

# 試験管内での転写と翻訳の再現実験

松井千佳 井上潮音 巽理紗 富田菜穂子 前田結衣  
兵庫県立神戸高等学校自然科学研究部生物班

## <動機・目的>

従来のタンパク質合成は、大腸菌などを用いて目的の遺伝子を挿入し、細胞内で行うことが主であった。これにより遺伝子組換え生物が生じ、その扱いには注意が必要であった。細胞外で遺伝子からタンパク質合成ができると、カルタヘナ法に抵触しないので扱いが広がる。

近年、細胞外でタンパク質合成阻害物質を除去したコムギ胚芽抽出液に、RNA 合成酵素などの酵素を加えることで目的とする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）。そこで細胞外で *GFP* 遺伝子から緑色蛍光タンパク質（*GFP*）を合成することを試みた。

## <実験内容>

### 1 日目 転写

1 マイクロチューブ 3 本に反応液を調整する。（表 1）

表 1 反応液の組成

試薬	反応液 A	反応液 B	反応液 C
①蒸留水	8 $\mu$ L	8 $\mu$ L	10 $\mu$ L
②転写反応用緩衝液	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L	4 $\mu$ L
③リボヌクレオチド溶液	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
④RNA 分解酵素溶液	0 $\mu$ L	2 $\mu$ L	0 $\mu$ L
⑤RNA 分解酵素阻害剤溶液	2 $\mu$ L	0 $\mu$ L	2 $\mu$ L
⑥RNA 合成酵素溶液	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
⑦プラスミド DNA 溶液	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L	0 $\mu$ L

2 転写反応を 37°C で 17 時間。その後、4°C で約 1 時間保存した。

※プラスミド DNA（試薬⑦）はタンパク質合成用に作製された *GFP* 遺伝子を挿入したプラスミド（pEU-*GFP*）である。

反応液 A；RNA の材料となるリボヌクレオチド溶液（試薬③）、RNA 合成酵素溶液（試薬④）、*GFP* 遺伝子を挿入したプラスミド DNA 溶液（試薬⑦）が入っているの、転写に必要な条件はそろっている。よって転写は起きると考えられる。  
反応液 B；反応液 A と同様に転写に必要な条件はそろっているの転写は起きるが、RNA 分解酵素溶液（試薬④）が入っているため mRNA が分解されてしまうと考えられる。

反応液 C；転写に必要なプラスミド DNA 溶液（試薬⑦）が入っていないため転写は起きないと考えられる。

### 2 日目 翻訳

1 RNA 蛍光試薬（紫外線により RNA が存在すると蛍光を発する）198 $\mu$ L が入ったマイクロチューブ 3 本に、1 日目の反応溶液 A、B、C をそれぞれ 2 $\mu$ L ずつ加え、よく混合し、暗所で紫外線（302nm）を照射する。

反応液 A は蛍光がみられたが、反応液 B、C ではみられなかった。

（図 1）これにより反応液 A のみ RNA が合成された。

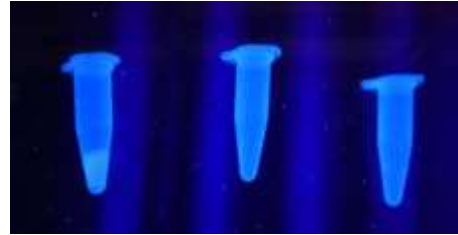


図 1 合成された RNA の可視化（左から反応液 A、反応液 B、反応液 C）

- 2 コムギ胚芽抽出液 10 $\mu$ L が入ったマイクロチューブ 2 本に、1 日目の反応液 A、C の反応液をそれぞれ 10 $\mu$ L ずつ加え、穏やかに混合し溶液 A、C を作成する。
- 3 アミノ酸溶液 200 $\mu$ L が入ったバイアル瓶 2 本に溶液 A、C をゆっくり加え、各溶液が混合せず二層となるように室温で 15 時間反応させた。

### 3 日目 タンパク質の可視化

2 日目のバイアル瓶に暗所で紫外線（365nm）を照射する。

反応液 A は緑色の蛍光がみられたが、反応液 C は蛍光がみられなかった。（図 2）

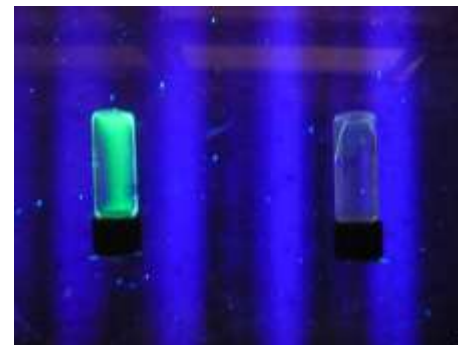


図 2 タンパク質の可視化（左；反応液 A、右；反応液 C）

※緑色の蛍光がみられたことから緑色蛍光タンパク質（*GFP*）が合成されたことを確認した。

## <まとめ>

反応液 A；転写反応・翻訳反応が起こり、緑色蛍光タンパク質（*GFP*）が合成できた。

反応液 B；RNA 分解酵素溶液（試薬④）を加えていたため、RNA ができず *GFP* が合成できなかった。

反応液 C；プラスミド DNA 溶液（試薬⑦）を加えていないため、*GFP* 遺伝子がなく *GFP* が合成できなかった。

細胞外でもコムギ胚芽抽出液を用いると遺伝子から目的とするタンパク質を合成できることを確認した。今後は細胞外のタンパク質合成を *GFP* 遺伝子以外の遺伝子（例えばサンゴの赤色蛍光タンパク質、*RFP* 遺伝子）でも試みたい。なお、今回の実験はセルフリースサイエンス社の転写・翻訳実験キットを使い行った。