

核内癌遺伝子産物による DNA 複製と転写調節

Regulation of DNA replication and RNA transcription by the nuclear oncogene product

- 代表研究者 北海道大学薬学部教授 有賀 寛 芳
Prof., Faculty of Pharmaceutical Sci., Hokkaido Univ.
Hiroyoshi ARIGA
- 協同研究者 北海道大学医療技術短期大学部助教授 有賀 早 苗
Associate Prof. College of Medical Technology, Hokkaido Univ.
Sanae M. M. IGUCHI-ARIGA
- 理化学研究所筑波ライフセンター研究員 横山 一 成
Researcher, Tsukuba Life Science Center, Riken
Kazushige YOKOYAMA

Nuclear oncogene products including *c-myc*, *N-myc* and p53 have been extensively studied in terms of the oncogenesis. These oncoproteins were considered to regulate cell proliferation and have functions of regulating cell cycle. However, the fundamental functions of these were not clarified.

We have studied the molecular mechanisms of initiation of DNA replication and transcription in mammalian cells, and found that the nuclear oncogene products above had the key roles to regulate both DNA replication and transcription; promotion of DNA replication by recognizing the origin of DNA replication (*ori*) and regulate transcription as an enhancer or promoter binding protein.

We have first identified the *oris* in *c-myc* gene and heat shock protein 70 (HSP70) gene, and found that *ori* in *c-myc* gene was overlapped with transcriptional enhancer and *ori* in HSP70 gene with promoter. *c-myc* protein regulates their transcriptional level and the functional domains of *c-myc* protein necessary for its function were determined. Furthermore, protein complex including *c-myc* protein bound to the above sequences. The candidates for the partner of the *c-myc* protein in the complex were identified and named MSSP. MSSPs bound both double- and single-stranded DNA and their cDNAs were cloned. In case of the *N-myc*, we have identified the transcriptional regulatory regions and *ori* which shared the enhancer region as in *c-myc*. Moreover, enhancer binding proteins were identified, and one of them bound to both double- and single-stranded DNA. *N-myc* protein transrepressed *N-myc* gene expression itself and transrepression domains were also determined.

研究目的

核内に遺伝子産物が存在する癌遺伝子 (*c-myc*, *N-myc*, p53 など) は癌細胞で強く発現しているのはもちろんだが, 正常細胞でも発現しており, 細胞増殖, 特に細胞周期の移行に携わる基本的に重要な遺伝子と考えられている。この遺伝子群の正常な制御からの逸脱が細胞癌化, 神経疾患, 遺伝病などを引き起こすと考えられる。近年, 我々

のグループは上述の癌遺伝子産物の少なくとも一つの機能は細胞 DNA 複製を開始させることを見いだした。これらは異常増殖する (常に DNA 合成が ON である) 癌細胞においてこれらの遺伝子の発現が高いという事実の理論付けをしたと考えられる。さらに解析の進んだ *c-myc* については *c-myc* タンパク質は転写因子として *c-myc* 遺伝子自身, 熱ショックタンパク質 70 (HS70) 遺伝子な

どに複合体を形成して結合し、転写調節することが判明した。これらは動物細胞の DNA 複製、転写の分子機構解明、癌化機構解明に大きく寄与したと考えられる。しかしながらまだ詳細は不明な点が多い。そこで遺伝子の形質発現機構を分子レベルで解明するために、これらのタンパク質のターゲット遺伝子を明らかにし、DNA-DNA、DNA-タンパク質相互関係を解析することを目的とする。

研究経過

c-myc 遺伝子はトリ赤芽球ウイルス MC29 の癌遺伝子 *v-myc* に相同な細胞癌遺伝子として同定された。*N-myc* 遺伝子は *c-myc* と DNA 塩基配列に相補性のあるものとして神経芽腫細胞より単離された。*c-myc* が細胞種を選ばずほとんどすべての正常、癌細胞で発現しているのに対して、*N-myc* は神経系、または発生初期、未分化細胞でのみ発現するといった際だった違いがあるが、遺伝子、およびタンパク質の構造は極めて類似している。癌細胞で強い発現が見られるのはもちろんだが、正常細胞でも血清刺激などの細胞周期移行に関する物質で処理すると *myc* 発現が誘導される。また、*c-myc* は HSP70 遺伝子発現を促進することが知られており、こうしたことから、*myc* 遺伝子群は細胞増殖、特に細胞周期移行に関与する基本的に重要な遺伝子と考えられていた。

一方、p53 は DNA 型腫瘍ウイルス SV40 の癌遺伝子産物 T 抗原と複合体形成するタンパク質として同定された。*myc* の場合と同様、癌遺伝子 *ras* との細胞への cotransfection により、細胞癌化が起こることから癌遺伝子の仲間入りをした。ここ二、三年間の間に、細胞癌化能を有する p53 は変異型であり、正常 p53 は逆に細胞癌化阻止に機能することが明らかになり、劣性癌遺伝子として位置付けられてきた。*myc* と同様、細胞増殖に関与する遺伝子と考えられていたが、本来の機能は依然として不明のままであった。

我々は細胞および動物ウイルスの DNA 複製、転写調節機構の研究を行ってきており、その過程で、*myc* と p53 の機能は DNA 複製開始と転写の調節因子であることを実験的に明らかにしてき

た。すなわち、*myc* および p53 は DNA 複製開始領域 (*ori*) を認識し、複製開始を行うことであり、我々はこれらのタンパク質に対応する *ori* をヒト細胞より単離した。また *c-myc* においては *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、そこは *ori* であるとともに転写エンハンサーであり、*c-myc* タンパク質が転写調節因子であることを明らかにした。これと時を同じくして、他の核内癌遺伝子 *jun* はエンハンサー結合タンパク質 AP1 であることが報告され、その後急速な発展を見た。こうしたことより核内癌遺伝子が転写、複製因子であろうという気運が高まってきた。

本研究においてはその後 (1989-1992) における申請者らの *myc* タンパク質を中心とした研究成果を概説したい。

研究成果

1) *c-myc* タンパク質認識配列

我々は本申請以前に *c-myc* タンパク質複合体が *c-myc* (H-P) 領域を認識し、そこが *ori*、エンハンサーとして機能することを報告していた。(H-P) 領域を含むプラスミドクローンは培養細胞で染色体外で自律増殖する。これを ARS と呼ぶ。さらに、このクローンはマウス受精卵に導入後、トランスジェニックマウスを作製したところ、そのマウス、および子孫マウスに次々に複製、伝播された。このことより (H-P) 領域が ARS であることがさらに確認され、さらにこの系を利用して、形質発現ベクター、応用して遺伝子治療の可能性を開いた。

次に、(H-P) 領域のどこに *c-myc* タンパク質のターゲット配列が存在するかを検討したところ、(H-P) 210 塩基体のうち、21 塩基体が *ori*、エンハンサー、タンパク質結合に必須であり、*c-myc* タンパク質複合体結合にはさらに、TCTCTTA の 7 塩基対が重要であることが明らかになった。

この 21 塩基対のエンハンサーとしての機能はさらに、SV40 系を利用して解析した。SV40*ori*、プロモーター、エンハンサーを有するプラスミド DNA において、SV40 エンハンサーと *c-myc* 21 塩基対エンハンサーを交換し、サル Cos 1 細胞で

転写と複製への影響を検討したところ、SV40 エンハンサーが SV40DNA 複製、転写を、それぞれ、負、正に制御するのに対して、*c-myc* 21 塩基対は両者に正に作用し、必須塩基対は TCTCTTA であった。

2) *c-myc* タンパク質複合体

我々が *c-myc* 複合体結合配列として上記の TCTCTTA を 1989 年に報告後、1991 年になり、他のグループが CACGTG が *c-myc* の結合配列であり、このとき *c-myc* は Max と名づけたタンパク質と複合体を形成すると発表した。しかしながら、この配列を有する遺伝子は今のところ、見いだされていない。そこでこの両者の関係を検討したところ、*c-myc* 遺伝子上に存在する TCTCTTA には後述する我々が MSSP と名づけたタンパク質と *c-myc* が、CACGTG には Max/*c-myc* が結合することが判明した。最近の報告によると、完全な形の *c-myc* タンパク質は CACGTG 配列には直接結合できず、Max を介して結合するようであり、また Max が細胞周期や癌細胞との相関性がないことから、機能面で重要であるかどうか疑問があると考え人もいる。

MSSP は *c-myc* と複合体形成し、*c-myc* 遺伝子上の TCTCTTA 配列に結合するタンパク質として同定した。MSSP はファミリーを成し、少なくとも 5 種は存在する。現時点において 4 種類の cDNA をクローニングした。最初にクローニングし、構造が明らかになった MSSP-1 はファミリーの中では比較的マイナーなもので、分子量 47 k ダルトンである。RNA 結合タンパク質がいくつか知られているが、RNA 結合ドメインとして 9 アミノ酸のコンセンサス配列が存在する。MSSP-1 もこの配列を有し (図 1)、他のグループが報告した一本鎖 DNA 結合タンパク質もこの配列を有することから、この配列は一本鎖核酸結合配列と考えたほうが良いかもしれない。MSSP-1 発現は *c-myc* のそれと極めて相関性を有す。すなわち、種々の臓器での発現で *c-myc* の高いものは MSSP-1 も高く、同調した培養細胞において、*c-myc* と MSSP-1 は G1→S 期に発現する。この点は Max と極めて対称的である。MBS の玉井さ

んとの共同研究で MSSP-1 の大腸菌での発現とその精製、MSSP-1 の抗体作製を既に行ったので今後の解析に大いに利用したい。

3) 転写因子としての *c-myc* タンパク質と細胞周期依存性発現

c-myc タンパク質は *c-myc* 遺伝子自身の転写をその量により、最初、促進し、のち抑制した。この促進機能ドメインは N 末、および C 末の約 40 アミノ酸が重要であった。

また、*c-myc* 上流域を CAT 遺伝子に挿入したプラスミド DNA を染色体に含むラット 3Y1 株を作製し、転写における影響を検討した。転写活性には (H-P) 領域の存在が重要であり、欠いたものは低い活性しか示さなかった。また同調した細胞でその発現を調べた結果、(H-P) を含む CAT は endogeneous に存在する *c-myc* の発現に対応して、すなわち G1→S 期に発現した。このことより、(H-P) 領域が細胞周期依存性 *c-myc* 発現に重要であることが明らかになった。

4) HSP70 遺伝子と *c-myc*

HSP70 は以前より、*c-myc* により転写促進されることが知られていたが、*c-myc* のターゲットがどこにあるかは不明であった。ヒト HSP70 遺伝子プロモーター領域の -170 から -200 には TCTCTTA 類似の配列が 2 ヶ所存在した。そこでこの領域へのタンパク質の結合を検討したところ、*c-myc* タンパク質を含む複合体が結合し、この領域は *c-myc* による HSP70 の転写促進に必須であった。次に、HSP70 遺伝子上に *ori* を同定したところ、これらの領域を含む約 700 塩基対に存在した。この領域および *c-myc* タンパク質複合体結合配列オリゴヌクレオチドを含むプラスミドは ARS として機能し、変異塩基配列導入プラスミドでは活性がなかった。このことより、*c-myc* およびその認識配列が転写、複製に必須であることが明らかになった。*c-myc* タンパク質複合体は前述の MSSP ファミリーと考えられる一本鎖 DNA 結合タンパク質であり、すでに 2 種 cDNA クローニングを行った。

5) N-*myc* 遺伝子の構造

N-*myc* 遺伝子は *c-myc* 遺伝子と比較し、転写調

節領域, DNA複製 *ori* などの *cis element* はほとんど解明されていなかった。そこでマウスとヒト *N-myc* 遺伝子を材料として, 構造解析を行った。転写開始部位上流 -1000 付近より, 正, 負, 正に機能する部位が存在した。-1000 付近に存在するエンハンサーは *N-myc* プロモーターに対して上流かつ順方向でしか機能しないものであり, この必須領域 21 塩基対を同定した。この 21 塩基対エンハンサーは神経芽腫細胞 IMR32 細胞により特異的に機能した。21 塩基対には 2 本鎖, および 1 本鎖 DNA 結合タンパク質が結合した。このタンパク質に対する cDNA クローニングを行い, 既にポジティブなクローンを得ている。またヒト胎盤よりこのタンパク質を精製したので, 現在生化学的解析を行っている。またこの下流には SV40 プロモーターなどを *general* に促進するエンハンサーが存在した。

また, DNA複製 *ori* はプロモーター上流 -1000 に存在し, この領域は ARS として, 培養細胞で安定に存在した。

6) 転写因子としての *N-myc* タンパク質

N-myc と MHC class I 遺伝子発現とは負の相関があることから, 転写因子としての *N-myc* タンパク質は想定されていたが実験的には解明されていなかった。また他のターゲット遺伝子の存在は不明であった。そこで *N-myc* 発現系を利用して検討したところ, これらの遺伝子に対して *N-myc* タンパク質が転写レベルで寄与していることが明らかになった。更に, *N-myc* タンパク質は *N-myc* 遺伝子自身の転写を抑制することが明らかになった。この転写抑制に寄与する機能ドメインは N 末, C 末, 及び内部の酸性アミノ酸に富んだ部位であった。

今後の課題と発展

myc タンパク質が転写と複製の両因子であることはほぼ一般に受け入れられたと思われる。現在, *c-myc* のターゲット遺伝子は HSP70, *c-myc* 遺伝子であり, *N-myc* のそれは MHC Class I, NCAN, *N-myc* 遺伝子と考えられる。*c-myc* のターゲット遺伝子には我々の同定した配列が存在し, 現実に機能していた。しかしながら, *N-myc*

Complex formation

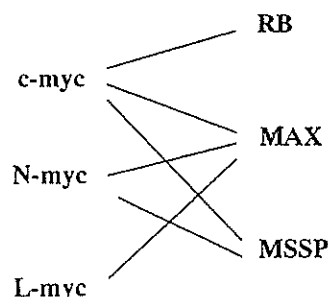


図2. *myc* タンパク質と複合体形成すると考えられるタンパク質。

の認識配列は決定されていない。*c-myc* も *N-myc* も Max と結合することは事実であるが, そのターゲット配列はこれらの遺伝子に存在せず, まだ議論すべきだと考えられる。*c-myc*, *N-myc* と複数個のタンパク質と複合体形成して, ターゲット配列, ターゲット遺伝子を変えることで多様な機能を分担しているように考えられる。現在まで考えられる複合体の組み合わせを図2に示す(図2)。今後, さらに複合体タンパク質の同定とその機能の解明が期待される。

一方, p53 に関しては, 我々は 1988 年に p53 依存性の *ori* の単離を発表して以来, 実験的には suspend しておいた。1991-1992 年になって p53 の DNA 結合配列が同定され, これらが *ori* と考えられる領域に存在することなどから, やっと我々の 1988 年の結果が認められつつある。我々は今年度より再び p53 の研究を再開し, p53 遺伝子上に *ori* の同定し, そこに p53 がいかに関与しているかを検討している。また p53 もやはり, 転写の調節因子であることが明らかになり, *myc* 同様, 少なくとも 2 つの機能を有するものと考えられる。

今後は種々の cDNA を利用して *myc* タンパク質との相互作用を明らかにすると同時に, 細胞周期における調節機構などを, 分子生物学的, 生化学的に解析していきたい。

発表論文リスト

- 1) Ariga, H., Imamura, Y. and Iguchi-Ariga, S. M. M.: DNA replication origin and transcriptional enhancer share the *c-myc* protein

- binding sequence. *EMBO J.*, 8, 4273~4279 (1989).
- 2) Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Concerted mechanism of DNA replication and transcription. *Cell, Str. Funct.*, 14, 639~641 (1989).
 - 3) Tomilin, N. V., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Transcription and replication silencer present within a conserved region of human Alu repeats interacting with Alu binding protein. *FEBS Lett.*, 263, 69~72 (1990).
 - 4) Sudo, K., Ogata, M., Sato, Y., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: cloned origin of DNA replication in *c-myc* gene can function and be transmitted in transgenic mice in episomal state. *Nucleic Acids Res.*, 18, 5423 ~ 5432 (1990).
 - 5) Kitaura, T., Galli, I., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Activation of *c-myc* promoter by *c-myc* protein in serum starved cells. *FEBS Lett.*, 290, 147~152 (1991).
 - 6) Kihara, F. And Ariga, H.: An eukaryotic 130 KDa protein binds bacterial c-AMP responsible element. *Biochim. Biophys. Acta*, 1089, 227 ~233 (1991).
 - 7) Negishi, Y., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Protein complexes bearing *myc*-like antigenicity recognize two distinct DNA sequences. *Oncogene*, 7, 543~548 (1992).
 - 8) Taira, T., Negishi, Y., Kihara, F., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: *c-myc* protein complex binds to two sites of the human hsp70 promoter region. *Biochim. Biophys. Acta*, 1130, 166~174 (1992).
 - 9) Galli, I., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: The AT-rich tract of the SV40 ori core: negative synergism and specific recognition by single stranded and duplex DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.*, 20, 3333~3339 (1992).
 - 10) Tomilin, N. V., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Human satellite DNA sequence from an unstable region of chromosome 1 interacts with ubiquitous transcription factor OTF-1. *Biomedical Science*, in press (1992).
 - 11) Imamura, Y., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: The upstream region of the mouse *N-myc* gene: identification of an enhancer element that functions preferentially in neuroblastoma IMR32 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1132, 177 ~187 (1992).
 - 12) Kumano, M., Nakagawa, T., Imamura, Y., Galli, I., Ariga, H. and Iguchi-Ariga, S. M. M.: Stimulation of SV40 DNA replication by human *c-myc* enhancer. *FEBS Lett.* 309, 146~152 (1992).
 - 13) Sato, M., Imamura, Y., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga H.; Determination of of transrepression domain of human *N-myc* protein. *Int. J. Onc.* 1, 539~545 (1992).
 - 14) Iguchi-Ariga, S. M. M., Ogawa, N. and Ariga, H.: Identification of the initiation region of DNA replication in the murine immunoglobulin heavy chain gene and possible function of the octamer motif as a putative DNA replication origin in mammalian cells, *Biochim. Biophys. Acta*, in press (1992).
 - 15) Säegusa, Y., Sato, M., Galli, I., Nakagawa, T., Ono, N., Iguchi-Ariga, S. M. M. and Ariga, H.: Stimulation of SV40 DNA replication and transcription by Alu family sequence. *Biochim. Biophys. Acta*, in press (1993).