Osaka University Knowledge Archive

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	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38677
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

【102】

氏　　名	上浦祥司（かみうらしょうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11057　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　濵岡　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クローンをプローブとして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関連クローン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ン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して示された。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関連シークエ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。