

Functional and structural basis of the interspersed nuclear localization signal in the ZIC3 zinc finger domain: a role of absolutely conserved residues in the zinc finger domain

ヒト ZIC3 蛋白質の核局在化機構 – Zn フィンガードメイン中に存在する非典型的核局在化シグナルと進化上特異に保存されたアミノ酸残基の役割

指導教官 真鍋 俊也教授

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻

平成 14 年 4 月入学

畑山 実

Zic は後生生物にひろく保存された遺伝子であり、5 つの C2H2 型の Zn フィンガー (ZF) をもつ核蛋白質をコードしている。C2H2 型の ZF は 2 つのシステイン残基と 2 つのヒスチジン残基が亜鉛イオンを中心に正四面体の各頂点に配位する構造をとる。Zic と類似した ZF ドメインを持つ遺伝子として Gli や、Glis などが知られている。その中でも Zic はきわめて広範な生物種においてその存在が確認されており、系統進化を考察する上で重要な位置を占めると考えられている。哺乳類においては Zic1~5 が存在し、中枢神経の発生・分化や骨形成などに重要な役割を担うだけでなく、成体における高次脳機能の発現にも関わる事が報告されている。Zic3 は上述の機能のほか、初期神経胚における左右軸決定にも関与し、ツメガエルでは胚の右側への過剰発現により臓器の逆位などを誘起する。また、Zic3 の欠損マウスでは大血管転位症をはじめ、左右軸異常と関連して発症すると考えられている多脾および無脾、肺や肝の葉数の異常などの奇形が生じる。ヒトでは伴性内臓左右不定位 (HTX1) の原因遺伝子であることがわかっており、単発性および家族性の大血管転位症患者

者から ZIC3 の突然変異体が単離され報告されている。これらの突然変異体はフレームシフトやアミノ酸置換を伴い、転写活性の異常が指摘されている。近年、家族性大血管転位症患者から発見された変異体は1番目のZF (ZF1) 中のトリプトファン残基がグリシンに変異していた (W255G)。このトリプトファンは既知の Zic で完全に保存されており、蛋白質の機能発現に重要な役割があると考えられる。一方、C253S、H286R は W255G と同様に心奇形患者から単離された変異体であり、ZF1 の亜鉛イオンが配位するアミノ酸に変異が生じている。この両者については転写活性の低下と核移行の異常が報告されている。本研究ではそれぞれの変異が機能不全を引き起こす過程を明らかにすることにより、これらのアミノ酸残基が Zic 蛋白質の機能発現にいかなる役割を担うかを考察する。

まず、変異蛋白質をツメガエル胚に過剰発現させ、左右軸形成に対する作用を野生型と比較した。すると、いずれも体軸形成に及ぼす作用の低下が観察され、中でも W255G の機能低下は顕著であった。次いで、培養細胞を用いた実験では W255G は転写活性、および蛋白質安定性が低下していた。また、ZF1 に変異を持つ蛋白質はいずれもその細胞内局在が核から細胞質へと変化しており、これが機能不全の原因の一つと考えられた (図 1)。そこで変異蛋白質に生じている異常を蛋白質構造の観点から分析し、どのような過程を経て機能不全に至るかを解明した。

はじめに、ZF の折畳みに異常が生じる可能性を追究するため、円偏光二色性スペクトルを測定した。すると、C253S、H286R など亜鉛イオンの配位に関わる残基に対する変異体ではランダムコイルの比率が増加していた (図 2)。これらの変異体は蛋白質の品質管理機構により再折り畳みや分解が促進、あるいは凝集体を形成するなどにより正常な機能を達成できないと推察された。一方 W255G では野生型と同様のスペクトルが観察された。そこで、核

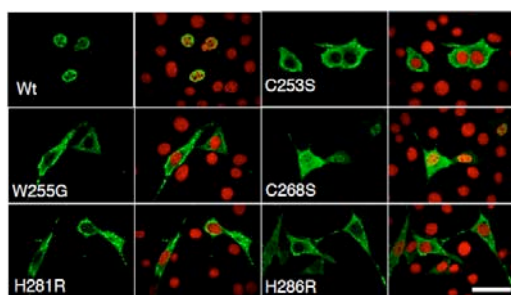


図 1 ZIC3 変異体の局在

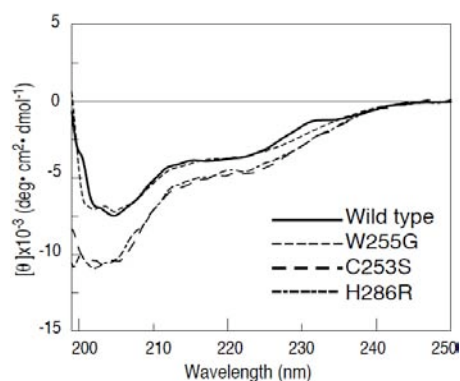


図 2 円偏光二色性スペクトル

外への輸送が亢進している可能性を検証するため、輸送蛋白質の阻害剤である leptomycin B を作用させた。しかし、W255G は leptomycin B に対する感受性を欠いたことから、核外輸送の亢進は否定され、核移行に異常があると推察された。

しかし、これまで Zic 蛋白質の核局在化シグナル (nuclear localization signal: NLS) に関する知見は乏しいことから、その同定を試みた。GST-EGFP に ZIC3 の各断片を融合し、その局在から NLS 活性を判定した。その結果、ZF2 から ZF3 に強い NLS 活性が認められたが、それぞれ単独では活性を失った。この結果から、ZF2 と ZF3 の両者が NLS に必要であると考えられた。しかし、一般的に NLS を形成するとされる塩基性アミノ酸 (リジンおよびアルギニン) は ZF2 から ZF3 に 13 残基存在し、各アミノ酸残基の NLS への貢献は明らかではない。そのため、各塩基性残基のアラニン置換変異体を用いて NLS 活性

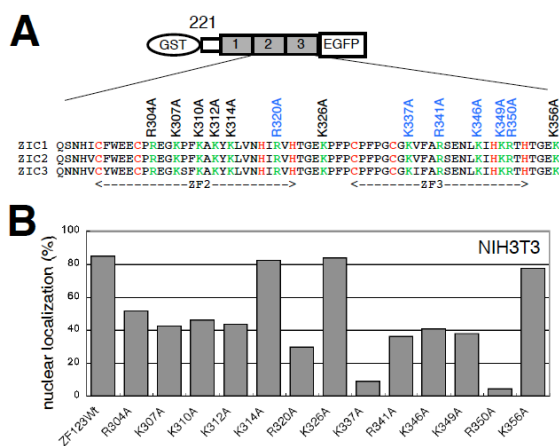


図 3 ZIC3 の核移行シグナル

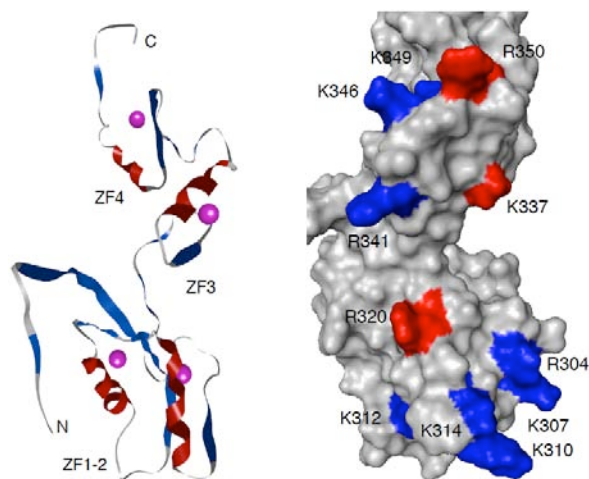


図 4 ZIC3 ZF1-4 の立体構造と核移行シグナルの表面モデル

を調べたところ、R320、K337、R350 それぞれの置換により活性の顕著な低下が観察された (図 3)。ZIC3 蛋白質全長に、これら 3 残基のアラニン置換を同時に導入すると核移行は効果的に抑制され、これらの残基は NLS を構成すると考えられた。また、このほかの塩基性アミノ酸残基も部分的に NLS 形成に関与すると思われる、典型的な塩基性アミノ酸残基のクラスターを呈する NLS とは異なり、ZIC3 は散在型の NLS であった。一連の探索から ZF1 は NLS とは認められず、W255G の細胞質局在に対する合理的な理由は得られなかった。

そこで、W255 が間接的に NLS に影響を及ぼす可能

性を追求するため、ZF1～ZF4 の水溶液中の立体構造を NMR 法により調べた。ZIC3 の ZF は概ね GLI と類似した構造をとり、ZF1 と ZF2 はトリプトファン (W255、W299) を介した疎水性コアを形成する一体の構造であった (図 4 左)。一方 NLS を形成するアミノ酸の側鎖はタンパク質表面で接近していた。一般に NLS は 10 数残基からなる小規模な配列であるが、ZIC3 の場合は 65 残基にもおよぶ。立体構造の解析は、折畳みにより NLS を構成するアミノ酸が狭い領域に集合することにより、塩基性アミノ酸のクラスターから成るいわゆる古典的 NLS に類似した構造をとることを明らかにした (図 4 右)。実際に ZIC3 NLS を古典的二分型 NLS である nucleoplasmin の Karyopherin $\alpha 1$ (Kpna1) との結合状態での立体構造と計算機上で比較すると、両者の NLS を構成するアミノ酸の側鎖の空間的配置には類似性が認められる。しかも、Kpna-nucleoplasmin NLS 複合体において nucleoplasmin NLS の占める位置に ZIC3 NLS を重ね合わせると、ZIC3 と Kpna は、概ね無理のない位置に配置できた。

続いて、W255 は疎水性コアを介して NLS の構造に寄与する可能性があることから、NLS に結合する輸送受容体の同定をおこなった。一般に巨大な分子量を持つ蛋白質は核膜孔を通過する際に輸送受容体の介助が必要であるとされており、典型的な輸送経路は NLS に Kpna が結合し、さらに importin β との 3 分子の複合体を形成することで核膜孔複合体と相互作用して核膜孔を通過する。ZIC3 に高い親和性を持つ Kpna を探索したところ、Kpna1 および Kpna6 に対する結合が強く、この結合は NLS の変異体では親和性が低下した。この結果から Kpna1/6 は ZIC3 の NLS に結合すると考えられた。さらに、siRNA を用いた Kpna1/6 のノックダウン実験では ZIC3 の核移行が有意に阻害され、siRNA に対して抵抗性をもつ変異 Kpna1 および Kpna6 の導入により核移行は回復された (図 5)。一連の実験の結果から、Zic-Kpna 複合体の形成は核移行に必須な過程であることが示唆された。しかし、W255G は Kpna との結合に

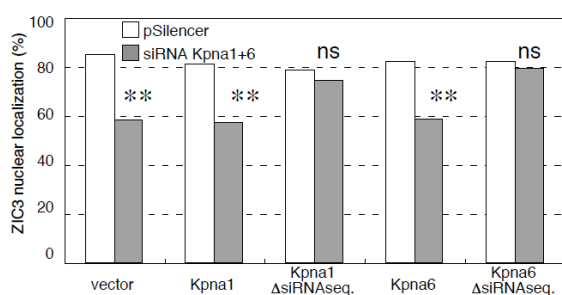


図 5 Kpna1/6 による ZIC3 の核内への輸送

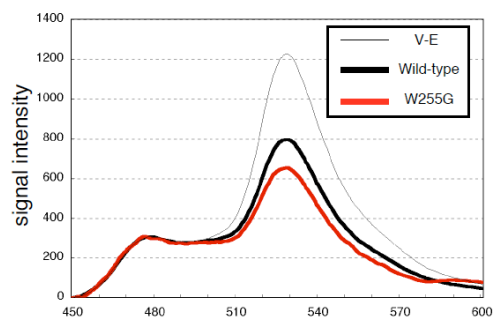


図 6 FRET による ZF1-2 の相互作用の観察

野生型同様、高い親和性を有し、W255G の細胞質局在は ZIC3-Kpna 複合体を形成する以前に生じる異変にその原因があると推察された。蛋白質の品質管理機構に注目すると、W255G は HSP110 などの分子シャペロンと局在が一致した。この結果から、W255G には円偏光二色性スペクトルの解析では検出されない高次構造に生じた何らかの異常の結果、再折畳みや分解経路へ取り込まれると推察された。

立体構造の解析により W255 は ZF1 と ZF2 の間に生じる疎水性コアを成すことから、W255G では ZF 間の結合が疎となり、周辺の疎水性側鎖が蛋白質表面に露出する可能性がある。その検証を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 解析によっておこなった。ZF1 のアミノ末端と ZF2 のカルボニル末端は 100Å 以下に近接しており、両端に蛍光蛋白質を融合することによって ZF 間の距離に依存した FRET 効果が生じると期待される。実験の結果 W255G の FRET 効果は野生型に比べて有意に低下していた (図 6)。したがって、W255G では十分な ZF 間相互作用がなされず、野生型とは異なる高次構造をとると推察された。

本研究により Zic 遺伝子の最初の ZF に保存されている、システインおよびヒスチジン残基は亜鉛イオンの配位に関わるだけでなく、正常な折畳みに必須であり、その変異によって正常な二次構造をとれないことが明らかになった。またトリプトファン残基は二次構造に対する影響はほとんどないが、Zic/Gli 遺伝子にみられるユニークな ZF 間の相互作用に不可欠であり、遺伝子の機能発現に重大な役割を担うことが明らかになった。