

染色体特異的, 組織特異的 cDNA の 単離法の開発

—— Adrenoleukodystrophy (ALD) の病因遺伝子に
関する研究への応用 ——

新潟大学脳研究所神経内科学教室 (主任: 辻 省次教授)

田 部 浩 行

Development of a Method for Isolation of Chromosome-specific
and Tissue-specific cDNA Clones.

— An Approach to Positional Cloning of a Gene for Adreno-
leukodystrophy —

Hiroyuki TABE

Department of Neurology

Niigata University,

Brain Research Institute

(Director: Prof. Shoji TSUJI)

Human Xq28 has been known for its unusually high gene density, and many neurogenic diseases including adrenoleukodystrophy, Emery-Dreifuss muscular dystrophy and hydrocephalus have been mapped to Xq28 by linkage analyses. Molecular cloning of cDNAs encoded by Xq28, which are expressed in the relevant tissues, will facilitate the identification of the disease genes.

We devised a method to identify cDNAs, which are encoded by a particular region of human chromosome and expressed in tissues. Briefly, 1784 cosmid clones carrying human DNA segments from Xq24-qter were divided into subgroups with each group containing 96 cosmid clones. The pooled DNAs were digested by *Bam*HI, electrophoresed through 1.0% agarose gels and transferred to nitrocellulose membranes. To reduce the complexity of cDNA probes, cDNA sublibraries were prepared from a human brain cDNA library, with each sublibrary containing approximately 500 cDNA clones. Hybridization of ³²P-labelled probes made from the cDNA sublibrary to the nitrocellulose filters containing cosmid DNAs enable the identification of genomic DNA segments carrying expressed

Reprint request to: Hiroyuki TABE,
Department of Neurology Brain Research
Institute Niigata University,
Asahimachi-dori 1, Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科学教室

田 部 浩 行

sequences. The genomic DNA segment carrying sequences were then used to identify corresponding cDNA clones.

By screening 2000 cDNA clones, a cDNA clone p877 was isolated. Regional mapping using a somatic cell hybrid panel showed that the gene coding for p877 is located at Xq28 and Northern blot analysis demonstrated that the mRNA is predominantly expressed in the central nervous system and muscle. The results indicate that the method is useful for identifying cDNA clones which are expressed in the brain and encoded by Xq24-qter. This clone was further mapped to a 900kbp region containing color pigment gene. The result raised the possibility that p877 is candidate gene for ALD. I performed Southern blot analysis of 20 patients with ALD and Northern blot analysis of 13 patients with ALD. I did not find any differences between normal controls and ALD patients. Further analysis including single strand conformation polymorphism (SSCP) and RNase cleavage will be required to identify point mutations in p877 gene.

Key words: Adrenoleukodystrophy (ALD), positional cloning, chromosome specific cDNA, 副腎白質ジストロフィー症, ポジショナルクローニング, 染色体特異的 cDNA

1. 緒 言

ヒト Xq28 は遺伝子頻度の高い領域として知られ、神経筋疾患に限っても adrenoleukodystrophy (ALD) (1-3), spastic paraplegia (4), mental retardation (5), hydrocephalus (6), Emery-Dreifuss muscular dystrophy (7), myotubular myopathy (8) などの遺伝子がマップされている。

我々の研究室では中でも特に adrenoleukodystrophy (ALD) の病因の解明をめざして研究を行っている。ALD は伴性劣性遺伝性脱髄疾患で近年その生化学的診断が可能になったことよりさまざまな臨床亜型が存在することが明らかにされている。その生化学的異常については Igarashi 等 (1) により、副腎、大脳白質に炭素数24~26の極長鎖脂肪酸を有するコレステロールエステルが蓄積することが発見された。現在のところ極長鎖脂肪酸に対するアシル CoA 合成酵素活性が ALD において低下しているとの報告 (9) があるが、この酵素系の精製は困難で cDNA クローニングはなされていない。一方連鎖解析により ALD の遺伝子座 (2,3) はX染色体長腕 Xq28 に存在することが見いだされてきており positional cloning による ALD 遺伝子の単離が可能になってきている。

従来の生理学、生化学、病理学的研究で原因が不明であった疾患に対して近年分子生物学的手法の進歩で疾患遺伝子の gene product についての情報がなくても直

接原因遺伝子を同定するという positional cloning の手法がさまざまな遺伝性疾患に応用され、成功をおさめている。positional cloning では最初に連鎖解析と呼ばれる方法により病因遺伝子のおおよその遺伝子座について決定し、次にその遺伝子座周辺について詳細な解析を行い、疾患の遺伝子を同定するものである。

ヒト遺伝子は5~10万個存在すると言われておりもしこれらが均等に存在するとすれば、ヒト染色体長腕末端の Xq28 の大きさは約 9 Mbp であるので Xq28 には150~300個の遺伝子が存在することになる。この領域にコードされている cDNA で現在までに見いだされているものは色覚遺伝子 (10), P3 (11), GDX (12), GABRA3 (13), Factor 8C (14), G6PD (15), L1CAM (16), QM (17), 第8因子イントロン内に見いだされた cDNA (18) にすぎず、既知のものはまだ数%にすぎないことがわかる。従ってこの Xq28 領域にコードされる cDNA を単離していくことが positional cloning の大きな柱となる。

一般に機能的遺伝子を単離する方法としてよく用いられてきた方法として 1) CpG island (19) を頼りに機能的遺伝子を単離する方法, 2) cross-species homology (20) を有する DNA 断片を手がかりに発現遺伝子を同定する方法, 3) コスミド, YAC などクローン化された DNA を直接プローブにして cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法 (21), 4) cDNA, mRNA とクローン化されたゲノム DNA との間でハイブリダイ

ゼーションにより cDNA を同定するあるいは enrich する方法 (22), 5) クローン化されたゲノム DNA エクソントラッピングといわれる方法を用いてエクソン部分を同定する方法 (23), 6) 雑種細胞で発現しているヒト由来の転写産物を同定する hncDNA クローニング法 (24) などが行われてきた。ここに上げた方法の中で, 1), 6) などはすべての組織で発現するような house-keeping gene (25) の単離には有効であるが, 神経筋疾患の原因遺伝子を求める場合むしろ特定の組織で発現している遺伝子を選択的に単離することができれば positional cloning の効率は著しく高まるものと考えることができる。

我々の研究室では以前からの研究でヒト Xq24-qter 由来のゲノム DNA を大量のコスミドクローンとしてクローン化している (17) ことを用いて, ヒト脳 cDNA ライブラリー (26) の cDNA クローンを mixed probe として用いヒト Xq24-qter 由来のクローン化したゲノム DNA に対してハイブリダイゼーションを行うことで coding sequence を含む DNA 断片をもつコスミドクローン同定することにより, 染色体特異的, 組織特異的 cDNA をクローン化する方法を考案し, 本法の有効性について検討を加え, 併せて Xq28 領域から新たに単離した cDNA

について ALD の candidate gene としての解析を行った。

II. 分析対象と研究方法

A. 方法の概略

1. ヒト Xq24-qter に存在し, ヒト脳で発現する遺伝子同定のストラテジー

本法の原理を図 1 に示す。我々の研究室ではヒト Xq24-qter のゲノム DNA をコスミドクローンとして大量にクローン化しているのので (17), これを96クローンずつプールして, サザンブロットによりニトロセルロース上に固定しておいて, 一方 500 個の cDNA クローン (26) より作成した mixed probe を用いてハイブリダイゼーションを行う。もしも 500 個の cDNA クローンの中の 1 つが Xq24-qter 由来のものであって, どれかのコスミドプールに対応してゲノム DNA が存在すればそのプールのレーンにシグナルが現れるはずである。このコスミドクローンの含まれるプールを同定した後, 第2のステップとしてそのコスミドプールの中のどのコスミドクローンが対応しているかを同定し, 最終的に cDNA を同定しようとするものである。

Isolation of transcribed sequences

hybridization between cloned genomic DNA and cDNAs.

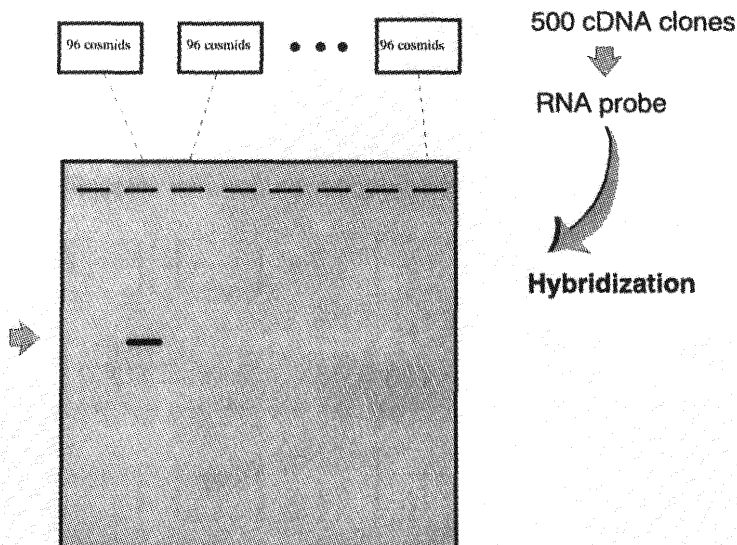


図 1 クローン化したコスミド DNA と Mixed probe を用いて coding sequence をもつコスミドクローンの同定法

本法の特徴は500程度のcDNAクローンを一度にスクリーニングしようというものであるがmixed probeをもちいてcoding sequenceを含むgenomic fragmentを同定するに当たり、次のような点が問題点と考えられた。すなわち、1) どの程度のプロープのcomplexityが許容されるか、2) cDNAに存在する反復配列由来のシグナルをいかにしてのぞくか、3) いかにしてハイブリダイゼーションの感度を上げるかである。そこでこれらについて次のような検討を加えた。

本方法でcDNAをmixed probeプロープとして用いる際、cDNAライブラリー由来のクローンすべてを用いるとcomplexityが高すぎて実用にならないと予想される一方、一度になるべく多数のcDNAクローンのスクリーニングを行いたいという点もあり、どの程度のcomplexityまでcDNAクローンを混合してもプロ-

ープとして使い得るかという点についての検討を行った。モデル系として我々の研究室でクローン化してあるヒト神経成長抑制因子(GIF)cDNA(27)をランダムに単離したcDNAクローンと混合し、それぞれGIFcDNAクローンを1/500含むようにしたプラスミドDNAを調整し、DNA量で5 μ gをBamHIで消化しサザンブロット(28)によりニトロセルロース膜に転写した。プロープとしてはヒト脳ラムダファージcDNAライブラリーDNA(26)を制限酵素XbaIで切断した後T7 RNA polymeraseにて³²PでラベルしcRNAプロープを作成し(29)、一方GIFcDNAについてはRandom prime法(30)によって³²Pでラベルし、それぞれ全プロープ中に放射活性で1/20, 1/100, 1/500, 1/2,500ずつ存在するように混合し、ハイブリダイゼーションを24時間行い検出感度について検討した。ハイブリダイゼー

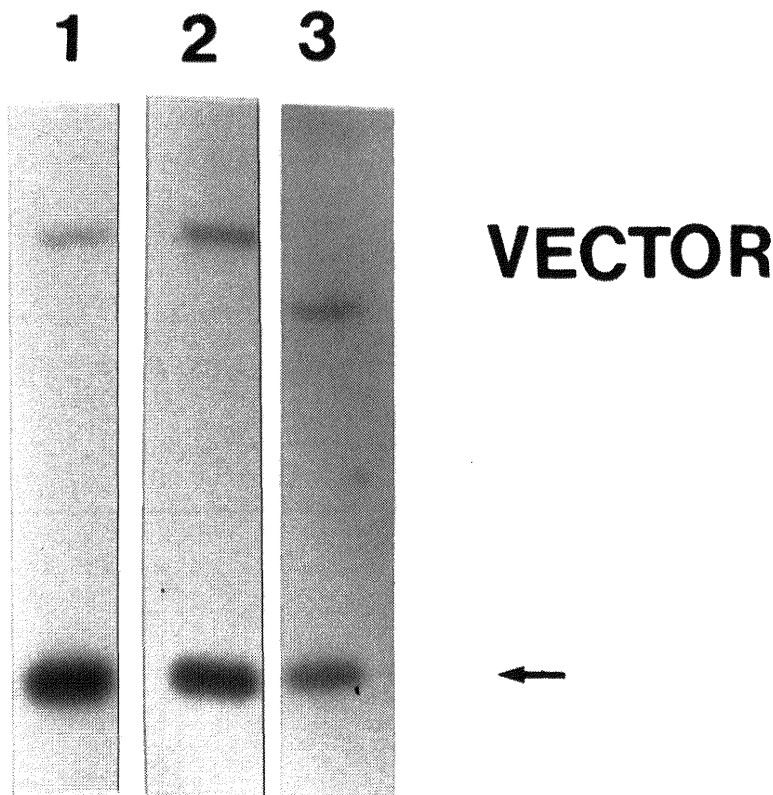


図2 プロープのcomplexityについての検討
各レーンにはコスミドDNA 5 μ gにたいして目的とするDNA(GIF)を1/500混合してある。cDNAプロープ中にはそれぞれGIFのプロープを1/20 (lane 1), 1/100 (lane 2), 1/500 (lane 3)の割合で混合し、ハイブリダイゼーションを行った。

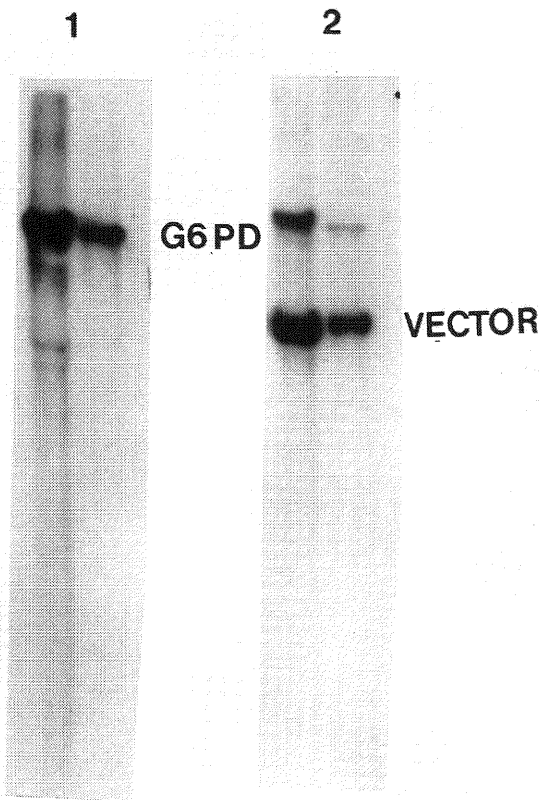


図 3 G6PD コスミドクローンを用いたモデル系における検証

それぞれ96個のコスミドクローンより成るプール DNA を制限酵素 *Bam*HI で切断し、アガロース電気泳動後ニトロセルロース膜に転写する。プローブとしては 1) は陽性コントロールとしての G6PD のみでプローブ濃度 2×10^6 cpm/ml, ハイブリダイゼーションの時間は18時間で、2) としては cRNA プローブに $1/500$ の濃度で G6PD のプローブを混合して、全プローブ濃度 1×10^7 cpm/ml, ハイブリダイゼーションの時間は36時間でそれぞれハイブリダイゼーションを行った。

ション (38) 後、最終的に $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS にて 65°C , 30分ニトロセルロース膜を洗浄しオートラジオグラフィーを行った。また cDNA に存在する反復配列によるシグナルを除くために competitor として total human genomic DNA (Sigma, St Louis, M.O.), $400 \mu\text{g/ml}$ をプレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーションの溶液に加えて行った (31)。またハイブリダイゼーションの感度を上げるためには一般に RNA プ

ローブの方が1本鎖であるために感度が高いと言われていたので実際のスクリーニングにおいては cRNA プローブを使用した。プローブ濃度の検討としてプローブ濃度を 2×10^6 cpm/ml および 1×10^7 cpm/ml でハイブリダイゼーション (38) を行った。ハイブリダイゼーション時間の検討としてはそれぞれ18時間, 24時間, 36時間, 48時間を行った。ハイブリダイゼーション溶液の組成 (38) は 50% formamide, $5 \times \text{SSC}$, $1 \times \text{Denhardt}$ 溶液, 20 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10% Dextran sulfate, $50 \mu\text{g/ml}$ denatured salmon sperm DNA, [$1 \times \text{SSC} = 0.15 \text{ M NaCl}$, $0.015 \text{ M sodium citrate}$ (pH 7.0); $50 \times \text{Denhardt}$ 溶液 = Ficoll 5 g, polyvinylpyrrolidone 5 g, bovine serum albumin 5 g in 500 ml] である。

2. モデル系での検証

上記の検討により決定したプロトコールを次のように定めた。プローブとして 500 種類の cDNA クローンをを用い、プローブ濃度は 1×10^7 cpm/ml, ハイブリダイゼーションの時間は36時間のように定めた。実際にこの方法が有効であるかどうかについて次のようなモデル実験系を用いてその検討を行った。モデル系での検討として96個のコスミドクローンよりなるプール中に1個の陽性クローンとして G6PD コスミドクローンを含むプールを用いてこのプール DNA $5 \mu\text{g}$ を制限酵素 *Bam*HI で切断後電気泳動し、ニトロセルロースフィルターに固定し、プローブは cRNA プローブに陽性クローンである G6PD cDNA を random prime 法にて標識後 $1/500$ の濃度で混合し上記で決定した条件を用いてハイブリダイゼーション (38) を行った。

3. ヒト Xq24-qter に存在しヒト脳に発現する遺伝子の同定

フローチャートを図 4 にしめす。ヒト Xq24-qter の領域から、我々の研究室で単離した 1,784 個のコスミドクローンについて96クローンずつプールし、それぞれのプールから調整した DNA $5 \mu\text{g}$ *Bam*HI で消化後アガロース電気泳動を行い、サザンプロットによりフィルター上に固定し、一方プローブについてはヒト脳 cDNA ライブラリーより 500 クローンずつからなるサブライブラリーを作成し、そのファージ DNA をテンプレートとして T7 RNA polymerase にて cRNA プローブを作成した。スクリーニングは3段階に分け 1) coding sequence をもつコスミドクローンを含む陽性コスミドプールを同定し、ついで 2) 個々の陽性コスミドクローンを同定、最終的に 3) サブライブラリー中の陽性 cDNA を同定するという方法により行った。

ヒトXq24-qterに存在し、ヒト脳に発現する遺伝子の同定

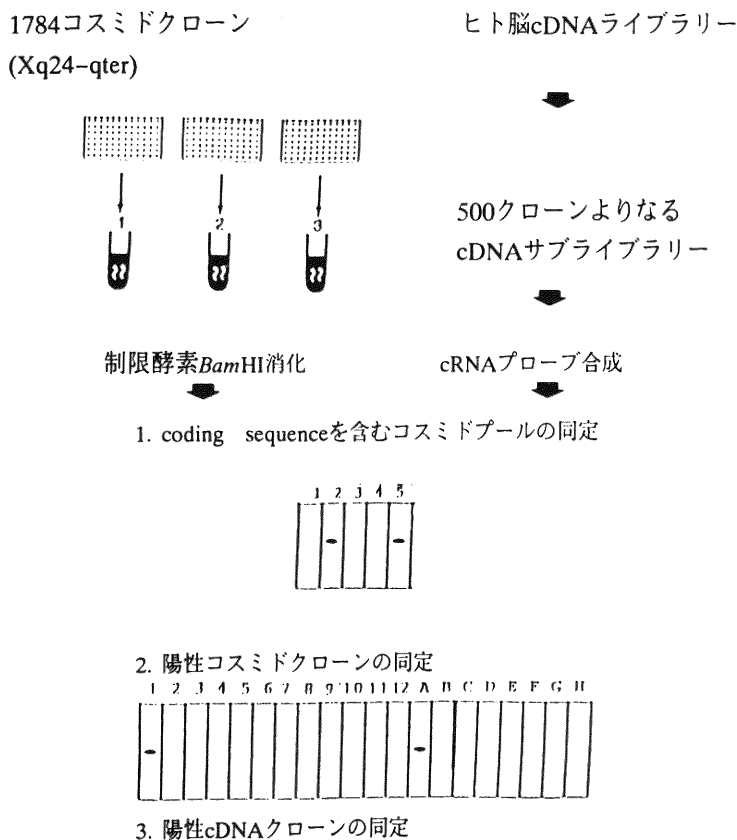


図4 ヒト Xq24-qter 領域からコードされ、ヒト脳で発現する cDNA のスクリーニング法

B. p877 の解析

1. 塩基配列の解析

本スクリーニングにより単離された陽性 cDNA クローン (λ 877) から調製したファージ DNA を制限酵素 *Eco*RI と *Xba*I で切断し cDNA を切り出した後プラスミドベクター Bluescript KS (-) (Stratagene, San Diego, C.A.) にサブクローン化した (p877)。

プラスミド DNA をアルカリ変性処理を行い T7 DNA polymerase を用いて dideoxynucleotide chain termination 法 (32, 33) を用いて primer extension 法により塩基配列を決定した。

2. p877 の regional mapping

ヒトX染色体のさまざまな部位を有する各種雑種細胞の DNA 5 μ g を制限酵素 *Eco*RI で消化後アガロース電気泳動, ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。p877 cDNA をプローブとして, ハイブリダイゼーションを行った。それぞれ用いた雑種細胞は CHO: chinese hamster ovary, 6318B: CHO+human X (Human Genetic Mutant Cell Depository), X3000 11.1: CHO+Xq24-Xqter (34), QIZ: CHO+Xq27.3-Xqter (35), CY2: mouse+Xpter-Xq25 (36), CY3: mouse+Xq26-Xqter (36), CY34: mouse+Xq26-Xpter (37), PECH-A: CHO+Xq27.3-Xqter (37), PECH-N: CHO+Xpter-Xq27.3 (37) である。

3. p877 の各組織における発現分布の解析

各細胞組織より抽出した 5 μ g の poly A (+) RNA を 1.2% 変性アガロースゲルに電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した (26). 単離した p877 を 32 P でラベルして上記と同様の条件にてハイブリダイゼーションを 42°C で 18 時間行った.

C. p877 を用いた ALD の解析

1. 症例

臨床および血清極長鎖脂肪酸の分析により診断した ALD 20 例で、その内訳は小児期発症の典型例である小児型 ALD 9 例、成人では痙攣性対麻痺を主体とする Adrenomyeloneuropathy (AMN) 5 例、小脳脳幹障害を主体とする型 3 例、成人期に痴呆などで発症し大脳白質の広範な病変を来す型 3 例である.

2. 培養皮膚繊維芽細胞, lymphoblastoid cell line または末梢白血球からの高分子ゲノム DNA の抽出

各症例よりの高分子ゲノム DNA の抽出は常法 (37) に従った.

3. サザン解析及びノーザン解析

ゲノム DNA 10 μ g を制限酵素 EcoRI, BamHI, または TaqI にて切断後アガロースゲル電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写しハイブリダイゼーションを 42°C で 18 時間行った. ハイブリダイゼーション溶液の組成 (38) は 50% formamide, 5 \times SSC, 1 \times Denhardt 溶液, 20mM sodium phosphate (pH 7.0), 10% Dextran sulfate, 50 μ g/ml denatured salmon sperm DNA, [1 \times SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate (pH 7.0); 50 \times Denhardt 溶液=Ficoll 5g, polyvinylpyrrolidone 5g, bovine serum albumin 5g in 500 ml] である. 10 例の ALD と 1 例の正常コントロールより抽出した total RNA 20 μ g を 1.2% 変性アガロースゲルに電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した. これらフィルターを p877 cDNA を random prime 法にて 32 P でラベルしてプローブとして用いハイブリダイゼーションを 42°C で 18 時間行った. ハイブリダイゼーション溶液の組成 (38) は 50% Formamide, 5 \times SSC, 1 \times Denhardt 溶液, 20mM Sodium phosphate (pH 7.0), 19% Dextran sulfate, 10 μ g/ml poly A (+) RNA, 50 μ g/ml salmon sperm DNA である. これらのフィルターをハイブリダイゼーションの後、最終的には 0.1 \times SSC, 0.1% SDS にて 60°C, 30 分間ニトロセルロース膜を洗浄し、オートラジオグラフィを行った.

III. 結 果

1. スクリーニングのプロトコールについての検討

図 2 に示すように目的とする cDNA (GIF) がプローブ中に 1/500 含まれていればプローブ濃度 1 \times 10⁷ cpm/ml, 24 時間ハイブリダイゼーションを行うことにより十分同定が可能である. さらに別に行った実験では目的の cDNA プローブが 1/2500 であっても 1 \times 10⁷ cpm/ml のプローブ濃度で 36 時間のハイブリダイゼーションで同定可能であった. これらの結果より安全性を考えプローブの complexity は 1/500, プローブ濃度は 1 \times 10⁷ cpm/ml,

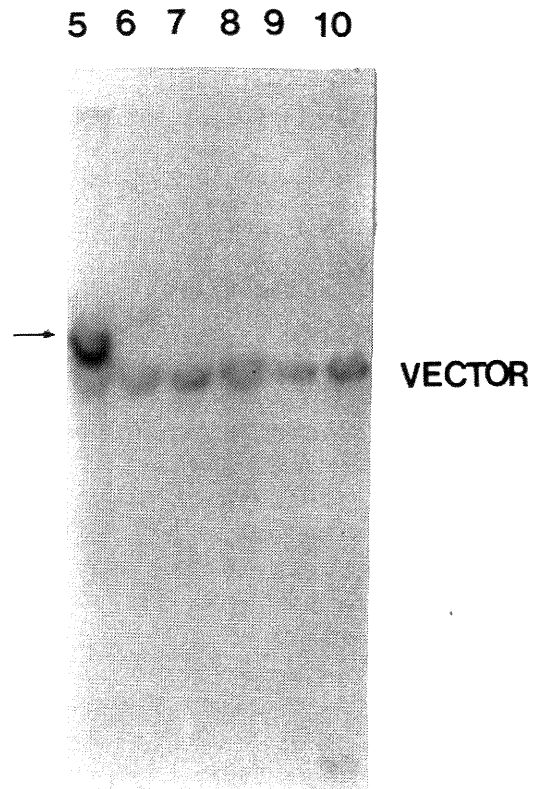


図 5 coding sequence をもつコスミドを含む陽性コスミドプールの同定

各レーンには 96 個のコスミドクローンよりなるプール DNA を制限酵素 BamHI で切断し、ニトロセルロース膜に転写されている. プローブとしては 500 クローンよりなるサブライブラリーより作成した cRNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った.

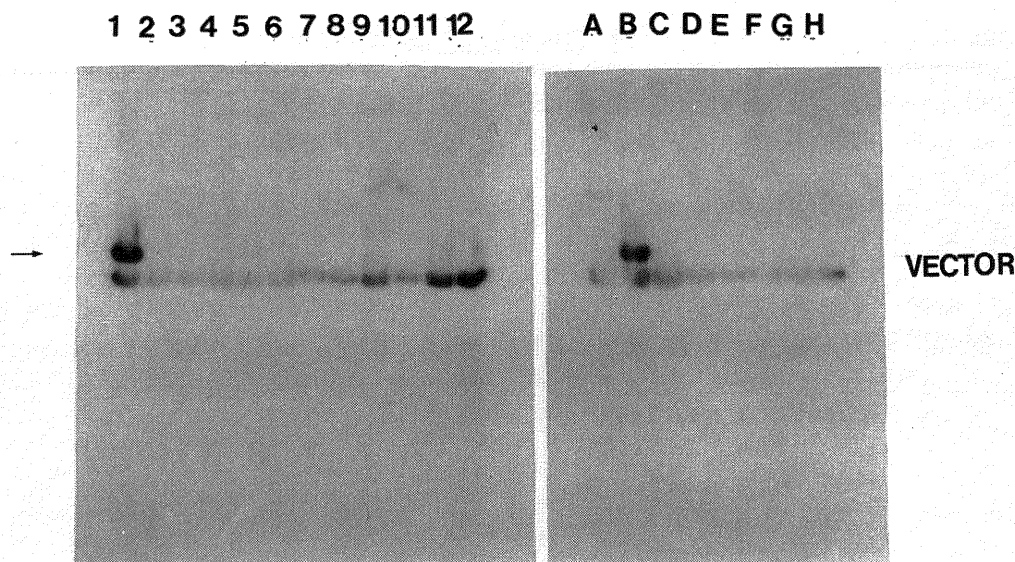


図6 陽性コスミドクローンの同定

同定されたプールの各々のクローンをたて8列、横12行のプールに分け、サザンブロットを行い、cRNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーションの時間は36時間と決めた。この条件を用いて実際のスクリーニングと同一条件のモデル系において検証した結果を図3に示すが1)はG6PDのみのプローブでハイブリダイゼーションを行い2)はG6PDのプローブが1/500存在するmixed probeを用いた場合である。このモデル系においてもG6PDの陽性バンドが明らかに同定できる。この結果よりコスミドプールの中に1つの陽性コスミドクローンが存在すれば同定できると考えた。

2. Xq24-qter 由来の cDNA クローンのスクリーニング

1,784個のコスミドクローンを96クローンずつの21プールに分割しそれぞれのプールDNA 5 μ g を制限酵素 *Bam*HI で消化、アガロースゲル電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。合計2枚のフィルターを作成し、500個のcDNA サブライブラリーから作成したmixed probe を用いて、スクリーニングを行った。4つのサブライブラリー(合計2,000クローン)のスクリーニングを行ったところ図5に示すように陽性のコスミドプール(プール5)が同定された。次にこの陽性コスミドプール5の中に存在する陽性コスミドクローン同定のステップであるが、プール5のコスミドクローン96個をそれぞれ縦8列横12行についてのプールDNAを調

製し、制限酵素 *Bam*HI で消化後サザンブロットを行い、ハイブリダイゼーションを行った。図6に示すように1列B行に陽性バンドがみられ、このことより陽性コスミドクローン cKT877 が同定できた。第3のステップとして cKT877 を 32 P でラベルしてプローブとして用いプローブとして cDNA サブライブラリーについてブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングして陽性 cDNA クローン λ 877 を同定した。

3. p877 (λ 877) の解析

まず最初にこの cDNA (λ 877) が Xq24-qter のどの領域に由来するかを決定するために雑種細胞パネルを用いたマッピングを行った。図8に示すように 6318B (human X), X3000 11.1 (Xq24-qter), QIZ (Xq27.3-qter), CY3 (Xq26-qter), PECH-A (Xq27.3-qter) にシグナルが認められるこのクローン p877 は Xq28 に存在することが明らかとなった。さらに Emory 大学の St. Warren との共同研究によりこの cDNA は色覚蛋白遺伝子を含む約 900 kbp の領域に存在することが明らかとなった。ALD 原因遺伝子座がこの色覚蛋白遺伝子近傍に存在する可能性が最近の研究で示唆されており(40) この cDNA は ALD の candidate gene となりうると考えた。各組織における発現を調べたものが、図8であるが、3.3 kb の転写産物は、大脳、小脳、筋肉

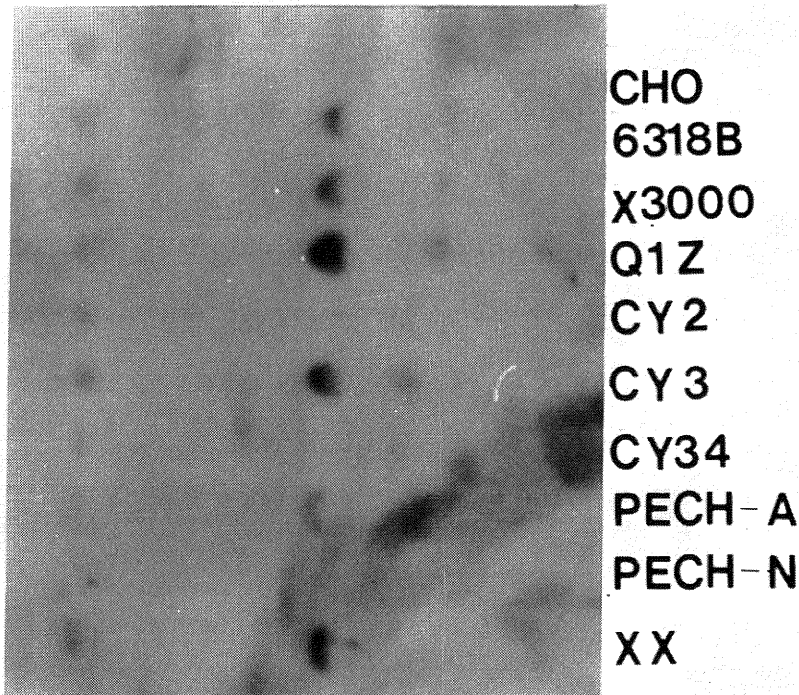


図 7 p877 の regional mapping

CHO: chinese hamster ovary (CHO) (lane 1)
 6318B: CHO+human X (lane 2)
 X3000 11.1: CHO+Xq24-qter (lane 3)
 Q1Z: CHO+Xq27.3-Xqter (lane 4)
 CY2: mouse+Xqter+Xq25 (lane 5)
 CY3: mouse+Xq26-Xqter (lane 6)
 CY34: mouse+Xq-Xq27 (lane 7)
 PECH-A: CHO+Xq27.3-Xqter (lane 8)
 PECH-N: CHO+Xpter-Xq27.3 (lane 9)
 human X (lane 10)

これら細胞より抽出した高分子ゲノム DNA をサザンブロットし， ^{32}P でラベルした p877 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

において強い発現がみられ，比較的組織特異性のある cDNA が得られていることより本法の有用性が確かめられた。塩基配列の結果この cDNA クローンは 1663 bp であり唯一存在する open reading frame から 461 個のアミノ酸をコードする可能性が示された。GeneBank Ver. 19) を用いてホモロジー検索を行ったところこれまでに報告のない cDNA であることが明らかとなり，さらに何らかの機能ドメインを示唆するような相同性も得られなかった。

4. ALD 患者の解析

この cDNA (p877) を用いて 20 例の ALD 症例についてサザン解析により ALD 症例について遺伝子の欠失などが存在するかどうかについて調べた。図 9 に 10 例の ALD 症例についてのサザンブロットの結果を示すが制限酵素 *EcoRI* によるサザン解析では正常と異なるサイズのバンドは認められず，他の制限酵素 *Bam* HI, *TaqI* においても解析を行ったが異常は認められなかった。図 10 はノーザンブロットの結果である 6 例の結果をここに示すが 10 例の ALD 症例について発現量やバンドのサイズの違いは認められなかった。

IV. 考 察

ゲノム DNA 上に存在する機能遺伝子を同定する方法として従来よく用いられる CpG island (19) を用いた方法や cross-species homology (20) を有する DNA 断片を手がかりに発現遺伝子を同定する方法はすべての

細胞で発現しているいわゆる house-keeping gene の単離には有効であるが組織特異的発現のある cDNA を単離するには難点がある。

この点を解決する方法として目的領域のゲノム DNA をコスミド, YAC 等のベクターにクローン化したものをプローブとしてスクリーニングすることが用いられている。この方法は個々のゲノム DNA をプローブするために数 Mbp の領域についてスクリーニングすることは困難である。

我々の方法は、ヒトゲノムの特定の領域をコスミドベクターを用いてクローン化してあることを利用し、Xq24-qter をカバーする 1,784 個のコスミドクローンをニトロセルロースフィルターに固定することにより通常のゲノム DNA のサザンブロットに用いる場合に比較してはるかに大量の DNA がフィルター上に存在することとなり、プローブとして 500 程度の種類の cDNA を混合して用いることを可能とした。

しかしながら本法では 1 回のスクリーニングで 500 個の cDNA を用いてスクリーニングをすることから、発現量の低い cDNA について本法で単離することは困難であると考えられる。

この点については均一化した cDNA ライブラリーを用いることが有効であると考えられる。またゲノム DNA としてクローン化されていないようなギャップ部分については、本法は適応できない難点もある。すなわちゲノム DNA としてクローン化されているということが必要条件であり、これについてはコスミド、酵母人工染色体を用いて目的領域の contig を作成することが必須である。

予備実験では cDNA プローブが 1/2500 存在すれば検出不可能であったが、対応するゲノム遺伝子のエクソンの長さなどによっても検出感度が変わると考えられ、安全を考えて、cDNA プローブは 1/500 の complexity とした。実際 G6PD コスミドクローンをを用いた実験では図 3 に示すように目的の coding sequence を含む DNA の同定が十分可能であった。この条件で 500 クローンからなる cDNA プローブによるスクリーニングを行い合計 4 回のスクリーニングで、1 個の cDNA クローンを同定した。ノーザン解析の結果から発現が脳と筋肉において多いことが見いだされ本法が確かに組織特異的発現する遺伝子の同定に有用であることが示された。

本法により単離できた cDNA (p877) は塩基配列の解析の結果からは、既知の遺伝子とは相同性を有さない新たな遺伝子であることが判明し、しかも ALD 遺伝

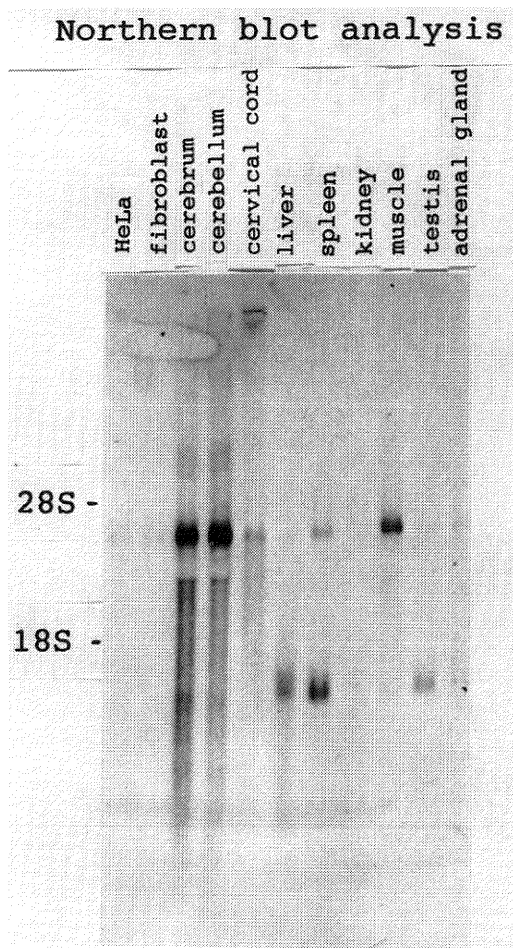


図 8 p877 の各組織における発現

HeLa (lane 1), fibroblast (lane 2), cerebrum (lane 3), cerebellum (lane 4), cervical cord (lane 5), liver (lane 6), spleen (lane 7), kidney (lane 8), muscle (lane 9), testis (lane 10), adrenal gland (lane 11) からそれぞれ抽出した poly A (+) RNA 5 μ g を 1.2% 変性アガロースゲル電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、 32 P でラベルした p877 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

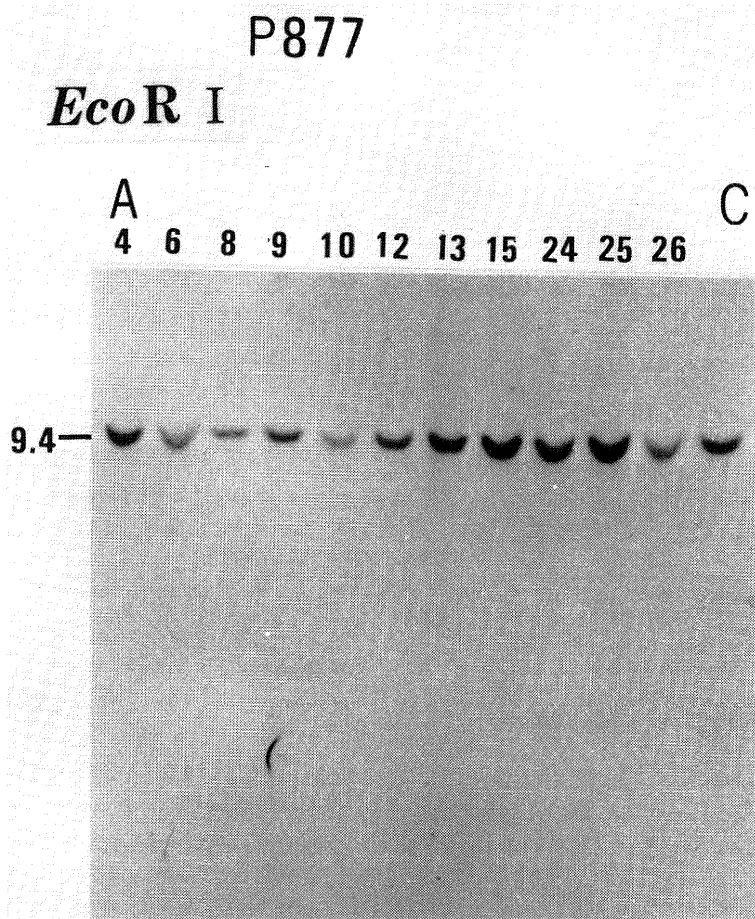


図 9 ALD 患者サザン解析

ALD 患者よりの皮膚線維芽細胞および末梢血白血球より抽出した高分子ゲノム DNA 10 μ g を制限酵素 *EcoRI* で切断，1 % アガロースゲル電気泳動した後ニトロセルロース膜に転写し， 32 P ラベルした p877 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

子が存在する可能性の高いとされる色覚遺伝子の周辺 900 kbp に存在することが示され，p877 が ALD の原因遺伝子である可能性が示唆された。

20例の ALD 患者の解析を行ったがサザン解析においては大きな異常は認められなかった。Gaucher 病などにおいては欠失などのサザン解析で検出できる変異はきわめて希であり (41) サザン解析で異常がないことで ALD の原因遺伝子でないとは判断できない。また10例のノーザン解析では発現している mRNA のサイズや発現量の違いはみられなかった。これについても点突然

変異がある場合などでは発現量や大きさの違いがないことも多く，今後症例を増やしていくと同時に点突然変異の検出方法として SSCP 法 (42)，RNase cleavage 法 (43) などを行う必要があると考えられた。

V. 結 論

1. ヒト脳で発現しており，X染色体特異的な cDNA を単離する方法を開発した。
2. 2000 クローンの cDNA をスクリーニングして Xq28 にマップされる cDNA クローン p877 を単離した。

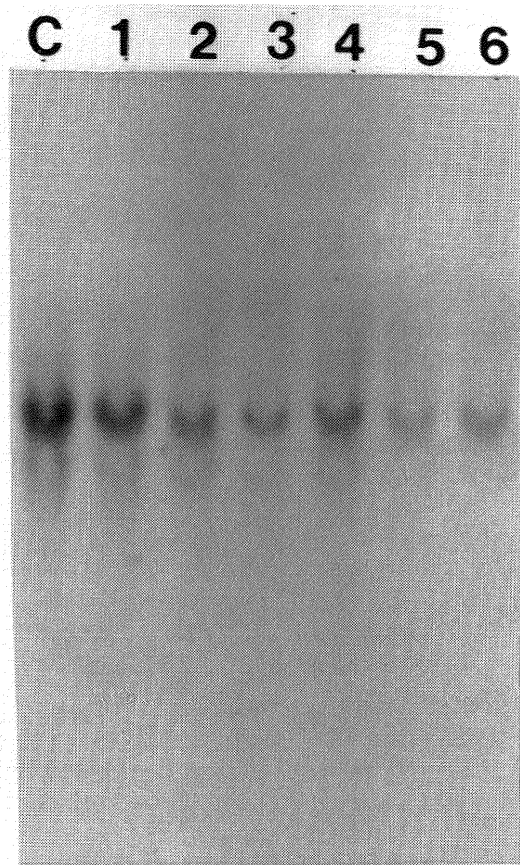


図 10 ALD 患者のノーザン解析

ALD 患者の皮膚線維芽細胞より抽出した total RNA 20 μ g を1.2%変性アガロースゲルに電気泳動した後ニトロセルロース膜に転写し、 32 Pラベルした p877 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

3. この cDNA は中枢神経系と筋肉で強い発現がみられた。

4. p877 をプローブにして ALD 患者20例のサザンブロットハイブリダイゼーションを行ったが現在のところ大きな欠失や重複は認められていない。

5. この方法はある特定の染色体にコードされていて、ある組織に特異的な cDNA を単離するために有用な方法であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、直接ご指導、ご校閲を賜りました辻 省次教授に心から感謝の意を表します。

またご指導いただきました東京医科歯科大学神経内科金子清俊先生、小林 央先生、新潟大学脳研究所神経内科小野寺理先生、小池亮子先生深謝いたします。諸橋イネ子さん、畠中喜美さんのご協力に感謝いたします。なお本研究の概要は VIIIth International congress of human genetics, 第15回日本分子生物学会年会等において発表した。

参 考 文 献

- 1) Igarashi, M., Schaumburg, H.H., Power, J.M., Koshimoto, Y., Kolodny, E. and Suzuki, K.: Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy, *J. Neurochem.*, **26**: 851~860, 1976.
- 2) Migeon, B.R., Moser, H.W., Moser, A.B., Axelman, J., Sillence, B. and Norum, R.A.: Adrenoleukodystrophy: evidence for X-linkage inactivation, and selection favouring the mutant allele in heterozygous cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 5066~5070, 1981.
- 3) Aubourg, P., Sack, G.H., Jr., Meyers, D.A., Lease, J.J. and Moser, H.W.: Linkage of adrenoleukodystrophy to a polymorphic DNA probe, *Ann. Neurol.*, **21**: 349~352, 1987.
- 4) Kenrick, J.W., Ionasescu, V., Ionasescu, G., Searby, C., King, A., Dubowitz, M. and Davies, K.E.: Linkage studies of X-linked recessive spastic paraplegia using DNA studies, *Hum. Genet.*, **73**: 264~266, 1986.
- 5) Winter, R.M., Davies, K.E., Bell, M.V., Huson, S.M. and Patterson, M.N.: MASA syndrome: further clinical delineation and chromosomal localisation, *Hum. Genet.*, **82**: 367~370, 1989.
- 6) Willems, P.J., Dijkstra, I., Van der Anvera, B.J., Vits, L., Coucke, P.J., Raeymaekers, P., Van Broeckhoven, C., Consalez, C., Freeman, S.B. and Warren, S.T.: Assignment of X-linked hydrocephalus to Xq28 by linkage analysis, *Genomics*, **8**: 367~370, 1990.
- 7) Yates, J.R.W., Affara, N.A., Jamieson, D.M., Ferguson-Smith, M.A., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Zaremba, J., Borkowska, J., Johnston, A.W. and Kelly, K.: Emery-Dreifuss muscular dystrophy: localization to Xq27.3-qter confirmed by linkage to the factor 8 gene, *J. Med. Genet.*,

- 23: 587~590, 1986.
- 8) **Thomas, N.S.T., Sarfarazi, M., Robert, K., Williams, H., Cole, G., Liechti-Gallati, S. and Harper, P.S.:** X-linked myotubular myopathy (MTM1): evidence for linkage to Xq28 DNA markers: *Cytogenet. Cell. Genet.*, **46**: 704, 1989.
- 9) **Hashimi, M., Stanley, W. and Singh, I.:** Lignoceryl-CoA ligase; Enzyme defect in fatty acids β oxidation system in X-linked childhood adrenoleukodystrophy, *FEBS Lett*, **196**: 247~250, 1986.
- 10) **Nathans, J., Piantanida, T.P., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Hogness, D.S.:** Molecular genetics of inherited variation in human color vision, *Science*, **232**: 203~210, 1986.
- 11) **Alcay, M. and Toniolo, D.:** CpG islands of the X chromosome are gene associated: *Nucleic Acids Res.*, **16**: 9527~9543, 1988.
- 12) **Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T., Luzzatto, L., Dono, R., Vilietto, G., Paonessaa, G., D'Urso, M. and Persico, M.G.:** Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase, *EMBO J.*, **5**: 1849~1855, 1986.
- 13) **Bell, M.V., Bloomfield, J., McKinley, M., Patterson, M.N., Darlison, M.G., Barnard, E.A. and Davies, K.E.:** Physical linkage of GABA_A receptor subunit gene to the DXS374 locus in human Xq28, *Am. J. Hum. Genet.*, **45**: 883~888, 1989.
- 14) **Gitschier, J., Wood, W., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vehar, G.A., Capon, D.J., and Lawn, R.M.:** Characterization of the human factor 8 gene, *Nature*, **312**: 326~330, 1984.
- 15) **Persico, M.G., Viglietto, G., Martini, G., Toniolo, D., Paoness, G., Moscatelli, C., Dono, R., Vulliamy, T., Luzzatto, L. and D'Urso, M.:** Isolation of human glucose-6-dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non coding region. *Nucleic Acids Res.*, **14**: 2511~2522, 1986.
- 16) **Djabali, M., Mattei, M.G., Ngugen, C., Roux, D., Demengeot, J., Denizot, F., Moos, M., Schachner, M., Goridis, C. and Jordan, B.R.:** The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics*, **7**: 589~593, 1990.
- 17) **Kaneko, K., Kobayashi, H., Onodera, O., Miyatake, T. and Tsuji, S.:** Genomic organization of a cDNA (QM) demonstrating an altered mRNM level in nontumorigenic Wilms' microcell hybrid cells and its locazation to Xq28, *Hum. Molec. Genet.*, **1**: 529~533, 1992.
- 18) **Levinson, B., Kenwrick, S., Lakich, D., Hammonds, G.Jr. and Gitschier, J.:** A transcribed gene in an intron of the human factor 8 gene. *Genomics*, **7**: 1~11, 1990.
- 19) **Bird, A.P.:** CpG-rich islands and function of DNA methylation, *Nature*, **321**: 209~213, 1986.
- 20) **Rommens, J.M., Inanuzzii, M.C., Kerem, B., Drumm, M.L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, B., Cole, J.L., Kennedy, D., Hidaka, N., Zsiga, M., Buchwald, M., Riordan, J.R., Tsui, L.C. and Collins, F.S.:** Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosomal warking and jumping, *Scince*, **245**: 1059~1065, 1989.
- 21) **Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.N., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J., Michell, A.L., Brownstein, B.H. and Collins, F.S.:** Type 1 Neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in the three NF1 patient, *Science*, **249**: 181~186, 1990.
- 22) **Parimoo, S., Patanjali, S.R., Shukla, H., Chaplin, D.D. and Weissman, S.M.:** cDNA selection: Efficient PCR approach for the selection of cDNAs encoded in large chromosomal DNA fragment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 9623~9627, 1991.
- 23) **Buckler, A.J., Chang, D.D., Graw, S.L., Brook, D., Harber, D.A., Sharp, P.A. and House, D.E.:** Exon amplification: A strategy to isolate mammalian genes based on RNA splicing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 4005~4009, 1991.
- 24) **Liu, P., Legerski, R. and Siciliano, M.J.:** Isolation of human transcribed sequences from

- human-rodent somatic cell hybrid, *Science*, **246**: 813~815, 1989.
- 25) **Bird, A.P.**: CpG island as gene markers in the vertebrate nucleus, *Trends Genet.*, **3**: 342~347, 1987.
- 26) **Kobayashi, H., Sakimura, K., Kuwano, R., Sato, S., Ikuta, F., Takahashi, Y., Miyatake, T. and Tsuji, S.**: Stability of messenger RNA in postmortem human brains and construction of human brain cDNA libraries, *J. Mol. Neurosci.*, **2**: 29~34, 1990.
- 27) **Tsuji, S., Kobayashi, H., Uchida, Y. Ihara, Y. and Miyatake, T.**: Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down regulation in Alzheimer' disease, *EMBO J.*, **11**: 4843~4850, 1992.
- 28) **Southern, E.M.**: Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, **98**: 503~517, 1975.
- 29) **Eperson, I.C.**: M13 vectors with T7 polymerase promoters: transcription limited by oligonucleotide, *Nucleic Acids. Res.*, **14**: 2830, 1986.
- 30) **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.**: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity, addendum. *Anal. Biochem.*, **137**: 266~267, 1984.
- 31) **Sealey, P.G., Whittaker, P.A. and Southern, E.M.**: Removal of repeated sequence from hybridization probes, *Nucleic Acids. Res.*, **13**: 1905~1922, 1985.
- 32) **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.**: DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 5463~5467, 1977.
- 33) **Nussbaum, R.L., Airhart, S.D. and Ledbetter, D.H.**: A rodent-human hybrid containing Xq24-qter translocated to a hamster chromosome expressed the Xq27 folate sensitive fragile site, *Am. J. Med. Genet.* **23**: 457~466, 1986.
- 34) **Warren, S.T., Knight, S.J., Peters, J.F., Stayton, C.L., Consaltz, G.G. and Zhang, F.P.**: Isolation of the human chromosomal band Xq28 with in somatic cell hybrid by fragile X site Breakage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3856~3860, 1990.
- 35) **Callen, D.F.**: A mouse-human hybrid cell panel for mapping human chromosome 16, *Ann. Genet.*, **29**: 235~239, 1986.
- 36) **Suthers, G.K., Davies, K.E., Hyland, V.J., Kozman, H.M., Baker, E., Eyre, H. and Harper, P.S.**: A new DNA marker tightly linked to the fragile X locus, *Science*, **246**: 1298~1300, 1989.
- 37) **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.**: Molecular cloning A laboratory manual second edition (CSH), 1989.
- 38) **Wahl, G.M., Stem, M. and Stark, G.R.**: Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyl-oxymethyl-paper and rapid hybridization by dextran sulfate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 3683~3687, 1979.
- 39) **Feil, R., Aubourg, P., Mosser, J., Douar, A.M., Paslier, D.L. and Philippe, C.**: Adrenoleukodystrophy: A complex chromosomal rearrangement in the Xq28 red/green-color-pigment gene region indicates two probable gene locations, *Am. J. Hum. Genet.*, **49**: 1361~1371, 1991.
- 40) **Beutler, T.**: Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment, *Science*, **256**: 794~799, 1992.
- 41) **Wackernagel, W. and Radding, C.**: in *Mechanisms in recombination*, ed. Grell, R.F. (Plenum, New York), pp111~112, 1974.
- 42) **Myers, R.M., Larin, Z. and Maniatis, T.**: Detection of single base substitution by ribonuclease cleavage at mismatches duplexes, *Science*, **230**: 1242~1246, 1985.