

◎ 総 説

JUN 遺伝子の生化学的、生物学的活性についての考察

光延 文裕, 貴谷 光, 岡崎 守宏, 御船 尚志,
浅海 昇, 谷崎 勝朗

岡山大学医学部附属病院三朝分院内科

要旨：c-junはニワトリの癌ウイルスから分離された癌遺伝子 (v-jun) の proto-oncogene であり、その遺伝子産物は細胞内転写促進因子 AP-1 の主成分である。v-jun, c-jun のトランスフォーム能を検討するために、我々は v-jun, ニワトリ c-jun 遺伝子さらに JUN 遺伝子の種々の組換え体を複製能を持つレトロウイルスベクター (RCAS) に挿入し、CEF 細胞 (ニワトリ胎児線維芽細胞) にトランスフェクションした。その結果 4 か所存在する両者の構造的相違のうち、アミノ末端近くの 27 アミノ酸の欠損と 3' untranslated region の欠損が、十分なトランスフォーム能と転写促進能発現に必須であることが明らかとなった。これらの部分がどのように機能発現に関与しているかは、これからの研究を待たねばならない。

索引用語：癌遺伝子, JUN 遺伝子, レトロウイルスベクター, トランスフェクション,
トランスフォーム

Key words: Oncogene, JUN gene, Retrovirus Vector, Transfection,
Transform

はじめに

現在まで 40 種類以上の癌遺伝子が発見されているが、その中で myc, myb, ski, jun, fos は核内癌遺伝子 (nuclear oncogenes) と呼ばれ、これらの遺伝子産物は核内に存在し種々の遺伝子の複製、転写に関与していると考えられている。その中で、ニワトリの癌ウイルスから分離された v-jun は、細胞由来の配列がレトロウイルスに挿入されたものでその細胞由来の配列を c-jun と命名した。そして c-jun の遺伝子産物は、哺乳類細胞における転写促進因子 (transcriptional activator) の主要因子である AP-1 と同一であることが判明した。さらに c-jun / AP-1 は c-fos 遺伝子産物と heterodimer を形成し、その heterodimer が DNA との結合能、転写調節能を有することが明らかとなった。本論文では、JUN 遺伝子の生化学的機

能と生物学的活性 (癌化能, transforming activity) との関係を中心として現在までの JUN 遺伝子に関する知見を述べる。

v-jun の分離

ASV17 は、1983 年に分離されたニワトリの肉腫ウイルスの 1 つであり、線維芽肉腫の原因ウイルスである¹⁾。ASV17 のプロウイルスの構造は、Fig. 1 のようになり、両端の LTR, gag 遺伝子の 5' 部分 (0.7kb), 0.93kb の非ウイルス由来で細胞由来の部分そして env 遺伝子の一部 (1.0kb) から成っている。即ち、gag 遺伝子の 3' 部分, pol 遺伝子, env 遺伝子の 5' 部分が欠損し、そのかわりに 0.93kb の細胞由来の配列が挿入されているわけである。この細胞由来の配列が癌遺伝子と考えられ "jun" と命名された²⁾ (Fig. 1)。

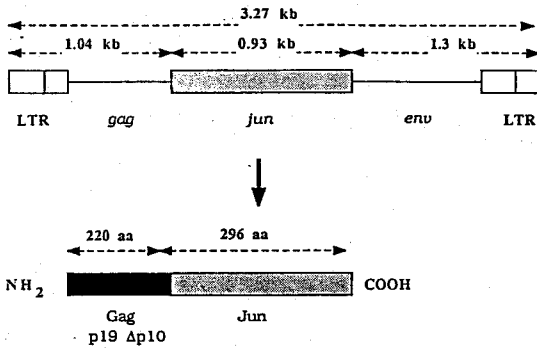


Fig. 1. Structure of ASV17

ASV17の塩基配列の解析の結果、gag遺伝子のp19の開始コドンから始まる分子量約65KDの、gagとjunの融合蛋白質 (p65^{gag-jun}) がコードされていることが推定された。この遺伝子産物は、ASV17でトランスフォームした細胞の核に局在している。DNA配列から推定されるjun蛋白のアミノ酸配列を他の蛋白質のアミノ酸配列と比較してみると、酵母の転写促進因子であるGCN4と高い相同性を有していることが判明した。GCN4には、いくつかのアミノ酸合成酵素をコードしている遺伝子上流にある調節領域の特定のコンセンサス配列 (ATGACTCAT) に結合して、それらの遺伝子の転写を促進させる働きがある。GCN4は、DNA-binding domain (カルボキシ末端の60~70アミノ酸) とtranscriptional activator domain (アミノ末端側の半分) から成るが、前者においてv-junとの高い相同性が存在する。この両者は構造だけではなく機能においても相同性を有する。

c-junはAP-1をコードしている

AP-1はHeLa細胞から分離された転写促進因子で、TGACTCAまたはそれに類似した配列に直接または間接に結合するという共通した性質をもつ蛋白質の混合物である³⁾。GCN4の標準コンセンサス配列 (ATGA (C/G) TCAT) には、AP-1のそれ (TGA (C/G) TCA) が含まれる。GCN4とv-junの相同性とGCN4とAP-1のコンセンサス配列が同一であることから、

AP-1とjunとの関係が注目されるようになった。次にv-junの2カ所の合成ペプチドに対しての抗体、DNAフットプリンティング法、ヒトAP-1・ヒトc-jun蛋白の部分アミノ酸配列決定などを用いた実験結果からc-junとAP-1の40KD蛋白とは同一のものと考えられる^{4~6)}。ただし、AP-1は数種の蛋白の混合物であり、AP-1標品には、JUN関連遺伝子、FOS、FOS関連遺伝子などを初めとして未知の蛋白も含まれていると考えられる。現在まで、ヒト・マウス・ニワトリのcDNAが分離され塩基配列が報告されている。さらにヒトとニワトリでは、ゲノムからのクローンも単離され構造が明らかとなっている^{7~9)}。これら3種の遺伝子は非常に類似した蛋白をコードしており、アミノ酸レベルで哺乳類どうしでは95%以上の相同性、ニワトリと哺乳類では約90%の相同性が存在する。

JUN産物の構造と生化学的機能

JUN蛋白は大きく3つのドメインに分けられる。1)アミノ末端の転写促進に必要なドメイン、2)プロリンに富む中央部分、3)カルボキシ末端のDNA binding domainである。DNA binding domainは、basic domainとleucine zipper (7塩基ごとにleucineが繰り返して4, 5回出現する α -helical domain) からなっている (Fig. 2)。

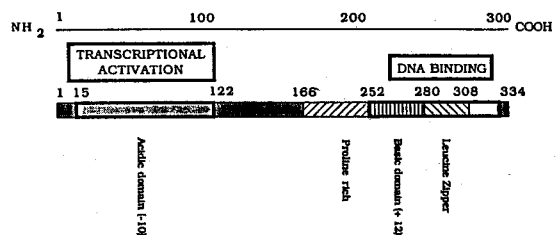


Fig. 2. Structure of c-jun

そして、ゲノミッククローンの解析から、ヒトとニワトリのc-junはイントロンを持っていないことが明らかになっている。さらには、jun関連遺伝子が存在することなどが示唆された^{4,10)}。そのうちの1つがjunBであり、これは細胞が増殖

刺激を受けた時に, 蛋白合成を伴わずに短時間で発現する遺伝子の1つとして発見された。c-junとjunBとの主な相同性はカルボキシ末端のDNA結合部位とアミノ末端に存在する。さらには, junDも発見され, c-junとはjunBと同様な部位において相同性を有する^{11, 12)}。

fos遺伝子産物は, 遺伝子発現の調節に関与している。細胞内においてfos蛋白はjun蛋白と結合しており, junとともに配列特異的にDNAに結合し転写促進をする。しかし, fos蛋白単独では, DNAには結合せずjunと結合して初めてDNAと結合することができる。JUN蛋白はそれ自体でhomodimerを形成する。しかしfosだけではhomodimerを形成しない。さらにfosはjunB, junDなどの関連遺伝子産物ともdimerを形成し, FOS関連遺伝子であるFras, fosBもc-jun, junB, junDなどとそれぞれdimerを形成することが知られている。すべてのdimerはAP-1結合部位に結合すると考えられており, これらのすべてがAP-1蛋白に含まれている。そのDNA結合能に関しては, c-jun, junB, junDでは, 全く同一である。

JUN, FOS, GCN 4などのdimer formationはleucine zipperと呼ばれる α -helical domainが必要であることがわかっている。しかし, leucine zipperがあればどのような蛋白どうしでもdimerを形成するわけではなく, leucine zipperの外部構造もdimer formationに重要な役割を果たしていると考えられる。そして, FOS, JUNなどを初めとするいくつかのleucine zipperをもつDNA binding proteinではleucine zipperに隣接して塩基性アミノ酸に富む領域が存在している。この部分もjun family, fos familyでよく保存されている。そして, この部分がDNA結合に必須であり直接DNAに接する部分であると考えられている。

JUN遺伝子の生物学的活性

ASV17はニワトリに腫瘍を惹起し, CEF細胞をin vitroでトランスフォームさせることができる。そしてその原因は, v-junであると考えら

れる。ところが細胞性遺伝子であるc-junは通常は, oncogenicityを持っていない。v-junとニワトリc-junでは, いくつかの構造上の相違が存在する。1) v-junにおけるgag配列とその融合部位における12アミノ酸の挿入, 2)アミノ酸末端側27アミノ酸(c-junにおける32番から58番目のアミノ酸)の欠損, 3)3箇所のpoint mutation, 4) c-junにおける3' untranslated regionの存在である。そこで我々は, どのような変化によって, c-junがoncogenic potentialを持つようになるのかを検討するために, c-jun, v-jun, それらの欠損mutant及び組換え体をRCASという発現レトロウイルスベクターに挿入しCEF細胞にトランスフェクトしてfocus forming assayを行ったところ次のことが判明した¹³⁾。1) c-junのみでもoverexpressさせることによってCEF細胞をトランスフォームさせ得る。2) v-junとc-junをほぼ同等のレベルでoverexpressさせた時にv-junはc-junよりも15~25倍高率にCEFをトランスフォームさせることができる。3) c-junにおける32番から58番目の27アミノ酸の欠損と3' untranslated regionの欠損が完全にoncogenic potentialの為に必要である。4) gag配列と融合部位の有無, 3箇所のpoint mutationはtransforming activityには影響を及ぼさない。

3' untranslated regionが欠損した時にはtransforming activityが3~5倍増加する。この部位の機能は不明ではあるが, この部位のAUUUA配列はmRNAを不安定化させると考えられている。従って, この部位の欠損によってmRNAレベルが上昇したためにtransforming activityが増加したと推定される。

27アミノ酸の部分の欠損は, oncogenic potentialの活性化に必須だけでなく, 十分な転写促進能にも, 必要であることが知られている。すなわち, c-junとv-junのDNA結合能は同様であるにもかかわらず, v-junの方がより強い転写活性化能を有する。さらにc-junの23~92番のアミノ酸の欠損によって, その転写促進能は上昇する。そのことから, この部分に転写のnegative regulatorが存在していることが示唆された¹⁴⁾。従っ

て、十分な転写促進能, oncogenic potentialのためにこの27アミノ酸の欠損は必要であるが正確にはどの部分が必要で、正確な機能は何であるのかはこれからの研究を待たねばならない。

おわりに

さらに他の実験から増殖因子や他の癌遺伝子が JUNとともに mitotic signal chainを形成していることが示唆されている。そのchainの中で増殖因子やホルモンなどの外部からのsignalによって活性化され、*fos*などととも特定の遺伝子を活性化させる一種のsignal converterの役割をJUNは担っているのではないかと考えられる。

そこで、どのような経路を通過してJUNが活性化されどの標的遺伝子を活性化し、それがトランスフォーメーションにどのようにつながっていくかを解明することが今後の課題であろう。

文 献

1. Cavalieri F., Ruscio, T., Tiknoco, R., Benedict, S., Davis, C. and Vogt, P. K. : Isolation of three new avian sarcoma viruses : ASV9, ASV17 and ASV25. *Virology* 143 : 680-683, 1985.
2. Maki, Y., Bos, T. J., Davis, C., Starbuck, M. and Vogt, P. K. : Avian Sarcoma Virus 17 carries the *jun* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 2848-2852, 1987.
3. Lee, W., Haslinger, A., Karin, M. and Tjian, R. : Activation by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human methallothionein gene and ASV40. *Nature*, 325 : 368-372, 1987.
4. Bohmann, D., Bos, T. J., Nishimura, T., Vogt, P. K. and Tjian, R. : Human protooncogene *c-jun* encodes a protein with antigenic and enhancer binding properties of transcription factor AP-1. *Science*, 238 : 1386-1392, 1987.
5. Angel, P., Allegretto, E. A., Okino, S. T., Hattori, K., Boyle, W. J., Hunter, T. and Karin, M. : Oncogene *jun* encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature*, 332 : 166-171, 1988.
6. Bos, T. J., Bohmann, D., Tsuchie, H., Tjian, R. and Vogt, P. K. : *v-jun* encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1. *Cell*, 52 : 705-712, 1988.
7. Nishimura, T. and Vogt, P. K. : The avian cellular homolog of the oncogene *jun*. *Oncogene*, 3 : 659-663, 1988.
8. Lamph, W. W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P. and Verma, I. : Induction of proto-oncogene JUN / AP-1 by serum and TPA. *Nature*, 334 : 629-631, 1988.
9. Ryder, K. and Nathans, D. : Induction of proto-oncogene *c-jun* by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 8464-8467, 1988.
10. Ball Jr. A. R., Bos, T. J., Loliger, C., Nagata, L. P., Nishimura, T., Su, H., Tsuchie, H. and Vogt P. K. : Oncogene and transcription Regulator. Cold Spring Harbor symposium on Quantitative Biology, 53 : 687-695, 1988.
11. Nakabeppu, Y., Ryder, K. and Nathans, D. : DNA binding activities of three murine *jun* proteins. Stimulation by *fos*. *Cell*, 55 : 907-915, 1988.
12. Hirai, S. -I., Ryseck, R. -P., Bravo, F. M. and Yaniv, M. : Characterization of *jun D* : a new member of the *jun* protooncogene family. *EMBO J.*, 8 : 1433-1439, 1989.
13. Bos, T. J., Monteclaro, F. S., Mitsunobu, F., Ball Jr., A. R., Chang, C. H. W., Nishimura, T. and Vogt, P. K. : Efficient transformation of chick-

en embryo fibroblasts by c-jun requires structural modification in coding and noncoding sequences. *Gene and Development* (in press).

The biochemical and biological activities of JUN.

Fumihiro Mitsunobu, Hikaru Kitani,
Morihiro Okazaki, Takashi Mifune,
Noboru Asaumi and Yoshiro Tanizaki

Division of Medicine, Misasa Hospital,
Okayama University Medical School

V-jun is the oncogene which was isolated from the avian transforming virus ASV17. C-jun is the proto-oncogene of v-jun. The product of the proto-oncogene, c-jun, is a major component of the AP-1 transcription complex. AP-1 regulates the transcription

14. Bohmann, D. and Tjian, R. : Biochemical analysis of transcriptional activation by jun : Differential activity of c-and v-jun. *Cell*, 59 : 709-717. 1989.

of several genes through its ability to bind specifically to the sequence TGACTCA and variations of this motif. In order to assess the transforming capability of c-jun protein, we have introduced v-jun, the chicken c-jun proto-oncogene and several mutants into a replication competent avian retroviral expression vector (RCAS). Each of those was expressed in CEF and assayed for transformation by focus formation. Analysis of the results reveals that deletion of a region of 27 amino acids near the amino terminus of c-jun and deletion of 3' untranslated sequences are critical in activating the full oncogenic potential of jun.