博士（薬学） 今 村 泰 弘

学 位 論 文 題 名

Expression and Function of the Eukaryotic Nuclear Oncogene N－*myc*

（真核細胞の核内癌遺伝子N－*myc*の発現調節と機能に関する研究）

学位論文内容の要旨

真核細胞における癌遺伝子産物には，細胞膜（*src*，*ras*，*ros* など），細胞質（*mos*，*raf* など），核内（*myc*，*fos*，*jun*，p53など）に存在するもので大きく分類される。*myc* ファミリーにはc，N，L－*myc* などがあり構造上非常によく似ており，第一，第二，第三エクソンのうち第二，第三エクソンが蛋白質をコードしている。*myc* ファミリーの1つであるc－*myc* の発現は殆どすべての癌細胞並びに正常細胞で認められるのに対し，N－*myc* は神経芽細胞，網膜芽腫細胞などの癌細胞，更に正常細胞では未分化神経細胞，発生初期の細胞で認められることから細胞或いは組織特異的発現があると示唆されている。また，*myc* 蛋白質の機能は細胞増殖や分化，更にアポトーシスに関与しているものと考えられており，特に細胞周期，DNA 複製や転写における制御を担っているものと示唆されている。

c－*myc* についてはc－*myc* 蛋白質を含む複合体がc－*myc* 遺伝子の第一エクソン上流約2kbp 領域に結合すること，しかもそこには DNA 複製開始部位並びに転写調節シグナルエンハンサーが存在することを明らかにした。エンハンサーの一例として，heterogeneous な DNA 型腫瘍ウイルス SV40のエンハンサーの代わりにc－*myc* 蛋白質複合体結合必須領域21bp が SV40の DNA 複製並びに転写を促進することについても明らかにした。

一方，N－*myc* 遺伝子に関してはその発現はN－*myc* 蛋白質によって autosuppress することが明らかとなり更にその機能部位を同定したが，N－*myc* 遺伝子の詳細な構造と機能に関しては殆ど明らかにされていない。そこでマウスN－*myc* 遺伝子の第一エクソン上流域における転写制御について検討した。N－*myc* 遺伝子の第一エクソン上流 *Eco*RⅠ－*Xho*Ⅰ，第一エクソンの一部とその上流 *Xho*Ⅰ－*Pst*Ⅰ，更に第一エクソンと第一イントロンを含む *Pst*Ⅰ－*Pst*Ⅰ領域の下流にバクテリア由来の CAT（chloramphenicol acetyltransferase）遺伝子を連結

したDNAを，N－*myc*を殆ど発現していないHeLa或いは大過剰発現しているIMR32両細胞にそれぞれ導入しCATアッセイを行なった（native expression)。その結果，*Xho* I －*Pst* I 領域において転写活性が認められたことから転写調節領域の存在性が明らかとなり，またHeLaよりもIMR32で高い結果となった。更に，この領域について*Xho* I site（－980）から－860，－797，－578，－279まで消失したミュータント或いは*Pst* I site（＋108）から－226，－379，－468，－548まで消失したミュータントについてそれぞれ同様に両細胞でCATアッセイを行なった。いずれの場合においても転写活性の傾向は両細胞においてほとんど変化はなかったが，－860－－797領域がIMR32で高い結果となった。

上述の*Eco*R I －*Xho* I，*Xho* I －*Pst* I，*Pst* I －*Pst* I 領域のみの機能を調べるためにheterogeneous SV40プロモーターとCAT遺伝子の存在するプラスミドpSVPCATに連結し，HeLa或いはIMR32細胞でCATアッセイを行なった。その結果，同様に*Xho* I －*Pst* I 領域で転写活性が認められHeLaよりもIMR32で高いことが明らかとなった。また，このテストクローンにはputative N－*myc* プロモーターが含まれているためＳ１マッピング法で解析したところ，両細胞で大部分がSV40プロモーターに依存していることが確認された。上述のディレーションミュータンについて同様に　ＳＶ40プロモーター存在下でCATアッセイを両細胞で行った。*Xho* I site からの場合，転写活性の傾向は両細胞間で殆ど変化はみられなかった。*Pst* I site からの場合，HeLaでは殆ど転写活性が認められなかったのに対し，ＩＭＲ32では広範囲にわたって認められた。特に－980－－860領域は－860－*Pst* I 領域に対してエンハンサーとして機能した。このことから，cell type preferentialな発現があることが示唆された。

N－*myc* 遺伝子の発現（native expression）は，－860－－797領域においてIMR32で転写活性が高い結果となったため，この領域に結合する核内蛋白質の認識する配列をDNase I フットプリンテイング法で決定した。HeLa或いはIMR32の核抽出物を用いたところ，両細胞で共通にプロテクトされた配列（N21box）には*Sac* II 制限酵素認識配列を含んでいた。更に，N21 boxを化学合成しこれを－797－*Pst* I 領域のオリジナルの位置である－797に連結しHeLa或いはIMR32でCATアッセイを行なった。N21boxは－797－*Pst* I 領域に対して両細胞で転写活性が認められた。更に，N21boxの機能を詳細に調べるため位置と方向性についてHeLa，IMR32，mouse fibroblast L，rat glioma C６，mouse embryonal carcinoma F９，human retinoblastoma Rb24KY，mouse neuroblastoma N18TG2 p 26細胞について同様にCATアッセイで検討した。その結果，IMR32ではN21boxがオリジナルの位置である－797に順方向に存在する時のみ機能したのに対し，その他の細胞では順，逆方向どちらも認められた。

また，N21box の putative N－*myc* promoter に対する影響を調べるためにプロモーターのみと CAT 遺伝子が存在するプラスミドにN21box を連結し，位置と方向性について同様に上述の細胞で CAT アッセイを行なった。その結果，IMR32以外ではN21box がプロモーター上流に存在すれば方向性に関係なく転写活性が認められた。以上のことから，N21box はN－*myc* が大過剰発現している IMR32と発現レベルの低い或いは殆ど発現していない IMR32以外の細胞で転写制御が異なることが明らかとなった。

核内 DNA 結合蛋白質の存在性を調べるために；二本鎖N21box をプローブとして HeLa 或いは IMR32細胞核抽出物と反応させてゲルシフト競合実験で調べた。DNA 塩基配列特異的に結合する蛋白質は両細胞で少なくとも2種類存在することが明らかとなった。更に一本鎖プラスN21box についても同様に行なったところ，塩基配列特異的に結合する蛋白質は少なくとも HeLa で2種類，IMR32で1種類存在することが明らかとなった。

N21box に特異的に結合する核内蛋白質の分子量を決定するために UV クロスリンキング競合実験を行なった。二本鎖N21box に特異的に結合する核内蛋白質は，HeLa，IMR32細胞で100kDa と42kDa であることが明らかとなった。また，一本鎖プラスN21box において HeLa では42kDa と37kDa が，IMR32では42kDa であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主　査	教　授	有　賀　寛　芳
副　査	教　授	大　塚　栄　子
副　査	教　授	横　沢　英　良
副　査	助教授	近　藤　博　之

本学位論文申請者は過去6年間に渡り，細胞癌遺伝子N－*myc* の発現調節機構を解析し，今回それをまとめ，学位論文として提出した。

N－*myc* 遺伝子は *myc* ファミリーに属する癌遺伝子であり，神経系で発現するといった特徴を持つ。同じ *myc* ファミリーの一つである c－*myc* 遺伝子はN－*myc* と異なり，殆ど全ての細胞で発現するといった特徴を有し，その発現様式は詳細に解析されてきた。N－*myc* に関しては上述の神経系発現といった特徴は多く報告されてきたが，その分子的基盤は殆ど解明されて

いなかった。

本論文の第一章ではまず，本来のN－*myc* プロモーターによる転写調節領域の同定を詳細に行った。転写調節領域に関してはプロモーターのみが明かにされているだけであったが，申請者はまず転写開始部位上流約1000塩基対にエンハンサーを同定し，次に各種欠損変異株を作製することで－860－－797領域に転写エンハンサーを同定した。このエンハンサーは神経芽腫細胞IM32細胞によりその発現特異性を示した。

第二章においては発現調節領域をSV40プロモーター存在下で検討し，上述の領域の上流－980－－860にエンハンサーを認めた。N－*myc* プロモーター依存の場合はエンハンサー活性には方向性（順方向）を要求したが，SV40プロモーター依存性発現には方向性に無関係な典型的なエンハンサー活性を示し，興味ある点である。また異なったプロモーター存在下で異なった領域がエンハンサー活性を示すことは転写制御機構を考える上で興味深い。

第三章においては第一章で同定したN－*myc* 依存性の本来のプロモーターでの発現制御を更に詳細に解析した。発現には DNA 配列に結合するタンパク質の存在が重要である。そこでDnase I フットプリンティング法でタンパク質結合領域を－860～－797領域内の21塩基対に同定した。この21塩基対（N21box）はこれだけで－860～－797領域のエンハンサー活性を相補し，活性は非神経系と神経系細胞では異なっていた。即ち，神経系の IMR32細胞では順方向でかつ－797からプロモーターまでの配列が必要であったが，非神経系の HeLa 細胞では方向性に関係なく，かつN21box を間の配列非存在下で直接N－*myc* プロモーターに連結しても作用した。このことは神経系細胞での発現はN21box とプロモーターまでの配列の両方が重要であることを意味している。

次に申請者はこのN21box に結合するタンパク質を解析した。まず二本鎖N21box には塩基配列特異的 DNA 結合タンパク質が存在することを示した。次にN21box プラス鎖にも同様に塩基配列特異的 DNA 結合タンパク質を同定し，その分子量が HeLa，IMR32細胞とも42, 100 kDa であり，HeLa 細胞には更に37kDa タンパク質が存在し，上述の点や様式の違いはこれらのタンパク質の違いに依存することを示唆した。また7種類の細胞株を使用してこうした塩基配列特異的タンパク質を解析した。

こうしたタンパク質の DNA 結合性とN21box のエンハンサーとしての活性は明確な相関性があり，N－*myc* 遺伝子の発現制御に関して新たな知見を提出している。

すでにこれらの成果は国際的科学雑誌に掲載または印刷中であり，すでに高い評価を得ている。

以上のように，本論文はN－*myc* 発現に関して多くの新しい知見を含んでおり，博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいものと判断した。