RNAをプライマーとしたPCR

九州大学遺伝情報実験施設ゲノム解析分野
古川宗一郎, 柴田弘紀, 林 健志

特定のDNA断片を増幅することが可能であるPCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法は, その単純な原理によりさまざまな形で利用されており, 今日分子生物学分野での研究に必要不可欠な手法となっている。

PCR法は, 試料とするDNA中の目的とするDNA部分と対応する, 数十塩基のDNA鎖 (プライマー) を必要とする。このプライマーは現在, ホスフォアミダイト法などの化学的合成で得られている。しかし, 多種多様な変法, 改良法が発表されているPCR法自体の進歩と比較して, プライマー合成技術は変わっていない。化学的にDNAを合成すると, かなりのコストがかかり, 必要とするDNAの量よりも大過剰にできてしまう。このため, DNA合成機がある研究室でプライマーを自家合成するにせよ, 各メーカーに依頼するにせよ, 実際に使用されるDNAプライマーはごくわずかで, 大部分は余ってしまうという事態は筆者の経験からも想像できる。また, この合成のステップは, 貴重な実験時間に空白の時間を与えるのも事実である。これらの問題点は, 大量のサンプルを処理しなければならない実験系において, 大きな問題になりうる。事実, 国際協力のもとで進行しているヒトゲノム計画においても, 巨大なヒトDNAの塩基配列を決定する際, 必要とされるプライマー合成におけるコストと時間の問題は障害となっており, 早急に改善されなければならない。

我々は, これらの問題点を解決すべく *in vitro* で酵素的に合成したRNAをプライマーとして用いる, RNA-primed PCRを開発した。生体内でRNAは, DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼにより, 転写というかたちで合成される。現在では, ファージの系での転写反応は

試験管内で行うことができ, 各メーカーからキットとして供給されている。これを用いて, 必要なプライマーの配列をもつ鋳型DNAを調製することで, プライマーは酵素的なインキュベーション反応 (*in vitro* transcription) のみで合成することができる。この方法は, 化学合成よりもコストの面でも時間の面でも経済的である。RNAプライマーを実際にPCRに用いる際, 二つ大きな問題がある。第一の問題は, RNA鎖からDNA鎖が伸長するかどうかという点である。このことは, *in vivo* でDNA複製に働くすべてのDNAポリメラーゼは, RNAプライマーからのDNA鎖伸長を行っていることから問題ないと考えられる。第二の問題として, PCRの2サイクル目の反応から鋳型DNAにRNAの配列が含まれることが挙げられる (図1)。よって, 通常PCRによく使われる *Taq* DNAポリメラーゼの活性だけで

図1 図のように, PCRの2サイクル目から, 鋳型DNAにプライマー由来のRNA配列が含まれる (点線で示す)。*Taq* DNAポリメラーゼの活性によるPCR身長反応はRNA配列に行き着いたところでストップしてしまう。しかし, *Tth* DNAポリメラーゼを Mn^{2+} 存在下で用いると, 逆転写活性により伸長反応はストップしない。

RNA-primed PCR

Soichiro FURUKAWA, Hiroki SHIBATA, Kenshi HAYASHI

Division of Genome Analysis, Institute of Genetic Information, Kyusyu University

e-mail. furuso@gen.kyushu-u.ac.jp

表1 RNA-primed PCRの例

<RNA-primed PCR反応組成>

鋳型DNA 750pg
 10 mM Tris-HCl, pH 8.3
 90 mM KCl
 1.0 mM MnCl₂
 0.3 mM dATP
 dCTP
 dGTP
 dTTP
 1.0 μM RNAプライマー (フォワードプライマー)
 1.0 μM DNAプライマー (フォワードプライマー)
 rTth DNAポリメラーゼ 0.75 unit
 H₂O

total 5μl

<RNA-primed PCR反応条件>

2-ステップPCR

変成 94℃30秒

アニーリング, 伸長 70℃3分 20サイクル

は, RNA 配列に行き着いた時点でPCRの伸長反応は止まってしまう。この問題を解決するために, 我々は, *Tth* DNA ポリメラーゼを使用した。*Tth* DNA ポリメラーゼは高い逆転写活性をもっている。逆転写反応とは, RNA を鋳型としてDNAを合成するものである。よってPCR伸長反応は, RNAが鋳型になった時点で逆転写反応を行うことで止まることなく進む。ここで重要なことは, *Tth* DNA ポリメラーゼの逆転写反応に必要な補因子であるMn²⁺イオンをPCR反応液に加えたことである。

RNA-primed PCRの例を以下に示す。ここでは, プラスミドpBluescript SK (+)を用いて片側のプライマーをRNAで調製し, RNA-primed PCRを行っている。まず, pBluescript SK (+)をT7プロモーターから30ベース下流にあるXho Iサイトで切断し, *in vitro* 転写反応によって30 ntのRNAプライマーを合成した。その後, アクリルアミドゲル電気泳動により精製し, pBluescript SK (+)を鋳型としてRNA-primed PCRを行った。結果は(図2)に示した。

コントロールのDNAプライマーでのPCRと比べて若干の増幅率の低さが見られるが, サイクル数を増やすことでこれは解決できる。また, ここではRNAプライマーのゲル精製を行っているが, このステップは非常に手間と時間がかかる。現在は, より簡便な精製法を開発中である。ところで, Mn²⁺イオンは, PCR等にお

図2 pBluescript SK (+)をT7プロモーターから30ベース下流のXho Iで切断して*in vitro*転写でRNAプライマー(RSX30)を合成した。また, リバースDNAプライマー(BS400)とPCRのコントロールとしてのDNAプライマー(T7-30)を化学合成し, これらを用いてPCRを行った。各PCR産物のサイズは図のとおりである。写真は反応後の溶液をアガロースゲル電気泳動したもので, 予想されるサイズのPCR産物が合成されていることが確認される。

いてヌクレオチドの非特異的取り込みを起こしやすいという問題がある。しかし, PCRプロダクトをダイレクトシーケンシングする場合には問題にはならなかった。またRNAプライマーのRNaseによる分解も, 数十merの長さでは問題にはならない。

以上, 酵素的に合成したRNAプライマーを用いた新しいPCRテクニックを紹介したが, ここでの例は, プロモーターをもつベクターにインサートされたDNAを使用しており, プライマーが得られる領域と長さも制限される。現段階では既知配列からのプライマー合成には適用範囲が限られ, 何らかの工夫が必要である。しかし, 転写合成によるRNAプライマーにはプライマーデザインの際, あらかじめ配列を知っておく必要がないという最大の利点がある。このことは, 未知のDNA配列を扱う際, 大きな威力を発揮する。実際に, ファージプロモーター配列をもつアダプターを用いた, 未知配列由来のRNAプライマーによるRNA-primed PCRの成功も確認している。

文 献

- Shibata, H., T.Tahira and K.Hayashi. 1995. RNA-primed PCR. *Genome Research* 5 : 400-403.