

# 生化学I

## 細胞、分子、生体システムの解析方法③

(分子の検出、操作、応用)

2025 (R7)年 6月 27日 (金)

1限

分子遺伝学 (生化学第一)

倉知 慎

## 【検出編】

- ① どのような**種類(カテゴリー)**の分子を目標としているか？ DNA、RNA、タンパク
- ② 目標カテゴリーの中で、**何を測定**しようとしているのか？ 大きさ、中身(配列)、形状、量、場所
- ③ 目標カテゴリーの中で、**特定の目的分子**に絞るのか、それとも**全体像**か？ 個別、網羅
- ④ どのように**可視化**するか？ 蛍光、ラジオアイソトープ、発光、凝集、電流、抗体
- ⑤ どのように**効率よく**検出するか（S/Nを高くするか）？ 選別、濃縮
- ⑥ 検出は**定性的**か、それとも**定量的**か？ 存在有無だけ判断、量も測定
- ⑦ どのように分子と分子の関わり(**分子間相互作用**)を検出するか？ タンパク間、DNA-タンパク

## 【操作編】（ある対象遺伝子/分子の機能を調べる時）

- ⑧ 解析に使いやすいように、**大量・均一に作る** 遺伝子組み換え
- ⑨ 分子の**量を増減**させて、効果を見る トランスジェニック、ノックアウト、ノックダウン
- ⑩ 分子の**質を変化**させて、効果を見る

# 今日の学修目標

- ① DNAクローニングを応用した遺伝子組み換え技術と組み換えタンパク質産生（医療応用）について簡単な模式図を用いて説明できる。発現ベクター、過剰発現、インシュリン、遺伝子組み換え作物。
- ② 遺伝子型(genotype)と表現型(phenotype)について説明できる。
- ③ 順遺伝学(forward genetics)と逆遺伝学(reverse genetics)について説明できる。
- ④ トランスジェニック、ノックダウン、ノックアウトの実験操作概念を説明できる。
- ⑤ 遺伝子の機能を解析する目的で人工的に変異を導入する方法について説明できる。ゲノム編集、Cas9/CRISPR。
- ⑥ 遺伝子の変異がもたらす効果について以下の用語を説明できる。機能喪失変異(loss-of-function)、機能獲得変異(gain-of-function)、優性ネガティブ変異(dominant negative)、抑圧変異(suppressor)。
- ⑦ *in vitro*、*in vivo*、*in silico*、*in situ*、*ex vivo*が指す実験操作概念を説明できる。

過去3コマの講義で、DNA/RNA/タンパク質の大きさ/配列/量/形状など「物理的特徴」を検出する手法を見てきた。

しかし、医科学としては「生体における機能」が大切であり、今日は、遺伝子の発現と機能の解析、分析・操作する技術とその医療応用をみる。

まず、遺伝子クローニングの復習と遺伝子組み換えから。

## 復習

# 遺伝子をプラスミドに入れてクローニングすると自在に取扱ができるようになる

- あるDNA分子をさらに詳細に調べたい場合、裸の二本鎖のままでは増やせないし、タンパク発現など機能解析もしにくい。そこで、自在に増幅したり機能解析できるように、目的のDNA断片(下図の赤色)をベクター(運び屋；下図橙色)とよばれる別のDNAのなかに組み込んで単離・確保する。これをDNAクローニングという。
- 数kbpまでのDNA断片であれば、ベクターには**プラスミドDNA**が使われることが多い。クローニング用のプラスミドには、決まった場所にDNA断片を組み込めるように、特定の配列が仕込まれている。

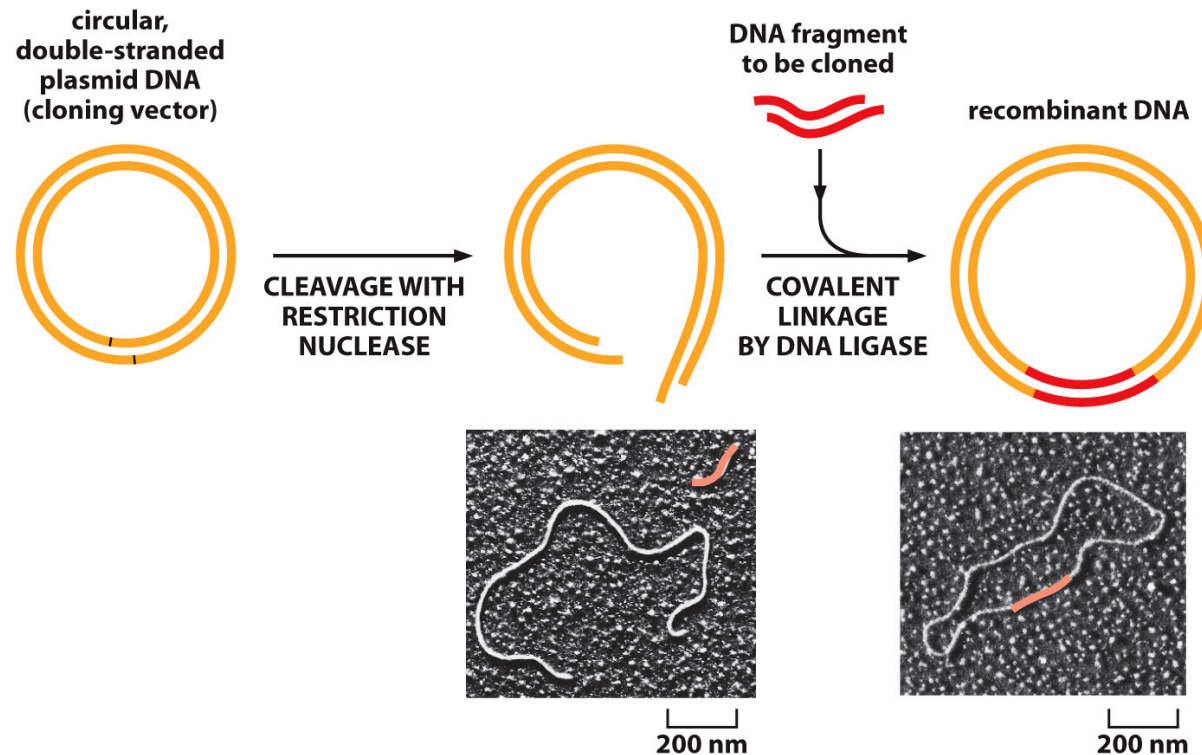
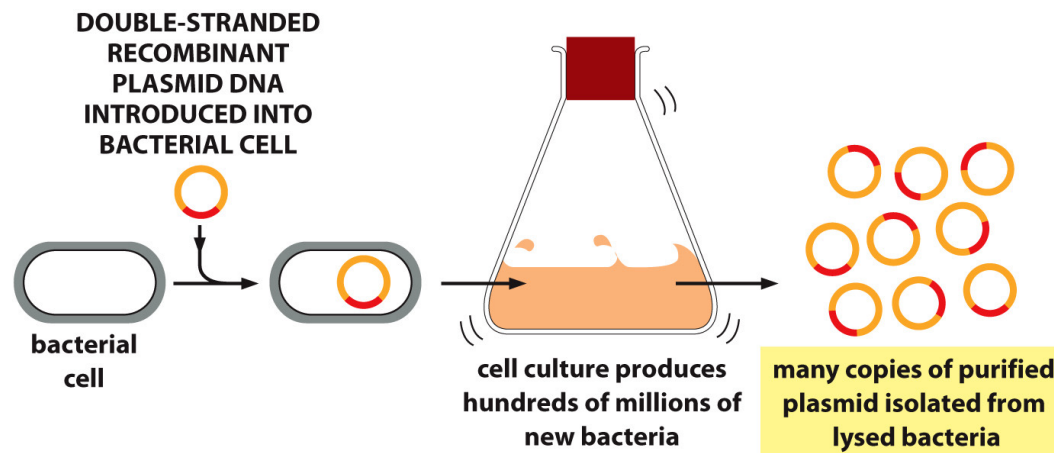


Figure 8-27 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

## 復習

# プラスミドを細菌に取り込ませて、 細菌の増殖とともにプラスミドを増幅し、抽出する

- ・ 目的DNA断片を含む組み換えプラスミドを、細菌に取り込ませる。**形質転換**という。（細菌に熱や電気のショックを与えると一時的にプラスミドDNAが透過するようになることを利用する。）
- ・ プラスミドを含んだ細菌を液体培地で培養する。細菌は最速で20分に1回分裂するため、一晩で数百万倍以上に増やすことができる。（下図では省略されているが、実際にはプラスミドを取り込んだ細菌だけが増殖するように、液体培地には抗生物質、プラスミドには抗生物質に耐性の遺伝子を含めている）
- ・ 培養後に、細菌を集め、溶菌して、細菌由来のDNA/タンパク質/脂質などを除去すれば、均一なプラスミドDNAを大量に得ることができる。
- ・ このようなDNAクローニングにより、どんな生物由来のDNAのいかなる配列であっても、増幅と単離が可能となり、遺伝子の解析が飛躍的に進んできた。



## 復習

# RT-PCRを用いると目的遺伝子のcDNAクローン樹立が容易

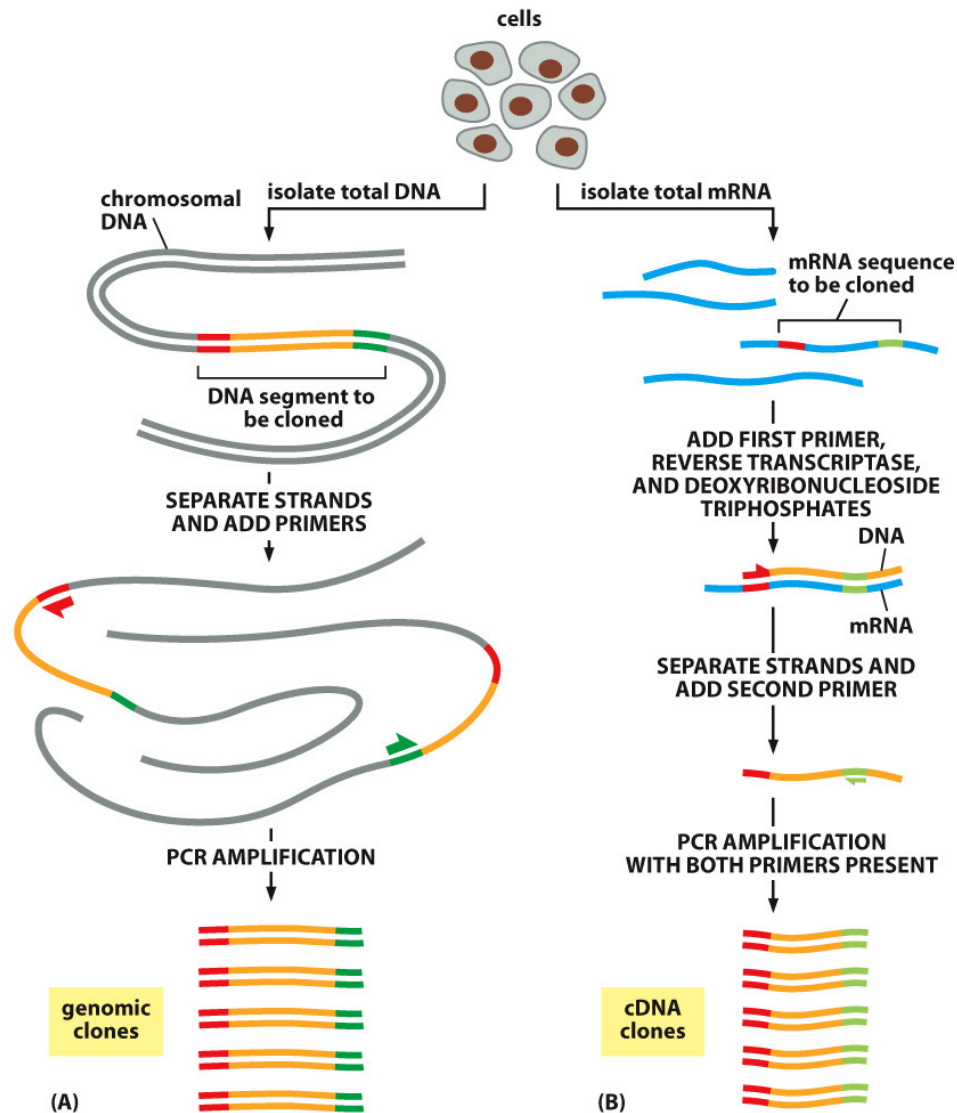


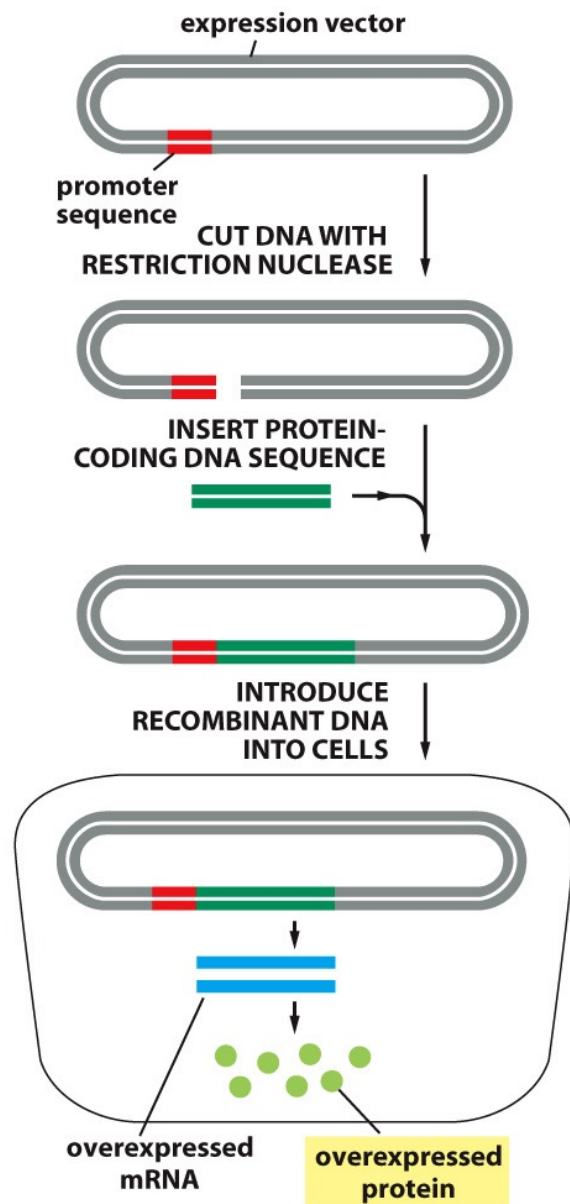
Figure 8-37 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

- PCRで増幅する鋳型二本鎖DNAは、ゲノムDNAに限らない。mRNAから**逆転写反応** (reverse transcription; **RT**)により作られた相補的DNA (cDNA)も鋳型になる。cDNAを鋳型に行うPCRを**RT-PCR**という。
- PCRを利用して遺伝子クローニングを行う場合、(左)ゲノムDNAを鋳型にする genomic PCR (gPCR)ではイントロンを含んでしまうが、(右)cDNAを鋳型にする RT-PCRではスプライシング後の成熟 mRNAを鋳型にするため**遺伝子コード配列を直接増幅**することができる。
- また、RT-PCRを利用すると、cDNAライブラリー樹立を経ずとも、目的遺伝子のcDNAを「一本釣り」できるため、目的遺伝子のcDNAクローンが入手しやすい。

↓  
cDNAをプラスミドにクローニングする



# タンパク質をコードしているDNA配列を発現ベクターに クローニングして細胞に導入すると、大量のタンパク質を生産できる



- ・ 目的のDNA断片をクローニングするベクター(プラスミド、灰色)に、DNA断片の転写を促進するプロモーター(赤色)を組み入れたもの(**発現ベクター**)を準備する。プロモーターの近傍にタンパク質をコードしているDNA断片(濃緑色)を挿入し、組換えDNAを作る。組換えた発現ベクターを、細菌や細胞に導入すると、DNA断片の配列に基づいて大量のmRNA(水色)が転写され、さらに大量のタンパク質(薄緑色)が翻訳される。
- ・ この方法を用いれば、大量に均質な標的タンパク質を無制限に作り出すことができる。細菌や細胞をすり潰して、クロマトグラフィーで精製すれば、不純物が少ない標的タンパク質を得ることができ、生化学的あるいは構造学的な解析に用いることができる。
- ・ この遺伝子組換え技術は、本来は微量しか発現していないタンパク質を大量に生産し、医薬品として利用する時にも使われている。(次項)



# 1970年代まで生体から抽出するしかなかったインシュリンは 遺伝子組み換え技術により大量に合成できるようになった



**In 1950s:** 4535 kg of Pig Pancreas make 0.45 kg of Insulin.



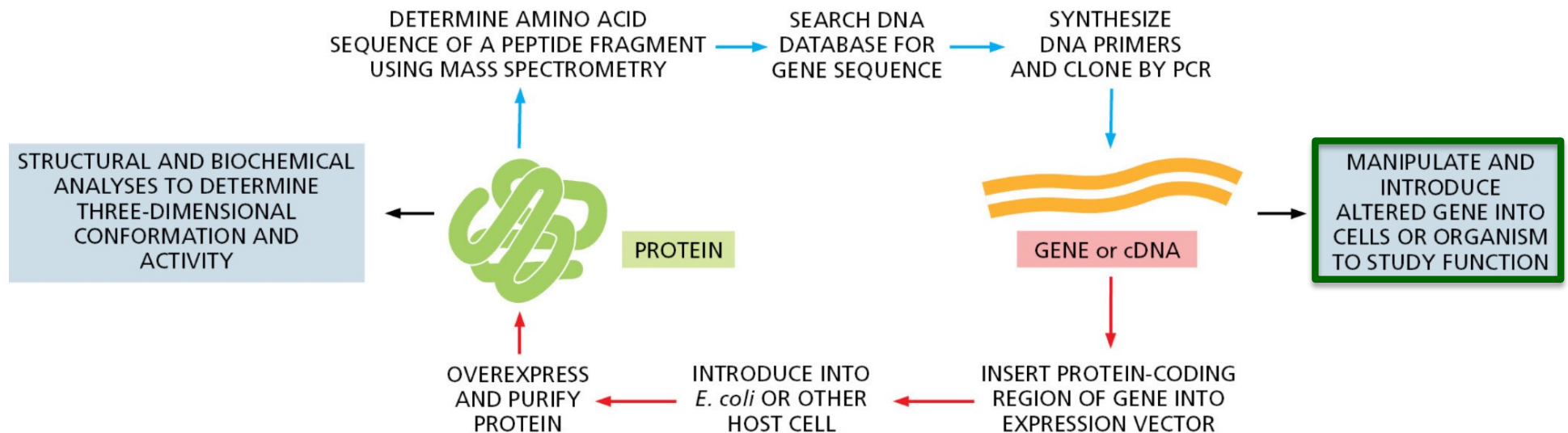
**NOW:** Genetically Engineered Bacteria produces Insulin, without animals.

@BIOTECH.BAE

- ・糖尿病は、膵臓から分泌されるインシュリンというホルモンが欠乏することで生じる。
- ・治療の1つは、インシュリンの補充。
- ・しかし、膵臓に自然状態で含まれるインシュリンの量は僅かであり、インシュリンのタンパク質を得るためには、以前は極めて大量の動物膵臓から抽出精製するしかなかった。左上の写真では、450gのインシュリンを入手するために、4.5トンのブタ膵臓が必要であったことを示している。また、精製しても不純物は残るため、インシュリン注射部位の発赤など副作用もあった。
- ・(左下)前項の遺伝子組み換え技術が開発され、工場の巨大なタンク培養を用いることで、高品質なインシュリンが安価に大量に得られるようになった。

# 遺伝子組み換え技術により、DNAからでも、タンパク質からでも 遺伝子の探索や機能解析が可能になった

- ・ (下半分の赤色矢印の経路) 塩基配列から遺伝子の機能解析を行う流れ。遺伝子のDNAあるいはcDNA配列が分かっているならば、タンパク質をコードしている塩基配列を発現ベクターに挿入し、大量のタンパク質を生産させて、その生化学的性質や構造を調べることができる。
- ・ (上半分の青色矢印の経路) タンパク質から遺伝子を探索する流れ。あるタンパク質が特定の生化学的特性に基づいて精製できた場合は、質量分析法などを用いて(部分的にせよ)アミノ酸配列を得ることができ、それに対応するゲノム塩基配列を探索できる。塩基配列が一部でも分かれば、それを手がかりに完全な遺伝子配列をクローニングすることができる。
- ・ (右の緑色枠) 遺伝子を改変して細胞や個体に導入し、生体における機能解析を行う。(次節)



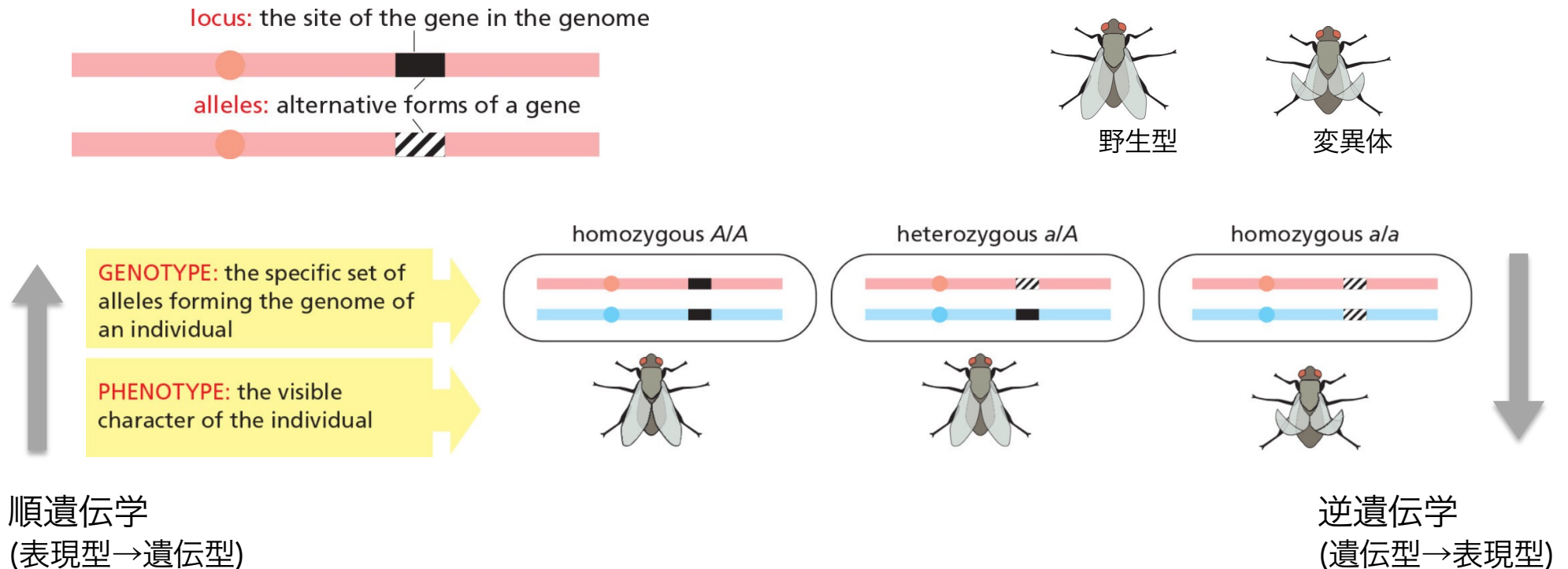
遺伝子組み換え技術によって、遺伝子の塩基配列を  
解読し、性質を解明し、単離することが可能になっ  
たこと、遺伝子産物を大量に生産して、構造や機能  
の詳細な解析や医療に役立てることは分かった。

それでは、遺伝子の機能を調べるアプローチ法につ  
いて見てみよう。

まず、総論として、順遺伝学と逆遺伝学、遺伝子変  
異によるタンパク質機能変化分類について。

# 遺伝子型と表現型、順遺伝学と逆遺伝学

- ・ 遺伝子(がコードするタンパク質)の生体内での機能を解析するには、どこから着手するか？
- ・ 古典的な遺伝学では、動植物の色や形や行動(**表現型, phenotype**)が異なるものに注目し、その特徴を作り出す遺伝子(**遺伝子型, genotype**)を決めるアプローチ。**順遺伝学 (forward genetics)**という。左端矢印の向き。
- ・ これとは逆に、特定の遺伝子からスタートしてその遺伝子に変異を起こし、変異細胞や変異生物を作り出して表現型を観察することで遺伝子の機能を解析するアプローチがある。**逆遺伝学 (reverse genetics)**という。右端矢印の向き。





## 復習

# DNA塩基の変異は遺伝子の変異につながる

### 【DNAの変異】

点突然変異 (point mutation)

欠損 (deletion)

挿入 (insertion)

### 【遺伝子の変異】

静的変異 (silent mutation)

DNA配列は変化するが、アミノ酸は不変

5' -GAU GCA CAC-3'	5' -GAU G <u>C</u> C CAC-3'
Asp Ala His	Asp Ala His

ミスセンス変異 (missense mutation)

DNA配列は変化し、アミノ酸も変化

5' -GAU GCA CAC-3'	5' -GAU <u>A</u> CA CAC-3'
Asp Ala His	Asp <b>Thr</b> His

ナンセンス変異 (nonsense mutation)

DNA配列が変化し、終止コドンに変化

5' -GAU GAA CAC-3'	5' -GAU <u>I</u> AA CAC-3'
Asp Glu His	Asp <b>Stop</b>

フレームシフト変異 (frame shift mutation)

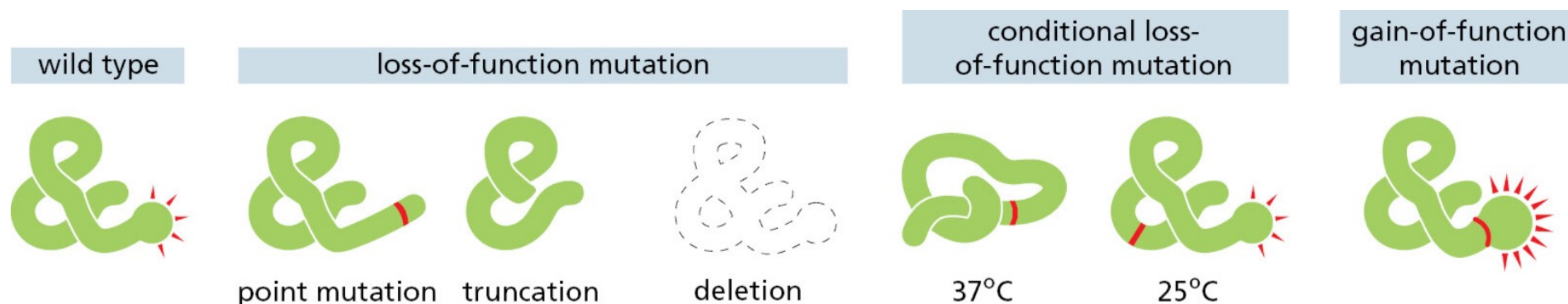
読み枠がずれる

5' -GAU GAA CAC-3'	5' -GAU AAC AC-3'
Asp Glu His	Asp <b>Asn</b>

「遺伝子の変異」が「タンパク質の機能」に  
どのような影響を及ぼすのか？ (次項)

# 変異はタンパク質の機能を喪失させたり、獲得させたりする

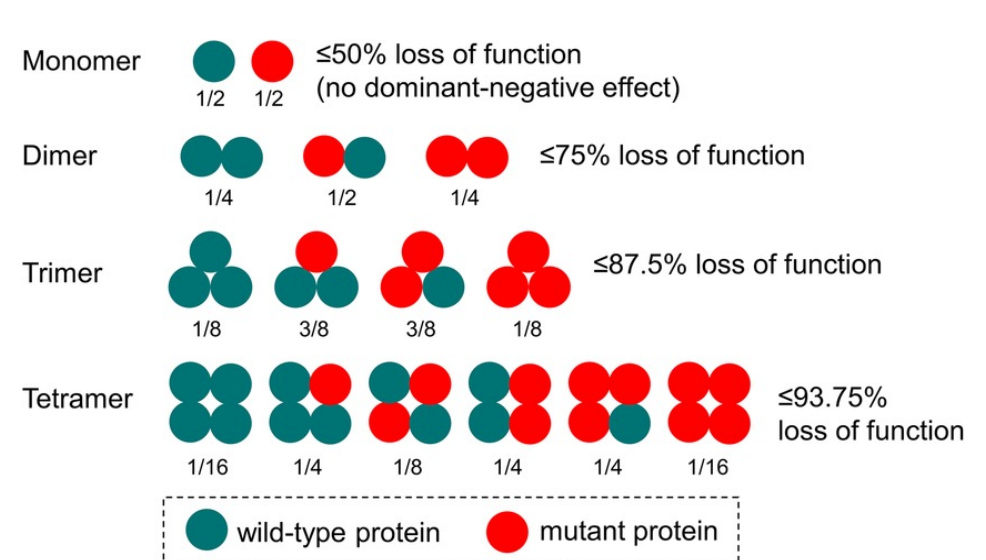
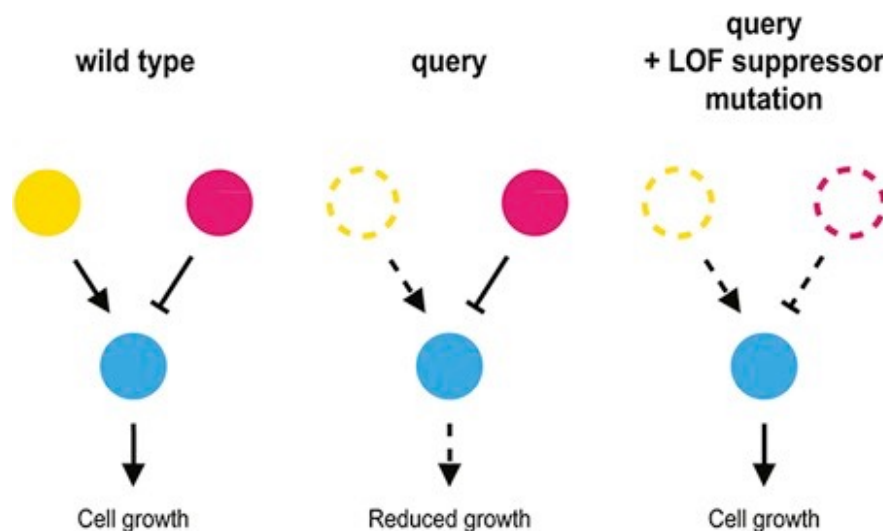
- ・ 遺伝子の変異をタンパク質の機能変化に読み替えて捉えると、大きく分けて**機能喪失型 (loss-of-function)**と**機能獲得型 (gain-of-function)**に分類される。
- ・ 下記の例では、野生型タンパク質の機能(左、赤色印)が、点変異/短縮型変異/欠失型変異によって機能喪失したり(中2つ)、機能獲得(右)している概念を示している。機能喪失型のなかには、特定の条件でのみ生じるタイプもある(中右)。
- ・ ほとんどの遺伝子是对立アレル(両親から1コピーずつ、合計2コピー)で構成されているため、機能喪失型変異は2コピーとも変異となって初めて表現型が生じることが多い (**潜性, recessive**)。
- ・ 一方、機能獲得型変異は1コピーでも変異があると機能亢進を生じて表現型が生じることが多い (**顕性, dominant**)。細胞増殖に関わる癌遺伝子など。
- ・ 「機能喪失 vs 機能獲得」の考え方は、そのまま逆遺伝学の遺伝子機能解析に当てはまる。





# 変異にはドミナント・ネガティブ変異やサプレッサー変異もある

- ・ 生体内ではタンパク質は単独で作用するのではなく複合的に作用することが多いため、下記のようなサプレッサー変異やドミナント・ネガティブ変異を呈することがある。
- ・ (左下) **サプレッサー変異 (suppressor mutation)**とは、別の変異による表現型への影響を抑制する変異であるため、二重変異体は一見正常に見える。左下例で、黄色が促進、赤色が抑制に働くとする。黄色の変異では促進が減少するため細胞増殖が減少するが、ここに2つ目の変異が赤色に生じると抑制も減少するため、結果として細胞増殖は不変となる。
- ・ (右下) **ドミナント・ネガティブ変異 (dominant negative mutation)**とは、遺伝子の変異産物が正常産物に対してドミナント(優位)に働いて、正常産物の作用を阻害する(ネガティブな効果)。右下例にあるように、多量体を形成するタンパク質で特に効果が顕著になる。正常な遺伝子(産物)が存在していても、産物群として見ると機能喪失型を呈する。



遺伝子の機能解析の入口として、順遺伝学と逆遺伝学、遺伝子型と表現型、遺伝子変異によるタンパク質機能変化の分類について学んだ。

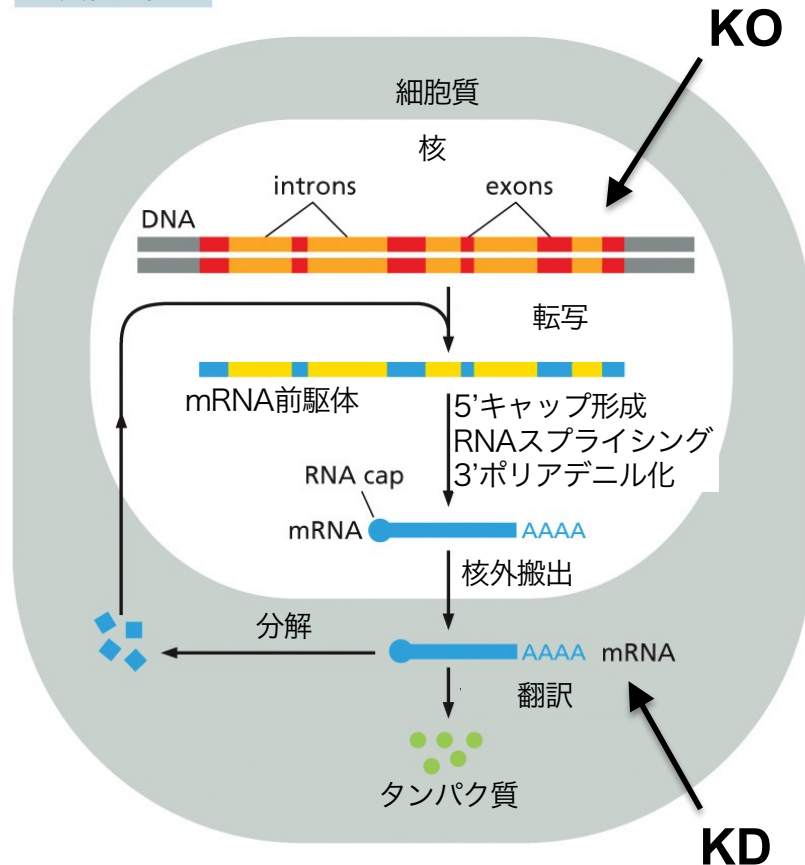
ある遺伝子の働きを調べようと思ったとき、まず遺伝子を欠失させたり、過剰にさせることで生体内での役割を解析することが多い。

次は、遺伝子の量（質）の操作の基本的な考え方を見てみよう。

# 遺伝子の量を減らす方向は、ノックアウトやノックダウン

(機能喪失型)

真核生物

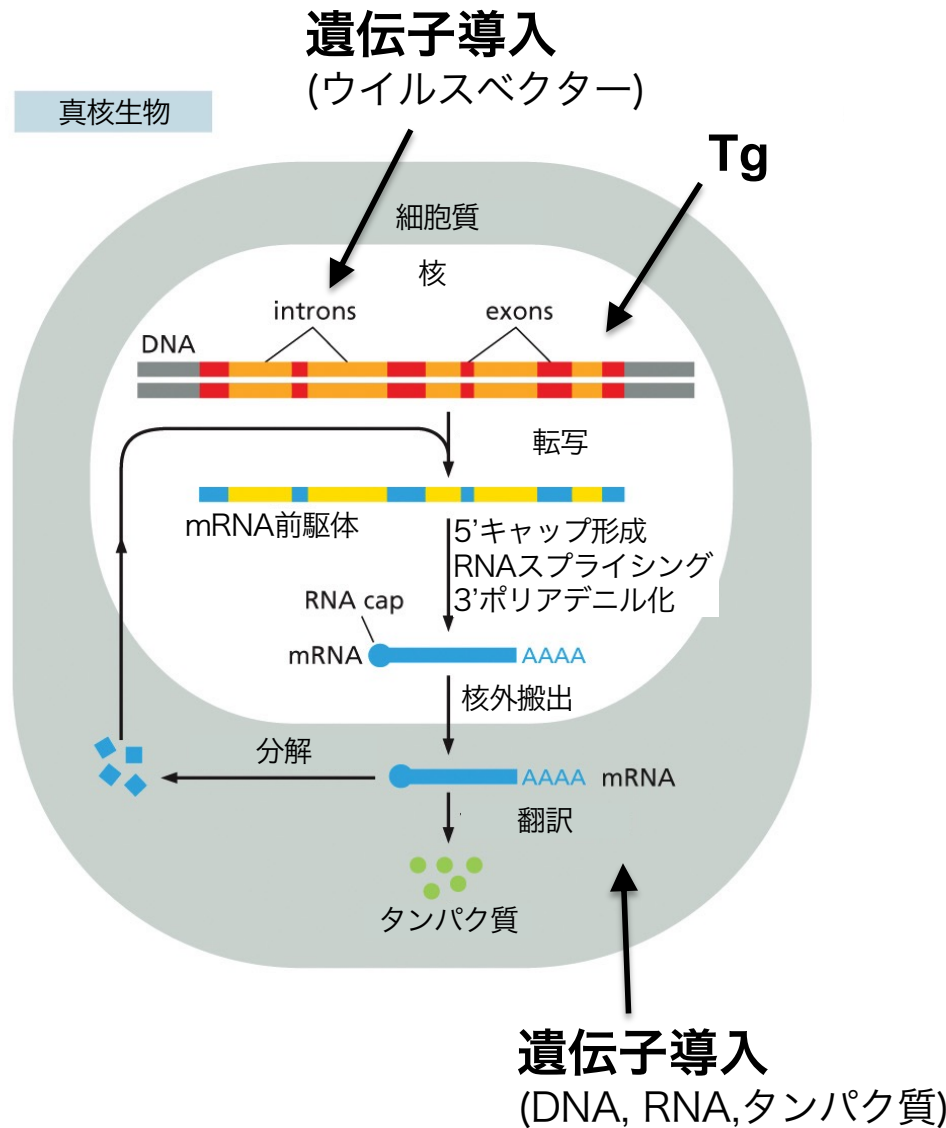


- ・ **ノックアウト (knock out, KO)**は遺伝子の機能を完全に失わせることを指す。遺伝子組み換えやゲノム編集を用いて、標的遺伝子のDNAを破壊し、標的遺伝子のタンパク質を欠損させる。歴史的には、標的遺伝子を破壊したDNA断片を準備しておき、遺伝子導入後に相同組み換えでKOしていたが、近年はゲノム編集が用いられることが多い。

- ・ **ノックダウン (knock down, KD)**は遺伝子の発現を部分的に減少させることを指す。**RNA干渉**を用いて、mRNAの数や翻訳量を減らし、タンパク質の量を低減させるのが最も一般的な手法。標的mRNA配列を参考にRNA干渉を起こすshRNAやsiRNAを設計し、細胞に導入する。細胞側のDNA配列を変化させない。RNA干渉では、有効なmRNAが一部残り、低レベルで翻訳されるため、標的遺伝子のタンパクは低減するものの完全に除去はされない。

ヒント：完全欠損 vs 部分減少？、宿主細胞ゲノムDNAは改変 vs 不変？

# 遺伝子の量を増やす方向は、トランスジェニックや遺伝子導入 (機能獲得型)



- ・トランスジェニック (transgenic, Tg)は遺伝子工学を用いて**個体レベルで特定の遺伝子を外部から導入**することを指す。目的遺伝子のDNA断片を受精卵やES細胞に導入し、宿主細胞のゲノムDNAに組み込ませて安定的に発現させるのが一般的な手法。
- ・**遺伝子導入 (transgenesis)**は細胞レベルあるいは個体レベルで特定の遺伝子を外部から導入することを指す。大きく分けて①ウイルスベクター(生物学的手法)による**transduction**、②物理/化学的手法による**transfection**がある。①ウイルスベクターを用いる方法のうち、レトロウイルスやレンチウイルスでは宿主細胞のゲノムDNAに組み込まれる。持続的に発現するものが多い。②物理/化学的手法で導入されたDNA/RNA/タンパク質は安定性に欠けるため、効果は一時的である。

ヒント：宿主細胞ゲノムDNAは改変 vs 不変？、効果は永続的 vs 一時的？

解析手法や実験を学ぶ過程で、*in vitro*、*in vivo*、*in situ* などの表現をよく聞く。

一体、どのような実験手法を指しているのか？

# 医科学研究は分子～細胞～臓器～個体～集団レベルで展開する

分子

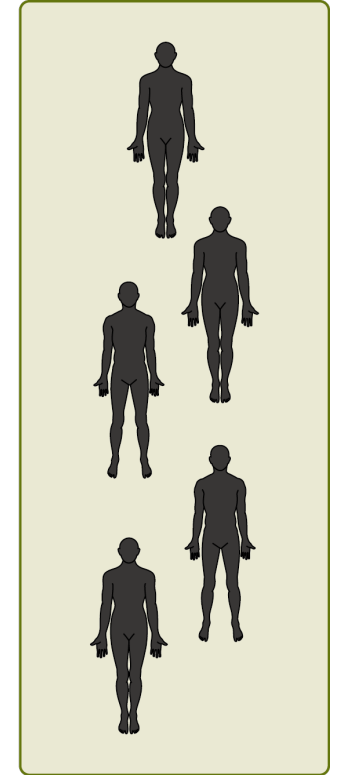
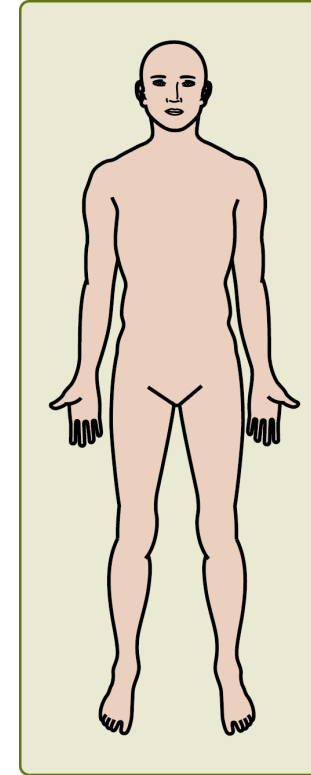
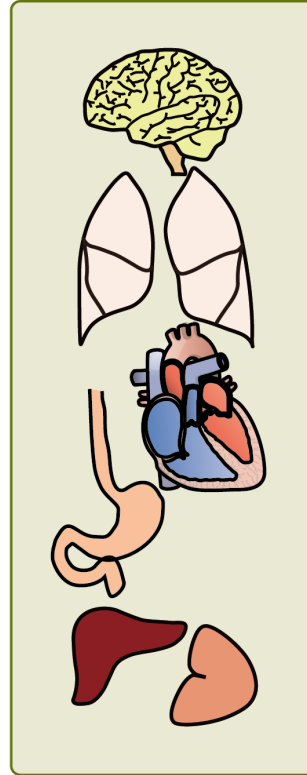
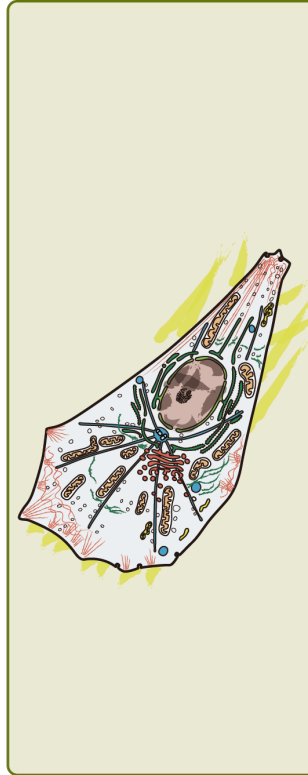
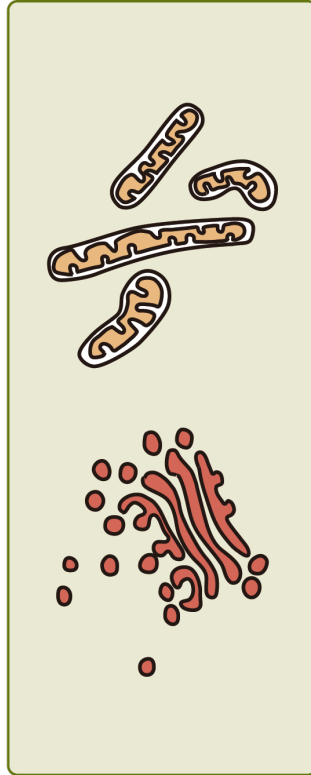
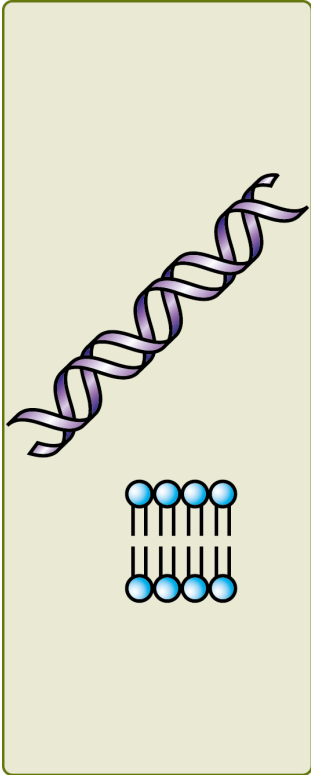
細胞内小器官

細胞

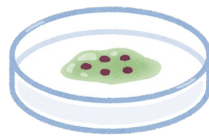
組織・臓器

個体

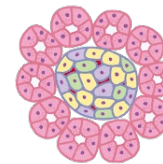
集団



研究を行うレベルは大きく分けると3段階



試験管内



組織



生体



# 生命科学研究では、実験をどのように行ったか？を ラテン語風に記載することが多い

## 具体例

**in silico**  
(インシリコ)

PC/計算

数理モデル解析や予測



**in vitro**  
(インビトロ)

試験管内

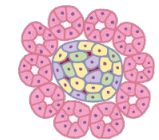
細胞培養など試験管内で完結する解析



**in situ**  
(インサイチュ)

組織内  
(その位置において)

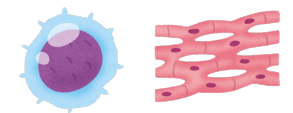
組織切片上での遺伝子発現解析  
(生体内の本来の場所で)



**ex vivo**  
(エクスビボ)

生体から取出

生体から取り出した組織や細胞を  
人工的な環境下で観察・分析



**in vivo**  
(インビボ)

生体内

マウスなど個体レベルの解析

