

氏名(本籍)	黒崎久仁彦(栃木県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	博甲第914号
学位授与年月日	平成3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	ゲノム・サブトラクションによるヒト特異的 DNA 領域の単離とその解析及び法医学的応用 (Dissertation 形式)
主査	筑波大学教授 医学博士 濱口秀夫
副査	筑波大学教授 医学博士 中井利昭
副査	筑波大学教授 医学博士 藤木素士
副査	筑波大学教授 医学博士 三輪正直
副査	筑波大学助教授 医学博士 深尾立

論文の要旨

〈目的〉

本研究の目的は、1)生物種としてのヒトを特徴づけている遺伝的特性の解明に役立てるためにヒト特異的 DNA 領域を単離すること、2)このヒト特異的 DNA を用いた人獣鑑別法を開発することである。

〈試料と方法〉

ヒト特異的 DNA 領域を単離するために、ヒトゲノム DNA から、ヒトに最も近縁な種であるチンパンジーに存在する相同 DNA を差し引く、ゲノム・サブトラクション法という新しい手法を開発した。まず、ヒト男子血液から抽出した DNA を Sau3AI で、雄チンパンジー血液から抽出した DNA を HincII で切断し、チンパンジー DNA 断片100に対してヒト DNA 断片1の量比で混合した。つぎに、混合 DNA 断片を熱変性により一本鎖に解離した後、Phenol Emulsion Reassociation 法によって再会合させた。ヒト由来同士の再会合 DNA をファージベクター M13 の BamHI クローニングサイトに組み込み、大腸菌 (JM103) に導入してクローニングした。クローン DNA の中から、ヒト特異的である可能性が高いクローン DNA を選び、これを用いてヒトゲノムライブラリーからより大きなヒト特異的 DNA 断片をクローニングした。ヒト特異的 DNA 断片の分子生物学的特徴を明らかにするために、チンパンジーのゲノム DNA ライブラリーからも対応 DNA 領域をクローニングした。DNA の塩基配列はジデオキシン法により決定した。

〈結果と考察〉

31個のクローンDNAの塩基配列を決定した。その大きさは68塩基対～205塩基対の範囲であった。これらのクローンDNAをプローブとして用いて、Southernハイブリダイゼーション法により、ヒトDNAとチンパンジーDNAを分析した。31個のクローンのうち1クローン（PER5）がヒトDNA断片とのみ反応して一本のバンドを形成した。したがって、PER5（106塩基対）がヒト特異的DNA断片である可能性が考えられた。そこでPER5を用いてヒトゲノムDNAライブラリーからDNA断片をクローニングし、クローニングしたDNA断片を制限酵素地図作成とSouthernハイブリダイゼーション法により分析した。また、このヒトDNAと対応するチンパンジーのDNA領域をクローニングした。このようにして得たヒトの3.7kbのDNA断片とチンパンジーの1.5kbのDNA断片の塩基配列を決定して比較した結果、ヒトDNAの5'側1070塩基対と3'側415塩基対の合計1485塩基対はチンパンジーDNAと相同であったが、その間に存在する2282塩基対はヒト特異的であった。このヒト特異的2282塩基対をHS5と命名した。PER5はHS5に含まれていた。HS5にはopen reading frameに該当する配列は存在しなかった。

HS5の3'側1.2kbにはLINE-1 family遺伝子とのホモロジーが認められた。そこで5'側から747塩基対を切り出し、これをプローブとして用いてヒトや他の動物のDNAをSouthernブロット法で分析した。日本人12名（男女各6名）、ヨーロッパ系白人、アフリカ系黒人各2名についてEcoRIで消化したDNAを分析したところ、どの人においても3.7kbの単一バンドが観察された。しかし、チンパンジー、オランウータン、テナガザル、カニクイザル、タマリン、キツネザル、イヌ、ウサギ、マウスなどの他の生物種ではシグナルが検出されなかった。また、このプローブを用いてヒト血痕から抽出したDNAをドットブロット法で分析したところ、半年経過血痕の場合でもシグナルが検出できた。

以上の結果はHS5がヒト特異的DNAであり、真の人獣鑑別に有用であることを示している。

審 査 の 要 旨

本研究は、1) ヒト特異的DNAの単離法を開発したこと、2) ヒト特異的DNAであるHS5の単離に成功したこと、及び、3) HS5を用いた真の人獣鑑別法を開発したことの三つの点で高く評価できる。なお、本研究の内容の大部分は1990年にGenomics誌に報告されており、黒崎氏はThird Authorであるが、実際の研究の大部分は黒崎氏が行ったものであることを指導教官から確認した。

よって、著者は医学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。