Osaka University Knowledge Archive

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次元サザンブ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ー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ＮｏｔＩを選んだ場合はさらに（ｆ）ＮｏｔＩ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る。（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（Ｔａｂｌｅ　１（ａ）），制限酵素の認識部位を用いた（Ｔａｂｌｅ　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）プロー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。（Ｔａｂｌｅ　１　参照）　次にマーカーとする制限酵素認識部位としてＮｏｔＩを選んだ。これは、（１）ＮｏｔＩ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、ＮｏｔＩ認識部位の９０％が遺伝子に存在する（Ｒｅｆ．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ＮｏｔＩ認識部位を標識するためゲノムＤＮＡをＮｏｔＩ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（Ｔａｂｌｅ　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（Ｔａｂｌｅ２（２））を選ばず、ＮｏｔＩ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Ｔａｂｌｅ　１，２に，また著者の戦略の概略についてＦｉｇ．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砕したもの0.5gにプロティナーゼ緩衝液（1mg/mlプロティナーゼＫ、0.5M EDTA、0.5% SDS、50mM トリス一塩酸 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	10μg
Ｎｏｔ　Ｉ	100単位
10×Ｈ緩衝液	5μl
蒸留水	適量
全量	50μl

10×Ｈ緩衝液

50mM トリス一塩酸(PH8.0)
100mM NaCl
10mM $MgCl_2$
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を濃縮したものを用いて下記の反応織成を調製し、65℃で１時間反応させた。

ゲノムＤＮＡ	10μl
3000Ci/m mol(10mCi/ml)[α-^{32}P]dGTP	5μl
3000Ci/m mol(10mCi/ml)[α-^{32}P]dCTP	5μl
Ｔａｑ　ＤＮＡ　ポリメラーゼ	10単位
5×Taq ＤＮＡ　ポリメラーゼ用緩衝液	10μl
蒸留水	適量
全量	50μl

5xTaq DNA ポリメラーゼ用緩衝液
250mM トリス－塩酸（pH9.0）
50mM $MgCl_2$

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	10μ
10×Ｈ緩衝液	5μ l
６塩基認識の制限酵素(BamHI, EcoRV, SphI,BglII)	100単位
蒸留水	適量
全量	50μl

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（３mmｘ８mmｘ０.８mm）に上記の様に調製した試料５μgをマイクロピィッ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、１ｘＨ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（ＨｉｎｆＩ，ＤｄｅＩなど）	１，５００単位
１０ｘＨ緩衝液	１３０μｌ
蒸留水	適量
全量	１，３００μｌ

（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
１０ｘＴＢＥ緩衝液	２４ml
蒸留水	適量
全量	２４０ml

さらにN,N,N',N'－テトラエチレンジアミンを２４０μｌ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－５™，コダック社製）と増感紙（Quanta Ⅲ™，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〕

（ＮｏｔＩマーカーによるゲノムの２次元ＤＮＡフィンガープリント）

Ｆｉｇ．３　は、キイロショウジョウバエゲノムＤＮＡをＮｏｔＩで消化後末端標識し、ＢａｍＨＩ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、ＤｄｅＩ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。　Ｆｉｇ．４も同様にヒトゲノムＤＮＡをＮｏｔＩで末端標識し、ＢｇｌＩＩ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、ＨｉｎｆＩ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（Ｆｉｇ．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。

（ＮｏｔＩ切断部位の特異的放射標識化）

Ｆｉｇ．５はヒトのゲノムＤＮＡのＮｏｔＩ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〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＡＴＰ，〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＧＴＰ，〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＣＴＰ，〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＴＴＰを用いたものである。　このようにＮｏｔＩ切断部位は、Ｆｉｇ．６の様な認識配列をしているので基質として〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＧＴＰ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〔$\alpha-^{32}$Ｐ〕ｄＣＴＰとそれぞれ非放射性のｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＴＴＰを加えて反応したものであるが、ｄＧＴＰを加えたｆのときだけラダーがみられる（Ｆｉｇ．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、ＧＣ↓ＧＧＣＣＧＣ　の　ＮｏｔＩ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。

（ＮｏｔＩ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（Ｆｉｇ．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（Ｆｉｇ．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）ＮｏｔＩ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ＮｏｔＩ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ー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ールを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）

Ｔａｂｌｅ１（ａ），Ｔａｂｌｅ２（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，Ｆｉｇ４）。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、ＮｏｔＩ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をはるかに上回る。
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、ＮｏｔＩ以外の８塩基認識の

制限酵素（ＦｓｅＩ，ＣｓｐＩ，ＳｆｉＩ等）やｒａｒｅ　ｃｕｔｔｉｎｇの制限酵素（ＭｌｕＩ，ＳａｌＩ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イズム）

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ー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ー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）ミユ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ーを同定出来ると考える。

（３）メチル化の変化の検出

ＮｏｔＩ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ーを検索できる。

(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ーを増やせる。

(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) マイクロミューテ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ことが必要である。

〔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ＮｏｔＩ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現在行なっているので、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、マイクロミューションを著者の方法で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ーテ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ことが容易であるので（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ＮｏｔＩ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。ＮｏｔＩ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ＮｏｔＩ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。ＮｏｔＩ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）ＮｏｔＩ認識部位の特異的標識化
図はゲノムＤＮＡのＮｏｔＩ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ＮｏｔＩ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ーを行った。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ＮｏｔＩ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。 ＮｏｔＩ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ＮｏｔＩ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ＤＮＡ５μｇを１．２％アガロースゲル電気泳動後、０．３４－２．８ｋｂ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ＮｏｔＩ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ＮｏｔＩ認識部位があり、６塩基認識の制限酵素にＢｇｌⅡ、４塩基認識の制限酵素としてＨｉｎｆＩを用いた１次元，２次元目の泳動距離（１．８ｋｂ，０．６ｋｂ）、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. Gen. 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) Meeting 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（ＮｏｔＩ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	・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つのアリールを別のスポットととして検出できる。	・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ＮｏｔＩ切断部位の90%が遺伝子に存在する。
欠点	・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。	・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	・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。	・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。	・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	・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。	・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。	・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がある。

Fig.1 Haploid amounts of DNA in various cells

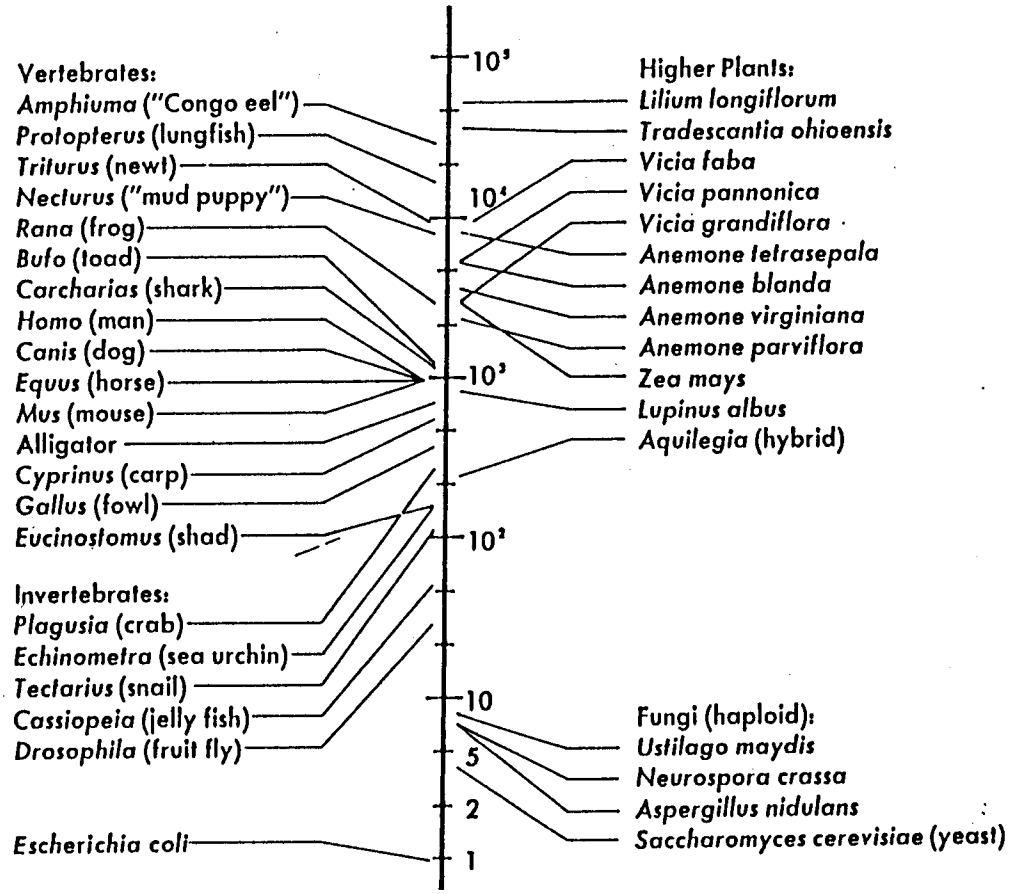


Fig.2 Strategy for Two-dimensional Gel Electrophoresis of Genomic DNA

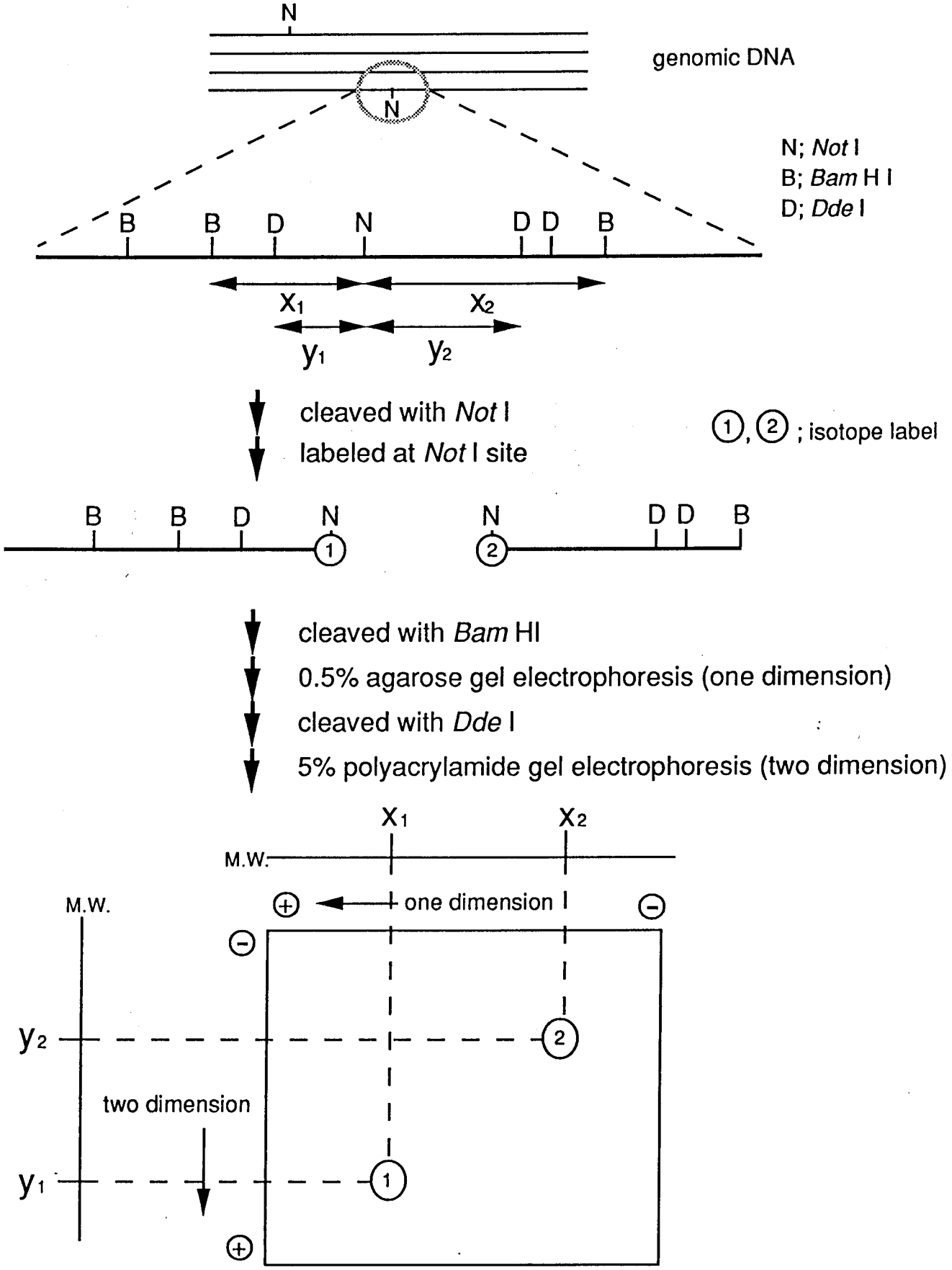


Fig.3 Two-dimensional electrophoretic pattern of *Drosophila* genomic DNA labeled in *Not* I site

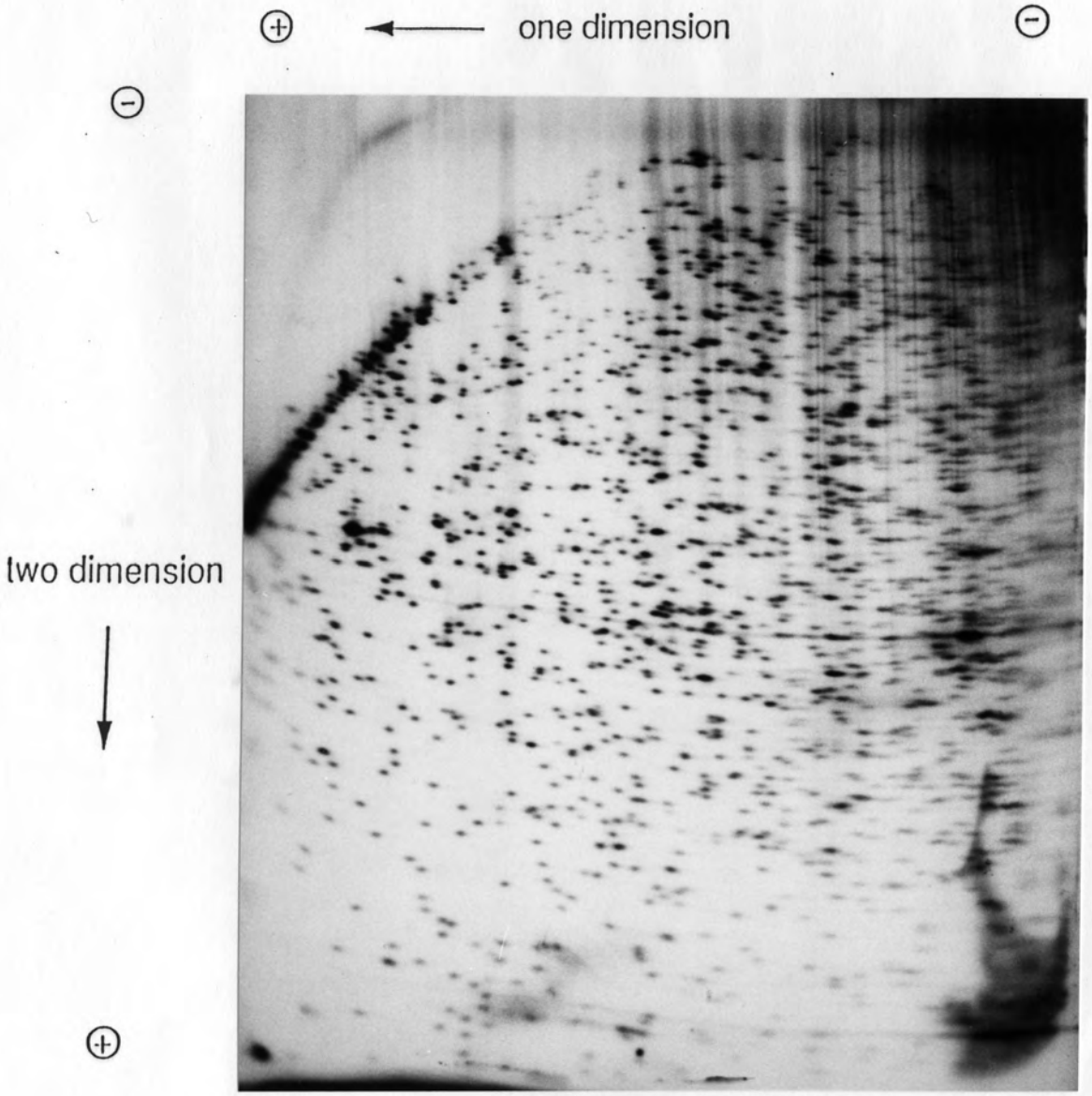


Fig.4 Two-dimensional electrophoretic pattern of *Human* genomic DNA labeled in *Not* I site

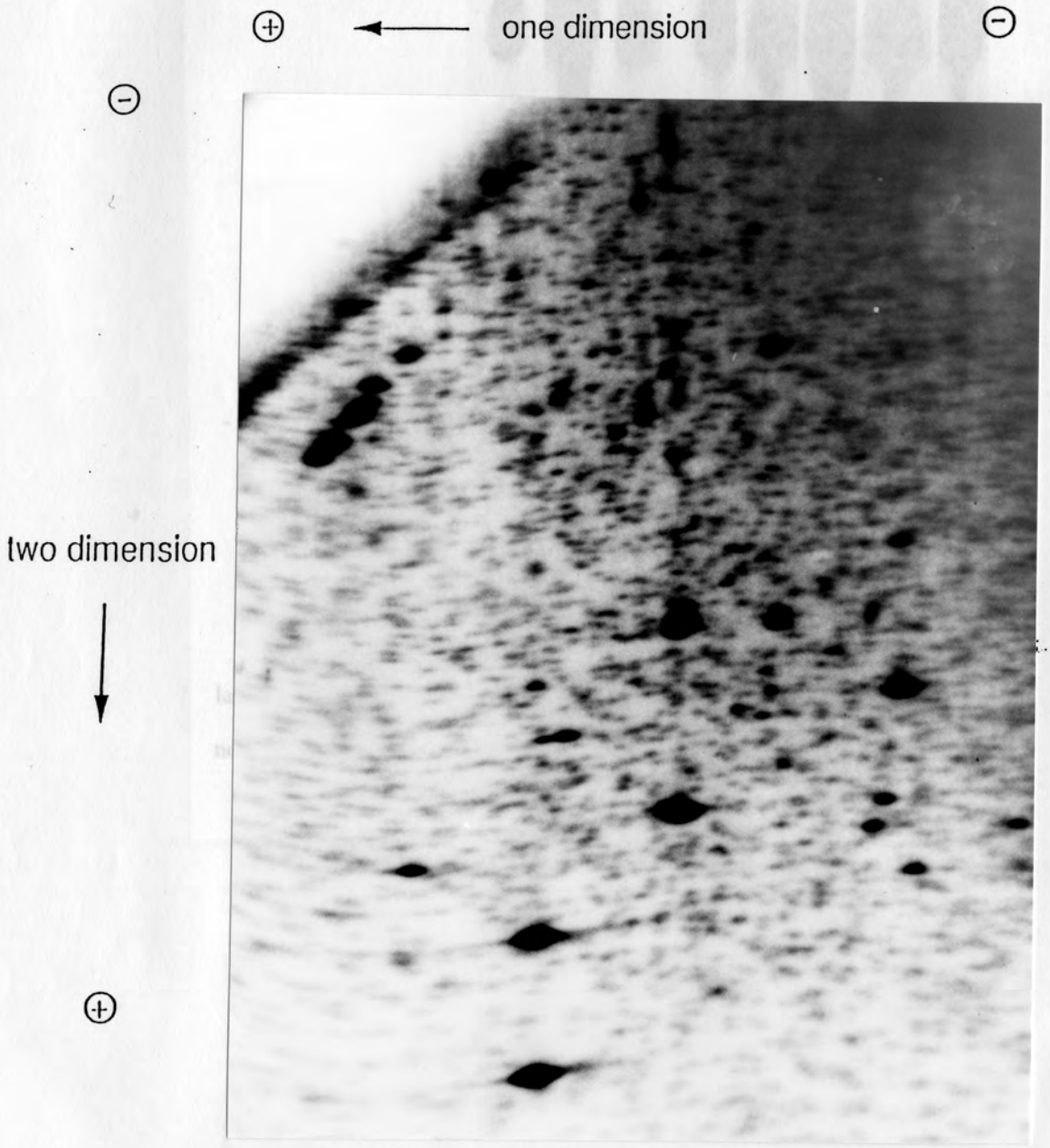


Fig.5 Specific labeling of *Not* I site

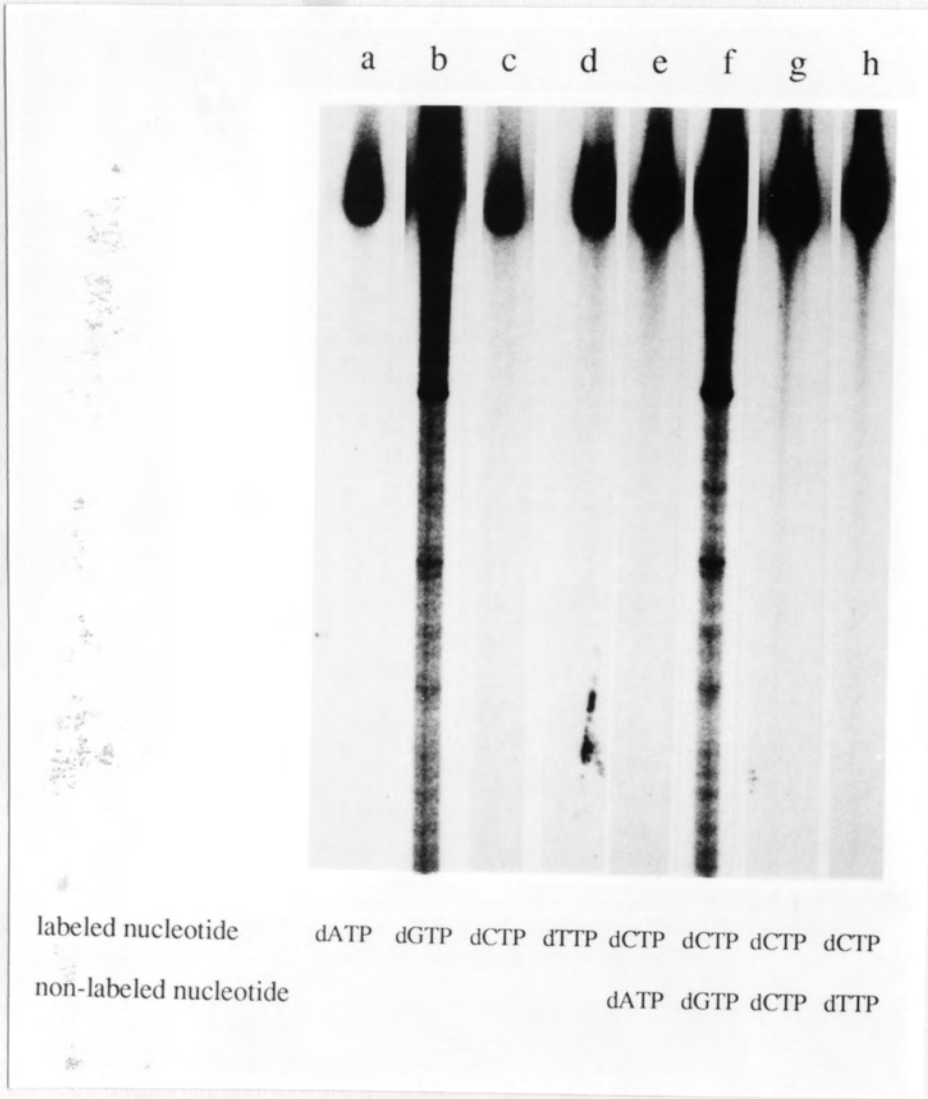
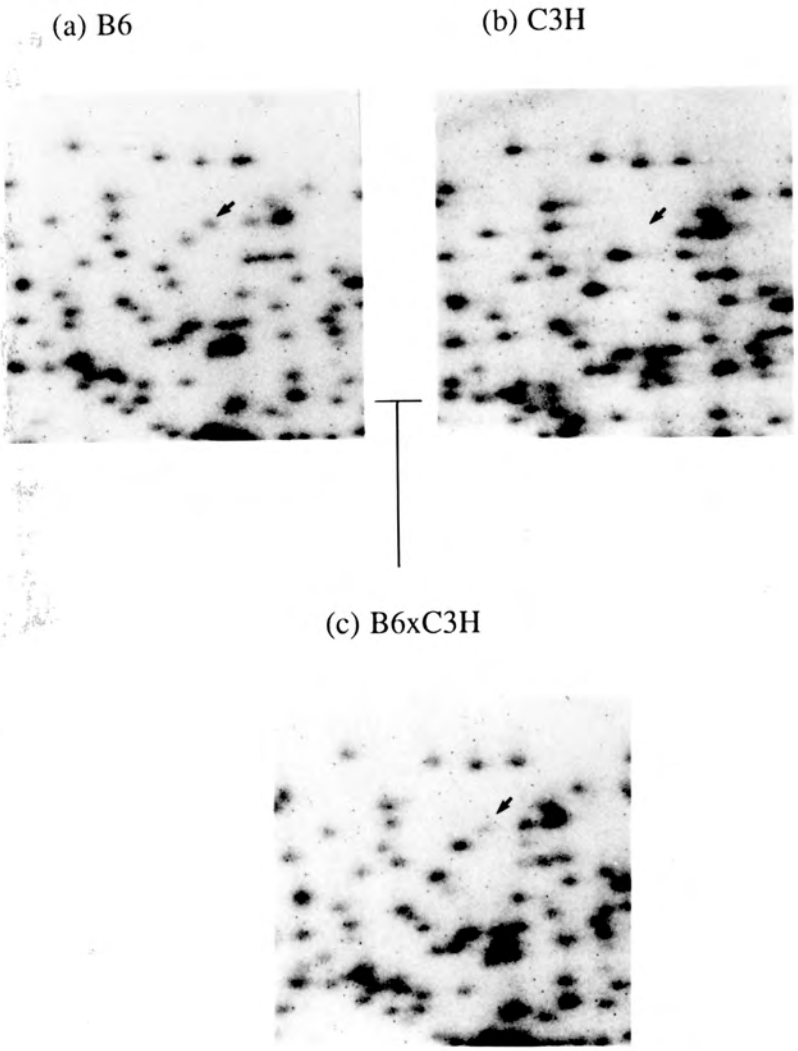


Fig.6 Recognition sequence of *Not* I

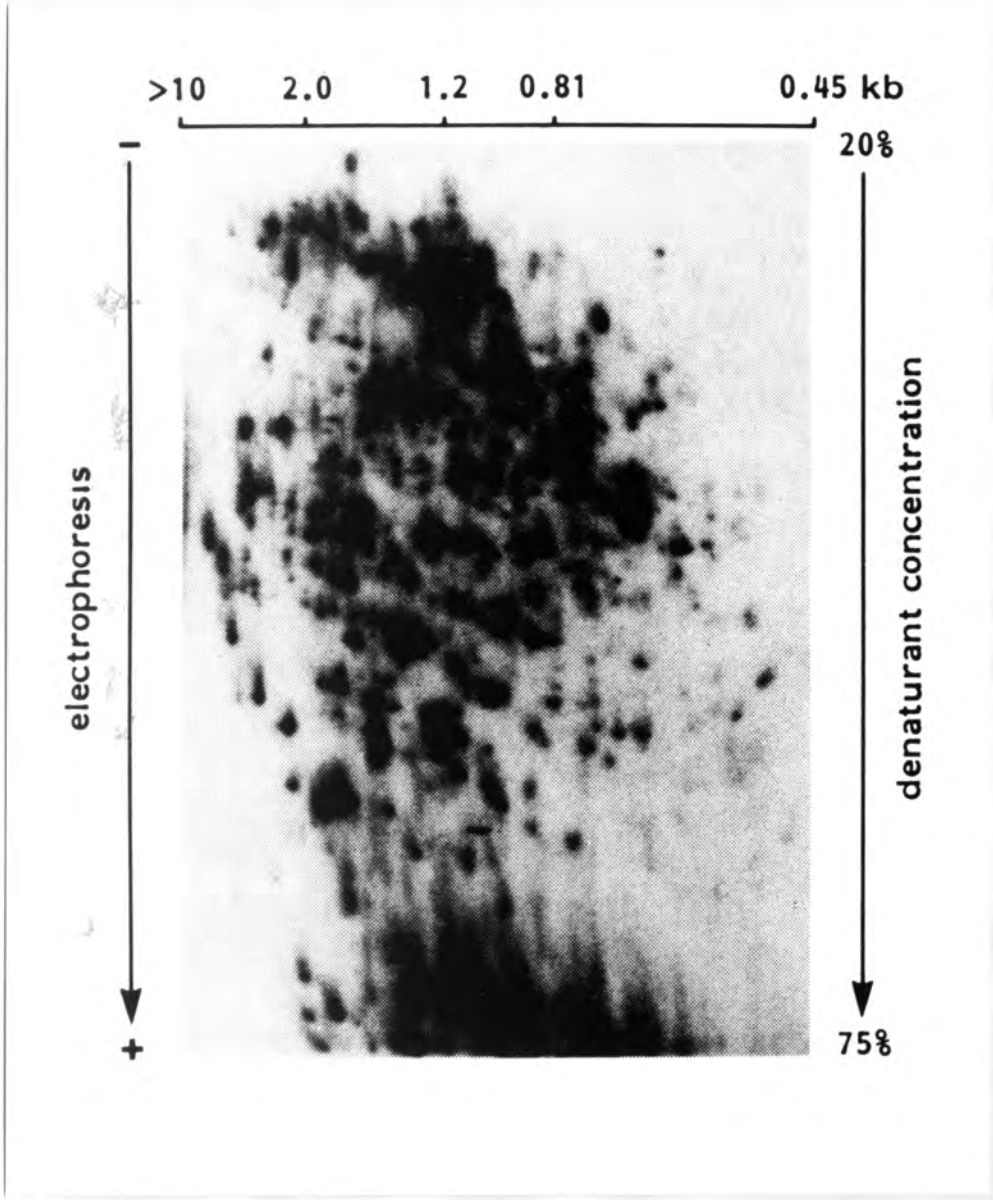
```
5′ ... G C▼G G C C G C ... 3′
3′ ... C G C C G G▲C G ... 5′
```

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.

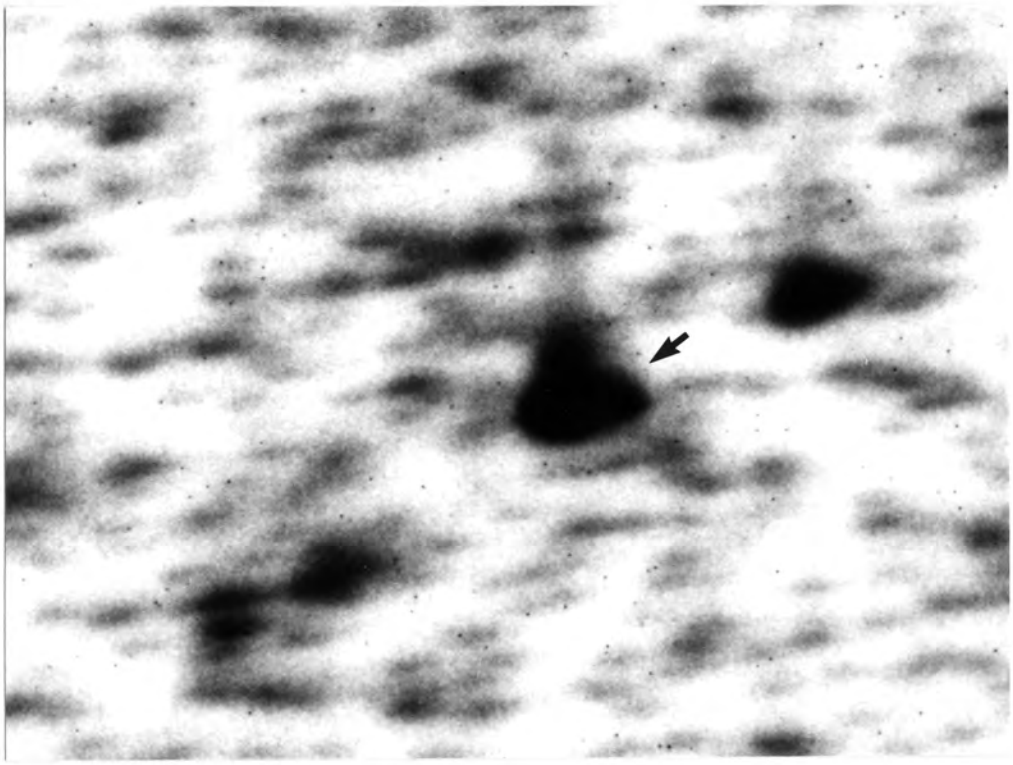
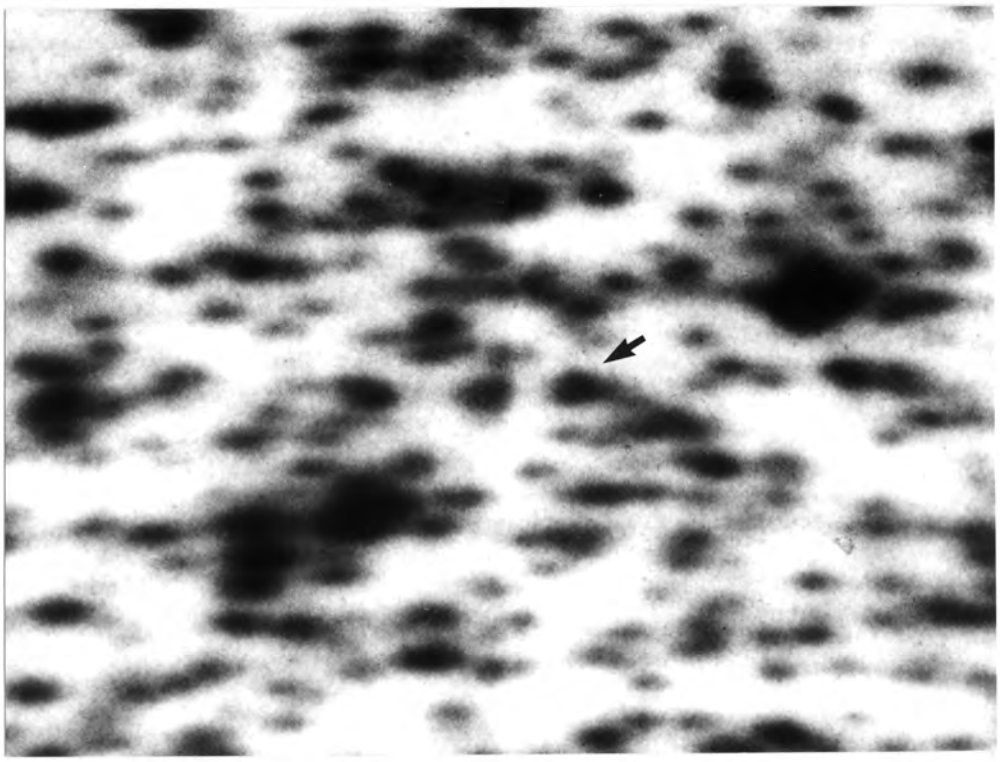
Fig.8 Two-dimensional DNA fingerprint of human individual using VNTR as a probe



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