DNA シーケンサー

浦 野 元, 国 田 正 徳

DNA Sequencer

Gen URANO, Masanori KUNITA

Key words: DNA Sequencer, Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides, Genome Mapping, Ordered Clone Bank

1. はじめに

分子生物学の進歩とともにヒトを含む生物の DNA の塩基配列が、急速に解明されつつある。DNA の塩基配列決定法には従来から数種類あるが、これらはどれもが放射性同位元素で標識された DNA 断片を電気泳動により分離しオートラジオグラフィーで検出する方法である。近年、蛍光標識を採用した DNA の塩基配列自動決定装置 (DNA シーケンサー) がいくつかが発表されている^{1)~4)}。これらは、蛍光標識の位置や、蛍光色素の数、装置の検出方法が違ふ。これまでは放射性同位元素を取り吸うための特殊な施設でのみ DNA 分析が可能であったのが、蛍光標識法により一般の実験室での取扱いが可能となった。さらに DNA シーケンサーは、遺伝子診断装置への応用も期待されている⁵⁾。

本稿では、Dupont 社の DNA シーケンサー GENESIS-2000 を例として、その動作原理と応用例を紹介する。

2. 原 理

DNA の塩基配列決定法にはジデオキシン法を採用している⁶⁾。まず、配列決定の対象となる領域を鋳型 DNA とし、そのすぐ上流に相

補配列を持つプライマーを結合させて DNA ポリメラーゼによる修復合成を行う。このとき chain terminator となるジデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (以下 ddNTP と略す) を、酵素反応の基質となる 4 種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (以下 dNTP と略す) に適当な比率で加えておく。たとえば、ddNTP のひとつ ddGTP を加えたたすると、ある確率で ddGTP が本来の基質である dGTP の代わりに取り込まれる。一度取り込まれると糖の 3' の位置がデオキシになっているため伸長反応が終了する。その結果、鋳型鎖 (テンプレート) の C が出現する位置で反応が止まった一連の生生物が得られることになる (図 1)。

Dupont 社の方式では、4 種類の塩基の特定部位に、それぞれ波長特性が少しずつ異なる蛍光色素を、リンカーを介して結合させた ddNTP を使用している。この標識法には、いくつかの利点がある。末端のヌクレオチドだけが標識されるので 1 つの反応チューブで 4 種類すべての塩基についてサンプル調製をすることができる。また、使用するプライマーの制約もない²⁾。

現在、AMV 逆転写酵素と、Sequenase™ (米国 U. S. B. 社製) を用いたキットが発売されている。

Fig. 1 Scheme of the fluorescence labeled dydeoxy sequence analysis.

ポリメラーゼ反応を利用して標識された DNA 断片は GENESIS-2000 によって分析される。

この装置は図 2 に示すように電気泳動部、光検出部およびコンピュータから構成されている。標識された DNA 断片は、ポリアクリルアミド電気泳動によって鎖長が 1 鎖長ずつ短いものから順に検出部を通過する。このとき検出部を走査しているアルゴンレーザーの励起ビームで、標識されている DNA 断片から末端のヌクレオチドに応じた蛍光が発光する。蛍光は 2 つの光電子倍管によって測定される。光電子増倍管にはおのの別のフィルターが使用されていて、1 つは蛍光の短波長の光を、もう 1 つは長波長の光を測定する (図 3)。

DNA 断片の 3'末端の塩基を標識している 4

Fig. 2 Scheme of the DNA sequencer.

Fig. 3 Fluorewcnce detection system of GENESIS 2000. Schematic drawing of optical system used for sanning excitation and for mesuring fluorescence from multiple sequencing lanes in an electrophoresis gel. (Prober J. M. et al.: SCIENCE 238: 336~341, 1987)

種類の蛍光色素は、図4に示すような蛍光波長特性を持ち、短波長側のフィルターで検出される信号と、長波長側のフィルターで検出される信号とは、蛍光色素によってそれぞれ異なる。たとえば G-505 では低波長側の検出器の信号が大きく、高波長側のそれは小さい。T-526 ではこの反対となる。A-512 と C-519 ではその中間となる。

塩基配列の決定は、低波長側の信号と高波長

側の信号に比の大きさから行われる (図5)。検出された信号はすべてコンピューターに記憶され、電気泳動がすべて終了した後、演算処理されて塩基配列がきまる (図6)。1回の電気泳動で、最高12サンプルの分析が可能で、1サンプルあたり平均300ベースの塩基配列を決定することができる。

3. 応 用

DNA めぐる研究技術の急速な進展によって、生物の遺伝子に関する研究から、次の段階の遺伝子群、さらには生物のゲノムに対する全体像的なアプローチが世界的に試みられはじめた⁷⁾。特に近年、日本および欧米でヒトゲノムの全塩基配列を決定しようとする計画が始まっている^{8)~10)}。

ヒトのゲノムは30億塩基対といわれ、その全シーケンスを決定するには300人の熟練した研究者が年間200日働いて100年かかるといわれるほど、膨大な労力を必要とする⁹⁾。DNAシーケンサーは、その労力の省力化の手段の一つとして開発されてきた^{1)~4)}。DNAシーケンサーはシーケンシングの自動化を可能とするだけでなく、ゲノム解析において必要不可欠の染色体のフィジカルマッピングの手段としても注

Fig. 4 Normalized fluorescence emission spectra of the reagents, measured in an 8% W/V polyacrylamide gel (19:1 W/W acrylamide:bis), the excitation wavelength was 488 nm. (Prober J. M. et al.: SCIENCE 238:336~341, 1987)

Fig. 5 Principles of detection and selectivity of the DNA sequence.

Fig. 6 An example of sequence showing base assignments. Region of the sequence from base 157 to 185 M13 mp18 using 17 mer universal primer (-40).

Fig. 7 Capture procedure for sampled sequence fingerprinting. (Brenner S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8902~8906, 1989)

目されつつある⁹⁾¹¹⁾。

フィジカルマッピングの手段の一つに、まず染色体 DNA を制限酵素で適当な大きさの DNA 断片 (10 Kb 前後) としてクローンライブラリーをつくり、ついでそれぞれの塩基配列の傘なりを利用して隣あうクローンを見つけ並べていく方法がある¹²⁾。Dupont 社では認識配列と切断点とが数塩基離れている制限酵素を利用して、GENESIS-2000 でフィジカルマッピングを試みている¹³⁾。

制限酵素の FokI は、2本鎖 DNA の GGATG という塩基配列を認識し、認識配列の 3'末端から 9塩基目を 5'末端が 4塩基突出した形で切断する。生じた断片の末端はそれぞれの切断点で固有の配列を示すので、末端からの配列と、生じた断片の長さから DNA 断片を一義的に並べることができる。

Dupont 社では、まずクローンから切り出した DNA 断片の末端をビオチンラベルした後 FokI で切断する。つぎにストレプトアビジン化している磁力担体にビオチンラベルした DNA 断片を結合させる。そして磁石でビオチ

ンラベルした DNA 断片を回収し、ジデオキシ法で FokI の切断点をシーケンスする (図 7)。塩基配列が重なりあうクローンでは、重なりあう部分で切り出される DNA 断片の長さと FokI の切断点の塩基配列とが互いに等しい。検出されるピークのパターンとピークとピークの間隔 (検出時間間隔) をクローン同士の間で比較する事で、隣あうクローンがわかる。このようにしてフィジカルマッピングを試みている。

4. まとめ

DNA シーケンサーは、DNA の塩基配列の決定作業の省力化に寄与するだけでなく、ゲノム解析に欠かせないフィジカルマップの作成にも貢献しようとしている。今後の DNA シーケンサーの進歩につれ、遺伝子診断などの診断装置への応用も期待される。

文 献

- 1) Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SBH and Hood LE: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis, *Nature* **321**: 674~679, 1986.
- 2) Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA and Baumeister K: A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science* **238**: 336~341, 1987.
- 3) Kambara H, Nishikawa T, Latayama Y and Ymaguchi T: Optimization of parameters in a DNA sequencer using fluorescence detection, *Bio/Technology* **6**: 816~821, 1988.
- 4) Yang MM and Youvan DC: A prospectus for multispectral-multiplex DNA Sequencing, *Bio/Technology* **7**: 576~580, 1989.
- 5) Landgren U, Kaiser R, Caskey CT and Hood L: DNA diagnostics-Molecular techniques and automation, *Science* **242**: 229~237, 1988.
- 6) Sanger F, Nicklen S and Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463~5467, 1977.
- 7) 由良隆, 松原謙一: 細胞の全ゲノム解析研究の背景,

- 細胞工学 8: 385~386, 1989.
- 8) 清水信義: ヒトのゲノムのシーケンシングと遺伝子マッピングをめぐる最近の話題、細胞工学 5: 931~934, 1986.
- 9) 清水信義: ヒト染色体のフィジカルマッピング, 細胞工学 8: 436~440, 1989.
- 10) 楠佳之: ヒトゲノムプロジェクトとは, 実験医学 8: 11~14, 1990.
- 11) Carrano AV, Branscomb EW, de Jong PJ and van Dilla MA: ヒト染色体特異的コスミドマップ, 実験医学 8: 29~35, 1990.
- 12) Olson MV, Dutchik JE, Graham MY, Brodeur GM, Helms C, Frank M, MacCollin M, Scheinman R and Frank T: Random-clone strategy for genomic restriction mapping in yeast., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7826~7830, 1986.
- 13) Brenner S and Livak KJ: DNA fingerprinting by sampled sequencing., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8902~8906, 1989.
-