

ゲノムも読めます

長崎大学医学部附属動物実験施設

大沢一貴

《はじめに》

ATG でメチオニンに翻訳される云々という3つ組のコドン表を見つめながら、「地球上のすべての生命の共通祖先」を特定することを夢み、「タンパク合成技術を活用し、人類が新たな生命体を創出できないのはなぜか」と疑問を抱く生徒がいた。20年後、依然として塩基配列の決定(シーケンス)を実験の手段としている若輩者がいて、一方、世界に目を向けると、個体クローン技術によりやく花が咲いた。科学・技術の進歩は目覚ましくも、生命体の深遠さには足下にも及ばないようである。

ひと昔、「ある物質をコードする核酸をシーケンスする」ことは、肩書きにもなるような偉業であった。今日では、「シーケンスは、その物質の機能解明のための一合目」とみなされ、シーケンスはその分野の研究者であれば誰でもできて当然の研究手段となっている。このことは、「容易にシーケンスできるようになった」ことの裏返しであり、研究のスピードが、技術の進歩やその応用に大きく依存していることの傍証でもある。

著者が、塩基配列の決定技術を修得して未だ3年に満たない。この間にも、解読可能な塩基数がほぼ倍増し、シーケンスゲルを作製しなくとも可能なキャピラリー遺伝子解析装置が徐々に普及しつつある。しかしながら、解読塩基数や安定性では、ゲル電気泳動にまだ分があるようである。そこで今回は、ABI PRISM™377 DNA シークエンサー(パーキンエルマー社)を用いた、Dye-Terminator ラベル方式による解析法を具体的に紹介する。現状では、36cm 長ゲルで 800 塩基 × 36 レーン/8 時間のシーケンスが可能である。

昨年 of 当連載講座「PCR を始めませんか」を、本稿の前編と位置づけ、PCR に関する解説はなるべく省略する。また、「遺伝子の話題はうんざり」という貴兄には、図だけでも供覧されたい。

《Dye Terminator ラベル方式の原理と特徴》

ABI PRISM™377 DNA シークエンサーは、電気泳動装置と蛍光シグナル検出部とから構成されている。すなわち、RI を必要としない、通常の実験室で使用可能な蛍光シグナル解析型シーケエンサーである。この機種 of 最大 of 特徴は、4 色蛍光標識法(特許)を採用したことで、1 レーンで 1 サンプル of シークエンズが可能なことである。Dye Terminator 法というラベル方式を用いることで、この特徴を最大限生かすことができる。

概要はこうである。デオキシヌクレオチド(dNTPs)のアナログである4種類のジデオキシヌクレオチド(ddNTPs)が、別々の色の蛍光で標識されており、伸長反応の際に ddNTPs が取り込まれると、それ以上はもはや延伸できない。その結果、テンプレート、耐熱性ポリメラーゼ、プライマーと ddNTPs・dNTPs ミックスを混合して伸長反応を繰り返すと、1塩基ずつ長さが異なり、3'末端に一種類の蛍光色素を付随した DNA の集団が形成される。この DNA 群を変性アクリルアミド電気泳動で展開し、短い方から順番に泳動されてきた DNA の蛍光シグナルを検出、解析することでシーケンスが可能になるのである。

《PCR で標的らしき産物が回収できた場合のシーケンスの概要》

PCR を行い、幸運にも標的らしき産物がきれいなバンドとして増幅できた場合には、この DNA を回収し、これをテンプレートにしてシーケンスすることになる。

DNA の回収法には、

- a) キャピラリー電気泳動装置の利用
- b) 電氣的回収法
- c) ゲル溶解とガラスビーズ吸着の組み合わせ

などがある。a) は初期投資が必要で、b) は回収率が安定しないことから、著者はもっぱら c) の応用キット QIAEX (QIAGEN 社)を使用している。

1. ダイレクトシーケンス

PCR 産物が短い場合には(およそ 500 塩基以下程度)、この時用いた両端のプライマーでシーケンスできることが多い。もしできない場合でも、そのプライマーの 5'端を数塩基短くしたプライマー(16~18 塩基)でシーケンスすることをお勧めする。これが成功すれば、クローニングするよりはずっと時間と労力を節約できる。

それでも失敗に終わった場合には、クローニングせざるを得ない。ただし、失敗の原因を考えてみる必要がある。

テクニカルな失敗を除けば、

- a) 両端のプライマーシーケンスが完全には一致していなかった (PCR 産物を得るには、プライマーのシーケンスが完全に一致している必要はない)
- b) 標的の産物のみが増幅・回収できたと思っていたが、じつは複数の産物から構成されていた

などが考えらる。もし、原因が b) であればクローニングを選択せざるを得ない。a) であれば既知のシーケンスを参考にして、他のプライマーを設定し、あくまでもダイレクトシーケンスを目指すことは可能である

(good luck !).

2. 大腸菌でクローニング後、プラスミドのシーケンス

「クローニングなんて簡単だよ」という意見に賛成はするが、いざ始めようと思うと多少の覚悟が必要になる。PCR 産物のクローニングは a) PCR 産物の精製 b) 大腸菌の取扱い c) プラスミドの精製 などに安定した技術が要求される。現在ではほとんどの場合キットを利用すればよく、個々のテクニックは難しいものでは決してない。

PCR の増幅に Taq 系(Takara の ExTaq[®] も含む)の酵素を利用した場合には、TA クローニングが可能である。PCR 産物の末端に”A”がひとつだけ余計に付加されており(Taq 酵素の特徴)、クローニング用ベクターにはそれに対する”T”が付いている。その結果、効率的に PCR 産物がベクターに取り込まれるというものである。取り込まれたかどうかをコロニーの色でほぼ判定できる(blue-white selection)便利なキットが Invitrogen 社から市販されている(TA Cloning[®] Kit)。

ライゲーションの方法やコンピテント細胞のトランスフォーメーションなどは、マニュアルに譲る。ライゲーションの総量を半分に抑えたり、SOC 液量を減らして大腸菌の濃度を上げ、ガラスビーズで播種するなど、いくつかの工夫は成功している。ベクターの概要を図 1 に示す。

図 1. TA クローニング用ベクターの構造

V の部位に PCR 産物が挿入される。これによって、プロモーターと *lacZ* (ガラクトシダーゼ)のコード開始部位とが乖離し、当酵素が発現せずにコロニーが青くならない(白色)。従って、白いコロニーを選択すれば、高率で PCR 産物が挿入されたプラスミドが得られるはずである。



首尾良くクローニングに成功して、3 クローン以上でシーケンスができたとしても、クローン間でシーケンスが異なる結果になることが予想される。これは、クローニングの際に変異が生じたためで、回避しがたい宿命である。ただし、99%以上の精度でシーケンスが決定したのだから、ここで再度ダイレクトシーケンスにトライすることで、この問題は容易にクリアできる。

《PCR で標的らしき産物が回収できない場合のシーケンスの概要》

PCR用のプライマーをいくら設定しても、不運にも目的とする産物が得られなかった場合、a) *in vitro*での増殖可能なウイルスやバクテリアの場合、および特定の条件で発現が上昇することが明らかな場合には、mRNAを抽出し、ランダムプライマーを用いてディファレンシャルディスプレイ法(DDRT法)を試みる、b) mRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作製するなどの解決策が考えられる。いずれにしても片手間の仕事ではない。紙面の都合もあり、これらの詳細は、参考文献1)を参照していただきたい。

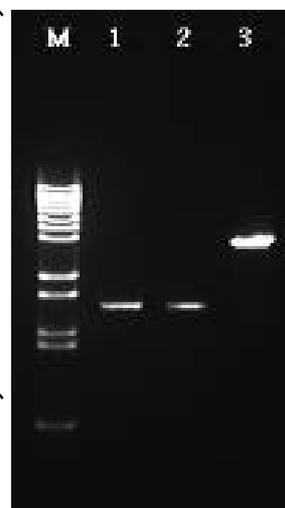
《さて、シーケンスを始めよう》

1. PCR産物からテンプレートを精製する

前述のQIAEX (QIAGEN社)のマニュアル通りでトラブルはない。ただ、高分解能のMetaPhorゲル(FMC社)の場合を除けば、ゲル溶解液(QX1)や洗浄液(PE)はマニュアルの1/3~1/2で充分である。また、PE液のアルコール濃度の低下が原因で、DNA回収率が落ちたことを経験している。

回収後、おおよそのDNA量を電気泳動で推定する必要がある。既知の濃度のマーカーを同時に泳動し、比例計算する(図2)。

図2. アガロースゲルでサンプル(各2 μ l)を泳動し、SyberGreenで染色した。Mは-BstP digest マーカーで、分子量の大きい方から8453、7242、6369、5687、4822、4324、3675、2323、1929、1371、1264、702 bpとなっている。DNAの全長は48502 bp。1のバンドの濃さは、1929bpバンドと、2のバンドは1371bpバンドと、3のバンドは8453bpバンドと同様と予想される。マーカーは100ng/2 μ lになるように調整したので、1のバンドのDNA量は $100 \times 1929/48502 = 4 \text{ ng}/2 \mu\text{l}$ となる。(株)アイシン・コスモ研究所の画像解析装置で解析したところ、1: 2.8 ng/2 μ l、2: 1.7 ng/2 μ l、3: 8.9 ng/2 μ l という結果を得た。シーケンスのテンプレート量推定には、目算でも充分である。



2. TAクローニングでテンプレートを作製する

TAクローニングの詳細もマニュアルに従えば失敗はない。最近、キットが改良されて、ライゲーションが室温、5分で完了するようになった(以前は14~4時間以上)。

大腸菌からプラスミドを抽出するにも有用なキットが市販されている。

QIAprep[®] (QUIAGEN 社)、GFX[™]Kit(ファルマシア社)、RPM[®]Kit(BIO101 社)などがある。いずれのキットもアルカリ-SDS 法を応用したもので、1 サンプルの処理が ¥150 程度である。キットを使用しない場合の処理液の処方等は文献 2)に詳しい。また、アルコールはシーケンス反応を阻害するので、プラスミド抽出液中への洗浄液の混入をできるだけ避けるようにしたい。プラスミドの抽出後、PCR 産物と同様に濃度を測定する。ただし、スーパーヘリックス構造をとったプラスミドの移動度は、通常の DNA 断片の移動度に一致しない。より正確を期すのであれば、1 カ所カット部位をもつ制限酵素で処理した後、その断片の長さおよび量を推定することになる。

3. シーケンス反応と反応産物の精製を行う (図 3)

サンプル数が多い場合や、まだ慣れないうちは、シーケンス前日までにシーケンス反応・精製まで済ませておくことをお勧めする。

1) プライマーの準備

シーケンス用のプライマー合成を依頼する(¥150~180/塩基)。プライマーは 16~20 塩基がよく用いられ、シーケンスのみに使用する場合は 16 塩基でよい。また、精製の程度もゲル濾過グレードで充分である。

プライマー購入後、濃度を 3.2pmole/μl に TE バッファーで調整する。例えば、購入時の添付書に 45nmoles 入りとあれば、凍結乾燥品の場合、450μl の TE バッファーに溶解すれば 100pmole/μl (PCR 用プライマーの濃度)に、さらにこれを 1μl とり TE バッファー 30μl で希釈すればシーケンス用の 3.2 pmole/μl に調整される。

2) 反応条件など

GeneAmp[®] PCR system 2400 および 9600(パーキンエルマー社) を用いた場合の反応条件を、図 3 右上に記した。他機種の場合は、マニュアルに詳しいが、温度勾配が急すぎても望ましくないようである。また、ブロックが 96 になってからチューブをマウントする必要がある(準ホットスタート)。

3) 反応産物の精製法は、図 3 を参照されたい。70%エタノールによる精製が、最も省コストであるが、他にもカラム精製法などがある。

プレミックスと称する試薬は、この 1 年間に二度も改良され、本稿が読者の手元に届く頃には BigDye[™]Sequencing キットが最新の試薬となっているであろう。当然、著者も使用経験がないのでコメントはできないが、今までの実績からも期待を裏切られることはないと思う。

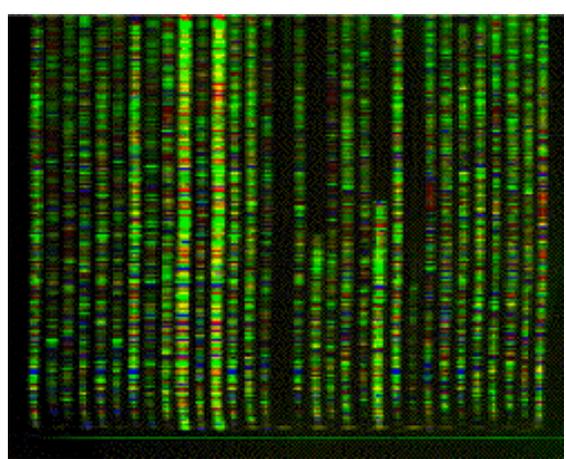
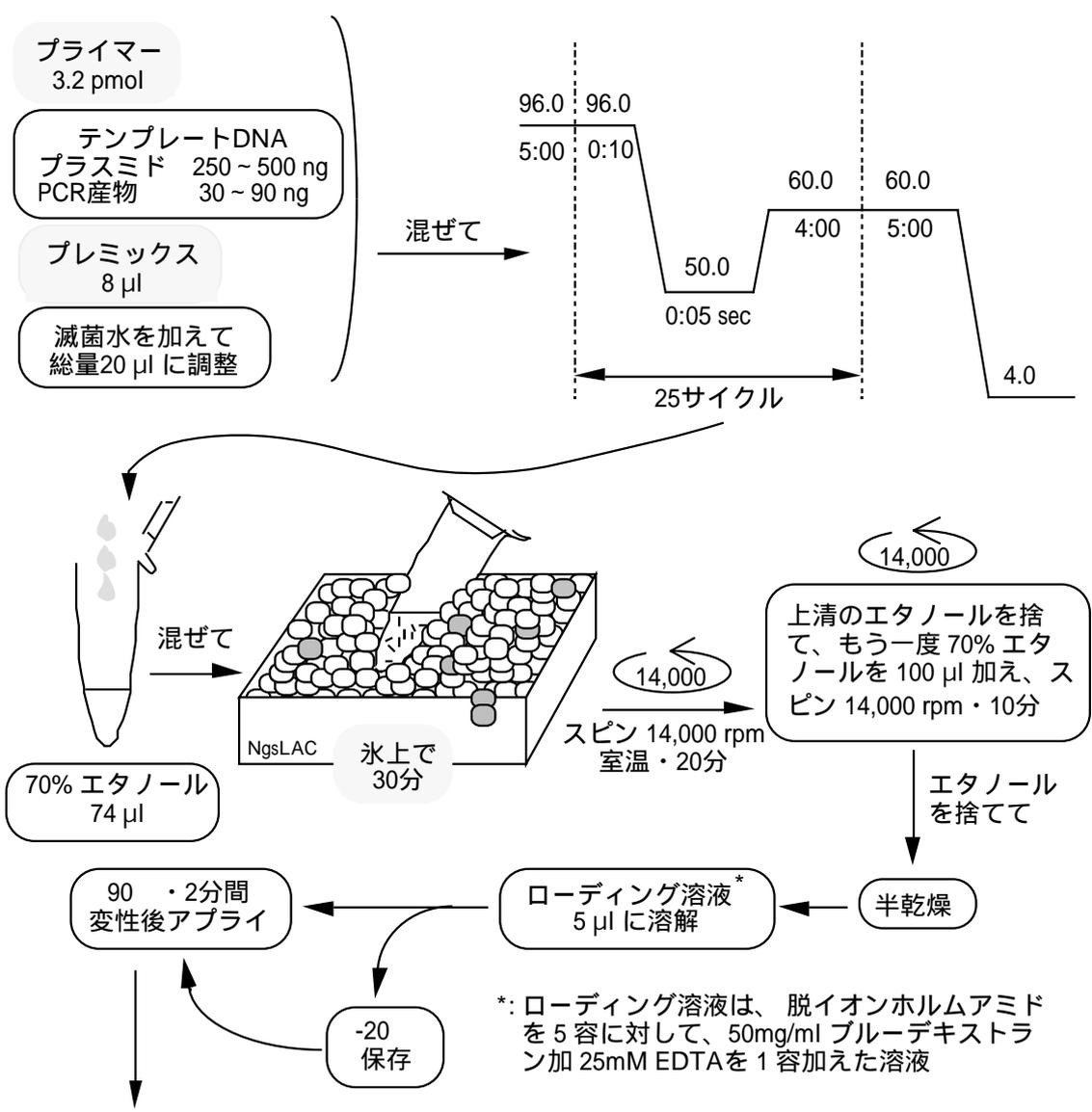


図3. シークエンス反応の概略

テンプレートの量が少ないと蛍光強度が低くなり、逆に多すぎても後半の解読効率が低下する。

70% エタノールで精製するとペレットが非常に見えにくい。チューブの内壁に粉がふいているように見えるのがそれである。

ローディング溶液に溶解後は、-20 で数週間以上保存可能である。

左のゲルでは、16レーンを除いた31サンプルでシークエンスに成功している。

4. ゲル板を組立て、ゲルを流し込む

ゲルの質がシークエンスの成功・不成功を大きく左右する。ゴミや気泡がゲルに混入している場合は、局所的にゲル化せず、そのレーンが使用不能になる。それに気付かずにサンプルをアプライしていた場合、解読できないばかりか隣接するレーンにずれ込んで、自動解読を妨害することになる。ゲルの作製には、「赤子泣いても・・・」の覚悟と細心の注意が求められる。

ゲルの作製デバイス一式として、ゲルカセット(ゲル板の運搬や本体セットの際に使用する)、ガラス板(プレーンとノッチ)、スペーサー(**0.2mm**)、シヤークティースコーム(**0.2mm**)は、最低限必要である。新規に購入したガラス板は、水酸化カリウム飽和のエタノールで拭いた後、洗剤(**BIO NOX** あるいはクリームクレンザージフ)をつけて柔らかいスポンジ洗浄し、洗剤をよく落としのち蒸留水を通して乾燥させておく。また、表裏を混同しないように予め表側の適所にシールを貼っておくことをお勧めする。台所用合成洗剤(蛍光物質入り)、粉末クレンザーおよびたわし類(ガラスに傷)の使用は禁忌とされている。

ゲル板組立ての詳細は、マニュアルに譲る。

ゲルは以下の要領で作製する。未重合のゲル(ゾル)は神経毒なので、手袋をする等の配慮が必要である。

尿素	18 g
10x TBE バッファー	5 ml
蒸留水	約 32 ml
50% Long Ranger 液(宝酒造社)	5 ml

をスターラーを入れて攪拌・溶解する。加温せずとも尿素は容易に溶解する。**0.2 μ m** 経のニトロセルロースフィルター(ナルゲン社のフィルターウェア™やミリポア社のステリカップ™など)で吸引濾過し、濾過後 10 分間放置する(気泡の除去)。その後、フィルターをはずして

10% 過硫酸アンモニウム(APS)水溶液	250 μ l
TEMED	25 μ l

を加え、気泡が入らないように軽く混和する。**50 ml** のシリンジで **20 ml** 吸引し、図 4 の様にして組立てたゲル板の間隙にすべり込ませる。ゲル板が指紋などで汚れることなく清潔なままであったならば、ほぼ滞りなくゲルが完成するはずである。

ゲル化は 2~3 時間で完了するので (APS/TEMED の量で調整も可能)、速やかに使用する。6 時間以上経過したゲルは、使用しない方が無難である。

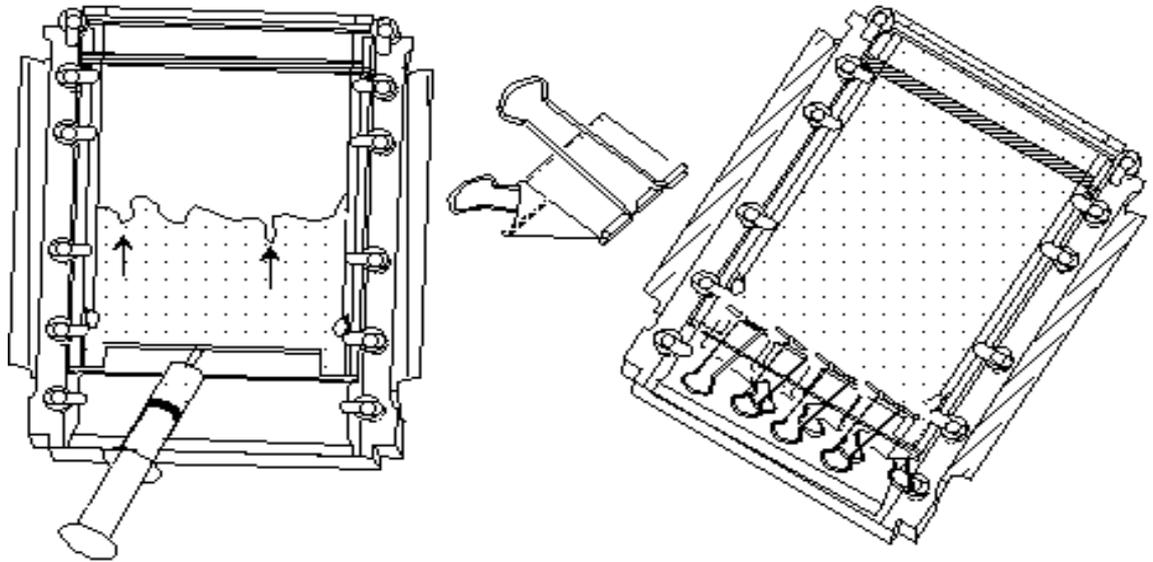


図4. ゲル板より小さく低い台(発泡スチロールなど)にゲル板をゲルカセットにセットして置く。ゲルの入ったシリンジとカセットを左手で同時に握り、ゲルを徐々に流し込む。ゲル板を傾けるとゲルの進行は早くなるので、はじめのうちはほとんど水平でよい。途中で気泡が入りそうになったら(矢印)、水平にして矢尻辺りを軽くたたく。その時にも、なるべく指紋やゲルが付着しないよう配慮する。スペーサーの角部分に大きな気泡が入るが、これは放置してよい(サンプル泳動初期の整流、オートトラッキング率アップのためと思われる)。最後に、コームのスムーズな側を差し込んでゲル化を待つが、この時ダブルクリップ(超特大)でコーム部分を押しえつけることを忘れてはならない。これを忘れると、ひとつのサンプルが両側のレーンに漏れ出し、多サンプルの同時シーケンスはほとんど不可能になってしまう。

5. シークエンサーと格闘する

マニュアルに詳しいので、トラブルを起こしやすいポイントだけを指摘する。

1) ゲル板の汚れの大半が、ゲルと指紋と思われる。ガラス面の隅々まで拭こうとするよりも、検出部位面だけを特に清浄に保つことを心がけるべきである。検出部位には、「汚れを付けず・持ち込まず」ということである。ときには、ゲル板の内面が汚れていることもあるので、あきらめも肝要である。検出部位面には、イソプロパノールの付いたキムワイパー以外には、何物にも接触させないことが成功への近道である。

- 2) イソプロパノールの乾燥が不十分な場合、プレートチェックの際にベースラインが緩やかなカーブを描くことがある。通常、時間の経過とともに揮発してベースラインは平坦に回復する。
- 3) ゲル板をシークエンサー本体に設置する以前に、シャークコームをセットする。設置してからはゲル端がまったく見えなくなってしまう。また、コームの先がゲル端に**0.5mm**程度入り込むようセットする。深く入れすぎると自動解析の妨げとなるので注意する。
- 4) 上下のチャンバーに注ぐ**TBE**バッファは約**1.2L**。バッファが少ないと、泳動の途中で通電不良のために自動停止してしまう(次の日、愕然とした経験あり)。多すぎても、アップバッファがゲル板の耳を伝わり同様の結果になる。

6. 結果の解析

シーケンス結果が首尾良く印刷されている光景は、なかなかおつなものである。

自動解析が終了すると、ゲルファイル(約**20MB**)とレーン毎のサンプルファイルが作成される。まず、ゲルファイルを開いてトラッキングが予定のレーンに載っているかを確認する。隣のレーンを解析している場合には、再度トラッキング(待ち時間は、長く感ずる!)するか、あるいはそれらを踏まえて解析を進めるかのいずれかである。シグナルが弱過ぎる場合は、再度シーケンス反応から試みるより致し方ない。サンプルファイルは、**図5**に示すウィンドウなどから構成されている。詳細については、マニュアルに譲る。

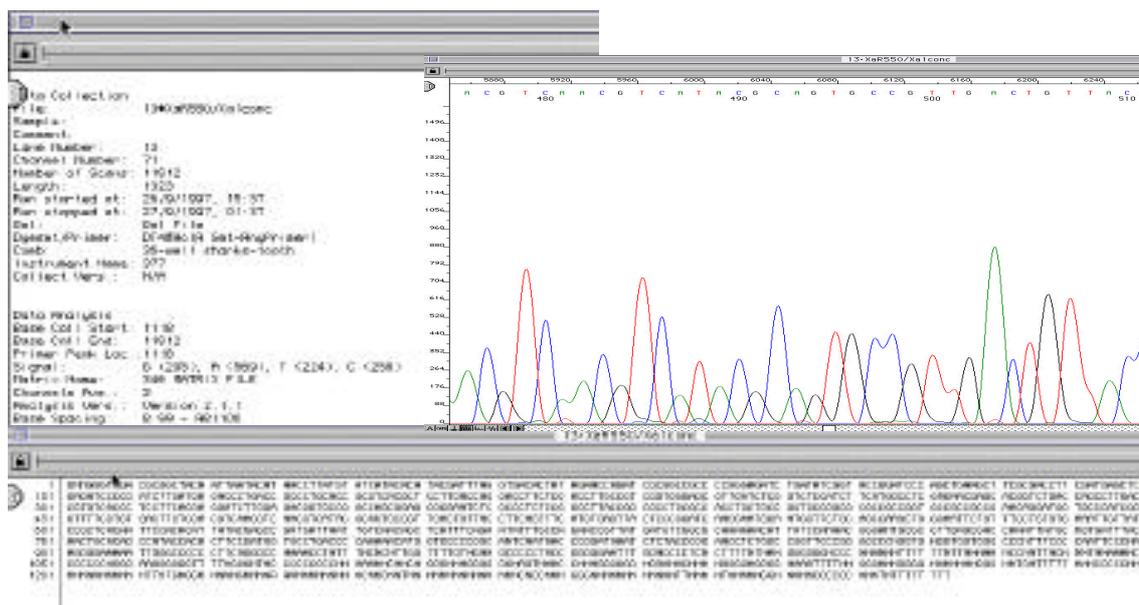


図 5 右上から反時計回りに、**Electropherogram** 表示、**Annotation** 表示 (解析情報)、シーケンス表示である。このほかに、生データ表示、**EPT** 表示(電圧、電流など)がある。**Electropherogram** 表示の上辺のシーケンスを手入力で修正すると、シーケンス表示が連動して変化し、保存することができる。慣れてくると、機械では解読でない「N」表示でも、前後の **Electropherogram** から類推することができる。

7. まとめ

「シーケンスは誰でもできる」と述べたが、ほとんどの実験者にとっては、一度聞いただけでできるものでは決してないであろう。陥りやすい箇所がいくつか点在している。失敗しても、その精神的ショックにめげることなく、何度もチャレンジしていただきたい。各自で、失敗した落とし穴を確認することによって熟練度が飛躍的に上昇する。まず、「1人でなんとかできるようになる」ことを目標に健闘を祈る。

参考文献

- 1) バイオ実験イラストレイテッド 苦勞なしのクローニング 真壁和裕著 秀潤社
- 2) バイオ実験イラストレイテッド 遺伝子解析の基礎 中山広樹 西方敬人著 秀潤社
- 3) **ABI PRISM™377 DNA Sequencing System** 取り扱い説明書