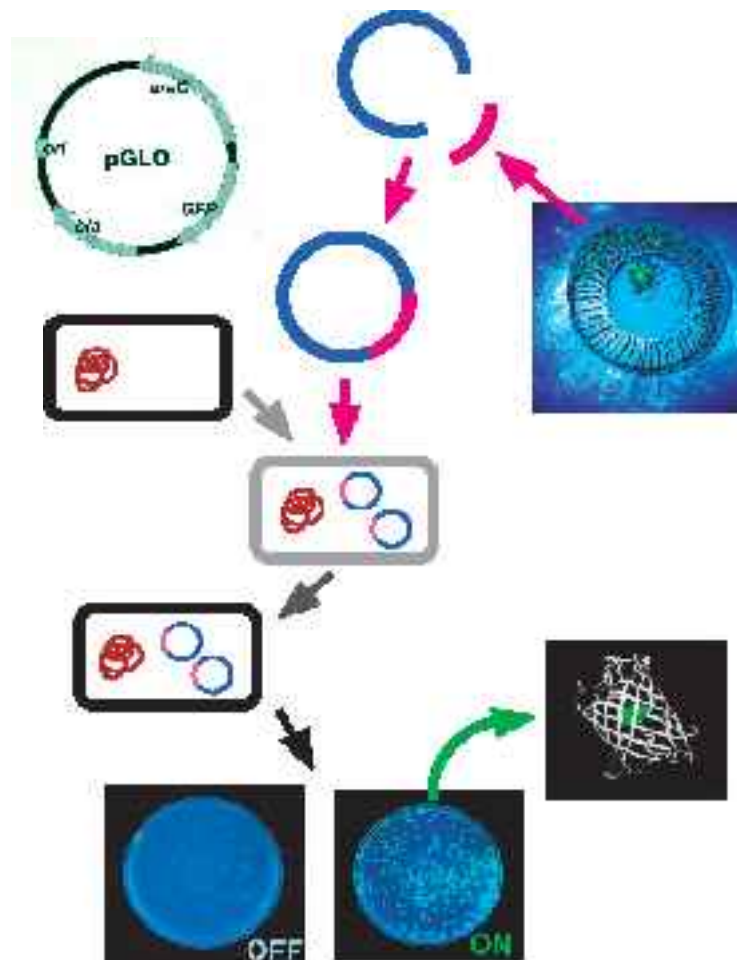


東京農工大学遺伝子実験施設  
「理科教員のための組換え DNA 実験教育研修会」

教育目的組換え DNA 実験(講義と実習)  
2005 年 7-8 月版

大藤道衛

東京テクニカルカレッジ・バイオテクノロジー科講師





## 1. はじめに

授業の中に「組換えDNA実験」を取り込む場合、実験操作を行うことが目的ではない。生徒が、実験を通じ実物に触れ、生物学における重要な概念であるセントラルドグマ(DNA RNA タンパク質 表現型)並びに遺伝子発現調節の仕組みを学ぶことが目的である。更に授業のなかでは、組換え DNA 実験の原理および対照実験を含めた実験結果の評価方法ばかりでなく、法律に定められた組換え DNA 実験の安全管理や廃棄物処理方法についても含まれる必要がある。授業を受けた生徒は、組換え DNA 実験の体験を通じ、生命科学の面白さに触れるキッカケや更に深く学ぶ動機付けになるであろう。

本研修では、遺伝子教育ならびにアメリカ合衆国での遺伝子教育の歴史、更には組換え DNA 実験の原理と流れを概説した後、米国の高校で広く使われている市販教材“Biotechnology Explorer”(Bio-Rad laboratories)を用い、組換え DNA 分子を用いた大腸菌の形質転換実験(組換え DNA 実験)を体験する。また実験結果判定、実験の安全管理、廃棄物処理方法ならびに授業方法についても考察する。この実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性確保に関する法律」に基づく「教育目的組換え DNA 実験」である。

“Biotechnology Explorer”には、実習用試薬、器具ばかりでなく50分単位で授業ができるように教員用テキスト、生徒用テキスト、確認テストなど授業実施に必要な教材が全て含まれている。このキットでは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)に含まれる緑色蛍光タンパク質である Green Fluorescent Protein (GFP)の遺伝子を大腸菌へ導入し大腸菌を形質転換することで光る大腸菌を作製する系を使用している。具体的には GFP の遺伝子を大腸菌プラスミドのプロモータ下流に組み込んだ組換えプラスミドDNA (pGLO)を大腸菌K12(HB101)株に導入し形質転換する。形質転換された大腸菌体内で、GFP 遺伝子を発現させ、GFP タンパク質を作らせる。タンパク質が発現されたかどうかは、この大腸菌に紫外線を当て蛍光により確認する。発現調節に必要なプロモータはアラビノースオペロンのプロモータ配列を用いているため培地にアラビノースを添加するか否かで遺伝子発現調節ができる。

このキットは、実験に必要な試薬・器具・テキストが含まれ良くできたものであるが、実際に授業を組み立てる教員は、キットをそのまま使用するのではなく、その授業で生徒に教える内容を明確にし、授業の流れの中で組換え DNA 実験を有効に取り入れることが大切である。

本テキストは、実験のプロトコール、実験実施のポイントばかりでなく、参考図書ならびに参考資料も多く盛り込んである。講習終了後も本テキストが教材作成の参考になれば幸いであろう。

2005年7月27日

大藤道衛

## 目次

1. はじめに p. 3
2. 講義・実習予定 p. 6
3. 遺伝子教育と教育教材 p. 7-12
  - 3-1. 遺伝子教育について
  - 3-2. 米国におけるバイオ技術と産業の発展と遺伝子教育
  - 3-3. 遺伝子教育教材キット” Biotechnology Explorer”
4. Biotechnology Explorer テキストを用いた実習授業の流れ p. 12-14
  - 4-1. 形質転換授業準備(約3時間)
  - 4-2. 遺伝子組換えについての講義と実習・演習(50分 x4コマ)
5. 教育目的組換え DNA 実験の背景と予備知識 p. 14-30
  - 5-1. 遺伝子工学と実習の位置付け
  - 5-2. DNA の構造
  - 5-3. セントラルドグマとコドン表
  - 5-4. 組換え DNA 実験
  - 5-5. 制限酵素と連結酵素
  - 5-6. Green Fluorescent Protein (GFP) とは
  - 5-7. プラスミド pGLO の構造
  - 5-8. アンピシリン (Ampicillin) と  $\beta$ -ラクタマゼ( $\beta$ -lactamase)
  - 5-9. pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌におけるタンパク質の発現
  - 5-10. アラビノースオペロンと遺伝子発現調節
  - 5-11. プロモータ配列と遺伝子発現
  - 5-12. 大腸菌への遺伝子導入
  - 5-13. 教育目的組換え DNA 実験に際しての注意点
6. 実験の準備 p. 30-36
  - 6-1. キットの購入
  - 6-2. 器具の準備、試薬・プレートの準備
  - 6-3. 実験台の準備

- 7. 組換え DNA 実験 (形質転換) p. 37-50
  - 7-1. 実験開始の確認事項
  - 7-2. 実験方法
  - 7-3. 実験のポイント
  - 7-4. 実験結果のまとめ
  - 7-5. まよめのポイント
  - 7-6. 実験結果例
  - 7-7. 実験終了後の廃棄物処理
  
- 8. どのような授業をおこなうか p. 51-52
  
- 9. 参考図書 p. 53-55
  - 9-1. 実験に役立つ本
  - 9-2. 米国高等学校生物学教科書
  - 9-3. 関連 URL
  
- 10. 参考資料 p. 56-79
  - 10-1. ゲノム / 遺伝子 / DNA
  - 10-2. 遺伝子とタンパク質の関係のたとえ話
  - 10-3. 組換え体の封じこめについて
  - 10-4. 組換え DNA 実験管理規則と安全委員会
  - 10-5. タンパク質の立体構造表示
  - 10-6. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列
  - 10-7. 組換え体の封じこめについて
  - 10-8. 安全委員会
  - 10-9. オートクレーブ以外の滅菌方法
  - 10-10. 実験に用いる水について
  - 10-11. LB 培地調製方法
  - 10-12. 組換え DNA 実験における無菌操作とヌクレア-ゼ
  - 10-13. 形質転換効率測定の必要性について
  - 10-14. pGLO プラスミド DNA の起源

## 2. 講義・実習予定

### 1日目

#### 講義:

1. 米国における遺伝子教育
2. 組換え DNA 実験の基礎知識
3. 教育目的組換え DNA 実験実施の要点
  - 実験原理
  - 実験操作のコツ
  - 実験操作の注意点
  - “Biotechnology Explorer Kits” テキストの使用法

#### 実習:

1. 大腸菌への GFP 遺伝子の導入と形質転換
  - 実験開始の準備
  - 形質転換実験

### 2日目

#### 演習と講義:

1. 形質転換データのまとめ考察
2. 実験の準備方法
  - 実験に必要な機器・器具の準備
  - 培地・試薬の準備
  - 実験台の準備
3. 廃棄物処理方法
  - 使用した器具・プレートの滅菌
4. 遺伝子教育授業の実施方法

#### 実習:

1. 形質転換結果の観察
  - コロニーの観察
  - 紫外線照射による GFP 発現確認
  - コロニー数の測定
2. アラビノースによる GFP 遺伝子発現実験

質疑応答:

### 3. 遺伝子教育と教育教材

#### 3-1. 遺伝子教育<sup>(注)</sup>について

遺伝子教育とは、実験を含めた授業により生命科学に対する興味や理解を促す教育である。生命科学とそれを支える遺伝子工学などのバイオテクノロジーは、21世紀の基盤技術といわれている。組換え DNA 実験を含む生命科学の授業は、これからの科学を支える若い人々に生命科学への興味を促すばかりでなく、市民の一般教養(例えば新聞の生命科学に関する記事を読みこなし、自分の意見がもてるレベル)としても必要であろう。このような背景で遺伝子教育の重要性は益々高まっている。

注:用語の説明

遺伝子教育、DNA 教育、バイオテクノロジー教育、生命科学教育は、同じような意味で使われることが多い。本稿では、触れないが生命倫理を遺伝教育に含めて考察する場合もある。

このような遺伝子教育の主な目的には、下記の4種類のカテゴリーが考えられる。

生命科学への動機付け教育(中学校・高等学校)

書物の上ばかりでなく、実習を通じ物に触れ興味を促す。

高度な生命科学教育

高等学校の教科レベルを超えた先取り教育(Advanced placement (AP:米国)、スーパーサイエンスハイスクール(SSH:日本))

実験技能・技術教育

実験の組み方、操作方法、データの見方などの実験技術を促す。

(専門高等学校等での Technique/ Technology も含まれる。)

市民教養教育

バイオテクノロジーや遺伝子工学技術に対する理解と認識をもち、自分の意見がもてるレベルのリテラシー教育(Scientific literacy, Genetic literacy Public acceptance (PA) )

#### 3-2. 米国におけるバイオ技術と産業の発展と遺伝子教育

遺伝子教育を考える上で、生命科学・バイオテクノロジー先進国であるアメリカ合衆国の状況を知る必要がある。米国では、学術研究・産業における生命科学・バイオテクノロジーの発展に伴い遺伝子教育に対する努力がなされてきた。その結果として、生命科学の動機付けの機会が中学校・高等学校で提供されるばかりでなく、市民リテラシーとしての Genetic literacy 教育が学校教育に取り入れられている。このような教育は、若者が生命科学関連の大学・大学院に進み研究者・技術者を見ずばかりでなく、遺伝子医療・バイオ産業が、市民に受け入れ(Public acceptance)られていく素地が形成されてきた。そこで、米国におけるバイオテクノロジーの発展とそれに伴う学校教育における遺伝子教育の歴史を眺めてみる。

### 3-2-1 遺伝子工学技術の進歩と産業の発展

1970年代初頭の組換えDNA実験技術の確立から現在までのバイオ技術の進展を眺めてみる。

1970-1980年代前半(クローニング・シーケンシングの時代)

組換えDNA技術を中心とした遺伝子工学技術が確立し、多くの遺伝子がクローニングされるとともに、バイオ産業への導入が開始され生物製剤が組換え技術で作成され始めた。また、組換え植物の研究が始まった。

1980年代後半(クローン化遺伝子の利用とPCR法によるDNA解析の時代)

組換え技術ばかりでなく、PCRを中心とした解析技術の進展によりDNA鑑定、遺伝子診断・遺伝子治療への応用が始まった。

1990年代(多検体同時処理(High throughput:HT)化による網羅的解析の時代)

シーケンシング技術にIT技術を駆使した大規模ゲノム解析技術が確立し多くの生物におけるゲノムプロジェクトが進展した。また、組換え食品の実用化がなされた。

2000~(omeの時代)

複雑な生体物質の相互作用を調べるためバイオインフォマティクスが発展した。淡白質全体を見るプロテオーム(proteome)からタンパク質間の相互作用全体を見るインタラクーム(interactome)、表現型全体を見るフェノーム(phenome)など網羅的解析手法を用いて生命現象を調べる試みがなされ始め、生命科学の新たな展開が期待される時へと移っている。

このように、1970年代以降、従来の中学・高校の生物学の考え方とは異なる生物学の流れができてきた。このような社会の動きに呼応し、1980年代より米国高等学校における遺伝子教育の取り組みが始まり、生物学の新しい考え方を学校の中に取り込もうという機運が盛り上がった。この教育の背景には、大学・企業・高校の連携が深い米国ならではの歴史があった。

### 3-2-2 米国高等学校での遺伝子教育の取り組み

1980年~:学校の生物学と実社会でのバイオ産業の進歩に温度差

高校カリキュラムの生物学と実社会でのバイオテクノロジーとの間にあるギャップの存在を高校教員が感じ取ってきた。「生命科学を目指す人、一般社会人となる人」

全ての人に対する一般教養(リテラシー)としてのバイオテクノロジー教育/遺伝子教育の必要性からギャップを埋めるための新カリキュラムを作ろうとする機運が、カリフォルニアなどバイオ産業が発展した地域の高校教員の中から草の根的に発生した。



1985 年ごろ: 大学研究者と高校教員による共同カリキュラムの創造

米国では、高校教員が夏季休暇などを利用して大学でトレーニングを受ける機会が多々ある。このようなトレーニングの中で Stanford Univ. などでは、高校教員の遺伝子教育トレーニングが始まった。更に、高等学校の advanced placement (AP) プログラムに遺伝子教育が取り入れられた。このトレーニングの中で、高校・大学教員と地域企業との交流(産学共同の機運)がもたれた。大学研究室と地域企業との連帯が数多く見られる大学の中で、高校教員のトレーニングについて、企業の協力が見られた。

1980 年代後半: カリキュラム開発

バイオ技術の発展と遺伝子教育は、生命科学の発展とそれに基づくバイオ技術の推進は「車の両輪」という認識のもと遺伝子教育のカリキュラム開発に対し国の助成が促進され始めた。

1990 年: 実験を含む遺伝子教育の推進

初の“DNA SCIENCE”教科書が作成された。また、安全性が確かめられている教材を用いた教育目的の組換え DNA 実験は、研究目的に作られた NIH ガイドラインと無関係であるとの認識で、実験を含む遺伝子教育が推進された

1995 年

DNA SCIENCE が“National Science Education Standards”に掲載

この Standard は、日本の指導要領と異なりガイドラインとなる。このため教員はこの Standard を参考とし様々な教材を作成し独自の授業を展開している。

充実した生物学教科書が多数出版されてきた。DNA 抽出など簡単な実習が盛り込まれているもの AP プログラム対応のテキストなどもある。

Bio-Rad laboratoreis 社による遺伝子教育教材キット“Biotechnology Explorer system“(Stanford Univ. 共同開発)販売開始

このように米国における遺伝子教育の発展には、高校(高校教員)、大学、企業との連携ができる素地があった。このため、高校生に対する大学・企業における様々な研修プログラムも行われている。

### 3-2-3 米国の遺伝子教育(大学・企業連携)事例

Bay area biotechnology education consortium(BABEC) : <http://www.babec.org/>

サンフランシスコ湾周辺の大学・企業・高等学校が連携し、教員向けならびに高校生向けワークショップを夏休みに実施している。



### The University of Illinois College of Medicine at Rockford

Pierce 社と共同で学生のインターンシッププログラムを 1992 年より実施している。夏休みを利用して、高校生が大学・企業にて、また大学生は企業にてインターンとして研究に従事する。3 ヶ月間の成果を審査員が審査し、優勝者には 3000 ドルの奨学金が支給される。

テーマは、企業・大学研究室テーマの一部に関わる。例えば、アッセイ法の開発・現製品の改良等夏休み 3 ヶ月で実施できる内容である。短期間での研究であるため、審査基準は、研究の新規性(10%)、実験内容の把握と結論の妥当性や今後の展望(50%)、プレゼンテーション能力(40%)である。審査員は、大学教官、企業研究者などが担当する。

大学生 企業  
高校生 企業・大学



### 3-3 . 米国の遺伝子教育教材 “Biotechnology Explorer”

遺伝子教育を実施する際、教材開発は大きな課題です。アメリカ合衆国では、多くの遺伝子教育教材が市販されている。その中で、特徴をもち高いシェア-をもつ教材が、“Biotechnology Explorer Kits & Curriculum”( Bio-Rad laboratories 社製品)である。このキットは、分子生物学研究に関わる多くの実験手法(図1)が含まれており構成もよく工夫されている。これは、Stanford 大学の高校教員教育プログラムを参考にし、元高校教員である Bio-Rad laboratories の担当者(Ron Mardigan) が作製したプログラムであり、米国 advanced placement (AP)プログラムに対応した製品である。キットは、使用する試薬・器具を含むばかりでなく、実習実施に際してのカリキュラムと先生用ならびに生徒用マニュアル、理解度確認の練習問題が含まれている。

“Biotechnology Explorer Kits & Curriculum”

#### Kit 1: 形質転換(組換え DNA 実験)

pGLO Bacterial Transformation kit

#### Kit 2: 発現タンパク質の精製(組換え DNA 実験)

Green Fluorescent Protein Chromatography kit

#### Kit 3: 電気泳動による DNA 解析

Analysis of Precut Lamda DNA kit\_

#### Kit 4: 電気泳動による DNA 解析

Restriction Digestion & Analysis of Precut Lamda DNA kit

#### Kit 5: DNA 鑑定

DNA Fingerprinting kit

#### Kit 6: クローニング(組換え DNA 実験)

Secrets of the Rain Forest kit

#### Kit 7: ゲルろ過原理

Size Exclusion Chromatography

#### Kit 8: PCR と DNA 鑑定

PV92 PCR/ Informtics kit

#### Kit 9: タンパク質解析

Protein Fingerprinting kit

#### Kit 10: ヒトゲノム DNA 抽出

Genes in a Bottle kit

#### Kit 11: 免疫化学

ELISA ImmunoExplorer kit

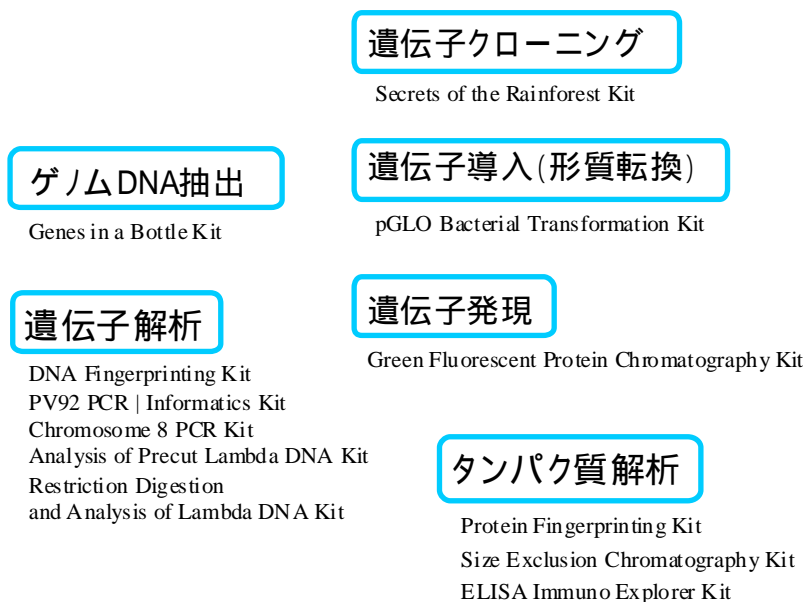


図1 遺伝子工学技術における各キットの位置付け

各キットは、遺伝子工学技術を用いた分子生物学実験を体験できるように構成されている。

遺伝子教育キット教材をそのまま使用することで、実習が実施できる。しかし、このキットは米国の AP プログラム用に設計されているため、練習問題の内容など日本の授業にそぐわない場合もある。このため、日本でキットを使用する際、教員自身が教えたい内容に適するようにキットの実験を取り込む必要がある。

下記に遺伝子教育用キットを用いる場合のメリットを挙げてみる。

1. 必要な試薬・器具が含まれている。
2. 容易な操作で実習できる。
3. 比較的安価である。
4. 学習目標を自由に設定できる。

#### 4. Biotechnology Explorer キットを用いた実習授業の流れ

Biotechnology Explorer Kit 1 を用いた教育目的組換え DNA 実験の流れをまとめてみる。

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット(Biotechnology Explorer Kit 1: カタログ No.166-0003JEDU)

製造(販売): Bio-Rad Laboratories (日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ)

<http://explorer.bio-rad.com>

示したページ数は、キットに含まれるテキストマニュアルのページ数を示している。

#### 4-1. 形質転換授業準備(約3時間)

授業開始前々日に試薬・器具の準備ならびに生徒用・先生用マニュアル当該箇所の確認を行う。

実習の試薬・器具準備 p. 3-15

必要な試薬・器具一覧:p. 3-4

実験開始前の準備:p. 11-12

寒天プレートの準備:p. 13-15

スタータープレートの準備・試薬調製:p. 15-17

遺伝子組換え原理・実験原理・操作方法について講義内容の確認

形質転換と遺伝子組換え:p. 1-2

このキットを使用するにあたってのポイント:p. 5-10

先生用実験操作簡易説明「クイックガイド」:p. 18-21

付録:p. 50-68

(付録内容 A:バイオテクノロジーの歴史、B:このキットに出てくる用語の解説、C:分子生物学の基礎と用語、D:発現調節、E:参考文献、F:教育目的組換え DNA 実験実施における注意事項)

生徒用マニュアル: lesson ごと解説・操作方法、練習問題で構成されている。

Lesson 1 遺伝子組換えについて p. 31-34

Lesson 2 遺伝子導入実験 p. 35-41

Lesson 3 データの収集と分析 p. 42-45

Lesson 4 考察 p. 46-49

各 lesson の練習問題答え(先生用):p. 22-30

#### 4-2. 遺伝子組換えについての講義と実習・演習(50分 x4コマ)

各コマにおける実施内容の要点を示す。

##### 1コマ目(Lesson 1): 遺伝子組換えについて(講義) p. 31-34

下記の5項目を盛り込んだ講義。

組換え DNA 実験と原理(宿主・ベクター)

組換え DNA 実験の規則(実験室・滅菌方法)

実験の結果評価方法

遺伝子発現とセントラルドグマ(DNA>RNA>タンパク質>形質)

発現調節の仕組み(プロモーター:種固有)

2コマ目(Lesson 2) : 遺伝子導入実験(実習) p. 35-41

pGLO による形質転換・培養を行う。

3コマ目(Lesson 3) : データの収集と分析(演習) p. 42-45

コロニーの有無、蛍光観察によりを、発現調節の仕組みを考える。(定性的分析)

4コマ目(Lesson 4) : 考察(演習) p. 45-48

コロニー数を測り、他のクラスメートの結果と比較するとともに形質転換効率を測定し、評価する。  
(定量的分析)

注:ここでいう「講義」・「実習」・「演習」とは、

講義:先生からの一方通行が中心の授業

実習:先生の指示により生徒が手を動かし実際に実験してみる授業

演習:先生と生徒がディスカッションし双方向性のある授業

## 5. 実験の背景と予備知識

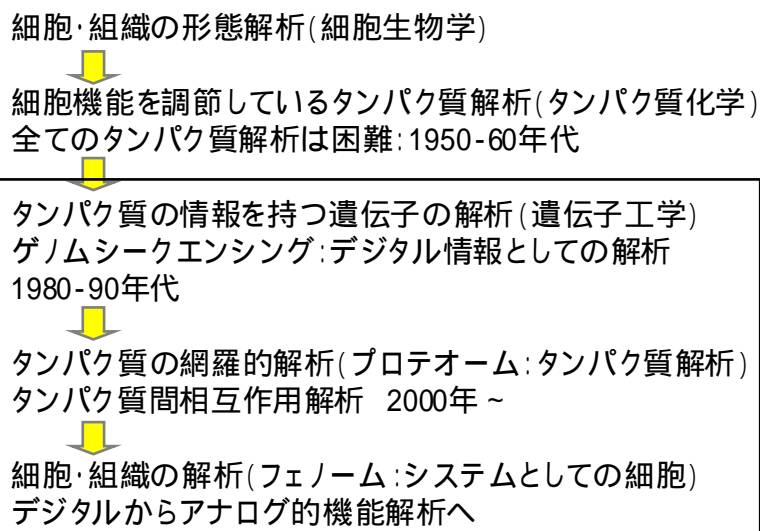
### 5-1. 遺伝子工学と実習の位置付け

そもそも遺伝子工学は、なぜ発展したのであろうか？

生命の分子レベルでの解明は、当初細胞・組織レベルで行なわれた。細胞染色や免疫染色などの手法も取り入れられた。その後、細胞内で機能を果たしているタンパク質(酵素、ホルモン、調節物質)を抽出精製する試みがなされたが、細胞内で一時に存在するタンパク質の種類は、数千から数万と多く、20種類のアミノ酸の配列から立体構造を形成するタンパク質を解析することは、困難を極めた。また、タンパク質の種類によっては、存在量が低く抽出精製も困難なものがあった。このため、タンパク質自体を取り出すのではなく、その情報を持つ遺伝子であるDNAを取り出し解析する方が、容易と考えられた。組換え DNA 技術が開発された1970年代から、タンパク質に対応する遺伝子の分子クローニングが盛んに行なわれるようになった。その後、DNA 解析技術や機器の進歩にも助けられ、その生物がもつ遺伝子全部を含むゲノム DNA 塩基配列を決定する仕事(ゲノムプロジェクト)が進み、情報である遺伝子を網羅的に見るできるようになってきた(図2)。

今世紀に入り、ゲノム DNA 塩基配列に基づき、遺伝子の発現を網羅的に検索するトランスクリプトーム解析、さらにはタンパク質を網羅的に見るプロテオーム研究がなされている。トランスクリプトーム解析は、マイクロアレイや DNA チップを用い、プロテオーム研究では、2次元電気泳動、MALDI-TOF-MS(質量分析)、更にはNMR(核磁気共鳴)などの手法により多数のタンパク質を同定され構造解析がなされている。このような流れの中で、遺伝子工学は、機能を持つタンパク質解析の近道、突破口としての意味を持っていた。一方、DNA 解析技術は、DNA 上の繰り返し配列の繰り返し数を測定することを利用した個人鑑定や病気に関係した遺伝子の変異解析による遺伝

子診断などその方法自体が実用的な分野に利用されている。



## 図2 生命科学の発展と遺伝子工学の位置付け

生命科学は、細胞を見る学問から、分子レベルへと移行した。タンパク質の構造を調べることから更に遺伝子工学による遺伝子のクローニング・シーケンシング、ゲノムデータベースに基づいた細胞内分子の網羅的解析により細胞全体をみる方向へ進んでいる。

遺伝子工学実験には、特定の遺伝子クローンを得る遺伝子クローニング、得られたクローン化遺伝子を他の細胞に入れる遺伝子導入、更に遺伝子の多型、変異、塩基配列を決める遺伝子解析がある(図3)。これらの実験のうち、いわゆる組換え DNA 実験と呼ばれるものは、遺伝子クローニングならびに遺伝子導入実験である。

Biotechnology Explorer キットでは、オワンクラゲに含まれる蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)の遺伝子を大腸菌のプロモータ配列をもつベクターに組み込んだ組換え DNA 分子を大腸菌に導入し大腸菌を形質転換する。培地に発現誘導物質を加えることでこの大腸菌内で GFP が発現したことを紫外線照射による GFP の蛍光により確認する。

この授業では、組換え DNA 実験の原理と操作方法、組換え DNA 実験を実施する際のきまりごと、コントロール実験とに比較による実験の結果評価方法、遺伝子発現とセントラルドグマ、発現調節の仕組みを学ぶことができる。

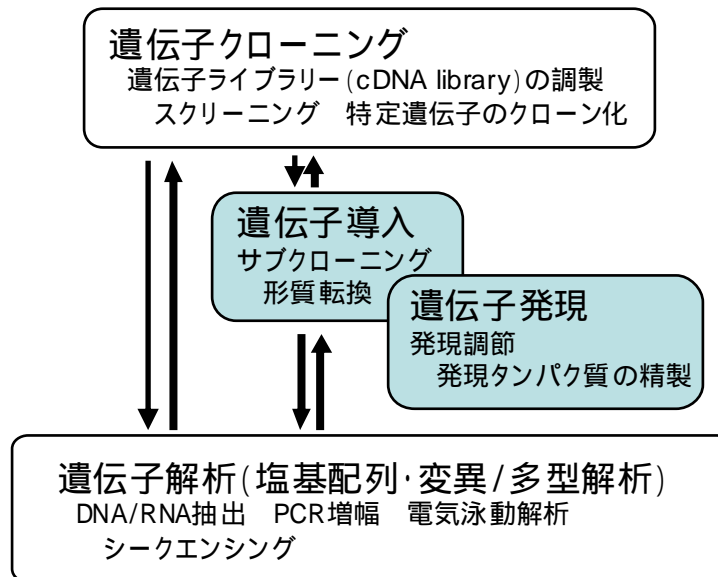


図3 遺伝子工学実験の全体像

遺伝子工学実験は、遺伝子クローニング、細胞内への遺伝子導入と遺伝子発現、遺伝子解析に分けられる。

### 5-2 . DNA の構造

DNA は、デオキシリボースという糖にアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) という 4 種類の有機塩基並びにリン酸が結合したヌクレオチドがリン酸エステル結合した高分子である。この 4 種類の塩基の配列が遺伝情報をになっている。このため塩基の並び方 (塩基配列) を遺伝暗号ということもある。

分子構造はヌクレオチドの繰り返し構造 (図4) であるため、複雑な立体構造をとるタンパク質にくらべ解析しやすい構造である。2重らせんの形成に当たっては、GとC (水素結合3つ)、AとT (水素結合2つ)が、対となって結合する。このため水素結合が3本あるGCの含量はDNAの安定化に寄与している。また、リン酸は中性水溶液中でマイナスチャージを帯びているため、DNAを分析する際には、電気泳動による分離方法が有効である。



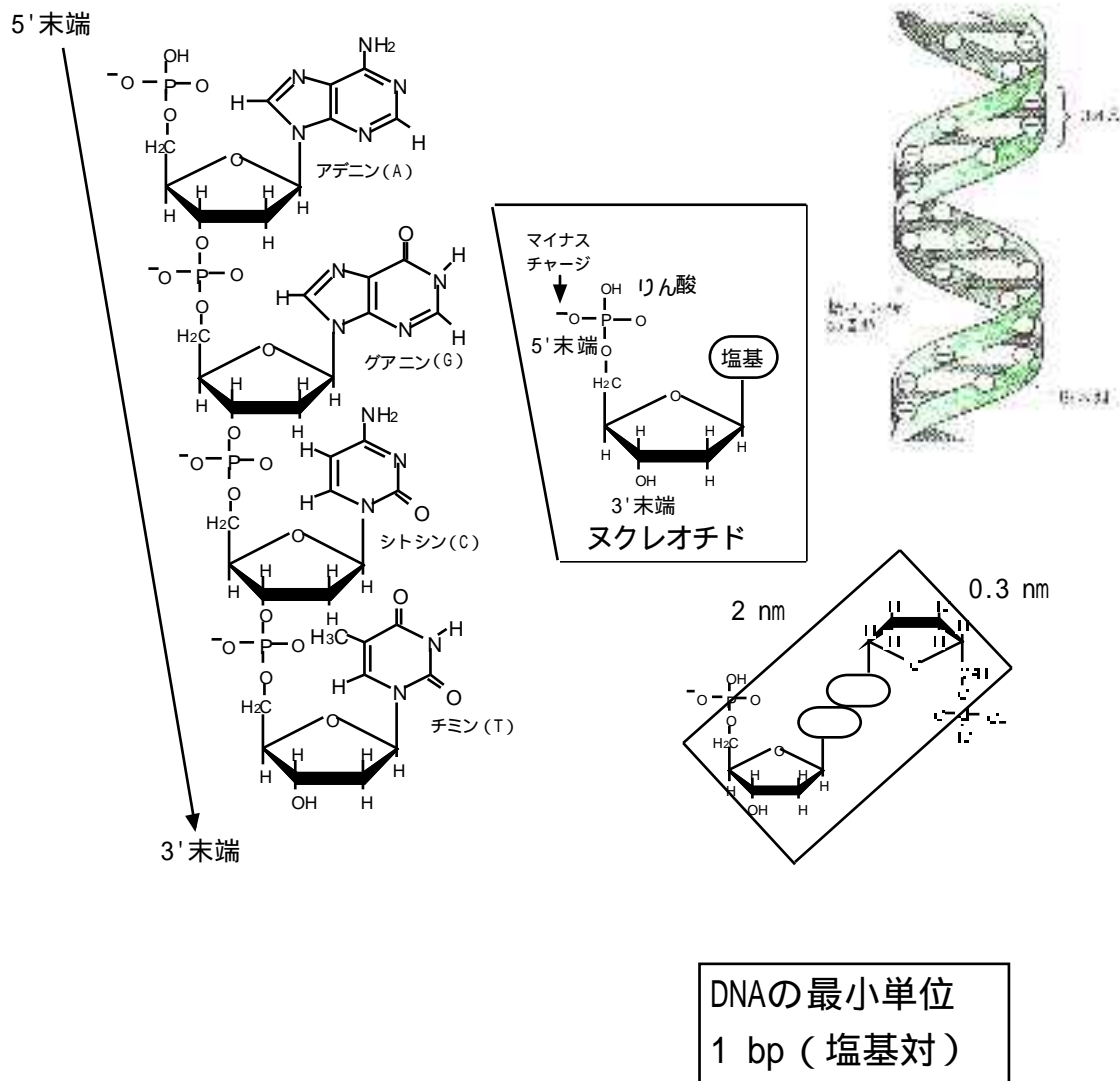


図4 DNAの構造

DNAには、糖に含まれるC(炭素)の番号により方向付けられている。これは、リン酸が結合している5'方向とOH基が存在する3'方向である。また、DNAの最小ヌクレオチド単位を1 base pair (bp:塩基対)といい、幅2 nmで長さが約0.3 nmである。

### 5-3. セントラルドグマとコドン表

遺伝情報は、DNA から RNA に転写され、タンパク質に翻訳される。この流れはレトロウイルスを除く全ての生物に共通である。この流れに沿って、遺伝情報は機能をもつタンパク質へ細胞内で作られていく(図5)。

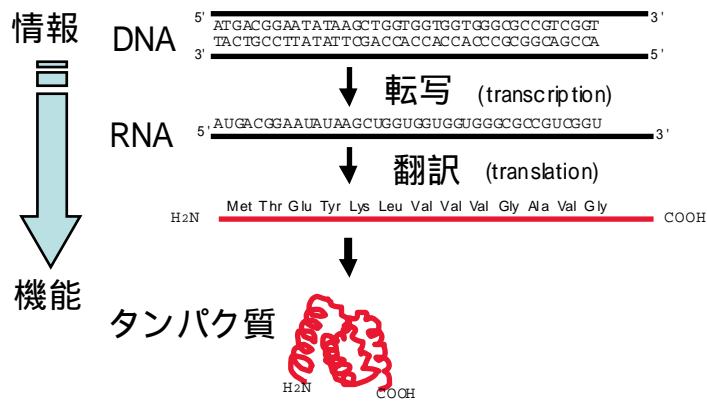


図5 セントラルドグマ

DNA 上に載っている遺伝情報は、RNA ポリメラーゼにより RNA に転写されます。RNA もまた情報を担う分子です。ここで、RNA は T の代わりにウラシル(U)となります。RNA からリボソーム上で翻訳が行われアミノ酸が連結してタンパク質が作られる。なお、タンパク質はアミノ酸が連なった高分子で折りたたまれ(フォールディングされ)立体構造を形成する。

第一塩基	第二塩基				第三塩基
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	stop	stop	A
	Leu	Ser	stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

表1 コドン表

DNA の塩基配列(A, G, C, T)は 3 塩基を 1 単位 (コドン) として RNA に転写された後、アミノ酸に翻訳される。コドン表は、この遺伝暗号解読表である。(コドン表では、RNA で表しているため塩基は AGCU で示されている。) このコドン表は、基本的に全ての生物に対し共通である。

#### 5-4. 組換え DNA 実験

異なる生物由来のDNAをプラスミドDNAなどのベクターDNAに結合させた「組換えDNA分子」を細胞内に導入することで新たな形質を持つ生物が生まれる。このような組換えDNA分子を用いた新たな個体を作成する実験を組換えDNA実験という。具体的には大腸菌を用いた実験を考えてみる。まず、cDNAライブラリーなどから目的DNAを制限酵素にて切り出す。一方プラスミドなどのベクターDNAも同じ制限酵素で切断した後、目的DNAとベクターDNAを連結酵素(DNAリガーゼ)にて連結する。この分子を「組換えDNA分子」という。この組換えDNA分子を宿主細胞(ここでは大腸菌)に導入することで、組換えDNAをもつ細胞ができる。ベクターDNAのプロモーター領域の下流にコドンに合わせて目的遺伝子を組み込むと、遺伝情報に従い組換えタンパク質が宿主細胞のタンパク質合成系を用いて合成される。その結果、細胞内で新たに合成されたタンパク質により大腸菌の形質が変化するため形質転換という。(ここで大腸菌は単細胞であるため細胞=菌個体である。)

種を超えて組換え実験ができる前提は、全ての生物において遺伝子は4種類の塩基を持つDNAで構成されており、塩基配列とアミノ酸の種類の関係(コドン表)も生物種を超えて共通であることによる。

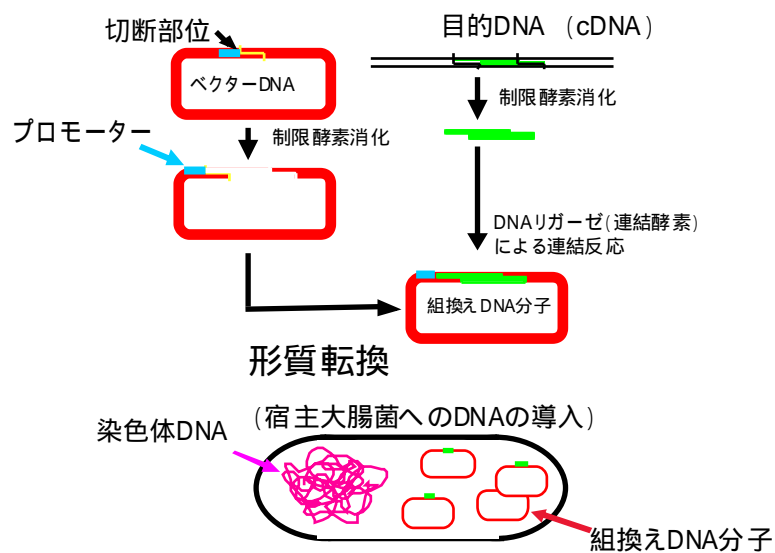


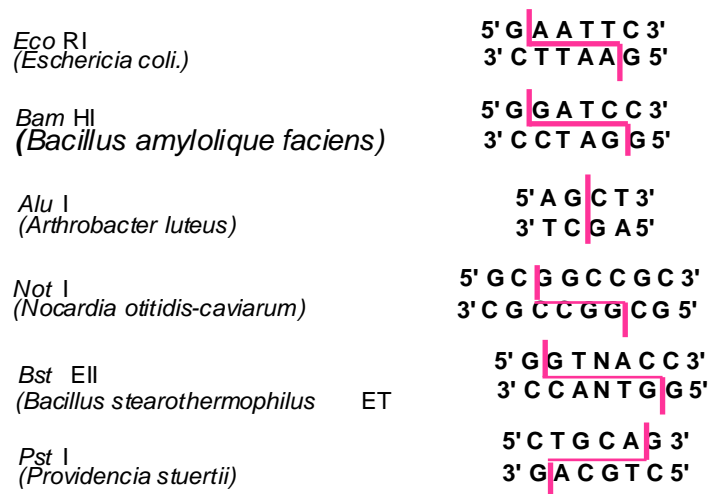
図6 大腸菌を宿主とした組換えDNA実験

ベクターDNA(遺伝子の運び屋)としてプラスミドDNAを、宿主として大腸菌を用いた場合を示している。

## 5-5. 制限酵素と連結酵素

### 制限酵素

DNA を切断する酵素(DNA 分解酵素 : DNase)には、DNA 鎖の途中を切断するエンドヌクレアーゼ (endonuclease) と DNA 鎖の末端から切断するエキソヌクレアーゼ (exonuclease) がある。エンドヌクレアーゼのうち、特定の塩基配列を認識し、この部位を特異的に切断する酵素を制限酵素 (restriction endonuclease) という(図7)。制限酵素は、現在までに 1,000 種類以上が見つけれ、100 種類以上がメーカーから市販されている。



### 図7 制限酵素

制限酵素には、4 塩基認識、6 塩基認識、8 塩基認識など色々な種類がある。何れも

認識配列は回文構造 (palindorome) を持っている<sup>(注)</sup>。命名は、その酵素が存在する微生物の名前に由来している。属名と種名の最初の 2 文字のイタリック体で示し、1 種類の菌で 2 種類以上の制限酵素が存在するときは、ローマ数字を付け区別する。

また切り口は、5 または 3' 側に突出している付着末端 (cohesive end) や平滑に切断される平滑末端 (blant end) がある。

注: パリンドローム 構造をとらない配列を認識する制限酵素もある。

### 連結酵素

2 本の異なる DNA 鎖の 3'-OH と 5'-リン酸基を、ホスホジエステル結合で連結させる、いわば糊の役割をする酵素を DNA リガーゼ (DNA ligase: 連結酵素) という(図8)。よく用いられる DNA リガ

ーゼには、大腸菌 DNA リガーゼ、T4DNA リガーゼがある。前者は、付着末端同志の連結に適し、後者は平滑末端同志の連結もできる。これらの酵素も各メーカーから市販されている。

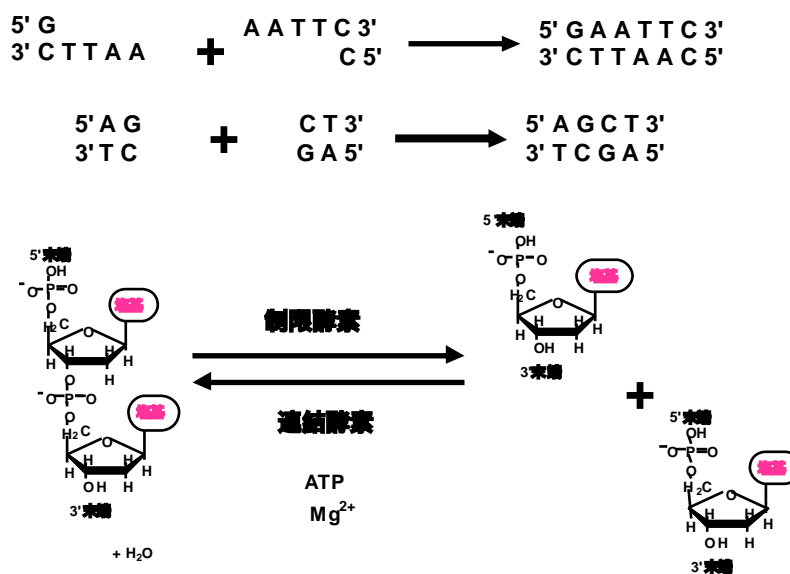


図8 連結酵素反応

連結酵素は、付着末端、平滑末端いずれも連結することができる。よく用いられる連結酵素に大腸菌由来 DNA リガーゼがあるが、平滑末端の連結反効率は低い。一方、T4 DNA リガーゼは、平滑末端の連結反応も効率よくおこなうことができる。なお、この反応はエネルギーを必要とするため、ATP が必要である。

5-6 . Green Fluorescent Protein (GFP) とは

GFP は発光オワンクラゲ *Aequorea victoria* (図9A) に含まれる緑色蛍光タンパク質である。オワンクラゲにはフォトサイトと呼ばれる発光組織があり、この組織中にイクオリンと GFP の2つの発光分子が結合して存在している。外部から刺激を受けた場合、イクオリンにカルシウムが結合し、エネルギーが生産される。そのエネルギーが GFP に受け渡されて緑色の蛍光を発する。一方、単離された GFP にエネルギーの高い紫外線を照射した場合でも GFP は、蛍光を発する。これは紫外線を当てると照射された光のエネルギーの一部を熱として、残りの多くのエネルギーを蛍光と放出するためである。蛍光は、始めに照射した光よりもエネルギーの低い光(長波長)となる(注)。(図9B)。

GFPは、27kDa(分子量:27000)の籠状のタンパク質を構成している3つのアミノ酸が発色団を形成している(図9C、巻末<参考>参照)。

注:  $E = h\nu = hc/\lambda$ : エネルギーは光の波長に反比例する。つまり紫外線のような波長の短い(青色系の)光のエネルギーは高く、赤外線のような波長の長い(赤色系の)光のエネルギーは低い。

E: エネルギー、 $\lambda$ : 波長 (nm)、N: アボガドロ数 (6.02x10<sup>23</sup>)、h: プランク定数 (1.58x10<sup>-37</sup> kcal/mol)、c: 光速 (3x10<sup>8</sup> m/s)

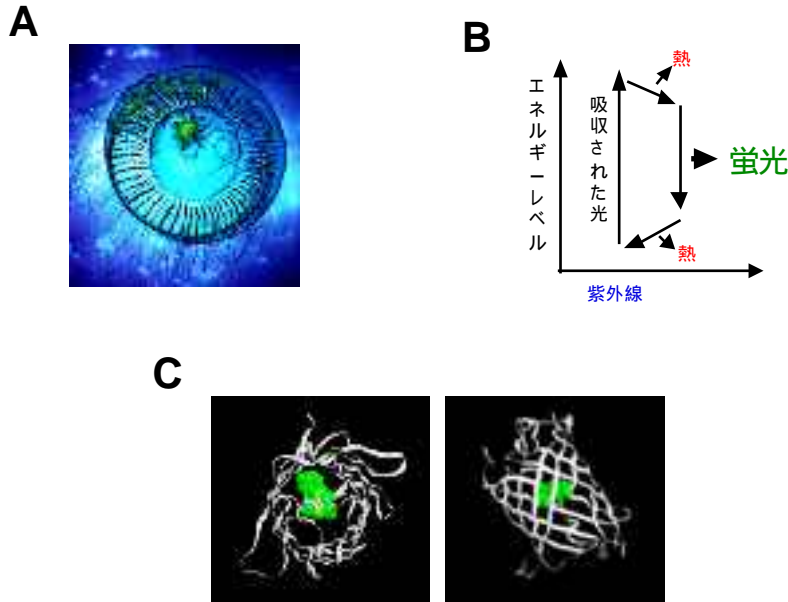


図9 蛍光タンパク質 GFP の構造と性質

A: オワンクラゲ, B: 紫外線照射と蛍光, C: GFP の立体構造 (3アミノ酸で発色団を形成している。)

### 5-7. プラスミド pGLO の構造

プラスミド pGLO は、オワンクラゲ由来の GFP 遺伝子ならびに選択マーカー遺伝子として抗生物質アンピシリンを分解する酵素(ラクタマーゼ)の遺伝子 (*Bla*) を含むプラスミド DNA である。このプラスミド DNA には、更に GFP 遺伝子の発現調節を行うために、アラビノースオペロンのプロモータ (P<sub>BAD</sub>) 配列および P<sub>BAD</sub> に結合し発現調節に関与するタンパク質 (*Ara C*) の遺伝子 *Ara C* を含んでいる。総塩基数 5371 bp のプラスミド DNA (組換え DNA 分子) である (図10)。このプラスミド DNA が導入された大腸菌を、アンピシリンを含む培地に植えることにより選択的に生育させることができる。

注:

プロモータとは、RNA ポリメラーゼが結合する配列のことである。

ラクタマーゼ (lactamase, Beta lactamase) は、アンピシリンナーゼ (ampicillinase) といふこともある。

ラクタマーゼの遺伝子 (*Bla*) をアンピシリン耐性遺伝子といふこともある。

ori とは、大腸菌内で複製できる複製開始点である。

プラスミド pGLO の全塩基配列は、参考資料参照

なお、遺伝子を英文字で現す場合、斜体字で表示する。

GFP: GFP タンパク質 *GFP*: GFP 遺伝子

Ara C: Ara C タンパク質遺伝子 *Ara*: Ara C 遺伝子

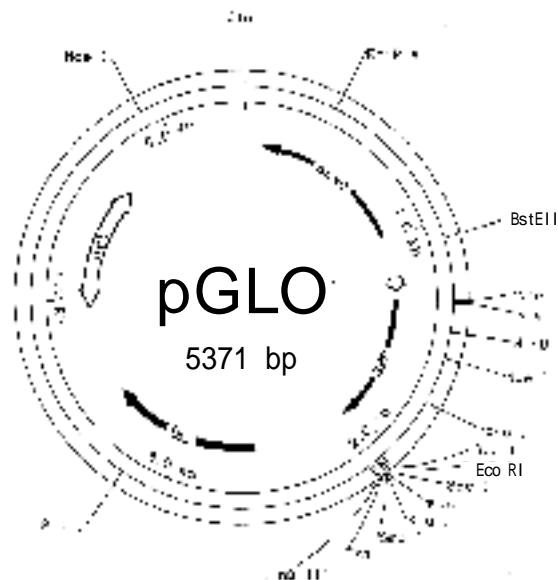


図6 pGLO プラスミド DNA の構造(含:制限酵素地図)

p: plasmid, G: GFP, L: Lactamase, O: ori

注: pGLO の発音

ピージーエルオーもしくは p-glow (ピーグロウ)と発音

光る(glow)タンパク質の遺伝子を持つプラスミドの意味: Ron Mardigian (Bio-Rad laboratories)命名

塩基配列などの詳細は、巻末<参考>に記載

### 5-8. アンピシリン (Ampicillin) と ラクタマ-ゼ (lactamase)

アンピシリンはペニシリン系の抗生物質で ラクタム構造と呼ばれる4員環をもち、ラクタム系抗生物質とも言われる。アンピシリンは、バクテリア細胞壁のペプチドグリカン架橋の合成を阻害することでバクテリアの生育を阻害する。

アンピシリン分子の立体構造は、ペプチドグリカン生合成で生じる D-アラニル-D-アラニン の立体構造によく似ている(図11)。そこで D-アラニル-D-アラニン に作用しペプチドグリカン合成に関与するトランスペプチターゼが類似分子であるアンピシリンを誤認することで細胞壁の架橋が阻害される。このため菌の細胞壁は細胞分裂ごと弱くなり、数回の細胞分裂の末、浸透圧に耐えられなくなった菌は溶菌し死滅する。

### D-alanyl-D-alanine

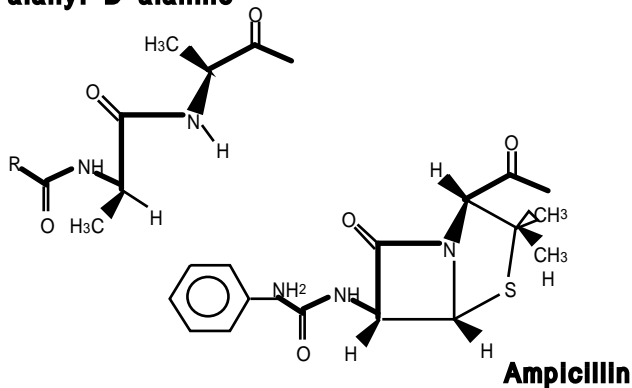


図11 D-アラニル-D-アラニンとアンピシリンの分子構造

一方、アンピシリン分解酵素である  $\beta$ -ラクタマーゼは、アンピシリンの  $\beta$ -ラクタム構造を加水分解する(図12)ことにより、アンピシリンを失活させる。

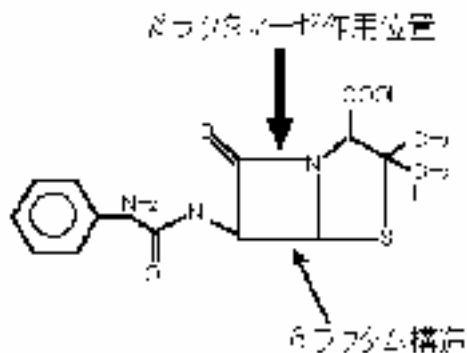


図12 アンピシリンの分子構造と  $\beta$ -ラクタム構造

組換え DNA 実験において、 $\beta$ -ラクタマーゼの遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子(*Bla* または *amp*) といわれ、実験で用いる pGLO プラスミドにも含まれている。形質転換の際、アンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドDNAをベクターとして目的遺伝子を組み込むと、プラスミドDNAが導入されなかった細菌はアンピシリン存在下で増殖できないため、プラスミドDNAすなわち目的の遺伝子を含む細菌を選択できる。

アンピシリンは、アンピシリンナトリウムの粉末で市販されており、冷蔵庫中で遮光保存する。アンピシリンは熱に弱いのでオートクレーブした培地は、温度が下がってから加える。



### 5-9 . pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌におけるタンパク質の発現

GFP 遺伝子を含む pGLO プラスミドを大腸菌に導入し形質転換 (Transformation)した場合、GFP ばかりでなく Beta-lactamase やアラビノースプロモータ結合タンパク質も発現される(図13)。形質転換した大腸菌では、Beta-lactamase が発現されるためにアンピシリンを含む培地でも生育できる。また、GFP の発現は、培地にアラビノースが存在するか否かによって調節される。アラビノースが存在しない場合は、GFP 遺伝子が菌体内に存在するにも関わらず、発現はしない。言い換えれば、情報があるにもかかわらず、機能には結びつかない。

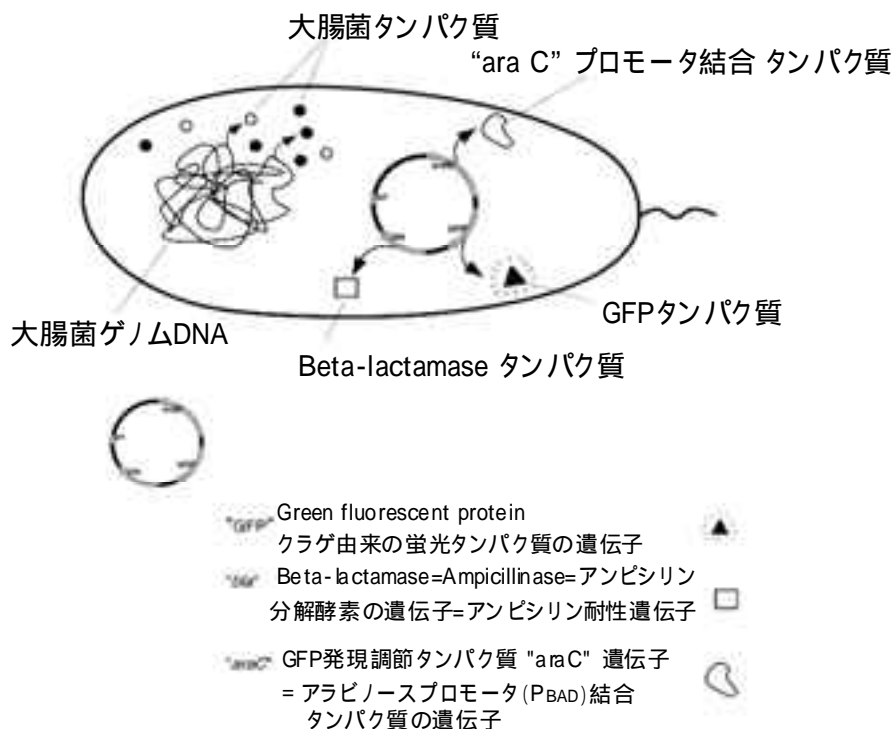


図13 pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌でのタンパク質発現

大腸菌体内にはゲノム DNAに含まれる遺伝子から発現されたタンパク質に加え、導入した pGLO プラスミド DNA に含まれる遺伝子から発現されたタンパク質が存在する。



プラスミド pGLO では、*araB*, *araA*, *araD* の代わりに、オワンクラゲの GFP 遺伝子が組み込まれている。このためアラビノースオペロンでの発現調節同様に GFP の発現は、AraC タンパク質にアラビノースが結合することにより行われている。pGLO プラスミド DNA により形質転換された大腸菌は、培地にアラビノースを加えるか否かにより GFP の発現調節することができる(図15)。

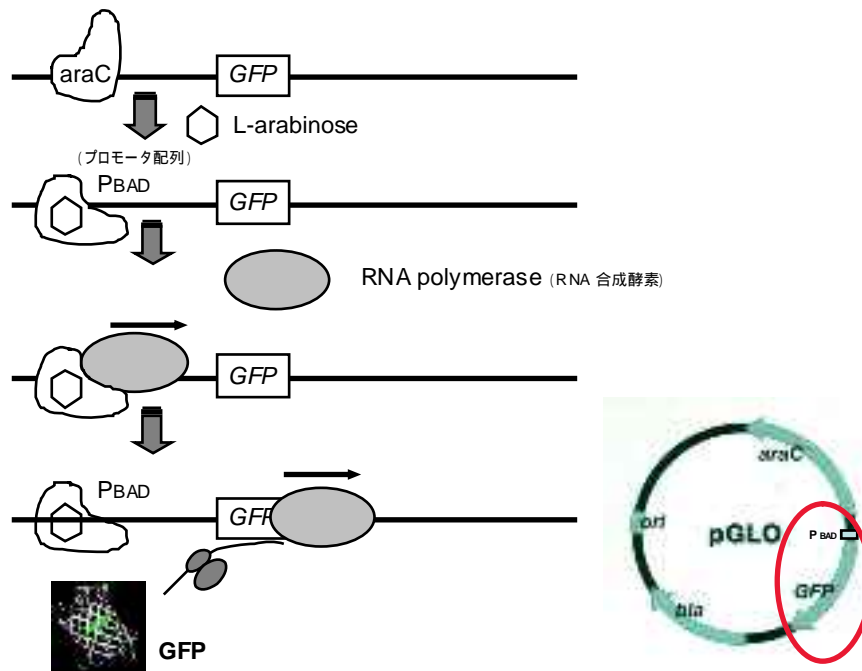


図15 pGLO プラスミド DNA におけるアラビノースによる GFP 遺伝子発現調節

### 5-11. プロモータ配列と遺伝子発現

生物種によりプロモータ配列や調節遺伝子は異なる。実験では、大腸菌のプロモータ配列 PBAD を含むプラスミドベクターに組み込んだ GFP 遺伝子を用いている。しかし、このプラスミドを植物細胞やヒト細胞に導入して培地にアラビノースを加えても GFP は発現しない。これは、生物種ごとに RNA ポリメラーゼも異なりプロモータ配列も異なるためである。例えば、大腸菌プロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、大腸菌のみで発現している。一方、植物細胞で有効なプロモータ配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、植物細胞のみで発現する。ヒト細胞でも同様である(図16)。

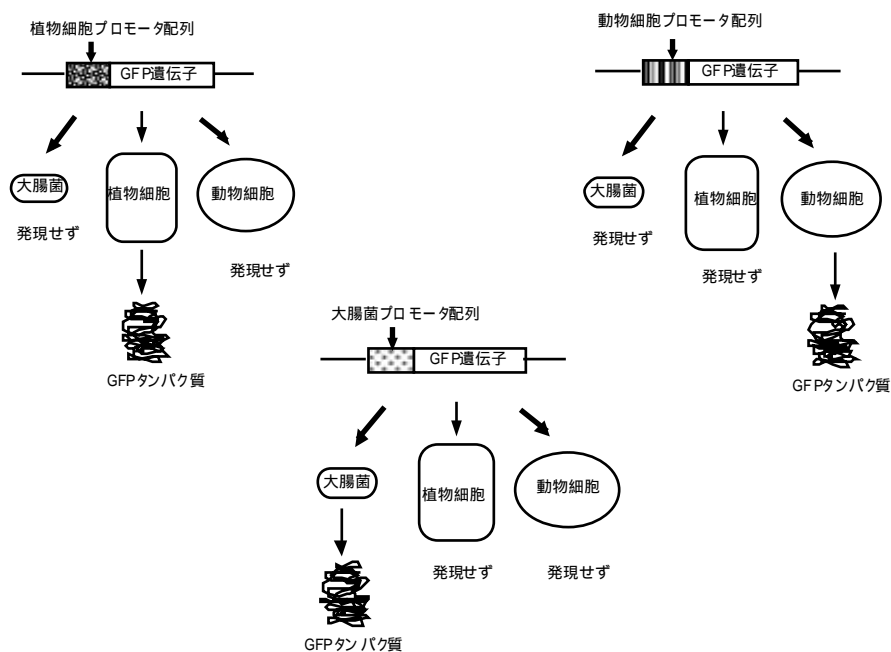


図16 生物種とプロモータ

RNA ポリメラーゼが結合するプロモータ配列は全ての生物共通ではない。また、生物種により様々なプロモータ配列がある。このため遺伝子が導入させた場合、導入細胞で活性をもつプロモータがなければ遺伝子は発現しない。

### 5-12. 大腸菌への遺伝子導入

大腸菌は細胞膜および細胞壁をもち、通常、プラスミド DNA のような大きな分子は菌体内部に取り込めない。大腸菌を 50 mM の CaCl<sub>2</sub> 処理することによりプラスミドを取り込みやすい細胞(コンピテント細胞: competent cell) を調製することができる。

このようなコンピテント細胞とプラスミド DNA を混合すると、プラスミド DNA はコンピテント細胞表面に吸着した後<sup>(注)</sup>、大腸菌の中に取り込まれる。実験に際しては、42 °Cでの熱処理を短時間おこなうことで膜の流動性が変わり導入効率をあげることができる。形質転換実験で用いる形質転換用緩衝液が、50 mM CaCl<sub>2</sub> を含む溶液である(図17)。

注: 2価であるCa<sup>2+</sup>イオンによりプラスミド DNA のマイナス電荷が中和されると同時にマイナス電荷をもつ細胞表面からの反発が除かれプラスミド DNA が細胞表面に吸着しやすくなる可能性もあるが詳細なメカニズムは不明である。

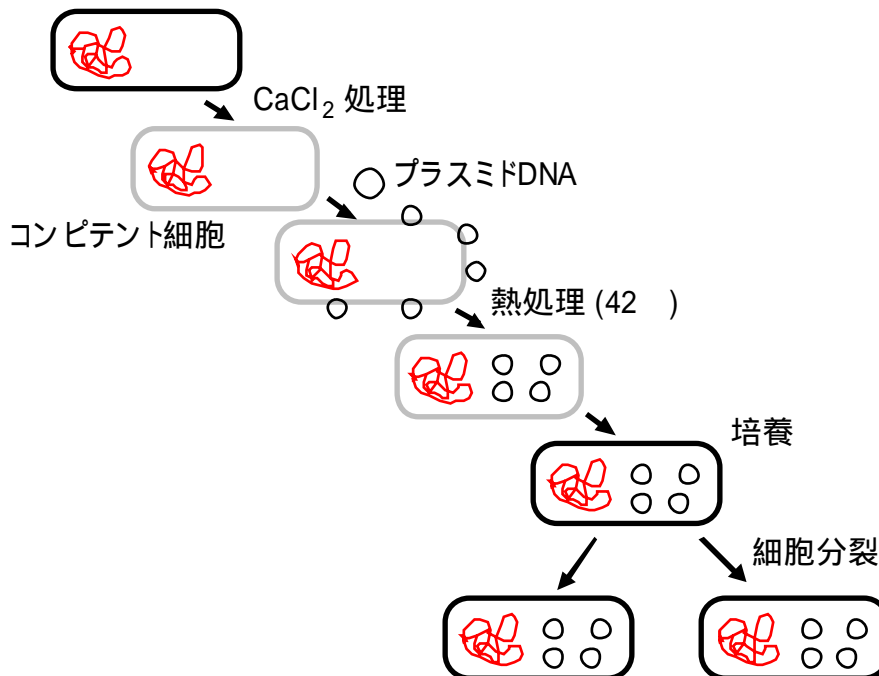


図17 コンピテント細胞の作製(CaCl<sub>2</sub>法)と形質転換

対数増殖期の大腸菌を CaCl<sub>2</sub> 溶液に加えることで大腸菌はプラスミド DNA を取り込みやすい細胞(コンピテント細胞)になる。このコンピテント細胞とプラスミド DNA を混合し、42℃ で熱処理することでプラスミド DNA は大腸菌内(細胞内)に導入される。

### 5-13 .教育目的組換え DNA 実験に際しての注意点

教育目的組換え DNA 実験を行う際には、まず実験申請手続きを行う必要がある。実際の実験に際しては、実験系、実験者、実験室環境を守るために幾つかの注意が必要である。

注意の原則は、

実験への雑菌のコンタミを防ぐ、DNase<sup>(注)</sup>のコンタミを防ぐ、組換え体を実験室外に出さない。

実験前に、ドアを閉めて実験中閉鎖系とする(物理的封じ込めP1とする)。

実験室内では靴の履き替え白衣の着用することが望ましい。

実験前および実験後に、必ず手を洗う。(実験前:実験系へのコンタミを防ぐ、実験後:実験室内の菌や試薬が外部に移行しないようにする。)

実験台に70%エタノール溶液を噴霧し殺菌してから使用する。実験終了後も殺菌する。

使用する水は、蒸留水、イオン交換水以上の高純度な水を用いる。(キットでは培地調製)

使用する器具、試薬は、予め全て滅菌する。(キットの試薬は、滅菌済みだが、培地は滅菌しなければならない。)

プラスミド DNA を扱う場合は、会話を避け唾液からの DNase の混入を避ける。

使用した菌、器具、試薬は、全てオートクレーブもしくは準じた方法にて滅菌後、廃棄する。

紫外線を使用する際には、紫外線を直視しないもしくはゴーグルを使用して目を保護する。

注: DNA 分解酵素

DNA は安定な物質であるが、 $Mg^{2+}$ イオン依存性の DNA 分解酵素 (DNase) により簡単に分解されてしまう。DNA 分解酵素は、細胞内ばかりでなく 唾液・血液・その他の体液中にも存在し、実験中に実験者から混入する可能性がある。これを防ぐためには、実験系にキレート剤である EDTA を添加し、実験中会話をしないようにする

## 6. 実験の準備

教育目的組換え DNA 実験を行う際、まず実験申請手続きを行う必要がある。手続きを確認した後、実験準備に入る。(準備方法は、キットのマニュアルに記載されている。)

滅菌について

キットを用いる場合、キット中の器具、試薬は予め滅菌してある。しかし、ピペットやチューブなどをキット以外に購入し使用する場合は必ず滅菌してから用いる。この滅菌は、菌のコンタミを防ぐばかりでなく混入した DNase を失活させる目的がある。また、実験後にも同様に滅菌する。

滅菌方法として主に用いる方法は、オートクレーブ滅菌である。

### 6-1. キットの購入

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット (Biotechnology Explorer Kit 1: カタログ No.166-0003JEDU)  
製造 (販売): Bio-Rad laboratories (日本バイオ・ラッドラボラトリーズ) <http://explorer.bio-rad.com>  
代理店を通じ、キットを購入する。

### 6-2. 器具の準備、試薬・プレートの準備

このキットは、8 実験用である。このため、8 名 (1 人 1 実験)、16 名 (1 班 2 名)、24 名 (1 班 3 名)、32 名 (1 班 4 名) で実習を実施できる。

#### 6-2-1. キット以外に必要な共有器具

オートクレーブ: 培地調製、廃棄物処理

代用品

培地調製 電子レンジ

廃棄物処理 圧力釜

42 インキュベータ (水浴): ヒートショック

代用品

42 の温水: 実験時に 42 (プラスマイナス 1) になるように湯を用意する。

37 インキュベータ(空気循環型):バクテリアの培養  
代用: 室温で長時間培養(24 ~ 48 時間)

UVランプ(長波長 366 nm):蛍光検出  
代用品  
ブラックライト

6-2-2 .1 グループに配布する試薬・器具等

スタープレート(大腸菌 HB101)	1 プレート
寒天培地プレート (LB 1 枚、Lb/amp 2 枚、LB/amp/ara 1 枚)	4 プレート
形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu")	1 本(約 0.8 ml)
LB(Luria-Bertemi)液体培地	1 本(約 0.8 ml)
プラスミド DNA 溶液 (容量がが少ない場合、ループで採取できなくなるため、2グループで1本)	2 グループで1 本
ループ	1 袋
使い捨てピペット(スポイト)	5 本
チューブラック	1
アイスボックス(発泡スチロール空き箱)	1
マーカーペン	1
廃棄物ゴミ箱	1
はさみ	

~ はキットに含まれていない。

### 6-2-3. 寒天培地の作製(8 実験分)

使用する水: 蒸留水、イオン交換水が望ましい。

滅菌方法: ガラス製三角フラスコに水を加えた後培地パウダーを添加し塊ができないように攪拌する。攪拌後、オートクレーブ(121、20分)<sup>(注)</sup>にかけることで溶解ならびに滅菌ができる(図18)。オートクレーブの準備ができない場合、電子レンジで代替可能である。ガラス製三角フラスコに培地を加え、電子レンジ中で十分に沸騰させる必要がある。十分という意味は、「ぐつぐつ」沸騰してから数分間、沸騰を続けることである。

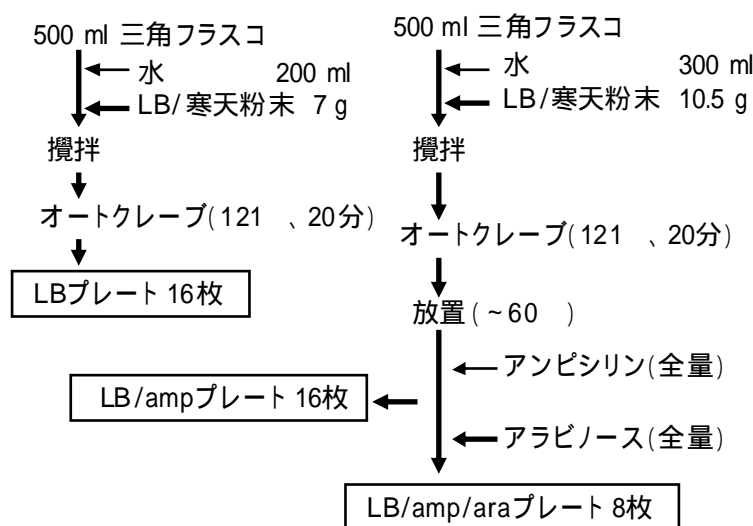


図18 培地作製方法

注: オートクレーブ滅菌(121、15-20分)

バクテリアの培地滅菌に用いる高圧蒸気滅菌。タンパク質成分など熱に弱い物質を含まない溶液の滅菌に使用する。また、ポリプロピレン製のチューブ、チップ、更にはマイクロピペットを滅菌する時にも用いる。チューブ・チップなどの場合、オートクレーブ滅菌後 60 程度で乾燥させてから使用する。実験後には、使用したチューブ、ピペット、プレート、菌を含む培地など全て滅菌する。(ポリスチレンやポリエチレンの器具は、熱に弱いのでオートクレーブでは、滅菌できない。また、タンパク質や抗生物質などの熱に弱い成分を含む溶液を滅菌する場合、抗生物質などは溶液をオートクレーブした後に添加する。

培地の分注に際して、プレートにラベルを付け、寒天培地に添加する試薬を調製する。

プレートのラベル: マーカーペンで LB、Lb/amp、LB/amp/ara 培地が判別できるように記載する。

試薬調製:



アンピシリン: 凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 1ml 添加 30 mg/ml  
アラビノース: 凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 3ml 添加 200 mg/ml  
オートクレーブより取り出した寒天培地を、まず攪拌する。寒天が底に沈んでいる可能性があるためである。フラスコを手で軽く触れられる温度(60 くらい)になった時点<sup>(注)</sup>で、プレートへの分注を開始する。アンピシリン、アラビノースを加える培地では、まずアンピシリンを加えよく攪拌後、16枚のプレートに分注。更にアラビノースを添加した後、8枚のプレートに分注(図19)。分注したプレートは、寒天が固まるまで室温で放置する。

注: アンピシリン・アラビノースは、熱に弱いので三角フラスコを手で触れられる温度で添加



図19 寒天培地の分注

#### 6-2-4. 寒天培地の水分除去

寒天上に水分が多く残っていると、コロニーが流れてしまう場合がある。このため、固化した後、クリーンベンチ中でふたを開けて数時間放置するか、ふたをしたまま24時間以上室温に放置することで、水分が蒸発させたほうがよい。

#### 6-2-5 試薬調製

まず、分注するチューブに試薬名ラベル表示をマーカーペンで記載する。

(形質転換用溶液: Bu、プラスミド DNA:pGLO、LB 培地: LB)

分注は、マイクロピペットもしくは、キットのピペット(スポイト)を用いて行う(図20)。

pGLO プラスミド DNA: 凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 250  $\mu$ l 添加 80  $\mu$ g/ml  
大腸菌: 凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 250  $\mu$ l 添加  
溶解した際、必ず攪拌する。

#### 試薬分注

プラスミド DNA 溶液: 60  $\mu$ l/1 チューブ 2 グループで1本

プラスミド溶液(凍結乾燥品): 250  $\mu$ l/ ボトル

プラスミド DNA 溶液は、ループで採取することになるため、ある程度容量が必要となる。

微量遠心管の容量は、60  $\mu$ l 以上となる。

形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu") 0.8 ml/1 チューブ

LB(Luria-Bertani) 液体培地 0.8 ml/1 チューブ



図20 ラベル表示と分注

撮影協力: 原田和雄先生(東京学芸大学)

#### 6-2-6. スタータープレートの作製

LB培地プレート(アンピシリン、アラビノースが添加されていない培地)を準備し、溶解した大腸菌をループにより植菌する。ループの辺縁に大腸菌を少量付着させ、ループで寒天培地表面をなぞるようにしてプレート全面に植菌する(図21)。1回採取した菌をプレート全面に伸ばすように植菌する。

植菌後、37℃のインキュベータで培養する。培養時間は、16~20時間が良い。培養後小さなコロニーが多く見られる。これらのコロニーには、対数増殖期に相当する増殖状態がよい大腸菌が多く見られる。実験の成否は、増殖状態が良い菌を用いることで決まる。

(形質転換に用いる菌の選び方は、p. 42 参照)

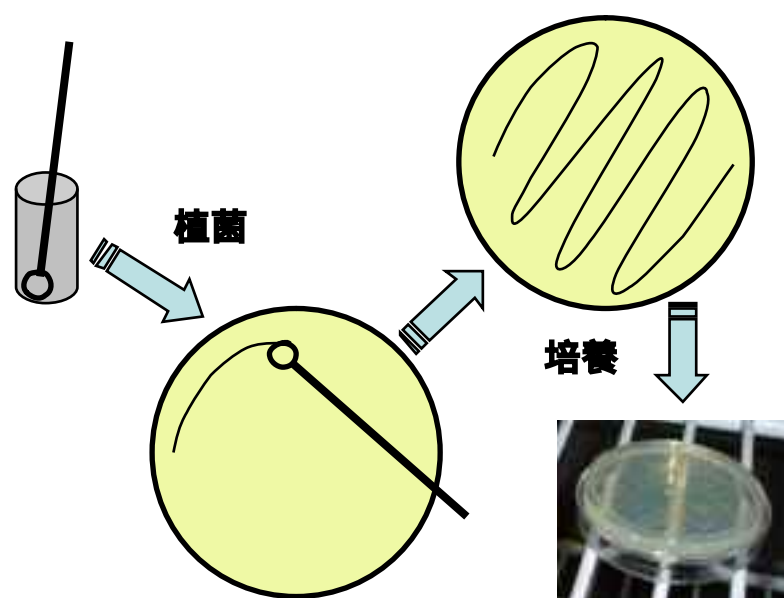


図21 スタータープレートの作製

#### 6-2-7. 資料の作成

Bio-Rad laboratoriesのマニュアルはAPプログラムに対応したものである。レッスンごとのテストは、米国の授業に対応している。このため、必ずしも日本の教科書に対応していない。このため、キットのマニュアルをそのまま使用するかどうかは、授業の内容に依存している。

### 6-3. 実験台の準備

実験を行う当日、実験グループごとに

スタータプレート1枚、プレート(LB1枚, LB/amp2枚, LB/amp/ara1枚)、氷、試薬、ピペット、ループ、はさみ、マーカーペン、ラック、チューブ等を配置する。

オートクレーブと37℃インキュベータは、共同で使用する。

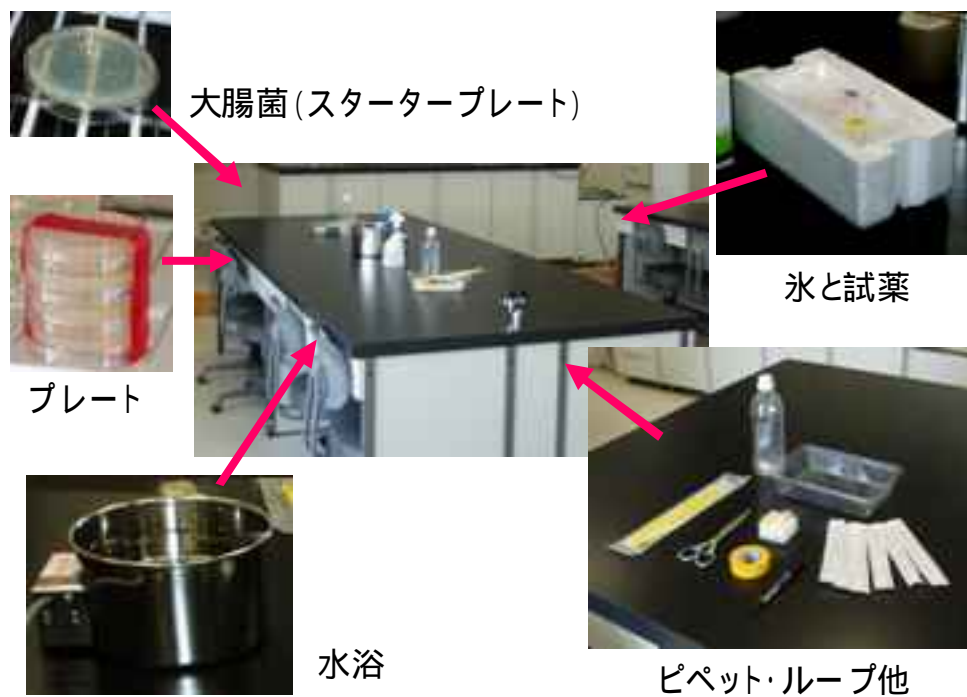


図22 実験台の準備

## 7. 教育目的組換え DNA 実験 (形質転換)

まず、実験開始の確認をする。

### 7-1. 実験開始の確認事項 (図23)

実験室内では靴の履き替え白衣の着用することが望ましい。

実験前に、窓とドアを閉めて閉鎖系にする (物理的封じ込めP1とする)。

腕まくりし手を洗う。(実験終了後も行う。)

実験台に70%エタノール溶液を噴霧し殺菌する。(実験終了後も行う。)

プラスミド DNA を扱う場合、会話しないなどの注意を払い唾液からの DNase の混入を避ける。

使用する器具・試薬等は滅菌済み。使用後の器具・試薬等は滅菌

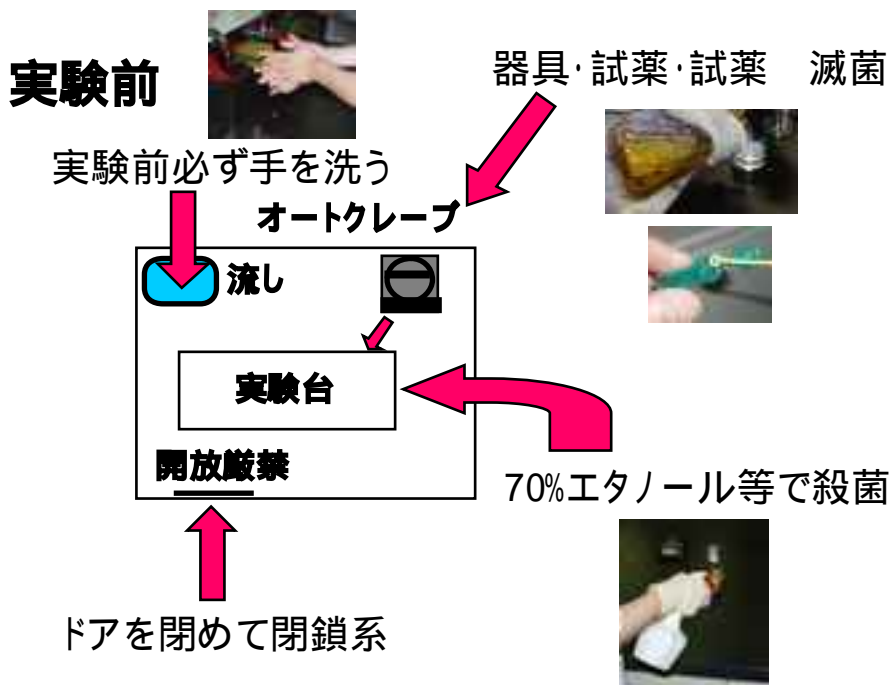


図23 実験開始前の確認

7-2. 実験方法 実験プロトコールと操作(図 24, 25)

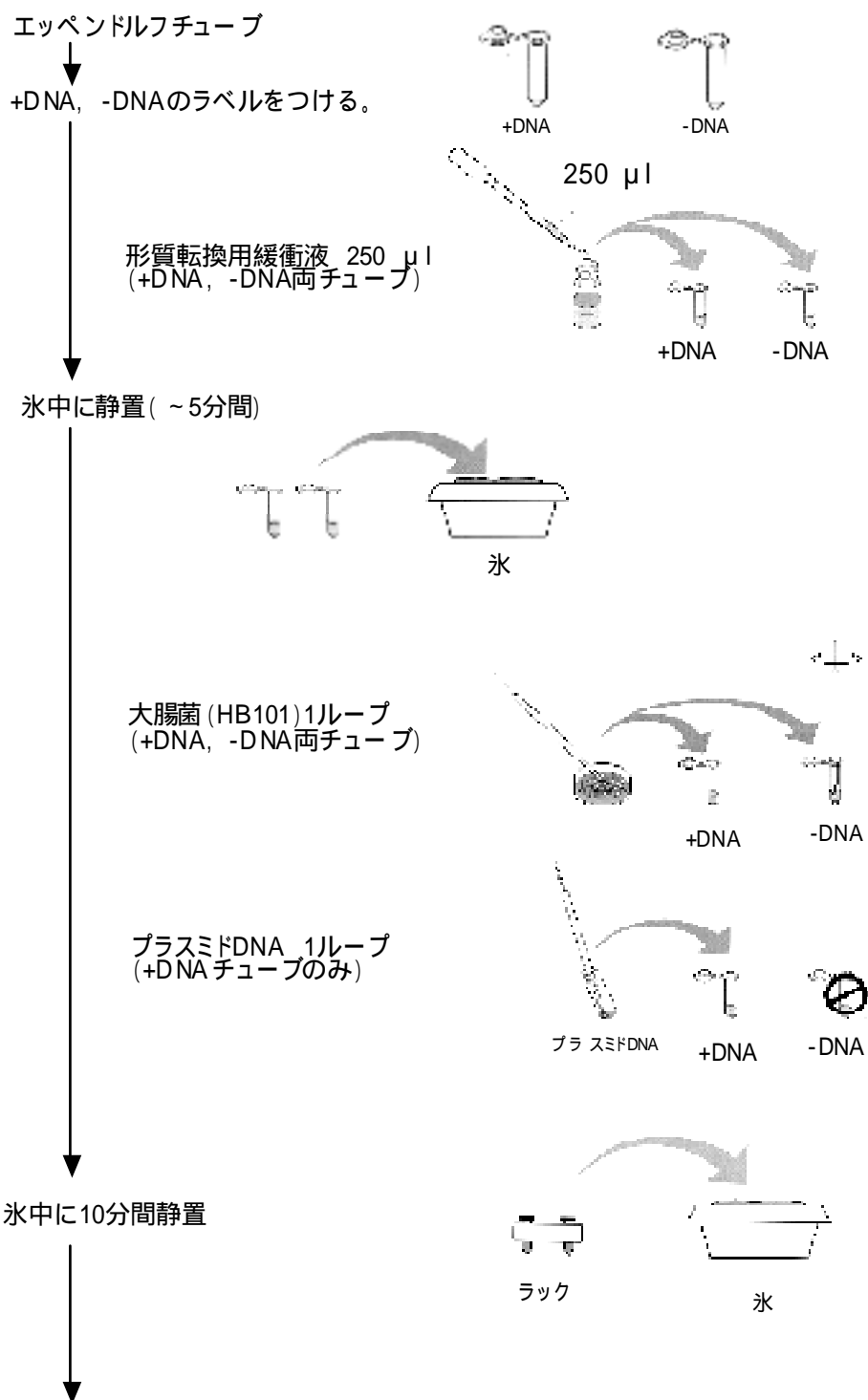


図 24 形質転換プロトコール

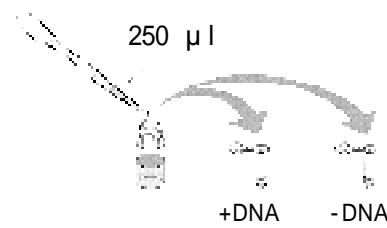
42、50 秒間ヒートショック



\*ここを手早く正確に行うことがコツ

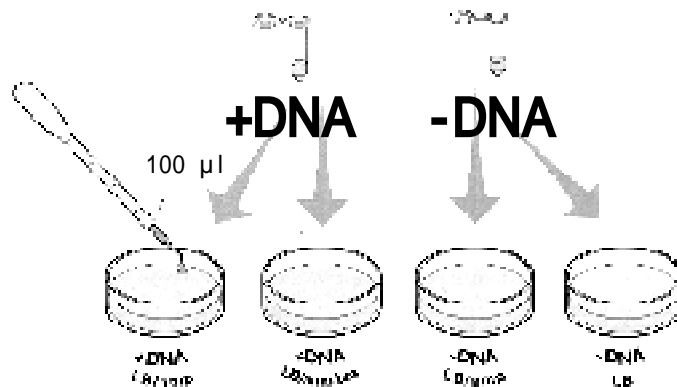
氷中に戻し 2 分間静置

LB broth 250  $\mu$ l



室温 10 分間静置

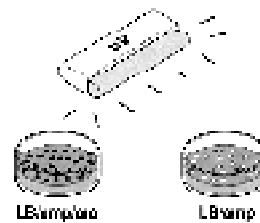
培養した菌の 100  $\mu$ l をアガープレートに植菌



37 にて一晩培養

プレートに UV を当て、コロニーの蛍光を観察する。  
また、コロニー数を測定する。

(蛍光を放たないコロニーがあるかどうか確認する。)



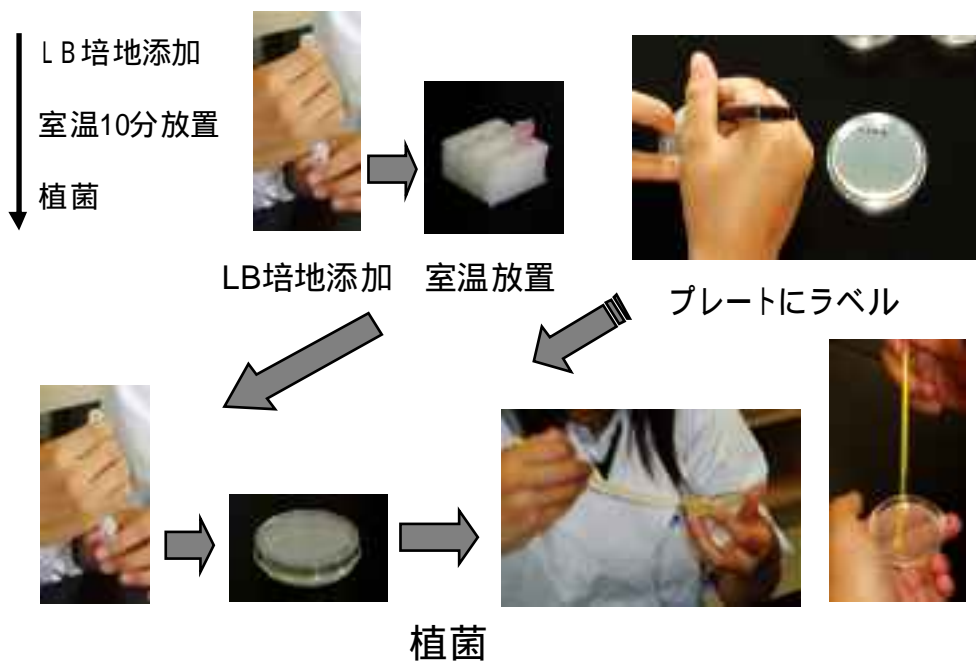
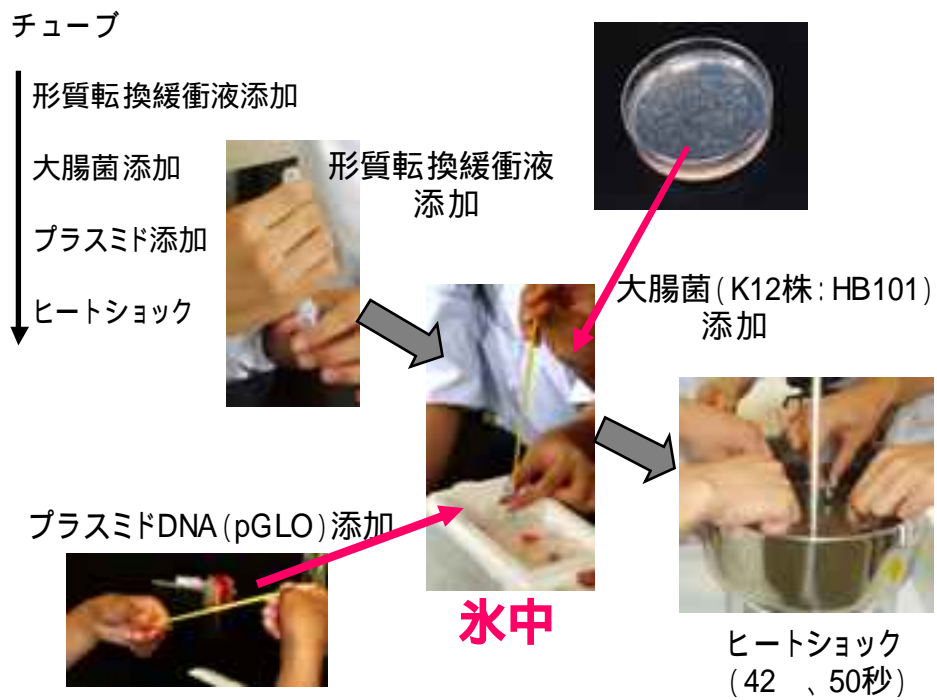
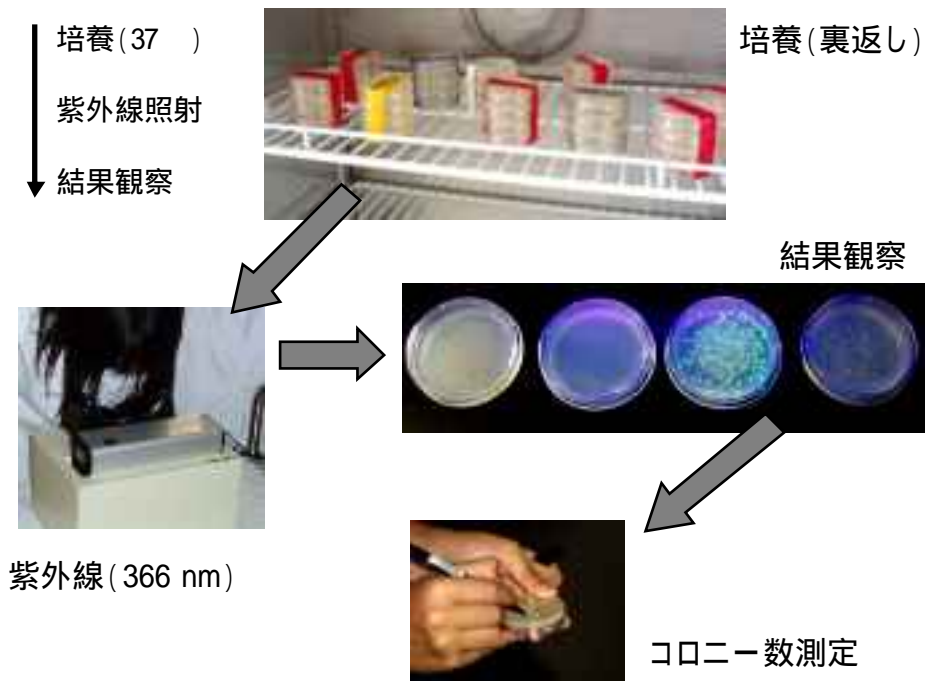


図25 形質転換操(写真)





## 実験中

DNaseの混入を避ける  
静粛に実験する



## 廃棄物処理

オートクレープ滅菌



## 実験後

必ず手を洗う



オートクレープバッグ



撮影協力: 鳴原康浩先生、伊藤仁先生、阿部憲一先生、庄司良二先生  
(福島県立福島明成高等学校)

### 7-3. 実験のポイント

実験の各ステップでのポイントを示す。実験の各ステップでどのような反応が起こっているかも同時に示す。

ピペットで液を採取

本実験で使用する場面：

形質転換緩衝液添加、 LB-broth 添加、 形質転換した菌の採取

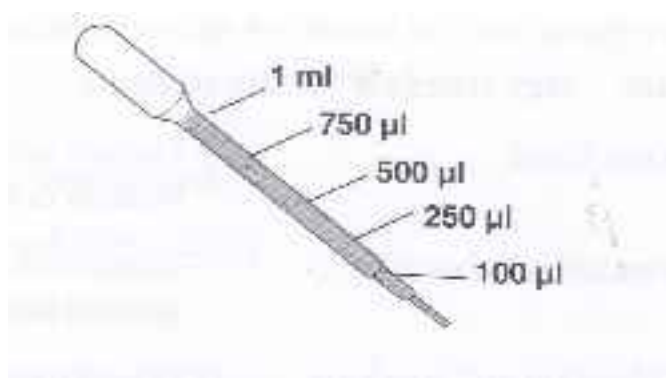


図 26 使い捨てピペット(スポイト)

使い捨てピペットは、滅菌した状態で 1 本ずつ袋に入った状態で供給される。直前に袋から出し使用する。100 µl ~ 1 ml を採取できる(図 26)。

#### 使用する菌の増殖状態と数

スタープレートにおける大腸菌の増殖状態と数は、形質転換効率に影響する。実験には前日から培養した増殖中の菌を用いる。培養時間は、16 ~ 20 時間が適当である。

長期間培養した菌は死滅期の細胞を含むため用いない方がよい。

コロニーの周縁部の菌は、増殖が盛んな状態(増殖曲線の対数増殖期(図 27 A))である。このため大きいコロニーを選び、増殖の盛んな辺縁部の菌を多く採取する必要がある(図 27 B)。しかし、現実に大きいコロニーの辺縁部をループで採取することは現実には難しい。そこで、小さいコロニーが散在している場所を探し、小さいコロニーを 5 個くらい採取すると増殖状態のよい菌が得られる(図 27 C)。

本実験では、全てのコロニーは同一のクローンと考えても問題ない。このため、コロニーが小さい場合は、単一コロニーにこだわらず複数のコロニーを採取しても問題はない(図 27 C)。十分な菌数を確保することが大切である。

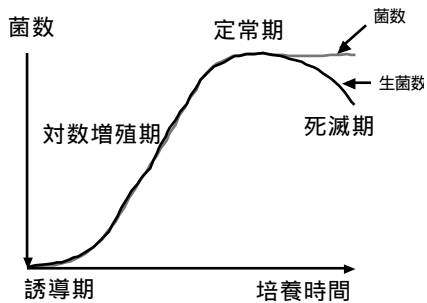


図 27A 菌の増殖曲線  
対数増殖期の菌を使用する。

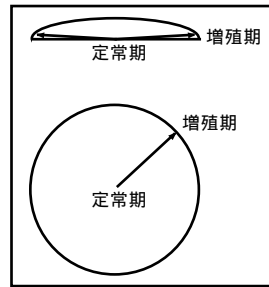


図 27B 一つのコロニーにおける菌の増殖  
コロニーの辺縁部に良く増殖した菌が存在する。



図 27C スタータープレートの状態

印のように小さなコロニーが散在している箇所からコロニーを採取する。

菌を形質転換緩衝液に添加した後、氷中で保温  
形質転換緩衝液は、塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) 溶液であるため、懸濁した菌は不安定な状態にある。特にプラスミドを混ぜる時やヒートショックを行う際には、氷中に静置し室温に放置しないように注意する。製氷機で作製した氷を使用できない場合は、氷を木槌などで十分に破碎 (crushed ice) し、更に水を加え、チューブが十分に氷に接する状況を作ることが大切である。また、いずれの場合でも、氷の表面をアルミホイルで覆い、アルミを貫いてチューブを立てると氷の温度が一定しチューブも安定する(図 28)。

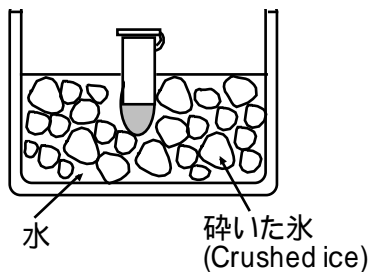


図 28A 砕いた氷を用いた場合



図 28B アルミホイルで氷を覆った場合

### プラスミド DNA を確実に採取

“+ DNA”のチューブにプラスミド DNA 溶液を添加する。ループを用い、プラスミド DNA 溶液を表面張力により「シャボン玉」のように採取する(図 29)。採取された溶液量は、約 10  $\mu$ l (0.8  $\mu$ g) である。(プラスミド DNA 溶液濃度: 20  $\mu$ g/250  $\mu$ l = 0.8  $\mu$ g/10  $\mu$ l)

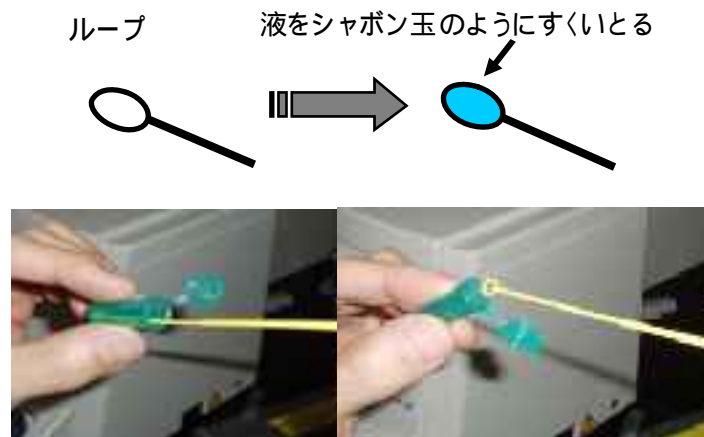


図 29 ループによるプラスミド DNA の採取

### ヒートショック

ヒートショックは、氷中 > 42 °C・50秒 > 氷中、と連続的に温度差をつけなければならない(図 17)。このため、あらかじめ42 °Cにセットした水浴の脇に、チューブをさした氷容器を移して操作する。この温度差により大腸菌の膜の流動性が変化しプラスミド DNA が菌の中に入り込める。42 °C 処理前に室温に出してしまうと菌は弱まり、ヒートショックにもならないために形質転換の効率が低下するので注意する(図 30)。

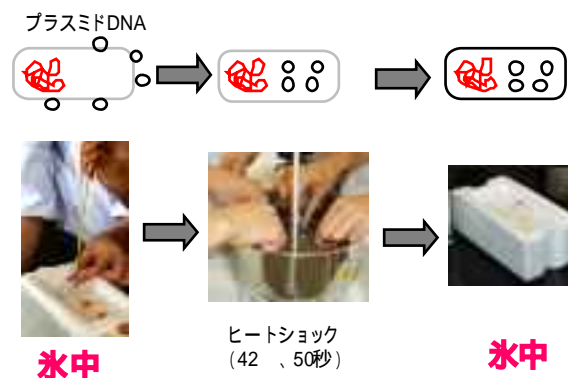


図 30 ヒートショック

#### LB broth 添加後の放置

放置中に lactamase ならびに AraC の遺伝子が発現し各々のタンパク質が翻訳・産生する。この放置時間中に抗生物質が分解できる能力(抗生物質耐性)の獲得、ならびに AraC タンパク質のプロモータ配列への結合による GFP 遺伝子発現のブロックも起こる。

#### 液の混合

実験では、混合が重要である。この実験においても菌と DNA の混合(懸濁)を充分に行う。ただし、混合の際、泡立ったり室温に戻ってしまうと菌の状態が悪くなり形質転換の効率が落ちるために注意する。植菌の際、LB 培地中の菌は沈んでいるため、混合する。

#### プレートの培養

プレートは裏返して培養します。培養中は、蓋が下、培地が上になるようにする。蓋が上になった場合、水蒸気が蓋の内面で水滴になり培養中に培地表面に落ちることがある。これは、コロニーが流れる原因となる。

#### プレートへの必要事項の記載

プレートに amp<sup>+</sup>、ara<sup>-</sup> など必要事項を記載する際、プレートの周りや上面端などに記載し観察の妨げにならないようにする。

#### 7-4 . 実験結果のまとめ

Biotechnology Explorer キットのテキストでは、実験授業を 50 分ずつに分けて各々目標を設定し、授業後に確認試験を行う形式である(キットテキスト 3 ページ参照)。

各プレートでのコロニーの有無観察後、紫外線を照射し蛍光の有無を調べる。更に、+DNA, LB/amp, LB/amp/ara のプレートについて、コロニー数を測定する。

#### 各プレートの観察

予め、各プレートでコロニーが形成されるかどうか予想し、各プレートのコロニーを観察し状態をスケッチする。

#### 蛍光観察

紫外線を照射し蛍光を観察する。

紫外線は長波長側(366 nm)のものを用いる。

pGLO で発現する GFP の励起波長は 380 nm 付近をピークとしているため長波長側のトランスイルミネータを用いる。トランスイルミネータがない場合、市販のブラックライトでも蛍光を観察できる。短

波長側(例えば 254 nm)のトランスイルミネータでは、かえって蛍光が弱くなる。また短波長は高エネルギーで目や肌に危険であるため用いないほうが良い。長波長であっても紫外線は注意しなければならない。

このため、可能ならばゴーグルを着用する。

また照射中に直接紫外線を裸眼で見ないようにする。

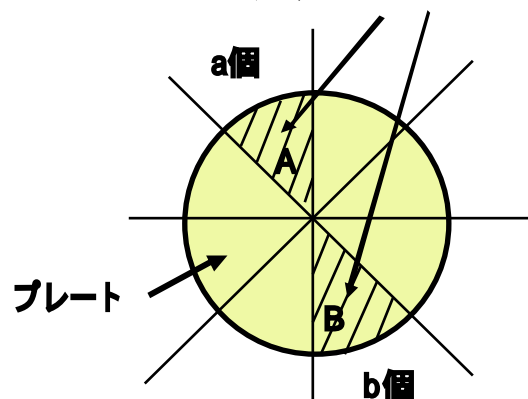
安全面を考えるとライトボックスを作るなどの工夫も良いであろう。

#### コロニー数の測定

プレート底からコロニーを観察し、マジックでドットしながらコロニー数を数える。

コロニー数が多い場合、プレートを8等分子そのうち2箇所のコロニー数を測定後、全コロニー数を計算する。

#### プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数測定



$$\text{全コロニー数} = 4 \times (a + b) \text{個}$$

#### 7-5. まとめポイント

植菌した4枚のプレートを、比較することにより得られる知見をまとめてみる(図31)

情報と機能、セントラルドグマ(+DNA, LB/amp/ara プレート)

GFP 遺伝子(情報)を含むプラスミド DNA は、紫外線を照射しても蛍光を発しない(Explorer キットのテキスト17ページ)が、アラビノース添加培地のコロニーは紫外線で蛍光を発する。DNA は情報であり「蛍光を発する」という機能を持たないが、大腸菌に導入し GFP タンパク質を発現させると GFP タンパク質は、「蛍光を発する」機能を有する。

発現調節(+DNA, LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート)

プラスミド DNA を導入した大腸菌を、アラビノースを含む培地中で培養すると、アラビノースがプロ

モータ配列(PBAD)に結合した araC タンパク質と結合することで araC タンパク質の構造変化により PBAD が露出する。このため RNA ポリメラーゼが PBAD に結合し GFP が発現する(本テキスト 13 ページ参照)。

ここでアラビノースは発現スイッチの ON/OFF の役割を担っている。また、GFP 遺伝子(情報)が大腸菌内に存在しても発現しなければ、蛍光を発するという機能は起こらない。ここで、プロモータ配列は大腸菌由来であるため大腸菌の RNA ポリメラーゼが結合できる(14 ページ)。

#### 対照実験の置き方(4枚のプレート)

実験系が成立しているか否か(生きた大腸菌が入っているかどうか)

-DNA, LB プレート

実験の再現性はどうか

+DNA, LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート コロニー数比較

抗生物質(アンピシリン)の効果はあるか

LB/amp プレート, +DNA vs -DNA

アラビノースによるタンパク質発現スイッチの ON/OFF は確認されたか

+DNA, LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート

各々プレート同志を比較し確認する。

#### 実験の再現性とバラツキ

実験者全員のコロニー数のデータを比較し、再現性やバラツキの原因を考察する。

通常、形質転換実験では形質転換効率(比例計算によりプラスミド DNA 1  $\mu\text{g}$  で形成されるコロニー数: 個/ $\mu\text{g}$ )を測定する。しかし、本実験の場合、スタープレートから採取した大腸菌を CaCl<sub>2</sub> 溶液(Transformation 溶液)に漬すものの完全なコンピテント細胞となっていない大腸菌を用いている。このような大腸菌に充分量のプラスミド DNA を加えて形質転換を行っているため、実験者間の形質転換効率は、形質転換効率を求めなくとも、形成されたコロニーの数を観察することで充分比較できる。

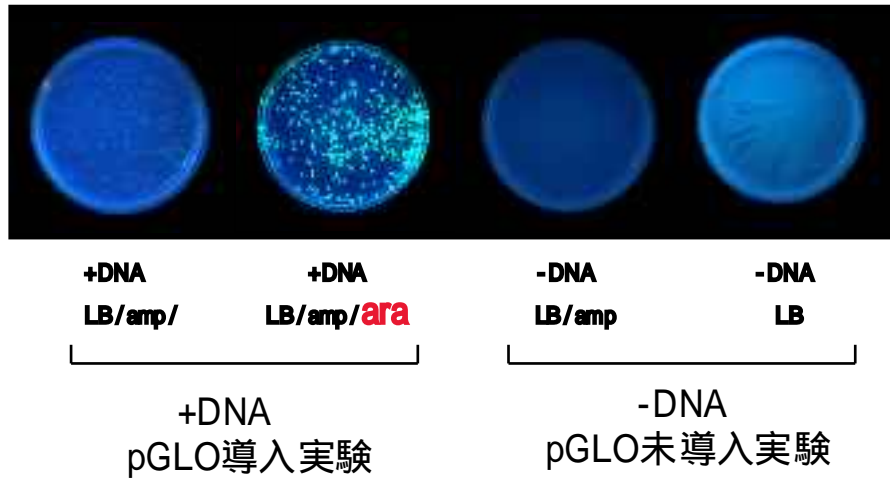
CaCl<sub>2</sub> にてコンピテント化された大腸菌の形質転換効率は、通常  $10^7 \sim 10^8$  個/ $1 \mu\text{g}$  プラスミド DNA であるが、本実験では、 $10^3$  個/ $1 \mu\text{g}$  プラスミド DNA 程度である。

#### 菌の増殖

形質転換後、翌朝すぐに観察する。更に昼食時、研修終了時に観察しコロニーの大きさや蛍光の具合を観察する。菌の増殖に従いコロニーは大きくなり蛍光強度も強くなるはずである。

7-6. 実験結果例

形質転換



組換えDNA実験

図 31 形質転換結果例

amp:ampicilline ara:arabinose DNA:plasmid

E. coli: 大腸菌 K12 株 HB101 LB: LB 培地



### アラビノースによる GFP 発現誘導

+DNA, LB/amp の系で培養した形質転換大腸菌のコロニーの内、孤立して隣接しているコロニーを選び、一方にアラビノース溶液をパスツールピペットで 1 滴垂らし、他のコロニーをコントロールとして、時間による蛍光強度を観察する(図 32)。

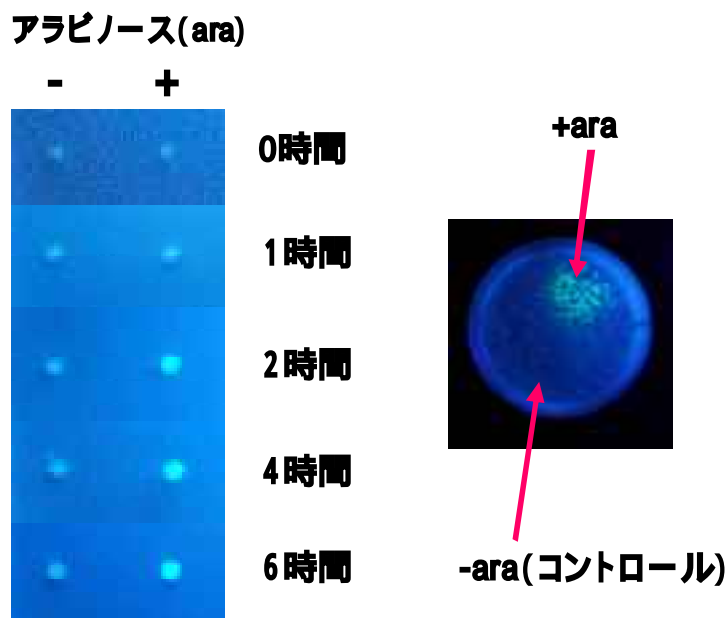


図 32 GFP 発現誘導実施例

### 7-7 . 実験終了後の廃棄物処理

組換え実験に使用した器具 / 試薬 / 組換え大腸菌などは、全て滅菌してから廃棄する。滅菌方法は、オートクレーブ滅菌(121℃、20分)が原則である(図 33)。

オートクレーブが設置されていない施設では、圧力釜で代用することも可能である。

菌をまいたプレートは、オートクレーブ滅菌後、最終的には産業廃棄物業者に処置してもらう。ゴミの処理方法は、各都道府県により方法が異なるため、各地区の方法に沿って行う。

実験を実施する施設で、廃棄物処理のプロトコルを事前に作製しておくといよい。

オートクレーブ



圧力釜



オートクレープバッグ

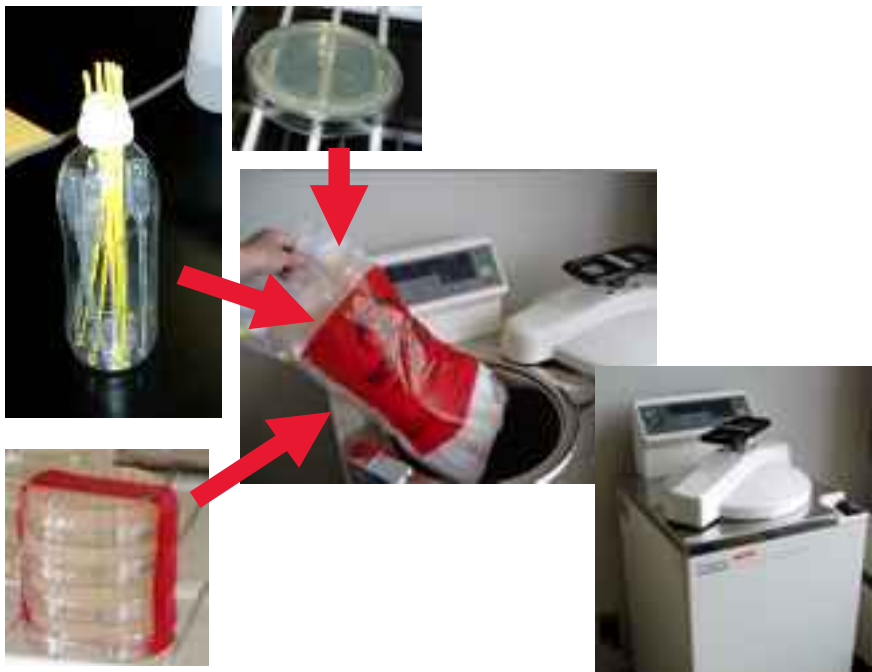


図 33 オートクレーブ滅菌による廃棄物処理

実験で使用したピペット、ループ、プレート(スタータープレート、形質転換大腸菌プレート)は全てオートクレープバッグに集め滅菌してから廃棄する(図 33)。

## 8. どのような授業をおこなうか

教育用キットを授業に取り入れる場合、まず授業で何を教えたいかを明確にし、実行できるシラバスやコマシラバスを作製することで授業計画する必要がある。同じキットであっても使い方などで様々な目的に使用できる。下記にいくつかの事例を示す。指導者は、授業の目的に沿った指導計画が必要であろう。

### 分子生物学の基本であるセントラルドグマを学ぶ

DNA は、情報であり mRNA を通じ、機能をもったタンパク質が作られる。(このキットの場合は、GFP が産生され蛍光を発する。) これを体験的に学ぶ。

#### < 実験中の指導ポイント >

プラスミド DNA に UV を当て、DNA は情報であり、蛍光を発する機能はもたないことを確かめる。

アラビノースマイナスのプレートの大腸菌にも GFP 遺伝子は、導入されている。つまり遺伝子は存在する。アラビノースを加えなければ、GFP は作られないことを確かめる。言い換えれば、遺伝子という情報が存在しても、タンパク質が発現されなければ蛍光を発するという機能は持たないことを実験で確かめる。

アラビノースを加える遺伝子発現調節により、初めて GFP タンパク質が作られて蛍光を発するという機能が生まれることを体験する。

アラビノースを加えていない培地で培養し、後からアラビノース溶液をコロニーに降りかける実験を行うことで、発現調節が更に明確になる。また、大腸菌から GFP を粗抽出し、熱処理で蛍光が消失する実験を行うと GFP がタンパク質であることが解る。

更に発展させて、ゲノムは、情報であり細胞で一意的に決まるが、各細胞での発現状態を反映したトランスクリプトーム(遺伝子発現プロファイル)さらにプロテオーム(発現タンパク質のプロファイル)は発現調節によりきまる話題にも迫りゲノム科学の話題に入っていくことも可能でしょう。

#### < 参考 >

ヒトの DNA 配列は、99.9%一致するといわれている。個人による DNA 配列の違いは、多型といい、特に1塩基の多型(Single nucleotide polymorphisms: SNPs)は、ヒト DNA 上に 0.1%存在すると言われ個人個人の性質の違い関係する。例えば、お酒に強いかわ弱いかわ(ALDH2:アセトアルデヒド脱水素酵素)の多型、特定の薬剤に対する感受性などは SNPs と関係している。また、プロモータ配列など調節領域 DNA の多型は、発現のレベルに影響する。一方、個人を見た場合、脳でも肝臓でも存在している遺伝子は同じであるが発現している(使われている)遺伝子の種類が違うために組織や臓器の違いが出てくる。このように遺伝子発現は、遺伝子の情報を機能への結びつけ、細胞・組織・臓器・個体の性質(形質)を決める重要なカギとなる。ここでもちいた Biotechnology Explorer の pGLO プラスミドには、アラビノースオペロンの遺伝子発現調節機構が含まれているため GFP 発現の「ON」、「OFF」ができる。このためセントラルドグマと遺伝子発現の教育に適している。

実験を体験し生命科学への興味を促し、更に学ぶための動機付けとする。

#### < 実験中の指導ポイント >

GFP の遺伝子 (UV を当てても光らない) を、大腸菌に導入することで大腸菌は GFP を産生し UV を当てると光るようになる。遺伝子には、GFP の情報が含まれていることを知る。

キットに含まれている簡単な試薬で細胞内へ遺伝子を導入し形質転換が自分の手で行えることを体験する。

たとえ簡単な実験であっても、組換え体を取り扱うことを意識できるように安全な廃棄物の処理も体験する。

細胞内への遺伝子の導入は、組換え植物の作成や遺伝子治療など多くの応用技術がある。新聞や啓蒙書に記載されている身近な内容を含め、この体験実験の先に講義を含めて実施する。

#### 組換え DNA 実験の基本技術を学ぶ

#### < 実験中の指導ポイント >

試薬の滅菌を行い、パスツールピペットの代わりにマイクロピペットを用いるなど、この教育用キットの試薬や器具は用いるものの実施方法は、研究レベルの組換え DNA に即して行う。

滅菌・廃棄物処理を含め自分で準備し、実験し、廃棄するところまで実施する。

マイクロピペット検定など実験操作自体の評価も含めて実施する。

コントロール実験の設定など、実験系を組む場合の基本も盛り込む。

#### 更に発展した実習授業

遺伝子が DNA であることを確かめるため、形質転換した大腸菌と形質転換する前の大腸菌から DNA を抽出し電気泳動することで、形質転換した大腸菌からプラスミド DNA (pGLO) の存在を示す。

大腸菌が光ることは、GFP タンパク質が形質転換した大腸菌に存在することを確かめるため、Biotechnology Explorer Kit 2 を用いて GFP タンパク質を精製する。

あるいは、形質転換大腸菌を凍結融解にて GFP を粗抽出し、熱処理でタンパク質を変性させることで蛍光がなくなることを確かめる。(蛍光がタンパク質であることの傍証)

実際の授業では、上記 、 、 の要素、更には指導者がオリジナルで考えた要素を付け加えて実験授業を組み立てることになるでしょう。

何れにしる、実習ありきで授業があるのではなく、何を教える授業かを明確にし、授業を助ける意味での体験実習として位置付けることが大切でしょう。

## 9. 参考図書

### 9-1. 実験に役立つ本

緒方宣邦 / 野島博著:「遺伝子工学キーワードブック」

羊土社 2000 ISBN 4-89706-637-9

絵や図をふんだんに取り込まれ、遺伝子工学技術やゲノム科学を勉強するには便利な辞書

安藤昭一編著:

「初めて学ぶ人のための微生物実験マニュアル 培養から遺伝子操作まで」

技報堂出版 2003 ISBN 4-7655-02384

バクテリア、カビ、酵母などの微生物に関する基礎的内容から、無菌操作や培養方法など微生物取り扱いの基本が実験操作の豊富な写真を用いて判りやすく解説。更に組換えDNA実験ガイドライン、教育目的組換えDNA実験のプロトコル事例も紹介されている。

大藤道衛著:「バイオ実験超基本 Q&A」

羊土社 2001 ISBN 4-89706-659-X

なぜ白衣は着るの？ DNA を扱う基本は何？ データベースは実験でどのように使うの？ 遺伝子実験に必要な知識は何？ バイオ支援企業ってどんな会社？ など実験初心者に必要な超基本を Q&A 形式で解説

高木利久/監、大藤道衛、高井貴子/編:「これからのバイオインフォマティクスのためのバイオ実験入門」 羊土社 2002 ISBN 4-89706-285-3

「バイオインフォマティクスのための」とあるが、実験初心者向けのゲノム解析入門書。ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームの概念と具体的な実験方法が示されており、更に DNA 解析・タンパク質化学・組換え DNA 実験の体験実習プロトコルが含まれている。微生物、動物、植物を問わず必要となるゲノム解析入門書。

組換えDNA実験は、Biotechnology Explorer を元に、プラスミドDNA抽出、電気泳動でのタンパク質解析も含めたプロトコルが盛り込まれている。

広川貴次、美宅成樹:「できるバイオインフォマティクス」: 中山書店、2002

ゲノム配列、タンパク質立体構造、代謝経路などの公共の生物情報データベースには、どのようなものがあり、どのように利用することができるかを解説。更に演習問題を通じ、BLAST 検索やアライメント、タンパク質の立体構造表示などデータベース活用方法の基本を体得できる入門書。データベースに基づくこれからの生物学に必須の一冊。

Sambrook and Russell : “Molecular cloning A laboratory manual” 3<sup>rd</sup> ed.

この本の第 1 版 (Maniatis et al) は、遺伝子工学実験の原点であった。遺伝子工学実験プロトコールのバイブルとして、1980年代初頭多くの遺伝子工学研究者が活用。第3版も試薬の調製方法から、ベクターの構造などあらゆる実験プロトコールが含まれている。更に、マイクロアレイや GFP テクノロジーについても触れている。

Cold Spring Harbor Laboratory press 2001 ISBN0-87969-577-3

URL: <http://www.MolecularCloning.com>

原田宏(研究代表者) 「生物教育と市民の理解」(財)国際高等研究所報告書 2003

委員: 原田宏、岡田益吉、鎌田博、大藤道衛、佐々義子

生物学を専門とする人、専門としない人への生物教育のあり方、今後の遺伝子教育のあり方についてまとまっている。

## 9 2 . 米国高等学校生物学教科書



- 1 . Campbell N. A. :”Biology” 4<sup>th</sup> edition The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park CA 1996 ISBN 0-8053-1957-3
- 2 . Greenberg J ed “BSCS Biology A molecular approach” 8<sup>th</sup> edition Everyday Learning Corporation Chicago, IL 2001 ISBN 0-538-69039-9
- 3 . Leonard W. H. and Penick J. E.: “Biology A community context” South-Western Educational Publishing Cincinnati, OH 1998 ISBN 0-538-65208
- 4 . Laboratory Manual “Biology:The Dynamic of Life” The McGraw-Hill company ISBN 0-02-828251-5 (実習書)

9-3. 関連 URL

NCBI GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>



Cn3D <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>



RasMol <http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>



Biotechnology Explorer <http://explorer.bio-rad.com>



## 10. 用語解説・参考資料

### 10-1. ゲノム/遺伝子/DNA

ゲノムとは、その生物が持つ遺伝子の 1 セットのことである。例えばヒトの場合、生殖細胞 (Haploid) では 1 セットの、体細胞(Diploid) では、2 セットのゲノムをもつことになる。ゲノムの物質としての実体は DNA であり、情報は、DNA の 4 種類の塩基、すなわちアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)の配列に刻まれている。ヒトのゲノムは常染色体 22 対、性染色体 1 対の合わせて 23 対の染色体上にある。ヒトのゲノム 1 セットは、30 億塩基対で、長さは約 1 メートルである。すなわちヒトの体細胞では、父親由来のゲノム 1 セットと母親由来のゲノム 1 セット、合計 2 セットの 60 億塩基対からなっている。ゲノムには、遺伝子ばかりでなく遺伝子以外のまだ機能が明らかになっていない配列も含まれる。すなわちゲノム=遺伝子ではない。なお、ゲノムという用語の由来は、gene+chromosome=genome である。

ヒトのゲノム DNA (genomic DNA) は、体細胞から DNA として抽出することができる。また、大腸菌では、抽出した染色体 DNA がゲノム DNA である。これに対して実際に発現したすなわち mRNA となった DNA 配列は、mRNA から逆転写した cDNA として得られる。

遺伝子とは、DNA のうちタンパク質の情報をもっている配列である。一昔前に"1 遺伝子 1 酵素"、"1 遺伝子 1 ペプチド"という考え方があったが、基本的には一つの遺伝子は、一つのタンパク質の情報をもっている。しかし現在では、一つの遺伝子が複数のタンパク質の情報を持っている場合もあることが分かった。これは Alternative splicing により一つの遺伝子の情報から複数のタンパク質ができることもあるためである。また、高等生物では Post translational modification (翻訳後修飾) により多くのタンパク質が作られる。ヒトの場合、DNA には、タンパク質の構成成分であるアミノ酸配列の情報を持っているエクソン(exon)とその間を繋ぐイントロン(intron)という配列からなっている。遺伝子は、mRNA を介してあるタンパク質を作る(発現させる)ために必要な情報、すなわちプロモータ、エクソン、イントロン含めた配列である。ただし大腸菌のような原核細胞では、イントロンはない。ヒトの場合、30 億塩基対のうちアミノ酸の情報をもっている配列は、2%程度といわれている。国際ゲノムプロジェクトにより、次々に各染色体の配列が決められ遺伝子の数も同定された。1999 年に発表された慶應義塾大学清水信義のグループの 22 番染色体(全体の約 1%)の結果では、545 個の遺伝子(1)が、また 2000 年に発表された理化学研究所ゲノム科学総合研究センターの榊佳之・服部正平グループの 21 番染色体(22 番よりもやや大きい)が全体の約 1%)の結果では、225 個の遺伝子が発見された(2)。このような中、2000 年 6 月 26 日には、ドラフトシーケンスは完成したとの発表がなされ、2001 年 2 月の "Nature" には、ヒトの遺伝子数は当初の予想していた 10 万個よりもかなり少なく 3 万個程度と云われた(3)。2003 年 4 月 14 日のヒトゲノムプロジェクト終了宣言が発表され、32,615 個の遺伝子があるとされた。その後の精査により、ヒトゲノム DNA には、2005 年現在、20000 25000 個の遺伝子が存在すると発表されている(4)。



DNA とは、核酸の一種で有機塩基、糖でできたヌクレオシド (nucleoside) が、リン酸を介してリン酸エステル結合した二重らせん構造の高分子ヌクレオチド (nucleotide) で遺伝情報を有機塩基であるアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、チミン (T) の配列として持っている。DNA は、リン酸基があるため中性付近でマイナス電荷をもつ似た構造の繰り返し配列であるため、ゲル電気泳動で分析が可能となる。また、A と T、G と C の塩基同士は水素結合で特異的に結びついており熱や変性剤により変性し、変性剤を除くと再生する。更に G-C では、3 本の水素結合が、A-T では、2 本の水素結合をもつため塩基配列により結合の強さが違う。この性質を利用して PCR による特定 DNA 配列の増幅やハイブリダイゼーションによる特異的な配列検出が可能となった。

(1) Dunham, I. et al.: "The DNA sequence of human chromosome 22": Nature, 402: 489-495, 1999

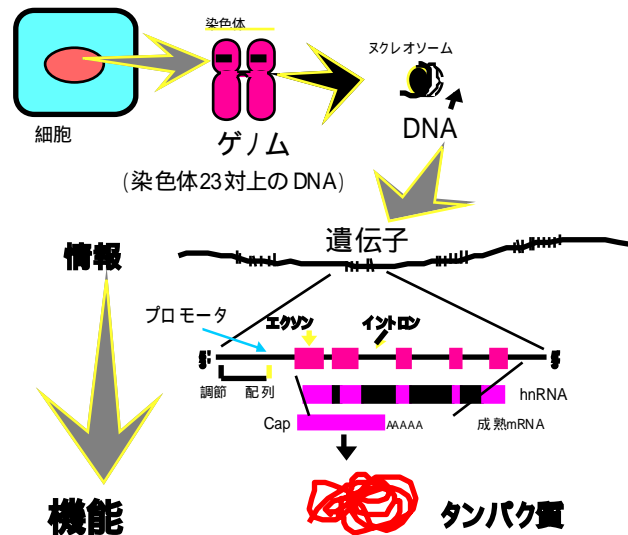
(2) Hattori M. et al.: "The DNA sequence of human chromosome 21": Nature, 403: 311-319, 2000

(3) International Human Genome Sequencing Consortium: "Initial sequencing and analysis of the human genome": Nature, 409: 860-921, 2001

(4) International Human Genome Sequencing Consortium: "Finishing the euchromatic sequence of the human genome.": Nature, 431: 931-945, 2004

## 10 - 2 . 遺伝子と発現

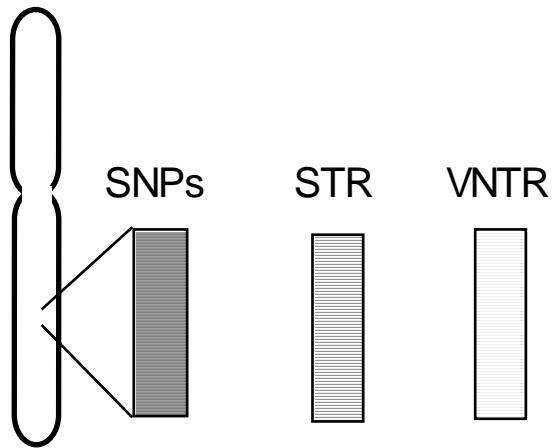
ヒトを含む高等生物では相同染色体が存在する。また遺伝子は、イントロンにより分断されたエクソンとして存在し、原核細胞である大腸菌とは異なる構造を呈している(次図)。しかし遺伝子はどの生物においても、プロモータを含む調節配列で発現調節され、遺伝情報により機能をもつタンパク質が作られる。このプロモータの配列や調節配列は、生物により異なるために、大腸菌で発現させた遺伝子を他の生物で発現させるためには、異なる調節配列を用いなければならない。言い換えると、本実験で用いた pGLO プラスミドは、大腸菌用のプラスミドであり、他の生物の細胞に導入しても発現はできない。



### 10 - 3 .SNPs

SNPs(Single Nucleotide Polymorphisms)は、「スニップス」とよみ1塩基多型をことである。ゲノム全領域にわたり500-1000塩基に1つ程度の割合でこの多型は存在する。ヒトゲノム全体での総数は約300万個(ヒトゲノムDNAは約30億bpであることから前塩基数の0.1%)になる。通常、DNA上の繰り返し配列を多型マーカーとする。STR(Short tandem repeats:3-5塩基対の繰り返し配列)やVNTR(Variable number of tandem repeats:塩基対の繰り返し配列)がその例である。SNPsは、これらの繰り返し配列に比べ高密度な多型マーカーとして利用できる。

ちなみに1塩基多型と点突然変異は、同じように例えばAからGへの変化となる。多型とは、集団中に1%以上その変化がある場合と定義されている。SNPsは、様々な形質と関連し、個人個人の性格に結びつく変化となる。SNPsには、cSNPs(codingSNPs:タンパク質の情報を持っている遺伝子におけるSNPs)、rSNPs(regulatorySNPs:調節領域にあるSNPs)、gSNPs(genomeSNPs:遺伝子でないDNA配列に対するSNPs)などがある。この内cSNPsとrSNPsは、表現型に影響がある多型であるため重要である。例えば、酒に強いかわ弱いかは、ALDH(Acetaldehyde dehydrogenase)の多型により決まる。また、薬剤の副作用があるか否かなども特定の遺伝子の多型によって決まるものもある。今後多くのスニップスが見つけられ病気との関連や薬剤の作用機序との関連が解ってくると期待される。



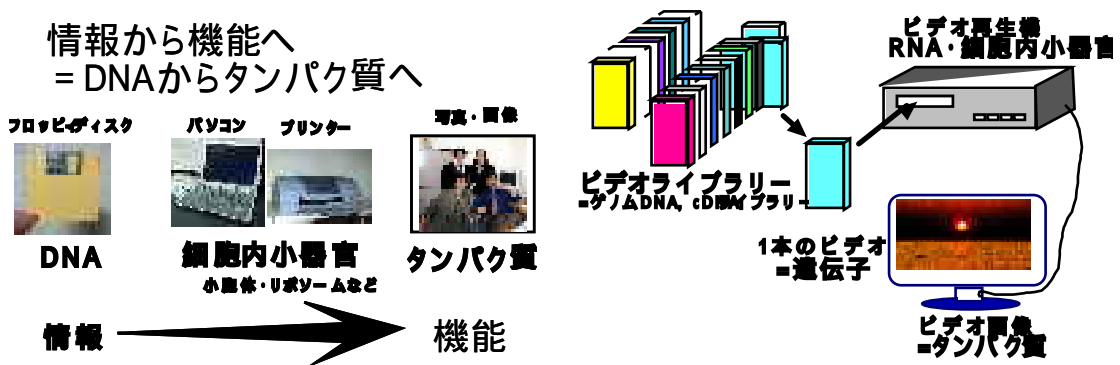
### SNPs STR VNTR

SNPs は、他の繰り返し配列マーカに比べ遥かに高密度多型であることから、個々人の体質を示す多型マーカである。

### 10-4 . 遺伝子とタンパク質の関係のたとえ話

DNA は、情報でありその中に遺伝子が含まれている。遺伝子が発現すると機能をもつタンパク質ができる。タンパク質同志の相互作用で生命現象が成り立ってくる。

下図のように、フロッピーディスクのデジタル情報(下記の例では写真情報)がパソコンやプリンターで実体である写真になることや、多くのビデオテープ(ゲノム DNA: 情報)の中から特定のビデオテープ(遺伝子)を選び再生して映像という機能を発揮させる様子と似ている。



### 10-5 . タンパク質の立体構造表示

タンパク質の立体構造は、タンパク質立体構造データベースのデータをWeb上に存在する立体構

造表示ソフトを用いて表示できる。以下には、立体構造表示ソフト RasMol または Cn3D を用いた GFP 立体構造の表示について示す。本テキスト中の GFP 立体構造グラフィックも RasMol で描いたものである。

RasMol(Windows)を用いた場合  
ソフトウェアの入手

<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/getras.htm> (Windows 95, 98)

<http://www.bemstein-plus-sons.com> (Windows XP)



にアクセスし画面の指示に従って RasMol ソフトウェアをダウンロードする。

立体構造座標データの入手

<http://www.genome.ad.jp/>

ゲノムネットにアクセスし、PDB を選択して調べたいタンパク質をキーワードとして検索する。

例:GFP の場合は、green fluorescent protein をキーワードとしてクリック



[1EMA](#) (GFP 立体構造座標データ)のファイルを選択  
Entire PDB file としてテキストファイルで保存する。

立体構造(3次元分子グラフィック)の表示と操作

・PDB ファイル(座標データ)のアイコンを、RasMol のアイコンに重ねるとソフトが起動してグラフィックが表示される。

- ・option キーを押しながら立体構造の絵自体を左クリックした状態でマウスを動かし上下左右、斜めへのグラフィックの移動ができる。
  - ・shift キーを押しながら立体構造の絵自体を左クリックした状態でマウスを左右に動かし拡大縮小できる。
  - ・shift キーとoption キーを同時に押しながらグラフィック自体を左クリックした状態でマウスを動かすとグラフィック自体を回転させることができる。
  - ・メニューの"Display"を、左クリックすると下記のような分子表示を選ぶことができる。例えば、分子の全体像を見たいときには、"Ribbons"で表示する。また、分子を構成している原子同士の結合を見たい場合には、"Ball & Stick"で表示する。
- "Wireframe" (針金モデル)、"Backbone" (骨格モデル)、"Sticks" (棒モデル)、"Spacefill" (空間充填モデル)、"Ball & Stick" (球・棒モデル)、"Ribbons" (リボン状モデル)などがある。

その他、特定の元素を色分けすることもできる。

例: GFP タンパク質の発色団 (アミノ酸番号 65-67 番; cro) を表示する。

RasMol Command line を用いて下記のようにコマンドを打ち込み表示する。

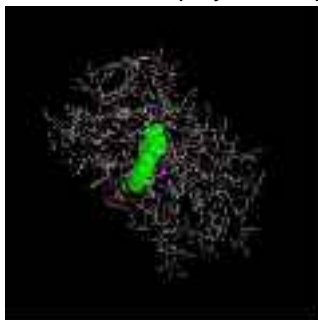
RasMol> select cro            と打ち込む

22 atoms selected!           と表示される。

RasMol> colour green        と打ち込む

グラフィック上で発色団が緑色に表示される。

メニューの"Display" から"Spacefill" を選択すると、下図のように発色団が表示できる。



## 2. Cn3D の場合

Cn3D は、NCBI が供給するソフトウェアで NCBI のタンパク質立体構造データベースのデータ (ASN.1 フォーマット) からグラフィック表示ができるソフトウェアである。

Cn3D ホームページとソフトウェアの入手

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>

画面の指示に従い、Cn3D をダウンロードする。

立体構造座標データの入手

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI ホームページにアクセスして search: Structure を選択する。目的タンパク質をキーワードとし座標データを手にする。

例: GFP の場合は、キーワード green fluorescent protein

「Go」をクリック



色々な GFP ミュータントが表示されるなか、

[1EMA](#)を選択

View 3D structure をクリックし、ファイルのダウンロードを行なう。

PC に Cn3D ソフトウェアがダウンロードされていれば、ファイルをダブルクリックするとそのままグラフィックが表示される。注:ダウンロードされたソフトウェアは、予めインストールしておく。



#### 10-6. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列

NCBIデータベースの一つである GenBank data から本実験で使用したpGLOの塩基配列を取り出すこともできる。

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

1: U62637 Cloning vector PubMed, Protein, Related Sequences, Taxonomy

pBAD-GFPuv,  
complete sequence

LOCUS CVU62637 5371 bp DNA SYN 14-AUG-1996

DEFINITION Cloning vector pBAD-GFPuv, complete sequence.

ACCESSION U62637

VERSION U62637.1 GI:1490531

KEYWORDS .

SOURCE Cloning vector pBAD-GFPuv.

ORGANISM Cloning vector pBAD-GFPuv  
artificial sequence; vectors.

REFERENCE 1 (bases 1 to 5371)  
AUTHORS **Crameri,A., Whitehorn,E.A., Tate,E. and Stemmer,W.P.**  
TITLE **Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling**  
JOURNAL **Nat. Biotechnol. 14 (3), 315-319 (1996)**  
MEDLINE 98294348

REFERENCE 2 (bases 1 to 5371)  
AUTHORS Crameri,A. and Kitts,P.A.  
TITLE pBAD-GFPuv complete sequence  
JOURNAL Unpublished

REFERENCE 3 (bases 1 to 5371)  
AUTHORS Kitts,P.A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (28-JUN-1996) CLONTECH Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303-4230, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..5371  
/organism="Cloning vector pBAD-GFPuv"  
/db\_xref="taxon:50707"

**gene complement(96..974)**  
**/gene="araC"**

CDS complement(96..974)  
/gene="araC"  
/note="PID: g455167"

```

/codon_start=1
/transl_table=11
/product="araC protein"
/protein_id="AAC53662.1"
/db_xref="GI:1490532"
/translation="MAEAQNPELLPGYSFNAHLVAGLTPI EANGYLDFFDI DRPLGMKG
YILNLTIRGQGVVKNQGREFVCRPGDILLFPPGEIHHYGRHPEAREWYHQWYFRPRA
YWHEWLNWPSIFANTGFFRPDEAHQPHFSDLFGQII NAGQGEGRYSELLAINLLEQLL
LRRMEAINESLHPPMDNRVREACQYISDHLADSNFDIASVAQHVCLSPSRLSHLFRQQ
LGISVLSWREDQRISQAKLLLSTTRMPIATVGRNVGFDDQLYFSRVFKKCTGASPSEF
RAGCEEKVNDVAVKLS"
gene 1342..2061
/gene="gfpuv"
CDS 1342..2061
/gene="gfpuv"
/note="GFPuv is the GFP variant called 'cycle 3'; Allele:
AC2; green fluorescent protein variant"
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="GFPuv"
/protein_id="AAC53663.1"
/db_xref="GI:1490533"
/translation="MASKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFK
DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYITADKQKN
GIKANFKIRHNI EDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDH
MVLLEFVTAAGITHGMDELYK"
gene 2636..3496
/gene="bla"
CDS 2636..3496
/gene="bla"
/function="confers resistance to ampicillin"
/codon_start=1
/transl_table=11

```



/product="beta-lactamase"  
 /protein\_id="AAC53664.1"  
 /db\_xref="GI:1490534"  
 /translation="MSIQHFRVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKDAEDQLGARVGY  
 IELDLNSGKILESFRPEERFPMSTFKVLLCGAVLSRVDAQEEQLGRRIHYSQNDLVE  
 YSPVTEKHLTDGMTVRELCSAAITMSDNTAANLLLTITGGPKELTAFLHNMGDHVTRL  
 DRWEPELNEAIPNDERDTTTPAAMATTLRKLITGELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPL  
 LRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIWITYTTSQATMDERNRQIA  
 EIGASLIKHW"

BASE COUNT      1369 a    1368 c    1300 g    1334 t

ORIGIN

1 atcgatgcat aatgtgctg tcaaatggac gaagcagga ttctgcaaac cctatgctac  
 61 tccgtcaagc cgtaattgt ctgattcgtt accaattatg **acaacttgac ggctacatca**  
 121 **ttcacttttt cttcacaacc ggcaaggac tgcctcgggc tggcccgggt gcattttta**  
 181 **aatacccgcg agaaatagag ttgatgtca aaaccaacat tgcgaccgac ggtggcgata**  
 241 **ggcatccggg tggtgctcaa aagcagcttc gctggctga tacgttggtc ctcgccgacg**  
 301 **cttaagacgc taatccctaa ctgctggcgg aaaagatgtg acagacgga cggcgacaag**  
 361 **caaacatgct gtgcgacgct ggcatatca aaattgctgt ctgccagggt atcgctgatg**  
 421 **tactgacaag cctcgctac cagattatcc atcggtgat ggagcagctc gttaatcgct**  
 481 **tocatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaagc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc**  
 541 **ccttcccctt gccggcggtt aatgatttgc ccaaacagggt cgctgaatg cgctgggtgc**  
 601 **gcttcatcgg ggcgaagaa cccgctatg gcaaatattg acggccagtt aagccattca**  
 661 **tgccagtagg cgcgaggacg aaagtaaac cactggatg accatcgcg agcctccga**  
 721 **tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc gggaacagca aaatacacc cggtcggcaa**  
 781 **acaattctc gtccctgatt ttaccacc cctgaccgc gaatggtag attgagaata**  
 841 **taaccttca ttccagcgg tcggtgata aaaaaatga gataaccgtt ggctcaatc**  
 901 **ggcgttaaac ccgccaccag atgggcatg aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt**  
 961 **tgccgttcag ccat**actttt catactccg ccattcagag aagaaccaa ttgtccat  
 1021 tgcacagac attgccgtca ctggtcttt tactggctct tctcgctaac caaacggta  
 1081 accccgctta ttaaagcat tctgtaacaa agcgggacca aagc**catgac aaaaacgggt**  
 1141 **aaacaagtg tc**tataatca cggcagaaaa gtccacattg attatttga cggcgtcaca  
 1201 ctttgctatg ccatagcatt ttatccata agattagcgg atcctacct **g acgttttta**  
 1261 **tcgaactct ctactgt**ttc tccataccg ttttttggg ctagaataa ttttgttaa

1321 ctt taagaag gaga tataca ta tggctagc aaaggagaag aactttcac tggagttgc  
1381 ccaattcttg ttgaattaga tggatggtt aatgggcaca aattttctgt cagtggagag  
1441 ggtgaagggtg atgctacata cggaaagctt accctaaat ttatttgac tactggaaaa  
1501 ctacctgttc catggccaac actgttact actttctctt atggtgttca atgctttcc  
1561 cgttatccgg atcatatgaa acggcatgac ttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat  
1621 gtacaggaac gcactatatac ttcaagat gacgggaact acaagacgcg tgcgaagtc  
1681 aagtttgaag gtgataacct tgtaatcgt atcgagttaa aaggtattga ttttaagaa  
1741 gatggaaaca ttctcggaca caaactcgag tacaactata actcacaca tgatacatc  
1801 acggcagaca aacaaggaa tggatcaaa gctaacttca aaattcgcca caacatgaa  
1861 gatggatcgg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgtggccct  
1921 gtccttttac cagacaacca ttacctgtcg acacaatctg ccctttcgaa agatccaac  
1981 gaaagcgtg accacatggt ccttcttgag ttgttaactg ctgctgggat tacacatggc  
2041 atggatgagc tctacaata atgaa ttgca gctcgg tacc cggggatcct ctagagtcga  
2101 cctgcaggca tgcaagcttg gctgttttg cggatgagag aagatttca gcctgataca  
2161 gat taa tca gaacgcagaa gcggtctgat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc  
2221 ggtggtcca cctgaccca tggcaactc agaagt gaaa cgcctagcg ccga tggtag  
2281 tgtgggtcc cca tgcgag agtagggaac tgccaggcat caaataaac gaaaggctca  
2341 gtgcaaagac tggcctttc gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag  
2401 gacaaatcgg ccgggagcgg atttgaactg tgcaagcaa cggcccggag ggtggcggc  
2461 aggaccccg cca taactg ccaggcatca aattaagcag aaggcatacc tgacggatgg  
2521 cctttttgcg tttctacaaa ctctttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc  
2581 gctcatgaga caataacc **ct gataa**atgct tcaataatat tgaaaaagga agagt **atgag**  
2641 tat tcaacat ttccgtgtcg ccttattcc cttttttgcg gcattttgcc ttctgtttt  
2701 tgctcaccca gaaacgctgg tgaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg gtgcacgagt  
2761 gggtfacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gccccaaga  
2821 acgttttcca atgatgagca cttttaagt tctgctatgt ggccgggtat tatccgtgt  
2881 tgacgccggg caagagcaac tccgtgccg catacactat tctcagaatg acttggttga  
2941 gtactacca gtacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagt aagag aattatgag  
3001 tgctgccata accatgagtg ataactgc ggccaactta ctctgacaa cगतcgggg  
3061 accgaaggag ctaaccgtt tttgcacaa catggggat catgtaactc gcctgtatc  
3121 ttgggaaccg gacgtgatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca cगतcctgc  
3181 agcaatggca acaacgttgc gcaactatt aactggcga ctacttactc tagcttccg  
3241 gcaacaatta atagactgga tggagggga taagttgca ggaccacttc tgcctcggc  
3301 ccttcggct ggctggtta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcggg

3361 **tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctccgt atcgtagtta tctacacgac**  
3421 **ggggagt cag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact**  
3481 **gat taagcat tggtaa**ctgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttacg  
3541 cgccctgtag cggcgcatt a agcgcggcgg gtgtggtgtg tacgcgcagc gtgaccgcta  
3601 cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt ccttccctt ctcgccacgt  
3661 tcgccggctt tcccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgat ttagtg  
3721 ctt tacggca cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcagct agtgggcat  
3781 cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac  
3841 tcttgtcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggg ctattcttt gatt tataag  
3901 gga tttgcc gattcggcc tttgggttaa aaaatgagct gat ttaaca aaat ttaacg  
3961 cgaat tta caaaatat ta acgtttacaa tttaaaagga tctagtgaa gatccttttt  
4021 gataatctca tgacaaaat ccttaacgt gagtttctg tccactgagc gtcagacccc  
4081 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgttg  
4141 caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg gttgtttgc cggatcaaga gctaccaact  
4201 cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatc caaatactgt ccttctagt  
4261 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg  
4321 ctaatcctgt taccagtggc tgcgtccagt ggcgat aagt cgtgtctac cgggttgac  
4381 tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggt gaaacggggg ttcgtgcaca  
4441 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acc tacagcg tgagctatga  
4501 gaaagcgcca cgct tcccga agggagaaag gcggacaggt atccggt aag cggcaggtc  
4561 ggaacagag agcgcacgag ggagcttcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct  
4621 gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc agggggcg  
4681 agcctatgga aaaaagccag caacgcggc tttttacggt tctggcctt ttgctggcct  
4741 tttgtcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgatctg tggataaccg tattaccgcc  
4801 tttgagtgag ctgataccgc tgcgcgagc cgaacgacc agcgcagcga gtcagtgagc  
4861 gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggtat ttctcctta cgcatctgt cggatattca  
4921 caccgcatat ggtgactct cagtacaatc tgctctgat cgcgatagtt aagccagtat  
4981 aactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg  
5041 ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc cggcatcgc ttacagacaa gctgtgaccg  
5101 tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagggcagc  
5161 aaggagatgg cgccaacag tccccggcc acggggcctg ccaaccatacc cacgcccgaa  
5221 caagcgtca tgagcccga gttggcagcc cgatctccc catcgggat gtcggcga ta  
5281 taggcgccag caaccgcacc tgtggcgccg gtgatgccc ccaacgatgc tccggcgt ag  
5341 aggatctaat tctcatgttt gacagcttat c

オリジナル論文:

Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E. and Stemmer, W. P.

“Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling” *Nat. Biotechnol.* 14 (3), 315-319 (1996)

論文要旨

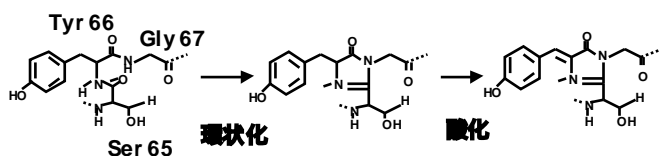
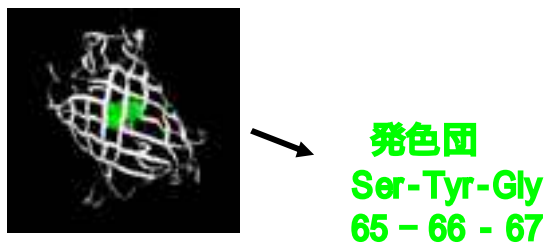
“Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.”

Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP.

Affymax Research Institute, Palo Alto, CA 94304, USA.

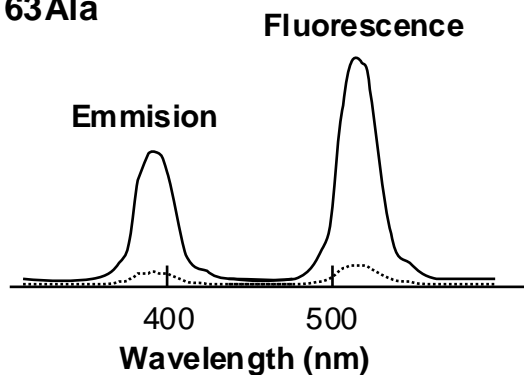
Green fluorescent protein (GFP) has rapidly become a widely used reporter of gene regulation. However, for many organisms, particularly eukaryotes, a stronger whole cell fluorescence signal is desirable. We constructed a synthetic GFP gene with improved codon usage and performed recursive cycles of DNA shuffling followed by screening for the brightest *E. coli* colonies. A visual screen using UV light, rather than FACS selection, was used to avoid red-shifting the excitation maximum. After 3 cycles of DNA shuffling, a mutant was obtained with a whole cell fluorescence signal that was 45-fold greater than a standard, the commercially available Clontech plasmid pGFP. The expression level in *E. coli* was unaltered at about 75% of total protein. The emission and excitation maxima were also unchanged. Whereas in *E. coli* most of the wildtype GFP ends up in inclusion bodies, unable to activate its chromophore, most of the mutant protein is soluble and active. Three amino acid mutations appear to guide the mutant protein into the native folding pathway rather than toward aggregation. Expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, this shuffled GFP mutant showed a 42-fold improvement over wildtype GFP sequence, and is easily detected with UV light in a wide range of assays. The results demonstrate how molecular evolution can solve a complex practical problem without needing to first identify which process is limiting. DNA shuffling can be combined with screening of a moderate number of mutants. We envision that the combination of DNA shuffling and high throughput screening will be a powerful tool for the optimization of many commercially important enzymes for which selections do not exist.

DNA シャッフリングにより得られた GFP から発現した GFP は、長波長側の紫外線で励起された場合、高い蛍光強度を有する。GFP の発色団は、65-67 番のアミノ酸により形成されている。一方、DNA シャッフリングにより選択された遺伝子から発現された蛍光強度が高い GFP は、99、153、163 番のアミノ酸置換が起こっている、



GFP は、65 67 番アミノ酸 (Ser、Tyr、Gly) により発色団を形成し、紫外線により蛍光を発する。

**Phe99Ser**  
**Met153 Thr**  
**Val163Ala**



DNA シャッフリングにより発色団以外のアミノ酸変化がある。(Phe99Ser、Met153 Thr、Val163Ala)  
 図で直線がDNA シャッフリングにより得られた GFP 遺伝子より発現した GFP、長波長紫外線による励起効率が高く、蛍光強度も高い。

#### 10-7 .組換え体の封じこめについて

遺伝子組換え体は、自然界に存在しないものである。このため組換え DNA 実験を行う場合、その宿主 ベクターのレベルに応じ異なる区域で実験する必要がある(物理的封じ込め)。また、宿主自体も特定の培養条件でなければ生育できないよう外界と区別されている(生物学的封じ込め)。

### 物理的封じこめ(Physical containment)

物理的封じこめは、そのレベルに応じ番号が付けられている。(P は、Physical の頭文字) 組換え体が、実験室外に漏出するのを防ぐための実験施設レベルであり、数字が大きいほうが厳しい基準となっている。

各レベルの概略を下記に記します。法律により、具体的な組換え体を取り扱う際の危険度、安全性等をふまえ、どの材料を使用する場合にはどの封じ込めレベルの施設で行えば良いかの基準が定められている。

#### < P1 レベル >

オートクレーブ等の滅菌装置が設置された通常の微生物実験室で、実験中は窓や扉が閉められる区域。

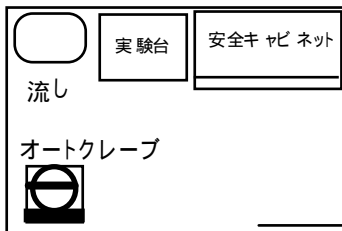
教育目的組換え DNA 実験は P1 レベルの施設であれば問題なく実施できる。



開放厳禁

#### < P2 レベル >

P1 レベルの条件に加え、安全キャビネットが設置、稼働できる区域。実験中は、“P2 レベル実験中”の表示を入りに掲げる必要がある。

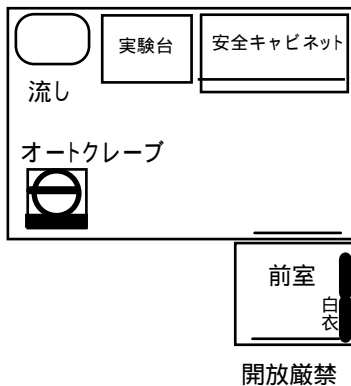


開放厳禁

#### < P3 レベル >

P2 レベルの条件に加え、実験室内を陰圧(空気が出入口から室内の方向に流れる状態)となる区域で、専用の無塵衣に着替えるための前室(他の区域と隔離できるように、前後の扉は同時に開かない構造であること)とエアシャワーなどが備えられている。

また、実験区域の床や天井は容易に洗浄できるようになっている必要がある。



### 生物学的封じ込め(Biological containmant)

特定の培養条件でなければ生育できない生物もしくは、組換え体が、万一実験室外に洩れてたとしても死滅してしまうような宿主、ベクターを用い、組換え体の拡散を防ぐ事。B1、2 がある。(B は、Biological containmant の頭文字) 大腸菌 K12 株とプラスミドの組み合わせは、B1 である。

#### B1 レベル

自然条件下での生存率が低い宿主系と宿主依存性が高いベクターを用いた実験系です。宿主としては、大腸菌 K12 株とその誘導株、枯草菌 *B. subtilis* Marburug168 株とその誘導株、酵母 *S. cerevisiae*、動植物細胞、アグロバクテリウム、*Thermus* 属細菌を用います。

#### B2 レベル

大腸菌 K12 株-ベクター系のうちの安全性がさらに高い宿主ベクター系で、1776 などがあります。

このような「物理的封じ込め」ならびに「生物学的封じ込め」を組み合わせる個々の実験を行いません。例えば、動物細胞由来DNAを組み込んだプラスミドDNAをB1レベルである大腸菌K12株に導入する実験は、P2施設で行います。一方、微生物や植物由来のDNAを用いてB1レベルの大腸菌K12株を用いた実験は、P1レベルの施設で実施します。

教育目的組換えDNA実験では、B1レベルの系を用いる。

### 10-8.安全委員会

研究目的で組換えDNA実験を行う研究所などの施設では、法令に基づき安全委員会を設置して初めて実験ができる。

安全委員会は、組換えDNA研究者、他の分野の研究者、人文社会研究者、医学研究者、医師などで事業所ごとに構成される。

しかし、PCR実験や制限酵素処理と電気泳動、シーケンシングなど組換えを伴わない遺伝子実験は、この規則には関わらず実験ができる。

教育目的組換え DNA 実験では、安全委員会の設置は必要ない。

#### 10-9. オートクレーブ以外の滅菌方法

乾熱滅菌(160℃、1-2 時間)

乾熱滅菌器を用い、主にガラス器具の滅菌に用いる。

火炎滅菌

火で直接あぶる。白金耳の滅菌など植菌の際に用いる。

ろ過滅菌

0.22 μm のニトロセルロースフィルターなどで溶液をろ過する。オートクレーブにかけられない血清タンパク質や抗生物質を含む溶液の滅菌(除菌)に用いる。

ガス滅菌

エチレンオキシドガスで置換し滅菌する。熱に弱いプラスチックプレート(ポリスチレンやポリエチレン製)の滅菌に用いる。通常の使い捨てプラスチック製品は、すでにガス滅菌してある場合がある。

#### 10-10. 実験に用いる水について

本実験では、キットに含まれている試薬を用い実験が行えるため、あえて水を準備する必要はない。しかし、発展的授業を行うため、更に培地を作成する場合には水が必要である。このため、実験に用いる水についての知識を概説する。

実験に用いる水は、水道水を原料としてイオン交換・蒸留・膜を通すなどの処理によりイオンや有機物を除いたものである。イオン交換水、蒸留水、純水、超純水などがあり、実験目的に応じて使い分ける。一方、組換え DNA 実験で用いる DNase や RNase Free(含まない)滅菌水は、9000 円/500 ml 程度で(日本ジーンなど)各メーカーから市販されている。

水道(用途: 水洗剤による器具の洗浄)

飲料規格基準値に基づいた品質管理を通り水道管によって家庭に供給されている水で水道局が管理している。器具の洗浄に用いるが、洗浄後のすすぎは、その後の実験で用いるレベルの水を用いる。

**イオン交換水・脱イオン水(用途: 微生物の培養、生化学実験)**

水道水を基にイオン交換樹脂によりイオンが除去されたことです。Mg や Ca イオンが多く含まれる硬水を用いる場合は、蒸留後にイオン交換樹脂を通したほうが、樹脂の劣化はすくなくなる。培養では、オートクレーブ滅菌して用いる。

**蒸留水(微生物の培養、生化学実験)**

イオン交換水又は水道水を沸騰・気化した蒸気を冷却することで得られた水。蒸留水の比抵抗値:



1〜3M・cm 程度である。培養では、オートクレーブ滅菌して用いる。

純水(タンパク質解析実験、動物細胞培養、生化学実験)

Reverse osmosis(RO)膜処理、MilliQ 装置処理、蒸留処理、イオン交換処理等の方法を用いてイオンを除去し、比抵抗値 1〜10M・cm 程度の水のことをいう。

超純水(DNA クローニング実験、動物細胞の培養)

品質管理されたイオン交換樹脂処理、活性炭処理、Reverse osmosis(RO)膜処理等を組み合わせで処理され、比抵抗値 17M・cm 以上の純水を特に超純粋という。

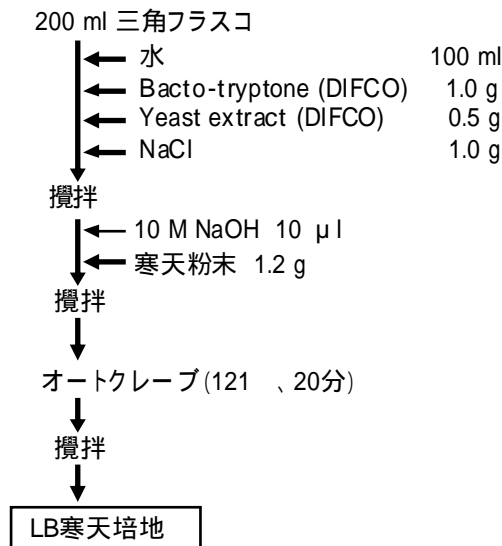
組換え DNA 実験で使用する大腸菌など微生物の培養では、水道水に含まれる Cl や Fe などのイオンを取り除き、オートクレーブ滅菌した脱イオン水や蒸留水が十分に使用できる。動物細胞や植物細胞など増殖速度が遅く、微量に含まれる有機物などの影響を受ける可能性がある培養では純水または超純水を滅菌して使用する。

#### 10-11 . LB 培地調製方法

LB 培地は、自作することもできる。方法は、各成分から自作する方法と調製済み培地粉末を購入する方法がある。

成分から調整する方法

Bacto-tryptone, Yeast extract (各 DIFCO 社製) NaCl(試薬特級)、NaOH(試薬特級)、寒天粉末を用意し、下記の要領で調製する。



液体培地を作成する場合は寒天粉末を添加しない。

#### 調製済み粉末から調整する方法

調製済み粉末例: 日本製薬「ダイゴ」培地 LB

LB培地「ダイゴ」1包(2.5g)にイオン交換水もしくは蒸留水 100 ml を加え攪拌後、加温溶解し、121 で 20 分間オートクレーブ滅菌する。(寒天培地とする場合、寒天粉末を、と同様に添加する。

その他必要試薬:

アンピシリン: アンピシリンナトリウム(試薬特級) 30 mg/ml(滅菌水)

アラビノース: L(+) アラビノース(試薬特級) 200 mg/ml (滅菌水)

プレート:

プラスチックプレートを購入する。プレート径は、どのような大きさでも問題ない。

#### 10-12 . 組換え DNA 実験における無菌操作とヌクレア-ゼ

微生物を扱うときの基本は、特定微生物の純粋培養である。このため無菌操作は、実験系へ他の微生物が混入しないことならびに実験にもちいている微生物を外部に出さないことを目的とする。すなわち実験操作中の空中落下菌や試薬に混入している菌、更には他のプレートに生えている菌のコンタミを防ぐために無菌操作を実施する。病原微生物を扱う場合は、実験系外に出ない操作をすることもある。

一方、DNA・RNAを取り扱うときの無菌操作は、DNA・RNAの安定性に関わるDNA分解酵素(DNase)やRNA分解酵素(RNase)などのヌクレア-ゼ(Nuclease)が、実験系に混入することを防ぐことが目的である。このため同じ無菌操作でも微生物の取り扱いの場合とDNA・RNA取り扱いの場合では目的や意味が異なる。

ヌクレア-ゼは、細胞中ばかりでなく、試薬、水、更には実験者の唾液や汗からも混入する。そこで、使用する試薬は全てオートクレーブ(高圧蒸気)滅菌し、さらにEDTA(DNaseの場合)などの阻害剤を加える。また、唾液や汗の混入を防ぐために状況に応じ実験中にマスクや手袋を着用する。

このようにDNAやRNAを取り扱う実験を行う際にも、オートクレーブ滅菌や器具の乾熱滅菌を行なうため、操作自体は微生物の無菌操作に似ているが、目的はまったく異なる。(もちろん、微生物がコンタミすれば、その微生物からヌクレア-ゼがコンタミすることもありえるので、滅菌操作で微生物を死滅させることも含む。)

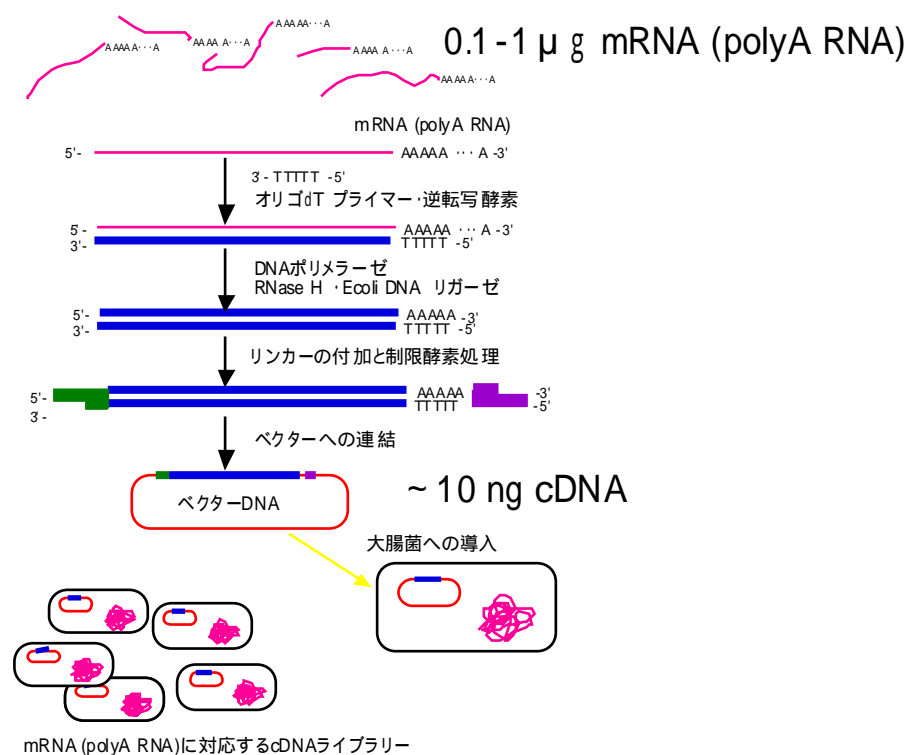
ろ過滅菌という滅菌方法がある。タンパク質を含む溶液の滅菌には、オートクレーブ滅菌するとタンパク質が非可逆的に変性するために0.22~0.45 μm程度のポアサイズをもつフィルターに溶液を通し、滅菌(正確には除菌)する方法である。この方法では、タンパク質であるDNA分解酵素

やRNA分解酵素は、フィルターを通過してしまうため、DNA・RNAを扱う場合には意味が無い。  
DNA・RNA抽出で用いる酵素は、高純度なものを同時にオートクレーブ滅菌した緩衝液に溶解し、できるだけヌクレアゼのコンタミを防いで使用する。

### 10-13. 形質転換効率測定の一必要性について

#### ライブラリーと形質転換効率

遺伝子ライブラリーを作製し、特定の遺伝子をクローニングする際、少量のライブラリーDNAから、より多くのコロニーを作らせてスクリーニングする必要がある。



#### cDNAライブラリーの作製

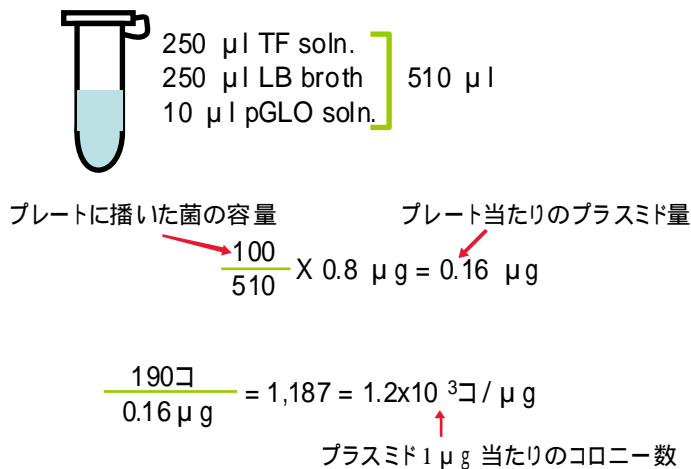
細胞から抽出精製したマイクログラム単位のpolyA RNAを材料として逆転写酵素を用いてライブラリーを作製する。ライブラリー作製には、幾つかの工程を経るため最終的なDNA量は、ナノグラム単位となる。このような少量のDNAで大腸菌を形質転換させ、できるだけ多くのコロニーを形成させることにより目的のクローンがスクリーニングしやすくなる。そこで、形質転換効率が重要になってくる。

通常、宿主(大腸菌)とベクター(プラスミド DNA)との組み合わせ、ならびにコンピテント細胞調製方法の違いや形質転換方法により形質転換効率の高い系を用いて実験する。評価は、実験に用いたプラスミド DNA 量と形成されたコロニー数から計算し、プラスミド DNA の1 μg で形成されるコロニー数(colony forming unit :CFU) で比較する。

なお、ライブラリー作製にはファージベクターを用いる場合も多い。

例えば、pGLO プラスミド DNA 1ループ(約 10 μl、約 0.8 μg)を用いて、形質転換実験を行ったところプレート当たり190個のコロニーが形成されたとする。この場合、形質転換効率は、 $1.2 \times 10^3$  コ/μg プラスミド DNA である。

### 形質転換効率



### 形質転換効率の測定

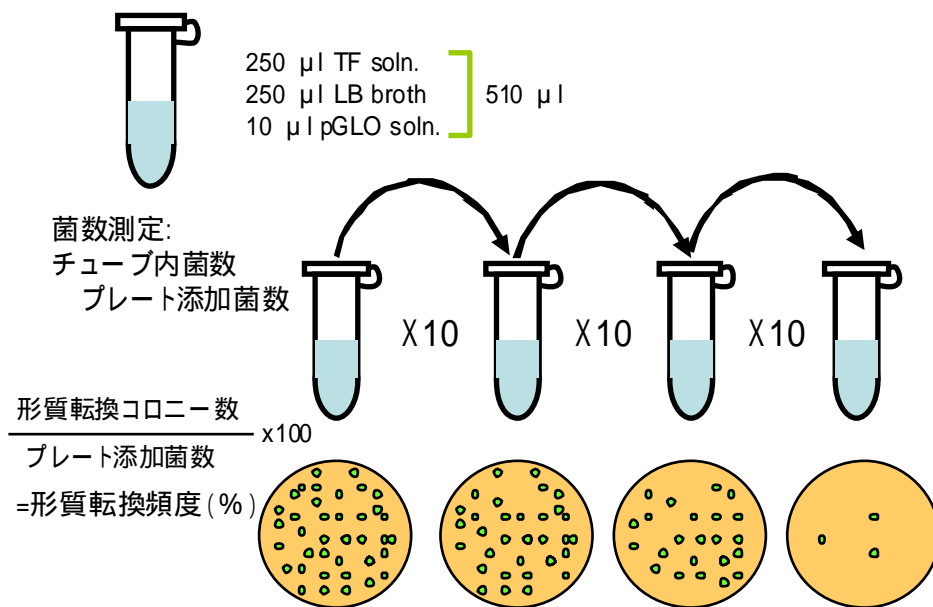
プレート当たりに仕込んだプラスミド DNA 量とコロニー数の関係から形質転換効率を求めることができる。

ライブラリーのスクリーニングでは、多数のプレートを用いて万単位コロニーを作らせる必要がある。そこで通常、形質転換効率が、 $10^7 \sim 10^8$  個/μg プラスミド DNA のコンピテント細胞(大腸菌)を用いる。本実験を、このようなコンピテント細胞をもちいて実験した場合、同数のコロニーを作らせるために必要なプラスミド DNA 量は、 $1/1,000$  から  $1/100,000$  ですむ。図 16 の例の場合では、形質転換効率が  $3.2 \times 10^3$  コ/μg プラスミド DNA ならば  $30,000$  コ/10 μg プラスミド DNA であるのに対し、形質転換効率が  $3.2 \times 10^8$  コ/μg プラスミド DNA ならば  $30,000$  コ/0.1 μg プラスミド DNA となる。このように形質転換効率の高いコンピテント細胞を用いれば、ng 単位の DNA が用意できればスクリーニングが可能である。

### 形質転換頻度

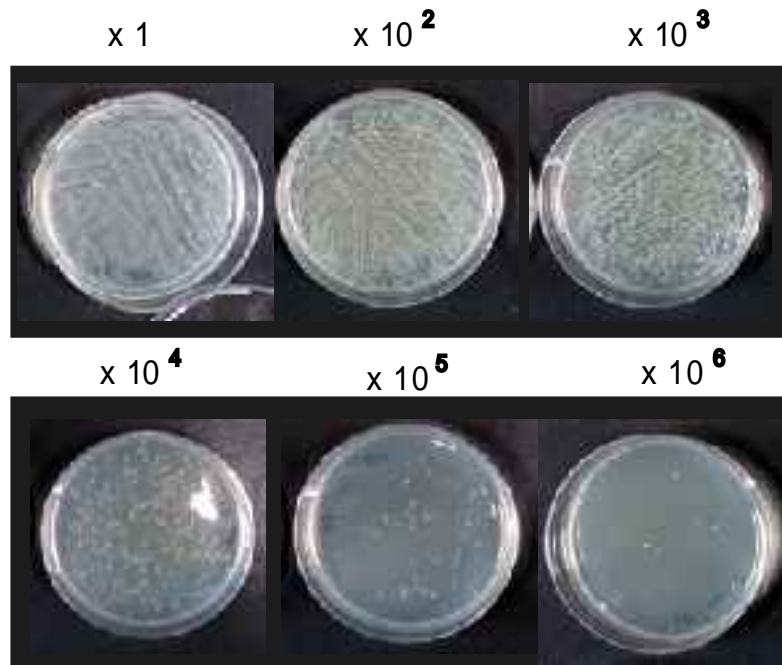
実験に用いた大腸菌のうちプラスミド DNA を取り込んだ大腸菌がどれくらいの頻度で存在するかを推定することも可能である。

大腸菌とプラスミド DNA を仕込んだ溶液の希釈系列を調製しコロニーを形成させることで仕込んだ溶液中の大腸菌数を推定できる。ここから形質転換プレート当たり存在する菌数(形質転換体+非形質転換体の総数になる)を計算し、仕込んだ大腸菌のうちどの程度の頻度でプラスミド DNA を取り込んだ(形質転換された)大腸菌が存在するか推定できる。



### 仕込んだ大腸菌のうち形質転換された頻度の推定

仕込んだチューブから大腸菌溶液を一定量採取し希釈系列を調製した後、抗生物質を含まない培地に植菌し、培養することでコロニー数からチューブ内の菌数を計算する。チューブ内の菌数からプレートに添加した菌数を計算し、形質転換コロニー数と比較することにより形質転換の頻度を測定する。形質転換頻度を測定するとプラスミド DNA が大腸菌に取り込まれる頻度は決して高くないことがわかる。



例:

1. 形質転換プレートのコロニー数 520 個
  2. 仕込んだチューブの希釈系列からのコロニー数  $\times 10^4$  389 個、 $\times 10^5$  36 個
- 1, 2ともに1枚のプレート当たり100  $\mu$ l の菌溶液を植菌

まずプレートの全菌数を計算する。

プレート上のコロニー数を測定できるプレートは、 $10^4$ 、 $10^5$  と考えられる。

(濃いプレートはコロニー数が多すぎて測定できない。また、薄いプレートのコロニー数は10個以下であり、信頼性に欠ける。)

$389 \text{ 個} \times 10^4 = 3.9 \times 10^6 \text{ 個}$ 、 $36 \text{ 個} \times 10^5 = 3.6 \times 10^6 \text{ 個}$

平均:  $3.8 \times 10^6 \text{ 個}$  (プレートの全菌数)

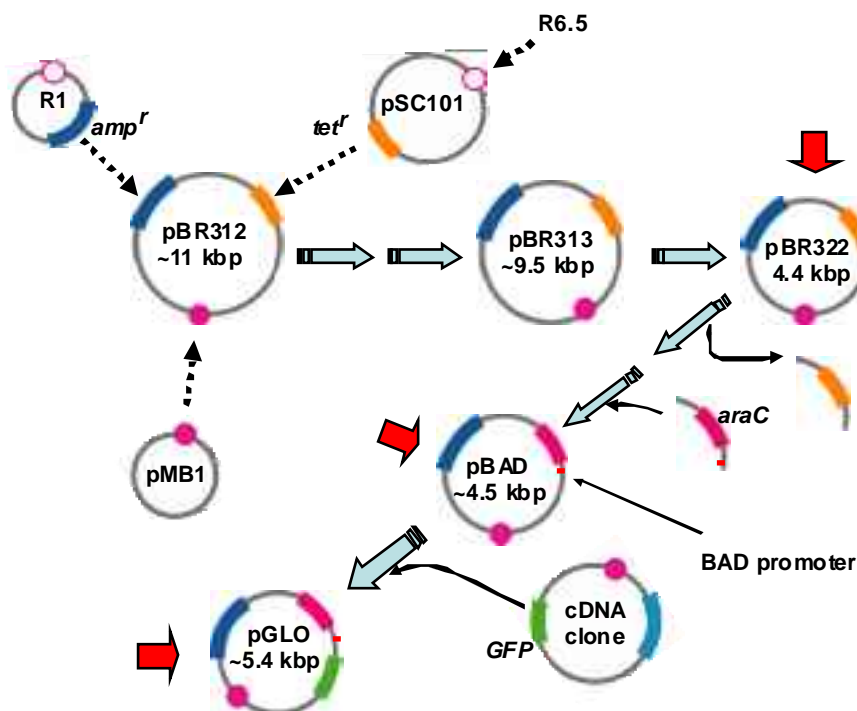
ここで、形質転換した菌数は、520 個であることから、

形質転換頻度 (%) =  $5.2 \times 10^2 / 3.8 \times 10^6 = 1.4 \times 10^{-4}$  (0.014%)

である。

#### 10-14 . pGLO プラスミド DNA の起源

オワンクラゲがもつ GFP 遺伝子を含む pGLO プラスミド DNA は、古くから使われてきたプラスミドベクター pBR322 をベースに作られた。ここで、pBR322 プラスミド DNA 自身は大腸菌プラスミド DNA から組換えにより作られた。大腸菌のプラスミド DNA pMB1、R1、R6.5 から各々 ori amp<sup>r</sup> tet<sup>r</sup> が切り出され、pBR312 が調製された。この pBR312 から pBR313 を経てプラスミドの塩基対数を減らすことにより pBR322 が作られた(1)。この pBR322 の tet<sup>r</sup> という遺伝子を取り除き、araC 配列と pBAD プロモータを挿入し、新たに構築された pBAD シリーズが完成する(2)。pBAD プラスミドに GFP 遺伝子をサブクローニングして構築されたプラスミド DNA が pGLO である。



(1)pBR322: Bolivar F et. al.: "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system." *Gene*, 2, 95-113. (1977)

(2)pBAD: Guzman LM et. al.: "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J. Bacteriol.*, 177, 4121-4130. (1995)