

遺伝子クローン単離法

研究協力者 関 口 睦 夫

(九州大学・理学部)

1. 序

われわれは遺伝病の DNA 診断に必要な遺伝子クローンを単離するための一般的方法を確立することを意図した。

多くのヒト遺伝病においては特定の遺伝子または遺伝子群の欠損あるいは異常が要因として考えられているが、それらの遺伝子を同定、単離することは多くの場合、極めて困難である。従来はその遺伝子産物のアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチド・プローブ、あるいはその蛋白に特異的な抗体を利用して、目的の遺伝子の cDNA クローンを分離する方法が採られている。しかし当該遺伝子産物のアミノ酸配列が未知の場合や、特異抗体が得られていない場合には、このような方法は適用できない。

ある種の遺伝病細胞は正常細胞と区別できるような表現型、たとえば薬剤や放射線に対する感受性の増加を示すことが知られている。このような場合は、その感受性を正常型に復帰させる正常遺伝子の活性を DNA トランスフェクションによって検出し、転換細胞を選択することが原理的に可能である。本研究では、このような系において、目的の遺伝子移入を高感度でモニターし、その後の遺伝子クローニングを容易にさせるシステムの開発に成功した。

2. 方法、結果および考察

われわれはまず、培養細胞系で優性に選択可能なネオマイシン耐性遺伝子と、大腸菌のサプレッサー tRNA 遺伝子 supF とが同じ 1 本の EcoRI 断片上に位置するプラスミッドを作成した。この EcoRI 断片を連結した正常ヒト DNA を受容細胞にトランスフェクションし、ネオマイシン (G418) 耐性コロニーを得れば、それらは確実に外からの DNA を獲得した転換細胞である。このような細胞から目的の遺伝子の活性を示すものが特定できれば、その DNA をわれわれの開発したテトラサイクリン耐性遺伝子にアンバー変異を持つコスミッドベクター、pKT8 に組み込む。このライブラリーをテトラサイクリンを含む培地で選択すると supF 標識遺伝子を含む約 35,000 塩基対の領域が自動的にクローニングできる。得られたクローンの supF 遺伝子近傍に目的のヒト遺伝子が位置していることが期待できる。同じ原理に基づく λ ファージベクターへのヒト遺伝子のクローニングはすでに達成され、この方法の有効性は実証されているが、ここではコスミッドベクターの採用によってクローニング可能な領域を λ ファージの場合の数倍に拡張できた。この方法は特に、遺伝子産物が不明で用いる供与 DNA と受

容細胞が同一生物種に由来する場合に威力を発揮すると思われる。この方法はさらに、目的の遺伝子の産物は同定されていても、その転換細胞を直接選択できない場合に、ネオマイシン耐性コロニーの酵素活性を測定したり、ラジオイムノアッセイやセルソーターなどを併用することによって転換細胞を同定できるならば、広く多くの遺伝子について応用することも可能である。

以上のほか、マウスやハムスター由来の受容細胞を用い、ヒト DNA をトランスフェクトして特定の遺伝子を検出し、ヒト DNA に特異的な反復配列を標識として λ フェージやコスミッドベクターにクローニングする方法はすでに確立しており、われわれの研究室でもヒト胃癌に由来するトランスフォーミング遺伝子やハムスター細胞株の高温致死変異を相補するヒト遺伝子などがクローニングされつつある。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



1.序

われわれは遺伝病の DNA 診断に必要な遺伝子クローンを単離するための一般的方法を確立することを意図した。

多くのヒト遺伝病においては特定の遺伝子または遺伝子群の欠損あるいは異常が要因として考えられているが、それらの遺伝子を同定、単離することは多くの場合、極めて困難である。従来はその遺伝子産物のアミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチド・プローブ、あるいはその蛋白に特異的な抗体を利用して、目的の遺伝子の cDNA クローンを分離する方法が採られている。しかし当該遺伝子産物のアミノ酸配列が未知の場合や、特異抗体が得られていない場合には、このような方法は適用できない。

ある種の遺伝病細胞は正常細胞と区別できるような表現型、たとえば薬剤や放射線に対する感受性の増加を示すことが知られている。このような場合は、その感受性を正常型に復帰させる正常遺伝子の活性を DNA トランスフェクションによって検出し、転換細胞を選択することが原理的に可能である。本研究では、このような系において、目的の遺伝子移入を高感度でモニターし、その後の遺伝子クローニングを容易にさせるシステムの開発に成功した。