

遺伝子組換え—組換えDNA技術—
実験の教材化

筑波大学附属駒場中・高等学校

貝 沼 喜 兵

遺伝子組換え—組換え DNA 技術— 実験の教材化

貝 沼 喜 兵

I はじめに

バイオテクノロジーの最近の発展は、実にめざましいものがある。特に、遺伝子組換え—組換え DNA 技術—実験は、すでに実用化の段階に達している。インターフェロン、インシュリン、成長ホルモンなどの生産がその代表例である。それだけにとどまらず、この技術は、生物学の各分野の実験に広く応用され、成果をあげている。そのようなトピックスは、新聞やテレビ、雑誌などにたびたび報導されるので組換え DNA 技術に対する生徒達の関心はかなり高いものがある。生徒達の関心は次のようなものである。技術の原理はどうなっているのか、基本技術を理解するための実験はできないのだろうか、また、安全性について問題にされているが、一体どのような危険性があるのだろうかなどである。

筆者は、過去15年間、分子遺伝学の成果を高校生物の教材として利用するための実践的研究を続けてきた。枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を用いた形質転換で「DNAが遺伝子の本体である」ことを実証する実験の教材化が最初の試みであった。ついで、T₄ファージを用いて一段増殖、単個菌からのファージ産生、亜硝酸処理による rII 変異株の分離、シストランス相補性テスト、三点交雑実験による遺伝子地図の作成などの教材化を続けてきた。これら一連の実験を背景に分子遺伝学における遺伝子概念—ミュトン、レコン、シストロン、オペロンなどの歴史的発展過程の指導を実践し、その成果を報告してきた。

このような指導実践の中で組換え DNA 技術を指導するための設備は大体整備されていたので、組換え DNA 技術の、選択生物に導入する準備をはじめた。

筆者は幸いにも、東京大学応用微生物研究所の高橋秀夫氏から pBR322 プラスミドと T₄dC ファージの分譲を受け、実験についての適切なアドバイスをも頂けた。

このように、プラスミドとファージの2種のベクターを材料に、制限酵素、リガーゼなどの酵素を用いなくても、組換え DNA 技術の基礎と危険防止のための安全対策がどのようにとられているかの指導も可能と判断した。予備実験をはじめたのは1985年1月上旬からである。約2カ月間の予備実験をへて、2月下旬から3月上旬の選択生物の授業にこの実験を導入した。組換え DNA 技術の生徒実験の実態、実験結果とその考察、およびこの種の教材化の可否について検討し報告する。組換え DNA 技術を選択生物の授業に導入した初期の実践例として批判・検討を頂ければ幸いである。

II 選択生物における実験学習の計画

1. 選択生物の指導計画

筆者の学校の選択生物は、高2で履習させている。選択化学と選択生物のいずれかを選ばせている。1984年は、化学138名、生物32名であった。週3時間（3単位）、水曜日の4時限、木曜日の5～6時限であった。

指導計画は次の通りで、主な実験、観察テーマのみを示した。

1学期 生態系の構造と機能

- (1) 草地の種構成の特徴（砕法による優占種の決定）。
- (2) 層別刈り取りによる生産構造図の作成。

2学期 分子遺伝学

- (1) 微生物（枯草菌）の遺伝形質とその特徴。
- (2) 形質転換「DNAが遺伝子の本体である」ことを枯草菌を用いて実証する。
- (3) DNA塩酸加水分解物のペーパークロマトによる塩基分析。A, T, G, Cのモル比を調べる。
- (4) ファージの遺伝形質とその特徴。ブランクの特徴とファージ増殖法について実験する。
- (5) ファージの一段増殖。ファージのライフサイクルについて調べる。
- (6) 単個菌によるファージ産生。1個のファージが1個の大腸菌に感染して何個の子ファージを産生するか調べる実験。

3学期

- (1) 突然変異の誘起。T₄r⁺にNaNO₂処理をし、r^{II}変異株を分離し、その機構について考察する。
- (2) シストランス相補性テスト。シストロンとは何かを実験を通して指導する。
- (3) ファージr^{II}変異株(x₁, x₂, x₃)の三点交雑による遺伝子地図の作成。この実験に関連してレコンとは何かを考察する。
- (4) 組換えDNA技術の基礎実験
 - ① プラスミドベクターの形質転換
 - ② ファージベクターの形質導入

2. 実験班の構成と評価

生徒32名を名簿の順に6ヶ班に分けた。班長は互選で選ばせた。実験が終るとその都度レポートを作成させ、そのレポートで各人の評価を行った。

III 組換えDNA技術の指導計画

DNA運搬体（ベクター）の代表であるプラスミドとファージを用い、次の2種のテーマの実験を計画した。

1. 大腸菌プラスミド pBR 322

次の5段階の実験からなる。

- (1) pBR 322の精製
- (2) 制限酵素によるDNAの特定部位の切断

- (3) ハイブリッド形成 (リガーゼによる連結)
- (4) 形質転換による転換菌の選択
- (5) 組換え DNA の確認

この中で今回実施したのは(1)と(4)で、(2), (3), (5)の実験は省略し講義だけにした。

2. T₄dCファージ

実験は次の諸段階からなる。

- (1) C600AP^r recA, r⁻m⁻を増殖し T₄dCAP^sを感染させ、T₄dCAP^rを得る。
 - (2) T₄dCAP^rを MC1061AP^sに感染させ、形質導入により MC1061AP^rの選択。
- ファージについては、(1)を筆者が準備し、(2)を生徒実験として実施した。

IV 大腸菌プラスミド pBR322の実験

細菌類の抗生物質などに対する薬剤耐性は、主として細菌内にある主染色体とは別個に自律的に増殖する分子量 10⁶~10⁷ダルトンの環状二重ラセン DNA、プラスミドによるものである。プラスミドは組換え DNA 技術のベクターとして優れた特徴をもちよく利用されているので本実験に用いた。この実験で用いた大腸菌の遺伝的特徴を Table 1 に、pBR322 の遺伝子地図を Fig 1 に示した。この実験のマーカーとして、アンピシリン (ampicillin, AP と略記し、感受性菌は AP^s、耐性菌は AP^r とし、感受性菌は pBR322 がいない) 耐性を用いた。

Table 1 大腸菌の遺伝形質

選択培地 大腸菌	A ⁺ * ₁	A ⁻	備 考
MC1061AP ^s * ₂	-	+	pBR322 なし、アンピシリン感受性。
MC1061AP ^r * ₂	+ * ₃	+	pBR322 あり、アンピシリン耐性。
C600AP ^s * ₂	-	+	pBR322 なし、アンピシリン感受性。
C600AP ^r * ₂	+	+	pBR322 あり、アンピシリン耐性。

*₁ 培地はアンピシリンを含を含み、A⁻は含まない

*₂ いずれも recA r⁻m⁻

*₃ +はコロニー形成、-は形成せず

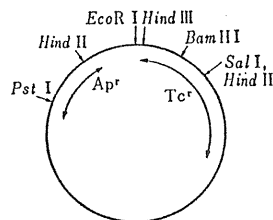


Fig. 1 pBR322の遺伝子地図
(→は制限酵素の切断部位)

Fig 2 に pBR322 を用いる形質転換の実験原理を示した。大腸菌は、一般に形質転換をしないが、特殊な前処理と高濃度の塩化カルシウムのもとで DNA を加えると細胞膜を通過し形質転換

をする。ここでは、この塩化カルシウム法を用いている。すなわち、プラスミドのない菌は AP^s であるが、形質転換した菌は AP^r で、これはアンピシリンを含んだ選択培地 (A^+) にコロニーを形成できる。組換え DNA 技術で pBR322 に外来性 DNA を組換えておけば、 A^+ のコロニーは、組換え DNA を保持している可能性は高い。組換え DNA を別な方法で確認すれば特定の遺伝子を大量にクローニングできるし、その生産物であるインターフェロンあるいはホルモンなどを安価に大量に、大腸菌などを用いて生産させることが可能である。

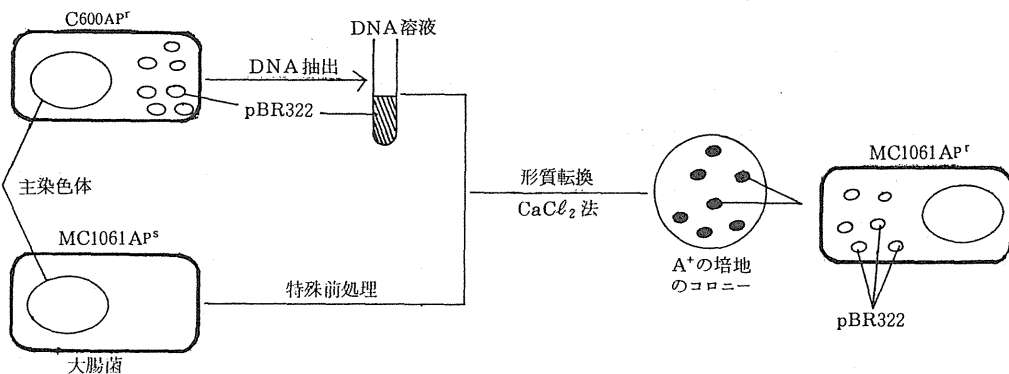
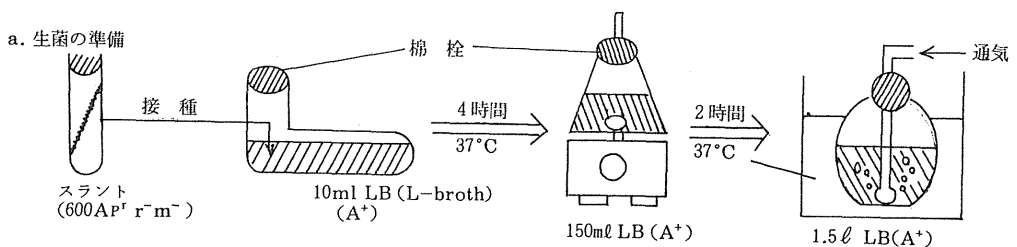


Fig 2 pBR322 の形質転換実験の原理

2. 実験方法 実験の手順を Fig 3 に図解で示す。

(1) pBR322 プラスミッド DNA の準備



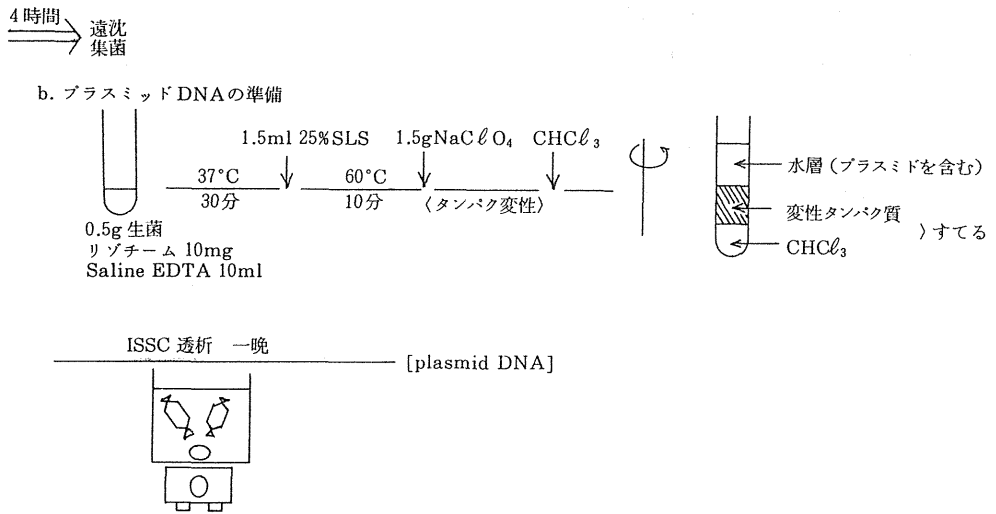
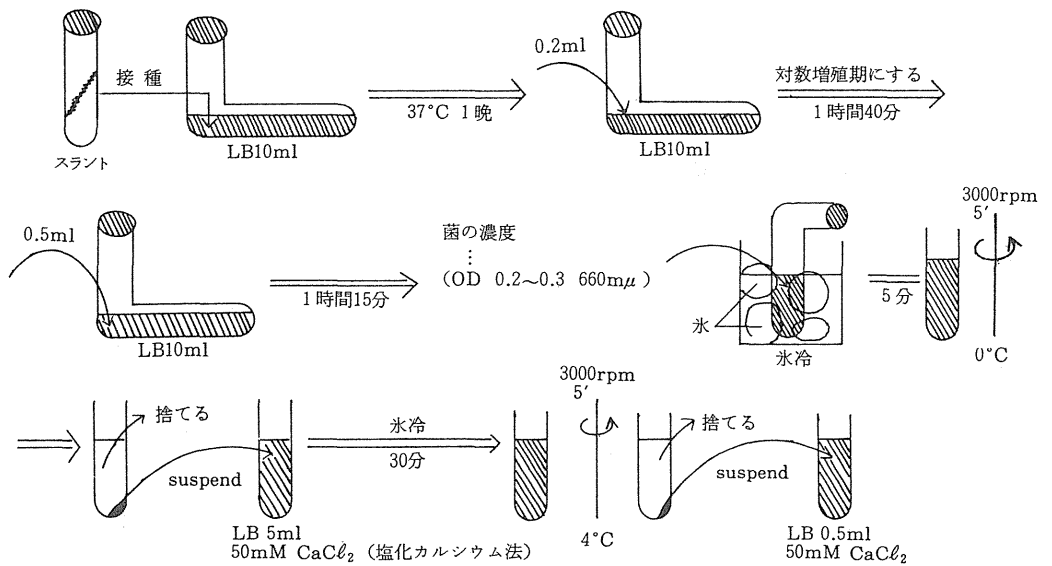


Fig 3 pBR322 の形質転換の実験手順

(2) プラスミッドの受容菌として MC1061AP^sr⁻m⁻ の準備



(以上は筆者が準備し、以下生徒実験)

(3) 菌液を 0.1ml ずつ 2 本に分け I, II とする。なおプラスミッド DNA 処理のときの条件を班

によって若干変えた。

I + 0.01ml (10 μ l) DNA

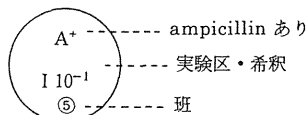
II + 0.01ml (10 μ l) LB

(4) 氷冷30分

(5) LB 1 ml を加え37°C 30分

(6) L-bottom plate 10枚を準備する。

① シャーレに記号をつける。



② ampicillin 0.1ml 分注 (10ml のメスピペットで)

③ L-bottom を分注 (約20ml)

(7) 選択培地に、寒天重層法で植えつけ pBR322'プラスミドを取込んだ転換菌を選択する。

(Table 2 参照)

Table 2 転換菌の選択

	dil.	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻⁶	備考
		A ⁺	A ⁺	A ⁻	
I	cell+DNA	実験区
II	cell+LB	対照区
III	DNA only	対照区

3. 実験結果と考察

Table 3 に実験の結果を示した。

Table 3 プラスミドによる形質転換と転換率

班		1	2	3	4	5	6
		1. 受容菌	C600 Ap ^s r ⁻ m ⁻			MC1061 Ap ^s r ⁻ m ⁻	
条件	2. plasmid	10 μ l 直接	LBで1/2dil.	10 μ l 直接	LBで1/2dil.	10 μ l 直接	LBで1/2dil.
	3. 培養時のLB	LB+50mM CaCl ₂			LB only		
	I - 10 ⁰	696 1032	75 107	401 621	8 11	37 47	57 78
I - 10 ⁻¹	160 175	15 16	56 64	0 1	4 8	4 8	
II - 10 ⁰	0	0	0	0	0	0	
III - 10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	
I - 10 ⁻⁶	60 74	31 36	56 66	62 81	48 56	33 51	
転換率 (%)		0.0019	0.00037	0.00091	0.000010	0.000098	0.00015

この転換率は、アガロースゲル電気泳動で精製したプラスミドを用いたのではないのであること。生徒実験であるという2点から十分評価できるデータである。

結果の考察について生徒のレポートを引用する。

「条件のちがいがから、0.0019%~0.00001%までの開きが出た。技術的巧拙を無視すれば、はっきりと条件の違いからの転換率への影響が出たと思う。最も高い転換率を示したのが、1,3班。すなわち、受容菌に C600Ap^r-m⁻, プラスミド10 μ l 直接, LB+50mM CaCl₂である。これは、受容菌LBについて同じ条件で、プラスミドについて違えた2班に比べ、転換率が大きい(約3倍)ことから、プラスミドについては10 μ l 1/2 希釈よりも転換がおこりやすいことを示していると思う。また、5班と4班の比較でも同じことがいえる。次に、1,2,3班と4,5,6班との比較によって、受容菌とLBの条件について考えてみる。明らかに、1,2,3班の方が、4,5,6班よりも転換率が大きい。特にプラスミドについて同一条件である1,3班と5班を比べると、転換率が約10倍の較差を示している。このことから、プラスミドを取り入れる際には、受容菌は C600Ap^r-m⁻, LBについては LB+50mM CaCl₂を用いるとよいことがわかる。しかし、どちらの要因がより、転換に優利に働いたかは、対照実験がないため、知ることができない。」

4. レポートに課したテーマ

4つの課題を与えたが、生徒は、あらかじめ配布された資料をよく読み、内容をよく消化してレポートにまとめていた。(1),(3),(4)はテーマのみを、(2)については生徒のレポートの一部を紹介する。

(1) 組換え DNA 技術でプラスミドを用いた利点を述べよ。

(2) 危険防止のために取られる処置は何か。生徒のレポートの一部を引用する。

○ 室外に洩れることの危険性

プラスミドは受容菌の中でクローン化し、細菌同士の接合でどんどん広まるし、受容菌の増殖でもプラスミドをもつ菌は増える。そのため、一度プラスミドをもった菌を洩らすと、それが自然界に広まってしまう。例えば、現在世界的に抗生物質が効かなくなっているのは、耐性を持ったプラスミド入りの菌を洩らしたためと考えられている。

○ 物理的封じ込め——研究室の設備

濾過装置 etc

○ 生物的封じ込め——研究室内の特殊条件では生育できるが、室外の自然条件では生育できないように受容菌の性質を変えておく。

DNA 受容菌として用いられる株に付与される性質

recA ……主染色体との組み換えがおこらない。
 r⁻m⁻ ……制限酵素マイナス。すなわち、外来性の DNA が入っても
 “制限”がおこらない。(plasmid DNA が切断されない) } 実験上必要

洗剤に感受性
 高温に感受性
 紫外線に感受性
 ある栄養素がなければ生育できない } 組み換え DNA 実験の受容菌に付与

ナリシン抵抗性 (Nal^r) ——特に x 1776 に付与

……自然界に存在しないと考えられる Nal^r を与えることで追跡を楽にする。

ベクター (プラスミド) に必要な性質

非伝達性……接合などをおこして、すすんで伝達するようなことはない。

△遺伝子工学というのは、ある意味でも核以上に危険なので、より安全性を高めることが望ましい。

- (3) 組換え DNA 技術で次の酵素はどんな役割を果しているか。(i)制限酵素, (ii)ターミナルトランスフェラーゼ, (iii)リガーゼ
- (4) pBR322 プラスミドを用いて特定の遺伝子 (外来性 DNA) が挿入されたことはどのような実験で証明されるか。

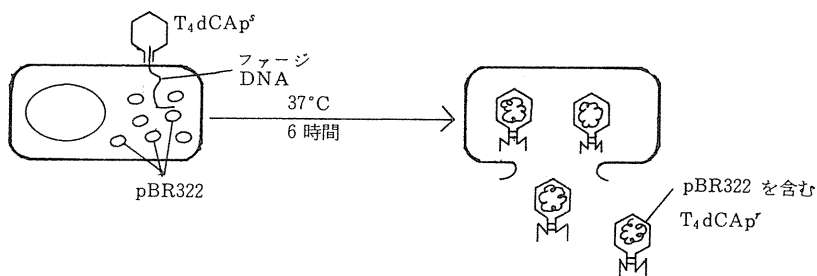
V T₄dCAp^rの形質導入実験

1. 実験原理

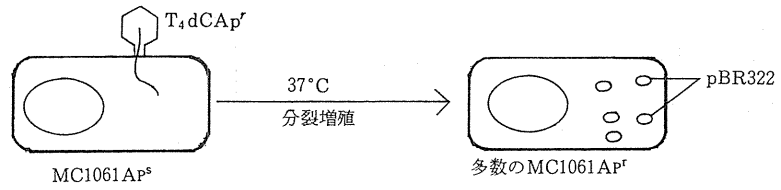
ファージが菌に感染したとき、溶菌しないで特定の遺伝子を運ぶことによって菌の遺伝形質が変化する現象が形質導入である。形質転換より、DNA を受容菌への持ち込むのが簡単である。その上に、ファージ DNA の精製が容易なのでクローニングが楽にできる利点がある。

原理を図解する。

- (1) C600Ap^r r⁻m⁻に T₄dCAp^sを感染させ、T₄dCAp^rを得る。



(2) MC1061Ap^s r⁻ m⁻に T₄dCAp^rを感染させ pBR322の形質導入をはかる。



(3) A⁺の選択培地で pBR322を導入した MC1061Ap^rの選択

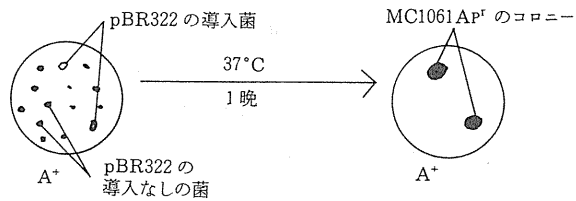
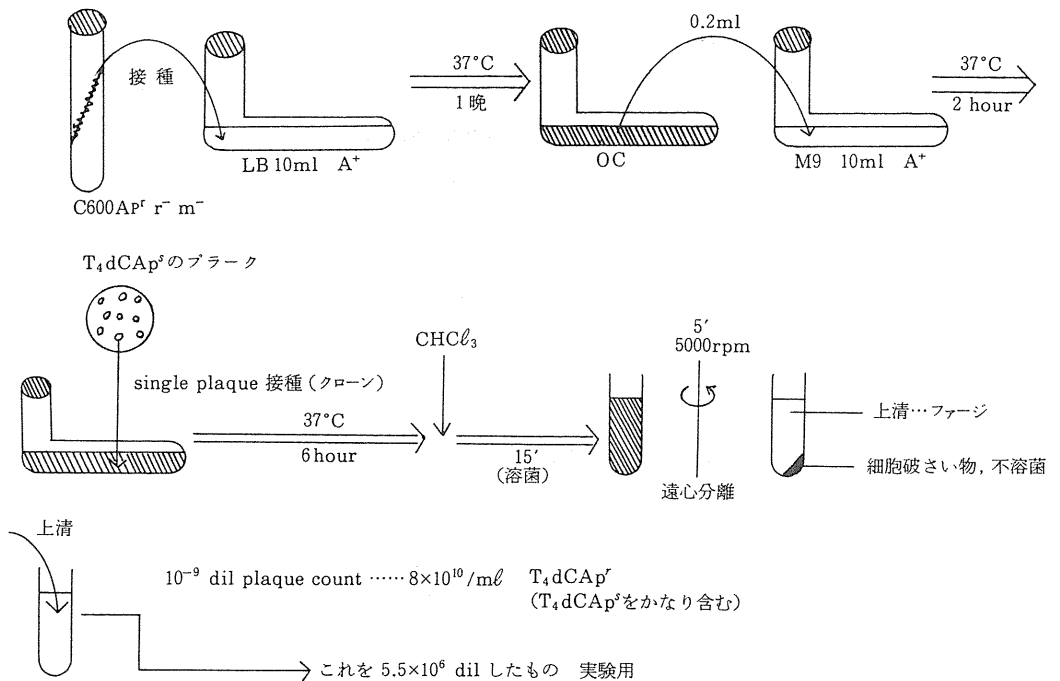


Fig 4 形質導入の原理

2. 実験方法

実験の手順を Fig 5 に図解で示す。

(1) T₄Ap^sから T₄dCAp^rを調整する。



(2) MC1061 (受容菌) の準備

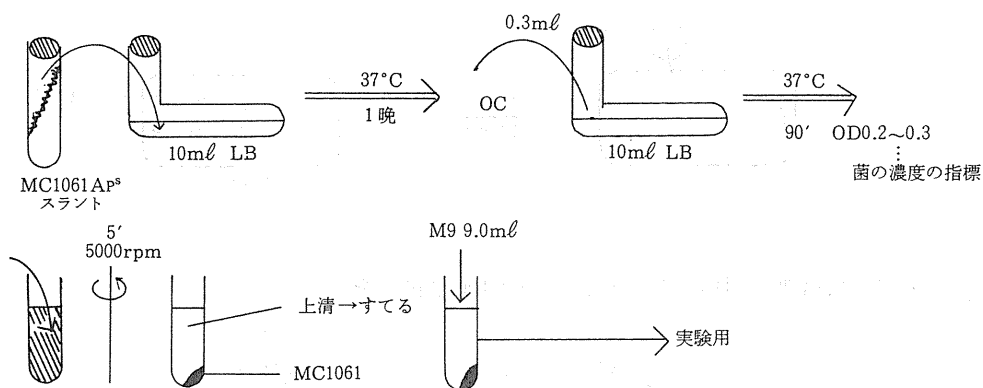


Fig 5 形質導入の実験手順

以上は筆者が準備し、以下は生徒実験である。

(3) L-plate の用意

Ap⁺ : Ap(0.1mℓ) + L-bottom 8枚

Ap⁻ only L-bottom 4枚

(4) T₄dCAp^r フェージ 1本と MC1061Ap^s 0.9mℓ 2本 (I, II と記号する) を 37°C 2分保温

(5) I MC1061 0.9mℓ + T₄dCAp^r 0.1mℓ ……実験区

II MC1061 0.9mℓ + M9 0.1mℓ ……対照区

(6) I, II を 37°C 7分保温

(7) Table 4 のように plate

Table 4 PBR322 の形質導入菌の選択

		Ap ⁻	Ap ⁺
I	10 ⁰	/	2枚
	10 ⁻¹	/	2枚
	10 ⁻⁶	2枚	/
II	10 ⁰	/	2枚
III	10 ⁰	/	2枚

I …MC1061 + T₄dCAp^r

II …MC1061 + M9

III …T₄dCAp^r only : 10⁻⁴ dil. したものを 0.1mℓ ずつ加える。

3. 実験結果

Table 5 は各班の実験結果をまとめた。

Table 5 形質導入の実験結果

班		1	2	3	4	5	6	備 考
I	A ⁺ ₀	185 186	168 176	142 190	58 196	169 199	141 184	MC1061Ap ^r + T ₄ dCAp ^r
	A ⁺ _{10⁻¹}	14 27	16 17	14 14	9 14	12 13	6 18	"
	A ⁻ _{10⁻⁶}	43 46	22 26	29 229	56 673	41 71	24 28	"
II	A ⁺ ₀	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 2	0, 0	MC1061Ap ^r + M9
III	A ⁺ ₀	0, 0	0, 0	0, 0	0, 0	0, 9	0, 0	T ₄ dCAp ^r only
導入率		4.2×10 ⁻⁶	4.0×10 ⁻⁶	1.2×10 ⁻⁶	3.5×10 ⁻⁷	3.2×10 ⁻⁶	6.2×10 ⁻⁶	

4. 結果の考察

生徒実験の導入率は $10^{-6} \sim 10^{-7}$ であまり高くはない。しかし、筆者の予備実験のデータは 5.5×10^{-5} のオーダーである。その点からみるとそれほど低くはなく、生徒実験の結果は実験成功とみなしてよいであろう。II～IIIは、一部の班を除けば0である。5班のIIの2個とIIIの9個のコロニーは、おそらく雑菌のコロニーであろう。

5. 生徒のレポートの考察

生徒のレポートの中の実験結果の考察を引用する。導入率について興味ある討論をしている。

「さて、今回の実験の考察をしたいと思う。まず、II、IIIの数値は0とする。そうすると、IとIIの比較からMC(受容菌)にAp^rを与えたのは、M9中のある成分ではなく、T₄dCAp^rであろうことがわかる。なぜなら、IIではM9のみではコロニーを生じなかったので、IでAp^rを与えたのはM9ではなくそこに含まれるT₄dCAp^rであろうと推測が可能で、かつ自然だからだ。また、このコロニーがT₄dCAp^r自身によるものであるのでは、という疑いに対して対照区としてIIIがもうけられた。ここで、T₄dCAp^rのみでまかれたものが、コロニーを生じなかった。つまりT₄dCAp^rとMCが一緒になって初めてコロニーをつくることがわかった。コロニーを生じるのは、一般に大腸菌の方なので、このコロニーはMCによるものと考えられる。すると、T₄dCAp^rが感染または他の機構でAp^rという形質を与えた、ということがこの実験だけからわかる。そして、遺伝子の本体がDNAであることを考慮に入れるならば、T₄dCAp^rのDNAの全部もしくは一部が、大腸菌へプラスミドとして移されたのではという仮説も成立する。(実際は、Ap^r部分が plasmidらしい)

次に、導入率である。これは、予備実験のときの 5.5×10^{-5} と大きくかけはなれている。これは、一つには、手際の悪さが原因であろう。例えば、Iの 10^{-6} で41, 71と大きくかけ離れているのもおそらく0.1ml分注する際のミスであろう。また、希釈が十分でなかったということも考えられる。しかし、一概にこれだけと決めるわけにはいかないと思う。というのは、ここでいう導入率が、あまり正確なものとは言えないからだ。導入率は次の式で求められる。Ap⁺でのコロニー

数/Ap⁻でのコロニー数。Ap⁺でのコロニー数というのは、T₄dCAp^rの感染を受け、Ap^rの形質をうけたものである。ここで、第二の疑問が出てくる。T₄dCAp^rの感染を受けたもののうち、Ap^rとなった菌の割合が導入率というのではないかという問題である。もし、そうだとすれば、m.o.i.によって単独感染が保証されているので、Ap⁺でのコロニー数/ファージブランク数とした方が正確であるような気がする。また、もし、感染を受けてしまえばすべてが形質導入してしまうとする。そうすると Ap⁺でのコロニー数/Ap⁻でのコロニー数は、感染を受けた菌数/全体の菌数で、あまり意味をもたない。(なぜなら、これは、形質導入の性質というよりも、ファージと大腸菌の濃度差を表すもの) 結局、この実験自体に、形質導入を見るためにはいいが、導入率を示すには、不適といつた性格をもっているのでは? この観点から見ると、約10倍の誤差も許容範囲内だと思おう。」

6. レポートに課した課題

- (1) λファージの特徴は何か。
- (2) 形質導入とは何か。
- (3) ファージベクターの特徴は何か (プラスミドに比較した)。
- (4) 外来性 DNA の組み込みの確認法は何か。

いずれも、生徒に資料を印刷配布し、それを読んでまとめられるようにした。資料の内容はあらかじめ講義で指導したものである。

VI 組換え DNA 技術の教材化の検討

1. 制限酵素、連結酵素を用いないことの可否の検討

組換え DNA 技術の基本は、ベクターであるプラスミド、あるいはファージ DNA に外来性の DNA を Fig 6 のようにリガーゼで切断し、粘性末端をつくることにある。ついでアニーリング

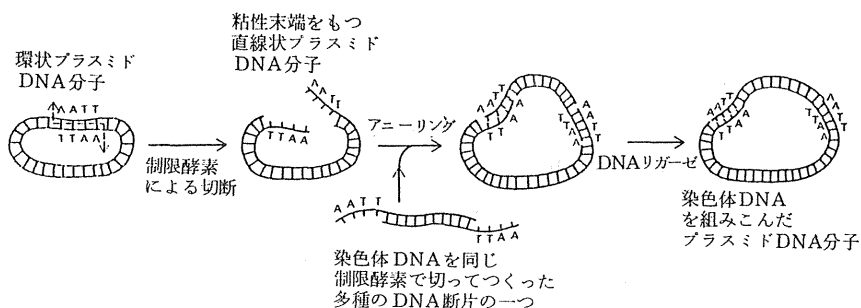


Fig 6 組換え DNA 技術のポイント

で水素結合させる。最後にリガーゼを用いてリン酸ジエステル結合をはかる。このようにしてできたプラスミド、あるいはファージ DNA を細菌などでクローニングするという操作をする。

ところが、今回の実験では、制限酵素とリガーゼを用いる実験は実施しなかった。その理由は次の通りである。

- (1) これらの酵素は、現状では高価で入手困難である。
- (2) 仮りに、酵素を用いたとしても、生徒実験ではできず、教師実験にとどまる。
- (3) 組換え DNA 技術の原理方法は、これらの酵素を用いなくても指導できる。

特に最後の理由に関連していうならば、プラスミドあるいはファージ DNA がどうしてベクターとしてよく利用されるのかを、理由をあげて説明することが重要と考える。また、制限酵素については、細菌の細胞の中での本来のもつ役割は何か、切断の機構と粘性末端の生ずる理由、およびアニーリングによるハイブリッド形成とその利用法の原理を指導することで生徒の興味を喚起できると思う。もちろん、組換え DNA 技術の実験を、全くしないで講義ですませることは、生徒の理解の面では大変困難であろう。

2. 組換え DNA 技術の教材化の可否

選択生物などで、この種の実験を教材として導入するには、一定の前提条件が必要であると考ええる。

いきなり「組換え DNA 技術」に入るのでは、生徒は理解するのに困難であろう。次の諸段階を経て実施することが必要ではないかと考えている。

(1) 細菌の遺伝形質を調べる実験

野生株と比較した栄養要求性変異株の遺伝形質を理解させる。コロニーの特徴を理解させ、定量的方法を同時に学ばせる。

(2) 形質転換実験

「DNA が遺伝子の本体である」ことを実験を通して指導する。この実験系として枯草菌が最もすぐれている。

(3) ファージの遺伝形質を調べる実験

野生株と比較した突然変異株の遺伝形質は、指示菌に対してプラークを形成するか否かで区別できることを指導する。コロニーと比較したプラークの特徴を理解させ定量的方法を学ばせる。

(4) ファージに関する諸実験

一段増殖、シーストランス相補性テスト、組換え実験による遺伝子地図作成など、この中の実験のいずれでもよいが実施して、ファージに対する理解がある程度ないと、形質導入の実験は生徒にとって大変むずかしいものになるであろう。

このような諸実験を経験し、生徒が分子遺伝学にある程度の展望が得られてはじめて組換え DNA 技術の選択生物への導入が可能になるものと考えている。

VII 安全性について

組換え DNA 技術の実験をすすめる上での安全対策については、次の諸点に配慮した。

1. 実験をすすめる上での安全対策

実験をすすめる中で、用いた菌液、器具、培地、廃液などは、すべてオートクレーブ、あるいは乾熱滅菌をし、研究室の外に出ることのないように注意した。また、生徒に対して実験に用いた C600recA, r⁻, m⁻, MC1061recAr⁻, m⁻, T₄dCなどは生物的封じこめに十分配慮された安全

性の高いものであることを指導した。

2. 一般的安全対策について

組換え DNA 技術に関する実験をする研究室は、物理的封じこめ (P1~4) と生物的封じこめ (B1~2) により、外にもれないようにと、またもれた場合周辺に影響のないように、その遺伝形質に配慮されていることを指導した。レポートの課題の1つに安全対策に関するテーマを出題し、まとめさせた。生徒のレポートの一例を先に紹介した。

3. 社会で問題にされている諸点

日本では、国立や民間の研究所が、人間にとって恐しい病原微生物、たとえば発がん遺伝子をもった大腸菌などを研究室外にもらしてバイオハザードをおこす危険性があると不安をもつ地域住民との間で十分なコンセンサスが得られていないなどの問題がある。また、先に紹介した生徒のレポートにも書かれているように、細菌兵器として研究されている危険性について多くの生徒がその不安を訴えている。

VIII おわりに

組換え DNA 技術の成果は、現在の細胞生物学、分子遺伝学、医学の研究などをすすめる上で重要な研究手段として広く応用され、大きな成果をあげている。まもなく、高等学校生物の教科書にも記載されるであろう。

多くの生物教師が、この技術は深い関心をもち、できたら実験を経験したいと希望されているものと推察している。そのような生物教師にこの報告が少しでも参考になれば幸いである。

最後に、実践研究をすすめる上で必須な実験材料を提供して下さり、かつ、適切なご指導を下された東京大学応用微生物研究所斉藤日向教授、ならびに高橋秀夫助教授に深く感謝いたします。

IX 参考文献

1. HIDEO TAKAHASHI AND HIUGA SAITO (1982)
High-Frequency Transduction of pBR322 by Cytosine-Substituted T₄ Bacteriophage :
Evidence for Encapsulation and Transfer of Head-to-Tail Plasmid Concatemers : PLASMID
8, 29~35.
2. Watson 他：細胞の分子生物学 中村桂子，松原謙一共訳 教育社
3. 池田庸之助：遺伝子操作技術入門 株式会社工業調査会
4. 貝沼喜兵：(1969)：やさしい分子遺伝学の実験(1)~(2)：遺伝：裳華房：Vol.23 No.2~3
5. 貝沼喜兵：(1971)：フェージを用いた分子遺伝学の実験：(1)~(4)遺伝：裳華房：Vol.25 No.7~10