

学 位 論 文 題 名

SV40ORIGIN OF REPLICATION ACTIVITY IS INFLUENCED BY  
CELLULAR *CIS* AND *TRANS* FACTORS

(SV40DNA 複製に関与する *cis*, *trans* 細胞因子の解析)

学位論文内容の要旨

INTRODUCTION

Cell proliferation and DNA replication lie at the heart of tumorigenesis, DNA replication is a tightly regulated event in the cell cycle and involves multiple protein-DNA and protein-protein interactions. Progress in understanding the molecular mechanisms and the regulation of DNA replication has been made in recent years mainly from the genetic studies of replication in budding years(*S. pombe*) and the development of a reconstituted simian virus 40 (SV40) DNA replication system. Unfortunately, the exact structures of mammalian origins of replication (*ori*) remain elusive, as do the mechanisms that control the extent of cellular replication and its coordination with transcription and other cellular processes. The SV40 replication system has been a useful model to gain informations about mammalian replication features because of the similarities existing between the SV40 DNA and a mammalian replicon. In my work, I have concentrated on the functions of adenine and thymine rich sequences, which are a characteristics of many replicating systems, such as papovavirus *oris*, yeast ARSs and possibly mammalian origins of replication, but whose functions remain very much obscure.

RESULTS AND DISCUSSION

The core sequence of the SV40 origin of replication comprises a run of thymine and adenine residues whose sequence and position relative to the rest of the *ori* core cannot be changed without loss of replication. In this work, I show that copies of AT stretches

added in *cis* to a functional *ori* core dramatically reduce replication, probably by creating some physical block. Interestingly, the yeast *ori* consensus is homologous to the SV40AT stretch, *in vivo*, its substitution for an SV40AT stretch does not sustain replication, but its presence beside a functional SV40 *ori* inhibits replication just like additional wild type AT stretches. However, totally unrelated sequences do not affect replication. Inhibition of replication seems thus to be specific to AT-rich sequences.

Using crude nuclear extract of CosI cells, I have demonstrated the existence of factor(s) (MW about 50 kDa), named SOAP, that *in vitro* bind specifically to the SV40AT stretch and to some (but not any) homologous sequences, including the yeast ARS consensus. The same factors recognize both single (T-rich strand) and double stranded forms of the AT stretch. Binding to single stranded AT stretches can be specifically competed for by the corresponding duplex form (less efficiently *vice versa*), which suggests that sequence-specific binding to duplex and single stranded DNA may involve a single protein. In all cases binding is mediated by a species of 50 kDa, termed SV40 ori core AT stretch binding protein (SOAP). SOAP appears to be a ubiquitous, abundant nuclear factor, with strong binding affinity. Its binding to the SV40AT stretch and to the yeast ARS consensus correlates with the inhibition of replication presented by the two elements; moreover, SOAP binding activity reaches a maximum during S phase. These observations strongly suggest that SOAP may be a factor involved in the regulation of replication.

So far, mutations in the AT stretch have been found to drastically reduce, and in most cases abolish, replication. Nonetheless, the AT stretch has been shown to be the target for several host cellular proteins that belong to the replication machinery—including SOAP. I reasoned that, in this light, there might exist cellular DNA sequences that can substitute for the SV40AT stretch. To study this possibility, I digested mammalian genomic DNA and inserted the fragments instead of the SV40AT stretch in a plasmid carrying the SV40 *ori* core. To analyze the pool, I developed a 'replication trap' in CosI cells. I present evidence that there are indeed several mammalian sequences that can substitute for the SV40AT stretch. All of them are rich in adenines and thymine but, surprisingly, these sequences differ from the wild type SV40AT

stretch to such extent that at first sight they would seem unlikely to replicate. This is all the more impressive if one considers that another AT-rich sequence from the yeast TRP1 gene (which includes an ARS), which also carries a similar variation, cannot substitute for the SVR40AT stretch.

Among several functional variants, one carried an element that was previously shown to be an essential part of a mammalian putative origin of replication located upstream from the human *c-myc* gene. Interestingly, SOAP presents many features in common with MSSP-1, a human factor that recognizes sequence-specifically this *myc* upstream element, and which appears to interact with the *c-myc* protein itself. The most striking features are: The two proteins recognize each other's cognate sequences, and the activities of both proteins during cell cycle coincide (maximum in the S phase). These observations strongly suggest that SOAP and MSSP-1 may be related factors. If proven correct, the SOAP/MSSP-1 binary could provide a very interesting connection between the SV40 replication system and mammalian origins of replication. To investigate this matter, I have established an empirical protocol for the purification of SOAP from animal tissues (pork liver). In future, following this protocol, it shall be possible to isolate SOAP from human tumoral cells (e.g. Raji) and from human normal tissues (placenta). Besides the identity of this factor, it shall be very interesting to determine any differences between SOAP from tumoral and normal cells.

## 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博士課程において動物ウイルス SV40 の DNA 複製に関する研究を行って

おり、今回ウイルス DNA 上の機能部位とそこに結合する細胞因子に関する研究をまとめ学位論文として提出した。

SV40DNA は動物細胞遺伝子の一つのレプリコンに相当し、多くの研究が成されてきた。複製に必須な領域として ori core と隣接する AT rich な領域の65塩基対が既に明らかにされている。ori core にはウイルスタンパク質であるT抗原が結合し開始のシグナルを与える。AT rich 配列は複製に必須であることの他は機能は不明であり、またこの配列にも何等かのタンパク質が結合し機能すると考えられるが詳細は全く不明のままである。

本論文の第一章ではまずこの AT rich 配列の性格を詳細に検討した。一般に転写調節配列などはその配列を複数個連結した場合活性が増強される。しかしながら AT rich 配列はその数に反比例して活性の低下が見られ、かつ順方向に位置した場合のみ機能した。そこで申請者はこれを negative synergism と名づけた。すなわち数を増やすことにより、ここではクロマチンの1ターン毎増加させているが、複製開始領域の構造変化が誘起される可能性を示している。次に SV40AT rich 配列と類似のパン酵母の自律増殖配列 ARS を AT rich 配列と交換したところ複製活性を示さなかった。これは次の AT rich 配列結合タンパク質で重要な意味を持ってくる。

次に申請者はこの AT rich 配列に結合する細胞タンパク質の解析を行った。2本鎖及び1本鎖の AT rich 配列には塩基配列特異的に分子量50Kのタンパク質が結合することがサル CosI 細胞核抽出液を用いて調べられた。1本鎖が DNA プローブが2本鎖 DNA により50Kタンパク質の結合が阻害されることにより、2本鎖、1本鎖 AT rich 結合タンパク質は同一のものと考えられる。

第2章においてはこの50Kタンパク質、SOAP と命名、を更に解析している。SOAP はサル、ヒト、マウスなど殆ど全ての細胞に普遍的に存在するタンパク質であり、また細胞の種類を問わず存在する。前述の酵母の ARS 配列は DNA 複製活性は存在しなかったが SOAP は結合し、コントラストを示した。勿論今までにこのタンパク質の存在は報告されていない。

第3章においては、SV40AT rich 配列と機能交換できる細胞 DNA の検索を行った。今までのこの AT rich 配列に変異を導入すると全て DNA 複製活性は失われている。申請者は ori core、AT rich 配列を含むテストプラスミド内に AT rich 配列を細胞 DNA と交換させ、サル CosI 細胞で SV40DNA 複製の起こるクロンをクローニングした。得られた約10種類のクロンを解析したところ、全て ori core に隣接して AT 配列が存在する200-300塩基対の挿入であった。こうした配列が単離されたのは初めてである。この配列の consensus sequence を調べると次章の c-myc 遺伝子上の DNA 複製開始/転写エンハンサー必須配列 TCTCTTA を含んで

おり、現実はこの配列を AT rich 配列と交換したものは複製活性を示した。

第4章では第3章の結果に基づき c-myc TCTCTTA 配列と SOAP との関連を検討した。当研究室ではすでにこの TCTCTTA 配列に結合するタンパク質として MSSP-1 を同定し、その cDNA をクローニングしている。そこで申請者は SV40AT rich 配列、c-myc TCTCTTA 配列を相互にプローブ、コンペティターとして競合実験を行い、また MSSP-1 は RNA レベルでは G1→S 期に発現し、タンパク質レベルでは S 期でピークを迎えるが SOAP も全く同様であることから、両者は全く同一のものかまたは極めて類似のタンパク質であることを明らかにした。このことは SOAP、MSSP-1 の機能を考える上で極めて重要な知見といえる。

更に第5章においては SOAP の精製を行った。まず材料の入手が容易なブタ肝臓より3つのカラムクロマトグラフィーを行い2つのタンパク質を精製する方法論を確立した。この両者とも SV40AT rich 配列に結合能を示し SOAP と考えられる。今後はサルまたはヒト細胞よりこの方法で SOAP の精製を行う予定である。

本論文の成果は既に国際的科学雑誌に2報掲載され、その続報も現在準備中である。また関連論文もすでに8報を数える。

以上のように、本論文は SV40 及び細胞 DNA 複製開始機構に関し多くの新知見を含んでおり、博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいものと判断した。