Question & Answer

紙パルプ分野で使われるバイオテクノロジーの用語について (II)

—遺伝子操作の方法と実際—

東京農工大学農学部 佐 渡 篤, 川合 伸也

On Technical Terms in Biotechnology Related to Pulp and Paper Research (II) — Methodology and Practice of Gene Manipulation Technique —

Atsushi Sawatari and Shinya Kawai

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

Methods and practice of gene manipulation technique were explained for the production of human insulin. The DNA synthesizing and DNA sequencing were outlined with a few examples. Furthermore, peculiarity in studying gene technology was also described.

Keywords : Gene manipulation technique, *E. coli*, Restriction enzyme, Plasmid, Recombinant DNA, Transformation, Genome, Host-vector system, Gene cloning, DNA synthesizer, DNA sequencing, PAGE, HPLC, Insulin, Interferon, cDNA

II-1 遺伝子操作によるタンパク質の産生

Q : 人間のインシュリンと同じものを遺伝子操作によって作る方法はどうするのですか。

A : インシュリンの製造法は遺伝子操作の成果としては著名なもので、遺伝子操作の実際を理解するには良い例です。その実際は、大腸菌からプラスミドを分離して、制限酵素によってそのプラスミドを開裂して、人間のインシュリン遺伝子をリガーゼという酵素により繋げた組換え DNA を大腸菌に導入してやります。

Q : プラスミド、制限酵素、リガーゼ、組換え DNA そして導入って何ですか。丁寧に説明して下さい。

A : 特定の生物の細胞に遺伝子を入れてやることを導入と言い、それによってその生物の形質が変化する場合、形質転換 (Transformation) と言います。このとき、その人間にとって都合の良い遺伝情報が発現しやすい形で導入しなくてはなりません。

そこで話が少し戻りますが、生物体の細胞は前回述

べた様に真核細胞と原核細胞の2つがあり、原核細胞から成る生物 (原核生物と言います) は細菌類と藍藻類です。原核細胞の模式図を図 2-1 に示します。原核細胞にはミトコンドリア、ゴルジ体、葉緑体、小胞体

図 2-1 細菌 (原核生物の一例) の細胞構造の模式図¹⁾

などの構造体は認められません。そして真核細胞に比較すると、はるかに単純な構造をしています。原核細胞は核はもたないのですが、それに対応するものとして、DNAの繊維からなる核様体(Nucleoid, ヌークレオイドと読む)と呼ばれる小体を持ちます。しかし核膜がありません。この核様体以外に細胞質の中にDNAがある場合は、それをプラスミド(plasmid)と言います。しかもそのDNAは、複製を染色体とは独立して自律的に行うことができます。

勿論、真核細胞の中にもプラスミドはありますから、プラスミドとは、染色体とは独立に存在するDNAで自律的に子孫に伝達される場合を言う事になります。そして、真核生物のプラスミドには、直鎖状の2本鎖DNAから成るものも知られています。またプラスミドは核外遺伝子と言われることもあります。

細菌に由来するプラスミドは、放線菌などの例を除き2本鎖の環状ですので図2-2の様に円の形で描かれることが多いのです。実際には高次構造をとるため、厳密に円状となっている訳ではありません。(染色体からのDNAをゲノムDNAと呼ぶことがあります。ゲノム(Genome, 英語ではジーノムと発音する)とは生物の生活機能の調和を保つのに必要不可欠な染色体の一群を言います。一つのゲノムから出来ている個体を一倍体と言い生殖細胞がその例ですし、また2組から出来ている場合を二倍体と言い体細胞がその例です。染色体からのDNA—ゲノムDNA—に対して、プラスミドのDNAのことをプラスミドDNAと言うこともあります。)

大腸菌からのプラスミドは遺伝子操作ではとても多く使われますので、それについて少し述べて置きましょう。

大腸菌は学名では*Escherichia coli* (エッシャーリキアコリと読む、また英語で発音する時はエッシャーリアコライ)と言い、*E. coli* と略記され、イー コリと読

みます。この菌—つまり*E. coli*—は形態的には長さ1~3 μ m、幅0.7 μ m程度の小さな単細胞の微生物ですが、生育が容易でかつ生化学的および遺伝学的な性質が良く知られているので取扱い易く、遺伝子を増殖させる過程ではよく用いられます。人間の腸内細菌として古くから知られ、水などからこの菌が検出されれば大便が混入していることが分るので、衛生状態のチェックの為にも良く使われていることはご存知だと思います。遺伝子の関わる研究には、*E. coli* K12株が最も多く用いられて来ました。(菌の株の名前—ここではK12—は分離した人が勝手につけるのです。例えば伊豆の土壤中から分離した人がIZU-n番などをつけることもあります。)この株の繁殖速度は速く条件が良いと20分から30分に1回の割合で分裂を繰り返します。(このことは、この株の生産性の良さを利用してインシュリンなどの物質生産をすると見ることも出来ます。)しかも世界中でこの同一のK12株とそれから派生した変異株により研究が進められた結果、実験結果の比較検討が充分可能になり、確実な現象の把握ができたこともこの分野の進歩にとっては重要なことだったのです。また*E. coli* K12株の変異株は人間や動物の腸内では繁殖出来ない程度に弱体化されているために安全でもあります。

Q: 大腸菌からプラスミドを取り出すにはどうするのですか。

A: 様々な方法がありますが、その内アルカリ-SDS法を述べます。大腸菌をリゾチーム(Lysozyme, 細菌の細胞壁にあるムコ多糖を分解する酵素でムラミターゼと言うこともある)によって破裂させて、アルカリとSDS(Sodium dodecyl sulfate)によりDNAを一本鎖にしてから、酢酸カリウムにより中和します。そうしますと、プラスミドはすぐに2本鎖DNAにもどりますが、クロモソーム(染色体)は、プロテイン/クロモソーム/SDS(蛋白質—染色体—SDS)複合体として沈殿します。その上澄み液を更にフェノール/クロロホルム抽出して除蛋白して、エタノールによって沈殿させます。この沈殿は殆どプラスミドとRNAと塩なので、リボヌクレアーゼを処理して精製します。一般の遺伝子操作にはこの状態で充分使用に耐えますが、更に精製したい場合はPEG(ポリエチレングリコール)沈殿法、酢酸アンモニウム沈殿法、塩化リチウム沈殿法、塩化セシウム/エチジウムブロマイド平衡密度勾配超遠心法などを用います。

Q: 今のお話はインシュリンの遺伝子操作による製造法についてのお話でしょうか。

A: そうです、話がずれかけました。今、米国のある製

図 2-2 プラスミド DNA
の表し方の例

図 2-3 人間のインシュリンの化学構造。21 個のアミノ酸のペプチド鎖とジスルフィド結合から成る A 鎖と、30 個のアミノ酸から成るペプチド鎖の B 鎖を 2 本のジスルフィド結合がつないでいる。

薬会社で開発した遺伝子操作によるインシュリンの製造法を述べているところなのです。インシュリンの構造から話を進めます。さて、大腸菌 *E. coli* により大量に作りたと思っている人間のインシュリンは図 2-3 の構造をしています。21 個のアミノ酸がペプチド結合した A 鎖と、30 個のアミノ酸がペプチド結合した B 鎖を 2 個のイオウから成る 2 本のジスルフィド結合 -S-S- がつないでいます。また A 鎖内にも 1 本のジスルフィド結合があります。分子式は $C_{257}N_{383}N_{65}O_{77}S_6$ で分子量 5,807.66 の高分子の白い結晶性粉末です。

このタンパク質を合成する遺伝子を先に *E. coli* から精製したプラスミド DNA に入れてやる必要があります。そのためにはプラスミド DNA の一部を開裂してやらなくてはなりません。これを行うのが制限酵素 (Restriction enzyme) です。今までの話の中で酵素の説明をしていなかったのですが、酵素 (Enzyme, エンザイムと読む) は生物が持っているタンパク質から成る触媒のことですが、次のような特徴があります。すなわち、その酵素が十分に精製されていれば反応の選択性があること、酵素が作用する基質に接触出来るなら反応が速く進むこと、タンパク質が変性する条件下では酵素の作用を示さなくなるつまり失活してしまう、などの特徴です。

制限酵素は外部から侵入した異質の DNA を切断分解する酵素で、DNA 分子内の特定の塩基配列の部分を選択的に切断します。DNA 分子を末端からでなく、内部から切断する酵素の一種のエンドヌクレアーゼ (Endonuclease) なので制限エンドヌクレアーゼとも言われます。多くの制限酵素は、DNA 中の特定の塩基配列を認識して一言い換えると見分けて一切断するのですが、よく使われる制限酵素の名前とその切断部位そして分解産物をまとめて表 2-1 に示します。制限酵素は DNA 分子を切るハサミだと言うこともできます。このように反応が厳密に選択的であることは驚くべきことです。遺伝子を切り貼りして移植することが可能

になったのは、この制限酵素によるこの特異的な切断のおかげで、異種の DNA 断片を切断部分に結びつけられるようになったことが大きな原因なのです。

1970 年にこれら制限酵素群を発見したアーバー、スミス、ネイサンスの 3 人は、この「制限酵素の発見と分子遺伝学への応用」の研究に対して 1978 年にノーベル生理学医学賞を受賞しました。

これらの制限酵素は現在では市販されており、簡単に手に入れることが出来る様になっています。しかし少量で比較的高価なので、大学の様に研究費が少ないところでは制限酵素の購入が研究室の財政を圧迫していることも事実です。

細胞の中で外部からよそ者の DNA が入り込み遺伝情報を発現するとすると、その細胞にしてみれば迷惑千万な話です。ですから細胞は普通侵入した DNA を分解する酵素を持ち、よそ者の DNA が入り込んで分解してしまいます。そして自分の DNA は分解されない様に修飾され保護されています。

E. coli の C 株で増殖した λ-ファージを *E. coli* の K 株にうつしてやると、その増殖度は 1/10,000 位に小さくなってしまいます。それは C 株で増殖した λ-ファージが K 株の細胞中では増殖を制限されたからなのです。それは K 株が細胞中の C 株由来の λ-ファージの DNA を分解する酵素を持つからで、よそ者の DNA を分解する酵素はその DNA の特定の塩基配列の部分切る酵素で制限酵素と呼ばれたのです。λ-ファージは宿主の C 株中では増殖するのに都合の良いメチル化による修飾を受けており、宿主である C 株の制限酵素によっては切断されない様になっていたのです。

しかし、一度 K 株で増える様になった C 株由来の λ-ファージは K 株によく感染しますが、今度は C 株に対する感染効率は低下してしまいます。これは、今度は K 株の制限酵素に切られない様に修飾を受けていますが、C 株の制限酵素で切られない様な修飾を K 株では

表 2-1 良く用いられる制限酵素の例—それらの標的部位と分解産物—

酵 素 名	標 的 配 列	分 解 産 物
<i>Hin</i> d III	<pre>5' ↓ 3' A A G C T T T T C G A A 3' ↑ 5'</pre>	<pre> A 5' T T C G A A G C T T 5' A</pre>
<i>Eco</i> R I	<pre>5' ↓ 3' G A A T T C C T T A A G 3' ↑ 5'</pre>	<pre> G 5' C T T A A A A T T C 5' G</pre>
<i>Sma</i> I	<pre>5' ↓ 3' C C C G G G G G G C C C 3' ↑ 5'</pre>	<pre> C C C G G G G G G C C C</pre>
<i>Hae</i> III	<pre>5' ↓ 3' G G C C C C G G 3' ↑ 5'</pre>	<pre> G G C C C C G G</pre>
<i>Pst</i> I	<pre>5' ↓ 3' C T G C A G G A C G T C 3' ↑ 5'</pre>	<pre> C T G C A G G A C G T C 3'</pre>
<i>Sst</i> I	<pre>5' ↓ 3' G A G C T C C T C G A G 3' ↑ 5'</pre>	<pre> G A G C T C C T C G A G 3'</pre>

注: *Hin* d III ヒンディスリーと言う *Eco* R I エコアルワンと言う
 Sma I スマワンと言う *Hae* III ハエスリーと言う
 Pst I ピーエスティーワンと言う *Sst* I スストワンと言う
 : 開裂する部分

受けていないからです。

Q: たびたびファージと言う用語が出てきますが、ファージとは何ですか。

A: ファージ (Phage) とは細菌に感染するウイルスの総称です。ファージとは「食べる」という意味で、細菌を食べてしまうので、ひと昔前まではバクテリオファージ (Bacteriophage) と言いましたが、今では単にファージと呼ばれることが多くなりました。

ウイルスが細菌に感染してから、細菌を破壊する(溶菌) 毒性ファージと、感染しても直ちに増殖や溶菌を起こさずに、菌のゲノムに組み込まれ(溶原), 何らかの刺激によって分離して溶菌することもある溶原性ファージに分けられます。前者の例としては *E. coli* に

つく T 系ファージが、後者としては λ-ファージがあります。

ファージの形態は様々ですが、中心部には DNA と RNA があり、その周りにタンパク質からなる殻があります。

遺伝子操作では、λ-ファージを例とする溶原性ファージが、プラスミドとともに遺伝子の運び屋 (ベクター, **Vector**) として役立ちます。遺伝子の運び屋としてのファージベクター (**Phage-vector**) として、λ-ファージをそのまま用いることは不適當で、DNA 分子の一部が欠失した突然変異株や遺伝子組換えを受けた株が用いられ、このようなファージ株は、制限酵素による切断箇所が少なく、また大きな DNA 断片を

挿入することができるのです。

次に、制限酵素により開裂させたプラスミド DNA にインシュリンを合成する遺伝子を挿入します。この時インシュリンを合成する遺伝子を開裂部分に結合させる酵素を DNA リガーゼ (DNA ligase) あるいは DNA 連結酵素と言います。この DNA リガーゼは DNA の隣合った塩基の 5'リン酸基と 3'水酸基の間の共有結合の形成を触媒する酵素で、DNA 断片を繋ぎ合わせるのに使われます。ですから、制限酵素がハサミなら、DNA リガーゼは糊と言うことになります。DNA リガーゼによってインシュリンを合成する遺伝子を組み込んだプラスミドなどを、組換え体プラスミド (Recombinant plasmid) と言います。

ベクター (Vector) とは運び屋 (Vesicle) と言われ、他の遺伝子を宿主の中で増殖出来るプラスミドやファージのことを言います。ベクターに挿入される DNA のことをパッセンジャー DNA と言います。例えばこの場合、人間のインシュリンの合成を指定する DNA 断片がパッセンジャー DNA になります。

次に組換え体プラスミド DNA を大腸菌細胞の中に入れてから大量培養して増殖させてやります。この時、「組換え体プラスミド DNA を宿主 (しゅくしゅと読む, host と言う) である大腸菌に戻すあるいは導入する」と言います。また遺伝子操作で用いられる宿主とベクターの組み合わせを宿主-ベクター系 (Host-vector system) と言い、ここで使われる *E. coli* K 12 株とそのプラスミドやファージから成る EK 系、枯草菌とそのプラスミドやそのファージから成る BS 系と名付けられている系などがあります。

組換え体 DNA は分子量が大きく *E. coli* 中に導入することは容易ではありません。しかし *E. coli* はカルシウムや他の化学物質が存在すると、溶液中から DNA を細胞中に取り込む様になります。また場合によっては、組換え体 DNA 分子と受容細胞の混合物に高電圧のパルスを加えるエレクトロポレーション (Electroporation) によって、一時的に小孔を作って、組換え体プラスミド DNA の取り込みを増加させることもあります。先に述べました様に、細菌細胞により組換え体プラスミド DNA が取り込まれる現象を形質転換 (Transformation) と言うのですが、ファージ DNA が取り込まれる現象の場合トランスフェクション (Transfection) と呼びます。

この様に形質転換された *E. coli* を増やしてやることを遺伝子クローニング (Gene cloning) あるいは分子クローニング (Molecular cloning) と言います。しかしこのままでは、インシュリンの遺伝子は大腸菌中

では発現しません。遺伝子が発現するにはそのプラスミドの中に転写-前号で説明した様に mRNA に塩基配列を写し取らせること-を引き起こすプロモーター、転写を停止させるターミネーターの配列が必要です。これらを備えたプラスミド・ベクターを発現ベクターと呼び、プロモーターとターミネーターの間に正しい向きで発現させたい遺伝子を挿入させてやる必要があります。

そしてそれらを培養して増殖した菌の細胞壁を溶かしてやり (溶菌と言います)、酵素蛋白-メチオニン-人間のプロインシュリン複合体を分離します。このままでは活性型のインシュリンではないので、次にブロミアン (BrCN) により処理をしてメチオニンとプロインシュリンの間の結合を化学的に切断し、未精製のプロインシュリンとしてスルホン化してプロインシュリン-SSO₃ (プロインシュリン S-スルホン酸) を作ります。それをシステイン塩酸塩と水酸化ナトリウムによって処理してジスルフィド結合 -S-S- を作り人間のプロインシュリンを作ります。次にトリプシンカルボキシペプチダーゼを作用させて余分のアミノ酸配列を除き、人間のインシュリンを分離します。こ

図 2-4 a 大腸菌へのヒトインシュリン遺伝子の組換え

図 2-4 b ヒト遺伝子組み込み済プラスミドからのインシュリンの製造

これらの過程を図2-4に示します。

こうして遺伝子組換え技術によって作った人間のインシュリンは、人間の膵腺から分泌された天然のヒトインシュリンと全く同じX線回折図(X線回折パターン)を示し、つまり同じ結晶構造を持ち、高速液体クロマトグラフィー(HPLCとも略記されます)によっても同一物質であることが示されたのです。

また、このHPLCによると、ブタのインシュリンは1個のアミノ酸が、ウシのインシュリンでは3個のアミノ酸が、ヒツジのインシュリンでは4個のアミノ酸が人間のインシュリンと異なることが分りました。こうした分離・精製技術、分析技術などの周囲の手法やKnow howの集積がバイオテクノロジーの発展にとって不可欠なものだったのです。それらについては

後でも触れることがあると思います。また、効能試験をすると天然のインシュリンと同等な血糖値の低下効果を示し、二重盲検法などの統計的に信頼のおける方法によってもその効能は従来の動物由来のインシュリンより優れていることも示されました。

そして食肉市場でウシやブタの膵臓の分泌腺から取り出していた時代に比べると、食肉市場の動向によって供給が左右されずに充分に安定供給される様になったのです。更に、ウシやブタのインシュリンを人間に用いると人間のインシュリンと違いがあるため免疫反応による拒絶反応が生じることもありましたが、インシュリン自体による免疫反応の心配もなくなりました。日本のある製薬会社も米国のこの会社と技術提携して遺伝子操作を用いるこの方法によって人間のインシュリンを作り販売しているのです。

そして重要なことは、遺伝子組換えの手法が高度な特異性を持ち、従来は自然界では遺伝的な交流が行われることのなかった種々の生物の遺伝子を縫ぎ合わせる能力を持っているということなのです。歴史的に見ますと人類は初めて生物の機能を計画的に改変して、新しい機能をもつ生物や生物材料を合成する可能性を手に入れたと言うことができます。ここでは、先ず遺伝子操作技術による人間のインシュリンの製造について述べたのですが、この手法は他のタンパク質をつくることにも使えることになります。

社会的に大きな反響を呼んだのは、抗ウイルス性で抗腫瘍性の糖蛋白インターフェロンの遺伝子操作による製造でした。インターフェロンは人間や動物から取り出して精製しても極く僅かしか集められません。しかし遺伝子操作技術を用いるとはるかに多量に得ることができるのです。まさにE. coliの増殖度の大きさを利用して、つまり生産性の良さを利用して大量に得られる様になったのです。

Q: 今までの説明では全てを塩基配列で説明しようとする流れがあったと思うのですが、インシュリンについてはそこが具体的に説明されていませんでした。説明しにくければ何かほかのタンパク質の例でも結構ですから具体的に説明して下さい。

A: では、インシュリンに比べるともう少しアミノ酸の数の少ないタンパク質であるソマトスタチンと言うホルモンについて先ず説明しましょう。このホルモンは人間の脳下垂体から分泌され、生長ホルモンやインシュリンなどのホルモンの分泌を抑制する働きを持っています。

ソマトスタチンはアミノ酸が14個配列したペプチド系のホルモンで、その化学構造は図2-5の一番上側

図 2-5²⁾ ソマトスタチンのアミノ酸配列と遺伝子の合成。ソマトスタチンのアミノ酸配列 (上部) から推定された遺伝子 DNA (中央) が (1)~(8) の DNA の 1 本鎖に分けて合成され、結合された。破線はアミノ酸と DNA 塩基対の対応関係を示す。

の様に書けます。

人間の細胞の中で、このホルモンの遺伝子がどんな構造かは分りませんが、このソマトスタチンを作るアミノ酸の種類と配列順序は分っているので、前所述した遺伝暗号を使い、各アミノ酸を指定する mRNA の暗号の配列を推定できます。表 1-2 から一つのアミノ酸を指定する暗号は 1 つだけでなくコドンが 2~6 個ありますが、1 種を選ぶこととします。mRNA の構造が決まればその mRNA の元となる 2 本鎖の塩基配列は容易に推察することができます。

板倉等は 1975 年に、この様に考えてソマトスタチンの設計図を作りました。それに対応する DNA の塩基配列は図 2-5 の下から 4, 5 行目に示す様に考えました。図 2-5 から分るように、この設計図は実際のソマトスタチンの遺伝子より大きいのです。これは *E. coli* 中で発現ベクターに繋げるためののりしろになっています。

そして板倉等は図 2-5 の設計図をもとに、8 つの 1 本鎖の断片に分け、番号(1)から(8)までを化学合成し、8 つの断片を DNA リガーゼ (DNA 連結酵素) によって結合させました。こうしてこれを *E. coli* 細胞内で増殖させて、ソマトスタチンを遺伝子操作により作ったのです。これが、遺伝子操作によるタンパク質生産の最初の成果だったのです。

彼らは同じ方法を使って、人間のインシュリンの遺伝子の人工合成にも成功したのです。インシュリンの 21 個のアミノ酸から成る A 鎖については 77 個の塩

基から、30 個のアミノ酸から成る B 鎖については 104 個の塩基から成る遺伝子の設計図を作りました。彼らはこの設計図を 29 個の DNA 鎖断片に分割して各々を化学的に合成して結合し、インシュリン遺伝子を作り出したのです。そして *E. coli* 中に導入してインシュリンをつくることに成功しました。

Q: 遺伝子操作の歴史上の意義あるいは位置づけについてまとめてみて下さい。

A: そうですね。遺伝子操作技術について、基本的には試験管内で DNA を任意に切断・再結合する手法と、*E. coli* を宿主とするプラスミドやファージをベクターとしてその中に挟み込んだ任意の遺伝子を *E. coli* の中で複製・維持させる宿主—ベクター系が開発され、これらの手法が応用される生物の種類の範囲は拡大しています。遺伝子工学は極く一部の例外を除く全ての生物種における遺伝情報の共通性という原理によって、種の障壁を越えて生物学の基礎と応用の全領域に普遍的な手法として力を発揮するようになっているのです。

遺伝子操作の成果として驚異的なものをもう一つ挙げます。図 2-6 は、1982 年の *Nature* 誌の表紙です。右側が通常のマウス (ハツカネズミ) ですが、左側の大きなマウスは、特定の遺伝子を発現効率の高いプロモーターにラット (ドブネズミ) の成長ホルモンの遺伝子をつないでマウスの受精卵に注入して体重が約 1.8 倍になった「スーパーマウス」を示しています³⁾。

図 2-7 はこのスーパーマウスを産生させた時に用いた 2 本鎖 DNA から成る pMGH という名前のプラス

図 2-6 Nature 誌の表紙 (Vol. 300, No. 5893, 1982 年)。ラット (ドブネズミ) の成長ホルモン遺伝子のマウス受精卵への注入によって体重が 1.8 倍となった形質転換マウス (左側, スーパーマウスと呼ばれる) と注入していない野生型マウス (右側)。

図 2-7 図 2-6 のスーパーマウスを産生させるときに用いた 2 本鎖 DNA から成る pMGH という名のプラスミドの構造

ミドを示しています。円の外側に書かれた *Sst*I, *Bam*HI や *Xho*I などは各制限酵素により認識される場所 (部位あるいはサイト) を示しています。太く黒い部分■はラットの成長ホルモン遺伝子のエクソン部分を示しています。(エクソンの説明をします。真核生物の遺伝子は分断された構造をとることが多く、タ

ンパク質や RNA となって機能する部分をエクソン (Exon) と言い、エクソンとエクソンの間に介在する配列をイントロン (Intron) と言います。)

Rat GH はラットの成長ホルモン遺伝子を示し、Mouse MT-I はマウスの重金属耐性タンパク質であるメタロチオネインの遺伝子のプロモーターを示し、pBR 322 とは大腸菌ベクターで、これがあるために大腸菌を宿主として増やすことが出来ます。

図 2-6 から遺伝子进行操作するということは、これほど重大な変化を引き起こすことが分ります。これは見方によっては、深刻な空恐ろしいことでもあります。したがってここで生命の尊厳をどう考えるかと言う倫理上の問題が出て来るのです。

遺伝子操作とはそれ程威力ある手法なのです。

II-2 DNA の合成法と分析法

Q: 現在行われている DNA の合成法と分析法について教えて下さい。

A: DNA の合成は DNA シンセサイザー (DNA 合成機) と言う装置を使うことが多いのです。

試薬瓶に入れられた A, T, G, C の 4 種の塩基の試薬を必要な順に入れて反応カラム中で付加反応させてやります。いくつでも付けられる訳ではなく数十塩基 (数十 Base または数十 b) になると反応の収率が小さくなって限界となってきます。そして精製は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やゲル電気泳動により行います。

また DNA の分析法としてはまず、核酸分子やタンパク質の大小や電荷の大きさの違いによって電気泳動の速度が異なることを利用して分子量の推定に用いるポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis, 略して PAGE) やアガロースゲル電気泳動 (Agarose gel electrophoresis) を良く用いますが、これはポリアクリルアミドやアガロースを支持体として電気泳動を行うものです。DNA はりん酸があるのでマイナスに帯電するため陽極側へ動き、それも分子量の小さいものほど速く泳動します。例えば、分子量の分っている核酸を分子量マーカーとして一つまり標準物質として一用いて試料核酸の分子量を求めるのに使います。

また核酸の塩基配列を決定する方法として、大別するとマキシム・ギルバート法とサンガー法がありますが、現在一般にはサンガー法の方が多く用いられています。サンガー法は別名ジデオキシ法 (Dideoxy chain termination method) と呼ばれ、デオキシリボ核酸 (つまり DNA) の他に 2',3'-ジデオキシ核酸 (ddNA) を用います。デオキシリボ核酸 (DNA) は 2'-デオキシ

リボースを含みますが、ジデオキシリボ核酸(dDNA)は、2',3'-ジデオキシリボースを含んでいます。これについては図2-8を参照して下さい。

ここで前の復習になるのですが、DNA重合酵素(DNAポリメラーゼ)はDNAのデオキシリボースの3'-水酸基に新たなDNA単分子の5'-水酸基と結合したリン酸基を重合させてホスホジエステル結合をつくってDNA鎖を伸ばしていきます。しかし、デオキシリボースの代わりにジデオキシリボースを用いた場合

は、3'-水酸基がないのでDNA鎖は伸びることが出来ません。特定の場所からDNAの重合を開始させるのには、次の様な方法を用います。

2本鎖のDNAをアルカリ等によって一本鎖DNAに変性するか、M13という名前のファージの様な元々1本鎖のDNAをゲノムとする様なファージに塩基配列を求めたいDNAを挿入するかして、片方の鎖とのみ相補的な短いDNA鎖を加えてゆっくり温度を下げてやると相補的な水素結合が生じます。(このことをア

図 2-8 dNTP と ddNTP の化学構造

図 2-9 M13 ジデオキシ法による DNA 塩基配列の決定法の模式図⁴⁾

ニーリングと言います。) この短い DNA 鎖 (プライマーと言います, つまりプライマーとは特定の場所から DNA 鎖の重合を開始させるのに必要な水酸基を供給する短い DNA 鎖を言います) は DNA 重合の開始点として 3'-側の水酸基を供給するので, 4 種の dATP (デオキシアデノシン 3 リン酸), dCTP (デオキシチジン 3 リン酸), dGTP (デオキシグアノシン 3 リン酸), dTTP (デオキシチミジン 3 リン酸) と DNA ポリメラーゼを加えますと, もう片方の DNA 鎖の鋳型として相補的に DNA が合成されます。

ところがここで, 系を 4 分してそれぞれに ddATP (ジデオキシアデノシン 3 リン酸), ddCTP (ジデオキシチジン 3 リン酸), ddGTP (ジデオキシグアノシン 3 リン酸), ddTTP (ジデオキシチミジン 3 リン酸) を少量加えてやりますと, 各々の dNTP (デオキシヌクレオシド 3 リン酸) を取り込むところで, ある確率で ddNTP が取り込まれ DNA 鎖の合成反応が終結します。これによって各々の塩基によって終結する場所が異なりますから, 一つの塩基の差でも分離出来る一つまり高分解能の一尿素を含む変性ポリアクリルアミドゲルによってこれらを電気泳動して分離してやります。

この時, 系の中に放射性同位元素の ^{32}P や ^{35}S で α 位のリン酸がラベルされた (標識された) dNTP (一般には dATP か dCTP が用いられます) を加えておいて泳動したものを X 線フィルムに露光させ, 塩基配列を解読します。この手順を図式化したのが図 2-9 です⁴⁾。我々の大学でルーチンに行っているこの分析法の X 線フィルムに露光した電気泳動のパターン例を図 2-10 に示します。

しかし最近では, 放射性物質の代わりに蛍光物質を使って標識したものをを用いて自動的に塩基配列を読みとってくれる DNA シーケンサー (DNA sequencer) が用いられるようになってきましたが, まだまだ高価 (およそ 2 千万円位) で大学の一般の研究室にはそれほど普及していません。しかし放射性物質を使わずに済むので企業の研究所にはかなり普及しています。高くても購入出来るところに普及しますと, ほんの 5, 6 年前に 2, 3 千万円した DNA 合成機 (DNA synthesizer) が最近では 2 百万円を切るものまで出現した例があります。従って, 低価格の機種が出現すると期待されますから安くはないと購入出来ない大学の一般の研究室のためにも, 高くても購入出来る研究機関の方々には是非よろしく願います。おっと話が脱線してすみません。

また遺伝子の設計図は, その遺伝子を分離して塩基配列を決め発現出来る形にするか, 遺伝情報が転写さ

図 2-10 図 2-9 で行った電気泳動パターンの露光写真の例。酵母の銅耐性遺伝子の一部を 8 M 尿素を加えたポリアクリルアミドゲルを支持体として得た。この図の様に CATTTCCTCCAG……などの塩基配列を求める。

れる mRNA を分離して mRNA から DNA に逆転写して相補的 DNA (Complementary DNA, cDNA と略記) を合成するか, あるいはタンパク質のアミノ酸の種類と配列順序から遺伝暗号表を使い DNA 構造を推定することによって求められます。このことは, どんな遺伝子であれ合成することが可能であることを示してはいるのですが, 数百から数千の塩基対から出来ている遺伝子の構造を調べて同じものを合成することはたやすいことではありません。

II-3 バイオテクノロジーの特異性

溝渕氏はその著書の中でバイオテクノロジーの特徴について次の趣旨のことを述べています⁵⁾。

「技術はもともと人間の生活のために役立つもので, 人間の体の延長として発展してきました。例えば, 汽車, 電車, 自動車などの交通手段は人間の足の延長で

“走る”と言う機能を満たしさらに発展させました。汽船は水の上を“泳ぐ”機能を、飛行機は鳥の様に“空を飛ぶ”機能を発展させてきました。クレーンやブルドーザーは人間の手足の延長で“荷を吊り運ぶ”、“整地する”と言う機能を発展させてきました。

また電信、電話は人間の目や口の延長であり、近年発展の著しいコンピュータは脳の延長です。また合成繊維やプラスチックをつくる化学工業は細胞内での生体反応の延長と見ることも出来ます。

こうした技術は人間の体の能力を一層延長・増大させたものとして捉えることが出来ます。そして技術が進んで来ますと、単に体の延長でなく我々の体に代わって同じことをさせたいと言う考えが出てきて、それが実用化に向けられます。

無人に近い工場で働くロボットがそれです。ロボットは人が道具や機械を使って行う作業より、はるかに能率良く危ない作業も代行します。本来、体の延長として発達した技術がそれを乗り越えて取って代わることは、技術そのものについての考え方が質的に変化したことを示しています。

ではバイオテクノロジーの発展は何に対応するのでしょうか。従来の品種改良などの生物学上の技術は、生物が本来持っている遺伝子に突然変異を起こさせたり、交配を行うことにより、人間の生活に一層役立つ様に変えていくものでした。

この場合は、大腸菌や酵母にインシュリンを作らせようとしても、インシュリンを合成する能力—遺伝子—は持っていないので、いくら努力しても不可能なことです。しかし、人間のインシュリン合成を code する遺伝子を入れて新しい能力を付与した生物を作り出すことは、人間の細胞と同じ動きの一部を微生物に代行させると言うことであり、この意味で微生物に特定のタンパク質を作らせる、つまり或るタンパク質を製造する「ロボット」の発想に基づいていると言えます。

言い換えると、単なる手足の延長に比べてはるかに高度に専門化した「工場用ロボットが複雑な溶接を迅速に短時間で行う、あるいは大腸菌がインシュリンを多量に生産性良く作り出す」と言った機能を持つ様になっています。バイオテクノロジーが先端技術として捉えられる理由は、それが最新の生物学的技術と言うばかりでなく、技術そのものについての考え方の変化を反映していると見る事が出来ます。」

遺伝子をいじることから生じる安全性の問題や倫理上の問題とともに、バイオテクノロジーを異質に感じさせ、また勉強しにくくしている原因は、従来の技術と異なるこうした発想があるからでもあります。

また、生物共通の遺伝暗号表として前回の表 1-2 を示しました。停止コドンは表 1-2 に示した様に TGA, TAA そして TAG なのですが、ゾウリムシはたった一つの TGA だけを停止コドンとして使い、後の二つはグルタミンを作るのに使われることが 1984 年に発表され、確認されたのです。また真核生物のミトコンドリアでもコドンが特殊化しています。私が遺伝暗号の共通性についてお話しした際にくどい程「極く一部の例外を除くと」と言う枕詞（まくらことば）をつけたのはこんな重大な例外があったからなのです。

ゾウリムシは他の生物の情報を正確に読みとめることは出来ません。ですから他の微生物と遺伝子を交換することが出来ません。また表 1-2 の TGA は停止コドンですが、マイコプラズマと言う微生物はこのコドンをトリプトファンの暗号として使っていることも示されました。極く少ない例外とは言え、表 1-2 の遺伝暗号が厳密には当てはまらない生物がいた、つまりあの遺伝暗号表は厳密には全生物共通ではなかったのです。

先に述べた制限酵素の発見者の一人のアーバーは、「生物学では殆どの理論が短命であり、先ず理論から出発し実験によってそれを検証していく物理学と異なり、自然そのものが驚異の宝庫となっており、寿命の長い理論を作り上げることは難しい。」と言っています⁶⁾。このことも、バイオテクノロジーの勉強を始める時に、せつかくの遺伝暗号の共通性を学んだところで「実は極く少ないけれど例外も発見されているのですよ」などと言われては勉強を始めたばかりの者にしてみますと混乱させられてしまい、理解を遅らせ、勉強しにくくさせる原因の一つであると言えます。

また、この Q & A は用語についてのものですが、それにしてもこのバイオテクノロジーと言う分野は略号が多いものだと思います。日本語で書かれた用語集は私の目に触れただけでも 9 冊もあり⁷⁻¹⁵⁾、特に 7, 8) は優れた事典だと思います。勿論用語は分るまで調べる必要があります。

しかし、それだけでは不十分であり、その用語をそこで使う意味や意義を理解するには、その用語に関わる論理の流れをつかむ必要があります。そしてそれらの論理を繋げるには自分に合った、そして優れた質の良い著書を読むことが大切です。例えば、ワトソンのそれなど¹⁶⁻¹⁸⁾を、そして実験法については(4), (19), (20)などをご覧になることをお勧めします。ここでは私なりに論理の繋がりについてお話しするように努力しました。

Q: 話して戴いた遺伝子操作は我々紙パルプ分野とはどんな関連があるのですか。

A: 10 年程前までは「遺伝子操作ではタンパク質は作ってもセルロースやリグニンをつくりませんからしばらくは関連が出てきません。」と言われたこともありましたが²¹⁾。しかしセルロース, ヘミセルロース, リグニンなどは結局, 酵素が作るものです。その酵素の合成を指令・支配するつまり code する—のは遺伝子です。その酵素の発現時期や発現量などを支配・調節しているのも遺伝子です。従って, 我々の紙パルプ分野にとって重大な接点の一つにはそこにあるのです。それについては来年の 2 月号で述べることにしましょう。

文 献

- 1) M. W. バーンズ著, 田沢 仁・新免輝男訳, 「細胞の生物学」, p. 3, 培風館, (1981)
- 2) 石川辰夫著, 「分子遺伝学入門」, 岩波新書, p. 116, (1982)
- 3) R. D. Palmiter et al, Nature, 300 (5893), 611-615 (1982)
- 4) 「生化学実験の手引き, 3. 核酸の分離・分析法」, 化学同人, p. 104, (1986)
- 5) 溝渕 潔, 「バイオテクノロジーと社会」, p. 1-4, 東京大学出版会 (1987)
- 6) E. アンテビ, D. フィッシュロック著, 「バイオテクノロジー—生物技術戦略—」, 渡辺 格監訳, p. 51, 同文書院 (1988)
- 7) 太田次郎, 室伏きみ子, 「バイオテクノロジー用語早わかり」, オーム社, (1984)
- 8) 今堀和友ら, 「生化学辞典, 第 2 版」, 東京化学同人, (1990)
- 9) 「日経バイオ最新用語辞典 91」, 日経 BP 社, (1991)
- 10) S. G. オリヴァー, J. M. ウェード著, 村松正実訳, 「遺伝子工学小辞典」丸善 (1991)
- 11) 駒嶺ら編, 「植物バイオテクノロジー事典」, 朝倉書店, (1990)
- 12) 福井三郎, 斉藤日向監修, 「バイオテクノロジー事典」, シーエムシー, (1986)
- 13) 富田房男著, 「JIS に準拠した産業用バイオテクノロジー辞典」, 講談社サイエンティフィク, (1989)
- 14) インターグループ編, 「和英, 英和バイオテクノロジー用語辞典」, タイヤモンド社, (1987)
- 15) 「中日英バイオテクノロジー辞典」, 石川県農業短期大学, (1987)
- 16) J. ワトソン著, 三浦謹一郎訳, 「遺伝子の分子生物学」, 化学同人, (1988)
- 17) J. ワトソンら著, 中村桂子ら訳, 「細胞の分子生物学」, 教育社, (1987)
- 18) B. レヴィン著, 松原謙一ら訳, 「遺伝子上, 下」, 東京化学同人, (1986)
- 19) T. Maniatis et al, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- 20) F. Ausubel et al, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, (1990)
- 21) 斉藤日向, 「遺伝子工学の展望」, 繊維学会紙パルプ研究委員会, 第 86 回研究会, (1981, 7, 7, 於: 東京国立教育会館)