

Title	CHROMOSOMAL ASSIGNMENT OF HUMAN GENES FOR GASTRIN, THYROTROPIN (TSH)- β SUBUNIT AND C-erbB-2 BY CHROMOSOME SORTING COMBINED WITH VELOCITY SEDIMENTATION AND SOUTHERN HYBRIDIZATION
Author(s)	Fukushige, Shinichi
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36004
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【16】

氏名・(本籍)	福	重	真	一
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8093	号	
学位授与の日付	昭和63年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒト染色体のソーティングとそれを用いたガストリン, 甲状腺刺激ホルモンβ鎖, c-erb B-2 遺伝子の染色体マッピング			
論文審査委員	(主査) 教授	松原 謙一		
	(副査) 教授	吉川 寛	教授	内田 驍

論文内容の要旨

[目的]

近年, 組換えDNA技術の普及に基づき, 生命活動で重要な働きをする遺伝子が次々と単離されている。これらの遺伝子を特定染色体あるいは染色体上の特定部位にマッピングすることにより遺伝子の染色体地図を作製できる。これは遺伝子相互の関係を総合的に理解する上で欠くことのできないものである。

本研究の目的はセルソーターで分画したヒト染色体を材料として任意の遺伝子を特定染色体上にマッピングできるシステムを開発することにある。

[方法ならびに成績]

シングルレーザー方式のセルソーターを用いた場合, 各染色体を完全に分離することは不可能である。そのため, 2段階で遺伝子を特定染色体へマッピングした。

i) 核型の正常な細胞から染色体試料を調製しエチジウムブロミドで染色後, 全染色体を8つのグループにソーティングする。次に, 各グループからDNAを抽出し, 調べたいヒト遺伝子をプローブとしてサザンハイブリッド法を行い, 遺伝子がどの染色体グループに属するのかを決定する。

ii) グループ内のどの染色体に位置するのを知るために2種類の細胞を利用した。1つは染色体間で転座の見られる細胞である。そのような細胞中にはふつう, 特定の染色体に関し, 正常な大きさの染色体と転座によって大きさの異なる染色体が同時に存在している。そのため, これらの染色体を異なるグループにソーティングできれば遺伝子をマッピングすることができる。また, ヒトげっ歯類の雑種細胞を用いても特定染色体へのマッピングが可能である。この場合, グループ内の特定の染色体のみを含

む雑種細胞からその部分だけをソーティングし、解析に用いた。

セルソーターにかける染色体試料は細胞をコルセミドで分裂期に止め、穏やかな条件で細胞膜を壊しただけなので、染色体以外に様々な物質が混在している。また、ヒト染色体は24種類あるが、セルソーターは一度に2つの画分しか分離できない。このような試料と装置の特性からソーティングの速度を上げる一つの手段としてショ糖密度勾配遠心法によって分画した試料をソーティングの材料にした。この方法は非常に有効で、染色体粗抽出液中に混在する細胞の破片や核を大部分取り除くことができ、且つ大まかに分画された染色体を得ることができた。これによりソーティングに要する時間は染色体試料をそのままセルソーターにかける場合に比べ1/5~1/10に短縮できた。

また、サザンハイブリッド法にも改良を加え、各染色体あたり数十ngのDNAで十分シグナルが得られるようになった。最終的に2日間セルソーターを動かし、各染色体あたり4~5×10⁵個ソーティングし、サザンハイブリッド法で明確なシグナルを得る条件を確立した。

この方法を用い、新たに単離されたヒトガストリン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)β鎖、*c-erb*B-2遺伝子を特定染色体上にマッピングした。まず、正常な核型を示すヒトリンパ芽球様細胞株GM0131(2n=46, XX)の染色体を8グループに分画し、DNAを抽出後、それぞれの遺伝子の一部をプローブとしてサザンハイブリッド法を行った。その結果、ガストリン、*c-erb*B-2遺伝子のシグナルを第16, 17, 18染色体を含む画分に、またTSH-β鎖遺伝子のシグナルを第1, 2染色体を含む画分に検出した。次に、第17染色体と第22染色体間に転座の見られる細胞株GM3197を用い、ガストリン、*c-erb*B-2遺伝子を第17染色体上にマッピングした。一方、第1, 2染色体に関し第1染色体のみを含むヒトマウス雑種細胞株TA1Aを用い、TSH-β鎖遺伝子を第1染色体上にマッピングした。

[総括]

シングルレーザー方式のセルソーターにより分画した正常ヒト染色体、転座染色体、雑種細胞の染色体を用い、サザンハイブリッド法で任意のヒト遺伝子を特定染色体上にマッピングする方法を確立した。この方法により、ガストリン、TSH-β、*c-erb*B-2遺伝子など新たに単離された15個の遺伝子をマッピングし、この方法の有用性を立証した。

論文の審査結果の要旨

本研究はセルソーターで分画したヒト染色体を用い、任意のヒト遺伝子を特定染色体上へマッピングする一般的な方法を示している。この方法の特徴は簡便かつ正確にマッピングができる点にあり、その有用性は新たに単離された数多くの遺伝子のマッピングによって立証された。また本研究は、多量の染色体を短時間で分画する方法を示しており、これは染色体の生化学的研究に今後大いに役立つものと考えられる。

以上の理由から本論文は学位論文として十分価値あるものと認められる。