

✧ 目次概略 ✧

概説 遺伝子工学—誕生から今日まで、そして未来へ

第Ⅰ部 遺伝子・DNAの基礎

- 1章 遺伝子工学で使われる生物
- 2章 DNAの構造と複製
- 3章 遺伝子の発現

第Ⅱ部 基本の酵素からクローニングまで

- 4章 制限酵素、メチラーゼ、リガーゼ
- 5章 核酸の合成、分解、修飾酵素
- 6章 プラスミド、ファージ、トランスポゾン
- 7章 ベクター
- 8章 タンパク質産生制御系
- 9章 組換えDNAの作製と細胞への導入
- 10章 DNAクローニング

第Ⅲ部 核酸の抽出・増幅・シークエンシング

- 11章 核酸の取り扱いと分離
- 12章 塩基配列の検出と解読
- 13章 PCRとその応用
- 14章 遺伝子発現と遺伝子産物の解析

第Ⅳ部 遺伝子工学の応用

- 15章 遺伝子工学関連技術と医療における利用
- 16章 遺伝子操作の安全性と倫理

基礎から学ぶ

遺伝子工学



◆ 目 次 ◆

序	3
---	---

概説	遺伝子工学 —誕生から今日まで、そして未来へ	14
1.	遺伝子工学とは	14
2.	最初の遺伝子工学実験とその意義	15
3.	遺伝子工学を発展させたエポック	15
4.	遺伝子工学の現状と将来	17

第 I 部 遺伝子・DNA の基礎

1章	遺伝子工学で使われる生物	18
1.	遺伝子工学で生物を用いる目的	18
2.	原核生物と真核生物	19
①	原核生物 ② 真核生物	
3.	ゲノムと遺伝子	22
①	遺伝子 ② ゲノム ③ ゲノムサイズと遺伝子数	
4.	大腸菌	23
①	特徴 ② 遺伝子型 ③ 培養 ④ 減菌	
5.	遺伝子工学に登場する真核生物	26
①	酵母 ② 培養動物細胞 ③ 多細胞動物個体 ④ 植物	
	章末問題	28

2章 DNAの構造と複製	29
1. DNAの構造	29
① 遺伝子の実体はDNA ② DNAはヌクレオチドが連結した分子 ③ 細胞のDNAは二本鎖として存在する	
2. DNAの構造変化	34
① 一本鎖と二本鎖の間の変換 ② 切断、剪断 ③ 修飾によるDNA損傷	
3. DNAの複製	37
① DNA合成反応の原則 ② 細胞で起こるDNA複製：レブリコンの複製 ③ DNAポリメラーゼ ④ 試験管内DNA合成	
4. DNAのメチル化	41
① メチル化部位 ② 原核生物でのメチル化 ③ 真核生物でのメチル化	
章末問題	42

3章 遺伝子の発現	43
1. RNA	43
① RNAとは ② 種類と機能	
2. 転写機構	43
① RNA合成：RNAポリメラーゼ ② 転写開始 ③ 転写終結まで ④ 新生RNAの修飾	
3. 原核生物の転写制御	47
① ポリシストロニック転写とオペロン ② ラクトースオペロンの構造と制御機構 ③ 遺伝子工学で汎用される大腸菌の転写制御因子	
4. 真核生物の転写制御	49
① エンハンサーと転写制御因子 ② 制御のメカニズム ③ クロマチンによる転写制御 ④ mRNAの加工・成熟 ⑤ 核外輸送	
5. アミノ酸、ペプチド、タンパク質	52
① アミノ酸 ② ペプチド結合 ③ タンパク質	
6. 翻訳	53
① コドンとtRNA ② 翻訳機構	
7. 真核細胞で翻訳されたポリペプチドの運命	56
① 翻訳後のタンパク質の移動 ② タンパク質の分解	
章末問題	57

第Ⅱ部 基本の酵素からクローニングまで

4章 制限酵素、メチラーゼ、リガーゼ	58
1. 細菌がもつ自己防衛手段：制限と修飾	58
① 現象の発見 ② 制限と修飾の実体	
2. 遺伝子工学における制限酵素発見の意義	60
3. 制限酵素の種類	60
① I～III型酵素 ② 制限酵素の分布	
4. II型制限酵素のDNA認識配列と切断末端	61

① 認識配列と切断部位 ② 粘着末端と平滑末端 ③ 切断地図 ④ 制限酵素の反応性とスター活性	
5. DNA メチラーゼと制限酵素の切断特性	63
① 制限修飾系でのメチル化 ② 大腸菌で増やしたDNAの制限酵素処理での注意	
6. ホーミングエンドヌクレアーゼ	63
7. 粘着末端を利用したDNAの連結	65
① DNAの付着と連結 ② DNAリガーゼ反応の実際 ③ 同一粘着末端をもたないDNA末端の連結方法	
章末問題	67

5章 核酸の合成、分解、修飾酵素 68

1. DNA 合成酵素	68
① 通常のDNA合成用DNAポリメラーゼ ② クレノー断片 ③ 特殊な用途で使われるDNA合成酵素	
2. 核酸分解酵素	72
① 多様な核酸分解酵素 ② DNAに働くエンドヌクレアーゼ ③ DNAに働くエキソヌクレアーゼ ④ 一本鎖を特異的/優先的に分解するヌクレアーゼ ⑤ RNAを分解する酵素: リボヌクレアーゼ (RNase)	
3. DNAの平滑末端化	76
4. 末端リン酸基の脱着	78
① リン酸基の脱着 ② リン酸基脱着反応を遺伝子操作の中で応用する	
5. 組換えDNAからのRNA調製	79
章末問題	80

6章 プラスミド、ファージ、トランスポゾン 81

A. プラスミド

1. プラスミドの基本的な特徴	81
① プラスミドの複製とコピー数 ② 不和合性	
2. 大腸菌のプラスミド	83
① ColE1 ② R因子 ③ F因子	
3. その他のプラスミド	87
① Tiプラスミド ② 他の細菌プラスミド ③ 出芽酵母のプラスミド	

B. 大腸菌のファージ

4. ファージの種類と増殖	88
① ファージとは ② ファージに特徴的な性質 ③ ファージの検出、定量: プラークアッセイ	
5. λ ファージ	90
① 増殖: 溶菌サイクル ② 溶原化サイクル	
6. 一本鎖ファージ: M13	93
① 概要と増殖 ② 利便性	

C. トランスポゾン

7. 概要	94
8. DNAトランスポゾン	94
9. レトロトランスポゾン	95
章末問題	96

A. ベクターの基本

1. 遺伝子組換え実験におけるベクター	97
① ベクターとは ② ベクターの種類と条件 ③ クローニング	
2. 選択マーカー	99
① マーカーの意義 ② 検出方法によるマーカーの分類 ③ 汎用性の高いマーカー：GFP	
3. ベクターの能力にかかる機能性配列	100
① マルチクローニング部位 ② 制御配列	

B. 原核生物のベクター

4. 主な選択マーカー	101
① 抗生物質に対する耐性遺伝子：薬剤耐性遺伝子 ② lacZ 遺伝子と青白選択 ③ 致死マーカー	
5. DNA導入・増幅用の大腸菌プラスミドベクター	105
① プラスミドベクターかファージベクターか？ ② プラスミドベクター用菌株	
③ 古典的サブクローニング用ベクター ④ 多用途汎用ベクター ⑤ 特定の目的で使用されるベクター	
6. 遺伝子発現用の大腸菌プラスミドベクター	107
① 遺伝子発現の基本戦略 ② 大腸菌内の発現の方策	
7. 大腸菌以外の細菌用プラスミドベクター	108
8. 大腸菌用ファージベクター	108
① λ ファージ系クローニングベクター ② 発現可能な λ ファージクローニングベクター	
③ M13 ファージベクター	
9. 混成プラスミドベクター	109
10. 巨大DNAクローニング用ベクター	110

C. 真核生物のベクターとマーカー

11. 真核細胞中での発現制御系	111
① 真核細胞内で働くプロモーター ② 転写後シグナルと翻訳シグナル	
12. 真核細胞で利用されるマーカー	112
① 薬剤耐性遺伝子 ② 代謝欠陥を補う遺伝子 ③ 致死遺伝子 ④ レポーター遺伝子	
13. 酵母・真菌のベクター	114
① ベクターのタイプ ② マーカー遺伝子	
14. 動物細胞用ウイルスベクター	116
① レトロウイルスベクター ② アデノウイルスベクター ③ その他の動物ウイルス	
章末問題	119

1. 発現ベクター	120
2. 大腸菌でタンパク質をつくる場合のポイント	121
① コドンの使用頻度に注意する ② 不溶化防止策を執る ③ 発現させるタイミングを工夫する	
3. 融合タンパク質の作製	122
① β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 融合タンパク質 ② タグ付きタンパク質とその精製	
③ ファージディスプレイ	
4. T7 RNAポリメラーゼによる発現系	125
① pETベクター ② 発現制御系：pETシステム	

5. 真核生物でのタンパク質発現	125
① ピキア発現系 ② バキュロウイルス発現系 ③ テトラサイクリンによる発現制御系 (Tetシステム)	
6. 遺伝子工学で使われるタンパク質分解酵素	128
章末問題	128

9章 組換えDNAの作製と細胞への導入 129

A. 組換えDNAの作製	
1. 伝統的なサブクローニング	129
① サブクローニングとは ② DNAリガーゼによるベクターとDNA断片の連結	
2. 新しい組換えDNA構築法	130
① TOPOクローニング ② LIC法 ③ ゲートウェイクローニング	
B. DNA構築に関連する技術	
3. オリゴヌクレオチド	133
4. 部位特異的変異DNAの作製	134
① トランスフォーマー法 ② 制限酵素 <i>Dpn</i> Iを使う方法	
5. cDNAの合成	135
① 真核生物mRNAの調製 ② cDNAの合成	
C. 細胞へのDNA導入	
6. DNA導入の一般的な方法	137
7. 原核生物(大腸菌)へのDNA導入	137
① 形質転換とコンピテント細胞 ② ファージ感染 ③ 目的クローンの決定	
8. 動物細胞へのDNA導入	139
① トランسفエクション ② その他の物理的方法	
③ ウィルスベクターを用いる方法 ④ 細胞に入ったDNAの運命	
9. 植物細胞: TiプラスミドDNAに基づく方法	140
章末問題	141

10章 DNAクローニング—ライブラリーの作製とクローンの単離 142

A. 伝統的なクローニング法	
1. 伝統的なDNAクローニングの概要	142
2. DNAライブラリー: クローニングの材料	142
① ファージベクターを使うか、プラスミドベクターを使うか	
② λ ファージを使ったDNAライブラリーの作製 ③ プラスミドを使ったDNAライブラリーの作製	
3. ゲノミックライブラリーの作製	145
① ライブラリー作製の要点: DNAサイズを揃える ② ハイブリダイゼーションによるクローンの選択	
B. cDNAクローニング	
4. cDNAライブラリーの作製	147
① ライブラリー作製の要点 ② 特異的クローン濃縮のためのサブトラクション	
③ ディファレンシャルディスプレイ	
5. cDNAクローンの選択	149
① 結合性に基づく発現クローニング ② 機能性クローニング	

C. 現在のクローニング事情

6. ゲノム情報とPCRを活用したクローニング	152
章末問題	152

第Ⅲ部 核酸の抽出・増幅・シークエンシング

11章 核酸の取り扱いと分離 153

1. 核酸の物理化学的性質	153
① DNAの性質 ② RNAの性質	
2. DNAの調製	153
① 細胞からのゲノムDNAの抽出 ② 細菌からのプラスミド抽出	
③ DNAの精製 ④ 核酸の濃度測定	
3. RNAの扱い	157
4. 核酸の濃縮	157
① 核酸のエタノール沈殿 ② その他の濃縮法	
5. ゲル電気泳動による核酸の分離	159
① 通常ゲル（中性ゲル）による電気泳動 ② 変性ゲルによる電気泳動	
③ ゲルの素材と形状 ④ 特別な目的のための電気泳動	
6. 超遠心分離機による核酸の分離	162
① ゾーン遠心分離法 ② 塩化セシウム平衡遠心分離法	
③ 塩化セシウム-EtBr平衡遠心法：形態によるDNAの分離	
章末問題	165

12章 塩基配列の検出と解読 166

1. 核酸のハイブリダイゼーション	166
① ハイブリダイゼーションとは ② T_m に影響を与える要因	
③ ハイブリダイゼーションの実施条件	
2. プローブの作製：DNAの標識	169
① 放射性同位体（RI）とは ② DNAをRI標識する方法（A）：DNA合成による方法	
③ DNAをRI標識する方法（B）：末端のリン酸標識による方法	
④ RIを画像として検出する：オートラジオグラフィー	
3. ハイブリダイゼーションによる核酸の検出法	172
① サザンブロッティング ② ノーザンブロッティング	
③ <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションとFISH	
4. ジデオキシ法によるシークエンシング	174
① 原理 ② 一本鎖DNA鋳型の準備 ③ 反応、電気泳動、検出	
④ 現在までに改良された点（昔のものから順に）	
5. DNAシークエンサー	177
① ジデオキシ法に基づくシークエンサー ② 次世代シークエンサー	
6. バイオインフォマティクスを用いた塩基配列情報解析	179
① バイオインフォマティクスとは ② 必要な要素	
章末問題	180

13章 PCRとその応用

181

1. PCRの原理	181
2. 材料と反応条件	182
① プライマーの設計 ② 耐熱性酵素の選択 ③ 反応液とサイクルプログラム ④ ホットスタートPCR ⑤ 修飾温度サイクル	
3. 遺伝子工学におけるPCRの目的	186
① DNAの検出、増幅、シークエンシング ② RNAの検出 ③ PCR産物のサブクローニングへの使用 ④ 塩基配列の付加や変更のための利用 ⑤ DNAの多型解析、変異解析への応用	
4. 定量PCR	189
① 定量PCRとは ② リアルタイムPCRの原理 ③ 発光系	
章末問題	190

14章 遺伝子発現と遺伝子産物の解析

191

1. 遺伝子の発現状態の解析	191
① 検索の戦略：個々か全体か？新規か既知か？ ② 特定のRNAの検出・解析・同定 ③ タンパク質の検出・同定	
2. 細胞を使った遺伝子の機能解析	197
① 導入遺伝子の一過的発現と安定的発現 ② レポーター・アッセイとその応用：転写系を利用した解析 ③ 遺伝子ノックダウン法	
3. 試験管内反応による遺伝情報の発現	200
① <i>in vitro</i> 転写 ② <i>in vitro</i> 翻訳	
4. 情報高分子間の相互作用解析	202
[A] タンパク質と核酸の相互作用の解析方法 ① 細胞を使う方法 ② <i>in vitro</i> 反応による方法 [B] タンパク質間相互作用の解析方法 ① 細胞を使う方法 ② 細胞抽出液を使う方法 ③ タグ付きタンパク質を使う方法 ④ ファーウエスタン法 ⑤ 結合タンパク質を網羅的に検索するさまざまな方法 ⑥ それ以外の方法	
章末問題	206

第IV部 遺伝子工学の応用

15章 遺伝子工学関連技術と医療における利用

207

1. タンパク質工学	207
① タンパク質工学とは ② タンパク質工学の利点	
2. RNA工学	208
① RNA工学とその利点 ② RNAによる遺伝子機能の抑制 ③ RNAの結合性の利用 ④ RNAの触媒能の利用	
3. 細胞、組織、個体発生を操作する技術	210
① 細胞工学 ② 発生工学 ③ クローン動物 ④ 組織工学とES細胞、iPS細胞 ⑤ 再生医療	
4. ゲノム工学	213
① 遺伝子ターゲティング ② トランスジェニック動物 ③ 植物の遺伝子操作と遺伝子組換え食品	
5. 遺伝子治療	215
① 遺伝子治療という選択肢 ② 対象となる疾患、遺伝子 ③ 伝統的アプローチ ④ RNAを発現させる方策	

6. ゲノム解析とテーラーメード医療	217
① 遺伝子多型解析と遺伝子診断	217
② テーラーメード医療	
7. 遺伝子工学と創薬	218
章末問題	218

16章 遺伝子操作の安全性と倫理 219

A. 遺伝子組換え実験での安全確保	
1. 遺伝子組換え実験の自己規制	219
2. カルタヘナ法の成立	219
① その後の経過	219
② カルタヘナ議定書	
3. 遺伝子組換え生物の使用と実験の種類	220
① 遺伝子組換え生物等 (LMO) の使用形態と実験の申請	220
② 機関承認実験と大臣確認実験	220
③ 実験分類	
4. 実験の種類と拡散防止措置	223
① 実験の種類	223
② 拡散防止措置	
5. 留意すること	225
B. 遺伝子工学関連領域に関する倫理と安全性	
6. 遺伝子組換え食品の安全性	226
7. 遺伝子情報や個人試料の管理と利用	227
8. ヒトを対象にする操作	227
① 操作における倫理	227
② 遺伝子治療の問題点	
章末問題	229

付 錄	230
章末問題 解答	236
索 引	247

Column コラム

- | | |
|------------------------|------------------------------|
| ● リンの代わりにヒ素を用いる細菌／22 | ● 遺伝子工学の黎明期：日本では／141 |
| ● RNA ワールド仮説／45 | ● 南西クローニング？／151 |
| ● 制限修飾系は日本でも発見されていた／59 | ● ヒトゲノム解読レースのもたらしたもの／178 |
| ● 逆転写酵素：その発見から普遍性へ／71 | ● 社会の中で使われているPCR／190 |
| ● 抗生物質とペニシリン／85 | ● クローンヒツジ「ドリー」誕生の興奮とその顛末／212 |