

氏名	いとうこうせい 伊藤公成
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第1894号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科病理系専攻
学位論文題目	c-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus large T antigen (がん遺伝子産物 c-Jun による, 大型 T 抗原依存性ポリオマウ ルス DNA 複製開始反応 (Unwinding) の促進)
論文調査委員	(主査) 教授 野田 亮 教授 西川伸一 教授 伊藤嘉明

論文内容の要旨

ポリオマウイルス (Py) DNA の複製にはエンハンサーが必須である。現在, 転写因子による発がんの分子機構はほとんど解明されておらず, まして転写因子の複製制御における関与はいまだ不明な点が多いなかで, このようなエンハンサーを介して転写因子による DNA 複製調節機構の解明は, 新しい展開の可能性を与えるものと考えられる。

Py エンハンサーに AP1 結合部位が1ヶ所ある。転写因子 AP1 は c-Jun, c-Fos およびそれらの関連タンパクによる二量体であるが, 外界からの増殖因子に鋭敏に反応することが報告されているので, これらにより DNA 複製が転写促進とは独立に促進されるとすれば, シグナル伝達系の見地からもきわめて魅力的な研究対象である。申請者の所属する研究室では, Py エンハンサーのかわりに AP1 結合部位を挿入したレポータープラスミドを用意し, c-Jun, c-Fos を発現させることにより AP1 結合部位を介して強い (100倍程度) 複製促進の起こることを観察し, 報告してきた。そこで申請者はさらにこの分子機構を詳細に解析するため, *in vitro* の実験系を構築した。

これまでのデータによると, AP1 は複製開始反応を促進しているものと思われる。複製開始反応では DNA 合成の前段階として, 2本鎖 DNA の Unwinding が起こる。そこで, われわれは PyDNA 複製開始点 (*ori*) および AP1 結合部位をもつ 300 bp の線状 DNA を用いた Unwinding アッセイを構築し, まずこの系における AP1 の効果を検討することから開始した。このアッセイでは, 大型 T 抗原 (LT), 一本鎖 DNA 結合タンパク質 (RP-A), Py *ori* 依存性の Unwinding 活性が観察され, 反応は ATP を要求した。この系に AP1 を加えると, その量に依存して Unwinding 活性が最大 6 倍まで再現性よく上昇した。AP1 が c-Jun / c-Fos の場合も c-Jun / c-Jun の場合もほぼ同様の結果を得た。そしてこの活性の上昇は, LT の低濃度条件下で顕著であり, 反対に RP-A の濃度変化には, ほとんど影響されることがなかった。

またそのような LT の低濃度条件下で, *in vitro* Py DNA 複製系 (モノポリメラーゼ系) に AP1 を加えたところ, その量に依存して複製活性が最大 4 倍まで再現性よく上昇した。Py DNA Unwinding の促

進効果と同様、AP1がc-Jun/c-Fosの場合もc-Jun/c-Junの場合もほぼ同様の結果を得た。これらの事実は、AP1(c-Jun)によるPy DNA Unwindingの促進とその後に引き続くPy DNA複製の促進効果は、AP1がPP-AではなくLTをターゲットとし、そのLTの機能をサポートすることによって現われることを示唆している。

さらに、このc-Junの機能を解析するため、共同研究者によって作出された種々の欠損変異体を実験系に加えたところ、c-JunのC末端のDNA結合領域を除いたN末端側に、特異的な活性化領域が存在した。

この同定されたc-JunのN端領域の機能を解析すると、Unwindingに先立って起こる大型T抗原(LT)のPy oriへの結合、LTのPy oriでの複合体形成を特異的に促進していることがわかった。ゲルシフトアッセイを用いると、LTのDNA結合能を最大8倍まで高めること、さらにPy ori領域でのフットプリンティングによる解析から、このN端領域がPy ori-coreへの特異的なLTの結合を促進していることが判明した。

BIA coreシステムを用いた分子間相互作用の解析から、c-JunがPR-Aとは結合せず、LTとのみ特異的な結合をもつという、全くいままでに報告のない新しい相互作用の存在が明らかにされた。

以上の結果は、c-Junが、LTとの特異的な結合を介してLTをoriに呼び込み、oriでの複合体形成を促すこと、さらにそれに引き続くDNA unwindingが活性化されることによってDNA複製が促進されるという一連の機構を明確にしている。この成果により、c-JunによるPy DNA複製活性化機構の少なくともひとつが解明されたものと思われる。

論文審査の結果の要旨

発がんの分子機構の解明に向けた細胞周期の研究が大きく発展しているが、その制御の中心であるDNA複製機構には不明な点が多い。申請者らはポリオーマウイルス(Py) DNAの複製が核内がん遺伝子産物c-Jun(転写因子AP1として機能)により強く促進されることを報告してきた。今回この分子構造を調べるため*in vitro*の複製系を用いて解析し、次の様な結果を得た。

- (1) c-Junは単独で、AP1結合配列を介し、PyDNA複製を3~4倍促進する。
- (2) c-Junは単独で、AP1結合配列を介し、PyDNA unwindingを4~5倍促進する。
- (3) c-Junは大型T抗原のoriへの結合を7~8倍促進する。
- (4) c-Junは大型T抗原と特異的な結合を示す。

以上の結果により、PyDNA複製のc-Junによる促進機構がほぼ明らかになった。これにより転写因子の細胞DNA複製制御への直接的関与の可能性が更に強く示唆されるようになり、複製調節機構の研究に新たに視点をあたえるものと思われる。

以上の研究は発がん遺伝子の作用機構の解明に貢献するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成9年2月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。