

## 論文内容の要旨

### 論文題目 Identification of the proteins that interact with Brn-2 and analysis of their mode of interaction

(転写因子 Brn-2 と相互作用する因子の同定とその解析)

氏名 黄 郁慈

#### 1. 序論

哺乳類において著しく発達している大脳新皮質は、神経細胞が六層に層状化してできる複雑な組織である。大脳新皮質の構築には、神経細胞の正しい増殖・分化・遊走が必要であるが、これらを可能にするには、発生過程における多数の遺伝子発現が正確に調節されなければならない。遺伝子発現の制御は主に転写因子と呼ばれる DNA 結合蛋白質を中心に、転写因子、転写因子と共同して働く因子、転写因子の標的遺伝子などの分子間相互作用によってなされている。新皮質で特異的に発現するような転写因子群の転写制御機構の解析は新皮質構築の分子メカニズム解明の鍵となるであろう。

class III POU (Brn-1, Brn-2, Brn-4, SCIP) は発生過程を通じて新皮質を含む中枢神経系で発現している転写因子群である。中でもアミノ酸配列と発現パターンの極めて類似した二つの転写因子、Brn-1 と Brn-2 のダブル欠損変異マウスでは、大脳新皮質の發育不全や、層化構造が乱れることが明らかにされている。単一遺伝子の欠損変異マウスでは、たとえば野生型の Brn-1 が、欠損した Brn-2 の機能を代償するなど新皮質構築の異常は認められていない。本研究では class III POU 転写因子群の転写制御性メカニズムをより明らかにするために Brn-2 に注目し分子生物学的な機能解析を行った。

Brn-2 蛋白質の C 末端側は、POU ドメインと呼ばれる class III POU 転写因子群内で高度に保存されている DNA 結合ドメインがあり、N 末端側に転写活性化領域がある。哺乳

類の Brn-2 転写活性化領域にはグリシン (G)、グルタミン (Q)、プロリン (P) という単一アミノ酸リピート構造が見られる (図1)。この単一アミノ酸リピート構造の構成は Brn-1 蛋白質とは異なり、Brn-1 と Brn-2 の機能的な差異を産み出しうる領域である可能性がある。また、下等脊椎動物の Brn-2 では転写活性化領域のアミノ酸リピート構造の種類や長さが保存されていない。従って、このような構造の獲得により、進化の過程において哺乳類 Brn-2 転写因子に機能的な変化が起こり得た可能性がある。そこで、Brn-2 の転写活性化領域に結合する蛋白質の同定を試みた。

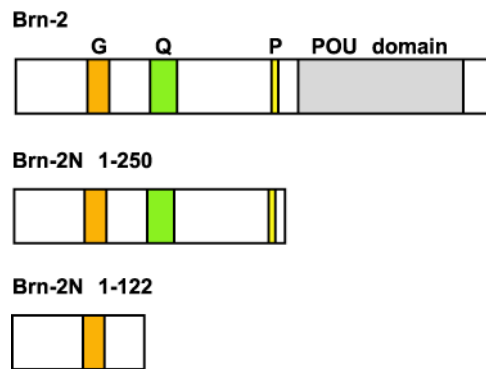


図1 : Brn-2 の構造と使った bait

## 2. 結果と考察

Brn-2 の N 末端側領域を probe (bait) として (図1)、酵母の遺伝学的な性質を利用した酵母ツーハイブリッド法により、マウス脳由来 cDNA library をスクリーニングした。スクリーニングは異なる性質の候補蛋白質をより多く得るために、Brn-2N1-122 (Brn-2 蛋白質の N 末端側領域 1 から 122 番目のアミノ酸残基までの領域、以下同様に記載) および、Brn-2N1-250 の 2 種類を用いそれぞれ独立に行った。

### 2-1. Brn-2N1-122 と相互作用する蛋白質

Brn-2N1-122 を bait としてスクリーニングを行った結果、3 個の候補配列が得られ、DNA 配列とアミノ酸配列を *in silico* で解析した。その結果、生体内で相互作用する可能性がほとんどないものとフレームが合わなかったものを除いたら、1 つは Jun-activation-domain-binding protein 1 (Jab1) というコアクチベーターであった。CPRG レポーターアッセイによって Brn-2 と Jab1 間の相互作用を定量し、両者の特異的な結合を明らかにした。また、Brn-2 の欠失変異体を用いてレポーターアッセイを行い、Brn-2N1-67 領域が Jab1 と結合する領域であることを示した。

次に、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance; SPR) 現象を利用した相互作用測定装置 Biacore を用いて Jab1 と Brn-2 との相互作用を *in vitro* で検証した。Biacore はセンサーチップ上の生体分子間の相互作用をリアルタイムにモニターすることができ、リガンドとアナライトの結合・解離する量に応じて SPR シグナル (RU) に変換できる。まず、GST タグを N 末端側に付けた Jab1 を大腸菌で大量発現させて、GST 結合カラムを使っ

て蛋白質を回収・精製した。その後センサーチップに固定化した Brn-2 N 末端側転写活性化領域 (CM5-Brn-2N-chip) に、精製 Jab1 蛋白質 を結合させた。その結果、Jab1 特異的な結合シグナルが得られたことから、Jab1 と Brn-2 は *in vitro* 状況下でも相互作用することを明らかにした (図2)。

Jab1 は AP-1 転写因子の補助活性化因子として発見され、MIF や p27<sup>kip1</sup> や LFA-1 など他の蛋白質との結合を介し、細胞周期・増殖や遺伝子発現などいろいろな細胞現象を調節することが報告されている。また、Jab1 欠損体は出生前死であることから、正常な発生にはなくてはならない遺伝子であることが示唆されている。また、Jab1 は COP9 signalosome のサブユニット (CSN5) として発現し、他のサブユニット (CSN2) は P19 細胞株において Brn-2 の発現を誘導することが報告されている。

最近、Alzheimer's disease や Parkinson's disease など神経変性疾患に関与している小胞体ストレス応答にも関わっていることが示唆された。この過程で Jab1 は ER stress transducers (IRE1) と結合・解離することによって、神経細胞死の初期反応に関与するとされる。今後、Brn-2、Jab1、CSN2、IRE1 の間の相互作用ネットワークを解明することにより、神経細胞の発生や神経変性症などの理解に貢献できると考えられる。

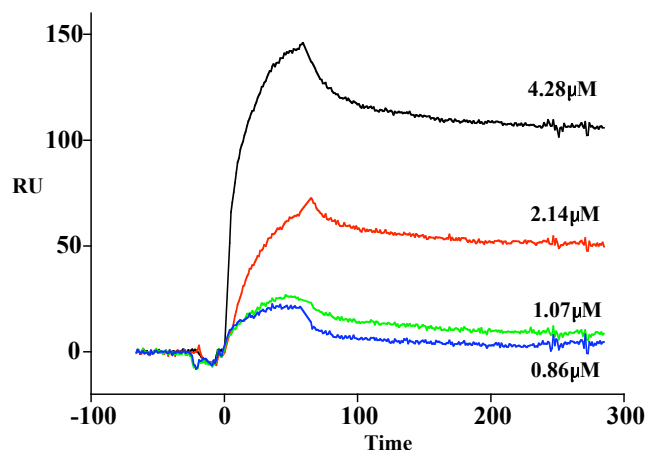


図2：違う濃度の Jab1 と Brn-2 との結合

## 2-2. Brn-2N1-250 と相互作用する蛋白質

Brn-2N1-250 を用いて酵母ツーハイブリッド法によりスクリーニングした結果、84 個の候補クローンが得られ、78 個の DNA 配列とアミノ酸配列を *in silico* で解析することができた。その結果、28 個は Brn-2 と生体内で相互作用する可能性がほとんどなく、14 個はコードされるアミノ酸配列のフレームが合わなかった。また、他の 14 個は 3' UTR 領域しか含まず、2 個は DNA 配列の向きが逆であったため、解析から省いた。6 個については相同性がある遺伝子が見つからなかった。残った 14 個について次の解析を試みた。

Brn-2 の単一アミノ酸リピート構造を全て欠失させた転写活性化領域 (Brn-2NΔGQP) を使って CPRG レポーターアッセイを行ったところ、9 個は Brn-2N1-250 との結合が Brn-2NΔGQP との結合より 25 倍以上の高活性を示した。この 9 個については Brn-2 と相

相互作用する際に単一アミノ酸リピート構造が関与する可能性が示唆された。大腸菌での組換え蛋白質発現実験では、6個の蛋白質について発現・精製が成功し、Brn-2との相互作用をBiacoreを用い検証した。うち、2個(2810432D09RIK、NAV1)については特異的な結合シグナルが得られた。

2810432D09RIKは機能未知の蛋白質であり、マウスのtranscriptome解析により同定された。発現パターンなどはまだ不明であるが、黒色腫(melanoma)に発現する可能性が示唆されている。Brn-2は中枢神経系の他に、黒色素芽細胞(melanoblast)、黒色素細胞(melanocyte)と黒色腫で発現することが知られて、特に黒色腫で大量に発現している。Brn-2の発現を抑制すると黒色腫の増殖は著しく減少することから、Brn-2はmelanocytic転写因子群と相互作用することによって、黒色素細胞の表現型を調節することが示唆されている。今後、2810432D09RIKの機能を解析することによって、細胞増殖に関するBrn-2の役割を解明できるであろう。

neuron navigator 1 (NAV1)は、線虫のunc-53遺伝子のヒトの相同遺伝子として同定された。unc-53は遊走性細胞の前方・後方移動の誘導に必要とされる。ヒトにはNAV1、NAV2、NAV3が同定されている。ヒトとマウスのNAV1は発生中の脳で高度に発現するが、出生後に発現が低下することが報告されている。Brn-1、Brn-2のダブル欠損変異マウスの大脳新皮質ニューロンの移動に問題が生じたことを考えると、NAV1はBrn-2と共に脳の発生に関与している可能性がある。

### 3. 結論

本研究では転写因子Brn-2と相互作用する蛋白質を三種類(Jab1、2810432D09RIK、NAV1)同定した。相互作用をCPRG assay並びに、SPRバイオセンサーで検証した。このうち、2810432D09RIKとNAV1については、哺乳類Brn-2の特徴的なアミノ酸リピート構造が相互作用に関与することを示した。このことは、Brn-2とBrn-1の機能的差異、及び、哺乳類Brn-2の遺伝子構造の進化と機能進化の関係を蛋白質間相互作用の視点から考察する上で役立つであろう。また、今後、Jab1、2810432D09RIK、NAV1とBrn-2の相互作用のネットワークを研究することによって、新皮質の発生、神経変性疾患などの理解につながると考えられる。