

分子生物学関係 classical

分子生物学史年表 (年と出来事)	4
分子生物学の誕生.....	10
生物学への物理的思考の導入	11
分子生物学 (構造学派と情報学派)	14
遺伝子の構造.....	16
分子遺伝学	18
分子生物学の概略史	19
創始期.....	19
第 1 期.....	20
【遺伝情報の転写と複製】	20
【制限酵素の発見】	21
第 2 期.....	22
【組換え DNA 実験の誕生】	22
【逆転写酵素と DNA 合成】	23
【スプライシング現象の発見】	23
【免疫グロブリン遺伝子の可変性】	24
【癌遺伝子の発見】	24
【ウイルス学の進歩】	25
【分子進化学】	26
【遺伝子クローニング法の改良】	26
第 3 期.....	26
【スーパーマウスとノックアウトマウス】	27
【遺伝子の発現調節機構】	27
【プログラム細胞死】	28
【癌抑制遺伝子】	29
【遺伝病の解明と遺伝子診断】	30
【生命現象の解明へ】	30
DNA から RNA への転写.....	31
転写制御因子の構造	35
1, 転写制御機構	35

2、転写制御因子	36
3、転写制御因子の機能ドメインとモチーフ.....	36
4、転写制御に至るメカニズム	38
RECOGNITION OF DNA.....	39
1) ロイシンジッパー	39
a、歴史とあらまし	39
b、分子構造	39
c、機能.....	40
d、これからの展開	40
<i>The basic leucine zipper (bZip) motif.....</i>	<i>41</i>
2) ZN フィンガー/リングフィンガー.....	41
a、歴史とあらまし	41
b、分子構造	41
c、機能.....	42
d、これからの展開	42
<i>The zinc-finger motif.....</i>	<i>43</i>
3) HTH	43
a、歴史とあらまし	44
b、分子構造	44
c、機能.....	44
d、これからの展開	45
<i>The helix-turn-helix motif</i>	<i>45</i>
4) HLH	46
a、歴史とあらまし	46
b、分子構造	46
c、機能.....	47
d、これからの展開	47
GLOSSARY	48
ヘリックス ALPHA (α) —HELIX [α らせん ; α 構造 α -STRUCTURE]	48
ALU (アル) 配列 ALU SEQUENCE [ALUファミリー—ALU FAMILY]	48
アイソフォーム ISOFORM.....	48
アニーリング ANNEALING.....	49
アロステリック効果.....	49
アロステリック酵素 ALLOSTERIC ENZYME.....	49
アンチセンス ANTISENSE.....	49

遺伝子 GENE.....	50
遺伝子ライブラリー GENE LIBRARY.....	50
遺伝子治療 GENE THERAPY 【遺伝子療法】	51
鋳型 TEMPLATE.....	51
A T P (ADENOSINE 5' -TRIPHOSPHATE) 【アデノシン5' -三リン酸】	52
S D S (SODIUM DODECYL SULFATE) 【ドデシル硫酸ナトリウム;ラウリル硫酸ナトリウム SODIUM LAURYL SULFATE】	52
液体クロマトグラフィー LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	52
ELISA (エライザ) ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY ; ENZYME IMMUNOASSAY	53
エキソサイトーシス EXOCYTOSIS	53
エンドサイトーシス ENDOCYTOSIS 【飲食作用】	53
オリゴDT OLIGO DT.....	54
ガングリオシド GANGLIOSIDE.....	54
界面活性剤 DETERGENT	55
環状AMP CYCLIC AMP (cAMP) 【サイクリック AMP】	56
CAT (キャット) アッセイ CAT (CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE) ASSAY.....	56
キナーゼ KINASE 【ホスホトランスフェラーゼ PHOSPHOTRANSFERASE】	57
偽遺伝子 PSEUDOGENE.....	57
逆転写酵素 REVERSE TRANSCRIPTASE 【RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ RNA DEPENDENT DNA POLYMERASE】	58
グルココルチコイド GLUCOCORTICOID 【糖質コルチコイド】	58
クローニングベクター CLONING VECTOR 【クローニングビークル CLONING VEHICLE】	59
クロマトグラフィーの原型。	59
クローニング CLONING [クローン化]	59
COS (コス) 細胞 COS CELL.....	59
コンセンサス配列 CONSENSUS SEQUENCE [共通配列]	60
コンセンサス配列 (表)	60
G 418	61
シャペロン CHAPERONE [分子シャペロン MOLECULAR CHAPERONE]	62
ステロイドホルモンレセプター (受容体) STEROID RECEPTOR (SHR)	63
ストレスタンパク質 STRESS PROTEIN [熱ショックタンパク質 HEAT SHOCK PROTEIN (HSP)]	63
性決定遺伝子 SEX DETERMINING GENE.....	64
相同遺伝子組換え HOMOLOGOUS RECOMBINATION	64
中間径フィラメント INTERMEDIATE FILAMENT [10NM フィラメント 10NM FILAMENT]	65
転写 TRANSCRIPTION	66
等電点 ISOELECTRIC POINT (PI)	66
パーコール PERCOLL	67

ハウスキーピング遺伝子	HOUSE KEEPING GENE67
PCR	(POLYMERASE CHAIN REACTION) [ポリメラーゼ連鎖反応]67
PCNA	(PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN) [増殖(性)細胞核抗原]68
FAS (ファス) 抗原	FAS ANTIGEN68
フェノール抽出	PHENOL EXTRACTION68
プロテインキナーゼ	PROTEIN KINASE [タンパク質リン酸化酵素]69
プロテインキナーゼC	PROTEIN KINASE C (PKC) [Cキナーゼ C-KINASE]70
プロテオグリカン	PROTEOGLYCAN70
プロトオンコジーン	PROTO-ONCOGENE71
ブロモデオキシウリジン	BROMODEOXYURIDINE (BrdU ; BUDR)71
MAP キナーゼ	MAP KINASE (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE)71
メチル化 (DNA の)	METHYLATION (OF DNA)72
免疫監視機構	IMMUNE SURVEILLANCE ; IMMUNOLOGICAL SURVEILLANCE73
免疫寛容	IMMUNE TOLERANCE [寛容 TOLERANCE]73
免疫グロブリン	IMMUNOGLOBULIN73
免疫沈降 (法)	IMMUNOPRECIPITATION74
ラージT抗原	LARGE T ANTIGEN [大型T抗原]74
LAC (ラック) オペロン	LAC OPERON [ラックオペロン ; ラクトースオペロン LACTOSE OPERON]75
ラミニン	LAMININ75
ΔGT 11 ベクター	ΔGT 11 VECTOR76
リボヌクレアーゼプロテクション法	RIBONUCLEASE PROTECTION ASSAY [RNアーゼプロテクション法 RNASE PROTECTION ASSAY]76
リン脂質	PHOSPHOLIPID76
レクチン	LECTIN77
レチノイン酸	RETINOIC ACID77
胚幹細胞	EMBRYONIC STEM CELL. EMBRYO-DERIVED STEM CELL [ES細胞 ES CELL]78
胚中心	GERMINAL CENTER [芽中心、明中心 ; 二次結節 SECONDARY NODULA]79

分子生物学史年表 (年と出来事)

1869 DNAの単離(F. Miescher)

- 1911 ○ラウス肉腫ウイルスの発見 (F. P. Rous)
- 1915 ○コールタール塗布による発がんの証明 (山極勝三郎, 市川厚一)
- 1940 ファージグループによる大腸菌ファージの研究開始
(M. Delbrück, S. E. Luria ら)
トウモロコシのトランスポゾンの発見 (McClintock)
- 1944 DNA による肺炎双球菌で形質転換の発見 (O. T. Avery ら)
- 1945 1 遺伝子 1 酵素説 (G. W. Beadle, E. L. Tatum)
○「生命とは何か」
(生命現象も物理法則に従うかという問いかけ, E. Schrödinger)
- 1946 大腸菌の遺伝的組換えの発見. 微生物遺伝学の基礎を築く
(J. Lederberg, E. L. Tatum)
- 1951 ○HeLa の細胞の単離 (最初に株化されたヒト由来の細胞, G. O. Gey)
- 1952 RNA の化学的構造の解明 (A. F. Markham, M. Smith)
インスリンの全一次構造決定 (F. Sanger)
T2 ファージの遺伝物質は DNA であることを証明 (A. D. Hershey, M. Chase)
ジヌクレオチドの化学合成 (A. R. Todd)
☆ポリペプチド化学合成法 (V. Du Vigneaud ら)
☆レプリカ法 (J. Lederberg)
☆アミノ酸配列決定法 (F. sanger)
- 1953 B 型 DNA の二重らせんモデル (J. D. Watson, F. H. C. Crick)
- 1955 大腸菌の接合を用いた遺伝子地図作成. 微生物遺伝学の基礎を築く
(E. L. Wollman, F. Jacob)
DNA ポリメラーゼの発見 (A. Kornberg ら)
- 1956 DNA の半保存的複製の証明 (M. Meselson, F. W. Stahl, J. Vinograd)
☆塩化セシウム密度勾配遠心法
- 1957 大腸菌の遺伝子地図は環状であると発表 (F. Jacob, E. L. Wollman)
鎌状赤血球における異常ヘモグロビン S がアミノ酸 1 個の置換によることの
証明 (V. M. Ingram)
○センダイウイルス細胞融合現象の発見 (岡田善雄)
☆ショ糖密度勾配遠心法 (Roberts, Britten, Bolton)
- 1958 セントラルドグマの提唱 (F. H. C. Crick)
- 1959 クローン選択説. 免疫学の基礎をかたちづくった (F. M. Burnet)
リボソームでアミノ酸重合が起こることの発見 (R. J. Britten ら)
○RNA 酵素説. リボザイムの研究
☆ポリアクリルアミド電気泳動 (Raymond ら)
- 1960 薬剤耐性因子の発見. プラスミドの存在を確立 (Anderson ら)

- X線結晶解析によるミオグロビンの構造決定 (J. C. Kendrew ら)
- がんウイルスによる培養細胞でのフォーカス生成を発がん性の検索に使用 (P.Vogt, R. Dulbecco)
- 1961 sus, am フェージで条件致死変異体形成 (A. M. Campbell, M. A. Epstein ら)
- 核酸の水素結合対の変性・再生 (J. Marmur, P. Doty)
- オペロン説. 遺伝子発現の調節機構に関する研究がはじまる (F.Jacob, J. L. Monod)
- 大腸菌で poly U がフェニルアラニンのコドンであることを発見 (M.W. Nirenberg ら)
- トリプレットコドンの証明 (F. H. C. Crick, S. Brenner, W-Tobin ら)
- mRNA の概念提唱とその証明 (S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson)
- ☆高分子 DNA の調整法 (Marmur)
- 1962 大腸菌における制限・修飾現象の発見 (W. Arber)
- RNA ポリメラーゼの発見 (M. Chamberlin, P. Berg)
- アロステリックタンパク質モデルの提唱 (J. L. Monod, F. Jacob)
- 胚細胞の操作によるキメラマウスの作出 (B. Mintz)
- 電子顕微鏡による DNA 観察 (A. K. Kleinschmidt)
- カエルの分化細胞の核を除核卵に注入し個体を発生させ, 分化において遺伝子系が全能性を保つことの証明 (J. B. Gurdon)
- 1963 ○体細胞 (ニンジン) から植物体が再形成され, 植物の体細胞不定胚形成の発見 (F.C. Steward ら)
- 1964 RNA レプリカーゼの発見 (S. Spiegelman, I. Haruna)
- 組換え分子の中間体を予測した Holliday 分岐モデル (R. Holliday)
- 1964 ☆アミノ酸配列のデータベース作業はじまる (NBRF)
- コンドの解読完了. 普遍コンドという概念 (M.W. Nirenberg, S. Ochoa, H. G. Khorana ら)
- 組換え, 修復に関与する大腸菌変異株の研究が進展 (P. Howard-Flanders ら)
- 免疫グロブリン産生における遺伝子再構成の予見 (Drayer, Benner)
- 分子進化時計の概念 (E. Zuckerkandl, L. Pauling)
- ☆DNA・RNA のハイブリット形成 (S. Spiegelman ら)
- ☆ニトロソグアニジンによる大腸菌の変異誘導. 強力な変異誘起剤は微生物遺伝学の進歩を促した (E. A. Adelberg)
- 1966 ラクトースリプレッサーの精製に成功 (W. Gilbert ら)
- 電子顕微鏡による DNA の部分変性地図作成 (Inman)
- 1967 岡崎フラグメント (岡崎令治ら)
- 1968 色素性乾皮性は DNA 障害修復の欠損によることを発見 (J. E. Cleaver)

- 高等真核生物には多数の繰返し配列があることを証明 (Britten ら)
レプリコン. 複製調節の基本モデル (S. Brenner, F. Jacob)
- タバコのプロトプラストを作成. 培養して個体の再生に成功 (Takebe ら)
○分子進化の中立説を提唱 (木村資生)
☆電気穿孔法による動物細胞のトランスフォーメーション
(A. J. Sale, W. A. Hamilton)
- ～1969 SV40 ウイルスの分子生物学はじまる (R. Dullbecco, P. Berg ら)
- 1969 ○ σ 因子の発見. 転写開始機構の解明進む (R. R. Burgess, A. A. Travers ら)
○ ρ 因子の発見. 転写終結機構の解明進む (Roberts)
- ～1970 ○がん遺伝子の存在を予見 (がん遺伝子 src を同定) (Huebner ら)
- 1970 制限酵素 Hind II の精製 (H. O. Smith ら)
逆転写酵素の発見 (H. M. Temin, D. Baltimore ら)
☆大腸菌のトランスフェクション. 塩化カルシウム法を用いてファージ DNA を
導入. その後, プラスミド DNA にも応用されるようになった
(M. Mandel, A. Higa)
- 1971 ○カエル卵母細胞への mRNA の微注入による形質発現 (J. B. Gurdon ら)
- 1972 アラニン tRNA 遺伝子の DNA の化学合成 (H. G. Khorana ら)
試験管内組換え DNA 分子の作製 (P. Berg ら)
○ポテトとトマトの細胞融合から得た個体, ポマト作出 (Melchers ら)
☆ λ ファージゲノムの試験管内パッケージング法. λ ファージベクターやコスミ
ドベクター開発の原動力となる (Kaiser, Masuda)
- 1974 異種 DNA であるカエル rDNA を大腸菌の中で増やす. 組換え DNA 実験法の確
立 (S. Cohen, H. W. Boyer ら)
ヌクレオソーム構造モデル (A. Krug, R. D. Kornberg ら)
○Ti プラスミド (細菌と植物間に動く因子) の発見
(J. Schell, K. Van Montagu ら)
☆FACS の実用化 (L. A. Herzenberg ら)
- ～1975 大腸菌遺伝子の転写開始シグナル配列. プリブノーボックスやリボソームとの
相互作用決定シグナル配列発見 (Pribnow ら)
- 1975 mRNA のキャップ構造を発見 (Miura ら)
大腸菌におけるトランスポゾンの発見. 動く遺伝子の概念ができた
(P. Berg, S. Cohen ら)
遺伝子工学に関する国際会議, 第 1 回アシロマ会議開催
☆ハイブリドーマの開発. モノクローナル抗体産生可能になる
(J. F. G. Köhler, C. Milstein)
☆DNA の塩基配列決定法の 1 つであるマキサム. ギルバート法の開発

- (A. M. Maxam, W. Gilbert)
- ☆DNA の塩基配列決定法の 1 つであるサンガー法の開発 (F. Sanger)
 - ☆コロニーハイブリッド形成法 (M. Grunstein, D. S. Hogness)
 - ☆サザンブロッティング法 (E. M. Southern)
 - ☆ポリエチレングリコールを用いる細胞融合法 (G. Pontecorvo)
 - ☆タンパク質の二次元電気泳動 (P. H. O' Farrell ら)
- 1976 逆転写酵素の利用による cDNA 作製 (Maniatis ら)
- 酵母ゲノムでゲノム DNA ライブラリー作製がはじまる (Clarke, Carbon)
- ヒト成長ホルモン遺伝子が大腸菌で発現させる (H., M. Goodman ら)
- 1977 大腸菌複製開始領域 oriC のクローニング (S. Yasuda, Y. Hirota)
- タンパクキナーゼ C の発見 (西塚泰美ら)
- アデノウイルスの遺伝子の中に介在配列の発見. エクソン, イントロンの概念 (Sharp, Chow ら)
- φ X174 の全ゲノムの塩基配列決定. この中から重複遺伝子の存在がみつかった (F. Sanger ら)
- ☆リン酸カルシウム法による動物細胞のトランスフォーメーション法 (M. Wigler ら)
- ☆pBR322 クローニングベクターの構築 (F. Bolivar, H. W. Boyer ら)
 - ☆ノーザンブロッティング法 (J. C. Alvine, D. J. Kemp, G. R. Stark)
 - ☆フットプリント法開発. タンパク質が結合する部位が一目瞭然となった (Galas, Schmitz)
 - ☆ニックトランスレーション法. これにより DNA の高度放射能標識が可能になった (P. Berg ら)
- 1978 mRNA は前駆体から生成することを証明. スプライシングの概念確立 (Darnell, Weissman, Leder ら)
- 遺伝子ファミリーの概念 (遺伝子は重複し, おのおの進化するという考え)
- その後, 免疫グロブリンスーパーファミリーなどが知られるようになった (Maniatis ら)
- 免疫グロブリン産生における遺伝子再構成の証明 (利根川 進ら)
 - ACTH-βLPH 前駆体遺伝子のクローニング. ポリプロテイン概念の確立 (中西重忠, 沼正作ら)
 - λファージベクターによる高等動物の遺伝子ライブラリー (Maniatis ら)
 - 大腸菌を用いたインスリンの生産 (Goeddel ら)
 - がん遺伝子 src に対応する正常細胞の DNA を発見 (J. M. Bishop, Hanafusa ら)
- 1979 真核生物のプロモーターシグナル配列, TATA ボックスの発見 (Hogness, Goldberg)

- Z型 DNA 構造の発見 (Rich ら)
- ☆ウエスタンブロッティング法 (Towbin ら)
- 1980 ○レトロウイルスの分子生物学はじまる (J. M. Bishop ら)
○受精卵への DNA 微注入. 最初のトランスジェニックマウスの作製 (K. Gordon ら)
- ☆コスミドベクターの開発 (Collins ら)
- 1981 SV40 転写調節系の研究からエンハンサーの発見 (P. Chambon ら)
○ラウス肉腫ウイルスが v-s r c, 正常細胞内に相同の c-s r c があることを確定 (J. M. Bishop, Varmus ら)
○ヒトがん活性型遺伝子の検出. がん細胞由来の DNA で 3T3 細胞を形質転換できることを発見 (Weinberg ら)
- ☆レトロウイルスベクターの開発 (K. Shimotohno, E. M. Scolnick ら)
- 1982 ○ショウジョウハエ P 因子の発見 (G. M. Rubin ら)
○M13 ファージクローニングベクターの構築 (J. Messing ら)
☆塩基配列のデータベース作成がはじまる (EMBL, Genbank)
☆CAT アッセイ法. 発現調節領域の同定などに多用されるようになった (Gorman ら)
- 1983 ○Ti プラスミドを用いて植物細胞に遺伝子を導入する方法の確立 (M. Van Montague, J. Schell ら)
○ヒト網膜芽種発生は劣性遺伝子 R b-1 に支配されることを発見 (W. K. Cavaneer ら)
○ハンチントン舞踏病の原因遺伝子研究に多型マーカーを活用難病研究の新しい研究方法論を確立 (Gusella, Wexler ら)
○ショウジョウハエ形態形成遺伝子群の分子生物学的解析がはじまる (W. J. Gehring ら)
○P 因子を用いるショウジョウハエの遺伝子系改造 (G. M. Rubin ら)
○フェニルケトル尿症の遺伝子診断 (S. L. Woo ら)
☆パルスフィールドゲル電気泳動 (Schwartz, Cantor ら)
☆データベースを使ったホモロジー検索広まる (タンパク質については 1970 年～)
- 1984 ○AIDS ウイルスの発見と性質解明がほぼ完了 (R. C. Gallo, L. Montagnier ら)
○T 細胞レセプター産生における遺伝子再構成の証明 (利根川 進ら)
○Ds, Ac などトウモロコシの動く遺伝子の実体を解明 (Messing ら)
☆アンチセンス RNA の発現調節への利用. いくつかの調節系が操作されるようになった (Weintraub, Inouye ら)
☆アミノ酸配列のデータベースを統一化 (NBRF-PIR)

- ☆NMRによるタンパク質の立体構造決定 (Wüthrich ら)
- 1985 ○家系分析に基づくヒト遺伝子マップ作成法が広まる (R. L. White, H. Donis-Keller ら)
○ヒトの多型マーカーの発見と利用が広まる (R. L. White, 中村祐輔ら)
○RNA型生命の起源説
- 1986 5～6センチモルガンのヒト遺伝子マップ作成作業が盛んになる (R. L. White, H. Donis-Keller ら)
○デュシャンヌ型およびベッカー型筋ジストロフィー遺伝子 (ジストロフィン) のクローニングに成功 (L. M. Kunkel ら)
☆ゲルリターデーションアッセイ法による転写因子の同定はじまる (Singh ら)
- 1987 大腸菌ゲノムの整列クローニングの作製 (小原雄治ら)
FGFが中胚葉誘導能をもつことが発見. 胚誘導研究の新しい時代がはじまる (J. M. W. Slack ら)
☆non-R1であるDIGを用いたDNAの塩基配列決定法
☆YACベクターの開発 (B. T. Burke, M. V. Olson ら)
☆エンハンサートラップ法 (C. J. O' Kane, W. J. Gehring)
☆オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異導入法の確立 (M. Smith)
- 1988 PCR反応 (R. K. Saiki ら)
DNA複製ライセンス因子の発見 (J. J. Blow, R. A. Laskey)
☆ノックアウトマウス (M. R. Capecchi ら)
- 1989 ☆酵母 two hybrid systemの開発 (S. Fields, O. Song)
- 1990 ○ヒト遺伝子治療がNIHではじまる (R. H. Blease ら)
- 1990～ ○アポトーシスの分子メカニズムの解明
- 1991～ サイクリンタンパク質群, Rbの作用の発見 (C. J. Sherr ら)
- 1993 MAPキナーゼカスケードの解明
DNAのメチル化の機構を解明 (R. J. Roberts)
- 1994 ☆GFPタンパク質 (R. Y. Tsien ら)
- 1995 ○インフルエンザ菌のゲノム完全解読 (J. C. Venter ら)

以上 細胞工学 15/4 (1996) 407～410 より

生物学への物理的思考の導入

生物学が物質を基盤とした生化学に変化していき、遺伝子が単なる概念ではないことが明らかになったのが、1930年代から1940年代である。これと同じ時代に現われた忘れてならない動きは、物理学者が生命に興味をもちはじめたことである。これが現在の分子生物学（分子遺伝学をも含めて）の発端であり、生命科学もここを一つの出発点としている。

このような背景の基に、1930年代になって物理学者が生命現象に積極的興味をしめし、物理学的思考による生命の解明が開始された。そして、その時までには基礎づくりのできていた生化学と遺伝学の成果の上に、新しい学問、分子生物学が誕生する。これはある意味では、生物学という学問をまったく変えてしまったともいえる画期的な動きである。分子生物学の思想をうみ出したのは、ドイツの物理学者デルブリュック（Max Delbrück）であるが、この学問の誕生には多くのドラマが含まれている。

1932年、コペンハーゲンで開かれた“国際光学療法会議”で量子物理学者ボーア（Niels Bohr）が「光と生命」という講演を行なった。物理学者である彼が生命について考察するようになったいきさつは、次のようなものといわれている。ラザフォード（E. Rutherford）の研究室の一員であったボーアの目の前には、古典物理学の観点からは説明できない原子の性質が、次々と現われてきた。たとえば、水素スペクトルの振動数には、法則性があり連続的ではない。さらに、種々の元素から生じるX線の波長は、その原子の原子番号と相関関係をもつことなどである。彼は、これらの観察にプランク（Max Planck）の量子論的概念を導入することを試み、観察された性質をお互いに結びつけて、みごとな原子模型を作り上げることに成功した。

ボーアの模型は、原子自身をうまく現わしただけではなく、この模型を使うとそれまで化学で経験的につくられていたメンデレーエフの周期律表がみごとに説明された。こうして彼は、一見、解釈不可能ともみられる現象にぶつかることこそ、一段高いレベルでの理解へ飛躍することにつながると強く信じるようになった。そして、この考えを生命現象にまで発展させたのが「光と生命」の講演だったのである。その中で彼は、次のようにいっている。

物理学の基礎の上に生命を理解するためには、自然現象の分析に何か基本的なものが欠けているのではないか。生命現象を解明するには、対象は生きたままの状態にしておく必要がある。ところが、生物を極限まで分析していき、生物の中での原子の役割を解明しようとするれば、生命を奪うことになってしまう。これでは生命の解明にはならない。すなわち、生物には、それが置かれている物理的条件に関して、ある不確定性が残ることは避けられない。

彼のこの見解に従えば、生命の存在それ自体が、作用量子の存在と同様、基本的事実として認められなければならない。そして、作用量子の存在が古典物理学からみれば非合理的であったのと同様に、生命には量子力学でも説明不可能な特有の作用が考えられることになる。逆の表現をすれば、作用量子を理解するには、新しい量子力学という学問が必要

であったのと同様に、生命現象を理解するためには、また別の物理学が必要なのではないかという考え方である。この論法はそれまでの常識とは逆の発想である。物理学は生命現象を理解するための理論や実験技術の面で生物学に寄与できるかもしれないという考え方でなく、生物学から新しい法則が導き出され、まったく新しい物理学が生まれるかもしれないというのである。そして、量子論が古典力学で描かれていた世界像を一新したように、新しい法則をもった生物学が量子論的世界をさらに拡大していくことを期待しているという点で、生物学と物理学とをそれまでとはちがった新しい関係に置いたことになる。

しかし当時の聴衆には、彼の意図はよく理解しえなかったのであろう、彼の熱心さにもかかわらず、この講演にはほとんどなんの反響もみられなかったという。ところが、その中にただひとりこの講演にいたく感激して、原稿のコピーを依頼してきた青年物理学者がいた。これが**デルブリュック**である。彼はドイツのゲッチンゲン大学に学び、実験物理学で学位をとった後、量子物理学研究の意欲を胸にボーアの研究室に仲間入りしたばかりであった。ボーア原稿を熟読したデルブリュックは、その意図するところに共鳴し、いつかは生物学の研究に手を染めようと決心した。ここに彼が実験物理学の出身であったという大きな偶然があったと思う。ボーアは物理的思考から非決定論的生命観をうみ出して、一つの新しい問いかけをしたという点では評価される。けれども、それはあくまでも実証のない理論にすぎず、哲学的思弁の範囲を出ていない。ボーアに刺激を受けたデルブリュックが、これをなんとかして実証しようと望み、後にみずから生物学を勉強したことによって、はじめてこれは分子生物学という科学の芽ばえになったわけである。

その後ベルリンに帰って、カイザー・ウィルヘルム研究所の放射線研究部門にはいったときも、デルブリュックは生物のことを忘れていなかった。そこで、同じ研究所の遺伝学部門の生物学者、ティモフェエフ・リゾフスキーやチンマーら数人が集まって、サロンの雰囲気で行っていた議論の場に積極的に参加した。その集まりは日常の実験の話ではなく、生物の特性は何かとか、遺伝子の本質はなんだろうなどという根本的問題を勉強する会であり、たいへん活発な議論が重ねられていた。このときの成果は、1935年「遺伝子の突然変異と遺伝子構造の本性について」という論文にまとめて発表されたが、デルブリュックはこの中で突然変異の原子物理的モデルを提出している。“遺伝子という微小部分が、生物という複雑で大きい全体の秩序を支配し、秩序の再生産を行ないながら、しかもそれが安定であることが、生物学の根本問題である”というのが、ここでの彼の考えである。

遺伝子こそ生命の本質であるという把握はまさに卓見であり、その後次々と実証されていくことになる。彼がこのような正しい出発点にたったことが、現在の生物学の発展を築いたともいえよう。ただし、この時のデルブリュックの解釈は、残念ながら正しいものではなかった。彼は安定でありながら、しかも一方で突然変異を起こすような不安定性をもつという遺伝子の二重性格を、なんとか解釈しようと努力した。そして、それを遺伝子の高分子性に帰する説を提唱した。すなわち、遺伝子は、通常はその最低エネルギー準位にあるために安定であるが、外部からX線照射などでエネルギーを与えられるとそのエネ

ルギー状態に不連続的変化が起こる。この量子の飛躍を、生物学的にとらえれば突然変異になると解釈したのである。彼は、ボーアが講演した生命現象の間のかけ橋になるであろう相補性原理の究明という立場をとって、生物の世界にはいったのであるが、実際の問題にぶつかると、やはり既存の物理学での解釈を試みているのはおもしろい。

1938年、アメリカに渡り、ファージ（バクテリアに感染するウイルス）の存在を知ったデルブリュックは、遺伝の物質的基礎を探るには、これが最良の対象であると信じ、ファージの実験をはじめた。その後、ルリア（S.E.Luria）、ハーシェイ（A.D.Hershey）などの仲間を得た。そして、このころから生物科学の一つとしての分子生物学がはじまった。第二次大戦中、ヨーロッパから多くの学者がアメリカへ移住し、それが新しい学問をアメリカで起こすことになるのである。

分子生物学の成功の理由は、いろいろあるだろう。しかしなんとといっても、ファージという、遺伝子がカラをかぶっているだけのような、簡単で解析しやすい材料を選び、大腸菌とファージを用いる系を確立したことが、もっとも大きな原因だと思う。物理学は共通性、統一的理解ということを経済的目標とする学問だから、遺伝子研究の材料としても、なるべく他の妨げのないものに興味をもったのだろう。それが生物として興味深いものであるかどうかは二の次である。モデルとしてよいものがよい材料だ。分子生物学の底流には、今でもこの考え方が存在している。この考え方が物質の解析手段としては、もっとも有効な方法であることは実証済みである。しかし、それは一方、生物学をささえてきた、多様な生きものへの関心をうすれさせたことも事実だ。大げさにいえば生き物への興味や自然への畏敬を、どこかへ追いやったともいえる。ここに分子生物学がもっている利点と難点が集約されている。

それはさておき、ファージ・グループによる遺伝子の本体の追究は続き、1952年になって、それがDNAであることを確認する。

物理学者が生命に興味をいだき、後の学問の発展に影響を与えたもう一例は、量子力学の創始者のひとりシュレディンガー（Erwin Schrödinger）である。1945年、第二次世界大戦終結直後、彼の著書『生命とは何か』が出版された。この本は、生物学者からはそれほど重要視されなかったようであり、また彼自身はボーア同様、生物を対象とした実験をすることはなかった。しかし大戦後、量子論から発展した物理学に行き詰まりを感じはじめ、新しいものを求めていた若手物理学者は、この本によって生物に大いに興味をいだいた。この若手の中にはベンザー（Seymour Benzer）やクリック（Francis H. C. Crick）など、後に分子生物学の中心的人物となる名前がみられる。

シュレディンガーは、“現在の物理学と化学とが、生物体という空間的境界の内部で起こっている、時間的、空間的事象を説明する力を持っていないからといって、これらの科学が本質的にそれを説明できないものと考えてはならない”という立場から出発した。彼は一般の生体内現象は物理法則の範囲外に出るものではないとしている。ただし、ここでいう物理法則の中には、現存の物理学の法則以外に、何か未知の法則をも包含しており、

生物が未知の法則で説明でされる可能性もあるとしている。

彼は、現在の物理学の立場から生物をみた場合の最大の課題は、分子である遺伝子がどのようにして生体の秩序をつかさどっているかということであると考へた。そして、デルブリュックの説、すなわち、遺伝子は巨大分子であり、原子の配列換えによって不連続的变化をすることができるというモデルを、遺伝の物質的基礎を与えた唯一の試みと評価している。シュレディンガーは、遺伝子をのせている染色体が非周期性結晶であるために、遺伝子の構造が安定しているのだという考へを提唱した。

シュレディンガーは、生物学に関して得られるであろう未知の法則は、ひとたび見いだされればこれまでの物理諸法則と同様に物理学の必要欠くべからざる一部となるであろうと述べている。さらに、主観的見解として、生物の心の動きや自覚的な活動に対応するものまでも含めて生命現象はすべて統計的ではあるが、決定論的であるという考へをしめした。そして、ある物理学者たちがいっている、生命現象では、量子論的不確定性が重要な役割を果たしているという意見には反対であるといっている。ここでいう“ある物理学者”とは、ボーアのことだろう。現在の生物学の知識では、少なくとも遺伝現象までは物理法則に従い、不確定性を考へる必要がないことは明らかにされた。しかし、シュレディンガーのいうように、心の動きまでもこの延長上で説明しうるのか、あるいはそこには新しい法則が存在するのか。それはまだ解明されてはいない。

分子生物学（構造学派と情報学派）

前述のように、分子生物学の産みの親はデルブリュックであるとして、彼にはじまる一連の生物学の発展を記述した。しかしこれは、通常、分子生物学ということばが使われるときには、その背景に常にデルブリュックの思想があるという立場に立ち、生物科学における物理的思考の重要性を強調する気持ちが強かったため、歴史的には必ずしも正しくない。分子生物学ということばをこのような意味で使うことに、不満をいだく人もいるかもしれない。

また、生物科学と物理科学とのかかわりも、実際的な面、すなわち、生物を理解する手段としての物理を重要視する立場もある。事実、分子生物学（Molecular Biology）ということばをつくりだした人といわれているアストベリー（W.T.Astbury）による定義は次のようである。“分子生物学とは、特に、生物学的な分子の形を問題とし、さらには、より高度な組織段階におけるこれらの形の進化や利用や複雑化を問題とする。分子生物学は著しく三次元的で構造的である。といってもそれは単に形態学をより精密にただけのものではなく、同時に発生や機能に及ばなければならない”（彼自身は Molecular Biology ではなく Biomolecular Structure の教授であったが）。

ことばの定義はさておき、分子生物学が物理学者の中から生まれてきたことはたしかである。またその中に、生物学的情報や遺伝現象を解明することが生命を知る本質であるとする学派（情報学派）と、生体高分子の構造を知り、そこから機能に及ぼうとする学派（構

造学派)とがあって、これら二学派がそれぞれに偉大な業績をあげて生物科学の発展に大きく寄与したことも明らかである。前述の情報学派がデンマーク、ドイツなど、ヨーロッパ大陸で芽生え、アメリカで育ったのに対し、構造学派は純粹の英国っ子である。

構造学派の中で、情報学派におけるボーアの役割を果たしたのは、有名な結晶物理学者ブラッグ (W.L.Bragg) であり、デルブリュックに代わる人はアストベリーであった。英国の王立研究所員であったブラッグは、ある時、「ありふれた物質の結晶的な性質について」というテーマで、一般向けの公開講座で話すことになった。そこで、自然界の物質で普通は結晶と考えられていないものの中に、実際には結晶性をしめすものがたくさんあることをしめす資料の一つとして、ヒトの毛髪を取り上げ、アストベリーにそのX線写真の撮影を命じた。アストベリーが毛髪を撮影してみると、そこにはぼんやりながら結晶性をしめす点がみられ、これが構造研究を主体とする分子生物学誕生のきっかけとなった。すなわち、それまでは空間群の理論に興味をもつ理論結晶学者であったアストベリーが、毛髪という生体物質の構造解明に興味をもち、それに専心するようになったのである。彼は、生物体を理解する鍵は、その分子構造を知ることであるという強い信念で仕事を続けた。

ブラッグの発想、その命令で生体物質のX線写真を撮影したアストベリーの研究が発展していく経過を知るにつけ思い出されるのが、西川正治らによるセルロース・絹フィブロインなど天然繊維のX線写真撮影の報告が1913年になされていることである。フルートン (Joseph S. Fruton) は「分子と生命——化学と生物学の結びつきの歴史」の中で“The X-ray examination of natural fibers, such as cellulose or silk fibroin, was begun by Nishikawa and Ono in 1913, but was not systematically pursued~”と紹介している。このような仕事がうまく体系づけられて、伝統ができ上がっていたらと思うと少々残念な気もする。

英国ではブラッグらの考えの延長上に大勢の研究者が生まれ、生体物質のX線解析を精力的に行なって成果をあげることになる。生物体にとっての重要な二種の物質、タンパク質と核酸をくらべると、X線解析の材料としてはタンパク質のほうがはるかに適切である。それでもアストベリーは、タンパク質の解析を進めていく一方、1930年にははじめてDNAのX線写真を撮影している。DNAは繊維状に引き伸ばすことができ、ちょうど毛髪の中でケラチンが並ぶように、細長い分子が並ぶ。けれどもそのX線写真はボヤーンとしていて、とても構造の解析ができるものではなかった。そこで核酸の構造については、ほとんどなにもわからないまま1950年までの年月が流れることになる。

分子生物学は、このように情報学派、構造学派ともに物理学者の手によってはじめられ、実験的にも進歩していったが、お互いの間の連絡や情報交換はほとんど行なわれなかった。むしろ、お互いに相手の方法を無視していたきらいがある。これは、二つの学派の創始者たちの物理学と生物学の関係に対する態度が、根本的に異なっていたからであろう。いずれにしても、その後、偶然のことからこの二派の橋渡しが行なわれ、新しい展開がなされる。

アメリカの有名な分子生物学者、ステント（Gunther S. Stent）は、その著書の中で物理学、というよりむしろ物理学者が、生物学に関与していた 1950 年ごろまでを現代生物学における**ロマンチック時代**と名づけているが、この時期の学問の特質を巧みにとらえた表現である。。当時その渦中にいた研究者にとっては、困難の多い時だったにちがいないが、歴史としてふりかえると夢が満ち満ちており、大げさにいえば“一寸先は闇”の中で模索している科学者たちの姿には、強くひかれるものがある。

ロマンチック時代を**アカデミック時代**へと転換したのが、さきの情報学派と構造学派をたまたま結ぶつけ、遺伝子の本体のみならず、遺伝現象の本質までを明らかにした DNA の二重らせん構造の発見である。（註 日本でも物理学者が生物に関心をもち、生物物理学会を結成した。しかし、ボーアが考えたように生物に特有の物理学はこれまでのところ見つかっていないので、明確な分野として確立したとはいえない。実際には、分子生物学は分子遺伝学として展開していくことになり、DNA 研究が主流となって、ここで述べられた内容は置き去りにされてきた。しかし、それは「著しく三次元的で構造的な」研究に意味がないからではない。DNA を基盤にした研究があまりにもみごとに進んだために、研究の主力がそこに置かれたことと、三次元的で構造的な研究は難しくてとっかかりがなかったからである。実は、DNA 研究が軌道にのったいま、重要な分野として浮かび上がっている「構造生物学」は、まさにここで述べられている分子生物学をめざしている。生命現象の実態を知るには、実際に働いている分子、主としてタンパク質の形を問題にしなければならないのである）。

生命科学（中村桂子著、講談社学術文庫）1996 年より

遺伝子の構造

この発見のおぜん立てには、1950 年はじめに出された二つの実験成果が必要であった。一つは、アメリカの生化学者シャルガフ（**Erwin Chargaff**）による、DNA の塩基組成の正確な分析である。彼は純粋な DNA を調製し、ていねいな分析を行なって、どんな材料でもアデニン（A）とチミン（T）、グアニン（G）とシトシン（C）の量が、それぞれ等しいことをみつけたのである。もう一つは、アストベリーらが苦心していた DNA の X 線回析法が、ウィルキンス（**Maurice Wilkins**）、フランクリン（**Rosalind Franklin**）のふたりの手で改良され、鮮明な写真が撮影できるようになり構造解析が進んだことである。

この時、若いアメリカ青年が、X線解析研究の中心であるケンブリッジへ、タンパク質の構造研究のために留学してきた。彼ワトソン（**James D. Watson**）は、情報学派の中心人物のひとりであるルリアの下で、ファージの増殖に関する遺伝子・生理学を勉強していたが、1951 年にポーリング（**Linus Pauling**）がタンパク質の構造を決定したことに刺激を受け、生命現象の本質を理解するには、遺伝物質の構造を知ることがたいせつであると考へて、ケンドルー（**John C. Kendrew**）の研究室へ勉強にやってきたのである。ところが、彼は本気で X 線解析を習う代わりに、研究室の中でちょっと風変わりと思われていた

物理学者クリックと議論ばかりしていた。しかし、周囲のひんしゆくを買っていたおしゃべりの中で、彼らは DNA の X 線写真をながめ、シャルガフがみつけた塩基対の規則に合致する DNA の構造を描き出していたのである。そして、安物の金物の模型をいじりまわして、わずか数週間で歴史的模型をつくり上げたのだ。

こうして 1953 年春に発見された DNA の構造は、二本の鎖がからみ合ったらせん状をしている。この鎖はお互いに反対方向を向き、塩基の並び方が相補的になっている。すなわち、グアニンがあれば相手は必ずシトシン、アデニンならばチミンというぐあいである。これらの特徴をもっているために、二本の鎖が分かれてお互いに新しい相手をつくった時に、前とまったく同じ構造のものをつくるという、ただ驚嘆する以外にない性質をもっている（図-1 参照）。

これを基本にしてその後発展した分子生物学の細部を紹介する余裕はないので、巻末にのせた参考書をご覧ください。ただ一つ、この二重らせんモデルから期待される遺伝の機構をみごとに実験的に証明し、ワトソン・クリックの提案の妥当性を実証した、メセルソン (Matthew S. Meselson) とスタール (Franklin W. Stahl) の実験だけは紹介しよう。これはまさに、分子生物学を実質化した重要なものだからである。

ハーバード大学のメセルソンとスタールは、大腸菌を用いて、親がもっていた DNA の二本鎖がほどけて、その一本ずつが次代の細胞の DNA にはいることを証明した。彼らは、大腸菌を窒素の同位元素 ^{15}N (肩の数字は質量数を表わすので ^{15}N は、普通のちっ素 ^{14}N より重い) を入れた培地中で培養し、DNA の中に ^{15}N を取り込ませた。この DNA は普通の培地、すなわち、窒素が ^{14}N である培地で培養した菌の DNA より重いはずである。この二種類の DNA が区別できれば、DNA 中の鎖の動きを追うことができる。ここで彼らが使った巧妙な方法は、塩化セシウムという重い塩を溶かした濃い溶液を長時間遠心していると、水より重い塩化セシウムはだんだん沈んでいき、遠心管の底ほど密度が高くなり、管の中に密度勾配ができることを利用したものである。この溶液の中に DNA を入れて遠心すると、DNA は自分と同じ比重をもつ部分まで落ちてくるが、そこで止まってしまう。ということは、重い DNA は、管の底に近いほうでとまって一つの帯をつくり、軽い DNA は、それより上方に帯状に集まるということである。 ^{15}N の培地で育った大腸菌を ^{14}N の培地に移し、細胞が一回分裂した時に生育を止めさせ、その DNA を抽出する。さらに二回分裂した細胞の DNA、何回もくり返し分裂した細胞の DNA も抽出し、前に説明した遠心法で、それぞれの重さを比べた。その結果が、図-5 である。

親細胞の DNA は最も重く (^{15}N)、なんども分裂した細胞の DNA は軽い (^{14}N)。さて、一度だけ分裂した二代目の細胞の DNA はとみると、これはすべて ^{15}N と ^{14}N のちょうどまん中にある。娘細胞の DNA は、親の ^{15}N からもらった一本の鎖と、新しくつくられた ^{14}N の一本の鎖から二重らせんをつくってできていることを予想させる。(この事実からだけでは他の可能性も考えられるが、これは他の実験から否定されているので、ここでは簡単にこうしておく)。第三代の細胞をみると、第二代の場合と同じ中間の位置に全体の二分の一、

^{14}N の位置に二分の一のDNAがみられた。この結果は図でしめすように、まさにワトソン・クリックのモデルから予想されたとおりである。逆にいえば、ワトソン・クリックのモデルの正しさが証明されたことになる。

生命科学（中村桂子、1996年より）

分子遺伝学

ワトソン・クリックのモデルおよびメセルソンとスタールのあざやかな実験で、分子生物学は遺伝学と一体化した。もっとも、この仕事以前に、遺伝学の分野で、核酸が遺伝子の本体であるという事実がつかまれているからこそ、彼らの仕事の意味が出てくるのである。

遺伝をつかさどる物質が DNA であることを明らかにしたのは、ロックフェラー研究所のエブリー（Oswald T. Avery）による肺炎連鎖球菌の毒性と形態との関係の研究である。この関係については、1928年、グリフィス（Frederique Griffith）がすでに興味ある発見をしていた。

肺炎連鎖球菌には、二種類ある。平らな膜でおおわれている **S 菌**と、この膜をもたないために表面がざらざらしている **R 菌**であり、前者は病原性をもち、後者は非病原菌である。グリフィスが、煮沸して殺した病原性のある S 菌を、無毒の R 菌に混ぜてネズミに注射したところ、不思議なことに注射を受けたネズミは、全部肺炎にかかってしまった。一方、煮沸した S 菌だけを注射したネズミは、ピンピンしていたのである。この二つの事実からグリフィスは、煮沸しても安定であり、病原性を支配する物質が S 菌から R 菌に受け渡されたと考えた。そこで、この物質の受け渡しによって一度病原性を獲得した R 菌の子孫を調べてみたところ、やはり病原性をもっていたのである。この結果から、彼はこの物質が遺伝物質にちがいないと考えた。

この事実をもとにして、その実体をつきとめたのがエブリーらである。彼らは、煮沸して殺した S 菌の液から DNA、タンパク質、RNA をそれぞれ分離して R 菌に混ぜ、R 菌の性質を転換させる能力をもつのは DNA であることを証明した。しかもこの能力は、デオキシリボヌクレアーゼという酵素を作用させて、DNA を分離してしまうと失われることもしめた。この発表がなされたのは、**1944年**である。この時期には、この結果は革命的でありすぎたために、かえって生物学者にもファージ・グループの人々にも影響を与えなかった。その後、1952年になって、ファージ・グループの仲間のハーシーとチェイスが、バクテリオファージの DNA に放射性同位元素で目印をつけ、実際に遺伝子として大腸菌の中にはいるのは DNA であることを証明してはじめて、遺伝子の本体は DNA であることが皆に認められることになった。ウィルキンスらによる X 線写真の撮影、シャルガフの塩基分析、核酸が遺伝子であることの確認、これらすべてが 1950 年はじめに出そろい、ワトソン・クリックのモデルが 1953 年に提出された……このころの生物学界の活気がそのまま伝わってくるような気がする。

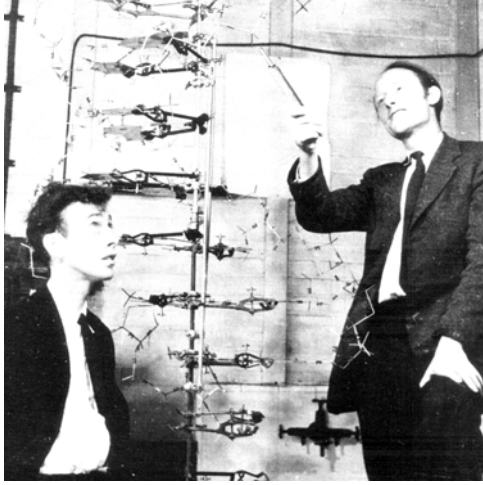
分子生物学の概略史

創始期

1950年頃までの古典的な生物学では、生物体や生物現象について細かい観察や記載をし、そこから導かれる概念的な仮説を考察することが中心であった。1930年代にイギリスの物理学者シュレーディンガー E. Schrödinger は『生命とは何か』という本で生命現象といえども物理や化学の法則に従っていて分子の働きで説明されるはずだと主張し、多くの物理学者に衝撃を与えた。

第2次世界大戦の勃発とともにドイツ生れの物理学者デルブリュック M. Delbrück を中心とする、ナチスの弾圧からアメリカに逃れて移住した研究者の手によって、バクテリアのウイルスであるバクテリオファージを材料にした研究が始った。生物学に数量的な法則を導入し、物質的な基礎を固めようとする新しい生物学——分子生物学——が始められたのである。彼らは分子遺伝学の基礎となる実験方法を確立し、遺伝子の本体であるデオキシリボ核酸（DNA=deoxyribonucleic acid）の性質を詳しく分析した。デルブリュックとその弟子のルリア S. E. Luria、そしてハーシー A. D. Hershey の3人は「分子生物学の0. 父」として1969年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。これが分子生物学の創始期である。

ルリアのもとで大学院学生として学んでいたワトソン J. D. Watson は、遺伝子の基本的な働きが DNA 分子の立体構造から説明できるであろうと考えた。当時、イギリスのフランクリン R. E. Franklin は、結晶分子の立体構造の解析に使われる X線回折法を DNA の構造解析に応用して研究を進めていたが、分子構造のモデルを提唱するまでにはいたっていなかった。ケンブリッジ大学に留学したワトソンは、共同研究者のクリック F. H. C. Crick とともに、フランクリンのデータに最もよく合う DNA の分子模型を組立て、1953年に発表した（第1図）。



DNAの二重螺旋分子は、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)という4種類の塩基をもったヌクレオチド(第2図)が鎖のようにつながっており、このDNA分子の立体構造についての仮説は、「ワトソン＝クリックのモデル」あるいは「DNAの二重螺旋仮説」と呼ばれている。このモデルは遺伝子DNAの分子構造を正しく示したばかりでなく、この仮説によって、遺伝情報が安定に保たれ子孫に伝えられるメカニズムや遺伝情報が発現される仕組みが分子レベルで説明され、分子生物学における輝かしい研究成果のすべてはこの仮説に基づいているといっても過言ではない。

第1期

「DNAの二重螺旋仮説」が発表されたあと、大腸菌や、大腸菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ、さらにプラスミドをおもな研究材料にして怒濤のような分子遺伝学の興隆時代が訪れ、遺伝子の構造と働きについて基本的な知識が得られた。

【遺伝情報の転写と複製】

1955年、ベンザーS. Benzerは、バクテリオファージの変異体を調べて詳しい遺伝子地図を作成し、地図上で隣合う2つの変異の間の最小距離はDNAを構成する化学的な単位であるヌクレオチドに対応することを明らかにした。1961年、ニレンバーグM. W. Nirenbergは遺伝子の暗号表を解析し、遺伝子の暗号コードが4種類の塩基をもったヌクレオチド、A, T, G, Cの4文字から3文字を選び出した順列でできていることを明らかにした(表参照)。これを「トリプレット仮説」といい、この遺伝子コードは地球上のすべての生物にほぼ共通に使われている。

1961年、ブレンナーS. Brennerらは大腸菌に非常に短命なリボ核酸(RNA=ribonucleic acid)分子が存在することを突止め、メッセンジャーRNAの発見の端緒をつくった。遺伝情報、すなわちDNAのヌクレオチド配列(塩基配列)は、1960年、リチャードソンC. C. RichardsonとワイスB. Weissが発見したRNAポリメラーゼによって合成されるメッセンジャーRNAの塩基配列に写し取られる。この過程を転写と呼んでいる。メッセンジャーRNAは、RNAと蛋白質からなるリボソーム粒子に結合して鋳型として働き、メッセンジャーRNAの遺伝情報に従ってアミノ酸が重合し蛋白質が合成される。この過程を翻訳と呼ぶ。遺伝情報の転写と翻訳によって、遺伝子(遺伝情報)の発現が行われる。

1961年、ジャコブF. JacobとモノJ.-L. Monodは、大腸菌の乳糖発酵を司る遺伝子群の発現について、乳糖が存在しない条件下ではリプレッサーと呼ばれる抑制因子が働いて発現しない状態にあるが、乳糖が存在するとリプレッサーの働きが抑えられ、乳糖発酵を

司る一群の遺伝子が活発に転写され、そのためこれらの酵素が生成されるようになるという「オペロン仮説」を発表した。

1966年、ギルバード W. Gilbert はこのリプレッサー蛋白質を精製し、遺伝子 DNA の転写開始点にリプレッサー分子が結合することによって RNA ポリメラーゼによる転写開始が抑制されることを確認した。その翌年、プタシニ M. Ptashne はバクテリオファージ・ラムダの遺伝子とそのリプレッサーについて、同様な実験でリプレッサーと DNA の結合の仕組みを詳しく調べ、転写調節のメカニズムを分子レベルで明らかにした。一方、1960年に、コーンバーグ A. Kornberg は DNA 合成を行う DNA ポリメラーゼ酵素群を発見した。細胞の分裂に先立って、DNA は一時的に二本鎖をほどかれ、大腸菌の dna E 遺伝子で支配される DNA ポリメラーゼⅢがそれぞれのヌクレオチド鎖の塩基配列を写し取りながら新しいヌクレオチド鎖を合成する。新しく誕生した DNA 分子では、常に二本鎖の片方に親の DNA 鎖が保存されており、遺伝情報、すなわち DNA の塩基配列は安定した形で娘細胞へ伝えられる。この仕組みを DNA の半保存的複製と呼び、1958年にメッセルソン M. Meselson とスタール F. W. Stahl が実験によって確かめた。

ここにいたって、遺伝情報を安定に保つ役割の DNA を中心にして転写と複製が行われるという、遺伝子の働きの基本的構図が描き出された。こうした輝かしい成果が積重ねられている間にも、大腸菌とそのバクテリオファージについてさまざまな遺伝子が突止められ、それらの遺伝子で支配されている蛋白質の機能も明らかにされていった。

【制限酵素の発見】

1947年、レーダーバーグ J. Lederberg とテータム E. L. Tatum は大腸菌にも雌雄があることを発見し、1958年、ジャコブとウォルマン E. L. Wollman は雌雄の大腸菌を接合させた実験の詳しい解析から、大腸菌の性決定因子は F 因子と呼ばれるプラスミドであることを明らかにした。プラスミドは大腸菌の染色体の遺伝子とは独立に行動する、より小さな環状 DNA からなる遺伝因子で、大腸菌に雄の性質を与え、F 因子をもたない雌の菌との接合を誘導し、雄から雌の菌へ遺伝子を導入させる働きをもつ。プラスミドは大腸菌の遺伝子の解析のためのすぐれた実験材料として用いられ、のちに組換え DNA 実験でも重要な役割を果たすことになる。

日本では 1950 年代から使われはじめた抗生物質に耐性になった病原菌が出現して問題となっていたが、1960年、渡辺力と深沢俊夫は、抗生物質に耐性の腸内細菌に F 因子とよく似たプラスミドである R 因子が存在し、R 因子は抗生物質に耐性を与える遺伝子群を含み、R 因子をもたないバクテリアと接合を起こして R 因子を伝達し、薬剤耐性をバクテリアからバクテリアへと広める働きがあることを発見した。

R 因子の研究は日本における分子遺伝学の基礎を与えたばかりでなく、第 2 期の分子生物学の発展に必須な研究方法をもたらした制限酵素の発見へと導いた。すなわち、1966年、高野利也は R 因子をもつバクテリアに制限酵素が存在することを確認し、4年後の 1970年、スミス H. O. Smith はインフルエンザ菌の制限酵素を精製し、その翌 71年、ネイサ

ンズ D. Nathans はこの酵素の働きを明らかにしたのである。制限酵素は DNA 分解酵素の一種で、それまでに知られていた DNA 鎖をランダムに分解する DNA 分解酵素とは違い、DNA 鎖の上で数個のヌクレオチドが特定な配列をした部分で切断する、つまり決った位置で DNA を切る「鋏」として働くので、いつも一定の DNA 断片が得られる。

現在、100 種類以上の制限酵素が発見されており、異なる制限酵素は違う配列部分で切断するので、さまざまな DNA 断片を目的に応じて切出して実験に用いることが可能になった。制限酵素の「制限」とは、バクテリアの細胞内に異種の遺伝子 DNA が侵入したとき、制限酵素がそれを見分けて切断してしまうように働くので、「種を限定する」という意味である。R 因子をもつバクテリアの場合、R 因子をもたないバクテリアの DNA を排除する機構として働いている。

第 2 期

【組換え DNA 実験の誕生】

最初の組換え DNA 実験は、1972 年にバーグ P. Berg らによって行われ、サル由来のウイルスである SV40 と大腸菌の DNA 断片をそれぞれ制限酵素で切断したのちに結合させ、動物ウイルスの遺伝子と大腸菌の遺伝子とのキメラ DNA が誕生した。その翌 73 年、コーエン S. Cohen が 2 種類のプラスミド DNA を切断してからつなぎ合せた組換え体 DNA を作製し、バクテリアで増殖させることに成功した。組換え DNA 実験では、(1)まず調べようとする遺伝子を含む細胞の DNA を制限酵素で切断し、(2)得られた DNA 断片をバクテリオファージやプラスミドの DNA につなげる。DNA 鎖をつなげるには、1967 年にリチャードソンが発見した DNA リガーゼという酵素を用いる。(3)つなげた DNA をバクテリアの細胞内に移入させると、バクテリオファージやプラスミドの働きでこの DNA 分子がふえ、(4)ふえたバクテリオファージやプラスミドのなかから目的の遺伝子を含んでいる部分を純化する。こうして、研究対象の遺伝子はバクテリアでふやすことができる形で純化される。

遺伝的に均一な生物をクローンと呼ぶので、この実験操作は遺伝子のクローニングといい、用いたバクテリオファージやプラスミドをクローニングベクターという。

ヒトや動物の一個の細胞の核には、直線状に伸ばすと約 2 メートル、量にしてバクテリアの約 1000 倍の DNA が含まれ、その DNA 分子の上には約 10 万種類の遺伝子が並んでいる。こうした複雑さに加え、ヒトや動物ではバクテリアと違って人為的に変異体をつくることができないので、それまでヒトや動物の遺伝子を解析することは不可能であった。組換え DNA 実験の成功によってヒトや動物から遺伝子をひとつひとつ取出し、純化して調べることができ、従来の遺伝学や生化学による分析に比べて約 1 万倍の精密さで生体分子を解析することが可能となった。組換え DNA 実験は、いわば分子についての電子顕微鏡を提供したのである。分子生物学は一挙に高等動物の分子遺伝学の世界に突入し、第 2 期の分子生物学の時代の開幕を告げることになった。

【逆転写酵素とDNA合成】

組換え DNA 実験の成功に続く約 10 年の間に、実験の方法やそれに付随する解析方法の開発が矢つぎばやに行われた。1970 年、テミン H.M. Temin とボルティモア D. Baltimore は、それぞれ独立に、動物に癌を起こすウイルスから RNA を鋳型にして DNA を合成する酵素を発見した。細胞の遺伝子では、遺伝情報は DNA→RNA の方向に発現されるが、この酵素はその逆方向の反応を行うので逆転写酵素と呼ばれ、この酵素をもつウイルスはレトロウイルスと命名されている。

逆転写酵素は癌ウイルスの研究に重要な知見をもたらしたばかりではない。メッセンジャーRNA の塩基配列をこの酵素でいったん DNA に読み直して相補的デオキシリボ核酸 (cDNA=complementary deoxyribonucleic acid) を合成してから、cDNA を組換え DNA 実験法でクローニングする場合にも用いられる。この cDNA クローニング法は 1976 年にマニアティス T. Maniatis によって開発された。一方、1975 年、ケラー G. Köhler とミルシュテイン C. Milstein は、モノクローナル抗体法を開発した。この方法は、組換え DNA 実験によってクローニングされた遺伝子によって支配される蛋白質の検出に使われ、組換え DNA 実験法とモノクローナル抗体法とが相まって、現在の分子生物学とバイオテクノロジーの飛躍的な発展をもたらした。

1977 年には、クローニングされた遺伝子の塩基配列を分析する方法として、マクサム A.M. Maxam とギルバード W. Gilbert、そしてサンガー F. Sanger が、それぞれ、原理的に違う方法を開発し、遺伝情報の迅速な解析が可能となった。その後、サンガーの方法を応用し、レーザー光線とコンピューターを駆使した塩基配列自動分析装置が使われるようになった。

一方蛋白質のアミノ酸配列は、遺伝子の塩基配列データから、コンピュータによってたちどころに算出される。同じ 1977 年、板倉敬壺は有機化学を用いた方法で DNA を合成することに成功し、成長ホルモンの分泌を抑制する作用をもつホルモンのソマトスタチンの遺伝子を人工合成してクローニングし、大腸菌でこのホルモンを産生させることに成功した。79 年、ゲッデル D. V. Goeddel と廣瀬忠明はさらに効率のよい方法でインスリンの遺伝子を合成し、産生されている。現在では、DNA の合成には自動合成装置が使われるようになっている。

【スプライシング現象の発見】

第 2 期に得られたおもな研究成果を総括してみよう。この時期に、ヒトや動物の遺伝子の基本的な構造と機能が明らかにされた。そのうち特筆すべき点はスプライシング現象の発見であろう。動植物の細胞では、ほとんどの遺伝子で、蛋白質のアミノ酸配列を支配する塩基配列の中にイントロンと呼ばれるアミノ酸配列を支配しない塩基配列が挿入されている (第 3 図)。

イントロンの挿入によって分断されてできたアミノ酸配列を支配する塩基配列部分のそれぞれをエクソンという。遺伝子の塩基配列はまずイントロンとエクソンを含んだままの

状態で大きな RNA 分子に転写される。この RNA が細胞の核から細胞質に運ばれるまでにイントロン部分が切断除去され、細胞質に見出されるメッセンジャーRNA はエクソン部分だけがつながった構造になっている。これがスプライシングと呼ばれる現象で、1977年シャンボ、P. Chambon がニワトリのオバルブミン遺伝子について最初に観察した。

1981年、スタイツ J. A. Steitz は、細胞の核の中にある small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) という RNA と蛋白質の複合体が、スプライシングの際、エクソンの端と次のエクソンの端を「糊付け」し、イントロンをループアウトさせる役目を果たしていることを見出した。RNA 分子は、蛋白質合成を行うリボソームに遺伝情報を伝達するばかりでなく、スプライシングでは snRNP が結合した部分に作用し、みずからの RNA 分子の切断や再結合を行う酵素作用をあわせもつことが、1982年、シェック T. R. Cech によって示され、こうした RNA は酵素作用をもつ RNA という意味でリボザイムと呼ばれている。一方、スプライシングのされ方の違いで一つの遺伝子から2種類の蛋白質が発現される場合も知られている。

【免疫グロブリン遺伝子の可変性】

ヒトや動物では、浸入してくる病原体などの抗原に対して、「鍵と鍵穴」の関係で結合する蛋白質の免疫グロブリン（抗原に対して抗体ともいう）がプラズマ細胞という細胞群でつくられ、免疫グロブリンは抗原と結合して抗原を不活性化し、最終的には抗原は破壊されて身体は守られる。病原体などの抗原は何百万種類もあり、それぞれの抗原に対応した「特別注文の免疫グロブリン」が個々のプラズマ細胞で一種類ずつつくられる仕組みは長い間大きな謎であった。

1976年、穂積信道と利根川進は免疫グロブリンの遺伝子について画期的な事実を見出した。免疫グロブリンを支配する遺伝子は4つの部分に分れ、それぞれの部分には違うアミノ酸配列を支配する何種類もの遺伝子が用意されており、プラズマ細胞の前駆細胞であるBリンパ球が分化する過程で特定の抗原と結合できる抗体をつくれるように、4つの部分の遺伝子群から一つずつ選び出されてつながり、あらためて遺伝子が構成し直されることが明らかにされた。特に可変領域と呼ばれる部分では、実に数百種類をこえる遺伝子が用意され、多様な免疫グロブリンを産生することができる。この現象は「免疫グロブリン遺伝子の再構成」と呼ばれている。

のちに、可変領域では、胎児期に用意されてる遺伝子に塩基配列の変化も付加され、免疫グロブリンの多様性がさらに増すことも明らかにされている。この研究は、1980年のデービス M. M. Davis によるさらに詳しい免疫グロブリン遺伝子の構造の解析、本庶 佑^{たすく}による免疫グロブリンのクラス・スイッチの機構の解明（1980）、さらに、デービスによる、免疫反応の調節を司るTリンパ球の表面にある抗原と結合するリセプターの遺伝子の解明（1984）へと発展し、免疫機能を司る遺伝子群の働きのほぼ全貌が解明されている。

【癌遺伝子の発見】

1976年、ステラ D. Stehelin とビショップ J. M. Bishop は、1911年にラウス F. P. Rous

が発見したニワトリに肉腫を誘発するラウス肉腫ウイルス（癌ウイルスの一種）から、細胞を腫瘍化する働きをもつ遺伝子、すなわち癌遺伝子サーク **src** を純化した。だが驚いたことに、正常な癌化していない細胞にもこの癌遺伝子とよく似た遺伝子が存在していることがわかった。これは原型サーク遺伝子と名づけられた。

1982年、ワインバーグ **R. A. Weinberg** は、ヒトの膀胱癌の細胞から直接、癌遺伝子をクローニングしたところ、それはラス **ras** 遺伝子という、すでに癌ウイルスで発見されていた遺伝子であった。しかも、ラス遺伝子によって支配される蛋白質は、正常細胞の原型ラス遺伝子が支配する蛋白質と比べると、200個あまりのアミノ酸からなる配列のうちわずか1個のアミノ酸が変化していた。

癌ウイルスや癌細胞からは、数十種類以上の癌遺伝子が発見されている。しかし、その後の研究によって、癌遺伝子は癌の発生に関係した遺伝子であるという最初の予想とは違い、むしろ癌の悪性度に関係しているものと考えられている。癌遺伝子の研究は、癌遺伝子の働きが動物細胞のさまざまな重要な機能と関連をもっていたことから、細胞の増殖、分化、遺伝子の転写調節などの研究の進展に大きな波及効果をもたらした。

1979年、中西重忠と沼正作は、脳下垂体の前葉から分泌される神経ペプチドの一種の**プロオピオメラノコルチン**のcDNAをクローニングすることに成功した。この生体物質は、脂肪代謝を調節するリポトロピン、モルヒネ様鎮痛作用をもつエンドルフィン、副腎皮質刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモンの4種類の生理活性物質を含む前駆体であった。また、同じ年にゲッデルはヒトの成長ホルモンのcDNAをクローニングした。これらの研究は、その後、医薬品の開発への期待を込め、抗ウイルス作用や抗癌作用をもつインターフェロン、抗癌作用と炎症誘起作用をもつ腫瘍壊死因子（カケクチン）、免疫系骨髄細胞群の分化や増殖を誘導する各種のコロニー刺激因子、Tリンパ球などの分化や増殖を誘導する各種のインターロイキンなどの遺伝子のクローニングを促し、それらの多くは医薬品として実用化され、さらに臨床実験が続けられている。

【ウイルス学の進歩】

1979年、サマーズ **J. A. Summers** らは、ヒトに肝炎を起し、のちに肝硬変や肝癌の原因となるB型肝炎ウイルスの遺伝子全体のクローニングに成功した。1980年にギャロ **R. C. Gallo** が成人T細胞白血病の病原体であるヒトT細胞白血病ウイルスの遺伝子を、そして1984年にはモンタニエ **L. Montagnier** が、エイズすなわち後天性免疫不全症候群（**AIDS=acquired immunodeficiency syndrome**）の病原体であるヒト免疫不全ウイルスの全遺伝子をクローニングした。

ウイルスの研究では、これらの新しく発見されたウイルスばかりでなく、既知の病原ウイルスについても組換えDNA実験によって遺伝子がクローニングされ、ウイルスの増殖や病気を起すメカニズムについての研究が飛躍的に発展した。また逆に、ヒトや動物の遺伝子の構造と機能についての重要な知識は、まずウイルスを研究材料とした実験から得られていった。もちろん、ウイルスの研究が最終的に目指すものは、ワクチンなどを開発し

てウイルス病を予防し、撲滅することにある。

【分子進化学】

1962年、ポーリング L. C. Pauling は、種の違う生物に存在する同種類の蛋白質（たとえばヘモグロビンの α 鎖）のアミノ酸配列を比較することにより、進化の進み具合や時間的關係が明らかにできるとして、「分子時計」という概念を提唱した。

組換え DNA 実験以後、おもにリボソーム RNA の遺伝子をクローニングして塩基配列を分析し、生物種間の比較が行われている。1977年、ウォース C. R. Woese は、リボソーム RNA の塩基配列が従来のバクテリアにも、真核生物にも似ていない一群のバクテリアを発見した。このバクテリアは、水素ガスと炭酸ガスが充満した環境下でメタンガスを生成し、この環境条件が約 46 億年前といわれる地球誕生直後の大気とよく似ていることから、「古細菌」と名づけられた。古細菌は従来知られていなかった「第3の生物界」を形成し、約 35 億年前の原始化石時代の微生物の多くはこの種のバクテリアであったのであろうと考えられている。分子レベルで進化の研究を行うこうした学問は、分子進化学と呼ばれている。

【遺伝子クローニング法の改良】

遺伝子をクローニングする実験技術はさらに進歩し、研究は一層加速されることになった。メッセンジャーRNA の DNA コピーをクローニングする cDNA クローニング法が改良され、ある状態に分化したり、特定の性質をもった細胞や組織で発現している遺伝子を探索することが可能になった。

また、2種類の組織や細胞の性質の違いに注目して、片方の細胞でのみ発現している遺伝子を探索するサブトラクテッド cDNA ライブラリーの方法も、1984年にデービスによって本格的な成功を収めた。それまでは、蛋白質がすでに精製されているか、あるいは抗体などによってすでに確認されている場合にその蛋白質を支配する遺伝子がクローニングされていた。だが、サブトラクテッド cDNA ライブラリーの方法によって、逆に蛋白質も遺伝子もどのようなものか見当がつかない場合でも、まずは遺伝子をクローニングして、得られた新しい遺伝子について働きを調べ、研究対象となっている生物現象に重要な役割を果している遺伝子を突止めることが可能となった。

第3期

分子生物学の第3期は、1980年のゴードン J. W. Gordon の報告によって開幕した。彼は、クローニングされた遺伝子をマウスの受精卵（初期胚）の核に注入して雌マウスの子宮に戻して出産させ、注入した遺伝子をもったトランスジェニックマウスをつくることに成功した。この研究方法によって、動植物など多細胞生物の遺伝子、ことに細胞分化や個体発生、器官形成、発癌といった個体レベルで作用する遺伝子が動物体内でどのように働くか調べることができるようになった。

【スーパーマウスとノックアウトマウス】

1982年、パルミター R. D. Palmiter はラットの成長ホルモンの遺伝子をマウスの受精卵に注入してトランスジェニックマウスをつくったところ、体重が普通のマウスの2倍近くもあるスーパーマウスが誕生した。90年、シンクレア A. H. Sinclair は、ヒトのY染色体上にある性決定に関係する SRY 遺伝子をクローニングした。翌91年、ガベイ J. Gubbay はこの遺伝子をマウスの雌の胚に注入したところ、雄マウスが生まれた。SRY 遺伝子は睾丸決定因子と呼ばれ、睾丸の発生と形成に重要な役割をもっている。

1989年、カペッチ M. R. Capecchi は、ある特定の遺伝子の働きを失ったマウスを作出する方法の開発に成功した。まず、試験管の中で培養しておいたマウスの胚幹 (ES) 細胞に、目的とする遺伝子の構造を人為的に破壊した変異遺伝子クローンを移入して、塩基配列の相同性による組換え現象によって ES 細胞の正常な遺伝子を変異遺伝子で置き換える。次に操作された ES 細胞をマウスの初期胚に埋込み、妊娠を継続させ、ES 細胞から発生分化したマウス個体を誕生させる。この研究方法は、特定の遺伝子にねらいを定めて置き換えるという意味で、遺伝子ターゲティング法といい、得られたマウスは、特定の遺伝子の機能が失われているので、ノックアウトマウスと呼ばれ、新たにクローニングされた遺伝子の機能を動物の個体レベルで解析する強力な方法として用いられている。

また、クローニングした遺伝子をマウスなどの胚に注入して疾患モデル動物を作製することも試みられている。病気の発症メカニズムや治療、予防法の研究には疾患モデル動物が必要となる。植物でも胚細胞に改変した遺伝子を注入して病害や虫害に強く、より品質のすぐれた作物に品質改良する努力が続けられている。

【遺伝子の発現調節機構】

ヒトの身体を構成する 10 兆個ともいわれる細胞は、さまざまな種類に分化し、身体に必要な役割を分担している。細胞の核にはすべての遺伝情報が保たれており、分化した細胞ではその一部分の遺伝子が働いてその細胞特有の機能を営んでいる。たとえば、神経細胞では 4 万種類前後の遺伝子が働いているが、そのうち神経の機能に関係した遺伝子は約 1 万 5000 程度だといわれている。すなわち、個々の遺伝子の発現は細胞の分化状態などに応じて制御されている。したがって、細胞分化や個体発生のメカニズム、そして分化した細胞の機能を解明するためには、遺伝子の発現調節機構を明らかにすることが重要である。

遺伝子の発現は転写、翻訳の過程を含めて調節されているが、転写開始の調節が主役になっている。1980年、グロシェデル R. Grosschedl とブリンスティール M. L. Brinstiel は、クロマチンのヒストン H2A 蛋白質を支配する遺伝子の発現にはこの遺伝子上流にある塩基配列が必要であることを報告し、81年、ベノイスト C. Benoist は SV40 ウイルスの転写開始点付近にある 72 塩基の配列がこのウイルスの発現に必須であることを報告した。遺伝子上流に位置して転写の開始を誘導するこれらの塩基配列部分はエンハンサーと呼ばれる。

1984年、ゲステランド R. F. Gesteland は酵母のガラストース発酵を司る遺伝子のエンハンサーに結合する蛋白質の転写因子の遺伝子をクローニングし、プタシニ M. Ptashne はこの転写因子がエンハンサーに結合して転写開始が促進されるメカニズムを解析した。87年以降現在までに、チジャン R. Tjian やその他の研究者は動物の遺伝子のエンハンサー配列やそれに結合する転写因子を数多く発見した。ホルモンによって発現が誘導される遺伝子に働く転写因子や特定の分化した細胞にだけ存在し、その細胞で発現する遺伝子に働く転写因子も見出されている。

また、遺伝子の転写開始点付近には、メッセンジャーRNAを合成するRNAポリメラーゼが結合して転写が開始されるわけであるが、ここにも複数の転写因子が結合する。1989年、レーダー R. C. Roeder はそうした転写因子の一つを始めて精製した。こうしたさまざまな転写因子が転写開始点や、その上流域に結合して転写のON/OFFや転写開始の速度を調節しているものと考えられている。

一方、遺伝子の転写を抑制するように働く転写因子も見出されている。DNAと蛋白質分子の結合を調べる転写調節の研究は分子生物学の最も得意とする領域であり、1989年から90年代にかけて急速な進歩をとげている。

ショウジョウバエでは、20世紀前半にモーガン M. Morgan らによって行われた膨大な変異体の解析結果が遺産として残されている。そのうちのひとつ、個体発生における体節の形成にあずかるホメオティック遺伝子群が、1983年にベンダー W. Bender らの5年間の努力の結果、初めてクローニングされた。1924年にシュペーマン H. Spemann によって提唱された形成体（オルガナイザー）仮説の現象的、概念的な段階にどどまっていた個体発生における器官形成の研究も、分子レベルでメカニズムが解明される方向に進んでいる。

【プログラム細胞死】

新しい研究対象としてノーベル賞受賞のブレンナー S. Brenner が推進してきた線虫 Nematoda の研究は、生物について新しい次元の概念を提供している。線虫の個体は1000個あまりの細胞から成り立っており、1個の受精卵から出発して、虫体の細胞ひとつひとつについて、どう分裂し、分化し、そしてどの細胞はどの時点で死ぬるかという全細胞の系統図が、1983年、サルストン J. E. Sulston らによって明らかにされた。このことは、増殖、分化、寿命など個体の細胞の運命が遺伝子の上にあらかじめプログラムされていることを示している。

1987年、ホルビッツ H. R. Horvitz のグループはこうした細胞の系統分化やプログラム細胞死を決定する遺伝子を突止め、これらの遺伝子の多くは細胞間のシグナル伝達にあずかるGTP結合蛋白質を支配していることを明らかにした。この結果は、動物個体における個々の細胞の命運が細胞相互間のシグナルによって統御されていることをうかがわせる。

こうしたプログラム細胞死はアポトーシスとも呼ばれ、中枢神経系の細胞分化と組織構築、免疫系における抗原に対応した抗体産生細胞の分化誘導、癌細胞の排除の際にも認められ、リンフォカイン様のリガンドが細胞表面のレセプターに結合することによってこの

現象が誘導される。このほかにも、細胞が放射線障害や薬物作用を受けた場合（後述）の死や細胞の寿命による死も、プログラム細胞死であり、遺伝子の解析が進められている。現在では、不老長寿を支配する遺伝子さえも突止められている。

酵母は、単細胞生物であるので多細胞生物に特有な現象の解析には不適當であるが、真核細胞として最もすぐれた遺伝解析の研究方法を行使でき、細胞の増殖や分裂のメカニズムを解析するすぐれた実験系を提供している。1988年、ビーチ D. Beach を含め多くの研究者によって、酵母の CDC 遺伝子群を中心とした細胞の増殖を調節するカスケードの全貌がほぼ明らかにされた。

【癌抑制遺伝子】

癌の研究では、1970年代に盛んに研究された癌遺伝子とは逆に、癌細胞の性質を抑制する遺伝子に異常が起って、抑制が働かなくなると細胞の癌化が誘導されるという発想が提唱され、癌抑制遺伝子が探索された。1986年、ドライジャ T. P. Dryja とワインバーグは、まれな遺伝性の小児の眼の癌である網膜芽細胞腫の患者で異常となっている RB 遺伝子をクローニングすることに成功し、その後、正常な RB 遺伝子を癌細胞に移入すると細胞は癌としての性質を失うことから RB 遺伝子が癌抑制遺伝子であると確認された。

これに続いて、遺伝性のウィルムス腫瘍の WT 遺伝子、フォン・レックリングハウゼン症候群の NF1 遺伝子などが発見され、これらの遺伝子は癌抑制遺伝子であることが明らかにされた。癌抑制遺伝子の蛋白質の一部は、酵母の増殖調節に働く CDC 遺伝子のカスケードに働く可能性が示されている。

癌抑制遺伝子 p53 の機能は非常に興味深い。細胞が放射線を浴びたり、さまざまな薬物の作用を受けると、細胞にストレスが加わり、しまいにはその細胞は死滅してしまう。正常な細胞では p53 遺伝子はほとんど発現していないが、いったん細胞にストレスが加わって緊急事態が発生すると、p53 蛋白質が大量に産生され、p53 蛋白質は細胞の増殖を一時停止させ、放射線や薬物の作用で生じた遺伝子 DNA 上の障害を監視する。その間に DNA 上の障害をなおす修復酵素が働くが、どうしても DNA の傷がなおりきらないと判断すると、p53 蛋白質はプログラム細胞死を誘導する。細胞は、障害を受けたあと、元の正常な細胞に回復できない場合、p53 蛋白質が働いてみずからの命を絶つのである。p53 蛋白質は、DNA 上の障害の監視や、細胞増殖の一時停止、アポトーシスの誘導などの機能に必要な遺伝子群の発現をスイッチオンさせることによって働いている。もし、p53 遺伝子に変異があると、こうした一連の仕組みが働かず、細胞はプログラム細胞死から免れて異常に増殖し、癌細胞として生残ると考えられている。

1987年、リオッタ L. Liotta は、転移を起す悪性黒色腫と起さない悪性黒色腫を比較して、癌の転移に関係する NM23 遺伝子をクローニングした。この遺伝子は、その翌年、シャーン A. Sharn がクローニングしたショウジョウバエの awd 遺伝子とよく似ており、awd 遺伝子に欠損をもつショウジョウバエは羽の形成に異常が起る。癌細胞の転移が、ショウジョウバエの羽の形成における細胞の移動と組織の構築のメカニズムに接点をもつこ

とは興味深い。

【遺伝病の解明と遺伝子診断】

1985年にクンケル L. M. Kunkel は、悲惨な結末をもたらす遺伝病の進行性筋ジストロフィーの患者で異常を起しているジストロフィン蛋白質の cDNA をクローニングすることに成功した。

ジストロフィンとは骨格筋の筋膜の内側で筋繊維の束を包む膜様の蛋白質で、この病気ではジストロフィンが失われて進行性の筋萎縮を招き、患者は 20 歳前後に呼吸筋の麻痺などにより死亡する。ジストロフィン遺伝子は現在知られている最も大きい遺伝子で、X 染色体の上にある。この病気は伴性劣性遺伝を示し、男児のみに発症し、女兒は異常なジストロフィン遺伝子と正常遺伝子をあわせもつ保因者となる。保因者の女性から生れる男児には 2 分の 1 の確率で病気が出るが、出生前診断を行うために妊婦の羊水を採取して胎児の性別の判定とジストロフィン遺伝子の検査が行われる。この遺伝子の検査が、分子生物学の技術を駆使した遺伝子診断である。10 万の出生あたり約 3 名の患者が発生するという進行性筋ジストロフィーの発生の約 3 分の 1 を出生前診断によって検出することができる。

クンケルのジストロフィン cDNA のクローニングを契機にさまざまな遺伝病の遺伝子がクローニングされ、遺伝子診断が試みられている。さらに、遺伝病では、患者に正常な遺伝子を送り込んで病気を治す遺伝子治療の研究が進められ、遺伝子を送り込むためのベクターや病的遺伝子と置き換えるための遺伝子ターゲティング法の開発が行われている。

一方、遺伝子診断は、遺伝病ばかりでなく、患者材料からウイルスや病原菌を検出する検査法にも用いられている。さらに、癌や白血病、それに高脂肪血症、糖尿病、動脈硬化、代謝異常、アルツハイマー病などでも、病巣の細胞には特定の遺伝子の異常や遺伝子発現の異常が明らかにされ、遺伝子病と呼ばれるようになった。遺伝子病の異常な遺伝子の検出にも遺伝子診断が使われはじめ、将来、健康診断の 1 つとして遺伝子診断が行われ、これらの病気の発病危険率を予測できるようになるものと期待されている。

【生命現象の解明へ】

1985 年、マリス K. B. Mulis はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を開発した。この方法は、自動装置によって DNA ポリメラーゼを数十回繰返し作用させて特定の遺伝子 DNA 断片を増幅させるもので、試料の中にごくわずかに含まれる遺伝子を検出する強力な方法であり、遺伝子診断法をはじめとしてさまざまな研究や検査に用いられている。

遺伝子をクローニングして蛋白質を突止めても、それだけでは、個々の遺伝子の働きを明らかにしたという断片的な情報に還元しただけで、生命現象の解明にはほど遠い。そこで、細胞あるいは動物個体で発現しているすべての遺伝子をクローニングして遺伝子の番地をつけてカタログ化し、細胞の分化や個体発生の時間経過とともに発現する一群の遺伝子全体の変化を追究しようという動きも現れた。

1990 年、洪実は均一化 cDNA ライブラリーの方法を発表した。この方法は、遺伝子ご

とのメッセンジャーRNAの量の違いを均一化したcDNAライブラリーをつくり、そのうえで各遺伝子間で塩基配列の類似性の少ない、cDNAの最下流部分の短いDNA断片を遺伝子のサンプルとしてすべてクローニングし、カタログ化しようというものである。遺伝子のカタログ化としては、科学技術庁の主導のもとに、政府間国際協力研究として「ヒトゲノムプロジェクト」が1989年より発足し、最終的にはヒトの染色体上のすべてのDNAの塩基配列を明らかにすることを目的としている。

(高野利也) 1993、ブリタニカ国際百科辞典より

DNAからRNAへの転写

転写という過程は3つの段階に分けることができる、すなわち、開始、転写産物の伸長、終結の3段階に分けられる。ゲノムからの情報の流れを調節する重要なポイントは(訳注: 転写開始から翻訳後修飾に至る過程で)多数存在するが、その中でも転写開始の調節が最も重要であるようなので、ここで詳細に述べることにする。

真核生物では、タンパクをコードしている遺伝子の転写は、(rRNAやtRNAのような構造RNAとは異なり)RNAポリメラーゼIIという酵素とそれに会合する複数の調節タンパクによって行われる。これらの調節タンパクは、ポリメラーゼと複合体(ポリメラーゼ複合体と呼ばれている)を形成し、正確な転写に必要な転写開始のふたつの局面の調節に決定的な役割を演じている。すなわち、第一に、RNAポリメラーゼが遺伝子の転写開始部位に正確に位置しなくてはならないこと、第二に、転写開始の速度が特定のmRNAを細胞が必要とする量だけ産生するように制御されなければならないことの二点である。

転写調節に関係するタンパクは**転写因子**、あるいはときとして**トランス作用因子(trans-acting factors)**と呼ばれる(**trans**という接頭辞は、これらのタンパクがゲノム上のどのような場所でコードされていても構わないということを示している。すなわち転写因子をコードする遺伝子は、これらの転写因子によって調節される遺伝子に物理的につながっている必要はない)。全体として、何百という転写因子が存在しているらしいが、その中には、多数の遺伝子と相互作用するものもあれば、ごく少数の遺伝子としか相互作用をもたないものもある。転写因子は、作用を及ぼす遺伝子の発現の速度を速めたり、遅らせたりすることができる。すなわち、転写因子は、転写のアクチベーターとしてもリプレッサーとしても働きうる。後述のように、転写因子の中には生理的なシグナルによる修飾後に初めて遺伝子の発現を活性化するものもある。

多種の転写因子が存在し、しかもそれらが異なった機能的特性を示すことを考慮すると、生物学的に適切な転写因子だけが、調節を受ける遺伝子の転写開始部位の近くに運ばれる

ことが重要となる。この位置の特定は、DNA 上に特異的な結合部位をもつ転写因子によって行われる。こうして転写因子は他の遺伝子ではなく、標的遺伝子に正確につなが止められることになる。DNA の転写調節領域内に存在する特定の塩基配列が、転写因子の結合部位特異性を決定する。転写因子が結合する短い DNA 配列をシス調節因子 (**cis-regulatory element**) と呼ぶ (図 1-7)。(cis という用語は、これらの調節要素および調節される遺伝子が同じ DNA 分子上に存在することを意味している)。神経薬理学における受容体概念との類似性から、DNA 上のシス調節因子の特異的な塩基配列は転写因子に対する受容体と考えられる。実際、DNA 上の結合部位に対する転写因子の結合親和性を表わす解離定数は、多くの薬物の神経伝達物質受容体に対する解離定数にきわめて似た分布幅の値をとる。

真核生物では、複数のシス調節要素が遺伝子の転写開始位置の上流に (すなわち、5' 上流側。図 1-7)、ときには下流 (3' 側) に並んでいる。シス調節因子に変異を起こした実験から、個々の遺伝子には特定のシス調節因子の組み合わせが存在すること、およびこれらの要素の性質、数、DNA 上の空間的な配列が遺伝子の特異的な発現パターンを決定していることがわかる。このような特異的な発現パターンには、遺伝子が発現している細胞の種類、発生過程における発現時期、成熟細胞の基底状態での発現レベル、および生理的なシグナルに応答した状態での発現レベルの違いなどが含まれる。

シス調節要素は、一般的には転写開始位置から数百塩基程度の領域内に見つかるが、ときには何千塩基も離れたところに存在することもありうる。転写開始部位の近傍の発現調節領域はプロモーターと呼ばれ、また転写開始部位から離れた位置で発現の制御を行う調節領域はエンハンサーと呼ばれているが、発現調節のメカニズムを考えるとこの区別は人為的であるように思われる。機能的には、プロモーターおよびエンハンサーは似たような働き方をしている。すなわち、両者とも複数の短い配列の調節単位 (**module**) から構成され (しばしば 7 から 12 塩基対の長さ)、各々の調節単位がひとつあるいは複数の転写因子の結合部位となっている。

プロモーターやエンハンサーといったシス調節要素に結合するタンパクが、どのようにして遺伝子発現を制御するかという機構に関しては未知のことが多い。このようなタンパクの多くはふたつのドメイン、すなわち、特異的な DNA 上の塩基配列 (すなわち、シス調節要素) を認識して結合するドメインと転写装置 (**RNA ポリメラーゼ II** とそれに会合してポリメラーゼ II 転写複合体を形成するタンパクから構成される) と相互作用をおよぼし合うドメインとを持っている。転写開始部位から遠く離れたシス調節要素に結合しているタンパクが、どのような機構によって転写を活性化あるいは抑制しうるのかに関しては、すべが明らかになっているわけではない。しかし現在、支配的なのは、DNA はループ構造をとることが可能で、その結果、DNA 上では遠く離れている別々の領域に結合したタンパク同士が接触できるようになるという考え方である (図 1-8)。

多くの転写因子は、同一のタンパクからなるホモ二量体、あるいは異なるタンパクからなるヘテロ二量体のどちらかの二量体となって初めて活性を示すようになる。転写因子が

ヘテロ二量体を形成しうることで、細胞内で構成される転写因子複合体の種類が増し、その結果として、遺伝子発現の特異的な調節の種類も増えることになる。

調節機構の例

真核生物のプロモーターの場合には、転写開始点の 25 から 30 塩基上流に位置する、ヌクレオチドの A と T に富む領域が存在することが多い。TATA ボックス (図 1-7) と呼ばれるこの配列は、正確に転写開始点を決定するのに必要な TFIID (polymerase II transcription factor D) という転写因子を結合する。TATA ボックスの配列に変異が生じれば、転写は開始されないか、あるいは開始されても不正確となってしまう可能性がある。

多くのプロモーターは、TATA ボックスに加えて、遺伝子の基底状態での転写活性に影響を与える転写因子が結合するひとつあるいは複数のシス調節要素を含んでいる。基底状態で機能している多くのシス調節因子はたいていの遺伝子が共通に持っている。よくみられる例としては、SP1 と呼ばれる転写のアクチベータータンパクが結合する GC ボックス (ヌクレオチドの G と C を多く含む)、数種類の異なった転写因子が結合する CCATTT ボックスが挙げられる。ある条件下で遺伝子発現を抑制するリプレッサータンパクがその遺伝子に結合していない限りは、こうした種類の調節因子を含んだ遺伝子は、細胞の生存のために常に発現している (換言すると、細胞が刺激を受けていない状態においてもある一定のレベルで発現されている)。

多細胞生物である個体を構成するすべての細胞は同じ DNA を持っている (すなわち、ゲノムの完全なコピー)、個々の遺伝子は発生段階および成熟期の生命活動で起きている選択的な遺伝子発現を可能にする調節因子を含んでいなければならない。共通のゲノムから異なった遺伝子発現が起こることが、発生期間中に特定の種類の細胞 (たとえば、ニューロン、腎細胞、肝細胞といった) が形成されるために必要となる。このような細胞の分化には、脳内で見出される何千種類にも及ぶ異なったニューロンへの分化も含まれている。異なる遺伝子発現の違いはまた、多様な種類の細胞が示す機能特性の基礎となる。

数多くのメカニズムが働くことで特異的な遺伝子発現が正確に起こる。遺伝子のなかには、転写リプレッサータンパクと結合するシス調節因子を含むものがある。ある特定の種類の細胞にリプレッサータンパクが存在すれば、その種の細胞ではこのような調節因子を持った遺伝子の発現は阻害されるであろう。(おそらく、リプレッサータンパクの作用は、活性を持ったポリメラーゼ転写複合体の形成を阻害することである。) 他方で、どの細胞にも存在しているような転写アクチベーターが結合するシス調節因子を欠いている代わりに、それ自体は限られた種類の細胞にしか見出されないようなタンパクに発現を依存しているならば、そのような遺伝子の発現は特定の種類の細胞だけに限定される可能性がある。これは下垂体ホルモンの成長ホルモンとプロラクチンに当てはまるようである。これらのホルモンは、それぞれ下垂体の成長ホルモン産生細胞とプロラクチン産生細胞という細胞

にだけ発現しているが、これらの細胞では成熟細胞としては唯一、Pit1 と呼ばれるタンパクが主な転写アクチベーターとして機能している。Pit1 (POU という転写因子ファミリーに属している) の選択的な発現がどのようにして起こるのかという未知の問題が生じることになる。

実際のところ、遺伝子発現が適切な細胞に限定して起こるメカニズムは複雑な課題となっていて、少数の場合にしかその詳細は解明されていない。特異的な遺伝子発現は複数のメカニズムが組み合わさることで達成されているらしい。すなわち、ある遺伝子は複数の型のリプレッサーとアクチベーターの結合部位をもつ可能性があり、これらが互いに協調して働くことによってその遺伝子がどの細胞で発現するかが決定されるのかもしれない。ここでの短い議論から、細胞においてどの遺伝子が発現するのかを決定する特定の組み合わせのアクチベーターおよびリプレッサータンパク自体の発現を細胞がどのような方法で行うのかを知ることが発生生物学の主要な問題のひとつであることが理解できよう。

遍在するシス調節因子と細胞の種類に特異的に (組織特異的とも呼ばれる) 存在するシス調節因子の両者に加えて、多くの、おそらく大部分の遺伝子は、生理的なシグナルにตอบสนองして転写を活性化するようなタンパクが結合するシス調節因子をもっている。遺伝子発現調節の研究分野の用語では、このような転写活性化タンパクと結合する DNA 上の因子しばしば**応答因子**と呼ぶ。このように呼ぶのは、これらの因子が、特定の生理的なシグナルにตอบสนองして行われる遺伝子発現調節に関与しているからである。生理的なシグナルで調節されている因子の重要なファミリーのひとつにグルココルチコイド応答因子 (GREs) がある。グルココルチコイドは細胞質に存在する特異的な受容体に結合し、それを活性化する。その後、活性化された受容体は核内に移行し、特定の遺伝子上に存在する GRE に結合する。活性化された受容体が GRE に結合することが、GRE の精細な性質と周囲の DNA 配列次第で、標的遺伝子の転写速度を速めたり遅らせたりすることになる。グルココルチコイドが細胞機能におよぼす効果のうちで解明されているものの大部分は、遺伝子発現調節を介したものである。性腺ステロイド、甲状腺ホルモン、ビタミン D の細胞に対する効果にもきわめてよく似たメカニズムが関与している。

別種の応答因子で重要なものにサイクリックアデノシン 1 リン酸 (AMP) 応答 (CRE) がある。これは、サイクリック AMP に対する応答性を遺伝子にもたらす塩基配列という共通の性質をもっている。主な型の CRE は、TGACGTCA、あるいはそれによく似た塩基配列からなる。この配列は、サイクリック AMP にตอบสนองすることが知られている多数の遺伝子のプロモーター領域を調べることによって決定された。きわめて類似性の高い塩基配列がこれらの遺伝子内で同定され、CRE と命名された。(ひとつの特異的な機能的特性をもたらす互によく似た DNA 配列はコンセンサス配列と呼ばれる)。サイクリック AMP が遺伝子発現におよぼす効果を、CREs に結合することによって仲介する転写因子ファミリーは、CRE 結合タンパク、あるいは CREB タンパクと呼ばれている。CREB タンパクがその認識する DNA 配列 (すなわち、CREs) に結合し、サイクリック AMP 依存性タン

パクキナーゼでリン酸化されると、遺伝子の転写は活性化される。第4章で明らかになるように、ニューロン内のサイクリック AMP のレベルを調節する多くの神経伝達物質と薬物は、こうしたメカニズムを通じて、遺伝子発現に重要な影響をおよぼしている。

もうひとつ別の生理的に重要な応答因子は、タンパクキナーゼ C のシグナル・トランスダクション経路に応答して遺伝子を活性化することを可能にする。この因子は TGACTCA というコンセンサス配列を持ち、**CRE** のコンセンサス配列とはたった一塩基違うに過ぎないが、異なった組み合わせのタンパクと結合し、異なったシグナル・トランスダクション特性を示す。この因子は初めアクチベータータンパク (**activator protein1, AP-1**) と呼ばれる粗なタンパク抽出分画と結合したため **AP-1 部位** と名付けられた。近年になって、AP-1 複合体の個々の構成タンパクが解析されるようになった。たとえば、AP-1 複合体を構成する主な転写因子のうちのふたつは **c-Fos** と **c-Jun** であることが明らかにされている。**c-Fos** と **c-Jun** はヘテロ二重体を形成して AP-1 部位に結合する。

細胞がその環境から受けるシグナルの多くは、タンパクキナーゼの活性化とそれに引き続いて起こる特異的な転写因子のリン酸化に至る生化学的な連鎖反応を活性化することで遺伝子発現の調節を行う。最もよく調べられている例は、上述のサイクリック AMP 依存性タンパクキナーゼによる **CREB** タンパクのリン酸化である。しかしながら、多くの他の転写因子もまた環境からのシグナルに応答してリン酸化される。転写因子のリン酸化が遺伝子発現調節において果たす役割、および精神医学においてもちうる潜在的な重要性については第4章で詳述する。

(精神医学の分子生物学 by Hyman and Nestler, 1993 より)

転写制御因子の構造

概論—因子のモジュール構造による機能単位の形成

1. 転写制御機構

真核生物では、遺伝子転写のために RNA ポリメラーゼ I、II、III、3種類の酵素が用意されており、それぞれリボソーマル RNA、メッセンジャーRNA、トランスファーRNAなどの低分子RNAを転写する。真核生物の特異的転写にはRNAポリメラーゼだけでは不十分で、それぞれのRNAポリメラーゼに特異的な、一群の基本転写因子 (general transcription factors) が必要である (1章参照)。これら**基本転写因子**は、**プロモーター (promoter)** を標的としてDNA上に集結し、**RNAポリメラーゼ**を組み込んで転写の開始複合体 (**initiation complex**) をつくる。プロモーターに依存する転写を、**基本転写 (basal transcription)** という。一方、細胞は生理的環境の変化や外界からの刺激に対し、遺伝子発現レベルを微妙に上下させたり、特定遺伝子の発現を on/offする。このような制御を司る領域 (シスエレメント: cis-element) は、エンハンサー (enhancer) あるいはサイ

レンサー (silencer) という形でおもにプロモーターの上流に存在し、基本転写レベルを調節している。制御シスエレメントは遺伝子の中や下流に位置する場合もあり、遺伝子によって特異的である。このように、**遺伝子発現はプロモーターと制御領域という 2つの部分によって調節されているが、シスエレメントの構造とその位置は遺伝子特異的なため、遺伝子に特有な転写制御が可能になる。**

2、転写制御因子

転写制御領域には、トランスに働く因子 (trans-acting factors) が直接あるいは間接的に結合し、これらの分子が実際の制御を行っている。転写制御に関与する因子を、**基本転写に関与する基本転写因子と、制御転写に関与する転写制御因子(transcription regulatory factors : エンハンサー因子、遺伝子特異的 DNA 結合因子も同義的)とに大別できる (図 1)。**転写制御因子の機能は、単にプロモーターからの転写水準を上げ下げするだけではなく、時期あるいは組織特異的遺伝子発現という現象に必要である。本章では、真核生物の転写制御研究の中で最も進んでいる RNA ポリメラーゼ II 関連転写因子を中心に、おもにそれらの構造について解説する。なお、**転写因子の中には、DNA 結合能をもたない、メディエーター (mediator) 、コンプレッサー (corepressor) 、あるいはコアクチベーター (coactivator) と呼ばれる一群の因子が知られているが、構造研究があまり進んでおらず、本章でも取り上げない。**

基本転写因子の中で、DNA 結合能をもつ最も重要なものは、TBP (TATA 結合蛋白質)、あるいはそれを含む TFII D などの複合体である。TBP は、プロモーター内の TATA ボックスに結合し、転写開始複合体形成の引き金になる重要な因子であり、TATA ボックス結合と基本転写活性化に必要な鞍型構造モチーフをもつ。一方、DNA 結合性の転写制御因子は非常に多くのものが知られている。現在、転写制御因子は数百~千のオーダーで知られているが、類似因子ファミリーを含めると、実際にはその数倍存在すると考えられる。1つの遺伝子を制御する因子数は通常複数個あり、またその結合部位も多様である。従って遺伝子の制御方式の数は、遺伝子の数を十分上回って用意されていることになり、これによって遺伝子ごとにきめ細かい制御が可能になる。

3、転写制御因子の機能ドメインとモチーフ

転写制御方式の詳細は遺伝子によりまちまちであるが、転写制御因子をその構造からみると、比較的少数のカテゴリーのものに分類できることが明らかにされ、実際ここ 5~7 年間で、主要な転写制御因子の構造に関する系統的分類が進んだ。研究対象の中でも機能領域を特定しやすいとか、機能部位が安定な構造をとりやすいとか、機能部位を“抽出”が可能 (ある部分だけで機能が現れるとか、それを他の因子とのキメラにすることができるとか) などという理由により、DNA 結合性転写制御因子の構造解析に関する研究が特に進んだ。蛋白質にはヘリックスやシート、あるいはターンといった二次構造が存在し、それら

の1個ないし数個が1つの機能単位を構成するが、これらはドメイン (domain) あるいはモジュール (module) と呼ばれる。転写制御因子のドメイン解析には、①蛋白質に与えた変異が機能に及ぼす影響をみる、“構造/機能相関解析 (あるいは変異解析)” や、②蛋白質の立体構造をX線やNMRで解析する“高次構造分析”が適用され、特にX線結晶解析では、DNA-因子複合体の解析も行われている。

転写制御因子には“DNA結合ドメイン”と“転写制御ドメイン”という2つの主要ドメインがある(図2)。DNA結合ドメインとして、塩基性アミノ酸に富む領域が知られているが、DNAと相互作用する部位にはそれ以外の構造もある。1つは α -ヘリックス構造で、ここでDNAの主溝にはまり込むことが知られているし、TBPでは、 β -シート構造からなる鞍型構造部分とDNAの副溝とが相互作用する。転写制御ドメインに関して比較的好くみられる構造は、①負電荷に富む領域 (acidic domain)、②グルタミン (Q) に富む領域や、③プロリン (P) に富む領域がある。①に関しては正味の電荷が制御能と相関することがわかっているが、②、③に関してはQやP残基が制御能と必ずしも直結しないことがわかっており、QやP残基の周囲にアミノ酸構造の重要性が指摘されている。多くの転写制御因子は、自分自身あるいは他の因子と相互作用する“蛋白質結合ドメイン”をもつ。DNA結合因子は単独よりも二量体の方がDNAと安定に結合でき、この性質によって因子はさまざまなヘテロ二量体となることができ、この機構によって因子のDNA結合様式に幅が与えられる。金属転写因子 (MTF) は重金属により、またステロイド受容体ではステロイドホルモンによって転写制御因子としての機能が現れるが、因子によってはこのような“リガンド結合ドメイン”をもつものがある。

転写因子は上に述べたように4つの基本ドメインをもつものが、因子によっては、Gal4のDNA結合ドメインと活性化ドメインのように、各ドメインを明確に分離できるものもあれば、そうでないものもある。TBPの鞍型構造は分子内で二量体構造をとり、その構造自体が機能に必須なため、ドメインの分離ができない。大部分の因子は本来の構造で最大の機能を発揮するが、これは転写制御因子内での各ドメインが機能発揮に都合よく配置されているためと考えられる。これまでの研究により、転写因子内部での各ドメインの配置に、いくつかのタイプがあることが明らかになっている。いくつかの因子間で共通にみられる構造で、一定の機能を発揮する構造をモチーフ (motif) と呼ぶが、1つのモチーフをもつ一群の因子はファミリーを形成する場合が多い(例:ステロイド受容体-レチノイン酸受容体-ビタミンD受容体などは核内受容体ファミリーを形成する)。よく知られているモチーフにはZnフィンガー、ロイシンジッパー、ヘリックス-ターン-ヘリックス、ヘリックス-ループ-ヘリックスなどがある。ロイシンジッパーをもつ因子では、N端に活性化ドメインがあり、次に塩基性アミノ酸に富むDNA結合ドメインを配し、その後にロイシンを含む α -ヘリックス(蛋白質結合ドメイン)があるので、全体で[b-Zip構造]というモチーフが形成されている。現在モチーフあるいはドメインの数は、上にあげたもの以外にもそのバリエーションも含め、リングフィンガー、イソロイシンジッパー、

両親媒性ヘリックス、POU ドメイン、HMG ボックス、Ets ドメイン、SPKK モチーフなど 10 数種類が知られている。

4、転写制御に至るメカニズム

転写の制御がどのような分子的变化に起因するのかについて、現在のところはまだよくわかっていない。転写の抑制であれば、積極的な相互作用がなくとも、さまざまな理由によって起こりうるが、活性化では、転写制御因子は直接あるいは間接的に遺伝子発現に関与する蛋白質と相互作用するとみなされる。その機構を考える上で参考になる知見は、転写制御部位およびその標的因子の分子構造である。しかし、活性化ドメインとその標的蛋白質の組合せは多種多様であり、活性化に到達する経路はいろいろあると考えられる。相互作用様式にしても、酸性アクチベーターの場合、標的因子の反応表面は塩基性の性質をもっていると予想されるが、それ以外の活性化モチーフに関しては（疎水結合などによって蛋白質どうしの相互作用が起こると想像されるが）、今後その相互作用形式を明らかにしなくてはならない。

制御に至る経路がいくつもあるとしても、転写制御の最終的な作用機序は次の3点に集約できよう。最初に考えられる機構は、**転写制御因子が DNA に結合に結合した後、周辺のクロマチン蛋白質と相互作用しそれらの蛋白質を解離させる機構**であり、この過程は実際に示されている。この反応によりプロモーターが“開”かれ、結果的に基本転写因子のプロモーターへのエントリーが容易になると考えられる。これと別な機構として、“TFII D などの基本転写装置と結合することにより、それらの因子の局所濃度を高めたり、あるいは開始複合体を DNA 上で安定化させる”という転写制御因子の関与が考えられる。転写活性化因子を複数用いることにより、その効果が相乗的に現れるなどの知見により、この機構も実際にあると思われる。3番目の機構としては、制御因子と結合した基本転写因子群が構造変化を起こし、その“活性化”された基本転写因子が、さまざまな転写反応に参加するといった仮説が考えられる、最近、基本転写因子 TFII B で、酸性アクチベーターとの結合により、TFII B の構造を誘導する現象が発見された。

参考文献

- 1) Lewin, B. : Genes IV, Oxford University Press, Oxford, 1994
- 2) 鈴木義昭、他：転写因子研究の新展開。実験医学 Vol.11 No.18 羊土社,1993
- 3) 田村隆明：転写制御のメカニズム、実験医学バイオサイエンス、羊土社,1995

(転写因子、用語ライブラリー、田村、牧野、1995)

Recognition of DNA

転写制御因子—DNA 結合認識

1) ロイシンジッパー

a、歴史とあらまし

ロイシンジッパー (leucine zipper) は 1988 年、Landschulz らによって見出された DNA 結合蛋白質によくみられるモチーフであり、酵母の転写因子 GCN4、哺乳類の転写因子 C/EBP (CAATT/エンハンサー結合蛋白質)、さらに核内癌遺伝子産物 Jun、Fos、Myc などで見つかった。この領域には 7 アミノ酸ごとのロイシン残基の繰り返し配列がみられ、彼らは、この領域が α -ヘリックス構造を形成したとき、ロイシン残基が同一平面上に規則正しく並び、二重体形成に関与しているというモデルを考案した。初期のモデルでは、2本の α -ヘリックスが逆平行にならび、ロイシン残基が互い違いにジッパーのように機械的に組合されることによって、二重体を形成するというものだった。しかし、後にこのモデルは訂正され、この領域による複合体形成は線維状蛋白質などにみられるコイルドコイル構造 (coiled-coil structure) をとり、2本の α -ヘリックスは平行に並び、ロイシン残基どうしが向かい合って結合することが明らかになった。

b、分子構造

約 30 残基の領域にわたって、7 残基 (abcdefg) ごとの繰り返し構造がみられる (図 1)。1 番目の a 位と 4 番目の d 位には疎水性アミノ酸が配置され、d 位にはロイシンが位置している。ロイシンジッパー領域は右巻きの α -ヘリックスを形成し、a 位と d 位のアミノ酸は同一平面上に並ぶ。さらに二重体を形成する際には、2本の α -ヘリックスは左巻きのコイルドコイル構造を形成する。このとき、a 位および d 位のアミノ酸側鎖は、平行するもう一方のヘリックスのそれぞれに対応する疎水性アミノ酸と、ファンデルワールス相互作用で、その間の穴を埋めるような形で結合している。一般的に e 位と g 位のアミノ酸には、電荷をもつものが位置している傾向があり、この静電的相互作用により、コイルドコイル構造を安定化している。これらの蛋白質・DNA 複合体の三次構造が、GCN4 や MAX などの X 線結晶解析により明らかになった。

C/EBP、CREB (cAMP 応答因子結合蛋白質) などの、ロイシンジッパー構造をもつ多くの DNA 結合能をもつ蛋白質には、6つのアミノ酸からなる連結領域を介して、ロイシンジッパーの N 末側に DNA に結合する塩基性アミノ酸領域 (basic region) があり、ここには塩基性のアミノ酸残基、特にアルギニンとリジンが多く存在し保存されている。ロイシンジッパーで二重体を形成した蛋白質は、ロイシンジッパー部を幹とし、塩基性領域を 2本の枝とした Y 字構造をとり、その枝が DNA に結合する (図 2)。GCN4 の X 線解析

の結果、塩基性領域、ロイシンジッパー領域が連続した1本の55残基からなる α -ヘリックスを形成し、2本のヘリックスがロイシンジッパー部分で二量体を形成し、塩基性領域がDNAの主溝に入り込み、ピンセットのようにDNAと結合することが示された。

c、機能

この構造をもつ蛋白質は、核内癌遺伝子や転写因子などのDNA結合蛋白質でおもにみられるが、それ以外にパラミクソウイルスの融合糖蛋白質、HIV-1のenv蛋白質、カリウムチャンネル、グルコーストランスポーター、アミノ酸トランスポーターなどの細胞膜貫通型輸送担体、チロシンキナーゼ活性をもつ活性型Met癌遺伝子産物、シグナル伝達型の癌遺伝子産物であるSki、Vavなどに類似の構造がみられる。これらの蛋白質において、その三次構造がこれまで解析されたDNA結合能をもつものと同じであるかは明らかになっていないが、ロイシンジッパーが複合体形成、あついはサブユニットの集合などに関与し、それぞれの機能の活性に関わっていると考えられる。このモチーフをもつDNA結合蛋白質として、Jun/Fosファミリーやc-Myc、L-Myc、N-Myc、Max、Mad、Mafなどの癌遺伝子や、GCN4、C/EBP、NF-IL6、HSF-1/HSF-2などの転写因子があげられる。これらはホモあるいはヘテロ二量体を形成することにより、特定の蛋白質をつくる遺伝子を活性化する調節蛋白質としての機能をもつ。

d、これからの展開

二量体形成時にホモ二量体だけでなく、ヘテロ二量体を形成するということが、さまざまな発現調節蛋白質の組合せができ、遺伝子の発現に多様性や特異性をもたせることができるということが、このモチーフのもつ最大のメリットであろう。Jun/Fos二量体形成において、Fos蛋白質のe位とg位のアミノ酸が、酸性アミノ酸側に傾いているということにより、ホモ二量体でなくJun/Fosヘテロ二量体の形成に働いていると考えられている。また、a位とd位に変異をかけたGCN4のロイシンジッパー領域において、二量体だけでなく、三量体や四量体を形成することも示されている。このようにロイシンジッパー領域が、二量体を含めて複合体形成に大きな役割をもち、遺伝子の発現の調節の多様性を与えているということが明らかになってきている一方で、この特異性がどの部分で制御されているのかという問題が残っている。

Database (GenBank)

GCN4 : KO2205、M22042

C/EBP : X62600

(¹95年転写因子、用語ライブラリー、実験医学別刷、羊土社、1995)

(田村隆明)

The basic leucine zipper (bZip) motif

In 1988 a number of transcription factors were found to share a common sequence pattern of leucine residues repeated at intervals of **seven** residues. This motif mediates the dimerization of these proteins, through the formation of an α -helical coiled coil structure. A basic region adjacent to the 'zipper' directs sequence-specific DNA binding. At the time of writing, the structure of this region is not known, but there is evidence that on binding to DNA, it adopts an α -helical conformation. Two related models for the protein-DNA interaction have been suggested: the 'scissors grip' and 'induced helical fork' models. In these models, the intertwined helices in the zipper continue as individual helices into the basic region and grip the DNA in the major grooves on either side of the double helix. (from EMB 1994)

2) Znフィンガー／リングフィンガー

a、歴史とあらまし

Zn フィンガーは、TFIIIA の DNA 結合モチーフとして提唱されて以来、Sp1、核内レセプター群、GATA 因子群、癌遺伝子産物 ErbA など、200 種以上もの蛋白質（おもに転写因子）中に見出されている。真核生物における出現頻度は高く、例えばヒトのゲノム中の約 1% は Zn フィンガーをコードするといわれている。近年 X 線結晶解析や NMR でその立体構造が次々と明らかにされ、その DNA の認識機構についても詳細が論じられるようになってきた。また '90 年代に入り、Zn フィンガーの変形といえるリングフィンガーと呼ばれるモチーフが、細胞の機能調節や分化に関連した核内蛋白質中でファミリーを形成し、ウイルスからヒトまで広範にわたってよく保存されていることが明らかにされた。

b、分子構造

Zn フィンガーにはいくつかタイプがあり、それぞれ立体構造も塩基配列の識別機構も大きく異なる (図 1)。C₂H₂ タイプは真核生物の転写因子によくみられ、30 残基からなり、多くの場合繰り返し配列として見つかる C-X₂₋₄-C-X₁₂-H-X₃₋₅-H という配列をもつ。N 末側の 10 残基程度の二本鎖逆平行 β -シートがループの左半分を、C 末側の 11 残基程度の α -ヘリックスがループの右半分を形成し、 β -シートの基部の 2 個の C 残基とヘリックス基部の 2 つの H 残基は Zn を介して結合し、ループを束ねるピンの役割をしている。この安定なユニットはリンカーと呼ばれる構造につながれ、各ユニットはヘリックスの N 末側が DNA の主溝に入る形をとって結合する。

C₄ タイプはステロイドホルモン受容体に多く見つかっており、独立した 70 残基程度の DNA 結合性構造ドメインをもつ。C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C という配列があり、よく保存されている。グルココルチコイド受容体やエストロゲン受容体などで立体構造が解

析されており、いずれもドメイン当たり2つのフィンガーをもち、互いにヘリックスを介して合体し、N末側のフィンガー中のヘリックスがDNAの主溝にはまり込む。C₂H₂タイプと違い、フィンガーが単独でDNA結合ドメインを形成する例は見つかっていない。

GAL4 タイプは、C-X₂-C-X₆-C-X₆-C-X₂-C-X₆-Cという配列をもち、ZnとZn₂C₆クラスターを形成している。立体構造は似通った2つの部分からなり、短いループと2つのZnでつながれ、クラスター全体は対称性の高い構造をしている。N末端ヘリックスのC末側が、DNAの主溝に入る形で結合する。DNA塩基とはこのヘリックスC端2残基の側鎖と相互作用し、N端はDNAリン酸骨格と相互作用する。

リングフィンガーは、DNAと相互作用する蛋白質中によくみられるCリッチモチーフ：C-X (I,V) -C-X₁₁₋₃₀-C-X-H-X-(F,I,L)-C-X₂-C-(I,L,M)-X₁₀₋₁₈-C-P-X-Cとして報告された。CとHはよく保存されている。構造的には、ループの部分がリング状に180度の位置で配置されるという特徴があり、ループの部分重複による立体障害が避けられている。

C、機能

Znフィンガーは例えばSp1では特異的な配列を認識する読み取りヘッドとして機能する。マウスの初期発生に関わる転写因子である zif 268 はC₂H₂タイプのフィンガーを3つもつが、そのDNAとの結合様式がよく解析されている。第1、3番目のフィンガーでは、ヘリックスの最初のねじれのアミノ酸残基が標的のコードンの第1文字を認識し、3つめのねじれの残基が第3文字を認識する。第2番目のフィンガーは1つめと2つめのねじれの残基が標的塩基対の第1、2文字目を認識している。いずれの場合も、アミノ酸は対応する塩基対の片側の塩基とのみ結合する。このルールがほかのZnフィンガーにも当てはまること、さらに上で述べた3カ所のアミノ酸がZnフィンガーごとに変化に富むことが示され、このアミノ酸が識別する塩基配列の特異性を決定している可能性が注目された。しかし近年、このルールでは説明できない結合様式を示す例が相次いで報告されている。

C₄タイプのフィンガーは2つが独立した読み取りヘッドとして機能せずC末側のフィンガーは受容体蛋白質が二量体を形成する際に働く。認識されるDNAはパリンドローム配列となっており、受容体に対応する配列に正しく結合するには、特定の塩基配列を認識する領域とパリンドロームの中間距離を認識する領域の両方が必要で、二量体形成時に標的とするパリンドロームに合わせる機能をもつと考えられている。リングフィンガーの機能に関しては未知の部分が多いが、そのトランスフォーミング活性、DNA結合能など今後の研究の意義は大きい。

d、これからの展開

ZnフィンガーのDNAとの結合様式の解明は転写の理解のみならず、医学にも貢献することが期待される。例えばウイルス腫瘍は、Znフィンガー領域における突然変異に起因

する。またリングフィンガーのような類縁モチーフ、さらに新しい機能についての新発見も期待される。

Database (GenBank)

エストロゲン受容体 (ヒト) : X03635、M11457

TFIIIA (アフリカツメガエル) : K02938

SP1 : J 03133

GAL4 : K01486

PML-1 (ヒト) : M79462

(1995年転写因子、用語ライブラリー、実験医学別刷、羊土社、1995)
(田村隆明)

The zinc-finger motif

In 1985 a sequence motif of 30 amino acids (termed 'zinc finger') was observed in the *Xenopus* transcription factor TFIIIA where nine such motifs are arranged sequentially and direct sequence-specific DNA binding. This motif is defined by four metal ligands (arranged: Cys-X_(2~5)-Cys-X_(12~13)-His-X_(2~5)-His) and three conserved hydrophobic residues. Analysis using NMR SPECTROSCOPY revealed that each 30-residue motif folds to form a discrete structural unit consisting of an irregular β -sheet packed against a short helix, C-terminal to the sheet. A zinc ion is tetrahedrally ligated by two histidines at the C-terminal end of the helix and two cysteines within the sheet (Fig. P62b). The three conserved hydrophobic residues form a core to the domain. It is now clear that this motif is used extremely widely in eukaryotic DNA-binding proteins from yeast to man. Indeed, to date, more than 200 different cDNA sequences have been found to encode zinc finger motifs, amounting to more than 1200 individual zinc fingers. The modular nature of the zinc-finger motif, with variable numbers of fingers, or recognition units, arranged tandemly, may account for the widespread occurrence of these motifs.

The crystal structure of three zinc-finger domains from the mouse protein Zif268 complexed with 11 bp of DNA illustrates this modular mode of binding: each finger makes equivalent contacts in the DNA major groove with no interaction between adjacent fingers. The binding site is 3~4 bp to which hydrogen bonds are made by residues toward the N terminus of the α -helix (Fig. P64a). (from EMB 1994)

3) HTH

a、歴史とあらまし

ヘリックス-ターン-ヘリックス (helix-turn-helix : HTH) モチーフは、約 20 個のアミノ酸からなる DNA 結合モチーフで、原核生物、真核生物の両方で多くの調節蛋白質にみられる。HTH モチーフは、1981 年に CAP (カタボライト遺伝子活性化蛋白質) という大腸菌の分解に関するオペロンを活性化する蛋白質で最初に見出され、その後、 λ ファージリプレッサーや Cro 蛋白質で詳しく解析された。真核生物では、ショウジョウバエの発生に関与するホメオティック遺伝子の中から見出されたホメオドメインや、線虫の神経発生に影響を与える因子 Unc86 の研究から見出された POU ドメインに、この HTH 構造が含まれていることがわかっている。

b、分子構造

HTH モチーフは、20 個のひと続きのアミノ酸残基が短いターンをはさんで、2つの α -ヘリックスを形成しており、その三次構造は厳密に保存されている。この前後にいくつかの残基がある場合もあるが、中央の 20 残基はどのモチーフにも存在する。第 2 のヘリックスは認識ヘリックスと呼ばれ、DNA に結合する。 λ ファージの Cro、リプレッサー、CAP の HTH の三次元構造を比較した結果、9 番目の残基はグリシンでなければならないなど、いくつかの位置での立体化学的制約が明らかになっている。

ショウジョウバエから見出されたホメオドメインは、約 60 アミノ酸からなり、比較的短いターンで結ばれた 3 本の α -ヘリックスを形成している。このうち第 2、第 3 のヘリックスが HTH モチーフを形成し、Cro やリプレッサーの HTH モチーフと事実上同じ構造をとっている (図 1,2)。ホメオドメインの認識ヘリックスは、原核生物のものとは比べてかなり長い。また、ホメオドメインの N 末端側には N 端アームという部分がある。

POU ドメインは、POU (Pit1-Oct2-Unc86) ドメイン転写因子群にみられる DNA 結合ドメインで、150~160 アミノ酸からなっている (図 3)。POU ドメインは、約 60 アミノ酸のホメオドメインに似た POU ホメオドメインと、その上流の約 70 アミノ酸の POU に特異的な POU 特異的ドメインに分けられる。POU 特異的ドメインは 4 つの α -ヘリックスを含み、第 2、第 3 のヘリックスが HTH を形成している。

c、機能

HTH モチーフの 20 アミノ酸のうち、第 2 のヘリックスは認識ヘリックスと呼ばれ、DNA らせんの主溝 (major groove) に入り、そこに突き出したアミノ酸側鎖が、特定の DNA 塩基対と水素結合を形成する。 λ ファージの Cro、リプレッサー/CAP など、原核生物の HTH 蛋白質は、すべて対称的な同型二量体をつくって DNA と結合する。二量体中の 2 個の同じ認識ヘリックスは、正確に DNA らせんのひと巻き分 (3.4nm) だけ離れていて、これによって 2 つの認識ヘリックスは結合部位にある対称的な塩基配列と結合できる。これに対し、真核生物のホメオドメインなどの蛋白質は、単量体のままで DNA に結合する。

ホメオドメインの HTH 部分は原核生物のものと同様に、DNA の主溝に結合するが、ホメオドメインにはN端アームがあり、このN端アームは DNA に副溝に入り込み相互作用する。

POU 蛋白質は、ホメオドメインと POU 特異的ドメインからなっている。POU 特異的ドメインだけでは有意な DNA 結合の特異性はみられないが、POU ホメオドメインと相互作用することにより結合の特異性を高める。POU ホメオドメインと POU 特異的ドメインはそれぞれ HTH を用いて DNA の反対側に結合する。POU 蛋白質も単量体として DNA に結合するが、DNA 上では POU 特異的なドメインに依存して二量体を形成する。

d、これからの展開

転写因子の DNA への結合は、HTH などの蛋白質の特異的ドメインに依存するため、これまでに多くの蛋白質とその DNA 結合ドメインの構造解析が行われてきた。中でもホメオドメインや POU ドメインは注目されており、最近でも、Oct-1 (POU 蛋白質) と DNA の複合体の立体構造解析が報告されている。今後は、このような構造解析とともに、調節蛋白質との相互作用や転写への影響なども重要になると考えられる。

Database (GenBank)

Cro : L 22692

Pit-1 : D 10216

Oct-1 : X 13403

Unc86 : M22363

アンテナベディア : M22363

(95 年転写因子、用語ライブラリー、実験医学別刷、羊土社、1995)

(田村隆明)

The helix-turn-helix motif

Our understanding of the structural basis of *DNA* recognition originated with studies of the helix-turn-helix (HTH) motifs observed originally in the early 1980s in prokaryotic and bacteriophage transcriptional regulators and now more recently in the homeotic proteins in eukaryotes (*see* HOMEODOMAIN GENES AND HOMEODOMAIN PROTEINS). At the time of writing, three-dimensional structures have been determined for 10 protein-DNA complexes. These have revealed a common structural motif and similar mode of binding to DNA. The minimal 20-residue HTH motif consists of two helices packed together at between 90° and 120° with a tight turn between them (Fig. P62*a*). It is not, in general, a stably folded structure when isolated from the rest of the protein and is packed against a variety of different supporting structures in the different HTH proteins. The residues in the turn and on the inside surface of the two-helix 'elbow' are partially conserved. The prokaryotic HTH proteins

(*e.g.* λ repressor. *see* LAMBDA) bind to DNA as symmetric dimers and are arranged such that the two HTH motifs interact with successive turns of the DNA double helix (Fig. P63). The C-terminal helix of the protein (also known as the recognition helix) lies in the major groove.

While the orientation of the HTH motif in the major groove is broadly similar in all these complexes, there is considerable variation in the precise angle of the protein with respect to the major groove. In the eukaryotic HTH motifs in particular, the recognition helix is substantially longer, which results in a significantly different orientation. Furthermore, whereas the prokaryotic HTH proteins all bind to DNA as dimers the eukaryotic proteins are monomeric.

(from EMB 1994)

4) HLH

a、歴史とあらまし

ヘリックス-ループ-ヘリックス (HLH) は、1989 年免疫グロブリンのエンハンサーに結合する因子 E12/47 と MyoD、N-Myc などの、いくつかの DNA 結合蛋白質との間に保存されたコンセンサス配列から、Murrer らによって発見された。HLH はダイマーを形成するモチーフであり、ループに隔てられた 2 つの α -ヘリックス構造によってダイマーを形成する。bHLH はこれに先行して塩基性アミノ酸に富む領域 (basic region) をもち、このドメインを介して DNA の E ボックス (CANNTG) を認識し、結合する。

HLH 蛋白質は、細胞の増殖、発生分化の転写制御において重要な役割を果たしていると考えられており、今日までに広い生物種から多数の HLH 蛋白質が単離されている。

b、分子構造

HLH は 2 つの α -ヘリックスがリンカー配列によって隔てられているという構造をもつが、多くの HLH 蛋白質にはヘリックス 1 の 5' 側に、保存された 5~6 個の親水性アミノ酸を含む親水性ドメインが存在する。この領域は DNA 配列を認識し、結合を仲介する。その 3' 側に保存された疎水性アミノ酸残基を含む疎水性ドメインが、リンカー配列で隔てられて存在している。2 つの疎水性領域はそれぞれ 12 個と 13 個からなる α -ヘリックス構造をとり、これを隔てるリンカー配列はその長さはさまざまであるが、 β ターン構造をもちループを形成していると考えられる。

bHLH 蛋白質は 2 つの α -ヘリックスによってホモダイマー、またはヘテロダイマーを形成し、ダイマーの形で DNA 結合蛋白質として機能する。DNA への結合は、2 つの bHLH 蛋白質によって形成されるダイマーの塩基性ドメインが DNA の CANNTG 配列によって

ホモダイマー、またはヘテロダイマーを形成し、DNA 結合蛋白質として機能する。2つの bHLH 蛋白質によって形成されるダイマーの各塩基性ドメインが、DNA の CANNTG 配列 (Eボックス) をそれぞれ半分ずつ認識して DNA に結合する。

c、機能

HLH をとる蛋白質群は、細胞運命の決定、細胞の増殖、個体の発生分化などに関わる遺伝子発現を制御する転写因子としてさまざまな組織で、また広い生物種において機能していると推定される。

筋芽細胞の分化に関する **MyoD** ファミリーは、組織特異的に発現している bHLH 蛋白質であり、E12/47 のような普遍的に存在する bHLH 蛋白質とヘテロダイマーを形成し、転写因子として機能する。一方、Id は塩基性ドメインをもたない HLH 蛋白質であるが、E12/47 と優先的に結合する。このため Id が多量に存在すると E12/47 と MyoD との結合が阻害されるという結果になり、MyoD は転写因子として機能しなくなる。同じような転写制御のメカニズムが、ショウジョウバエの神経芽細胞の分化の初期にもみられる。ショウジョウバエの神経芽細胞の分化に関与する bHLH 蛋白質 AC-S (achaete scute complex) は、普遍的に存在する bHLH 蛋白質 da (daughterless) とヘテロダイマーを形成して機能しており、その機能は塩基性ドメインをもたない HLH 蛋白質 emc (extra macrochaetae) が多量に発現するとき阻害される。以上の機構から、組織特異的に発現している bHLH 蛋白質のダイマー形成を、普遍的に発現している bHLH 蛋白質が促進し、塩基性ドメインをもたない HLH 蛋白質が阻害するという仕組みがわかる。

その他の HLH 蛋白質として、細胞増殖に関与し、癌遺伝子としても知られる Myc ファミリーがある。c-Myc は bHLH モチーフの C 末端に隣接してロイシンジッパー (leucine zipper) をもつのが特徴であり、(bHLH-Zip)、同じように bHLH-zip 構造からなる Max と結合する。Max は Myc の HLH-Zip モチーフにのみ特異的に結合する性質をもち、Myc-Max の DNA への結合の活性は、ダイマー形成部位と Myc の塩基性ドメインの両方に依存することがわかっている。

d、これからの展開

今日まで bHLH 蛋白質群の構造と機能解析は、おもに筋発生と神経発生の制御機構において詳細に研究されてきた。今後はさらに広くの組織、あるいは種について解析され、多数の HLH 蛋白質の存在が明らかにされる可能性がある。そして今後の研究により、HLH 蛋白質の細胞運命の決定と細胞増殖、細胞分化における役割がさらに解析されることが期待される。

Database (GenBank)

ヒト MyoD : X56677

マウス MyoD : M18779

マウス マイオジェニン : X15784

(田村 隆明)

(1995年転写因子、用語ライブラリー、実験医学別刷、羊土社、1995)

Glossary

α ヘリックス alpha (α) -helix [α らせん ; α 構造 α -structure]

タンパク質やポリペプチドの二次構造の一種で、多くのタンパク質中に見出される。ペプチド結合は共鳴混成体となり、4アミノ酸ごとに-NHと-CO間で水素結合を形成することにより、エネルギー的に最も安定ならせん構造をとる。アミノ酸3.6残基ごとに1回転し、そのピッチは5.4Åである。水素結合はらせん軸にほぼ平行に形成され、アミノ酸の側鎖は外側に突き出している。アラニン、メチオニン、ロイシンなど電荷をもたないアミノ酸は α ヘリックスを形成しやすいのに対して、アルギニン、グルタミン酸、セリンのような極性のあるアミノ酸は α ヘリックスを形成しにくい。ペプチド鎖内の環状アミノ酸のプロリンは、ペプチド鎖を折り曲げてしまうため、 α ヘリックスを中断させる。L-アミノ酸からなるペプチドでは、右巻きらせんの方が左巻きより安定であるので、天然タンパク質は右巻きのらせん構造をとる。

Alu (アル) 配列 Alu sequence [Aluファミリー Alu family]

ヒトゲノム中のいたるところに存在する反復配列の一種。制限酵素 Alu I によって切断され、約300bpの長さをもつ。ハプロイド当たり約30万あり、それぞれの配列はよく似ているが同一ではない (Aluファミリー)。典型的 Alu 配列は130bpの単位とそれにさらに無関係な31bpが挿入された単位が2個連結したものである。ヒト Alu 配列に似た配列は他の哺乳動物ゲノム中にも存在し、Alu 関連ファミリーとよばれている。

アイソフォーム isoform

遺伝子およびタンパク質の同類型の意味。

アミノ酸配列や機能が酷似したタンパク質は、進化的起源を共通する一群の遺伝子によって指定されている。これら一群の遺伝子は互いにアイソフォーム遺伝子である。産出されたタンパク質は、酵素である場合にはアイソザイム (イソ酵素) とよばれるが、これらも

含めて、タンパク質に対してもアイソフォームの語はしばしば用いられる。異なるアイソフォーム遺伝子は、異なる組織中や、発生の異なる時期に発現することがあって、その分子機構や意味が研究されている。

アニーリング annealing

DNA 二重鎖水溶液を加熱していくと二本鎖が一本鎖に解離する。解離する温度を DNA 融点という。融点後に徐々に冷却すると一本鎖に分かれた DNA が再結合してもとの二重鎖にもどる。これをアニーリングという。対合すべき鎖間の塩基対合の程度は、塩類の濃度などにより左右される。アニーリングは雑種分子の形成や、特異的部分配列の検出など、遺伝子技術で広く利用される。

アロステリック効果

基質とは異なる結合部位にエフェクター (effector : 修飾因子) が結合することによって酵素の反応速度が変化する現象 (ギリシャ語で allos は「異なる」, steros は「空間」の意)。ただし、エフェクターの立体構造が基質と異なるのが名称の由来という説もある。

アロステリック酵素 allosteric enzyme

アロステリック効果を示す酵素の総称。複数の立体的に異なる結合点をもつ酵素で、エフェクターが結合することによってその酵素活性が変化する。エフェクターが基質と同じときはホモトロピック酵素 (homotropic enzyme) とよばれ、同一サブユニットの四量体であるヘモグロビンが代表的である。一方、エフェクターが基質と異なるときはヘテロトロピック酵素 (heterotropic enzyme) とよばれ、リガンドが結合する触媒サブユニットと調節サブユニットをもつアスパラギン酸転移カルバミラーゼが代表的である。一般に一連の代謝経路の最初の反応を触媒する酵素か、分岐点での反応を触媒する酵素が多く酵素活性の変化により代謝調節する。

アンチセンス antisense

メッセンジャーRNA (mRNA) 転写物に相補的な DNA または RNA 鎖。遺伝子組換え実験においては通常、プラス鎖 RNA (それ自身が翻訳される RNA) 由来の遺伝子発現を抑える目的でアンチセンス DNA あるい RNA (マイナス鎖) が使用されるほか、ノーザンブロット法、リボヌクレアーゼプロテクション法、in situ ハイブリダイゼーションなどにおいて RI

(ラジオイムノアッセイ)で標識されたアンチセンス RNA プローブとして使用される。アンチセンス RNA を発現させるには、転写のプロモーターの下流に目的の DNA 断片を逆向きにつなげばよい。

特異的遺伝子発現を抑制する方法としてのアンチセンス RNA は、実験手技の複雑さ、ベクターからのアンチセンス RNA の発現量のコントロールの困難さ、細胞内の RNA-RNA ハイブリッドの巻き戻し活性などのため、最近では、アンチセンス-オリゴヌクレオチド法 (アンチセンス DNA) も多く用いられている。理由は、オリゴヌクレオチドは簡単にかつ多量に人工合成でき、培養細胞の場合、培地に加えるだけで細胞膜を通過し、効率よく導入可能であることによる。

作用原理は、培地に添加または直接微量注入 (マイクロインジェクション) して導入されたアンチセンス DNA のうち、細胞のヌクレアーゼ活性を逃れた分子が標的 mRNA とハイブリッドを形成し、翻訳を抑制することによる。その他、実験系により、内在性のリボヌクレアーゼ H 活性による DNA-RNA ハイブリッドの mRNA の標的部位の分解も関与する。実験に使用する DNA は、一般に翻訳開始部位を含めて合成する。これは、リボソームの転位の阻害を目的とする。近年、オリゴヌクレオチドの安定性、細胞内への透過性を向上させる目的で、DNA のリン酸の酸素をメチル基やイオウに置換したもの、DNA の 5' 末端あるいは 3' 末端を修飾したものなどの修飾オリゴヌクレオチドの使用も報告されている。→顕微操作

遺伝子 gene

遺伝情報をになう実体物質。一般に DNA であるが、一部のウイルスでは RNA である。アミノ酸に翻訳されるコード領域と、領域内部のイントロンと、5' 上流および 3' 下流で mRNA に転写される部分の全範囲を含む。この範囲外の部分でも、ある領域の転写の実行や能率にかかわる部分は、遺伝子の一部と考えるべきである。

遺伝子ライブラリー gene library

ある生物の全ゲノム DNA を制限酵素や、超音波により断片化し、ベクターに挿入した組換え DNA の集団。遺伝子ライブラリーにはゲノムライブラリー

(genomic DNA library) と cDNA ライブラリー (cDNA library) がある。これらがライブラリーとよばれるのはゲノム全体の領域をカバーすることが前提となっていることによる。

ベクター DNA にはファージ、コスミドまたは YAC (ヤック) ベクターがよく用いられる。

ゲノムライブラリーは遺伝子のエキソン、イントロンの構成や、プロモーター、エンハンサーなどの発現調節にかかわる領域の解析などに用いられる。

特定の生体組織において発現している遺伝子の組換え DNA の集団は cDNA ライブラリーと

して得られる。cDNA ライブラリーは mRNA から逆転写酵素により相補的 DNA (cDNA) を作り、これをベクターに挿入してクローン化する。

遺伝子治療 gene therapy 【遺伝子療法】

代謝異常症などの遺伝疾患は、特定の遺伝子の突然変異によって起こる。この遺伝疾患の治療には、薬物投与や酵素蛋白の補充などの方法もあるが、原理的に最も有効な方法は、細胞に正常な遺伝子を移植し、欠損を克服することが考えられる。胚への遺伝子導入が最も有効と思われるが、ヒトの遺伝疾患を考慮した場合、体細胞への遺伝子導入が現実的である。遺伝子産物が血中に分泌されるような場合には、遺伝子導入する体細胞は、線維芽細胞、血管内皮細胞、肝細胞、神経細胞、筋肉細胞などでもよいが、継続的な発現を考えると、造血幹細胞などの分化・増殖が拡大再生産される細胞が望ましい。

遺伝子導入は、採取した数少ない細胞に行うので、効率の高いウイルスベクターが最も適しており、レトロウイルスを改良したベクターの開発が行われ、ウイルスを生産せず、細胞へ効率よく遺伝子導入できるようになっている。また単純ヘルペスウイルスなどを改良したベクターも特定の細胞を目的として利用可能である。

これまで、マウス、サルなどを実験動物として研究が重ねられ、現在ヒトを対象として遺伝子治療が開始されている。例えば、米国の NIH (National Institute of Health) で免疫不全を起こすアデノシンデアミナーゼ欠損症の患者に造血幹細胞を用いた遺伝子治療が行われ、有効であるとの報告がなされた。また、癌の免疫療法において、リンパ球にマーカー遺伝子を導入して戻し、治療成績を追跡するような研究も行われている。

現在ヒトの遺伝子治療は、上に述べたようなきわめて限られた場合につき、米国を中心として行われているが、今後基礎研究が進めば、より広範な遺伝疾患や特定疾患に利用されていくものと思われる。

また、造血幹細胞を用いなくても、分裂をそれほどしない体細胞を用いた遺伝子治療も動物実験では、かなり長期的に有効であることが確認されつつある。

鋳型 template

生体高分子の合成の際、単位の配列を指定する基準配列を鋳型とよぶ。具体的な例としては、核酸合成（新たに合成される DNA 鎖または mRNA 鎖が、既存 DNA 鎖の塩基配列を鋳型とする）の場合があるのみで、タンパク質が既存タンパク質のアミノ酸配列を鋳型とするような例は知られていない。抗体生成の機構として、古く L. C. Pauling は鋳型説を唱えたが、誤りであった。

ATP (adenosine 5' -triphosphate) 【アデノシン 5' -三リン酸】

分子量 507.18、構造式は以下のとおり。

アデノシンのリボースの 5' 位のヒドロキシル基 (-OH 基) にリン酸が 3 分子結合したヌクレオチド。あらゆる組織、細胞に存在する。RNA 合成の直接の前駆体であるばかりでなく、生体内のエネルギー伝達体 (蓄積と供給) として働いている。1 分子中に高エネルギーリン酸結合を 2 個含み、ATP の加水分解により、ADP (アデノシン 5' -二リン酸) とリン酸を生む中性下の反応では、約 7 kcal の自由エネルギーを生じる。この大きなエネルギーを使って、高分子合成など生体内での多くの反応が営まれている。

ATP は、①酸化リン酸化、②光リン酸化、③基準レベルリン酸化 (解糖系) によって産生される。ATP の合成系には、de novo および、サルベージ経路 (核酸の分解や消化によって生じたピリミジン塩基を利用する) が存在する。ATP の合成には、GTP のエネルギーを必要とし、逆に GTP の合成には、ATP のエネルギーを必要とする。それぞれの合成系での代謝物が、別の代謝経路での生産を制御するシステムは、1 つの代謝物が、それ自身をフィードバックするシステムとは異なる交差制御のモデルとなっている。

ATP からエネルギーを引き出す反応として、ATP の ADP と Pi への分解、さらに ADP の AMP (アデノシン一リン酸) と Pi への分解がある。

ATP→ADP+Pi で生じるエネルギーを利用する例としては、糖代謝の中間生成物である各種リン酸化合物の生成にみられるような、多くの生体内での反応、特に大きなエネルギーを必要とする筋肉の収縮、細胞膜での能動輸送、生物発光、タンパク質の成熟・輸送過程におけるシャペロンとの解離などである。ADP→AMP+Pi を利用する例としては、アミノ酸や脂肪酸の活性化、補酵素 (NAD など)、cAMP の生合成で観察される。このように ATP は、細胞内のエネルギー供給源として重要な役割をになっている。

SDS (sodium dodecyl sulfate) 【ドデシル硫酸ナトリウム ; ラウリル硫酸ナトリウム sodium lauryl sulfate】

長鎖アルキル基をもつ陰イオン性界面活性剤の一種で、不溶性、難溶性の膜タンパク質などの可溶化に用いられる。また強力なタンパク質変性能や、タンパク質複合体を構成サブユニットに解離させる作用もある。

SDS 共存下で行う SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) はタンパク質の分子量を簡便に再現性よく測定できるので頻繁に利用される。

→ポリアクリルアミド電気泳動法

液体クロマトグラフィー liquid chromatography

クロマトグラフィーの原型。クロマトグラフィーは固定相と移動相への親和性の違い (分

配係数)を利用して試料を分離する方法であるが、そのうち、固定相が液体であるものを液体クロマトグラフィーという。固定相粒子を微細、均一にし、カラム全体をシステム化した高速液体クロマトグラフィーが生化学と分子生物学の分野で常用されている。

ELISA (エライザ) enzyme-linked immunosorbent assay ; enzyme immunoassay

【エリサ】

酵素免疫測定法、あるいは酵素免疫定量法ともいわれる。抗原抗体反応を利用して特定の物質の量を測定する方法で、生化学的検査などで非常によく用いられる。アイソトープを用いたラジオイムノアッセイ (RIA) とは異なり、アイソトープの代わりに酵素を標識として用いる。RIA と比べ、同等あるいはそれ以上の高感度が得られる。さまざまな変法が開発されている。同一の抗原を認識するが、異なる2つのエピトープを認識する2種類の抗体を利用して、第一抗体により固相化された抗原の量を標識第二抗体を用いて測定する方法をサンドイッチ ELISA という。

エキソサイトーシス exocytosis

細胞内から何らかの物質が細胞膜の開口により外界に放出される過程をいう。細胞内から細胞外への膜動輸送。細胞膜を通過しえないタンパク質などの高分子化合物およびさまざまな低分子化合物がエキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。放出される物質は細胞内で分泌顆粒に取り込まれて存在し、分泌顆粒は細胞の内側から細胞形質膜に接着・融合した後に細胞外に開口して内容物が放出される。細胞内から細胞膜近傍までの分泌顆粒の輸送・接着・融合、および開口の各過程にはアクチンを構成成分とするマイクロフィラメントおよびチューブリンを構成成分とする微小管と、それらを制御するさまざまな細胞骨格関連タンパク質の働きが重要な役割をになっている。少なくともその一部は、さまざまな細胞刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇と、それに伴うタンパク質のリン酸化の亢進によっていると考えられている。

エキソサイトーシスの活性は、細胞の増殖・運動活性や細胞膜の流動性、細胞骨格の状態に大きく左右されるが、特に神経終末での神経細胞の興奮の際の神経伝達物質の放出が研究されている。

エンドサイトーシス endocytosis 【飲食作用】

細胞がその外液から、細胞形質膜の陥入による小胞を介して種々の物質を取り込む膜動

輸送。陥入した膜に取り囲まれた小胞をエンドソーム (endosome) とよぶ。エンドソームはやがてリソソームと融合し、リソソーム中に含まれるさまざまな分解酵素によって内容物が処理される。一部のエンドソームとは再び細胞表面に移動して細胞膜と融合し、レセプターや膜成分が再利用される。取り込まれる物質が比較的大きな ($1 \mu\text{m}$ 以上) 固体粒子の場合をファゴサイトーシス (〔食〕食作用)、液体の場合をピノサイトーシス (〔食〕飲作用) として区別する。この場合、それぞれの作用で取り込まれた小胞を、それぞれファゴソーム (phagosome) およびピノソーム (pinosome) とよぶ。ファゴサイトーシスは白血球やマクロファージなどの特殊な細胞 (ファゴサイト) にのみみられる。これらの作用はエネルギー依存的であり、細胞の増殖・運動、細胞膜の流動性、細胞骨格の状態に大きく左右される。また、細胞膜表面に取り込まれる物質に対する特異的なレセプターが存在する場合もあり、その場合には細胞膜がクラスリン被覆小胞としてレセプターごと細胞内に陥入して取り込みが行われる。やがてクラスリンはクラスリンアンコーティング ATP アーゼ (HSC70 と同一である) の作用によつてはずれ、エンドソームとなる。

オリゴdT oligo dT

チミジンの重合体で、真核細胞の mRNA の精製や相補的 DNA (cDNA) の作成に利用されている。真核細胞の mRNA の 3' 末端にはポリ A 構造があるために、これと相補的に結合するチミンの重合体 (オリゴ dT) を担体に結合したカラム (オリゴ dT カラム) に、細胞から抽出した RNA を流すと、ポリ A をもたない rRNA や tRNA はすり抜け、タンパク質に翻訳される mRNA のみがトラップされる。mRNA は低塩濃度液でカラムから溶出させて精製する。

この mRNA より cDNA を作成する際も、オリゴ dT のプライマーを mRNA の 3' 末端に付着させ、部分的に二重鎖を作ってから逆転写酵素を用いて DNA 合成反応を行う。

ガングリオシド ganglioside

スフィンゴ糖脂質のうち、シアル酸をもつものの総称。糖脂質は糖鎖と脂質で構成される。動物細胞では脂質部分がセラミド (ceramide) よりなるものが主成分である。セラミドは長鎖の塩基であるスフィンゴシン (sphingosine) のアミノ基に脂肪酸が酸アミド結合したものである。したがって、ガングリオシドはセラミドとシアル酸を含む糖鎖よりなるといえる。セラミド部分が脂質膜二重層に糖鎖をアンカーする役割をになうことになる。他の糖脂質同様、ガングリオシド糖鎖はゴルジ体で糖転移酵素の関与により糖鎖が生合成され、細胞膜では細胞の外側に向かって分布する。このような特徴からガングリオシドは細胞・細胞間あるいは細胞・基質間の認識に関与することが考えられている。

もともとガングリオシドはE. Klenkにより、ヒト脳から分離されたシアル酸含有糖脂質に対して与えられた名である。神経細胞で含量が高いことから、神経機能に密接にかかわる分子と考えられている。ある種の神経芽腫培養細胞にGQ1bガングリオシドを添加すると、神経突起の伸長がみられる。性質の異なるシナプスには糖鎖の異なる特異的なガングリオシドが存在する。神経系以外の細胞にも存在し、100種を越える異なる糖鎖構造のガングリオシドが知られている。EGF（上皮増殖因子）によるEGFレセプターのリン酸化はG_{M3}ガングリオシドにより抑制される。ガングリオシドは細菌毒素、ウイルスのレセプターとなることなどが報告されている。なかでもコレラ毒素のBサブユニットはG_{M1}ガングリオシドと特異的に結合する。細胞が癌化するとガングリオシドの糖鎖に変化が起こり、メラノーマではG_{M3}、G_{M2}、G_{D3}ガングリオシドが癌関連抗原となることが示されている。E-セレクトリン（ELAM-1）はシアリルLe^xあるいはシアリルLe^a糖鎖構造を認識するとされているが、両糖鎖構造はガングリオシドとして、あるいは糖タンパク糖鎖として存在している。

界面活性剤 detergent

界面活性作用すなわち界面の諸性質をもつ一群の物質。化学構造的に、分子内に親水性原子団および疎水性原子団をもつ両親媒性物質である。水に溶けている界面活性剤は低濃度でも疎水性原子団は水に排除される傾向にあり、界面に移行し系を安定化する。空気は疎水的であり、界面活性剤が界面に配向、吸着すると、自由エネルギーの小さい疎水性原子団が自由エネルギーの大きい水分子に置き換わり表面の張力が低下する。界面活性剤の親水性原子団、疎水性原子団にはさまざまなものがあり、多様な種類の界面活性剤が存在する。親水性原子団の親水性と疎水性原子団の疎水性のバランスを親水性-疎水性バランスという。これが大きいほど可溶性も大きい。

界面活性剤は化学構造、主に親水基の種類によって分類されることがある。

水に溶解したときに、イオンに解離するものをイオン性界面活性剤、イオンに解離しないものを非イオン性界面活性剤とよぶ。イオン性界面活性剤は解離する際の電荷によって陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤に分類される。天然に存在する脂質の多くは界面活性作用をもち、リン脂質は両性あるいは、陰イオン性界面活性剤としても作用する。生体膜に多量に存在する疎水性原子団を2つもつリン脂質では可溶化力は小さいが、疎水性原子団のうち一方の脂肪酸が切れて生じたリゾリン脂質は可溶化力が強い。人体において肺胞の水-空気の界面にはジパルミトイルレシチンなどのリン脂質が大量に存在し、界面活性作用によって表面張力を低下させて肺胞がうまくふくらむのを助けている。

環状AMP cyclic AMP (cAMP) 【サイクリックAMP】

化学式 $C_{10}H_{12}N_5O_6P$ 、分子量 329.21。cAMPは、アドレナリンやグルカゴンなどの血糖上昇ホルモンが肝臓におけるグリコーゲンホスホリラーゼの活性化に作用する際の、細胞内セカンドメッセンジャーとして発見された。さらに、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、上皮小体(副甲状腺)ホルモン(PTH)、黄体形成ホルモン(LH)、プロスタグランジン、ドパミンやバソプレシンなどの多くの生理活性物質が作用する際、細胞内セカンドメッセンジャーとなっていることが明らかにされている。

cAMPは、種々の生理活性物質が細胞膜のレセプターへ作用する際に、Gタンパク質を介して細胞膜のアデニル酸シクラーゼによってATPから合成され、ホスホジエステラーゼによってAMPに分解される。cAMPは、細胞内のcAMP依存性プロテインキナーゼを活性化させ、種々の酵素の活性調節、酵素の誘導、イオンチャンネルの調節、ホルモンの産生・分泌、筋細胞の収縮・弛緩、細胞の増殖・分化の調節など多岐にわたる細胞機能の変化、調節に関与している。

cAMP依存性プロテインキナーゼは、2個の触媒サブユニットと2個の調節サブユニットよりなる四量体で、調節サブユニットに1分子当たり2分子のcAMPが結合すると、触媒サブユニットが遊離して基質タンパク質のセリンやトレオニン残基をリン酸化する。

CAT (キヤット) アッセイ CAT (chloramphenicol acetyltransferase) assay

CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ) 遺伝子をレポーター遺伝子として用いたプロモーターの転写活性測定法。転写を活性化、あるいは抑制するプロモーター上の塩基配列を検索する目的でよく利用されている。簡便で感度が良く、再現性が高いため広く用いられているが、最近では、ルシフェラーゼアッセイや成長ホルモンアッセイも同様に利用されている。

方法としては、転写活性を測定したいプロモーターを、CAT 遺伝子の上流に接続したプラスミドを作成し、動物細胞にリン酸カルシウム法やDEAE デキストラン法を用いて導入する。安定形質転換体を得た後に、CAT 活性を測定することもあるが、通常一過性の発現を検出するため、48~72時間培養した後に細胞を破碎し、その細胞抽出液にアセチル CoA とクロラムフェニコールを加えて

反応させる。反応液を薄層クロマトグラフィーを用いて解析すると、1位あるいは3位がアセチル化されたモノアセチルクロラムフェニコールが検出され、CAT 活性が強い場合は1、3-ジアセチルクロラムフェニコールも検出される。

また、アセチル CoA のかわりにブチリル CoA を用い、液体シンチレーションカクテルの中で反応させる方法も利用されている。ブチリル化したクロラムフェニコールは速やかに

液体シンチレーションカクテルへ拡散するため、そのまま CAT 活性を測定できる。この方法を用いると反応を行いながら継続的に活性を測定できるので、迅速に定量的なデータを得ることができる。このようにして測定した CAT の酵素活性をプロモーターの転写活性とする。

キナーゼ kinase 【ホスホトランスフェラーゼ phosphotransferase】

ヌクレオチドなどのリン酸基を水以外の化合物に転移し、リン酸化合物を生成する反応を触媒する酵素の総称。EC2.7 群のリン酸転移酵素に分類される。リン酸の供与体は大部分の場合 ATP であるが、その他にホスホエノールピルビン酸、ホスホクレアチンリン酸、1, 3-ビスホスホグリセリン酸も知られている。一方、リン酸のレセプターは糖、核酸、タンパク質、リン脂質などの場合がある。キナーゼによるリン酸化反応には Mg^{2+} や Mn^{2+} のような金属イオンが必要とされるが、リン酸レセプターに対する特異性によって異なり、特異性がきわめて高いものから多数の基質を有するものまで幅広い。また、キナーゼの活性調節は、リン酸化反応生成物や調節因子によるアロステリック効果、セカンドメッセンジャーによる活性化、キナーゼ自身のリン酸化などによって行われる。特にキナーゼのリン酸化はカスケード (cascade : 連続的に反応が起こること) をなすことによって、情報を増殖させ、高次の情報伝達網を形成する。例えば、インスリンや EGF (上皮増殖因子) などの一部のホルモンや増殖因子のレセプターは、その細胞質内側のドメインが、タンパク質のチロシンをリン酸化するチロシンキナーゼである。このチロシンキナーゼは細胞外からの刺激に応じて活性化し、直接あるいは間接的にさまざまなリン酸化反応を引き起こすものと考えられる。このようにキナーゼはリン酸化反応を通して、代謝、増殖、分化、情報伝達、運動などの多彩な細胞機能の調節をになっている。

偽遺伝子 pseudogene

既知の遺伝子 DNA と相同性をもち、タンパク質や RNA をコードする機能を失った DNA 領域。哺乳類ではヘモグロビン遺伝子をはじめとして多数の例が見つかっている。遺伝子としての機能を失っていることから dead gene (死亡遺伝子) ともよばれる。機能的な遺伝子が重複して生じたコピー遺伝子に終止コドンやフレームシフトなどを生じる突然変異や、mRNA の安定性を壊すような変異が起こることにより生ずると考えられる。遺伝子の情報がいったん mRNA に転写されたあと、再び DNA に逆転写されてゲノム中に入り込んだとみられるタイプの偽遺伝子も存在する。偽遺伝子は遺伝子としては機能しないが、他の遺伝子の発現制御や組換えに何らかのかかわりをもつ可能性も否定されていない。偽遺伝子の特徴は進化に伴う変異速度が非常に大きく突然変異の率とほぼ近いと推定されることで、遺伝子の変異速度のなかでは最大で、適応・選択による進化とは明らかに異なっている。

逆転写酵素 reverse transcriptase 【RNA依存性DNAポリメラーゼ RNA dependent DNA polymerase】

一本鎖 RNA を鋳型にして相補的な塩基配列をもつ DNA に逆転写する酵素。普通の転写は DNA を鋳型として RNA を合成する。1970 年に H. M, Temin らがラウス肉腫ウイルスから、D. Baltimore がマウス白血病ウイルスからそれぞれ独立に発見した酵素である。それ以来、逆転写酵素をもつ RNA ウイルスをレトロウイルスとよぶようになった。レトロウイルスの RNA は逆転写酵素によって cDNA を合成して RNA-DNA ハイブリッドを形成する。このハイブリッド（雑種分子）は、逆転写酵素の C 末端側にあるリボヌクレアーゼ H 活性によって RNA が加水分解を受ける。さらに逆転写酵素は一本鎖 DNA を鋳型にして相補的 DNA を合成する酵素活性ももつため、RNA-DNA ハイブリッドを二本鎖 DNA に変えることができる。でき上がったレトロウイルスの二本鎖 DNA は同時に転写・翻訳された逆転写酵素の遺伝子の下流にあるインテグラーゼにより、宿主の DNA に組み込まれてプロウイルスとなる。逆転写酵素の発見は DNA→RNA→タンパク質の遺伝情報の伝達の一方通行というセントラルドグマを修正した点で重要である。この酵素はレトロウイルスだけに存在すると考えられていたが、その後広く生物界にレトロトランスポゾン (retrotransposon) のかたちで存在していることがわかった。

本酵素は遺伝子工学では mRNA から cDNA の作成や逆転写 PCR など利用されている。医学ではエイズの治療に逆転写酵素の活性を阻害するアジドチミジン (AZT) が使用されている。その他ジデオキシイノシン (DDI)、やジデオキシシトシン (DDC) も同様の効果がある。こうした薬剤に耐性をもつのは、使用中に逆転写酵素が変異するためと考えられている。

グルココルチコイド glucocorticoid 【糖質コルチコイド】

副腎皮質ホルモンの中で、糖質代謝に関与するステロイドホルモンおよびその誘導体の総称。コルチゾール、コルチゾン、ブレドニゾロンやデキサメタゾンなどがある。末梢臓器ではタンパク質異化作用があり、肝臓では糖新生およびグリコーゲン貯蔵の促進作用がある。抗炎症作用と免疫抑制作用があり、医薬品として多用される。

グルココルチコイドは細胞質内のグルココルチコイドレセプターに結合し、核内に移行して特定の遺伝子を活性化し、リポコルチンの合成を誘導し、作用を発揮する。リポコルチンにはホスホリパーゼ A₂ 抑制作用があり、そのためアラキドン酸の供給が減少し、プロスタグランジン系とロイコトリエン系の両方の代謝産物の生成を抑制する。また培養肝細胞に作用して、糖新生に間接的に関与するチロシンアミノトランスフェラーゼの誘導を行

うことが知られている。

グルココルチコイド類は、原発性副腎機能低下症、続発性副腎機能低下症、膠原病、慢性関節リウマチ、呼吸器疾患、消化器疾患、腎疾患、神経・筋疾患、血液疾患、アレルギー、内分泌疾患、悪性腫瘍に対して用いられる。また全身性の副作用を避けるために、炎症局所へのターゲティング療法や局所親和性の強化を志向したものも開発されている。
→コルチコステロイド

クローニングベクター cloning vector 【クローニングビークルcloning vehicle】

いかなる生物種の遺伝子も任意の生物内で自律複製可能な DNA 分子に挿入することによって、その生物内で均一なものとして増幅、すなわちクローニングすることができる。このときの DNA 分子をクローニングベクターあるいはクローニングビークルとよぶ。一般的には、挿入した DNA の安定性、宿主として理想的な性質をもつ変異株の存在、取り扱いの容易さ、周辺技術の膨大な蓄積があることから、大腸菌が宿主として最も好まれる。したがってクローニングベクターには、導入された菌のみ選定的に増殖させるためのマーカー遺伝子（薬剤耐性遺伝子など）と外来遺伝子を挿入するための制限酵素認識部位を組み入れた改変プラスミドやファージが使用されている。一方、長大な動物細胞のゲノムのクローニングには、酵母を宿主とした YAC（酵母人工染色体）がベクターとして開発されている。

また、ハイブリダイゼーションによるクローニングのための遺伝子プローブが使えないような際には、大腸菌などの宿主内で外来遺伝子を発現させることによって目的の遺伝子を単離する（発現クローニング）ベクターが広く用いられている。

クロマトグラフィーの原型。

クロマトグラフィーは固定相と移動相への親和性の違い（分配係数）を利用して試料を分離する方法であるが、そのうち、固定相が液体であるものを液体クロマトグラフィーという。固定相粒子を微細、均一にし、カラム全体をシステム化した高速液体クロマトグラフィーが生化学と分子生物学の分野で常用されている。

クローニング cloning [クローン化]

①DNA 組換え技術で、特定配列をもつ細菌などの細胞を検出し、単離して別個の系統として増殖させること。②ある一定の細胞集団の中から 1 個の細胞に由来する均一な細胞だけを分離・増殖させること。

COS (コス) 細胞COS cell

アフリカミドリザルの腎臓由来の培養細胞 CV-1 に複製起点 (ori) 欠損 SV40 変異株を

感染させトランスフォームした細胞。人工的に遺伝子を導入して一過性の外来遺伝子発現を起こさせるのに頻用される。この細胞はSV40のT抗原(T antigen, 腫瘍抗原)を発現するとともに、SV40の複製起点を含むプラスミドの複製に必要な細胞性要素をすべてもっている。したがって、特定の遺伝子が発現させたいときには、導入目的の遺伝子(cDNA)をSV40初期プロモーターの下流に連結した組換えDNAを作成し、これをCOS細胞に遺伝子導入する。導入遺伝子は増幅、発現するが、組換え体が細胞内に一定以上蓄積すると細胞死が起こり、導入された遺伝子の発現が永続することはない。このために一過性の遺伝子発現しか起こらない。

コンセンサス配列 consensus sequence [共通配列]

核酸の短い配列、ことに転写調節に関する上流部分を数種のもので比較し、共通点を選び出したモデル配列をいう。

転写調節因子のコンセンサス配列には、タンパク質一次構造上のアミノ酸配列および結合部位のDNA塩基配列の2種類がある。前者に関しては、多くの転写調節因子の一次構造が決定され、あるものは共通のアミノ酸配列をもつことが明らかにされている。代表的な例としては、ロイシンジッパー、ヘリックスループヘリックス、ジンクフィンガー、ホメオドメイン、POUドメインなどの構造があげられる。

結合部位のコンセンサス配列については各々の転写調節因子について精力的に決められているが、いずれの場合にも絶対的なコンセンサス配列というものはなく、かなり変異をした配列にも結合可能なようである。代表的なものを表にまとめた。例えば、Sp1はGCボックス(GGGCGG)に結合する転写調節因子であるが、最近の研究では他の配列にも結合することがわかり、現在ではそのコンセンサス配列はむしろ ${}^G T^G A G G C G^G T^G A^G A^C T$ となっている。しかし、このコンセンサス配列があれば必ずSp1が結合するわけではなく、周辺の配列の影響も受けていると考えられている。また、1つのコンセンサス配列に複数の転写調節因子が結合し、異なった転写活性を示す例が知られている。極端な場合としては、インターフェロン(INF)遺伝子のプロモーターに存在するAAGTGAモチーフがある。この部位には転写を亢進させるIRF-1と抑制的に作用するIRF-2とが結合する。どちらの因子が優位に結合するかでこのモチーフは正および負の制御を行うことが可能である。このように1つのコンセンサス配列によって多彩な転写調節が行われている。

コンセンサス配列 (表)

転写調節因子	コンセンサス配列	機能・特徴
AP1	TGAGTCA	Jun と Fos とのヘテロダイマー。TPA 反応領域に結合して転写を亢進させる。ロイシンジッパーをもつ。
CREB	TGACGTCA	Aキナーゼによるリン酸化をうける

		と、cAMP 反応領域に結合して転写を亢進させる。ATF-1 と同一物質。ロイシンジッパーをもつ。
CTF/NFI	TGGCTN ₃ AGCCAA	種々のプロモーターに存在する CCAAT ボックスに結合して転写を活性化する。
Oct, OTF	ATTGTCAT	Oct1 は種々の細胞に存在。Oct2 はリンパ系細胞に存在。Oct3 は未分化な EC 細胞で発現しているが、分化誘導で減少する。いずれも POU ドメインをもつ。
Pit1	^A _T TAT ^T _C CAT	脳下垂体に特異的な転写促進因子で成長ホルモン遺伝子の発現を亢進する。POU ドメインをもつ。
Spl	GGGCGG	GC ボックスに結合して転写を亢進する。GC ボックスは TATA ボックスをもたないプロモーターに多い。ジンクフィンガーをもつ。
C/EBP	CCAAT TGTGG ^{A A A} _{T T T} G	CCAAT ボックスやエンハンサーに結合する。肝細胞や脂肪細胞に多く、それらの分化に関与。ロイシンジッパーをもつ。
MyoD	CACCTG	筋肉分化を引き起こす転写因子。ヘリックスループヘリックスをもつ。
TFIID	TATA ^T _A A	TATA ボックスに結合して転写開始複合体を形成する。アダプターを介して種々の転写調節因子と関係している。
IRF-1, IRF-2	AAGTGA	インターフェロン遺伝子のプロモーターの AAGTGA モチーフに結合する。IRF-1 は促進因子で、IRF-2 は抑制因子である

G418

アミノ糖またはアミノシクリトールを含むアミノグリコシド抗生物質の1つ。塩基性でよく水に溶ける。Streptomyces fradiase によって生産されるネオマイシンの類縁体で、80S リボソームに作用して真核生物のタンパク質合成を阻害する働きがあり、動物細胞に作用して細胞を殺す。一般には、遺伝子操作において薬剤耐性マーカーとしてネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子を用い、トランスフェクションした目的の遺伝子が恒常的に発現している動物細胞を単離する際、その形質転換細胞を選択する過程で培地中に投与されることが多い。その際、G418 の至適濃度や選択時間、形質転換細胞単離の効率・頻度は、遺伝子

を導入される宿主となる細胞の種類によってかなりの幅がある。→ネオマイシン耐性遺伝子

シャペロン chaperone [分子シャペロン molecular chaperone]

ヌクレオソームの形成には、ヒストンにヌクレオプラスミン (nucleoplasmin) が一過性に結合して、その正しい会合 (assembly) を助けていると考えられているが、シャペロンという名称は、このヌクレオプラスミンの働きを指してはじめて用いられた。もともとシャペロンという言葉は、社交界にデビューする若い貴婦人を介添えする役割の婦人を指すが、この言葉がよく用いられるようになったのは、R. J. Ellis らがストレスタンパク質の機能を説明するために用いてからである。分子シャペロンといわれることも多い。Ellis らの定義によれば、シャペロンとは、①未成熟のポリペプチドに一過性に結合し、その folding (折り畳み) や unfolding (ほどけ) を助けた後、②完成成熟したタンパク質からは解離してしまうものということになる。

ストレスタンパク質にはいくつかのファミリーが存在するが、そのうちでシャペロンとしての働きがよく研究されているものに、HSP70 ファミリーと GroEL ファミリーがある。これらは、個々のタンパク質としてシャペロン機能をもっているが、これら2つのファミリータンパク質が協働している例として、ミトコンドリアへのタンパク質膜輸送の例を示す (図)。ミトコンドリアで働くタンパク質の多くは、細胞質で作られてからミトコンドリア内へ輸送される。ポリソームで作られたポリペプチドには、合成直後から細胞質に存在する HSP70 が結合して、新生 (nascent) ポリペプチドを unfold 状態に保持する (a)。ミトコンドリアに局在するタンパク質のもっている移行シグナルによって、ミトコンドリア膜にアンカーされたポリペプチドは、外膜と内膜との接する部分から内部へ移行し (b)、この時移行シグナルはシグナルペプチダーゼによって切断される (c)。侵入してきたポリペプチドには今度はミトコンドリア内に存在する HSP70 (酵母の場合は SSC1) が結合 (d)、同様に folding を抑えつつ、細胞質側では、ATP 依存的に細胞質 HSP70 が解離する (e)。ポリペプチドは folding を抑えられたまま、次にミトコンドリア内の別のストレスタンパク質 HSP60 (大腸菌 GroEL の相同染色体) に受け渡され (g)、同時に HSP70 (SSC1) は解離する (f)。HSP60 は、ATP 依存的にポリペプチドを解離しながら folding を促進する。

このようにストレスタンパク質は、分子シャペロンとしてタンパク質の folding を介助してその成熟を助けたり、変性タンパク質の再生 (renaturation) を行ったり、ある場合には上にみたように膜輸送をつかさどったりしている。HSP70 や GroEL ファミリータンパク質は、基質特異性をもたないシャペロンであるが、最近、コラーゲンに結合特異性をもって、プロコラーゲンの小胞体内でのプロセッシングに関係している HSP47 のような、基質特異的シャペロンの存在も知られるようになってきた。GroEL ファミリータンパク質を特別にシャペロニン (chaperonine) とよぶことが多い。

ステロイドホルモンレセプター (受容体) steroid receptor (SHR)

ステロイドホルモンのレセプター。グルココルチコイドやプロゲステロンなどのステロイドホルモンは、細胞内に存在するそれぞれのステロイドに特異的なレセプターに結合してその生理作用を発揮する。ステロイドは一般に脂溶性が高く、容易に細胞膜を通り抜けて細胞内に到達する。そのため、レセプターは細胞質あるいは細胞核内に存在して、ステロイドは細胞の中でレセプターに結合する。ステロイドホルモンおよび関連物質のレセプターの一次構造がこれまでに次々と明らかにされ、互いに相同性の高いスーパーファミリーを形成していることが知られている。このファミリーの中にはグルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、プロゲステロン、アンドロゲン、エストロゲンなどのいわゆるステロイドホルモンに対するレセプターに加えて、甲状腺ホルモンや形態形成因子の1つであるレチノイド、レチノイン酸（ビタミンA群化合物）やビタミンDに対するレセプター、芳香族炭化水素のレセプターであるダイオキシシンレセプター、昆虫の変態を支配するエクジソン（エクダイソン）のレセプターなども含まれる。また、ステロイドレセプターファミリーに含まれていながら、リガンドが同定されていないレセプターも存在する。ステロイドレセプタースーパーファミリータンパク質はいずれもN末端にリガンド結合部位をもち、C末端にDNA結合部位をもち、転写調節因子である。リガンドを結合後DNA結合活性を獲得したレセプターは、それぞれ特異的な配列をもちホルモン反応要素（HRE：hormone response element）に結合して、他の転写因子と相互作用しつつ標的遺伝子の転写の活性化・不活性化をつかさどる（図）。グルココルチコイドレセプターなどいくつかのステロイドレセプターはストレスタンパク質（熱ショックタンパク質；HSP90）と細胞内で複合体を形成して存在し、レセプターの活性や局在が制御されている（図）。また、ナチュラルリガンド以外に、レセプターに結合してレセプターの活性化を引き起こすアゴニストや逆にレセプターに結合してレセプターの活性化を阻害するアンタゴニストが多数開発され、いずれも医薬品として重要である。

ストレスタンパク質 stress protein [熱ショックタンパク質heat shock protein (HSP)]

従来、熱ショックタンパク質とよばれてきた従来、熱ショックタンパク質とよばれてきた一群のタンパク質で、大腸菌からヒトに至るすべての生物に存在し、種を越えて非常によく保存されたタンパク質である。その誘導は、熱ショックのみならず生命の存続に危険な状態（低酸素状態、重金属、アルコール、ウイルス感染など）によっても生じることからストレスタンパク質とよばれるようになった。ストレスタンパク質はSRPと略されることもあるが、多くの場合従来の慣習に従い、HSPと略される。

(以下略)

性決定遺伝子sex determining gene

人間やマウスではY染色体上に精巣（睾丸）決定因子（TDF：testis-determining factor）の遺伝子がある。またY染色体上には、突然変異によってXY個体の女性への性転換をもたらす遺伝子（SRY）があり、これがTDFそのものであって、男性化決定に基本的に重要な性決定遺伝子と考えられる。しかし性の確実な決定には遺伝子の複雑な相互作用が必要であるとも考えられている。線虫（*Caenorhabditis elegans*）では、her（両生化）、fem（雌化）、tra（転換因子）など数個の性決定遺伝子がつきとめられている。

相同遺伝子組換え homologous recombination

細胞の染色体上の内在遺伝子と塩基配列上の高い相同性をもつ遺伝子ベクターを導入すると、ある確率でベクターが染色体の相同な部分と組換えを起こし外来遺伝子が入り込む場合がある。これを相同遺伝子組換えとよぶ。この現象を利用すると、従来の細胞や受精卵への非相同的組換えによるランダムな染色体部位への遺伝子導入と違い、染色体上の目的の部位に外来遺伝子ベクターを導入することができる。ただし、相同組換えは酵母などでは高い確率で起こるが、動物細胞で相同遺伝子組換えが起こる確率は、導入された外来遺伝子の染色体への組み込み全体の $10^3 \sim 10^5$ 回に1回である。したがって、大多数の非相同的な組換えの中から相同組換えを起こしたものを選別しなければならない。そこで、培養下で多数の細胞として扱って、しかも選別した後に動物個体を再構築する能力のある胚幹（EC）細胞が利用される。

相同遺伝子組換えが起こった場合に、その遺伝子の機能が壊れること自体を使って培養下で細胞を選別できる場合、例えばX染色体上に位置するHPRT遺伝子のような場合は特別な選択方法を遺伝子ベクターに組み込まなくとも、目的とする胚幹細胞コロニーの選別が可能である。しかし、一般には改変される遺伝子自体によって相同組換えを起こした細胞の選別を行うことはできないので、前頁の表と図の①～④に示すように4種類の方法が今までに考察された。最も単純なのは選別マーカー遺伝子なし（①）で、PCR法のプライマーに使う部分の塩基配列のみが内在の遺伝子と異なった遺伝子ベクターを細胞に導入して、多数の細胞をまとめてPCR法によって検定して、相同組換えを起こした細胞クローンを見つける方法である。この場合は遺伝子を組み込んだ細胞を選びだす選択さえも行わないので、遺伝子の組み込みを非常に高い率で起こす必要があり、細胞への遺伝子導入には細胞核への顕微注入法が使われた。逆に最も複雑なのは、選別用遺伝子としてネマイシン（G418）耐性遺伝子と単純ヘルペス（HSV）ウイルスのtk（thymidine kinase）遺伝子を使う、Capecchiらが考案した二重選別法（positive-negative selection）である（④）。この方法は、通常の遺伝子組み込みがベクターの両端で起こる場合が多いのを利用して、ベクターの端の部分に細胞が組み込まれた場合、細胞の生存にとって不利になりうる遺伝子をつないで、相同組換えを起こした場合にのみこの遺伝子が外れることを期待する方法がある。したがっ

て、処理した細胞を G418 で選択することによりベクターが組み込まれた細胞をまず選び、次にガンシクロビルなどの薬剤を与えることにより、tk 遺伝子をもつ細胞を除外する。したがって残った細胞コロニーには相同組換えを起こしたものが高率で存在することになる。また tk 遺伝子以外の遺伝子も負の選択に使われている。

耐性遺伝子のプロモーターなしのものを使って、相同部位に入ったときだけ G418 耐性が発現するようにした方法も使われる (②)。ただしこの場合は胚幹細胞で発現している遺伝子を標的とする場合しか使えないし、ベクターの構築方法によっては、その標的遺伝子産物の一部と neo 遺伝子との融合タンパク質が G418 耐性の機能を保持している必要がある。

最後に、選別遺伝子として G418 耐性遺伝子を使い、ランダムな組換えを含めて、外来遺伝子が組み込まれた胚幹細胞をまず選別し、次に PCR 法によってその中から相同遺伝子組換えを起こしたものを選び出す方法がある (③)。

中間径フィラメント intermediate filament [10nmフィラメント 10nm filament]

細胞骨格を構成する主要線維成分の 1 つで、その名前は他の主要成分である直径 24nm の微小管と直径 6nm のアクチンフィラメントの中間の直径(10nm)をもつことに由来する。微小管とアクチンフィラメントの主要構成タンパク質であるチューブリンとアクチンが種・組織間において差異が少ないのに対し、核ラミナを除く中間径フィラメントは、その主要構成タンパク質が組織間で異なるだけでなく、発生・分化の過程でも変化している。現在、中間径フィラメントは生化学的および免疫学的知見に基づいて、次の 6 種に大別されている。

- (1) 上皮系細胞に分布し、2つのタイプのケラチンタンパク質(酸性ケラチン、中性-塩基性ケラチン)より構成されているケラチンフィラメント。
- (2) 間葉系、未分化細胞に分布し、ビメンチンタンパク質より構成されているビメンチンフィラメント。
- (3) 筋組織に分布し、デスミンタンパク質により構成されているデスミンフィラメント
- (4) 脳のアストログリア細胞に分布し、**グリア酸性タンパク質**により構成されているグリアフィラメント
- (5) 神経組織に分布し、分子量の異なった 3 種類のタンパク質(68kD、160kD、200kD)より構成されているニューロンフィラメント。
- (6) ラミンタンパク質により構成され、線維状のネットワーク構造で核膜を内側より裏打ちしている核ラミナ。

これらの構成タンパク質は、そのアミノ酸配列により I~V のタイプに分類されている。表に中間径フィラメントの構成タンパク質を示した。中間径フィラメント構成タンパク質は N 末端から順にヘッド、ロッド、テイルの 3 つの主要ドメインから構成されており、中央のロッドドメインが α ヘリックス構造をとり、アミノ酸残基数および配列が各タンパク

質間で類似しているのに対し、ヘッドおよびテイルドメインは α ヘリックス構造をとらずアミノ酸残基数および配列は各タンパク質間で異なっている。→細胞骨格

転写 transcription

DNA のヌクレオチド配列が鋳型となり、これと相補的な配列ともつ RNA を作成すること。3 種類の転写に働く酵素があり、(1) mRNA、(2) rRNA、および (3) tRNA、5SRNA などを含む小分子 RNA がそれぞれの対応する DNA から転写される。

二本鎖 DNA の中で遺伝子ごとに決まった一方の鎖だけが鋳型となって RNA に転写される。転写方向は RNA の 5' 側から 3' 側に向けて RNA が合成される。転写に働く RNA ポリメラーゼは多くのサブユニットから構成されており、DNA に結合する分子、二本鎖 DNA をほどこく機能、触媒作用、プロモータ認識などのサブユニットがある。

真核細胞では、遺伝子の上流に TATAAA の配列が転写のプロモーターであることが多く、その下流数十塩基の部位に転写の開始点がある。RNA ポリメラーゼのほかにも多数の転写に関与するタンパク質があり、転写因子とよばれて、転写の調節を行っている(図)。その中にはオンコジーン産物として知られる Fos や Jun などの転写因子も含まれている。転写の調節には遺伝子にあるエンハンサーやサイレンサーとよばれるような塩基配列が反復していることが多く、細胞の増殖と分化、栄養や環境条件に応じて複雑な転写の調節が行われている。

いったん転写を開始すると、RNA の 3' 側への合成の延長と終止がつづく。転写の延長と終止にはそれぞれに必要な因子が知られている。真核細胞の mRNA の転写産物には 5' の開始点に 7-メチルグアニル酸のキャップ構造が、3' の終止点にはポリアデニル酸が付加されている。このほかに mRNA の前駆物質である高分子核内 RNA (hnRNA) はイントロン部分のスプライシングなど転写後の修飾を受けてから mRNA として細胞質に移行する。同様のプロセッシングはリボソーム RNA でも核小体でも行われている。

等電点 isoelectric point (pI)

タンパク質などの生体成分の多くは両性電解質である。それらは溶媒の pH によって正負の電荷の数が変化し、ある特定の pH では正負の電荷の数が等しくなって正味の電荷が 0 になる。この pH 値を等電点 (pI) という。両性電解質は等電点より高い pH では負に荷電し、等電点より低い pH では正に荷電している。等電点を用いる溶媒の種類や濃度によって若干変化する。タンパク質については、等電点で電気泳動移動度が 0 になるので、等電点泳動法によって等電点を求めることができる。タンパク質は等電点で溶解度が最小になるので分離・精製に用いられる場合もある(等電点沈澱)。また粘度・浸透圧は等電点で最小になり、泡立ちなどの性質が最も強くなる。全体のタンパク質の 6~7 割は等電点が 4~7 付近にあるといわれている。イオン交換クロマトグラフィーやゾーン電気泳動法なども、等電点の差を利用したタンパク質の分析・精製法である。

パーコール percoll

表面をポリビニルピロリドンでコートしたシリカ微粒子のコロイド状溶液（商品名）。遠心によって自動的に密度勾配が形成されることから、密度勾配遠心分離法のために媒体として用いられる。粘性が低く、濃度による浸透圧の変化も小さいうえに細胞毒性も少ないことから、フィコールとともに、生きた細胞の分離によく使われるが、生細胞以外に細胞オルガネラ、ウイルスなどの比較的大きな生物材料の分離に適している。

ハウスキーピング遺伝子 house keeping gene

細胞の生存に不可欠な過程に関与する遺伝子。DNA の複製、転写、タンパク質合成や代謝などの細胞の基本的な物質代謝をつかさどる遺伝子を指す。そのためほとんどの細胞において転写活性をもつ遺伝子である。例えば、DNA 複製においては DNA ポリメラーゼ、チミジンキナーゼ、リボヌクレオチドレダクターゼ、チミジル酸シンターゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼなどの多数のハウスキーピング遺伝子に関与している。これらの遺伝子の 5' 側上流は一般的に、TATA ボックスや CAAT ボックスをもたず、転写因子 Sp1 が結合する GC ボックス (GGGCGG) とよばれる塩基配列が複数並び、複数の転写開始部位が存在することなどの共通した構造が認められる。

PCR (polymerase chain reaction) [ポリメラーゼ連鎖反応]

特定の DNA 領域を挟んだ 2 種類のプライマーと基質ヌクレオチドおよび耐熱性 DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ) を用いて試験管内で DNA 合成反応を繰り返し行うことにより、微量の試料からその特定の DNA 領域を数十万倍に増幅して取り出す方法 (次頁図)。

PCR 法は 1985 年に Mullis らにより開発され、その後の耐熱性 DNA 合成酵素 Taq (タック) ポリメラーゼの導入と 1987 年に米国 Perkin Elmer 社と Cetus 社 (当時) が共同開発した PCR 自動化装置サーマルサイクラーにより飛躍的に利用が広まった。

試料として DNA のかわりに RNA を用いる方法がある。この場合には RNA を鋳型として逆転写酵素により一本鎖 cDNA を合成後、これを増幅して (逆転写 PCR)、PCR 産物を電気泳動を用いて解析したり、クローン化 (direct cloning)、あるいは直接塩基配列決定 (direct sequencing) することにより解析する。ただ、PCR の場合には通常の 20~30 サイクルの反応を行ったときに増幅された DNA 産物の 0.3~0.8% に塩基の変異が導入されるので、塩基配列決定の場合にはクローンを複数調べる必要がある。

PCR 法を応用することにより、複数の試料の間で特定の遺伝子産物の塩基配列に差異がないか調べることが可能である。これを PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorphism) 分析法という。まず、放射性標識したプライマーあるいは基質ヌクレオチドを用いた PCR を行い、対象とする配列を増幅するとともに放射性標識する。次に得られ

た PCR 産物を変性することにより単鎖化し、電気泳動により分離し、オートラジオグラフィを行う。塩基配列の差は高次構造の変化をもたらす、分離された一本鎖 DNA の 1 バンドの移動度の差として検出される。数百塩基中の 1 塩基の違いでも検出されるといわれる。

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [増殖 (性) 細胞核抗原]

分子量 3.3 万のポリペプチドよりなる等電点 4.8 の非ヒストン酸性核タンパク質で、全身性エリテマトーデス (SLE) に特異的な抗核抗体の対応抗原として報告された。後に Bravo らによって細胞周期に特異的なタンパク質として報告されたサイクリンと同一の物質であることが明らかにされた。PCNA は細胞周期の **late G1 から S 期にかけて**細胞核質内に急速に増加し、DNA 複製の際に DNA ポリメラーゼ δ がリーディング鎖 (→ラギング鎖) を合成するのを補助する。この特性により、細胞増殖および分化のマーカーとして有用で、本抗原に対するモノクローナル抗体が腫瘍性細胞および活性化細胞の検出に利用されている。PCNA は動物ばかりではなく植物にも存在し、cDNA (相補的 DNA) のクローニングによって明らかにされた一次構造 (塩基配列) がきわめて類似していることから生物現象に基本的に重要な役割をもつ物質であることが示唆されている。

Fas (ファス) 抗原 Fas antigen

ヒト細胞表面抗原の一種で、分子量 4.5 万の糖タンパク質。アポトーシスを仲介し、細胞内へ細胞死のシグナルを伝達することができる。構造上、腫瘍壊死因子 (TNF) や神経成長因子 (NGF) レセプターファミリーに属し、細胞外領域に 4~6 個のシステイン残基からなるシステインに富む保存領域が 3 回繰り返して認められる。このファミリーに属する分子としては、CD40 などが知られる。全身性エリテマトーデス (SLE) のモデルマウスである MRL/lpr マウスでは Fas 抗原遺伝子の異常が認められ、 $CD4^+ CD8^-$ T 細胞異常増殖に関与するとされている。Fas リガンドも最近、クローニングされた。

フェノール抽出 phenol extraction

フェノールによるタンパク質変性作用を利用して除タンパクする抽出法。具体的には核酸を精製する場合や、核酸に酵素を作用させたあとに酵素を失活させて除去する場合によく用いられる。ゲル電気泳動後、ゲルから抽出した核酸試料中のゲル断片などの不純物を除去する場合にも適用される。フェノール溶液は酸性で、そのまま作用させると DNA 鎖が切断されるため、中性の緩衝液で飽和させた溶液として用いる。試料の水溶液と等量のフェノール液とをよく混合し遠心分離すると 2 層となる。比重の高い水溶液を用いない限り、通常は上層が水層である。変性したタンパク質はフェノール層に分配するか、2 層の境界に不溶物として濃縮される。核酸は水層に回収される。水層からフェノールの残留成分を除去するため、続けて同様の操作でエーテル抽出やクロロホルム抽出を行うこともあう。最後にエタノール沈澱を行う。

プロテインキナーゼ protein kinase [タンパク質リン酸化酵素]

ATP または GTP の γ 位のリン酸の基質タンパク質への移行を触媒する酵素。プロテインホスファターゼと共役し、タンパク質のリン酸化、脱リン酸化反応をつかさどる。現在までのところ、この種のタンパク質の共有結合による修飾反応は、リン酸化のほかメチル化、アセチル化、グリコシル化など、100 種以上のものが知られている。

細胞外シグナルによって細胞内に産生されるセカンドメッセンジャー（細胞内情報伝達物質）である cAMP、cGMP、ジアシルグリセロール、カルシウムイオンが、いずれも特定のプロテインキナーゼをその情報伝達システムの一員としている。このことからプロテインキナーゼが種々の細胞機能の調節に大きな役割をになっていることが推定される。また、最近 src、yes、fgr、raf、mos をはじめ多数のオンコジにおいて、その産物がプロテインキナーゼであることが判明した。

さらに MPF (maturation promoting factor, 卵成熟促進因子; mitotic phase promoting factor, 細胞分裂促進因子) がある種のプロテインキナーゼであることが明らかにされ、一層プロテインキナーゼへの関心が高まっている。

プロテインキナーゼは、タンパク質のセリン、トレオニン残基をリン酸化するセリン・トレオニンキナーゼとチロシン残基をリン酸化するチロシンキナーゼに大別される。

セリン・トレオニンキナーゼはさらに 2 種類に分類される (次頁表)。1 つは、セカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼで、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロール、 Ca^{2+} -CaM) などのセカンドメッセンジャーによって活性化されるサイクリックAMP (cAMP) 依存性プロテインキナーゼ、cGMP依存性プロテインキナーゼ、Cキナーゼ、カルモジュリン依存性キナーゼがこれにあたる。もう 1 つは、セカンドメッセンジャーで活性化を受けないもので、カゼインキナーゼ I、II、ロドプシンキナーゼ、S6 キナーゼ、ヒストンH1 キナーゼなどがこれに属する。これらの酵素の命名はそれら酵素の基質タンパク質の名に基づいてなされた例が多い。

セリン・トレオニンキナーゼのなかには、広い基質特異性を持ち、数多くの基質タンパク質や共通の基質タンパク質を利用するものもみられるが (セカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼにはこのタイプのものが多い)、基本的にそれぞれのセリン・トレオニンキナーゼの基質認識性は異なる。現在まで比較的解析の進んでいるものについては、その基質認識性を表に付記した。

チロシンキナーゼは 3 種類に大別される。第 1 のタイプは成長因子依存性プロテインキナーゼで、インスリンレセプター、EGF レセプター、PDGF レセプターなどのレセプター型のチロシンキナーゼである。第 2 のタイプにはプロトオンコジーンやオンコジーンの産物が属し、src、yes、fgr、abl、fps、fes、ros、fms、erbB などがある。第 3 タイプは血小板、リンパ球、脳、脾などの膜画分あるいは可溶性画分に多量かつ多種見出されている。このタイプの酵素の命名は酵素分子の SDS-PAGE 上での分子量に由来する場合が多い。

プロテインキナーゼC protein kinaseC (PKC) [Cキナーゼ C-kinase]

カルシウム、リン脂質、ジアシルグリセロールに依存性のタンパク質分解酵素。1977年西塚らのグループによって、最初プロテアーゼによって活性化されるcAMP非依存性プロテインキナーゼ (Mキナーゼ) のプロ酵素として見出された。その後活性化因子としてCa²⁺、ジアシルグリセロールが見出されたことにより、セカンドメッセンジャー依存性プロテインキナーゼの仲間入りをした。当初、1種類の分子種からなると考えられていたが、遺伝子クローニングの結果、数種類の分子種からなるアイソザイムファミリーを形成していることが判明した。構造的にみると、膜結合部位である調節領域、Ca²⁺結合領域、ATPおよび基質タンパク質に結合能力をもった活性領域の3領域からなる活性化にCa²⁺を必要とするアイソザイムと、新たに見出されたCa²⁺結合領域を欠き、活性化にCa²⁺を必要としないアイソザイムがある。前者には α 、 β I、 β II、 γ の4種類、後者には δ 、 ϵ 、 ζ の3種類が知られている。

プロテインキナーゼCの活性化は、Ca²⁺やリン脂質およびジアシルグリセロールに依存している。しかし、Ca²⁺とリン脂質のみでは、活性化にmM近くの高濃度のCa²⁺濃度を必要とする。一方、ジアシルグリセロールがごく微量存在すれば生理的なCa²⁺濃度でも十分に活性化される。これらの事実によって、**ジアシルグリセロールは細胞内におけるプロテインキナーゼCの活性化調節因子と考えられている**。種々のホルモンや成長因子によりイノシトールリン脂質の代謝機構が働き、その結果産生されるジアシルグリセロールはセカンドメッセンジャーとして働き、プロテインキナーゼCが活性化され、外界からの情報を伝達すると考えられている。また、発癌プロモーターの1つであるホルボールエステル (PMA) はジアシルグリセロールと同様の作用機序によって、プロテインキナーゼCを直接活性化することが見出され、本酵素の癌化および細胞増殖への関与について興味をもたれている。

プロテインキナーゼCはタンパク質のセリン残基およびトレオニン残基をリン酸化する。この際のコンセンサス配列は-Ser または Thr-X-Arg-Lys (Xは任意のアミノ酸) とされているが、必ずしも明確でない。

プロテインキナーゼCは前頁の表に示すように種々のタンパク質をリン酸化する。レセプタータンパク質、膜タンパク質、筋収縮系・細胞骨格系タンパク質、代謝系酵素、イオンチャンネル構成タンパク質など多彩なタンパク質がプロテインキナーゼCによってリン酸化され、これらのタンパク質のリン酸化反応を通じて、プロテインキナーゼCは種々の細胞現象に調節的役割をになっていると考えられている。

プロテオグリカン proteoglycan

グリコサミノグリカン (ムコ多糖類) とタンパク質との共有結合化合物の総称。糖類とタンパク質間の結合様式はコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリンではD-GlcUA β 1 \rightarrow 3D-Gal β 1 \rightarrow 3D-Gal β 1 \rightarrow 4D-Xyl β \rightarrow Ser が架橋構造であり、ケラタン硫酸では

GlcNAc→Asn または GalNAc→Thr (Ser) が架橋構造である。グリコサミノグリカンは、アミノ糖とウロン酸（またはガラクトース）からなる二糖の繰り返し構造から成り立ち、ウロン酸には硫酸基が結合していることが多い。アミノ酸、ウロン酸、硫酸基の有無により分類され、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸A・B・C、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸がある。プロテオグリカンはコラーゲンなどと共に結合組織の細胞外マトリックス中の基質を形成している主要な生体高分子である。

ヒアルロン酸は細胞間の接着物質で、眼の硝子体、臍帯に含まれる。分子鎖は自由に屈折できるので溶液に粘滑性を与える。コンドロイチン硫酸Bは皮膚（真皮）に含まれ、その他のコンドロイチン硫酸は軟骨・腱・骨に含まれる。

プロトオンコジーン proto-oncogene

[癌原遺伝子；細胞性癌遺伝子 cellular oncogene (c-onc)]

RNA 型腫瘍遺伝子のゲノム上に見い出されるオンコジーン（ウイルス性癌遺伝子）に相同な、細胞由来の遺伝子、細胞性のオンコジーンという意味で、c-onc と表記される。染色体上の遺伝子に突然変異が起こり、細胞が癌化能を有するようになる場合、この変化する前の遺伝子をプロトオンコジーンとよぶこともある。プロトオンコジーン産物は、細胞内の種々のオルガネラに存在し、細胞の増殖や分化に基本的な役割をになっていることが知られている。増殖因子として働くもの、チロシンキナーゼ活性をもつもの、GTP 結合タンパク質、転写因子として働くものなどに分類される。このように細胞の生命活動に基本的な機能に変異が起こることによって、増殖の制御機構に異常が起こり、細胞の癌化が引き起こされると考えられる。→オンコジーン

ブロモデオキシウリジン bromodeoxyuridine (BrdU ; BudR)

ブロム基はメチル基とほぼ同じに大きさなのでチミジンの類似体として用いられる。DNAポリメラーゼはBrdUTPを基質としてよく取り込む。ブロモデオキシウリジンの使用方法としては、次の3つに分類される。（1）まず、ブロモデオキシウリジンは可視光によってDNAを変化させるので、DNA合成をしている細胞を選択的に死滅させるのに用いる。例えば、細胞周期の変異株を分離するのに、BrdUを取り込ませS期まで進んだ細胞のみを光照射で選択的に死滅させることができる。（2）次に、ブロモデオキシウリジンに対するモノクローナル抗体が作製されているので、抗体による検出が可能である。例えば、BrdUを取り込ませてDNA合成の有無を判定できる。すなわち、アオソトープラベルチミジンの代用として使用できる。（3）また、BrdUは密度が高いので、取り込まれたDNAを密度勾配超遠心分離法によって分画可能である。密度勾配作製には、硫化セシウム (Cs₂SO₄) が用いられる。

MAPキナーゼ MAP kinase (mitogen-activated protein kinase)

分子量4～4.5万のセリントレオニンタンパク質キナーゼで、種々の細胞増殖因子や

発癌プロモーターの刺激で素早く活性化するキナーゼとして見出された。卵母細胞の成熟過程の細胞分裂期（M期）に、細胞周期のマスター制御因子である卵成熟促進因子（maturation promoting factor ; MPF）の下流で活性化する。さらには、分化因子である神経成長因子（NGF）の刺激にも応答して活性化する。このように、細胞増殖、細胞周期並びに細胞分化のシグナル伝達をになうキナーゼと推定されている。

本酵素分子自体がチロシン残基とトレオニン-セリン残基の両リン酸化を受けて初めてキナーゼとして活性化する特徴をもつ。チロシンリン酸化によって活性化することが知られているセリントレオニンキナーゼは、今のところ MAP キナーゼだけである。しかも、非活性化型の MAP キナーゼは弱い自己チロシンリン酸化能を有するというユニークな特徴がある。したがって、従来の分類に当てはまらない、新しいタイプのキナーゼである。酵素学的には、非常に狭い基質特異性が特徴である。ミエリン塩基性タンパク質や微小管結合タンパク質の1つ MAP2 をよくリン酸化するが、ヒストンやカゼインはほとんどリン酸化しない。基質のコンセンサス配列として、Pro-X-(Ser または Thr)-Pro が提唱されている。

MAPキナーゼは、分子量約9万の別のセリントレオニンキナーゼ (p90^{rsk}) をin vitro でリン酸化し活性化する。そこで、増殖因子のシグナル伝達におけるキナーゼのカスケード（連鎖反応）に重要な役割を果たし、転写調節に関与する可能性が推定されている。また、in vitroにおいて、間期型からM期型への微小管ダイナミクスの変換をMAPキナーゼが引き起こすことから、M期における紡錘体形成に関与すると考えられている。

メチル化 (DNAの) methylation (of DNA)

塩基に起こる修飾の1つ。メチル化は、原核生物では DNA の不適正塩基対の修復、免疫学的自己と非自己の識別および監視機構において、また真核生物では遺伝子発現の調節において重要な要素と考えられている。メチル基供与体は一般に S-adenosyl methionine (SAM) である。

大腸菌の例では、2つの系が知られている。大部分のDNAメチル化は2つのDNAメチル基転移酵素 (DamおよびDcmメチラーゼ) により行われる。Damメチラーゼは、5' -GATC-3' 配列を認識し、アデニンの6位のアミノ基をメチル化し、Dcmメチラーゼは5' -CCa/tGG-3' 配列を認識し5' 側から2番目のシトシンの5位の炭素をメチル化し、それぞれN⁶-メチルアデニンおよび5-メチルシトシンになる。これらはDNAの複製に際して起こる不適正塩基対の修復に重要な役割（おそらく正しい親鎖と誤りを含む娘鎖を識別する）を果たすことが示唆されている。もう1つのメチル化は、制限メチラーゼによるもので、これは制限酵素によるDNAの切断を防ぐための機構と考えられ、制限酵素が認識する塩基配列と対応する制限メチラーゼによってメチル化すると、DNAはその部位で切断されなくなる。

高等真核生物にみられるDNAのメチル化は、DNA鎖中の5' -CG-3' 配列を認識して、

特異的なDNAメチラーゼによりシトシンの5位の炭素をメチル化し、5-メチルシトシン (mC) となる。多細胞生物では組織によって、遺伝子のメチル化の程度が異なる。**活性な遺伝子DNAに比べて、不活性な遺伝子のDNAほど多くメチル化されている。**メチル化の程度は、DNAを制限酵素HpaII (CCGGは切るが、 C^m CGGは切らない) とMspI (どちらも切る) を用いて、生じたDNA断片を比較し切れ方の違いから知ることができる。真核生物のDNAのメチル化は遺伝子発現の制御に働いていると考えられているが、その仕組みは明らかではない。なお、ショウジョウバエや酵母には5-メチルシトシンは存在しないか非常に少ない。

免疫監視機構 immune surveillance ; immunological surveillance

狭義には1960年代末にF. M. Burnetが提唱した説で、「リンパ球系免疫機構は元来、感染微生物からの生体防御のために備えられたものではなく、癌細胞を見出して排除するために体内をパトロールして監視する機構として進化の過程で作られたものである」という主張を指す。しかし、それに関与すべきT細胞の欠如したヌードマウスにおいても、発癌率が正常マウスと変わらないこと、ヌードマウスではNK細胞が発達していることから、Burnetのいう免疫監視機構の主役はT細胞ではなく、NK細胞であるという考えが台頭した。広義には、免疫監視機構は癌に対する防御だけに限定する必要はなく、健全な自己体成分以外のものを体内から排除する機構であると理解する。その主な対象は、癌細胞、ウイルス感染細胞、病原微生物、寄生虫、自己の老朽細胞などである。

免疫寛容 immune tolerance [寛容tolerance]

免疫原性がある抗原に対してB細胞応答(抗体産生)、T細胞応答(サイトカイン産生、キラーT細胞応答)を起こさない状態を指す。自己抗原に対する免疫寛容を特に自己寛容(self tolerance)とよぶ。

免疫寛容導入の機序として、①反応細胞を物理的に排除するクローン除去、②機能不全を誘導するクローンアネルギー、③サプレッサーT細胞による不応答性の導入がある。胸腺細胞の分化段階で主に起こるクローン除去と成熟T細胞で起こるクローンアネルギーを対比させて、前者を中心性寛容、後者を末梢性寛容という場合もある。→クローンアネルギー、クローン除去

免疫グロブリン immunoglobulin

抗体並びにこれと構造的に関連するタンパク質の総称。免疫能をもつすべての動物種の体液中に見出され、ヒトではIgM、IgG、IgA、IgD、およびIgEの5クラス、さらにIgGとIgAはサブクラスに分類される。したがって抗体分子はIgクラス、サブクラスのいずれかに属する。Ig分子は4本のポリペプチド鎖からなる基本構造をもち、2本の相同のH(重)鎖、および2本の相同のL(軽)鎖とからなる。H鎖の分子量は15~18万で、クラスによって異なる特徴的な構造をもつが、L鎖は κ 鎖と λ 鎖の2つの型があり、どのクラスのH

鎖とも対構造を作る。Ig はB細胞に由来する形質細胞 (plasma cell) によって作られ、また Ig はB細胞の特異的抗原レセプターとしても存在し、膜型免疫グロブリン (membrane Ig) とよばれ、抗原との結合はB細胞の特異的活性化、並びに形質細胞への分化・成熟を導くための信号としての重要な役割を果たしている。

免疫沈降 (法) immunoprecipitation

細胞質内あるいは細胞表面に存在する抗原を放射性元素やその他の標識物質で標識したあと、界面活性剤などにより溶解して、抗体を用いて抗原抗体複合体の形で免疫吸着体に結合させて他の物質と分離する免疫化学的方法 (図)。微量のタンパク質を検出できるように、SDS-PAGE と組み合わせると、相対的な抗原の量や分子量、代謝の速度、翻訳後の修飾の有無、細胞内および細胞表面での他の分子 (タンパク質、核酸など) との相互作用などの重要な情報を得ることができる。

操作は、①抗原の標識、②抗原の可溶化、③抗原抗体複合体の形成、④免疫複合体の不溶性担体への吸着、の4つのステップに分けられる。細胞表面抗原の標識にはラクトペルオキシラーゼ法を用いた放射性ヨウ素 (^{125}I) による標識がよく用いられる。細胞質内の抗原の場合、放射性標識アミノ酸 (^{35}S -メチオニン、 ^{14}C -ロイシンなど) を用いて生合成によって抗原タンパク質を標識することが一般的である。標識後、界面活性剤によって細胞を溶解して抗原を可溶化して、抗体を加えて抗原抗体複合体を形成させる。抗原抗体複合体をプロテインAまたはプロテインGを結合させたセファロースなどの不溶性担体に吸着させたあとに、SDS-PAGEなどにより解析する。抗原抗体複合体をさらに酵素処理、リガンドとの結合、イムノブロット法など他の操作を加えたあとに、目的に応じた解析をすることもできる。

ラージT抗原 large T antigen [大型T抗原]

ポリオーマウイルス属 (サル由来の SV40、マウス由来の狭義のポリオーマウイルスなど) の初期遺伝子産物のうち、最大の分子量をもつ T 抗原 (腫瘍抗原、tumor antigen)。SV40 のラージT抗原は、708 個のアミノ酸残基からなる、分子量約 9.4 万のタンパク質である。SV40 ラージ抗原の機能としては、①SV40DNA の複製起点に結合することにより、複製反応を開始させる。ATP アーゼ、DNA ヘリカーゼ活性をもつ。②SV40 の初期遺伝子から、後期遺伝子への転写の切り換えに関与する。③初代培養細胞を不死化する能力、および樹立細胞株を癌化する能力をもつ。オンコジーン (癌遺伝子) としての作用は、ラージT抗原が細胞内の癌抑制遺伝子産物 pRB、p53 と、複合体を形成し不活化することによると考えられている。ポリオーマウイルスのラージT抗原の機能は、SV40 のそれとほぼ同様であるが、細胞を癌化する能力はなく、不死化する能力のみをもつ。また、pRB とのみ複合体を形成する。→ミドル抗原、SV40

lac (ラック) オペロン lac operon [ラックオペロン; ラクトースオペロン lactose operon]

大腸菌における乳糖 (ラクトース) などの β -ガラクトシドの分解に関与する遺伝子群の転写調節単位 (オペロン)。lac オペロンは、lacZ、lacY、lacA の3つの構造遺伝子が lacP (プロモーター) と lacO (オペレーター) の支配を受け、1つの mRNA として発現される転写単位である (次頁図)。lacZ 産物は 1,023 のアミノ酸からなり四量体を形成し、ラクトースをグルコースとガラクトースに加水分解する β -D-ガラクトシダーゼ活性をもつ。また、この酵素はラクトースを異性化し、より強く lac オペロンを誘導するアロラクトースを生成する。lacY 産物は 416 のアミノ酸からなりガラクトシドパーミアーゼ活性をもつ。この酵素はラクトースの大腸菌内膜内への透過を触媒する。lacA 産物は 202 のアミノ酸からなり二量体を形成し、ガラクトシドアセチルトランスフェラーゼ活性をもつ。この生理的意義は不明だが、不要なラクトース様の代謝産物の除去に役立つと考えられる。

lac オペロンは2種類の転写調節を受ける。一方は lac オペロンの 5' 末端側に隣接する lac I の産物であるリプレッサー (抑制物質) による負の調節制御で、他方は代謝産物抑制による正の調節である。RNA ポリメラーゼによる転写反応は、リプレッサーがオペレーター部位 (lacO) に結合すると阻害される。誘導物質である β -ガラクトシドがリプレッサーに結合して不活性されると転写が始まる。誘導物質にはラクトース、アロラクトース、IPTG などが含まれる。cAMP 受容タンパク質 (CRP) が cAMP と結合した複合体は lac オペロンを含むある種の糖代謝オペロンのプロモーターに結合して転写効率を増大させる。大腸菌が通常炭素源として用いるグルコースの分解産物は、菌内の cAMP 濃度を低下させ転写を抑制する。

lacZ は発現産物の β -ガラクトシダーゼが X-gal などの発色剤を基質としうることから、クローニング、発現、組換え反応などの指標に広く応用され、動物細胞にも用いられる。また他遺伝子との融合遺伝子の作製に利用されることも多い。→オペレーター遺伝子

ラミニン laminin

さまざまな組織の基底層 (basal lamina) や基底膜 (basement membrane) に特異的に存在する分子量約 100 万の巨大な細胞接着性糖タンパク質。細胞外マトリックス分子の1つである。マウスEHS肉腫由来のラミニンが主に研究され、変異ラミニン分子も知られている。ラミニンは分子量 45 万のA鎖、24 万のB₁鎖、23 万のB₂鎖が、それぞれ1本ずつ会合している。電子顕微鏡像は図のような十字架形を示す。A鎖の長腕の先端に1か所、A鎖の短腕およびB鎖の各々2か所に球形ドメインがある。各鎖の球形のドメイン以外の部位には、二重 α ヘリックス (coiled-coil α -helix) が豊富に存在する。ラミニンのアミノ酸配列は、米国のY. Yamadaらにより遺伝子工学的にすべて解析されており、アミノ酸配列中に2種類の繰り返し構造がみられる。生理活性として、ラミニンは上皮細胞、色素上皮細胞、シュワン (Schwann) 細胞、黒色腫 (melanoma) 細胞など多くの細胞の接着を促進する。また、癌細胞がほかの組織、器官へ転移する際、標的組織への接着や浸潤にラミニンが関

与している可能性が高く、癌細胞の移動や接触走性 (haptotaxis) を刺激することが報告されている。神経細胞では、ラミニンの作用により、神経成長因子がなくても神経突起伸長 (neurite outgrowth) が促進される。ラミニンは基底膜中で上皮細胞を保持する重要な機能をもち、上皮細胞の形態上の方向性を支配していると考えられる。ラミニンの細胞接着活性をになうペプチドとして、RGD配列、YIGSR配列、IKVAVなど8配列・8部位が報告されており、細胞表面のレセプターは分子量6.7万のタンパク質、11万のタンパク質、およびインテグリン $\alpha_3\beta_1$ (VLA-3) $\alpha_6\beta_1$ (VLA-6)、 $\alpha_7\beta_1$ が報告されている。

λ gt 11 ベクター λ gt 11 vector

λ ファージから誘導、作製された遺伝子組換え用ベクター。ラムダ系の組込み用ベクターのうちでも、目的とする相補的 DNA (cDNA) を効率的に細菌に導入できることや、 β -Gal (ガラクトシダーゼ) との融合タンパク質などとして cDNA を発現させるためのデザインが容易なことから、広く用いられる。

→発現クローニング

リボヌクレアーゼプロテクション法 ribonuclease protection assay [RNアーゼプロテクション法Rnase protection assay]

転写開始点などを決定するために広く用いられてきたS1 マッピング法の変法。プローブとしてin vitroで合成したアンチセンスRNAを用いる点、mRNAとハイブリッド形成していない領域を消化するために一本鎖特異的リボヌクレアーゼAとリボヌクレアーゼT1を用いる点がS1 マッピング法と異なる。RNAプローブをin vitroで合成する際³²P 標識ヌクレオチドを用いるため、プローブは非常に比活性が高くなり (通常 $>10^9$ cpm/ μ g)、0.1pg程度あるいは細胞当たり1~5コピーしか存在しないmRNAでも検出可能である。末端標識プローブを用いるS1 マッピング法と比べて感度は20倍程度高い。そのため、転写開始点、転写終結点の決定、スプライシング部位の決定だけでなく、転写量を感度よく定量的に決定するために有効である。また、塩基の挿入、脱落、置換などの検出にも使用できる。方法は図(次頁)に示したように、①調べたい遺伝子の全部または一部をRNA合成用プラスミド(例えばPromega社のpGEMベクター)に組み込む。②直線状とした鋳型からSP6あるいはT7RNAポリメラーゼを用いて、³²P 標識ヌクレオチド存在下、mRNAの相補鎖をRNAプローブとして合成する。③RNA(通常10~20 μ g)とプローブRNAを、一晩ハイブリダイゼーションした後、一本鎖で残った領域をリボヌクレアーゼAとT1で消化する。④変性用ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、オートラジオグラフィで解析した後、マーカーと比べることによって、消化されなかったプローブRNAの長さを決定する。

リン脂質 phospholipid

リン酸を極性基とする複合脂質で、グリセロホスホリピドとスフィンゴリピドに分けら

れる。前者はホスファジン酸 (PA)、CDP-グリセリド、コリンホスホグリセリド、イノシトールホスホグリセリドなどで、後者はスフィンゴミエリンに代表される。共に生体膜の構成成分である。神経髄鞘 (ミエリン) には特に多く含まれ、電気絶縁と跳躍伝導に役立っている。ホルモン刺激によりPAがジアシルグリセロールから作られることが分かるように、ホスホイノシトール代謝に関わっている。また、リン脂質からホスホリパーゼA₂により、アラキドン酸が遊離し、プロスタグランジンが合成される。このように細胞膜構成成分として情報伝達に深く関与している。

レクチンlectin

糖鎖を認識する植物由来のタンパク質に対して与えられた名称であるが、現在では動物組織に存在する抗体以外の糖鎖認識タンパク質に対しても使われる。レクチンの存在が知られるようになったのは、植物種子の抽出液中に種々の動物の赤血球を凝集する活性が存在し、凝集が単糖あるいはオリゴ糖により阻止されることからである。これらは植物性血球凝集素 (plant hemagglutinin) とよばれたが、その後、W. Boydによりレクチンとよぶことが提唱された。その後の広範な研究で、多種類のレクチンが種々の植物種子、根茎から分離同定され、生物学的な作用も、赤血球凝集活性のみならず、リンパ球分裂促進活性、細胞毒素を示すことが明らかになってきた。その後、細菌、動物の体液、組織にも糖鎖を認識するタンパク質の存在することが明らかにされはじめ、動物レクチンとよばれるようになり、生物学的に重要な機能を果たしていることが明らかにされてきた。

ナタマメ (*Canavalia ensiformis*) のレクチンはコンカナバリンA (ConA) とよばれ、 α -D-マンノースあるいは α -D-グルコースのC-3、C-4、C-6の水酸基が未置換のものを含む糖タンパク質の糖鎖に高い親和性をもつ。ConAはリンパ球分裂促進活性を示す代表的なレクチンで、胸腺細胞、脾細胞、末梢血Tリンパ球などの幼若化を引き起こし、抗原非特異的サブレッサーT細胞を誘導する。アガロースなどの単体に結合させ、糖タンパク質、糖ペプチド、オリゴ糖を分離するアフィニティクロマトグラフィーにも利用される。

哺乳動物の肝細胞にある肝レクチン (hepatic lectin) のアシアログリコプロテイン結合タンパク質は動物レクチンの代表的なもので、血液中にある糖タンパク質の糖鎖 NeuAc-Gal-GlcNAc-の NeuAc (N-acetylneuraminic acid) が切断され、Gal (galactosamine) が露出した糖タンパク質を結合して、細胞内に取り込む (GlcNAc は N-acetylglucosamine)。血管内皮細胞の表面に誘導される ELAM-1 は白血球上の糖鎖 NeuAc α 2-3 Gal β 1-4 (Fuc α 1-3) GlcNAc β を認識するレクチン様ドメインをもつ。

レチノイン酸 retinoic acid

レチナール (retinal; ビタミンAアルデヒドともいう) からレチナールオキシダーゼにより産生されるビタミンA誘導体。分子量 300.44。視覚などの生理作用以外では、体内では肝、腎、小腸粘膜などで生成され、レチノール (retinol; ビタミンAアルコールともい

う) より強力な上皮保持作用、制癌作用をもつ。レチノイン酸は鳥の肢芽形成を誘導することが知られていたが、肢芽形成部にレチノイン酸の勾配が存在すること、レチノイン酸により形態形成に関与するホメオティック遺伝子が誘導されることなどから、形態形成因子として注目を集めている。レチノイン酸には、細胞質に存在する CRBP と核内に存在する RAR の 2 種の受容体が知られている。RAR はレチノイン酸による転写調節因子と考えられており、その調節機構の研究が行われている。

胚幹細胞 embryonic stem cell, embryo-derived stem cell [ES細胞ES cell]

胚に存在する全能性の幹細胞。この細胞はマウスでのみ株化されている。マウス胚幹細胞株は、胚盤胞 (blastocyst) とよばれる時期のマウス初期胚の内部に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊 (inner cell mass ; ICM) を分離して、人為的に解離しながら培養皿の中で未分化状態を保ったままで増殖しつつけるようにして樹立された細胞株。この細胞は内部細胞塊の細胞と同じようにほとんどあらゆる種類の細胞に分化できる多分化能 (pluripotency) をもち、実際正常胚盤胞の中に注入すると、マウス胚の形成に参加して混ざりあい、キメラマウス (chimeric mouse) を作ることができる。このとき胚幹細胞 (ES 細胞) が将来、卵や精子を作る始原生殖細胞 (primordial germ cell) の分化・形成に寄与した生殖細胞系列キメラ (germ cell line chimera) となった場合は、このキメラマウスを交配させることにより、ES 細胞由来のマウス個体を得ることができる。そこで ES 細胞を培養中に、遺伝子導入などのいろいろな人為操作を加えて、しかも目的とするように改変された細胞クローンを多数の細胞の中から選別した後に、キメラマウスを経由して、この細胞由来のマウス個体を作ることができる。このようにして新たな遺伝形質をもつマウス個体を作る方法の最大の利点は、培養細胞の段階で非常に多数の細胞を材料として人為操作を行えることで、特に最近遺伝子ターゲティングに広く利用されている。マウス以外の動物からの ES 細胞株樹立は試みられているが、まだキメラ動物の作成などのはっきりとした成果はない。

マウス胚盤胞から ES 細胞株が最初に Evans や Martin らによって樹立されたのはほぼ 1980 年代からであるが、その後いろいろな方法の改良や簡便化が試みられてきた。胚細胞が未分化状態のまま増殖を続ける機構については、未分化状態を保つように働くタンパク質因子 LIF (リフ) の発見以外には不明な点が多く、したがって細胞株の樹立についても経験に頼る部分が多い。いったん樹立された ES 細胞株を維持し使用するのには、樹立することに比べれば比較的たやすい。しかし遺伝子導入や選別の過程を経た後にも生殖細胞系列に寄与できる能力を維持させるためには、最良の方法で注意深く ES 細胞を取り扱い培養するため、培養方法の習熟が必要である。ES 細胞株の樹立法と使用方法を図に示した。細胞株樹立の際はマウス胚盤胞をそのままか、免疫手術によって単離した内部細胞塊を、前もってフィーダー細胞層 (feeder cell layer) (STO 株細胞やマウス胚からの初代線維芽細胞を使う) を作っておいた培養皿に入れて培養する。胚盤胞の場合は、やがてフィーダ

一細胞層に接着して伸展するので、露出した内部細胞塊を分離する。内部細胞塊が細胞の増殖と伸展しはじめたら、細胞コロニーが大きくなる前に定期的に解離して植え継ぐ。このようにして、フィーダー細胞層上で未分化細胞の形態を維持して増殖するようになったコロニーを樹立したものが ES 細胞株である。通常、培養液の交換を毎日行い、2～3日ごとに継代して維持する。未分化状態を維持するのに効果のある LIF や BRL 細胞株のならし培地を加えることが多い。→遺伝子ターゲティング

胚中心 germinal center [芽中心、明中心；二次結節secondary nodula]

リンパ節、脾臓、腸管付属リンパ組織などの末梢リンパ組織には一次小節 (primary follicle) という小リンパ球の集まった構造がある。抗原による刺激があると、この一次小節の中心にリンパ芽球、大リンパ球からなる構造が出現する。この部は、リンパ芽球が存在し盛んな分裂像を示すことから、リンパ球を造成する所という意味で、胚中心あるいは芽中心とよんでいる。新しい胚中心を組織学的にみると暗い半球と明るい半球に区別できる。前者ではリンパ球の増殖が盛んで、細胞の破片を貪食した大型のマクロファージが散在している。網目状の樹枝状細網細胞 (dendritic reticulum cell) が支持組織となっていて、リンパ組織に入った抗原はこの細網細胞に捕捉される。胚中心のリンパ球は大部分が IgM 陽性の B 細胞からなる。

未完。 勉強のために 1990s の昔 に pirate/edit した「普段目につかない代物が多い」。 古いものの中に 捨てがたいものがたくさんある。“What’s new” が最も価値あるものだと信仰している 「おめでたいヒト」のために この「危うい草紙集」を up して、便を図ることにした。許されよ！ K.K.