

氏名	いけ はた ひろ のぶ 池 畑 広 伸
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 博 第 1291 号
学位授与の日付	平成 3 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科動物学専攻
学位論文題目	マウス培養細胞における突然変異特異性の研究

(主 査)
論文調査委員 教授 加藤幹太 教授 日高敏隆 教授 米田満樹

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類細胞における突然変異の特異性を DNA 塩基配列のレベルで容易に解析するための方法として、申請者はこれまでに行われた方法の欠陥を克服できる実験系の確立に努力した結果、突然変異の標的遺伝子としてヒトの *hprt*-cDNA を採用し、これを組み込んだシャトルベクター *pZipHprtNeo* を作製した。このレトロウィルス型ベクターはマウス細胞の染色体中に組み込まれるので、ゲノム DNA 上に起こる事象を忠実に反映することが期待できる。

次に、*pZipHprtNeo* を細胞当たり 1 コピーだけ安定に組み込んだマウス細胞 VH-12 株を分離して、突然変異の解析に利用できるかどうかを検討した結果、HPRTase 欠損株の選択のために 6-チオグアニンを用い、さらに薬剤耐性遺伝子 *neo* の発現の選択のために G418 (Geneticin) を用いる二重選択法によって、ゲノム遺伝子とほぼ等しい自然突然変異頻度を実現することができた。これは、ベクター DNA がゲノムから異常に脱落することを排除し得たものと考えられる。ベクターの回収には、A. D. Miller らの用いた COS 細胞融合法を採用して、全 *hprt*-cDNA 断片を含むベクター DNA を高い効率で回収した。回収した一群のプラスミドの 1 つについて全塩基配列を決定した結果は、D. J. Jolly らの結果と完全に一致し、ベクターが細胞へ導入された後も正常に保存されていることが確認できた。

この実験系を用いて、VH-12 細胞に組み込んだ *hprt*-cDNA に生ずる自然突然変異の特異性の解析を塩基配列の決定によって行った。その結果を列挙すると、(1)標的遺伝子上の全域にわたって突然変異が生じており、特にホットスポットにあたる部位は見られない、(2)生じた突然変異のうち、フレームシフト型変異が最も多くて約 40% を占め、しかも数塩基の欠失によるものがほとんどである、(3)塩基置換型変異は約 20% を占め、そのほとんどはトランスポージョン型である、(4)欠失型変異も約 20% を占め、ほかに倍加型、挿入型も検出される、(5)これまではほとんど記載されていない欠失-挿入型突然変異も見出される。

申請者は、この結果について詳しく考察を行っているが、とくに突然変異の発生部位にしばしば短い反復配列から或るコンセンサス構造が見られることに注目して、この原因についてのモデルを提出し、マウ

ス細胞の自然突然変異の発生機構と DNA 複製エラーの関連性について論じている。

論文審査の結果の要旨

哺乳類細胞では、その遺伝子が大きく構造も複雑でクローニングが容易でないために、突然変異の特異性を塩基配列レベルで解析することは困難であった。サザン法では 50bp 以下の変化は検出困難であり、シャトルベクター法が用いられ始めた。しかし従来の自律複製型シャトルベクターは、細胞導入時にベクター DNA に損傷が起って高頻度の突然変異が生ずるという欠陥があった。

申請者は、これらの欠陥を克服するものとして、1つの実験系を開発した。すなわち、pZipHprtNeo というシャトルベクターを作製し、突然変異細胞の選択とベクターの回収に工夫を加えて、信頼度の高い系を確立した。このレトロウィルス型ベクターは、標的遺伝子 hprt-cDNA を含み、マウス細胞の染色体中に組み込まれるが、さらに細胞当たり 1 コピーだけを安定に組み込んだ細胞 VH-12 を分離し、変異細胞の選択に 6-チオグアニンと G418 の二重選択法を用いて、ゲノム遺伝子とはほぼ等しい自然突然変異頻度を生ずることを確かめている。ベクターの回収に COS 細胞融合法を採用していることも結果の信頼性を高めている。

この詳細に吟味された実験系を用いて、VH-12 細胞に生ずる自然突然変異の特異性を調べた結果、フレームシフト型変異が約 40% を占めること、塩基置換型は約 20% で、その大部分はトランスポージョン型であること、欠失型も約 20% を占め、倍加型や挿入型も見出されること、また欠失-挿入型変異が始めて明らかにされたこと、など多くの興味ある事実を見出している。

申請者の用いた方法が極めて信頼度の高いものであることを考慮すれば、この結果は 1 つの規範として今後多くの突然変異研究者に引用されるべきものと言えよう。申請者は、この結果に基づいて自然突然変異発生の機構について示唆に富む多くの考察を加え、特に新しく同定された欠失-挿入型変異の成立についてのモデルを提唱している。これらを総合して、本論文は、マウス培養細胞における突然変異特異性の研究として高く評価できる内容を有している。

よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心に関連する研究分野について試問した結果、合格と判定した。