

学 位 論 文 題 名

Characterization of promoter and targeted  
mutagenesis for MSSP gene which  
encodes C-MYC binding proteins

(ヒト C-MYC 結合タンパク質 MSSP 遺伝子の  
プロモーター及びジーンターゲティング法による解析)

学位論文内容の要旨

当研究室では、ヒト *c-myc* 遺伝子第一エキソンの約 2 kb 上流に DNA 複製開始部位及び転写活性化のエンハンサーが存在することを同定した。これらの機能には TCTCTTA 配列を含む 21 bp のコア配列が必須であり、その両一本鎖に特異的に結合し *c-myc* タンパク質と複合体形成する細胞タンパク質群として MSSP (*c-myc* single strand binding proteins) が同定された。MSSP は、2つの RNP ドメインを持ちこの領域で *myc* (H-P)21 の両一本鎖及び二本鎖に結合すること、SV40 DNA を用いた実験系において DNA 複製活性を増強すること、 $\alpha$ -smooth actin のプロモーター活性を抑制することが既に報告されている。また MSSP の 2つの RNP-1 ドメインが C-MYC との結合に必須であることも明らかとなった。一方、阪大の野島のグループが *cdc2* (*cdc13*)kinase を欠損させた *Schizosaccharomyces pombe* を補う Scr2 と Scr3 (suppressor of *cdc2* (*cdc13*) with RNA binding motif) をコードする cDNA クローンそして、他のグループによって HIV-1 及び IL2 receptor alpha promoter の repressor タンパク質として human YC1 (GenBank L11289) がクローニングされ、塩基配列は MSSP と極めて類似していた。また当研究室で MSSP-1 cDNA をプローブとし、ヒトゲノム DNA を用いスクリーニングを行った結果、異なる二種類の遺伝子座を同定した。これらを *MSSP gene-1*, *MSSP gene-2* と名付けた。*MSSP gene-1* を解析した結果 retropseudogene であること示唆された。*MSSP gene-2* は、15 個のエクソンを有し約 60 kb 以上にわたり存在した。このエキソンの塩基配列は、MSSP, Scr2, human YC1 cDNA と一致し、MSSP-1 と MSSP-2, Scr2, human YC1 はスプライシングの違いによることが明らかとなった。本研究において *MSSP gene-2* のプロモーター解析を詳細に行い、また MSSP 遺伝子のマウスゲノム DNA クローニングを行い、MSSP 欠損マウスの作製を行った。

*MSSP gene-2* でのプロモーター活性を持つ領域を決定させるため、ルシフェラーゼ遺伝子を持つプロモーター欠損ベクター pGV-B に *MSSP gene-2* の様々な deletion mutants を連結させ、HeLa 細胞にトランスフェクションした。-1283 から +61 の領域で、高いプロモーター活性が確認された。-1709 から -1024 間の領域にサインサーの存在が、また -1024 から -488 の間の 536 bp 領域を欠損させると劇的にプロモーター活性が減少することより、この領域にエンハンサーの存在が示唆された。また -488 から -196 間の領域にもエンハンサーの存在が考えられることより、HeLa 核抽出液を使用し、*MSSP gene-2* の -545 から -289 なる領域を probe とし DNase I footprinting 解析を行った。Upper strand では -473 から -440、lower strand では -473 から -440 の領域が、HeLa 核タンパク質による結合が見られた。この領域が転写に関与しているかを検討するため Mup1 領域の各種 deletion mutants を 3, 4 個連結したレポータープラスミドを

構築した。転写活性は $\Delta P$ に比べ6~8倍増強し、転写因子が結合に必須である配列であることが明らかとなった。Mup1に point mutationを加えた Mup1-mu1, Mup1-mu2を同様にルシフェラーゼアッセイを行った結果、Mup1-mu2のみが $\Delta P$ まで転写活性を低下させた。このことより、-464 から-460 のCCGCC配列が、転写活性に必須であることも明らかとなった。この464 から-460 領域には、Sp1, AP-2などの転写調節因子の結合配列が存在した。配列特異的に結合するタンパク質を同定するためサウスウエスタン法を用い解析した。プローブをMup1-Nとし、HeLa核抽出液を用いた結果、150, 62, 38 kDaの3つのバンドが検出された。62 kDaのバンドは、他の2つバンドより非常に強かったが、150kDaのバンドは、Mup1-Nmu2をプローブを用いても観察されたため非特異的結合であることが明らかとなった。38, 62 kDaのタンパク質は、すでに報告されているSp1(106 kDa), AP-2(52 kDa)とは異なる転写調節因子であった。38 kDaのタンパク質は、K562, Rajiの核抽出液においても検出することができた。

また、マウス MSSP, Scr3 cDNA をクローニングするためヒト MSSP cDNA をプローブとし、マウス脳 cDNA あるいは F9 cell ライブラリーを用いスクリーニングを行った。マウス MSSP, Scr3 cDNA は、全長 1,650 bp と 1,354 bp であり、それぞれ 370, 356 アミノ酸をコードしていた。ヒトそしてマウスにおける MSSP と Scr3 のタンパク質は、2つの RNP-1 ドメインが存在し、N 末において高いホモロジーを示した。マウス MSSP そして Scr3 に特異的なプローブを用い、各種臓器における mRNA の発現を Northern blotting 法で検討した。Scr3 は、6.3, 1.8 kb の2つの mRNA が観察され、腎臓、骨格筋、肺そして心臓で高い発現を示した。MSSP は、すべての臓器において 5.3, 2.5 kb の mRNA が発現していた。精巣においては、1.8, 1.36 kb の mRNA も検出された。MSSP の精巣における発現を RT-PCR と *in situ* hybridization 法で検討を行った。その結果、MSSP は、精原細胞から減数分裂の精子細胞まで発現し、精子では発現していないことが明らかとなった。次に、TT2 ゲノミック DNA ライブラリーより、マウス MSSP cDNA をプローブとして *Mssp* gene をスクリーニングを行った。*Mssp* gene は、開始コドンを含むエキソンを 1 とし、13 個のエキソンを有し約 40 kb 以上わたり存在した。機能ドメインである RNP-1B が存在するエキソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、相同領域の 3' 端にはネガティブ選別用の遺伝子としてジフテリア毒素 A 断片遺伝子を付加したターゲティングベクターを構築した。このベクターを TT2 細胞に遺伝子導入し、耐性コロニー約 900 個のうち 227 個より DAN を抽出した後、サザンブロット法によって 12 個のポジティブクローンが得られた。12-15 個の ES 細胞を 8 細胞期胚にインジェクションを行い、偽妊娠 ICR マウスの子宮に移植した。その結果、キメラマウスが 3 匹作製され、70, 100% 毛色への寄与を示す雄マウスが 2 匹そして 70% の雌マウスが作製された。雄の 100% マウスのみが germline を通過し、ヘテロ接合のマウス間交配により得たマウスをサザンブロットで解析したところ、正常 (+/+)、ヘテロ (+/-) およびホモ (+/+) は、1 : 2 : 1 の割合で生まれてきた。ヘテロ、ホモ接合体共、顕著な形態学的変化は現在までに観察されていない。また、開始コドンが存在するエキソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、相同領域の 3' 端にはネガティブ選別用の遺伝子としてジフテリア毒素 A 断片遺伝子を付加したターゲティングベクターを構築した。耐性コロニー約 600 個のうち 238 個より DAN を抽出した後、サザンブロット法によって 12 個のポジティブクローンが得られた。インジェクションにより 100%, 70%, 20% の雄キメラマウスがそれぞれ 8, 1, 1 匹作製された。100% 雄キメラマウスは、germline を通過し、現在、ホモ接合体マウスの作製を行っている。

# 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

### Characterization of promoter and targeted mutagenesis for MSSP gene which encodes C-MYC binding proteins

(ヒト C-MYC 結合タンパク質 MSSP 遺伝子の  
プロモーター及びジーンターゲティング法による解析)

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、myc/ras による細胞トランスフォーメーション能の調節などを行う重要な遺伝子と考えられる。これらの機能は c-Myc を始めとする複数のタンパク質と複合体を形成することで行われていると考えられる。従って、MSSP の生体内での機能解析を行うために、まず MSSP のヒトゲノム遺伝子を単離し、構造とプロモーター解析を詳細に第 1 部において行った。次に、MSSP 遺伝子欠損マウス作成のために、マウス MSSP cDNA 及びゲノム DNA を単離し、ターゲティングベクターの作成、組換え ES 細胞の樹立、そして最終的に MSSP 遺伝子欠損マウスを作成した。

#### 1. MSSP ゲノム遺伝子の単離とそのプロモーター解析

ヒトマウス MSSP cDNA をプローブとしてヒト胎盤ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニング、ゲノム PCR を駆使して MSSP ゲノム DNA を単離し、MSSP gene-2 と銘々した。たかだか 50 Kda タンパク質の MSSP であるが、ゲノム DNA は実に全長 60 kbase に渡り、16 個のエキソンを有していた。次に、第 1 エキソンから上流をルシフェラーゼ遺伝子に連結させ、HeLa 細胞にトランスフェクションすることで、MSSP 遺伝子のプロモーター解析を行ったところ、-545 ~ -196 の領域にエンハンサーが同定された。更に HeLa 細胞核抽出液を使ってこの領域をフットプリント法で解析したところ、約 30 塩基対がタンパク質結合領域として同定され (Mup1 領域)、この Mup1 単独でエンハンサー活性を有していた。Mup1 に種々の塩基置換変異を導入するとこのエンハンサー活性が消失することからこの領域の重要性が確認された。

Mup1 領域にはAP2, Sp1 の結合類似配列が存在するため、ゲルシフト、サウスウェスタン法を組み合わせ、Mup1 結合タンパク質を解析したところ、Mup1 にはAP2, Sp1 とは異なる新規タンパク質が結合することが明らかとなった。

## 2. マウスMSSP, Scr3 cDNA 及びマウスMSSP ゲノムDNA の単離と発現

MSSPファミリーは少なくとも2つの遺伝子にコードされ、Gene 2はスプライシングの違いによりMSSP-1, MSSP-2, Scr2をコードし、Scr3は他のMSSP/scr遺伝子にコードされている。そこで、マウスMSSP, Scr3 cDNAを単離し構造解析を行ったところ、ヒトMSSP, Scr3同様、N末は高度に保存され、C末が多様であった。組織での発現をノーザンブロット法で解析したところ、Scr3がどの組織にも一様に発現しているのに対し、MSSPはどの臓器にも一様に弱いながら発現している事に加えて、複数の小さなサイズのmRNAは精巣で強い発現が見られた。そこで、マウス精巣、精子発生過程におけるMSSPの発現をノーザン及び精巣組織切片をin situ hybridization法で解析したところ、精原細胞から発現が見られるが、最終的な精子にはMSSPは発現していなかった。このことはMSSPが精子形成過程に重要な機能を担っている可能性を示唆していた。次にマウスMSSPゲノム遺伝子を単離し構造解析を行ったところ、ヒトMSSP遺伝子同様40 kbs以上に渡る巨大な遺伝子であり、全体の構造はヒトと類似していた。

## 3. MSSP 遺伝子欠損マウスの作成

MSSPは2つのRNPドメイン(RNP-1A, RNP-1B)を有し、ここはDNA結合、c-Mycとの結合などの機能ドメインである。そこで、RNP-1Bをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを最初に、おってATGコドンからRNP-1A近傍までを同様に置き換えたベクターを作成し、ES細胞に導入後、G418で選択し、組換えES細胞を複数樹立した。一般に目的とする組換えES細胞の樹立確立は1/100程度であるが、今回は1/10～1/20と高率であった原因としてNeo遺伝子両端に10 kbs以上のMSSP遺伝子を挿入して点に起因すると考えられる。次に、組換えES細胞をマウス卵に導入し仮親に戻すことでMSSP遺伝子欠損キメラマウス、それらを交配してヘテロ、さらにヘテロ同士を交配させ、最終的にホモ欠損体マウスを作成した。RNP-1Bホモ欠損マウスは生後2ヶ月を経過した時点で大きな形態的な異常は観察されていない。これは2つ存在するRNP1の内、RNP-1Aが機能相補、あるいは複数存在する他のMSSPファミリータンパク質がMSSP-1 RNP1-B機能を相補している事が予想された。しかしながら、ATGから組み換えたホモMSSP欠損マウスは明らかに子供の出生数の顕著な減少が見られ、他のMSSPファミリータンパク質の機能相補を超えて、致死へと向かっていることが示唆された。MSSPが精子形成に関与している可能性が高いので、このATGホモ欠損マウスの詳細な解析が期待され、更に引き続いて観察している。

以上の結果はc-Myc結合タンパク質MSSPの個体レベルでの機能解析に重要な知見と可能性を与えており、学位論文にふさわしく、薬学博士として藤本充章を推薦するものである。