講座

遺伝子工学実験講座

I. プラスミドの単離・生成・分析法[†]

山口和男

金沢大学遺伝子実験施設

920 金沢市宝町13-1

Key Words: plasmid, restriction enzymes, gel electrophoresis, deoxynucleic acid replication

1. プラスミド^{1), 2)}と遺伝子工学

今日の遺伝子工学の興隆を見るまでに、主に三つの研究分野の発展が大きな役割を果たしてきた。それは、①細菌細胞内の細胞質因子として染色体 DNA とは独立に存在するプラスミド DNA の分子生物学、②細菌の自己防衛機構としての外来 DNA に対する制限、修飾現象の分子機構解明とそれに伴う制限酵素の発見、③ DNA 塩基配列の迅速な決定法、である。後二者が比較的近年になって発展してきたのに比べて、①のプラスミド研究は、大腸菌の性決定因子（それが F 因子とよばれるプラスミドの一種であることは、後になって判明したことではあるが）として、分子遺伝学の曙とともに姿を現わし、以後さまざまな形で分子生物学の発展を支えてきた。たとえば、ウイルスから高等動植物に至るまで広く生物界に存在する“動く遺伝子”（ある DNA 領域が構造、機能の単位として高頻度に他の DNA 領域に転移する）の転移の分子機構や、DNA 複製開始とその制御機構解明の格好の材料となっている。このようなプラスミドが組換え DNA 技術の誕生とともに外来 DNA の担い手（宿主・ベクター）としてただちに取り入れられた理由にはつぎのようなことが考えられる。①宿主細胞の増殖にとって必ずしも必須のものではないこと。このことはプラスミド DNA が安定に複製されるシステムさえ保持していれば他の部分は外来 DNA に置き換えても差し支えない（宿主

に有害でなければ）ことを意味する、②プラスミド DNA は細胞染色体に比べて格段に小さく、①のことから全長 2000 塩基対 (bp) 足らずの DNA が利用できる。これは DNA の取扱いを非常に容易なものとするだけでなく、さまざまな大きさの外来 DNA を取り込むことを可能にしている。③後述する Col E1 のようなプラスミドには DNA 量を増幅する系が知られており、プラスミド中の外来遺伝子を大量に調製することが容易である。④プラスミドはそれぞれ一定の分子数（コピー数）を細胞内に維持する機構を持つが、その数は 1-2 個から数十、さらに突然変異株を入れれば 200 以上まである。これらプラスミドベクターを使い分けることにより、細胞内の外来遺伝子数を加減することが可能である。実際に、ある遺伝子の多数コピーの存在が宿主の増殖を阻害するために、低コピー数ベクターでのみクローニングされた例がある。

つぎにプラスミドの基本的な構造と機能を概観してみる。化学構造としては DNA で閉環状二本鎖構造

図1 プラスミド DNA の構造

[†] Introduction to the Experiments of Genetic Engineering. I. Preparation and Analysis of Plasmid DNA. Kazuo YAMAGUCHI: Institute for Gene Research, Kanazawa University, 13-1, Takaramachi, Kanazawa-shi 920, Japan.

(CC)をとっているものがほとんどである(図1)。二本鎖 DNA のらせん(螺旋)は一般的にB型(約10bpで1回転)で安定しているが、プラスミド DNA は細胞内ではB型が少し解けた状態で二本鎖が閉じている。そこで個々のらせんは安定なB型を取ろうとする結果、DNA 分子全体としてはさらに大きならせん構造をとる(図1a)。これを超らせん構造とよぶ。DNA 抽出の過程などで片方の DNA 鎖に切断が入ると、その鎖は自由に回転できるようになり安定なB型らせんを作るため超らせん構造は消失する(図1b)。これを開環状二本鎖構造(OC)という。さらに二本鎖がほぼ同じ場所で切断されると、もはや環構造がとれず、線状二本鎖(L)(図1c)となる。

プラスミドが担う機能としては、まず細胞内で複製されるためのシステムが必須であるが、低コピー数のプラスミドにとってはさらに、増殖している宿主細胞へ分配され安定に維持される機構も欠かせないものである。これらの機能と関連した現象として不和合性(incompatibility)がある。詳しくは後述するが、複数のプラスミドが宿主細胞に導入された時、細胞の増殖に伴って共存できる場合(和合性, compatibility)と共存し得ない場合(不和合性)とがあるので注意しなければならない。一般にプラスミドはさらに付加的な機能を有する遺伝子群を抱え、むしろこれら遺伝子の性質がおおのプラスミドを特徴づけている。たとえば大腸菌F因子は性せん毛を合成、これを通じて非保有細胞と接合し、新たに合成されたF因子 DNA を伝達する機能を、R因子は各種抗生物質や重金属に対する耐性能力を、Col E1は抗菌物質コロシンE1蛋白質とそれから宿主を守るための免疫物質を産生するといった具合である。とくに薬剤耐性を付与する遺伝子は、それを保持する宿主細胞のみを容易に選択できることからベクターに取り入れられ選択マーカーとしてよく利用されている。また、F因子や一部のR因子が持つDNA伝達性は、組換えDNA実験の安全性とも絡んで考慮すべき問題である。伝達性プラスミドは高頻度非保有菌へと伝達されるからである。また、このような伝達性を持たなくても、伝達に必要なDNA合成機構だけは保持するなどして伝達性プラスミドと共存すると非保有菌へ高頻度に移るものがある。これを可動化(mobilization)と言う。

以下に実験方法を述べていくが、現在使用されているベクターは、おのおの研究対象とする細胞と大腸菌の両方で複製されるように2種類の複製系を保持したもの(シャトルベクターとよぶ)が多いので、大腸菌

からのプラスミドDNA抽出法を中心に述べる。すでに出されている秀れた実験書^{9)~11)}とはできるだけ重複を避けたので合せて参照いただきたい。最後にプラスミドの複製、安定性に関する解説と実験法若干を加えた。これらはプラスミドを材料にした分子生物学の問題と言えるが、遺伝子工学実験を進めていく上で、プラスミドの基本的問題の理解が必要な場合も多いと考え取り入れた。

2. プラスミド DNA の単離法

プラスミド DNA の調製には、この DNA が細胞染色体 DNA よりずっと低分子であること、超らせん構造をとっていることを利用する。したがって前者では不必要に物理的力(せん断力)を加えて染色体 DNA を小断片化することを、後者ではスクレアーゼによるプラスミド DNA 鎖の切断を避けなければならない。

2・1 大量プラスミド DNA の調製

溶菌液の調製でいろいろな方法があるが、後半ではCsCl-エチジウムブロミド(EtBr)密度平衡遠心法を用いる。これは超らせん構造の DNA では EtBr のような塩基対間に入り込みらせんのねじれを変化させる分子の結合量が直線状、開環状二本鎖 DNA より少ないため、CsCl 溶液中での密度が高くなることを利用している。

プラスミド保有大腸菌を LB 培地(バクトトリプトン10g, イーストエキス5g, NaCl 10g/l pH 7.5)で $1-2 \times 10^9$ /ml まで培養, Col E1系(pBR 322等)プラスミドの場合には $A_{600} \approx 0.6$ でクロラムフェニコール(CM)を160-180 μ g/ml になるように加え、一晚培養(37℃)する。ただし、Col E1系でもpUCシリーズのプラスミドを保持する *E. coli* JM 109 等ではCM処理は不要である。

溶菌液の調製法には、①煮沸法⁹⁾, ②Triton 法¹⁰⁾, ③SDS¹¹⁾法, ④アルカリ-SDS 法¹²⁾等がある。①が最も操作手順が簡便であるが、リゾチーム存在下での煮沸条件は用いる菌株、培養条件によって異なり、あらかじめ条件を十分検討する必要がある。③は②より溶菌が激しく粘度も高くなる。溶液の取扱い、染色体DNAの切断に注意を要する。そこで①, ③についての説明は他書^{9), 10)}に譲ることとする。④については次項で説明するので、ここでは②について述べる。

800 ml 培養菌体を8 ml の25%ショ糖/50 mM Tris・Cl pH 8.0に懸濁し、超遠心機(日立 RP50T, ベックマン 50Ti)用チューブに移し、水中で0.4 ml の20

mg/ml リゾチーム, 0.8 ml の 0.5 M EDTA (pH 8.0), 6 ml の 2% Triton X-100/50 mM Tris・Cl (pH 8.0)/20 mM EDTA, 80 μ l の 2 mg/ml RNase A (10 mM 酢酸ナトリウム pH 6.0 中 100°C 10 分処理済) を順次加え溶菌させる。チューブを横にしてゆっくり回転させた時, 溶菌液の粘度上昇のため液がチューブ壁に引かかるようになったら, 35 krpm 30 分, 2°C で遠心, 上清液 7.4 ml に CsCl 7.2 g, EtBr (5 mg/ml) 0.8 ml の割合で加えよく混合する。3 krpm, 15 分, 室温で遠心し表面の膜を取り除いてから 2 本のパーティカルローター (日立 RP67VF, ベックマン VTi65) 用シールチューブに分注する。20°C で 55 krpm 12 時間または, 65 krpm で 2 時間, ついで 55 krpm に落として 4-5 時間遠心する。可視光線でもチューブの下から 1/3 程度の所に赤いバンドが見える。見にくければ部屋を薄暗くして紫外線 (360 nm) を当てれば下の太いバンドはもちろんその 7, 8 mm 上に細いバンドが見える。これは宿主染色体 DNA 断片や開環状または線状プラスミド DNA である。密度の大きな下の太いバンドが閉環状プラスミド DNA である。チューブの上端に穴を開けてから, バンドの下にチューブ横から注射針を射し込み DNA を回収する。DNA をさらに精製したい時はこの CsCl-EtBr 遠心をもう一度繰り返すとよい。この DNA 溶液から EtBr を除くため, 飽和 CsCl 溶液で飽和した *n*-ブタノールをほぼ等量加えよく混合, 軽く遠心してブタノール層 (上層) を捨てる。この操作を 2-3 回繰り返す。最後に 2 倍量強の水を加え, さらにその 2 倍量の冷エタノールを加えて混合, -20°C で一晩, または -80°C で 30 分放置後, 3 krpm 15 分 2°C で遠心, 上清を捨て, 約 5 ml の 90% エタノールをチューブ壁を洗うようにして加え, すぐ捨てる。同じ操作をもう一度。つぎにチューブを逆さまにしてよくエタノールを除いたら, DNA を 0.5 ml 10 mM Tris・Cl (pH 8.0)/1 mM EDTA ($T_{10}E_1$) に溶解, 1.5 ml マイクロチューブに移す。等量のフェノール/クロロホルム*を加えよく混合, 14 krpm 3 分, 室温で遠心する。上清を別のマイクロチューブに移し, 約 1 ml のジエチルエーテルを加えてフェノール

* フェノール/クロロホルム: フェノールはあらかじめ 0.1 M Tris・Cl pH 9 を飽和させ (水層の pH は 7-8 を確認) ておく, 酸化防止のため 0.1% 8-hydroquinoline, 0.2% β -mercaptoethanol を入れておくことよい, クロロホルムはイソアミルアルコールと 24:1 の割合で混合しておく。このようなフェノールとクロロホルムを 1:1 で混合し 4°C で保存する。

図 2 DNA のアガロースゲル電気泳動

a, b: プラスミド DNA (2.9 kb) を Triton 法で溶菌し CsCl-EtBr 法で精製 (a) またはアルカリ-SDS 法 (b) で単離し 0.7% アガロース, 5 V/cm で電気泳動, L: 線状二本鎖, OC: 開環状二本鎖, CC: 閉環状二本鎖, SS: 一本鎖 (以上プラスミド DNA), Ch: 大腸菌染色体 DNA, c, d, e: 図に示した各鎖長の線状二本鎖 DNA を 0.7% アガロース, 15 V/cm (c), 0.7% アガロース, 4 V/cm (d), 1.2% アガロース 15 V/cm で電気泳動。高分子 DNA については 0.7% アガロースで低電圧の方が, また低分子 DNA については 1.2% アガロースで分離能がよくなる。

を抽出, エーテル層を捨てる。このエーテル抽出をさらに 2 回, 最後に残った少量のエーテルは空気を吹きつけて除く。50 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 6.0), さらに 1 ml の冷エタノールを加え混合, この後の操作は, 先のエタノール沈殿と同じで, 最後に DNA の沈殿物はデシケーター中で吸引乾燥させた後 100-200 μ l $T_{10}E_1$ に溶解する (図 2 a)。

2.2 多数の少量プラスミド DNA の調製

多数の試料からプラスミド DNA を調製するには, 多少純度は落ちても操作が簡便であることが必要となる。そこでプラスミド DNA の低分子という特徴を生かした抽出法から①煮沸法と②アルカリ-SDS 法がよく用いられるが, 先にも述べたように①は必ずしも同一条件で実験が進められないことから②がよく使われているように思われる。以下は②について述べたものである。

形質転換株等の単一コロニーを 2 ml の LB 培地で一晩振とう培養する。場合によっては CM 処理を行う。翌日, 1.5 ml 培養液をマイクロチューブに取り 14

krpm, 3分, 4℃遠心する。残りの培養液は4℃保存。遠心後, 上清をアスピレータで吸引しよく除去する。(一度吸引後, 軽く遠心するとよい)菌を100 μ l の2 mg/ml リゾチームを含む50 mM グルコース/25 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)/10 mM EDTA に懸濁, 室温5分または水中30分以上置く。200 μ l の0.2 N NaOH/1% SDS (室温, おおの10倍濃縮液で保存, 実験ごとに所定濃度溶液を調製)を加え, 穏やかにチューブを上下し溶菌させる(このアルカリ処理は短時間ほど良い)。液がほとんど透明になったら氷中に入れ150 μ l の氷冷3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)を加え, 初めは穏やかに混合, しだいに強め, 最後にボルテックスミキサー等で5秒よく攪拌し氷中に5分置く。14 krpm 5分, 室温で遠心, 上清を別のチューブに移しフェノール/クロロホルム処理をした後, 2倍量のエタノール(室温)を加えよく混合, 室温で5分放置, 以後は通常のエタノール沈殿操作を行う。最後に乾燥したDNAを50 μ l $T_{10}E_1$ に溶かし, 1 μ l の2 mg/ml RNase Aを加え, 37℃15分保温(DNAをすぐ制限酵素処理する時はこの保温は不要)。プラスミドDNAをそのまま電気泳動にかけける場合には2-4 μ l も使えば十分である(図2b)。

なおこの方法は大量のプラスミドDNAを単離するのにも用いることができるが, その場合, 宿主染色体DNAと大量のRNAの混入が問題となる。そこで次のような改良が加えられている¹³⁾。3 M 酢酸ナトリウムで宿主染色体DNAや蛋白質を沈殿させるところまでは同じである。ここで染色体DNAが大量に上清に残るようであればアルカリ-SDS処理と酢酸ナトリウムによる沈殿を繰り返す。DNAをエタノール沈殿させた後, 50 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)/1.5 mM CDTAに溶解し, その1/2量の15 M LiCl/50 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)を加え, 室温で15分間静置後, 12000 g, 10分, 4℃で遠心, その上清からエタノール沈殿でDNAを回収する。この段階で大部分のRNAが除去される。さらに混在するRNAを除きかければDNAを6 M NaClO₄/50 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)/10 mM CDTAに溶解後, 10倍量の同液に懸濁したガラス粉末と混合する(1 gのガラス粉末は0.5 mg以上のDNAを吸着する。まずWhatman GF/Aガラスフィルタを乳鉢でよく磨砕後, 1 gに50 ml水を加えて懸濁, 一夜静置後, 上清を除く)。室温で15分緩やかに攪拌後, Millipore HAフィルタで濾過, 6倍量の同溶液でガラス粉末を洗淨する。ついで, 初めのガラス粉末-DNA混液と等量の0.2 M NaClO₄/60 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)/10 mM

CDTAをゆっくり通してDNAを溶出させる。最後にDNAをエタノール沈殿で回収する。

3. プラスミドの分析法

前項までで調製したプラスミドDNAは制限酵素によって切断し, ゲル電気泳動等によりその構造を解析することになる。

3.1 制限酵素によるDNAの切断

制限酵素I, II型のうち, ある特定の塩基配列に対して決まった位置で二本鎖切断を行うII型がDNAの構造解析に用いられる。現在では100種類以上の制限酵素が国内外のメーカーにより市販され, 品質のチェックもしっかり行われ安心して利用できるようになった。ただし中には切断後のDNA断片のDNAリガーゼによる再結合反応や同じ酵素による再切断ができないものも製品化されていることがある。これは酵素自身の性質(たとえば切断末端がリガーゼ反応のいらない3'-P, 5'-OHとなっている)による場合もあるが, 単に標品純度による(mapping grade等と記載されている)こともあるのでカタログを注意して見る必要がある。詳しくは文献⁹⁾や各メーカーが作成した資料を参照するとよいが, 以下に主な注意点を述べる。

(1) 塩濃度: 実験の簡略化や同一のDNAを複数の酵素で切断することを考え, 反応条件はできるだけ統一したものにする。代表的なものとして10 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 7.5)/10 mM MgCl₂/1 mM ジチオスレイトールがある。10倍濃縮液を用意し, 用いる酵素によって1 M NaClを加えて塩濃度を調整する。ただしSma IのようにKClを要求するものがあるので注意すること。

(2) 反応温度: ほとんどのものが37℃であるが, Taq Iなど好熱菌由来のものなどに大きく異なるものがある。

(3) Star活性: 反応条件によっては反応の特異性が甘くなり予想外のDNA断片が得られることがある。これを制限酵素のstar活性とよぶ。低温濃度, 基質に対して大過剰の酵素, Mn²⁺, 高濃度のグリセロール, ジメチルスルホキシド, 高pH等の条件下で知られている。このうちとくに低塩濃度とグリセロールが問題となる。前者は至適塩濃度を用いればよいが, 後者は酵素標品には通常50%グリセロールが入っているので, 用いる酵素液量は反応液量の1/10以下に抑えた方がよい。

(4) メチル化塩基: 酵素によっては認識配列中のアデニンのN6位またはシトシンのC5位がメチル化さ

れていると切断できないものがある。大腸菌では GA TC の A をメチル化する *dam* メチラーゼと CC×GG の内側の C をメチル化する *dcm* メチラーゼがある。そこでたとえば *dam*⁺ 菌から得た DNA を GATC 配列で切断する時は、メチル化の影響を受ける *Mbo* I は使えず *Sau* 3AI を使う必要がある。

(5) DNA 標品中の混入物：酵素反応が期待したほどには進まない時は試料中の混入物によることが多い。試料をもう一度フェノール/クロロホルム処理した後、酢酸ナトリウムの代わりに 7.5M 酢酸アンモニウムを 1/2 量加えてエタノール沈殿すると効果がある。

3・2 DNA のゲル電気泳動法

担体としてアガロースとポリアクリルアミドがよく用いられるが、分子量の広い範囲にわたって使用可能なことおよび簡便さでアガロースが優れている (表 1)。さらに最近では従来よりも高濃度ゲル (2-10%) の作成が可能なもの (NuSieve: 宝酒造)、低濃度 (0.3%) でもゲル強度が高いため取扱いが容易なもの (Agarose H: ニッポンジーン) 等が開発され、分離可能な DNA サイズが広がっている。

緩衝液としては下記の TAE または TBE が、前者はアガロースに、後者はアガロース、ポリアクリルアミド両方によく使用されている。TAE は緩衝力が弱いので 20 cm 以上の長いゲルを長時間泳動させる時などは循環させるか、時々両極の緩衝液を混合させた方がよい。TBE は DNA の回収目的にアガロース電気泳動を行った時、DNA の抽出過程で多量の沈殿を生ずることがあるという。

TAE: 40 mM Tris/20 mM 酢酸ナトリウム/2 mM EDTA 酢酸で pH 8.0 に調整 (10 または 20 倍濃縮液を作成)

表 1 ゲル濃度と線状二本鎖 DNA の有効分離範囲³⁾

アガロース		ポリアクリルアミド	
ゲル濃度 (%)	有効分離範囲 (kb)	ゲル濃度 (%)	有効分離範囲 (bp)
0.3	60-5	3.5	100-1000
0.6	20-1	5.0	80-500
0.7	10-0.8	8.0	60-400
0.9	7-0.5	12.0	40-200
1.2	6-0.4	20.0	10-100
1.5	4-0.2		
2.0	3-0.1		

TBE: 89 mM Tris/89 mM ホウ酸/2 mM EDTA (pH 8.0) (5 倍濃縮液を作成)

3・2・1 アガロースゲル電気泳動

必要量のアガロース粉末を 1×緩衝液に加え、電子レンジ等で溶解、50-60℃までさました後、1/10000 量の 5 mg/ml EtBr を加えてからゲル作成器に流し入れ、くしを差し込み固まらせる。超らせん等 DNA の構造を問題とする時には EtBr をゲルに入れず、電気泳動終了後 0.5 μg/ml EtBr を含む緩衝液に 30-60 分浸けさらに同緩衝液に 30-60 分浸け余分な EtBr を除く。静かにくしを抜きゲルを泳動槽にセットする。DNA 試料には 1/10-20 量の 0.05% ブロムフェノールブルーを含む 80% グリセロールを加えてから試料孔に入れる。

プラスミド DNA を無処理のままアガロースゲル電気泳動にかけると高次構造の違いによって分離することができる。超らせんをとる DNA (図 2 の CC 分子) はコンパクトな構造をとっているため泳動速度が早い。超らせんの巻数が減少するに従って開環状分子 (OC) に近づいていく。同じ高次構造をとる DNA ならば、アガロース濃度のある範囲内 (表 1) でその泳動速度は分子量の log₁₀ に逆比例する。図 2c-e に各種長さの線状二本鎖 DNA の電気泳動におけるゲル濃度と電圧の影響を示した。高分子領域での分離能を上げなければ電圧は 5 V/cm 以下がよい。

電気泳動後はゲルを箱型紫外線照射器の上に置き (波長が 254 nm, 302 nm, 360 nm の 3 種類が市販されているが、短波長のものほど検出感度が高いが DNA に損傷を与えやすい。そこで 302 nm がよく使われている) 橙色フィルターを付けて撮影する。フィルムは高感度のタイプ 667 (ポラロイド) や FP-3000B (フジフイルム) が良い。

3・2・2 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

低分子 (約 500 bp 以下) DNA の分離にはポリアクリルアミドゲルの方がアガロースより優れている (表 1)。アクリルアミド、N, N'-メチレンビスアクリルアミドの比は 19:1 または 29:1 が使われている。前者の場合は 40% 溶液 (38 g: 2 g/100 ml)、後者は 30% 溶液 (29 g: 1 g/100 ml) を作って冷暗所に保存する (アクリルアミド類は神経性毒物なので取扱いに注意)。アクリルアミド溶液、5×TBE 緩衝液、水を所定量混合した後、10% 過硫酸アンモニウムを 100 ml 当たり 0.7-0.8 ml 加え吸引脱気する。この試薬の濃度はゲル化速度に大きく影響するので、ゲル化が 10-15 分で終わるように加減するとよい。最後に N, N, N', N'-

テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を100 ml 当たり30 μ l 加えて混合、ただちにゲル作製容器に流し込む。詳しくは文献^{3)-5),7)}や電気泳動装置説明書を参照されたい。泳動後はゲルを前項のごとく EtBr 溶液に浸し DNA を染色する。ポリアクリルアミドは EtBr からの蛍光をクエンチするのでアガロースゲルより感度は低下する(10-15 ng が限界)。その点銀染色法はさらに高感度で、従来より簡便な方法が試薬キットとして市販されており(関東化学、第一化学等)便利である。

二本鎖 DNA のポリアクリルアミド電気泳動で注意すべきことは、DNA 断片によっては分子量から予想される移動度より遅く泳動されるものがあることである。これは塩基配列に依存して DNA 二本鎖が折れ曲がる(bending)ためと考えられている¹⁴⁾。屈曲点が生ずる分子の中央にあるほど、泳動速度が遅くなり、DNA の高次構造の解析に応用されている。とくに転写開始の調節部位¹⁴⁾や DNA 複製開始部位¹⁵⁾を含む DNA 断片で見出されていることから最近注目を集めている。

3・2・3 ゲルからの DNA の回収

ベクター中にクローニングした DNA の特定領域をさらにクローニング(サブクローニングと言う)する時などに、電気泳動ゲルから DNA 断片を回収することがよくある。

アガロース、ポリアクリルアミドいずれにも使える方法は電気泳動で DNA をゲルから回収する方法である。DNA のバンドを切り出し透析チューブに泳動用緩衝液とともに入れ、チューブの両端を泳動槽の液面より上に出して電気泳動を行う。DNA を EtBr で染色しておけば DNA がゲルから抜け出たかどうか分かる。最後に2分ほど逆方向に電流を流してからチューブ中の緩衝液を回収する。この後 DNA は DEAE-Sephacel(ファルマシア), NACS-PREPAC (BRL, コスモバイオ), NENSORB 20 (NEN, 第一化学)等のカラムを通すかフェノール抽出を行いエタノール沈殿法で回収する。ただしアガロースゲルの場合、フェノール処理だけではその後の酵素反応の阻害物を十分除去できないことがある。この場合、アガロースの種類を変えるか上記カラムを通す必要がある。なお専用の装置も市販されている。

アクリルアミドゲルの場合、ゲルを細かく碎き、15 ml マイクロチューブ中でゲルが浸る程度に 0.2 M NaCl/10 mM Tris $\cdot$ Cl pH 8.0/1 mM EDTA または 0.5 M 酢酸アンモニウム pH 8.0/1 mM EDTA を加え 50℃一晩放置後 14 krpm 5 分遠心し、上清を別のチ

ューブに移し、ゲルに新たに上記溶液を加え 50℃ 3 時間置き同様に遠心、上清を先の上清に加えエタノール沈殿させる、ゲルを細かくし過ぎた時は可溶性ポリアクリルアミドが DNA と挙動をとにもするので、先の NACS-PREPAC や NENSORB 20 で DNA を精製するとよい。

アガロースゲルの場合、低融点アガロースを利用するのも簡便で回収率も良い。ゲルブロックを 65℃ で融解、1-2 倍量の 25 mM Tris $\cdot$ Cl (pH 8.0)/1 mM EDTA (65℃に保温)を加えた後、等量のフェノール(室温)とよく混合、室温で遠心し上清を集める。クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿で DNA を回収する。DNA 量が少ない時には、エタノール沈殿前に等量の 2-ブタノールを加えてよく混合、軽く遠心してブタノール層(上層)を除く。ブタノール量を加減すれば目的とする量に DNA 溶液を濃縮できる。最後にジエチルエーテルを加え上層を除去、エーテルも気化させる。最近、通常のアガロースゲルからも DNA を短時間で効率よく回収できる試薬が市販され(GENECLEAN, フナコシ)良好な結果が得られている。

4. プラスミドの複製¹⁶⁾⁻¹⁸⁾

4・1 複製系の基本単位(basic replicon)

プラスミドが持つ複製系の性質を示すのに必要最小限の DNA 領域を basic replicon とよぶことがある。これまでによく研究されてきた代表的なプラスミドについてその性質を表 2 にまとめた。その構造は Col E1 系のプラスミドを除いては自己の複製に特異的に働く複製開始蛋白質(イニシエーター)をコードする遺伝子(rep)とこの蛋白質存在下に複製を開始することのできる開始領域(ori)から成り立っている。それに対して Col E1 系は、すべて宿主細胞の複製蛋白質に依存している。しかしいずれのプラスミドもこの basic replicon 中に複製開始の頻度を調節する機構を保持している。

プラスミドゲノム中の DNA 複製に関与する領域の同定にはつぎのような方法がよく使われる。今、プラスミド A と B (A がこれから解析を進めるプラスミド)は互いに独立に複製され、同一細胞内に導入されても、宿主細胞の分裂増殖の過程で安定に共存する、すなわち互いに和合性(compatible)である時、まず、A, B の融合プラスミドを作る。つぎに A の領域について、遺伝子操作技術を用いて A のさまざまな領域に欠失や挿入を導入した変異プラスミドを複製系 B が働

表 2 プラスミド複製系の性質

プラスミド	分子量 (kb)	basic replicon (kb)	コピー数	<i>polA</i> * 依存性	プラスミドが コードする複製 蛋白質	制御低分子** RNA	～20 bp 反復設列
Col E1	6.6	0.58	～20	+	—	+(*)	—
R1	90	1.8	1-2	—	+	+(**)	—
pT181	4.4		20	—	+	+(**)	—
R6K	38	1.3	～15	—	+	—	+
pSC101	9.2	1.3	～5	—	+	—	+
F	95	1.5	1-2	—	+	—	+

* *polA*: DNA ポリメラーゼ I の構造遺伝子

** +(*): プライマー RNA 形成を抑制, +(**): 複製蛋白質の翻訳を抑制

く条件下で単離する。ついで複製系 B が不活性のもとなお、この融合プラスミドが複製されるかどうかを見るわけである。B としては λ フェージ複製系 (λ フェージの溶原菌内では複製が抑制される) や Col E1 系 (DNA ポリメラーゼ I 欠損株 (*polA*) では複製されない) 複製の高温感受性変異を持つ pSC 101 等が用いられる。

4.2 不和合性 (incompatibility)

不和合性とは 2 種類の区別できる (たとえば異なる薬剤耐性遺伝子を持つ) プラスミドが同一細胞内で安定に維持されないことであるが、その主な原因は両者が同じ複製系を有することにある。すなわち各複製系には一定のコピー数を維持する機構が働いている結果、同じ複製系を持つ 2 種のプラスミドは、両者のコピー数の和が一定数に保たれることになる。個々のプラスミド分子の複製開始頻度が必ずしも均等でないか、複製された娘分子が宿主細胞の分裂のさい、娘細胞に均等に分配されない等の理由により、両プラスミド数にアンバランスが生じると不可逆的に増長され、細胞の増殖に伴って少数となったプラスミドが脱落していくと考えられる。そこで複製開始の調節機構に関係した DNA 領域であれば、自律複製能までもなく不和合性を発揮することができる。これまでに複製開始を抑制する因子を産生する領域と複製開始に必要なイニシエータ蛋白質の結合部位とが不和合性活性を持つ領域として同定されている。なお、不和合性を発揮するのは DNA 複製機能に関連した領域だけでなく、後述するプラスミド DNA の娘細胞への分配機能に関与する領域にも見出されている。

不和合性活性の測定法を簡単に述べる。プラスミド A 保有菌 (A⁺) に対し、調べたい領域を含むベクター

B (A とは compatible で異なる選択マーカーを持つ) を形質転換法で導入し、A⁺B⁺ および B⁺ を選択する。通常 A⁺B⁺/B⁺ は約 1 か 0.01 以下と両極端の値が得られるが、時に不和合性活性が弱くその中間的な値とか 1 近くてもコロニーが小さい時がある。そのような時は、B⁺ 選択培地中でのプラスミド A の安定性を調べればよい (プラスミドの安定性テストについては 5. で述べる)。

4.3 複製中間体の検出と単離

前述のごとくプラスミドは細胞内では超らせん構造をとっている。これが複製開始部位から複製を始めると親 DNA 鎖は超らせん構造を保ったままであるが、複製を終えた領域は娘 DNA 鎖がまだ開環状であるため複製中間体は CC と OC の中間的性質を示す。これを利用して中間体を単離することができる。しかしプラスミド DNA は小さいので複製を開始しても 1 分足らずで完了し、分子数も多くはないので対数増殖期の細胞からは複製中間体はほとんど得られない。そこでチミン要求株に目的とするプラスミドを保持させ、対数増殖期にチミン飢餓状態に 37℃, 30 分置いた後、温度を 20℃ に下げる。5 分後 ³H-チミジンを 30 秒間取り込ませ、ただちに等量の氷冷 40 mM KCN を加え、Triton 法でプラスミド DNA を調製、CsCl-EtBr 遠心法を 2 回繰り返して CC と OC の中間部を精製する。なお、アルカリ-SDS 法は使えない。

CsCl-EtBr 遠心を行わずにプラスミド DNA 画分を直接アガロースゲルの電気泳動にかけても、図 2 で示した CC と OC 分子の間に中間体が見出されるが、複製が進行するに従って分子量が増加し二量体の大きさに近づくため、OC よりさらに移動速度の遅いものも現われてくる。

4・4 プラスミド DNA 複製の調節機構

これまでの DNA 複製研究には大きな二つの流れがある。一つは *in vivo* における複製の解析であり、複製中間体の単離やその構造解析、遺伝子操作技術を駆使しての遺伝学的解析等が含まれる。他方は *in vitro* での複製系の開発とそれに続く精製蛋白質を用いての複製機構の解析であり、富沢らにより Col E1 系プラスミドで大きな成果をあげてきた¹⁹⁾。最近 Kornberg らにより開発された方法²⁰⁾により、他のプラスミドでも、つぎつぎと *in vitro* 複製系が確立され、今やこれらの流れが一つになって複製開始の調節機構解明へと向かっている。以下にベクターとして最も広く使用されている Col E1 系と、低コピー数で複製機構も Col E1 系とはまったく違う F, pSC 101 について述べてみる。

4・4・1 Col E1 系プラスミド¹⁹⁾

表2に示したようにこの一群のプラスミドは自己のゲノム中に複製タンパク質の遺伝子を持たないで、複製に必要な酵素類はすべて宿主に依存している。図3に示したようにまず複製開始点 (ori) の上流555 bp から RNA ポリメラーゼが RNA II (プライマー RNA)

を合成し始め ori 部位を越える。この周辺ではおそらく RNA II の特殊な高次構造のため RNA 鎖は DNA 鎖に結合し二本鎖のままである。この二本鎖の ori 部位で RNase H (RNA: DNA ハイブリッドの RNA 側を切断する RNase) が RNA 鎖を 3'-OH が残るように切断する。こうしてできた RNA II 3' 末端を利用して DNA ポリメラーゼ I (*polA*) が DNA 鎖を伸長させる。

この DNA 複製開始の調節は RNA II とは逆方向に転写されることにより RNA II とは相補的な塩基配列を持つ109ヌクレオチドの RNA I によって行われる。この RNA I が RNA II とハイブリッドを形成することにより、プライマーとなるべき RNA II に構造変化が起こり、ori 部位で RNA II: DNA のハイブリッド形成が阻害され、その結果 RNase H が作用できず RNA II の成熟が阻止される。RNA I は図4に示すような二次構造をとることができ、RNA II とのハイブリッド形成は、まず RNA I のループから起きる (それは mRNA とアミノアシル tRNA 間のコドン-アンチコドン形成を想起させる)。このループ中の塩基置換はハイブリッド形成能を低下させ (この塩基置換はその位置に相当する RNA I にも起きているので両者が依然相補的であることには違いがないが)、その結果 RNA II の成熟が促進され、プラスミドのコピー数が上昇する。さらにこの塩基置換部位は野生型 RNA II の同じ部位とは相補性が無いため変異 RNA I の野生型 RNA II 形成阻害能力はさらに低下する。逆に野生型 RNA I も変異 RNA II とはハイブリッドを形成できず、両者間の不和合性が消失することになる。プラスミド p15 A, RSF1030, CloDF13 等同様の複製機構を持ちながらお互いに compatibleなのはこの理由による。

Col E1 にはさらに第二の調節因子 (Rom) が存在する。それは分子量約7000の蛋白質で RNA I と RNA II のループ間のハイブリッド形成を促進することにより

図3 Col E1 DNA 複製開始におけるプライマー形成¹⁷⁾

図4 RNA I: RNA II ハイブリッドの形成
P_{RNA I}, P_{RNA II} はそれぞれ RNA I, RNA II 合成のプロモータ部位

プライマー形成を抑制するという。ベクター pBR322 にはこの *rom* 蛋白質の遺伝子があるが、pUC 系では除かれているためさらにコピー数が増加している。

Col E1 系プラスミドはその DNA を大腸菌内に大量に蓄積させる（増幅）ことができることも大きな特徴である。CM 添加等により蛋白合成を阻害すると宿主染色体は複製を完了した所でつぎの新たな開始は起らない。しかし Col E1 複製は続くためコピー数は 1 000 を超えることになる。この種のベクターにクローニングした遺伝子はこうして大量に得ることができる。なお、CM 耐性遺伝子を持つプラスミドの増幅はスペクチノマイシン (300 $\mu\text{g/ml}$) 添加で行える。

4.4.2 プラスミド pSC101, F

自律複製に必要な領域を模式的に図 5 に示した。ori 領域に約 20 bp の反復配列を持つことが特徴で、rep 蛋白質（イニシエータ）がこの反復配列に結合する。この反復配列だけで不和合性活性を持つことは、この rep 蛋白質を ori 領域中の反復配列と取り合うためと説明されている。実際に F の rep 遺伝子下流にある反復配列は自律複製には不必要で、むしろ除くと（構造的には pSC101 と同じになる）コピー数が数倍増加する¹⁹⁾。また、rep 蛋白質のある種のアミノ酸置換がコピー数を増加させる変異株として単離されている²²⁾、²³⁾。このことは rep 蛋白質の反復配列への結合が複製開始の調節に深く関与していることを示す。ところが rep 蛋白質は反復配列に結合するだけでなく、rep 遺伝子のプロモータ領域と重複して存在する逆反復配列（塩基配列は ori 領域の反復配列と約 50% の相同性を持つ）にも結合し、rep 遺伝子発現を抑制する²⁴⁾。すなわち rep 遺伝子は自己制御系であり、それによって rep 蛋白質の細胞内濃度はほぼ一定に保たれる。そこで変異 rep 蛋白質では自己制御系が甘くなり合成量が増加するか、ori 領域の反復配列への結合親和性が増

加したことが考えられる。しかしながら rep 蛋白質の ori 領域に結合した後、複製開始に至る道すじは依然霧中である。

なお、これらプラスミドのコピー数上昇変異株の単離には、アンピシリン(Amp)耐性遺伝子 (pBR 322 由来のものでよい) の量がアンピシリン耐性度にはほぼ比例することを利用することが多い。たとえば野生型 pSC101 保有菌が 400 $\mu\text{g/ml}$ Amp までに耐性であれば 500 $\mu\text{g/ml}$ 以上で生育してきた細胞からプラスミドのコピー数変異株が検出される。高コピー数プラスミドの場合、野生型がすでに数 mg/ml 耐性であるため、Amp (6 mg/ml) とメチシリン (4 mg/ml) を含む培地でコピー数増加変異株を選択した例もある²⁵⁾。

5. プラスミドの安定性²⁶⁾

プラスミド保有菌が分裂増殖する過程でプラスミド分子が常に宿主細胞に保持されるとは限らない。いま細胞が分裂するさい、無作為的にプラスミド分子が娘細胞に分配されるならば、その時存在するプラスミド分子の数が少ないほど、プラスミドをまったく受取らなかった細胞の出現頻度は増加するはずである。ところが実際にはコピー数 1-2 個の F や R1 等はきわめて安定に宿主細胞中に維持される。このことはこれらプラスミド分子が少なくとも 1 分子は娘細胞に分配される機構の存在を示している。一方でコピー数が 20 のようなプラスミドは無作為的に分配されたとしても、プラスミド非保有菌の出現頻度はきわめて低いと予想される。実際に高コピー数プラスミドも安定であるが時として不安定なものがある。その原因の一つは、プラスミドの存在が宿主細胞に悪影響を与え、細胞の増殖速度を低下させると、一度出現した非保有菌が細胞集団の中で優性となる、というものである。

プラスミドのゲノム中に安定保持に寄与する DNA 領域が存在することは pSC101 で最初に見出された²⁷⁾。この領域 (Par) は 200 bp 程度の長さで、この領域を保持するプラスミド DNA のみを宿主細胞中に安定に保持させる。すなわち *cis* 位にのみ働くことができる。この領域が果たす機能については依然不明であるが、この領域が小さいことから容易にプラスミド DNA 中に挿入できるので、作製したプラスミドが不

図 5 プラスミド pSC101 と F の複製開始領域

▨: 複製開始蛋白質をコードする遺伝子 (rep), 矢印は N 末端 → C 末端を示す。inc: 不和合性領域 ((inc) は F のみに存在する), P_{rep} : rep 遺伝子のプロモータ, "dnaA": 大腸菌複製開始蛋白質 dnaA の結合部位, AT 対: AT 対が 80% を超える領域

安定な場合には役に立ちそうである。

その後、F, R1, P1 といったプラスミドゲノム中にもプラスミドを安定化させる領域が見出された²⁶⁾。その遺伝子構成はお互いに類似しており、F を例にとると約3500 bp の領域に蛋白質をコードし *trans* 位に働くことのできる遺伝子が2個、43 bp の配列が12個直列に並ぶという特異な構造を持ち *cis* 位にのみ働く領域1個が同定されている。これらの蛋白質が3番目の *cis* に働く領域に作用し、たとえば細胞膜などにプラスミド DNA を固定し、娘細胞への分配を確実にするといったモデルが出されている。同様の遺伝子構成を持ちプラスミドの安定保持に働く領域がイーストの 2 μ プラスミドにも見出されている²⁸⁾。

F や R1 等には上記の分配機構に働くと思われる DNA 領域だけでなく、さらにプラスミドを受け取らなかった娘細胞を致死に至らしめる機能を持つ領域も存在している²⁶⁾。この領域からも蛋白質が作られるが、これらの具体的な作用様式は不明である。

最後に安定性のテスト法を簡単に記す。プラスミドに薬剤耐性マーカーを付けておき、この薬剤存在下に培養し、対数増殖期に薬剤を含まない（一薬剤）培地で培養を続ける。薬剤存在下に静止期まで培養するとプラスミド非保有菌も存在する可能性が高い。一薬剤培地で適当代培養後、①希釈して+薬剤、一薬剤プレートに菌液を拡げて、出てきたコロニー数を測定する、②一薬剤プレート当たり100-500コロニーになるように菌を拡げ現われたコロニーについてレプリカ法で薬剤耐性株を計測する。①の方法はプラスミド保有菌が全菌数より桁違いに少なければ簡便でよい方法であるが、10%以上もあるとプレートごとの菌数の誤差で精度は低い。②の方法ではレプリカするコロニー中に1個でもプラスミド保有細胞があれば、プレートに拡げられた時プラスミドを保有していたと考える。

文 献

- 1) 松原謙一：「プラスミド」，講談社サイエンティフィック (1976)
- 2) Helinski, R.D.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **27**, 437 (1973)
- 3) Maniatis, T. et al.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- 4) Davis, L.G. et al.: "Basic Methods in Molecular Biology", Elsevier, New York (1986)
- 5) 矢野和夫：「遺伝子操作」(松原謙一，矢野圭司編)，共立出版，p. 270 (1981)
- 6) 松原謙一：「核酸の化学 I (生化学実験講座 2)」(日本生化学会編)，東京化学同人，p. 65, (1975)
- 7) 池村淑道：「遺伝子研究法 I (続生化学実験講座 1)」(日本生化学会編)，東京化学同人，p. 137, (1986)
- 8) 青山卓史，高浪 満：「遺伝子研究法 II (続生化学実験講座 1)」(日本生化学会編)，東京化学同人，p. 15 (1986)
- 9) Holmes, D.S. and Quigley, M.: *Anal. Biochem.*, **114**, 193 (1981)
- 10) Clewell, D. and Helinski, R.D.: *J. Bacteriol.*, **110**, 1135 (1972)
- 11) Godson, G.N. and Vapnek, D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 516 (1973)
- 12) Birnboim, H.C. and Doly, J.: *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513 (1979)
- 13) 丸尾文治，東條 敬：アルカリ抽出ーグラスパウダー吸着処理によるプラスミド DNA の分離，精製法の検討，日本大学農獣医学部学術研究報告，42号，p. 57 (1985)
- 14) Wu, H. and Crothers, D.M.: *Nature*, **308**, 509 (1984)
- 15) Zahn, K. and Blattner, F.R.: *ibid.*, **317**, 451 (1985)
- 16) 犬塚 学：蛋白質・核酸・酵素，**27**, 87(1982)
- 17) 山口和男：Radioisotopes, **33**, 307 (1984)
- 18) Scott, J.R.: *Microbiol. Rev.*, **48**, 1 (1984)
- 19) 富沢純一：蛋白質・核酸・酵素，**31**, 1078(1986)
- 20) Fuller, R.S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7370 (1981)
- 21) Tomizawa, J. and Ito, T.: *Cell*, **31**, 575 (1982)
- 22) Armstrong, K.A. et al.: *J. Mol. Biol.*, **175**, 331 (1984)
- 23) 石毛郁治，他：第8回微生物シンポジウム (金沢) p. 70 (1986)
- 24) Yamaguchi, K. and Masamune, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 362 (1985)
- 25) Inuzuka, M. and Wada, Y.: *EMBO J.*, **4**, 2301 (1985)
- 26) 平賀壮太：細胞工学，**6**, 28 (1987)
- 27) Meacock, P.A. and Cohen, S.N.: *Cell*, **20**, 529 (1980)
- 28) Kikuchi, Y.: *ibid.*, **35**, 487 (1983)