氏　　　　名	木本　崇文
授与した学位	博　士
専攻分野の名称	工　学
学位授与番号	博甲第４５６２号
学位授与の日付	平成２４年　３月２３日
学位授与の要件	自然科学研究科　機能分子化学専攻 （学位規則第５条第１項該当）
学位論文の題目	Development of a novel *in vivo* gene mutation assay using the *Pig-a* gene as an endogenous reporter （Pig-a 遺伝子を内在性レポーターとして用いる新規な生体内遺伝子変異測定法の開発）
論文審査委員	教授　大森齊　　教授　今村維克　　准教授　金山直樹　　教授　酒井裕

学位論文内容の要旨

The evaluation of gene mutations *in vivo* is useful to further assess the genotoxic potential of chemicals that may be related with carcinogenicity. Recent studies suggested that the X-linked phosphatidylinositol glycan class A (*Pig-a*) locus had been identified as a reporter of *in vivo* gene mutation in flow cytometry-based assays conducted on peripheral red blood cells (RBC) or bone marrow erythroid (BME) samples from laboratory animals. Mutation in *Pig-a* could abolish GPI synthesis, which, in turn, would cause a deficiency in GPI anchored protein markers (*e.g.*, CD59 or CD24) on the cell surface. The function of the Pig-a protein in the synthesis of GPI anchors is conserved in variety of eukaryotic cells, including human and rodent cells, which implies that *Pig-a* mutants can be measured in a similar manner in different mammalian species. Thus the *Pig-a* assay is expected as a promising tool for evaluating *in vivo* mutagenicity.

I focused on further assessing the feature of *Pig-a* mutant kinetics and improving the assay protocol more efficiently to increase the throughput of the assay. Several flow cytometric approaches have been developed for measuring *Pig-a* mutant frequency using rats or mice treated with typical mutagen, *N*-nitroso-*N*-ethylurea. In studies conducted with rats, I developed an original *Pig-a* assay and monitored the kinetics of RBC *Pig-a* mutation frequency in rats treated with ENU. Our data indicate that ENU-induced *Pig-a* mutant RBCs in rats persist for as long as 6 months after a single dose or the beginning of split doses of ENU, and that *Pig-a* mutant RBCs accumulate in a near-additive fashion.

In studies conducted with mice, I developed an assay for measuring *Pig-a* gene mutation in BME and RBC using an antibody to glycophorin-associated protein TER-119, a specific cell-surface marker of murine erythroid lineage. By conducting both BME and RBC *Pig-a* assay, I provided the crucial evidence for the mutant manifestation model, which *Pig-a* mutations causing deficiency in GPI-anchored markers are fixed in BM, where the mutants proliferate, differentiate and transit to RBC.

Furthermore, I developed novel rat *Pig-a* assays that facilitate measuring mutant frequencies in two early arising populations of RBC, BMEs and reticulocytes. I believe that these *Pig-a* assays will become a useful in *in vivo* toxicology assay of chemicals that might induce *in vivo* gene mutation.

論文審査結果の要旨

木本氏は医薬品を含む化学物質の発癌性に関連する遺伝毒性を，in vivoで効率よく的確に評価する実験系の開発を目指して本研究を行った。X染色体上に存在するphosphatidylinositol glycan class A（Pig-a）遺伝子に着目し，この遺伝子をレポーターとして選択することを構想した。Pig-a遺伝子が変異して機能を失うとGPIアンカーが合成されなくなるので，細胞表面のGPIアンカータンパク質の発現が低下する。木本氏は末梢の赤血球（ＲＢＣ）や骨髄赤芽球（ＢＭＥ）上に多く発現するGPIアンカータンパク質であるＣＤ５９やＣＤ２４の発現を指標として，被験化合物の変異原性を測定する手法を開発した。Pig-a遺伝子の機能はヒトからマウス，ラットに至るまで多くの生物種で保存されているため，この遺伝子をレポーターとして用いることは大きな意味がある。

In vivoでの変異原性を評価するために，被験薬物を短期間あるいは長期間投与した動物から血液を少量採取するだけで，血球上のＣＤ５９やＣＤ２４分子のレベルをフローサイトメトリーにより，短時間で効率よく測定する方法を開発することに成功した。この方法は例えばN-nitroso-N-ethylureaなどの代表的変異原物質を１回投与したマウスやラットでも，その変異原性を検知できる鋭敏な方法である。実際にどのような変異が導入されたかについても，木本氏はPig-aの塩基配列解析により，精密な結果を得ている。また，変異原投与の影響がどの程度長期間持続するかについても，興味あるデータが得られている。この方法は今後，医薬開発の現場などで，実用的な変異原性試験法として広く用いられることが期待される。

以上を勘案して，本論文は博士（工学）の学位を授与するに値するものと認定する。