

氏 名 (本籍)	い 岩	な 波	や 泰	ふ 夫
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	9 4 6	号
学位授与年月日	昭 和 5 1 年 9 月 8 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭 和 2 7 年 3 月 東北大学理学部化学科卒業			

学位論文題目 癌における核酸メチル化塩基の動態に関する生化学的研究

- 1) Methylated bases of tRNA from HeLa and L cells
(HeLa および L 細胞 tRNA のメチル化塩基)
- 2) Methylated bases of rRNA from HeLa cell
(HeLa 細胞 rRNA のメチル化塩基)
- 3) Methylation patterns of tRNA from ascite hepatomas
(腹水肝癌 tRNA のメチル化パターン)
- 4) Transfer - RNA methylase activity in rat ascites hepatomas : Altered methylation patterns in the presence of guanidine carbonate
(腹水肝癌における tRNA メチル化酵素活性, 炭酸グアニジン添加によるメチル化パターンの変動)
- 5) Heterogeneity of human DNA observed

from the distribution of methylated bases
in isopycnic CsCl density gradient centri-
fugation

(塩化セシウム沈降平衡遠心におけるメチル化
塩基の分布により示されるヒトDNAの不均一
性)

(主 査)

論文審査委員 教授 吉 沢 善 作 教授 及 川 淳

教授 立 木 蔚

論 文 内 容 要 旨

メチル化塩基は、核酸の微量成分として知られているが、生命現象の中樞をなす核酸の機能発現のためには必須であると考えられ、その重要性が認識されてきている。殊に癌細胞においては、多種にのぼるメチル化塩基群の含有量に正常細胞と対比して差があることが示唆され、さらにそれらを導入する役割をもつ核酸メチル化酵素の活性も一般的に可成高い傾向を示す実験結果が得られてから一段と注目されてきている。

一方、アルキル化剤（メチル化剤）による発癌の過程で、核酸中の7-メチルグアニンなどのメチル化塩基が急激に増していくことが明かにされている。癌にとってこれら一群のメチル化塩基は、その疾病の発生においても、またその属性においても深いかわりをもつことが示唆される。

著者らは、癌におけるメチル化塩基の動態を明かにすることが癌の究明に重要であると考えて研究を進め、次の5項目に要約される成果を得た。当初は十数種にものぼるメチル化塩基を放射性同位元素（ ^{14}C あるいは ^3H ）で標識したのち、同定しながら系統的に分離定量する手法に工夫を凝らし、tRNA（4SRNA）についてその分離分析法を確立するとともに、それをrRNA（18Sおよび28SRNA）の精査に応用した。さらに正常肝細胞と対比して肝癌細胞ではメチル化塩基群の存在比によって表わされるメチル化パターンがどのように変わっているかを明かにし、続いて肝癌ではtRNAのメチル化酵素活性がどのように高められているかを把握しようと試みた。また主として人癌において、遺伝子そのものと考えられるDNA中でのメチル化塩基の分布のあり方についての知見を得ることに成功した。

1) HeLa および L細胞 tRNA のメチル化塩基

メチル化塩基のみを標識して、僅少の試料でも効率良く分析を行なう必要があったが、酵素反応における ^{14}C -標識メチル供与体である〔 ^{14}C -メチル〕メチオニンの ^{14}C は、長時間の培養により ^{14}C -ギ酸を経て核酸中のプリン骨核にも取込まれてしまうことが明らかになった。従って、メチル基のみを選択的に標識できるよう種々試みた結果、プリンヌクレオシドを 10^{-4}M 濃度でMEM培地に添加しておくことによって目的が達せられることを見出した。以後の系統的分析法は、 ^{14}C -RNAを抽出したのち、1N-HClにより 100° 、1h加水分解して生成する ^{14}C -メチル化塩基を、幾つかの段階を経て分取するに至るものであるが、分析法として一般的に利用可能なことを主眼とし、各段階とも確実に平易な手法になるよう心掛けた。この方法をtRNAに適用して得られた知見の一つは、 N^0 -メチルアデニン、 N^0 -ジメチルアデニン、および N^4 -メチルシトシンの3塩基はこれら細胞tRNAには全く含まれておらず（但しE. coli tRNAには N^0 -メチルアデニンを含むものもあるといわれる）、これらは次項のrRNAにのみ存在する

という事実であった。さらにまた、結果は種々の面で示唆に富んでいたが、例えば tRNA の構造の推定にも役立つようである。メチル化塩基として最も多く含まれるものは 5-メチルシトシンであり全メチル化塩基量の 21~22% を占めていた。一方、5-メチルウラシル(チミン)は 7~8% の含量であった。tRNA については、まだ一次配列が未決定のものも多いが、クローバー型 4 葉構造のうち 1 葉はいわゆる T \cdot ψ \cdot C ループと呼ばれならわされたものであり、5-メチルウラシル(T)を必ず含むものとして了解されていたが、そのためには T を 17% 程含有せねばならず、上記の分析値はこれに対して否定的であった。最近では該当ループに T をもたないマウス myeloma tRNA などが知られるようになり著者らの結果を支持しているものと思われる。

2) HeLa 細胞 rRNA のメチル化塩基

18S および 28S RNA につき検討し、その量的分布は 4S をも含め分子量の大きい方がメチル化体に乏しいことが判明した。即ち 4S では 13 個のヌクレオチドに 1 個、18S および 28S ではそれぞれ 48 個および 71 個に 1 個の割合でメチル化塩基を含有した。質的には 1-メチルヒポキサンチン、5-メチルシトシンおよび 5-メチルウラシルが欠如していた。

3) ラット肝および腹水肝癌における rRNA のメチル化塩基の変動

上と同様な手法により *in vivo* で調べたところ、4 系統の肝癌ではメチル化グアニン類の減少が目立ち、中でも 7-メチルグアニンの含有率が低かった。

4) 腹水肝癌における tRNA メチラーゼ活性の動態

E. coli tRNA を基質としてその活性を調べ、正常肝細胞に比べて 4 倍も高いことを見出した。N²-ジメチルグアニン含量は肝癌酵素によってメチル化された RNA に高く、正常肝酵素による生成物は 2-O-メチルリボースを多く含んでいた。

5) ヒト DNA のメチル化塩基

正常リンパ球、HeLa 細胞および NPC-204 細胞を用いてメチル化塩基のみを標識した各 DNA の CsCl 平衡遠心を行ない、どの細胞系にもメチル化度の異なる DNA 分子種が存在することを明かにした。

以上の結果から、癌においては核酸のメチル化塩基が変動し、癌の発生、増殖などと不可分と考えられるような本質的な役割を果たしているものと推定された。

審査結果の要旨

メチル化塩基は核酸の機能発現のために必順のものとなされ、特に癌におけるその変動が注目されている。そこで著者は、癌におけるメチル化塩基の動態を明らかにすることが、癌の究明に重要であると考えて研究を進め、以下に要約される知見を得た。

培養下に [^{14}C -メチル] メチオニンからメチル化塩基にのみ放射能を取込ませる方法を工夫し、数々の段階を経て、15種にもものぼるメチル化体の系統的分析法を新たに確立した。この開発された4種類のまぎらばしいメチル化グアニン類の分離確認法は現在のところ唯一の便法である。

この方法をHeLaおよびL細胞tRNAに適用して得られた知見の一つは、 N^6 -メチルアデニン、 N^6 -ジメチルアデニン、および N^4 -メチルシトシンの3塩基はこれら細胞のtRNAには全く含まれておらず、HeLa細胞のrRNAにのみ存在するという事実であった。さらに、結果は種々の面で示唆にとみ、例えば、tRNAの構造の推定に役立つことを示した。

次に、HeLa細胞rRNAの、18Sおよび28S RNAにつき、メチル化塩基の分布をしらべ、4Sをも含め、分子量の大きい方がメチル化体に乏しいことを明らかにした。

また、ラット肝および腹水肝癌におけるrRNAのメチル化塩基の変動をしらべ、4系統の肝癌ではメチル化グアニン類の減少が目立ち、中でも7-メチルグアニンの含有率が低いことを明らかにした。

さらに、腹水肝癌におけるtRNAメチラーゼ活性が、正常肝細胞に比し、4倍も高いことを見出すと共に、 N^2 -ジメチルグアニン含量は肝癌酵素によってメチル化されたRNAに高く、正常肝酵素による生成物は2-0-メチルリボースを多く含むことを明らかにした。

その上、主として人癌において、遺伝子そのものと考えられるDNA中のメチル化塩基の分布のあり方をしらべるため、正常リンパ球、HeLa細胞および、NPC-204細胞を用いて、メチル化塩基のみを標識した各DNAをCsCl平衡遠心を行い、どの細胞系にもメチル化度の異なるDNA分子種が存在することを明らかにした。

以上の成績は、癌においては核酸のメチル化塩基が変動し、癌の発生、増殖などと不可分と考えられるような本質的な役割を果していることを示唆するものであり、癌の解明に重要な手がかりを与えたものといえる。

よって本論文は学位を授与するに値する。