

高等学校生物科目において酵素の基質特異性を学ぶための 新しい思考実験方法に関する研究

Studies on the Development of New Method of Thought Experiment
for Learning on the Substrate Specificity of Enzymes
in Upper Secondary School Biology Class

西野 秀 昭

田 仲 里 音

Hideaki NISHINO

Rio TANAKA

福岡教育大学・教職実践研究ユニット(理科) 九州産業大学附属九州産業高校

(令和4年9月26日受付, 令和4年12月20日受理)

要 約

本研究は, 高等学校生物科目において, 酵素の基質特異性を科学的に探究するのに役立つ, 新しい「思考実験方法」の提案を行うものである。酵素の基質特異性に関しては高校生物科目の教科書では, タンパク質分解酵素はタンパク質のみを分解する, というように, かなりおおざっぱに記載され, 酵素の基質特異性がかなり厳密なものであることを高校生が実感をもって学ぶことができず, 酵素の基質特異性が, どのような構造に由来するのか, 等の疑問を持ち, 探究する態度を育むにも困難がある現状がある。そこで探究活動で実施可能な新しい実験方法の導入が必要であるが, このような分子生物学や生化学の実験の実施となると, 高校では設備や予算, 時間等の不足などのため実施困難となる可能性も考えられる。そこで, 酵素の基質特異性の厳密さを生徒が実感できることを目的に, 生徒自身が観察・実験を実施しなくても, 生徒の予想に基づいた「思考」実験に対して, 教師が予め準備した検証実験結果の提示によって, 酵素の基質特異性の厳密さを実感できる授業が可能と考えられる授業内容の流れの例を, 本研究で構築することとした。

キーワード 酵素, 基質特異性, 高等学校, 観察・実験, 生物, 思考実験

1 目 的

高等学校の生物(4単位)の「酵素としてはたらくタンパク質」の単元では, 「酵素は, どのような特徴をもつのだろうか?」という課題がある。ここでは最初にまず, 「基質特異性」が採り上げられている(例えば, 浅島他, 2019; 本川他, 2019; 庄野他, 2019)。この基質特異性を観察する実験の一例として, 制限酵素の認識部位の塩基の一部を, 回文構造を保ちながら置き換えた(すなわち, 変異を導入した)基質への制限酵素の作用を観察することで示せる事が既に報告されている(西野, 2021)。また, ある同一の制限酵素部位を持つが, 異なるプラスミドDNAを2種類用い, 競争的阻害現象の観察・実験を通じて基質特異性を学ぶことの可能性が示されている(西野他, 2022)。

本研究では, 基質特異性が厳密なものであることを学べる教材として, 尿素分解酵素ウレアーゼがウレアは分解するが, ウレアの炭素を硫黄に置き換えただけのチオウレアは分解できない事を例に酵素の基質特異性の厳密さの例を示している先行研究(西野, 2021; 西野他, 2022)と同様に, 高校生物科目の教科書に既に採り上げられている「制限酵素」の基質特異性, 即ち特定の塩基配列のみを認識して切断(加水分解)する, に着目した。この制限酵素の認識配列を使って, 部位特異的変異導入による塩基配列を一部変えた配列

に対する酵素の認識の変化を観察する仮説検証の探究活動，そしてそのような実験準備のための大学等の高等教育機関等（研究所等含む）との連携が既に提案されている（西野，2021；西野他，2022）。しかし本研究では，思考実験で対応可能な方法を提案した。即ち，Microsoft Word 文書の検索機能を用い，まず部位特異的変異導入計画と同じ塩基配列を対象の DNA に見いだす。しかし，実際の実験データを見ると，そのような塩基配列においては切断が起きていないことから酵素の基質特異性の厳密さを実感するものである。このような探究活動であれば，50 分ほどの授業時間のうち 10～15 分ほどで実施が可能と考えられ，探究活動と同等の効果を授業時間内に導入することが可能になると考えられる。ちなみに，本研究における「思考実験」は，「単純化された装置その他の条件を想定し，そこでおこると考えられる現象を理論にもとづいて思想的に追求すること。現実に行いうる実験の極限をとった理想化」という岩波理化学辞典の考え方（長倉他，2004）に基づいている。

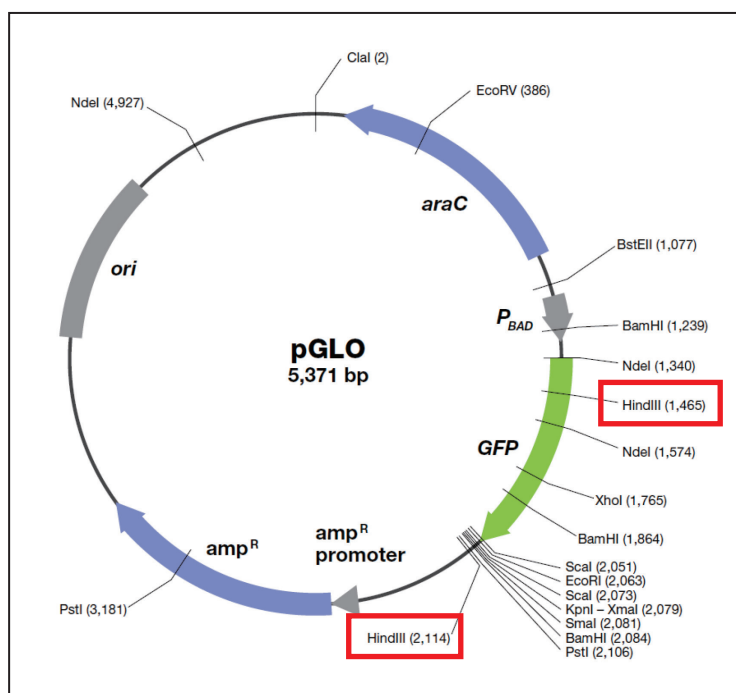


図1 pGLO プラスミドの制限酵素地図

2カ所（赤枠）の *Hind* III 認識部位が GFP の塩基配列を挟むように存在しているのが分かる [BIO-RAD 社のホームページより引用]。制限酵素の *Hind* III で切断すると，大小 2 本の DNA が出来ることが予想される。bp: base pairs, 塩基対

2 研究方法

基質 DNA：市販の遺伝子組換え実験キット「pGLO™ バクテリア遺伝子組換えキット」に含まれているプラスミドである pGLO (5,371bp) (BIO-RAD 社) の塩基配列を用いる (図1)。

pGLO の全塩基配列の情報は，BIO-RAD 社のホームページ（以降，HP）から取得する事ができる (図2, https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/Bulletin_7433.pdf) ので，これを「コピー」して Microsoft Word 文書などへ「ペースト」する。又は別の方法として，米国国立衛生研究所 (NIH) が運営する National Center For Biotechnology Information (NCBI) の HP から，GenBank の「U62637.1」か，又は「pBAD-GFPuv」を検索して，得られた全塩基配列をコピーすることでも全塩基配列情報の入手が可能である。

大小2本(4.7kbほどと0.7kbほど)のDNAに切断されることが予想される。反応条件は、TaKaRa社のHPのHindIIIに貼付される文書の情報に従った。即ち、HindIII 1 μ L, 10 \times M緩衝液 2 μ L, 基質DNA 1 μ g, 滅菌蒸留水で20 μ Lにして良く混合し(以下、サンプル), 37 $^{\circ}$ Cで60分間保温することで行った(https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/1060a_ds_j.pdf)。

アガロースゲル電気泳動: 電気泳動槽は、Mupid-2plus (ADVANCE) を用いた。アガロース濃度は0.8%でミニゲルに作成し、サンプルにはHindIIIに添付されている6 \times 色素を4 μ L加えてよく混合し、0.5 \times TBE中でアガロースゲル末端から2cmほどまで電気泳動を行った。染色は、電気泳動終了後、臭化エチジウム0.5 μ g/mL 0.5 \times TBE (Sambrook & Russell, Molecular Cloning, 2001)で10分ほど染色し、トランスイルミネーター上で観察した。写真撮影は、ミニゲル全体にフードカバーをかけ、デジタルカメラのモノクローム様式で行った。この写真は授業時間を有効に使うために、事前に教師が準備するのを本研究では前提にしている。従って、大学等の高等教育機関で実験を行ってもらい、データを作成してもらうか、本論文の写真を使う方法も考えられる。

また、DNAの染色には、臭化エチジウムに替わる、安全性をうたったアガロースゲル電気泳動用蛍光染色試薬(例えば、ミドリグリーン Direct, <https://www.n-genetics.com/products/1072/1023/13219.pdf>)などもある。泳動位置の変化など注意点を押さえれば利用可能である。

変異の導入設計: 部位特異的変異導入用のキットPrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa社)の説明書に準じて、HindIII認識塩基配列への変異導入を計画した(附録図1)。この説明書はTaKaRa社のHPからpdfでダウンロードできる(https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/r046a_j.pdf)。変異を導入するのは、HindIIIが認識して切断する塩基配列、5'-A/AGCTT-3' (「/」はHindIIIが切断するホスホジエステル結合の位置を示す。アンダーラインは変異を導入する予定の塩基を指す。)である。制限酵素が認識する塩基配列が回文(palindrome)構造を有するという特質を維持したまま、5'-A/ACGTT-3' (アンダーラインは変異を導入した塩基を指す)という塩基配列へ変更する。そのためのプライマー設計は、同キットの説明書に倣って附録図1のように行った。

3 結果と考察

HindIIIの認識塩基配列5'-A/AGCTT-3'に、回文構造という特質を残したまま、5'-A/AGCTT-3' (「/」はHindIIIによって加水分解されるホスホジエステル結合の位置を示す。アンダーラインは変異を導入する塩基を指す。)を、5'-A/ACGTT-3' (アンダーラインは変異を導入した塩基を指す)という塩基配列へ、部位特異的に変異を導入する計画を立てた(附録図1)。しかし、変異が導入された後のセンスプライマーとアンチセンスプライマーでは、プライマーあたりのGC含量が一致していない(附録図1)。GC含量が一致していないと、DNAの融点(T_m)の値が異なるため、PCRによって産物を得るのが難しくなることがある(例えば、TaKaRa社HPの「PCRの基礎編Q1プライマー設計で注意することは?」, https://catalog.takara-bio.co.jp/com/tech_info_detail.php?mode=1&masterid=M100005115)。本研究を実施する以前に、EcoRIの認識配列への部位特異的変異導入でT_m値が異なるプライマーでPCRを行ったことがある。しかしPCRの条件を様々試してみたが、結局、産物を得ることができなかった。HindIIIでも、EcoRI同様にPCRで産物が得られない可能性が考えられた。

そこで、pGLOの塩基配列に既に、変異を入れた場合と同じ塩基配列が無いか検討することにした。pGLOの全塩基配列を、PC上でコピーしてMicrosoft Word文書へ貼り付け、フォントをCourier Newに変換した。改行は塩基配列の途中には入っていない。「ホーム」タブ上で、すべての塩基配列を選択した上で、Microsoft Word文書の右上の「検索」をクリックし、「ナビゲーション」枠を出して、HindIIIの認識配列に変異を導入した5'-A/ACGTT-3'の「acgtt」を記入して検索した。すると、「acgtt」は3カ所見つけた(附録図2)。

附録図2から、制限酵素HindIIIが厳密に5'-A/AGCTT-3'にのみ認識して切断した場合のDNA断片の大きさ(bp, base pairs, 塩基対数)(附録図3)、及び5'-A/ACGTT-3'も認識して切断した場合のDNA断片の大きさ(附録図3)を計算した(表1)。

表1 *Hind*Ⅲによる切断断片の数と大きさ (bp) の予想

<i>Hind</i> Ⅲによる塩基配列の認識が…	
厳密な場合, 2本	厳密では無い場合, 5本
649bp と 4722bp で, 計 5371bp	649bp, 312bp, 767bp, 787bp, 2856 bp で, 計 5371bp

附録図2～4も参照。

そこで実際に、制限酵素 *Hind*Ⅲで pGLO を切断し、アガロースゲル電気泳動を行った (図3)。切断の条件は、*Hind*Ⅲ (TaKaRa 社) の100%の相対活性を得られる条件で行った。

「研究方法」に記載された適切な反応条件の下、pGLO は *Hind*Ⅲの厳密な認識配列の数から予想される大きさのDNA断片 (2本) のみが得られ、回文構造を保ったままの変異が見いだされた場合の切断 (DNA断片5本) は観察されなかった。この事から、*Hind*Ⅲによる基質の認識、すなわちDNAにおける塩基配列の認識、は厳密に行われている、と考えることができる。ここから、他の制限酵素でも同じ事が言えるだろうか、という演繹的な思考実験の構築の可能性も考えられる。

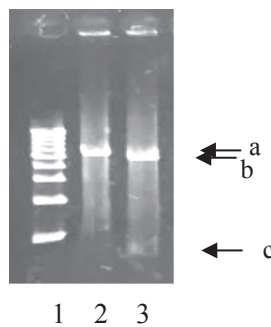


図3 制限酵素 *Hind*Ⅲによる pGLO の切断結果

レーン1: 1kb DNA ラダー; レーン2: *Hind*Ⅲ未処理 pGLO (超らせん構造を解くため、*Eco*RI 処理はしてある); レーン3: *Hind*Ⅲ処理 pGLO (5.4kb ほど); a: 切断前の pGLO; b: *Hind*Ⅲで pGLO 切断後の大きい DNA 断片 (4.7kb ほど); c: *Hind*Ⅲで pGLO 切断後の小さい DNA 断片 (0.7kb ほど)。1kb DNA ラダーは下から上へ、1kb, 2kb, 3kb, …の大きさの DNA である。*Hind*Ⅲでの処理条件は研究方法を参照。

ここでの染色は、野生型への復帰突然変異を誘導する事を指標としたエイムス試験で変異原性が検出される臭化エチジウムを用いている。しかし、DNAの染色には近年、臭化エチジウムに替わる、安全性をうたったアガロースゲル電気泳動用蛍光染色試薬も販売されている (例えば、ミドリグリーン Direct, <https://www.n-genetics.com/products/1072/1023/13219.pdf>)。ミドリグリーン Direct は、電気泳動の前にサンプルに混合して使用する。ただ、高等学校で購入するとなると高価すぎるとされる可能性も考えられること、また室温では1年間しか保管できないことから、やはり大学等の高等教育機関等との連携が必要と考えられる。更に、DNAの量が少なくなると、電気泳動での移動度が遅くなるなどがあるなどが取り扱い説明書に記載されているので、DNAの大きさを比べる場合は注意が必要である (上記のミドリグリーン Direct の説明書参照)。アガロースゲル電気泳動の実験は、生徒は行わない前提で示しているが、年間授業予定のどこかのタイミングか、授業時間外等で生徒自身が、マイクロピペットを用いてアガロースゲル電気泳動を行う経験が一度でもあれば、思考実験であっても、その経験を想起して実際に実験をしている感覚に至る事ができるのでは、と考えられる。「知識」に加え、「技能」も育てたいところなので、例えば夏期休暇で、机での受験勉強に加えて、気分転換にじっくり時間をかけて観察・実験に取り組む機会も設けることが高等学校理科の目標実現に繋がるための工夫とも考えられる。

4 まとめ

本研究で示した思考実験を適用すると、酵素の基質特異性の高さを高校生が実感できる探究活動を50分ほどの授業時間内に組み込む事が可能になると考えられる。制限酵素でDNAを切り、アガロースゲル電気泳動を行う実験操作法は、別途映像などで確認し、教師が準備したアガロースゲル（または写真データ）で切断状況を確認する観察のみを行う事で電気泳動の時間を省略も可能だろう。今後、COVID-19の状況が落ち着きを見せたら、高校生への実践研究等を経て、その有効性を確認していきたい。

参考文献

- ・浅島誠・他23名（2019）：改訂 生物，24，東京書籍（ISBN9784487165551）
- ・文部科学省（2009），高等学校学習指導要領解説 理科編 理数編，実教出版（ISBN9784407319262）
- ・文部科学省（2018），高等学校学習指導要領（平成30年告示）解説 理科編 理数編，実教出版（ISBN9784407348736）
- ・本川達雄・他16名（2019）：生物 改訂版，33，新興出版啓林館（ISBN9784402091491）
- ・長倉三郎・井口洋夫・江沢洋・岩村秀・佐藤文隆・久保亮五（2004）：岩波 理化学辞典 第5版第8刷，580，岩波書店（ISBN4000800906）
- ・西野秀昭（2021），高等学校生物科目において酵素の基質特異性を学ぶための新しい実験方法に関する研究，福岡教育大学紀要，第70号 第3分冊，39-46，2021
- ・西野秀昭，大野航汰，青木麻由（2022），高等学校生物科目において酵素の競争的阻害現象とその応用を学ぶための新しい観察・実験方法に関する研究，福岡教育大学紀要，第71号，第3分冊，105-112，2022
- ・庄野邦彦・他17名（2019）：生物 新訂版，33，実教出版（ISBN9784407204223）

附記

本研究は，福岡教育大学令和4年度科研費獲得推進サポート経費の交付を受けて行えた成果である。感謝申し上げます。このような研究成果は，本来は所属学会誌等にて発表すべきところではある。しかし本学紀要では，リポジトリ上であれば高画質のカラーで写真データも掲載されることから，学術研究の公表の効果にも鑑み，またピア・レビューも実施されていることもあり，本学紀要にて発表するものである。本研究で参照した全てのウェブサイトは，2022年9月26日時点でアクセス可能である事を確認している。

本研究内容に関する問合せ先

西野 秀昭（にしの ひであき）

〒811-4192 福岡県宗像市赤間文教町1番1号 福岡教育大学・教職実践研究ユニット（教職大学院・理科）



e-mail: hideakin--atmark--fukuoka-edu.ac.jp

Tel 0940-35-1385（研究室直通）

researchmap:「西野秀昭」で検索（"--atmark--"は@に置き換えて利用）

pGLO における *Hind*III 認識塩基配列への部位特異的変異導入のための primer 設計

〈目的〉

*Hind*III の認識塩基配列 (5'-A/AGCTT-3') のセンス鎖の中央の「5'-GC-3'」を「5'-CG-3'」に置換する (アンチセンス鎖は「3'-CG-5'」を「3'-GC-5'」に置換する。) ただし回文 (palindrome) 構造は残す。

〈参考〉

製品コード R046A 研究用 TaKaRa PrimeSTAR[®]Mutagenesis Basal Kit 説明書 v201601Da, p.6

〈方法〉

*Hind*III の認識配列「5'-A/AGCTT-3'」のみ, 大文字で記す (「/」は, 加水分解するホスホジエステル結合の場所)。

5' -ggtgaaggtgatgctacatacgggAA[GC]TTaccctaaatttattgacac-3'

3' -ccactccactacgatgtatgctTT[CG]AAtggaatttaataaacgtg-5'

↓ 置換を行う

5' -ggtgaaggtgatgctacatacgggAA[CG]TTaccctaaatttattgacac-3'

3' -ccactccactacgatgtatgctTT[GC]AAtggaatttaataaacgtg-5'

↓ オーバーラップ領域を 15base 選定する (変異部分をなるべく中心にする)

5' -ggtgaaggtgatgctacatacgggAA[CG]TTaccctaaatttattgacac-3'

3' -ccactccactacgatgtatgctTT[GC]AAtggaatttaataaacgtg-5'

↓ 変異部分から 18base 3' 側に伸ばす。GC 含量を考慮し最長 30bp まで 5' や 3' 方向に伸ばすことも検討。

5' -ggtgaaggtgatgctacatacgggAA[CG]TTaccctaaatttattgacac-3'

3' -ccactccactacgatgtatgctTT[GC]AAtggaatttaataaacgtg-5'

↓ 太字でない部分を削除して, primer 配列とする。

5' -acgggAA[CG]TTaccctaaatttattt-3' (27bases, GC=8/27)

3' -actacgatgtatgctTT[GC]AAtgga-5' (27bases, GC=12/27)

〈結果〉

*Hind*III 部位に変異を導入する primer

name : sequence (27bases)

p_HIII_3GC4_3CG4_pGLO: 5' -ACGGAAACGTTACCCTTAAATTTATTI-3'

p_HIII_4CG3_4GC3_pGLO: 5' -AGGGTAAACGTTTCCGTATGTAGCATCA-3'

付録図 1 制限酵素 *Hind*III の認識塩基配列への部位特異的変異導入のためのプライマー設計 (説明書の p6 に倣った)

附録図 1 制限酵素 *Hind*III の認識塩基配列への部位特異的変異導入のためのプライマー設計の実際 (説明書の p6 の指示に倣った)

atcgatgcataatgtgcctgtcaaatggacgaagcaggattctgcaaacctatgctactccgtcaagccgtcaattgtctgattcgttacca
 attatgacaacttgacggctacatcattcactttttcttcacaaccggcagcgaactcgctcgggtggccccggtgcatttttaataaccg
 cgagaaatagagttgatcgtcaaaaaccaacattgcgaccgacggtggcgatagggatccgggtgggtgctcaaagcagctcgcctggctgata
 cgttggctctcgcgcagcttaagacgctaatacctaactgctggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcagaagcaaacatgctgtgcga
 cgctggcgatatcaaaattgctgtctgcccaggatgctgctgactgacaagcctcgctaccgattatccatcggtggatggagcgactc
 gtaatcgccttccatgcgccgagtaacaattgctcaagcagatttatcgcagcagctccgaatagcgccttcccttgcggcggttaag
 atttgccaaacaggctcgtgaaatgcggtggtgcttcatccgggcaagaacccccgatttgcaaatattgacggccagttaagccatt
 catgccagtaggcgcgagcgaagtaaacccactggatgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaatctctcctggcgg
 gaacagcaaaatcacccggctcggcaaaacaaattctcgtccctgattttcaccacccccgacccgcaatggtagattgagaatataacct
 ttcatcccgagcggctcgtgataaaaaatcgagataaccgctggcctcaatcggcgttaaaccgcccaccagatgggcattaaaccgagtatc
 ccggcagcaggggatcattttgctcctcagccatactttcactcctccgcatcagagaagaaaccaattgtccatattgcatcagacattg
 ccgtcactgctctttactggctcttctcgttaaccaaacggtaaacccgcttataaaagcattctgtaacaaagcgggaccaaaagccatg
 acaaaaacgctgaacaaaagtgtctataatcacggcagaaaagtcacatgtattttgacggcgtcacactttgctatgcatagcatttt
 tatccataagattagcggatcctacctgacgctttttatcgcaactctctactgtttctccataccggttttttgggctagaaataattttgt
 ttaactttaagaaggagatatacatatggctagcaaaggagaagaacttttactggagttgtcccaattctgtgaaatagatggtagt
 aatgggcaaaaattttctgctcagtgagaggggtgaaggtgatgctacatacggaaagcttaccctaaatttattgcaactactgaaaactac
 ctgttccatggcaaacacttgtcactactttctctatggtgttcaatgcttttccgcttatccggatcatatgaaacggatgacttttcaa
 gaggccatgcccgaaggttatgtacaggaacgactatattcttcaaagatgacgggaactacaagacgcgtgctgaagtcaagttgaaggt
 gatacccttgtaaatcgtatcgagttaaaggtattgatttaaaagaagatgaaacattctcggacacaaaactcgagtacaactataactcac
 acaatgtatacatcacggcagacaaaacaaagaatggaatcaaagctaacttcaaaaatccgcacaacatgaaatggatccgttcaactagc
 agaccattatcaacaaaactccaattggcgatggccctgtcctttaccagacaaccattacctgtcgacacaactctgcctttcgaagat
 cccaacgaaaagcgtgaccacatggctccttctgagtttgaactgctgctgggattacacatggcatggatgagctctacaaaataatgaattc
 gagctcgttaccggggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggctgttttggcggatgagagaagattttcagcctgatacaga
 ttaaatcagaacgcagaagcgtctgataaaaacagaatttgcctggcggcagtagcgcgggtgccacctgacccatgcccgaactcagaagt
 gaaaacgcgtagcgcgatggtagtggtgggtccccatgagagtagggaactgccagcatcaataaaaacgaaagcctcagtgcaaaagc
 tggcctttcgttttatctgttgttgcgggtgaacgctctcctgagtaggacaaaatccgcccggagcggatttgaaacgttgcaagcaacggc
 ccggaggggtggcggcagcagcggcgcataaaactgccagcatcaaatgaagcagaagccatcctgacggatggcctttttgctttctaca
 aactctttgtttattttctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaag
 agtatgagattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcgccattttgccttctgtttttgctcaccagaaaacgctgggtgaaag
 taaaagatgctgaagatcagttgggtgacagagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggcccgaaga
 acgttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgggtattatcccggttgacgcgggcaagagcaactcggctcgcgcata
 cactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcattcaccggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcca
 taacctgagtgataaacctgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaacgctttttgcaacaatgggggatca
 tgaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccatacacaacgcagcgtgacaccacgatgctcgcagcaatggcaacaaacg
 ttgcgcaaacatttaactggcgaactacttactctagcttcccgcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttc
 tgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccaga
 tggtaagccctccgctatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaaacgaaatagacagatcgctgagataggtgctca
 ctgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatataacttttagattgatttacgcgcctgtagcggcgcattaaagcggcgggt
 gtgggtggttacgcgcagcgtgacccgtacacttccagcgccttagcgcctcctttcgtttcttcccttcttctcgcacgcttcgccc
 gctttcccgctcaagctcaaaatcggggctccttttagggttccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattgggtga
 tggttcacgtagtgggcatcgcctgatagacggtttttgcctttgacgttggagtccacgttctttaaagtggaactctgttccaaact
 ggaacaacactcaaccctattctcgggctattctttgatttataagggattttgcgatttccgctattggtaaaaaatgagctgatttaac
 aaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaaacgtttacaatttaaaagatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcc

```
cttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttttctgcgcgtaaatctgctg  
cttgcaaacacaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcaga  
gcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaa  
tcctgttaccagtggtgctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcgggtcggg  
ctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacg  
cttcccgaagggagaaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggtcggaacagagagcgcacaggggagcttccaggggaaacgcctggt  
atctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatgaaaaacgccag  
caacgcggcctttttacggttctggccttttgccttttgcctcactgttcttctcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtatt  
accgcctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcagcagtgactcagtgagcaggaagcggaaagagcgcctgatgctg  
atttttccttacgcacatctgtgcgggtatctcacaccgcataatggtgcaactctcagtacaatctgctctgatgcccgatagttaagccagtatac  
actccgctatcgctacgtgactgggtcatggctgcgccccgacacccgcaaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccggcat  
ccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggttttaccgctcatcaccgaaacgcgcgagggcagcaaggagatgg  
cgcccaacagtcccccgccacgggctgccaccataccacgcgaaacaagcgtcatgagccgaaagtgccgagcccgatcttcccacatc  
ggtgatgtcggcgatataggcggccagcaaccgcacctgtggcggcgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgtagaggatctaattctcatgt  
ttgacagcttatc
```

5,371bp

附録図2 pGLOの全塩基配列に、Hind IIIの認識配列 aagctt に変異を導入した場合と同じ塩基配列 aacgtt は3カ所存在する

*Hind*IIIの認識配列 aagctt は aagctt と、塩基配列 aacgtt は aacgtt と色分けしてある。この全塩基配列は列の末端どうしは、本来はつながっている。そのつなぎ目を含む塩基配列には aagctt も aacgtt も見出せない。

agcttggctgttttggcggatgagagaagatctcagcctgatacagattaaatcagaacgcagaagcggctctgataaaacagaatttgcctgg
cggcagtagcgcgggtgtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgcgtagcgcgatggtagtgtgggtccccatgagagag
tagggaactgccagggatcaataaaacgaaaggctcagtgcaaagactggcctttcgttttatctgttgttgcggtgaacgctctcctga
gtaggacaaatccgcccggagcggatttgaacgcttgcgaagcaacggccccggagggtggcgggcaggacgcccgcataaaactgccagggatca
aattaagcagaagggcatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactccttgtttatcttaataacattcaaatatgtatccgctc
atgagacaataaacctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagatgagtagttcaacatttccggtgctgcaccttattccctttttg
cgccattttgccttctgttttgcctcaccagaaacgctggtaagatgaaagatgctgaagatcagttgggtgacgagtggttacatcga
actggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcggcgaagaacgctttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcg
gtattatcccgtgtgacgcgggaagagcaactcggctgcgcgatacactattctcagaatgacttgggtgagtagtaccaggtcacagaaa
agcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgccataaccatgagtgataaacactgcccgaacttactctgacaacgat
cggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcaacaatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccata
ccaaacgacgagcgtgacaccagatgctgacgaatggcaaacgcttgcgaaactattaactggggaactacttactctagcttcccggc
aacaatataagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcgctcggccttccggtggtgttattgctgataaatctgg
agccggtgagcgtgggtctgcggtatcattgcagcactggggccagatggaagccctccgctatcgtagtattctacacgacggggagttag
gcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggaactgtcagaccaagttaactcatatatac
tttagattgatttacgcccctgtagcggcgcataaagcggcggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttag
cgcccgtcctttcgtttcttcccttcttctcgcacgcttgcggcttcccctcaagctctaaatcgggggctcccttaggggtccg
atthagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgattgggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggttttgcctt
ttgacgttggagtccacgttctttaaagtggactcctgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataag
ggattttgccgatttccgctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatgaaacgcaatgtaacaaaaattaacgcttacaattta
aaaggatctaggtgaagatccttttggataatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaa
gatcaaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgctaactctgctgcttgcaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgttgcg
gatcaagagctaccaactcttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagcgttagtgcc
accacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagctgctgtcttac
cgggttggactcaagacgatagttaccggataaaggcagcggctcgggtgaacgggggtcgtgcacacagccagcttgagcgaacgacc
tacaccgaaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcaggg
tcggaacaggagagcgcagcagggagcttccaggggaaacgcctggatctttatagctcctgtcgggttccgcaacctctgacttgagcgtc
attttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatgaaaaacgcagcaacgcggccttttacggttccctggccttttgccttttgcct
cacatgttcttctcgttatcccctgattctgtggataaacgctattaccgctttgagtgagctgataccgctgcgcgacggcaacgaccg
agcgcagcagtagttagtgagcaggaagcgaagagcgcctgatcgggtatcttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatatggtg
cactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatacactccgctatcgtacgtgactgggtcatggctgogccccgacacc
cgccaacaccgctgacgcgccctgacggccttctgctcggcgcacccgcttacagacaagctgtgacgctcctcgggagctgcatgtgtca
gaggtttaccgctcatcaccgaaacgcgcgagcagcaaggagatggcggccaaacagctccccggccacggggcctgccaccatacccagcc
gaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatctccccatcgggtgatgctggcgatataggcgccagcaaccgacactgtggcgcg
gtgatgccggccacgatcgtcggcgttagaggatctaattctcatgtttgacagcttatcatcgatgcataatgtgctgtcaaatggacgaa
gcagggtttctgcaaaccctatgctactccgctcaagccgtcaattgtctgattcgttaccattatgacaacttgacggctacatcattcactt
tttcttcaaacggcagcgaactcgtcgggtggccccgggtgcattttttaataaccggagaaatagagttgatcgtcaaaaccaacatt
gogaccgaggtggcgataggcatccgggtggtgctcaaaagcagcttccgctgctgatacgttggctcctcgcgcccagcttaagacgctaac
cctaactgctggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtgacgctggcgatataaaaattgctgtctgccaggt
gatcgtgatgtactgacaagcctcgcgtaccgattatccatcgggtgagtgagcagctcgttaactcgttccatgcccgcagtaacaattg
ctcaagcagatttatcgccagcagctccgaatagcgccttccccttggccggcgttaattgatttggccaaacaggtcgtgaaatgcccgtgg
tgccgttcatccggcgaaagaaccgctattggcaaatattgacggccagtttaagcattcatgccagtagggcgcgggacgaaagtaaaccc
actggtgataccattcgcgagcctccggatgacgaccgtagtgatgaatctcctcggcgggaacagcaaaaatcaccggctcggcaaaaa

ttctcgctccctgatttttcaccacccctgaccgcgaatggtgagattgagaatataacctttcattcccagcggctcggctcgataaaaaatcg
agataaccgttggcctcaatcggcgttaaacccgccaccagatgggcattaaacgagtatcccggcagcaggggatcattttgcgcttcagcca
tacttttcatactcccgcattcagagaagaaaccaattgtccatattgcatcagacattgccgtcactgctcttttactggctcttctcgct
aaccaaacggtaaccccgcttattaaaagcattctgtaacaaaagcgggaccaaagccatgacaaaaacgctaacaaaagtgtctataatcac
ggcagaaaagtccacattgattatgtgacggcgctcacactttgctatgccatagcatttttatccataagattagcggatcctacctgacgct
ttttatcgcaactctctactgttttctccataaccggttttttgggctagaataattttgtttaactttaagaaggagatatacatatggctag
caaaggagaagaacttttactggagttgtcccaattctgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaaattttctgtcagtgagagggt
gaaggtgatgctacatacggaa :4722bp
agcttaccccttaaatttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactactttctcttatgggtgtcaatgcttttc
ccgttatccggatcatatgaaacggcatgactttttcaagagtgccatgcccgaagggtatgtacaggaacgcactatatctttcaagatgac
gggaactacaagacgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttgttaatcgtatcgagttaaaaggtattgattttaagaagatggaa
acattctcggacacaaaactcgagtacaactataactcacacaatgtatacatcacggcagacaaaacaaaagaatggaatcaaagtaacttcaa
aattcgccacaacattgaagatggatccgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcagatggccctgtccttttaccagac
aaccattacctgtcgacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggtccttcttgagtttgaactgctgctggga
ttacacatggcatggatgagctctacaaataatgaattcgagctcggtaaccgggatcctctagagtcgacctgcagggcatgca :649bp
計 5,371bp

附録図3 *Hind*Ⅲによる pGLO の切断が a/agctt の 2箇所のみで起こる場合の DNA 断片の塩基配列と bp 数

*Hind*Ⅲの認識配列 a/agctt は a/agctt と、塩基配列 a/acgtt は a/acgtt と色分けしてある。

acgtttacaatttaaaggatctaggtgaagatcctttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttccgctccactgagcgtca
gaccccgtagaaaagatcaaaggatccttcttgagatccttttttctgcgcgtaactctgctgcttgcacaaacaccccgctaccagcgg
tggtttgtttgccgatcaagagctaccaactcctttttccgaaggaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgt
gocgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactcctggtaccagtggtgctgcccagtggggat
aagtcgtgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgctgcacacagcccagct
tgagcgaacgacctacccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaaagcgcacgcttccgaagggagaaaggcggacaggtatcc
ggaagcggcagggctcgaacagagagcgcacagggagcttccaggggaaacgcctggtatctttatagtctgctgggtttccacctc
tgacttgagcgtcgatctttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacccagcaacggcctttttacggttctcggccttt
gctggccttttctcacatgttctttcctcgcttatccctgatctctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgcg
cagccgaacgaccgagcgcagcagtgctgagcaggaagcgggaagagcgcctgatgaggatctttctccttacgcatctgtgaggatattca
caccgcatatggtgactctcagtacaatctgctctgatgcccgatagttaagccagatacactccgctatcgctacgtgactgggtcatggc
tgccccgcacacccgcaacacccgctgacgcgccctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccggg
agctgcatgtgtcagaggttttaccgctatcaccgaaacgcgcgagggcagcaagagatggcgcccaacagctccccggccacggggcctgcc
accatacccacgcgaaacaagcgtcatgagcccgaagtggcgagcccgatcttcccctcggtgatgtcgggcatataggcgcagcaaccg
cacctgtggcgccggtgatgcccggccacgatgctcggcgtagaggatctaattctcatgtttgacagcttatcatcgatgcataatgtgcct
gtcaaatggacgaagcagggattctgcaaacctatgctactccgtcaagccgtcaattgtctgattcgttaccattatgacaactgacggc
tacatcattcactttttctcacaacggcaggaactcgtcgggctggccccgggtgcattttttaaatcccgcgagaaatagagttgatcg
tcaaaaccaacattgacgacgaggtggcgataggcatccgggtggtgctcaaaagcagcttcgctggctgatacgttggtcctcgcgccagc
ttaagacgctaatccctaactgtgggcggaaaagatgtgacagacgcgacggcgacaagcaaacatgctgtgcaacgctggcgatatacaaat
gctgtctgccagtgatcgctgatgactgacaagcctcgcgtaccgattatccatcggtggatggagcagctcgttaatcgcttccatgccc
cgagtaacaattgtcgaagcagatttatcgccagcagctccgaatagcgccttcccctgccccggcgttaatgatttgcccaaacaggtcgc
tgaaatcgggctggtgcttcatccgggcaagaaccccgtattggcaaatattgacggccagtttaagccattcatgcccagtaggcgcgg
acgaaagtaaacccactgggtgataccattcgcgagcctccggatgacgacagctagtgatgaatctctcctggcggaacagcaaaatataccc
ggtcggcaaaacaattctcgtccctgatttttcaccaccccctgaccgcgaatggtgagattgagaatataacctttcattcccagcgggtcgg
cgataaaaaatcgagataaacggtggcctcaatcggcggttaaacccgccaccagatgggcattaaacagatatacccggcagcaggggatcatt
ttcggcttcagccatacttttatactcccgcattcagagaagaaccaattgtccatattgcatcagacattgcccgtcactgctcttttac
tggtcttctcgttaacaaaccggttaacccgcttattaaaagcattctgtaacaaagcgggacaaagccatgacaaaaacgcgtaacaaaa
gtgtctataatcacggcagaaaagtccacattgattatttgcacggcgtcacactttgctatgcatagcatttttatccataagattagcgg
tctacactgacgctttttatcgcaactctactgtttctccataaccgcttttttgggctagaaataattttgtttaactttaagaaggagat
atacatatggctagcaagagagaagaacttttactggagttgtcccaattcttgttgaattagatgggtgatgtaattgggcacaaatctctg
tcagtggagaggtgaaggtgatgctacatacggaa 2856bp

agcttacccttaatttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgcactactttctctttaggtgttcaatgcttttc
ccgttatccggatcatatgaaacggcatgacttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaacgcactatatacttcaagatgac
gggaactacaagcgcgtgctgaagtcaagtttgaaggtgataccctgttaatcgatcgagttaaaaggtattgattttaaagaagatggaa
acattctcggacacaaactcgagtacaactataactcacacaatgtatacatcacggcagacaaaacaaagaatggaatcaaagctaacttcaa
aattcgccacaacattgaagatggatccgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagac
aaccattacctgtgcacacaatctgccctttcgaagatcccaacgaaaagcgtgaccacatggctccttcttgagtttgaactgctgctggga
ttacacatggcatggatgagctctacaataatgaattcagagctcggtaaccggggatcctctagagtcgacctgcagggcatgca 649bp

agcttggctgttttggcggatgagagaagatttccagcctgatacagattaaatcagaacgcagaaagcggctgataaaacagaatttgcctgg
cggcagtagcgcgggtggcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaacgcggtagcggcggatggtagtgggggtccccatgagagag
tagggaactgccagggatcaataaaaacgaaaggctcagtgcaaaagactgggccttctgcttttctgctgtttgtcgggtgaacgctctcctga
gtaggacaaaatccgcccggagcggatttga :312bp

acgttgcgaagcaacggccccggaggggtggcgggcaggaccccccaataaactgccaggcatcaaatgaagcagaaggccatcctgacggatgg

cctttttgcgtttctacaaactctttgtttatttttctaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaa
taatattgaaaaaggaagagtatgagattcaacatctccggtgcgccttattccctttttgcgccattttgccttctgtttttgctcacc
cagaaacgctggtgaaagttaaagatgtgaagatcagttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttga
gagttttcgccccgaagaacgttttccaatgatgagcacttttaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgttgacgcgggcaagag
caactcggctgcgccatacactattctcagaatgacttgggtgagtactcaccagtcacagaaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagag
aattatgcagtgctgccataaccatgagtataaactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttt
gcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcggttgggaaccggagctgaatgaagccatacaciaaacgacgagcgtgacaccacgatgcct
gcagcaatggcaaca : 767bp

acgttgcgcaactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcgataaaagtgcaggaccac
ttctgcgctcggccctccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggcc
agatggtaagccctcccgtatcgtagttatctacacgacgggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgcctgagataggtgcc
tcaactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttacgcgcctgtagcggcgcattaagcggcg
ggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgcctagcgcctcctttcgttttctcccttcttctcgcacggttcg
ccggctttcccgtcaagctctaaatcggggctccctttagggtccgatttagtgctttacggcacctcgaccccaaaaaacttgatttggg
tgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacggtttttcgcccttgacgttgagtgccacgttctttaaagtgactcctgttccaa
actggaacaacactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgattt
aacaaaaatttaacgcaatttttaacaaaatatta : 787bp

計 5, 371bp

附録図 4 *Hind*Ⅲによる pGLO の切断が 2 箇所の a/agctt と 3 箇所の a/acgctt の計 5 箇所で起こる場合の DNA 断片の塩基配列と bp 数

*Hind*Ⅲの認識配列 a/agctt は a/agctt と、塩基配列 a/acgctt は a/acgctt と色分けしてある。

