Osaka University Knowledge Archive

Title	Construction of radiation-reduced hybrids and their use in mapping of microclones from chromosome 10p11.2-q11.2
Author(s)	藤田, 彰一
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38497
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【129】

氏　　名	藤　田　彰　一（ふじた しょういち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11112　号
学位授与年月日	平成6年2月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Construction of radiation-reduced hybrids and their use in mapping of microclones from chromosome 10p11.2-q11.2 **(放射線照射による雑種細胞の作製とヒト染色体10p11.2-q11.2領域の微小DNA断片のマッピングへの応用)**
論文審査委員	(主査) 教授　森　武貞 (副査) 教授　髙井新一郎　　教授　田中亀代次

論文内容の要旨

【目　的】

遺伝子マッピング法の一つであるリンケージ解析は，減数分裂時の相同染色体間の組換えを指標とするため，ごく稀にしか組換えの起こらない，非常に狭い染色体領域内での遺伝子のマッピングには，相当数の減数分裂を解析することが必要である。一方，放射線により誘導された雑種細胞を用いることにより，より簡便に，より狭い領域の遺伝子のマッピングが可能となり，また目的とする領域の染色体断片だけを有する雑種細胞を作製することにより，より効率的なDNAマーカーのクローニングができるようになった。本研究では，多発性内分泌腫瘍症2A型（MEN2A）の原因遺伝子の位置するヒト第10番染色体動原体近傍のDNAマーカーをマップすると共に，同染色体領域のDNAマーカーを単離するために有用な雑種細胞を得る目的で，放射線照射を用いて雑種融合細胞を作製した。

【方法ならびに成績】

1）X線照射および細胞融合

ヒト10番およびY染色体のみを有する，ヒト・ハムスターの雑種培養細胞を入手し，これに40,000radのX線を照射した。照射後，この細胞とhypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase（HPRT）geneを欠いたハムスター培養細胞とを，polyethylene glycol 1000もしくはSendai virusを用いて融合させた。次にHPRT遺伝子が移入された融合細胞だけをHAT培地で選別し，単一のコロニーをクローニングした。このようにして得られた126種の雑種細胞は各々短期間培養後，高分子DNAを抽出した。

2）サザンハイブリおよびマッピング結果

抽出した雑種細胞の高分子DNAを，制限酵素*Eco*RIにて切断し，0.8%アガロースゲル電気泳動の後，サザン法にてナイロン膜にトランスファーした。10番染色体動原体近傍の既知のマーカー7種，*FNRB*, D10S34, D10Z1, *RET*, D10S94, D10S102, *RBP3*をプローブとして用い，ハイブリダイズ法にてヒト10番染色体動原体近傍の断片を有する，10種類の放射線雑種細胞を選別した。次に，この10種類の融合細胞のDNAをマッピングパネルとして用い，以前にマイクロダイセクション法で単離していた10番染色体動原体近傍の6種の微小DNA断片（m6-3，m

27, m58-1, m58-2, m135, m149-2）のマッピングを試みた。その結果，2種のクローン（m135, m149-2）をマーカーD10S102の近傍にマッピングすることができた。さらにパルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）での解析でも，これら2種のクローンはD10S102と同一のパターンを示し，D10S102の近傍に位置していることが確認された。また得られた10種の放射線雑種細胞のうちの一つは，用いた10番染色体動原体近傍のマーカーに対応する染色体領域をすべて有しており，この雑種細胞DNAは，同染色体領域のDNAマーカーを効率的に単離するために，有用性の高いものと考えられた。

【総　括】

1）放射線雑種細胞法にる遺伝子のマッピングは，比較的狭い染色体領域内で遺伝子のマッピングを行う際に，非常に有用な方法である。照射する放射線量を変化させることで，マッピングしようとする領域の範囲を調整することも可能である。

2）リンケージ解析法では，マップすべきDNAマーカーが多型性を示す事が必要であるのに対し，本法では，多型性を示さないマーカーのマッピングも可能である。

3）本法で得られる特定の染色体領域を含む融合細胞は，目的とする染色体領域より効率的にDNAマーカーを単離するための材料としてきわめて有用である。

論文審査の結果の要旨

疾患の原因となる遺伝子変異を同定するためには，特定の染色体領域より，数多くのDNAマーカーを単離し，詳細な遺伝子地図を作製することが必須である。本研究では，放射線照射と細胞融合法を用いて，特定の染色体領域の断片を有する雑種細胞10種を樹立した。対象とした染色体領域は，常染色体性優性の遺伝性腫瘍性疾患である多発性内分泌腫瘍症2A型（MEN2A）の原因遺伝子の位置するヒト10番染色体動原体近傍である。さらに，樹立した雑種細胞のDNAを用いて，以前に単離されていた同染色体領域の2種の微小DNA断片を詳細にマップすることができた。本研究で用いた手法ならびに作製した雑種細胞は，今後の遺伝子マッピングや同染色体領域の解析に非常に寄与するものであり，この点で本研究は学位に値するものと考えられる。