

審査の結果の要旨

氏名 土田里香

本研究は、放射線などの外的ストレスにより細胞内で損傷を受けた DNA 修復にかかわる最初の分子である ATM (Ataxia telangiectasia mutated) の遺伝子の変異を迅速かつ安価にスクリーニングする方法を、出芽酵母において確立したものである。

ATM は癌抑制遺伝子である p53 をその上流で制御し、現在、癌になりやすい体質を決定する分子として注目されている。

ATM 遺伝子の両対立遺伝子に truncating mutation を持った場合は毛細血管拡張性運動失調症 (AT; Ataxia telangiectasia) という高発癌性遺伝性疾患となるが、片方の対立遺伝子に変異を有する AT 保因者(ATM ヘテロ変異)においても発癌のリスクが高いことが報告されており、AT 保因者は人口の約 1% といわれている。しかし、ATM 遺伝子はヒトの遺伝子としては最大級の 66 個のエクソン数を持つ巨大な遺伝子であるため、遺伝子変異の発見には多大な労力を伴い、これまで AT 保因者のスクリーニングはほとんど行われていない。本研究により確立した ATM 遺伝子変異スクリーニングとしての酵母アッセイ法は下記の点で優れている。

1. ATM cDNA を 6 分割し、得られた 6 種類の PCR 産物をギャップベクターに相同組換えして環状プラスミドとし、ロイシン不含有培地上で選択後、ウラシル・ロイシン不含有培地に移して、ウラシルの要求性の違いにより表現形を正確に決定することが証明された。各々 6 領域の PCR 産物は互いに重なりを有して増幅されるようにプライマーの設定がなされており、ATM cDNA 変異検出に漏れはない。これにより 1 週間以内に被検遺伝子が野生型か否か、変異を持っているとすればどの領域に存在するかまでをスクリーニングすることが可能となった。

2. 本方法では対立遺伝子の変異を分けて検索できる。これまでは、異常が対立遺伝子の片方に重複しているのか、双方に分散しているのかはそれぞれの対立遺伝子をサブクローニングして遺伝子配列を決定することによって確認しなければならなかった。しかし本方法によれば対立遺伝子が別個に解析できることが証明された。
3. 酵母アッセイ法を用いた遺伝子変異の検索はこれまでに家族性大腸ポリポシスの原因遺伝子である *APC* (adenomatous polyposis coli)、家族性乳癌・卵巣癌の原因遺伝子である *BRCA1* (responsible for familial breast cancer) に応用されスクリーニングの報告がなされているが、*ATM* 遺伝子について 6 領域に分けて正確なスクリーニングができることを証明したのは本研究が初めてである。
4. *ATM* 遺伝子を含む染色体 11q23.1 の領域は、乳児白血病や二次性白血病において染色体転座を生じる *MLL* (mixed-lineage leukemia) 遺伝子の座位でもあり、本方法を用いた *AT* 保因者における高発癌性の問題の解決は、これら白血病発症機構の解明に繋がると考えられる。
5. 本方法は他の高発癌性遺伝病に関わる分子のヘテロ変異体 (保因者) のスクリーニングにも応用することが可能である。

以上、本研究により、遺伝子サイズの大きさのためこれまでほとんど解明がされていなかった遺伝的発癌要因である *ATM* 遺伝子変異の発見を容易にした。また、本方法は他の高発癌性遺伝病の原因遺伝子の変異の検出にも応用が可能であり、迅速、安価、実際的でかつ汎用性に優れている。本方法を用い広くスクリーニングを行うことにより患者や保因者の検出に役立つことが期待され、ヒトの発癌機構解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。