

Title	Chromosomal Assignment of Human Genomic NotI Restriction Fragments in a Two-Dimensional Electrophoresis Profile.
Author(s)	吉川, 浩英
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40336
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"〉 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	吉 川 浩 英
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 9 月 19 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	Chromosomal Assignment of Human Genomic NotI Restriction Fragments in a Two-Dimensional Electrophoresis Profile. (2次元電気泳動法によるヒトゲノム DNA の NotI 制限酵素断片の染色体アサインメント)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 原 謙 一 (副査) 教 授 島 田 和 典 教 授 田 中 亀 氏 次

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

DNA の 2 次元電気泳動 (Restriction Landmark Genomic Scanning, 以下 RLGS) パターン中の 2871 個に及ぶ制限酵素断片の染色体アサインメントを明らかにすることによりヒトゲノム解析における RLGS 法をより有用なものとした。

(方法, 成績)

正常男性核型を有する細胞株 GM0130B より染色体を調整しフローソーターによって各々の常染色体を約 6×10^5 , 性染色体を約 3×10^5 を単離した。この染色体サンプルより DNA を抽出し, その過程で生じた DNA の破損部位をヌクレオチドアナログと DNA ポリメラーゼ I によってブロックし, 制限酵素 NotI によって DNA を切断後その NotI 断端に ^{32}P ヌクレオチドをシークエナーゼによってフィルインした。さらに EcoRV で消化し DNA 断片の平均長を短くし, 1 次元目のアガロースゲルで分離した。ゲル中で DNA を HinfI によって切断し 2 次元目のポリアクリルアミドゲル電気泳動によって平面に展開した。各染色体の RLGS パターンにはスポットの数か少なく直接全ゲノムの RLGS パターンにアサインすることができなかつたため染色体 1 と 2, 3-8, 13-17, 18-22 の 4 分画を分取し, 各グループの RLGS パターンを作成した。まず単染色体の RLGS パターンを, このグループの RLGS パターンにアサインし, 次にグループのパターンを全ゲノムのパターンにアサインした。アサインは肉眼とコンピューターを併用し各スポットについて少なくとも 2 回おこつた。この方法によって 2871 個のスポットが染色体にアサインされた。2676 個が 1 つの染色体に, 82 個が 2 つの染色体に 101 個が 3 つ以上の染色体にアサインされた。この染色体アサインメントの情報が加えられた RLGS を CARLGS (Chromosome Assigned-Restriction Landmark Genomic Scanning) と名付けた。アサインした範囲の放射活性と全体の放射活性を 1 次元目の電気泳動終了後にゲルを分割して測定, 比較することにより, 約 43% の NotI サイトをアサインしたと推定した。NotI サイトの密度を, 各染色体にアサインされたスポット数と, その染色体の長さから推定したところ, それは一様ではなく染色体 17, 19, 22 で高く, 染色体 3, 4, 8, X, Y, では低かつた。RLGS 法ではフィルイン反応にてラベリングするため制限酵素断片のコピー数をスポットのイン

テンシティーとして正確に知りうる。そこで、性染色体のスポットに注目すると、44個のX染色体と2個のY染色体スポットがハプロイドのインテンシティーを示した。次に、染色体21のスポットに注目すると、アサインした範囲に55個存在した。計算上、64個のNotIサイトを21番染色体に推定した。1例のダウン症の脳からのDNAをRLGSで調べたところ、単一染色体にアサインされた11個のスポット中10個がトリプロイデーターを示した。ダウン症の脳のDNAのみならず、肝臓のDNAのRLGSパターンとCA-RLGSパターンを比較しても91%のスポット位置が保存されており、CA-RLGSによるゲノムDNA解析はポリモルフィズムに大きな影響を受けないことが示された。CA-RLGSを用いることにより、1つの染色体にフォーカスすることができる。X染色体の不活性化に注目し、ポリX細胞のDNAのRLGSパターンとCA-RLGSパターンを比較することによりX染色体の不活性化を逃れるスポットを見い出した。これらのDNA断片をRLGSゲルからクローニングしたところ遺伝子であることが判明し、解析中である。CA-RLGSは多遺伝子性の疾患の究明にも有用と考えられる。事実、我々は肝細胞癌で変化するRLGSパターン上のスポットの染色体アサインメントを決定しており、高頻度で変化を示す染色体を明らかにしている。

(総括)

2次元電気泳動法を用いて2871個のNotI制限酵素断片の染色体アサインメントを決定した。この、染色体アサインメントが付加されたRLGS法(CA-RLGS)はさまざまな疾病に利用でき、画像を目で比較するだけで変化を示すDNA断片の染色体アサインメントを知ることができる。ゲノムサイエンスに広く貢献できるよう、CA-RLGSをインターネットを通して公開した。

論文審査の結果の要旨

DNAの2次元電気泳動法によってヒトゲノムDNAは大規模に、且つ迅速に解析することができる。吉川 浩英はソーティングした染色体を出発材料として各々のDNAを2次元電気泳動法で調べる技術を開発したのみならず、すべての染色体を解析して全ゲノムの2次元電気泳動パターンにあらわれる2871個のスポットを染色体にアサインメントした。またこの染色体アサインメントを用いて癌やインプリンティングに伴う特殊な染色体領域の変化を研究することもできるようになった。以上の研究成果はゲノムレベルでのDNAの解析に大きな貢献をしていると認められ博士(医学)の学位授与に値する。