

氏名(本籍)	近藤郁子 (愛媛県)		
学位の種類	医学博士		
学位記番号	博乙第226号		
学位授与年月日	昭和59年11月30日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Genetic Analysis of Human Cellular Protein by Two-Dimensional Gel Electrophoresis: Detection of polymorphic Proteins and Its Application to Medical Problems. (二次元電気泳動法を用いたヒトの細胞蛋白質の遺伝分析 : 多型性蛋白質の同定とその医学への応用)		
主査	筑波大学教授	医学博士	三澤章吾
副査	筑波大学教授	医学博士	澤口重徳
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	田村昇
副査	筑波大学教授	医学博士	東 惠彦

## 論 文 の 要 旨

### (1) 目的

遺伝子の連鎖を用いて遺伝性疾患の発症前診断, 保因者の同定を簡便で有効に行うために, ヒト末梢血リンパ球の細胞蛋白質の多数の多型性蛋白質を一度に分析すると共に, 新しい多型性蛋白質の同定を行い, 遺伝性疾患に応用することを目的とする。

### (2) 方法

ヒト末梢血 2 ml の白血球層を 10% 牛胎児血清と phytohemagglutinin を含む RPMI1640 培地で 6 日間培養後, 0.5% の Nonidetp-40 を含む溶液で可溶化して, 105,000×g, 60分遠心後, 上清の約 35 μg の細胞蛋白質を改良した O'Farrell (1975年) の二次元電気泳動法で分離して, Merrill ら (1981年) の銀染色法で検出した。検出された約 250 の蛋白質中の個体間変異は, 家系分析, 集団調査により遺伝分析を行い, 多型性蛋白質の既知のそれらとの異同を明らかにするために, 細胞内分布, 細胞分布, 既知の酵素蛋白質の同定を行った。また, 末梢血リンパ球の染色体分析は, high-resolution banding 法を用いて行った。

### (3) 結果

- ① 3つの新しい多型性蛋白質の同定

種々の細胞の細胞質に存在する分子量約31.000と約38.000の蛋白質は、家系調査、集団調査の結果、各々、常染色体上の単一遺伝子座の2つの対立遺伝子により支配される多型性蛋白質であり、日本人集団における各々の2つの対立遺伝子頻度は、0.924と0.076及び0.880と0.120であった。これらと類似した分子量と遺伝子頻度をもつ既知の多型性蛋白質である adenosine deaminase, uridine monophosphate kinase とは同一個体に異なる表現型が見られることから、新しい多型性蛋白質であることが明らかにされた。

分子量約68.000の蛋白質は、mitochondria 分画に存在し、家系分析と集団調査の結果、常染色体上の単一遺伝子座の2つの対立遺伝子により支配される多型性蛋白質で、日本人集団における2つの対立遺伝子の頻度は0.622と0.378であった。既知の mitochondria の多型性蛋白質である glutamate oxaloacetate transaminase と malic enzyme とは、分子量、遺伝子頻度、または、細胞、組織分布が異なることから、ヒトの新しい mitochondria の多型性蛋白質であることが明らかになった。

#### ② 二次元電気泳動法による esterase D の同定と網膜芽細胞腫の遺伝分析への応用

二次元電気泳動法により検出された分子量約33.000の多型性蛋白質は、esterase D (EsD) の分子量、細胞分布、日本人集団における遺伝子頻度と類似していること、EsD の表現型も調べた72人において、これら2つの表現型が完全に一致したことから、EsD の subunit であることを明らかにした。従来の酵素染色法を用いた電気泳動法では分析困難である線織芽細胞やリンパ球のEsDの遺伝分析も容易にでき、日本人特有の酵素活性の低いEsD 7 の subunit も明確に同定することができた。又、13番染色体長腕部分欠失を伴う患者のEsDの遺伝分析によって、これに密に連鎖した網膜芽細胞腫 (Rb) を早期に診断し治療することができた。更に、網膜芽細胞腫のEsDの分析の結果、Rbの発症に関与する第2のヒットはEsD 遺伝子座を含まない突然変異によるものであることも明らかになった。

#### ③ Leukocyte Cytosol 64k polypeptide の遺伝子座の決定

二次元電気泳動法により同定され、浜口らの報告した4種類の多型性蛋白質の1つである Leukocyte Cytosol 64k polypeptide (LC64P) の家系分析の結果、上述のRbを伴った患者では父親由来の遺伝子が欠如しており、この遺伝子が染色体13q 14.1→q32.1に位置することが示唆された。そこで、90家系を用いてEsD 遺伝子座との連鎖の分析を行い、これらの2つの遺伝子座が密に連鎖していることを明らかにした。

#### (4) 考察

改良された二次元電気泳動法によるヒトリンパ球を用いた多型性蛋白質の同定は、同時に8つの多型性蛋白質を検出することができ、内7つは従来の電気泳動法では同定されない新しい蛋白質であり、残る1つのEsDも従来の方法より鮮明に検出することができる。更に、EsDとLC64Pの遺伝的多型を利用することによりこれらの遺伝子と密に連鎖したRbは早期診断、治療が可能であり、他の多型性蛋白質も、遺伝性疾患との連鎖を明らかにすることにより、いくつかの疾患の発症前診断、保因者の同定が可能であろう。又、卵性診断、親子鑑定にも有力な方法として利用することができる。

## 審 査 の 要 旨

ヒト末梢血リンパ球の細胞蛋白質の多型を一度で分析可能にするため、二次元電気泳動法と銀染色法を改良して用いている。この方法により、3つの新しい多型性蛋白質を同定し、分子量、家系調査、集団遺伝学的調査を行い、それぞれ遺伝様式と日本人集団における遺伝子頻度を明らかにした。また、EsDを従来より鮮明に検出することを可能にし、染色体異常と、これに密に関連した網膜芽細胞腫の早期診断への応用を指摘した。

二次元電気泳動法のような新しい方法を導入し、未知の遺伝的多型形質の発見と遺伝様式の決定は、人類遺伝学上ばかりでなく個人識別、親子鑑定、卵性診断などへの幅広い応用と、疾病の早期診断、早期治療への臨床学的に重要な手段を提供したといえる。これらの知見に今後の遺伝的多型形質の発見に糸口をつけたことをも加味して、本論文は高く評価される。

よって、著者は医学博士の学位を受けるのに十分な資格を有するものとみとめる。