遺 伝 子 の 組 換 え

高 木 康 敬*

Gene Manipulation

Yasuyuki TAKAGI

This is an article introducing the genetic engineering or gene manipulation, a technique which was developed most remarkably during the past few years in genetic studies and nucleic acid biochemistry. The historical background of this technique, principle of the general procedures and the significance in future biological researches and its application have been surveyed.

生物学は遺伝子を一つの焦点として近年著しい進歩をとげた。その結果 1) 遺伝子の化学的本体は方向性を異にする2本の相補的なポリデオキシリボヌクレオチド鎖が2重らせん構造をとる DNA 分子であり、2) その独自の塩基配列に遺伝情報がぎざまれている、3) この DNA 分子は自分の塩基配列すなわち遺伝情報にもとづいてメッセンジャー RNA (mRNA) を作り、それを介して細胞の産生するタンパクの質ならびに量を支配することによって、細胞の形質を規定すると共に、4) 細胞の分裂に際して半保存性機構で自分と全く同じ複製を2組つくり、2つの娘細胞にそれぞれ1組ずつ分配して遺伝情報を誤りなく子孫に伝えるという2つの仕事をしており、これが生物のもつ基本的活動、すなわち生命の保持と遺伝を支える過程であることを明らかにした。

これらの進歩には微生物という比較的単純な生物系で遺伝解析の可能となったことが大きな原動力であった。すなわち 1946 年に大腸菌にも雌雄の別があり、細胞間を遺伝子の移動することが発見されて以来種々の微生物を用いて

- 1) 接合：遺伝子を供与する菌と受取る菌とが接触し、間に橋ができ、それを通して DNA が移動する。
 - 2) 形質導入：細菌性ウイルスすなわちバクテリオファージが感染して増殖する間に、宿主菌の DNA の一部をとりこみ、次に感染した菌にそれを与える。
 - 3) 形質転換：DNA が直接菌に取りこまれる。
- の3つの現象がまとめられ、これらを用いて遺伝学的研究が急速に進展した。中でも大腸菌とそれに寄生するバクテ

リオファージに特に多くの研究が集中したが、これには初めは接合と形質導入の現象だけが使われていた。ところが 1970 年代に入って大腸菌でも形質転換が可能となり、ファージ DNA やプラスミド（細胞質性遺伝因子：細菌の菌体内で染色体とは離れて存在する DNA 分子で、自ら複製して、たとえば抗生物質に対する抵抗性のような細菌にとっては補助的な形質を支配する遺伝子を含むことが多い）DNA をそのまま菌体内に入れることができるようになり、研究は一層多様化し拍車をかけられた。

一方このような微生物における遺伝学的研究の進歩の上に 1960 年代後半から 1970 年代の初期にかけて、DNA を物質として取扱う生化学的技術がすすみ、その化学的性質に関する研究が展開された。そしてその流れの中で DNA 制限酵素と DNA リガーゼが発見されるにおよび、遺伝子を試験管内で適宜に切断して、別の遺伝子につなぎ、人工的組換え体を作ることが可能となった。1971 年頃からアメリカで始められたこの技術は遺伝子組換え、遺伝子操作または遺伝子工学とよばれ、同じ「種」の間は勿論のこと、「種」の壁をこえても、人為的に組換えを行わせて、形質転換により遺伝的性質を伝達する途を初めて開いたもので、純粋化学として、遺伝学はもとより、広く生物学全体の研究にとりまさに革命的な実験技術の進歩であり、同時に応用生物工学にも新しい分野を拓いた。

遺伝子操作の技術は原理的には

- 1) 目的とする特定の遺伝子 (DNA) を適当な生物材料から精製する。
- 2) それを自己複製能をもった DNA 分子に試験管内で結合させる。
- 3) 得られた組換え DNA (キメラ DNA とよぶ。キメラとは頭がライオン、胴体がヒツジ、尾は蛇でできて

*九州大学医学部生化学教室 ()

*Faculty of Medicine, Kyushu University()

いるギリシヤ神話の怪物)を適当な宿主細胞に入れて、細胞とともに増殖させる。という3つの段階にわけられる。

今日諸外国においては遺伝子操作を用いた実験がまさに怒濤のごとき勢いで拡がりつつあり、あらゆる遺伝子に応用されようとしているといっても過言ではない。そこで本文においてはこの操作の基本を順に概説し、今後の発展を考察したい。

1. 特定の遺伝子の精製

1.1. 制限酵素¹⁾ 以前から大腸菌のある菌株の細菌に増殖したファージは、他の菌株の細菌に感染しても増殖の悪いことが観察されていた。たとえばλとよばれるファージは大腸菌 K-12 株、C 株のいずれをも宿主として増殖することができる。ところが C 株の菌に増殖したファージは、再び C 株の菌に感染するとよく増殖するけれども、K-12 株の菌では増殖がよくない。一方頻度は低いが一たん K-12 株に増殖したものは、今度は K-12 株でも C 株でもよく増殖することができる。それに反してもしももう一度 C 株の菌をとすと、また元のファージのように C 株ではよく増殖するが、K-12 株では増殖が悪くなる。この現象は宿主支配性変異とよばれ、1960 年代に Arber らによって遺伝学的に詳細に研究された。その結果 K-12 株の菌の中で増殖したファージ DNA はこの宿主に特異な修飾をうけるので(後にこれは塩基のメチル化であることが証明された)、次に K-12 株の菌

に侵入した時には何んら作用を受けずによく増殖できるが、他の株に増殖したファージ DNA はそのような修飾をうけていないので、K-12 株の菌に感染すると分解され増殖の悪いことがみとめられた。すなわち K-12 株の菌には外来の DNA に特異な変化をほどこす修飾酵素と、そのような変化をうけていない DNA 分子を認識して切断する制限酵素とが遺伝的に備わっており、これは細菌がウイルス、性因子または他の細菌 DNA の断片のような外来性 DNA に感染しないように自己防禦する機構の一つと見ることができる。

類似の現象は *Haemophilus* 属の細菌でもみられ、同種間で形質転換をする時は異種間の場合にくらべ効率が著しく高いことが知られていた。そして 1970 年 Smith らは *Haemophilus influenzae* d 株の菌抽出液から、自分自身の DNA には作用しないが、他種の DNA をすみやかに分解するエンドヌクレアゼを精製し、この酵素の存在が原因であることを明らかにした。さらに彼らはこの酵素によって生じた DNA 分解産物の末端を分析して、そこに特異な塩基の配列をみとめ、この酵素が DNA 分子内の特別な構造を識別して 2 本鎖切断をおこすことを初めて確証した。この発見が契機となり、種々の細菌から制限酵素をもとめる研究が急激に増加し、今日では約 25 種の微生物について約 100 種の制限酵素活性が区別され、その内 30 種程は切断部位も確定されている。

これらの制限酵素は Smith と Nathans の提案した命

Fig. 1 Recognition site and action mode of some restriction enzymes.

名法で区別されている。それは分離した菌の属名の頭文字1個を大文字で書き、ついで種名の頭2文字を小文字でつづけて合計3文字で表現し、株名が必要な時はそのあとに示し、たまたもしも同一種から1種類以上の制限酵素が分離される時にはローマ数字をそえて区別する方法である。たとえば *Haemophilus aegypticus* から精製された2種の酵素は Hae I, Hae II であり、*Haemophilus influenzae* d 株よりのものは Hind I, Hind II, 薬剤耐性因子 R I, R II をそれぞれ含んだ大腸菌から単離されたものは Eco RI, Eco RII とよばれる。

これらの制限酵素はその反応機構によって次の2種にわけられる。

1) タイプ I : 上述の大腸菌 K 株または B 株に見出された酵素で、反応に S-アデノシルメチオン、ATP, Mg^{++} を必要とし、DNA 分子の中で認識する特異な配列部位と実際に鎖を切断する部位とが異なり、かつ一定していないようである。

2) タイプ II : 制限酵素の大部分をしめ、遺伝子操作に用いられるもので、次のような性質をもつ(図1)。

- a) 一般に安定で、扱いやすい酵素である。
- b) 反応には Mg^{++} のみを要求する。
- c) DNA の種類にかかわらず、2本鎖 DNA の特異な3~6個のヌクレオチド対配列を識別して、その中で切断する。(すなわち認識部位と切断部位が一致している)。塩基配列に関する酵素の特異性は極めて高いが、特別な塩の存在などによってやや低くなることもみとめられている。
- d) 認識部位では、極性を異にする2本の DNA 鎖について5'末端から3'末端の方向にみると、ヌクレオチドが全く同じ並び方をしており(回文的な並び方)、中央を軸とした2回転対称構造をとる。
- e) 大部分の制限酵素はこの認識配列の中でヌクレオチド数個離れた場所で2本の鎖を切断し、その結果生じた DNA 断片の末端では互いに相補的なヌクレオチド配列をもった1本鎖部分がとび出した形でのこり、これを接着末端(cohesive end)とよぶ。

ただし一部の制限酵素たとえば Sma I は認識部位の中で2本の DNA 鎖を同じ場所で切断し、1本鎖の末端をのこさない。このような末端を flush end または blunt end とよぶ。

f) 制限酵素による切断では3'-OH と5'-P の2つの末端を生じ、かつヌクレオチドの切れ目を生じない(したがってそのまま DNA リガーゼによる共有結合化反応の基質となりうる)。

これらの性質は DNA を大きく切断して、その断片同

志を再びつなぐためにまことに好都合である。たとえば代表的な制限酵素である Eco RI は6個のヌクレオチド対配列を認識するが、このような配列が DNA 分子内にあらわれる頻度はかなり低く平均4,000~16,000対につき1カ所と計算されるので、数個の遺伝子を含む DNA 断片を生ずるハサミとして使いやすく、遺伝子操作実験を著しく促進した。一方これらの酵素は DNA の構造研究の突破口ともなった。すなわち天然の DNA 分子は小型のウイルス DNA でも 10^4 個程の塩基対をもつため、従来一次構造決定は極めて困難であった。ところが特異性の高い制限酵素の発見によって、あたかもタンパクの一次構造決定に際しまずトリプシン、キモトリプシンで切断すると同様に、DNA 分子を一定の長さの断片とすることが可能となった。その際認識部位の塩基対の員数が多いほどそのような組合せが DNA 鎖内にあらわれる頻度は低いから、員数の多いものから少ないものへと順次制限酵素の種類をかえて作用させることにより、大きな DNA 分子を次第に小さくしていくことができる。

1.2. 遺伝子の切り出し DNA 分子を切断するには、制限酵素の中でも目的の遺伝子の内部を切断せず、かつ比較的切断箇所の少ないものを用いるか(Eco RI, Hind III, Sal I, Bam I など)、または機械的なせん断力(shearing)による。後者の場合 DNA 分子がどこで切断されるかはわからないが、それでも1個ないし数個の完全な遺伝子を含む断片を得ることはできる。

ある生物の全 DNA を切断して、生じたいいろいろの断片を分離精製せずに、そのまま組換え実験に用いる方法をショットガン実験(shotgun experiment)という(図2)。しかしこれではいろんな断片を含んだキメラ DNA を生ずる。そこでこの方法は同じ遺伝子が多数繰返して存在する場合、または後で多くの菌をスクリーニングできる場合を除いては用いず、普通は目的としている遺伝子を含む DNA 断片をまずある程度精製することが必要である²⁾。これには分解によって生じた DNA 断片の混合を、アガロース、アクリルアミド、または両者を混合したゲルの中で電気泳動させ、分子量の差にもとづいて分画する方法がもっとも簡単である。しかもエチジウムブロミドを緩衝液に含ませて泳動するか、または泳動後にゲルをとり出して短時間この色素溶液で染めると、紫外ランプのもとで赤いバンドとしてみとめられるので、容易に泳動位置をすることができる。そこでこのゲル部分を切り出し、DNA を少量の緩衝液に抽出する。

次にこのようにして分離した DNA 断片の中で、いずれに目的の遺伝子が含まれているかを知るために次の2つの方法がとられている(図3)。

Fig. 2 Preparation of fractionated and unfractionated DNA fragments for *in vitro* recombination.

a) その遺伝子の mRNA かまたはそれをもとにして逆転写酵素で作った相補的 DNA (cDNA) を、分離した各 DNA 断片と共にまぜて加温し、しずかに冷却して、相補性のために水素結合でハイブリッドを形成した DNA 断片を単離することによって、対応する遺伝子を効率よく精製する。

b) 高濃度のホルムアミドで DNA に部分的変性をおこさせると、DNA は 2 本鎖構造よりも mRNA とハイブリッドを作って安定となり、mRNA が DNA の $\ominus$ 鎖とむすび $\oplus$ 鎖がはみだした 1 本鎖ループ (R-loop) となり、3 本鎖構造をとる^{3,4)}。この構造はホルムアミドを除いても安定に保たれ、DNA の 2 本鎖構造よりも密度がたかく、CsCl 中の遠心で 2 本鎖 DNA から容易に分離される。また用いる mRNA に水銀をあらかじめ結合させておくと、-SH 基をもつアフィニティーカラムでも容易に分離できる。

1.3. 遺伝子の化学的合成 ヘモグロビン遺伝子のように精製の困難な場合、もしもその mRNA が得られれば、これから酵素的に合成した遺伝子が使われる⁷⁾。また大腸菌ラクトースオペロンのオペレーター^{8,9)} やサブプレッサー、tRNA など構造がすでに知られた遺伝子は化学的に合成される。

2. 遺伝子の運び手

目的の遺伝子を含む DNA 断片が分離精製されても、それだけを細菌細胞の中に入れることはできない。DNA 断片が比較的短い直鎖状分子であると、菌体内に含まれ

Fig. 3 Screening of a DNA fragment containing special gene.

る強力な ATP 依存性 DNA 分解酵素によって完全に分解されてしまうし、たとえこの酵素が弱い、または全くない変異菌を使って無事に入れたとしても、染色体とは別に存在し、自ら増殖することはできない。そこで遺伝子操作においては、断片を、自己増殖能をもった DNA に共有結合で結びつけてそれと一諸に行動させ、その力で増殖させねばならない。このように目的とする遺伝子を組込んでこれを運搬する役をもつ DNA はベクター (vector または cloning vehicle) とよばれ、適当な細胞内で自己増殖能をもっており、かつ小さい環状 2 本鎖 DNA であることが必要で、その上にこの運び手を含む細胞を識別できるような遺伝形質を少なくとも 1 個備えており、また細胞内で培養条件によって多量に増殖し、精製の簡単なことが実験には便利である。

このような条件を満たすものとしてプラスミドやウイルスが第一にあげられる。その理由は

a) これらの DNA は細胞内で物理的に独立して一つのユニットとして増殖しうる遺伝的な単位である (このような単位をレプリコンとよぶ)。

b) その DNA の中で、増殖に関係する機構をそなえている部位が占める割合は小さく、せいぜい数個の遺伝子や構造部分からできているにすぎず、その大きさは $1 \sim 2 \times 10^6$ ダルトン程と推定される。それ以外の部分は、この調節部位に支配されて受動的に増殖しているにすぎず、したがってもしもその部分から DNA の一部を除去したり、または逆に他の DNA 断片を加えても、全体の増殖に直接影響を与えることはないと考えられる。

c) ほとんどすべてのプラスミドや一部のウイルスは閉じた環状 DNA として宿主染色体の外に存在することがあげられる。

今日ベクターとして用いられているものの大部分は大腸菌系では主に次の 3 つに由来する。

1) pSC101 プラスミド¹⁰⁻¹³⁾: R 6-5 という伝達性で大きい薬剤耐性因子から、増殖調節部位とその付近だけが取り出されたプラスミドで、分子量は 5.8×10^6 ダルトン、テトラサイクリン耐性 (tet) 遺伝子をもっている、この入った菌を選択するには便利である。しかし細胞あたりプラスミドは数個しか作れないので、この DNA を多量あつめたり、遺伝子を挿入して多くの遺伝子産物を作らせる目的には適さない。また遺伝的構造も充分には解析されていない。

2) コリシン E₁ (Col E₁) プラスミド¹⁴⁾: 大腸菌に寄生してタンパク性の抗生物質コリシンを産生するプラスミドで、分子量は 4.2×10^6 ダルトン、生物汚染の危険性はなく、しかも培養途中でクロランフェニコールを加

えると、宿主細胞はそれ以上増殖しないが、その菌体内で Col E₁ はふえつづけて細胞あたり数千個にも達する^{15,16)}ので、DNA を多量にあつめたり、遺伝子増幅の効果をしらべたりする上に便利である。複製の様式も *in vivo* や *in vitro* でかなり研究されている。しかし遺伝構造の解析はほとんどされておらず、また Col E₁ プラスミドが入った菌を選択するには、Col E₁ 耐性を獲得することを用いるが、同じプレートの上でコリシン耐性菌がかなり高い頻度で自然にあらわれるので困難である。

3) λ ファージ: λ ファージは分子量が 32×10^6 ダルトンで、E_{co}RI によって 5 カ所で切断される¹⁷⁾。Thomas ら¹⁸⁻²⁰⁾は変異と組換えによって、この内増殖調節部位に関係のない中央部の 3 カ所だけが切断され、他の 2 カ所は切断されないようなファージを作った。このファージの中央部を E_{co}RI 切断によって除去すると、ゲノムが元の野生株にくらべて小さくなるので、適当な指示菌の上ではブランクを作らなくなり、一方もしもこの欠失した部分に代りに別の DNA 断片を入れて元の λ ファージゲノム位の大きさにもどすと、同じ指示菌でブランクを作るようになる。Thomas ら¹⁸⁾はこの現象にもとづいて、組換え DNA を容易に識別することに成功した。ただこの場合は挿入する DNA 断片の大きさが元の欠失部と同じ位でなければ、出来上った組換え DNA がブランクを作るようにはならない不便さをともなっているが、適当な選択マーカーをもたない DNA 断片をつなぐ時には有効なベクターである。また λ ファージの DNA は取り扱いが容易であり、かつファージ自身もプラスミドにくらべて安定である。

これに対して λ ファージの増殖調節部位付近がプラスミドとなった λ_{dv} プラスミドは 3 個の遺伝子と 2 ~ 3 個の遺伝的構造部分の働きによって制御系がなりたっている、遺伝解析もかなりすすんでいる。分子量は 9.4×10^6 ダルトン (2 量体として)、生物汚染の危険もなく、またこれをもつ菌は λ ファージに耐性になるので容易に選択できる。その上変異株も多く分離されており、たとえば細胞あたり数百個も含まれるものもえられている。ただこのプラスミドは増殖調節部位の末端にある P とよばれる遺伝子の近くを E_{co}RI で切断される²¹⁾ 難点がある。幸いこのプラスミドは自然界では 2 量体として存在する傾向が強い^{22,23)}ので、E_{co}RI で部分分解をして一方のみを切断して他の DNA 断片を組込ませ、のこりの一方は元のままにして調節の機能を保たせることができる。

これら三者はいずれも一長一短があり、その後主として遺伝子操作の技術を使って、より一層便利なベクターを作ることが多く試みられている。その結果

1) pSC101 と Col E₁ をむすんで、両者のもつ長所、

すなわち薬剤耐性遺伝子をもち、しかも大腸菌内でプラスミドが多数増殖しうる pMB9²⁴⁾ が実験によく用いられる。

2) テトラサイクリンおよびアンピシリンの両方に対する耐性遺伝子をもたせ、Hind III, Bam I, Sal I がいずれもテトラサイクリン耐性遺伝子の中を切断するため、そこに他の DNA 断片を入れるとこの耐性遺伝子は正常な機能タンパクを作れず、菌はこの薬剤に感受性となることによって組換えプラスミドを容易に検出できるようにしたベクター pBR 313²⁴⁾, pGM 706, pGM 16²⁵⁾ も作られている。

3) 大腸菌のラクトースオペロンの一部をプラスミドに組込ませ、そのとなりに他の遺伝子 DNA 断片を入れることによって、ラクトースオペロンの調節下にその遺伝子の形質発現をさせるものも得られている²⁶⁾。

4) Col E₁ のレプレッサー遺伝子の中にアンピシリン耐性遺伝子を組込んで、プラスミド識別のマーカーにすると共に、正常なレプレッサータンパクを作れないようにした pKY2283 が得られた²⁷⁾。このプラスミドを含む菌は低温ではコリシンタンパクを作らないので生育するが、42℃ でインキュベートするとコリシンタンパクの合成が誘導され、しかもレプレッサータンパクを作れないため、自分自身をまもれずに死滅する。ところがこのプラスミドを EcoRI で切断してそこに他の DNA 断片を挿入すると、コリシンタンパクの構造遺伝子の中で切断されているためにもはや 42℃ にしてもコリシンを産生せず、したがってレプレッサータンパクがなくても菌は生育するので組換え DNA を含む菌を容易に区別できる。

その他遺伝子操作安全のために米国 NIH の Guideline では、特別に弱くて、たとえ実験室外に出ても容易に生存しえない大腸菌またはファージを用いることが要求されており (HV-2 とよばれる)、この条件にあったベクターの確立にむけて努力がなされている。

また以上のほかに動物ウイルスの SV 40, およびポリオマウイルスの欠損変異株^{28,29)} をベクターにした報告もあり、真核細胞で遺伝子操作を行う上に今後重要である。

2.2. ベクター DNA の分離 細菌の細胞壁をリゾチームで処理したあと、Brij または SDS のような表面活性剤でおだやかに菌をとかすと、プラスミド、ポリゾーム、可溶性タンパク、tRNA など細胞質内の物質は全部溶出される。一方核様の染色体 DNA は細胞の残渣に付着したままで遠心分離される。

次に溶菌液の上澄からフェノールで核酸を抽出し、エ

チジウムブロミドを含んだ CsCl 溶液中で密度勾配遠心を行う。これは環状のプラスミド DNA が、2 本鎖とも切れ目なく分子全体としてさらによじれた 3 次構造をとっている閉鎖状 DNA (図 4) であるので、平面構造をもった色素が 2 本鎖 DNA の塩基対の積み重ねられているすき間に割りこんで (intercalation), 2 本鎖の局所的な巻きもどし (unwinding) をおこす際に、直鎖状の DNA 分子や 2 本鎖の内 1 本だけに切断の入った開環状 DNA 分子にくらべて限度があり、色素のはいり方が少なく、その結果密度は大きくなって (CsCl 溶液中でその差は 0.04 gm/ml ほど)、容易に分離精製されるのである。遠心後 DNA のバンドを紫外ランプのもとで簡単にみわけることができる。

Fig. 4 Various forms of DNA molecule.

3. DNA 断片とベクターとの結合

目的とする特定の遺伝子を含んだ DNA 断片をベクターに結合するには、まず環状のベクター DNA を適当な制限酵素で切断して直鎖状 DNA にすることが必要である。この場合ベクターの増殖調節部位を切ることなく、かつ普通は 1 カ所で切断する制限酵素をえらぶ。もしもそれ以上の箇所を切る時には当然生じた断片の内増殖調節部位を含むものだけを分離精製しなければならない。次に両者を共有結合で結び、再び環状 DNA 分子にするためには 2 つの方法がある。(ただし λ ファージをベクターにする場合は、両端に相補的な 1 本鎖末端をもっているもので、感染後自ら環状分子になる¹⁸⁾)。

3.1. 制限酵素法 制限酵素による切断で生じた DNA 断片は普通両端に相補的な 1 本鎖の接着末端をもっているもので、2 つの異種 DNA 断片の間でも適当な温度で水素結合対をつくらせることができる (図 5)。(たとえば EcoRI による末端では接着に 6 ヌクレオチド対が関与しており、6℃ と計算される³⁰⁾。EcoRII の場合はこの部分に GC 対が多いのでさらに高くなる)。この時切

Fig. 5 Construction of a recombinant DNA molecule by the action of restriction enzyme and ligase.

Fig. 6 Procedure to construct a recombinant DNA molecule with the aid of *T4*-phage ligase.

断部位では3'-OHと5'-Pをそれぞれもったヌクレオチドが相対していてその間にすき間がないため、DNAリガーゼによって共有結合で結ばせることができる(この酵素は0℃の低温でもよく作用する)。すなわちこの方法では制限酵素がDNAを切断して断片を作るとともに、結合に必要な末端をも用意することになり、制限酵素とリガーゼの2種の酵素があれば、容易に組換えDNAを作ることができる。しかし欠点としてDNAの濃度によって強く左右される。同一のDNA断片の両端に相補的な1本鎖接着末端をもつので、濃度が低い時には分子内で環状DNAを作ってしまう、一方濃度が高い時には同じ種類のDNA断片間に結合を生じ連鎖した重合体となりやすい。また組込むべき遺伝子DNA断片がベクターに比べてかなり長い場合は、目的とする環状組換え体を生ずる効率は非常に悪くなる(18×10^3 塩基対までつないだ例は報告されている⁴⁰⁾。

便利な変法に、*T4*ファージ感染菌から精製したDNAリガーゼが大腸菌のそれとことなり、結合しようとする両DNA分子の末端に相補的な1本鎖の接着末端のある場合は勿論のこと、ともにflush endである時にも働く^{32,33)}ことを利用した方法がある。したがってflush endを生じる制限酵素で切ったDNA断片でも、あるいは1本鎖の接着末端を生じる制限酵素を使った場合、DNAポリメラーゼで1本鎖部分を修復して完全なflush endにしても、結ぶことができる(図6)。この方法はつな

Fig. 7 Formation of a recombinant DNA molecule by the use of terminal transferase and annealing technique.

ぐべき DNA 断片を生ずる制限酵素とベクターを切断する制限酵素が異なる時にも使用できる利点をもつ。しかし上の原法と同じ欠点は依然のこっている。なお最近 Bam I, Hind III, EcoRI の認識塩基対配列を含む 2 本鎖 DNA の小片が化学的に合成市販されている。これを今組込もうとする 2 本鎖 DNA の両端に T₄ リガーゼで結合した後、これらの酵素の一つで消化すると特異な接着末端を人工的に作ることが可能である³⁴⁾。

3.2. 末端トランスフェラーゼ法 次の方法は Berg ら³⁵⁾ が制限酵素の発見に先立って、DNA の人工的組換えに最初に用いたもので、現在も広く使われている。原理は DNA 断片の末端に結合部分をつくるため、3'-OH 末端に任意のデオキシリボヌクレオチドをつけ加えて、1 本鎖をつくる子ウシ胸腺の末端トランスフェラーゼとよぶ酵素を用いることを骨子としている。すなわち図 7 に示すごとく

1) 結合しようとする第一の DNA 分子を何んらかの方法で切断する。

2) コバルト塩存在下で、dATP を基質として、得られた DNA 断片の 3'-OH 末端に末端トランスフェラーゼを働かせて、40~150 個の dA を付加する³⁶⁾。

3) 同様に第 2 の DNA 分子を処理して、3'-OH 末端に dT をほぼ同じ数つける。

4) 2 つの DNA 分子をアニールすると、末端に相補的な 1 本鎖部分があるので、相互に相手をみつけて水素

結合対をつくり、2 本鎖の環状分子となる。この場合生じた環状分子は完全な 2 本鎖状態ではなく、1 本鎖の切れ目または溝あるいは余分の部分をもっているが、それらは宿主に感染後菌体の DNA ポリメラーゼ、リガーゼ、またはヌクレアーゼで容易に修復される^{37,38)}。

なお dATP, dTTP の代りに dGTP, dCTP を用いても同様に行える。

この方法では結合する 2 種の DNA 断片が互いに相補的な 1 本鎖の末端をもっており、しかも同じ種類の DNA 断片では両端に同じ末端が突出しているので、前の方法にみられたように 1 つの分子の両端が結合したり、重合体を作ったりすることはなく、目的とする環状の組換え体形成の効率が低い。特に目的の遺伝子が長い場合はこの方法が有効である。しかし欠点としては、用いる DNA に 1 本鎖切断があったり、また用いた末端トランスフェラーゼにもし他のヌクレアーゼが混在していて、反応の間に DNA 分子に 1 本鎖切断をおこす時には、そこに dA または dT が添加されて目的の組換え分子をつくらない。また得られた組換え DNA から挿入した DNA 断片を切り出す簡単な方法がない。そこで最近では図 8 のごとく、ベクター DNA を EcoRI で切断し、生じた接着末端を DNA ポリメラーゼで修復して 2 本鎖の flush end とした上で、3' 末端に末端トランスフェラーゼで dC 鎖をつけ、一方組込む DNA 断片の 3' 末端には dG 鎖をつけて、結合し、挿入した DNA 断片の末端に EcoRI の切断部位

Fig. 8 Modified procedure for *in vitro* recombination by terminal transferase and annealing

Fig. 9 Procedure used for *in vitro* synthesis of double stranded DNA from mRNA.

をのこし、あとで切断回収するという方法がとられている。

なお目的とする遺伝子を分離精製できなくても、その mRNA があれば、逆転写酵素で cDNA をつくり、これを分離して DNA ポリメラーゼで 2 本鎖にして、その末端のループを 1 本鎖 DNA に特異的なエンドヌクレア

ーゼ S_1 酵素で切り、完全な 2 本鎖 DNA 分子とした上で、末端トランスフェラーゼを働かせる方法もよく用いられる (図 9)。

4. 形質転換と組換え DNA 保持菌の検出

組換え DNA を次に適当な宿主に感染させ (形質転換)、ベクターのもつ自己増殖能を利用して増加させる。このようにある特定の遺伝子を組込ませたクローン (1 個の親に由来した相同な子孫の一群すなわち遺伝的に同一な一群の生物) を分離する操作をクローン化 (cloning) とよぶ。

形質転換には Mandel と Higa が見出した極めて簡単な方法が用いられる³⁹⁾。すなわち大腸菌を塩化カルシウムで処理して細胞膜の透過性をたかめると、低温で DNA とまぜるだけで容易にこれを菌体内にとりこむようになる。普通 DNA を宿主の染色体上に組込ますためには複雑な過程が必要であるが、プラスミドやファージの DNA 場合そのような過程は不必要で^{40,41)}、 10^{5-6} 個の DNA 分子につき約 1 個の割合で形質転換した菌が得られる。

次に組換え DNA を保持している菌を検出するためには、ベクター DNA の薬剤耐性、コリシン耐性、またはファージ耐性など比較的容易に識別できる形質でまず一次選択をする。ベクターに λ ファージまたは pKY2283 を使った実験では、理論的に組換え DNA をもったものだけがえられるから選択は容易である。しかし制限酵素法で

かつプラスミドをベクターとした場合、特にショットガン実験ではいろいろな遺伝子の挿入されたものがまざるから、この一次選択したものについてさらに目的の遺伝子を含むものを選ばなければならない。このためにはコロニーのレベルで目的の遺伝子の mRNA とハイブリッドを作らせるコロニーハイブリダイゼーション法⁴²⁾が使われている。これは一次選択をした菌のコロニーをニトロセロローズろ紙の上に作らせ、菌体をとかして DNA を変性したろ紙に固定、放射性 mRNA とハイブリッドを作らせオートラジオグラフィーで見出すのである(遺伝子自体を検出するものであり、形質発現には関係ない)。この方法で数千個の大腸菌クローンについて、1~2週間目的とする mRNA に対応する遺伝子の有無を検討できる。

これと同様なブランクハイブリダイゼーションもインファージのベクターを用いる時には可能で、1日に 10^6 個のブランクをテスト出来⁴³⁾、高等生物の繰り返しのない遺伝子のような場合についても、精製濃縮をせずにいろいろな組換え体をつくって、この方法で選択できるであろう。

5. 組換え DNA クローンの解析

目的の遺伝子をもつと思われるクローンが分離された時は、その DNA を多量にあつめ、精製して、その遺伝子の存在をたしかめ、かつそれが元の生物に由来することを示さなければならない。DNA の構造を解析するには、制限酵素による分解産物のゲル泳動にもとづく地図の作成、電子顕微鏡による分子量測定と組換え場所の決定がまず行われる。その上で目的とする遺伝子の mRNA または cDNA が入手できる時にはハイブリダイゼーションを行えば、比較的容易に遺伝子を確認できる。しかしもしも得られない時には証明が困難で、もとの生物の DNA とのハイブリダイゼーション、DNA 密度測定、組換え DNA によるタンパクの *in vitro* 合成などを行うが、いずれも決定的な証拠とは云いがたい。特に組換え DNA のクローンに含まれる遺伝子が元の生物のそれと全く同じ構造をもつか否かは未だ明らかでなく、繰り返しのある DNA の場合には宿主の中で欠失や重複をおこす可能性がある⁴⁴⁾。

6. 化学的に合成された遺伝子による実験

1977年カリフォルニアの City of Hope National Medical Center の板倉、広瀬らはサンフランシスコのカリフォルニア大学の Boyer らと共に化学的に合成した哺乳動物の遺伝子が大腸菌の菌体内で形質発現させることに成功した⁴⁵⁾。

遺伝子としてはソマトスタチンの構造遺伝子を用いた。それはこのホルモンが14個のアミノ酸からなる小さいペプチドで、分析には極めて鋭敏な radioimmunoassay と bioassay の2つがあり、しかも毒性は知られておらず、反対に生理的作用は興味深く、治療の面でも重要と考えられたからである。

遺伝子を合成するにあたっては、まず既知のアミノ酸配列から塩基配列を推測したが、遺伝コードには縮重があり、1つのアミノ酸に対して1個以上のコドンがあるので、遺伝子全体の塩基配列には多くの可能性がある。

そこで彼らは MS2 ファージゲノムの構造解析で明らかになった大腸菌におけるアミノ酸コードにもとづいて決定した。

次に DNA の合成には Khorana らのホスホジエステル法⁵⁵⁾と最近発達したトリエステル法^{56,57)}の2つが確立されているが、板倉らは速度の速い後者を取り、さらにこれを改良して3種のデオキシリボヌクレオチドを順に縮合させてコドンの trimer block をつくり、それを重合させてオリゴヌクレオチドとし、さらに DNA の相補性を利用して目的の遺伝子を作る方法で合成速度を一層はやめた。

またソマトスタチンペプチドの合成を確実にするために、図10のごとくタンパク合成開始装置として調節機能のよく知られている大腸菌のラクトースオペロン(ラクトースを代謝するのに必要な酵素、 β -ガラクトシダーゼなどをつくる情報をもった遺伝子群)を頭につけた。そしてソマトスタチンペプチドを含み、生物学的に不活性な大きいホルモン前駆体を *in vivo* でまず合成させて細胞から抽出し、それからソマトスタチンペプチドだけを切り出すこととした。それには合成したソマトスタチン遺伝子の N 末端の先きにメチオニンのコドンをつけて、この場所で後に臭化シアン分解によって切断して頭部の不要部分を除去できるようにし(ソマトスタチンペプチド自身にはメチオニンを含まない)、一方 C 末端には余分のアミノ酸を付けないために、nonsense コドンを2個つけた。そしてベクターへの接着を容易にするため、N-, C-末端にそれぞれ EcoRI と Bam I の接着末端を用意した。

実験の結果 1) ソマトスタチン遺伝子をもつ断片が正しい方向性をもって挿入された時にのみ合成がみられた。 2) その合成は実験計画通りラクトースオペロンの制御下にあり、このプラスミドを含む菌の抽出液そのものにはソマトスタチン活性をみとめなかったが、臭化シアン処理によって活性があらわれた。 3) この活性を精製するとクロマトグラフィー上で動物組織より得ら

Fig. 10 Production of somatostatin peptide depending on a recombinant DNA molecule carrying its structure gene chemically synthesized.

れたものと同じ挙動を示し、かつ白ネズミ脳下垂体細胞からの生長ホルモン分泌を抑えた。4) ソマトスタチン遺伝子断片をラクトースオペロンとβ-ガラクトシダーゼ構造遺伝子の最初の7個のアミノ酸コドンとからなる203ヌクレオチド対の小断片につけた時にはソマトスタチン活性物質はえられなかった。一方ラクトースオペロンとβ-ガラクトシダーゼ構造遺伝子の大部分を含む大きい断片とした時にはじめて活性物質の合成が証明された。しかしこの時にも予想された最大量の約1/10であった。これはタンパク分解酵素によるものと考えられている。

7. 遺伝子操作の生物学的意義

遺伝子操作実験が始められてから数年を経過した。この技術が生物学にもたらした意義として

1) DNAの断片をクローニングすることによって、複雑な染色体の一部を取り出し、精製純化して種々の実験に供する。

2) 遺伝子を細胞内に多数作ったり、遺伝子産物を多く産生させるなどによって遺伝的制御系に直接又は間接の変化を計画的におこす。

3) 「種」をこえてある生物の遺伝子を他の生物の細胞に入れる。

ことを可能とした点があげられよう。

従来はミトコンドリア、プラスミドおよび一部のウイ

ルスを除いては、DNAを純粹に得ることは困難であったが、遺伝子操作によって、生物がもつDNAの少くとも一部を多量にあつめることが出来るようになった。その結果ホルモンや酵素の合成に関与する遺伝子はもとより、転写や増殖に働く遺伝子についても構造の解析が急速にすすむことであろう。ただそのためには特定の染色体DNAやその上の目的の遺伝子DNAなど量的に極めて微量の試料を取扱う技術がさらに開発される必要がある。

その中であってこの操作実験が高等生物の遺伝子研究の途を開いたことはもっとも重大である。すなわち近年遺伝学の研究において微生物が大きな位置をしめてきたのは、地球上のすべての生物が複雑な多細胞真核生物から単細胞の前核生物にいたるまで、共通の生命現象を営んでいるという基盤に立って、比較的簡単で、解析の容易な生物系という意味で研究されたのであった。しかしたとえば細胞の分化、形体形成のような細胞間の現象に遺伝子がどのように関与するかを知るためには、どうしても多細胞生物についての研究が要求され、今日まで真核細胞系の遺伝子解析に進もうとして多くの努力がなされたが、複雑な構造体であるために研究は著しくさまたげられてきた。今ここに遺伝子操作の技術によって、特定の遺伝子を単細胞系にもちこんで遺伝子を解析することが可能となり、初めてその研究の門戸が開かれた。すでにこの線にそって、β-グロビン⁴⁶⁾、絹フィブリン⁴⁷⁾、免疫グロブ

リン^{48,49}、卵アルブミン^{50,51}、ヒストン⁵²の遺伝子の単離、および構造決定がなされている。

第2には遺伝子操作によってある遺伝子を別の制御系に組入れた時当然何らかの変化をもたらす可能性があり、それを用いて遺伝子の機能からさらに生体調節や発生分化の機構、遺伝病の成因、ホルモンの作用、発ガンなどと研究の拡大されることが考えられ、すでに微生物でタンパク合成機構⁵³、DNA複製⁵⁴等の重要な機能の解析がすすんでいる。ただし現在のところ、原核細胞の中に入れた真核細胞DNA、または逆に真核細胞にはいった原核細胞DNAが形質発現できるか、すなわち自らのプロモーターやオペロンの支配下に転写をおこし、ついで翻訳によって活性あるタンパクを合成できるか否か確実ではない。今後は遺伝子操作の技術を用いた人工的組換えの実験系を通じて、両者の間のRNA合成酵素やリボソームなどの違いを明確にすることが必要である。また遺伝子操作による場合は、従来の *in vivo* における組換えとはことなり、異質な時には致死的な系についても実験が可能であり、それによって2次的にこれを補償する変異を誘発するなど、新しい知見のもたらされることを期待したい。

第3に人工的雑種形成を容易にしたことは、人類の将来に有用な育種や個体改良の手段を提供した。微生物細胞の中に特定の遺伝子を入れて、アミノ酸やビタミンなどを大量に作らせたり、ホルモンのような高等生物でしか従来は見い出されていなかったペプチド性活性物質、抗生物質、各種酵素、抗体などの産生、または食糧増産のための品種改良、遺伝病の治療などの夢をもたせ、すでに一部は実施の段階に入ろうとしている。その中にあってソマトスタチンについて、化学的に合成された遺伝子にもとづく形質発現が初めて示された実験は極めて大きい意義をもつ。この報告は過去30年間に生物学がつみあげてきた知見がすべて正しかったことを証明したいわば総決算であったが、それとともに、遺伝子操作実験を行うにあたり自然の材料より取り出したDNAにくらべ、化学的に合成したものが目的の遺伝子のみを含むために、はるかに安全と考えられ、この実験は合成DNAによる形質発現を確認して、この技術の実用化に大きな力を与えた。今後はDNA合成技術の進歩と相俟って、遺伝子操作の応用は急速に展開されていくことであろうし、それはまた基礎的な生物学の研究にも大きく反映し新しい局面を拓くことであろう。さらにソマトスタチンの研究は従来生物学の研究においてともすれば軽視されがらであった有機合成技術の力を改めて強く認識させるものであった。

8. むすび

今日遺伝子操作の技術的問題はほぼ解決済みというであろう。実験の危険性も最初考えられたほどはなく、世界的にむしろ安全ムードが高まりつつある。実験に必要な酵素もすべて市販されるにいたった。したがって今日ではいかなる研究室でも、すぐ明日にもこの実験を行うことができる。しかし遺伝子操作の危険がどこかにひそんでいることは、常に強調されねばならないであろう。この画期的な技術の進歩が、人類のみならず地球のすべての生物にとって幸福をもたらすように、生物学、化学の総力を結集してより高い安全性を指向しつつ、細心の注意をもって少しずつこの技術の使用を上げ伸ばすことこそわれわれに課せられた最大の責務である。

(昭和53年8月30日受理)

文 献

- 1) W. A. Salser, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 923 (1974)
- 2) D. D. Brown, R. Stern, *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 667 (1976)
- 3) M. Thomas, R. L. White, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 2294 (1976)
- 4) R. L. White, D. Hogness, *Cell*, **10**, 177 (1977)
- 5) M. K. Dale, E. Martin, D. C. Livingston, D. C. Ward, *Biochemistry*, **14**, 2447 (1975)
- 6) M. K. Dale, D. C. Ward, *Biochemistry*, **14**, 2458 (1975)
- 7) A. Efstratiadis, F. C. Kafatos, A. M. Maxam, T. Maniatis, *Cell*, **7**, 279 (1976)
- 8) K. J. Marians, *Nature*, **263**, 744 (1976)
- 9) H. L. Heynecher, *Nature*, **263**, 748 (1976)
- 10) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, R. W. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3240 (1973)
- 11) A. C. Y. Chang, S. N. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 1030 (1974)
- 12) J. F. Morrow, S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, H. M. Goodman, R. B. Helling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 1743 (1974)
- 13) K. Timmis, F. Cabllo, S. N. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4556 (1974)
- 14) V. Herschfield, H. W. Boyer, C. Yanofsky, M. A. Lovell, D. R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 3455 (1974)
- 15) D. B. Clewell, *J. Bact.*, **110**, 667 (1972)
- 16) D. B. Clewell, D. R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **62**, 1159 (1969)
- 17) J. Hedgpeth, H. M. Goodman, H. W. Boyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 3448 (1972)
- 18) M. Thomas, J. R. Cameron, R. W. Davis, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4579 (1974)
- 19) N.E. Murray, K. Murray, *Nature*, **251**, 476 (1974)
- 20) A. Rambach, P. Tiollais, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 3927 (1974)
- 21) B. Allett, P. G. N. Jeppesen, K. J. Katagiri, H. Delius, *Nature, New Biology*, **241**, 120 (1973)
- 22) G. Hobom, D. S. Hogness, *J. Mol. Biol.*, **88**, 65 (1974)
- 23) K. Matsubara, Y. Takagi, T. Mukai, *J. Virol.*, **16**, 479 (1975)
- 24) R. L. Rodriguez, R. Tait, J. Shine, F. Bolivar, H. Heyneker, M. Betlach, H. W. Boyer, Miami Winter Symp., p. 73, 1977
- 25) D. H. Hamer, C. A. Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 1537 (1976)
- 26) B. Polisky, R. J. Bishop, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 3900 (1976)
- 27) S. Maeda, K. Shimada, Y. Takagi, *Gene*, **3**, 1 (1978)
- 28) A. L. Nussbaum, D. Davoli, D. Ganem, G. C. Fareed, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 1068 (1976)
- 29) P. Berg, Miami Winter Symp., p. 1, 1977
- 30) J. E. Mertz, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 3370 (1972)
- 31) D. Glover, R. White, D. Finnegan, D. S. Hogness, *Cell*, **5**, 149 (1975)
- 32) V. Sgaramella, J. van de Sande, M. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 1468 (1970)
- 33) K. Backman, M. Ptashne, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 4174 (1976)
- 34) J. W. S. Szostak, J. I. Stibs, J. I. Bahl, R. Wu, *Nature*, **265**, 61 (1977)
- 35) D. A. Jackson, R. H. Symons, P. Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2904 (1972)
- 36) R. Roychoudhury, E. Jay, R. Wu, *Nucleic Acids Res.*, **3**, 101 (1976)
- 37) P. Wensink, D. Finnegan, J. Donnellson, D. S. Hogness, *Cell*, **3**, 315 (1974)
- 38) L. Clarke, J. Carbon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 361 (1975)
- 39) M. Mandel, A. Higa, *J. Mol. Biol.*, **53**, 159 (1970)
- 40) A. Taketo, *J. Biochem.*, **72**, 973 (1972)
- 41) S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, L. Hsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2110 (1972)
- 42) M. Grunstein, D. S. Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 3961 (1975)
- 43) R. W. Davis, M. Thomas, D. Benton, J. Cameron, P. Philippsen, K. Struhl, T. St. John, R. Kramer, Miami Winter Symp., p. 155, 1977
- 44) J. F. Morrow, N. T. Chang, J. M. Wozney, A. C. Richards, A. Efstratiadis, Miami Winter Symp., p. 161, 1977
- 45) K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. D. Riggs, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer, *Science*, **198**, 1056 (1977)
- 46) R. Higuchi, G. V. Paddock, R. Wall, W. Salser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 3146 (1976)
- 47) Y. Ohshima, Y. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5363 (1977)
- 48) S. Tonegawa, C. Brack, N. Hozumi, R. Schuller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3518 (1977)
- 49) S. Tonegawa, A. M. Maxam, R. Tizard, O. Bernard, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 1485 (1978)
- 50) L. A. McReynolds, J. Catterall, B. W. O'Malley, *Gene*, **2**, 217 (1977)
- 51) A. C. Garapin, J. P. Lepennec, W. Rooskam, F. Perrin, B. Cami, A. Kurst, R. Breathnach, P. Chambon, P. Kourilsky, *Nature*, **273**, 349 (1978)
- 52) S. G. Clarkson, H. O. Smith, W. Schaffner, K. W. Gross, M. L. Birnstiel, *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2617 (1976)
- 53) M. Nomura, *Cell*, **9**, 633 (1976)
- 54) S. Yasuda, Y. Hirota, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5458 (1977)
- 55) H. G. Khorana, *Pure Appl. Chem.*, **17**, 349 (1968)
- 56) K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman, S. A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7327 (1975)
- 57) K. Itakura, N. Katagiri, S. A. Narang, C. P. Bahl, R. Wu, *J. Biol. Chem.*, **250**, 4592 (1975)