The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation and mapping of microsatellites from a library microdissected from the Werner's syndrome region, 8p11. 2-p22
Author(s)	永野, 敬子
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38916
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	永野敬子（ながの　けいこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11292　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**Isolation and mapping of microsatellites from a library microdissected from the Werner's syndrome region, 8p11. 2-p22** **（ウェルナー症候群遺伝子領域［8p11.2-p22］からのマイクロサテライト遺伝子の単離とマッピング）**
論文審査委員	（主査） 教　授　荻原　俊男 （副査） 教　授　高井新一郎　　教　授　田中亀代次

論文内容の要旨

【目的】

ウェルナー症候群（WRN）は常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性早老症で，日本人に頻度の高い難病である。最近，家系を用いた連鎖分析や，近親婚患者を解析したホモ接合性マッピングにより，WRNの遺伝子座位は第8染色体短腕（8p11.2-p22）に決定されたが，原因遺伝子そのものは未だ決定されていない。原因遺伝子を単離同定しその機能を調べることは，老化の機序を解明する上で非常に重要である。本研究では，WRN領域から新しい遺伝子マーカーを単離しマッピングすることを目的として，WRN領域（8p11.2-p22）を染色体顕微切断法（microdissection）を用いて顕微鏡下で直接切り出し，遺伝子ライブラリーを作成後，このライブラリーから（CA)nリピートを持つ多型性マイクロサテライト遺伝子を単離し，家系を用いた連鎖分析により連鎖地図を作成した。

【方法並びに結果】

(1)（CA)nリピート遺伝子の単離：第8染色体短腕のWRN領域（8p11.2-p22）を染色体顕微切断法（microdissection）で切り出し，Sau3AI消化後アダプターを接続し，PCRで遺伝子増幅した産物をEcoRIで消化し，プラスミドpUC18にクローニングしライブラリーを作成した。PCR産物は，染色体ペインティング法で，切り出した8p11.2-p22付近に由来することを確認した。次に，ライブラリーを（CA)nリピートからなるプローブでスクリーニングした。（CA)nリピートでハイブリダイズするプラスミドクローンを単離し，（CA)nリピート前後の塩基配列を決定した。

(2)多型性マイクロサテライト遺伝子の決定：血縁関係のない6-10人の健常人DNAの（CA)nリピートをPCRで遺伝子増幅し，DNA多型の有無を検索するため，（CA)nリピートを挟んだ領域で，100bp前後の長さのPCR産物となるオリゴプライマーを合成した。多型性マイクロサテライト遺伝子を迅速かつ簡便に確認するために，温熱気と微小ガラス管を組み合わせたPCR装置（1605 Air Thermo-Cycler／Idaho Technology）でPCRの反応時間を40分以内とし，PCR産物を8x7cmのポリアクリルアミドゲルで泳動することにより，泳動時間を40分に短縮し，エチジウムブロマイド染色で2塩基対の差も検出可能な系を開発した。

(3)マイクロサテライト遺伝子の連鎖地図作成：7個の多型性マイクロサテライト遺伝子から4個（MS8-2, MS8-10, MS8-11, MS8-171）を選び出し，CEPH（CENTRE d'ETUDE du POLYMORPHISME HUMAIN）由来の大家系を用いて連鎖分析を行った。連鎖分析には，LINKAGE（ver.5.1）プログラムを使用し，二点分析法にてロッド値を算出した。MS8-2とMS8-171の間で組換え率（＝θmax）0.11の時，最大のロッド値（＝Zmax）は15.8であった。

MS8-10とMS8-11の間では θ max＝0.14でZmax＝1.57であった。さらに，これらのマーカーとCEPHデータベース（ver.6.0）由来の第8染色体上の他のマーカーとの間で二点分析を行ったところ，MS8-2とMS8-171のグループはANK 1 A, Bと，MS8-10とMS8-11のグループはLPL3GTに隣接していることが判明した。この2グループ間では互いに連鎖を認めなかったが，2グループ間にWRN遺伝子が位置していることが推測された。

(CA)nのプローブでハイブリダイズした合計160個のクローンの塩基配列を決定し，(CA)nが10リピート以上の独立した46個のクローンのうち30個についてPCRプライマーを作成し，最終的に24個の多型性マイクロサテライト遺伝子を同定し，7個のクローンがWNR座位に近接することを証明した。

RFLP, VNTRの次の世代として登場したマイクロサテライト遺伝子は，遺伝子マーカーとしての頻度が高く，平均70-80kbに一個存在するため全染色体にほぼ均一に分布する。ヘテロ接合体となる頻度が高く連鎖分析に役立ち，少量のDNA検体で解析が可能であるため，有用な遺伝子マーカーとして注目されている。今回の4個のうち3個の遺伝子マーカーは，ヘテロ接合性となる確率は，50%以上であった。最近，1000個以上のマイクロサテライト遺伝子マーカーが入手可能となったが，目的とする領域におけるマーカーの数が少なく，詳細な遺伝子地図が作成出来ない場合もある。今回のように，目的とする領域を染色体顕微鏡下で切断し，マイクロサテライト遺伝子を単離することは，意義のあることである。

【総括】

第8染色体のWRN領域（8p11.2-p22）を染色体顕微切断法で切り出し，プラスミドライブラリーを作成し，このライブラリーをスクリーニングすることにより，(CA)nリピートからなる7個の多型性マイクロサテライト遺伝子を単離した。うち4個のクローンについては，家系を用いた連鎖分析法で連鎖地図を作成し，WRN領域にあることを証明した。また，マイクロサテライト遺伝子の多型性の検出には迅速かつ簡便な方法を開発した。将来，これらのクローンは，コスミドクローンやYACクローンによる染色体地図作成時，染色体のSTS（sequence tagged site）として役立つであろう。染色体顕微切断法と組み合わせることにより，目的とする領域から，有用な多型性マイクロサテライト遺伝子を単離できることを本研究で示した。本法は，他の遺伝性疾患のポジショナルクローニングに応用できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性早老症，ウエルナー症候群（WRN:Werner's syndrome）の原因遺伝子を単離同定する目的で行なわれている。最近，家系を用いた連鎖分析や，近親婚患者を解析したホモ接合性マッピングにより，WRNの遺伝子座位は第8染色体短腕（8p11.2-p22）に決定されたが，原因遺伝子そのものは未だ決定されていない。原因遺伝子を単離同定しその機能を調べることは，老化の機序を解明する上で非常に重要である。本研究では，多型性マイクロサテライト遺伝子の連鎖分析により，WRN遺伝子領域に存在する4つの新しい遺伝子マーカーを同定した。第8染色体のWRN領域（8p11.2-p22）を染色体顕微切断法（microdissection）で切り出し，プラスミドライブラリーを作成し，このライブラリーをスクリーニングすることにより，(CA)nリピートからなる7個の多型性マイクロサテライト遺伝子を単離した。うち4個のクローンについては，家系を用いた連鎖分析法で連鎖地図を作成し，WRN領域にあることを証明した。また，マイクロサテライト遺伝子の多型性の検出には迅速かつ簡便な方法を開発した。将来，これらのクローンは，コスミドクローンやYACクローンによる染色体地図作成時，染色体のSTS（sequence tagged site）として役立つであろう。染色体顕微切断法と組み合わせることにより，目的とする領域から，有用な多型性マイクロサテライト遺伝子を単離できることを本研究で示した。本法は，他の遺伝性疾患のポジショナルクローニングに応用できると考えられる。これらの結果は，WRN原因遺伝子の解明上重要な手掛かりとなることが示唆され，さらに，単離した多型性マイクロサテライト遺伝子は国際的なゲノムマッピングや他の疾患遺伝子のクローニングに利用されるであろう。したがって，本研究は，学位授与に価すると認める。