OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	簡便なコスミドベクターの開発とその応用
Author(s)	大橋, 博
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36949
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【9】

氏名・(本籍)	大橋 博 (おおはし ひろし)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第8730号
学位授与の日付	平成元年5月19日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**簡便なコスミドベクターの開発とその応用**
論文審査委員	(主査) 教授 内田 驍 (副査) 教授 岡田 善雄　教授 上田 重晴

論文内容の要旨

(目　的)

コスミドベクターはラムダファージのコヒーシブエンドサイト(*cos*)を有するプラスミドベクターであり，約50キロ塩基対(kb)までの大きなDNA断片をクローニングでき，哺乳動物の遺伝子を単離するのに非常に有用である。本論文の目的は，第1にゲノムDNAを簡便にクローニングするために新しいコスミドベクターを開発すること，第2に開発したベクターを用いてコスミドクローニングの至適条件を確立すること，第3にジフテリア毒素(DT)耐性のペプチド鎖伸長因子2(EF2)遺伝子を我々のクローニング系を用いて単離することである。

(方法ならびに成績)

1) 新規コスミドベクターの作成。コスミドベクターpHC79から出発して，同一方向に*cos*を2個有するコスミドベクターpDC1とpDC104とを作成した。これらのコスミドベクターを用いると，ベクターアームが非常に簡便に調製できる。すなわち，ベクターDNAを連続的に*Pvu*II分解，ホスファターゼ処理，*Bam*HI分解することによって，右腕と左腕との等モル混合物を得ることができ，そのままインサートDNAと連結することができる。これらのベクターは30－50kbの*Sau* 3 AI，*Mbo*I，*Bam*HI，*Bgl*II断片を*Bam*HIサイトにクローニングできる。

2) コスミドクローニング至適条件。コスミドクローニングの効率に影響を及ぼす要因としては，ベクターとインサートDNAのモル比や，インサートDNAの質，大腸菌宿主などが考えられる。マウスゲノムDNAをインサートに用いて条件を検討した。クローニングの効率は，インサートに対するベクターのモル比に比例して上昇し，モル比が4～6で一定の値に達した。インサートとベクターの和であ

る全ＤＮＡ濃度が82－490ng／μlの範囲ではクローニングの効率はほぼ一定であった。ショ糖密度勾配遠心分画で得た40－50kbの *Sau* 3 AI断片を用いた場合のクローニング効率は，クローニング化した40－50kbの *Bam*HI断片を用いた場合の１／10であった。*rec*A欠損の大腸菌株ＨＢ101，ＥＤ8767，490A，ＤＨ１は，コスミドクローニングの宿主として広く用いられている。ＥＤ8767，490Aは，常にＨＢ101よりも１～2.6倍高いクローニングの効率が得られた。ＤＨ１を用いた場合には，ＨＢ101の場合とほぼ同じ効率が得られた。

３）ＤＴ耐性ＥＦ２遺伝子の単離と培養細胞での発現。ＤＴ耐性チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）変異株のゲノムＤＮＡに対するコスミドライブラリーをpDC104ベクターで作製した。ラットおよびＣＨＯのＥＦ２cDNAをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションでこのライブラリーをスクリーニングし，17個ポジティブクローンを得た。コスミドＤＮＡのサザンブロッティングによる解析から，４つのコスミドクローンcCEF２－６，cCEF２－７，cCEF２－９，cCEF２－16上に完全長のＥＦ２遺伝子が存在することが推定された。そこで，完全長の毒素耐性ＥＦ２遺伝子を含む組換え体コスミドを探すために，シュードモナスエルギノーサの外毒素Ａ（ＰＡ）に感受性のマウスLtk$^-$細胞にこれらのコスミドＤＮＡをリン酸カルシウム沈澱法で遺伝子移入し，毒素耐性の発現を調べた。まず，ＨＡＴ選択培地で選択し，ベクター上の *tk* 遺伝子を発現するトランスホーマントを得た。次にＰＡで選択した。２つのコスミドcCEF２－７とcCEF２－９とは，TK$^+$に形質転換したLtk$^-$細胞のおよそ30％にＰＡ耐性を与えた。さらに，cCEF２－７の8.7kb *Bam*HI断片をpDC104の *Bam*HIサイトにサブクローニングし（pCEF２－７），同様に遺伝子移入した。このプラスミドも同様にLtk$^-$細胞にＰＡ耐性を与えた。以上の結果より，コスミドcCEF２－７とcCEF２－９は完全長の毒素耐性ＥＦ２遺伝子を有すること，8.7kbの *Bam*HI断片上に毒素耐性ＥＦ２遺伝子が存在することが分かった。またこの遺伝子が毒素耐性の優性選択マーカーとして働くことが明らかになった。

（総　括）

我々が開発したコスミドクローニング系の有用性を毒素耐性ＥＦ２遺伝子の単離で実証することができた。ここで確立したクローニングの至適条件下で実験を行えば，哺乳動物のゲノムＤＮＡに対するコスミドライブラリーを容易に作製することができる。

論文の審査結果の要旨

大橋博は本博士論文の中で，①同一方向にcosを２個有する新規コスミドベクターの作成，②このベクターを用いてのコスミドライブラリー作製の至適条件の確立，③そして，応用例としてジフテリア毒素耐性のペプチド鎖伸長因子２（ＥＦ２）遺伝子の単離と発現を報告した。

本研究により，大橋博らが開発したコスミドクローニング系の有用性を毒素耐性ＥＦ２遺伝子の単離で実証することができた。ここで確立したクローニングの至適条件下で実験を行えば，哺乳動物のゲノムＤＮＡに対するコスミドライブラリーを容易に作製できることが期待される。したがって，大橋博の本博士論文は，医学博士の学位授与に十分値するものと考えられる。