

組換えDNA利用技術

Recombinant DNA Technology

高 橋 秀 夫*

Hideo Takahashi

1. はじめに

異なる起源の DNA 分子を試験管の中で継ぎかえ、得られた雑種 DNA 分子を再び生きた細胞の中へ導入する技術は、組換え DNA 技術と呼ばれる。遺伝子操作あるいは遺伝子工学といった場合にも、この組換え DNA 技術が中心に据えられており、ほとんど同義で用いられることも少なくない。組換え DNA 技術の原理が提唱されたのは、1970年代に入ってからのことであるが、その後の技術的発展と生物関連の諸分野への波及には驚くべきものがある。単に分子遺伝学やその応用分野である育種(分子育種)ばかりでなく、生物を対象とするほとんどの分野に及んでいる。遺伝学という基礎的な学問から派生した技術が、あらゆる生物関連の分野に導入可能となったことを示している。

組換え DNA 技術は、1960年代までに蓄積された分子遺伝学の知識から、ある意味では必然的に発生した技術である。この技術は、一つには基礎的な生物関連分野に大きな影響を及ぼしつつあるが、同時にその応用分野にもはかり知れないインパクトを与えている。本稿では、現在バイオテクノロジーと呼ばれる領域の中心的存在として発展している組換え DNA 技術の現状と展望について私見を述べたい。

2. 分子遺伝学と組換えDNA技術

2.1 分子遺伝学の進展

物理学、化学、生物学などの理科系の基礎学問の中で、生物学は常に最も後れた学問であると言われ続けている。肉眼ではふれることのできないウイルスや微生物から植物、動物、そしてヒトに至る膨大な対象を扱う学問であることがその原因の一つである。さらに、おのおのの個体、あるいは細胞が小宇宙にもたとえられる深遠な世界を構成しており、それらの営みの原理

を解き明かすことは、困難を極めているからでもある。生物の世界は、それぞれの種が共通の原理と独自の原理を織りまぜて躍動する小宇宙なのである。

1960年代の中ば過ぎ、分子遺伝学は生物のもつ基本的な遺伝情報に関する描写を終えたと考えられた。大腸菌とそのウイルス(ファージ)を対象としていたとは言え、遺伝情報の継承の仕組みや発現のカラクリを一定程度、描き出すことに成功したわけである。

生物の遺伝情報の担い手が DNA であることが、疑いようもなく明らかにされ、DNA 上の情報は、RNA (メッセンジャーRNA)を介して蛋白質へと発現して行くという転写や翻訳の仕組みや、DNA, RNA 上の塩基の並び方が遺伝暗号としてアミノ酸に対応していることなどが解明された。このような仕組みが、生物界全体に通用できるものであることを疑う積極的な理由はほとんどなかったのである。

しかし、DNA の塩基の並び方(塩基配列)を決めることは、当時ほとんど不可能に近いとさえ考えられていた。DNA が巨大分子であったからである。遺伝情報の担い手として最も重要な物質について、その塩基配列はもとより、DNA の特定の部分—そこには遺伝子が乗っているが、それを分離精製することさえまならなかった。大腸菌のような単純な細胞においてさえ、DNA のサイズはおおよそ 2×10^9 (ダルトン) もあり、塩基対(bp)にして400万近くになる。ヒトの細胞あたりの DNA は、大腸菌の800倍と言われている。大腸菌の染色体を構成する DNA は、1つの分子(二本鎖DNA)であり、通常の実験条件では、そのまま精製することさえ困難である。サイズが巨大であるために、物理的な切断が起こり、バラバラに切れてしまうからである。たとえば、100個の断片に切れた大腸菌の DNA でも、各々の断片のサイズは 2×10^7 もあり、大きい蛋白質の10倍以上もある。バクテリオファージの中には、比較的小分子の DNA を持つものも知られていたがそれでもその DNA の塩基配列を調べるのに

* 東京大学応用微生物研究所第2研究部助教授

〒113 東京都文京区弥生1-1-1

は、いくつかの難かしい点があった。

このように、遺伝情報の担い手としての DNA を解析して行くことが困難であったために、1960年代の後半は、分子遺伝学者にある種の手詰り感が漂っていた時代であると言える。

2.2 制限酵素の発見

生物の染色体を構成する DNA、すでに述べたように巨大分子であるが、その領域によって含まれている遺伝情報が異なる。このことは、古くから遺伝的解析によって示されている。DNA の特定の領域を分離精製できれば、その構造や機能を知ることが出来るわけである。生体高分子の中でも桁外れてサイズの大きい染色体 DNA を特定の領域で切断する唯一とも言える方法は、DNA の塩基の並び方を見分けて切断するような酵素を使うことである。

制限酵素(Restriction Enzyme)は、制限修飾現象という細菌とファージとの間に見出される特殊とも言ふべき現象の研究から発見された。“魔法のハサミ”にもたとえられるように、制限酵素は DNA の特定の塩基配列を認識して切断を起こす。1968年に最初の制限酵素が分離されているが、組換え DNA 技術に用いられているタイプの制限酵素の発見は、1970年代に入ってからである。制限酵素には、見分ける塩基配列の違いなど特異性の異なるものが多数発見されており、DNA を扱う上で不可欠の道具となっている。制限酵素の分離と利用は、組換え DNA 技術の確立と進展に決定的な役割をはたしたことは言うまでもない。一方、DNA を連結する酵素(DNAリガーゼ)、DNA 合成に関与する DNA ポリメラーゼや逆転写酵素などを始めとして DNA 関連酵素群の発見や性質の解明も、大きな影響を与えた。いずれの場合も、ファージなどの分子遺伝学の進展と相俟ってなされたものである。

2.3 組換え DNA 技術

組換え DNA 技術は、制限酵素を始め各種の DNA 関連酵素の利用と DNA 複製などに関する基本的な理解の深まりの中から必然的とも言えるような形で確立されたものである。DNA の切断と再結合によって新たに雑種 DNA 分子を作り、それを生きた細胞に入れて複製増殖させるという技術は、すべての生物が遺伝情報の担い手としての DNA を持っているということから、生物学にあるいは生物と関連する諸分野に革命的とも言える影響を与えることとなった。自然の条件で染色体も DNA が組換えを起こすが、このような組換えは生物界全体から見れば極めて限られた範囲の生

物種の間でしか起らない。自然の条件で起こる組換えは、染色体 DNA 間の類似性(相同性)や DNA の接触の機会が限られていることなどから、相当に限られた生物種でしか起り得ない。これに対し、分離精製した DNA を試験管内で処理して雑種 DNA、すなわち組換え体 DNA を作る場合には、いかなる起源の DNA 分子間でも可能となる。自然界では起こり得ないような生物種間で組換え型 DNA を作る事が非常に簡単な処理で出来るようになった。唯一の問題は、このようにして作った雑種 DNA 分子が生きた細胞の中で複製出来るか否かである。複製を出来るようにするためには、雑種分子を形成する一方の DNA が特定の細胞で複製できるようにしておけばよい。このように人工的に造成した雑種 DNA 分子を細胞中で複製出来る機能を持たせたものをベクター(vector)と呼び、プラスミドやファージの DNA がベクターとして用いられる。実用的に用いられているベクターは、細胞中にもどした時、その存在が見分けられるような遺伝的性質を付与してある。重要な点は、ベクター DNA 分子と連結させた別の起源の DNA 部分は、それ自身に複製する機能がなくても、1つの DNA 分子として複製することである。このことは、まったく別の起源の DNA が本来複製増殖できない別の細胞中で複製できることを意味する。人工的に造成した雑種 DNA 分子は、巨大な染色体 DNA の一部を組込んだ状態で増殖する。すなわち、ある特定の DNA 領域だけを取り出して、ベクター DNA の複製系の一部として増殖させることが可能となる。このような操作は、クローニングと呼ばれ、組換え DNA 技術の最も基本的な方法である。

ベクター DNA は、クローニングベクターとも呼ばれ、特定の細胞でのみ複製可能である。そこで、クローニングベクターとその宿主となる細胞とは一組にして宿主-ベクター系と呼ばれる。組換え DNA 技術が確立されたのは、大腸菌(*Escherichia coli* K12)を宿主細胞とする系であり、現在は各種の細菌や酵母、動植物細胞においても宿主-ベクター系が確立あるいは開発されつつある。

クローニングに用いられる DNA は、細胞の染色体 DNA の断片とは限らない。メッセンジャー RNA を分離することが出来る場合には、その RNA を鋳型として逆転写酵素によって DNA(cDNA)を合成し、ベクター DNA と連結させてクローニングすることもできる。さらに、最終生産物である蛋白質のアミノ酸配列があらかじめわかっているような場合には、遺伝暗

号から予想される DNA を化学合成し、クローニングすることもできる。インシュリンをはじめ比較的分子量の小さい蛋白質あるいはポリペプチドに対応する DNA のクローニングは、合成 DNA を用いて行われることが多い。DNA の化学合成が容易となった現在では、数百塩基にも及ぶ DNA を合成し、クローニングすることもしばしば行われている。このように、ベクターに挿入する外来 DNA は、いかなる起源のものであってもよいわけである。組換え DNA 技術によって、種の壁が破られたとされる所以である。

巨大分子である染色体 DNA の一部などを小型のクローニング・ベクターに連結し、複製させる組換え DNA 技術の確立によって、遺伝子の構造や機能、遺伝子発現やその調節の仕組み、あるいは遺伝子産物を得てその機能などを詳細に解析することが可能となり、次々と新しい事実が明らかにされている。組換え DNA 技術の確立は、分子遺伝学に新しい強力な手段を与えたばかりでなく、生物学の諸分野にも極めて強い影響を及ぼすとともに、遺伝子工学と称される分野の発展にも大きな力となっている。

3. 組換え DNA 技術の現状と展望

組換え DNA 技術によって何がもたらされたか、あるいは何が可能となっているかなどについて若干の考察を加えたい。

3.1 遺伝子構造の解析

組換え DNA 技術の確立されて以降で、当初の予想をはるかに越えて進んだことがらの第一は、DNA の塩基配列決定法の確立と簡易化、それによってもたらされた多数の遺伝子の塩基配列の決定である。1977年に発表された Maxam と Gilbert による化学修飾分解法、Sanger らによるチェーン・ターミネーター法、さらに Messing らによる M13 クローニング・ベクターの開発などによって、短期間にかなりの長さの DNA 塩基配列を決定することが可能となった。塩基配列の決定に用いられる DNA は、特殊な場合を除いてすべてクローン化によって得られたものである。組換え DNA 技術によって、あらゆる起源の DNA (遺伝子) の塩基配列が決められるようになった。DNA の塩基配列が容易に決定できるようになり、今まで詳しく分からなかった遺伝子の構造や発現制御の機構などの理解が飛躍的に増した。このことは、特にクローン化した遺伝子の効率的な発現を行わせるための方策を与えることになり、遺伝子産物である蛋白質を多量に得る

という組換え DNA 利用技術をも発展させることとなった。

DNA の塩基配列が決められるようになり、対応する蛋白質のアミノ酸配列を予測することが可能となった。現在では、また、遺伝子の発現や制御に必要な領域、すなわちメッセンジャー RNA の転写開始(プロモーター領域など)や終結(ターミネーター領域)、翻訳開始や終結のシグナル領域、さらには遺伝子発現の調節制御に関する領域などの蛋白質の構造と対応しない構造などがしだいに明らかにされている。単に大腸菌やそのファージなどに限定されていた分子遺伝学の領域が、その他の微生物やさらに高等な生物にまで拡大されたことも意味している。とりわけ、真核生物で広く認められる介在配列(イントロン)の存在は、予想外のことと言える。また、繰返し配列、可動 DNA の存在なども明らかにされている。さらに、ガンウイルスの染色体への組込み、あるいは発癌の機構、免疫に関与する種々の遺伝子の構造や機能の解析、発生や分化的機構などもしだいに明らかにされつつある。これらの研究のほとんどが遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定などによってなされたものであることは、否定できない事実である。

このようにして決定された DNA の塩基配列の総数は、すでに500万塩基対を突破しており、年々増加している。ファージや細菌の遺伝子からヒトの遺伝子まで含めた総量であり、数千遺伝子に相当する。あらゆる生物種を含んでいることを考えるとまだきわめて限られたものであると言える。塩基配列が比較的容易に決められるようになり、1960年代後半に生じた手詰り感は完全に解消されたように思われる。しかしながら、DNA の二次構造の決定によって対応する蛋白質の一次構造は容易に知られるようになったが、それ以上の理解はまだ出来ていない。また、各 DNA 構造の本当の意味についてもまだ充分明らかにされているとは言えない。DNA の塩基配列がその生物細胞の複製や転写などに関与する複合酵素群との相互作用を通じて意味をもってくると、DNA の生きた細胞中での存在状態にかかわっていることなど、まだまだ未解決なことが多い。

3.2 遺伝子産物の生産と増強

特定の遺伝子のクローニングが出来るようになり、用いる宿主細胞の遺伝子発現や制御の機構についての研究が盛んに行われるようになってきている。多くの場合、クローン化した異種遺伝子そのままが発現して、遺伝子産物、すなわち蛋白質が作られてくることはない。

生物種によって遺伝子の発現や制御に関連する因子は異なっていることが多いからである。しかし、大腸菌など詳しく研究されている細胞内では、遺伝子の発現がどのような条件で起こるかかわっており、クローン化した遺伝子からの発現を起させることは特別難かしいことではない。

基礎的な分子遺伝学の成果を直接利用して遺伝子の発現を起させ、さらにその効率を高めることが可能となっている。一方、遺伝子産物を効率よく得ようとする研究の成果も、分子遺伝学の発展に寄与することも少なくない。このように基礎的な研究と応用的な研究とはその境界部分においてはほとんど区別することが出来なくなっている。

工業的な面で組換え DNA 技術が利用されているのは、もっぱら有用な蛋白質などを経済的に得ようとする領域についてである。特に医薬品など蛋白質自体が付加価値の高い場合である。

インシュリンや成長ホルモンを初めとする各種のポリペプチド性の蛋白質、インターフェロンを始めとする抗ウイルス、抗腫瘍性などの効果を示す生理活性物質、あるいはウイルス抗原などに対応する遺伝子筆々は、組換え DNA 技術が確立された当初からのターゲットであり、時期的なズレは多少あるものの、実用化の最終段階に入っているものが多い。

このほか、各種の有用酵素遺伝子のクローン化と発現の増強、あるいはアミノ酸をはじめ有機酸などの生産を向上させるために遺伝子クローニングの技術を用いることも試みられている。基礎化学品の製造プロセスの効率化、バイオマスによる新しい再生エネルギーの製造、エタノールやメタノールなどの製造プロセスの効率化など、一連の酵素が関与するような系においても遺伝子クローニングの手法が利用されつつある。目的とする最終生産物が遺伝子の産物そのものでなく、一連の遺伝子産物(酵素)が作用した結果生成される物質を産業的に利用する方向は、最も応用範囲が広いが、それだけに困難な点も多い。

組換え DNA 技術を産業に利用する場合には、単にある遺伝子をクローン化して、生産物を多量に効率よく得るというだけでは終らない。従来の醗酵技術や、バイオリアクター、育種技術、化学工業的な面での各種の技術との関連における利用がなされる必要がある。また、組換え DNA 技術に用いられる遺伝子の素材をどこに求めるかということも重要な点である。優良な遺伝子資源を確保することは、微生物などを中心とし

て行われているスクリーニングがいかに成果を上げるかに依存している。組換え DNA 技術は、すでに見つけられている遺伝子の組合せを変えたり、改良することにはきわめて有効であるが、新しい遺伝子素材を探し出すことには、ほとんど有効性を期待できないからである。

3.3 宿主-ベクター系について

現在、成果を上げている遺伝子クローニングのほとんどは、大腸菌を宿主細胞とするベクター系を用いてなされたものである。また、物質遺伝子産物の生産という面からだけ見ても、ほぼ最大限の生産が可能となっているものも少なくない。しかし、医薬品などに求められる高純度の生産物を経済的に得ることは必ずしも容易なことではない。また、大腸菌などの細胞中で非常に不安定な蛋白質も知られており、それを克服するための努力がはらわれている。さらに、蛋白質の修飾(グルコシル化やプロセッシングなど)や高次構造の保持など大腸菌中では元の細胞におけるように行かない例も多い。

一般的に言えば、大腸菌の宿主-ベクター系は、DNA や蛋白質の安定性に優れ、それらの分離・精製も容易である。大腸菌の系で行えることをわざわざ別の宿主-ベクター系で行なう必然性はほとんどない。

しかしながら、このことは大腸菌以外の宿主-ベクター系が不必要であることを意味しない。むしろ逆に、生物の細胞は、その種類に応じて優れた点があり、利用できる細胞は無数にあると言ってもよい。細菌からヒトの細胞に至るまで、各生物種の細胞には、普遍的な性質とともに、それぞれの細胞に固有な特性があり、一つの生物種の細胞がすべての面において他より優れているということもあり得ない。大腸菌の細胞でうまく行くことも多いかわりに、うまく行かないことも多いわけである。微生物は、その多様性の故に、その他の高等動植物細胞では行ない得ない機能を持つものが存在する可能性が高い。事実、各種の醗酵工業に用いられている微生物は、その特異的な機能が利用されているわけである。もちろん、微生物では行ない得ないことも沢山あるわけであるが、どの生物種の細胞をどのように用いるかは、解決すべき個々の問題によって違ってくる。

各種の抗生物質をはじめ多数の生理活性物質を産生するというユニークな性質をもつ放線菌群、各種の有機化合物の合成・分解などの機能をもつ *Pseudomonas* 属細菌、窒素固定を行なう細菌、単細胞真核生物

である酵母，光合成を行なう微生物や植物細胞，さらには高等動物の未分化細胞や分化した細胞，等々各々特有の機能や性質を持っており，他の細胞では代替できないものが多い。まだ，限られた範囲ではあるが，これらの細胞を宿主とする宿主-ベクター系が開発されており，それぞれの細胞のもつ機能の解明や利用が始められている。

3.4 遺伝子の改変

DNA は，すでに述べて来たようにあらゆる生物の遺伝情報を担っているが，それ自体では酵素のような触媒活性をもたない。DNA 上の遺伝情報は，蛋白質に翻訳されて始めて機能を発揮することになる。一方蛋白質は，それ自体が遺伝情報となって蛋白質を作り出すことは出来ない。遺伝情報担体である DNA と酵素や構造体として，触媒作用や細胞内の種々の構造体形成に関与する蛋白質とははっきりと役割が違っているわけである。

蛋白質の機能は，基本的にはそれを構成するアミノ酸の配列によって決まっている。一方，蛋白質のアミノ酸配列は，DNA 上の塩基配列によって一意的に決っている。DNA 上の塩基の変化は，蛋白質の変化を引き起こす。このことは，DNA 上の塩基の変化が突然変異となって生物の性質が変化することからもわかる。このように DNA の塩基配列に手を加えることにより蛋白質の構造や機能を変化させることが可能である。

蛋白質の構造と機能との関係を知るためには，その一次構造のみならず高次構造が明らかにされなければならない。さらに，どの部位のどのアミノ酸が酵素活性などとどのように関連しているかを知るためには，アミノ酸の置き換えなどによって，活性や構造がどう変化するかなど基礎的なデータの蓄積が不可欠である。

アミノ酸の配置とその機能との間にある一般法則が解明されれば，自由に酵素の活性や特異性を変化させることが出来るようになる。また，化学合成した人工遺伝子を用いて活性の強い安定な酵素を作り出すことも可能となるかもしれない。

アミノ酸の置換は，クローン化した遺伝子の塩基配列を変えることによって行なうのが，最も確実である。DNA 上の特定の部位をねらい撃ちして変化させる方法は，部位限定突然変異誘起 (Site-directed Mutagenesis) と呼ばれる。この方法にはいくつかあるが，最近では化学合成した DNA (オリゴヌクレオチド) を用いる場合が多い。この方法を用いれば，どのアミノ酸をどのアミノ酸に変えると蛋白質の構造や機能がどう変化するかを解析することが出来る。この種の研究はまだ緒についたばかりであり，一般法則が得られるのはまだまだ先の事と思われる。また，方法自体にも問題点があり，当分は試行錯誤の状態が続くのではないかと考えられる。このような分野は，蛋白質工学とか分子設計とか呼ばれているが，まだ完全に確立されたわけではない。

一方，この前段階として，同じような機能をもつ蛋白質の構造遺伝子レベルでの組換え体を作り，雑種蛋白質を作成して構造と機能との関係を解析することも行われている。

4. おわりに

DNA 組換え技術とその利用について，出来るだけ巾広く書くよう心がけたが，必ずしも要点をとらえきっていない点についてはお許しいただきたい。具体的な話がほとんど入っていないので，その点についてはしかるべき一次あるいは二次情報源を参照いただきたい。

