

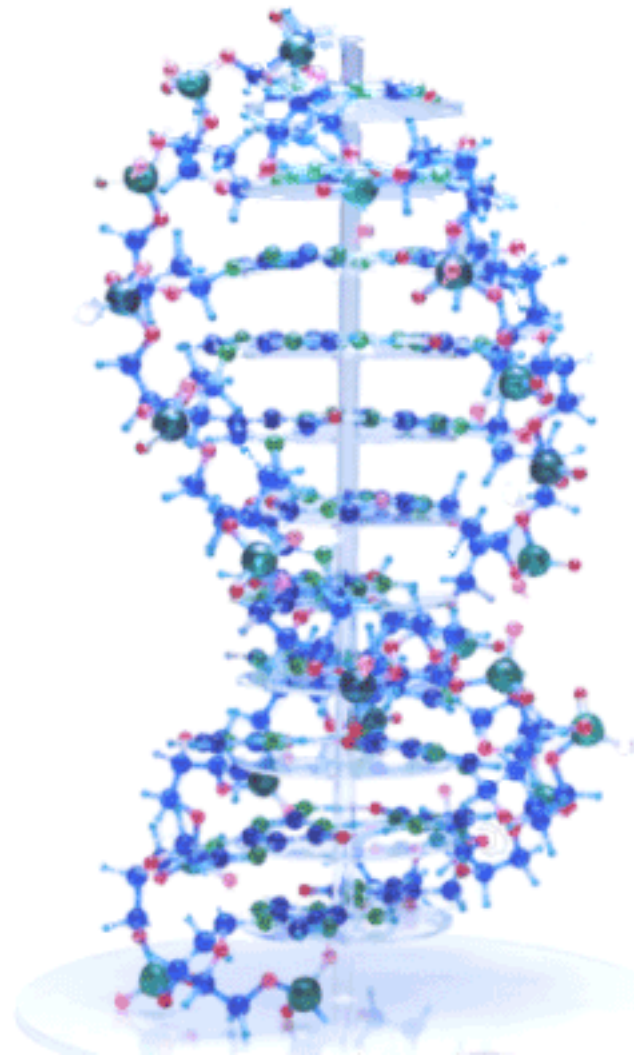
Department of Molecular Biology  
Daiichi College of Pharmaceutical Sciences  
22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka 815-8511, Japan



# 第8回 分子生物学

平成20年5月29日(木)

担当：荒牧弘範



# 遺伝子工学

- 遺伝子を人工的に操作する技術を指し、特に生物の自然な生育・増殖過程では起こらない型式で行うことを意味している。
- 組換えDNA技術、遺伝子操作、遺伝子組換えなどの用語もほぼ同じ意味で用いられる。

# 一部の例

- 細菌や培養細胞によるホルモン（インスリンやエリスロポエチンなど）の生産
- 除草剤耐性などの性質を与えた遺伝子組換え作物
- 遺伝子操作を施した研究用マウス（トランスジェニックマウス）
- 人間を対象とした遺伝子治療の試み

ビデオ

9:45—20:15

# 遺伝子組換え

1970年代初頭までに

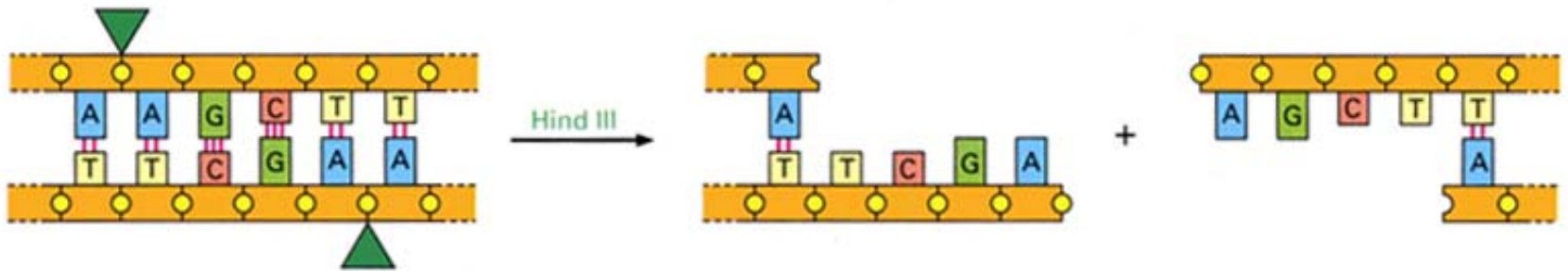
- DNAを特定の位置で切断する制限酵素
  - DNA断片をつなぎ合わせるDNAリガーゼ
  - DNAを細胞に導入する形質転換
- これらが組換えDNA技術の基礎となった。

# 制限酵素

- 1968年に、スイスのウェルナー・アーバー やアメリカのハミルトン・スミスによって発見された。
- 制限酵素の名前の由来としては、大腸菌のある種の株でファージの増殖が**制限**されるという現象が確認されていたことによるもので、そのような菌からファージのような外来DNAを切断する制限酵素が発見された。
- ホスト側(大腸菌)のゲノムは、メチル化などの修飾によって保護されているため切断されない。

# 制限酵素

特定の塩基配列(回文構造)を認識して切断する制限酵素が見つかった。



上の例ではAAGCTTを認識して、右のように切断する。

# DNAリガーゼ

- 1966 B. Weiss, C.C. Richardson がDNAリガーゼを分離。
- 2本のDNA鎖をつなぐ酵素である。
- 遺伝子工学では<ノリ>として(<ハサミ>に当たる制限酵素とともに)必要不可欠である。
- ATPまたはNAD<sup>+</sup>を基質として、DNAの3'-ヒドロキシ基と5'-リン酸基をつなぐ。
- 生物ではDNA複製の際の岡崎フラグメントをつなぐ段階と、DNA修復に必要である。

5'-AGTCTGATCTGACT      GATGCGTATGCTAGTGCT-3'  
3'-TCAGACTAGACTGACTACG      CATACGATCACGA-5'



5'-AGTCTGATCTGACTGATGCGTATGCTAGTGCT-3'  
3'-TCAGACTAGACTGACTACGCATACGATCACGA-5'

# 形質転換

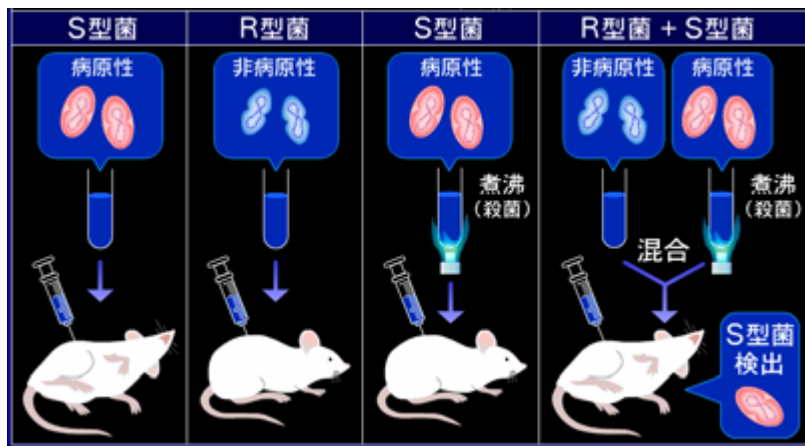
分子生物学において二つの意味をもつ。

- 外部からDNAを導入し、その遺伝的性質を変えること。またその操作。
- 正常な細胞が無制限に分裂を行うようになる、つまりガン化すること。

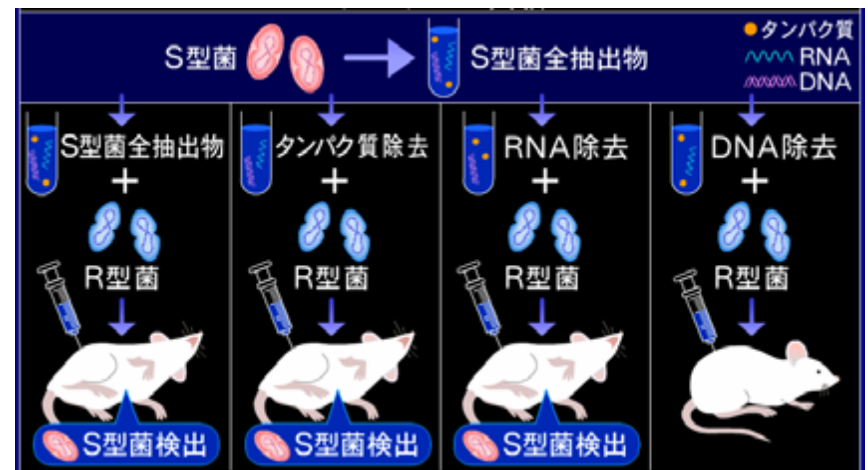
形質転換法は、生物学の研究にとって欠かすことのできないツールである。

# 肺炎双球菌の形質転換

## グリフィスの実験



## アベリーの実験

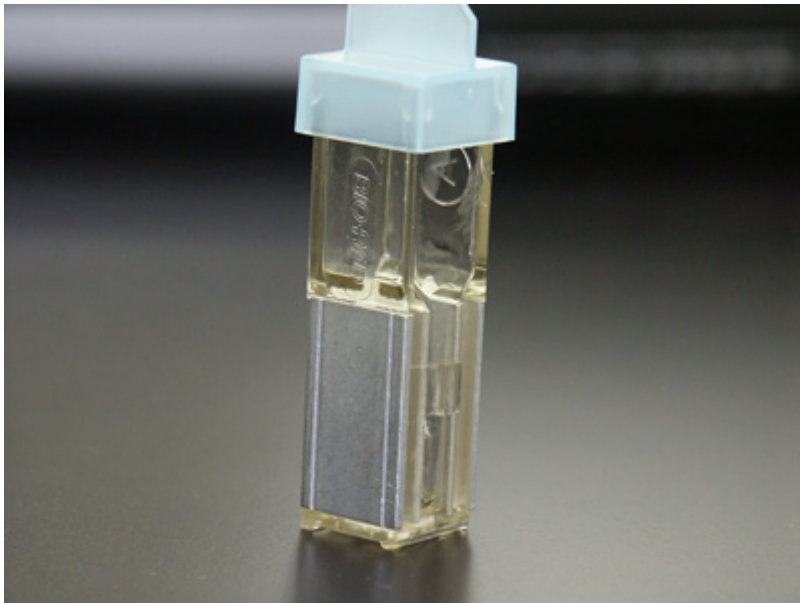


# 形質転換法の開発

大腸菌に対する形質転換としては、

- カルシウム法によってコンピテントセルとした菌を用いる方法がある。
- 電気パルスにより瞬間的に細胞に穴を開けるエレクトロポレーション法がある。
- 通常はファージ、プラスミドなどのベクターを用いて外来遺伝子を導入する。

# エレクトロポレーション法



# 形質転換法の開発

- 動物細胞に対してはエレクトロポレーション法
- 糸状菌などに対してはプロトプラスト-PEG法  
やエレクトロポレーション法
- 植物細胞に対してはアグロバクテリウムを使用する方法、
- 酵母に対してはLi法

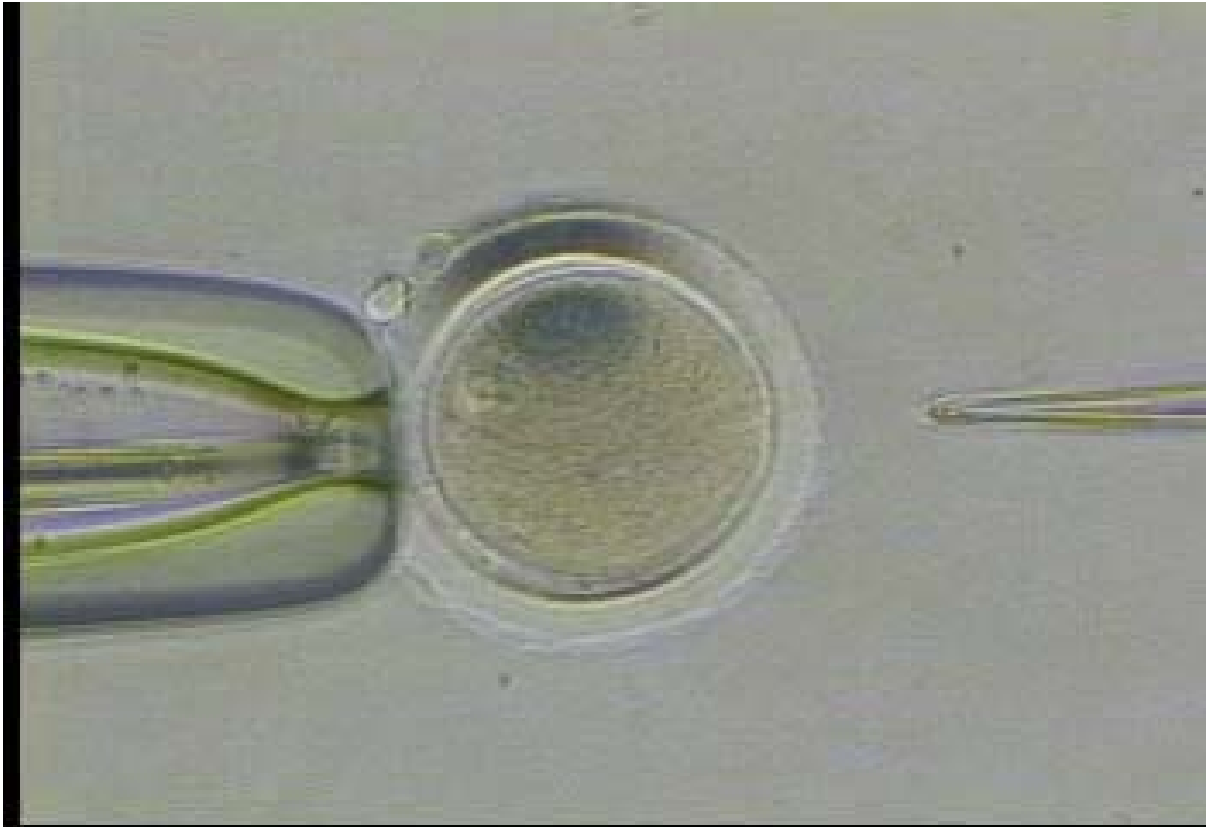
# プロトプラスト化

- この形質転換法において最も重要な手順がこのプロトプラスト化である。
- プロトプラストは、浸透圧調整剤（マンニトールなど）の存在下で、糸状菌の菌糸から細胞壁溶解酵素によって調整する。
- 形質転換に適したプロトプラストは糸状菌の株に依存するので、それぞれの菌においてプロトプラスト化の最適化が必要になる。

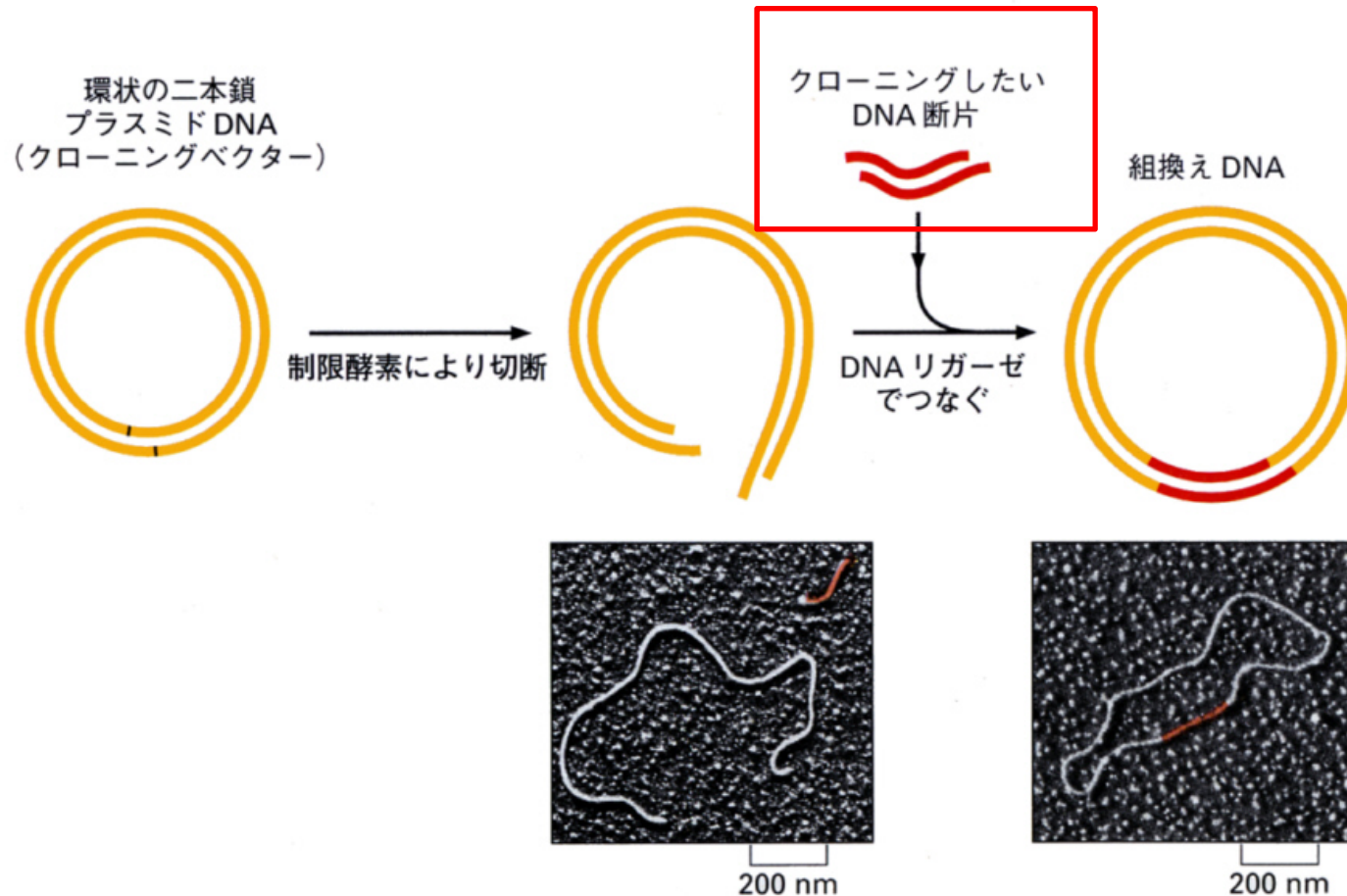
# アグロバクテリウム

- この“*A. tumefaciens*”は植物細胞に感染してDNAを送り込む(形質転換)性質があるため、植物のバイオテクノロジーでよく利用される。

# マイクロインジェクション



# クローニング

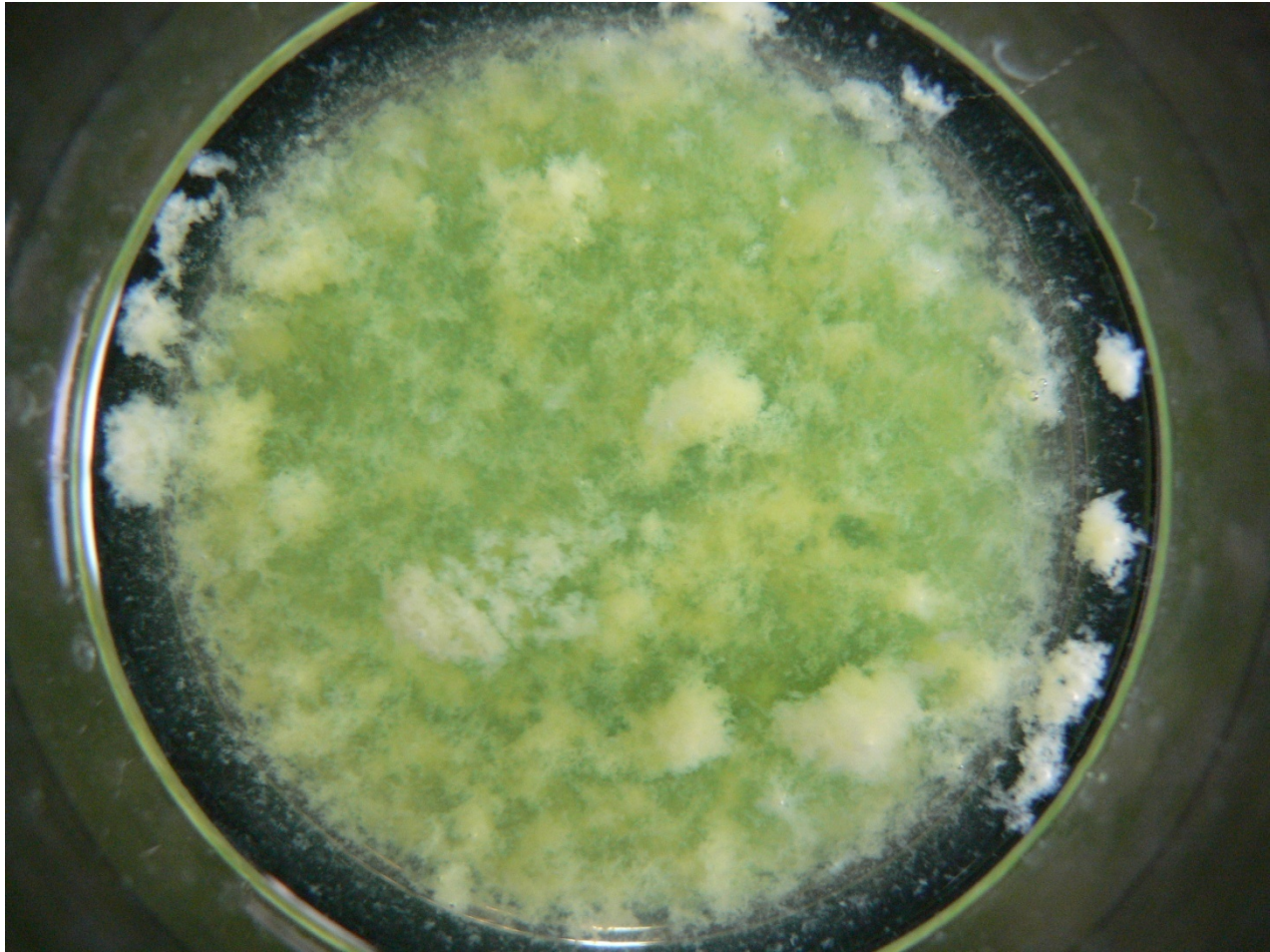


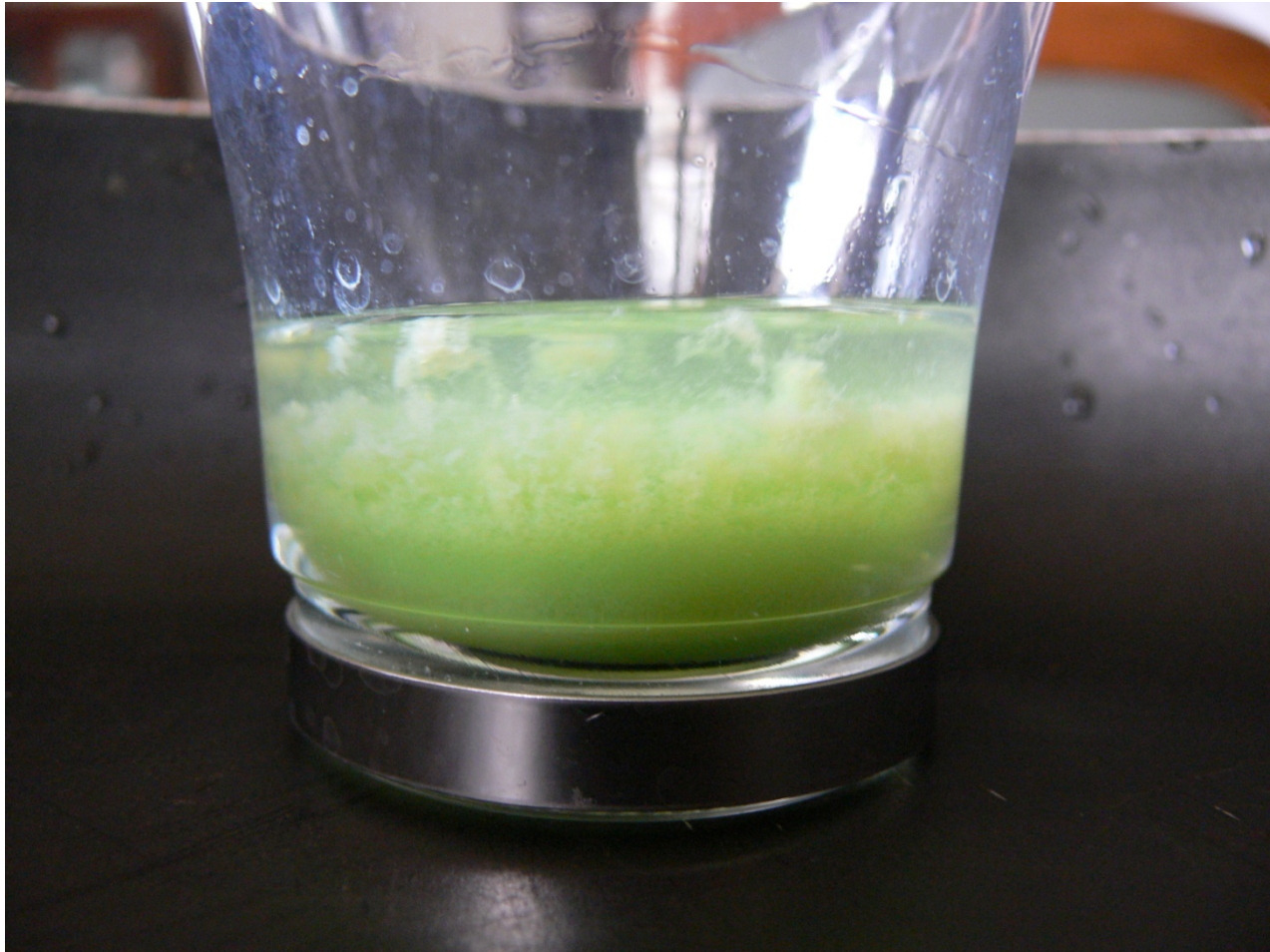
制限酵素で切断し、リガーゼでDNA断片を挿入することができる。

# ブロッコリーのDNA抽出 (簡易法)

# ブロッコリーのDNA抽出 (我が家で)





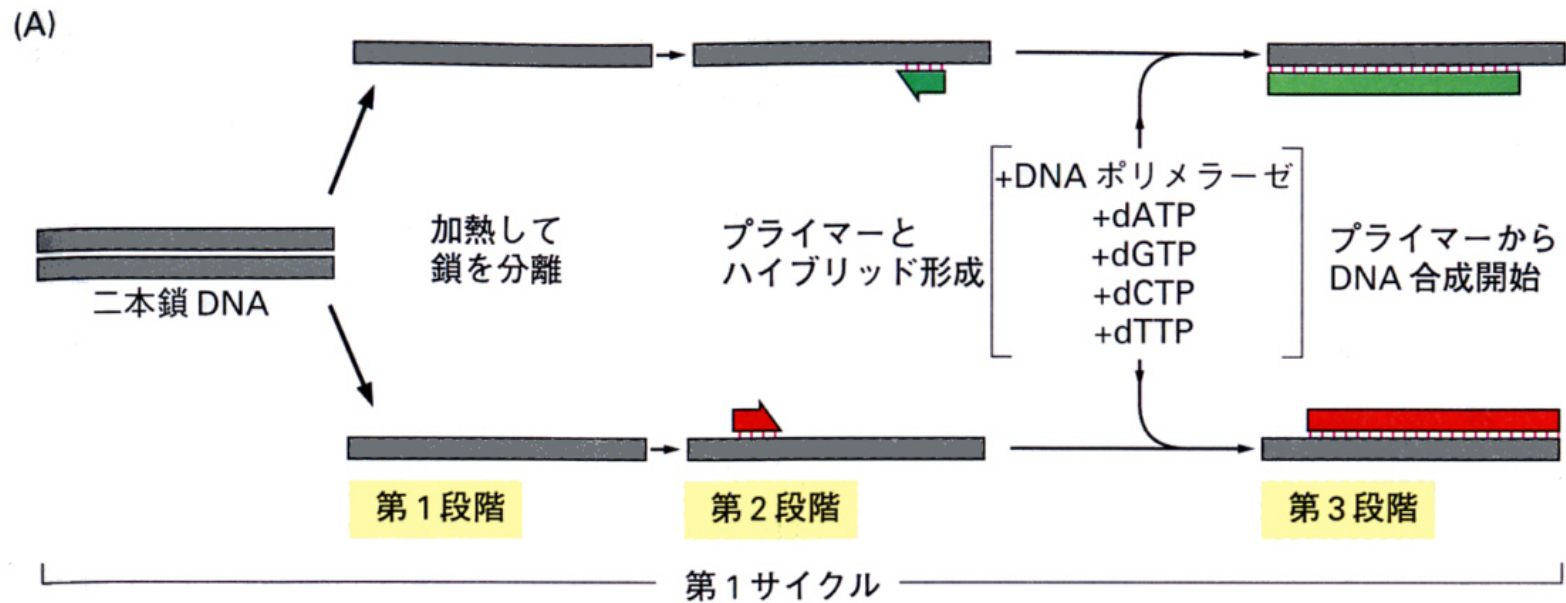


# 遺伝子の複製

- 1980年代にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって目的とする遺伝子の複製が容易に行えるようになり、遺伝子工学はますます利用範囲を広げた。

# PCR(polymerase chain reaction)

DNAは加熱すると水素結合が切れて、一本鎖になる。

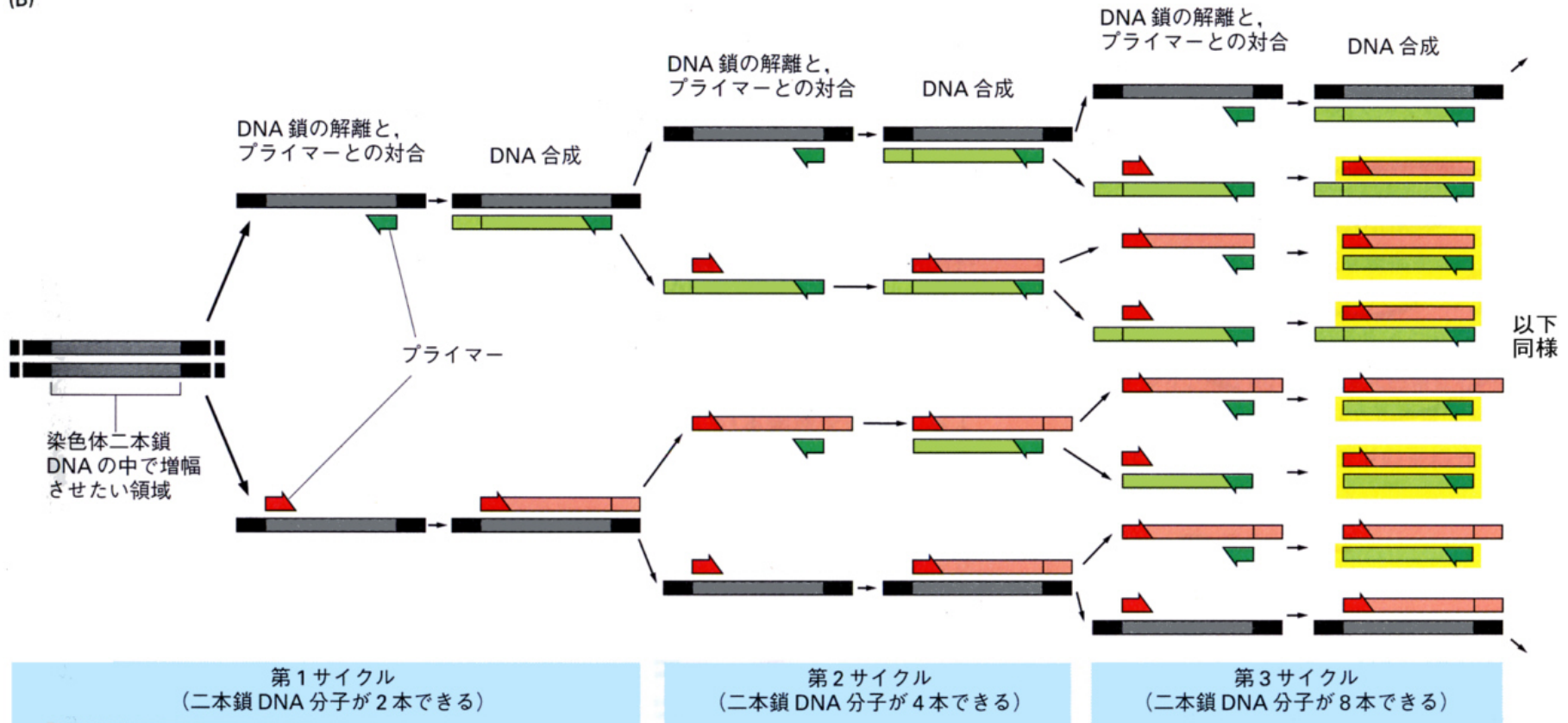


1組のプライマーと原料となるヌクレオチドを加え、DNAを合成させる。

# PCR

この操作を繰り返すと、倍々に増えていく。

(B)



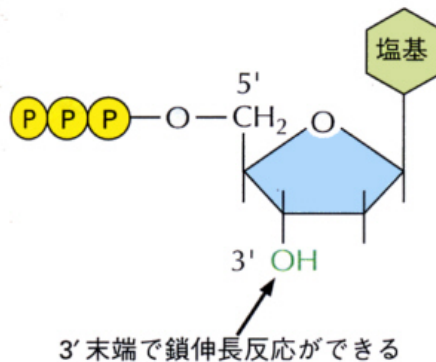
# ゲノム配列の決定

# DNA塩基配列の決定

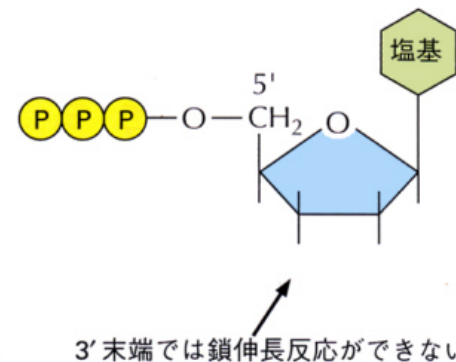
3' に水酸基がないジデオキシヌクレオシド三リン酸を使うと、5' → 3' 合成がとまる。

(A)

デオキシリボヌクレオシド三リン酸

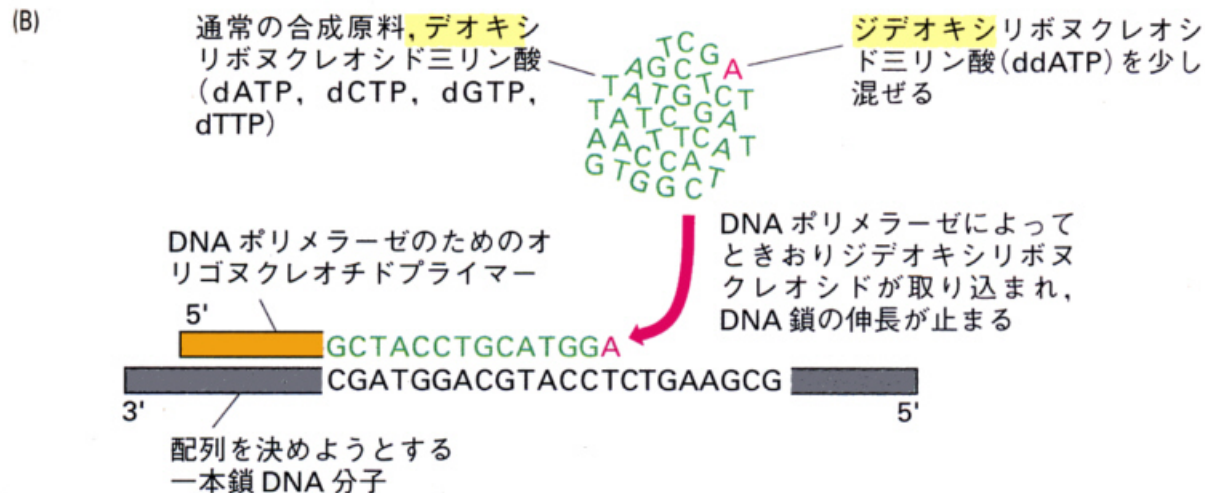


ジデオキシリボヌクレオシド三リン酸



# DNA塩基配列の決定

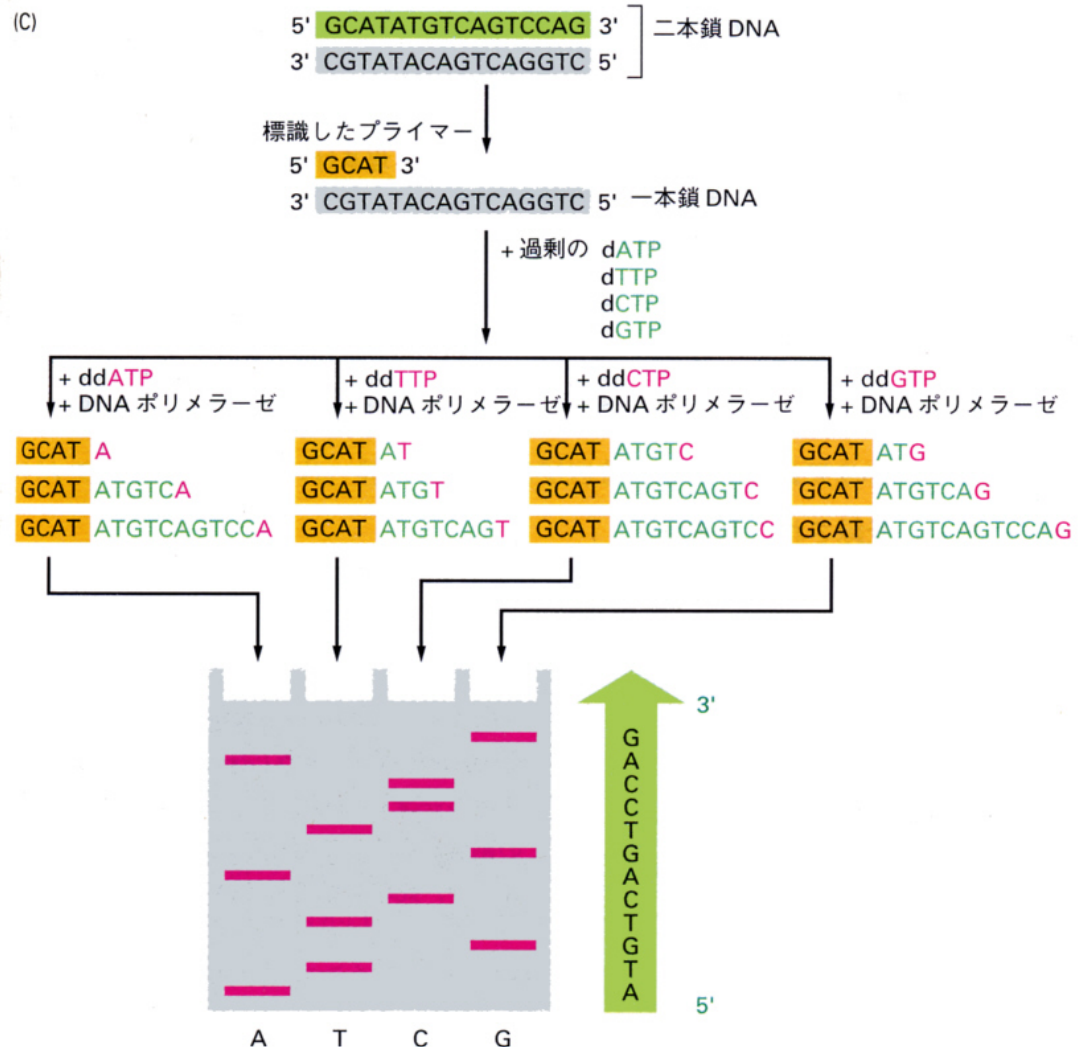
デデオキシヌクレオシド三リン酸を原料に少し混ぜて、DNAの合成反応を進める。



ジデオキシヌクレオシド三リン酸が取り込まれたところで合成が止まった、いろいろな長さのDNA断片が生じる。

# DNA塩基配列の決定

4種の塩基でこれを行い、ゲル電気泳動する。  
4つのクロマトグラムを並べ、下から読んでいくと、それが塩基の配列になる



# 遺伝子工学の危険性

# 遺伝子工学の歴史

- 遺伝子工学のうち組換えDNAの研究を最初に行ったのは1972年米国スタンフォード大学のポールバーグ教授で、SV40 DNAに大腸菌を導入するという異種DNAの結合に成功した。  
○

# 遺伝子工学の歴史

- この年J.E.メッツとR.W.デービスは「組換え(Recombinant)」という言葉が論文中で初めて使用した。
- これに続いて1973年に制限酵素を用いてDNAを切る方法が初めて試みられ、スタンフォード大学のコーエン教授とカリフォルニア大学サンフランシスコ校のボイヤー教授は組換えDNAの実験に使用可能なプラスミドを開発した。

# 遺伝子工学の危険性と規制

- 遺伝子工学の手法が開発されて間もなくポールバークは「遺伝子組換えによって人間に癌や不治の病を引き起こす危険な生物が作られる可能性がある」と心配し、それを受けて1975年にカリフォルニアにあるアシロマ会議センターでいわゆるアシロマ会議が開かれた。米国、イギリス、日本を含む世界の主要な研究者が集まって組換えDNA分子の潜在的な危険性について論議した。  
。
- 科学者自らが研究の自由を束縛してまでも自らの社会責任を問うたことで科学史に残る。

- 会議は紛糾したが、シドニー・ブレナーによって提案された「**生物学的封じ込め**」によって合意をみる。また各国はこの会議に基づいて「**物理学的封じ込め**」などのガイドライン制定を行った。
- 日本では1979年に文部省と科学技術庁が、次いで86年に通商産業省が「組換えDNA技術工業化指針」を告示した。日本では「組換えDNA実験指針」が取り決められた。

# 生物学的封じ込め

- 特殊な培養条件以外では生存しない宿主（組換え核酸が移入される生物をいう）と実験用でない他の生物への伝搬性がないベクター（組換え核酸のうち、移入された宿主内で当該組換え核酸の全部または一部を複製させるものをいう）を組合わせた宿主ベクター系を用いることにより、封じ込めを実施している。
- この対策は、組換え体の環境への伝播および拡散を防止するため、とくに生物学的安全性が高いと認められた宿主ベクター系を用いることにより、実験の安全性を確保することを目的としている。

# 生物学的封じ込め

- ここで用いられる宿主ベクター系は、認定宿主ベクター系、または、特定宿主ベクター系となる。
- 認定宿主ベクター系とは、特殊な培養条件下以外で、生存率が低い宿主と当該宿主以外の生物への伝達性が低いベクターとの組合わせであって、文部科学大臣が定めるものをいう。
- 特殊認定宿主ベクター系とは、認定宿主ベクター系のうち、特殊な培養条件下以外での生存率が極めて低い宿主と当該宿主以外の生物への伝達性が極めて低いベクターとの組合わせであって、文部科学大臣が定めるものをいう。

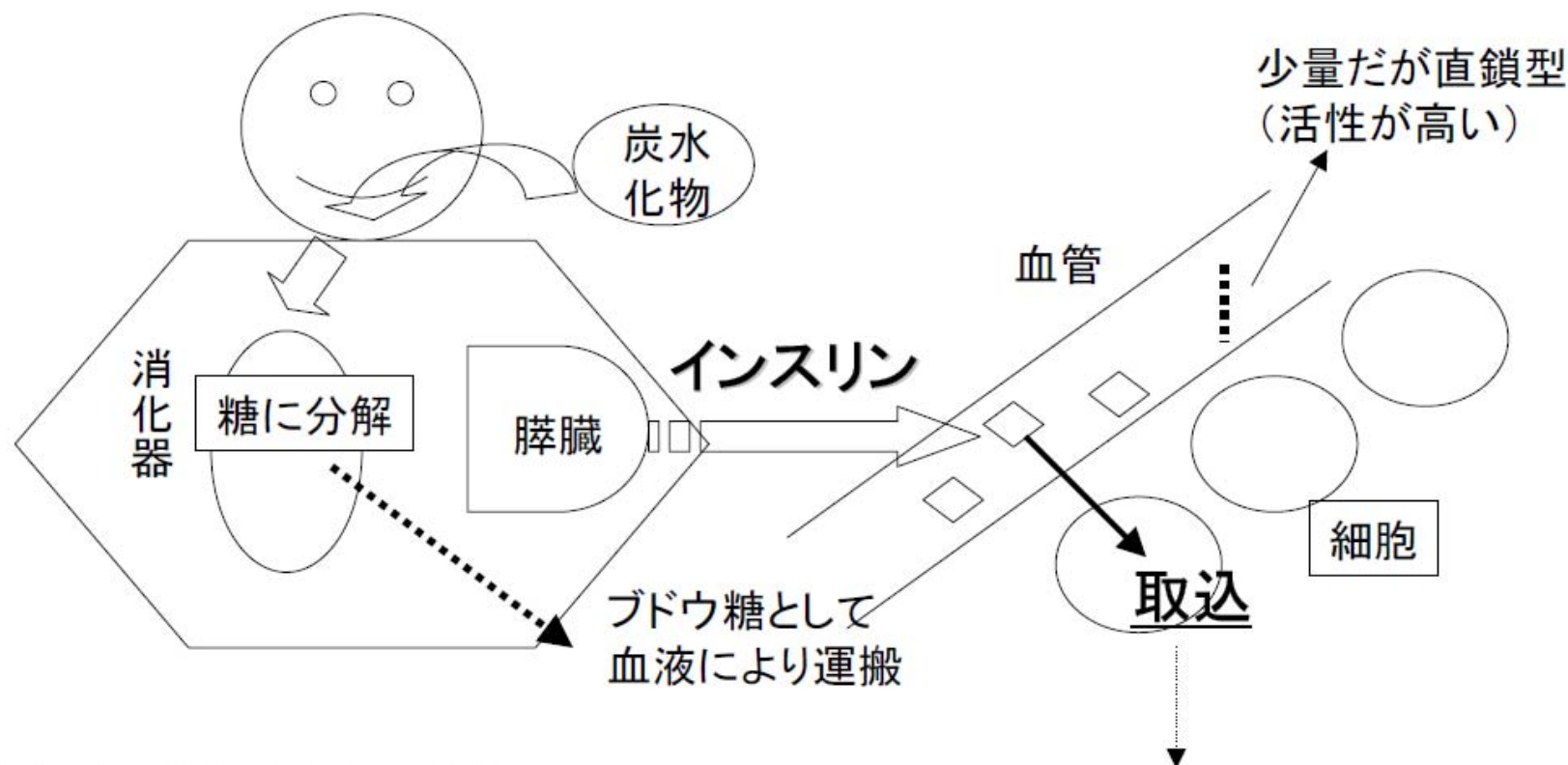
# 物理学的封じ込め対策

- 組換え体を施設および設備内に閉じ込めることにより、実験従事者その他者への伝播および外界への拡散防止を目的とする。
- これより、物理的封じ込めは、一次隔離と二次隔離の2段階の対策を必要とする。
- 一次隔離は、病原体と実験者との間の隔離であり実験者への感染防止を目的とし、安全キャビネットの設置、実験排水の滅菌によって達成される。
- 二次隔離は、実験室と外部環境の間の隔離で実験室外への汚染を防止することを目的とし、バイオハザード標識、作業区域内陰圧の保持等がある。

# 応用

- 最初の遺伝子組換え医薬は**ヒトのインスリン**で、アメリカで1982年に承認された。
- もう一つの初期の応用例には**ヒト成長ホルモン**があるが、これは以前には遺体から抽出されていたものである。
- 1986年には最初のヒト用組換えワクチンである**B型肝炎ワクチン**が承認された。
- これ以後、多くの遺伝子組換えによる医薬・ワクチンが導入されている。

# 「インスリン」って知ってますか？



## 合併症：老化作用の亢進

- ・ 網膜症
- ・ 腎障害
- ・ 末梢神経異常
- ・ 心筋梗塞、下肢動脈閉塞
- ・ 難治性潰瘍、傷が治りにくい

糖尿病になると  
→ブドウ糖の細胞への取り組みに問題

1. 太る→やせる
2. 多尿になる
3. 血管が傷む

# インスリンの生産方法の模索

- 患者数: 218万人 (平成8年調査)  
→ 強く疑われる者: 690万人
- インスリン投与患者数: 推定50万人 (薬価390億円)  
→ これだけの量をどのように確保するのか?



ウシ等の膵臓から抽出: 抗原性  
化学合成: 高コスト



遺伝子組換え技術の確立  
インスリンタンパク質の一次構造判明



遺伝子組換え微生物に生産させられないか?

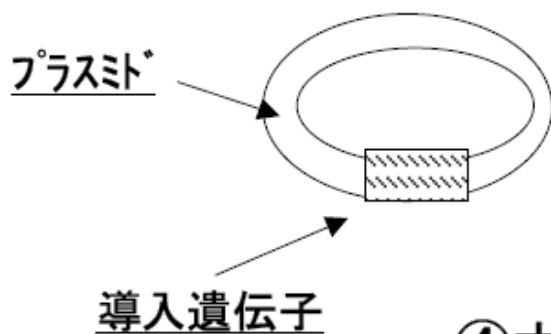
# 遺伝子組み替え技術によるヒトインスリン生産

## ①ヒトインスリンDNA配列を用意

・タンパク質一次構造からDNA配列を推定

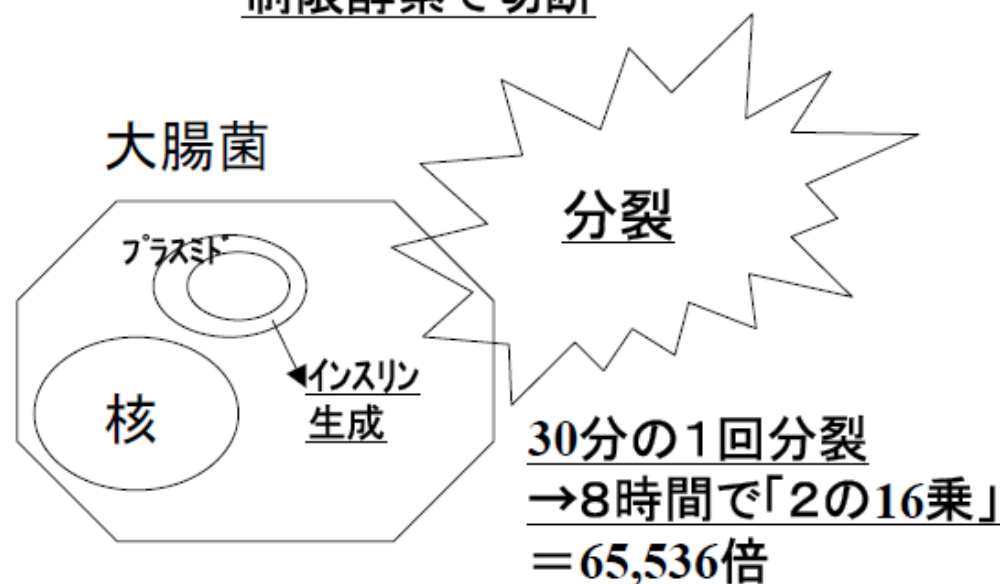
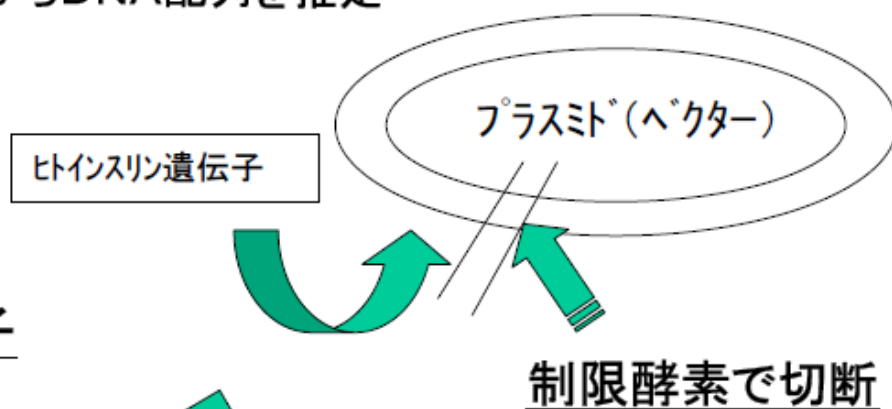
・DNA配列を生成

## ③ヒトインスリン遺伝子を導入したプラスミド



## ④大腸菌に導入

## ②ベクターを用意





## ファルマシアプレスリリース

2002年01月18日

**ファルマシア株式会社 ヒト成長ホルモン製剤「ジェントロピン®」に適応追加  
ー プラダーウィリー症候群に対する国内初の治療薬 ー**

ファルマシア株式会社(本社:東京都新宿区、社長:ローレンス J. ペイン)は1月18日、遺伝子組換え天然型ヒト成長ホルモン製剤「ジェントロピン®」(一般名:遺伝子組換えソマトロピン)が、新たな効果・効果として「プラダーウィリー症候群における低身長」の承認を取得したと発表しました。日本では、プラダーウィリー症候群の適応症が認められた唯一の成長ホルモン製剤です。

プラダーウィリー症候群(PWS)は希少な遺伝子疾患で、低身長、過食、肥満、筋力低下、性腺機能低下、認識障害などをもたらします。これまでの治療は、食事療法、運動療法、性ホルモン補充療法などが行われてきましたが、有効な治療薬がありませんでした。

今回、「ジェントロピン®」が小児のPWS治療薬として承認されたことで、上記3つの療法に成長ホルモン療法を追加することで、成長障害を改善することも可能となりました。日本におけるPWS患者の発生頻度は、欧米同様10,000人から15,000人に1人と推定されています。

「ジェントロピン®」のPWSに対する適応症は、米国において2000年6月、EUにおいては2000年7月に承認されています。「ジェントロピン®」は、遺伝子組換え技術を応用し、1987年に世界で初めて開発された天然型ヒト成長ホルモン製剤です。現在50ヵ国以上で使用され、成長ホルモン分泌不全性低身長症などの治療薬として、世界の成長ホルモン市場におけるトップブランドになっています。日本では、1988年に成長ホルモン分泌不全性低身長症の治療薬として発売以来、低身長の治療に貢献してきました。

ファルマシア株式会社は、米国ファルマシア社(本社:米国ニュージャージー州 会長兼CEO:フレッド・ハッサン)の日本における子会社です。ファルマシア社はトップクラスのグローバル医薬品企業であり、その子会社は農業製品分野をリードしています。革新的な医薬品をはじめとするファルマシア社の製品は、救命とQOLの向上に貢献しています。健康を未来に伝えることが59,000名のファルマシア社員の使命です。

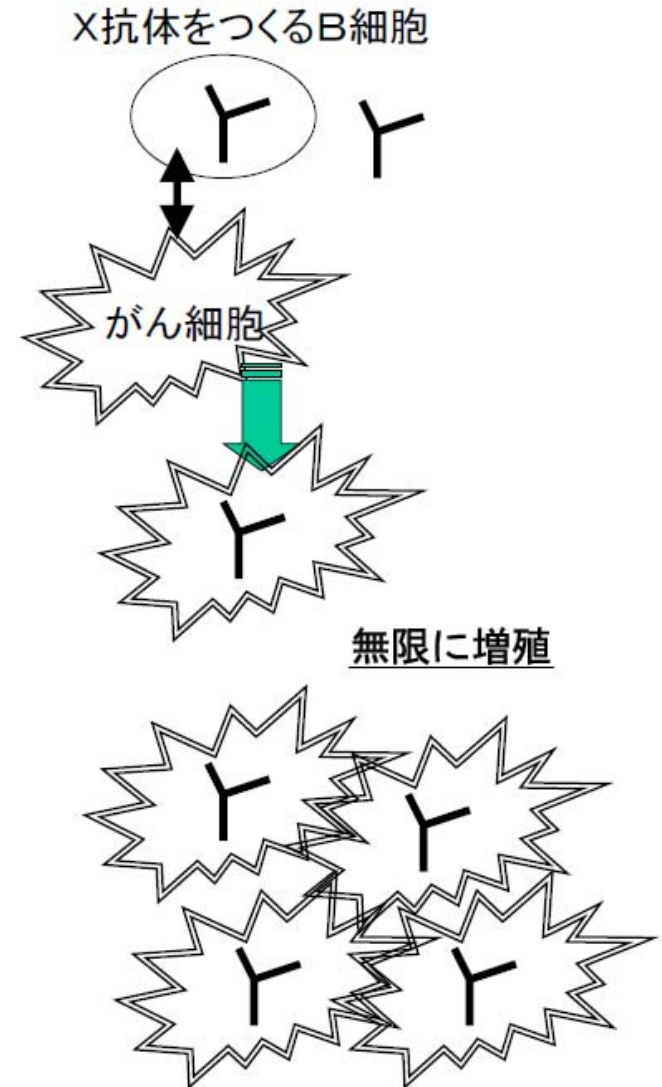
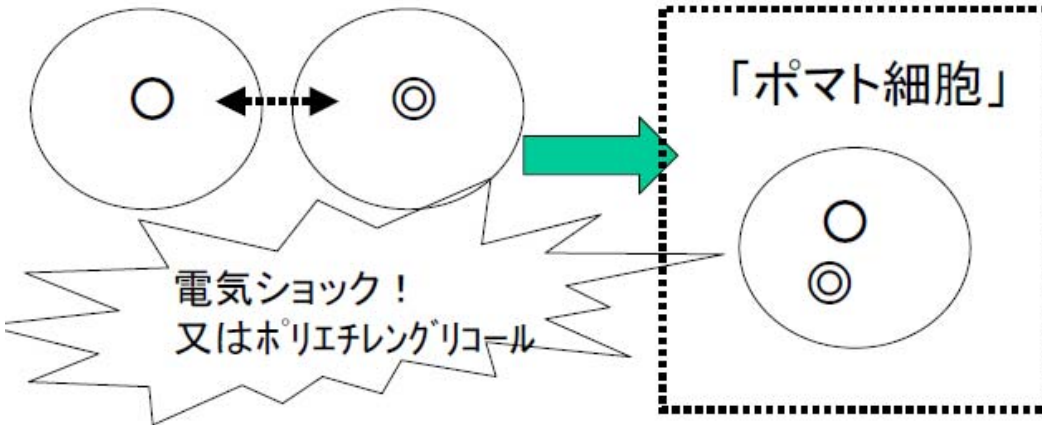
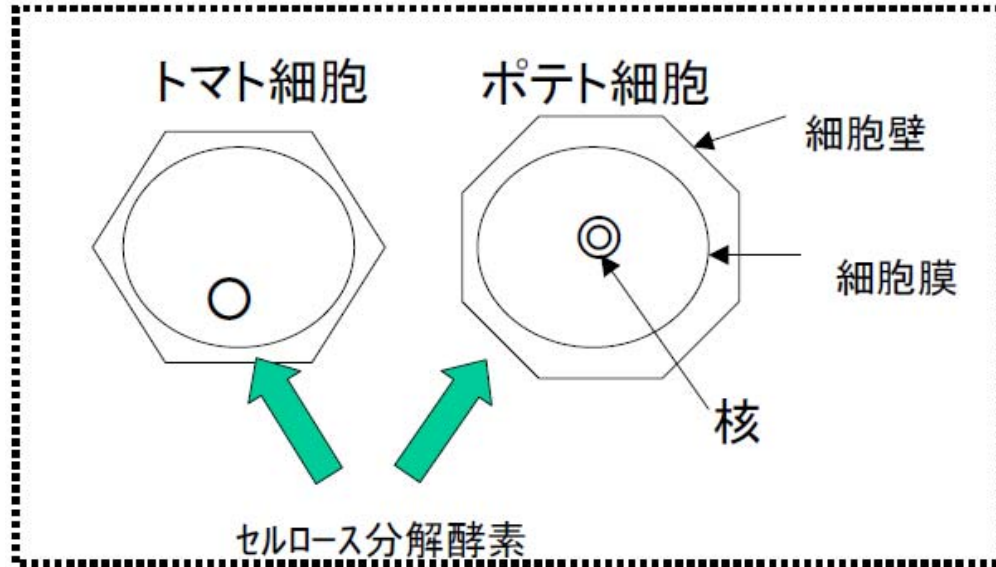
# B型肝炎ワクチン

- 組み換えDNA技術によりB型肝炎ウィルスの表面抗原の遺伝子を酵母に組み込んで、酵母に表面抗原だけを生産させてワクチンとするもので、我が国で初めて組み換えDNA技術を用いて感染の危険性を有するウィルスが混入しない安全なB型肝炎ワクチンを安定的に効率よく製造する技術を確立したものである。

# 応用

- このほかに遺伝子工学の応用としてよく知られるのは、すでに実用化されている遺伝子組換え作物などを含む遺伝子組換え生物（GMO）である。
- まだ実用化はされていないが有望視され研究されているものに、経口用ワクチンやアレルギー治療用ペプチドを、作物で安価に生産する試みがある。

# 細胞融合技術



# まとめ

- 1944年 DNAによる肺炎双球菌形質転換(エイヴリー)
- 1945年 ファージのDNA組換え(デルブリュック)
- 1953年 DNAの二重らせん構造発見
- 1956年 センダイウイルスによる動物細胞融合(岡田善雄)
- 1967年 DNAリガーゼの発見
- 1968年 制限酵素の発見
- 1970年 大腸菌へのDNA導入(マンデル、比嘉昭子)
- 1973年 人工的遺伝子組換え技術(コーエン、ボイヤー)
- 1974年 ポリエチレングリコールによる細胞融合
- 1975年 モノクローナル抗体(ケーラー、ミルスタイン)

# まとめ

- 1977年 DNA塩基配列決定法(サンガー法)
- 1977年 ヒトソマトスタチン遺伝子が大腸菌で発現
- 1982年 組換えインスリン認可
- 1985年 ポリメラーゼ連鎖反応発明  
(キャリー・マリス)
- 1990年 ヒト遺伝子治療開始(NIH)
- 1994年 Flavr Savr(遺伝子組換えトマト)市販
- 1996年 クローン羊ドリー出産
- 1998年 ヒトES細胞作製
- 2000年 ヒトゲノムの概要解読

# ソマトスタチン

- ソマトスタチンとは、脳の視床下部、膵臓のランゲルハンス島、消化管の内分泌細胞などから分泌されるホルモンので、主な機能は、下垂体からの成長ホルモンの分泌の抑制、ランゲルハンス島からのインスリンおよびグルカゴンの産生・分泌の抑制の他、消化管からの栄養の吸収を抑制するなどである。

# クローン羊『ドリー』の早すぎる死で、さらに高まるクローン技術への懸念

- スコットランドのロスリン研究所は、6歳になっていたクローン羊の『ドリー』を安楽死させたと発表した。ドリーは老化が早く、肺の疾患を患っており、クローン動物の実用性を疑問視する声があがっていた。
- 「ドリーの早すぎる死の原因がクローン技術と関係があるか否かは、解剖結果を待たねばならない」
- 「もし関係があれば、生殖目的のクローニングの危険性と、クローン技術を人間に応用しようとしている人々の無責任さがさらにはっきりと示されることになる」

- AP通信 2003年02月17日



