

Title	DNAポリメラーゼd遺伝子改変マウスの解析とそれを利用した新規の哺乳動物進化実験モデル系の開発
Author(s)	内村, 有邦
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49307">https://hdl.handle.net/11094/49307</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	うちむらありくに 内村有邦
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第22188号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	DNAポリメラーゼ $\delta$ 遺伝子改変マウスの解析とそれを利用した新規の哺乳動物進化実験モデル系の開発
論文審査委員	(主査) 教授 八木 健 (副査) 教授 花岡 文雄 教授 田中亀代次

### 論文内容の要旨

哺乳類の進化の問題を考える上で、形態進化と分子進化の隔たりを埋めることは重要である。現在の哺乳類がDNA鎖上に保持している遺伝情報は、進化の過程を通して度重なる突然変異の発生と淘汰の歴史を繰り返すことで形成されてきたと考えられている。そこで、本研究ではそのような形態進化と分子進化の隔たりを埋めるための方法論として、遺伝子組み換え技術の利用により突然変異の発生率を増加させたマウス系統を作製し、そのマウス系統を用いることで、通常は解析することが難しい世代を超えて蓄積される突然変異の影響を実験室内で解析可能にする新しい実験モデルを考えた。これまでに行われた遺伝学的な研究によって、実際の進化の過程で生じている突然変異の多くはDNA鎖の複製エラーに起因するものであることが示唆されている。そこで、本実験モデルではDNA鎖の複製エラーに起因する突然変異の発生率を増加させることにより、突然変異蓄積の影響を解析しようと考えた。本研究ではDNA鎖の複製を担うと考えられているDNAポリメラーゼ $\delta$  (Pol $\delta$ )に着目し、その複製忠実度を低下させることで新しい実験モデルの開発を行おうと考えた。

Pol $\delta$ は染色体のDNA鎖の複製や修復に関わると考えられているが、哺乳類の生体内におけるその生理学的な機能については、これまで詳しく調べられていなかった。そこで、Pol $\delta$ の生理学的な役割を明らかにするために、ジーンターゲット技術を利用してPol $\delta$ の触媒活性を担うサブユニット (*pold1* 遺伝子) を機能的に破壊したマウスを作製し、その表現型の解析を行った。ヘテロ接合型の *pold1* 欠損マウスは、野生型と同様に生育し繁殖可能であり、目立った異常は観察されなかった。一方、ホモ接合型の *pold1* 欠損マウスは胎生致死であり、E3.5やE4.5ではホモ接合型の胚に特別な異常はみられなかったが、E7.5以降ではホモ接合型の胚は1つも見つからなかった。これらのことから、*pold1* 遺伝子の欠損は着床期の致死を引き起こすことが明らかになった。さらに詳しく解析するために、回収した胚盤胞を *in vitro* で培養した結果、*pold1*<sup>-/-</sup> 胚では内部細胞塊の増殖が起こらないことが明らかになった。また、3日間培養した *pold1*<sup>-/-</sup> 胚では、DNA合成はほとんど行われておらず、高頻度でアポトーシスが起きていることが明らかになった。これらの結果から、マウスの発生過程において *pold1* 遺伝子は必要不可欠であることが確認され、マウスの生体内でもPol $\delta$ はDNA合成に関わっていることが示唆された。

これまでに、DNA複製の正確性に関わると考えられているPol $\delta$ の3'-5'エクソヌクレアーゼ活性を欠損したマウスは高頻度で癌を発症することが報告されている。我々は、そのマウスと同様の塩基置換を利用して、Pol $\delta$ の3'-5'エ

クソヌクレアーゼ活性を欠失させたマウスを C57BL/6 系統で作製した。エクソヌクレアーゼ活性を欠失したマウスは、*pold1*<sup>exo/exo</sup>、*pold1*<sup>exo/+</sup> 個体とも、正常に出生し繁殖可能であることが確認された。また、*pold1*<sup>exo/exo</sup> 個体では胸腺肥大による死亡や尾の瘤が高頻度で観察された。これらの結果は先行研究の結果とよく一致している。さらに、*pold1*<sup>+/-</sup> 個体との交配により作製した *pold1*<sup>exo/-</sup> 個体からも *pold1*<sup>exo/exo</sup> 個体と同様に胸腺の肥大や尾の瘤が高頻度で観察された。これらの結果により、Pol δ の 3'・5' エクソヌクレアーゼ活性が発癌の抑制に必須であることをより明確にすることができた。

世代を経て蓄積される突然変異の影響を解析する目的で、現在は、突然変異の発生率の上昇が期待される *pold1*<sup>exo/exo</sup> 個体の継代を繰り返している。これまでに、興味深い表現型を示すマウスが出現しており、従来までほとんど報告がない表現型を持つマウス系統も誕生している。今後は、このような実験モデルを利用し、実験的な研究と理論的な研究を組み合わせることで、哺乳類の形態進化と分子進化の隔たりを埋めていくことができなしかと考えている。

### 論文審査の結果の要旨

申請者は、マウスの生殖系列を通して突然変異が蓄積されていく過程を実際に実験室内で解析することで哺乳類の進化に関する新たな知見を得ようと考えた。通常は発生頻度が低い突然変異を効率的に解析するために DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼ δ に着目し、その複製時の忠実度を低下させた遺伝子変換マウスを作製した。さらには、DNA ポリメラーゼ δ を機能的に破壊した遺伝子欠損マウスをも同時に作製し、DNA ポリメラーゼ δ がマウスの正常な初期発生に必須であることを明らかにした。また、申請者は、この DNA ポリメラーゼ δ の複製忠実度を低下させた突然変異誘発マウス系統を利用することで、突然変異が蓄積される過程についての研究を行い、これまでにマウス個体レベルにおける多様な表現型変異を得ることに成功している。よって、申請者が本研究で開発した実験系は哺乳類における遺伝的変異蓄積と表現型変異との関連性を解き明かすための革新的な実験モデルとなる可能性があると考えられる。これらのことから、申請者は、学位の授与に値すると考える。