

生物化学 (分子遺伝学)

あるcDNAが本当に目的とするタンパク質のものであるか否かどのようにして知ることが出来るか。その方法について述べよ。H03

cDNAの塩基配列の解析を行う。それを対応するアミノ酸配列に翻訳すれば、目的のタンパク質をコードしているかが分かる。

その塩基配列決定法については以下。

DNAの塩基配列決定法について説明しなさい。H06

・Gilbert法

DNA断片の一端を ^{32}P で標識し、そのDNAを4つの試料に分け、ATCGの特定の1or2塩基を破壊する。この時、どのDNA分子も数箇所しか切れ目が入らないように反応条件を調節する。これをピペリジン処理することで、切れ目が完全に切断される。

こうして一連の標識された断片が生じる。これをPAGEで断片の長さによって分離する。ゲルをオートラジオグラフィーにかけて、X線に写ったバンドの並びから、DNAの塩基配列を読み取る。

・Sanger法

反応液に、一本鎖DNAとそのプライマー、混合比の決まった特定のddNTPとdNTP、その他の3種のdNTPを入れておく。

DNAポリメラーゼを加えると、重合反応がプライマーから始まり、ddNTPが取り込まれるとそこで伸長は止まる。適正なddNTP:dNTP比を選べば、様々な長さの標識されたDNA鎖ができる。これをATCGの4種について行い、PAGEで分離する。その後オートラジオグラフィーにかけて、バンドのパターンから塩基配列を決める。

遺伝子操作におけるPCRの原理について述べよ。またその利用例を2例示せ。H04 H08 H12 H16

まず二本鎖DNAを加熱し、二本鎖を解離させる。

反応液を冷却するとプライマーがそれぞれの鎖にアニーリングを起こす。

Taqポリメラーゼが鋳型に相補的な新生鎖DNAを合成する。

反応液を再び加熱し、元の鎖と新生鎖を解離させる。

反応液を冷却すると、プライマーが新生鎖にアニーリングする。(もちろん元の鎖にも)

Taqポリメラーゼが新たに相補鎖を合成し、目的の長さのDNAを得る。

これを繰り返すことで、目的のDNAを増幅することができる。

利用例は、

がん細胞に特徴的な遺伝子領域を検出できるので、白血病の治療後に悪性細胞が根絶したかどうか調べることができる。

ウイルスの配列に対応するプライマーを用いて、抹消血中の細胞から抽出したDNAにPCRを行うことで、感染細胞に組み込まれたHIVなどのDNAを検出できる。(ウイルス感染の確認)

遺伝子操作技術の薬学分野(医学分野も含む)への応用の現状とその将来への展望について述べよ。H05

(gene targetingの医薬分野への応用について説明しなさい。H10)

糖尿病患者に用いられるヒトインシュリンがある。組み換え分子の生産以前は、インシュリンはブタやウシの膵臓から得られていた為、患者によっては抗体が産生され、免疫反応を起こすことがあった。組み換えヒトインシュリンは天然物と同じであるので、免疫原性に問題がなくなった。

これからの応用として、腫瘍における腫瘍遺伝子や感染患者におけるウイルス遺伝子の発現を阻害するアンチセンスDNA・RNAによる治療が考えられる。

次の語句を説明せよ。H05

(A) Splicing

真核細胞において、mRNAはいくつかの部分に切断され、イントロンは除去されて、エクソンのみが再結合し、新しいmRNAが形成される過程のこと。

(B) restriction endonuclease

特定の塩基配列を認識して、特定の塩基配列部位を切断する酵素。(認識部位と切断部位は必ずしも同じではない)

(C) transformation

外部からDNAを導入し、その遺伝的性質を変えること。またその操作。

または、正常な細胞が無制限に分裂を行うようになる、つまりガン化すること。

(D) oncogenes

その機能が異常になることにより、正常細胞から悪性腫瘍細胞への分化を引き起こす遺伝子のこと。

機能が過剰になることによりがんの原因となるがん原遺伝子と、

正常な状態で発ガンを抑制しており、その機能が失われることによってがんの原因となるがん抑制遺伝子がある。

(E) promoter

転写の際に、RNAポリメラーゼが結合するDNAの特定の塩基配列で、RNA合成の開始信号である。

(F) plasmids

制限酵素の遺伝子や抗生物質を破壊する酵素の遺伝子を含むリング状のDNAのこと。大腸菌のような細菌の中で染色体とは別に存在する環状二本鎖DNAで、細胞分裂や染色体DNAの合成とは無関係に増殖できる。

DNAが遺伝情報物質であることの合理性をDNAの構造から説明しなさい。H06

ATCGというたった4つの塩基の配列によって膨大な遺伝情報が得られる。

二本鎖であるので、二本鎖がほどけてそれぞれが鋳型となることにより相補鎖を合成し、もとと全く同じ二本鎖DNAが合成するという半保存的な複製ができる。

標的遺伝子組み替え技術を用いたマウスの個体レベルでのgene targetingの方法について述べよ。H07 H10 H11

ES細胞への電気穿孔法による遺伝子導入により行われる。

ES細胞を濃縮し、移入するDNAと混合した後、電気パルスをかけて細胞膜に一過性に穴を開ける。この時DNAはES細胞内へ入る。

これを支持細胞を用いて培養し、移入したDNAがES細胞染色体と相同性組み換えを起こす。相同組み換えを起こしたES細胞を胎盤胞に顕微注入する。

遺伝病の分類及びその診断法について述べよ。H07

単一遺伝子疾患、染色体異常、多因子遺伝病、ミトコンドリア遺伝病、体細胞遺伝病 の5つに分類される。

単一遺伝子疾患における遺伝子異常には、1)点突然変異、2)欠失 / 挿入、3)遺伝子変換、4)3塩基反復配列数の増加がある。

未知の点突然変異を検出するために現在よく用いられている方法は、

- 1) 疾患遺伝子のエクソンごとにプライマーを設定しPCR法でゲノムDNAを増幅し、
- 2) SSCP法あるいはWAVEによるheteroduplex法で、正常コントロールと異なるパターンを示すエクソンを選び、
- 3) そのエクソンについてシーケンスを行い、点突然変異を検出する。

疾患遺伝子が発現している組織が得られる場合にはその組織からmRNAを抽出し、逆転写反応でcDNAを作成し、これをPCR法で増幅させ(RT-PCR法)、このPCR産物をシーケンスする、という方法により点突然変異を検出することができる。

欠失 / 挿入や遺伝子変換の診断は、その異常部位が数塩基と小さい場合には点突然変異の検出と同様の方法で行う。異常部位が数十kbと大きい場合には、染色体標本を用いたFISH法で診断できる場合がある。

塩基反復配列数の増加の診断は反復数が多数の場合は Southern解析を必要とする場合があるが、一般にPCR法で診断可能である。

ADA欠損症に対する遺伝子治療法について述べよ。H08

アデノシンデアミナーゼ欠損症にたいして、レトロウイルスベクターに正常のアデノシンデアミナーゼ遺伝子を組み込み、患者から体外に取り出された末梢血リンパ球に導入した後、体内に戻すという方法により行われ成果をあげつつある。

このように正常な遺伝子を体内に導入することにより治療しようとする遺伝子治療の試みがなされつつある。

相同性遺伝子組み替え Homologous Genetic Reaction の生成機構と生物学的意義について述べよ。(但し、人為的な相同性組み替えは除く) H08

機構：(減数分裂における相同性組み換え)

1 .二つの相同染色体の一方の染色体にある二本鎖切断が、エキソヌクレアーゼの作用で二本鎖ギャップに広げられる。この時、3´末端側を持つ鎖が突き出るように分解される。

2 .突き出した3´末端は、もう一方の無傷の相同染色体の相補鎖を対合すると同時に他方の鎖を押し除ける

3. 侵入してきた3'末端からDNA鎖がDNAポリメラーゼ作用を分岐点移動によって二つの交叉点をもつホリデイ中間体を形成する。

4. はじめの二本鎖切断に由来するDNAギャップ部分が、DNAポリメラーゼでうめられる。

5. 特別なヌクレアーゼによるホリデイ中間体の切断により、2種類の組み換え産物を生ずる。産物セット2では、修復されるDNA領域の両方の側で組み替えが起こっている。

意義：

1. 何種類かのDNA損傷の修復に関与すること。
2. 真核細胞では、最初の減数分裂の際に染色体が正しく分離するために必要とされる染色体間の一時的な結合状態を作ること。
3. ある集団における遺伝的な多様性に寄与すること。

transgenic mouseの作り方とその応用について説明せよ。H14(transgenic mouseの作成法について説明しなさい。H09)

交尾後の雌マウスの輸卵管より受精卵を摂取したのち、雄性または雄性前核のうちの1つに遺伝子DNAを注入する。

顕微注入を受けた受精卵は、去勢された雄マウスと交尾した偽妊娠雌マウスに移植する。

誕生した子マウスについて、注入DNAが挿入されたかどうかサザンプロット法かPCR法により確認する。

応用として、ヒト疾患のモデルとして利用される。

多くのウイルスは宿主特異性があり、一般には一つの種のみで感染する。従ってヒトの疾患のもとになるウイルスは動物実験ができないが、ヒトのウイルスDNAをマウス受精卵に直接トランスジェーンとして注入すれば、容易に感染モデル系が樹立される。

また、ある遺伝子がある特別な標的細胞に発現させる方法は、マウスの発生を研究するための有力な実験系としても利用されている。

conditional gene targetingの方法とその利点について説明しなさい。H10

conditional gene targetingって何ですか。条件つき遺伝子ターゲティング。

遺伝子構造改変法(in vitro mutagenesis)についてどのような改変法があるか列記した上で、それぞれの原理について説明せよ。H11(in vitro mutagenesisについて説明せよ。H14)

ランダム変異導入法

・制限酵素部位を変える

粘着末端を作る制限酵素でDNAを切断し、その粘着末端について、S1ヌクレアーゼ処理して平滑末端に縮めてDNAリガーゼで繋げるか(欠失変異導入)、DNAポリメラーゼで平滑末端に伸ばしDNAリガーゼで繋げる(挿入変異導入)。

・オリゴヌクレオチドリンカーを挿入する

まず制限酵素によって直鎖DNAにする。これをエキソヌクレアーゼ処理して両端を削る。これにリン

カーを付けて、制限酵素で切断し、新しいベクターに繋げる。これにより整列欠損変異体が調整できる。

・プラスミド DNA を化学処理する

次亜硫酸ナトリウムを一本鎖 DNA 上の C に作用させて、U に変化させる。U は T と構造が似ているので、A と塩基対が作れる。これにプライマーをつけて、DNA ポリメラーゼで完全な二本鎖にする。これで C を A に変異させることができる。

部位特異的変異導入法

・合成オリゴヌクレオチドを導入する。

入れたい変異を持ったオリゴヌクレオチドを一本鎖鋳型 DNA とアニールする。このオリゴヌクレオチドをプライマーとして、DNA ポリメラーゼで DNA 合成を行い、リガーゼで連結する。この不完全二本鎖 DNA を形質変換法で大腸菌に導入する。

・カセット変異導入法

変異を入れたい配列にはさんで EcoRI と Hind III の切断部位のあるプラスミド DNA を出発材料とする。制限酵素小断片を除去し、入れたい変異をもつカセット (DNA 断片) をプラスミド DNA にリガーゼで繋ぐ。カセットは 2 本の合成オリゴヌクレオチドからなるが、アニールしたとき EcoRI と Hind III の突出部位ができるようにつくってある。

培養 cell に gene を導入する方法 3 つ説明 H16 (培養細胞への遺伝子導入法について説明せよ。H11)

粘着末端を作る制限酵素で DNA を切断し、そこに同じ粘着末端をもつ外来 DNA を混ぜて、DNA リガーゼで繋げる。

平滑末端をもつ 2 本の DNA 鎖をターミナルトランスフェラーゼによって粘着末端 (例えばポリ dA とポリ dT) に変え、塩基対を形成させる。そして、適当な酵素で一本鎖部分のギャップを埋め、DNA リガーゼで完全に結合させる。

粘着末端を作る制限酵素で DNA を切断し、その粘着末端を DNA ポリメラーゼで平滑末端に変える。それを DNA リガーゼで繋げる。

PCR 法において耐熱性 DNA polymerase を使用する利点について述べよ。H12

DNA 増幅の 1 サイクルごとに加熱操作で DNA ポリメラーゼが失活するため、毎回 DNA ポリメラーゼを加える必要があり、DNA 増幅に限界があった。しかし、耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いると二本鎖 DNA を分離するために加熱しても酵素は失活しない。これにより PCR が効率的で簡便になり、自動化への道も開かれた。

DNA microarrays (DNA tips) を説明しなさい。H12

ガラスやシリコン製の小基盤上に DNA 分子を高密度に配置したものである。マイクロアレイを用いると数千から数万種といった規模の遺伝子発現を同時に観察することができる。

スタンフォード方式は、あらかじめ調製された DNA 断片をスライドガラス上に高密度にスポットしたマイクロアレイを意味していた。この場合、比較解析対象のターゲットは、2 つの異なる試料から RNA を

調製し、逆転写時に異なる蛍光色素により標識することによって調製する。この2つのターゲットをアレイ上で競合的にハイブリダイゼーションさせ、各プローブ DNA のシグナルを数値化し解析する。Affymetrix 社方式もあるけど割愛。

組み換えレトロウイルスを用いた遺伝子治療法について説明しなさい。H13

変異遺伝子を持つ細胞に正常遺伝子を移入することによってその機能を回復させるという原理による。例えば嚢胞性繊維症(CF)において、CFTR のcDNA をレトロウイルスベクター上にクローン化し、そのベクターを CF 患者から取り出した骨髄細胞や繊維芽細胞に感染させそれを戻す、またはベクターを直接患者の細胞内に移入することで、治療を行う。

ついでにレトロウイルス(RNA ウィルス)のこと。もまとめて書いたらいいかもしれません。レトロウイルスが細胞に感染すると、その RNA ゲノムは DNA に逆転写される。ウィルス DNA は宿主のゲノム中に効率よく組みこまれ、そこに永久的に存在して、細胞分裂の度に複製される。

制限酵素の働きとその応用について説明せよ。H14

働きは略。

様々な制限酵素を用いて制限酵素切断断片を作ること、制限酵素切断地図を作ることができる。更には塩基配列決定の手立てとなる。

また組み換え DNA を作る手段にもなり、プラスミドを外来遺伝子をクローニングする為のベクターを作ることができる。例えば EcoRI によって環状プラスミドの一箇所を切断し、直鎖にする。そこへ外来の EcoRI 切断片を混ぜ合わせ、DNA リガーゼを加えると、新しいハイブリッドプラスミドができる。(EcoRI 切断による粘着末端同士をつなげる)

単一遺伝子疾患 3 つ説明 H16

サラセミア(地中海貧血)

ヘモグロビンを形成する4つのアミノ酸の鎖のうち1鎖の産生が不均衡なために生じる遺伝病。グロビン鎖の合成低下によるサラセミアと、グロビン鎖の合成低下によるサラセミアがある。ヘテロ接合体であれば、貧血は軽いが、ホモ接合体の場合には重度の貧血となる。

筋ジストロフィー

筋肉の栄養障害により体を動かす動作ができなくなる。

遺伝形式や症状によって様々に分類されるが、最も重症で症例も多いのがデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)である。

DMD は3歳前後の男児に発病する。X染色体短腕(Xp21)に欠失があるために、筋肉中にジストロフィンが欠損していることが原因。

嚢胞性繊維症

CFTR 遺伝子が上手く機能しないことによる遺伝病。CFTR タンパク質は、細胞から余分な塩を吐き出す作用があり、これが不足することで、特に体液が粘性を帯び、その結果さまざまな器官の活動が障害される。例えば膵臓で粘液がたまると、膵臓がインスリンを分泌できず、糖尿病になる。