講座

遺伝子工学実験講座

Ⅷ. 染色体 DNA の新しい解析法

菊池韶彦, 岡 良生, 小林まり子
 三菱化成生命科学研究所核酸研究室
 194 東京都町田市南大谷11

Key Words: electrophoresis, large deoxyribonucleic acid, karyotype analysis, yeast, Sfi I, Not I restriction enzyme mapping, artificial chromosome vector

1. はじめに

しばらく前まで DNA を扱うのは、大変なことであった。まずフェノールの蒸留から始まり、手は洗い清めた上で手袋をつけ、できるだけ静かに操作をし、穴の細いピペットを使うこともできず、普通は 10 ml のピペットの吸い口側を使用していた。こうした注意はいずれも DNA が長い糸状の分子で、機械的に切れやすいということに起因するもので、案の定、抽出してきた DNA は、分子量が 10^7 - 10^8 もあればいい方で、それでも濃い溶液はネバネバと糸を引く扱いにくい溶液であった。おまけにこんな高分子の糸をそれ以上解析する手段は、ほとんどないに等しかった。制限酵素の開発により、この問題は急速に解決し、20 kb (キロベース=1 000 塩基対) 以下の大きさになった断片は、アガロースやポリアクリルアミドを支持体とした電気泳動で、分離、精製が可能になった。しかし、ある生物の全染色体の DNA ははるかに大きく、たとえば大腸菌では約 5 000 kb、もっと小さいマイコプラズマや古細菌ではその 1/3 くらい、真核生物で比較的小さい方の酵母では約 15 000 kb になる。ちなみにヒトの場合は 3×10^{12} b となり、3 000 メガベース (Mb) あるいは 3 ギガベース (Gb) といった宇宙スケールの単位を使いたくなる。とは言え、最小の第 21 染色体がただか 50 Mb、最大の第 1 染色体でも 250 Mb にすぎない。

今や 100 kb オーダーなら、全塩基配列を知ることすら不可能ではなくなっているが、そうすると、そのくらいの大きさの DNA を取り扱う手法が必要となってくる。たとえばスファージの DNA は約 50 kb で、適当な制限酵素で切れば 10 くらいの断片として、すべての断片を電気泳動によりアガロースゲル 1 枚の上にディスプレイできるのである。同様のことを大腸菌や酵母で行うと 1 000 から 10 000 個の断片を生ずることになり、手に負えない。この総説では 100 kb から 10 000 kb にわたる DNA を分画する新しい電気泳動法を中心に二、三の応用例を紹介したい。

2. パルスフィールドグラディエント電気泳動法の原理

とにかく DNA が扱いにくいのは線状の高分子だからである。蛋白質ならば、どんなに大きくても分子量 200 k を超えるものは少ない。アミノ酸にしてみればただか 2 000 個で、適当に折りたたまれている。DNA にしてみれば、大腸菌のようにスクレオチドが 5 000 000 個などというのは小さい方なのである。ヒトの染色体のうち最小のものですら、この 10 倍の長さが切れ目なくつながっているはずである。しかしこの長いということを逆手にとって、分画しようと考えついたのは、コロンビア大学の一介の学生だったという話である¹⁾。

アガロースを支持体として通常の電気泳動をしたことのある人ならば、おそらく誰でも気がつくと思うが、線状の DNA はある程度以上の大きさ (50 kb) になると一団となって動いて行き、泳動時間を長くすれば、アガロースの中を通り抜けてしまう。大きさの方は 100 kb であろうと 10 000 kb であろうとほとんど差

† Introduction to the Experiments of Genetic Engineering. Ⅷ. How to deal with chromosome size DNA. Akihiko KIKUCHI, Yoshio OKA and Mariko KOBAYASHI: Mitsubishi Kasei Institute for Life Sciences, 11, Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194, Japan.

はない。おそらく一端を先頭にしてアガロースの網目を通り抜けていくので長さにはそれほど影響されないのかも知れない。しかし、こうして揃って動いて行くものに方向転換をさせるとどうなるだろうか。突然、電場を 90° 動かして、DNA分子に左向け左を命じ、直角方向に泳動させるのである。もちろん長いやつは小まわりがきかず、もたもたして、短いのに遅れをとるにちがいない。またしばらくしたら、今度は右向け右を命じ、もともと同じ方向に戻してやると、ここでも短いやつは得をして、長いのに差をつけていく。これを適当な間隔で繰り返せば、100 kbと1 000 kbと10 000 kbは分離できるというのが基本的な原理で、一定時間ずつ電場の向きをかえるのでパルスフィールドグラディエント電気泳動と呼んでいる。実に簡単なつまらない原理であるが、これで確かに巨大な線状のDNAをいとも簡単に分けることができるのである。そして実際に240 kbから3 000 kbにわたり16本のDNAから成る酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の全染色体を見事に1枚のアガロースゲルの上に分離してみせたのである。

3. 環状のDNAについて

これまで、線状DNAというのを強調してきたのは環状のDNAはまったく異なる挙動を示すからである。真核生物と異なり原核生物の染色体DNAやプラスミドDNAなどは、端と端とがつながった閉環状をしているものが多い。実際、大腸菌の染色体は約5 000 kbの閉環状をしており、有名なプラスミドpBR 322は、4.5 kbの閉環状DNAである。細胞からこの閉環状DNAを抽出してくると負の超螺旋構造を取っており、これを電気泳動にかけると、直線状のDNAとは異なった移動度を示す。とくに、100 kbから300 kbくらいまではきちんと分離することができる。それ以上になると、そんなに大きなものを無傷で取るのは難しいし、おそらくアガロースの中に入って行かなくなると思われる。閉環状のものにニックが入ると開環状になり、こうなると50 kbのものもアガロース中に入らず、サンプルウェルに引っかかってしまう。小さいものは、これまた独自の移動度を示し、線状、開環状、負の超螺旋を持った閉環状は、同じ分子量のものでも、電気泳動の条件によりかなり異なる泳動の仕方をする。細菌のファージやプラスミドの中には優に100 kbを超す閉環状のものが多いが、これらはDNAの調製さえよければ通常の電気泳動で充分分離検出す

ることができるはずである。

先にDNAの取扱いは難しかったと書いたが負の超螺旋を持った閉環状DNAを細菌から抽出するのはそんなに困難ではない。いわゆるアルカリ法(あるいはアルカリ-熱処理法²⁾)を使うと100 kbを超えるものでも簡単に精製できる。線状のものはどうかというと、昨今ではそれほど注意を払わなくても結構きれいにとれる。フェノールは蒸留する必要もないし、自分の手をフェノールから守りたいと思わなければ、手袋もする必要もない。λファージDNA(50 kb)くらいならガチャガチャ振ってもあまり切れないし、T₄ファージDNA(170 kb)でもそんなに簡単には切れない。ただし希薄な溶液は針の穴のようなところを通さない方が無難だし、ガラス棒に巻きつけて乾燥させるのは禁物である。しかし、もっと大きなDNAを扱う場合には、以下に述べるように、まったく異なった方法をとることになる^{3),4)}。

4. 電気泳動の装置

電気泳動の原理は先に述べたように電場を一定時間ごとに 90° ずつ動かせばよいだけのことである。それに従ってこれまでに何種類の装置が工夫されている。最初にSchwartz¹⁾によって発表された装置は、正方形のゲルの四方にそれぞれ独立した電極を張り(東一、南一、西十、北十)、東西、南北間に一定時間ごとに交互に電流を流すというもので、東側にサンプルウェルをおけば、DNAは東南から西北へとゲルの対角線に沿って泳動することになる。泳動の結果、とにかく20 kb-1 000 kbのDNAが分離できることが示されたが、隣り合ったレーン同志でも比較が難しいという弱点を持っていた。これに対してCarleとOlson⁵⁾はゲルを 45° ずらした位置に据え、ちょうど、電極がゲルの対角線上になるように配置した。こうするとサンプルウェルは東南に位置しDNAは西北へ、つまりゲルに並行して泳動するようになる。これで、一度に複数のサンプルを泳動しても各々のレーンが比較しやすくなり、DNAの分子量も標準サンプルの移動距離から計算できるようになった。CarleとOlsonは酵母*Saccharomyces cerevisiae*の染色体の、遺伝学的に推定された17本のうち、16本までを同定、若干の重なり合うものを含めて12本のバンドとして見事なパターンを発表した⁵⁾。これに刺激されて、日本エイドーの加嶋さんに頼み、若干の簡素化を図った装置を試作してもらい日常使用している(図1)。

図 1 OFAGE の装置

1: 電気泳動槽, 2. スイッチング用タイマー,
3: アガロースゲル作製用ガラス板, 4: アガロースブロック作製用小箱

LKB-Pharmacia から現在発売されているパルサーフォーションシステムは、ほとんど同じものであるが当方の試作品に比べて目もとびでるほど高価である。図2に示すように酵母染色体 DNA の分離に関する限り試作品で充分間に合っている。この装置の欠点は、中央部を除くと泳動パターンが〈X〉型にゆがみができ、とくに末広がりになってしまう点である。

図 2 OFAGE で分離した酵母染色体 DNA

5. 電気泳動装置についてのさまざまな工夫

以上のように正方形のアガロースゲルの四方に電極を張り、東西、南北方向に交互に電流を流し、DNA を 90° ずつ向きをかえながらジグザグ行進をさせるというのが OFAGE (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis) あるいは PFG (Pulsed Field Gradient) と言われるものの基本原理である。最初の頃はこの電気泳動中、電場に勾配のできることが DNA の分離にとって重要であると説明されていたが、実際のところそんな七面倒臭いことを考える必要のないことはすぐ明らかになった。Carle ら⁶⁾ は、ジグザグ行進でうまく行くなれば、いっそのこと行きつ戻りつさせれば同じ効果が得られるのではないかと考え、FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis) を行った。これは、従来の一次元の電気泳動装置を使い、+極-極の方向を一定時間ごとに切り換え、DNA をまさに行きつ戻りつさせながら分離するものである。ただし、あまり戻りすぎても仕方がないので、少しずつは進行方向に動いていくようにしかなるべきプログラミングが必要となる。簡単に30秒前進、15秒退却といった方法でも何とかなるらしいが、現在では簡単なプログラムを内蔵した装置が市販されている。あまり大きな DNA に関してきれいなパターンは見たことはないが、500 kb 以下のものについては見事に解像力を示すようである。

染色体番号	分子量(kb)	DNA の長さに応じてプログラミングを変える必要がある
(XII)	3 100	ので、広い範囲を一度の電気泳動でカバーしようというの
IV	1 630	には適さないかも知れない
VII, XV	(1 170 1 140)	が、プログラマーさえ買えば、従来の電気泳動装置を使えるという利点がある。
XIII, XVI	(1 010 955)	この FIGE の装置で分かる
II	840	ことは電場の勾配などいら
XIV	830	ないということである。逆に勾配ができるために泳動パター
X	785	ンが〈X〉型になってしまい、端
VI	675	のサンプルは、隣りや中央の
VIII, V	(595 590)	レーンとの比較がしにくくな
IX	455	ってしまっている。そこで、
III	355	Chu ら ⁷⁾ は、電場に勾配が
VI	280	できないように、泳動槽全体
I	240	に均一な電場を作るように工

図3 CHEF装置と配線図⁷⁾

1: 電気泳動槽, 2: 抵抗とスイッチングタイマー, 3: 電源, 4: マグネチックスターラー

夫した装置 CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field) を作製した。これは電極を6方向に配し、各電極間に適当量の抵抗を挟み、ゲルが常に均一な電場にあるようにしたもので、この装置(図3)も日本エイドーの加嶋さんに試作してもらい、もはや端の方のレーンがゆがんだり末だがりになったりすることもなく、図4に示すように文句のつけようのないパターンが得られるようになっていた。CHEF型の装置はBioRadから比較的安い値段で売り出されるらしい。

図4 CHEFによる酵母染色体DNAの分離
中央のレーンはλDNA マルチマー

電極をゲルの周囲に配するPFG, OFAGE型の電気泳動装置はすべてLKB-ファーマシアが特許を持っているために、ベックマンが作り出した装置は、図4に示すように縦においたゲルの前後に電極を置き、ゲルの厚みの中でジグザグ運動をさせるというものである⁸⁾。これも電場は均一になり、宣伝の写真ではきれいなパターンがでていますが、LKB-ファーマシアの装置よりも高い値段がつくらしい。しかし、これはたかが電気泳動なので、そんな大それた値段であるはずがなく、できれば、数台あった方が望ましい。実際、日本エイドーの加嶋さんに試作してもらったものはCHEFでさえ、20万円くらいということで、これに電源、冷却装置、マグネチックスターラー2台もあれば充分、使用に耐え、でてくるデータはまさるとも劣らないはずである。ちなみに、アメリカでは1000ドル程度の装置が市販されていた。

これまでに紹介した装置はすべて電場を動かすという原理を使っているが、Southernら⁹⁾、Gemmellら¹⁰⁾は、ゲルを90°ずつ回転させる方法(図6)をとって見事な結果を得ている。発想の転換のすばらしさは言うまでもない。この装置もドイツ製でフナコシから売り出されると聞いている。

6. どのように電気泳動を行うか

日本エイドーに試作してもらったOFAGEの装置はCarle と Olson が Nucleic Acids Research に発表した設計¹¹⁾とほとんど同じである。変更した点はバッファの冷却法で、通電中のバッファをポンプで冷却器に送り循環させるのをやめ、電気泳動槽の真下に冷却水を循環させるようにした点である。ただし、バッファ

図 5 垂直型の PFG 装置⁵⁾ 図 6 ターンテーブル型の装置¹⁰⁾

が電気分解で不均一になるのを防ぐために、マグネチックスターラー 2,3 基で常時攪拌することにした。原報ではポンプから流速 250 ml/min でバッファを流すために攪拌する必要もないが、通電中のバッファをこんな速さで還流するのは少々危険な気がしたからである。攪拌しないと電気泳動中にかなり熱を持つことは確かであるが、どの程度の攪拌が必須であるか試したことはない。市販の FIGE のシステムでは、ほとんど通常のサブマリン型の泳動槽を使っているようで、強いてバッファの攪拌を行っていない。

ゲルは 10cm 四方で、通常ガラス板の上に作り、泳動槽のほぼ中央に置くが、バッファの攪拌が激しければ当然動いてしまう。Carle と Olson⁴⁾ は特殊な糊でガラス板にはりつけており、Cold Spring Harbor の

実験書¹¹⁾では、ゲルの上にピペットを 1 本横たえておけばよいとしている。当初筆者らは、ゲルをガラス板にヒモや輪ゴムでゆわえつけておいたり、ガラス板の周囲に多孔質の枠を作ったりしたが、結局、ガラス板にあらかじめ深さ 1-2 mm の溝を切っておく方法をとっている。またガラス板は泳動槽の底に直接置かず、下駄をはかせ数 mm 浮かして底にもバッファが流れるようにすると泳動パターンはさらに美しくなる。

7. 電気泳動の条件はどのように決めるか

ゲルに使うアガロースは Seakem (ME) のものを 1.5% にして使っていたが、最近になって、一度泳動してから特定のバンドを切り出してそのまま制限酵素で処理する方法を取り入れるために BioRad の ultrapure (DNA grade)

を 1% の濃度で使ってみた。値段が高いただけあってこちらの方が結果はきれいになる。ただし、従来は、泳動後、1 週間以上水につけておいてもバンドはたいして拡散しなかったが、BioRad のでは数日でバンドが消えてしまう。泳動バッファはすべて 1/2 に希釈した TBE (90mM Tris, 90 mM Boric Acid 2.5 mM EDTA) を使っていて、およそ 15℃ くらいに冷却している。バッファは 1 回ごとに替えた方がよいが、3-4 回は使うこともできる。回数を重ねるにつれて泳動時間が長くなる傾向にある。

電源は 500 V, 500 mA くらい流れるものが欲しい。普通は 200 V, 200 mA もあれば充分であるが、たいていの電源は、スイッチングのとき過剰な電流が流れ、安全装置が働き切れてしまうらしい。Pharmacia や ATTO 製のものや核酸シークエンス用の大きなものがよい。電極と電源の間に、電極の向きを変えるためのパルスタイマーを入れ、CHEF の装置ではさらに Science の論文⁷⁾ にでていたとおりに抵抗が接続されている。FIGE⁹⁾ では、プログラマーが入ることになる。OFAGE や CHEF の場合、日本エイダーが作ってくれたパルスタイマーは、いろいろなモードの運転ができるようになっており、パルスのタイミングも秒単

位から, 時間単位までできるようになっている。通常, 100 kb から 2 000 kb くらいを分けるのには 1.5 分を使っているが, 短い DNA には短いパルス, 長い DNA には長いパルスを与えると良い。ちなみに 3 000 kb, 4 000 kb, 6 000 kb の 3 本の染色体を持つ *Schizosaccharomyces pombe* の DNA を分ける^{12), 13)} のには, 60 分のパルスで 150 時間も電気泳動をしたということである。もちろんこうした条件下では 100 kb-1 000 kb 程度の DNA はほとんど分離しない。パルスタイムと泳動時間の設定はかなり経験によるものが多く, どのくらい電流を流すかに大きく依存している。1.5%ゲルを使い 15℃, 200 V 定電圧, パルスタイム 1.5 min, 15 時間泳動というのかが CHEF で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の DNA 240 kb-3 000 kb を分離するための目安である (図 2, 図 4 参照)。

8. 染色体の分析への応用

ところがこうして, 手許にある二, 三の酵母の DNA を分離してみると, それぞれでパターンが異なっていることが分かる。同じ *Saccharomyces cerevisiae* と呼んでも, それぞれの染色体の長さにはかなりばらつきがある¹⁴⁾。中には 100 kb くらい長さが違っているように見えることもある。こうした染色体の長さの違いのある半数体の酵母同志の 2 倍体を作てやると, 両方のセットの染色体をきちんと持ち, バンドの数が増えてしまう。それではこの 2 倍体からでてきた 4 分胞子は, どういう染色体構成を取るのかと思うと, そう簡単ではないらしく, さらに複雑な染色体の分配のパターンが見られるようである^{15), 16)} (図 7)。そういうわけで, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の標準株としては, AB 972 を使うことにしている。これは Olson らのグループによって, すでに Not I と Sfi I の制限酵素地図ができあがってしまっているからであり, さらに各染色体のライブラリーによる微細な制限酵素地図の作製も進行中だからである¹⁷⁾。

このように, 酵母などの比較的小さな生物では, カリオタイプ (核型) の分析に使うことができる¹⁸⁾。実際トリパノゾーマ, マラリア病原虫などの原虫については, 酵母と並んで早くから研究が進められている¹⁹⁾⁻²¹⁾。こういうカリオタイプ分析の他に当初考えられたのは, DNA の複製や組み換えの中間体なども見つかるのではないかと^{22), 23)}ということもあり, とくに増幅したミニ染色体の解析にも用いられたようである²⁴⁾⁻²⁶⁾。また遺伝子のマッピングには好都合であり²⁷⁾, とくに広い領域にわたる遺伝子群の解析²⁵⁾⁻³¹⁾には, 今

図 7 酵母染色体構成の複雑さ
1, 2: 半数体酵母, 3: 1 と 2 の 2 倍体,
4-7: 3 に由来の 4 分胞子

後欠かせない技術となりそうである。

9. サンプルの調整

大腸菌や子牛胸腺から DNA を通常のフェノール抽出, エタノール沈殿法でとったことのある者なら誰でも, 巨大 DNA 分子を切断しないように取り扱うことが, 非常に難しいことを知っている。「ああ, これがかの Watson-Crick の言う遺伝子 DNA の本体か。」と感嘆に満ちた思いで, 白い糸状沈殿を見つめるとき, この巨大な DNA 分子は, もうすでに, さまざまな物理的力で引きさかれ本来の大きさをほとんどどめていないのである。

OFAGE で巨大な染色体 DNA 分子の解析を可能にしているのは, すべて損傷のない DNA 分子をいかに調製するかにかかっている。ここでは, 現在行われている三つの方法を実験に即して解説し, 各方法の特徴も述べてみたい。(以下 * 印の溶液の組成は表 1 にまとめて示した。)

9.1 アガロースブロック法^{3), 31), 14), 32)}

酵母を 5 ml の YPD 培地* で一晚培養し (対数増殖期をこえて静止期に達した細胞でかまわない), エッペンドルフチューブに集菌後, 上清の培地を十分除いてから 50 mM EDTA (pH 8.0) 1 ml で 2 回洗浄する。菌体を 150 μ l の SCE* に懸濁し, 50 μ l の溶液 I* と, 40℃ に保温した 1% 低融点アガロース (0.125 M EDTA pH 8.0 中) 0.5 ml を加えて全量を 1 ml とし均

表 1 サンプル調整に使用する溶液

YPD 培地	1%酵母エキス, 2%ペプトン, 2%ブドウ糖
SCE	1 M ソルビトール, 0.1 M クエン酸ナトリウム 0.06 M EDTA pH 7
溶液 I	10 ml SCE, 0.5 ml 2-メルカプトエタノール, 10 mg ザイモリエース 100T
溶液 II	46 ml 0.5 M EDTA pH 9 0.5 ml 1 M Tris HCl pH 8 4 ml 2-メルカプトエタノール
溶液 III	45 ml 0.5 M EDTA pH 9, 5 ml 10% Na ラウリルサルコシネート 0.5 ml 1 M Tris HCl pH 8, 50 mg プロティネース K (Boehringer Mannheim)
溶液 EC	6 mM Tris HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA pH 7.5 0.5% ブリッジ-58, 0.2% デオキシ コール酸, 0.5% サルコシル 1 mg/ml ライソザイム 20 µg/ml RNase
色素溶液	60% グリセリン 0.25 M EDTA pH 8, 0.05% BPB, 0.05% XC
SE	75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8
溶液 IV	1% サルコシル, 25 mM EDTA pH 8, 50 µg/ml プロティネース K
TE	10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8

一にしてから室温で固化する。このとき、繁用するサンプルウエルの幅に合わせたアガロース固化用容器(図1参照)を作製しておく、同時にいくつかのサンプル処理が可能になり便利である。成形されたアガロース・ブロックを試験管に取り出し、1 ml のアガロースブロックに対して、1 ml の溶液 II* を加え、密封し、37℃で一晩保温し、細胞壁を消化する。翌日、溶液 II を溶液 III* に置換し、軽く振盪しながら 50℃で一晩保温し、細胞膜の溶解ならびにプロティネース K による蛋白質の消化を行う。この操作後、サンプルゲルは透明度を増す。溶液 III を 0.5 M EDTA (pH 8.0) に変えて 4℃に保存する。サンプルブロックをカッターで切り出して分離用ゲルのサンプルウエルに埋め込んでから電気泳動槽へ移し、OFAGE を開始する。

細菌の DNA を扱う場合にはザイモリエース(溶液 I)の代りにライソザイム(リゾチーム)の入った溶液 EC* で処理したあと溶液 III に進む。ハエ全体やヒトの細胞でもこの方法でうまくいくそうである³²⁾。

9.2 溶液法⁴⁾

細胞の培養・集菌・洗浄まで 'A' と同じに行いエッペンドルフチューブ中に集めた細胞を 200 µl の SCE に懸濁し、3 µl の 2-メルカプトエタノールと 10 µl の 2 mg/ml ザイモリエース 100T (SCE に溶解) を加え攪拌後 37℃で 15 分間保温する。ここに 100 µl の 2% SDS を加えて、さらに 37℃で 15 分間保温する。最後に 30 µl の色素溶液* を加えて穏やかに回転しながら色素が均一になるよう混合する。サンプルをのせるときにはあらかじめ分離用ゲルを電気泳動槽中に沈め、サンプルウエル内に十分泳動バッファが入っていることを確かめ、先端を切って穴を大きくしたチップ

で静かに吸い取った DNA 溶液をサンプルウエルの底へ向かってゆっくりとのせる。あわててチップをぬきとると、DNA 溶液はいっしょにスーッとウエルから泳ぎ出してしまうので、最後まで気をぬいてはいけない。電気泳動開始後もバッファの攪拌は 1 時間ほど行わない方がよい。

9.3 アガロースビーズ法¹⁴⁾

酵母を 200 ml の YPD 培地で培養し、OD₆₀₀ が 1.0 に達したら集菌する。SE* 10 ml で 2 回洗浄し、菌体を 4 ml の SE に懸濁して 125 ml のエルレンマイヤーフラスコに移し、45℃に保温する。ここに 45℃に保温した 1% 低融点アガロース (SE 中) 5 ml を加えて混合し、つぎに 45℃に保温した 20 ml の流動パラフィンを加えて 30 秒間激しく攪拌して均一なエマルジョンを作る。これを 100 ml の氷冷した SE 中へ攪拌しながら注ぎ込み、アガロースをビーズ状にする。数分攪拌を続けたのち遠心管に移し、軽く遠心してビーズを集める。上部の流動パラフィンを捨てて、浮遊したビーズと遠心管の底に集まったビーズを先端を切った駒込ピペットで何回も吸い上げ押し上出して混ぜ合わせる。再び遠心すると大部分のビーズは沈殿として集まる。沈殿しないビーズと過剰なバッファを除去する。ビーズを 1 本の遠心管に集め、流動パラフィンを完全に除き(管壁はティッシュでふきとる)上清を捨てると約 5 ml のビーズができあがる。ここに 2-メルカプトエタノール 0.5 ml とザイモリエース 100T を 5 mg 加え、SE を加えて全量 10 ml とし、ビーズと混合したのち 37℃で 2 時間保温する。その後ビーズを再び遠心して集め、溶液 IV* を 20 ml 加えて、50℃一晩保温する。遠心して集めたビーズは、20 ml の TE* で十

図 8 バキューブロット装置³³⁾

分洗浄し, 同じバッファに懸濁して 4°C に保存する。

9.4 3 方法の比較

アガロースブロック法は, 全行程の完成に 2 日間かかるが, 操作が簡単で, また一回調製したサンプルは 2 - 3 か月は使用可能である。

溶液法は, サンプルを分離ゲルにのせるまでが 1 時間以内ですむ。サンプルをサンプルウェルにのせるときに, 多少の注意が必要である以外は, OFAGE の分離も悪くない。調製したサンプルは 1 回限りと思った方がよい。

アガロースビーズ法は, DNA をアガロースに埋め込んだ DNA 分子と各ステップで使用する種々の溶液との接触面積の拡大を図ったものである。ステップが多いのでとりかかりにくい, 今後さらに DNA を Not I や Sfi I などの制限酵素処理をするさいに反応時間の短縮が期待されるので有用と思われる。

9.5 マーカーとする λ ファージ DNA マルチマーの作製法

OFAGE の分子量マーカーとしては λ ファージ DNA を重合させ, 通常およそ 50 kb 間隔で梯状のバンドとなったものを使用する(図 4 参照)。約 1000 kb くらいまでのマーカーを得るためには DNA にして 0.2-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の λ ファージ粒子をアガロースブロックの中に直接埋め込み, 溶液Ⅲで処理する。あるいは, λ ファージ DNA を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.3M 食塩, 0.03M クエン酸ナトリウム, 3% Ficoll に溶かし, 37°C で 30 分温め, さらに室温で 18-24 時間放置したのちアガロースブロックに埋め込んだものを用いてもよい。どちらの場合もライゲース (リガーゼ) 処理の必要はない。

この他に T₄ ファージ DNA が約 170 kb のマーカーとなる。

10. 酵母染色体 DNA の解析例

ここでは, 著者らがクローンした酵母温度感受性変異株 ts 46 の遺伝子をプローブとして, 酵母染色体 DNA を CHEF で分離し, サザンハイブリダイゼーションを行った方法と結果を紹介する。

酵母細胞は 5 ml の YPD 培地で一晚培養し, 縦 20 mm 横 9 mm 厚さ 5

mmのアガロースブロックに成形し、縦 0.5-1.0 mm を切りとってサンプルウェルへ埋め込んだ。分離用ゲルは、0.5×TBE 中、1.5%のアガロースで作製し厚さ 5-7 mm、縦横 100 mm の大きさのものを作成した。泳動バッファは 0.5×TBE で泳動条件は、パルスタイム 1.5 分、180 V の定電圧、9℃で19時間であった。泳動後、ゲルを 0.5 μg/ml エチジウムブロミド溶液に 20-30 分漬けてからサンプルウェルの位置を 0 とし、ゲルのわきに定規をあてがい写真をとっておく。

このアガロースゲルから染色体 DNA をニトロセルロースメンブレンへトランスファーするには、通常の酸・アルカリ処理後、中和して、20×SSC (3 M 食塩、0.3 M クエン酸ナトリウム) で一晩ブロットングする方法で十分である。最近、著者らは、バキュプロット転写システムを用いて、トランスファーに要する時間を1時間以内に短縮し、とくに染色体サイズの大きな DNA が効率よくトランスファーされるようなので、合わせてここで紹介したい³³⁾。著者らの用いたバキュプロットの装置を図8に示す。バキュプロットでトランスファーするためには、あらかじめサンプルウェルを分離用ゲルと同じ濃度のアガロースで埋めるか、それが面倒な場合には、ウェルから上を切りとってしまうのがよい。サンプルウェルをアガロースで埋める場合には、ウェル内の水分をろ紙で十分に吸い取ってから融解したアガロースを加えて、前後左右のアガロースとの間にすき間を作らないようにすることが重要である。完全に埋まっていないとトランスファーバッファが、ここから流れ落ちてしまう。ウェルより上を切りとってしまうのは簡単だが、ゲルの下に敷くゴムシートが、ゲル周囲より約 5 mm 位内側に切られているので、ウェルから 5 mm 位までのトランスファーは、あきらめないといけない。いずれの場合にも、あらかじめメンブレンに印をつけて、ウェルの位置が確認できるようにしておくことが重要である。吸引装置は何を利用してよく、肝心なことは、ゲルがさけない程度の強さで、ゲルを通して流れ落ちたトランスファーバッファが指定量に達することである。標準的には、1%のアガロースゲル(10cm四方、厚さ0.5cm)からニトロセルロース系のメンブレンに移すには 1-2 ml/min の流速、真空度 64 kPa (水銀柱25cm) で40 ml のバッファが通過すればよいとされている。ここでは何も気にせずアスピレーターを使っている。真空が弱すぎると時間がかかる。トランスファー後のメンブレンの扱いは通常通りでよい。

図9は第1回目の OFAGE から得られた ts 46 遺伝

図9 ts 46(603)を使ったサザンハイブリダイゼーション

子のサザンハイブリダイゼーションの結果である。遺伝子が、第7番か第15番染色体上に位置することが分かる。著者らは、マッピングをさらに進めるため、第7番染色体と第15番染色体の長さの異なる菌株を選び出し、パルスタイムを1.5分、泳動時間を24時間に延長して、OFAGEを行った。図9bに、その結果を示す。このようにして ts 46 遺伝子が、第7番染色体に位置することが決定された。Not I, Sfi I で、第7番染色体を消化すれば、さらに詳細な ts 46 遺伝子のマッピングが可能である。

11. 特異性の高い制限酵素で大まかに切る

数 100 kb から数 1000 kb の DNA をもう少し小さ

い断片として解析する場合には, よく Sfi I, Not I と呼ばれる 8 塩基認識の制限酵素を使う¹⁷⁾。アガロースブロック内に埋め込まれた試料を充分にそれぞれの制限酵素に応じたバッファで洗い (アガロースブロックを数倍量のバッファ中に浸し, ゆっくりとゆするとよい), 平衡化したあとで制限酵素を加え, 一晚消化を行う。消化後は, 泳動用のバッファで洗った後, 電気泳動を行う。試料の入ったアガロースブロックをあらかじめサンプルウェルの大きさに細断しておくとしつたり酵素反応を行ったりする時間は短かくて済む。

いったん電気泳動を行って分離した DNA バンドを切り出し, 制限酵素処理を行うことも可能である。Olson からの私信によれば, 最初分離用ゲルは Bio-Rad の ultra pure DNA grade のアガロースを使い, 分離した DNA バンドの観察は, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロミドで20分間染色した後, 蒸留水で10分間脱色し調製用 302 nm の UV を照射し, しかるべきバンドを 5 mm $\times$ 2 mm $\times$ 30 mm の大きさに切り出す。このような用途に適した UV トランスイルミネータは, アメリカの Fotodyne 社が売り出しており, 数分間 UV 照射しても DNA にニックが入らないと言っている。切り出したアガロース片は, TE で充分洗い, エチジウムブロミドを除いたのち, 前述のように制限酵素用のバッファに置換し, 0.1 units/ μl の制限酵素と 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の BRL 製 BSA を加え, 8-12時間, 処方温度で反応させる。試料は 0.5 M EDTA (pH 8) の中に 4°C で貯えておくこともできるが, 電気泳動を行う前には泳動用のバッファで洗うとよい。

12. 大腸菌と酵母の全 DNA の制限酵素地図

大腸菌の DNA は約 5 000 kb の環状 DNA であるために, そのままでは試料としては使えず, たとえば, Not I, Sfi I などの大雑把に切る制限酵素で消化すると, 初めて PFG で十数本のバンドとなって解析することができる。大腸菌についてはすでに小原³⁴⁾によって 6 塩基認識の制限酵素によるほぼ完璧なマップができあがっているために, それより荒っぽいマップを作ってみてもさしたるインパクトはないように思われるが, もっと大きな DNA の制限酵素地図を作るのための手本にはなる。大腸菌 K 12 株は Sfi I で 28, Not I で 22 に断片化し, それぞれの断片の総計はおおよそ 4 700 kb となる³⁵⁾。Sfi I や Not I サイトを含む断片をクローン化しておけば, サザンハイブリダイゼーションで, どの断片とどの断片が隣接するか判定することもでき, Sfi I や Not I で得られた断片の

順序を推定できる³⁶⁾⁻³⁸⁾。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (DNA 断片の総約 14 650 kb) や *Schizosaccharomyces pombe* などではすでに Olson らのグループと柳田らのグループにより Sfi I と Not I の制限酵素地図が作られており, 今後はもっと大きな染色体を持つ生物の DNA が標的になることはまちがいない。また Not I や Sfi I のマップをもとにして, さらに 6 塩基認識の制限酵素による微細マップを作っていくことも可能で, こうすればランダムなクローニングをし, コンピュータを駆使してそれぞれの断片を並べていく場合よりも手軽に短時間でマップを作れるだろう。

13. 大きな DNA 断片をクローン化するには

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は, 240 kb (第 1 染色体) - 3 100 kb (第 12 染色体) にわたる 16 本の DNA がこの電気泳動法で確認され, 総計は 14 650 kb となる。遺伝学的には第 17 染色体があるとされているが, 実体は未だ見つからない。第 12 染色体には, 約 2 000 kb にわたる rDNA (1 単位は約 9 kb) がタンデムに連なった部分があるために電気泳動的に異様な挙動を示す。時には 2 番目に大きい第 4 染色体 1 630 kb よりも小さい位置に出てくることがあり, これは rDNA の部分が特別な構造をとりやすいからであると考えられている¹⁴⁾。現在使われている PFG のシステムでは, この大きさの範囲が好都合なので酵母の DNA が標準のマーカーとしてもよく使われる由縁である。

酵母の 1 本の染色体は, 基本的には, 両端のテロメア (TEL) と呼ばれる部分と染色体の分配と安定保持に必要なセントロメア (CEN) と呼ばれる部分と, DNA の複製起点となり得る ARS の三つの部分から成っている。逆に, 最低この三つがあれば, 酵母内で, 一つの染色体として機能し得ることになる。そこに適当な DNA を組み込んでやれば, 数 100 kb の DNA をクローン化できるベクター系となり, OFAGE を使えば, 酵母の染色体中に新しい DNA が加わったことも検出できるはずである。Olson ら³⁹⁾はこのような宿主-ベクター系を開発し, YAC (Yeast Artificial Chromosome) ベクターを使い, ヒトの DNA から 100 kb から 500 kb にわたる断片をクローン化し, 酵母の中で独立した染色体として保持されていることを示した。現在ベクターには 3 種類あり, pYAC 2, pYAC 3, pYAC 4 と名付けられているが, クローニングサイトが異なるだけで基本的な構造は図 10 に示す pYAC 2 と同じである。このベクターは pBR 322 に由来する Amp と ori を持っているため, 大腸菌の中でプラスミドと

図 10 数 100 kb の DNA をクローン化する方法³⁹⁾

して増やすことができる。酵母内では、ARS 1, TRP 1, CEN 4, URA 3, HIS 3, SUP 4, TEL を 1 対持っており、プラスミドとして増殖可能である。SUP 4 遺伝子内にあるクローニングサイト Sma I と HIS 遺伝子をはさむ Bam H I とで切り、他から Sma I の断片を持ち込みライゲーションをすれば、両端にテロメアを持つ直線状の DNA が得られ、標準的なスフェロプラスト法で酵母に送り込み、URA 3 と TRP 1 のマーカーを使って選択することができる。SUP 4 の遺伝子は、DNA の挿入により不活性化されるため、ade 2 ochre 変異株を宿主に使うと赤色のコロニーとして組み換え体を選びだすことができる。宿主に AB 1380 を使い、25 μ g のベクターに 12.5 μ g の DNA をライゲーションしたものを 5×10^7 個の細胞にトランスフォームして 1×10^4 のトランスフォーマントが得られ、適当に 48 個拾ってきた中で、16 個には予想通り 40 kb を超す DNA が取り込まれていたという。

14. さらに大きな DNA を扱うには

現在、コスミドを使ってクローニングをしたところでたかだか 50 kb が一つのベクターに納まり得る上限であるが、たとえばハエの体節化を調節する遺伝子は 320 kb、ヒトの血液凝固にかかわる領域は少なくとも 190 kb、Duchenne の筋萎縮症にかかわる遺伝子に関与

する遺伝子座は 1000 kb にわたるだろうと予測されている^{28), 29)}。こうした大きい DNA をクローンするための方法の第 1 歩はここで確立されたと言ってよい。

続く問題点は、制限酵素である。現在大きく DNA を切り出せるのは 8 塩基認識の Not I と Sfi I である。計算上 Not I のサイトは 3000 kb に 1 回のはずであるが、ヒトの DNA では、平均 200 kb の断片になってしまう⁴⁰⁾。Sfi I にしても予想以上にサイトの数があるらしい。まれな切断箇所を持つものとして Mlu I, BssH I Sac II, Nru II などがあるが、大概是 20 kb-40 kb に 1 か所の割でサイトがでてくる。もう少し大まかに

切ってくれる制限酵素はないものだろうか。

実際、制限酵素の探策はもうそろそろ限界にきているようである。蛋白質工学を使って制限酵素の特異性をきびしくしようという手もあるかも知れない。修飾酵素とうまく組み合わせて、制限酵素が部分的にしか働かないようにすることもできる。しかしもっと特異性の高い DNA 切断酵素があることを知っている。たとえば、 λ ファージのパッケージに使う cos サイトに働く A 蛋白質である。これは、少なくとも 12 塩基を認識する制限酵素のようにふるまう。あるいは組込みのときに働くインテグレースで、これは、15 塩基 (att) を認識する。認識するサイトを甘くして行くことはさほど難しくないのである。あるいはトランスポゾンを使って cos サイトや att サイトを染色体 DNA 上のあちこちに散りばめてやる方が簡単かも知れない。似たような働きは、さまざまな組み換え反応を行うところにてでくる。免疫グロブリンの V-C ジョイントのときに働く酵素もあるにちがいない。大きな DNA を相手にする技術は、やっと始まったばかりである。

文 献

- 1) Schwartz, D., Saffran, W., Welsh, J. et al.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47,

- 189-195 (1982)
- 2) Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F.: "Basic Method in Molecular Biology", Elsevier (1986)
- 3) Schwartz, D.C and Cantor, C.R.: *Cell*, **37**, 77-84 (1984)
- 4) Carle, G.F. and Olson, M.V.: *Nucl. Acids Res.*, **14**, 5647-5664 (1984)
- 5) Carle, G.F. and Olson, M.V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3756-3760 (1985)
- 6) Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V.: *Science*, **232**, 65-68 (1986)
- 7) Chu, G., Vollrath, D. and Davis, R.W.: *ibid.*, **234**, 1582-1585 (1986)
- 8) Gardiner, K., Laas, W. and Patterson, D.: *Somatic Cell and Molec. Genet.*, **12**, 185-195 (1986)
- 9) Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A. and Fletcher, D.S.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 5925-5943 (1987)
- 10) Gemmill, R.M., Coyle-Morris, J.F. and Mc-Peek, Jr., F.D.: *Gene Anal. Techn.*, **4**, 119-131 (1987)
- 11) Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B.: "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor (1986)
- 12) Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 4481-4489 (1987)
- 13) Vollrath, D. and Davis, R.W.: *ibid.*, **15**, 7865-7876 (1987)
- 14) Carle, G.F. and Olson, M.V.: *Methods in Enzymol.*, **155**, 468-482 (1987)
- 15) O'Rear, J. and Rine, J.: *Genetics*, **113**, 517-529 (1986)
- 16) Hoffmann, M., Zimmermann, M. and Emeis, C.-C.: *Curr. Genet.*, **11**, 599-603 (1987)
- 17) Olson, M.V., Dutchik, J.E. and Graham, M. Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7826-7830 (1986)
- 18) De Jonge, P., De Jonge, F.C.M. and Meijers, R.: *Yeast*, **2**, 193-204 (1986)
- 19) Majiwa, P.A.O., Young, J.R., Hamers, R. and Mathysens, G.: *Gene*, **41**, 183-192 (1986)
- 20) Giannini, S.H., Schittini, M., Keithly, J.S. et al.: *Science*, **232**, 762-765 (1986)
- 21) Johnson, P.J. and Borst, P.: *Gene*, **43**, 213-220 (1986)
- 22) Zakian, V.A., Blanton, H.M., Wetzel, L. and Dani, G.M.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 925-932 (1986)
- 23) Contopoulou, C.R., Cook, V.E. and Mortimer, R.K.: *Yeast*, **3**, 71-76 (1987)
- 24) Garvey, E.P. and Santi, D.V.: *Science*, **233**, 535-560 (1986)
- 25) Van der Blik, A.M., Van der Velde-Koerts, T., Ling, V. and Borst, P.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 1671-1678 (1986)
- 26) Borst, P., Van Der Blik, A.M., Van Der Velde-Koerts, T. and Hes, E.: *J. Cell. Biochem.*, **39**, 247-258 (1987)
- 27) Brown, W.R.A. and Bird, A.P.: *Nature*, **322**, 477-481 (1986)
- 28) van Ommen, G.J.B., Verberk, J.M.H., Hofker, M.H. et al.: *Cell*, **47**, 499-504 (1986)
- 29) Kenwrick, S., Patterson, M., Speer, A. et al.: *ibid.*, **48**, 351-357 (1987)
- 30) Lawrence, S.K., Smith, C.L., Srivastava, R., et al.: *Science*, **235**, 1387-1390 (1987)
- 31) Carroll, M.C., Katzman, P., Alicot, E.M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8535-8539 (1987)
- 32) Smith, C.L. and Cantor, C.R.: *Methods in Enzymol.*, **155**, 449-467 (1987)
- 33) Medveczky, P., Chang, C.W., Oste, C. and Mulder, C.: *Biotechniques*, **5**, 242-246 (1987)
- 34) Kohara, Y., Akiyama, K. and Isono, K.: *Cell*, **50**, 495-508 (1987)
- 35) Smith, C.L., Econome, J.G., Schutt, A. et al.: *Science*, **236**, 1448-1453 (1987)
- 36) Smith, C.L. and Cantor, C.R.: Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol., **51**, 115-122 (1986)
- 37) Lawrence, S.K., Srivastava, R., Rigas, B. et al.: *ibid.*, **51**, 123-129 (1986)
- 38) Ponska, A., Pohl, T., Barlow, D.P. et al.: *ibid.*, **51**, 131-139 (1986)
- 39) Burke, D.T., Carle, G.F. and Olson, M.V.: *Science*, **236**, 806-812 (1987)
- 40) Smith, D.I., Colembieski, W. and Gilbert, J. D.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1173-1184 (1987)