

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | A genetic linkage map of mouse using an expanded production system of restriction landmark genomic scanning (RLGS Ver. 1.8)  |
| Author(s)    | 岡崎, 康司   |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/38995">https://hdl.handle.net/11094/38995</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。 |

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

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

Osaka University

|               |   |
|---------------|---|
| 氏 名           | おか ぎき やす し<br>岡 崎 康 司   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 8 0 5 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 7 年 3 月 23 日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当<br>医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻  |
| 学 位 論 文 名     | A genetic linkage map of mouse using an expanded production system of restriction landmark genomic scanning (RLGS Ver. 1.8)<br>(新世代RLGS (Ver. 1.8) 法の開発及びそれを用いたマウス遺伝的地図の作成) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 井 上 通 敏<br>(副査)<br>教 授 米 田 悦 啓 教 授 荻 原 俊 男  |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

ポジショナルクローニングを行なううえで必須のDNAマーカーを高率に検出し、高速に全染色体上にマッピングする系の開発とそれを用いて実際にマウスの遺伝的地図を作成する。

#### 【方法ならびに成績】

DNA二次元電気泳動 (RLGS) 法は、DNAを切断する制限酵素がその認識部位を再現性よく認識し切断することから、制限酵素サイトがランドマークとして活用できるであろうという概念から考案された筆者らのオリジナルな方法である。その概要は以下の7つのステップより成る。(1)ブロッキング：一般にゲノムDNAは組織から精製する過程で、ニックやギャップが入る。標識をする際には、そのような部位にも標識が入り、バックグラウンドの原因となる。そこで標識する前に新しいヌクレオチドアナログ (ddYTP ( $\alpha$ S)) を取り込ませた。そうすることにより、エキソヌクレアーゼ活性による分解を防ぎかつ新たなヌクレオチドの付加も阻害することができた。

(2)ランドマーク切断：(1)の方法で前処理したDNAをrare-cutter 酵素 (Not I) で切断する。(3)ランドマーク標識：切断端をラジオアイソトープ ( $[^32\text{P}]$  dCTP (6,000Ci/mmol), ( $[^32\text{P}]$  dGTP (3,000Ci/mmol) で標識する。標識後、制限酵素Pst Iで更に切断して、一次元分画を行なう。(4)一次元分画：アガロースゲルを用いて、(3)で調製したDNAの電気泳動を行なう。(5)DNAのゲル中での切断：一次元電気泳動したDNAをゲル中で、制限酵素Pst Iで切断する。(6)二次元分画：ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元分画を行なう。(7)オートラジオグラフィを行なう。RLGS法は、筆者らが開発してきたオリジナルな方法であるが、本論文ではこの方法を根本的に改変し、ブロッキング、ランドマーク切断、ラベリング等の各ステップにおいて、フェノール抽出やエタノール沈殿によるバッファー置換を不要とした。これにより、大量のサンプルの処理が可能となった。さらにゲル中制限酵素消化、一次元電気泳動装置、二次元電気泳動装置を新たに開発し、一度に16枚の半切大ゲルの泳動を可能とした。これにより、RLGS原法に比べて必要コストおよびスペースを約10分の1以下に抑え、一日の処理能力を2枚/日から16枚/日にすることができた。RLGS画像は、半切の画面上にゲノム上の約3,000点を抽出することができる。これをマウスの亜種間の多型解析に応用し、ラボラトリーマウスであるC57BL/6とDBA2の間に209個の多型を検出した。これらのマーカーをリコンビナントインブリード家系BXDを用いて連鎖解析により遺伝的地図を作成し195個のマーカーを染色体上にマッピングした。

## 【総括】

R L G S法は次のような利点を有している。1) 感度と分離能が高く、ヒトを含む高等生物のゲノム研究に利用できる。2) 数千のスポット（染色体座位）が一度にスキャンニングできる。1枚のR L G Sパターンでスキャンニングできる領域は数パーセントにすぎないが、異なるランドマークを使用することにより、スキャンニング領域を拡大することができる。3) スポットの強度は、ゲノムのランドマークのコピー数を反映する。従って、ハプロイド、デュプロイドの変化を判別することが可能である。4) サザン法と異なりプローブが不要なので、全ての生物種に適用可能である。5) 更に、メチル化感受性の酵素（Not I等）を用いることにより、生物ゲノムにおいて遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていると考えられているメチル化の変化を系統的に検出することができる。本論文ではこのように数多くの応用が可能であるR L G S法を全面的に改変し、効率化、高速化、安定化を実現した。更に、本法（R L G S Ver. 1.8）をマウスの全ゲノム地図作成に応用し、実際に約200個の新しいDNAマーカーを高速にマッピングした。これは、疾患モデル動物としてのマウスの突然変異体をポジショナルクローニング法によって最終的に遺伝子同定する上での極めて重要な情報となりうる。R L G S（Ver. 1.8）法は、原法に比し約10倍以上のコストダウンと実験スペースの縮小を可能にし、サンプル処理の効率と泳動の効率も約10倍に上げることに成功した。本法は他のDNAマーカーの存在しない全ての生物種に効率よく応用できるのみならず、例えばがん細胞などで高率に見られる染色体上の欠失や増幅、発生途上における細胞のメチル化の変化等をゲノムレベルで高速かつ大量にスキャンニングする上で非常に強力な手段となると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

近年の分子生物学分野の進歩の大きな貢献の一つとして、ポジショナルクローニングによる疾患関連遺伝子の染色体上へのマッピング及びその染色体の位置情報をもとにした遺伝子そのもののクローニングが挙げられる。ヒトにおいては家系収集が必ずしも容易でないため、疾患モデル動物としてのマウスの家系を利用した遺伝子クローニングを行ない、それに対するヒトのカウンターパート遺伝子の同定を行なう方法が効を奏している。家系解析を行なう上では、全染色体上に散在するDNAマーカーが必須である。本論文は、家系解析を行なう上でDNAマーカーを高率かつ高速に検出する画期的な方法（Restriction Landmark Genomic Scanning（R L G S）Ver. 1.8）を用いて、マウスの家系で非常に高速に全染色体地図を作成する高速ゲノムマッピング系の開発を行ってきた。更に筆者らは本法を心筋症ハムスターに応用し、今までにゲノム地図の全く存在しなかったシリアンハムスターの全染色体地図を作成し、最終的に心筋症の原因遺伝子と連鎖するDNAマーカーを単離した。

本法は、一枚の半切フィルム上でこれらのDNAマーカー数千個を一度にスキャンニングできる方法であり、その応用範囲も広い。本法の応用例の一つとして、Not I等のメチル化感受性酵素を使うことにより、CpG islandのメチル化の変化を追うことも可能である。実際に筆者らはメチル化の変化を追うことによりインプリンティング現象を示す遺伝子U2 afbprsを同定した。この過程で、筆者らはrestriction trapperを用いたspot cloning法を開発し、R L G S画像から効率よくspotのcloningを行なう系を樹立して来た。更に、spotのintensityは染色体のコピー数を反映することから、がん細胞における染色体の欠失や増幅なども検出することができる。また本法は他の全ての生物種に応用できる方法で、DNAマーカーの存在しない生物種においても有効である。このような、生物学に普遍的に応用できうる方法論の開発とその応用を実証した本論文の成果は、博士（医学）の学位授与に値するものと考えられる。