

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3776121号

(P3776121)

(45) 発行日 平成18年5月17日(2006.5.17)

(24) 登録日 平成18年3月3日(2006.3.3)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00 A

請求項の数 11 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平7-529768	(73) 特許権者	シーダーズ - サイナイ メディカル センター
(86) (22) 出願日	平成7年5月9日(1995.5.9)		アメリカ合衆国 90048-1865
(65) 公表番号	特表平10-500306		カリフォルニア州, ロサンジェルス, ベ
(43) 公表日	平成10年1月13日(1998.1.13)		バリー ブールバード 8700, スウィ
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/005918		ート 2114
(87) 国際公開番号	W01995/031573	(74) 代理人	弁理士 浅村 皓
(87) 国際公開日	平成7年11月23日(1995.11.23)		
審査請求日	平成14年5月8日(2002.5.8)	(74) 代理人	弁理士 浅村 肇
(31) 優先権主張番号	08/242,553		
(32) 優先日	平成6年5月13日(1994.5.13)	(74) 代理人	弁理士 長沼 暉夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		(74) 代理人	弁理士 小堀 貞文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高解像度マッピング法およびマッピングプローブ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ビオチン化プローブの蛍光 in situハイブリダイゼーションおよび少なくとも1種の対抗染料での in situハイブリダイゼーション後対抗染色により高解像 R (逆) バンドを得るヒト染色体上の単一バンドに対する核酸配列の高解像度マッピング方法において、ハイブリダイズした染色体塗抹を少なくとも1種の蛍光標識および少なくとも2染色サイクルにおける少なくとも1種の対抗染料との接触からなり、ここで少なくとも2染色サイクルの最初の2染色サイクルの間ではUV照射は行わず、対抗染料との染色時間はプローブサイズに応じて変動させ、少なくとも1種の対抗染料は、クロモマイシン A 3 およびジスタマイシン A からなる群から選ばれるものである、高解像度マッピング方法。

10

【請求項2】

核酸配列の長さは約1Kb~約1Mbである請求項1の方法。

【請求項3】

核酸配列は平均インサートサイズ < 2Kbである請求項2の方法。

【請求項4】

複数個の試薬からなり、それぞれの試薬はヒトゲノムに由来する核酸配列を含有し、各試薬はそれぞれ染色体バンド上の特異的遺伝子座に相当する請求項1~3のいずれかに記載の方法に使用される組成物。

【請求項5】

組成物中の全試薬が単一の染色体バンドに由来する請求項4に記載の組成物。

20

【請求項 6】

組成物中の全試薬が単一染色体に由来する請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

試薬はセントロメアに由来する核酸配列からなる請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

試薬はテロメア由来の核酸配列からなる請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

組成物中の全試薬がゲノムの連続ストレッチをカバーする重複試薬の集合からなる請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 10】

組成物中の全試薬が非キメラである請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 11】

試薬は細菌人工染色体である請求項 10 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

謝 辞

本発明は一部、米国エネルギー省 (The Department of Energy) からの助成金 DE-FG003-92ER-61402, ならびに米国国立衛生研究所ゲノムイニシャティブ (The National Institutes of Health Human Genome Initiative) からの助成金 R29-HG0037-04 による政府の援助によって行われた。政府は本発明に一部の権利を有する。

発明の分野

本発明は、ヒト疾患に関与する遺伝子を同定するために用いられる方法および試薬に関する。本発明はまた、ヒトゲノムをカバーする高解像度遺伝子マップの構築に関する。

本明細書を通じて様々な刊行物をカッコ内に引用する。これらの刊行物の開示はその全体が、本発明に関連する技術の水準をさらに完全に記述するため、引用により本明細書に導入される。

発明の背景

ヒトゲノムプロジェクト (The Human Genome Project) によって提供された資金により、ヒト疾患に関与する 5 万 ~ 10 万の遺伝子を同定するために用いられる戦略が形成されつつある。高度な多型マーカーを用いて、遺伝子疾患に関与する遺伝子を迅速かつ費用効率よくマッピングする最近の努力 (Weissenbach, J. ら, Nature 359:794-801, 1992) によって、利用可能なマーカーが現在知られているヒト cDNA の既に 1 万以上と関連づけられてきた。現時点で、総計約 5 万 ~ 10 万と予想されるヒト遺伝子の約 2 万のフラグメントがクローン化され、その一部は配列が決定されている。このような成功にもかかわらず、これらのクローンのわずかに約 3 千がそれぞれの染色体部位にマップされているのみで、それも大部分は多くのバンドを包含する 10 ~ 20Mb の大領域にマップされているにすぎない。すなわち、これは、染色体上に均一に配置された高い情報価値を有するマーカーを同定できない現在のマッピング技術の重大な弱点によるものである。

物理地図の作成技術は遺伝子連鎖に補助的な手段を提供する。たとえば、標準アガロースゲル電気泳動は 1 ~ 10kb の範囲の解像を与える。パルスフィールド法はこの範囲をメガベースのレベルに拡大する。しかしながら、ゲル電気泳動法は、以前にマップされていない DNA 配列の初期の位置決定には有用ではない。さらに、これらの方法には直接、数百キロベース以上離れた DNA 配列をオーダリングする能力はなく、またこのような方法には特異的染色体領域に DNA 配列をアサインする能力もない。

染色体バンディング法は特異的ヒト染色体の同定を促進し、現時点では染色体異常の診断において大きな基盤を提供している。最初の染色体のアサインメントおよび遺伝子の位置決定には、高レベルの精度での位置決定を達成するために、数種の方法が用いられてきた。しかしながら、これらの方法には幾つかの欠点がある。たとえば、UV 照射後の DNA の喪失に一部を依存するバンディング法では、その結果として、一部のシグナルの喪失を生じる [Cherif ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6639-6643 (1990) および Takahashi ら, Hum. Genet. 86:14-16 (1990)]。他の方法とは異なり、標準 DAPI (4',6-ジア

10

20

30

40

50

ミジノ-2-フェニルインドール)またはPI(ヨウ化プロピジウム)染色は一定したパターンを生じないし、一般に解像度も低い[Pinkelら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2934-2938(1986); Lemieuxら, Cytogenet Cell Genet. 59:311-312(1992); Yamadaら, Genomics 15:449-452(1993)およびHengら, Chromosoma 102:325-332(1993)]。他の方法は強力な十分に分別されたパターンを生じ、強いシグナルを有する大きなプローブの検出には適しているが、小さなプローブによって生じる弱いシグナルは隠蔽されることがある[Rowleyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9358-9362(1990)]。最後に、他の染色法の代表としてのハイブリダイゼーション後のギムザ染色は2ラウンドの顕微鏡評価、ハイブリダイゼーションプローブの検出に1回とバンディングされた染色体におけるシグナルの位置決定に1回を必要とする[Kleverら, Hum. Genet. 86:484-486(1991)]。バンドをマークするために散在するリピート配列との同時ハイブリダイゼーションを用いる方法も使用できる[Baldiniら, Genomics 9:770-774(1991)]が、小さなプローブから生じる明瞭なバンディングパターンとハイブリダイゼーションシグナルの両者を示す中期染色体を得ることは困難なことが多い。

ヒトDNAセグメントの染色体座位を同定するための最も直接的な方法はin situハイブリダイゼーションによる方法である。同位元素で標識されたプローブを用いることによって、1Kb長未満のユニーク配列の位置を決定できるが、オートラジオグラフの現像時間が長く(数週から数カ月のことが多い)、膨大な統計解析を必要とし、マッピングの精度には放射される同位元素シグナルを表面の乳剤によって捕捉する必要があることでの限界がある。これに対して、非同位元素標識プローブでは、スピードと空間的解像度は改善されるが、感度の悪いことが難点である。

すなわち、染色体バンドのアサインメントには多くの方法が報告されてはいるものの、これらの従来技術にはそれぞれに欠点がある。たとえば、大部分の従来技術は標準ギムザバンディングよりも解像度が低く、スペクトルが標準FISHタグと重複する蛍光染料を使用し、DNAの喪失を生じ、またコスミドもしくはファージベクター内に挿入された大ゲノムプローブにしか使用できない。

したがって、マッピング法における上述の進展にもかかわらず、ヒトゲノムをカバーするクローン化ゲノム配列の調節的に配置されたアレイを呈示するため、多数のクローンを迅速に、効率的に、かつ正確にマップする努力は、幾つかのレベルで遭遇する様々な制限によって妨げられてきた。結果として、とくに欠失、転座または重複によって医学的に重要な遺伝子を確定する立場での、ユニークなマーカーにより特定された特異的染色体バンド領域の詳細な地図の成就是現時点では及ぶべくもない。

すなわち、遺伝子の単一染色体バンド上の座位への正確なアサインメントを容易にする方法および試薬の開発の必要性が存在する。このような開発が行われれば、遺伝子配列決定情報とその生物学的意義の関連づけが促進され、その結果として適切な医療処置の確定が容易になる。本発明はこれらの要求を満足し、同時に関連する利益を提供するものである。

発明の概要

本発明により、高解像度の、迅速なかつ再現性のある染色体バンディング法が開発された。本発明の方法は、登録シフトがない遺伝子の単一染色体バンドへの正確なマッピングを可能にする。

本発明の他の実施態様においては、配列が既にマッピングされた試薬が提供される。このような試薬は、特定のDNA配列が由来する染色体バンドを同定するために有用である。

【図面の簡単な説明】

図1は本発明の単一染色体バンドのマッピング戦略を例示するものである。各染色体バンドの右側の黒丸は染色体バンド上の特異的な位置を同定しマークするユニークな分子細胞遺伝学的試薬を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、遺伝子配列の単一染色体バンドマップ位置の迅速な決定と正確なアサインメントを可能にする、高解像度の再現性ある逆(R)バンディング法を提供する。本発明の方

10

20

30

40

50

法は、生物学的に重要な遺伝子配列の特異的染色体バンド位置への関連づけを促進する。本発明の方法によって得られるデータは、ヒトゲノムにおける全染色体の完全な物理地図の構築、したがって遺伝子疾患の適切な医療処置の確定を可能にする。さらに、本発明の方法によって改良された解像度はヒト遺伝子疾患に関連するマウスホモロジーの正確な確立ならびに評価を可能にする。本発明の教示は、多重遺伝子内の転写遺伝子座位またはヌクレオチドレベルで約93%のホモロジーを有するプロセス型偽遺伝子ファミリーの正確な検出を可能にする。

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) は、単一遺伝子の特異的ヒト染色体バンドにアサインする最も正確かつ迅速な方法の一つであって、ヒト遺伝子マッピングおよび臨床細胞遺伝学における必須の要素である [Pinkelら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2934 (1986)]。本発明は、平均 < 2kb のインサートサイズを有する cDNA を単一ヒト染色体バンドにマップするため、高感度の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを高解像度染色体バンディングおよびランダム cDNA 配列決定と組合わせた改良方法を提供する。また、*in situ* ハイブリダイゼーションに適合する高解像度 R-バンディングの作成方法を提供する。

別の実施態様においては、本発明はサイズ範囲 1~1,000Kb の DNA プローブを R-バンディングされたヒト染色体上に直接マッピングする方法および試薬を提供する。また、R-バンディング法と組合わけて適用可能な染色体の調製、ハイブリダイゼーションおよびシグナル産生のための特異的な方法を提供する。本発明の方法および試薬はヒト染色体の完全な物理地図の構築を可能にする。

本発明のユニークな逆 (R) バンディングは、クロモマイシン A 3 およびジスタマイシン A による *in situ* ハイブリダイゼーション後染色によって達成される。本発明のハイブリダイゼーション法で得られる明瞭なバンディングパターンは、標準写真顕微鏡または自動化画像取得システムのいずれかを用いて、蛍光 R バンドと *in situ* ハイブリダイゼーションシグナルの両者を同時に可視化することを可能にする。この方法の感度は、標準写真顕微鏡のみを用い、サイズ範囲 1.2~3Kb の cDNA の単一ヒト染色体バンドへのマッピングを可能にする。本発明の方法は迅速かつ再現性よく 350~700 ステージでバンドを可視化する。

本発明の実施に際して重要な問題は、弱いシグナルに由来するマッピング結果の信頼基準を定めておくことの必要性である。染色体の 100% より有意に低いシグナルに関しては、真のシグナルを非特異的染色体バックグラウンドと識別するため、伝統的なマッピング基準が確立されている。単一染色体の両染色分体の同じバンド位置に見られるシグナルのみを陽性結果とみなした。さらに、多くの中期染色体は重複するかそうでなければ解析から失われるので、第二の染色体上のシグナルはマッピングの確実性を高めるために使用しない。したがって、プローブは検査した 200 個の中期細胞の 10% 以上における単一部位で少なくとも 1 個の染色体がシグナル陽性の場合にマップされたこととみなし、検査した中期細胞の 5~10% に存在する場合にはプローブは予備的にマップされたこととみなし、検査した中期細胞の 2~5% に存在する場合には多分マップされたこととみなす。シグナルが 1% 未満の細胞で陽性の場合にはバックグラウンドとみなす。多くの遺伝子は 2~5% の細胞のみに存在するシグナルで正確にマップされてきたし、正確にマップすることができる。たとえばグルタミナーゼは (< 5%, 下記参照)、本発明の方法を用いて、2q32 にマップされた (従来のアサインメントでは 2q32-34)。

FISH の前および後に得られた本発明の R-バンディングパターンの比較から、ハイブリダイゼーション後に染色を必要とする本発明が染色体の形態を変化させることはないことが明らかにされた。「前」および「後」の染色体バンディングパターンは解像度および明晰度において実質的な類似性を示した。このバンディングパターンは与えられたプレレーションで中期細胞の 90% 以上に認められ、染色体にプロモデオキシウリジン (BrdU) の取込みがあってもなくても同じである。Magenisら, Hum. Genet 69:300-303 (1985) によって開発された従来のバンディング法の改良は、従来技術の方法を用いた場合に通常遭遇する急速な褪色を排除することができた。たとえば、マッキラバン (McIlavane) の緩

10

20

30

40

50

衝液 [Schweizer, D. ら, Exp. Cell Res., 111:327 (1979)] の pH を上昇させ, クロモマイシン A 3 による染色時間をプローブサイズにより変動させ, クロモマイシン A 3 / ジスタマイシン染色を 2 ラウンド使用した. さらに, プローブおよびバンディングパターンの撮影または画像取得を同時に行うために, 露出時間および染色の程度をシグナル強度に従って調整した. 弱いシグナルを産生する小さなプローブでは, 標準写真顕微鏡を用いる場合に必要となる露出時間を 15 ~ 200 秒で変動させる. 比較的, 強いシグナルを記録する場合ほど必要な時間は短くなる. すべての標準写真顕微鏡で解像度を最大にするために Kodak 100ASA フィルムを使用した. 感光速度の速いフィルムほど露出時間を短縮できるが, バンドの解像度は犠牲になる.

本発明の方法は, 再現性のある高解像度のバンディングパターンを得るための方法であり, > 1Kb ~ 1Mb のサイズ範囲の DNA 配列の染色体バンド位置の決定に, 熟練した技術者がルーチンの方法として有利に使用できるものである. 本発明では, 広範囲のプローブ, たとえば酵母人工染色体 (YAC), 細菌人工染色体 (BAC) のような大きなプローブからゲノムプラスミドおよび cDNA のような小さなプローブまでの使用が可能である. 最近では, 大部分のヒトゲノムのマッピングで YAC もしくは酵母人工染色体が利用されている. YAC は, 約 500Kbp のフラグメントのクローニングを可能にする. しかしながら, YAC ライブラリーの取扱いにはある種の難点がある. たとえば, 様々な YAC ライブラリーに, クローンの分画が共クローニング現象により生じる. すなわち, それらは単一クローン中に非隣接 DNA フラグメントを包含する. 高率の YAC クローンが, とくに高分子量のインサートを有するクローンをキメラである. キメラクローンは染色体の多重部位にマップされ, したがって, マッピングおよび解析の進行の妨害になる. YAC クローニングに際して生じる他の固有の問題には, DNA セグメントがクローン化されないかまたは不安定で, 再配列および欠失しやすい場合があることである.

細菌人工染色体 (BAC) は YAC システムの代替物を提供する. BAC は, YAC の問題点の大部分, たとえば高率のキメラおよびクローンの不安定性を解消する. BAC は大腸菌の単一コピープラスミド F 因子に基づき, サイズ約 300Kb 以上の DNA フラグメントの忠実な増殖が可能である. BAC は, 物理地図の作成に適当な多くの物理的性質を有する. たとえば取扱いの容易性およびキメラの不存在である. キメラがないことと大きな外因性 DNA を増殖させる能力から, BAC は, 染色体歩行および隣接物理地図の作成のための優れた候補となっている.

線状である YAC と異なり, インサートを含む BAC は大腸菌内では超ラセン状の環状プラスミドとして存在する. このコンフィギュレーションにより, 溶液中, 損傷を最小限にして大きな DNA の容易な単離および取扱いが可能になる. 一方, 酵母染色体では, 線状の DNA が剪断力に弱いことから, 無傷で単離することが難しい.

本発明で使用される BAC クローニングシステムは, YAC とコスミドの間に挿入できる中間物理地図作成システムを提供する. YAC システムは依然として大規模なマッピングのための極めて強力なツールではあるが (1メガベース以上の分子をクローン化してきたことから), BAC は, YAC よりもはるかに使いやすく, 精密な物理地図の作成および染色体歩行に適している. 実際, YAC ベクター中ではクローン化不能または不安定である DNA セグメントが, すなわち YAC が欠失またはギャップを有する領域が, BAC 中では, きわめて良好にクローン化されることが見出されている. さらに BAC は, コスミドと同様に取扱いが容易で, インサートサイズは 10 倍長まで可能である. BAC は, 高いクローニング効率, クローン化された DNA の操作の容易性, および挿入された DNA の安定な保持を可能にする.

本発明は, FISH の可能性を有意に増大させ改良する. すなわち, 従来技術における検出限界約 2 ~ 3Mb の範囲は, 検出限界約 1 ~ 10Kb の範囲に劇的に改善された. したがって, 本発明の方法は, 本技術分野の熟練者による転写配列の高解像度マップの迅速な作成を可能にする.

本発明はまた, ヒトゲノムにおけるユニークな単一バンド染色体部位に対する配列がマップされた試薬を提供する (図 1 参照). 本発明の試薬は, 染色体バンド上の特異的な位置

を同定しマークするユニークな分子細胞遺伝学的マーカーである。本明細書で用いられる本発明の試薬の語は、容易に検出され、物理的ゲノム位置をユニークに同定するDNAまたはcDNA配列の短いストレッチを意味する。これらの試薬は標識に適したプローブとして使用することが可能で、疾患決定遺伝子の正確な染色体位置を同定するために使用できる。さらに、本発明の試薬はゲノムの大規模配列決定のための基質を提供する。本発明の試薬の組合せもしくはキットも本発明により提供される。ゲノムの連続ストレッチ、すなわちcDNAコンティグをカバーする重複試薬の組合せも提供される。本発明のキットは染色体バンド上の特異的な座位に相当しそれを同定する個々の試薬である複数個の試薬から構成される。本発明キットの試薬の内容は位置決定もしくはマッピングするDNA配列に依存して変更することができる。たとえば、与えられた染色体上の単一バンドは約40 ~ 約80のユニークなマップされた部位を有し、それに相当する特異的試薬により各部位が表示される。したがって、本発明のキットは、各染色体バンドに相当する複数個の試薬、セントロメアに相当する試薬、テロメアに相当する試薬または個々の染色体に向けられた試薬から構成できる。

10

他の方法に比べた本発明の利点はたとえば、130のcDNAを含む900を越えるDNA配列、30のプラスミド、50のコスミド、500の細菌人工染色体(BAC)および150のYACの単一ヒト染色体バンドへのマッピングにより例示できる。さらに、ヒト脳に発現する39の新たにクローン化された遺伝子がマッピングされた。それらの26は、既知の遺伝子に有意なホモロジーを有する新規な座位を確定し、これらの20は、高等動物における多重遺伝子の新たなメンバーを呈示し、その6つは下等動物の多重遺伝子の新たなメンバーを記述するものである。それらには、ホスホジエステラーゼ、ホスファターゼ、プロテインキナーゼ、ナトリウムチャンネル、超低密度リポ蛋白質(VLDL)受容体、軸索糖蛋白質、膜輸送蛋白質、APP(アミロイド蛋白質前駆体)ファミリー(一つは以前に示唆されたアルツハイマー連鎖の領域にマップされ、第二のものは将来の研究のための候補となる座位を提供する)等に関連する遺伝子が包含される。これらの遺伝子は、表1に示すようなそれらのマップ位置を考え合わせると、ヒトおよびマウスの同種領域の両者における神経疾患の直接の候補領域を提供するものといえる。

20

表1

ゲノム名	インサートサイズ	マッピング位置	
推定APP- c100	11 Kb (c*)	Xq24	
ディスク大腫瘍抑制剤		17p12-13.1境界	
ヒトフォリポリ			
グルタメートアーゼ	2.1 Kb(c)	9q34.1	
フィブリン	2.2 Kb(c)	22q13.3	10
ナトリウムチャンネル 3	1.6 Kb(c)	2q24	
VLDL受容体	1.2 Kb(c)	2q24	
フィブロモデュリン	3つの異なる配列	1q32	
アグレカン	(c)	15q26	
Tg737	(c)	13q12	
アルギニノスクシネートシンターゼ	1.5 Kb(c)	9q34.1	20
細胞質ゾルセリンヒドロキシ			
メチルトランスフェラーゼ	2.0 Kb(c)	11p11.2	
ミトコンドリアセリンヒドロキシ			
メチルトランスフェラーゼ	2.0 Kb(c)	12q13.2	
カリウムチャンネル		11p14-15境界	
G蛋白質			30
CON E & G α i3	(c)	1p13.1	
OD & G α i2	(c)	3p21.3	

*c = cDNA

表に示した結果は大規模cDNAマッピングに対する本発明の適用を実証するものである。これらの結果はcDNA配列のマッピングの正確度(高分解度の染色体バンドアサインメント, 多重シグナルの取得および解析を含め), 感度および速度で, 本発明が他の方法より優れていることを明瞭に示すものである。

多重部位におけるシグナルの意味の解釈に際しては, 標的サイズまたはホモロジーの低下は陽性シグナルを示す細胞または染色体の比率の低下を生じると仮定できる。これは, 実験変数が大部分一定に保持されている同一細胞または細胞集団内での第二の部位ハイブリダイゼーションの場合はとくに真実である。したがって, 標的サイズが一定もしくはとくにさらに小さい偽遺伝子および多重遺伝子ファミリーの可能性を示すシグナルに対して, 陽性細胞の比率がより大きい部位は転写遺伝子座位を示す可能性がとくに大である。たとえば, 93.5%以上のホモロジーを有する多重遺伝子ファミリーでは, 陽性シグナルを生じる細胞の比率を指標に転写遺伝子座位の確定が期待される。

陽性細胞の割合と転写遺伝子対偽遺伝子座の関係は, 以下のように試験された(例11~12参照)。大部分の非プロセス型偽遺伝子については, シグナルは偽遺伝子標的サイズ

10

20

30

40

50

の低下(トランケーションおよび再配置による)のために減弱し、配列浮動による標的対転写遺伝子座プローブのホモロジーの低下のために確からしさが低下する。プロセス型偽遺伝子については、ホモロジーは依然として高いがゲノム配置が異なる点で問題が変わってくる。これは、たとえば、配列のホモロジーは低下しても、最近誘導されたプロセス型偽遺伝子はエクソンが集結して、イントロンがエクソンのハイブリダイゼーション標的を中断している転写遺伝子のゲノム座位よりも優れたハイブリダイゼーション標的として働く可能性があることに関係する。この関係は、ホモロジーの高い偽遺伝子座位が転写遺伝子座位に関連するバンドよりも有意に強いバンドを生成するというサザンプロットでよく知られている観察により不適切に強調されている。もちろん、サザンプロットにおいては、バンド濃度は標的サイズおよび配列ホモロジーの両者を反映する。したがって、関連する転写遺伝子座位に対するcDNAで検出される偽遺伝子バンドは、数個の濃度の薄いバンドに分割されることもある転写遺伝子座位からの類似サイズのバンドよりもはるかに多くのエクソン(ホモロジーは低い)を表すことがある。

10

中期染色体の解像のレベルでは、蛍光in situハイブリダイゼーションを用いると、すべてのエクソンが単一スポットとして検出される。したがって、配列のホモロジーおよびエクソン標的サイズ(エクソン数)がシグナルのサイズの重要な決定因子となる。他の決定因子には、たとえば、易接近性、塩濃度、塩基組成、フラグメントの二次構造等がある。ホモロジー単独の低下では、大部分のプロセス型偽遺伝子は転写遺伝子座位から期待されるシグナルに比べて小さなシグナルを発生するものと考えられる。

本発明の方法は、ある点では、固定膜への溶液ハイブリダイゼーションよりも旧来のコット曲線に密接に関連すると考えることが重要である。これは、各染色体は単一分子を表し、したがって特異的なハイブリダイゼーションシグナルをもつ染色体の比率はハイブリダイゼーションの可能性、すなわち与えられたコットにおいてハイブリダイズした分子の比率を感度よく反映するからである。濃度によってある程度近似されるものの、この情報は非線型シグナル濃度と多重バンドでの標準サザンプロットでは大部分が失われてしまう。FISHシグナルの増幅はサイズおよび強度の増大が検出に明らかに寄与する非線型性には寄与しない。転写遺伝子および潜在的偽遺伝子座位のいずれも同一のプレパレーションで検出されることから、プローブ濃度およびハイブリダイゼーション条件の両者、すなわちコットは二者に対し一定に保持され、シグナルをもつ細胞の比率は大部分ホモロジーの程度と標的のサイズを反映する。したがって、偽遺伝子の配列浮動と再配置があっても、陽性シグナルをもつ細胞の比率は偽遺伝子の場合よりも転写遺伝子座位で大きいことが期待できる。

20

30

標的とプローブのサイズの関係もハイブリダイゼーションシグナルの特異性に重要である。たとえばプローブおよび標的がいずれも約50~100bp(シグナルが用いられた条件下に安定なハイブリダイゼーションを行うのに必要なサイズ)以上であると、標的サイズ(偽遺伝子および転写遺伝子座位)が等しい場合、ホモロジーの程度、したがって安定度が高い遺伝子座がより大きなシグナルを発生する。標的サイズに対してプローブサイズが大きくなるに従い、小さいエクソン(<50~100bp)に不完全にフィットするプローブの比率は増加する。たとえば2個以上のエクソンを含有するハイブリダイズcDNAフラグメントでは、第二のエクソンは対合しないままで、完全マッチの安定性は低下する可能性がある。したがって、サイズの小さい隣接エクソンをもつ標的からのシグナル産生には大きなプローブサイズ(>200bp)が好ましい傾向がある。これは、エクソンがプローブのサイズより大きな場合には、シグナルに重要な寄与はしない。したがって、上述の本発明を用いる場合には、小さなプローブサイズ(50~200bp)の使用が転写遺伝子座とプロセス型偽遺伝子座の相対的検出を容易にする。

40

本発明の方法論は、著しく近似する配列の間のシグナル強度の差を最大にし、cDNAのサイズ範囲での小さなフラグメントを再現性よくマップする。すなわち、本発明は、従来法とは幾つかの点で相違する。たとえば、より高い緊縮条件(洗浄温度の上昇を含む)の使用、多重増幅、および平均範囲100~200bpの小フラグメントプローブの使用である。小フラグメントサイズおよび高緊縮洗浄の使用はハイブリッド形成の特異性を増大させる傾

50

向があり、アルギニノスクシネートシンテターゼ系について示すように（例11参照）、6%のわずかなホモロジー差でも転写遺伝子座の高感度な確定を可能にする。

本発明により、比較的完全なセットの転写遺伝子配列のオーダリングが可能になったことから、ヒトゲノム地図を完成する努力は著しく進歩するものと考えられる。本発明の配列が既にマップされた試薬からなるcDNAコンティグの使用は、平均標的サイズを増大させ、遺伝子マッピングへのこの直接的アプローチをヒトゲノムの微細構造転写遺伝子座地図の作成のための迅速でかつ費用効率の優れた方法とするものである。得られるcDNAの枠組はディテイルドYACおよび遺伝子地図を固定、確認し、多数の地図化ヒト遺伝子を直接提供し、それらのヒト遺伝子疾患における役割の研究を可能にするものと考えられる。

10

以下の実施例は本発明の例示を意図し、本発明を限定するものではない。

例 1

中期染色体の調製

染色体は、BrdUブロック [Zabelら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6932-6936 (1983)] を一部改良して用いて調製した。略述すれば、ヒト末梢リンパ球を、L-グルタミン (2 mM)、15%ウシ胎児血清、ペニシリン (100IU/ml)、ストレプトマイシン (0.5mg/ml) および0.02%フィトヘマグルチニンを補充したRPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 中、37 °Cにおいて72時間増殖させた。5-プロモデオキシウリジン (0.8mg/ml) を加え細胞を16時間S-期でブロックした。次にHBSS (ハンクス平衡塩溶液, Gibco BRL, Gaithersburg) で1回洗浄して同調剤を除去し、2.5 μg/mlのチミジンを補充した培地中

20

例 2

高品質染色体プレパレーション

高品質染色体プレパレーションを得るためには、懸濁液1滴をアルコールで清浄化したスライド上に均一、平坦に落とし、細胞質を完全に除去した中期塗抹標本を調製した。ついでスライドを熱水を満たした容器上に、周囲の湿度に応じて20~60秒間置いた。至適条件は最初に数個のスライドを位相差顕微鏡下にチェックして決定した。スライドをin situ ハイブリダイゼーション前に少なくとも2~3週室温でエイジングすると最良の結果が得

30

例 3

小DNAプローブのマッピングのためのプローブフラグメントサイズ

ニックトランレーションによって標識するプローブのフラグメントサイズは約100~200bpとし、ハイブリダイゼーション混合物中のプローブDNAの濃度は20~40ng/μl (すなわち、200~400ng/スライド) とする。これは非特異的結合を増大させるが、一般に良好なシグナル/ノイズ比が得られる。リピート配列の非特異的バックグラウンドハイブリダイゼーションを減少させるため、cDNAとともに少量のCotI DNAプローブを用いる (すなわち、200~400ngのプローブDNAとともに1~3ngのCotI) 。

40

例 4

プローブのビオチン化

DNAはニックトランレーションによりビオチン-14-dATP (Gibco BRL) で標識した。取り込まれなかったヌクレオチドはクロマトグラフィーで分離した (Sephadex G-50)。DNAプローブはすべて、平均フラグメントサイズ約200bp、100~600bpの範囲にセットし、非変性アガロースゲルにより確立した。

例 5

50

in situハイブリダイゼーション

小DNAプローブと単一コピー配列の特異的ハイブリダイゼーションを得るために、Lichterら、Science 247:64-69 (1990)により報告されたFISH法を改良した。使用1年以上前に作成したスライドではRNアーゼ処理は必要ない。必要な場合は、100 µg/mlのRNアーゼをスライド上に37 °Cで20分間置き、ついで冷エタノール系列70%、90%および100%によって脱水してRNアーゼ処理を実施した。スライドの変性は70%ホルムアミド/2 × SSC (0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸ナトリウム)中、67~70 °Cで1~2分間(新鮮な染色体プレパレーションでは時間を短くする)行った。ビオチン化プローブを3 µgのCot 1 DNAおよび7 µgの超音波処理サケ精子DNAとともに含有するハイブリダイゼーション緩衝液(10 µl)を(プローブ:Cot 1 DNAの比は1:15~30;総DNA濃度1 µg/µl)各スライド上に置いた。オーバースリップを適用してゴムセメントでシールし、ついで湿箱中で一夜インキュベートした。

10

例6

免疫蛍光法によるプローブシグナルの検出

一夜ハイブリダイゼーションしたのち、スライドを50%ホルムアミド(v/v)/2 × SSC中44 °C(4 × 5分)ついで2 × SSC中50~60 °C(3 × 5分)で洗浄した。洗浄時間は短いプローブ(インサートサイズ<1.5Kb)では短く(3 × 2分)した。小さいプローブによって生じる蛍光シグナルの強度を増大させるためにはハイブリダイゼーション後の洗浄の緊縮度を低下(2 × SSC, 45~50 °C)させる必要がある。ついでスライドを3%ウシ血清アルブミン(BSA)および0.1%Tween 20を含む4 × SSC 100 µlと37 °Cで10~20分間インキュベートしてブロックした。緩衝液をついで37 °Cで30分間FITC-アビジン(4 × SSC/1%BSA/0.1%Tween 20中0.5 µg/ml)で置換した。2 × SSC/0.1%Tween 20中45 °Cで3 × 5分洗浄後、ビオチン化ヤギ抗-アビジン抗体層(5 µg/ml)を加えてハイブリダイゼーションシグナルを37 °Cで30分間増幅させた。増幅工程の前にスライドは5%ヤギ血清/2 × SSC/3%BSA/0.1%Tween 20中10~20分間プレインキュベートして免疫学的非特異的結合を低下させた。洗浄したのちFITC-アビジンの第二の層を前述の場合と同様にしてスライドに添加した。ハイブリダイゼーションシグナルの強度を増大させるための第二ラウンドの増幅は必要に応じて実施した。ついでスライドを2 × SSC/0.1%Tween 20中45 °Cで3回洗浄し、短時間放置してドレインした。

20

例7

染色体R-バンディング

染色体バンドと蛍光シグナルを同時に観察するため、染料クロモマイシンA3とジスタマイシンAを対抗染料として用いた[Schweizer, Chromosoma 58:307-324 (1976); Schweizer, Hum. Genet 57:1-14 (1981)およびMagenisら, Hum. Genet 69:300-303 (1985)]。最後の検出後直ちに、スライドをマッキラバン緩衝液(pH 8.5~9.0; Schweizerら, 前出; 蒸留水で1:1に希釈)中で短時間すすいだのち染色に付した。100 µlのクロモマイシンA3(1/2マッキラバン緩衝液, pH 8.5~9.0中0.5mg/ml)を暗所室温で、スライド上に10分~1時間置いた。必要な染色時間はスライドの新鮮度に依存し、新鮮なスライドでは長い染色時間を要し、エイジングしたスライドでは10分程度で十分である。第一ラウンドの染色後、スライドを1/2マッキラバン緩衝液中で1分間リンスし、ついで過剰の液を振払って除去した。これに続いてスライド上に50 µlの0.1mg/mlジスタマイシンAを置いて室温で1~2分間インキュベートし、ついで上述のようにリンスして第二ラウンドの染色を行った。

30

40

小さなインサートをもつDNAプローブを用いる場合には(たとえば薄いシグナルが期待される)、この時点でスライドをリン酸塩緩衝液中p-フェニレンジアミンを含む抗褪色液[Jhonsonら, J. Immunol. Methods 43:349-350 (1981)]の薄層に載せた。

2ラウンドのクロモマイシンA3およびジスタマイシンA染色によって、最大のバンディング解像と最低の褪色が得られる。さらに、スライドを検出工程直後ただし2~3日後前に染色することによって最良の染色結果が得られる。スライドを染色直後ただし小プローブ(1.0Kb~2.5Kb)では2~3日後前までに大プローブ(>2.5~3Kb)では1~2週間後

50

前までに顕微鏡で観察することにより最良の観察が達成される。スライドを蛍光顕微鏡下で検査する前に軽い染色が必要なだけである。実際に、このバンディング法の利点は、染色体を必要に応じてさらに明るくするために、ハイブリダイゼーション後の任意の時点で対抗染色工程を反復できることである。さらに、映像の取得後、FITCハイブリダイゼーションシグナルをより明瞭に観察するために、コンピューター化されたシステムを用いてバンディングパターンを選択的に漂泊することもできる。

例 8

顕微鏡および撮影

スライドは、Zeiss Axiophot 100またはAxiovert 135蛍光顕微鏡 (Zeiss, Inc., Thornwood, NY) で観察した。FITCおよびクロモマイシン A 3 は、いずれも400-480nmバンドパスエキサイター、460nm二色性、470nmバリアー (Zeissフィルターセット#05) を用い励起させる。ハイブリダイズしたセグメントは明るい緑青色もしくは明るい黄緑色のスポットとして現れ、染色体バンドの他の部分はぼんやりした緑色に見える。黑白写真にはKodak Technicalパン (ASA100) フィルムを使用した。カラーの映像はBDS (Biological Detection System, Pittsburgh, PA) イメージングソフトウェアを用い、冷却-CCDカメラ (Photometrics CH 250, Photometrics Ltd., Tucson, AZ) で捕捉した。

10

例 9

cDNA

cDNAは標準ミニプレレーション培養によって得られた [Sambrook, J. ら Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2版 (Cold Spring Harbor 1989)]。これらはBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) 中にクローン化された胎児脳ライブラリーから単離しランダムに配列決定した。FISHマッピングには、サイズ範囲1Kb以上のインサートを含むcDNAに限定し、表IIおよびIIIに示すデータベースにマッチしたcDNAのサブセットを包含させた。

20

表2. FISHによる新規遺伝子の位置決定

クローンID	(+)細胞%	データベースマッチ	マッチの程度	挿入サイズ	マップ位置
HFBCA82	20	カルモジュリン依存性 蛋白質キナーゼIIベータ型	ラット98% aa sim, 107 res. コドン28-末端	2.2kb	7p13
HFBCD19	≤5	マウス希薄ペプチド	100% 同一; 短 (51bp マッチ)	1.6kb	10q24.3 to q25.1
HFBCHE61	≤5	クラスリン関連蛋白質 AP47	酵母 82%, 62 res.; マウス 95%, 104 res.	20.kb	Xq13
HFBCI88	25	大ERKキナーゼ	ヒト 完全にマッチ	3.0kb	1p36.1
HFBCJ51	8	グルタミンナーゼ	ラット 80%, 34 res.; キメラ/サブライス?	2.0kb	2q32
HFBCP87	50	cAMP特異的 ホスホジエステラーゼ2 (PDR2)	ヒト PDE2	1.9kb	1p31 to p32
HFBCX08	85	Rab5様	ヒト 92%, 91 res. (215 res, 完全長)	2.4 kb	12q13
HFBDR29	8	電圧ゲート ナトリウムチャネルII	ヒト 完全にマッチ	0.6kb	2q31
HFBEH30	≤5	超低密度 リポ蛋白受容体/ VLDL	ヒト 完全にマッチ	1.6kb	7p13 to p14

クローンID	(+) 細胞%	データベースマッチ	マッチの程度	挿入 サイズ	マップ位置
HHCMD29	15	<i>Yarrowia lipolytica</i> XPR2 に対する 仮想蛋白 3'	酵母・65%, 88 res.; R=マッチなし	2.2kb	15q22
HHCME18	25	α -エノラーゼ	ヒト 完全にマッチ	1.5kb	1p36.3
HHCME40	10	ロダネーゼ (チオ硫黄スル フォートランスフェラーゼ)	ウシ 97% sim, 70 res.	2.0kb	22q13.1
HHCME78	55	神経末梢蛋白質 SNAP25	ヒト 完全にマッチ	2.3 kb	5q11.2
HHCMG18	40	AMPデアミナーゼ	ヒト AMPD2	1.8kb	5q32
HHCMH17	30	マイトジェン活性化キナーゼ	ヒト 完全にマッチ	1.8kb	12q21
HHCMH42	60	軸索糖蛋白質 TAG-1; f-polyT	ヒト 完全にマッチ	2.0kb	1q32
HHCMH89	40-50	膜トランスポート ファミリー (Nod1)	根瘤菌 72%, 71 res.	4.0kb	6q21
HHCPB41	55	蛋白質ホスファターゼ 2A β サブユニット	ヒト 77% (DNA), 288bp	1.9kb	4p16.3 遠位
HHCPF23	20	グリア細胞維 酸性蛋白質	ヒト 完全にマッチ	2.1kb	17q21
HHCPK77	12	Lon プロテアーゼ様 蛋白質	ヒト 完全にマッチ	1.8kb	19p13.2

クローンID	(+) 細断%	データベースマッチ	マッチの程度	挿入 サイズ	マップ位置
HHCPQ06	40	イノシトールトリホス フェートキナーゼ (IP3)	ヒト 80%, 65 res.; as: 177-460; 849bp	2.8kb	19q12
HFBCJ87	55	カルボキシペプチダーゼ	53% ヒト, 350 res.	2.5kb	7p13 to p14

10

20

30

40

表3. FISHによる遺伝子座マップ位置の確認/リファインメント

起源	(+) 細胞%	遺伝子記号/遺伝子産物	挿入 サイズ (kb)	既定または推定 マップ位置	FISHによる 位置決定
ATCC (*HGM)	85	C3/糖体成分3	4.3	19p13.3-9p13.2	19p13.3
	70	F8VWH/ファン ヒルアラント因子	2.9	12pter-12p12+ps	12p13.1
	45	HMGCR / 3-ヒドロキシ メチルグルタルル-CoA リダクターゼ	4.3	5q13.3-5q14+ps	5q13.3
	15	ASS/アルギニノ スクシネートシンターゼ	1.5	9q34-9qter+ps	9q34.1
Venter ら (#1)	50	MAP-1B / ノイラキシン / 微小管関連蛋白質 1B	1.8	5q13	5q13
	30	アルドラーゼA	2	16q22-16q24	16q22 (大) 16q11 (小)
	25	α-エノラーゼ	1.5	1pter-1p36.3	1p36.3
	20	グリア細胞維 酸性蛋白質	2.1	17q21	17q21

起源	(+) 細胞%	遺伝子記号/遺伝子産物	挿入 サイズ (Kb)	既定または推定 マップ位置	FISHによる 位置決定
ATCC (*HGM)	85	C3 / 補体成分3	4.3	19p13.3-9p13.2	19p13.3
	70	F8VWH / ファン ビルプラント因子	2.9	12pter-12p12+ps	12p13.1
	8	グルタミナーゼ	2	HSA 2q32-q34	2q32
Venter ら (#2)	45	アミロイド前駆体様 蛋白質1/APLP1	1.6	19q11-q13	19q12
	30	アミロイド前駆体様 蛋白質2/APLP2	1.5	11q26	11q25
Denny ら	10	B37 / ヒト リンパ球 特異的 pp52 遺伝子	1.7	コスミドクローン: 11pter+ps	11p15.5
Wilkie ら	25	G-alpha-16 / G- 蛋白質	2.1	19p13	19p13.3
	35	G-alpha-i2	1.34	マウス 9, 推定ヒト 3	3p21.2
	20	G-alpha-i3	2.4	マウス 3, 推定ヒト 11	11p13.3
Cohn ら	25	PHN-02 / ヒト alpha IL-1	1.6	alpha-セントロメア に近い2q	2q13.1

起源	(+) 細胞%	遺伝子記号/遺伝子産物	挿入 サイズ (Kb)	既定または推定 マップ位置	FISHによる 位置決定
ATCC (*HGM)	85	C3/補体成分3	4.3	19p13.3-9p13.2	19p13.3
Shane は	70	F8VWH/フォン ビルアラント因子	2.9	12pter-12p12+ps	12p13.1
Ingram は	40	h-FPGS/ヒト フォリポリグルタメート シンターゼ	2.1	8 (細胞融合試験)	9q34
Guellaën は	15	VM1732/ナトリウム チャネルIa	1.6	YACクロン & PCRハイブリッド	2q24
	30	グルタメート デヒドロゲナーゼ	3	10q23.3	10q22-23 境界
	50	D7S8 遺伝子座DNA (チロメア)	1.4	7q31	7q31 遠位
	40	膜会合蛋白質 HEM	1.8	12q13.1	12q13.1
	65	凝固因子 XIIIa	2.8	6p25	6p25
	30	オルニチン アミノトランスフェラーゼ	1.8	10q26	10q25-26 境界

例10

単一遺伝子のマッピング

本発明の正確度を、マップアサインメントが既知の単一遺伝子および多重遺伝子または偽遺伝子ファミリーのメンバーであることが既知の遺伝子のマッピング能力によって試験した。最初に、マップ位置が既に知られているかまたは推定されている15の遺伝子のマップ位置を確認した。すべての場合、cDNAクローンのFISH分析に基づいてかなりのリファインが達成された。さらに、単一遺伝子およびそれらの検出の感度に関する問題を以下に考察する。

10

20

30

40

50

多重遺伝子ファミリーについては、転写遺伝子の部位のマッピングの正確度を標的サイズ、ホモロジーの程度およびゲノム再配置の可能性によって決定した。15のG-蛋白質-サブユニットから構成される多重遺伝子ファミリーのマッピング [Wilkieら, Nature Genetics 1:85-90 (1992)] を本発明の方法で実施した。すべてのヒトcDNAが独立に、既知のマウスホモロジーによって推定された領域にマッピングされた。さらに、G α 2およびG α 3の間のヌクレオチド配列のホモロジーは75%と高いにもかかわらず、いずれのDNAについても第二の部位は認められなかった。

2.0Kbフラグメントを用いたアルドラーゼAのマッピングでは解像度が上昇したのみでなく、全コード領域でのホモロジーが約74% (Costanzo, 1988) のアルドラーゼCの類似遺伝子の既知部位に第二のシグナルは検出されなかった。これらのデータは多重遺伝子ファミリー中の同じゲノム配置の配列のユニークなマップ位置が、約75% (既知の多重遺伝子ファミリーの大部分のメンバーのホモロジーより高い) のヌクレオチドホモロジーがあっても本発明の方法を用いて確定できることを示唆する。これは一般に約90%の蛋白質ホモロジーに相当する。

10

例11

偽遺伝子シグナルの検出

転写遺伝子座位と偽遺伝子座位からのシグナルの優先的な検出の可能性の厳密な試験として、14のプロセス型偽遺伝子のファミリーを伴う転写遺伝子、アルギニノスクシネートシンターゼ (AS) のcDNAを用いて、本発明のシグナル識別能力を例示した。3つの偽遺伝子は、2139bpの間で、93.5% (AS1p1)、92.9% (ASp3) および89.4% (ASp7) の配列ホモロジー (発現された配列に対して) を示す。この高いホモロジーにもかかわらず、ASの1.5Kb cDNAを用いたハイブリダイゼーションにより、200の細胞中で最高の比率は転写遺伝子座位、9q34.1に染色体がシグナルをもつ細胞の15%であり、細胞の3%に陽性の第二部位 (染色体6p21) および1%に陽性の第二の部位 (7p32) が明らかにされ、推定偽遺伝子の座位が確認された。

20

例12

転写遺伝子座位の検出

類似する偽遺伝子の存在下において転写遺伝子座位を検出する興味ある例が、pp52のcDNAのマッピングで報告されている。これはヒトリンパ球特異的遺伝子であり、1つのエクソンは90%以上のホモロジーを示すが、他の3つは多分偽遺伝子の4つの異なるゲノム位置が関連づけられている (Mayら, 1993)。これらの座位についてコスミドは2以上の座位を認識し、一部はほぼ等しい頻度を示したが、cDNAプローブは染色体11p15.5、転写遺伝子座位において優位にシグナルを発生した。

30

例13

アミロイド4-様遺伝子の位置決定

19q13.1にマッピングされるアミロイド前駆体蛋白質様遺伝子 (APLP1) が遅発型家族性アルツハイマー病 (AD2) に関連する可能性には興味がある。染色体21上のアミロイド蛋白質前駆体遺伝子 (APP) の突然変異が家族性アルツハイマー病の一型AD1に関連する。AD2と数個の近位19q上DNAマーカーとの間の連鎖の証拠はPericak-Vanceら, Cytogenet. Cell Genet. 58:751 (1991) によって得られた。これらの家族において、解析に発病者のみを用い、ATP1-A3 (19q13.2) およびD19S13 (19can-q13.1) 付近で最大多重点LOD評点4.4が得られた。19q13.2に位置するアポリポ蛋白Eの遺伝子、対立遺伝子APOE4 (テロメア~APLP1) の投与量の増加がAD2のリスクの増大と相関するとしても、Wascoら, Genomics 15:237 (1993) が示唆しているように、このリスクとの関連の一部は他の遺伝子、多分本発明者らがこの領域にマップしたAPLP1との連鎖不均衡によると考えることも不合理ではない。

40

第二のAPLP遺伝子 (酵母セントロメアのコンセンサス配列に結合することから、CDE-1-BPと命名) は11q26にマップされ、同じように興味もたれるが、APPとの間にさらに高いホモロジーを示すにもかかわらず、現時点では遺伝子な関連を示唆する結果は全くないことから、家族性アルツハイマー病との連鎖は前者ほどではないものと思われる

50

．それでもなお，これらの両マップ位置は，染色体21もしくは染色体19のいずれもが関連しない家族 [スウェーデンの家族：Lannfeltら，Nature Genetics 4:218-219 (1993)；およびボルゴイトの家族：Schrillenbergら] における家族アルツハイマー病が関与する遺伝子の評価のための座位候補を提供するものではある．

例14

プロテインホスファターゼ2A，サブユニットの位置決定

プロテインホスファターゼ2Aが広領域の細胞過程にある役割を果たしていることにはかなりの証拠がある．これらには多くの代謝経路の調節，翻訳，転写，G2-M細胞周期の遷移，および腫瘍形成が包含される [Jonesら，Cytogenet Cell Genet 63:35-41 (1993) の総説を参照] ．したがって，そのマップ位置の染色体4p16.3へのアサインメントはウルフ-ヒルシュホーン (Wolf-Hirschhorn) 症候群 (WHS，完全な生育および精神遅滞を特徴とする) に関連する可能性がある直接的遺伝子候補を提供した．cDNAマッピングを4p16.3上の欠失した2.5Mb棄却域内のプロテインホスファターゼ (Gandelmanら，1992) のアサインメントに適用した．

10

例15

軸索糖蛋白質 (TAG-1/アクソニン-1) の位置決定

近年，神経組織において発現し，ニューロンネットワークの発生に重要な役割を果たすと考えられる細胞表面蛋白質，たとえばTAG-1が同定されている．現在ヒトのTAG-1/アクソニンは独立にクローニングされていて，その発現は発生時の神経系におけるニューロン分化領域に限定されることが見出されている [Haslerら，Biochem 211:329-339 (1993)] ．したがって，ヒトのTAG-1/アクソニンの染色体バンド1q32へのマッピングは，この領域の欠失によって生じるファンデルウード (Van der Woude) 症候群 (下唇粘膜嚢胞を伴う口唇裂/口蓋裂) に関連して興味のある遺伝子候補を提供する．

20

例16

ロダネーゼの位置決定

ミトコンドリア蛋白質における核のコード遺伝子として，この遺伝子の染色体22q13.1上におけるマッピング位置は常染色体優性の様式で遺伝するミトコンドリア疾患に対するその関係の検討の基盤を提供するものである．この領域にマップされるマウス突然変異は神経学的な異常を生じ，グレイ振戦，ワグラーおよび失明を包含し，すべてこの遺伝子との関連に興味をもたれる．

30

例17

イノシトール1,4,5 トリホスフェートキナーゼの位置決定

筋肉のセントラルコア病 (CCD) と連鎖する染色体19領域のマップは興味をもたれる [Mulleyら，Am J Hum Genet 52:398-405 (1993)] ．最近の連鎖および物理学的データはこの関係の評価に直接適用できる．

例18

カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII 型の座位

染色体7p13の領域には候補疾患は起こっていないが，この遺伝子は，カルモジュリン様配列に加えて，この領域で同定されるべき第二または第三のプロテインキナーゼ (PKAR1B) である．

40

例19

Nod1膜トランスポートスーパーファミリーの位置決定

この遺伝子は，結節形成過程に関与する根瘤菌の遺伝子と高いホモロジー (72%) を有し，ATP依存性細菌トランスポート蛋白質と強いホモロジーを示す．これは，他の2つの神経受容体とともに，6q21の領域におけるわずかな既知の遺伝子の一つである．このように配列が高度に保存された遺伝子は明らかに重要な機能に関与すると思われる．

例20

ポリミキシンB抵抗性蛋白質の位置決定

酵母ときわめて高いホモロジーを有する多分プロテインキナーゼと思われるこの遺伝子は12q21にマップされ，この領域における最初の既知遺伝子の一つを提供する．

50

例21

A M P デアミナーゼの位置決定

この遺伝子はエネルギー代謝に重要な役割を果たし、受容体のあるヒト領域、5q32にマップされ、vt (汎下垂体前葉機能亢進を伴う残遺尾骨)、dt (矮小突然変異) を含む神経学的突然変異が見られるマウス領域とホモロジーを有す。

例22

c A M P 特異的ホスホジエステラーゼの位置決定

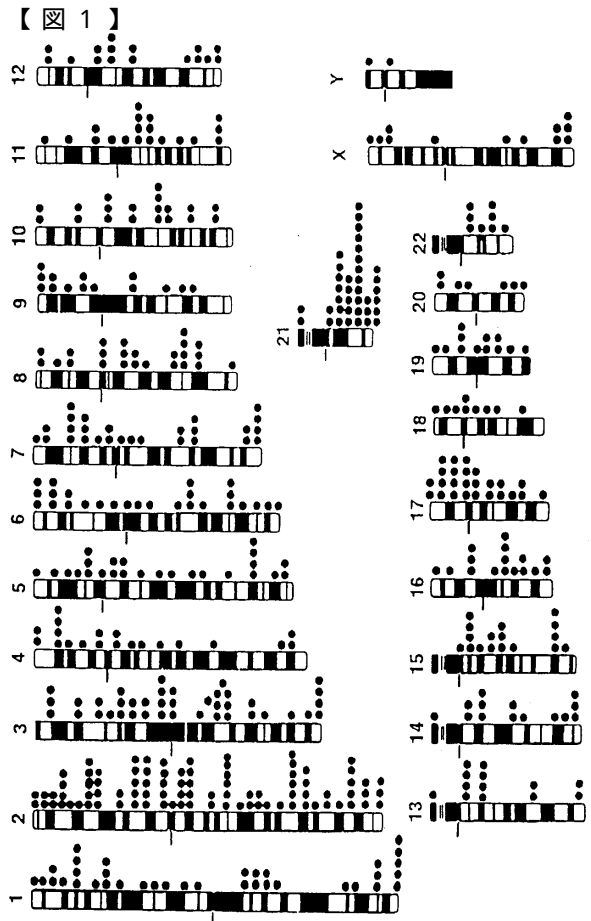
以前に確定されているヒト遺伝子に対応して、遺伝子に富む領域、1p31-32にマッピングされたこの新しい遺伝子はそのクラスで最初にマップされた遺伝子である。

例23

X P R 2 の位置決定

15q22に位置決定されたアルカリ性細胞外プロテアーゼは、その全バンドにおいてマップされた最初の遺伝子である。これはこの領域の核を形成し、マップされた最初の細胞外プロテアーゼであり、前骨髄球性白血病に伴う15q22-関連染色体再配置に関して興味もたれる。

以上、開示された実施態様を参照しながら本発明を説明したが、本発明はその精神から逸脱することなく様々な改変が可能であることを理解すべきである。



フロントページの続き

- (72)発明者 コレンバーグ, ジュリー アール.
アメリカ合衆国 9 0 0 4 6 カリフォルニア州ロスアンジェルス, カーマー ドライブ 2 7 4
5
- (72)発明者 チェン, ザイアオ - ニン
アメリカ合衆国 9 1 7 5 4 カリフォルニア州モンテレイ パーク, サウス ムーア アベニュー
- 2 0 8, ナンバー ディー.

審査官 斎藤 真由美

- (56)参考文献 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 0年, Vol.87, p.6639-6643
Trends in Biotechnology, 1 9 9 2年, Vol.10, p.27-323
Science, 1 9 9 0年, Vol.247, p.64-69

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 90
C12Q 1/00 - 70
C12P 1/00 - 41/00
C12N 1/00 - 7/08
PubMed, MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI (DIALOG)