

課題の選定 遺伝情報の発現の流れには、DNAの塩基配列をもとにmRNAが転写され、アミノ酸が指定されてタンパク質が合成されるというように方向性がある。この考えはセントラルドグマとよばれ、遺伝情報の発現の大原則である。DNAからRNAが転写され、そのRNAからタンパク質が合成されることを確かめ、セントラルドグマについて理解しよう。

仮設の設定 「DNAからRNAが転写され、RNAからタンパク質が合成される。」

情報収集と実験の計画 転写と翻訳は細胞内で行われるが、コムギ胚芽の抽出液を用いたタンパク質合成法(⇒p.126 **参考**)を用いれば、試験管内で安全にDNAからタンパク質を合成することが可能である。そこで、この方法を用いてDNA→RNA→タンパク質というセントラルドグマの流れを試験管内で再現してはどうかと考えた。RNAはメチルグリーン・ピロニン溶液で染色することで可視化する。また、翻訳されるタンパク質をオワンクラゲの蛍光タンパク質(GFP)とすることでタンパク質の合成を可視化することにした。

準備 転写反应用緩衝液^{*}、リボヌクレオチド溶液^{**}、RNA分解酵素(RNase A)、RNA分解酵素阻害剤、RNA合成酵素(SP6 RNAポリメラーゼ)、GFP遺伝子(*gfp*)をコードしたプラスミドDNA(pEU-GFP)、低融点アガロース、メチルグリーン・ピロニン溶液^{***}、コムギ胚芽抽出液^{****}、アミノ酸溶液^{*****}、マイクロチューブ、透明なフタ付きチューブ、マイクロピペット(⇒p.463)、インキュベーター、ブラックライト、氷

◇ 探究活動の進め方、レポートの書き方などはp.464~465を参考にしてみよう。

* 238.3gのHEPES(ヘペス)を800mLの水に溶かし、KOHを加えてpH7.8に調整し、水を加えて1Lにする。この238mg/mL HEPES-KOH(pH7.8)40mLと142mg/mL 酢酸マグネシウム8mL、14.5mg/mL、スベルミジン10mL、30.9mg/mL ジチオトレイトール25mLに水を加え、全量を100mLとする。

** リボヌクレオチド溶液とはATP、CTP、GTP、UTPの混合液のことである。50.7mg/mL ATP、48.3mg/mL CTP、52.3mg/mL GTP、48.4mg/mL UTPを等量混合する。

*** 加熱した100mLの蒸留水に500mgのメチルグリーンを溶解し、冷えてから30mLのクロロホルムを加え、容器(分液ろうとうが望ましい)を激しく振る。しばらく静置すると、下層にクロロホルム、上層に水が分離するので、上層の水を注意深く別の容器に移す。この水にピロニンY(G)を80mg加えて溶解する。

**** コムギ胚芽抽出液996μLに20mg/mL クレアチンキナーゼ4μLを加える。

***** 20種類のアミノ酸(アラニン2.67mg、アルギニン5.23mg、アスパラギン3.96mg、アスパラギン酸3.99mg、システイン3.63mg、グルタミン4.38mg、グルタミン酸4.41mg、グリシン2.25mg、ヒスチジン4.65mg、イソロイシン3.94mg、ロイシン3.94mg、リシン4.39mg、メチオニン4.48mg、フェニルアラニン4.96mg、プロリン3.45mg、セリン3.15mg、トレオニン3.57mg、トリプトファン6.13mg、チロシン5.44mg、バリン3.51mg)に水を加え溶解する。これに238mg/mL HEPES-KOH(pH7.8)40mL、98.2mg/mL 酢酸カリウム10mL、142mg/mL 酢酸マグネシウム0.27mL、14.5mg/mL スベルミジン0.4mL、30.9mg/mL ジチオトレイトール1.25mL、50.7mg/mL ATP1.2mL、52.3mg/mL GTP0.25mL、15.4mg/mL クレアチンリン酸8mLに水を加え、全量を100mLとする。

方法 実験Ⅰ 転写

- ① マイクロチューブを3本(A, B, C)用意し, 右表のように溶液を混合する。
- ② 37℃で4時間, インキュベーターで反応させる。

▼表 反応液の調製

	A	B	C
蒸留水	8μL	8μL	10μL
転写反应用緩衝液	4μL	4μL	4μL
リボヌクレオチド溶液	2μL	2μL	2μL
10mg/mL RNA 分解酵素	0μL	2μL	0μL
0.1mg/mL RNA 分解酵素阻害剤	2μL	0μL	2μL
0.1mg/mL RNA 合成酵素	2μL	2μL	2μL
1 mg/mL プラスミド DNA	2μL	2μL	0μL
合計	20μL	20μL	20μL

実験Ⅱ RNAの可視化

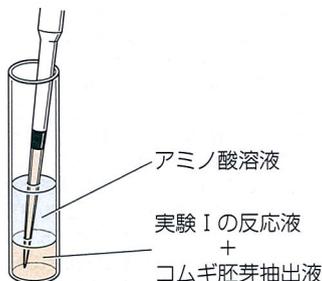
- ③ 20mg/mLの低融点アガロース 8μL をそれぞれのマイクロチューブに入れ, あらかじめ50℃に設定したインキュベーターで暖めておく。
- ④ 実験ⅠのA, B, Cの反応液をそれぞれ2μLずつ, 低融点アガロースの入ったマイクロチューブに入れ, 氷中で冷やし固める。それぞれA', B', C'とする。
- ⑤ アガロースが固まったら, メチルグリーン・ピロニン溶液を20μL加え, 5分間染色する。染色液を加える際, マイクロピペットの先でゲルを浮かし, 全体に染色液が浸るようにする。
- ⑥ 染色液を取り除き, マイクロチューブの半分まで水を加え脱色する。RNAが生成していればゲルは脱色されず赤色のままで, 生成していなければ脱色される。



▲インキュベーター

実験Ⅲ 翻訳

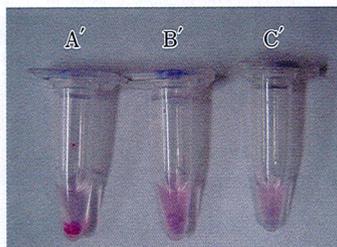
- ⑦ コムギ胚芽抽出液 10μL を実験Ⅰの反応液 A, C 10μL にそれぞれ加え, 穏やかに攪拌する。
- ⑧ アミノ酸溶液 200μL を2本の透明なフタ付きチューブ(底が平らなもの)に入れる。
- ⑨ 実験Ⅰの反応液 Aを加えた溶液と反応液 Cを加えた溶液をそれぞれ実験Ⅲ⑧のチューブ下部からゆっくり加え, 混ぜないようにして二層にする(右図)。それぞれをA'', C''とする。
- ⑩ 常温で, 1~3時間反応させる。



実験Ⅳ タンパク質(GFP)の可視化

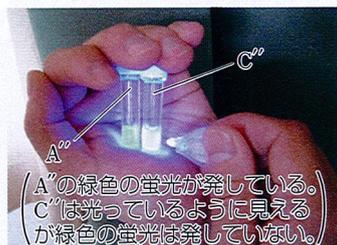
ブラックライトを横から当てて観察する。タンパク質(GFP)が合成されていれば緑色に蛍光する。

- 結果** (1) 実験Ⅱでメチルグリーン・ピロニン溶液を加えるとゲルは赤色になった。また、染色液を取り除いたときは赤色のままであった。
- (2) 水を加えしばらくすると、実験Ⅱのマイクロチューブ内のゲルの色はA'が赤色のまま、B', C'が透明色になった(右上図)。
- (3) 実験Ⅳで、A', C'にブラックライトを当てると、A'は緑色の蛍光を発生し、C'は緑色の蛍光を発生しなかった。



▲実験Ⅱ 結果例

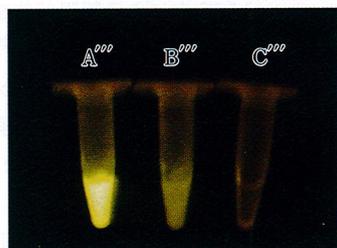
- 考察** ① 実験Ⅱの結果から、転写が起こったのはA, Bのうちどちらと判断できるか。理由も含めて考察してみよう。
- ② 転写には何が必要か考察してみよう。
- ③ 実験Ⅲ, Ⅳの結果から翻訳が起こったのはA', C'のどちらと判断できるか。理由も含めて考察してみよう。
- ④ 翻訳には何が必要か考察してみよう。
- ⑤ 実験結果から考えて、仮説「DNA から RNA が転写され、RNA からタンパク質が合成される。」は正しいといえるだろうか。検証してみよう。



▲実験Ⅳ 結果例

発展 実験Ⅱにおいて、RNAに特異的に結合し、蛍光を発生する色素(RNA 蛍光試薬)を用いてRNAを可視化してみよう。

- (1) 水98μLを3本のマイクロチューブに入れ、それに実験ⅠのA～Cの反応液をそれぞれ1μLずつ加え、それぞれA''', B''', C'''とする。
- (2) 10倍希釈のRNA 蛍光試薬をA''', B''', C'''のマイクロチューブに1μLずつ加え、よく攪拌する。
- (3) 暗所でA''', B''', C'''に青色LEDの光を当て、オレンジフィルターをかけ観察する。



▲結果例

参考

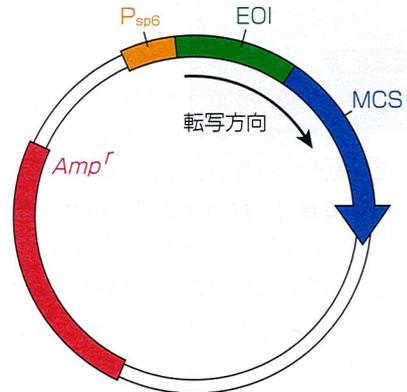
- (1) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法 ニーレンバーグらは、大腸菌の抽出液を用い、試験管内ポリペプチド合成反応に成功した(⇒ p.92)。しかし、翻訳反応が不安定で合成量が極端に低いことから、実用化が困難であった。最近になって、mRNA からタンパク質を合成するコムギ胚芽から調製した酵素を利用して、試験管内でタンパク質を合成する技術が遠藤弥重太によって開発された(2000年)。このコムギ胚芽によるタンパク質合成法は、食用のコムギ種子を原料にした方法なので安全である。また、この方法は生きた生物を使わない(抽出液のみを用いる)反応であることから、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律(通称：カルタヘナ法、⇒ p.463)」の対象外の実験である。
- (2) pEU-GFP pEUはコムギ胚芽の抽出液を用いた試験管内でのタンパク質合成用に作製されたプラスミドであり、P_{SP6}、EO1、MCSとよばれる塩基配列が存在する。

P_{SP6}：SP6 プロモーターとよばれる SP6RNA ポリメラーゼに特異的なプロモーターである。

EO1：翻訳エンハンサーの一種である。

翻訳エンハンサーとは DNA 中では機能せず、転写された mRNA が翻訳されるときにこれを促進する機能がある塩基配列である。

MCS：マルチクローニングサイトとよばれ、制限部位(制限酵素による切断部位)を集めた塩基配列のことである。実験でよく用いられる制限部位が MCS のみに含まれるように設計されている。そのため、



▲ プラスミド pEU

MCS 内にある制限部位を制限酵素で切断した場合、他の箇所は切断することなく MCS のみを切断できる。この探究活動で用いる pEU-GFP は、pEU の MCS に GFP 遺伝子 (*gfp*) を挿入したものである。

Amp^r：アンピシリンを分解する β-ラクタマーゼという酵素の遺伝子で、これが働くとアンピシリン耐性になる(⇒ p.106)。

- (3) SP6 RNA ポリメラーゼ SP6 RNA ポリメラーゼはファージ由来の RNA 合成酵素で、P_{SP6} を含む二本鎖 DNA を鋳型、4 種類のリボヌクレオチドを基質として、P_{SP6} に続く DNA に相補的な一本鎖 RNA を合成する酵素であり、P_{SP6} に特異性を示し、他のプロモーターは認識しない。