

Title	Long-Range Physical Map of the Ly-6 Complex : Mapping the Ly-6 Multigene Family by Field-Inversion and Two-Dimensional Gel Electrophoresis
Author(s)	上浦, 祥司
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/38677">http://hdl.handle.net/11094/38677</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

氏 名	かみ 上	うら 浦	しょう 祥	じ 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)			
学 位 記 番 号	第 1 1 0 5 7 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	Long-Range Physical Map of the Ly- 6 Complex: Mapping the Ly- 6 Multigene Family by Field-Inversion and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. (フィールド・インバージョン2次元電気泳動を用いたマウス Ly- 6 マルチジーンファミリーの染色体地図の作製)			
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 澤 修			
	(副査) 教 授 濱 岡 利 之 教 授 中 村 敏 一			

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

マウス Ly- 6 抗原は、グリコホスファチジル・イノシトール・アンカー (GPI) により細胞表面に発現される蛋白質群で、他の GPI アンカーを持つ細胞表面抗原と同様に、T 細胞活性化に関与している。多数の抗 Ly- 6 モノクローナル抗体が作製され、その特異性と組織分布の差異から 8 つの Ly- 6 関連抗原が同定された、リンパ球以外に脳、腎、心などの臓器でも発現されており、その生物学的役割はいまだ不明な点が多い。近年の分子生物学的解析により、これらの分子が15番染色体上のごく限られた領域に近接して存在する遺伝子群によってコードされていることが判明したが、その詳細な遺伝子構築は不明である。本研究においては、コンベンショナルなλファージ、コスミッドライブラリースクリーニングと共に、1000Kb 以上の高分子 DNA 鎖を分離できる Field-inversion gel electrophoresis (FIGE)、さらには FIGE により分離された DNA を別の制限酵素で切断後、FIGE に直交する方向に泳動する二次元電気泳動 (2D-DE) を採用して、Ly- 6 遺伝子座の詳細な遺伝子地図を作製した。

### [方法ならびに成績]

#### 1) Field-inversion gel electrophoresis (FIGE)

C57BL/6胸腺細胞を低融点アガロースブロック中に封入し、ゲル内において高分子 DNA を抽出した。ゲルブロック中の DNA は、methylation 感受性の NotI, NarI 等の rare-cutting endonuclease により消化され、FIGE により分離後サザンブロッティングを行い、Ly-6E. 1 cDNA クロームをプローブとして hybridization を行った。その結果、Ly- 6 ローカスは約600Kbの範囲内に局在するものの、Ly- 6 遺伝子がマルチジーンファミリーを構成していることと、rare-cutting endonuclease により生ずる部分消化産物の存在のために制限酵素地図の作製は困難であった。そこで、C57BL/6 liver ゲノムライブラリーより Ly- 6 関連クロームをスクリーニングし、rare-cutting enzyme 切断部位を持つファージクローム 1-6 より、シングルコピーゲノムプローブ 16Alu を得た。プローブ 16Alu は、Ly- 6 ローカスの最も端の部分を認識し、これと Ly- 6 cDNA プローブを用いて、Ly- 6 ローカスを含んだ1600Kb を越える範囲の染色体地図を作製した。

## 2) コスミッドスクリーニング

Ly-6 ローカスの詳細なマップの作製と、全ての Ly-6 関連遺伝子のクローニングを目的として、B10, AQR 細胞株よりコスミッドライブラリーを作製し、Ly-6E.1cDNA プローブによりスクリーニングを行った。合計61個のコスミッドクローンが得られ、3つのクラスター (A, B, C) と1個の個立クローン (c63) に配列された。C57BL/6マウスゲノム DNA には、Ly-6E.1cDNA プローブと hybridize する27個の Hind III断片が含まれるが、このうち23個がクローニングされた。クラスター A は、全長108Kb で5つの Ly-6 関連 Hind III断片を含み、うち一つは Ly-6A.2をコードする事が特異的オリゴヌクレオチドをプローブとした hybridization により示された。クラスター B は、全長82Kb で5つの Ly-6関連断片を含み、うち一つは Ly-6C.2をコードすることが同様に示された。クラスター C は全長137Kb で11個の Ly-6 関連の Hind III断片を含んでいた。他のコスミッドクラスターとオーバーラップしないクローン c63は38Kb のインサートを持ち、2つの Ly-6 関連 Hind III断片を含んでいた。各々の Ly-6 関連シーケンスのオリエンテーションは、Ly-6E.1cDNA の 5' 側断片と 3' 側断片をプローブとして決定した。

## 3) 二次元ゲル電気泳動

各コスミッドクラスターの配列順序を決定し、Ly-6 ローカス内の染色体地図を作製するため、二次元ゲル電気泳動を行った。Ly-6 ローカスより高い頻度で切断する rare-cutting enzyme Sal I で DNA を消化後、FIGE にて分離する。分離された DNA をさらに Hind IIIによりゲル内で消化し、FIGE と直交する方向へコンベンショナルな電気泳動を行うことにより二次元に展開し、hybridization を行った。この方法により、クラスター A-クラスター B-クラスター C-コスミッドクローン c63という配列が決定され、クラスター Bを除いてはその方向も決定された。また、クローニングされなかった4つの Ly-6 関連 Hind III断片のおおよその位置も決定し得た。

## 4) NZB マウス Ly-6 ローカスにおける二重組換え

NZB マウスは、Ly-6.1ハプロタイプでありながら Ly-6B.2を発現しており、その機序は不明であった。作製された染色体地図を元にいくつかの Low-copy ゲノムプローブを分離し、NZB マウスゲノム DNA の RFLPs を検討したところ、クラスター Cにおいて二重の組換えが起こっていることを証明し得た。

### [総括]

- 1) 1600Kb を越えるマウス細胞表面抗原 Ly-6 マルチジーンファミリーの染色体地図を作製し、Ly-6 ローカスのゲノム DNA のクローニングを行った。
- 2) 既知の Ly-6A.2, Ly-6C.2をコードする遺伝子の位置を決定した。
- 3) 染色体地図を元に分離されたゲノムプローブを用いて NZB マウスにおいて、Ly-6 ローカスの二重組換えが起こっていることを示した。
- 4) この染色体地図とコスミッドクローンは、Ly-6 抗原及びそれをコードする遺伝子ファミリーの研究を進める上で重要な tool となる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文において、マウス細胞表面抗原の一つである Ly-6 抗原をコードするマルチジーンファミリーの染色体地図の作製と Ly-6 抗原遺伝子群のクローニングを行った。その上で1600kb にわたる染色体地図を元に、既知の Ly-6A.2, Ly-6C.2をコードする遺伝子の位置を決定し、また分離されたゲノムプローブを用いて NZB マウスにおいて Ly-6 ローカスの二重組換えが起こっていることを証明している。この染色体地図とコスミッドクローンは、Ly-6 抗原とそれをコードする遺伝子ファミリーの研究を進める上で重要な tool となり、よって本論文は学位を授与されるの値する研究であること確認した。