

- 細胞と染色体
 - 原核細胞
 - 真核細胞
 - 細胞周期
 - DNA分子の様子と染色体構造
- 核酸の化学構造
 - 核酸の構成成分
 - DNAとRNAの構造
 - 核酸の性質
 - 遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)
- DNA複製
 - DNAポリメラーゼ
 - DNA複製の諸問題
 - 大腸菌のDNA複製機構
 - 校正機構
 - 真核細胞のDNA複製
- 転写
 - RNAポリメラーゼ
 - プロモーターとターミネーター
 - 転写に影響を与える要因
 - RNAのプロセッシング(真核細胞)
 - 転写産物(RNA)の種類
 - RNAの編集
- タンパク質の生合成(翻訳)
 - リボソーム
 - 遺伝暗号(コドン)
 - タンパク質の生合成機構
 - コドンのゆらぎ
 - 開始コドンの読み飛ばし
 - 遺伝暗号の書き換え
 - タンパク質のプロセッシング
 - 分子擬態
- 遺伝子の構成
 - 原核生物遺伝子
 - 真核生物遺伝子
 - ミトコンドリアのDNA
 - ゲノムと遺伝子
- 遺伝情報の修復
 - DNAの変化
 - DNA修復に関するヒトのDNAポリメラーゼ
 - DNA修復機構
- 核酸の分析技術
 - 核酸分解酵素
 - 核酸の分離と精製
 - プロットィングとハイブリダイゼーション
 - DNAの一次構造決定法
 - その他の技法
- 遺伝子工学の技術
 - 遺伝子工学の道具
 - 制限酵素
 - 組換え体の作成
 - クローニングベクター
 - 組換え体の導入と検出
 - 組換え体の発現
 - PCR法
- 遺伝子工学の利用
 - 遺伝子やタンパク質の構造と機能の解析
 - 有用タンパク質の生産
 - タンパク質工学
 - 生物の品種改良
 - 医学への応用

細胞と染色体

戻る

原核細胞

真核細胞

細胞周期

DNAの様子と染色体構造

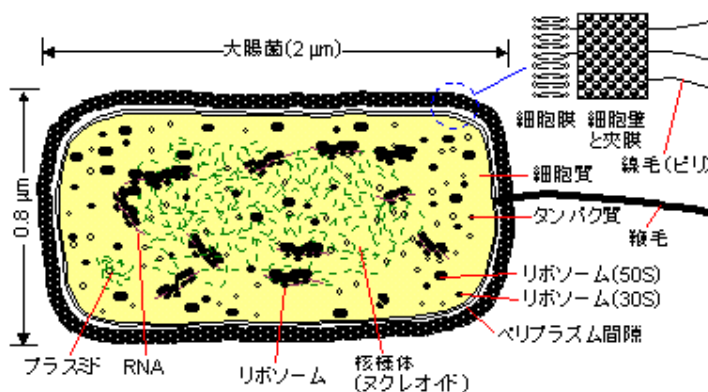
全ての生命体の構造と機能の単位は**細胞**(cell)である。細胞には構造的に**原核細胞** (prokaryotic cell) と**真核細胞** (eukaryotic cell)の2つがある。それ以外に、生命体と物質の中間的な**ウイルス**(virus)がある。

生物	原核生物 (prokaryote) 原核細胞から成り、ただ1組の環状染色体をもつ 一倍体(haploid) バクテリア(細菌)、マイコプラズマ、ラン藻、古細菌*などがある。 マイコプラズマは細胞壁を持たない。
	真核生物 (eukaryote) 真核細胞から成り、細胞内に複雑な小器官をもつ。 有性生殖で子孫を残すものは2組の線状染色体をもつ 二倍体(diploid) 原生動物、菌類(酵母とカビ)、藻類、動物、植物に分類。
その他	動物ウイルス、植物ウイルス、細菌ウイルス(バクテリオファージ phage)。 遺伝物質にDNAまたはRNAをもち、タンパク質の殻に収まっている。

* 古細菌 (archaeobacteria)の外観は原核生物と変わらないが、多くの点で原核生物よりも真核生物に近いという証拠が蓄積されており、細菌をモネラ界、古細菌を古細菌界と区別する。

原核細胞

大腸菌などに代表される原核細胞は、一般に細胞内には特定の仕切りがなく、1~10 μ mの大きさである。DNAはある種の塩基性タンパク質に結合して折りたたまれ、裸の状態では**細胞質**(cytoplasm)に存在する。DNAが存在する領域は**核様体**(nucleoid)と呼ばれる。細胞膜の外側には糖脂質やプロテオグリカンなどから構成される**細胞壁**(cell wall)が存在し、また、**線毛**(ピリ, pilus)で覆われているものもある。細胞によっては、細胞膜は細胞内に折りたたまれて多層構造をなした**メソソーム**(mesosome)を形成している。細いタンパク質の繊維から成る**鞭毛**(flagellum)が細胞から突き出ており、これを使って細胞は運動する。原核細胞から成る原核生物は単細胞生物である。通常、遺伝子のセットを1組しかもたず、**一倍体**(haploid)という。DNAは環状構造をしている。原核細胞では染色体DNA以外に、**プラスミド**(plasmid)のような低分子の核外DNAが存在し、薬剤耐性や性因子の交換などを行う。

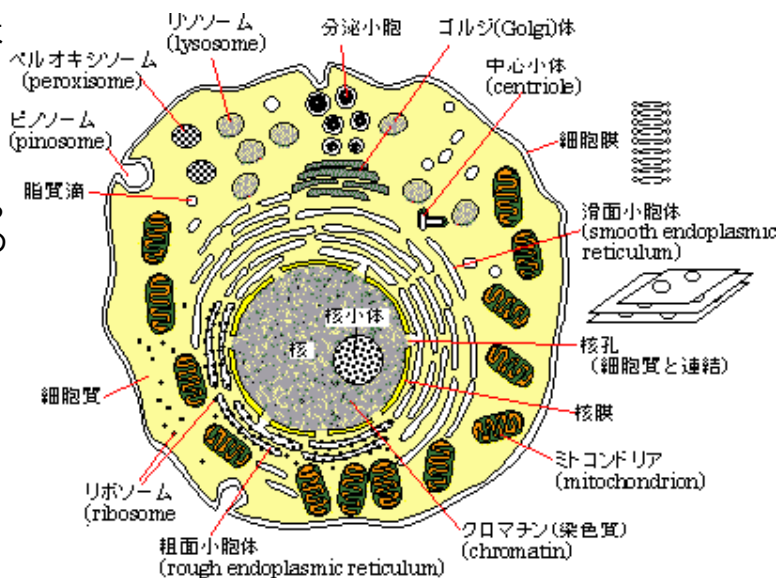


【細菌(原核細胞)の模式図】

一般的な細菌を模式的に表している。各部分の相対的大きさは図とは異なる。

真核細胞

もう一方のタイプは真核細胞と呼ばれ、10~100 μ mの大きさで、細胞内には**ミトコンドリア**(mitochondrion)、小胞体(endoplasmic reticulum)、**ゴルジ装置**(Golgi apparatus)、**リソソーム**(lysosome)、**葉緑体**(chloroplast)などの様々な小器官がある。DNAは**核**(nucleus)に存在し、**核膜**(nuclear envelope)で覆われている。核の中には通常濃く染色される**核小体**(nucleolus, 仁ともいう)がある。有性生殖を行うものが多く、そのために通常、遺伝子のセットが2組存在する。これを**二倍体**(diploid)という。真核細胞から成る真核生物には、酵母、原生動物のような単細胞生物から、動物、植物のような多細胞生物まである。



【動物細胞(真核細胞)の模式図】

植物細胞には細胞壁、葉緑体(chloroplast)、液胞(vacuole)などがある。

真核細胞の小器官

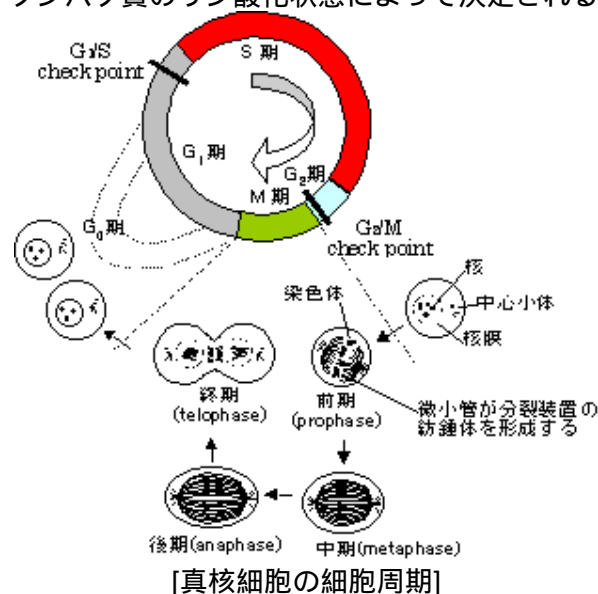
核	DNAが存在する。核小体はRNAを合成する場所。細胞質とは核膜で隔てられ、核孔で連絡している。
核小体	RNAに富む。リボソーム合成を行う。
ミトコンドリア	楕円体状の小体で二重膜をもち、内膜は内側にひだをつくり、クリステを構成。1つの細胞に1~5000個存在。エネルギー(ATP)を生産する場。
滑面小胞体	細胞膜や核膜に連結している。物質の輸送路。
粗面小胞体	微細顆粒(リボソーム)が結合した小胞体。タンパク質合成。
ゴルジ体	小胞体の一部が分化した器官で、タンパク質などを含む分泌液を貯蔵。
リソソーム	タンパク質、核酸、脂質分解酵素を含む顆粒。

細胞周期



細胞分裂において、DNAは複製という機構によって同じものがもう1組作られ、2つの細胞に均等に分配される。真核細胞の細胞周期(cell cycle)を下の図に示す。細胞分裂を行っていない休止期の細胞はG₀期にある。ヒト体細胞の大部分はこの状態にある。細胞周期は大きくG₁期、S期、G₂期、M期の4つに分けられ、リン酸化酵素やサイクリンなど多くのタンパク質によって調節されている。

遺伝情報を正確に次の世代に伝えるためには、染色体複製が正確に完了することが必須である。何らかの原因でDNA複製が遅れたときには細胞周期を停止し、複製の完了を待つしくみがあり、これをDNA複製チェックポイントと呼ぶ。G₁期からS期への進行はG₁/Sチェックポイント、G₁期からM期への進行はG₂/Mチェックポイントと呼ば、ある種のタンパク質のリン酸化状態によって決定される。



G₀期 (静止期)

細胞分裂の周期から外れ、静止状態にある。

G₁期 (第1間期)

細胞周期中で最も長い期間。DNA合成に必要なタンパク質が合成される。G₁/S checkpointを通過すると、S期への進行が決定される。

S期 (DNA Synthesis phase)

DNAの複製が行われる期間。ヒストン合成とリンク。細胞は二倍体(2n)から四倍体(4n)に変化。

G₂期 (第2間期)

有糸分裂の準備期間。染色質の凝縮とパッキングが起こり、核膜が消失する。G₂/M checkpointを通過すると、M期への進行が決定される。

M期 (有糸分裂 Mitosis)

有糸分裂の開始から終了までの期間。染色質は染色体構造をとり(前期)、2つの中心体に引かれるように中央に集合し(中期)、細胞分裂(終期)が起きる。中期の細胞は球状化する。

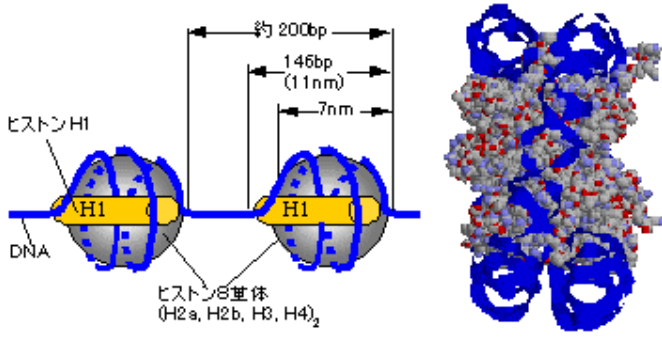
DNAの様子と染色体構造



原核細胞と比べると真核細胞のDNAはサイズが大きいいため、DNAを核の中に収めるためには秩序だった折りたたみが要求される。細胞周期の間期ではDNAは**ヌクレオソーム構造**をとり(図1.4)、さらにこれが幾重にも折りたたまれて核の中に存在する(これを**染色質** chromatinという)。間期の染色質はクロモマアの状態に分散して存在する。密にパックされた染色質を**ヘテロクロマチン**(heterochromatin)、粗にパックされたものを**ユウクロマチン**(euchromatin)という。前者はセンロロメアやテロメアのような非遺伝子領域や不活性な遺伝子領域を含む領域である。後者は活性な遺伝子領域である。細胞周期のM期では特有な**染色体**(chromosome)構造をとる。

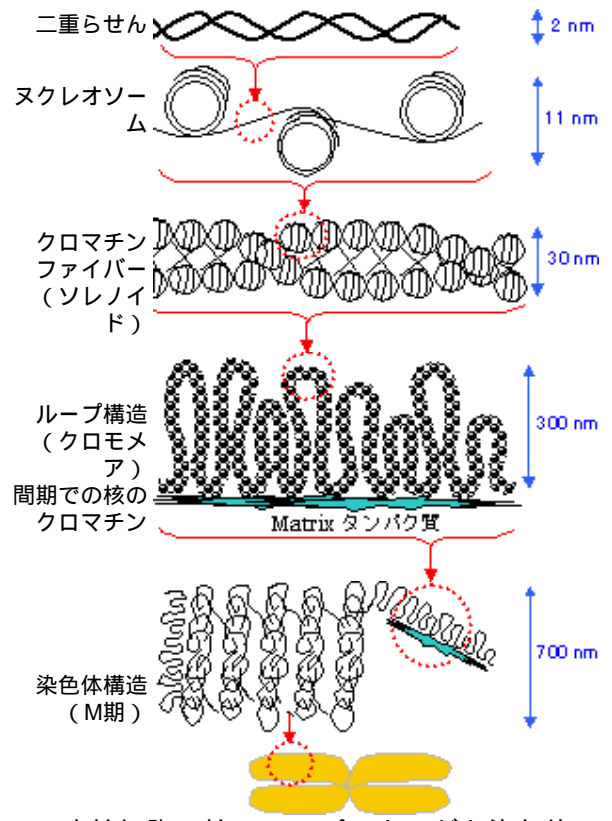
種々のDNA分子の大きさと形 * kbp=10³塩基対

	DNAの種類	塩基対, kbp*	長さ(μm)	ウイルス中	細胞内
virus	大腸菌ファージφX174	5.39(kb)	1.6	環状一本鎖	環状二本鎖
	大腸菌ファージλ	48.6	17	線状二本鎖	環状
	大腸菌ファージT2	166	55	線状二本鎖	環状
	動物ウイルスSV40	5.1	1.7	環状二本鎖	環状
procaryote	大腸菌コリシンE1	7.0			環状
	大腸菌F因子	103	1,000		環状
	大腸菌染色体	4,000			環状
eucaryote	酵母染色体(計17本)	13,500	4,600		線状(17対)
	ヒト染色体(計23本)	2,900,000	990,000		線状(23対)
	肺魚(計19本)	102,000,000	34,700,000		線状(19対)
	ヒトミトコンドリア	16.6			環状二本鎖



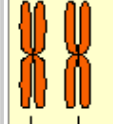
[真核細胞の染色体の基本単位 (ヌクレオソーム nucleosome) の構造]

2本鎖DNAがヒストン8量体の周囲を1.75回転して巻きついている。ヒストンH1はこのDNA鎖を押さえるとともに、H1同士の会合によってクロマチンファイバー (ソレノイド) を形成するのにも役立っている。



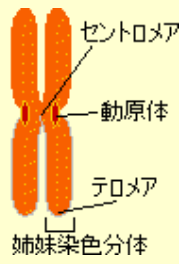
染色体(chromosome)

体細胞中では両親由来の1対の染色体が存在する。これを相同染色体(homologs)といい、細胞周期のM期において、図のような1対の染色体として観察される。



相同染色体

DNA複製後、各染色体は2コピーの姉妹染色分体になる。M期では、姉妹染色分体はセントロメアで結合している。セントロメアには動原体(kinetochores)というタンパク質複合体が結合している。動原体にはさらに紡錘体(spindle)の一部を形成する微小管(microtubule)が結合し、細胞分裂の際に染色分体を2つの細胞に分配する。



姉妹染色分体

[真核細胞の核DNAのパッキングと染色体] Matrixタンパク質にはトポイソメラーゼ (DNA複製を参照) が含まれる。染色体全体の構造はMatrixタンパク質のフレームワークの形を反映している。

核酸の化学構造

戻る

核酸の構成成分

DNAとRNAの構造

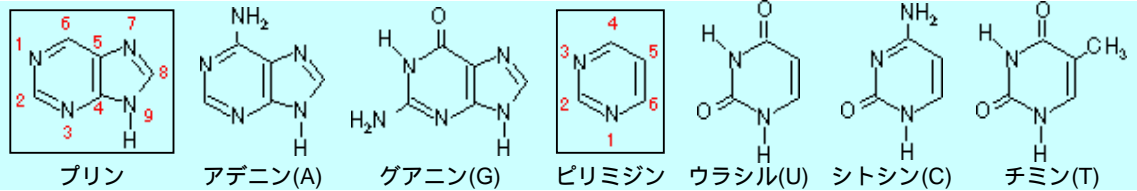
核酸の性質

遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)

核酸の構成成分

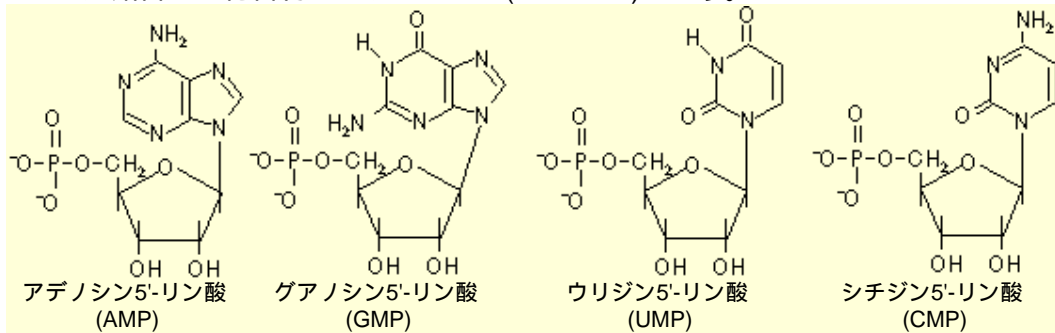
核酸は五炭糖、リン酸および塩基から成る。五炭糖にはD-リボースとデオキシ-D-リボースの2種があり、リボ核酸(RNA)にはD-リボース、デオキシリボ核酸(DNA)にはデオキシ-D-リボースが含まれる。塩基はアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、ウラシル(U)、チミン(T)の5つがあるが、RNAではA、G、C、U、DNAではA、G、C、Tが含まれる。

核酸	β-D-リボース	: RNAにのみ存在	五炭糖 2-デオキシ-β-D-リボース	: DNAにのみ存在
リン酸	H ₃ PO ₄		D-リボース	デオキシ-D-リボース
塩基 (base)	プリン系	: アデニン、グアニン	ピリミジン系	: シトシン、ウラシル(RNAのみ)、チミン(DNAのみ)

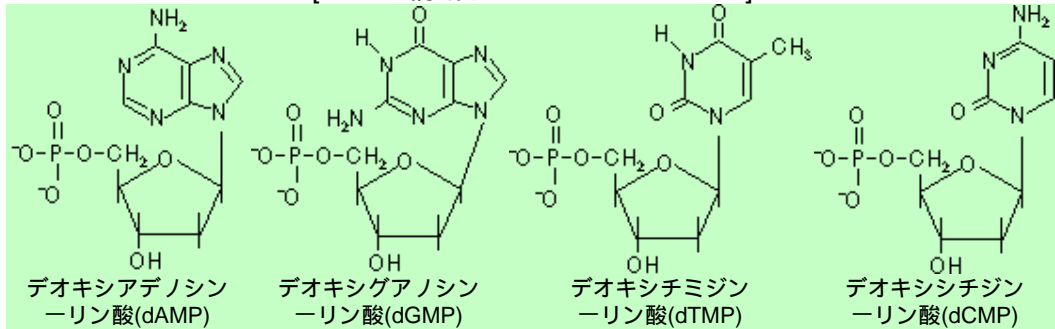


[核酸を構成する塩基]

D-リボースやデオキシ-D-リボースの1'位に塩基が結合した化合物を **ヌクレオシド(nucleoside)** という。ヌクレオシドの5'位にリン酸がエステル結合した化合物を **ヌクレオチド(nucleotide)** という。



[RNAを構成するリボヌクレオチド]



[DNAを構成するデオキシリボヌクレオチド]

核酸(DNAやRNA)は、ヌクレオチド単位が長く連結した鎖状の高分子化合物である。

DNAとRNAの構造

● デオキシリボ核酸(DNA, deoxyribonucleic acid)

DNAは細胞の核や核様体中存在するが、ミトコンドリアや葉緑体にも少量のDNAがある。遺伝情報を担うゲノムの実体である。

DNAの1次構造: 塩基の配列順序のことで、遺伝情報そのものである。遺伝子部分はタンパク質やRNAの1次構造を指定する。

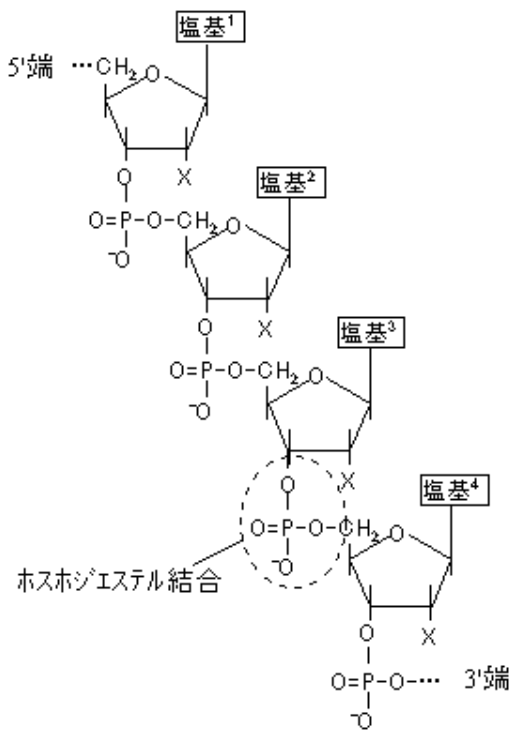
DNAの2次構造: RNAと異なり、DNAは**二重らせん構造(double helix)**をとる。二重らせん構造には通常のB型DNA以外に、立体構造が少しずつ異なるA型DNAやZ型DNAもある。これらは互いに主溝(major groove)や副溝(minor groove)の深さが異なる。シャルガフ則DNAのX線回折像をもとに、この構造が予測された(Watson & Crick, 1953年)。二重らせんの直径は20、1巻きが34で**10塩基対**に対応する(1塩基対で36°回転)。

シャルガフ則

各種DNA中のプリン、ピリミジンの含量

塩基	材料			
	ヒト肝臓	ニンジン	大腸菌	入ファージ
A%	30.3	26.7	23.8	26.0
G%	19.5	23.1	26.0	23.8
C%	19.9	23.2	26.4	24.3
T%	30.3	26.9	23.8	25.8
A/T	1.00	0.99	1.00	1.01
G/C	0.98	1.00	0.98	0.98
Pur/Pyr	0.99	0.99	0.99	0.99

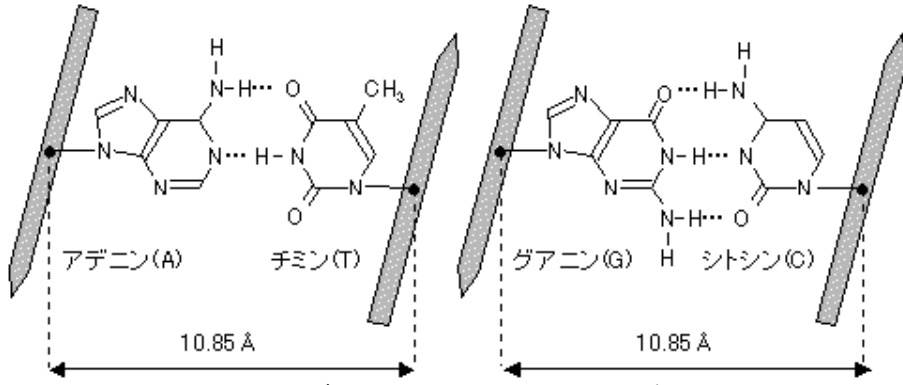
A/T=1、G/C=1、プリン/ピリミジン=1



[核酸のポリヌクレオチド鎖]

X=H (DNA), OH (RNA); 塩基1-4=AGCT (DNA), AGCU (RNA)

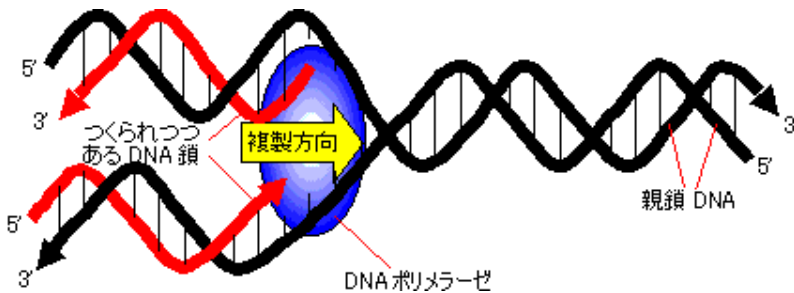
DNAの鎖は相補的な塩基対を形成し、互いに相手の鎖を認識できる。



[DNA中のチミン(T)とアデニン(A)、シトシン(C)とグアニン(G)間の水素結合]

Watson-Crick塩基対という。

この原理に基づき、DNAのそれぞれのポリヌクレオチド鎖（親鎖）を鋳型として、それらに相補的な新しい鎖（娘鎖）が合成される。新しい鎖を構成する2本の鎖の一方は元の親鎖由来である。これを半保存的複製(semi-conservative replication)という。詳細についてはDNA複製を参照せよ。

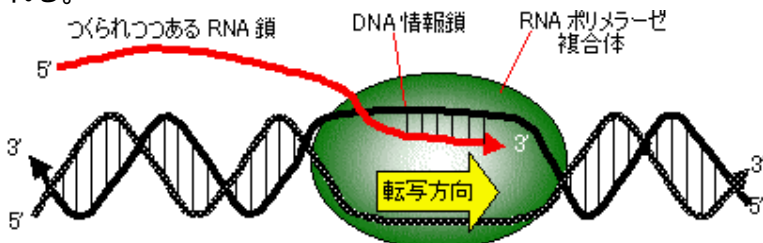


[DNAの半保存的複製のモデル]

赤い鎖が新しくつくられた鎖で、親鎖由来の黒い鎖と逆平行である点に注意。

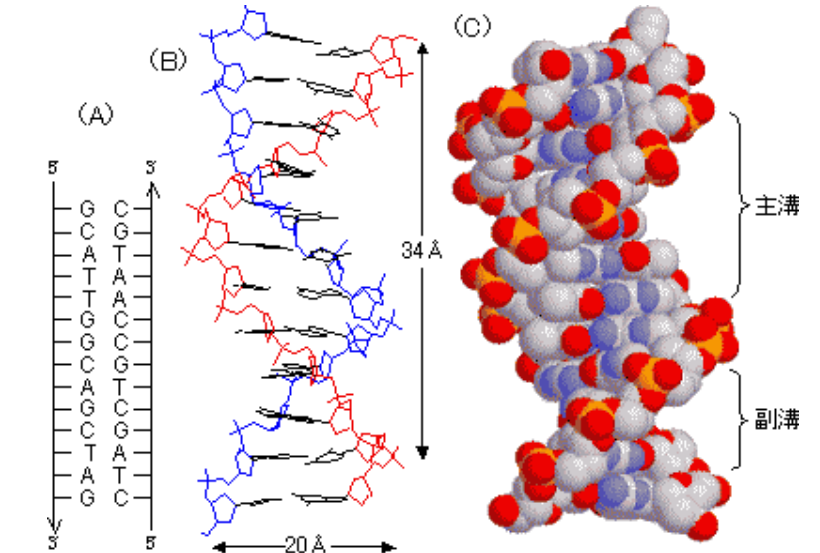
● リボ核酸 (RNA, ribonucleic acid)

細胞質と核に存在。DNAの二本鎖のうち一方を鋳型として、A→U, T→A, G→C, C→Gの規則に従って合成される。



[RNAの合成のモデル]

DNAの2本鎖のうち、鋳型となる鎖(黒線)は3'から5'方向に読みとられ、5'から3'方向にRNA(赤い線)がつくられる。



[DNAの二重らせん構造のモデル]

(A) DNA二本鎖間の塩基対：2本の鎖は互いに逆向きである。

(B) 二重らせんの針金模型：らせんは右巻き。内側に向いた塩基対を構成するプリンとピリミジン環はらせん軸にほぼ垂直。

(C) 二重らせんの空間充填模型：らせんの側面には深い溝（主溝と浅い溝（副溝）がある。

A . . . T
G . . . C
相補的塩基対
(complementary base pair)
<分子生物学の基礎>

タンパク質の生合成に関する主なRNAとしては、次の3種類がある。

● 伝令RNA (messenger RNA, mRNA)

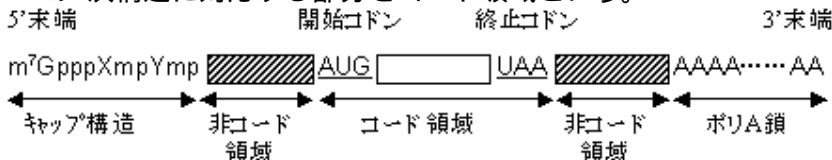
DNAのタンパク質の1次構造に関する情報を写しとったもの。細胞質に移り、リボソームに結合してタンパク質合成の鋳型となる。

● mRNAの3つ組塩基は1つのアミノ酸を指定する。連続した3つの塩基を**コドン** (codon) といひ、1つのアミノ酸に対応する。

(例) GGG Gly(グリシン)

● 真核細胞のmRNA分子は末端が修飾される **プロセシング** mRNAのコドン表

5'末端に**キャップ構造**, 3'末端に**ポリA鎖**をもつ。タンパク質の1次構造に対応する部分を**コード領域**という。



		2文字目				
		U	C	A	G	
1文字目	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
		UUA Leu	UCA Ser	UAA オーカー	UGA オパール	A
		UUG Leu	UCG Ser	UAG アンバー	UGG Trp	G
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
		AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
	GUG Val*	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

AUGは開始コドン。下線は終止コドン。
*原核生物では開始コドンとなる。

● 転移RNA (transfer RNA, tRNA)

細胞質中に存在する低分子量のRNA。A,G,U,C以外の特殊塩基が含まれる。3'末端は--CCAで、ここにアミノ酸をエステル結合し、リボソームへと運ぶ。分子中の1ヶ所にアンチコドン(暗号解読部)部位があり、mRNAと結合する。tRNAはタンパク質と核酸の橋渡しをする分子である。

(例) コドン: 5'-A-G-A-3' (mRNA)

アンチコドン: 3'-U-C-U-5' (tRNA)

● リボソームRNA (ribosome RNA, rRNA)

リボソームはタンパク質合成の場で、大腸菌では3種のrRNAと53種のタンパク質、真核細胞では4種のrRNAと82種のタンパク質から成る。リボソームの重量の2/3はrRNAが占めている

核酸の性質

● アルカリに対する安定性

RNAは酸化され易い2'-OH基があるため、希アルカリで分解される。DNAはアルカリに安定。この性質はDNA中の微量のRNAを除去するのに利用される。

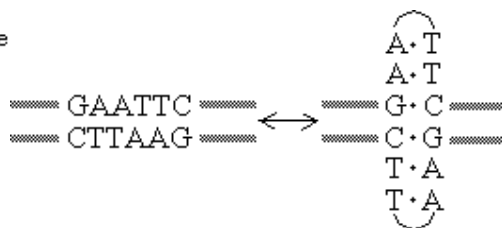
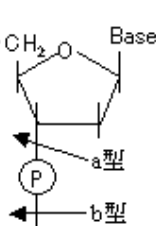
● 加水分解酵素

RNAやDNAを加水分解する酵素が数多く存在し、それぞれを分解・除去するのに広く利用される。酵素の作用点にはa型とb型の2つがある。

制限酵素 (restriction enzyme)は特定の塩基配列を認識して決まった位置を切断するので、遺伝子工学になくてはならない道具である。その大部分は回文構造を認識する。

[制限酵素]

酵素名	単離源	エンド	回文構造	配列
EcoRI	(E. coliより単離)	エンド (a型)	回文構造	...G AATTC...
Hae III	(Haemophilus aegyptiusより単離)	エンド (a型)	回文構造	...GG CC...
Hind III	(Haemophilus influenzaより単離)	エンド (a型)	回文構造	...A AGCTT...



[回文(パ lindローム palindrome)構造の例]
右のように、十字型の構造をとることができる。

● 核酸の変性とアニーリング

2本のDNA鎖は、ある温度以上に加熱したり、pH 10以上にすると相補鎖が分離しランダム構造になる。これをDNAの**変性**という。DNAは260nmにUVの吸収極大を示す(50 μg/mlが吸光度1に相当)。DNAが変性するとUV吸収は約40%増大する(**濃色効果**, hyperchromic effect)。50%変性する温度をDNAの**融点** Tmという。変性したDNA溶液を冷却すると、相補的な鎖はひとりでに結合して元の2本鎖に戻る。これを**アニーリング**(焼きなまし)という。同様に、RNAとDNAの相補鎖も結合し(**ハイブリダイゼーション**)、RNA-DNAの混成二重らせんをつくる。

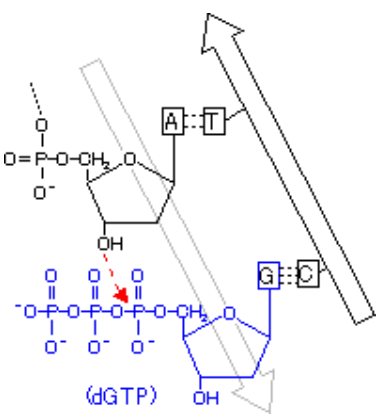
DNA複製

- 戻る
 - DNAポリメラーゼ
 - DNA複製の諸問題
 - 大腸菌のDNA複製機構
- 校正機構
 - 真核細胞のDNA複製

細胞周期のS期においてDNAは半保存的に合成される。これをDNAの複製(DNA replication)という。DNA複製は多くのタンパク質や酵素が関与する複雑な機構で、DNA鎖を延長させるのはDNAポリメラーゼという酵素である。まず、この酵素の性質から見ていこう。

DNAポリメラーゼ (DNA polymerase) ▽

DNAを鋳型として、相補的なデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を娘鎖の3'末端に結合し、鎖を延長させる酵素をDNA依存性DNAポリメラーゼという。この酵素は、DNA親鎖を3' 5'方向に読み取り、親鎖と相補的な新しい鎖(娘鎖)を5' 3'方向に延長合成する。ポリメラーゼの基質は4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)である。



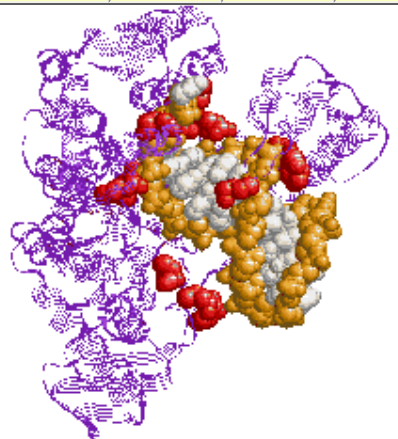
鎖の延長の開始には、親鎖の3'末端に、相補的な短いDNAやRNA断片が前もって結合していることが必要であり、単なる1本鎖には作用しない。つまり、DNAポリメラーゼは鎖の合成の開始はできない。この短い断片をプライマー(primer)という。DNA複製に関与する酵素はDNAを3' 5'方向に分解する活性を合わせもっている。この活性はDNA複製の校正に必要のものである。DNAポリメラーゼは多くの補助タンパク質と共同してDNA複製を行う。

- [DNAポリメラーゼの特徴のまとめ]
- 鎖の合成の開始はできない
 - DNAを鋳型として要求
 - DNA親鎖を3' 5'方向に読み取り、相補的なdNTPを娘鎖の3'末端に結合(5' 3'方向に延長)
 - 鎖の延長にプライマーを要求
 - 3' 5'DNA分解活性をもつ
 - (校正機構のため)

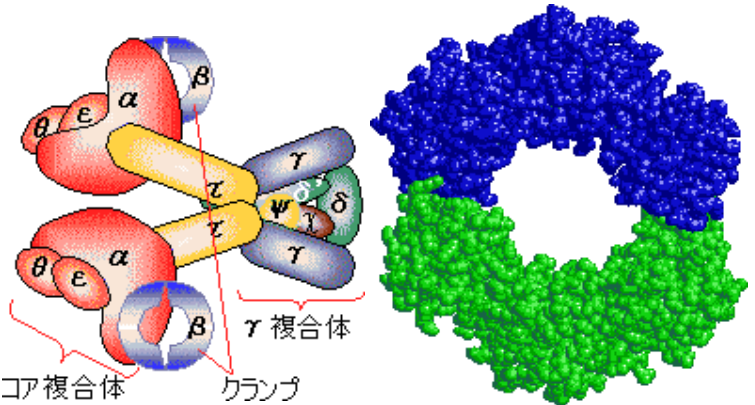
●大腸菌の酵素 大腸菌のDNAポリメラーゼ

性質	I	II	III
分子質量(kD)	109	120	175
サブユニット	1	1	約10
分子数/細胞	400	?	10-20
合成速度(NTP/分)	600	30	30,000
構造遺伝子	polA	polB	polC
合成活性: 5' 3'	+	+	+
分解活性: 3' 5'	+	+	+
分解活性: 5' 3'	+	-	-

DNAポリメラーゼIはDNA修復と複製(成熟)に関与する。DNAポリメラーゼIIも修復に関与。DNA複製の主役はポリメラーゼIIIで、多くのサブユニットから成る。



[DNAポリメラーゼIの立体構造]
DNA鎖に結合している様子。赤は結合に関与する塩基性アミノ酸。



[大腸菌DNAポリメラーゼIIIの構造] [βサブユニットの構造]

- αεθ: コア複合体(触媒中心)
- α: DNAポリメラーゼ
- ε: 3'-5'エキソヌクレアーゼ
- β: クランプ
- γ複合体: 進行性促進(クランプ装着)
- τ: コアの二量体形成促進, ATPase

大腸菌DNAポリメラーゼIIIのβサブユニットは2量体で、ドーナツ状をしている。12本のα-ヘリックスでできた中央の35Åの穴にDNAを通して複製中にDNAが外れないようにするため、クランプと呼ばれる。DNAポリメラーゼのコア酵素の複製速度を1000倍に高める。

●真核細胞の酵素

動物細胞のDNAポリメラーゼ

性質	α	β	γ	δ	ε
所在	核	核	ミトコンドリア	核	核
分子質量(kD)	120-220	30-50	150-300	140-160	核?
サブユニット	4	1	2	2or3	1?
合成活性: 5' 3'	+	+	+	+	+
分解活性: 3' 5'	-	-	+	+	+
分解活性: 5' 3'	-	-	-	-	-
合成に必要なもの					
RNAプライマー	+	-	-	+	?
DNAプライマー	+	+	+	+	+
プライマーゼの結合	+	-	-	-	+

DNAポリメラーゼα、δ、εがDNA複製に関与する酵素である。αは核DNAの複製開始とプライマー合成に関与する。δはリーディング鎖とラギング鎖を合成。εはラギング鎖のすき間をふさぐ(DNA鎖の熟成)酵素である。

DNAポリメラーゼβは核でDNA修復に関与する。DNAポリメラーゼγはミトコンドリアDNAの複製と修復を行う。

表に掲げた以外に、DNA修復に関与するDNAポリメラーゼが数多く知られている。

DNA複製の諸問題

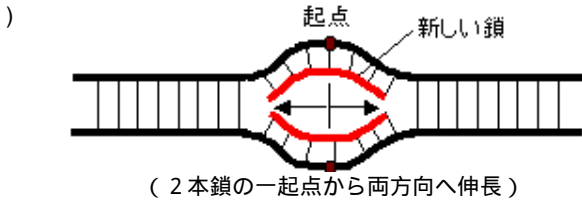


DNAの半保存的複製に関する諸問題

複製の方法

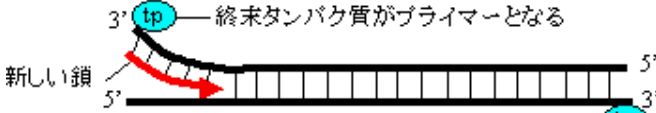
一般には(A)のように、複製は2方向に進行する。しかし、(B)や(C)のような例もある。

(A) 2方向複製(θ型)



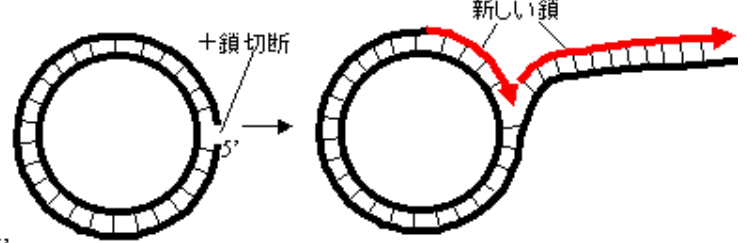
(2本鎖の一起点から両方向へ伸長)

(B) 1方向複製



(一起点から一方向へ伸長)

(C) ローリングサークル型



[DNAの半保存的複製]

(A) 一般の場合、(B) アデノウイルスの場合、(C) ファージφX174の場合

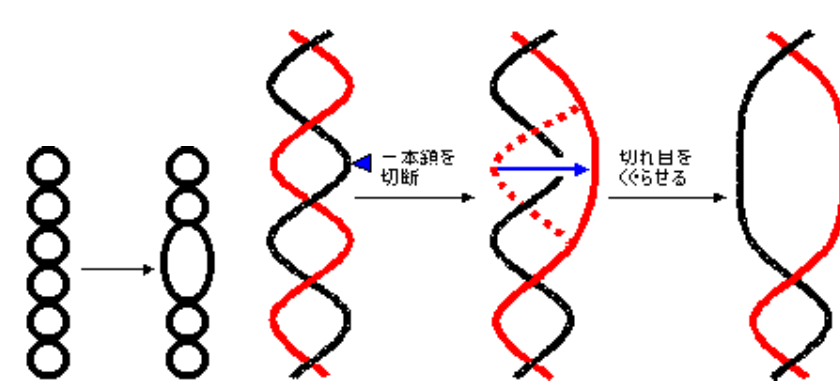
DNAの超ラセンをどうやってほぐすのか?

原核細胞のDNAは環状二本鎖である。しかも、それがさらにラセンを形成し、超ラセン状になっている。真核細胞でもDNAはソレノイドやループ構造をとっている。この超ラセンやループをほぐすのが、型トポイソメラーゼである。

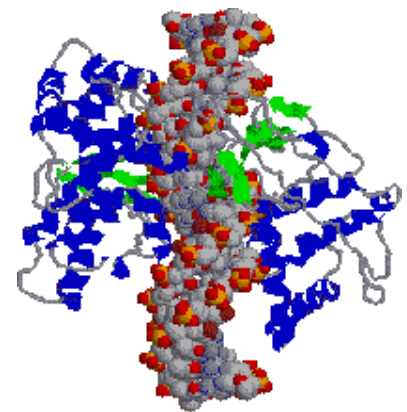
型トポイソメラーゼ: DNA鎖を一本だけ切断し、ラセンを巻き戻した後、二本鎖に戻す。

型トポイソメラーゼ: DNA二本鎖を切断し、ラセンを巻き戻した後、二本鎖を再結合。

トポイソメラーゼはDNA複製だけでなく、細胞周期でのDNAの折りたたみや巻き戻し、転写の際のDNAの巻き戻しなどにも関与する。



超ラセン 緩んだラセン [型トポイソメラーゼの作用]



[ヒトのトポイソメラーゼI/DNA複合体]

複製の開始点(複製起点 replication origin)

複製はDNAのどこから開始されるのか? 細菌の複製起点は、特有の短い繰り返し配列からなる約240塩基対の領域で、普通、1ヶ所ある。

酵母では、自律複製配列 (autonomously replicating sequence, ARS) と呼ばれる共通配列がある。

AATTCGTCAAAAAATGCT.....ATTAAAGTATTG.....TGAAAAGCAAGCA.....
.....CTAAACATAAAATCT.....

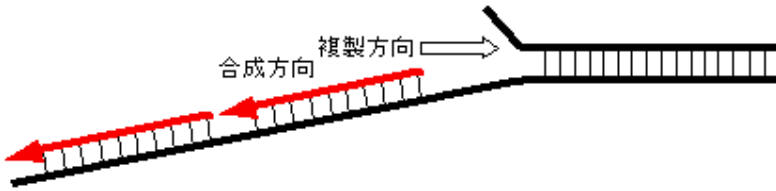
[酵母の複製起点(ARS)]

AとTに富む。赤で示す配列が必須で、下線部はその作用を増強する。

ラギング(lagging)鎖はどのようにして合成されるか?

DNAの2本の鎖は逆平行。3' 5'方向の鎖と5' 3'方向の鎖がある。3' 5'方向の親鎖から合成される娘鎖をリーディング鎖、先行鎖(leading鎖)という。DNAポリメラーゼが読み取る方向と合成方向が一致する。

一方、5' 3'方向の親鎖から合成される娘鎖を**ラギング鎖**、**遅延鎖**（lagging鎖）という。配列を読み取る方向と合成方向が逆になる！ lagging鎖をどうやってつくるのか？



[ラギング鎖は**岡崎断片**（図の赤い矢印）単位で不連続に合成される]

● DNAポリメラーゼが間違ったヌクレオチドを結合させたらどうするか？

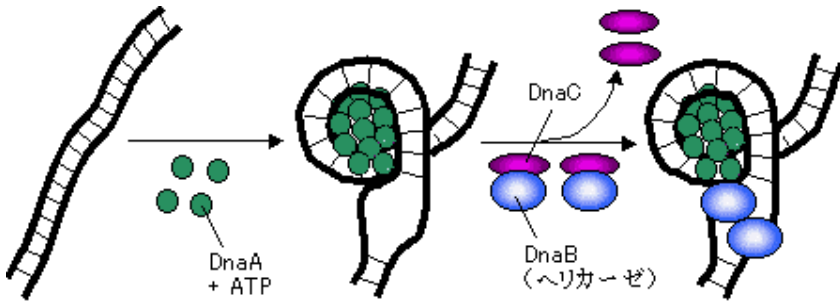
DNAポリメラーゼ自身のもつ3'->5'エキソヌクレアーゼ活性によりミスマッチヌクレオチドはすぐに分解され、正しい配列に訂正される（**校正機能**）。

大腸菌の DNA 複製機構

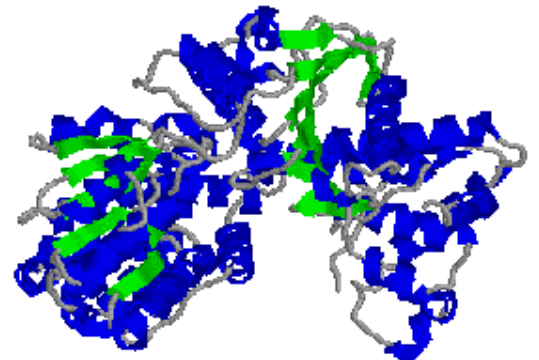


DNAの複製は多くのタンパク質や酵素が関与する複雑な機構である。

- 1) **DnaA**タンパク質が複製起点を認識し、会合体を作る。近傍のDNA鎖のらせんが巻き戻される。
- 2) **ヘリカーゼ(DnaBタンパク質)**がATPの加水分解のエネルギーで水素結合と疎水結合を切り、DNAを部分的に変性させる。



[大腸菌の複製起点におけるラセンの巻き戻し]



[ヘリカーゼの構造]

分子の下側に斜めに深い溝がある。ここにDNAが結合する。

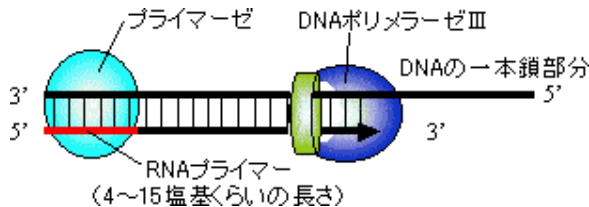
- 3) **ジャイレース**（II型トポイソメラーゼ）がDNA二本鎖を切り、鎖を回転させた後、切れ目を閉じることによって複製フォーク前方の正の超らせんを解消する。らせんの巻き数を減らす。

- 4) 一本鎖DNA結合タンパク質（single-strand binding protein, **SSB**）がDNAの一本鎖部分に結合し、再会合（アニーリング）を防ぐ。

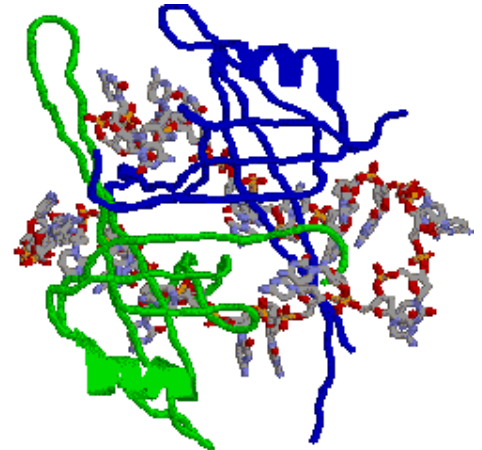
- 5) リーディング(leading)鎖の合成

- ・ **プライマーゼ**(DnaGタンパク質)によって、親鎖の3'末端に相補的なプライマーが作られる。

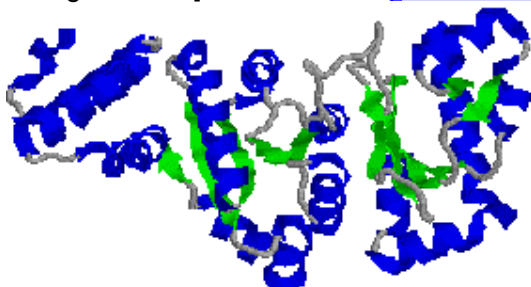
- ・ クランプ装着因子（特異的ATPaseで、**γ複合体**という）が**クランプ**分子をDNA二本鎖に装着する。



[leading鎖の合成] 緑色はクランプ（βサブユニット）

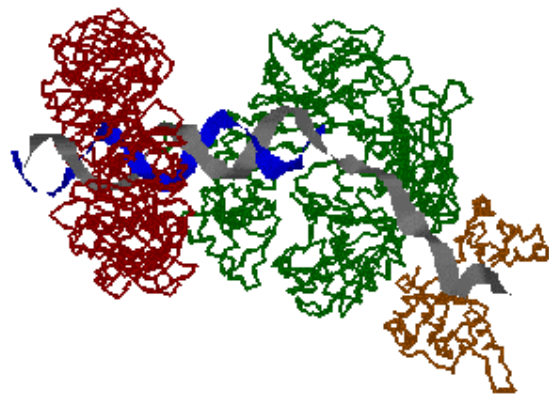


[折れ曲がった1本鎖DNAに結合したSSB]



[大腸菌プライマーゼの構造]

- ・DNAポリメラーゼIIIがクランプに結合し、プライマーの後に新しい鎖を連続的に合成していく。
- ・もし、塩基配列に間違いが生じた場合ポリメラーゼIIIはその3' 5'エキソヌクレアーゼ活性を利用して誤ったヌクレオチドを切除し、正しいヌクレオチドを挿入する(校正)。

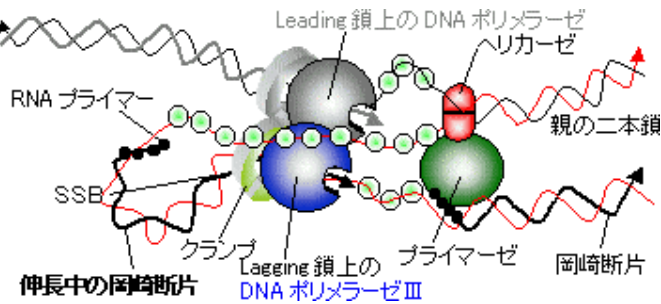


[DNAポリメラーゼ の触媒機構]

6) ラギング(lagging)鎖は岡崎断片単位で不連続に合成される。

左(赤)はクランプ, 中央(濃緑)はポリメラーゼの触媒サブユニット, 右(茶)は一本鎖DNA結合タンパク質(SSB)である。中央には二本鎖と一本鎖のDNAが見える。

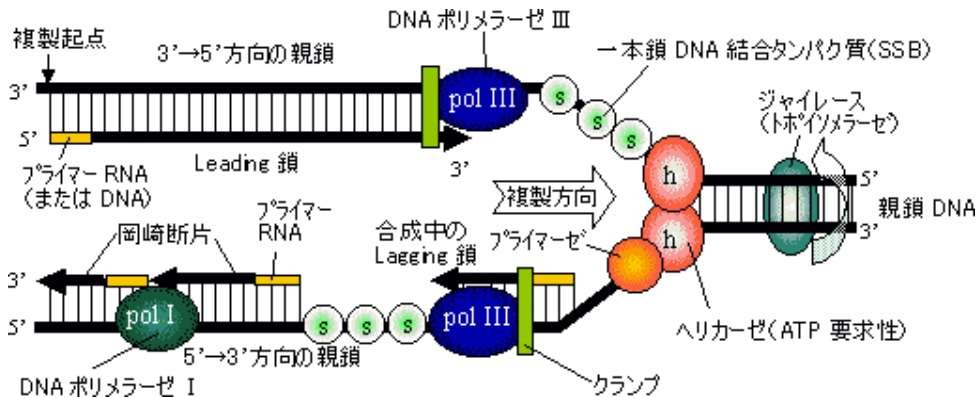
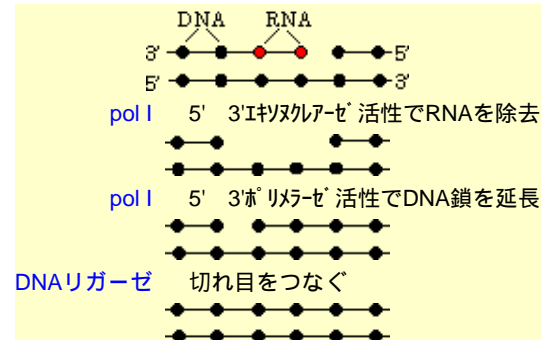
- ・プライメラーゼによって、RNAプライマーが作られる。
- ・DNAポリメラーゼがプライマーの後に新しい鎖を合成する複製方向と逆向き。DNAポリメラーゼは二量体を構成しているため、lagging鎖はleading鎖と一緒に作られる。ただし、複製される位置はleading鎖よりもずっと遅れる。合成は1つ前のプライマーの位置で終る。
- ・岡崎断片(1000~2000塩基対)が形成される。



7) DNAポリメラーゼがその5' 3'エキソヌクレアーゼ活性を利用して、岡崎断片の先頭のRNAプライマーを分解しながらDNA鎖の隙間を埋める(熟成)。

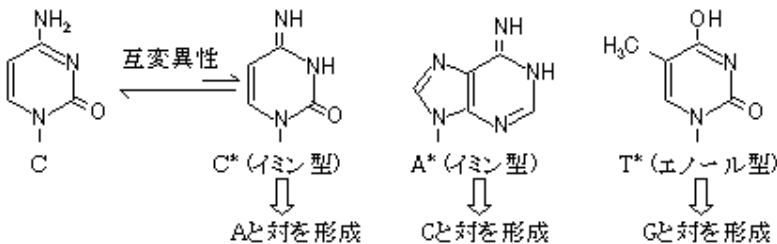
8) リガーゼが岡崎断片同士をつなぐ。

9) II型トポイソメラーゼが2つの娘鎖を分離する。



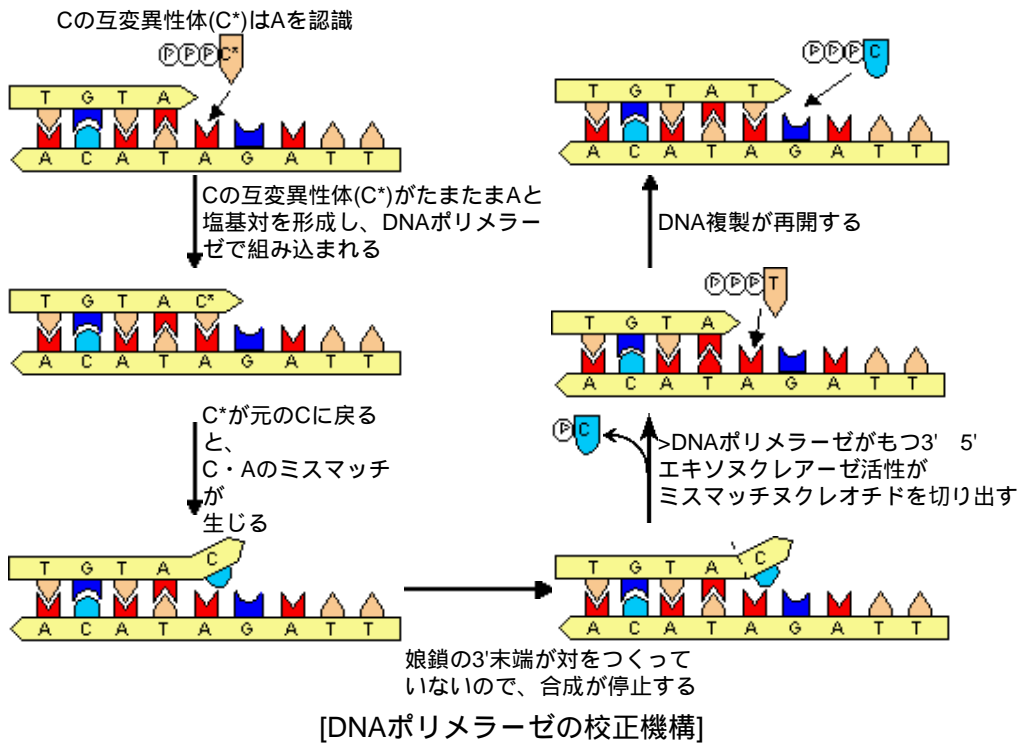
校正機構

DNAポリメラーゼは時々、間違ったヌクレオチドを挿入する。これは塩基の互変異性による場合がある。



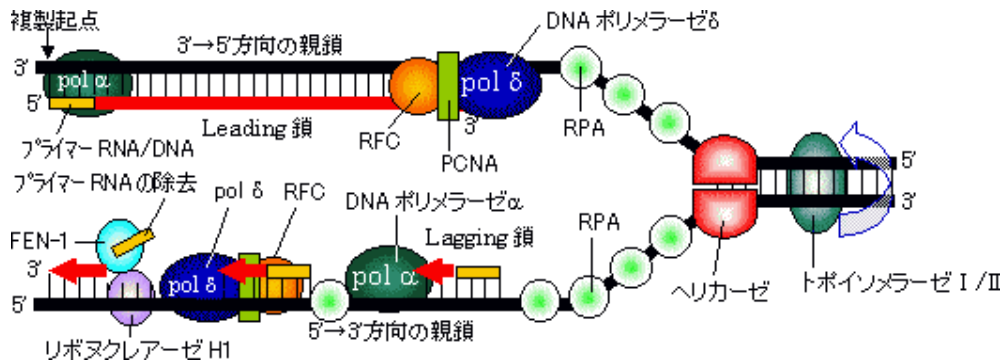
[DNAポリメラーゼのミスを引き起こす互変異性による以上塩基対形成]

この時、DNAポリメラーゼは自身の3' 5'エキソヌクレアーゼ活性で下の図のように誤りを訂正する。この校正(proof-reading)機構により、大腸菌における複製の間違いは $10^8 \sim 10^{10}$ に1回程度に抑えられる。



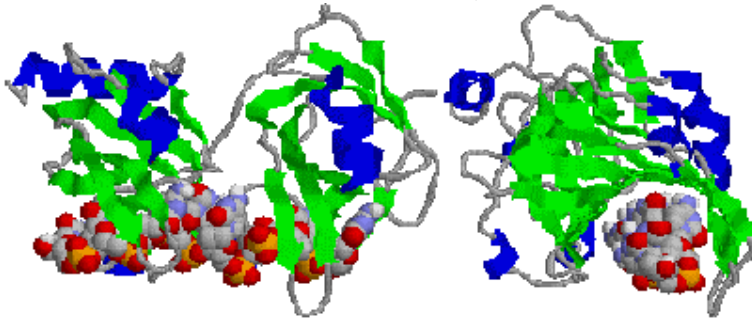
真核細胞の DNA 複製

真核細胞のDNA複製にはまだ不明な点が多いが、基本的には原核細胞と類似している。



以下に大きな違いを記す。

- 1) ヘリカーゼで一本鎖になったDNAには、大腸菌のSSBに相当する複製因子A(RF-A)が結合する。

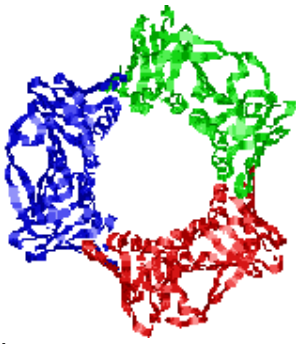


[DNAに結合したヒト一本鎖DNA結合タンパク質(RF-A)の立体構造]

左は横から、右はDNA鎖の方向から見た図。

- 2) leading鎖とlagging鎖は別々のポリメラーゼで合成される。

- ・ポリメラーゼα (プライマーゼsubunitをもつ) はプライマーと短いleading鎖を合成する。
- ・RFC (クランプ装着因子) がクランプ (3量体で環状をなし、PCNA[増殖細胞核抗原の略]という) を装着する。



1次構造がほとんど似ていないにも関わらず、ヒトのクランプ（PCNA）は大腸菌DNAポリメラーゼIIIのβサブユニットとそっくりの構造をしている。中央にたくさんのα-ヘリックスで囲まれた径35Åの穴があり、DNAポリメラーゼδをDNAに固定する役割をもつ。図で色分けしたように、このタンパク質は3量体で構成されている。ポリメラーゼαと違って、ポリメラーゼδが長いDNA鎖を複製できるのはこのタンパク質のおかげである。

[ヒトPCNA (proliferating cell nuclear antigen)]上および横から見た図

- ・ PCNAがαを排除した後、ポリメラーゼδが結合する。
- ・ ポリメラーゼδ/PCNA/RFC複合体が残りの鎖を連続的に合成する。
- ・ lagging鎖では、ポリメラーゼαと複製因子C(RF-C)がプライマーをつけた後、岡崎断片を合成する。

3) プライマーRNAはリボヌクレアーゼH 1とともに、FEN-1 (Rad 2ともいう)で分解される。隙間はポリメラーゼδがうめる(熟成)。

4) 岡崎断片は大腸菌の場合より短く、100~200塩基対程度である。

5) 複製の進行に伴い、ヌクレオソーム構造を分解したり、新生(ヒストンの倍化)する必要がある。

● ヒトのゲノムDNAは長い(右の枠内参照)。短いS期(8~10時間)で、全体をどうやって複製するのか?

==>複製起点がたくさんある。

このような複製単位をレプリコンと呼ぶ(下の図)。複製起点は電子顕微鏡で観察でき、複製バブルと呼ばれる。



<p>【ヒトの細胞のDNA】 23対、46本の染色体 (2n) DNA鎖の長さ = 99cm/haploid (n) 29億塩基対/haploid S期の長さ = 約10時間 複製の速さ = 約50塩基対/秒 (大腸菌: 500塩基対/秒) DNAの複製起点 = 約100ヶ所/染色体</p>

転写

戻る

RNAポリメラーゼ

プロモーターとターミネーター

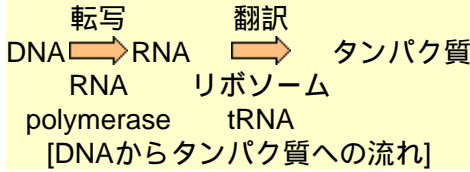
転写に影響を与える要因

RNAのプロセッシング(真核細胞)

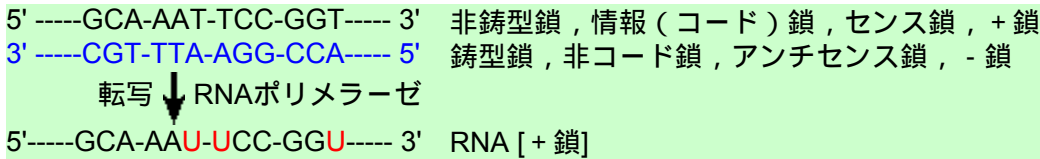
転写産物(RNA)の種類

RNAの編集

遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)によれば、DNAからRNAを経てタンパク質が作られる。



DNAからRNAを合成する段階を**転写**(transcription)という。RNAはDNAの**-鎖(アンチセンス鎖)**を鋳型として作られる。このとき、鋳型鎖のGはC、CはG、TはA、AはU(RNAではTの代わりにUを用いる)と読み取られる。



DNAの鋳型鎖(-鎖, アンチセンス鎖)がRNA合成の鋳型となる

原核生物では転写と翻訳(タンパク質合成)は同時に進行する。解糖系の酵素群のように、生物の生存に必要な最小限のタンパク質の遺伝子(ハウスキーピング遺伝子)は常にスイッチONの状態にあるが、タンパク質合成は多くのエネルギーを消費するので、生物にとって無駄な遺伝子の転写や翻訳は避けなければならない。従って、多くの遺伝子のうち、どれを、いつ、どこで、どの程度発現させるかは、生物にとって最も重要な事のひとつである。外界からのさまざまな刺激や真核生物生物が元来もっている種々のプログラムによって、個々の遺伝子の転写は調節される。

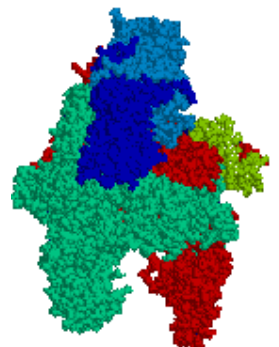
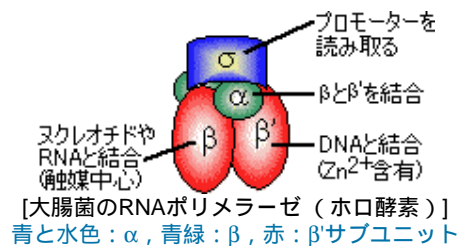
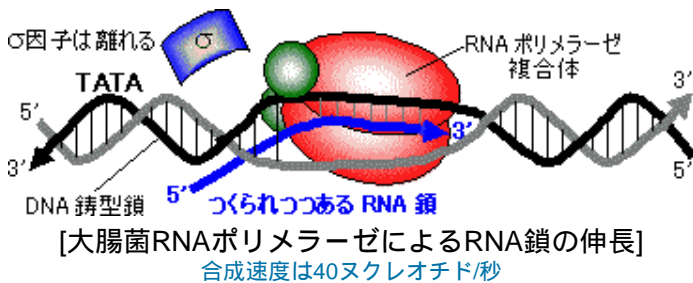
転写を触媒する酵素は**RNAポリメラーゼ**で、これには多くのタンパク質が関与する。原核生物の場合、**プロモーター**と呼ばれる特有のDNAの塩基配列がσ因子で認識されて転写が開始される。真核細胞では**転写因子**が遺伝子上流の**エンハンサー配列**に結合し、同時に、プロモーターを読み取ることによって転写が開始される。

RNAポリメラーゼ

DNAの鋳型鎖[-鎖]の塩基配列を読み取って相補的なRNAを合成する反応(転写)を触媒する中心となる酵素をDNA依存性RNAポリメラーゼ(以下、単にRNAポリメラーゼと呼ぶ)という。ヌクレオチド鎖の合成方法は**DNAポリメラーゼ**の場合と似ているが、RNAポリメラーゼが**プライマーを必要としない**ことは際立った違いである。なお、RNAポリメラーゼには、ある種のウイルスに見られるRNA依存性RNAポリメラーゼや、鋳型を必要としない真核生物の**ポリ(A)ポリメラーゼ**などもある。

● 大腸菌のRNAポリメラーゼ

RNAポリメラーゼのホロ酵素は1種のコア酵素($\alpha_2\beta\beta'$ の4量体)にσ因子が結合したものである。



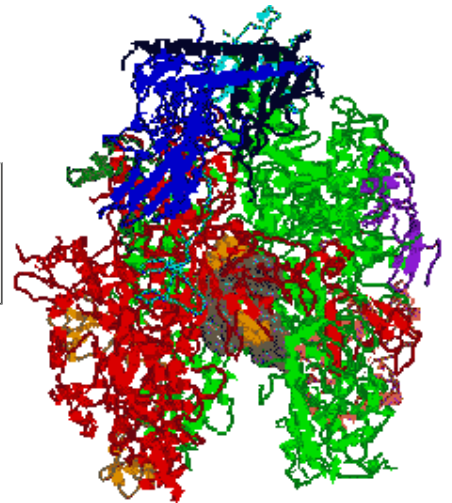
- コア酵素だけでもRNA合成活性はあるが、プロモーターからの転写開始ができない。
- σ因子は σ^{70} , σ^{32} , σ^{54} などがあり、RNA合成が開始されるとコア酵素から離れる。
- コア酵素にどのσ因子が結合するかによって転写される遺伝子の種類が決まる。

● 真核生物のRNAポリメラーゼ

真核生物には3種類のRNAポリメラーゼ(I,II,III)が存在し、そのうちRNAポリメラーゼIIがmRNAの転写を行う。RNAポリメラーゼIIは少なくとも10種類のサブユニットをもち、さまざまな調節因子と結合して巨大な複合体(ホロ酵素)を形成する。しかし、これらだけでは転写を開始できない。これらの酵素は、それぞれ異なるプロモーターを認識する因子群と結合して**基本転写因子**(酵素複合体)を形成する。

- RNAポリメラーゼI： 核小体中存在。rRNA前駆体を合成。
- RNAポリメラーゼII： 核質中存在。HnRNA(mRNA前駆体)、snRNAを合成。
- RNAポリメラーゼIII： 核質中存在。tRNAと5S rRNAを合成。

酵母の酵素は12種のサブユニットから成る巨大な複合体である。220 kDaと140 kDaサブユニットに挟まれたDNA（灰色）-RNA（橙色）複合体が中央に見える。酵母RNAポリメラーゼIIのC端にはTyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Serが26回繰り返した配列がある。哺乳類ではこれが52回繰り返している。この反復配列はカルボキシル末端ドメイン(carboxyl terminal domain, CTD)と呼ばれ、転写活性に重要である。転写が開始されるとCTDのポリリン酸化が起きる。



[転写中の酵母RNAポリメラーゼII]

プロモーターとターミネーター



● 原核生物（大腸菌）の場合

原核生物の場合、特有の塩基配列が信号として働き、転写が開始される。転写開始点の上流約10塩基と35塩基の位置に特有の配列（-10配列および-35配列）がある。これらの配列を プロモーター(promoter)といい、RNAポリメラーゼのσサブユニット（σ因子）によって認識される。なお、原核生物の翻訳は転写の開始直後から起こる。一方、転写の終了を調節する配列をターミネーター(terminator)という。

● プロモーター

コンセンサス配列	[-35信号]	[TATA box]	[転写開始位置]
	TTGACA	TATAAT	+1
<i>lacP1</i>	CCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	ATGTGTG	TGGAATT
<i>malT</i>	CATCGCTTGCAATTAGAA	AGGTTTCTGGCCGACCT	TATA ACCATTA
<i>trp</i>	GAGCTGTGACAAATTAA	ACATCGAACTAGT	TACTAGT ACGCAAGT
<i>bioB</i>	ATCGACTTGTAAACCAA	ATTGAAAAGATTTAGGT	TACAAGTCTACA
<i>recA</i>	AAACACTTGATACTGTA	TGAGCATACAGT	ATAATGCT TTAACA
<i>str</i>	TATTTCTTGACACCTTT	TGGCATCGCCCTAA	AAATTCG GCGTCC
<i>rpoA</i>	TTTTTCTTGCAAGTTG	GGTTGAGCTGGCTAG	ATTAGC CAGCCA
<i>λPR</i>	TGCGTGTGACTATTTT	ACCTCTGGCGGTGAT	AAATGGT TGCATGT
<i>λPL</i>	GCGGTGTGACATAAAT	ACCACTGGCGGTGAT	ACTGAG CACATCA
<i>ΦxA</i>	TCAGGATGACACCCCTC	CCAATTGTATGTTT	TCATGCC TCCAAAT
<i>pBR tet</i>	TCATGTTGACAGCTTA	TCATCGATAAGCTT	AAATGGG GTAGTTT
<i>ColE1 P1</i>	ACAGTCTTGACAGGGAA	AATGCAGCGGCGTAGCT	TTTA TGCTGTAT

σ⁷⁰ -10領域：TATAAT (Pribnow配列[TATA box])
 -35領域：TTGACA (-35信号)
 σ³² -10領域：CCCCATNT (Nは任意)
 -35領域：CCCTTGAA
 σ⁵⁴ -12領域：TTGCA
 -24領域：CTGGNA
 σ²⁸ -10領域：GCCGATAA
 -35領域：CTAAA

[大腸菌とバクテリオファージのσ⁷⁰プロモーターの例]

6種のσ因子は別々のプロモーターを認識する。通常はσ⁷⁰が使われるが、条件によっては別のσ因子も用いられる。例えば熱ショック時はσ³²。これにより、それぞれの環境において、異なるプロモーターをもつ遺伝子の発現を可能にしている。

転写は、(1) DNA鎖の巻き戻し、(2) プロモーターへのσ因子/RNAポリメラーゼ複合体の結合、(3) σ因子の遊離、(4) ポリメラーゼによる転写の開始と進行、(5) DNA鎖の巻き直し、の順に進む。

● ターミネーター

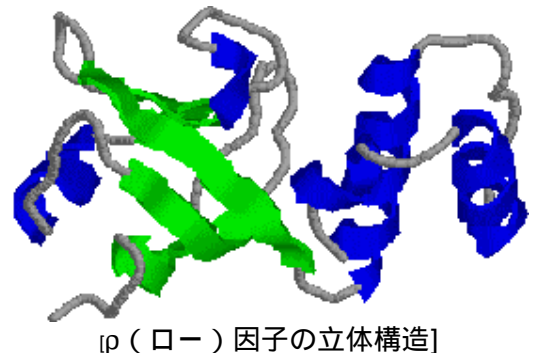
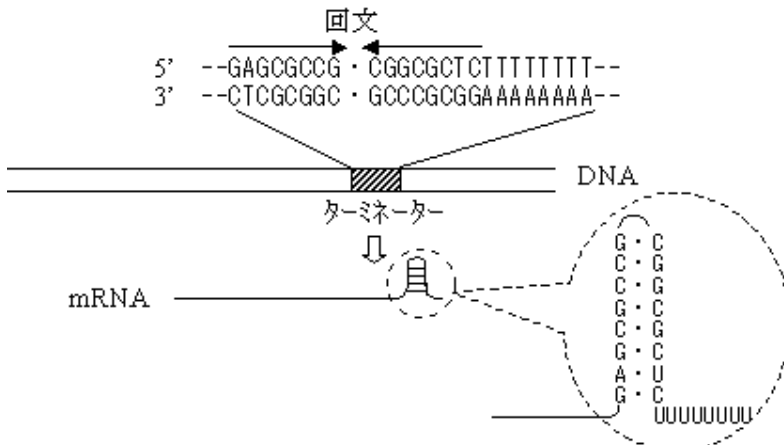
回文（パリンδροーム）配列

G：Cに富む回文は強固なヘアピン構造をとり、この後ろにU 終了もある。

が連続する。このUと鋳型DNAのAは弱い水素結合で結びついているので、RNAは鋳型から離れやすい。

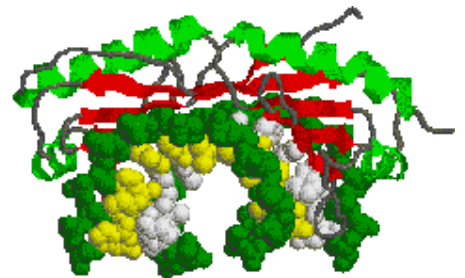
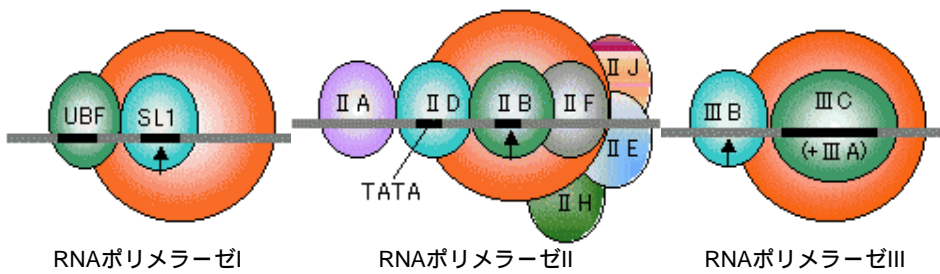
転写終結因子（ρ因子）の結合による転写

ρ（ロー）因子はヘリカーゼ活性をもち、DNA-RNA間の水素結合を切る。



[ρ（ロー）因子の立体構造]

[大腸菌の回文型ターミネーター]



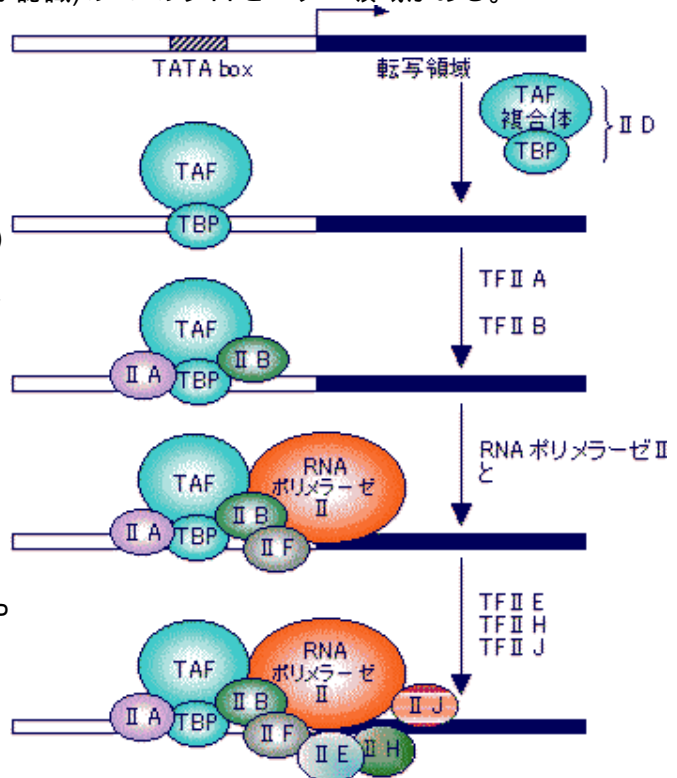
[真核細胞のRNAポリメラーゼ (基本転写因子)]

灰色横線はDNAを、黒い部分はシスエレメントを表す。矢印は転写開始位置(+1残基)。SL1, II D, III BはいずれもTBP (TATA Binding Protein)をサブユニットにもつ複合体である。

[(TATAボックス結合タンパク質) TATA配列をもつDNA分子の主鎖を濃緑、側鎖を白と黄で示す]

- RNAポリメラーゼIIIの場合
IIIのプロモーターは転写領域内部に存在。tRNA遺伝子では2つある。
- RNAポリメラーゼIの場合
コア要素 (SL1が認識) と上流域制御要素 UCE(UBFが認識)の2つのプロモーター領域がある。
- RNAポリメラーゼIIの場合
プロモーター(-25 ~ -100bp)

- (1) Hogness配列(TATA box)* : TATA(A/T)A(A/T) TF IID中のTATA binding protein (TBP)が認識
 - (2) CAAT box : (GG)CCAATC
 - (3) GC box : GGGCGG
- *TATA boxの代わりに転写開始点にイニシエーター(initiator)をもつ遺伝子もある。
イニシエーター配列 : YYAN(A/T)YY (Y=C or T)



ターミネーター

ポリ(A)付加信号 (AATAAA) の約20塩基ほど3'側 (下流) で転写終了。

原核生物の場合と異なり、TATA配列はRNAポリメラーゼ自身ではなく、TFIIDと呼ばれる基本転写因子のひとつで認識される。TFIIDは10種類以上のタンパク質から成るTAFとTBP (TATAボックス結合タンパク質) の巨大な複合体である。TFIIHはヘリカーゼ活性をもつ。RNAポリメラーゼIIが開始複合体から伸長複合体に移行するためには最大サブユニットのC末端がリン酸化される必要がある。

真核生物遺伝子の応答エレメント(RE)と対応するDNA結合因子の例

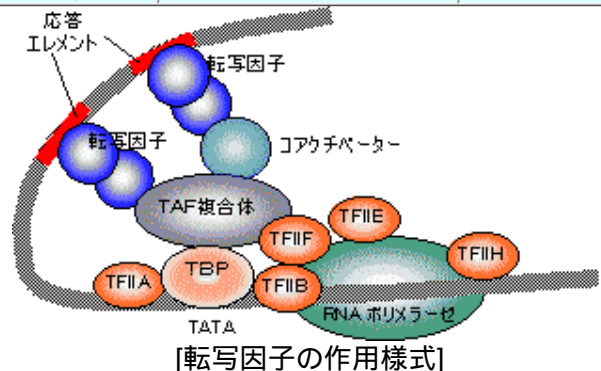
応答配列 (略語)	コンセンサス配列	結合因子
グルココルチコイドRE(GRE)	AGAACANNNTGTTCT	グルココルチコイド受容
エストロゲン応答配列(ERE)	AGGTCANNNTGACCT	エストロゲン受容体
血清応答配列(SRE)	CCATATTAGG	Serum Response Factor
熱ショックエレメント(HSE)	CNNGAANNNTCCNNG	Heat Shock Factor
cAMP応答配列(CRE)	TGACGTCA	CREB(ATF)
TPA応答配列(TRE)	TGACTCA	AP-1(Jun/Fos)
p53応答配列	PuPuPuC(A/TNA/T)GPpPyPy	p53(癌抑制遺伝子産物)
E2F応答配列	TTTCGCGC	E2F
赤血球GATA応答配列	GATA	GATA-I

転写に影響を与える要因

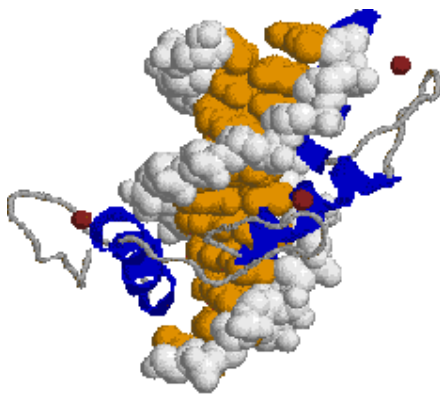


- エンハンサー配列やサイレンサー配列
遺伝子の数 ~ 数10kbp上流や下流に位置し、隣接遺伝子の転写効率を変化させるDNAの特定の配列を**応答エレメント** (reactive element, RE) という。転写効率を著しく高めるREをエンハンサー配列という。

- 転写因子(transcription factor)
遺伝子の発現や転写の促進、抑制に関わるタンパク質を**転写制御因子**あるいは単に**転写因子**という。転写因子は、DNA結合部位と転写活性化部位をもち、特有の配列 (応答エレメント) を認識する。DNA結合部位はZnフィンガー構造, helix-turn-helix (HTH)構造, ロイシンジッパー構造などの特有の立体構造から成る。現在, 数10種の転写因子が同定されている。一般に, 転写因子は二量体で機能を発揮する。

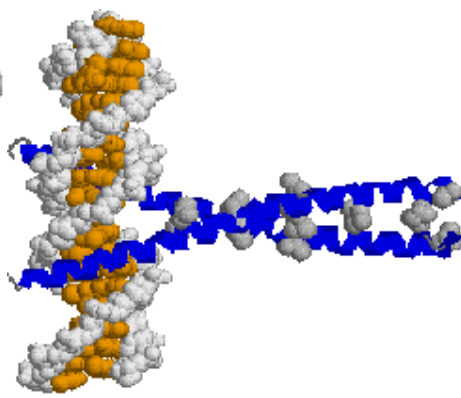


[転写因子の作用様式]



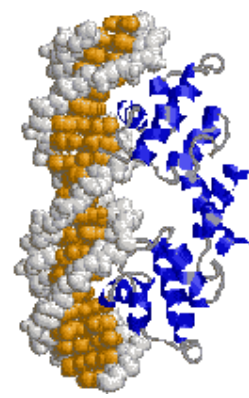
[ジンク(Zn)フィンガー構造]

転写因子ZIF268。中央に黄色と白で示したDNA鎖の主溝にはまり込むようにして、転写因子の3つのジンクフィンガーが結合している。茶色の球はZnイオンである。



[ロインジッパー構造]

巨大なヘリックスがDNAを挟むようにして、主溝に結合する。ロイシン残基を赤で示す。



[helix-turn-helix (HTH)構造]

HTH構造のそれぞれ1つのヘリックスがDNAの主溝に結合する。

● DNAのメチル化

脊椎動物遺伝子では、CG配列のシトシンが**メチル化** (mCG配列となる) されると不活性化される。メチル化部位には転写因子が結合できなくなるためである。不活性化染色体領域 (**ヘテロクロマチン**) は高度にメチル化されている。

RNAのプロセッシング(真核細胞)

● インترون (intron)

真核細胞のゲノムDNAにはタンパク質に翻訳されない塩基配列が存在する。このような配列がそのまま写しとられて生じるRNA (hnRNAという) にはタンパク質の一次構造に対応しない配列が存在することになる。このような非コード領域を**イントロン** (intron) と呼ぶ。hnRNAのイントロン部分は後で切り捨てられる。一方、転写されてはmRNAとして残る部分を**エクソン** (exon) という。真核細胞の多くのタンパク質遺伝子のエクソンはイントロンによって分断されている。原核細胞では普通、イントロンはない。

CAATボックス TATAボックス

← cccctgtggagccacacctaggggtggccaatctactcccaggagcagggagggcaggagccagggctggccataaaagtccagggca →

非転写領域 開始コドン

gagccatctattgctt**ACATTTCCTCTGACACAACCTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAG**

30

GluLysSerAlaValThrAlaLeuTrpGlyLysValAsnValAspGluValGluGlyGluAlaLeuGlyArg

GAGAAGTCTGCCGTACTGCCCTGTGGGCAAGGTGAACCTGGATGAAGTGGTGGTGGGCCCTGGGCAGCTGGTATCAAGGTTA

CAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTGGGTTTCTGATAGCCACTGACTCTCTCTG

31

gLeuLeuValValTyrProTrpTheGlnArgPhePheGluSerPheGlyAspLeuSerThr

CCTATTGGTCTATTTCCACCCTTAGCTGCTGGTGGTCTACCTTGGACCCAGAGGTCTTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACT

ProAspAlaValMetGlyAsnProLysValLysAlaHisGlyLysLysValLeuGlyAlaPheSerAspGlyLeuAlaHisLeuAsp

CCTGATGCTGTTATGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGCCAAGAAAGTGCCTGGCTTCTAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGAC

104

AsnLeuLysGlyThrPheAlaTheLeuSerGluLeuHisCysAspLysLeuHisValAspProGluAsnPheArg

AACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGACTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACCTGGATCCTGAGAAGTTCAGGCTGAGTCTATGG

GACCCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTAGAAATG

GGAAACAGACGAATGATTCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTATTTGCTGTTCATAACAATGTTTTCTTT

TGTTAATTTCTGCTTTCTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAGGAAA

TATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTCTTATT

TGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTCTTTATTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATG

TTTTAATATGTGTACATATTCACCAAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTAAAAATGCTTTCTTCTTTAATACTTTT

TTGTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATTAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCAATCT

AAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATTTCTGCATATAAATGTAACTGATGTA

AGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAATTCGCTTTATTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAG

105

LeuLeuGlyAsnValLeuValCysValProAla

TCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAAGTGGTGGTCTGTGTGCCGGCC

HisHisPheGlyLysGluPheThrProProValGlnAlaAlaTyrGlnLysValValAlaGlyValAlaAsnAlaLeuAlaHisLys

CATCACTTTGGCAAGAAATTCACCCACCAAGTGCAGGCTGCCATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGCTAATGCCTGGCCACAAG

146

TyrHis 終止コドン

TATCACTAAGCTCGCTTCTTCTGCTGCCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGATATTAT

ポリA付加信号

GAAGGGCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAACCATTTATTTTCATTCGaatgatgtatttaaattatttctgaatatttta

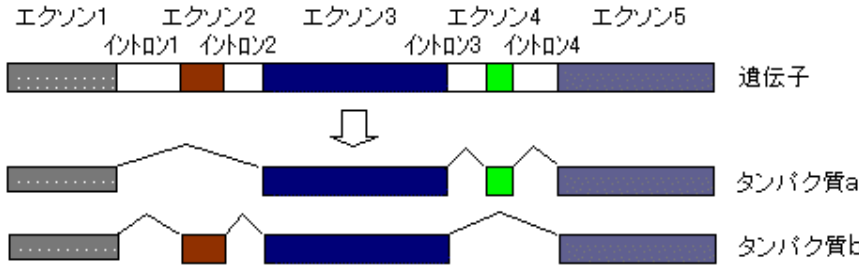
Ctaaaaagggaatgtggaggtcagtg..... ←

非転写領域

[ヒトβ-グロビン遺伝子の全ヌクレオチド配列]

● 選択的スプライシング (alternative splicing)

多くの遺伝子の発現は、スプライス部位の選択で制御される。エキソン部分が前後のイントロンと一緒にイントロンとして働くと、そのエキソンを欠くタンパク質となる。この機構により、1つの転写単位から複数のタンパク質をつくり出すことができる。免疫グロブリンや骨格タンパク質の例が特に有名。



[選択的 (Alternative) スプライシングの模式図]

タンパク質aとbそれぞれ、エクソン2と4を欠いている。タンパク質aではイントロン1-エクソン2-イントロン2が1つのイントロンとして認識されるため。

転写産物(RNA)の種類

● ヘテロ核RNA (hnRNA、真核生物のみ)

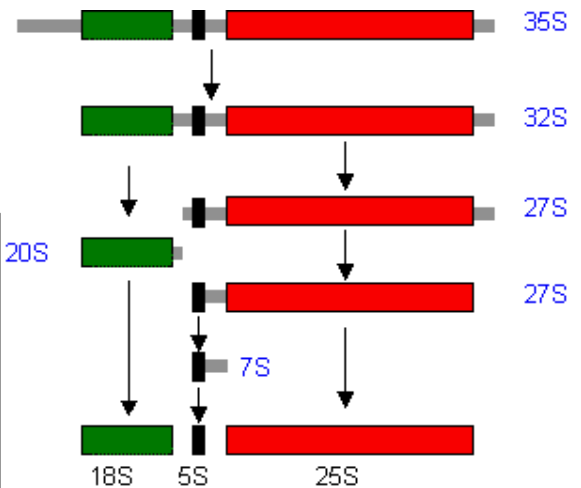
- RNAポリメラーゼIIの直接の転写産物で、mRNAの前駆体として核に存在する。
- 5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ(A)鎖がつく。大半は核で分解されるが、一部がスプライシング過程を経てmRNAになる。

● 伝令RNA (mRNA)

- 核においてhnRNAのプロセッシングで生じる (真核生物)。原核細胞では直接DNAから転写されてつくられる。
- リボソームに結合し、タンパク質合成の鋳型となる。
- 原核細胞の場合、複数のタンパク質が1つのmRNAからつくられることが多い (ポリシストロン)。

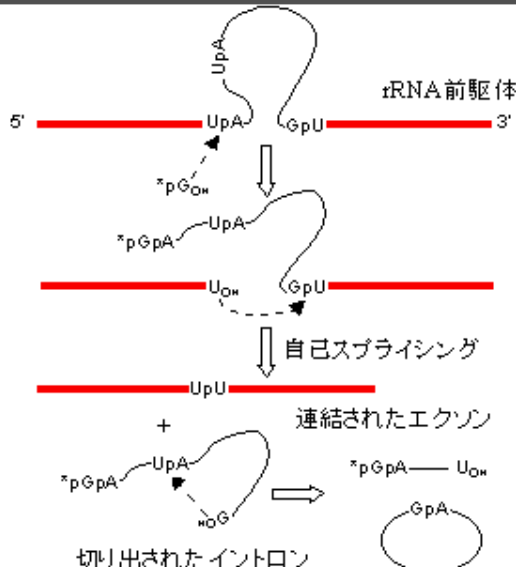
● リボソームRNA (rRNA)

- 真核細胞では核小体においてRNAポリメラーゼIで転写され、プロセッシングを経てつくられる。ラットの場合、18S, 28S, 5.8S, 5Sの4種。大腸菌では16S, 23S, 5Sの3種。
- rRNAは分子内塩基対形成によって固有の二次構造をとり、リボソーム過程の多くの部分で主要な触媒活性を担う (核酸酵素, ribozyme)。

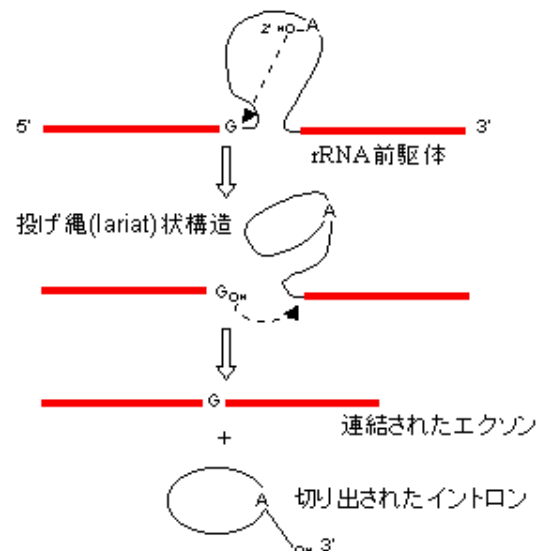


《自己切断を起こすRNA(ribozyme)》

- 1) ウイロイド(viroid)：殻をもたない裸の一本鎖、環状、低分子RNA。ジャガイモやせいも病など植物の病原体。
- 2) ウィルスoid(virusoid)
 - 一本鎖、環状RNA。直線状RNAウィルスと一緒に粒子中に存在。単独では感染性なし。
 - これらはともにローリングサークル型で複製される。また、自己触媒的にプロセッシングを起こす。構造上、次の2つがある。
 1. ハンマーヘッド型リボザイム
 2. ヘアピン型リボザイム
- 3) その他：T4ファージRNA前駆体、d型肝炎ウィルスRNA、アカパンカビのミトコンドリアのプラスミド転写物なども自己切断や自己連結を起こす。



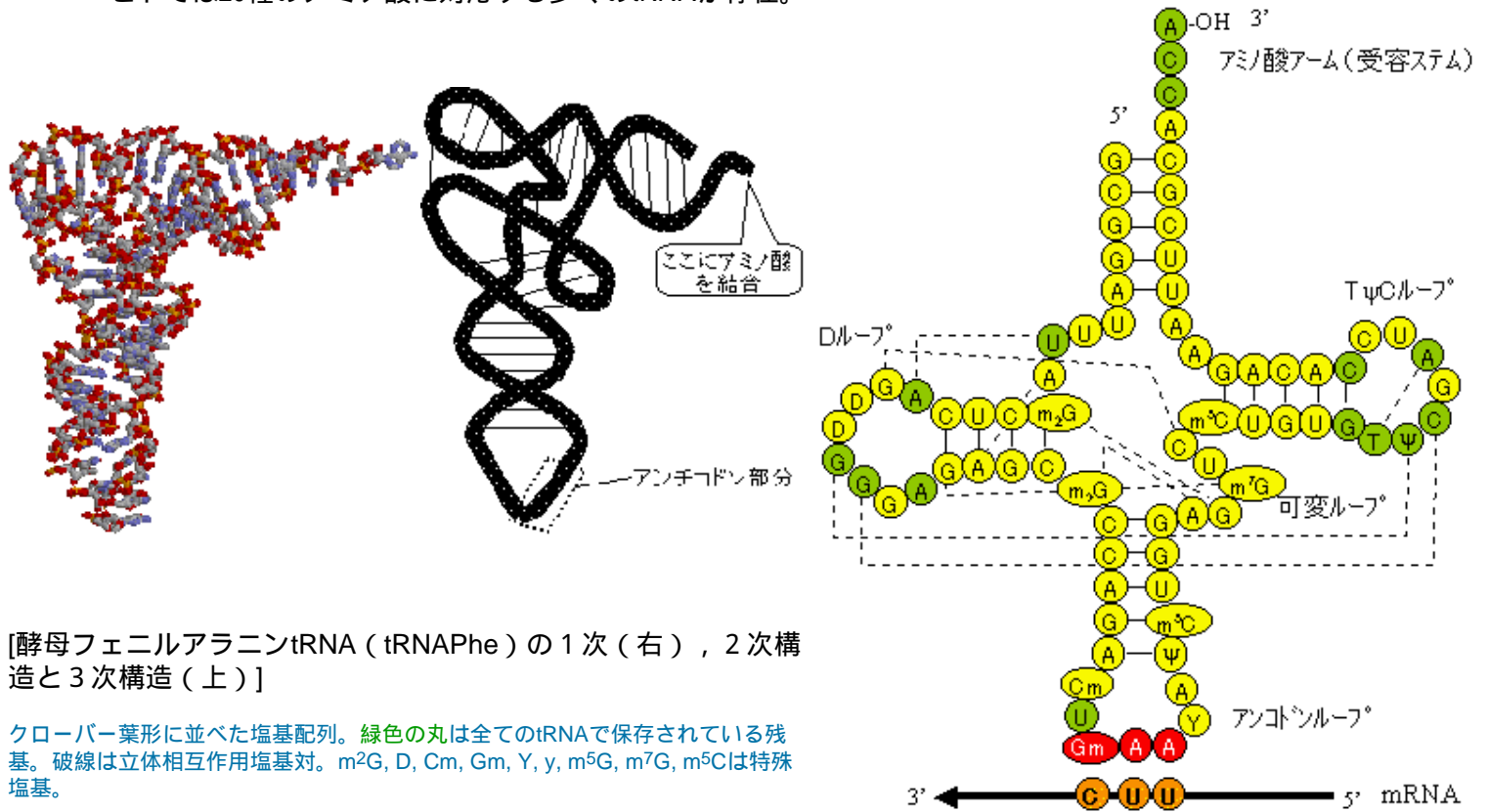
[グループI型イントロンの除去 (テトラヒメナrRNAの自己スプライシング)] グアノシンとMg²⁺(or Mn²⁺)が必須。



[グループII型イントロンの除去] ポリアミンを補助因子として要求。

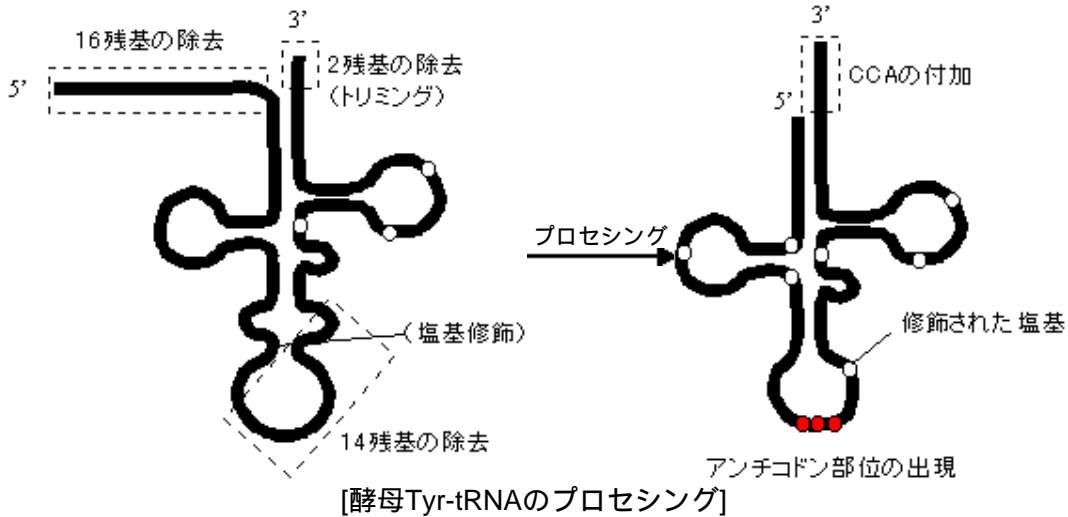
● 転移RNA (tRNA)

- ・真核細胞ではRNAポリメラーゼIIIで転写され、プロセッシングを経た後、塩基に種々の修飾を受け、65～110塩基の低分子RNAになる。
- ・分子は平面構造で書くとクローバー葉をなすが、立体的にはL字型の3次構造をとる。G:Uのような非Watson-Crick塩基対も含む。
- ・3'端は常に-CCAで、場合によってはCCAが後で付加される。
- ・3'末端のAに所定のアミノ酸をエステル結合で結合してリボソームまで運ぶ。mRNAのコドンに相補的なアンチコドン (anticodon) 部位をもち、ここでmRNAと結合する。
- ・ヒトでは20種のアミノ酸に対応する多くのtRNAが存在。



[酵母フェニルアラニンtRNA (tRNA^{Phe}) の1次 (右), 2次構造と3次構造 (上)]

クローバー葉形に並べた塩基配列。緑色の丸は全てのtRNAで保存されている残基。破線は立体相互作用塩基対。m²G, D, Cm, Gm, Y, y, m⁵G, m⁷G, m⁵Cは特殊塩基。



● ミトコンドリアRNA (真核生物)

ミトコンドリア独自のrRNA、tRNA、mRNA。ミトコンドリアのコドンは一部、核のコドンと異なる。

● snRNA (small nuclear RNA、真核生物)

イントロンの切り離しに鋳型として利用される小型のRNA。

● トランスファーメッセンジャーRNA (tmRNA、原核生物)

大腸菌内でRNaseによりmRNAが分解され転写が途中で停止した場合、tmRNAはリボソーム-mRNA複合体に結合し、tRNAの代わりとなって運んできたAlaを付加する。さらに、自己のタグ配列をmRNAの代わりに使ってタンパク質合成を完了する (C端は常に、AANDENYALAAとなる)。C端にこの配列を持つタンパク質は大腸菌内で分解される。

2) 塩基の置換

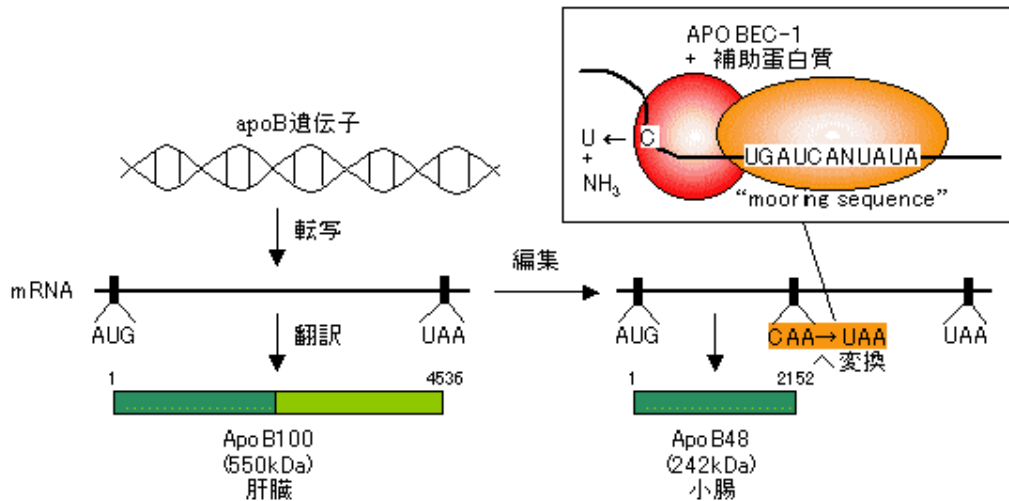
これまでに[A I], [C U], [U C], [U A]の4つの変換が報告されている。

(例) apolipoprotein B (apoB) (CAAGln UAAstop)

neurofibromatosis type I (NF1) (CGAArg UGAstop)

グルタミン酸受容体B subunit (CAGGln UIGArgなど8ヶ所)

A Iへの変換はアデノシンデアミナーゼによる。



[アポリポタンパク質mRNAの小腸における編集]

肝臓では550 kDaのフルサイズのアポリポタンパク質が作られる。一方、小腸ではそのmRNA (APOBEC-1) の段階で、シトシンデアミナーゼ作用でCがUへ変換して終止コドンが生じる。その結果、上の図のように242 kDaのタンパク質が作られる。

● RNA編集の意義

(1) correctional editing (編集を受けてはじめて機能する分子になる)

植物ミトコンドリアのある遺伝子には開始コドンがない。ACG AUGの編集により開始コドンが創生され、翻訳可能な配列になる。

(2) transmutational editing (別の機能の獲得)

編集前のRNAも機能をもつが、編集により機能が変化する。

- 「センスコドン \rightleftharpoons 終止コドン」の変化で翻訳産物の大きさが変化
- 塩基挿入によりフレームシフトが起き、翻訳産物の大きさや分子後半の配列が変化
- 特定のアミノ酸のみが置換され、翻訳産物の機能が変化
グルタミン酸受容体のGln Arg (Q/R エディティング) など
- 塩基配列の変化により、RNAの安定性などが変化

トリパノソーマでは、その生活環に合わせてミトコンドリアの機能が大きく変化する。発生の分化の段階によってmRNAの編集を行えば、構造的、機能的に異なる蛋白質をつくる事が可能となる。

RNAプロセシングのまとめ

種類	標的RNA	触媒	結果
キャップ付加	HnRNA	キャップ形成酵素	5'にキャップが付加される
ポリ(A)付加	HnRNA	ポリ(A)ポリメラーゼ	3'にポリ(A)鎖が付加される
スプライシング	HnRNA, pre-rRNA, pre-tRNA	スプライセオソーム またはpre-RNA自身	イントロンが除去される
トリミング	全RNA	ヌクレアーゼ	ヌクレオチド残基が3'末端から除去される
塩基修飾	pre-tRNA	特定の酵素	特定の塩基が特殊塩基に変わる
編集	mRNA	エディトソーム	ヌクレオチド残基が付加、削除、変更される

タンパク質の生合成(翻訳)

- 戻る
- リボソーム
- 遺伝暗号(コドン)
- タンパク質の生合成機構
- コドンのゆらぎ
- 開始コドンの読みだし
- 遺伝暗号の書き換え
- タンパク質のプロセシング
- 分子疑態

mRNAを鋳型としてタンパク質がつくられる段階を翻訳(translation)という。タンパク質の生合成にはmRNA以外に、トランスファーRNA(tRNA)やリボソームが必要である。原核細胞と真核細胞の翻訳機構は大変良く似ている。生命にとって重要な機構は生物種を超えて保存されてきた結果といえる。

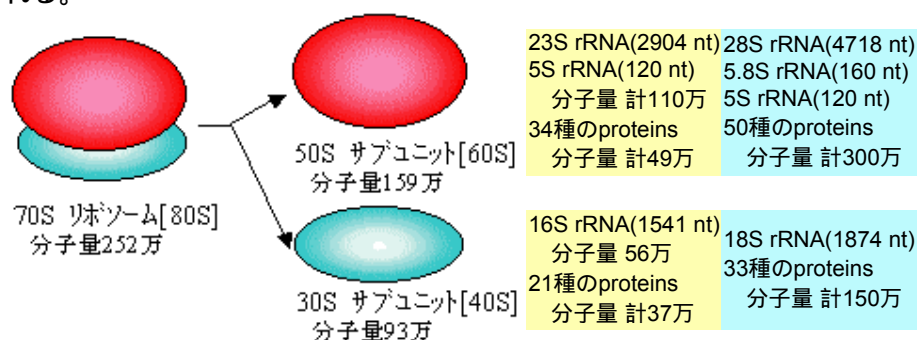
リボソーム (ribosome) ▼

タンパク質合成の場。大小2つの粒子よりなる。大腸菌では3種のrRNAと53種のタンパク質、真核細胞では4種のrRNAと82種のタンパク質から成る。rRNAは触媒活性をもつ(ribozyme活性)。

原核細胞：リボソームは細胞質に遊離の状態が存在する。

真核細胞：リボソームは小胞体膜に結合し、粗面小胞体を形成する。

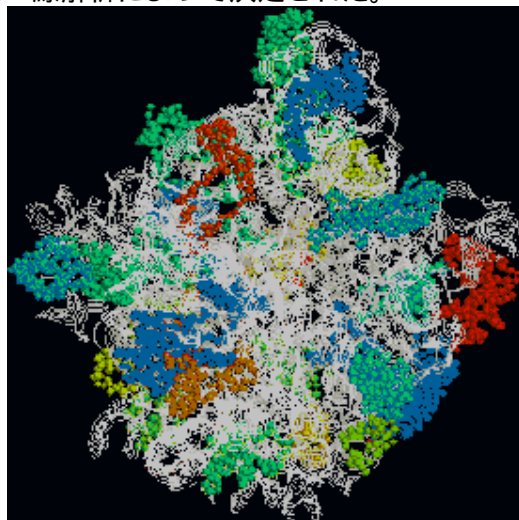
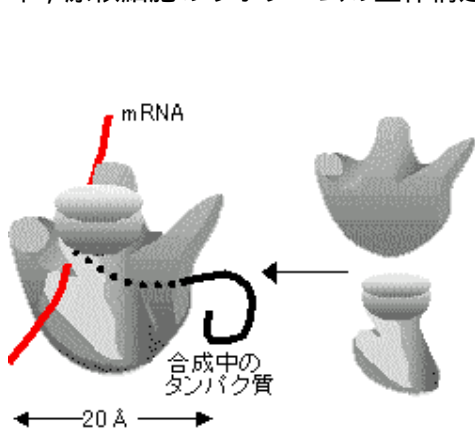
ミトコンドリア、パーオキシソーム、核で必要なタンパク質は遊離の状態のリボソーム(free ribosome)でつくられる。



[原核細胞と真核細胞のリボソームのサブユニット構造と構成成分]
水色枠内は真核細胞の場合

●リボソームの姿

電子顕微鏡でとらえられた像から、大腸菌のリボソームは下のような奇妙な形をしていると推定されていた。2001年、原核細胞のリボソームの立体構造がX線解析によって決定された。



[リボソーム50Sサブユニット]
正面(30Sと結合する面)から見た図

構成： 23S rRNA(2904 nt), 5S rRNA(120 nt)
分子量計110万
34種のタンパク質 分子量計49万



[リボソーム30Sサブユニット]
正面(50Sと結合する面)から見た図

構成： 16S rRNA(1541 nt) 分子量56万
21種のタンパク質 分子量計37万

遺伝暗号(コドン) ▲

mRNAの連続する3塩基をコドン(codon)という。コドンはそれぞれ1つのアミノ酸に対応するが、UAA, UAG, UGAの3つに対応するアミノ酸はなく、タンパク質合成の終了を指定する(終止コドン)。mRNAの翻訳の際、最初に現れるAUGはタンパク質合成の開始を指定する(開始コドン)。開始コドン以降の配列を3塩基ずつ区切っていくと、それらが1つ1つのアミノ酸に対応する。

.....GAUAGGCGCCATTAGAU**AUG** GUU UGU UUU GCG.....CAU **UAA** UAUAGCGAUUUU.....
 開始コドン 終止コドン

遺伝暗号表(mRNAのコドン)

		2文字目				
		U	C	A	G	
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U	
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C	
	UUA Leu	UCA Ser	UAA オーカー	UGA オパール	A	
	UUG Leu*	UCG Ser	UAG アンバー	UGG Trp	G	
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U	
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C	
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A	
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G	
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U	
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C	
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A	
	AUG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G	
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A	
	GUG Val*	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G	

下線は終止コドン。 * 原核生物では開始コドンとなる

●コドン偏位(codon bias)

全てのコドンが一様に使われるわけではない。各々のコドンの使用頻度は生物によってかなり偏りがある。終止コドン(Stop)の使用頻度の偏りが特に大きい。コドンバイアスはPCRのプライマーをデザインする時に考慮する必要がある。

ヒトと大腸菌のコドン使用頻度(%)

アミノ酸	コドン	ヒト	大腸菌
Arg	CGU	8.4	37.3
	CGC	19.6	38.1
	CGA	11.0	6.6
	CGG	20.6	10.2
	AGA	20.0	4.9
Ala	AGG	19.8	2.9
	GCU	26.2	17.3
	GCC	40.1	26.6
	GCA	22.2	21.9
Stop	GCG	10.9	34.3
	UAA	28.5	61.7
	UAG	20.8	8.0
	UGA	50.7	30.3

タンパク質の生合成機構



●大腸菌のタンパク質合成

原核生物の翻訳は転写と共役して起こる。

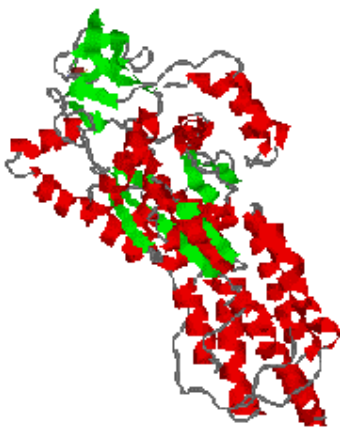
(1) アミノ酸の活性化

アミノ酸が特異的なtRNAの2'または3'末端にエステル結合する。アミノアシル-tRNA合成酵素がtRNAへのアミノ酸の結合を触媒する。

●アミノアシル-tRNA合成酵素

アミノアシル-tRNA合成酵素の分類

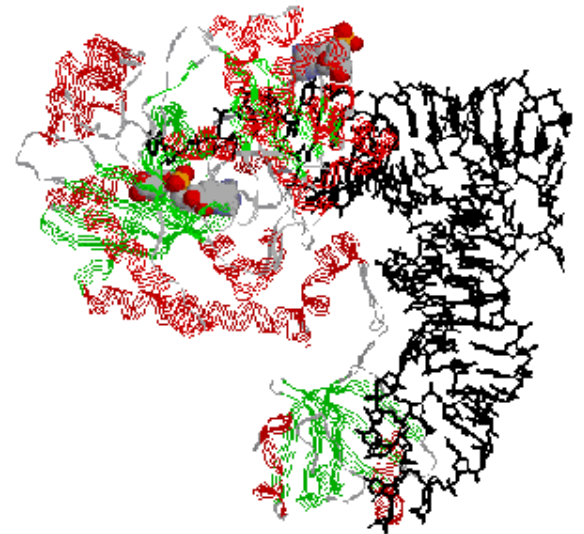
クラス	酵素(2'-OH)	クラス	酵素(3'-OH)
Glu, Gln, Arg, Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Trp		Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Asp, Asn, His, Lys	



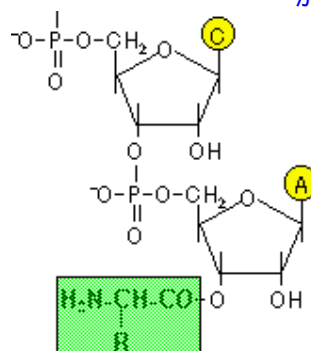
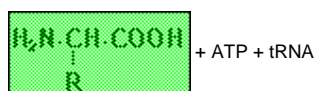
[Met-tRNA合成酵素の構造]
クラス 酵素



[His-tRNA合成酵素の構造]
クラス 酵素 (酵素内部にHisが結合)



[Asp-tRNA合成酵素とtRNA^{Asp}複合体]
左半分はAsp-AMPと結合したAsp-tRNA合成酵素。右の黒線で示すのはAsp特異的なtRNA。tRNAの3'末端がAspのすぐ側に結合しているのが分かる。

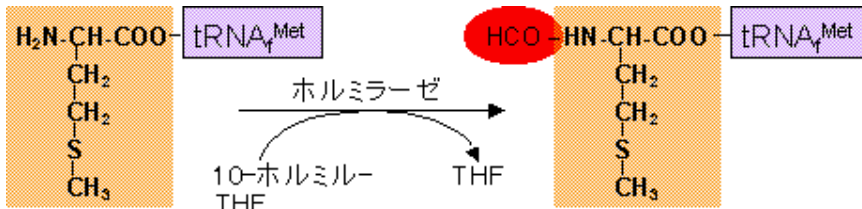


[アミノアシル-tRNAの合成(アミノ酸の活性化)]

tRNAの3'末端

(アミノ酸は2'-OHに結合する場合もある)

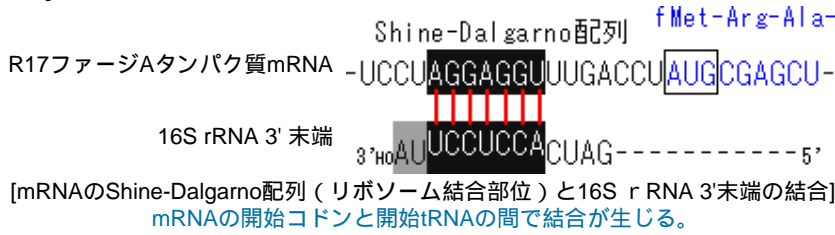
開始コドンに対応する開始tRNA (tRNA^{fMet}) には先ずメチオニンが結合し、そのアミノ基がホルミル化されてホルミルメチオニンになる。



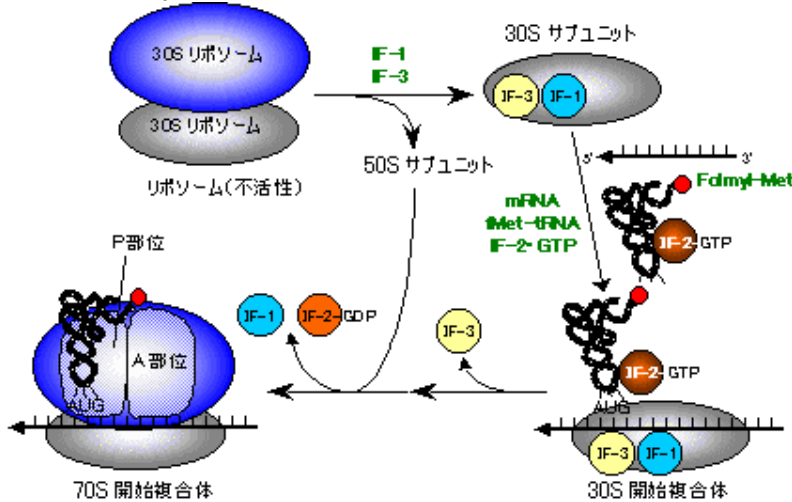
[原核細胞の開始tRNAの合成]

(2) 開始複合体の形成

不活性リボソームの30Sサブユニットに開始因子3(IF-3)と開始因子1(IF-1)が結合し、リボソームを解離する。つづいて、GTP、mRNA、IF-2、Formyl-メチオニンを結合した開始tRNA(fMet-tRNA^{fMet})複合体が30SサブユニットのP部位に結合する。



IF-3の遊離に続き、50Sサブユニットが30Sサブユニットに結合したGTPを加水分解しつつ、この複合体に結合する。IF-1とIF-2が離れる。次にFormyl-メチオニンを結合した開始tRNA (tRNA^{fMet}) が結合する (真核生物では、開始tRNAはメチオニンを運ぶ)。これにさらに50Sサブユニットが付き、複合体が完成する。



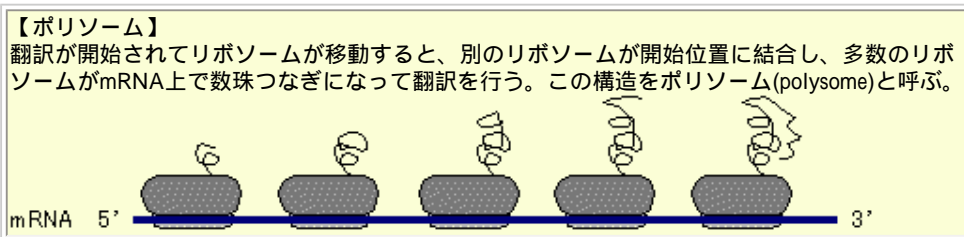
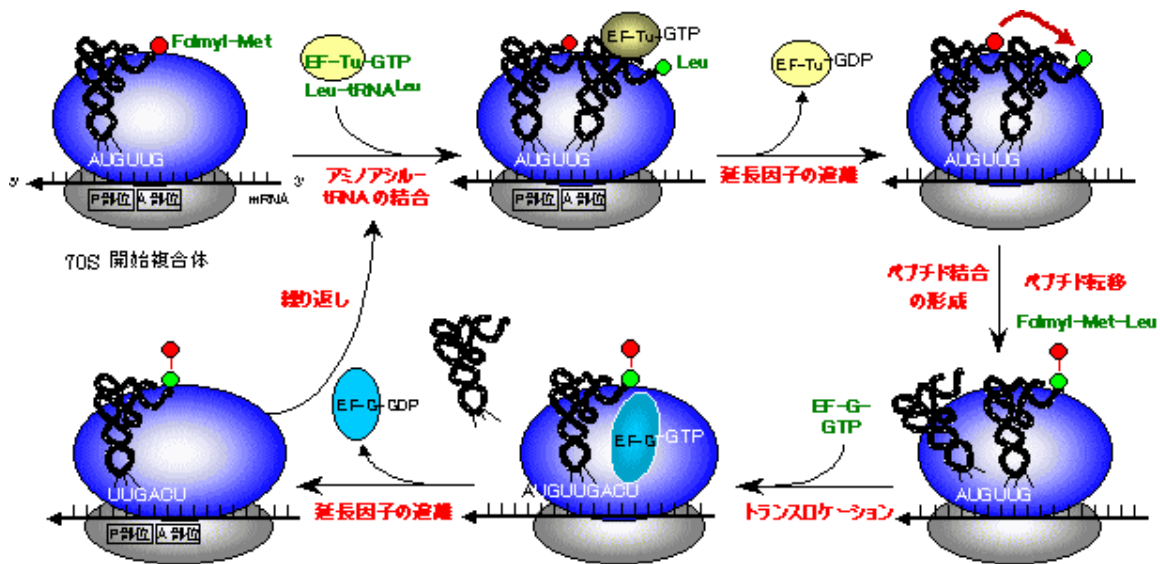
[タンパク質合成の開始 (大腸菌)]

(3) ポリペプチド鎖の延長

成長ペプチド鎖のC末端にアミノ酸をつける3段階反応サイクルでタンパク質がつくられる。

- 1) mRNAのコドンに対応するアミノアシル-tRNA-延長因子Tu-GTP複合体がリボソームの **A部位**へ結合する。
- 2) **P部位**のアミノ酸が**A部位**のアミノ酸に転移し、ペプチド結合を形成する (**ペプチド転移**)。
- 3) アミノ酸を放して空となったtRNAがP部位を離れる。
- 4) A部位のペプチジル-tRNAがmRNAごとP部位に移動し (**トランスロケーション**) , GTPを結合した延長因子GがA部位に結合する。
- 5) 延長因子GがGTPを加水分解してリボソームを離れ、次の繰り返しサイクルに入る。

このサイクルを繰り返すことで、つぎつぎとアミノ酸が連結されていく。



(4) 生合成の終了 (鎖終結)

mRNAの終止コドン (UAG、UAA、UGA) がA部位にくると、解放因子(RF-1,2,3)がリボソームのA部位に入り、終止コドン認識する。RF-1はUAAとUAGを、RF-2はUAAとUGAを認識する。これによりtRNAに結合したポリペプチド (タンパク質) を切り離し、タンパク質合成が終了する。

● 真核生物のタンパク質合成

基本的には、大腸菌の場合と大変良く似ている。リボソームの構成の違いはリボソームの項を見よ。

- 開始因子は6種ある： eIF-1a, eIF-2, eIF-3, eIF-4a/4b, eIF-4f, eIF-5
- 開始tRNA (tRNA_i)はFormyl-Metではなく、**メチオニン**を運ぶ。
- リボソームへのmRNAの結合では、キャップ構造が認識される。Shine-Dalgarno配列はないが、Kozak配列 (**G/ACCAUGG**)が開始部位近傍にあると、翻訳効率が著しく向上する。一般に、最初の開始コドン(AUG)から翻訳が始まるが、2番目以降の開始コドンから始まる場合もある。
- 開始複合体形成に、GTP以外にATPを必要とする。
- ペプチド鎖の伸長段階に、延長因子eEF-1a, eEF-1b, eEF-2が関与する。
- 解放因子は1種(eRF)で、GTPを必要とする。

コドンのゆらぎ

アンチコドンの5'末端 (mRNAのコドンの3文字目に対応) はしばしば標準的ではない塩基対をつくる (コドンの3文字目の位置に構造のゆとりがあるため*)。このゆとりをゆらぎ(wobble)という。A-I塩基対のようなプリン同士を組み合わせも可能となる。

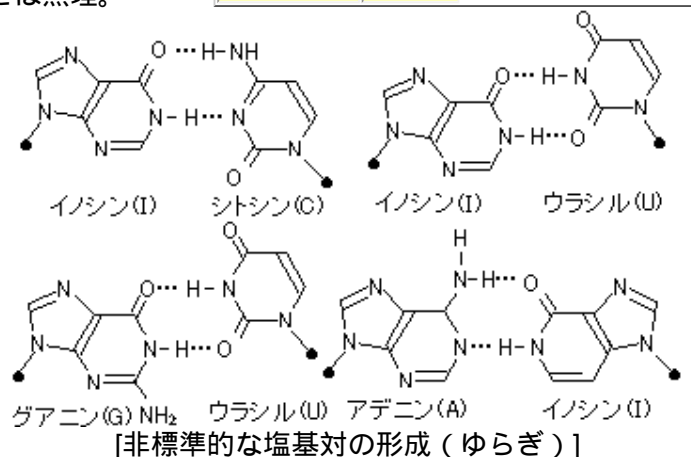
* DNAでは構造のゆとりはなく、A・T, G・C以外の組み合わせは無理。

アンチコドンの1文字目 (5'末端)	対応するコドンの3文字目	コドンの3文字目 (3'末端)	対応するアンチコドンの1文字目
C	G	C	G, I
A	U	A	U, I
G	C, U	G	C, U
U	A, G	U	A, G, I
I	C, A, U		

開始コドンの読みもらし

一般に、最初の開始コドン(AUG)から翻訳が始まるが、複数の開始コドンが用意されているタンパク質の場合には、2番目以降の開始コドンから始まることもある。どの開始コドンから翻訳を始めるかによって、長さの異なる複数のタンパク質(isoforms)が作られる。これを開始コドンの読みもらし(leaky scanning)という。

次のCCAAT/enhancer binding proteinは、長さの違いにより、機能が異なるタンパク質が作られる例である (Calkhovenら, Genes & Dev., 14, 1920-1932 (2000))。



CAGUUGGGGC ACUGGGUGGG CGGCGGCGAC AGCGGCGCCA CGCGCAGGCU GGAGGCCGCC 第1開始コドン (CUG)
 GAGGUCUGCC AUGCCGGGAG AACUCUAAUC CCCC AUGGA GUCGCGCGAC UUCUACGAGG 第2, 第3開始コドン
 UGGAGCCGCG GCCCCCAUG AGCAGUCACC UCCAGAGCCC CCCGACGCG CCCAGCAACG 第4開始コドン
 CCCGCCUUUG GCUUCCCCG GGGCGCGGGC CCCGCGCCG CCCCAGCCCC ACCUGCCGCC
 CCGGAGCCGC UGGCGGAUC UGCGAGCAG AGACGUCUAU AGACAUCAGC GCCUACAUCG
 ACCCGGCCGC CUUCAACGAC GAGUUCUGG CCGACCUCUU CCAGCACAGC CGACAGCAGG
 AGAAGGCCAA GGCGCGGGC GGCCCGCGG GUGGCGGGG UGACUUUGAC UACCCGGGAG
 CCCCGCGGG CCCCGCGGC GCGGUC AUGU CCGCGGGGG GCACGGGCC CCUCCCGGCU 第5開始コドン
 ACGGCUUGC GGCGCCGGC UACCGGACG GCAGGCUUGA GCCCUGUAC GAGCGCGUCG
 GGGCGCCCGC GCUACGGCCG CUGGUGAUCA AACAAAGAGC CCGCGAGGAG GACGAGGCGA
 AGCAGCUGG GCUUGCCCGC CUCUUCUUU ACCAGCCACC GCCGCCACCG CCACCGCCGC
 ACCCGCACGC GUCUCCCGC ACCUGGCCG CCCCACUU GCAGUUCAG AUCGCGCACU
 GCGGCCAGAC CACCAUGCAC CUACAGCCUG GCCACCCAC ACCCGCGCC ACGCCCGUCG
 CCAGCCCGCA CGCUGCGCC GCCUUGGGUG CUGCGGGCCU GCCUGGCCCC GGGAGCGCGC
 UCAAGGGCUU GGCCGGUGCG CACCCCGACC UCCGCACGGG AGGCGGCGGC GGUGGCAGCG
 GUGCCGGUGC GGCAAAGCC AAGAAGUCGG UGGACAAGAA CAGCAACGAG UACCGGGUAC
 GGCGGGAACG CAACAACAUC GCGGUGCGCA AGAGCCGAGA UAAAGCCAAA CAACGCAACG
 UGGAGACGCA ACAGAAGGUG CUGGAGUUGA CCAGUGACAA UGACCGCCUG CGCAAGCGGG
 UGGAACAGCU GAGCCGUGAA CUGGACACGC UGCGGGGCAU CUUCCGCCAG CUGCCUGAGA
 GCUCUUGGU CAAGGCCAUG GCAACUGCGC GUGAGGCGCG CGGCUGCGGG ACCGCCUUGG
 GCCGCCCCC UGGCUGGAGA CCCAGAGGAU GGUUUCGGU CGCUGGAUCU CUAGGCUGCC
 CGGCGCGCGC AAGCCAGGAC UAGgagauuc cgguguggcc ugaagccug gccugcuccg 終止コドン(UAG)

第1開始コドン (CUG) は通常のAUGではなく、例外的な開始コドンである。第2開始コドンは他の開始コドンとは読み枠がずれており、13塩基うしろに終止コドン(UAA)がある。それ以外の開始コドンは最後の行のUAGが共通の終止コドンである。

第1, 3, 4開始コドンから翻訳される長鎖アイソフォーム(46 kDa)は転写活性化因子の働きを示すのに対し、第5開始コドンから翻訳されるN端欠損アイソフォームは逆に、転写抑制因子として働く。第2開始コドンからの短いIORF (AUGCCGGGAGAACUCUAA) が欠損すると、第5開始コドンからの読み取りが激減する。

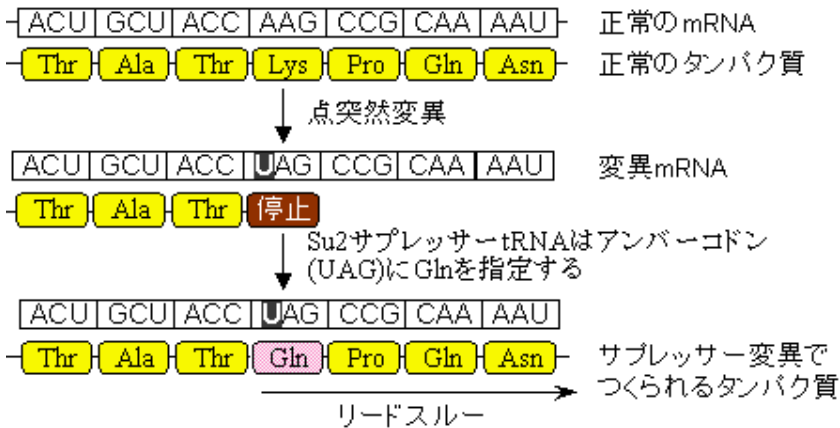
遺伝暗号の書き換え



翻訳における例外的な事例として、読み取り枠の移動、リボソームの跳躍、**終止コドンの読み飛ばし** (リードスルー)、終止コドンUGAの読替え (セレノシステイン[NH₂-CH(CH₂-SeH)-COOH]として翻訳) などある。これらをmRNAによる遺伝暗号の書き換え(recoding)という。一方、**RNAエディティング**のように、mRNAの段階で大幅な変更が行われる場合もある。

● リードスルー (read through)

遺伝子に突然変異が生じ「センスコドン⇒終止コドン」の変化が起きた場合、変異を強引に押さえ込む機構の1つである。アンチコドン部分に変異を持つ**サプレッサー-tRNA**が終止コドンに適切なアミノ酸を振り当てて終止コドンを読み飛ばし、とりあえずタンパク質をつくる。また、アンチコドンが4塩基になったもの (フレームシフト変異を抑制する) など、いくつかの例が知られている。



【レトロウィルスのリードスルー】
 レトロウィルスのgag (殻タンパク質遺伝子) とpol (逆転写酵素遺伝子) の間には終止コドンが1つある。通常は、Gagタンパク質がつけられているが、少量のサプレッサー-tRNAが終止コドンを読み飛ばし、一定量のGag-Pol融合タンパク質がつけられる。この融合タンパク質の限定分解により、成熟型のPolタンパク質がつけられる。

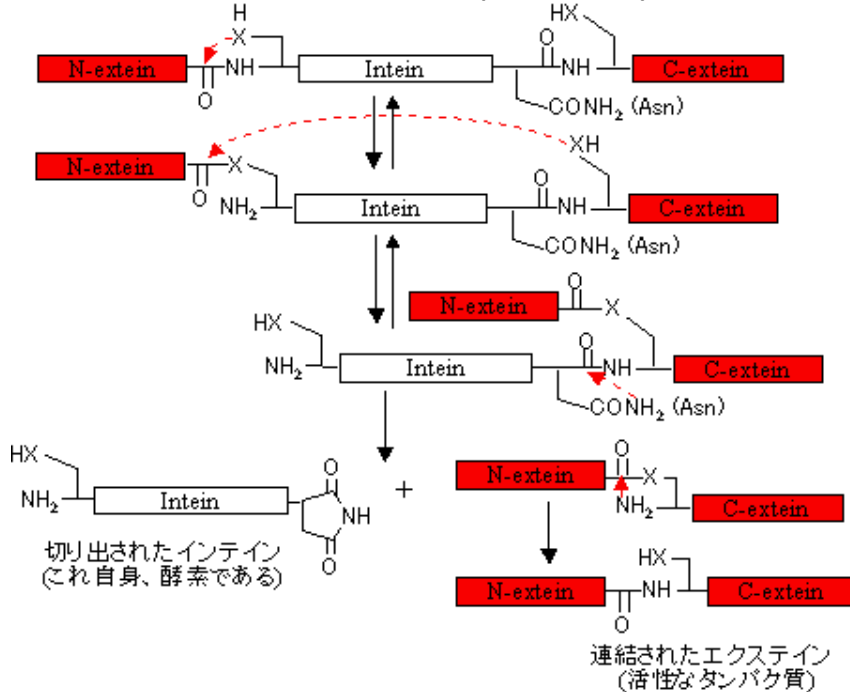
[変異tRNA (サプレッサー-tRNA) によるリードスルー]

タンパク質のプロセッシング



生合成直後のタンパク質は、一般に不活性である。翻訳されたタンパク質は種々の修飾を受けてはじめて活性なタンパク質へと変化 (成熟) する。これをタンパク質のプロセッシングという。

- ペプチド結合の限定分解...N端Metの除去、N端シグナルペプチドの除去、限定分解による酵素前駆体(zymogen)の活性化など。
- 補酵素、金属イオン、ヘムなどの付加
- シャペロンによる高次構造の形成
- ペプチド結合のシス化(特定のPro残基)
- ジスルフィド結合の形成
- アミノ酸側鎖の修飾...リン酸化、メチル化、アシル化、ヒドロキシル化、糖鎖の付加、Gluのカルボキシル化、Lys残基間の架橋、ポリADPリボシル化、ユビキチン化など。
- 特定のアミノ酸のD型化(まれな事象)
- タンパク質の自己スプライシング(まれな事象)



[タンパク質スプライシング]

切り離される部分をインテイン(intein)、連結される部分をエクステイン(extein)という。 RNAのintron, exonを真似た名前である。

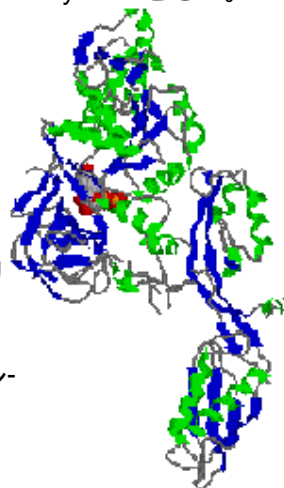
● タンパク質のソーティング

- 1) 小胞体膜を通過するタンパク質は、N端にシグナルペプチドを持つ。
- 2) 小胞体内腔に留まるタンパク質は、C端にLys-Asp-Glu-Leu配列を持つ。
- 3) 核に移行するタンパク質にはN端に核移行シグナル配列(LysやArgが5残基)がある。
- 4) ミトコンドリアや葉緑体に行くタンパク質もN端に20残基ほどの特徴的な配列がある。
- 5) ペルオキシソームに行くタンパク質はC端にSer-Lys-Leuをもつ。

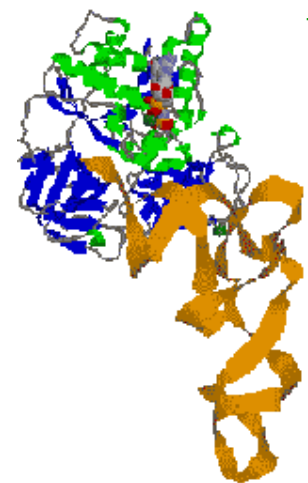
分子擬態 (molecular mimicry) ▲

アミノアシル-tRNA-延長因子Tu (EF-Tu) -GTP複合体はタンパク質合成(翻訳)において、アミノ酸をリボソームへと運ぶ役割をもつ。一方、延長因子G (EF-G) はペプチジル-tRNAのトランスロケーションに関与する。延長因子Gと延長因子TuはともにGTP結合型でリボソームと結合し、自身のGTP加水分解酵素活性でGTPをGDPにすると、リボソームから離れていく。

面白いことに、延長因子Gの立体構造はアミノアシル-tRNA-EF-Tu-GTP複合体と大変よく似ている。つまり、延長因子Gはアミノアシル-tRNA-EF-Tu-GTP複合体の「そっくりさん」で、その一部がtRNAの形を真似ていることになる。このような現象を分子擬態(molecular mimicry)と呼ぶ。分子擬態は翻訳の解放因子(RF)や免疫系のHLAタンパク質でも見られる。



延長因子G



アミノアシル-tRNA-EF-Tu-GTP複合体 [分子擬態の例]

タンパク質部分を青と緑、tRNA部分を茶色で示す。tRNAと結合していなくてもEF-GがリボソームのA部位に結合できるのは、このような立体構造をとるためであろう。

遺伝子の構成

戻る

原核生物遺伝子

真核生物遺伝子

ミトコンドリアのDNA

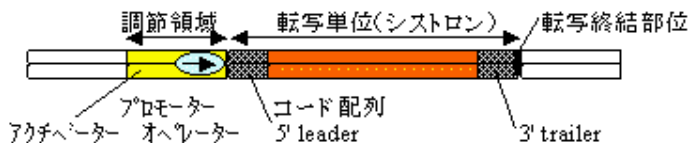
ゲノムと遺伝子

原核生物遺伝子

遺伝子の転写単位には、次の3つがある。

- (a) モノシストロン転写単位：単一のタンパク質をコードする遺伝子
コード配列の前後に5'リーダー(leader)と3'トレーラー(trailer)がつく。
 - (b) ポリシストロン転写単位：オペロンを構成する複数のタンパク質をコードする遺伝子
 - (c) rRNAとtRNAをコードする遺伝子：スペーサー配列で区切られている。
- 原核生物のタンパク質遺伝子の多くはポリシストロン転写単位である。

(a) モノシストロン転写単位



(b) ポリシストロン転写単位(オペロン構成タンパク質)



(c) rRNAとtRNAの転写単位



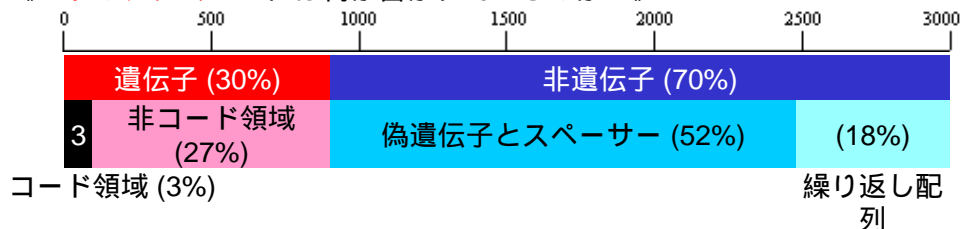
[原核生物の遺伝子の構造的特徴]

真核生物遺伝子

真核生物の場合、全てモノシストロン転写単位から成る。用いられる転写系の違いで次の3つに分けられる。

- クラス 遺伝子：RNAポリメラーゼI(核小体に局在)によって転写。5.8S, 18S, 28S rRNA前駆体の遺伝子。
- クラス 遺伝子：RNAポリメラーゼIIによって転写。全てのmRNAと核内低分子RNA(snRNA)遺伝子。
- クラス 遺伝子：RNAポリメラーゼIIIによって転写。5S rRNA, tRNA, 細胞質低分子RNA(scRNA)遺伝子。

《ヒトのゲノムDNAには何が書かれているのか?》



1) 遺伝子領域：ゲノム全体の30%(900Mb)

タンパク質とrRNA,tRNAをコードする約32,000個の遺伝子があるとされている。

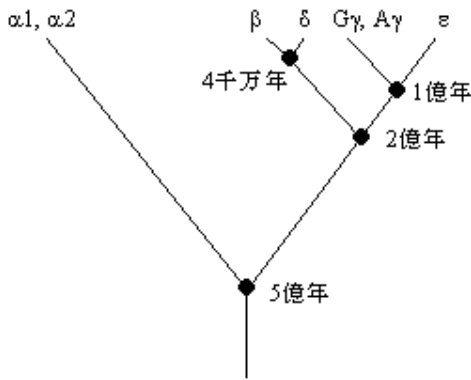
● 構造遺伝子領域(90Mb = 全体の3%)

リボソームRNA遺伝子→約250コピーが複数の染色体上に存在する。5S rRNAは約2,000コピーもある。

RNAポリメラーゼIの1分子がrRNA前駆体を転写するのに約5分かかる。複数のポリメラーゼで一度にたくさんのrRNAをつくるには多コピーが必要。

tRNA遺伝子→約1,300コピー存在(1つのtRNA当り約10~100コピー)

タンパク質をコードする遺伝子→通常、1つのタンパク質当り1コピー。(例外的に、ヒストンのように同じ遺伝子が多数、直列に配置している場合もある)。また、 α -および β -グロビン遺伝子群、アクチン群、チューブリン群、コラーゲン群など、遺伝子重複によって生じた近縁遺伝子群(多重遺伝子)が25~50%を占める。



[グロビン遺伝子スーパーファミリーの分子進化(分子系統樹)]

グロビン遺伝子群は共通の祖先遺伝子から進化した。

- 非コード領域(810Mb = 全体の27%)
 - ・ 遺伝子を分断する **イントロン**、転写調節領域、5'-リーダーや3'-トレーラー配列などがある。

いくつかの遺伝子における介在配列 (イントロン)

遺伝子産物	生物	エキソン	イントロン	
			数	総塩基対
エリトロポエチン	ヒト	582	4	1,562
α-インターフェロン	ヒト	600	0	0
アデノシンデアミナーゼ	ヒト	1,500	11	30,000
低密度リポタンパク質	ヒト	5,100	17	40,000
チログロビン	ヒト	8,500	>40	100,000
VIII因子	ヒト	9,000	25	177,000
アポリポタンパク質	ヒト	14,000	28	29,000
b-グロビン	マウス	432	2	762
HGPRT	カエル	1,307	8	32,000
ピテロゲン	カエルの	6,300	33	20,000
フィブリン (絹)	カイコ	18,000	1	970
ファセオリン	インゲンマメ	1,263	5	515
ウリカーゼサブユニット	ソラマメ	300	7	4,500
ゼイン	トウモロコシ	700	0	0
tRNATyr	酵母	76	1	14
シトクロムb	酵母ミトコンドリア	2,200	6	5,100

植物, 動物, それらに感染するウイルスにはイントロンが多いが, 無脊椎動物ではまれ。原核生物にはないが, T4バクテリオファージのチミジル酸シンターゼにはイントロンがある。古細菌にもイントロンが見つかった。

2) 非遺伝子領域: ゲノム全体の70%(2100Mb)

機能不明のものが多い→ガラクタ(junk)DNAといわれる。

- 繰り返し配列 (420Mb = 全体の18%)
 - 縦列型反復配列(TR, tandem repeat): 短い配列が同じ領域に繰り返している配列。
 - サテライトDNA(セントロメア近傍に局在)
 - ミニサテライトDNA(大きさが > 500bp) 染色体末端に存在。
 - テロメアはTTAGGGという配列が2000回以上(12kbp)繰り返したミニサテライトである。
 - マイクロサテライトDNA (大きさが500bp以下) 染色体全体に散在
 - 可変長反復配列(VNTR, variable number of tandem repeat): 個体により反復数の異なる反復配列
 - 分散型反復配列: 染色体に散在する反復配列 (ゲノム全体の10%)
 - 短分散型核因子(SINE): (例)Alu配列 ゲノム全体の5%
 - 長分散型核因子(LINE): (例)L1 6.1kbp。2つのORFをもつ。ゲノム全体の4%。
 - ウイルス遺伝子の挿入痕跡 レトロウイルスのプロウイルスDNA (LTR)
 - トランスポゾン(transposons、動く遺伝子) 染色体をあちこち動き回る遺伝子
- 非繰り返し配列 (1680Mb = ゲノム全体の52%)
 - 遺伝子重複で生じた非機能性の**偽遺伝子(pseudogene)**
 - スペーサーDNA** 遺伝子間を区切っている無意味な配列
 - 応答エレメント (エンハンサーやサイレンサー配列)、複製開始点など

《SNP, 1塩基多型》
ヒトのゲノムの0.1% (約300万bp, 1000 bpに1つの違い) は個人の間で差がある。これをSingle Nucleotide Polymorphism (SNP, 一塩基の多型性) という。

《Alu配列》
制限酵素Alu Iで切断される部位を持つ全長300bpの配列で、ゲノム全体にほぼ均一に存在。

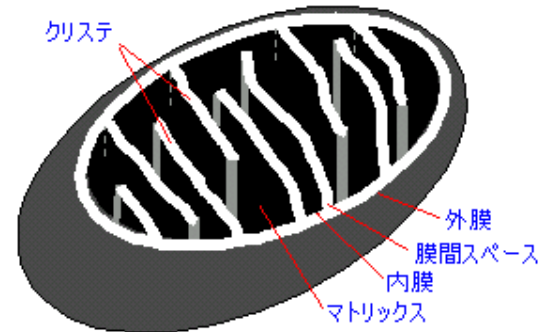
ミトコンドリアのDNA

哺乳類の肝臓の細胞には1500個ものミトコンドリアがあるが, 赤血球には1つも無い。細胞内でエネルギーを必要とする部分には特にミトコンドリアが密集している。ミトコンドリアは母系遺伝する。

ミトコンドリアは独自の核(核様体)をもち, 数~数十コピーの環状二本鎖DNAを含んでいる。ミトコンドリアは形を変えたり, 細胞分裂などではミトコンドリアも分裂して数を増すが, 細胞周期とは少しずれがあるという。ミトコンドリアは, 進化の過程で真核細胞のもとになった細胞に取り込まれ共生関係になったαプロテオ細菌(光合成能を失った紅色光合成細菌とされている)に起源を発するとされている。最近, 細胞のプログラム死(アポトーシス)にもミトコンドリアが関わっていることが分かってきた。ミトコンドリアの構築や機能に必要なタンパク質の大部分は核DNAの遺伝子で作られるが, 一部はミトコンドリアゲノムにコードされている。ゲノムの大きさや遺伝子の構成は種によって大きく異なる。動物では20kbp以下, 植物では数100~数1000kbp, 酵母は約80kbp。1つのミトコンドリアに5~10コピー存在する。

【ヒトミトコンドリアDNAの特徴】

全体的には原核生物的な特徴が見られるが, mRNAがポリA化されるなど真核生物的性質も兼ね備えている。

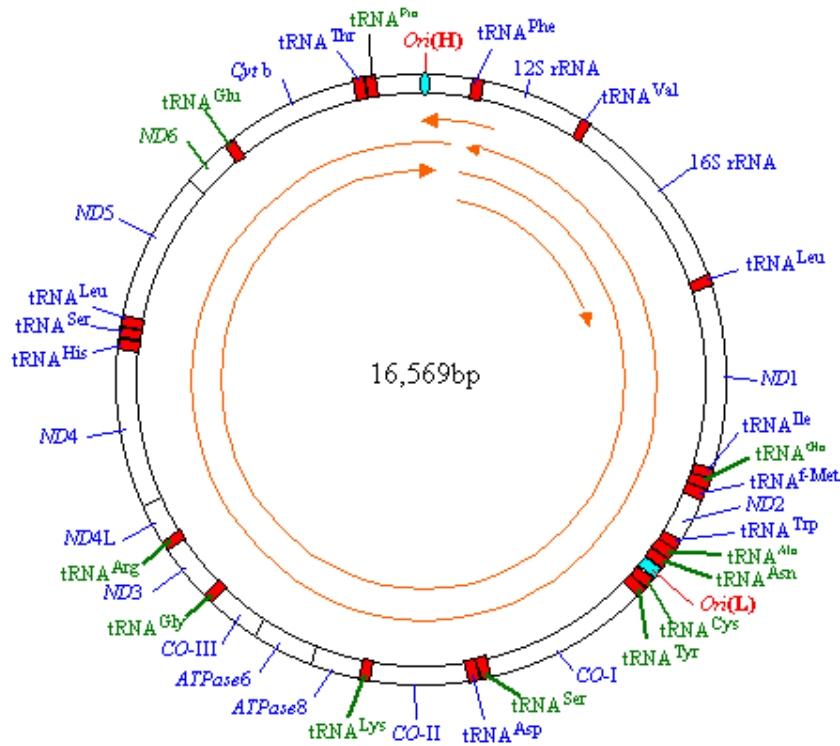


[ミトコンドリアの模式図]

ミトコンドリアは球あるいは回転楕円体状の形をとることが多いが, トリパノソーマのキネトプラスチドのように, 網目状となっているものもある。

● ミトコンドリアゲノムの構造

ミトコンドリアDNAはクリステに結合した状態で存在し、核様体をなす（原核生物的）。
ミトコンドリアゲノムは環状二本鎖構造をしており、数コピー存在する。
ゲノムには13個のタンパク質、2個のrRNA（原核生物的）および全種類のtRNAがコードされている。
遺伝子にはイントロンがない（原核生物的）。
ミトコンドリアDNAは核DNAよりも10倍早く変異する 種内集団遺伝学の研究対象としてよく用いられる



[ヒトミトコンドリアDNA]

DNA2本鎖（H鎖，L鎖と呼ぶ）のそれぞれに複製起点(OriHとOriL)が存在。内側の矢印はOriHからの転写産物。一番内側の矢印はrRNA専用の転写。

OriLからは全長のものは1つだけつくられる。遺伝子の向きは時計回りのものと、反時計回りのものとがある。

赤いboxはtRNA遺伝子。ND, NADHデヒドロゲナーゼ複合体；CO, シトクロムcオキシダーゼ；Cytb, シトクロムb

● ミトコンドリアの分裂とDNA複製

細胞分裂に伴ってミトコンドリアも分裂する。この時、細胞の分裂に先立ってミトコンドリアの分裂も起こる。
ミトコンドリアのDNAの複製は核DNAとは独立に行われるが、核の遺伝子で厳密な制御を受けている。複製酵素はDNAポリメラーゼγである。

● ミトコンドリア遺伝子の転写

転写は特別なミトコンドリアRNAポリメラーゼが行う。

mRNAはポリA化されるが（真核生物的）、5'末端のキャップ構造はない（原核生物的）。

2つのDNA鎖（H鎖，L鎖）のそれぞれに複製起点(OriHとOriL)が存在し、それぞれ全長が転写されてプロセッシングでmRNA, rRNA, tRNAになる。

rRNA専用の転写もある 一度に多くのrRNAを作るため

● ミトコンドリアタンパク質の翻訳

いくつかのミトコンドリアゲノムの遺伝子には終止コドンがない

これらの転写産物の3'末端はUかUAで、ポリA化されるとUAAという終止コドンが自動的に生じる。

ミトコンドリアのコドンは核のコドンと一部異なる。また、種による違いもある。

AUG以外に、AUA, AUU, AUCも開始コドン

UGAは終止コドンではなくTrpのコドン

AGAとAGGはArgのコドンではなく終止コドン

翻訳の際、開始tRNAはFormyl-Metを運ぶ（原核生物的）

ミトコンドリアのリボソームは細胞質のリボソームよりも小型（原核生物的）

ゲノムと遺伝子

遺伝子(gene)は、個々の表現形質に対応する原因となる単位を表わし、分子的には独立した存在ではなく、単に巨大なDNAの一部である。これに対して、ゲノム(genome)という概念は、ある生物種の個体全体を完全な状態に保つために必要な遺伝的情報の1セットを指す言葉である。従って、生物種ごとに固有のゲノムが存在する。ウイルスや細菌についてもファージゲノムや細菌ゲノムとよぶ。細胞小器官でDNAをもつミトコンドリアや葉緑体についても、ミトコンドリアゲノム、葉緑体ゲノムと呼ぶことができる。遺伝情報そのものはDNAの塩基配列であるから、ゲノムの実体はDNAそのものといえる。

今後、たくさんの生物のゲノムの全構造が決められ、その中の遺伝子と遺伝子産物に関する情報が次々と明らかにされるであろう。ゲノム全体を対象に全遺伝情報を調べあげ、そこから個別的な研究を始めるという研究を「ゲノム生物

学」という。

【全ゲノム配列が発表・公開された生物】

バクテリアを中心に、ゲノムの全配列が次々と報告されています。これまでに全ゲノム配列が決定されているものは以下のとおりである(from KEGG)。DNAの大きさは生物種ごとにずいぶん異なる。現在のところ、真核生物で全ゲノムが分かっているのはC. elegans (線虫) だけであるが、2003年までにはヒトゲノムの全配列が明らかとなるであろう。

生物種	ゲノムサイズ (kbp)	遺伝子総数
Mycoplasma genitalium (マイコプラズマ感染症)	580	467
Mycoplasma pneumoniae (肺炎の病原体)	816	677
Borrelia burgdorferi B31 (ライム病の病原スピロヘータ)	910	1256
Chlamydia trachomatis (トラコーマ病原体)	1040	894
Rickettsia prowazekii (発疹チフス病原体)	1110	834
Treponema pallidum (梅毒トレポネマ)	1140	1031
Chlamydia pneumoniae (クラミジア)	1130	-
Aquifex aeolicus (超好熱性細菌)	1550	1522
Helicobacter pylori J99 (ピロリ菌)	1640	1495
Methanococcus jannaschii (メタン細菌)	1660	1770
Helicobacter pylori 26695 (胃炎や胃潰瘍の病原菌ピロリ菌)	1670	1566
Pyrococcus horikoshii OT3 (超好熱性古細菌)	1740	1979
Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH (メタン細菌)	1750	1869
Haemophilus influenzae Rd (インフルエンザ菌)	1830	1717
Archaeoglobus fulgidus (好熱性硫黄細菌)	2180	2407
Synechocystis sp.PCC6803 (ラン藻類)	3570	3166
Bacillus subtilis (枯草菌)	4210	4100
Mycobacterium tuberculosis H37Rv (結核菌)	4410	3918
Escherichia coli (大腸菌)	4640	4289
Saccharomyces cerevisiae (出芽酵母)	12000	6286
Caenorhabditis elegans (線虫)	97000	約19000
Thermotoga maritima MSB8 (好熱性真正細菌)	1860	1877
Aeropyrum pernix K1 (好気性好熱菌)	1670	2694

DNA修復

戻る

DNAの変化

DNA修復に関するヒトのDNAポリメラーゼ

DNA修復機構

長期的に見た場合、遺伝子の変化は環境に適応するために必要である(分子進化)。しかしながら、個体の生存といった短期的な時間内では、遺伝子の変化は個体の生存そのものを脅かす可能性(例えば発癌など)が考えられ、好ましいものではない。アミノ酸残基の変異が許容される程度はタンパク質によって大きく異なる。

各種タンパク質のアミノ酸配列の変化

タンパク質	単位進化時間(百万年)*
フィブリノペプチド	1.2
ヘモグロビン	6.1
シトクロムc	21
ヒストンH4	600

*タンパク質中の100残基ごとに、1個の死に至らない変異が出現するのに要する平均時間。

フィブリノペプチドのように変異に要する時間の短いものもあれば、ヒストンH4(ヌクレオソームを構成するタンパク質)のようにほとんど変異を容認しないタンパク質もある。

従って、このようなタンパク質の遺伝子は正確な保全が要求される。これを支えるものとして、次のような機構がある。

● DNAの正確な複製

Cの互変異性はC : G C* : Aの変化をおこし、DNA複製のエラーを誘う。しかし、DNAポリメラーゼの校正機能により、複製のミスは108 ~ 1010に1回程度に抑えられる。

● DNAの修復(DNA repair)

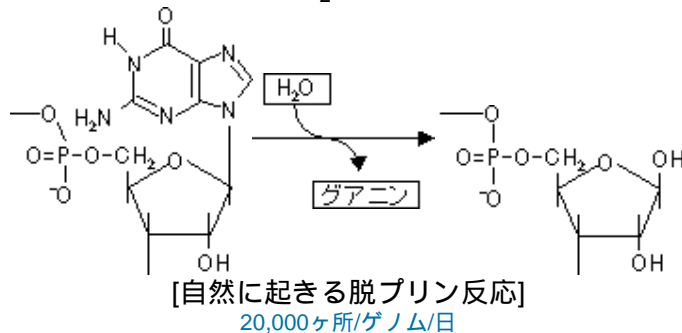
DNAの鎖を修復・伸長するのは大腸菌ではDNAポリメラーゼIであるが、真核細胞では多くのDNAポリメラーゼが関与する。

DNAの変化

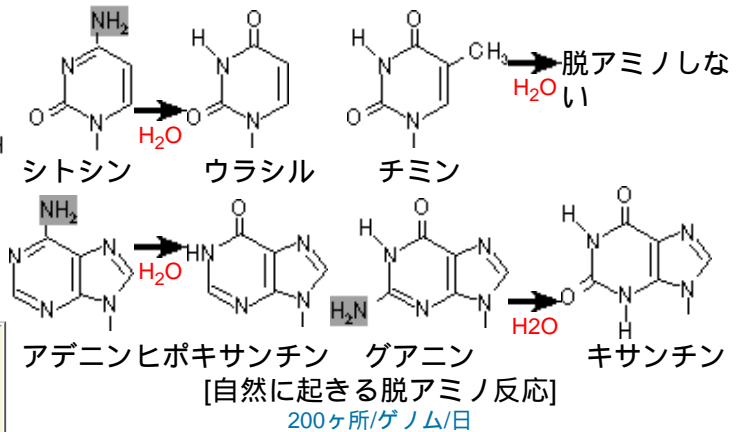
DNAは決して安定な化合物ではない。細胞内の反応性環境、毒物、紫外線や放射線などによって、絶えず損傷を受けている。DNAの損傷は細胞の老化や死、癌細胞の発生などを引き起こす原因となる。DNAの損傷には、次のような様々なタイプがある。

● 脱プリン反応 : H⁺によるアデニン、グアニンの切断

● 脱アミノ反応 : 水によるNH₂ C=Oの変化

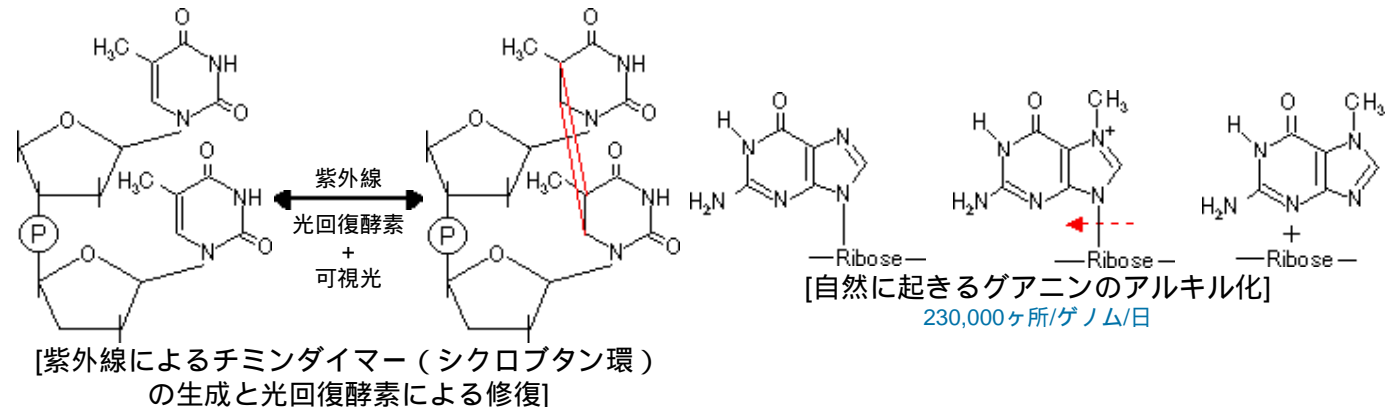


【DNAにウラシルを用いない理由】
シトシンから脱アミノ反応でウラシル(U)が生じる。UはAと対合するので、C-Uの変化は突然変異の原因となる。強い脱アミノ化剤である亜硝酸は突然変異を誘発する。



● チミン2量体(ダイマー)生成 : 紫外線による損傷

● アルキル化 : アルキル化剤 プリン塩基のN,O原子をアルキル化。S-アデノシルメチオニン グアニンのN⁷をメチル化。



● 活性酸素による酸化 : $\cdot\text{OH}$ ラジカル グアニンのC⁸-HをC-OHに変化 [170ヶ所/ゲノム/日]

DNA 修復に関するヒトの DNA ポリメラーゼ

真核細胞のDNAポリメラーゼ α , δ , ϵ , γ は核やミトコンドリアのDNA複製に関与するが, α , γ 以外は修復も行う。

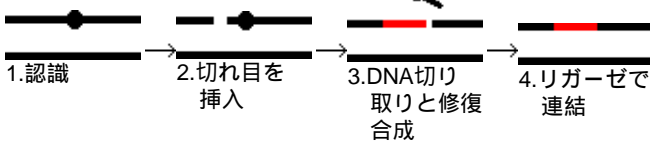
DNA修復においてはDNAポリメラーゼ β 以外に, 多くのDNAポリメラーゼが関わっていることが最近, 明らかにされた。もっぱら修復に関わる酵素はいずれもDNA鎖伸長能 (processivity) が低く, また, 忠実度 (fidelity) の低いものが多い。ただし, DNAポリメラーゼ η はチミン2量体を正確に修復する。

DNA 修復機構

● 除去修復

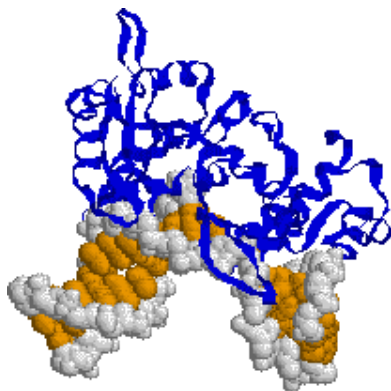
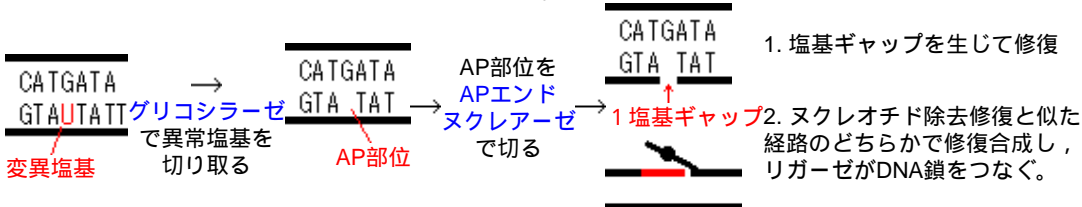
● ヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair, NER)

1. 損傷部位は通常, 真核細胞ではXPC-HR23B複合体が認識するが, 転写中はRNAポリメラーゼ II が認識する (下記の転写共役DNA修復を見よ)。次いで, TFIIH (ヘリカーゼ), XPG, XPA, RPAタンパク質群が損傷部位の2本鎖DNAのらせんをほどく。
2. XPE-ERCC1複合体とXPGが損傷を含むオリゴヌクレオチド (約25-30塩基) をDNAから切り取る。
3. 生じた1本鎖の隙間を原核細胞ではDNAポリメラーゼ I が, 真核細胞ではPCNA, RF-Cと共同して, DNAポリメラーゼ δ と ϵ が埋める。チミン2量体の修復も可能。
4. リガーゼがDNA鎖をつなぐ。



● 塩基除去修復(base excision repair, BER)

変異塩基をDNAグシコシラーゼが切り取る。生じた脱プリン/ピリミジン部位 (AP部位という) のDNA1本鎖をAPエンドヌクレアーゼが切る。以後, DNAポリメラーゼ β が1塩基ギャップを生じて修復される経路か, DNAポリメラーゼ δ と ϵ が比較的長い修復を行った後, FEN1がはねだされた損傷を含むオリゴヌクレオチドを切り取って修復を行う経路に分かれる。

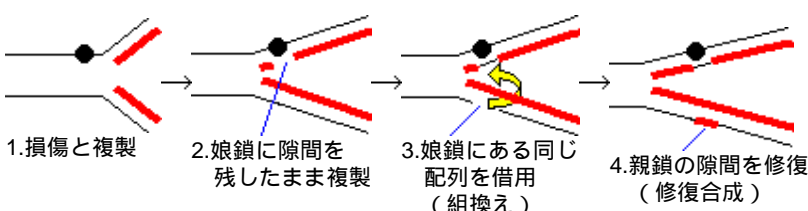


ニック (切れ目) の入ったDNAを修復中のDNAポリメラーゼ β

● 複製後修復 (損傷を抱えたDNAが複製に入った場合に適用される)

● 相同DNA組み換え修復

損傷のない他方の鎖の組換えで損傷部分を補充した後, 損傷のないDNAに生じた隙間を埋めて閉じる。

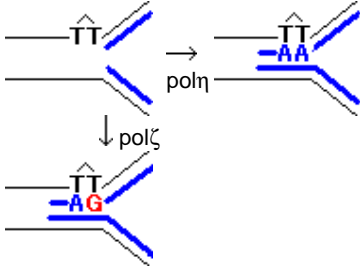


ポリメラーゼ	遺伝子	機能
pol β	POLB	塩基除去修復
pol γ	POLG, POLG2	ミトコンドリアDNA複製と修復
pol δ	POLD1, POLD2	DNA複製とヌクレオチド除去修復
pol ϵ	POLE, POLE2	DNA複製とヌクレオチド除去修復
pol ζ	POLZ	除去修復
pol η	POLH	DNA複製とヌクレオチド除去修復
pol θ	POLQ	除去修復
pol ι	POLI	損傷乗り越え修復, 組換え修復
pol κ	POLK	紫外線損傷乗り越え修復
pol λ	POLL	DNA修復?
pol μ	POLM	DNA修復?
deoxycytidyl transferase	REV1	損傷乗り越え修復? 減数分裂での修復? 体細胞突然変異? 損傷乗り越え修復

● 損傷乗り越え修復

紫外線によりチミン 2 量体が生じた場合、上記のヌクレオチド除去修復で修復されるが、除去されない場合はDNA複製が停止する。そこで、真核細胞の場合DNAポリメラーゼ η が正しい塩基（アデニン）を挿入する。DNAポリメラーゼ ζ もチミン 2 量体を修復するが、しばしば誤った塩基を挿入する（誤りがちな乗り越え修復）。

大腸菌ではDNAポリメラーゼV（以前はUmuD₂と呼ばれていたが、最近、DNAポリメラーゼ活性をもつことが分かりpol Vと命名された）が行う。[なお、大腸菌には忠実度の低いDNAポリメラーゼIVも知られていて、適応変異という別の修復に関与する]。



● ミスマッチ修復 (mismatch repair, MMR)

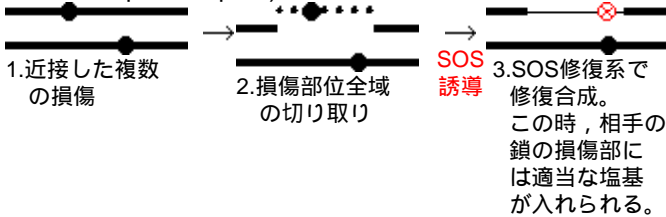
1. DNA複製におけるエラーでミスマッチが起き、DNAポリメラーゼによる校正がなされなかった場合、新生の娘鎖のミスマッチを大腸菌ではMutS-MutL複合体、ヒトではhMSH2-hMSH6複合体かhMLH1-hPMS2複合体が認識する。

2. 大腸菌では非メチル化鎖を新生鎖と見なしてMutHタンパク質が損傷部位に切れ目を入れた後、エクソヌクレアーゼでミスマッチ塩基を取り除く。

3. 真核細胞ではミスマッチ塩基を含むオリゴヌクレオチドがエンドヌクレアーゼで除去され、PCNA、RF-Cと共同して、DNAポリメラーゼ δ と ϵ が隙間を埋める。

● 誘導SOS修復 (大腸菌)

大腸菌が変異原に曝された時に起きる防御機構である。DNAに大きな損傷が起ると、生じた1本鎖DNAにRec Aタンパクが結合し、SOSボックス（オペレーター部位）に結合しているLexAリプレッサータンパクを不活性化化する。その結果、SOS遺伝子の転写が開始されてDNAポリメラーゼVとRec Aタンパク質を生成する。これらが傷を修復する。SOS修復系は元の塩基がわからなくても適当な塩基を入れるので**変異原性**(誤りがちな修復, error-prone repair)である。



● 光回復

光回復酵素（フォトリアーゼ）、FADH₂、プテリンと300-500nmの光によりシクロブタン環を開裂。

● 適応修復(adaptive repair)

グアニンのメチル化で生じるO⁶-メチルグアニンは、O⁶-メチルグアニンDNAアルキルトランスフェラーゼで脱メチル化される。このSH酵素はメチル化されて失活する（自殺酵素）。

● 転写共役修復(transcription-coupled repair, TCR)

DNAが転写されている時に損傷部位に遭遇した場合、転写共役DNA修復が発動される。真核生物では、RNAポリメラーゼ II が損傷を認識し、XPAタンパク質をはじめと多くのタンパク質が関与するが、詳細は不明である。修復はDNAポリメラーゼ δ と ϵ が行う。この修復系は他の修復より格段に高速である。

核酸の分析技術

戻る

核酸分解酵素

核酸の分離と精製

プロテインゲとハイブリダイゼーション

DNAの一次構造決定法

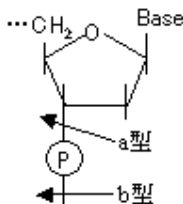
その他の技法

核酸分解酵素

(ヌクレアーゼ) ▼

ヌクレアーゼ(nuclease)はDNAやRNAを処理するために利用される。RNAを分解するものを**リボヌクレアーゼ(RNase)**、DNAを分解するものを**デオキシリボヌクレアーゼ(DNase)**という。

5'または3'末端から順にヌクレオチドをはずしていく酵素を**エキソヌクレアーゼ(exonuclease)**、ヌクレオチド鎖の途中を切断する酵素を**エンドヌクレアーゼ(endonuclease)**という。ヌクレアーゼはホスホジエステル結合のどちら側を分解するかで、次の2つがある。



名称	起源	特異性	被切断鎖	切断様式
膵臓RNase	ウシ	RNA	一本鎖	エンド(b型)
RNase T1	コウジカビ	RNA	一本鎖	エンド(b型)
S1ヌクレアーゼ	A. oryzae	RNA,DNA	一本鎖	エンド(a型)
蛇毒ヌクレアーゼ	C. atrox	RNA,DNA	一本鎖	エキソ(3' 5')
膵臓ホスホジエステラーゼ	ウシ	DNA,RNA	一本鎖	エキソ(5' 3')
スチフィコカヌクレアーゼ	S. aureus	RNA,DNA	一本鎖	エンド(b型)
マンングマヌクレアーゼ	マンングマ	DNA,RNA	一本鎖	エンド(a型)
アカパンカビヌクレアーゼ	アカパンカビ	DNA,RNA	一本鎖	エンド(a型)
RNase H	各種細胞	RNA,DNA	二本鎖	エンド(a型)
RNase H	レトロウィルス	RNA,DNA	二本鎖	エキソ(3' 5')
膵臓DNase I	ウシ	DNA	一、二本鎖	エンド(a型)
Bal 31	A. espejiana	DNA	一本鎖	エンド(a型)
		DNA	二本鎖	エキソ(3' 5')
Exo I	大腸菌	DNA	一本鎖	エキソ(3' 5')
Exo III	大腸菌	DNA	二本鎖	エキソ(3' 5')
Exo VII	大腸菌	DNA	一本鎖	エキソ(3' 5')
λエキソヌクレアーゼ	λファージ	DNA	二本鎖	エキソ(5' 3')

DNaseの場合、一本鎖を切断する酵素と、二本鎖を切断する酵素がある。

核酸の分離と精製



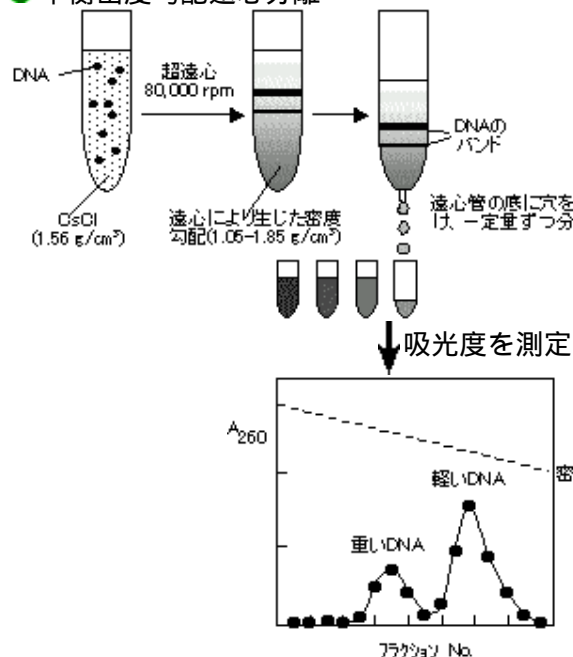
核酸はタンパク質と結合しているので除タンパクする。核酸水溶液をフェノールまたは CHCl_3 -イソamilアルコールと振り混ぜると、タンパク質は沈殿する。大きなDNAは機械的に分解されやすいので注意する。また、タンパク質を界面活性剤や高塩濃度で解離させ、プロテアーゼで分解する方法もある。

除タンパク後、エタノールを加えると核酸(RNA+DNA)は沈殿する。RNAを得るには混在するDNAを膵臓デオキシリボヌクレアーゼ(DNase)で分解し、DNAを得るにはリボヌクレアーゼ(RNase)でRNAを除く(核酸分解酵素)。(核酸を扱う場合、実験材料やヒトの手に核酸を分解するヌクレアーゼがあるので、器具は加熱処理し、ゴム手袋を使用する。)

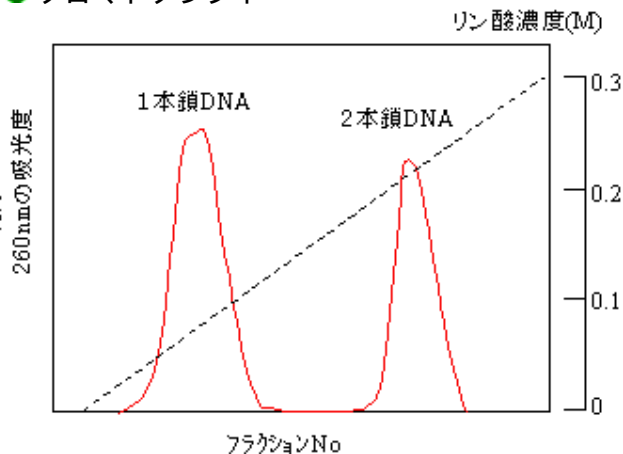
核酸の精製にはタンパク質の分析や精製で用いられる方法が利用できる。

● 平衡密度勾配遠心分離

● クロマトグラフィー



[CsCl平衡密度勾配遠心法]

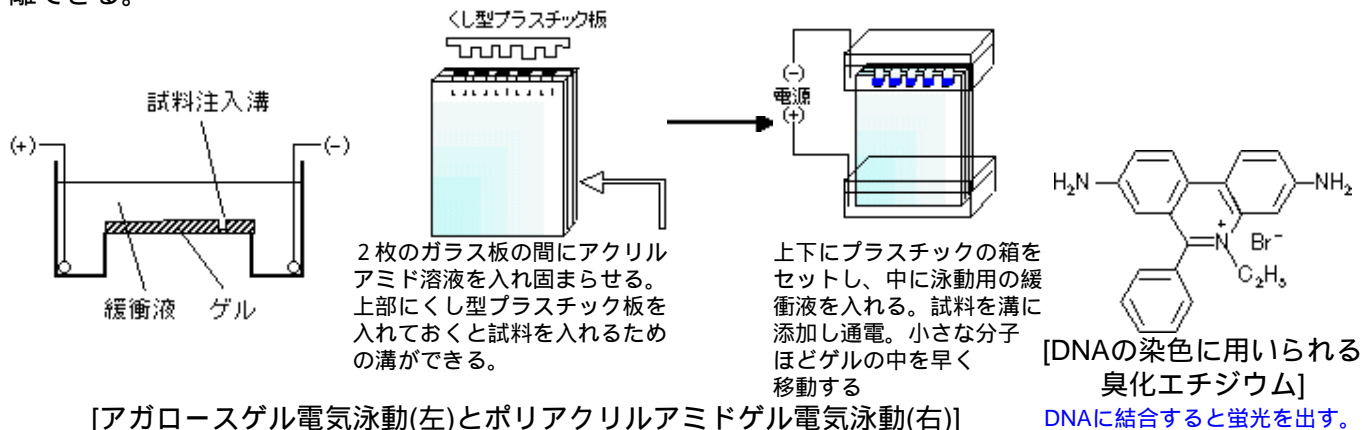


[ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーによる1本鎖と2本鎖DNAの分離]

● 電気泳動

核酸の分離にはアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを担体とした電気泳動がよく利用される。核酸はリン酸基に起因する負の電荷をもつので、常に陽極に移動する。この時、短い断片ほど速く移動する。DNAの検出には臭化エチジウムが用いられる。

アガロースゲル電気泳動は約50kbが分離の限界である。非常に大きなDNAにはパルス電場(PEG)電気泳動が用いられる。これは、一定時間ごとに電場をかける方向を60~90度変化させる方法で、アガロースゲル内で短いDNAほどrealignし易く、泳動速度が速いことを利用したものである。この方法で10,000kbまでのDNA断片が分離できる。



[アガロースゲル電気泳動(左)とポリアクリルアミドゲル電気泳動(右)]

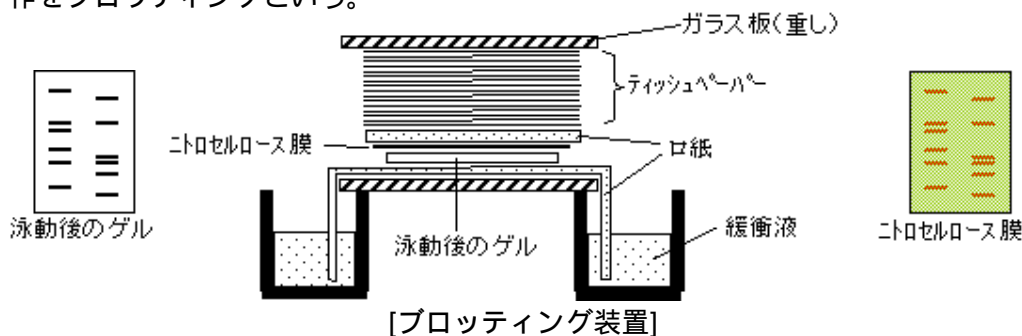
プロテイングとハイブリダイゼーション



DNAやRNA断片が、目的の塩基配列と相補性があるかどうかを調べる方法。

● プロテイング

電気泳動のゲル中で分離したDNAやRNA断片あるいはタンパク質をニトロセルロースなどの人工膜に写しとる操作をプロテイングという。



[プロテイング装置]

【種々のプロテイング】

(a) サザン(Southern)プロテイング

標識したmRNAやcDNAでDNA断片を検出する方法

(b) ノザン(Northern)プロテイング

標識したcDNAでmRNAを検出する方法

特定のmRNAの(i) 鎖長の解析、(ii) 組織分布、(iii) 発現の有無や量の解析に利用される。

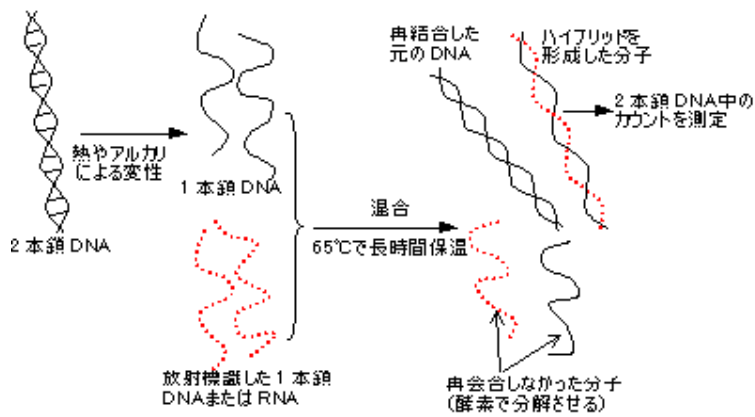
(c) ウェスタン(Western)プロテイング

標識した抗体でタンパク質を検出する方法

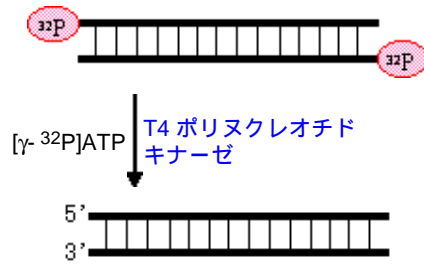
標識法としては、放射能標識以外に蛍光標識がよく利用される。Westernプロテイングでは、酵素標識法や化学発光法も使われる。

● ハイブリダイゼーション

^{32}P などで放射性標識したcDNAやmRNAと2本鎖を形成するかどうかを調べる方法をハイブリダイゼーション (hybridization) という。このような目的に使われる標識物をプローブ(probe)といい、プローブが結合したDNAの位置はX線フィルムに感光させて検出できる (オートラジオグラフィ)。BAS-2000などのイメージングアナライザーで検出することもできる。



[ハイブリダイゼーション]



[DNAの5'末端の放射性標識法]
 広範囲に標識するときはDNAポリメラーゼIのニックトランスレーションを利用。

DNAの一次構造決定法



● 化学的分解法 (Maxam-Gilbert法)

(例) 次の13残基のオリゴヌクレオチドの構造決定を行うこととする。

5' ATCGATTCTCGGA 3'

1) まず、このオリゴヌクレオチドの5'末端を³²Pや³³Pで放射標識する()。

5' -ATCGATTCTCGGA 3'

2) この試料溶液を4等分し、次の4種の化学分解を行う。

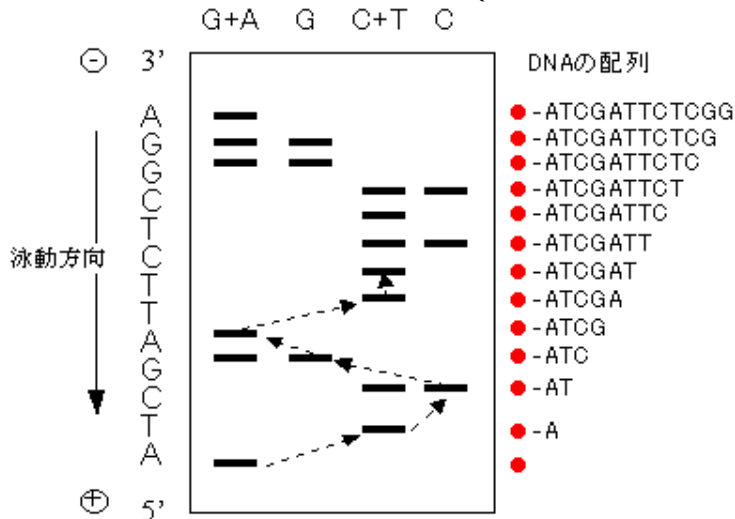
切断される塩基	G	G + A	C	C + T
反応液の組成	³² P-DNA DMA緩衝液 ジメチル硫酸	³² P-DNA 水 ギ酸	³² P-DNA NaCl溶液 ヒドラジン	³² P-DNA 水 ヒドラジン
反応条件	20 ,4.5分	20 ,10分	20 ,8分	20 ,8分

この条件では、特定の塩基のところでランダムに切断が起こり、反応液中に以下のような放射標識断片が生じる。(標識されていない断片もたくさんできるが、検出できないので考えなくてよい)

Gで分解	Cで分解	G + Aで分解	C + Tで分解
-ATC	-AT		-A
-ATCGATTCTC	-ATCGATT	-ATC	-AT
-	-ATCGATTCT	-ATCG	-ATCGA
ATCGATTCTCG		-ATCGATTCTC	-ATCGAT
		-ATCGATTCTCG	-ATCGATT
		-	-ATCGATTC
		ATCGATTCTCGG	-ATCGATTCT

3) これら4つの試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。各々のDNA断片はサイズだけで分離される。

4) ゲルのオートラジオグラムを作成する (X線フィルムに露光すると、例の場合、図のようになるであろう。



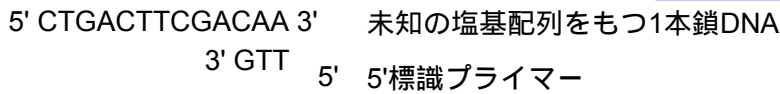
[Maxam-Gilbert法によるDNA塩基配列の決定]
 (オートラジオグラム)

5) 図の泳動先端(図の下端)のバンドから順に上にバンドの位置をたどっていくことで、目的DNA断片の5' 3'方向の配列を決定できる。(ただし、C+TとCの同じ位置にバンドがある場合はCとなり、C+TにはあるがCにバンドがない場合はTとなる。G+Aについても同様。)

● ジデオキシ法 (Sanger*法, 鎖終結法) * インシュリンの1次構造決定でノーベル賞を受賞した人

大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用い、配列を決めたい1本鎖DNAの相補的コピーをつくる。この時、DNA合成に必要な4種のdNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)以外に、DNA阻害剤である2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸(ddNTP)を少量反応液に加える。ddNTP (terminatorという) が取り込まれると、DNA合成は停止する。反応の停止はランダムな位置で起こるので、鎖の長さの異なる様々な断片が得られ、あとは化学的分解法と同様な考え方で配列を決定する。

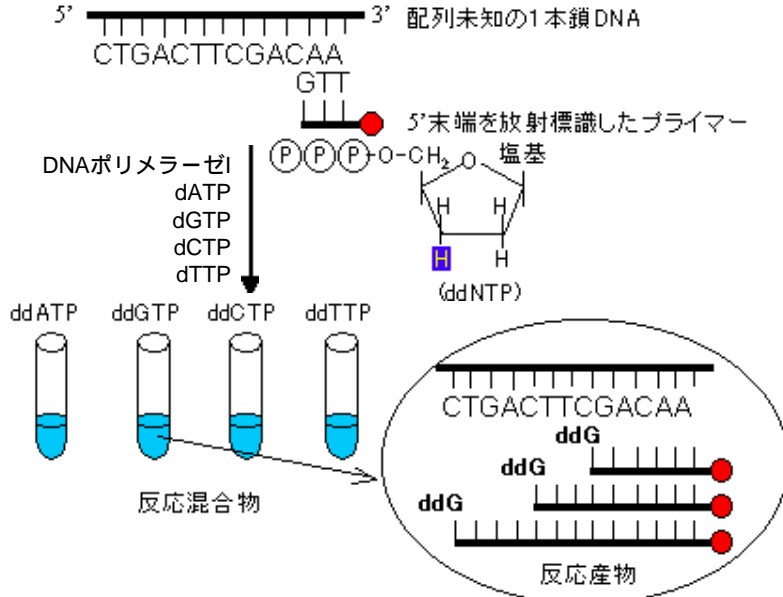
1) まず、配列を決めたい1本鎖DNAの3'末端に相補的な短いオリゴヌクレオチドをプライマーとして準備し、プライマーの5'末端を³²Pや³⁵Sで放射標識するか、または**蛍光色素で標識**する。



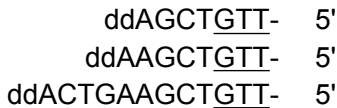
2) 配列を決めたい1本鎖DNA溶液を4等分し、標識プライマー、4種のdNTPを加える。これらにterminator (ddNTP) を1種ずつ加える。

3) DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを加えて複製を開始する。

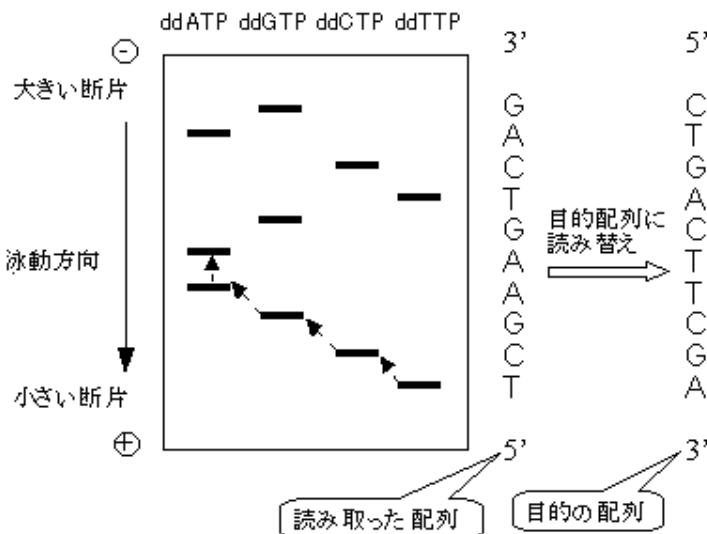
->加えたddNTPのため、鎖伸長はランダムな位置で停止する。



例えばddATPを少量加えた試験管の場合、上の配列では次の3つの標識断片が生成する。下線はプライマー部分を表す。



4) これら4つの試料をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。各々のDNA断片はサイズだけで分離される。
 5) ゲルのオートラジオグラムを作成する。



[Sanger法による塩基配列決定]

6) 図のように、泳動先端(下端)のバンドから順に上にバンドの位置を辿っていくことで、目的配列の相補鎖の5' 3'方向の配列を決定できる。これを目的配列(鋳型鎖)に読み替えるには、読みとった配列をひっくり返せばよい。

● 蛍光標識法を用いる塩基配列決定の自動化

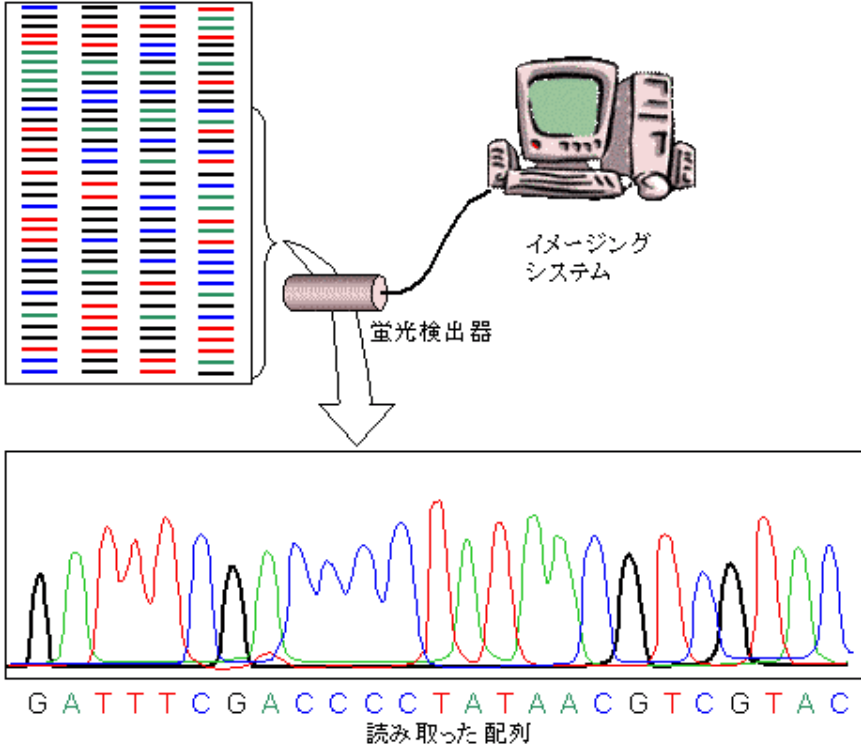
Sangerの原法では、実験ごとにプライマーをいちいち放射標識する必要があり、大変面倒である。波長の異なる蛍光発色団でterminatorを標識することにより、迅速で簡便な塩基配列決定法が開発された。

ddATP- ddTTP- 波長の異なる4種の蛍光発色団
ddGTP- ddCTP- 実際には、rhodamine系蛍光色素

[蛍光標識terminators]

蛍光標識法の手順

1. 先ず、配列を決めたい11本鎖DNA、プライマー、4種のdNTPを含む溶液に、波長の異なる蛍光色素で標識した4種のddNTP混合物 (terminator) を加える。
2. DNAポリメラーゼで鎖を伸長させる。加えたterminatorによって、鎖伸長はランダムな位置で停止する。
3. 試料をゲル電気泳動にかける。
4. ゲルにレーザー光を当てて蛍光バンドを検出し、情報をイメージングシステムに転送する。
5. 検出したバンドの情報をコンピューターで処理し、ピークとして表す。



《蛍光標識法の利点》

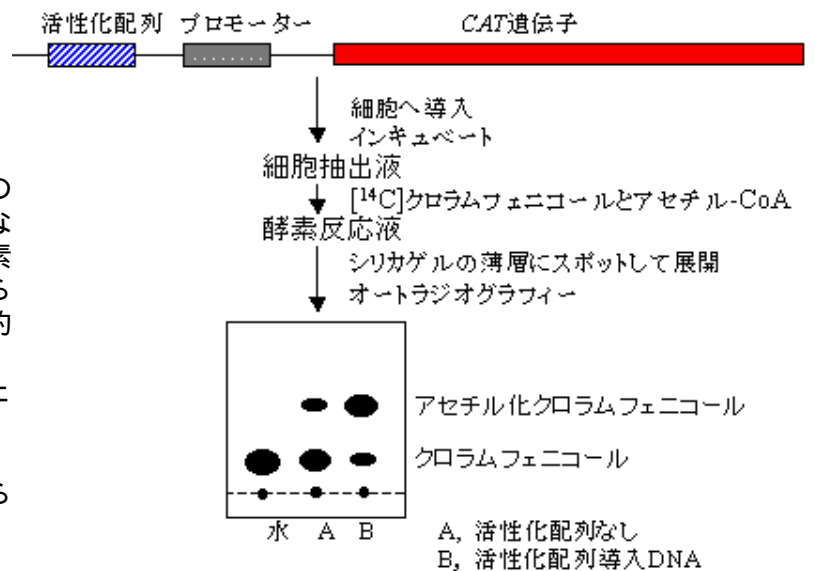
1. プライマーを標識する必要がない。
2. 反応は1本の試験管で行える。
3. 電気泳動も1試料1レーンですむため、バンドの物理的なゆがみによる読み取り誤差がない。
また、大量の試料を一度に処理できる。
4. 放射能を使用しないので、いつでも実施でき、また、放射性廃棄物を出さない。
5. オートラジオグラフィーが不要。
6. 自動化ができるので、迅速で簡便。

[蛍光標識法による塩基配列決定]

その他の技法 ▲

● 転写活性の測定法

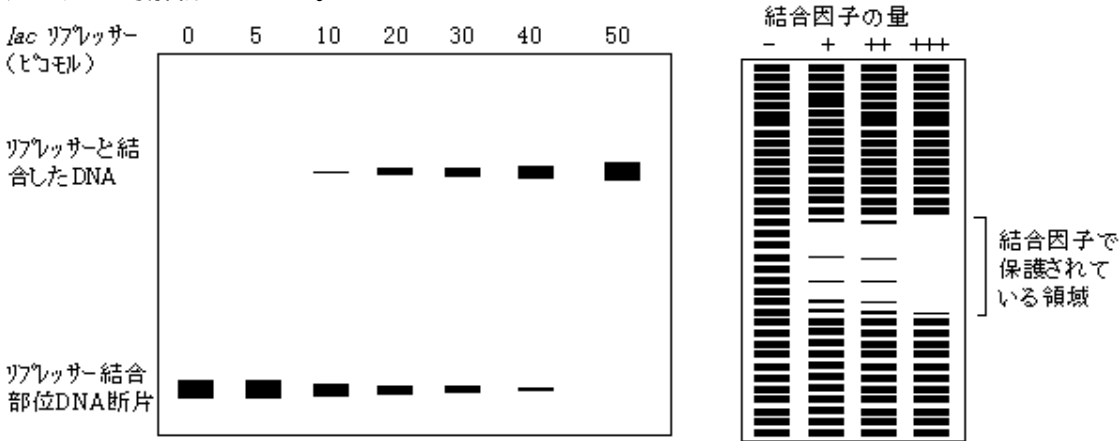
転写活性を簡便に測定するには、プロモーターの下流に酵素遺伝子をリポーター遺伝子としてつなぎ、細胞に導入する。プロモーターが働くと酵素遺伝子が転写され、タンパク質(酵素)が作られる。その酵素活性を測ることによって、間接的にRNA量、つまりプロモーター活性が見積もられる。リポーター遺伝子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (Chloramphenicol Acetyltransferase, CAT)、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼなどが用いられる。



● 転写制御因子などのDNA結合タンパク質の検出

1) ゲルシフト法 (電気泳動移動度シフト解析: electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

タンパク質（転写制御因子）が結合すると、分子サイズが大きくなり電気泳動におけるDNAの移動度が低下することを利用した転写制御因子の検出法。³²Pで標識したDNA断片と転写制御因子を混ぜ、ゲル電気泳動にかける。オートラジオグラフィーでDNAの位置を見ると、因子の結合したDNAはゆっくり動くので、通常のバンドよりも遅れて移動するバンドとして検出される。DNAのほんの一部に結合があっても検出でき、DNA結合反応の定量的解析ができる。

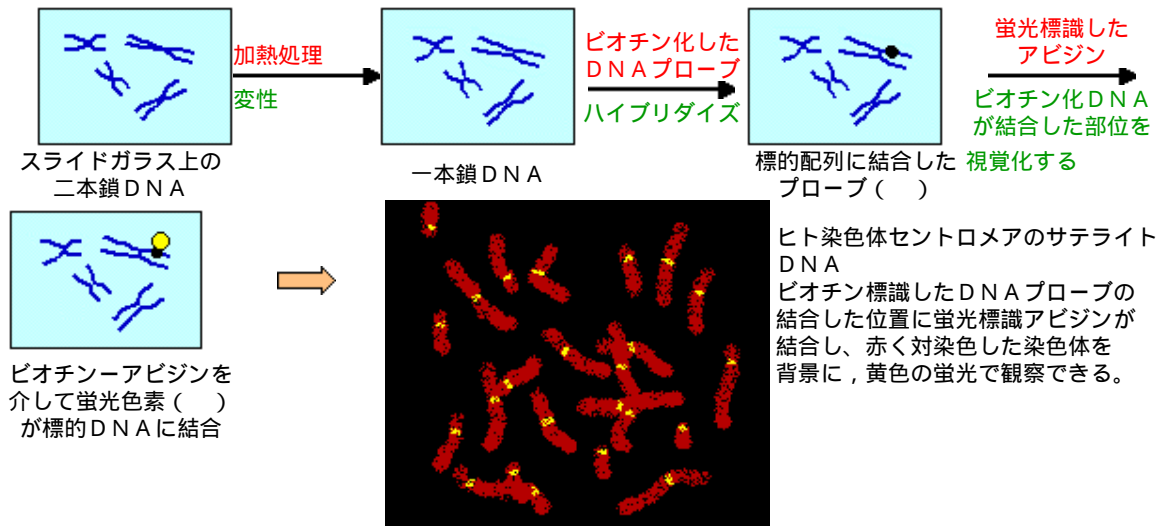


2) DNase I フットプリント法 (上右)

DNA分解酵素の一種であるDNase I (デオキシリボヌクレアーゼ) は裸のDNAを分解するが、タンパク質と結合したDNAは分解しない。この性質を利用して、転写制御因子が結合するDNAの領域を決定する方法である。一端を³²Pで標識したDNA断片と転写制御因子を混ぜ、少量のDNase Iを低温または短時間作用させて部分的にDNAを分解する。電気泳動とオートラジオグラフィーでDNAの断片を調べる。標識末端からのDNA長に従ってはしご状のバンドが見えるが、転写制御因子が結合した部分ではDNAが切れないために断片が生じず、はしご状のバンドの一部が足跡(footprint)のように抜ける。同じDNA断片をMaxam-Gilbert法で処理したものと比較することで、抜け落ちた領域が決定できる。

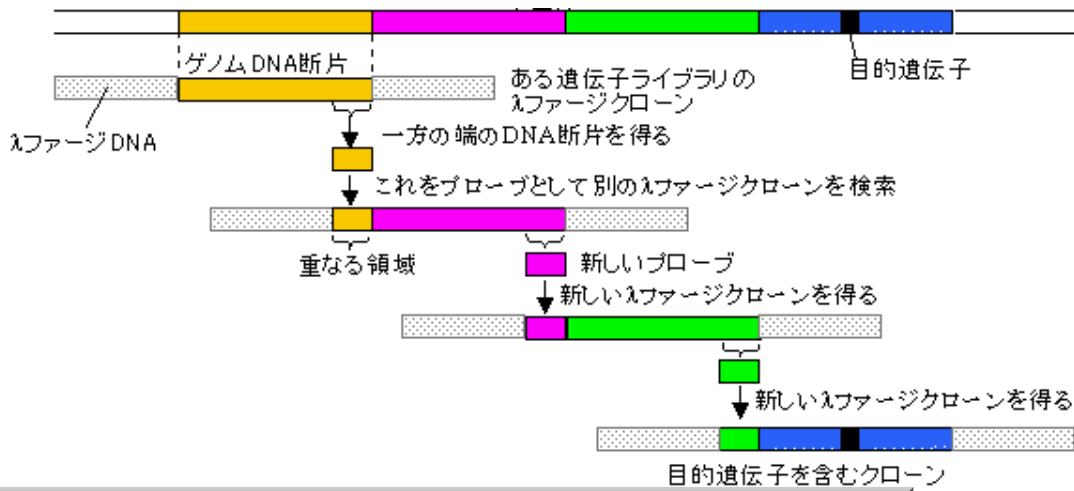
● in situ ハイブリッド形成法(in situ hybridization)

クローン化されたDNA断片の染色体上の位置を決める方法。標識DNA断片（プローブ）を、細胞分裂中期の染色体に直接ハイブリッド形成させ、染色体上の結合部位を標識によって可視化する。組織のmRNAの解析にも用いられる。蛍光標識プローブを用い、蛍光で検出する方法を fluorescence in situ hybridization (FISH)という。



● 遺伝子歩行(gene walking)

目的遺伝子の近傍のDNAから出発して、重なり合うクローンを次々にクローン化（歩行）して目的遺伝子にたどり着く手法。巨大な遺伝子の全領域のクローン化には無くてはならない方法である。染色体歩行(chromosome walking)やDNA歩行ともいう。



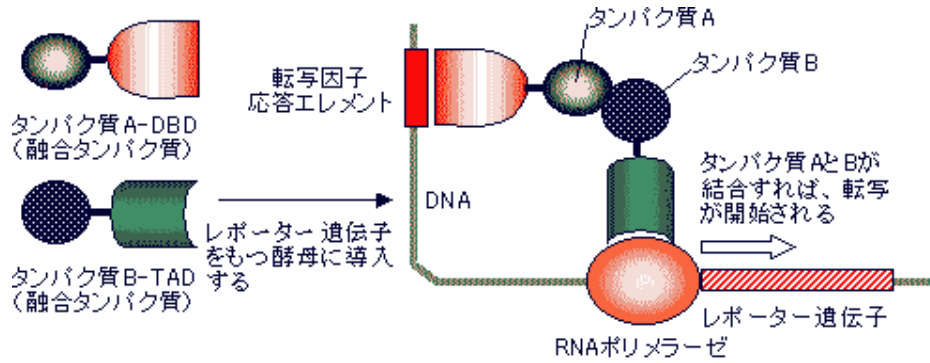
《一言》

ヒト血液凝固因子VIII遺伝子は190kbp、Duchenne筋ジストロフィーの原因タンパク質（ジストロフィン）遺伝子は2,000kbpにもわたる。また、真核細胞の遺伝子間の距離は一般に非常に遠いため、遺伝子歩行のためにはできるだけ大きなクローンが有利である。

=>YACベクター

● ツーハイブリッド法

タンパク質間の相互作用を遺伝子（転写因子活性）で調べる方法。転写因子のDNA結合部位(DBD)と転写活性化部位（TAD）は別の分子上にあっても、それらが結合すれば転写因子活性が出ることを利用。レポーター遺伝子としてはβ-ガラクトシダーゼ遺伝子がよく用いられる。



遺伝子工学の技術

戻る

遺伝子工学の道具

制限酵素

組換え体の作成

クローニングベクター

組換え体の導入と検出

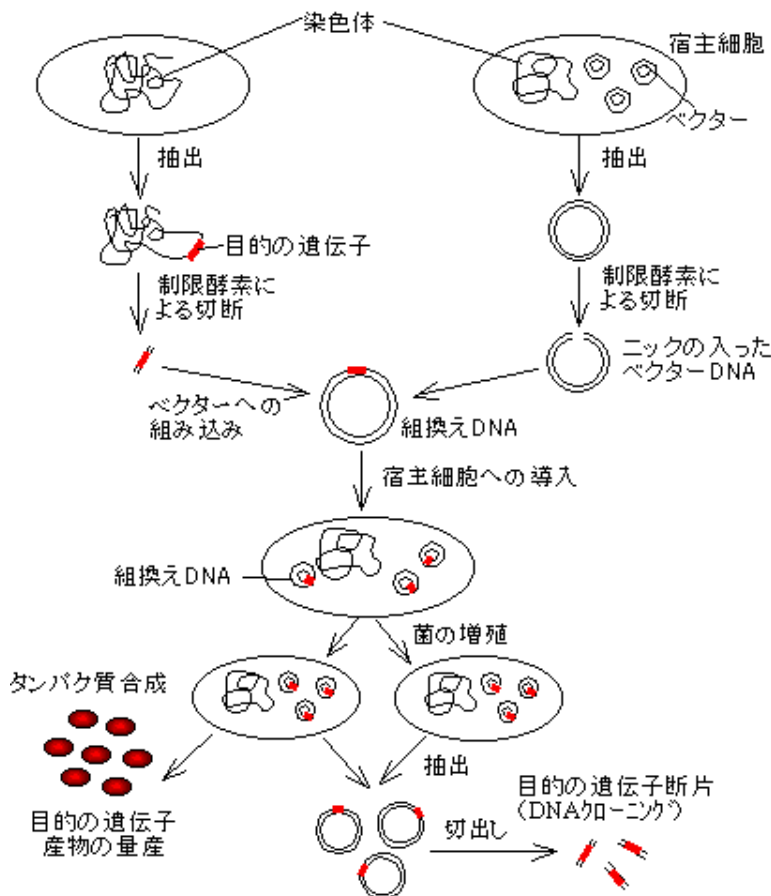
組換え体の発現

PCR法

遺伝子工学の道具

遺伝子DNAを細胞から取り出し、人工的な操作を加えたり、それを利用して遺伝子産物（タンパク質）を細胞につくらせる技術を**遺伝子工学**（gene technology, genetic engineering）、**遺伝子操作**（gene manipulation）、**遺伝子組み換え技術**（recombinant DNA technique）などと呼ぶ。

組み換え体を宿主細胞に入れ、目的遺伝子を増やしてDNA断片を量的に得る操作を**DNAのクローニング**と呼ぶ。その塩基配列を決定することによって、遺伝子の構造や遺伝子の制御の仕組みを知ることが可能となった。一方、組み換え体を用いて、目的のタンパク質を作らせることも出来る。ヒトのタンパク質を微生物で作らせる場合、目的の遺伝子をリボソーム結合部位（SD配列）の後に組み込む必要がある。このために開発されたベクターを特に**発現ベクター**と呼ぶ。近年、DNAの新しい増殖法として**PCR法**が開発され、微量の試料からでもDNAをクローニングできるようになった。



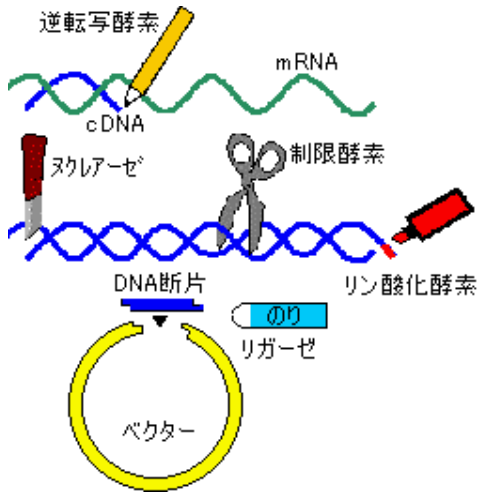
《基本的な手順》

1. 目的のDNA断片の調製
2. 組換え体DNAの作成
3. 組換え体を宿主細胞に導入
4. 組換え体を含む細胞の検出と選別

DNAのクローニング(cloning)
宿主細胞からの組換え体
DNAの抽出
目的DNAの切り出し
DNAの1次構造解析

組換え体を含む細胞の増殖
有用物質の生産

遺伝子工学にはいくつかの道具が必要である。1970年に相次いで発見された**制限酵素**と**逆転写酵素**は、遺伝子工学を現実のものとした。制限酵素はDNAの特定の塩基配列を認識して切断するため、目的遺伝子の切り出しに欠かせない。逆転写酵素はmRNAに相補的な放射能標識した**cDNA**を作るのに用いられる。cDNAは目的遺伝子の検出やそれ自体のクローニングに利用される。**リガーゼ**はDNAの切れ目をつなぐ酵素で、**組み換え体**(recombinant)を作成するのに用いられる。遺伝子を組み込む相手として用いられるDNAを**ベクター**と呼ぶ。現在広く用いられているベクターとしては、ファージ、動植物ウィルスおよびプラスミドなどがある。**プラスミド**は多くのバクテリアに存在する小型の核外遺伝子で、組み換え体を選別するためのマーカー遺伝子や複製開始点を持つ。この他、長鎖のDNAを組み込むため、 λ ファージとプラスミドを基に人工的に作られた**コスミド**や**酵母の人工染色体**などが用いられる。組み換え体を取り込ませ増やすためには、大腸菌、酵母などの宿主細胞が必要である。



● **核酸分解酵素**

目的遺伝子を切り出したり、末端を加工する酵素。**制限酵素**が特に有用である。

● **逆転写酵素 (reverse transcriptase)**

mRNAを鋳型として相補的なDNA (**cDNA***)をつくる酵素。校正機構はもたない。
* complementary DNAの略。

● **DNAリガーゼ**

DNAの切れ目をつなぐ酵素 (のりの役目)

● **ベクター**「運搬者(vector)」

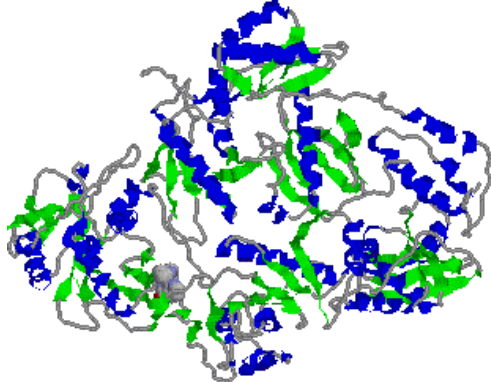
目的遺伝子を組み込む相手。
(例) プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母の人工染色体など

● **宿主細胞**

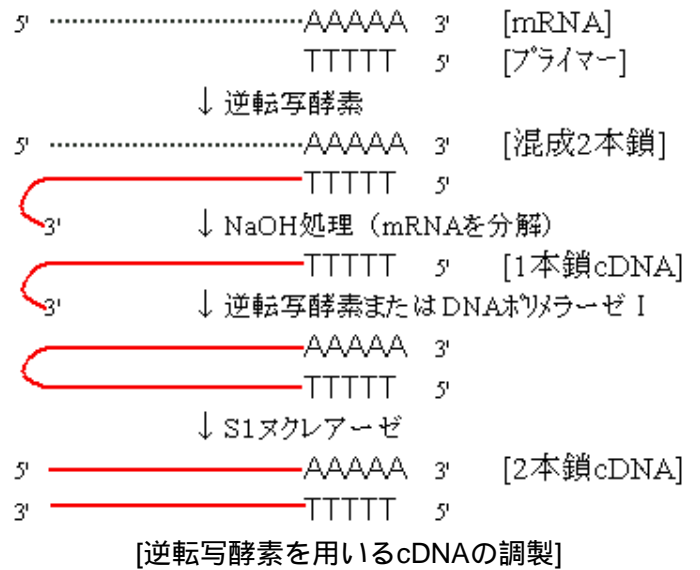
目的遺伝子を取り込ませ増やす役目
(例) 大腸菌、枯草菌、酵母、細胞株など

● **cDNAの調製**

細胞で発現している遺伝子産物の構造を調べる目的で、mRNAのヌクレオチド配列を決定することが行われる。mRNAは3'末端にポリ(A)鎖をもつので、オリゴ(T)をプライマーとして**逆転写酵素**を作用させると、mRNAに相補的なDNA鎖が合成できる。アルカリ処理でmRNAを分解後、生じた1本鎖DNAを鋳型として逆転写酵素またはDNAポリメラーゼで2本鎖にし、クローニングに供される。



[逆転写酵素の立体構造]



[逆転写酵素を用いるcDNAの調製]

制限酵素

DNAの特定の塩基配列を認識して切断する酵素を**制限酵素**(restriction enzyme)という。特に、II型の制限酵素は遺伝子工学においてDNAの断片化に頻りに用いられる。

II型の酵素は4~8塩基対の回文構造を認識するものが多い。400種以上知られているが、その内100種ほどが市販されている。分解の様式から、**付着末端**を生じる酵素群と、**平滑末端**を生じる酵素群に大別される。I型やIII型と異なり、DNAのメチル化は起こさない。同一の基質特異性をもつメチル化酵素は別に存在する。同じ配列を認識するものでも切断箇所を異にする酵素もあり、**アイソシゾマー**(isoschizomer)と呼ばれる。

組換え体の作成

《目的DNA断片を調製する》

DNAを制限酵素で切断し、得られた断片を電気泳動で分離し、プロットング後、放射標識した**プローブ**で目的の断片を検出する。プローブとしてはmRNAからつくったcDNAや合成オリゴヌクレオチドなどを用いる。

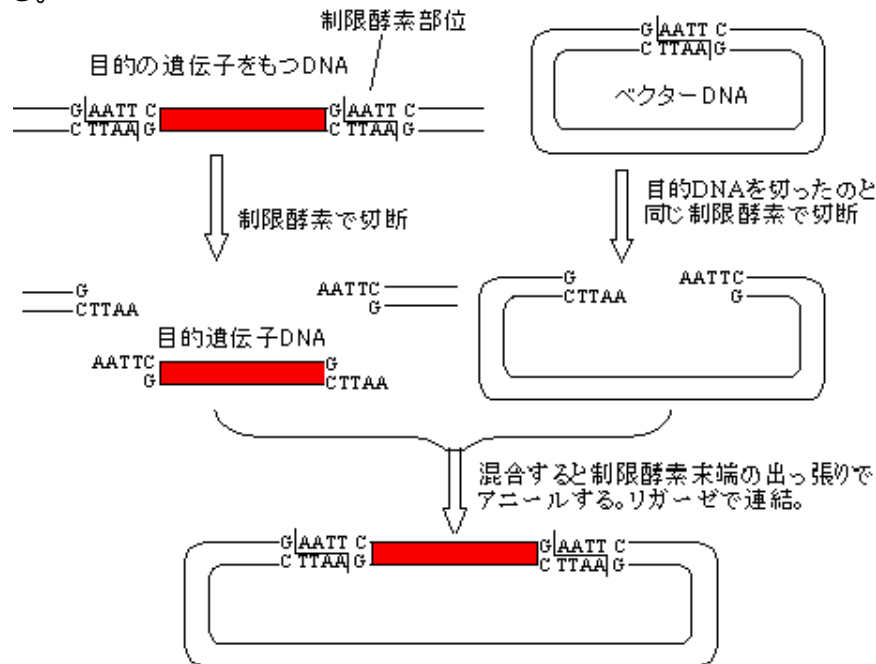
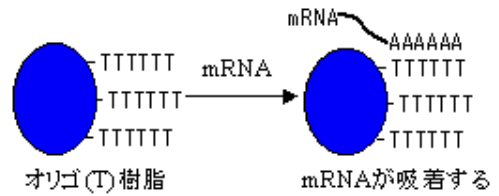
代表的なII型の制限酵素とその認識部位 **縦線**が切断箇所

付着末端(cohesive (sticky) end)切断型			
<i>Eco</i> RI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	→	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
<i>Hae</i> II	5'-PuGCGC Py-3' 3'-PyCGCGPu-5'	→	5'-PuGCGC Py-3' 3'-Py CGCGPu-5'
<i>Pst</i> I	5'-CTGCA G-3' 3'-GACGTC-5'	→	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'
<i>Hind</i> III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	→	5'-A AGCTT-3' 3'-TTCGA A-5'
<i>Bam</i> HI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	→	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'
平滑末端(flush (blunt) end)型切断			
<i>Hae</i> III	5'-GGCC-3' 3'-CCGG-5'	→	5'-GG CC-3' 3'-CC GG-5'
<i>Alu</i> I	5'-AGCT-3' 3'-TCGA-5'	→	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'
<i>Sma</i> I	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCC-5'	→	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'
<i>Bal</i> I	5'-TGGCA-3' 3'-ACCGGT-5'	→	5'-TGG CCA-3' 3'-ACC GGT-5'

cDNAはPCR法などで増やして用いる。遺伝子ライブラリが利用できる場合は、それを用いる。

《DNA断片をベクターに組み込む》

- 付着末端を生じる制限酵素でDNA断片が切り出せた場合
- 制限酵素法
突出した末端をベクターとのアニーリング部位に利用する。



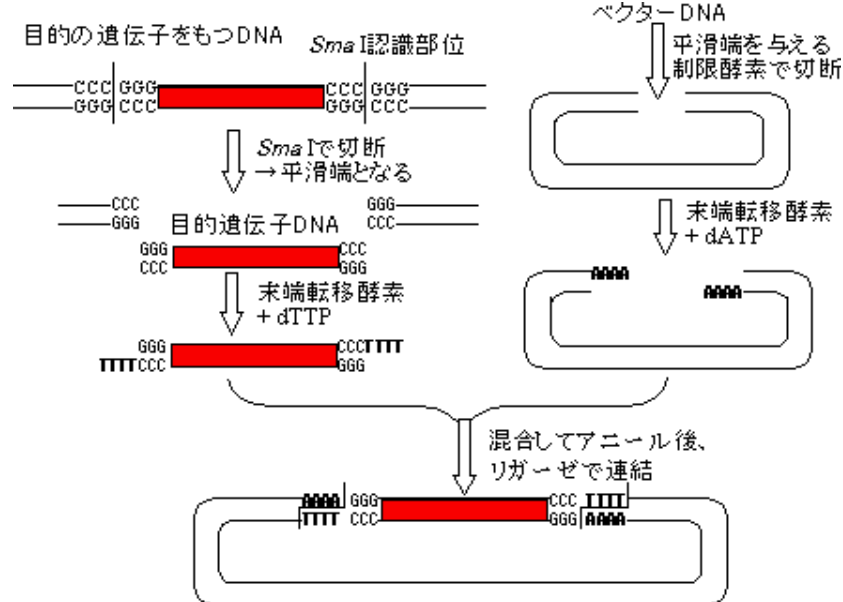
[制限酵素切断末端をのりしろにする方法]
付着端を生じる制限酵素でDNA断片が切り出せた場合はベクターも同じ制限酵素で切り、切断片をのりしろにしてアニールさせる。切れ目をリガーゼでつなぐ。

- 平滑末端を生じる制限酵素でDNA断片が切り出せた場合
- T4リガーゼ結合法

T4ファージのDNAリガーゼが、平滑端の2本鎖DNAを直接結合することを利用する。通常のリガーゼでも、基質濃度を高くすれば、直接、平滑端をつなぐことができる。

- ホモポリマー法

短いオリゴヌクレオチドをDNA断片とベクターに付けてアニーリング部位にする。



[ホモポリマーを結合させてのりしろにする方法]
平滑端のDNA断片しか得られなかった場合は、末端転移酵素を用いて、DNA断片にオリゴ(T)、ベクターにオリゴ(A)を結合させてのりしろにする。このやり方では、後で同じ酵素で切り出せない。そこで制限酵素部位を持つリンカーをつけるとうい。

クローニングベクター (cloning vectors)

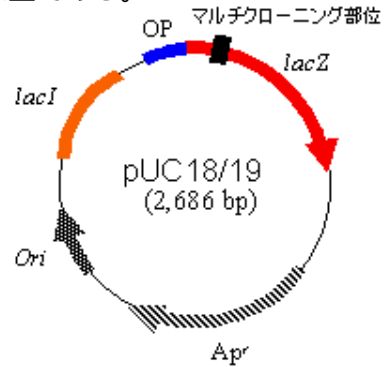
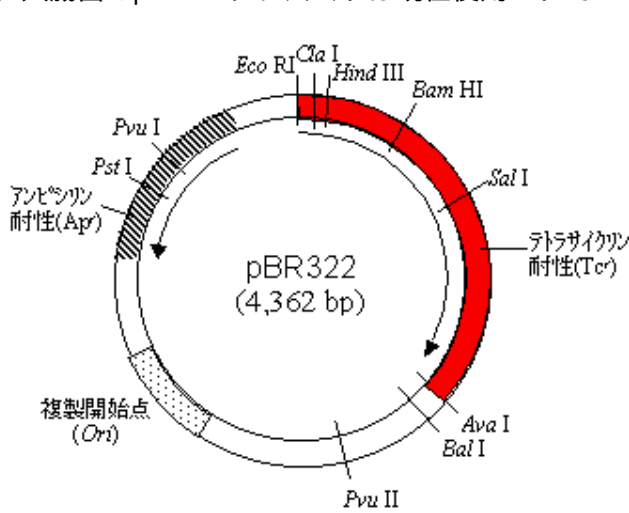
- プラスミド系ベクター

プラスミド(plasmid)とは、複製開始点など遺伝に必要な仕組みを備えた小型(1~200kbp)の環状二本鎖DNAである。細菌中で自立増殖が可能で、染色体DNAとは独立に複製される。細胞内に1~数10個(クローニングに用いられるものは細胞内にふつう10~200個)存在できる。抗生物質耐性遺伝子を持ち、これが組換え体作成のためのマーカー遺伝子として利用される。天然のプラスミドは制限酵素部位が多すぎるため、人工的に改変されたものが用いられる。

《クローニング用ベクターの条件》

1. 宿主細胞中で自己複製能を示す
2. 宿主細胞と容易に区別しうる表現型の遺伝子をもつ
3. 制限酵素切断部位を少なくとも1つもつ
4. 宿主細胞の外では生存できないもの

プラスミドベクターには5~10kbまでのDNA断片を組み込むことができる(これ以上大きなDNAを組み込むと不安定になる)。大腸菌のpBR322プラスミドは現在使用されているものの原型である。



Blue Script Vector

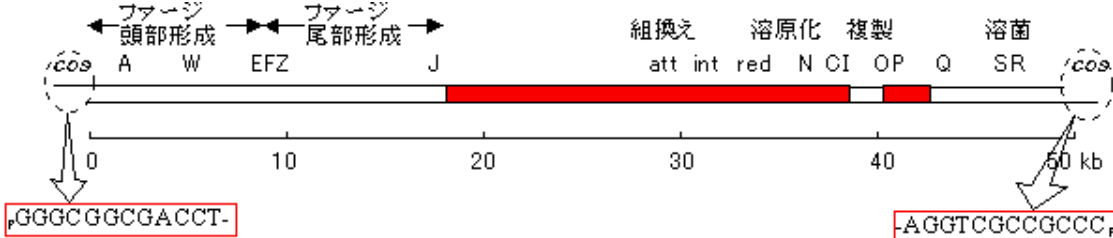
[いろいろなプラスミドベクター]

矢印はマーカー遺伝子のセンス鎖の方向。細い線は制限酵素の作用部位。

lacI : lacリプレッサー、lacZ : β-ガラクトシダーゼ、マルチクローニング部位 : 種々の制限酵素で切断可能な配列(例)。

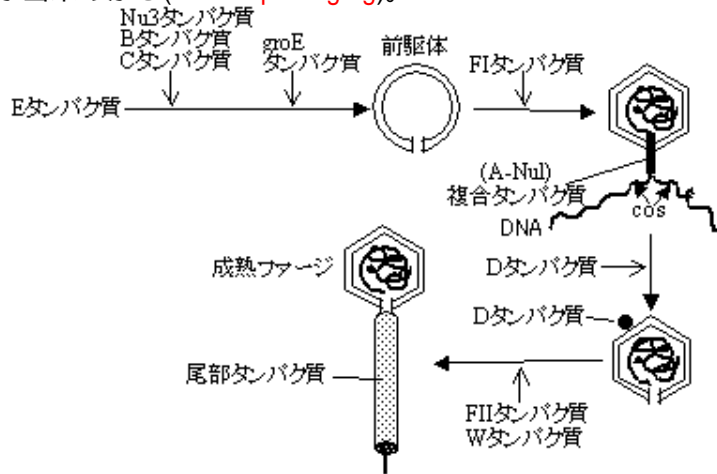
● λファージベクター

λファージは大腸菌に寄生するウィルスで、クローニングによく用いられる。48.5kbpの2本鎖線状DNAである。分子中央1/3はウィルスに感染させるのに必要ではないので、外来のDNAとそっくり置換が可能である。ここに、15~20kbの外来DNAを組み込める。



[λファージ遺伝子の構成] 赤はファージの感染に必要な部分。

ファージDNAが頭部に収納されるためにはcos部位と呼ばれる12塩基の相補的な2つの1本鎖配列が両端にあり、これらが36~51kb離れていることが必要である。ファージタンパク質とDNAを試験管内で混ぜるだけで、成熟ファージ粒子が出来あがる(in vitro packaging)。



[λファージ粒子の形成]

遺伝子ライブラリやcDNAライブラリの作成

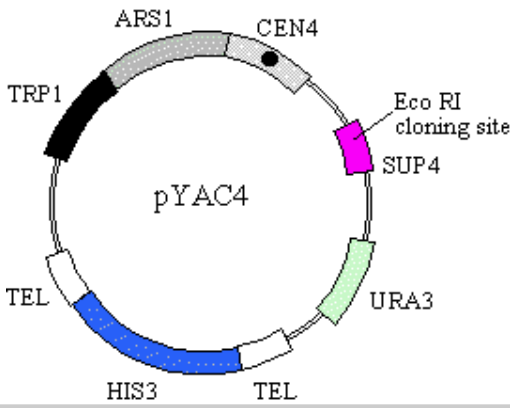
in vitro packagingでファージ頭部に入りうるDNAの大きさには制限がある(野生ファージゲノムの78~105%の長さ)。1つの生物の遺伝子を制限酵素で分解して得られたDNA断片をファージに組み込むと、ほぼ一定の長さのものだけを詰め込むことができることになる。このようなDNAの集合物を**遺伝子ライブラリ**という。ファージに組み込まれたDNAは安定に保存できるし、増やすのも容易なので、多くの人が迅速に利用できる。細胞の全mRNAをcDNAに変え、同様にパッケージしたものを**cDNAライブラリ**と呼ぶ。

● コスミド・ベクター

λファージの2つのcos部位をプラスミドベクター上に適当な距離に置けば、ファージにin vitro packagingが可能。この目的で作られた小型(4~6kb)のベクターをコスミドという。プラスミドと同様にマーカー遺伝子や複製開始点をもつのでファージ感染後、細胞内ではプラスミドとして増殖する。コスミドには約45kb程の長鎖のDNAを組み込めるのが特徴。

● 酵母人工染色体 (YAC, yeast artificial chromosome)

YACは酵母での複製に必要なものを全て備えた線状DNA断片で、複製起点(自立複製配列ARS)、セントロメア(CEN)、テロメア(TEL)をもつ(下図)。YACには数100kbのDNA断片を組み込める。



3種のベクターの比較

目的	プラスミド	ファージ	コスミド
10kb以上のDNAのクローニング	-	+	+
遺伝子ライブラリの作成	-	+	+
cDNAライブラリの作成	+	-	-
小さな(<10kb)DNAのサブクローニング	+	-	-
大腸菌での遺伝子発現	+	-	-

《一言》

数Mbpも離れた遺伝子を検索するために**染色体歩行**を行う場合、YACベクターはサイズが大きいクローンを得ることができるので大変有利である。

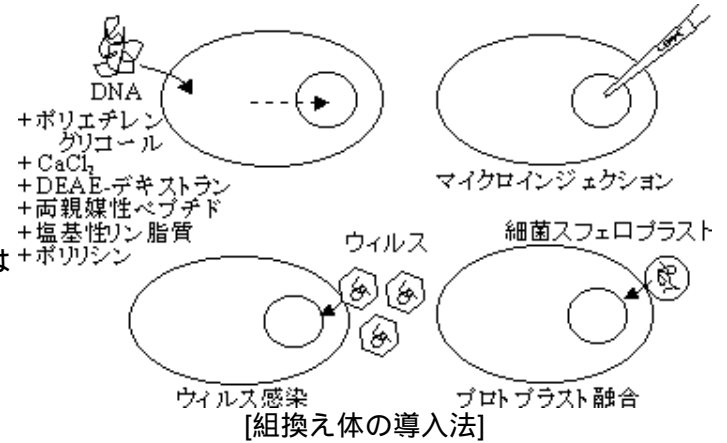
YACベクターを構築する場合、プラスミドpBR322のアンピシリン耐性遺伝子と複製開始点を組み込んだシャトルベクターをつくり、大腸菌で大量に調製する。ベクター自体の大きさは約5~20kbpである。

組換え体の導入と検出



● 宿主細胞への導入

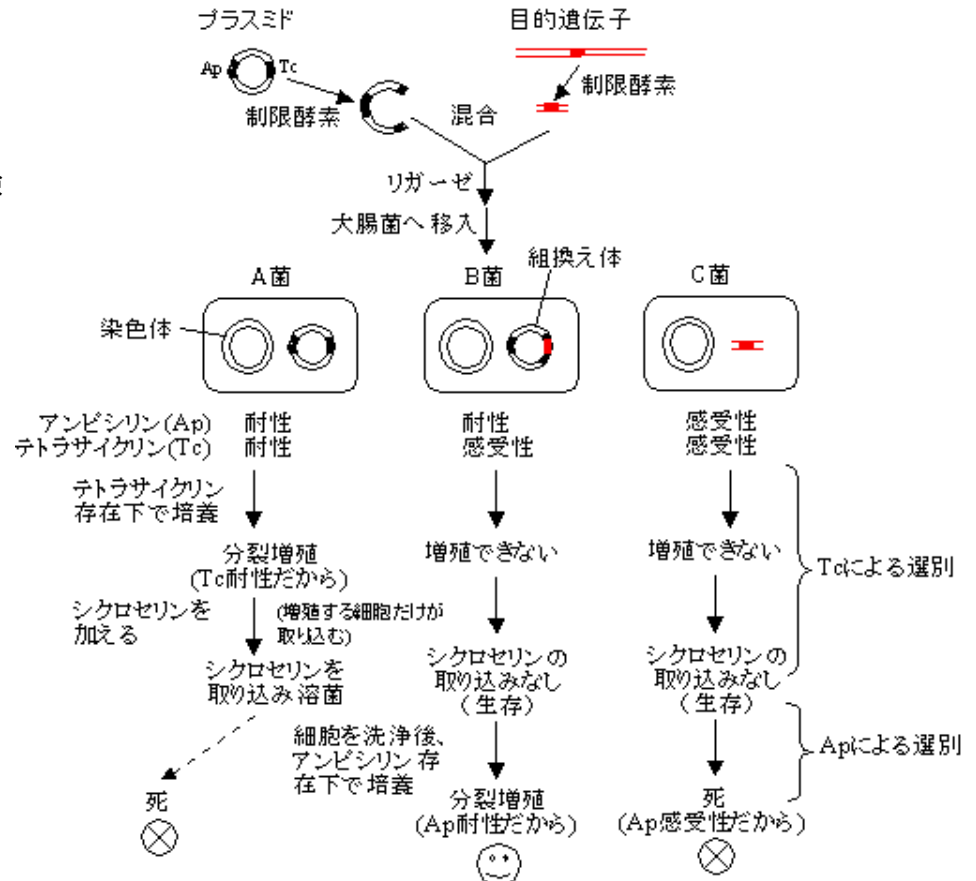
- 大腸菌へのプラスミドの取り込み
菌を氷冷下、CaCl₂で処理すると、DNAを取り込むようになる（コンピテントな状態という）。
- ベクターとしてファージを利用する
感染によって取り込ませる。菌に入ったファージは隣の菌に次々と感染し、溶菌班（プラーク）を形成。
- 動物細胞へのDNAの取り込み（トランスフェクションという）
カルシウム - リン酸共沈法（細胞の食作用を利用）
その他、種々の方法がある。



● 目的遺伝子を受け取った細胞の選択的検出

● 挿入失活法

pBRプラスミド：テトラサイクリン(Tc)とアンピシリン(Ap)耐性マーカー遺伝子が存在
2段階選別法(右図)。

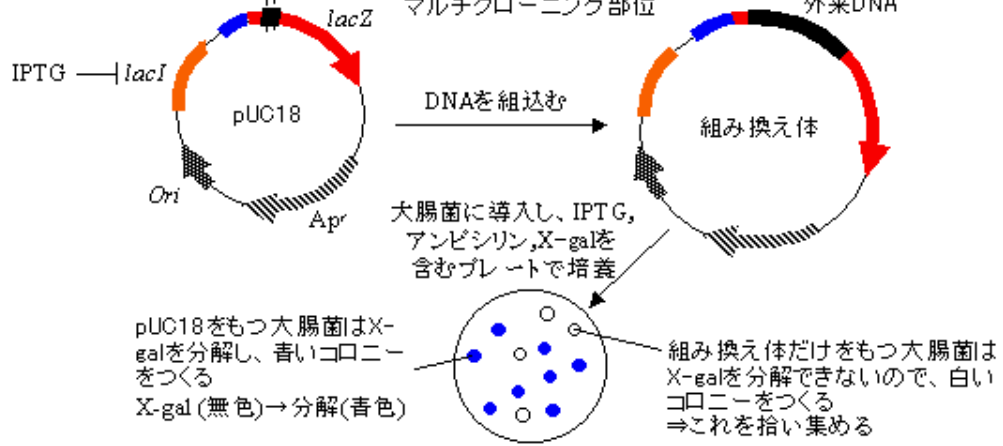
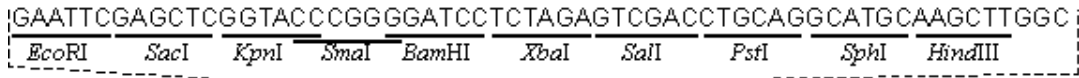


[マーカー遺伝子を利用した組み換え大腸菌の選別]

● 直接選別法

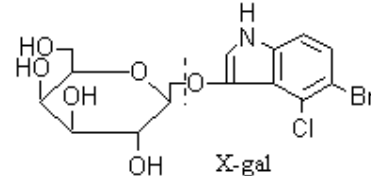
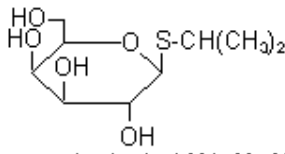
β-ガラクトシダーゼを組み込んだpUC系ベクターで、目的DNA断片の挿入失活を利用する。基質 X-gal を作用させると、β-ガラクトシダーゼが作られていれば (lacZ遺伝子が分断されていなければ) X-galが分解されて青色を呈し、青いコロニーを生じる。

lacZ遺伝子の途中には遺伝子を組み込むためのマルチクロニング部位がある。もし、ここに目的DNA断片が挿入されていれば、β-ガラクトシダーゼを作れない。従って、組換え体を取り込んだ細胞はX-galを分解できないため白いコロニーを生じるので、これを選別すればよい。



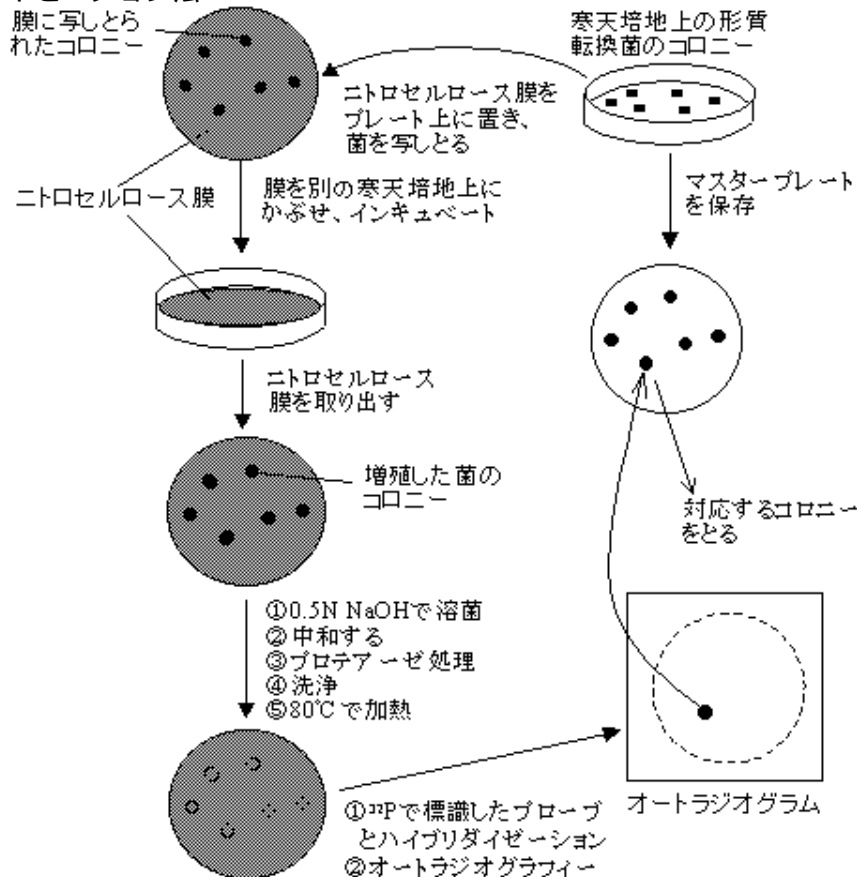
[直接選別法による組み換え大腸菌の選別]

コロニー(colony)：細胞の集落のこと



イソプロピルチオガラクトシド (IPTG)：乳糖 (ラクトース) と同様、lacリプレッサータンパク質に結合してリプレッサー活性を抑え、lacZ (β-ガラクトシダーゼ) 遺伝子の転写を開始させる。しかし、乳糖と異なりβ-ガラクトシダーゼで分解されないため、持続的に作用を發揮する。

● コロニーハイブリダイゼーション法



[コロニーハイブリダイゼーション法による組み換え体の検出]

● DNAのクローニング

1. 目的遺伝子DNAの入った細胞を大量培養し、DNAを抽出
2. 組換え体を単離
3. 制限酵素で目的DNAを切り出す
4. 大量の目的DNA断片をえる (クローン化DNA)

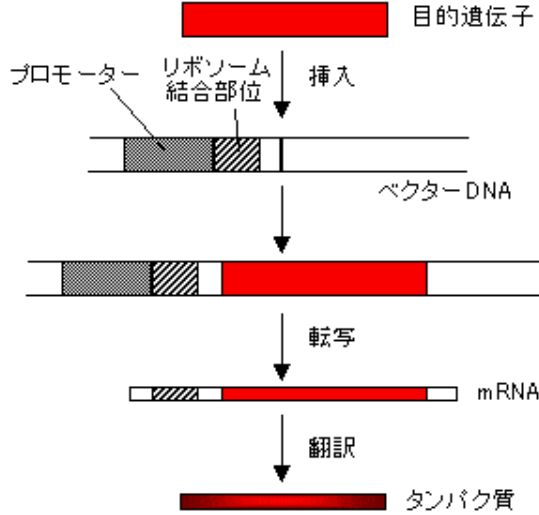
組換え体の発現



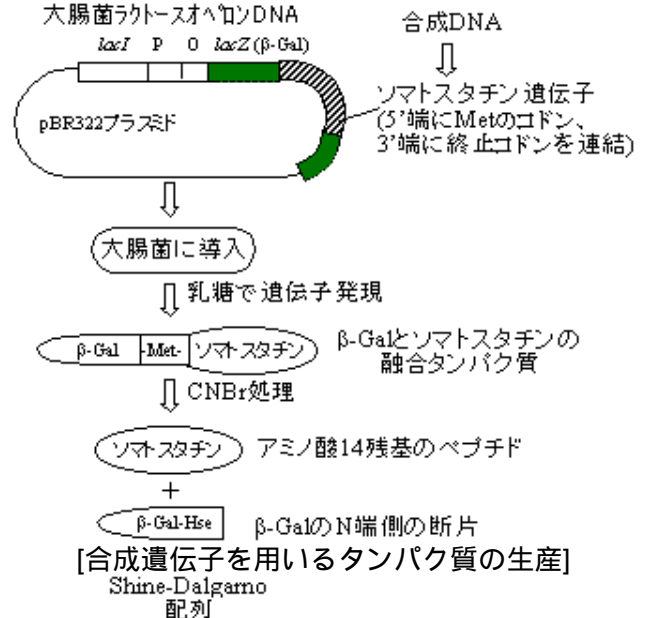
目的遺伝子が入った細胞を使ってタンパク質を生産したいが？

このためには、宿主細胞のプロモーター、リボソーム結合(Shine-Dalgarno)配列を配置したベクターの適切な位置に目的DNAを組み込む必要がある(下左図)。

最初の頃は、大腸菌プラスミドのラクトースオペロンのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の途中にDNA断片を挿入して、β-ガラクトシダーゼN端部との融合タンパクとして多くのタンパク質がつくられた(下右図)。



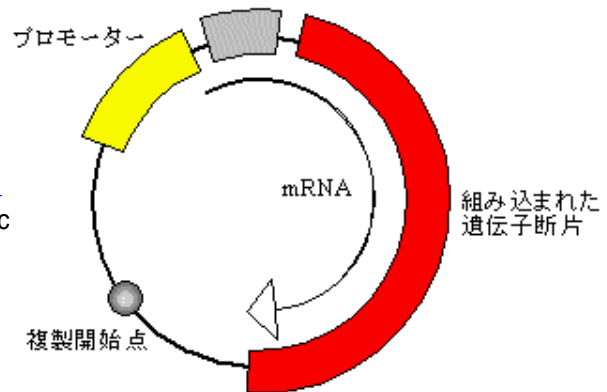
[目的遺伝子のタンパク質の合成]



[合成遺伝子を用いるタンパク質の生産]
Shine-Dalgarno
配列

● 発現ベクター

現在では、タンパク質合成能を持つベクター (発現ベクター) が用意されており、発現ベクターと呼ばれる。lac (ラクトースオペロン), trp (トリプトファンオペロン), tac (lacとtrpオペロンを融合したもの) のプロモーターを組み込んだ発現プラスミド (大腸菌)、バキュロウィルス由来のベクター (昆虫細胞中で糖タンパク質も作れる)、酵母の発現ベクターなどがよく使われる。



[発現プラスミドの構成]

プラスミドpU18/19はこの目的に利用可能。マルチクローニング部位の前にプロテアーゼ認識部位を入れておくと、後で遺伝子産物を切り出せる。

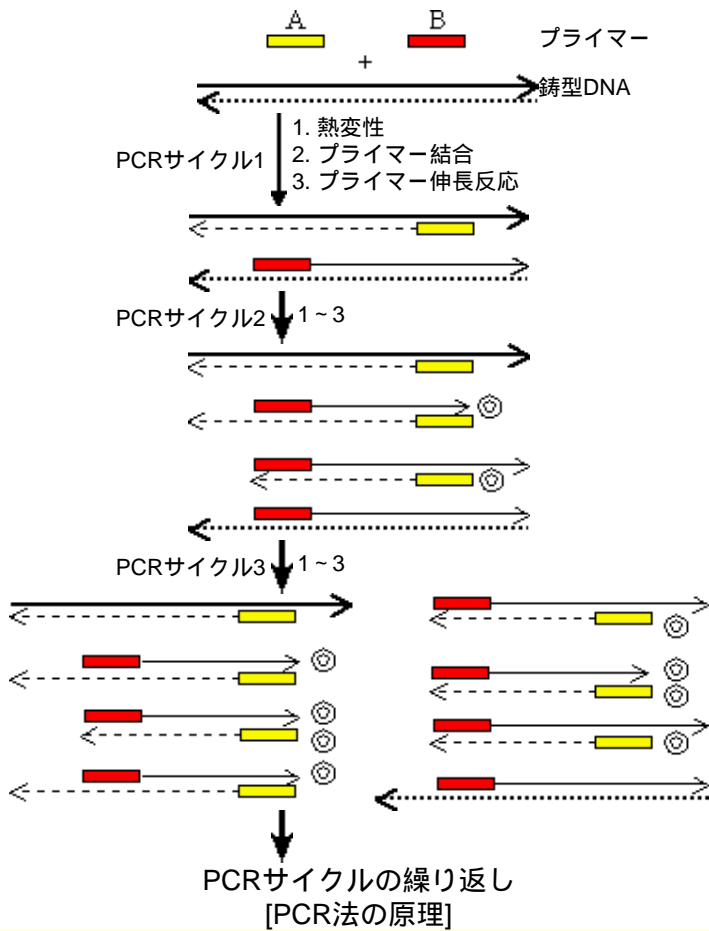
PCR法 Polymerase Chain Reaction法

1985年、Mullisによって考案された画期的なDNA増幅法で、2種のプライマーで挟まれた領域のDNAだけを増幅する。1988年、耐熱性のDNAポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼ) が導入され、この方法が実用化された。PCR法は次の3つの段階からなり、このサイクル(1)~(3)を20回ほど繰り返すことにより、短時間にかつ簡便にDNA断片を百万倍以上に増幅できる。

- (1) 2本鎖DNAの熱変性 1本鎖へ解離
- (2) 2つのプライマーのアニーリング
- (3) DNAポリメラーゼによるDNA2本鎖の延長

増幅するDNAの範囲は、設計したプライマーの配列に依存する。下の例ではプライマーAとBで挟まれた範囲だけが増幅される。PCRサイクルで初めて目的のDNA断片が1組生成し (二重丸), 以後は、nサイクルで、 $2^n - 1$ になる。

n = 10 1,013組, n = 20 1,048,555組



増幅したい標的DNA断片の配列をS+とS-とする。

(S+) 5' ATCAACTAATA-----ACGACGAGGATG 3'

(S-) 3' TAGTTGATTAT-----TGCTGCTCCTAC 5'

この2本鎖の3'末端部分に相補的な短いオリゴヌクレオチド（プライマー）を準備する（合成品を使う）。

プライマーA： 3' CTCCTAC 5'（青部分の相補鎖）

プライマーB： 5' ATCAACT 3'（赤部分の相補鎖）

標的配列を含むDNA, プライマーAとB, 4種のdNTP, 耐熱性のDNAポリメラーゼを混合し, 反応を開始する。反応は温度を上げ下げするだけ！

<サイクル1>

5' --- ATCAACTAATA-----ACGAC GAGGATG--- 3' 標的配列を含む
3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTG CTCCTAC --- 5' DNA

↓ 1. 熱変性(96℃, 15秒)

↓ 2. プライマーのアニーリング(55℃, 30秒)

5' --- ATCAACTAATA-----ACGAC GAGGATG--- 3'
3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTG CTCCTAC --- 5' (プライマー-A)

ATCAACT → (プライマー-B)

↓ 3. DNAが鎖を伸長(72℃, 90秒)

から 5' --- ATCAACTAATA-----ACGAC GAGGATG--- 3'
3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTG CTCCTAC --- 5'

から 3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTGCTCCTAC --- 5'
5' --- ATCAACTAATA-----ACGACGAGGATG --- 3'

<サイクル2>

↓ 1~3

から 5' --- ATCAACTAATA-----ACGAC GAGGATG--- 3'
3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTG CTCCTAC --- 5'

から 3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTGCTCCTAC --- 5'
5' --- ATCAACTAATA-----ACGACGAGGATG --- 3' (S+)

から 3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTGCTCCTAC --- 5'
5' --- ATCAACTAATA-----ACGACGAGGATG --- 3'

から 5' --- ATCAACTAATA-----ACGACGAGGATG --- 3'
3' --- TAGTTGATTAT-----TGCTG CTCCTAC --- 5' (S-)

【PCR法の利点と欠点】

(1) 未精製DNAや部分分解DNAからでも目的の遺伝子部分だけを短時間に増幅できる。ただし、6kb位が限度。

(2) DNA鎖に新しい塩基配列を導入できる。（プライマーの5'末端に新しい配列を接続することによって）

(3) 用いる機械は精密な温度コントロールシステムだけ。

Taqポリメラーゼは校正機構が弱いので、時々、複製のミスが起こるのが欠点。

遺伝子工学の応用

戻る

遺伝子やタンパク質の構造と機能の解析

有用タンパク質の生産

タンパク質工学

生物の品種改良

医学への応用

遺伝子工学は生命科学の研究分野のみならず、広く産業界においても利用されている。遺伝子の構造の研究からは、真核細胞のDNAにおける介在配列（イントロン）の発見、核酸酵素（触媒作用をもつRNA）の発見、タンパク質やその前駆体の構造決定、遺伝子発現のしくみなどの解明に多大の貢献をした。特に、医学領域では遺伝子疾患の分子レベルでの解明が可能となり、癌遺伝子や難病の研究など、多くの成果を生んだ。PCR法の登場により、ミイラや絶滅動物などの古生物学の研究や、遺伝子鑑定など法医学への応用も可能となった。微生物にヒトのタンパク質を作らせる試みは、特に産業界の注目を集めた。インシュリン、ACTHなどのペプチドホルモン、血栓溶解剤として用いられるウロキナーゼなどの酵素、インターフェロンやインターロイキンなどの免疫治療剤、ワクチンタンパク質などが、融合タンパク質法や発現ベクターを用いて生産された。また、自然界にはないような変異タンパク質を作ることも可能で、**部位特異的変異導入法**を用いればタンパク質中の任意のアミノ酸を他のアミノ酸で置換することができる。従来のやり方では成し得なかったタンパク質の機能改変が可能となった。

クローン羊の衝撃的な報告に見られるように、遺伝子工学は発生工学とタイアップして、これまでの交配によるやり方から枠を外れ、全く新しい次元の品種改良の道も開いた。また、医療の面における応用も数多く報告されている。しかしながら、遺伝子の本体を人工的に操作することは、社会的、倫理的な諸問題を含んでおり、決して濫用すべきものではないことも十分知っておく必要がある。

遺伝子工学

遺伝子やタンパク質の構造と機能の解析

有用タンパク質の生産

新規タンパク質の創製

古生物学の研究

犯罪捜査への利用

生物の品種改良

遺伝子診断と病因解析

遺伝子治療

遺伝子やタンパク質の構造と機能の解析

● 真核細胞の遺伝子の構造解析

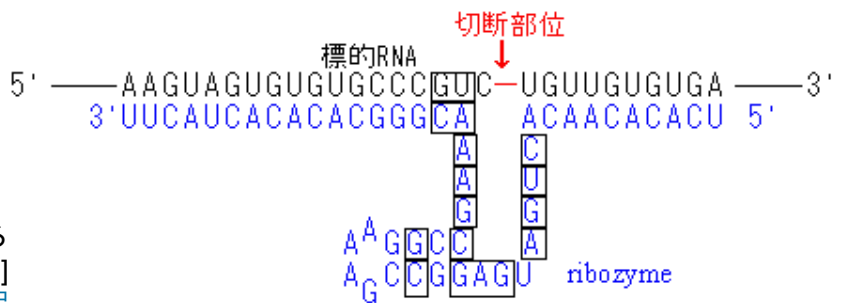
● イントロンの発見とプロセッシング機構の研究

核酸酵素（Ribozyme）の発見。

標的RNAを切断するリボザイムをデザイン。特定の遺伝子の発現を抑制したり、RNAウイルス疾患の治療に有用。

[ハンマーヘッド型リボザイム(RNAを切るハサミ)]

枠内の配列は、ハンマーヘッド型リボザイムの共通配列



● RNA編集（エディティング）の発見

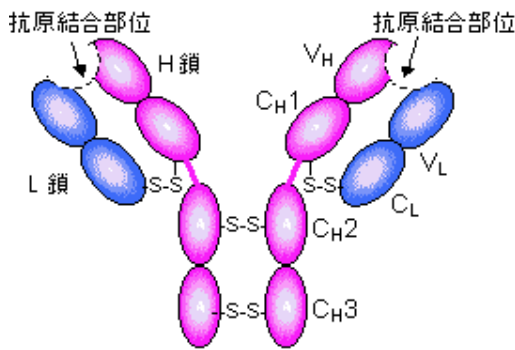
遺伝情報がRNAレベルで書き換えられるという、遺伝子発現の多様性の1つ。

● 転写制御因子群の発見

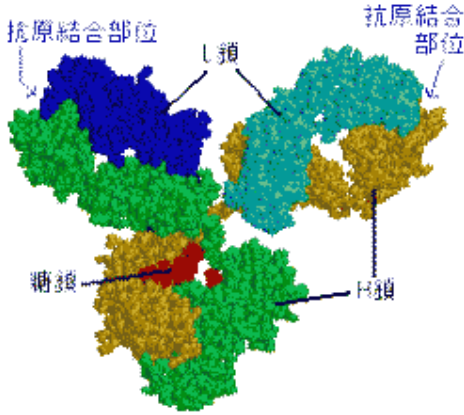
真核細胞における転写調節のメカニズムの解明。

● 免疫グロブリンやT細胞受容体を解明。

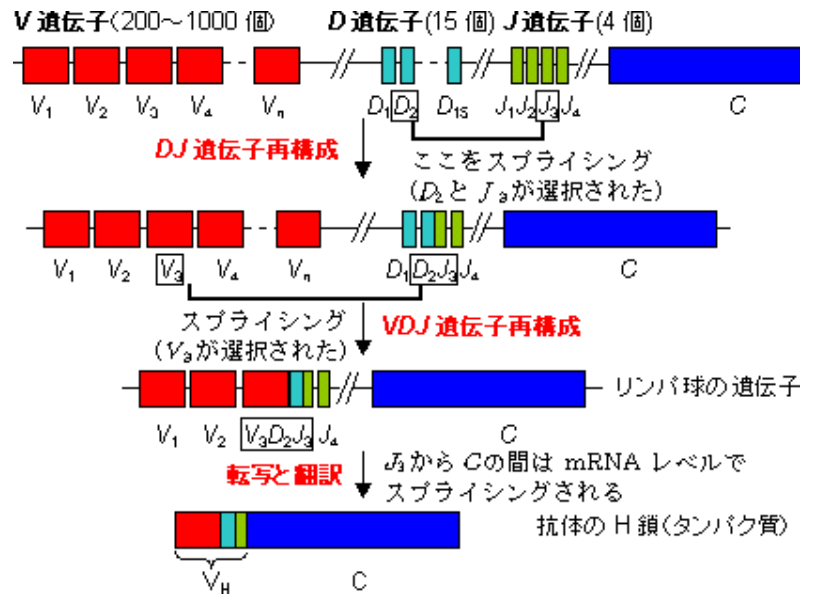
ヒトはこの世に存在するあらゆる抗原(antigen)に対して抗体(antibody)をつくることができる。このようなタンパク質分子の多様性がどのようにして生じるかという免疫学の問題は、免疫グロブリン遺伝子(ゲノムDNA)を調べることで解決された。抗体産生細胞（Bリンパ球）の発生初期の段階で、DNAレベルでのスプライシングによって遺伝子の再構成が起き、莫大な数の抗体遺伝子を準備できるためである。また、スプライシングの位置を少しずらすことや、リンパ球内での免疫グロブリン遺伝子の高頻度の突然変異なども、抗体の多様性を増加させる一因である。



[免疫グロブリンのドメイン構造]



[免疫グロブリンの立体構造]

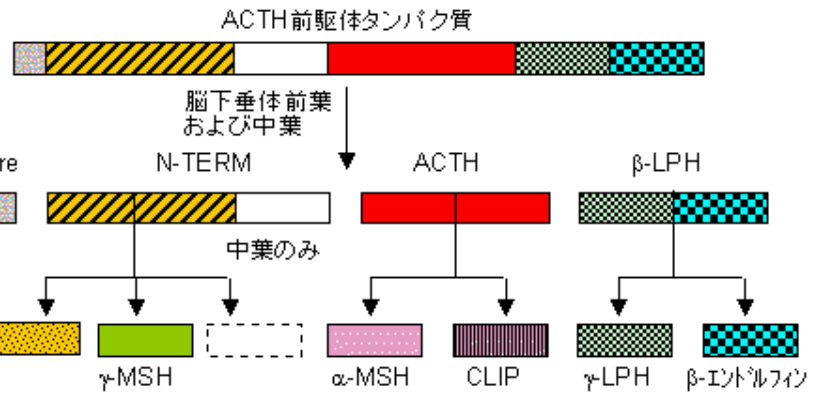


[免疫グロブリンH鎖遺伝子の再構成]

免疫グロブリン遺伝子の可変域(Variable region)はV, D, Jの3領域に分断されてコードされ、それぞれのV, D, J領域は複数の類似した配列が直列に多数つながっている。

● タンパク質の一次構造決定

- mRNA(cDNA)やゲノムDNAの1次構造タンパク質の1次構造を決定
- 酵素の前駆体とその活性化機構の解明。
- ACTH前駆体のmRNAの構造
- ホルモン生産の調節機構の解明



[ACTH前駆体の翻訳後プロセッシング] 1つの前駆体から多くのホルモンペプチドがえられる

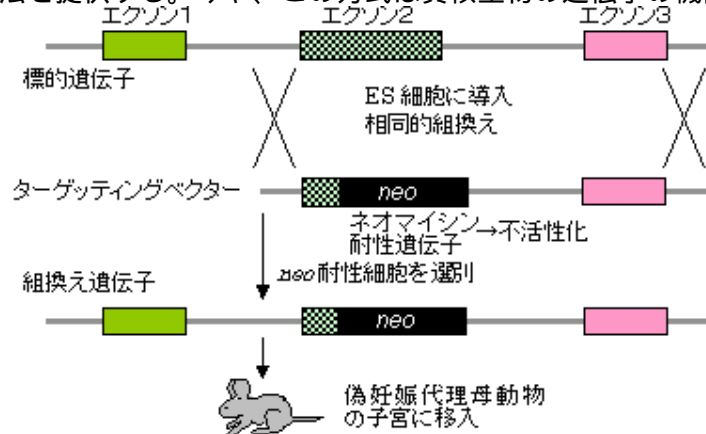
● 古生物学の研究 (PCR法) ミイラ、絶滅動物などの遺伝的研究

● トランスジェニック動物による遺伝子機能の解析

外来性の遺伝子を導入し形質転換を目的とした機能獲得性の変異動物をトランスジェニック(transgenic)動物という。遺伝子を受精卵に組み込み、その機能を解析する。マウスでは胚性幹細胞 (ES細胞) がよく用いられる。遺伝子の役割を直接調べる方法として普及した。

● ノックアウト動物による遺伝子機能の解析

特定の遺伝子を破壊すること目的とした機能喪失型の変異動物を、ノックアウト(knockout)動物という。その遺伝子の機能を知る強力な方法を提供する。今や、この方式は真核生物の遺伝子の機能を探る常道となっている。



[標的遺伝子の破壊(ノックアウトマウス)]

有用タンパク質の遺伝子工学による生産

有用タンパク質の生産

ホルモン、免疫治療剤、酵素製剤、ワクチンタンパク質を大腸菌や酵母でつくる 産業界に大きな影響。

タンパク質工学

合成DNAを用い、遺伝子操作によって標的タンパク質の任意のアミノ酸残基を変化させる手法

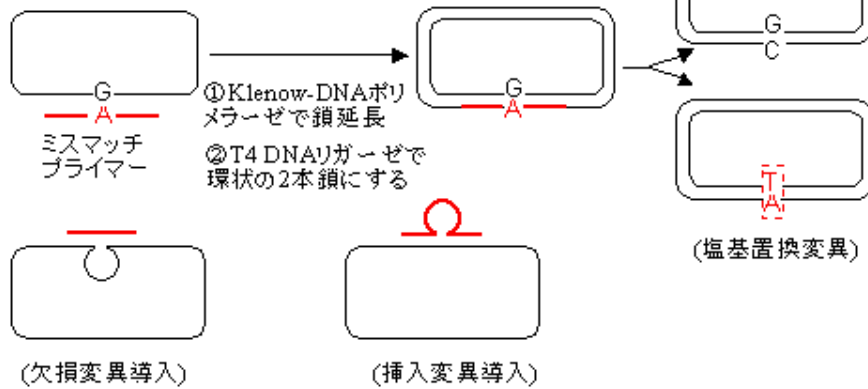
→自然界にはない変異タンパク質の創製。熱や有機溶媒に対する安定性。

→タンパク質の機能の研究や酵素機能の改変

● 部位特異的変異導入法 (site-directed mutagenesis)

任意のアミノ酸残基を他のアミノ酸に置換または欠失、挿入が可能。

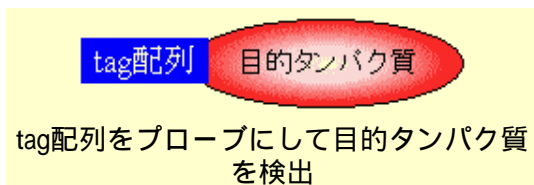
組換え体M13ベクターの1本鎖



[短鎖ヌクレオチドプライマーを用いる変異導入法]

● ポリペプチドがN端に付加した融合タンパク質の生産→タンパク質の機能の研究によく用いられる。

- グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) : グルタチオンに結合する。グルタチオンカラムで精製する。
- マルトース結合タンパク質(MBP) : アミロースに結合する。
- Hisタグ (オリゴHis, 6-10残基) : ニッケルcolumnに特異的に結合。
- HAタグ(YPYDVPDYA) : 抗HA抗体に結合。
- Mycタグ(EQKLISEEDL) : 抗Myc抗体に結合。

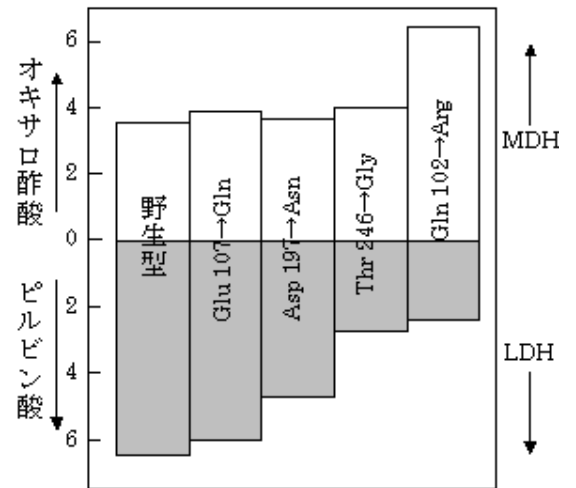


分類	物質	用途
ペプチドホルモン	インスリン ヒト成長ホルモン ACTH エンドルフィン 副腎皮質ホルモン(PTH) カリクレイン アンギオテンシノーゲン EGF ウシ成長ホルモン	糖尿病 小児症、骨折創傷治療 副腎皮質不全(ステロイド離脱) 鎮痛 テタニー 高血圧症 血圧の調節 創傷治療 牛乳生産増加
インターフェロンおよびリンホカイン	IFN α , IFN β , IFN γ IL-2(TCGF)	ウイルス疾患や悪性腫瘍 免疫不全症
血液成分	抗血友病因子(IX因子、VIII因子) フィブリノーゲン アルブミン アンチトロンビンIII α_1 -アンチトリプシン	血友病 出血性素因 低アルブミン血症 血栓症、DIC 気腫
ウイルスなどの抗原	B型肝炎(HBs, HBc, e抗原) A型肝炎、インフルエンザ 小児麻痺やトリパノソーマ マラリア、口蹄病ウイルス	ワクチンの製造
酵素	各種プロテアーゼ(ウロキナーゼ、組織プラスミノゲンアクチベーター、ペプシノーゲン) 仔ウシプロキモシン	血栓溶解、消炎 チーズの製造

ニワトリ・リゾチームの Trp⁶²変異体の性質

リゾチーム	溶菌活性	グリコールキチン加水分解活性	(GlcNAc) ₃ との結合活性 (M ⁻¹)
野生型(Trp ⁶²)	100%	100%	7.5 × 10 ⁴
Tyr ⁶²	180 ± 15%	85%	1.2 × 10 ⁴
Phe ⁶²	240 ± 15%	62%	73 × 10 ⁴
His ⁶²	225 ± 20%	18%	15 × 10 ⁴

Log k_{cat}/K_m



[乳酸デヒドロゲナーゼの基質特異性変換]

生物の品種改良

遺伝子操作で改変された生物をトランスジェニック(transgenic)生物という。

● 農業用植物の改良

病気、病害虫、除草剤に抵抗性の遺伝子導入
病気、乾燥、熱、霜、塩に強く、生産性の高い植物の創出。

ポリガラクトuron酸分解酵素のアンチセンス処理→ ゆっくり熟すトマト

Met強化マメ、Lys強化トウモロコシ 栄養価の高い穀物（遺伝子工学食品の安全性、環境への影響などの問題点が議論。）

生物分解性プラスチック（ポリヒドロキシ酪酸）を作る植物。

● 哺乳類のタンパク質を植物で生産

ヒトインターフェロン（カブでつくる）；
マウスの抗体（plantibody）、ヒト血清アルブミン、 α -アマラーゼ（タバコでつくる）；
ヒトエンケファリン（セイヨウアブラナでつくる）など。

● 微生物の改良

アルコール発酵効率の良い酵母の生産。
石油を分解する菌（1989年と1990年の原油流出事故に使用）。
ワクチン生産に適したコレラ菌、ポリオウィルス。
セルロースやプラスチックを分解する菌。

● 観賞用植物の改変

青いバラ。光るタバコ（ホタルのルシフェラーゼ導入）。

● 動物の改良

成長ホルモン遺伝子を導入 スーパーマウスやスーパー豚。スーパー鮭（従来の半分の時間で育つ）。
ヒト α_1 -アンチトリプシンを乳に分泌するヒツジ。
多乳性の乳牛。

医学への応用

● 法医学への応用（PCR法）：髪の毛1本、ごく少量のDNA試料でも増幅可能

10～60塩基対長ミニサテライトDNAやマイクロサテライトDNA（代表例として、CA繰り返し配列がある）の多型性（個体間で繰り返し回数が違う）を利用して個人を識別できる(DNA指紋)→犯罪捜査に活躍

● 遺伝子異常による疾患の分子機構（病因解析）

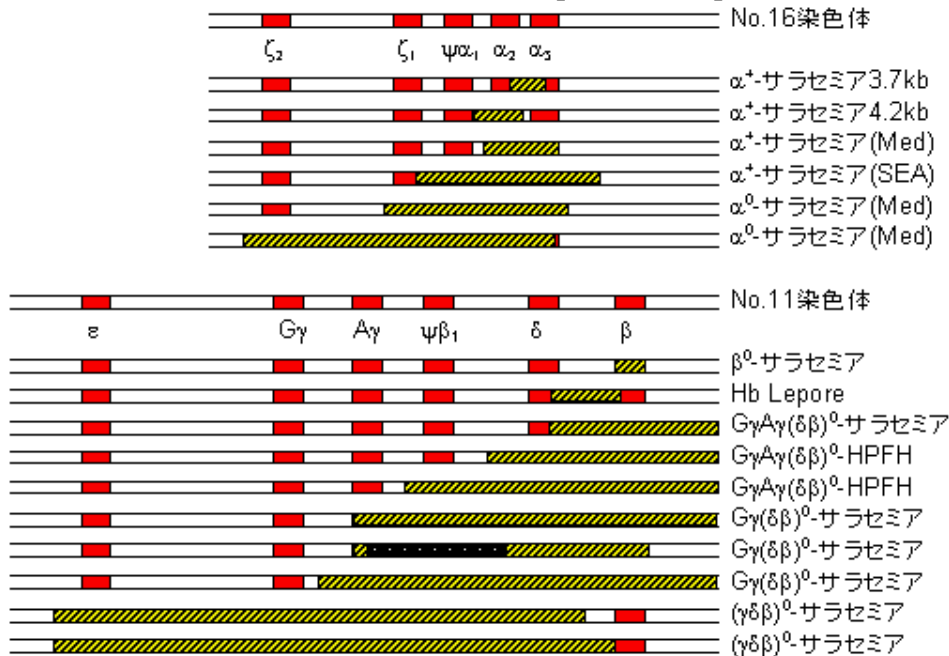
● 癌の研究→癌遺伝子(oncogene)や癌抑制遺伝子の発見。発癌機構の解明。

T24膀胱癌の癌遺伝子	アミノ酸	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly...
	DNA	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GTC	GGT...
正常細胞の対応遺伝子	DNA	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GGC	GCC	GGC	GGT...
	アミノ酸	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly...

遺伝子の構造とそのコードするタンパク質の1次構造の比較（この遺伝子全域で変異は赤枠内のG→Tの1ヶ所だけ！）

[ヒト膀胱癌T24の癌遺伝子と、正常細胞における対応]

● グロビン遺伝子群の異常→地中海貧血症 [thalassemia] の原因



[thalassemiaにおけるグロビン遺伝子の欠失変異] 斜線部分が遺伝子の欠失、黒い部分が遺伝子の逆位を表す。

● Alzheimer病、筋ジストロフィー、嚢胞性繊維症、ハンチントン舞踏病などの難病の原因遺伝子の究明。

遺伝子疾患のタイプ

- 部分的または全体的遺伝子欠失
サラセミア、血友病ほか、多くの報告がある。
- 遺伝子発現調節領域の変異や欠失
- スプライシング異常によるmRNA合成障害
- 産生タンパク質の異常
アミノ酸置換や終止コドン出現による不活性化。
- CAGなどの3塩基繰り返し配列の反復回数の増大
繰り返し配列はコード領域だけでなく、リーダーやト
レーラー配列、
イントロン内にも見られる。
神経疾患に多く見られる病気→トリップレットリピート
病という。
脆弱X症候群、ハンチントン病、脊髄小脳変性症、筋緊
張性
ジストロフィー、Friedreich運動失調症など。

《ハンチントン病とCAG反復回数》
第4染色体の遺伝子の異常。コード領域内
にCAGの反復配列がある。正常人では反復回数
は6～36回であるが、患者では37～100回。

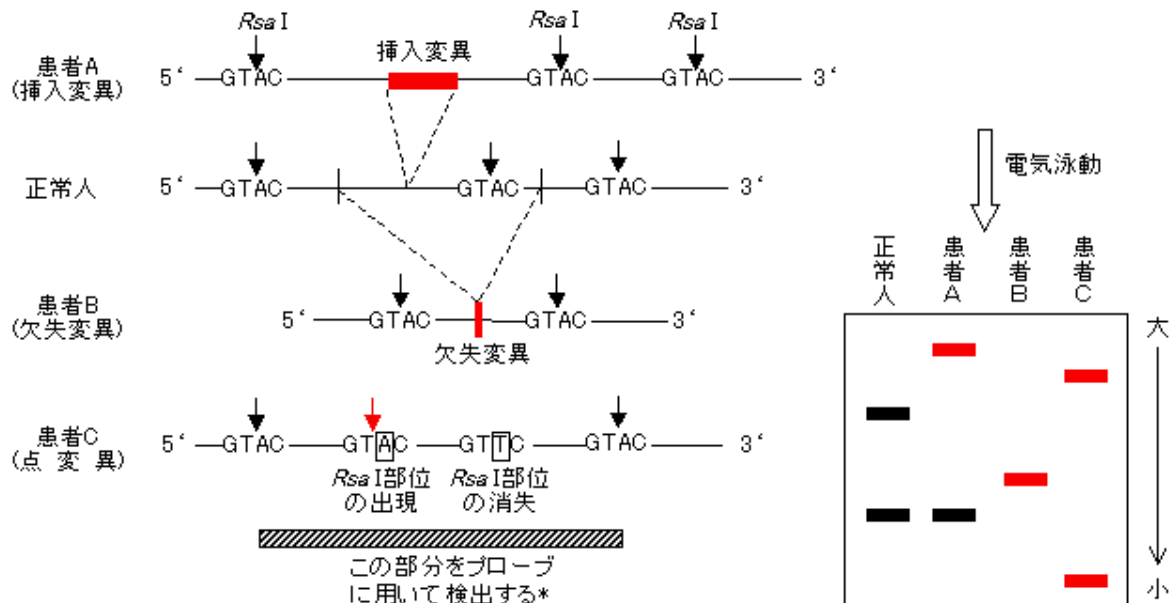
● 遺伝子診断と鑑定 (PCR法が多用される)

遺伝子の異常を検出する多くの方法が開発され、多くの難病の出生前診断が可能になった。制限酵素断片長多型性(RFLP)法が有名。

● Tay-Sachs病 (ヘキサミンダーゼA欠損) → 羊水穿刺で出生前診断

● PCR法による伝染病、ウイルス感染症などの迅速診断

ある遺伝子近傍の制限酵素地図(Rsa Iの場合。矢印は制限部位)



[制限酵素断片長多型性(RFLP)法による遺伝子診断]

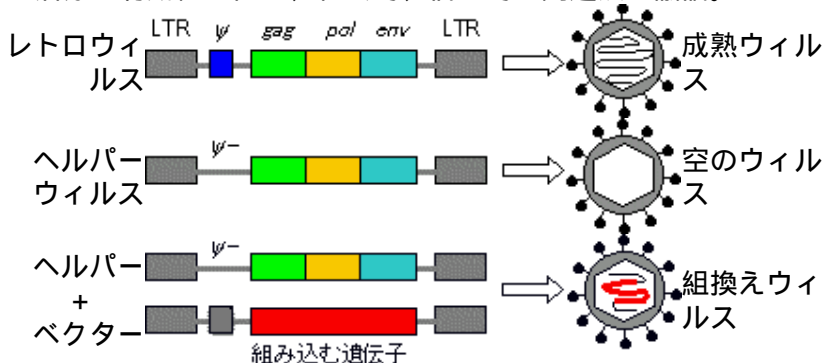
患者遺伝子の変異が制限酵素の切断パターンの変化として現れることを利用。

● 遺伝子治療 (正常遺伝子の導入)

正常遺伝子を遺伝子疾患患者の体内に導入して疾患を治療する方法 (B)。遺伝子疾患以外に、癌やAIDSにも適用される。癌治療の場合、自殺遺伝子や毒素遺伝子を導入したり、アンチセンス遺伝子や癌抑制遺伝子を導入する方法もある。正常遺伝子を組み込むベクターとしては、レトロウイルスやアデノウイルス遺伝子などが用いられる (A)。

● アデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症の治療開始(1990年9月)

● 治療の有効性の他に、社会的、倫理的な問題点が議論。



レトロウイルスのgag-pol-env 領域に目的の遺伝子を組み込み、ベクターをつくる。ヘルパーウイルスと混ぜると、ヘルパーウイルスRNAはパッケージングシグナルがないのでパッケージされないが、ベクターはパッケージされる。

gag: 内殻タンパク質群遺伝子

pol: 逆転写酵素遺伝子

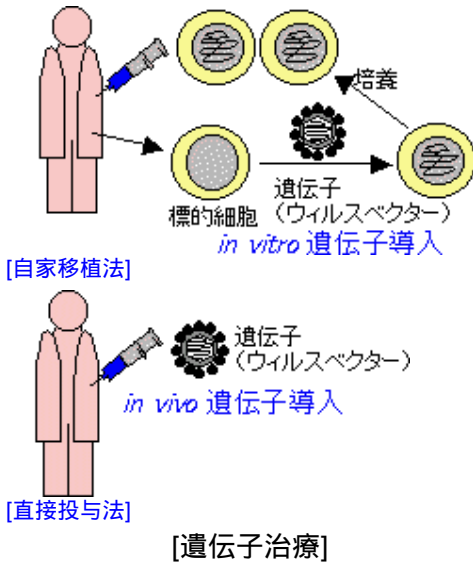
env: 外膜糖タンパク質遺伝子

LTR(long terminal repeat): 宿主のDNAに挿入されるのに必要。

エンハンサー、プロモーター、ターミネーター配列がある。

● ウィルス遺伝子がウィルス粒子内に入り込むために必須の配列。

遺伝子治療の適用範囲



疾患 (対象遺伝子/標的細胞)
遺伝病 先天性重症複合免疫不全症 (ADA遺伝子/リンパ球、骨髄幹細胞) Lesch-Nyhan症候群 (HGPRT遺伝子/神経細胞) ゴーシェ病 (グルコセロシダーゼ遺伝子/骨髄幹細胞) 家族性高コレステロール血症 (LDLレセプター遺伝子/肝細胞) サラセミア (グロビン遺伝子/骨髄幹細胞) 血友病 (VIII, IX凝固因子遺伝子/繊維芽細胞、血管内皮細胞) 遺伝性肺気腫 (α_1 -アンチトリプシン遺伝子/肺上皮細胞) 嚢胞性繊維症 (CF遺伝子/肺上皮細胞)
癌 1) 直接療法 - 癌細胞の正常化 (アンチセンス遺伝子、癌抑制遺伝子/癌細胞) 2) 免疫療法 - 免疫系の活性化 (サイトカイン遺伝子/リンパ球、癌細胞)
AIDS (抗HIV遺伝子/リンパ球、骨髄幹細胞)