

Title	Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli
Author(s)	長池, 和広
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49990
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

【37】

氏名	なが いけ かず ひろ 長 池 和 広
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 2 2 3 5 1 号
学位授与年月日	平成 20 年 4 月 21 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	Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in <i>Escherichia coli</i> (大腸菌における水痘帯状疱疹ウイルスのクローニング)
論文審査委員	(主査) 教 授 生 田 和 良 (副査) 教 授 松 浦 善 治 教 授 塩 田 達 雄

論文内容の要旨

〔目的〕

近年BACシステムを用いて多くのヘルペスウイルスの組換えウイルスが報告されている。BACとはBacterial artificial Chromosome (バクテリア人工染色体) の略で大腸菌の染色体複製機構を利用したクローニングベクターである。これまでのコスミドによるクローニングにはDNAの断片の長さに制限があったが、BACは300kb程度の外来DNA断片をも挿入できる。またBACは大腸菌内で非常に安定であり、F因子によって複製が制御されているため塩基配列の変異の可能性が非常に低い。よって本法を用いることによりヘルペスウイルスゲノムDNAを大腸菌内で維持することができ、かつ大腸菌内での遺伝子組換えが可能となっている。我々は水痘帯状疱疹ウイルスゲノムDNAのBACベクターへのクローニングを試み、以下の結果を得ることができた。

〔方法ならびに成績〕

1) 相同組換えを利用してBACベクターを水痘0kaワクチンウイルス原株のゲノムのORF11と12遺伝子の間に挿入し、その組換えウイルスを得ることができた。2) これらの組換えウイルスを薬剤による選択、限界希釈法を併用することによりメジャー化し、それらから環状のDNAを取り出し大腸菌DH10Bに導入した。3) この大腸菌より得られたコロニーを薬剤選択することにより水痘ウイルスゲノムを保持した大腸菌を得ることができた。4) この大腸菌よりDNA抽出し、HEL細胞にトランスフェクションすることにより水痘ウイルスに特異的なCPEを観察することができ、BACベクターに含まれるGFP遺伝子の発現も確認することができた。5) Cre/loxPシステムによってBACベクターを組換え水痘ウイルスから取り除くことができた。6) HEL細胞において水痘ワクチンウイルス原株とBACベクターを除いた組換え水痘ウイルスの増殖性を比較したところ同等であることが確認できた。

〔総括〕

これまでのところ、水痘0kaワクチン株は非常に安全性の高いウイルスであるのでこれをウイルスベクターとして用いた幾つかの報告がある。よって水痘ウイルスゲノムを保持した大腸菌を用いることによって大腸菌の遺伝学を利用することができ、それによって様々な組換え水痘ウイルスが迅速かつ簡便に作製することができると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年BACシステムを用いて多くのヘルペスウイルスの組換えウイルスが報告されている。BAC (Bacterial artificial Chromosome) とは大腸菌の染色体複製機構を利用したクローニングベクターである。BACシステムは長いDNA断片を挿入でき、大腸菌内で安定であり、塩基配列の変異の可能性が低い。よって本法によりウイルスゲノムDNAを大腸菌内で維持することができ、かつ大腸菌内での遺伝子組換えが可能となっている。

そこで本論文では、水痘帯状疱疹ウイルスゲノムDNAのBACベクターへのクローニングを試み、1) ウイルスゲノムをBACベクターへクローニングし、大腸菌内に保持させた。2) またBACシステムによるウイルスDNAを培養細胞に導入し、組み換えウイルスを産生させた。そこで、水痘ウイルスにおけるBACシステムの利用はこれまで煩雑であった組み換えウイルスの作成を迅速かつ簡便なものとし、水痘ウイルスの病原性発現機能や増殖性機能の解析ツールとして有用であることを示唆した。以上より、本論文は学位に値するものと認める。