

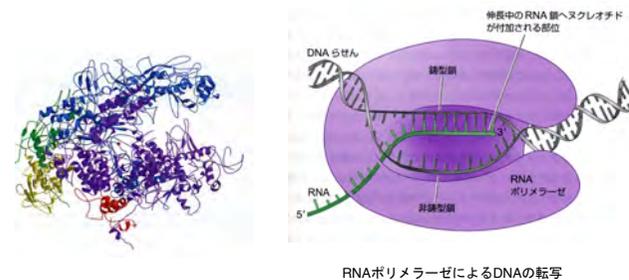
生命理学分属説明会

日時： 11月27日(水) 15:00から
 場所： 理学E館131講義室



RNAポリメラーゼと転写

- ◆複数のサブユニット(大腸菌: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$)
- ◆生物種間での各サブユニットの1次構造の類似性
- ◆高次構造の類似性

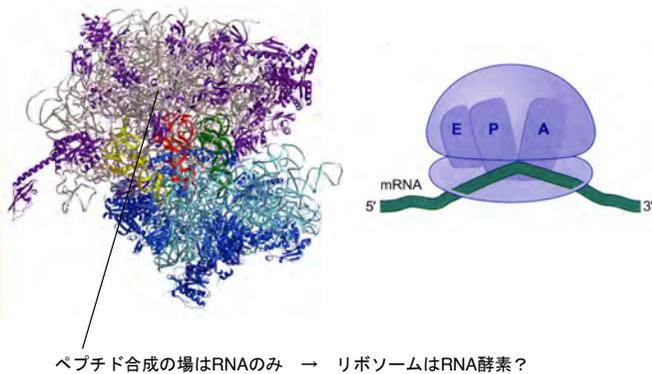


バクテリアのRNAポリメラーゼ

RNAポリメラーゼによるDNAの転写

2

リボソームの構造

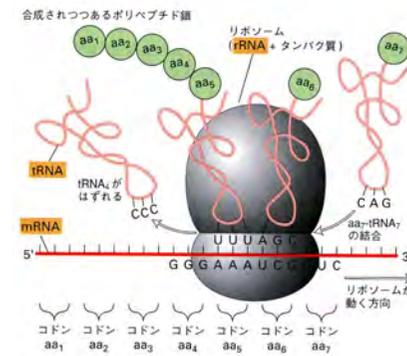


ペプチド合成の場合はRNAのみ → リボソームはRNA酵素?

3

遺伝子発現におけるRNAの役割

- ◆ mRNA: タンパク質合成の鋳型(アミノ酸配列を指令)
- ◆ tRNA: mRNAとアミノ酸のアダプター
- ◆ rRNA: リボソームの構成成分



4

遺伝子とは？ DNAとは？

私たちの身体は、すべて遺伝子という設計図をもとにつくられている

生きものの遺伝情報は、DNAと呼ばれる物質に記されている

情報を運んでいる物質がDNA

A ゲノムとは何か



タンパク質のはたらき

細胞のさまざまな機能には多くのタンパク質が関与
例：分子機械、情報伝達システムなど

タンパク質の働きには立体構造（かたち）が重要

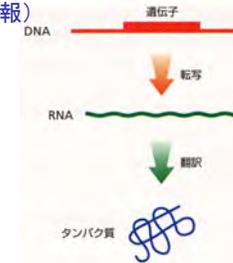
例：酵素と基質の結合（鍵と鍵穴モデル）

立体構造はアミノ酸配列（一次元の情報）

によって決まる

DNA → mRNA → タンパク質

→ タンパク質のはたらきを理解するためにも遺伝子を扱う必要がある



The Nobel Prize in Chemistry 2006



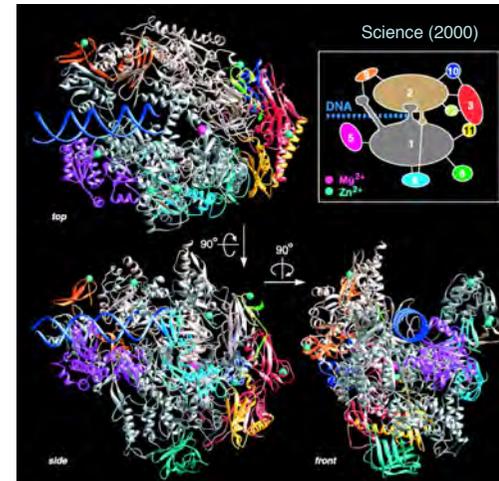
Roger D. Kornberg

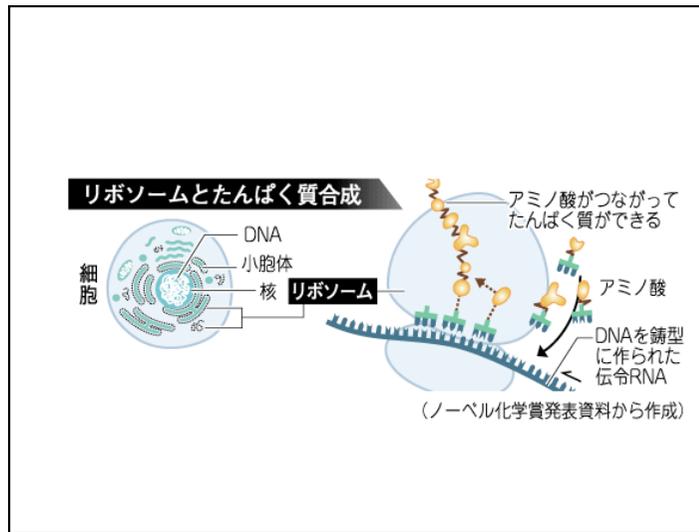
ノーベル賞プレスリリースから

Kornberg's contribution has culminated in his creation of detailed crystallographic pictures describing the transcription apparatus in full action in a eukaryotic cell. In his pictures (all of them created since 2000) we can see the new RNA-strand gradually developing, as well as the role of several other molecules necessary for the transcription process. The pictures are so detailed that separate atoms can be distinguished and this makes it possible to understand the mechanisms of transcription and how it is regulated.

「真核生物の転写の分子基盤に関する」でノーベル化学賞を受賞

酵母RNAポリメラーゼIIの構造





The Nobel Prize in Chemistry 2009



Venkatraman Ramakrishnan

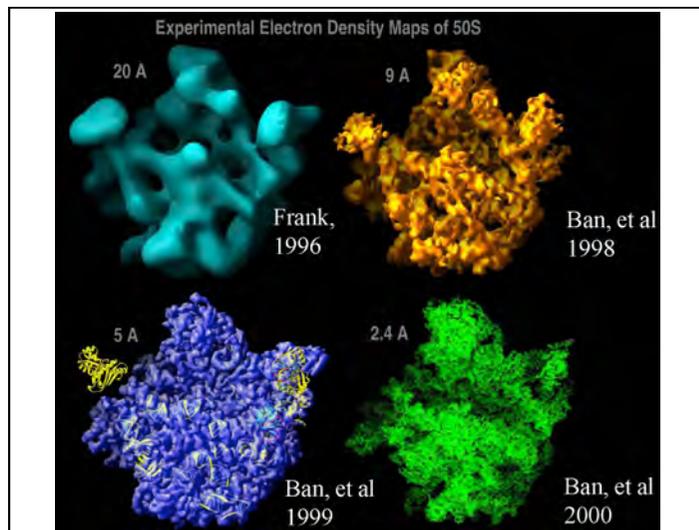


Thomas A. Steitz



Ada E. Yonath

The Nobel Prize in Chemistry 2009 was awarded jointly to Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz and Ada E. Yonath "for studies of the structure and function of the ribosome".



巨大タンパク質構造解析を可能にしたシンクロトロン



兵庫県播磨科学公園都市にあるシンクロトロン放射光施設「Spring-8」

遺伝子の調節:細胞に含まれるDNA量

真核生物		ゲノムサイズ X1000	タンパク質指令 遺伝子数 (推定)
出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	最小のモデル真核生物	12,069	約 6300
シロイヌナズナ <i>Arabidopsis thaliana</i>	顕花植物のモデル生物	約 142,000	約 26,000
線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	発生を完全に記載できる単純な動物	約 97,000	約 20,000
キイロショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i>	動物発生の遺伝子に貢献	約 137,000	約 14,000
ヒト <i>Homo sapiens</i>	最も精力的に研究されている哺乳類	約 3,200,000	約 24,000

ゲノムサイズや遺伝子数は、特に細菌と古細菌の場合、同じ種でも系統によって異なる。表のデータは配列決定された特定の系統のもの。遺伝子には何通りものタンパク質を生じるものが多いので、ゲノムによって規定されるタンパク質の総数は遺伝子数よりかなり多い。

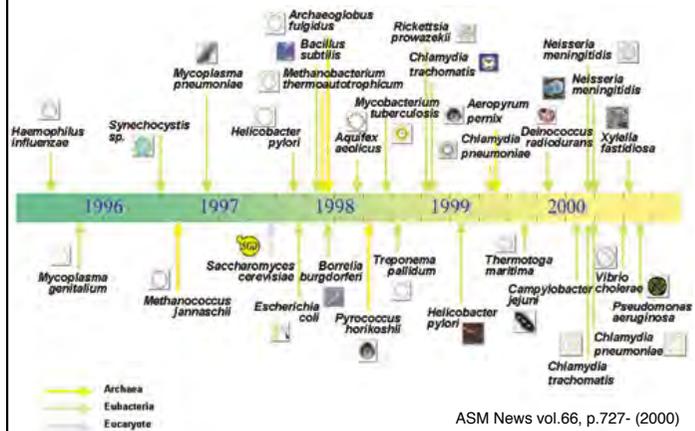
組み換えDNA技術からゲノム配列決定

1975年: カリフォルニアのアシロマにおいて、組換えDNA実験の安全性に関する激しい論争が、研究者の自主的な会議において展開され、組換えDNA実験の本格的な幕開けとなった。
 1979年: 3月我が国においても、組換えDNA実験の開拓に向け「大学等の研究機関等における組換えDNA実験指針」が文部省大臣告示。
 1980年: 東京大学医科学研究所および大阪大学微生物病研究所に、組換えDNA実験施設が設置された。
 1983年: 東京大学遺伝子実験施設を皮切りに、逐年、組換えDNA実験施設が整備されるようになった。(施設予定地から江戸時代の土器が出土)
 1990年: 米国によってヒトゲノム計画は発足。
 1995年: 独立生活を営む生物(細菌)の最初の完全なゲノム配列決定。
 2003年: ヒトのゲノム配列の完全版が公開。

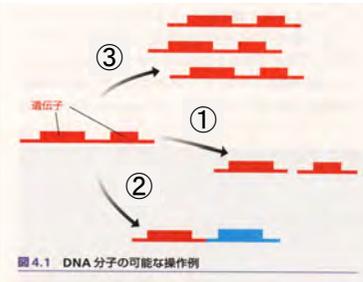
ゲノミクス から **プロテオミクス**
 配列解読 から **インフォマティクス**

結局 生命現象理解のために、
タンパク質の機能解析をおこなう

細菌ゲノム決定のタイムテーブル



DNA を操作する



遺伝子を
 ①切ったり
 ②貼ったり
 ③増やしたり

- ・ DNA鑑定
- ・ 遺伝子診断 (治療)
- ・ 遺伝子組み換え作物

遺伝子工学: 遺伝子操作の道具

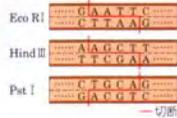
ベクター DNAの運び屋



本図のプラスミド
外来のDNAを細胞内に運ぶ役目をするDNAをベクター(運び屋)という。大腸菌に対してはプラスミド(菌体内にある小さな環状DNAで自己増殖する。ori)などが使われる。

遺伝子操作と酵素 DNAを操作する酵素

【制限酵素】切断のための「はさみ」



【逆転写酵素】
制限酵素には RNAを鋳型にしてDNAを合成する酵素。通常の転写酵素(RNAポリメラーゼ)の逆の働きをする。RNAを遺伝子として持っているレトロウィルスの研究から発見され、遺伝子操作に利用されている。

【リガーゼ】接着のための「のり」

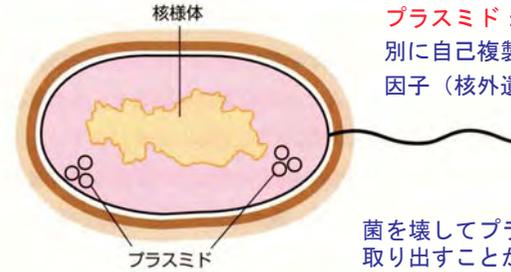


リガーゼは DNA鎖をつなぐ酵素である。

プラスミド

レプリコン: 複製起点をもち、それによって自己複製できるDNA分子

プラスミド: 染色体とは別に自己複製される遺伝因子(核外遺伝子)



菌を壊してプラスミドだけを取り出すことができる

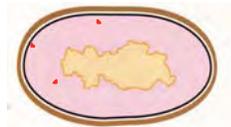
プラスミドはある種の原核生物細胞の中に見いだされる小型の環状DNAである

形質転換

プラスミドをもたない大腸菌細胞(薬剤感受性)



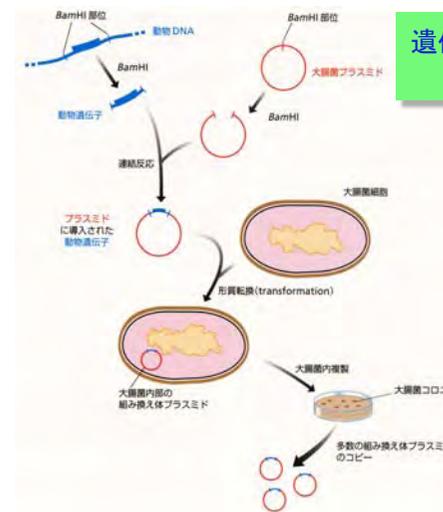
精製したプラスミド DNA (薬剤耐性遺伝子を含む)

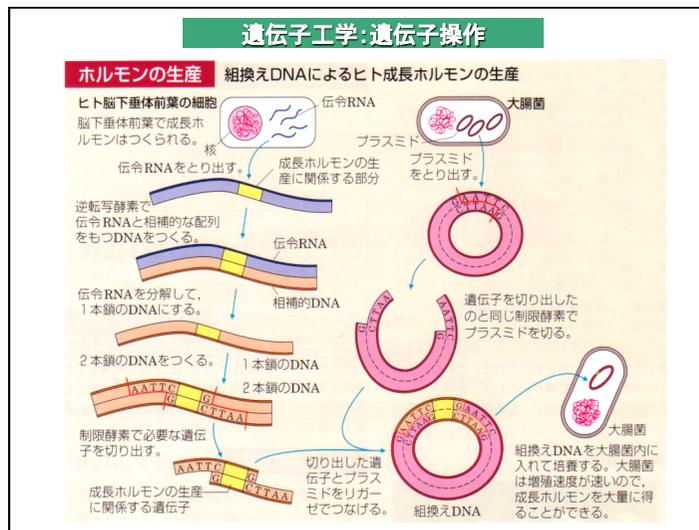
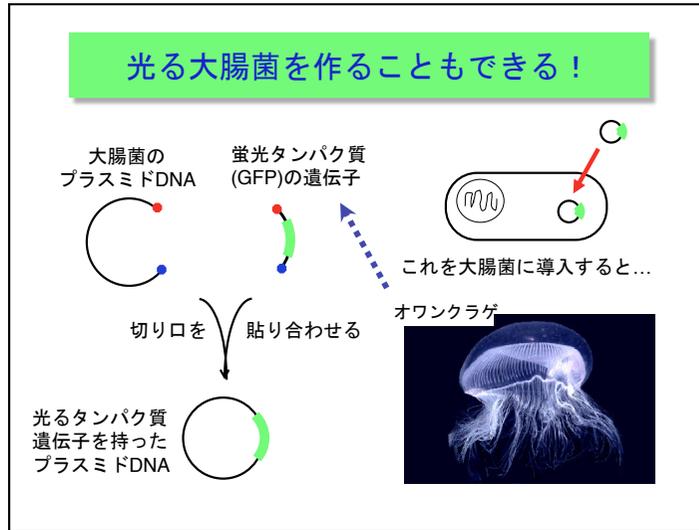


プラスミドを獲得した大腸菌細胞(薬剤耐性) = 形質転換体

- 1) カルシウム処理法
- 2) 電気穿孔法
- 3) パーティクルガン法

遺伝子クローニングの概要





DNA 塩基配列の決定 (ジデオキシ法)

ジデオキシヌクレオチド

* dNTPのOH基がH基に入れ替わっている位置

ジデオキシヌクレオチドがDNAポリメラーゼによってDNA鎖に取り込まれると、それ以上伸長しなくなる。

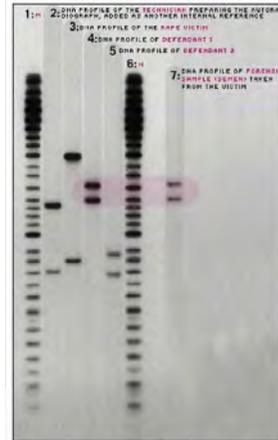
(A) 通常の合成原料。少数のジデオキシリボヌクレオチド(ddNTP)が混入すると、DNAポリメラーゼによって、たまたまジデオキシリボヌクレオチドが取り込まれると、DNA鎖はそれ以上伸長しない。

(B) DNAポリメラーゼによって、DNA鎖が伸長する。ddNTPが取り込まれると、DNA鎖はそれ以上伸長しない。

実際に使われている例

DNA鑑定を用いた犯罪捜査
これはアメリカでの一例。

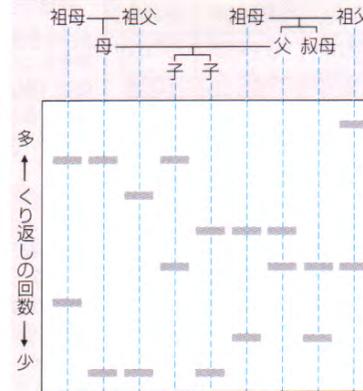
1. サイズマーカー
2. 技術員のDNA
3. 被害者のDNA
4. 容疑者 1 のDNA
5. 容疑者 2 のDNA
6. サイズマーカー
7. 犯人のDNA



裁判所に出す証拠としても最も信用されるものとされている

遺伝子工学:DNA鑑定による親子の識別

親子鑑定



あるくり返し配列を調べると、図のように、くり返しの回数は親から1つずつ受け継いでいる。1つは母親由来、もう1つは父親由来であることがわかる。

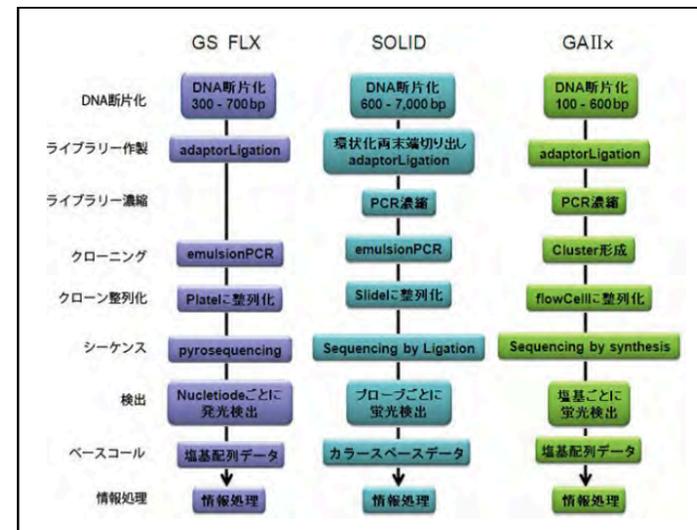
このように比較すれば、親子かどうかを判断することができる。

ただし、血縁関係にあっても必ずしも同じくり返し回数をもっているとは限らない。たとえば図の例では、子ども、子のひとりと叔母は異なっている。

次世代シーケンサーSOLiDを使用した染色体DNAの解析

SOLiDによる解析の流れ

- ゲノム(フラグメント)ライブラリーの作成
- ePCRとビーズ調製
- シーケンス反応
- データ解析



<機器の特長>

	GS FLX	SOLID	GAIIx
1リード長	300~400 base	50 base	75 base
1ランあたりのデータ量	約400 Mb	約60 Gb	約6~12 Gb
解析手法	Pyrosequencing	Sequencing by Ligation	Sequencing by Synthesis
アプリケーション例	新規ゲノム解析 cDNA解析 各種PCR産物解析	ゲノム変異解析	ゲノム変異解析 ChIP解析 small RNA解析 cDNA解析

↑
今なら100万円で
細菌のゲノム配列を
決定してもらえる

問1 ヒトのゲノムサイズ(塩基対)は？

(1)30万 (2)300万 (3)3000万(4)3億 (5)30億 (6)300億

問2 ヒトの推定遺伝子数は？

(1) 2400 (2)24000 (3)240000 (4)2400000 (5)24000000

問3 遺伝子増幅をする方法とは？

(1) PBR法 (2) PMB法 (3) PKC法 (4) PPR法 (5) PCR法

問4 遺伝子操作でもちいるDNAを切断する酵素名は？

(1) 制限酵素 (2)消化酵素 (3)分解酵素 (4)切断酵素 (5)限定酵素

問5 ヒトゲノム配列が完成した年は？

(1)1983年 (2)1988年 (3)1993年 (4)1998年 (5)2003年

問6 大腸菌で遺伝子操作に使われる遺伝子の運び屋は？

(1)プラスチド (2)プラスチック (3)プラカード (4)プラスミド (5)プチミド

問7 大腸菌のゲノムサイズ(塩基対)は？

(1) 46万 (2)460万 (3)4600万(4)4.6億 (5)46億 (6)460億

問8 はじめての細菌のゲノム配列が決定された年は？

(1)1980年 (2)1985年 (3)1990年 (4)1995年 (5)2000年