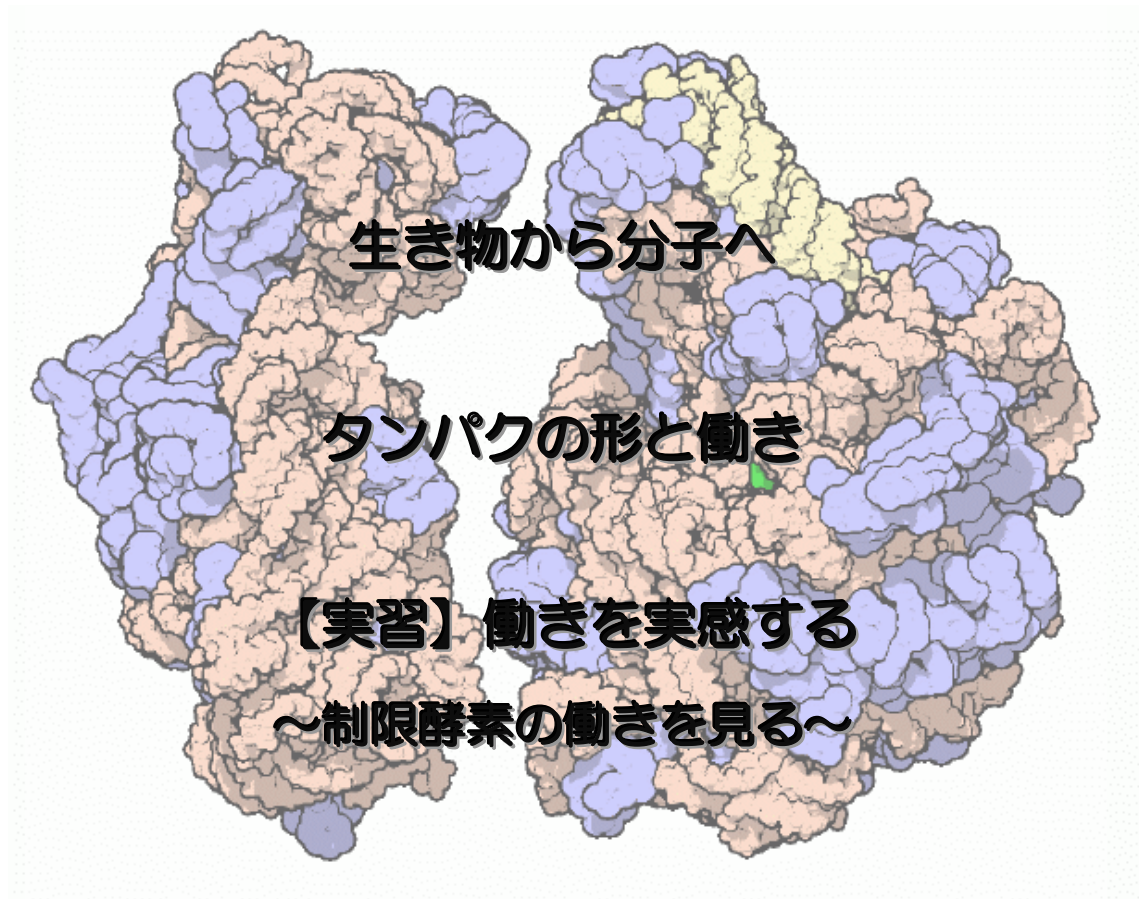




# タンパクを知っていますか



静岡県ニュートンプロジェクト  
ターゲットタンパク研究プログラム(<http://www.tanpaku.org/>)  
国立遺伝学研究所(<http://www.nig.ac.jp/museum/msg.html>)

国立遺伝学研究所講堂とゲストハウスにて  
2010年10月29日

(画像は Ribosome (Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/>))の  
2000年10月 Molecular of the Month より))



本資料はは [クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 表示 2.1](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.1/) のもとでライセンスされています。

# 生き物から分子へ

細胞遺伝研究系 微生物遺伝研究部門・日誌 光治

みなさん、すでに高校の授業で「タンパク質」について学習したことと思います。でも、みなさんの体の中でタンパク質がはたしていることを実感できていますか？あるいは、タンパク質がはたらく姿を、想像できますか？

タンパク質は、多様な性質をもった「分子」です。そのタンパク質の分子、非常に小さな分子、アミノ酸という部品をつなぎ合わせてできあがった分子が、細胞の中（あるいは外）で、実に様々な機能をはたしています。

まず、いかに色々な役割を個々のタンパク質が果たしているか、いくつかの例について紹介します：DNA を細胞の中に折りたたんでいるタンパク質。筋肉を収縮させるために“動く”タンパク質。細胞膜のなかでイオンを通過させる通り道となっている“開閉するトンネル”のようなタンパク質。DNA に結合して、遺伝情報を読み出す量を調節する役割を果たしているタンパク質。

このように、タンパク質は、一つ一つまったく異なる性質や役割を担っています。そのタンパク質の設計図は、遺伝子に書き込まれています。しかし、遺伝子の DNA 配列を知ることが出来ても、その遺伝子から読みだされるタンパク質のはたらきについては、限定的に予測することしかできません。ですから、個々のタンパク質について細胞内でのそのはたらきを解明する研究が、とても重要なのです。

## タンパク質の形と働き

構造遺伝学研究センター・伊藤 啓

「タンパク質」と聞いて、まず頭に思い浮かべるものは何でしょうか。栄養分？ 髪の毛？ 筋肉？どれも正解ですが、ミクロの世界に目を向けるとタンパク質のまた違った本来の姿が見えてきます。細胞の中では様々な機能を持った無数のタンパク質が生命活動を支えるために働いており、タンパク質無くしては、我々生物は生きていけません。

タンパク質は遺伝情報を元に細胞の中で作られます。遺伝子の情報に従ってアミノ酸が紐状につながって作られたポリペプチドで出来ています。ポリペプチドは複雑に折りたたまれて、機能を持つタンパク質となります。タンパク質が、DNA など他の紐状分子と異なっているところは、それぞれのタンパク質が独特の立体構造を持ち、その構造が機能へと深く関わっているところです。

そんなタンパク質の働きを理解するためには、立体構造を知る事が欠かせません。一つ一つのタンパク質分子は非常に小さくてナノメートル（10億分の1メートル）のサイズです。もはや光学顕微鏡では見る事が出来ません。そこで X 線を用いたり、研究者は様々な方法を駆使してタンパク質が働く仕組みを、まさに原子のレベルで詳しく解析しようとしています。そうしたタンパク質研究から得られる成果は、生命の謎を解き明かすために基礎科学分野で貢献するのみならず、医療、創薬分野を始めとして、我々の生活にも活かされています。



本資料は [クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 表示 2.1](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.1/) のもとでライセンスされています。

ターゲットタンパク研究プログラム情報プラットフォーム  
代表研究者  
国立遺伝学研究所特任教授 菅原秀明



生きものら分子へ  
国立遺伝学研究所  
細胞遺伝研究系微生物遺伝研究部門  
助教 日詰 光治

タンパク質の形と働き  
国立遺伝学研究所  
構造遺伝学研究センター  
助教 伊藤 啓



本資料はは[クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 表示 2.1](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.1/)のもとでライセンスされています。

# タンパク質の働きを実感する

～制限酵素の働きを見る～



### (目的)

塩基配列特異的に DNA を切断するタンパク質、制限酵素の働きを確認することにより、タンパク質が「活きた分子」であることを実感する。酵素によって切断される配列を持つ DNA が、制限酵素によって実際に切断される事を、アガロースゲル電気泳動を用いて確認する。生命科学で必要不可欠となっている遺伝子組み換え操作の雰囲気を経験する。

### (器具、試薬)

- マイクロ・ピペッターと、ピペット用チップ
- エッペンチューブ
- アイスボックス
- DNA 溶液
- 制限酵素溶液
- バッファー溶液（制限酵素を含まない）
- ローディング・バッファー
- 油性マジック
- フローター、恒温槽、電気泳動槽、泳動バッファー、ゲル撮影機、ラテックス手袋、DNA サイズマーカー（共通）

### (実験実施時の注意事項)

- 全ての溶液類は、使う時以外はアイスボックスの中で氷冷しておくこと！
- マイクロ・ピペッターの取り扱いには注意すること！
- 実習で用いるゲルは、DNA 染色剤として臭化エチジウムを含んでいる。臭化エチジウムは遺伝子毒性を持ち、発癌性が疑われている。ゲルや泳動バッファーが皮膚に直接付着しない様、サンプルをゲルにのせる際には、必ずラテックス手袋を装着すること！
- 実験方法を良く読み、手順を理解してから操作に移ること！



(実験操作)

- 本実習では、pET-22b プラスミド由来 DNA を制限酵素 EcoR I で切断する。
1. 2個のエッペンチューブを準備し、それぞれのキャップに油性マジックで1と2の印を付ける。
  2. 印を付けたエッペンチューブに、それぞれ下記の分量ずつ混合する。

3.

		チューブ 1	チューブ 2
2 本 の チ ュ ー ブ	DNA 溶液	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
	バッファー溶液	5 $\mu$ L	0 $\mu$ L
	制限酵素溶液	0 $\mu$ L	5 $\mu$ L
	合計	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

ユ

ーブをフローターに固定し、37℃恒温槽に浮かべて30分間反応させる。

4. 2本のチューブに、それぞれ2  $\mu$ Lずつのローディング・バッファーを加えて混合する。
5. 10  $\mu$ Lをアガロース・ゲルにロードし、20分間電気泳動する。
6. 泳動が終わったゲルを撮影機で撮影し、得られた写真から泳動結果を検討する。

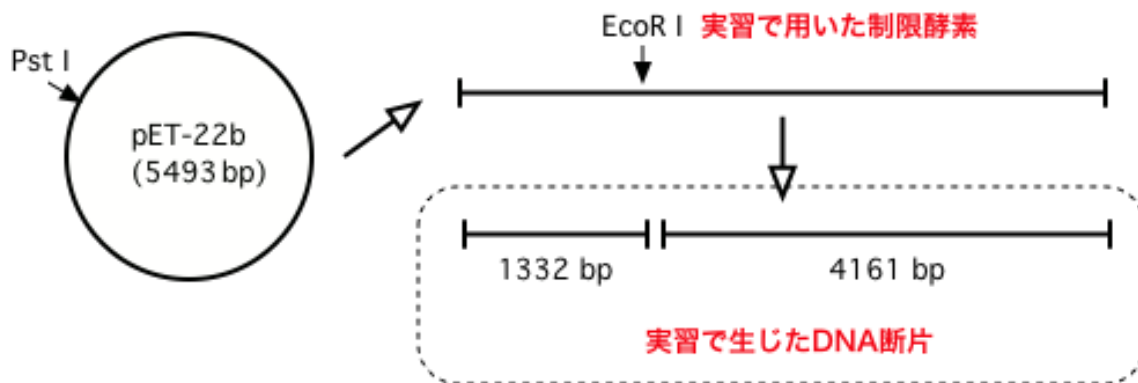




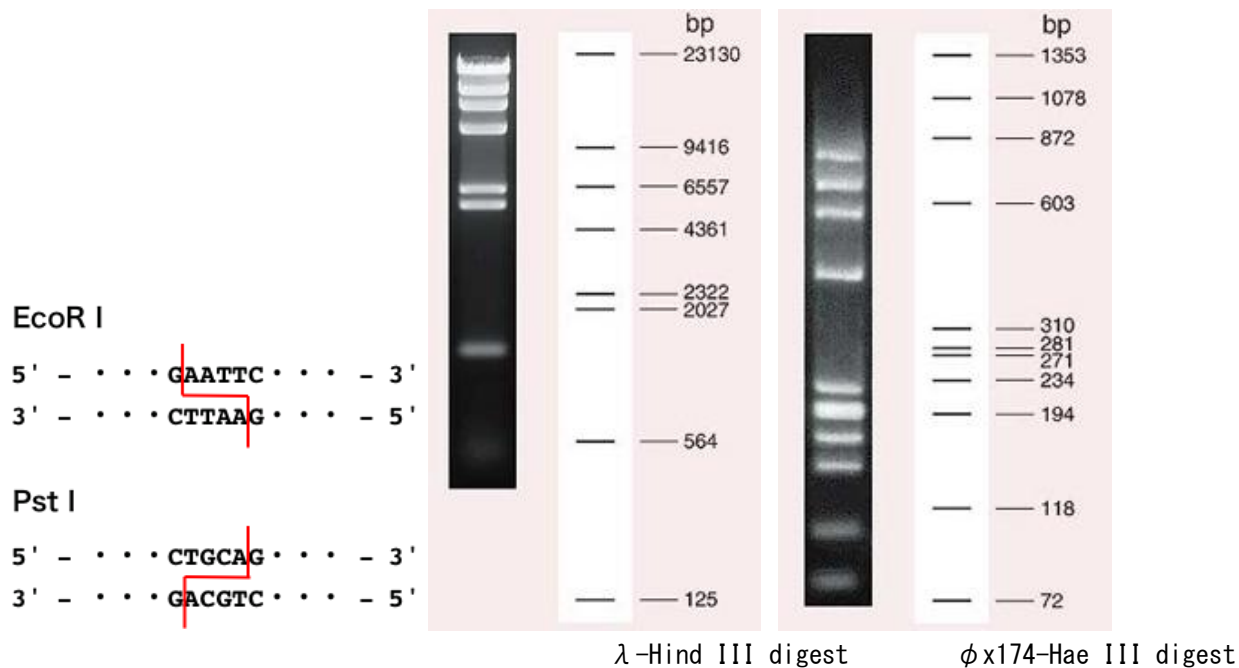
**(実験結果の検討)**

- チューブ 1 は対照実験区 (制限酵素無し)、チューブ 2 は制限酵素を含む実験区である。科学実験は全て、対照実験区と実験区との比較によって結論を導く。
- 本実習で用いた DNA は全長約 5500 bp (base pairs, 塩基対) であり、Pst I という制限酵素で切ってあらかじめ直鎖化してある。皆さんが EcoR I で切断する事により、本 DNA は約 1300 bp と約 4200 bp とからなる 2 本に分離される。

(今回の実習で行った操作)



(参考: 実習に関連する制限酵素の切断配列と、DNA サイズマーカー)



## (用語解説)

### ● 制限酵素：

それぞれ特異的な切断配列を持つ多数の制限酵素がこれまでに単離されている。制限酵素を選ぶ事で、DNAを任意の配列で切り出す事が出来る。DNAをつなぐ酵素（ライゲースと呼ばれる）と合わせて、遺伝子組み換え実験に欠かすことが出来ないタンパク質である。

制限酵素とは、元々は微生物が自己防衛のために、侵入してくる外来遺伝子を分解するために持っていたタンパク質であり、それぞれの酵素が切断するDNAの配列、その切り口の形も様々である。それらタンパク質の働きが遺伝子の「切り貼り」をするのにたまたま都合だったため、人類が本来の目的とは異なる用途で便利な道具として勝手に利用しているだけなのだが、それが遺伝子工学という新たな地平を切り拓いた。現在、実に200種以上の制限酵素が単離され、試薬メーカーから販売されている。制限酵素などはほんの一例に過ぎないが、自然界は我々が驚く様な巧みな仕組みや生理活性を持つ物質の宝庫なのであり、科学分野、産業分野に大きなインパクトを与える未知なる大発見の可能性を秘め続けている。そして、各企業が懸命にその産業利用の可能性を狙っているのだ。名古屋で行われてきたCOP10（生物多様性条約第10回締約国会議）で各国が必死に権利を主張する理由もそこにある。

### ● プラスミドDNA：

バクテリアや酵母の細胞質中に存在する、ゲノムDNA以外のDNA。一般的に環状2本鎖DNAである。小型で扱いやすく、遺伝子組み換え操作に良く用いられる。今回の実習で用いたpET-22bはタンパク質研究で良く用いられるプラスミドである。目的タンパク質の遺伝子を本プラスミドに組み込んで大腸菌に導入する事により、特定の条件下でその目的タンパク質を大腸菌細胞内にて大量に産出させることが出来る。安全性を鑑みて、本実習で用いたプラスミドは遺伝子が組み込まれていない空の状態であり、更に直鎖化し複製不能にしてある（遺伝子組み換え実験は、安全性確保について認可を受けた実験室でのみ可能である）。

### ● DNAのアガロースゲル電気泳動：

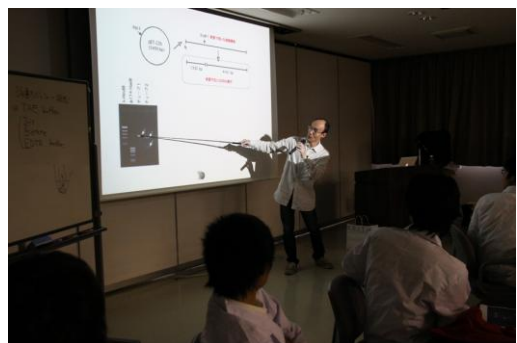
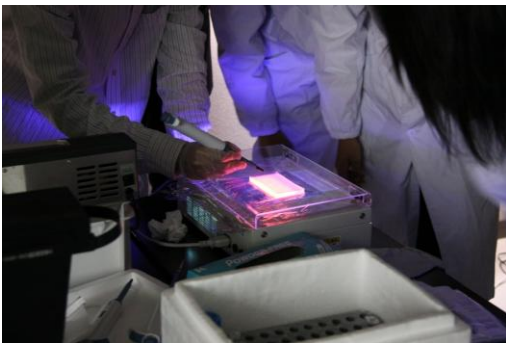
DNAはリン酸基を含むため負の電荷を帯びているので、電界中に置くと正の方向へ移動しようとするが、この時、アガロースゲルの網目の中をくぐらせてやると、分子の大きさによってそれぞれ網目の中での移動のし易さが異なるため移動度に差が生じる。この性質を用いて、DNA分子の大きさを調べたり、異なる長さのDNAの混合物を分離したりする手法である。





## 講義と実習風景

(ここに掲載されている写真は、国立遺伝学研究所ホームページ、文部科学省ターゲットタンパク研究プログラム Web サイトならびに国立遺伝学研究所要覧に限り使用が認められています)



本資料はは[クリエイティブ・コモンズ・ライセンス 表示 2.1](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.1/)のもとでライセンスされています。