

審査の結果の要旨

氏名 小川実幸

本研究は、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転写因子 Zic2 の具体的な分子作用機序を理解するため、Zic2 と相互作用する新規の蛋白質を探索、同定し、その機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1、Yeast two hybrid 法を用いて同定された、Zic2 と相互作用する蛋白質の中から、発現部位が Zic2 のそれと一部重なる新規の蛋白質数種を同定し、完全長 cDNA をクローニングした。その中でも 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、解析を行い、Rines 蛋白質が、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を示した。
- 2、Rines の発現部位の検討を Northern blot 法および in situ hybridization 法により行ったところ、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く発現することが示された。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ることが示された。以上のことから、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。
- 3、Zic 蛋白質と Rines 蛋白質との結合を GST pull-down 法により示した。また結合ドメインとして、Rines 蛋白質は、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示された。また精製蛋白質を用いて、Zic2 と Rines の direct な結合を示した。
- 4、293T 細胞内での Rines 蛋白質と Zic2 蛋白質との結合を免疫沈降法により検討したところ、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。したがって、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られた。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るが、リソソームプロテアーゼ阻害剤では抑制されないことが示された。また Rines 蛋白質自身もプロテアソーム阻害剤存在下でのみ増加することを確認した。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分解効果が抑制されるが、カルパイン特異的阻害剤存在下においては抑制されないことが示された。実際に Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質の半減期を早めることが 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。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示された。
- 5、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 の欠失変異体を用いて検討した。その結果、Rines の N 末領域のみの変異体、および Zic2 結合ドメインである coiled-coil ドメインの欠失変異体には有意な Zic2 蛋白質分解活

性がないことが示された。一方、Zic2 結合ドメインである RING finger ドメインの欠失変異体は弱い Zic2 分解活性を示したが、野生型 Rines に比べてその活性は減少していた。これらの事実から、Rines 蛋白質による Zic2 蛋白質分解において、coiled-coil ドメインは必須のドメインであり、また RING finger ドメインも関与するものと考えられた。

6、実際に、Rines 蛋白質が Zic2 の転写活性化機能に影響を与えるかを、レポーターアッセイにより検討したところ、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ることが示された。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 の転写活性化抑制能力があることが示された。しかし、Rines の N 末領域および coiled-coil の欠失変異体では Zic2 の転写活性化は有意な影響を受けなかった。以上のことから、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能力はよく一致することが示された。これらの事実から、Rines 蛋白質が Zic2 蛋白質の分解を促進することで、Zic2 の転写活性化機能を抑制すると考えられた。

7、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示された。したがって 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での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。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 Zic2 分解モデルが考えられた。

以上、本論文は新規 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を明らかにした。本研究はこれまで未知であった、Zic2 蛋白質のプロテアソーム系蛋白質分解制御機構を明らかにし、神経前駆細胞の発生、分化におけるプロテアソーム系蛋白質分解の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。