

II. DNA実験

実験の目的

DNA を実感し、その働きを理解する。

実験の内容

(A) DNA を抽出し、観察する。

(B) 形質転換（組換え DNA）実験を行い、DNA の働きを調べる。

実験スケジュール

第一日目：大腸菌を形質転換する。

第二日目：DNA を抽出し、DNA を見る。

実験についての注意事項

○実験室に入る際の注意—上履きなど

実験室は土足禁止となっていますので、各自持参した上履きまたはスリッパを履いてください。実験室ではいろいろな薬品を扱うので、白衣を着ます。白衣は用意してあるものを貸し出します。この白衣は今回の実験の間中、同じものを着用しますので、自分に決められた白衣の番号を覚えておいてください。

実験の際は備え付けてある使い捨てゴム手袋をつけて下さい。

○実験室の機材に触れる際の注意

実験室の機械には危険なものや細かい調整をしてあるもの、滅菌してあるものなどがあります。特に手袋をしていないときはまわりの機器にむやみに触れないように注意してください。また、機械は許可なしでは絶対に動かさないようにしてください。

○異常が起きた際にはスタッフに

実験室で、何か異常と思われることが起きた場合には、直ちにスタッフに知らせて下さい。

○実験の際の注意

△ヌクレアーゼの注意

DNAやRNAなどの核酸は、核酸分解酵素によって分解されます。核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）は人間の皮膚や唾液など、いたるところに存在します。そのため、実験の際は使い捨てのゴム手袋を着用してください、その手袋の表側は、可能な限り周りに触れないようにし、実験室外に出る場合はこれを外してからできるようにしてください。また、素手で実験器具に触れないようにも心掛けて下さい。

△毒性のある薬品に対する注意

実験では、毒性のある薬品や腐食性のある薬品などを使用します。使用する薬品に対する注意を聞きもらさないことはもちろん、フタを開けたまま放置したり、素手で扱ったりすることがないように、十分に注意を払ってください。

△無菌操作に関する注意

私達の周囲には目に見えない細菌やカビ等が無数に存在します。このカビ等が実験に使用している試料や薬品に混入すると、培養時にこれらの菌がふえてきたりして失敗の原因となります。従って、なるべくこれらの雑菌やカビが混入しないようにするため、以下のことに注意してください。

○：滅菌済みの器具や使い捨ての器具は素手でさわらない。

○：培養液などのフタを開けている時間はなるべく短く。開ける前にガスバーナー等で軽くあぶって滅菌する

○：使い捨ての器具は使用後はすぐに捨てる。

○：寒天培地はシャーレのフタを下側にして保存、インキュベーションを行う。

組換えDNA実験の指針と安全管理

組換えDNAは、自然界にもともと存在しない組み合わせのDNAを持っています。このため、予測できない危険性を含んでいることを知っておいて下さい。

旧文部省「大学等における組換えDNA実験指針」(平成10年度4月)と東京学芸大学「東京学芸大学組換えDNA実験安全管理規定」(平成12年3月)では、組換えDNA実験を行う際に、その組換え体の実験室の外に漏れ出ることが無いように指針を定めています。今回の実験も、この指針にしたがって行います。

・物理的封じ込め

組換えDNA実験において組換え体を施設、設備内に封じ込めることにより、外界への拡散を防止することが目的であり、P1～P4レベルが定められている。

P1:

- ① 実験室の窓は開けない
- ② 機械的ピペットを使用すること
- ③ 実験室内で飲食及び化粧は行わない
- ④ 実験操作は飛沫を飛び散らせないようにていねいに行う
- ⑤ 実験前後に実験台の上をアルコールで消毒する
- ⑥ 実験室から出る際は手を洗う
- ⑦ 組換え体の付着した実験器具は全て滅菌してから廃棄する(滅菌はこちらで行います)

P2:P1に安全キャビネットを加える

P3:P2に以下を加える

- ① 実験区域を設け、前室は両方が同時には開かない扉を前室にもち、更衣室を整える
- ② 安全キャビネットを厳重にして外界にもれないようにし、フィルターの厳重点検をする

P4:P3に以下を加える

- ① 組換え体を取り扱うためのクラスⅢの安全キャビネットを設置する
- ② 特別な実験区画において生命維持装置によって換気され、陽圧に維持されること
- ③ 上下続きの実験着を着用すること。
など

今回の実験はP1レベルの実験ですのでP1レベルに書かれている規定を厳守してください

・生物学的封じ込め

組換え実験において特定の宿主－ベクター系を用いることにより、組換え体の環境への伝播、拡散を防止することが目的であり、B 1、B 2 レベルが定められている。

B1

自然条件下での生存能力が低い宿主と宿主依存性が強く、他の細胞に移行しにくいベクターを組み合わせて用いることにより、組換え体の環境への伝播、拡散を防止できると認められる宿主－ベクター系、又は遺伝学的及び生理学的性質並びに自然条件下での生態学的挙動に基づいて人類等に対する生物学的安全性が高いと認められる宿主－ベクター系については、その生物学的封じ込めレベルはB1レベルとするものとする。

B2

B1レベルで規定する宿主－ベクター系のうち、自然条件下での生存能力が特に低い宿主と宿主依存性が特に高いベクターを組み合わせて用いることにより、組換え体の環境への伝播、拡散を防止できると認められる宿主－ベクター系については、その生物学的封じ込めレベルはB2レベルとするものとする。

今回使用する大腸菌(K12株)とプラスミドの組み合わせは、特定栄養下でないと生育できないという生物学的封じ込めを行った実験材料を用いています。

(A)

『DNA を見る』 DNAの抽出・観察

DNAを抽出し、自らの目で確かめ、手で触れてみる。自分の身体にあるDNAもこのようなものであることを実感する。

DNAの抽出・観察実験

例1. 鳥のレバーのDNA抽出

目的:ニワトリのレバーからDNAを取り出し、DNAを実際に目で見てみる。

実験法

特. 準備

1. 材料

凍らせた鳥のレバー

ブロッコリーでも可。芽の部分を使って下さい。

2. 薬品・器具

2 mol/l食塩水、エタノール（95%以上）、氷

ミキサー（あるいは、おろし金、乳鉢・乳棒）、ガーゼ、ビーカー、ろ紙、漏斗、薬さじ、ミニ薬さじ、ガスバーナー、三脚、石綿金網、試験管ばさみ

(監) 実験手順

1. 凍らしたトリのレバー100g、洗剤液（台所用中性洗剤を1押ししたもの）150ml、氷50gをミキサーに入れ、2分間連続運転で粉碎する。

（ブロッコリーの場合、1塊のブロッコリーに対して70mlの洗剤液、30gの水。4分間の連続運転。）

ミキサーがない場合は、次の方法でもできる。

凍らせた鳥のレバーをおろし金でおろす（1匹分（50g程度）の半分ぐらいをおろす）。



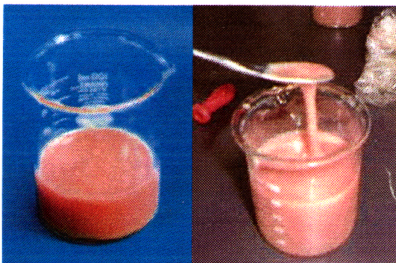
洗剤液を10～15ml加えて、乳鉢・乳棒を使ってよくすりつぶす。

3. 食塩水を等量（それまでの全量に対して）加えて、軽く混ぜる。

食塩水を加えると急に粘性があがる（食塩水の終濃度が1～2mol/Lの間に収まるようにする）。

（ブロッコリーの場合は、水分が多いので、食塩を直接加えて終濃度が1～2mol/Lの間になるようにする）もし、このときにどろっとした状態にならなかった場合は、やり直した方が無難である。

食塩は、タンパク質とDNAの結合を切ると考えられている。



ここまでの過程では、DNaseのはたらきにより、DNAが壊されていく。手早く行うこと。目安としては、5分程度。
湯煎の準備をしてから、実験を始めないとうまく行かない。

4. ビーカーに移した後、100℃で5分湯煎する。



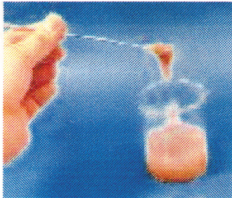
タンパク質が凝固し、レバーの色が赤色から白色に変化するまで加熱する。この時、DNAは壊れやすい状態である。優しく扱うこと。

5. 手で触れるようになったら、四枚重ねのガーゼで濾過する。



この段階では、DNAの粘性が高すぎて、ろ紙では濾過しにくい。そこでガーゼでろ過する。固形物がガーゼを通り抜けることもあるが、あまり気にせずにしっかり搾ること。この段階での収量が悪いと、最後にDNAがでなくなることがあるので要注意。

6.ろ液を良く冷やして、冷エタノールを静かに入れ、ミニ薬さじを逆さにして、静かにかき混ぜる。



エタノールは予め氷冷しておく。
加える量は、溶液の2～3倍体積。入れすぎても全く問題ない。
DNAは繊維状になるのでガラス棒に巻き付いてくる。この段階では多くの不純物が含まれている。写真のような色の方が望ましい。

もし、もっと薄い色（黄色から白色）の場合は、量が少ないと考えていいと思う。それでも気を付ければ最後までいけるが油断すると無くなってしまいますので要注意。

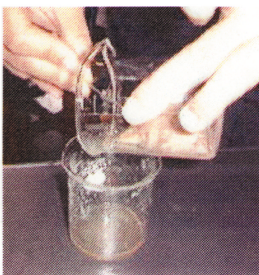
すべて巻き取った後、もう一度かき混ぜてみる。塩溶液とエタノールが接触していないと沈殿しないので、そこの方にまだ溶けたままのDNAが残っていることが多い。

DNAはエタノールには溶けないので、エタノールを入れると沈殿する。温度が低い方がより溶解度が下がるので、温度をできるだけ下げて沈殿させる。

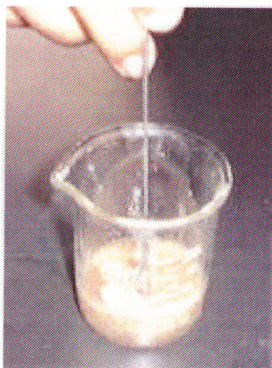
7.巻き取ったものを別のビーカーに入れ、食塩水を20～30ml程度加えてよく溶かす。



このときも、不純物の混入はあまり気にせず収量を多くするようにする。



巻き取ったときについてきたエタノールはなるべく取り除く。エタノールが残っていると、食塩水に溶けないので、最後に消えてしまうことになる。



よく溶かす

8.再び湯煎する。

湯煎しながらかき混ぜるのだが、優しくかき混ぜること。

9.濾過する



熱いうちにろ過した方が粘性が低いので濾過しやすい。

10.ろ液を良く冷やしてから、冷エタノールを静かに入れ、ガラス棒で静かにかき混ぜる。

濾過しながら冷やすと良い。

加えるエタノールは、塩溶液の2～3倍体積。入れすぎても問題ない

ろ液とエタノールの境界面に白い雲のような沈殿が見えるはずである。ゆっくりとかき混ぜると、透明から白色のDNAが巻き付いてくる。

量が少ない場合は、できるだけ静かにエタノールを注いで、しばらくそのまま待ってみる。

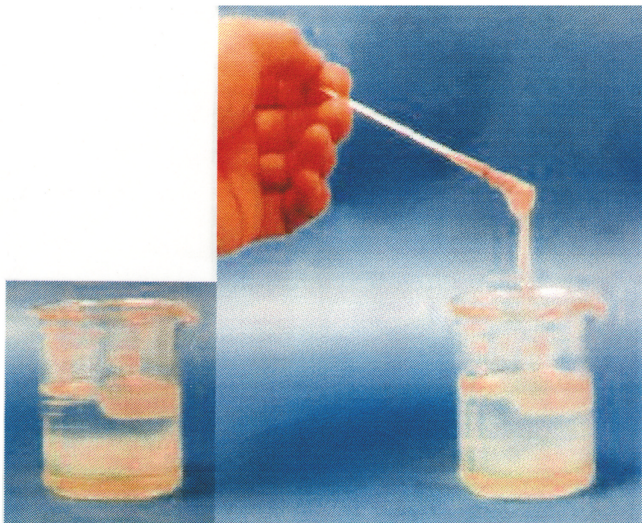
ビーカーを静かにゆらして境界線に注目してみると、少量のDNAができている場合がある。

揺らしながら混ぜていくと沈殿が増えることもある。

このような場合に最初からかき混ぜてしまうと、見失ってしまうことがある。

何故かはわからないが（知っている方は教えて下さい）、エタノール沈殿させると気泡が生じる。

かき混ぜないで、そのまま放置しておくと、気泡によって上昇してくる。



この実験方法は埼玉県立川越女子高等学校
森田保久先生によって開発されたものです

鶏レバーからのDNAの抽出（ミニ化したもの）

(まず最初に湯煎の準備をする)

鶏レバー25 g、洗剤液37.5 ml、氷12.5 g

↓

ミキサーで2～3分連続破碎（全量約75 ml）

↓

等量の2 M NaClを加える（原液75 ml+2M NaCl 75 ml=150 ml）

↓ （200 mlビーカーを用いる）

100℃で5分間熱する（しっかり加熱する）（タンパク質変性）

↓ （ビーカーを軍手でもってガラス棒で静かに回す、レバーの色が赤色から白色になったら次へ）

氷で冷やす

↓ （溶液が手で触れられるようになったら）

4枚重ねのガーゼで絞り出す（しっかり絞る）（タンパク質除去）

↓ （ここでは200 mlのビーカーに絞り出す）

ろ液（約100 ml）、良く冷やす（アイスボックスで）

↓

冷エタノールを2倍量（200 ml）加える（全量300 ml）（DNAの沈澱）

↓ （300 mlのビーカーを使う）

白色の沈澱ができる（DNAが沈澱してくる）

↓

DNAと思われる物をガラス棒でビーカーに巻取る（DNAの分離）

↓ （この時エタノールはできるだけ除く——紙で吸い取る）

2M NaCl 25 mlを加え熱し、静かにかき混ぜる（DNAの精製）

↓

ろ過（熱い内にろ過するのが良い——冷えると粘性が増してろ過しにくい）

↓ （ろ液は100 mlのビーカーに落とす。ビーカーはアイスボックスにセットしておく）

冷エタノールを2倍量（50 ml）加える（静かにガラス棒で攪拌する）

↓ （全量75 ml）

白いDNAをガラス棒で巻取り、DNAを実感する（DNAの観察）

（小林 興）

例2 ホウレンソウのDNAの抽出

目的：ホウレンソウの細胞が持っているDNAを取り出し、DNAを実際に目で見てみる。

用意する道具

乳ばち、乳棒、50ml ファルコンチューブ12本、駒込ピペット(5～10ml)3本

用意する試薬

- ・緩衝液[3mM 酢酸マグネシウム, 3mM トリス (pH7.4), 3mMEDTA, 5mM メルカプトエタノール] 100ml
- ・フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) 50ml
- ・エタノール 250ml
- ・クロロホルム 50ml

1：ホウレンソウおよそ30g を乳ばちですりつぶし、それに緩衝液100ml を加えます。

○ホウレンソウの細胞を壊して、中身を取り出します。緩衝液とは、細胞の中の環境に似せた水溶液で、植物や動物の細胞からDNAやタンパク質などを取り出したことでDNAやタンパク質が壊れないようにするために使います。

2：フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを50ml 加え、よく混ぜます。

○この溶液は、水（緩衝液）と混ざりません。混ざったかのように見えますが、そのままおいておくと別れてきます。そして、フェノールはタンパク質を変性させ、不溶化します。この性質を利用して、タンパク質を取り除き、DNAだけを分離しようとしています。

3：ファルコンチューブ4本に分け、冷却遠心機を用いて3000rpm, 20分間遠心します。

○クロロホルムの比重が大きいため、そのまま置いておいてもフェノールと水は分離しますが、遠心をかけることによってより早く分離させることができます。

○このとき、分けた4本のチューブが同じ重さになるようにバランス（天秤）で調節して遠心機にかけてください。

4：上清を新しいファルコンチューブに移します。

- 上清を駒込ピペット（5～10ml）を用いて50ml ファルコンチューブに移します。下の層（フェノール層）をとらないように注意してください（とった層は水層で、そこにDNAが溶けています）。

5：4のファルコンチューブに、クロロホルムをそれぞれのチューブごとに12.5ml 加え、ボルテックスでよく混ぜます。

- この操作は上清に残っているフェノールを取り除くためです。
- クロロホルムは直接においを嗅がないように注意して下さい。

6：冷却遠心機を用いて3000rpm, 20分間遠心して、上清を新しいファルコンチューブに移します。

- 上清を駒込ピペットを用いて50ml ファルコンチューブに移します。下の層（クロロホルム層）をとらないように注意して下さい。

7：その上清に、あらかじめ氷で冷やしておいたエタノールを250ml 加え、よく混ぜます。

- DNAはエタノールに溶けないので白い糸状のものとなって現れます。

(B)

『DNA の働きを知る』 組換え DNA 実験

組換えDNA実験を行うことにより、DNAがどのような働きをしているかを考え、その重要性（遺伝子の本体であること）を知る。

実験 2．組換え DNA 実験

形質転換（組換え DNA）実験をしよう。

◆ Lesson 1 遺伝子組換えについて

この実験で、遺伝子組換え実験として知られている工程を学びます。使用する遺伝子は DNA の一部分で、その DNA は、その生物特有の性質を表すタンパク質を作り出すもとになります。遺伝子的な形質転換は、文字通り、遺伝子によってその性質を変えることを意味し、そこには性質を変えるために他の生物の遺伝子を挿入することも含まれます。形質転換は、バイオテクノロジーにおいて、広範囲に使われています。農業の分野では、霜や病害虫、干ばつに耐えるための遺伝子を導入します。環境科学では、流出した原油を分解できる性質を持つように遺伝子が導入されます。医療では、欠陥遺伝子が引き起こす病気の治療をするために、患者の細胞に健康な人の遺伝子を取り込ませる、遺伝子治療が始められています。

人間や動物、植物の DNA から一部分を切り取って、バクテリアの細胞中に取り込ませることができます。例えば、バクテリアにホルモンインシュリンをコードした健康な人の遺伝子を取り込ませることができ、そのバクテリアは、ある環境に置くと人のインシュリンと同じインシュリンを作り出すことができます。こうして得られたインシュリンは、治療のために、糖尿病の患者へ投与することができます。

このキットでは、Green Fluorescent Protein (GFP) をコードする遺伝子をバクテリアに導入します。この遺伝子は、蛍光を発する、オワンクラゲの DNA から切り取ってきたものです。オワンクラゲが暗闇の中で光を発することができるのは、この遺伝子がコードしている Green Fluorescent Protein が存在するからなのです。形質転換の各段階に従って、バクテリアは今まで持っていなかった、クラゲの遺伝子を発現させて、紫外線を当てると明るく緑色に光るタンパク質をつくりだします。

この実験で、プラスミドを使って、ある生物から別の生物に遺伝子を組み込む手法を学びます。バクテリアは染色体遺伝子の他に、プラスミドと呼ばれる比較的小さな環状の DNA を持っています。

通常、プラスミド DNA は、バクテリアが生き延びるのに有益かもしれない 1 つ以上の機能を持つ遺伝子を含んでいます。通常、これらの有益な遺伝子をバクテリア同士が共有するために、プラスミド DNA を細胞内に取り込んだり、外へ放出したりします。バクテリアは新しい環境に順応するために、このメカニズムを利用します。最近話題になっている、抗生物質耐性バクテリアは、こうして生まれてきたのです。

pGLO プラスミドは Green Fluorescent Protein (GFP) の遺伝子と、抗生物質アンピシリン耐性のための遺伝子が含まれています。また、pGLO は取り込まれた細胞中で、GFP の発現が糖の一種、アラビノースの有無によりコントロールされるように作成されています。このように、他の機能を持つ遺伝子を組み込まれた遺伝子を組換え DNA と言います。

新しい遺伝子を取り込んだ後、培養される寒天培地の中にアラビノースが含まれていると細胞は蛍光を発し、アラビノースが含まれていない培地では白く（もともとの細胞の色）見えることでしょう。ここではじめて、遺伝子発現調節とセレクションのメカニズムを、目で見ることにより簡単に体験することができるのです。

キットには、遺伝子組換え実験のために必要な試薬や器具、プロトコールがついており、このキットを使用す

ることで、

1. 遺伝子組換え実験を体験する
ことを目的としています。

2. 実験の成否を評価する方法を学ぶ

◆ Lesson 1 質問（実験を始める前に）

科学的な実験を計画する時には、よく考えておかなければいけない課題がたくさんあります。遺伝子組換え実験に挑戦する前に、よく考えてみてもらいたいことがいくつかあります。

以下の質問に対する答えのヒントが得られるように、実験は組まれていますので、まず第一歩として実験のポイントをまとめておきましょう。

< 学習 1 どんな生物に形質転換できるでしょうか？ >

1. ある生物に形質転換させるために、どの細胞にも新しい遺伝子を導入しなくてはなりません。遺伝子を導入し、形質転換させるために都合が良いのは、たくさんの細胞できている生物と、1 つの細胞できている生物のどちらですか？

2. 次に、自分達が形質転換させた生物の子孫やそれ以降の代まで、新しい性質が遺伝しているかどうか確認しようと思います。これを確認するためには、早い培養時期の細胞と、ある程度時間が経ったあとの培養細胞のどちらがよいですか？

3. どのような生物を実験に使用するかを決定する場合、その生物の安全性が重要なポイントの 1 つになります。私達や環境へ害にならないためには、実験生物はどんな性質や特徴があることが、またはないことが必要でしょうか？

4. 以上のことをふまえると、細胞に遺伝子を組込み、形質転換させるのに利用する生物は、バクテリア、昆虫、魚類、マウスのうちどれが一番適していると思いますか？その理由も述べてください。

< 学習 2 遺伝子組換えが行われた細胞はどうなる変わるでしょう? >

1. 遺伝子組換えは、生物の性質(目で見える性質)を変えること、と言い替えることができます。生物の性質変化を検出する前に、元々の性質を観察しておく必要があります。まず、スタータープレートの大腸菌コロニーを観察してください。気がついた性質や特徴をできるだけたくさん述べてください。

次に挙げる、形質転換前の大腸菌の様子は、形質転換が起こったとを確認するために、重要なデータとなります。

1-a. コロニーの数

1-b. コロニーの大きさ ; 一番大きなコロニー

一番小さなコロニー

コロニーの平均的な大きさ

1-c. コロニーの色

1-d. プレート上に生えたコロニーの分布のしかた

1-e. UV ランプを当てたときのコロニーの様子

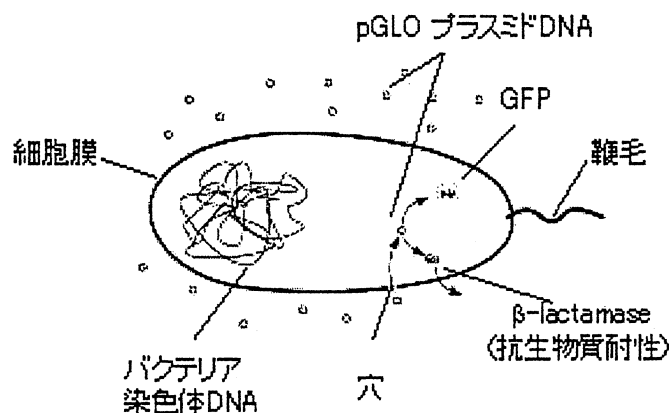
1-f. アンピシリンのような抗生物質を含むプレート上での生存、増殖能力

2. 大腸菌に対するアンピシリンの影響を調べるために、LB 培地のみの寒天培地プレートとアンピシリンを含むプレートの 2 枚を、どの様に利用したら良いですか?

3. 結果 ; 2. で予想した実験結果から、アンピシリンは大腸菌に対してどのような影響を与えていると思いますか?

< 学習 3 遺伝子 >

遺伝子組換えには、大腸菌の細胞内に新しい DNA を取り込ませる操作(遺伝子導入)が含まれます。バクテリアは1つの大きな染色体遺伝子の他に、プラスミドと呼ばれる、環状 DNA を1つ以上持つことがよくあります。通常、プラスミド DNA は最低でも1つのある性質や特徴を有するための(コードする)遺伝子を含んでいます。それを利用して、その細胞がもともと持っていない性質や特徴を持たせるために、目的の性質や特徴をコードする遺伝子を細胞に取り込ませる操作を研究者は行います。これも遺伝子工学と言われる、一つの実験手法です。今回の実験では、緑色蛍光タンパク質、GFP をコードする遺伝子と、抗生物質に対して耐性のある細胞にするための遺伝子(*bla*)を含む、pGLO プラスミドを使用します。遺伝子学的に設計されたプラスミドは新しい性質や特徴を持たせるために、バクテリアに導入されます。



< 学習 4 遺伝子組換え実験 >

この実験で行う遺伝子導入の過程は主に3つのステップで行われます。これらのステップは大腸菌の細胞内にプラスミド DNA を取り込ませ、新しく獲得した遺伝子を発現させるための環境を与えるために行われます。

プラスミド DNA、pGLO が細胞膜を通過するために、

1. CaCl_2 (塩化カルシウム)を含む形質転換用緩衝溶液を使用します。
2. ヒートショックと呼ばれるステップを行います。

そして、遺伝子導入した細胞をアンピシリン存在下で生育させるために、

3. 栄養となるものを与え、新しく獲得した遺伝子を発現させるために、短時間のインキュベーション(アンピシリン無で)をします。

◆ Lesson 2 遺伝子導入実験

＜使用する試薬・器具の一覧＞

実験を始める前に、次のリストにある試薬や器具等がそろっているかどうか確認してください。

準備するもの/一人分

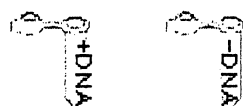
大腸菌スタープレート(LB)	1枚	☐
寒天培地プレート	4枚	☐
(LB×1、LB/amp×2、LB/amp/ara×1)		☐
形質転換用緩衝液	1本	☐
LB培地	1本	☐
植付け用ループ	1パック	☐
ピペット	5本	☐
チューブ立て	1つ	☐
クラッシュアイスボックス	1つ	☐
マーカーペン	1本	☐

準備するもの/共通

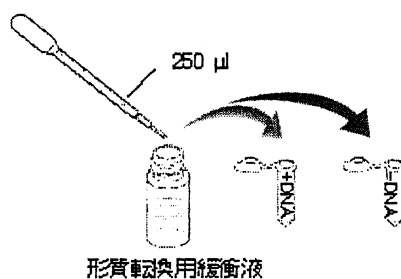
pGLOプラスミド溶液	1本	☐
42℃に温度調整したウォーターバス	1つ	☐
温度計	1本	☐
(可能であれば)37℃インキュベーター	1つ	☐

<実験手順>

1. マクロチューブの蓋を開けて、緑チューブに“+DNA”、青チューブに“-DNA”とペンで書き、チューブラックに差しておきます。



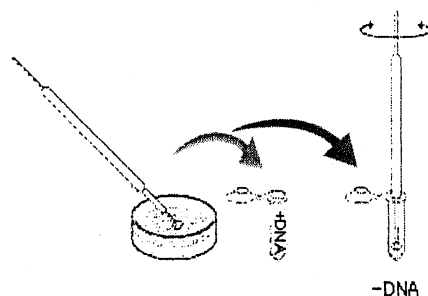
2. “Bu”チューブの蓋を開けて、滅菌済みピペットを使用して形質転換用緩衝溶液を 250 μ l ずつ、“+DNA”、“-DNA”チューブに加えます。



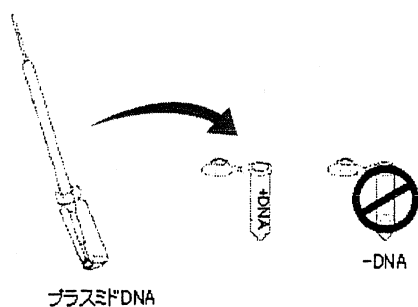
3. マイクロチューブを氷上に置きます。



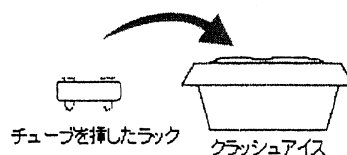
4. 植付け用ループを用い、スタータープレートからシングルコロニーを1つすくいとります。“+DNA”チューブの底までループを入れて、人差し指と親指をこすり合わせるようにしてループをまわし、先についている大腸菌を緩衝溶液に溶かし入れ、ダマがないようにします。同様に、“-DNA”チューブにもコロニーを取ります。大腸菌をチューブに溶かし入れた後は、チューブの先端(溶液の入っている部分)を持たないようにしてください。



5. ここで、試しに pGLO プラスミド溶液に UV ランプを当ててみて、溶液の状態を観察しておいてください。新しいループの、輪の部分が全部浸るようにプラスミド溶液に入れ、シャボン玉を作る時のように輪の部分に溶液の膜を張らせます。その状態で“+DNA”チューブにループを入れたら、チューブの蓋を閉めて、氷上に戻します。“-DNA”チューブにはこの操作を行わないでください。



6. マイクロチューブの蓋がしっかり閉まっていることを確認し、チューブラックに差し、ラックごと氷上に 10 分間置きます。この時、チューブがきちんと氷中にあるように、チューブを最後まで深く差しておきます。

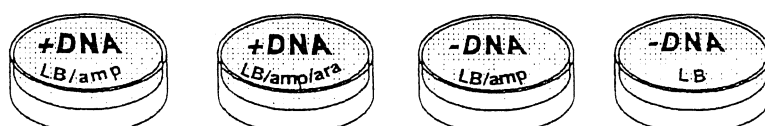


7. チューブを冷やしている間、寒天培地プレート(計 4 枚)の底面にそれぞれにまくサンプル名を表記します。

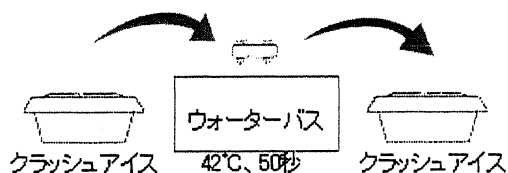
“LB”プレート ; -DNA

“LB/amp”プレート ; +DNA、-DNA (1 枚ずつ)

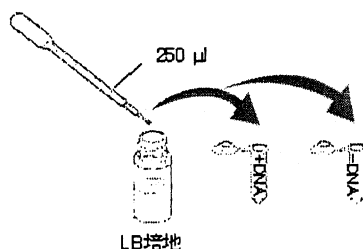
“LB/amp/ara”プレート ; +DNA



8. ヒートショックを行います。チューブラックごと、42℃に調節しておいたウォーターバスに 50 秒浸けます。ウォーターバスに浸ける前に、チューブがラックに深く差し込んであることを確認します。50 秒経ったら、チューブを氷上に戻します。氷上とウォーターバスとの間の移動を速やかに行うことがポイントです。



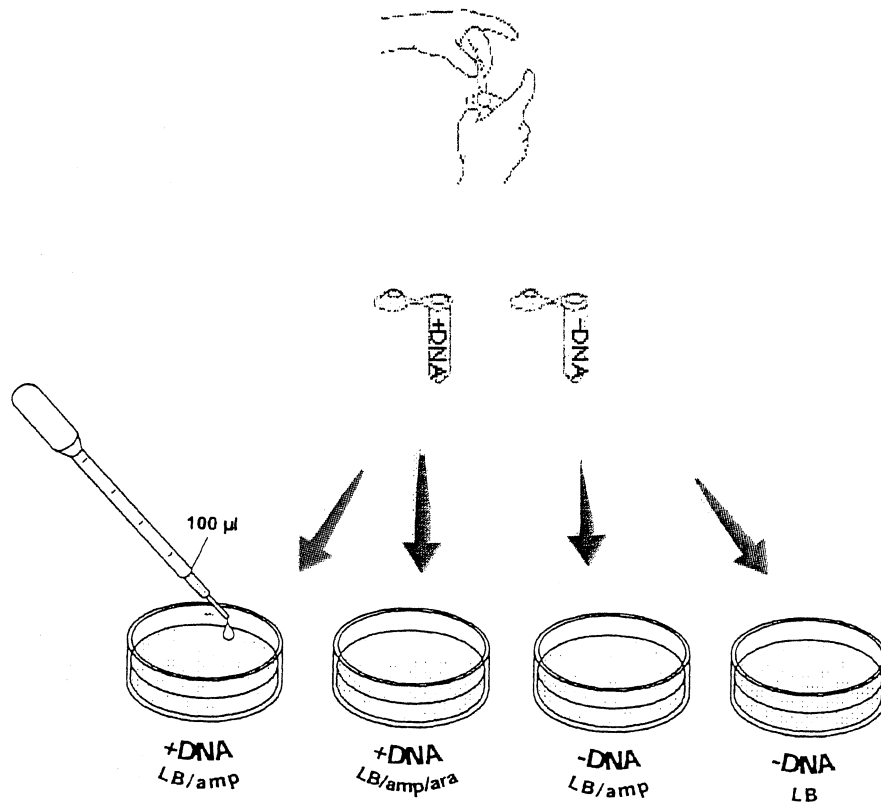
9. 氷上に 2 分間置いた後、ラックごとチューブを実験台の上に移します。片方のチューブの蓋を開け、新しいピペットを用いて LB 培地を 250 μ l 加え、蓋を閉めます。もう片方のチューブにも同様に、新しいピペットを用いて LB 培地 250 μ l を加えます。10 分間室温で放置します。



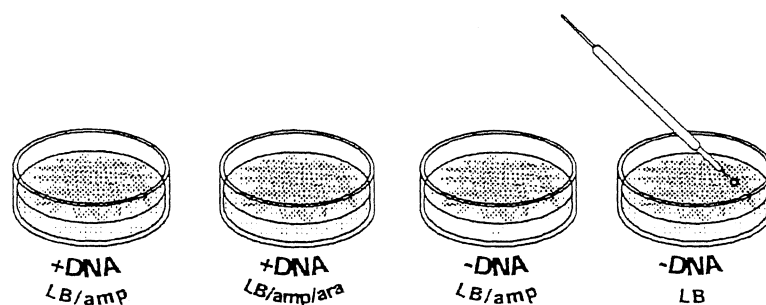
10. チューブの蓋が閉まっていることを確認し、タッピングして溶液を混ぜます。新しいピペットで大腸菌サンプルを 100 μ l 吸い取り、プレートを開けて滴下し、蓋を閉めます。それぞれの大腸菌サンプルには違うピペットを用い、決まったプレートに滴下します。

“+DNA”チューブ ; “LB/amp”、“LB/amp/ara”プレートに

“-DNA”チューブ ; “LB/amp”、“LB”プレートに



11. 新しい植付け用ループを使って滴下した大腸菌サンプルを広げます。プレートを開け、ループ先の輪の部分で培地表面と平衡に滑らせるように、手早く、プレート表面にできるだけ広い範囲に広がりますたら、蓋を閉めます。操作はプレート 1 枚ずつ行い、新しいプレートごとに新しいループを使用してください。



12. 4 枚のプレートに大腸菌サンプルを広げたら、プレートを裏返して積み上げ、テープでくくります。班名を明記し、37℃インキュベーターに次の日まで入れておきます。



◆ Lesson 2 質問

データの収集と分析を行う前に、次の質問について考えましょう。

1. もとものの、形質転換されていない大腸菌のコロニーはどのプレートに生えると思いますか？その理由も述べてください。
2. 形質転換された大腸菌があるとする、コロニーはどのプレートに一番多く生えると思いますか？その理由も述べてください。
3. 形質転換されたかを確認するためには、どのプレートと比較したら良いですか？その理由も述べてください。
4. コントロールプレートにはどういった意味があると思いますか？

注1:コロニー

一つ一つのコロニーは、元は1つ1つの大腸菌だったものです。大腸菌は液体中では好きなように泳ぎ回りますが、寒天の上ではそういきません。そのため、大腸菌が分裂して増え続ける時、同じ場所で増え続けることになり、その場所に大腸菌の塊ができます。これがコロニーです。1つのコロニーは、100億を超える大腸菌から出来ており、その大腸菌はすべて最初の1匹の子孫(クローン)です。一つのコロニー全体が蛍光を発するという事は、最初の1匹の遺伝子(DNA)が、全ての子孫に伝わっているということも示しているのです。

注2:アラビノース

大腸菌を含めた生命は、必要のないタンパク質は作らない、という節約の能力を持っています。それぞれの遺伝子は、必要な時にしか発現されないように非常に精密に制御をされています。

今回、GFPタンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドは、もともとアラビノースという糖の一種がたくさんあるとき、それを分解して栄養とするための酵素の遺伝子を持っていました。それを取り去ってGFP遺伝子を入れています。本来、普通にはプラスミド自体は、アラビノースがたくさんあるとこれを分解しようとしてアラビノースを分解する酵素をたくさん生成しはじめます。しかし、今回はそこにアラビノースを分解する酵素遺伝子はなく、GFP遺伝子があるためにGFPタンパクが作られ始めるのです。このGFPタンパク質はもともと大腸菌には必要のないものなので、通常では全く生成されません。生命がいかにうまく遺伝子の発現を制御しているかを実感してください。

注3:アンピシリン

アンピシリンは抗生物質の一つで、大腸菌の細胞壁の合成を阻害し、大腸菌を殺菌する化学物質です。アンピシリンがプレートに含まれていると、大腸菌はそこで生きることができずに死滅します。しかし、今回使用するプラスミドには、GFPタンパクの他にアンピシリンを分解できるタンパク質で β ラクタマーゼ(アンピシリン分解酵素)の遺伝子が含まれています。このため、プラスミドを取り込んだ大腸菌はアンピシリンを含むプレートで生育できるようになります。この現象は、プラスミドを取り込んだ大腸菌と、取り込まなかった大腸菌を選別するのに有効です(マーカー遺伝子)。

注4:コントロール

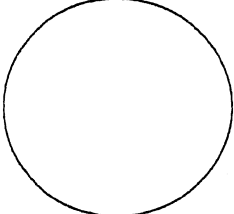
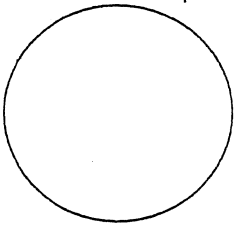
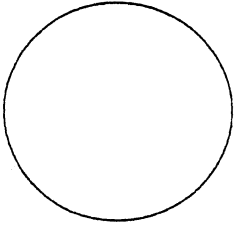
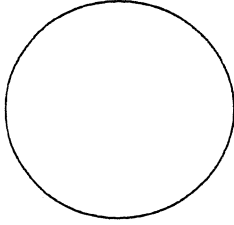
今回の実験では4枚のプレートを用います。これらのプレートのうち幾つかは「コントロール」と呼ばれるもので、研究において非常に重要な役目を持っています。アンピシリンだけを含んだ2枚のプレートを見てみましょう。この2枚には、DNAを形質転換された大腸菌と、させなかった大腸菌をまくことになっています。このとき、DNAを入れた大腸菌だけしかまかななかった場合、それが形質転換によって生育できるようになったコロニーなのか、それともなんらかの理由で抗生物質が効いていないから出てきてしまったコロニーなのか、確かめる手段はありません。しかし、もう一枚プレートを用意して、そこにプラスミドを持たない大腸菌をまくことで、アンピシリンが効かない(もしくは入れ忘れ)という可能性を否定することができるのです。こうして、可能性を否定するために比べる対象を用意しておくことをコントロールといいます。今回のプレートの組み合わせには、ほかにも幾つかのコントロールがありますので、どういうコントロールになっているのか考えて実験してください。

◆ Lesson 3 データの収集と分析

A. データ収集

遺伝子導入実験の結果を、実験室の光の下でよく観察、その後に、プレートにUVランプを照射させて、観察してください。

1. 4つのプレートを観察し、それぞれの様子を2～4.の質問を考えながら下の表にまとめましょう。左側の円の中にはコロニーが生えている様子を絵で書いてください。
2. それぞれのプレートには、どの程度コロニーが生えていますか？
3. コロニー(大腸菌)の色は？
4. それぞれのプレートに生えたコロニーの数を数えましょう。

プレート	プレートの様子
+DNA – LB/amp 	
+DNA – LB/amp/ara 	
–DNA – LB/amp 	
–DNA – LB 	

B 実験結果の分析

データ分析の最終目標は、得られたデータから形質転換が起こっているかどうか結論づけることです。

1. 形質転換した大腸菌を目で見た時に、形質転換前と変わらなく見える性質や特徴にはどのような点がありましたか？ またそれは何を根拠にそう考えましたか？

2. 形質転換した大腸菌を目で見た時に、形質転換前と明らかに変化した性質や特徴にはどのような点がありましたか？ またそれは何を根拠にそう考えましたか？

3. 抗生物質のアンピシリン存在下で生育できる能力を、形質転換によって大腸菌が得たとしたら、どのようなプラスミドが形質転換に関与していると思いますか？

4. 得られた結果から、どういった変化が起こったか、説明してください。

◆ Lesson 3 質問 1

プレート上にはどんな大腸菌が育っていますか？

UVランプを照射して大腸菌のコロニーが緑色に光っていたら、それには必要な 要因 が2つ、培地に入っていることになりますが、それは何でしょう？次の問いについて考えてみましょう。

1. もともののプラスミド DNA に UV ランプを照射させた時、どのような様子でしたか？
2. 蛍光を発するのに必要なものに関して、この実験結果からどのようなことを表していますか？
3. 行った形質転換の実験が成功したか、失敗してしまったか、それを判断する結果と共に述べてください。

◆ Lesson 3 質問 2

遺伝子と環境の関係について

4 枚のプレートを観察し直してみましょう。LB 培地のみのプレートに大腸菌は生えていますか？

1. LB 培地のみのプレートを観察するだけで、その大腸菌がアンピシリン耐性があると言えますか？
2. 大腸菌の生育環境をどの様に変えれば、アンピシリン耐性があると証明できるようになりますか？

3. 生物は遺伝子の組み合わせや環境によって異なる性質を持つことがあります。実際に目にした、遺伝子的に形質転換させた大腸菌が発した緑色について考えてみましょう。

3-a. 緑色を見るために、バクテリアの生育に必要な環境因子が 2 つありますが、それは何でしょう？

3-b. 大腸菌を緑色に変化させる形質転換が起こるために、上で挙げた 2 つの環境因子が何をしているのでしょうか？

3-d. 生物が環境に応じて、ある特定の遺伝子の発現を調節することには、どんな利点がありますか？

◆ Lesson 4 考察

遺伝子組換え効率の計算

今度は、大腸菌がどの程度、遺伝子組換えされたかどうかを決定する方法について学びましょう。計算によって得られた数値は遺伝子組換え効率となります。

実験においては、できるだけたくさんの細胞に遺伝子組換えが起こることが重要になってきます。たとえば、ある遺伝子治療では、細胞が患者から採取され、実験室で遺伝子導入を行い、また遺伝子組換えした細胞を患者に戻されます。必要とされるタンパク質がたくさん細胞内で発現しているほうが、治療はうまくいくでしょう。研究者は、文字どおり、どれだけ遺伝子組換えが起こったかを決定するために、遺伝子組換え効率を計算します。

<目的>

実際に行った実験結果から情報を集めて、遺伝子組換え効率を計算しましょう。遺伝子組換え効率はコロニーにある大腸菌の細胞がどのくらい効果的にDNA分子を取り込んだか、を示します。計算方法は、蛍光タンパク質を発現した大腸菌の細胞数を実験で使ったDNA量で割り算します。またその数値は、1 μg のDNAがどれだけの細胞に導入されたか、細胞の総数を表します。式に表すと、次のようになります。

$$\text{形質転換効率} = \frac{\text{寒天培地プレートに生育した細胞数}}{\text{寒天培地プレートにまいたDNA量}}$$

そこで、実際に効率を計算する前に、実験結果から、次の2つの情報を得る必要があります。

- (1) “LB/amp/ara”プレート上に生育している緑色蛍光コロニーの総数
- (2) “LB/amp/ara”プレート上にまいた大腸菌細胞内のpGLOプラスミドDNAの量

1. 遺伝子組換えした細胞数を求める

“LB/amp/ara”プレートをUVランプの近くに置いてみましょう。一つ一つのコロニーは、単細胞の大腸菌が集まってできています。1つの細胞が増殖し始めると、それらがどんどん増えていき、コロニーを形成します。遺伝子組換えされた、緑色の蛍光を発する細胞数を決定するには、コロニーの数を数えるのが良いでしょう。プレート上にコロニーはいくつありますか？

コロニー数 ; _____ 個

2. “LB/amp/ara”プレートにまいた大腸菌に導入されたDNA(pGLO)の量を求める

この実験において、“LB/amp/ara”プレートにまいた大腸菌に導入されたDNA(pGLO)の量を求めるには2つの情報が必要です。それは、①実験を始めた時のDNAの総量がどれだけだったのか、②DNA総量に対してどの位の割合のDNAがプレートにまかれたか、の2つです。このデータを計算した後に、この2つの数値を掛け算する必要があります。掛け算の答えは、“LB/amp/ara”プレートにまいた大腸菌に導入されたpGLOの量になります。

2-a. pGLOの総量を求める

実験を始めた時のDNAの総量はDNA濃度と使用したDNA溶液の容量から計算できます。

$$\text{DNA}(\mu\text{g}) = (\text{DNA 濃度}(\mu\text{g}/\mu\text{l})) \times (\text{DNA 溶液の容量}(\mu\text{l}))$$

この実験では濃度が $0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の pGLO を $10 \mu\text{l}$ 使用しましたので、上の式に当てはめて計算すると、使用した DNA の総量は、_____ μg になります。

大腸菌に導入された DNA (pGLO) の量を求めるには、この計算結果をどのように使ったら良いでしょう？

2-b. 実際にプレートにまいた大腸菌中の DNA 量を求める

実験に使用した DNA がすべて大腸菌に導入され、プレートにまかれたわけではないので、まず、実際にプレートにまかれた DNA の割合を求める必要があります。それには、ヒートショック後、プレートにまくためにピペットで取ったサンプル量を、チューブの中にあったサンプル全容量で割り算することで得られます。求める式は、

$$\text{プレートにまかれた DNA の割合} = \frac{\text{培地にまいたサンプル容量}}{\text{チューブ内のサンプル全容量}}$$

ここでは、チューブ内に $510 \mu\text{l}$ あったサンプルから、 $100 \mu\text{l}$ のサンプルをまきました。(チューブ内のサンプル全容量が $510 \mu\text{l}$ であるのに注意してください。どうして $510 \mu\text{l}$ なのか、操作を振り返って確認しましょう。)このことから、プレートにまかれた DNA の割合は、_____ になります。

大腸菌に導入された DNA (pGLO) の量を求めるには、この計算結果をどのように使ったら良いでしょう？

ここで、何 μg の DNA がプレートのまかれたのか計算してみましょう。

それには、実験に使用した DNA 全量と、プレートにまいた DNA の割合を掛け算します。

$$\text{まいた DNA 量}(\mu\text{g}) = (\text{使用した DNA 全量}(\mu\text{g})) \times (\text{DNA の割合})$$

この式から、プレートにまかれた DNA 量は、_____ μg となります。

以上の計算をまとめてみましょう。

“LB/amp/ara”プレートに生えているコロニーの数 — _____ 個、

プレートにまいた DNA の量 — _____ μg

ここから、今回の実験で行った遺伝子組換えの効率を計算します。

遺伝子組換え効率は、

$$\text{遺伝子組換え効率} = \frac{\text{プレート上で生えたコロニーの数}}{\text{プレートにまいた DNA 量}}$$

の式で求められます。ここまでに計算して得られた数値を当てはめて計算すると、遺伝子組換え効率は、
_____となります。

<解析>

●遺伝子組換えの計算結果はとても大きな数値になります。科学者はその数値を簡単に表記します。例えば、遺伝子組換え効率が 1,000 (菌体/ μg of DNA)とすると、

10^3 (transformants/ μg of DNA) (10^3 は $10 \times 10 \times 10$ または 1000、を表します)

と表現します。ですから、10,000 は_____となります。

例えば、遺伝子組換え効率が 5,000 (transformants/ μg of DNA)であった場合、 $5 \times 10^3 (= 5 \times 1,000)$ transformants/ μg of DNA、40,000 (transformants/ μg of DNA)は_____ (transformants/ μg of DNA)と表記し、2,600 (transformants/ μg of DNA)は 2.6×10^3 (transformants/ μg of DNA)となります。

●これに習って、今回行った実験の遺伝子組換え効率は、_____ (transformants/ μg of DNA)と表記できます。

●こうして求めてきた遺伝子組換え効率にはどんな意味があるのでしょうか？簡単に説明してください。

●生物学者がこの手法で遺伝子組換えをした場合、一般的に、効率はおよそ $8.0 \times 10^2 \sim 7.0 \times 10^3$ (transformants/ μg of DNA)A と言われています。それと比較して、あなたが実験して得られた遺伝子組換え効率 はどうですか？

●他の班の遺伝子組換え効率もチェックしてみましょう。

班名	遺伝子組換え効率

●他の班の結果と比較して、あなたが得られた結果はどうですか？

●以下の情報や結果を利用して、この時の遺伝子組換え効率を計算してください。

DNA プラスミド溶液の濃度 — 0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

250 μl 形質転換用緩衝溶液

10 μl プラスミド溶液

250 μl LB 培地

100 μl プレートにまいた大腸菌サンプル

227 形質転換されたコロニー

"LB/amp/ara"プレートに生えたコロニー数 =

プレートにまいた DNA 量 (μg) =

遺伝子組換え効率 =

<応用問題>

遺伝子組換え効率が 3×10^3 (transformants/ μg of DNA)とわかっているとした時、"LB/amp/ara"プレートに生えたコロニー数はいくつになりますか？DNAの濃度やプレートにまいたDNAの割合等は実際に行った実験と同様な条件として考えてみてください。

付録 A

バイオテクノロジーの歴史

遺伝子組換えには面白い歴史があります。1928 年、ある病理学研究室で研究をしていた医師のフレデリック・グリフィス(Frederick Griffith)は、彼自身が解釈に苦しむような実験結果を得ました。グリフィスは毒性のない、非病原性の肺炎球菌を、毒性のある、病原性のバクテリアに変化させてしまったのです。熱を加えて殺した、病原性のバクテリアと同じ溶液中で非病原性バクテリアを扱うことで、彼はこの驚くべき細胞の変化を起こしました。この混合溶液の中には毒性のあるバクテリアは生きていませんが、その溶液を注射されたマウスは死んでしまいました。彼は何度も同じ実験を繰り返しましたが、結果はいつも同じで、グリフィスや周りの研究者たちは非常に悩みました。毒性のないバクテリアを毒性のある殺人バクテリアに変えてしまったのは、一体何だったのでしょうか？それから何年も経った後、これは実験室で行われた遺伝子操作による形質転換(たとえば、植物で起こる自然交配と比較して)の最初の例として知られましたが、どうして起こったのか、誰も説明ができませんでした。グリフィスはその当時、DNA の存在は知りませんでしたが、一度変化した性質は後の代に遺伝することには気づいていました。グリフィスの形質転換実験は、これ以後発達する組換え実験へ、さらにはバイオテクノロジーの発展へ通ずる、分析的な遺伝子操作の誕生と見ることができます。

グリフィスの実験から 16 年後の 1944 年、ロックフェラー研究所のオスワルド T. アベリー(Oswald T. Avery)率いる研究グループは、グリフィスの実験に関する論文を発表しました。アベリーは、研究員と共に、原因となる物質は何であるか？ということについて考えていました。肺炎球菌を用いた研究をしながら、アベリーや研究者たちは、その物質が DNA であることを証明し、形質転換はその細胞がもともと持っていない DNA を発現することによって起こることを示しました。

アベリーに名声が与えられるには何年もかかりましたが、今日、生物学における重要な進歩として、一般的に広く認められています。アベリー達(1983)やダグラス・ハナハンら(1987)の研究によって、このキットで使われている DNA 組換え技術へと発達しました。

歴史

遺伝子組換えの歴史

1865 — Gregor Johan Mendel : メンデルは親から子へと遺伝的特徴が受け継がれる現象を証明する発見をしたと発表した。彼の研究から、遺伝の基本的な単位として遺伝子の概念が生まれました。

1900 — Carl Correns、Hugo de Vries、Erich Tschermak : 彼ら植物遺伝学者達は、自分たちが今までしてきた研究が、本質的には、40 年近くも以前に無名のオーストリアのキリスト教修道士であったメンデルがエンドウマメを用いて行った研究の繰り返しであったことに気づきました。

1928 — Frederick Griffith : グリフィスは熱で殺した有毒なバクテリアを使用することで非病原性の *D. pneumonia* (肺炎球菌)を病原性の菌に変化させました。彼は、形質転換に関与する因子が多糖類カプセルの合成にあると提言した。グリフィスは DNA について知らなかったが、形質転換された性質は遺伝することを知りました。

1944 — Oswald Avery, Colin MacLeod : アベリーと彼の同僚らは、形質転換の因子、DNA を高純度に分離・精製した、と発表しました。この分子レベルの基礎実験以来、バクテリア、マウス、のような植物や動物、哺乳類の培養細胞間の遺伝子組換えや人間の遺伝子治療に遺伝子導入や細胞融合という方法が用いられるようになりました。

1952 — Alfred Hershey, Martha Chase : ハーシーとチェイスはリン、イオウの放射性同位元素とバクテリオファージ T2 を用いて、DNA は遺伝する情報をもつ分子であることを確証しました。アベリーらの研究とあわせて、ハーシーとチェイスの実験結果は DNA が細胞に取り込まれ、遺伝情報を担う分子であることを確認しました。

1972 — Paul Berg, Janet Mertz : ベルグは新しく発見されたエンドヌクレアーゼ(ポリヌクレオチド内部加水分解酵素)、*EcoRI* は SV40 DNA やバクテリオファージ P22 DNA を切断し、末端転移酵素と DNA リガーゼが切れた DNA を一つの DNA につなぎあわせることを利用し、組換え DNA を最初に作成しました。ここからバイオテクノロジーの時代が始まったのです。しかし、倫理的問題を含む種々の問題を考慮し、組換え DNA は哺乳類動物細胞内へ導入されることはありませんでした。

1973 — Herbert Boyer, Stanley Cohen, Annie Chang : ベルグらのたった 1 ヶ月後、ボイヤーとコーエンらはカナマイシン耐性のための完全な遺伝子を分離させるのに *EcoRI* を使用しました。3 人は *EcoRI* で切断した、テトラサイクリン耐性を持つプラスミドにカナマイシン耐性遺伝子を繋ぎ合わせ、2 つの抗生物質に耐性を有するリコンビナントプラスミドを作成し、それを大腸菌に導入しました。

1977 — Genentech, Inc. : 遺伝子工学の最初の産物は、バクテリアによって産出されたヒト・ソマトスタチン(成長ホルモン抑制ホルモン)であり、ジェネンテックという企業により発表されました。

1980 — J. W. Gordon, Frank Ruddle : ゴードンとルドルはマウスの生殖細胞に遺伝子をマイクロインジェクション(微細な針を使用して、細胞に直接遺伝子を挿入する)という方法での遺伝子導入に成功しました。

1982 — Richard Palmiter, Ralph Brinster : パルミターとプリンスターはラットの成長ホルモンをマウスの胚にマイクロインジェクション法で遺伝子導入しました。これは、動物における生殖細胞の治療として報告された最初の例でした。このマウスはこびと症のような症状が出るようにされていたので、“リトル”と呼ばれていました。

1988 — Steven Rosenberg : ローゼンベルグとそのグループは人の転移性メラノーマ患者に対して初めて遺伝子導入実験を行うことを認められました。この実験は、遺伝子治療ではなく、マーカー遺伝子 Neo^R の追跡として行われました。

1990 — W. French Anderson, Michael Bleas, Kenneth Culver : 1990 年 9 月 14 日、金曜日午後 12 時 52

分、4歳の少女、クリーヴランド、オハイオにすむシルバ、Ashanthi De Silva は米国・国立ガンセンターで、人間では初めての遺伝子治療を受けました。“正確な”アデノシンデアミナーゼ(ADA)遺伝子を運ぶ彼女自身の白血球を投与しました。アンダーソン医師、ブリーズ医師、カルバー医師の3人にとって、その後1年間の経過はあまり期待できるものではありませんでした。1990年、二人目の少女、シンシア、Cynthia Cutshall も同様な治療を受けました。1993年6月、二人の少女が元気に笑顔で校庭を走り回る姿が報告されました。二人の体の免疫システムが効果的に働き、その結果治療が成功したのです。

1994 — 遺伝子治療の対象として、鎌状赤血球貧血、血友病、糖尿病、癌、および心臓病患者などが挙げられます。生殖細胞への遺伝子治療は組換えDNA諮問委員会の会議で討論されています。

付録 B

このキットに出てくる用語の解説

寒天培地	バクテリアの生育をサポートする固体物質。炭水化物やアミノ酸、ヌクレオチド、塩、ビタミンを含みます。
抗生物質による選別	抗生物質であるアンピシリンに耐性を持つ、 β -lactamase というタンパク質をコードする遺伝子を組み込んだプラスミド DNA をバクテリアに導入します。そのプラスミドを持つバクテリアは β -lactamase を産出し、分泌します。分泌された β -lactamase は LB/寒天培地に含まれるアンピシリンを不活性化し、バクテリアが生育できるようにします。プラスミドを持ち、 β -lactamase を産出できるバクテリアだけがアンピシリン存在下で生き残ることができます。形質転換されなかった細胞、すなわちプラスミドを持たないバクテリアはアンピシリンを含むセレクションプレート上では生育できません。
アラビノース	バクテリアが通常食物として利用する炭水化物、糖の一つ。
β -lactamase	β -lactamase は抗生物質であるアンピシリンに対しての耐性を、細胞に与えるタンパク質です。 β -lactamase タンパク質は β -lactamase 遺伝子を含むプラスミドを持つバクテリアによって産出、分泌されます。分泌された β -lactamase はアンピシリンを不活性化し、それによってバクテリアが生育し、新しい、例えば GFP のような目的の遺伝子が発現されるのです。
バイオテクノロジー	生存している生物に対して、生物が実際に行っている分子レベルでの生命活動を利用して有益な物質を産出できるように、主に遺伝子レベルでの操作を施すこと。
クローニング	ある一つの細胞を培養することにより多数に増やした時、それらの細胞はすべて、同じ遺伝子を持つことになります。この増やされた多数の細胞をクローンといいます。そして、クローン細胞を作り出す過程をクローニング、といいます。特異的な DNA 配列または遺伝子のコピーは、導入された細胞(宿主)の細胞分裂により作られます。
コロニー	寒天培地上で生育した、同じ遺伝子を持つ細胞の凝集塊。一つのコロニーにあるすべての細胞は同じ遺伝子を持つので、クローンと呼ばれます。
培地	液体や寒天の LB 培地のような、液体や固体の培地は、バクテリアの生育に必要な栄養源である炭水化物、アミノ酸、ヌクレオチド、塩、ビタミン等を含む酵母の抽出物や肉をタンパク質分解酵素で処理したものから作られています。寒天(アガロース)はご存知の通り、海藻から抽出されたもので、加熱すると溶解し、冷却すると固形化する性質を持ち、バクテリアを培養する際には良く使われています。
遺伝子工学	生物の遺伝子 DNA に、他からの遺伝子を組み込んだり、そこから切り出したりという操作を行うこと。
遺伝子発現調節	全ての生物の遺伝子発現は環境に適応するために、その時に不要なタンパク

質が無駄に生産されないように入念に調節されています。食物の運搬と消化に関与する遺伝子も、発現調節されている遺伝子の良い例の一つです。例えば、糖であるアラビノースはバクテリアにとってエネルギー源と炭素源の両方に使われます。例えばバクテリアでは、アラビノースを食物として消化する消化酵素をコードする遺伝子は、アラビノースがないと発現されませんが、アラビノースが存在すると発現されます。そして、アラビノースが消化されてなくなると、遺伝子発現もストップします。言い換えれば、バクテリアの周りにアラビノースがあると消化酵素がつくられ、アラビノースがなくなると消化酵素は作られなくなるのです。付録 D に、遺伝子発現調節におけるアラビノースの役割と、GFP 遺伝子の発現について詳しく説明がありますので参照してください。

Green Fluorescent Protein	Green Fluorescent Protein (GFP) は生物蛍光を発するオワンクラゲ、 <i>Aequorea victoria</i> から単離されたタンパク質です。GFP 遺伝子は最近になってクローン化されました。特徴的な構造ゆえに、紫外線を照射するとそのエネルギーを吸収し、吸収されたエネルギーは緑色のきれいな光となって放出されます。
プラスミド	環状の DNA で、自己複製ができます。抗生物質耐性タンパク質や GFP のようなクローン化された他の生物の遺伝子を組み込むことができます。
pGLO	GFP 遺伝子とアンピシリン耐性である β -lactamase 遺伝子を含むプラスミド。
組換え DNA 技術	遺伝子を単離したり、それらの構造や機能を変えるために、目的の DNA 断片を切り取って、他の遺伝子に組み込む操作。
スクリーニング	たんさんのバクテリアの中から、目的のバクテリアを選別する過程。
無菌操作	“清潔”に操作を行う、という規則のもと、実験中に外部からのバクテリアの混入を最小限にするために、注意深く行う実験操作。
プレートにまく ベクター	植付け用ループにバクテリア溶液をつけ、寒天培地プレート上に広げる操作。 例えば、プラスミドのように、他の生物からの DNA 断片を組み込まれ、宿主となる細胞に導入される、自己複製する DNA 分子。

付録 C

分子生物学の基礎と用語

全ての生物がある独特の方法で生命活動を営んでおり、生命の世界を研究することはそれを明らかにすることです。各生物の青写真はその子孫に伝えられます。

細胞は独立して増殖できる、一番小さい機能的単位です。例えば、たくさんのバクテリアは細胞一つで生き残ることができます。それぞれの細胞中の分子は調和しながら各々の役割を果たしています。

・細胞培養と採取

細胞は本来、存在している場所から採取され、適切な栄養源と環境を整えば、フラスコの中で増殖させることができます。バクテリアや酵母はとても簡単に培養することができます。植物や昆虫、動物から採取した細胞も培養することができますが、バクテリアや酵母よりも難しくなります。

培養が完了すると細胞は採集され、研究に用いられます。

・クローニング

ある一つの細胞を培養によって多数に増やした時、それらの細胞はすべて、同じ遺伝子を持つことになります。この増やされた多数の細胞をクローン細胞といいます。そして、クローン細胞を作り出す過程をクローニング、といいます。寒天培地上にバクテリアをまくのは、それぞれ一つの細胞からできる、同じ遺伝子を持つ細胞が集まったコロニーを得るためです。

・細胞の中を見てみる

細胞中のたくさんの物質には、それぞれの役割があり、それを果たしています。例えば、DNA 分子はコンピューターのハードディスクドライブのように、たくさんの情報を蓄積しています。タンパク質は、細胞の中の働きアリのようにせっせと働いているのです。

これらの物質について研究をするために、私たちは目的の細胞をクローン化し、細胞を壊し、その内容物を分離します。例えば、そのなかから DNA とタンパク質を分離することは簡単にできるのです。

細胞の中に含まれている、たくさんのタンパク質が混合しているところから、たった一種類のタンパク質を単離することも可能なのです。タンパク質には、一つ一つに、それぞれに違った物理的、化学的性質を持っています。これらの性質、例えば分子の大きさや電荷、疎水性度などを利用することにより、目的のタンパク質を単離することが可能になるのです。

・特別な物質のそれぞれの機能

細胞内には 3 種類のとても重要な物質があります。それが DNA、RNA、タンパク質です。これら 3 つの物質はそれぞれに異なる機能を持っています。DNA はたくさんの情報がファイリングしてあるキャビネットの様なものです。RNA は DNA にファイリングしてある司令を検索して、実行する(=タンパク質を作る)手助けをします。タンパク質は細胞内の物質から(まれに細胞外の物質からも)作られるように設計されています。

・DNA — 全生物情報共通のテンプレート

生物の複製のもととなる台本は、DNA、デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic Acid) でできています。細胞が機能するために必要な全てが稼動し始めるのに十分な情報が、個々の細胞中の DNA にはあります。

DNA 分子はヌクレオチドと呼ばれるサブユニットの繰り返しで構成される、非常に長い鎖です。1 つ 1 つのサブユニットであるヌクレオチドには、アデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、グアニン(G)の 4 つのうちどれか 1 つの塩基が、枝のようについています。

そのヌクレオチドの“頭”と“しっぽ”が次々と結合することで骨組みが組まれ、その長い鎖に対して、枝のように塩基が配置する、という立体構造をとります。この物質によって運ばれる情報は、鎖に沿ってアデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、グアニン(G)の配列としてコード化されています。

・DNA の構造について

1. DNA 鎖のサブユニットは、“頭”と“しっぽ”が次々と結合しており、その順番には向きがあります。通常、向きは、“頭”側、糖部分(5'と表記)から、“しっぽ”側、リン酸部分(3'と表記)へとなっています。例えば、

5' ... AACTG... 3'

このように表記されます。

2. DNA 鎖についている塩基の“枝”は、もう 1 本の DNA 鎖の“枝”と、ある規則にのっとって結合することができます。その規則とは、

(i) A は T と結合する

(ii) G は C と結合する

この規則は、A と T、G と C はそれぞれ相補的な塩基である、とされています。

(iii) 結合した 2 本の DNA の配列は必ず相補的な組み合わせになっており、その向きはそれぞれ逆になる。

例えば、5' ... AGGTC...3' とペアになる DNA 鎖の配列は 3' ...GAACT ...5' となります。並べて書いてみると、

5' ... AGGTC...3'

3' ... GAACT...5'

となります。この時、相補的にペアを組んでいる塩基は塩基対、と言い、上記の DNA 鎖は 5 塩基対の長さがある、と言います。このように、DNA は通常二本鎖の状態をとっており、全て相補的な塩基対の組み合わせになっています。

3. DNA は大抵数千、長い時には数百万塩基対の長さになります。また、鎖の両端がつながって、環状になっている DNA もあります。
4. 細胞の中では、二重鎖 DNA はコイルのようにらせんになっているため、二重らせん構造、と呼ばれています。

DNA の二重らせん構造は増幅する時に、とても便利にできています。この二重らせんの鎖は 1 本ずつにほぐれることができ、そのどちらか 1 本が鋳型になり、DNA ポリメラーゼと呼ばれる酵素によって、相補的なペアが合成されていきます。こうして、DNA は 1 本から 2 本、4 本…と、同じ配列のまま増えていくのです。

・タンパク質と RNA は細胞の働きアリ

生命活動においては、生化学的に非常にたくさんの特異的、かつ効率的な化学反応が同時に起こることが

必要です。それらの化学反応を起こすのは、寿命の短いタンパク質と RNA です。この 2 つの物質は時には一緒に、時にはそれぞれに、たくさんの機能を発揮します。DNA のように RNA やタンパク質もあるユニットの繰り返しによる長い鎖なのです。

・RNA

RNA(リボ核酸、Ribonucleic Acid)、は DNA のように 4 種類のユニットが数珠つなぎになって、鎖のような構造をとっています。RNA ではアデニン、シトシン、グアニン、そしてウラシルの 4 つのユニットから成り、DNA 同様、G と C、A と U が相補的なペアになっています。RNA も RNA 鎖同士、または DNA 鎖とペアを組むことができますが、通常細胞内では一本鎖の構造をとっており、鎖の骨組みにある糖部分はデオキシリボースではなくリボースです。また、RNA は DNA 断片のコピーになるので、DNA と比較すると短い鎖になっています。DNA 断片から RNA がコピーされることを転写、といい、RNA ポリメラーゼという酵素が転写を行います。

・タンパク質

タンパク質(正確に言うとポリペプチド)は、鎖のように長くなっていますが、その立体構造は DNA や RNA と大きく異なります。タンパク質を構成しているユニットは 20 数種類あるアミノ酸という物質です。その鎖がどういった立体構造をとるかは、ペプチド鎖に沿ったアミノ酸の配列が大きく影響しています。そしてその構造は、どういった役割を果たすかに影響します。

ほとんどの場合、タンパク質は一つの役割を持っています。非常にたくさんの細胞内の機能がタンパク質によって行われています。酵素、と呼ばれるタンパク質は化学反応の触媒の役割をします。ホルモンタンパク質はある細胞からある細胞へ信号を伝えます。またあるタンパク質は抗体、と呼ばれ、細胞外侵入者と戦う役目を果たしています。ある反応を制御するタンパク質は、細胞内のルールに従って、交通整理を行うものもあります。このように、細胞の中には、多種多様な構造を持ったタンパク質が集まっているのです。

・一次元的な暗号、三次元的な構造

DNA は、生命のシステムにおける情報の倉庫です。これまでも書いたように、この情報は A、T、C、G のユニットが一次元的に並ぶことによって暗号化されています。そしてこの一次元的な暗号は、親から子へと伝えられます。それは、DNA がそっくりそのまま複製することが可能だからです。

DNA の短い断片は、転写されるために必要な時に、必要な部分が倉庫の中から選び出されます。これらの断片を遺伝子、と呼びます。RNA ポリメラーゼと呼ばれる酵素が、A、U、C、G の中からひと塩基ずつ、鋳型の DNA 断片と完全に同じ配列に成るように、コピーをして RNA が作られます。

DNA は RNA の鋳型になるだけでなく、RNA ポリメラーゼがいつ、どのくらい、DNA のどこからどこまでのコピーを作ればいいのか、という情報も持っています。さらに、コピーされる RNA 配列のなかに、その RNA の寿命と生産性を決める配列をはめ込むこともできるのです。

RNA には、主に 3 つの種類があります。メッセンジャー RNA(mRNA)、と呼ばれる RNA は、タンパク質を組み立てるのに必要な配列情報を供給します。トランスファー RNA(tRNA)は、タンパク質のラインの配列組み立てに関与します。リボソーム RNA(rRNA)は、タンパク質を合成するリボソームの“足場”を組む手助けをします。

mRNA の配列情報からタンパク質が合成されます。リボソームがこの配列を読み、タンパク質のアミノ酸配列に読み替えます。この過程を翻訳、と呼びます。しかし、4種類しかないヌクレオチドがどうやって26種類もあるアミノ酸に翻訳されるのでしょうか？

翻訳の過程では、リボソームは3つのヌクレオチドを同時に読み、その3つの並び方がどのアミノ酸に翻訳するか、という暗号になるのです。この3つの並びはコドンと呼ばれ、アミノ酸に読み替えられる並び方は64種類あります。これにしたがって、次々にアミノ酸が端からつなげられ、タンパク質の鎖になっていくのです。また、次々につなげられたアミノ酸の配列が、タンパク質がその特徴を示すように、正確な立体構造をとるよう折り重なる方法を決定します。

まとめると、細胞内での情報伝達が、次のように行われています。

DNA >>> RNA >>> タンパク質 >>>> 特徴

情報そのものは一次元的ですが、その意味は三次元構造にあるのです。組換えDNA技術においては、生きている細胞の機能が永久的に、そして私たちが望むように変化することが、その細胞が持つDNAの一次的配列の変化によっておこる、と仮定することが基本です。

・遺伝子は、不連続なDNA情報のファイルである

遺伝子は、RNAにコピーされるために選ばれたDNA断片です。直接に、間接的にRNAはそれぞれの機能を果たしています。そう考えると、遺伝子を機能のユニットとして捉えやすくなるでしょう。

例えば、バクテリアの抗生物質耐性のように、一つの遺伝子がある一つの性質を支配していることはたくさんあります。バラの色やヒトの鼻の形はいくつかの遺伝子が作用することにより支配されている性質です。

遺伝子にはいろいろな長さがあります。数百塩基対のものもあれば、数万塩基対のものもあります。あるDNAはほんの数百塩基だったものが数千塩基にまで延長したものもあるかもしれません。また、DNA分子(染色体)の数は、1つしかもってない細胞や数個持っている細胞もあります。大腸菌のようなバクテリアは約5,000の遺伝子を持っています。ヒトは46個のDNA分子を持っており、遺伝子の数は約10万と言われています。

細胞の中にある全ての遺伝子が、同時に、同じ速度でRNAにコピー(転写)される訳ではありません。遺伝子機能を説明する時に、RNAへの転写について説明する必要があることがあります。この転写の速度は細胞自身のDNAに書かれている、既に決められた規則にのっとってコントロールされています。

例えば、私たちの体は100兆個の細胞でできていると言われますが、その一つ一つがその細胞自身のDNAを持っています。例えば、肝臓の細胞は肝臓の機能に必要な遺伝子だけを発現させますが、それは皮膚の細胞が発現させるものとは全く異なっているのです。

・DNAは制限酵素によって切断することができる

バクテリアは、ウイルスDNAのような外部から入り込んでくる、関係のないDNAに対しての防衛策として、制限酵素を持っています。制限酵素は、それぞれが独自の、おおよそ4~6塩基対の塩基配列を認識し、そのうちの1ヶ所を切断します。例えば、*Bam*H I という制限酵素は、5'..GGATCC..3' という塩基配列を認識し、2つのGの間を切断します。

制限酵素は認識部位が含まれるのであれば、バクテリアでも、植物でも、ヒトのDNAでも切断することができます。

ます。

- ・DNA の断片は DNA リガーゼによって繋ぐことができる

DNA リガーゼは DNA 断片同士を繋ぐ酵素です。

ヒトやカエル、トマトの DNA を *Bam*HI で切断した断片は、同じく *Bam*HI で切断したバクテリアの DNA と簡単に繋ぐことができます。このようにして、二種類の生物由来の DNA 断片をつなげることにより、組換え DNA は作られるのです。例えば、ヒトのインシュリンをコードする遺伝子をバクテリア DNA に組み込み、あった環境下で培養すると、バクテリアはヒトのインシュリンタンパク質を作ることができます。

- ・プラスミドは DNA の小さな環状断片

バクテリアには、小さな環状 DNA、プラスミドを細胞内に持つものがあります。プラスミドが増える時は、バクテリア自身が持つポリメラーゼで増やされるので、細胞分裂のような細胞にとっておおがかりな仕事をする必要がありません。

プラスミド DNA は小さいので、簡単に抽出、精製することができます。そして、それを制限酵素で切断すれば、同じ制限酵素で切断した他の生物の DNA 断片をつなぎ合わせることができます。

つなぎ合わせてできたプラスミドは、形質転換と言う方法で、バクテリア細胞の中で再増幅することができます。プラスミドは、今度は組みこまれた他の生物由来の DNA とともに、永遠に自己複製していくことができます。組みこまれた他の生物由来の DNA にしてみれば、いわば無銭乗車、のようなものです。

このようにしてプラスミドは完全に増幅され、このとき、組みこまれた他の生物由来の DNA も増幅されています。このとき、組みこまれた他の生物由来の DNA はクローン化された、と言い、他の生物由来の DNA を持つプラスミドはベクターと言います。

他の生物由来 DNA のクローニングに便利な上、ベクターは自身の遺伝子も増やします。バクテリアは栄養源であるアラビノースがなくなると死にますし、抗生物質耐性遺伝子を持つバクテリアはアンピシリンのような抗生物質存在下でも生存することができます。このような遺伝子はプラスミドの中に見られることが良くあります。これらの遺伝子を含め、他生物由来 DNA を持つプラスミドが細胞に入り、発現されているかどうかを確認するのは、とても簡単のことなのです。なぜなら、うまく取り込んだ細胞は抗生物質があっても生きていますが、そうでない細胞は生きていけないからです。

- ・DNA ライブラリー

先に述べたように、細胞から抽出された DNA はちいさな断片にカットされ、プラスミドに組み込まれてたくさんに増えることができます。

例えば、1,000 種類の遺伝子が細胞から抽出され、1,000 種類のプラスミドが作成され、それぞれ 1 つの細胞に 1 種類の DNA が入ったとすると 1,000 種類の形質転換された細胞が作られたことになります。これは、1,000 種類の異なった遺伝子情報をもつ細胞ができるわけです。これは DNA ライブラリーと呼ばれています。組み込まれる DNA が抽出された細胞が人間のものであれば、ヒト DNA ライブラリーとなります。

このようにしてできたライブラリーから適切な条件で調べると、そのなかから目的の DNA を見つけ出すことができます。

付録 D

発現調節、1 遺伝子=1 タンパク質

私達の体は、たくさんの異なった役割を持つ、何千ものタンパク質から成り立っています。消化酵素も、その一つですし、私達の体中に走っているホルモン信号や病気から守ってくれる抗体もタンパク質です。その、タンパク質を作るもとなる情報は、DNA が持っています。タンパク質を作り出す暗号を含む DNA 部分は遺伝子と呼ばれ、人間には 10 万以上の遺伝子が存在します。それぞれ 1 つの遺伝子は、1 つのタンパク質をコードしています。たとえば、消化酵素をコードする遺伝子は消化酵素だけをコードし、抗体や目の色素をコードする遺伝子とは異なるのです。

私達生物は、私達の遺伝子が発現するのを自身で調節することで、進化や細胞特異性、環境適応など、さまざまな理由から、細胞中で機能するタンパク質の量や種類を調節します。遺伝子発現調節は、状況変化への適応だけでなく、不必要なタンパク質が過剰生産されるのを防ぎます。食物の運搬と消化に関与する遺伝子も、発現調節されている遺伝子の良い例の一つです。例えば、糖であるアラビノースはバクテリアにとってエネルギー源と炭素源の両方に使われます。バクテリアは食物としてアラビノースを消化するために、3 種類の酵素(タンパク質)を作り出します。これらの消化酵素をコードする遺伝子は、アラビノースがないと発現されませんが、アラビノースが存在すると発現されます。これはどういうことでしょうか？

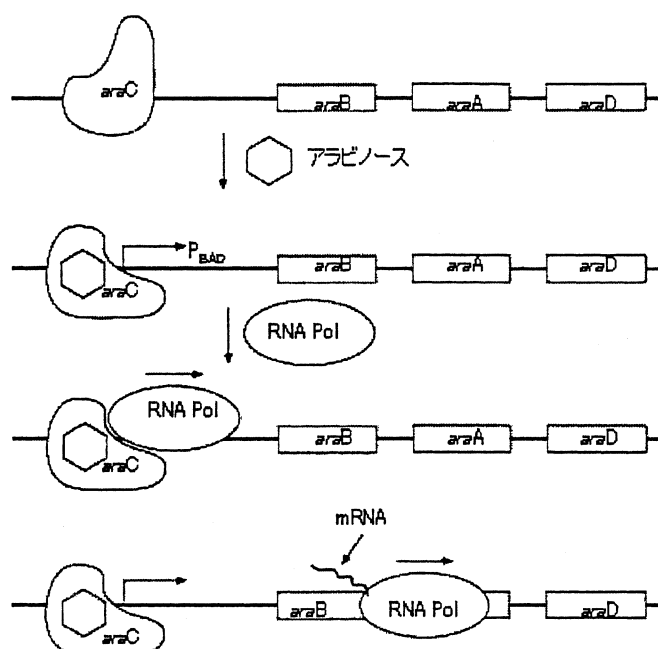
タンパク質の発現調節は DNA から RNA が転写されるときに起こることもあります。この調節はプロモーターと呼ばれる、テンプレートである DNA 上にあり、RNA ポリメラーゼが結合し RNA への転写が始まる、という非常に特異的な位置で行われます。バクテリアでは、関係のある遺伝子はある場所に集中して存在し、一つのプロモーターで転写調節されています。この遺伝子の集団(=クラスター)はオペロンと呼ばれ、1 つのプロモーターで転写調節されています。

アラビノースを分解する酵素を始めとした、3 つの消化酵素は *araB*、*araA*、*araD* の 3 つの遺伝子によってコードされています。これらの遺伝子はクラスターを形成しており、アラビノースオペロンとして知られています。これら 3 つのタンパク質は P_{BAD} という 1 つのプロモーターによって RNA への転写が開始されます。3 つの遺伝子の転写はプロモーター、オペロンを含む DNA テンプレート、RNA ポリメラーゼ、*araC* という DNA 結合タンパク質が必要になります。*araC* は RNA ポリメラーゼが結合するアラビノースオペロンの始まる DNA 配列部分に結合します。アラビノースが存在すると、バクテリアはアラビノースを細胞内に取り込みます。取り込まれたアラビノースは DNA に結合している *araC* と作用します。RNA ポリメラーゼが DNA に結合することを手助けできるように、アラビノースとの作用によって *araC* は形を変え、3 つの遺伝子の転写が始まるのです。3 つの酵素が作られると、その酵素が機能してアラビノースが消化され、なくなっていくます。アラビノースがない時には、*araC* はその形を変えることがないので、転写は行われなくなります。

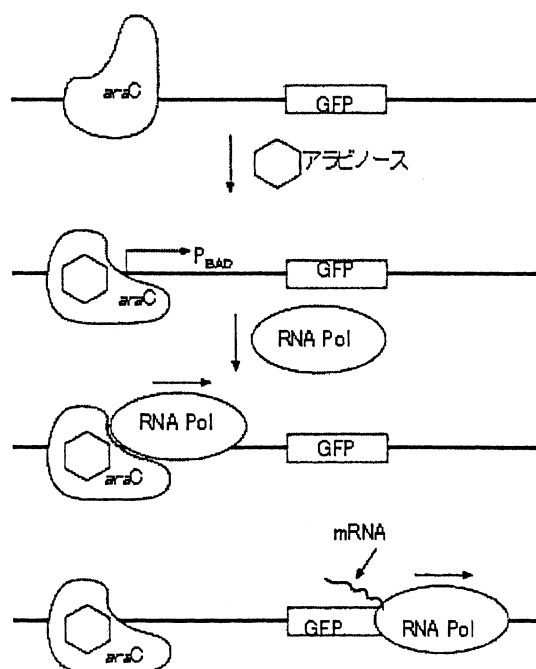
pGLO プラスミドの DNA には、アラビノースオペロンの一部分が組み込まれています。プロモーター P_{BAD} と *araC* 遺伝子が存在しています。しかし、アラビノース消化酵素をコードする *araB*、*araA*、*araD* は含まれて折らず、代わりに GFP をコードする遺伝子が 1 つ、組み込まれています。このことによって、アラビノース存在下では *araC* が RNA ポリメラーゼの結合を促し、GFP が作り出されるのです。細胞が緑色に光るのは GFP が細胞内でたくさん作り出されるからなのです。アラビノースがない場合は、RNA ポリメラーゼが DNA に結合する手助けをしないため、GFP 遺伝子は転写されません。GFP タンパク質が作り出されないときは、細胞はもともと細胞の状態、光らない、白いコロニーになるのです。

このことは、DNA>RNA>タンパク質>性質・特徴という、生物を理解する上で、大変重要な 1 つのしくみ(セントラルドグマ)の格好の例なのです。

アラビノース オペロン



GFP タンパク質の発現



参考文献一覧

- ◇ J.D.Watson et al. :「細胞の分子生物学 第3版」中村桂子ら監訳 教育社 (1995年)
- ◇ J.Darnell et al.:「分子細胞生物学下 第2版」野田春彦ら訳 東京化学同人 (1993年)
- ◇ B.Lewin :「遺伝子 第5版」菊地昭彦ら訳 東京化学同人 (1996年)
- ◇ 大田行人著「細胞からみた生物学」裳華房 (2000年)
- ◇ J.D.Watson et al. :「ワトソン組換え DNA の分子生物学」松橋通生ら訳 丸善 (1999年)
- ◇ 田宮信雄ら訳「ヴォート生化学、第2版」(1996年) 東京化学同人
馬淵一誠ら著「生命科学資料集」東京大学出版会 (1998年)
- ◇ 田村隆明、山本 雅著「分子生物学イラストレイテッド」羊土社 (2000年)
- ◇ International Human Genome Sequencing Consortium *Nature* Vol.408:792~826 (2000)
- ◇ 鈴木孝仁監修「生物図録」数研出版 (2000年)

作成年月日 2001年11月20日

このテキストは小林興、原田和雄（東京学芸大学物質生命科学科）および岩崎哲哉（同学科大学院修士1年）によって作成されたものですので、転載をおことわりします。