Osaka University Knowledge Archive

Title	Isolation of Region-Specific Cosmids by Hybridization with Microdissection Clones from Human Chromosome10q11.1-q21.1
Author(s)	辛川, 克
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38609
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【103】

氏　　名	辛（から）　川（かわ）　克（かつ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11058　号
学位授与年月日	平成6年2月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	Isolation of Region-Specific Cosmids by Hybridization with Microdissection Clones from Human Chromosome 10q11.1-q21.1 **(ヒト染色体10q11.1-q21.1のマイクロダイセクション・クローンを用いた領域特異コスミドの単離)**
論文審査委員	(主査) 教授　森　武貞 (副査) 教授　辻本　賀英　　教授　髙井新一郎

論文内容の要旨

[目　的]

遺伝子異常により発生する各種疾患の原因遺伝子を同定するためには，特定の染色体領域より多数のDNAマーカーを単離し，詳細な遺伝子地図を作成することが必須である。本研究では，特定の染色体領域を顕微鏡下に切断するマイクロダイセクション法を用いて，多発性内分泌腫瘍症2A型（MEN2A）の原因遺伝子が位置する10番染色体動原体近傍より，多数のマイクロクローンを単離し，さらに，これらのクローンをプローブとして，より長いDNA断片を含むコスミド・クローンを効率的に単離することを目的とした。

[方法ならびに成績]

先ず，10番染色体動原体近傍（10q11.2-q21.1）を顕微鏡下にガラス針を用いて切断したものを10個集めた。これらより抽出したDNAを制限酵素*Sau*3AIで切断し，34merのリンカーを結合した後，リンカー中の24merをプライマーとし，31サイクルのPCRにより増幅した。非放射性in situハイブリダイゼーション法（FISH法）により，この増幅したDNAが10番染色体動原体近傍に由来することを確認した。

次に，増幅したDNAをペラスミドに組み込み，20,000個のマイクローンを得た。この中から217個のマイクローンを任意に選び，インサートを確認したところサイズは50〜800bp，平均220bpであった。これらのインサートをサザン・トランスファーし，^{32}Pで標識したヒト胎盤DNAとハイブリダイズした結果，32／217（15%）が強いシグナルを示すことによりヒト由来の繰り返し配列を含むものと考えられた。シグナルを示さなかったもののうち比較的長い（>200bp）DNA断片を含むマイクロクローン95個を選び詳細に解析した。

ヒト女性より得たゲノムDNA及び，ヒト10番とY染色体を含むハイブリッド細胞（762-8A）より抽出したDNAを各々制限酵素*Eco*RIで切断し，サザン・トランスファーしたパネルを作成した。このパネル上に上記の95個のマイクロクローンを各々^{32}Pで標識し，個々にハイブリダイズした結果，43／95（45%）がヒト女性及びハイブリッド細胞DNAに各々1本の同じサイズの*Eco*RI断片を検出した。よってこれらをヒト10番染色体上のユニークな配列であると考え，コスミド・ライブラリーのスクリーニングを用いることにした。

次に，正常人より得たゲノムDNAを*Sau*3AIで部分切断し蔗糖密度勾配により分離した35〜42kbのDNA断片をベクターに取り込み，230,000個のコスミド・クローンを得た。このコスミド・ライブラリーを，ヒト10番染色体上のユニークなDNA配列と考えられる前述の43個のマイクロクローンより無作為に選んだ25個を用いてスクリーニングした結果，14個のマイクロクローンに対応する34個のコスミド・クローンが単離された。このコスミドDNAを標識し，先に用いたパネルにハイブリダイズした結果，32／34のコスミドがヒトとハイブリッド細胞DNAで同一のシグナルを示し，ヒト10番染色体由来の配列を含んでいることが判明した。さらにFISH法にてマッピングできたのは25／32で，このうち24個がマイクロダイゼクトした染色体領域またはその近傍（10p11.2-q22.3）に，1個がやや遠位側（10q24.3-q25.1）にマップされた。また，restiction fragment length polymorphism（RFLP）の有無を調べるため，6種の制限酵素で切断した10人の日本人のゲノムDNAを含むサザンフィルターに，先に10番染色体上にマップされたコスミドDNAをハイブリダイズさせたところ，13／32（41%）がRFLPを示した。

［総　括］

マイクロダイセクション，マイクロクローニング法により単離されたクローンを用い，特定の染色体領域由来の，より長いDNA断片を含むコスミド・クローンを効率的に単離できることを示した。さらに，得られたクローンにより，対応する酵母人工染色体（YAC）やcDNAを単離することも可能であると考えられる。ここに報告した10p11.2-q11.2に位置するクローンは，MEN2A遺伝子近傍の詳細なるマップを作成する上で有用な指標となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究はマイクロダイセクション法を用い，多発性内分泌腫瘍症2A型（MEN2A）原因遺伝子領域より，効率的に染色体部位特異的なDNAマーカーを単離することを目的としたものである。単離されたマーカーは，詳細なん解析の結果，この染色体領域に由来することが確認され，遺伝子解析に有用であることが示された。遺伝性疾患の解析に必要な特定の染色体領域のDNAマーカーを，マイクロダイセクション法によって効率的に単離し得ることを証明した本研究の意義は大きく，学位に値するものと考えられる。