

特別講演

遺伝子ゲノム解析とRIの利用

新潟大学医学部

教授 高橋由明

新潟大学大学院医学研究科では大学院授業共通科目を開講し、実験医科学理論、遺伝子工学概論及び医学放射線概論の授業科目を纏めて、オムニバス形式で行っております。その1つの講義を担当していますが、本日はその講義内容に準じてお話をしたいと思います。演題名は「遺伝子ゲノム解析とRIの利用」ですが、最初に簡単にゲノムの話をしたと思います。

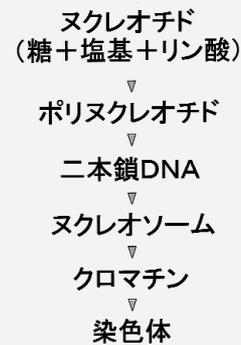
1 ゲノム

1.1 ゲノムの構成

(スライド1)

スライド1はゲノム構造の構成を示しています。ゲノムの一番小さい基本単位をヌクレオチドと言い、糖、有機塩基、リン酸の3つの物質から構成されています。ヌクレオチドが重合しポリヌクレオチドになります。ヌクレオチドが 3×10^9 個重合したものがヒトのゲノムです。ポリヌクレオチドは1本鎖構造をとっていますが、通常、DNAの場合は、このポリヌクレオチド鎖が二本合さり二重らせん構造を形成しています。なお、RNAのほとんどは一本鎖構造をとっています。ポリヌクレオチド鎖には方向性があり、2本鎖DNAのポリヌクレオチド鎖はそれぞれ逆の方向性を持ち、それぞれの鎖から出ている塩基間の水素結合(相補塩基対)により2本鎖DNAの安定化をしています。ヒト1番染色体を例にとると、ヌクレオチドをつなぎ合わせた長さは、7センチくらいになると言われています。1つの細胞、すなわち1個の核のDNAをすべてつなげて長さを測ってみますと、2倍体で2メートルくらいになります。1つ核の中には2メートルくらいのDNAが入っているわけですが、そのままでは入りきれず、実際には複雑に折り畳まれて収容されています。その折り畳まれる最小基本単位は、ヌクレオソームと呼ばれています。ヌクレオソームにはヒストンという塩基性の4種類のタンパクが2分子ずつ入っています。ヒストンのH2A, H2B, H3, H4の4種類がセットとなっ

ゲノムの構成



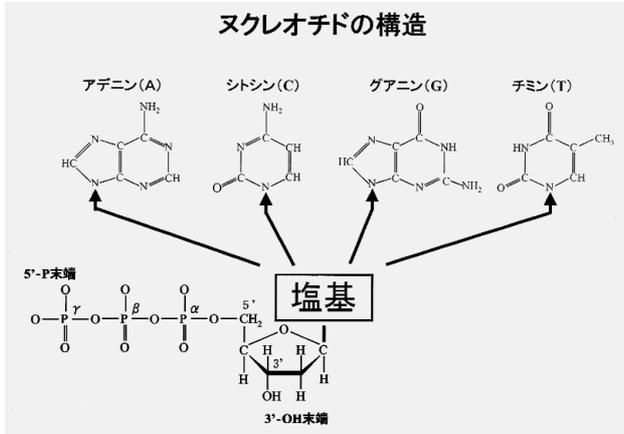
スライド1

て8分子でオクタマーという単位を構成しています。そのオクタマーの周囲をDNA鎖が2回弱、1.7回くらい、巻きつきDNA鎖を短くしています。このDNA鎖を短くすることを凝縮と言います。DNA鎖が巻きついたオクタマーが数珠状に並んだ状態をクロマチン構造あるいはクロマチン繊維といわれますが、それが折り畳まれてソレノイド構造となります。ソレノイドはさらに折り畳まれて染色体を形成しています。染色体は細胞分裂中期(metaphase)で最も凝縮度の高い状態で、染色体の1つひとつが光学顕微鏡で観察可能となります。以上のように、凝縮により、伸ばしきると2メートルくらいの長さを持つDNAは、サイズが10~20ミクロンと言われている1つの核の中に収められています。

1.2 ヌクレオチドの構造

(スライド2)

スライド2は先程のヌクレオチドがどういう構造をしているかということを示しています。ヌクレオチドはリン酸、糖と塩基から構成されていますが、糖はDNAとRNAで構造が違います。糖はペントース、すなわち5つの炭素からなっており、それぞれの炭素には番号があります。糖の炭素は、塩基の構成原子と区別するためにプライムを付けて1プ



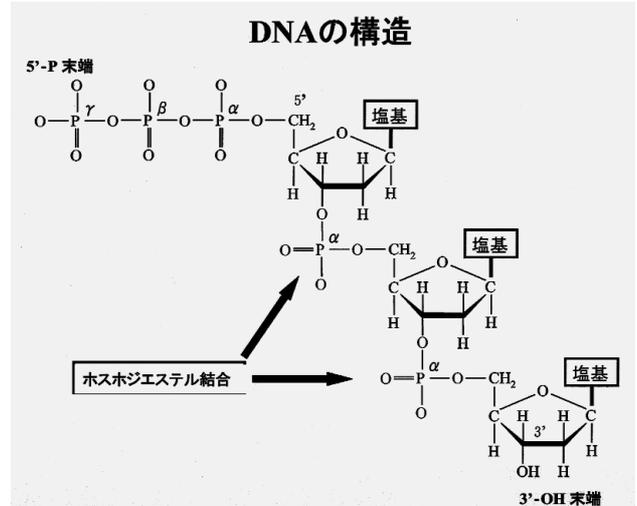
スライド 2

ライム (1'), 2プライム (2'), 3プライム (3'), 4プライム (4'), 5プライム (5')と名付けています。スライドに示す糖はDNAを構成する糖で、2'の炭素に水素原子が2個結合しています。3'の炭素には、1つは水素原子、もう1つはアルコールの性質を持つOH(水酸基)が結合しています。なお、RNAの糖はリボースであり、2'の炭素に水素原子と水酸基が1個ずつ結合し、DNAを構成する糖とは異なっています。DNAの糖の2'炭素が水酸基を持たないことから、DNAを構成する糖は、デオキシリボースといわれます。デオキシというのはデイスオキシのことで、オキシ(O)のないという意味からきています。

塩基は、DNA、RNAの両方とも4種類あります。DNAの塩基組成はアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、チミン(T)であり、RNAの場合はチミンの代わりにウラシル(U)が構成塩基となっています。

1.3 DNAの構造 (スライド3)

次はDNAの構造です。先程、ヌクレオチドが重合してポリヌクレオチドになるというお話をしましたが、スライド3はポリヌクレオチド構造を示しています。スライドは分かりやすいようにデオキシリボースの5'の炭素にリン酸基が3つ結合した状態を示しました。リン酸基は、5'炭素から近い順に α 、 β 、 γ 位になっています。ヌクレオチドの重合は、ヌクレオチドのデオキシリボース3'炭素と結合したOH基と、別のヌクレオチドのデオキシリボース5'炭素に結合している α 位リン酸基との間でホスホジエステル結合を形成することで生成されます。エステル結合は、酸とアルコールから水分子が取れてできる結合です。デオキシリボースの3'炭素の水酸基はアルコールの性質を持ち、5'炭素のリン酸は酸の



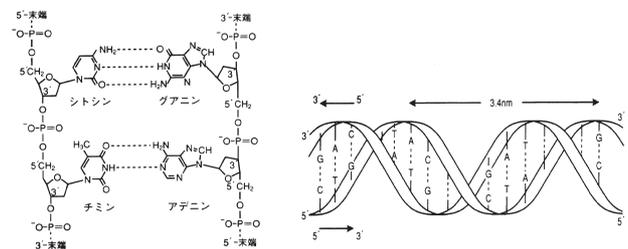
スライド 3

性質を持っており、それから水分子が取れることでエステル結合が形成されます。スライドの例は、3つのヌクレオチドが2個のホスホジエステル結合でつながったものを示しています。ヌクレオチドの方向性についてですが、スライドの例のヌクレオチドは、左上の糖の5'炭素と右下の糖の炭素は3'の炭素は共にエステル結合に関与せずフリーの状態になっています。したがって、方向性としては上が5'、下が3'で、このスライドの上から下に向かって5'から3'の方向性を示しています。

1.4 DNA二重らせん構造 (スライド4)

スライド4はDNAの2本鎖構造を示しています。スライドの左の図で、C(シトシン)とT(チミン)を持つ鎖は、上から下に5'から3'の方向性を持っており、もう一方のG(グアニン)とA(アデニン)を持つ鎖は、下から上に5'から3'の方向性を持ち逆向きになっています。それぞれのポリヌクレオチド鎖から出てい

DNA二重らせん構造



スライド 4

る塩基は、相手の鎖の塩基と水素結合をしており、2本鎖構造をとるための大きな力となっています。水素結合で形成される塩基対は、シトシンに対してはグアニン、チミンに対してアデニンに結合するというルールがあります。このような相手が決まっている塩基対を相補塩基対といいます。この塩基対の水素結合はこれからの話にも出てきますが、遺伝子・ゲノムの構造や機能において非常に意味のある重要な結合になります。DNAの2本鎖構造は、実際は右の図のようにらせん構造をとっています。溶液中でDNAはB型構造をとり、塩基対はらせんが1回転(1ターン)する間に10塩基対存在します。通常のB型DNAの場合ですと、右巻きのらせん構造を取っていますが、特殊なZ型DNAの場合ですと、反対巻き、すなわち左巻きのDNA構造を取ります。Z型DNAは、GCの繰り返し配列のあるところで見られる構造で、この塩基対の数は1ターンの間に12塩基対になります。2本鎖DNAを形成するための相補塩基対で結ばれている結合は弱い結合であり、熱あるいはアルカリで解離しますが、緩やかな条件で戻してやるとまた元通りの2本鎖構造に戻ります。このような解離したDNA鎖が、元の2本鎖に戻ることをアニーリングと言います。多くの分子生物学的手法にDNAのアニーリングの性質が取り入れられています。

1.5 ゲノム
(スライド5)

次はゲノムのお話です。先程もお話しましたが、ゲノムサイズはヒトの場合ですと 3×10^9 、すなわち30億の塩基対です。そしてゲノムというのは生物学的な情報をすべて含んでいます。すなわち、生物が生活をしていく上で、あるいは子孫を残す上で必要な生物学的な情報をすべて含んでいることを意味します。もっと簡単に言いますと、人の体細胞は2倍

ゲノム

サイズ: 3×10^9 bp

生物学的情報

一倍体(22 + 1: 生殖細胞の染色体)

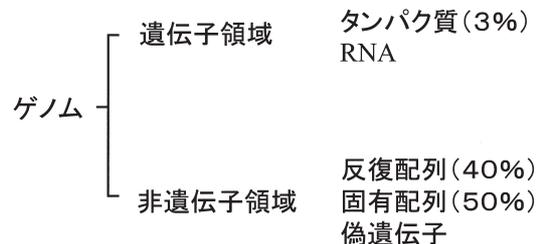
スライド5

体ですが、2倍体というのは、生物としての設計図を父親と母親の染色体をセット、相同染色体、として受け継いでいることを意味します。情報としてセットの片方の設計図があれば、生物学的な情報を満たします。もっと簡単に言いますと、1倍体の染色体をゲノム、すなわち生殖細胞のDNAをゲノムと言い換えることができます。

1.6 ゲノムの領域
(スライド6)

ゲノムにどのような領域があるかと言いますと、スライド6に示すように1つは遺伝子領域、もう1つは遺伝子でない領域(非遺伝子領域)です。遺伝子領域はRNAあるいはタンパク質の遺伝情報領域になります。RNAにはリボソームRNAやトランスファーRNAがあります。タンパク質はメッセンジャーRNAの形で情報をもっています。タンパク質としての情報は、ゲノム全体として3%程度といわれています。これまで、ヒトの総タンパク質の数は5万~10万ぐらいあると言われていたのですが、今年2月のヒューマン・ゲノムプロジェクトの結果を見ると、おそらくその半分ぐらい、3万ぐらいだろうと言われていています。

非遺伝子領域は、反復配列、固有配列及び偽遺伝子の3つに分類されます。反復配列は、ゲノムの中に、ある塩基配列が繰り返して存在する配列を言います。例えばヒト染色体の末端には、AATGGGという6つの塩基配列の繰り返しがあります。あるいは染色体のセントロメア(動原体)と呼ばれる領域は、171塩基の配列が1つの単位となって繰り返されています。テロメアやセントロメアの反復配列は、染色体の末端や動原体に局在しています。その他のミニサテライトやマイクロサテライトと呼ばれる反復配列は、それぞれ5~50と1~4くらいの塩基配列単位が反復して染色体上に散らばっています。ミニサテライトという反復配列は、マウスではゲノム全



スライド6

体に分散しています。最近、報道等によく出てくるマイクロサテライトは、3塩基の配列が繰り返された反復配列で、マイクロサテライトのあるものは遺伝病と密接に関係しています。例えば、神経の変性を伴うある病気では、CAGの繰り返し配列の数が健常者と発症者で異なることが知られています。また、その繰り返し数を調べることで、将来の発症の可能性を診断することが可能となっています。マイクロサテライトのもう1つの重要な点は、ゲノムのマーカー(目印)として利用されている点です。理由として、ほとんどのマイクロサテライトの反復配列は200塩基長以下とかなり短い配列であるためPCRで簡単に増幅可能であることです。これは、反復配列の外側のユニークな配列、すなわち染色体の中に特異的にしか存在しない配列に対してプライマーをデザインしPCRで増幅することで、ゲノムの特定の位置を知ることのできることです。もう1つの理由として、マイクロサテライトがゲノム上に広く散在、～104塩基に1回ぐらいの頻度で出現しているため、詳細なゲノム地図が作製できる点です。2番目の非遺伝子領域の固有配列は、反復配列ではないユニークな配列です。3番目の非遺伝子領域の偽遺伝子は、遺伝子の変異によってタンパクが途中までしかできず、機能していない遺伝子です。あるいはメッセンジャーRNAが逆転写酵素(リバーstransクリプターゼ)という酵素によって、メッセンジャーRNAに対するcDNAが作られ、それがゲノムの中に挿入されたものが含まれています。したがって、偽遺伝子は遺伝子として機能していません。

2 遺伝子・ゲノム解析とRIの利用

2.1 遺伝子・ゲノム解析とRI利用法の分類 (スライド7)

今までは前置きで、これから本題に入ります。遺伝子・ゲノム解析のRI利用を大別すると4つに分類

遺伝子・ゲノム解析とRIの利用

目的とする遺伝子・DNA断片の単離
遺伝子の機能解析
変異解析
DNA塩基配列決定

スライド7

されます。1つは遺伝子やDNAの断片を単離するときにRIを用います。2つ目は遺伝子の機能を知る時、3つ目はゲノム上の変異の解析を行うときに用います。4つ目はDNAの塩基配列を決めるときに用います。

2.2 RIを用いた遺伝子工学の手法 (スライド8)

スライド8はRI利用法のそれぞれの手法を示しています。

(1) 遺伝子やDNA断片の単離

遺伝子やDNA断片の単離には、実際にどのような方法で用いられているかと言いますと、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションという方法があります。これはゲノムあるいはDNAを制限酵素で消化しベクターにランダムにつながります。あるいはメッセンジャーRNAのコピーのDNA、いわゆるcDNAを作り、目的のメッセンジャーに対応するcDNAを捕捉するときに利用します。あるいはゲノムを超音波等でランダムに切ってベクターの中につないで、その中から目的とするDNAを拾い上げます。この単離のためにプローブを使用しますが、プローブは対象とする、DNA(ターゲット)の一部、あるいは塩基情報にした合成DNAがこれに当たります。このプローブをRIで標識して目的とする遺伝子やDNA断片を捕まえることとなります。

もう1つはサザンブロット法です。この方法は、遺伝子・DNA断片の単離とあとでお話しますが変異を解析する両方の目的に利用されます。この方法の手順は、正常な人と患者さんのゲノムを制限酵素で消化、アガロースゲル電気泳動しフィルターにDNAをブロットして、調べようとする遺伝子の一部のDNA断片を標識します。これをプローブとして用い

RIを用いた遺伝子工学の手法

遺伝子・DNA断片の単離	→	コロニー/ブランクハイブリダイゼーション法 サザンブロット法
遺伝子の機能解析	→	DNase I フットプリント法 ゲルシフトアッセイ法 ノーザンブロット法 リボプローブマッピング法
変異解析	→	PCR-SSCP 法 DGGE 法

スライド8

ることにより、正常な人と患者さんのDNAを比較してその違い、変異を知ることができます。このときに検出されるバンドは、電気泳動で分画してあるのでDNAサイズがわかります。この情報を基にクローニングを行い、目的とする遺伝子やDNA断片の単離が可能となります。

(2) 遺伝子の機能解析

DNA 遺伝情報が、RNA やタンパク質になるとき、DNA 単独で RNA になったりタンパク質になったりするものではありません。RNA が作られる際には、細胞の中にある多くのタンパク成分が DNA と相互作用し、タンパク質が合成されるときには、mRNA にリボソーム、tRNA や他のタンパク因子が作用します。DNase I フットプリント法、あるいはゲルシフトアッセイ法は、このようなゲノムあるいは遺伝子に相互作用するタンパク成分が、DNA 上のどの部位に作用するかを知る方法です。

メッセンジャー RNA は組織によってさまざまな発現様式を呈します。それを知るのにノーザンブロット法を使います。いろいろな組織から RNA を抽出して、その RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動に流して、知りたいメッセンジャー RNA に対応する DNA の断片を標識して調べる方法をノーザンブロット法と言います。リボプローブマッピング法もノーザンブロット法と同様な目的で使用されますが、後で出てきますのでそのときに詳しく説明します。

(3) 変異解析

変異解析法の1つはPCR-SSCP法という方法です。SSCPというのはsingle-strand conformation polymorphismの省略形で、DNA上に変異があったときに調べる方法です。もう1つのDGGE法はdenaturing gradient gel electrophoresis(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)で、これもDNAの変異を調べる方法です。これは後から出てきませんので簡単にお話します。変異のあるDNAと正常のDNAを変性剤濃度の勾配を持たせ、ゲルを60℃ぐらいに発熱させ電気泳動を行います。正常と変異をもつDNAは塩基配列が異なっているので、両者のDNAは熱の影響とそれぞれ異なった変性剤の濃度でDNA鎖の解離が起き、泳動距離の差が生じます。このようにして変異を見つける方法をDGGE法と言います。

2.3 RI 実験法

2.3.1 RI による DNA の標識法

(スライド9)

一般的に使われている DNA の RI 標識方法は3つ

あります。

1つ目は、カイネースという酵素によってDNAの末端を標識する方法です。カイネースはATPの γ 位のリン酸をある物質に転移する反応を触媒する酵素です。移す相手がDNA、あるいはRNAの場合は、ポリヌクレオチドカイネース、タンパク質の場合は、プロテインカイネースと言われます。DNAの場合は、ポリヌクレオチドキナーゼを用いてATPの γ 位のリン酸をポリヌクレオチドに移すことによって核酸の末端を標識することができます。この方法は非常によく使われます。

2つ目はクレノウという酵素を用いる方法です。クレノウ酵素は大腸菌の2つのドメインから構成されるDNA合成酵素I(ポリメラーゼI)の1つのドメインがこれに相当します。クレノウフラグメントともいいますが、このクレノウ酵素は、分子量110kDaのポリメラーゼIをプロテアーゼで消化すると35kDaと75kDaの2つのドメインに分離できます。分子量が35kDaの方は、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性があります。分子量75kDaの断片がクレノウフラグメント(DNAポリメラーゼI大フラグメント)と言われるもので、この断片にはDNAを合成する活性と3'から5'の方向にDNA鎖をかじるエキソヌクレアーゼ活性、先程の小フラグメント(3万5千)とは逆の活性(プルーフリーディング活性)があります。そういう2つの活性によって標識が可能であり、DNAの末端、あるいはDNA全体も標識することができます。

3つ目はPCR法による標識です。PCRは目的とするDNAを数十万倍から百万倍近くまで増幅できます。このPCRにはテンプレート、つまり鋳型となるDNAが必要です。それ以外にPCRというのはDNAを合成する反応であるため、DNA合成酵素(ポリメラーゼ)、合成するための材料となる4種類のデオキシヌクレオチド、増幅するDNA断片の両端のところ

RIによるDNAの標識法

ポリヌクレオチドキナーゼによる末端標識

クレノウ酵素による標識

PCR法による標識

スライド9

で相補性を持つデオキシオリゴヌクレオチドプライマー(プライマー)が必要です。両方のプライマーからDNAを合成していきます。増幅反応は、DNA鎖の合成(伸長)、解離とプライマーのアニールという一連の反応を30回程度繰り返します。プライマーとして末端標識したものを使えば、末端標識された増幅産物が、また、合成する材料であるデオキシヌクレオチドの1種類以上に標識されたものを使うと、標識されたデオキシヌクレオチドが取り込まれたところすべてが標識されます。

2.3.1.1 ポリヌクレチドキナーゼによる5'末端標識法

(スライド10)

スライド10は5'末端の標識法を示していますが、DNAとRNAの両方に利用できます。スライドのように必ず標識する5'末端はフリーのOHの形でなければなりません。もし、末端がフリーでなくリン酸基をもつ場合には、脱リン酸化酵素を働かせてリン酸基を除きます。T4ポリヌクレチドカイネースはT4ファージ由来のカイネースで、ATPが必要であり、 γ 位が標識されたATPを用いることで、 γ 位の放射性リン酸基を酵素的に5'の末端に移します。

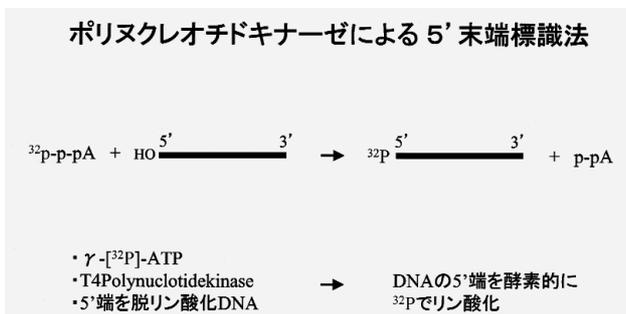
2.3.1.2 クレノウエンザイムによる標識法(ランダムプライマー法、ニックトランスレーション法)

(スライド11)

スライド11はクレノウ酵素による標識法のうち、ランダムプライマー法の例を示しています。この方法は、標識を目的とする鋳型となるDNAが必要です。この鋳型となるDNAは1本鎖状態にしておかねばなりません。この1本鎖状態にするには熱をかけてやればいいのです。DNA試料に熱をかけて急激に冷やしますと、DNAは2本鎖に戻らず1本鎖の状態となります。標識反応にはこの試料の他に、クレノウ酵素と材料となる4種類のデオキシヌクレオチド(このうちの1種類以上が標識されたデオキシヌクレオチドを使用)とランダムプライマーが必要です。

クレノウ酵素による標識はポリヌクレチドカイネースによる標識法で用いる γ - ^{32}P -ATPと異なり、 α 位が標識されたデオキシヌクレオチドを使います。DNAとRNAの合成の基質はヌクレチド三リン酸が材料ですが、合成時に取り込まれヌクレチドに残るリン酸基は、5'の炭素に一番近い α 位のリン酸基のみです。合成される前の基質ヌクレチドには3つのリン酸が付いていますが、取り込まれると β ・ γ 位がピロリン酸の形で外れるので α - ^{32}P -ヌクレチドを用います。また、DNA合成酵素が合成を始めるためにはプライマーが必要となります。ランダムプライマー法の名前の由来は、このプライマーを指しています。

実際の標識反応では、6つから7つのヌクレチドのつながった短いオリゴヌクレチドが同時に何種類もまざっているものを使用します。スライドには7種類のプライマーしか示していませんが、実際にはもっと多く入っています。これらのプライマーに熱変性した1本鎖DNAと混ぜると、1本鎖DNA中の塩基配列と相補性の持ついくつかのプライマーがアニールします。このスライドの例では、7種類のオリゴヌクレチドのうち、右から2番目のプライマー(CTACGG)の6つのヌクレチド配列全部が鋳型DNAの相補的である塩基配列のところでアニールしています。ところが一番左のプライマー(CTAAAC)は鋳型DNAの(CATTTG)に結合していますが、すべての塩基が相補塩基対になっていません。一番右のプライマー(CAAACC)も5つの塩基が相補塩基対になっています。この2つの例は、短いプライマーではアニールの条件を緩やかにすると、プライマーと鋳



スライド10



スライド11

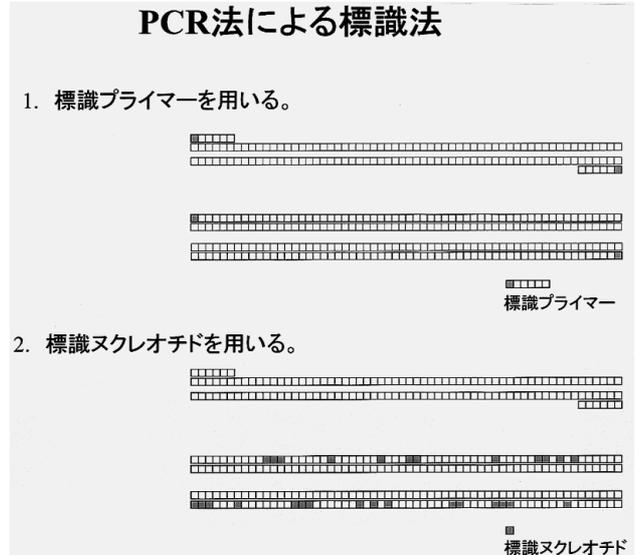
型の間でミスマッチを生じても残りの塩基が相補的な関係を持っていれば、プライマーは鋳型とアニールできることを示しています。クレノウ酵素は、このようにアニールしたプライマーの3'OHのところを認識してDNAの合成を開始します。合成は、鋳型の塩基と相補的な基質デオキシヌクレオチドを鋳型塩基配列に従って5'から3'の方向に合成します。なお、テンプレート(鋳型)の方向性は逆(3'から5')になります。スライドの例では基質のうちの一つ、デオキシCTP(dCTP)をRIで標識したヌクレオチドとして用いているので、鋳型の塩基配列がGのところはRIにより標識されます。このようにDNAを一本鎖状態にして、ランダムプライマーを用いてクレノウ酵素による伸長反応でDNAを合成させる方法は、ランダムプライマー(プライマーエクステンション)法と呼ばれています。一方、DNase Iで切れ目(ニック)を入れた2本鎖DNAに、DNAポリメラーゼIを作用させ、エキソヌクレアーゼ活性でDNAを分解すると同時に、DNAポリメラーゼ活性により新たにDNAを合成する方法は、ニックトランスレーション法と呼ばれています。

また、クレノウ酵素は末端標識に使用することが可能です。仮にこのスライドの下のヌクレオチドが2本鎖状態と仮定します。この仮想した2本鎖DNAの右端には、5'端の3個のヌクレオチドCGAが突出しています。この仮想の2本鎖DNAと突出ヌクレオチドと相補性のあるヌクレオチド3種類、このうちの1種類以上に標識ヌクレオチドを使用して、クレノウ酵素で埋め込む反応を行います。例えば、標識ヌクレオチドに α -³²P-dCTPを1種類だけ使用した場合は、5'突出ヌクレオチドは左からCGAですので、1番目に非標識ヌクレオチドGが入り、2番目のGに対しては標識してあるCが入り、3番目に非標識ヌクレオチドTが入り、結果として、3'末端を標識することができます。このようにクレノウ酵素というのは、5'突出切断面を生じる制限酵素でDNAを消化した場合に、その末端を標識することができる非常に便利な優れたものです。

2.3.1.3 PCR法による標識法 (スライド12)

もう1つはPCR法による標識法です。PCR法にはテンプレート(鋳型)のDNAである1本鎖のDNAと材料のヌクレオチド、それにプライマーが必要です。PCR法による標識法では、標識プライマーを用いる場合と標識ヌクレオチドを用いる場合があります。

スライド12上段のようにプライマーに末端標識し

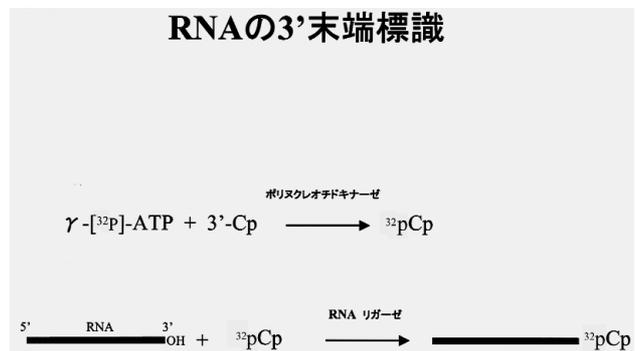


スライド 12

ておいて、PCRを行うと増幅サイクルごとに、標識されたプライマーが取り込まれていきます。したがって、最終増幅産物すべてが5'末端標識されることになります。一方スライド下段のように標識されたヌクレオチドを用いる場合ですと、材料となるヌクレオチドに1種類以上標識したのを使いますと、先程クレノウ酵素のところでお話したように、標識したヌクレオチドが取り込まれDNAが均一に標識されます。RIで標識された核酸は分解しやすいので注意が必要です。末端標識の場合はあまり問題ないのですが、均一標識の場合は、DNA鎖が壊れやすくなりますが、標識後1~2週間は十分使えます。

2.3.2 RNAの3'末端標識法 (スライド13)

RNAの3'プライムの末端標識法は、ちょっと変わっています。RNAの場合はスライド13のように2段階で標識を行います。まずスライド上式のように3'



スライド 13

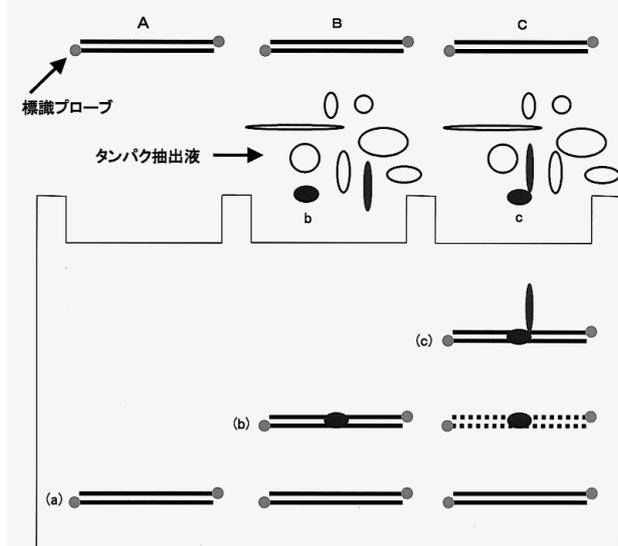
の炭素にリン酸が入り、5'の炭素にはリン酸が入っていない状態で空いている状態になっているヌクレオチド(Cp)に γ - ^{32}P -ATPを用い、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて反応させると5'にATPの γ 位のリン酸基が移り ^{32}P で標識(^{32}pCp)されます。次にスライド下式のように3'末端がフリーのOHであるRNAに、RNAリガーゼにより上式で標識した ^{32}pCp をRNAの3'末端に連結させることでRNAの末端が標識できます。

2.3.3 ゲルシフトアッセイ法

2.3.3.1 ゲルシフトアッセイ法の原理 (スライド14)

これまででは、核酸の標識方法をお話しましたがけれども、今度は実際に機能を解析する方法です。1つは、ゲルシフトアッセイという方法です。これにはいろいろな名前の呼び方があり、ゲルリターデーションアッセイ、あるいはエレクトロモビリティ・シフトアッセイ、ゲルモビリティ・シフトアッセイといろいろありますが、よく使われている名前はゲルシフトアッセイ、あるいはゲルリターデーションアッセイです。これはどのような方法かと言いますと、先程お話したように遺伝子の発現はDNAのみではできず、多くのタンパク因子と相互作用しながら発現していきます。本法はそのようなDNA結合タンパク質を同定する方法です。まず、知りたいと思う遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域のDNA断片を末端標識します。

ゲルシフトアッセイ法の原理

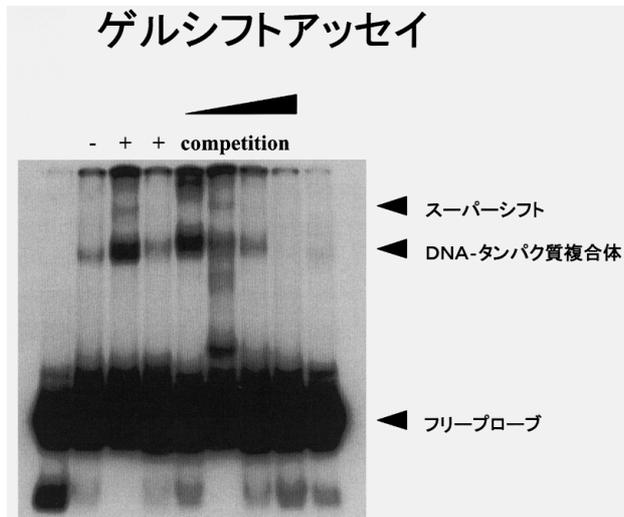


スライド 14

このときのDNA断片は長いと良い結果が得られませんが、数百bpぐらい、できれば100bp以下のDNA断片を準備し標識します。次に調べようとする遺伝子を発現している細胞から、タンパク質の抽出液を作ります。抽出液は、単離した核、あるいは細胞全部をすりつぶして作製します。タンパク質の抽出液と標識したDNA断片を加え保温し、電気泳動後にオートラジオグラフをとります。スライド14の左のレーンは、タンパク抽出液を加えていない標識DNAのみの対照です。レーン中央は、結合タンパク質が存在する場合で、対照の結合タンパク質のない電気泳動パターン((a)のバンド)と比較すると(b)のバンドのようにタンパク質(b, 黒の楕円)が結合したことにより電気泳動移動度が小さくなってしまいます。このようにタンパク質が結合することによってバンドがシフトあるいはリターデーションするため、ゲルシフトアッセイあるいはゲルリターデーションアッセイなどと呼ばれています。ゲルシフトアッセイでは、標識DNAに1種類以上のタンパク質が結合する場合があります。スライドの右のレーンでは、1つの結合タンパク質にさらに別のタンパク質(c, 黒の細長い楕円)が結合した例です。標識DNAの異なった領域に、あるいは同一領域でも良いのですが複数の異なるタンパク質が結合する場合があります。これらの場合には、複数のタンパク質が付くことにより、さらに結合複合体の移動度は小さくなります(スライド右の電気泳動例(c)参照)。このように、(b)のバンドの複合体に別のタンパク質が結合して生じた、新たな(c)の複合体バンドのシフトをスーパーシフトと言います。

2.3.3.2 ゲルシフトアッセイ法の実例 (スライド15)

スライド15はゲルシフトアッセイの実際の写真ですが、フリープローブ(標識DNA)はタンパク質の付いていないものです。実際にタンパク質の核抽出液と混ぜてやると、スライドのようにタンパク質が結合したバンド(DNA-タンパク質複合体)、それに、この例ではスーパーシフトのバンドが観察されます。ゲルシフトアッセイで必ず確認しないといけないのは競合阻害実験(competition)です。タンパク質と標識DNAを混ぜるときに、同時に、標識DNAと同一な非標識DNAを反応系に加え、シフトバンドとスーパーシフトバンドの消失を確認する必要があります。また、これとは別に、まったく関係のないDNA、よく使うのはポリdC、ポリdIというポリヌクレオチドですが、これらを標識DNAと一緒に混ぜて、シフトバンドとスーパーシフトバンドの濃さが変わ



スライド 15

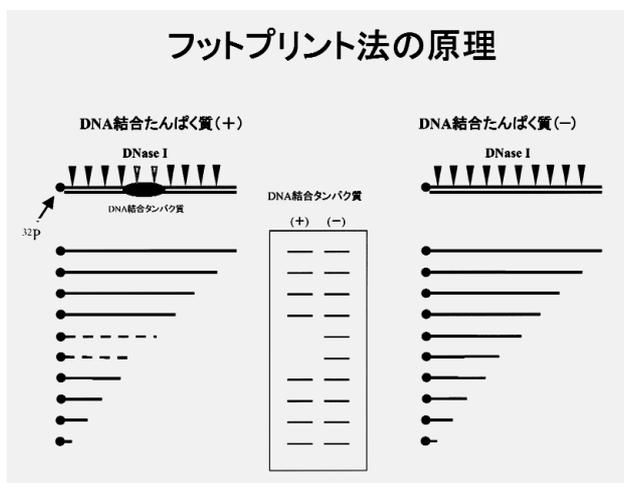
らないという結合複合体の特異性を確認することが大事です。

2.3.4 フットプリント法

2.3.4.1 フットプリント法の原理

(スライド 16)

フットプリント法は、タンパク質が結合する DNA 領域を検出する方法です。フットプリント法の前に DNase I をつけて DNase I フットプリント法とも言います。スライド 16 の左のシェーマに示すように DNA と結合タンパク質を混ぜて DNA・タンパク質複合体を形成します。スライド右のシェーマはタンパク質を入れていない対照です。これらに対し DNase I という DNA 分解酵素を作用させます。このときの DNase I の濃度は、DNA 1 分子に対して 1ヶ所切断するという反応条件を使用します。スライドでは



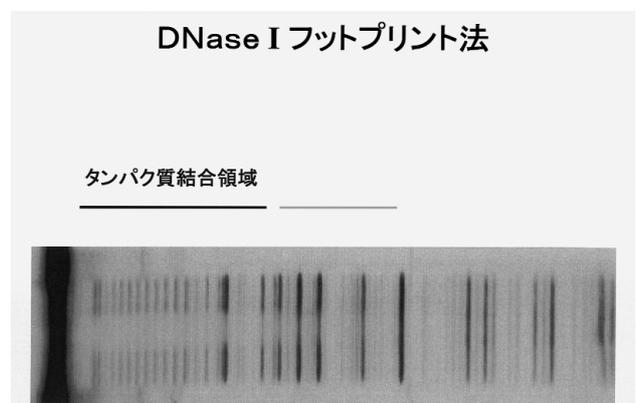
スライド 16

DNase I による切断部位を黒のアローヘッドで示してありますが、DNase I 消化反応後には、対照では様々な個所に 1ヶ所切断を受けた複数の DNA 分子が生じます。一方、DNA 結合タンパク質が存在している(スライド左)場合には、白抜きのアローヘッドで書いてあるように、タンパク質が結合している DNA 領域は、DNase I による切断を受けません。したがって、これらに相当するバンドはゲル上には出現しないこととなります。フットプリント法は、試料の DNA を末端標識したものをを用いているので、タンパク質を入れてない対照の方は、スライド右のようにオートラジオグラフで、小さい分子から大きい分子と 1 分子ずつサイズの異なった DNA 分子のラダーができます。一方、結合タンパク質が存在する場合には、スライド左のようにタンパク質の結合で保護されている領域は抜けてきます。この実験で用いた DNA 断片の塩基配列の情報を知っていれば、どの領域にタンパク質が結合しているかが分かります。対照とタンパクを結合した試料を泳動するときに、同時に、このゲルに化学修飾法によるマクサム・ギルバート法 (DNA 塩基配列決定法) で反応をした DNA 断片を泳動します。これにより、実際に DNA 分子のどこからどこのシーケンスの間でタンパク質が結合しているかがシーケンスレベルで分かります。

2.3.4.2 フットプリント法の実例

(スライド 17)

スライド 17 はフットプリント法の実例です。上下のレーンが対照で、真中のレーンはタンパク質を結合させた試料です。ゲルの右半分、低分子領域は 3 者とも同一強度のバンドが見られます。しかしながら、高分子側の右半分で図中央のバーで示してある領域のバンドでは、真中のレーンのバンドがかなり薄くなっています。この領域はタンパク質と結合を

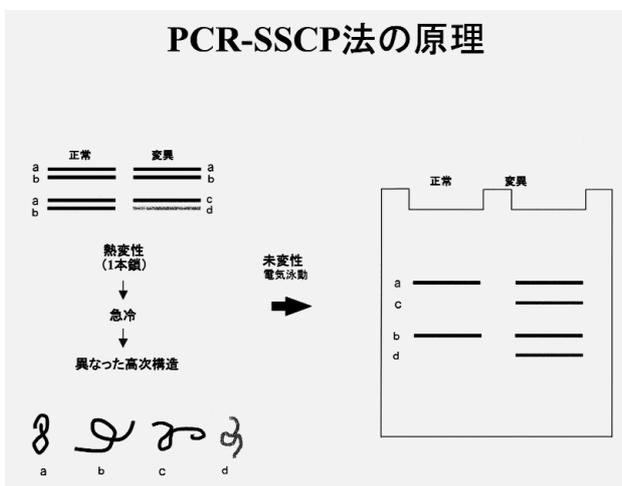


スライド 17

したことで、DNAの高次構造が変化しDNase Iの攻撃を受けにくくなった結果と考えられます。さらに、高分子領域では、バンドがほぼ消失し、この領域にタンパク質が結合していることを示します。フットプリントの名前の由来は、雪が降った直後の路面を歩くと足跡が残りますが、この足跡になぞらえてフットプリント(足跡)という名前がつけました。

2.3.5 PCR-SSCP法 (スライド18)

PCR-SSCP法はDNA変異を同定する方法で、スライド18はその原理を示しています。目的とする正常の人と変異を持っている患者さんの同じ遺伝子座をPCR標識法で増幅します。増幅した遺伝子(染色体)領域(スライドのab, cd)を熱変で1本鎖にします。この熱変性したものを急激に冷やすと、DNAはアニールできなくなり、糸だま状の1本鎖構造をとります。この糸だま構造は、DNAの塩基の違いによって異なった立体構造をとります。aとbは相補鎖ですから違う塩基配列になっています。aとc, bとdがどこが違うかと言うと、それぞれは同じ塩基長なのですが、その中の1ヶ所の塩基が違い(変異)、1本鎖DNAの立体構造が違うことを示しています。1ヶ所の塩基ですが、その変異の位置がDNA鎖の左端、中央あるいは右端に入ることによって3者を取るそれぞれの立体構造は変わってきます。これらの立体構造は、熱により壊されやすいので、試料にできるだけ熱がかからないように電気泳動を行います。このための電圧条件として、よく利用されている15cMのゲル板で、バッファーによりゲル板を冷却するような方式になっている電気泳動装置で250

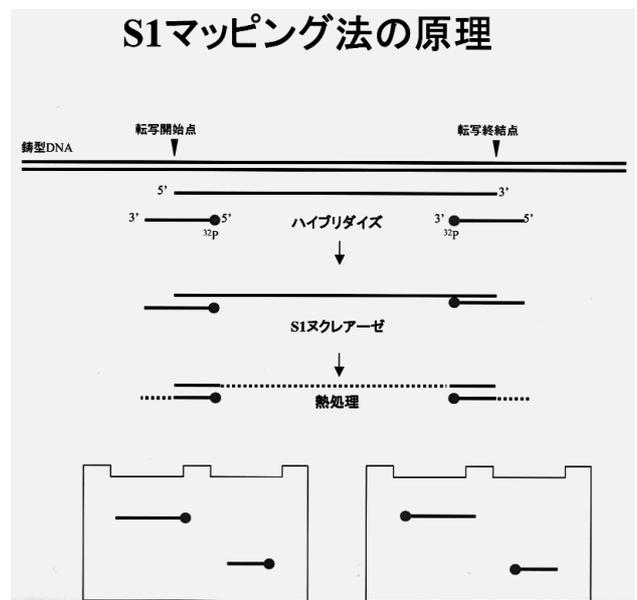


スライド18

ボルトぐらいかけても大丈夫です。また、シークエンス用の長い40~60センチぐらいのゲル板ですと、1000ボルトぐらいかけてやりますが、当然、放熱板を付けて、場合によっては放熱板に扇風機を当てて冷やしてやります。なお、泳動している間には、時々ゲル板を手で触って温度の確認し、もし熱くなるようなら電圧を下げます。1本鎖DNAが取る立体構造は、電気泳動時のバッファー条件でかなり異なります。泳動バッファー中のグリセロール濃度を0%, 5%あるいは10%といろいろ濃度を変えて、トライアルアンドエラーで対象とするDNA試料について最適条件を決めます。PCR-SSCP法は変異検出の非常に優れた方法で、高い確率で変異を検出できます。短所として、DNA鎖長が500塩基長以上の試料には適用できないことと、変異がどの場所にある、どのようなものであるか同定できないことです。したがって、変異を検出したあとで、最終的にそのバンドのシークエンスを行い、その変異を同定する必要があります。

2.3.6 S1マッピング法 (スライド19)

S1マッピング法は、S1ヌクレアーゼを使ってスライド19に書いてあるように転写の開始点、転写の終結点、あるいはスプライシングのジャンクションを見つけるときに使います。例えばスライド左の例ですと、転写の開始点をカバーする5'末端を標識したDNAプローブを用意し、RNAに対してこのプローブ



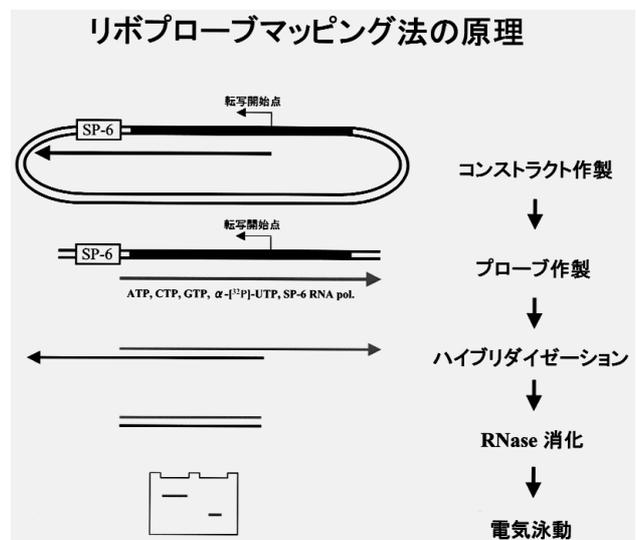
スライド19

をハイブリダイズします。DNAプローブとRNA間で相補性を持つ領域が対合を形成します。この対合にS1ヌクレアーゼを処理します。S1ヌクレアーゼはRNA, DNAの1本鎖を特異的に消化する酵素ですので、飛び出した領域を消化し、対合を形成している2本鎖部分は消化されずに残ります。消化後の試料を熱処理によって水素結合を外し、電気泳動を行います。このとき、同時にプローブも一緒に泳動することで、どれくらい短くなったかが判別できます。その長さから転写の始まりがどこの部位であるか同定することができます。逆に終結点はまったくこの逆になりますが、3'側に標識して同様な手順で行います。

2.3.7 リボプローブマッピング法 (スライド20)

遺伝子の発現解析を行う際、目的とする遺伝子のmRNAを定量することで、どのような時期にどのような組織でその遺伝子が発現しているか知ることは重要となります。このような目的でmRNAを定量する方法がリボプローブマッピング法です。この方法は、RNaseプロテクション法とも言われ、RNAの末端、転写開始点や遺伝子の点突然変異にも利用されています。

スライド20で、RNAの転写開始点を例にとって説明します。この方法の特徴は、プローブにDNAではなくRNAを用いる点で、手順はスライドの右に示してあります。まず、コンストラクトの作製ですが、SP-6というベクターに転写開始点を含むDNA断片を逆向きにつなぎます。ベクターの下に示された左向きの矢印が調べようとするmRNAの方向(5'から3')ですから、このベクターで合成されるRNAはメッセンジャーRNAと逆向き(相補鎖)ができます。ベクター中のSP-6は、RNAを作るバクテリオファージのプロモーターです。コンストラクトを作製してから、ベクターをスライドのように適当な制限酵素消化して直鎖状のDNA断片として切り出します。この操作は必ずしも必要ありませんが、制限酵素消化せずそのままのベクターを使うと、挿入した外来DNAを通り過ぎ、ベクター部分までRNAが合成されてしまいます。このような余分な領域を持つRNAプローブを用いると検出効率が悪くなるため、制限酵素による消化操作を入れた方が無難です。次に、制限酵素で切り出したDNA断片を鋳型としてRNAを合成します。合成は、4種類のリボヌクレオチドを用い、そのうちの1種類、 α - ^{32}P -UTPを標識ヌクレオチド

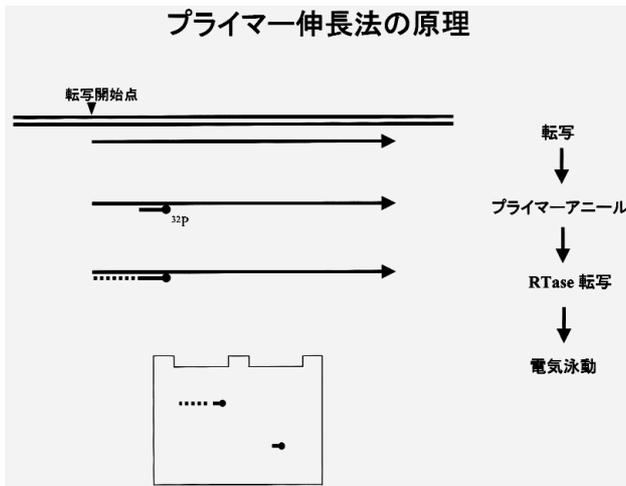


スライド20

としてDNA依存RNAポリメラーゼでプローブを合成します。そうすると、鋳型DNAのAの配列に対してUが取り込まれ、Uのところはすべて標識された標識プローブができます。次に、調べようとする組織からRNAを調製し、このプローブとハイブリダイゼーションを行います。リボプローブマッピング法は、対象物を検出のため、消化にRNase(通常はRNaseAあるいはT1)を使います。RNaseAはピリミジン塩基のところを切り、RNaseT1はグアニンの3'側を切断する酵素です。RNaseは特異性がありますが、RNase濃度を上げると特異性が低くなってしまいますので、消化時の濃度や条件、温度が非常に重要になります。通常30℃で30分間反応を行います。条件が強すぎる場合は水中で反応させることもあります。S1マッピング法と同様に、対合形成をしてない領域をRNase消化し、熱をかけて、元のプローブと消化したもののバンドのサイズから転写開始点を知ることができます。なお、発現を調べるときには、同一操作で得られるバンドの濃さを比較することによって発現量を知ることができます。調べたいRNAの発現が多ければ、オートラジオグラフに現れるバンドの濃さは強くなります。

2.3.8 プライマー伸長法 (スライド21)

プライマー伸長法も同じく転写開始点を知る方法です。転写開始点からRNAが転写されますが、そのRNAと相補性を持つDNAの標識プローブを作製します。このプローブは転写開始点下流の任意の場所に、5'末端標識した相補オリゴヌクレオチドで作製



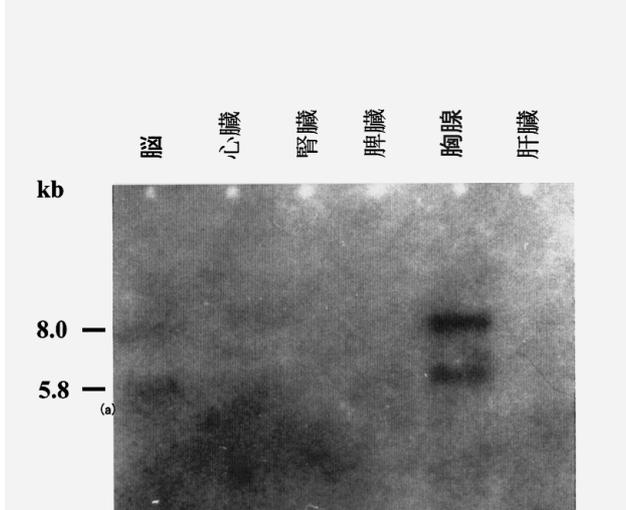
スライド 21

して用います。RNA を鋳型にして DNA 合成を行います。そのときに逆転写酵素 (RTase), すなわち RNA を鋳型にして DNA を作る酵素を用います。DNA 合成は鋳型のあるところまで、すなわち転写の開始点までしか伸長できませんので、転写物の長さを観察することで転写開始点がどこにあるかを知ることができます。

2.3.9 ノーザンブロット法—原理と実例— (スライド 22)

ノーザンブロット法は遺伝子の発現を調べる方法です。まず、様々な組織から抽出した RNA をポリアクリルアミド電気泳動にかけ、ゲル中の RNA をフィルターに移します。移した RNA に対して、発現を調

種々の組織における mRit-1 遺伝子の発現



スライド 22

べようとする遺伝子の一部の DNA 配列をランダムプライマー法によって標識します。そのプローブを用いて、RNA をブロットしたフィルターに対してハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィを行います。プローブがハイブリダイズした組織は、黒化バンドが認められその遺伝子の mRNA のサイズが推定できます。また、黒化バンドの濃さから、その mRNA の発現量を予測できます。

スライド 22 はマウスの胸腺リンパ腫の発症に関係する遺伝子 (mRit-1) をポジショナル・クローニングしたときのデータの 1 つで、「種々の組織における mRit-1 遺伝子の発現」に関するノーザンブロット法の実例です。mRit-1 は胸腺に強く、脳に弱く発現していることがわかります。この遺伝子は、選択的スプライシング (alternative splicing) によって 1 つの遺伝子から 4 種類のメッセンジャー RNA ができることを明らかにしてありますが、このスライドではそのうちの 2 種類、8 kb の RNA と 5.8 kb の RNA が脳と胸腺に発現していることが示されました。ノーザンブロット法では、このように、発現している組織が分かり、バンドの強さによって発現量を知ることができます。

2.3.10 サザンブロット法

2.3.10.1 サザンブロット法の手順 (スライド 23)

サザンブロット法は、電気泳動した DNA をフィルターにブロット (移す) する点がノーザンブロット法との違いです。サザンブロット法は、ゲルにアクリルアミドではなくて、多くの場合アガロースを使用します。手順はまず、ゲノム DNA を適当な制限酵素で消化します。次にアガロースゲルの電気泳動にか

サザンブロット法

- ゲノム DNA の制限酵素消化
- アガロースゲル電気泳動
- アルカリ処理
- フィルターブロット
- 標識プローブとのハイブリダイゼーション
- オートラジオグラフィ

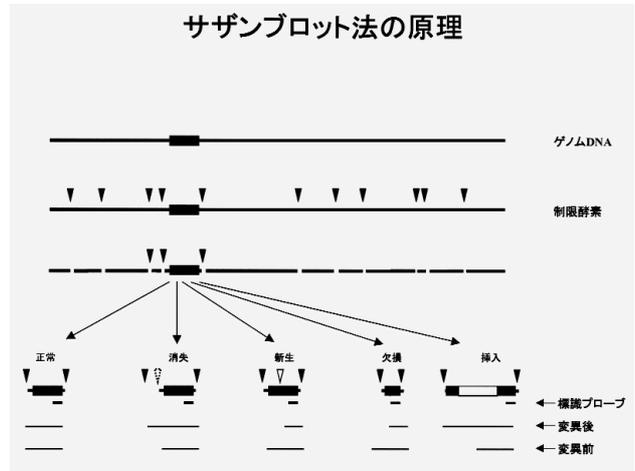
スライド 23

けて消化したDNA断片をサイズによって分離します。消化したDNAは2本鎖ですので、泳動が終わった後にゲルを直接アルカリの溶液に浸し2本鎖DNAをゲルの中で1本鎖にします。この操作のあとでアルカリを中和することもあります。必ずしも中和する必要はなく、そのままナイロンフィルターにDNAを移してもかまいません。DNAをフィルターにプロットしてから次に、プロットしたDNAをフィルターから外れないように共有結合させる操作(固定)を行います。次に検出用プローブを標識しますが、標識法には末端標識法も使いますが、ランダムプライマーによる標識法がよく用いられます。標識プローブを使ってハイブリダイゼーションを行い、フィルター洗浄してX線フィルムあるいはイメージングプレートにあててオートラジオグラフをとります。

2.3.10.2 サザンブロット法の原理 (スライド24)

サザンブロット法の原理を説明します。スライド24では、調べようとする部位をボックスで示してあります。ゲノムDNAを適当な制限酵素で消化してやります。アローヘッドは制限酵素の認識部位を示していますが、消化によって切られたDNA断片を大きさによってアガロースゲルで分離します。最終的に標識プローブをハイブリダイズして目的とするDNA断片(変異部位)を検出するわけですが、スライドのように大体4つのパターン、すなわち消失、新生、欠損、挿入があります。スライドにプローブのDNAが黒いバーで示してありますが、実際にハイブリダイゼーション用の標識プローブとして用いる場合には、標識反応後に熱をかけて1本鎖状態にして使用します。ゲルの中でゲノムDNAはアルカリ処理ですでに1本鎖になっているので、標識プローブとのハイブリダイゼーションで、正常の場合は制限酵素で切られて正常サイズの断片ができます(スライド下1番左)。スライドではサイズの尺度のために正常なDNAサイズを一番下に示してあります。

スライド下の左から2番目の消失の例について説明します。変異により、制限酵素による認識部位のDNAの塩基配列が変わったために、制限酵素消化で本来の制限酵素断片長とは異なったDNA断片が生じる場合がこれに相当します。例えば、制限酵素EcoRI認識配列GAATTCがGAATCCに変異したとすると、この配列は制限酵素EcoRIで切断されなくなります。制限酵素切断サイト(正常サイト)が消失したことをドットのアローヘッドで示しています。そうしますと正常サイトがないので、ゲノムをEcoRI



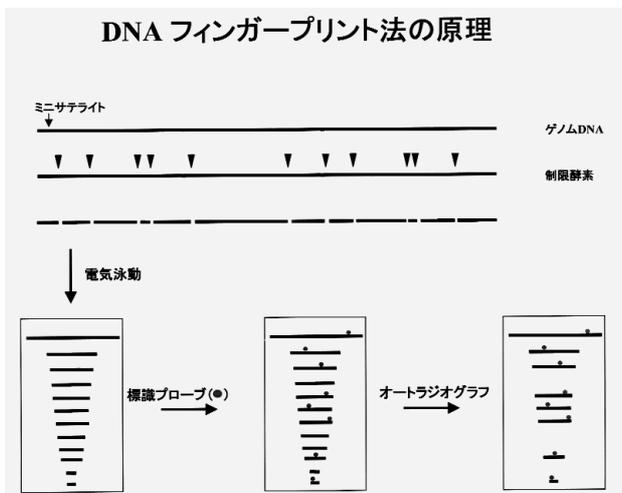
スライド24

で消化したものは、隣の認識サイトのところで切断されます。したがって変異後の検出されるバンドは、正常のバンドに比べて長くなります。次にスライド左から3番目の新生について説明します。今度は逆に、ボックスで示す部位にある塩基が1つ変わったことによって、今までなかったEcoRIのサイトがボックスを挟む正常サイトの中間にできたとします。そうしますと、新たに生じたサイトで切断されますので短いバンドが新たに生じます。プローブはスライドの例ではボックスの右端にしかハイブリダイズしないので左側のボックスは認識しません。もう1つは、問題としている部位に大きな欠損が起こった場合です。欠損して短くなっているため、プローブの認識する部位はもとのサイズよりも短くなります(スライド右から2番目の欠損)。逆に大きな挿入が入った場合は、挿入領域をスライドで四角の白抜きボックスで示していますが、挿入が入った分だけ制限酵素で生ずる断片は長くなります(スライド一番右の挿入)。このように変異が入ったことによって、制限酵素の断片の長さが変わることを、RFLPと言います。Restriction Fragment Length Polymorphismの頭文字を取った略で、制限酵素の断片長による多形という意味です。

2.3.10.3 DNAフィンガープリント法—プローブとしてミニサテライトを用いるサザンブロット法—

2.3.10.3.1 DNAフィンガープリント法の原理 (スライド25)

前のスライドで示したサザンブロット法は、1つのプローブが1つの遺伝子座を認識する方法でしたが、もっと強力なサザンブロット法があります。これはDNAフィンガープリント法と言われるもので



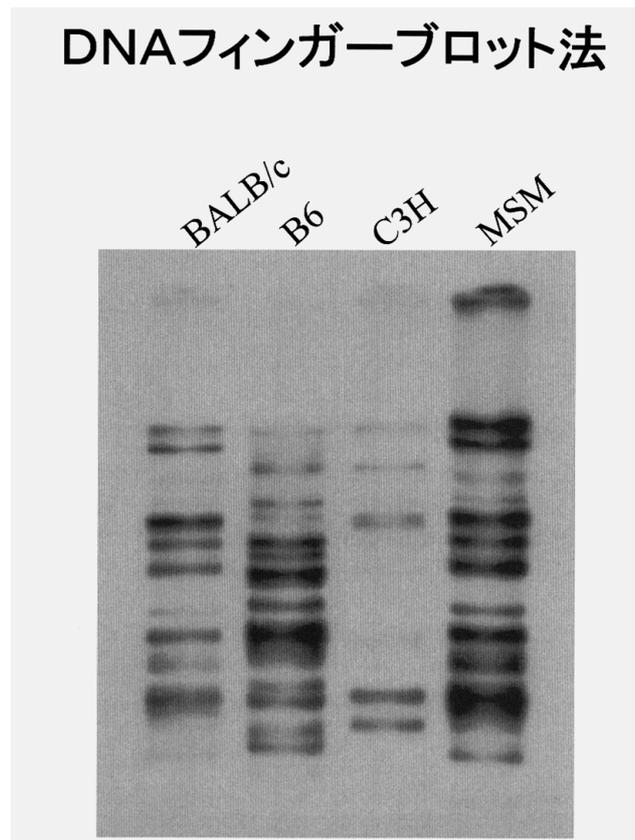
スライド 25

す。サザンブロット法の1種ですが、スライド25に書いてあるようにプローブとして反復配列の1種であるミニサテライトを使います。サザンブロット法とDNAフィンガープリント法の違いは、フィンガープリント法はプローブにミニサテライトを使用する方法です。ミニサテライトは5から100の塩基配列が1つの配列単位となっている反復配列です。しかもミニサテライトの座はゲノム上に分散しています。ゲノムには、同じ単位配列を持つミニサテライトが、ある遺伝子座では10個つながり、またある座では20個つながっている、さらに他の座では5個つながっているというように反復数が違っているものが分散しています。ゲノムを制限酵素で消化して生じたDNA断片中には、ゲノム中に分散しているミニサテライトがDNA断片のどれかに入っています。しかもそれぞれの断片の中に入っているミニサテライトは反復数が違うので断片の長さに違いが生じます。制限酵素で消化したゲノムDNAを電気泳動にかけると、スライド25で示すように、DNA断片のサイズに従って大きなものから小さいものに分離されます。その中にミニサテライトが入った断片があるわけです。本法はサザンブロット法の1種ですから、先程説明したようにゲルをアルカリ処理し、DNAをフィルターにブロットして、ミニサテライトを標識したものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行います。前のスライドと違うのは、1つのプローブでゲノム中の複数の遺伝子座を同時に観察できます。プローブとして使ったミニサテライトの反復数は個体によって異なることが多いので、電気泳動後のバンドを比較することで反復の数の違いによってバンドの移動度の差としてみることができます。このよ

うに個体によるミニサテライトの移動度の差を利用することにより個体識別、例えば親子鑑定に応用されています。

2.3.10.3.2 DNA フィンガープリント法の実例 (スライド26)

スライド26は異なった4系統のマウス(BALB/c, B6, C3H, MSM)を使ったDNAフィンガープリント法の実例です。ここで使用したマウスのミニサテライトは反復配列の単位がAGGCAGGという7塩基配列が繰り返されたものを使用しています。マウスはヒトと違って染色体がホモ接合になっています。ヒトの場合は、父親と母親の染色体が区別できますが、純系マウスの場合は父親・母親の染色体がまったく区別できません。マウスの個体はそれぞれ相同染色体の両方の座を見ているのですが、1本のバンドとして検出されます。今お話ししたAGGCAGGというプローブを制限酵素で消化したブロットに対してハイブリダイゼーションしてやると、マウスの系統によってスライドのようにバンドの位置が異なってきます。これは繰り返す数の違いを反映していると考えられています。このように、個体によるミニサテライトのバンドの違いをDNAフィンガープリント、



スライド 26

すなわち指紋による個体識別と同じように応用することが可能となります。例えば、法医学では親子鑑定や血痕がヒトのものか動物のものかを区別するために利用されています。またマイクロサテライトも同じような目的で使われています。

2.3.10.4 高頻度アレル欠失領域のBAC コンティグ

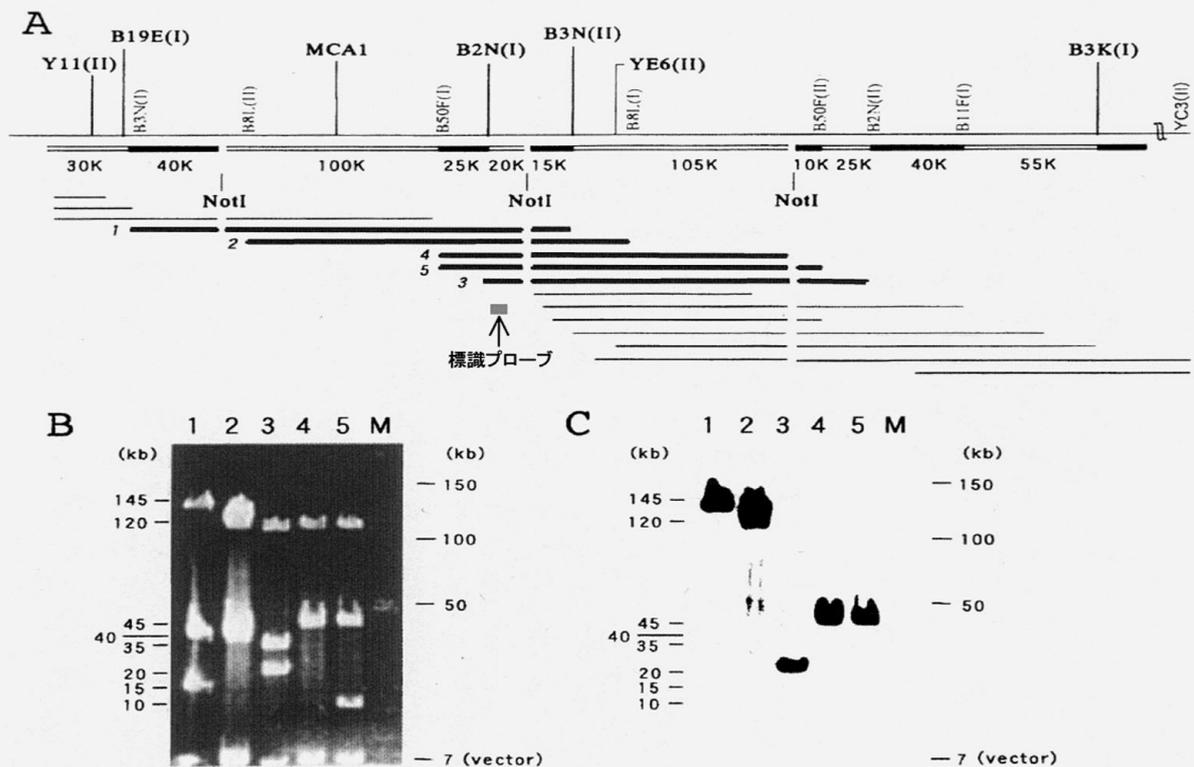
(スライド27)

このスライドは、先程出てきた胸腺リンパ腫の原因遺伝子のポジショナルクローニングで行ったサザンブロット法の1例です。胸腺リンパ腫の原因遺伝子がゲノムのどの領域に存在するか調べたものです。アレルの欠失をLOHと言いますが、LOHはloss of heterozygosityの略語です。これまでに、多くのがんの発症に関わる遺伝子がLOH解析から同定されました。例えばp53とか、Rb遺伝子ですが、がんの組織ではこれら遺伝子の片方のアレルが欠失し、残

存するアレルにおいても遺伝子に変異をし、これらの遺伝子の機能消失によりがんが発症すると考えられています。このような理由から、LOHが高頻度に見られる部位に、目的とする原因遺伝子の存在を予想できます。

胸腺腫瘍マウスを1000頭くらい作製し、胸腺腫瘍からDNAを調製しLOH解析を行います。この解析法で、マウスの12番染色体のある部位で、高頻度にLOHを示す領域(スライド図-A上段)を絞り込みました。次に、BACライブラリーを購入し、DNAマーカーを用いこの高頻度LOHを示すゲノム領域を含むBACクローンを複数個拾い上げ、コンティグを作製します。BACはBacterial Artificial Chromosomeの略で、コンティグは連続したクローン集団を意味します。まず、任意のBACクローン、例えば図-A下段コンティグのクローン1を選びます。このクローンについて、挿入ゲノム断片の左右両末端のDNA塩基配

高頻度アレル欠失領域のBAC コンティグ



スライド27

列を決定します。それらの塩基配列を基に、左右両末端にそれぞれPCRのためのプライマーセットを作製します。この2セットのプライマーで、別のBACクローン、例えばクローン5に対してそれぞれPCRを行います。クローン5は、左側プライマーでPCR産物はできないが、右側プライマーでPCR産物ができたとします。この結果からクローン5は、クローン1の右側にオーバーラップしていることが予想できます。次いで、クローン5の右末端のDNA塩基配列を決定し、プライマーセットを作製します。このプライマーを用いて、クローン5とオーバーラップするクローンを探し出し、同一操作を繰り返してコンティグを作製します。

さらに、これらのクローンが連続していることを確認する目的で、BACクローンをNot1という制限酵素で消化し、サザンブロット法を行いました。Bは、5つの連続したクローン(1-5)をNot1消化し、アガロースゲル電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した図です。レーンの番号は、それぞれクローン番号に対応しています。1番のレーンは、3つの断片(40, 145, 15kb)に分かれます。同様に2番目、4番目のレーンは2つの断片、3番目、5番目のレーンは3つの断片に分かれます。このゲルをブロットし、Aで示された標識プローブを用いハイブリダイゼーションしてオートラジオグラフィを行います。結果は、Cのようなオートラジオグラムが得られました。4番、5番のレーンには、同じサイズのバンドがハイブリダイズしています。これらのバンドは、Aのクローン4と5のそれぞれ左端のNot1断片であることを示しています。このようにして、これらの5つのクローンが連続したクローンという確固たる証拠を作っておきます。この確認作業が終わってから、BACクローンに対してさらに細かく解析し、LOHの中心点に存在する遺伝子を見つけっていくというのがポジショナルクローニングです。このようなポジショナルクローニングにもRI標識したDNAが利用されています。

2.3.11 DNA塩基配列決定法

(スライド28)

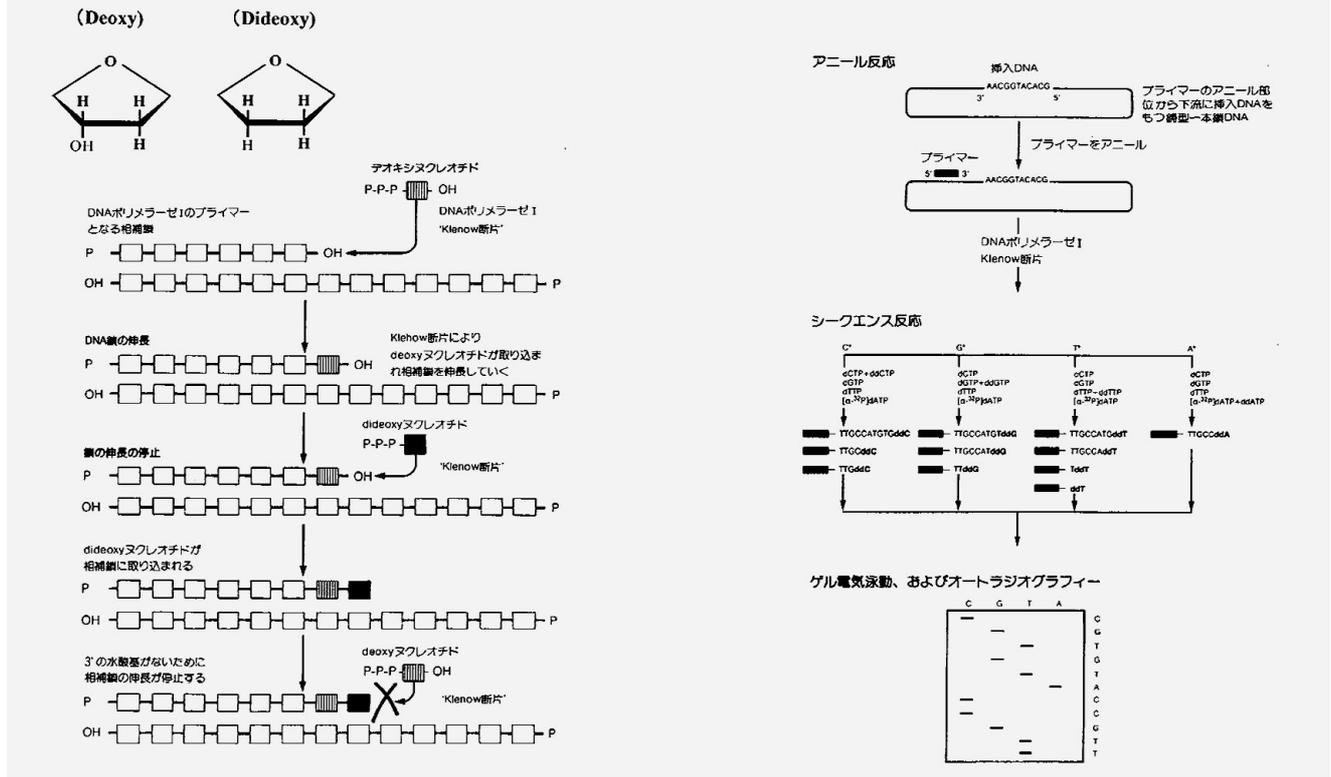
DNA塩基配列決定法ですが、DNase I フットプリント法のところでマクサム・ギルバート法の話をしてきましたが、現在では、ほとんどのDNA塩基配列決定はサンガーのジデオキシ(dideoxy)法が使われていますので、この方法について説明します。このDNA塩基配列の決定は、DNAの合成反応を利用します。DNA合成反応ですから、1本鎖の鋳型DNA、プライマー、

材料となる4種類のヌクレオチド(デオキシタイプ)が必要です。通常のDNA合成反応と違う点は、4種類のヌクレオチドに加えて、それぞれに対応した類似体のジデオキシヌクレオチドを反応系に加えます。

この類似体の構造は、スライド28左上の化学構造式に示すように3'-OH基がOHではなくて3'-Hになっています。合成のときに、ジデオキシをデオキシに対して数十分の一の濃度になるように加えておきます。この濃度比の調整は結構大変なのですが、現在はキットとして、最適の濃度比になっているものが売り出されています。反応の原理をスライド左の反応シエマ図に示してあります。鋳型DNAにアニールしたプライマーの3'末端に、鋳型と相補的なヌクレオチドを取り込んで合成反応を続けていきます。反応系には、デオキシとジデオキシヌクレオチドが存在するので、取込まれるヌクレオチドは、デオキシとジデオキシタイプのヌクレオチドの競合反応になります。ひとたびジデオキシヌクレオチドが取込まれると、3'がOHでないため、次のヌクレオチドが取り込まれなくなり、そこで反応は止まってしまう。例えば、鋳型DNAが100分子存在し、合成反応で1分子の鋳型DNAがジデオキシヌクレオチド、残り99分子はデオキシヌクレオチドを取込んだと仮定します。ジデオキシヌクレオチドを取込んだ分子は、先に述べた理由で合成反応は止まりますが、残りの99分子は3'がOHであるデオキシヌクレオチドを取込んでいるため、次の合成反応に進むことができます。次の合成反応でも1回目の合成反応と同じように競合反応が起こり、反応終了時(100回の合成反応)では、1分子から100分子まで1ヌクレオチドずつ長さの異なった分子が合成されます。デオキシとジデオキシタイプのヌクレオチドの濃度比が問題となる点は、ジデオキシヌクレオチドを多く入れてしまうと、すべての鋳型にジデオキシが入り込むこみ、合成反応が進まなくなってしまうからです。逆に、ジデオキシヌクレオチド濃度が極端に低いと反応が進みすぎ、結果としてシーケンスシグナルが弱くなります。

スライド右の中段の図はシーケンス反応の例を示しています。鋳型、プライマー及び4種類のヌクレオチドが入っていますが、その1種類のデオキシCTP(dCTP)に対して1種類のジデオキシCTP(ddCTP)を入れておきます。そうすると先程の説明から、1分子は最初のC(シトシン)のところ、次の分子は2番目のCのところと云った具合に、すべてのCごとで反応が止まった分子集団ができます。

DNA 塩基配列決定法



スライド 28

同様に4種類のヌクレオチドのほかにジデオキシのA(アデニン), G(グアニン), T(チミン)の3種類の反応を同時に行います。合成反応の際, 末端標識プライマー, あるいは反応中のヌクレオチド1種類に標識デオキシヌクレオチドを用いることで, 合成されるDNA鎖は標識されますから, ゲル電気泳動によって分離してからオートラジオグラフィを行うことでDNA塩基配列の決定ができます。バンドを下から順に読んでいけば塩基配列がわかります。

3 おわりに

RIは遺伝子・ゲノム解析に重要な役割を果たしてきました。最近様々の非RI法が開発され, またRI取扱の煩雑さも相俟ってRI法の利用は以前よりも減少しています。しかし, RI法はうまく利用すれば有効な方法であり今後も利用され続けると考えられます。放射線測定器などの改良・開発とともにRIの特徴を生かした画期的な実験方法の開発によりバイオサイエンス研究の進展に寄与することが期待されます。

(平成13年10月3日開催の金沢大学アイソトープ総合センター主催「特別講演」の講演録)