

学位論文題名

c-myc 遺伝子 DNA 複製開始／

転写調節タンパク質の同定と機能解析

学位論文内容の要旨

c-myc遺伝子は、癌細胞で発現レベルが高く、正常細胞においても細胞周期に依存した発現レベルの上昇が認められる。これまでに、mycタンパク質の機能は、細胞増殖や分化、アポトーシス(プログラムされた細胞死)、癌化に関与し、核内においてDNA複製や転写開始における様々な制御が示唆されているが、詳細な機能について未だ明らかにされていない。

当研究室では、ヒト c-myc 遺伝子の第1エクソンの約2キロ塩基对上流の HindIII-PstI 領域内に TCTCTTAT 配列を含むエレメントが DNA複製開始及び転写調節に必須であり、そのエレメントに c-mycタンパク質を含む複合体が結合することを明らかにしてきた。又、SV40-DNA複製開始領域の DNA塩基配列を部分的に TCTCTTAT 配列に変換した場合でも SV40の DNA複製活性があることを示した。そこで TCTCTTAT 配列に結合する c-mycタンパク質複合体の性状と機能を解析することが DNA複製或いは転写調節機構の解明につながると考え、c-mycタンパク質の会合タンパク質の同定及び cDNA クローニングを行ない、その機能について解析したので以下報告します。

過去、我々を含む様々なグループによりc-mycタンパク質と様々なタンパク質とが複合体を形成することが報告されてきた。特に、Maxタンパク質は、ロイシンジッパーを介して c-mycタンパク質と複合体を形成し、当研究室で報告してきた配列とは、全ったく異なった塩基配列、即ち、CACGTGという結合配列(CM-1配列)を認識します。CM-1配列を有する遺伝子として ECA39という未分化細胞特異的な遺伝子が見い出され mycにより活性化されますが、Maxタンパク質との複合体形成による活性化は、認められません。又、myc/maxの正常細胞での標的遺伝子は、まだ、解明されていない。そこで本研究におきまして当研究室で報告してきた c-mycタンパク質複合体の結合配列、TCTCTTATと myc/maxの結合する配列、CM-1配列を用い、c-mycタンパク質複合体の性状を比較検討した。その結果、両配列に結合するタンパク質複合体は c-mycタンパク質を含むことが示唆された。又、myc(H-P)コア配列には分子量約84kDaのタンパク質が、CM-1配列には84kDaと88kDaのタンパク質が結合していることが判明し、この両者塩基配列に結合する c-mycタンパク質複合体に関して以下の説明が可能となる。即ち、c-mycタンパク質は、複合体を形成する会合タンパク質によって異なる DNA塩基配列を特異的に認識し、少なくとも myc(H-P)コア配列には CM-1配列に結合する複合体(c-myc/Maxタンパク質)とは異なるタンパク質複合体を形成していると考えられた。

一般に DNA複製や転写開始には、DNA結合タンパク質による二本鎖 DNAの認識後、その領域が開裂し、DNAやRNAの伸長反応が行なわれると考えられている。そこで更に、同様の配列に複製や転写調節に関与すると考えられる塩基配列特異的な一本鎖 DNA結合タンパク質の有無を調べるため、myc(H-P)21配列の一本鎖 DNAをプローブとしヒト前骨髄球白血病由来 HL-60細胞の粗核抽出物を用いてバンドシフト法及びサウスウエスタン法により解析を行なった。その結果、myc(H-P)21配列のプラス又はマイナス一本鎖 DNAに塩基配列特異的結合する8種類の異なる分子量のタンパク質群が同定され、これらのタンパク質を MSSP(c-myc gene single strand binding proteins)と命名した。このうち幾つかの複合体は抗 c-myc抗体

により複合体形成が阻害されることから、1本鎖上においても2本鎖と同様に c-mycタンパク質複合体が結合していることが判明した。そこで MSSPの cDNA を単離する為に HL-60細胞の cDNAライブラリーを用い、myc (H-P) 21配列の1本鎖 DNAをプローブとしてサウスウエスタン法により cDNAクローニングを試みた。

得られたクローン、MSSP-1は、全長1,116 bpの open reading frame を持ち 372 アミノ酸残基から成ると推測された。アミノ酸レベルでのコンピューター相同性検索を行なったところ、部分的に RNA 結合タンパク質や1本鎖 DNA結合タンパク質と相同性を有し、RNP-コンセンサスモチーフが見いだされた。又、大腸菌内で発現及び精製した MSSP-1/GSTを用いた結果より、MSSP-1タンパク質は、myc (H-P) 21配列の2本鎖及びプラス又はマイナス1本鎖に塩基配列特異的に結合し、その認識配列は ATCTATA/T Tであることが判明した。又、MSSP-1が細胞周期に依存した発現をしているかをラット3 Y1細胞を無血清培地内で培養した同調細胞を用い、ノーザンブロット法により解析した。結果より細胞周期の G1 から S 期に、一過性の上昇が認められた。又、臓器においては、c-myc との協調発現、即ち、c-myc の発現している臓器でのみ認められ c-mycとの協調発現が確認された。

これまでに当研究室において SV40-DNA複製開始領域内の AT rich 配列に分子量約 50kDa のタンパク質、SOAP (SV40-myc origin associated protein) が結合していることを報告した。又、AT rich 配列は、TCTCTTAT 配列に機能上変換可能なことから、MSSP-1と SOAPは類似のタンパク質である可能性が考えられた。そこで、両者タンパク質の DNA 結合能及び細胞周期での発現について比較した結果、MSSP-1と SOAPは同一か、極めて類似のタンパク質であると考えられた。

前述した様に TCTCTTAT 配列、即ち MSSP-1結合配列が DNA複製開始に必須であることを報告してきた。そこで MSSP-1タンパク質が塩基配列に依存した DNA複製能を有するかを調べる為、TCTCTTAT 配列に依存した SV40の複製モデルを用いて検討した。その結果、TCTCTTAT 配列を持つプラスミドに対する DNA複製活性は MSSP-1発現ベクターの添加量に応じて増強していることが判り、MSSP-1タンパク質は、DNA複製促進因子であることが明らかとなった。さらに、MSSP-1タンパク質が c-myc 遺伝子 H-P 領域内の塩基配列に依存した転写調節をしているか否かを調べるため、TCTCTTA 塩基配列を含む myc (H-P) 21 配列を heteroな SV40プロモーターとルシフェラーゼ遺伝子を持つプラスミドに連結し、MSSP-1発現ベクターと共に HeLa 或いは CHO 細胞に導入しルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、SV40プロモーターに作用し、そのレベルが高く、myc (H-P) 21配列への依存性は明らかでなかった。MSSP-1タンパク質結合配列と相同性の高い配列を検索したところ SV40プロモーター領域内の TATA boxと重複する AT rich 配列であると推測され、その配列を欠損させると MSSP-1による活性増強が見られないことから、ATrich/TATAbox に依存して転写活性を促進し、MSSP-1タンパク質が転写調節因子であることが判明した。

次に MSSP-1タンパク質の他のバイオロジカルな機能としてトランスフォーミング能について検討した。その結果、MSSP-1は、ras、myc によるトランスフォーミング能を促進したが、MSSP-1単独では活性促進は認められなかった。この結果は、MSSP-1がプロモーターに作用した為でなく c-mycとの何らかの協調作用によるためと考えられた。

以上、本研究の結果より MSSP-1タンパク質は、c-myc、転写開始因子などと相互作用する DNA複製/転写調節因子であることが明らかとなった。

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 沢 田 均

学 位 論 文 題 名

c-myc 遺伝子 DNA 複製開始／ 転写調節タンパク質の同定と機能解析

c-myc遺伝子は殆ど全ての癌細胞で発現高進をしているばかりでなく、増殖期の正常細胞で発現しており、細胞増殖、細胞癌化との関連で多くの研究がなされてきたが今だにその分子機能は不明の点が多い。c-mycタンパク質は核内に存在し、DNA結合能を有し、正常細胞ではG1→S期で発現する。当研究室を含むいくつかの研究の結果より、c-mycタンパク質は転写とDNA複製因子として、細胞増殖、細胞分化、細胞死において重要な機能を果たすことが明かになってきた。この正常な機能からの何等かの逸脱が細胞癌化をもたらすと考えられる。一般にこうしたタンパク質が機能する際、単独で働くというよりも幾つかのタンパク質と複合体形成し機能する。本研究室においては、c-myc遺伝子上にDNA複製開始領域を同定し、そこが同時に転写エンハンサーとして機能することを最初に見出し、その必須配列21塩基対を同定した。この21塩基対にはc-mycタンパク質複合体が結合することが次に明かにされた。その後、アメリカのグループが我々と異なる塩基配列にc-mycタンパク質がMAXと名づけたタンパク質と複合体形成して機能することを発表した。しかしながらc-myc/Maxのターゲット配列は未だに明かでない。

そこで本学位論文申請者 根岸洋一は我々のc-myc遺伝子上のターゲット配列TCTCTTA(c-myc core)とc-myc/Max認識配列CACGTG(CM-1)との相互関連より出発し、次にc-mycタンパク質複合体形成タンパク質としてc-myc core配列に結合するタンパク質群MSSPを同定し、その一つのcDNA, MSSP-1をクローニングし、その構造解

析と転写、複製における機能を解明した。

1、c-myc coreとCM1配列におけるc-mycタンパク質複合体の相関

本研究室では抗c-myc抗体を利用してc-myc遺伝子上流のHindIII-PstI((H-P)領域)にc-mycタンパク質複合体が結合し、転写とDNA複製開始調節に機能することを報告した。この結合及び機能に必須な配列はTCTCTTA配列(c-myc core)であることを次に明かにしてきた。アメリカのグループはc-mycタンパク質はhelix-loop-helix, basic region, leucine zipper構造を有するため、この種のタンパク質はCA--TG配列を認識する筈であるとの仮定のもと、内部2箇所を機械的に変換しCACGTG配列(CM1)を同定し、そのタンパク質複合体形成タンパク質としてMaxをクローニングした。そこで申請者は両者の結合配列を相互にコンペイターに用いるバンドシフト及びUVクロスリンク法により解析し、両組合せで相互に阻害されること、即ち共通のタンパク質c-mycタンパク質を介して異なるパートナーが存在し、異なった組み合わせにおいては異なった配列、即ちCM1にはc-myc/Max、c-myc core 配列には後述のc-myc/MSSPが結合することを証明した。現時点では一般にc-mycタンパク質のパートナーとして10種類以上のタンパク質を想定しているが、この結果はこうした概念の発端となった。

2、MSSPの同定とcDNAクローニング

c-myc core配列は転写エンハンサーであり、同時にDNA複製開始領域である。DNA複製開始を考えた時、ある特定の配列が認識され、次に鎖が開裂する。開裂した一本鎖DNAを2本鎖と同様認識するタンパク質が存在しても良い。そこでc-myc core配列のプラス鎖をプローブとしてそこに結合するタンパク質を解析した。いくつものタンパク質が存在し、それらをMSSPと命名した。抗c-myc抗体の添加により、DNA-タンパク質複合体形成が阻害されることより、2本鎖DNAの場合と同様1本鎖c-myc coreにもc-mycタンパク質複合体が結合することが判明した。分子量が異なる少なくとも7種類のタンパク質がMSSPファミリーとして存在することが次に明らかになった。ヒトHL60cDNAライブラリーより一本鎖c-myc coreをプローブとしたサウスウェスタン法によりcDNAクローニングを次に行い、MSSP-1を単離した。MSSP-1はSDS-PAGE上で分子量50,000のタンパク質であり、内部にRNA結合タンパク質と知られる一群のタンパク質が保持するRNP-1ドメインを2箇所有していた。この領域はDNA結合能に必須であり、1本鎖核酸結合配列と呼んだ方が良いかもしれない。次にglutathion-S-transferaseとの融合タンパク質として大腸菌内で発現後、精製したタンパク質を用いてDNA塩基配列結合特異性を解析したところ、TCTCTTA配列を中心とした塩基を認識した。更にこのMSSP-1は2本鎖c-myc coreに

も同様に結合し、1で述べたタンパク質はMSSPであることが判明した。MSSP-1の発現はc-mycと連動、即ち細胞周期のG1→S、c-mycタンパク質の発現している臓器のみで発現しておりその機能を考える上で重要である。

3、MSSP-1とSOAP

当研究室のIvo Galliにより動物ウイルスSV40のDNA複製開始必須領域に存在するAT rich配列を認識するタンパク質としてSOAPが同定された。SOAPは1、2本鎖DNAを認識する複製タンパク質である。MSSP-1同様分子量50,000ダルトンであり、タンパク質の発現としてはS期でピークを迎える。従ってMSSP-1とSOAPは類似のタンパク質と考えられた。両者のDNA結合配列の特異性を両者のプローブ、タンパク質のいくつかの組合せで検討したところ、結合特異性は全く同一であった。更に、タンパク質分解酵素で限定分解したタンパク質を用いたバンドシフト実験より両者が同一のペプチドを有することから、MSSP-1とSOAPは同一または極めて類縁のファミリータンパク質であることが明かとなった。現実に既にIvo Galliの実験により、SOAPの認識配列をTCTCTTAに変換したSV40DNAが複製能を有していることが判明しているのでこの関係の重要性が浮かび上がった。

4、MSSP-1の転写とDNA複製における機能

上述のようにMSSP-1とSOAPとは同一または極めて類縁のタンパク質である。そこでSV40DNA内のSOAP認識配列(TATA boxと重複したAT rich配列)をMSSP-1認識配列TCTCTTAに変換したレポーター遺伝子を用いてMSSP-1のDNA複製における効果を培養細胞を使用してのトランスフェクション実験で検討した。MSSP-1添加によりSV40DNAは濃度依存的に複製活性上昇が観察され、MSSP-1の塩基配列特異的DNA複製への関与が示された。次に同様な配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター遺伝子を用いて転写への効果を検討した。同様に塩基配列特異的に転写活性が促進され、MSSP-1の転写因子としての機能が明かとなった。しかしながら、MSSP-1は他の種々の転写プロモーター活性を抑制することが判明した。c-myc遺伝子上のc-myc core配列はc-myc、MSSP-1の絶対量が少ない時は転写活性に必須である。しかしながらMSSP-1の絶対量が多い時は抑制に回る。この事実は細胞周期との関わりを考えると考え安い。即ちc-myc/MSSP-1量が少ないG1期では転写促進に機能し、量が増加するS期に入ると転写を抑制しDNA複製を活性化する。この時、MSSP-1/c-mycのターゲットはG1期ではc-myc core配列であり、S期においてはTATA Boxを含む転写開始複合体と考える。細胞周期調節と転写と複製の連動を考える際、極めて重要と考えられる。次にMSSP-1の細胞癌化能、即ち細胞トランスフォーメーション能をラット3Y1細胞を用いて検討した。MSSP-1は単独或は

c-myc、rasとの組合せでは何等効果を示さなかったがras/c-myc/MSSP-1の組合せでトランスフォーメーション活性を増強した。従ってMSSP-1過剰発現における細胞癌化への関与が示された。

以上のように、申請者はc-myc複合体形成タンパク質MSSPでの研究により、DNA複製、転写の連動、細胞周期調節、細胞癌化機構を分子レベルで詳細に解析し多大の新知見を得た。これら主論文は既に国際的科学雑誌2報に掲載され、関連論文も数報に及ぶ。従って、申請者、根岸洋一は博士(薬学)を授与するに充分であると判断された。