

氏名(本籍)	さか 坂	もと 本	とおる 透	(東京都)
学位の種類	医学博士			
学位記番号	博甲第566号			
学位授与年月日	昭和63年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	B16マウスメラノーマ細胞の由来の transform 遺伝子 (dissertation 形式)			
主査	筑波大学教授	医学博士	田村	昇
副査	筑波大学教授	医学博士	上野	賢一
副査	筑波大学教授	医学博士	杉田	良樹
副査	筑波大学教授	医学博士	添田	周吾
副査	筑波大学助教授	薬学博士	小野崎	菊夫

## 論 文 の 要 旨

がん細胞においては、その腫瘍特異抗原が細胞表面に発現されるにいたるまでの機構は現在全く不明である。しかしながら、がん遺伝子の活性化により細胞のがん化が起きるのであれば、その現象と腫瘍抗原遺伝子の発現との間に何らかの関係が存在するはずである。本研究ではこのような考えに基づき、B16マウスメラノーマ細胞をモデルとして用い、腫瘍特異抗原の発現に関与しているゲノム DNA について、細胞のがん化との関係を調べた。

B16マウスメラノーマ抗原の発現に関与することがすでに明らかにされているゲノム DNA (pD 2-7) は PV103 コスミドベクターに組み込まれている。全長は 34.8Kb で、EcoRI 制限酵素により、5.8, 0.8, 2.8, 8.2, 5.1, 12.1kb の 6 個の DNA 断片に分けられる。この pD 2-7 ゲノム DNA をリン酸カルシウム沈澱法により NIH/3T3 細胞に導入した。そして、このトランスフェクタント細胞をヌードマウスに移植したところ、移植後約 10 日で腫瘍の形成を認めた。これにより、pD 2-7 には transform 活性が存在することが判明した。次に、この transform 活性が pD 2-7 上のどの部位に局在しているかを知るために、EcoRI 制限酵素を用いた部分消化により pD 2-7 deletion mutant を作成し、同様な方法で活性の検定を行った。その結果、5.8, 0.8, 2.8kb EcoRI 断片から構成される pD 2-7-1 deletion mutant を導入した場合に腫瘍の形成を認め、transform 活性はこの DNA 上に存在することが明らかとなった。

そこで、pD 2-7-1 DNA 上に存在する遺伝子を確認するため、5.8, 0.8, 2.8kb EcoRI 断片

をプローブに用い、B16mRNA に対してノザンプロット解析を行ったところ、18S の大きさの mRNA が検出された。この18SmRNA に相当する遺伝子をクローニングするため、B16cDNA ライブラリーを作成し、0.8及び2.8kb断片をプローブに用いスクリーニングを行った。その結果、両方の DNA 断片に対して陽性となる1.6kb の cDNA クローン D2-18が単離された。この cDNA はポリ (A) テイルの長さを考慮に入れるとほぼ全長に近いものであると考えられた。次にこの遺伝子の pD2-7 上での構成をサザンプロット解析により調べると、D2-18遺伝子はpD2-7の5.8, 0.8, 2.8および8.2kb EcoRI 断片にわたって存在し、5個のエクソンから成ることが判明した。したがって、pD2-7-1上にはD2-18遺伝子のみしか存在せず、この遺伝子が transform 活性を担っていることが明らかとなった。

次に、得られた遺伝子の機能を推定するため cDNA クローンの塩基配列を決定した。D2-18 cDNA は、全長が1605bpで1029bp から成る open reading frame を含んでいた。3末端にはポリ (A) 付加シグナル存在し、7個のポリ (A) テイルが付着していた。この open reading frame から予測される遺伝子産物は、342のアミノ酸からなり、分子量は37722である。また、GenBank および NBRF データベースにより相同性の検索を行ったところ、D2-18遺伝子はまったく新しい transform 遺伝子であると考えられた。

さらにこの遺伝子産物のアミノ酸配列の詳細な解析から、この蛋白質が、DNA と結合して遺伝子発現の調節を司っている可能性、あるいは、何らかの因子のレセプターとして働きそれ自身がリン酸化の基質となることによってシグナル伝達に関与している可能性、などが推定された。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、B16マウスメラノーマ細胞をモデルに用い、腫瘍特異抗原の発現に関与しているゲノム DNA について、細胞のがん化との関連を調べ、このゲノム DNA には腫瘍抗原の発現に関わる活性のほかに transform 活性も存在することを明らかにし、さらにこの transform 活性を有するゲノム DNA 領域を限定し、そこに存在する遺伝子を単離し、その遺伝子および遺伝子産物の構造と機能について推論を加えたものである。これらの成果は、著者の綿密な実験計画と適切な実験技術によるものであり、がん遺伝子の研究の発展に大いに寄与するものと、高く評価できる。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。