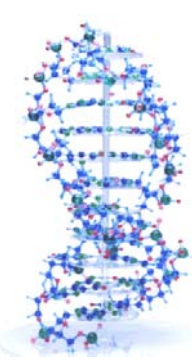


Department of Molecular Biology  
Daichi College of Pharmaceutical Sciences  
22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815-8511, Japan



**分子生物学講義**

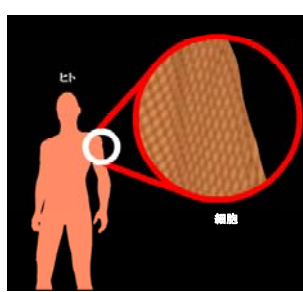
平成20年5月22日(木)

担当：荒牧弘範

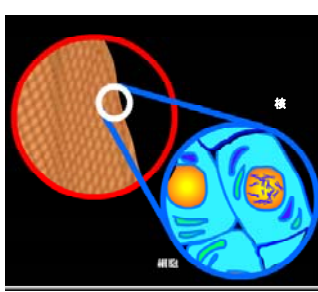
遺伝子は体のどこにある？



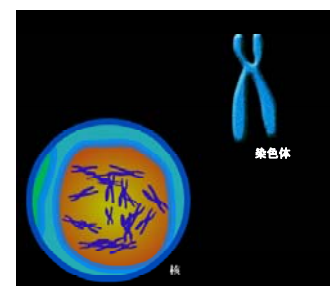
遺伝子は細胞の中にある



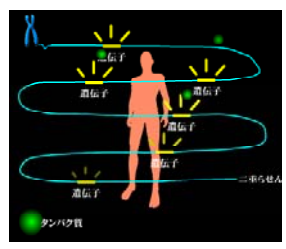
遺伝子は細胞内の核にある



遺伝子は核の中の染色体に存在している



遺伝子は染色体を構成するDNA分子の中の特定の領域にある



遺伝子は何でできていて、  
どんな形をしているのですか？



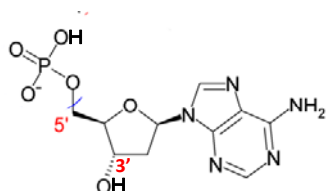
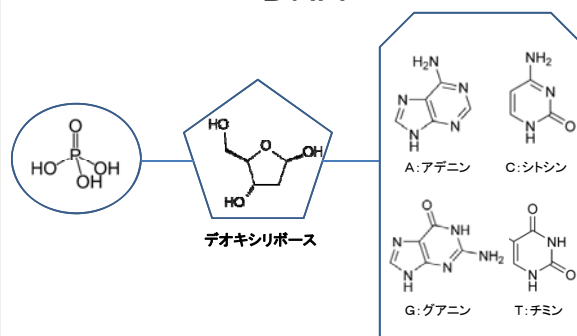
## 遺伝子の本体

DNA(デオキシリボ核酸)

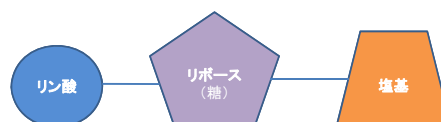
## DNA

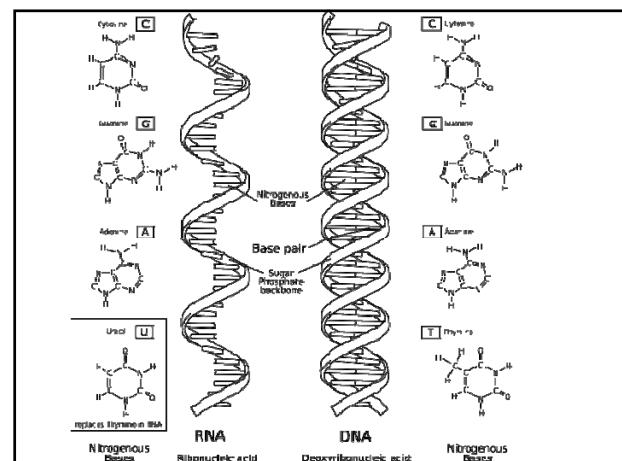
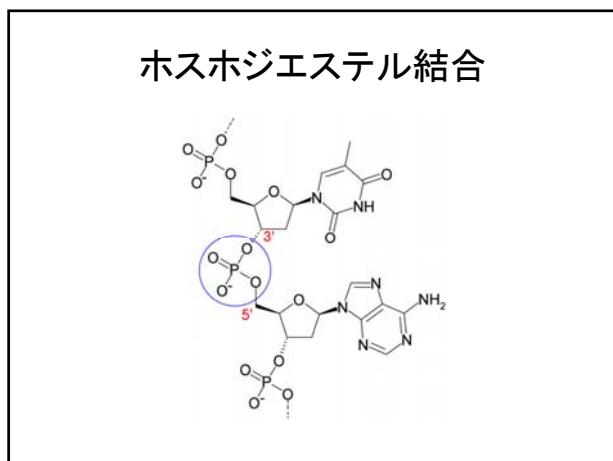
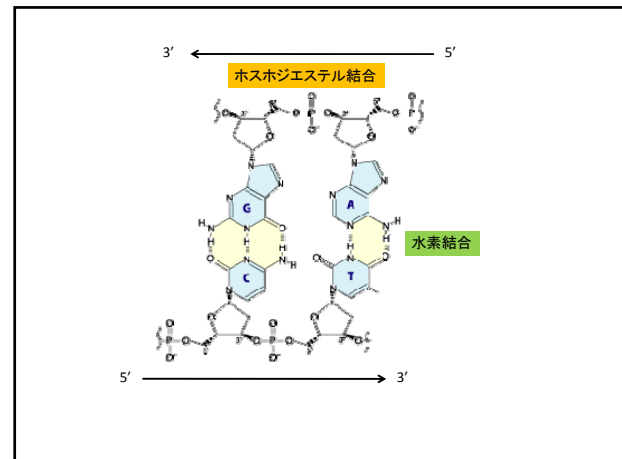
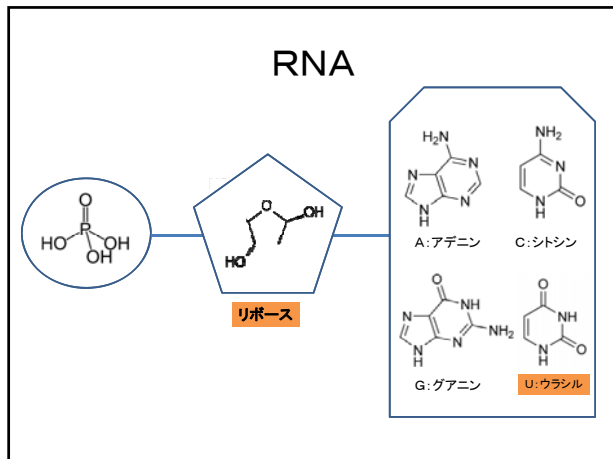


## DNA



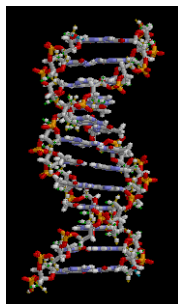
## RNA





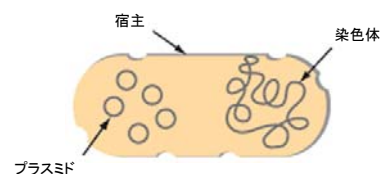
### DNAの二重らせんを形状で分ける

- 最も多いB型の他に、AとZがある。
- AとBは右手すなわちZ巻き
- Zは左手すなわちS巻き



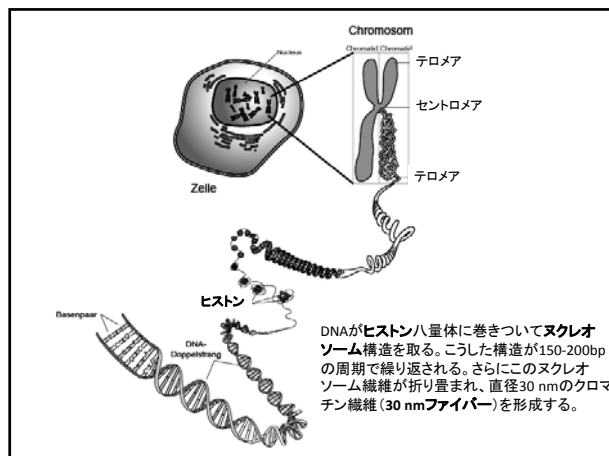
### 細胞内でのDNA

- **真正細菌**において核DNAは通常**環状DNA**としてむき出しで存在し、細胞質で核様体を形成する。また、プラスミド(plasmid)と呼ばれる核外の環状DNAが存在することがある。



## 細胞内でのDNA

- 真核生物においては細胞核内に線状DNAとして存在し、ヒストンと結合して染色体を形成している。
- 動物細胞は直径が1000分の5ミリメートル程しかないが、その中のDNAをつなげてまっすぐに伸ばすと2メートルにも達する(ヒトの場合)ため、普段は非常に高度に折りたたまれている。

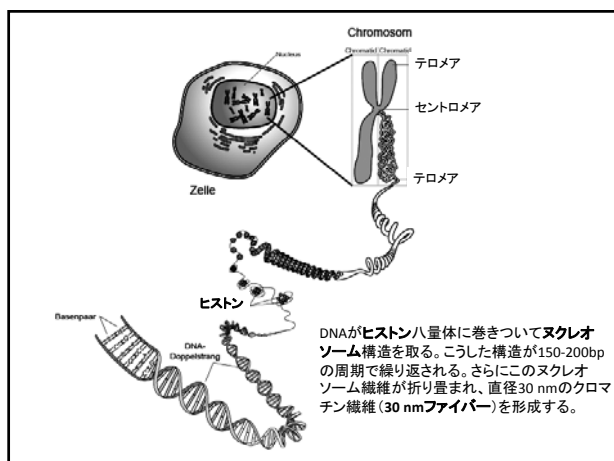


## ヒストン

- 真核生物(と大部分の古細菌)のクロマチンを構成するタンパク質の一群。
- DNAを自身に巻き付けてコンパクトにする役目を持つ。
- 強い塩基性のタンパク質であり、酸性のDNAとの高い親和性を示す。

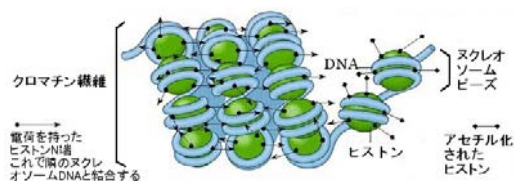
## ヒストン

- ヒストンは主に、5種類のヒストン(H1, H2A, H2B, H3, H4)が知られている。
- このうち、H2A, H2B, H3, H4の4種は、コアヒストンと呼ばれ、それぞれ二分子でヒストン八量体を形成する。
- 一つのヒストンオクタマーは、約 146 bp の DNA を左巻きに約1.65回巻き付ける。この構造はヌクレオソームと呼ばれ、クロマチン構造の最小単位である。
- H1 はリンカーヒストンと呼ばれ、ヌクレオソーム間のDNAに結合する。二つのヌクレオソームの連結に関与している。



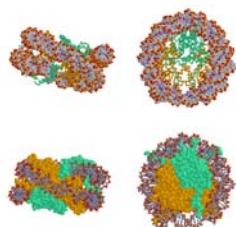
## ヌクレオソーム

- ヌクレオソームが下のような繊維構造を取る。これがクロマチン。



## クロマチン

- ヒストン八量体にDNA鎖が巻きついたヌクレオソームが基本構造。



## クロマチン

- クロマチンには、大きく分類して
  - ユークロマチン (euchromatin)
  - ヘテロクロマチン (heterochromatin)

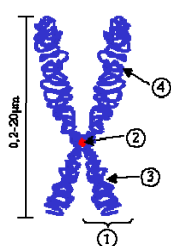
## ユークロマチン

- クロマチン構造がゆるまっており、転写されている遺伝子はこの部分に多く存在する。

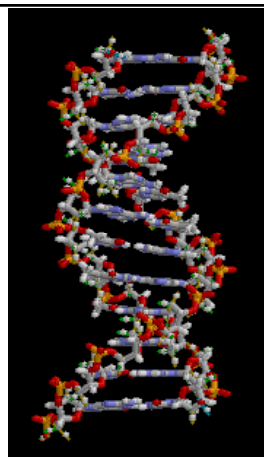
## ヘテロクロマチン

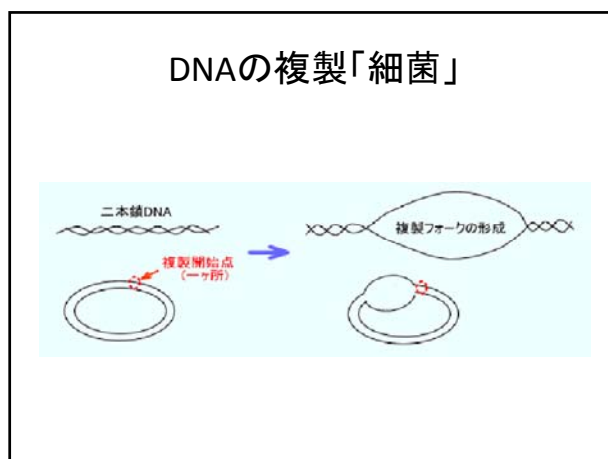
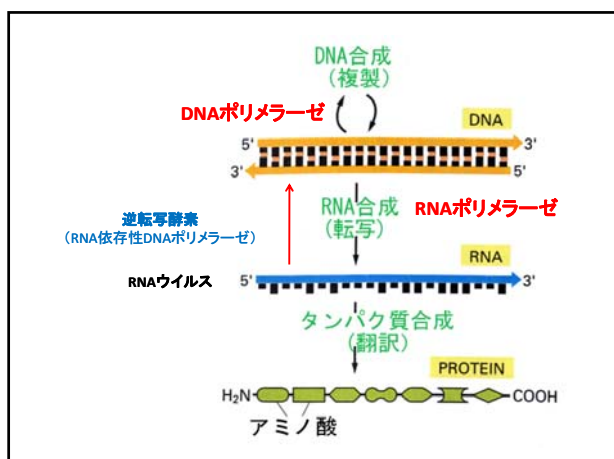
- ヘテロクロマチンは密に凝集しており、この領域ではあまり転写が起きていない。
- 細胞周期の間も常に凝縮されたクロマチンの形状、または種類のこと。
- セントロメアとテロメア周辺によく見付き、主に短い配列の繰り返し。

## 染色体の各部位



- ① 染色体の末端部はテロメアと呼ばれる特有の構造をしている。
- ② セントロメア: 2つの染色分体が接合する場所で、ここに微小管が結合する
- ③ 短腕
- ④ 長腕





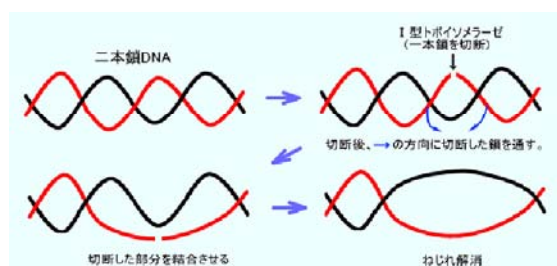
## DNAの複製「細菌」

### • 複製開始点

- 細菌の場合、DNAの複製開始点(Orig)は**一ヶ所**である。
- この複製開始点は**特徴的な配列**を有しており、245bpからなっている。
- DNAの複製が行われるには**フォーク(複製フォーク)の形成**が必要である。

フォークは  
どのようにして形成するか？

## (1)ねじれの解消



## (1)ねじれの解消

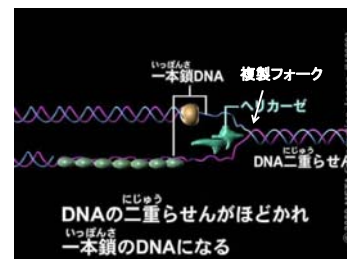
- DNAの立体構造を変化させる酵素にトポイソメラーゼがあり、それにはI型とII型が存在する。
- I型トポイソメラーゼはDNAの二本鎖のうち一本鎖だけを切断した後、切断したDNAの再結合をする。
- II型トポイソメラーゼは二本鎖を切断し、再結合させる。なお、II型トポイソメラーゼはDNAジャイレースとも呼ばれている。
- この働きによってDNAのねじれの構造(超らせん)を解消する。つまり、「ねじれ」の数を減少させている。
- ただし、トポイソメラーゼはねじれを解消するだけである。この時点では、まだDNA間の水素結合は切れていない。

## (2)フォークの形成

- ねじれを解消しDNAの複製を行いやすくすると、次に**DnaAタンパク質**が複製開始点を認識する。
- 複製開始点を認識したDnaAタンパク質はDNAのらせんを巻き戻す。「巻き戻す」とは「塩基対をほぐく」ということである。
- その後、**ヘリカーゼ(DnaBタンパク質)**が水素結合を切断し、DNAを巻き戻す。
- これらの酵素の働きによって、二本鎖DNAを一本鎖DNA二本にする。  
二本鎖DNA → 一本鎖DNA × 2

### DNA複製

1. 複製はいくつかの因子が複製起点に誘導されることによって開始される。
2. それらがDNAに結合してDNAを湾曲させ、さらにDNAヘリカーゼが結合し、二重らせんのねじれをとるように回転させ、複製バブルと呼ばれる構造を作る。
3. この複製バブルにできるDNAの枝分かれ部分を複製フォークと呼ぶ。



## (3)再結合の防止

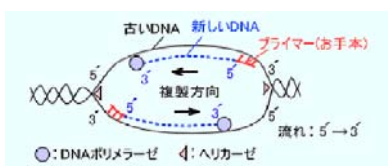
- DNAを一本鎖にしたのはいいが、早期に二本鎖へ戻ってしまうのでは都合が悪い。
- そこで、二本鎖DNAに戻らないようにSSBが結合する。SSBが結合することで一本鎖の状態が保たれる。

## (4) DNA複製

- DNAの複製はDNAポリメラーゼ(DNA polymerase)が行う。
- 複製するときはDNAを3' → 5' の方向に読み取り、新しく作られるDNAは5' → 3' の方向で作成される。合成されるのはデオキシヌクレオチド(dATP、dGTP、dTTP、dCTP)である。
- DNAポリメラーゼだけでは複製は開始されない。

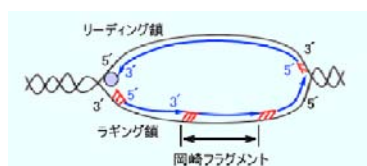
## DNA合成

- 複製開始にはお手本が必要であり、このお手本部分を**プライマー(RNA断片)**という。つまり、複製開始には複製開始部分に前もってプライマーが作成されていないといけない。
- プライマーは短いRNA断片であり、RNAポリメラーゼの一種である**プライマーゼ**という酵素によって作られる。なお、このようにプライマーがDNAと結合することを**Aニールグ**という。



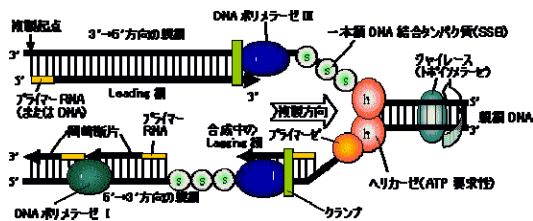
## 実際の複製では同一のDNAポリメラーゼが両方の鎖を同時に複製している。

- この矛盾は「片方の鎖は連続して5' → 3' の方向で複製し、他方の鎖は断片的に5' → 3' の方向で複製する」という方法によって解消される。
- このときに作製される断片を**岡崎フラグメント**という。また、フォークの進行方向と同じ方向の一本鎖で合成される鎖を**リーディング鎖**といい、フォークの進行と逆向きに合成される鎖を**ラギング鎖**という。





## 大腸菌における DNA複製の全体の流れ



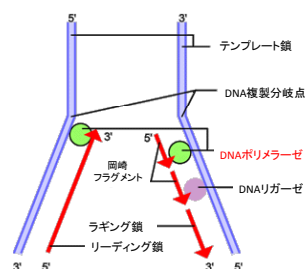
## DNA複製のまとめ

1. 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)。
2. I型トポイソメラーゼが、一本鎖を切断し、再結合し、ねじれを解消する。
3. 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。
4. 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、二本鎖DNAを巻き戻す。
5. 一本鎖DNA結合タンパク質(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。

## DNA複製のまとめ

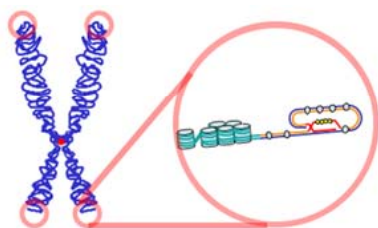
6. リーディング(leading)鎖の合成
7. ラギング(lagging)鎖は岡崎フラグメント単位で不連続に合成される。プライマーゼによって、RNAプライマーがつくられる。
8. DNAポリメラーゼIがその5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を利用して、岡崎フラグメントの先頭のRNAプライマーを分解しながらDNA鎖の隙間を埋める(熱成)。
9. リガーゼが岡崎フラグメント同士をつなぐ。
10. II型トポイソメラーゼが2つの娘鎖を分離する。

## DNA複製の模式図



**半保存的複製**  
二重鎖の片方を鋳型とし、もう片方を新たに作り上げることで複製が行われる。DNA複製の場合には、元の分子は残らないが、古いポリヌクレオチド鎖と新しい鎖を半分ずつに含んだものが作られるので、これを**半保存的**というのである。

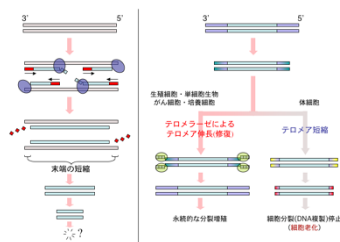
## 末端複製は？



## 末端複製は？

- 染色体の末端にはテロメアという構造がある。テロメア部分は5'-TTAGGG-3'が高度に反復している。
- DNAの複製前にはお手本部分としてプライマー(RNA断片)が必要である。このプライマー部分は複製後に除去されてしまう。
- つまり、一回複製するごとに染色体の末端はプライマーの長さの分だけ短くなるのである。このテロメア部分は通常の方法では複製できない。
- ただし生殖系、腸管細胞、がん細胞は何回でも分裂することが可能である。これはテロメア部分を合成するテロメラーゼという酵素が存在するからである。

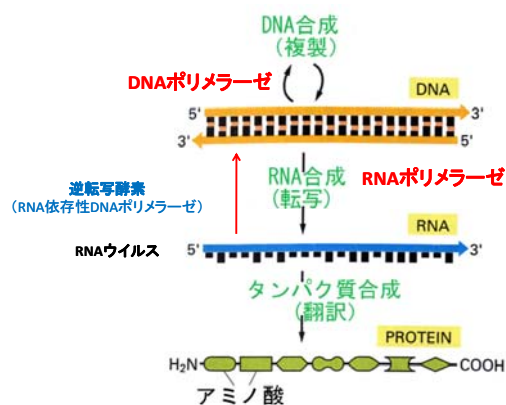




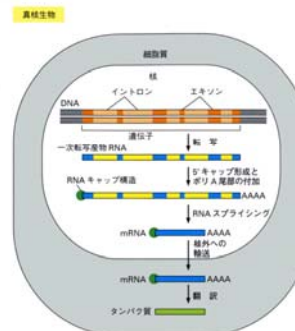
左) DNAはDNAポリメラーゼ(青丸)によって複製されるが、最末端のプライマー(赤線)部分は複製されない。このため、複製のたびにDNAは短縮し、最後にはなくなってしまうはず。これが「末端複製問題」である。右) 生殖細胞やがん細胞ではテロメラーゼ(逆転写酵素の一種)によって末端部分の複製が行われる。テロメラーゼ活性がない体細胞では分裂ごとに短縮がおり、一定以上短くなると分裂を停止し細胞老化が起こる。

## 末端複製問題の回避

- 真正細菌のゲノムやプラスミドなど、末端のない環状DNAではこの問題は起こらない。
- 一部のウイルスも直鎖状ゲノムをもつが、ゲノムDNAを直線的に連結させたり、感染したのちに環状構造をとることで末端複製問題を回避している。

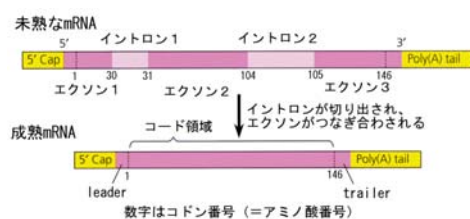


## mRNAのプロセッシング

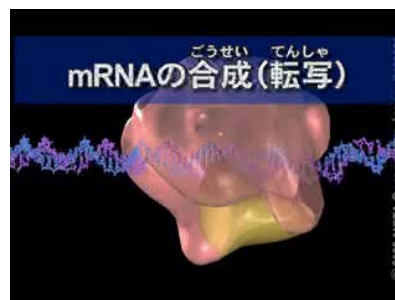


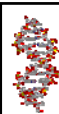
大事な用語は**エクソン**と**イントロン**。エクソンは情報領域でイントロンは非情報領域。イントロンを切り取ってエクソンだけをつなぎ合わせることを**スプライシング**という。

## 実例(ヒトβグロビン遺伝子)



核膜孔からサイトゾールへ





## DNAからタンパク質へ

		2番目の塩基				
		T	C	A	G	
1番目の塩基	T	Phe	Ser	Tyr	Cys	T
		Phe	Ser	Tyr	Cys	C
		Leu	Ser	Stop	Stop	A
		Leu	Ser	Stop	Tyr	G
	C	Leu	Pro	His	Arg	T
		Leu	Pro	His	Arg	C
		Leu	Pro	Gln	Arg	A
		Leu	Pro	Gln	Arg	G
	A	Ile	Thr	Asn	Ser	T
		Ile	Thr	Asn	Ser	C
		Ile	Thr	Lys	Arg	A
		Met	Thr	Lys	Arg	G
	G	Val	Ala	Asp	Gly	T
		Val	Ala	Asp	Gly	C
		Val	Ala	Glu	Gly	A
		Val	Ala	Glu	Gly	G

## 変異と修復

### 静的変異(サイレント変異)

- 静的変異とはDNA配列には変化があるが、アミノ酸配列には無関係の場合の変異である。

C → T, CTA → TTA  
Leu Leu

- 例えば「CTA」はLeuをコードしていることを意味するが、C→Tに変化したとしてもLeuをコードする「TTA」に変化したただけなのでアミノ酸には全く影響を与えない。

### ミスセンス変異

- ミスセンス変異とはDNA配列が変化することによって、アミノ酸が置き換わることである。
- 例えば「TTA」はLeuのコードを意味するが、A→Tに変化すると「TTT」となりPheをコードすることになる。変異した場所のアミノ酸がタンパク質にとって重要でない部分ならさほど問題とならないが、変異した部分が重要な場所であればかなり問題である。

A → T, TTA → TTT  
Leu Phe

### ナンセンス変異

- ナンセンス変異とはアミノ酸のコードが終止コドンに変化する変異のことである。
- 例えば「TTA」とコードしている配列があるとする。「TTA」はLeuのコードであるが、T→Gに変異すると「TGA」となり終止コドンへと変化する。
- 終止コドンに変化するとタンパク質の合成は途中でストップしてしまう。この場合、途中で途切れた短いタンパク質が合成されることになる。なお、このタンパク質のほとんどは活性がない。

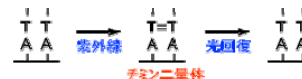
## フレームシフト変異

- 読み枠移動変異
- 塩基の挿入や欠損の結果として起こる変異である。この場合はアミノをコードする配列がすべて変化する。



## 損傷の修復 直接修復

- DNA上にチミンが二つ並んでいるとき、紫外線を受けるとチミン二量体を形成してしまう。このチミン二量体は光回復酵素によって修復される。光回復酵素は可視光によって活性化する。



- 光回復酵素(フォトリアーゼ),  $\text{FADH}_2$ , プテリンと300-500nmの光によりシクロタン環を開裂

## 損傷の修復 アルキル化の修復

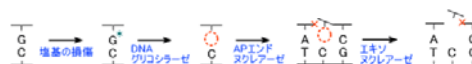
- $\text{O}^6$ -メチルグアニンや $\text{O}^4$ -メチルチミンなどのアルキル化の修復は $\text{O}^6$ -メチルグアニン-DNA-メチルトランスフェラーゼ(MGT)によって行われる。



- MGTはアルキル化した塩基にあるメチル基を自分に移す。こうすることによって塩基のアルキル化を修復する。ただし、これによって酵素は失活するのでMGTは自殺酵素と呼ばれている。

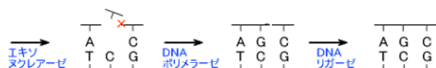
## 損傷の修復 塩基除去修復

- 塩基除去修復とは塩基が損傷した部分を酵素によって切り取って再びつなぎ合わせる方法である。1塩基を切り取る場合はDNAグリコシラーゼによって行われる。DNAグリコシラーゼは損傷塩基を外し、APサイトを作る働きをする。



- APサイトが作られると、APエンドヌクレアーゼによってAPサイトが存在する部分が1ヶ所切断される。その後、エキソヌクレアーゼによってAPサイトは完全に除去される。

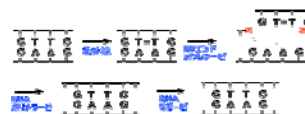
- APサイトが除去されるとDNAポリメラーゼによって新しく塩基が作られる。そして、最後にDNAリガーゼがニックを埋めて修復が完了する。



- DNA中のグアニンが酸化されて8-オキシグアニンができた場合、ヒトでこの8-オキシグアニンを取り除くDNAグリコシラーゼをOGG1という。
- また、DNA中の塩基ではアデニンも酸化される。アデニンが酸化されると2-ヒドロキシアデニンとなる。ヒトで2-ヒドロキシアデニンを取り除く働きをする酵素はMUTYH1である。

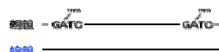
## 損傷除去修復 ヌクレオチド除去修復

- チミン二量体を修復するとき、光回復を利用しない修復の仕方が存在する。この方法は酵素によって行われる。
- 塩基を切り取る時、チミン二量体を挟んで12~13ヌクレオチドで切り取る。大腸菌ではUVエンドヌクレアーゼによって切り取られる。その後、DNAポリメラーゼとDNAリガーゼの働きによって修復が完了する。

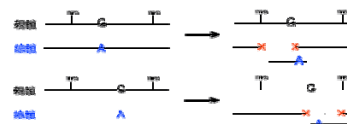


### 複製後修復 ミスマッチ修復

- DNAポリメラーゼは塩基を挿入するときに間違いを起こすことがある。間違いはすぐに訂正されるが、間違いが見逃されることがある。このように訂正されなかった塩基にはミスマッチ修復(不適合修復)という機構が働いて修復される。
- 塩基のエラーが確認されたとき、どちらが親鎖かを見分ける必要がある。見分けるときにはアデニンのメチル化で親鎖を決定する。親鎖のところでことには-GATC-配列があり、この配列中のアデニンはメチル化されているのである。

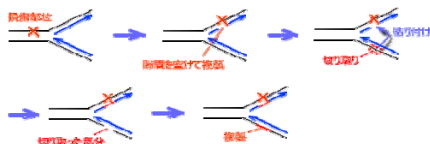


- エラーを修正するためにヌクレオチドを切断するとき、まずどちらが親鎖かを認識する。その後、エラー箇所から近い方のメチル化部位の反対側を切る。ヌクレオチドが取り除かれる部分はエラー部分からメチル化部分までである。

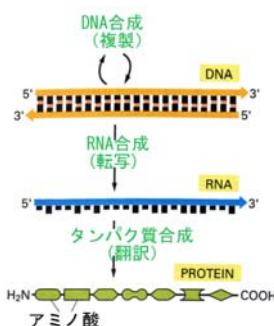
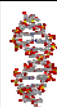


### 複製後修復 相同DNA組み換え修復

- 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。



### セントラルドグマ



### ゲノム(genome)とは

- ゲノム(genome)という言葉は、遺伝子(gene)と染色体(chromosome)の合成語である。
- 生物の構成単位である細胞のなかには、染色体と呼ばれる遺伝子をのせた集合体が存在する(ご存知の通り、ヒトでは23対の染色体が存在する)。

### ゲノム(genome)とは

- 一つ一つの染色体には、DNA鎖が、コイル状にぐるぐる巻きになって(これをクロマチン構造と呼びます)収まっている。
- このDNA二重らせんのなかに、生物が持つすべての機能や活動をコントロールするための指示が(暗号のように)並んだ部分が含まれており、これを遺伝子と呼ぶ。

図1 ゲノムとは

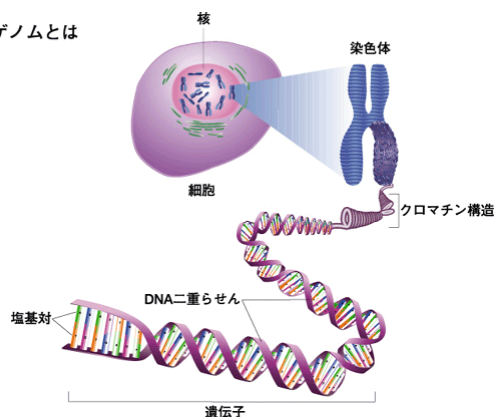
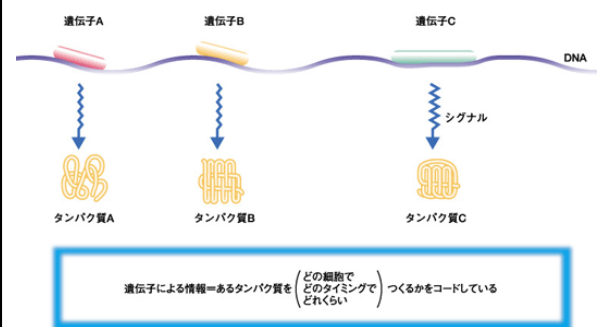


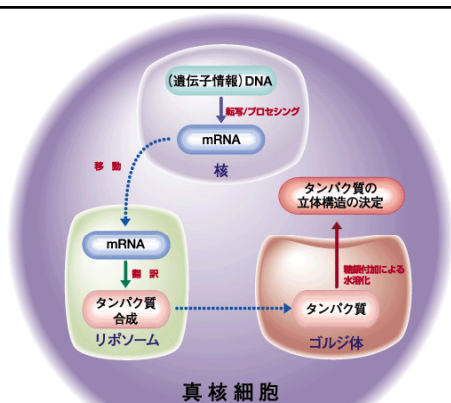
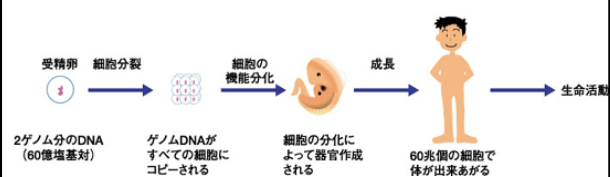
図3 遺伝子上の暗号とその役割



## 遺伝子部分

- DNA二重らせんの内の10%弱が遺伝子部分に相当すると言われている。最近、ヒトの場合、この遺伝子が約2万2千個存在すると言われている。
- ゲノムとは、上に述べた染色体から遺伝子にいたる一つのシステムをセットにして呼んでいる。
- ヒトで、この塩基対の数は約30億個であることがわかっている。

図4 遺伝子と生命活動について

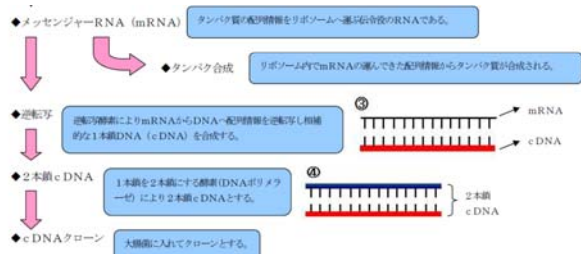


## ポスト・ゲノム時代の研究の方向

1. cDNA (相補型DNA) 解析
2. バイオインフォマティクス
3. プロテオーム解析

### 1) cDNA (相補型DNA) 解析:

- cDNAはmRNAのコピーであり、遺伝子だけを効率よく研究するためには必須の技術である。



### 2) バイオインフォマティクス:

- 生命情報科学などと訳されているが、生命化学と情報科学の境界に生まれた新しい研究分野である。
- 現在、生命関連のデータベースはDNA配列、アミノ酸配列、タンパク質立体構造などですが、これらのデータを効率良くコンピュータ処理して、新薬に結びつく情報を引き出す研究、技術をいう。
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

### 3) プロテオーム解析:

- プロテオーム (proteome) とは **protein** (タンパク質) と **genome** (ゲノム) を組み合わせた造語であり、ゲノムが一つの生物の持つ全ての遺伝情報を指すのに対し、プロテオームは、細胞内で発現している (発現する可能性をもつ) 全タンパク質のことを指す。

### 3) プロテオーム解析:

- 病態と正常の細胞中のプロテオームを比較することで、疾患に関係しているタンパク質を見出すことが出来る。

### プロテオーム解析の流れ

- (1) タンパク質の発現
- (2) タンパク質の分離
- (3) タンパク質の同定
- (4) ゲノムデータベースへの反映、という手順を経て行われます。

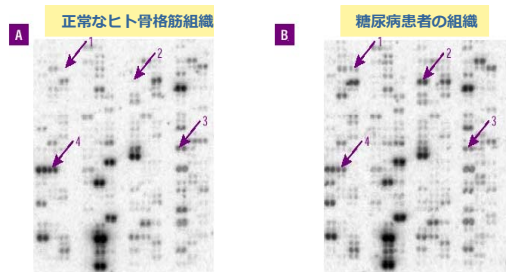








## マイクロアレイを用いた発現 プロファイリング



(Atlas™ Plastic Human 8.0 Microarray)