

Title	Isolation of 115 Human Chromosome 8-Specific Expressed Sequence Tags by Exon Amplification
Author(s)	小山, 公美子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41269">https://hdl.handle.net/11094/41269</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	小 山 公 美 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 1 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 4 月 23 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	Isolation of 115 Human Chromosome 8-Specific Expressed Sequence Tags by Exon Amplification (エクソン増幅法による115のヒト第8番染色体特異的遺伝子断片配列の単離)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中 村 祐 輔 (副査) 教 授 谷 口 直 之 教 授 野 村 大 成

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

ヒト第8番染色体は約135 Mbの長さで、約4500個の遺伝子が存在すると推測されておりこれまでに色素性網膜炎などの遺伝性疾患の原因遺伝子の存在が示唆されている。また、ヒト第8番染色体短腕上に肺癌、肝癌、大腸癌、前立腺癌、膀胱癌など多くの癌において高頻度に欠失している部位が存在することも示されており、癌抑制遺伝子の存在も示唆されている。我々はヒト第8番染色体について、これら疾患を含め、疾患に関与する遺伝子を単離すべく多数のコスミドクローンを単離し、FISH法により染色体上の局在の決定をしてきた。本研究では、これらのコスミドクローンをを用いてエクソン増幅法によりヒト第8番染色体特異的遺伝子断片配列を多数単離し、転写地図の作成と新規遺伝子の単離を試みた。

### [方法および結果]

我々が単離し、染色体上の局在の決定した416個のヒト第8番染色体特異的コスミドクローンをを用いてエクソン増幅法により転写されている可能性の高いDNA断片を単離した。まず、コスミドDNAを制限酵素BglIIIとBamHIで完全に切断し、エクソンスプライシングベクターpSPL1のBamHI部位にクローニングした。これらDNAを大腸菌DH5 $\alpha$ にトランスフォームしプラスミドDNAを回収した。回収したプラスミドDNAをCos7細胞にエレクトロポレーション法によって導入した。約48時間後に細胞質RNAを調製し、ベクターの配列を基に設計されたプライマーを用いて逆転写PCR(RT-PCR)を行った。次いで、1回目のプライマーの内側のDNA配列に相当するプライマーを用いて2nd-PCRを行った。これら2回目のPCRによって得られた遺伝子断片配列産物はpBluescriptII(Stratagene社)を用いてサブクローニングし、シーケンス反応を行い塩基配列を決定した。その結果ヒト第8番染色体特異的コスミドクローンに由来する169の遺伝子断片配列が得られた。得られた塩基配列についてTFASTA, FASTAプログラムを用いて解析した。データベース検索の結果、Alu, L1などの繰り返し配列と考えられる配列が38種類あり、131種類がユニーク配列であった。131のうち115の配列にオープンリーディングフレーム(ORF)の存在を認めた。ORF

の存在を認めた115のうち15については、6個の既知の遺伝子の部分配列と同一であった。この6個の既知の遺伝子のうちの zinc finger protein 7 と heart shock transcription factor 1 については詳細な遺伝子座位の決定がなされていなかったが単離されたコスミドクローンの染色体上の局在より8q24.3に存在する事が確定された。さらに、単離された遺伝子断片配列を基にエクソンコネクション法およびcDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。エクソンコネクション法により遺伝子断片配列705-1と705-3は同じ遺伝子の隣り合ったエクソンであることが確認された。また、単離された遺伝子断片配列の中から、マウス細胞内輸送制御蛋白質：AP-47 に類似のアミノ酸配列をコードする629-5と536-4を用いてエクソンコネクション法を行った。これも同じ遺伝子の隣り合ったエクソンであることが確認された。この配列をプローブとしてヒト胎児脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、目的とする2つのcDNA クローンを得た。シーケンス解析の結果、全長3480 bp, 1254 bp の ORF, 418アミノ酸よりなる新規遺伝子でありコスミドクローンの染色体上の局在よりこの遺伝子座位は8p11.2であった。このアミノ酸配列は、これまでに知られているクラスリン小胞輸送システムの AP-Complex medium chain 蛋白質あるいはそのホモログである mouse AP47, rat AP50, yeast YAP54 ホモログに高い相同性を示し、これらと同様の機能を有する重要なヒト細胞内輸送制御蛋白質であることが示唆された。

#### [総括]

ヒト第8番染色体特異的コスミドクローンよりエクソン増幅法により115の遺伝子断片配列を単離し、既知の2遺伝子については詳細な遺伝子座位の決定がなされた。また新規遺伝子の単離にも成功し、その新規遺伝子はヒト細胞内輸送制御蛋白質であることが示唆された。エクソン増幅法はゲノム配列からの遺伝子単離に有用であることが証明された。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトゲノム解析計画の目的はヒトゲノム全体の構造を明らかにし、そこに存在する全ての遺伝子を単離し、その機能を解明することにより医学、生物学に貢献することにある。本研究は、ゲノム解析研究を進める一貫として、構造解析の対象としてヒト第8番染色体を選び、第8番染色体特異的コスミドクローンの FISH 法による詳細な染色体地図の作成とこれらコスミドクローンを用いたエクソン増幅法によりヒト第8番染色体特異的遺伝子断片配列を多数単離すること、さらに転写地図の作成と新規遺伝子の単離を目的としている。その結果、ヒト第8番染色体特異的な115種類の遺伝子断片配列が単離され、現在までに遺伝子座位の決定がなされていなかった既知の2遺伝子についての詳細な遺伝子座位を明らかにした。さらに、単離された遺伝子断片配列をもとに新規遺伝子を単離し、その新規遺伝子はヒト細胞内輸送制御蛋白質であることが示唆された。エクソン増幅法は直接ゲノム配列から遺伝子を効率良く単離する方法として有用であることが証明され、本研究成果はヒトゲノム解析研究に貢献するものであり学位授与に値すると考えられる。