



Title	多型性を示すヒトDNA断片の単離と染色体座位の同定
Author(s)	西庄, 勇
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36032">https://hdl.handle.net/11094/36032</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	西庄	勇
学位の種類	医学博士	
学位記番号	第 8129 号	
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 25 日	
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻	
	学位規則第 5 条第 1 項該当	
学位論文題目	多型性を示すヒト DNA 断片の単離と染色体座位の同定	
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞	
	(副査) 教授 熊原 雄一 教授 吉川 寛	

### 論文内容の要旨

#### [目的]

近年、組換えDNA技術の進歩により、DNAを制限酵素で切断したときに生ずる長さの多型性 (Restriction Fragment Length Polymorphisms ; RFLPs) を遺伝マーカーとして用いることが可能になった。多内分泌腺腫瘍症第2型 (MEN 2) および家族性大腸ポリポージスなどの遺伝性疾患の連鎖検定のために、多型性を示すDNA断片の単離と得られた断片の染色体座位の同定を目的として実験をおこなった。ライブラリー作製に、大腸菌内で複製数の多いプラスミドpUC18をベクターとして用いることにより、少量の培養から得られたDNAで多型性の有無を検討でき非常に効率的であった。単離された9種の多型性断片のうちの一つ (OS-4) は、ヒト・マウス雑種細胞および第18番染色体異常を有する数種の細胞を用いて 18q21.3-qter にマッピングされた。

#### [方法]

1) DNAライブラリー；ヒト白血球より抽出した高分子量DNAを制限酵素Hind IIIで切断後、2-8 kbの長さの断片を分離し、プラスミドpUC18のHind III部位に挿入しライブラリーを作製した。ヒト全DNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションをおこない、繰り返し配列を含まないプラスミドを選別した。得られた各々のプラスミドを5 ml培養し、アルカリ法にてDNAを抽出し、再度ヒト全DNAとのハイブリダイゼーションにより繰り返し配列を含むものを除外した。こうして得られた繰り返し配列を含まないヒトDNA断片について、これらをプローブとして4種の制限酵素で切断した12名の健常人のDNAとのハイブリダイゼーションにより、多型性の検出の有無を検討した。多型性を示すDNA断片については、さらに多くの健常人について検討し、遺伝子頻度を算定すると同時に、核

家族数家系を用いてメンデルの法則により分離することを確認した。 2) 高分子量DNAの抽出切断とプロッティング ; ヒト末梢血よりデキストラン法により白血球を分離しこれよりDNAを抽出した。高分子量DNAを4種の制限酵素(Msp I, Taq I, Hind III, EcoRI)で完全に切斷した後、アガロースゲル電気泳動にて断片を分離し、サザン法にてニトロセルロースフィルター上にプロットした。 3) ハイブリダイゼーション ;  $^{32}P-\alpha-dCTP$  を用いたニックトランスレーション法によりプローブをラベルし、1M NaClの条件下でのハイブリダイゼーション後、オートラジオグラフィーをおこなった。

4) ヒト・マウス雑種細胞と第18番染色体異常を有する細胞 ; 数種のヒト染色体を含む10種のヒト・マウス雑種細胞を用いて多型性断片の由来する染色体を同定した。さらに、第18番染色体異常(部分欠失、トリソミーなど)を有する細胞のDNAを用いたハイブリダイゼーションにより、遺伝子座位を同定した。

#### [結果]

ヒトDNA断片を含む1500個のプラスミドのうち、繰り返し配列を含まないものは20個で、このうち、多型性を示したものは4個であった。合計9個の多型性を示すDNA断片が単離され、このうちの一つ(OS-5)は3種の対立遺伝子を検出し、他の一種(OS-7)は挿入欠失型の多型性を示した。さらに、OS-4断片は雑種細胞を用いた実験により、第18番染色体にその座位を占めることが明らかとなり、第18番染色体異常を有する6種の細胞を用いたハイブリダイゼーションの結果、18q21.3-qterにマッピングし得た。同時に、この断片は、Taq IのみならずPst Iでも多型性を示すことが判明した。これらの断片により検出される多型性は、家系内でメンデルの法則に従って分離することを確認した。なお、その後の実験により、OS-2断片は第10番染色体にその座位を占めることが明らかとなっている。

#### [考察]

今回ライブラリー作製に際して用いたプラスミドpUC18は、大腸菌内での複製数が多く、わずか5ml培養から得られたDNAを用いて多型性の検出の有無を検討でき、非常に簡便で、多くのクローンを調べることが容易であった。われわれは、2-8 kbの比較的短いDNA断片を組み込んだが、長い断片ほど多型性を検出する頻度は高いが、同時に、繰り返し配列を含む頻度も高く、プローブとして用いるのは容易ではない。多型性の検出のために、4種の制限酵素についてのみ検討したが、約20%のクローンが多型性を示し、従来の報告と同様の頻度であった。ヒトDNAでは、CpG配列のシトシンは大部分がメチル化されており、多型性を示しやすいと言われているが、われわれが単離したクローンの大部分も、その認識部位にCpG配列を含む制限酵素(Msp I, Taq I)で多型性を示した。

OS-4断片の染色体座位の同定のために用いた方法は、染色体の部分欠失等の異常を有する細胞DNAとのハイブリダイゼーションにより得られたバンドの濃さを比較し、染色体異常を有する細胞DNAとのハイブリダイゼーションにより得られたバンドの濃さを比較し、染色体異常を有する細胞内での遺伝子のコピー数を算定することで、その遺伝子座位を限定するものである。遺伝子のマッピングのための有用な方法のひとつであると思われる。OS-4断片は、Human Gene MappingにおいてD18S5として登録され、第18番染色体上の有用なDNAマーカーとして利用されている。

## 論文の審査結果の要旨

組換えDNA技術の進歩により、高分子量DNAを制限酵素で切断したときに生じる断片の長さの多型性を遺伝マーカーとして利用することが可能になった。本研究は、各種の遺伝病の連鎖検定を目的として、ヒトDNAライブラリーより9種の多型性断片を単離し、そのうちのひとつであるOS-4断片について、その染色体の座位を明らかにしたものである。OS-4断片は、Human Gene MappingにおいてD18S5として登録され、多くの研究者に利用されており、第18番染色体上の有用なDNAマーカーとして高い評価をうけている。以上の理由より、本研究は学位に値するものと考える。