

京都 WEB マガジン
現代アートとサイエンス

Kyoto WEB Magazine
Contemporary Art and Science

ISSN 2433-4006

<http://6789-6666.jimdo.com>

No. 11

大腸菌と組替え DNA 技術

Escherichia coli and Recombinant DNA Technology

平賀壮太

Hiraga Sota

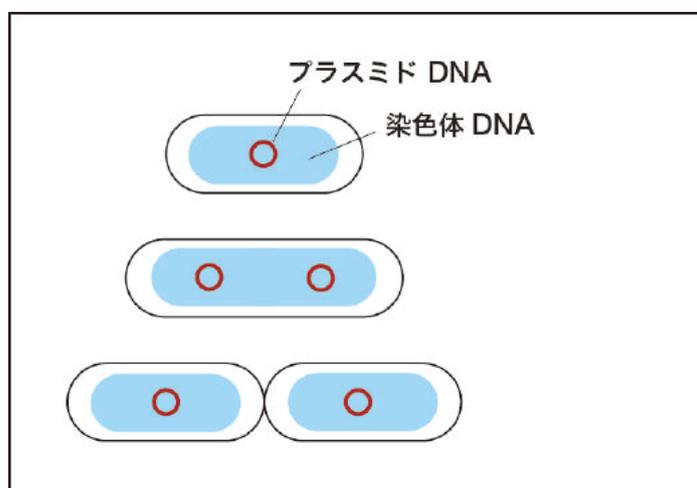
目次

組替え DNA 技術の発展	2
ミニ F プラスミドの分配機構の発見	4
ミニ F プラスミドの CCD 機構の発見	7
基礎研究の功績	10
日本における科学研究力低下の背景	10

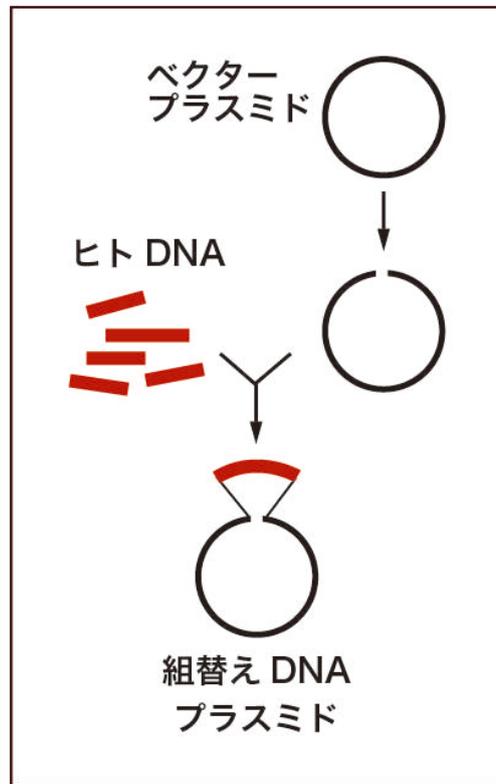
組替え DNA 技術の発展

私たちヒトを含めた温血動物の大腸の中には大腸菌という細菌が棲んでいて、私たちの健康の維持のために日夜共生的に働いています。O157のような病原性の株は例外的です。ちなみに、人の糞便の体積の半分以上は大腸菌が占めています（死骸も含めてですが）。糞便からは大腸菌のいろいろな株がたくさん分離されています。数十年前に或る研究者が「大腸菌の K12 株を使って全ての生物に共通な生命の仕組みを世界中の研究者が徹底的に研究しよう」という提案をしました。そしてそこから大腸菌 K12 株を使ったノーベル賞級の研究が次々に発表されたのです。大腸菌は栄養が豊富な培地で体温と同じ 37°C で培養すると 25 分で 2 倍になり分裂増殖するのです。したがって、一昼夜の内に数億個の細胞に増えることが出来るので、研究材料としてはとても便利なモデル生物なのです。大腸菌は 2 マイクロメートル（1 マイクロメートルは 1 ミリメートルの 1000 分の 1）のソーセージのような形をしており、4 マイクロメートルに成長すると細胞の中央がくびれて 2 個になります。その細胞の中には遺伝物質の染色体 DNA があり、これも細胞分裂前までは複製して 2 倍になります。この染色体 DNA は 2 本鎖で環状ですが細胞の長さの 500 倍ほどの長さがあり折りたたまれて存在しています。現在ではこの DNA の塩基配列は全て解析されており約 4000 個の遺伝子が存在していることが知られています。すなわち、大腸菌は 4000 種の蛋白質を合成する能力があるのです。一見単純に思われる細菌でも複雑なたくさんの生命維持機構を持っているのです。

大腸から分離した多くの大腸菌の株のなかには、染色体 DNA の他に小さい環状の 2 本鎖 DNA を持っている株もあります。このような DNA のことを『プラスミド』といいます。プラスミドは染色体 DNA 同様に自己複製します。プラスミドの種類はいろいろあり、細胞当たり 1 個か 2 個のものや数十個のものもあります。抗生物質に耐性になる遺伝子を運ぶ R プラスミド (R は resistant の R) もあります。また F プラスミド (性プラスミド : F は fertility の F) を持つ大腸菌 (雄株) は持たない大腸菌 (雌株) に接合して F プラスミドを伝達します。そのときに染色体 DNA も同時に伝達することがあり、両者の遺伝子の交雑が起こります。



大腸菌のプラスミド

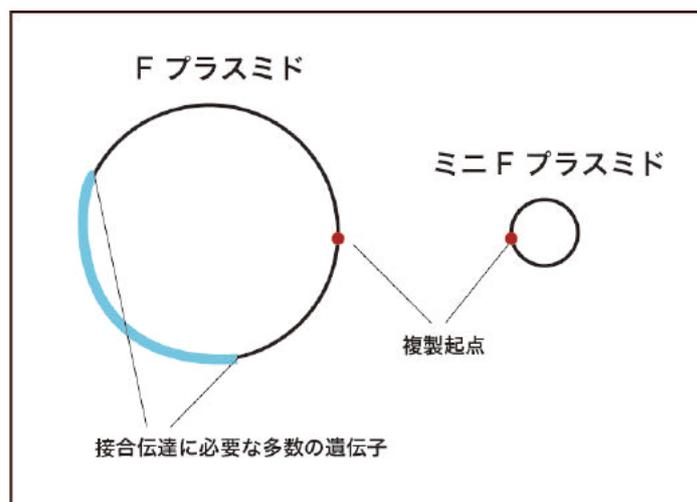


組換え DNA 技術

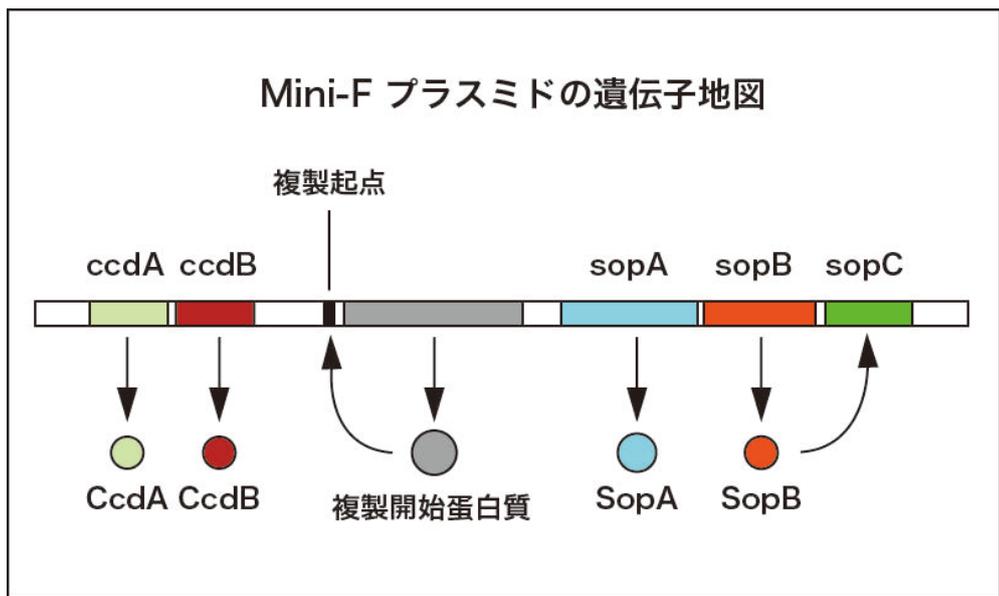
ヒトのインスリンや成長ホルモンの遺伝子を持つ組換えプラスミドの入った大腸菌を大量に増殖させ、大腸菌が作ったインスリンや成長ホルモンを精製して実際に治療に使われています。この技術が発見される以前は屍体から脳下垂体を取り出して成長ホルモンを精製しており、思春期に身長が伸びない一人の患者の治療のためには数体の屍体が必要だったそうです。

ミニ F プラスミドの分配機構の発見

私たちは F プラスミド（性プラスミド）を研究テーマの一つに選びました。F プラスミドは接合伝達するために働くたくさんの遺伝子を持っています。私たちは接合伝達の遺伝子を失った小さな『ミニ F プラスミド』を実際に研究に用いました。



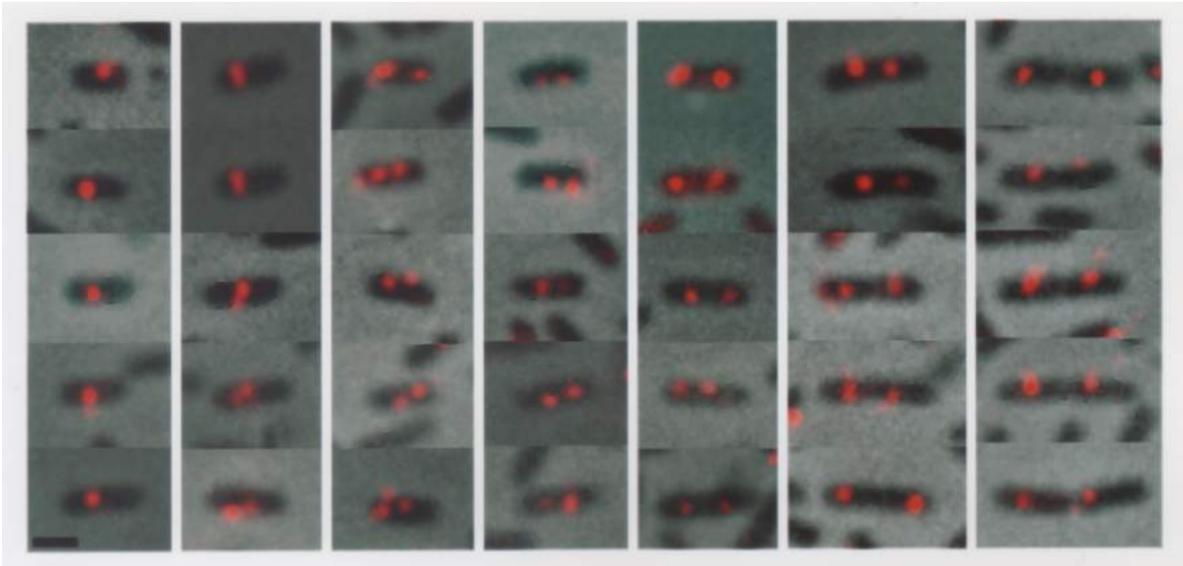
このミニ F プラスミドは F プラスミドと同様に細胞あたり 1 個か 2 個しかないので、細胞分裂の際正確に子孫の細胞に 1 個ずつ受け継がれて行きます。すなわち『分配』は正常に行われているのです。ミニ F プラスミドには自己増殖するための複製起点や複製開始蛋白質の遺伝子を持っていることは知られていました。この複製開始蛋白質の遺伝子の右隣の DNA 領域(下の図参照)を欠失させるとミニ F プラスミドは不安定になり、ミニ F プラスミドを持たない細胞が高頻度で出現するようになります。すなわちこの領域に分配に必要な機能があるのです。詳しくこの領域を調べると、*sopA* と *sopB* (stability of plasmid の略号) と名付けた遺伝子から作られる SopA・SopB 蛋白質と *sopC* と名付けた DNA の塩基配列が重要であることが分かりました。精製した SopA・SopB 蛋白質は互いに反応しあう性質があり、SopB 蛋白質は *sopC* DNA 領域に強く結合する性質がありました。



ミニ F プラスミド上の遺伝子座地図

ミニ F プラスミドは自身のもつ複製起点に特異的に働く複製開始蛋白質によって複製を開始する。

私たちは大腸菌の中のプラスミド DNA の位置を調べる蛍光位相差顕微鏡技術を開発しました。ミニ F プラスミドは最初細胞の中央に存在していますが、その後複製して 2 分子になり細胞長の 1/4 と 3/4 の位置に存在することが明らかになりました (次ページの写真)。

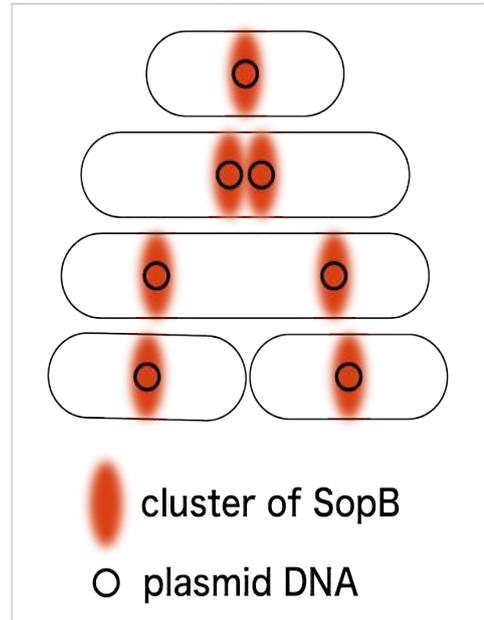


ミニ F プラスミド DNA 分子を赤く染めた大腸菌の蛍光位相差顕微鏡写真
赤い蛍光物質を結合したミニ F プラスミド DNA 断片との
in situ ハイブリダイゼーションによる

一方、*sopA-sopB-sopC* 領域を欠失しているミニ F プラスミド分子は染色体 DNA が存在しない細胞端にランダムに存在していました。プラスミドの 2 分子の両方が一方の細胞端に存在していることもありますから、細胞分裂でプラスミドを持たない細胞も高頻度で出現するのです。これらの実験結果から *sopA-sopB-sopC* システムはプラスミド分子の細胞内の位置を決定する機構であると結論できました。

また私たちは細胞内の蛋白質の分布状態を調べる新しい蛍光位相差顕微鏡技術を開発して SopA と SopB 蛋白質を調べたら、SopA と SopB 蛋白質は細胞内に縞状に分布しており、SopB 蛋白質の濃度が高いところにミニ F プラスミド分子が存在していることを発見しました。この実験データを基にして、私たちはこの現象は『反応・拡散モデル』で説明できるのではないかと考えました。このモデルはコンピューターの原理を発見した天才的数学者のアラン・チューリングがトラやシマウマのような動物の縞模様ができるメカニズムについて発表したものです(1952)。簡単に説明すると、拡散速度の異なるお互いに反応しあう 2 つの蛋白質は濃淡の縞模様を作るという仮説です。これは動物の胎児の中ばかりでなく、単細胞の細菌の中でも起こりうるものです。

すなわち、互いに反応しあう SopA 蛋白質と SopB 蛋白質の働きで縞模様ができ、プラスミド DNA は *sopC* 領域で SopB 蛋白質に結合する性質があるので SopB 蛋白質の濃度の濃いところに存在することになるのです。コンピューターによるシミュレーションは研究結果と一致しました。この結論を 2006 年に発表しましたが、この結論にたどり着くまでにはミニ F プラスミドの分配機構の発見 (1983) から実に 23 年の年月が経っていたのでした。



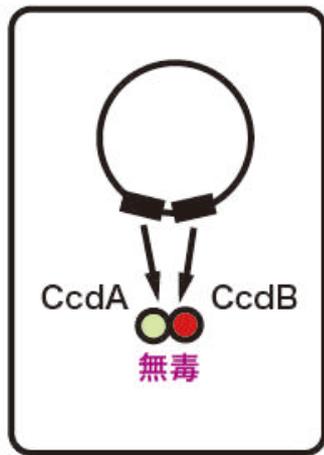
「反応・拡散モデル」

私たちのこの分配機構の研究結果は組替えDNA技術に使われるベクタープラスミドに応用されています。*sopA*・*sopB*・*sopC*を持つベクタープラスミドが海外の薬品会社によって販売されたのです。このベクタープラスミドを使うとプラスミドを失った細胞が出現しないので目的のヒトの蛋白質（インスリンや成長ホルモンなど）の産生の効率が良くなるのです。大腸菌の大量培養でのこの利点は経済的に大変大きいとのこと。

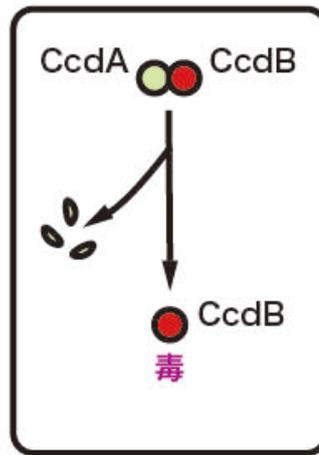
ミニFプラスミドの CCD 機構の発見

さらに私たちはミニFプラスミドの新しい機構を発見して『CCD 機構』と名付けました（CCD は control of cell death の略称）。この機構はミニFプラスミド上の *ccdA* と *ccdB* と名付けた2つの遺伝子から作られる蛋白質（CcdA 蛋白質および CcdB 蛋白質）の働きで行われるのです(5 ページの図参照)。詳細な実験の結果、CcdB 蛋白質には細胞を殺す働きがあり、CcdA 蛋白質には CcdB 蛋白質の毒性を消してしまう力があることが分かりました。したがって両方の蛋白質が共存している時には細胞は死にません。しかしながら、何らかの障害でミニFプラスミドを持たない娘細胞が細胞分裂の時に出現するとその細胞の中では両蛋白質は新たに作られなくなり、CcdA 蛋白質には壊れやすい性質があるのでそのうちに無くなってしまい CcdB 蛋白質の毒性によってその細胞は殺されてしまうのです。この CCD 機構はミニFプラスミドを持つ細胞が持たない細胞よりも優位に環境に生き残るためのプラスミドにとっての『利己的な機構』なのです(1985)。

ミニFプラスミドを持つ細胞 ミニFプラスミドを失った細胞

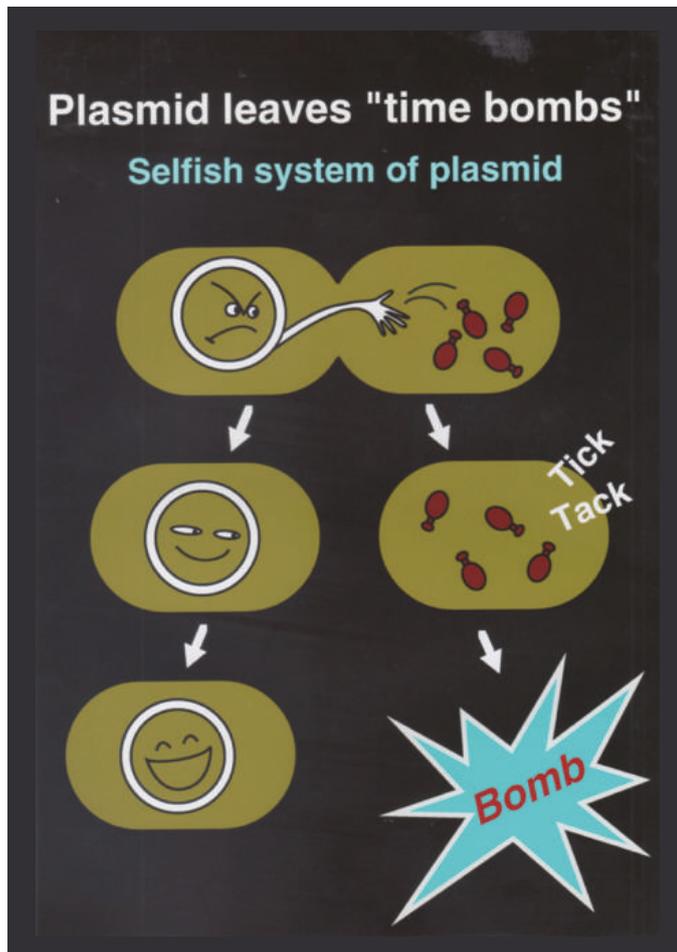


増殖する

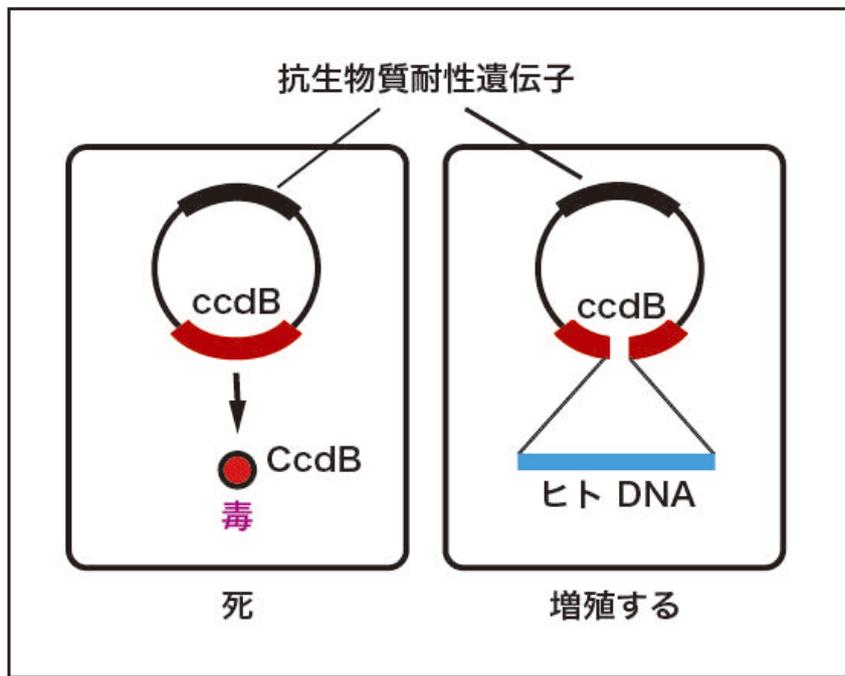


死

CCD 機構



このCCD機構の発見はプラスミドの研究者の間で評判になりました。そして、海外の薬品会社がこの*ccdB*遺伝子を組み込んだベクタープラスミドを作成し、組換えDNA 技術での活用を目的にそのベクタープラスミドの販売を始めました。このベクタープラスミドを使って人間の遺伝子をクローニングするには、試験管の中で*ccdB*遺伝子の中に1ヶ所ある塩基配列を制限酵素で切断して、同じ制限酵素で切断した人間のDNA断片と混合してから、DNA断片を接続させる酵素を働かせます。そのDNA溶液を大腸菌と混ぜて抗生物質を含む寒天培地の上に撒くと人間のDNA断片が*ccdB*遺伝子に挿入されたベクタープラスミドを持った大腸菌のみが増えてコロニー（細胞の集団）を作ります。このベクタープラスミドは抗生物質に耐性の遺伝子を持っています。しかし人間のDNA断片が挿入されずにそのまま環状になったベクターDNAを受け取った大腸菌ではCcdB蛋白質が作られて全部死んでしまいますので凄く効率の良いクローニングなのです。このようなベクタープラスミドは現在世界で広く研究に使われていますが、これも私たちの行ったプラスミドの基礎研究から生まれたものなのです。



ccdB 遺伝子を持ったベクタープラスミド

ニューハンプシャー州で開催されたプラスミドに関するゴードン研究集会でこのCCDメカニズムの発見を発表したとき、私は次のように予言しました。

「他のプラスミドも F プラスミドと同様に毒素蛋白質と中和蛋白質の対を持つと推定されるが、これらの蛋白質は F プラスミドにおける CCD 機構の蛋白質とは異なるであろう」と。
 その後、CCD のメカニズムは私の予言どおりに様々なプラスミドで次々と発見され、それはプラスミドの世界で大きなブームとなったのです。さらに、九州大学の三木良健のグループによって、精製した CcdB 蛋白質は DNA ジャイレース（DNA の超ラセンの捻れを増加させるタンパク質。

トポイソメラーゼの1種)に結合してその機能を不活性化し、その結果、細胞死をもたらすことが分かりました(1996)。

基礎研究の功績

ヴェルナー・アーバーの制限酵素の発見(ノーベル賞受賞)は大腸菌で古くから知られていた「制限と修飾機構」という現象の基礎研究から生まれたものです。「制限と修飾機構」というのは、K株の大腸菌で増殖したバクテリオファージはK株の大腸菌では良く増殖できるがB株の大腸菌では増殖し難い。そしてその反対にB株の大腸菌で増殖したバクテリオファージはB株では良く増殖するのにK株では増殖し難いという現象です。またハミルトン・スミスは他のタイプの制限酵素を発見しました(ノーベル賞受賞)。DNAの特殊な塩基配列を切断する制限酵素はその後いろいろなバクテリアから多種類が発見され、先に記したように現在組換えDNA技術によるDNA解析に広く使われています。

また、下村修は、オワンクラゲを使った研究で緑色蛍光蛋白質(GFP:green fluorescence protein)を発見しました(ノーベル賞受賞)。下村さんの仕事は注目されて1959年にアメリカの大学に招聘されました。このGFPを組換えDNA技術により他の蛋白質に結合させることにより、細胞内の蛋白質の分布を解析することが可能になり、世界中の研究に威力を発揮しています。下村さんは何もノーベル賞をもらおうなどと考えて実験をやっていたのではなく、光る蛍光蛋白質を解析すること自身に情熱を燃やしていらっしやっただだと思います。しかし85万匹のオワンクラゲを使ったこの基礎研究の成果が結果的には広く応用されているのです。

日本における科学研究力低下の背景

「日本の科学研究力がこの頃落ちてきているのではないか」と憂慮する新聞記事などが目に付くようになりました。特に基礎研究の分野での力が減少しているのではないかという指摘です。昨今の日本では長期的展望のもとで一つの研究課題を落ち着いて続けられない環境になってきており、その要因として、特定の狭い分野に高額な研究費を集中的に配分するために、それに反比例して定常的な研究・運営費が縮小圧迫されていることが挙げられています。

また、学生の現状として、大学院の博士課程をせっかく修了した彼らも定職に就くことができずにポスドク(博士研究員とも呼ばれる)の身分で、研究プロジェクトごとに任期付き研究者の非正規雇用されるのが普通で、その後の地位の補償もないことが多く、次々と研究機関を渡り歩かざるを得ない状況の中で自分のアイデアを膨らませての自由な研究を落ち着いて続けることができない状態も問題視されています。これでは若者が研究に情熱を出しきれないのも当然ではないでしょうか。

近年日本人の科学者が毎年のようにノーベル賞を受賞していますが、それは20~30年前の基礎研究の遺産なのです。基礎研究から大発見が生まれてくるのですから、持続的な基礎研究がもっと潤沢な研究費で援助されることが必要なのではないのでしょうか。そして安定した研究環境での若い研究者の長期的な研究が援助されることが必要だと思います。

2019年3月記

謝辞

この原稿の英文は体細胞遺伝学分野の専門家である国立遺伝学研究所の瀬野悍二名誉教授(このWEBマガジンの編集者)によって生き生きとした分かり易い文章に校正していただいたことに感謝いたします。

より詳細な研究内容を知りたい方は『平賀壮太のホームページ：続編』
<https://hs12345.jimdo.com> の No. 6 のPDFファイル『大腸菌と私』をご覧ください。