

# ❖ 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・シーケンシング

**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
---	---

<b>概説</b>	<b>遺伝子工学</b>	—誕生から今日まで，そして未来へ—	<b>14</b>
-----------	--------------	-------------------	-----------

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

<b>1 章</b>	<b>遺伝子工学で使われる生物</b>	<b>18</b>
------------	---------------------	-----------

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 滅菌	
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	

<b>章末問題</b>	<b>28</b>
-------------	-----------

2章	DNAの構造と複製	29
1. DNAの構造	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	29
2. DNAの構造変化	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	34
3. DNAの複製	① DNA合成反応の原則 ② 細胞で起こるDNA複製：レプリコンの複製 ③ DNAポリメラーゼ ④ 試験管内DNA合成	37
4. DNAのメチル化	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	41
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わる機能性配列	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 <i>lacZ</i> 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 大腸菌内での発現の方策	
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 $\lambda$ ファージ系クローニングベクター ② 発現可能な $\lambda$ 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 $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -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 トランスフェクション ② その他の物理的方法	
③ ウイ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・シーケンシング

## 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	
3. ハイブリダイゼーションによる核酸の検出法	172
① サザンブロットング ② ノーザンブロットング 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ケンシング	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シーケンサー	177
① ジデオキシ法に基づくシーケンサー ② 次世代シーケンサー	
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

<b>13章</b>	<b>PCRとその応用</b>	<b>181</b>
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 塩基配列の付加や改変のための利用 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	
	<b>章末問題</b>	190

<b>14章</b>	<b>遺伝子発現と遺伝子産物の解析</b>	<b>191</b>
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	
	<b>章末問題</b>	206

## 第Ⅳ部 遺伝子工学の応用

<b>15章</b>	<b>遺伝子工学関連技術と医療における利用</b>	<b>207</b>
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イド医療 .....	217
① 遺伝子多型解析と遺伝子診断   ② テーラーメイド医療	
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   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	
② 機関承認実験と大臣確認実験   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   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   ② 遺伝子治療の問題点	
章末問題 .....	229

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