

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	おお 大	はし 橋	ひろし 博
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	駿
	(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 *PvuII* 分解、ホスファターゼ処理、*BamHI* 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 *Sau3AI*, *MboI*, *BamHI*, *BglII* 断片を *BamHI* 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/ μ l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。*recA*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EF2 cDNA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のサザンブロットニ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フォーマントを得た。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。