

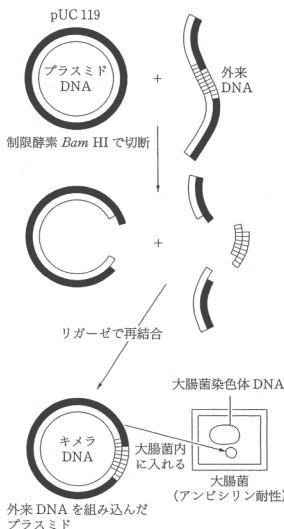
大阪大学 Z-sce 分子生物学実習 Ver.16

科学や思考をエンジョイし、大きな感動と生きる力を与える

3日間延べ24時間以上に及ぶ **科学的キャリア教育「ジャイアントインパクト」**

実習期間 連続3日間(9時~19時過ぎ)
事前学習(別日)

場所 大阪大学理学部本館
生物科学科 学生実験室(b236)



大阪大学大学院理学研究科

吉本和夫

e-mail: yosimoto@bio.sci.osaka-u.ac.jp

Z-sce (ゼット・シー) 大阪大学 高大接続教育 origin×科学的キャリア教育実践団体 代表

目 次

● 大阪大学 Z-sce 分子生物学実習「ジャイアントインパクト」	p.1
● 大腸菌形質転換実験の基礎知識	p.2 ~ p.3
● 遺伝子操作の基礎知識	p.4 ~ p.8
● この実習のあらすじ	p.9
● 実習計画・日程	
➢ 1日目	p.10 ~ p.13
➢ 2日目	p.14
➢ 3日目	p.15 ~ p.17
● 事後提出課題	p.18
● 物質化学構造式一覧	p.19
● 引用文献及び参考文献・資料	p.20
● 事前学習資料・当日学習資料	p.28 ~ p.55
● 資料	
➢ 遺伝暗号表 (コドン表)	p.59
➢ pUC119 の塩基配列図	p.60 ~ p.64
➢ 制限酵素認識配列一覧・制限酵素緩衝液対応表など	p.65 ~ p.68
➢ 基礎実験マニュアル	p.69 ~ p.73
➢ 分子生物学基礎知識	p.74 ~ p.82

(注) 参考の図は、おもにヴォート生化学 (東京化学同人) 及び TaKaRa 遺伝子工学製品ガイド (宝酒造) から引用した。



大阪大学 Z-sce 分子生物学実習 学びを生きる力に変える 科学的キャリア教育

※ 実習紹介HP <http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/kojitsu/DNA/index.html>

(大阪大学理学部生物科学科公開講座 実施主担 吉本和夫)

主催：大阪大学大学院理学研究科 生物科学専攻

実施主担当：(実習窓口・連絡先)：吉本和夫 Email: yosimoto@bio.sci.osaka-u.ac.jp

実習実施団体名 Z-sce (ゼット・シー) ⇒ <http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/kojitsu/Z-sce/>

大阪大学 高大接続教育 origin×科学的キャリア教育実践団体

27 年前から始まった日本最古の高大連携教育 origin

高校生から大学生・院生まで教育する総合的な教育システム

遺伝子組換え実験などを通じて純粋に実験と思考を楽しんで、科学の世界の社会人基礎力をしっかり学びます！

求めるものは生きる力 Zest for living

日本で唯一の科学的キャリア教育 Scientific career education

「今何のために勉強しているのかを考えさせるための教育」

「いかにすれば学びを生きる力に変えることができるのか」という教育の本丸に迫るのは、本実習だけです！

「思考のプロセスを徹底的に追いかける」ことで 思考を楽しむ力に迫るのが阪大 Z-sce 実習です。

優れた阪大生院生チューターと 実験や思考のキャッチボール を楽しんでください！

※参加高校生の声は以下のHPでご確認ください。 http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/kojitsu/DNA/index.html#student_reports

この実習は、「高校と大学の理想的な接続」を可能にすることのみならず、若者達に潜在する科学的能力や学ぶ意欲を引き出し、**実社会のニーズに応える科学技術人材育成を可能にするための「科学的キャリア教育高大連携システム」**でもあります。よって、本実習では、科学的思考のプロセスを重視して、現実の実験科学の世界で自己の能力を知り、その自己適性を考える機会を与えることによって、今後の主体的な人生展開を可能にしています。また、分子生物学に留まらず幅広い科学の世界に適する科学的思考の過程を通じて、適性を考えていくので、物理・化学系や工学系などの非生物系各分野への進路を考えている方々にも効果的なキャリア教育となっています。

1. 実習概要 遺伝子組換え実験や電子顕微鏡実習・生徒立案前自実験・キャリア教育訓講、阪大研究科研究室見学

大阪大学で、「遺伝子組換えや電子顕微鏡実習・研究紹介などを3日間延べ24時間以上かけて行う。この実習の内容は、DNAの制限酵素処理・再結合処理・形質転換・抽出・電気泳動分析・ゲル分析そして電子顕微鏡実習などとなっています。また、この実習は、オープンなセミナーのような大学説明会ではなく、単に、大学生活の節を過ごし、施設を見学して回るようなものではない。つまり、高校生が大学における実際の研究者の生活を3日間かけて体験して、**実社会を知り、自己を見つめ、自己の適性を考えるためのものである。**

2. 目的 「科学や思考を楽しむ力を育成し、今何のために勉強しているのかを考えることによって学びを生きる力に変える」

「高校生が人生を変え、大学生が院生を超えること」＝ 科学や研究への意欲に点火させる「二段ロケット」

この実習は、単に科学技術を体験することのみを目的とせず、遺伝子組換えなどの分子生物学実験とこれらの実験に関する小問を通して、結論を急ぐことなく科学や思考をエンjoyししながら、生命の本質に迫る。市販の実験キットは一切排除し、極力すべての実験手順・操作を体験させる。その意義を考えることによって科学の本質に迫り、「わかるということ」「かかっているということ」のかを学ぶ。また、実験結果をもとに科学的思考過程（情報活用）の実践的トレーニングを行うが、「科学的思考とは何か」から始め、問題発見、仮説の設定、検証実験立案・実施、問題解決、未知への挑戦などを体験しながら、純粋に実験や思考を楽しむ、科学の基礎基本をしっかりと学びます。

本実習では自然科学の世界に入り若者達は多くの苦難を乗り越えていくことになるが、この過程で「大きな感動と衝撃」（ジャイアントインパクト）を与えられることによって、科学への意欲、明日への希望や生きる力を育み、「今何のために勉強しているのか」をあらためて考えさせ、自らの力でその答えに到達させる。また、いち早く現実の大学生活や研究現場を体験させることによって、より正確な進路選択を可能にする「科学的キャリア教育」である。さらに、高校生を指導する大学生は、長時間の指導や準備を行うため多くのことを学び、劇的な成長を遂げ、院生をも超えてしまう。中々ならぬ大学生生活に近を入れ「大学に何のために入学したのか？」を今一度再確認し、科学や研究への意欲に再度点火させる「二段ロケット」のような役目を果たす。

理科教育や高大連携教育のノウハウを伝えるために研修者の受け入れも行う。高校生と一緒に実習を体験しながら、高校生が3日間でのように変化していくかを見ていた。これは、単なる教員研修とは異なり、高校生の存在する教育現場での実地研修となり、さらにレベルの高い成果が期待できる研修でもある。

3. 対象 高校生（主に2年生理進進学希望者）高大連携研修者（教員・研究員など） 大学1回生など 約30名

4. 日程 実習当日：連続3日間（9時～19時過ぎ） 事前指導授業（別日）にオンラインで実施 学校参加は別日各高校で実施

5. 場所 大阪大学理学部本館2階生物学生実験室b236・生物科学科研究室など

6. 指導者 大阪大学大学院理学研究科研究員 吉本和夫（全体進行・解説）

その他 大阪大学の教員・学生・院生（高校生の時に本実習を体験した者も含まれる）

7. 交通 地下鉄御堂筋線：梅田～千里中央（約20分）→南改札口から南へ徒歩約5分

→大阪モノレール：千里中央～堺原（約5分）→進行方向へ徒歩約5分

8. 持ち物 実習書・配布物・生物図録・化学図録・ノート・筆記用具・交通費など

9. 参加条件（申込書内容などによる事前審査があります）参加には保護者の承諾同意が必須で、学校参加は各校引率教員必須。

① 3日間の全ての実習に必ず参加・履修が必要です。「遅刻早退」は認められません。

② 実習終了後、この実習に関する感想文（1000字程度）・アンケート・事後提出課題をWordファイルで必ず提出できる方。

③ この実習に必要な予備知識（遺伝子・DNA・酵素・タンパク質・ラクトースオペロン）等を学習する事前指導を事前に行うとした方。

本実習は3日間、朝は早く晩は19時30分ぐらいまで行いますので、実習内容のみならず体力的にもかなりハードですでの無理のでない方、また集中力の続いた方の参加は認めておりません。

10. 修了証書授与

3日間の全ての実習に参加・履修し、感想文・アンケート・課題を、提出した方には、修了証書が大阪大学から授与される。

※実習紹介DVDダウンロードサイト⇒ JSTサイエンスチャンネル⇒ <http://www.jst.go.jp/cpse/spp/module/movie.html>

大腸菌形質転換実験の基礎知識

①形質転換とは

ある種の生物の細胞に体外からDNA（遺伝子）を入れて、その生物の遺伝的形質を変化させること。この技術は、現在行われている遺伝子工学上の最重要技術の一つである。

②大腸菌（E. coli）

形質転換は最初、グリフィスやアベリーらによって行われたが、これは肺炎双球菌によるものであった。しかし、肺炎双球菌は危険性が高く、遺伝子工学に適さない。ところが大腸菌には無害なものが多く、特に今回用いるK12株は、仮に人体に入っても生きることができずに死滅してしまう、無毒で安全な菌である。このような安全な大腸菌を用いて現在の遺伝子工学は進歩してきた。

③プラスミドDNA

（ア）細胞内で、世代を通じて安定して子孫に維持伝達されるにもかかわらず、染色体とは別個に存在して自律的に増殖する遺伝因子の総称。

一般に染色体に比べ極めて小さい環状のDNAである。

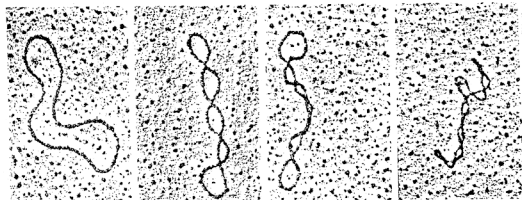
（イ）また、プラスミドは細胞の生存に関してはあってもなくてもよい。今回はプラスミドを持っている大腸菌を利用する。

④アンピシリン（Amp）耐性

（ア）抗生物質：生物の正常な生育または機能を阻害する物質。

（イ）アンピシリン：抗生物質の一つで、原核生物の細胞壁の形成を阻害する。よって大腸菌は、アンピシリン耐性遺伝子（アンピシリン分解酵素の構造遺伝子）を外部から入れない限り生育できず死滅する。

図1 形質転換概念図（アンピシリン耐性）



プラスミドDNAの電子顕微鏡写真

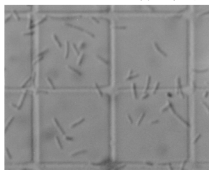
⑤大腸菌染色体DNAとプラスミドDNAの比較

	長さ (塩基対数)	DNA分子数 (大腸菌 1 匹当たり)
大腸菌染色体DNA	約 3×10^6 塩基対	1 個
プラスミドDNA	$10^3 \sim 10^4$ 塩基対	200~300個 (図 1 参照)

⑥培地

培地としてはL培地を使用する。これには寒天の入っていない液体培地であるL-brothと寒天の入っている寒天培地であるL-plateの2種がある。また、アンピシリンを含む培地としてL Amp-plateを用いる。

- (1) L-broth (液体培地) (1 ℓ 用組成)
 ポリペプトン 10g 酵母エキストラクト 5g
 NaCl 5g pH 6.8~7.2
- (2) L-plate (寒天培地) (1 ℓ 用組成)
 1) 以外に寒天を15g加えたもの。
- (3) L Amp-plate (寒天培地) (1 ℓ 用組成)
 2) 以外にアンピシリンを50mg加えたもの。



大腸菌の光学顕微鏡写真

(一ますに一匹居れば、 2×10^7 匹/ml)

⑦大腸菌の増殖曲線 (培養液内の菌の状態)

培養液の菌濃度が約 10^5 細胞/mlであるので、20倍希釈すると約 5×10^7 細胞/mlの菌濃度になったことになる。この希釈培養液内で大腸菌がどのように増殖していくかを大腸菌の増殖曲線を中心に説明する。なお、菌濃度は、赤血球計算盤で測定する。(例えば、トーマ血球計算盤、暗視野用 20 ミクロン、大腸菌の増殖曲線は、3つの期間に分けることができる。日本産床器械工業(株) 東京都江戸川区 北小岩 3-3-1)

①誘導期 (lag phase)

菌を植え継いから分裂開始までの期間 (図2のグラフ $t_0 \sim t_1$) で、菌は丸く小さいものが多い。

②対数増殖期 (log phase)

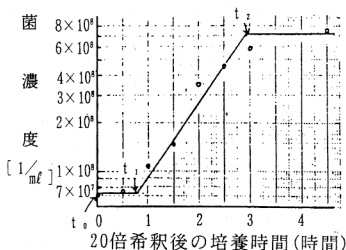
菌の分裂期間 (図2のグラフの $t_1 \sim t_2$) で、20~30分に1回分裂する。菌は分裂中にあるものが多く、かなり長くなっている。分裂直後の菌でも、誘導期の菌の2~3倍の長さになっている。

③定常期 (stationary phase)

菌濃度が一定になる期間 (図2のグラフの $t_2 \sim$) で、密度効果によって菌は増殖をほぼ停止し、死菌が増える。

死菌は、増殖期よりさらに長くなることが多く、また、会合する傾向もあり菌の集団を作る。その他の生菌は、徐々に丸く小さいものになっていく。

図2 大腸菌の増殖曲線



遺伝子操作の基礎知識

(1) 制限酵素：DNAのハサミ

二本鎖DNAの4～8塩基対の特異的な配列を認識し、二本鎖を切断する酵素。生じるDNA断片には、1～4塩基の相補的な一本鎖（のりしろ）が残るケースが多く、ここで互にくっつくことは容易である。この末端のことを付着末端という。今回使用する制限酵素の切断部位の塩基配列を表1に示す。

表1

⇒資料p65～p68 参照

制限酵素	切断部位の塩基配列
<i>Bam</i> H I	$\begin{array}{c} 5' - \text{GGATCC} - 3' \\ 3' - \text{CCTAGG} - 5' \end{array}$
<i>Eco</i> R I	$\begin{array}{c} 5' - \text{GAATTC} - 3' \\ 3' - \text{CTTAAG} - 5' \end{array}$
<i>Sca</i> I	$\begin{array}{c} 5' - \text{AGTACT} - 3' \\ 3' - \text{TCATGA} - 5' \end{array}$

<問1>

上の下線部の特異的な配列にはある共通した特徴がある。どのような特徴があるか考えてみよう。また、この特徴からこれらの制限酵素の高次構造についてどのようなことが考えられるか、想像してみよう。

(2) リガーゼ（L i g a s e）：DNAのノリ

制限酵素で切断したDNA断片を再結合する酵素。制限酵素のように認識する塩基配列には特異性はない。また、リガーゼの反応には、ATPが必要であり、ATPと複合体になって初めて働くことができる。

(3) アガロースゲル電気泳動

電場をかけDNA分子（断片）の大きさの違いを用いてDNA分子を分離する方法。

DNAは、電気的に陰性（マイナス）に帯電しているので、陰極から陽極に向かって動く。しかし、多糖であるアガロースゲル内の入り組んだ通路を通らなければならず、大きな分子ほど通りにく小さい分子ほど通りやすい。よって、小さいDNA分子ほど速く泳動する。

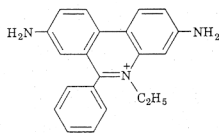
(4) エチジウムブロマイドによるDNAの染色

エチジウムイオンは、二本鎖DNAの塩基対間に滑り込んで結合し、紫外線をあてると可視光の蛍光を放つ物質である。よって、この物質をアガロースゲルに加えておくと、紫外線をあてることによって、DNAの存在場所がわかる。

[注] この物質は、危険物であるので、直接手で触れないように注意する。



電気泳動用ゲル作成



エチジウム

図3

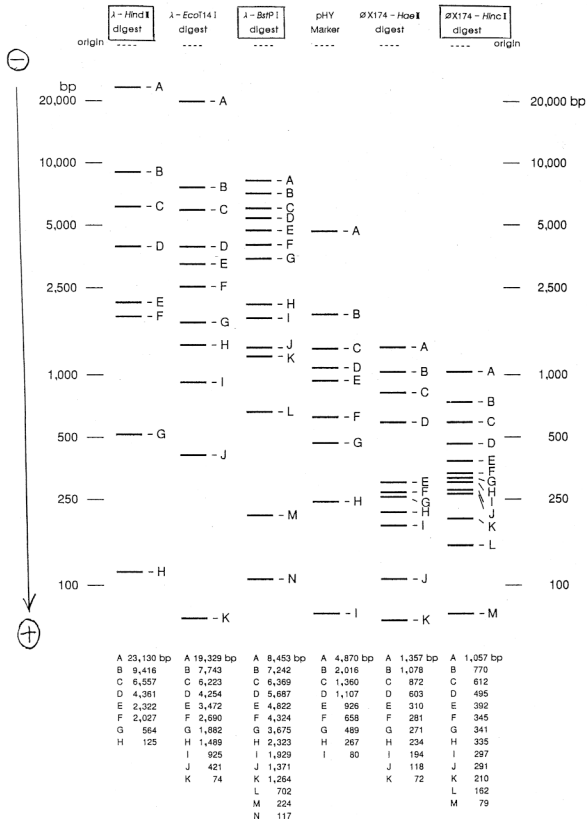
(5) マーカ－DNA

長さがわかっているDNAを同時に電気泳動し、未知のDNAの長さを推定することができる。

今回は、λファージ(大腸菌に感染するウイルス)のDNAを制限酵素HindⅢで切断したものを
用いる。電気泳動のパターンは、次の図に示すとおりであり、23, 130 b p (塩基対)のA断片から、
125 b pのH断片までの8断片がみられる。

図4 DNA分子量マーカ－の泳動パターン

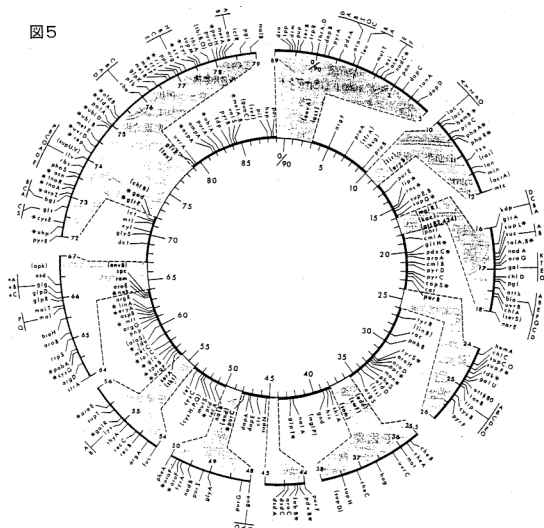
(注) log [DNA の長さ] と
その移動度とは逆比例



(6) 大腸菌の遺伝子地図

<問2>ラクトースオペロン (*lac*) やトリプトファンオペロン (*trp*) の位置は、どこか確認してみよ。

図5



(7) プラスミドDNA：pUC119の遺伝子地図

Ori：DNA複製開始点

Amp^R：抗生物質であるアンピシリンに対する耐性遺伝子（アンピシリン分解酵素の構造遺伝子）

P・O・*lacZ* P：ラクトースオペロンのプロモーター領域

O：ラクトースオペロンのオペレーター領域

lacZ：β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子

lacI：ラクトースオペロンのリプレッサーの構造遺伝子

調査リサーチ

「オペロン」で何だろう？ プロモーター・オペレーター・リプレッサー で何？

図書館などで調べてみよう！ Let's begin!

<問3> 次の図6～8を参考にして、p60の資料(pUC119の塩基配列図)に関する以下の各問に答えよ。ただし、塩基番号は、pUC119の塩基配列図の塩基番号で答えよ。

- ① pUC119中にある *lacZ* の mRNA の 1 番目の塩基が、pUC119の塩基配列図の中にある何番目の塩基に相当するかを確定せよ。
- ② また、*lacZ* (β-ガラクトシダーゼの構造遺伝子) は pUC119 中の何番目の塩基からスタートし、③ 何個のアミノ酸を指定した後、④ 何番目のどのような終止コドン(ナンセンスコドン)で翻訳を停止させているか。

⇒資料 p 60 : pUC119の塩基配列図 参照

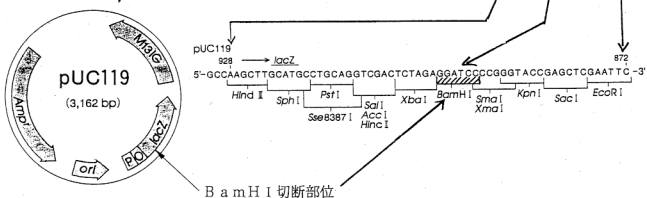
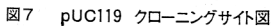
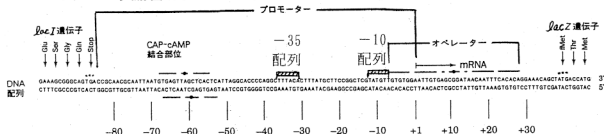


図8 大腸菌 *lac* プロモーター-オペレーター領域の塩基配列.



よって、*lacZ* の遺伝子を持たない大腸菌でも、このプラスミドを持てば、誘導物質の存在下で、*lacZ* の mRNA の転写が誘導され、 β -ガラクトシダーゼが合成されるので、ラクトース（乳糖）を加水分解できる。

今回は、培地に、IPTG と X-gal という物質を入れておく。IPTG は、ラクトースオペロンの誘導物質であり、X-gal は、これ自体、無色であり、誘導物質ではないが、 β -ガラクトシダーゼによって、 β -ガラクトースと青色の色素に加水分解される物質である。

そこで、IPTG によって、*lacZ* の遺伝子の発現が誘導されると、大腸菌は、青色のコロニーを作る。逆に、 β -ガラクトシダーゼが合成されていない大腸菌のコロニーは、青色にならない。（普通のコロニーは、うすい茶黄色）⇒図9参照

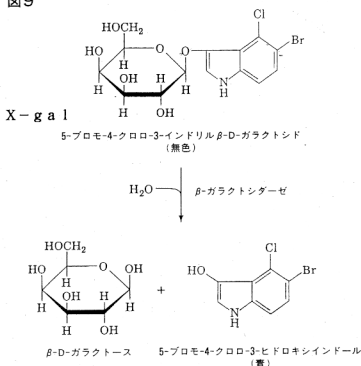
<参考> IPTG は、本来の誘導物質であるラクトース（乳糖）の一部分によく似た構造をしているが、 β -ガラクトシダーゼによって分解されにくく、mRNA の転写を一時的に誘導するのではなく、誘導を長期的に維持することができる貴重な物質である。

<問4>

① *lacZ* の遺伝子を持たない大腸菌に、pUC119 を入れて形質転換したとき、この大腸菌のコロニーの色は、どうなると考えられるか？

② pUC119 を制限酵素 *Bam*HI で切断し、その部位に、全く別のDNA断片をリガーゼで挿入したプラスミドを作り、正常な *lacZ* の遺伝子を持たない大腸菌に入れた。このときの大腸菌のコロニーの色はどうなると考えられるか？その理由とともに答えよ。

図9



大腸菌のコロニー



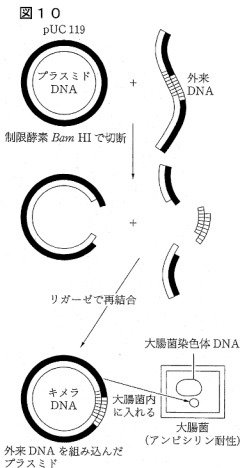
今回行う遺伝子操作とこの実習のあらすじ

- (1) pUC119(Amp耐性遺伝子、ラクトースオペロンのプロモーター領域・オペレーター領域・*lacZ*遺伝子を持つ3162bpのプラスミドDNA)を*lacZ*遺伝子内でDNAのハサミといわれる制限酵素 *Bam*HIで切断し、この部位に、別のDNA断片をDNAのノリといわれるリガーゼという酵素でつなぎこみ、新しいプラスミドを作る。
- (2) この新しいプラスミドDNAをAmp耐性遺伝子及び*lacZ*遺伝子を持たない大腸菌DH5 α の中に入れて形質転換し新しい大腸菌を作る。そして、その形質転換した大腸菌の遺伝的特徴を調べ、新しいプラスミドDNAの遺伝子の働きを確認する。また、コロニーを観察しその考察を行う。
- (3) 大腸菌内で、この新しいプラスミドDNAを複製させた後、大腸菌からこのプラスミドDNAを抽出・精製する。
- (4) 大腸菌から抽出したプラスミドDNAを再び、制限酵素*Bam*HIなど3種類の酵素で切断し、どのようなDNA断片が取り込まれていたかをアガロース電気泳動で確認する。
- (5) 各参加者が、自分で作製したプラスミドDNAについての電気泳動の結果から、プラスミドの遺伝子地図を作製し、泳動パターン分析会議で説明・発表する。
- (6) その他この実習では、プラスミドDNA pUC119を制限酵素で液で処理し、その構造的特徴を電気泳動で調べたり、このプラスミドDNAの全塩基配列図を用いたゲノム分析も行う。また、ミトコンドリアなどの細胞構造体を透過型電子顕微鏡で観察したり、自分の髪の毛やハエの目などを走査型電子顕微鏡で観察する。

これらは、現在、遺伝子工学やゲノム分析などの生命科学の研究現場で行われている基本かつ最も重要な技術である。

実習の流れ

	1 日で完結する実験	3 日目まで続く実験
1 日目	pUC119を制限酵素処理 ↓ 電気泳動 ↓ 電気泳動結果を分析	pUC119とインサートDNAを結合 ↓ 大腸菌に形質転換 ↓ 寒天培地にスプレッド(散布)
2 日目	電子顕微鏡実習 生徒何でも面白実験	コロニーの観察とその考察 ↓ 液体培地への植継ぎ
3 日目		大腸菌を集菌してDNAを抽出 ↓ 制限酵素処理をして電気泳動 ↓ 電気泳動結果を分析



実験の流れ図



実習計画・日程

3日間で行う。(ただし、事前学習・事前指導は、別の日に約5時間かけて行う。)
1班は4人とし、各班に学生指導者(チューター)が1人付く。

<事前学習・事前指導>

遺伝子操作の基礎知識・オペロン説などの説明 諸注意
※これのみ各高校で実施

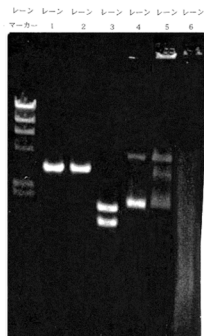
<1日目>

- (1) 実習概説・基本操作確認 9時～11時30分
(2) プラスミドDNA (pUC119) を制限酵素処理してから電気泳動する

反応液調製→〈A〉
泳動用ゲル作製→〈B〉
酵素処理→〈A〉
電気泳動開始まで→〈C〉
電気泳動
電気泳動写真撮影
泳動パターン分析→問7
泳動パターン分析会議



電気泳動の結果



<A> pUC119制限酵素処理

各班のプレートにDNA液(DNA約0.06μg)・制限酵素緩衝液(buffer)・酵素液をピペットマンで入れて、37℃で反応させる。

使用する酵素名	DNA液	緩衝液	酵素液	滅菌水
① BamHI	8 μl	1 μl	1 μl	0 μl
② ScaI	8 μl	1 μl	1 μl	0 μl
③ BamHIとScaI	8 μl	1 μl	各1 μl	0 μl
④ pUC119そのまま	8 μl	0 μl	0 μl	2 μl
⑤ だ液処理(緩衝液なし)	8 μl	0 μl	2 μl	1 μl
⑥ だ液処理(緩衝液あり)	8 μl	1 μl	2 μl	0 μl

<問5>

pUC119を左表の①～③のように制限酵素で切断すると、どのようなDNA断片が生じると考えられるか。

<おもしろ実験⑤・⑥>

制限酵素液の代わりに君達のだ液を入れたらどうなると思う?やってみよう。だ液を5μl取り、滅菌水で2倍希釈した液を2μl加える。

*1 制限酵素緩衝液(×10)

10×H buffer

500mM トリス-塩酸緩衝液
(pH7.5)

100mM MgCl₂
10mM DTT
1M NaCl

10×K buffer

200mM トリス-塩酸緩衝液
(pH8.5)

100mM MgCl₂
10mM DTT
1M KCl

<参考>DTTは、ジチオスレオトルという物質であり、SH基を還元する。タンパク質中のアミノ酸であるシステインのSH基同士のS-S結合を切断し、タンパク質の機能を維持する働きがある。細胞内で働くタンパク質は、一般に、S-S結合を作らないで、立体構造を維持している。

＜B＞ 電気泳動用 0.7%アガロースゲルの作成

0.7%アガロースゲルを電子レンジで溶かし、ゲルトレイに流し込む。その後、固まるまで30分間放置する。

*2

トリス-ホウ酸緩衝液 (×10)	
500mM トリス	
500mM ホウ酸	
10mM EDTA	

＜参考＞EDTAは、エチレンジアミン四酢酸の略記であり、溶液の中で Ca^{2+} や Mg^{2+} を取り除く働きがある。

＜問6＞DNA液や実験操作中にEDTAを加えるのは、何のためだろうか。

*3

0.7%アガロースゲル

アガロース	7 g
トリス-ホウ酸緩衝液 (×10)	100mℓ
10mg/ℓ エチジウムブロマイド	0.05mℓ
+H ₂ O	
合計	1000mℓ

*4

電気泳動用緩衝液

トリス-ホウ酸緩衝液 (×10)	100mℓ
10mg/ℓ エチジウムブロマイド	0.05mℓ
+H ₂ O	
合計	1000mℓ

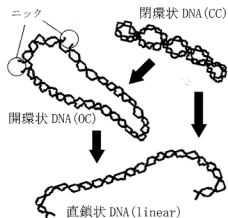


図11 プラスミドの三態

＜C＞ 電気泳動 (電圧50V 50分)

＜A＞のプレートの反応液からビペットマンで5μℓ取って横に移し、そこに、3μℓのBTBグリセロール液(dye solution)を加えて混ぜ、この混合液8μℓ (DNA約0.03μg)を、アガロースゲルの穴(ウェル)に入れる(アプライする)。

マーカーDNA (λファージDNA: HindⅢ処理) [注] 穴(ウェル)のふちに

- ① pUC119: BamHI処理
- ② pUC119: ScaI処理
- ③ pUC119: BamHIとScaI処理
- ④ pUC119 (未処理) そのまま
- ⑤ pUC119: だ液処理 (制限酵素緩衝液なし)
- ⑥ pUC119: だ液処理 (制限酵素緩衝液あり)

沿わせてゆっくり入れ、穴を傷つけないように注意する。



*5

BTBグリセロール液 (×10)

0.025% BTB	
50% グリセロール	
10mM EDTA	
10μg/ml RNA分解酵素(RNase)	

＜参考＞BTBは、プロモチモールブルーと呼ばれる色素。これで、大体の電気泳動の進行を知ることができる。しかし、これは、DNAの染色液ではない。

グリセロールは、グリセリンのことで、電気泳動の開始時に、DNAをアガロースゲルの穴の中に沈め、DNAが拡散するのを防ぐために入れる。

＜問7＞ 1)電気泳動の結果は、問5で予想した通りでしたか? p5のDNA分子量マーカーの泳動パターンを参考にして答えよ。また、この結果を観察してみて何か不思議なことに気づきませんか。気づいたことを答えて下さい。そして、もし、＜C＞の①②④⑤⑥の泳動パターンが異なっていたとすると、その原因は、いかなる理由によると思われるか? 考えてみよう。

2)これらの結果から、だ液中に何が存在していると想像されるか? また、これは何のためなのだろうか? 実習は始まったばかり、3日間あるぞ。結論を急がずにゆっくり考えてみよう。先生には、質問はしてもいいですが、答えを聞いてはだめよ!

(3) ライゲーション (DNA再結合)

[注]今回は、時間短縮のために、pUC119をBamHIで処理した後、除タンパクなど精製済みのDNA液を準備し、これをここで使う。

反応液調製

11時～11時20分

酵素処理

11時20分～16時頃

pUC119をBamHIで切断したDNA液 $4\mu\text{l}$ (DNA $0.04\mu\text{g}$)に、 $1\mu\text{l}$ のリガーゼ緩衝液、 $1\mu\text{l}$ のリガーゼ液(酵素液)、新たに挿入するDNA断片(BamHI切断済み)を含む溶液 $4\mu\text{l}$ (DNA $0.4\sim1\mu\text{g}$)をピペットマンで加え、室温(15°C)で反応させる。

*6

リガーゼ緩衝液 ($\times 10$)

660mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.6)

66mM MgCl_2

100mM DTT

50mM ATP

(4) 形質転換 (ライゲーションしたDNAを大腸菌に入れる)

大腸菌形質転換簡便法ビデオ説明

20倍希釈から培養・集菌まで

集菌からスプレッドまで・大腸菌顕微鏡観察



13時20分～13時40分

13時40分～15時20分

15時20分～18時頃

今回使用する大腸菌 DH5 α : *lacZ*遺伝子を持たずAmp (アンピシリン) 非耐性の大腸菌

手順 ※生命科学教育吉本コンテンツを用いた解説

① [大腸菌液体培養] 大腸菌(DH5 α)を5mLのL液体培地で、一晚 37°C で振とう培養する。この培養液を100mLのL液体培地に入れて、約1.5時間、振とう培養を続ける。(20倍希釈)



② [集菌] 1.5×10^8 細胞/mLの濃度まで増えてくれば、遠心機で集菌する。
6000回転/分で5分間遠心する。(以下の処理は、 0°C で行う)



③ [L液体培地の除去] 上澄み液を完全に取り去り、遠心管の底に沈んだ大腸菌の沈殿を残す。



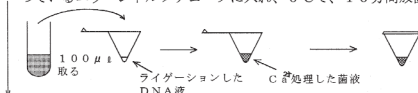
④ [カルシウム処理] 遠心管に合計7mLの50mM CaCl_2 液を加え、大腸菌を懸濁し、 0°C で、5分間放置する。





⑤[ライゲーション処理したDNAの添加]

④の Ca^{2+} 処理した菌液を、 $100\mu\text{L}$ 取り、これを(3)でライゲーション処理したDNA液の入っているエッペンドルフチューブに入れ、 0°C で、10分間放置する。

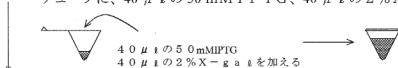


<問8> 本実習の遺伝子操作実験[p12～p13]の結果(大腸菌の生育とその色について)を予想して答えて下さい。
また、その対照実験として、ここで行わなければならない実験が少なくとも3つ考えられます。対照実験①は、大腸菌DH5 α が、*lacZ*遺伝子を持たないことを証明する実験。対照実験②は、大腸菌DH5 α が、Amp(アンピシリン)非耐性であることを証明する実験。対照実験③は、プラスミドpUC119には、*lacZ*遺伝子とAmp耐性遺伝子が存在していることを証明する実験です。では、どのような実験をすればよいかを考えて各自行って下さい。[ヒント：L Amp 寒天培地2枚、L 寒天培地1枚使用] もちろん、実験の結果(大腸菌の生育とその色について)を予想することも忘れないで下さい。

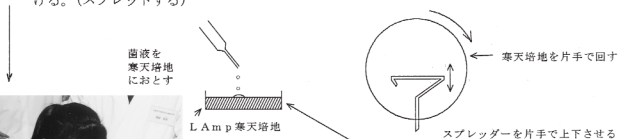
なお、この解答用紙は、班別に実習1日目の午後開始までに 必ず提出してください。

⑥[IPTG・X-galの添加]

チューブに、 $40\mu\text{L}$ の50mMIPTG、 $40\mu\text{L}$ の2%X-galを加えて、混ぜる。



⑦[スプレッド]チューブから全菌液を取り、L Amp 寒天培地 (アンピシリンが入ったL 寒天培地) に広げる。(スプレッドする)

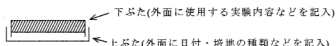


[注] plate を簡単に回転させる用具としてターンテーブルという用具があるが、これがなくても手のみで回転させるだけで十分である。
スプレッターはスプレッド一回一回につきエタノールをつけてパーナーで焼き十分に滅菌してから使用する。



⑧[大腸菌寒天培養]

スプレッドした寒天培地は、寒天の入っている下ふたを上にして、一晚 37°C で培養する。



< 2 日 目 >

(5) 形質転換体コロニー観察及びここまでの設問の解説・ヒント

9時～12時

；コロニー数カウント・コロニーを滅菌水に懸濁して観察する。

(4)の結果と問8の3つの対照実験の結果は予想通りでしたか？(コロニーの色と数に注意)

<問9> (4)の結果と問8の実験結果は予想通りでしたか。予想通りにならなかった実験があればその理由を考えて説明して下さい。また、この結果を観察してみて何か不思議なことに気づきませんか。気づいたことを答えて下さい。

<問10> 今、1個のコロニーをつまようじでついて、0.1mlの滅菌水で懸濁した。この懸濁液を顕微鏡で調べてみると、この懸濁液の中には、1ml当たり約 1×10^8 匹の大腸菌がいた。この1個のコロニーは、約何匹の大腸菌でできているか？また、このコロニーは、1匹の大腸菌が一晩かけて生じたものであるが、では、約何回分裂したと考えられるか？計算してみよう。



(6) 形質転換体コロニーを液体培地に植え継ぐ

13時～18時頃

(4)で得られた形質転換体コロニーの一部を取って、L Amp 液体培地 5ml (アンピシリンの入ったL液体培地)に植え継ぎ、37℃で振とう培養する。

※ 生徒何でも面白実験 目指せ！おもしろ大発見!
“ふとした疑問から生まれる 新事実！”



(7) 電子顕微鏡実習 13時～18時頃

；透過型及び走査型電子顕微鏡を用いた大腸菌や動物細胞などの観察

[注]その他、研究施設見学・阪大の先生方のお話・研究披露があれば随時入れる。



走査型電子顕微鏡実習



< 3 日 目 >

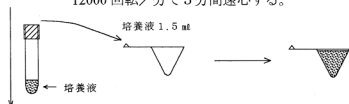
(8) プラスミドDNAの抽出 (形質転換した大腸菌からDNAを取り出す)

9時～11時

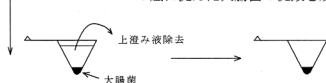
①[プラスミドDNAの複製] (4) で得られた形質転換体コロニーの一部を取って、L A m p 液体培地 (アンピシリンの入ったL液体培地) に植え継ぎ、37℃で振とう培養する。

②[集菌] ①の培養液 1.5 ml をエッペンドルフチューブに入れて集菌する。

12000 回転/分で5分間遠心する。



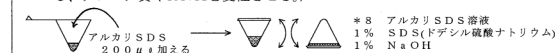
③[L液体培地の除去] 上澄み液を完全に取り去り、チューブの底に沈んだ大腸菌の沈殿を残す。



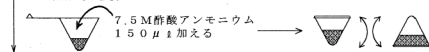
④[大腸菌の懸濁] チューブに 100 μ l の G T E 液を加え、大腸菌を懸濁する。(ボルテックスミキサー処理する)



⑤[大腸菌の破壊・タンパク質の変性] チューブに 200 μ l のアルカリ SDS 溶液を加え、手で数回、ゆっくりと上下にひっくり返す。この後、氷中に5分間放置する。(この操作で、大腸菌を壊し、タンパク質やRNAを変性させる。)

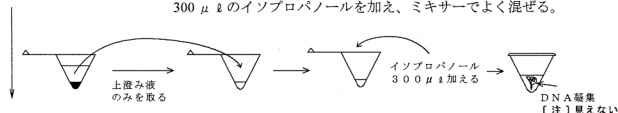


⑥[除タンパク・細胞残骸除去] チューブに 150 μ l の 7.5 M 酢酸アンモニウム液を加え、手で数回、ゆっくりと上下にひっくり返す。(この操作で、溶液を中和し、変性した、タンパク質やRNAを凝集・沈殿させる。また、大腸菌の染色体DNAは、細胞の残骸にくっついていてるので、遠心で底に沈む。)



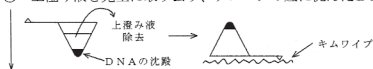
⑦ 15000 回転/分で7分間遠心した後、プラスミドDNAが溶けているその上澄み液 350 μ l を別のチューブに取り、再び 15000 回転/分で5分間遠心する。(4℃)

⑧[DNAアルコール沈殿] プラスミドDNAが溶けている上澄み液 300 μ l を別のチューブに取り、300 μ l のイソプロパノールを加え、ミキサーでよく混ぜる。



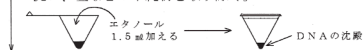
⑨[アルコールの除去] 12000 回転/分で10分間遠心する。(4℃)

- ⑩ 上澄み液を完全に取り去り、チューブの底に沈んだDNAの沈殿を残す。



- ⑪ [不純物の除去]

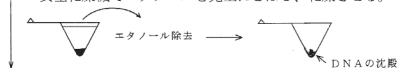
100%エタノールを1.5 ml加えて、DNAの沈殿を洗い、塩などの不純物を取り除く。



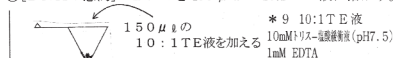
- ⑫ 12000 回転/分で5分間遠心する。



- ⑬ [アルコールの除去・乾燥] 上澄み液を完全に取り去り、チューブの底に沈んだDNAの沈殿を残す。真空乾燥機でエタノールを完全にとばし、乾燥させる。



- ⑭ [DNAの懸濁] DNAを150 μ lの10:1 TE液に溶かす。



【注】うまくいけば、各チューブ当たり20 μ gぐらいのDNAがとれているはず。

- (9) 抽出したプラスミドDNAを制限酵素処理してから電気泳動する

反応液調製→<D>

制限酵素処理→<D>

電気泳動開始まで→<E>

電気泳動(面白実験結果分析)

電気泳動写真撮影

11時～11時40分

11時40分～12時40分(昼食※班別時間差)

12時40分～13時30分

13時30分～14時20分

14時20分～15時頃

<D> プラスミドDNAの制限酵素処理

各班のプレートにDNA液・制限酵素緩衝液・酵素液をピペットマンに入れて、37℃で反応させる。

<形質転換体から抽出されたプラスミドDNA>

使用する酵素名	DNA液	緩衝液	酵素液
① <i>Bam</i> HI	8 μ l	1 μ l	1 μ l
② <i>Eco</i> RI	8 μ l	1 μ l	1 μ l
③ <i>Sca</i> I	8 μ l	1 μ l	1 μ l

*酵素緩衝液 *Bam*HI : K
*Eco*RI : H
*Sca*I : Cut Smart



<E> 電気泳動 (電圧100V 50分)

<D>の各反応液からピペットマンで5 μ l取って横に移し、そこに3 μ lのSDS泳動用dye solutionを加えて混ぜ、このうちの2 μ l (DNA約0.1 μ g)をアガロースゲルの穴に入れる。
このdye solutionには、RNA分解酵素(RNase10 μ g/ml)が加えられており、DNA抽出液に含まれるRNAを分解する。これを入れておかないと、RNAの存在のためDNAの小断片が見えなくなる。
なお、取れたDNA量によって電気泳動する反応液の量は変わる。

- ①形質転換体から抽出された
プラスミドDNA : *Bam*HI 処理
- ②形質転換体から抽出された
プラスミドDNA : *Eco*RI 処理
- ③形質転換体から抽出された
プラスミドDNA : *Sca*I 処理
- ④形質転換体から抽出された
プラスミドDNA : そのまま
- ⑤pUC119 : *Bam*HI 処理
- ⑥クローニングDNA断片
(ライゲーションしたインサートDNA)
- ⑦マーカーDNA
(λ ファージDNA : *Hind*III 処理)
(λ ファージDNA : *Bst*PI 処理)
(ϕ X174ファージDNA : *Hinc*II 処理)



泳動パターン分析会議

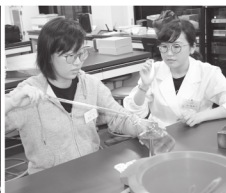
- (10) 生徒発表会・泳動パターン分析会議 14時20分～18時50分
; 自分の作ったプラスミドDNAの電気泳動結果について、まず、各自で分析し、その後、
班別会議、全体会議で各自の分析結果を発表・説明する。 →次ページの課題1

<問11>

p5のDNA分子量マーカーの泳動パターンを参考にして、あなたの作ったプラスミドDNAの*Bam*HI 切断部位に挿入されたDNA断片(インサートDNA)について考えてみよう。

- ① このDNA断片の大きさは、およそ何千何百bp(塩基対)か? 理由とともに答えよ。
- ② このDNA断片の中に、*Eco*RI 切断部位、*Sca*I 切断部位があると思いますか? 理由とともに答えよ。

- (11) 修了証書授与式・挨拶 18時50分～19時50分
事後指導キャリア教育最終訓話(講師・学生・院生)・高校生謝辞



大阪大学 Z-sce 分子生物学実習「ジャイアントインパクト」

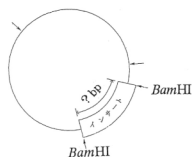
遺伝子操作（クローニング）を体験しよう

課 題 1

あなたの作ったプラスミド DNA の遺伝子地図を作製して下さい。
できる限りカラフルにお願いします。

① まず、実験結果のみから判断して、まずラフな遺伝子地図を描いて下さい。

- [手順] 1) *Bam*HI 処理の結果からどんなことが言えるか？
2) *Eco*RI 処理の結果からどんなことが言えるか？
3) *Sca*I 処理の結果からどんなことが言えるか？
4) 右のようなラフな遺伝子地図を描き、*Bam*HI・*Eco*RI・*Sca*I の切断部位と挿入された DNA 断片の大体の長さ（何千何百 b p 程度）も記入して下さい。



② 3 日目の泳動パターン分析全体会議で正確な DNA 断片の長さを与えます。
この情報をもとに、1 b p まで正確な遺伝子地図を描いて下さい。

- [手順] ①と同じですが、*Bam*HI・*Eco*RI・*Sca*I の切断部位の正確な数字と挿入された DNA 断片の正確な長さも記入して下さい。（1 b p まで正確な数値を明記）

課 題 2

小問 1～11 と追加課題についての解答と詳しい解説を書いて下さい。
また、問 5（だ液の実験含む）と問 8 については、行った実験の事前予想（仮説）とその実験結果も書いて下さい。

※事後提出課題をアンケート・感想文とともに、必ず指定日までに提出して下さい。
提出方法はあらためてお伝えします。

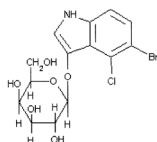
提出物提出先

吉 本 和 夫

(E-mail) yosimoto@bio.sci.osaka-u.ac.jp

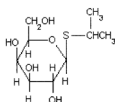
<自宅> 〒560-0003 豊中市東豊中町 5-24-18 (TEL) 06-6848-5533

物質化学構造式一覧



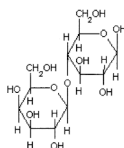
X-gal

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside

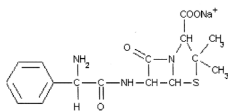


IPTG

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside



ラクトース



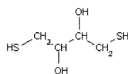
アンピシリンナトリウム



βガラクトース

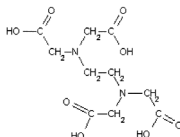


βグルコース



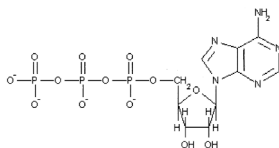
DTT

ジチオスレイトール



EDTA

エチレンジアミン四酢酸



ATP

アデノシン三リン酸



エタノール



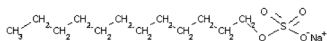
イソプロパノール



グリセロール



ホウ酸



SDS

ドデシル硫酸ナトリウム



トリスヒドロキシメチルアミノメタン

引用文献及び参考文献・資料

- 1) 中山広樹・西方敬人 (1996年) : 細胞工学別冊 目で見る実験ノートシリーズ バイオ実験イラストレイテッド ②遺伝子解析の基礎 秀潤社
- 2) D. VOET・J. G. VOET (1996年) : ヴォート生化学 第2版 東京化学同人
- 3) T a K a R a 遺伝子工学製品ガイド 宝酒造
- 4) 別冊サイエンス 特集 生命の科学 遺伝子操作 (1978年) 日本経済新聞社
- 5) Maniatis, T・Fritsch, E, F・Sambrook, J (1982年) : Molecular cloning Cold spring laboratory
- 6) 吉本和夫 (1996年) : 高校と大学の共同授業への試みー分子生物学校外実習実施報告ー大阪教育大学附属高等学校平野校舎研究紀要 第6号 pp35~60
- 7) 吉本和夫・倉光成紀 (1998年) : DNAの構造解析ーアガロース電気泳動を中心にー新しい生物実験の開発Ⅱ 大阪府高等学校生物教育研究会 pp146~148
- 8) 吉本和夫 (1998年) : 大腸菌の形質転換 新しい生物実験の開発Ⅱ 大阪府高等学校生物教育研究会 pp70~73
- 9) 吉本和夫 (1990年) : 大腸菌形質転換簡便法実験 解説書・マニュアルビデオ(全86分)
- 10) 吉本和夫 (1991年) : 簡便な高校生物分子遺伝学実習の開発ー大腸菌形質転換簡便法ー(授業実践を中心に) 大阪教育大学附属平野中学校・大阪教育大学附属高等学校平野校舎研究紀要 pp70~76
- 11) 吉本和夫 (1994年) : 簡便な高校生物分子遺伝学実習の開発(2)ー大腸菌形質転換簡便法の開発過程を中心にー 大阪教育大学附属高等学校平野校舎研究紀要 第5号 pp31~40
- 12) 朝日新聞社 (1998年) : 大学で高校生が遺伝子操作一学ぶ楽しさはボーダーレスー(大阪教育大学附属高等学校平野校舎・大阪大学) 朝日新聞 1998年12月27日
- 13) 朝日新聞社 (2001年) : 理科離れを探る 2 好きでも大切でもない・試験のためにやるだけ(国際数学・理科教育調査) 朝日新聞 2001年1月17日
- 14) 朝日新聞社 (2001年) : 京大理学部生「理系授業面白い」たった3割ー高校まではあんなに好きだったのに 朝日新聞 2001年3月19日
- 15) 吉本和夫 (2000年) : 高校と大学の共同授業の試みー高校生に大学で遺伝子クローニングを実験させてみたー 遺伝54巻3号(2000年3月) 裳華房 pp37~42
- 16) 吉本和夫 (2001年) : 科学や思考をエンジョイするための遺伝子操作体験実習の試み[実習計画・指導案・設問解説]ー3日間延べ24時間以上に及ぶ実習によって「大きな感動と衝撃」を与えるためにー 大阪教育大学附属高等学校平野校舎研究紀要 第7号 pp25~53
- 17) 安田信人・吉本和夫 (2001年) : 高校生が大学での遺伝子操作実習から学んだもの 大阪大学大学院理学研究科
- 18) 吉本和夫・倉光成紀 (2002年) : 理科教育の再生への道のりー高校と大学の連携教育によって得られるもの 化学Vol. 57No. 2(2002年2月) 化学同人 pp35~40
- 19) 吉本和夫・倉光成紀 (2002年) : 若者に感動を与える実験授業を!ー高校生が大学で体験する分子生物学実習を例に 化学Vol. 57No. 9(2002年9月) 化学同人 pp40~44
- 20) 吉本和夫 (2003年) : 特集ゲノムの時代の遺伝教育 高校「生物」における問題点(2) 組換えDNA実験の導入をめぐる② 遺伝57巻1号(2003年1月) 裳華房 pp51~53
- 21) 東原真志・吉本和夫 (2003年) : 平成15年度文部科学省SPP事業「研究者招へい講座」(招171) 生物特別授業「樹木がわかる林学実習」報告書 大阪教育大学附属高等学校平野校舎
- 22) 産経新聞社 (2004年) : 「新しい理科」楽しさ知ってーホタル酵素で実験・企業開発者が参観ー(大阪教育大学附属高等学校平野校舎・吉本和夫) 産経新聞 2004年11月16日
- 23) 毎日新聞社 (2005年) : 「理系白書'05 第2部文理分け教育を問う」ー高1に独自の「生命科学」 実社会とのつながり示すー(大阪教育大学附属高等学校平野校舎・吉本和夫) 毎日新聞 2005年6月15日
- 24) 日本経済新聞社 (2005年) : 「理科離れ」食い止めるー研究者、実験ひと工夫ー(大阪教育大学附属高等学校平野校舎・吉本和夫) 日本経済新聞 2005年7月21日
- 25) 吉本和夫 (2005年) : 時代の要請ー生物教育から生命科学教育への転換ー 高校理科研究 NO. 11 2005年9月13日 大日本図書 pp14~16
- 26) 吉本和夫 (2007年) : 「若者に大きな感動と衝撃を」JST News2007 1月号コラム p15
- 27) 吉本和夫 (2006年) : 生命科学教材デジタルコンテンツ『遺伝子とは何か』①生命を語る分子「DNAとタンパク質」②タンパク質合成のメカニズム ③遺伝子発現の制御「オペロン」
- 28) 吉本和夫 (2009年) : 生命科学教材デジタルコンテンツ『遺伝子操作を基本から学ぼうー実験に関する小問に挑戦してみようー』④大腸菌を用いた形質転換実験「DNAは遺伝子の本体」⑤遺伝子組換えを具体例で学ぶ「遺伝子組換え実験の各操作の意味を考える」

※このデジタルコンテンツは、音声・解説文・用語説明入りのビデオで、高校生のみならず一般市民や障害者などの生命科学リテラシー向上を目的に制作しました。英語版もあり、途上国への対応も可能です。ご興味のある方は、吉本までご連絡下さい。

Point 0

生物界の基本原則・キーワード

I A「秩序」とB「個性」

①秩序の維持：「最低限のルールを守れ！」←誰が言う？

1「地球・環境・自然界」

[例]生物の基本単位：2「細胞」→細胞構造体→3「分子・原子・イオン」
生活エネルギーの獲得方法：4「有機物を O_2 を用いて分解する」
遺伝子の本体：5「DNA」を継承・遺伝子の働き方
ウイルスに感染しない生物はない

②個性化・多様化

生命の起源と進化

約200億年前 6「ビッグバン」

約46億年前 7「地球誕生」

約40億年前 8「生命誕生」

9「画一化」→絶滅

→10「突然変異」→多様化→環境の変化への対応→11「自然淘汰」→現在
12「偶然」
↓
13「必然」

ルールが守れない

秩序の維持ができない「無秩序状態」→絶滅

1) 多様化させながら継承してきたもの？

遺伝子の本体：5「DNA」

：40億年継承→そのために必要になったもの 14「生物・細胞」

[参考]利己遺伝子説 リチャード・ドーキンス(英)

；生き残って増えようとしているのは個人、個体ではなく、遺伝子であり、個体は遺伝子という名の利己的な存在を生き残らせるためにプログラミングされたロボットのようなものだ。

2) 遺伝子は偶然の多様化を繰り返した 10「突然変異」

ところが、意図的な多様化を可能にした生物が出現した 15「人類の脳」

遺伝子の人工的な多様化：16「遺伝子操作」

生命にとって新たな試練：15「人類の脳」VS「遺伝子」の対立の激化

17「心」：21世紀のキーワード

II C「競争」とD「共生」

①余裕→競争→切磋琢磨→試練乗り越え→進化

②危機的な有事→共生→助け合い

1. 細胞

Point 1

細胞説

→リードα p4

:すべての生物体は、1「細胞」からできている。

1「細胞」は生物の基本単位である。

⇒「細胞を持てば生物」

[注1] 2「ウイルス」: 生物と無生物の中間体。 <参考>図録 p129 p87

1) 3「遺伝子(DNA)」と4「タンパク質」の複合体。

2) 独自の宿主細胞に寄生して、この細胞内で増殖。

(1) 1665年 ロバート・フック (英)

: コルク切片を顕微鏡で観察 → 小室 → 1「細胞」と命名

5「死細胞」

cell

(2) 1838年 シュライデン (独): 細胞説 (植物) の提唱

(3) 1839年 シュワン (独): 細胞説 (動物) の提唱

[注2] “生と死の定義”

細胞レベルの生と死

生 6「原形質流動」

死 7「止」

[注3] 生物分類法 → 図録 p214~p215

①二界法 → 8「植物界」と9「動物界」

細胞壁: あり なし

②五界法 → 原核生物界: 細菌類 (原則として光合成不可)・ラン藻類 (光合成可)

原生生物界: 原生動物 (光合成不可)・単細胞藻類 (光合成可)

菌界 (光合成不可): アオカビ・酵母菌・マツタケ

植物界: 光合成可能な多細胞生物

動物界: 光合成不可能な多細胞生物

[注4] 単細胞生物 <参考>図録 p32・p210

①10「原核生物」: 11「核膜」なし

細菌類 (原則として光合成不可) <例> 12「大腸菌・乳酸菌」

ラン藻類 (光合成可) <例> ネンジュモ <参考>図録 p210

②13「真核生物」: 11「核膜」あり

1) 原生動物 (光合成不可) <例> 14「アメーバ・ゾウリムシ」

2) 単細胞藻類 (光合成可)

<例> 15「ミドリムシ」 <参考>図録 p32

: 動物と植物の中間体生物

植 16「葉緑体」: 光合成可

動 17「細胞壁」なし・18「ペクチン」あり

19「眼点」 (光受容体) あり

3) 菌類 (光合成不可) <例> 20「酵母菌」

[注5] 単細胞生物 → 21「細胞群体」 → 多細胞生物 p32

探究

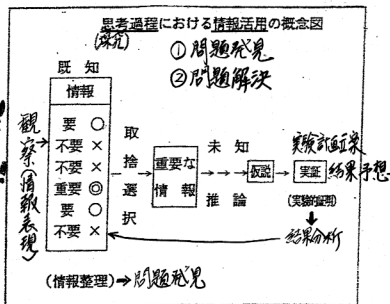
「重要な情報は何か？」

「キーワード」を採せ

1.

issues (イシューズ)

未解決の難問題への挑戦



〈課題1〉① なぜ、核に穴(核膜孔)がわいてくるのか?

情報不足

正確な

正解は

知らない

② 核膜が2枚の単位膜でできてくる。なぜ細胞膜は1枚なのか?

③ なぜ、原料物質の流動は行われるのだろうか?

〈課題2〉どの細胞で好気呼吸を行い、生活活動のエネルギーを得ているのか?

どの細胞

重要な情報か?

→どの細胞にミトコンドリアがあるのか? ④ エネルギーは何?

⑤ 外呼吸 ↔ 内呼吸

〈ガス交換〉

〈細胞呼吸〉

呼吸

全生細胞内

$CO_2 \rightleftharpoons O_2$

有機物の分解

→ 生活環境

自然の方向に流れる

〈課題3〉なぜ、光合成植物は色素(葉緑素)を持っているのか?

② 「光合成」するため → なぜ色素があると「光合成」できるのか?

不透明情報: 色素は何をしているのか?

③ 「光の吸収」

④ 光合成に利用 (青紫色光・赤色光) を利用

不透明情報2: 光は何か? = 「エネルギーをもった微粒子の波(電磁波)」

〈課題4〉「黒い花」の植物は存在しない。なぜかな？

情報整理 ① 色素；[光を吸収する物質]。

② 白色光；いろいろな色の光の集まり。

③ 植物の色とは、

{ 緑色；クロロフィルが緑色光以外の光を吸収し、緑色光を反射。
白色；すべての色の光を反射している。[色素なし]アルビ
黒色；すべての色の光を[吸収]し、反射光なし。

④ 不足情報？(色以外の情報だよ！何か不足しているかな？)

「花は何のためにあるのか？」

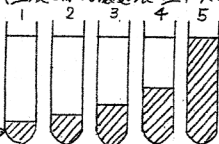
〈課題5〉 ビデオ実験 (血液を様々な濃度の食塩水に入れて遠心する)

『なぜこんな結果になったのか？』

(赤い部分の差がなぜ生じたか?)

↓
このことから、どのような自然界のルールを見い出せるかな？

(食塩水) 濃



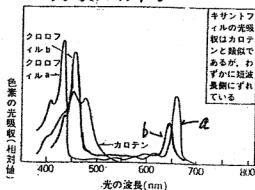
〈注〉斜線部は赤い部分。

↓遠心
(細胞が沈み
その他の物質は沈まない)

薄 (水)

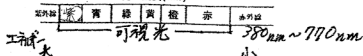
情報整理

吸収スペクトル



→ 理科総合B p 37

UV → DNA傷害 → 突然変異 → ガン化 (異常増殖)
紫外線 ↓ 修復



3. 生体物質をつくる化学結合と生体物質の種類

Point 9 化学結合 ※図録 p223~

：同種または異種の原子どうしや結合して単体、化合物をつくること。

1) 強い結合

〈例〉結晶

{ イオン結合 --- NaCl
金属結合 --- Fe (鉄)
★共有結合 --- ダイヤモンド (C)

2) 弱い結合 (分子間力)

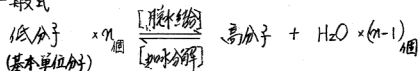
{ ★極性
★水素結合
ファンデルワールス力

3) 生体物質

〈例〉

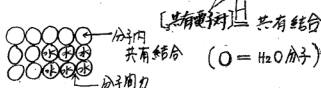
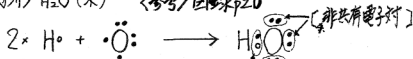
1. 無機化合物 : $H_2O, CO_2, NH_3, O_2, N_2, H_2$ 等 → *5
2. 単体有機化合物 : フドウ糖, アミノ酸, グセリン, 脂肪酸 等
(低分子有機化合物) (グルコース)
3. 複合体有機化合物 : デンプン, タンパク質, DNA, RNA, 脂肪, リン脂質 等
(高分子有機化合物)

・一般式

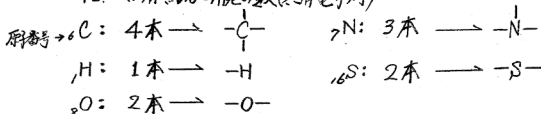


*1 分子性物質：共有結合よりなる分子が分子間力によって結合している物質。

〈例〉 H_2O (水) 〈参考〉図録 p20



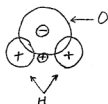
*2. 共有結合の腕の数 (共有電子対)



*3<参考> 極性：分子内の電気的な分り

{ 極性 (親水性) (例) H_2O , $C_6H_{12}O_6$
無極性 (疎水性) (例) 油, 脂肪, CO_2

H_2O



分子内に電気的分り



電気的分りによる結合

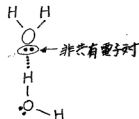
*4 水素結合

<参考>

$H \cdots O, N, F$

(原子半径 小さい
電気的引力が強い
非共有電子対がある)

<例>



水素結合 水素原子が酸素・窒素・フッ素のように原子半径が小さく、電気的に陰性の強い原子と結合し、かつ分子中に非共有電子対が存在するときに水素結合が生ずる。すなわち、水素原子中の電子が強く他の原子に引き付けられるため、水素原子は正の少量電荷 ($\delta+$) をもち、これが他の分子の非共有電子対と静電引力で結合する。これが水素結合であり、この結合は分子間力の中では最も強い結合であるが、水素結合は上記のような特殊な条件がそろわないと起こらない。

*5 大気組成

原始大気 → 現在の大気

CO_2	91%	0.03%	↓ () 吸収: ()
N_2	6.4%	78.09%	↑ () 原因
H_2S	2.0%	—	
H_2O	0.2%	—	
O_2	—	20.95%	↑ () 原因

Point 10

生体物質の種類

→リードα p 9

I タンパク質

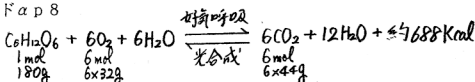
*組成元素: C・H・O・N・S

(働き) 生命現象発現の主役 (参考) 図録 p 91

1. 1「**酵素**」: 自分自身は変化せず、生体内の化学反応を促進する。

→リードα p 8

<例>



2. 2「**ホルモン**」: 恒常性の維持(内部環境を一定に保つ)に関与する。

→リードα p 117 体温の維持・血糖の調節などに関与 (参考) 図録 p 134

ホルモン名	内分泌腺	働き	欠乏	過剰
インスリン	膵臓ランゲルハンス島β細胞	血糖低下	3	
グルカゴン	膵臓ランゲルハンス島α細胞	血糖増加		
成長ホルモン	脳下垂体前葉	成長促進・血糖増加	小人症	巨人症

3. 4「**赤血球**」: 5「**赤血球**」に存在し酸素の体内運搬する。

→リードα p 113 (参考) 図録 p 124

4. 抗体6 (**免疫グロブリン**): リンパ球(おもにB細胞)が産生し生体防御に関与する。

→リードα p 114 (参考) 図録 p 127

5. 7「**Na⁺-K⁺ATPase**」: イオンの能動輸送を行い神経興奮に関与する。

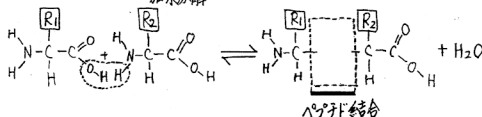
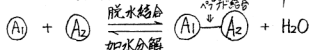
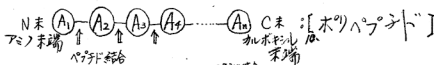
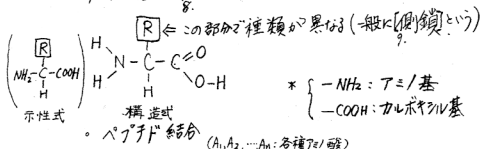
→Point 8・リードα p 10 (参考) 図録 p 24

6. アクチン・ミオシン: おもに筋細胞に存在し筋収縮に関与する。

(参考) 図録 p 110

構造)・基本単位分子

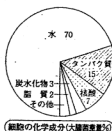
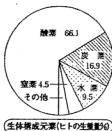
アミノ酸 (20種) (参考) 図録 p 90



1 生物物質としてのタンパク質

A 細胞と細胞を構成するいろいろな物質のうち、細胞に最も多く含まれているのは水で、タンパク質は水の次に多い。

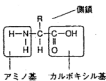
生体内のタンパク質は、大きくは構造タンパク質(構造形態の維持)と機能タンパク質(酵素、抗体、ホルモンの本体)に分けられる。



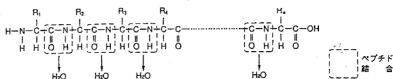
→ リットα p9

B タンパク質の構成単位

- タンパク質は、多数のアミノ酸がつながってできた高分子化合物である。
- (1) アミノ酸の基本構造 アミノ酸は、1個の炭素原子にアミノ基(-NH₂)、カルボキシル基(-COOH)、水素原子、側鎖が結合したもので、側鎖の種類によって異なるアミノ酸になる。



- 生体内のタンパク質は20種類のアミノ酸からできている。
- (2) ペプチド結合 一方のアミノ酸のアミノ基と他方のアミノ酸のカルボキシル基とから1分子の水がとれてできる...CO-NH...の結合をペプチド結合という。また、多数のアミノ酸がペプチド結合してできた長い鎖状の物質をポリペプチドという。



C タンパク質の構造

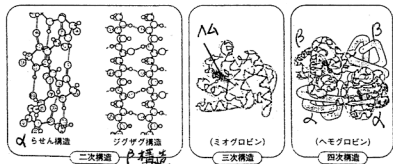
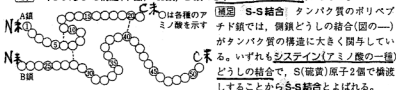
- タンパク質には多くの種類があり、それぞれ異なる立体構造をとるが、それらは、構成しているアミノ酸の種類と数と配列順序によって決まる。タンパク質の構造は一次、二次、三次、四次構造に分けられる。
- (1) 一次構造 タンパク質を構成するアミノ酸の配列順序。
- (2) 二次構造 ペプチド鎖中のOとHやNとHの間でできるゆるやかな結合(水素結合)による部分的な立体構造で、らせん構造やジグザグ構造などがある。
- (3) 三次構造 らせん構造やジグザグ構造が組み合わさってできるペプチド鎖全体の立体構造のこと。[例] ミオグロビン (赤血球のヘモグロビン)
- (4) 四次構造 1つのタンパク質分子が複数のサブユニット(三次構造をもつポリペプチド)からなる場合、そのタンパク質全体の構造のこと。[例] ヘモグロビン (赤血球のヘモグロビン)

① 色素タンパク質
; ホムヘムタンパク質
色素をもつタンパク質。

(例)
Hb + ホムヘムタンパク質
(赤血球の色素)

タンパク質	存在場所	働き	ホムヘムタンパク質の数
ミオグロビン	筋肉	O ₂ 貯蔵	1つ 三次構造
ヘモグロビン	赤血球	O ₂ 運搬	4つ グロビン O ₂ 貯蔵

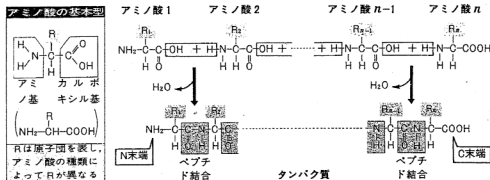
<参考> 図録 p91
p124



ペプチド結合とタンパク質

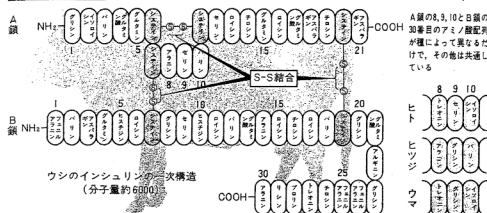
タンパク質は、アミノ酸がペプチド結合によって多数結合した高分子化合物。

アミノ酸は、1分子中にアミノ基(-NH₂)とカルボキシル基(-COOH)をもつ化合物。



<参考1>

一次構造 ペプチド結合で結合しているアミノ酸の配列順序



II. 炭水化物 * 組成元素: C, H, O

<参考> 図録 p.21

働き) エネルギー源, 貯蔵物質, 細胞壁の成分

<例> $\downarrow$
1. [グリコーゲン・デンプン] 2. [セルロース]

構造) 基本単位分子: $\left[\text{単糖} \right]_n$



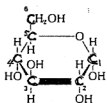
<例> 6 炭糖 ($n=6$) = ブドウ糖 (グルコース)



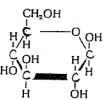
5 炭糖 ($n=5$): リボース



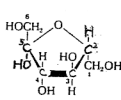
(参考 2))



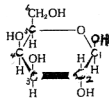
α -ブドウ糖



β -ブドウ糖

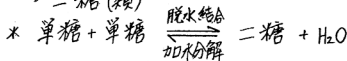


β -果糖

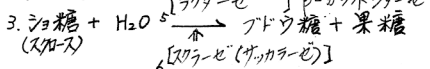
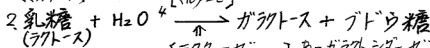
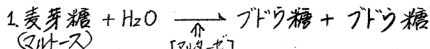


β -ガラクトース

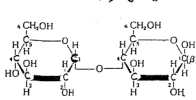
・二糖(類)



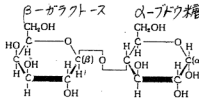
<例>



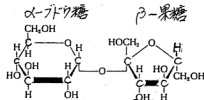
(参考 3))



1. (麦芽糖)



2. (乳糖)



3. (ショ糖)

○ 多糖 (類)

<参考> 図録 p17

<例>

1. デンプン α -ブドウ糖

基本単位

構造

直鎖状

5'

枝分れ構造

アミース

<植物のエネルギー源の貯蔵>

2. グリコーゲン α -ブドウ糖

基本単位

構造

枝分れ構造

アミロプクテン

<動物のエネルギー源の貯蔵>

3. セルロース β -ブドウ糖

基本単位

構造

直鎖状

<植物 細胞壁の成分>

III 脂質

* 組成元素 C, H, O, N, P 他

「無極性溶媒 (アルコール, エーテル) で抽出される物質」

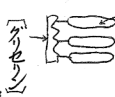
働き 貯蔵物質, エネルギー源, 単位膜の構成物質

<例> [脂肪]

<例> [リン脂質]

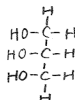
構造

1. 脂肪 (中性脂質): 貯蔵物質



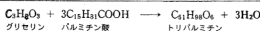
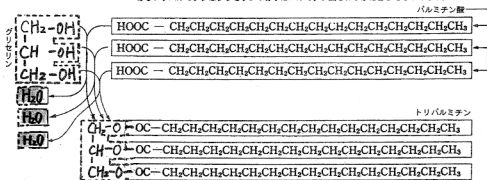
[脂肪酸]

* グリセリン



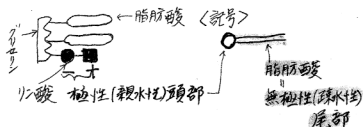
■ (参考3) 脂肪

水にとけず、アルコールやエーテルなどにとける性質をもつ化合物のこと。細胞の活動に必要なエネルギー源となる。脂質のうちの脂肪は脂肪酸とグリセリンが結合した化合物である。脂肪の一種であるトリパルミチンはグリセリン1分子にパルミチン酸3分子が結合したものである。



* パルミチン酸は脂肪酸の一種

2. リン脂質：単位膜構成 (参考) 図録 p22



3. 糖脂質：単位膜構成

4. ステロイド：ステロイドホルモン (性ホルモン, 副腎皮質ホルモン) → リトール P159

胆才酸 (胆液の主成分) <※> 胆液; [] で合成

コレステロール

<※1> 脂肪 + 3H₂O $\xrightarrow{\text{加水分解}}$ グリセリン + 脂肪酸
[1:3] (1 : 3)

胆のうで貯蔵分泌
脂肪の消化を助
ける消化液である
か? 消化酵素も

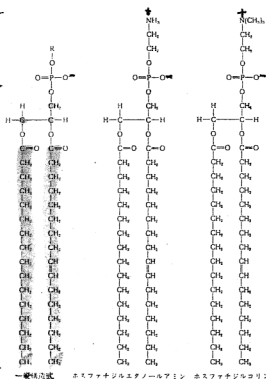
<※2> 必須脂肪酸：リノール酸, リレン酸

なはい。

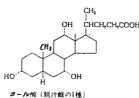
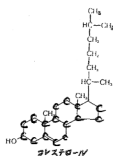
((参考4))

極性頭部

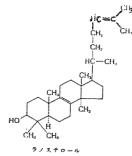
無極性尾部



一価アルコール ホスファチジルエタノールアミン ホスファチジルコリン



アンドロステノン (男性ホルモンの1種)



テストステロン (男性ホルモンの1種)

いくつかのステロイド

リン脂質

Ⅳ 核酸 (DNA・RNA) * 組成元素: C・H・O・N・P

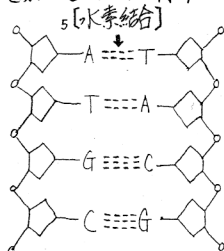
働き { DNA (デオキシリボ核酸)
: [遺伝情報] (生命設計図)
= タンパク質の [アミノ酸配列指定]
RNA (リボ核酸)
: タンパク質の合成の道具

XI RNAの種類

[mRNA (伝令RNA): 遺伝情報の伝達]
[tRNA (転移RNA): [アミノ酸]の運搬]
[rRNA (核小体RNA): リボソムの形成]

<注> リボソム: タンパク質とrRNAの複合体

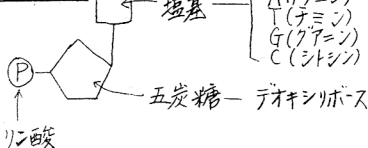
構造) * 基本単位 <参考> 図録 p88



* A = T, G ≡ C : [相補的結合]

リン酸 デオキシリボース

ヌクレオチド



RNA
A (アデニン)
U (ウラシル)
G (グアニン)
C (シトシン)
リボース

★ 分子構造 { DNA : [二重らせん] 構造
<参考> 図録 p30 * 2⁺ フォトン・クリックの模型 <1953年>
RNA : 一本鎖構造

<探究課題> ① ヒトの1つの核のDNAの長さは、何m?

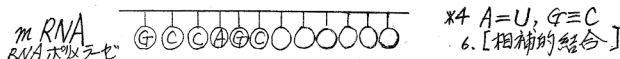
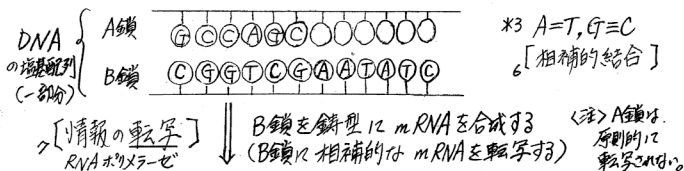
情報 1. DNAの長さの単位は、ヌクレオチド対 = 塩基対 (bp) base pair
2. DNAの二重らせん構造 1ピッチ (回転) = 10塩基対 = 3.4nm → 1塩基対 ≐ 0.34nm
3. ヒトの1つの核のDNA ≐ 1.2 × 10¹⁰ ヌクレオチド (塩基)
1.2 × 10¹⁰ 塩基 = $\frac{1.2 \times 10^{10}}{2}$ = 6 × 10⁹ 塩基対 = 6 × 10⁹ × 0.34 = 2.04 × 10⁹ nm = 2.04 × 10⁹ × 10⁻⁹ m ≐ 2m

② ヒトの1つの核には 最大、何個の遺伝子が存在すると思う?

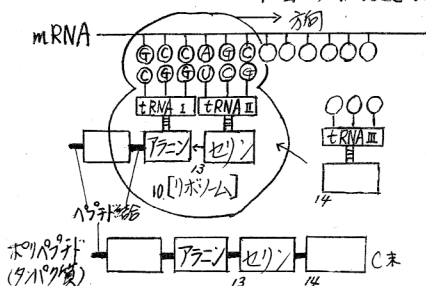
ただし、1つの遺伝子を 1000塩基対 (ヌクレオチド対) とする。

6 × 10⁹ 塩基対 = $\frac{6 \times 10^9}{1000}$ = 6 × 10⁶ 遺伝子 10% 実際の遺伝子の数
(60億) 約10万遺伝子?

<セントラルドグマ (中心命題)> 《重要》 図録 p92 ~ 93
 ; タンパク質合成のメカニズム "遺伝子が動くとはどういうことか?"

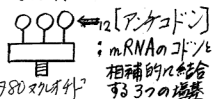


8. [情報の翻訳] mRNA の情報通り, [3つの連続した塩基(コドン)について] 1個のアミノ酸を tRNA から運搬する



*5. [トリプレット] 説
 : 1種類のアミノ酸が 3つの連続した塩基(コドン)に対応するという説。

*6 tRNA (参考) NO7-2 (新聞)



*7 アミノ-tRNA複合体



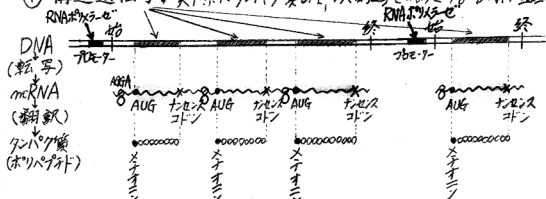
*8 特殊な暗号

{ 翻訳の始め: AUG (メチオニン), GUG (バリン)
 翻訳の終り: (ナンセンスコドン) (終止コドン)

→ UAG, UGA, UAA

タンパク質合成のメカニズム のつぎ

- ① 構造遺伝子: 実際にタンパク質の[一次構造]を指定する DNA塩基配列。



(注1) DNAのすべての塩基配列が mRNA などの RNA に転写されるわけではない。

(注2) mRNA に転写されるすべての塩基配列がアミノ酸配列の暗号となっているわけではない。

- ② なら 3つの連続した塩基配列で 1つのアミノ酸を指定することになったか?

塩基数 → 指定アミノ酸種類

1つ	4 種類
2つ	2() 種類
3つ	3() 種類
4つ	4() 種類

- ③ 遺伝子突然変異

DNA中の[塩基配列]の変化

↓
タンパク質中の[アミノ酸配列]の変化

↓
タンパク質の立体構造の変化

↓
個体の危機 or 致死

逆により環境に適応する場合もある。

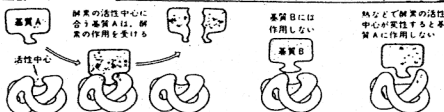
→ 遺伝子の構造と働き

<例> [鎌状赤血球貧血症] NO.3(4)

ヘモグロビン (転写) 図録 p95

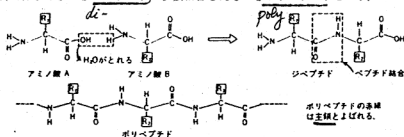
② ① βグロビン中の
③ ④ グルタミン酸 → バリン

※3 酵素の基質特異性 酵素は立体構造に由来して、特定の基質に結合できる基質にのみ作用する。そのため、活性中心の形が何らかの原因で変形すると、酵素作用は失われる。



※4. タンパク質の構造

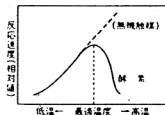
- (1) アミノ酸の結合 アミノ酸はアミノ基 ($-NH_2$)、カルボキシル基 ($-COOH$) をもった化合物であり、側鎖 ($-R$) の違いによって、アミノ酸の種類が異なる。アミノ酸どうしは $-NH_2$ と $-COOH$ から H_2O がとれて結合(ペプチド結合)し、ペプチドになる。2個結合したものをジペプチド、多数結合したものをポリペプチドという。



- (2) タンパク質の一次構造 タンパク質のアミノ酸の配列順序を一次構造という。構成アミノ酸は20種類しかないが、タンパク質の種類が無数であるのはこの構造のため。
- (3) タンパク質の高次構造 実際のタンパク質では、糸状のポリペプチドの鎖が折れ曲がったり、組み合わさったりして、複雑な立体構造をしている。これを高次構造といい、タンパク質のはたらきはこの構造に基づいている。
- (4) タンパク質の変性と回復 温度、pH、化学物質などによってタンパク質の高次構造が壊れ、活性を失うことを変性という。しかし、高次構造が壊れても一次構造が壊れていなければ、再び同じ高次構造に回復することができる。→ 図録 p152

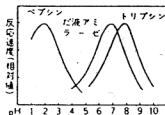
c) 最適温度

▶ 最適温度は35~40℃。高温になると(60℃以上)、酵素のタンパク質が変性して、酵素作用を失う。低温では作用が低下する。



d) 最適pH

▶ 酵素作用は水素イオン濃度 (pH) によって影響を受ける。各酵素には最適 pH があって、特定の pH 範囲内でのみはたらく。



※5 pH: 水素イオン濃度 $[H^+]$

- 1) 中性: 10^{-7}mol/l → $pH=7$ mol 濃度
- 2) 酸性: 10^{-7}mol/l より大 → $pH < 7$
- 3) 碱性: 10^{-7}mol/l より小 → $pH > 7$

Point 57 細胞分化のしくみ <参考> 図録 p97

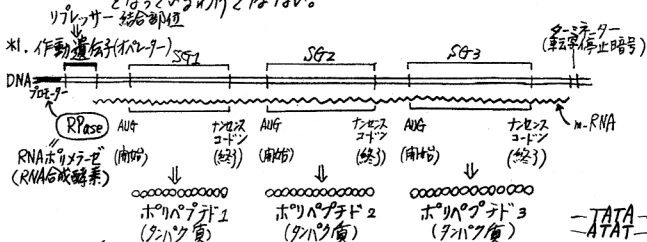
遺伝子発現のメカニズム(機構)

オペロン説 ジャコブとモ (1961年)

タンパク質 DNA
オペロン: 一つの調節効果(リプレッサー)と作動遺伝子(オペレーター)により、調節を受けて、一つの m-RNA に転写されるいくつかの遺伝子(構造遺伝子)群のこと。

(注1) DNA のすべての塩基配列が、m-RNA などの RNA に転写されるわけではない。

(注2) m-RNA に転写されたすべての塩基配列がアミノ酸配列の暗号となっているわけではない。



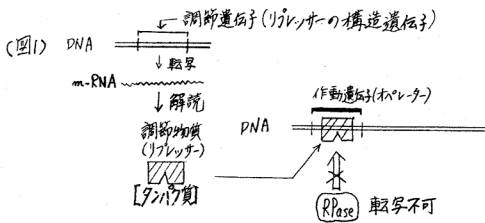
・ RPase = RNAポリメラーゼ: 特定の塩基配列のプロモーター領域を認識し (注) プロモーター領域は RNA 転写開始点 RNA を転写(合成)する酵素。

* プロモーター領域: 大腸菌では平均 約 60 bp の特異的な塩基配列。

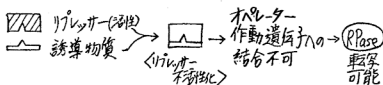
林 bp = base pair (塩基対): DNA 中の つらなつたヌクレオチドの数を表す単位。

・ SF1 } 構造遺伝子: 実際にタンパク質の遺伝暗号を与える
SF2 } DNA 塩基配列。
SF3 }

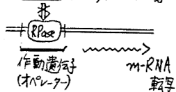
直前に存在する。
オペレーター領域は、
一般に、プロモーター領域
もしくは、それより下流に
存在する。



*2. 誘導 (誘導物質が存在する時転写促進)



(図2) (リレラー-誘導物質複合体)



<例>

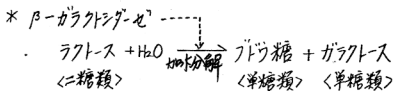
誘導例

ラクトースオペロン:

誘導物質: ラクトース (乳糖)

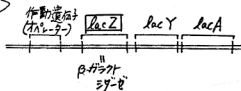
構造遺伝子数: 3個

コードするタンパク質(酵素): β -ガラクトシダーゼ



異化に利用
(生活エネルギーを得る)
ATP

<参考>



②病原体の分類

微生物

プリオン：タンパク質

ウイルス：糖タンパク質＋遺伝子(DNAまたはRNA)

細菌類：原核生物(細胞膜・遺伝子DNA) ←抗生物質(原核生物用)

生物 (菌類：真核生物(細胞膜・遺伝子DNA・核膜・ミトコンドリア)

予防・対策は？

熱 (<133℃・20分間・3気圧の加熱処理)

変性剤(尿素・グアニジン塩酸)

ホルマリン

タンパク分解酵素

界面活性剤



β構造

治療薬の開発

プリオン抗体 (ワクチン)

異常プリオンを減少させる

マブリア治療薬 (キナクリン)

抗増殖剤

免疫抑制剤

クロロフィル誘導体 など

異常プリオンへの実験阻止

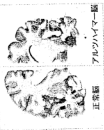
抗真菌剤 (アムホテリジンB)

抗がん剤 (アントラサイクリン) など

熱・薬品で殺せない

アルツハイマー病

ヒト脳の切断面



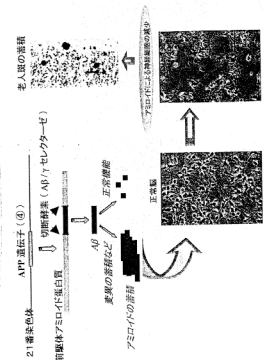
主なアルツハイマー病関連遺伝子

- ① PSEN2・プレズリニン2遺伝子
- ② PSEN1・プレズリニン1遺伝子
- ③ Aβ2・アポリポタンバイ質遺伝子
- ④ APP・アミロイド前駆体遺伝子

ヒト染色体上の 前駆体遺伝子

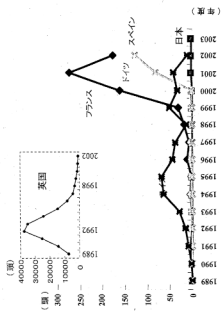


アルツハイマー病の発症

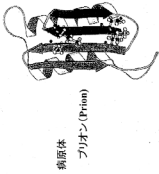
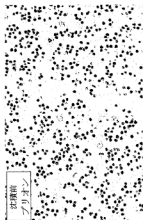


Q

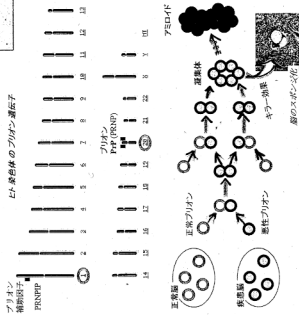
(國際防疫事務局：2003年1月17日現在)



③ BSEウシ

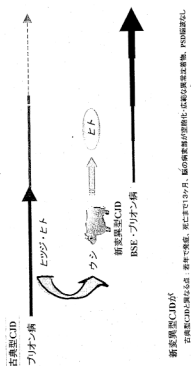


⑤



④

狂牛病の新変異型CJD(クロイツフェルト・ヤコブ病)と従来の古典型CJDとの関係



変異型CJDが
古典型CJDと異なる点：老年で発症、死亡まで13ヶ月、脳の病変部が星状化・広範な異常沈着物、PSD陽性なし、

<転写の開始と終結> 資料: ヴァイト生化学(下) <資料1> 大腸菌のプロモーター p 799

29・2 RNA ポリメラーゼ

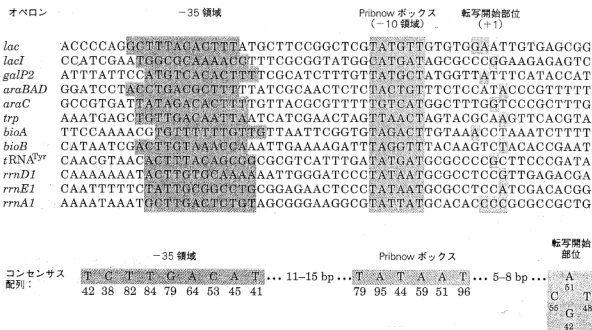


図 29・10 大腸菌の代表的プロモーターの暗号鎖の配列。-10 位付近に中心をもつ 6 bp 領域(橙色網かけ)と-35 領域の 12 bp の配列(青網かけ)はともに保存されている。転写開始部位(+1)はほとんどのプロモーターでプリンヌクレオチドである(緑網かけ)。最下行は大腸菌プロモーターの 298 種のコンセンサス配列。下の数字は出現率(%)を示す[M. Rosenberg, D. Court, *Annu. Rev. Genet.*, 13, 321-323 (1979) による。コンセンサス配列は S. Lisser, H. Margalit, *Nucleic Acids Res.*, 21, 1512 (1993) より]

開始には開放複合体の形成が必要

プロモーターとホロ酵素の接触領域はジメチル硫酸(DMS)などアルキル化剤に対する感受性が変わる DNA の範囲を調べて決められた。これをフットプリント法(足跡法)ともいう (§ 33・3 B)。その結果、ホロ酵素は-10 領域および-35 領域付近だけでプロモーターと接することがわかった。これら保護領域(-10、-35 領域)は B-DNA 二重らせんの同じ側にあり、RNA ポリメラーゼはプロモーターの片側から結合するらしい。

DMS は DNA の G の N7 と A の N3 (§ 28・6 B) ばかりに、A の N1 と C の N3 もメチル化する。しかし、後二者は塩基対を形成しているので、一本鎖のときだけ DMS と反応する。したがってメチル化反応は DNA 鎖の分離すなわち「融解」のよい検出法になる。ホロ酵素が結合すると、-10 領域の中ほどから開始部位の少し先(-9 から +2)まで、少なくとも 11 bp のプロモーター領域が融解することがフットプリント法でわかった。このように「開放複合体(開いた複合体)」を形成する関係で-10 領域中に G・C 塩基対が増えるとプロモーター効率が低下するのであろう。G・C 対は A・T 対より安定で開きにくいからである。

C. 転写開始

原核 RNA の 5' 末端はほとんどプリンで、A が G より多い。転写は二つのヌクレオシド三リン酸の連結で始まる。



したがって細菌 RNA の 5' 末端は三リン酸で、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を与えるとラベルが RNA に取込まれる。このラベルは RNA の 5' 末端だけ、内部のリン酸ジエステルは α -リン酸基に由来するのでラベルされない。

RNA 合成は、少なくとも試験管内では、ふつうヌクレオチド 2-3 個、せいぜい 9 個までつながったところで中断することが多いことから、開放複合体をつくるのは難しいことがわかる。しかしホロ酵素はプロモーターを放さず、転写を再開する。最終的には開放複合体が形成され、プロセシブ(連続的)な RNA 合成が始まる。この時点で、 σ 因子はコア酵素-DNA-RNA 複合体から解離、別のコア酵素に結合して新しい開始複合体を形成する。これは、あらかじめホロ酵素を入れた転写反応液にコア酵素を加えると、爆発的に RNA 合成が起こることと証明される。

<資料2> 転写の終結 p 803

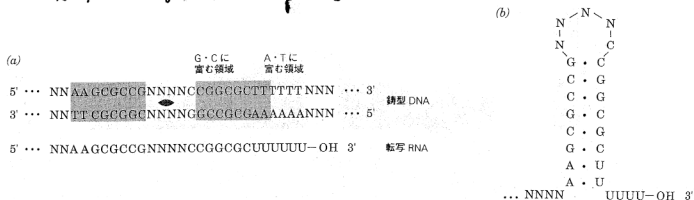


図 29・15 いくつかの転写物の配列から推定した仮定の強力な(効率のよい)大腸菌転写終結配列。(a) DNA 配列と、対応する RNA 配列。A・Tに富む領域を青、G・Cに富む領域を赤で示す。逆転反復配列を成す区分を網かけ、2 回対称軸をレンズ印で示す。(b) 転写終結を誘起する RNA ヘアピン構造とポリ(U)の尾 [D. Pribnow, "Biological Regulation and Development," ed. by R. F. Goldberger, Vol. 1, p. 253, Plenum Press (1979) による]

終結は ρ 因子を必要とすることが多い

前述の終結配列は転写を自然に終結させる。しかし明瞭な類似点がなく、強いヘアピンもつけない終結部位もある。この場合は転写終結に ρ (ロー) 因子というタンパクが必要である。

<資料3> 真核生物のプロモーター p 805

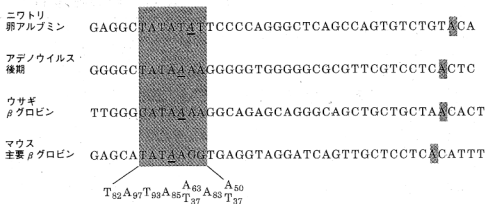


図 29・17 真核構造遺伝子のプロモーター配列の例。互いによく似た配列の TATA ボックスに橙色網かけ、-27 位塩基に下線。最初の転写塩基(+1)は緑網かけ。最下行に多数のプロモーターのコンセンサス配列を示す。添字は塩基の出現率(%) [F. Gannon, K. O'Hare, F. Perrin, J. P. Le Pennec, C. Benoist, M. Cochet, R. Breathnach, A. Royal, A. Garapin, B. Cami, P. Chambon, *Nature*, **278**, 433 (1978)]

シリーズ 遺伝子 IV

ヒトゲノム計画 ① 図 p101

< ヒト 1 核当り $2n=46$ >

1.2×10^9 対 1 対 $= 6.0 \times 10^9$ 塩基対

1 ヶ ヴム ($n=23$) 3.0×10^9 塩基対 $= 30$ 億塩基対

1 塩基子 $= 1000$ 塩基対 $\times 30$

1 ヶ ヴム当り $\frac{3.0 \times 10^9}{1000} = 3.0 \times 10^6$ 塩基子

しかし、実際は約 5% の塩基子しか??

残りの 95% は、意味不明 unknown 領域
未知

★ なぞを解く

遺伝子・ゲノム研究の主な歩み	
1853年	DNAの立体構造が分かる
77	DNA塩基配列を決める技術の発表
86	米エネルギー省がヒトゲノム研究開始
89	日本学術会議がヒトゲノム研究を推進する勧告
90	米エネルギー省・NIH共同のゲノム研究が始まる
91	日本・文部省がヒトゲノム研究開始
95	米でインフルエンザゲノム解読完了 細菌で初めての全ゲノム解読 癌の大などがヒトゲノムの22番染色体の解読を完了
2000	米セラ・ジェノミクス社が「ヒトゲノムの90%を解読」と発表

「ヒトゲノム計画」は、ヒトの全ゲノムを解読し、その情報を活用することを目指す。ヒトゲノムは、約30億塩基対から構成されており、そのうち約5%は遺伝子（タンパク質をコードする）で、残りは非コード領域（調節領域など）である。ヒトゲノム計画は、ヒトの健康、疾病の予防、そして人類の進化の理解に大きく貢献する。

ガングロ

「ガングロ」は、ヒトゲノム計画の進展に伴って、遺伝子の機能を解明するための重要なツールとして注目されている。ガングロは、特定の遺伝子が発現する組織や細胞を特定し、その機能を研究するための重要なツールである。ガングロは、ヒトゲノム計画の進展に伴って、遺伝子の機能を解明するための重要なツールとして注目されている。

A Q
**どんなビジネスが
ななる分野。**
新薬開発や遺伝子診断につ

ゲノムの解読結果は、ヒトの健康、疾病の予防、そして人類の進化の理解に大きく貢献する。ゲノムの解読結果は、ヒトの健康、疾病の予防、そして人類の進化の理解に大きく貢献する。ゲノムの解読結果は、ヒトの健康、疾病の予防、そして人類の進化の理解に大きく貢献する。



ヒトゲノム解読のためにずらりと並んだDNA解読装置。昨年10月、米メリーランド州のセラ・ジェノミクス社で、浅井亨が

米エネルギー省などは、九〇年代に世界に先駆けヒトゲノム研究に取り組み始めた。日本も英米、フランスなど九〇年前後に国家的なプロジェクトとして本格化させた。各国の研究機関は協力し、役割を分担して解読を進めていく。DNA解読競争の

セラ社は、ヒトゲノム解読競争に勝つため、最先端の技術を駆使して特許を取得し、競争優位性を確保した。セラ社は、ヒトゲノム解読競争に勝つため、最先端の技術を駆使して特許を取得し、競争優位性を確保した。セラ社は、ヒトゲノム解読競争に勝つため、最先端の技術を駆使して特許を取得し、競争優位性を確保した。

「ヒトゲノム計画」は、ヒトの全ゲノムを解読し、その情報を活用することを目指す。ヒトゲノムは、約30億塩基対から構成されており、そのうち約5%は遺伝子（タンパク質をコードする）で、残りは非コード領域（調節領域など）である。ヒトゲノム計画は、ヒトの健康、疾病の予防、そして人類の進化の理解に大きく貢献する。

ヒトゲノムって何だろう

「ヒトゲノム」という言葉がニュースによく登場する。遺伝や医学に関連するといふ。遺伝子とか、DNA（デオキシリボ核酸）という言葉によろしくなじんできたといふのに、また新たな片仮名語の出現だ。ビジネスにもかかわるらしい。遺伝子やDNAとどう違うのか。ヒトゲノムを解説するってどんな意味があるのかのほどくちか。

（科学部・津井 文和）

(科学部・浅井 文和)

ゲノムの意味は

生物がもつ遺伝情報の全体で、その生物の全遺伝子を含む。

「レースに強い競走馬の子
馬は一般に高値で取引される
含まれたDNAだ。」

解説して何が分かるの

A 病気との関連など、解析はまだこれから。

塩基配列が分かって、それだけでは役立つ情報にはならない。研究者が知りたいのは、ゲノムの中のどの遺伝子があるのか。病気との関連性など、遺伝子とどんな働きをもっているのか……などだ。

七〇年代以降、分子生物學の発展で、病気に関連する遺

読者とつくる

[illegible][illegible]

用とみられてゐる。仕組みが
かれば防虫もやすくな
だ。

明「具体的に防虫するお
れが、その診断したてに
て、そのDNAを断片にし
て意味を持つのは一般に
は理解しない。これは、
遺伝子とDNAとの区別を
よく理解し、心理面を念
頭に、適切な相談をして
いかねばならぬ。カガセ
の配座を、医療者の発
達とともに知識の普及が重

塩基

A…アデニン G…グアニン
T…チミン C…シトシン



解読完了はい？

2003年とされるが、早まるかも。

性傾向とし、解読室の目標が1005年(約1001年)に達している。

こうした国際協力の中で、歴史的な清水信義教授のグループは昨年11月、人間の「21番染色体の塩基配列」を解読し、と発表。21番染色体は小さな染色体ではあるが、23対ある人の染色体を解読する上で貴重な「目録」だ。

一方、学術的な色彩が濃かった解読は、民間企業研究員と参入し、激しい競争になっ

H12.2.9

遺伝情報での差別禁止

連邦政府の米で大統領令
採用・昇進

【ワシントン8日】連邦政府の大統領令は、八日、連邦政府雇員の採用や昇進に当たり、遺伝情報による差別を禁止する大統領令に署名した。遺伝子研究の進歩は、病気の治療法

を大きく変える一方で、病気に関係する遺伝子を持つていることを理由に解雇されるなどマイナス面が社会問題になり始めている。大統領は「ライバシー保護が徹底しないと、せっかく

の進歩の恩恵を受けられない人が出る」と述べ、民間に対しても同様の差別を禁ずる法律の早期成立を議会に求めた。

遺伝子の解析は急速に進み、がんなどいくつもの病気の進歩の恩恵を受けられない②昇進や任地の選定

気について発病確率などを調べる遺伝子検査が行われている。即日発効した大統領令は連邦政府に対し、①採用の際、遺伝情報や遺伝子検査を要求してはならない②昇進や任地の選定

②遺伝情報のもたらすもの

1) 遺伝子の差別化

就職差別
結婚差別
保険差別

2) 精神不安の増大

3) 家庭不和 DNA鑑定

↓
知るか？

幸せか不幸せか？

に、遺伝情報を用いてはならない③職員の遺伝情報を得たり公開したりしてはならない、としてい

る。大統領は、米議会に提出されている、こうした遺伝子差別の禁止を民間に対しても求める法律の制定を促すとともに、遺伝子を理由に保険加入を断られるのを防ぐ法律の制定も急ぐよう求めた。団体加入保険については、遺伝情報の要求を禁止する法律が一九九六年に成立しており、個人加入の保険が次の課題となっている。

遺伝子差別をめぐる九六年の民間の調査では、病気に関係する遺伝子を持つ人の一五％が採用などの際に遺伝情報を求められ、一三％が本人や家族が解雇されるなどの差別を受けたと答えている。九七年の別の調査では、六三％の人が雇用者に結果が知られるなら遺伝子検査を受けたい、とも答えてい

ヒト

染色体と遺伝子

第1染色体

- 血圧調整に関与するもの
- レニン・アンギオテンジノーゲン・心房性ナトリウム利尿ホルモン
- Rn血液型
- 甲状腺刺激ホルモン

第2染色体

- システチン尿症
- 白内障
- 免疫グロブリン(ガンマーL鎖群)

第3染色体

- 家族性良性嚙性天疱瘡
- フォン・ヒッペル・リンドウ症候群
- ロドプシン(網膜色素変性症)

第4染色体

- ヘンダーソン病
- 毛髪色(赤)
- 家族性パーキンソン病

第5染色体

- 嚙痔性症候群
- 家族性大腸ポリポーシス
- 脊髄性筋萎縮症

第6染色体

- インシリン依存性糖尿病
- ストレプトミシン抵抗性
- 組織適合抗原群 (HLA)

第7染色体

- のう膜性網膜腫
- 家族性乳がん ← 遺伝的診断
- ウイルン病

第8染色体

- ウェルナー症候群(早老症)
- GPT(グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)
- 骨形成因子

第9染色体

- 福山型先天性筋ジストロフィー症
- 色素性乾皮症A群
- ABO血液型

第10染色体

- ヒルシュスプリング病
- (先天性巨大結腸症)
- ウォルマン病
- GOT(グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ)

第11染色体

- 嚙痔性症候群
- 嚙痔性大腸ポリポーシス
- 脊髄性筋萎縮症

第12染色体

- ビタミンD抵抗性くる病
- アルデヒド脱水酵素 2
- 良性脂肪腫

第13染色体

- 網膜芽細胞腫
- 家族性乳がん ← 遺伝的診断
- ウイルン病

第14染色体

- アルツハイマー病 ← 遺伝的診断
- マン・ショセフ病
- 内臓逆位・免疫不全

第15染色体

- マルファン症候群
- プラダー・ウーリ症候群
- アンジェルマン症候群

第16染色体

- 家族性高HDL血症
- 白内障
- 本態性高血圧症

第17染色体

- 神経線維腫症1型
- (レックリングハウゼン病)
- がん抑制遺伝子p53 ← 遺伝的診断
- 成長ホルモン

第18染色体

- 家族性アミロイドポリネーロパチー1型
- ニーマン・ピック病
- 多発性硬化症

第19染色体

- 家族性高コレステロール血症
- 虹彩色(緑・青)
- 毛髪色(茶)

第20染色体

- プリオンたんぱく
- アダマンデアジーズ(ADA)欠損症
- 骨形成因子

第21染色体

- ベータ・アミロイド前駆たんぱく(APP)
- スーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)
- 胚毒毒性副溶血性敗血症(ALS)

第22染色体

- 猫目症候群
- ガンマ・GTP
- シタクロビン

X染色体

- 血友病・赤痢色盲
- デュシェンヌ型筋ジストロフィー症
- 男性同性愛

女性→Y染色体

- 性器發育異常XY型
- 無精子症
- XYY男性(染色体異常)

女性→X染色体

- 性器發育異常XY型
- 無精子症
- XYY男性(染色体異常)

資料

- 遺伝暗号表 (コドン表)..... p.59
- pUC119 の塩基配列図..... p.60 ~ p.64
- 制限酵素認識配列一覧・制限酵素緩衝液対応表など..... p.65 ~ p.68
- 基礎実験マニュアル..... p.69 ~ p.73
- 分子生物学基礎知識..... p.74 ~ p.82

(注) 参考の図は、おもにヴォート生化学 (東京化学同人) 及び TaKaRa 遺伝子工学製品ガイド (宝酒造) から引用した。

参考文献

遺伝子操作関連:

Voet, D. and Voet, J.G. (1995) "ヴォート 生化学 (第2版) (上下)", 田宮信雄他訳, 東京化学同人
(毎年補迫が出されている。演習問題の解答集もある。)

J.D.Watson, N.H.Hopkins, J.W.Roberts, J.A.Steitz, and A.M.Weiner (1987)

"ワトソン 遺伝子の分子生物学 (第4版)", 松原謙一他監訳 (1988) トッパン, 東京
(最近, 第5版が出版された。)

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Lab. Press
山中広樹, (西方敬人), "バイオ実験イラストレイテッド", 秀潤社

1. 分子生物学実験の基礎 (1995)

2. 遺伝子解析の基礎 (1995)

3. 本当にふえる PCR (1996)

(挿絵が多くて初心者向けの, この種の本が最近多く出版されている)

標準遺伝暗号

第一塩基 (5' 末端)	第二塩基				第三塩基 (3' 末端)
U	U	C	A	G	U C A G
	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	
	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	
	UUA Leu	UCA Ser	UAA 終止	UGA 終止	
	UUG Leu	UCG Ser	UAG 終止	UGG Trp	
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U C A G
	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	
	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	
	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U C A G
	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	
	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	
	AUG Met†	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U C A G
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	
	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	
	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	

† AUG は開始コドンにも内部 Met 残基のコドンにもなる。

アミノ酸の略号(一文字表記と三文字表記)†

A	Ala	アラニン	M	Met	メチオニン
B	Asx	アスパラギンまたはアスパラギン酸	N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン	P	Pro	プロリン
D	Asp	アスパラギン酸	Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸	R	Arg	アルギニン
F	Phe	フェニルアラニン	S	Ser	セリン
G	Gly	グリシン	T	Thr	トレオニン
H	His	ヒスチジン	V	Val	バリン
I	Ile	イソロイシン	W	Trp	トリプトファン
K	Lys	リシン	Y	Tyr	チロシン
L	Leu	ロイシン	Z	Glx	グルタミンまたはグルタミン酸

† 未同定アミノ酸および非標準アミノ酸の一文字表記は X とする。

資料 pUC119 の塩基配列図

```

1600      1590      1580      1570      1560      1550      1540      1530      1520      1510
TGACACACAGC CCACTCTGGA GCGAACGACC TACACGGAAC TGAGATACCT ACAGCGGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCTCGAAGG AGAAGGCGCG
ACGTGTGTGCG GGTGCAACCT CGCTTGTGTC ATGTGGCTTG ACTCTATGGA TGTCGCACCT GATACTCTTT CCGCGTGGCA AGGGCTTCCC TCTTTCCGCC

1500      1490      1480      1470      1460      1450      1440      1430      1420      1410
ACAGGTATCC GGTAGCGCGC AGGGTGGGAA CAGGAGAGCG CAAGGAGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCGCT GTATCTTTAT AGTCTGTGCG GGTTTGCGCA
TGTCCATAGG CCAATGGCGC TCCACGCTTT GTCTCTCTGC GTGCTCCCTC GAAGGTCCCC CTTTGGCGAC CATAGAAATA TCAGGACAGC CCAAGAGCGT

1400      1390      1380      1370      1360      1350      1340      1330      1320      1310
CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTGCTCAGGG GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCGCTTT TACGGTCTCT GGCCTTTTGC
GGAGACTGAA CTCGAGCTA AAAACACTAC GAGCAGTCCC CCGCGCTCGG ATACCTTTTT GCGGTGCTTG CCGCGGAAAA ATGCCAAGGA CCGGAAACCG

1300      1290      1280      1270      1260      1250      1240      1230      1220      1210
TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCTCTGC TTATCTCCCTG ATTCTGTGGA TAACGCTATT ACAGCGCTTG AGTGAAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA
ACCGAAAAAC GGGCTGACCT GAAAGGAGCG ACTGAGGGAC TAAGACACCT ATTGGCATTA TGCGGGAACG CACTCGACTT ATGGCGAGCG CAGTGGCGCT

1200      1190      1180      1170      1160      1150      1140      1130      1120      1110
CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGGAGAG AAGCGGAAGA GCGGCCAATA CGCAAAACCG CTCCTCCCGC GCGTGTGGCG ATTCATTAAAT GCAGCTGGCA
GCTGGCTCGC GTCGCTCAGT CACTCGCTCC TTCCGCTCTT CCGCGGTTAT GCGTGTGGCG GAGAGGCGGC CGCAACCGCG TAAGTAATTA CGTGCACCGT

1100      1090      1080      1070      1060      1050      1040      1030      1020      1010
CGACAGGTTT CCGCAGTGGG AAGCGGGGCG TGAGCGCAAC GCAATTAAAT TGAGTTAGCT CACTCATTAG GCACCCCAAG CTTTACACTT TATGCTCCCG
CGTGTCCAAA GGGCTGACCT TTCCGCGCTG ACTCGCGTTG CGTTAAATTA ACTCAATGCA TGCGAGTAAT CAGTGGGCTC GAAATGTGAA ATACGAAGCG

1000      990      980      970      960      950      940      930      920      910
GCTCGTATGT TGTGTGGGAT TGTGAGCGGA TAACAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTAGC CCAAGCTTGC ATGCGCTGAC GTGCACTCTA
CGAGCATACA ACACACTCTA ACAGCTCGCT ATTGTAAAG TGCTGCTCTT GTGATGATCT ACTAATGCG TGCTGGAAGC TACGGAGCTG CAGCTGAGAT

900      890      880      870      860      850      840      830      820      810
GAGGATCCCC GGGTACCGAG CTCGAATTCA CTGCGCGTCG TTTTACAACG TGCTGACTCG GAAACCCCTG GCGTTACCCA ACTTAATCGC CTTGCAAGCA
GCTCTAGGGG CCAATGGCTC GAGCTTAAGT GACCGCGCAG AAJATGTGTC AGCACTGACC CTTTGGGAC GCATATGGGT TGAATTAGCG GAATGTCGTG

800      790      780      770      760      750      740      730      720      710
ATCCGCCCTT CCGCAGCTGCG CGTAATAGCG AAGAGGCGCG CACCGATGCG CTTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCGTGAATGCG GAATGGCGCG TGATGCGGTA
TAGGGGGAJA GCGGTGACAG CATTATGCG TTCTCCGGCG GTGGCTAGCG GGAAGGGTTC TCAACGCGTC GGACTTACCG CTTACCGCGC ACTACGCCAT

700      690      680      670      660      650      640      630      620      610
TTTTCTCCTT ACGCATCTGT GGGGTATTTC ACACGCGATA CGTCAAAGCA ACCATAGTAC GCGCGCTGTA GCGCGCGTAA AAGCGCGCGC GGTGTGGTGT
AAJAGAGGAA TCGGTAGACA CGCCATAAAG TGTGCGGTAT CGAGTTTGTG TGGTATCATG CAGCGGACAT CCGCGCGGTA TTGCGCGCGC CACACACACC

600      590      580      570      560      550      540      530      520      510
TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACCTTGCA GCGCGCTTAG CCGCGCTCTT TTGCGTCTTT TCCTTCTCTT TCTCGCGACG TTTCCGCGCT TTCCCGCTCA
AATGCGCGTC GCATGGCGCA TGTGAACGCT CCGCGGAATCG CCGGCGAGGA AAGCGAAGGA AGGGAAGGAA AGAGCGGTGC AAGCGCGCGA AAGGGGACGT

500      490      480      470      460      450      440      430      420      410
AGCTCTAAAT CGCGGGCTCC CTTTAGGGTT CGATTATAGT GCTTTACGCG ACCTCGACCC CAAAAAAGT GATTTGGGTG ATGTTTCAAG TGTGTTGGTA TGTGTTGGTA
GAGGATTTA GCGGCGGAGG GAAATCCCAA GTCTAAATCA CGAAATGCGG TGAGAGCTGG TTTTTTGAAC CTAAACCCAC TACCAGGTGC ATACCGCGCT

400      390      380      370      360      350      340      330      320      310
TGCCCGTGAT AGACGCTTTT TGCGCCTTTG ACCTTGGAGT CCACGTTCTT TAATAGTGGG CTCTGTGTTCC AAATCGGAAC ACACCTCAAC TCTATCTCGG
AGCGGAGCTA TCTGCTCAAA AGCGGGAAGC TGCAACCTCA ATTATCACCT GATGCAAGAG GTATCAATGCT GAGAACAAAG GTTGAAGTTG AGATAGAGCC

300      290      280      270      260      250      240      230      220      210
GCTATCTCTT TGATTATATA GGGATTITGCG CGAATTTCGT CTAATTGGTA AAAAATGAGC TGAITTAACA AAAATTAATG GCGAATTTTA ACAGAAATATT
CGATAAGAAA ACTAAATATT CCCTAAAGCG GTTAAAGCCA GTAAACCAAT TTTTACTGCG ACTAAATTTT TTTTAAATTT CUCCTTAAAT TCTTTTATAA

200      190      180      170      160      150      140      130      120      110
AAGGITTACA ATTTTATGCT GCACTCTCGA TAACTATGCG TCTGATGCGG CATAGTTAGT CCGAGCCCGCA CCGCGGCAAC CACCGCGTGA CCGCGCGTGA
TTGCAATATG TAAATATACA CDTGAGAGCT ATGTTAGAGC AGACTACGCG GTATCAATTC GGTGCGGGCT GTGCGCGGTT GTGCGCGGCT GCGCGCGGCT

100      90      80      70      60      50      40      30      20      10
CGCGCTGTCT TGCTCCCGCG ATCCGCTTAC AGACAGAGCTG TGACGCTGCT CCGGAGGCTGC ATGTGTGAGA GGTTTTCAAC GTCATCAGC AAGAGCGCGA
GCCCGCAACG ACGAGGCGCG TAGCGGAATG TCTGTTGCGC ACTGCGCAGG CGCCTCGACG TACACAGTCT CCAAAAGTGG CAGTATGTCG TTTGCGCGCT

```

3160 3150 3140 3130 3120 3110
 GA CGAAAGGGGCC TGGTGATACG CCTATTTTTA TAGGTTAATG TCATGATAAT AATGGTTTCT
 CTGCTTTCCCGG AGCACTATGC GGATAAAAA ATCAACATT AGTACTIATTA TTACCAAGAA

3100 3090 3080 3070 3060 3050 3040 3030 3020 3010
 TAGAGCTCAG GTGGCACATT TCGGGGAAAT GTGGCGGGAA CCCTATTGTT TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACATAAAC
 ATCTGCAGCT CACCGTGAAA AGCCCCCTTA CACGCGCCTT GGGGATAAAC AATAAAAAAT ATTTATGTAA GTTTATACAT AGGCGAGTAC TCTGTATTATG

3000 2990 2980 2970 2960 2950 2940 2930 2920 2910
 CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT GAGTATTCAA CATTTCCGTT TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTGT GCCTTCTGTG
 GGACTATTTA CGAAGTTATT ATAACCTTTT CTTTCTCATA CTCATAAGTT GTAAAGGCAC AGCGGGATAA AGGGAAAAAA TACGCTAAAA CGGAAGGACA

2900 2890 2880 2870 2860 2850 2840 2830 2820 2810
 TTTTGTCTAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAGATGCT GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGAG ATCTCAACAG CGGTAAAGATC
 AAAACGAGTG GGTCTTTGCG ACCACTTTCA TTTTCTACGA CTCTAGTCA ACCCACGTGC CTCTAGTCA ACCCACGTGC TAGCTTGACC TAGAAGTTGTC GCATTCTAG

2800 2790 2780 2770 2760 2750 2740 2730 2720 2710
 CTTGAGAGTT TTCGCCCGCA AGAACGTTTT CCAATGATGA GCACCTTTTAA AGTTCTGTCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC
 GAATCTCTAA AAGCGGGGCT TCTTGCAAAA GCTTACTACT TACTGAACCA ACTCATGAGT GGTCAAGTGT TTTTGTGATA AGGCTACCG TACTGTCAAT CTTCTAATAC

2700 2690 2680 2670 2660 2650 2640 2630 2620 2610
 AACTCGGTGCG CGCATACATC TATTCTCAGA ATGACTTTGGT TGAGTACTCA CCACTGCACG AAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG
 TTGAGCCAGC GGCGATGTGT ATAAGAGTCT TACTGAACCA ACTCATGAGT GGTCAAGTGT TTTTGTGATA AGGCTACCG TACTGTCAAT CTTCTAATAC

2600 2590 2580 2570 2560 2550 2540 2530 2520 2510
 CAGTGTGCGC ATAACCATGA GTGATAACAC TCGCGCCAACT TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGAGCCGAAG TATCATACCG CTCTTTTGTGA CAACATGGGG
 GTCACGACGG TATTGGTACT GACTATTGTG AGCGCGGTGT AATGAAGACT GTTGCTAGCC TCTCGCTTCC CAGGATTGCG GAGAAAAAGCT GTGTGATCCCC

2500 2490 2480 2470 2460 2450 2440 2430 2420 2410
 GATCATGTAA CTCGCGCTGA TGGTTGGGAA CGGAGCTGTA ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCG TGTAGCAATG GCAACAACGT
 GCATAGCATT AAGCGAAACT AGCAACCCCT GCTCTGACTT TACTTCGATA TGGTTTGTCT CTTGCTACTGT AGTGTACGCG CATATTTCGA ACATGCTTAC GTGTGTGCA

2400 2390 2380 2370 2360 2350 2340 2330 2320 2310
 TCGCGAAACT ATTAACCTGCG GAACCTACTTA CTCTAGCTTC CCGGCAACAA TTAATAGACT GATGAGGAGC GGATAAAGTT GCAGGACACCT TCTTCGCTGC
 ACGCGTTTGA TAAATTGACCG TTGTGATGAT GAGATCGAAG GCGCGTTGTT AATTATCTGA CTTACTCTCG CATATTTCGA CTTCTGCTGT AAGACGCGAG

2300 2290 2280 2270 2260 2250 2240 2230 2220 2210
 GCGCCCTTCCG GCTGGCTGCT TATTGTCTGA TAAATCTGGA GCGCGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGCG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC
 CCGGGAAGCG CGACGACCA AATAACGACT ATTTAGACTCT CGGCCACTCG CACCCAGAGC CACATAGTAA CGTGTGACCC CGGCTCTACC ATTGGGAGG

2200 2190 2180 2170 2160 2150 2140 2130 2120 2110
 CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGCGGAGT CAGGCAACTA TGGATGAAAC AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCTCT ACTGATTAACT CATTTGTGATG
 GCATAGCATC AATAGATGTG CTGCCCCCTCA GTCCGTTGAT ACCTACTTGC TTTATCTGTC TTTTCTAGAT ATCCACGGAG TGACTTAATC GTAAACCATTC

2100 2090 2080 2070 2060 2050 2040 2030 2020 2010
 TGTGACAGCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT AAAACTTCAT TTTTAAATTT AAAGGATCTA TGGTGAAGAT CTTTITGTATA ATCTCATGAC
 ACAGCTGGT TCAATTAAGT ATATATGAAA TCTAATCAAA TTTTGAAGTA TTTTCTAGAT TTTCTAGATA ATCCACGGAG TGACTTAATC GTAAACCATTC

2000 1990 1980 1970 1960 1950 1940 1930 1920 1910
 CAAATCCCTT TACATGTAGT TTTTCTTCCA CTGAGCTCTA GACCCCGCTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCTTT TTTTCTGCG CTAATCTGCG
 GTTTTATGGA ATTGACACTA AAAACAGAGT GACTCGCATC TCGGGCGATC TTTTCTAGAT TTTTCTAGAT ATCTAGAGAA AAAAGAGAGC GCATTAGAGC

1900 1890 1880 1870 1860 1850 1840 1830 1820 1810
 TGCTTGCAAA AAAAAAACC ACCGCTACCA CGCGTGCTTT GTTTGCGCGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TCCGAAAGT AATGCTGCTC AGCAGAGGCG
 ACGAACCTTT GTTTTCTTGT TCGGATGCTT GCGGACCAAA AGTTCTGAGT AGTTCTGAGT AGTTCTGAGT AGTTCTGAGT AGTTCTGAGT AGTTCTGAGT

1800 1790 1780 1770 1760 1750 1740 1730 1720 1710
 AGATACCAAA TACTGTCTCT CTAGTGTAGC CTAAGTATG CCAACACTTC AAGAACTCTG TAGCAGCGCC TACTACTCTC GCTCTGTCTA TCCGTGTACC
 TCTATGTTT ATGACAAAGA GATACATCTG CCACTCAATCC GTTGTGTGAGC GTTGTGTGAGC GTTGTGTGAGC GTTGTGTGAGC GTTGTGTGAGC GTTGTGTGAGC

1700 1690 1680 1670 1660 1650 1640 1630 1620 1610
 AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAGATCTGT TCTTACCGGG TGGAGTCTAA GACATAGTT ACCGATAGC CGGCGAGCGT CGGCTGAGC GGGGGGCTCG
 TCAACGACGA CGGTACACGC TATTACGAC AGAATGGCCC AACCTGAGTT CTGCTATCAA TGGCTTATTC CGGCTGACCA GCGCGACTTG CCCCCCAAGC

[illegible]

L E I Y G V R A G L Q D E A D K V K V L
 T R E L G S S T C O V S R * C R K S E O A
 W N S T V W E E V W S * K L M K * K * W
 G O T C A A G C T A C T T G G T G A C A C T G G T T G A C T A G A A G C T G A A A A T G A A A G T G G T
 2830 2840 2850 2870
 C C A G T C G A T G T A A C C C A C T C C T G C C A C C A C T A C T C T A G C A T C T T T A C T T T C A C C A
 F V R C N F L V H F T D L Q H L L L S F
 Q V D V T H S C T Q L I F F Y F H Q
 S S M * P T R A P N * S S A S F T T T S

 T E P H A F V P L C F A A F F P I L A V
 N R P S C F C S P L I G C F L S Y P R C
 R K O T L L F L F A F R L F P F L P S
 C C A A A G A C C A C T C T T T T T G C T T C G T T T A G C G G C T T T T T C C T T A T T A T C C G C T
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 G C T T T C T G G T G A C A A A A C A G A A G C A A A T G C C G A A A A A G G A A T A A G G C G A
 A F L G F O K Q E G K M P O K R E * C R
 R F W V S K N R K A K C R K K G N K G D
 V S G * A K T G R Q N A A K K G I R A T

 R F H Q I S M S K R K * Y * Q L M * * P
 P F T S Y E Y E E K K L I I S A N I L T
 V S I N F V * V R G K E I N N F C K D P
 G T G C C T T A C A A C T A T A G A T A G A G A A A A G T A T A A T A A C T C G T A A A T A G T C C
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 C A C G A A A T G T T G A A T A C T A T A C T C T C T T T T C A A T A T A T T G A A G C A T T A T C A G G
 H G N V E Y S Y S S F F N I I E A F I R
 F E M L N T H E V L F P F S I L L K K L S G
 R K C * I L I L F L F Q Y Y * S I Y Q G

 * Q M M L P Y M M S H I * P F F L C I P T
 I T E H A S V Y K F T N L F I F L Y P N
 H D * S R I C I Q I Y R S F Y V P L P
 C A T A A C A G A T A C T G C C T A T A T A A C T A C A T A A A C T T T T A T A T C C C
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 G T A T T G T C A T A G C G A C A T A T T T G A A G T A T T A G A A A A T A A C A A A T A G G G
 V I V S * A D T Y L H V F R E I H K * G
 L L S H E R I N I * N Y L E K * T N N G
 Y C L M S G Y I F E C I * K M K Q I G V

 G R V N G R F T G G S T * S V M I I M V
 R A C K G S F E W R V D L F O N N D S C
 E A C M E G F L A V Q N R L F N * * S
 A A G C C G C T G T A A A G G C C T T T C A C G T G A C T C A G A T C T T T G T A T A A T A G T A C T
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 T C C G C G C A T T C C C C G A A A A G T G C C A C T G A C C T T A G A A A C A T T A T A T A G A
 F R A N F P E K C H L T S K K F L L S *
 S A E I S P K S A T * R L R W H Y Y H D
 P R T F P R K V F P D V * E T I I I M T

 N V * L F L R I V L G K R
 * G I F I P T D R P G K T
 K L R Y F V A Y * S A R E D
 G R A A T G A T A T T T A T C C C G A T A G C C C C G A A G C G
 3130 3140 3150 3160 3170
 C A T T A C C T A T A A A A T A G C G T A C A G A G C C C T T C G T C
 E * P I K I G V S R G P F V
 I N L * K * A Y R E A L S
 L T Y K N R R I T R P F R

制限酵素の認識配列による分類

1. 4, 5, 6 塩基のパリンドロームを認識する制限酵素

[illegible]

□ : 販売酵素 + 販売アイソシゾマー + 未販売酵素

☐ : 販売酵素 + 未販売酵素

☐ : 販売酵素+販売アイソシゾマー

☐ : 販売酵素

Ⅱ. 7塩基のパリンドロームを認識する制限酵素

	AATT	ACGT	AGCT	ATAT	CATG	CCGG	CGCG	CTAG	CATG	GC GC	GGCC	GTAC	TATA	TCGA	TGCA	TTAA
C □ □ N □ □ G																
C □ □ N □ □ G								<i>EcoRI</i> ↓ <i>Apy I</i>								
C □ □ N □ □ G																
C □ □ N □ □ G																
C □ □ N □ □ G																
C □ □ N □ □ G																
C □ □ N □ □ G																
G □ □ N □ □ C													<i>BstE</i> ↓ <i>BspI</i>			
G □ □ N □ □ C								<i>EcoI</i>			<i>EcoRII</i> ↓ <i>BsuI</i>					
G □ □ N □ □ C																
G □ □ N □ □ C																
G □ □ N □ □ C											<i>PaeI</i>					
G □ □ N □ □ C																

※色分はp.38欄外を御参照ください。

Ⅲ. 8塩基のパリンドロームを認識する制限酵素

<i>NotI</i>	GC ↓ GGCGC	<i>AscI</i>	GG ↓ CGCGCC
<i>PaeI</i>	TTAAT ↓ TAA	<i>FseI</i>	GGCCGG ↓ CC
<i>SfiI</i>	GGCCNNNN ↓ NGGCC	<i>PmeI</i>	GTTT ↓ AAAC
<i>SgfI</i>	GCGAT ↓ CGC		
<i>SrfI</i>	GCCC ↓ GGGC		

Ⅳ. その他の制限酵素

1. さえぎられたパリンドロームを認識する制限酵素

<i>BglI</i>	GCC(N) ↓ NGGC
<i>BstXI</i>	CCA(N) ↓ NTGG
<i>SfiI</i>	GGCC(N) ↓ NGGCC
<i>Tth111I</i>	GACN ↓ (N)GTC
<i>XmnI</i>	GAA(N) ↓ (N)TTC

2. パリンドロームでない配列を認識する制限酵素

<i>BbvI</i>	GCAGC(N), CGTCG(N) ↓	<i>MboI</i>	GAAGA(N), CTTCT(N) ↓
<i>BsmI</i>	GAATGCN ↓ CTTAC ↓ GN	<i>MniI</i>	CCTC(N) ↓ GGAG(N), GCATC(N) ↓
<i>FokI</i>	GGATG(N), CCTAC(N) ↓	<i>SfaNI</i>	CGTAG(N) ↓ CAAPuCA(N) ↓
<i>HgaI</i>	GACGC(N) ↓ CTGCG(N) ↓	<i>Tth111I</i>	GTTPyGT(N) ↓
<i>HphI</i>	GGTGA(N) ↓ CCTACT(N) ↓	<i>GsuI</i>	CTCCAG GAGGTC

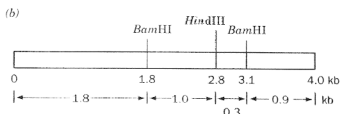
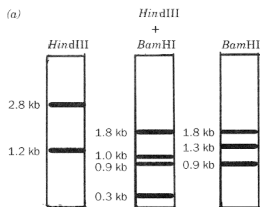
3. 切断部位がわかっていない制限酵素

<i>DraIII</i>	CAC(N) ↓ GTG
<i>NlaIV</i>	GGN ↓ NCC
<i>MstII</i>	CC ↓ TNAGG
<i>HgiEII</i>	ACC(N) ↓ GGT
<i>SnaI</i>	GTATAC

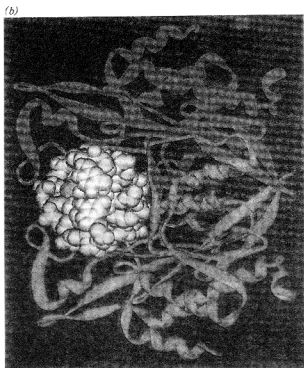
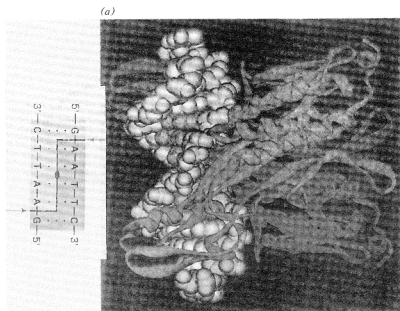
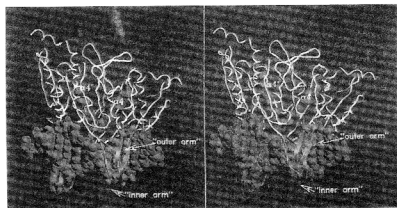
Ⅴ. 複数の塩基配列を認識する制限酵素

<i>AccI</i>	↓ GTAGAC GTATAC CTCGAC GTCTAC	<i>BanI</i>	↓ GGCAAC GGCGCC GGTACC GGTGCC	<i>GdiI</i>	↓ CGGCCG TGGCCG	<i>HincII</i>	↓ GTCAAC GTCGAC GTTAAC GTTGAC	<i>XhoII</i>	↓ AGATCC AGATCT GGATCC GGATCT
<i>AhaII</i>	↓ GACGCC GACGTC GGCGCC GGCGTC	<i>BanII</i>	↓ GAGCCC GAGCTC GGGCCC GGGCTC	<i>HaeI</i>	↓ AGGCCA AGGCCT TGCCCA TGGCCT	<i>Nsp7524I</i>	↓ ACATGC ACATGT GCATGC GCATGT		
<i>AflIII</i>	↓ ACACGT ACATGT ACGCGT ACGTGT	<i>CfrI</i>	↓ CGGCCA CGGCCG TGCCCA TGCCGC	<i>HaeII</i>	↓ AGCGCC AGCGCT GGCGCT GGCGCT	<i>NspBII</i>	↓ CAGCGG CAGCTG CCGCGG CCGCTG		
<i>AvaI</i>	↓ CCCGAG CCCGGG CTCGAG CTCGGG	<i>Cfr10I</i>	↓ ACCGGC ACCGGT GCCGGC GCCGGT	<i>HgiAI</i>	↓ GAGCAC GAGCTC GTGCAC GTGCTC	<i>PpuMI</i>	↓ AGGACCT AGGTCT GGGACC GGGTCCC		

	tel	fax	e-mail
Teichu	06(348)3786	06(348)3833	techosk@bio.toyobo.co.jp
Teikyō	03(3660)4819	03(3660)4951	techtky@bio.toyobo.co.jp



ある DNA 分子を *Hind*III, *Bam*HI, 両者の混合物で消化, 電気泳動し (a) のようなパターンを得たとする. この情報から得られる DNA の制限地図を (b) に示す. 左右逆の地図も可能



*Eco*RI と二本鎖 DNA 断片の複合体の X 線構造. DNA は自己相補的配列 TCGCGAATTCGCG (12 bp で両 5' 末端に T が突出, 下線は 6 bp の標的配列) をもつ. DNA は実体モデルで, 糖-リン酸鎖を黄, 認識配列塩基を淡青, 他の塩基を白で示す. タンパクはリボンモデルで, 二つの同一サブユニットを赤と紫で示す. (a) DNA ラせん軸を横から見た図. (b) 上から見た図. 両図とも, 複合体の 2 回対称軸は水平方向. DNA の大きい溝は右側 (タンパク向き) にある [John Rosenberg, University of Pittsburgh の X 線構造に基づく]

培地

YT 培地 (× 1, 1-liter)

酵母エキス	5 g
polypepton	8 g
NaCl	2.5 g
H ₂ O	
+ NaOH (最終 pH 7.2 - 7.4)	
total	1 - liter

YT 培地 (× 10, 5-liter)

酵母エキス	250 g
polypepton	400 g
NaCl	125 g
H ₂ O	
+ NaOH (最終 pH 7.2 - 7.4)	
total	5 - liter

(注意: ロット毎に, pH の抜き取り検査をする!)

YT-寒天プレート の場合は, 15 g (1.5%) の寒天を加える。

L 培地 (× 1, 1-liter)

酵母エキス	5 g
polypepton	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	
+ NaOH (最終 pH 7.2 - 7.4)	
total	1 - liter

3×D 培地 (× 1, 1-liter)

KH ₂ PO ₄ (MW 136.09)	3 g (→ 22 mM)
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O (MW 358.14)	26.5 g (→ 74 mM)
(無水なら 10.5 g)	
NH ₄ Cl (MW 53.50)	3 g (→ 56 mM)
glycerol (MW 92.09, d 1.26)	24 ml (→ 0.33 M)
polypeptone	10 g
酵母エキス	1 g

滅菌後, 別途滅菌した下記の 2 溶液を添加

1 M MgSO ₄ (MW 120.38)	1 ml (→ 1 mM)
0.1 M CaCl ₂ (MW 110.99)	1 ml (→ 0.1 mM)

Terrific 培地

A 溶液 (× 1 / 0.9)

酵母エキス (Difco)	24 g
Tryptone (Difco)	12 g
glycerol	4 ml
+ H ₂ O	計 900 ml

B 溶液 (× 10)

KH ₂ PO ₄	23.0 g
K ₂ HPO ₄	125.4 g
+ H ₂ O	計 1000 ml

A, B 両溶液 を滅菌後, A に, その 1/9 体積の B 溶液を加える。

(→ これによって, B 溶液の濃度は × 1 になる)

遺伝子操作用 溶液

1 M Tris-HCl (pH 6.8, 7.5, 8.0, or 8.8)	(MW 121.14)	121.1 g / 1000 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	(2Na, 2H ₂ O, MW 372.24)	186.1 g / 1000 ml
3 M CH ₃ COONa (pH 7.0)	(3H ₂ O, MW 136.08)	408.2 g / 1000 ml
7.5 M CH ₃ COONH ₄ (pH 7.0)	(MW 77.08)	578.1 g / 1000 ml
1 M MgSO ₄	(MW 246.47)	245.6 g / 1000 ml
50 mM CaCl ₂	(MW 110.99)	5.55 g / 1000 ml

10:1 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA (pH 8.0))

50 mg/ml ampicillin (Na⁺) (×1000) in 70% ethanol

20 mg/ml chloramphenicol (×1000) in ethanol

5 mg/ml tetracycline (×1000) in ethanol

100 mg/ml IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, MW 283.30) in H₂O

20 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside, MW 408.64)
in dimethylformamide

DNA : アガロースゲル電気泳動用

Tris-borate Buffer (×10)

Tris	(MW 121.14)	60.75 g
H ₃ BO ₃	(MW 61.83)	30.92 g
EDTA	(MW 327.24)	3.73 g / 1000 ml

Aragose Gel or Running Buffer

+ / - agarose	0.7 - 1.5 g
10 mg/ml ethidium bromide	5 μl
Tris-borate (× 5)	10 ml / 100 ml

(DNA 用) Dye Solution

BTB	2.5 mg
glycerol	5.0 ml
0.5 M EDTA	0.2 ml / 10 ml

DNA Miniprep

1. 集菌

一晚培養した大腸菌 1.5 ml を遠心チューブ (1.5 ml 入り) へ移して、
遠心 (12,000 rpm × 5 分) により集菌し、
上澄を完全に捨てる。

【GTE 溶液】

1 M Tris HCl (pH 7.6)	2.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
20% glucose	4.5 ml
H ₂ O	
total	100 ml

2. 菌の懸濁

沈殿に GTE 溶液 100 μ l を加え、懸濁 (Vortex 使用可) し、
氷上で冷却。

3. 溶菌, DNA 一本鎖化, RNA 加水分解, 蛋白変性

作りたてのアルカリ SDS 溶液 200 μ l を加えて、
チューブを ゆっくりと上下にひっくり返して攪拌し
(激しい攪拌は、大腸菌ゲノム DNA を膜から離す)、
溶液が透明になり、粘度が上がることを確かめる。
氷上で、5 分間放置。

【アルカリ SDS 溶液 (fresh)】

NaOH (一粒)	約 0.1 g
SDS	0.1 g
H ₂ O	10 ml

4. 中和

7.5 M NH₄Ac 150 μ l を加えて中和し、
チューブを ゆっくりと上下にひっくり返して攪拌する。

【10:1 溶液】

10 mM Tris (pH 7.5)	
1 mM EDTA	

5. 沈殿 (菌・蛋白質) 除去

遠心 (12,000 rpm × 10 分) により蛋白質の沈殿を集めて除き、
DNA を含む上澄を、新たな遠心チューブへ移す。

6. DNA の isopropanol 沈殿

上澄に isopropanol 300 μ l を加え、
常温で 10 分間放置して DNA を沈殿させ、
遠心 (12,000 rpm × 10 分) して、DNA を集め、上澄を捨てる。

7. DNA の ethanol 洗浄

DNA の沈殿を洗うために、80% ethanol を約 1000 μ l 加えて、軽く攪拌し、
遠心 (12,000 rpm × 3 分) して、上澄を捨てる。

8. DNA の乾燥

遠心エバポレーターで、DNA を乾燥させる。

9. DNA の濃度決定

DNA を 10:1 溶液 100 μ l に溶かし、
アガロースゲル電気泳動にて、濃度を確認する。

DNA Large Preparation (非常に大量の調製)

1. 集菌

overnight culture 1-liter を遠心チューブ (250 ml × 4 本) へ移し、
遠心 (8,000 rpm × 10 分) により集菌し、
上澄を完全に捨てる。

[GTE 溶液]

1 M Tris HCl (pH 7.6)	2.5 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
20% glucose	4.5 ml
H ₂ O	
total	100 ml

2. 菌の懸濁

沈殿に GTE 溶液 50 ml を加え、懸濁し、氷上で冷却。
以後は、氷上で操作する。

3. 溶菌, DNA 一本鎖化, RNA 加水分解, 蛋白変性

リゾチーム 30 mg を加えて、30 分間放置する。

[アルカリ SDS 溶液 (fresh)]

NaOH	1.0 g
SDS	0.3 g
H ₂ O	30 ml

作りたてのアルカリ SDS 溶液 30 ml を加て、
ゆっくりと 攪拌し、溶液が透明になることを確かめる。
(さらに、pH 試験紙でアルカリ性を確認する)
5 分間放置。

4. 中和

3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 25 ml を加えて、ゆっくりと攪拌し、中和する。

5. 沈殿 (菌・蛋白質) 除去

遠心 (8,000 rpm × 10 分) により除蛋白し、上澄を新たな遠心チューブへ移す。

6. DNA のエタノール沈殿

上澄に 2 倍量 (体積) のエタノールを加えて DNA を沈殿させ、

7. 再エタノール沈殿

沈殿を 10:1 溶液 100 ml に溶かし、遠心 (8,000 rpm × 10 分) し、
上澄を新たな遠心チューブへ移して、不溶物を除去する。
3 M 酢酸ナトリウム (pH 7) 10 ml を加え、2 倍量のエタノールを加え、
遠心 (8,000 rpm × 10 分) して、DNA を集める。

8. DNA の ethanol 洗浄

100% ethanol を約 1000 ml 加えて、遠心 (12,000 rpm × 3 分) し、DNA を ethanol で洗う。

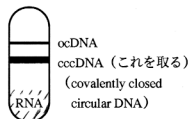
9. DNA の乾燥

遠心エバポレーターで、DNA を乾燥させる (「エタノール臭が抜けた、半乾燥」が理想的)。

10. CsCl の密度勾配 超遠心

遠心チューブ

DNA を 10:1 溶液 10 ml に溶かし、
10 mg/ml エチジウムブロミド 0.5 ml と
CsCl 12 g を加え、遠心 (10,000 rpm × 10 分) で除蛋白。
超遠心 (100,000 rpm × 6 時間) し、cccDNA を分取。



蛋白質：SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

<u>Separation Gel</u>	<u>12.5%</u>	<u>25.0%</u>	
acrylamide (29)	12.08 g	24.17 g	
bisacrylamide (1)	0.42 g	0.83 g	
1 M Tris (pH 8.8)	37.5 ml	37.5 ml	
1.5% ammonium persulfate	4.7 ml	4.7 ml	
10% SDS	1.0 ml	1.0 ml	
+ H ₂ O			
氷冷後, TEMED	0.07 ml	0.07 ml	/ 100 ml

<u>Stacking Gel</u>	<u>3.0%</u>	
acrylamide (29)	2.9 g	
bisacrylamide (1)	0.1 g	
1 M Tris (pH 6.8)	12.5 ml	
1.5% ammonium persulfate	4.7 ml	
10% SDS	1.0 ml	
+ H ₂ O		
氷冷後, TEMED	0.07 ml	/ 100 ml

<u>Running Buffer</u>			
Tris (MW 121.14)	30.3 g	(→ 0.25 M)	
glycine (MW 75.07)	144.1 g	(→ 1.92 M)	
SDS (MW 288.38)	10 g	(→ 1 %)	/ 1000 ml

<u>Denaturation Buffer</u>			
1 M Tris (pH 6.8)	0.31 ml	(→ 62.5 mM)	
10% SDS	1 ml	(→ 2 %)	
mercaptoethanol	0.25 ml	(→ 5 %)	
glycerol	0.5 ml	(→ 10 %)	
BPB (bromophenol blue)	5 mg	(→ 0.1 %)	/ 5 ml

<u>Staining Solution</u>			
Coomassie brilliant blue R-250	2.5 g	(→ 0.25 %)	
acetic acid	100 ml	(→ 10 %)	
methanol	500 ml	(→ 50 %)	/ 1000 ml

<u>Destaining Solution</u>			
acetic acid	75 ml	(→ 7.5 %)	
methanol	50 ml	(→ 5 %)	/ 1000 ml

【QUIZ：生物の不思議さ・複雑さ・すばらしさ】

1. 遺伝子

ヒトには約60兆個の細胞があり、各細胞のDNAは約 3×10^9 個の塩基対からなる。塩基毎の間隔は0.34 nmである。

(1) ヒト一人分のDNAすべてを一本につなぐと、およそどれだけの長さになるか？

(なお、ミトコンドリアのDNAは考慮に入れなくてよい)

(2) (1)は、地球（1周は4万km）を何周する長さに相当するか？

(3) (1)は、地球と太陽の間（約 1.5×10^8 km）を何回往復する長さに相当するか？

(4) 複製時にDNAがもつれないのは、なぜだろうか？

2. DNA修復

DNAは、デオキシリボース、リン酸、GATCの4種類の塩基から成ることが知られている。DNAから塩基部分が外れると、細胞の情報が正確に伝達できなくなり、組織の癌化に至ることもある。

(1) このような恐ろしい反応が、ヒトの体の中で1秒間に何回起きているかを、想像してみよう。

(2) どの様にして、損傷DNAを修復しているのだろうか？

3. エネルギー代謝

(1) ヒトの基礎代謝は一日約2000 kcalである。このエネルギーをATPに換算すると、一日に何gのATPを使っていることになるか？なお、ATPの分子量は500、 $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ の反応によって取り出せるエネルギーは $8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ である。

(2) ATPのエネルギーを何に使っているのだろうか？

4. ヒトの臓器の働き

(1) ヒト心臓は、握りこぶし程度の大きさである。一日の内にどれだけの体積の血液を送り出すか？

(2) 胃液は、約0.1 Mの塩酸を含んでいる。一日の内にどれだけの体積の胃液が分泌されるか？

(3) どうして、食べ物は消化されるのに、胃は消化されてしまわないのか？

基本事項

アミノ酸側鎖 (アミノ酸残基)

- 1) 構造式, 名称 (英語)
- 2) 略号 (3文字 および 1文字)
- 3) 解離性側鎖 (7個) が H^+ を解離する前後の 構造式 と pK_a
- 4) 疎水性の高いアミノ酸側鎖 (→ プリント 参照)

糖

- 1) glucose, galactose, fructose, ribose, arabinose, erythrose, threose, glyceraldehyde の 構造式 (→ Voet p.214-215)
- 2) glucose の ピラノース型, 開環型 の構造式
fructose の フラノース型, 開環型 の構造式 (→ Voet p.216)

ヌクレオチド

- 1) 塩基 (purine - adenine, guanine; pyrimidine - cytosine, thymine, uracil)
糖 (ribose, deoxyribose) の 構造式 (→ Voet p.686-687)
- 2) AMP, ADP, ATP, dATP, NAD(P)H, NAD(P)⁺ の 構造式, 正式名称 (→ Voet p.286, 289)

脂質

- 1) lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid,
stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid,
triacylglycerols, glycerophospholipids, sphingolipids, cholesterol の 構造式 (→ Voet p.238-243)

【「Q1」は、生物の不思議と・驚嘆と「すばらしい」のヒント】

1. 測定子

$$(1) 0.34 \times (3 \times 10^9) \times (6 \times 10^9) \sim 6 \times 10^9 \text{ mm}$$

$$= 6 \times 10^9 \text{ m} = 6 \times 10^6 \text{ km}$$

(2) 地球を 150 万回 1 周する距離に相当する。

(3) 地球と太陽の距離を約 200 回 1 周する距離に相当する。

(4) ?

2. DNA 複製

$$(1) (1 \times 10^9 \text{ sec}^{-1}) \times (3 \times 10^9) \times (6 \times 10^9) \sim 2 \times 10^9 \text{ sec}^{-1} \text{ body}^{-1}$$

(2) ?

参考文献:

Sancar, A. (1994) Science 266, 1954-1966

"Mechanisms of DNA Lesion Repair"

Mohr, P. (1994) Science 266, 1954-1966

"Nucleic Acid Stability and Causation"

Friedberg, E.C., Walker, G.C., and Slick, W. (1993)

"DNA Repair and Mutagenesis", AMS Press, Washington, D.C.

3. エネルギー代謝

$$(1) 500 \times (2000/8) = 1.25 \times 10^9 \text{ g} = 125 \text{ kg}$$

(ATP の価格は 11000g なので、1 日当たり $31.25 \times 10^9 = 3.125 \times 10^9$ 約一億回相当)

(2) ?

4. ヒトの細胞の構造

(1) 7,000 liter (平均寿命が 75 歳とすると、一生の内に約 2×10^9 liter)

(2) 2.5 liter

(3) ? (自身の解が明かされると、明確)

DNA (遺伝子)

1. DNAの構造

A. 二重ラセン構造 double helix

DNAは、いわゆる二重ラセン (double helix) 構造をしていることが Watson と Crick によって明らかにされた (図15-2)。2本のポリヌクレオチド鎖が共通の軸のまわりをコイル状にまいているような構造をしている。塩基はラセンの内側に向かってラセン軸に垂直に突出している。塩基は平面構造で、隣合った塩基平面同士は平行になっている。2本のポリヌクレオチドの間で、グアニン (G) とシトシン (C)、アデニン (A) とチミン (T) の間に水素結合が形成され、構造を安定化している (図15-3)。相補的 (complementary) 結合といわれ、この組み合わせ以外の塩基間には水素結合は起こらない。2本のポリヌクレオチド鎖の構造は互いに無関係ではなく、その塩基配列に関して相補的になっているのである。その結果、DNA中のプリンとピリミジンの比は1 ($[A+G]/[C+T]=1$) であり、アデニンとチミンの量、グアニンとシトシンの量は等しい (Chargaff の法則)。

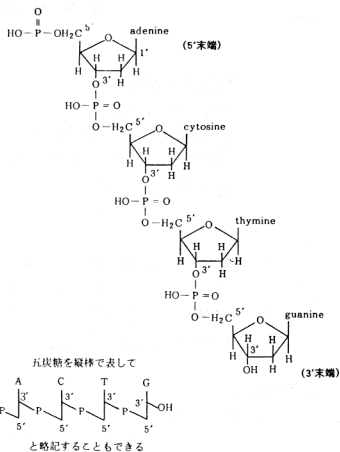


図15-1 核酸の構造

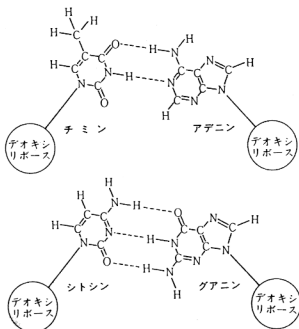


図15-3 塩基間の相補的水素結合

2本のラセンは右巻き*で、主鎖の方向は互いに逆平行である (図15-4)。この典型的な構造をB型DNAという。

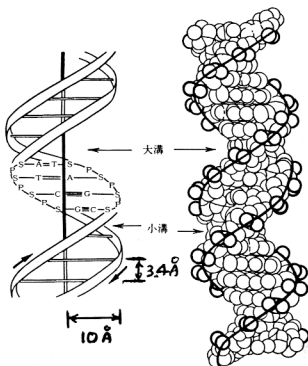


図15-2 DNAの二重ラセンモデル
A, T, G, Cは塩基, Pはリン酸, Sはデオキシリボース。

すべては“二重らせん”から始まった！

[Reprinted with permission from Nature, Vol. 171, pp. 737-738, 1953. Copyright © 1953 by Macmillan Magazines Ltd.]

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Fraser (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.



This figure is purely diagrammatic. The two ribbons symbolize the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate diester groups joining β -D-deoxy-ribofuranose residues with 3', 5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being

hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{2,3} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data⁴ on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at King's College, London. One of us (J. D. W.) has been aided by a fellowship from the National Foundation for Infantile Paralysis.

J. D. WATSON
F. H. C. CRICK

Medical Research Council Unit for the Study of the Molecular Structure of Biological Systems, Cavendish Laboratory, Cambridge, April 2.

¹ Pauling, L., and Corey, R. B., *Nature*, **171**, 346 (1953); *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, **39**, 84 (1953).

² Furberg, S., *Acta Chem. Scand.*, **6**, 634 (1952).

³ Chargaff, E., for references see Zamenhof, S., Brewster, G., and Chargaff, E., *Biochim. et Biophys. Acta*, **9**, 402 (1952).

⁴ Wyatt, G. R., *J. Gen. Physiol.*, **36**, 201 (1952).

⁵ Astbury, W. T., *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **1**, Nucleic Acid, 66 (Camb. Univ. Press, 1947).

⁶ Wilkins, M. H. F., and Randall, J. T., *Biochim. et Biophys. Acta*, **10**, 192 (1953).

DNA (遺伝子) の構成成分

A. 塩基 base

プリン (purine) とピリミジン (pyrimidine) が主である (図14-1).

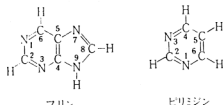
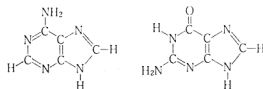


図14-1

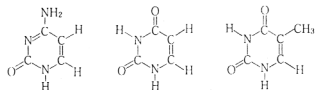
核酸の中に見出される主なものは、図14-2に示した5種である。この中でアデニン (adenine), グアニン (guanine), シトシン (cytosine) はRNAにもDNAにも含まれているが、ウラシル (uracil) はRNA, チミン (thymine) はDNAにしか存在しない。



アデニン

グアニン

プリン誘導体



シトシン

ウラシル

チミン

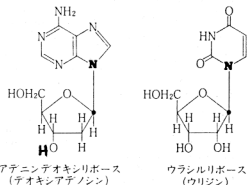
ピリミジン誘導体

図14-2

B. ヌクレオシド nucleoside

塩基の窒素にグリコシド結合で糖質が結合したもの。核酸中に見出されるヌクレオシド構成糖質はリボース (ribose) か2-デオキシリボース (2-deoxyribose) である。そのC-1炭素がピリミジン塩基のN-1あるいはプリン塩基のN-9と結合する。立体配置はβ配向が普通である (図14-4)。

塩基の語尾に、プリンヌクレオシドでは～シン (アデノシン adenosine, グアノシン guanosine, デオキシアデノシン deoxyadenosine, デオキシグアノシン deoxyguanosine), ピリミジンヌクレオシドでは～ジン (ウリジン uridine, シチジン cytidine, デオキシシチジン deoxycytidine, デオキシチミジン deoxythymidine) をつけて呼ぶ。糖部分の原子の位置を示す番号にはダッシュをつけて塩基部分と区別する。



アデニンデオキシリボース
(デオキシアデノシン)

ウラシルリボース
(ウリジン)

図14-4

C. ヌクレオチド nucleotide

1) 構造と命名

ヌクレオシドの糖の遊離の水酸基にリン酸がエステル結合したものを、構成五炭糖がリボースの場合、リボヌクレオチド (ribonucleotide)、デオキシリボースの場合、デオキシリボヌクレオチド (deoxyribonucleotide) という。生体内に見出されるヌクレオチドには5'位にリン酸をもっているものが多く、5'-リボヌクレオチド、5'-デオキシリボヌクレオチドと呼ばれる。

名称はヌクレオシドリン酸と呼ばれ、アデノシン-5'-リン酸 (adenosine-5'-phosphate) というようになるが、慣用名としてアデニル酸 (adenylic acid) も用いられる。リン酸基が1つの場合、アデノシン-5'-モノリン酸 (adenosine-5'-monophosphate)、2つの場合、アデノシン-5'-ジリン酸 (adenosine-5'-diphosphate)、3つの場合、アデノシン-5'-トリリン酸

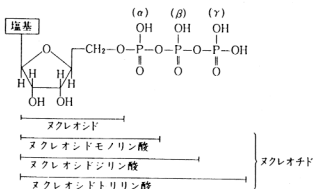


図14-5 塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの関係

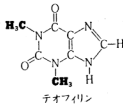
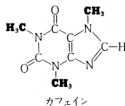
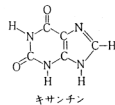
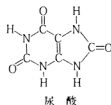
表14-1 塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの関係

塩基	ヌクレオシド	ヌクレオシド-5'-リン酸	ヌクレオシド-5'-二リン酸	ヌクレオシド-5'-三リン酸
アデニン (A)	アデノシン デオキシアデノシン	アデノシン-5'-リン酸 (AMP)(アデニル酸) デオキシアデノシン-5'-リン酸 (dAMP)(デオキシアデニル酸)	アデノシン-5'-二リン酸 (ADP) デオキシアデノシン-5'-二リン酸 (dADP)	アデノシン-5'-三リン酸 (ATP) デオキシアデノシン-5'-三リン酸 (dATP)
グアニン (G)	グアノシン デオキシグアノシン	グアノシン-5'-リン酸 (GMP)(グアニル酸) デオキシグアノシン-5'-リン酸 (dGMP)(デオキシグアニル酸)	グアノシン-5'-二リン酸 (GDP) デオキシグアノシン-5'-二リン酸 (dGDP)	グアノシン-5'-三リン酸 (GTP) デオキシグアノシン-5'-三リン酸 (dGTP)
シトシン (C)	シチジン デオキシシチジン	シチジン-5'-リン酸 (CMP)(シチジル酸) デオキシシチジン-5'-リン酸 (dCMP)(デオキシシチジル酸)	シチジン-5'-二リン酸 (CDP) デオキシシチジン-5'-二リン酸 (dCDP)	シチジン-5'-三リン酸 (CTP) デオキシシチジン-5'-三リン酸 (dCTP)
ウラシル (U)	ウリジン	ウリジン-5'-リン酸 (UMP)(ウリジル酸)	ウリジン-5'-二リン酸 (UDP)	ウリジン-5'-三リン酸 (UTP)
チミン (T)	デオキシチミジン	デオキシチミジン-5'-リン酸 (dTMP)	デオキシチミジン-5'-二リン酸 (dTDP)	デオキシチミジン-5'-三リン酸 (dTTP)

関連事項

核酸には含まれないが日常遭遇する塩基

尿酸やキサンチン (xanthine) はプリン塩基の代謝過程で生じ、特に尿酸は代謝最終産物である。カフェイン (caffeine, trimethylxanthine), テオフィリン (theophylline, 1,3-dimethylxanthine), テオブロミン (theobromine, 3,7-dimethylxanthine) は、おののコーヒー、茶、ココアなどの植物に含まれているもので、強い薬理作用を有する。ピタミンBもピリミジン誘導体である。

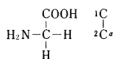


蛋白質構成 アミノ酸 の構造と略号

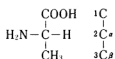
(3) モノアミノジカルボン酸およびアミド

A. 脂肪族アミノ酸

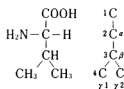
(1) モノアミノモノカルボン酸



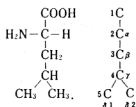
グリシン
Glycine Gly
Glycine G



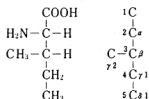
アラニン
Alanine Ala
Alanine A



バリン
Valine Val
Valine V

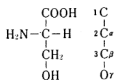


ロイシン
Leucine Leu
Leucine L

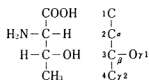


イソロイシン
Isoleucine Ile
Isoleucine I

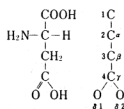
(2) ヒドロキシモノアミノモノカルボン酸



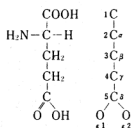
セリン
Serine Ser
Serine S



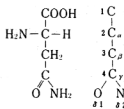
トレオニン
Threonine Thr
Threonine T



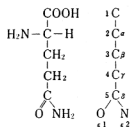
アスパラギン酸
Aspartic acid Asp
AsparDic acid D



グルタミン酸
Glutamic acid Glu
アルファベット
で D のつぎ E

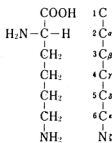


アスパラギン
Asparagine Asn
AsparagiNe N

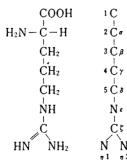


グルタミン
Glutamine Gln
未使用のアル
ファベット Q

(4) ジアミノモノカルボン酸

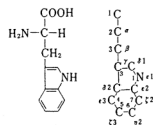


リシン
Lysine Lys
アルファベッ
トで L の前 K

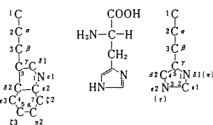


アルギニン
Arginine
Arginine
Arg R

C. 複素環式アミノ酸

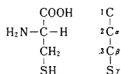


トリプトファン
Tryptophan
環がかさ高いので

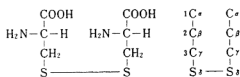


ヒスチジン
Histidine
Histidine H

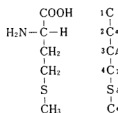
(5) 硫黄含有アミノ酸



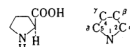
システイン
Cysteine
Cysteine Cys C



シスチン
Cystine
Cystine
Cys Cys
C C



メチオニン
Methionine
Methionine Met M

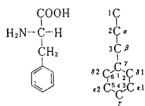


プロリン
Proline
Proline Pro P

D. アミノ酸の1文字略号

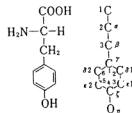
A	Ala	N	Asn
B	Asx	P	Pro
	(Asp または Asn)	Q	Gln
C	Cys	R	Arg
D	Asp	S	Ser
E	Glu	T	Thr
F	Phe	V	Val
G	Gly	W	Trp
H	His	X	未同定または未確認アミノ酸
I	Ile	Y	Tyr
K	Lys	Z	Glx
L	Leu		(Glu または Gln)
M	Met		

B. 芳香族アミノ酸



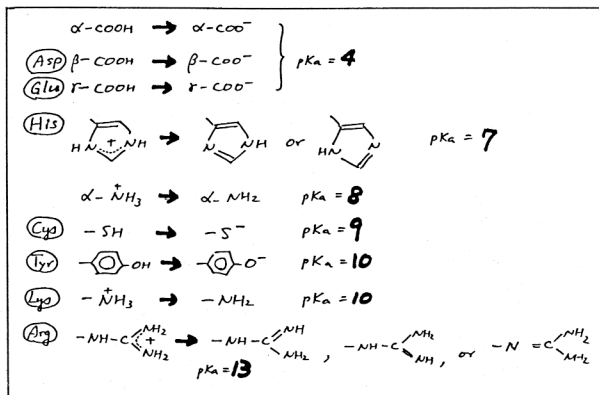
フェニルアラニン
Phenylalanine
Fenylalanine

Phe
F



チロシン
Tyrosine
TYrosine Tyr Y

生化学データブック I より
(東京化学同人)



アミノ酸側鎖の疎水性の尺度 (Δg_i) (25°C)^{a), b)}

アミノ酸側鎖	Δg_i (kcal/mol)	アミノ酸側鎖	Δg_i (kcal/mol)
グリシン	0	半シスチン	+1.0
アラニン	+0.5	セリン	-0.3
バリン	+1.5	トレオニン	+0.4
ロイシン	+1.8	アスパラギン	0.0
イソロイシン	+3.0	グルタミン	-0.1
フェニルアラニン	+2.5		
チロシン	+2.3	アスパラギン酸 (非解離)	+0.5
トリプトファン	+3.4	グルタミン酸 (非解離)	+0.5
プロリン	+2.6	ヒスチジン (非解離)	+0.5
メチオニン	+1.3	リシン (メチレンの部分)	+1.5
システイン	—	アルギニン (メチレンの部分)	+0.7

Δg_i は、側鎖を有機溶媒から水へ移すときの自由エネルギー変化

a) C. Tanford, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 4240 (1962).

b) Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211 (1971).

阪大豊中キャンパス アクセス方法

<主要駅・空港からのアクセス>

阪急梅田、JR 大阪駅より（約 40 分）

阪急電鉄宝塚線「石橋」駅下車、東へ徒歩約 20 分

JR 新大阪駅より（約 1 時間）

地下鉄御堂筋線で「千里中央」駅下車、大阪モノレールで大阪空港方面「柴原」駅下車、柴原駅より徒歩 5 分

大阪伊丹空港より（約 30 分）

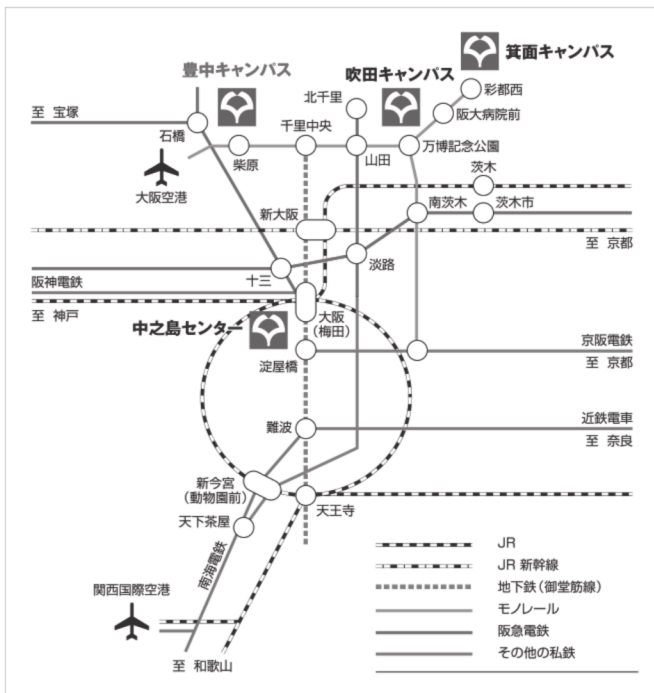
大阪モノレールで門真市方面「柴原」駅下車、柴原駅より徒歩 5 分

関西国際空港より（約 2 時間）

南海電鉄で「難波」駅下車、地下鉄御堂筋線で「千里中央」駅下車、
大阪モノレールで大阪空港方面「柴原」駅下車、柴原駅より徒歩 5 分

または、空港リムジンバス伊丹空港行きで伊丹空港下車、

大阪モノレール門真市方面「柴原」駅下車、柴原駅より徒歩 5 分



大阪大学 豊中キャンパス 探検マップ



大阪大学
OSAKA UNIVERSITY

所属 () 氏名 ()