

理学博士西村 暹君の「核酸塩基修飾に関する有機化学・生化学的研究」

に対する授賞審査要旨

西村暹君は昭和三五年三月東京大学化学系大学院生物化学博士課程を赤堀四郎教授、丸尾文治教授の指導の下に修了した。直ちに財団法人癌研究会癌研究所の研究員となり、昭和三六年から昭和四〇年、オークリッジ国立原子力研究所生物部 (G. D. Novelli 博士) とウィスコンシン州立大学酵素研究所 (H. G. Khorana 教授) に留学した。帰国後は昭和四〇年より国立がんセンター研究所において、一貫して有機化学、生化学、分子生物学的にがんの基礎研究に取り組んで来た。

今回の受賞対象の成果も、上記のような観点に立って、細胞増殖に関わる基本的な反応である遺伝情報解読の機構の研究や、発がんにおけるDNA損傷の分子機構の研究が実を結んだものと云うことができる。その研究業績は大別して以下の二つにまとめることができる。

I tRNA 中に含まれる修飾ヌクレオシドの同定と生合成、機能に関する研究

タンパク質生合成において遺伝情報解読の要となる tRNA (転移核酸) から多種多様な高度に修飾された修飾ヌクレオシドを分離し、それらの化学構造を同定した。一九七〇年代以降に西村暹君によって構造が同定された修飾ヌ

クレオシドは一三に及び、その間に世界中で発見された修飾ヌクレオシドの一七種の大部分を網羅している。

これら修飾ヌクレオシドはどれも高度に修飾を受けたユニークな構造を持ち、化学構造的にも天然核酸成分として非常に興味あるものである。中でも昭和五〇年に化学構造が決定されたキューオシン(queuosine)と呼ばれる修飾ヌクレオシドは、7-デアザグアノシン骨格を持った新しいタイプの修飾ヌクレオシドであり、大きな反響を呼んだ。

西村暹君の tRNA 修飾塩基の研究の特徴は、単にそれら化合物の分離、同定にとどまらず、それらの遺伝情報認識における役割、それらの生合成機構、そのがんとのかんがわりなど、生物学的、医学的意義を考えて深く追求したことである。以下これらの成果を列記すると、

一、tRNA のアンチコドンの 3' 側に隣接して存在する修飾ヌクレオシドと対応する tRNA のコドン認識に一定の相関があることを発見した。すなわち U (ウリジン) で始まるコドンを認識する tRNA はほとんどの tRNA がイソペンテニルアデニン ($\text{iso}^{\circ}\text{A}$) 又はその誘導体など疎水性の修飾ヌクレオシドを含んでおり、A (アデノシン) で始まるコドンを認識する tRNA は、トリオニンを含んだアデノシン誘導体 ($\text{ad}^{\circ}\text{A}$) など親水性の修飾ヌクレオシドを有している。tRNA による正確な遺伝情報認識のためには、アンチコドンの 3' 塩基に加えて、その 3' 側の特定の修飾ヌクレオシドが必要だという原則を見いだした。

二、tRNA のアンチコドンの一字目には多種の修飾ヌクレオシドが存在し、これはコドン認識において、重要な働きをしていることを明らかにした。例えば新しく発見された $\text{emo}^{\circ}\text{U}$ は A と G の他に U も認識する。反対に K°C

はAだけを認識する。K²²Cはインロイシン tRNAに存在するが、その前駆体はCであり、これがそのままとメチオニンのコドン AUG を認識してしまふ。K²²Cに修飾されて初めてインロイシンのコドン AUGAが認識できるようになる。修飾ヌクレオシドの生成が tRNA の正しいコドン認識に必須であることを示している。

三、tRNA 中のキユーロシンは、これまでの修飾ヌクレオシドの生成とは全く異なったメカニズムで生成することを発見した。すなわち、キユーロシンの塩基(キユーイン)又はキユーインの誘導体が別途に生成し、それが tRNA 分子内のグアミン残基と交換挿入されることを明らかにした。この反応の触媒には tRNA・グアミントランスグリコシラーゼが関与するが、このような修飾反応は tRNA に限らず、核酸全般についてみても、転写後修飾の新しいタイプの反応である。興味あることに W. Farkas 教授(テネシー大学)によって哺乳動物はキユーインを合成できず、食物由来あるいは腸内細菌によって供給されなければならないことが示された。云わばキユーインは哺乳動物にとっては、自身では合成できない重要な物質である。現在キユーインの持つ機能の解明が国際的に多くの研究者の研究課題となっている。

四、Onco-fetal tRNA (がん-胎児 tRNA) の実体を明らかにした。これまで長らく、細胞のがん化とともに新たな tRNA 分子種が出現し、それががん細胞の表現系に何等かの関与をしていると云われてきたが、その実体は明らかでなかった。西村暹君は独自に開発したポストラベル法による tRNA の一次構造決定と修飾ヌクレオシドの分析により、tRNA・グアミントランスグリコシラーゼを用いる方法を利用することによって、onco-fetal tRNA は新たな tRNA 遺伝子の転写によるのではなく、tRNA のアンチコドンとその周辺に存在する修飾ヌクレオ

シドの不完全修飾によることを初めて明らかにした。特に興味あるのはキューオシンの生合成の場合である。ほとんどの正常細胞の tRNA ではキューオシンの生合成が完結しているのに対し、がん細胞では必ずキューオシンの生合成が不完全な tRNA が含まれていることである。キューオシン tRNA の細胞分化やがん化における積極的な役割が示唆されている。例えば、フレンド白血病細胞の分化と共に特異的にキューオシン tRNA が増大する。又 H. Kersten 博士（ユルランゲン大学）は粘菌の分化過程でキューオシン tRNA が変動し、それによって特定のタンパク質の合成が誘導され、又キューインの添加によって細胞分化を制御できることを示した。

II 変異原による DNA の修飾に関する研究

西村暹君はこれまでの微量修飾マクロシド同定の技術を応用して、研究領域を化学発がん物質による DNA の修飾の研究へと広げた。すなわち活性酸素（例えば X 線や γ 線照射又は臭素酸カリウムのような化学発がん物質）によって、DNA が修飾を受け、DNA 中のグアニン残基から 8-ヒドロキシグアニンが生成することを発見した。グアニン残基の修飾は二〇年間におよぶ活性酸素の研究の中で初めて見つげられたものである。西村暹君はさらに DNA 中の 8-ヒドロキシグアニンは、それを鋳型として DNA が合成される際に、顕著な読み間違いを起こすことを明らかにした。この発見は活性酸素の突然変異や発がんへの関与についての分子機構を説明する一つの手がかりを与えるものである。又、西村暹君は天然微量成分の構造決定の特技を生かし、焦がしたいわし、ハンバーガーなどから三種の突然変異原物質を分離し、それらの化学構造を決定した。化学構造が同定されたことによって、これら化

化合物の大量化学合成がおこなわれ、且つその後の当該化合物の代謝、化学発がん等の研究に大きなインパクトを与えた。

以上述べたように西村暹君の研究は、自ら開発した分析技術を使って基礎的な問題に取り組み、さらにそれを生物学的、医学的に重要な面へと広げていったとすることができる。上記研究成果の他に、その延長上の成果として以下のような業績をあげることができる。

一、キヌーオシンの誘導体である7-デアザグアノシン5'-β-D-リボシリン酸を dGTP の代わりに用いて GC 含量の高い DNA 塩基配列決定を容易に行う方法を開発した。今やこの方法は世界中で広く用いられている。

二、tRNA 研究の発展からテトラヒメナの遺伝情報認識は遺伝情報の普遍性からはずれていることを発見した。この成果は分子進化の領域で最近大きな反響を呼んだ。

三、DNA の構造解析をがん遺伝子に応用し、*L-myc* や *EGFR* の存在様式が、ヒト肺がんの転移の度合や、ヒト肺がん、胃がん、直腸がんの発生頻度と相関があることを見いだした。

四、大塚栄子教授(北大、薬学部)、S.-H. Kim 教授(カリフォルニア大学)との共同研究により、*Chlamydia* がん遺伝子産物、*p21* の三次構造を明らかにした。がん遺伝子産物で三次構造が明らかになったのは世界で初めてである。

1. S. Nishimura, D.S. Jones and H.G. Khorana: Studies on polynucleotides. XLVIII. The *in vitro* synthesis of a co-polypeptide containing two amino acids in alternating sequence dependent upon a DNA-like polymer containing two nucleotides in alternating sequence. *J. Mol. Biol.* **13**, 302-324 (1965).
2. S. Nishimura and G.D. Novelli: Dissociation of amino acid acceptor function of sRNA from its transfer function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**, 178-184 (1965).
3. S. Nishimura, Y. Yamada and H. Ishikura: The presence of 2-methylthio- N^6 -(2^2 -isopentenyl) adenosine in serine and phenylalanine transfer RNA's from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 517-520 (1969).
4. H. Ishikura, Y. Yamada, K. Murao, M. Saneyoshi and S. Nishimura: The presence of N^1 -[9-(β -D-ribofuranosyl) purin-6-ylcarbamoyl]threonine in serine, methionine and lysine transfer RNA's from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 990-995 (1969).
5. K. Murao, M. Saneyoshi, F. Harada and S. Nishimura: Uridin-5-oxy acetic acid: A new minor constituent from *E. coli* valine transfer RNA I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 657-662 (1970).
6. S. Nishimura: Fractionation of transfer RNA by DEAE-Sephadex A-50 column chromatography. in *Procedures in Nucleic Acid Research*, Ed. by G.L. Cantoni and D.R. Davies, Harper and Row, New York, Vol. 2, pp. 542-564 (1971).
7. S. Nishimura: Minor components in transfer RNA: Their characterization, location, and function. in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Ed. by J.N. Davidson and W.E. Cohn,

- Academic Press, New York, Vol. 12, pp. 49-85 (1972).
8. Z. Ohashi, M. Maeda, J.A. McCloskey and S. Nishimura: 3-(3-Amino-3-carboxypropyl) uridine: A novel modified nucleoside isolated from *Escherichia coli* phenylalanine transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **13**, 2620-2625 (1974).
 9. S. Nishimura, Y. Taya, Y. Kuchino and Z. Ohashi: Enzymatic synthesis of 3-(3-amino-3-carboxypropyl) uridine in *Escherichia coli* phenylalanine transfer RNA: Transfer of the 3-amino-3-carboxypropyl group from S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 702-708 (1974).
 10. F. Harada and S. Nishimura: Purification and characterization of AUA specific isoleucine transfer ribonucleic acid from *Escherichia coli* B. *Biochemistry* **13**, 300-307 (1974).
 11. H. Kasai, Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, N.J. Oppenheimer, P.F. Crain, J.G. Liehr, D.L. von Minden and J.A. McCloskey: Structure of the modified nucleoside Q isolated from *Escherichia coli* transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry* **14**, 4198-4208 (1975).
 12. Y. Taya, Y. Tanaka and S. Nishimura: 5-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545-547 (1978).
 13. N. Okada, N. Shindo-Okada, S. Sato, Y.H. Itoh, K. Oda and S. Nishimura: Detection of unique tRNA species in tumor tissues by *Escherichia coli* guanine insertion enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4247-4251 (1978).
 14. N. Okada and S. Nishimura: Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3061-3066 (1979).

15. Y. Kuchino, H. Kasai, Z. Yamazumi, S. Nishimura and E. Borek: Under-modified Y base in a tRNA^{Phe}, isoacceptor observed in tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **565**, 215-218 (1979).
16. N. Okada, S. Noguchi, H. Kasai, N. Shindo-Okada, T. Ohgi, T. Goto and S. Nishimura: Novel mechanism of post-transcriptional modification of tRNA: Insertion of bases of Q precursors into tRNA by a specific tRNA transglycosylase reaction. *J. Biol. Chem.* **254**, 3067-3073 (1979).
17. N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto and S. Nishimura: Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver. *Biochemistry* **19**, 395-400 (1980).
18. Y. Kuchino, N. Shindo-Okada, N. Ando, S. Watanabe and S. Nishimura: Nucleotide sequences of two aspartic acid tRNAs from rat liver and rat ascites hepatoma. *J. Biol. Chem.* **256**, 9059-9062 (1981).
19. Y. Kuchino, E. Borek, D. Grunberger, J.F. Mushinski and S. Nishimura: Changes of post-transcriptional modification of wye base in tumor-specific tRNA^{Phe}. *Nucl. Acids Res.* **10**, 6421-6432 (1982).
20. S. Noguchi, Y. Nishimura, Y. Hirota and S. Nishimura: Isolation and characterization of an *E. coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase: Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *J. Biol. Chem.* **257**, 6544-6550 (1982).
21. S. Nishimura and Y. Kuchino: Characterization of modified nucleosides in tRNA. *in* *Methods of DNA and RNA sequencing*, Ed. by S.M. Weissman, Praeger publishers, CBS Inc., New York, pp. 235-260 (1983).
22. S. Nishimura: Structure, biosynthesis and function of queuosine in transfer RNA. *in* *Progress in*

- Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Ed. by W.E. Cohn, Academic Press, New York, Vol. 28, pp. 49-73 (1983).
23. Y. Taya, K. Hosogai, S. Hirohashi, Y. Shimamoto, R. Tsuchiya, N. Tsuchida, M. Fushimi, T. Sekiya and S. Nishimura: A novel combination of K-ras and myc amplification accompanied by point mutational activation of K-ras in a human lung cancer. *EMBO J.* 3, 2943-2946 (1984).
 24. H. Kasai and S. Nishimura: Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucl. Acids Res.* 12, 2137-2145 (1984).
 25. H. Kasai, H. Hayami, Z. Yamaizumi, H. Saito and S. Nishimura: Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucl. Acids Res.* 12, 2127-2136 (1984).
 26. N. Shindo-Okada, H. Akinoto, H. Nomura and S. Nishimura: Recognition of UAG termination codon by mammalian tyrosine tRNA containing 6-thioqueuine in the first position of the anticodon. *Proc. Japan Acad.* 61(B), 94-98 (1985).
 27. N. Hanyu, Y. Kuchino, H. Beier and S. Nishimura: Dramatic events in ciliate evolution: Alteration of UAA and UAG termination codons to glutamine codons due to anticodon mutations in two *Tetrahymena* tRNAs^{Gln}. *EMBO J.* 5, 1307-1311 (1986).
 28. S. Mizusawa, S. Nishimura and F. Seela: Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucl. Acids Res.* 14, 1319-1324 (1986).
 29. K. Miura, Y. Inoue, H. Nakamori, S. Iwai, E. Ohtsuka, M. Ikehara, S. Noguchi and S. Nishimura:

- Synthesis and expression of a synthetic gene for the activated human c-Ha-*ras* protein. Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **77**, 45-51 (1986).
30. H. Kasai, P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka: Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**, 1849-1851 (1986).
31. Y. Kuchino, H. Beier, N. Akita and S. Nishimura: Natural UAG suppressor glutamine tRNA is elevated in mouse cells infected with Moloney murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2668-2672 (1987).
32. Y. Kuchino, F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka and S. Nishimura: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* **327**, 77-79 (1987).