

❖ 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：化学構造，複製，構造変化

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，DNAメチラーゼ，DNAリガーゼ

5章 核酸の合成，分解，修飾に関する酵素

6章 プラスミド，ファージ，トランスポゾン

7章 ベクター —DNAの導入，増幅，発現，組込みのツール

8章 DNAクローニング —新規クローンの単離とサブクローニング

9章 タンパク質産生制御系

第Ⅲ部 核酸の取り扱いと構造機能解析

10章 核酸の取り扱いと検出

11章 PCRによるDNAの増幅

12章 DNAシーケンシングとゲノム解析

13章 遺伝子発現と遺伝子産物の解析

14章 エピゲノムとその解析

第Ⅳ部 遺伝子工学の応用と安全性の確保

15章 ゲノム工学と関連技術

16章 小型核酸による細胞機能の特異的制御

17章 医療における遺伝子工学

18章 遺伝子操作における安全性確保：カルタヘナ法

❖ 目 次 ❖

第3版の序	3
第2版の序	4
初版の序	5

概説 遺伝子工学 —誕生から今日まで、そして未来へ 18

1. 遺伝子工学とは	18
2. 最初の遺伝子工学実験とその意味	19
3. 遺伝子工学を発展させたエポック	19
4. 遺伝子工学はどのように活かされているか	21
5. 遺伝子工学の未来	22

第 I 部 遺伝子・DNA の基礎

1章 遺伝子工学で使われる生物 23

1. 遺伝子工学で生物を用いる目的	23
2. 原核生物と真核生物	24
① 原核生物 ② 真核生物	
3. ゲノムと遺伝子	27
① 遺伝子 ② ゲノムと含まれる遺伝子	
4. 大腸菌	28
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	31
① 酵母 ② 多細胞動物個体 ③ 植物 ④ 培養動物細胞	
6. 遺伝子工学に利用される動物ウイルス	32
① ウイルスとは ② 使用される主なウイルス	
章末問題	33

2章 DNA：化学構造，複製，構造変化 34

1. DNAの構造	34
① DNAはヌクレオチドが連結した分子 ② 細胞のDNAは二本鎖として存在する	
2. DNAの構造変化	38
① 一本鎖と二本鎖の間の変換 ② 切断，剪断	
3. DNAの複製	41
① DNA合成反応の原則 ② 細胞内で起こるDNA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	44
① メチル化部位 ② 原核生物でのメチル化	

5. DNAの変異, 損傷, 修復, および組換え	45
① DNAの変異 ② DNAの損傷 ③ 損傷DNAの修復 ④ DNAの組換え	

章末問題	47
------	----

3章 遺伝子の発現 48

1. RNA	48
① RNAとは ② RNA機能の多様性 ③ 遺伝子発現制御能をもつncRNA ④ RNAのそれ以外の機能	
2. 転写機構	50
① RNA合成: RNAポリメラーゼ ② 転写開始 ③ 転写終結まで	
3. 原核生物の転写制御	52
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 <i>lac</i> オペロンのグルコース効果	
4. 真核生物の転写制御	54
① エンハンサーと転写制御因子 ② 制御のメカニズム	
5. 転写後のできごと: RNAの加工と成熟	55
① mRNAの末端修飾 ② スプライシング ③ その他の加工	
6. アミノ酸, ペプチド, タンパク質	57
① アミノ酸 ② ペプチド結合 ③ タンパク質	
7. 翻訳	59
① コドンとtRNA ② 翻訳機構	
8. 真核細胞で翻訳されたポリペプチドの運命	62
① 翻訳後のタンパク質 ② タンパク質の分解	

章末問題	63
------	----

第Ⅱ部 基本の酵素からクローニングまで

4章 制限酵素, DNAメチラーゼ, DNAリガーゼ 64

1. 細菌がもつ自己防衛手段: 制限と修飾	64
① 現象の発見 ② 制限修飾の実体	
2. 制限酵素発見の意義	66
3. 制限酵素の種類	66
① I~Ⅲ型酵素 ② 制限酵素の分布	
4. Ⅱ型制限酵素の反応特性	67
① 認識配列と切断部位 ② 反応様式と切断面 ③ 制限酵素のスター活性	
5. DNAメチラーゼと制限酵素の切断特性	68
① 制限修飾系でのメチル化 ② 大腸菌で増やしたDNAのメチル化に関する注意	
6. ホーミングエンドヌクレアーゼ	69
7. 粘着末端を利用したDNAの連結	70
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	72
------	----

5章 核酸の合成, 分解, 修飾に関する酵素 73

1. DNA合成酵素 73
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 76
① 核酸分解酵素の区分 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 一本鎖特異的ヌクレアーゼ ⑤ RNAを分解する酵素: リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)

3. DNAの平滑末端化 80

4. 末端リン酸基の脱着 82
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 *in vitro* RNA合成 82

章末問題 83

6章 プラスミド, ファージ, トランスポゾン 84

A. プラスミド

1. プラスミドの概要 84
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 86
① ColE1 ② R因子 ③ F因子

3. その他のプラスミド 89
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 90
① ファージとは ② ファージの一般的性質 ③ ファージの検出と定量: プラークアッセイ

5. λファージ 92
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 94
① 概要と増殖 ② 利便性

C. トランスポゾン

7. 概要 95

8. DNAトランスポゾン 95

9. レトロトランスポゾン 96

章末問題 97

7章 ベクター — DNAの導入, 増幅, 発現, 組み込みのツール 98

A. ベクターの基本

1. ベクターとクローニング 98
① ベクターとは ② ベクターの使用目的と材料別ベクターの種類
③ ベクターとしての要件 ④ クローンとクローニング

2. 選択マーカー 100
① マーカーの意義と原理 ② 検出方法によるマーカーの分類

3. ベクターの能力にかかわる機能性配列 101
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	102
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 致死ベクター	
5. 大腸菌のプラスミドベクター	105
① 古典的・標準的なプラスミドベクターと使われる菌株	② 多用途汎用ベクター
③ 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. 大腸菌用ファージベクター	108
① λ ファージ由来の一般的クローニングベクター	② λ ファージ由来発現ベクター
③ M13 ファージベクター	④ 混成ベクター
C. 真核生物のベクターとマーカー	
8. 真核細胞中での発現制御系	109
① 真核細胞で使われるプロモーター	② 転写後シグナルと翻訳シグナル
9. 真核細胞で利用されるマーカー	110
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
10. 酵母・真菌のベクター	112
① ベクターのタイプ	② マーカー遺伝子
③ カウンター選択	
11. 動物細胞用ウイルスベクター	114
① レトロウイルスベクター	② レンチウイルスベクター
③ アデノウイルスベクター	④ その他の動物ウイルス
D. トランスポゾンベクター	
12. トランスポゾンベクター	117
① 概要	② DNA型トランスポゾンベクターの使い方と特徴
③ 動物細胞で使われるベクター	
章末問題	119

8章 DNA クローニング —新規クローンの単離とサブクローニング 120

A. 古典的なゲノム DNA のクローニング法	
1. 古典的 DNA クローニングの概要	120
2. ゲノミッククローニングの実際	120
① ベクターの選択	② ライブラリー用 DNA の調製
③ 目的クローンの選択	④ PCR による選択
B. 古典的 cDNA クローニング法	
3. cDNA ライブラリーの作製	123
① ライブラリー作製の要点	② 特異的 cDNA の濃縮
4. cDNA に特異的なクローン選択法	125
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. ポストゲノム時代の遺伝子クローニング	
5. 現在のクローニング戦略	126
① クローニング戦略の変化	② ゲノム DNA のクローニング
③ cDNA クローニング	
D. 組換え DNA の再構築：サブクローニング	
6. 標準的なサブクローニング戦略	128
① サブクローニングとその手順	② DNA リガーゼによるベクターと DNA 断片の連結
7. 新しい PCR 産物クローニング法	129
① 末端の特別な構造を介する組換え体の構築	② シームレスクローニング
E. 重要な DNA 構築技術	
8. オリゴヌクレオチド	132

9. 部位特異的変異の導入	133
① 概要 ② <i>Dpn</i> I を使って変異DNAを作製・濃縮する方法	
10. cDNAの合成	134
① 真核生物 mRNA の調製 ② cDNA の合成	
F. 細胞へのDNA導入	
11. 原核生物（大腸菌）へのDNA導入	136
① プラスミドによる形質転換 ② ファージ感染 ③ 目的クローンの選別と決定	
12. 動物細胞への核酸導入	137
① トランスフェクション ② ウイルスベクターを用いる方法	
13. 植物細胞への導入：Tiプラスミドを使う方法	139
章末問題	140

9章 タンパク質産生制御系 141

1. 真核生物タンパク質の発現・産生	141
① 原核細胞での発現 ② 真核細胞での発現	
2. 大腸菌でタンパク質をつくる場合の注意点	142
① 塩基配列とコドンバイアス ② 不溶タンパク質の可溶化と不溶化防止策 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	144
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 ポリメラーゼ発現系	146
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	147
① 真核細胞発現ベクターに求められる要素 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	149
章末問題	150

第Ⅲ部 核酸の取り扱いと構造機能解析

10章 核酸の取り扱いと検出 151

A. 取り扱い

1. 核酸の物理化学的性質	151
① 核酸一般の性質 ② DNA 特有の性質 ③ RNA 特有の性質	
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 細胞から抽出したDNAの精製	
3. RNAの扱い：常に「分解阻止」を念頭に置く	155
4. 核酸の濃縮	155
① 核酸のエタノール沈殿 ② その他の濃縮法	

B. 核酸同士の分離

5. ゲル電気泳動による核酸の分離	157
① ゲルの素材と形状 ② 通常ゲル（中性ゲル）による電気泳動 ③ 変性ゲルによる電気泳動 ④ 特別な目的のために行う電気泳動 ⑤ ゲルからのDNA抽出	

6. 超遠心分離による核酸の分離	160
C. 核酸の視覚的検出と定量	
7. 蛍光を用いて核酸を視覚化する	160
① 概要 ② 核酸検出法	
8. 核酸の紫外外部吸収	161
① 核酸の定量 ② 核酸の純度	
D. ハイブリダイゼーションによる核酸配列の探査	
9. ハイブリダイゼーション探査の概要	162
10. 核酸ハイブリダイゼーションの基礎	163
① T_m に影響を与える要因 ② ハイブリダイゼーション実施条件	
11. プローブの作製：DNAの標識	165
① DNAのRI標識法 ② 非RI標識DNAの調製	
12. 標識プローブの検出	166
① RIプローブの検出：オートラジオグラフィー ② 非RIプローブの検出	
13. ハイブリダイゼーション検出の実際	167
① サザンブロットング（RIプローブを使う例） ② ノーザンブロットング	
③ 基盤付着DNAの検出 ④ <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	
章末問題	170

11章 PCRによるDNAの増幅 171

1. PCRの原理と概要	171
2. 材料と反応条件	172
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 修飾温度サイクリング	
3. 遺伝子工学におけるPCRの利用	177
① PCRの基本的な使われ方 ② 微量DNA中の特定配列検出への応用	
③ DNAシーケンシングへの応用 ④ RNAの検出 ⑤ 新たな構造をもつDNAの作製	
⑥ クロマチン結合タンパク質の検出	
4. PCR産物の直接クローニング/サブクローニング	180
5. リアルタイムPCR	181
① リアルタイムPCRとは ② 蛍光検出系 ③ DNAが定量できる原理	
6. デジタルPCR	183
① 原理 ② 概要と応用	
7. PCRによらないDNA増幅法	184
① 概要 ② 非PCR DNA増幅の要点 ③ ICAN法 ④ LAMP法 ⑤ RCA法 ⑥ SATIC法	
⑦ SmartAmp法	
章末問題	187

12章 DNAシーケンシングとゲノム解析 188

1. ジデオキシ法によるマニュアルシーケンシング	188
① 原理 ② 一本鎖鋳型DNA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）	
2. DNAシーケンサー（第一世代シーケンサー）	191
3. 標準的次世代シーケンサー：NGS	192
[A] 第二世代シーケンサー ① PCR増幅と均一DNA集団の形成 ② 反応系	
[B] 第三世代シーケンサー	

[C] NGSを活用する	① NGSを使用するまでの操作フロー：ライブラリー作製	② NGSの応用	
4. 第四世代NGS：ナノポアシーケンサー			197
① どういうものか	② 検出の概要と使い方	③ 利便性、応用性、発展性	
5. ゲノム解析			199
① NGS以前	② NGS以後		
章末問題			202

13章 遺伝子発現と遺伝子産物の解析 203

1. 内在性遺伝子の発現状態の解析			203
① RNAやタンパク質の構造決定や同定の戦略	② 特定のRNAの検出・解析・同定		
③ RNAの網羅的解析	④ タンパク質の検出・同定		
2. シングルセル解析			210
① 概要	② 解析のプラットフォームとscRNA-Seqの実施		
3. 細胞を使った遺伝子の発現機能解析			211
① 導入遺伝子の一過的発現と安定発現	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		
4. <i>in vitro</i> での遺伝子発現解析と遺伝子産物合成			214
① <i>in vitro</i> 転写	② 細胞抽出液による伝統的 <i>in vitro</i> 翻訳	③ PUREシステム：再構成遺伝子発現系	
5. タンパク質-核酸相互作用の解析			215
① <i>in vitro</i> 反応による方法	② 細胞内での相互作用の検出		
6. タンパク質同士の結合の解析			216
① 免疫沈降-ウエスタンブロットティング法	② 結合能をもつタグ付きタンパク質を使う方法		
③ 細胞を使う方法	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その他の方法	
7. イメージング解析			219
① 光学顕微鏡とその発展形	② 電子顕微鏡	③ 走査型プローブ顕微鏡	
章末問題			221

14章 エピゲノムとその解析 222

A. クロマチンとエピゲノム

1. クロマチンの基本構造			222
① クロマチンとは	② ヌクレオソームとヒストン	③ ヌクレオソーム形成反応	
④ 高次クロマチン構造：クロマチンの階層的折り畳み			
2. エピゲノム：修飾されたクロマチン			225
① DNAのメチル化	② ヒストンの化学修飾	③ ヌクレオソームアレイの変更	
④ クロマチン会合分子			
3. エピジェネティクス			228
① ゲノムインプリンティング	② X染色体不活化	③ 遺伝子の位置効果による斑入り	

B. クロマチン、エピゲノムの解析

4. 解析方針			230
5. メチル化DNAの検出			231
① メチル化DNAの分離・調製	② メチル化DNA配列の同定		
6. クロマチンタンパク質の解析			232
① 解析の概要	② 個別部位における結合タンパク質の解析：ChIPアッセイ		
③ 結合部位の網羅的同定			
7. 高次クロマチン構造の解析			234
① 古典的なクロマチン分析法	② オープンクロマチン領域の解析	③ 3C法およびその関連法	
章末問題			236

第IV部 遺伝子工学の応用と安全性の確保

15章	ゲノム工学と関連技術	237
1.	ゲノム工学とは	237
A.	遺伝子導入個体の作出とそれに付随する技術	
2.	遺伝子導入（トランスジェニック）個体の作製	239
	① 作製法 ② トランスジェニック実験の評価	
3.	植物の生命工学	242
	① 植物を対象とする生命工学 ② 植物細胞への遺伝子導入 ③ 植物に特有な問題	
B.	ゲノムを狙った通りに改変する技術	
4.	遺伝子ターゲティング	244
	① 概要 ② 条件（コンディショナル）ノックアウト	
5.	ゲノム編集	245
	① 背景と概要 ② 初期に開発された方法 ③ 現在の主流：CRISPR/Cas9法 ④ CRISPR/Cas9法の課題	
6.	新しい時代のCRISPR/Cas9利用法	248
	① 基盤技術の進歩 ② Cas9をニッカーゼとして使う ③ トランスポゾンとの相互作用を利用する ④ エフェクターの多様な機能を利用する ⑤ 因子集積プラットフォームとして使う	
	章末問題	251
16章	小型核酸による細胞機能の特異的制御	252
A.	総論	
1.	特異的細胞制御因子としての小型核酸	252
	① 概要 ② 使い方	
2.	使用に関する基本的留意点	254
	① 分解抵抗性付与 ② 細胞移入法 ③ オフターゲット効果	
B.	各論	
3.	アンチセンス核酸	255
	① 概要 ② 作用機構 ③ 分子デザイン ④ ヘテロ二本鎖としての使用	
4.	siRNAとRNA干渉	256
	① RNA干渉：始まりと概要 ② 遺伝子ノックダウン ③ 遺伝子抑制機構 ④ siRNAのデザイン ⑤ shRNAによる恒常的遺伝子抑制	
5.	マイクロRNA	259
	① マイクロRNA（miRNA）とは ② miRNAにかかわる核酸医薬	
6.	アプタマー：結合性核酸	260
	① アプタマーの発見 ② 改良や応用	
7.	リボザイム	261
8.	デコイとしての使用	261
9.	自然免疫賦活化活性をもつCpGオリゴ	262
	章末問題	262

17章 医療における遺伝子工学 263

A. 医薬

- 1. 新規創薬モダリティの移り変わり 263
- 2. 抗体医薬 263
 - ① 免疫療法 ② 単クローン抗体とその作製 ③ 単クローン抗体のヒトへの適用
 - ④ 抗体の医薬としての使い方 ⑤ 抗体医薬の進化
- 3. 核酸を医薬として使う 266
 - ① 核酸医薬というモダリティ ② 薬剤の組織デリバリー（送達） ③ 毒性
- 4. 核酸ワクチン 269
 - ① ワクチンとは ② 核酸ワクチンの多様性

B. 治療

- 5. 遺伝子治療 270
 - ① 遺伝子治療という選択肢 ② 遺伝子治療の経緯 ③ 遺伝子導入のためのベクター
 - ④ 遺伝子改変T細胞療法 ⑤ その他の取り組み

C. 細胞の脱分化・分化・移植

- 6. 幹細胞工学, 組織工学, 再生医療 273
 - ① 分化, 幹細胞, 再生 ② 人工的な多能性幹細胞 ③ 多能性幹細胞を使う再生医療
 - ④ 分化細胞の移植に関する課題 ⑤ iPS細胞を用いるその他の取り組み

D. 新しい時代の生命科学

- 7. 膨大なデータに基づく生命科学 276
 - ① シングルオミクスからトランスオミクスへ ② 生命情報に基づく医学・医療
 - ③ 最新生命科学研究の潮流

章末問題 277

18章 遺伝子操作における安全性確保：カルタヘナ法 278

- 1. 遺伝子組換え実験の自己規制 278
- 2. カルタヘナ法の成立 278
 - ① その後の経過 ② カルタヘナ議定書 ③ 法令で使用される用語の意味
 - ④ 法令に規制されない遺伝子組換え実験
- 3. 遺伝子組換え生物の使用と実験分類 280
 - 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 282
 - ① 実験の種類 ② 拡散防止措置
- 5. 留意すべきこと 285

章末問題 286

付 録 287

索 引 294