ミニレビュー

RLGS 法による高速ポジショナル
クローニング法

高原得栄, 奥泉久人, 岡崎康司, 林崎良英

1. ゲノム科学の進展とポジショナル
クローニング

1970年代後半から1980年代前半にかけて、DNA マーカーを用いてヒトを始めとする高等動物の遺伝地図が整備され始め、1990年代前半に酵母人工染色体を主とする染色体の物理地図また1990年代中盤よりゲノム全長の塩基配列決定に向かってゲノムプロジェクトが進行している。これにより明らかにされた情報を基に、染色体上の位置情報から未知遺伝子を単離するという手法により、突然変異体の表現形質（疾病）とその原因遺伝子を直接的に結び付けることが可能となった。これには、ゲノムの上にランドマーク（道標）を1本ずつ立て、このランドマークの数を順次増やし、より目的の遺伝子に近いランドマークを単離し、最終的には目的の遺伝子にたどりつくという手法（ポジショナルクローニング）が用いられる。ヒトのようにゲノム構造が精力的に解析されている生物ではより早く目的の遺伝子に近いマーカーを同定することが、またゲノムの遺伝地図すらない生物においては、なおさらのこと遺伝地図を作成し、より原因遺伝子により近傍のマーカーを単離同定することが必要となる。そこでわれわれは制限酵素をランドマークとし、一気にゲノムをスキャンするリストリクションランドマークゲノミックスキャンニング（RLGS）法の開発を行い、それを基本とした RLGS 高速ポジショナルクローニングシステムを開発した^{1), 2)}。

2. リストリクションランドマークゲノ
ミックスキャンニング（RLGS）法

ゲノム DNA をまず制限酵素 A で切断し、³²P でエンドラベリングを行う。この制限酵素 A としては切断頻度が低い 8 塩基認識ないし 6 塩基認識のレアーカッターを用いる。制限酵素

A のサイトに ³²P で標識した DNA 断片をさらに切断頻度の高い制限酵素 B (6 塩基認識) で切断し、DNA 断片の平均鎖長を数 kbp にまで短くし、アガロースゲル電気泳動を行う。さらなる分離を目的として、DNA 断片の平均鎖長を数百ベース以下になるように、より切断頻度の高い制限酵素 C (4 塩基認識) によって DNA をゲル中で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を二次元方向に行う。そのオートラジオグラフィをとってスポットを検出する。こうして得られた各スポットの位置を原点から X, Y 軸方向の距離 (X_1, Y_1) (X_2, Y_2) …… (X_n, Y_n) で表すと、この XY 座標は制限酵素 A の認識部位から制限酵素 B の認識部位までの距離、および制限酵素 A から制限酵素 C の認識部位までの距離を反映する。したがって、巨大ゲノムであっても、二つのスポットが同一の位置に重なることはほとんどなく、ゲル上のあるスポットは必ずゲノム上の一点に一对一で対応し、ランドマークとして機能する。

RLGS 法には次のような利点がある。① 一度に数千のスポットが検出でき、スキャン能力がきわめて高い。② この方法はすべての生物のゲノムに応用できる。③ 制限酵素の種類を変えることによって、ランドマークの数を増やすことができる。④ ヒトを含めて脊椎動物のゲノム上には遺伝子転写調節領域と考えられている CpG アイランドという CG 含量の非常に高い領域があり、それは転写開始点の約 2 kbp 以内の近傍に存在していることが多く、*NotI* のような GC リッチな配列を認識する制限酵素は主に CpG アイランドに存在することが知られている³⁾。たとえば、*NotI* で切断される部位の約 9 割が CpG アイランド、つまり、遺伝子のごく近傍に存在するため、*NotI* を用いて行った RLGS のスポットの 9 割が遺伝子そのものを検出していることになる。RLGS 法は GC リッチな制限酵素を用いることにより、遺伝子を検出する方法としては効率がきわめて高い⁴⁾。⑤ スポットの濃度が、その DNA のコピー数を反映する。

3. RLGS 法による高速ポジショナル
クローニング法

RLGS 法の利点を用い、任意の生物の任意の突然変異体に迫るシステムを開発した。これ

を神経芽細胞の発生過程の移動障害の生じるリーラーマウス突然変異体（常染色体劣性遺伝）の遺伝子単離に応用した。

3・1 RLGS スポットボンピング（詳細な RLGS 連鎖スポットの同定）

一般に雑種第1代 (F1) をその親に戻し交配した N2 家系の表現形質を解析すると、表現形質 (+) の個体と (-) の個体に分かれる。標的とする遺伝子のより近傍のマーカーを同定するために、表現形質の有無でグループ化した個体の DNA をプールし、その二つのプールの DNA の RLGS パターンを較べる。交配に用いた親種の一方に特異的なスポットに注目すると、表現形質の支配遺伝子の近傍に位置するスポットは2枚の RLGS パターンで出現消失の差異が見られるが、標的遺伝子より遠くに位置するスポットでは、標的遺伝子とスポット間での遺伝的組換えが起こり2枚の RLGS パターンで差異が少なくなる。制限酵素の組合せを変えて2枚の RLGS パターンで差異を示すスポットをスクリーニングすることにより、標的遺伝子近傍の RLGS スポットを同定することができる (RLGS スポットボンピング)⁵⁾。そこで、実際にリーラーマウスに RLGS スポットボンピング法を適用した⁵⁾。4種の制限酵素の組合せを用い、N2のプールの DNA に適用したところ、当座位に最も近いスポットが34個/12 cMの精度で同定できた。34スポットのうち3個が340個体の N2 で遺伝的組換えがみられなかった。これらの3スポットからそれぞれに対応する DNA クローンを単離し⁶⁾、それらを用い、リーラー遺伝子領域をカバーする YAC (酵母人工染色体) を同定した⁷⁾。

3・2 RLGS を用いた高速 YAC クローン 整列化法

共通領域を持つ YAC クローンの RLGS パターンは共通の RLGS スポットを共有するという基本原理に基づき、YAC クローンを整列化できる。本法を用いてリーラー遺伝子領域をカバーする YAC クローンの整列化を行った⁷⁾。

3・3 リーラー遺伝子のポジショナルクローニング⁷⁾

YAC をコスミドクローンにサブクローニングしたところ、三つのコスミドクローンがジャクソンリーラー (リーラー突然変異体の一つの

アレル) の欠失領域の境界をカバーしていた。これらのクローンをプローブとしてマウス cDNA ライブラリをスクリーニングし、リーラー遺伝子を単離することができた。リーラー遺伝子は全長 12 kb で、EGF 様モチーフを (持つ蛋白質を) コードしており、*in situ* ハイブリダイゼーションより胎生期にパイオニアニューロンで発現しているペプチドであることがわかった。正常の脳の高次構造を形成する発生過程において、パイオニアニューロンは脳表層にあり、それを追うように未分化な神経細胞が移動し、所定の位置において神経細胞に分化する。リーラー遺伝子産物に障害があると、パイオニアニューロンが出すシグナルの機能に異常が生じ、未分化な神経細胞は移動するべき方向を認識できなくなる。細胞外マトリックスの特性を持ったリーラー遺伝子産物は、この突然変異体の表現形質を非常に合理的に説明できる。

4. おわりに

RLGS 法による高速ポジショナルクローニング法を利用した機能遺伝子探索法を紹介した。ゲノム解析が急速に進んでいるが、ゲノム解析の究極的目標は機能遺伝子の探索であり、ゲノム構造と機能をどのように、しかも迅速にむすびつけるかが今後の残された問題である。ゲノムスキャンニングという概念はこの問題に一つの解答をあたえるものと考えられる。

Key Words : end-labeling, restriction landmark genomic scanning, positional cloning

文 献

- 1) Hatada, I., Hayashizaki, Y. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9523-9527 (1991)
- 2) Okazaki, Y., Okuizumi, H. et al. : *Electrophoresis*, **16**, 197-202 (1995)
- 3) Lindsay, S. and Bird, A. P. : *Nature*, **327**, 336-338 (1987)
- 4) Hayashizaki, Y., Hirotsune, S. et al. : *Genomics*, **14**, 733-739 (1992)
- 5) Okazaki, Y., Hirose, K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5610-5614 (1995)
- 6) Hirotsune, S., Shibata, H. et al. : *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **194**, 1406-1412 (1993)
- 7) Hirotsune, S., Takahara, T. et al. : *Nature Genetics*, **10**, 77-83 (1995)

(理化学研究所ライフサイエンス
筑波研究センターゲノム科学研究室)