

【基盤研究(S)】

理工系(化学)



研究課題名 転写・翻訳反応のQCM法による時空間的解析

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

おかはた よしお
岡畑 恵雄

研究分野: 生体関連化学

キーワード: 転写・翻訳過程、水晶発振子マイクロバランス法、定量的解析

【研究の背景・目的】

生体内では転写・翻訳過程に代表されるように、多くの分子が順序よくそのタイミングに従って認識し反応している。しかし、生体内での多くの分子が順序正しく各々のタイミングに従って認識・反応している、分子間で連携して進行する複雑な反応を追跡する計測手法はまだ確立されていない。

分子の認識、解離、反応には必ず質量変化が伴うので、我々がこれまでに用いてきた水晶発振子マイクロバランス(QCM)法が有効である。27-MHzの基本振動数をもつQCM法を用いれば、基板に0.6 ng/cm²の物質が結合すると、1 Hzの振動数が減少するので、非常に高感度で分子の結合量が経時的に定量化できる。

本研究の目的は、転写・翻訳過程を水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いて、定量的に解析し、生体内反応の時空間制御を解明することにある。

【研究の方法】

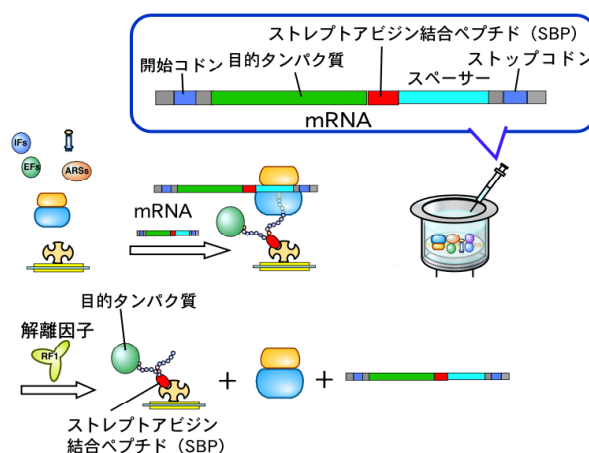
1) 転写過程の動力学解析

これまで転写過程は生成物であるRNAをゲル電気泳動で確認する事が多く、各々の因子がどのような順序で、どのようなタイミングで結合してRNAが伸長するのかが明らかになっていない。QCM基板にDNA二本鎖を固定化し、①転写因子と②RNAポリメラーゼを添加すると塩基配列特異的に結合(質量増加)し、続いてRNAモノマーを加えると③転写(RNAの伸長)(質量増加)が起こり、DNAの終止コドンや鎖末端まで来ると④酵素とRNAの脱離(質量減少)が続いておこり、質量は元のDNA鎖の状態に戻ることが予想される。転写因子の種類、酵素への変異の導入、DNA鎖長の長さ、などを変えることにより転写過程を定量的に評価できるようになる。

2) 翻訳の各過程に解析

ストレプトアビジンを固定化したQCMセル内に開始因子(IF)、成長因子(EF)、tRNAやアミノ酸やtRNAアミノアシル化酵素を入れ、これにmRNAを加えるとセル内で翻訳が始まる。このときmRNAの開始コドンのすぐ下流に目的タンパク質をコードする配列、ストレプトアビジン結合ペプチド(SBP)をコードする配列を入れておけば、翻訳が進むにつれてタンパク質、続いてSBP

がリボソームから顔を出し、SBPがQCM基板のアビジンに特異的に結合し、質量が増加する。翻訳が止まった後で解離因子(RF1)を加えるとリボソームがペプチドから離れて質量が減少して、基板にはタンパク質とペプチドの質量分だけ残ることが期待される。



【期待される成果と意義】

これまで転写や翻訳過程は、ゲル電気泳動や超遠心分析などの古典的な手法で定性的に解析されてきた。水晶発振子法を用いれば、転写過程でのRNAの生成速度や量がナノグラムレベルで定量化できる。翻訳過程についても、タンパク質の生成量や速度が定量化できる特徴があり、新しい研究手法となり得る。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- 1) S. Takahashi, R. Akita, H. Matsuno, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata, *ChemBioChem*, 9, 870-873 (2008).
- 2) S. Takahashi, M. Iida, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 9326-9332 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成22年度-26年度
142,200千円

【ホームページ等】

<http://www.okahata-lab.bio.titech.ac.jp/>