

第四章 組換え DNA 分子の作製

比 嘉 昭 子

最近（昭和60年10月）遺伝子操作で作られたインシュリン（タンパク質で、糖の代謝を調節するホルモン）の使用が許可されたことが報道された。このように第一章で概観した遺伝子操作（遺伝子工学又はバイオテクノロジーとも言う。）の一部は、既に実用化されている。遺伝子操作に必要なことは、第一に目的の遺伝子を取り出して自己増殖できるようにし、第二にそれを適当な細胞（宿主）に入れて増やすことである。こうして増やした遺伝子を再び取り出してその構造を調べたり、細胞の中でその遺伝子の産物を生産させて実用に供する。ここでは第一の技術について述べる。

<はじめに>

生物の性質や形態を特徴付けているのは、細胞の中の多種多様のタンパク質の働きであり、そのタンパク質に関する情報は、DNAという巨大な分子が持っていること、また、DNAはその情報を正確に自己複製して親から子に伝達することは前に述べた。遺伝子操作とは細胞の外、つまり実験容器の中でDNAを人工的に操作して、自然界とは異った遺伝子の組み合わせ（組換えDNA分子）を作成し、これを宿主の細胞に移入して増やすことをいう。例えばヒトのインシュリンの情報をもった遺伝子を、大腸菌の中で自己増殖できる遺伝子と組み合わせながら大腸菌に入れてやれば、速い速度で増殖する細菌と共に増えるので、短時間で多量のインシュリン遺伝子が得られる。そこでその遺伝子の情報が、転写、翻訳されれば、多量のインシュリンを大腸菌が作ることになる。つまり目的の遺伝子はごくわずかでも得られれば多量に増やすことができる。

このように、ある細胞の中で異種の生物の遺伝子を増やしたり、その機能を発揮させたりできたのは、科学の歴史にとって画期的なことである。このことはまた、全ての生物は、基本的に同一の原理に支配されていることの証明にも

なった。

そこで第一に、目的の遺伝子（DNAの断片）、上の例ではインシュリンの遺伝子を手にする必要がある。DNAは巨大分子とは言っても、ごく微小のものであるから、目的の遺伝子を手にするというのは、その存在を何等かの方法で、間接的に確かめることができるということである。またDNAの断片は、そのままでは細胞の中で増殖しない。それが増殖するには自己増殖に関する情報、つまり増殖因子（レプリコン）が必要である。そこで第二に、目的のDNA断片をレプリコンを持ったDNA（これを目的のDNA分子の運び屋という意味でベクターと呼ぶ）に組み入れて、組換えDNA分子を作らなければならない。第二章付記で、細菌にはプラスミドという小さな環状の自律増殖遺伝子が存在することがあると述べたが、このDNAも各種のウイルスも、それぞれの宿主の中で増殖可能なレプリコンを持っているので、ベクターとして使用されている。では組換え遺伝子はどのようにして作られるだろうか。

1) 組換え遺伝子の作製法

本題に入る前に、DNAについてもう一度復習をしよう。（図-1参照）

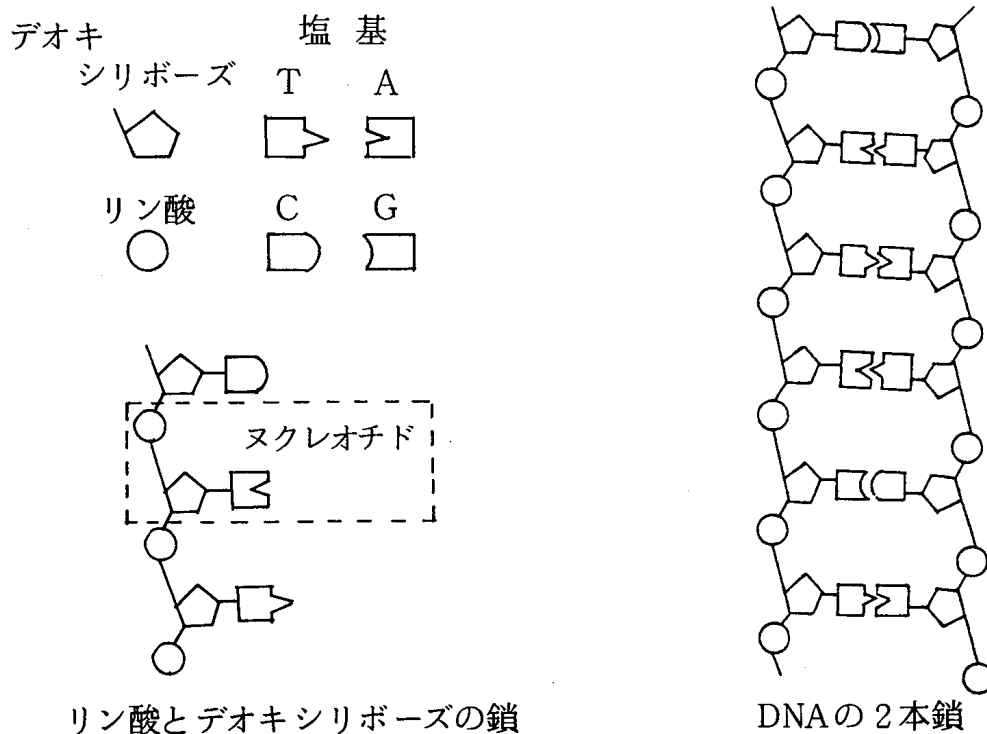


図-1：DNAとその構成要素

DNAは、デオキシリボースにリン酸と塩基が結合した単位分子（ヌクレオチド）がいくつも連なっている鎖状の分子である。それはリン酸とデオキシリボースが交互に連結した長い鎖にA, T, G, Cと略記される4種の塩基が等間隔に並んだ構造をしている。この分子が2本、塩基を内側に向い合って、一方の鎖のAは他方の鎖のTと、また一方のGは他方のCと水素結合で結ばれて相補的な2本鎖になっている。

遺伝情報とは、20種のアミノ酸が一行に連なってできているタンパク質の構造に関する情報で、3個の塩基の並び方（コドン）がこれらのアミノ酸の暗号である（表-1）。

表-1：アミノ酸とその遺伝暗号の例

アミノ酸	略記	遺伝暗号 (mRNAに記述されているもの)
メチオニン	Met	AUG
フェニールアラニン	Phe	UUU UUC
イソロイシン	Ile	AAU AUC AUA
バリン	Val	GUU GUC GUA GUG
ロイシン	Leu	UUA UUG CUU CUC CUA CUG
セリン	Ser	UCU UCC UCA UCG AGU AGC

このDNAの相補的2本鎖は、情報の保存と次の世代への正確な伝達に適した構造である。ある生物が生きていくのに必要な遺伝情報の全て（これをゲノムと言う）は、この分子の中に保存され、mRNAを介してタンパク質の構造に翻訳される。大腸菌のゲノムは、ひと続きの2本鎖で分子量が数十億であるが、ヒトのゲノムはその約千倍もあり、DNAの構成単位のヌクレオチドが、約30億個連なったものに相当する。

1個の遺伝子の大きさは、千から数万ヌクレオチド（300~10,000個のアミノ酸でできているポリペプチドについての情報量）であるから、ある特定の遺伝子がゲノムの中で占める割合はヒトの場合、数十万から百万分の一（細菌でも平均数千分の一）になる。従ってゲノムの中の特定の遺伝子を同

定するのは困難であるが、そのためにいろいろな方法が工夫されている。そのひとつは、ゲノムDNAを、例えば後で説明するような方法で切断してDNA断片を作る。これらの中から、少なくとも1個の遺伝子を含む大きさのものを選び出してベクターにつなぎ（組換え体を作り）、ベクターの宿主細胞（受容体）の中に入れると受容体の増殖に伴って増える。

こうして増えた受容体は異なる各種の組換え体をもった集団（これを遺伝子図書館又は遺伝子銀行と呼ぶ）なので、これらの中から**目的の遺伝子をもった受容体を適当な方法***で選び出し、増殖させれば目的のDNAを多量に得ることができる。

＊ 目的の遺伝子が入った受容体を選ぶには、例えばその遺伝子が入ったために変化した性質を利用する方法がある。His⁺の遺伝子を選ぶのが目的の場合、His⁻受容体の中でヒスチジンなしで成育する菌を選べばよい。この時、組換え体のために変化したことを知るために組換え体のプラスミドDNAの持っている性質を確かめる必要がある。

もし目的のDNAを転写するmRNAを分離、精製できる場合には、これを使って、あらかじめ目的のDNAを選び出して、ベクターDNAにつなぎ受容体の中で増やす。従ってこの場合理想的にいけば、目的の組換え体をもった受容体だけを増殖させることが可能である。また遺伝子のDNAの構造（塩基配列）が分かっている場合には化学的に遺伝子を合成して使用することができる。

では大腸菌の染色体遺伝子（染色体DNA）の図書館を作る方法を例に具体的に述べよう。同じ大腸菌の間にもいろいろな種類がある。例えばテトラサイクリンという抗生物質に耐性を持つ（この場合は耐性因子はプラスミドにある。）もの（Tet^Rと記す。Tetracycline Resistantの意味）もあれば、そうでない（Tet^S, Sensitive）ものもある。

ある種のアミノ酸、例えばヒスチジンがなければ増殖できないもの（His⁻と略記するが、ヒスチジンを合成できない）もあれば、このアミノ酸なしで増殖できるものもあるというように変化に富んでいる。培養液の中にグルコ

ーズと窒素やイオウの化合物その他ナトリウムやカリウム塩など数種の無機化合物だけを与えれば増殖する野生型の種類は、これらの栄養からアミノ酸やヌクレオチドを合成するのに必要な酵素を全て持っているので、ごく限られた栄養で生育する。そこでこの菌の遺伝子図書館を作る過程を箇条書きにすると次のようになる。

- ① ベクターとしてのプラスミド又はファージDNAと、染色体DNAを精製する。
- ② これらのDNAをそれぞれ別々に、ある種の酵素（制限酵素）で切断する。
- ③ 制限酵素は図-2のように、DNA断片の両端の数個の塩基が1本鎖になるように切断するので、両者を混合すると相補的な1本鎖が分子間又は分子内で水素結合で会合する。

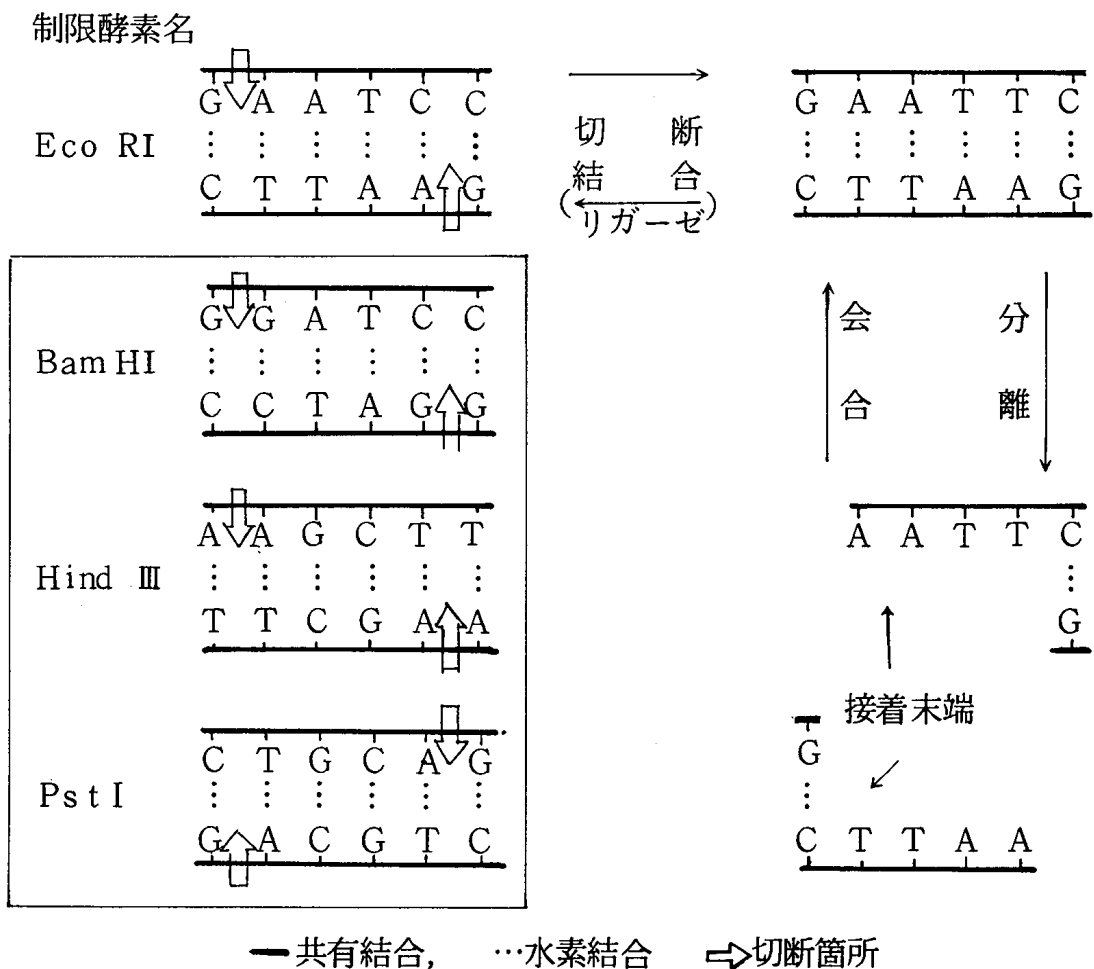


図-2：制限酵素の作用

- ④ それぞれの1本鎖に切れ目のある相補的な塩基間の水素結合は、簡単にはずれるから、切れ目を酵素（リガーゼ*）を用いて共有結合でつなぎ2本鎖の環状DNAにする。

***リガーゼ**

正しくはDNAリガーゼでDNAの糖とリン酸を共有結合でつなぐ酵素。

- ⑤ 環状DNAを宿主の中に入れて増殖させる（形質転換*）。

***形質転換**

DNA分子それ自体が直接細胞に侵入して、その中で増殖し細胞の形質を変化させることをいう。その他DNA分子が、ウイルスで運び込まれたり（形質導入）、細菌同志が接触して、一方の菌から他方へDNAが移動する（接合）こともある。

- ⑥ 形質転換した細菌から目的の遺伝子を含んだ菌を選び出す。

これらについて具体的に記述しよう。①については実験を通して学び、⑤と⑥は五章で扱うので、ここでは②、③、④について述べる。

制限酵素には、丁度ノリしろを付けて切るように、DNAのある特定の塩基配列を認識して、一部1本鎖を残してリン酸とデオキシリボースの結合を切断するものがある。例えば図-2で示したようにEco RIは、GAATTCとCTTAAGの相補配列のそれぞれの鎖のGとA、AとGとの間を切断するので一方はAATTの配列、他方はこれと相補的なTTAAの配列の1本鎖の接着末端、つまりノリしろ部分を付けて切れる。Bam HIの作用箇所は、GGATCCとCCTAGGの相補配列でGG間で切断されるのでGATCとCTAGの接着末端ができる。1本鎖の部分を接着末端というのは、この相補的1本鎖は水素結合でつながるからである。

ここでは4種の制限酵素（Eco RI, Bam HI, Hind III）の例を挙げたが、その他いろいろな種類の制限酵素が知られている。組換え遺伝子を作る時利用する制限酵素は、当然ベクターの自己複製に必要な部分と、目的の遺伝子を切断

しないものでなければならない。そのような制限酵素を選び、両者にそれぞれ作用させて混合すれば、これらの接着末端は水素で会合する。しかし、水素結合は弱い結合なので、このままでは安定な分子とはならないので、それぞれの鎖の切れ目を共有結合でつないで、安定な分子（組換え遺伝子）を作る。この働きをするのがリガーゼである（図-2の右側の矢印を逆にたどる反応に相当する）。

そこでベクターとして pBR322 といわれる大腸菌のプラスミドを用い大腸菌の染色体 DNA の遺伝子図書館を作る実例を示そう。

このプラスミドは自己増殖に必要な部分（ori と記す）と、テトラサイクリン（Tet）とアンピシリン（Amp）という抗生物質に対して、抵抗性を示す耐性遺伝子*（それぞれ Tet^R、Amp^R と記す）を持つ約 4300 個の塩基対の環状 DNA で、その全塩基配列が明らかになっている。従って、DNA のどの部分が、どの制限酵素で切断されるかが分っている。

* 耐性遺伝子

細菌を死滅させる薬剤がいろいろあるが、何十億もの菌の中にはこれらの薬剤で死滅しないもの（耐菌性）が、ごくわずか、例えば数億に一個程度含まれていることがある。この菌の集団を、ある薬剤の入った培養液に入れておくと、耐性のないものは死滅して、耐性菌だけ増えて耐性菌だけの集団になってしまう。

テトラサイクリンやアンピシリンなどを長く使用していると、やがて効果がなくなるのはそのためである。

図-3は、その遺伝子地図（各種遺伝子の DNA 上での相対的位置関係を示したもの）で、このプラスミドは、ここに記した 4 個の制限酵素では、それぞれ一箇所だけ切断される。

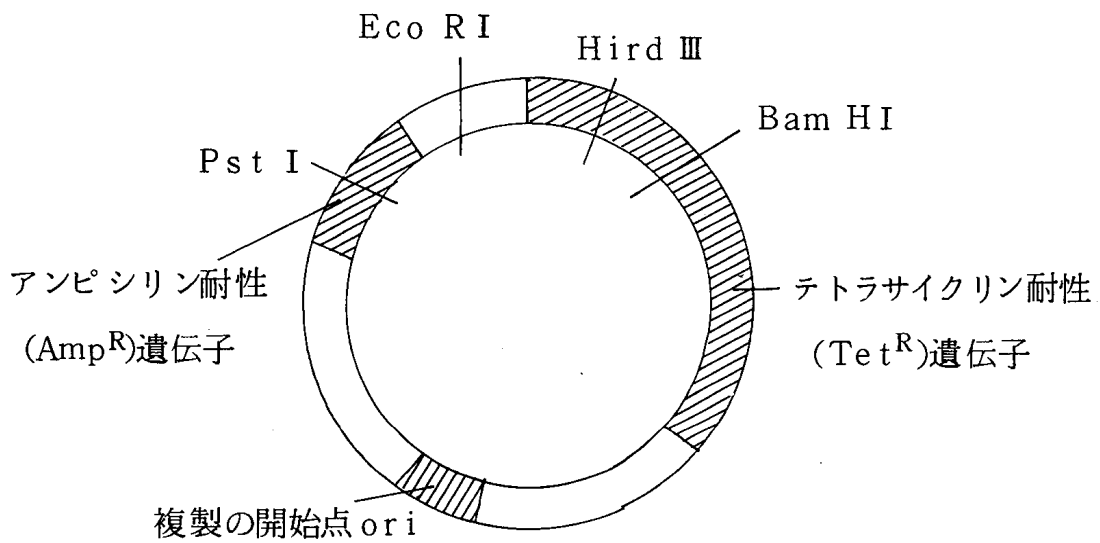


図-3：pBR322の遺伝子地図と制限酵素の作用点（一部）

図-2で示したようにBam HI の作用箇所は、GGATCCとCCTAGGの相補配列のGG間で切断されるので、GATCとCTAGの接着末端ができる。両末端間の水素結合が離れると、環は開いた直鎖状になる（図-4）。

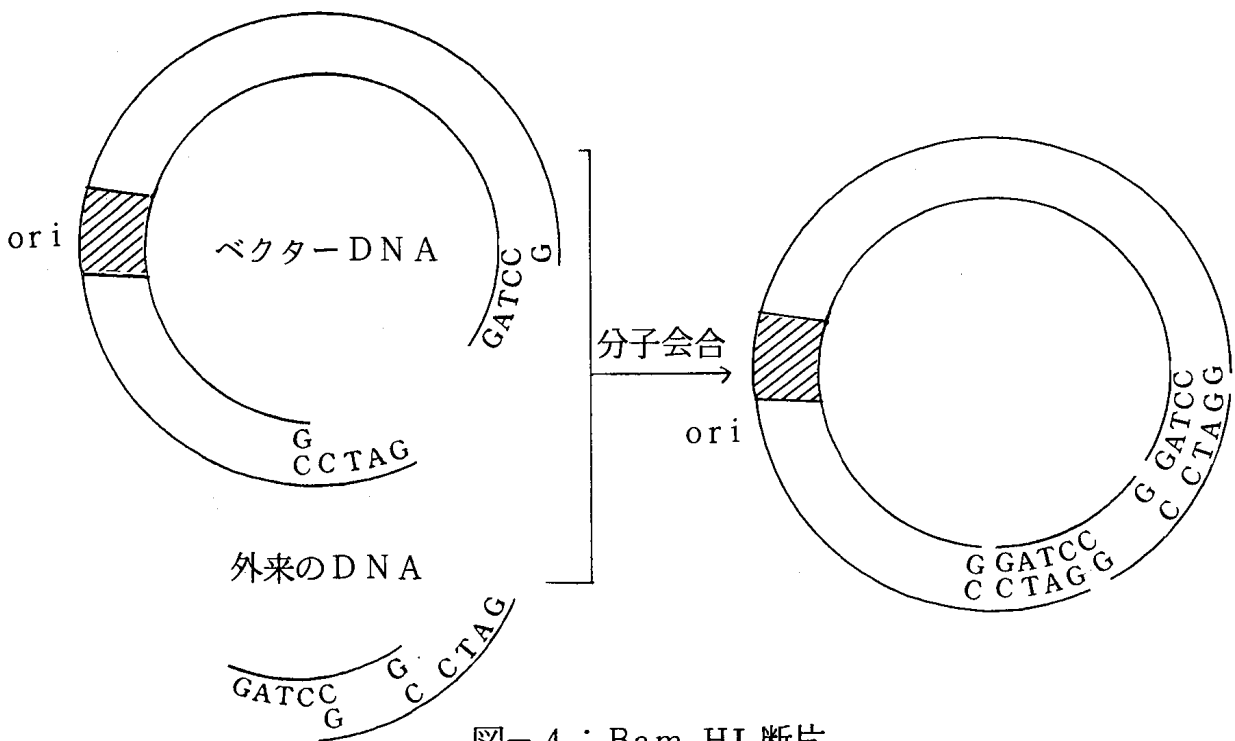


図-4：Bam HI 断片

このプラズミドが大腸菌に寄生すると、上記の二つの薬剤に対して耐性を与えるが、宿主の生活に必須のものでなく、またベクターとして必要なのは、

oriの機能だけである。そこで制限酵素Bam HIで切断して、そこに目的の遺伝子を挿入して組換え遺伝子を作ると、テトラサイクリン耐性の機能は消失するが、目的の遺伝子は、このプラスミド宿主の中で増殖できるようになる。この組換え遺伝子をTet^S、Amp^Sの菌に入れると、テトラサイクリンに感受性(Tet^S)でアンピシリン耐性(Amp^R)になる。

染色体DNAも、Bm HIで切断すると、各種の長さのDNA断片ができる。大腸菌のゲノムの各遺伝子の配列順序(遺伝子地図)は、ほとんど全部明らかにされているが、これはプラスミドに比べると格段に大きいから、その塩基配列は一部しか分っていない。従って制限酵素による切断箇所は明らかではないので、やみくもに切断することになるので、ショットガン方式とも言われている。いろいろな長さの断片を分離して、少なくとも一個の遺伝子を含む程度の大きさのものをを選び、同じ制限酵素で切断したpBR322と混合してリガーゼでつなぐ。こうしてできた組換え遺伝子は大腸菌の染色体遺伝子の各種の性質を持ったものの混合物である。これらが大菌腸*を受容体にして増殖させると大腸菌の遺伝子図書館ができる。

2) 組換え遺伝子作製実験

実験 - 1. DNAの抽出と精製

(A) 染色体DNA

- ① 適当な培養液の中で、成育させた大腸菌を、遠心分離器で集める(集菌)。これを緩衝溶液に懸濁して、細菌の外壁を溶かす酵素(リゾチーム)を作用させ、更に界面活性剤(例えば、SDSと呼ばれるもの)を加えて細胞を完全に溶かして、その内容物を溶出させる。
- ② 非可溶物を遠心分離器で沈澱として除外してから、フェノール* (またはクロロフォルム)のような、タンパク質を変性させる試薬を加えてよく混合する。これを軽く遠心すると、二つの相に分離する。

*** フェノール**

フェノールは、あらかじめ弱アルカリの緩衝溶液で飽和したものを
用いる。それはDNAが酸性に弱いのとフェノールが水と部分的に混合
するためである。

上相は水溶液（水相）で、DNAやRNAその他の水溶性の分子が溶
けている。2相の界面には、変性して固化したタンパク質が集まって
いるので、これを混入しないよう注意して水相をピペットで吸いあげ
て別の器に移す。

- ③ RNA分解酵素（RNase）で処理した後、界面の固体がなくなるま
で上の操作を繰り返し、タンパク質を十分に除く。この時タンパク質
分解酵素を使うこともある。
- ④ 水相に、エタノール（ -20°C に冷却したもの）を2倍容加えて*
 -20°C に2時間以上おくと高分子のDNAが沈澱する。RNAのほとん
どはRNaseで低分子に分解されているので沈澱しない。

* フェノールを完全に除去するために、エタノール沈澱の前に水相と
エーテルをよく振り混ぜてから2相に分け、エーテル相を捨てる操
作を2~3度繰り返すこともある。

フェノールは水にいくらか溶けるが、エーテルの方によりよく溶け
るので、エーテル抽出を繰り返すとフェノールを完全に除去できる。

沈澱を遠心で集め*、1~2度70%エタノールで洗浄した後エタノ
ールを除いて、適当な緩衝溶液に溶解して試料とする。

* 非常に細くて長いDNAは、引っ張る力に弱いですが、それに注意して精
製すれば、DNAが多量存在する場合には、エタノールを加えた後ガラ
ス棒に巻き取ることができる。口の太いピペットを使用すると、DNA
に張力のかかるのを少なくすることができる。

〔 DNAの濃度の測定 〕：DNAは 260nmの光を強く吸収する。

DNAの種類によっていくらか差はあるが、 $A_{260} = 1$ を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度と算定して用いる。

(B) プラスミドDNA

プラスミドDNAは、染色体DNAに比べて、一般にごくわずかしかな存在しないので、染色体DNAを混入させないで精製するのは困難であるが、物理化学的性質の違いを利用して、両者を分離して精製する方法がいくつか考案されている。そのひとつ*を次に略記する。

* これは、アルカリ性で2本鎖DNAの水素結合がはずれることを利用した方法で、直鎖DNAは急速に元のpHに戻しても、元の2本鎖に戻らないが、環状DNAは元に戻る。そこで2本鎖と1本鎖の性質の違いで分離する。

- ① 染色体DNAと同様に集菌してリゾチームを作用させた後、アルカリ性の液（pH約12）に溶かした界面活性剤を0℃で加えて混合する。
- ② これを高い塩濃度にすると共に中性に調整して、0℃で60分以上おいてから遠心分離すると、染色体DNA、RNAとタンパク質は沈澱として除去できる。遠心上清には、プラスミドのDNAが溶けているので、これを(A)の場合と同様に精製する。

(C) ファージDNA

ファージを、宿主の中で増殖させた後ファージを調整し、そのDNAを(A)と同様な方法で精製する。ファージは、DNAとタンパク質だけでできているのでRNaseでの処理は必要でない。

実験－2. 制限酵素による染色体DNA及びプラスミドDNAの切断

- ① プラスミド pBR322と染色体DNAの1～5 μ g(百万分の一g)を, 5～10 μ l(百万分の1l)の容積に溶かしたものを, ミクロピペットで別々のミクロの遠心管にいれて, これへ反応液*と1活性単位*の制限酵素 Bam HIを入れ, 素早くよく混合する。直ちに1 μ lだけを反応停止溶液*に入れ, これを反応時間ゼロの試料とする。

* 反応液

それぞれの酵素の反応に必要なイオンを含んだ緩衝溶液。多くの場合 Mg^{2+} イオンを必要とする。

* 1 活性単位

酵素の活性の基準単位で, 標準のDNAを一定時間, 一定量分解する活性を1単位とする。商品化されている制限酵素の場合, 1時間に1 μ gのpBR322又は λ DNAを完全に消化するのに必要な量を1単位としている。

* 反応停止溶液

酵素の活性を止める試薬(例えばEDTA)が入った溶液。活性に Mg^{2+} が必要な場合にはEDTA(キレート剤)を入れると, これが, Mg^{2+} イオンを挟むように結合してそのイオンの効果を遮断してしまう。

- ② 残りは, 37℃で1時間保温した後, 1 μ lを1時間分解のサンプルとして, 反応停止溶液にいれて酵素の反応状態をテストする試料とする。残りは, 直ちに-20℃のフリーザーに入れて次の実験まで保存する。

実験－3. アガロース・ゲル電気泳動（酵素反応状態の確認）

実験－2で行った反応が完全であるかどうかを確かめるために、電気泳動を行う。

DNAは、中性からアルカリ性水溶液の中でマイナスに帯電しているので、電解質溶液の中に入れて電気を流すと、プラスの電極の方に移動する。移動の速度はDNA分子の電荷や大きさや三次元構造によるので、これらの異なった分子を分離することができる。アガロースは、寒天の主成分を精製したもので、電解質溶液の支持体として用いる。適当な緩衝溶液^{*}に、アガロースを加熱して溶かし、容器に流して固める（ゲル化）と高分子が通りぬけられる程度の立体の網目ができる。

*緩衝溶液

例えば、pH8のトリス緩衝液を用いる。

網目の大きさはアガロースの濃度によるから、分離するDNAの大きさで決めるが、この場合は0.8%位が適当である。固まる前に楕状のもの（コーム又はスロット・フォーマー）でサンプル^{*}を入れる矩形の窪み（ウェル又はスロットと言う）を陰極側に数個作り、それにサンプルを入れて電流を流す。

*サンプル

サンプルに蔗糖を混合して、緩衝溶液であらかじめ満たしたウェルに入れると、密度が高いので緩衝液に拡散しないのでウェルの下に沈む。また色素BPBも一緒に加えておく。

プロモフェノールブルー（BPB）という色素と一緒に泳動して、電流を流す時間を知る目安とする。一般にこの色素がゲルの4/5程度、移動したところで止めるとよい。ゲルを取り出しエチジウムブロマイド（Eb）

の溶液に浸ける。Ebは蛍光色素で、2本鎖DNAの塩基対の重なりの際間に入り込む性質があるので、DNAのところに濃縮される。そこで長波長の紫外線を照射するとEbが赤っぽく光り、DNAの位置を知ることができる。

実験-4. ベクター (pBR322) と染色体DNA断片との組換え分子の作製
制限酵素による切断が完全であることを確かめたら、それぞれ別々にもう一度フェノール処理、エーテル処理、エタノール沈澱をした後、反応溶液に再溶解する。この場合、扱う試料が微量なので細心の注意が必要である。

ベクターと染色体DNAの混合の割合やDNAの濃度は、組換え分子を作るのに大事な要素である。例えば、ベクターDNAが染色体DNAより過剰に存在する場合ベクターDNAが自分自身で輪になる確立が高くなってしまふ。

DNAの濃度は約 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、ベクターと染色体DNA断片の比は、1対2~3がよいとされている。混合溶液に、リガーゼを0.1単位加え、 15°C で6時間か、 4°C で16時間反応させる。反応後、前回と同様アガロース電気泳動で反応の状態を観察する。

以上が組換えDNA作製の概要であるが、これは様々な方法の一例である。次の章ではこのDNAをどのように大腸菌の中に入れ、組換えDNAを持った菌を選択するかを記述する。

ま と め

細胞の外で酵素を使うなどして生化学的操作をした遺伝子を、再び細胞の中に入れてその遺伝子を増殖させたり、その機能を発現させたりする技術を遺伝子操作という。

このため第一に必要なことは、目的の遺伝子を何等かの方法で得ることであり、第二に、その遺伝子をウイルスやプラスミドなど自律増殖因子を持った遺伝子（ベクター）に組み入れて雑種遺伝子（組換え遺伝子）を作り、自己増殖可能な分子にする。第三に、それをベクターの宿主の中に入れて、増殖させることである。それには、いくつかの方法があるが第四、第五章では細菌の染色体DNAの遺伝子図書館を作る方法を通じて遺伝子操作について記述する。

この章で学んだ組換え遺伝子を作る方法は、下記の通りである。

- 1) 制限酵素 Bam HI で目的の遺伝子（大腸菌の染色体DNA）とベクター（プラスミドDNA, pBR322）とを切断すると、相補的1本鎖を両端に持つDNA分子ができる（実験－2）。
- 2) それらをおある条件下で混合すると、ベクターと目的の遺伝子の相補鎖が会合する。リガーゼで2本鎖の各鎖間の切れ目を共有結合でつなげば、環状の組換えDNA分子ができる（実験－4）。
- 3) 1)と2)の酵素反応の結果を確かめるために電気泳動を行う（実験－3）。
- 4) 精製したDNAを購入することもできるが、そうでない場合は、まず最初にDNAを抽出精製しなければならない。その方法は、使用する材料や目的によって異なるが、要点は次の通りである。
 - a) 細胞壁を溶かし、内容物を溶出させる。

- b) タンパク質を変性させて除去したり, 又は酵素で分解する。
- c) RNAを分解して低分子にする。
- d) 使用した試薬を除去する。
- e) DNAをエタノールなどで沈澱させて, 上清中の低分子を遠心して除き, 適当な溶液に再び溶かして必要な濃度にする (実験-1)。

付 記

アガロース電気泳動

ここでは、DNAの切断状態を調べるために用いたが、DNAの分離精製に使用することもある。DNAは大きさと形によって移動速度が異なるから、泳動後特定の位置にあるDNAを抽出して使用する。また、同じ立体構造のものの移動速度から、およその分子量を算定することができる。

遺伝子地図

各遺伝子の染色体上の相対的位置。例えば、図-3はpBR322上の3個の遺伝子の相対的位置を示した遺伝子地図である。突然変異の起こる箇所から帰納的に決定される。

遺伝子図書館

ある生物の、全ての遺伝情報を含むゲノムの断片をベクターにつなぎ、宿主の中に入れて増殖させ、クローン化したものの集団。無差別な断片の標品なのでショットガン標品とも言われる。

緩衝液

酸やアルカリなどの添加によるpHの変化が最小限になるように調製された溶液。弱酸や弱塩基と、その塩の混合物が緩衝作用をする。細胞や血液は、緩衝液でできていて常に一定のpHを保持する傾向にある。

酵素の活性はpHの変化に左右されやすいので、生化学の実験では緩衝液を使う必要があることが多い。

遠心分離

物質の混合溶液を容器に入れて回転させると、物質に遠心力がかかる。回転数を変えて遠心力を変えると、物質を比重と大きさの違いによって分離す

ることができる。

クローン

一個の共通の祖先に由来する同一のゲノムを持つ生物や細胞の一群。例えば細菌を一個ずつ、ばらばらになるように寒天培地にまき培養してできたコロニー（第二章）はクローンといえる。

DNAの移動

DNAが、ひとつの菌株から他の菌株へ移行することが自然界でも割合によく起こる。この移動は、細菌の接合（菌の接触で菌から菌に移動する）や、形質導入（ファージの感染などによって運びこまれる）、形質転換（DNAが直接侵入する）によって起こる。

ベクター

自然界に存在するプラスミドやファージのDNAの他に、これらをいろいろ切り貼りして、目的にかなうようなのが作られている。

変性

生体高分子が薬剤や熱などで、自然状態での構造が変化したものを言い、一般に変性によって生物活性を失う。複雑な立体構造をしたタンパク質は強アルカリや強酸、高温や有機溶剤（フェノールやクロロフォルム）で、非可逆的にその立体構造が壊されて生物活性を失うことが多い。DNAは、これらの苛酷な化学的条件に比較的安定であり、また変性も可逆的な場合が多い。つまり、元の条件にすると遺伝子としての機能を発揮する。

野生型

自然界に多く存在する遺伝型をいう。

練習問題

第四章

- (1) ヒトのインシュリンの遺伝子を取り出して、そのまま細菌の中に入れることができたとしても、この遺伝子は増殖しない。それは何故か。
- (2) プラスミド pBR322 の遺伝子地図を参照して、次の問に答えよ。

問1：制限酵素 Pst I で切断したときの接着末端の塩基配列を下の空欄に記入せよ。



- 問2：Pst I で切断した外来のDNAと、上記のDNA と結合して組換え体を作り細菌に入れた（形質転換）時、この組換え体は増殖する。それは何故か。
- 問3：上記の組換え体で形質転換した細菌は、アンシピリン（Amp）とテトラサイクリン（Tet）を、それぞれ別々に入れた培養液の中で増殖するか否かに答えよ。
- (3) DNAの精製について、次の問に答えよ。
- 問1：フェノールを加えるのは何故か。
- 問2：RNase を作用させる必要があるのは何故か。
- (4) アガロース電気泳動に関する問に答えよ。
- 問1：DNAは、陰陽どちらの極に動くか。
- 問2：染色体DNA を制限酵素で切断した資料を電気泳動すると、DNA は電場全体に広がるのは何故か。