

第8章：微生物の基礎実験と遺伝子操作

生物の分類は、1859年ダーウィンの「種の起源」を機に、自然分類学を目指すようになりました。その後、1866年にヘッケルが生物界を動物、植物、原生生物の3つに類別し、1969年には、ウィッタカーが生物の体制とエネルギー獲得機構から、細菌類を独立させた生物5界説「動物、植物、原生生物、菌類、モネラ（細菌、放線菌、シアノバクテリア）」を提案しました。

1990年、ウーズらは、主としてリボソームRNAの塩基配列の情報から生物を大別した化学分類学を使用し、遺伝子解析に基づく分類法で、普通の環境に棲む「バクテリア（細菌）」、極端な環境に棲む「アーキア（古細菌）」と「真核生物」の3群に大きく分類しています。これら3群の生物界は、相互依存の関係で生態サイクルを形成し、地球上の物質の循環が行われています。微生物に見られる生物化学反応は、動植物のそれときわめて類似していることと、生育速度が動植物と比較して非常に速いことから、研究材料となります。

一般的に、微生物は肉眼で見えない微小な生き物ですが、実は偉大な存在意義のある生き物で、素晴らしい機能を持っています。今世紀における生命科学分野において、主なテーマは7つで、老化、ガン、脳、発生、植物、動物、環境と考えられます。これら7つのテーマを解明するためには、微生物の機能の力を借りなくてはならないのです。

8.1 微生物の内部構造と形態

酵母（真核細胞）は、基本的に球形ですが、種類によって、卵形、楕円形やキューリ形などがあり、培養条件で形が変化する場合もあります。細胞の大きさは、ビール酵母では $5 \times 7 \mu\text{m}$ 程度、細胞壁の厚さは、約 $0.25 \mu\text{m}$ とかなり厚く、その成分はグルカン、マンナン等です。原形質は、タンパク質の液体で、その中にミトコンドリアなどが含まれています。酵母（真核細胞）の構造を図8-1に示しました。

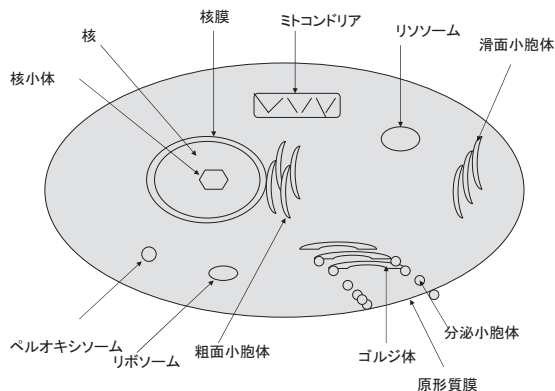


図8-1. 酵母（真核細胞）の構造

細菌（原核細胞）は、身の回りに広く分布し、腐敗菌、病原菌など私たちに関係が深く、その細菌の形は主に球菌、桿菌、らせん菌の3つに大別されます。細菌の構造は、外側に細胞壁が、その内側に細胞膜があり原形質を囲んでいます。その原形質の中には微粒子のリボソームがあり、タンパク質の合成に関与しています。細胞壁の組成はグラム陽性菌と陰性菌とは異なり、グラム陰性菌は、グラム陽性菌に比べて、脂質の含有量が多く、芳香族および含硫アミノ酸も含んでいます。細菌の多くには鞭毛や繊毛があり、運動に関係しています。その鞭毛はらせん状のタンパク質の糸で、細胞の端に1本～数本、または、周囲に持っている細菌もあります。細菌の構造を図8-2に、一般的な微生物細胞の構造と機能を表8-1に、細菌の主な形を図8-3に示しました。

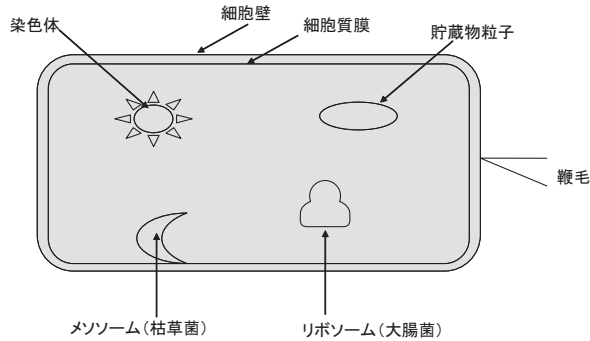


図8-2. 細菌（原核細胞）の構造

表8-1. 一般的な微生物細胞の構造と機能

構成要素	構造	機能
核膜	核を薄い二重膜で包む	RNA合成、核を保護する
染色体	DNA分子が集まっている	タンパク質合成を指令する
核	15nmの直径の粒子の集まり	リボソームRNAの合成場
ミトコンドリア	内部は内膜がひだになっている	解糖系、クエン酸回路をもち電子伝達系を行う
リボソーム	ダルマ型 (15nm x 20nm) でタンパク質とRNAの結合	タンパク質を合成する
小胞体	多数の長い袋	合成と分解の作用
細胞膜	2本の線の二重膜構造	膜自身が吸収・排出する 細胞内に栄養分を入れる
メソソーム	細胞膜に接続している膜構造	新たな細胞壁形成
リソソーム	膜に囲まれた小胞体	広範囲の加水分解酵素群を含み、ほとんどの生物学的巨大分子を分解

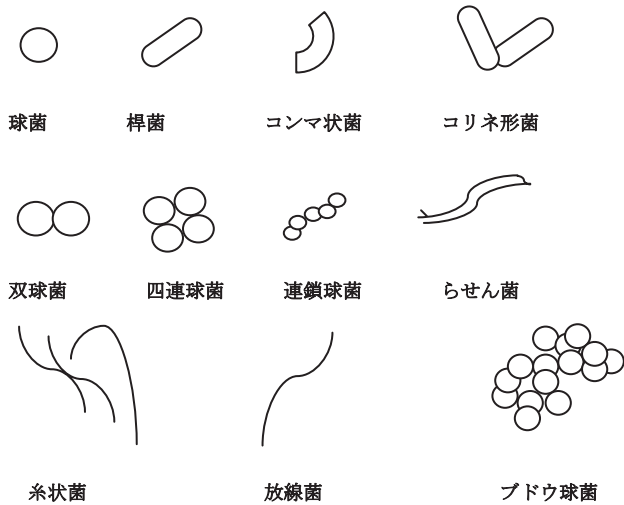


図8-3. 細菌の主な形

細菌の形のひとつである球菌は、ほぼ球状の単球菌ですが、分裂後は集合状態により、双球菌、四連球菌、八連球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌等になります。桿菌には、短桿菌（幅の割合に長さが短いもの）と長桿菌があり、酢酸菌、枯草菌、乳酸桿菌、インフルエンザ等がこれに属します。

微生物の種類は、温度、pH、酸素、紫外線、栄養源などの諸要因で著しく異なります。細菌、酵母、カビの形態と生理を表8-2に、さらに万国共通の微生物の名称を表8-3に示しました。

表8-2. 細菌、酵母、カビの形態と生理の比較*

項目	カビ	酵母	細菌
核	真核生物	真核生物	原核生物
細胞	多細胞	単細胞	単細胞
形状	糸状	球状、卵形	球状、桿状、らせん状
大きさ（平均）	3～10（胞子）	4 x 6 μ m	0.7 x 2.0 μ m
繁殖方法（主な）	胞子	出芽	分裂
生育温度（℃）	0～40	5～40	0～85

pH	4～6	4～6	7～9
酸素	好気性	通性嫌気性	好気性、通性嫌気性

*友枝ら、「微生物学」、(一部改変)、弘学出版、p.33 (1981)

表8-3. 万国共通の微生物の名称*

俗名	属名・種名
乳酸菌	ラクトバチルス・ブルガリス (<i>Lactobacillus bulgaricus</i>)
アルコール酵母	サッカロミセス・セルビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var.)
コウジカビ	アスペルギルス・オリゼ (<i>Aspergillus oryzae</i>)

上記のように属名と種名(ラテン語)とを併記して表すことになっています。印刷する場合は、属名と種名は斜体で表しますが、varは変種の意味で斜体にはしません。新種の場合はnov. spec.と表します。*小崎ら、「応用微生物の基礎知識」、(一部改変) オーム社、p.11 (1995)

8.2 微生物の基礎実験

私たちの日々の生活は微生物なしでは成り立ちませんが、その存在を重視し、功罪を認めて活用していかなければなりません。しかし、その取り扱いについては、何となく不安を持つ人も多いように思います。筆者がこれまで、初心者に微生物の理論と実験を指導してきた経験を基に、ここでは微生物を取り扱う上での一般的な注意事項、実験に必要な器具、実験の基本操作、培養と栄養源、生育、純粋培養、純粋分離の操作方法について説明します。

A. 微生物実験における一般的注意事項

- (1) 実験者は、清潔な白衣を着用する。
- (2) 実験室内の周囲は、常にきれいに掃除しておく。
- (3) 実験室の窓は、閉めて無菌操作を可能にすること。また、直射日光を遮る。
- (4) 実験器具、培地の使用前後は、消毒、滅菌を行う。
- (5) 恒温器、乾熱滅菌器および冷蔵庫内は、常に清潔にしておく。
- (6) 実験室では静かに行動し、実験をするにあたり細心の注意を払う。

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

- (7) 実験結果は細かく記録しておく。
- (8) 継続実験のものと、終了したものを区別して後始末する。
- (9) 実験室内で喫煙、飲食をさける。
- (10) 薬品や器具などを無駄にしない。
- (11) 実験器具や機械類は元の位置に返却する。
- (12) 事故が起きた時には、すぐ指導者に報告する。

B. 微生物実験に必要とする器具

- 試験管： 主に菌株の保存、植え替えなどに使用する。試験管の上にシリコ栓か綿栓を挿入することから肉厚の試験管を用いる。
- 培養フラスコ： 好気性菌の培養は、表面の広いフラスコを使用する。
- シャーレ： 平板培養に用いる。直径10cm、高さ1.5cm程度のものをよく用いるが、通常は滅菌したプラスチックのシャーレを使用する。
- ピペットマン： 100 μ L、1.0mL、2.0mL、5.0mL、10.0mLのものをよく使用する。
- ビーカー： 50mL、100mL、300mL、500mL、1.0L 等のビーカーで試薬の調製をする。
- ロート： 液体培地を入れて、それぞれの試験管に分注するときに使用する。
- 白金線： 直径、0.5mm程度で、長さ数cmの白金線、またはニクロム線を長さ約12cmのガラス棒またはアルミニウム棒の先に付けて微生物の移植に使用する。
- 綿栓： 微生物は綿の層を通り抜けられないことから、雑菌の侵入を防ぐため、また、綿の層を気体のみが通り抜けられるように、綿栓を用いる。綿栓用の綿には青梅綿が良いと言われている。
- シリコ栓： 試験管やフラスコの口に合う種々のシリコ栓が市販され

ている。

C. 微生物実験の基本操作

一般的な微生物実験の基本操作を下記に示しますが、毎年、各学会や研究会が開いている講座を受講して、基本操作を習得するのによいかと思います。例えば、日本防菌防黴学会が開いている（9月頃）「かび抵抗性試験法、細菌の同定」や日本食品機械研究会が行う（3月頃）「食品の細菌検査、大腸菌の検査」などが関西大学でも開催されています。それぞれの学会や研究会に直接申し込み、こうした良い機会を活用してください。

一般的な微生物実験の基本操作

- | | |
|----------------|--|
| (1) 滅菌操作 | 実験に使用する培養フラスコ、試験管等の器具類や、培養液を最も適した方法で滅菌操作をする。 |
| (ア) 火炎滅菌 | 試験管の口、綿栓、白金線等を内炎、外炎に入れて、滅菌する。 |
| (イ) 乾熱滅菌 | 綿栓試験管や綿栓フラスコ類を約160℃で乾熱し、1時間以上乾熱を保つ。 |
| (ウ) 高圧蒸気滅菌 | 110℃以上、0.5ゲージ圧以上の高圧蒸気（オートクレーブ）によって、耐熱孢子を短時間で死滅させる方法。最もよく使用されている。 |
| (エ) 常圧滅菌法 | 加熱や高圧に対して不安定な物質を含む液体等の滅菌に使用。 |
| (オ) 紫外線滅菌 | 無菌箱内の上部に紫外線殺菌灯を設置して箱内を滅菌、操作中は消灯する。 |
| (カ) 薬剤滅菌 | 消毒剤：アルコール、フェノール、過酸化水素、硝酸銀を用いる。 |
| (キ) 防腐剤による滅菌 | ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム等を用いる。 |
| (ク) 化学療法剤による滅菌 | |

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

- サルファ剤、抗生物質などを用いる。
- (2) 除菌操作 滅菌操作と同じように最も適した方法で除菌する。
- (ア) 液体ろ過 メンブランフィルター、ザイツろ過器等を用いて除菌する。
- (イ) 空気ろ過 綿栓、紙栓、プラスチック製の栓、シリコ栓等を使用する。
- (3) 培地の調製法 培地は、微生物が必要な栄養源をすべて含んでいること。その栄養源は、微生物の種類や実験の目的によって異なる。
- (ア) 液体培地 通常、高圧蒸気滅菌した培地を使用するまで冷蔵庫で保存する。
- (イ) 固体培地 通常、液体培地に寒天（1.5%～2.0%）を添加、加温して溶解させた後、斜面培地、平面培地、高層培地等を使用する。
- (4) 移植操作 保存菌株を新しい培地に移植させる操作のことで、雑菌の侵入を防ぐために無菌的に行う。
- (5) 菌の純粋分離法（カビ、酵母、細菌）：雑菌が混在しているので平板塗抹を繰り返し、目的の菌株を純粋分離する。
- (6) 培養法 菌株を移植した培地は、電気恒温器内に入れて、一定温度（細菌：35℃、酵母：30℃、カビ：25℃）で培養を行う。

菌株（細菌、酵母、カビ等）の主な保存方法については後の項で説明します。

D. 微生物の培養に用いる栄養源

通常、微生物の生育あるいは生理的諸性質は培地の組成、培養環境などによって影響される場合が多く、カビや酵母菌の培養には麦芽汁を、細菌にはブイヨンを経栄養源としてよく使用します。また微生物の保存培養および純粋分離などには、液体培地に約2%寒天やゼラチンを加えて固体培地としま

す。生育をささえる栄養源とするものは、炭素源としては炭水化物が多く、窒素源としてはアンモニア、尿素、硫酸、アミノ酸などが使用されます。これらのものは菌体のタンパク質や多糖、核酸、その他細胞内のいろいろな構成成分に利用されます。

また、リン酸塩もエネルギー代謝の必須成分で、その他、微量の無機元素も欠かすことができません。下記に培養液のつくり方を簡単に説明します。

麦芽汁： 4.5gの麦芽エキスを水100mLを加えて溶解後、pH5.0に塩酸で調製し、高圧蒸気滅菌してから使用する。

グイヨン： 肉エキス (5.0 g)、ペプトン (15.0 g)、塩化ナトリウム (5.0 g)、リン酸一水素カリウム (5.0 g) 等を1.0Lの水に溶解させた後、pH7.0に水酸化ナトリウムで調製し、高圧蒸気滅菌をして使用する。

E. 微生物の生育

微生物が生育するのに、栄養源、温度、pH、溶存酸素、水分、浸透圧、光、圧力などが必要であることから微生物の生育、代謝に最適な培養条件を決めます。

微生物は、有機物、無機物の栄養分を取り込んでエネルギーとして、細胞構成成分の合成を行っています。菌体の合成に必要な素材は、微生物の種類によって著しく異なり、栄養要求の立場から微生物を2群に大別しています。

独立栄養微生物： 炭素源や窒素源の有機物を必要とせず、アンモニア、亜硝酸、硫化水素、硫黄、水素、硫酸第一鉄などを酸化することによってエネルギーを得て生育する微生物。

従属栄養微生物： 炭素源としての糖類や窒素源としてのアミノ酸のような有機物を必要とする微生物で、大腸菌、酵母、カビ、腐敗細菌等の微生物。

微生物の生育と温度との関係はその種類によって著しく異なり、それが生育するための温度として、最高温度、最低温度および最適温度があります。

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

また、生育に及ぼすpHも微生物の種類によって異なり、通常、細菌の最適pHは、中性あるいは微アルカリ性で、酵母やカビ類の最適pHは微酸性です。一般の微生物の生育温度と最適pHを表8-4に示しました。

表8-4. 一般の微生物の生育温度と最適pH

微生物	最高温度	最低温度	最適温度	最適pH
細菌類	30～70℃	0～40℃	15～60℃	7～8
酵母類	40℃	5℃	25～35℃	5～7
カビ類	40℃	0℃	20～35℃	4～6

微生物の生育過程には、細菌の細胞では2分裂、酵母は通常、娘細胞の出芽で、カビや放線菌は菌糸の伸長による生育の3通りがあり、菌株の種類によって生育曲線が異なります。一般の微生物の生育曲線を図8-4に示しました。

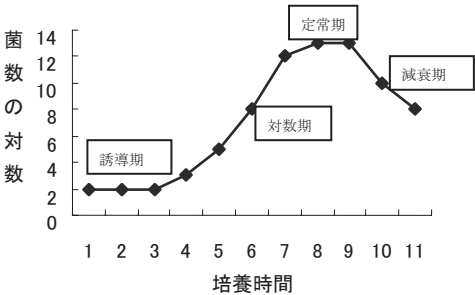


図8-4. 一般の微生物の生育曲線

細菌の生育速度は、細菌数が2倍になるのに要する時間、すなわち世代時間で表しています。

$$\text{世代時間} = t \text{分後} / 3.3 \{ \log (t \text{分後の菌数}) - \log (\text{最初の菌数}) \}$$

大腸菌、乳酸菌の世代時間は、20分程度で1個の細菌が1時間後には21個に生育することになり、カビの場合は、菌糸が連続して伸びていきますから、

世代時間を計算することは困難で、通常は菌体の重量（菌体を乾燥させて恒量にする）を測定して、生育量を測定することになります。

F. 微生物の純粋培養

自然界には、多くの微生物が混在しています。その自然界より、純粋に微生物を分離するには、まず、必要とする微生物が存在しそうな場所の一部を最適培地に投入して、最適な培養条件で培養すると集積培養によって、必要とする微生物を培養することができますが、他の雑菌も混在していますので、純粋分離操作を行って、はじめて必要とする微生物を純粋培養することができます。純粋分離の操作方法（準備する器具も含む）を下記に示します。

- (1) 滅菌水の入っている綿栓（またはシリコ栓）つきの試験管を数本準備する。
- (2) 平板培養用の固体培地（酵母、カビは麦芽寒天、細菌はブイヨン寒天をそれぞれ約15mL試験管に入れて滅菌）を数本準備する。
- (3) 市販されている滅菌シャーレを数枚準備する。
- (4) 寒天培地を入れた試験管を沸騰浴中に入れて寒天を溶かした後、湯浴の温度を45℃に低下させて寒天が固化しないようにする。
- (5) 集積培養から平板培養に移す場合、培養条件によって集積培養の菌数が異なることにより適当に薄める。
- (6) 培養液から1白金耳（ガスの火で滅菌）をとり、滅菌水（約15mL）を入れた試験管内に移し、よく振り混ぜて、その試験管から1白金耳をとり、別の滅菌水（約15mL）を入れた試験管内に移し、よく振り混ぜる。
- (7) 2回希釈したものから1白金耳をとり、寒天培地の入った試験管に移し、手早く振り混ぜて、再びその中から1白金耳をとり、同じ寒天培地の入った試験管に入れて、両試験管の寒天が固まらないうちに滅菌シャーレへ注ぎ込む。放置後、放冷し、寒天を固める。
- (8) 滅菌シャーレの蓋が下になるようにして、30℃の恒温器に入れ、24～

72時間培養後に、コロニーが20～80個以内のものを選んで、色や形などを観察する。目的の菌体を探して白金耳でとり、新しい寒天培地で純粋培養する。必要とする菌は上記の操作を2～3回繰り返す。

代表的な合成培地の組成を表8-5に示しました。

表8-5. 代表的な合成培地の組成

(A) ツアベックドックス液（通常のカビに使用）	
ショ糖	30g
硝酸ナトリウム	3g
リン酸水素二カリウム	1g
塩化カリウム	0.5g
硫酸マグネシウム	0.5g
硫酸第一鉄	0.01g
蒸留水	1.0 L
(B) ヘンネベルヒ液（通常の酵母、細菌に使用）	
ショ糖	150g
アスパラギン	3g
硫酸マグネシウム	2g
リン酸水素二カリウム	5g
蒸留水	1.0 L

微生物の入手方法

通常の微生物の入手方法には下記のようなものがあります。

- (1) 自然界から個人で分離し、単一な菌株を確認後、最適培養条件を確立し、菌学的諸性質や16SrDNA解析による細菌の同定を行なった後に保存する。
- (2) 学会や文献などで知り得た情報から、研究当事者に使用目的を明記して依頼する。無料で分譲してもらえるが、共同研究の形になる場合が多い。
- (3) 微生物の保存機関は国内外にあり、希望する場合は、所定の書類に使用目的を記載して分譲を依頼する。しかし、有料の場合が多い。

微生物の主な保存機関を表8-6に示しました。

表8-6. 微生物の主な保存機関*

機関名 (略称)	ホームページアドレス	保存微生物
独立行政法人 製品評価 技術基盤機構 (N B R C)	http://www2.nbrc.nite.go.jp/	細菌、酵母、カ ビ
東京大学分子細胞生物学 研究所 (I AM)	http://imcbns.iam.u-tokyo.ac.jp/ misyst/ColleBOX/IAMcollection.html	細菌、酵母、カ ビ
American Type Culture Collection (ATCC)	http://www.atcc.org	細菌、古細菌、 酵 母、 ウ イ ル ス、カビ、
National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria	http://www.ncimb.co.uk/ ncimb.htm	有用細菌、海洋 細菌 食品細菌

*主な微生物保存機関を上げましたが、他にも多くの保存機関で、病原性の細菌や微細藻類などを保存しているところがあります。

*土庫ら、「微生物制御」、(一部改変) 講談社、p.131、(2002)

微生物の保存方法

微生物は長期間保存すると、形態や生理的性質の変化、または、死滅してしまうおそれがあるので注意が必要です。保存するときの注意としては(1)保存操作が簡単なこと (2)汚染されないこと (3)保存が長期間できること (4)保存期間中に変異や死滅が無いこと等です。微生物の主な保存方法を表8-7に示しました。

表8-7. 微生物の主な保存方法

方法	原理	保存微生物
凍結乾燥法	細胞を休止状態で保存、長期間保存	多数の細菌、酵母、 カビの胞子、ウイルス
凍結保存法	凍結状態で細胞保存	多数の細菌、酵母、 カビの菌糸、藻類、原虫

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

流動パラフィン	継体培養で保存が延長できる	カビ、放線菌、酵母
担体保存法	細胞を砂や土壌と混合後に乾燥	胞子形成する微生物
		カビ、放線菌、細菌の一部
懸濁法	細胞を緩衝液に懸濁させる。	細菌、放線菌、酵母、カビ

上記の表に示した凍結保存法は、寒天培地で培養した微生物を分散剤（10%スキムミルクや10～15%グリセリン溶液）で懸濁し、密栓して-20℃または-80℃のディープフリーザーで凍結保存すると、1～3年は保存可能です。しかし、凍結保持温度と凍結速度（1分間に1℃）、さらに凍結後の解凍速度が菌株の生存率に影響を与えるので、注意が必要です。

8.3 微生物の基礎遺伝子操作

遺伝子进行操作する遺伝子組み換え技術は、今や医学、医薬品、食品、化学工業などに幅広く用いられ、その産物は私たちの身近にあって、豊かな生活に大きく貢献しています。

遺伝子操作の対象は、微生物から植物細胞、動物細胞と様々ですが、特に微生物は、遺伝子組み換え技術の発展段階から大きく寄与してきた歴史を持っています。

微生物の遺伝子操作の歴史

1970年代はじめまでは、遺伝子（DNA）の分析は困難とされ、その単離や遺伝子进行操作して細胞に戻すことなど夢のような話でした。そこにArberの制限酵素の発見（後にNathansとH.Smithが精製）により光明が射すこととなりました。

制限酵素は、細菌がつくる酵素であることから大量培養、大量精製が可能であり、多くの細菌から様々な制限酵素が見つけられています。現在、4～8塩基の異なる塩基配列を識別する100種類以上が用いられています。

遺伝子組み換え技術は、この制限酵素によるDNAの切断、DNA断片の塩基配列の決定及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列の決定から始まり、DNA分子の数を膨大に増やした後、そのDNAの塩基配列に改変を加えて（変異）から細胞などに挿入する遺伝子工学などを主な技術としています。

ゲノムDNAからDNA断片を遺伝子組み換え技術によって取り出すことをDNAクローニングといいます。それを図8-5に示しました。このDNAクローニングに使われるプラスミドベクターも、細菌がもつプラスミドからつくられる小型の環状二本鎖DNAです。このようなプラスミドをクローニングベクターと呼び、目的のDNAを挿入した後、大腸菌などに導入することにより、その細胞分裂にともなって、目的のDNAも増やすことができます。プラスミドとは染色体の外に存在する環状のDNAで、細胞の生存に必ずしも必要ではないものです。

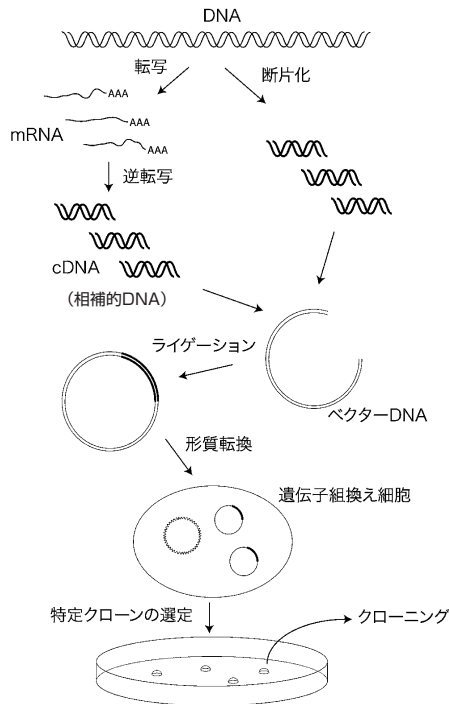


図8-5. DNAクローニング

このように、遺伝子組み換え技術に微生物は大きく関わり、歴史的には1977年に、コーエンがはじめてプラスミドと制限酵素を用いてブドウ球菌の

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

遺伝子を大腸菌に導入することに成功しています。

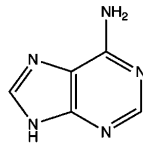
現在では、遺伝子工学によって微生物に様々な外来の遺伝子を導入することにより、優れた性質をもつものが数多くつくられ、多くの分野で実用化されています。

しかし同時に、自然界にこれまで存在しなかったものをつくり出す遺伝子の組み換えは、法律家に大きなショックを与えることになり、1979年に「文部省告示第42号」大学等の研究機関における組み換えDNA実験指針が公示された後、幾度かの改定の後、2002年1月31日に文部科学省告示第5号に新しい組換えDNA実験指針が公表されました。このように、生命科学の概念は、従来のものから大きく変貌し、生物学、医学、微生物学、有機化学、量子化学、物理学、哲学、心理学、法学など多様な分野の研究者によって多くの問題が議論され、生命科学の成果が社会に大きな影響を及ぼすようになりました。

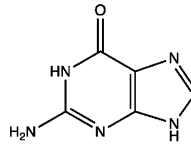
遺伝子の本体はDNA

スイスの生化学者フリードリッヒ・ミーシャーによって1869年、傷病兵の包帯に付着した膿から取り出した細胞から抽出された遺伝子（DNA）は、1944年になって、ある細菌のDNAを別の細菌に入れることで、前者の遺伝形質が後者に移ることが示され、遺伝物質であることが証明されました。

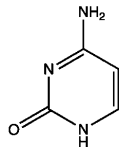
DNA鎖の構成単位は、わずか4種類の塩基アデニン（A）、チミン（T）、シトシン（C）、グアニン（G）がそれぞれ糖とリン酸と結合したデオキシリボヌクレオチドです。DNAの塩基の構造を図8-6に示し、デオキシリボヌクレオチドの構造を図8-7に示しました。これらの糖の5'の炭素と次の糖の3'の炭素がホスホジエステル結合でつながることにより、枝分かれのない鎖を形成しています。DNA鎖（ホスホジエステル結合）を図8-8に示しました。



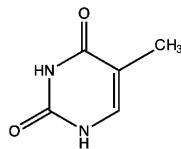
アデニン (A)



グアニン (G)

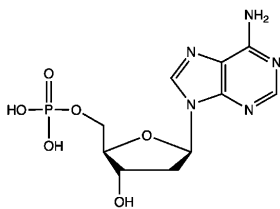


シトシン (C)

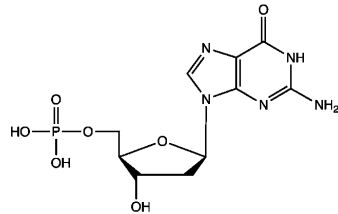


チミン (T)

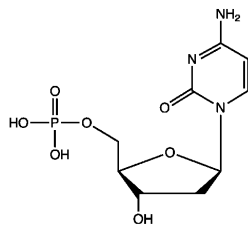
図8-6. DNAの塩基の構造



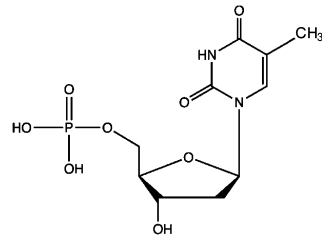
デオキシアデノシン 5'-リン酸 (dAMP)



デオキシグアノシン 5'-リン酸 (dGMP)



デオキシシチジン 5'-リン酸 (dCMP)



デオキシチミジン 5'-リン酸 (dTMP)

図8-7. デオキシリボヌクリオチドの構造

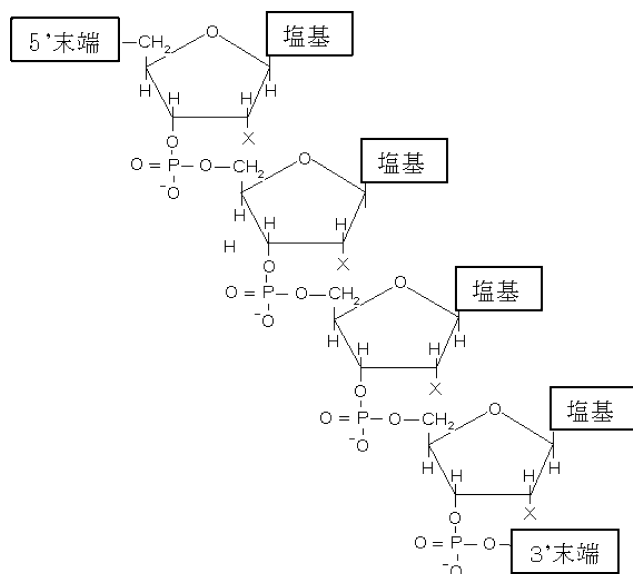


図8-8. DNA鎖（ホスホジエステル結合）

1950年代はじめのDNAのX線解析から、ワトソンとクリックはDNA分子が二本鎖のらせん構造をもつことを示しました。そして、DNAの塩基は、らせん構造の内側に位置し、二本鎖の間で塩基同士が接近することにより、AとT、GとCの間で相補的塩基対が形成されていることもわかりました。DNAの2重らせん構造と塩基対を図8-9に示しました。

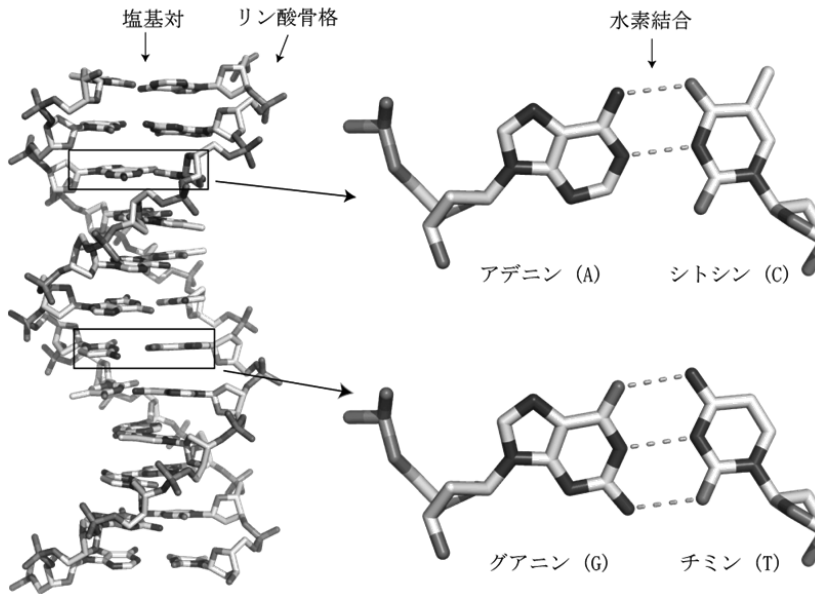


図8-9. DNAの2重らせん構造と塩基対

遺伝子は生命の膨大な情報を担い、その2本鎖は、それぞれが鋳型となって新しい相補鎖をつくることで遺伝情報を複製し、正確に子孫に伝えられます。このDNA複製反応は、非常に正確に行われ、仮にミスがあったとしても、いくつかの修復機構によって間違いが訂正されます。しかし、ごくまれにミスがそのまま残ることがあり、この塩基配列の変異は子孫に伝えられてしまいます。変異の入る箇所によっては、致命的な場合もあれば、何の問題も起きない場合もあります。時には、これまでもちえなかった有利な働きをもつ遺伝子になることもあり、それはダーウインの提唱した自然選択により、もともとの遺伝子に代わって存続しつづけることになります。

遺伝子発現の仕組み

遺伝子情報に基づいてタンパク質が合成されるには、DNAをRNA（リボ

核酸)に転写する必要があります。RNAは、アデニン (A)、ウラシル (U)、シトシン (C)、グアニン (G) の4つの塩基からなり、骨格になる糖とリン酸部分の糖がDNAのデオキシリボースと違ってリボースで、一本鎖です。RNAの塩基の構造を図8-10に、リボースとデオキシリボースの違いを図8-11に示しました。

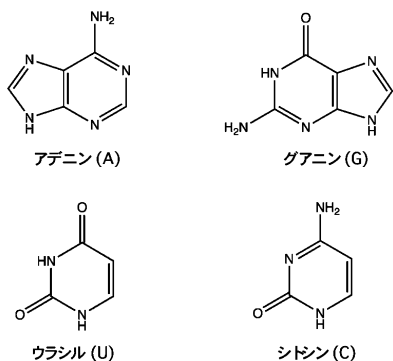


図8-10. RNAの塩基の構造

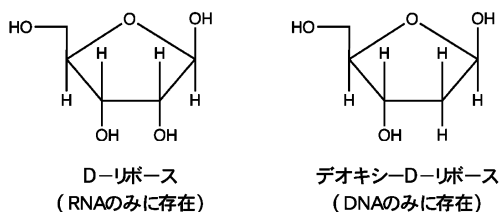


図8-11. リボースとデオキシリボースの違い

DNAから転写された産物の中で、タンパク質となりえるものをmRNA (メッセンジャーRNA) という。このほかにtRNA (転移RNA)、rRNA (リボソームRNA) があります。mRNAの塩基配列は3つずつ読まれ、3つ (コドンという) で1つのアミノ酸に翻訳されます。どの塩基配列がどのアミノ酸に対応するかは遺伝コード (表8-7) として解読されています。RNAをどこから読み始めるかによって3通りに翻訳できますが、塩基配列には開始

コドンといわれる翻訳開始点が存在し、そこから読み始めたものが機能をもつタンパク質に合成されます。

タンパク質の合成は、まず、RNA合成酵素が矢印の方向に移動すると、DNAの二本鎖の片方の塩基配列が鋳型としてRNAが合成され、スプライシング「イントロン（タンパク質合成の関与しない塩基配列）が取り除かれる」を受けてmRNAになります。DNAの遺伝子情報をコピーしたmRNAがタンパク質に翻訳される際、3つの塩基とそれに対応するアミノ酸の両者を識別するものがtRNAです。tRNAにはアンチコドンといわれる場所があり、mRNAの中の相補的なコドンと塩基対をつくります。そして、多くのタンパク質とrRNAからなるリボソーム上でtRNAがmRNAの情報を読みながら、タンパク質が合成されます。その過程を図8-12に、mRNAのコドンに対応するアミノ酸の種類（遺伝子コード）を表8-8に示しました。

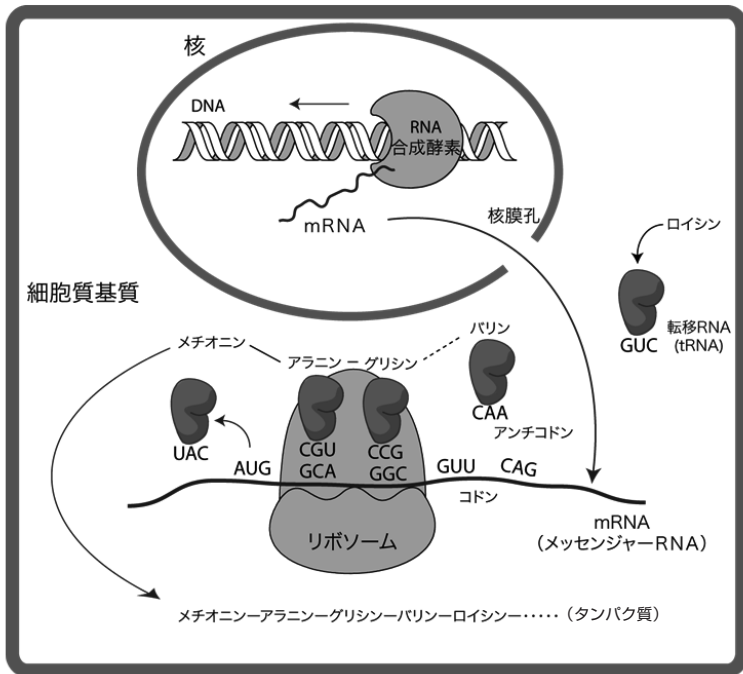


図8-12. タンパク質の合成過程

表8-8 遺伝子コード

アミノ酸	3文字表示	1文字表示	コドン
アスパラギン酸	Asp	D	GAU, GAC
アスパラギン	Asn	N	AAU, AAC
アラニン	Ala	A	GCX
アルギニン	Arg	R	CGX, AGA, AGG
イソロイシン	Ile	I	AUU, AUC, AUA
グリシン	Gly	G	GGX
グルタミン酸	Glu	E	GAA, GAG
グルタミン	Gln	Q	CAA, CAG
システイン	Cys	C	UGU, UGC
セリン	Ser	S	UCX, AGU, AGC
チロシン	Tyr	Y	UAU, UAC
トリプトファン	Trp	W	UGG
トレオニン	Thr	T	ACX
バリン	Val	V	GUX
ヒスチジン	His	H	CAU, CAC
フェニルアラニン	Phe	F	UUU, UUC
プロリン	Pro	P	CCX
メチオニン	Met	M	AUG (開始)
リシン	Lys	K	AAA, AAG
ロイシン	Leu	L	CUX, UUA, UUG
終止			UAA, UAG, UGA

8.4 微生物学の発展

微生物は、約35億年前に地球上に現れていましたが、私たちの肉眼では、観察することができなかったことから、その存在が長い間わかりませんでした。しかし、1676年オランダのレーヴェンフックが顕微鏡を発明してから微生物の存在がわかり、球菌、桿菌などを記録しています。それ以降、次々とさまざまな微生物が発見されてきましたが、人間が微生物を利用した初めての記録は、エジプトの壁画に描かれているブドウ酒ではないかと思われます。微生物学の発展を表8-9に示しました。

表8-9. 微生物学の発展

年代	微生物学の発展
4500年前	ブドウ酒の記録壁画（エジプト）
3000年前	酢をつくる（イスラエル）（旧約聖書）
170年頃	日本酒の記録「魏志倭人伝」
717年	カビから酒造り「続日本紀」
1548年	醤油が普及「日本」（運歩色葉集）
1676年	細菌の発見（Leeuwenhoek, A.）
1880年	清酒火落菌の発見（Atkinson R.W.）
1801年	微生物の分類（Persoon, C.H.）
1821年	カビの分類を体系化（Freis）
1855年	炭疽菌の発見（Poollender, A.）
1857年	糖の乳酸発酵を発見（Pasteur L.）
1859年	「種の起源」の出版（Darwin, C.R.）
1875年	カビの純粋培養に成功（Neisser）
1875年	放線菌の発見（Cohn, F.）
1875年	淋菌の発見（Neisser, A.）
1876年	清酒麴より麴菌の分離（Ahlburg, H.）
1878年	ビール酵母の純粋培養（Hansen, C.）
1882年	結核菌の発見（Koch, R.）
1884年	破傷風菌の発見（Nicolaiar, A.）
1884年	グラム染色法の確立（Gram, H.C.J.）
1897年	チマーゼの発見（Buchner, H.）
1888年	食中毒原因菌の分離（Gartner）
1890年	硝化細菌の分離（Vinogradsky, S.N.）
1893年	アオカビからクエン酸生産（Wehmer C.）
1894年	ペスト菌の発見（北里）
1898年	赤痢菌の発見（志賀）
1898年	ゴルジ体の発見（Golgi, C.）
1899年	ビフィズス菌の発見（Tissier）
1900年	麴菌からコウジ酸の発見（藪田）
1905年	梅毒スピロヘータの発見（Schaudinn, F.R.）
1906年	真性火落菌の命名（高橋）
1910年	アルコール発酵の化学経路を提示（Neuberg, C.A.）

第8章 微生物の基礎実験と遺伝子操作

1911年	梅毒菌の純粋培養（野口）
1915年	バクテリオファージの発見（Twort, F.W.）
1915年	アセトン・ブタノール発酵（Weizman C.）
1923年	カビによるクエン酸発酵（Pfizer社）
1937年	クエン酸回路の発見（Krebs, H.）
1938年	ジベレリンの結晶化に成功（薮田）
1939年	細胞内にDNAを発見（Casparson, T.O.）
1940年	アクチノマイシンの発見（Waksman, S.A.）
1941年	放線菌より最初の抗生物質の発見（Waksman, S.A.）
1943年	細菌の突然変異の発見（Delbruck, Luria）
1944年	ストレプトマイシンの発見（Waksman, S.A.）
1945年	補酵素A（CoA）の発見（Lipman, F.）
1946年	協会7号酵母の分離（山田）
1947年	枯草菌アルカリプロテアーゼの発見（Ottesen, M.）
1949年	エチレンオキシドを用いたガス殺菌の発見（Phillips, C.R.）
1949年	紫外線によるDNA傷害の光回復酵素の発見（Kelner, A.）
1952年	亜硫酸廃液から飼料酵母の連続培養の確立（三輪）
1953年	DNAの二重らせん構造モデルの提唱（Watson, J. Crick, F.）
1954年	微生物の同調培養法の確立（田宮、柳田）
1956年	火落菌の生育因子の発見（田村）
1956年	大腸菌よりDNA合成酵素抽出に成功（Kornberg, A.）
1956年	グルタミン酸発酵の確立（木下）
1957年	微生物の細胞壁を溶解する消化酵素の発見（Eddy）
1957年	酸化細菌の分離と代謝の研究（朝井）
1957年	カナマイシンの発見（梅沢）
1958年	酵素の“誘導適合説”の提唱（Koshland, Jr.D.E.）
1958年	麹菌溶菌酵素の発見（堀越）
1960年	アフラトキシンの発見（イギリス）
1960年	黒麹菌酸性プロテアーゼの開発（吉田）
1961年	酵素の固定化法の開発（Katchalski, E.）
1962年	ケカビの凝乳酵素の発見（有馬）
1963年	n-アルカンから微生物タンパク質の生産（山田）
1963年	遺伝暗号を解析（Nirenberg, M.）
1964年	放線菌からグルコースイソメラーゼの発見（津村）
1965年	マンガンの微生物精錬の開発（今井）

1965年	微生物レンニンの生産（有馬）
1965年	カビの分類法の確立（飯塚）
1965年	細菌の遺伝子の暗号を解説（Khorana）
1965年	酵母と不完全菌の分類（長谷川）
1968年	大腸菌表層の分画法の発見（水島）
1969年	微生物による有機水銀化合物分解の発見（外村）
1969年	固定化酵素によるアミノ酸生産の確立（田辺製薬）
1970年	制限酵素の発見（Smith, O.H.）
1970年	微生物起源の酵素阻害剤の発見（梅沢）
1970年	発酵法によるn-アルカンからのクエン酸製造法の確立（阿部）
1972年	微生物起源のアルカリプロテイナーゼ阻害剤の発見（村尾）
1973年	高度好熱性細菌 α -アミラーゼの発見（斉藤）
1973年	固定化微生物によるアスパラギン酸製造の工業化（田辺製薬）
1974年	氷核活性細菌を発見（Maki）
1975年	酵母細胞のマイクロボダイの発見（大隅）
1977年	微生物からアブシジン酸単離に成功（Assantes, G.）
1978年	異担子菌の接合因子の発見（福井）
1979年	大腸菌DNA複製開始部位の塩基配列を決定（高浪）
1979年	酵母の直鎖プラスミドの発見（群家）
1980年	放線菌プラスミドの発見（岡西）
1983年	固定化酵母を用いて連続アルコールの生産（鯨島）
1990年	磁性細菌の発見（Blackmore）
2000年	深海微生物の発見（堀越）
2001年	低温細菌から凍結保護タンパク質の発見（幸田）
2004年	南極細菌からカルシウム塩結晶化抑制物質の発見（小幡）
2004年	微小微生物（300nm）の発見（Mayo Clinic）
2007年	南極細菌から不凍タンパク質の発見（河原）
2009年以降	どのような発見及び報告があるのでしょうか、楽しみに待ちたいと思います。