

Title	Oncogenic activation of murine mos Protein Kinase by DNA rearrangement of its N-terminal coding region
Author(s)	大内, 徹
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/38013">http://hdl.handle.net/11094/38013</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 【4】

氏名	大内徹
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 10142 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 生理系専攻
学位論文名	<b>Oncogenic activation of murine mos Protein Kinase by DNA rearrangement of its N-terminal coding region</b> (マウス mos 遺伝子のトランスフェクションによる活性化機構)
論文審査委員	(主査) 教授 豊島久真男 (副査) 教授 羽倉 明 教授 野村 大成

## 論文内容の要旨

## (目 的)

ハムスター由来癌遺伝子検索細胞 SHOK 細胞を受容細胞に用いた場合、その形質転換感受性は、従来用いられてきた NIH 3 T 3 細胞とは異なることが知られている。

X 線誘発高発癌系マウス由来の骨肉腫 (N 5 - 2057) ゲノム DNA を SHOK 細胞に導入したところ、第一次形質転換細胞として、マウス Ki-ras 遺伝子、あるいはマウス mos 遺伝子を含む二種類の細胞株を得た。Ser/Thr キナーゼとして知られる Mos 蛋白質は、アフリカツメガエル卵を用いた研究より、卵成熟過程において重要な生理作用を有することが明らかとなってきたが、癌遺伝子としての作用機序は不明である。同時に、DNA トランスフェクションアッセイによって活性型 mos 遺伝子が単離された例は初めてなので、その活性化のメカニズムを解析することを目的として実験を行なった。

## (方法ならびに成績)

- 1) N 5 - 2057 による第一次形質転換細胞 2057f-1 からゲノム DNA を抽出し、マウス反復配列およびマウス mos 遺伝子をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行なったところ、両者とも検出された。
- 2) そこで、コスミドレスキュー法により、形質転換活性を有するクローン二種類を単離した。それぞれ、mos 遺伝子を含む約 40 kb の insert を有していた。mos 遺伝子近傍の DNA 塩基配列を決定したところ、正常マウス mos 遺伝子の第 118 番目のアミノ酸 (Gly) から上流が、未知の DNA 塩基配列と入れ替わっていた。その塩基配列は、後に行なったサザンハイブリダイゼーションから、ハムスター由来であることがわかった。

- 3) 第一次形質転換細胞2057f-1におけるノーザンブロット解析を行なったところ、活性型 mos 遺伝子の mRNA は1.8kbの単一バンドとして検出された。SHOK 細胞中で、Molony murine leukemia virus 及び Gardner-Rasheed feline sarcoma virus に由来するキメラLTR (long terminal repeat) によりマウス mos 遺伝子を転写させ、ノーザンブロット解析で、その発現レベルを活性型 mos と比較したところ、両者とも同程度であった。
- 4) S1 マッピングによって、活性型 mos の転写開始点を決定した。遺伝子再構成の起きた位置から-146 及び-133塩基上流に転写開始点を認めた。遺伝子再構成位置から+78塩基下流のマウス mos 遺伝子の第二番目の Met コドンと、転写開始点との間には、in-frameのMet コドンは存在しなかった。
- 5) 活性型 mos 遺伝子を、SHOK 及び NIH 3 T 3 細胞に導入し、一過性発現条件下で遺伝子産物の同定を行なった。抗マウス Mos 抗体により、免疫沈降後、ウェスタンブロット解析したところ、37kDa の活性型 mos 遺伝子産物が同定された。これは、4) の結果ともあわせて、トランスフェクション過程の遺伝子再構成により、正常マウス mos 遺伝子の第二番目の Met コドンから翻訳された蛋白質であると結論された。
- 6) 活性型 mos 遺伝子上流に認めたハムスター由来のゲノムに、正常型マウス mos 遺伝子を接合し SHOK 細胞へ導入したところ、形質転換活性は活性型 mos 遺伝子に比較して有意に低下した。また、マウス mos 遺伝子のみでは、SHOK 細胞は形質転換しなかった。NIH 3 T 3 細胞は、全ての mos 関連遺伝子に対して、低感受性であった。

(総括)

活性型 mos 遺伝子について、以下のことが明らかになった。

- 1) 活性化は、トランスフェクションの際の遺伝子再構成に起因する。
- 2) 再構成上流域は、ハムスターゲノムに由来し、その領域は高い転写活性を有する。
- 3) 遺伝子産物は、正常マウス mos 遺伝子の第二番目の Met コドンから翻訳される分子量37kDa の単一蛋白質で、そのアミノ酸配列からキナーゼ活性は保持されていると思われる。
- 4) 以上から、今回単離した活性型 mos 遺伝子においては、マウス mos 遺伝子エクソン5'側の truncation 及び特異的ハムスターゲノム下流域への integration によって、SHOK 細胞において高い形質転換活性を示すことが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス mos 癌遺伝子の活性化機構について、分子生物学的手法により解析を行なったものである。

DNA トランスフェクション実験においては、導入される遺伝子によって、NIH 3 T 3 細胞株及びハムスター由来細胞株 SHOK は、その感受性が異なることが知られている。本学医学部野村大成博士により樹立された X 線誘発高発癌マウスの一系統に、骨肉腫担癌マウスがある。申請者は、本腫瘍に於て

活性化している癌遺伝子を解析する過程において SHOK 細胞に効率よく focus 形成を示す遺伝子を、コスミドレスキュー法によって単離することに成功した。また、詳細に検討を加えた結果、単離した遺伝子はマウス mos 癌遺伝子であり、活性化には、1) 特異的ハムスター遺伝子下流域への integration、並びに 2) mos 遺伝子 5' 翻訳領域内の truncation が必須であったことを明らかにした。

マウス mos 癌遺伝子が DNA トランスフェクションによって単離された例は初めてであり、その活性化機構を解析した本研究は、学位授与に価するものである。