

学 位 論 文 題 名

MSSP 複合体による細胞周期調整と癌化

学位論文内容の要旨

【序論】

がん遺伝子産物 c-Myc は細胞周期進行、細胞トランスフォームやアポトーシスの重要な因子である^{1,3)}。c-Myc の N 末端側には、Myc ファミリーで保存された Mycbox が、C 末端側には b-HLH-LZ ドメインが存在し、c-Myc の細胞トランスフォーム、アポトーシス、転写活性化に重要であると考えられている。また c-Myc は、様々な因子と複合体を形成しており、そのうち Max は、c-Myc と結合し、転写活性化能や細胞トランスフォームを促進する。現在までに、c-Myc が転写調節する遺伝子が、約 30 種報告されているが、c-Myc(-)細胞の樹立、転写能はないが他の機能を全て有する c-Myc-S の存在から、これらが全て真のターゲットであるのか疑問視されている。これらの背景より c-Myc と他の因子の相互作用による機能調節が重要視されている。また、DNA 複製は細胞が増殖することにおいて、重要なイベントの一つであり、真核細胞において、DNA 複製を担う DNA polymerase 複合体は、5 種類が報告されている⁴⁾。そのうち DNA polymerase α (pol α) は、SV40 ウイルスの DNA 複製で T 抗原と pol α は相互作用しながら、機能することが解っている⁵⁾。また MSSP は、ヒト c-myc 遺伝子上流の転写エンハンサー/複製開始部位 myc(H-P)21 配列に結合し、転写・複製因子として機能する MSSP を報告している⁶⁾。MSSP は RNA 結合モチーフ RNP を 2 つ有し、DNA 結合、転写、複製、myc とのトランスフォーム、アポトーシスに必須である。そこで今回、MSSP が c-Myc、Max と 3 者複合体を形成し、転写活性化の抑制に関与する知見を得た⁷⁾。また、MSSP と pol α の相互作用についても解析した。

【結果/考察】

Pull-Down assay や免疫沈降によって、MSSP は RNP を介して、c-Myc の DNA 結合に関与する C 末端領域の塩基性領域付近に結合することが示された。また、Max は、c-Myc の leucine zipper に結合する。したがって、MSSP と Max は別の領域で c-Myc に結合していることが示された。次に、MSSP、c-Myc、Max の 3 者での複合体形成の可能性を検討したところ、Max は MSSP とは直接結合せず、c-Myc を介して MSSP/c-Myc/Max の 3 者複合体が形成することが明らかになった。

c-Myc は Max と結合し E-box 転写を活性化する。そこで、c-Myc/Max の DNA 結合への MSSP の影響を Band-shift assay で検討した。c-Myc/Max に対して、MSSP/c-Myc/Max 3 者複合体は、DNA 結合性が減少していた。これは、MSSP が c-Myc/Max に結合して DNA 結合領域を阻害しているのではないかと考えられる。次に、c-Myc 転写活性に対する MSSP の影響を Luciferase assay で検討した。その結果、c-Myc の E-box 転写活性化能は、MSSP により抑制された。これより、MSSP は c-Myc/Max に結合して c-Myc の DNA 結合

部位をマスクしてE-box から解離し、転写抑制することが示唆された。

またc-Myc/H-Ras は細胞を協調的にトランスフォームする。そこで、c-Myc/H-Ras 及び MSSP を NIH3T3 細胞に導入しトランスフォームに与える影響を検討した。その結果 MSSP は、c-Myc/H-Ras と協調的に細胞トランスフォームすることが示された。これは、MSSP の c-Myc/H-Ras との協調的細胞トランスフォームは E-box を介する経路以外で機能しているのではないかと考えられる。

さらに、MSSP と pol α の相互作用を検討した。まず、MSSP と pol α の結合を免疫沈降法により検討したところ、KB 細胞において結合が確認された。また、Pull-Down assay により、MSSP は pol α の N 末端の 1-116 アミノ酸領域に結合した。また、MSSP は *in vitro* polymerase 活性を増強させることが明らかになった。

複製開始部位に MSSP は結合する。そこで、MSSP の DNA 結合能に pol α が、どのように影響するか、プローブに myc(H-P)21 配列を用いた Band-shift assay を行ったところ、pol α 存在下で MSSP の DNA 結合能が減少した。これは、複製開始因子として機能している MSSP に pol α が作用することが示唆される。さらに、MSSP が DNA から解離することは、MSSP が pol α を複製開始点に呼び込み、解離することで更なる DNA 複製の伸長反応に結びついているのかもしれない。

また、MSSP は、cdk2 とは間接的に、PCNA とは直接結合した。これらの因子と MSSP の相互作用の生物学的意義は明らかになっていない。

これらの実験結果より、MSSP は転写と DNA 複製の両面で機能している多機能タンパク質であると考えられる。MSSP 独自で複製開始反応に関与すると共に c-Myc を転写反応から DNA 複製反応へと変換をつなぐためのアダプターとしての機能を合わせて持っていると考えられる。細胞トランスフォーム能の増強は pol α を活性化し、DNA 複製の促進させることで細胞が異常に増殖することによるのではないかと考えられる。

【まとめ】

MSSP は、c-Myc と直接結合し、さらに c-Myc を介し Max と 3 者複合体を形成する。その 3 者複合体は、MSSP が c-Myc の DNA 結合領域をマスクしているため E-Box に結合できず、転写を抑制する。また、c-Myc/H-Ras と協調的に細胞トランスフォームを促進する。MSSP は、poly α の p180 と直接結合し、DNA polymerase 活性を増強する。また、MSSP は、cdk2 とは間接的に、PCNA とは直接結合する。

【参考文献】

- 1) Obara, A.J., Mateyak, M.K. & Sedivy, J.M. (1999). *Oncogene*. 18, 2934-2941.
- 2) Classen, G.F. & Hann, S.R. (1999). *Oncogene*. 18, 2925-2933.
- 3) Prendergast, G.C. (1999). *Oncogene*. 18, 2967-2987.
- 4) Wang, T.S.-F. (1991). *Annu. Rev. Biochem.* 60, 513-552
- 5) Dornreiter, I., Copeland, W.C. & Wang, T.S.-F. (1993). *Mol. Cell. Biol.* 13, 809-820.
- 6) Negishi, Y., Nishita, Y., Saegusa, Y., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. (1994). *Oncogene* 9, 1133-1113.
- 7) Niki, T., Izumi, S., Saegusa, Y., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M.M. & Ariga, H. (2000). *Genes Cells in press*

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 横 澤 英 良

副 査 助 教 授 澤 田 均

副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

MSSP 複合体による細胞周期調整と癌化

MSSP は癌遺伝子 c-myc の転写エンハンサー/DNA 複製開始領域に直接結合するタンパク質として、本研究室で cDNA クローニングされた。MSSP は c-Myc 同様、多機能タンパク質であり、DNA 複製、転写制御、アポトーシス誘導などを行う。一方、転写因子としての機能で c-Myc の全ての機能を従来説明しようとしてきたが、c-Myc の低い転写活性化能、転写能を有さないが他の全ての機能を有する c-Myc-S の発見などから、多様な c-Myc 機能は転写因子として直接ターゲット遺伝子に結合して転写活性化するのに加えて、他の様々なタンパク質との結合により機能調節することが示唆され、ここ数年 c-Myc 結合タンパク質の同定が積極的に行われている。本研究において、MSSP が c-Myc に直接結合して、c-Myc の転写能の抑制、及び細胞癌化能の促進活性を有すること、更に DNA 複製因子である DNA ポリメラーゼ α に結合し、その複製活性を増強させること、さらには PCNA, cdk2 などの細胞周期の G1/S の進行、複製開始に関与するタンパク質群にも結合することを見出し、MSSP がどのように細胞周期調節に関与することを検討した。

1. MSSP の c-Myc 結合する c-Myc の転写、トランスフォーメーション能への影響

以前の本研究室の結果から、MSSP が c-Myc と複合体形成することが示唆されていた。そこで、完全長の c-Myc, MSSP を大腸菌内で発現後、精製したタンパク質を利用して、*in vitro* pull-down 法、共免疫沈降法で両者の直接の結合を検討した。その結果、MSSP の機能ドメインである RNP 配列を介して c-Myc の C 末に直接結合することが明らかとなった。この結合は *in vivo* 培養細胞でも確認された。c-Myc は C 末に basic-helix-loop-helix-leucine zipper (bHLHZip) 構造を有し、Zip で Max と呼ばれるタンパク質と結合し、この複合体が basic region を介して E-box と呼ばれる CACGTG 配列に結合する。そこで、種々の欠損 c-Myc 変異体を作成し MSSP の c-Myc 結合領域を同定したところ、basic region 付近に結合した。Max の c-Myc 結合配列と異なることから 3 者の関係を *in vivo*, *in vitro* で検討したところ、Max は MSSP とは直接結合しないが c-Myc を介して、c-Myc, Max, MSSP 3 者複合体形成することが判明した。E-box へのこの複合体の結合能を検討したところ、MSSP は c-Myc-Max と 3 者複合体形成し、c-Myc の basic region をマスクすることで E-box から解離させることが判明し、結果として E-box を介す

るc-Myc の転写活性化能を抑制した。この抑制はc-Myc の結合能を有さないRNP 欠損MSSP では生じないことより更に確認された

次に、c-Myc のRas との協調的細胞癌化能に対するMSSP の影響を検討するために、マウス NIH3T3 細胞にMSSP, myc, ras を種々の組み合わせで導入しトランスフォーメーションアッセイを行った。MSSP は単独ではトランスフォーメーション活性は有しないが、myc/ras によるトランスフォーメーション活性を増強し、RNP 欠損MSSP変異体にはその効果は失われていた。更に重要な事は、myc/ras/MSSP でトランスフォームした細胞は極めて増殖能が高く、軟寒天中で大きなコロニー形成した。この活性はMSSP のDNA複製と全くパラレルであり、癌細胞樹立後の増殖にMSSP が深く関与していることを示していた。

2. MSSP とDNAポリメラーゼ α との結合によるポリメラーゼ活性の増強

次にMSSP が複製因子であり、また上述のトランスフォーム細胞の増殖を促進することから、DNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ α との結合を1と同様な方法で検討した。DNAポリメラーゼ α は180 kDa のタンパク質であり、MSSP はDNAポリメラーゼ α のN末約100 アミノ酸に直接結合した。SV40 のDNA複製開始因子であるT 抗原はDNAポリメラーゼ α N末 200-300 アミノ酸に結合することが知られているが、よく類似していた。MSSP はc-Myc 同様RNP 領域を介してDNAポリメラーゼ α と結合していた。MSSP はc-myc 遺伝子の複製開始領域の一つとして本研究室で同定した myc(H-P) 領域に結合する。そこで、MSSP のmyc(H-P)結合に対するDNAポリメラーゼ α の効果を検討したところ、MSSP はDNAポリメラーゼ α と結合することでmyc(H-P) から解離することが明らかとなった。次に、精製したMSSP, DNAポリメラーゼ α を使用してMSSP のポリメラーゼ活性への影響を検討したところ、MSSP はDNAポリメラーゼ α 活性を極めて強く促進した。これらの結果は、MSSP は一旦複製開始領域を認識し、次にDNAポリメラーゼ α を引き寄せ、何らかの構造変換などを通じて複製活性を増強するらしいことが示唆された。

3. MSSP のcdk2, PCNA との結合

次にDNA 複製開始に関与するcdk2, 複製の伸長に関与するPCNA とMSSP との関係を *in vivo*, *in vitro* にて検討した。MSSP はcdk2 とは他のタンパク質を介して、PCNA とは直接結合することが明らかとなった。

これらの知見はMSSP は細胞周期、とりわけG1/S 境界点において様々なタンパク質と次々に結合し、S 期への進行、とりわけ複製活性を直接増強し、結果として癌細胞の増殖を担っているらしいことが示唆された。

以上の結果はc-Myc 結合タンパク質 MSSP の機能解析に重要な知見を与えており、学位論文にふさわしく、薬学博士として仁木剛史を推薦するものである。