

Title	毒素耐性EF-2遺伝子による培養細胞の in vivo 相同組換え測定系の確立とその応用
Author(s)	木戸, 充
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37170
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、 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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【23】

氏名・（本籍）	木 戸 充
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9 6 7 4 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	毒素耐性 EF-2 遺伝子による培養細胞の in vivo 相同組換え測定 系の確立とその応用
論文審査委員	(主査) 教 授 藤 尾 啓 (副査) 教 授 谷 口 維 紹 教 授 岡 田 善 雄

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

染色体の遺伝子と導入した遺伝子の間でおこる相同組換え (Gene Targeting) は、培養細胞の特定の遺伝子に変異を導入または修正でき、大変に重要だが頻度が非常に低い。そこで培養細胞での in vivo 相同組換え測定系を確立し、さらに大腸菌由来の相同組換え酵素 RecA を、培養細胞に注入しその機能を発揮させて、効率よく相同組換えが起こるようになることを目指した。

(方法ならびに成績)

[in vivo 相同組換え測定系の確立]

本研究室においてジフテリア毒素に耐性の変異を持つ染色体 EF-2 遺伝子 (チャイニーズハムスター由来) の全長がクローニングされていた。EF-2 はタンパク質合成に必須の因子でありかつ単一コピー遺伝子なので、この毒素耐性型 EF-2 遺伝子は、natural な positive selection マーカーとしてすぐれており、相同組換え (Gene Targeting) の良い指標となりうる。毒素耐性染色体 EF-2 遺伝子は 6 kb の長さで、13 エクソンからなる。毒素耐性の突然変異は第 11 エクソンに存在し、Gly から Arg へのミスセンス変異である。この遺伝子の第 1 エクソンを除き、また第 13 エクソンの下流 (3' 側) に第 2 の positive selection マーカーとして neomycin 耐性の遺伝子を挿入した (Δ EF-2^R-Neo^R)。このテストプラスミドは、染色体上の EF-2 遺伝子と相同組換えした時のみ、欠いている第 1 エクソンが補われ、細胞をジフテリア毒素耐性にする。at random な染色体上への integration では、毒素耐性を示さない。このテストプラスミド Δ EF-2^R-Neo を制限酵素で直鎖状にした後、電気パルス法にて 4.7×10^7 の CHO 細胞 (Chinese Hamster Ovary Cells) に transfect した。毒素および G418 の選択を行

い、両方に耐性（二重耐性）となった細胞クローンを17株得た。これらをサザンブロット法で調べたところ、8割以上のクローンで予期した通りの相同組換えが起こっていた。この系によって二重耐性になった細胞のクローンを数えることで、相同組換えの起きた細胞数を測定できることが明かになった。

（RecA タンパク質の核内導入）

培養細胞 *in vivo* 相同組換えの測定が可能となったので、大腸菌由来の相同組換え酵素 RecA を細胞に注入したときの効果を調べることにした。RecA タンパク質には核移行活性がなかったので、核内導入するため、カルボキシル末端に SV40 Large T 抗原の核移行シグナルとして知られる Lys-Lys-Lys-Arg-Lys を含む10残基のアミノ酸を遺伝子レベルで付加した (T-RecA)。T-RecA は SDS-PAGE において修飾したアミノ酸残基分だけ大きな分子量を示し、DNA 依存の ATPase 活性は失わず (*in vitro* 活性)、また *recA*⁻ 大腸菌の紫外線感受性を抵抗性へと回復した (*in vivo* 活性)。この活性を保持している T-RecA タンパク質を大腸菌から精製し、HEL 細胞 (human embryonic lung cell) にマイクロインジェクションしたところ、核に移行し、核内に局在することが確かめられた。

（総括）

本研究により、クローニングされていたジフテリア毒素耐性の変異をもつ genomic EF-2 遺伝子を利用して、natural マーカーによる培養細胞をもつ *in vivo* での相同組換え測定系を確立できた。また大腸菌の相同組換え酵素 RecA を活性を保ったまま効率よく培養細胞の核内に導入することに成功した。これらの結果により、バクテリアの RecA 活性を培養細胞で検定できることが可能になった。

論文審査の結果の要旨

培養細胞に遺伝子を導入した際、その遺伝子と相同性のある染色体遺伝子とが組換わる相同組換えは、 1×10^{-6} 以下の極めて頻度の低い現象であり、検出することさえ容易ではない。このような培養細胞における相同組換えを検出・定量化に成功した本研究は、細胞の相同組換え研究に基礎を与えるものであり、学位論文に値するものと考えられる。