

学位論文題名

Structural Analysis of the Human MSSP Genes

(ヒト *c-myc* 結合蛋白質 MSSP 遺伝子の構造解析)

学位論文内容の要旨

The increasing amount of evidence for the involvement of the malfunction of genes in oncogenesis has led to the discovery of a variety of potential cancer genes. These genes are normal cellular genes, carefully controlled in every cell type, whose crucial functions in cell proliferation and differentiation are mimicked by certain highly resembling retroviral genes responsible for the malignant transformation of their host cells.

One of their best-known representatives is *c-myc*, in whose delicately regulated expression a variety of *cis* and *trans* elements are suggested to be involved. MSSP proteins have been identified by their binding to an upstream element of *c-myc*. Independently, two different approaches yielded two cDNA clones highly homologous to the MSSP cDNAs, suggesting an involvement of MSSP in the regulation of the cell cycle (*scr2*) and in the repression of HIV-1 and ILR2 alpha promoter transcription (human YC1).

Screening human genomic libraries, clones belonging to two different gene loci have been isolated. Whereas the human MSSP gene 1 turned out to be intronless, the organization of the coding sequence within gene 2 is more complex. It spans more than 60 kb and contains at least 15 exons, ranging from 48 to 287 bp. The intron sizes vary from 0.1 to more than 13 kb.

Gene 1 has been completely sequenced. A deletion series of its upstream region was cloned upstream of the luciferase gene, but the transfection of these

constructs did not show any promoter activity. This result and the occurrence of about 20 point mutations, compared to the cDNA sequences known so far, suggest that the *MSSP* gene 1 is a processed retropseudogene.

Sequence analysis of a 1.7 kb fragment of the 5' flanking region of the *MSSP* gene 2 revealed that the promoter of gene 2 lacks consensus sequences for TATA and CCAAT boxes, is GC-rich, and contains numerous potential transcription factor binding elements, including Sp1 and AP-2. The principal site of transcription initiation was determined by primer extension analysis and shown to be at an adenine residue located 57 nucleotides upstream from the initiator methionine codon. Luciferase assays employing progressive deletions of the 1.7 kb promoter region revealed a complex pattern of transcriptional regulation of the human *MSSP* gene 2 promoter and defined a minimal region of 428 bp (-488/-61). Furthermore, it can be concluded that the *MSSP* gene 2 encodes both *MSSP*-1 and *MSSP*-2, and moreover *scr* 2 and human YC 1.

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 加 藤 宏 幸

副 査 講 師 澤 田 均

学 位 論 文 題 名

Structural analysis of the human MSSP Genes

(ヒト c-myc 結合蛋白質 MSSP 遺伝子の構造解析)

MSSPは癌遺伝子c-myc遺伝子上のDNA複製開始/転写エンハンサー結合タンパク質として同定され、当教室でそのcDNAが2種 (MSSP-1, MSSP-2) クローニングされた。MSSPは1本鎖、及び2本鎖DNAに塩基配列特異的に結合し、転写、複製因子として機能する。MSSPはファミリーを成すタンパク質で、他のグループにより、細胞周期のG1/S チェックポイント遺伝子であるcdc2 のサプレッサーであるScr2, Scr3、HIV-1, IL2R 遺伝子のサイレンサー結合タンパク質としても別個cDNAクローニングされた。更にMSSPは、C-MYC, cdk2, DNAポリメラーゼ α などの転写、複製、細胞周期関連タンパク質と複合体形成する。以上のことから、MSSPファミリータンパク質は転写、複製因子として、細胞周期調節、細胞癌化、アポトーシスに関与すると考えられる。また、その発現はc-mycと協調している。則ち、細胞周期のG1→S期に発現し、増殖能の高い細胞で発現が高く、細胞増殖に密接に関連したタンパク質群と考えられる。こうしたタンパク質の発現制御は、その遺伝子上の種々の転写調節エレメントとそこに結合するタンパク質群によって一般に規定されている。例えば、c-myc遺伝子の細胞周期依存的発現には、転写因子E2Fがc-myc遺伝子上のエンハンサーに結合することが必須であることが知られている。また、タンパク質のin vivoでの機能解析に、現在のテクニックとしては、その遺伝子の欠損動物（マウス、ラットなど）を作成することが日常的に行われており、こうした遺伝子の発現制御およびタンパク質の機能解析にはゲノムDNAのクローニングが必須である。

本学位論文においては、まず、MSSP-2 cDNAをプローブとして、ヒト胎盤ゲノムライブラリーをスクリーニングし、gene 1 を単離した。このDNAはイントロンを有さない遺伝子で、MSSP-1 のゲノム遺伝子と最初考えられた。しかしな

から、プロモーター領域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作成し、プロモーター活性を検討したところ、全く活性を有しないことから、偽遺伝子であると結論された。そこで、新たなスクリーニングを再開し、gene 2 を単離した。しかしながら、解析を進めていくにつれて、この MSSP 遺伝子群が、そのコードするタンパク質の分子量がたかだか 50 KDa にもかかわらず、全長が 60 kbase pairs にも及び、エキソンが 16 個以上有する長大なものであることが明らかとなり、完全長の遺伝子 DNA をクローニングすることは困難を極めた。通常、分子量 50 KDa 程度のタンパク質のゲノム DNA は 10-20 Kbase であるのが普通である。そこで、通常の DNA-DNA ハイブリダイゼーションに加え、cDNA 上の種々の領域に対応する塩基配列をもとに、多くの PCR 用プライマーを設定し、HeLa 細胞 DNA を鋳型とした PCR を組合せ、ほぼ全長をクローニングした。現在まで、あと 2 カ所のエキソンが連結していないが、PAC ライブラリーでの新たなスクリーニングにより、これらをカバーするクローンが得られ、現在解析している。このクローニングに実に 3 年以上を費やしたことは、本人の未熟さと、実験量の不足をも加味したといえ、この長大な遺伝子故にいたしかたないといえる。こうした長大な遺伝子のクローニングはえてして、途中で挫折することが多々あるが、この点を克服したことは努力賞ものといえる。

次に申請者は得られた遺伝子の構造解析の結果、MSSP-1, MSSP-2 はスプライシングの違いによって生じることを明らかにした。則ち、MSSP-1, MSSP-2 の唯一の違いである MSSP-2 に見られる 48 塩基対 (16 アミノ酸) が第 12 エキソンに由来することを示した。このアミノ酸の挿入により、タンパク質の細胞内の局在が核から細胞質に変化する点を考えると極めて興味深い。また、得られたエキソン-イントロンの境界領域の塩基配列を決定したところ、全て Chambon rule に従っており、エキソンとしての長さは 50-600 塩基対に渡っており、C 末に近い cDNA に対応するエキソンは、サイズの小さいものが連続して存在した。遺伝子の進化を考えると興味深い。

次に申請者は転写調節領域の解析を行い、まず転写開始点を決定し、上流約 2Kb まで塩基配列を決定し、プロモーターには典型的な TATA box が存在せず、GC box がプロモーター活性を有することを明らかにしました。更に種々の欠損変異株を作成することで、上流約 2Kb までには少なくとも、サイレンサー、エンハンサー領域が各 1 個存在するを明らかにしました。今後は、その詳細な解析、則ち cis, trans element の同定、細胞周期での発現パターンなど、が望まれる。

また、本論文は英語で書かれているが、練れた文章であります。

以上の審査の結果、申請者クリスティアンに博士（薬学）の学位を与えるにふさわしいと判断された。