

## 顕微鏡染色体切断片からの15q11-q12特異的DNAライブラリーの作成とそのクローンをを用いたAngelman症候群の診断

新川詔夫、濱辺淳一

要約15q11-q12に座位があるAngelman症候群(AS)のDNA出生前・早期診断法を確立するため、染色体15q11-q12部分を顕微鏡下でmicrodissectし、次いでNsp(7524)Iで切断し、切断端に相補的なoligonucleotideをprimerにしてPCRを行い、pUC19のEcoRI部位に組み込みcloningを行った。クローンp15NJ4を用いたサザン分析では、9例のAS中2例で欠失パターンを示したが、同部位に座位があるPrader-Willi症候群(PWS)患者48名では正常の2コピーの遺伝子量を示した。このことは、(1)ASとPWSの座位は異なっていることを示唆し、(2)このプローブはASの診断に有用であることを示す。

見出し語Angelman症候群、DNA診断、染色体microdissection、DNA-microcloning

**研究目的：**隣接遺伝子症候群と考えられるAngelman症候群(AS)(常染色体劣性遺伝病?)およびPrader-Willi症候群(PWS)は双方ともその遺伝子座位は15番染色体長腕q11-q12領域にあるとされる。両症候群共にその責任遺伝子は単離されていない。両症候群とも診断に決定的な生化学所見はなく、臨床症状からの診断を余儀なくされる。ときに一部の患者に15q11-q12部分の染色体欠失を認めるが、欠失の部位・幅は両疾患で差を認めない。

本研究は、ASの診断特に出生前診断に有用なDNAプローブの取得を目的として、染色体microdissection/microcloning法による15q11-q12領域特異的DNAライブラリーの作成を行った。

**研究方法：**

(1)染色体microdissection:(A)ヒト末梢血リンパ球培養から得た新鮮な染色体標本をGTG分染し、(B)倒立顕微鏡に接続したマイクロマニピュレーターを操作して、先端0.3 $\mu$ mのガラス針で染色体15q11.2部分を切断し、(C)同一バンド部分を20断片ほどパラフィンオイルを被せたオイルチャンバー内の100nlのproteinase KおよびSDSを含むcollectionバッファーに集めた。

(2)Microcloning:(A)バッファーをエッペンドルフチューブに移し、染色体蛋白消化を行い、(B)制限酵素Nsp(7524)Iで消化し、(C)(5')CATG(3')を3'端に、EcoRI-siteを5'端付近にもつ単鎖20mer-オ

---

長崎大学医学部原研遺伝(Dept. Hum. Genet., Nagasaki Univ. Sch. Med.)

リボヌクレオチドにligateし、(D)同じオリゴヌクレオチドをprimerにしてPCRを行い、(E)PCR産物をpUC19のEcoRI部位に組み込みcloningを行った。

(3)Southern blotting: 9名のAS患者および48名のPWS患者の核DNAを抽出し、制限酵素HindIIIで切断後、Southernプロットし、(1)、(2)で得たクローンとのhybridizationを行い、次いでdensitometryを行い、内部コントロールとして置いたpPA1断片濃度と比べ、gene doseを検討した。

#### 研究結果:

(1)15q11-q12特異的DNAライブラリー: 平均サイズ250-350 bpのクローンを計 $2 \times 10^4$ 個得た。調べた50個のクローン中27個(54%)はsingle-copy sequenceで、4個(8%)はrepetitive sequence、ヒト核DNAとhybridizeしないクローンは19個(38%)であった。

(2)ASおよびPWS患者DNAとのhybridization: 3個[クローンp15N.J65(550bp)、p15N.J118(400bp)、p15N.J4(500bp)]において1コピー(欠失)を示すASおよびPWS患者がいた。このうち、クローンp15N.J4は48例のPWS患者では欠失を認めず、AS患者の9例中2例に欠失を示した。

#### 考察:

本研究で得たクローンのうち、少なくとも1個(p15N.J4)はAS患者の一部に特異的に欠失を認めた。このことは、ASとPWSの遺伝子座が15q11-q12内でも異なっていることを示す。従って、このクローンはAS遺伝子座位に最も近接したDNA断片であることを示唆し、現在のところAS患者の診断に最も有用なプローブである。

本microdissection/microcloning法は遺伝子座位さえ判明していれば、全ての

遺伝子クローニングが原理的に可能である。本研究で得た2万個のクローンをスクリーニングし、ASおよびPWS患者全例に変異(欠失など)を認めるクローンを選択することで、責任遺伝子の単離に近づくことができる。

#### 文献:

- 1 Donlon TA et al: Similar molecular deletion of chromosome 15q11.2 are encountered in both the Prader-Willi and the Angelman syndromes. *Hum. Genet.* 80:322-328, 1988.
- 2 Knoll JHM et al: Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am. J. Med. Genet.* 32:285-290, 1989.
- 3 Nicolls RD et al: Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. *Nature* 342:281-285, 1989.
- 4 Ludecke H-J et al: Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* 338:348-350, 1989.
- 5 Jinno Y et al: An improved method for microcloning of chromosomal DNA microdissected from a human chromosome band. *Genomics* (in preparation).
- 6 Hamabe J et al: Molecular deletion studies of the Prader-Willi, the Angelman, the Williams, and the Cohen syndromes. *Am. J. Med. Genet.* (in preparation).



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約 1.5q11 - q12 に座位がある Angelman 症候群 (AS) の DNA 出生前・早期診断法を確立するため、染色体 15q11・q12 部分を顕微鏡下で microdissect し、次いで Nsp(7524)I で切断し、切断端に相補的な oligonucleotide を primer にして PCR を行い、pUC19 の EcoRI 部位に組み込み cloning を行った。クローン p15NJ4 を用いたサザン分析では、9 例の AS 中 2 例で欠失パターンを示したが、同部位に座位がある Prader-willi 症候群 (PWS) 患者 48 名では正常の 2 コピーの遺伝子量を示した。このことは、(1) AS と PWS の座位は異なっていることを示唆し、(2) このプローブは AS の診断に有用であることを示す。