

## 新規核蛋白質複合体Npw38-NpwBPの発見

Discovery of an Npw38-NpwBP complex system involved in an mRNA factory

動態解析グループ 小室晃彦

Akihiko Komuro

We have a Homo-Protein cDNA bank composed of about 4,000 human full-length cDNA clones. In this bank, I focused on a novel protein, Npw38, which has a WW domain, one of protein-protein interaction motifs. The WW domain of Npw38 was found to function as a transcriptional activator in CHO cells. Then I isolated a novel Npw38-binding protein (NpwBP) from a HeLa cell nuclear extract. Npw38 and NpwBP show an identical localization pattern in nuclei and have a nucleic acid binding activity. NpwBP contains two proline-rich regions capable of binding to the WW domain of Npw38. Furthermore, we determined the short proline-rich sequence, PPGPPP, surrounded by arginine in the proline-rich regions of NpwBP. This sequence designated as a "PGR motif" is a novel class of proline-rich motif which associates with the WW domain. Using a yeast-two hybrid analysis, I identified several RNA processing proteins including a splicing related factor, RNA helicase and DNA helicase. These results imply that this Npw38-NpwBP complex may play a role in RNA processing events such as transcription, splicing and elongation as a member of an "mRNA factory".

### はじめに

我々は現在約4,000種類のヒト完全長 cDNA からなるホモ・プロテインcDNAバンクを有している。本プロジェクトの研究目標の一つは、この中に含まれている新規蛋白質の機能解析である。ホモ・プロテインcDNAバンクには蛋白質-蛋白質相互作用モチーフをもつ新規蛋白質が数多く存在するので、演者はこれらの蛋白質をターゲット蛋白質として、相互作用する蛋白質の探索を行うことによって、新しい蛋白質ネットワークを見つけることを目指した。具体的なターゲットとして選んだのは、クローンHP10345がコードしているWWドメインを有する新規蛋白質である。分子量が38kDaであり、核に局在することから Npw38 (Nuclear protein containing a WW domain with a molecular mass of 38 kDa)と命名した。

WWドメインとは、約40アミノ酸からなるモジュールであり、WW(WWP)ドメインの名はその一次配列内で高度に保存された2つのトリプトファン残基(W)と1つのプロリン残基(P)に由来している(本報告書研究成果集参照)。蛋白質-蛋白質相互作用を担う他のいくつかのモチーフと同様に、WWドメインも機能的には無関係な多くの蛋白質中に見出される。例えば、蛋白質分解に関係があるユビキチンリガーゼ Nedd4、細胞周期の分裂期の制御をしている Pin1、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子産物であるジストロフィン、YAP、FBP、その他いくつかの未解析蛋白質などがWWド

メインを有している。WW ドメインが結合する蛋白質の結合領域の特徴として、プロリンに富んだ配列があげられ、PPXY、PPLP、PGM モチーフなどが知られている。また最近、Pin 1 が細胞周期のM期に特異的にリン酸化される蛋白質群と相互作用することやアルツハイマー病関連の Tau 蛋白質の変性を抑制することなどが報告された。しかし、WW ドメインはまだ発見されて間もないドメインであり、生理的機能の解明や結合するパートナーの同定はそれほど多くはなされていない。そこで、本研究では、Npw38 のパートナーの同定、その結合配列の同定などを通して、WWドメインを介する新しい蛋白質複合体の存在を明らかにした。

## 実験結果

### Npw38 の構造と発現

Npw38 cDNA は265 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、予想されるアミノ酸配列は、N末端側の酸性領域とそれに続く WW ドメイン、塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸のくり返し領域を有している (図 1 A)。Npw38 cDNA のインビトロ転写/翻訳産物はSDS-PAGE 上で38 kDa のバンドを示した。抗 Npw38 抗体を用いたHeLa 細胞溶解物のウエスタンブロットにおいても同じ分子量のバンドが検出された。ノーザンブロット解析の結果、すべての組織において約 1.3 kb の転写産物がみられた。Npw38 mRNA の発現量は心臓、骨格筋、膵臓、脾臓、胸腺、胎盤、卵巣、小腸、末梢血において比較的高かったが、いずれの組織にも存在することからハウスキーピング遺伝子であることが示唆された。GFP 融合遺伝子を用いた局在解析の結果、EGFP-Npw38 融合蛋白質は核に局在が見られた。さらにHeLa 細胞を抗 Npw38 抗体で染色したところ、DAPI 染色と同様、核のみが染まり、Npw38 は核蛋白質であることがわかった。

### Npw38 の WW ドメインは転写活性化能を有する

Npw38 の WW ドメインと相互作用する蛋白質を同定するために、WW ドメインをベイトとした酵母ツーハイブリッドによるスクリーニングを試みた。しかし、WW ドメインを発現させただけで転写活性化が起こり、スクリーニングを行えなかった。CHO細胞におけるツーハイブリッド系でCAT アッセイを行ったところ、酵母の場合と同様の転写活性化が認められた。Npw38のWW ドメインはコントロールにくらべ50-70 倍転写を活性化した (図 1)。一方、完全長Npw38 を発現させた細胞ではほとんど転写活性化はみられず、転写を抑制している領域が存在すると考えられた。このような転写の活性化がWWドメインに共通の性質かどうかを調べるために、他のWW ドメインについてもCHO細胞によるCAT アッセイを行った。ヒト YAP、Pin1 のWW ドメインはGAL4 DNA 結合ドメインのみと比べそれぞれ40 倍、20倍程度転写を活性化した。さらにNpw38 とは対照的にPin1 は完全長でも約 6 倍程度転写を活性化した。これらの結果より、WW ドメインのいくつかは基本転写の活性化能を有していることが示唆された。ただ、この作用が生理的に意味あるものかどうかは現時点ではわからない。

### Npw38 のWWドメインと結合する蛋白質の同定

Npw38 の結合パートナーを同定するために、HeLa 細胞の核抽出物をGST-Npw38 とインキュベートし、結合蛋白質をグルタチオンセファロースビーズにより精製したところ94 kDa の蛋白質が得られた。この蛋白質の部分アミノ酸配列を用いてデータベースを検索した結果、この蛋白質をコードしていると思われるcDNA をESTの中から見いだした。このcDNA がコードしている641 アミノ酸残基からなる蛋白質をNpwBP と命名した(図2)。NpwBPのアミノ酸配列の特徴は、2つのプロリンに富む領域と2つの酸性領域を有することである。

NpwBP がNpw38 と直接相互作用することを確認するために、NpwBP のインビトロ翻訳産物とGST-Npw38 をインキュベートし、グルタチオンセファロースビーズによりGST-Npw38 を回収した。その結果、GST-Npw38によって<sup>35</sup>S-NpwBP が共沈することから、両者はインビトロで結合することがわかった。しかもこの結合には、WW ドメインの存在が必須であった。また、WW ドメイン中の保存された Trp、Pro をAla もしくはGly に変異させたところ、相互作用は全く見られなくなった。以上の結果よりNpw38 とNpwBP の相互作用は WW ドメインを介しているということがわかった。

両者の結合は、細胞内局在のデータからも裏付けられた。EGFP-Npw38 を発現している HeLa 細胞を抗 NpwBP 抗体をもちい免疫染色した。EGFP-Npw38 由来の緑の蛍光パターンとローダミン標識 2 次抗体を用いた抗 NpwBP 抗体による赤色の蛍光パターンとを重ね合わせたところ EGFP-Npw38 由来の緑色の蛍光が黄色に変化し、両蛋白質が核内の同じ領域に存在するということを強く示唆した(本報告書研究成果集参照)。

### NpwBPの結合モチーフの特定

Npw38 の WW ドメインが NpwBP 中のどの領域と相互作用するかを調べるため、NpwBP の各種欠失体の GST 融合蛋白質を用いたプルダウンアッセイ、並びに酵母ツーハイブリッド法による相互作用検定を行った。その結果、WW ドメインは NpwBP の 2 つのプロリンに富んだ領域と相互作用することがわかった。

Npw38 が結合する NpwBP の配列中の特異的なモチーフがあるかどうか調べるため、NpwBP のプロリンに富んだ領域をすべてカバーするようにデザインした 12 もしくは 13 mer の 4 4 個のペプチドがスポットしてある SPOTs 膜を用いて結合アッセイを行った(図3)。その結果、PPGPPP からなるプロリンに富んだ配列を有するペプチドと強く結合することがわかった(表1)。さらに周辺の配列を調べてみると、PPGPPP というコア配列の周辺に Arg 残基を含んでいた。そこで、我々はこのモチーフを「PGR モチーフ」と命名した。なお、Npw38 は、これまで WW ドメイン結合モチーフとして知られている、PGM モチーフ(U1C、SF1、SmB/B')、PPXY モチーフ(WBP2、上皮Naチャンネル)、PPLP モチーフ(Mena) のいずれの配列にも特異的な結合は見られなかった。

### Npw38 とNpwBPの核酸結合能

Npw38 の酸性、塩基性アミノ酸のくり返し領域には、RNA 結合モチーフとして知られている RGG ボックスに似ている RGH のくり返し領域が存在する。hnRNP などの蛋白質の RNA 結合アッセイに広く使われている方法をもちい、RNA 結合能を調べたところ、

ポリrGにのみ強く結合がみられ、Npw38はRNA結合蛋白質であることが示唆された(図4)。しかし、Npw38は一本鎖DNA、または二本鎖DNAへは結合しなかった。

NpwBPのインビトロ翻訳産物を核酸樹脂とインキュベートしたところポリrGに強く結合が見られ、Npw38同様RNA結合蛋白質であることが示唆された(図5)。同条件で一本鎖DNAにも結合が見られた。そこでNpwBPの一本鎖DNAに対する結合の特異性をゲル移動度シフト法により調べた。各種デオキシリボヌクレオチドのホモポリマーのうち<sup>32</sup>PラベルしたオリゴdG24とのみ蛋白質-一本鎖DNA複合体を形成した。Gに富んだ領域をもつAdMLPの一本鎖DNAとも強く結合し、NpwBPはNpw38と同様にGに富んだ配列と好んで結合するということがわかった。

### NpwBP、Npw38と相互作用するその他の蛋白質の検索

完全長Npw38をベイトとして酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところNpwBPの他に、スプライシング因子の成分として報告があるDim1を得た。また、NpwBPの酸性領域(210-401)をベイトとし酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、陽性クローンが数十個得られ、そのうちATP依存性RNAヘリカーゼp68、核小体蛋白質MSP58、細胞周期により制御されている蛋白質ICP22BPなどが5クローン以上得られた。またクロモドメイン、ヘリカーゼドメイン、DNA結合ドメインをもつCHD1のC末端領域を含むcDNAも得られた。

### **考察**

本研究ではホモ・プロテインcDNAバンクの中からWWドメインを持つ新規核蛋白質Npw38cDNAを同定し、さらにNpw38の結合蛋白質NpwBPを同定した。両者の結合は、Npw38のWWドメインとNpwBPのプロリンに富む部分で起こることを示し、SPOTS解析によって、周辺にArg残基を含むPPGPPPというモチーフ(「PGRモチーフ」と命名)を特定することができた。これらの蛋白質間のインビトロや細胞内での結合を示唆するデータ、細胞核内での局在部位の一致など、いずれのデータも、NpwBPがNpw38の生理的なりガンドであることを強く示唆しており、両者が核内で複合体を形成して機能していることを窺わせる。

この複合体の機能を考えるうえで、いずれもGに富むRNAに結合できるというデータは示唆的である。Npw38においてはRGGボックスに類似した配列が存在するがNpwBPにはRNA結合モチーフは存在しないので結合部位の同定が待たれる。またNpwBPは一本鎖DNAへの結合能がみられ、特にGに富んだ配列にそのGストレッチの長さに依存して結合能が増す。Gに富んだRNA、DNAに結合する特異性の意味については現在分からないが、テロメア配列TTAGGGには強い結合は見られなかった。またリボゾームに参与するGに富んだRNAが存在するがNpw38、NpwBP両者の局在は核全体にあり核小体をさける染色パターンである。細胞のステージなど条件によって局在が変わるかもしれないが、これは今後の課題となるであろう。酵母ツーハイブリッドスクリーニングにおいてはスプライシング因子、DNA、RNAヘリカーゼなど数種類の蛋白質が得られた。これらの蛋白質との結合は、今後さらに検討を進める必要がある。こ

これらの蛋白質が関与していることから想像すると、本複合体は DNA -クロマチンの構造の維持、もしくはスプライシング、エロンゲーション、ポリアデニル化のような RNA のプロセッシングに関わるような mRNA ファクトリーの一員として機能している可能性が考えられる。

## おわりに

完全長cDNAバンクの中から、結合モチーフを手掛かりとして、核の中で機能していると思われる新しい蛋白質複合体を同定することができた。WWドメイン以外にも多くの蛋白質間結合に関与するモチーフが知られており、我々のバンクの中にもこれらのモチーフを有するものがまだ数多く含まれている。したがって、これらのクローンをターゲット蛋白質として、今回と同様な戦略を用いれば、新しい複合体が次々と見いだされるものと期待される。

このような戦略の成否は、ターゲット蛋白質の生理的リガンドをいかにして見いだすかということにかかってくる。本研究では、蛋白質-蛋白質相互作用を検出するのに従来使われてきた方法の多くを試してみた。すなわち、酵母ツーハイブリッド法、哺乳動物細胞ツーハイブリッド法、プルダウン法、免疫沈降法、細胞内局在の比較、SPOTs解析、データは示さなかったがBIAcore法などである。その上、核酸との結合を見るために、アフィニティービーズ法やゲルシフトアッセイも行った。これらの実験を実施する中で感じたのは、いずれの方法も、非特異的な結合や人工的な結合を拾う可能性があり、本当に細胞内で起こっている結合であることを証明するのは難しいということである。スクリーニング法としては、酵母ツーハイブリッド法が一番良く用いられているし、実績もあるが、今回のWWドメインのケースのようにベイトのみで自己転写活性化能を有する場合には使えない。今後、このアプローチを用いた研究を展開していく場合には、新しい蛋白質-蛋白質相互作用の開発が望まれる。

## 関連報文

### 1. A.Komuro, M.Saeki, and S.Kato

Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription.

*Nucl.Acids Res.* **27**:1957-1965, 1999.

### 2. A.Komuro, M.Saeki, and S.Kato

Association of two nuclear proteins, Npw38 and NPwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine.

*J. Biol. Chem.* **274**:36513-36519, 1999.

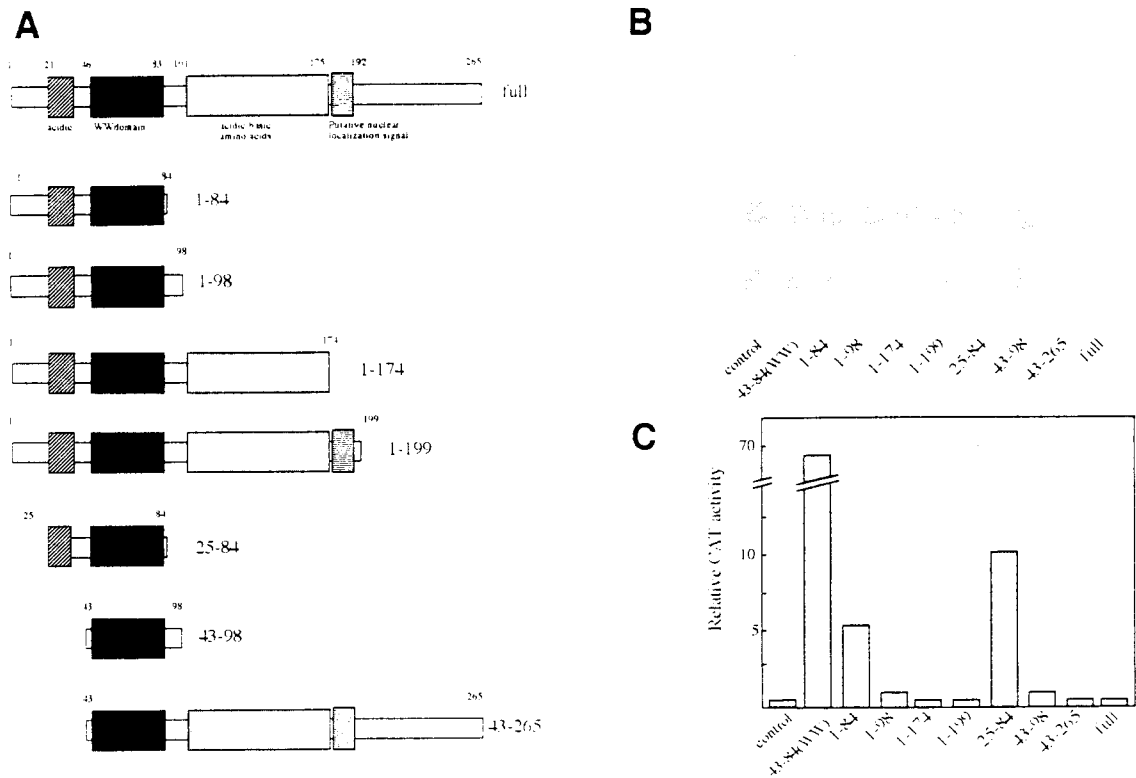


図1 Npw38のWWドメインの転写活性化能

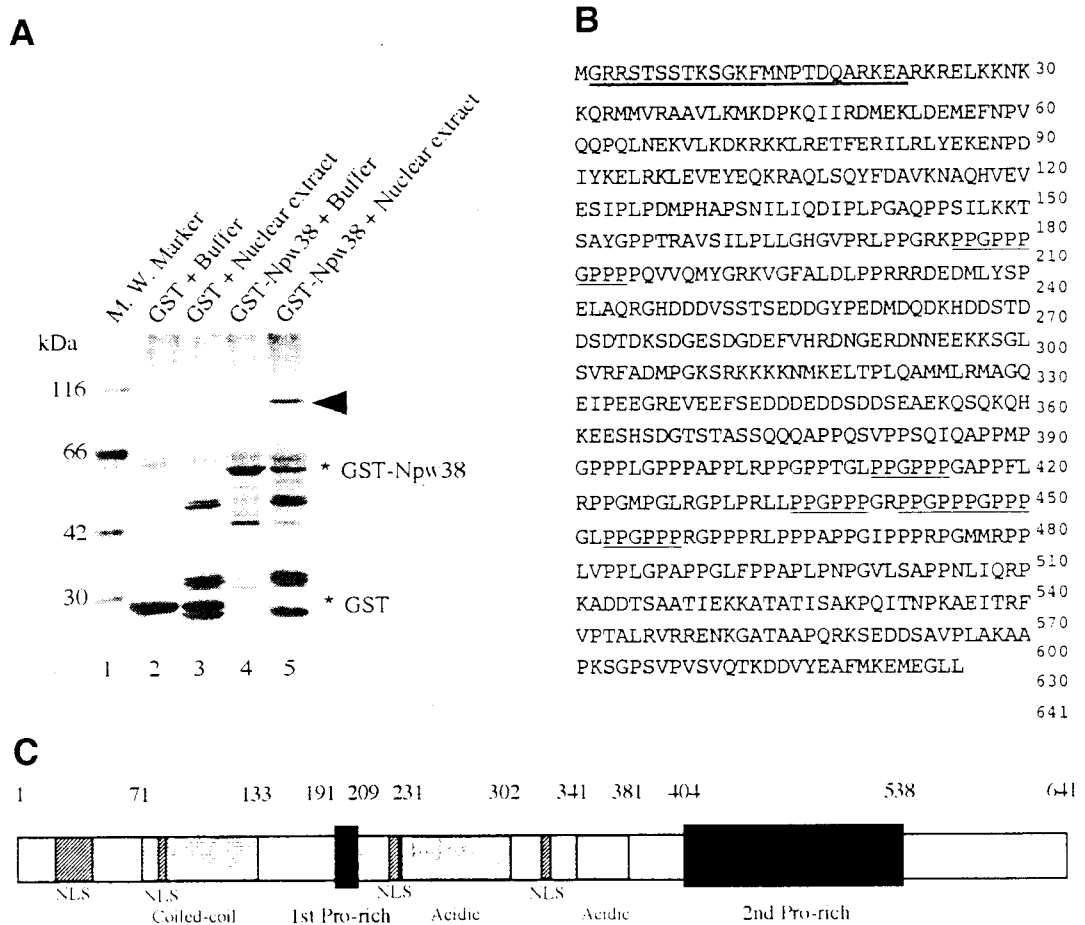


図2 NpwBPの単離精製と構造

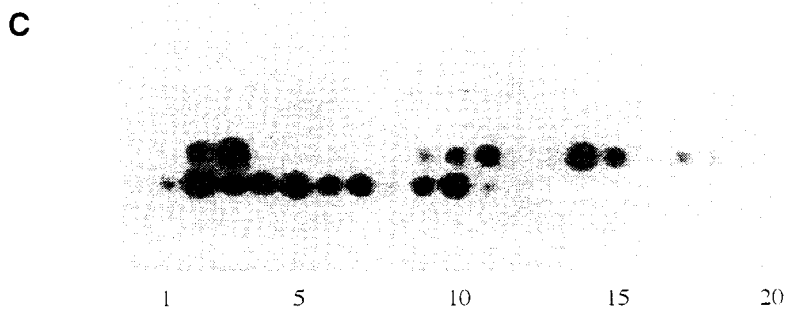
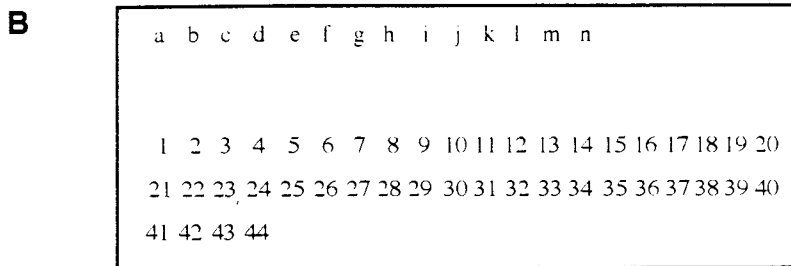
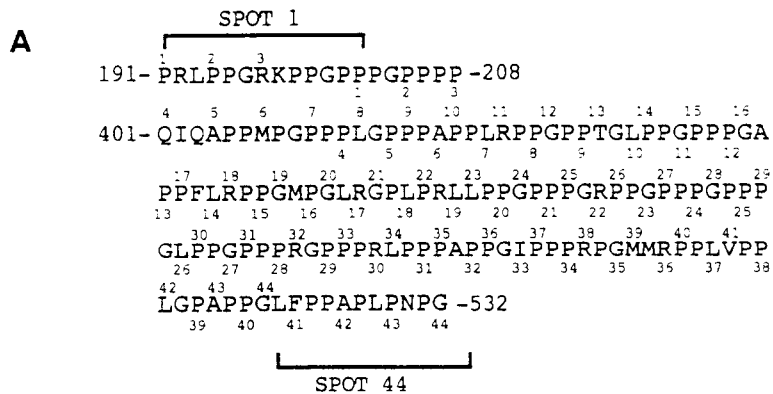


図3 SPOTs解析

表1 Npw38の WW domainと相互作用する NpwBP 由来のペプチド

Peptide No.	Sequence	Relative intensity
22	PRLPPGPPGR	100
3	RKPPGPPGPPPP	85
14	PPGPPPGAPPFL	72
25	PGRPPGPPPGPP	65
30	PPGPPPRGPPPR	59
23	LPPGPPPGRPPG	55
27	PPGPPPGGLPPG	43
24	GPPPGRPPGPPP	42
2	PPGRKPPGPPPG	42
29	PGLPPGPPPRGP	37
11	RPPGPPTGLPPG	37
26	PPGPPPGPPPG	33
15	PPGAPPFLRPP	31
10	PPLRPPGPPTGL	24
31	PPPRGPPPRLPP	15
21	GPLRLLPPGPP	15
9	PPAPPLRPPGPP	14
17	PFLRPPGMPGLR	13
13	TGLPPGPPPGAP	11
28	GPPGGLPPGPPP	9
12	GPPTGLPPGPPP	4

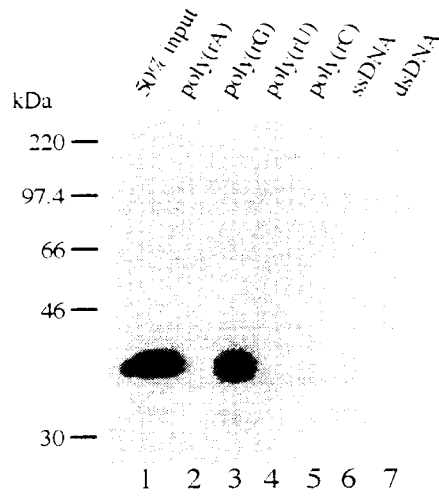


図4 Npw38の核酸結合能

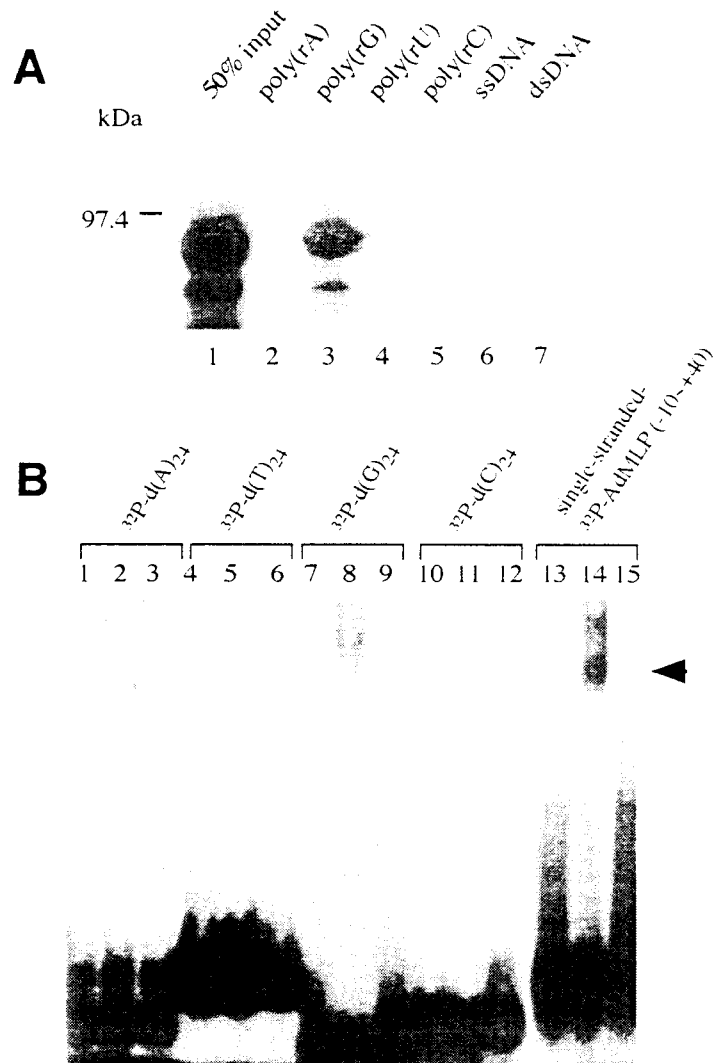


図5 NpwBPの核酸結合能