

大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻生物工学コース
進化生命システム学領域

担当教官：塚田 幸治 助教

TA：桑田 幸奈・近藤 脩平（修士2年）

「核酸分解酵素活性の測定」

背景と目的

最近の生活用品売り場には、アレルギー対策やアトピー対策の意味もあってか、多種多様な清潔グッズや抗菌コートを施された商品が並ぶようになった。我々人間は日々、無数の病原菌やウイルスと出会い、時には打ち勝ち（流行性感冒など）、時には共存（消化管内細菌など）、時には屈しながら（肝炎の一種、AIDSなど）生きている。外界に接する最前線である皮膚、気道、鼻粘膜、口腔などは、最初の防波堤となっている体の器官といえる。したがって、皮膚や粘膜には多様な免疫担当細胞が局在していることが知られている。

一般に我々にとっての外敵はタンパク質と核酸から構成されている（微生物の場合は脂質や糖質も主要な構成成分である）ため、「汗」や「唾液」の中には、これらを分解する活性を有するタンパク質（酵素）群が存在する。

本実習では、核酸分解活性を有する酵素である DNase と RNase に着目し、我々の「汗」や「唾液」にこれらが含まれていることを確認する。さらに、酵素タンパク質の特徴を知る上で有効な「耐熱性」や、核酸分解酵素の「配列特異性」についても調べたい。

今回の実習の背景の理解を目指して、事前課題として以下の3点について調査・考察していただいた。

1. 遺伝情報を載せた高分子である DNA と RNA の構造をよく見て、その分子構造の中に見出されるそれぞれの特徴を「同様な点」と「違う点」に分けて、化学の言葉で説明してください。また、それぞれを構成している4種の塩基個々について、「同様な点」と「違う点」に分けて、化学の言葉で説明してください。
2. 微生物をはじめとして、細胞性生物はほとんど全てが DNA をゲノムとして用いています。一方、ウイルスの間には DNA をゲノムとして利用していないものが多いのですが、皆さんはどういったウイルスを知っていますか。（インフルエンザ、肝炎ウイルス、SARS、ヘルペス、エイズ、・・・他にも

調べてください) また、それらのゲノムはDNA でしょうか、RNA でしょうか。

3. 「酵素」って何ですか (どんな性質を持っているでしょうか)。また、世の中にあったら便利 (高く企業が買ってくれる) と思う「酵素」を3つ、理由とともに提案してみてください。

1 では、

核酸は次のように五炭糖、リン酸および塩基から成る。

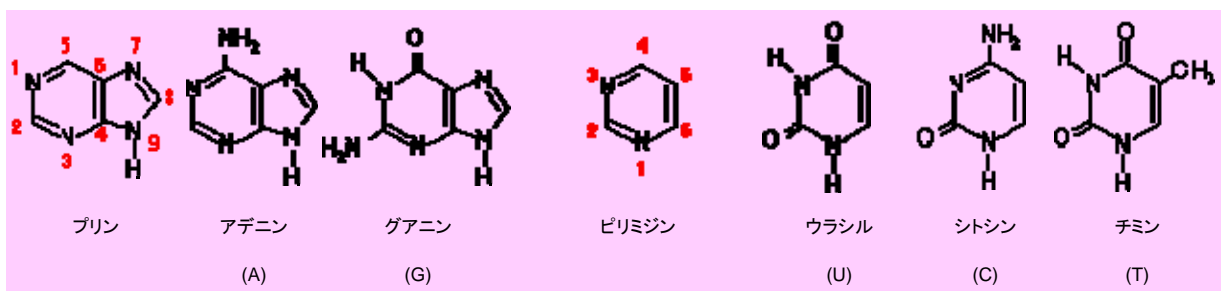
五炭糖にはリボースとデオキシリボースの2種があり、リボ核酸 (RNA) にはリボース、デオキシリボ核酸 (DNA) にはデオキシリボースが含まれる。

デオキシリボースはリボースの2位の-OH基がHに置換された構造をしている。

核 酸	β-D-リボース…RNAにのみ存在	
	五炭糖 2-デオキシ-β-D-リボース…DNAにのみ存在	
	リン酸 H ₃ PO ₄	D-リボース デオキシ-D-リボース
	塩基 プリン系 …アデニン、グアニン	
	(base) ピリミジン系 …シトシン、ウラシル(RNAのみ)、チミン(DNAのみ)	

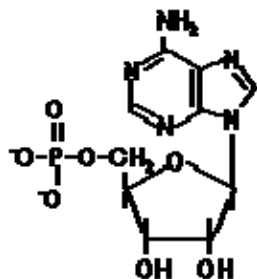
塩基はアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、ウラシル(U)、チミン(T)の5つがあるが、RNAではA, G, C, U、DNAではA, G, C, Tが含まれる。

DNAに含まれるチミンは、RNAに含まれるウラシルの-Hが-CH₃基に置換された構造をしている。

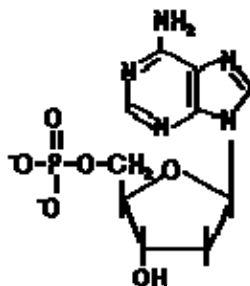


リボースやデオキシリボースの1'位に塩基が結合した化合物をヌクレオシド(nucleoside)と

いう。ヌクレオシドの 5'位にリン酸がエステル結合した化合物を**ヌクレオチド(nucleotide)**という。

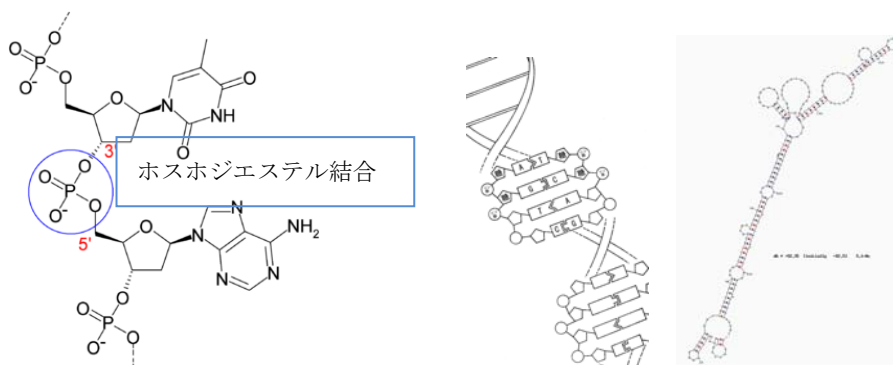


アデノシン 5'-リン酸
(AMP)



デオキシアデノシンー
リン酸(dAMP)

DNA と RNA はこれらのヌクレオチドがホスホジエステル結合により結合することで鎖を作る。DNA では 2 重螺旋、RNA は複雑な高次構造として存在している。



2 では、

ウイルスは基本的に粒子の中に DNA か RNA を持っており、その形態によって 7 つに分類される。

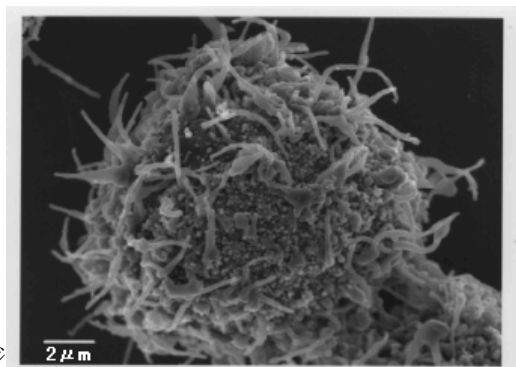
1. 第一群 2 本鎖 DNA (ex. 天然痘ウイルス)
2. 第二群 1 本鎖 DNA (ex. M13 ファージ)
3. 第三群 2 本鎖 RNA (ex. コロラドダニ熱ウイルス)
4. 第四群 1 本鎖 RNA + 鎖 (ex. SARS ウイルス、コレラウイルス)
5. 第五群 1 本鎖 RNA - 鎖 (ex. インフルエンザウイルス、はしかウイルス)
6. 第六群 1 本鎖 RNA 逆転写 (ex. HIV)
7. 第七群 2 本鎖 DNA 逆転写 (ex. B 型肝炎ウイルス)

人に関わるウイルスは現在のところ第 4 群に多く見つかっている。

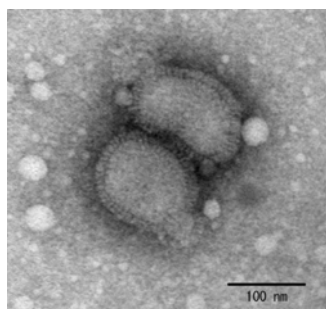
ウイルスは遺伝子による分類の後、さらにその形によっても分類される。



M13 ファージ



HIV



インフルエンザウイルス



T7 ファージ

3では、

酵素は生体内での化学反応を促進する、触媒の役割を果たしている。天然の生物が持つ酵素は古くから利用されており、醤油や味噌といった発酵食品はその代表である。昔から通常ならば進まない、または時間がかかるような化学反応を酵素の力を借りて実現してきた。現在でもバイオエタノールの産生に関わるような工業的に有用なものから、成長ホルモンをブロックして、ミニ植物を作るような変わったものまで様々な酵素が発見・研究されている。

実習内容

- I. 活性と濃度が既知の精製酵素 DNase、RNase を用いて、活性値と観測量（蛍光強度）との関係を捉える。
- II. 採取した試料（皮膚から、及び唾液）を適当な倍率で希釈したもので、Iと同様に観測する。Iで得た活性値と観測量との関係を元に試料に含まれていた酵素活性を算出する。
- III. I、IIと同じ精製酵素、試料を 98°Cで 30 分間。これらの活性を I、IIと同じ様に求める。
- IV. 唾液試料の残りを使って、λ-DNA を切断してみる。比較として制限酵素の 1つである *Sfy* I を使用する。両者の切断様式の差をアガロース電気泳動により調べ、唾液中の酵素と制限酵素との違いを実際に確かめる。

使用するもの

- Ambion 社 DNaseAlert Kit
 - Substrate solution
 - DNaseAlert Buffer(10×)
 - DNase I (70 unit/μl)
- Ambion 社 RNaseAlert QC System
 - Substrate solution
 - RNaseAlert Buffer(10×)
 - RNase A (1×10^{-5} unit/μl)
- 緩衝液
 - TE buffer
 - Phosphate buffered saline (PBS)
- 滅菌超純水
- λ-DNA 溶液 (300 ng/μl) (λファージのゲノム DNA)
- Sfy I (New England Biolab 社) と NEB buffer #3
- 1% アガロースゲル
- 電気泳動用緩衝液 (TAE)
- その他
 - オートピペッター (フランス Gilson 社の P20、P200、P1000)
 - 1.5 ml サンプルチューブ
 - 8 連チューブと 8 連のフタ : 数枚
 - ビニール手袋 (手の表面の酵素の混入から測定試料を守るため)
 - マスク (唾液の混入から測定試料を守るため)

実習の流れ (以後、手袋とマスクを着用して行う。全て氷上にて操作。)

22 日午前中 : 活性測定用の標準酵素と試料の準備 (1~5)

0. **ABI 7700 の起動** レーザーの安定化のために早めにメイン電源を ON にする。
1. **標準曲線作製** DNase(70 unit/μl)の、1/10000、1/20000、1/40000、1/80000 希釈及びRNaseA (1.8unit/μl)の、1/1000000、1/2000000、1/4000000、1/8000000 希釈をそれぞれ作製する。 (TA作製)
2. **唾液の採取** 50 ml サイズのファルコンチューブに直接唾液を約 1 ml 採取。
3. **汗の成分の採取** 綿棒を用いて手のひら (5 cm×5 cm) をよくふき取り、400 μl の PBS の入ったチューブに投入。よく溶かす。遠心分離を行い、上清を採取する。
4. **試料の希釈** 唾液試料は実験操作資料に従い 200 μl を別のチューブに採り、

そこに PBS を 200 μ l 加えて 2 倍希釈を 400 μ l 作る。これを用いて希釈列 1/2、1/20、1/200 希釈を作製。汗試料も同様に、希釈列 1/2、1/20 希釈を作製。

5. **試料の熱処理** 1/10000 DNase、1/1000000 RNase の標準品及び、手のひら試料の 1/2 溶液、唾液試料の 1/2 希釈を 200 μ l 別のチューブに移し、98°C で 30 分間熱処理する。やけどに注意して取り出す。遠心は不必要。

22 日午後から：測定試料を ABI 7700 にセット、測定開始 (6~10)

8 連チューブを使用。(DNase/RNase)

6. DNaseAlert Substrate、RNaseAlert Substrate のチューブに 1 ml の TE を加える。
7. 90 μ l の DNaseAlert buffer には 90 μ l の DNaseAlert Substrate を混ぜ、90 μ l の RNaseAlert buffer には 90 μ l の RNaseAlert Substrate を混ぜる。
8. 上記の Substrate と buffer の混合液を各チューブに 21 μ l ずつ分注。
9. 試料液 79 μ l を加える。
10. 8 連チューブにフタとして、ABI 7700 にセット。DNaseAlert は TAMRA フィルター、RNaseAlert は SYBR フィルターで計測する。37°C で測定開始。
(測定は 1 時間程度)。ここは TA さんが簡単な説明をしながら操作します。

22 日午後から 23 日午前： λ -DNA を実際に切断し、産物をアガロースゲル電気泳動法で調べる。(11、12)

11. 「唾液試料を 5 μ l」、または「Sty I を 1 μ l と滅菌水 4 μ l」を λ -DNA 溶液(300 ng in 25 μ l NEB #3 buffer)に混ぜ、37°C で一晩反応させる。
12. 翌日にアガロース電気泳動をする。約 30 分泳動後に臭化エチジウム溶液に数分間ゲルを漬け、核酸を染める。ゲルを取り出し、ATTO 社のトランスイルムネーターを用いて紫外線 (365 nm) を照射したときに観察される蛍光を観察、撮影する。結果は ATTO ImageSavior によりフロッピーディスクに保存。

結果と考察 (23 日午後)

ABI 7700 のデータ打ち出し。Excel シート format に変換。

実験者のパソコンにデータを移して解析へ。

- ・ 標準曲線 (横軸：酵素活性、縦軸：蛍光変化の初速度) の描画。
- ・ 試料の酵素活性の算出 (希釈倍に注意)
- ・ 熱処理後の活性算出

電気泳動写真と、この資料の 10 ページにあるマーカーの写真をもとに、 λ -DNA がどのように切断されたのかを記述し、制限酵素と唾液試料中の酵素との「配列特異性」による差を考察する。

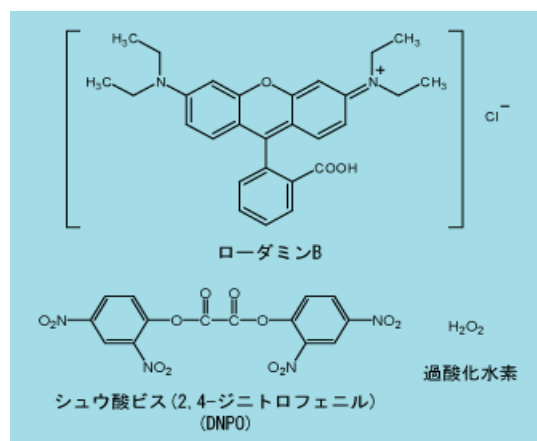
Appendix

蛍光とは・・・

蛍光とは発光の1つの様式です。物質がエネルギーを吸収して光を出す現象を発光といい、そのエネルギー源として光、X線、熱、化学反応等があります。ここでは照射された光をエネルギー源として観察される発光を例にとり、その原理を説明します。

化学物質などが光を吸収すると、光のエネルギー分だけエネルギーの高い状態になります。これを励起状態といいます。光を吸収する前のエネルギーの低い安定な状態を基底状態といいます。励起状態は余分なエネルギーをもっているために不安定な状態です。高いところの物体は高い位置のエネルギー（ポテンシャルエネルギー）をもっているため、支えを失うと物体はポテンシャルエネルギーの低い状態に戻ろうとして下に落ちます。同様に、光を吸収して励起状態になった化学物質についてもいえます。エネルギーの高い励起状態から余分のエネルギーを外部に放出して安定な基底状態になろうとします。このとき余分なエネルギーの放出方法として、(1) 光として放出する、(2) 熱として放出する、そして(3) 余分のエネルギーを利用して化学反応を起こし別の化合物の基底状態になる、という3つが主に観察されます。(1)で放射される光を蛍光といいます。

この発光には「蛍光」と「りん光」の2種があります。「蛍光」は光っている時間が非常に短く（寿命が非常に短く）、「りん光」は光っている時間が長いため（寿命が長いため）発光体（光を出す物質）にあてている光を切っても、出てくる光をしばらくの間見ることができる場合があります。発光はほとんどの化学物質では微弱もしくはまったく観察できません。主に「芳香族化合物」と呼ばれる化学物質に多く見られる傾向があり、特によく光るものが選ばれて蛍光、夜光塗料などに用いられています。右図と次のページ



の写真は、秋田大学の教育文化学部により製作された「先端科学を覗いてみよう」というホームページから転載させていただいた。是非、一度参照してみてください。

(<http://science.is.akita-u.ac.jp/education/sentan/index.html>)

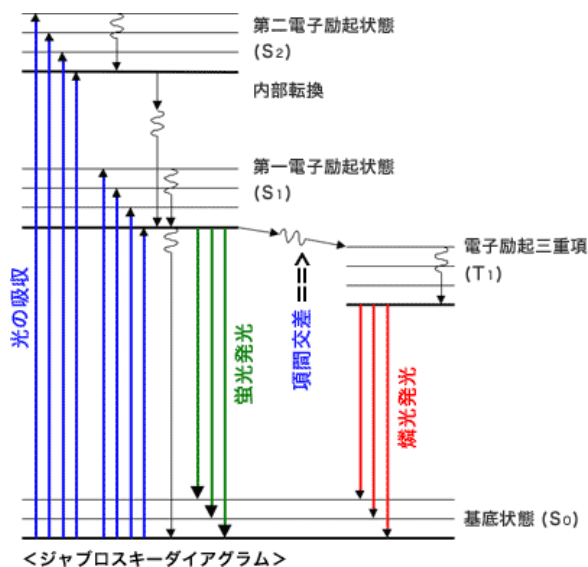


有名な蛍光色素にはローダミンBがあります。通常は非常に濃い朱色の液体となるローダミンBは紫外線を照射するとオレンジ色の蛍光を見せます。また、シュウ酸ビス(2,4-ジニトロフェニル)では、過酸化水素(H₂O₂)と混ぜられたときに蛍光を発するため、ポキッと容器を折ることで2液が混ざり蛍光色の棒となるような商品(左写真)に使用されています。

蛍光とりん光の違いは・・・

「蛍光」と「りん光」の違いについてももう少し厳密に定義します。「蛍光」は同じスピン多重度の状態間での発光、「りん光」は異なる多重度の状態間での発光ということができます。通常の芳香族化合物などでは、「蛍光」は励起一重項状態から基底状態(これも一重項状態)への電子遷移にともなう発光です。それに対して、りん光は三重項状態から基底状態(一重項状態)への電子遷移に伴う発光です。一重項状態から一重項状態への遷移は電子のスピンがそのままの状態で行き(電子のスピンの変化がない)、非常に短時間です。一方、異なる項の間の遷移は電子スピンの変化を伴うため、本来禁制遷移です。この遷移が起こるためには長い時間が必要となります(発光の寿命が長くなります)。

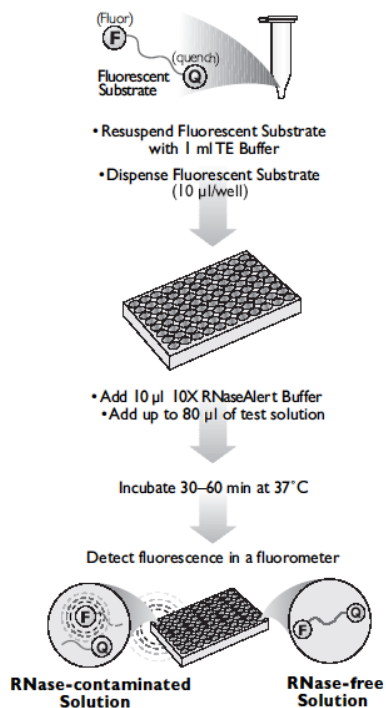
右の図はヤブロンスキー図(Jablonski diagram)といわれている化学物質のエネルギー状態の模式図です。S₀、S₁、S₂はそれぞれ基底状態、第1励起一重項状態、第2励起一重項状態を表わしています。また、T₁は三重項状態を示しています。この図でもわかるように、一番低い一重項状態(第1励起一重項状態)からの発光が「蛍光」です。三重項状態からの発光が「りん光」となります。これらの光を出してエネルギーの低い状態へ移る過程を輻射遷移といえます。



上図は堀場製作所により提供されている「蛍光分光法の原理」から転載させていただきました。http://www.jyhoriba.jp/product_j/spex/principle/index.htm簡単に言えば、光(エネルギー)を浴びて、エネルギー状態が上昇した物質が、元の状態(下)に戻るときに放出される光の1つが蛍光ということです。

今回の実習で用いた酵素活性検出法について・・・

Figure 1. RNaseAlert® Procedure



左図は今回使用した Ambion 社(テキサス州、U.S.A.) の kit の説明書にある図を転載したものです。蛍光色素 (F) とその蛍光エネルギーを energy transfer により消してしまう (吸収してしまう) 色素 (Q) を両端に付けられた遺伝子が描かれています。

もし、図の最上部に描かれた状態であれば、F と Q の距離が近いので Q の働きによって、蛍光は弱いままですが、遺伝子切断酵素によって核酸分子内に切断が起これば、F は Q から遠く離れることが出来 (図の最下部左)、蛍光を発するという原理を使っています。

また、今回実習で用いた ABI 7700 という機器は、一度に多くの試料からの蛍光測定が可能であり、非常に多くの測定を必要とする研究になくしてはならない測定器です。

参考知識 (これと似たテクノロジーとして)

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) とは・・・

FRET とは、日本語ではそのまま直訳すれば「蛍光共鳴エネルギー移動」となります。蛍光共鳴エネルギーの厳密な定義は難しいので、実際に 2 つの蛍光物質間で起こる蛍光共鳴エネルギー移動がどのようなものか、蛍光物質 1 として蛍光タンパク質 (CFP)、蛍光物質 2 として蛍光タンパク質 (YFP) とを使った場合について説明します。CFP は 430 nm の光を照射する (励起する) と 475 nm のシアン色の蛍光を発し、YFP は 500 nm の光で励起すると 530 nm の黄色の蛍光を発する性質をもつタンパク質であります。ここで、CFP と YFP とがごく近傍 (約 7 nm 以内といわれている) にあると、CFP を 430 nm の光で励起すると、CFP が光照射により得たエネルギーのほとんどが YFP へ遷移し、YFP からの黄色の蛍光が観察できます。この現象を FRET といいます。

FRET は、近年盛んに科学分野で応用されている技術の 1 つで、1 つの細胞内の代謝を直接観察したり、生体内の分子同士が近接して直接相互作用している様子をモニターしたり、そして今回のように酵素活性を測定したりすることに用いられています。

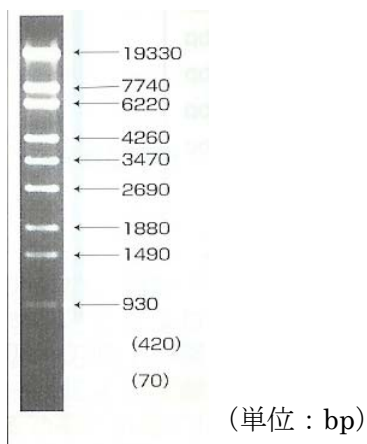
制限酵素 (restriction enzyme) とは・・・

核酸分解酵素には、末端からどんどん切断するエキソヌクレアーゼ、配列の中ほどから切断するエンドヌクレアーゼが存在する。エンドヌクレアーゼの中には、ある特定の認識配列を選択的に切断する酵素が数多く知られており、制限酵素と呼ばれています。いろいろな配列をどんどん切断する酵素と異なり、制限酵素で切断された核酸は切断されてできる断片のパターンが決めます。認識配列の出現する位置で DNA 鎖を正確に切断するので、組み換え DNA 実験や DNA 塩基配列解析に不可欠な酵素です。

今回の実習では、*Sty* I という制限酵素を用いましたが、この酵素は、サルモネラ菌 (*Salmonella typh*) から採られる酵素です。その認識配列は、以下です。W は A または T のことです。



下の図は、 λ -*Sty* I マーカーをアガロース電気泳動した際に検出されるバンドと、その分子量 (大きさ) を示したものです。



アガロース電気泳動とは・・・

アガロースは寒天の 1 成分です。ゲル化すると網目構造を持つので DNA や RNA の電気泳動の支持体として利用されています。分子量が大きい DNA よりも分子量が小さい DNA の方が網目状の構造の中をより早く通り抜けることが可能なので、上の図のように分子量順に並んだ電気泳動像となります。実は、皆さんが今回分析した、「 λ -DNA を *Sty* I で切断した DNA 断片」のパターンは、日常的に遺伝子操作して電気泳動するときの分子量マーカーとして実際に実験室で使っているものと本質的には同じなのです。