

Title	Chromosomal Assignments of HepG2 3'-Directed Partial cDNA Sequences by Southern Blot Hybridization Using Monochromosomal Hybrid Cell Panel
Author(s)	福嶋, 淳
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39341
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"〉 大阪大学の博士論文について〈/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	福 嶋 淳 ふくしま あつし
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 月 1 1 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Chromosomal Assignments of HepG 2 3' - Directed Partial cDNA Sequences by Southern Blot Hybridization Using Monochromosomal Hybrid Cell Panel (単一染色体雑種細胞のパネルとサザンプロットハイブリダイゼーション法を用いて HepG2 由来の cDNA を染色体に位置づける試み)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 原 謙 一 (副査) 教 授 島 田 和 典 教 授 田 中 亀 代 次

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

ヒトゲノムプロジェクトは、ゲノム全体の塩基配列解析を通してその上に並ぶ全遺伝子の同定単離を目指している。この目標のために進められたゲノム物理地図作成の進展に合わせて整列化された領域での遺伝子マッピングに重点が置かれるようになってきた。大規模塩基配列解析により大量に産み出される cDNA は、このための最適な遺伝子マッピングマーカーとなる。

当研究では、3' 末端部分 cDNA ライブラリーの大規模塩基配列解析により得られた多種 cDNA を染色体にマッピングすることによりヒトゲノムの遺伝子地図作成を目的とする。こうして整備される遺伝子地図は、遺伝病リンケージ解析の進展と相まって疾患原因遺伝子候補の探索に寄与する。

(方 法)

ヒト肝癌細胞 HepG 2 株を用いてポリ (A) から近傍 MboI 部位までの数百塩基のみを含む 3' 末端部分 cDNA ライブラリーを作製した。これより無作為に 982 クローンを選択して塩基配列を決定した。配列の相互比較により既知未知あわせて 641 種の cDNA が存在することを見出した。その中から 150 塩基対以上の配列を持ち、DNA データベースに未登録の新規 160 種を任意に選択し、これらについて遺伝子の存在染色体を決める染色体アサイメントを行った。

cDNA の染色体アサイメントは、ヒト単一染色体雑種細胞パネルを用いたサザンプロットハイブリダイゼーション法により行った。PCR 法で増幅した cDNA 断片をランダムプライミング法によりアイソトープ標識プローブとした。まず、cDNA に相当する遺伝子のコピー数を同定するため 3 種の制限酵素 (EcoRI, BamHI, BglII) の 4 通りの組み合わせで切断したヒトゲノム DNA でのサザンプロット解析を行った。この解析結果をもとに最大のコピー数を示す制限酵素の組み合わせで切断した DNA により作製したヒト単一染色体雑種細胞パネルを用い、サザンプロット解析により各 cDNA の染色体アサイメントを行った。

(成績)

ヒトゲノム DNA 解析

160種のうち144種がハイブリダイゼーションにより明確なバンドを与えた。他の7種は、スメアパターンを示し、9種についてはバンドが認められなかった。明確なバンドを与えた144種のうち67種が1本、41種が2本、10種が3本、7種が4本、19種が5本以上のバンドを与えた。この結果に基づきそれぞれの cDNA に相当する遺伝子のコピー数を同定した。

染色体アサイメント

ヒトゲノム DNA での解析により明確なバンドを出現させた144種の cDNA について染色体アサイメントを行った。シングルバンドとなった cDNA 種については一義的に遺伝子の存在する染色体を決めることができることから、67種のうち62種についてはその存在染色体を決定した。アサイメントされた遺伝子の染色体分布には偏りが見られ、特に第17番染色体は相対的に高いスコアを示した。

複数のバンドを与える cDNA 種の場合には、偽遺伝子を含め関連遺伝子の存在する染色体をも調べることが可能である。ハイブリッドクローンに由来するゲッ歯類 DNA とのクロスハイブリダイゼーションは、それぞれのバンドの由来する染色体の同定を困難にするが、これは種間で保存された配列の検出を可能とした。遺伝子コピー数と配列保存性とは相関性が見られ、多コピー数の cDNA 配列ほどゲッ歯類 DNA とクロスハイブリダイゼーションする傾向が認められた。

(総括)

サザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて3'末端部分 cDNA の染色体アサイメントを行った。実験に供した cDNA のうち、90%の cDNA 種が明確なバンドを示したことから、本方法が多種 cDNA の染色体アサイメントに適用可能であることが明らかである。

これらを総して、144種の cDNA に相当する遺伝子のコピー数やその遺伝子ファミリーの染色体分布、他種動物間の塩基配列保存性等の知見が得られた。本方法により染色体アサイメントされた cDNA は、さらに詳細なマッピングにより、新規遺伝子の機能類推が可能となるほか、それらをヒトゲノム上の特異的マーカーとして用いて疾患原因遺伝子の検索に役立てることも可能であろう。

論文審査の結果の要旨

ヒトゲノム解析プロジェクトの進展と共に大量の cDNA 配列データが得られるようになった。これをヒト染色体上にマップすることは計画を進める上で極めて重要である。そこで、ヒト単一染色体雑種細胞パネルとサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて160種の3'末端部位 cDNA 配列の染色体アサイメントを行った。

実験に供した cDNA のうち、90%の cDNA 種が明確なバンドを示したことから、本方法が多種 cDNA のアサイメントに適用可能であることを示した。

さらに、前述の知見に加えて、それぞれの cDNA に相当する遺伝子のコピー数、その遺伝子ファミリーの染色体分布、他種動物の相当する遺伝子との塩基配列保存性等の知見も得られた。これらの知見を総合することにより、新規遺伝子についてその機能の類推が可能である。

今後、本方法によりアサイメントされた多種の cDNA についてさらに詳細なマッピングを行い、染色体上の領域を特定していくことにより、これら cDNA をヒトゲノム上の特異的マーカーとして用いることが可能であろう。さらに遺伝子リネージ解析の結果から予想される染色体領域内の疾患原因遺伝子の候補遺伝子としてこれら cDNA を用いることも可能であろう。

以上により、本報告は、学位に値すると考える。