

---



---

 シンポジウム
 

---



---

## 遺伝子工学と医学

Gene Technology and Medicine

第 422 回新潟医学会次第

 日 時 昭和61年10月18日(土)午後2時から  
 会 場 新潟大学医学部研究棟第II講義室

司 会 緒方規矩雄教授(生化学第一)

 演 者 三嶋行雄(生化学第一), 高橋康夫(神経薬理), 吉田光昭(癌研究会癌研究所ウイルス腫瘍部),  
 高木康敬(藤田学園保健衛生大学医学部総合医科学研究所分子遺伝学部門)

## 1) 遺伝子操作の概略

(主任: 緒方規矩雄教授) 三 嶋 行 雄

The outline of recombinant DNA technology

Yukio MISHIMA

*Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine*
*(Director: Prof. Kikuo OGATA)*

I introduce the outline of recombinant DNA technology. The most important techniques used in recombinant DNA technology are (1) specific cleavage of DNA by restriction endonucleases, DNA synthesis by DNA polymerase or reverse transcriptase, and DNA ligation by DNA ligase, (2) DNA cloning procedures to utilize plasmids or viruses as a vector so that a specific DNA fragment can be amplified in bacteria cells, (3) nucleic acid hybridization to identify the specific sequences and (4) DNA sequencing to determine the nucleotide sequence of cloned DNA fragments.

---

 Key words: recombinant DNA technology, DNA cloning,  
 遺伝子操作, DNA クローニング
 

---

 Reprint requests to: Yukio Mishima,  
 Department of Biochemistry, Niigata  
 University School of Medicine, Niigata  
 City, 951, JAPAN.

 別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
 新潟大学医学部生化学第一教室

三嶋行雄

遺伝子操作法の導入により、酵素的・化学的に合成されたり、細胞から抽出してきた遺伝子 DNA を自己複製するプラスミドやファージ DNA に連結し、増殖速度の速い大腸菌や酵母細胞に導入し、目的とする遺伝子を増殖させ大量に得ることができるようになった。この遺伝子操作法は、種々の技術が集大成されたものであるが、その重要なものとして次の4つに大別される技術の発展によるものであろう。それらは、①DNA の特異的塩基配列を認識して切断する制限酵素の発見や DNA を合成したり、連結する酵素類の開発、②特異的遺伝子 DNA をベクターと呼ばれるプラスミド DNA やファージ DNA に連結し、大腸菌や酵母細胞内に導入し、大量に増殖させる遺伝子クローニング技術の開発、③特異的塩基配列を検出する核酸 hybridization 法の確立、および④ DNA 塩基配列を解析する技術の確立、であろう。これら遺伝子操作の概略を、順を追って説明する<sup>1)~3)</sup>。

### 1. 遺伝子操作に用いられる酵素類

二本鎖 DNA の4~6個の特異的塩基配列を認識して DNA 鎖を切断する制限酵素といわれる一群のエンドヌクレアーゼがある。例えば大腸菌から得られる Eco RI は、5' G↓AATT C 3' という2回対称構造を認識して DNA を切断する。6塩基認識の制限酵素では、 $4^6=4,096$ 塩基に1カ所、4塩基認識の制限酵素では、 $4^4=256$ 塩基に1カ所の割合で切断部位がある計算となる。現在精製されている100種以上にも及ぶそれぞれ異なる塩基配列を認識して切断する制限酵素を組み合わせれば、とてつもない長い DNA 断片を計画的に一定の場所で切断し目的とする遺伝子を含む DNA 断片を得ることができる。

また、同一の制限酵素を用いて切断した DNA は、同一ののりしろ(粘着末端: cohesive end と呼ばれる)を持つことになり、相補的な塩基対を形成することにより、2つの DNA 断片を結合することができる。

これら制限酵素の他、DNA を連結する DNA リガーゼ、DNA を合成する DNA ポリメラーゼ、逆転写酵素などの酵素類も、遺伝子操作には欠かせないものである。

### 2. ベクター DNA

薬剤耐性マーカーを持ったプラスミドやバクテリオファージは、大腸菌の中で染色体外 DNA として自己複製することができる。一方、目的とする特定の遺伝子 DNA を含む DNA 断片を直接細胞に導入しても、自

己複製操置をもたないため、大腸菌の中では増殖できない。しかし、プラスミドやファージの DNA 分子中に目的とする外来遺伝子を制限酵素切断などを利用して挿入し、大腸菌の中へ導入すれば、目的とする DNA 断片をプラスミドやファージ DNA の一部として増殖することが可能となる。これら組み換え体プラスミドやファージ DNA は、染色体 DNA と簡単に分離して精製することができる。また、制限酵素で組み換え体 DNA を切断することにより、目的とする DNA 断片を大量に回収することができる。このように、外来遺伝子と結合して、宿主細胞中で増殖できる担体 DNA をベクターと呼ばれる。

ベクターとしてよく用いられるプラスミドに、pBR 322 DNA がある。pBR 322 は、アンピシリンとテトラサイクリンの2つの薬剤耐性遺伝子をもつ 4,362塩基対の環状 DNA である。制限酵素 Hind III, Bam HI, Sal I, Eco RI の切断部位が1カ所ずつ存在し、Hind III, Bam HI, Sal I 部位に外来遺伝子が挿入されるとテトラサイクリン耐性が消失する。また、Pst I 部位に外来遺伝子が挿入されるとアンピシリン耐性が消失するので、pBR 322 の組み換え体をスクリーニングするのに挿入失活法を用いることができる。

一方、ファージベクターは、 $\lambda$ ファージに由来するものがよく用いられている。 $\lambda$ ファージは、48,000塩基長の二本鎖 DNA で、その半分程度の領域は、複製・増殖には必須ではなく、これらの部分を適当な制限酵素で切除し、目的とする外来 DNA と置き換えることができる。ファージ DNA をベクターとして用いる利点は、20,000塩基長くらい長い DNA 断片でも挿入できること、一度に大量の組み換え体 DNA をもつファージをスクリーニングできること等である。

外来遺伝子 DNA として用いられる DNA 断片は、染色体 DNA を制限酵素で切断して得られたもの他、mRNA から合成した二本鎖 DNA や人工的に合成した二本鎖 DNA が用いられる。

### 3. Hybridization 法

DNA 溶液を 100°C に熱したり、pH が13以上の強アルカリ性になると、二本鎖構造を形成する水素結合が切れ、一本鎖 DNA へと解離する。これを DNA の変性というが、この変性は不可逆ではなく、65°C で適当な条件に保つと、再びもとの二本鎖を形成することが知られた。この現象を re-naturation 又は hybridization と呼ばれる。これと同様なことが、相補的な塩基配列をもつ2つの一本鎖核酸の間でも生じる。この

hybridization の時、放射化標識した DNA や RNA (プローブと呼ばれる) を用いると、その塩基配列と相補的な DNA や RNA の検出を行うことができる。

この hybridization 法を利用して目的の遺伝子 DNA を持つコロニーの検出を行うのを、Colony hybridization 法<sup>4)</sup>という。ニトロセルロースフィルター上にふやした大腸菌のコロニーをアルカリ処理し、DNA をフィルター上に固定し、プローブと hybridization を行う。ここで用いるプローブは、mRNA から合成した cDNA や、その蛋白質のアミノ酸配列から予想される合成オリゴヌクレオチドなどを用いる。大腸菌のコロニーが用いたプローブと相補的な塩基配列の DNA をもっていれば、オートラジオグラフィにより目的とするクローンを特定することができる。

同様に、ファージ DNA を用いて特定の遺伝子をもつクローンを特定する方法は、plaque hybridization 法<sup>5)</sup>と呼ばれる。寒天培地表面に広げられたファージ溶菌斑を、ニトロセルロースのフィルターに移し、フィルターをアルカリ処理した後、熱処理を行うと、ファージ DNA がフィルター上に固定される。このファージ DNA と放射化ラベルしたプローブとの hybridization により、目的とする遺伝子をもつファージ組み換え体を選び出すことができる。

また、Southern<sup>6)</sup>により開発された Southern blotting 法を用いることにより、目的とする遺伝子の制限酵素断片を同定することができる。すなわち、DNA を適当な制限酵素により切断し、寒天電気泳動により各 DNA 断片を大きさにより分離した後、寒天から DNA をニトロセルロースフィルターに拡散により移し、このフィルターを標識したプローブと hybridization させるものである。オートラジオグラフィを行うことにより、目的とする遺伝子の存在と大きさなどの構造解析を行うことができる。

#### 4. DNA の塩基配列決定法

遺伝情報は DNA を構成する 4 つの塩基の配列順序によって決められている。この DNA 塩基配列の決定法は、Maxam と Gilbert により開発された化学的分解法<sup>7)</sup>と Sanger らにより開発された DNA 鎖伸長阻止法<sup>8)</sup>の 2 つが用いられている。

化学的分解法は、末端を標識した DNA 断片を DNA の塩基特異的な反応により修飾し、その修飾された位置から DNA 鎖を切断する反応を用いたものである。G は、ジメチル硫酸でメチル化修飾が DNA 鎖上でランダムに 1 回生じるような反応条件下で反応させ、ピペリ

ジン存在下熱処理することにより DNA 鎖が G の位置で切断される。DNA の末端から修飾された G に至るすべての長さの DNA 断片が得られる。これを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により DNA 断片を分離する。これと同様なことを A, T, C, について行えば順次 <sup>32</sup>P-末端ラベルに近い位置からの DNA 塩基配列が決定される。ここで A は G と同時にギ酸酸性下で脱プリン反応を起こし、ピペラジン存在下熱処理することにより、A と G で切断される。また、ピリミジン塩基はヒドラジンによる開環反応を用いる。T と C は塩のない条件下で修飾され、高塩濃度下では C のみが修飾され開環する。これをピペリジン存在下熱処理することにより DNA は切断される。

DNA 鎖伸長阻止法は、DNA ポリメラーゼ I が一本鎖 DNA を鋳型として相補的な DNA 鎖を合成する時、dNTP (A, G, T, C) (少なくとも 1 つは <sup>32</sup>P-ラベルした前駆体を用いる) の各々の塩基に特異的な 2',3'-ジデオキシ体を取り込ませ、ヌクレオチドの伸長をある確率で停止させることを利用するものである。たとえば、ddATP を反応液に加えておくと、dATP が取り込まれる時に一定の確率で ddATP が取り込まれ、DNA 鎖の伸長が停止する。反応終了後、ゲル電気泳動により伸長した DNA をオートラジオグラフィで測定すれば、DNA 鎖上の dATP の取り込まれる位置が分かる。同様なことを ddCTP, ddTTP, ddGTP について行えば、鋳型 DNA に対する相補的な塩基配列がプライマー DNA に近いところから順次決定される。

以上遺伝子操作の概略について述べたが、これら技術を用いることにより、遺伝子の構造と機能の解析、蛋白性ホルモンやワクチンなどの有用物質の大腸菌での生産、遺伝子診断や遺伝子治療へと応用されるものであり、これらについての最先端の研究については、以下三人の先生方からの御報告にもある通りである。

#### 参 考 文 献

- 1) 村松正実, 藤井義明: 遺伝子工学の基礎と医学への応用, 新医科学大系 3. 遺伝子とその操作, p. 3~34, 中山書店(東京), 1984.
- 2) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.: Recombinant DNA Technology. Molecular Biology of the Cell, p. 185~192, Garland Publishing Inc. (New York), 1983.
- 3) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook,

- J.: Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 4) Grunstein, M. and Hogness, D.: Colony hybridization; A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72**: 3961~3965, 1975.
- 5) Benton, W.D. and Davis, R.W.: Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science., **196**: 180~182, 1977.
- 6) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**: 503~517, 1975.
- 7) Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavage. Methods Enzymol., **65**: 499~560, 1980.
- 8) Sanger, F. and Coulson, A.R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol., **94**: 441~448, 1975.

## 2) 遺伝子工学の脳研究への応用

— 神経ペプチドをめぐって —

新潟大学脳研究所神経薬理学部門 (主任: 高橋康夫教授)

高橋 康夫・桑野 良三

薄井 宏・荒木 一明

新潟大学医学部精神医学教室

長谷川まこと

### Application of the Recombinant DNA Technique to Brain Research — Neuropeptide —

Yasuo TAKAHASHI, Ryozo KUWANO, Hiroshi USUI and Kazuaki ARAKI

*Department of Neuropharmacology, Brain Research Institute*

*(Director: Prof. Yasuo TAKAHASHI)*

Makoto HASEGAWA

*Department of Psychiatry, School of Medicine, Niigata University*

We have applied the recombinant DNA technique to brain research. These studies contain 1) gene analysis of neurological diseases, 2) gene expression in the cells of the central nervous system, and 3) analysis of genes for proteins concerning the nerve function.

Reprint requests to: Yasuo TAKAHASHI,  
Department of Neuropharmacology, Brain  
Research Institute, Niigata University,  
Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所神経薬理学部門  
高橋 康夫