

## 組み換えDNA技術からゲノム配列決定

1975年：カリフォルニアのアシロマにおいて、組換えDNA実験の安全性に関する激しい論争が、研究者の自主的な会議において展開され、組換えDNA実験の本格的な幕開けとなった。

1979年：3月我が国においても、組換えDNA実験の開拓に向け「大学等の研究機関等における組換えDNA実験指針」が文部省大臣告示。

1980年：東京大学医科学研究所および大阪大学微生物病研究所に、組換えDNA実験施設が設置された。

1983年：東京大学遺伝子実験施設を皮切りに、逐年、組換えDNA実験施設が整備されるようになった。（施設予定地から江戸時代の土器が出土）

1995年：独立生活を営む生物（細菌）の最初の完全なゲノム配列決定。

2003年：ヒトのゲノム配列完成版が発表される。

2010年：本間研のビブリオ菌株VIO5の全ゲノム配列を外注で決定。

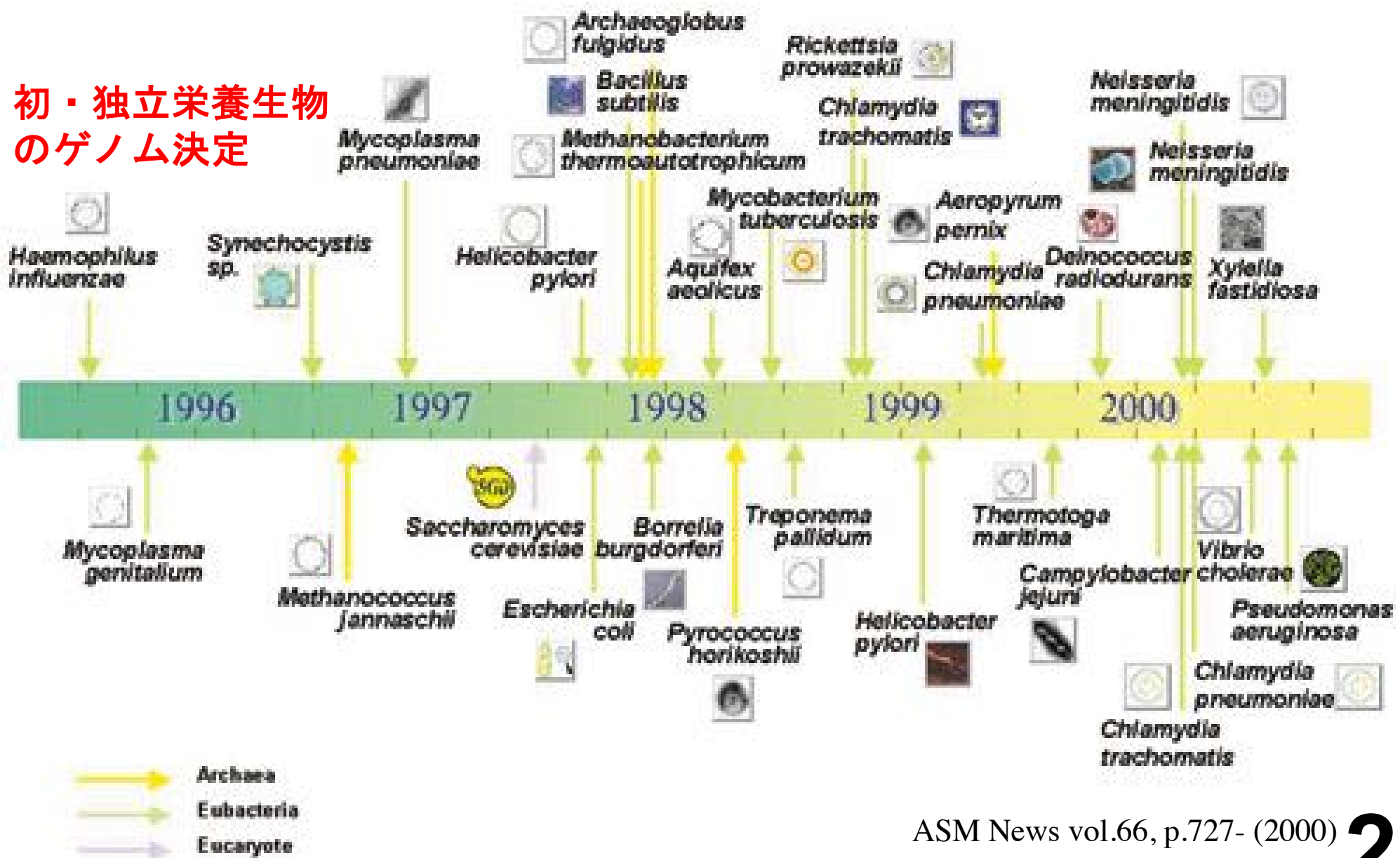
2010年：本間研のVIO5変異体の変異部位を次世代シーケンサーで決定。

ゲノミクス から プロテオミクス  
配列解読 から インフォマティクス

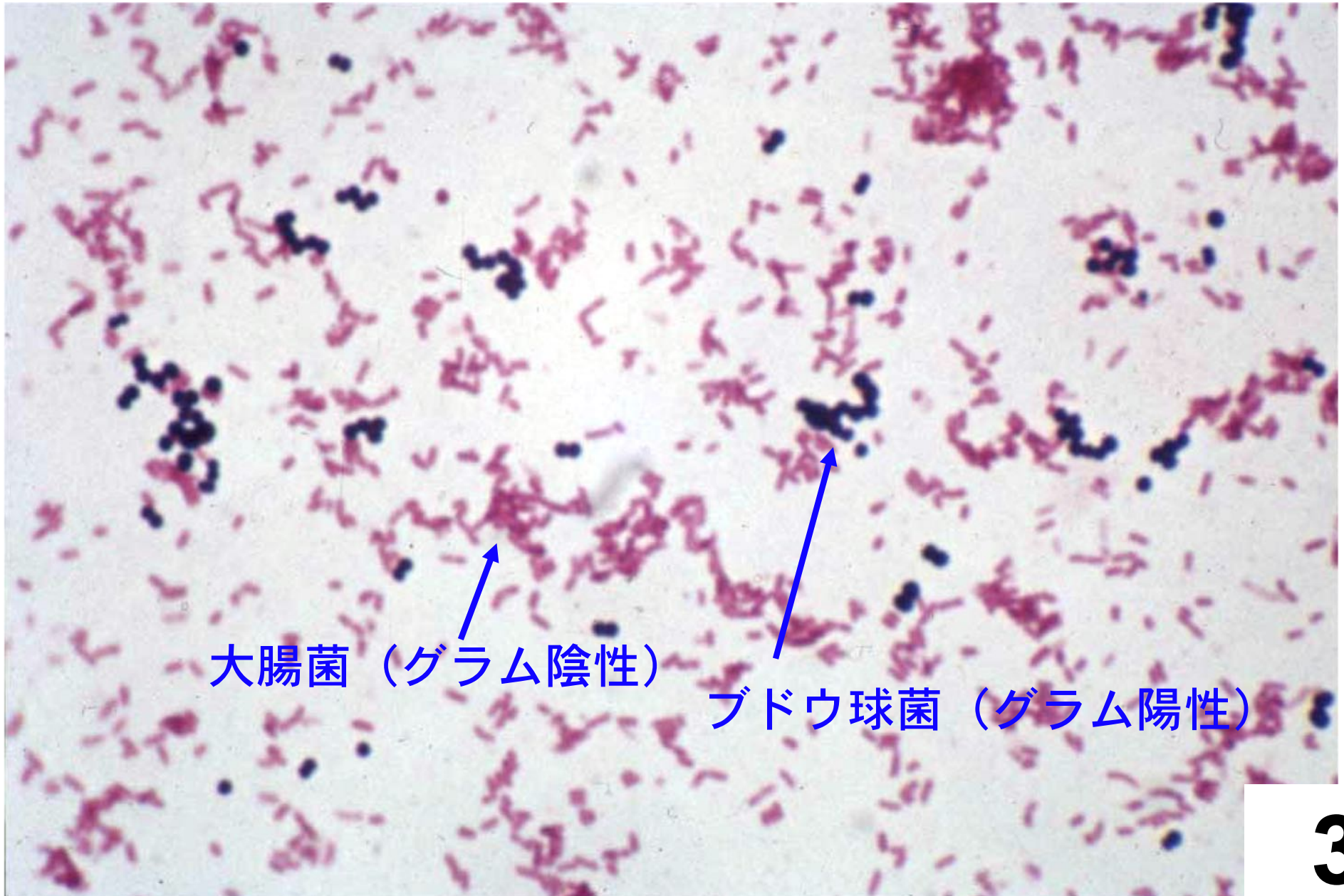
結局 生命現象理解のために、  
タンパク質の機能解析をおこなう

# 細菌ゲノム決定のタイムテーブル

初・独立栄養生物  
のゲノム決定



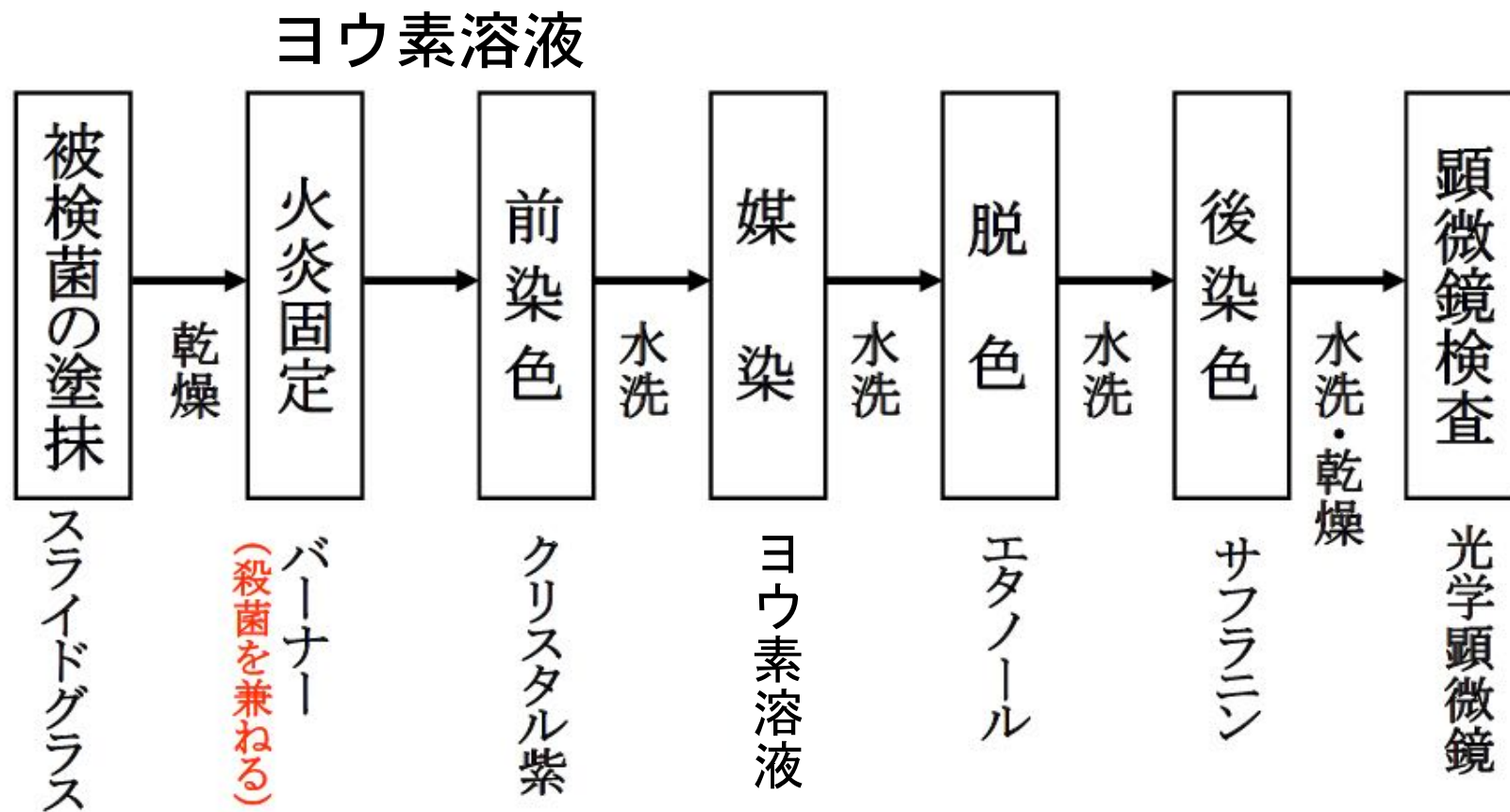
# グラム染色



大腸菌 (グラム陰性)

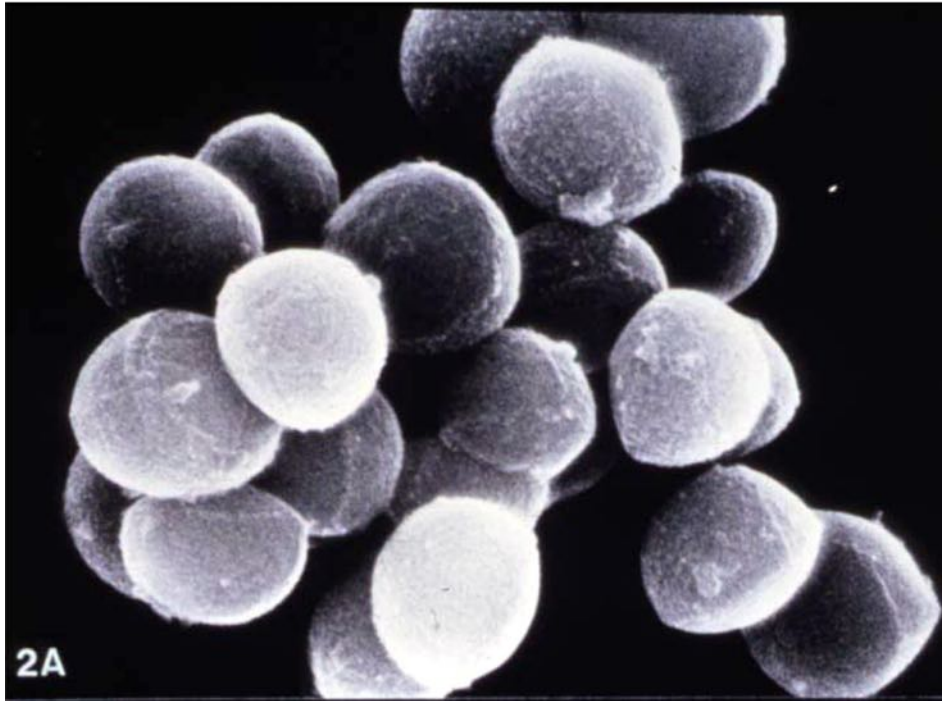
ブドウ球菌 (グラム陽性)

# グラム染色の手順





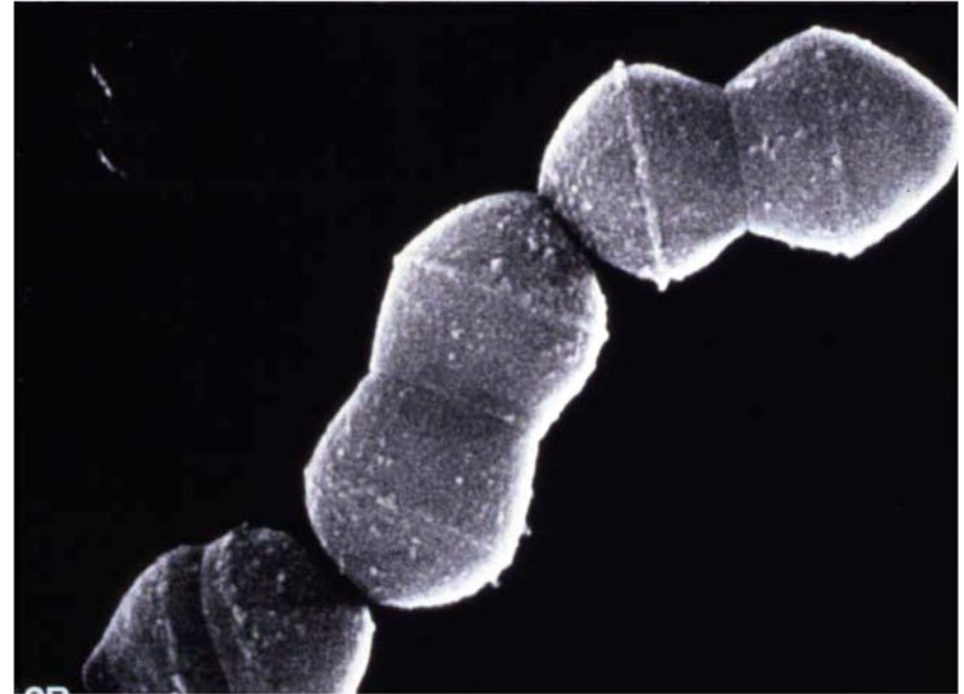
## 細菌の形 I



ブドウ球菌

*Staphylococcus*

(*S. aureus*: 黄色ブドウ球菌)



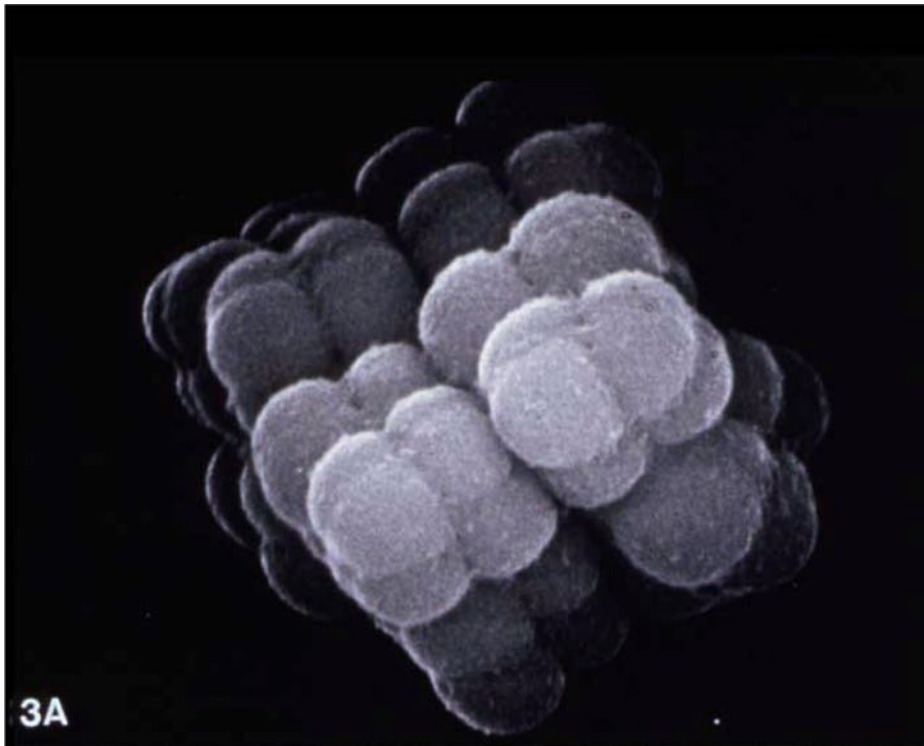
レンサ球菌

*Streptococcus*

(*S. pneumoniae*: 肺炎レンサ球菌)

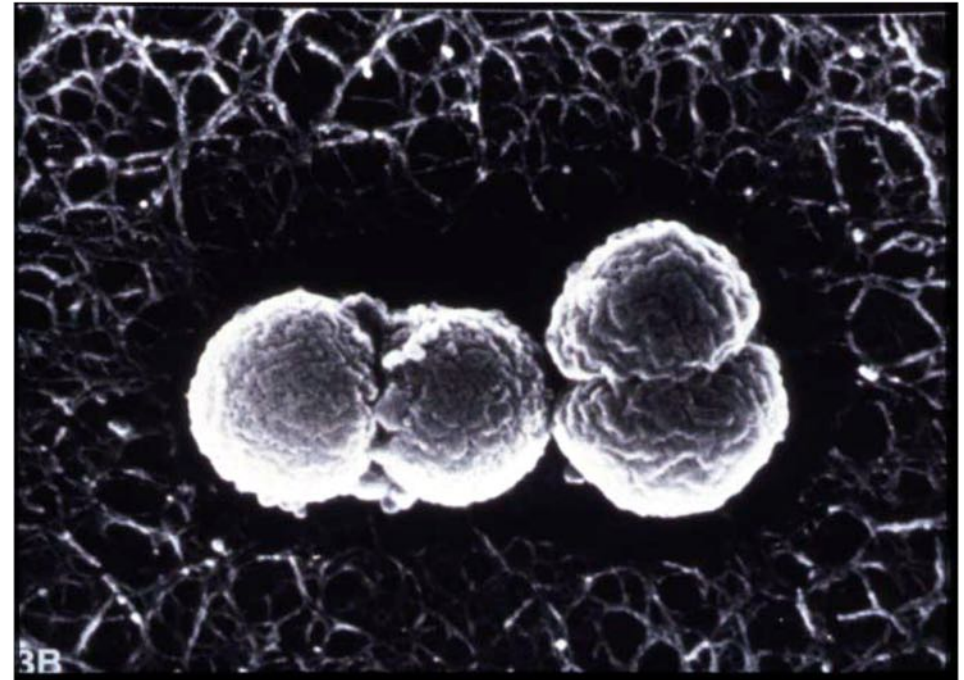
食中毒＝産生されたエンテロトキシンが原因

## 細菌の形 II



ミクロコッカス（八連菌）

*Micrococcus*

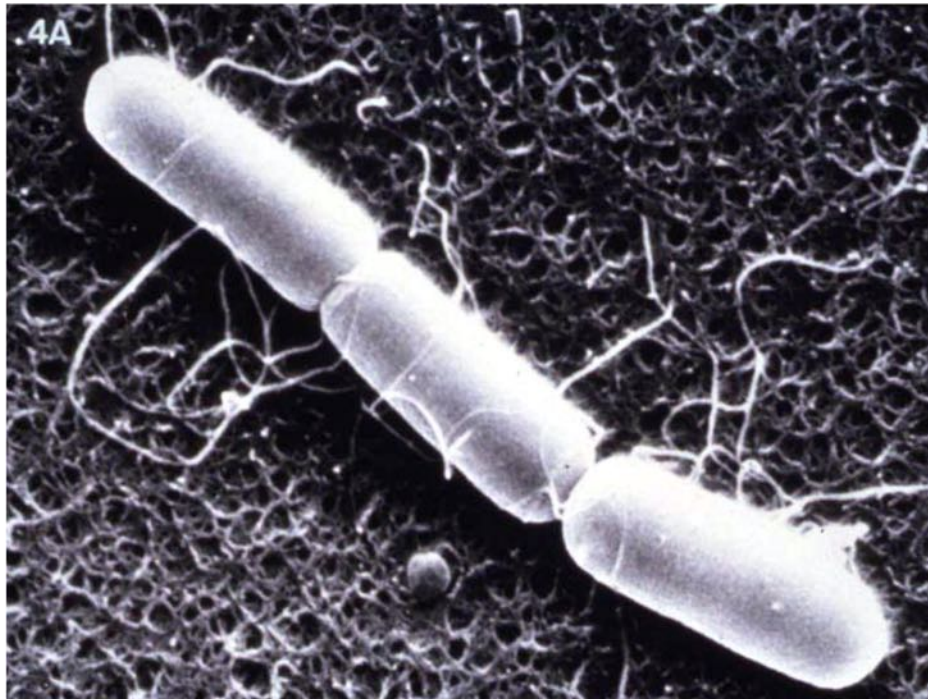


淋菌（双球菌）

*Neisseria gonorrhoeae*

尿路感染症

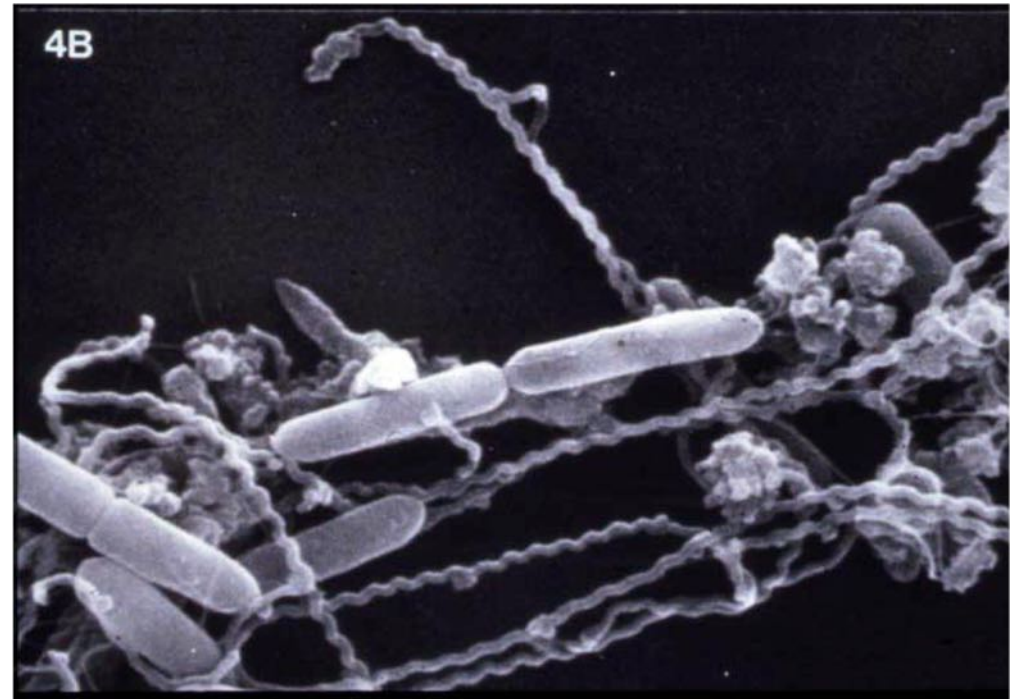
## 細菌の形 III



枯草菌

*Bacillus subtilis*

納豆菌(*B. subtilis ver. natto*)  
の仲間



枯草菌とレプトスピラ

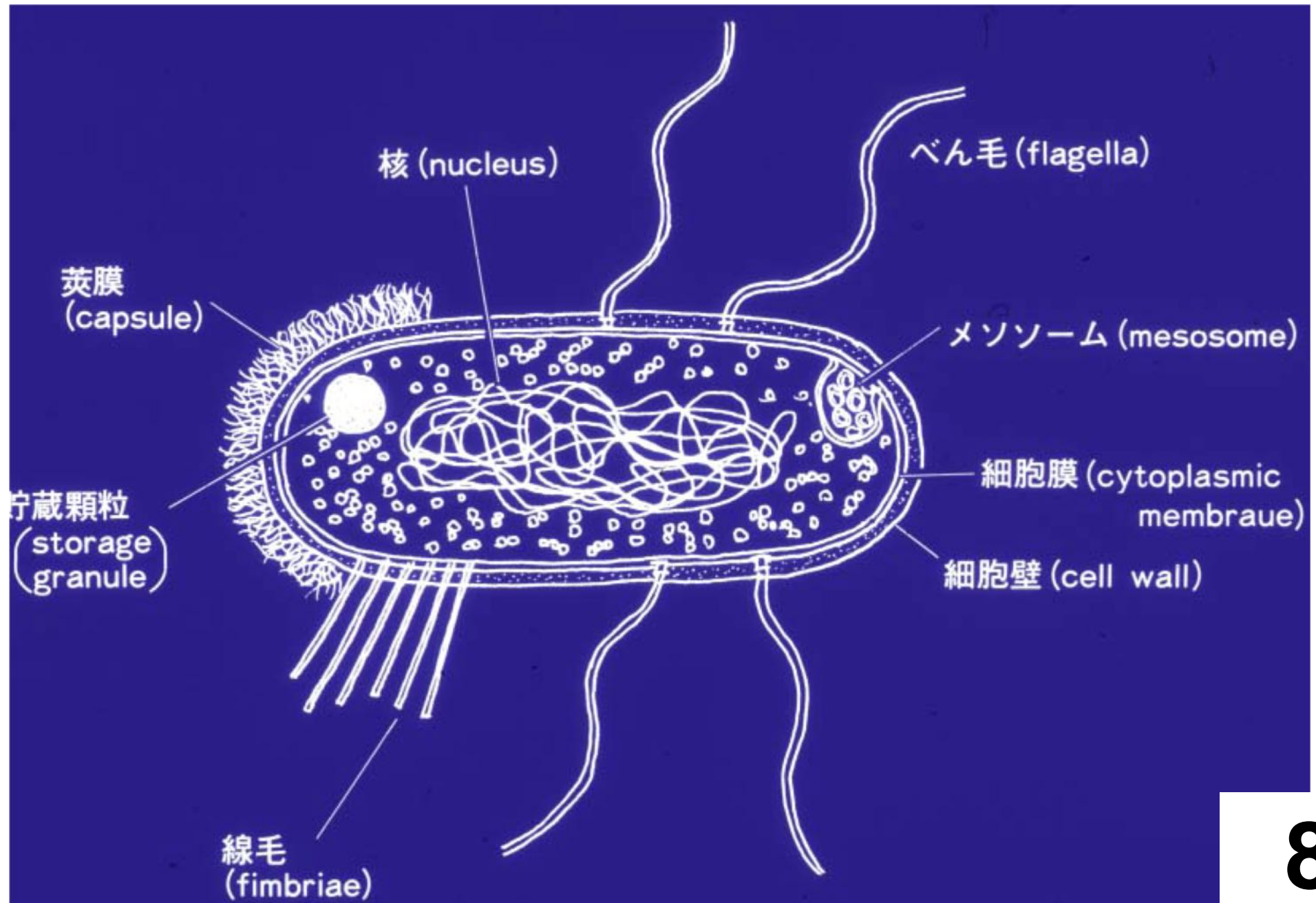
*Leptospira*

(スピロヘータ)

レプトスピラ症 (ワイル病)

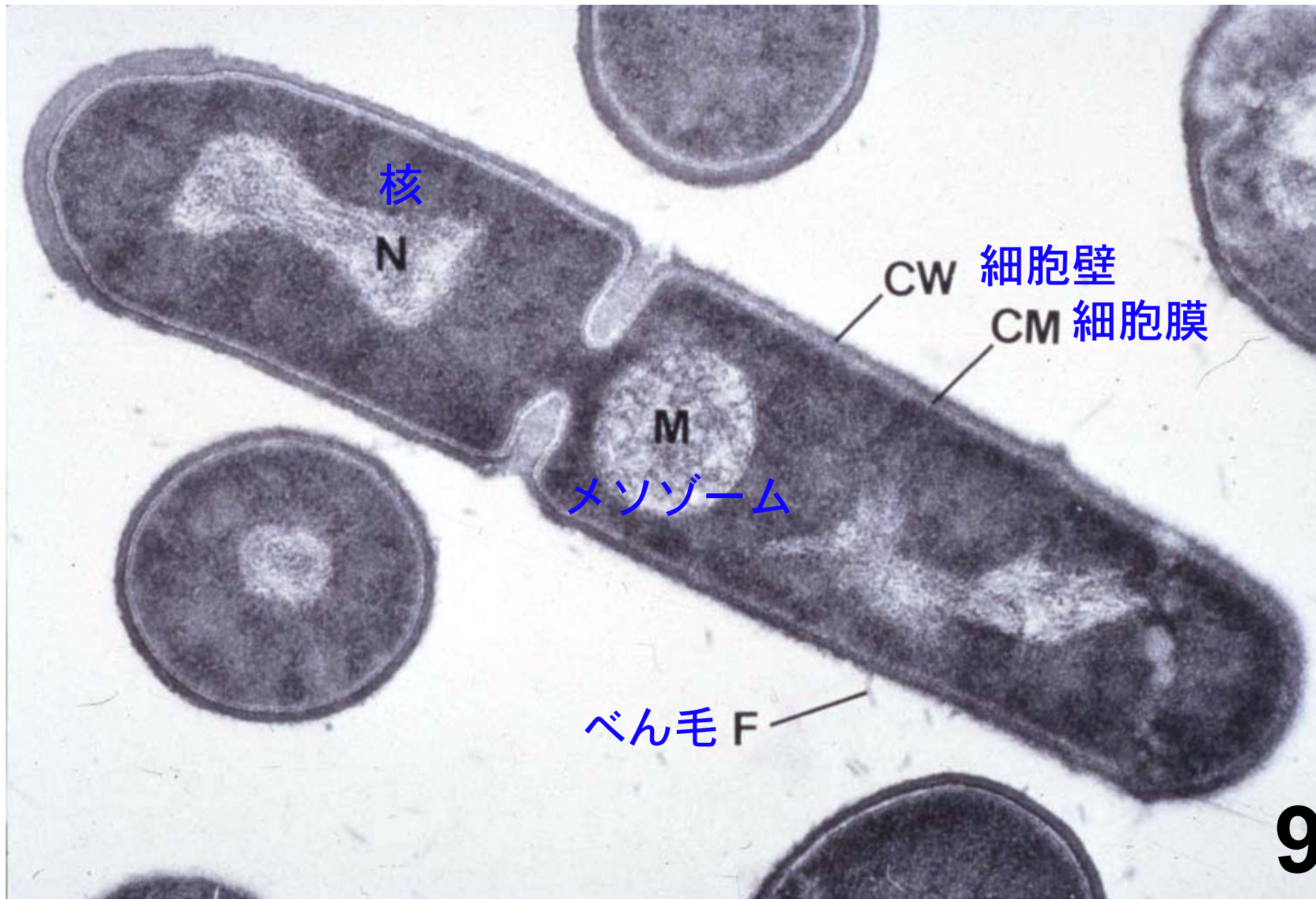


# 細菌の構造



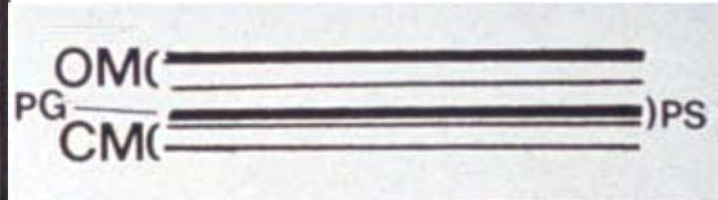
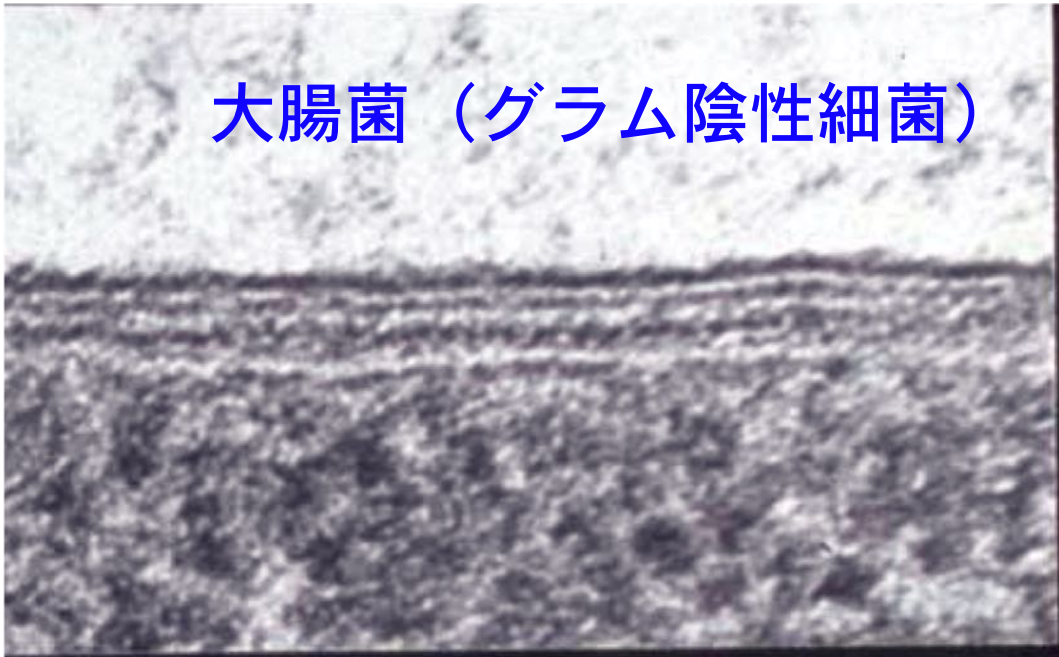


# 枯草菌の超薄切片像

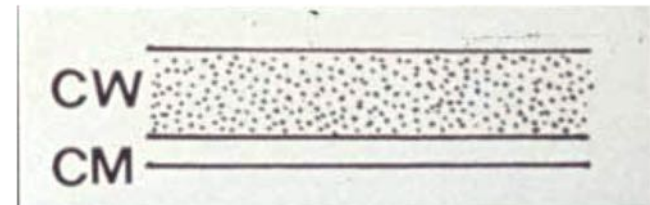
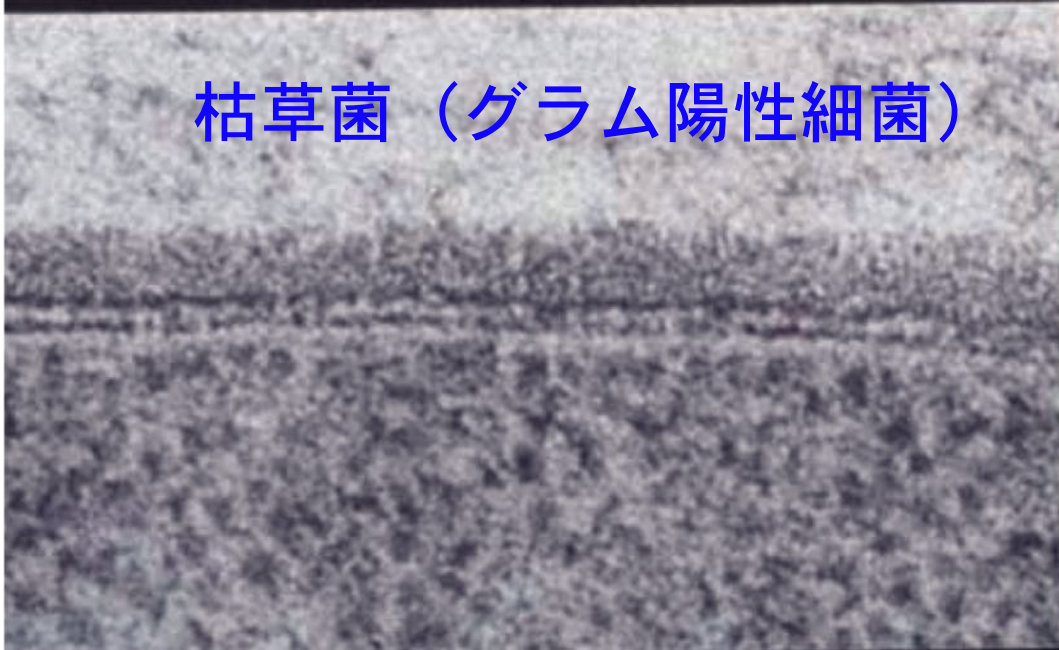


# 超薄切片法で見た細胞壁の構造

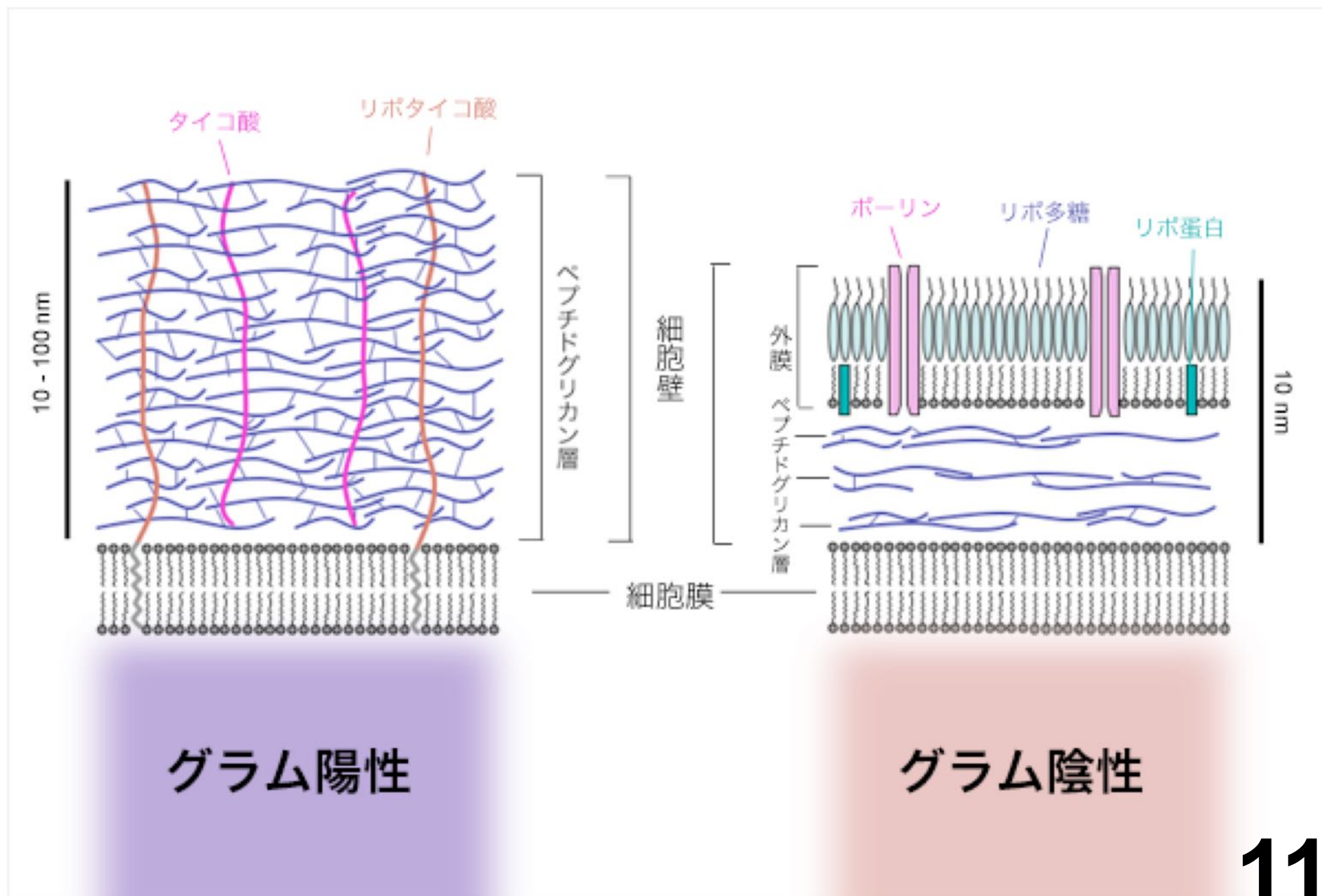
大腸菌（グラム陰性細菌）



枯草菌（グラム陽性細菌）

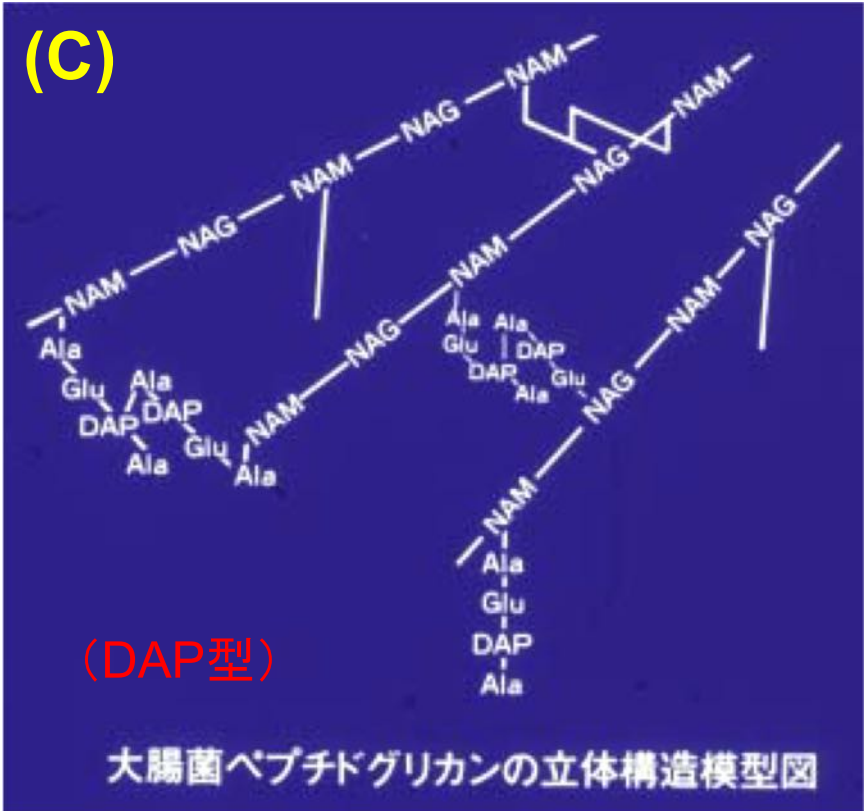
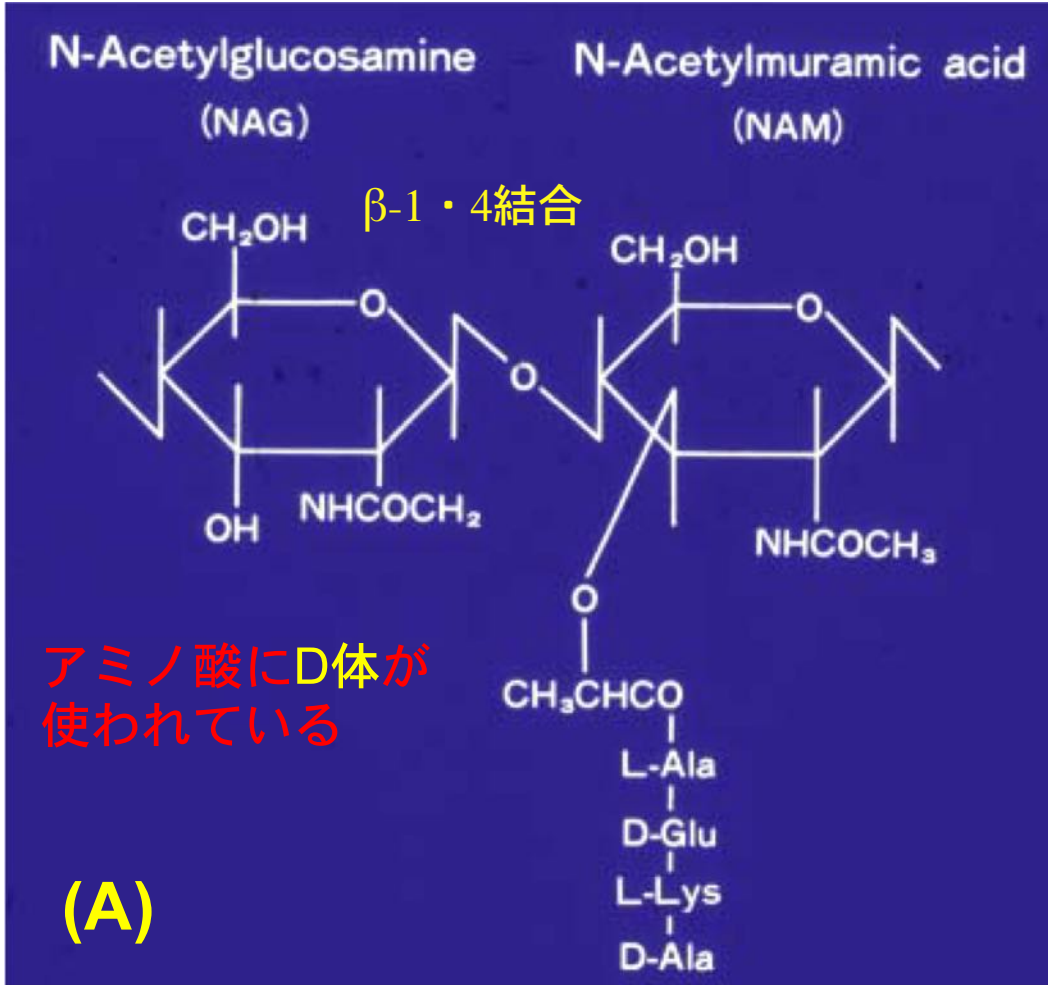




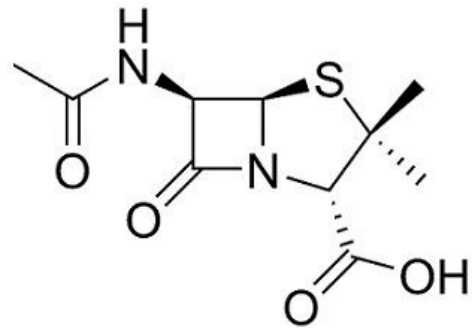
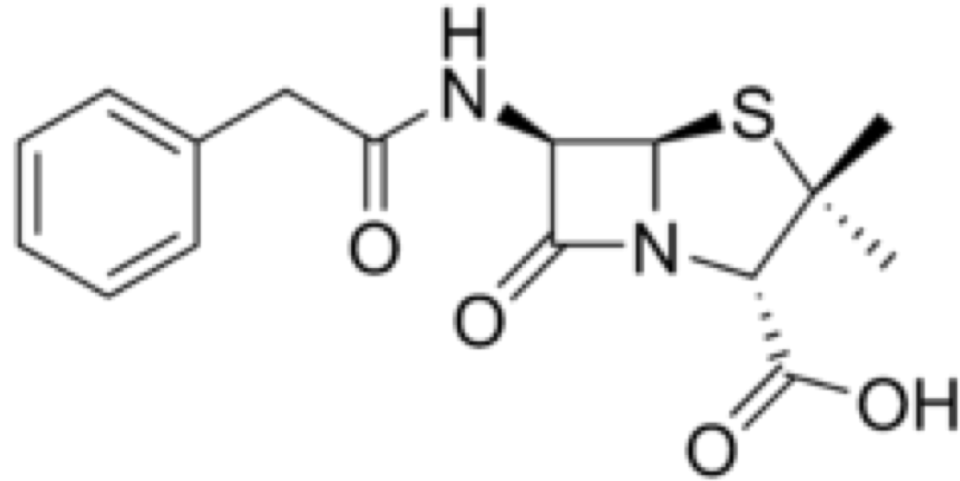




# ペプチドグリカンの構成ユニットとペプチド鎖の結合

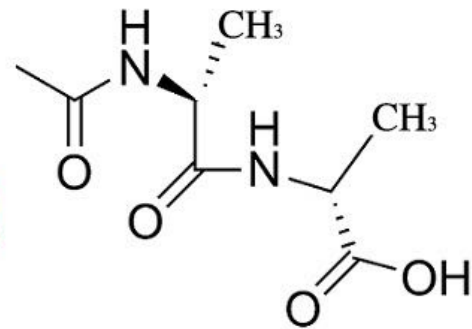


# ペニシリンG



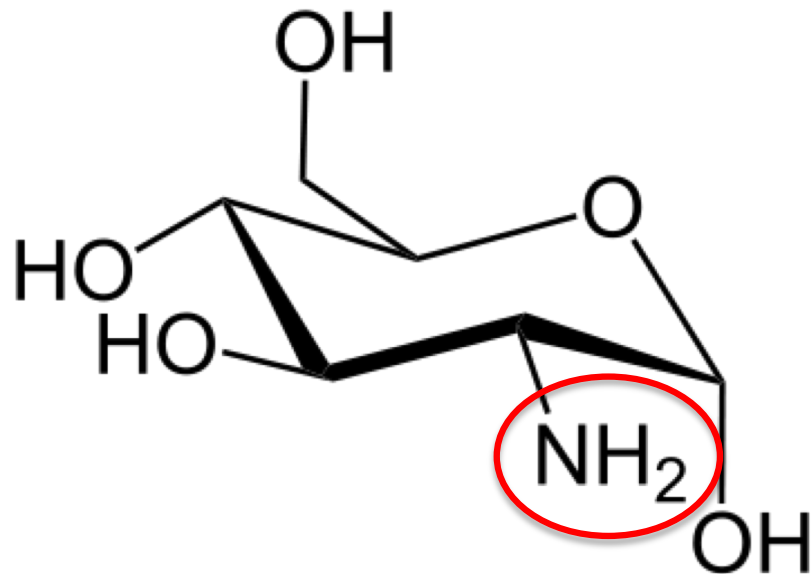
ペニシリンG

激似



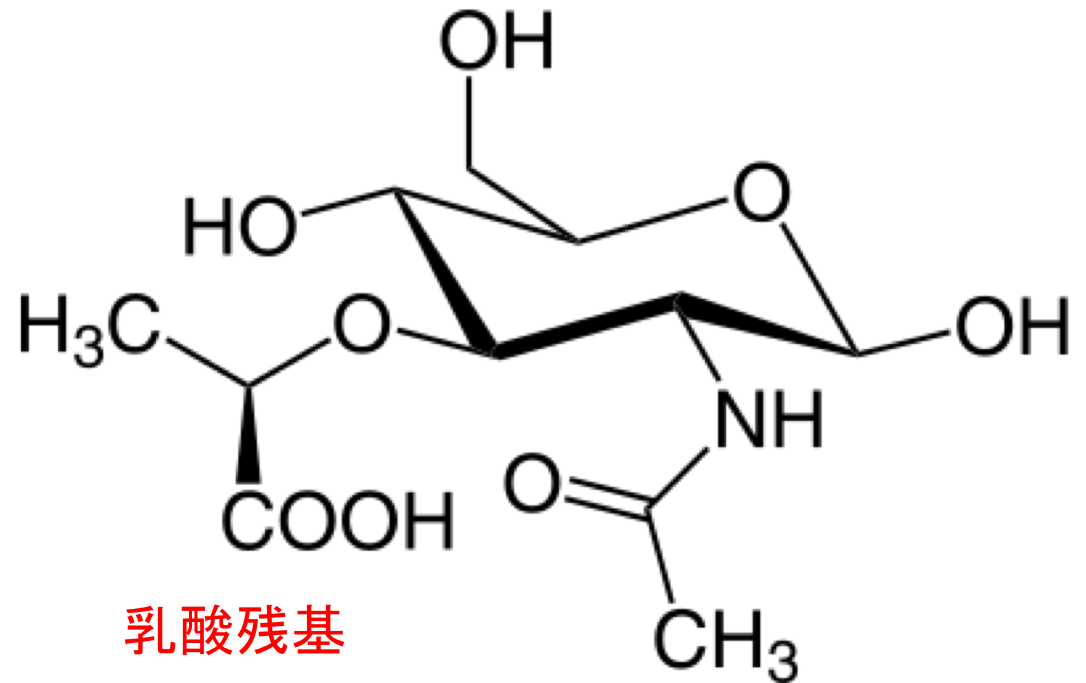
D-Ala-D-Ala

グルコサミン(Glucosamine、  
化学式 $C_6H_{13}NO_5$ )は、  
グルコースの一部の水酸基が  
アミノ基に置換された  
アミノ糖の一つである。



単一成分、またはコンドロイチン（コンドロイチン硫酸）との混合物として、栄養補給サプリメントや健康食品として販売されているが、経口摂取の場合の変形性膝（-しつ）関節症の改善効果は医学的に認められていない。

N-アセチルムラミン酸  
(N-Acetylmuramic acid) は、  
N-アセチルグルコサミン  
から誘導された単糖である。



アセチル化

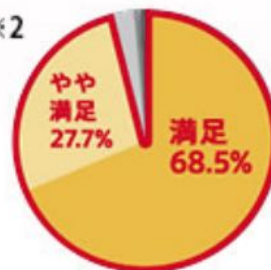


## グルコサミンをお探しの方へ

サントリーグルコサミン&コンドロイチンは、

グルコサミン7年連続売上**No.1**<sup>※1</sup>

しかも、満足度**96%**!<sup>※2</sup>



累計売上  
1900万  
本!



### サントリー グルコサミン&コンドロイチン

ケルセチンプラス

180粒入り/1日6粒目安(約30日分)

※1日の目安量を参考に、摂り過ぎにならないよう注意してご利用ください。

通販でしか購入できません

4,500円+税

購入する

※お得なコースもご用意しております。

※表示価格には別途、消費税がかかります。 ※原則7日以内まで返品可能です。(送料はお客様負担) [詳細はこちら](#)

※1 2007-2013年売上金額(確定) 出典: H・Bフーズマーケティング便覧2009-2015 No.2 機能志向食品編(グルコサミン成分カテゴリー内シェア)  
(株)富士経済

※2 円グラフ出典: サントリーのグルコサミン継続飲用1年以上のお客様対象の調査(2010年) n=700



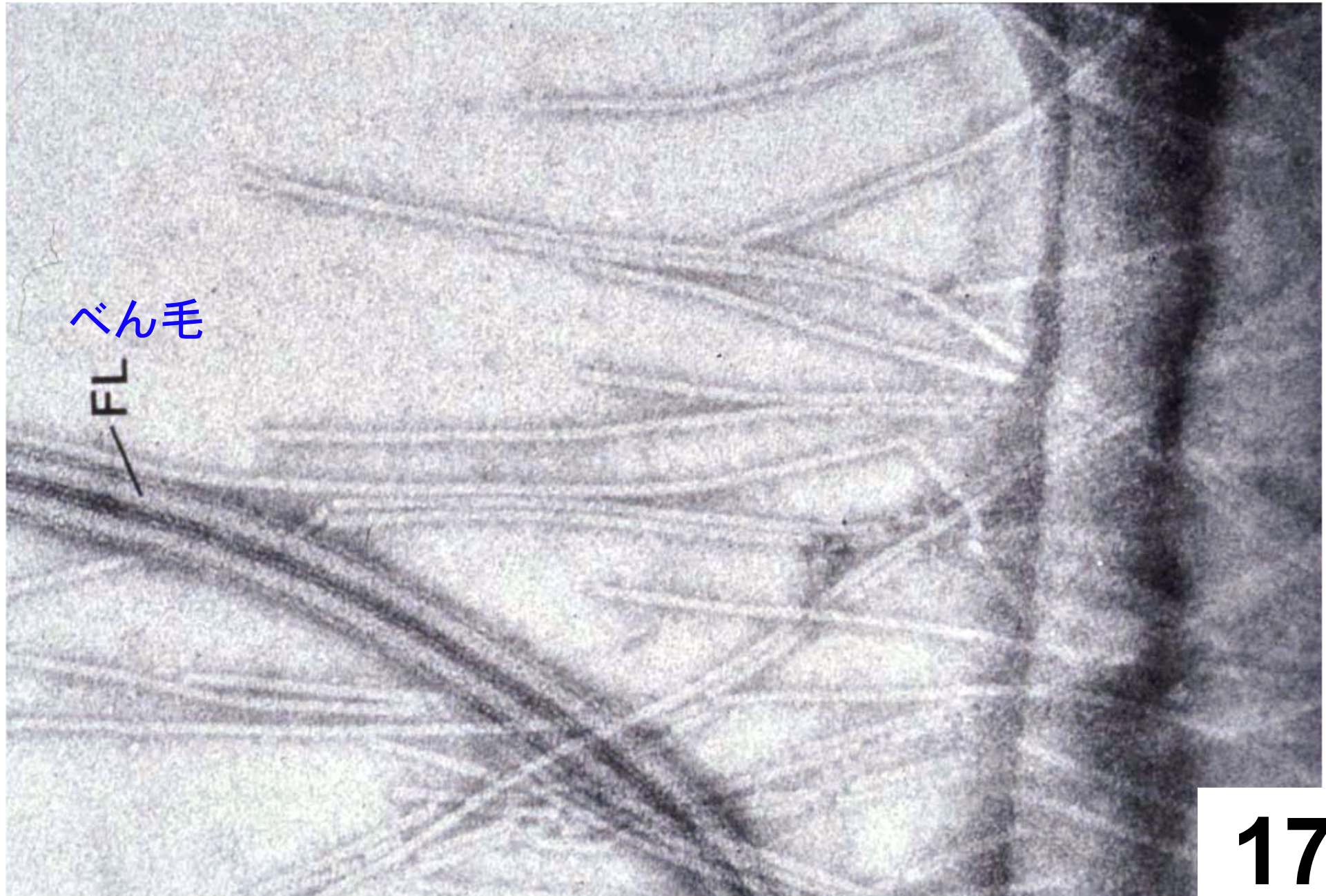
## 毒素原性大腸菌のもつ線毛CFA/I

ヒトの腸管粘膜に付着する性質があり腸管への  
定着因子となっている



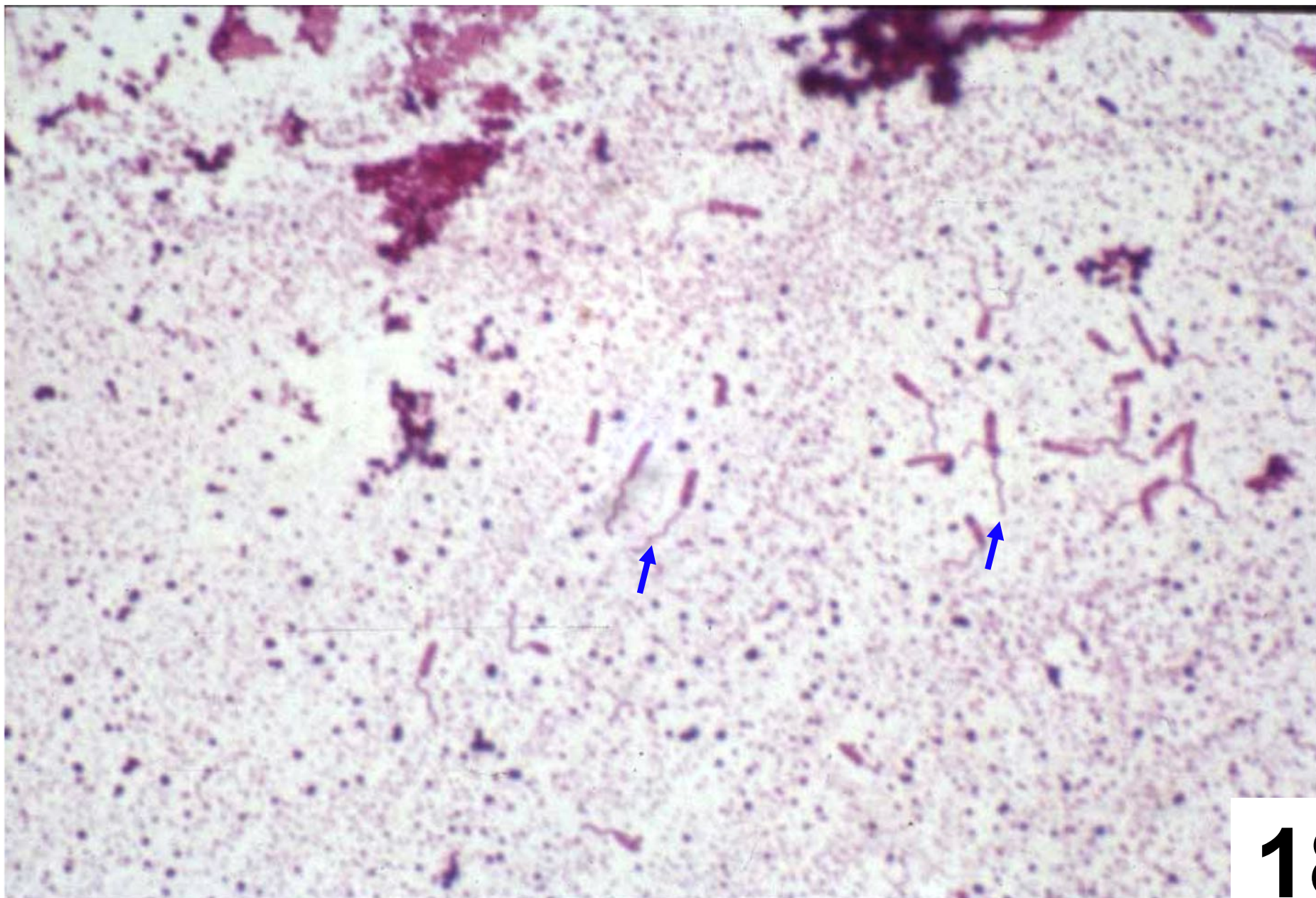


# 大腸菌のtype I 線毛とべん毛



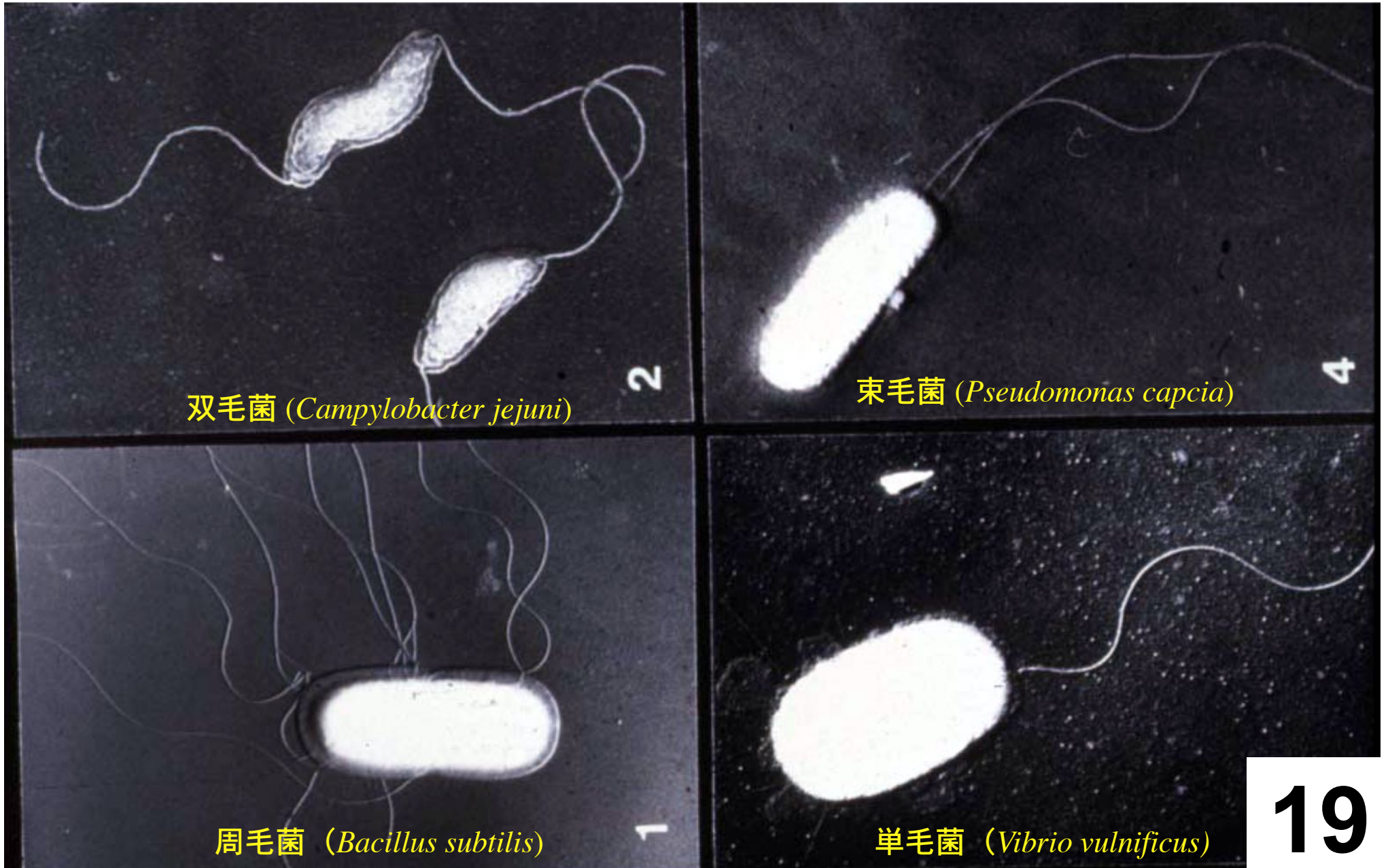


# 緑膿菌のべん毛染色（戸田法）

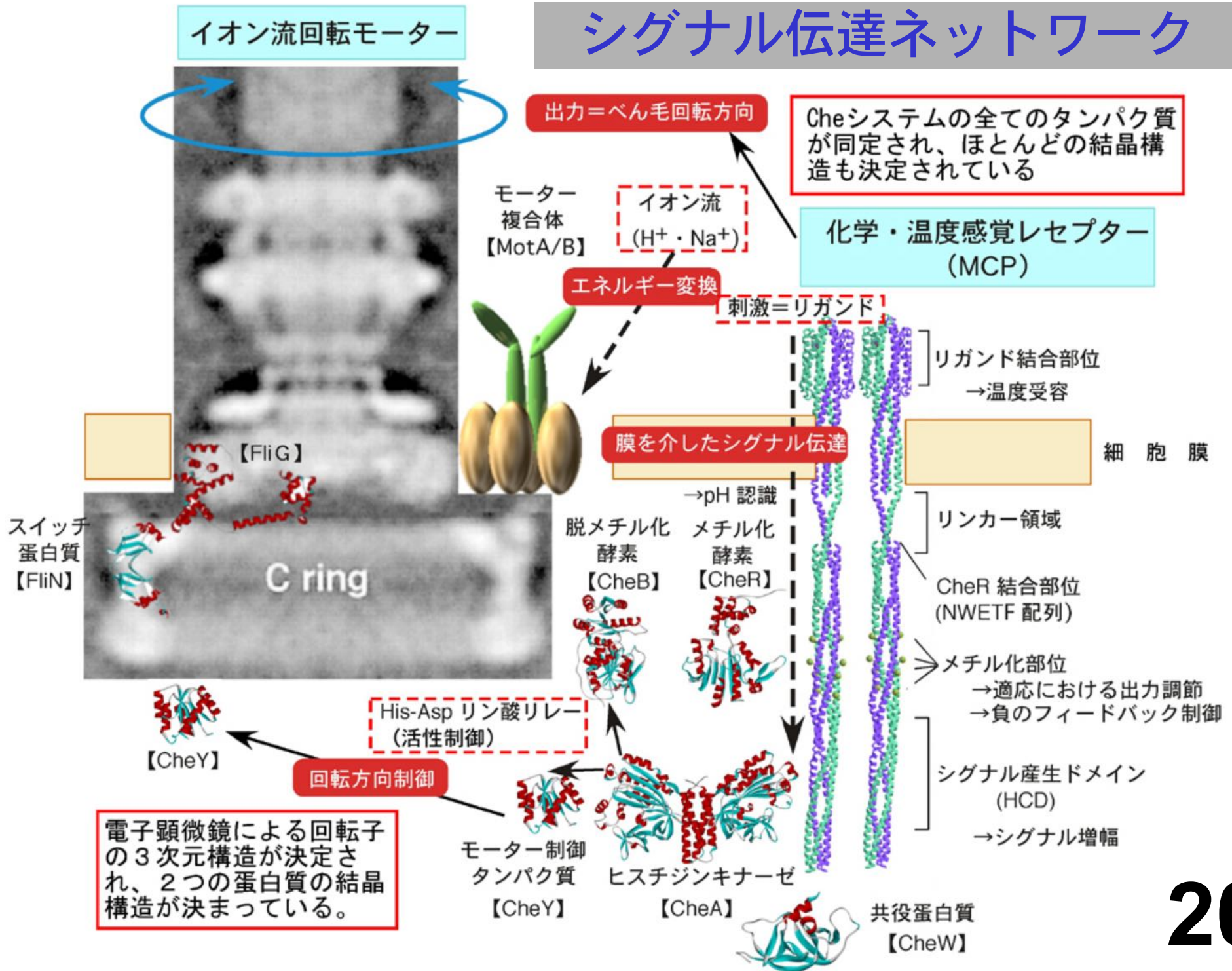




# 菌体へのべん毛のつきかた

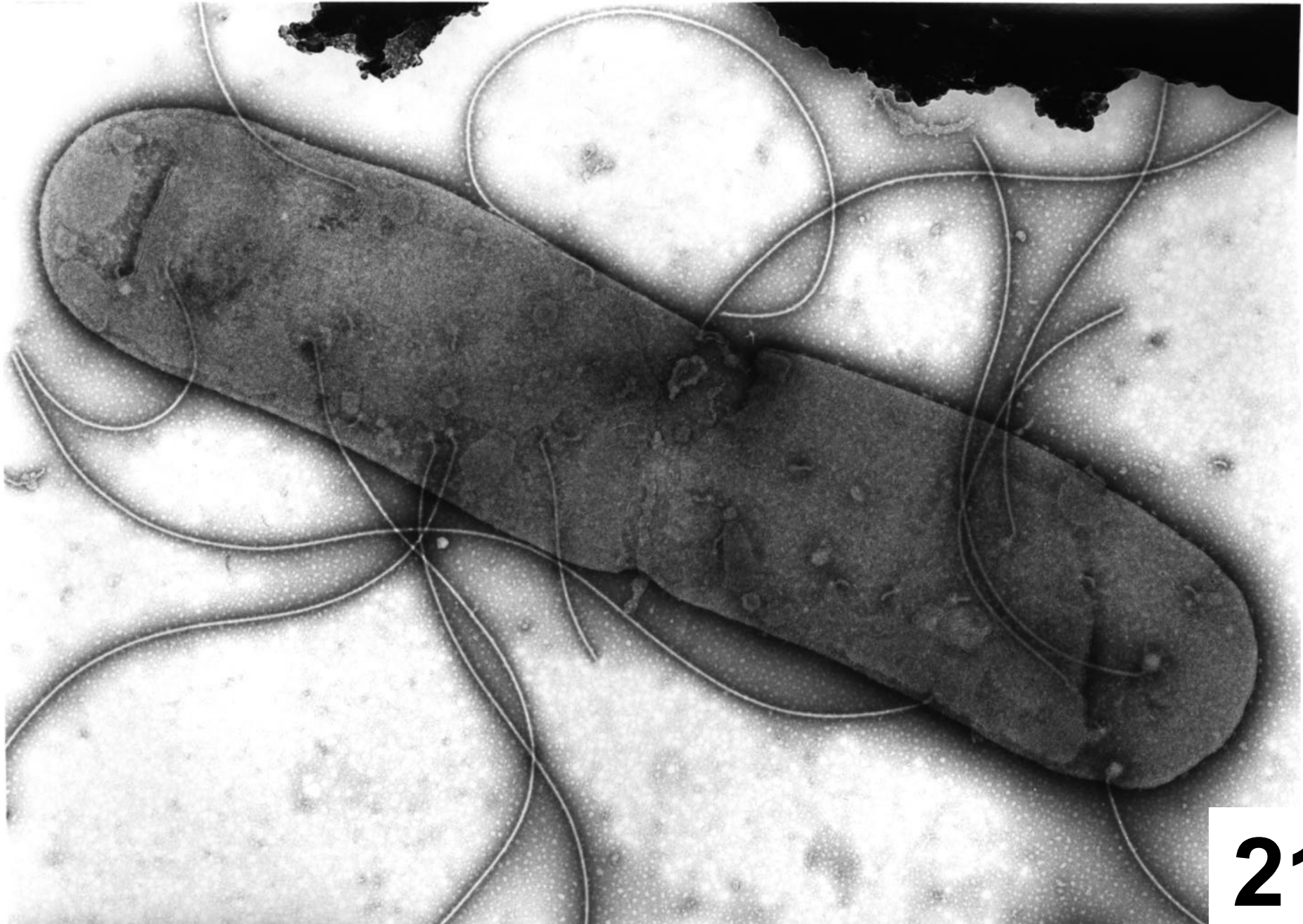


# シグナル伝達ネットワーク

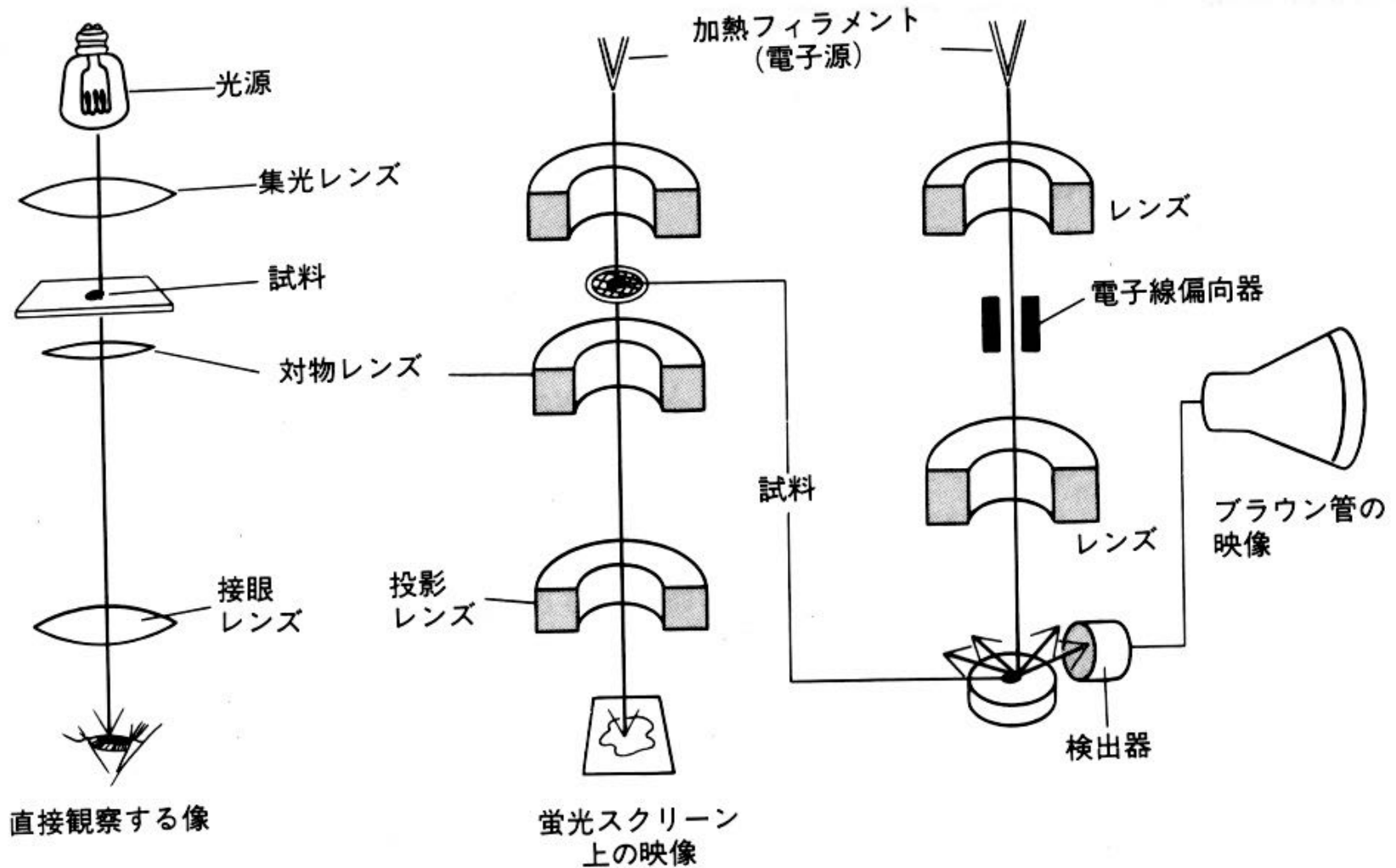




# Electron micrograph of *Salmonella* cell



# 電子顕微鏡模式図



光学顕微鏡

透過型電子顕微鏡

走査型電子顕微鏡





透過型生物用  
120kV電子顕微鏡

この値段はいくらで  
しょうか？

安いもので、  
???円くらい

300kVクライオ電子顕微鏡  
で原子レベルの構造解析が  
できる顕微鏡は  
???円くらい

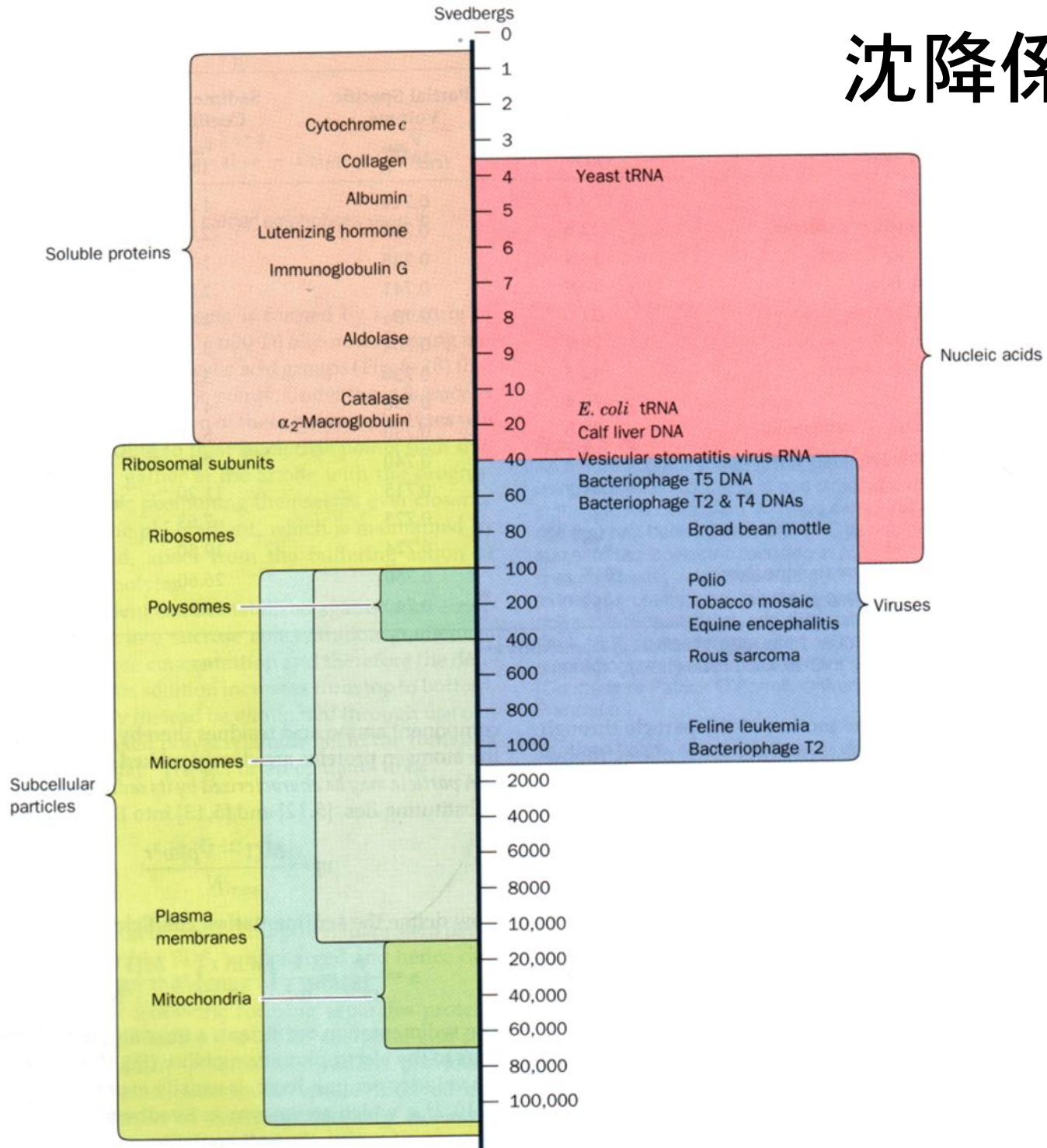
一日の使用料は  
???円くらい

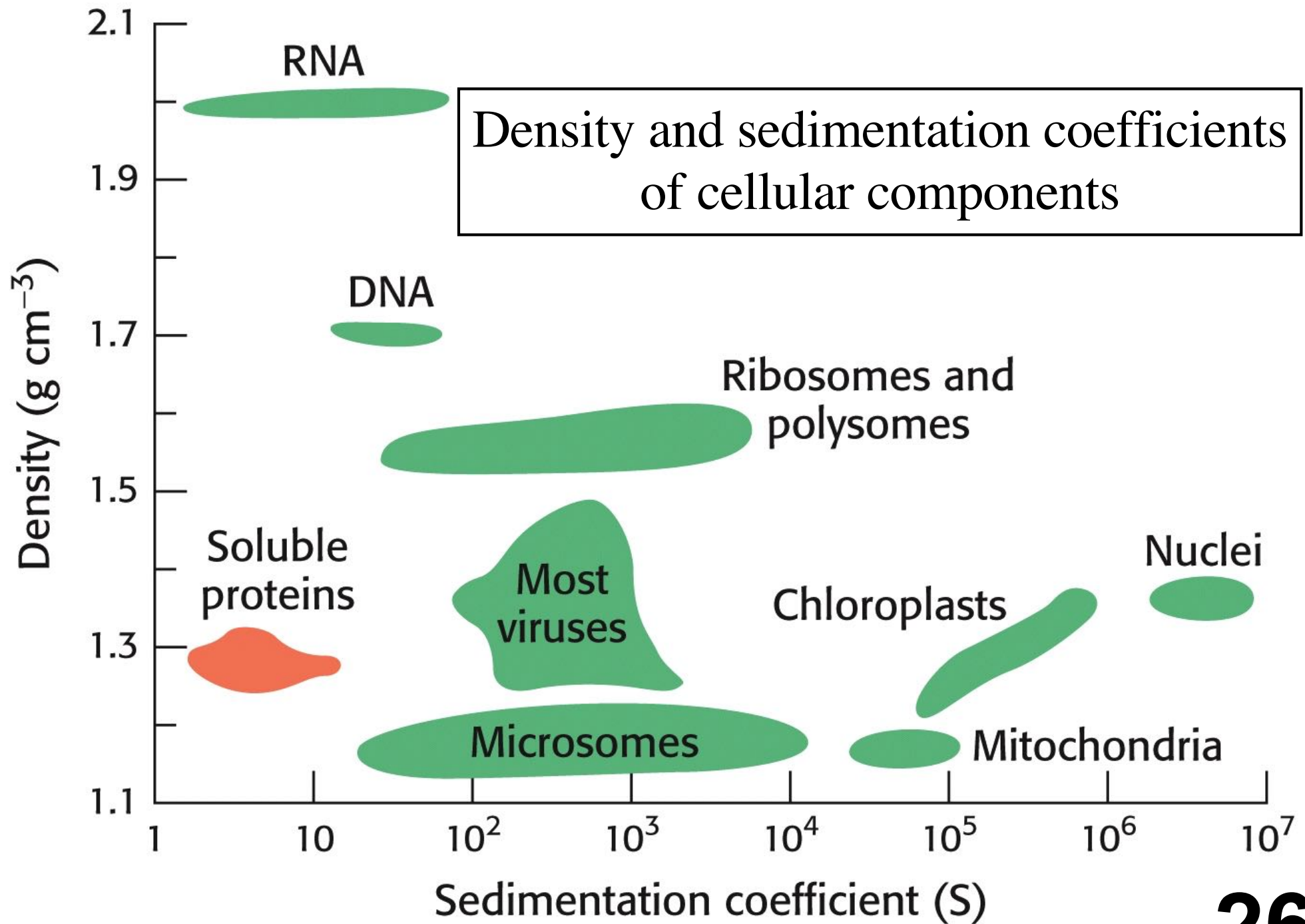


# べん毛の単離プロトコール

- 1) 菌体の回収 (低速遠心)
- 2) しよ糖を含む緩衝液にいれる
- 3) リゾチーム処理+ EDTA
- 4) トリトンX-100処理
- 5)  $MgSO_4$ +DNase
- 6) EDTA
- 7) 低速遠心
- 8) 10万gで遠心
- 9) 沈殿をバッファーに懸濁

# 沈降係数







# 超遠心機



型式：CP100MX

最高回転速度(rpm)：100,000

最大遠心加速度( $\times g$ )：803,000

回転制御精度(rpm)： $\pm 10$

加減速時間：0~100,000rpm:5分

温度制御精度/表示： $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$

真空方式：

油回転真空ポンプ+油拡散真空ポンプ

到達圧力0.13Pa以下

駆動部保証：完全10年間

冷却方式：

フロンレス、サーモモジュール冷却システム

表示

大きさ(mm)：(W)790 $\times$ (D)690 $\times$ (H)1,000

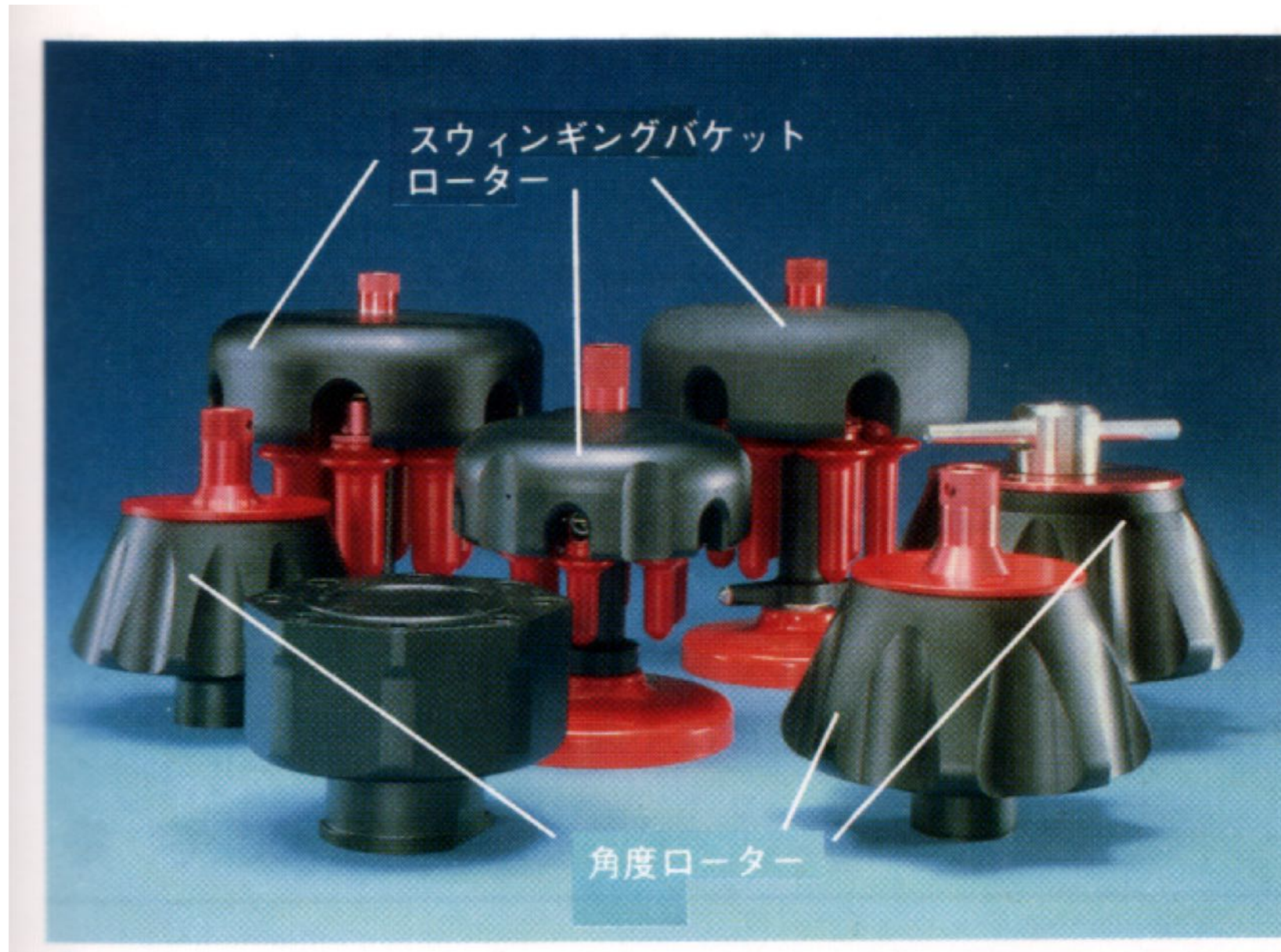
質量(Kg)：400

標準価格(円)：

定価 ? 万円

# 超遠心ローター

ローター7個  
How much?



- 70万円
- 210万円
- 350万円
- 700万円
- 1000万円
- 1800万円

# 遠心分離 I

## 遠心力

角速度 (rad · s<sup>-1</sup>) =  $\omega = d\theta / dt$

加速度 =  $\alpha = r \omega^2$

半径 =  $r$

加速度  $g = 9.8 \text{ m/s}^2$

$$r = 10 \text{ cm} \quad \begin{array}{l} 6,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 100)^2 = 39,438 \text{ m/s}^2 = 4,024 g \\ 30,000 \text{ rpm} \Rightarrow 0.1 \cdot (2\pi \cdot 500)^2 = 985,960 \text{ m/s}^2 = 100,608 g \end{array}$$

沈降力 は 遠心力から 浮力を引いたもの

$$F_s = m\omega^2 r - V_p \rho \omega^2 r$$

$V_p =$  体積

$\rho =$  溶液の密度

$m =$  質量

摩擦力  $F_f = v f$

$v =$  粒子の沈降速度

$f =$  摩擦係数

粒子の沈降速度は沈降力と摩擦力が釣り合うまで加速する

$$m = M(\text{分子量}) / N(\text{アボガドロ数})$$

$$\text{従って } m\omega^2 r - V_p \rho \omega^2 r = v f$$

$$\bar{V} = \text{偏比容} \doteq \text{密度の逆数}$$

$$V_p = \bar{V} m = \frac{\bar{V} M}{N}$$

1 g の粒子を無限大溶媒に溶かしたときの溶液増加



## 遠心分離 II

$V_p = \bar{V} \cdot m$ ;  $\bar{V}$  = 偏比容  $\equiv$  密度の逆数

$$V_p = \bar{V}m = \frac{\bar{V}M}{N} \quad \longrightarrow \quad v_f = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2 r}{N}$$

沈降係数  $s$  を定義する

$10^{-13}s = 1S$ (スドベリ) として表す

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{1}{\omega^2} \left( \frac{d \ln r}{dt} \right) = \frac{M(1 - \bar{V}\rho)}{Nf}$$

加速度に対する粒子の沈降速度

半径  $r$  の粒子の  $f$  (摩擦係数) はストークの式で計算される

$$f = 6\pi\eta r_p \quad \eta = \text{粘度}$$

$f$  と  $f_0$  (最小摩擦係数: 水和していない球体)  
を求めることで分子形が推定出来る

# 課題

問1) グラム陰性細菌とグラム陽性細菌の違いは何？代表的な菌名2つづつをあげて下さい。

問2) 超遠心機（日立製）の本体とローターを7個買うといくら？

問3) 直径10 cmの超遠心ローターをつかってその先端の遠心力が10万 g になるようにするには、ローターの回転数を一分間に何回転 (rpm) させればいいのか？