

氏名(本籍)	きた やま ひと し (青森県)
学位の種類	理学博士
学位記番号	博甲第799号
学位授与年月日	平成2年10月31日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Isolation and Genetic Analysis of the <i>Krev-1</i> Gene with Transformation Suppressor Activity (トランスフォーメーション抑制遺伝子 <i>Krev-1</i> の単離と性質について)
主査	筑波大学教授 理学博士 渡邊 良雄
副査	筑波大学教授 理学博士 柳澤 嘉一郎
副査	筑波大学教授 理学博士 山根 国男
副査	筑波大学助教授 薬学博士 岡田 典弘

論文の要旨

1970年代の初めに、癌細胞に正常細胞を融合させると正常細胞の形質が現われる場合があることが報告されたが、果たして癌化抑制をする遺伝子が発現するのか問題となっていた。これまで、多くの癌遺伝子の解析が急速に進められてきたが、癌抑制遺伝子の単離やその性状を明らかにした報告は全くなかった。

著者は、この点に着目し、癌細胞を正常化する遺伝子の単離を試み、世界で初めて癌抑制遺伝子の単離に成功した。さらに、癌抑制遺伝子の構造と作用機構の解析から、この遺伝子は正常細胞に遍在するもので癌遺伝子産物の活性を制御する可能性があることを明らかにした。これらの結果は、癌遺伝子の機能や癌化の機構を探る観点からも重要な新発見であった。以下に得られた結果を要約する。

I. 癌抑制遺伝子の単離

癌細胞として、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 に 2copies の Kirsten 肉腫ウィルスが感染している DT 細胞を用い、これにヒト正常線維芽細胞の mRNA 由来の cDNA 発現ベクターをトランスフェクトし、正常型へ復帰した細胞 (リバータント) を得、その細胞から悪性形質抑制能を持つ cDNA を回収する方法を用いた。その結果、7 株の形態的に正常化したリバータント株がとれ、それらの細胞株では通常通り *ras* 癌遺伝子の発現が確認された。

II. 癌抑制遺伝子 *Krev-1* の構造と発現

リバータントの 1 株から回収された cDNA は DT 細胞にトランスフェクトすると正常化への誘導能を持っている。この cDNA を *Krev-1* と名づけ cDNA 塩基配列を決定したところ、全長 1.8Kb の長

さの中に184個のアミノ酸をコードできる領域が含まれていた。この遺伝子産物は*ras*癌遺伝子産物と50%前後の同一性を持っていた。*Krev-1* 遺伝子が生体内で癌化抑制に働いているとすれば広く動物種に保存されている筈である。実際、検討の結果、ヒト、ラット、マウス、ニワトリ等の高等動物にこの遺伝子が存在し、しかも、動物の各組織にレベルの差はあるが活発に発現していることが判った。

Ⅲ. 点突然変異を導入した *Krev-1* の活性

Krev-1 は *ras* 癌遺伝子と類似性をもつが逆の生物活性を持つので、*ras* 遺伝子との類似点と相違点をより明らかにする必要があり、アミノ酸1個の置換を起こす変異を特定の部位に導入した *Krev-1* の活性を調査した。これまで、*ras* のトランスフォーメーション能を左右することが知られている12番目、17番目、38番目、59番目、61番目、63番目、116番目、160番目、167番目、181番目の各アミノ酸置換を行って、活性を調べたところ、12番 Val、63番 Glu の変異をもつ *Krev-1* は腫瘍形成に対して強い抑制効果をもつことが判った。この *Krev-1* は DT 細胞のみではなく、ヒトに自然発生した腫瘍細胞のヌードマウスでの腫瘍形成を強く抑制することも明らかになった。

Ⅳ. *Krev-1* の癌抑制能領域

Krev-1 の癌抑制能を支配する領域が遺伝子のどこにあるのかを知るために *ras* 癌遺伝子とのキメラ遺伝子を作成し、癌抑制能を活性の指標として検討した。その結果、N末端1-59番までのアミノ酸配列中に抑制能をもつ領域があることが判明した。また、*Krev-1* は *ras* 遺伝子群と同様に GTP・GDP交換反応により活性が制御されていることも判った。

審 査 の 要 旨

著者は、世界の研究者達の激しい競争の中で、癌抑制遺伝子を活性を指標として単離することに初めて成功し注目を集めた。その上、単離された *Krev-1* が *ras* 癌遺伝子群と相同性をもちながら逆の生物活性を持つ新しい遺伝子であることを示し、癌抑制に関与する領域がN末端1-59番までのアミノ酸配列中に存在することも示し更に大きな注目を浴びている。著者の研究業績は単に癌抑制遺伝子を発見したにとどまらず癌化の作用機序の解明に多大な貢献をもたらした点で高く評価され、分子生物学的にも価値の高い重要な成果と云える。

よって、著者は理学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。