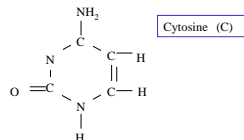
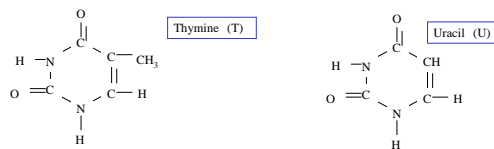


バイオフィーマティクス
第2回
生物情報を生み出す最先端分析技術

- DNAシーケンス技術(ゲノムサイエンスを支える分析技術)
- 遺伝子発現解析技術(DNAマイクロアレイ)
- タンパク質発現解析技術(2次元電気泳動、質量分析、)
- 代謝フラックス解析技術(NMR、GCMS)

DNAシーケンス技術



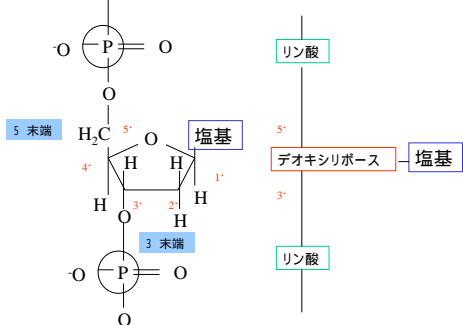
ピリミジン塩基には
チミン、シトシン、ウラシルがある。

Pyrimidine塩基

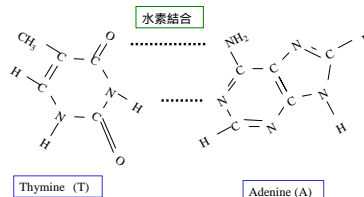
DNAシーケンス技術

DNAの構造

DNAの鎖はリン酸、デオキシリボース、塩基からなっている。



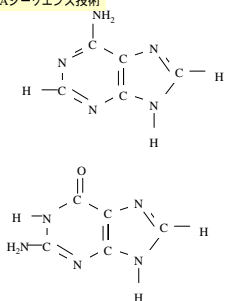
DNAシーケンス技術



アデニンとチミンの塩基対モデル

アデニンとチミンは水素結合で結ばれる。

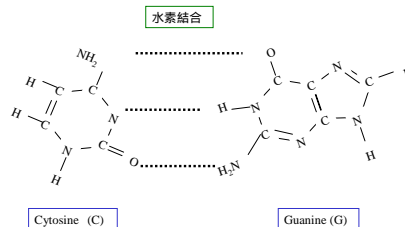
DNAシーケンス技術



Purine塩基

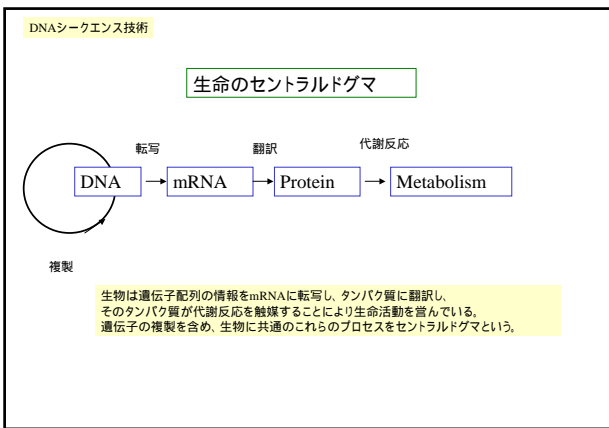
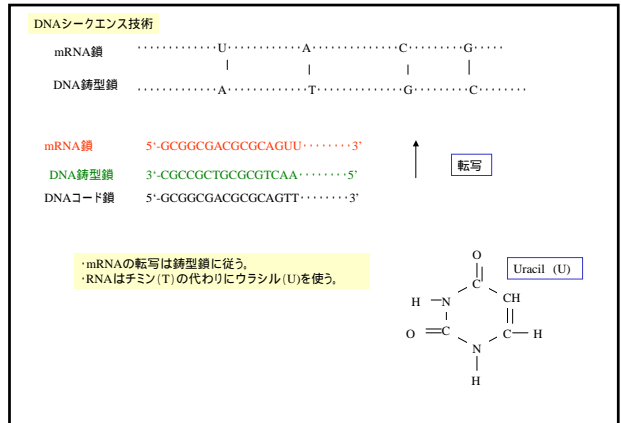
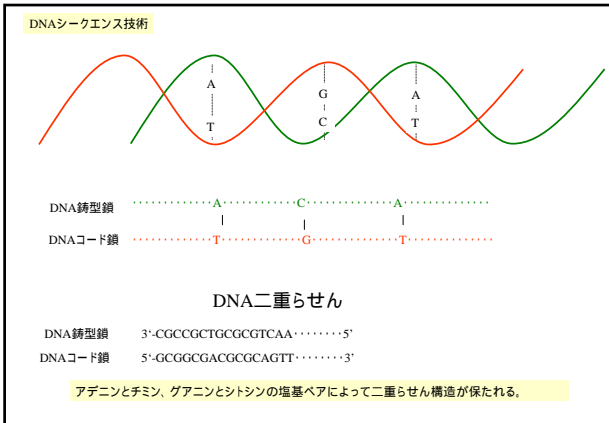
塩基にはプリン塩基とピリミジン塩基がある。
プリン塩基: アデニン、グアニンがある。

DNAシーケンス技術



グアニンとシトシンの塩基対モデル

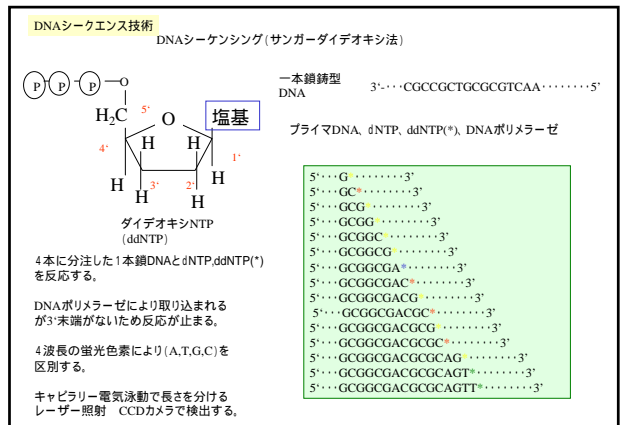
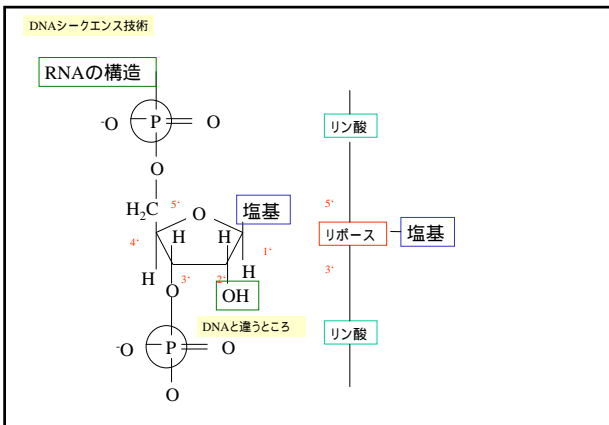
グアニンとシトシンは水素結合で結ばれる。



DNAシーケンス技術 遺伝子配列のコード表(コドン)

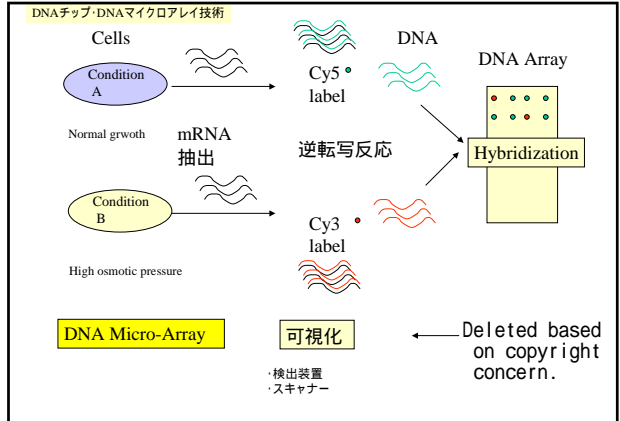
1文字目 (5'末端)	2文字目			3文字目 (3'末端)	
U	C	A	G		
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	終止	終止	A
	Leu	Ser	終止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Asp	Gly	G

AUGは翻訳開始コドンである他、Metもコードする。



DNAシーケンス技術 DNAシーケンスの例 コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* *odhA* 遺伝子シーケンス

Deleted based on copyright concern.

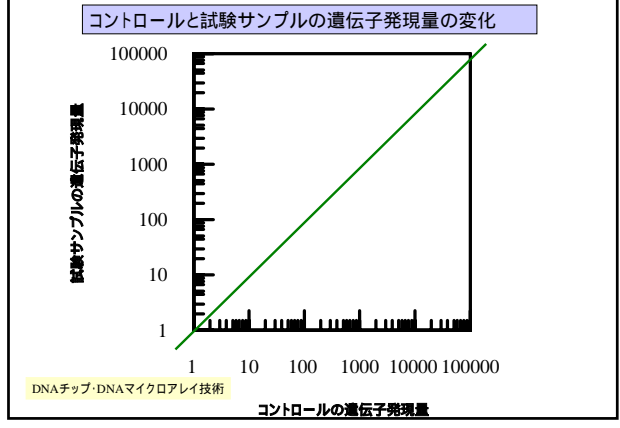
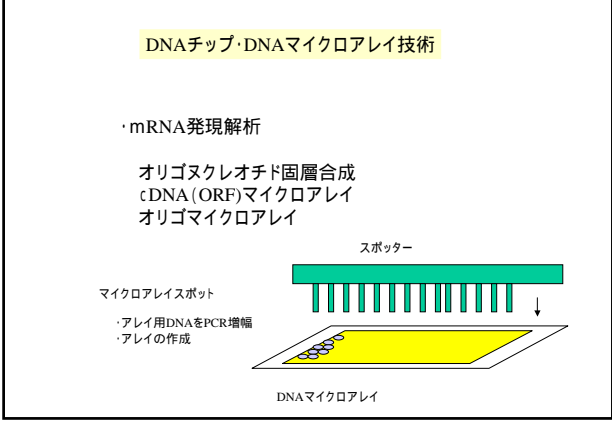


- DNA解析技術の歴史
- 1953 DNA二重らせん構造決定
 - 1972 遺伝子組み換え技術
 - 1982 シークエンス技術
 - 1985 PCR技術
 - 1986 蛍光DNAシーケンス技術 (6kb/day)
 - 1993 キャピラリー電気泳動技術
 - 1995 DNAチップ・マイクロアレイ技術
 - 1997 大腸菌ゲノム解析完了
 - 2000 ヒトゲノムドラフトシーケンス
 - 2001 600kb/day
- 遺伝子配列のデータベース
GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (米国)
EMBL (<http://ebi.ac.uk/embl/>) (欧州)
DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) (日本)

DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術

Deleted based on copyright concern.

DNAマイクロアレイ



プロテオミクス技術

2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動
2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

タンパク質発現解析

- ・等電点電気泳動 (isoelectric point (pI) electrophoresis)
- ・SDS電気泳動 (SDS PAGE)
- ・タンパク質スポットをクマシプリリアントブルー (CBB) 染色、銀染色にて可視化
- ・マトリクスレーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析計 (MASS) によるタンパク質同定

高浸透圧環境下 (1 M NaCl添加) における酵母の二次元電気泳動
画像解析: Imagemaster 2-D Elite (Amersham)

Deleted based on copyright concern.

プロテオミクス技術

酸性 (pH3) ← PI → 塩基性 (pH10)

分子量大

MW

Deleted based on copyright concern.

SDS PAGE

分子量小

プロテオミクス技術

ペプチドフィンガープリンティングによるタンパク質同定

プロテアーゼ消化
Arg, Lys残基のC末端加水分解 (トリプシン)

質量分析

m/z

ペプチド断片の質量フィンガープリント

マッチング同定

データベース (タンパク質配列) 加水分解ポイント予測

タンパク質同定を支援するサイト
例
MASCOT <http://matrixscience.com/cgi/>

プロテオミクス技術

2-D PAGEと質量分析計を用いたタンパク質同定

試料調整

2-D PAGE

タンパク質スポットの切り出し

酵素消化 (トリプシンなど)

MALDI-TOFMASSによるペプチド断片質量分析

データベースと照合しスポットタンパク質の同定

プロテオミクス技術

高浸透圧ストレス環境下における酵母のプロテオーム解析

Control

+NaCl

S1'

S3'

Deleted based on copyright concern.

等電点電気泳動とSDS-PAGEを組み合わせた二次元電気泳動を行い、実験室酵母・醸造酵母それぞれについて1 M NaCl添加前後のSYPRO-Redにより蛍光染色した際の泳動像を比較する。

Normalization $\sum_{i=1}^n Si = \sum_{i=1}^n Si'$ (Si: スポットSiのspot volume)

代謝解析技術(メタボロミクス)

代謝経路: 細胞を維持する化学反応シーケンス

- ・外界からの栄養源の取り込み
- ・生物エネルギー合成
- ・巨大分子構成要素合成
- ・巨大分子 (DNA, RNA, タンパク質、脂質、炭水化物)
- ・自己複製

代謝
表現型に最も近い階層

物質生産など応用に直接深く関与

代謝解析技術(メタボロミクス)

同位体標識化合物を用いた代謝フラックス決定

細胞外の物質の変化速度のみ
観測データ(束縛条件)が少ない
詳細なフラックスの決定が不可能

↓

基質に¹³C化合物を用い、蓄積物であるアミノ酸を分析
細胞内の情報取得

background image removed based on copyright concern.

代謝解析技術(メタボロミクス)

代謝反応速度(流束)を見る。フラックス

細胞内部の代謝ネットワークにおいて、細胞外の代謝物質の変換速度と細胞内の代謝流束分布のことを指す。

→ 代謝ネットワークの個々の反応がどれだけ起きているか? [mol/h/cell]

基質AからターゲットへDの生成速度、収率

代謝解析技術(メタボロミクス)

フラックス解析の流れ

¹³C-Labeled glucoseを用いて菌体の培養

↓

菌体酸加水分解(105℃、18時間)
アミノ酸精製(陽イオン交換)

↓

アミノ酸をGC-MS・NMR分析

↓

フラックス解析用プログラムへ導入
フラックス決定

代謝解析技術(メタボロミクス)

NMR解析装置構成図

代謝解析技術(メタボロミクス)

NMRの原理

外から磁場のかからない場合
核スピンは勝手な方向を向いている

↑ 強い外部磁場

外から強い外部磁場をかけた場合
核スピンの向きは磁場方向とその反対方向にきれいに分かれる

エネルギー順位で見ると低い状態が多い

↓

エネルギー差に相当するエネルギーを与えてやると下から上へ励起され(核磁気共鳴)、その後、緩和する

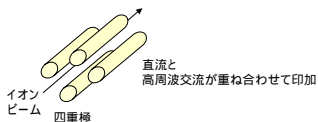
GCMSの原理

ガスクロマトグラフ(GC)

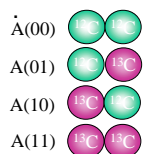
移動相:ガス(He)と固定相(キャピラリカラム)への分配を繰り返し、物質の移動速度の差により分離

質量分析(MS)

気化された試料分子の電子をイオン化電圧を与えることによりたたき出して(電子衝撃法)、電圧を変化させる四重極を安定に通るイオンを検出



代謝物質分子内の同位体濃縮の決定法
GC-MS、NMR分析法



炭素番号は、図も二進表記も左から1位、2位...とする

GC-MSデータ

Deleted based on copyright concern.

$$I_{(M+i)} = \frac{\text{Intensity of } (M+i)}{\sum_j \text{Intensity of } (M+j)}$$

$$[M+0] = A(00)$$

$$[M+1] = A(01) + A(10)$$

$$[M+2] = A(11)$$

NMRデータ

Deleted based on copyright concern

$$I_s = \frac{\text{Area}(S)}{\text{Area}(S) + \text{Area}(d)} = \frac{A(01)}{A(01) + A(11)}$$

$$I_d = \frac{\text{Area}(d)}{\text{Area}(S) + \text{Area}(d)} = \frac{A(11)}{A(01) + A(11)}$$