

氏 名	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 抗原依存性ポリオーマウ 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

ポリオーマウイルス (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 結合部位が一ヶ所ある。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。