

個人研究報告

機能解析グループ 國田竜太

ヒト新規メガサテライト反復配列 (RS447) によってコードされる新規脱ユビキチン化酵素遺伝子 (USP 17) の脳内における基質タンパク質の検索

目的

私は、池田研究室で発見、解析されている新規メガサテライト配列がコードする脱ユビキチン化酵素の脳内における基質タンパク質の検索を行うことを研究テーマにしてみました。本遺伝子は、酵素であるが故にその基質タンパク質の検索は、機能の推定に不可欠と考えられる。また、池田研究室の斎藤らにより本酵素遺伝子は、ほぼユビキチンに発現しているが、脳において特に強くアンチセンス鎖の存在が確認されていました。最近、ユビキチンシステムの異常が脳における神経細胞の生存に与える影響が強く示唆される数例の論文が報告されている。このように本脱ユビキチン化酵素が担うヒト脳内での機能の解析は、神経細胞の生存または、死滅の機構を知る一助となると考えられる。

結果と考察

まず最初に、脳内におけるアンチセンス鎖の転写を司るプロモータ配列が、本メガサテライト上に存在することを、COS7 細胞を用いたトランスフェクション実験により確認した。その部位は、プレミナリーな結果ではあるが、ほぼセンス鎖のプロモータ付近にマップされた。また少なくとも 2 つのプロモータ活性に分けられたことから、2 箇所以上のプロモータ配列の存在が示唆された。本アンチセンス鎖の転写を司るプロモータ活性は、センス鎖のプロモータと比べて弱かった。In vivo では、かなりアンチセンス鎖の方が強く転写されているが、これは COS7 細胞が脳内の環境とは全く違うことに起因していると考えられる。将来、アンチセンス鎖の脳特異的な転写制御を解析することは大変興味深いですが、それには脳由来で適切な細胞が必要となると考えられた。今回は、アンチセンス鎖の転写を司るプロモータのベイサルレベルの活性を検出したのみでそれ以上の解析は行わなかった。しかしながら、本メガサテライト配列中には、アンチセンス鎖の転写を司るプロモータ配列が確かに存在することが、確認された。

次に Two-Hybrid 法を用いて USP17 と相互作用をするタンパク質の検索を、ヒト脳の cDNA library に対して行った。ベイトとしては、最終的に 50 番目のアミノ酸残基から最後の 530 番目までを用いたが、このほかにも多くのコンストラクトを作成し、相互作用の部位や信憑性を確認した。このスクリーニングの結果、Cofactor C, KIAA0390, Ubiquitin, KIAA0058, HOK-2, Interferon Regulatory Factor-6, CREG2 などのタンパク質をコードする cDNA を得た。これらのタンパク質は、USP17 と最も相同性の高い脱ユビキチン化酵素である Dub-1 や、相同性の低い脱ユビキチン化酵素である UBH1 とは相互作用をしないことを Two-Hybrid 法で確認した。またこれらのタンパク質と相互

作用をするのに最低必要な部位は、USP17 の His domain と Cys domain の間の領域であることが判明したが、これは他のグループの例とよく似ている。脱ユビキチン化酵素共通に保存される領域である His domain と Cys domain の間の領域は、脱ユビキチン化酵素間でシステインに富むという特徴は共有するものの相同性はほとんどない。このことは、この領域が少なくともある種の脱ユビキチン化酵素において特異的な基質との相互作用にかかわることを示唆すると考えられる。今回得られた cDNA の中で、CREG2 は、新規のタンパク質をコードしており、その推定アミノ酸配列は、低いながらも有意な相同性を CREG と示した。CREG は、未分化な幹細胞が分化するのをエンハンスする機能があると考えられる分泌タンパク質である。この新規サイトカイン様分子 CREG と CREG2 の低いながらも有意な相同性は極めて興味深い。CREG2 と CREG タンパク質は、N 末端では相同性がない。つまり現在のところ、CREG2 が分泌されるタンパク質か否かは全く不明であり、その解析が急務である。また最終的に 5' RACE 実験により、CREG2 タンパク質は 290 アミノ酸残基からなることを明らかにしたが、USP17 との相互作用には 181 番目以降のアミノ酸残基があれば充分であることを明らかにした。本 CREG2 遺伝子の発現臓器の解析のためにノザン解析を行ったが、非常に高い脳特異的発現を示した。脳内においても小脳での発現は皆無で、海馬などリンピックシステムに含まれる部位で強く発現するという極めて興味深い発現パターンを示した。次に CREG2 の 103 番目から 290 番目のアミノ酸配列をベイトとして CREG2 と相互作用をするタンパク質の検索を Two-Hybrid 法を用いて検索した。その結果 male specific lethal-3, protein kinase C interacting protein related の 2 種の cDNA を得た。このうち protein kinase C interacting protein related は、新規遺伝子であり興味深い。それ以上の解析は現在行っていない。次にマウスの CREG2 cDNA も単離して、その推定アミノ酸配列をヒトのそれと比較した。その結果、ヒトとマウスの CREG2 タンパク質は、互いに約 83% の同一性を示し、CREG に対しては約 38% の同一性を示した。またノザン解析の結果、マウスの CREG2 遺伝子も脳において強く転写されていることが明らかになった。ヒト USP17 が CREG2 タンパク質と相互作用する可能性が考えられているが、細胞レベルの局在部位や免疫沈降等の結果が待たれる。現在、CREG2 が実際にユビキチン化されるタンパク質であるのか否か、USP17 が CREG2 の半減期に脱ユビキチン化することにより影響を与えるかに興味を持ち、CREG2 が USP17 の基質の一つであるか否かの解析を行いつつある。本解析により CREG2 が基質である可能性が高くなれば、CREG2 そのものの脳内における機能を解析を行う予定である。