

論文審査の結果の要旨

氏名 井野麻美

本論文は4章からなる。第1章は、イントロダクションであり、本論文の主題である、*in vivo* における遺伝子ターゲティングの、現在までに得られた知見などについて述べられている。RNA/DNA キメラオリゴヌクレオチドによる *in vivo* において高頻度な遺伝子ターゲティングが報告されたが、このオリゴによる遺伝子ターゲティングは、再現性がないことや、PCR 法をもちいた測定法の定量性などについて、数多く議論されている。

第2章は、Mutamouseトランスジェニック・リポーターマウスシステムを検出系として使用した、上述の キメラオリゴによる、遺伝子ターゲティングの試みについて述べられている。このマウスの染色体上には、野生型 *lacZ* 遺伝子をもつ、バクテリオファージラムダゲノムが挿入されており、マウスゲノム DNA の *in vitro* パッケージングによって、バクテリオファージ粒子として *lacZ* 遺伝子を回収できる。また、*lacZ* のファージが選択的に増殖する、p-gal を含んだ選択培地を使用したポジティブ選択によって、*lacZ* となったファージを検出できる。まず目的の変異をもつラムダファージを作成し、p-gal 選択をおこなった。野生型 *lacZ* をもつラムダファージは、p-gal 存在下でプラーク形成効率が約 10^{-4} に減少した。一方、*lacZ* に期待される変異をもつラムダファージは、p-gal 存在下においてもプラーク形成効率は約 90%となり、効率よく選択されることも確認されている。キメラオリゴは、HVJ-liposome の肝臓への直接注射によって投与された。切除した肝臓から抽出したゲノム DNA を、*in vitro* パッケージングし、得られたラムダファージの総プラーク数、*lacZ* となったファージ数、及び突然変異体頻度を測定した。このように、PCR によらない、高感度かつ定量的な検出法を使用して実験をおこなったが、予想された組換え体は検出されず、頻度は $1/20000$ 以下であった。この結果は、以前の報告より3桁下で、この分野の研究にインパクトを与えるものである。以上の結果は、Journal of Gene Medicine 誌上ですでに公表されている。

第3章は、同マウスシステムを使用した、アデノウイルスベクターによる遺伝子ターゲティングについて述べられている。Fujita らは、複製能欠損型アデノウイルスベクターを使用し、培養細胞において遺伝子ターゲティングを検討した結果、その頻度は 10^{-5} から 10^{-4} であった。また、その組換え体は相同組換えのみが起こったものが多く、非同組換え頻度は低く抑えられていた。そこで、*lacZ* 遺伝子上に点変異をもつ相同領域約 8.1kb を、アデノウイルスゲノムの EI 欠損部位に挿入し、Mutamouse の尾静脈に注

入した。上記と同様に、高感度かつ定量的な遺伝子ターゲティングの頻度の測定を試みたが、組換え体は検出されなかった。アデノウイルスによる *in vivo* における遺伝子ターゲティングは、今まで、おこなわれておらず、世界で最初の試みであり、評価に値する。

第4章では、総括的なディスカッションがおこなわれ、今後の展望について述べられている。組換え体が発見されなかった要因のひとつとして、標的遺伝子のクロマチン構造について述べられている。今後の、この分野の研究に、大きな影響を与えると考えられる。

なお、本論文第2章は、Seiji Yamamoto, Yasufumi Kaneda, Ichizo Kobayashi、第3章は、Yasuhiro Naito, Hiroyuki Mizuguchi, Naofumi Handa, Takao Hayakawa, Ichizo Kobayashi との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(理学)の学位を授与できると認める。