DNA 解析による種内遺伝的多型の研究法

松 本 緑*

1. はじめに

基礎生物学の諸分野において海産無脊椎動物は、優れた研究材料として広範に用いられているが、それらはいずれも、野生動物を用いているため、最近めざましく発達した分子生物学的手法や遺伝学的手法を駆使することができないでいた。したがって海産動物を実験動物化して、ストレインを確立することは基礎研究を進めるためきわめて重要な試みと考えられる。そこで、2-3カ月で成熟個体となり、比較的飼育しやすいと考えられるユウレイボヤの実験動物化を試みる一環として、ユウレイボヤ類について遺伝的多型の解析を行い、遺伝的バックグラウンドの差(個体の遺伝子レベルでの差)を分子レベルで検討することとした。その際、遺伝的多型の解析の指標となる遺伝子マーカーが必要となる。そこで、そのマーカーの一つとして我々はリボソーム RNA 遺伝子(rDNA)に着目し、まず野生に生息するユウレイボヤ個体の rDNA の遺伝的多型について調べてみた。

制限酵素を用いた多型の解析は RFLP (restriction fragment length polymorphism) と呼ばれ、DNA を制限酵素で切断した断片が個体によって長さの違いを示すことを利用したものである。つまり、個体間の塩基配列の違いが制限酵素認識部位で生じたとき、制限酵素によって切断される断片の長さの違いが生じることになる。この違いは核内遺伝子の場合にはサザンハイブリダイゼーションにより、ミトコンドリア内遺伝子の場合には電気泳動後、EtBr による染色により同定する事ができる。現在、認識部位も多種多様な2000種類に及ぶ制限酵素が発見されており、多くの酵素が販売されている。したがって、理論的にはほとんどの場合、RFLP 解析によって単一の塩基置換をも同定できることとなり、RFLP によるゲノム解析は、遺伝的バックグラウンドを見

るうえで、きわめて有効な手段となってきた。

近年、開発された PCR (polymerase chain reaction) 法は、極微量の DNA から目的とする DNA 断片を、わずかな時間で数十万倍に増幅することができる。増幅させたい DNA の末端塩基配列がわかっているならば、短時間で多数のサンプルを処理することができるため、様々の種類の DNA サンプルを処理する必要がある遺伝的多型の検討には、たいへん有効と考えられる。

本稿では、できるだけ技術ノートとして一般に役に立つために、2 節では DNA の抽出法、3 節ではサザンハイブリダイゼーション、4 節では PCR 法、5 節では主にミトコンドリア DNA で行われる制限酵素切断による方法、そして最後に6 節では、我々が実際に行っているユウレイボヤの系について実験データも加えて、話を進めていく。

2. 組織の DNA 抽出

高等動物の細胞内の DNA は、主に核 DNA とミトコンドリア DNA の2 種類に分けられる。ここでは全 DNA、およびそれぞれの抽出方法について述べる^{1, 2)}。

1) 全 DNA の抽出 取り出した直後の組織または取り出したのちすみやかに液体窒素で凍結した組織を、細胞内の内存性 DNase による分解を受けないように、ドライアイスで冷却した乳鉢で粉々に粉砕する。組織の湿重量 1 g あたり、1 mg/ml のプロテイナーゼ K を含む緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1 % SDS) を 20 ml 加え、37°C で 2 時間から一晩振とうする。塊がなくなったら、タンパク質、脂質などを取り除くため、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 飽和フェノールを等量加え、高分子の DNA が切断されないように緩やかに室温で約 1 時間、振と

*Midori MATSUMOTO, 東京工業大学生命理工学部生命理学科(〒227 横浜市緑区長津田町4259)

うしたのち、600×g、10分間、室温で遠心分離し、フェノールによって白く変性されたタンパク質の中間層をとらないように上層部の水層のみをとる。同様にフェノール・クロロホルム (TE 飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール、25：24：1) で処理したのち、さらにクロロホルム (クロロホルム：イソアミルアルコール、24：1) にて除タンパクしたのち、1/10容量の3M 酢酸ナトリウムと2倍量のエタノールを加え、-30℃に静置し、600×g、15分間、4℃で遠心分離し、DNAを沈澱させる。ここまでの処理では高分子核酸であるRNAも含まれてくるので、RNAを除くために、沈澱をTEに溶解し、RNase (10 μg/ml、混在するDNaseを煮沸によって不活化させたもの) 処理をしたのち、再びフェノール処理、エタノール沈澱を繰り返す。

2) 核DNAの抽出 取り出したばかりの組織を細片化したのち、5%クエン酸中にてホモゲナイズし、細胞を破壊し、500×g、10分間の遠心によってできた沈澱を5%クエン酸に溶解し、核のみを沈澱させるため、30%シヨ糖、5%クエン酸溶液に重層し、600×g、8分間遠心する。このあとは全DNAの抽出のプロテイナーK処理以降に従う。

3) ミトコンドリアDNAの抽出 取り出した直後の組織または取り出したのちすみやかに液体窒素で凍結した組織1gあたり10mlの緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH7.4), 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 中で2-3ストローク、ホモゲナイズしたのち、核を除くため、860×g、10分間、4℃で遠心する。さらに液層を10000×g、10分、4℃で遠心し、ミトコンドリアを沈澱させる。沈澱を2.5mlのSTE (0.1M Tris-HCl (pH7.5), 0.01 M EDTA, 0.05 M NaCl) 緩衝液に溶かし、1/10容量の20% SDSを加え、10分間室温で、静置し、ミトコンドリア膜を溶解させる。その後650 μlの5M NaClを加え、氷中で10分間静置し、ミトコンドリアのタンパクを沈澱させる。この沈澱を14000×g、10分間、4℃で遠心し、除く。この液層はミトコンドリア内のRNAを含むためRNase処理を行ったのち、CsCl 3.75g 200mg/mlのEtBr 100 μlを加え、Beckmann 卓上超遠心機 TL100で、アングルローター TL100.3にて90,000rpm、3時間、超遠心を行い、切断の起こっているDNAを除き、閉環状DNAのみを回収する。回収したDNAは、NaCl飽和のイソプロパノールでEtBrを完全に除き、2倍量のTEを加え、エタノール沈澱を行う。

図1 サザンブロッティング 10×SSC (20×でも可) に両端が浸かった濾紙の上にゲルを置き、その上に10×SSCに浸したフィルター、2-3枚の3MM濾紙、1-2パックのペーパータオルをゲルのトランスファしたい部分より少し大きめのサイズに切り重ねる。重しは500g くらい。

なお、DNAは長い分子であるので切断が起こりにくくするため、先の太いピペットを用いる。我々はパスツールピペットの細い部分を切断したものか10mlピペットの逆の部分を用いている。また使用する器具はディスポーザブルのものを用いるか乾熱滅菌することが望ましい。緩衝液類はオートクレーブをかけるべきである。

3. サザンハイブリダイゼーション

1975年にSouthernによって開発されたサザントランスファの方法は目的の標識されたプローブと相補的な塩基配列を持つDNAの領域を同定する事ができるため制限酵素の種類を変えることにより、遺伝的多型の検出が可能である^{1, 2)}。

1) フィルターの作成 2節の組織のDNA抽出で得られたDNA 5-10 μgを適当な制限酵素で完全に切断し、フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈澱を行った後、泳動用TAE (0.04 M Tris-HCl, 0.02 M 酢酸, 0.001 M EDTA) 緩衝液に溶解し、適量のB.P.B. (Bromophenol blue), X.C. (Xylene cyanol) とグリセロールを最終濃度10%になるように加える。このサンプルをウェルにいったのち、20VほどでB.P.B.がゲルの先端より約2cmにいたるまで、一晩かけてゆっくりとサブマリン型の電気泳動を行う。電気泳動は検出するDNAの長さにもよるが、主に13cm × 13cmのサイズの0.6%アガロースゲルを用いて行う。ハイブリダイゼーションのために、DNAを一本鎖にする必要があるが、電気泳動後ゲルをアルカリ溶液 (0.2 N NaOH-0.6M NaCl) に浸し、約1時間、ゲルが

図 2 PCR の原理 symmetric PCR (左) ; asymmetric PCR (右) プライマー A : 塩基配列を読み始める方向と逆方向のプライマー。プライマー B : プライマー A と逆方向のプライマー。プライマー C : 塩基配列決定用プライマー。

壊れないようにゆっくりと振とうし、DNA をアルカリ変性させる。アルカリ溶液を完全に除いたのち、中和溶液 (0.24 M Tris-HCl (pH7.5), 0.6 M NaCl) に浸し、約 1 時間振とうし、中和する。ニトロセルロースメンブレンフィルターはオートクレープ水に浸したのち、10 倍の濃さの SSC (10×SSC, 組織は 1.5 M NaCl, 0.15 M クエン酸ナトリウム) に浸し、ゲルとフィルターを図 1 のように配置する。この際、ゲルとフィルターの間に気泡が入らないように注意する。一晩放置すると毛細管現象により、DNA はフィルターに吸着する。その後、80℃にてベーキングし、これを固定する。

2) ハイブリダイゼーション フィルターはあらかじめプレハイブリダイゼーション溶液 (5 × SSC, 1 % SDS, 1 × Denhardt 溶液, 100 μg/ml サケ精巢 DNA (100℃で 5 分処理したのち急冷し一本鎖にしたもの)) に、約 2 時間浸しておく。プローブと

する DNA 断片をアマシャム社製マルチプライムラベリングキットなどでアイソトープまたは蛍光によりラベルし、ハイブリダイゼーション溶液 (6 × SSC, 25 mM KH₂PO₄, 0.5% SDS, 1 × Denhardt 溶液) とともに 65℃にて一晩振とうする。翌日、ハイブリダイゼーション溶液を除き、フィルターを室温で 2 × SSC, 0.5% SDS で洗浄したのち、さらに 65℃で 0.1 × SSC, 0.1% SDS で洗浄する。水気をきったのち、オートラジオグラフィーを行う。

なお、プローブと目的の DNA の相同性によってハイブリダイゼーションの温度とフィルター洗浄に用いる SSC 濃度及び温度を変化させ、適切な条件を決める必要がある。上記の条件は相同性が最も高い場合である。

4. PCR 法

1985 年、PCR を用いた DNA の増幅法が紹介された。以来、温度を急速にしかも安定に変化させる

図3 ユウレイボヤ rRNA 遺伝子の構造 18S と 5.8S 構造遺伝子，中央白部はスパーサー領域を示す。サザンハイブリダイゼーションのプロープには SmaI-XhoI 断片を用いた。PCR に用いたプライマーは矢印で示す。

PCR装置(サーマルサイクラー)の開発，耐熱性細菌 *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* 由来の DNA ポリメラーゼの販売により，様々な PCR を応用した方法が開発され，多くの研究者により利用されている。簡単な原理は図2(左)に示す。ここでは，基本的な DNA 断片の増幅³⁾と，増幅断片中の一塩基置換の検出法⁴⁾及び，ゲノムから直接塩基配列決定する方法について述べる。

1) DNA 断片の増幅 PCR の最も重要な点は，プライマーの配列とアニーリング温度である。PCR で増幅される DNA 断片の長さは200bp から 1 kbp くらいが適当とされているので，両プライマー間の距離はその範囲の中からプライマー同士がアニーリングしないような配列を選ぶ。またアニーリングの温度についてはプライマーと目的 DNA が完全に一致していれば，55℃でほぼ問題ないが，一致していない場合は適当に温度を下げ，非特異的な結合による増幅が少なく，目的の増幅が十分に起こる条件を選択する。ここでは，プライマーが目的の配列と完全に一致している場合について述べる。DNA 1 μ g，0.2 mM dNTP，1 μ M の両末端プライマー，耐熱性 DNA ポリメラーゼ用緩衝液で100 μ lにしたのち熱変性させ，耐熱性 DNA ポリメラーゼを加え，反応液が蒸発しないように，上層にミネラルオイルを重層する。熱変性 94℃ 30秒，アニーリング 55℃ 1分，DNA 伸長反応 74℃ 1分30秒のサイクルを PCR 装置を用いて30回繰り返す。ミネラルオイルを除くため，クロロホルム処理した後，反応液の 1/20を，5%アクリルアミド(アクリルアミド：ビスアクリルアミド 29：1)，0.5 $\times$ TBE(25 mM Tris-HCl, 25 mM ほう酸，1 mM EDTA)ゲルまたは 2%アガロースゲルで電気泳動を行い，検出バンドの長さにより変異の検討を行う。

2) 一塩基置換の検出法 電気泳動によって得られた DNA の長さが，見かけ上同じであったとして

も，その配列の中に点突然変異が起こっている可能性がある。最近，癌組織での変異の検出に迅速かつ容易な方法として確立されてきた SSCP(single-strand conformation polymorphism)法が，この場合は有用である。この SSCP は，一本鎖核酸や塩基配列特異的高次構造を，ポリアクリルアミドゲル電気泳動により，鋭敏に検出する。PCR 産物に，PCR 反応中または反応後アイソトープにて標識し，それを 5%アクリルアミド，5%グリセロール，0.5 $\times$ TBE のゲルを用いて，一定温度，定電力 40w で電気泳動を行い，オートラジオグラフィーにより解析する。これを行うと，1塩基置換した DNA 断片も，ゲルの中での移動度が異なるため，点突然変異した遺伝的多型が検出される。

3) 直接塩基配列決定法 遺伝子の変異を塩基配列のレベルで知りたいときは，非対称 PCR(asymmetric PCR)を用いて，ゲノム DNA から直接塩基配列の決定を行うことができる。この原理は図2(右)に示す。ゲノム DNA 1 μ g を 95℃，3分間加熱した後氷冷する。これに塩基配列を読み始める方向と逆方向のプライマー(プライマー A)20 μ M と 1/40濃度になるように正方向のプライマー(プライマー B)0.5 μ M，0.2mM dNTP，高熱菌 DNA ポリメラーゼ緩衝液を加え，100 μ lにしたのち，ミネラルオイルを重層する。熱変性 94℃，アニーリング 54℃，伸長反応 72℃のサイクルを30回繰り返す。その後，ミネラルオイルを除くために，クロロホルム処理をした後，エタノール沈澱を行う。沈澱を20 μ lの TE に溶解し，その 1/10を電気泳動し，目的のバンドが確認できるほど増幅していることを確認できたら，それと等量の増幅 DNA を用いて塩基配列を決定する。プライマー B の内側のプライマー C を作成し，これにアイソトープまたは蛍光で末端ラベルをいれ，シーケンス用プライマーとして用いる。これらをダイデオキシ法によるシーケンス

A

B

図4 ユウレイボヤ rRNA 遺伝子スペーサー領域を用いておこなった RFLP 解析 ユウレイボヤ DNA を HindIII (A), BamHI (B) で切断したときの rDNA のサザンハイブリダイゼーションで現れたパターンの種類と採集地点ごとの個体数を示す。▲印はリアス式海岸の個体でのみ出現するバンドを示す。

図5 RFLPパターン間の相互関係
浅虫, 山田, 気仙沼, 女川のユウレイ
ボヤDNAをBamHIで切断した時の
RFLPパターンにおいてそれぞれが
出てきたと考えられる道筋(Wagner
parsimony network)を示す。大文字
は図4に示したそれぞれのパターンを
示し、太線は1本のバンドのみが変化
したことを示し、=のついているとこ
ろは2本のバンドが変化したことを示
す。それぞれの地域ごとに出てくるパ
ターンを細線で囲んだ。

を行う。

5. ミトコンドリアDNAの制限酵素切断による変異の検討

ミトコンドリアDNAは分子量 10^7 、約30k ベースの環状二本鎖DNAである。したがって、ミトコンドリアのDNAのみを精製することができれば、4ベース認識(平均256ベースに1回切断される)、5ベース認識(1024ベース)や6ベース認識(4096ベース)の制限酵素で切断してもその断片について長さの変異がみれる。

そこで、ミトコンドリアDNAを上記の方法で精製し、適当な制限酵素で切断し、アガロースゲルまたはアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、EtBrで染色し、検出バンドの長さを比較検討する。

ミトコンドリアDNA量が少なくEtBrで検出できないときは、制限酵素で切断したあとで、DNAの5'末端のリン酸をアルカリフォスオアターゼで脱リン酸したのち、 γ - $[^{32}\text{P}]$ ATPにてリン酸化し、ラベルしたものを電気泳動し、オートラジオグラフィーで解析する。

6. ユウレイボヤを用いた実験例

近年、リボソーマルRNA遺伝子(rDNA)の核酸塩基配列を比較検討することにより、広範な分子レベルにわたる系統発生の関係を解析することが可能となった。真核生物においては、rDNAは18S、5.8S、28Sの構造遺伝子領域とその間のスペーサー領域より構成されており、そのコピー数は動物種により様々であるが、均一な遺伝子が何百と直列に並んで存在し、重複多重遺伝子群を形成している。構造

遺伝子領域は比較的ゆっくりと進化するので、目、科レベルでの生物種の関連を調べるのに役にたつと考えられる。ところが、変異が起こっても致死的作用がないと考えられるスペーサー領域については早く進化し、属レベルの種の間、あるいは集団内部で違いがみられる可能性も考えられる。

先にも述べたように、我々はユウレイボヤの遺伝的バックグラウンドの違いを解析する遺伝子マーカーの一候補として、リボソーマルRNA遺伝子(rDNA)を用いて、日本各地の野生動物集団において、その遺伝的多型についてRFLP及び、PCR法を用いて調べている。

大型多重遺伝子群のrDNAは協調進化すると考えられており、種内では数百の遺伝子コピーが存在するにもかかわらず、均一性が保たれているとされている。実際、数個体のユウレイボヤについて個体ごとに構造遺伝子内でPCRを行い、塩基配列が決定されているが、個体間に変異は発見されていない(私信, H. Wada *et. al.*)。しかし、スペーサー領域についての研究は、ほとんどなされていない。

我々はまずユウレイボヤ遺伝子ライブラリーを作成し、マウスrDNAをプローブに用いて、ユウレイボヤrDNAのクローニングを行った。その遺伝子の構造は図3に示す。我々の目的は種内の変異を解析することにあるので、比較的進化速度が早いと考えられる、この遺伝子の18Sと5.8Sに囲まれたスペーサー領域と5.8Sを含む断片をサブクローニングし、プローブとして用いた。日本各地(浅虫, 気仙沼, 山田, 館山, 三崎, 富山, 舞鶴, 名古屋, 菅島, 高知)の野生の個体について、それぞれDNAを精製し、制限酵素BamHI, HindIIIで切断し、サ

ザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、個体により検出バンドに違いが見いだされ、図4に示すようにそれぞれ十数種のパターンに分類することができた。これらのパターンについて、地点ごとに個体数を示すと図4のようになった。このように採集点において、いくつかのパターンが出現したが、地域によるパターンの特異性も存在した。その変異の出現を考えるために、それぞれのパターンのできてきた道筋を考察してみた。つまり、一つのパターンからバンドが増減することにより、他のどのようなパターンができていくかを考えてみると、図5に示すように地点によりパターンには、その由来を暗示するような類似性がみられた。

ここで一つ興味深いことが発見された、すなわち、リアス式の地形をもった地点から得られた個体の中からのみ、特異的な長さが見いだされたことである(図4)。この原因についてはわからないが、リアス式地形で外海から閉ざされた地点においては、いわゆる“地理的隔離”がおり、ユウレイボヤの本来のゲノムをもつ個体が、生き残っているのかも知れない。

さらに詳細な検討を加えるために、我々は18Sと5.8SrDNAの末端の塩基配列を用いて、その間のスパーサー領域を増幅し、増幅されるDNAの長さを調べた(図3)。その結果、個体によって様々な長さのバンドが検出され、多くの変異がみられた。現在これについては、さらに詳しい検討を続けている。

以上より、少なくともユウレイボヤの近縁種間の類縁関係について調べるためには、構造遺伝子内を利用し、同一種内における関係を調べるためには、スパーサー領域を利用することが有効であると考えられる。

現在まで、生物学の研究に多種多様な生物が用いられてきた。これらの研究をさらに大きく広げていくためにも、それぞれの実験動物の遺伝的背景を調べることは、大切なことだと考えられる。今後、様々な動物が実験動物化されていくことを期待して、本稿を終わる。

本研究を行うにあたり、日本各地の臨海実験所の皆様にユウレイボヤの採集のため、お世話になりました。この場を借りて、お礼を申し上げます。

文 献

- 1) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. ed.: Molecular Cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)
- 2) 村松正実編: ラボマニュアル遺伝子工学, 丸善 (1988)
- 3) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. ed. 斉藤隆監訳: PCR 実験マニュアル, HBJ 出版局 (1991)
- 4) 林 健志: 実験医学, 9, 95-98 (1991)