

生命科学最前線体験実習 予習課題（任意提出:成績には影響しません）

下に本実習の概要を記述する。本実習は、分子生物学と呼ばれる学術分野の知識を必要とする。記述を読み、分からない箇所を適当な文献で調べ、内容を理解した上で課題に挑戦せよ。

<全体の概要>

本実習では、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein: 緑色蛍光タンパク質) の遺伝子を大腸菌に形質転換し、大腸菌の細胞の中で大量に GFP を生産させる。そのためには GFP 遺伝子を大量に手に入れる必要がある。PCR (Polymerase Chain Reaction) 法と呼ばれる、長い DNA の鎖の一部 (断片) を人工的に増幅する技術を用いて、GFP 遺伝子を含む長い DNA から GFP 遺伝子断片を増幅し、それをプラスミドベクター (plasmid vector) に挿入する。この GFP 遺伝子を含むプラスミドベクターを大腸菌に形質転換し、大腸菌を培養する。通常の実験では、大量に増殖した大腸菌から目的遺伝子を含むプラスミドを抽出および精製する。ここまでの操作を一般にクローニングと呼んでいる。しかし、本実習では時間の関係で、プラスミドの精製は行わず、形質転換した大腸菌にそのまま GFP を生産させて、GFP の精製を行う。

<PCR の原理>

これは分子生物学を扱う入門レベルの教科書や参考書に必ず説明があるはずである。自身で適当な文献を探し、原理を理解してほしい。PCR は、課題に取り組むために必要な知識である。ただし、DNA の基本的な構造、DNA 複製のしくみを理解していなければ、PCR の原理を理解するのは難しい。

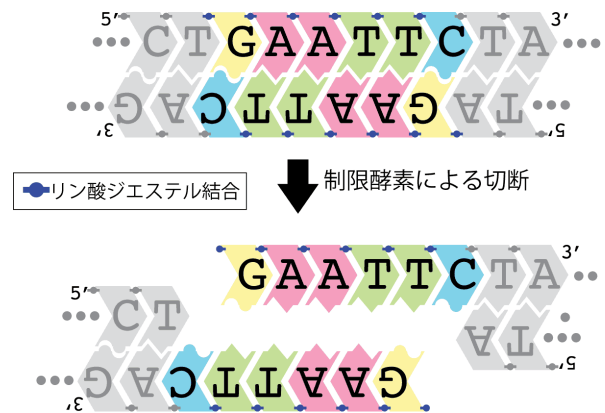
<プラスミドベクターとは>

原核生物は、メインとなる DNA 以外にもプラスミド (plasmid) と呼ばれる小型の環状 DNA を持つ種が存在する。プラスミドには様々な遺伝子が含まれており、しばしばその細菌のもつ特性を示す原因となっている。プラスミドはメインの DNA とは独立して複製され、一個の細胞の中に同じプラスミドが多数存在する。この性質を利用し、プラスミドに外来の遺伝子を組み込んで、細菌に取り込ませることで、その遺伝子に起因する形質を示す細菌を作り出すことが可能になる。そのために無駄を省き、使いやすいように人工的に改変したプラスミドをプラスミドベクターと呼ぶ。プラスミドベクターは、使用する細菌の細胞中で多量に複製させるための複製開始点、ベクターを含んでいることの指標となるマーカー遺伝子^{*1}、目的遺伝子を挿入するための制限酵素切断配列 (後述)、目的遺伝子を発現させるためのプロモーター配列 (後述) などを含んでいる。

※1 よく利用されているのが抗生物質耐性遺伝子。この遺伝子を持つと、抗生物質存在化でも生育できる。

<制限酵素とは>

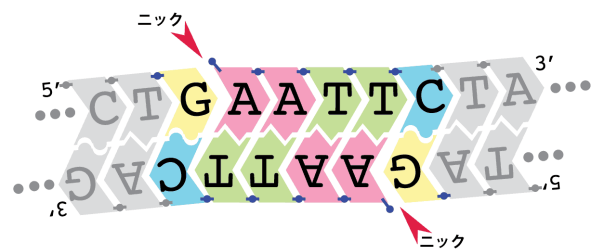
元来の酵素の役割は文献で調べてもらいたい。機能としては、特定の DNA 塩基配列を認識して、DNA を切断する酵素の総称である。その特徴は、回文構造になっている配列をターゲットにしていることが多い。例えば、*EcoRI* と呼ばれる制限酵素は、DNA の 5'-GAATTC-3' ^{※2} という塩基配列を認識する。この反対側の鎖は、3'-CTTAAG-5' となり、記述の向きを逆にすると同じ配列である（つまり回文構造）。この配列部分を右図のように、DNA の 5'-AATT-3' という 1 本鎖部分が残るように切断される（1 本鎖が残らないように平滑に切断する酵素もある）。この 1 本鎖部分が、ベクターに遺伝子を挿入する際の重要な鍵となる。



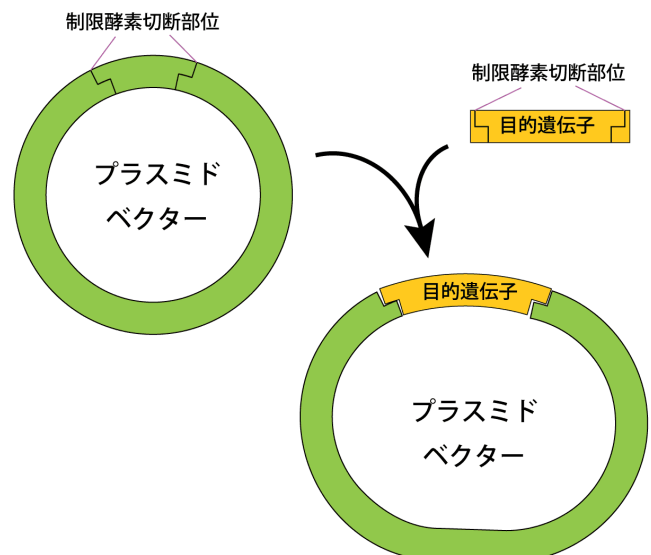
※2 塩基配列の両端にある 5' と 3' は、DNA の方向を示している。DNA を構成するヌクレオチドに含まれるリボースの炭素に 1' から 5' までの番号が振られており、隣り合うヌクレオチド同士で 5' 炭素と 3' 炭素がリン酸ジエステル結合により重合している。

<ベクターに DNA 断片を挿入する>

制限酵素によって DNA が、1 本鎖部分が残るように切断されると説明した。この部分を利用して 2 個の DNA 断片を繋ぎ合わせる方法がある。同じ制限酵素で切断された切り口は、同じ 1 本鎖の配列を持つ。ここで重要なことは、切断部分が回文構造であるので、その切り口は相補的配列（A と T 及び G と C の組み合わせ）である。従って、同種の制限酵素で個別に切断した 2 個の DNA 断片を混ぜると、切り口同士が水素結合により相補的に結合する。すると、DNA の 2 本鎖のうち片方だけに切れ目が入った構造ができる（ニック：nick と呼ばれる）。この切れ目を認識してリン酸エステル結合を触媒する酵素（リガーゼ：ligase）で処理することで、2 個の DNA 断片を繋ぎ合わせることができる。



これを利用し、プラスミドベクターに目的の遺伝子を挿入することができる。プラスミドベクターには、制限酵素切断部位がたくさん集中した場所がある。その中から適当な制限酵素を選び、プラスミドベクターを切断する。一方で、挿入するために目的遺伝子の DNA 断片を PCR で増幅する。プライマーを設計する際、プライマーの目的遺伝子の塩基配列の前にプラスミドベクターを切断したときと同じ制限酵素の認識配列を追加する。そうすることで、両端に制限酵素切断部位が付いた DNA 断片が増幅



される^{※3}。できた DNA 断片を制限酵素処理することで、切断されたプラスミドベクターの両端と同じ 1 本鎖配列を持つ DNA 断片となる。これらを混ぜてリガーゼで処理することで、目的遺伝子が挿入されたプラスミドが完成する。

※3 追加した制限酵素認識配列は、目的遺伝子の配列には存在しない配列なので、最初の鋳型 DNA にプライマーがくっつくときは、制限酵素認識配列部分はくっつかない。しかし、プライマーの 3'側が目的遺伝子の配列であれば、その部分がしっかりと鋳型 DNA にくっ付き、そこから DNA の重合反応が始まる。

<課題>

今回利用するプラスミドベクターは、pBAD/HisA と名付けられたベクターで、抗生物質アンピシリン耐性の遺伝子を持ち、アラビノース誘導プロモーター配列の支配下に、遺伝子を挿入するための制限酵素切断部位が存在する。これはつまり、このプラスミドを保持する大腸菌は、培地中にアンピシリンが存在しても増殖することが可能であり、培地中にアラビノースを添加することで、目的遺伝子の発現が誘導される。

プロモーターの後ろには、既に某のタンパク質をコードする塩基配列が存在する。これは、実際の研究で目的のタンパク質を操作するために便利な目印のようなもので、タグと呼ばれるアミノ酸配列をコードする塩基配列である。今回のタンパク質の精製にはこのタグを利用しないが、便宜上このタグを先頭に付加させた形で目的遺伝子を挿入し、プラスミドを完成させる。つまり、タンパク質の翻訳はタグ配列の開始メチオニンから開始される。

実際の実習では、プラスミドベクターに関しては教員がすでに制限酵素処理したものをを用いる。*XhoI* と *EcoRI* と呼ばれる制限酵素で切断し、短い方の DNA 断片は取り除いてある。

今回の目的遺伝子は GFP をコードする遺伝子である。GFP 遺伝子のタンパク質をコードする部分である、開始メチオニンから終止コドンまでの塩基配列を PCR 法を用いて増幅したい。さらに、DNA 断片の両端には制限酵素切断部位を付加させたい。

以上の条件から、実習で使用する PCR 用のプライマーを設計せよ。

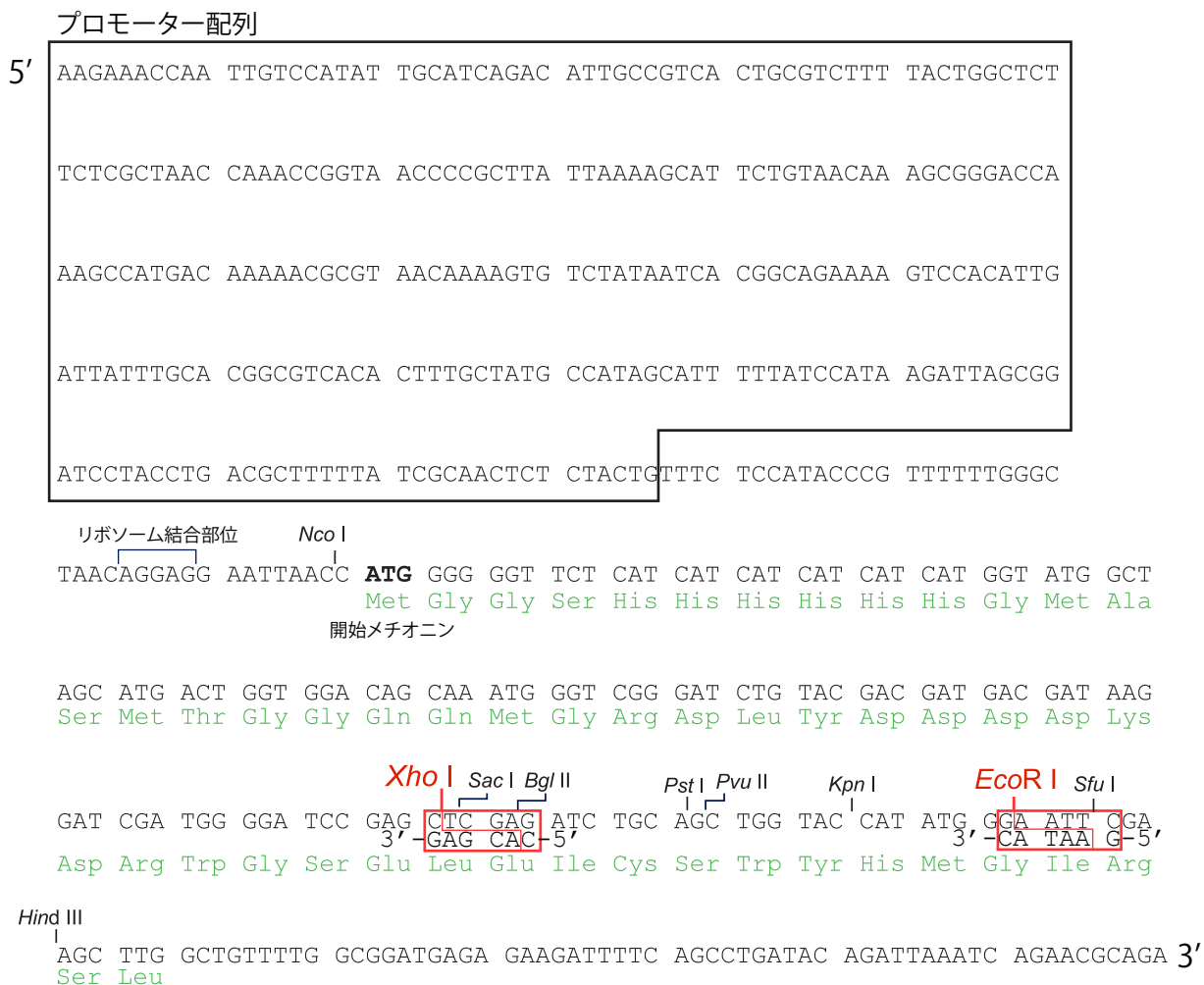
注意点

- (1) プラスミドベクターおよび GFP 遺伝子の配列情報は別紙を参照のこと。
- (2) *XhoI* の認識配列は、5'-CTCGAG-3' で、*EcoRI* の認識配列は、5'-GAATTC-3'である。
- (3) タンパク質を構成するアミノ酸配列は、コドンと呼ばれる 3 個の塩基によって 1 個のアミノ酸が決定する。したがって、2 個以下の塩基の挿入や欠失があるとフレームがずれ正しいアミノ酸に翻訳されなくなってしまう。制限酵素切断部位の配列と、コドンの関係をよく考えて設計せよ。
- (4) GFP の場合は、アミノ酸配列の先頭や末端部分に多少の余分なアミノ酸が付加されても、蛍光を発する能力に影響はない。したがって、タグ配列や制限酵素切断部位を付加することで、本来の GFP のアミノ酸配列に余分な配列が加わることは、問題ない。

提出期限： 2014 年 7 月 31 日 終日

提出方法： 電子メールでの本文に氏名、学籍番号を明記し、設計したプライマーの塩基配列と配列の名前（英数字で自由に決めて良い）を記載のうえ、 labcourse@csls.c.u-tokyo.ac.jp 宛に送信。

pBAD/HisA の目的遺伝子を挿入する部分の周辺の塩基配列



GFP遺伝子のアミノ酸をコードする領域の5'末端側と3'末端側の塩基配列

```

5' - ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC ...
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile ...
開始メチオニン

```

中略

```

... ACC GCC GCC GGG ATC ACT CTC GGC ATG GAC GAG CTG TAC AAG TAA -3'
... Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys ***
終止コドン

```