

遺伝子操作技術(Recombinant DNA Technology)

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	米澤, 保雄
巻/号	37巻3号
掲載ページ	p. 168-171
発行年月	1984年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



文 献

1) DONE, J. T.: *Vet. Rec.*, 67, 525~527 (1955).
 2) KONNO, S., FUGIWARA, H., KOEDA, T.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 12, 89~94 (1972).

3) 清水 健, 前田 稔: 豚病学, 熊谷哲夫ら編, 第1版, 422~437, 近代出版 (1979).
 4) YOSHIKAWA, T., HANADA, T.: *Jap. J. Vet. Sci.*, 39, 47~58 (1977).

技術講座

遺 伝 子 操 作 技 術 (Recombinant DNA technology)

I. 核 酸 (DNA) 分 析 の 実 際

米 澤 保 雄*

近年, 遺伝子操作技術 (Recombinant DNA technology)⁹⁾ がその成果とともに発表されているが, この基礎技術となっているのが DNA 分析である. DNA 分析とは, 制限分解酵素による DNA の特異的分解法とその電気泳動法 (アガロースゲル電気泳動法) によって, 成立する技術である. この技術は, 遺伝子操作技術とは違い, ほんの少しの機器があれば, どこでも行い得るものであり, 獣医畜産分野でも利用できるものと考え. 遺伝子の制限分解酵素による分析法は, 遺伝子操作技術確立までの過程において, 微生物の遺伝学上発見されたものである. 1968年に MESELSON と YUAN²⁾ により大腸菌 K 株から制限分解酵素が分離され, 次いで SMITH¹⁾ らがヘモウイルス菌より分離した制限分解酵素が特異的な塩基配列部位で DNA を切断することが認められ, さらに NATHANS ら⁶⁾ によって制限分解酵素が DNA 構造研究に利用可能であることが明らかにされた. そして, 遺伝子操作技術に至るまでの間, 細菌の R 因子 (耐性因子) の解析や, バクテリオファージの解析等に用いられてきた. 本稿では, 著者が行っている DNA の制限分解酵素による分析法の実際の簡略な説明を試み, さらに現在の応用の現況を示すことによって, 獣医畜産分野での利用の可能性を考えてみた.

1. DNA 制限分解酵素分析の基礎

1) 制限分解酵素

制限酵素はその作用特異性によって, 大きく次の2群に分けられる. その一つは, I型制限分解酵素で分子量が約30万のものが多く, その活性発現に Mg^{2+} , TAP, S-アデノシルメチオニン (SAM) が必要である. I型制限酵素は DNA 分子内で認識する塩基配列部位とホスホ

ジエステル結合を切断する部位とが異なり, その切断点が一定でないので, 特定の分子量を生成することができない. よって, 現在の DNA 分析法への利用には興味を示されなくなった (これが先に述べた MESELSON & YUAN らが発見した酵素の型である).

他の一つは II型制限分解酵素で, 分子量が約2万~10万のものが多く, 活性発現に Mg^{2+} のみを必要とし, 2本鎖 DNA 分子内の特定の塩基配列 (3~6個の中央を

表1 よく用いられている II 型 酵 素

Restriction Endonucleases	起 源
Acc I, Alu I	Acinetobactor, Arthrobactor
Ava I, Ava II	Anabaena, ibid
Bam HI, Bgl I	<i>B. amyloliquefaciens</i> H, <i>B. globigii</i>
Bgl II, Bst EII	<i>B. globigii</i> , <i>B. stearothermophilus</i>
Eco RI, Fok I	<i>E. coli</i> RY13, Flavobacterium
Hae III, Hha I	Haemophilus, ibid
Hinc II, Hind III	<i>Haemophilus influenzae</i> , ibid
Hinf I, Hpa I	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>H. parainfluenza</i>
Mlu I, Msp I	<i>Micrococcus luteus</i> , Maraxella species
Pst I, Psa I	<i>Proridencia stuartii</i> , Rhodopseudomonas
Sac I, Sau 3AI	Streptomyces, Staphylococcus
Sau 96I, Stu I	Staphylococcus, <i>Streptomyces tubercidicus</i>
Taq I, Xba I	<i>Thermus aquaticus</i> , <i>Xanthomonas badrii</i>
Xho I	<i>Xanthomonas holcicola</i>

注) これらの酵素の 1 unit は, 反応混合液 50 μ l 中 1.0 μ g の λ -DNA (バクテリオファージ λ の DNA) を 37 $^{\circ}$ C, 60分間で完全に消化するものが多い. 条件の異なるものは温度である.

* 日本全薬工業株式会社・中央研究所 (福島県郡山市安積町笹川字平の上1-1)

軸とした2回転対称を示す)を正確に認識し、その配列内またはその隣接部位で切断する。多くの場合、この認識配列の中で数ヌクレオチド離れた部位の2本鎖を切断し、相互に相補的な塩基配列を持つ1本鎖部分(付着末端:Cohesive end)をもつDNAを生成する(これが、先に述べたSMITHらが発見した酵素の型である)。

このI型、II型のうち、DNA分析に使われるのはII型であるが、これをsite-specific endonucleaseと呼ぶ。II型酵素は1970年以後続々と発見され、ROBERTS⁴⁾の分類によるとその数は200以上あり、特異性による分類では50を越えている。表1によく用いられているII型酵素を示した。著者らの研究室では、発売元が和光純薬工業(株)である(株)ニッポンジーンのものを利用している。これは、国内品として品質もよく、低価であるので使用するには好都合であった。

2) 酵素活性測定法

現在行われている方法(著者らも同じである)は、1973年にSHARPら⁵⁾によって報告されたもので、制限分解酵素で処理したDNAをアガロース・ゲル電気泳動を行い、切断されたDNAの分子量の差によって泳動値が異なるので、これをエチジウムブロマイド(Ethidium Bromide)の存在下で紫外線照射によって生ずる蛍光を写真撮影し、泳動バンドとして検出する方法である。この方法は以下のような特徴を有する。

(A) 基質DNAと酵素の組合せによりバンド列の並び方が決まることから、制限酵素の特異性を容易に測定することができる。

(B) 反応の進行に伴い、切断バンドの現われ方(電気泳動パターン)が変化するので、酵素反応の進行の判定ができ、またバンドの出現順序とパターンを構成するDNA断片の分子量(DNAの分子量マーカーとの同時泳動により算出できる)から、DNA鎖上の切断部位の位置を決めることができる。

(C) 平板ゲルを用いれば、多検体を同時に短時間(1~2時間)で操作し検出できる。

本方法がDNAの制限分解酵素によるDNAの分析法の基本である。また、制限酵素の反応で注意すべき点は、

① DNAの切断型式が、酵素によっては緩衝液の濃度、pHおよび1価イオンの濃度により変化する(例えばEcoR I, Ava II, Bam HIなど)。② 酵素が希釈された状態では反応液中で極めて不安定となり、ゼラチンまたは血清アルブミンなどの添加が必要な場合がある(例えばEcoR II)。③ 至適温度の高いものが存在する(例えばTha I, Bst I, Tag I, Bcl I)。④ 酵素反応にNaClが必須のものが存在する(例えばSal I, Sac I, Sst I)等である。制限分解酵素の反応条件については、Bethesda Research Laboratories Inc. (BRL), ニッポンジーン、和光純薬工業、等のreference chartが便利である。

2. DNA制限分解酵素による分析の実例

ここでは、著者の研究室で行っている水平型平板アガロースゲル電気泳動法について述べる。

1) DNA試料液の着色

DNAまたはDNA分解後溶液を0.02~0.06%のプロムフェノールブルー(BPB)で着色する。これはDNA溶液をゲルに添加する時にマーカーとなり、泳動中の状態を観察できるので便利である。しかし、分子量の小さいDNA断片の場合はBPBよりも速く泳動するので、DNAそのものの泳動マーカーにはならない。

2) アガロースゲルの調整

アガロース粉末(市販、電気泳動用)を緩衝液(Tris-ホウ酸緩衝液、Tris-酢酸緩衝液、Tris-リン酸緩衝液等:表2参照)に入れ、加熱して溶解する。この溶解条件は、普通はバーナーで加熱してもよいが、好ましいのは、電子レンジによって完全溶解させることである。そして、50~60℃に冷してから、泳動板に載せるように流すとよい。アガロース濃度はその分析の目的にもよるが、0.7~0.8%を著者は用いている(アガロースは、和光純薬、Bio-Rad, Sigmaのものが購入しやすい)。

3) 装置と泳動

水平型平板アガロース・ゲル電気泳動法では、ガラス製またはアクリル性平板を用いる。図1はアクリル性の平板を用いる装置である。手順は以下のようなものである。

① 両端にアクリル棒を接着した平板に、アクリル棒で開いている方の両端をクリップでとめ、薄型の箱をつくり、これを水平に置く。② 溶解したアガロースを平板の中央部から広げるように流す。③ 櫛(サンプル穴を作る)を垂直に差し込み30分~50分間放置して、アガロースを固化させる。④ 櫛をゆっくり持ち上げて、ゲル

表2 電気泳動用緩衝液

(A) Tris-Borate Buffer (トリス-ホウ酸緩衝液)			
890 mM	Tris		108 g
890 mM	ホウ酸		55 g
25 mM	EDTA-2 Na		9.3 g
pH 8.3			//
(B) Tris-Acetate Buffer (トリス-酢酸緩衝液)			
400 mM	Tris		48.4 g
50 mM	酢酸ナトリウム (3H ₂ O)		6.8 g
10 mM	EDTA-2 Na		3.7 g
pH 7.8~8.3			//
(C) Tris-Phosphate Buffer (トリス-リン酸緩衝液)			
360 mM	Tris		43.6 g
320 mM	リン酸一カリウム		43.5 g
10 mM	EDTA-2 Na		3.7 g
pH 7.8			//

注) (B)は氷酢酸で、(C)はKOHでpHを調整する必要がある。

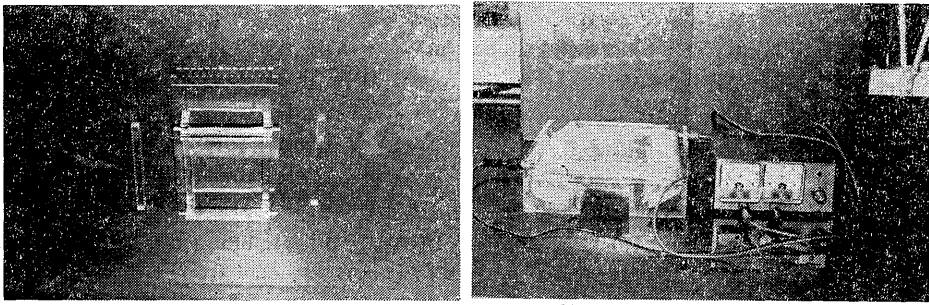


図1 水平型平板アガロース・ゲル電気泳動装置
左：組み立て前 右：組み立て後

より抜く。⑤ アガロース平板を緩衝液でぬらし、その両端を濾紙で緩衝液槽と連結する。⑥ サンプル穴にグリセリン含有の BPB をマイクロペッターを用いて添加する。⑦ パワーサプライ (定電圧定電流電源) と緩衝液槽とを連結し通電する (これは、先に述べたように、BPB が DNA 断片より泳動が遅いため、アガロース平板のでき具合をチェックするためである)。⑧ BPB がアガロース中を泳動し始めたとき、まっすぐであれば、サンプル穴に緩衝液を注入し、BPB とグリセリン含有の DNA 試料溶液を添加する。アガロース表面の乾燥を防ぐために、サララップでおおい泳動する。普通、本装置の場合、0.8%アガロースゲルでは 50 mA で 4~5 時間泳動する。⑨ 泳動が終了したら、平板をはずし、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μg/ml 程度) の中でゲルをはずし、20~30分間浸漬する。⑩ 浸漬した後、よく水洗する。254 nm の紫外線を照射し、生成する蛍光を Y.3 フィルターを通してバンドを写真撮影する。

これらの装置については、自作のもので十分可能である。市販品では、和科盛 (株) または最近販売された ADVANCE の超小型電気泳動システム《ミュービット》も安価であり、ルーチン化できるものにはよい。筆者は和科盛 (株) のものを主に用いている。

ウイルスの分野では、血清学的に極めて類似しているウイルスの分類に、細菌の分野では、R 因子 (薬剤耐性因子)、毒素産生因子、および感染時に関与する付着因子等の解析に用いられている。ウイルス分野では、ロタウイルスやパルボウイルスについて次のようなことが報告されている。ロタウイルスでは FLEWETT ら⁷⁾ が 25 の標準株の RNA 分析を行い、電気泳動型パターンにより、人型、牛型、マウス型に分け、これらの組織培養に適応させた株とを比較分類し、さらに、これらについて免疫学的 (ELISA: 酵素免疫測定法) 検討を行い、差異を見だしている。また、パルボウイルスでは、TRATSHIN ら⁸⁾ や MITRA ら⁹⁾ によって宿主の異なるウイルスの相同性を研究し、ウイルス感染の起源を考察して

いる。

具体例として、筆者らが行った Canine Adeno virus (犬アデノウイルス) の制限分解酵素でのパターン分析の結果¹⁰⁾を述べる。これは、犬アデノウイルスの弱毒株 (ワクチン株) と強毒株 (野外株を含む) をその制限分解酵素分析で比較したものであり、弱毒株と強毒株において DNA 上の差異が存在することを示唆した。以下、著者らの報告の概略を示す。

アデノウイルスからの DNA の抽出は、MARMONER らの Phenol 法で行い、これの水層部分よりエタノール沈殿により DNA をベレットで回収し、これに制限酵素 (Pvu II) の Functional buffer として 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (5 mM MgCl₂, 5 mM 2-メルカプトエタノール, 0.2 M EDTA) pH 7.5 を加え、Pvu II (5'-CAG CTG-3' / 3'-GTC GAC-5')

により 37°C で 50 分反応させて切断した後、10 mM になるように EDTA 溶液を加えて反応を停止し、最終濃度 80% になるようにしょ糖溶液を加えて、0.8% のアガロース平板で電気泳動を行った。その結果を図 2 に示したが、弱毒株と強毒株とで DNA 断片上に差異が認められ

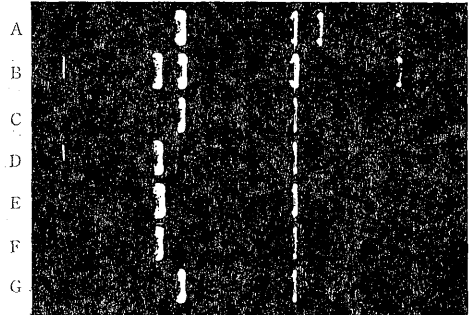


図2 犬アデノウイルスの Pvu II 切断パターン
0.8%アガロース・ゲルにて 40 mA, 5 時間泳動した。A: 弱毒株 B: 強毒株 C・G: 野外株で神経症状を呈する犬より分離 D・E・F: 野外株で下痢症状を呈する犬より分離

た。また、野外株のうち、神経症状型と下痢症型とで異なっているかもしれないことを示唆した。現在、これらのことを報告するべく調製中である。

実際に DNA 分析を行ってみようと考えられる方々のために、国内で容易に入手できる実験書を、下記に示した（出版年代順）。

a) 核酸実験法(上)：石浜 明, 岡崎令泊, 京極好正, 西村 運編, 蛋白質, 核酸, 酵素, 別冊, 共立出版(1972)。

b) *Methods in Enzymology, Vol. 68, Recombinant DNA by Ray Wu*, Academic Press (1979)。

c) *A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics* by R. W. DAVIS, D. BOSTSTEIN and J. R. ROTH, Cold Spring Harbor Laboratory: New York (1980)。

d) 遺伝子操作実験法, 高木康敬編著：講談社サンエントフィク(1980)。

e) *Methods in Enzymology, Vol. 65, Nucleic acid Part I*, by LAWRENC GROSSMAN and KINIE MOLDANE (1981)。

f) *Gel electrophoresis of nucleic acid: A practical approach*, by D. RICKWOOD and B. D. HAMES, IRL press (1982)。

g) *Recombinant DNA Techniques: An Introduction*, by RAYMOND, L. et al., ADDISON-WESLEY Publishing Company (1983)。

以上のように DNA 分析は制限分解酵素を用いて行う酵素分析法である。これを行うのには、試料（生物体：体細胞、ウイルス、細菌等）からの適切な核酸の抽出法、精製および濃縮法等を完全に行う必要があり、次に制限酵素という、特殊な酵素をえての各々の反応条件に合わせて用いることが必要である。よって、一度の分析例から結果をだすのではなく、その試料に適した方法を見いだすことが意外に困難であるが、その基本的な方法技術は上述のように容易なものである。

最後に現在、種々の分野で遺伝子分析法が用いられ、

その対象も微生物、ウイルス、植物、動物細胞と、生物のすべてをカバーするものとなってきた現状では、より精密な遺伝子分析が求められるとともに、反対により簡単な方法が確立しつつある。現在、不明または不明瞭な動物の疾病、感染症等にこれらの技術の利用によって明確化され、診断できるようになることを望む。

基礎微生物（微生物遺伝学）の仕事を行ってきた小生に、獣医学（臨床を含む）との接点を与えて下さった北里大学獣医学研究所の久米教授、日本獣医畜産大学の本好教授、並びに当社研究所の根本 久博士・臼井和哉博士に感謝致します。

<付>本稿では遺伝子操作技術の柱の一つである DNA の分析を述べたが、II. として本技術を基礎に発展した組換え DNA 技術に関して述べたい。

参 考 文 献

- 1) KELLY, T. J. and SMITH, O.: *J. H. Mol. Biol.*, 51, 393~398 (1970).
- 2) MESELSON and R. YUAN: *Nature*, 217, 1110~1111 (1968).
- 3) MITRA, S., SNYDER, C. E., BATES, R. C., et al.: *J. Gen. Virol.*, 61, 43~54 (1982).
- 4) ROBERTS, R. J.: *Gene*, 8, 329~332 (1981).
- 5) SHARP, P. A., SUGDEN, B. and SAMBROOK, J.: *Biochemistry*, 12, 3055~3061 (1973).
- 6) SMITH, H. O. and NATHAS, D.: *J. Mol. Biol.*, 81, 419~424 (1973).
- 7) THOULESS, M. E., BEABDS, G. M. and FLEWETT, T. H.: *Achines of Virol.*, 73, 219~230 (1982).
- 8) TRATSCHIN, J. D., MEMASTER, G. K., KRONAUER, G., et al.: *J. Gen. Virol.*, 61, 33~41 (1982).
- 9) WETZEL, R.: *American Scientist*, 69, 664~675 (1981).
- 10) 米澤保雄, 松崎由利子, 斉藤 亮, ほか: 日本獣医学会 (秋) (1983)。