

レチノイン酸受容体シグナリングに関与する核内銅結合タンパク質の検索

渡辺雅紀、山本美智子、手塚雅勝

日本大学薬学部衛生化学研究室

Identification of copper-binding nuclear proteins in mouse brain : its involvement in retinoic acid receptor signaling

Masaki Watanabe, Michiko Yamamoto and Masakatsu Tezuka

Department of Health Science, Nihon University, College of Pharmacy

Abstract Copper is an essential micronutrient with numerous cellular functions. Previous studies have demonstrated that copper deficiency in P19 embryonal carcinoma cells by using a copper depletor, bathocuproinedisulfonic acid, suppresses the retinoic acid-induced neuronal differentiation and the retinoic acid receptor-mediated transactivation. In this study, we used an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) technique to identify novel copper-binding nuclear proteins in mouse brain. Two copper-binding proteins, polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) and NonO/p54^{nrb} (NonO), were identified by IMAC loaded with copper ion and mass spectrometry. In transient transfection experiments, both PSF and NonO overexpression in Neuro-2a cells resulted in significantly increased expression of a luciferase reporter gene in response to retinoic acid. Our results suggest that the possible copper binding proteins, PSF and NonO, may act as a coactivator of retinoic acid receptor-dependent transcription.

Key words : 銅、immobilized metal affinity chromatography、レチノイン酸、レチノイン酸受容体

はじめに

必須微量元素である銅は、全ての生物の生存に欠かすことの出来ない栄養素であり、cytochrome c oxidase、copper, zinc-superoxide dismutase、dopamine β -hydroxylase などの銅要求酵素の活性中心に配位し、酸化還元反応を触媒している。また、細胞内において、銅要求酵素と結合している以外の銅は、銅輸送・恒常性維持など遊離銅の捕獲、銅代謝に関する特異的タンパク質と結合して存在している[1]。

我々は、レチノイン酸により、神経細胞へ分化することが知られているマウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞の銅欠乏培養を行った結果、銅欠乏によりレチノイン酸受容体 (RAR) およびレチノイン酸応答配列 (RARE)

を介したレチノイン酸に対する応答が抑制されるとともに、ニューロンへの分化が抑制されることを明らかにしている[2-3]。しかしながら、これらの詳細な機構は明らかになっていない。

本研究では、核内受容体である RAR を介した遺伝子発現制御に関与している銅結合タンパク質が存在しているかを検索するために、マウス脳から調製した核タンパク質から、2 価銅を固相化した immobilized metal affinity chromatography (IMAC) および質量分析法を用いて、銅と高親和性を有するタンパク質の検索・同定を行い、得られたタンパク質が RAR シグナリングに関与するか検討を行った。

実験方法

IMAC による核内銅結合タンパク質の精製と同定

4 週令の ddY 系雄性マウスの脳から核タンパク質を分画した。核タンパク質を EDTA および銅キレーターである tetrathiomolybdate で処理したのち透析した。透析後、2 価銅を固相化した metal chelate affinity chromatography column (HiTrap Chelating HP

連絡先： 渡辺雅紀

〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1

日本大学薬学部衛生化学研究室

TEL : 047-465-5637

FAX : 047-465-5637

E-mail : mwatnabe@pha.nihon-u.ac.jp

Columns : Amersham Biosciences) を用いて銅親和性タンパク質の精製を行った。10% SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、バンドを切り出し、MS/MS 解析 (Ultraflex: BRUKER DALTONICS 社製) および Mascot 検索によりタンパク質の同定を行った。

プラスミドの作製とトランスフェクション

マウス脳から RT-PCR 法により PSF および NonO の cDNA をクローニングし、p3XFLAG-CMV14 expression vector に挿入した。RARE を含む RAR β 2 プロモーターをマウス染色体 DNA より PCR で増幅し、luciferase リポーターベクターに挿入した (pRARE-luc)。プラスミドのトランスフェクションは FuGENE 6 (Roche Diagnostics) を用いて行った。

siRNA の作製とトランスフェクション

PSF および NonO に対する siRNA は *Silencer* siRNA Cocktail Kit (Ambion) を用いて作製した。また、negative control siRNA として、GFP に対する siRNA を同様に作製した。siRNA のトランスフェクションは lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて行った。

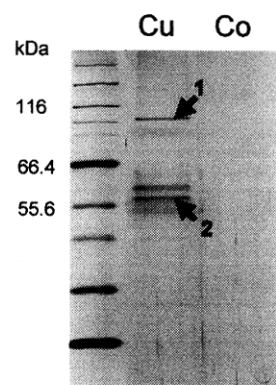
luciferase assay

トランスフェクションの補正用ベクターである pRL-TK vector を共トランスフェクションし、Dual Luciferase Reporter Assay System (promega) を用いて luciferase 活性を測定した。

結果および考察

2価銅を固相化した IMAC により得られたタンパク質のうち、約 100kDa および 55kDa のバンドを MS/MS 解析により同定した結果、それぞれ polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor (PSF) および NonO/p54^{mb} (NonO) であった (Fig. 1)。また、細胞質タンパク質を用いて行った IMAC あるいは、亜鉛を固相化した IMAC では、これらのタンパク質は得られなかった (data not shown)。PSF は、polypyrimidine tract-binding protein と complex を形成するタンパク質として見出された、100kDa の glutamine/proline-rich 領域を有する核タンパク質である。また、NonO は PSF の C 末端側の領域に高い相同性を持つ核タンパク質として同定されている。PSF と NonO はヘテロダイマーを形成することが報告されている。PSF および NonO は dsDNA、ssDNA および RNA に結合することが示されており、DNA のペアリング活性を持つことや、RNA のスプライシング因子、転写制御因子として機能している核内多機能タンパク質であることが報告されている [4]。

PSF および NonO の発現ベクターを pRARE-luc ベクターと共に Neuro-2a 細胞にトランスフェクション



1. polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor
2. NonO/p54^{mb}

Fig. 1 Identification of copper-binding nuclear protein in mouse brain by IMAC
Cu : copper-IMAC column Co : cobalt-IMAC column

し、PSF、NonO を一過性に過剰発現した時の、RARE を介する遺伝子発現に対する影響について検討した。あらかじめ、Neuro-2a 細胞における内因性の PSF および NonO の発現の有無を RT-PCR 法により検討した結果、両遺伝子は共に発現していた (data not shown)。トランスフェクションの 24 時間後に 0.5 μ M all-*trans* レチノイン酸 (ATRA) を添加し、16 時間後に luciferase 活性の測定を行った。ATRA の添加による luciferase 活性の増加は PSF および NonO の過剰発現により、さらに増加し、トランスフェクションしたプラスミドの量依存的 (1 μ g、2 μ g、5 μ g) 作用を示した (Fig. 2A)。また、PSF と NonO を共トランスフェクションしたところ、luciferase 活性は相加的な増加を示した (data not shown)。Neuro-2a 細胞の内因性 PSF あるいは NonO を RNA 干渉法によりノックダウンした時の影響について検討した。PSF あるいは NonO の siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に PSF および NonO の mRNA をノーザンブロット法により検出した結果、共に発現量の低下が認められた。pRARE-luc ベクターと共に siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に ATRA を添加して、同様に luciferase 活性を測定した結果、PSF の siRNA を導入した Neuro2a 細胞では、luciferase 活性が siRNA の導入量依存的 (100 nM、200 nM) に低下していた。NonO の siRNA を導入した細胞では、luciferase 活性の低下は見られなかった (Fig. 2B)。PSF は甲状腺ホルモン受容体 (TR) とパートナーであるレチノイド X 受容体 (RXR) の DNA-binding domain と相互作用し、甲状腺ホルモンによる転写活性化を抑制的に制御することが報告されている [4]。RAR は TR と同様に RXR と結合しているが、レチノイン酸による転写制御には PSF は促進的であり、作用が異なっていた。NonO を過剰発現すると、レチノイン酸による転写活性化を促進したが、発現量を低下させても抑制出来なかった。

これは、NonO の機能を代替するタンパク質の存在が考えられたが、詳細については今後検討していく必要がある。また、興味深いことに、PSF の siRNA を導入した細胞では、NonO の mRNA の発現が有意に増加していた。NonO の過剰発現細胞では、luciferase 活性は増加したが、PSF のノックダウン細胞では、luciferase 活性は減少している。このことから、NonO による活性の促進には、PSF の存在が必要である可能性が考えられた。

P19 細胞においても同様に、PSF・NonO の過剰発現およびノックダウンの影響について検討した。siRNA によるノックダウンの効果があまりみられなかったが、Neuro-2a 細胞とほぼ同様の結果が得られた (Fig. 3A, 3B)。また、銅欠乏剤である BCS の P19 細胞への添加は、NonO のレチノイン酸による転写活性化の促進作用を抑制した (data not shown)。

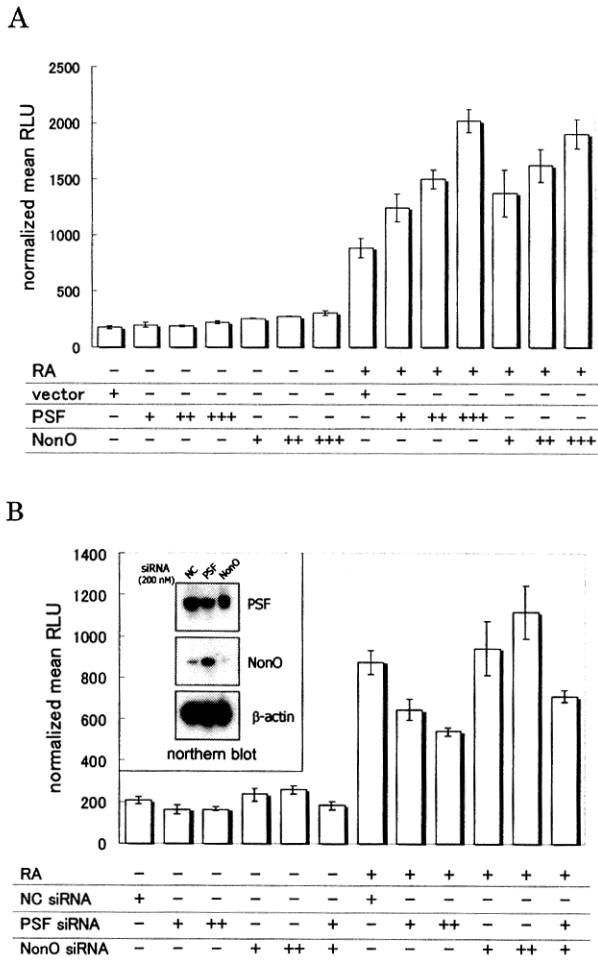


Fig. 2 Effect of PSF/NonO overexpression(A) or knock-down(B) on RA-induced transcriptional activation in Neuro-2a cells

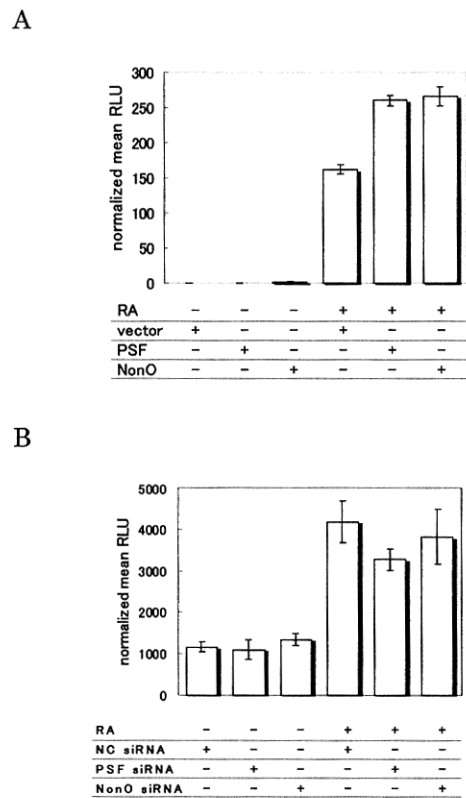


Fig. 3 Effect of PSF/NonO overexpression(A) or knock-down(B) on RA-induced transcriptional activation in P19 cells

今回、IMAC を用いた *in vitro* 系での検討であるため、PSF および NonO が生理的条件下で銅と結合しているか詳細な検討をする必要はあるが、核内受容体である RAR を介した遺伝子発現制御において、PSF および NonO が転写を促進的に制御する因子として機能していることを明らかにした。今後、PSF/NonO の RAR シグナリングにおける詳細な機構と銅との関連をさらに明らかにしていく。

参考文献

1. Pena MM, Lee J, Thiele DJ : A delicate balance : homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129(7) : 1251-1260, 1999
2. Watanabe M, Motegi K, Tezuka M : Copper deficiency inhibits the neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Biomed Res Trace Elements* 11(4) : 399-400, 2000.
3. Watanabe M, Tezuka M : Copper is necessary for the retinoic acid response on P19 embryonal carcinoma cells. *Biomed Res Trace Elements* 12(4) : 325-326, 2001.
4. Shav-Tal Y, Zipori D : PSF and p54(nrb) /NonO-multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 531(2) : 109-114, 2002