

学 位 論 文 題 名

Concerted Transcription and DNA replication in the Human *hsp70* gene

（ヒト熱ショックタンパク質70 (*hsp70*) 遺伝子の
転写と DNA 複製の連動（協調）作用）

学位論文内容の要旨

序 論

ヒト熱ショックタンパク質70(*hsp70*)遺伝子の発現は細胞周期に依存し、熱を始めとする様々な生理的ストレスにより誘発される。既に、*hsp70*遺伝子プロモーター領域には種々のトランス転写調節因子などの結合位置が明らかにされ転写の調節に機能している。また、核内癌遺伝子産物 *c-myc* タンパク質がショウジョウバエ及びヒト *hsp70*遺伝子の発現を促進することが報告されている。しかしながら、*c-myc* タンパク質の *hsp70*遺伝子転写プロモーター上での結合部位、発現調節の機構については未解明である。そこで、*hsp70*遺伝子上での *c-myc* タンパク質の結合位置の同定と結合様式の解明を目的とした。

一方、既に *hsp70*の転写と DNA 複製の連動（協調）が示唆されていた。また、動物細胞のモデル系である動物ウイルスの DNA 複製研究を発端とし、複製と転写が密接に関連していることが証明され、シス (*cis*) 及び、トランス (*trans*) の転写因子が転写のみならず複製をも直接制御していることが明らかにされている。そこで、このような DNA 複製と転写の連動（協調）作用が、ヒト *hsp70*遺伝子においても見られる現象なのか明らかにするため、転写調節因子であるプロモーターの DNA 複製に対する機能を更に解析した。

結果及び考察

1 *c-myc* タンパク質複合体の *hsp70*プロモーターへの結合

ヒト *hsp70*遺伝子転写開始点から約230, 160塩基上流に、ヒト *c-myc* 遺伝子上に存在する *c-myc* タンパク質複合体の結合に必須の *myc* (H-P) 配列 (TCTCTTA) に相同な配列 CCTCTCA 及び CCTCTGA を検出し、HSP-MYC A, HSP-MYC B と名づけた。バンド

シフト法によって、これらの配列と結合する核タンパク質の有無を解析した。競合実験の結果、HSP-MYC A および HSP-MYC B に対し塩基配列特異的に強い結合能を示すタンパク質複合体が検出された。このタンパク質複合体は抗体を用い結合阻害実験の結果から、*c-myc* タンパク質を含むことが示唆された。さらに、分子量は、UV-クロスリンク法で約70kDa（キロダルトン）に検出された。

近年、*c-myc* タンパク質が Max と命名されたタンパク質とヘテロダイマーを構成した場合、CACGTG 配列と結合することが報告されている。しかしながら、この結合配列（標的配列）の染色体上での遺伝子座、*c-MYC*/Max 複合体の機能は不明な点が多い。一方、HSP-MYC A および HSP-MYC B に結合する *c-myc* タンパク質複合体の分子量は約70kDa であり、*c-MYC*/Max 複合体の分子量より10から20kDa 小さい。これは、*c-myc* タンパク質が Max とは異なるタンパク質と複合体を形成して結合していることを示唆する。

ヒト *hsp70* 遺伝子プロモーター上の転写開始点より120塩基から1250塩基の広範囲が、*c-myc* タンパク質によって発現促進に必須であることが既に報告されていた。本研究で明らかとなった2ヶ所の結合配列(HSP-MYC A および HSP-MYC B)は、既報の領域内に位置し、CAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）実験から *c-myc* タンパク質による発現調節の標的配列と同定された。

2 ヒト *hsp70* 遺伝子プロモーターの DNA 複製開始領域としての機能

HeLa 細胞でヒト *hsp70* 遺伝子周辺について生体内で機能している DNA 複製開始領域のマッピングを行なった。その結果、転写プロモーター領域に複製開始領域が存在することが明らかとなった。さらに、この複製開始領域の様々な断片を pUC ベクターへ組み込み、各プラスミドの HeLa 細胞での自律複製能を解析した。その結果、プラスミド pHS-AB, pHS-A, 及び pHS-B の3種が HeLa 細胞で自律複製した。これらのプラスミドは、いずれも *c-myc* タンパク質複合体部位 (HSP-MYC A 及び B) を含んでいた。そこで、HSP-MYC A, 及び B に相当する化学合成オリゴヌクレオチドを pUC ベクターのポリリンカー部位に挿入し、同様に自律複製能を調べた。その結果、これらプラスミドも HeLa 細胞で良く複製したが、結合部位内に塩基置換を導入した変異体では複製能は消失した。これらの結果は、ヒト *hsp70* 遺伝子プロモーター上に DNA 複製開始部位が存在し、*hsp70* 遺伝子においても転写と DNA 複製が連動（協調）していることを直接示し、複製が HSP-MYC 配列に依存し、かつ、必須であることを証明する。

一方、DNA 複製開始には特異的な配列を認識する一本鎖 DNA 結合タンパク質の結合が重要

な作用をしていると考えられる。そこで、HSP-MYC 配列を一本鎖とし、塩基配列特異的な一本鎖 DNA 結合タンパク質を検索した。サウスウェスタン法により、ヒト由来の HL-60, Raji, IMR-32細胞, サル由来の COS 1, CV-1 細胞, ラット由来の 3 Y-1 細胞及びマウス由来の L 細胞の核タンパク質中に、HSP-MYC 配列のプラス鎖と特異的に強く結合する分子量45, 53及び26kDa のタンパク質が検出された。この結果は、これらのタンパク質が種、組織を超えて哺乳動物細胞では普遍的に発現され、複製開始部位として機能する HSP-MYC 配列に結合することから哺乳類動物の DNA 複製開始機構に重要な機能をもつことを示唆する。また、ヒト胎盤 cDNA ライブラリーからこのタンパク質に相当するクローンが2種得られ、そのうちのひとつには、DNA 結合性タンパク質の特徴である Zinc フィンガー構造が認められた。

以上の結果から、ヒト *hsp70* 遺伝子において転写と DNA 複製が連動（協調）した作用であることが証明された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	助教授	近 藤 博 之
副 査	助教授	澤 田 均

本学位論文申請者は、博士課程において *hsp70* 遺伝子の転写と DNA 複製に関する研究を行い、今回その結果をまとめ学位論文として提出した。

一般的にいつて DNA 複製と転写の協調作用はウイルスなどの系では報告されているが、動物細胞遺伝子などではまだその例は極めて少ない。その理由として転写制御に関しては近年極めて精力的に研究され、多くの知見を集めているが、DNA 複製、特にその開始機構に関しては動物細胞遺伝子が10⁹もの塩基対を有することから殆ど解明されていない。一方、*hsp70* に関しては熱などを始めとする様々なストレス、*c-myc* を始めとする癌遺伝子により発現誘導されるため、転写制御研究のモデルとして、また *hsp70* がタンパク質分子の分子内チャペロンとしての機能が明らかになってきたことから、近年極めて注目されている材料である。しかしながら、DNA 複製開始様式、*c-myc* などによる発現促進の分子的基盤はほとんど明かでない。

本論文の第1, 2章では *c-myc* による *hsp70* の転写制御に関して解析している。当研究室では *c-myc* 遺伝子上流の転写エンハンサー／DNA 複製開始領域に *c-myc* タンパク質複合体が結合し、その必須配列が TCTCTTA であることを明かにしている。申請者はこれと類似の配列を *hsp70* プロモーター内の -180, -230 付近に認め、まずこの領域に *c-myc* タンパク質複合体が結合するかを種々の分子生物学的手法で解析した。この領域(上流より *mycA*, *mycB* と名づけた)には現実に *c-myc* タンパク質が分子量10-20kDa のタンパク質と複合体形成して結合してきた。さらに CAT アッセイの結果、この領域が *c-myc* タンパク質による *hsp70* の転写調節を担っている領域であることが明かになった。

第3章においては *hsp70* 遺伝子の現実に機能している DNA 複製開始領域 *ori* を決定した。1990年に Vassilev and Johnson により BrdU ラベルと PCR を応用した *ori* の決定法が開発された。申請者はヒト HeLa 細胞中の *hsp70* 遺伝子にこの方法を応用し *ori* 領域を決定したところ、上述の転写プロモーターを含む700-1000塩基対が *ori* 領域であることが分かった。

この *ori* 領域は現在の方法ではこれ以上狭い領域まで限定できないため、第4章で、申請者はこの領域の自律増殖能を検討した。一般に *ori* を含むプラスミド DNA は細胞に導入した場合、染色体外で自律複製し、これを自律増殖配列 ARS と呼ぶ。申請者は *mycA*, *mycB* 領域を含む約100塩基対のプラスミド DNA が HeLa 細胞で ARS 活性を示すことをまず示し、次に *mycA*, *mycB* 配列のみのクローンも同様であり、*c-myc* タンパク質複合体結合能を失った変異を導入した配列では ARS 能を示さなかった。このことは、*mycA*, *mycB* 配列が *c-myc* タンパク質複合体結合と共に DNA 複製に必要な配列であることを示しており、この領域が同時に転写調節に必要な配列であることから、転写と DNA 複製の連動を綺麗に示した。

第5, 6章ではこの *mycA*, *mycB* 配列のプラス鎖に結合するタンパク質を解析している。このタンパク質も2本鎖の時と同様に一部は *c-myc* タンパク質と複合体形成していた。サウスイェターン法で分子量を解析すると少なくとも5種類以上のファミリーを成していることが明かに成った。この結合様式は上述の *mycA*, *mycB* 配列の ARS 能と強い相関性を示し、複製または転写制御に関与している可能性が高い。このタンパク質群を HSBP と名づけた。

第7章ではこの HSBP の cDNA クローニングを行った。得られた一つのクローン HSBP-1 は DNA 結合タンパク質に良く見られる zinc finger 構造を有しており、現実に *gst* との融合タンパク質を作成し、精製して検討した結果、Zn 存在下で DNA 結合能を示した。今後このタンパク質の機能解析が期待される。

これらの結果は既に国際的科学雑誌3報に掲載済みまたは投稿中であり高い評価を得ている。

以上のように、本論文は *hsp70* 遺伝子の DNA 複製と転写制御、それから導かれた DNA 複製と転写の連動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。