

論文内容の要旨

論文題目 Degradation of Zic2 protein is promoted by Rines, a novel RING
finger protein

和訳 新規 RING finger 蛋白質 Rines による神経発生制御因子 Zic2 蛋白質
分解の役割

指導教官 御子柴克彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士過程

脳神経医学専攻

氏名 小川実幸

(序論)

Zic ファミリーは神経発生をはじめとする脊椎動物の様々な発生過程を制御する Zinc finger 型転写因子である。特にヒト ZIC2 変異および、発現量が著しく減少する Zic2 ノックダウンマウスにおいては、終脳正中部位欠損の先天性奇形、holoprosencephaly (HPE) を生じる。さらにカエルでの Zic2 の過剰発現の結果、神経外胚葉と神経堤の拡大が観察され、Zic2 が神経発生において重要な役割を持つことが示されている。しかし、発生過程における Zic2 蛋白質の制御機構には不明な点が多い。そこで、Zic2 の具体的な分子作用機序を理解するため、yeast two hybrid 法を用いて Zic2 と相互作用する蛋白質を探索し、新規の RING finger 蛋白質を見出した。

最近、RING finger 蛋白質の多くが、ユビキチン-プロテアソーム系における E3 ユビキチンリガーゼであることが示されている。プロテアソーム系蛋白質分解機構は、細胞の増殖、分化、アポトーシスおよび神経発生やシナプス可塑性など様々な細胞制御過程に関わる蛋白質を特異的に分解し、適切な量に制御する機構である。E3 ユビキチンリガーゼは、基質蛋白質を特異的に認識し、その分解を時間、空間的に厳密に制御する分子群で、この分解系において中心的な役割を果たす。E3 ユビキチンリガーゼにより認識され、ポリユビキチン化された蛋白質はプロテアソームにより迅速に分解される。

本研究では、この Zic2 結合活性を持つ 新規の RING finger 蛋白質、Rines の構造、発現パターンおよび分子機能を解析し、Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質のプロテアソームによる分解を促進することを明らかにした。

(結果、考察)

1、新規 RING finger 蛋白質 Rines の同定。

Yeast two hybrid 法を用いて、Zic2 と相互作用する蛋白質数種を同定し、完全長 cDNA をクローニングした。またそれらの発現部位が Zic2 のそれと重なることを確認した。このうち、RING finger (C3HC4-type Zinc finger)ドメインを持つ新規遺伝子を *Rines* (*RING finger protein in neural cells*) と命名し、解析を行った。Rines 蛋白質は、coiled-coil

ドメインおよび RING finger ドメインを持ち、脊椎動物において進化的に保存されていることが分かった。特に RING finger ドメインで高く保存されていた。また、RING finger ドメインに相同性のある蛋白質の特徴から、Rines の RING finger ドメインが、蛋白質間相互作用に関わることが示唆された。

2、Rines の発現部位の解析

Rines はヒト、マウスにおいて脳での発現が強く、マウス胎児においては、神経前駆細胞の存在が示されている側脳室脳室帯で特に強い発現を示す(図1左、右)。また、発生段階の側脳室脳室帯では、Zic2 の発現が内側部位で強いのに対し、Rines は外側部位で強く、その境界で発現が重なっている(図1中、右)。さらに Rines は、Zic と同様に特定の脳腫瘍組織においても発現が見られた。これらの所見から、Rines が Zic2 の分子機能制御機構を介して神経前駆細胞の増殖、分化制御に関わる可能性があると考えられた。

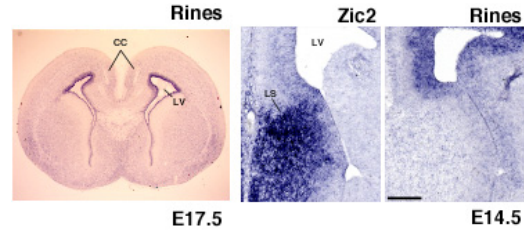


図1 マウス胎児脳におけるRines およびZic2の発現。17.5日胚(左)および14.5日胚(中、右)の前頭部冠状断。Rinesは側脳室の脳室帯に強く発現する(左、右)。Zic2とRinesの発現は脳室帯の内側の一部で重なる(中、右)。CC: 大脳皮質、LV: 側脳室、LS: lateral septal nucleus、scale bar: 200 μm

3、Rines 蛋白質と Zic2 蛋白質の相互作用の検討

Zic 蛋白質と Rines 蛋白質の結合を GST-pull down 法により in vitro で確認した。また、Rines 蛋白質は、その coiled-coilドメインおよび RING fingerドメインで Zic2 蛋白質と結合し、Zic2 蛋白質は、Zic-opa 保存領域(ZOCドメイン)と Zinc fingerドメインとの間の領域で Rines 蛋白質と結合することが分かった。また精製蛋白質を用いて、Zic2 蛋白質と Rines 蛋白質の direct な結合を確認した。

4、Rines は Zic2 のプロテアソームによる分解を促進する。

293T 細胞内での Rines 蛋白質と Zic2 蛋白質との結合は、通常では確認されず、プロテアソーム阻害剤存在下でのみ確認された(図2)。よって、Rines 蛋白質がユビキチンリガーゼとして働き、Zic2 蛋白質を標的として、プロテアソームによる分解を促進するのではないかと考えた。実際に 293T 細胞において Rines 蛋白質の過剰発現により Zic2 蛋白質の分解が促進され、その効果はプロテアソーム阻害剤でのみ抑制され、リソソームプロテアーゼ阻害剤では抑制されなかった。Zic2 蛋白質と同様に、Rines 蛋白質も、プロテアソーム阻害剤存在下でのみ増加することが確認された。さらに、NIH3T3 細胞においても Rines 蛋白質により Zic2 蛋白質の分解が促進され、プロテアソーム特異的阻害剤存在下においてのみ、その分解効果は抑制された。実際に Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質の半減期を早めていることが NIH3T3 細胞での蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミドによる chase 実験により証明された(図3)。以上の事実から、Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質のプロテアソームによる分解を促進し、自身もプロテアソームにより分解されることが明らかになった。

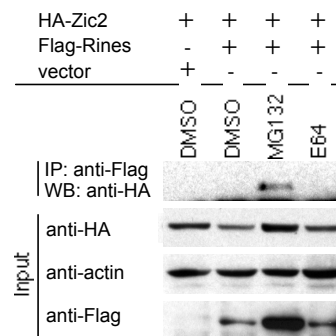


図2 293T細胞でのRines蛋白質とZic2蛋白質との結合。プロテアソーム阻害剤存在下でのみ結合が確認できる。また、Rinesの過剰発現によりZic2蛋白質は分解され、プロテアソーム阻害剤でのみ、その分解効果が抑制される。Rines蛋白質もプロテアソーム阻害剤でのみ増加する。MG132: プロテアソーム阻害剤 E64: リソソームプロテアーゼ阻害剤

次に、Rines 蛋白質の coiled-coilドメインおよび RING fingerドメインが Zic2 蛋白質の分解に必要であるかを Rines の欠生変異体を用いて検討した(図4)。その結果、Zic2 と結合できない Rines の coiled-coilドメインのみ、および、Zic2 結合ドメインである coiled-coilドメインの欠生変異体には有意な Zic2 蛋白質分解が認められなかった。一方、RING fingerドメインの欠生変異体は弱い Zic2 分解性を示し、RING fingerドメインおよび RING fingerドメインと coiled-coilドメインを併せた変異体は強い Zic2 分解性を示した。これらの結果から、Rines 蛋白質による Zic2 蛋白質分解には RING fingerドメインおよび coiled-coilドメインの両方が必要であることが示唆された。

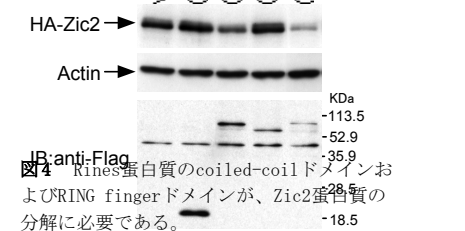
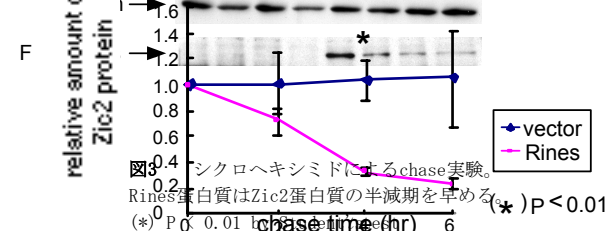


図4 Rines蛋白質のcoiled-coilドメインおよびRING fingerドメインが、Zic2蛋白質の分解に必要である。

び RING finger ドメインが必要であると考えられた。

5、Rines 蛋白質は Zic2 蛋白質による転写活性化を抑制する。

実際に、Rines 蛋白質の存在によって Zic2 の転写活性化機能が影響を受けるかを、レポーターアッセイにより検討した(図 5)。この結果、野生型 Rines の発現量に依存して Zic2 の転写活性化能が抑制された。また、RING finger ドメインの欠失変異体にも、野生型に比べて低い Zic2 の転写活性抑制能力があることが分かった。しかし、Rines の N 末領域および coiled-coil の欠失変異体では Zic2 の転写活性化能は有意には影響を受けなかった。このように、Rines の野生型および欠失変異体による Zic2 蛋白質の分解能力と転写活性化抑制はよく一致していた。これらの事実から、Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質へ結合し、分解を促進することで、Zic2 の転写活性化能を抑制すると考えられた。

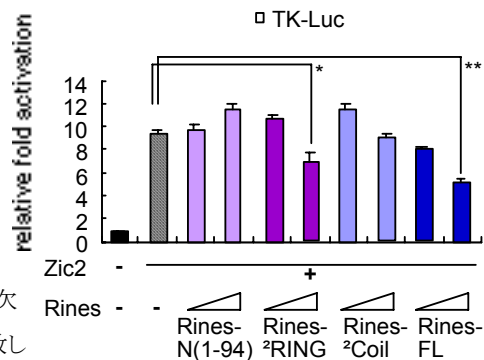


図5 Zic2の転写活性を指標にしたレポーターアッセイ。Rines蛋白質はZic2蛋白質による転写活性化をdose-dependentに抑制する。*, P < 0.05; **, P < 0.01 by or way ANOVA, with Student-Newman-Keuls test

6、E3 ユビキチンリガーゼとしての Rines 蛋白質の役割。

更なる解析の結果、多くの RING finger 型ユビキチンリガーゼと同様に、Rines 自身もユビキチン化され、プロテアソームにより分解されること、またユビキチン-プロテアソーム系において活性化ユビキチンと結合する E2 結合酵素の一つである UbcH6 と特異的に結合することが明らかになったため、Rines 蛋白質がユビキチンリガーゼとして働くことが考えられた。そこで、実際に Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質のユビキチン化を促進するかを検討したが、Zic2 蛋白質のユビキチン化は確認されなかった。以上の事実より、Rines 蛋白質は、基質蛋白質のユビキチン化を介さずにプロテアソームによる分解を促進するユビキチンリガーゼであることが示唆された。最近、同様に基質蛋白質のユビキチン化を介さないプロテアソームによる分解機構が報告されている。生理的条件下では Rines 蛋白質による、Zic2 蛋白質のユビキチン化の促進が起きている可能性も否定できないが(図 6A)、本研究の結果から、Rines 蛋白質が自身もしくは他のユビキチンリガーゼによりユビキチン化され、結合してきた Zic2 蛋白質と共にプロテアソームにより分解されるというモデルが考えられる(図 6B)。

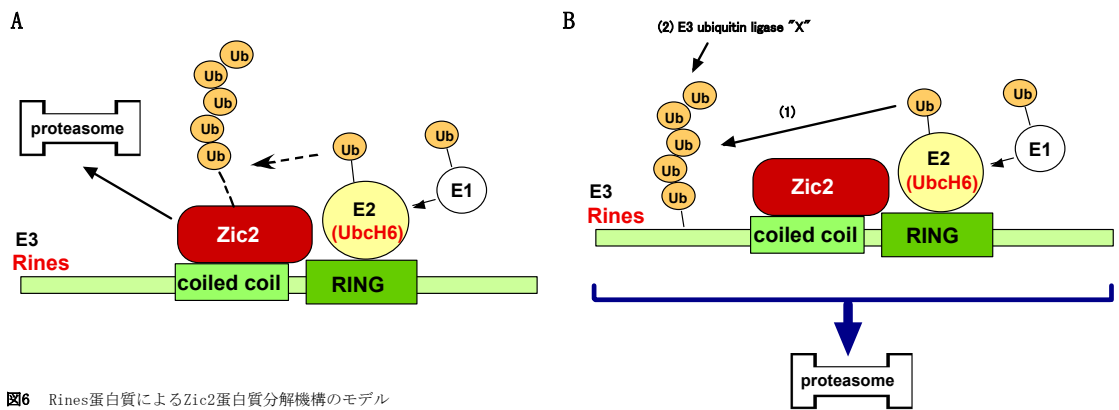


図6 Rines蛋白質によるZic2蛋白質分解機構のモデル

A : Zic2のユビキチン化によるZic2分解。Rinesがユビキチンリガーゼとして働き、Zic2のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解を促進させる。しかし、本研究ではZic2の直接のユビキチン化は見られていない。
B : Rinesのユビキチン化によるZic2分解。Rinesが自身のユビキチンリガーゼ活性(ルート1)もしくは他のユビキチンリガーゼ(ルート2)によりユビキチン化され、結合したZic2と共にプロテアソームにより分解される。

7、Rines—Zic2 蛋白質間相互作用の神経発生における役割

Zic2 蛋白質は、前脳背側の内側部分での神経前駆細胞の増殖と分化を制御すると考えられてきた。本研究の側脳室脳室帯における Zic2 と Rines の発現の特徴から、Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質の分解を介して、Zic2 蛋白質を前脳の内側部分に限局させ、発生過程の前脳脳室帯における内側—外側の境界の形成に関与していることが示唆された。結果として、Rines—Zic2 蛋白質間相互作用は、終脳の部域特異化に役割を持つ可能性があると考えられた。

(結語)

新規 RING finger 蛋白質 Rines が、Zic2 蛋白質のプロテアソームによる分解を促進し、その結果、Zic2 蛋白質による転写活性化を抑制することが明らかになった。以上により、Rines は神経前駆細胞における Zic2 蛋白質の分解を制御することにより、神経発生、分化に関わるのではないかと推測された。