

大腸菌遺伝子のヒト培養細胞中での発現の試み

春日 徳彦

重篤な精神病として知られる Lesch-Nyhan 症候群は X 染色体の一部欠陥によって生ずることが報告されているが、近年この患者由来の細胞において、プリン代謝に関係する酵素の産生が欠除していることが明らかにされた。この酵素はグアニン、ヒポキサンチンを基質とする Phosphoribosyl transferase (HGPT) である¹⁾。高等動物ではこの種の酵素はこの HGPT のほかに、アデニンを基質とするもの (APT) との 2 種類があるが、細菌においては基質特異性がやや異なり、HGPT はヒポキサンチンを基質とする HPT と、グアニン、キサンチンを基質とする GPT とに分化がみられる²⁾。そしてこのうちの GPT の産生遺伝子である *gxu* (または *gpt*) は、サルモネラの染色体上の *pro A, B* の近傍に位置が決定されていて³⁾、大腸菌でもほぼその位置に存在すると考えられている⁴⁾。

この材料は遺伝子の普遍性という観点からの研究方向に有用であると考えられる。その一つは細菌の GPT または HPT 産生遺伝子を多量にあつめ、それを Lesch-Nyhan 症候群由来の培養細胞に移入し、酵素産生の回復をみることである。本報では染色体上の位置が明らかにされている *gpt* を目標とした。染色体上の特定の遺伝子を多量に得る方法としては、ファージとの組み換えによって得られる defective な ファージ粒子の増殖によるもの、あるいは F または R プライムのようにプラズミドを用いる方法などがある。前者はもし目的とする遺伝子をもつファージ粒子が得られれば、後の操作が非常に容易になるが、*gpt* 近傍に attachment site をもつファージがないとこの方法を適用することは困難である。ただし特殊な溶原化ファージを用いなくても *gpt* をプラズミド化させることができれば、それから P1-*gpt* のようなファージを得られる可能性もある⁵⁾。そこでまず *gpt* をプラズミド化することを志向した。この方向の研究では、近年 Eco RI のような制限酵素を用いる方法が極めて有用な方法として一般化しつつあるが、この場合でも細菌染色体とプラズミドを直接組み合わせると、後の形質転換の効率が低下するので、事前に *gpt* を増強しておくことができれば望ましいのは当然である。

Hashimoto らは R₁₀₀ をもつ大腸菌からテトラサイクリン感受性の変異株 30 株を得たところ、そのうち 3 株において R 因子は不安定で、高率に脱落することを報告した⁶⁾。この増殖の不安定な変異 R 因子をもつ株を長期保

存したところ、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cml*) が安定化した株がいくつか得られ、その安定化は *cml* が宿主染色体に組み込まれたことによるのを明らかにした⁷⁾。Iyobe らはテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet*) のみをもつ R 因子によって染色体に組み込まれた *cml* を pick-up し、R (*tet, cml*) を得たが、この時非常に低頻度で R (*tet, cml, pro A, B*) を得ることができると報告した⁸⁾。*gpt* が大腸菌においても *pro A, B* と密接に関連しているならば、この R プライムが *gpt* をもっている可能性があり、またもってなくても *gpt* で直接選択することによって同様な系で *gpt* をもつ新しい R プライムを分離することができると考えた。

材料と方法

菌株とプラズミド AB 1157/P₃ および AB 1157/P₁ は群馬大学医学部微生物学教室、伊予部博士より分与を受けた。P₃ プラズミドは最初に分離された R プライム、R (*tet, cml, pro A, B*) であり、P₁ は P₃ から *cml* の解離した R (*tet, pro A, B*) である。

gpt の発現をみるためには *E. coli* E 5014- χ 2 *thi, pur E (gpt-pro A, B-lac)* Δ および *Sal. typhimurium* E 66 *pur E (gpt-pro A, B)* Δ を用いた。R プライム伝達を受容株として、ナリジキシム酸耐性 (*nal*) を付与した変異株も用いた。

培地 主として minimal E グルコース寒天培地を用い、適宜プロリン、キサンチン、ヒポキサンチンを添加した。*pur E, gpt* 変異株は minimal E グルコース寒天培地上で増殖することはできないが、*hpt* が正常であればヒポキサンチンを加えることによって増殖させることができる。しかしキサンチン、グアニンを加えたのでは増殖できない。*gpt* をもっている R プライムをこれらの株に伝達させると、伝達株はキサンチンまたはグアニンを添加した minimal E グルコース寒天培地上で増殖できるようになる。

薬剤耐性の測定と伝達にはマツコンキー寒天培地に適当な糖を加えて用いた。

酵素活性の測定 Gots らの方法⁹⁾によった。

導入 P1*kc* を用い、Lonnox⁹⁾ に従った。

分子量の測定 P₁ プラズミド DNA の分子量測定はアルカリ性蔗糖密度勾配遠心法によった。対照として用いた R 因子は R₂₈ K¹⁰⁾ である。分子量の決定は Hudson

ら¹¹⁾ および Folkmanis らの方法に従った¹²⁾。

プラスミド DNA の分離 Brij 58 を用いて “Cleared lysate” を作製し、塩化セシウム-エチジウムブロマイド密度勾配遠心法によって ccc DNA としてプラスミドを分離した。これまでの報告^{13,14,15)} を組み合わせ、部分的に改良を加えた。DNA の定量は 260 nm の吸収によった。

形質転換 分離されたプラスミドの ccc DNA が遺伝的活性を保持していることを確認するために、E 5014- χ 2 株の形質転換をおこなった。受容菌を塩化カルシウムで処理する方法^{16,17)} を適用したが、前培養、熱処理、発現の段階に一部改良を加えた。

結 果

P₁ または P₃ プラスミドをもつ AB 1157 株を供与菌とし、ナリジキシム酸耐性の E 66 株を受容菌として伝達をおこなった。選択にはナリジキシム酸 (NA) とテトラサイクリン (TC), または NA とクロラムフェニコール (CM) を含むマツコンキー寒天培地を用いた。純培養後各々の伝達株 E 66 *nal*/P₁ および E 66 *nal*/P₃ 各 250 株について、伝達されたマーカーをしらべた。表 1 に示したように、P₃ では TC, CM 耐性と同時に *pro A, B* および *gpt* が、P₁ においても TC 耐性と同時に *pro A, B* および *gpt* が伝達されていた。これらのマーカーは再伝達でも解離することはなかった。P₁, P₃ プラスミドともに *gpt* をもっていることが明らかとなったので、のちの分離・精製にそなえ、小さい P₁ を以後の実験に用いることにした。

ついで AB 1157/P₁ から供与菌 E 5014- χ 2 株に P1 *kc* による P₁ プラスミドの導入をおこなった。選択したマーカーは *gpt* であって、選択平板はチアミン、プロリ

ン、キサンチンを含む minimal E グルコース寒天培地である。3 回の独立した実験で導入頻度はやや異なり、1.5~4.2×10⁻⁸であった。純培養後、表 2 に示したような数の導入株について、他のマーカーが同時導入されているかどうかしらべた。その結果 *pro A, B* および TC 耐性が *gpt* と同時導入されていることが明らかとなった。キサンチンを含まない培地上ではいずれの導入株も増殖できなかったことから、宿主染色体の *pur E* が導入されたものは、しらべた導入株中になかったことがわかる。

導入された P₁ プラスミドは接合による伝達能をもっていることを、受容菌 E 66 *nal* を用いて NA, TC で選択することで確認した。

図 1 はアルカリ性蔗糖密度勾配遠心の結果である。用いた株は P₁ および R₂₈ K プラスミドをともにもつ AB 1157 であり、DNA は ³H-チミジンでラベルされている。R₂₈ K はアミノペンシル・ペニシリン耐性のみをもつ R 因子であり、その分子量は Kontomichalou らによって 44 millions of daltons (Mdal) と報告されている¹⁰⁾。この図から計算される P₁ プラスミドの分子量は 70 Mdal である。フェージ P1 の DNA 分子量がほぼ 70 Mdal なので、この結果は、P₁ プラスミド全体が P1 *kc* によって伝達能も失なうことなく導入されたという表 2 の結果とも一致する。

図 2 に塩化セシウム-エチジウムブロマイド密度勾配遠心によって、P₁ プラスミドが ccc DNA として分離されることを示した。2 l の AB 1157/P₁ 株培養液に、別に ³H-チミジンでラベルした 10 ml の培養液を加え、それを試料とした。遠心後エチジウムブロマイドで染色された 2 本の DNA バンドを観察することができるが、管底に近いバンド、図 2 では Fraction No. 13 をピークとする部分が ccc DNA であり、上部のバンドは環状ま

表 1 P₁, P₃ プラスミドのもつ遺伝子

Strains	Mac. -gal		Minimal E-glu			
	TC, NA	CM, NA	Pro, Xa	Pro, Hx	Xa	Hx
E66 <i>nal</i>	-	-	-	+	-	-
E66 <i>nal</i> /P ₁	+	-	+	+	+	+
E66 <i>nal</i> /P ₃	+	+	+	+	+	+

表 2 *gpt* と他の遺伝子の同時導入

実験番号	検査した導入株数	Minimal E-glu, thi			Mac. TC
		Pro, Xa	Xa	Pro	
1	79	79	79	0	79
2	50	50	50	0	50
3	80	80	80	0	80

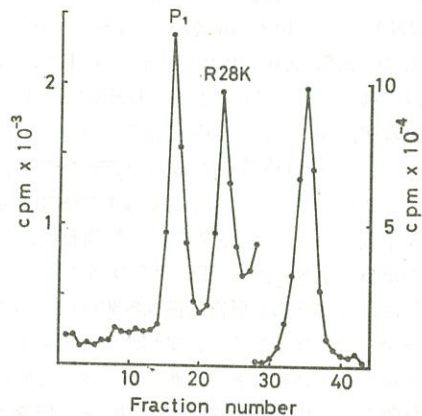


図 1

考 察

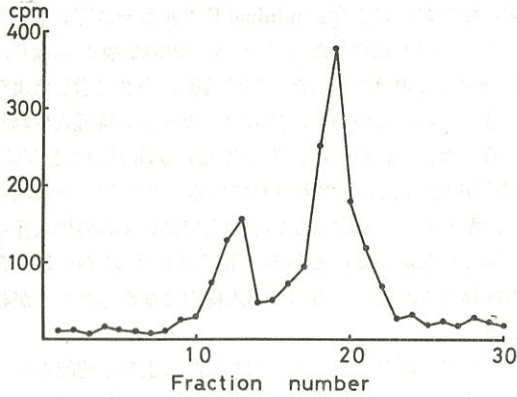


図 2

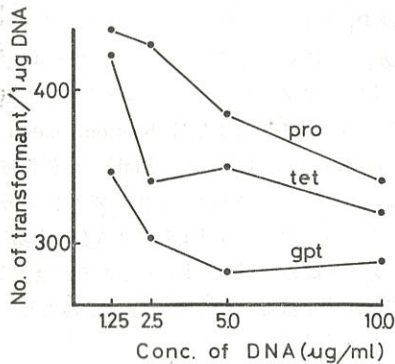


図 3

は線状 DNA である。2 l の培養液から最高 800 µg の ccc DNA を得ることができた。この時の 280 nm と 260 nm の吸収の比 A_{280}/A_{260} は 0.51 であった。

ここで得られたプラスミドの ccc DNA が遺伝的活性をもっていることを形質転換で確認した。受容菌は E 5014- χ 2 で、TC 耐性、*pro* および *gpt* のすべての遺伝子で選択した。供与菌数あたりで表わした形質転換の頻度は、DNA 濃度が 10 µg/ml のとき $4 \sim 5 \times 10^{-6}$ であった。1.25, 2.5, 5.0, 10.0 µg/ml の各 DNA 濃度において得られた形質転換株の数を、DNA 1 µg あたりで表現したのが図 3 である。DNA 濃度を 5.0, 10.0 µg/ml にすると、1 µg DNA あたりの形質転換株の数が低下することから、このプラスミドでは 1.25~2.5 µg/ml の DNA 濃度のとき、十分な効率で形質転換がおこることがわかる。*gpt*, *pro*, TC 耐性の各々のマーカーで選択したとき得られた形質転換株各 30 株について他のマーカーをもっていることがわかった。さらに形質転換株を供与菌とし、 P_1 を E 66 *nal* 株に接合で伝達させたところ、伝達能をもっていることがわかった。

大腸菌遺伝子をヒト培養細胞中で発現させる試みは、ガラクトース血症患者のファイブプロラスト培養においてなされている¹⁸⁾。ガラクトース血症患者の細胞は α -D-galactose-1-phosphate uridyl-transferase を産生することができない。大腸菌におけるこの酵素の産生遺伝子は *gal T* である。 λ p gal の DNA、またはファージ粒子そのままを培養細胞に与えると、この酵素産生の回復がみられるという。しかしこの報告にはいくつかの点で疑問が持たれているようである。

ところで P_1 プラスミドは *gpt* をもっていた。 P_1 および Col E1 プラスミドを用いて Eco RI 処理により、Col E1-*gpt* プラスミドを得ること、あるいはファージ P_1 -*gpt* を得ることのできる可能性もある。これらが得られれば、*gpt* をもつ DNA を更に容易に得ることができよう。しかし现阶段でも形質転換に必要な量のプラスミド DNA を分離するのは困難ではない。得られた P_1 プラスミド DNA を Lesch-Nyhan 症候群患者由来の培養細胞に移入する場合、DNA を受け取り、*gpt* を発現した細胞を選択するのに、培養液として HAT 溶液を用いることを計画している。この溶液はアミノプテリンを含んでいるので、IMP と TMP の合成が阻害されるが、ヒポキサンチンとチミジンを添加してあるため、正常細胞はこの溶液中で増殖することができる。Lesch-Nyhan 症候群患者由来の細胞は HGPT を産生しないのでヒポキサンチンを利用できず、HAT 溶液中で増殖することができない。この細胞が *gpt* を含む DNA 断片を受け取り GPT を産生すれば、ヒポキサンチンを IMP に交換できるようになるので、HAT 溶液中で増殖できるようになるはずである。目的とする遺伝子を受け取った細胞を直接選択できる可能性がある点で、ガラクトース血症患者由来の細胞を用いるより有利であると考えられる。

細菌の遺伝子をヒト培養細胞中で発現させることができた場合、その発現の持続性、宿主染色体に外来遺伝子が組み込まれるか、あるいはプラスミドとして存在するのか、という存在様式の問題など、極めて興味ある研究主題が、次に追求するべきものとして生ずることが期待される。

P_1 および P_3 プラスミドの使用を許可して下さった群馬大学医学部微生物学教室、伊予部志津子博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Seagmiller, J. E., F. M. Rosenbloom and W. N. Kelley. 1967. Science 155 : 1682-1684.

- 2) Gots, J. S. and C. E. Benson. 1973. Purine Metabolism in Man **41A** : 33-39.
- 3) Gots, J. S., C. E. Benson and S. R. Shumas. 1972. J. Bacteriol. **112** : 910-916.
- 4) Hoppe, I. and J. Roth. 1974. Genetics **76** : 633-654.
- 5) Mise, K. and W. Arber. Japan. J. Bacteriol. **30** : 358.
- 6) Hashimoto, H., S. Iyobe and S. Mitsuhashi. 1969. Japan. J. Microbiol. **13** : 343-349.
- 7) Iyobe, S., H. Hashimoto and S. Mitsuhashi. 1969. Japan. J. Microbiol. **13** : 225-232.
- 8) Iyobe, S., H. Hashimoto and S. Mitsuhashi. 1975. Japan. J. Bacteriol. **30** : 547-548. (in Japanese)
- 9) Lennox, E. S. 1955. Virology **1** : 190-206.
- 10) Kontomichalou, P., M. Mitani and R. C. Clowes. 1970. J. Bacteriol. **104** : 33-44.
- 11) Hudson, B., D. A. Clayton and J. Vinograd. 1968. Cold Spring Harbor Symp. Quaut. Biol. **33** : 435-442.
- 12) Falkmanis, A. and D. Freifelder. 1973. Biochem. Biophys. Res. Comm. **51** : 645
- 13) Humphreys, G. O., G. A. Willshaw and E. S. Anderson. 1975. Biochim. Biophys. Acta **383** : 457-463.
- 14) Guerry, P., D. J. LeBlanc and S. Falkow. 1973. J. Bacteriol. **116** : 1064-1066.
- 15) Godson, G. N. and R. I. Sinsheimer. 1967. Biochim. Biophys. Acta **149**:476-488.
- 16) Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. 1972. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **69** : 2110-2114.
- 17) Hershfield, V., H. W. Boyer, C. Yanofsky, M. A. Lovett and D. R. Helinshi. 1974. *ibid.* **71** : 3455-3459.
- 18) Merrill, C. R., M. R. Geier and J. C. Petricciani. 1971. Nature **233** : 398-400.