

環境共生科学特論

徳島大学大学院総合科学教育部環境共生分野
准教授

佐藤 高則

1. シラバス

2016年度 総合科学教育部(博士前期課程)		日英区分:日本語
環境共生科学特論 Advanced lecture of environmental symbiotics		前期
時間割コード	科目分野	昼夜
1813461	分野専門科目	
科目ナンバリング		
選必修区分		
選択		
担当教員 (ローマ字表記)		
佐藤 高則, 川上 竜巳 [Takanori Satoh, KAWAKAMI RYUSHI]		
授業形態	単位数	曜日・講時
	2	集中
対象学生		
1年次		

授業の目的

さまざまな環境に生育する生物は、それぞれが環境に適応した生体機能を有している。本授業では種々の生体成分の機能とバイオテクノロジーによる利用法や難培養微生物の遺伝子資源としての利用法について講義する。

授業の概要

さまざまな環境に生育する生物の生理活性物質の生体機能調節への影響と生体成分のバイオテクノロジーによる利用法について解説する(全16回)。(シラバス、授業の趣旨、目的、概要、評価の説明/1回) (佐藤高則/7回) バイオテクノロジーの各技術(遺伝子工学、タンパク質工学など)についての概説やその環境への応用に焦点をあて、バイオテクノロジーと環境とのかわりについて講義を行う。(川上竜巳/7回) 高温、低温、酸性、アルカリ性などの極限環境と呼ばれる環境にも生物が存在し、それらの生物機能がバイオテクノロジーの各方面で利用されていることを概説する。難培養微生物の遺伝子資源としての利用法について解説する。

キーワード

環境、生理活性物質、天然物、遺伝子、タンパク質化学、バイオテクノロジー、極限環境微生物、難培養微生物

到達目標

環境中の多様な生命現象に関する諸問題にに対応するための、生理活性物質や生体分子の利用法に関する知識の修得を目標とする。

授業の計画

1. シラバス、授業の趣旨、目的、概要、評価方法の説明 (佐藤)
2. 生体分子の機能・構造概論 (佐藤)
3. バイオテクノロジーの歴史および概論 (佐藤)
4. 遺伝子工学とその応用 (佐藤)
5. タンパク質工学とその応用 (佐藤)
6. 生化学とその応用 (佐藤)
7. 生体分子分光学概論 (佐藤)
8. 定期レポートの説明 (佐藤)

教科書・参考文献に関する補足情報

プリントと課題は、HP(<http://www.geocities.jp/satokichi2004jp/syllabus/jyugyou.htm>)よりダウンロードできます (佐藤)。

2. 生体高分子の基礎

生体高分子	構成単位	百分率
脂肪、脂質	脂肪酸	2~5%
多糖	単糖	1~2%
核酸	ヌクレオチド	2~3%
タンパク質	アミノ酸	10~12%

*その他、細胞中には、水（約70-80%）、低分子イオン、低分子物質などがあるが、これらは生体高分子とはいわない。

2.1 脂質

有機溶媒に溶ける生体物質。

生体内の機能は次の3つ。

- ①脂質二重層を形成し、生体膜の成分となる。
- ②炭化水素鎖を持つ脂質はエネルギー貯蔵体となる。
- ③細胞内、細胞間のシグナル伝達にかかわる。

脂質の分類

単純脂質：アルコール+脂肪酸

複合脂質：アルコール+脂肪酸+糖、リン酸など
(例：リン脂質)

ステロイド類：男性ホルモン、女性ホルモンなど

*脂肪酸：炭化水素鎖とCOOHからなる（両親媒性）

飽和脂肪酸：二重結合を持たない。分子式 $C_nH_{2n+1}COOH$

不飽和脂肪酸：二重結合を一つ以上持つ。

性質

- ①飽和脂肪酸は動物に比較的多く、Cが10以上で常温で固体
- ②不飽和脂肪酸は植物や青魚に比較的多く、常温で液体

脂肪酸の分類

飽和脂肪酸				
Cの数	n	構造式	名称	
1	0	HCOOH	ギ酸	アリ 食酢 乳製品
2	1	CH ₃ COOH	酢酸	
3	2	C ₂ H ₅ COOH	プロピオン酸	
4	3	C ₃ H ₇ COOH	酪酸	
.	.	.	.	乳脂肪
12	11	C ₁₁ H ₂₃ COOH	ラウリン酸	
14	13	C ₁₃ H ₂₇ COOH	ミリスチン酸	
16	15	C ₁₅ H ₃₁ COOH	パルミチン酸	
18	17	C ₁₇ H ₃₅ COOH	ステアリン酸	動植物 油脂
.	.	.	.	
26	25	C ₂₅ H ₅₁ COOH	セロチン酸	
30	29	C ₂₉ H ₅₉ COOH	メリシン酸	

不飽和脂肪酸

二重結合1つ $C_nH_{2n-1}COOH$
例：オレイン酸($C_{17}H_{33}COOH$)

二重結合2つ $C_nH_{2n-3}COOH$ 必須脂肪酸
例：リノール酸($C_{17}H_{31}COOH$)

二重結合3つ $C_nH_{2n-5}COOH$ 必須脂肪酸
例：α-リノレン酸($C_{17}H_{29}COOH$)

二重結合5つ $C_nH_{2n-9}COOH$
例：エイコサペンタエン酸(EPA, $C_{19}H_{29}COOH$)

二重結合6つ $C_nH_{2n-11}COOH$
例：ドコサヘキサエン酸(DHA, $C_{21}H_{31}COOH$)

単純脂質 ➡ 中性脂肪

アルコール+脂肪酸の脂質

アルコールとしては主にグリセロールが使われる。

グリセロール骨格からなる単純脂質

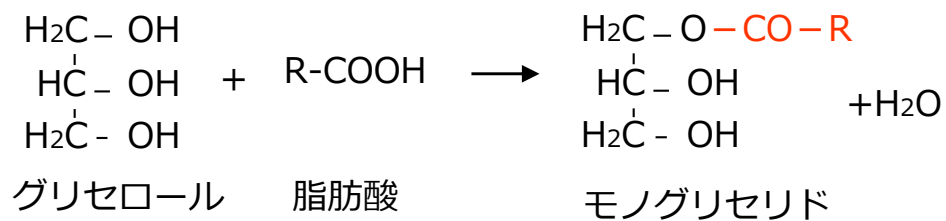
グリセロール+3脂肪酸=トリアシルグリセロール

脂肪酸1分子：モノアシルグリセロール

脂肪酸2分子：ジアシルグリセロール

これらは**エネルギー貯蔵物質**として蓄えられる。

血中に蓄積すると
動脈硬化の原因

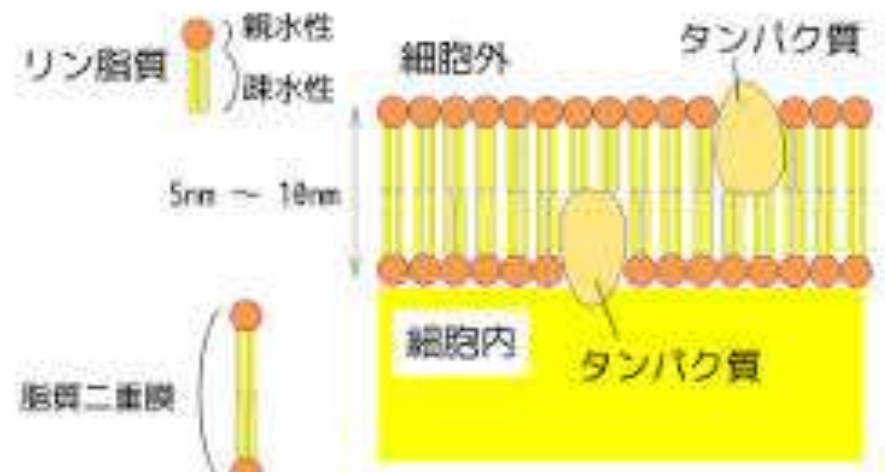
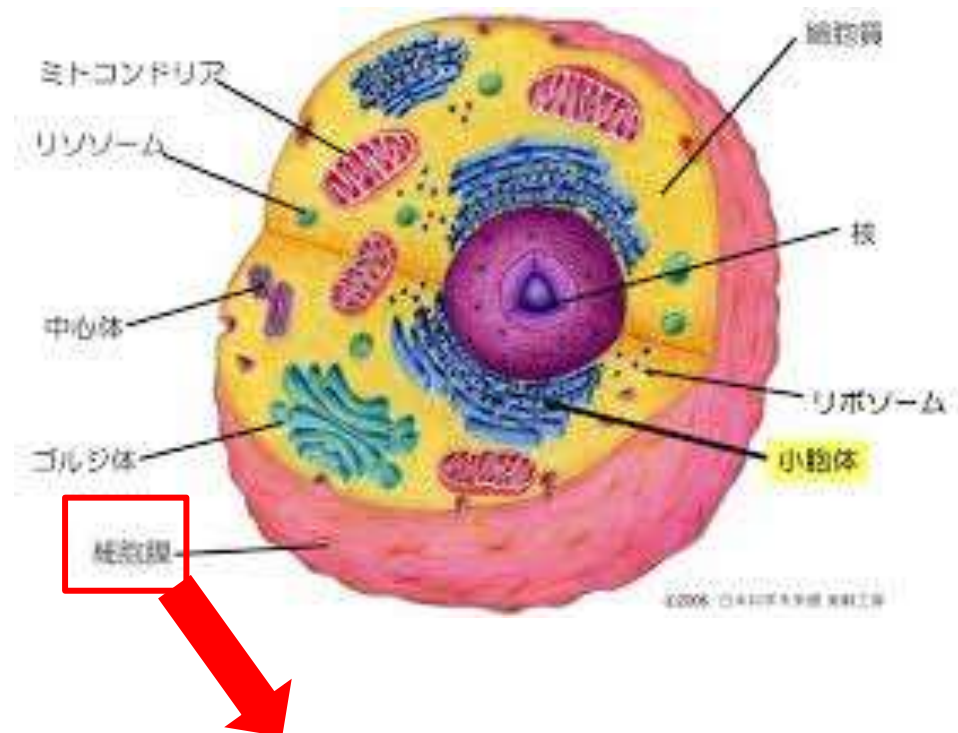
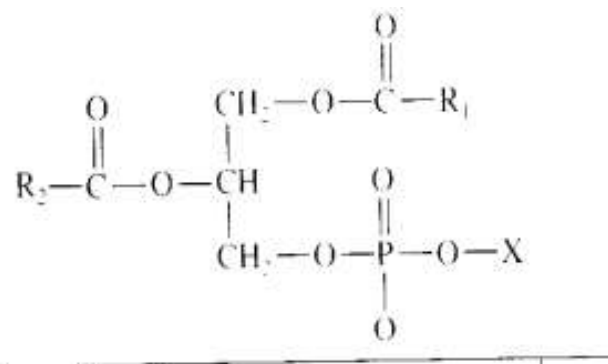


複合脂質 ➡ 細胞膜の構成成分

単純脂質にさらにリン酸や糖がついたもの。

単純脂質+リン酸=リン脂質

単純脂質+糖=糖脂質

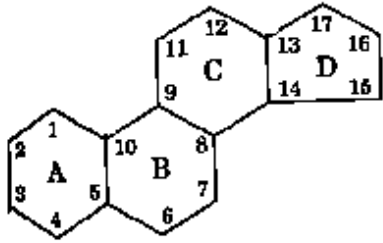


脂質

ステロイド

シクロペントノペルヒドロフェナントレン骨格を持つ (例) コレステロール

生理的な機能としては、ホルモンや
ビタミンの前駆体、細胞膜形成など



・ C3にOHがついたもの：ステロール

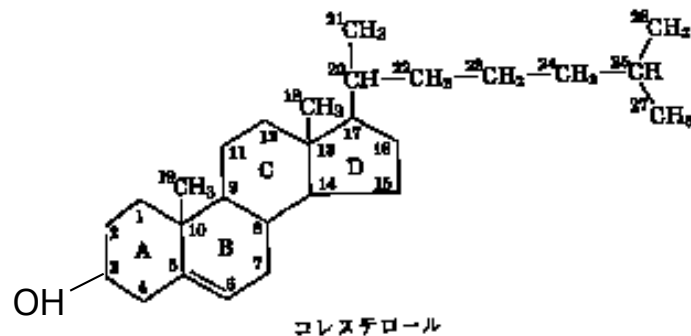


さらに脂肪酸と結合：コレステロールエステル

・ C17には炭化水素鎖がさらに結合している

コレステロール(C=27)

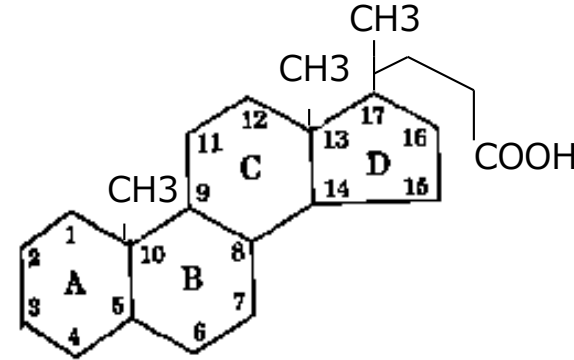
胆汁酸やビタミンD3の原料として使われる
動物にのみ存在



ステロイドの種類

①胆汁酸 (C=24)

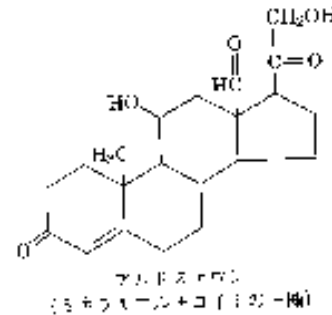
・ COOHを持つ胆汁に見られるステロイド。脂質の消化吸収を助ける



②ステロイドホルモン

(A)副腎皮質ホルモン (C=21)

アルドステロン：無機物・水分の代謝
(C19がCHO)



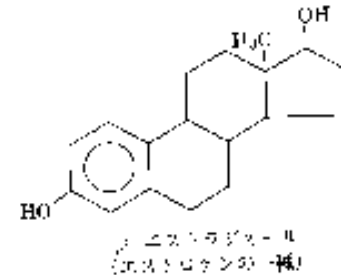
(C)黄体ホルモン(C=21)

(例) プロゲステロン
妊娠の成立・維持

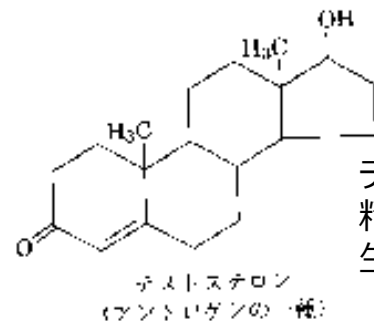
(D)卵胞ホルモン(C=18)

(例) エストラジオール

女性生殖機能の維持



(B)男性ホルモン (C=19)



テストステロン：
精子形成促進、男性
生殖機能の維持



① コレステロールって悪者？

コレステロールと聞くと、生活習慣病や肥満などの原因となる悪者のイメージがあり、敬遠されがちです。体内にコレステロールや中性脂肪が蓄積すると、高脂血症、高血圧、糖尿病といった生活習慣病を引き起こすといわれています。これは、過剰に摂取した脂肪が血管を詰まらせたり、動脈硬化を起こしやすくすることで、心筋梗塞、脳梗塞といった深刻な病気を引き起こすリスクが高まるからです。

そのため平成20(2008年)4月から40歳～74歳までの医療保険加入者(妊婦などを除く)を対象に、特定検診(特定健康診査)・特定保健指導(メタボ健診)が始まりました。これは「高齢者医療確保法」という法律に基づくもので、全国で約160ある健康保険組合と、全国に約1,800ある国民健康保険組合などの医療保険者に対し制度的に義務づけられるものです。一般にメタボ予備軍として挙げられるのは、腹囲が男性85cm以上/女性90cm以上の人です。

また、全世界で最も売れている薬は、高脂血症(血液中のコレステロールや中性脂肪の値が高い)を対象としたものです。ちなみに、三共(現在の第一三共)は、このコレステロール合成を阻害する物質を、種々のカビや微生物から探していました。そして18年後に、高脂血症薬であるメバロチンの販売にこぎつけ、多くの人の命を救いました。

薬以外にも「コレステロールを下げる」、「脂肪を落とす」ということを謳っている健康食品、サプリメントは数多くあります。このように、脂肪やコレステロールは、特に肥満・メタボ・ダイエットなどに対する「悪者」としてのイメージが一般的には強いのではないのでしょうか？

しかし、実は我々はコレステロールなしでは生きていけません。それは、我々の体を構成する60兆個の細胞膜(細胞内を保護する器のようなもの)にはコレステロールは欠かせないからです。また、性ホルモン、胆汁酸、ビタミンDなどは、コレステロールを原料として、生体内で合成されます。このように、コレステロールはヒトにとって必要なもののなのです。

問題となるのは、過剰なコレステロールの摂取や種々の要因で、生体内のコレステロール量を調整している肝臓の機能が低下し、適切なコレステロール量に調節できなくなったとき、高脂血症になると考えられています。(ブルーボックス:新しい薬をどう創るか、京大薬学研究科編)

② 女子砲丸投げの金 ドーピングで剥奪 ベラルーシの選手薬物違反

国際オリンピック委員会(IOC)は13日、ロンドン五輪陸上女子砲丸投げで優勝した●●●(ベラルーシ)をドーピング違反で失格にし、金メダルを剥奪すると発表した。筋肉増強剤のメテノロン*が検出された。

IOCによると、同選手は5日の事前検査と、6日の競技後に受けた検査の両方でメテノロンに陽性反応を示した。

2位の●●●●(ニュージーランド)が金メダルとなるなど、同種目の順位は一つずつ繰り上がる。(2012.8.13、共同通信)

*メテノロン:タンパク同化ホルモんで、体重増加、疲労回復、筋肉増強作用がある。もちろんオリンピックでは禁止薬物として指定されている。

ステロイド剤:人工的に合成されたホルモン剤



・炎症抑制や体内の抵抗力増加
・軟膏としてアトピー性皮膚炎治療にも用いられる

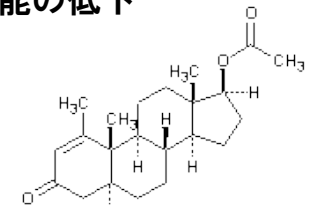


男性(女性)ホルモンの誘導
蛋白質同化(筋肉増強)作用
血糖値上昇
気分高揚



ドーピングなどの違反
副作用による女性の男性化
男性機能の低下

*ここで述べたステロイド剤は、男性ホルモんに類似した合成化合物を指す。他のステロイド類に類似したステロイド剤は市販されており、各々作用・用途や副作用は異なる



メテノロン酢酸エステル

2.2 糖と多糖

糖（炭水化物）とは？

(CH₂O)_nで表される。nは3~7のことが多い。
この基本単位を単糖という。**生体のエネルギー源や細胞の構成要素として重要**。また、分子や細胞間の認識にも使われる。例えばインフルエンザウィルスと抗体の関係など。

糖類の分類

単糖の重合する数により分類される

単糖類：単糖 1 分子のみ

二糖類：単糖が二分子結合

少糖類：単糖が10-20個程度結合

多糖類：単糖が数百~数千個結合

二糖類

単糖が二分子結合したもの

マルトース（麦芽糖）＝グルコース＋グルコース、でんぷん、グリコーゲンの構成要素

スクロース（ショ糖）＝グルコース＋フルクトース、さとうきび、てんさい、サトウダイコンなどから得られる。精製すると砂糖となる。

ラクトース（乳糖）＝ガラクトース＋グルコース、乳汁中に存在。ほのかな甘みがある。

多糖類

単糖が多分子結合したもの



食物繊維

- ・セルロース：植物の細胞壁に使われる。人はセルロースを利用できない
- ・デンプン：アミロースとアミロペクチンからなる。植物の貯蔵物質
- ・グリコーゲン：動物の貯蔵物質。アミロペクチンに類似の構造。
- ・キチン：甲殻類の外骨格に使われる。抗菌性を示すキチン・キトサンの原料

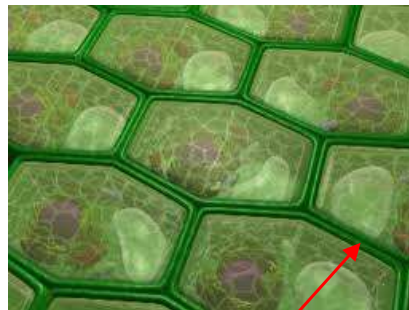
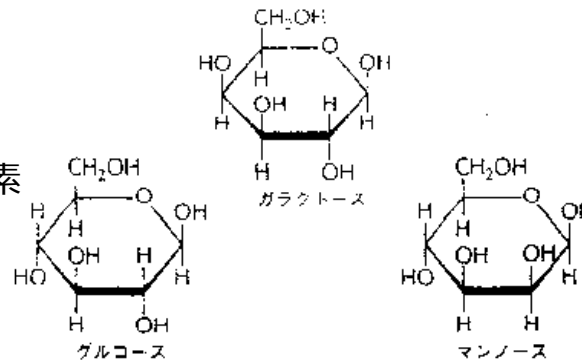
代表的な単糖

（六炭糖）

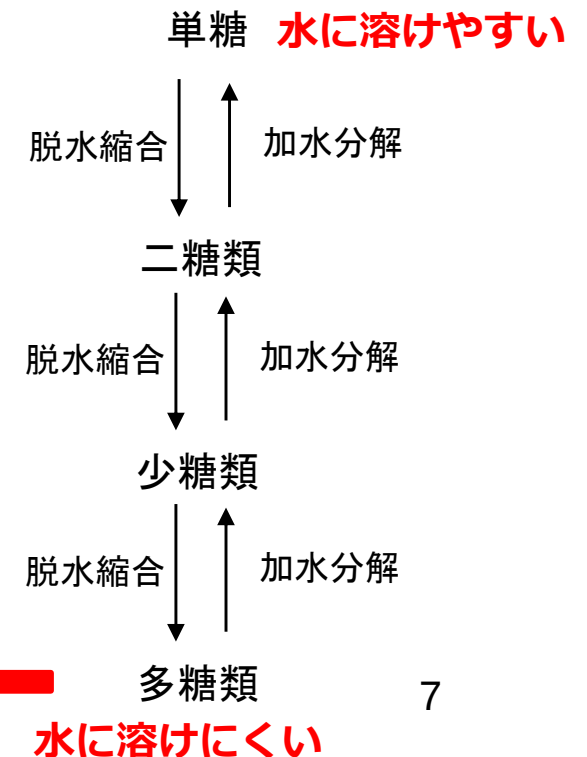
- ・グルコース：ブドウ糖
自然界に多く存在し、生物の代謝の出発物質
- ・ガラクトース：牛乳などに存在し、乳糖の構成要素
- ・マンノース：リンゴ・ももなどの果実中存在
- ・フルクトース（果糖）：
砂糖（ショ糖）の構成要素、果汁中存在

（五炭糖）

- ・リボース：RNA(リボ核酸)の構成要素
- ・デオキシリボース：
DNA(デオキシリボ核酸)の構成要素。
リボースの誘導体
- ・キシロース：植物の細胞壁に存在。
還元するとキシリトールになる。



植物の細胞壁





糖類に関する雑学

①キシリトールの効能

キシリトールはキシロースを還元して得られる人工甘味料である。

これが注目されたのは、①摂取後に得られる爽快感や②虫歯予防に役立つ、③血糖値への影響が少ない、などの特徴があるためである。下記のように各社から商品が販売されているが、主なものはガムである。

メーカー	商品	含有量
ロッテ	キシリトールガム (クールハーブ)	キシリトール60%
ロッテ	キシリトールガム(ライムミント)	キシリトール55%
ブルボン	アイスミント	キシリトール60%
カネボウ	歯みがきガム	キシリトール25%
カネボウ	ティースケアガム	キシリトール25%
明治	キシリッシュ(クリスタルミント)	キシリトール50%
グリコ	キスマントガム(ダイエット)	キシリトール10%
アダムス	トライデント各種	キシリトール28%
カバヤ	キシリクール(ボールガム)	キシリトール50%
カバヤ	Air Smash	キシリトール100%
TP Japan	キシリトールガム (シュガーレス)	キシリトール100%
リーフ	キシリフレッシュ	キシリトール100%

キシリトールの効能

①爽快感

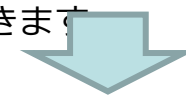
キシリトールが水に溶解する際に吸熱反応が起きるため、ひんやりとした爽快感が生じる。

②虫歯予防

口中の虫歯菌(ミュータンス菌)が生産する酸により、歯のエナメル質が溶かされて虫歯になる。この酸の生産には糖質が原料となっており、虫歯菌はキシリトールから酸を作れないため、虫歯予防に役立つといわれている。虫歯予防先進国のフィンランドでは、キシリトールに加え、フッ素を併用することで、予防効果をあげている。

③ 血糖値抑制

キシリトールの安全性についてはFAO(国連食料農業機関)やWHO(世界保健機構)からも「一日の許容摂取量を特定しない」という安全性の高いカテゴリーとして評価され、インシュリン非依存的に代謝されるので血糖値への影響がなく、糖尿病の方も安心して摂取できます。



しかし、ほかの人工甘味料(ソルビトール:グルコースを還元して得られる)などでも同様の効果を示すものもあり、キシリトール商品の宣伝戦略や他の糖類との摂取のバランスによっては効果が出にくいなどの問題点もあります。

また、糖類以外の人工甘味料としてはアスパルテーム、アセスルファム、古くはサッカリンなどがあり、発がん性など安全性の議論が続いている。

③ 人工甘味料と食品添加物

生化学ワンポイント

Box 8・2 人工甘味料

人工甘味料は食品や飲料にカロリーなしで甘味を加えるのに用いられる。味覚受容体ではスクロース(砂糖)を真似るが代謝されない。少量でよいのでエネルギー代謝に関係しないものである。天然の糖のうち、たとえばフルクトース(果糖)はスクロースより1.5倍甘い。蜂蜜はフルクトース、グルコース、マルトース(麦芽糖、グルコースの二糖)が主成分でスクロースの1.5倍甘い。甘さはどうなるのか？ 人が感じる甘さは他に潤いようがないので何人かの人がその溶液をスクロース溶液と比べてもらう。この方法で調べた化合物(下表)は相当薄めて測った結果である。

化合物名	スクロースとの相対甘味度
アセスルファム	200
アリサーム	2000
アスパルテーム	180
サッカリン	350
スクラロース	600

最も古くから知られているのは1879年に発見されたサッカリンで Sweet'N Low® として広く用いられる。1970年代になり非常に高濃度で与えると実験室でラットにがんをつくらせることがわかったが、甘味料として用いられるとは桁違いで心配することはないとされている。

アスパルテームは NumaSweet® および Equal® の有効成分で1981年、ヒトに用いることが承認され現在市場で最も多く流通している。サッカリンと異なりアスパルテームは分解されてアスパラギン酸(糖)、フェニルアラニン(糖)、メタノール(糖)になる。Asp と Phe はふつうのアミノ酸で代謝されるのでカロリーフリーではない。メタノールは大量なら毒性があるが、アスパルテームを用いた飲料から生じる量は天然のフルーツジュースが含むと同程度である。フェニルケトン尿症でフェニルアラニンを代謝できないヒトはアスパルテームとして Phe をとり過ぎないようにいわれる(糖のポリマーブチドも)。アスパルテームの最大の欠点は熱に不安定なこと、焼いたりできないし、ソフトドリンクでは数か月で加水分解して味がなくなる。

アセスルファムフェニルアラニルメチルエステル (アセスルファム)

アセスルファムはアスパルテームとの組合わせで用いられることがある。この二つは相乗作用がある(両者単独以上の甘さを与える)。その他の人工甘味料としては糖の誘導体スクラロース (Splenda®, 問題 9) やアスパルテームの誘導体アリサームなどがある。ある種の植物抽出液(たとえばステビア)も人工甘味料として用いられる。

アセスルファム

人工甘味料の市場は年に数十億ドルといわれる。しかし驚いたことに成功している甘味料の多くはそれを求めて努力してではなく、偶然か間違いで見つかった。たとえばアスパルテームは1965年、ある合成化学者が密かに付いたのを知らずになめて発見された。スクラロースは1975年、化合物を“テストせよ”といわれた学生が“テストせよ”と同じ間違えて見つかったという。

ヴォート基礎生化学p.139より抜粋

食品に含まれている添加物の数は790種ほどあり、日本人成人は1年で7.7kg摂取しているという報告もあります。食品添加物は、食品原料だけでは製造・加工がしにくかったり、保存性や見た目をよくするためなどの理由で使われ、大きく合成添加物(石油製品などから化学合成されたもの)と天然添加物(天然の植物・海藻などから特定の成分を抽出したもの)があります。合成添加物や天然添加物でも食用として使われない生物由来の成分には、発がん性、催奇形性、慢性f毒性、遺伝子変異などをもつものが知られています。

食品添加物の一種に人工甘味料(上記資料)があり、①で紹介したキシリトールやソルビトール、オリゴ糖など糖を加工して作られるものと、アスパルテーム、サッカリン、アセスルファムなど糖とは全く関係ない合成甘味料があります。

以下に人工甘味料の代表的なものと疑われている危険性を示します。

- ・アスパルテーム：二種のアミノ酸(Asp,Phe)とメタノールから合成される。国内では味の素が製造し1983年販売許可。清涼飲料水、ダイエット甘味料などに含まれている。アメリカでは脳腫瘍との関係が、イタリアでは白血病・リンパ腫との関係が指摘されています。
- ・アセスルファム：清涼飲料水・菓子類などに含まれ、砂糖の200倍の甘さを持つ。マウスに大量摂取させるとケイレン、胃・小腸・肺などの出血が見られ、イヌでは肝障害などが見られたとの報告もある。
- ・エリスリトール：ブドウ糖を酵母で発酵して作られた糖アルコール。消化されにくいためノンカロリーとされる。大量摂取により下痢を引き起こす。ダイエット甘味料パルスweetの20%はこの成分。
- ・キサンタンガム：細菌の培養液から得られる増粘安定剤で、ドレッシング、ソース、缶詰などに用いられる。大量摂取でも問題がなく、コレステロール値が下がったという報告もある。
- ・スクラロース：砂糖を塩素化して得られ、砂糖の600倍の甘みがある。1999年認可。生体で分解されにくく、ラットでは脾臓・胸腺組織の委縮、下痢・体重減少による死亡も見られた。しかし研究データが少なく、安全性の議論が続いている。
- ・ステビア：南米キク科のステビア葉から熱水抽出して得られる甘味成分。動物実験では不妊・避妊作用が見られ、1999年EUはオスの精巣に悪影響があるとして使用禁止としました。ほかに香港、シンガポールでも同様の理由で、ステビアを含む食品は販売禁止となっています。

その他、人工甘味料は多くの種類があり、動物実験などのデータ検証が十分になされていないものもあります。(参考：食べてはいけない添加物 食べてもいい添加物、渡辺雄二、大和書房)

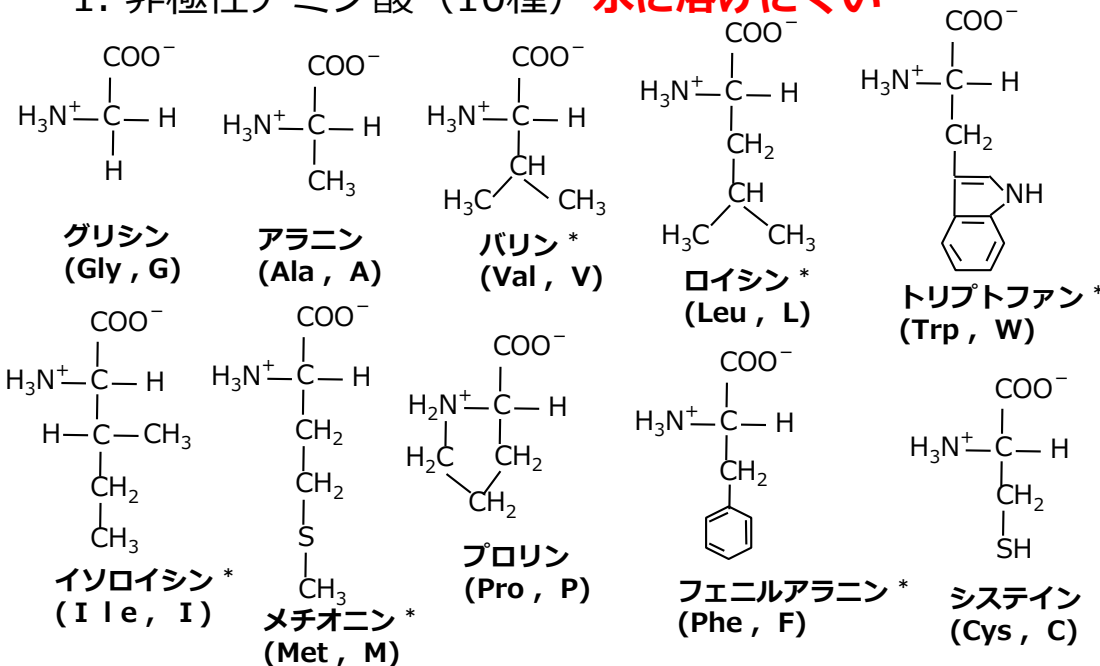
2.3 タンパク質・アミノ酸

タンパク質とは

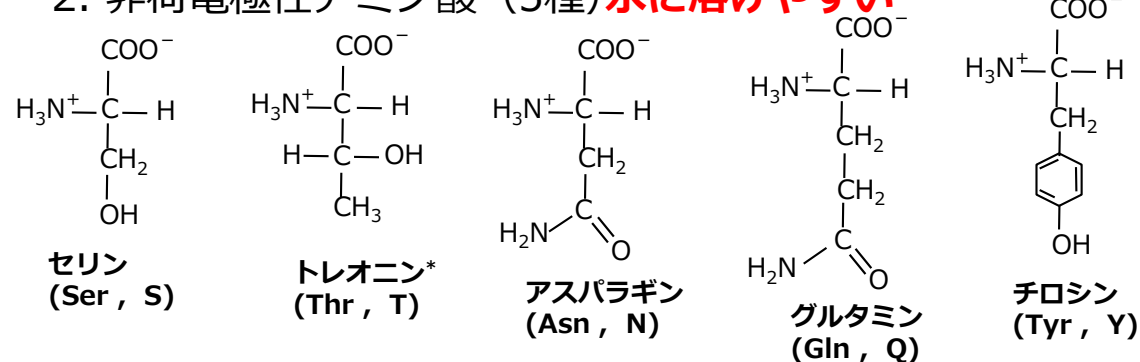
- ①構成単位であるアミノ酸同士がペプチド結合でつながったもの。
- ②タンパク質に使われるアミノ酸としては、20種のアミノ酸（L体）がある。
- ③どのアミノ酸がどういう順番で、何個のアミノ酸がつながるかにより、タンパク質のアミノ酸配列（アミノ酸の並び、一次構造ともいう）は膨大な数の組み合わせが存在する。アミノ酸配列の類似しているタンパク質同士は、類似した機能を持つことが多い。
- ④タンパク質の機能は、これら一次構造と、さらに官能基同士の相互作用で形成される三次元立体構造により決定される。

アミノ酸の種類と分類 *必須アミノ酸

1. 非極性アミノ酸（10種） 水に溶けにくい

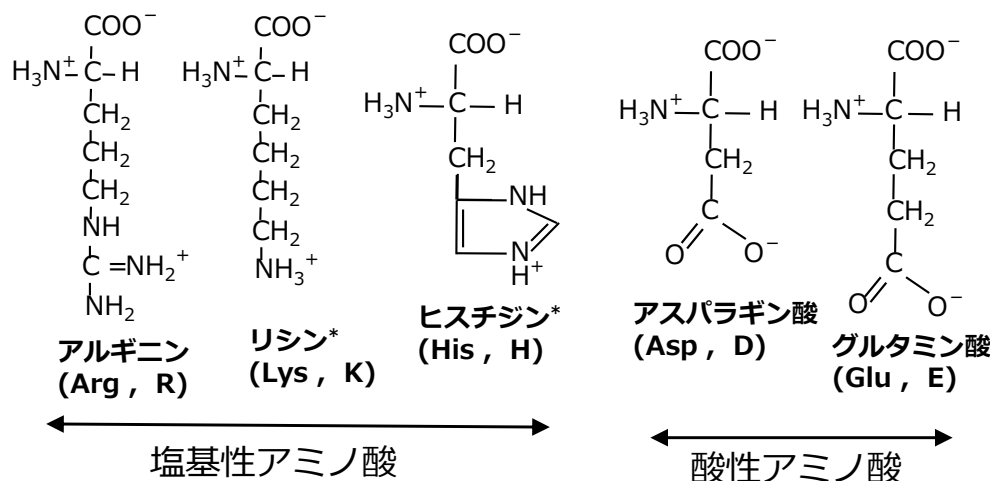


2. 非荷電極性アミノ酸（5種） 水に溶けやすい

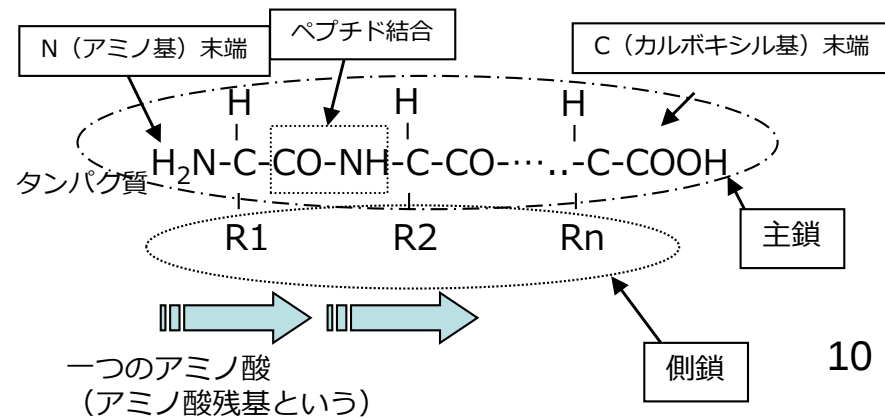


3. 荷電アミノ酸（5種）

水に溶けやすく、
電荷をもつ



タンパク質とアミノ酸



タンパク質の種類と機能

酵素とは？

①酵素

化学反応を触媒するタンパク質。

②貯蔵タンパク質

細胞や組織、個体に蓄えられるタンパク質
カゼインは乳タンパク質の主成分でCa貯蔵
フェリチンは肝臓などに存在し、Fe貯蔵

③運搬タンパク質

生体内で物質を運搬するタンパク質
血液中のヘモグロ빈は酸素を運搬
血清リポタンパク質は脂肪を運搬

④収縮タンパク質（アクチン、ミオシン）

ATPをエネルギー源として、アクチンやミオシン
は筋収縮を行う

⑤抗体タンパク質、防御タンパク質

抗原に対し、生体内で免疫反応により生産される
タンパク質。
または、生体防御にかかわるタンパク質。

⑥毒性タンパク質

生物が産生するタンパク質で毒性を示すもの。ボ
ツリヌス毒素やジフテリア毒素など

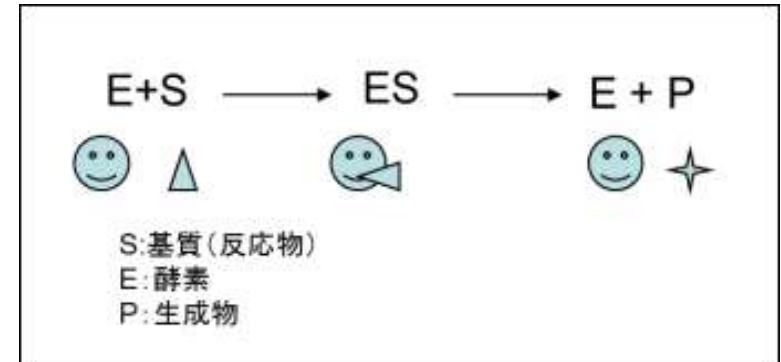
⑦構造タンパク質

生体の細胞や組織、器官を構成するタンパク質
ケラチン（角質：皮膚、毛髪、爪など）
コラーゲン（動物の細胞外基質の原材料、細胞間
接着に重要）

⑧ホルモン

細胞間の情報伝達にかかわる物質のうち、タンパ
ク質性のものは、インシュリン、成長ホルモン、
副腎皮質刺激ホルモンなどがある。

生体内のほとんどの化学変化は酵素(enzyme)というタンパク質によって触媒される。酵素と結びつき変化を受ける物質を基質（substrate）という。基質は酵素分子の表面の特定の部位（活性部位, active site）に結合し、酵素-基質複合体を形成する。この状態から、基質は生成物（Product）へと化学形を変え、酵素から離れる。それと同時に、酵素は元の分子状態に戻り、再び次の基質と結合する。

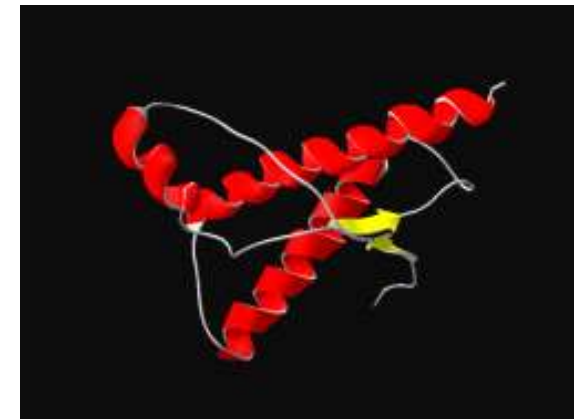


タンパク質中のアミノ酸の並び（アミノ酸配列）の表し方

タンパク質はN末端で始まり、C末端で終わる。
N末端から、アミノ酸の並びを一文字記号または三文字記号で表記する。

N-
AERTFIKADGVNRNLI MADGVNR
- C

タンパク質は、下記のように**立体的な構造**を作って機能する。
どのような形をとり、どのような機能を果たすのかは、上記の**アミノ酸配列**によって決定される。



プリオンタンパク質
狂牛病の原因とされる

2.4 核酸と遺伝子

核酸とは、ヌクレオチドの重合体で構成される生体高分子。
例として、DNA(デオキシリボ核酸)やRNA(リボ核酸)がある。
核酸は遺伝情報物質であり、いわば生命の「設計図」である。

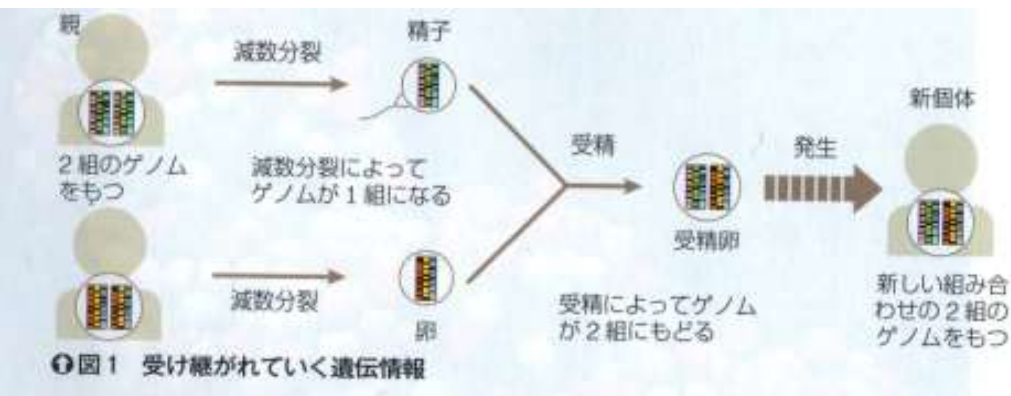
①遺伝情報とDNA

遺伝情報：生物が個体として生命活動を営むのに必要なすべての情報

遺伝情報は、ヒトの場合染色体(ゲノム)に格納されている。子のゲノムは、両方の親からそれぞれ受け継いだ2組のゲノムを持つ(下図)。

遺伝情報は細胞分裂により、親から子へ引き継がれる。

この遺伝情報を担う物質が「DNA」である。



②核酸の構造

核酸の基本単位は「ヌクレオチド」

ヌクレオチド = 糖 + 塩基 + リン酸

このうち糖と塩基の部分をヌクレオシドという。

ヌクレオシド = 糖 + 塩基

(1) ヌクレオチドの糖

ヌクレオチドの糖は2種類ある。

リボース：主としてRNAに使われる

デオキシリボース：主としてDNAに使われる

両者はC2にOH(リボース)かH(デオキシリボース)が結合している点異なる。

(2) ヌクレオチドの塩基

核酸に使われる塩基の種類は5種類ある。

- ・ アデニン(A)
- ・ グアニン(G)
- ・ シトシン(C)
- ・ チミン(T)
- ・ ウラシル(U)

DNAに使われる塩基はA, G, C, T

RNAに使われる塩基はA, G, C, U
である。

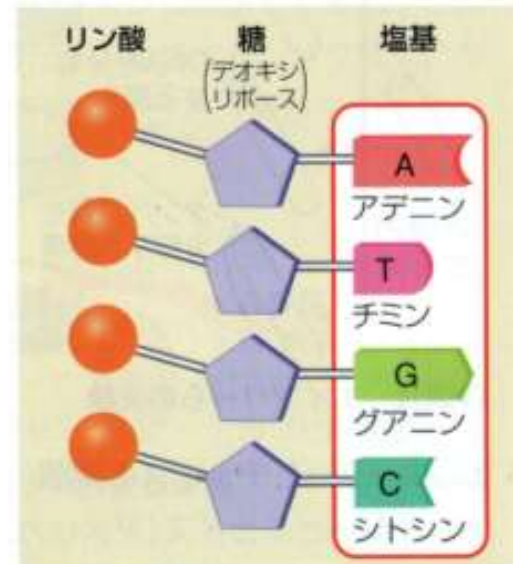


図2 DNAを構成するヌクレオチド

③核酸の構造的特徴

ヌクレオチドが多数重合したポリマー（ポリヌクレオチド鎖）。
(1) DNAは、この鎖が二対二本（二本鎖）からなっており、RNAは一本の鎖（一本鎖）からなる。

(2) このポリヌクレオチド鎖の始まりの末端を5'-末端、終わりの末端を3'-末端という。核酸が生体で作られる時には、5'→3'の方向に合成される。

(3) 通常、下記のように構造を書くのは大変なので、5'-末端から3'-末端に向かって、塩基の並び（塩基配列）のみを示す。

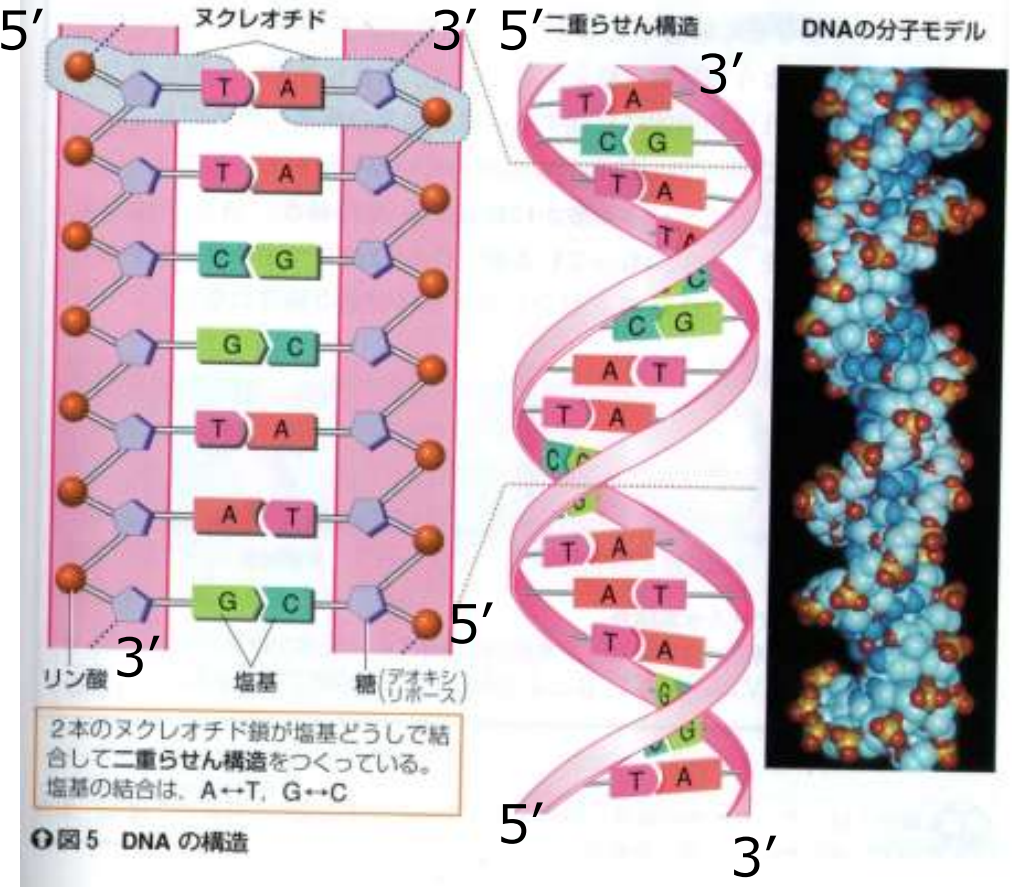
（例） 5'-ATGCATGCATG...-3'

(4) DNAの二本鎖は、塩基同士の水素結合により作られる。塩基の組み合わせはAとT, GとCの組み合わせである（右図）。したがって、DNAの塩基の割合（塩基組成）はAとTは等しく、GとCは等しい（シャルガフの法則）

(5) DNAは二本鎖がらせんを巻いた二重らせんの形で存在する（ワトソン・クリックのDNA構造、右図）。そのとき、二本鎖の方向は互いに逆平行である。片方の鎖に対し、もう一方の鎖を相補鎖という。DNAでは、AはT, GはCと対になるため、片方の鎖の塩基配列が分かると、もう一方の鎖の塩基配列もわかる。

5' — ATGCGTACTGCC... — 3'
3' — TACGCATGACGG... — 5' DNA

(6) RNAは一本鎖からなる。RNAはA, G, C, Uの塩基が使われ、この塩基の並び（塩基配列）が情報となる。RNAは、DNAの塩基配列の一部を写し取るために使われ、長さはDNAに比べ、著しく短い。



(7) RNAは、その機能に応じて、以下の3種類がある。

mRNA(メッセンジャーRNA, 伝令RNA) ; DNA(遺伝子) から塩基配列を写し取りできるRNAで、このRNAにはタンパク質のアミノ酸の並び（アミノ酸配列）を指定する塩基配列を含む。

tRNA(トランスファーRNA, 運搬RNA) : mRNAの情報（コドン）に基づいて、指定されるアミノ酸をリボソーム(タンパク質合成装置) に運ぶRNA。

rRNA(リボソームRNA) : リボソームを構成するRNA。

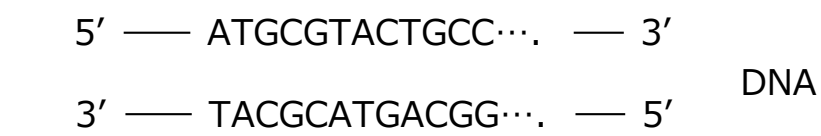
④核酸の機能

(1) DNAは遺伝情報の担い手である。エイブリーの実験(1944)により、DNAが遺伝物質であることが示された。DNAを細胞に導入すると、そのDNA上の情報により、細胞の形質が変化する(形質転換)。

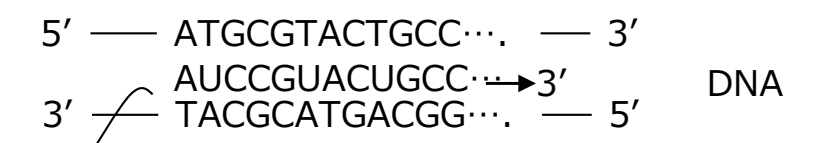
(2) DNA中には、タンパク質を作り出す情報の部分(遺伝子)が含まれており、セントラル・ドグマに従って、RNAに塩基の情報(転写)、その情報に従ってタンパク質が出来る(翻訳)。

(3) 細胞が分裂した際には、DNAも元の細胞と同じ塩基配列を持ったものがコピーされる(複製)。その複製の様式は半保存的である(半保存的複製)

(4) DNA中の遺伝情報の正体は、塩基(ATGC)の並び方(塩基配列)である。DNAの片方の鎖の塩基配列に相補的な塩基配列がRNAに写し取られる。

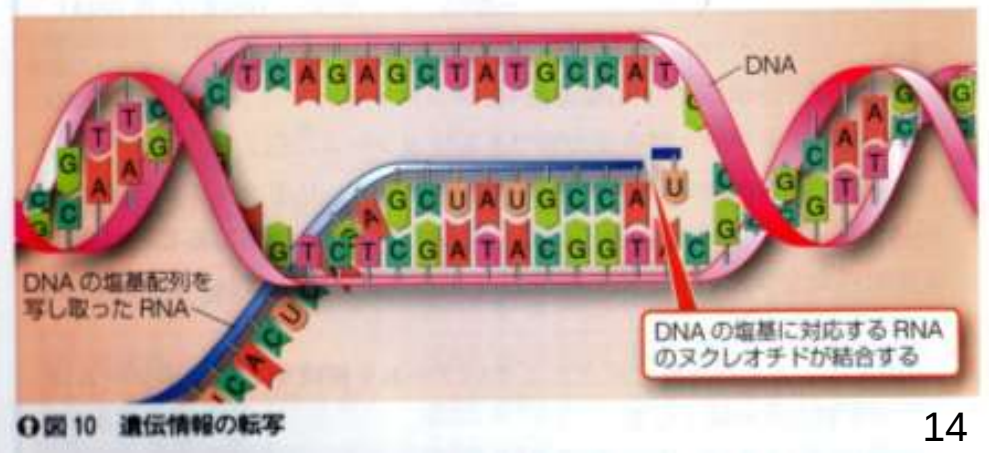
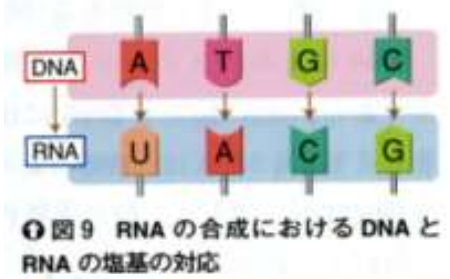
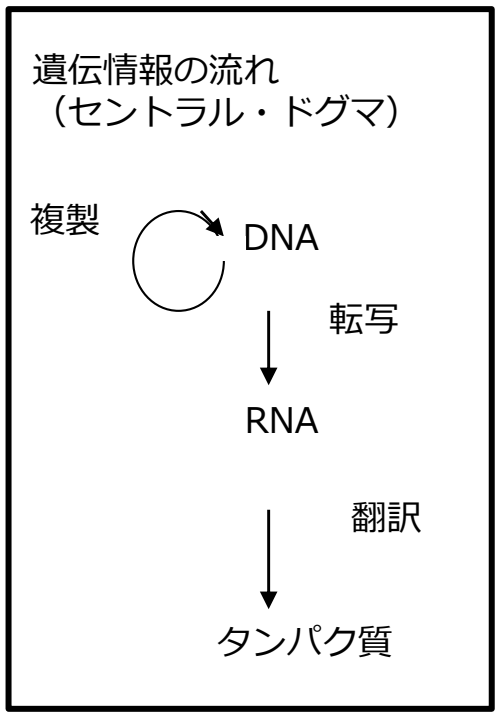
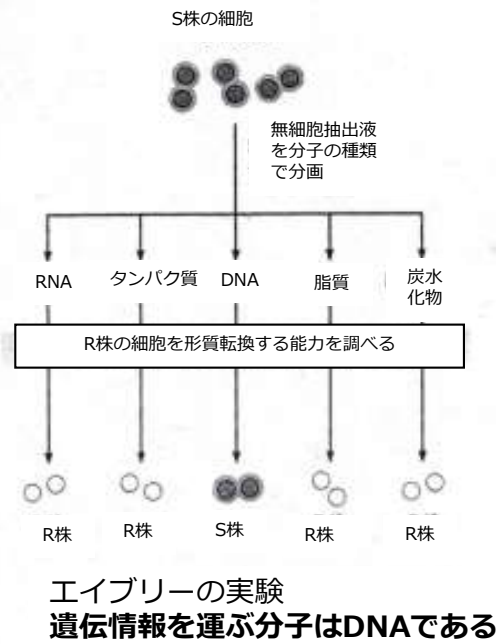


↓ 転写



5' RNA

転写の際はDNAの片方の鎖の塩基配列を基にして、RNAが作られる。そのとき、DNAのTの代わりにRNAではUが使われる。UはTと同じ機能を持ち、Aと水素結合(塩基対)を作る(右図)。

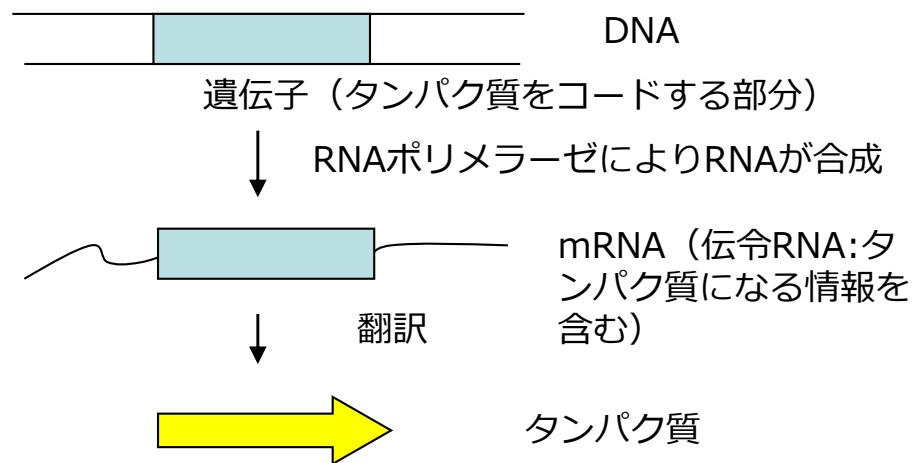


⑤ 転写

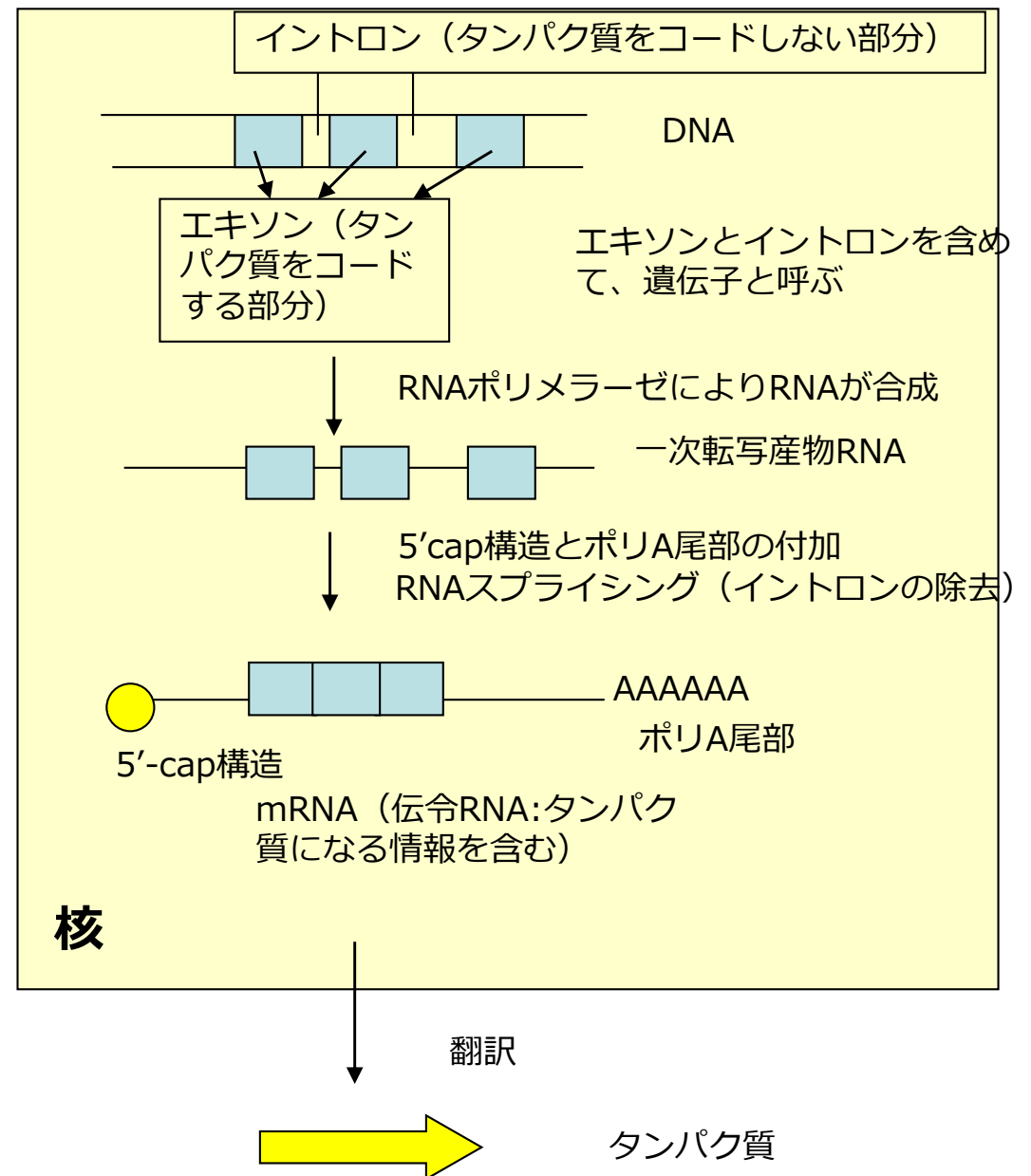
二本鎖DNA上の遺伝情報（塩基配列）の一方が読み取られ、mRNAが作られること。原核生物と真核生物では遺伝子の構造が異なるため、転写の様式も異なる。具体的には、二本鎖DNAの一部がほどけ、そのうちの一本の鎖（鋳型）を元にして、RNAポリメラーゼによりRNAが作られる。

(1) 原核生物の場合

DNAの情報を基に、RNAポリメラーゼによりmRNAが合成される。



(2) 真核生物の場合



転写されて出来たmRNAの塩基配列を基に、アミノ酸へと情報が変換される（翻訳）。

⑥ 翻訳

翻訳は、転写により生成したmRNAの情報（塩基配列）をアミノ酸に変換し、アミノ酸の重合したタンパク質を合成することである。

(1) 遺伝暗号（コドン、遺伝コード）

mRNAの塩基配列をアミノ酸に変換するには、何らかの法則が必要である。ニーレンバーグ、オチョア、コラーナは、様々な塩基配列のRNAを合成し、そこから生成されるアミノ酸の関係を発見した。（プリント次ページ）

その結果、mRNAの塩基3つの並び（コドン）が、一つのアミノ酸を規定することが分かった。ただし、3塩基の可能な配列は64通りあり、アミノ酸は20種ある。従って、対応関係は1:1ではない。1アミノ酸に対応するコドンは複数存在する（縮退、縮重）

(例) AUGTTTCCCAAA..



Met-Phe-Pro-Lys..

ここで、AUGはMet（タンパク質合成開始：開始コドン）を、UGA,UAA,UAGはタンパク質合成停止の合図（終止コドン）となる。生物によりGUGを開始コドンとして用いるものもある。

(2) 翻訳の概要

翻訳はmRNAだけではできない。そこで、

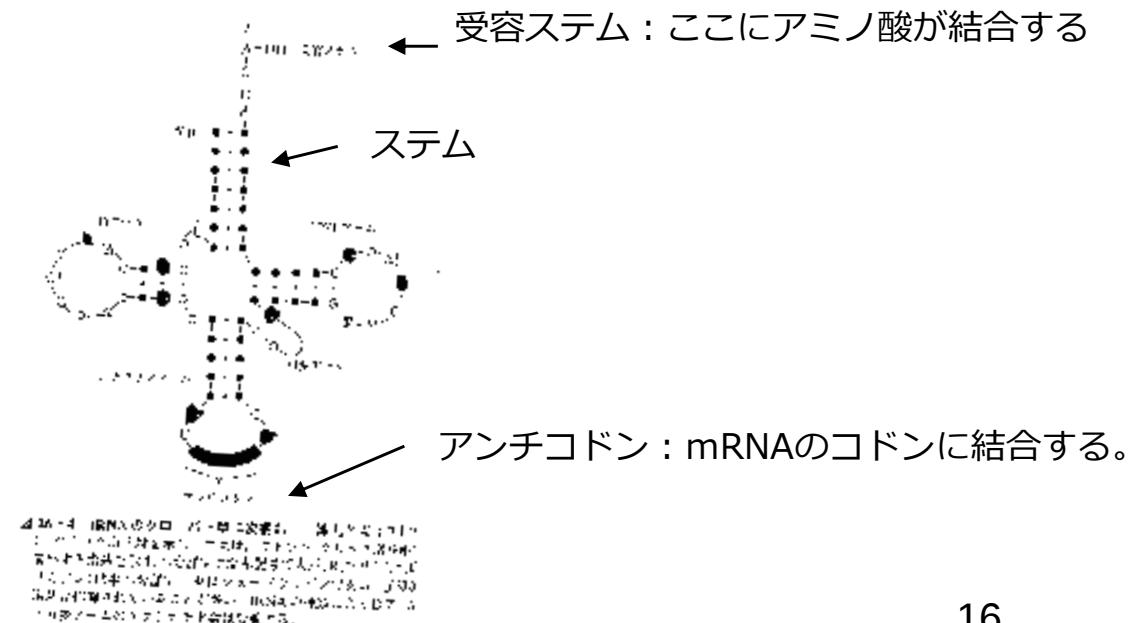
①mRNAの配列に対応するアミノ酸を運搬し、②アミノ酸同士を連結する装置が必要となる。

①に相当する分子がtRNA（転移RNAもしくは運搬RNA）で、コドンとアミノ酸の情報の仲介をする（アダプター分子）。

②に相当する分子がリボソームと呼ばれる分子であり、これは多数のタンパク質にrRNA(リボソームRNA)が結合した巨大な複合体分子である。

③ tRNAの構造

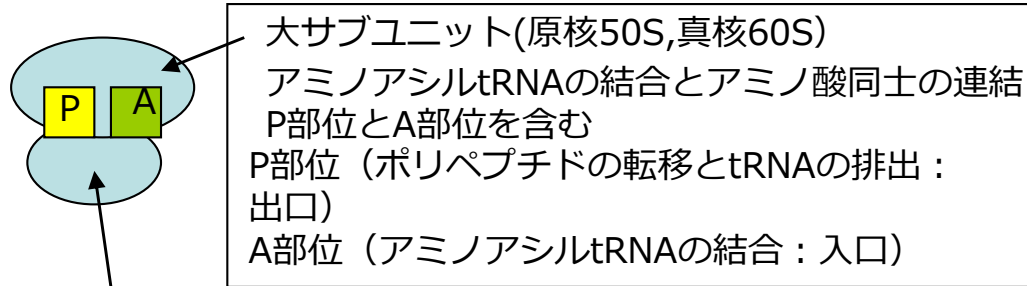
tRNAはRNAの一種でAUGCの塩基のほかに特殊な塩基（AUGCの誘導体）を含んでいる。一本鎖で存在するが、その分子内で水素結合を形成し、クローバー型の二次構造を形成する。



翻訳

④ リボソームの構造

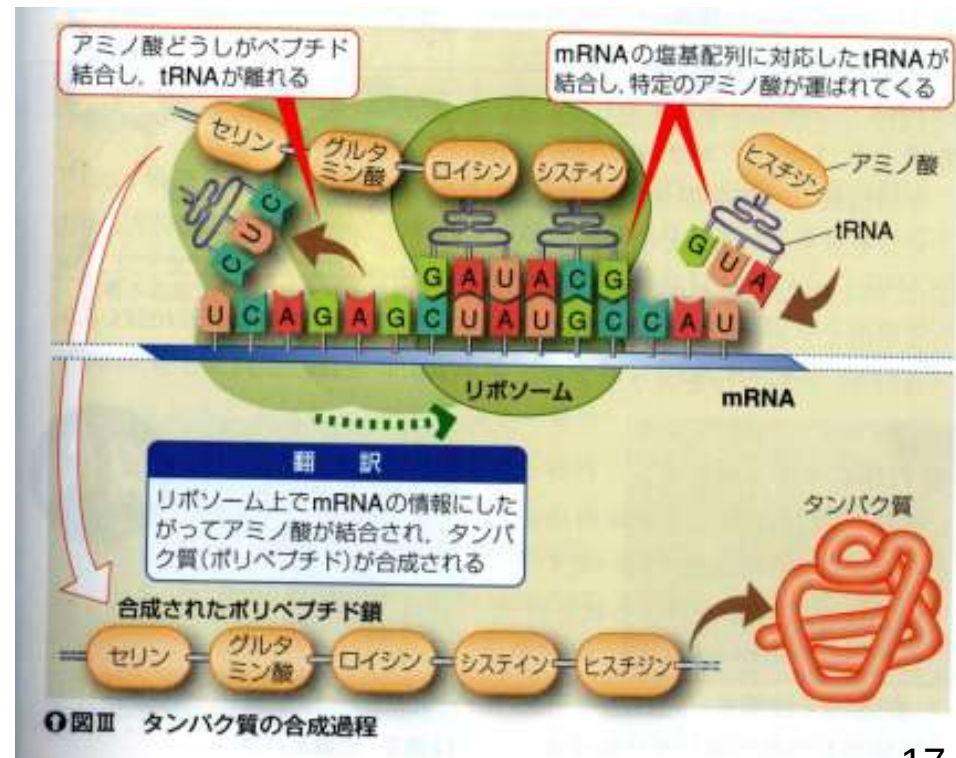
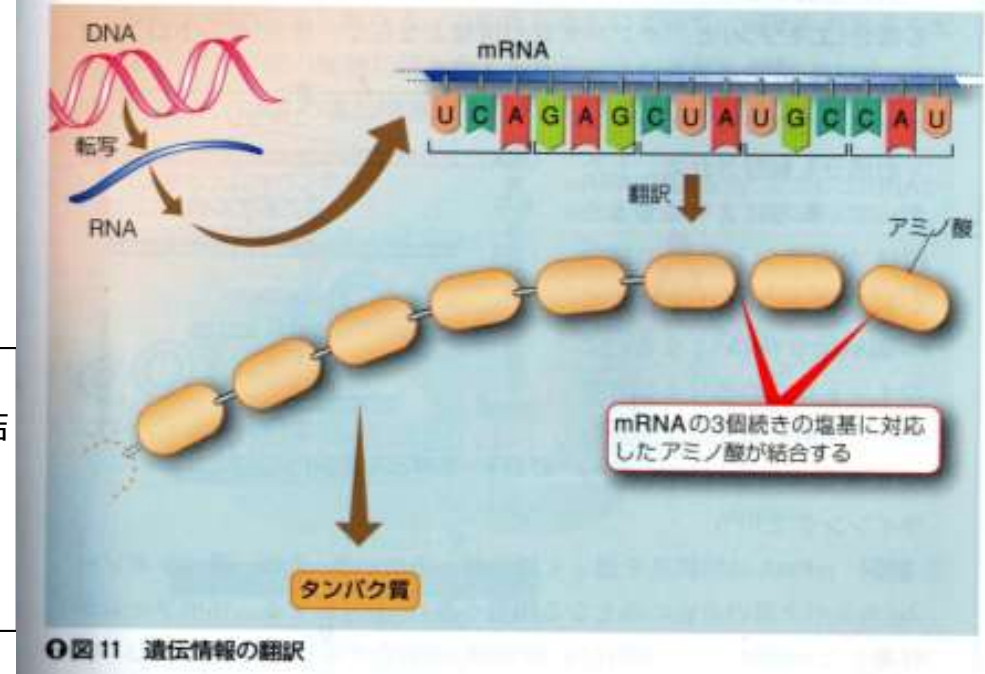
リボソームはタンパク質を合成する巨大な分子で、小サブユニットと大サブユニットからなる。原核生物と真核生物では大きさが異なる（原核70S,真核80S）。



⑤ 翻訳の機構

- (1)mRNAが核膜孔から細胞質へ出ていき、そこにリボソームが結合する。
- (2) mRNA上のコドンに対応したアミノ酸が結合したtRNAが、リボソームに運搬される。
- (3) tRNAにより運ばれたアミノ酸同士がリボソーム内で連結し、タンパク質が作られる。

* このように転写、翻訳を経て、DNA中の遺伝子の情報（塩基配列）がRNAに写し取られ（転写）、mRNAの情報を元にタンパク質が作られる（翻訳）。



		2文字目					
		U	C	A	G		
1文字目	U	UUU Phe UUC Phe UUA Leu UUG Leu Leu	UCU Ser UCC Ser UCA Ser UCG Ser Ser	UAU Tyr UAC Tyr UAA オー カー UAG アン バー	UGU Cys UGC Cys UGA オ パール UGG Trp	U C A G	3文字目
	C	CUU Leu CUC Leu CUA Leu CUG Leu Leu	CCU Pro CCC Pro CCA Pro CCG Pro Pro	CAU His CAC His CAA Gln CAG Gln	CGU Arg CGC Arg CGA Arg CGG Arg	U C A G	
	A	AUU Ile AUC Ile AUA Ile AUG Met Met	ACU Thr ACC Thr ACA Thr ACG Thr Thr	AAU Asn AAC Asn AAA Lys AAG Lys	AGU Ser AGC Ser AGA Arg AGG Arg	U C A G	
	G	GUU Val GUC Val GUA Val GUG Val* Val*	GCU Ala GCC Ala GCA Ala GCG Ala Ala	GAU Asp GAC Asp GAA Glu GAG Glu	GGU Gly GGC Gly GGA Gly GGG Gly	U C A G	

赤は終止コドン。* 原核生物では開始コドンとなる

遺伝コード(コドン)

mRNA

CGCCATTAGAU **AUG** GUU UGU UUU GCG.....CAU **UAA**
UAUAGCGAUUUU.....

開始コドン

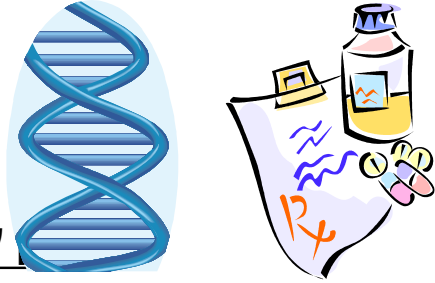
終止コドン

mRNAの連続する3塩基をコドン(codon)という。コドンはそれぞれ1つのアミノ酸に対応するが、UAA, UAG, UGAの3つに対応するアミノ酸はなく、タンパク質合成の終了を指定する(終止コドン)。mRNAの翻訳の際、最初に現れるAUGはタンパク質合成の開始を指定する(開始コドン)。開始コドン以降の配列を3塩基ずつ区切っていくと、それらが1つ1つのアミノ酸に対応する。

Topics

核酸に関する雑学

ヒトゲノム解読プロジェクト



ヒトゲノムというのは、人間の細胞内にある二十三対の染色体に記録された文字（四種類の化学物質＝塩基、約三十億個）からなっています。個人ごとにこの文字が異なり、一人ひとりの体質や性格を決めていると見られています。

このヒトゲノムの解明は、日米欧などの国際共同チームが一九九〇年から進めていたもので、参加研究者は千人以上に上り、「人類の月面着陸にも匹敵する生命科学プロジェクト」と言われてきました。そしてついに昨年(2000年)六月には、解読データの概要が完成*。「人類がつくりだした最も重要で驚くべき地図」（当時のクリントン米大統領）として世界に発表し、大きな反響を呼びました。

それには、これまで約十萬個が通説となっていた遺伝子の数が実は四萬個（その後三萬個に訂正）程度ではないかという推計や、病気に関連する遺伝子など、多彩な成果が盛り込まれていました。

国際的なプロジェクトである「国際ヒトゲノム計画」は、2006年6月にその解読をほぼ完了しました。

バイオ関連は二十五兆円市場に

ヒトゲノムの解読による新薬開発などバイオ関連技術は、同時にビッグビジネスのチャンスでもあります。

通産省は、現在約一兆円の日本のバイオ関連市場が、二〇一〇年に二十五兆円に拡大すると予測しています。米国では、バイオ関連の新興企業が続々生まれていて、二十五年後には三百兆円市場になると推計。政府の研究開発投資も、米国が約二兆一千六百億ドル、日本もすでに五千億ドルを投じていて、ヒトゲノム解読はITに続く新たな産業革命の火を付けました。

ゲノム開発で、がんや高血圧や糖尿病の新薬も

ヒトゲノム解明の成果によって今一番注目されているのは、新しい薬の開発でしょう。

人間の設計図は、細胞の中にあるDNAという遺伝子に記憶されている情報です。人の体は遺伝子の情報を基につくられたタンパク質から成っており、病気は様々なタンパク質がお互いに悪い作用をし合って起きていると考えられています。

薬はこれまで植物などから抽出した物質を、動物実験などで片端から試し、役に立つ物質を選び出す手間のかかる作業が必要でしたが、ゲノム開発によって病気と関連のある遺伝子が分かれば、そのタンパク質を探り当て、新しい薬の構造を予測した上で、その物質をつくることができるようになります。

自民党機関紙「自由民主」 2001/10/9号掲載

ゲノム解読をめぐる国際・国内の動き	
年	国際的な主な動き
1986	米国がヒトゲノム解読計画を発表
1996	米・英・日など6カ国20研究機関のヒトゲノム解析コンソーシアム「国際共同チーム」発足
1998	米ゲノムベンチャー・セセラ・ジェノミクス社がヒトゲノムの塩基配列解読に参入
2000	セセラ社と日米欧の国際共同チームの両者がヒトゲノム解読完了を宣言（ゲノム解析は遺伝子・タンパク質の機能解析競争の時代へ）
2001	セセラ社、共同チームの解析結果公開
年	国内企業の主な動き
2000	9月、製薬メーカー43社が日本人の遺伝子研究組織「ファルマスニップコンソーシアム」設立
2000	10月、住友化学工業、住友製薬がゲノム科学研究所を設立
2001	国内製薬22社が「タンパク質構造解析コンソーシアム」設立
2001	中外製薬・藤沢薬品工業など10社がタンパク質解析の新会社設立
2001	山之内製薬・日立製作所がゲノム創薬技術提携

ヒトゲノム解読計画でわかったこと

- ◆ 遺伝子の総数は約3 - 5万個
- ◆ 遺伝子の主要部分（人間の構造や機能の設計情報）は全遺伝情報中の1.5%
- ◆ 全遺伝子の40～60%の機能を推定
- ◆ 全遺伝子の74%は他の生物と類似
- ◆ 遺伝子223個は、感染した殺菌に由来
- ◆ 遺伝子情報の45%は同じ文字（塩基）列の繰り返し
- ◆ 解読した遺伝子情報の文字数は、全約32億個のうち27億2千万個程度

表 9-1 ヒトの各染色体上の遺伝子数

1 番染色体	2 番染色体	3 番染色体	4 番染色体
2 億 7,900 万塩基 2,610 個	2 億 5,100 万塩基 1,748 個	2 億 2,100 万塩基 1,381 個	1 億 9,700 万塩基 1,024 個
5 番染色体	6 番染色体	7 番染色体	8 番染色体
1 億 9,800 万塩基 1,190 個	1 億 7,600 万塩基 1,394 個	1 億 6,300 万塩基 1,378 個	1 億 4,800 万塩基 927 個
9 番染色体	10 番染色体	11 番染色体	12 番染色体
1 億 4,000 万塩基 1,076 個	1 億 4,300 万塩基 983 個	1 億 4,800 万塩基 1,692 個	1 億 4,200 万塩基 1,268 個
13 番染色体	14 番染色体	15 番染色体	16 番染色体
1 億 1,800 万塩基 496 個	1 億 700 万塩基 1,173 個	1 億塩基 906 個	1 億 400 万塩基 1,032 個
17 番染色体	18 番染色体	19 番染色体	20 番染色体
8,800 万塩基 1,394 個	8,600 万塩基 400 個	7,200 万塩基 1,592 個	6,600 万塩基 710 個
21 番染色体	22 番染色体	X 染色体	Y 染色体
4,500 万塩基 337 個	4,800 万塩基 701 個	1 億 6,300 万塩基 1,141 個	5,100 万塩基 255 個

三共出版、生命と環境、林要喜知ほかより引用

究極の個人情報～SNP～

前頁でのべたように、人の設計図であるゲノムの全塩基配列が2006年に全解明された。しかし、設計図はわかっても、そこから作られるものは何なのかはまだわかりません。ゲノム解読後（ポストゲノム）の現在、これを解き明かすことが、世界中の生命科学研究者の最重要課題です。例えば、どのような転写産物(RNA)が作られるのかを調べるトランスクリプトーム(Transcription:転写+Genome)、どのようなタンパク質が作られるのかを調べるプロテオーム(Protein:タンパク質+Genome)、代謝物質を調べるメタボローム(Metabolism:代謝+Genome)などの新しい学問分野が生まれ、総じてシステム生物学といわれています。

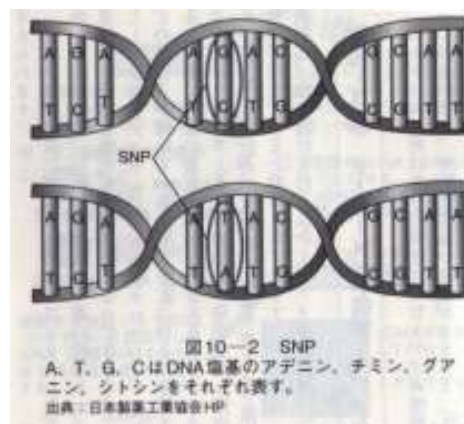
ところで、ヒトゲノムを丹念に解読すると、各個人の間で少しずつその塩基配列に違いのあること（遺伝子多型）がわかりました。特に、遺伝子の中でたった一塩基の違いの遺伝子多型をSNP (Single

Nucleotide Polymorphism)といいます。ヒトゲノムは30億塩基対であり、このうち0.1% (300万塩基) はSNPです。

このSNPが個人差を生み出す要因であり、いわば個人認証のバーコードです。SNPのように、遺伝子でたった一つ塩基が違って、遺伝子そのものに大きな影響がある場合と、そうではない場合があります。例えば、がん患者には、がん抑制遺伝子にSNPがよく見られます。また、アルコールを飲むと赤くなりやすい人、気分の悪くなる人、平気な人など「個人差」があり、薬に対しても効きやすい人、効きにくい人、アレルギーを起こす人など千差万別です。甘いものが好きな人、嫌いな人なども個人差があります。現在では、このような体質の個人差のうち、遺伝に起因するものは、SNPが要因であると考えられており、個人のSNPを検出できれば、一人ひとりにあった有効な治療薬や治療法の開発（テーラーメイド医療）につながります。

しかし、SNPはいい面ばかりではありません。がん、糖尿病などにかかりやすい遺伝子を持っていたり、逆に優秀な頭脳や秀でた身体能力などは、SNPを解析することでわかってしまうケースがあります。このことは、生活心理、プライバシー、健康保険、結婚、個人差別問題に発展する懸念があり、こうした生命科学や医療の発展が、個人の幸福に水をさすことにもなりかねません。こうした生命倫理のガイドラインの整備が、国家単位で求められています。

（ブルーバックス、新しい薬をどう創るか、京大院薬学研究科編、ブルーバックス、アメリカNIHの生命科学戦略、掛札堅著、東京化学同人、ヴォート基礎生化学などから引用）

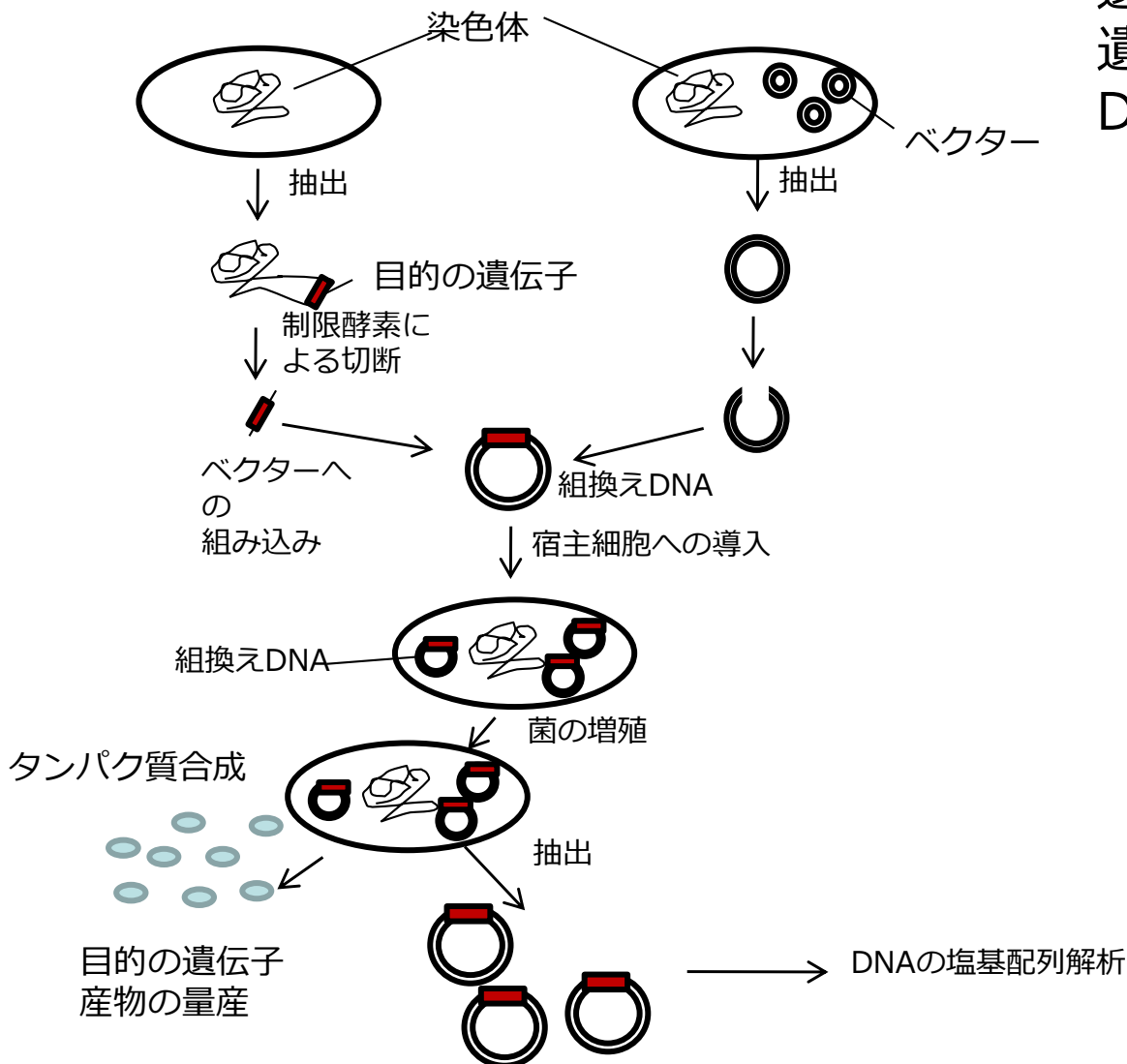


3. 遺伝子工学 (gene technology, genetic engineering)

3.1 遺伝子工学とは

遺伝子DNAを細胞から取り出し、人工的な操作を加えたり、それを利用して遺伝子産物（タンパク質）を細胞につくらせる技術

遺伝子操作 (gene manipulation)、
遺伝子組み換え技術 (recombinant
DNA technique) などと同義。



《基本的な手順》

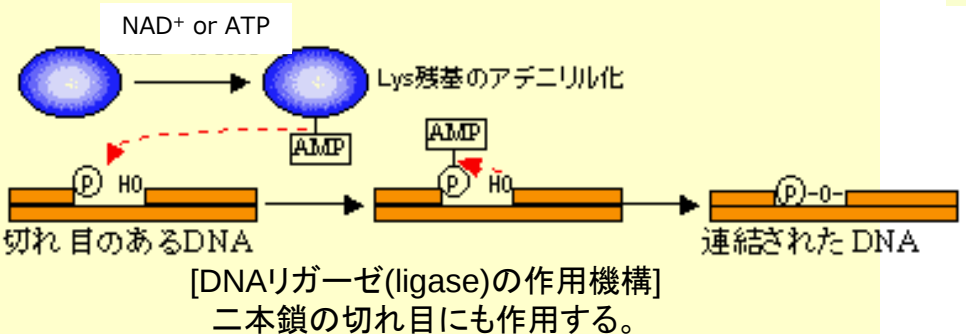
1. 目的のDNA断片の調製
2. 組換え体DNAの作成
3. 組換え体を宿主細胞に導入
4. 組換え体を含む細胞の検出と選別

DNAのクローニング(cloning)
宿主細胞からの組換え体DNAの抽出
↓
目的DNAの切り出し
↓
DNAの塩基配列解析

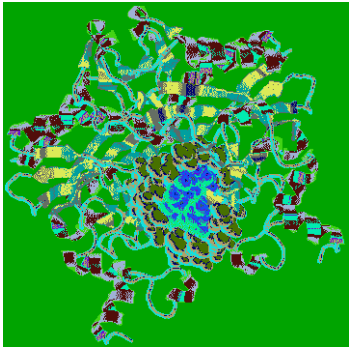
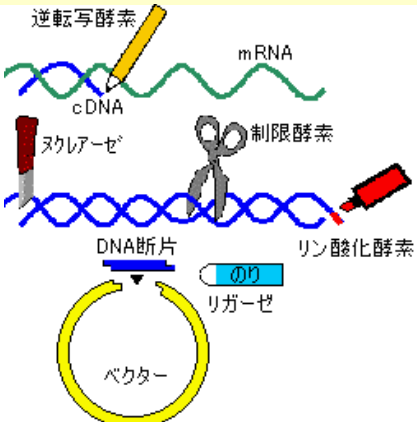
組換え体を含む細胞の増殖
↓
有用物質の生産

3.2 遺伝子工学の道具

- 核酸分解酵素
目的遺伝子を切り出したり、末端を加工する酵素。**制限酵素**が特に有用である。
- 逆転写酵素 (reverse transcriptase)
mRNAを鋳型として相補的なDNA(**cDNA***)をつくる酵素。
。校正機構はもたない。
* complementary DNAの略。
- DNAリガーゼ
DNAの切れ目をつなぐ酵素(のりの役目)



- **ベクター**「運搬者(vector)」
目的遺伝子を組み込む相手。
(例) プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、
酵母の人工染色体など
- 宿主細胞
目的遺伝子を取り込ませ増やす役目
(例) 大腸菌、枯草菌、酵母、細胞株など



制限酵素(restriction enzyme)

DNAの特定の塩基配列を認識して切断する酵素特に、II型の制限酵素は遺伝子工学においてDNAの断片化に頻繁に用いられる

代表的なII型の制限酵素とその認識部位
縦線が切断箇所

付着末端(cohesive (sticky) end)切断型

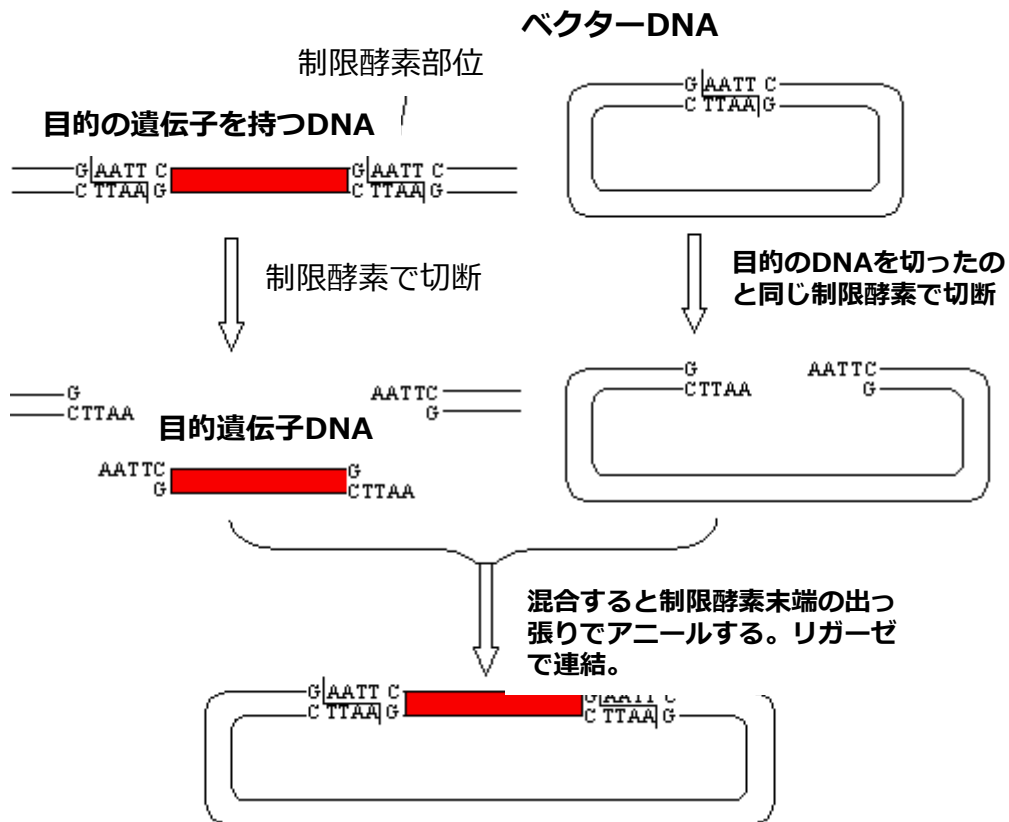
<i>Eco</i> RI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	→	5'-G AATTC-3' 3'-CTTAA G-5'
<i>Hae</i> II	5'-PuGCGC-Py-3' 3'-PyCGCGPu-5'	→	5'-PuGCGC Py-3' 3'-Py CGCGPu-5'
<i>Pst</i> I	5'-CTGCAG-3' 3'-GACGTC-5'	→	5'-CTGCA G-3' 3'-G ACGTC-5'
<i>Hind</i> III	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	→	5'-A AGCTT-3' 3'-TTCGA A-5'
<i>Bam</i> HI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	→	5'-G GATCC-3' 3'-CCTAG G-5'

平滑末端(flush (blunt) end)型切断

<i>Hae</i> III	5'-GGCC-3' 3'-CCGG-5'	→	5'-GG CC-3' 3'-CC GG-5'
<i>Alu</i> I	5'-AGCT-3' 3'-TCGA-5'	→	5'-AG CT-3' 3'-TC GA-5'
<i>Sma</i> I	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	→	5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5'
<i>Bal</i> I	5'-TGGCCA-3' 3'-ACCGGT-5'	→	5'-TGG CCA-3' 3'-ACC GGT-5'

DNA鎖に結合した制限酵素

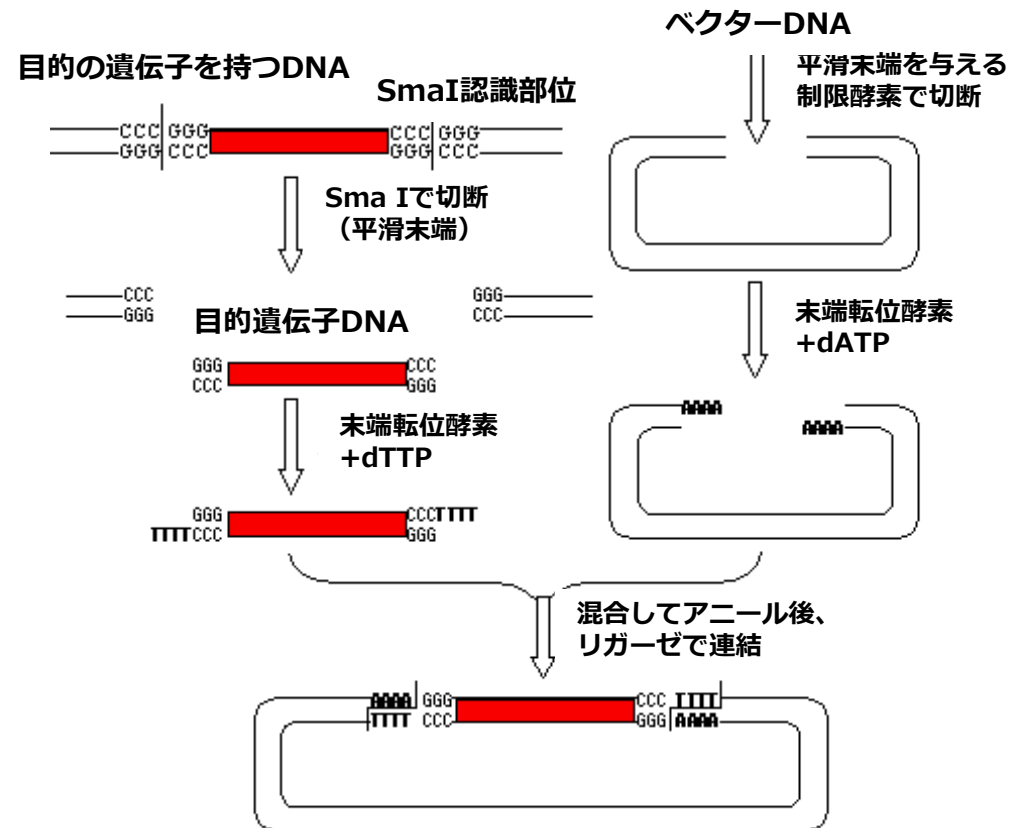
3.3 遺伝子のクローニング



[制限酵素切断末端をのりしろにする方法]

付着端を生じる制限酵素でDNA断片が切り出せた場合はベクターも同じ制限酵素で切り、切断片をのりしろにしてアニールさせる。切れ目をリガーゼでつなぐ。

この方法では目的遺伝子DNAが逆向きに入ることもある。それを避けるためには、2種の制限酵素で断片化すればよい。

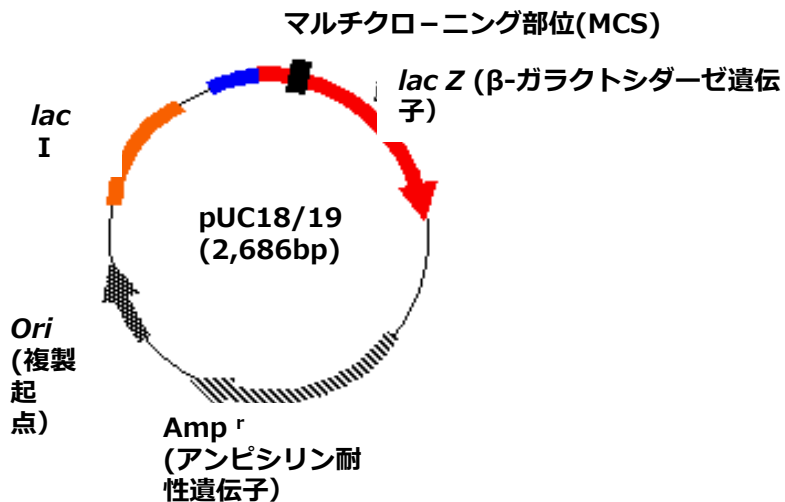


[ホモポリマーを結合させてのりしろにする方法]

このやり方では、後で同じ酵素で切り出せない。そこで制限酵素部位を持つリンカーをつけるとよい。

《クローニング用ベクターの条件》

1. 宿主細胞中で自己複製能を示す
2. 宿主細胞と容易に区別しうる表現型の遺伝子をもつ
3. 制限酵素切断部位を少なくとも1つもつ
4. 宿主細胞の外では生存できないもの



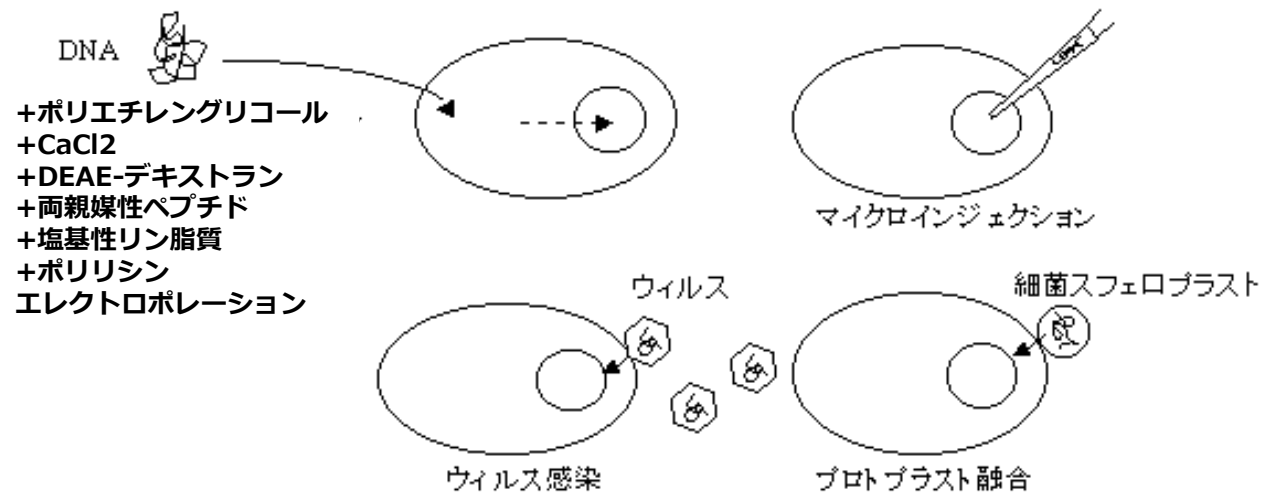
プラスミド系ベクター

プラスミド(plasmid)とは、複製開始点など遺伝に必要な仕組みを備えた小型(1~200kbp)の環状二本鎖DNAである。細菌中で自立増殖が可能で、染色体DNAとは独立に複製される。細胞内に1~数10個(クローニングに用いられるものは細胞内にふつう10~200個)存在できる。抗生物質耐性遺伝子を持ち、これが組換え体作成のためのマーカー遺伝子として利用される。天然のプラスミドは制限酵素部位が多すぎるため、人工的に改変されたものが用いられる。

プラスミドベクターには**5~10kb**までのDNA断片を組み込むことができる(これ以上大きなDNAを組み込むと不安定になる)。

宿主細胞への導入

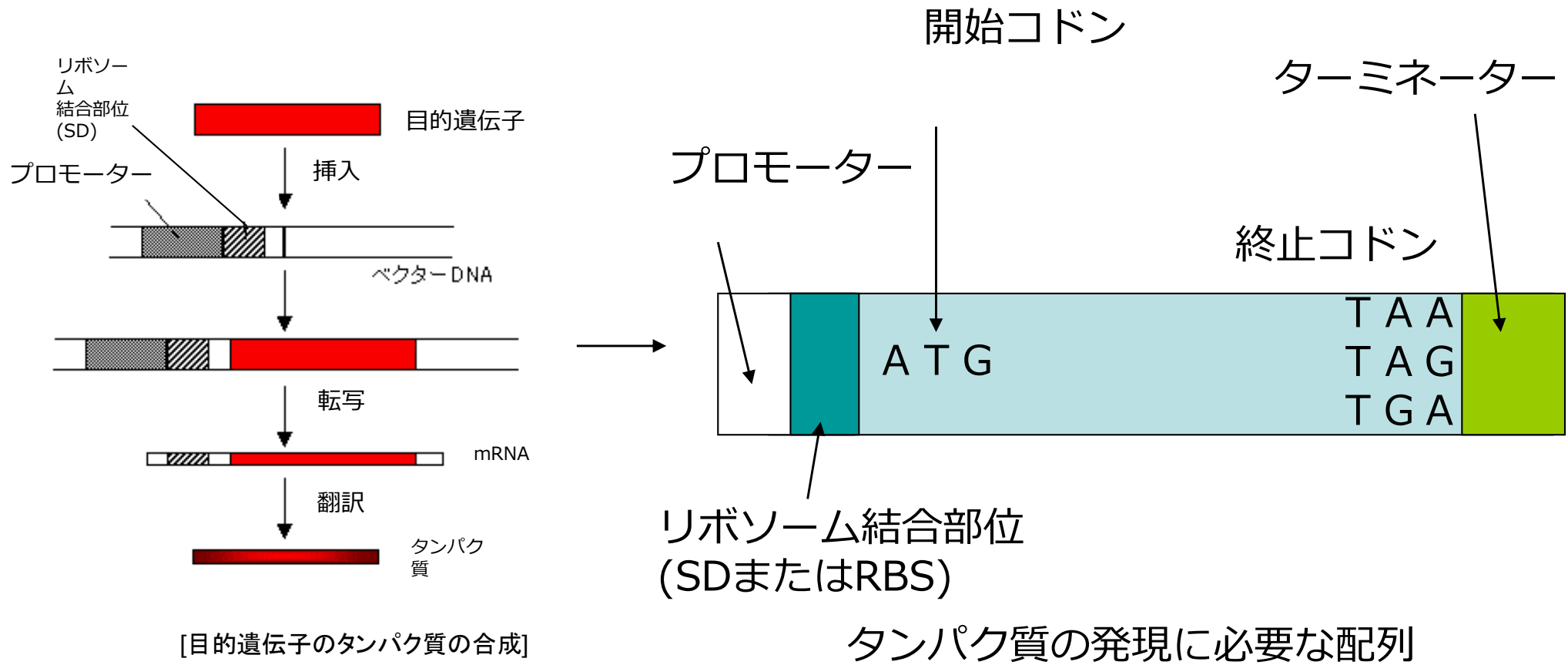
- 大腸菌へのプラスミドの取り込み
菌を氷冷下、CaCl₂で処理すると、DNAを取り込むようになる(コンピテントな状態という)。
- ベクターとしてファージを利用する
感染によって取り込ませる。菌に入ったファージは隣の菌に次々と感染し、溶菌班(プラーク)を形成。
- 動物細胞へのDNAの取り込み(トランスフェクションという)
カルシウム-リン酸共沈法(細胞の食作用を利用)
その他、種々の方法がある。



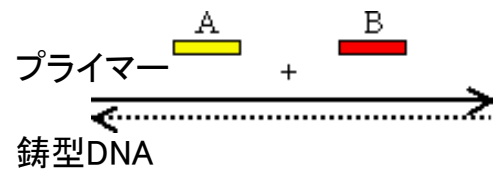
[組換え体遺伝子の宿主導入法]

3.4 目的遺伝子の発現

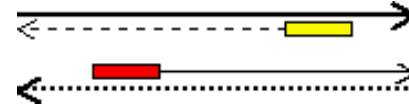
目的のタンパク質をコードする遺伝子を用いて、ある宿主細胞の転写・翻訳系を利用し、目的のタンパク質を作らせる（発現という）ことができる。目的遺伝子上流と下流には、転写・翻訳に必要な領域を含まなければならない。



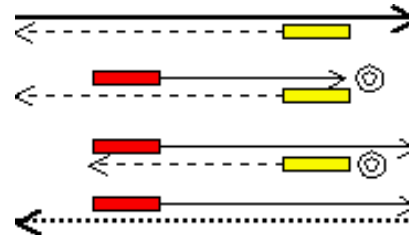
3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)



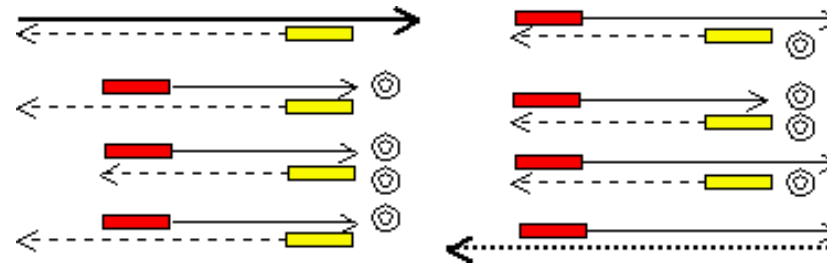
PCRサイクル1



PCRサイクル2 1~3



PCRサイクル3 1~3



PCRサイクルの繰り返し

1985年、Mullisによって考案された画期的なDNA増幅法である。1988年、耐熱性のDNAポリメラーゼ（Taq DNAポリメラーゼ）が導入され、実用化された。PCR法は次の3つの段階からなり、このサイクルを(1)~(3)を20回ほど繰り返すことにより、短時間にかつ簡便にDNA断片を百万倍以上に増幅できる。

PCRサイクル

1. 熱変性
2. プライマー結合
3. プライマー伸長反応

- (1) 2本鎖DNAの熱変性→1本鎖へ解離
- (2) 2つのプライマーのアニーリング
- (3) DNAポリメラーゼによるDNA鎖の延長

増幅するDNAの範囲は、設計したプライマーの配列に依存する。下の例ではプライマーAとBで挟まれた範囲だけが増幅される。

[PCR法の原理]

PCRの応用例 ～DNA鑑定～

【種類】

- ①DNA多型（塩基配列の個人差）の検出
 - ・ 個人鑑別（一致・不一致による個人の特定）
 - ・ 親子鑑定（血縁関係の検査）
- ②性染色体遺伝子の検出（男：XY, 女XX）
 - ・ 性別判定（個人識別の第一段階）
- ③種特異遺伝子（塩基配列）の検出
 - ・ 人獣鑑別、動物種判定
（通常はヒト特異塩基配列の検出のみ）

【方法】

試料（組織片、血痕、唾液、精液班、毛髪、骨など）からタンパク質、脂質を溶かし、不純物を除去してDNAを抽出し、これを元に多型遺伝子をPCRにより増幅する。



電気泳動法（ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動など）で分離・検出

【多型遺伝子のパターン】

- ①縦列型反復配列領域：反復する塩基配列の繰り返し数の個人差を分析

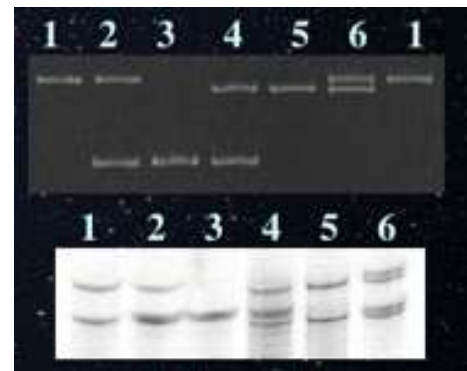
(共通配列)-GGCCGGCCGGCCGGCCGGCC-(共通配列)
(共通配列)-GGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCCGGCC-(共通配列)
(共通配列)-GGCCGGCCGGCC-(共通配列)
(共通配列)-GGCCGGCCGGCCGGCCGGCC-(共通配列)
— 全体の長さが異なる —

- ②単一塩基多型：塩基の欠失、置換の個人差を分析

-AGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT-
 ↑ ↓ ↑ ↓
-AGCTAGCTAGCTAGGTAAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT-

【法医学試料の実際】

- ①現場から採取した試料の場合、必ず分析できるとは限らない
 - (1) 試料の汚染：分析が阻害される
 - (2) 試料中DNAの分解：標的遺伝子が検査困難
 - (3) 微量の試料：PCRで増幅して対処、精度が問題
- ②望ましいDNA鑑定として、科学警察研究所の方針では、「必ず結果を出すことよりも、正確で再現性があること」が優先される。そのために、分析手順のマニュアル化、鑑定困難な試料は鑑定しないなどの方針が決められている。
- ③長期経過、保存状態の悪い試料では、DNAの極度の分解や汚染が生じている。核内のDNAで困難な場合、ミトコンドリアDNAやtRNAの解析をする方法が開発されている。



電気泳動法による解析例

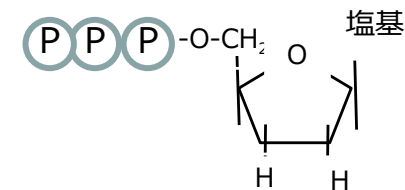
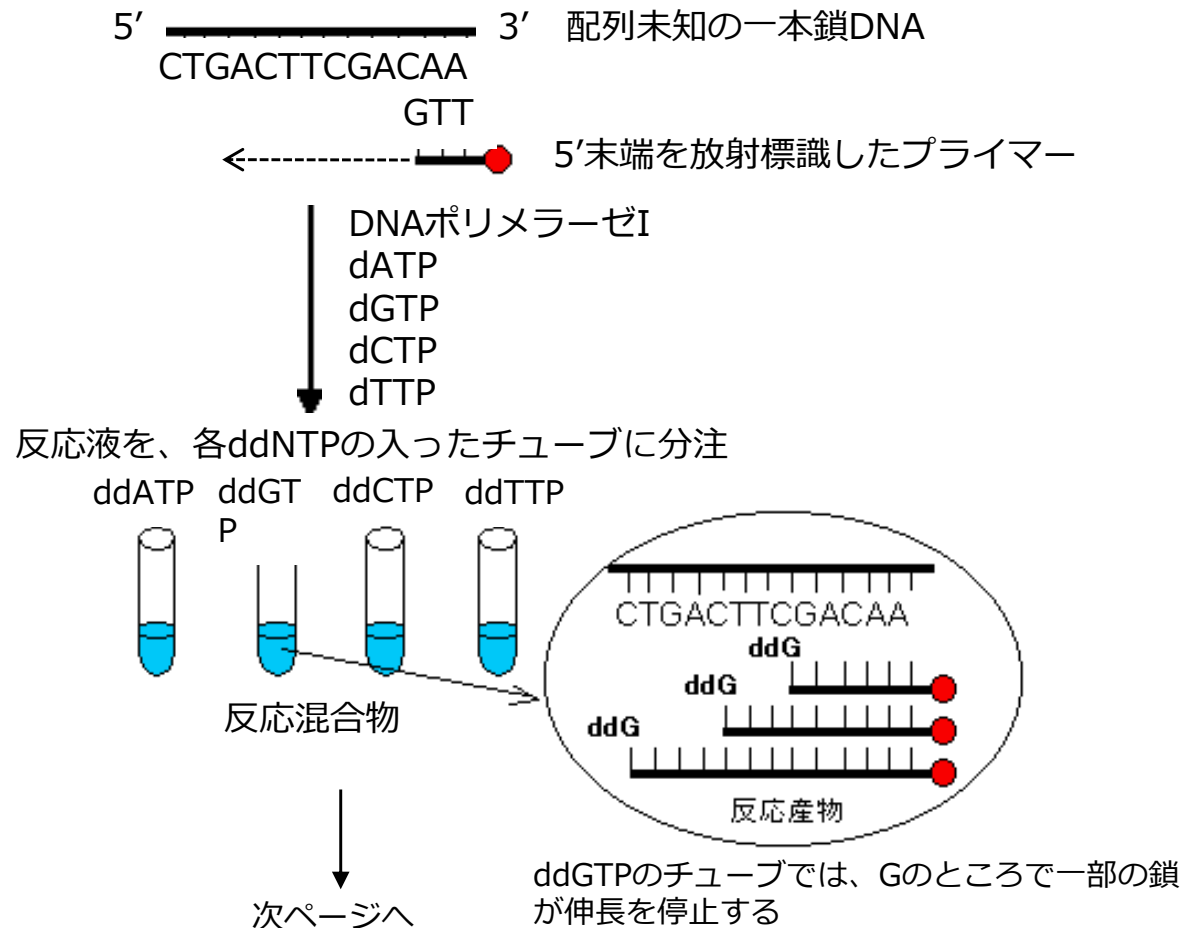


3.6 DNA塩基配列決定

ジデオキシ法 (Sanger*法, 鎖終結法)

大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用い、配列を決めたい1本鎖DNAの相補的コピーをつくる。この時、DNA合成に必要な4種のdNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)以外に、[DNA合成阻害剤](#)である**2',3'-ジデオキシヌクレオシド三リン酸(ddNTP)**を少量反応液に加える。ddNTP (terminatorという) が取り込まれると、DNA合成は停止する。反応の停止はランダムな位置で起こるので、鎖の長さの異なる様々な断片が得られ、あとは化学的分解法と同様な考え方で配列を決定する。

1) まず、配列を決めたい1本鎖DNAの3'末端に相補的な短いオリゴヌクレオチドをプライマーとして準備し、**プライマーの5'末端**を³³Pや³⁵Sで放射標識するか、または蛍光色素で標識する。

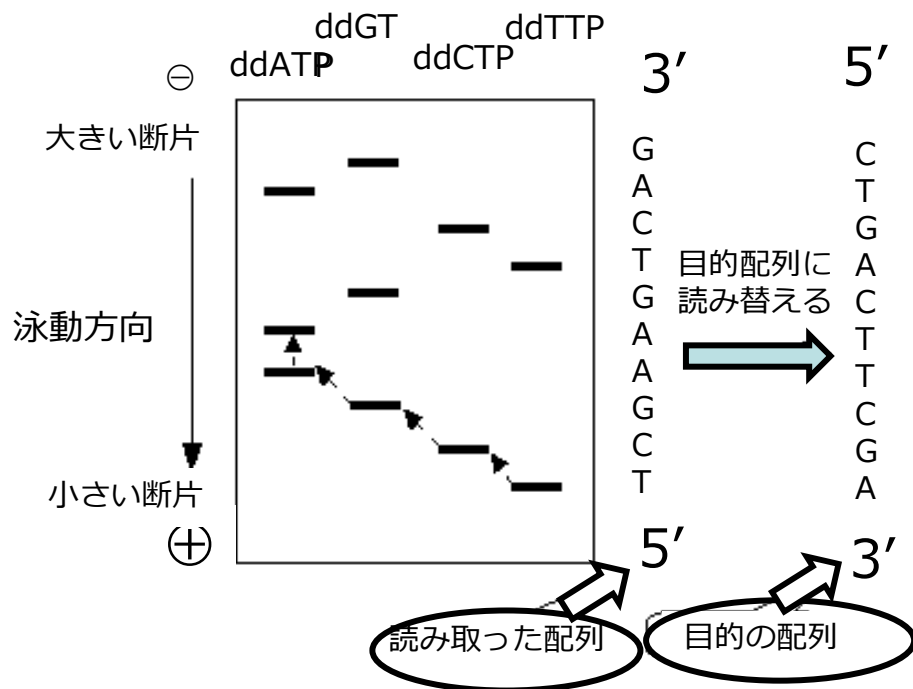


DideoxyNTP
(ddNTP)

3'末端に水酸基がないので、ddNTPを取り込んだDNAはこれ以上伸長できない

3.6 DNA塩基配列決定

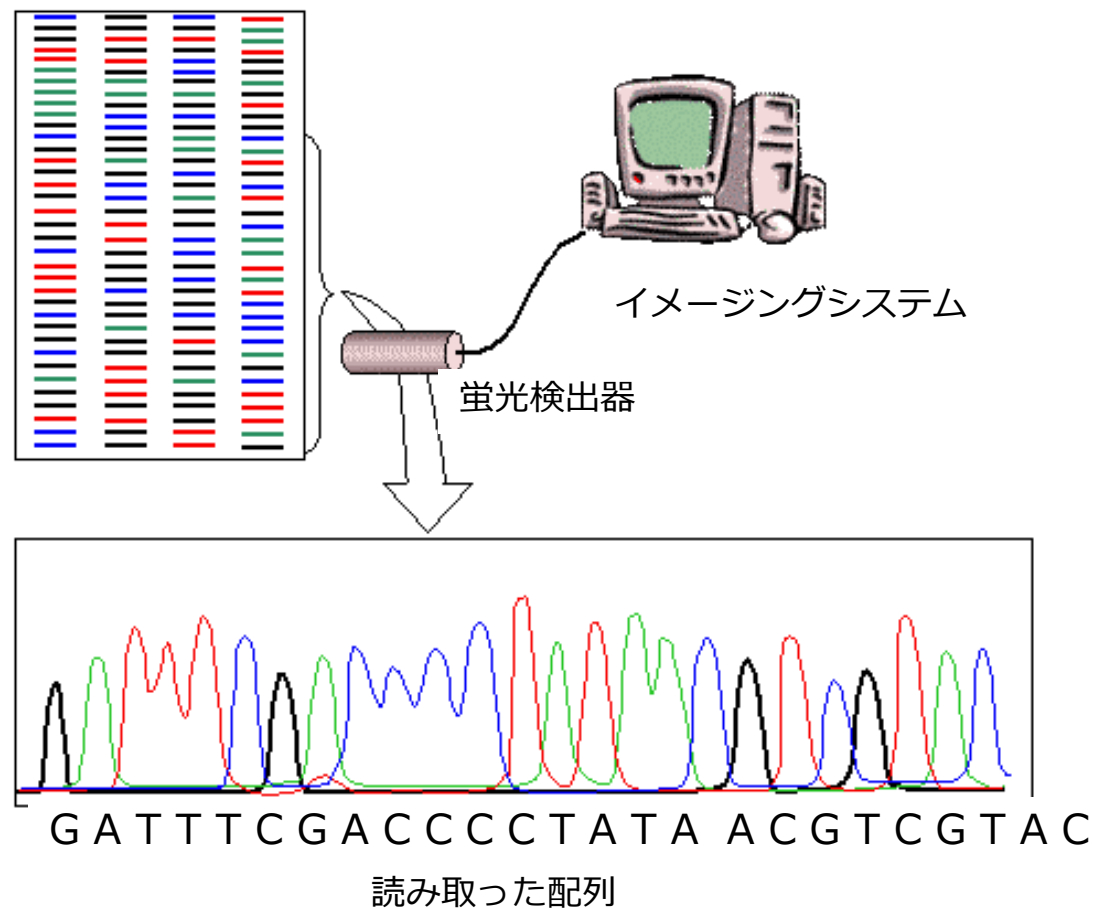
先の各反応液を、変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動



R I 標識の時はオートラジオグラムへ

波長の異なる4種の蛍光発色団
実際には、rhodamine系蛍光色素

[蛍光標識terminators]

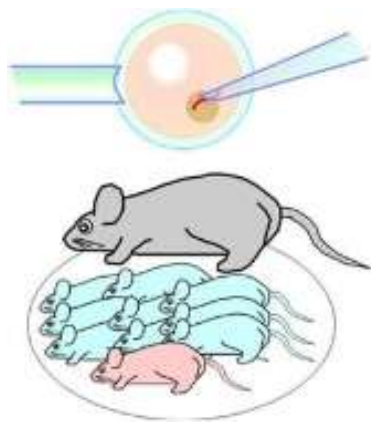


遺伝子工学の応用例

- ・ 生物のゲノム解析
- ・ 組み換え体タンパク質の生産
- ・ 遺伝子診断
- ・ 遺伝子治療
- ・ トランスジェニック生物など

① トランスジェニック生物

遺伝子導入技術を用いて、ある特定の遺伝子を受精卵などの細胞に注入（「顕微注入」または「マイクロインジェクション」という）し、注入された遺伝子情報がその生物の遺伝情報に取り込まれた個体を遺伝子導入動物（トランスジェニック動物）という。害虫抵抗性遺伝子を導入したトランスジェニック植物や、病気治療に有効なタンパク質を乳汁中に生産するトランスジェニック羊などがつくられている。ある遺伝子の働きを調べるための研究にも応用されており、ある遺伝子を導入して過剰に働かせると、どのような症状が出るかが研究されている。また、ヒトの遺伝子を導入したマウスを作成し、ヒトに効果のある薬の検証などを行うモデル動物として利用されることもある。



インターフェロンの生物学的特徴

タイプ	アミノ酸数	糖鎖付加	産生細胞	生物学的活性
α	166	有り	リンパ球・単球など	標的細胞にウィルス耐性を付与。
β	166	無し	繊維芽細胞・上皮細胞	標的細胞にウィルス耐性を付与。
γ	143	有り	Tリンパ球・NK細胞	免疫・炎症反応の調節

② 遺伝子工学による創薬

～組み換え体ヒト・インターフェロンの生産～

これまでの創薬は、経験や偶然の発見（セレンディピディ）に頼る部分が多かった。現在では、ヒトゲノムの解析も終了し、病気や生体防御にかかわる遺伝子も明らかになってきた。

ヒトのインターフェロン(IFN)は、外来のウィルスなどの異物から生体を防御する免疫系の調節タンパク質である。ヒトの場合には α, β, γ の三種類があり、さらに α には類似したものが16種あるといわれている。IFNは抗ウィルス剤として有望なものであったが、1970年代までは輸血用血液から得た白血球をもとに調製されていた。そのため、大量の輸血用血液が必要であり、臨床応用は困難であった。

遺伝子工学によるIFNの生産（組み換え体IFN）は1980年代にはじめて開発された。組換え体IFNは、天然のIFNと同様の抗ウィルス作用を示すことが明らかとなり、IFNの糖鎖部分（タンパク質本体にさらに少糖が結合）はこの作用に関与しないため、ヒトIFNは現在、大腸菌、酵母菌、動物細胞などに遺伝子を導入し、生産することが可能となっている。こうした組換え製剤は宿主細胞により大量に生産させ、細胞抽出液からIFN製剤のみを単離する（精製という）ことが容易になり、純度も著しく増加したため、副作用が減少した。この組換え体IFNの生産が可能になったことにより、下表にあるようなさまざまな病気の治療薬として認可され、臨床で使われている。

このような組換え製剤の有効性を判定する試験（治験）で、左に示したトランスジェニック動物（ある遺伝子を欠損させたもの：ノックアウト）が使われている。

医薬品として認可されているIFN製剤

商標名	内容	適応
Intron A	rhIFN α -2b	白血病、生殖器いぼ
Roferon A	rhIFN α -2a	白血病
Alferon N	rhIFN α -n3	生殖器いぼ
Infergen	rhIFN α	C型肝炎
Betaferon	rhIFN β -1b	多発性硬化症
Betasteron	rhIFN β -1b	多発性硬化症
Avonex	rhIFN β -1a	多発性硬化症

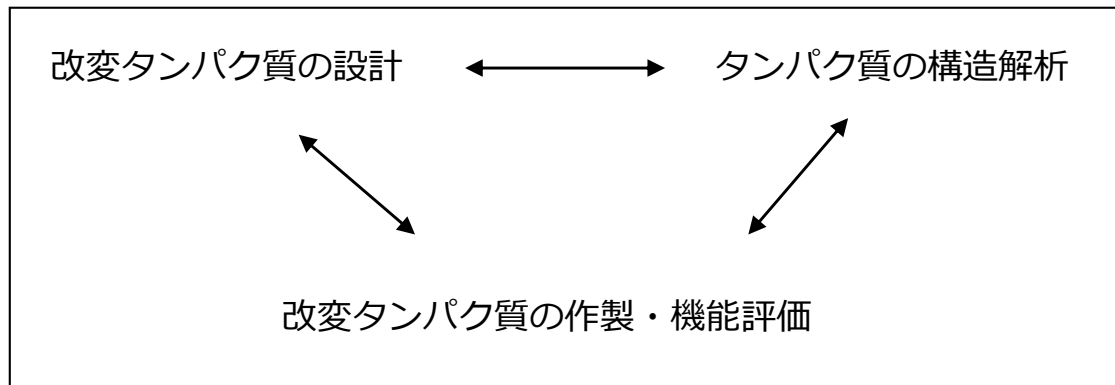
3.7タンパク質工学・酵素工学

「遺伝子工学の技術を用いて、目的の機能を持ったタンパク質を作る」
技術

1983年 Ulmerにより提唱



タンパク質の生産、安定化、部位特異的変異法など
特に酵素をターゲットとするときに、酵素工学という



タンパク質工学の基本サイクル

タンパク質工学による応用例

- ・タンパク質の機能解析（結合部位・活性部位・触媒機構など）
- ・タンパク質の機能改変（基質特異性の改変や触媒・結合能の向上）
- ・タンパク質の安定化（不安定なタンパク質の安定化や大量生産）

遺伝子・タンパク質関連データベースの利用

（リンク集は、<http://www.geocities.jp/satokichi2004jp/Links.html>）

[DDBJ](#)（遺伝子の塩基配列データベース）

[ExPASy - Biochemical Pathways](#)（代謝マップ検索）

[FASTA WWW System](#)（相同性検索）

[NCBI HomePage](#)（生命系データベース検索）

[化学関連データベース](#)（化学物質検索サイトのリンク集）

[Enzyme Database - BRENDA](#)（酵素データベース）

[IDEAS](#)（DNA・タンパクデータベース集）

[PDBj Japanese Home](#)（Protein data bank:タンパク質の三次元立体構造データベース）

[GOLD \(ゲノムデータベース\)](#)

[Entrez-PubMed](#)（文献検索）

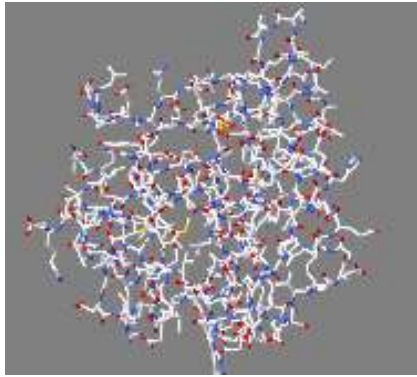
[SRSWWW at ExPASy](#)（タンパク質一次構造データベース）

[酵素データベース \(Swiss-plot版\)](#)

3.8 タンパク質の構造表示

例として、好熱性細菌由来Inorganic pyrophosphatase (EC3.6.1.1)の三次元立体構造を示す。

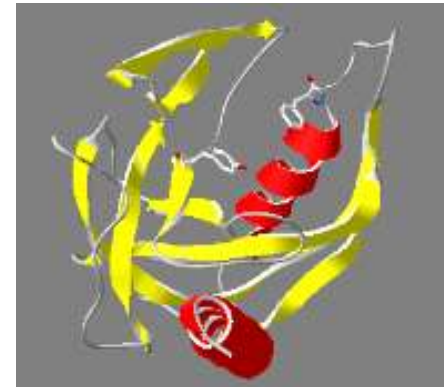
<http://us.expasy.org/uniprot/P38576>



Stick model
水素以外のすべての原子と
共有結合を表示



Ribbon model
二次構造のみを表示
(α -helixをらせんで、 β -
sheetを平板状に表記)



Ribbon表示とStick表示の組み合わせ
酵素活性部位のTyrを表示。
原子間距離、結合距離、結合角などの情報
が解析できる。

以下、目的に応じて、特定のア
ミノ酸や部位を改変したタンパ
ク質を設計する。

↓
タンパク質自身を直接
改変するのは難しい。

↓
元の遺伝子の塩基配列を改変する
と、対応したタンパク質の発現が
可能となる。

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
ATGGCGACCTGAGAGCCCTCCCGTGGGCGACAGGCGCCCGAGGTGGTCCACATGGTCATTGAGGTCCCCCGGGCTCGGGCACACAG
M A N L K S L P V G D K A P E V V H M V I E V P R G S G N K

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
TACGAGTACGACCCGACCTCGGGCGATCAAGCTGGACCGGGTCTGCGGGAGCCAGTTCTACCCCGGGGACTACGGCTTCATCCCC
Y E Y D P D L G A I K L D R V L P G A Q F Y P G D Y G F I P

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
TCCACCTGGCGAGGACGGGGACCCCTTGGACGGCCTCGTCTCTCCACCTACCCCTCCTCCCGGGGTGGTGGTGGAGGTCCGGGTG
S T L A E D G D P L D G L V L S T Y P L L P G V V V E V R V

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
GTGGGCTCCTCCTCATGGAGGACGAGAGGGCGGGGATGCCAGGTCATCGGGGTGGTGGCGAGGACGAGCGCTGGACCATCCAG
V G L L L M E D E K G G D A K V I G V V A E D Q R L D H I Q

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
GACATCGGGGACGTCCCGAGGGCGTGAGCAGAGATCCAGCACTTCTTTGAGACCTACAGGCCCTCGAGGCCAGAGGGGAGTGG
D I G D V P E G V K Q E I Q H F F E T Y K A L E A K K G K W

      460     470     480     490     500     510     520     530
GTCAGGTACCGGGCTGGCGGGACCGAGGGCGGCCTTGGAGGAGGTCCGGGCCTGCATCGCCCGCTACAGGGCTAA
V K V T G W R D R K A A L E E V R A C I A R Y K G *

```

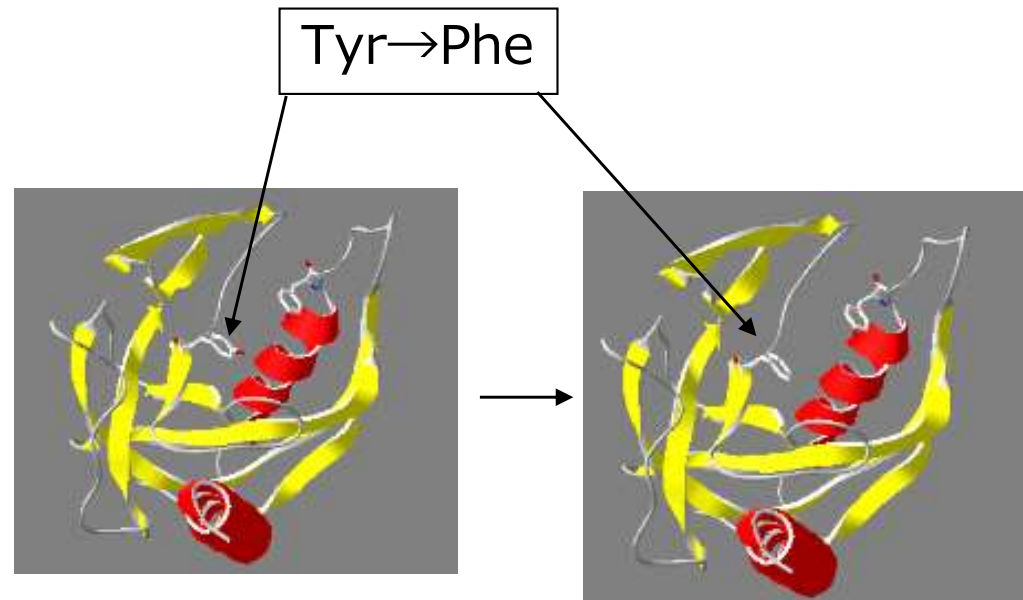
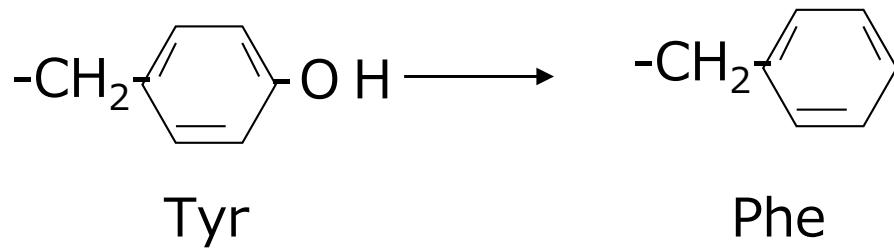
遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列

3.9 タンパク質の改変

改変の目的(設計)

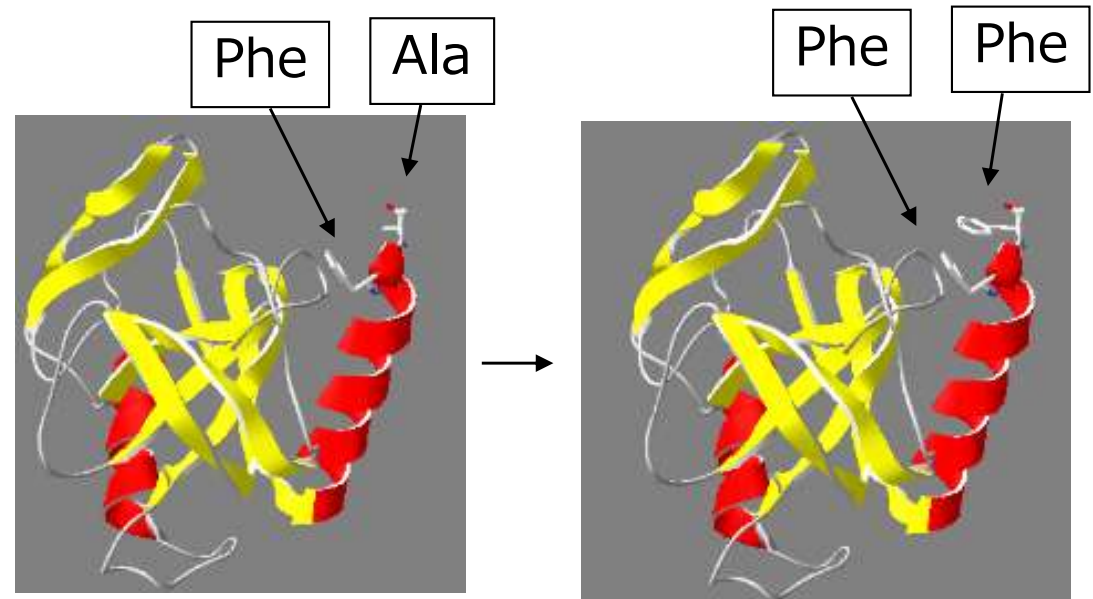
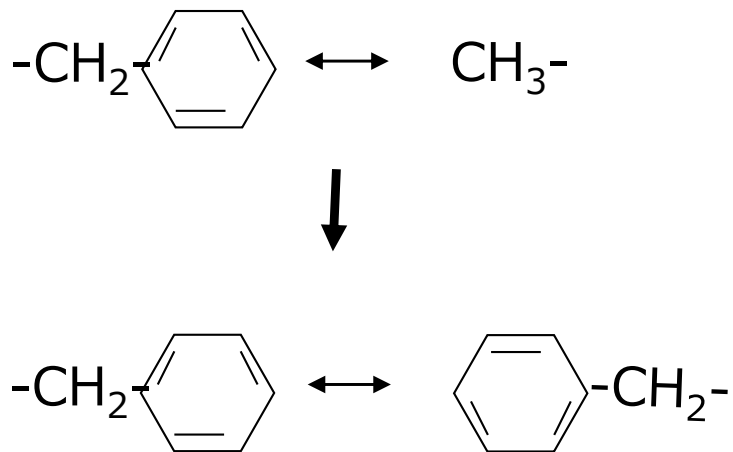
- あるタンパク質のあるアミノ酸の役割を知る。

↓
類似のアミノ酸（疎水性、体積、官能基など）に変える



- あるタンパク質を熱に安定にする

↓
三次構造の相互作用を形成させるように設計

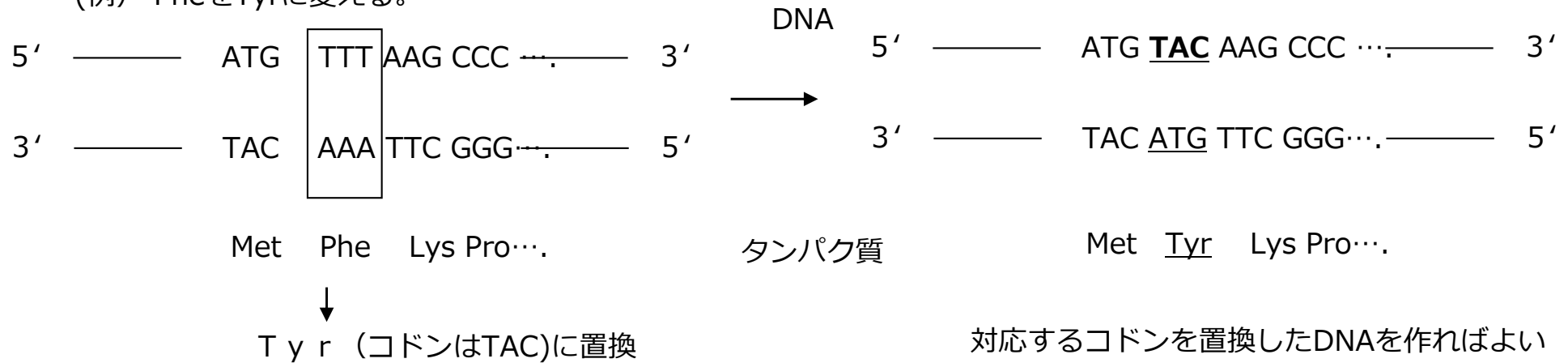


3.9 タンパク質の改変（続き）

改変パターンと設計

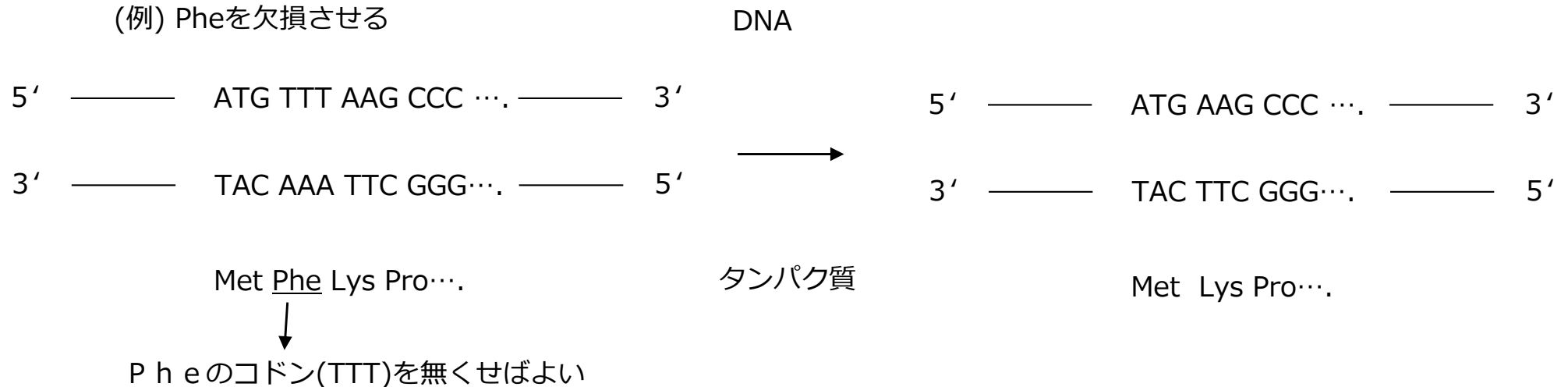
(1) アミノ酸置換

あるアミノ酸を異なるアミノ酸へ置換
(例) PheをTyrに変える。



(2) アミノ酸の欠損

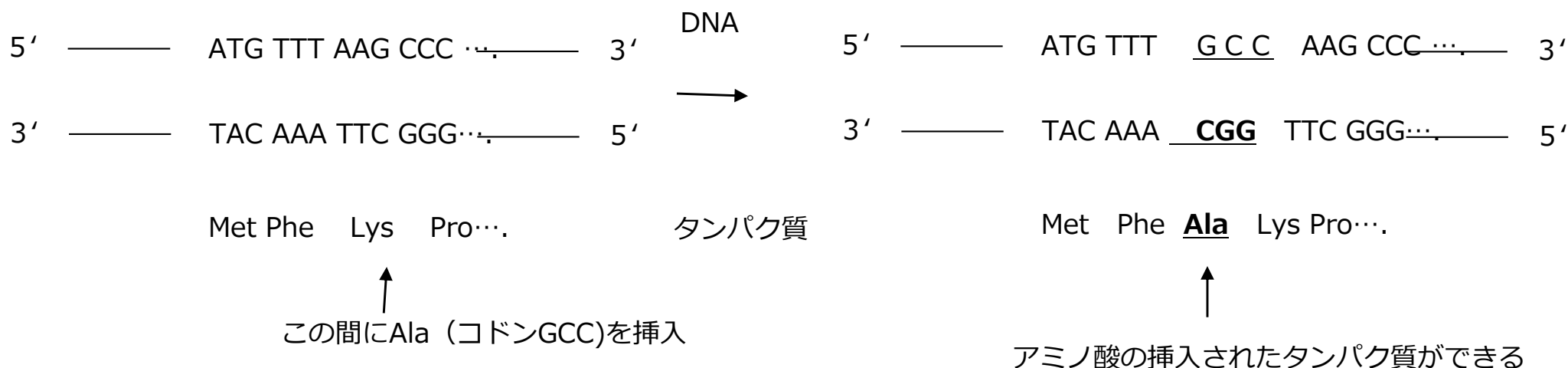
あるアミノ酸を欠損させる
(例) Pheを欠損させる



(3) アミノ酸の挿入

あるアミノ酸を挿入させる

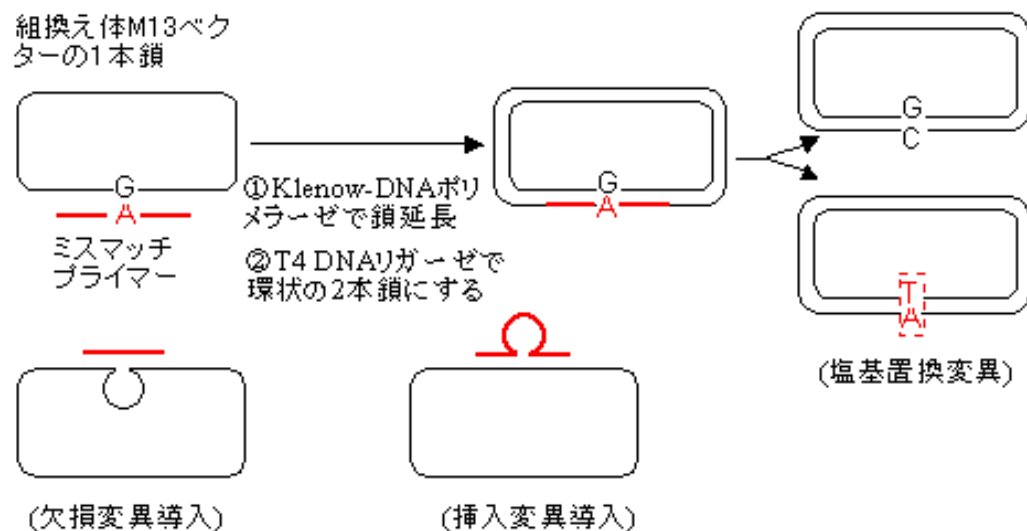
(例) Lys-Proの間にAlaを挿入



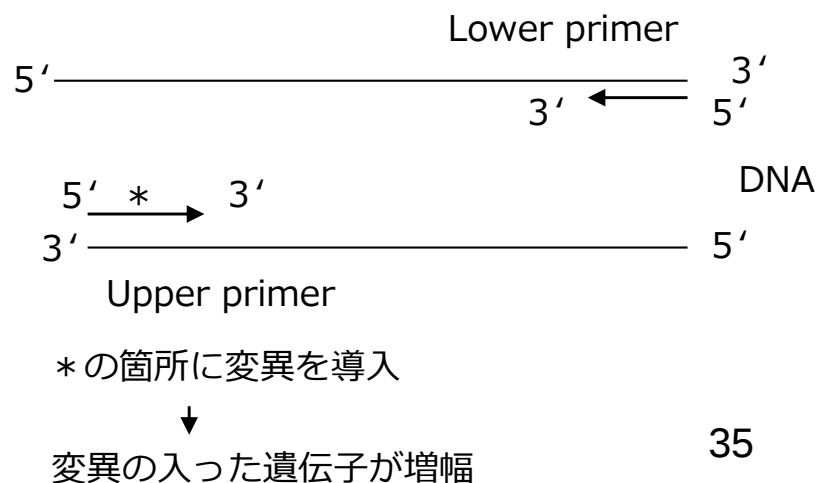
3.10 部位特異的変異法

遺伝子の特定の部位に、アミノ酸置換・欠損・挿入に対応する変異を導入する方法

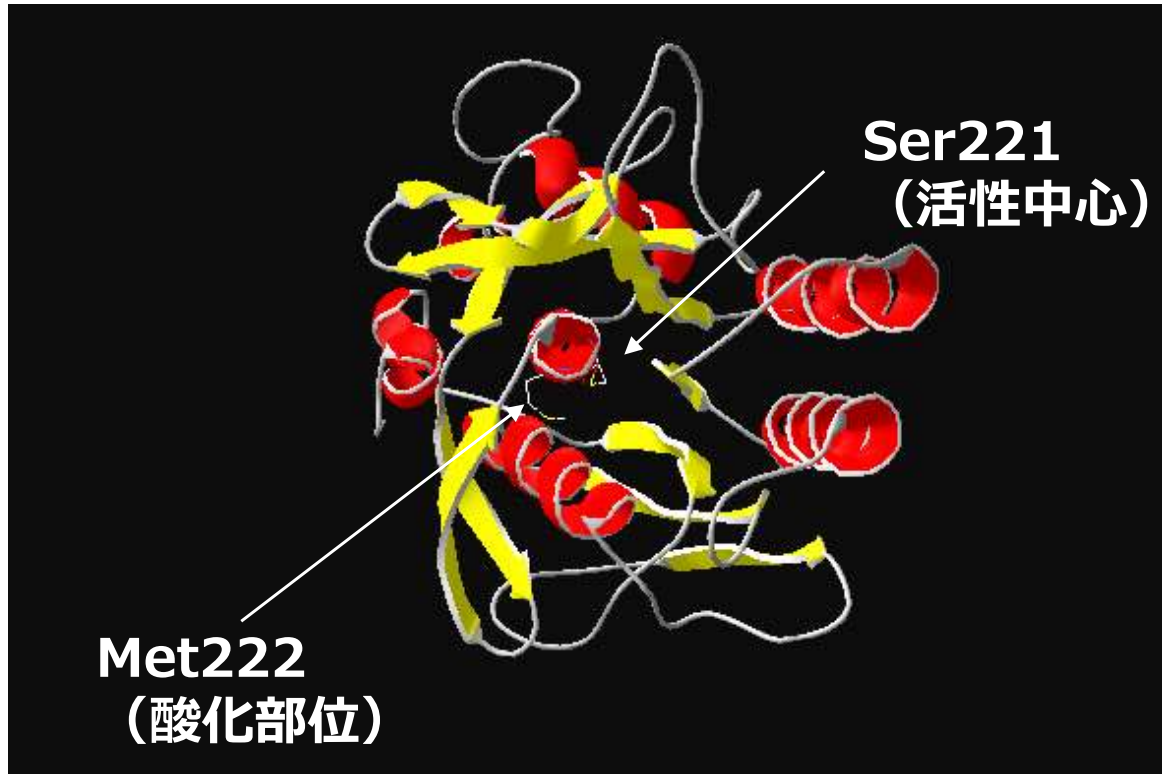
[短鎖ヌクレオチドプライマーを用いる変異導入法]



[PCRによる方法]



3.11 応用例 洗剤に含まれる酵素の安定化



上から見た図

Subtilisin BPN'の三次元立体構造



↓
Ala,Serなどに置換

↓
漂白剤耐性の増加

横から見た図



タンパク質工学・酵素工学に関するトピックス

酵素入り洗剤の開発

いまでは当たり前のように使われている酵素入り洗剤ですが、この酵素の正体はなんでしょう。その中には汚れを落とす（分解する）酵素が入っています。とりわけ、中心的な役割を果たすのが、タンパク質分解酵素（プロテアーゼ）です。このプロテアーゼは、衣類に付着したタンパク質を分解してくれます。つまり、自分もタンパク質の仲間でありながら、他のタンパク質のみを分解する（自分は分解しない）という変わり者のタンパク質です。 酵素入り洗剤の歴史は古く、20世紀の初めには洗剤製品に酵素が添加された。しかし、他の洗剤成分により失活したり、洗濯時のかくはんで失活したりして、ほとんど成功しなかった。

1960年代になると、工業用プロテアーゼも洗剤に耐性を示す微生物由来のプロテアーゼが見つかり、生産も安定化してきたため、洗剤製造においてプロテアーゼは広く応用された。しかし、1960年代終わり、洗剤への酵素添加が大きな議論となった。当時、プロテアーゼの純度が荒く、粗粉末として調製されていた。この粗粉末を扱う製造者や消費者が、この微生物由来の酵素を含む粉じんを吸い込むと、アレルギーやぜんそくを引き起こしたためである。

1970年代になると、酵素は大部分の洗剤製品から姿を消し、洗剤に酵素を添加する安全性をめぐる大論争が起きた。これは、酵素の工業的利用や食品加工に使われるものにまで及んだ。しかし、その後の科学的な調査により、酵素自身や酵素の工業的利用は安全であることが裏付けられた。人類は何世紀にもわたり、酵素・タンパク質を含む食品などを利用してきたことから、酵素・タンパク質自身は問題ないと考えられている。

現在市販されている洗剤中の主要な成分

洗剤成分	働き
セッケン・界面活性剤	繊維から汚れの粒子、特に疎水性分子の除去
過ホウ酸ナトリウム	繊維から色素や着色物の除去
トリポリリン酸ナトリウム	水を軟水にする
酵素	生物的汚れ(特にタンパク質)の除去
炭酸ナトリウム・ケイ酸ナトリウム	アルカリpHを維持
ポリカルボン酸	水中で汚れ粒子を分散させる
ケイ素	泡立ちを調整
芳香剤	繊維に好ましい香りをつける

その後、酵素入り洗剤の問題点であった、他の洗剤成分による酵素の失活に対して、プロテアーゼを安定化する技術（タンパク質工学）が用いられた。衣類の汚れのタンパク質は、洗濯の過程で変性・凝集し、衣類の繊維から取り除くことが困難であった。そのため、洗濯における条件でも作用するプロテアーゼを添加すれば、衣類のタンパク質性汚れを分解・除去することが可能であると考えられたためである。

洗剤に添加されるプロテアーゼに求められる性質は、pHがアルカリの条件で、比較的高温条件で、かつ他の洗剤成分（漂白剤、界面活性剤など）が共存していても、安定にタンパク質を分解できることである。

さまざまな生物（特に微生物）を起源とするプロテアーゼをスクリーニングした結果、プロテアーゼの一種であるサチライシンが洗剤用酵素に適していることがすぐわかった。これは、Bacillus属細菌が菌体外に分泌するセリンプロテアーゼで、天然の生産菌から大量に生産できる。その後、さらに生産量上げるために、遺伝子工学により作られたサチライシンが用いられるようになった。

サチライシンは、洗濯におけるタンパク質汚れの分解の点では、画期的であった。一方では、洗剤本体の成分である漂白剤も、より美しい衣類の仕上がりを求める点で、改良が重ねられてきた。そこで、強い漂白剤を用いても、失活しないプロテアーゼの生産が求められた。

漂白剤は、プロテアーゼのメチオニンやシステインなどの反応性の高いアミノ酸を酸化するため、漂白剤の作用を高めると、酵素が作用しなくなるためである。サチライシンの場合も、活性部位(セリン)の近くにメチオニンが存在し、漂白剤の作用でメチオニンが酸化されると、タンパク質分解能力が著しく低下した。そこで、タンパク質工学により、サチライシンの活性部位近傍のメチオニンを他のアミノ酸(セリン・アラニン)に改変し、酸化耐性のサチライシンが開発された（第二世代酵素入り洗剤）。これは、強い漂白剤存在下でもタンパク質分解が可能であり、現在市販されている。

4.細胞工学と再生医療

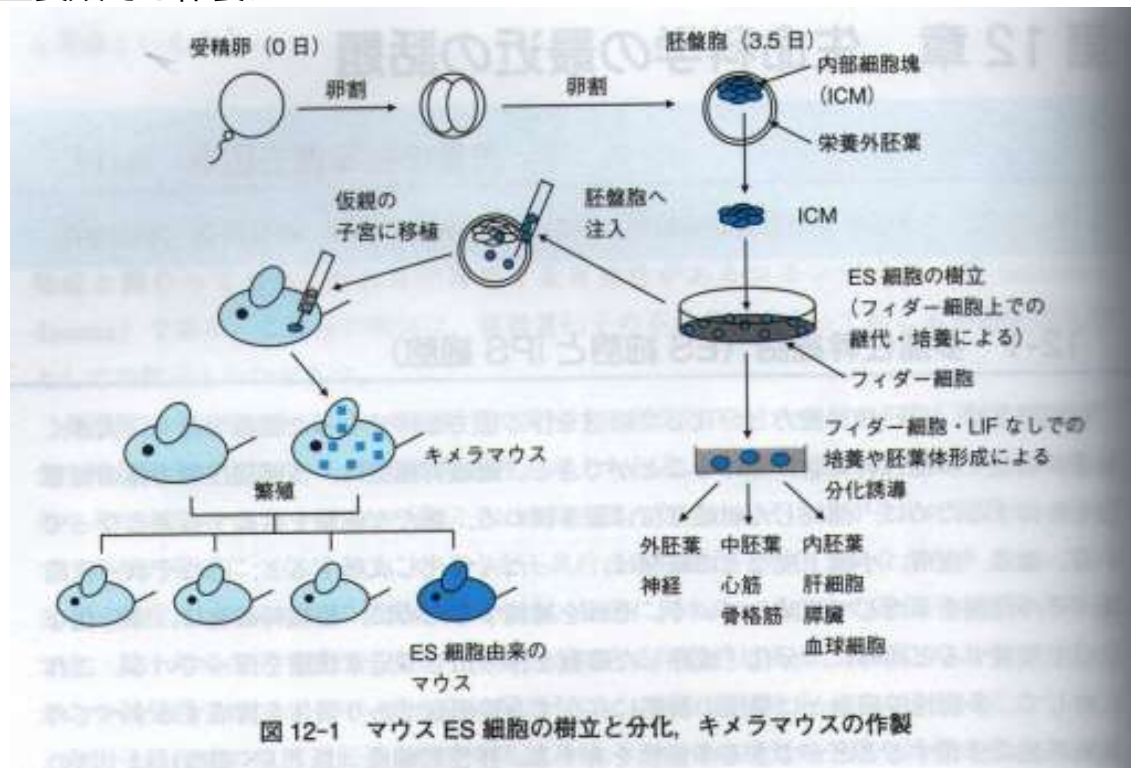
～ES細胞とiPS細胞～

幹細胞- 自己複製能力と分化した細胞を作る能力を併せ持つ細胞。
下記の二つに分類される。

- ・組織幹細胞：多細胞生物の体の恒常性維持のため、消耗した組織部位に置き換わる、新たな細胞の供給源(血液、皮膚、小腸上皮など)
- ・多能性幹細胞：発生の初期に存在する幹細胞で、個体のすべての組織細胞に分化できる多能性を持つ。(ES細胞, iPS細胞など)

1. ES細胞(Embryonic stem cell=胚性幹細胞)

1981年、イギリスのエバンスらにより、マウスの内部細胞塊(ICM)から作製された。その後、アカゲザル、マーモセット、ヒトなどの霊長類でも作製。



ES細胞とキメラマウスの作製法(マウスの場合)

動物は受精卵が分裂を繰り返すことにより発生する。受精卵や発生初期の細胞は、すべての組織細胞に分化する多能性を持つ。マウス受精後3.5日の胚盤胞中のICMは、すべての細胞の起源となる。

ICMから分離した細胞を培養し、分化能を持つES細胞を取り出す。



胚盤胞へ注入し、親の子宮に移植



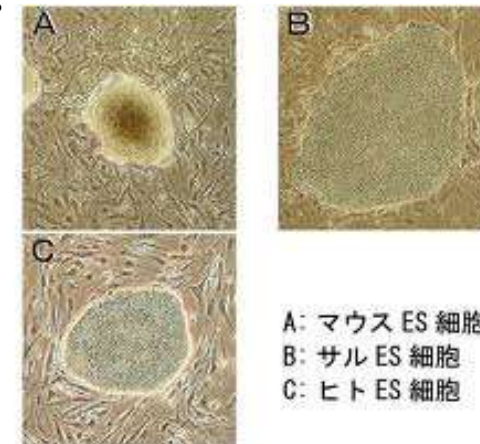
出産(キメラマウス：二組以上の親に由来する遺伝子が体の内部に混在する個体)、交配、繁殖をさせる

(例) 白い毛のマウスの受精卵に、黒い毛を持つマウス由来のES細胞を注入すると、生まれたマウスは白と黒のぶち柄になる。



ES細胞由来のマウス (完全に黒毛のマウス)

* ES細胞を用いたトランスジェニックマウス(特定の遺伝子改変をしたマウス) やノックアウトマウス(特定の遺伝子を欠損させたマウス) の技術の確立で、エバンス、カッペギ、スミシースは2007年のノーベル生理学医学賞授与。



E S細胞の特徴

- 神経細胞や血球細胞など様々な種類の細胞に分化する（多能性）。
- ほとんど無限に増殖するという高い増殖能力を持つ。

ES細胞の試験管内分化

ES細胞を試験管内で分化させると、様々な細胞や組織、器官が形成される。未分化状態は、白血病阻害因子(LIF)などの添加で維持されるが、LIFを加えず高密度培養（例:心筋）や浮遊細胞で細胞塊（胚様体）を形成させることなどで様々な細胞に分化する。

再生医療への応用

- ・パーキンソン病治療に必要なドーパミン産生する神経細胞
- ・糖尿病治療に必要なインシュリン産生細胞
- ・心筋梗塞で移植に必要な心筋細胞 …など

*分化：元のE S細胞とは違い、神経、筋肉や血液中の細胞のようにそれぞれ固有の機能を持つ細胞に変化すること

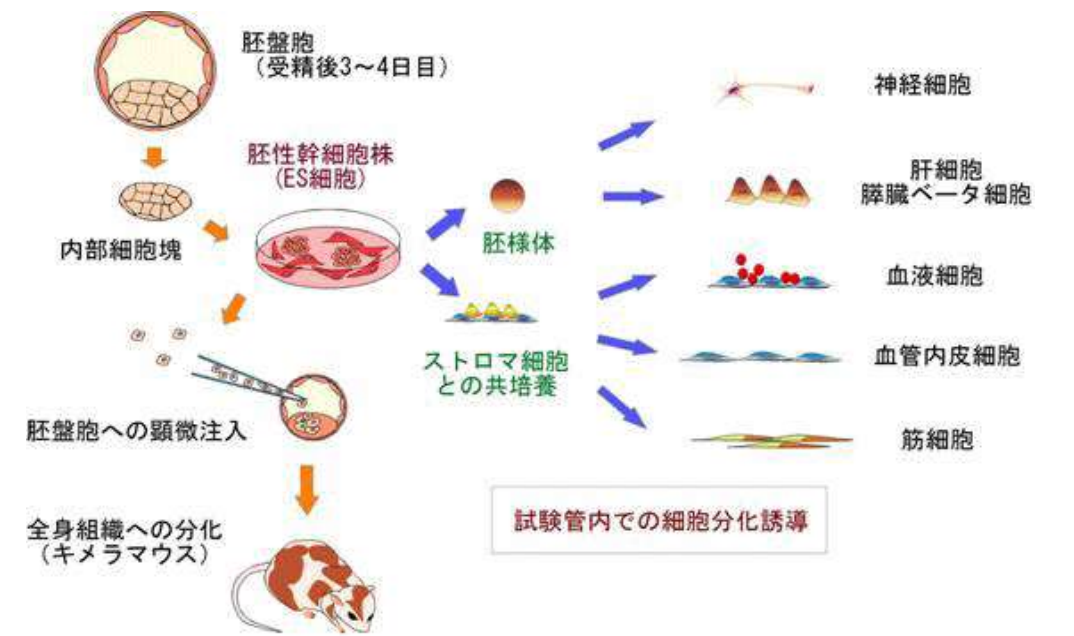
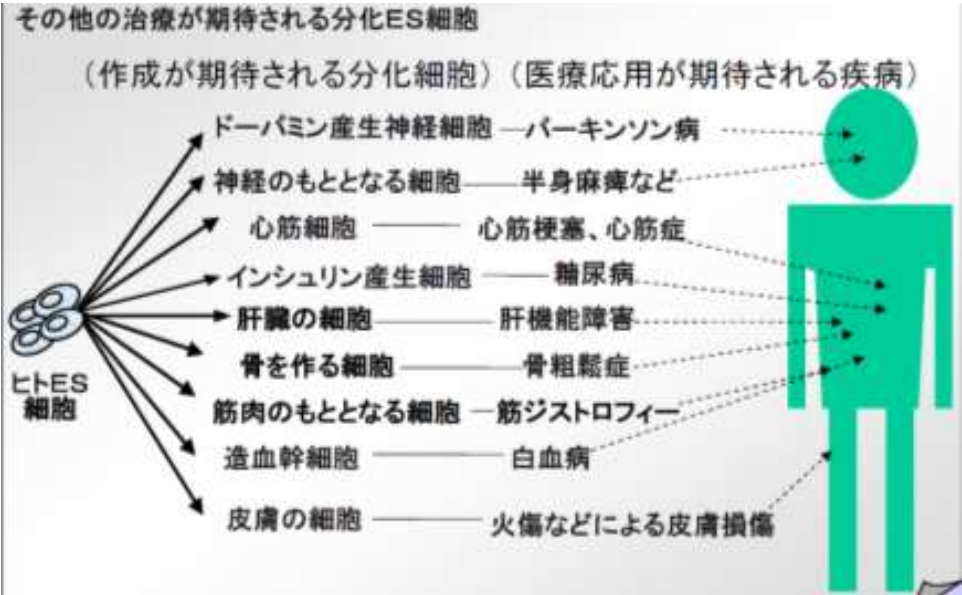


図1 マウスES細胞株で示された多分化能



ES細胞の治療応用への問題点

①実際に分化させて移植医療に用いる場合、移植先の固体細胞と組織適合抗原が異なるため、拒否反応を起こす可能性が高い。→受精卵に移植先の体細胞の核を入れ発生（クローン化）させ、その胚盤胞期のICMを移植に利用する（クローン技術）ことで拒絶反応抑制が期待されている。

②倫理上の問題

ヒトの場合、ES細胞作製には、将来ヒトとなるはずの初期胚を破壊しなくてはならない。→人殺しと同じ。胚は生命と言えるのかという問題。

・ヒトクローン 胚をつくることを認めてしまえば、クローン人間の産生につながりかねないという危惧。細胞など)

文部科学省は「ヒト ES細胞の樹立及び使用に関する指針を2001年9月に告示・施行した。研究に様々な規制がかけられ、自由に実験研究を行うことが困難である。

2001年9月：ヒトES細胞の樹立及び使用に関する指針告示
(http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/2001/es/010901.htm)

- 指針は、以下のことを定めている。
- ・ES細胞の作製と利用は当面基礎研究に限る。
 - ・研究機関は、必要以上のヒト胚の提供を受けない。
 - ・「ヒト胚が生命の萌芽である」ことに配慮し、人の尊厳を侵すことのないように誠実かつ慎重に扱う。ES細胞の作製に使われるヒト胚は、次の要件を満たすものとする。
 - ・不妊治療に使う目的で作製された受精卵で使用予定がないもののうち、胚を滅失させるといふ提供者の意思が確認されているもの
 - ・適切なインフォームド・コンセントを受けたもの
 - ・受精後14日以内の凍結保存胚
 - ・ヒト胚の提供者の個人情報の保護に最大限努め、胚と提供者の個人情報とが照合できないようにする。
 - ・ES細胞から個体を産生しない。ヒト胚・胎児にES細胞を混合しない。
 - ・ES細胞から生殖細胞を作製しない。
 - ・ES細胞を作製する機関は研究計画について、倫理審査委員会と文部科学省の二重の審査を受ける。
 - ・指針の違反者は公表する。

ES細胞捏造事件

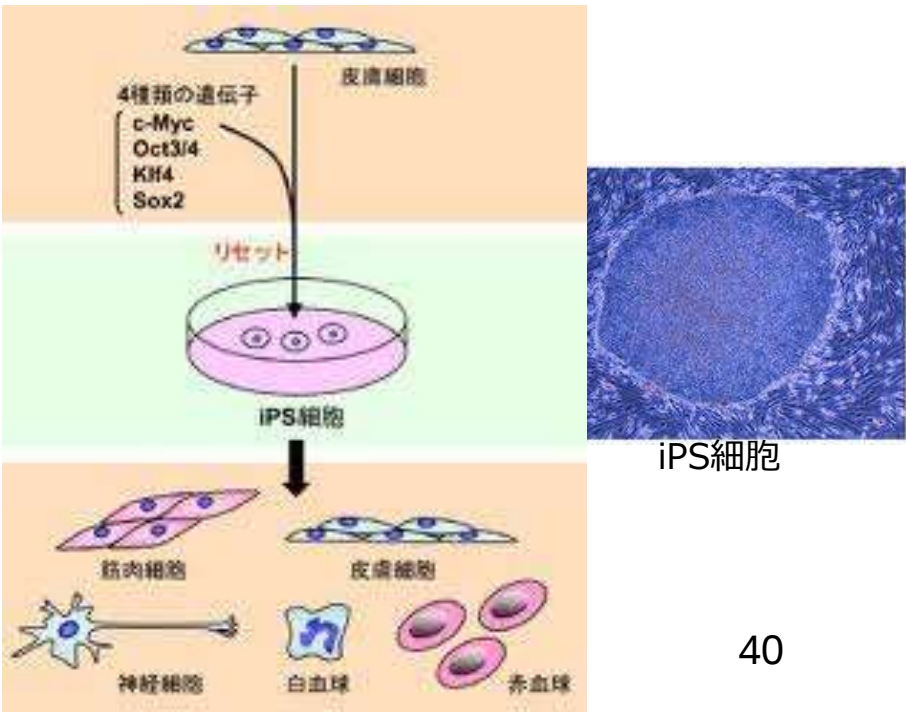
「韓国でノーベル賞に最も近い人物」として政府、企業、マスコミ、世論を挙げて応援した黄禹錫(ファン・ウソク)ソウル大教授の胚(はい)性幹細胞(ES細胞)研究をめぐる、韓国検察当局は2006年5月12日、「研究費を流用したり不法に実験用卵子の提供を受けたりした」として、既に辞任していた黄元教授と研究チームを業務上横領や詐欺、生命倫理法(05年1月施行)違反などの罪で在宅起訴した。黄元教授がヒトクローン胚から世界で初めてES細胞をつくったとする論文は、ソウル大調査委員会が06年1月までに「すべて捏造」と結論づけており、検察当局は捏造は立件しなかったものの、ソウル大の調査結果を追認した。研究が目指した再生医療は、障害や難病に苦しむ人たちにとって、大きな希望を与えるものであり、研究を阻むべきではないと主張する声もあ

2. iPS細胞(induced pluripotent stem cells=人工万能幹細胞)

2006年、京大の山中教授らは、マウスの繊維芽細胞に、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの転写因子(Yamanaka Factor)を導入することで、ES細胞様の多能性幹細胞を作り出すことに成功した。
第一世代iPS細胞：無限に増殖するなど試験管内では成功。キメラマウス作製すると発生が途中で止まる。
2007年に改良した第二世代iPS細胞（遺伝子を導入したiPS細胞からよりES細胞に類似したものを選別）を作製し、上記問題をクリアした。

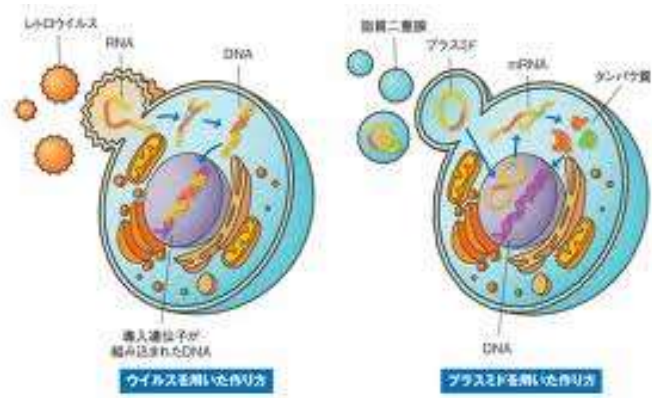


山中らの結果は、ES細胞のように初期胚を壊すことなく、たった4つの遺伝子で大人の体細胞から多能性幹細胞が作製できることを示し、再生医療に道を切り開いた。
2007年にはヒトのiPS細胞も作製に成功し、2011年ノーベル生理学医学賞が授与された。



iPS細胞の作製法と問題点

最初の方法は、マウスの繊維芽細胞に、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4つの転写因子(Yamanaka Factor)をレトロウィルスを用いて導入した。このうち、c-Mycはがん遺伝子であり、遺伝子導入に使用したウィルスもがん化に関与していることで、iPS細胞を使って生まれた2割のラットにがんが見つかった。その後、遺伝子導入にプラスミドを用いたり、4遺伝子のうち、がん遺伝子の「c-Myc」を抜いた3遺伝子でもiPS細胞を作製している(作製効率は減少する)。さらに、遺伝子を用いない方法(タンパク質や化学物質など)や山中factorのうち2つとさらに別の2つの遺伝子導入でiPS細胞を作製した例もある。



iPS細胞の利点

- ①成熟分化した細胞を使うため、ES細胞のような生命倫理の問題が生じない。
- ②比較的簡単な遺伝子導入技術で未分化細胞を作ることができる。成功率も高い。
- ③再生医療の際、患者本人の細胞から作製できるため、拒絶反応の心配がない。

iPS細胞の問題点

- ①iPS細胞での遺伝子発現パターンはES細胞と80%同じだが、残り20%が異なる。無限に増殖するが、長期の培養で染色体異常が起きる。
- ②iPS細胞由来のマウスはがんになる確率が高い。作製した臓器を移植した際も、がん化するリスクが高いと考えられている。

参考文献：生命と環境、林ほか（三共出版）、iPS細胞、八代嘉美（平凡社新書）

「全部入れよう」思わぬ成果＝1年間、極秘に検証－山中さんら・ノーベル賞

※記事などの内容は2012年10月8日掲載時のものです。小さな培養皿に、医療の未来を変える細胞が息づいていた。「何かの間違いじゃないか」。2005年、京都市左京区の京大再生医科学研究所。何度も失敗を繰り返していた山中伸弥さん（50）と高橋和利さん（34）（現京大講師）は、全く期待していなかった方法で誕生した万能細胞に目を疑った。それから1年、2人は極秘に検証を続け、世界初の細胞を確認した。

どんな細胞にもなれるが、受精卵を壊して作るため倫理的問題を抱える胚性幹細胞（ES細胞）。その中で働く遺伝子を皮膚細胞に送り込み、同じ性質を持った新しい細胞に作り変える。山中さんはこんな戦略を描いていた。「あまりに単純で、うまくいかない理由は100個くらい浮かぶ。とにかくやってみようと思った」

指示を受けた高橋さんは、24個の遺伝子をマウスの皮膚細胞に一つずつ入れる実験を続けた。だが、うまくいかない。「そんなに甘くないか」。山中さんが諦めかけたとき、高橋さんが「全部入れさせてください」と提案した。最後の大勝負に出たわけではない。「毎日やっている実験の一つ。やってみるか、くらいの気持ちだった」という。

そして、予想外の成功。高橋さんは「最初は別の皿のES細胞が混入したかと疑った。想像を超えたものが急にできたので、喜びよりも不安が大きかった」と話す。

簡単に作れるため、情報が漏れれば世界中のライバルに先に発表される恐れがあった。2人は研究室のメンバーにも内緒で実験を続け、4個の遺伝子で作製できることを突き止めた。海外で名前細胞着と名樹いよけたや「iPod（アイポッド）」の中さんは「1人だったら、諦めていたかもしれない」と振り返る。山中さんのアイデアと、高橋さんの大胆さが未来を開いた。（時事ドットコム）



体細胞の分化状態の記憶を消去し初期化する原理を発見

－細胞外刺激による細胞ストレスが高効率に万能細胞を誘導－



ヒトを含む哺乳類では、受精卵が分裂して血液や筋肉など多様な体細胞に変わり、その種類ごとに個性づけ（分化）されます。体細胞は分化を完了するとその細胞の種類の記憶は固定され、分化を逆転させて受精卵に近い状態に逆戻りする「初期化」は、起きないとされています。初期化を引き起こすには、未受精卵への核移植である「クローン技術」や未分化性を促進する転写因子というタンパク質を作る遺伝子を細胞に導入する「iPS細胞技術」など細胞核の人為的操作が必要です。

もし「特別な環境下では、動物細胞でも“自発的な初期化”が起きうる」といったら、ほとんどの生命科学の専門家が「それは常識に反する」と異議を唱えることでしょう。しかし、理研発生・再生科学総合研究センターの小保方研究ユニットリーダーを中心とする共同研究グループは、この「ありえない、起きない」という“通説”を覆す“仮説”を立て、それを実証すべく果敢に挑戦しました。共同研究グループは、まず、マウスのリンパ球を用い、さまざまな化学物質の刺激や物理的な刺激を加え、細胞外環境を変えることによる細胞の初期化への影響を検討しました。その過程で、酸性溶液で細胞を刺激することが初期化に効果的だと分かりました。実験では多能性細胞に特有の遺伝子「Oct4」が発現するかどうかで初期化の判断をします。詳しい解析の結果、酸性溶液処理によってリンパ球のT細胞に出現したOct4陽性細胞は、T細胞にいったん分化した細胞が初期化された結果、生じたものであることを突き止めました。また、このOct4陽性細胞は生殖細胞を含む多様な体細胞へ分化する能力をもつことが分かりました。さらに、ES細胞やiPS細胞な

される胎盤など胚外組織に分化することも発見しました。一方で、酸性溶液処理以外にもガラス管の中に細胞を多数回通すなどの物理的な刺激や、細胞膜に穴をあける化学的刺激でも初期化を引き起こすことが分かりました。小保方研究ユニットリーダーは、こうした細胞外刺激による体細胞からの多能性細胞への初期化現象をSTAP（刺激惹起性多能性獲得）、生じた多能性細胞をSTAP細胞と名付けました。また、STAP現象がリンパ球だけで起きるのではなく、脳、皮膚、骨格筋、肺、肝臓、心筋など他の組織の細胞でも起きることを実験で確認しました

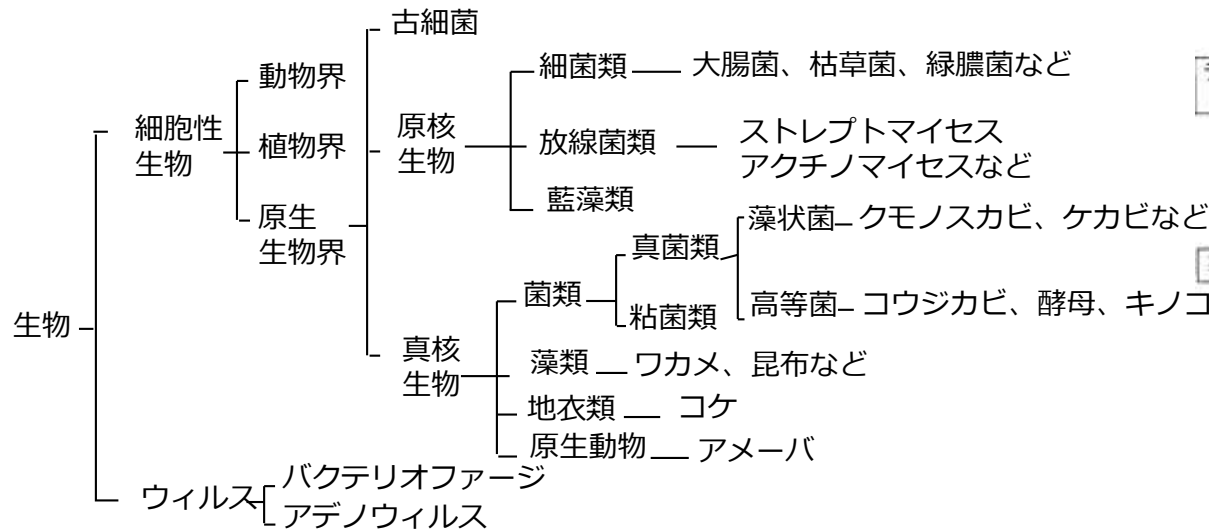


5.微生物工学

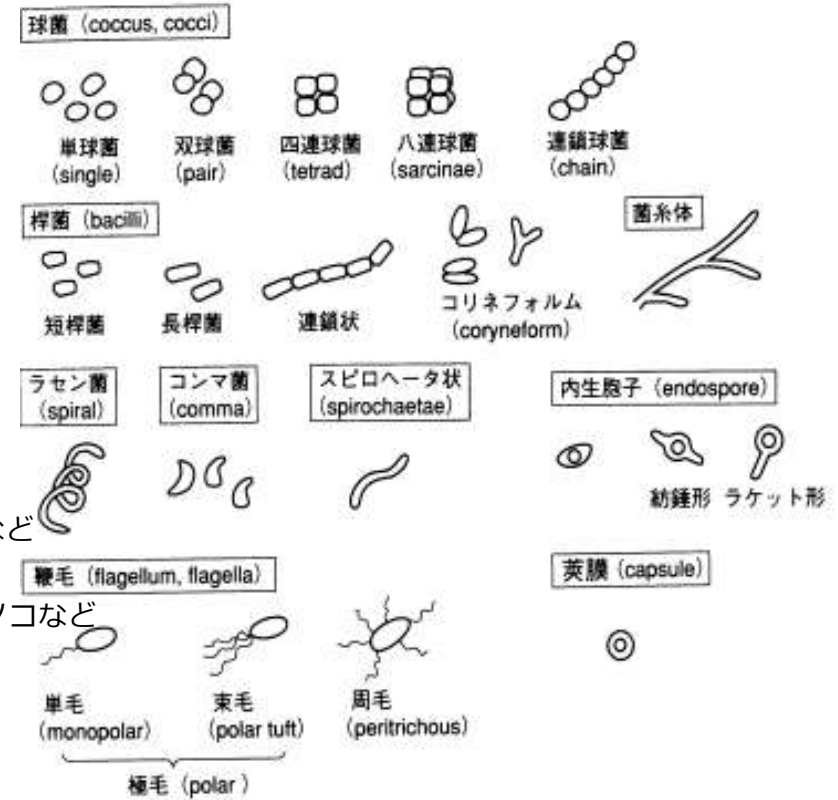
- 微生物の能力を発見し、活用する。
 1. 目的の機能を持った微生物の選択
 2. その機能をになうタンパク質/酵素、遺伝子の解析
 3. その機能、生産性の向上

5.1 微生物とは

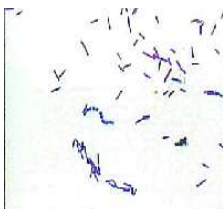
(A) 微生物の分類学上の位置



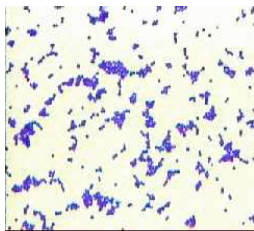
(B) 細菌の形状と分類



大腸菌



乳酸菌



黄色ぶどう球菌



土壤細菌



コウジカビ



酵母

ウイルス
細菌
菌類
原生動物
藻類

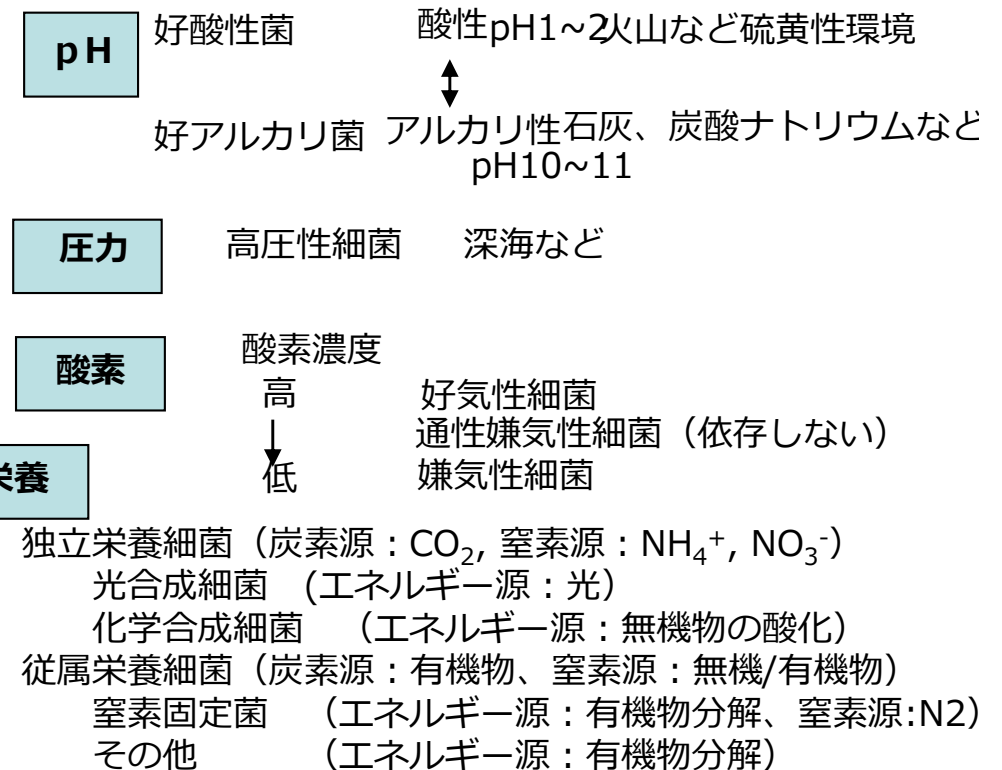
0.01~0.25μm
0.1~10μm
>2μm
2~1000μm
>1μm

微生物

細菌には、原核生物（核を持たない）および古細菌（原核、真核両方の特徴を持つ）が含まれる。前者を真正細菌という。真核生物の微生物は、細菌ではなく菌類と呼ばれる。

細菌および菌類を併せて微生物と呼ぶ。

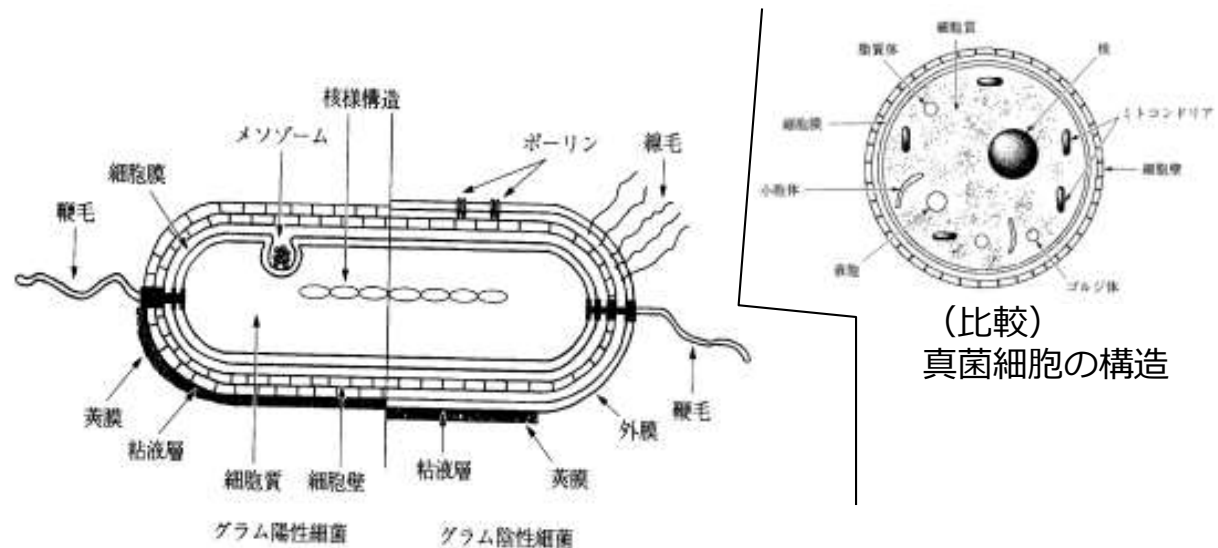
過酷な環境で生育している微生物を総称して、極限環境微生物という。



細菌は、グラム染色法による染色*から、
グラム陰性菌とグラム陽性菌に分類される。

原核生物では
 グラム陰性——大腸菌、サルモネラ菌など
 グラム陽性——納豆菌、乳酸菌など

一般的に、グラム陽性菌は細胞壁が厚く、この部分が染色色素に親和性を示す。



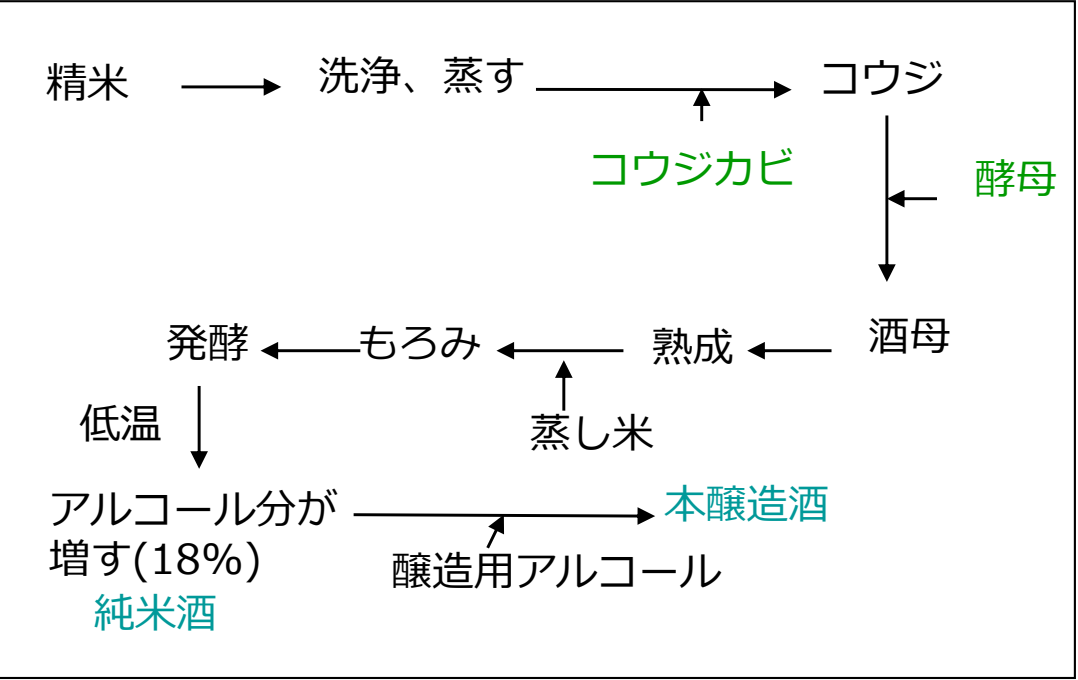
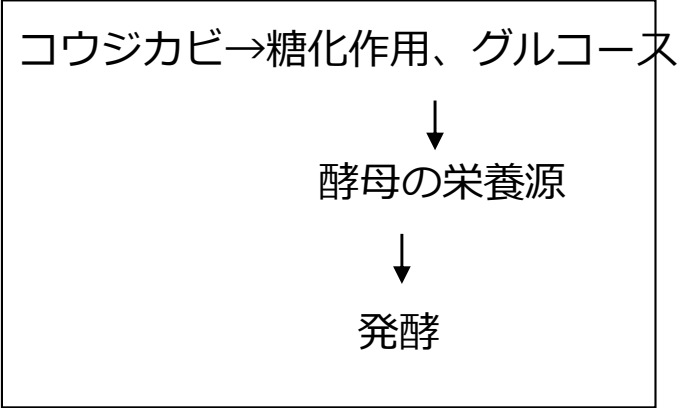
細胞壁を持つ
一部は芽胞を持つ

細胞壁はほとんどない。
細胞膜が二重になっている。

5.2 微生物の利用

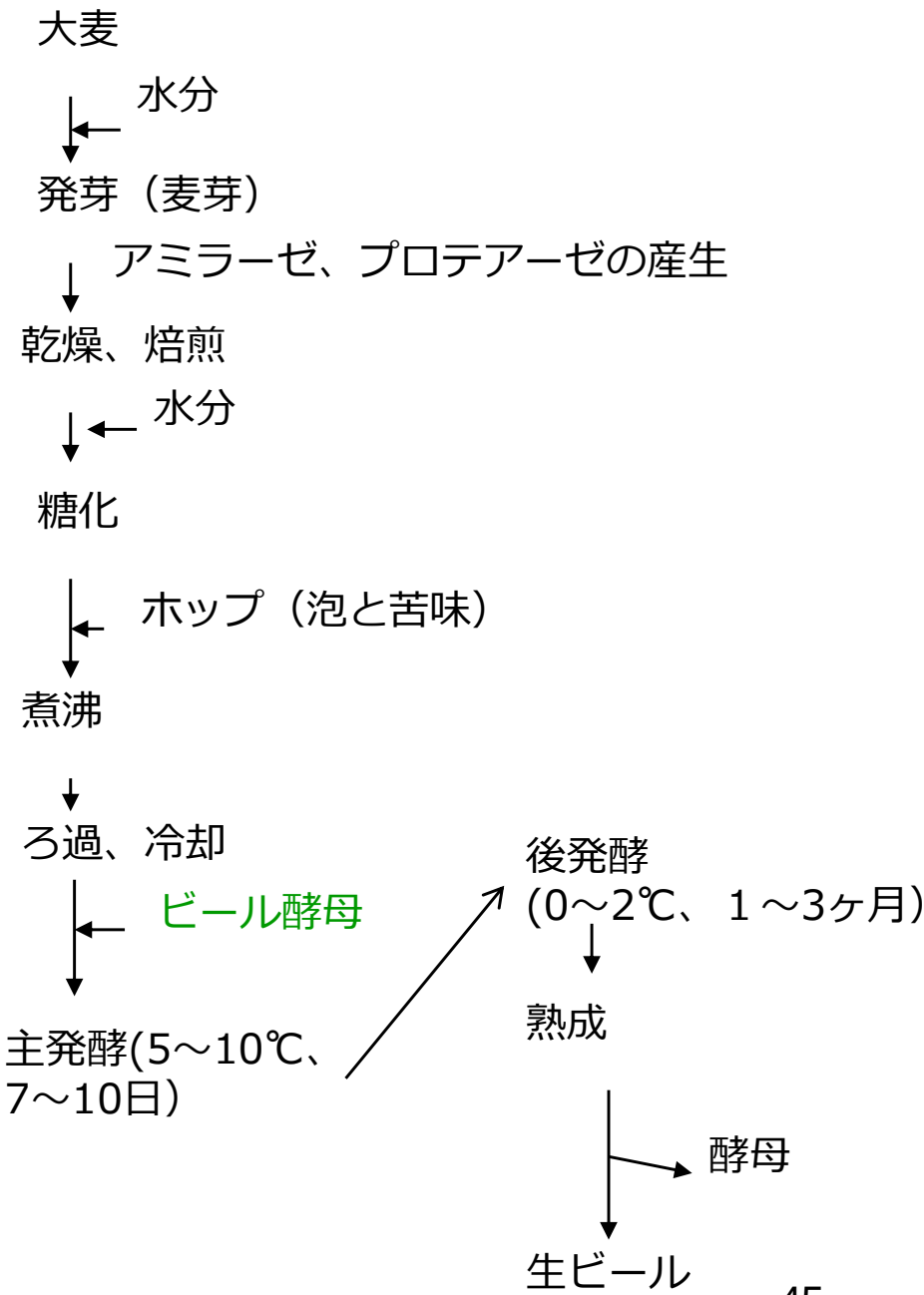
① アルコール発酵

清酒の場合
精米の度合いで分類
吟醸(60%以下)
大吟醸(50%以下)
通常 (70%)



日本酒の製造法と微生物利用

ビールの場合



② 発酵食品と微生物

発酵に寄与する微生物としては、細菌、酵母、カビの三大微生物がある。世界各地に微生物による発酵食品が存在するが、特に日本は高温多湿な環境であるため、微生物による発酵文化が栄えてきた。

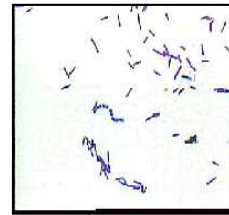
①カビによる発酵食品：

日本酒、米酢、みそ、甘酒、みりん（ニホンコウジカビ：黄麹菌）

→デンプンを糖化させ、ブドウ糖に変換する能力が強い

しょうゆ、みそ（ショウユコウジカビ）→タンパク質を分解しアミノ酸を生成する能力が強い

焼酎（クロコウジカビ）、泡盛（アワモリコウジカビ）鰯節（カツオブシカビ）、ゴルゴンゾーラ、カマンベールチーズ（アオカビ、シロカビ）、阿波番茶、碁石茶（コウジカビ、クモノスカビ：前発酵）など



乳酸菌



コウジカビ



酵母

②酵母による発酵食品：

パン、ビール、ワイン（サッカロミケス属出芽酵母）、清酒（清酒酵母）など

→アルコール発酵によりエタノールを生成

③細菌による発酵食品：

チーズ、ヨーグルト（乳酸菌）、食酢（酢酸菌）、チーズの熟成（プロピオン菌）、納豆（納豆菌）、糠漬け（乳酸菌、酪酸菌など）、くさや（コリネバクテリウム）、ふなずし、なれずし、魚醤、キムチ（乳酸菌）、阿波番茶、碁石茶（乳酸菌：本発酵）など



韩国の牛乳(左), チェダーチーズ(中央)、キムチ(右)



30年物のさんま
なれずし
(和歌山)



阿波番茶
(徳島)



ふなずし 46
(滋賀)

② 医薬品

抗生物質 → 細菌やカビが生産する

ペニシリン カビ、放線菌

クロラムフェニコール 放線菌

ペプチド抗生物質 細菌

ペニシリウム → ペニシリンG

↓

化学合成誘導体 耐性菌の出現

細菌の細胞壁合成阻害 → 動物細胞にはきかない

アンピシリン（大腸菌）

カルベニシリン（緑膿菌）

5.3 微生物の改良

① 微生物の単離法の改良

特殊環境からの単離の進歩

→ 深海、火山、温泉、両極、永久凍土

培養技術の進歩

→ 好気性・嫌気性、栄養要求性、耐圧、pH、温度

② 突然変異

自然突然変異 → 化学的変異剤
紫外線
X線、放射線
重金属など

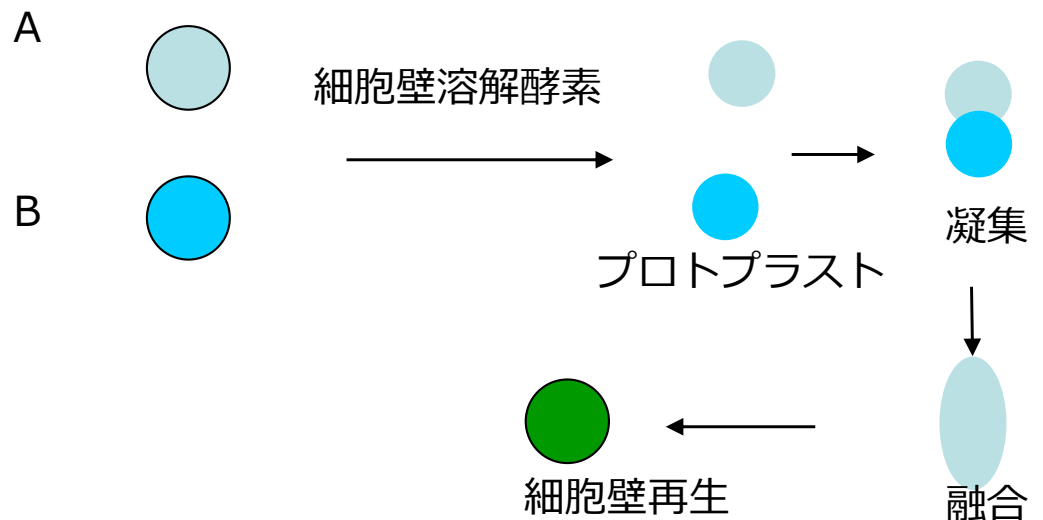
人為的突然変異 → 有効な機能への確率低い

↓

目的の機能を持ったものを選別する

③ 遺伝子組み換えによる改良

細胞融合法—遺伝子が不明、大きすぎるなどの場合
→カビ、酵母などに有効



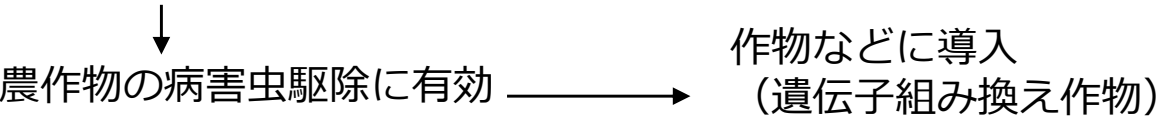
遺伝子がわかっている場合

プラスミドなどで形質転換 → 微生物の性質変化

5.3 微生物の改良

③ 遺伝子組み換えによる改良

Bt毒素 細菌より発見



相同時組み換え、融合型ベクター

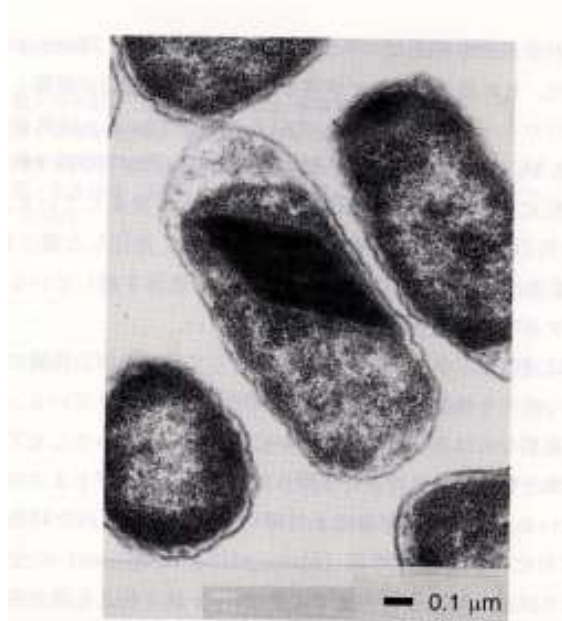
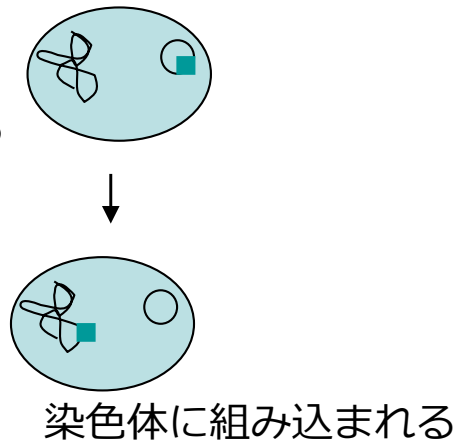
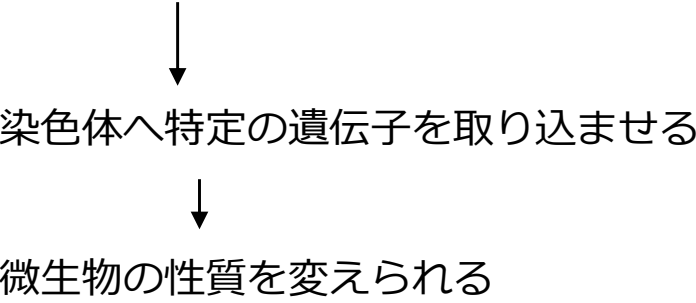


図 6.9 遺伝子工学的手法により有用タンパク質を大量に生産する大腸菌

Bacillus thuringiensis が生産する Bt 毒素タンパク質は、農作物害虫であるコガネムシの幼虫に対して強い殺傷力がある。遺伝子発現系を最適化することにより、大腸菌内に Bt 毒素を結晶するほど高濃度に蓄積させることができる。[資料提供：住友化学中央研究所]

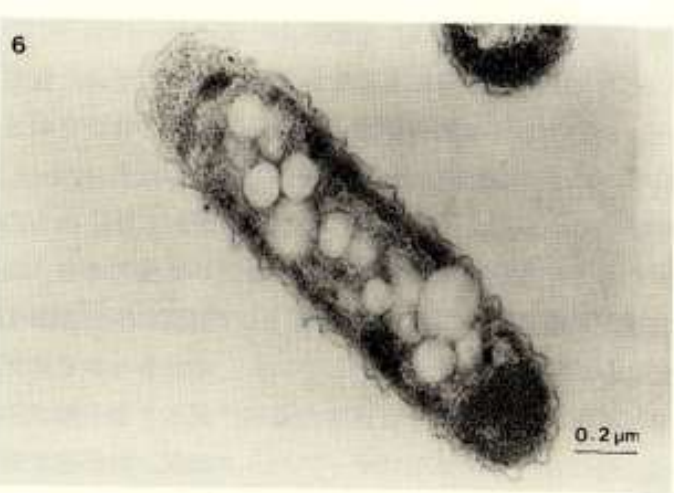


図 6.8 静岡県の油田から分離した石油系炭化水素を分解/合成する細菌 HD-1 株

細胞内には取り込んだ石油成分が油滴として確認できる。細胞表層は疎水性が高く培養中に細胞は凝集しやすい。

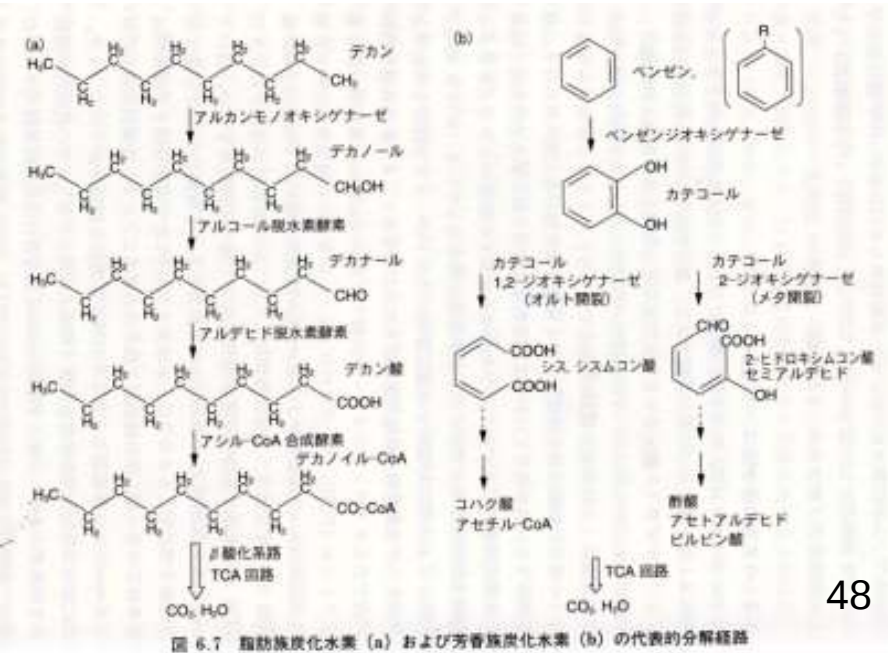
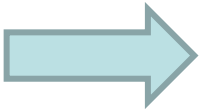


図 6.7 脂肪族炭化水素 (a) および芳香族炭化水素 (b) の代表的分解経路

極限環境微生物 (Extremophiles)

自然界の特殊な環境下に生育する微生物群

好熱性細菌 (Thermophiles)

55°C以上の高温環境で生育可能な細菌

生育環境: 温泉、土壌、堆肥、火山、熱水孔など



好塩性細菌 (Halophiles)

2M以上の塩濃度で生育可能な細菌

生育環境: 塩湖、海水など



好アルカリ性細菌 (Alkaliphiles)

pH9~11のアルカリ性環境で生育可能な細菌

生育環境: 石灰岩、乾燥湖など



好冷性細菌 (Psychrophiles)

15°C以下の低温環境で生育可能な細菌

生育環境: 氷河、雪原、永久凍土など



重金属耐性細菌

重金属に耐性や抵抗性を示す細菌

生育環境: 鉱山、工業廃水など

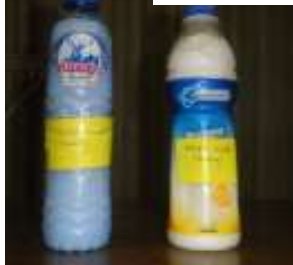


モンゴル国家畜乳および乳製品中の微生物解析と機能性ペプチドの探索

モンゴル国家畜乳および乳製品中の微生物解析と、これらの機能性ペプチドの探索を行っている。(モンゴル健康科学大学化学・生化学学科のMunkhtsetseg 主任と Ichinkhorloo准教授との共同研究)



Horse milk



Camel milk



Cow milk



Goat milk

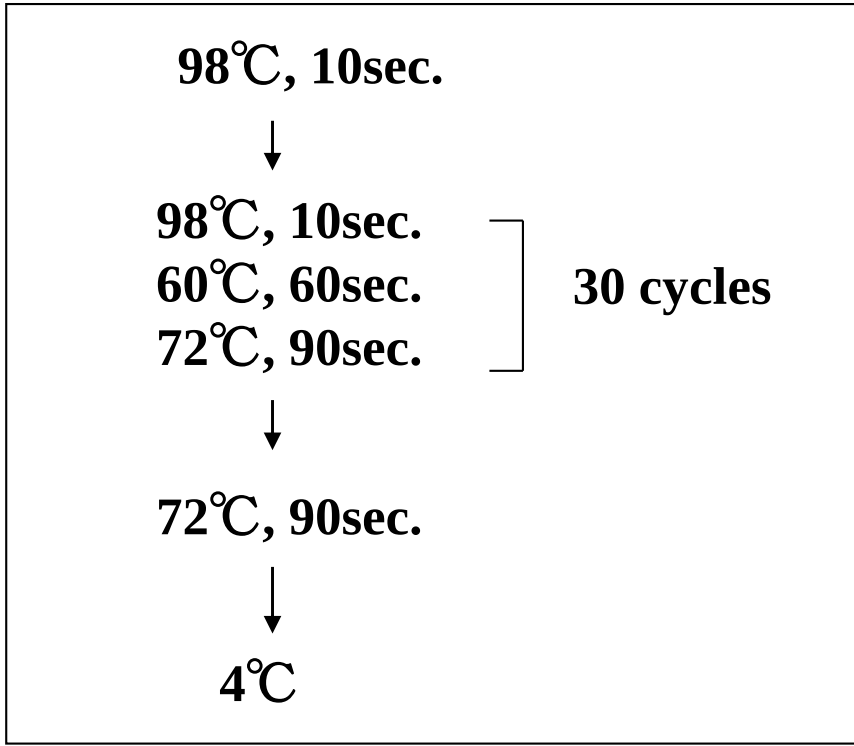
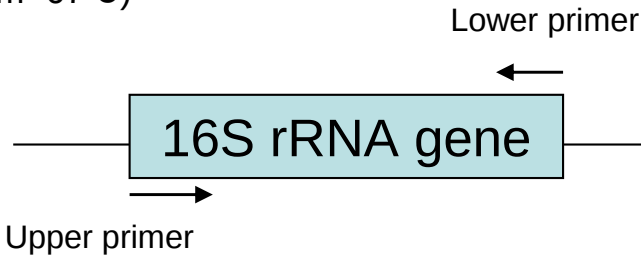


Camel milkのヨーグルト

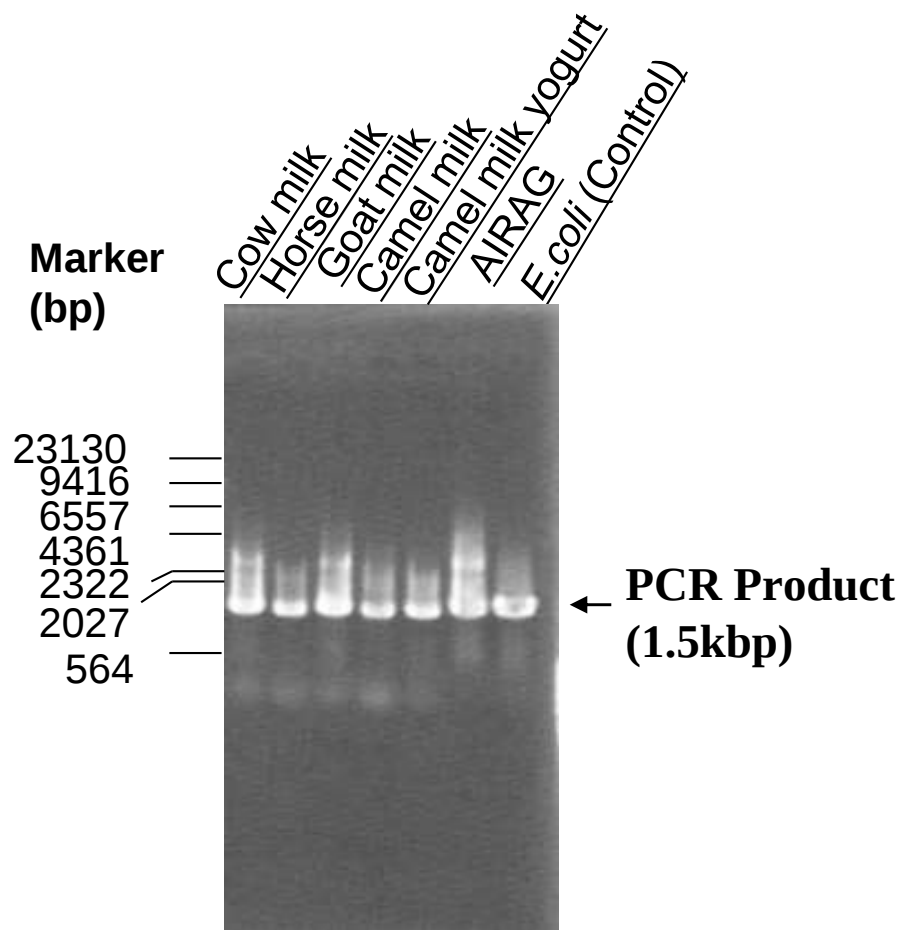
PCR amplification of 16SrRNA genes of bacteria from animal milks and dairy products

Upper primer 5'- ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA -3'
Xba I
(24mer, Tm=53°C)

Lower primer 5'- ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA -3'
Kpn I
(27mer, Tm=67°C)



PCR primers and PCR program



モンゴル乳製品由来細菌 DNA の 16SrRNA遺伝子のPCRによる増幅

We prepared the genomic DNAs from animal milks and dairy products, and then amplified 16SrRNA genes by PCR using PCR primers*.

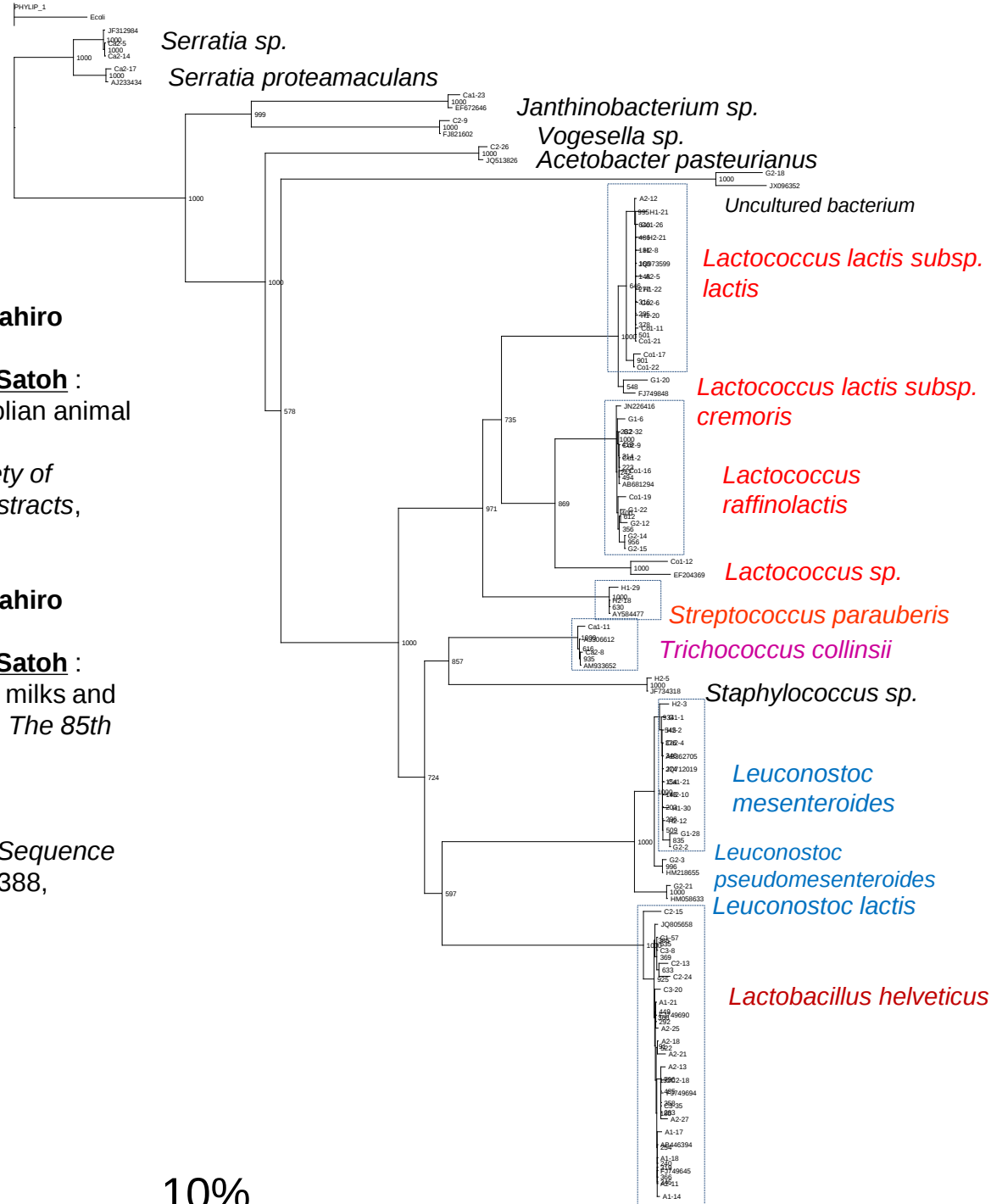
*Beffa, T. et al. (1996) *Appl.Environ. Microbiol.* 62,5,1723-1727

モンゴル乳製品中乳酸菌の 16SrRNA遺伝子による系統樹

Momoko Abe, Yuto Oe, Yousuke Endoh, Masahiro Sakata, Zesem Ichinkhorloo, Janlav Munkhtsetseg, Makoto Ohashi and Takanori Satoh :
16S rRNA gene analysis of bacteria from Mongolian animal milks and their dairy products,
The 28th Annual Meeting of the Japanese Society of Microbial Ecology (JSME2012), Program and abstracts, p.165, Sep. 2012.

Yuto Oe, Momoko Abe, Yousuke Endoh, Masahiro Sakata, Zesem Ichinkhorloo, Janlav Munkhtsetseg, Makoto Ohashi and Takanori Satoh :
Comparison of bacteria in the Mongolian animal milks and their dairy products by 16S rRNA gene analysis, *The 85th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, Abstracts,* Dec. 2012.

DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Database. Accession number AB749360~AB749388, AB750687~AB750724 (67 cases)



The tree was constructed by the neighbor-joining method, and *Escherichia coli* was used as the outgroup. Bootstrap values based on 1000 replications are given at the nodes, and scale bar represents 10% sequence divergence.

吉野川流域の銅鉱山跡に生育する重金属耐性細菌の探索



試料採取地点



黄銅鉱(CuFeS_2)



黄鉄鉱 (FeS_2)

四国の鉱山跡周辺の環境と知見

四国には三波川帯の結晶片岩層の中には含銅硫化鉄鉱の鉱床があって、別子銅山をはじめとして、いくつかは昭和40年代まで採掘されていた。吉野川流域(支流を含む)にも廃銅鉱山が多数あり、廃坑となった今でも金属漏出などが続いていると推定される。しかし、大規模な廃水処理は行われていない。火山帯にあり、硫黄等による酸性化が著しい岩手県松尾鉱山跡周辺などでは大規模な対策が講じられているが、四国ではそのような環境にはないため、早急な対策がなされていないのが現状である。台風などにより大量の土砂が流出した場合、含有金属化合物の漏出も懸念される。

これらの金属漏出等には、鉱山跡採掘滓に生育する重金属に耐性を有した特殊な微生物群の関与が考えられるが、四国における鉱山跡での研究例はほとんどない。

目的

本研究では、吉野川流域鉱山跡採掘滓に生育する重金属耐性微生物の耐性獲得機構と金属漏出作用に関する知見を得ることを最終目的とし、その一環として、鉱山跡採掘滓における重金属耐性微生物の単離・遺伝子解析とその酸化酵素活性の検討を行った。

1.高知県白滝鉱山跡採掘滓からのCu,Fe耐性細菌の探索



高知県大川村の白滝鉱山跡

採掘滓で谷を埋め整地して(写真手前)、その上に住居や学校を作っていました。
がけにも採掘滓が捨てられています。1972年閉山

2.徳島県高越・東山鉱山跡採掘滓からのCu,Fe耐性細菌の探索



徳島県吉野川市(旧山川町)の高越鉱山跡

坑口はふさいであります、排水は行っている。排水施設はない。
排水は茶色で、弱酸性(pH5.3)。1954年閉山



徳島県吉野川市(旧美郷村)の東山鉾山跡

東山鉾山の鉾泉排水。茶色の排水と茶色の堆積物が見られる。
現在では人もほとんど立ち入らない場所にある。

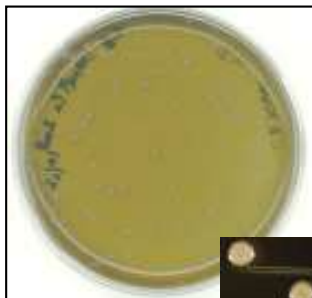
LB/CuSO₄培地



LB/4mM Cu



C1
(LB/4mM Cu)



C2
(LB/4mM Cu)



F47
(LB/6mM Cu)



F56
(LB/6mM Cu)

LB/FeSO₄培地



LB/2mM Fe



C2
(LB/2mM Fe)



C2
(LB/5mM Fe)



F47
(LB/2mM Fe)



F56
(LB/2mM Fe)

CuおよびFe添加LB寒天培地で培養後の変化

F47/LB+2mMFe
F56/LB+2mMFe
LB+2mMFe
LB+2mMCu
C2/LB+2mMCu



培養液の変化

2mMCuSO₄または2mMFeSO₄を含むLB培地(pH7.2)で
30℃,20時間、220rpmで振とう培養を行った。

阿南市阿瀬比石灰鉱山における炭酸塩耐性/形成細菌の探索



四国山地には四国カルストをはじめ大小さまざまな石灰岩地が存在します。阿南市阿瀬比にも大規模な石灰鉱山が存在し、その大理石(石灰岩)は国会議事堂にも使われています。こうした石灰岩の主成分である炭酸カルシウム(CaCO_3)は、その起源として化学反応起源と生物起源のものがあると考えられています。しかし、四国の石灰岩での炭酸カルシウム生成に関与する微生物についての知見はほとんどありません。そこで、阿南市阿瀬比の石灰鉱山土壌に存在する微生物の遺伝子を解析し、また炭酸カルシウムに耐性を示す微生物を探索しています。

Satoh, T. *et al.* (2015) Exploration for calcium carbonate-resistant bacteria from Limestone mine, Anan city, *Proceedings of Awa gakkai*, No.60, p.201-210

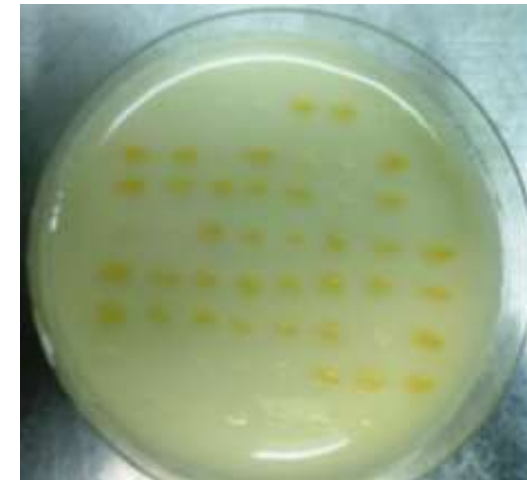
試料採取地点



土壌試料を採取した石灰鉱山の位置
(阿南市阿瀬比町阿利田)



阿瀬比石灰鉱山土壌の細菌
(0.5% CaCO_3 培地)



阿瀬比石灰鉱山土壌の
炭酸カルシウム耐性細菌 58
(10% CaCO_3 培地)

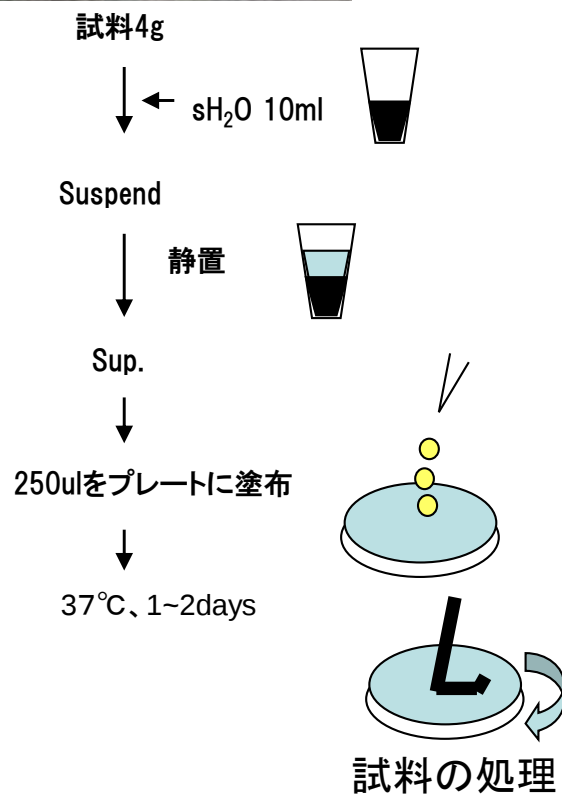
阿南市阿瀬比石灰鉱山における炭酸塩形成に関する細菌の探索



石灰鉱山の試料採取地点



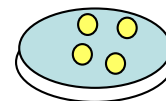
			コロニー数			
土壌試料	形状	pH	1st	2nd	3rd	4th
			screening	screening	screening	screening
			LB/ 0.5%CaCO ₃	0.1×LB/ 5%CaCO ₃	0.1×LB/ 10%CaCO ₃	0.1×LB/ 20%CaCO ₃
1	砂状	9.10	234	119	37	10
2	砂状	9.23	100	29	7	4
3	粘土質	8.70	77	33	8	2
4	粘土質	8.65	54	18	4	3
5	粘土質	8.41	51	27	6	6
合計			516	226	62	25



使用したプレート

・LB/0.5%CaCO₃寒天培地(pH7.0)

LB/0.5%CaCO₃で得られたコロニー

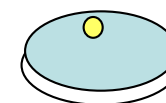


1/10LB+5% CaCO₃で1stスクリーニング

1/10LB+10% CaCO₃で2ndスクリーニング

1/10LB+20% CaCO₃で
3rdスクリーニング

生育可能なサンプルを
分析



No.1 試料採取地点



No.1試料 LB/CaCO₃培地, 37°C, 1day



No.4 試料採取地点 No.4 試料 LB/CaCO₃培地, 37°C, 1day



No.2 試料採取地点



No.2試料 LB/CaCO₃培地, 37°C, 1day



No.5 試料採取地点



No.5 試料 LB/CaCO₃培地, 37°C, 1day



No.3 試料採取地点



No.3試料 LB/CaCO₃培地, 37°C, 1day



2nd Screening(1/10LB+5%CaCO₃)

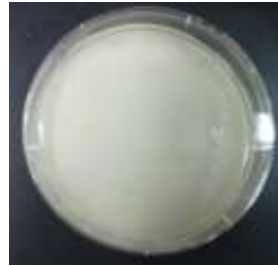
37°C, 1day



Asebi No.1-1



Asebi No.1-2



Asebi No.1-3



Asebi No.1-4/
Asebi No.2-1



Asebi No.2-2



Asebi No.3-1



Asebi No.3-2/
Asebi No.4-1

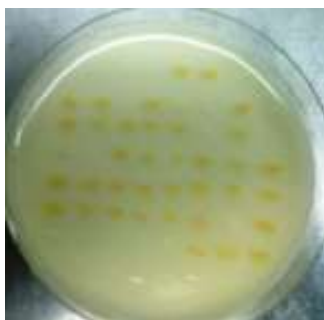


Asebi No.5-1

3rd Screening(1/10LB+10%CaCO₃)



Asebi No.1-1



Asebi No.1-2



Asebi No.2-1 3-1



Asebi No.4-1 5-1



単離した炭酸カルシウム耐性微生物
(ACT059, LB培地)



単離した分泌型炭酸カルシウム耐性微生物 (Asec004, LB培地)

微生物の同定方法（遺伝子解析）

先述の通り、「微生物」の範疇には、真正細菌（原核生物・古細菌）や真核生物（菌類など）が含まれる。形態や特性から、その微生物が何であるのかを同定することは難しい。

一般的に微生物の同定に用いられる手法としては、下記のものがある。

①生理・生化学試験

各種炭素化合物や窒素化合物に対する反応（資化性や酸の形成）

②細胞構成成分による分類

（細胞壁成分、脂質（脂肪酸）、タンパク質などの分析）

③染色体DNAの解析

（特定の遺伝子の塩基配列を調べ、ゲノム情報データベースと照合する）

ここでは、③の方法により、得られた微生物が原核生物か真核生物か、既知のものか未知のものかについて情報を得ることとした。その中でも細菌（原核生物）にターゲットを絞り、原核生物固有の16S rRNA遺伝子（16S rRNA）について、生物は、染色体上の遺伝情報に基づいてタンパク質を作り出すが、そのタンパク質合成装置となるのがリボソームとよばれる巨大なRNA-タンパク質複合体である。細菌の場合、その一部を構成しているのが16S リボソームRNA（16S rRNA）で、これも染色体上の16S rRNA遺伝子（16S rDNAともいう）から作られる。よって、ターゲットの微生物が細菌であれば必ず16S rRNA遺伝子を持つ。

この16S rRNA遺伝子の塩基配列については、現在約70万件のデータベース登録があり、全世界で利用されている。決定した塩基配列のデータベース上の照合は、コンピュータの高速化とインターネットの普及により、現在では簡便に行える。

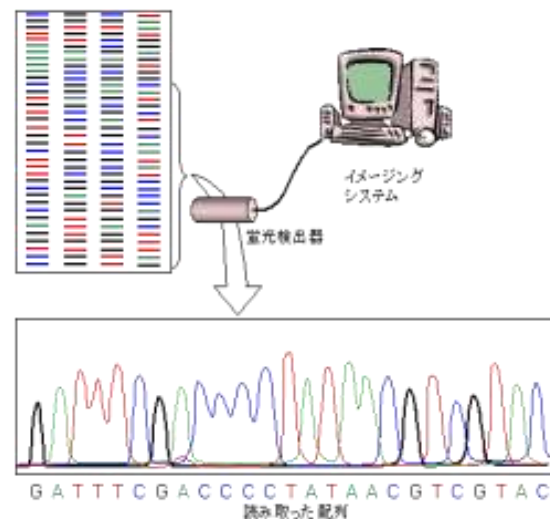
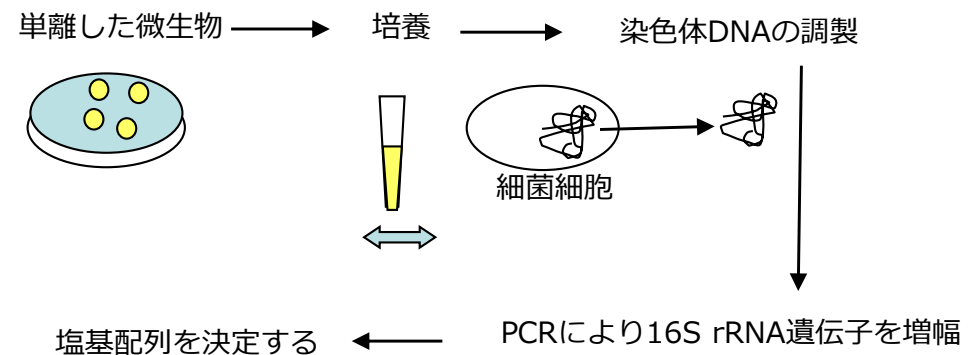
（16S rRNA遺伝子の増幅と解析）

ここで、染色体DNAから16S rRNA遺伝子をどうやって得るかが問題となる。16S rRNA遺伝子の塩基配列の一部は、細菌間で非常に似通っている（保存されている）。この部分を利用して、PCR（核酸連鎖重合反応）により遺伝子の一部を100万倍に増幅することができる。

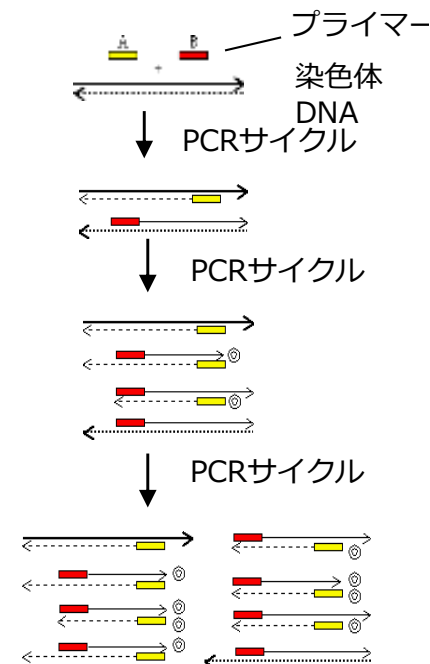
PCRは、例えば犯罪捜査、法鑑定（髪の毛からDNAを抽出し、遺伝子を増幅・解析を行う）や化石などからの生物の同定（映画ジュラシック・パークで有名）で用いられる手法で、微量のDNAを約100万倍に増幅することができる。

このようにして、得られた微生物が細菌であれば、16S rRNA遺伝子がPCRにより増幅でき、塩基配列を解析することができる。この場合、微生物の増殖が遅い、増殖できないなどの場合でも、固体培地で単離したコロニーから微量のDNAが抽出できれば、解析が可能となる。

遺伝子解析の流れ



データベースと照合



PCRサイクル

1. 熱変性
2. プライマー結合
3. プライマー伸長反応

応

単離した炭酸カルシウム耐性細菌の16SrRNA遺伝子解析による菌種の同定

Samples				Identification of bacteria by 16S rRNA sequence			
Isolated bacteria	Determined length (bp) of 16S rRNA gene	DDBJ Accession Number	Sampling point	Identified species	Length (bp) of 16S rRNA gene in database	Accession number	Homology (%)
Asec bacteria							
Asec003	1363	AB987914	4	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1481	KF475871	99.8
Asec004	1362	AB987915	5	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.6
Asec005	1365	AB987916	5	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	1481	KF475871	99.3
ACT bacteria							
ACT001	1362	AB987917	1	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1550	JF682516	99.8
ACT0051	1361	AB987918	1	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.1
ACT0052	1364	AB987919	1	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.6
ACT008	1372	AB987920	1	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	1504	JQ799091	99.9
ACT0091	1362	AB987921	1	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	99.9
ACT0092	1380	AB987922	1	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1478	NR_114207	99.4
ACT010	1372	AB987923	1	<i>Bacillus nanhaiensis</i>	1504	JQ799091	99.8
ACT013	1367	AB987924	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.3
ACT016	1363	AB987925	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.8
ACT031	1343	AB987926	1	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1441	EU086809	99.8
ACT035	1363	AB987927	1	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.7
ACT039	1377	AB987928	2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1557	NR_102499	99.9
ACT041	1372	AB987929	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1539	EU442189	99.6
ACT045	1362	AB987930	2	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.7
ACT048	1346	AB987931	2	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.8
ACT058	1345	AB987932	3	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.7
ACT059	1344	AB987933	3	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	100
ACT060	1344	AB987934	4	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	100
ACT061	1364	AB987935	4	<i>Bacillus indicus</i>	1505	NR_029022	99.7
ACT064	1365	AB987936	4	<i>Bacillus indicus</i>	1502	JX393081	99.7
ACT065	1343	AB987937	5	<i>Arthrobacter aurescens</i>	1441	EU086809	99.9
ACT066	1370	AB987938	5	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	98.4
ACT068	1344	AB987939	5	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.9
ACT071	1343	AB987940	5	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1488	KC934768	99.9
ACT104	1362	AB987941	5	<i>Bacillus cibi</i>	1502	JF772067	99.7

37°C, 1day, 1/10LB+5%CaCO₃



Control



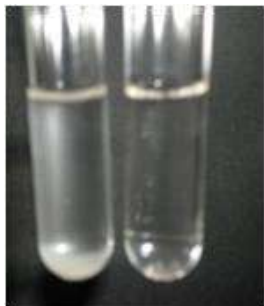
Asebi No.4
分泌白色コロニー



Asebi No.5
分泌白色コロニー



Asec
003 Control



分泌型炭酸カルシウム耐性微生物Asec003の尿
素—カルシウム培地での沈殿生成
(1.5M Urea, 0.5M CaCl₂を含む0.1×LB液体培地)

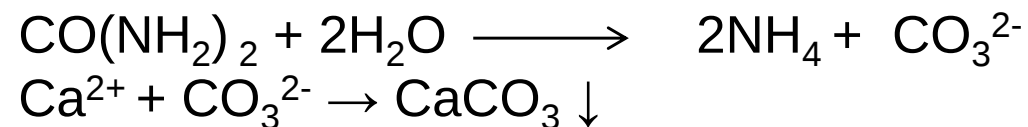
CaCO₃生成実験

1/10LB+1.5M urea, 0.5M CaCl₂

Fukue, M. *et al.* (2011) *Soils and Foundations*, **51**, 1, p.83-93

4°C, 3weeks

Urease



ノーベル賞：医学生理学賞に大村氏ら3人 感染症対策、待ったなし

毎日新聞 2015年10月08日 東京朝刊



2004年にアフリカのオンコセルカ症流行地帯を視察し、現地の人たちと交流する大村智・北里大特別栄誉教授＝大村さん提供

拡大写真

今年のノーベル医学生理学賞は、途上国の感染症の治療に功績があった3人が選ばれた。この背景には、2002～03年の重症急性呼吸器症候群（SARS）や昨年のエボラ出血熱の流行が世界に脅威を与えたように、感染症対策が喫緊の課題になっている現実がある。グローバル化に伴う人の移動の活発化や途上国の都市化は、感染を爆発的に広げる危険があるからだ。

大村智・北里大特別栄誉教授らが特効薬を開発したオンコセルカ症（河川盲目症）やリンパ系フィラリア（象皮病）など17種類の感染症は「見られない熱帯病（NTD）」と呼ばれ、世界保健機関（WHO）によると149カ国で14億人以上が感染している。途上国の貧困層で長く流行し、国内外の経済格差が広がる要因にもなっている。



熱帯地域の多くの人を救ったイベルメクチン（商品名メクチザン）＝MSD提供

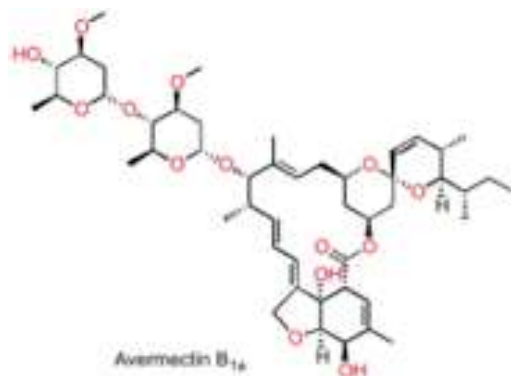
拡大写真

抗生物質の発見から企業と連携しての特効薬開発にまでこぎ着けた大村氏は「異例中の異例で、他にはまねのできない業績」と話す。

96年にHIV（エイズウイルス）感染の有効な治療法ができて以降、市場原理に任せず、非営利組織や官民の基金が投資や買い取り保証で医薬品開発を促す動きも出てきている。12年にはWHOや世界銀行、ビル・ゲイツ氏の財団などが、20年までにNTDの10疾患の制圧を目指すとの声明を発表した。

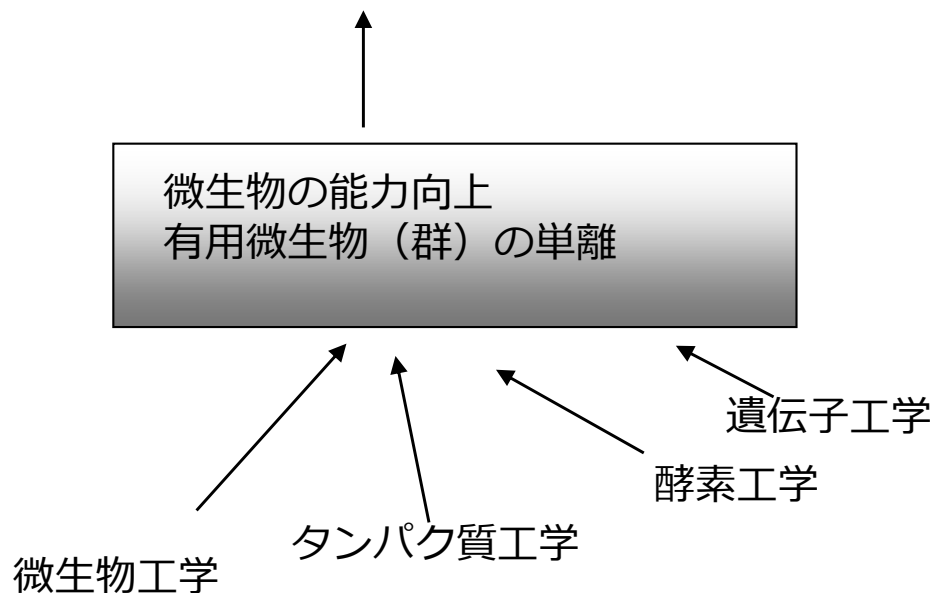


放線菌 (*S. avermectinus*)



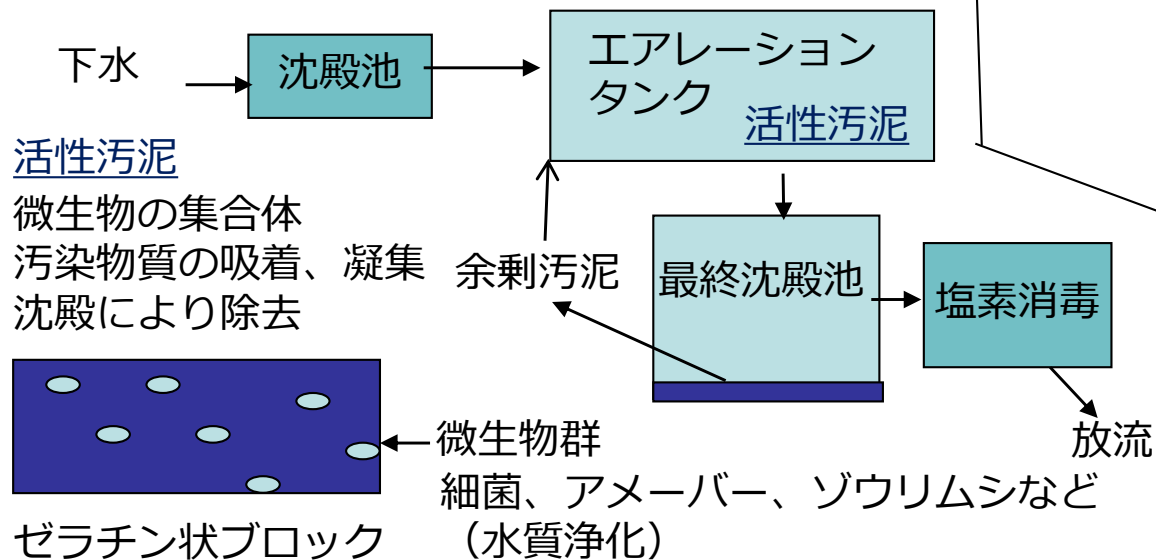
6. 環境工学

生物の浄化能力を利用して、汚染物質を除去

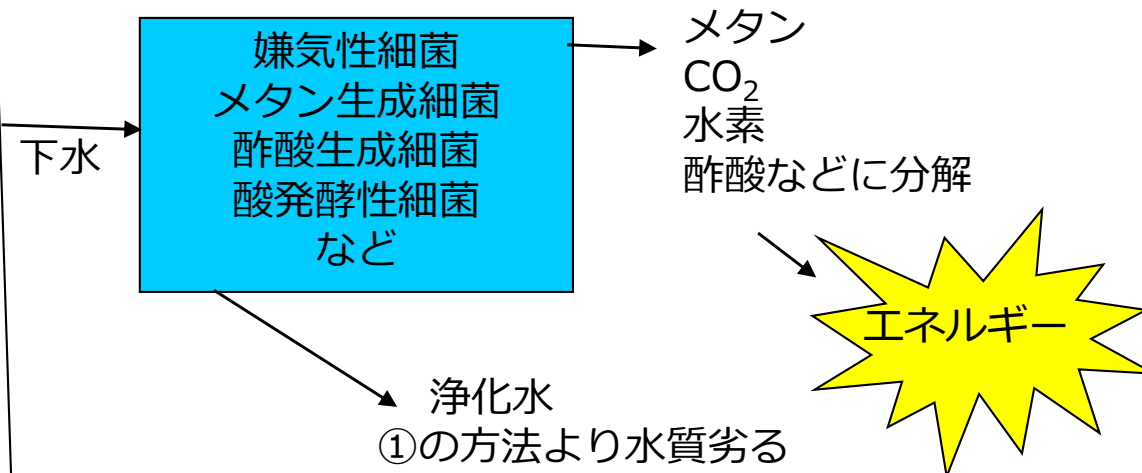


6.1 微生物を利用した廃水処理

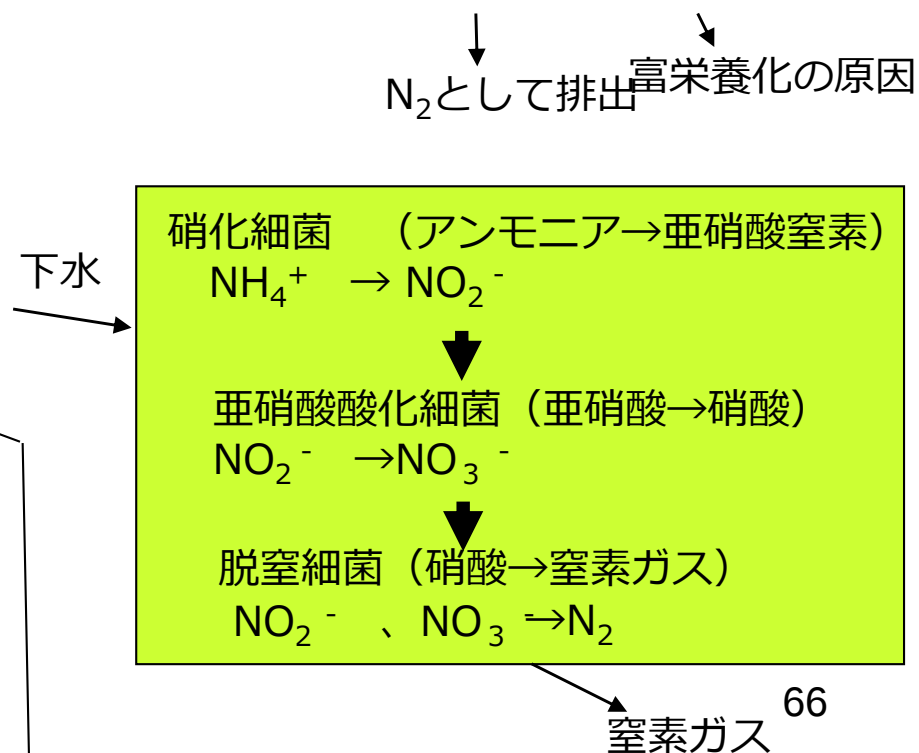
① 活性汚泥法 → 都市下水、工場廃水



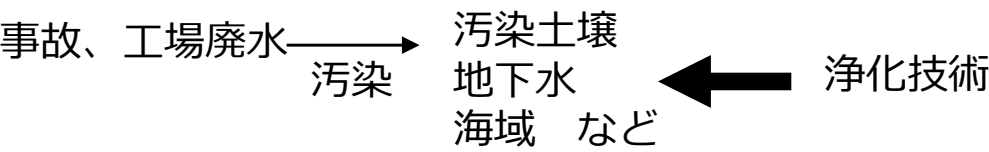
② 嫌気性処理法 → 下水、し尿、有機廃液



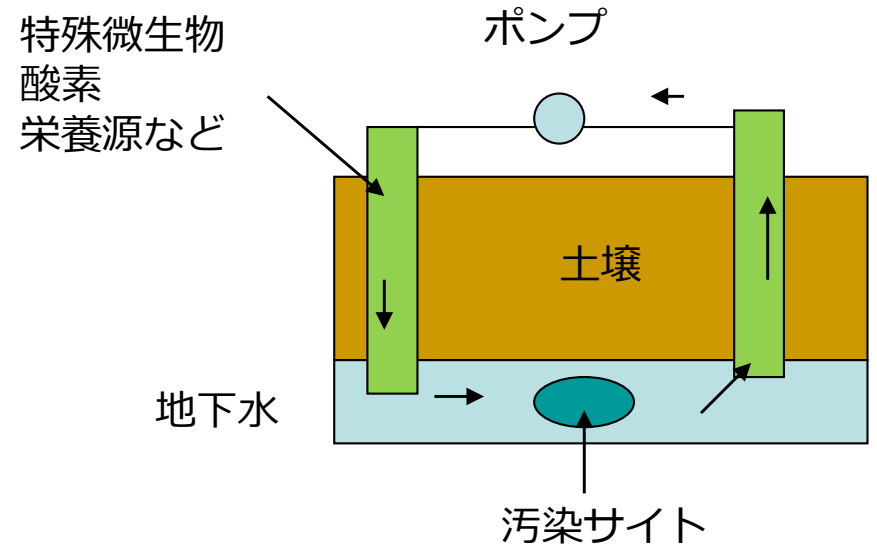
③ 生物学的硝化脱窒法 → 廃水中の窒素化合物の除去



6.2 バイオレメディエーション（生物学的環境修復）

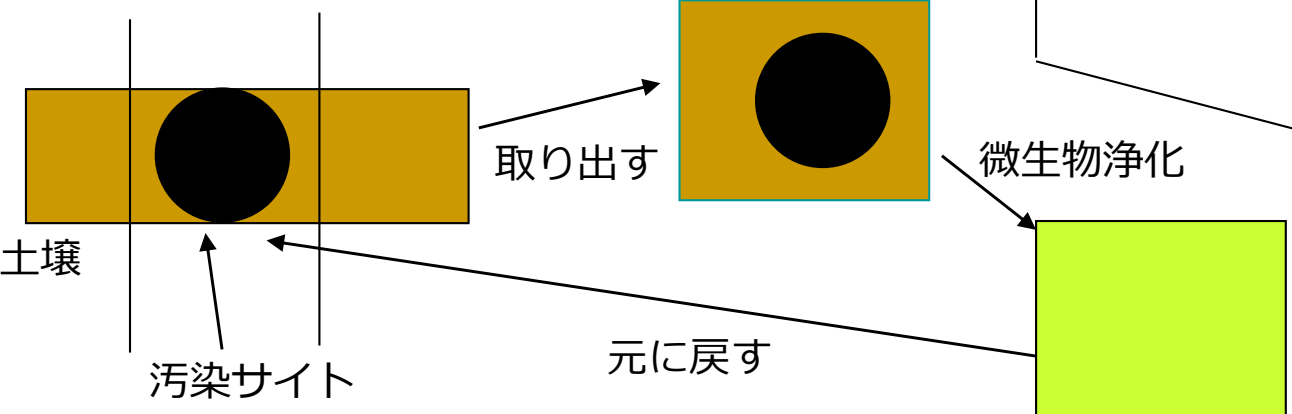


① 原位置バイオレメディエーション
その現場で直接環境修復

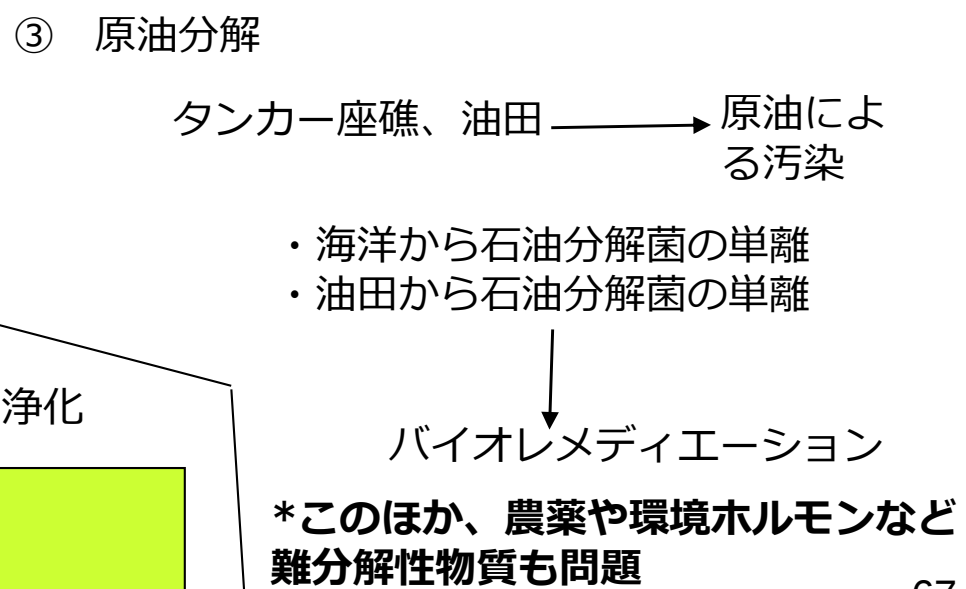
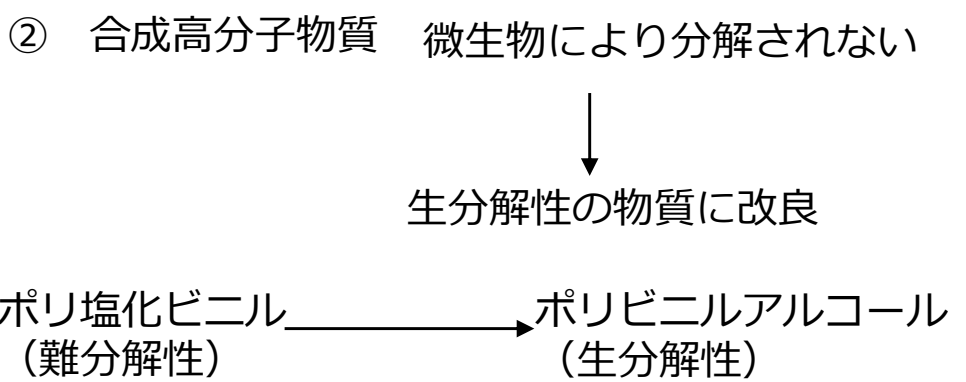
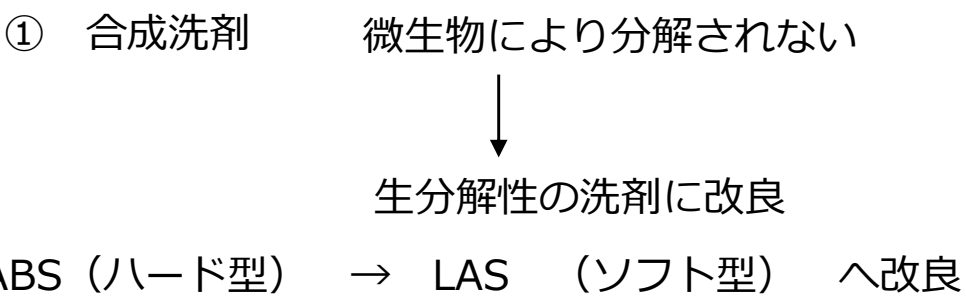


微生物の環境浄化能力を強化 → 低コスト

② 現場バイオレメディエーション



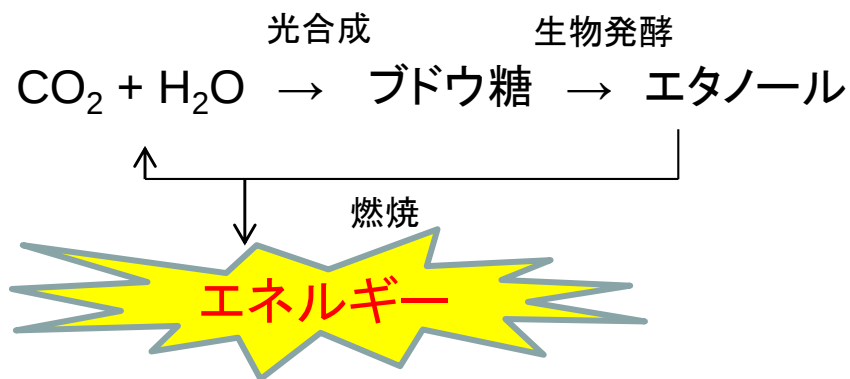
6.3 環境問題と解決法



④ バイオマスエネルギー

大気中のCO₂濃度は0.036%と他の温室効果ガスに比べ圧倒的に多い。そのため、CO₂は地球温暖化に対する影響が最も大きいとされている。1997年の京都議定書では、CO₂発生源の化石燃料エネルギーの使用制限を打ち出した。そこで注目されたのは、バイオマス(動植物などから生まれた生物資源の総称)を用いたバイオ燃料である。

植物はCO₂と水から光合成によりブドウ糖を作る。それを生物発酵させてエタノールを生産し、エネルギー源として使用する。使用後はCO₂と水になるため、CO₂排出が0と算定されるため、クリーンエネルギーとして注目されている。



バイオエタノール

世界で5000万キロリットル生産(2007年)

- ・アメリカ(2400万キロリットル)
- ・ブラジル(1770万キロリットル)

両国ともバイオエタノールの使用が義務づけられている。
ブラジルでは、バイオエタノール100%で車を走らせている。
(CO₂排出ゼロ)

バイオマスの分類 (経産省資源エネルギー庁HP)

	木質系	農業・畜産・水産系	建築廃材系
乾燥系	林地残材 製材廃材	農業残渣 (稲わら・トウモロコシ残渣・ もみ殻・麦わら・バガス) 家畜排泄物 (鶏ふん)	建築廃材
	食品産業系		生活系
湿潤系	食品加工廃棄物 水産加工残渣	家畜排泄物 牛豚ふん尿	下水汚泥 し尿 厨芥ごみ
	製紙工場系		
その他	黒液・廃材 セルロース(古紙)	糖・でんぷん 甘藷 菜種 パーム油(やし)	産業食用油

日本:2030年に600万キロリットルの生産目標
(現在は50万キロリットル程度)

環境省推奨バイオエタノール

・ガソリンとバイオエタノールを混合したもの
E3(バイオエタノールを3%混合)とE10 (同10%混合)がある。

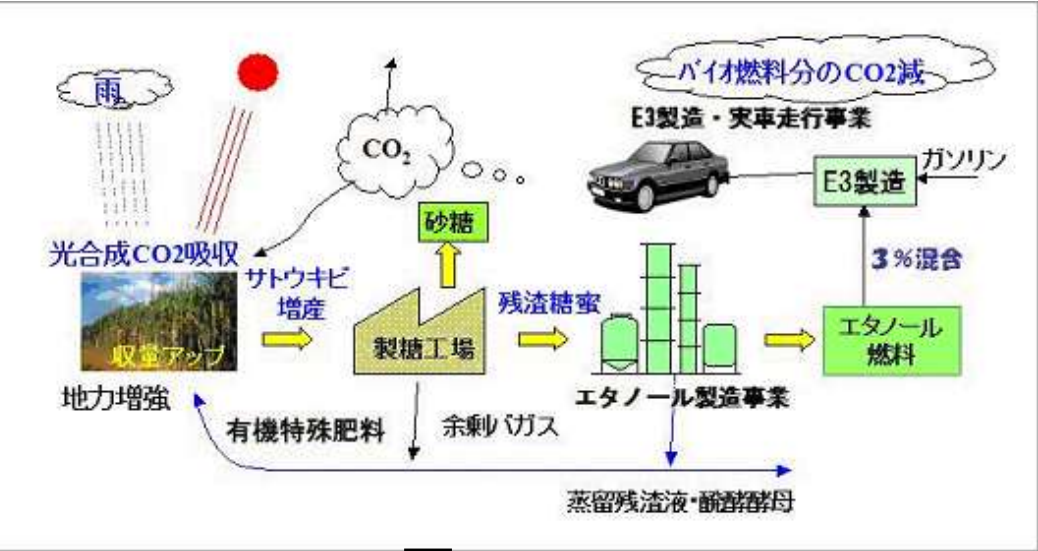
バイオエタノールの原料

- ・規格外の米、小麦、トウモロコシ、サトウキビなど
 - ・食品廃棄物、製材所端材、建築廃材など
- (問題点)

原料供給不足と関連商品の価格高騰を引き起こした。
遺伝子組み換え作物で収量upし、バイオ燃料を大量生産
発展途上国では、密林をトウモロコシ畑にする「緑の破壊」

宮古島バイオエタノールプロジェクト

内閣府・経済産業省・農林水産省・環境省・国土交通省・総務省消防庁の1府5省連携事業として国内産バイオマス原料によるバイオエタノール生産技術の確立と、E3燃料製造・物流・供給の管理体制のもと実車走行まで一貫して技術開発実証を行うわが国初めての事例。



石油元売り会社がE3ガソリンの供給を拒否しているため、普及が進んでいない

その他のバイオエネルギー

①BDF(バイオディーゼル燃料)

英国BP社・米国デュポン社: 食用ではなく干ばつに強いジャトロファ(ナンヨウアブラギリ)をインド・アフリカ・東南アジアで大規模な栽培計画。

廃食用油やパーム油などもBDFの原料として使われる。

林要喜知ほか「生命と環境」三共出版、宮古島バイオエタノールプロジェクトHP(<http://www.bioethanol-miyakojimapj.jp/index.jsp>)

バイオエタノールに加え、バイオブタノールも生産可能になった。

ブタノールはエタノールに比べ蒸発しにくく、ガソリンとも混合しやすい。

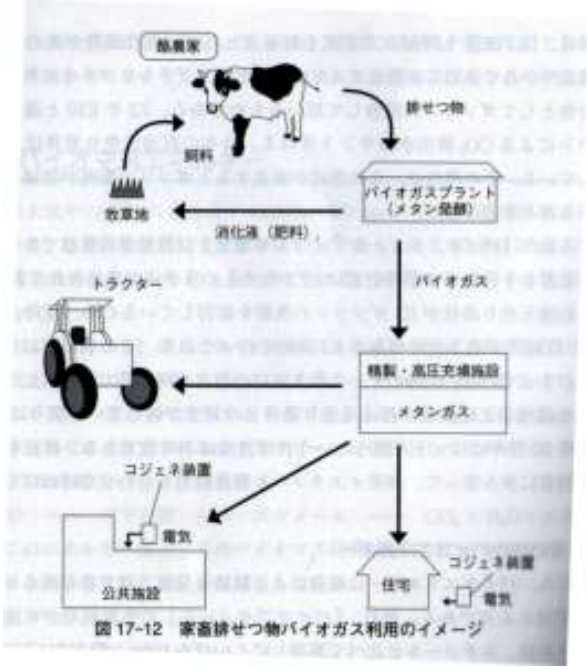
②バイオガス

微生物のメタン発酵菌を利用し家畜排せつ物(糞尿)からメタンガスを取り出す。
(北海道・九州で実証実験)

トラクター燃料や公共施設・一般住宅用の電気や燃料源として温水に利用してコジェネ化。

コージェネレーション(コジェネ):

一つのエネルギー源から電気や熱など二つ以上の有効なエネルギーを取り出して利用するシステム



6.5 バイオソープション

微生物の金属、放射性核種を吸着する能力



有害金属イオン、放射性核種の廃水処理、
鉱山からの金属回収
都市鉱山からのレアメタルの回収の可能性も。。

- 例) スルホロバス属：ヒ素を吸着
- タロマイセス属：ウランを吸着

Topics

原油流出事故とバイオレメディエーション

石油は、各種燃料や化学製品の原材料として、我々の生活に欠かすことができない物質であり、年々消費は増大傾向にあります。石油の産地は地球上で限られた地域にあり、産出国と消費国の間は主に石油タンカーによって海上輸送されています。

そのため、タンカーの事故による石油流出事故は恒常的に起こっている。例えば、1989年のアラスカで起きたエクソン号の原油流出事故では、4万2000Kℓの原油が流出し、プリンスウィリアム湾の海岸が汚染された。また、1997年のナホトカ号の日本海での座礁事故では、6240kℓの原油が流出、広く日本海沿岸の府県に漂着し、沿岸の経済、生態系に甚大な被害をもたらした。タンカー事故の他にも、1991年の湾岸戦争による油田破壊により、大量の原油がアラビア湾に流出し、生態系などに重要な影響を及ぼした。これらの被害は、流出石油汚染の除去技術開発の必要性を浮き彫りにさせた。

このような石油汚染に対して、石油中の揮発性の成分は蒸発するが、残り40-60%の成分は何らかの作用により分解される。その大半は環境中に存在する微生物の作用と言われている。こうした石油汚染に対して講じられている対策が、微生物を用いたバイオレメディエーション（生物学的修復）である。微生物を活用したバイオレメディエーションは、微生物の活用の仕方によって2つに分類されます。

1. バイオスティミュレーション

土壌1g中には約1億匹もの土壌微生物が生息しているので、この微生物を活性化させて、環境浄化を図るものです。具体的には、汚染した土壌・地下水に窒素、リンなどの無機栄養塩類、メタン、堆肥などの有機物、さらに空気や過酸化水素を導入し、現場に生息している微生物を増殖させて浄化活性を高めます。

2. バイオオーグメンテーション

汚染現場に微生物がない場合に、培養した微生物を導入して浄化する方法です。汚染物質の種類、汚染の濃度や広がり具合、土壌の種類、現場での水の流れなどを把握し、適切な微生物を導入します。また、微生物の分解能力が低い場合には、遺伝子組み換え技術によって、より強力な分解菌をつくることもできると考えられます。先のアラスカでのエクソン号事故では、1889-1992年の米環境保護局とエクソン社の共同研究で、栄養塩散布による石油汚染のバイオレメディエーション実験が行われた。親油性の液体肥料などを散布した海浜では、散布しない海浜に比べ、3-5倍の石油分解速度の向上が見られた。しかしこれには、この親油性液体肥料による、石油を海水中に可溶化する作用が影響しているのではないかという見方もある。

1997年のナホトカ号の事故では、座礁したナホトカ号が福井沖に漂流し、甚大な漁業被害をもたらした。海岸の石や砂には大量の原油が漂着し、そのままでは元の状態に戻るのには長い年月がかかっても不可能と思われた。浜と漁師を救ったのは、バケツとひしゃくで重油を掬いつづけた30万人に及ぶボランティア。「善意が奇跡を起こした」と世界中で報道されたこの快挙の陰には、ボランティアをまとめるために奔走した地元の青年たちの姿があった（NHKプロジェクトXより）。しかし、この事例では、主には油処理剤が用いられ、本格的なバイオレメディエーションは実施されませんでした（実証実験のみ）。バイオレメディエーションは、特にトリクロロエチレンに対しては最も有効といわれます。しかし、生態系への悪影響を懸念する声もあり、安全性の確認と社会のコンセンサスを得ることが、重要な課題であったためです。現在でも、このような大規模な原油流出事故が生じた際、大規模なバイオレメディエーションが行えるかは検討段階です。事実、2010年5月に起きたアメリカ・メキシコ湾で起きている大規模な原油流出事故は史上最大と言われ、現在対策が急がれています。

参考文献；微生物利用の大展開(NTS),環境省HPなど

メキシコ湾原油流出事故

2010年4月20日。この日、ルイジアナ州ベニス沖にある英国BP社の原油掘削施設「ディープウォーター・ホライズン」において、大規模な暴噴事故が発生し、噴出した油が爆発を起こします。この爆発事故により、そこにいた126名のうち11名が行方不明となります。

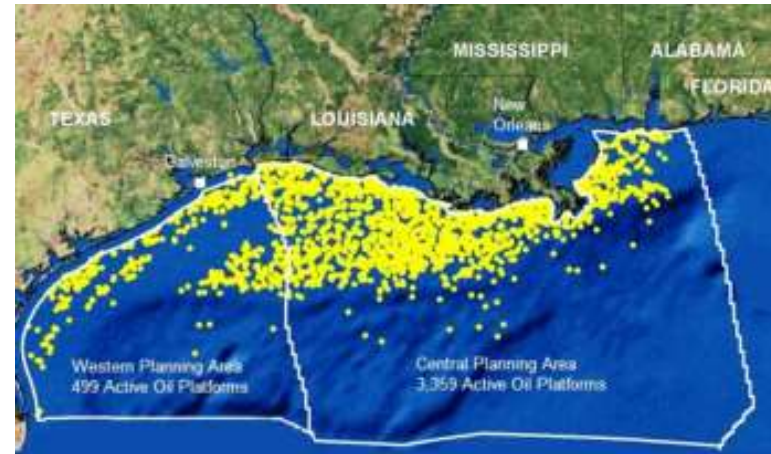
そして掘削施設は二日間燃え続け、22日に沈没しました。しかし、掘削施設沈没後も海底にはパイプが残り、その破損箇所などから原油の流出が続き、それがメキシコ湾一面に広がります。

流出した原油は4月30日には200km、幅120kmに達し、一部はアメリカの沿岸でも確認されることとなります。そのため、ルイジアナ州、アラバマ州、フロリダ州、ミシシッピ州の4州で非常事態宣言が発令されました。

その後も流出は止まらず、当初一日5000バーレル（1バーレルは約159リットル）とみなされていた流出量は、およそ1日あたり12000から19000バーレルと推定されるようになります。このまま流出が続いた場合、メキシコ湾どころか海流によって他の地域にも原油が流れ、世界の生態系に重大な影響を及ぼすことが懸念されましたが、7月15日にキャップを設置することが出来、なんとか流出を止めることが出来ました。

そこまでの総流出量は約78万キロリットル。1989年の米史上最悪と言われたアラスカ沖原油流出事故や、1991年の湾岸戦争時に、イラクの悪事としてたびたびメディアでアピールされた原油流出をしのぐ、最悪の原油流出事故となりました。

(TimeSteps記事より引用)



原油が拡散した海域



原油流出事故の消火作業



流出事故で生態系に影響が

細菌を利用した廃坑の廃水処理（岩手県旧松尾鉱山の事例）

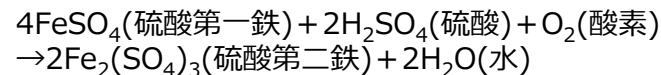
旧松尾鉱山は、北上川の支流の一つ赤川の上流、八幡平の中腹に位置しており、硫黄の生産により一時は「雲上の樂園」と呼ばれ隆盛を極めました。重油脱硫による安い回収硫黄が出回るなどして経営が悪化し、昭和47年に鉱業権を放棄し事実上閉山しました。この鉱山から大量の強酸性水が赤川に流入し、北上川を汚濁していたため、大きな社会問題となっていました。このような状況の中で、岩手県議会は昭和46年7月「北上川水質汚濁防止の恒久対策の樹立」を国に請願しました。これを受けて国は、同年11月に林野庁、通商産業省、建設省、自治省、環境庁で構成される「北上川水質汚濁対策各省連絡会議」、いわゆる五省庁会議を設置し対策の検討が進められました。

（岩手県HPより）
廃水処理過程

1. 酸化槽での細菌による二価鉄の酸化

坑廃水中は酸化槽に運ばれ、含まれる2価鉄（ Fe^{2+} ）を3価鉄（ Fe^{3+} ）に酸化します。濃縮された鉄酸化バクテリアの作用により、次の反応が行われます。

<反応式>



また、バクテリアのキャリア（着床担体）には、中和反応によって発生した鉄澱物を利用しています。

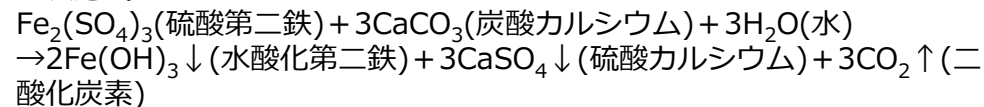
2. バクテリア回収槽

バクテリアの吸着した鉄澱物を凝集、沈殿させて、酸化槽へ繰り返します。

3. 中和槽

生成した硫酸第二鉄を炭酸カルシウムによって、中和します。水溶液状の炭酸カルシウムを添加し、空気を吹き込み攪拌しながら中和しています。

<反応式>



この中和反応により、多量の鉄澱物が発生します。

4. 固液分離槽

中和槽で発生した澱物と上澄水を分離します。

沈殿を促進するために、高分子凝集剤を添加しています。

凝集、沈殿した澱物は、貯泥ダムへ送ります。また、上澄水は赤川へ放流しています。



1. 酸化槽での細菌による二価鉄の酸化



2. バクテリア回収槽



3. 中和槽



4. 固液分離槽

(鉄酸化細菌による二価鉄の酸化)

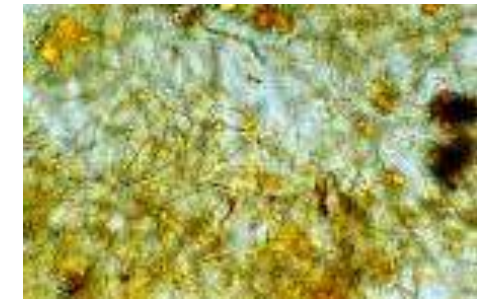
(ii) 中性鉄酸化細菌 (中性で作用、嫌気性)

(例) *Gallionella ferruginea*

中性付近で二価鉄を三価鉄に酸化する。
中性・アルカリ性では、鉄は自然に酸化するが、
嫌気的な環境で生育し、酸化されていない二価鉄を
利用する。



Acidithiobacillus 属

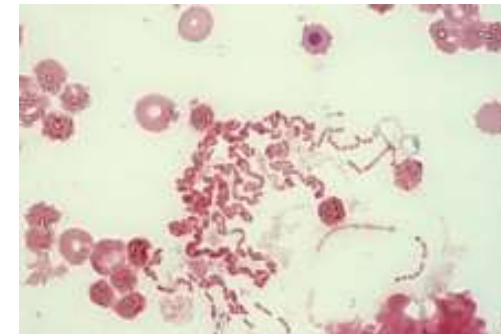
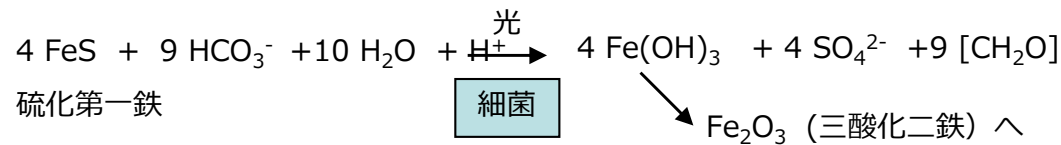
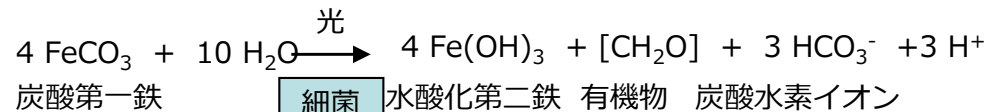


*Gallionella*属

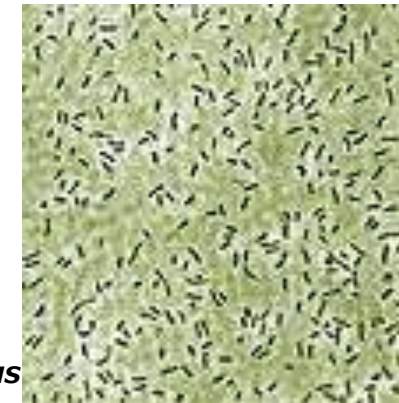
(iii) 光合成細菌 (嫌気性)

(例) 紅色細菌, 緑色硫黄細菌

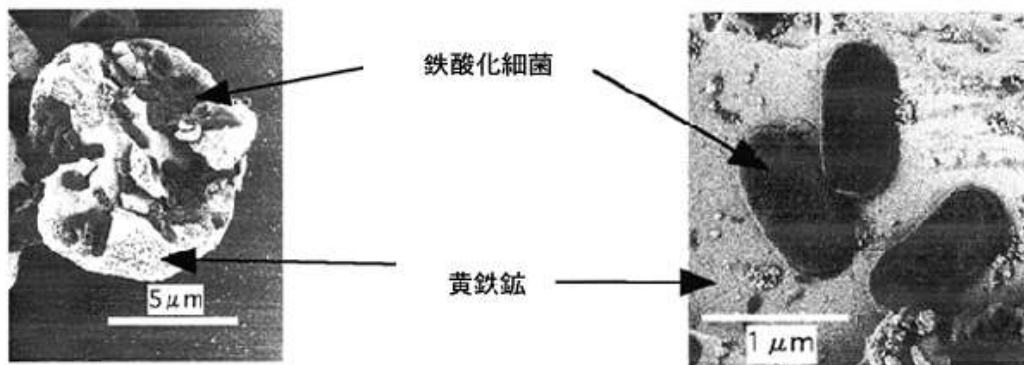
光のエネルギーを利用して、二価鉄化合物 (炭酸第一鉄、硫化第一鉄) から水酸化第二鉄と有機物を作る。



紅色細菌 *Rhodospirillum rubrum*



緑色硫黄細菌 *Chlorobium*属



黄鉄鉱に付着する鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus* 属 (SEM写真)



水酸化第二鉄

シアンobacteria



縞状鉄鉱石
オーストラリア産
(酸化鉄を含む)

今から約27億年前、当時の海には多くの鉄分が溶け込んでおりました。そこに、酸素を作り出すシアノバクテリアが誕生し、海中の鉄分を酸化させ酸化鉄を作り始めます。そしてその酸化鉄は海底に沈殿・固化し、写真のような鉄鉱石が出来たのです

鉱山と鉱毒対策 ～徳島県の事例～

徳島県には大きな金属鉱床はないが、三波川帯の結晶片岩層の中には含銅硫化鉄鉱の鉱床があって、そのいくつかは昭和40年代まで採掘されていた。中でも麻植郡山川町の高越鉱山は藩政時代から採掘され、明治初年に優秀な鉱床が発見されて規模が拡大した。（岩崎正夫編：徳島の自然・地質による）大正年代にはすでに鉱毒が問題となっており、鉱山排水や廃石の風化等による河川水の汚染、灌漑水の酸性化、重金属流入の被害が発生していたようである。

鉱害対策試験として記録に残されているのは大正9年からである。現地では麻植郡川田村で大正9年と10年に酸性土壌改良作委託栽培を麦作で実施し、肥料、土壌改良資材による改善効果を調べた。大正12年と13年には麦の委託試験を川田村川俣普通水利組合に委託して、山瀬町青木、川田村麦原、川田村旗見で実施した。大正12年度業務工程には「該試験八川俣普通水利組合地域八鉱毒目ツ強酸性土壌ナルヲ以テ其ノ矯正ノ目的ヲ以テ本年度麦作ヨリ試験二着手ス」とある。この試験で石灰を50～150貫施用した区は改善効果が認められている。場内では大正11年から14年まで貴金属有害量検定試験としてポットに植付けた水稻に0.005～0.05%の濃度で銅、亜鉛、鉛、ひ素を処理し、各成分について濃度と被害症状との関係を調査した。麦作についても大正14年度に同様のポット試験を実施している。これらの試験以降、第2次大戦が終るまで、調査・研究の記録はない。

昭和10年ごろから板野郡大津村を中心にナシ園を水田に転換するものが多かったが、梨園跡の水田では稲の生育が不良であった。昭和12年これの対策を検討した結果、原因は長年にわたって散布され蓄積したひ素が水田状態で可溶化し被害が発生したもので畑状態では被害は出ないことが明らかにされた。対策は土壌の乾燥（酸化）、イオウ華等の施用、堆厩肥の施用、金肥による窒素量を減量するとともにリン酸、カリを増施することとした。

大戦末期から戦後にかけて盛んにナシ園の水田転換が行われ、同様の生育障害が発生した。昭和28年ごろから31年ごろまで北島町などで、深耕、石灰施用等、二・三の対策試験が実施されたが見るべき成果はあがらなかった。

昭和24年度に低位生産地改良に関する調査の一つとして、銅による作物被害調査を鉱山のあった三庄村の19haについて実施した。

昭和40年代にはいって全国的に公害が社会問題となり、昭和45年12月の第64臨時国会（いわゆる公害国会）では多くの公害対策関係の法律が制定あるいは改正され整備された。昭和46年度には農地用地の土壌汚染防止に関する法律に基づき土壌保全対策調査事業（農林省補助事業）の中で土壌汚染に関する調査が始められ農芸化学科が担当した。昭和50年度からは新設の環境科が業務をひきついた。

土壌汚染調査では土壌、作物体中の重金属の濃度を把握するための土壌汚染概況調査を行った後、玄米中カドミウム1.0ppm、水田土壌中銅125ppm、ひ素15ppmの基準値を越える地点があれば細密調査ののち対策調査を行うことになっている。本県でも県下45定点（水田35地点、樹園地7地点、畑3地点）の土壌、作物体、かんがい水を対象にカドミウ

調査を行った。幸い本県ではどの調査年次も基準値を越える地点はなかった。データの集積できた昭和49年度からは45定点を1年に1/3ずつ3か年で調査することになった。昭和54年度からは土壌環境基礎調査の中の重要定点として、他の一般分析項目に加えて重金属を調査している。昭和49年度には重金属による土壌汚染のおそれのある休廃止鉱山周辺の農用地を調査することになり、三好鉱山（三加茂町）、釜脇鉱山（一字村、貞光町）、高越鉱山（山川町）、広石鉱山（神山町）、東山本鉱山（美郷村）の5鉱山周辺の農用地、玄米、河川水について分析調査を行った。

これらの事業とは別に昭和46年度に国および県耕地課の依頼により、水質汚濁対策調査として鉱山からの廃水等の流入する河川の流域農用地における重金属の影響の有無を山川町で調査した。

土壌汚染対策関係分析機器として昭和46年原子吸光光度計を農林省補助により設置、昭和51年3月には低温灰化装置、恒温水平振とう器が環境庁の補助により設置された。

（徳島県立農林水産総合技術センター 農業研究所HPより）

四国の鉱山跡周辺の環境に対する知見と現代GP

徳島県では、高越（こうつ）鉱山跡などで調査を行っているが、鉱山跡周辺の現状は下記の写真の通りである。他にも吉野川流域（支流を含む）には廃鉱山が多数あり、廃坑となった今でも金属漏出などが続いていると推定される。しかし、前述の松尾鉱山跡のような大規模な処理は行われていない。理由としては、松尾鉱山跡周辺は火山帯にあり、硫黄等による酸性化が著しいことから大規模な対策が講じられているが、四国ではそのような環境にはないため、早急な対策がなされていないのが現状である。台風などにより大量の土砂が流出した場合、含有金属化合物の漏出も懸念される。

四国の鉱山跡周辺の環境に関しては、地質学的な調査が中心であり、今回の高知県白滝鉱山跡の汚染状況についても、若干の分析例はあるものの、重金属分析に関する研究例は少ない。さらに、先述の通り、これらの金属漏出等には、鉱山跡採掘滓に生育する、重金属に耐性を有した特殊な微生物群の関与が考えられるが、四国での研究例はほとんどない。



徳島県高越鉱山本坑跡
（廃水処理施設はあるらしい）

そこで生命・環境コース生物化学研究室では、現代GPの一環として、白滝鉱山跡周辺土壌（採掘滓）に生育する特殊な環境微生物に関して情報や知見を得ることを目的に、昨年度から調査・研究を行っている。

（H19.徳島大学学長裁量経費（研究）により実施した）

豊島(てしま)の産廃不法投棄による環境汚染



豊島総合観光開発(以下、豊島開発)という業者が、島の西、海岸に面したはげ山に近い突端部で、土砂採取をしていた。所有地は広さ約三〇禰。その採取跡地に、有害産業廃棄物を投棄することを思いつく。豊島開発は、投棄場の建物の建設申請を香川県に提出した。豊島住民は反対の陳情をしたが、県は「業者にも生活権がある。豊島には産廃投棄場所が必要」と、住民の訴えに耳を貸さなかった。

やがて豊島開発は「無害なゴミでミズを養殖する」を表向きに、県の許可を取りつけ、兵庫などからチューブ片、シュレッダーダスト、有害な産業廃水などありとあらゆる産廃を専用フェリーやダンプで運び込み、野焼きを始めた。

その影響で豊島小学校では、全校生徒の九・六%がぜん息患者という事態まで起きた。全国平均の数倍の発生率だ。しかし野焼きとの因果関係を証明できず、泣き寝入りを余儀なくされた。

九一年七月、産業廃棄物処理法違反で、Mに懲役七月、執行猶予五年、罰金五万円の判決が出た。しかしこの判決後も、香川県は頑固に行政責任を認めようとしなかった。住民への損害賠償と撤去の責任が発生するのを恐れたからだ。

香川県との最終合意は、二〇〇〇年六月に実現した。県は謝罪を明記した。しかし、損害賠償は一切しない。廃棄物は豊島の隣の香川県直島・三菱マテリアルに運んで焼却、溶融処理して副成物を再生利用する、という内容だった。

いま、瀬戸内海に流出していた産廃現場の廃液は遮蔽壁によって防止され、ドス黒く汚れていた付近の海面に、藻やシオマネキなどの生き物がよみがえった。地下にたまった汚水はポンプアップして高度廃水処理施設で洗浄後、放流される。

産廃投棄現場には、巨大な中間保管・梱包施設が建つ。ここで、汚染した産廃土壌からコンクリート片や岩石を取り除いて洗浄し、タイヤなどは細かく切断、有蓋ダンプトラックに積み込み、フェリー型専用船(九九四禰)で約五礫離れた直島に運ぶ。

香川県環境センター中間処理施設は、三菱マテリアルの直島精錬所内にある。ここで一三〇〇度の高温で焼却、溶融処理し、できた飛灰(燃えかすの一種。形状、色はコーヒークリープに似る)を水と混ぜ、泥状にしてパイプラインでつながる精錬所の鋼精錬工程で回収する。

産廃投棄現場は白いシートで覆われ、汚染された土砂をブルドーザーが採取している。左上に中間保管・梱包施設が見える

中間保管・梱包施設

高度排水処理施設



文・中庭克之(フリーライター)

写真・大野智久(岡山民報編集長)

いつでも元気 2004.12 No.158より引用