



Title	遺伝子断片の新しい調製法およびその微生物における発現系の作製
Author(s)	千坂, 修
Citation	大阪大学, 1986, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35253
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・（本籍）	ち 千	さか 坂	おさむ 修
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	7 2 1 5	号
学位授与の日付	昭 和 61 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当		
学位論文題目	遺伝子断片の新しい調製法およびその微生物における発現系の作製		
論文審査委員	(主査) 教 授 松原 謙一 (副査) 教 授 内田 驍 教 授 谷口 維紹		

論文内容の要旨

（目 的）

現在遺伝子を断片化する為には、化学合成法もしくは制限酵素とエキソヌクレアーゼを併用する方法が一般的に用いられている。しかし前者は大きな断片の作成には適さず、後者は精密な領域の断片化には向いていない。そこで本研究では遺伝子の断片化の新しい方法を開発し、更に断片化された遺伝子を酵母中で発現させる系の作製を行った。

（方法ならびに成績）

本研究で新しく開発した方法は、GillamとSmithによって開発されたprimer directed mutagenesis法を応用したものである。まず、断片化した遺伝子全体を単鎖DNAフェージM13に組み込み、鋳型DNAとする。次に単離したい領域の先頭の配列を持ち、且つ鋳型DNAに相補的なドデカヌクレオチドを化学合成し、*in vitro* DNA合成のプライマーとする。次に単離したい領域の終わりから以降の部位に対応して3'末端がo-C1-phenylphosphate基で修飾されており、且つ鋳型DNAに相補的なドデカヌクレオチドを化学合成し、DNA合成のストッパーとして用いる。一本鎖鋳型DNA、プライマー、ストッパーをアニーリングさせ大腸菌のDNAポリメラーゼI Large Fragment (Klenow Fragment) を用いて、プライマーからストッパーの直前までの領域を二本鎖DNAに変換する。残った一本鎖部分はS1ヌクレアーゼで消化し、目的の領域を正確にコピーして得た二本鎖DNA断片をポリアクリルアミドゲルから回収する。この方法はDNA合成時の反応温度とポリメラーゼ濃度による影響が大きい。良好な結果を得る条件を検討したところ30℃以下、3－5 U/mlのポリメラーゼ濃度が必要であった。但し、このポリメラーゼ濃度はロットにより10倍程度の変動が見られた。この方法でテンプレートの約15%の二本鎖DNA断片が

得られた。

更に、分断化された遺伝子を酵母中で発現させるベクターの開発を行った。このため、先に宮之原らが開発したpAM81を改造し、抑制性酸性フォスファターゼのプロモーターの下流に開始コドンを持たない大腸菌の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入した。発現用のクローニング部位は β -ガラクトシダーゼN末端近傍のSalIサイトで、ここに開始コドンを持つDNA断片を挿入すると β -ガラクトシダーゼをC末側に持つ融合蛋白が産生される。このSalIサイト近傍のSmaIサイトに8bpもしくは10bpのリンカーを挿入し、3種類のコドンフレームに対応できるベクターもそれぞれ作成した。

この遺伝子の断片化法及び酵母における発現系を用いて、B型肝炎ウイルスの表面抗原遺伝子を分断し、酵母中で発現させた。 β -ガラクトシダーゼ活性を測定する事により、低リン酸培地中で約 10^6 分子/Cellの融合蛋白の産生が確認された。これらの融合蛋白は、 β -ガラクトシダーゼに対するアフィニティーカラムで精製できる。精製した融合蛋白の免疫原性などは現在検討中である。

(総括)

- (1) 遺伝子の新しい断片化法を確立した。この方法は化学合成法では困難な長さの断片にも適用できる。
- (2) 新しい酵母用の発現ベクターを作製した。このベクターからは β -ガラクトシダーゼと挿入されたDNA断片からのペプチドの融合蛋白が産生される。 β -ガラクトシダーゼは発現量のモニター、アフィニティーカラムでの精製、免疫時のキャリアーとして用いる事ができる。
- (3) この原理を用いて遺伝子の任意の領域を単離し、遺伝子もしくはそのコードする蛋白の機能解析を行う事ができる。

論文の審査結果の要旨

本論文で述べられた遺伝子を断片化する為の新しい方法は、非常にユニークな視点から考案されており、現在行われている方法の欠点をほぼ解消している。又、その中で用いるstopperも、自動合成機中で使える基質が開発されており、容易に調製できる。その為、この方法は一般的にかつ容易に用いる事ができる技術として確立されている。

更に、本論文に述べられた酵母での新しい発現ベクター系は性質の判然としないタンパクの精製や、タンパクドメインの機能解析に有用であり、今後多くのタンパク質への応用が期待できる。

以上本論文は非常に有用な技術の開発について述べたもので博士論文に値すると判定する。