

Title	Definition of the locus responsible for systemic carnitine deficiency within a 1.6cM region of mouse chromosome 11 by detailed linkage analysis
Author(s)	沖田, 考平
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40707
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	おき た こう へい 沖 田 考 平
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13719 号
学位授与年月日	平成10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	Definition of the locus responsible for systemic carnitine deficiency within a 1.6 cM region of mouse chromosome 11 by detailed linkage analysis (リンケージ解析により全身性カルニチン欠乏症原因遺伝子座はマウス第11番染色体上の1.6cMの領域に同定された)
論文審査委員	(主査) 教授 松澤 佑次 (副査) 教授 中村 祐輔 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

カルニチンは長鎖脂肪酸のミトコンドリア内転送に必須の物質である。カルニチン欠乏症は、カルニチン欠乏によりミトコンドリアでのエネルギー産生障害、脂質代謝異常が惹起され、肝機能障害、筋力低下、心不全等の臨床症状を呈する疾患である。Juvenile visceral steatosis (JVS) mouse は、常染色体劣性の遺伝形式にて全身性カルニチン欠乏症を発症するヒトカルニチン欠乏症のモデル動物である。今回私は、ポジショナルクローニングの手法を用いて JVS mouse の病因遺伝子 (*jvs* 遺伝子) を単離することを目的として、リンケージ解析を行い *jvs* 遺伝子座周辺の詳細な遺伝的地図を作製し、さらに物理的地図の作製を試みた。

【方法ならびに成績】

homozygous mutant mouse (*jvs* / *jvs*) と *Mus musculus molossinus* より得られた F_1 (*jvs* / +) mouse を、homozygous mutant mouse (*jvs* / *jvs*) に戻し交配し、190匹の N_2 mouse を得た。各個体の脂肪肝の有無の確認、組織のカルニチン量の測定にて表現型でのタイピングを行ったところ、89匹が affected mouse、101匹が unaffected mouse であった。各個体の組織より核 DNA を抽出した後、*jvs* 遺伝子座がマウス第11番染色体上にマップされるという報告にもとづき、両系統間で多型であることを確認した13個のマイクロサテライトマーカー (*D11Mit153*, *D11Mit141*, *D11Mit25*, *D11Mit154*, *D11Mit87*, *D11Mit24*, *D11Mit111*, *D11Nds9*, *D11Mit86*, *D11Mit23*, *D11Mit241*, *D11Mit207*, *D11Mit131*) を用いてリンケージ解析を行った。その結果、*jvs* 遺伝子座と *D11Mit24*, *D11Mit111*, *D11Nds9*, *D11Mit86* 及び *D11Mit23* との間に recombination を認めなかった。1匹の unaffected mouse で *D11Mit24* より centromere 側の5個の locus (*D11Mit153*, *D11Mit141*, *D11Mit25*, *D11Mit154*, *D11Mit87*) にて recombination を認め、また1匹の affected mouse で *D11Mit153* にて recombination を認めた。Telomere 側では、2匹の unaffected mouse において *D11Mit241*, *D11Mit207*, *D11Mit131* にて recombination を認め、さらに1匹の affected および1匹の unaffected mouse において *D11Mit207*, *D11Mit131* にて recombination を認めた。以上より計算される locus の順序と遺伝学的距離は以下になった。Centromere-*D11Mit153*-0.52 ± 0.52cM- (*D11Mit141*, *D11Mit25*, *D11Mit154*, *D11Mit87*) -0.52 ± 0.52cM- (*jvs*, *D11Mit24*, *D11Mit111*, *D11Nds9*, *D11Mit86*, *D11Mit23*) -1.05 ± 0.74cM-*D11Mit241*-1.05 ± 0.74cM- (*D11Mit207*, *D11Mit131*) -Telomere。その後223

匹の intercross mouse を用いて更に詳細なマッピングを行ったところ、*D11Mit86*及び*D11Mit23*で recombination を認めず、*jvs* 遺伝子座は (*D11Mit111*, *D11Nds9*) と *D11Mit241*の間の約1.2cM の領域にマップされた。

次に上記範囲をカバーする Yeast Artificial Chromosome (YAC) contig を作成するため、上記のマイクロサテライトマーカーを用い YAC のスクリーニングを行い 4 個の YAC clone を得た。すべての YAC clone よりそれぞれ DNA を抽出しパルスフィールドゲル電気泳動を行った後、Southern blot hybridization にてインサートの大きさを確認した。YAC25A1には600kbのインサートがあり、*D11Mit154*と*D11Mit87*を含み、YAC174B10には850kbのインサートがあり *D11Mit24*, *D11Mit111*及び *D11Nds9*を含み、YAC92C5には350kbのインサートがあり *D11Mit24*, *D11Mit111*及び *D11Nds9*を含み、さらに YAC171D1には950kbのインサートがあり *D11Mit86*, *D11Mit23*, *D11Mit241*及び *D11Mit207*を含んでいた。次に各 YAC clone のコスミドライブラリーより end clone を単離し、それらをプローブとし fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を行い、これらの YAC clone がカメラでないことを確認した。また上記 end clone をプローブとし上記 4 個の YAC clone より抽出した DNA を用いて作成したメンブレンにて Southern blot hybridization を行い、YAC171D1と YAC92C5がオーバーラップすることを確認した。このことより YAC174B10, YAC92C5, YAC171D1が連結していることが示された。以上、リンケージ解析と物理的地図より導かれる各 locus の順序は以下ようになった。Centromere-*D11Mit153*- (*D11Mit141*, *D11Mit25*, *D11Mit154*, *D11Mit87*)-(*D11Mit24*)-(*D11Mit111*, *D11Nds9*)-(*jvs*, *D11Mit86*, *D11Mit23*)-*D11Mit241*-*D11Mit207*-*D11Mit131*-Telomere。

【総括】

本研究では、JVS mouse を用いたリンケージ解析により、*jvs* 遺伝子座周辺の詳細な遺伝的地図が作製され、*jvs* 遺伝子座はマウス第11番染色体上のマイクロサテライトマーカー (*D11Mit111*, *D11Nds9*) と *D11Mit241* の間の約 1.2cM の領域にマップされることが示された。また、*jvs* 遺伝子の単離を行うには、この領域の物理的地図を作成する必要があるが、本研究により、この領域をカバーする Yeast Artificial Chromosome (YAC) contig が示された。以上により *jvs* 遺伝子を含む最小領域が決定され、*jvs* 遺伝子の単離を行うことが可能となった。JVS mouse は全身性カルニチン欠乏症のモデル動物であり、*jvs* 遺伝子を単離することはカルニチン欠乏症において認められる心筋症、脂質代謝異常、脂肪肝等の病態の分子レベルでの解析に貢献し、それらの治療戦略に寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は、本研究において、心筋症、脂質代謝異常、脂肪肝等の臨床症状を呈する原発性カルニチン欠乏症の原因遺伝子を単離する目的で、動物モデルである Juvenile Visceral Steatosis (JVS) mouse を用い、リンケージ解析を行った。その結果、疾患原因遺伝子座 (*jvs* 遺伝子座) をマウス第11番染色体上のマイクロサテライトマーカー *D11Mit111* または *D11Nds9* と *D11Mit241* の間の約1.2cM の領域に同定した。さらに、4 個の Yeast Artificial Chromosome (YAC) clone にて同領域の物理的地図を作成した。以上のことより、原発性カルニチン欠乏症の原因遺伝子は、350kb のインサートを持つ YAC92C5 または、850kb のインサートを持つ YAC171D1 上に存在することを示した。このことは、原発性カルニチン欠乏症の原因遺伝子を単離する上で重要な知見であり、*jvs* 遺伝子が単離されれば、カルニチン欠乏症において認められる心筋症、脂質代謝異常、脂肪肝等の病態解明も可能となり、今後の発展性も十分に期待できる。したがって、本研究は、生命科学への貢献度が極めて高い研究といえ、学位授与に十分値すると考えられる。