

## Dr. ジーン 6

### 大腸菌形質転換キット<GFP 発現系>

### 補足説明書

Code No. 314-08451      1 Kit (キット構成 : 6 班分)

- 緑色蛍光タンパク質 (GFP) について
- コンピテントセル
- プラスミド pUC18 DNA
- プロモーター
- 大腸菌 JM109 株
- 関連製品リスト

## 緑色蛍光タンパク質(GFP)について

緑色蛍光タンパク質(GFP, Green Fluorescent Protein)は、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*) より単離されたタンパク質で、紫外線を当てると緑色の蛍光を発します。GFP は、2008 年ノーベル化学賞\*1) の受賞対象となった物質です。ノーベル化学賞受賞者の一人である下村脩教授により、1962 年に世界で初めて単離・精製されました。

ホタルなど多くの生物の発光のしくみは、酵素、基質、補因子の全ての要因が揃って初めて発光が起こります。しかし、この GFP は UV を照射した際、単独で発光します。この特徴を利用し、目的のタンパク質の遺伝子に GFP 遺伝子を繋げ、GFP をレポーター遺伝子\*2)として発現させることで、目的のタンパク質の発現を確認することが容易になりました。現在、GFP は、生命科学や医学などの研究分野で幅広く利用され、iPS 細胞の研究にも利用されています。

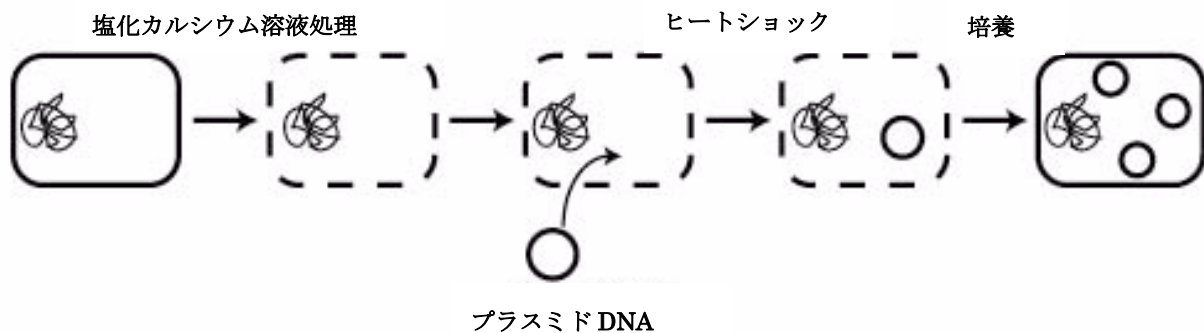
\*1) 下村脩博士 (米ボストン大学名誉教授)、マーティン・チャルフィー博士 (米コロンビア大学教授)、ロジャー・ツェーン博士 (米カリフォルニア大学サンディエゴ教授) の 3 名が受賞されました。下村脩博士は、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*) より GFP の単離に成功しました。マーティン・チャルフィー博士は、GFP を遺伝子の目印としてあらゆる生物に幅広く利用できることを実証しました。ロジャー・ツェーン博士は、GFP の発光メカニズムを解明し、緑色以外にも様々な色で発光できるよう GFP 遺伝子を改変する方法を開発しました。

\*2) レポーター遺伝子とは、目的の遺伝子が発現しているかを容易に確認するための特殊な遺伝子です。目的のタンパク質のみでは、発現していることを確認することは容易ではありません。しかし、レポーター遺伝子を目的の遺伝子と同時に発現させることで、レポーター遺伝子の発現=目的の遺伝子の発現として、発色や発光により目視での確認を可能にさせます。レポーター遺伝子の条件として、細胞毒性がない、細胞・個体レベルでの検出が可能であることが要求されます。

## コンピテントセル

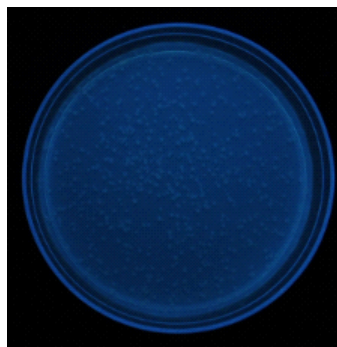
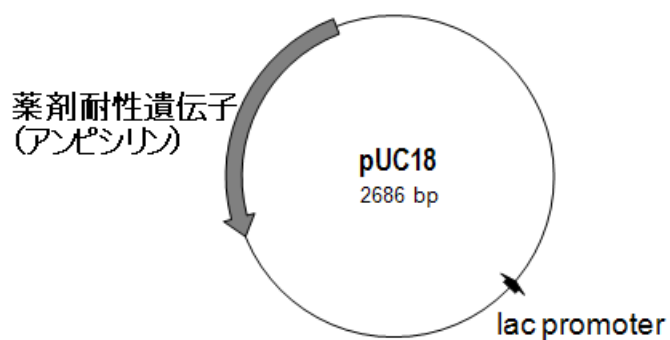
大腸菌は哺乳類の腸内細菌であり、細胞膜および細胞壁をもつ原核生物です。大腸菌は増殖速度が早く、簡単な培地で生育するので遺伝子工学における最も基本的な生物として使われています。

通常、大腸菌はプラスミド DNA (環状の DNA) のような大きな分子を細胞内に取り込むことはできません。しかし、大腸菌を塩化カルシウム溶液で処理するとプラスミド DNA は菌体内へ取り込まれやすくなり、一般にコンピテントセルと呼ばれる状態になります。大腸菌の形質転換のときは、この Ca イオンにより DNA のマイナス荷電が中和され、同様にマイナスの荷電を持った細胞表面からの反発が小さくなるので、プラスミド DNA が大腸菌内に取り込まれるようになると考えられています。実験に際しては、42℃で熱処理(ヒートショック)すると更に導入効率を上げることができます。



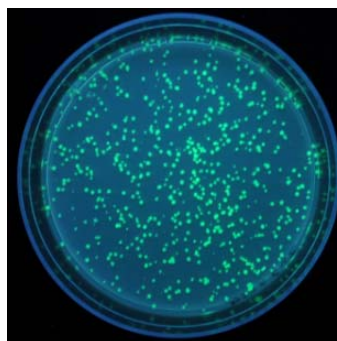
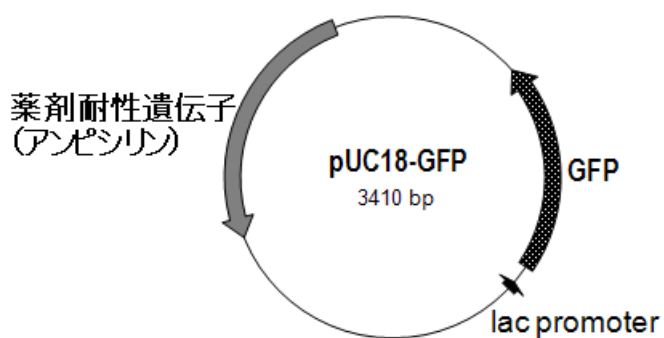
## プラスミド DNA

### プラスミド pUC18



pUC18 形質転換プレート

### プラスミド pUC18-GFP



pUC18-GFP 形質転換プレート

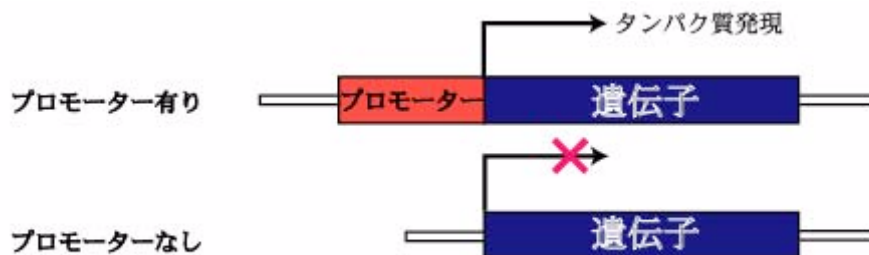
大腸菌には自己のゲノム DNA の他に小さな環状 DNA を持っているものがあります。この環状 DNA をプラスミド DNA といいます。プラスミド DNA は大腸菌内で自己複製し増殖することができます。また、組換え DNA 技術により新たに外来遺伝子を含むプラスミド DNA を大腸菌へ導入することで、新たな遺伝情報を持った大腸菌を作り出すことができます。この様にプラスミド DNA は遺伝子を細胞内へ導入する運び屋 (ベクター, vector) として利用されています。

pUC18 は抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子を持ったプラスミド DNA です。このプラスミドが大腸菌内に取り込まれると、アンピシリン耐性遺伝子から  $\beta$ -ラクタマーゼというアンピシリン分解タンパク質が発現し、大腸菌はアンピシリン存在下でも生育できるようになります (アンピシリンを含むプレート上でコロニーを確認することができます。)

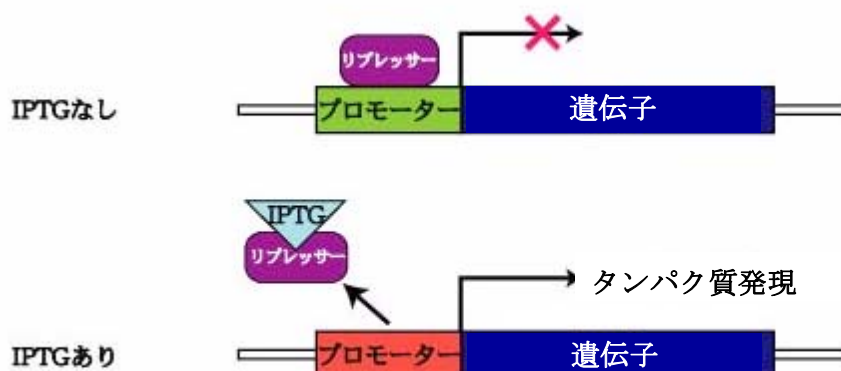
pUC18-GFP は pUC18 プラスミドの中に GFP という遺伝子を組み込んであります。このプラスミドは pUC18 同様アンピシリン耐性遺伝子を持っているため、アンピシリン存在下でも生育できます。さらに、pUC18-GFP を細胞内に入れた (GFP 遺伝子を導入した) 大腸菌 JM109 を培養すると細胞内で緑色蛍光タンパク質が作られる (発現する) ため、UV ライトを当てると緑色に光る大腸菌を観察することができます。

## プロモーター

本キットでは薬剤耐性遺伝子と GFP 遺伝子が大腸菌内で発現させますが、通常、ただ遺伝子のみを組み込んで大腸菌内に導入しただけではタンパク質を作らせることはできません。発現させたい遺伝子の前にプロモーターと呼ばれる、タンパク質を作る指令を出すための DNA 配列が必要になります。



本キットでは薬剤耐性遺伝子と GFP 遺伝子を発現させるために特殊なプロモーターを使用しています。通常は、このプロモーターにはリプレッサーと呼ばれるタンパク質が結合していて、プロモーターの機能を抑えているため遺伝子はほとんど発現していません。しかし IPTG (isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside) を培地中に添加すると、菌体に取り込まれた IPTG がそのリプレッサーと結合し、リプレッサーがプロモーター領域からはずれます。リプレッサーの外れたプロモーターはその機能を回復して遺伝子の転写を促進するため、タンパク質が作られる仕組みになっています。



## 大腸菌 JM109 株

大腸菌には様々な種類があり、大腸菌 O-157 株のように強い毒性を持ったものもありますが、通常、組換え DNA 実験には毒性が無く安全性の高い大腸菌 K-12 株由来のものが使われています。

組換え DNA 実験に使われる大腸菌は、組換え体が誤って外部環境へ漏れてしまった時に備えて、限られた条件下でしか生育できないように改造されています。さらに、組換え体を扱うのに便利なように大腸菌が本来持っているいくつかの遺伝子に変異を入れてあります。本キットで使用する JM109 株も K-12 株由来の大腸菌で、安全性が高く、組換え体を扱いやすいように遺伝子を改変してあります。

## Dr.ジーン 6 関連製品リスト

### 教育用バイオ実験

教育用バイオ実験キット「Dr. ジーン」	Code No.	容量
Dr.ジーン 1 ver. 2 (大腸菌形質転換キット・LacZ 発現系)	310-06351	12 反応用(6 班用)
Dr.ジーン 2 (アガロースゲル電気泳動キット)	318-05431	12 反応用(6 班用)
Dr.ジーン 6 (大腸菌形質転換キット・GFP 発現系)	314-08451	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 7 (植物多型解析 PCR キット)	311-08461	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 8 (DNA 鑑定キット)	318-08471	1 Kit (6 班用)
Dr.ジーン 9 (アガロースゲル電気泳動セット)	315-08481	1 Set (6 班用)
ISOHAIR Jr.	Code No.	容量
ISOHAIR Jr.	314-04431	30 回用
(毛髪からの DNA 抽出試薬、PCR 用試薬、電気泳動試薬のセット)	310-04433	60 回用

### コンピテントセル

品名	Code No.	容量
<a href="#">Competent <i>E. coli</i> JM109</a> (大腸菌 JM109 のコンピテントセル)	316-01353	100 $\mu$ l $\times$ 10 本
<a href="#">Transformation Kit JM109</a> (コンピテントセル、専用培地、プラスミド DNA)	319-01321	10 回用

### DNA

品名	Code No.	容量
<a href="#">pUC18 DNA</a> (プラスミド DNA)	314-00994	15 $\mu$ g