

早稲田応用化学会報

昭和57年7月 発行

早稲田応用化学会

目 次

昭和57年7月号

巻 頭 言	会長就任に当って	1
	篠原会長	
誌 上 講 義	遺伝子操作—DNA組み換え技術を中心として	2
	宇佐美昭次	
研 究 室 紹 介	長谷川研究室（有機化学）	8
職 場 だ よ り	三菱化成工業株式会社	12
ト ピ ッ ク ス	医用材料	16
	岡野光夫	
随 想	社会人生活一年を終えて	17
	戸梶りか	
教 室 消 息	18
新 博 士 誕 生	19
会 員 だ よ り	22
昭和57年度 定期総会	33
会 計 報 告	34
クラス会（昭和19年卒）	35
会 務 報 告	35
昭和57・58年度 新役員名簿	36
「編集後記」	表紙3

巻 頭 言

会長就任に当って

会長 篠 原 功



このたび前期に続き会長に就任することになり、監事、副会長も現在の陣容で運営することになりました。よろしく御支援、御協力をお願い致します。

本年は早稲田大学創立100周年であるとともに応用化学会も60周年を迎えました。大学も私共もこの節目の年を迎え、原点に戻って考えなければならないと思います。

ソニーの井深さんは日本は縦の系列の社会であり、横に対してはうまくゆかないと言っておられます。社会機構について言っておられるのですが、同窓生のクラス会は特に年代が古くなるほど緊密です。私も招かれて各卒業年度のクラス会に出席していますが、学生時代の思い出、仕事、子供のこと、早稲田の近況などの話題で賑やかな一夜を過ごしております。

本年も当科大学院進学者を除いて大学院55名、学部80名を外部へ送り出しています。毎年増加する会員に対し、教室内で処理、運営することは限界で、できれば専任者をと前から望まれていたのですが、幸いに卒業生の御厚意と大友前会長の御世話で有能な宮脇事務局長を迎え、鋭意事務組織の整備、強化を進めており、成果も挙がってきております。

早稲田応用化学会報は前期に続き酒井教授に編集委員長をお願いし、逢坂助教授に副委員長として補佐して頂き、さらに魅力のある会報をと願っております。

本年度の事業計画については当面秋に行う60周年記念式典についてですが、その他についても役員会で審議し、案を練りたいと考えております。

私は大友前会長の任期途中から会長を引き継ぎましたが、教室側からですのでこの機会に教室の現況を紹介しておきます。

現在教授14名、助教授2名、専任講師1名で教授が主体となっておりますが、これは理工学部各科同様であります。

学部学生の定員は1学年140名で、科内は3年次に工業化学、化学工学の両コースに分かれております。大学院進学希望者が多く毎年5～60名が推薦あるいは受験で進学しており、学部生、大学院生を合わせて各教授が20名近くを分担し、研究指導をしてきております。

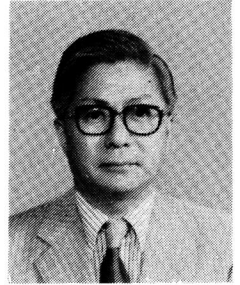
研究指導、講義以外に学部の方は理工学部長として加藤教授が、大学院の方は理工学研究科委員長の補佐役として宇佐美教授が理工学部の運営に当たっております。

理工学部は創立80周年記念事業により本部キャンパスから大久保キャンパスに移転しましたが、応用化学科は18階建の研究棟および本部キャンパスの小倉記念館からさらに昭和54年に現在の明治通り寄りの新棟に移転しました。

この新棟で教室は若い力である49年博士課程を修了し米国ジョージタウン大学へ留学した逢坂助教授、50年博士課程を修了しフンボルト研究員としてベルリン自由大学へ留学した西出助教授、54年博士課程を修了し英国アバディーン大学へ留学した黒田専任講師を加え、さらに飛躍を期しております。

以上が教室の現況ですが、早稲田応用化学会の目的である会員の学術的向上と会員相互の親睦を図り、当会の発展と応用化学科卒業生、教室、在校生の一体化に努力する所存ですのでよろしく御支援、御鞭撻をお願い申し上げます。

遺伝子操作——DNA組み換え技術を中心として



宇佐美昭次

1. はじめに

生命現象が分子レベルで解明され、タンパク合成に関与する核酸の構造と機能がいわゆる“化学の言葉”で説明できるようになったのは比較的近年になってからのことである。この分野はさらに予想を越えた進歩をとげ、試験管内 (*in vitro*) での DNA 組み換えによる遺伝子操作が可能ならしめるようになった。本稿はこうしたバイオテクノロジーの一環としての遺伝子操作の現状について概説したものであるが、この技術は文字通り日進月歩である。また、すでに多数の優れた総説が出版されているので、これらを末尾に記載した。至らぬ点はそれらで補足していただきたい。

2. 遺伝子とは

生物の形質はすべて主染色体 DNA の指令でつくられる。DNA は4つの塩基、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)が2-デオキシリボースを介したリン酸のジエステル結合を基本としたポリヌクレオチド鎖を形成している。通常この DNA 鎖は2本が互いに逆方向に、らせん状、平行に並んでおり、各塩基は内部に向かい合い、AとT、GとCがそれぞれ2本および3

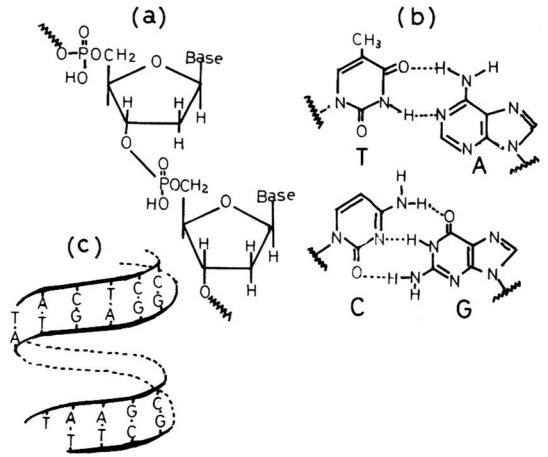


図1 DNAの構造

(a) 糖-リン酸のホスホジエステル結合
(b) 塩基間の水素結合 (c) 二重らせん

本の水素結合をつくって安定な対を形成している。図1にこれらの関係を示したが、塩基間の組み合わせは完全な相補的で、このことがDNAの複製、RNAへの転写、DNAの修復にとっても重要な条件で、絶対に読み誤りのない情報伝達がなされるのである。DNA鎖の長さとその間に打ち込まれた塩基の組み合わせが遺伝情報であり、大腸菌では約450万、ヒトでは約30億の塩基対からなっている。

このDNA鎖上の特定領域がRNAポリメラーゼで転写されてRNAができる。このRNAに転写される領域とその合成を調節する情報領域を合

早稲田大学理工学部応用化学科教授
昭和30年早稲田大学理工学部応用化学科卒業(新制5回)

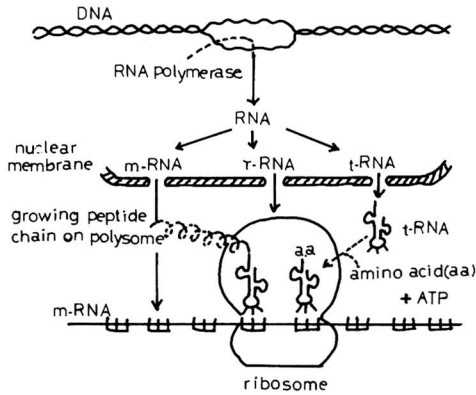


図2 タンパク合成におけるDNA, RNAの役割の模式図
 せたものが遺伝子である。主染色体上には無数の遺伝子が点在するが、それらを構成する塩基対は100前後から数万まで各遺伝子によって様々である。図2はタンパク合成におけるDNA, メッセンジャー(m) RNA, リボソーム(r) RNA, 転移(t) RNAの役割を様式化したものであるが、その詳細な説明は参考文献をみていただくこととして省略する。

3. 遺伝子操作に用いられる酵素

試験管内で異種間DNA組み換えの操作ができるようになったのは、DNAに関する酵素が解明され、十分に精製されたからである。表1にこの操作に用いられる主な酵素を示した。

(a) II型制限酵素 (DNA restriction endonuclease) : 細菌細胞には、本来外から侵入する異種DNAを分解または自己の生存に都合のよいように修飾する制限修飾系 (restriction modifi-

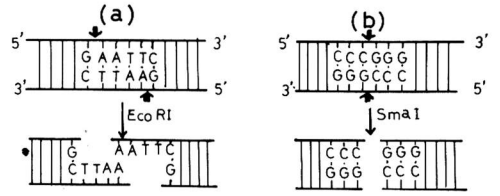


図3 II型制限酵素の切断様式例
 (a) 付着末端型 (b) 平坦末端型

*制限酵素の名称は微生物各菌株に固有の特異性を有するものが多いことから菌株の属名の頭文字1文字、種名の頭文字2文字で記し、そのあとに株名および同一菌株から2種以上の制限酵素が分離されたときは順次ローマ数字を付記する。(例)EcoRIは大腸菌 *Escherichia coli* の薬剤耐性因子RIをもった菌株より分離されたもの

cation system) が存在する。制限酵素はこの系を構成する酵素の一つでエンドヌクレアーゼ型 (エキソ *exo-* に対応する言葉で長鎖分子を中央部位で切断するもの) のDNA分解酵素である。この酵素は大腸菌とバクテリオファージの組み合わせによる溶菌現象の解明過程から発見された。この酵素はその特性によりI~III型に大別され、I型は認識するDNA分子内の塩基配列部位と切断するホスホジエステル結合部位が異なり、また切断部位が一定しないので特定の大きさのDNA断片を生成しない。これに対してII型制限酵素は2本鎖DNA分子の特定の塩基配列を正確に認識し、その配列内あるいは隣接部位でホスホジエステル結合を切断し、特定のDNA断片を生成する。そ

名称	機能	起源
(a) II型制限酵素	DNAの特異的切断	大腸菌・ヘモフィルス菌・ブドウ状球菌など
(b) DNAリガーゼ	付着末端DNAの連結, 平坦末端DNAの連結	大腸菌, T ₄ ファージ感染大腸菌
(c) ターミナルトランスフェラーゼ	DNA断片に人工的付着末端を形成	子牛胸腺
(d) エキソヌクレアーゼ	DNA断片の末端に1本鎖を露出	大腸菌・λファージ感染大腸菌
(e) DNAポリメラーゼ (逆転写酵素)	DNA依存性でDNA鎖の修復合成 RNA依存性でDNA鎖の相補的合成	大腸菌・T ₄ ファージ感染大腸菌 腫瘍ウイルス
(f) ヌクレアーゼS1	1本鎖DNAの特異的切断	アスペルギルス オリゼー

表1 組み換えDNA分子の作製に用いられる主な酵素

の機能は2本鎖DNA分子内の特定の3~6個のヌクレオチドの中央を軸として2回転対称の構造に対して活性をもつものが多い。DNAの切断にあたり2本鎖を同じ場所で切断し平坦末端 (*flush end*) を残すよう作用する酵素もあるが、多くの場合数個のヌクレオチド離れた部位で2本鎖を切断し、相互に相補的な塩基配列を有する1本鎖の付着末端 (*cohesive end*) を残すように切断する。図3にその実例を示した。なお切断末端は3'-OH, 5'-P (リン酸) である。なおⅢ型については説明を省略する。

(b) DNAリガーゼ (DNA *ligase*) : DNA分子の3'-OH末端と5'-P末端をホスモジエステル結合の形成によって連絡するもので、付着末端をもつDNA断片の連結にはいずれの生物種起源の酵素によっても可能であるが、平坦末端の連結にはT₄ファージ由来のものによってのみ可能である。

(c) ターミナル トランスフェラーゼ (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*) : DNA分子の3'-OH末端にデオキシリボヌクレオチド三リン酸を基質としてデオキシリボヌクレオチドを付加する作用をもち、人工的に付着末端を形成する。子牛胸腺から分離され、ピリミジンに対してはCo²⁺, プリンに対してはMg²⁺が有効である。

(d) エキソヌクレアーゼ (5'-*Exonuclease*) : 2本鎖DNAの末端に適当な長さの1本鎖を露出させるもので、大腸菌から分離されたエキソヌクレアーゼⅢは3'-OH末端から5'方向に逐次モノヌクレオチドを遊離し5'末端付近に1本鎖構造を有するDNA分子を形成する。λファージ感染株からえられるλエキソヌクレアーゼは5'末端から3'方向へモノヌクレオチドを遊離し、3'末端に1本鎖構造を残す。

(e) DNAポリメラーゼ (DNA *polymerase*) : 大腸菌のDNAポリメラーゼIやT₄ファージ由来のDNAポリメラーゼは、2本鎖DNA分子内に存在する1本鎖領域を鋳型として、欠損した方のDNA鎖の3'-OH末端にデオキシリボヌクレオチド三リン酸を基質としてデオキシリボヌクレオチ

ドを付加し修復する特性をもっている。またRNA依存性DNAポリメラーゼはRNAを鋳型としてデオキシリボヌクレオチド三リン酸を基質にDNAを合成する酵素で、m-RNAから相補的なヌクレオチド配列をもつcDNA鎖 (*complementary DNA*) を生合成することができる。この酵素をまた逆転写酵素 (*reverse transcriptase*) ともいう。

(f) ヌクレアーゼS1 (*Nuclease S1*) : タカジアスターゼ原末から分離され、1本鎖DNAに特異的に作用してモノヌクレオチドおよび少量のジヌクレオチドを生成する酵素で、ねじれをもたない環状2本鎖DNAや直鎖状DNAには作用しない。ねじれをもつ閉環状2本鎖DNAでは切れ目を入れ、さらに他方のDNA鎖を切断して直鎖状2本鎖DNAを生成させることでできる。

DNA組み換え技術による遺伝子操作の成功の可否は、これら酵素の特異性をいかに使い分けられるかにかかっていると見えよう。最近つぎつぎと新しいタイプの関連酵素が見出だされている。

4. ベクターDNA

目的とする特定遺伝情報部位を含むDNA断片が分離されても、それをそのまま細胞の中に入れて殖やすことはできない。制限酵素の存在に見られるように、生物は本来外来の異種DNAに対しては防衛的働きをする酵素をもっているからである。また、たとえそのような酵素が働かない場合でも、入れたDNA断片が宿主の主染色体とは別に独立して存在するのであれば、普通は自ら複製することはできない。

そこで、目的とするDNA断片を宿主細胞の中で自律的に増殖することのできるDNA分子に結合させ、その働きによって複製させる。このような外来遺伝子を宿主細胞にとりこませ、その中で殖やす役割をもつDNAのことをベクター (*vector* または *cloning vehicle*) とよんでいるが、こうした主染色体外遺伝因子としてプラスミド (*plasmid*) の存在がある。種を定める主染色体に対しあくまでも付加的な役割をもっている。ま

たベクターとしてファージを用いることもできる。

プラスミドが研究対象として注目を集めたのは、医療上抗生物質の乱用によって出現した薬剤耐性菌が薬剤耐性プラスミドが原因であることが明らかにされてからである。プラスミドは通常環状2本鎖 DNA で細胞内に存在するが、酵母では環状2本鎖 RNA の場合もある。主染色体 DNA より小さく、また塩基として GC 含量も異なる場合があり、こうした性質を利用して物理的に主染色体から分離取得することができる。その特異な生理的意義と比較的低分子であるので DNA モデルとして注目され、制限酵素による切断個所を含めてその性質が十分に調べられているものもある。プラスミドベクターとしての最低条件は、自己複製に必要な情報配列と異種 DNA を挿入するための制限酵素切断点配列があればよい。もちろん、昨今問題視されているバイオハザード (biohazard) の危険性を出来るだけ減らす目的で、生物学的封じ込めを考慮した選択も重要な条件となる。

5. DNA 組み換え体作製の手順

表 1 に記載した種々な酵素を組み合わせて様々な

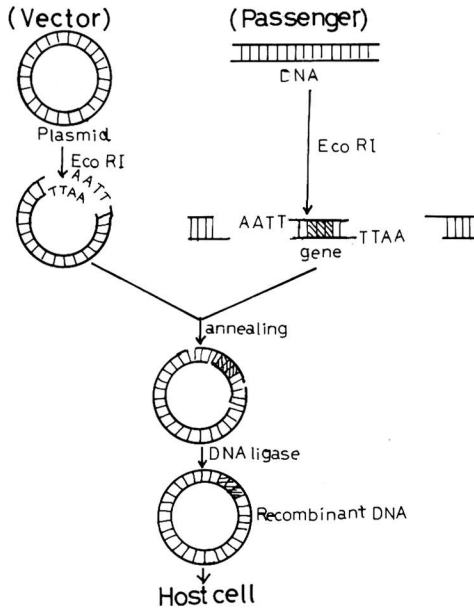


図 4 同種 II 型制限酵素と DNA リガーゼによる直接的組み換え DNA の作製

手法が提案されている。その代表的なものを述べてみよう。

(a) 同種 II 型制限酵素と DNA リガーゼによる直接的方法 (図 4)。

この方法は組み換え体をつくるための基本的な手順である。まず、細菌細胞からプラスミドをベクターとして用いるために抽出し、II 型制限酵素、たとえば Eco RI を作用させて付着末端をもつように切断する。一方、これに連結する異種 DNA を同じ制限酵素で切断して、目的とする遺伝情報をもち、かつベクターと塩基配列が相補的で水素結合形成が可能なような付着末端をもつ DNA 断片を単離する。この両者を混合して適当な温度で処理すると水素結合によって 2 本鎖を形成する

(annealing)。この水素結合で結ばれた環状 DNA 分子内の 3'-OH 末端と 5'-P 末端を DNA リガーゼを用いてホスホジエステル結合を形成させ閉環すると、目的とする組み換え体ができる。

(b) 異種 II 型制限酵素による DNA 末端の修復をともなう間接的方法 (図 5)。

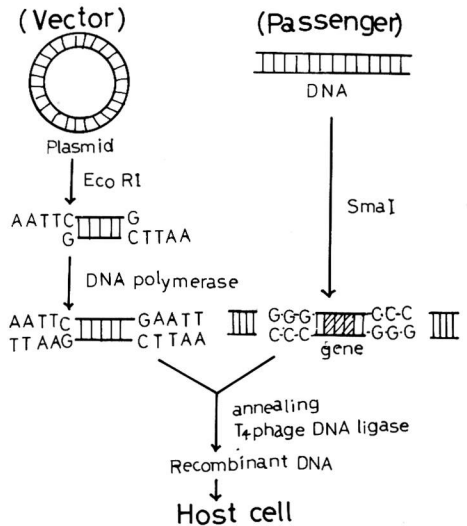


図 5 異種 II 型制限酵素による DNA 末端の修復をともなう間接的組み換え DNA の作製

DNA の遺伝情報部位の都合上、プラスミドの切除と供与体 DNA の切断をそれぞれ別の制限酵素を用いて行う必要がある場合には、両者の DNA 末端の塩基配列が必ずしも相補的とはならない。

このような場合にはプラスミドを付着末端を生じる制限酵素，たとえば Eco RI で切断したのち，デオキシアデノシン三リン酸（d ATP），デオキシチミジン三リン酸（d TTP）を基質としてDNAポリメラーゼで末端を修復し，平坦末端をもつ分子に変える。一方，供与体 DNA は平坦末端を生じる制限酵素，たとえば Sma I で切断し，目的とする遺伝情報部位を含む DNA 断片を単離する。両者を混合し T₄ フェージ由来の DNA リガーゼで平坦末端の連結を行って組み換え体を作製する。

またプラスミドベクター，供与体 DNA 共に平坦末端をもつものから付着末端型に変換するためにはつぎの手順で可能となる。すなわち，一本鎖を露出させるためにはエキソヌクレアーゼで処理し，5'-P 末端域を部分的に切除する。一方の DNA 断片の 3'-OH 末端には d ATP を基質としてターミナルトランスフェラーゼを作用させてデオキシアデニル酸を付加し，ついで他方の DNA 断片の 3'-OH 末端に d TTP によってデオキシチミジル酸を付加する。これら 2 種の DNA 断片をアニーリングし，末端の相補的な 1 本鎖部位で 2 本鎖を形成させる。つぎにエキソヌクレアーゼⅢ，DNA ポリメラーゼで処理し，最終的に DNA リガーゼで連結して組み換え体を完成させる。

最近では DNA の化学合成がきわめて進歩し，制限酵素認識部位を含む低分子の DNA 断片（linker）を DNA の平坦末端につけ，付着末端型のものをつくることもできるようになった。

(c) 逆転写酵素による c DNA の作製（図 6）。

目的とする特定の遺伝情報部位を含む DNA 断片の単離が困難な場合は，m-RNA を分離，純化し，これを鋳型として RNA 依存性の DNA ポリメラーゼである逆転写酵素により対応する遺伝子の c DNA を合成する。これをアルカリ性ショ糖密度勾配遠心法で DNA 鎖を分離後，DNA 依存性 DNA ポリメラーゼで 2 本鎖 DNA に修復合成する。さらにその DNA の末端のヘアピン個所をヌクレアーゼ S 1 で切断してからターミナルトランスフェラーゼで付着末端を形成させることによって，ベクターへの連結可能な DNA 断片を作製するこ

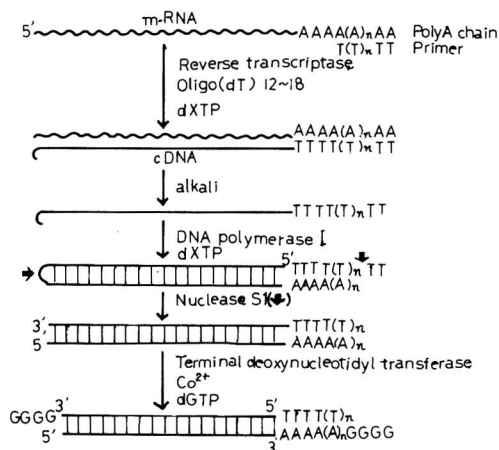


図 6 m-RNA から逆転写酵素による c DNA の作製とができる。

6. 組み換え体の宿主細胞への取り込み

ベクター DNA に特定遺伝情報を含む DNA 断片を挿入して作られた組み換え体は，傷つけられることなく宿主細胞の中に取り込まさなければならぬ。現在この種の研究が主に行なわれている大腸菌 K-12 株とそれに寄生増殖するベクター系では，その操作の詳細は不明であるが低温のもとで塩化カルシウムで処理した菌を用いると，菌膜の透過性が増大して，ただ組み換え体と混ぜるだけでそのまま細胞内へ移入させることができる。この方法はサルモネラ菌，ブドウ球菌などにも有効である。枯草菌では増殖のある段階で，自然に組み換え体を取り込みやすい状態になること，強固な細胞壁をもつ酵母でも，酵素的に細胞壁を壊して取り込みに成功した例もある。一方，本稿では省略したがフェージやウイルス系ベクターでは，試験管内でのウイルス粒子再構成法を用いて DNA を粒子内に取り込んで細胞へ感染させることができる。

大過剰の細胞を使用すると，組み換え体は各々別個に細胞の中に導入されるので，これを寒天培地上でコロニーを形成させると各コロニーは特定の組み換え体をもつ細菌で構成される。