

## 増殖と分化を調節するヒト遺伝子の単離と機能解析

Cloning and functional analysis of human genes that regulate growth and differentiation

代表研究者 大阪大学微生物病研究所助手 岡崎 孝 映  
Assist. Prof., Dept. of Molecular Genetics, Research Institute for  
Microbial Diseases, Osaka Univ.  
Koei OKAZAKI

We have attempted to isolate human genes which are involved in the regulation of cell differentiation and the cell cycle progression in  $G_1$  phase by means of screening for human cDNAs which complement *pat 1*, a *Schizosaccharomyces pombe* temperature sensitive lethal mutant. This mutant at the non-permissive temperature drives cells into the  $G_1$  arrest and subsequent meiotic cell division from the haploid state. The tool we have developed and used here is a novel cloning system that allows isolation of mammalian cDNAs based on *trans*-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. We have cloned eight distinct human cDNAs. None of the cDNAs encode *pat 1*<sup>+</sup> homolog. One is a partial clone encoding the putative regulatory domain of a novel protein kinase that belongs to the MAP kinase subfamily. Three have weak activity to suppress temperature sensitive *cdc2* mutants and encode proteins which have a consensus motif for RNA-binding proteins.

### 研究目的

成熟した動物個体はほとんどが増殖を停止して分化した細胞で構成されている。癌細胞はそのような細胞が脱分化して増殖し続けるように変異したものである。そのような観点から、細胞が増殖を続けるか、停止して分化するかを調節する多くの遺伝子を見つけだし、それらの機能を明らかにすることは、発生、分化および発癌などの機構を解明する上で不可欠な課題である。特にヒトにおいてそのような遺伝子群を単離解析することは医学生理学上大きな成果が期待できよう。しかしそのためには変異株を宿主とした遺伝子相補に基づく手段が必要となるが、宿主として利用しうる動物細胞の変異株を得ることは非常に困難である。そこで我々は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に動物の cDNA ライブラリーを導入し、酵母の変異株を相補する動物遺伝子をクローニングするという画期的なシステムを開発した。それはこの真核微生物は遺伝子構造やさまざまな細胞

機能の面で高等動物と意外なほどよく似ており、この微生物における種々の変異が動物の遺伝子によって相補され得ることが十分に期待されたからである。実際に我々は、最近このシステムを使って細胞周期の  $G_2$  期を制御する二つの主要な遺伝子、*wee 1* 遺伝子と *cdc 25* 遺伝子のヒトホモログの単離にも成功している。細胞の増殖か分化かの選択に関わるヒト遺伝子をクローニングするためにこのシステムを利用する場合はどのような酵母変異株が適切であろうか。動物細胞が分化するために増殖停止するのは細胞周期の  $G_1$  期であり、ここから  $G_0$  期と呼ばれる細胞周期から逸脱した状態に移る。すなわちこのとき  $G_1$  期の細胞周期遺伝子の働きが抑制されているはずである。これに類似した分裂酵母の過程としては減数分裂期に移行するために  $G_1$  期で増殖を停止する過程がある。分裂酵母の減数分裂期への移行は *mei 2* 遺伝子の働きによってなされるが、この働きを転写後の段階で抑制しているのが *pat 1* 遺伝子の産

物であるプロテインキナーゼである。*pat 1* 遺伝子の温度感受性変異株は高温で増殖を停止し、半数体であっても減数分裂へ移行して致死となる。*pat 1-mei 2* 系は他に多くの遺伝子が関連していると考えられ、*pat 1* 変異には多コピーサプレッサーや抑圧変異が知られている。したがって *pat 1-mei 2* 系の制御システムが動物細胞にも存在するかどうか不明ではあるが、*pat 1* 変異株を宿主としてこれを相補するヒト cDNA を検索すれば  $G_1$  期において増殖を促進する遺伝子や、分化を抑制するヒト遺伝子が得られるのではないかと期待した。本研究では増殖か分化かの選択に関わるヒト遺伝子を単離しその機能を明らかにする目的で、分裂酵母の *pat 1* 変異株を相補するヒト cDNA の単離を中心に、 $G_1$  期制御遺伝子系と分化の関係を解明するうえで必要な種々の実験を進めた。

#### 研究経過

本助成を申請した時点ですでに我々は分裂酵母の温度感受性 *pat 1* 変異を相補するヒト cDNA を 2 種類単離していた (#59 と #141)。#141 は不完全長の cDNA であり、プロテインキナーゼのアミノ酸配列モチーフの一部とそれに続く約 400 アミノ酸の調節ドメインと思われるユニークな配列からなるポリペプチドをコードしていた。完全長の cDNA を単離して構造決定した結果、プロテインキナーゼドメインのアミノ酸配列は動物の MAP キナーゼに最もホモロジーが高かった。MAP キナーゼは種々の増殖刺激で活性化されることが知られている。MAP キナーゼは出芽酵母の KSS 1, FUS 1 といった接合における  $G_1$  期停止とその解除に関与したプロテインキナーゼと互いにホモロジーが高いが、#141 にコードされたプロテインキナーゼはこれらのキナーゼサブファミリーに特徴的な配列を有していた。したがって #141 は構造の面からも  $G_1$  期の調節に関与する可能性が示唆された。またどちらかの cDNA も、*pat 1* 変異の相補能は部分的であり、それらによって相補された *pat 1* 変異株のコロニーには胞子が多く混在していた。このことは *pat 1* 変異による増殖停止と減数分裂の開始という二つの現象

のうち、増殖停止だけが解除されたという解釈が可能で、得られたヒト cDNA の作用は  $G_1$  期での細胞周期の進行を促進することにあるのではないかと考えた。そこで動物細胞においてもこれらの cDNA が  $G_1$  期の進行に関わっているのかどうか調べる必要があったので、動物細胞に導入してその影響を調べることを申請時に計画した。その宿主として NRK 細胞を選んだ。その理由はこの細胞が EGF と TGF $\beta$  という 2 種の増殖因子を加えることによって可逆的に癌化形質を表す性質を持ち、細胞の癌形質発現の調節機構を解析する上で理想的な細胞だからである。*pat 1* 変異の相補を分化への進行を止めて増殖を抗進させることと解釈すれば、得られた cDNA は動物細胞で癌遺伝子様の作用を示す可能性も考えられた。しかしながらこれらの cDNA を NRK 細胞に導入して過剰発現させても、増殖、癌形質の発現、増殖因子に対する反応性などに有意な変化は見られなかった。これらの cDNA を分裂酵母の野生型株に導入しても増殖速度や接合、胞子形成に目立った影響が見られなかったことから、遺伝子型が元来野生型である動物細胞に cDNA を導入しても検出可能な形質変化は期待できないと考えるに至った。そこで申請当初予定していた分化能を持つ培養細胞 (PC 12, HL 60) にこれらの cDNA を導入して分化能を検定するというアプローチは取りあえず中止した。そして *pat 1-mei 2* 系から  $G_1$  期の細胞周期制御系への情報伝達網を明らかにし、また *pat 1* 変異または関連の他の変異を相補するヒト cDNA をさらに多く得ることが先決であると考え、研究成果の節に記す内容の研究を行った。

#### 研究成果

##### 1) *pat 1* 変異を相補するヒト cDNA の単離と解析

*pat 1* 変異を相補するヒト cDNA として既にヒト繊維芽細胞ライブラリーから 2 種類 (#59 と #141) を得ていたが、さらに新たなヒト cDNA を得ることを試みた。cDNA ライブラリーはヒト大腸癌細胞株のものをを用いた。それは増殖を抗進させる遺伝子の mRNA がより多く含まれる細胞

であることを期待するからである。その結果、#72, #227, #231, #252, #310, #367, および #401 という 7 個のクローンを得た。うち #231 と #310 は同じものであったから新たに 6 種類の cDNA が得られたことになる。

#227, #231, #401, および以前得られていた #59 については完全な塩基配列を、のこりの遺伝子についても部分的な塩基配列を決定している。いずれも *pat 1* 遺伝子や既に分裂酵母での多コピーサプレッサーとして報告された遺伝子のホモログではなかった。

#227, #231 (#301), および #401 はいずれも RNA 結合蛋白質の一群に共通に見られるアミノ酸配列モチーフを有する蛋白質をコードしていた。驚いたことにこれらはいずれも *cdc 2* 遺伝子の温度感受性変異アレルの一つである *cdc 2-L 7* 変異をも弱いながら相補した。*cdc 2* 遺伝子は  $G_1$  期と  $G_2$  期の双方の進行に必須なプロテインキナーゼをコードし、酵母からヒトに至るまで広く保存されている。*cdc 2* 変異の多コピーサプレッサーとしては、*cdc 2* 蛋白質と複合体をつくるサイクリンおよび p 13 の遺伝子が知られているが、RNA 結合蛋白質様のものは知られていない。*cdc 2*, サイクリン, p 13 いずれかの mRNA の翻訳効率を上げるか分解を抑えるかしているのかもしれない。

#59 は 800 余りのアミノ酸からなるポリペプチドをコードできる。相補能を有するドメインを限定するため、多くの部分欠失 cDNA クローンを作製したところ、ポリペプチドのほぼ中央に位置する 100 アミノ酸余りからなる部分に *pat 1* を相補する活性があることが分かった。この部分と有意なホモロジーのあるアミノ酸配列が、後に得られた *cdc 2* と *pat 1* の両方を相補するヒト cDNA クローン (#68, 後述) がコードするポリペプチド内に見つかり、新しいアミノ酸配列モチーフであることが示唆された。

## 2) *pat 1* 変異を相補する分裂酵母 cDNA の単離と解析

このたび得られて構造を明らかにしたヒト cDNA がコードする蛋白質はいずれも分裂酵母

で知られたものとは合致しなかった。このことは分裂酵母で今まで知られた遺伝子の他にも *pat 1* 変異を相補する因子が存在することを示しており、またまずそのような分裂酵母遺伝子を単離してそれらの構成する情報伝達網を遺伝学的に解析することなしにはここで得られたヒト遺伝子の機能を解析することは不可能であると考えられた。そこで分裂酵母の cDNA ライブラリーを作製し、*pat 1* 変異を相補する cDNA を単離した。すでに多コピーサプレッサーとして知られた *pac 1*, *pac 2* などとは異なる新しい遺伝子を少なくとも 8 種類得た。そのうち一つは、癌遺伝子の *myc* や筋肉細胞の分化因子である *MyoD* などにみられるヘリックスループ-ヘリックスモチーフをもつ転写制御因子の一つをコードすることが分かった。現在他の遺伝子の構造解析を急いでいる。

## 3) *cdc 2* 変異を相補するヒト cDNA の単離と解析

*pat 1* 変異を相補するヒト cDNA のなかに *cdc 2* 変異を弱く相補するものが見つかったことから、*cdc 2* 変異株を宿主としたヒト cDNA の検索も行った。その結果、*cdc 2* ヒトホモログ以外に少なくとも 2 種類の遺伝子 (#3 と #68) を新たに単離した。#68 は *pat 1* 変異も相補することができた。この cDNA がコードするアミノ酸配列には前述の #59 の活性ドメインとホモロジーのある部分が見つかった。#3 は前述の #401 と同じ遺伝子に由来する cDNA であったが、いずれも不完全長の cDNA であって、#3 の方が短かった。どちらも *cdc 2* 変異アレルの一つ *cdc 2-L 7* は相補できるが、意外にも別の *cdc 2* 変異アレルである *cdc 2-M 26* は #3 のみが、*pat 1* 変異は #401 のみが相補活性を持っていた。このことは *pat 1* 変異の相補と *cdc 2* 変異の相補とにおいて同じ cDNA が活性を持っているものの、その標的となる因子はそれぞれの変異の場合において異なっていることを示唆する。同様のことは #59 と #68 が *pat 1* 変異を相補する同じアミノ酸配列モチーフをつことが示唆されるのにもかかわらず、*cdc 2* 変異に対しては #68 のみが活性をもっているという事実からも示唆されている。

## 今後の課題と発展

ここで得られたヒト遺伝子と分裂酵母遺伝子との間には今後互いにホモログ関係のものが見つかることが期待されるが、ヒトにおいても分裂酵母においてもまだ活性のある遺伝子を取り尽くしたとはいえ、さらに新しい遺伝子を検索する必要がある。得られた分裂酵母の遺伝子については遺伝子破壊などを行ってその機能や情報伝達網における各遺伝子の上下関係を明らかにしていかななくてはならない。また本研究で示唆された *pat 1*-*mei 2* 系と *cdc 2* との関係などから、関連する別の変異を宿主とした遺伝子検索も必要であろう。ここまで得られた結果から *pat 1* を相補するヒト cDNA の内少なくともあるものは細胞周期制御と何等かの関わりを持っていることが示唆された。ここで得たヒト遺伝子が実際にヒトの細胞のなかではどのような役割をしているのかを明らか

にするにはまだまだ長い道程をいかななくてはならない。しかし少なくとも分裂酵母細胞をモデル系としてその中のヒト遺伝子の機能を検定するところにおいては、 $G_1$  期の細胞周期遺伝子系と分化の関係がこのような研究によって明らかにされてくると期待がさらに強まった。

## 発表論文

- 1) Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H.: High-frequency transformation method and library transduction vectors for cloning mammalian cDNAs by *trans*-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 6485~6489 (1990)
- 2) Okazaki, N., Okazaki, K., Tanaka, K. and Okayama, H.: *ste 4<sup>+</sup>* gene, for sexual differentiation of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes a protein with a leucine zipper motif. *Nucl. Acids Res.*, in press.