

基礎分子生物学実習

担当：田上英明
研究室：北棟251号室
e-mail: dan@nsc.nagoya-cu.ac.jp
URL: <http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~dan/>

0. はじめに

実習の開始する前にこのテキストを熟読し、どのような操作をするのか、自分の実験ノートにフローチャート形式で整理しておく。そうでないと何が何だか分からないまま実験を進めるという事態になり、実習という機会を無駄にするだけでなく、事故などに繋がる危険性も増加する。実験ノートには実際に行った操作やデータを全て記録する。測定値だけでなく、テキストと違う操作をしたり、誤った点や気付いた点についてもメモしておくことが実験結果を考察する上で重要な情報となる。それらを基にレポートを作成するが、本実習のレポート作成については後述する。

1. 概要

本実習では、遺伝子の実体としての DNA についての生化学的特性(第1週)と遺伝学的特性(第2週)、遺伝子産物であるタンパク質について酵素活性(第3週)を、分子生物学実験に欠かせない基本操作とともに学ぶ。

生物は外界の状況などに応じて自身の遺伝子発現を調節することにより、環境応答を行う。非病原性の大腸菌 K12 株(*Escherichia coli* K12)は培養が簡単であり、世代時間が短く、組換え DNA 実験が容易に行えるという非常に有利な実験系として広く利用されている。歴史的にも重要な概念がこの系から多く導き出され、この株なしには現在のバイオサイエンスの隆盛はなかったとさえいわれるほどの大きな貢献を果たしてきた。本実習では、大腸菌ラクトースオペロンにおける遺伝子発現制御系を利用することで、巧妙な生物の環境応答システムについても考察する。

第1週: プラスミド DNA の調製と DNA 定量

- 核酸の生化学的特性を理解する
- マイクロピペッターの使用法を学ぶ
- 分光光度計の原理と使用法を学ぶ

第2週: 大腸菌の形質転換

- DNA の遺伝的性質を理解する
- 分子遺伝学の論理性を学ぶ
- 無菌操作を習得する

第3週: 酵素活性の定量

- 遺伝子発現制御を理解する
- 酵素活性の比色定量法を学ぶ

2. 原理及び基本操作

マイクロピペッターの扱い方

マイクロピペッターは、マイクロリットルオーダーの溶液を分取するために使用する道具であり、微量サンプルを扱う分子生物学では必須アイテムである。精密な実験には、正確な液体の分取が欠かせず、ピペッターの扱い方を熟知しておく必要がある。

1. 容量を合わせる

モーションナットを回して、デジタル容量目盛を目的の量に合わせる。

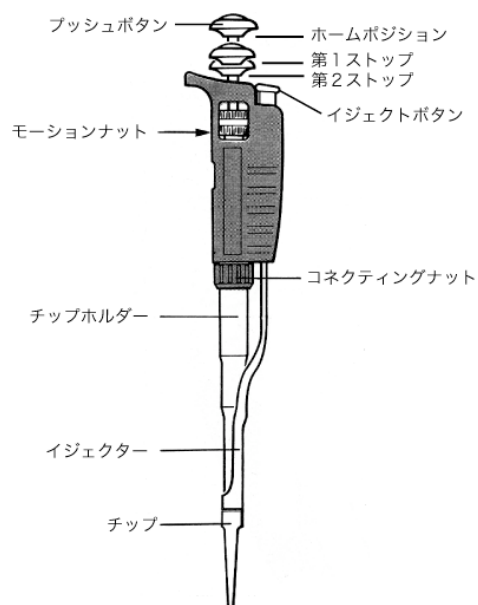
いったん目的の量を超えて余分に回し、そこから目的の量までゆっくり戻すのがよい。

2. チップを装着する

ピペッターを片手で持ち、垂直に保ったまま少しひねるようにしてチップスタンドのチップにチップホルダー（シャフト）先端を差し込み、しっかり装着する。

3. ピペッティング操作（フォワードモード）

- ① ピペッターを垂直に持ち、プッシュボタンを第1ストップの位置まで押す。
- ② チップの先端のみを液体に浸し、ホームポジションにまでプッシュボタンをゆっくり戻す。勢いよく戻すと本体に試料が入り汚染する。
- ③ 目的の容器にチップを入れ、第1ストップ位置までゆっくりプッシュボタンを押し、液をはき出させる。通常先端に少し液が残る。
- ④ 第2ストップ位置までさらにプッシュボタンを押し、残っている液を完全に排出する。
※これら一連の操作は必ず一度できめる。
- ⑤ チップイジェクターを押して、チップを捨てる。



4. 揮発性の液体（エタノール、エーテルなど）を扱うとき

揮発性の液体を分取するときは、あらかじめピペッター内の空気が揮発溶媒で飽和されるまでピペッティングを繰り返してから分取操作を行う。

5. 粘性の高い液体（グリセロール、酵素溶液など）を扱うとき

粘性の高い液体を分取する場合は、チップの先端を少し切り、時間をかけて液体をピペッターに吸い込む。一度、その液体を排出し、あらかじめチップ内に液体の膜を形成しておく。その後、分取の操作を極めてゆっくり行う。

6. その他注意すべき点

- ① チップの先は絶対に触らない。
- ② チップイジェクター先端部分は汚染し易いため清潔に保つ。
- ③ 液をチップに吸い込んでいるときは大きくピペッターを傾けない。もちろん逆さまにもしない。
- ④ 容量の大きなピペッターを使用するときは、シャフト内にまで液を吸い込んでしまうので、気

をつけて、ゆっくり吸い込む。

- ⑤ 触るなどして誤ってチップの先を汚染したときは、速やかにそのチップを取り外し廃棄する。
- ⑥ 塩酸などの強酸は、ピペッター内部のステンレスピストンを腐蝕させるので使用できない。
- ⑦ チップ内に液を残さないようにテクニックを磨く。
- ⑧ 定期的に分解掃除をする。
- ⑨ 内部のシール部材は摩耗品であるため、むやみに空ピペティングして遊ばない。
- ⑩ 水溶液の場合に先に水を使ってからバッファーを入れるなど順番を考えると、同じチップも使えるので無駄が省ける。ただし、酵素などに触れたチップは直ちに替え、クロスコンタミネーション（汚染）を極力避けること。

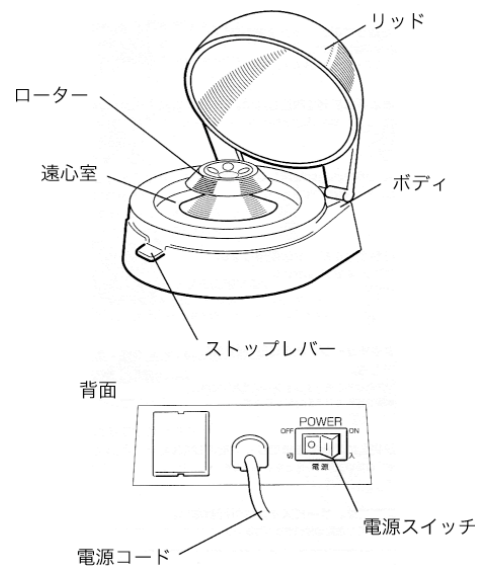
希釈、混合

再現性のある定量実験をする上で最も重要かつ基本的な操作は混合と希釈であるといっても過言ではない。正確に計り取り、よく混ぜるといことはあまりにも当たり前のことではあるが、実際に定量実験をすればこの難しさが実感できると思う。

卓上マイクロ遠心機の扱い方

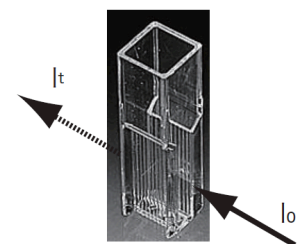
マイクロチューブ内に散乱した試料を集めるために、頻繁に使用する。小型で手軽な反面、壊れやすいので取り扱いには十分に注意する。

- ① 電源を入れ、リッドを空ける
- ② ローターに、アンバランスにならないよう対称的にチューブをセットする。奇数本の時は、バランス用のチューブを足す。
- ③ リッドを閉めて遠心を開始する。※強くたたきつけるようにすると壊れるので注意。
- ④ ストップレバーを押してリッドのロックを解放し、遠心を止めてからチューブを取り出す。



分光光度計

液体試料に任意の波長の光を当て、当てた光と試料を透過してきた光の強度から試料の吸光度 $[A = -\log_{10} T]$ ($T = I_t/I_0$:透過率) を測定する装置である。Lambert-Beer の法則により、吸光度は物質の濃度 c と光路長 d に比例する。比例定数 ϵ は、物質の特定の波長における吸収の強さを表す尺度で、モル吸光係数(molar absorption coefficient)とよばれる。 ϵ は物質固有の値であって、 ϵ と d がわかれば、濃度 c を決めることができる。通常、試料溶液の光の吸収を測定するのに用いられるが、大腸菌の 600 nm における濁度 OD_{600} (散乱光を含む) を測定する時にも用いるので、測定法など機種



$$T = I_t / I_0$$
$$A = -\log_{10} T$$
$$= \epsilon cd$$

によって変動することに注意し、キュベットの向きも一定にするようにする。可視光を測定する場合はガラスやプラスチックのキュベットでよいが、DNA やタンパク等を紫外領域で測定する際は石英キュベット等の紫外吸収のないものを用いる。透過面に触らないように注意する。なお、実習室の分光

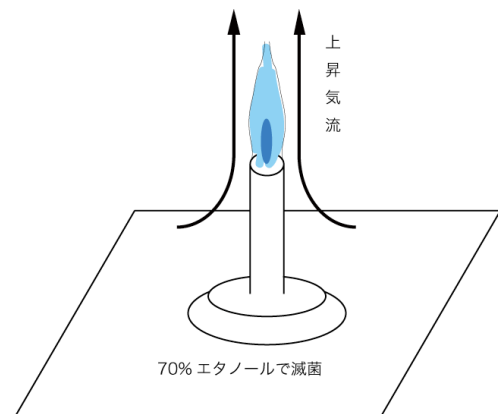
光度計はベースラインが上がりやすいので試料測定時毎に純水で対照を取るようにする。

滅菌及び無菌操作

空気中や机の上、手、唾液など至る所に細菌や真菌が存在する。それらが混入すると実験の目的とする生物を駆逐して増殖するなどにより、どの生命現象を観察しているのか分からなくなる。従って、生物実験に用いる培地や試薬類は滅菌した後、無菌的に扱うようにする。

培地や培養容器などに付着したいわゆる雑菌を殺す（滅菌処理）には幾つかの方法がある。ガラス器具や金属容器のうち耐熱性のもは、180℃で数時間乾熱処理することで完全に滅菌できる（乾熱滅菌）。液体培地、耐熱性プラスチック製品の大部分を滅菌するには121℃の加圧蒸気に十数分間以上さらす（オートクレーブ）。熱に弱いもの、例えばやわらかいプラスチック製品には、放射線（ガンマ線）滅菌やエチレンオキシド滅菌（ガス滅菌）が有効である。

無菌操作はクリーンベンチ等の装置を用いる場合もあるが、本実習では最も簡単で基本的な方法で行う。まず窓やドアを閉めて空気の流れを遮断し、実験台上を70% エタノールで拭く。次にバーナーを炊き、その上昇気流の中で操作を行うことにより無菌的な実験ができる。当然、実験者の後方で騒いだり、喋りながら実験をすれば無菌状態でなくなることを理解して、注意深く操作することが重要である。また、ガスバーナーの先端部の炎は見難いため、髪の毛や袖などを焦がさないよう充分気を付け、使用しないときは消す。



大腸菌のついたチューブやチップ、プレートは実験終了後まとめてオートクレーブにより滅菌処理する。廃液は1% 塩化ベンザルコニウム溶液で処理する。

大腸菌の形質転換

有性生殖のない大腸菌は遺伝学の実験材料として致命的と思われたが、1940年代にレーダーバーグらは接合伝達によって組換え体を生じる株を発見し、突然変異体などを分離する実験系を組み立てた。数年後、ファージによる形質導入という現象が発見され、分子遺伝学への道を拓くことになった。グラム陰性菌である大腸菌は外界のDNAを積極的に取り込むことができないが、二価の陽イオン存在下やエレクトロポレーションといった方法で人為的に裸のDNAを導入して形質転換させることができる。今回はハナハンらによって改良された形質転換法を用いてプラスミドDNAを大腸菌に導入する。このプラスミドは遺伝子マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子を持つため、抗生物質アンピシリンを含むプレートで形質転換した大腸菌を選択することができる。

3. 試薬

- 1) LB 培地 (10 g Tryptone, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl / 1 L H₂O, pH 7.0) : 大腸菌の培養に一般的に用いられる富栄養培地。プレートに用いる場合は 1.5 % agar を添加する。オートクレーブ滅菌したものを各班に分与する。
- 2) STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)
- 3) Sol.I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA)
- 4) Sol.II (200 mM NaOH, 1 % SDS)
- 5) Sol.III (5 M KOAc(CH₃COOK) (pH4.8))
- 6) TE 飽和 Phenol (pH8.0) *強いタンパク質変性作用を持つ有機溶媒につき、取扱注意
- 7) TE (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)
- 8) 3 M NaOAc (CH₃COONa) (pH5.2), 0.3 M NaOAc (CH₃COONa) (pH5.2)
- 9) 100 % (99.5 %) EtOH(C₂H₅OH)
- 10) 70 % EtOH(C₂H₅OH)
- 11) TFB (Transformation Buffer: 100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM LiCl, 35 mM KOAc (pH6.2) , 15 % sucrose) フィルター滅菌したものを各班に分与する。
- 12) MacConkey-Lactose Amp.プレート (50 g MacConkey Agar/ 1 L H₂O) オートクレーブ滅菌後、約 60°C まで冷めたところで、終濃度 50µg/ml になるよう Ampicillin を加えてからプレートを作製したものを分与する。
- 13) 10 % glucose (w/v)
- 14) 10 % lactose (w/v)
- 15) 0.1 M IPTG
- 16) Z buffer (60 mM Na₂HPO₄•12H₂O、40 mM NaH₂PO₄•2H₂O、10 mM KCl、1 mM MgSO₄•7H₂O、50 mM β-mercaptoethanol)
- 17) 0.02 % SDS
- 18) CHCl₃ クロロホルム *揮発性有機溶媒につき、取扱注意
- 19) 4 mg/ml ONPG
- 20) 1 M Na₂CO₃

4. 実験操作

第1週:

1) プラスミド DNA の精製

大腸菌からプラスミド DNA をアルカリ溶菌法により調整する。プラスミド DNA の存在様式や核酸の生化学的特性について学ぶ。

多くの細菌は染色体 DNA の他にプラスミド DNA と呼ばれる自己複製する環状 DNA を安定に保持する。遺伝子工学では、外来の DNA をプラスミドに組み込み単離増幅させる（クローニング）運び屋（ベクター）として利用する。大腸菌を宿主とするプラスミドやファージをベクターとする遺伝子クローニングは遺伝子操作のもっとも基本的な手法である。

本実験では、アルカリ溶菌法(Alkaline Lysis)により大腸菌からプラスミド DNA を調整する。プラスミド DNA 調整法のなかでアルカリ溶菌法は現在もっとも汎用されている方法であり、多くの市販キットや機器による自動化も行われている。界面活性剤である SDS (Sodium Dodecyl Sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム) によって大腸菌の細胞膜を穏やかに破壊し、タンパク質やプラスミド DNA、RNA などを溶出させる。アルカリ処理によりタンパク質や核酸が変性 (denaturation) するが、酢酸塩溶液で中和することにより、プラスミド DNA は再生(renaturation)して水溶性となる。この時、細胞膜や多くのタンパク質と結合している巨大な染色体 DNA や大部分のタンパク質はもつれ合って不溶性の沈殿となる。さらに強力なタンパク質変性剤であるフェノール溶液によって低分子タンパク質等を除去する。その後、高分子コロイドである核酸をアルコールと塩により凝集させて沈殿を得ることで精製する。エタノール沈殿はもっとも一般的であるが、塩や低分子成分は沈殿しないため DNA の精製や濃縮、バッファー置換に良く用いられる。エタノール沈殿では RNA 分子も共沈するが、RNase (RNA 分解酵素) 処理後に高分子アルコールである PEG (ポリエチレングリコール) で沈殿させると RNA の共沈はほとんど起こらなくなる。

今回用いる大腸菌株 1、2、3、4 は以下のプラスミドを保持している。この大腸菌からプラスミド DNA を抽出し、第2週目の形質転換実験に用いる。

- | | |
|------------|--|
| 1 : pBR322 | (vector : <i>bla</i>) |
| 2 : pCRP | (pBR322 に <i>crp</i> を挿入 : <i>bla</i> , <i>crp</i>) |
| 3 : pLAC | (pBR322 に <i>lacIZYA</i> を挿入 : <i>bla</i> , <i>lacIZYA</i>) |
| 4 : pCYA | (pBR322 に <i>cya</i> を挿入 : <i>bla</i> , <i>cya</i>) |

- 1) 4人で1班とし、各自1、2、3、4のいずれかの大腸菌の一晚培養液 10 ml を振とう培養器から取り、遠心分離器で集菌する (3 krpm x 5 min)。
- 2) 上清をデカンテーション (沈殿物の形状を崩さないように静かに注ぐこと) で大腸菌廃液入れに捨てる。菌体ペレットに P1000 マイクロピペッターで 1 ml STE を加えて懸濁し、1.5ml チューブに全量に移す。チューブのふたに油性ペンで班名、菌体名を記入する。この際に菌体がピペッター本体につかないよう充分注意する。

- 3) 卓上マイクロ遠心機で遠心分離(6 krpm x 2 min)後に、上清を P1000 マイクロピペッターで吸って大腸菌廃液入れに捨てる。
- 4) 菌体ペレットに P200 マイクロピペッターで 100 μ l Sol.I を加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
- 5) 200 μ l Sol.II を加えて、蓋をしてゆっくり反転して混ぜる。この時の状態をよく観察する。なぜ激しくしてはいけないか、考えよ。
- 6) 150 μ l Sol.III を加えて、蓋をして手で振って混ぜる。この時の状態をよく観察する。
- 7) 卓上マイクロ遠心機で遠心分離(6 krpm x 3 min)後に、450 μ l phenol 溶液を加えて、蓋をしっかりして手で振って混ぜる。フェノールは劇薬なので皮膚に付けないよう十分注意する。
- 8) 卓上マイクロ遠心機で遠心分離(6 krpm x 5 min)後に、上清(〜400 μ l) を P200 マイクロピペッターで吸って新しい 1.5ml チューブに移す。チューブのふたに油性ペンで班名、菌体名を記入する。この時、フェノール層や不溶物を取らないよう注意する。
- 9) 上清に P1000 マイクロピペッターで 1 ml 100 % エタノールを加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。この時の状態をよく観察する。
- 10) 微量高速遠心機で遠心分離(13 krpm x 5 min 10°C)。アングルローターを用いた遠心分離の際にチューブの蓋のヒンジを外側にしておくと沈殿物が付く側が一定になり、特に沈殿物が少量の際に確認しやすい。
- 11) 沈殿物に触れないよう、注意深く上清を P1000 マイクロピペッターで除く。
- 12) 沈殿物に P200 マイクロピペッターで 200 μ l 0.3 M NaOAc (pH5.2)を加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
- 13) P1000 マイクロピペッターで 500 μ l 100 % エタノールを加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
- 14) 微量高速遠心機で遠心分離(13 krpm x 5 min 4°C)後、沈殿物に触れないよう注意深く上清を P1000 マイクロピペッターで除く。
- 15) 沈殿物を壊さないように、P1000 マイクロピペッターでチューブの壁沿いに穏やかに 900 μ l 70 %エタノールを加える。
- 16) 微量高速遠心機で遠心分離(13 krpm x 2 min 10°C)後、注意深く上清を P1000 マイクロピペッターで除く。さらに P200 マイクロピペッターでエタノールを除き、蓋を開けたまま 5 min 静置してエタノールを完全に飛ばす。
- 17) 沈殿物に P200 マイクロピペッターで 100 μ l TE を加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。これを次回の実習に用いるので、-20°Cで保存する。

課題

- 1) 核酸の種類と化学構造について調べよ。RNAを抽出する場合は、フェノール抽出の際にpH5.2のものを用いるが、その理由も記せ。
- 2) 各試薬で何をしているのか、その原理を調べよ。

結果と考察

- 1) 各試薬を加えてからの混合の仕方が異なる理由について考察せよ。
- 2) 本実験での最終産物に含まれるものは何であるか？さらに、それらからプラスミドDNAのみを精製するにはどうすればよいか、実際に使われている手法を含め、各自考えよ。
- 3) 次回の実験(相補性試験)では、今回調整したプラスミドDNA溶液を使用する。何故この状態で問題ないのか、考察せよ。

II) DNA 濃度の測定

核酸の塩基(プリン基、ピリミジン基)分子内では多重結合が共役するため、紫外線を吸収する。吸収の強さが最大になる波長(吸収極大)は塩基によって異なるが、平均すると核酸は 260 nm 付近に吸収極大を持つ。

- 1) サケ精巢 DNA 溶液(200 μ l)を 1 人 1 本受け取る。
- 2) 新しい 1.5ml チューブ 3 本を用意し、①に TE を 190 μ l、②と③に TE を 100 μ l 入れる。
- 3) サケ精巢 DNA 溶液を①に 10 μ l 加えて、良く混合しそこから 100 μ l を取り②に加える。さらに、良く混合した②から 100 μ l を取り③に加える。
- 4) 紫外分光光度計 GE GeneQuant 1300 を用いて、③の 260 nm 付近の吸収スペクトルと 260nm における吸光度を測定する。対照は TE を用いて、キュベットは紫外吸収のない特殊プラスチック製のマイクロセルを用いる。
- 5) 同様に、②、①についても GE GeneQuant 100 を用いて、260nm における吸光度を測定する。
- 6) $1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ と希釈倍率から溶液の DNA 濃度を求めよ。吸収極大が 260 nm 付近にあるか、希釈の精度や吸光度の正確性についても考察せよ。
- 7) 残った DNA 溶液(−170 μ l)に 20 μ l 3 M NaOAc (pH5.2)を加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
- 8) 500 μ l 100 % エタノールを加える。蓋をしてボルテックスミキサーで十分に懸濁する。この時の状態をよく観察する。
- 9) パラフィルムで漏れないように蓋にシールをして、持ち帰って良い。
- 10) 実験終了後、使用した器具、机上を片づけ、元の状態に戻す。大腸菌の付いた廃液、チップは滅菌処理してから廃棄する。それ以外のものは産業廃棄物(可燃物・不燃物)として廃棄する。

課題

- 1) 何故 260 nm での紫外吸収を計ることで核酸の定量ができるのか、調べよ。
- 2) RNA の場合は、 $1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$ で計算する場合が多いが、何故 DNA と違うのか？
- 3) タンパク質も 280 nm での紫外吸収を計ることで濃度がある程度計算できるが、核酸よりも正確性が低い。その理由も含めて、なぜ紫外吸収によりタンパク質の定量ができるか、考えよ。また、他のタンパク質の定量法について調べてみよ。

結果と考察

- 1) 希釈精度をふまえて、もとの DNA 溶液の濃度を計算せよ。
- 2) この溶液に RNA やタンパク質があった場合は、1)の値はどう解釈できるか？また、その場合に正確な DNA 濃度を求めるのはどうすればよいか？について考察せよ。
- 3) エタノール沈殿の状態からこの DNA の構造について考察せよ。

第2週:

相補性試験による菌株の同定

大腸菌の変異はたいていの場合その遺伝子を運ぶプラスミドやファージなどを導入することで相補することが出来る。これを利用して、ある変異型の表現型がどの遺伝子の変異によるものかを調べる。たとえば CRP を作る事の出来ない菌株 (*crp* 株) は Lac^- の表現型を示すが、その菌株に *crp* 遺伝子を運ぶプラスミドを導入すると Lac^+ 、すなわち野生株と同じ表現型を取り戻す。 Lac 表現型を調べるのには MacConkey-Lactose plate を利用する。

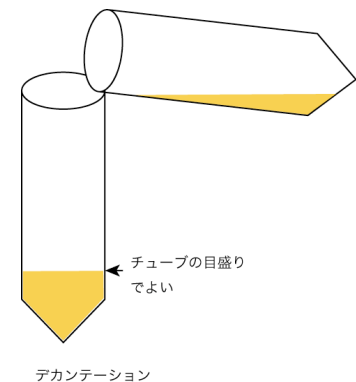
今回用いる大腸菌株 A、B、C、D の遺伝子型は、野生型、*lacZYA*、*crp*、*cya* のいずれかである。これらの菌株に各遺伝子を持つプラスミド DNA を導入した時の Lac の表現型を調べることによって、菌株 A、B、C、D がどの株であるのかを推測する。

(あらかじめ $37^{\circ}C$ と $42^{\circ}C$ にセットしておいた恒温水槽 (または恒温ブロック) を準備する)

(アイスボックスに氷を準備しておく)

大腸菌の植菌は滅菌操作で行う。最初に教員がデモを行うのでよく観察して各班 (4 人で 1 組) で実際に操作する。

- 1) 50 ml 培養チューブにオートクレーブ済みの LB 培地を 30 ml デカンテーションでとる。残りの 10 ml 程度はあとで用いるので、そのまま置いておく。
- 2) 大腸菌の前培養液 (A,B,C,D のいずれか 1 つ) をよく懸濁後にピペッターで 0.6 ml 取って加え、 $37^{\circ}C$ インキュベーターで振とう培養を開始する。この時チューブを少し斜めにするとう好气的条件が良くなる。大腸菌のついたチップやチューブは実験終了後に滅菌処理するので、各班ビーカーにまとめておく。
- 3) 培養開始後 1 時間ほど経過した時点で大腸菌培養液を無菌操作で 0.8 ml 程度とり、キュベットに移して 600 nm での濁度を測定する。この時、まず対照を水で取る。
大腸菌はこの条件において 30~40 分程度で倍加することからあとどれくらいで目的の濁度になるか推定する。なお、測定した大腸菌液は各班 1 つのビーカーにまとめておき、実験終了後に塩化ベンザルコニウム液を加えて殺菌処理してから廃棄する。
- 4) OD_{600} が 0.15~0.3 (early log phase) になったことを確認して集菌する (3000 rpm、5 min、室温)。この時の濁度を記録しておく。
- 5) 上清を大腸菌廃液入れに捨て、菌体ペレットに 1 ml 氷冷 TFB を加えてピペティングでやさしく懸濁する。この際に菌体がピペッター本体につかないよう充分注意する。それぞれの菌株を



200 μ l ずつ 1.5 ml チューブ 5 本に分注し、氷上で 10 分間静置してコンピテントセルとする。蓋にこれから加える DNA、班名などをマークする。

- 6) 各コンピテントセル懸濁液に以下の DNA 5 μ l を加え、おだやかに混ぜ、氷上で 30 分間静置する。この間にある頻度で DNA が取り込まれる。

第 1 週に自分たちで調整した以下の DNA 溶液

- 1 : pBR322 (vector : *bla*)
- 2 : pCRP (pBR322 に *crp* を挿入 : *bla* , *crp*)
- 3 : pLAC (pBR322 に *lacIZYA* を挿入 : *bla* , *lacIZYA*)
- 4 : pCYA (pBR322 に *cya* を挿入 : *bla* , *cya*)

教員から渡される DNA 溶液 (10 μ g/ml)

- 5 : pBR322 (vector : *bla*)

- 7) 42°C 恒温水槽で 1 分間静置して heat shock を行った後、氷上で 2 分間静置する。
- 8) 無菌操作で 1 ml の LB 培地を加え、37°C インキュベーターで 30 分間静置培養する。
- 9) 遠心分離 (4000 rpm、3 min) 後、軽く上清を捨て (~20 μ l 程度の培地がエッペンチューブ中に残る感じ)、底に沈澱した菌体をピペッティングでやさしく懸濁する。
- 10) 全量を各々 1 枚の MacConkey-Lactose Amp プレートにスプレッダーを用いて均一に塗布し、37°C で 1 晩静置培養する。次週に表現型を観察する。
- 11) 実験終了後、使用した器具、机上を片づけ、元の状態に戻す。大腸菌の付いた廃液、チップは滅菌処理してから廃棄する。それ以外のは産業廃棄物 (可燃物・不燃物) として廃棄する。
- 12) 野生型、*lacZYA*、*crp*、*cya* の遺伝子型の大腸菌株にそれぞれのプラスミドを用いて形質転換した場合の予想される結果を推察し、以下の課題を行う。来週の実験を予習した者から退出する。

	野生型 (wt)	<i>lacZYA</i>	<i>crp</i>	<i>cya</i>
pBR322				
pCRP				
pLAC				
pCYA				

W: White (Lac-), RE: Rabbit Eye (Lac+/-), R: Red (Lac++),

課題

- 1) 1つのコロニーに 10^7 の細胞が含まれるとする。大腸菌の世代時間が 30 分とすると 1 個の細胞からコロニーが形成されるのに必要な時間 (分) を計算せよ。
- 2) 大腸菌は約 460 万塩基対のゲノム DNA をもち、1 カ所の複製開始点から両方向に DNA ポリメラーゼが DNA を複製するが、全て複製するのに約 40 分かかる。どうして世代時間の方が短くなるのか、そのメカニズムを考察せよ。
- 3) 42°C でヒートショック後に、LB 培地を加えて培養するのは何のためか？
- 4) この実験には重要な対照実験が欠けているが、それは何か？
- 5) Ampicillin の入っていないプレートに撒くとどうなると予想できるか？

結果と考察

- 1) 自分の班の結果 (表現型、コロニー数など) と他班の結果を表にまとめる。
- 2) 生じたコロニーの数から教員から渡された pBR322 の形質転換効率 (cfu: colony forming units, DNA $1\ \mu\text{g}$ あたりいくつのコロニーが生じたか) を計算する。また各プラスミドの形質転換効率も同じであるとする、それぞれのプラスミドの濃度を推定せよ。
- 3) 生じたコロニーの色から、A~D の遺伝子型が何であるかを論理的に推察する。予想した結果通りであったか、違っていた場合は理由を考えよ。
- 4) CRP と cAMP によるラクトースオペロンの正の制御についてこの実験から分かることを考察せよ。
- 5) pCRP のプラスミドに紫外線を照射してから *cya* 変異株に導入したところ、形質転換体の中に赤いコロニーがでてきた。このコロニー中の *crp* 遺伝子はどうなったと考えられるか？
- 6) 今回の実験では Lac I による負の制御について調べることは難しい。それはどうしてか？

第3週：

β -galactosidase assay

大腸菌内の β -galactosidase 発現量とその酵素活性から測定する。 β -galactosidase 活性の定量的解析は ONPG を基質にした比色定量により行う。さらに、グルコース、ラクトース共存時にグルコースを優先的に代謝し、ラクトースオペロンの発現を抑制するという糖の選択的代謝の分子機構について考察する。

1) 各班 (4 人 1 組) 50 ml チューブ 4 本に LB 培地を 10 ml デカンテーションでとる。チューブには班名、#1~4 を書いておく。以下のように試薬を加える。

1 : 1 ml 10 % グルコース (終濃度 ~1 %)

2 : 1 ml 10 % ラクトース (終濃度 ~1 %)

3 : 1 ml 10 % グルコース + 1 ml 10 % ラクトース

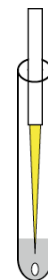
4 : 1 ml 10 % グルコース + 1 ml 10 % ラクトース + 40 μ l 0.1 M IPTG (終濃度 0.4mM)

2) 教員の用意した野生型大腸菌の前培養液を各々の培地に 400 μ l 加え (1/25 希釈)、37°C で振盪培養する(約 2 時間)。この間に前週のプレートを観察して考察を行う。

3) 培養中に 4 本のガラス試験管に班名、#1~4 を書く。900 μ l ずつ Z buffer を入れる。

4) さらに 50 μ l の 0.02% SDS、50 μ l の chloroform を分注する。Chloroform は揮発性なのでチップを溶液につけて加える。

5) 600 nm での濁度が 0.4 以上になったらサンプリングを行う。その時点での濁度を記録し、素早く培養液を 100 μ l サンプリングし、試験管内に用意しておいた Z buffer に加える。直ちに 5 秒間激しく vortex して生体反応を停止させ膜を透過性にする。この時点で置いておけるので、4 本ともサンプリングする。



クロロホルムは直接入れる

6) 室温 (~28°C) で以下のようにして β -galactosidase assay を行うが、試験管ごとの誤差を少なくするために反応は 30 秒ごとに始めると良い。混乱しないよう予め各自タイムテーブルを実験ノートに用意すること。

7) 200 μ l の 4 mg/ml ONPG 溶液を加え、vortex で軽く混合して反応を開始する。

8) 机上で静置して反応を進めるが、反応液が黄色を呈してきたところ (最短でも 2 分行う) で、1 M Na_2CO_3 を 500 μ l 加え vortex して反応を停止する。反応時間 (ONPG を加えてから Na_2CO_3 を加えるまでの時間) を記録する。20 分の時点で発色しないものに関してはその段階で反応を停止させてよい。

9) 2000 rpm で 5 分間遠心分離してクロロホルム、大腸菌の死骸を落とす。

10) 上清をガラスピペットで注意深く取り、420 nm の吸光度を測定する。クロロホルムをプラスチックキュベットに入れると変性するので注意する。

対照は水で取る。呈色の低いサンプルから行うと誤差が少ないことに留意する。OD₄₂₀ が 2.0 を

超えていたら Z-buffer または水で 5 倍希釈して再度測定する。

11) 次の式に従って β -galactosidase 活性を計算する。

$$\text{Miller units} = (\text{OD}_{420} \times 10000) / (\text{OD}_{600} \times t(\text{min}))$$

12) 実験終了後、使用した器具、机上を片づけ、元の状態に戻す。Chloroform を含む廃液は回収する。大腸菌の付いたチップ、プレートは滅菌処理してから廃棄する。それ以外のは産業廃棄物（可燃物・不燃物）として廃棄する。

課題

- 1) Z buffer, SDS, Chloroform それぞれの役割は何か？
- 2) Miller units の意味することは何か。何故 Miller units を計算する必要があるのかを考察せよ。
- 3) 吸光度と濁度の違いは何か？

結果と考察

- 1) #1~4 の β -galactosidase 活性についてデータを整理し、それぞれの条件下でどのようなラクトースオペロンの発現があるか、定量解析を行う。
- 2) ラクトースオペロンの発現誘導と、今回の結果から考えられる大腸菌の選択的糖代謝の分子機構について考察し、理由とともに論理的に説明せよ。
- 3) 今回の実験を *crp* 変異体や *lacI* 変異体で行った場合に予想される結果を考察せよ。

5. レポート

3 週分をまとめて1つのレポートにする。提出期限は実習終了後2週間であるが、締め切りを守るのは最低限のマナーである。

実習レポートは論文形式(目的と原理、実験操作、結果、考察)で実際に行った操作を過去形で記し、結果と考察を文章形式でまとめる。特に、得られた結果からどのように考察し、結論したかを自分なりに考え論理的に記述することが重要である。課題についても回答する。その他に自分で本実習にふさわしい問題を作り、回答した場合は加点する。大体は理解している(またはそう努力した)と思われるレポートを80点とするので、返却後確認すること。

出典を明記した上での引用は認めるが、教科書や Web の丸写しでは意味がない。班内外での積極的な議論をすることを奨励するが、他人のレポートや Web 等のコピーを発見した場合は単位認定しない場合がある。

6. 参考資料

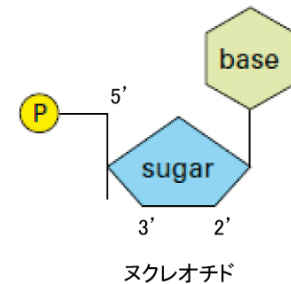
本実習にあたって、知っておくと良いことを以下に記す。高校で生物学未履修の者であっても、充分予習しておけば最低限理解できるようにしたつもりである。ここに記載されていない事項、詳細については各自調べること。

分子生物学

複雑な生命現象を、構成する基本的要素である核酸やタンパク質といった分子の働き、制御として理解しようとするのが分子生物学である。もともと、1940年代から物理学者たちが単純なモデルとしてファージやバクテリアなどを用いて、遺伝子を中心として生命原理を導こうとしたことが始まりである。狭義的に DNA、遺伝子を扱うのが分子生物学と考えるのではなく、分子レベルでのメカニズムの解明から生命のコンセプトを理解することが重要である。したがって、分子生物学は単なる記述的、観察的な博物学的な古典生物学とは一線を画す。組換え DNA 実験や PCR といった新しい研究技術の開発から今や細胞レベルから個体レベルにおける高次生命現象を理解する上でも分子生物学的手法は欠かせなくなっている。

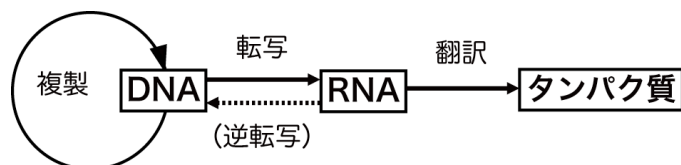
核酸 (Nucleic Acid)

1869年に F. Miescher が膿から抽出した生体高分子で、塩基と糖、リン酸からなるヌクレオチドを基本単位とする。各ヌクレオチドの 3' と 5' 位がリン酸エステル結合で繋がることで長い鎖状になる。糖の違いによって、2-デオキシリボース (2' 位が水素基) を持つデオキシリボ核酸 (DNA) と、リボース (2' 位が水酸基) を持つリボ核酸 (RNA) とがある。



セントラルドグマ

DNA 上の遺伝情報は RNA を介してタンパク質へと流れていき、その情報がタンパク質から核酸に逆流することも、タ



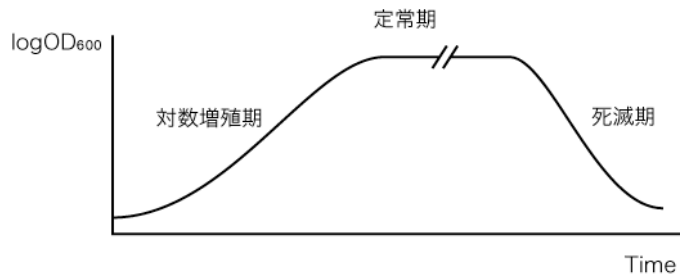
ンパク質からタンパク質へと流れることもないという生命の一般原理をクリックはセントラルドグマと表現した。後にレトロウイルスから逆転写酵素が発見され、RNA から DNA への情報伝達もわかってきたが、普遍的ではなく、タンパク質から核酸への情報伝達は未だに見つかっていない。

大腸菌

長さ約 2 μm ほどの桿菌でグラム陰性の真正細菌 (バクテリア) である。原核細胞で、核を持たない。環状のゲノム DNA を持ち、約 4.6Mbp 内に一箇所の複製開始点 *oriC* を持つ。現在最もよく解析されているモデル生物であり、ゲノム解析から約 4300 遺伝子から構成されていることが明らかとなっているが、その約 30% 程度の遺伝子の機能は未だ不明である。

バクテリアの増殖

液体培地にバクテリアを植菌すると細胞分裂を繰り返して増殖する。栄養条件がよい培地では大腸菌は指数関数的に増殖する (log phase, vegetative phase) が、時間が経過して条件が悪化すると増殖速度は下がり、定常期 (stationary phase) にはいる。



大腸菌の増殖曲線

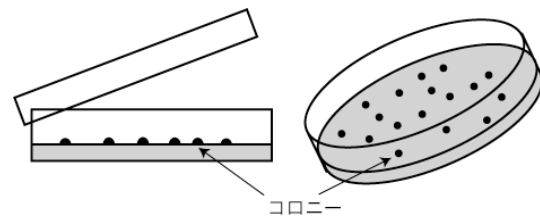
大腸菌は巧妙にこのような外界の環境変化に適応しながら生きており、定常状態でも数週間程度生きている (コロニーを形成できる) ことが可能である。

細胞濁度 (cell density)

大腸菌等のバクテリアを含む培地の濁度は細胞密度に一次比例して高くなる。使用するバクテリアの系統について濁度と細胞密度の関係を知っていれば、濁度を測定することで細胞密度を推定することができる。

コロニー

大腸菌をプレートに撒き、1晩ほどインキュベートするとコロニーが観察される。1個のコロニーは1個の大腸菌に由来し、約 10^7 個まで増殖したものであり、基本的に同一の遺伝子型を持つクローンと考えて良い。コロニー数を計測することで撒いた大腸菌液中の生菌数や形質転換効率も知ることができる。1枚のプレート上に $\sim 10^3$ 個程度のコロニーが出るように希釈してプレーティングすると計測しやすい。



コロニーは1個の大腸菌が 10^7 程度まで増えたものであり、コロニー数はプレーティングしたときの生菌数となる。

抗生物質

もともとは微生物によって作られる化学物質で他の微生物等の生物の成育を阻害するものであるが、現在では人工合成したものや抗ウイルス性、抗腫瘍性のもも含まれる。

本実習で用いる抗生物質 ampicillin は細菌の細胞壁合成を阻害する。pBR322 等が持つ ampicillin 耐性遺伝子 (*bla*) は ampicillin を分解する酵素 (β -lactamase) を産生するため、形質転換した大腸菌を Ampicillin を含むプレート上で選択する。

プラスミド

細菌は染色体 DNA 以外に、細胞内で独立して存在する環状二本鎖の DNA 分子を含んでいる。この DNA 分子のことをプラスミドと言う。プラスミドは染色体 DNA よりサイズがずっと小さく、せいぜい数キロ塩基対である。プラスミドは複製の起点として働くことのできる DNA 配列をもっているた

め、染色体と独立して細胞内で増殖することができる。pBR322は約30copies/cellのマルチコピープラスミドである。遺伝子工学でベクター（運び屋）として用いられるプラスミドは、抗生物質耐性遺伝子をマーカー遺伝子として持たせたものが多い。

MacConkey-Lactose プレート

MacConkey プレートは栄養源としての peptone や NaCl 以外に pH 指示薬である Neutral Red などを含む。この pH 指示薬は大腸菌が糖を代謝する際に菌体外に排出される酸に反応して赤色を呈するため、単一の糖源としてラクトースを含む MacConkey-Lactose プレート上ではラクトースを代謝できる菌は赤色のコロニーを、できない菌は無色のコロニーを形成する。X-Gal が β -galactosidase の酵素活性自身を直接検出するのに対して間接的な手法である。

遺伝子とタンパク質の表記

遺伝子やタンパク質の表記法は生物材料によって異なるが、遺伝子は基本的に *lacZ*, *crp* のように小文字の斜字体または、下線で記述する。遺伝子産物としてのタンパク質は LacZ, CRP のように大文字の立字体で表記する。LacZ の酵素学的な名前は β -galactosidase である。また、CRP のように発見の経緯等で複数の名前を持つタンパク質も多い。

遺伝子型 (genotype) と表現型 (phenotype)

遺伝子型とはその生物の遺伝子構成を表す表記法である。全ての遺伝子を記述することはできないので、着目する遺伝子の変異型を記述するが多い。大腸菌の場合、機能欠失遺伝子を *lacZ* のように小文字の斜字体で書いて示す。野生型であるか変異型であるかを区別するために *lacZ*⁺、*lacZ*⁻ のように書く場合もある。表現型とはその生物、細胞の形態的、生理的特性という観点で示す表記法である。例えばラクトースを資化する能力を持たない大腸菌株は Lac⁻ と表す。

一般に1つの遺伝子型は1つの形質に関して1つの表現型に対応するとされるが、必ずしも当てはまらない場合もある。逆に、同じ表現型であっても異なる遺伝子型である場合は多く存在し、1:1の対応関係ではない。例えば *lacZ* の遺伝子型を持つ大腸菌は Lac⁻ の表現型を示すことが推定されるが、Lac⁻ の表現型を示す大腸菌株の遺伝子型は必ずしも *lacZ* ではない。

大腸菌におけるラクトースの代謝

ラクトース（乳糖）はガラクトースとグルコースが β -1,4 結合して出来た二糖である。この糖を資化するためにはまず β -1,4 結合を加水分解してガラクトースとグルコースに分けなければならない。その過程に働く酵素は β -galactosidase と呼ばれ、大腸菌の場合 *lacZ* 遺伝子にコードされる。大腸菌におけるラクトース代謝に関わる遺伝子群 (*lacZ*, *Y*, *A*) は同一のオペロンを形成している。

ラクトースオペロン

大腸菌を含む全ての生物の遺伝子は、いかなる条件でもほぼ定常的に発現する遺伝子とある条件下でのみ発現する遺伝子とに大別することが出来る。タンパク質合成に関わるリボソームをコードする遺伝子群などは前者に属する。後者は誘導型の遺伝子とも呼ばれ、*lacZ* などがその代表例である。

ラクトース資化に関わる遺伝子で、*lac* の名前がつくものには *lacZ* の他に *lacY* がある。*lacY* はラクトースを菌体内に取り込む酵素、ラクトースパーミアーズをコードする。*lacZ*、*lacY* は一つの転写単位として転写される。このことを「*lacZ*、*lacY* はオペロンを構成する」と言い、この転写単位はラクトースオペロン (lactose operon または *lac operon*) と呼ばれる。*lac operon* にはもう一つの遺伝子、*lacA* が含まれる。*lacA* はガラクトシドアセチルトランスフェラーゼをコードするが、ラクトース資化には必須ではなく、その生理的意義は未だに不明である。*lacI* は *lac operon* の発現、すなわち *lac operon* に含まれる遺伝子群が転写、翻訳されて LacZ、LacY、LacA タンパク質が生産されるのを抑制するタンパク質 Lactose Repressor (Lac Repressor もしくは単に LacI: I は inhibitor に由来する) をコードする。

大腸菌の遺伝子発現調節の研究は *lac operon* の解析により大きく発展した。Jacob と Monod は *lac operon* の解析を通してオペロン説

(operon theory) を提唱し、誘導型の遺伝子の発現調節機構を説明した。彼らのオペロン説とは、ごく簡単に表現すると「誘導型の遺伝子もしくは遺伝子群には特異的なリプレッサー (repressor) と呼ばれる抑制因子が存在し、通常はオペレーター (operator) と呼ばれる作用部位にリプレッサーが作用することで転写が抑制されている。その遺伝子の発現が必要とされる時

lactose repressor (ラクトースリプレッサー)
: 負の転写因子。ラクトース非存在下でのラクトース

CAP (カタボライトアクチベータープロテイン)
: 正の転写因子。cAMPと結合し、転写開始を活性化する。

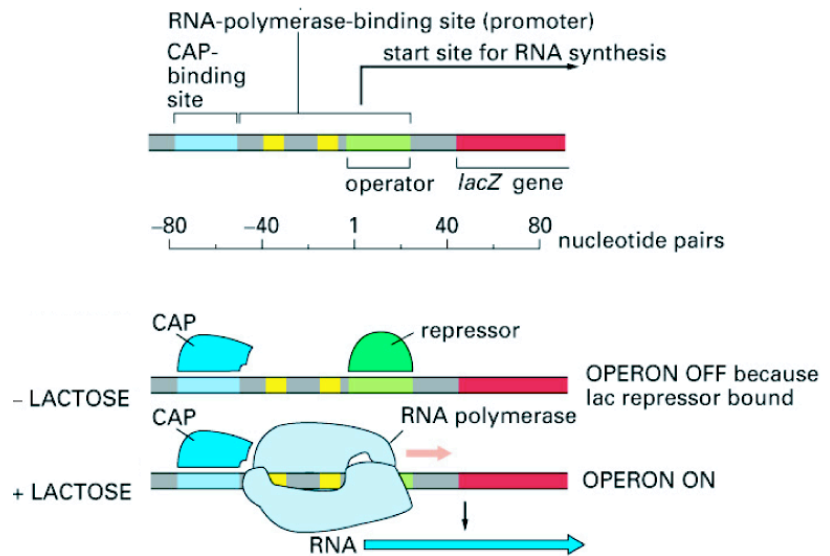


Figure 7-38. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

にはリプレッサーによる転写抑制が何らかの機構で解除され、その結果遺伝子が発現する」というものである。多くの場合、誘導型の遺伝子群は一つの転写単位として発現し、それが一つのオペレーターの制御下にあることから、オペロン (operon) と呼ばれる。この業績により彼らは Lwoff とともに 1965 年にノーベル医学生理学賞を受賞している。彼らの最大の功績は、遺伝子の発現制御のしくみが、『*trans* に働くリプレッサーが *cis* に働くオペレーターに作用して転写を抑制しているのが通常の状態であり、その転写抑制の解除こそが誘導型遺伝子の発現誘導であること』を明らかにした

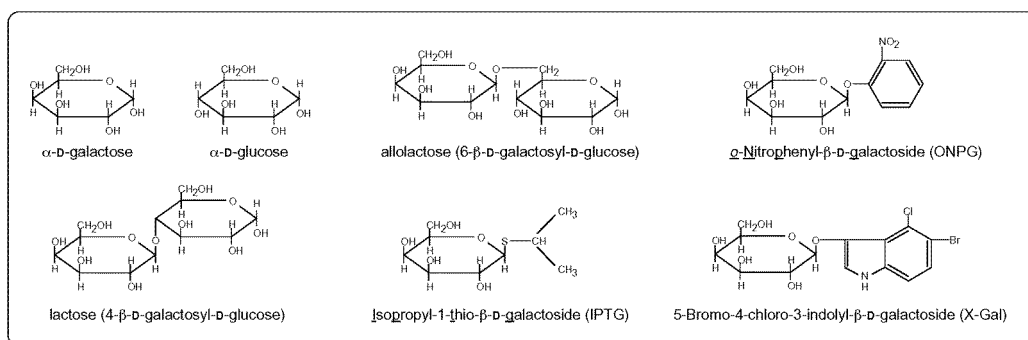
点である。この基本概念はその後様々な遺伝子発現調節機構にも当てはまることが示され、分子生物学の発展に大きく寄与した。

なお、転写調節にはリプレッサー以外にアクチベーター (activator) と呼ばれる転写活性化因子が働くことがあること、リプレッサーやアクチベーターは DNA 上の特異的な部位 (リプレッサーの場合はオペレーター) に結合することで RNA polymerase による転写開始反応を正、または負に制御することも以降の解析から明らかにされている。

lac operon の場合、Lac Repressor (LacI) がリプレッサーであり、アクチベーターとして cAMP 受容タンパク質 (CRP; cAMP receptor protein もしくは CAP; catabolite gene activator protein) と呼ばれるタンパク質が作用する。CRP は *crp* 遺伝子にコードされる転写制御因子であり、ラクトースオペロン以外にも多くの糖代謝系を制御する。cAMP 合成酵素は *cya* 遺伝子にコードされる。*lac operon* の転写は通常 *lac operator* に結合した Lac Repressor 四量体によって抑制されているが、Lac Repressor は lactose の異性体である allolactose と結合すると配列特異的 DNA 結合能を失い、operator に結合できなくなる。その結果抑制は解除され、*lac operon* は発現する。

ラクトースによる *lac operon* の発現誘導

LacY タンパク質 (lactose permease) によって大腸菌内に取り込まれたラクトースは LacZ (β -galactosidase) によってガラクトースとグルコースとに分解されるが、一部はアロラクトース (allolactose) と呼ばれるラクトースの異性体に変換される。アロラクトースは LacI に結合してその立体構造を変化させ、そうすると LacI はオペレーター部位に対する特異的 DNA 結合能を失いオペレーターから解離する。その結果抑制が解除され *lac operon* が発現する。すなわち、おおまかに言えばラクトースが *lac operon* の発現を誘導する誘導物質 (inducer) であると言って良いが、より正確にはアロラクトースが誘導物質であると言える。

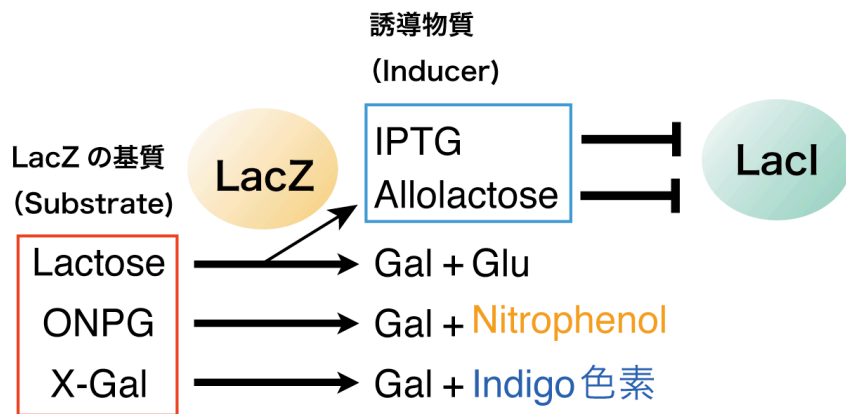


グルコース、ラクトースとそのアナログの構造

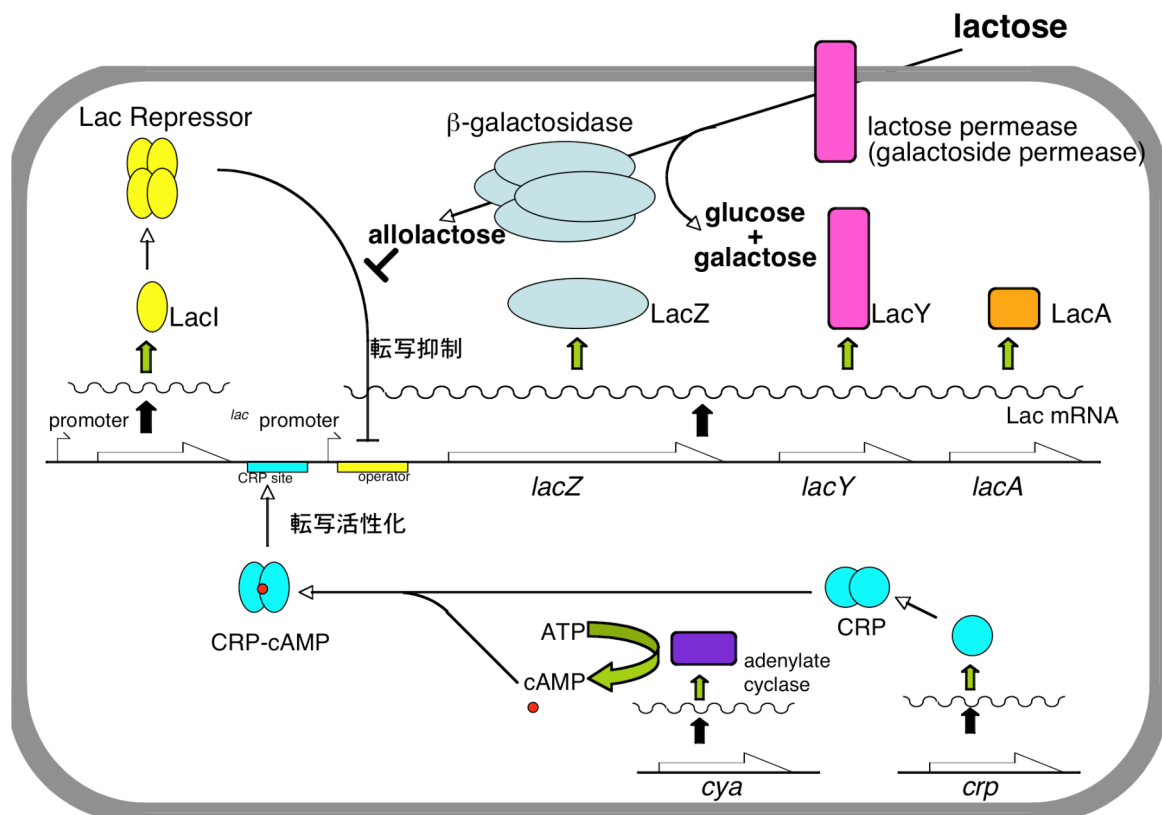
• IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) は allolactose のアナログで、allolactose と同様に LacI に結合してその特異的 DNA 結合活性を失わせる。その結果負の制御が解除されるので *lac operon* が発現する。つまり IPTG は *lac operon* の誘導物質 (inducer) である。IPTG は β -galactosidase の基質とはならない。

• X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) はそのままでは無色であるが、 β -galactosidase の基質となって加水分解され、5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol が遊離する。これはインディゴ色素の前駆体であり、空気酸化されて青色のインディゴ色素 (5-bromo-4-chloro-3-indigo) となる。X-Gal による呈色反応は検出感度の極めて高い方法であるが、色素が不溶性なので酵素活性の定量には不向きである。

• ONPG (*o*-nitrophenyl- β -D-galactoside) は無色の化合物で、 β -galactosidase の基質となって加水分解されると黄色の *o*-nitrophenol が遊離する。ONPG は水溶性で、その分解産物である黄色い色素も水溶性であることから、比色定量に向いている。



基質と誘導物質



大腸菌ラクトースオペロン制御系のモデル図