

Section 3

遺伝子工学

大腸菌を用いた
遺伝子クローニング

生命科学に革命をもたらした組換え DNA 技術は、遺伝子のアカデミックな研究を飛躍的に進展させただけでなく、臨床医学にも多大なインパクトを与え、高度先進医療の開発に貢献している。

本章では、組換え DNA 技術の基本技術、塩基配列の解読法、遺伝子増幅法、遺伝子解析法、トランスジェニック動物などの応用技術を理解する。また、遺伝子診断法や遺伝子治療などの臨床応用についても解説する。

ブロットイング

アガロースゲルを
紫外線下で観察

遺伝子工学

遺伝子組換え技術 recombinant DNA technology

1 DNAの特異的切断, 連結, 複製, 修飾などに 用いる酵素

遺伝子組換え実験にはDNA鎖を切断するハサミやDNA断片を結合させるノリの役目を果たすものなど, いろいろな酵素が用いられる。

➡ 制限酵素の立体構造

EcoRV が DNA 鎖に結合している状態。 *EcoRV* の2個のサブユニットが対称性をもって DNA の2回転対称性と一致する。

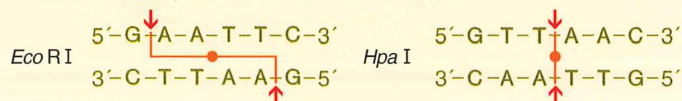
(Database : SWISS-PROT-today)

◆ 制限酵素の命名法

例) 大腸菌の RY13 株から1番目に分離された酵素 *EcoRI*

Escherichia coli RY13 *EcoRI*
属 種 株 1番目

◆ 切断部位は通常, 回文配列 (パリンδροーム) を持つ。



微生物名	制限酵素名	塩基配列 5'-----3' 3'-----5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>BamHI</i>	↓ G G A T C C C C T A G G ↑
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>EcoRI</i>	↓ G A A T T C C T T A A G ↑
	<i>EcoRV</i>	↓ G A T A T C C T A T A G ↑
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	↓ G G C C C C G G ↑
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	↓ G C G C C G C G ↑
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>HindIII</i>	↓ A A G C T T T T C G A A ↑
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>HpaI</i>	↓ G T T A A C C A A T T G ↑
<i>Providencia stuartii</i> 164	<i>PstI</i>	↓ C T G C A G G A C G T C ↑
<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	<i>Sau3A</i>	↓ G A T C C T A G ↑

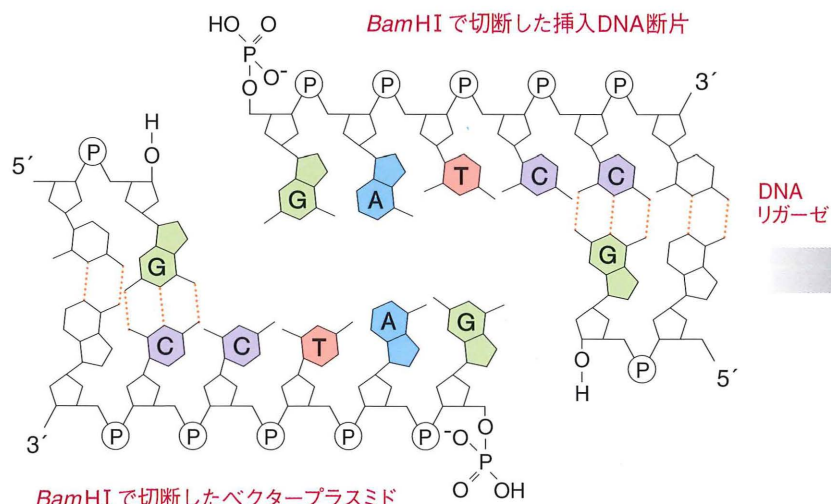
↓↑ 切断部位

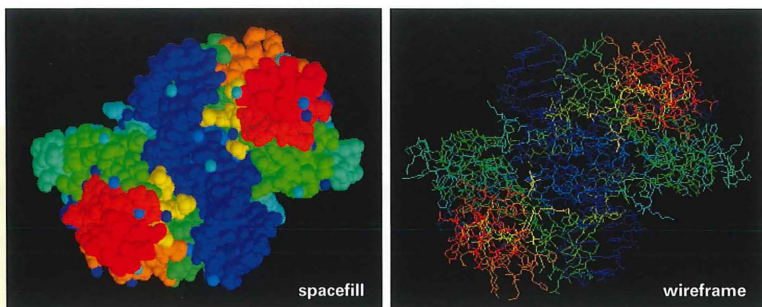
1 制限酵素 restriction endonuclease

二本鎖 DNA のある特定の塩基配列を特異的に認識して切断する。切断端は一本鎖 DNA を持つ付着末端 cohesive end (粘着末端 sticky end) の場合と, これを持たない平滑末端 blunt end の場合がある。同じ制限酵素で切断されて同じ付着末端を有する DNA は, 両切断末端の塩基配列が互いに相補性を持つのでアニールしやすい。複数の制限酵素を組み合わせることで切断することにより, プラスミドや特定遺伝子の制限酵素地図を作成することができる。

2 DNA リガーゼ DNA ligase

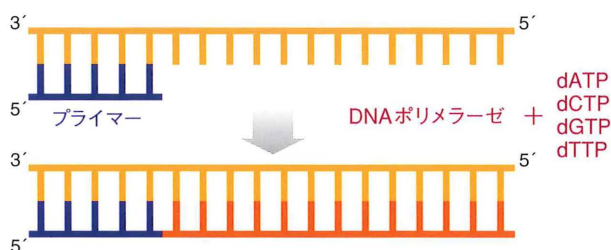
DNA 鎖の 3'-OH 基と 5'-リン酸基をホスホジエステルで結合する酵素。制限酵素で切断された DNA 断片を連結し, キメラ DNA を作るのに用いられる。大腸菌由来 DNA リガーゼは NAD を, T_4 ファージ由来の T_4 DNA リガーゼは ATP をそれぞれ補酵素に用い, 両者とも反応機構は同じであるが, 後者は平滑末端も連結できる。



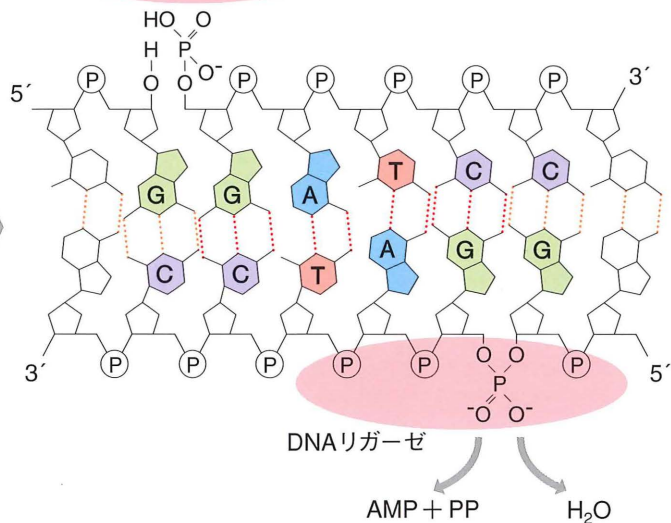


3 DNAポリメラーゼ DNA polymerase

鋳型DNAの塩基配列に従って、相補する4種のデオキシリボヌクレオシド3リン酸を基質としてDNA鎖を合成する。DNA鎖の標識などのニックトラレションなどに用いる。

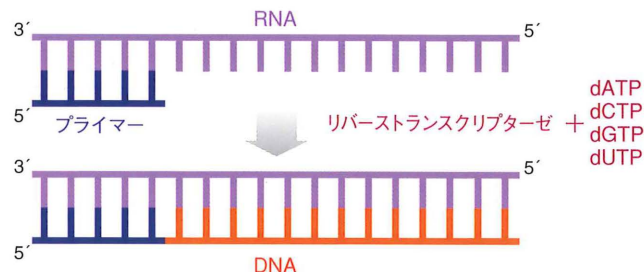


ATP + DNAリガーゼ



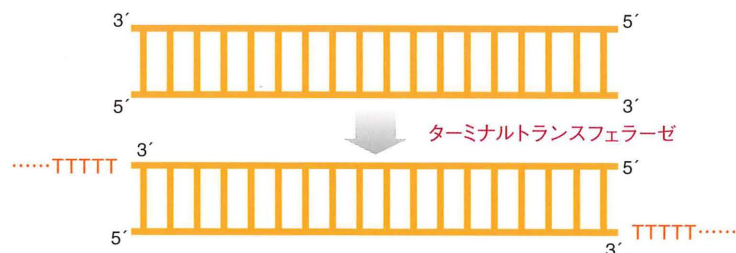
4 逆転写酵素 reverse transcriptase

RNA 依存性DNA ポリメラーゼ (RNA dependent DNA polymerase) のこと。RNA を鋳型として相補性DNA を合成する。mRNA からcDNA を作製するのに用いられる。



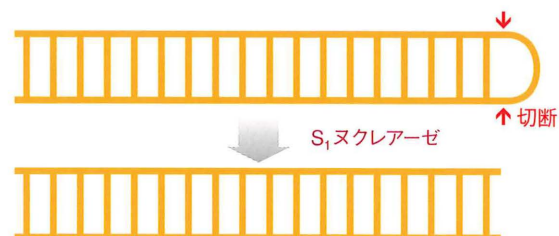
5 ターミナルトランスフェラーゼ terminal transferase

鋳型を必要としないでDNA鎖の3'-末端のOH基にヌクレオチドを添加していく酵素。ベクターDNAにポリdA、挿入DNAにポリdTを形成させ両者を連結してアニールできるようにしたり、放射性dTTPなどを用いてDNA鎖の標識などに用いる。



6 S₁ヌクレアーゼ S₁ nuclease

一本鎖のDNAやRNAを切断する酵素。mRNAから逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成し、これを鋳型にしてDNAポリメラーゼにより二本鎖DNAを作製するが、この際へアピクループ部分を切断するのに用いられる。またイントロン領域を確認するS₁マッピング法にも利用される。

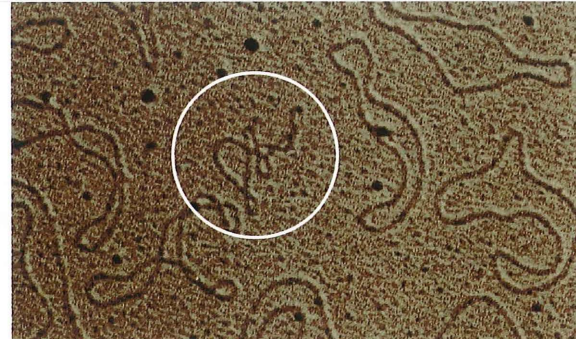


遺伝子工学

遺伝子組換え技術 recombinant DNA technology

2 目的遺伝子を宿主細胞に運搬する クローニングベクター

ある遺伝子を増殖させたいとき、目的 DNA を大腸菌内に運搬し安定に保持させるために、プラスミドやファージがベクター (vector, 運び屋) として用いられる。



④ プラスミド DNA の電顕写真

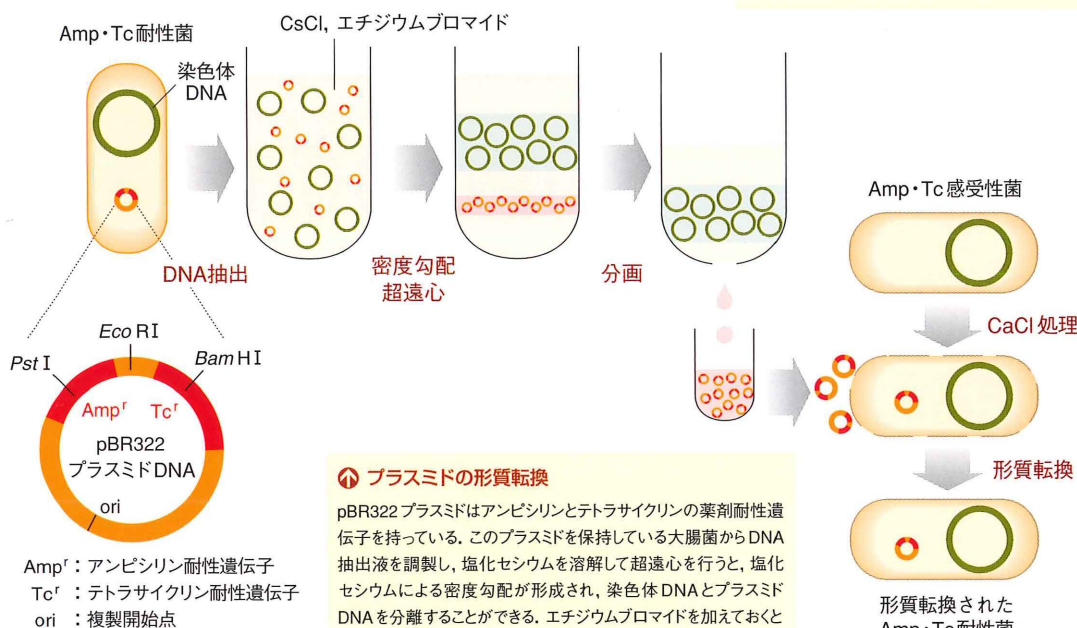
スーパーコイル状の環状構造がみられる(円内)。

1 プラスミド plasmid

細菌の薬剤耐性獲得の機構として働く染色体外性遺伝子で、自己複製能を持つ環状 DNA。通常、プラスミドと外来遺伝子を同一の制限酵素で切断し、DNA リガーゼで連結したキメラプラスミドを宿主細菌に形質転換して、抗生剤を添加した寒天培地でクローンを選択する。サイズの小さいプラスミドは細胞当たりのコピー数が多く、したがってプラスミドベクターに組み込まれた遺伝子のコードするタンパク質は大量に産生される。

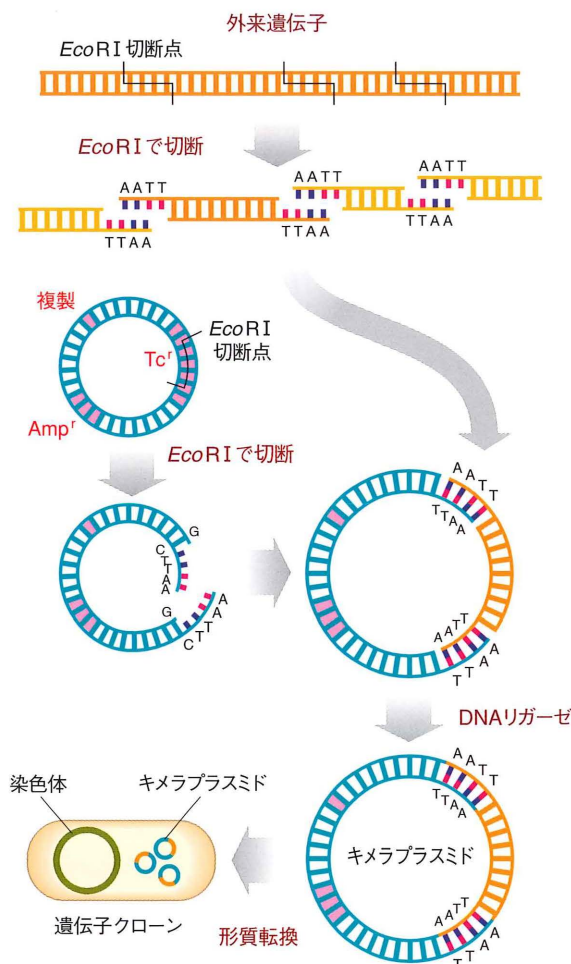
⑤ プラスミド遺伝子クローニング

プラスミド DNA と外来遺伝子 DNA を制限酵素 *EcoRI* で切断すると、同じ付着末端の塩基配列を生じる。両者を混合し、DNA リガーゼで結合させてキメラプラスミドを作製し、大腸菌に形質転換する。プラスミドが入らなかった大腸菌は $Amp^S \cdot Tc^S$ となり、アンピシリン寒天培地では増殖できない。プラスミド自身が入ったものは $Amp^R \cdot Tc^R$ となる。キメラプラスミドが入ったものは $Amp^R \cdot Tc^S$ となり、これらを区別することができる。



⑥ プラスミドの形質転換

pBR322 プラスミドはアンピシリンとテトラサイクリンの薬剤耐性遺伝子を持っている。このプラスミドを保持している大腸菌から DNA 抽出液を調製し、塩化セシウムを溶解して超遠心を行うと、塩化セシウムによる密度勾配が形成され、染色体 DNA とプラスミド DNA を分離することができる。エチジウムブロマイドを加えておく DNA 鎖に入り、紫外線照射下で染色体 DNA とプラスミド DNA の各バンドが確認できる。取り出したプラスミド DNA を塩化カルシウム処理した大腸菌に加えると、細胞内に取り込まれ複製を開始し、アンピシリン・テトラサイクリン耐性菌になる。



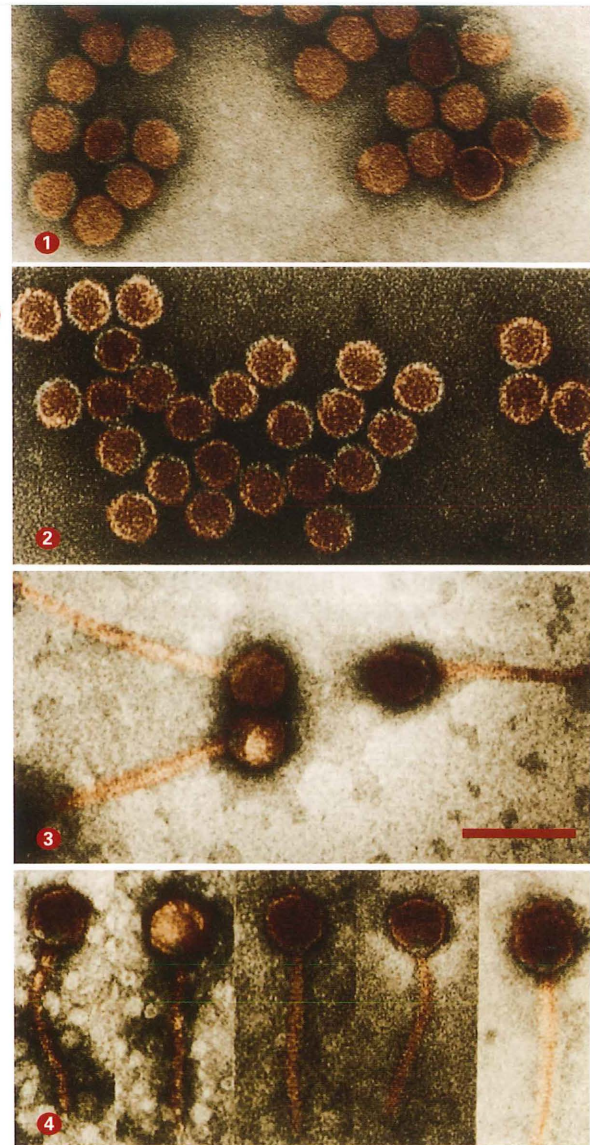
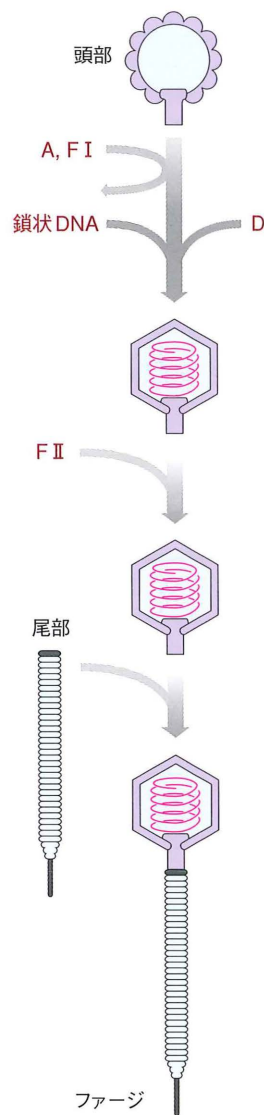
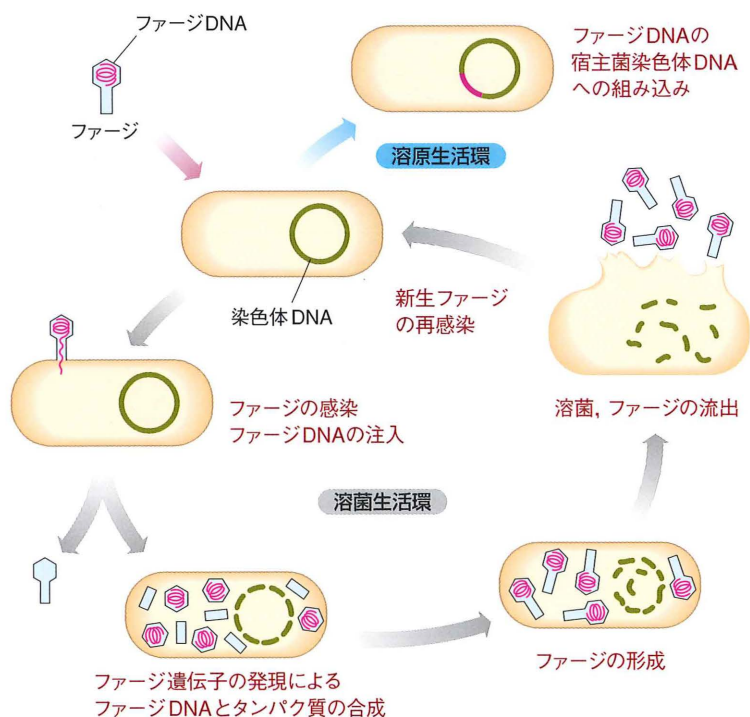
2 ファージ phage

バクテリオファージλの複製に不要な遺伝子部分を外来遺伝子と置き換え、*in vitro*パッケージ法によりファージ粒子を試験管内で作製し、宿主大腸菌に感染させてファージプラーク phage plaque として遺伝子クローンを得る。

① λファージの生活環(ライフサイクル)

λファージは大腸菌に感染後、2つの行動をとる。

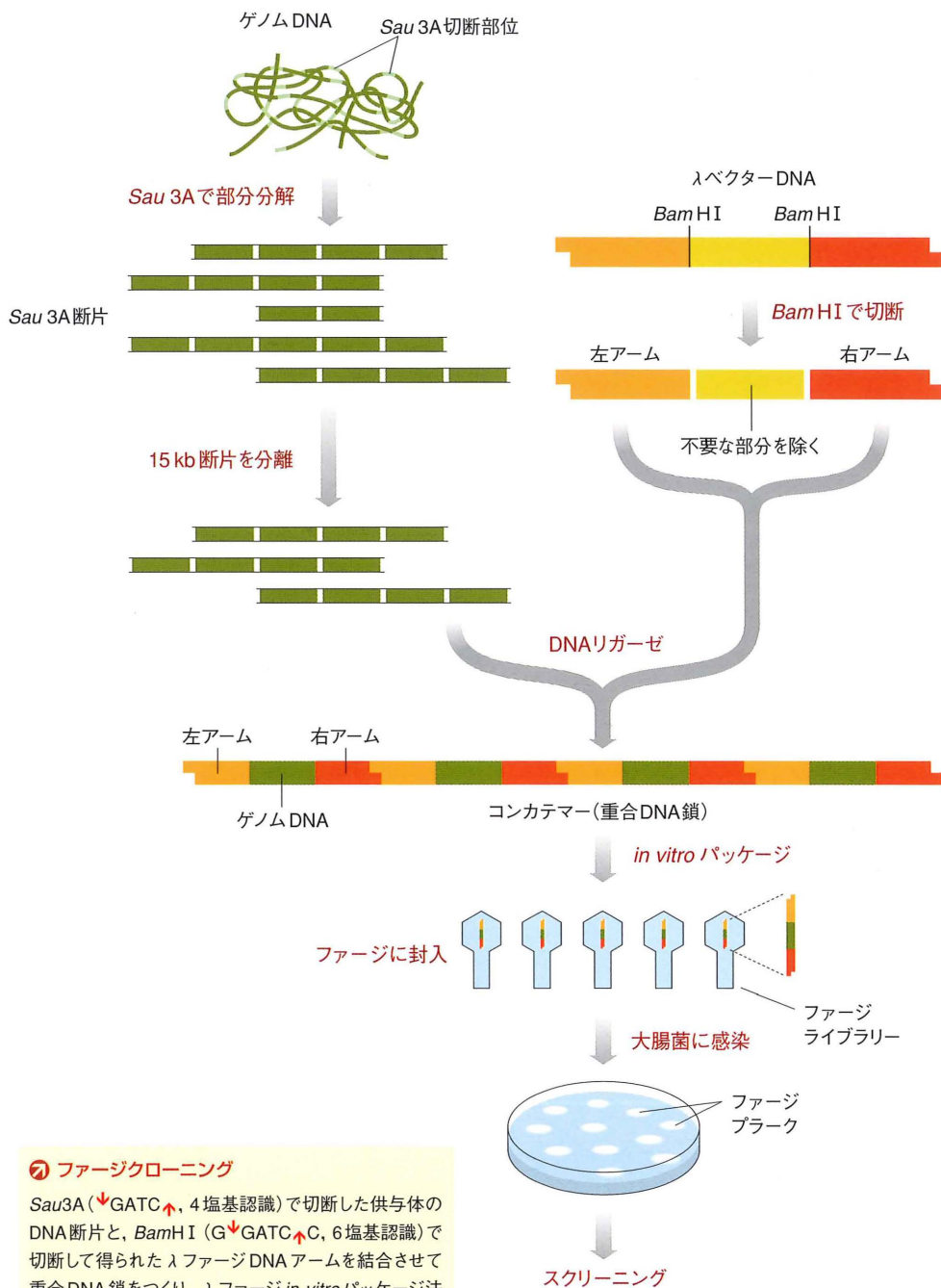
- ① λファージの遺伝子、タンパク質を合成し、ファージ粒子を作り、菌を溶菌する(溶菌生活環)。
- ② 宿主菌の染色体に組み込まれ、溶菌することなく、宿主が分裂増殖してもファージ遺伝子が保持される(溶原生活環)。



① A遺伝子欠損 ② D, F遺伝子欠損,
③ *in vivo*のファージ ④ ①②の組み合わせ
(Horn, B & Horn, T: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71(6); 2375, 1974)

② λファージの*in vitro*パッケージ

λファージ粒子の作製は、複数の構成タンパク質が順序よく正しく組み上げられる必要がある。構成タンパク質遺伝子中のA遺伝子あるいはD, F遺伝子をそれぞれ欠損している大腸菌の細胞抽出液を用いて*in vitro*でλファージDNAをパッケージしてファージ粒子を作らせると、それぞれ不完全なものしかできない。両者の細胞抽出液を混合してパッケージすると、感染能を持つλファージ粒子を完成することができる。



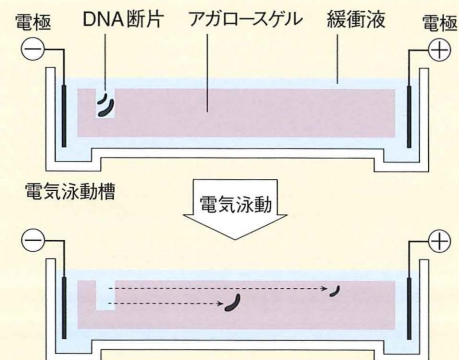
⑦ ファージクローニング

*Sau*3A (↓GATC↑, 4 塩基認識) で切断した供与体の DNA 断片と、*Bam*HI (G↓GATC↑C, 6 塩基認識) で切断して得られた λ ファージ DNA アームを結合させて重合 DNA 鎖をつくり、λ ファージ *in vitro* パッケージ法によりファージクローンを作製する。

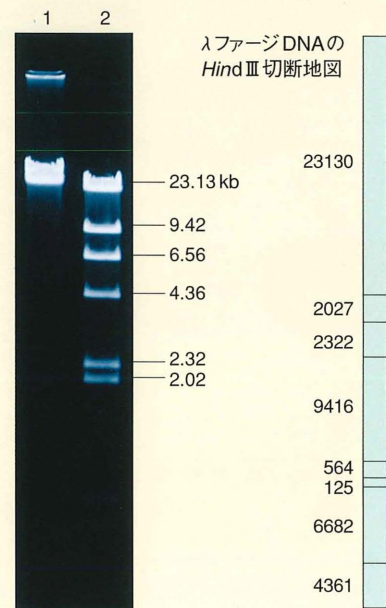
実験 NOTE

アガロースゲル電気泳動

小さな DNA 断片は大きな DNA 断片よりも速く移動する。ゲル内を移動した DNA 断片は分析・回収することができる。泳動終了後、ゲルを DNA 結合性のエチジウムブロマイド溶液に浸す。ゲルに紫外線を照射すると、蛍光で発色する DNA バンドを観察できる。



【実験例】λ ファージの DNA は *Hind* III の切断部位を 8 カ所持っているため、未知の DNA 断片のサイズを決めるマーカーとしてよく用いられる。レーン 1 は λ ファージを *Hind* III で切断する前、レーン 2 は切断後。

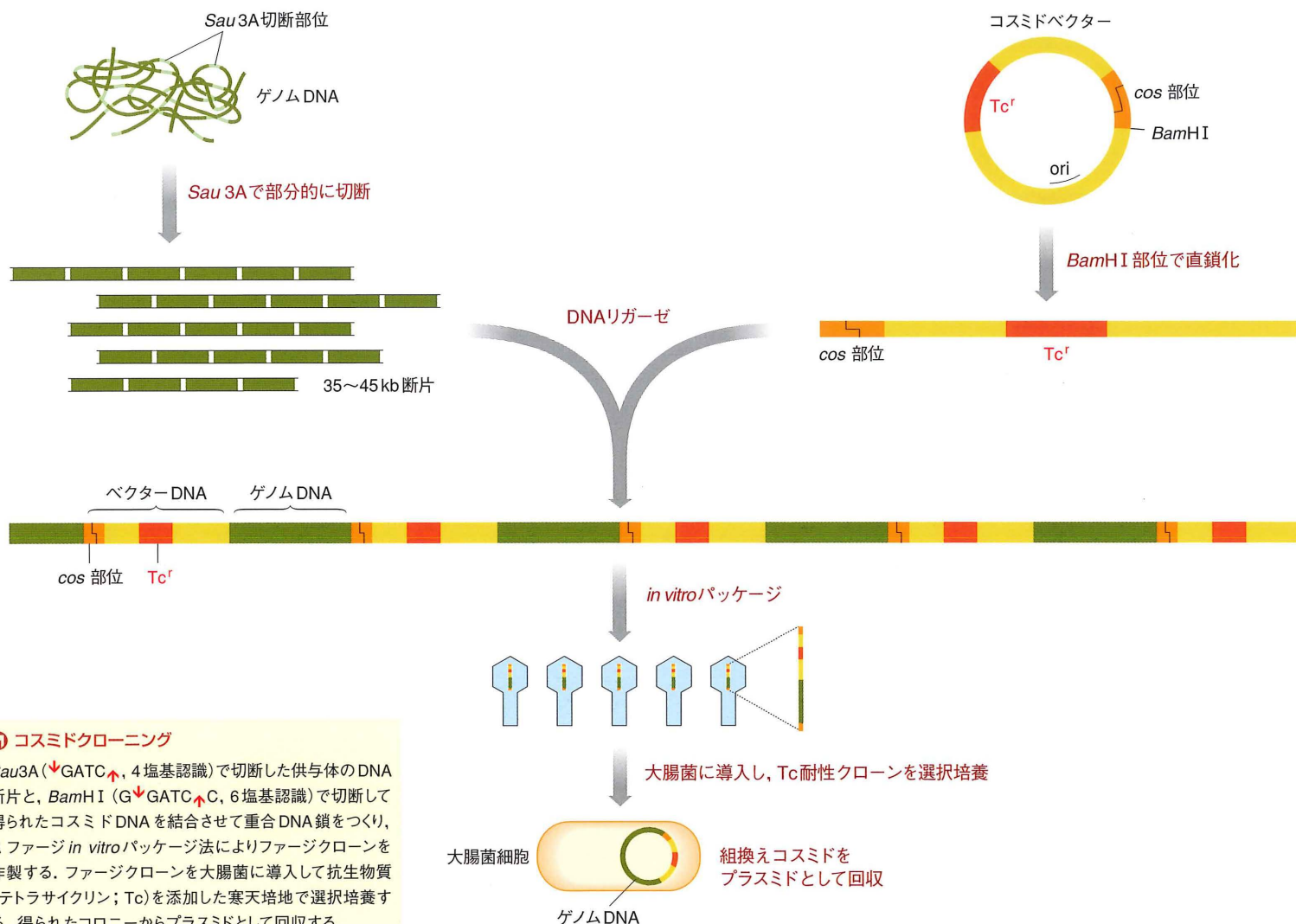


3 コスミド cosmid

プラスミドの自己複製能・薬剤耐性遺伝子に λ ファージ粒子の封入に必要な *cos* 遺伝子を併せ持ったベクター。 *in vitro* パッケージ法によりファージ粒子を試験管内で作製し、宿主大腸菌に感染させると、プラスミドを保持したコロニーとして遺伝子クローンを得ることができる。大きいサイズの外来遺伝子をクローニングできる。

4 ファージミド phagemid

プラスミドとファージベクターのハイブリッド。宿主細胞内で二本鎖DNAプラスミドとして増殖できるが、ヘルパーファージの感染により一本鎖のファージミドDNAが複製され、ファージ粒子として細胞から放出させることができる。



⑦ コスミドクローニング

Sau3A (↓GATC↑, 4塩基認識)で切断した供与体のDNA断片と、*Bam*HI (G↓GATC↑C, 6塩基認識)で切断して得られたコスミドDNAを結合させて重合DNA鎖をつくり、 λ ファージ *in vitro* パッケージ法によりファージクローンを作製する。ファージクローンを大腸菌に導入して抗生物質(テトラサイクリン; Tc)を添加した寒天培地で選択培養する。得られたコロニーからプラスミドとして回収する。

遺伝子工学

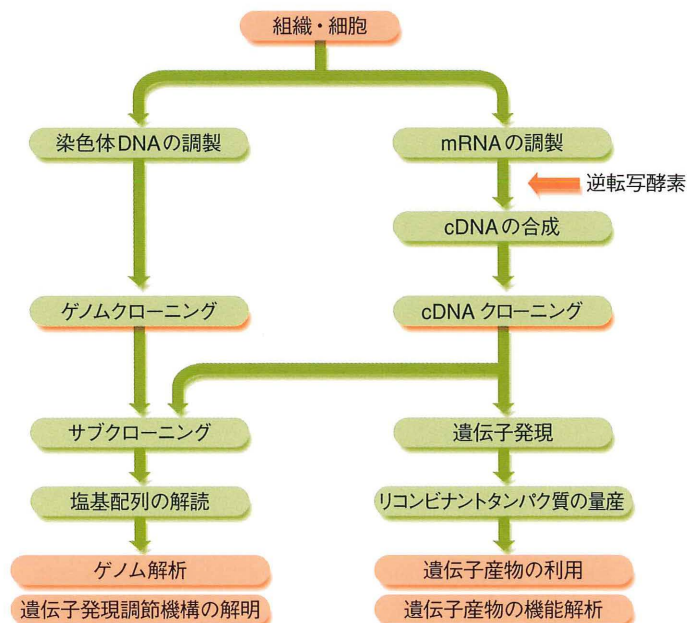
遺伝子組換え技術 recombinant DNA technology

3 ゲノムクローニングと cDNA クローニング

遺伝子クローニングは大別して、染色体 DNA を出発材料にするゲノムクローニングと、mRNA を出発材料にする cDNA クローニングがある。

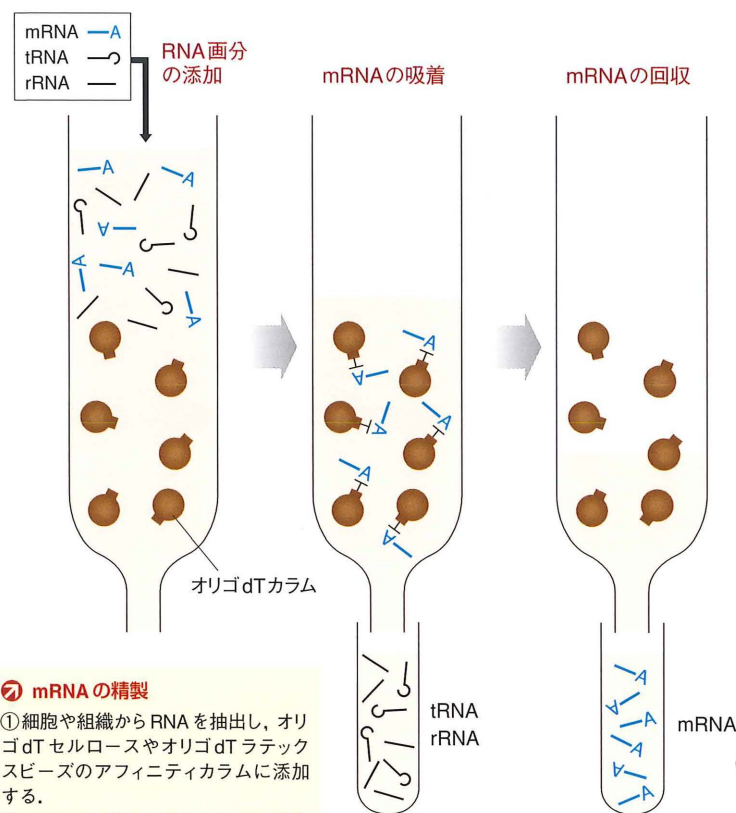
1 ゲノムクローニング

細胞から全ゲノム DNA を制限酵素で切断し、ベクターに挿入して作製するショットガン法で行う。通常、染色体 DNA を 4 塩基認識の高頻度切断制限酵素（たとえば *Sau*3A；GATC を認識して切断する）で部分消化した 20 kb に及ぶ DNA 断片を、6 塩基認識の制限酵素（たとえば *Bam*HI；GGATCC を認識し *Sau*3A で切断した DNA 断片と結合できる）で切断したファージベクターやコスミドベクターと結合させてライブラリーを作製する（前項参照）。原核細胞のゲノム遺伝子クローンが産生するリコンビナントタンパク質は機能的に発現するが、真核細胞ではイントロン部分を含んでいるので、目的遺伝子の本来の生理活性をもたない。ゲノム遺伝子クローンは、構造遺伝子のゲノム解析や遺伝子発現の調節エレメントの解析に利用される。



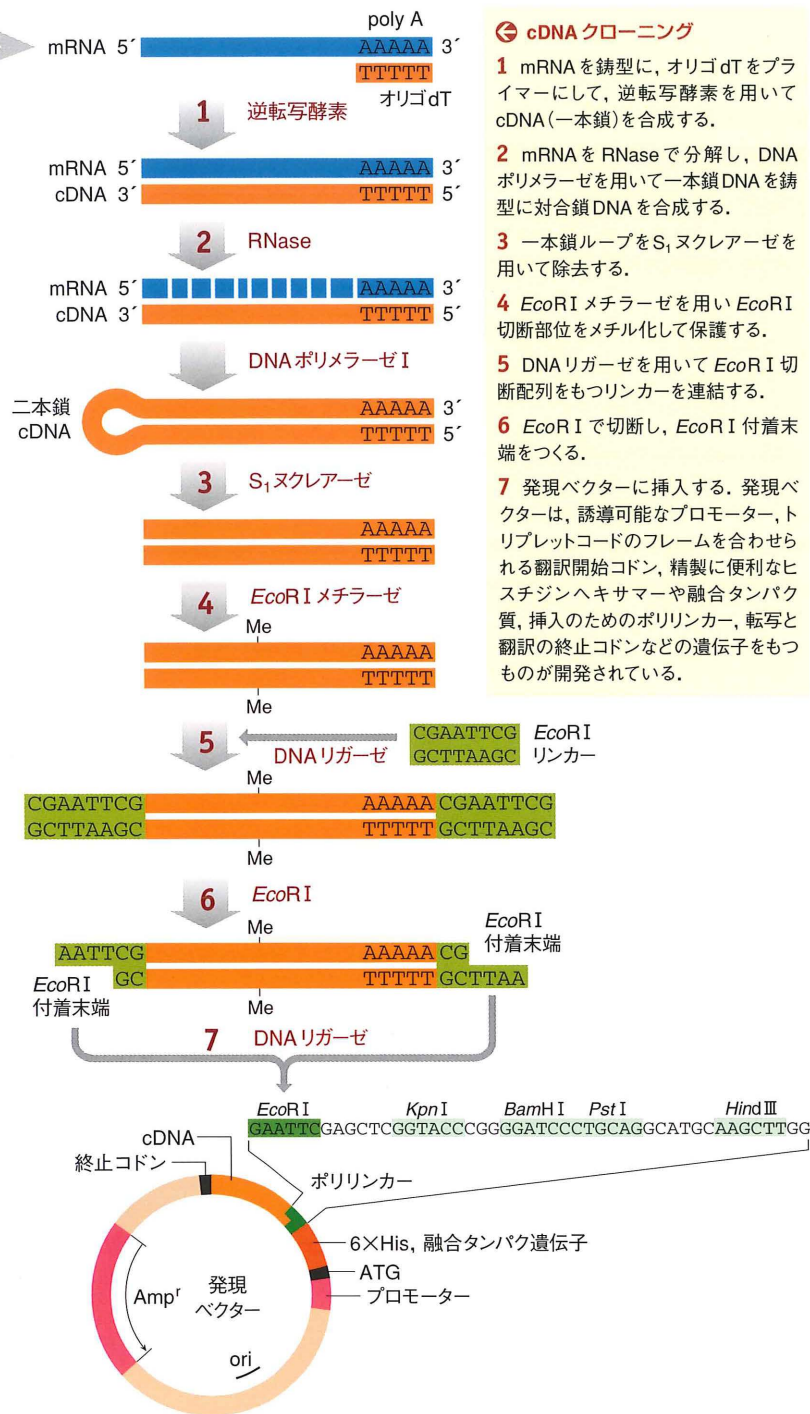
2 cDNA クローニング

mRNA を鋳型として逆転写酵素を用いて相補的 DNA (complementary DNA；cDNA) を合成して、ベクターに挿入して行う。cDNA クローンが産生するリコンビナントタンパク質は生理活性を発揮でき、抗体やリガンドを用いたスクリーニングが可能である。



⑦ mRNAの精製

- ① 細胞や組織から RNA を抽出し、オリゴdT セルロースやオリゴdT ラテックスビーズのアフィニティカラムに添加する。
- ② mRNA のポリ A がオリゴdT に結合する。rRNA、tRNA をよく洗い流す。
- ③ 吸着した mRNA を回収する。



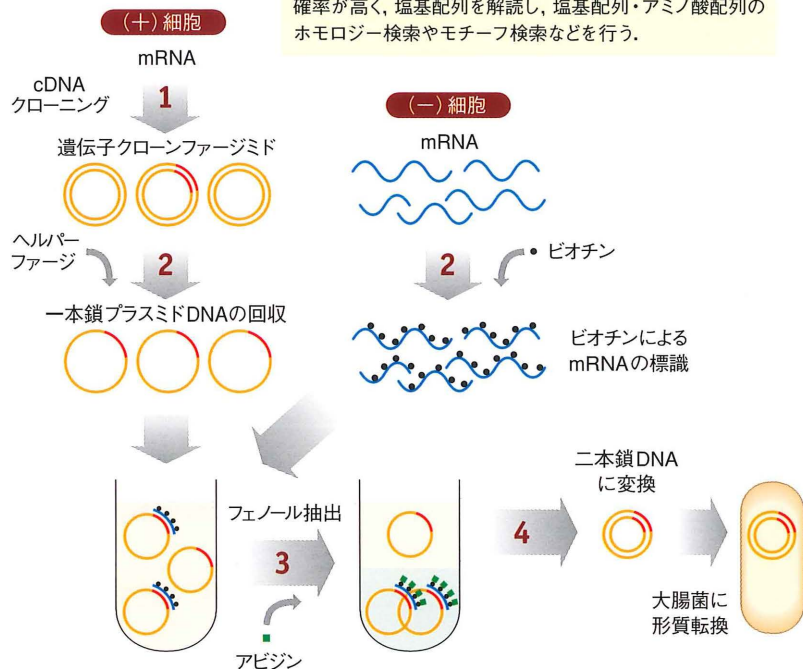
3 サブトラクション法

高等動物の遺伝子ライブラリーから、ある目的遺伝子クローンをスクリーニングするためには、100万個にも及ぶクローンを同定せねばならず、抗体や核酸プローブを利用する方法や、機能的スクリーニング法にも限界がある。そこで、ある細胞に特異的に発現している未知の遺伝子、発生過程の違いや細胞に刺激が与えられて発現する遺伝子などをクローニングする場合、サブトラクション法が応用されている。サブトラクション法は、目的とするcDNAを対象の共通する遺伝子のmRNAで結合させ、差し引いて残ったcDNAをクローニングする。

サブトラクション法の例

- 1 (+) (−) 両方の細胞からmRNAを調製し、ファージミドベクターで(+)細胞のcDNAライブラリーを作製する。**
- 2 ヘルパーファージを(+)細胞の遺伝子クローンに感染させ一本鎖プラスミドとして回収し、ビオチン標識した(−)細胞のmRNAを結合させる。**
- 3 アビジンを加え(ビオチンとアビジンは結合して安定な複合体をつくる)、フェノール処理してビオチンとアビジン複合体を沈殿させ除く。**
- 4 (−)細胞mRNAと共通しないプラスミドDNAを二本鎖DNAに変換し、大腸菌に形質転換してサブトラクションクローンを回収する。**

回収された遺伝子クローンは(+)細胞のみに発現している確率が高く、塩基配列を解読し、塩基配列・アミノ酸配列のホモロジー検索やモチーフ検索などを行う。



4 遺伝子クローンのスクリーニング

遺伝子クローニングのプロセスで重要かつ困難なのは、目的遺伝子クローンを選択することである。通常、ファージプラークあるいは溶菌させたコロニー中のDNAや遺伝子産物をニトロセルロース膜などに吸着させて、DNAプローブ、抗体、特異的リガンドなどを用いてスクリーニングを行う。

目的遺伝子のDNA配列と相補的なDNA(またはRNA)プローブを用いる。

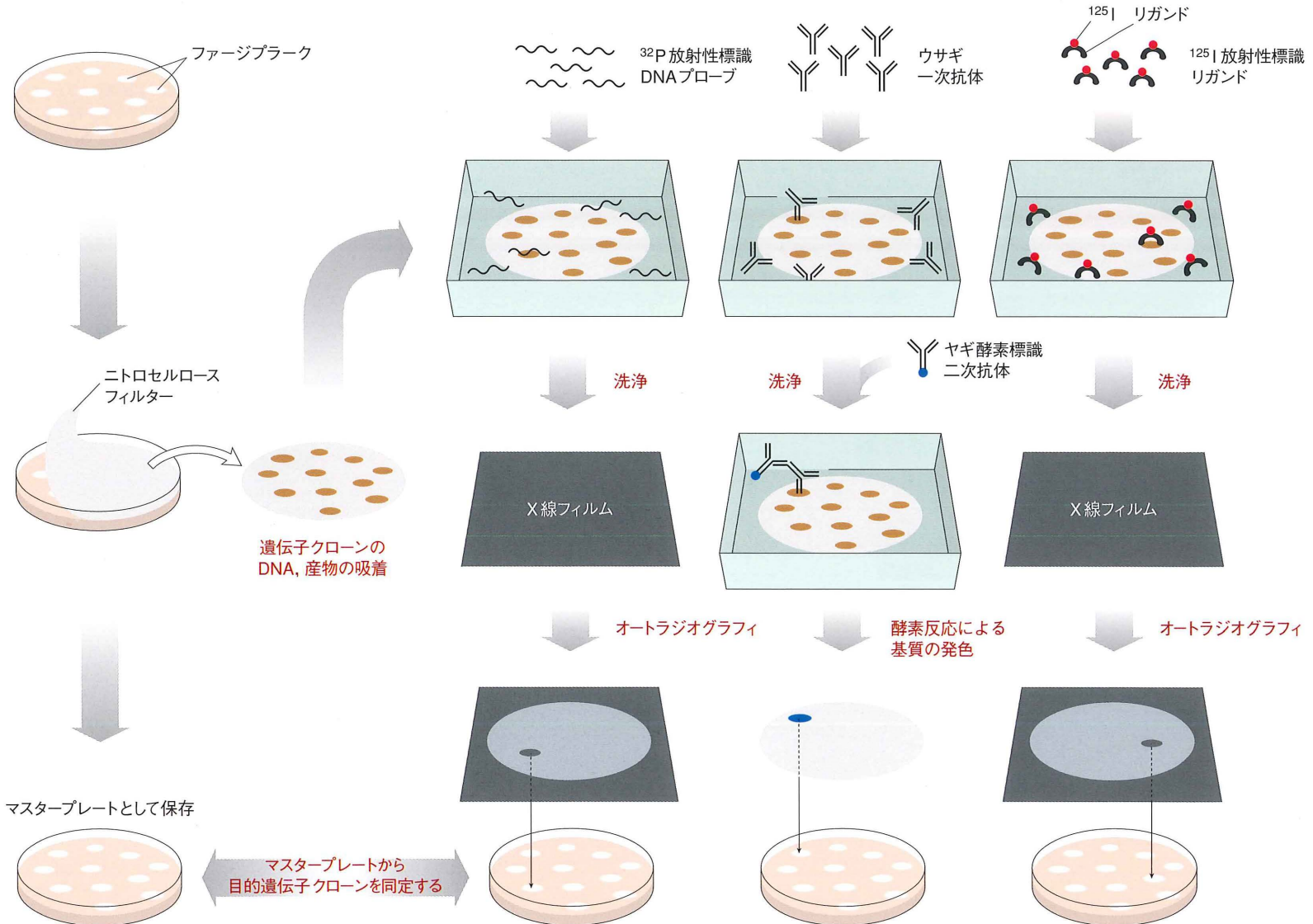
例：目的タンパク質のアミノ酸配列から塩基配列を推定し、オリゴヌクレオチドを化学合成して放射性標識し、DNAプローブとして用いる。

目的遺伝子がコードするタンパク質に対する抗体を用いる。

例：標的タンパク質を精製し、抗原としてウサギなどに免疫して抗血清を作製する。作製した抗体を直接、酵素標識するか、またはウサギの抗体に対するヤギなどの酵素標識二次抗体を用いる。

目的遺伝子がコードするタンパク質と結合するリガンドを用いる。

例：ホルモン受容体の場合、そのホルモンをリガンドとして応用できる。



遺伝子工学

遺伝子とその産物の解析技術

4 遺伝子・遺伝子産物の検出法

電気泳動後のDNA、RNA、タンパク質をニトロセルロース膜やナイロン膜に転写 (blotting という) して、DNA プローブや抗体を用いて検出する。① Southern blotting, ② Northern blotting, ③ Western blotting がよく用いられている。

1 Southern blotting

DNA を制限酵素で切断し泳動後、ゲルから膜に転写し、標識したDNA プローブやRNA プローブを用いてDNA-DNA (DNA-RNA) ハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィなどで相補性DNAを検出する。遺伝子診断や遺伝子地図の作成などに応用されている。

2 Northern blotting

RNA を泳動後、膜に転写し、標識したDNA プローブを用いてハイブリダイズさせてmRNAを検出する。目的遺伝子のmRNAの同定・定量が可能で、転写の遺伝子発現度を解析することができる。

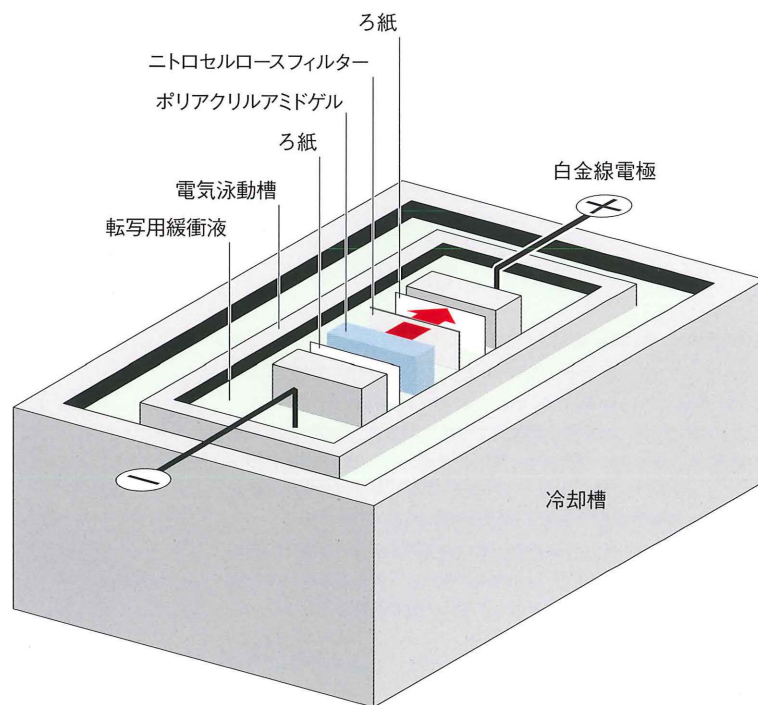
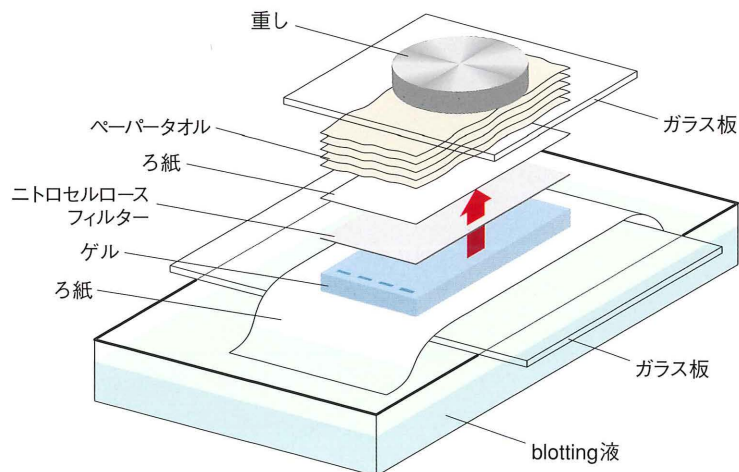
3 Western blotting

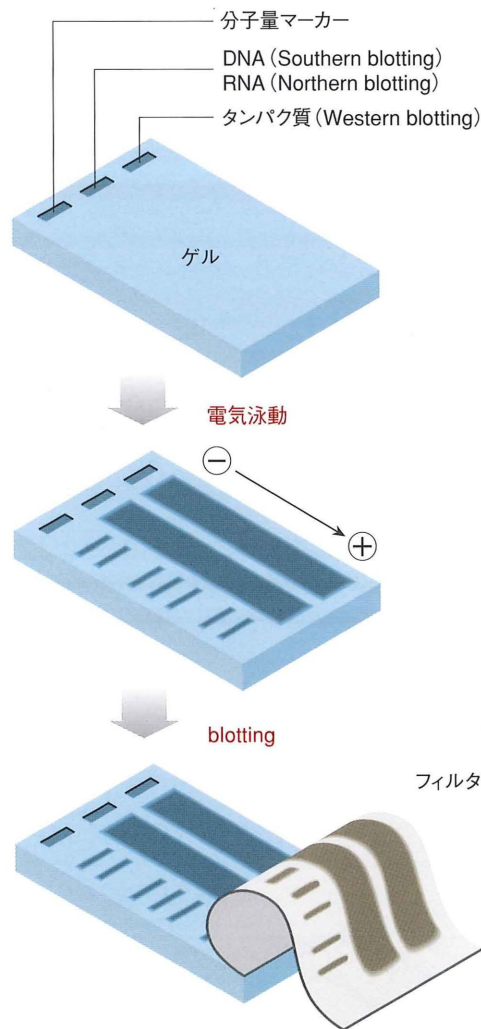
タンパク質をゲル電気泳動後、膜に転写して、標識した特異抗体を用いて数多くのタンパク質バンドから目的タンパク質を特異的に検出する方法である。

ブロッティング (blotting) の実際

① 緩衝液の毛細管現象を利用して、主にアガロースゲル中のDNAやRNAを膜に転写する。

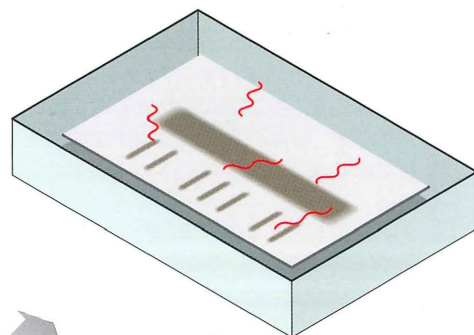
② 電気泳動を利用して、主にポリアクリルアミドゲル中の低分子のDNA (≤ 100 bp) やタンパク質を膜に転写する。



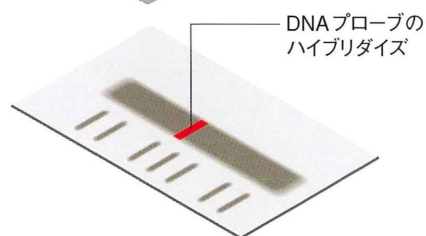


Southern blotting (DNA) Northern blotting (RNA)

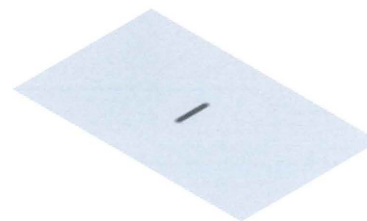
^{32}P 放射性標識
DNAプローブ



非結合 DNA プローブの洗浄

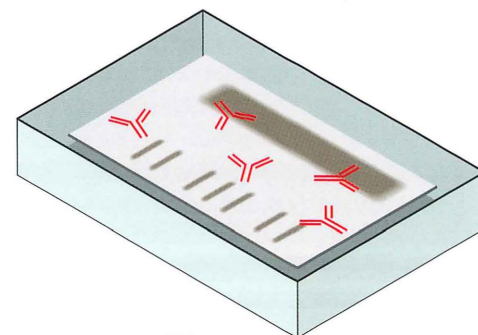


オートラジオグラフィ

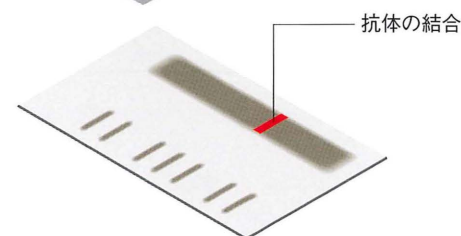


Western blotting (タンパク質)

特異抗体

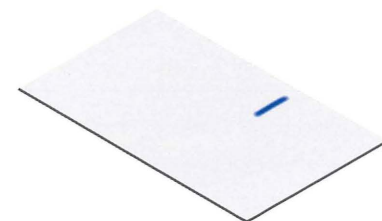


非結合抗体の洗浄



酵素標識
二次抗体

酵素活性染色



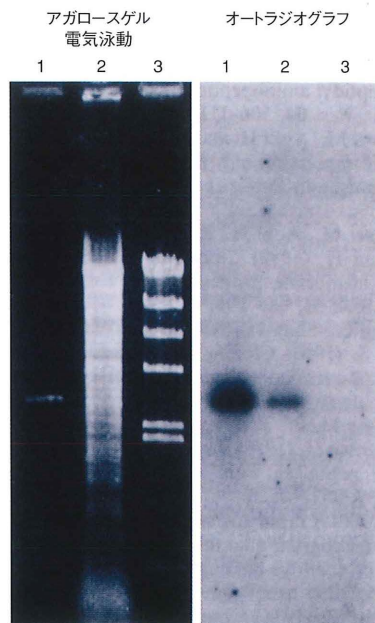
⑦ Southern, Northern, Western blotting の手順

Southern は DNA を, Northern は RNA を, Western はタンパク質をニトロセルロース膜やナイロン膜などに移送 (blotting) して解析する。

Southern blotting DNA を制限酵素で切断し泳動後, ゲルから膜に転写し, 標識した DNA プローブや RNA プローブを用いて DNA-DNA (DNA-RNA) ハイブリダイゼーションを行い, オートラジオグラフィなどで相補性 DNA を検出する。遺伝子診断や遺伝子地図の作成などに応用される。

Northern blotting RNA を泳動後, ゲルから膜に転写し, 標識 DNA プローブを用いてハイブリダイズさせ, mRNA を検出する。目的遺伝子の mRNA の同定・定量が可能で, 転写レベルでの遺伝子発現度を解析できる。

Western blotting タンパク質を泳動後, ゲルから膜に転写し, 標識した特異抗体を用いて結合するタンパク質 (標的抗原) を検出する。目的タンパク質の同定・定量が可能である。



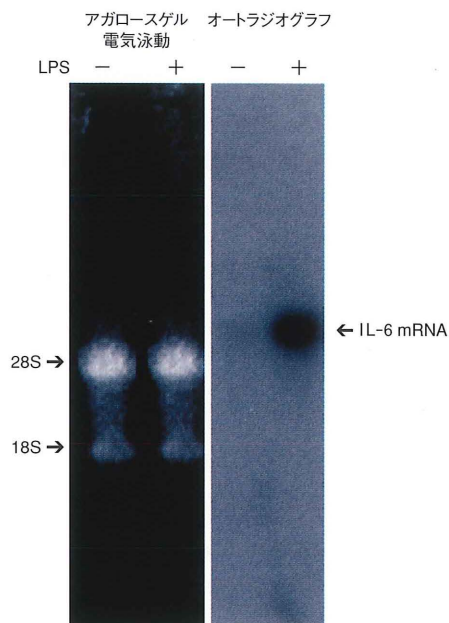
④ Southern blotting による DNA 解析の実験例

^{32}P 放射性標識したクローン DNA を用いた制限酵素切断染色体 DNA 中の DNA 断片の同定.

1. クローン DNA
2. 制限酵素切断した染色体 DNA
3. DNA サイズマーカー

クローン DNA と同サイズの染色体 DNA 断片が認められる.

(Archs Oral Biol. 37 (10) ; 807, 1992)



④ Northern blotting による RNA 解析の実験例

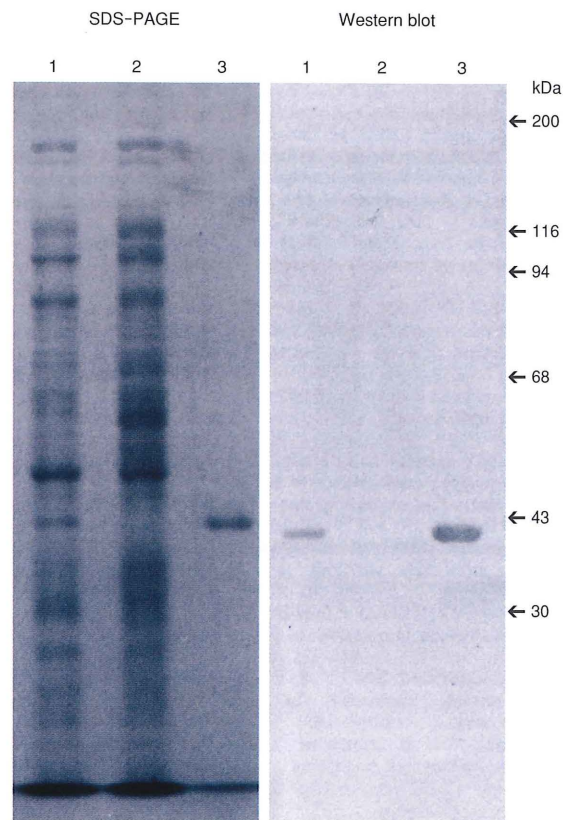
歯周病原菌内毒素のリポ多糖 (LPS) によるヒト歯根膜線維芽細胞の IL-6 遺伝子発現の影響.

線維芽細胞に LPS を加えて培養し, RNA を抽出してアガロースゲル電気泳動後, ^{32}P 放射性標識 IL-6 DNA プローブで Northern blot ハイブリダイゼーションを行った.

左: RNA 画分のアガロースゲル泳動写真で 28S, 18S rRNA のバンドがみられる (両レーンとも同量).

右: オートラジオグラフ. LPS 刺激により IL-6 遺伝子発現が促進している.

(Biochem. Med. Metab. Biol. 53 ; 130, 1994)



④ Western blotting によるタンパク質解析の実験例

歯周病原菌遺伝子クローンの遺伝子産物の同定.

ベクターとクローン遺伝子をもつそれぞれの遺伝子クローンの細胞抽出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後, 膜に転写し, 歯周病原菌に対する酵素標識抗体を用いて同定した.

1. 遺伝子クローン
2. ベクターのみの宿主
3. 精製した遺伝子産物

遺伝子クローンのレーンに対照の宿主菌には認められないタンパク質が同定された.

(Archs Oral Biol. 35 (9) ; 693, 1990)

遺伝子工学

遺伝子とその産物の 解析技術

5 塩基配列の解読法

タンパク質のアミノ酸配列の決定は、目的タンパク質を高度に精製した上でさらに煩雑な実験操作を必要とするが、目的遺伝子がクローニングできれば、塩基配列を解読してアミノ酸配列を容易に推定できる。

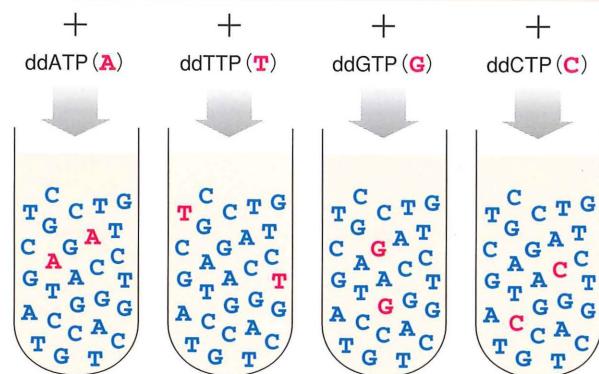
1 塩基配列解読 (DNA sequencing) の原理

解読したいDNA鎖を鋳型としてDNAポリメラーゼを作用させ1塩基ずつ短いDNA鎖を試験管内で合成し、1塩基違いのDNA断片でも分離可能な尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して読み取る。2種類の方法、①化学的方法 (Maxam-Gilbert法)、②酵素的方法 (Sanger法) が開発されている。DNA鎖の合成を終結させてしまうジデオキシヌクレオシド3リン酸 (dideoxynucleoside 3-phosphate; 3'-OH基が3'-Hに化学合成してある) を用いる Sanger法が現在多く用いられている。ここでは Sangerの dideoxy法を例にとって説明する。

2 酵素反応液の組成

- ① 解読する一本鎖の鋳型DNA：一本鎖DNAを複製するM13ファージベクターにクローニングして一本鎖テンプレートDNAをつくる。
- ② DNAポリメラーゼ、 Mg^{2+}
- ③ DNAプライマー：*in vivo*ではDNA鎖の合成を開始させるためにはRNAプライマーが働くが、*in vitro*ではオリゴヌクレオチド自動合成機が開発され、DNAプライマーが用いられている。
- ④ 過剰のデオキシヌクレオチド (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)： ^{32}P 放射性標識 (通常 $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{dATP}$ か $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{dCTP}$) を含む。
- ⑤ 少量のジデオキシヌクレオチド (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)

DNAポリメラーゼ + Mg^{2+} + テンプレートDNA + DNAプライマー
+
(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)



3 酵素反応と解読

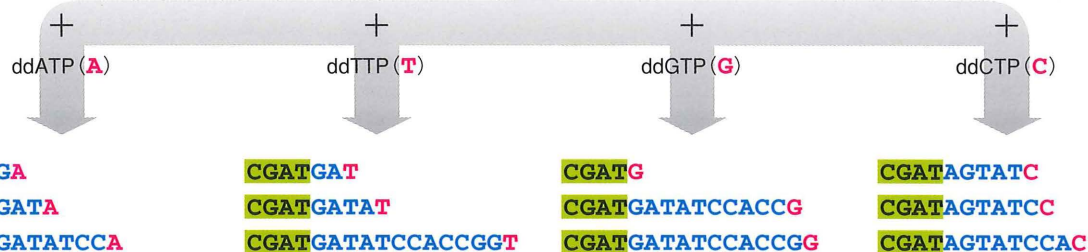
- 1 4種類の各反応液でDNA鎖を合成する。ジデオキシヌクレオチドが取り込まれた場合、DNA鎖の伸長は停止するので1塩基ずつ短いDNA鎖が合成される。
- 2 各反応液を同時に尿素-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。
- 3 ゲルを凍結し、X線フィルムを用いてオートラジオグラフィを行う。
- 4 ^{32}P 放射性エネルギーで感光して形成されたオートラジオグラフのラダーを順番に読んでいく。

また、デオキシヌクレオチドをレーザー感応性の蛍光物質で標識して反応させ、蛍光ラダーを読み取る自動レーザー蛍光DNAシーケンサーが開発されている。この方法によって、短時間に多くの塩基配列が決定できる。解読された遺伝子の塩基配列データは膨大な量になり、コンピューターを用いて保存・解析される。今後、ヒトゲノム計画の進展もあいまって、さらにデータベースが蓄積され、分子生物学、分子遺伝学などの研究はインターネットを利用したデータベースの利用が不可欠になっている。

解読する DNA
 5' CGATGATATCCACCGG 3'
 3' GCTACTATAGGTGGCC 5'

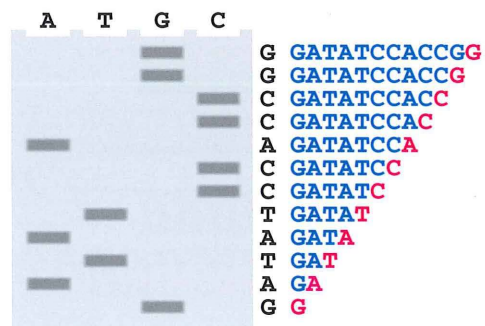
テンプレート DNA 3' GCTACTATAGGTGGCC 5'
 DNAプライマー 5' CGAT

過剰量の dATP, dTTP, dGTP, dCTP



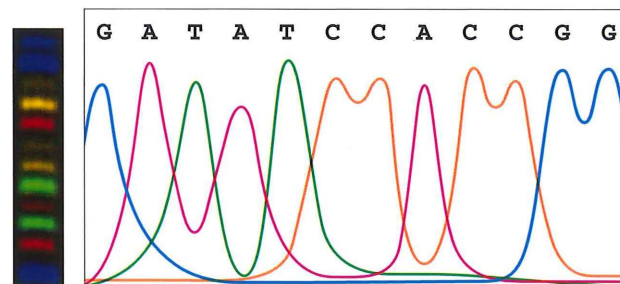
2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

3 オートラジオグラフィ



蛍光剤標識
 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

蛍光レーザーシーケンサー



遺伝子工学

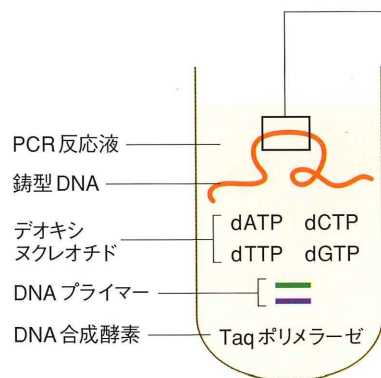
遺伝子とその産物の 解析技術

6 ポリメラーゼ連鎖反応

PCR法によって、細胞・組織からごく微量のDNAを抽出し特定領域DNAを増幅して遺伝子診断などに供することが可能になっている。

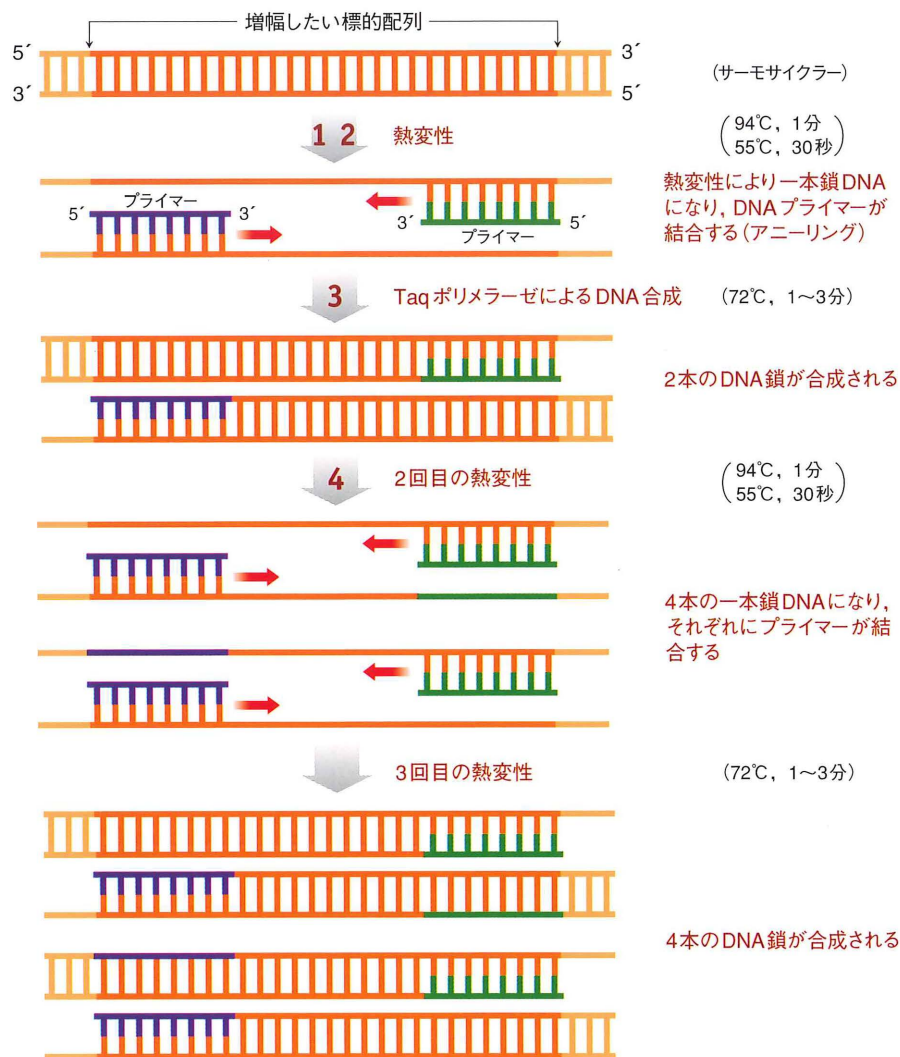
1 PCR (polymerase chain reaction) 法の原理

鋳型となる二本鎖DNAの標的部分をはさむ両端の塩基配列の情報から上流と下流のDNAプライマーを合成し、耐熱性のDNAポリメラーゼ (Taqポリメラーゼ) の応用によって、サーモサイクラーを用いてPCR反応による特定遺伝子領域の増幅を行う。理論的には反応サイクルの 2^n で増幅できるので、たとえば20サイクルでは約 10^6 、30サイクルで約 10^9 の増幅が可能である。



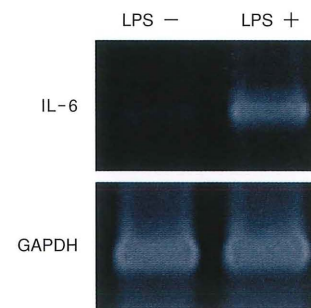
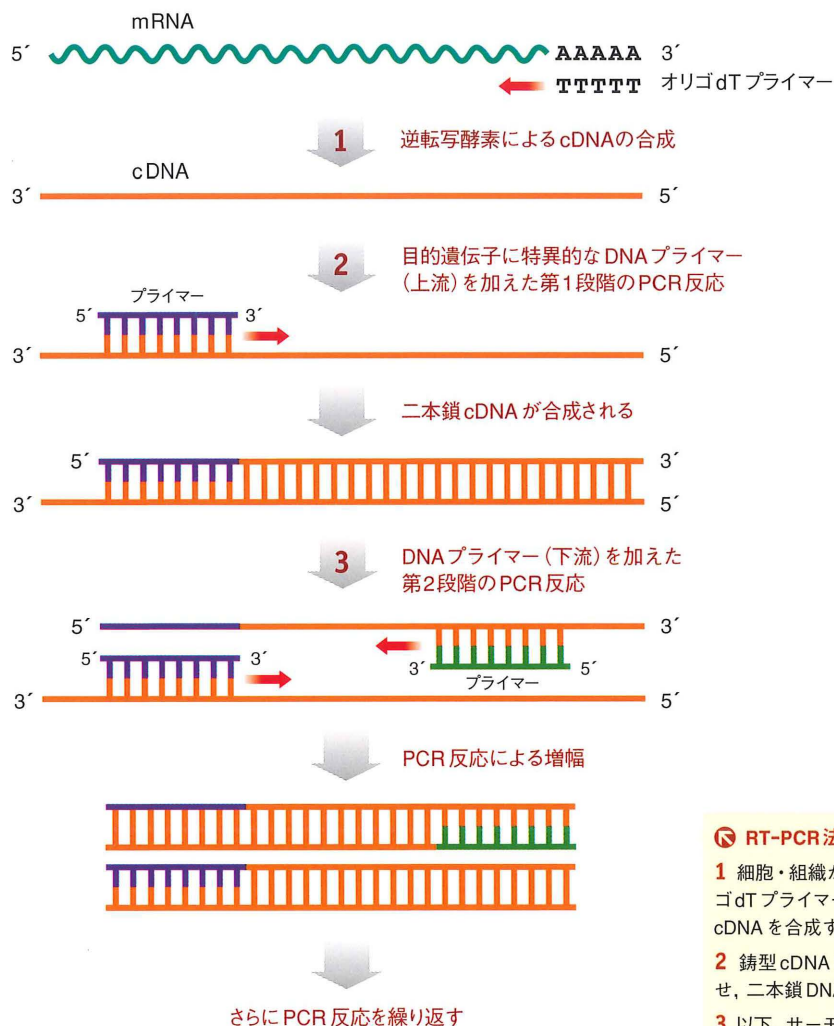
PCR法の原理

- 1 反応液を加熱 (94℃) して、鋳型DNAを一本鎖にする。
- 2 冷却 (55℃) して上下DNAプライマーを標的配列の両端に結合させる。
- 3 加熱 (72℃) してTaqポリメラーゼに鋳型DNAに相補的な新DNA鎖を合成させる。
- 4 再び反応液を加熱して、合成された二本鎖DNAを一本鎖にする。この工程をサーモサイクラーで繰り返す。



2 RT-PCR (reverse transcription-PCR) 法の原理

PCR法と逆転写酵素反応を組み合わせたRT-PCR法は、細胞から抽出したmRNAからcDNAを合成して、これを鋳型にしてPCR法で増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析する技術である。この方法によってmRNA量を推定し、転写レベルの遺伝子発現を定量できる。



⑦ RT-PCR法による実験例

歯周病原菌リポ多糖(LPS)によるヒト歯肉線維芽細胞のIL-6遺伝子発現の影響。

線維芽細胞にLPSを加えて培養し、RNAを抽出してcDNAを合成後、IL-6遺伝子のPCR DNA プライマーを用いてRT-PCRにより遺伝子増幅した。PCR産物をアガロースゲル電気泳動後、観察した。LPS刺激によりIL-6遺伝子発現が促進している。

なお、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) は遺伝子発現の変動が少なく、内部標準として用いられる。

(Mech. Aging Dev. 87 ; 47, 1996)

⑧ RT-PCR法の原理

1 細胞・組織から抽出したmRNAのポリAにオリゴdTプライマーを結合させ、逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。

2 鋳型cDNAに対するDNAプライマーを結合させ、二本鎖DNAを合成する。

3 以下、サーモサイクラーを用いてPCR法で増幅する。

遺伝子工学

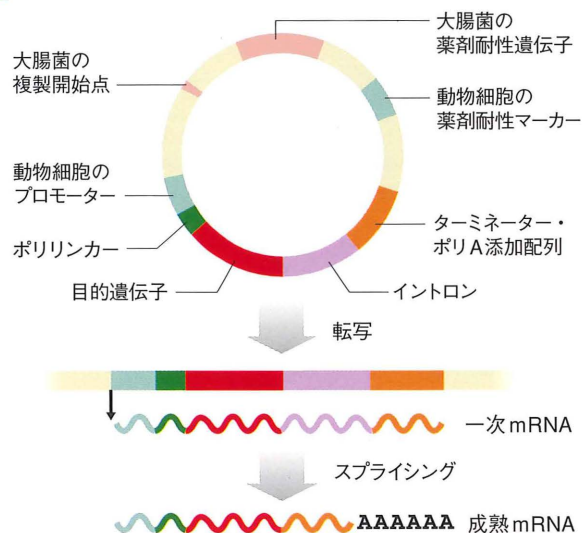
動物細胞への 遺伝子導入

7 動物細胞への遺伝子導入

遺伝子クローニングによって分離された特定遺伝子のDNAを、動物の培養細胞にトランスフェクション (transfection) させて導入する。遺伝子産物の量産や特定遺伝子の生理機能の解明に役立てられている。

1 動物細胞の発現ベクター

① 動物細胞内で発現するプロモーター、② イントロン、転写ターミネーター、ポリA添加配列、③ ポリリンカー (複数の制限酵素切断部位)、④ 薬剤耐性マーカーなどの遺伝子をもつ。薬剤耐性遺伝子は、チミジンの合成阻害剤であるアミノプテリンに対するチミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) やタンパク合成阻害剤であるネオマイシン系のG418に対するアミノグリコシド転移酵素遺伝子などが汎用されている。通常、大腸菌内で複製できるように大腸菌プラスミドを連結してある。このように複数種の宿主内で利用できるものをシャトルベクターという。

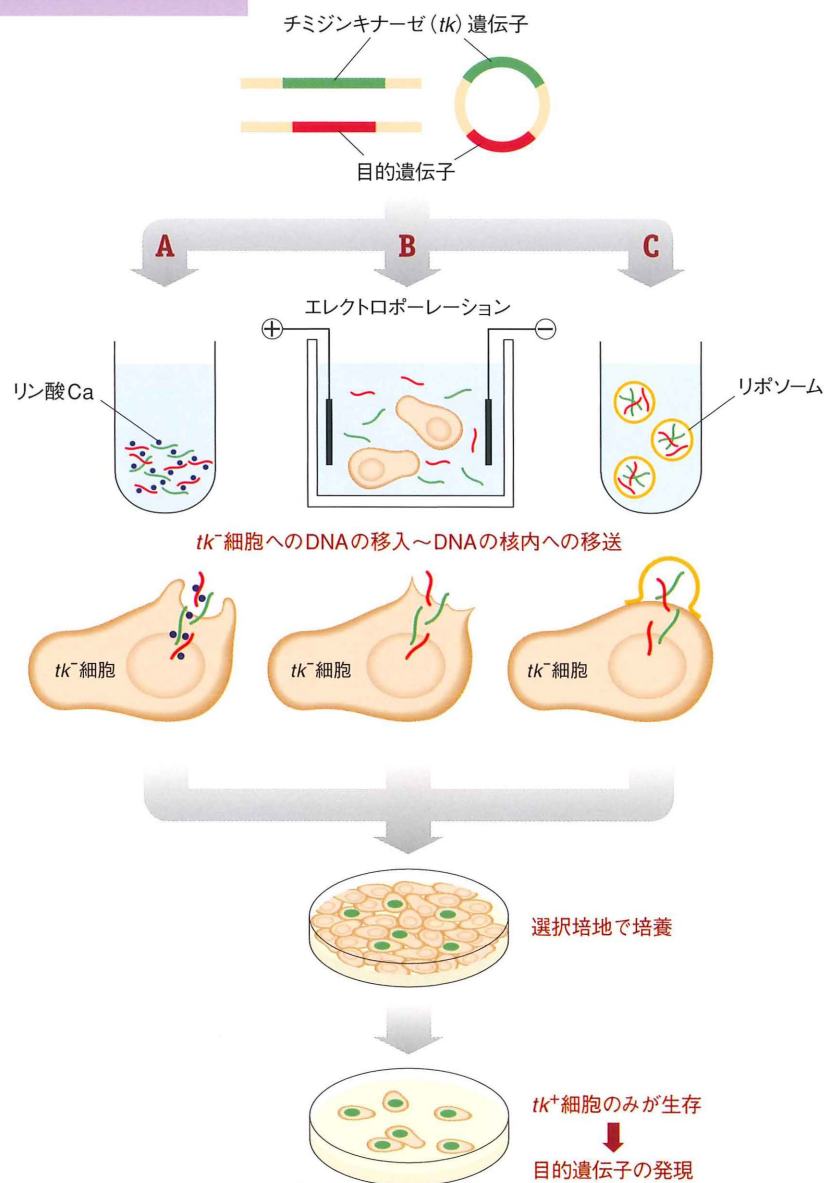


2 培養動物細胞へのDNA導入法

A DNAとリン酸カルシウムの共沈殿物やDNAリポソーム複合体を細胞に吸着させ、食作用を利用して取り込ませる。

B エレクトロポレーションにより細胞膜に一過性の穿孔を起こさせ、DNAを取り込ませる。

C リポソーム (人工的に作製した脂質小胞) にDNAを入れて細胞膜と融合させ、細胞内に移入する。



3 トランスジェニック動物

トランスジェニック動物 (transgenic animal) とは外来遺伝子を人工的に導入された動物で、組換え DNA 技術により単離された遺伝子を受精卵や胚幹細胞に移入して作製する。導入遺伝子は生体の全細胞の同一染色体に組み込まれ、各組織で発現する。この技術はマウスやブタなど種々の動物に対して試みられており、多くは特定遺伝子を過剰発現させる。したがって、遺伝子の発現様式は生体にとって必ずしも生理的でないこともある。

次のような目的で応用されている。

- ① 特異的遺伝子発現の調節機構の解明：たとえば組織特異遺伝子の機能解析や遺伝子発現の調節機構の解明、癌遺伝子の導入による癌の発生と遺伝子の機能解析。
- ② 特異遺伝子産物の過剰生産：たとえば成長ホルモン遺伝子の導入によるジャイアントマウスの作製。
- ③ 種を越えた遺伝子の個体での発現：たとえばヒト MHC 遺伝子のブタへの導入によるブタ臓器のヒト臓器移植への利用。

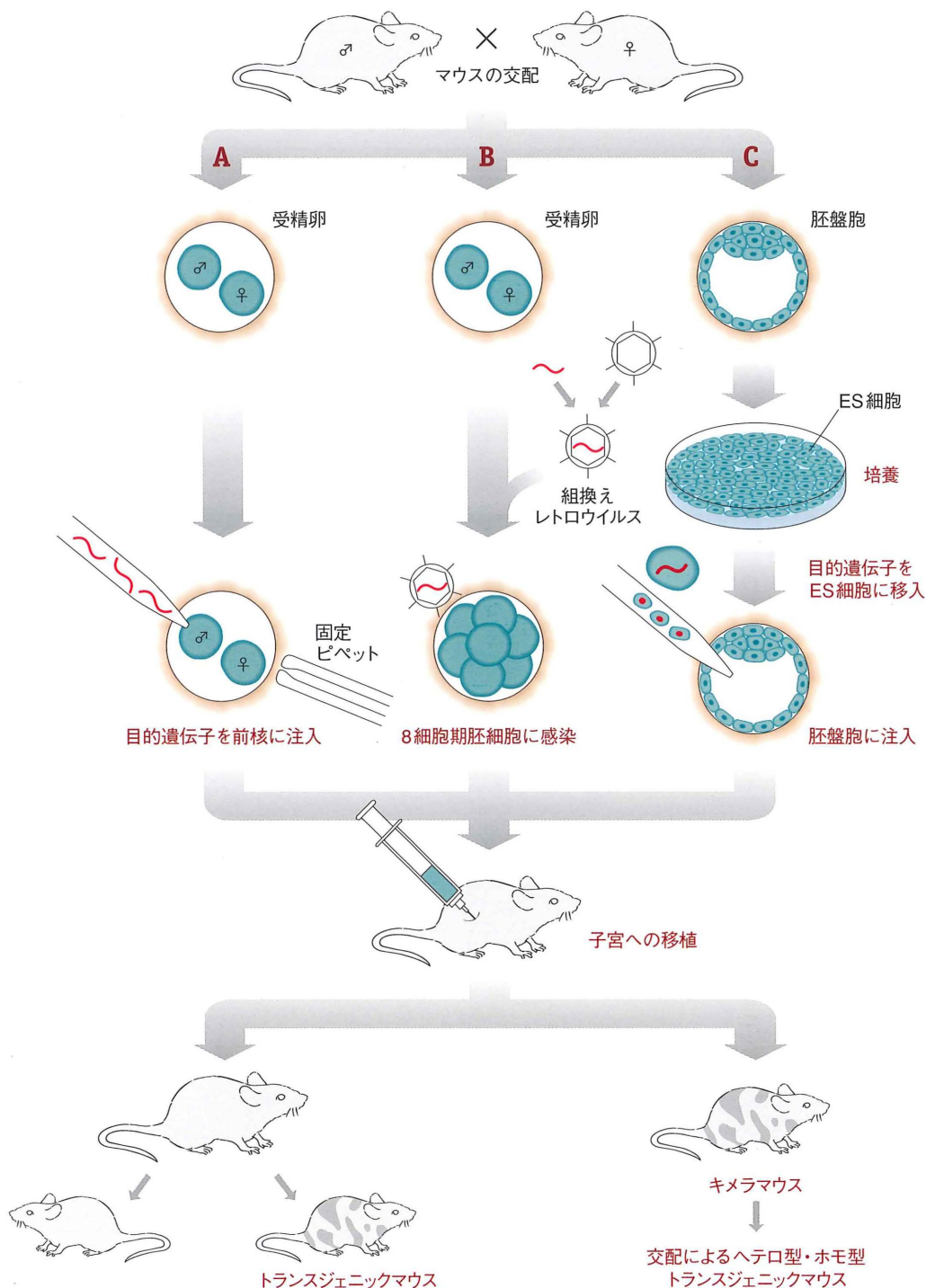
② トランスジェニック動物の作製法

A 受精卵注入法 ① 交尾させた雌マウスの輸卵管から受精卵を採取する。② 目的遺伝子を受精卵の前核中に顕微鏡下でマイクロニードルを用いて注入する。③ 遺伝子移入した受精卵を偽妊娠マウスの輸卵管に移植する。

B レトロウイルス法 ① 交尾させた雌マウスの輸卵管から受精卵を採取する。② 8細胞期の胚細胞に目的遺伝子を組み込んだレトロウイルスを感染させる。③ 目的遺伝子を移入した胚細胞を偽妊娠マウスの子宮に移植する。

C ES細胞法 ① 胚盤胞期の多分化能をもつ内部細胞 (ES細胞 embryonic stem cell; 113 ページ参照) を採取し培養する。② 目的遺伝子をトランスフェクション法、レトロウイルス法、エレクトロポレーション法により ES細胞に導入する。③ 目的遺伝子が導入された ES細胞を胚盤胞に注入する。④ 偽妊娠マウスの子宮に移植する。

目的遺伝子の導入時に薬剤耐性遺伝子を組み込んでおき、ES培養時に薬剤を用いると、目的遺伝子が導入されている ES細胞のみを選択培養できる。また、エンハンサー遺伝子が判明している場合、エンハンサー遺伝子を組み込んでおくこと特定の組織にのみ発現させることができる。たとえば、インシュリンのエンハンサー・プロモーターを組み込んでおくと、膵臓でのみ目的遺伝子を発現できる。

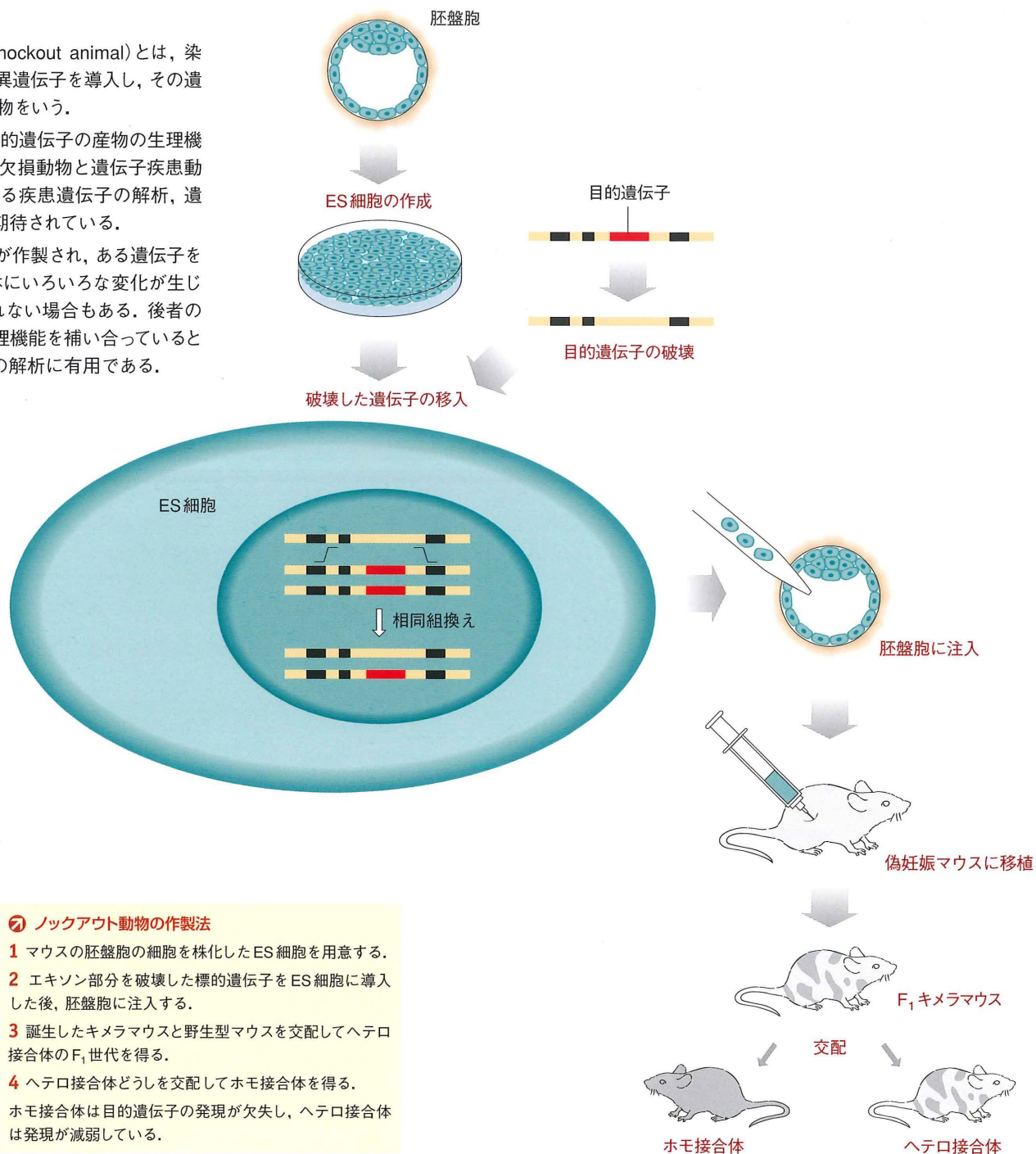


4 ノックアウト動物

ノックアウト動物 (knockout animal) とは、染色体内の特定遺伝子に変異遺伝子を導入し、その遺伝子機能を欠損させた動物をいう。

ノックアウト動物は、① 標的遺伝子の産物の生理機能の解明、② 標的遺伝子欠損動物と遺伝子疾患動物の表現形質の検討による疾患遺伝子の解析、遺伝子治療、などの応用が期待されている。

種々のノックアウトマウスが作製され、ある遺伝子を1つ破壊しただけで、生体にいろいろな変化が生じたり、逆に変化が認められない場合もある。後者の場合、複数の遺伝子が生理機能を補い合っていると考えられ、代謝調節機構の解析に有用である。



5 核移植によるクローン動物

動物の発生を人工的に操作して動物個体を作り出す新しい学問領域として生殖工学、発生工学が確立されつつある。1997年、体細胞クローンヒツジ「ドリー」が誕生した。次いでマウス、ウシなど種々の動物で成功している。2倍体の体細胞の核を用いて、卵子を精子の受精なしに胎児を誕生させるわけであるから、体細胞を供与した動物と全く同じクローンが誕生することになる。通常、卵母細胞を成熟させ、除核未受精卵を作製し、体細胞の核移植や細胞融合法を利用する。

クローン動物の問題点として、体細胞保持未受精卵の移植後、流産、早産、死産が起こることも多い。また、受胎雌では胎盤の巨大化、羊膜水腫、分娩の微弱徴候、後産の停滞などが、産仔では過大仔、臍帯肥大、右心室肥大、低酸素症、低ヘモグロビン値、リンパ球減少などの異常がみられる。その原因として、用いた体細胞のテロメア長、ミトコンドリア遺伝子が移植されないこと、などが議論されているが明らかでない。

現在、日本ではヒトクローン規制法によって、クローン人間を作製すること、ヒトか動物か判断できない個体を誕生させることは禁じられている。動物の特定胚細胞にヒト細胞を混合する動物性集合胚の作製や、ヒト遺伝子を持つ胚を作製して幹細胞を取り出す研究は認められており、再生医療への応用が期待されている。

核移植によるクローン動物

動物	ドナー細胞
マウス	卵丘、卵胞上皮、尻尾
ヒツジ	乳腺、胎仔
ヤギ	胎仔
ウシ	卵丘、卵管、耳、筋肉

核移植の受精卵の時期

	2細胞	4細胞	8-16細胞	桑実胚	胚盤胞	ES細胞
マウス	_____					
ヒツジ		_____				
ヤギ		_____				
ブタ		_____				
ウシ			_____			
サル			_____			

いろいろな動物に対して核移植によるクローン動物の作製が試みられており、容易に採取できるドナー細胞を含めて用いられ、成功している。また、発生過程における生殖系上の細胞核の発生能力が検討され、2細胞期から胚盤胞あるいはES細胞の核移植で種々の動物のクローンが作製され、移植した核が全能性をもつことが示された。



クローンヒツジ「ドリー」

6歳の妊娠ヒツジの乳腺培養細胞の核を、染色体除去した未受精卵に核移植して発生させ、受胎雌に移植した。

(Ian Wilmut, et al. : *Nature* 385 ; 812, 1997)



クローンウシ

15日目の子牛の耳から採取した皮膚細胞をドナー細胞核として核移植で誕生したクローンウシ。このケースでは出産51日に死亡している。

(Renard JP, et al. : *Lancet* 353 ; 1489, 1999)

クローン



コントロール



クローンマウスの異常

一般にクローン胎児の流産率は高く、また核移植によって作製されたクローンマウスの胎盤は、コントロールに比べて2〜3倍の大きさをもって生まれる。

(若山輝彦、柳町隆造 : *Nature Genetics* 22 ; 127, 1999)

遺伝子工学

遺伝子診断 gene diagnosis

8 DNA 診断

DNA プローブを用いたサザンブロット法を利用して、疾患遺伝子の異常を判定したり、標的遺伝子と連鎖している遺伝子や反復配列の多型を調べることによって遺伝子疾患の保因者を発症前、出生前に診断することができる。

1 疾患遺伝子の検出法

検出用 DNA マーカーは、染色体の目印として連鎖解析に重要であり、対立遺伝子 (allele) を認識するためには多型に富む必要がある。①制限酵素断片長多型 (RFLP)、②ミニサテライト多型、③マイクロサテライト多型が用いられている。

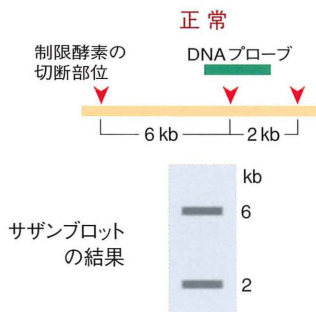
④PCR-SSCP 法：mRNA から cDNA を合成し、PCR 法で増幅した DNA を一本鎖にしてハイブリダイズさせ、ゲル電気泳動法で正常遺伝子 DNA と移動度の違いを観察する。1 塩基の違いでも異常を検出することができる。

⑤PCR-シーケンシング法：ベクターへの挿入に都合のよい制限酵素切断配列と疾患遺伝子の PCR 用プライマー配列を連続させた DNA プライマーを用いて増幅し、塩基配列読用のプラスミドベクターに組換えて塩基配列を直接読解する。

細菌やウイルスなどの病原因子や特異遺伝子 DNA プローブを用いた感染症の DNA 診断も可能になっている。

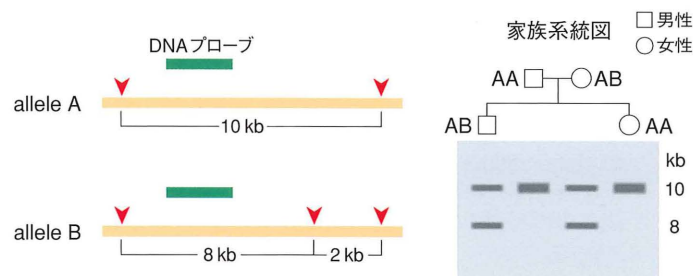
④ RFLP 分析の基本原則

制限酵素で切断した標的 DNA 断片をゲル電気泳動後、疾患遺伝子を DNA プローブを用いてサザンブロット分析を行い、遺伝子の欠失、塩基置換、再編成などを判定する。



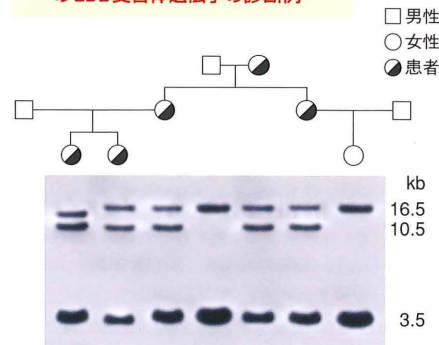
2 制限酵素断片長多型 (RFLP ; restriction fragment length polymorphism)

個体の違いにより遺伝子座の多型があるように、遺伝子の塩基配列にも多型性をもつ部位があり、制限酵素による切断パターンが異なる。これを利用して、DNA プローブを用いてサザンブロット法により RFLP を示す多型性を検出することができる。ある遺伝子疾患と RFLP とが連鎖しているとき、RFLP を示す部位と病因遺伝子との染色体上での位置が接近していると減数分裂時の交叉の確率は低く、分離せずに子孫に伝承されることから、遺伝子疾患を診断することができる。

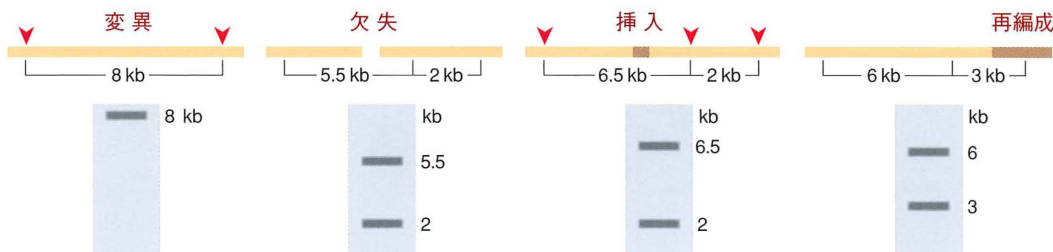


④ RFLP 分析による連鎖解析の原理

④ 家族性高コレステロール血症患者の LDL 受容体遺伝子の診断例



LDL 受容体を用いた RFLP 分析



5 PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法

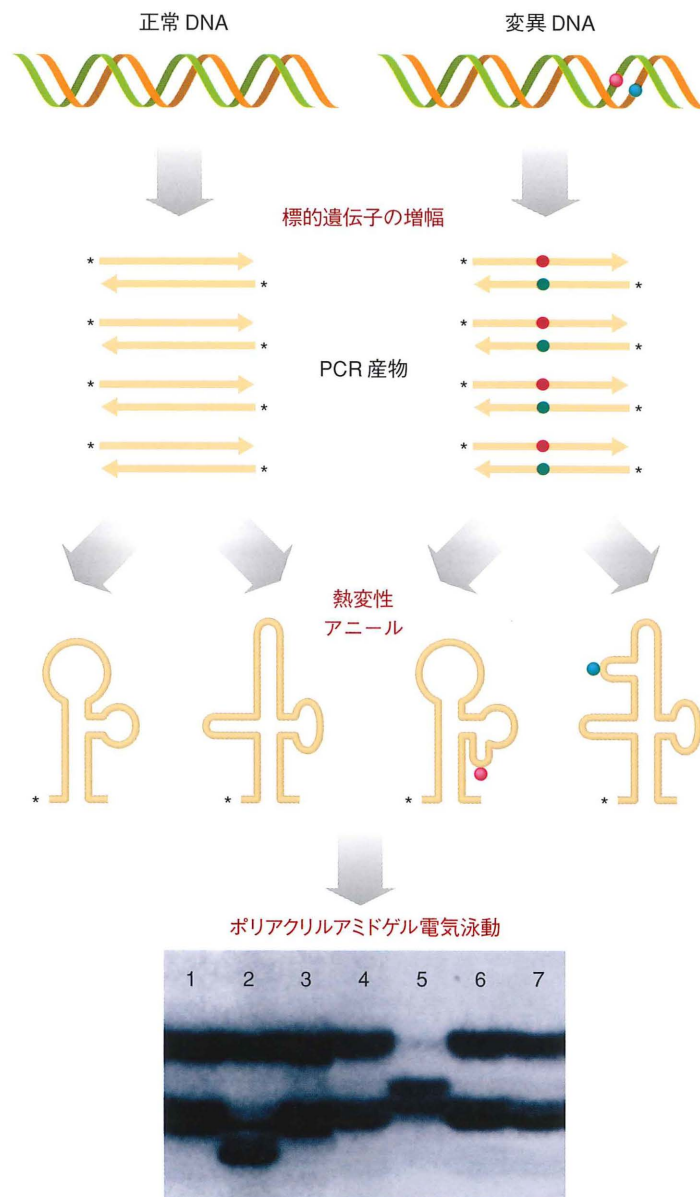
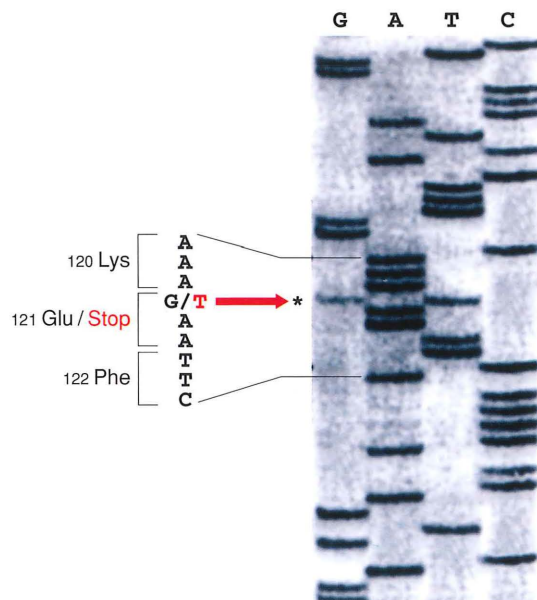
一本鎖DNAは、部分的な塩基対の形成を含め、種々の分子内相互作用によって複雑かつ塩基配列特異的な高次構造をとる。そこで、PCR法で増幅した標的DNAを一本鎖にし、ゲル電気泳動によって正常遺伝子との移動度の違いを観察する。この方法により、1塩基の異常でも検出することができる。また、mRNAからcDNAを合成して、疾患遺伝子を増幅して行うRT-PCR-SSCP法も有効である。

6 PCR-シーケンシング法

標的遺伝子のPCR用DNAプライマーを合成し、患者から採取したDNAをテンプレートに標的遺伝子をPCR法で増幅し、塩基配列解読用のプラスミドベクターにクローニングして、塩基配列を直接解読する。その塩基配列を正常遺伝子と比較して変異を検出する方法である。

PCR-シーケンシング法の実例

悪性貧血のサラセミアは、ヘモグロビンタンパク質であるグロビンの遺伝子異常により発症する。βグロビンは第11染色体に1つ存在し、遺伝子異常のヘテロ接合型では軽度の、ホモ接合型では重度の悪性貧血を起こす。この例は、片方の対立遺伝子のβグロビン遺伝子の121番目のコドンの1番目の塩基がGからTに置換（*印のバンドの濃さが他のバンドより薄いことに注意）したために起こった遺伝子のナンセンス変異をもつヘテロ接合型の患者例である。



PCR-SSCP法の原理

- 1 特異PCRプライマーを用いて標的遺伝子を増幅する。
- 2 PCR産物を熱変性により一本鎖にし、高次構造を形成させる。
- 3 ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動パターンを比較する。図中では2, 5の患者に変異が認められる。

遺伝子工学

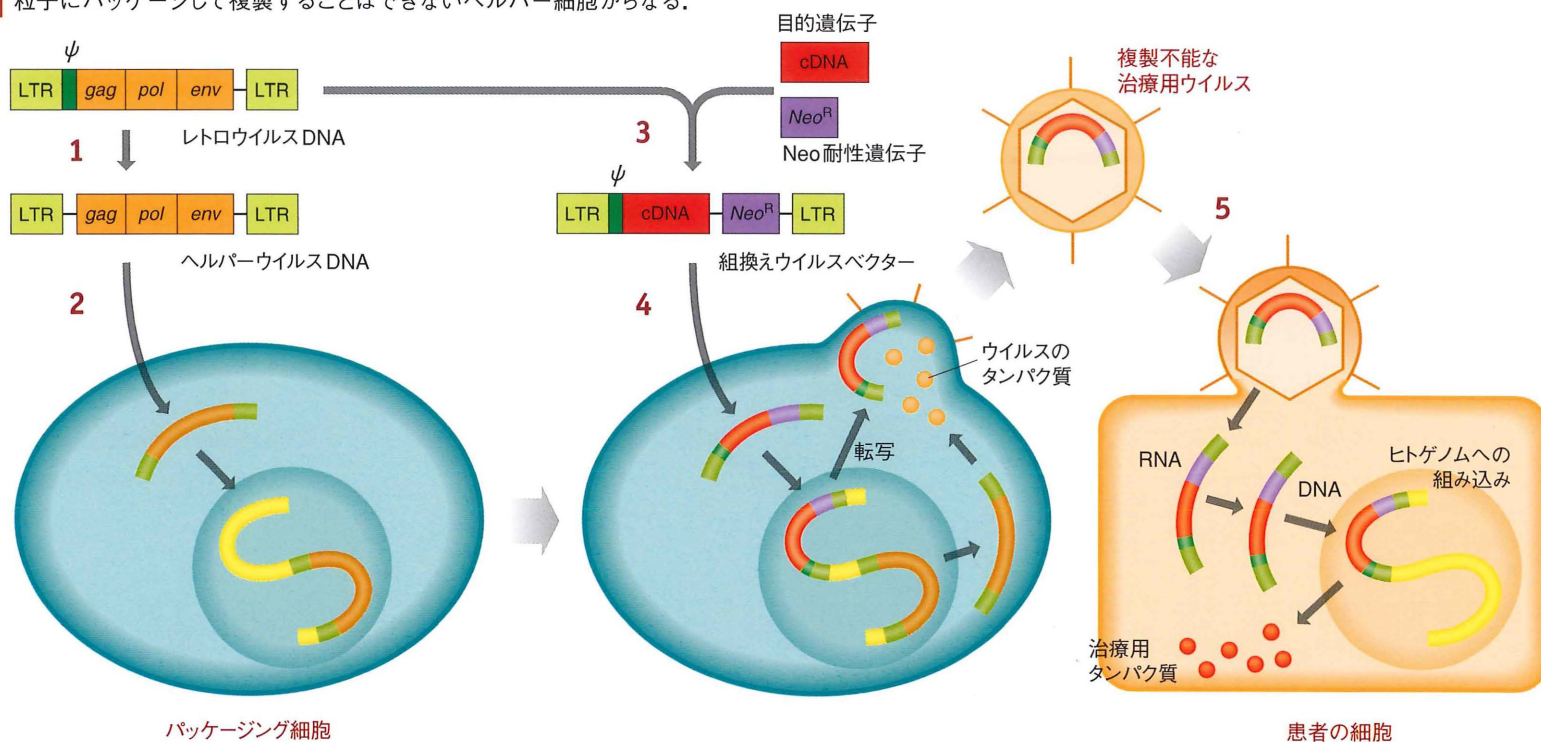
遺伝子治療 gene therapy

9 遺伝子治療

遺伝子異常の結果、遺伝子産物欠損や生理的機能欠失を引き起こした遺伝子疾患に対して、クローニングした正常遺伝子を発現させることで治療が可能である。また、癌の遺伝子治療が試みられている(152ページ参照)。

1 レトロウイルスベクター系による遺伝子治療

ヒトへの遺伝子導入にはレトロウイルスベクター系が最もよく用いられている。この系は、①パッケージングシグナルをもつウイルスベクターと、②レトロウイルスの構造タンパク質遺伝子をもつがウイルスゲノムをウイルス粒子にパッケージして複製することはできないヘルパー細胞からなる。



A パッケージング細胞の調製

- 1 レトロウイルス遺伝子中のパッケージングシグナル(ψ)を除去し、ヘルパーウイルスを作製する。
- 2 ヘルパーウイルスを宿主細胞に感染させ、パッケージング細胞を調製する。

B 複製不能ウイルスの調製

- 3 レトロウイルスの構造遺伝子(*gag*, *pol*, *env*)を除去し、SV40プロモーター(SV40)、ネオマイシン耐性遺伝子(*Neo^R*)、目的遺伝子(cDNA)を挿入して、組換えウイルスベクターを作製する。(SV40により*Neo^R*が、LTRにより目的遺伝子が発現する)
- 4 組換えウイルスベクターをパッケージング細胞に導入して、感染能をもつ組換えウイルス粒子を回収する。

C 標的細胞への導入

- 5 ウイルス粒子を標的細胞に感染させる。組換えウイルスの目的遺伝子が標的細胞のゲノムに組み込まれる。構造遺伝子を欠いたためウイルス粒子は産生されず、目的とする治療用タンパク質のみが産生される。

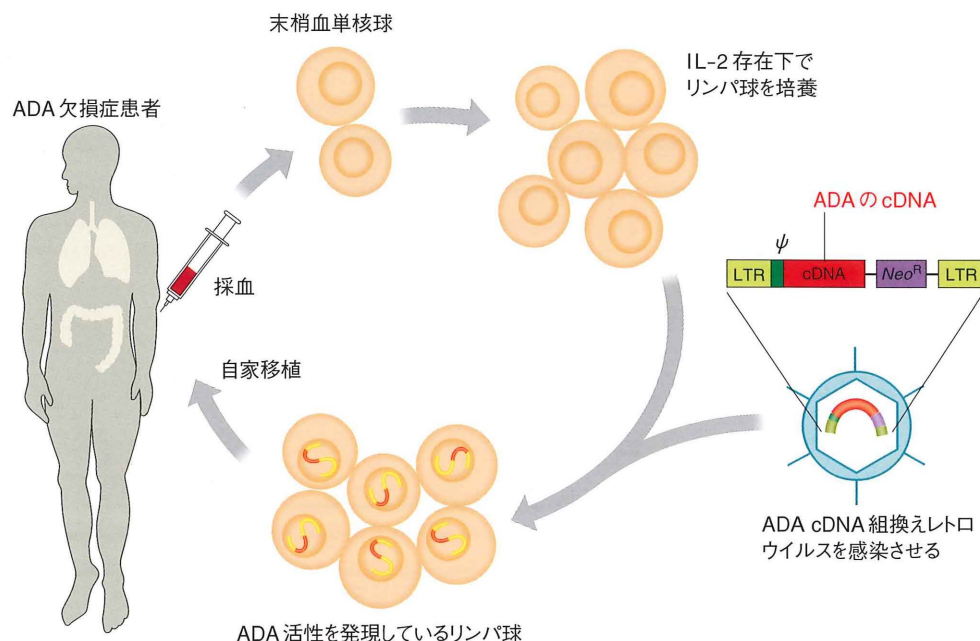
2 ADA 欠損症に対する遺伝子治療

アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase ; ADA) は、アデノシン、デオキシアデノシンの脱アミノ酵素である。本酵素遺伝子の異常により幼若T細胞にアデノシン、デオキシアデノシンが蓄積し、増殖抑制や機能異常を起こし、重症複合型免疫不全症の原因となる。

リンパ球を用いた遺伝子治療の結果、ADA 活性の増加に伴ってT細胞数が増加し、抗体産生能、免疫能が再建された。

⇒ ADA 欠損症の遺伝子治療

- ① 患者の末梢血単核球を採取する。
- ② IL-2 存在下で培養してリンパ球を増殖させる。
- ③ ADA cDNA の組換えレトロウイルスを感染させる。
- ④ ADA 活性を発現しているリンパ球を患者に投与する。



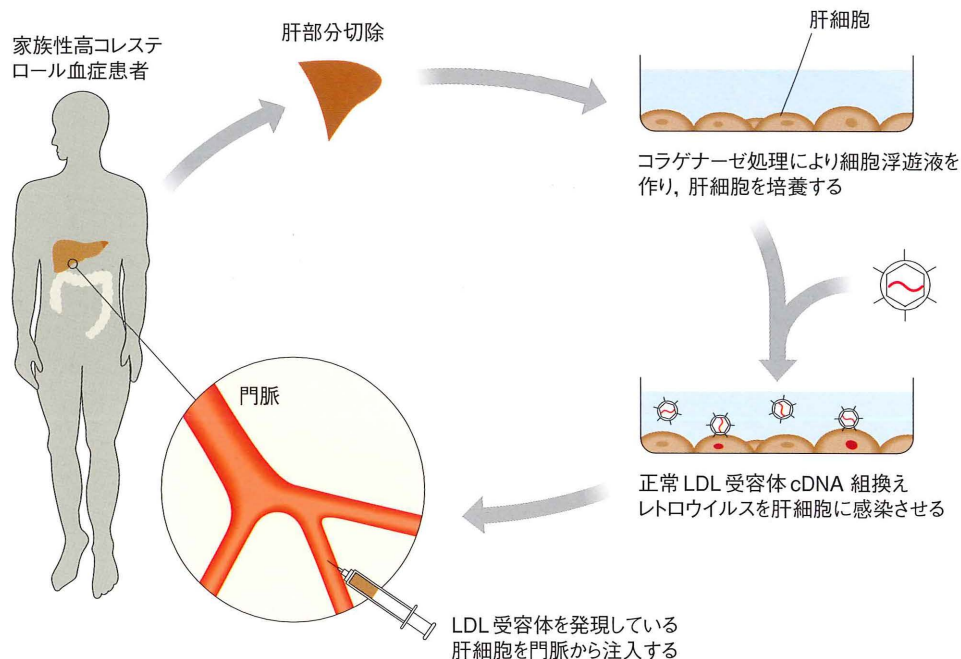
3 家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療

血中の低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein ; LDL) は、細胞膜の LDL 受容体を介して末梢組織へコレステロールを輸送している。LDL 受容体遺伝子に異常が起こると、血中 LDL 量が増大し、動脈壁に沈着してアテローム性動脈硬化症の原因となり、心筋梗塞を発症する。

肝細胞を用いた遺伝子治療の結果、肝細胞で LDL 受容体が発現し、血中 LDL 量が低下した。

⇒ 家族性高コレステロール血症の遺伝子治療

- ① 患者の肝臓を部分切除する。
- ② コラゲナーゼ処理により細胞浮遊液を作り、肝細胞を培養する。
- ③ 肝細胞に正常 LDL 受容体 cDNA の組換えレトロウイルスを感染させる。
- ④ LDL 受容体を発現している肝細胞を経門脈的に移植する。



遺伝子工学

ヒトゲノム解析

10 ヒトゲノム解析

国際協力によりヒトゲノム解析を推進する組織、HUGO (Human Genome Organization) が設立され、2001年、ヒトゲノムの全塩基配列 (約30億塩基対、機能的な構造遺伝子以外も含む) が解読された。

1 ヒトゲノムプロジェクト

数十kb～Mb (10^6 b) にも及ぶ巨大なDNA断片を分離できるパルスフィールドゲル電気泳動法、40～50kbのDNA断片のコスミドゲノムライブラリー作製法、50kb～2Mb DNA断片をクローニングできる酵母YACベクターの開発、また、大規模DNAシーケンシングやコンピュータを利用した大量情報処理技術の進歩により、ヒト全ゲノム解析の最終目的の達成が可能となった。

従来より、病因に関連する特異的機能をもつタンパク質遺伝子を標的とする機能的クローニング (functional cloning) が行われてきた。これに対して、遺伝子の位置関係をもとにした連鎖解析による疾患遺伝子の同定が可能となり、位置的クローニング (positional cloning) が進められている。詳細なヒト全ゲノム染色体地図が完成すれば、生命現象の遺伝子レベルでの解明、遺伝子疾患や癌など遺伝子に起因する種々の疾患の解明に計り知れない貢献が期待される。

2 cDNA プロジェクト

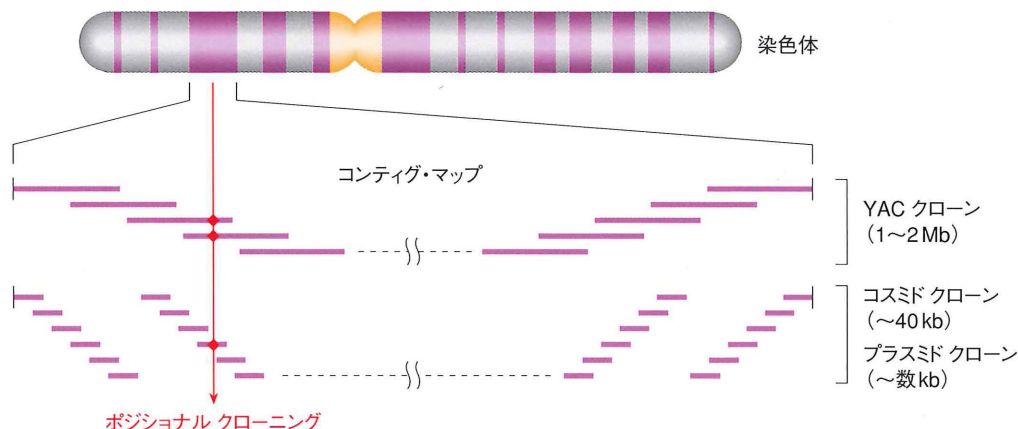
ヒトゲノムの全塩基配列の解読が終了したといっても、真核細胞では遺伝子の転写、タンパク質合成の過程にはmRNA スプライシング機構があり、エキソンとイントロンが連続するゲノムDNAのドラフトシーケンスから明確なスプライシング部位あるいはオープンリーディングフレームを特定することは困難である。

当然ながら、あらゆる細胞からmRNAを回収してcDNAクローニングを行い、cDNAを解析すれば、ヒトの構造遺伝子の全体像をとらえることが可能である。このような発現遺伝子を網羅的にデータベース化する計画をcDNAプロジェクトという。最終的にはすべての発現遺伝子の完全長cDNAの解明そしてデータベース化が必要であり、ドラフトシーケンスのゲノムプロジェクトの情報と相互利用して初めて真のヒトゲノムプロジェクトが完成するといえる。

3 EST プロジェクト

cDNAプロジェクトにおいて、すべての発現遺伝子の完全長塩基配列を網羅的に決定するには膨大な時間がかかる。そこで、完全長でなくともEST (expressed sequence tag) と呼ぶ発現遺伝子cDNAの一部配列のデータベースをまず構築し、細胞内で発現している遺伝子を網羅的におさえて全体像を理解し、かつゲノム研究に応用しようというのがESTプロジェクトである。

具体的には、細胞・組織からmRNAを回収し、ポリAにオリゴdTを結合させて逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、発現遺伝子cDNAライブラリーを作製する。各cDNAの完全長塩基配列か5'末端あるいは3'末端の300～500塩基対を片っ端から決定し、DNAデータベースとホモロジー検索を行い、同一の配列遺伝子があれば新たに新規遺伝子あるいはEST遺伝子としてデータベースに登録する。現在ヒトでは300万以上のEST情報が蓄積されている。これらESTクローンは機能不明の遺伝子も多数含むことから、ESTデータベースを応用して未知遺伝子を発見する糸口になる。事実、遺伝性大腸癌の原因遺伝子の発見に役立っている。



⑤ ヒトゲノム染色体地図の作成

2つの遺伝子間の減数分裂時の組換え率が1%のとき、その遺伝的距離をセンチモルガン (cM) 単位で表す。1 cMに相当するDNAの平均的長さは1 Mbである。連続した長いDNA断片が一部重なり合っている染色体地図をコンティグ地図 (contig map) という。酵母YACクローンの長いDNA断片は、扱いやすい大腸菌のP1ファージ、コスミド、プラスミドによるライブラリーによりさらに解析される。

遺伝子工学

バイオインフォマティクス bioinformatics

11 ゲノム機能科学

ゲノム、発現遺伝子、タンパク質に関する大量のデータベースが構築されつつある。これらを用いてゲノム機能を系統的、網羅的、ハイスループットに解明することが可能になっている。

📌 ゲノム機能科学の全体像

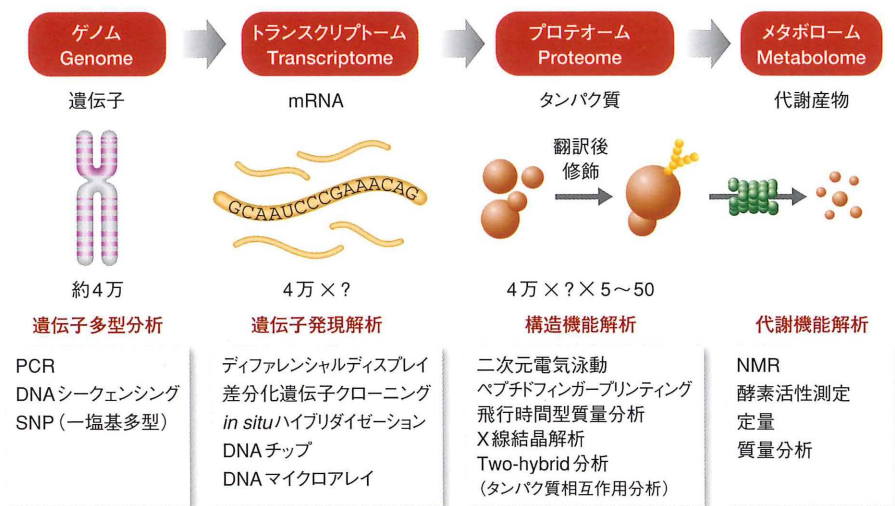
1 ゲノム機能科学とは

遺伝情報は、DNAからmRNAへの転写、そしてタンパク質合成へと流れていく。ゲノムの情報に対して、mRNAレベルの情報を総括してトランスクリプトーム(transcriptome)、遺伝子産物すなわちタンパク質の情報を総括してプロテオーム(proteome)、機能タンパク質の代謝における情報を総括してメタボローム(metabolome)と呼ぶ。これらの情報データベースを利用して統括する学問体系をバイオインフォマティクス(bioinformatics; 生物情報科学)という。

2 ゲノム

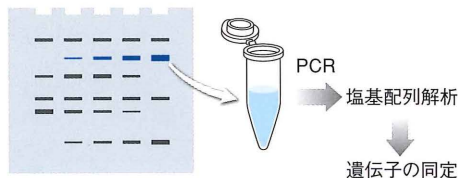
ヒトゲノムプロジェクトの完成によって膨大なヒト遺伝子の塩基配列が明らかにされ、遺伝子数、全遺伝子構造、非転写領域のデータベースが構築されている。このデータベースを用いて個人の遺伝子多型を分析すれば、疾患遺伝子の同定、そしてカスタムメイド医療に役立てられる。

各個人でのDNA塩基配列の1塩基の違いによる多型を一塩基多型(SNP; single nucleotide polymorphism)という。SNPは任意の染色体を比較した場合、およそ1000~2000塩基ごとに1塩基存在する。DNA複製時のDNAポリメラーゼは1億回に1回のミスを起こすと考えられており、ヒトゲノム30億塩基対、2倍体を考慮すると、世代交代で60カ所程度ミスが生じることになる。SNPは疾患原因遺伝子とリンクしていると考えられていることから、疾患原因遺伝子の探索、診断に役立つ。



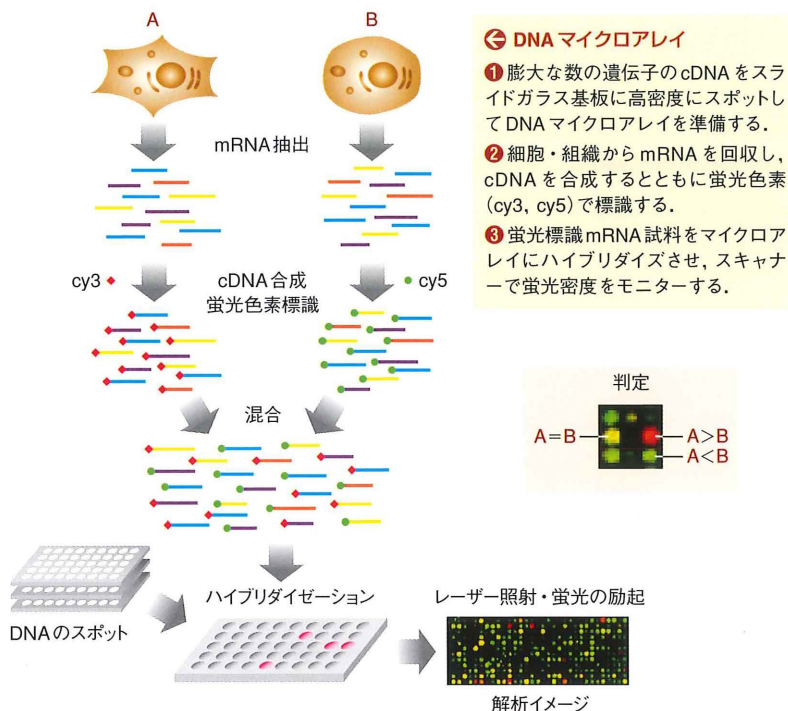
3 トランスクリプトーム

ゲノムはある生物に1セットしか存在しないが、mRNAは時間的・空間的な分布をもつ。また、1遺伝子から複数のmRNAが転写されうる。ヒトゲノムプロジェクトの結果から、ヒト全遺伝子数は約4万と想像されているが、ある瞬間のある細胞は、約6000~8000遺伝子がmRNA種として発現していると考えられている。このmRNA種とその発現レベル情報の総括をトランスクリプトームという。遺伝子の発現プロファイル解析は、バイオインフォマティクス研究の重要な情報となる。



📌 ディファレンシャルディスプレイ

- ① 複数のmRNA試料から任意の配列プライマーを用いてPCRを行い、cDNAを増幅する。
- ② PCR産物をゲル電気泳動して得られるフィンガープリントを比較することで、特異発現遺伝子を同定する。
- ③ 同定したDNAバンドをゲルから回収して再度PCR増幅し、塩基配列を解析する。



DNA マイクロアレイ

- 膨大な数の遺伝子のcDNAをスライドガラス基板に高密度にスポットしてDNAマイクロアレイを準備する。
- 細胞・組織からmRNAを回収し、cDNAを合成するとともに蛍光色素 (cy3, cy5) で標識する。
- 蛍光標識mRNA試料をマイクロアレイにハイブリダイズさせ、スクリーンで蛍光密度をモニターする。

4 プロテオーム

mRNAから翻訳されるタンパク質も時間的・空間的な分布を示すが、さらに翻訳後修飾によって多様な機能分子として生命現象を司る。すなわち、翻訳、合成されたタンパク質は、プロセッシング、ジスルフィド結合 (S-S)、リン酸化、糖鎖付加、脂肪酸付加などの生化学的変化によって機能タンパク質になる。これらの発現タンパク質種の同定、発現量、そしてタンパク質間の相互作用を解析することは、生命現象の理解、疾患の理解、治療法の開発、創薬に重要である。解析技術として、①二次元電気泳動法、②飛行時間型質量分析、③タンパク質間相互作用分析がある。

タンパク質の抽出・可溶化

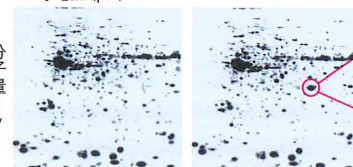
二次元電気泳動

限定分解



分子量 ↓

等電点 (pH) →



プロテアーゼ消化

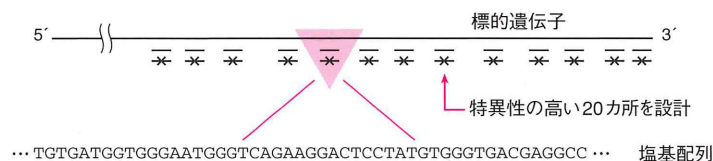
質量分析

飛行時間型
質量分析器

データベース検索

④ プロテオーム解析技術

- タンパク質試料を一次元では等電点で、二次元では分子量で電気泳動し、比較する。
- 発現量の異なるタンパク質スポットを同定し、回収する。
- ゲル中のタンパク質をトリプシンなどで限定分解したのち、ペプチド断片を回収する。
- 飛行時間型質量分析器を用いて各ペプチドの質量分析を行う。
- 分析結果をプロテオームデータベースと照合し、検索する。

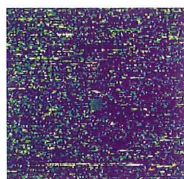


⑤ ジーンチップ

- 標的遺伝子の塩基配列データから特異性の高い領域を25塩基20カ所、完全マッチ、ミスマッチオリゴヌクレオチドを設計し、チップ上に直接合成する (計40wellで1遺伝子の種類とmRNAレベルを判定)。
- 試料のmRNAを蛍光標識し、断片化して、ハイブリダイズさせる。
- 完全マッチ、ミスマッチのオリゴヌクレオチド合計40カ所に結合した蛍光強度をモニターし、解析する (1.28 cm²のチップで1万以上の遺伝子のmRNAレベルをモニターできる)。



ジーンチップ



解析イメージ

MEMO

二次元電気泳動

一次元目に等電点電気泳動、二次元目にSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を組み合わせて分離する。タンパク質の電荷と分子量で分離するので、多数のタンパク質を高度に分離できる。

飛行時間型質量分析

タンパク質、ペプチドを真空中でイオン化し、電磁場中での飛行時間から質量と電荷数を分析する。種々のタンパク質、ペプチドの分析結果のデータベース化が進んでおり、遺伝子産物の同定に役立てられている。

遺伝子工学

バイオインフォマティクス
bioinformatics

12 ゲノム創薬

疾患のバイオインフォマティクス研究の成果を利用して、標的遺伝子の同定とその有効性を網羅的・効率的に研究することで、新たな医薬品の開発が期待できる。

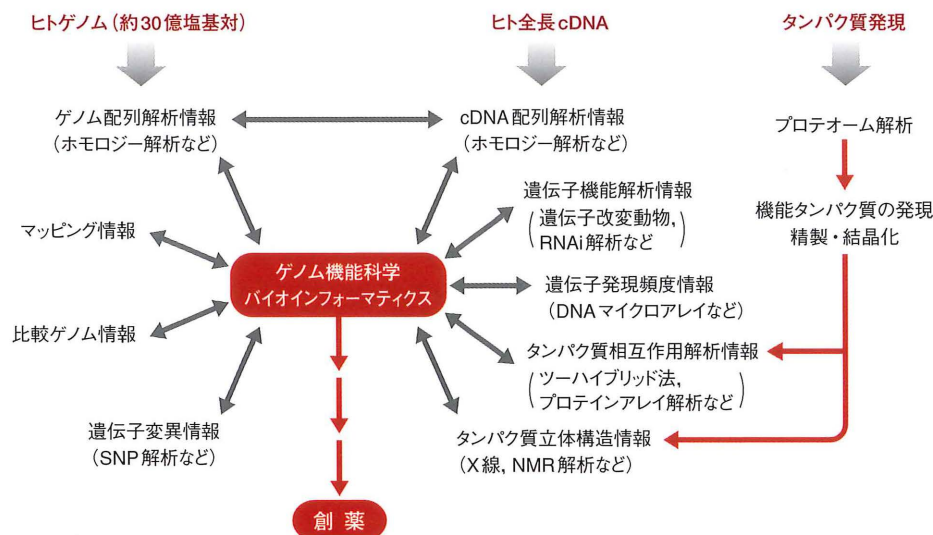
🔍 ゲノム創薬の戦略

1 標的遺伝子の同定

正常と疾患の両組織・細胞から mRNA を回収し、網羅的なトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行うことで、標的分子としての有効性を判定する。

2 標的遺伝子の有効性判定

細胞に標的遺伝子を導入して発現を促進したり、あるいは標的変異遺伝子の発現を抑制することで疾患の病態にどのように関与するかを調べ、有効性を確かめる。さらに、標的遺伝子のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作製することで、生体レベルでの有効性を判定する。



🔍 タンパク質構造情報と創薬

- 1 標的タンパク質を結晶化してX線結晶解析、あるいはNMR法によって立体構造を解析する。
- 2 立体構造の情報に基づいてシード化合物を検索する(標的タンパク質の活性部位の分子形状、性質、アミノ酸側鎖の動的解析、水分子の役割、リガンド、アゴニスト、アンタゴニスト情報、基質特異性などを考慮して、コンピュータ上で化合物のデータベースから医薬品のバーチャルスクリーニングを行う)。
- 3 シード検索で得たヒット化合物群からさらにリード化合物を検索する(化合物と標的タンパク質の複合体の共結晶化、複合体NMR構造の情報を利用して、リード化合物を選抜、あるいは修飾、合成を行う)。
- 4 最終医薬品の開発に向けて、薬理動態、毒性試験を行う。

