

Title	制限酵素マーカーによるゲノムの2次元DNAフィンガープリント法
Author(s)	畑田, 出穂
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1889
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

理55
18
9055

博士論文

制限酵素マーカーによるゲノムの2次元DNAフィンガープリント法

生理学専攻 畑田出穂

〔要旨〕

ゲノムDNAの変化(変異、修飾)を全体的に把握することは、高等生物においてはゲノムサイズが大きいため非常に困難である。この変化の同定の限界は、使用できるプローブ(マーカー)の数と、ゲノムDNAの制限酵素断片をどの程度分離できるかということによって規定される。しかし現状では用い得るプローブの数に限りがあることと、一般にDNA断片の分離は1次元サザンプロットという分離能の低い技術を用いているので、得ることの出来る情報は少ない。そこで著者は、制限酵素の認識部位をマーカーとして用いる事によりマーカーの数を無限に増やすことと、2次元電気泳動を行うことによりゲノムDNAの分離能を上げることとによって、高等生物のゲノムDNAの変化を全体的に把握することが出来る新しい技術を開発した。本法の概要は以下の5ステップからなる。(1)ゲノムDNAを8塩基認識の制限酵素のように出現頻度の少ない制限酵素で消化後末端標識する。(2)6塩基認識の制限酵素で消化する。(3)アガロースゲルを用いて1次元目の電気泳動を行う。(4)4塩基認識の制限酵素を用いてアガロースゲル中でDNAを消化する。(5)アクリルアミドゲルを用いて2次元目の電気泳動を行い、そのオートラジオグラフィをとりスポットを検出する。この様な手技をとったため本法は次のような利点を持つ。(a)スポットの濃さがコピー数に比例するので均一な濃さのスポットが得られる。(b)DNAを直接検出しているのでスポットが鮮明である。(c)プローブが要らないので全ての生物に適用できる。(d)標識する制限酵素をかえることによりマーカーを増やし、精度を上げることが出来る。(e)スポットの分離能がよい。なお標識する制限酵素認識部位としてNot Iを選んだ場合はさらに(f)Not I認識部位は90%遺伝子に存在するので効率よく遺伝子のみの情報が得られるという利点を持つ。著者は本法を用いて神経芽細胞腫におけるDNAの増幅、マウスの亜種間における多型とそのF1における多型の挙動を検出することが出来た。さらに著者は以下のような目的に本法が有用であると考えた。(I)癌を正常部と比べゲノムにおけるDNAの変化(欠失、増幅など)を検出する。(II)欠失の範囲の大きいミュータント、遺伝病の原因遺伝子をクローニングする。(III)分化、老化、発生におけるゲノムの変化(特に修飾)を検出する。

〔はじめに〕

ゲノムDNAの変化(変異、修飾)を全体的に把握することは、癌、分化、発生などといった生命現象を解明していく上で重要である。高等生物、例えばヒトの場合大腸菌の約1,000倍という大きなゲノムサイズのため(Fig. 1)ゲノムの変化を全体的に解析する事は困難であり、そのための確立された技術はない。この変化の同定の限界は、使用できるプローブ(マーカー)の数と、ゲノムDNAの制限酵素断片をどの程度分離できるかということとによって規定される。しかし、現状では、用い得るプローブの数に限りがあることと、一般にDNA断片の分離は1次元サザンブロットという分離能の低い技術を用いているので、この方法で得ることの出来る情報は少ない。

そこで著者は、ゲノムDNAの特異的なDNA断片にだけ末端標識を行う新手法を用いることによりマーカーの数を無限に増やすことと、2次元電気泳動を行う事によりゲノムDNAの分離能を上げることとによって、高等生物のゲノムDNAの変化を全体的に把握することが出来る新しい技術を開発したので報告する。

[方法論の戦略と概略]

本法の戦略を考える上において、前述のように(1) どの様なマーカーを用いてどのようにして検出するのか? (2) どの様な2次元電気泳動によってDNAを分離するのか? という2つの問題がある。そこで著者は、まず第一の問題に対してゲノム上のマーカーとして、一般にゲノムのフィンガープリントに用いられている反復配列を用いず(T a b l e 1 (a)) , 制限酵素の認識部位を用いた(T a b l e 1 (b)) 。これは(1) スポットの濃さがDNAのコピー数に比例するので均一なスポットが得られること、(2) DNAを直接検出しているのでスポットが鮮明であること、(3) プロブが要らないので全ての生物に適用できること、(4) 標識する制限酵素末端をかえることによりマーカーを増やし精度を上げることが出来ること、といった数々の利点を持っているからである。(T a b l e 1 参照) 次にマーカーとする制限酵素認識部位としてN o t Iを選んだ。これは、(1) N o t I認識部位はヒトゲノム中に約3, 000ヶ所という、程よい数存在する、(2) 哺乳類では、N o t I認識部位の90%が遺伝子に存在する(R e f. 1) ので効率よく遺伝子のみの情報を得られる、といった意義があるからである。このN o t I認識部位を標識するためゲノムDNAをN o t Iで消化後、その切断端にポリメラーゼを用いて放射標識されたヌクレオチドを取り込ませた。第二の問題に対し分離法としてパルスフィールド電気泳動によって長鎖のDNAを分離する方法や(T a b l e 2 (1)) 、変性勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってGC含有率によって分離する方法(T a b l e 2 (2)) を選ばず、N o t I認識部位を標識されたゲノムDNAを6塩基認識の制限酵素によって消化し、アガロースゲルの電気泳動を行った後、アガロースゲル中で4塩基認識の制限酵素で消化してからポリアクリルアミドゲルで2次元目の電気泳動を行い、そのオートラジオグラフィーをとるという方法を選んだ。その理由は、分離能がよい上、クローニングが可能であると考えたからである。各々のマーカーの検出法と分離法についてT a b l e 1, 2に、また著者の戦略の概略についてF i g. 2にまとめた。

〔方法〕

(試料からDNAの調製)

組織を液体窒素で凍結して粉碎したもの0.5gにプロテイナーゼ緩衝液(1mg/mlプロテイナーゼK、0.5M EDTA、0.5% SDS、50mM トリシュー塩酸 PH8.0) 3mlを添加して65℃で1時間保温した。フェノール抽出を行った後、10mg/mLリボヌクレアーゼAを0.3ml添加して37℃で1時間保温する。さらにフェノール抽出を行った後、TE緩衝液(10mM Tris-Cl PH7.5, 1mM EDTA)で透析した。

(ゲノムDNAの切断と末端の標識)

上記工程により得られたゲノムDNAを用いて下記の反応液組織を調製し、37℃で1時間反応させた。

ゲノムDNA	10 μ g
Not I	100単位
10 \times H緩衝液	5 μ l
蒸留水	適量

全量	50 μ l
----	------------

10 \times H緩衝液

50mM トリシュー塩酸(PH8.0)
 100mM NaCl
 10mM MgCl₂
 1mM ジチオスレイトール

フェノール抽出により反応を終了し、エタノール沈澱を行って、ゲノムDNAを濃縮したものをを用いて下記の反応組成を調製し、65℃で1時間反応させた。

ゲノムDNA	10 μ l
3000Ci/m mol(10mCi/ml)[α - ³² P]dGTP	5 μ l
3000Ci/m mol(10mCi/ml)[α - ³² P]dCTP	5 μ l
Taq DNA ポリメラーゼ	10単位
5 \times Taq DNA ポリメラーゼ用緩衝液	10 μ l
蒸留水	適量

全量	50 μ l
----	------------

5xTaq DNA ポリメラーゼ用緩衝液
250mM トリス-塩酸 (pH9.0)
50mM MgCl₂

フェノール抽出により反応を終了し、エタノール沈澱を行って、ゲノムDNAを濃縮した。

(6塩基認識の制限酵素によるゲノムDNAの切断)

上記のように末端標識されたゲノムDNAを用いて下記の反応液組成を調製し、37℃で1時間保温した。

標識されたゲノムDNA	10 μ
10 \times H緩衝液	5 μ l
6塩基認識の制限酵素(BamHI, EcoRV, SphI, BglIII)	100単位
蒸留水	適量
<hr/>	
全量	50 μ l

フェノール抽出により反応を終了し、エタノール沈澱をおこなってゲノムDNAを濃縮してからTE緩衝液に溶解する。

(ゲノムDNA断片を1次元目の電気泳動により分離する)

厚さ1mm、長さ50cmのアガロースゲル(0.5%シーケムGTG™ (FMC社製) 50mMトリス-酢酸(pH 7.5), 0.7mM 酢酸マグネシウム)のウェル部(3mm \times 8mm \times 0.8mm)に上記の様に調製した試料5 μ gをマイクロピペットを用いて乗せた後3V/cmの電圧で18時間泳動した。尚、電気泳動用緩衝液としては、50mMトリス-酢酸(pH 7.5), 0.7mM酢酸マグネシウムを使用した。

(4塩基認識の制限酵素によりゲノムDNA断片を切断する)

上記工程により得られたゲノムDNAのバンド群を有するゲルを30分間、1 \times H緩衝液に浸した後、下記の反応組成に浸し、37℃で2時間反応させた。

4塩基認識の制限酵素 (Hinf I, Dde I など)	1, 500 単位
10 x H緩衝液	130 μ l
蒸留水	適量
<hr/>	
全量	1, 300 μ l

(ゲノムDNA断片のバンド群を2次元電気泳動により分画する)

上記工程を終えたゲルを、5%ポリアクリルアミドゲル* (50cm x 50cm x 1mm)の近傍のガラス板上に載置した。アガロースゲルの泳動方向とポリアクリルアミドゲルの端縁とが平行になるように調整し、これらゲルの間をアガロースゲル(組成は前記と同様)で満たして固化させ、アガロースゲルとポリアクリルアミドゲルとを接続した後20V/cmの電圧で6時間電気泳動した。泳動用緩衝液としてはTBE (50mM トリス-ほう酸 (pH 8.3), 1mM EDTA)を用いた。

*5%ポリアクリルアミドゲル

アクリルアミド	11.6g
ビスアクリルアミド	0.4g
過硫酸アンモニウム	240mg
10 x TBE緩衝液	24ml
蒸留水	適量
<hr/>	
全量	240ml

さらにN,N,N',N'-テトラエチレンジアミンを240 μ l添加して調製した。

泳動終了後、ゲルを濾紙に移行させ乾燥させた。この濾紙をX線フィルム(XAR-5TM, コダック社製)と増感紙(Quanta IIITM, デュポン社製)にはさんで、3日間、-70℃で静置した。

[結果と考察]

(N o t I マーカーによるゲノムの2次元DNAフィンガープリント)

F i g. 3 は、キイロショウジョウバエゲノムDNAをN o t Iで消化後末端標識し、B a m H Iで消化してから矢印で示した方向に1次元目のアガロースゲル電気泳動、D d e Iで消化後2次元目のアクリルアミドゲル電気泳動を行ないオートラジオグラフィーをとったものである。F i g. 4も同様にヒトゲノムDNAをN o t Iで末端標識し、B g l IIで消化してから矢印で示した方向に1次元目の電気泳動、H i n f Iで消化後2次元目のアクリルアミドゲル電気泳動を行ってオートラジオグラフィーをとったものである。キイロショウジョウバエと比べてヒトのパターンはバックグラウンドが高いが、これはヒトのゲノムサイズがキイロショウジョウバエの30倍あるので(F i g. 1) 非特異的な放射標識の取り込みが30倍になるからだと考えられる。

(N o t I 切断部位の特異的放射標識化)

F i g. 5はヒトのゲノムDNAのN o t I切断部位が特異的に標識されていることを示した図である。レーンa, b, c, dはそれぞれ基質として[α -³²P] d A T P, [α -³²P] d G T P, [α -³²P] d C T P, [α -³²P] d T T Pを用いたものである。このようにN o t I切断部位は、F i g. 6の様な認識配列をしているので基質として[α -³²P] d G T Pを用いたときのみラダーがみられる。またレーンe, f, g, hは[α -³²P] d C T Pとそれぞれ非放射性的のd A T P, d G T P, d C T P, d T T Pを加えて反応したものであるが、d G T Pを加えたfのときだけラダーがみられる(F i g. 5)。即ち、図にみられるラダーは、最初がG、次にCが取り込まれることを意味し、G C ↓ G G C C G C の N o t I 認識部位のコヘンシブ末端に特異的に取り込まれていることを示唆するものである。

(N o t I 認識部位の均一的放射標識化)

スポットの濃さは特にキイロショウジョウバエの場合、非常に均一であり(F i g. 3)、それぞれの濃さは1対の遺伝子、つまり2コピーをあらわしていると考えられる。つまり当初の予想どうりスポットの濃さは、コピー数を反映していると考えられる。これはDNAの末端に取り込まれた放射標識を直接検出しているため得られた利点である。なおヒトのスポット(F i g. 4)は、キイロショウジョウバエと比べて濃さが不均一に見えるが、これは(1) N o t I という制限酵素が認識部位の5塩基目または6塩基目のCがメチル化されていると切断されないという性質を持つため、メチル化されているCもあるヒトゲノムDNAでは切断されないN o t I 認識部位があり標識されないこと、(2) ヒトゲノムは大変遺伝的に不均一であり、遺伝的に均一なキイロショウ

ジョウバエと異なりハプロイドのスポットが出現すること、が主な原因として考えられる。さらに著者の方法が1コピーと2コピーの差を検出可能なことを示したのがFig. 7の実験である。この実験ではB6とC3Hという2種類の純系のマウスとそれらを交配して出来たF1のフィンガープリントを比べている。B6とC3Hは純系であるのでほとんどのアリアルがホモであると考えられ、スポットの濃さは2コピーを示すはずである。従って矢印で示したスポットはB6にあってC3Hにはみられないが、これもB6には2コピーありまわりのスポットと同じ濃さである。それに対してF1では両親からそれぞれのアリアルを1コピーずつ受け継ぐため矢印で示したスポットはB6からのみ受け継ぎ1コピーの濃さのはずである。従ってB6、C3Hに共通してみられるためF1ではそれぞれから1コピーずつ受け継ぎ2コピーの濃さであるまわりのスポットと比べ、矢印のスポットは半分の濃さのはずである。実際F1で矢印のスポットをまわりのスポットの濃さと比べてみると半分の濃さである(Fig. 7(c))。それに対してB6では矢印のスポットは2コピーなのでやはりまわりと同じ濃さである(Fig. 7(a))。なお性差によるスポットの違いを除くためすべてメスのゲノムDNAを用いて実験を行った。

(スポットの鮮明さ)

Table 1(a), Table 2(2)で示した方法を採用した戦略を行った場合(Fig. 8, Ref. 2)と比べて著者のストラテジーで行った方がスポットが鮮明であるのは明かである(Fig. 3, Fig 4)。このように鮮明なのはパルスフィールド電気泳動を採用しなかったことと、DNAの検出にサザンプロットを用いないでDNA自体を標識したことによると考えられる。

(スポットの数)

スポットの数を目算で数えてみるとキイロショウジョウバエで約1,000個(Fig. 3)、ヒトで2,500個以上程度(Fig. 4)が1回の電気泳動で分離可能である。ヒトの場合、Not I 認識部位がゲノムDNAに3,000ヶ所存在するといわれているのでスポットは、理論上6,000個出現することになるが、著者の開発した系で出現するスポットをすべて分離したなら、理論値とほぼ同数検出されると推察する。このように1回の電気泳動でキイロショウジョウバエで1,000個、ヒトで2,500個スポットを検出した場合マーカー間の距離は、それぞれゲノムサイズから計算して、平均キイロショウジョウバエで200Kbに、ヒトで2,400Kbと考えられる。これは1990年現在、世界で使用可能なマーカーの数ははるかに上回る。また条件を変えた2次元電気泳動も行うことにより理論値とほぼ同数のスポットを分離することも可能と考えられる。さらに、Not I 以外の8塩基認識の

制限酵素 (Fse I, Csp I, Sfi I等) や rare cutting
の制限酵素 (Mlu I, Sal I等) 等も標識部位として用い、別に2次元電
気泳動を行う事でマーカーの間隔を無限に小さくすることが出来る。このよう
に1回の電気泳動でマーカーのゲノムにおける状況を把握できるのは、本法の
利点である。

〔応用例〕

・増幅の検出（神経芽細胞種）

Fig. 9は神経芽細胞種の癌組織と正常部組織のDNAの2次元電気泳動を行ったパターンを示したものである。それぞれを比べてみると矢印で示したスポットが癌組織の方で濃いことがわかる。従ってこのスポットに相当するDNA断片は神経芽細胞種において増幅していると考えられる。このスポットの位置をもとにNotI切断部位からBglII, HinfIまでの距離を算出すると1.8Kb, 0.6KbとなりこれはN-myc遺伝子のマップと一致する。実際この神経芽細胞種のDNAをN-mycをプローブとしてサザンブロットするとN-mycが増幅していることがわかり（未発表）このスポットは増幅したN-myc遺伝子に相当すると考えられる。またN-mycのクローン化DNAをゲノムDNAに混ぜて標識し2次元電気泳動すると、目的のスポットのみが濃くなる事でスポットの同定を行った（未発表）。この様に2次元泳動のパターン上のスポットが実際ゲノム上の遺伝子を示しゲノム上のガイドスポットとなり得ることが分かった。。

・点変異の検出（マウスの亜種間におけるポリモルフィズム）

B6 (Fig. 7 (a)), C3H (Fig. 7 (b))という2種類の亜種のマウスのゲノムDNAを2次元電気泳動パターンを比べてみると矢印で示したスポットは一方にあってもう一方にないスポットであり2種類のマウスのポリモルフィズムと考えられる。これは片方にあった制限酵素の認識部位が、点変異によって失われたためだと考えられる。

〔今後応用可能なこと〕

既に実例でも示したがこれらの例も含めてこの方法は次の様な目的に有用であると考ええる。

(1) 癌と正常部のゲノムDNAを比較することによるDNAの変化(欠失、増幅等)の検出

この方法は癌における遺伝子欠失を調べ劣性癌遺伝子にアプローチする手段として大変有望と考えられる。なぜなら現在のポルモルフィックマーカを使ってサザンブロットを行う方法と比べて、1回の電気泳動でスポットの数だけのマーカを使ってサザンブロットを行ったのに匹敵する情報が得られるという点で有利だからである。

(2) ミュータント遺伝子の近傍のDNA断片のクローニング

欠失の範囲の大きいミュータントであれば、スポットが変化する確立が高く、欠失の範囲に存在するマーカを同定出来ると考える。

(3) メチル化の変化の検出

Not I 以後に消化する制限酵素としてたとえばMspI, HapIIといった同じ認識部位でメチル化に感受性と非感受性の制限酵素の対を用いてそれぞれ2次元電気泳動のパターンを出し、ゲノムにおけるDNAのメチル化の状態を調べる事が出来る。このようなパターンを分化、老化、発生の各過程で調べれば、分化、老化、発生におけるゲノム全体のメチル化の変化を知る事が出来る。メチル化の変化は、分化、老化、発生において重要な働きをなしていると考えられている。

(4) 分化に伴うゲノムDNAの再編成の検出

利根川が示したように分化においてDNAの再編成が起こることがある(Ref. 5)。この様な例を他にも見つけるためにこの方法は役に立つと考えられる。

〔この方法の利点と問題点〕

この方法は当初予想したとおり以下の様な利点を持つ。

- (1) 1回の電気泳動で数千のスポット、つまり数千のゲノム上のマーカ―を検索できる。
- (2) NotI切断部位で標識したスポットは90%の確率で遺伝子を直撃している。
- (3) 最初に切断する制限酵素の種類をかえて電気泳動を行うことにより、検索するスポットつまりゲノム上のマーカ―を増やせる。
- (4) スポットの濃さがコピー数を反映している。
- (5) サザンブロットや他の方法の電気泳動を用いた方法よりスポットが鮮明であり、認識可能なスポットが多い。
- (6) プローブが必要ないのですべての生物に適用可能である。
- (7) 形質の変化が2つ以上の原因遺伝子に起因する場合でも解析が可能である。

次に問題点を上げると以下の様になる

- (1) NotIはメチル化感受性の制限酵素なのでスポットの変化はDNAの配列の変化だけでなく、メチル化の変化も含めてみていることによりお互いの区別がつきにくい。
- (2) 変化のあったスポットをクローニングする方法が必要である。
- (3) スポットに対応する染色体上の位置に関する情報がない。
- (4) マイクロミュレーションを検出することが困難である。
- (5) ヒトをはじめとするゲノムサイズの大きい生物の解析を行う場合、さらにスポットのバックグラウンドを下げる必要がある。

〔展望〕

問題点として5つあげたが、これらの問題は将来的には解決できる可能性が高いと考えている。なぜなら(1)に関しては将来メチル化感受性の8塩基以上の酵素が発見されるかもしれないし、人工的に酵素の1次構造をかえることによりメチル化非感受性の制限酵素をつくる事が可能かもしれないからである。また最近、人為的に特定の認識配列を切断する試みも行われている(Ref. 6)。(2)に関しては現在著者らは末端にNot I切断部位があるということを目印としてスポットをクローニングすることを試みている。(3)に関してはセルソーターで分離した個々の染色体のDNAを2次元電気泳動するということを実行しているため、このパターンをゲノムDNA全体のパターンと比べることにより、それぞれのスポットが何番染色体上に存在するかがわかると考えられる。(4)に関しては、マイクロミュレーションを著者の方法でみつけることは難しい。しかし、ヒト以外の高等生物ではマイクロミュレーションによるミュータントであってもクロラムブシルという薬剤を使えば、現在存在するミュータントと同じ原因遺伝子を含んだ大きなDNAの欠失を持つミュータントをつくるのが容易であるため(Ref. 3)、著者の方法が適用可能となる。(5)に関しては予め非標識のヌクレオチドなどをとりこましてブロッキングを行うことによって解決できると考える。なお、PDI社で蛋白の2次元電気泳動のパターンを比較するシステムが開発されたのでこれが著者の2次元電気泳動のパターンの解析にも適用できると考えられる。更に将来的にはDNAの泳動を行いながらパターンをコンピューターに読み込むような装置も可能ではないかと考えている。この様にしてゲノムの2次元電気泳動の問題点が解決されれば、ゲノムにおけるDNAの変化をゲノム全体で把握できる方法としてさらに簡単で精度のよい方法となるであろう。

〔Figureの説明〕

(Fig. 1) さまざまな生物におけるハプロイド当りのDNA量

図は、ハプロイド当りのDNA量を示す。縦軸は*Escherichia coli* (4×10^{-12} mg = 2.4×10^9 MW) を1とした場合の倍数を示す。(Ref. 4)

(Fig. 3) キイロショウジョウバエのゲノムDNAのNot I認識部位を標識して得られた2次元電気泳動パターン

図はキイロショウジョウバエ (*Drosophila Melanogaster*) をFig. 2の手技によりパターンを出した物である。Not I認識部位に標識し、6塩基認識の制限酵素としてBamHI、4塩基認識の制限酵素としてDdeIを用いた。←, ↓は各々、1次元、2次元目の泳動方向を示す。

(Fig. 4) ヒトゲノムDNAのNot I認識部位を標識して得られた2次元電気泳動パターン

図はヒト白血球DNAをFig. 2の手技によりパターンを出した物である。Not I認識部位に標識し、6塩基認識の制限酵素としてBglII、4塩基認識の制限酵素としてHinfIを用いた。←, ↓は各々1次元、2次元目の泳動方向を示す。

(Fig. 5) Not I認識部位の特異的標識化

図はゲノムDNAのNot I認識部位が特異的に標識されていることを示したものである。ヒト胎盤DNAをNot Iで消化後、a-h各レーンの下段に示す放射標識したヌクレオチド及び非標識のヌクレオチドを基質としてTaqポリメラーゼによる反応を行った。これらのDNAをBamHIで消化後5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィを行った。レーンb, fにはラダーがみられ、他には特異的なバンドは検出されなかった。

(Fig. 7) B6, C3H, B6xC3HマウスゲノムDNAのNot I認識部位を標識して得られた2次元電気泳動パターン

(a) B6メス (b) C3Hメス (c) B6オスとC3Hメスを交配したF1のメスの肝臓のゲノムDNAを図2の方法でパターンを出した。Not I認識部位に標識し、6塩基認識の制限酵素としてEcoRV、4塩基認識の制限酵素としてHinfIを使用した。各矢印は各マウスの亜種間で多型を検出

したスポットの一例である。 (a) の矢印はB6にディプロイドで出現するスポットを示すが、C3H (b) には 矢印 の所に同一のスポットは出現しない。 (c) の矢印 は、上記スポットと相同部位に出現したF1のスポットである。F1のスポットは、ハプロイドであるため、写真に示すようにまわりのスポットより濃さが半分になっている。(デンシトメトリーで測定) この様にスポットの濃さがゲノム中での特定のNot I 認識部位のコピー数を反映すると考えられる。性染色体の差がないよう、性はすべてメスに統一した。出生後の時期も8週に統一した。

(Fig. 8) VNTRをプローブとしてハイブリダイゼーションにより検出したヒトゲノムDNAのフィンガープリント

ヒト白血球ゲノムDNA 5 μ g を1.2%アガロースゲル電気泳動後、0.34-2.8 kbの領域を切り出し、7M尿素40%ホルムアミドを含有する6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。これをナイロンフィルターに移行させ、VNTRをプローブとして用いハイブリダイゼーションを行った。

(Ref. 2)

(Fig. 9) 神経芽細胞腫ゲノムDNAのNot I 認識部位を標識して得られた2次元電気泳動パターン

神経芽細胞腫のゲノムDNA (a) と同一個体の腎臓のゲノムDNA (b) についてFig. 2の方法によりパターンをだした。矢印は(a)で増幅しているスポットを示す。N-mycにはエクソン2の中にNot I 認識部位があり、6塩基認識の制限酵素にBgl II、4塩基認識の制限酵素としてHinf Iを用いた1次元、2次元目の泳動距離(1.8 kb, 0.6 kb)、つまり矢印と同じ位置にスポットが出現するはずである。

[参考文献]

(Ref. 1) Adrian, S. L. & Bird, P. (1987)
Nature Vol. 327, p336-338

(Ref. 2) Uitterlinden, A. G. et al (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 86, p2742
-2746

(Ref. 3) Russell, L. B. (1989) Proc. Natl.
Acad. Sci. USA Vol. 86, p3704-3708

(Ref. 4) After R. Holliday, Symp. Soc. Ge
n. Microbiol. 20 (1970) : 362

(Ref. 5) Tonegawa, S. et al (1978) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA Vol. 75, 1485-1489

(Ref. 6) Dervan, P. B. et al (1989) Meeti
ng on Genome mapping and sequencing
(Cold Spring Harbor, New York)

〔謝辞〕

本論文を作成するに当たって御協力いただいた国立循環器病センター研究所の林崎良英、広常真治、永井尚生、小松原秀介、向井常博諸氏及びに、研究を進めるに当たってご指導、ご鞭撻をいただいた指導教官の松原謙一先生に感謝します。

Table 1

ゲノムにおけるマーカーとその検出法

	(a)	(b)
方法	ナイロンまたはニトロセルロースフィルターにDNAをサザンブロットし反復配列のプローブでハイブリタイゼーションする。	特定の (Not I 認識部位を持つ) DNA断片をラジオアイソトープで標識しておいてオートラジオグラフィーで検出する。
利点	<ul style="list-style-type: none"> ・プローブが存在するのでクローニングに有利。 ・プローブとしてVNTR*を用いる時は、ポリモルフィックなので2つのアリアルを別のスポットとして検出できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・スポットの濃さがDNAのコピー数に比例するので均一な濃さのスポットが得られる。 ・DNAを直接検出しているのでスポットが鮮明。 ・プローブがいらないので全ての生物に適用できる。 ・制限酵素をかえることによりマーカーを増やし、精度を上げることができる。 ・哺乳類でNot I 切断部位の90%が遺伝子に存在する。
欠点	<ul style="list-style-type: none"> ・生物種をかえるとあらたなプローブが必要となる。 ・プローブとのホモロジーの強さによってスポットの濃さがまちまちである。 ・直接DNAを検出しないのでスポットが不鮮明になる。 ・マーカー (プローブ) の数に限りがある。 	<ul style="list-style-type: none"> ・クローニングが(a)に比べて困難である

* variable number of tandem repeat

Table 2

分離法

方法	(1)	(2)	(3)
1次元目の電気泳動法とDNA試料	8塩基認識の制限酵素などで消化後パルスフィールド電気泳動。	6塩基認識の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動。	6塩基認識の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動。
2次元目の電気泳動法	アガロースゲル中にて6塩基認識の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動。	変性勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いてGC含有率の差で分離。	4塩基認識の制限酵素で消化後ポリアクリルアミドゲル電気泳動。
利 点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 1次元目の電気泳動の鎖長が非常に長いので理論上ゲノム全領域の情報をカバーしている筈である。 ・ スポットを切り出してクローニングが可能。 ・ ゲル中で消化する制限酵素は、6塩基認識なので(3)と比べて拡散が少ない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ アガロース中での酵素反応が不要。 ・ DNAを調製する試料に制限がない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 簡単に大きなゲルで電気泳動ができる。 ・ 分離能が良好。 ・ DNAを調製する試料に制限がない。 ・ スポットを切り出してクローニング可能
欠 点	<ul style="list-style-type: none"> ・ 鎖長のきわめて長いDNAを調製するので試料に制限がある。 ・ 分解能が悪い。 ・ アガロースゲル中での酵素反応が必要。 ・ 電気泳動が大がかりで大きいゲルでは困難。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 2次元目の電気泳動でDNAが変性するのでDNAを回収してクローニングするのは困難。 ・ マーカー(スポット)近傍の情報しか得られない。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ アガロースゲルの酵素反応が必要。 ・ マーカー(スポット)近傍の情報しか得られない。 ・ ゲル中で4塩基認識の制限酵素で消化するので拡散の可能性はある。

Fig.1 Haploid amounts of DNA in various cells

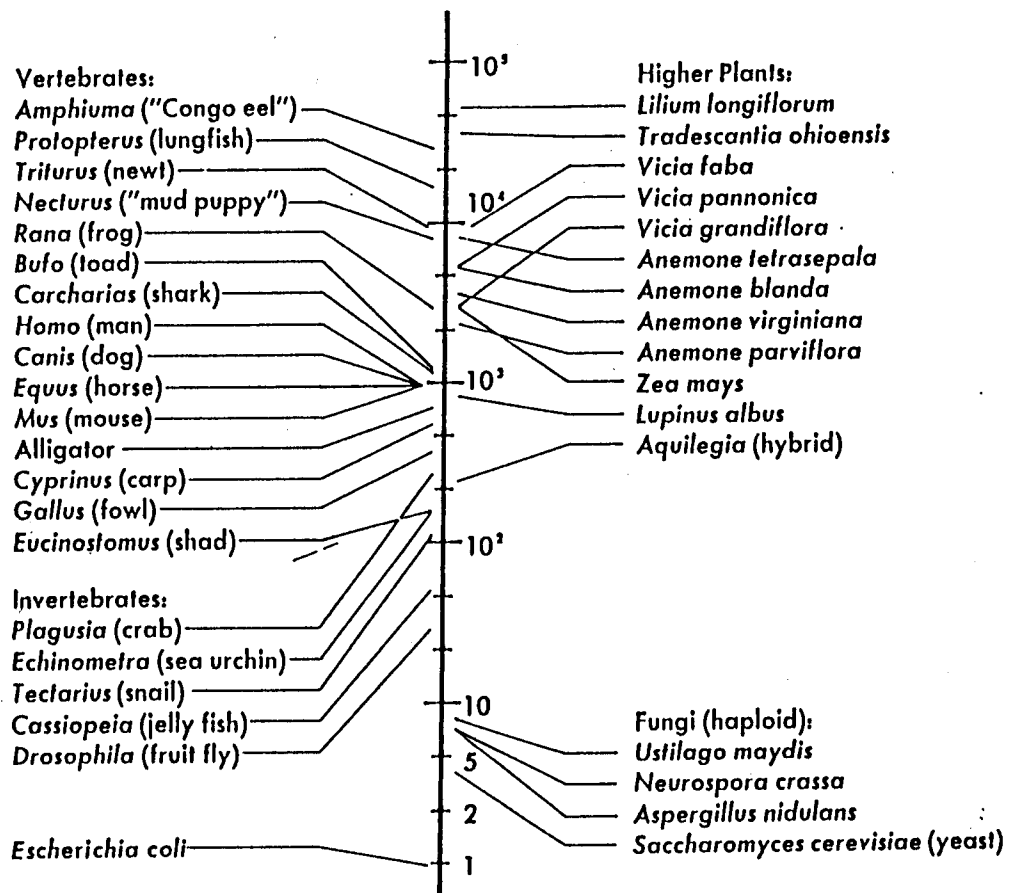


Fig.2 Strategy for Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA

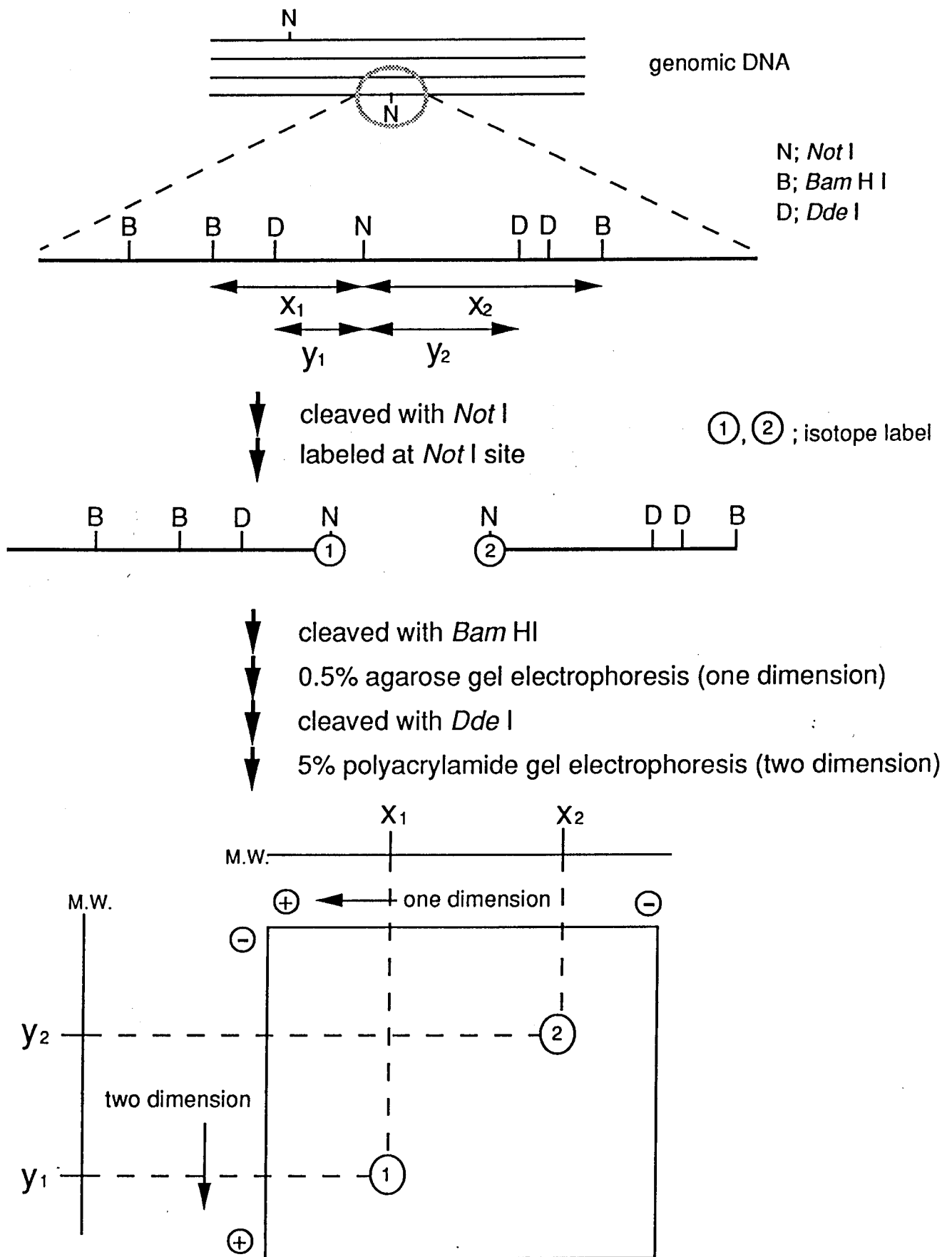


Fig.3 Two-dimensional electrophoretic pattern of *Drosophila* genomic DNA labeled in *Not* I site

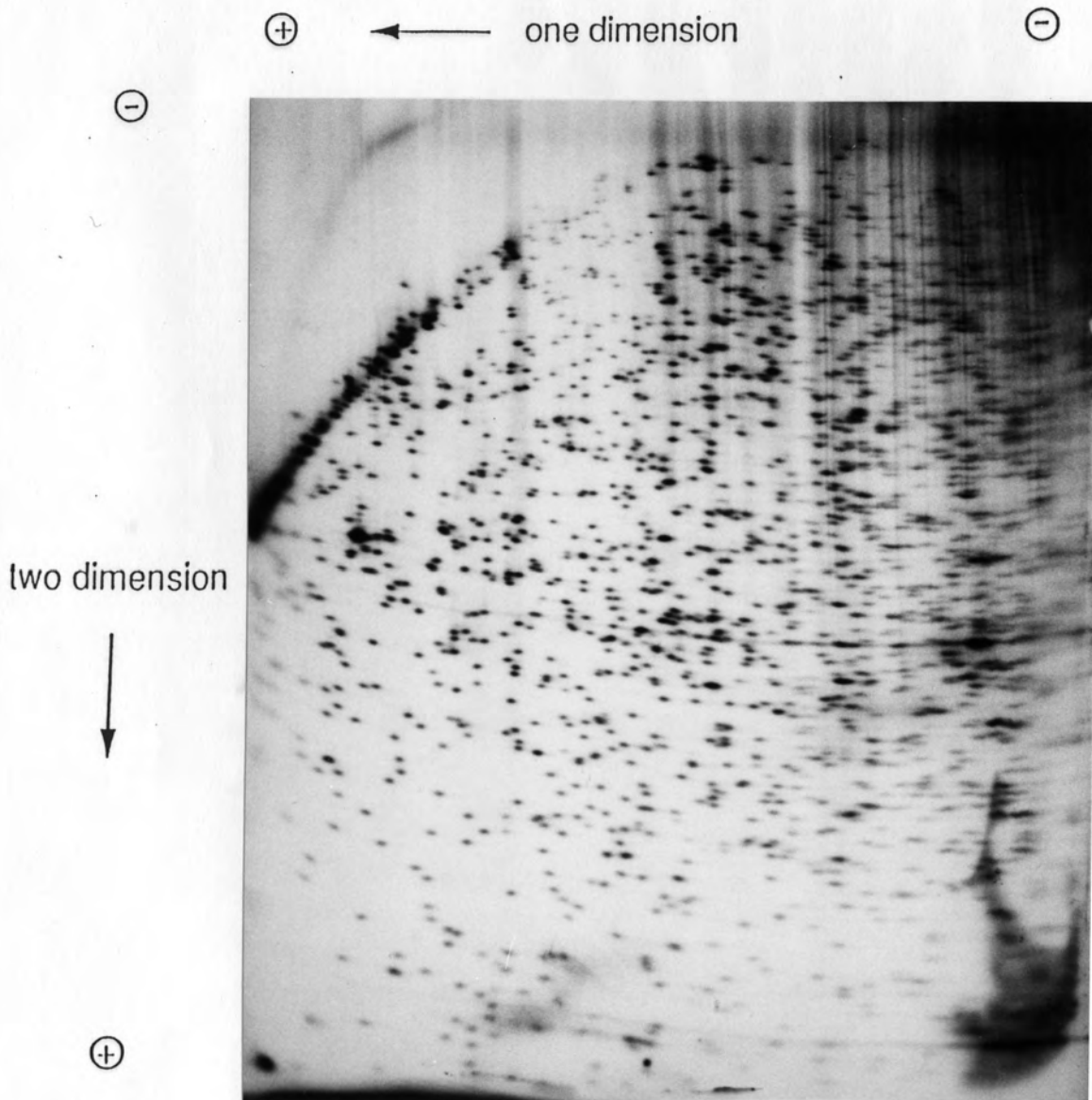


Fig.4 Two-dimensional electrophoretic pattern of *Human* genomic DNA labeled in *Not* I site

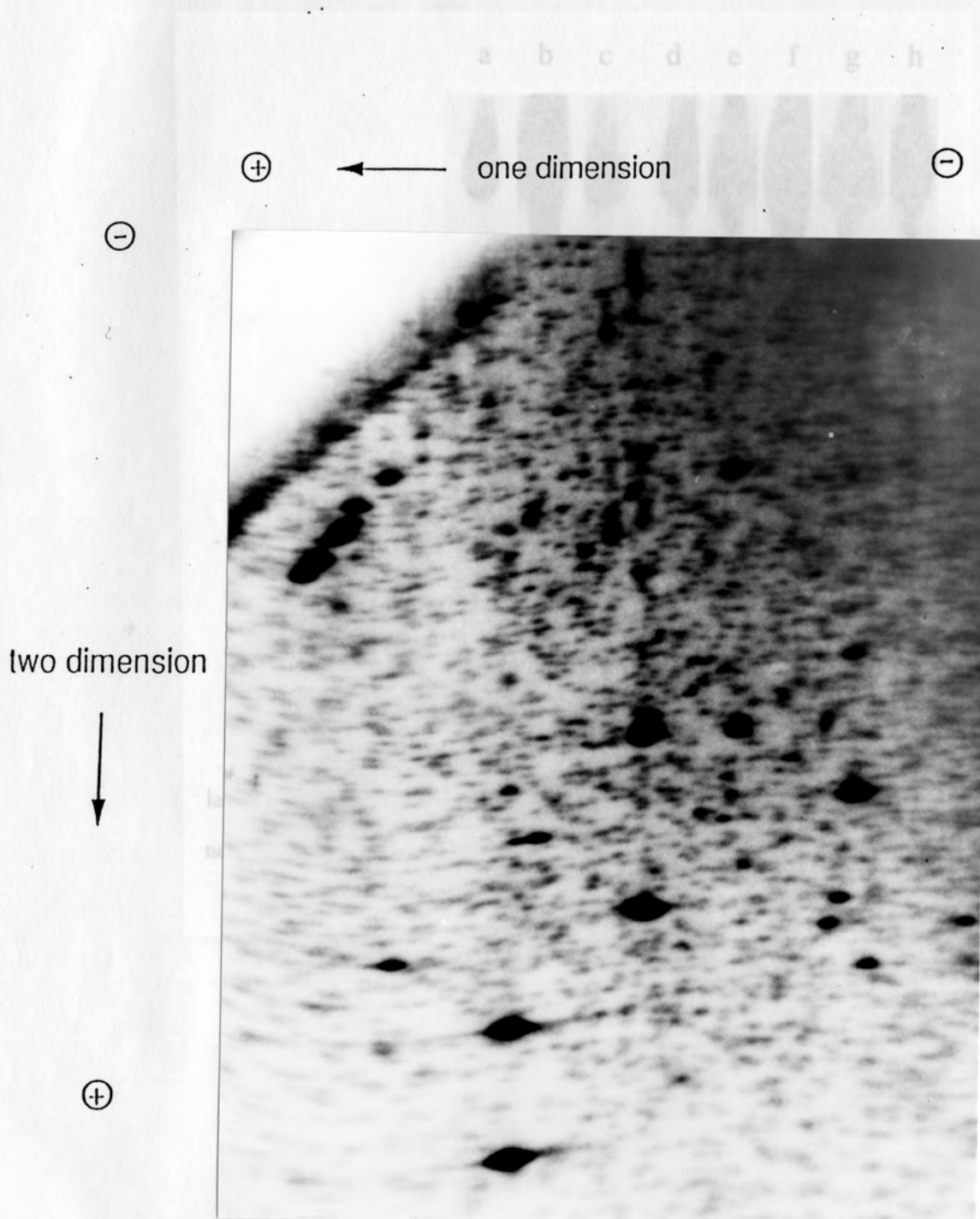


Fig.5 Specific labeling of *Not* I site

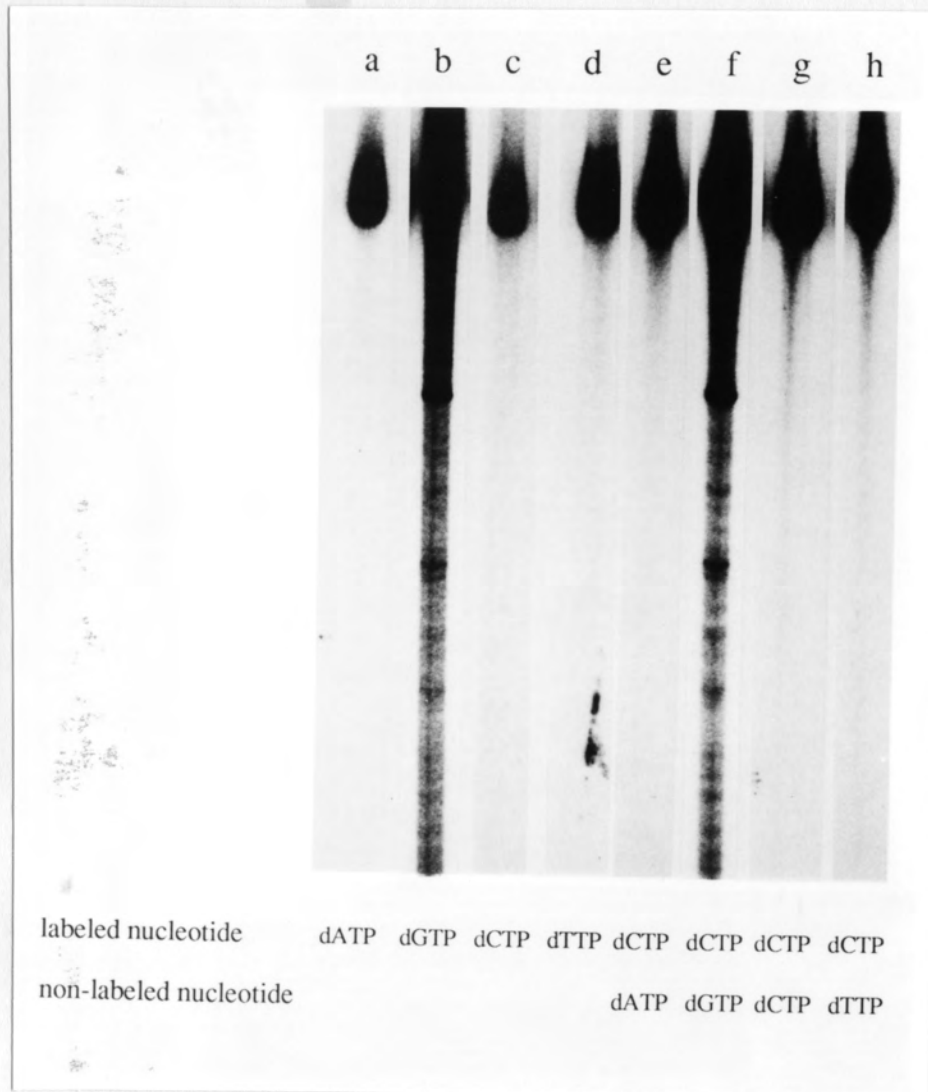


Fig.6 Recognition sequence of *Not* I

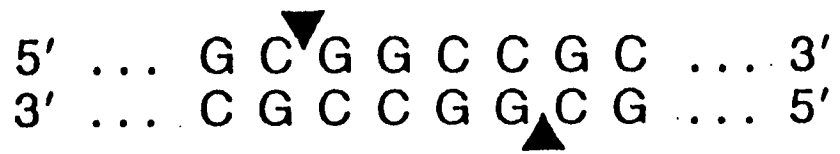
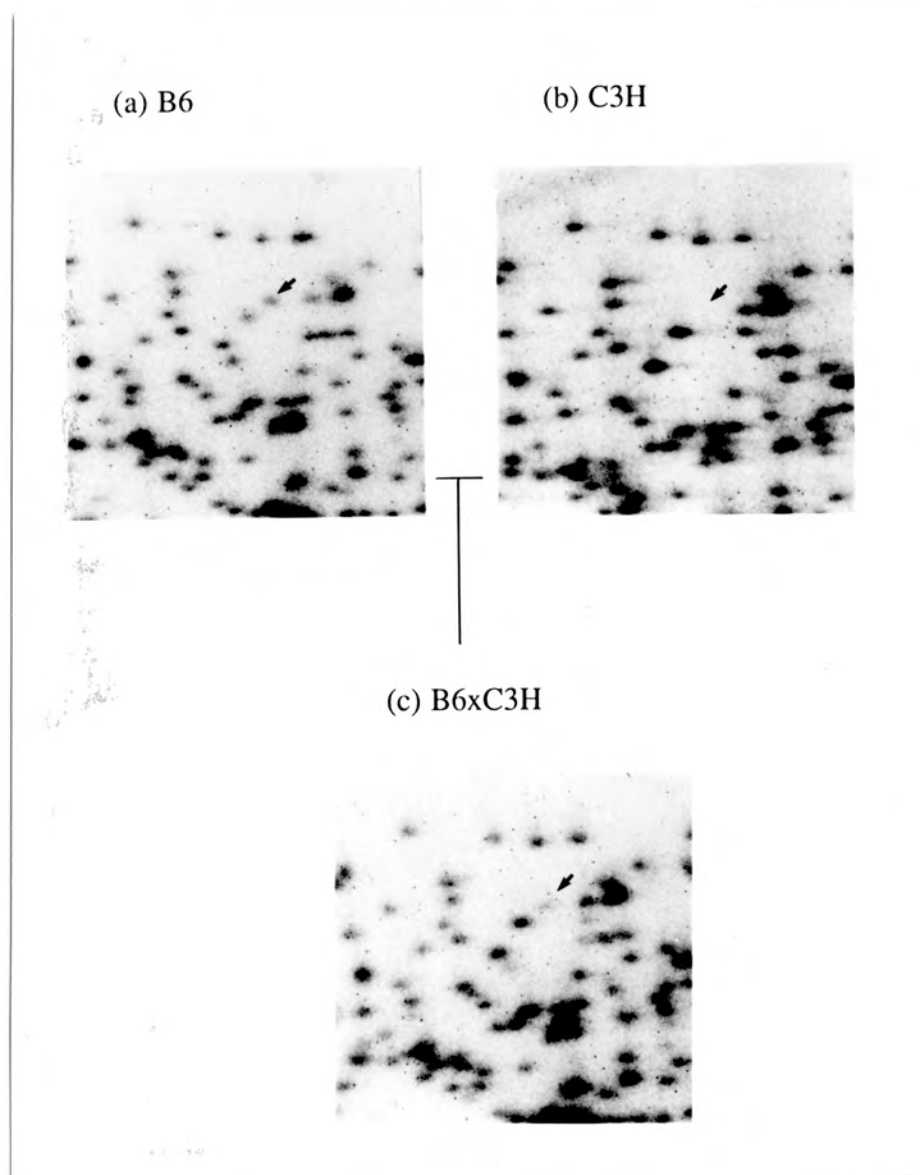
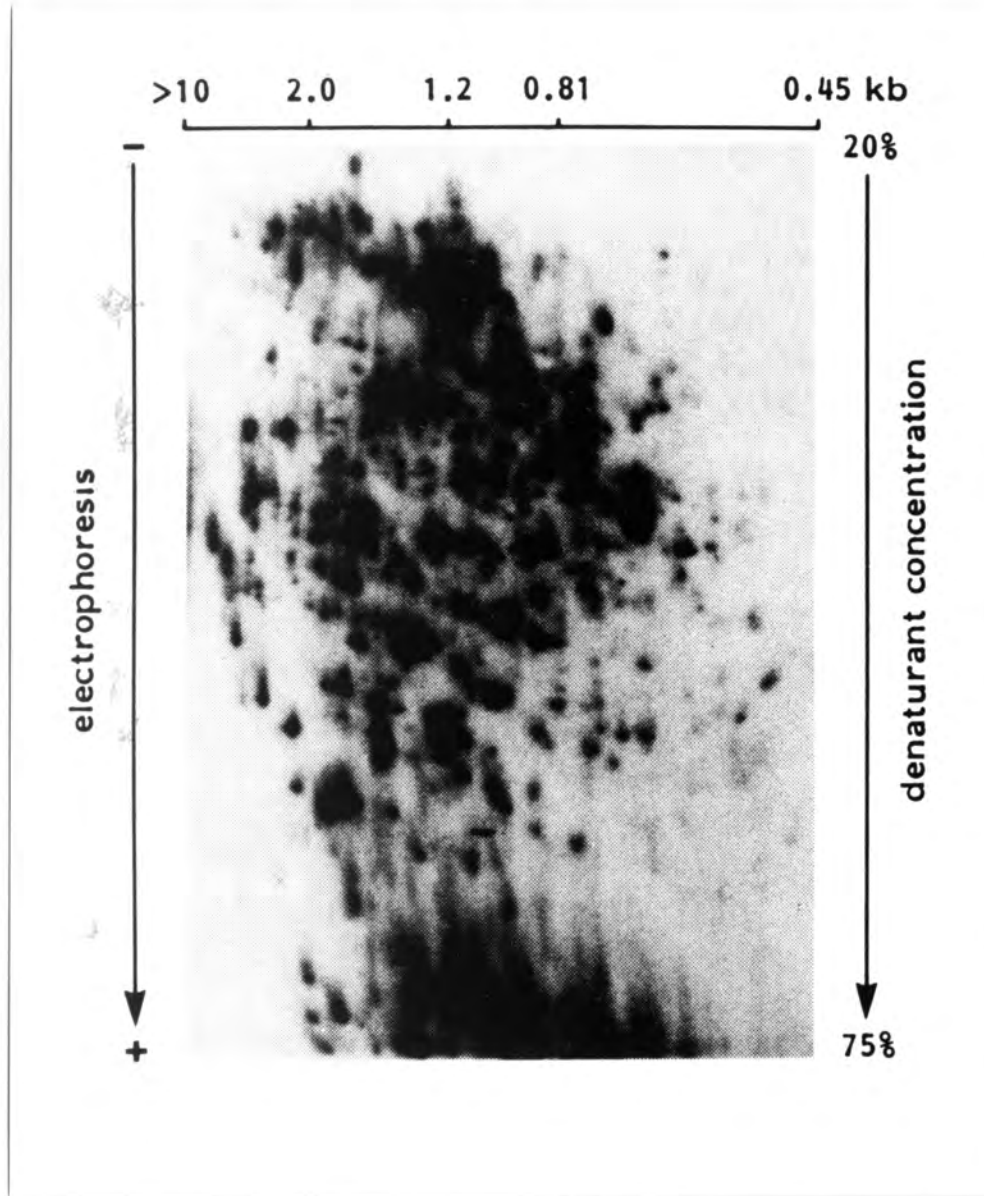


Fig.7 Two-dimensional electrophoretic patterns of B6, C3H and B6xC3H mouse genomic DNA labeled in *Not* I site



Ref. Uitterlinden, A. G. *et al* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
Vol.86,p2742-2746.

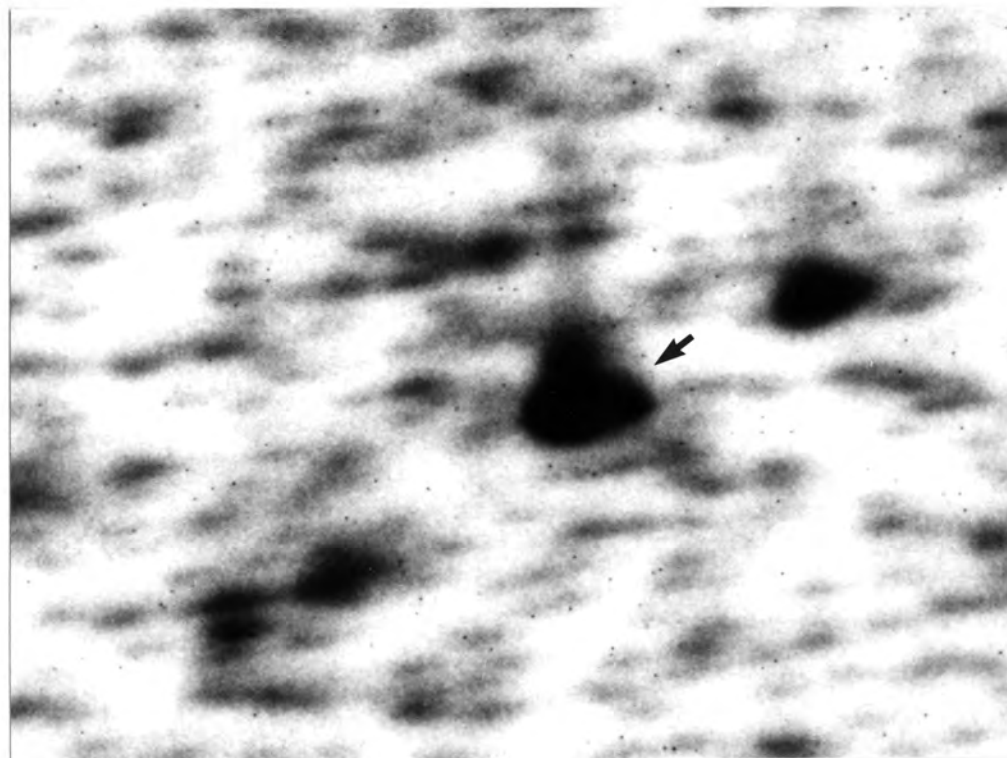
Fig.8 Two-dimensional DNA fingerprint of human individual using VNTR as a probe



Ref. Uitterlinden, A. G. *et al* (1989) *Proc. Natl.Acad.Sci.USA*
Vol.86,p2742-2746.

Fig.9 Two-dimensional electrophoretic patterns of neuroblastoma and normal tissue genomic DNA labeled in *Not* I site

(a) neuroblastoma



(b) normal tissue

