

論文審査の結果の要旨

氏名 黄 郁慈

本論文は4章からなり、第1章は中枢神経系の発生、分化に關与する転写因子 classIIIPOU 特に classIIIPOU 転写因子の一つである Brain-2 の概要について、第2章から第4章までは Brain-2 蛋白と相互作用して下流の遺伝子発現に影響を及ぼす cofactor 群の探索とその同定について、述べられている。

転写因子群のアミノ酸配列を比較すると、DNA 結合ドメインはほぼ完全に配列が一致し機能が保存されてきている、転写活性化ドメインは生物分類群間で顕著な違いがある。哺乳類 classIIIPOU では様々な種類の単一アミノ酸リピート構造が転写活性化ドメイン内に存在するが、下等脊椎動物ではこれらの構造が欠失している。転写活性化ドメインは様々な蛋白質と相互作用し、標的遺伝子群の発現を調節することが知られており、アミノ酸リピート構造の有無によって相互作用する蛋白質の種類や相互作用の様式が変化した可能性が考えられる。classIIIPOU 転写因子の一つ Brn-2 はアミノ酸リピート構造の進化上の差異が最も顕著であり、哺乳類 Brn-2 のグリシン、グルタミン、プロリンの3種類のアミノ酸リピート構造は下等脊椎動物では全て完全に欠失している。そこで本研究では哺乳類 Brn-2 に着目し、以下の研究をおこなっている。

マウス Brn-2 の N 末端側領域を bait として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。Brn-2N1-122 (マウス 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) を bait としてスクリーニングにより 3 個の候補クローンを得た。 *insilico* 解析の結果、そのうちの 1 つは、Jun-activation-domain-bindingprotein1(Jab1)であることを示した。また、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確認している。また、Brn-2 の欠失変異体を用いて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。さらに、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を用いて Jab1 と Brn-2 との相互作用を *invitro* で検証している。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・精製した後センサーチップに固定化した Brn-2N 末端側転写活性化領域(CM5-Brn2N-chip)に、精製 Jab1 蛋白質を反応させ、Jab1

特異的な結合シグナルを得ている。以上の結果から、Jab1 と Brn-2 は *invitro* 状況下でも相互作用することを明らかにした。

一方、Brn-2N1-250 (マウス Brn-2 蛋白質の N 末端側領域 1 から 250 番目のアミノ酸残基までの領域) 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て 84 個の候補クローンを得ている。これらクローンの DNA 配列とアミノ酸配列を *insilico* で解析し、このうちの 28 候補は Brn-2 と生体内で相互作用する可能性はなく、14 候補はコードされるアミノ酸配列のフレームが合わないと推測された。また、他の 14 候補は 3'UTR 領域しか含まず、2 候補は DNA 配列の向きが逆であったため、解析から省いた。6 候補については相同性がある遺伝子が見つからなかった。したがって、残った 14 候補について 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-2N△GQP)を使って CPRG レポーターアッセイを行ったところ、9 候補は Brn-2N1-250 との結合が Brn-2N△GQP との結合より 25 倍以上の高活性を示した。この 9 候補については Brn-2 と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・精製が成功した 6 候補について Brn-2 との相互作用を Biacore を用い検証した結果、2 候補について特異的な結合シグナルを得た。

以上、本研究は転写因子 Brn-2 と相互作用する 3 種類の新たな蛋白質を探索・同定し、脳で特異的に発現している転写因子の役割を解明するための貴重な知見を明らかにしている。なお、本論文第 2 章は植田信太郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。