

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650137

研究課題名(和文) セントラルドグマへのマイクロ波加熱による進化への効果

研究課題名(英文) The microwave heating effect of the central dogma in evolution

研究代表者

吉村 武朗 (Yoshimura, Takeo)

東京工業大学・理工学研究科・産学官連携研究員

研究者番号：10580938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物の基本原則であるセントラルドグマの複製、転写、翻訳へのマイクロ波加熱効果を調べた。DNAの複製にウイルス複製様式のローリングサークル反応をモデルとした。翻訳に用いた蛋白質は蛍光蛋白質 GFPを用いた。翻訳反応のために、大腸菌の無細胞翻訳系を用いた。DNA複製反応に、マイクロ波加熱による促進効果を確認した。その促進理由は、イオン成分のマイクロ波による選択加熱を示した。また誘電率測定、電磁界シミュレーションからもイオン成分の選択加熱を支持する結果を得た。GFPの翻訳反応は、RNAからの翻訳においてGFPの蛍光増加を確認した。

研究成果の概要(英文)：We focused on the microwave effect for the central dogma (the DNA replication, the transcription, and the protein translation). The rolling circle amplification, which is one of the gene amplification method, was employed to examine the microwave heating effect of DNA replication. The protein expression by using the GFP and the cell-free system was carried out to verify the microwave heating effect. As a result, the microwave-assisted RCA was accelerated by microwave selectivity heating of ionic components. We confirmed the increase of fluorescence of GFP under microwave heating compared to conventional heating.

研究分野：マイクロ波化学

キーワード：マイクロ波 遺伝子増幅 無細胞翻訳

1. 研究開始当初の背景

始まりの物質は何だったのか。膜、代謝、自己複製の生命を定義する能力獲得を明らかにしようと多くの研究がなされている。138億年前に宇宙が誕生してから、地球・太陽系が46億年前に誕生し、その6億年後の40億年前に最初の生物が誕生したと考えられている。ここで注目されるのは、地球が誕生してからわずか6億年で化学進化を遂げて生物を誕生させたことであり、300万年前のホモサピエンスまで40億年近くかかったことを考慮すると、6億年という進化は目を見張るスピードである。この進化について大内は、これまで原田らのおこなったタンパク質用高分子化合物の始原細胞モデル(プロテノイド・ミクロスフェア)と、自身のマイクロ波加熱によるアミノ酸のペプチド合成迅速化と宇宙に充満するマイクロ波から、マイクロ波加熱による反応促進が進化促進の理由とする仮説を立てている。これまで申請者は、微量な酵素反応に最適化したオリジナルの2.45 GHzマイクロ波装置を企業と共同開発し、ウイルス複製と同じ遺伝子増幅方法であるRolling Circle Amplification (RCA)を、マイクロ波加熱によって通常加熱と同じ温度でありながら、反応促進を報告した。ローリングサークル型の遺伝子増幅は、PCRのような複雑な温度変化を必要としない等温の遺伝子複製方法であり、数時間で長鎖のDNAコピーが得られることから、初期生命にとっても遺伝子複製方法としてリーズナブルな手段だと考える。このマイクロ波加熱による遺伝子増幅の促進結果から、初期地球の電磁場環境下において、生物の基本教義セントラルドグマの複製、転写、逆転写、翻訳においてマイクロ波加熱が進化の促進に貢献する可能性があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本申請の目的は、セントラルドグマの4反応(DNA複製、RNA転写、逆転写、タンパク質翻訳)におけるマイクロ波加熱の進化への影響の解明である(図1)。仮に、プロテノイド・ミクロスフェアやベシクル膜内等で最低限の環状遺伝子(DNA or RNA)が鋳型として働くとしたら、初期の酵素反応を助けるようにマイクロ波加熱が役に立つ可能性もあり得るのではないかと考えた。マイクロ波は波長100 μmから1 mまでの波長を持つ光と同じ電磁波であり、宇宙マイクロ波背景放射のように微弱な電磁波が初期生命環境下において地上に届いていた可能性は十分にある。本研究によって、世界初のセントラルドグマに対するマイクロ波加熱の影響を明らかにでき、生命進化への新たなアプローチが提案できるだけでなく、本

結果は電磁場環境における生物への影響と比較ができるようになる。

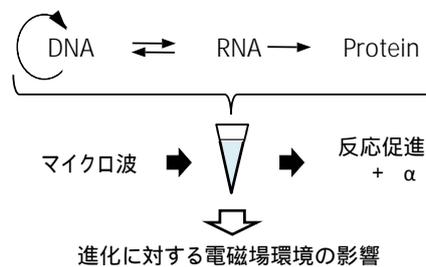


図1 本研究の概要。セントラルドグマの各反応へマイクロ波加熱をおこない、進化の過程における電磁場環境の影響を明らかにする。

3. 研究の方法

無細胞翻訳系を失活させないために、精密なマイクロ波加熱する必要がある。そこでTM010モードの空洞共振器と半導体発振器を用いた。また温度制御にはマイクロ波加熱環境下で適切な温度測定可能な光ファイバー温度計を採用した。反応容器は、一般的なポリプロピレン製チューブを用い、50 μLの反応スケールとした(図2)。

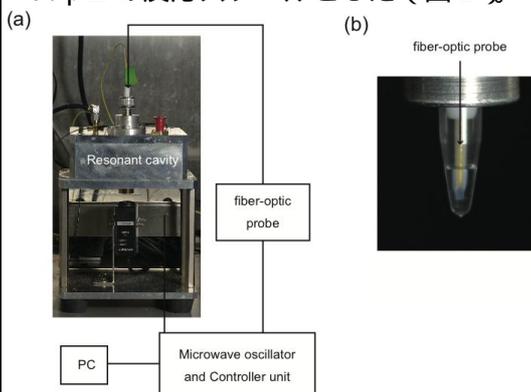


図2 マイクロ波装置外観とサンプル写真

マイクロ波加熱により目標反応温度に達すると温度制御によりマイクロ波照射が止まることを避けるために、装置をコールドルームに設置し外気温度を4度とすることで連続的なマイクロ波照射を可能にした。

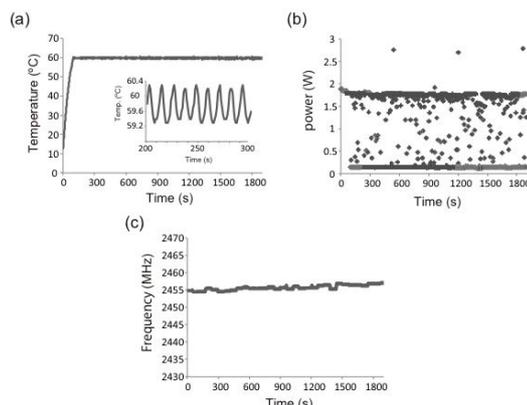


図3 MW加熱の温度、出力、周波数制御

図3にマイクロ波加熱時の温度(a)、出力(b)、周波数(c)を示す。温度が目標温度を精密に保つことが可能であることと、マイクロ波の周波数がサンプルの誘電特性変化に応じて共振周波数を制御できる。セントラルドグマの複製へのマイクロ波効果を調べる実験系は、ローリングサークル型の遺伝子増幅反応(RCA)とした。RCA反応は、一般的な遺伝子増幅反応である Polymerase Chain Reaction (PCR)に比べ温度変化を必要としないため、マイクロ波加熱の効果を検証する実験系として好適である。また、無細胞翻訳系は、大腸菌翻訳系である PURE express、PURE frex を用いた。翻訳する蛋白質ターゲットは、翻訳結果を手早く評価するために蛍光蛋白質 GFPとした。GFPの評価は、蛍光スキャナとプレートリーダー、SDS-PAGEを用いた。また、サンプルへのマイクロ波照射状況、反応成分へのマイクロ波効果を見積もるため、CST Microwave Studioを用いて電磁界シミュレーションをおこなった。また、電磁界解析で用いるパラメータのため、同軸プローブ法による ϵ_r 、 $\tan \delta$ 測定システムを用いて誘電率を測定した。

4. 研究成果

セントラルドグマの複製におけるマイクロ波効果の再現となぜ反応性の違いをもたらすか検証した。図4は4つの DNA polymerase を用いたマイクロ波加熱促進結果を示す。最大で4倍の時間短縮を達成した。

次に、なぜマイクロ波加熱で遺伝子増幅が促進するかを調べるため、各反応成分の温度測定を行った。結果として、イオンを含む buffer のマイクロ波による選択的な加熱が明らかとなった(図5)。同じ反応温度で有りながら反応促進が進む理由は、通常加熱とはイオン成分の働きがマイクロ波加熱環境下で異なることを示唆した。

さらに、マイクロ波照射下における選択的なイオン成分の導電損失を示すため、電磁界シミュレーションをおこなった。図6にマイクロ波装置内の電界、磁界分布を示す。TM010 シングルモードキャビティであるため、サンプルは電界成分によって加熱されていることを示した。シミュレーションモデルをもとに5種の RCA 反応成分の誘電率測定結果から、キャビティ内における電磁界シミュレーション結果を図7に示す。結果として、イオン成分を含む buffer が RCA 反応組成と同程度の電界損失があることを示した。

以上より、マイクロ波加熱環境下においてセントラルドグマの複製に関わる遺伝子増幅反応においてイオン成分の選択的加熱が反応促進をもたらす可能性を示した。

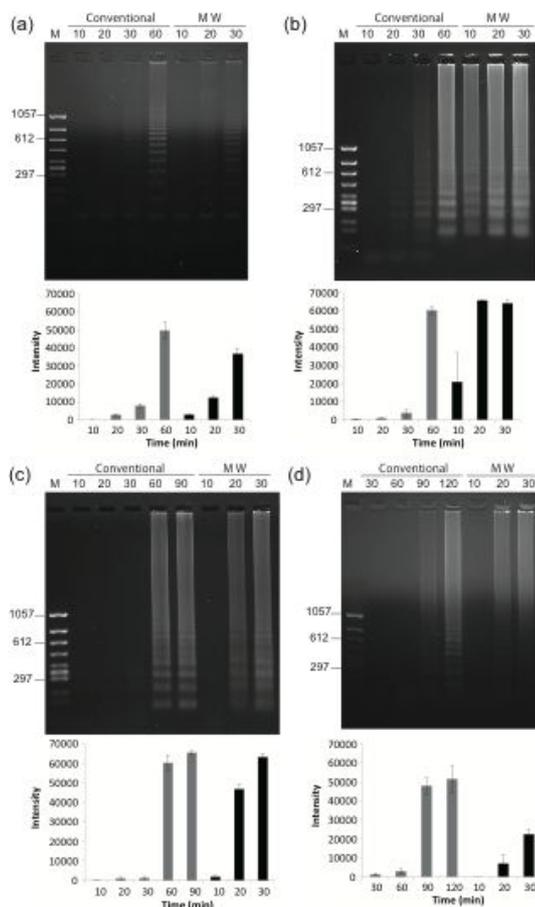


図4 4種の DNA polymerase を用いた遺伝子増幅結果

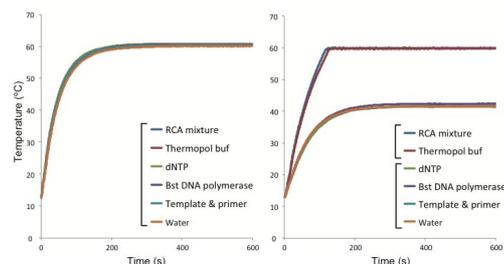


図5 RCA 反応成分の温度プロファイル (右)通常加熱(左)マイクロ波加熱

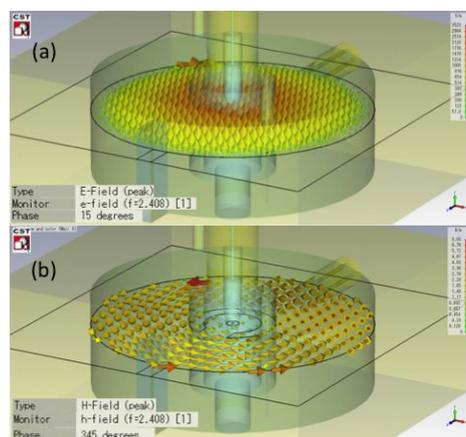
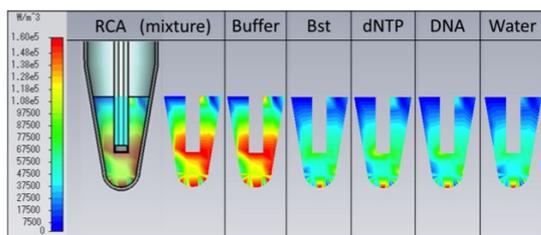


図6 電磁界シミュレーション結果

図7 RCA成分のマイクロ波加熱環境下における電界損失シミュレーション結果

セントラルドグマの翻訳については、論文投稿中である。マイクロ波加熱により翻訳したGFPの傾向増加を確認した。また無細胞翻訳系のイオン成分の加熱を示し、さら



に誘電率測定、電界損失シミュレーションでの損失を示すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Controlled Microwave Heating Accelerates Rolling Circle Amplification, T. Yoshimura, T. Suzuki, Shigeru Mineki, and Shokichi Ohuchi, *PLOS ONE*, 10, e0136532 (2015). (査読有)(<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136532>)

Electromagnetic field analysis of the resonator with a microfuge tube to heat in enzymatic DNA replication reaction, T. Yoshimura, T. Hanai, S. Mineki, J. Sugiyama, C. Sato, N. Ohneda, T. Okamoto, and H. Odajimma, *IEICE Technical Report*, WPT2015-14, 71-76 (2015). (査読有)(<http://www.ieice.org/ken/paper/20150417sBZX/eng/>)

[学会発表](計 6件)

比嘉世滋、吉村武朗、大内将吉、マイクロ波促進遺伝子増幅反応のポリメラーゼ酵素の最適化、日本蛋白質科学会、2014.6.25、ワークピア横浜

吉村武朗、峯木茂、大内将吉、マイクロ波加熱を用いた無細胞タンパク質合成、無細胞生命科学研究会、2014.10.8、大阪大

学

吉村武朗、峯木茂、大内将吉、マイクロ波加熱による無細胞蛋白質発現系、日本電磁波エネルギー応用学会、2014.11.27、高知会館

吉村武朗、花井孝真、峯木茂、杉山順一、佐藤千佳、大根田訓之、岡本正、小田島博道、酵素反応を目的としたマイクロチューブ加熱用共振器とその電磁界解析、電子情報通信学会、2015.4.16、機械振興会館

吉村武朗、松井宏樹、椿俊太郎、米谷真人、鈴木榮一、和田雄二、マイクロ波加熱と固体触媒による1-octanol酸化反応、日本電磁波エネルギー応用学会、2015.11.20、上智大学

吉村武朗、花井孝真、峯木茂、杉山順一、佐藤千佳、大根田訓之、岡本正、小田島博道、酵素反応用共振器を用いた遺伝子増幅反応における電磁界解析、日本電磁波エネルギー応用学会、2015.11.19、上智大学

[図書](計 5件)

Microwave-Assisted Enzymatic Reactions, T. Yoshimura, S. Mineki, and S. Ohuchi, *Microwave in Catalysis: Methodology and Applications*, 11, 213-236 (2015).

バイオ分野のマイクロ波利用(概要)、吉村武朗・大内将吉、最新マイクロ波エネルギーと応用技術、第5章、5.1 生化学、538-539 (2014)。

マイクロ波照射下での酵素反応、白石新・大内将吉・吉村武朗、最新マイクロ波エネルギーと応用技術、第5章、5.2 生化学、540-542 (2014)。

遺伝子増幅反応 吉村武朗・大内将吉、最新マイクロ波エネルギーと応用技術、第5章、5.4 生化学、550-552 (2014)。

微生物の培養と殺菌 永吉航・大内将吉・吉村武朗、最新マイクロ波エネルギーと応用技術、第5章、5.5 生化学、553-555 (2014)。

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉村武朗 (YOSHIMURA TAKEO)
東京工業大学・大学院理工学研究科・産学官研究員
研究者番号：10580938