

生化学部門

Department of Biochemistry

生化学部では、その前身である九州大学医学部癌研究施設化学部門（昭和36年～昭和57年）時代から一貫して発癌機構の解明を目的として研究を推進してきたが、特に、ここ数年は、細胞の癌化に伴う遺伝子発現の異常について、その分子機構を明らかにすべく執念を燃やしている。

研究生住吉日出夫が昭和60年4月1日付けで長崎大学医学部熱帯医学研究所助手として出向した。

同日池尻公二及び後藤公宣（昭和58年九大医学部卒業）が大学院医学研究科に入学し、当部門の研究に参画した。

同年5月11日付けでフランス・ストラスブール大学に留学中であった助手高橋慶吉が2年間の研究を終了し復職した。

同年12月1日付けで高楓（中国広西医学院卒業）が研究生として参加した。昭和61年1月31日付けで研究生緒方正広が退学した。

（文部省科学研究60010058, 60010078の援助を受けた。）

A. 癌における遺伝子発現の特異性の研究

癌がどのような仕組みでできるのかという疑問は、古くから多くの癌研究者の心をとらえてきた問題であるが、その研究が、遺伝子工学の技術を駆使し、ここ十年程の間に非常な進歩をとげ、遂に、正常細胞が癌細胞に変わる初期段階の機構が明らかにされた。即ち、正常細胞の染色体上にある proto-oncogene の活性化による oncogene への変換がそれである。しかしながら、変換によって生じた oncogene が生産する、いわゆる癌蛋白が、如何にして細胞を癌化するかは、依然としてブラックボックスの中に在る。そしてこのブラックボックスを解くべく、世界中のこの分野の研究者がしのぎを削っているのが現状であるが、その殆どは、癌蛋白からのアプローチである。

一方ひるがえって、細胞の癌化（トランスフォーメーション）を、表現形質のめんからみると、これが実に多種多様な表現形質の変化で特徴づけられていることが分かる。従って、上記ブラックボックスの機構が如何なる物であれ、それはこの多種多様な表現形質の変化を説明するものでなければならない。一般に細胞の表現形質は、その染色体上の多数の遺伝子から夫々 mRNA を介してコードされた多数の蛋白によって規定されている。従って、多種多様な表現形質の変化は、対応する多数の遺伝子の発現異常によってもたらされたものと考えられることが出来る。然らば、癌化によって、一体どのようなメカニズムが働いて一斉に多数の遺伝子の発

現が変わるのであろうか、残念ながら、この点は全く解かっていない。そこで、当研究室では、先ずは癌化に伴う一般遺伝子の発現異常の分子機構を明らかにすることを意図した。しかる後に、得られた知見と癌蛋白の機能との関連を解析しようというのが我々の基本的な立場である。

さて、このような立場で研究を進めるに当たって、先ず、どの遺伝子を扱うかが問題となる。我々は、遺伝子の機能はさておき、癌と正常細胞で、その発現の差が出来るだけ大きいものを解析することが最も意義が高いと考え、癌でのみ発現し、正常細胞では発現していない遺伝子、又は正常細胞でのみ発現し、癌では一切発現していない遺伝子の分離、解析を意図したのである。

A. a. がん特異的 mRNA 由来のスクリーニング(山本三毅夫, 前原喜彦, 高橋慶吉, 宮原正樹, 遠藤英也)

発現が癌に特異的な遺伝子があるとする、癌にのみ存在し、正常細胞には存在しない mRNA があることになり、それをつかまえることがさし当たったの目標となる。細胞内の mRNA は約三万種程あり、その中から目的のものを取り出すわけで、先ず癌細胞（主に各種ラット腹水肝癌細胞を用いた）の全ポリ(A)RNAを調整し、それから作製した約四千個のcDNA クローンの中から Differential colony hybridization 及び Northern blotting の手法を用いてラットの各臓器、再生肝、胎児肝などの mRNA とは相補性を持たず、腹水肝癌細胞 mRNA とは相補性を持つクローン31個を分離することが出来た。これらのクローンは mRNA の長さとして明確なサイズを示す幾つかのクローンのグループ、及びスメアを示すクローンのグループの二つに大別され、単一遺伝子や中頻度反復配列等、ゲノム上の異なるカテゴリーに属する領域から転写されていることが分かった。一方ある種の高頻度反復配列も癌細胞に特異的に転写されていた。いずれの遺伝子も Semiquantitative RNA dot blot assay から正常細胞には殆ど転写されていないか、されても極くわずかで、それに対し癌では、腹水肝癌細胞のみならず固型の継代移植腫瘍、更に、発癌物質で新たに誘発した肝癌でも共通して強く転写されていたので、この明確な転写の差は癌という状態に密接した現象と考えられる。なかならず、中頻度反復配列からの転写は癌特異性が高く注目に値する。

A. b. 1.5kb mRNA 由来のクローン (pAH34) の解析 (前原喜彦, 藤吉利信, 高橋慶吉, 山本三毅夫, 遠藤英也)

Northern blotting で明確なサイズを示したクローンは、蛋白をコードすることが予測されるが、果たして、1.5kb の mRNA 由来のクローン(pAH34)はハイブリーゼクト法—細胞翻訳系で分子量37,000の蛋白が合成されることが明かとなった。pAH34 についての解析は癌に特異性の高い当時未知の蛋白質を生ずる遺伝子として報告したが最近になり最新の遺伝子配列バンクのコンピューター検索によりグリセロールデヒド 3 リン酸脱水素酵素とほぼ100%の相同性をもつことが示されこの遺伝子と同定された。この酵素は癌化に伴い大巾に増加することが知ら

れているので我々の遺伝子分離法の有用性を確認できたと考えている。これに対し、中頻度反復配列から転写された mRNA に由来するスメアクローンをを用いた実験では明らかな蛋白質の合成は観察されなかった。

A. c. 6.8kb mRNA 由来のクローン(pAH1005)の解析 (藤吉利信, 志方出, 池尻公二, 後藤公宣, 前原喜彦, 遠藤英也)

pAH1005 と名付けたクローンは、6.8kb の mRNA 由来の cDNA クローンで、ラットのみならず、種を超えてマウス、及び人の癌にも共通して発現されているのに、検索したかぎり、ラット及びマウスの正常組織には発現されておらず、又、手術後に摘出された人肝癌の周辺肝組織や、人胎盤にも発現されていない極めて腫瘍特異性の高いもので、大変魅力的であり、目下その詳細な解析を急いでいる。クローン pAH64, pAH35 では塩基配列決定、無細胞蛋白質合成系を用いた解析等が精力的に行なわれつつありそれぞれ興味深い知見が蓄積して来ている。

A. d. 反復配列由来のクローンの解析 (山本三毅夫, 宮原正樹, 住吉日出夫, 鈴木憲明, 緒方正広, 藤吉利信, 高橋慶吉, 遠藤英也)

反復配列由来のスメアクローン(pAH53)は当初全く予想しなかった性格を有し癌における特異性の高さともあまって我々の大きな興味を引くところとなった。この塩基配列は過去に報告された反復配列と異なり新しいクラスと考えられた。この転写は他の多くの反復配列転写と異なり DNA の一方の鎖のみが転写され転写産物は核内のみならず細胞質ポリゾーマルポリマー(A)RNA として大量に存在していた。すなわち成熟 mRNA の性格を有するのであるが個々の mRNA を cDNA クローンの形にして解析を行うと pAH53 配列の両隣の塩基配列も全て別の種類の反復配列でありしかもこれらの塩基配列プローブが複雑な組合せで発現されているということが判明した。現在のところ癌における特異的転写の意義は全く不明だがこの様な例は過去に報告がなく癌という限られた状態のみならず未だ説明されていない生物現象の一つの現われかも知れない。

B. 今後の研究方向

癌特異的に転写される遺伝子が実際に存在し、しかも蛋白質をコードする多分、ユニークな遺伝子と、スメアグループに代表される中頻度反復配列や、高頻度反復配列、というように DNA の全ての反復度の異なる配列に存在するという事実は、癌における遺伝子発現の特異性、及び多様性を示して興味深い。なお、これら癌特異的 cDNA クローンをプローブにして Southern blot 法で癌と正常細胞のゲノムを調べると、両者に殆ど差が無く、遺伝子は癌にも、正常にも良く似た編成の下に存在することが分かった。従って今後、先ず明らかにすべき点は、癌特異性の高い cDNA クローンに相補的なゲノム遺伝子を癌と正常の両者から分離し、両者のヌ

クレオチド配列を検索し、癌にのみ発現が起こる原因が、その中のわずかな差に求められるか否かをみることであろう。

最後に、これら癌特異的遺伝子クローンは診断に応用出来る可能性が考えられ、またこの mRNA と相補的な mRNA を産生する様に遺伝子操作を行い適当な発現ベクターにつないで癌細胞に入れてやると、癌細胞の産出する mRNA は、外来のプラスミドから産生されるアンチ mRNA で抑制される筈で、この mRNA の機能についての示唆、更には癌の Biotherapy に道が開けるかもしれない。

業 績 目 録

原著論文

1. Yamamoto M, Y. Maehara, K. Takahashi and H. Endo:1983
Cloning of sequences expressed specifically in tumors of rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:7524-7527.
2. Kohno K, M. Yamamoto and H. Endo:1983
Transcription renders chromatin resistant to micrococcal nuclease digestion.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116:312-320.
3. Yamamoto M, H. Murata, H. Sumiyoshi and H. Endo:1984
Rapid inactivation of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent endonuclease of rat liver nuclei after cycloheximide treatment.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119:618-623.
4. Hirose K, M. Hakozaki, K. Matsunaga, C. Yoshikumi, T. Hotta, M. Yanagisawa, M. Yamamoto and H. Endo:1985
Cloning of sequences induced and suppressed by administration of PSK antitumor protein-bound polysaccharide
Biochem. Biophys. Res. Commun. 126:884-892.
5. Miyahara M, H. Sumiyoshi, M. Yamamoto and H. Endo:1985
Strand specific transcription of satellite DNA I in rat ascites hepatoma cells
Biochem. Biophys. Res. Commun. 130:897-903.
6. Maehara Y, T. Fujiyoshi, K. Takahashi, M. Yamamoto and H. Endo:1985
1.5kb mRNA abundantly expressed in rat tumors encodes a 37 kilodalton protein in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 131:800-805
7. 山本三毅夫・前原喜彦・遠藤英也・1985
癌における遺伝子発現の特異性
癌と化学療法, 12: 601-688.

著 書

1. 遠藤英也・古江尚・田口鐵男 編集, 黒川利雄 監修・1983
同文書院 癌の研究

学会報告

第42回日本癌学会総会

1. 宮原正樹・山本三毅夫・前原喜彦・遠藤英也・1983
ラット腹水肝癌 mRNA おける高度反復塩基配列の出現
第42回日本癌学会総会記事：310
2. 広瀬国孝・箱崎充徳・松永謙一・吉汲親雄・堀田鉄也・柳沢正昭・山本三毅夫・遠藤英也・1983
ラット腹水肝癌遺伝子の転写レベルにおける PSK の特異的影響
第42回日本癌学会総会記事：310
3. 前原喜彦・山本三毅夫・遠藤英也・1983
ラット腹水肝癌特異的 cDNA クローンの解析
第42回日本癌学会総会記事：306

第43回日本癌学会総会

4. 山本三毅夫・前原喜彦・遠藤英也・1984
シンポジウム, 癌における遺伝子発現の特異性
第43回日本癌学会総会記事：9
5. 鴻江俊治・前原喜彦・志方出・山本三毅夫・遠藤英也・1984
ラット肝癌およびその発癌過程における遺伝子発現の変動
第43回日本癌学会総会記事：50
6. 緒方正広・山本三毅夫・前原喜彦・鈴木憲明・遠藤英也・1984
癌特異的に転写される中頻度反復遺伝子配列の解析
第43回日本癌学会総会記事：226
7. 前原喜彦・鈴木憲明・鴻江俊治・志方出・山本三毅夫・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌特異的 cDNA クローンの解析III
第43回日本癌学会総会記事：325
8. 志方出・前原喜彦・鴻江俊治・山本三毅夫・遠藤英也・1984
Unique genes から転写される癌特異的 mRNA のクローニング
第43回日本癌学会総会記事：326
9. 鈴木憲明・前原喜彦・山本三毅夫・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌特異的ゲノムクローンの単離と解析
第43回日本癌学会総会記事：336
10. 宮原正樹・山本三毅夫・緒方正広・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌 mRNA おける高度反復塩基配列の出現

第43回日本癌学会総会記事：336

11. 広瀬国孝・箱崎充徳・松永謙一・吉汲親雄・堀田鉄也・柳沢正昭・山本三毅夫・緒方正広・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌遺伝子の転写レベルにおける PSK の特異的影響 (第2報)
第43回日本癌学会総会記事：336

第57回日本生化学会

12. 前原喜彦・尾辻耀子・遠藤英也・1984
ミトコンドリア DNA と sequence homology をもった cDNA クローンの単離
生化学, 56(8)：752
13. 鴻江俊治・市吉裕二・鈴木憲明・前原喜彦・山本三毅夫・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌細胞で発現が抑制される cDNA クローンの解析II
生化学, 56(8)：752
14. 志方出・上野孝毅・野替一郎・前原喜彦・山本三毅夫・遠藤英也・1984
ラット腹水肝癌特異的 cDNA クローンの解析II
生化学, 56(8)：753

生化学会九州支部例会

15. 上野孝毅・志方出・野替一郎・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌特異的 cDNA クローンの解析III
生化学, 57(6)：519
16. 市吉裕二・鴻江俊治・鈴木憲明・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌細胞で発現が抑制される cDNA クローンの解析
生化学, 57(6)：520
17. 鈴木憲明・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌特異的 cDNA ゲノムクローンの単離と解析
生化学, 57(8)：1069
18. 志方出・上野孝毅・野替一郎・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
癌特異的 cDNA クローン, pAH1005 の解析
生化学, 57(8)：1069
19. 鴻江俊治・前原喜彦・市吉裕二・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌細胞における反復配列遺伝子の発現
生化学, 57(8)：1208

第44回日本癌学会総会

20. 野替一郎・志方出・上野孝毅・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌特異的 cDNA クローンの解析IV

第44回日本癌学会総会記事, 344

21. 鴻江俊治・市吉裕二・鈴木憲明・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
アゾ色素誘発ラット肝癌と腹水肝癌の遺伝子発現の比較

第44回日本癌学会総会記事, 345

22. 市吉裕二・鴻江俊治・鈴木憲明・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌細胞で発現が抑制される cDNA クローンの解析

第44回日本癌学会総会記事, 345

23. 上野孝毅・志方出・野替一郎・宮原正樹・前原喜彦・藤吉利信・山本三毅夫・遠藤英也・1985
ラット腹水肝癌より単離した onco-fetal cDNA クローンの解析

第44回日本癌学会総会記事, 360

第8回日本分子生物学会年会

24. 藤吉利信・志方出・野替一郎・前原喜彦・遠藤英也・1985
癌特異的 cDNA クローン, pAH1005 の解析

学会開催

第43回 日本癌学会総会 会長(遠藤英也) 1984