

巨大な核酸分子の電気泳動

金子 嘉信

タンパク質の電気泳動についてはすでにこのシリーズで紹介されているので¹⁾、今回はタンパク質ではなく、核酸の電気泳動について話題提供したい。それもふつうの核酸電気泳動ではなく、たとえば出芽酵母の染色体DNAのような数百から数千キロ塩基対 (kb) という巨大サイズのDNA分子をそのまま泳動して分別できるアガロースゲル電気泳動法である。

大きなDNA分子の圧縮ゾーン

遺伝子組換え実験では、日常的にDNA分子をアガロースゲル電気泳動で調べたり、精製調製したりしている。その時、ふつう1%程度の濃度のアガロースゲルをつくって、泳動槽の陰極と陽極の電極間に置き、100 V前後の電圧をかけて泳動を行う。この通常の電気泳動条件では、DNA分子はそのサイズの対数に反比例してゲル中を移動していくことが知られている。しかし、あるサイズより大きなDNA分子ではこの関係が成り立たなくなり、大きなDNA分子はほとんどすべて同じ移動距離を示し、圧縮ゾーンを形成する。SDS-酢酸カリウム法で調製した出芽酵母染色体DNA (無傷だと200–2000

kbの16本染色体) を切断処理しないで電気泳動すると、図1に示すように λ ファージDNA *Hind*III断片の23.1 kbバンド付近にバンド形成する。つまり、この泳動条件では20 kb以上の大きなサイズのDNA分子はもう大きさによって分離することができず、同じ位置 (圧縮ゾーン) に移動してしまうわけである。アガロース濃度を低くすることにより、この圧縮ゾーンサイズを50 kbくらいまではあげることができるが、ゲル強度が低下し、取扱いが非常に難しくなる。凡人はここでお手上げになってあきらめてしまうが、このような通常では圧縮ゾーンに入る大きなDNA分子をもっと分離してやろうと考えた挑戦者たちが米国にいた。

巨大サイズDNA分子を分別したい

アガロースゲル電気泳動では、ランダムコイル状のDNA分子が電場方向に伸長したヒモ状になり、アガロースが形成する不規則な繊維構造 (ゲルマトリックス) の間隙をへびのように陽極の方に移動すると考えられていた。この移動速度が分子サイズと相関しているわけだが、ゲルマトリックスの分子ふるい効果には上限があり、前項で述べたようにDNA分子が大きくなるとサイズの違いがあってもほぼ同じ位置まで移動して、圧縮ゾーンを形成してしまう。電場の方で伸びたヒモ状DNA分子は電場が消失するとまたランダムコイル状に戻るが、1970年代始めにカルフォルニア大学のBruno Zimmらは溶液中でのヒモ状からランダムコイル状への復帰が分子サイズに依存するという報告をしていた。この情報からZimmの学生だったDavid Schwartzは電場を周期的に変化させることで巨大サイズDNAを分離できるのではと考えた。つまり、ヒモ状になって移動していた巨大サイズのDNA分子は電場方向が切り替わった時にランダムコイル状に戻りながら新しい電場方向に対応し、再び新しい方向に伸長して移動を始めるだろうと予想し、巨大DNA分子が新しい電場の向きに方向転換するために

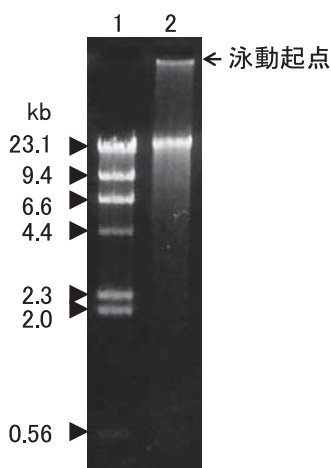


図1. 通常のDNAアガロースゲル電気泳動。1: λ DNA *Hind*III断片, 2: 出芽酵母染色体DNA。

必要な時間がDNA分子サイズに依存すると考えたのである²⁾。そして、Schwartzはコロンビア大学のCharles Canter研究室に移り、50 kb以上の巨大サイズDNAを分離する電気泳動装置を開発し、166 kbのT2ファージDNAや758 kbのGファージDNAそして出芽酵母染色体DNAを泳動分離して見せたのである³⁾。それが、大きな泳動槽で点電極を設置し、泳動緩衝液を冷却しながら電場を一定間隔で切り替えながら泳動を行うパルスフィールド勾配ゲル電気泳動 (pulse-field gradient gel electrophoresis) であった。Schwartzらの報告から2ヶ月後の1984年7月には、ワシントン大学のGeorges CarleとMaynard Olsonたちも交差角度90°の電場を一定周期で切り替える直交型交互電場ゲル電気泳動 (OFAGE, orthogonal field alternating gel electrophoresis) を考案して、16本ある出芽酵母染色体を11本のDNAバンドとして分離した⁴⁾。「50 kbの壁」を見事に乗り越えたわけである。

パルスフィールドという魔法

1984年に2つのグループから相次いで、二方向の電場を交互にかけるという電気泳動法によって、200 kb～2000 kbの出芽酵母染色体DNAをそのままのサイズで分画できることが報告され、DNAの分離可能サイズは一挙に100倍ほど上がり、数年のうちに5～10メガ塩基対 (Mb) サイズも分離されるようになった。この新しい泳動法では二方向の電場がパルス時間あるいはスイッチ時間と呼ばれる時間間隔で交互に切りかわることが重要だった。以後、この電場を切り替えて泳動するという点で共通な泳動法が次々と報告され、これらをひとまとめにパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) と呼んでいる。泳動中のDNA分子がどんな挙動をするかは想像するだけであったが、1989年には蛍光色素標識したDNA分子の挙動を蛍光顕微鏡で観察した結果が報告された^{5,6)}。巨大サイズDNA分子は予想どおりアガロースゲルマトリックス中をヒモ状に伸びて移動し、マトリックスの障害に引っかかるとU字型になって両端が同じ方向に引かれながらも最終的にはどちらかに優先的に移動することなどがあきらかになった。そして、電場が新しい方向に切り替わると、DNA分子はその新しい電場方向に対応して新しい端を先頭に移動を始めることもわかった。DNA分子は二方向の電場に対応しながらゲ

ル中をミクロ的にはジグザグに移動してマクロ的には直進するわけである。DNA分子の挙動を完璧に記述する数式モデルはいまだないようであるが、ほぼSchwartzが想定したようなことが起こっているようである。分離パターンについての研究も進み、スイッチ時間などの泳動条件により分離能のいい領域が異なり、ある泳動条件のゲル中でも分離能の異なる領域が存在することがわかっている。また、環状DNA分子の分離では線状DNA分子の場合と違い、スイッチ時間の影響が小さく、サイズが大きくなるにつれて環状DNA分子はアガロースマトリックスに引っかかりやすくなり、細菌の環状染色体DNAはそのままでうまくゲル中に進入しないことが知られている。複製途中のDNA分子は複雑な構造のためかゲルの中にほとんど進入しないこともわかっている。

泳動法の多様化、そして生き残り

PFGE装置としては、登場してから5年間ほどでさまざまなタイプが登場して多様化、進化した²⁾。SchwartzとCantorの初期の4つの点電極型は泳動パターンの歪みを軽減するために改良したヘキサゴナル電極型となり (図2)、さらに電場ではなく泳動ゲルの方が機械的に回転するタイプ (crossed-field gel electrophoresis) や垂直ゲルで泳動を行うタイプ (transverse alternating field electrophoresis) や通常のサブマリン泳動槽を使用するfield inversion gel electrophoresis (FIGE) などが次々と考案された²⁾。一番普及した (生き残った) と思われるPFGE装置はChuら⁷⁾によって考案されたcontour clamped homogeneous electric filed gel electrophoresis

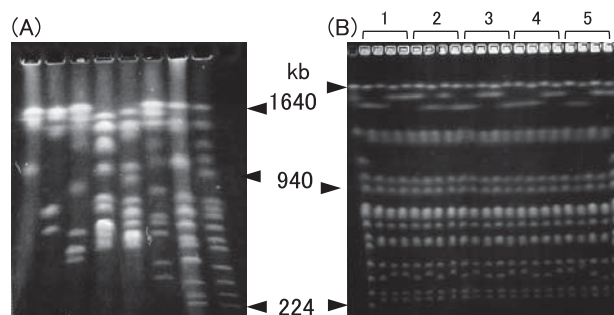


図2. PFGEによる酵母染色体DNA泳動パターン (電気泳動核型). A: *Saccharomyces* 酵母の電気泳動核型. B: 出芽酵母の子嚢由来の四分子セット1～5の電気泳動核型. Aは初期型PFGEのため低分子側が広がった末広形の泳動になっているが、Bは改良型PFGEで各レーンがほぼまっすぐ泳動されている。



図3. Bio-Rad社CHEF Mapper® XA システム

(CHEF)である。CHEFで使用される泳動槽には24個の電極が設置され、その電極間に抵抗器を入れることにより均一な電場を実現し、DNA分子の移動速度を一定に制御している。そのため、泳動パターンの歪みがほとんど見られない。Bio-Rad社から電場交差角度が120°固定のCHEF-DRIIシステムと90°~120°に調節できるCHEF-DRIIIシステムが販売されている。さらにCHEFとprogrammable autonomously controlled electrodesを兼ね備えたタイプの上位機種CHEF Mapper® XAシステム(図3)もあり、電場の方向、電圧、スイッチ時間を自在に設定できるようになっている。また、分離するサイズ領域の最適泳動条件を決定するアルゴリズムを内蔵しているため、分離したいサイズ領域に対する泳動条件の最適化作業を省くことができる。時代が進み、電気泳動の世界にチップテクノロジーが導入されると、直径2 μm高さ2 μmの微小円柱を2 μm間隔で3 mm×9 mmに整列させたチップ上で非対称パルスフィールド電気泳動を行うDNA prismが開発され、61~209 kbのDNA分離も報告されている⁸⁾。

サンプルづくりも大事

PFGEによりDNA分離サイズの上限をあげることができたわけだが、この電気泳動法の有効性を確認するためにも切断していない無傷の巨大サイズDNA試料を調製することは非常に重要であった。細胞を機械的破碎して溶液状態で染色体DNAを調製する操作ではどうしても物理的剪断より無傷な染色体を調製することはできない。生物種により細かな違いはあるが、ランダムなDNA切断をできるだけ防ぐためには細胞を低融点アガ

表1. CHEF システム泳動条件

パラメーター	分離するDNAサイズ		
	1-100 kb	0.1-2 Mb	2-4 Mb
電圧勾配 (V/cm)	6-9	4.5-6	2-3
スイッチ時間	0.05-10秒	10-200秒	200-1,800秒
電場交差角度	120°	120°	120°, 106°
温度	14°C	14°C	14°C
泳動緩衝液	0.5X TBE	0.5X TBE	1X TAE
アガロース濃度	1.0-1.2%	0.8-1.2%	0.6-1.0%
泳動時間	2-15時間	15-30時間	24-72時間

Bio-Rad社CHEF Mapper® XA Pulsed Field Electrophoresis System資料より改変。

ロースでブロック形状にまず包埋固定してから、SDSによる細胞破壊とProteinase Kによるタンパク質分解処理を0.5 M EDTA溶液中で行う方法が有効であった^{2,9)}。つまり、アガロースゲル中に固定した細胞をその場で溶解し、タンパク質除去を行うため、物理的剪断が最小限に抑えられると共に、0.5 Mという高濃度EDTAのキレート作用によってDNA分解に働くDNA分解酵素(Mg²⁺要求)や金属イオンが不活化されるわけである。こうして調製されたDNA試料は0.5 M EDTA溶液中で長期保存が可能である。処理を終えたアガロースブロックは適当な切片サイズにして試料溝に入れる。出芽酵母などの子囊菌酵母ではZymolyaseなどの細胞壁溶解酵素処理をしてからアガロース包埋、溶菌、タンパク質分解処理を行っている。

分離に影響する泳動条件^{2,9)}

泳動ゲルには通常1%アガロースゲルを使用する。アガロース濃度を下げるとDNAの移動度は早くなり、大きなサイズ領域の分離が可能になるが、バンドのシャープさが落ちる。泳動緩衝液は通常のアガロースゲル電気泳動と同じくトリス-ホウ酸緩衝液(0.5×TBE, 45 mM Tris-45 mM borate-1 mM EDTA, pH 8.3)あるいはトリス-酢酸緩衝液(1×TAE, 40 mM Tris-20 mM acetate-1 mM EDTA, pH 8.0)を使用する。TAEの方がTBEより緩衝能が弱い、DNAの移動度は少し大きく、2 Mb以上の大きなサイズの場合に使用されている。泳動緩衝液温度は循環により一定に保持し、通常14°Cに設定する。高い温度の方がDNAは早く移動するが、分離能は低くなる。電圧とスイッチ時間が最も分離能に影響を及ぼし、

分画したいDNAサイズにより最適条件を使用する必要がある(表1)。一般に分離したいDNAサイズが大きくなるほど、電圧は低く、スイッチ時間は長く設定し、泳動時間は長くなる。泳動中にスイッチ時間を一定にして泳動する方法と徐々に傾斜させる(ramping)方法があるが、スイッチ時間を傾斜させるとサイズと移動距離の直線性が向上する。電場の切替え角度(交差角度)はCHEFでは120°が一般であるが、分裂酵母染色体のようなMbサイズのDNA断片に対しては少し小さな角度106°にすると泳動時間が短くなるようである。

活用例あれこれ

多くの生物種のゲノム解析や細菌人工染色体(BAC)や酵母人工染色体(YAC)を用いたゲノムライブラリー作製では、PFGEを利用して出現頻度の低い制限酵素の切断地図を作製し、大きなサイズのDNA断片を回収する^{9,10}。制限酵素処理は1 mM PMSFを加えたTE(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)などでよく洗浄したアガロースブロックに対して行う。大きなDNA断片の回収は、目的のDNA断片を含むアガロースゲルを切り出して、電気泳動により溶出させるか、低融点アガロースゲルでPFGEを行い、切り出したゲル断片を加熱融解してアガロースの分解のためにβ-Agarase処理を行って回収する。サザンブロット解析をする場合には通常のサザントランスファー処理を行うが、対象とするDNA断片サイズが大きいためそのままでは膜への移行効率が低く、塩酸による脱プリン処理あるいは紫外線処理による小断片化が必須である。細菌では制限酵素処理した染色体DNAのPFGEにより、種あるいは株特異的な泳動パターンが得られ、院内感染や食中毒の原因菌の比較・特定に応用されている。また、巨大プラスミド存在の有無あるいは線状染色体の判定にも利用された。酵母では染

色体DNAの泳動パターンを電気泳動核型として菌種の同定や細胞融合株の確認などに利用され、クローン化遺伝子がどの染色体に存在しているかという遺伝子マッピングや酵母染色体構造変化の確認、DNA複製中かどうかの判定にも利用されている。

おわりに

1980年半ばに登場したPFGEは、数年のうちに進化して瞬く間に応用例もたくさん報告され、微生物から高等生物までを対象として、ヒトゲノム解読に象徴されるゲノム時代の幕開けに大きな貢献をした。出芽酵母では任意の部位での染色体分断によるゲノム改変¹¹や人工合成ゲノムの構築¹²が行われるようになり、新しいゲノム工学時代を迎えている。PFGEはすでに誕生して25年以上になるが、このゲノム工学時代の必須アイテムであり、重要な基盤技術である言えよう。

文 献

- 1) 福田青郎：生物工学, **89**, 332 (2011).
- 2) Birren, B. and Lai, E.: *Pulsed field gel electrophoresis, a practical guide*, Academic Press, Inc., San Diego (1993).
- 3) Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.: *Cell*, **37**, 67 (1984).
- 4) Carle, G. F. and Olson, M. V.: *Nucl. Acids Res.*, **12**, 5647 (1984).
- 5) Smith, S. B. *et al.*: *Science*, **243**, 203 (1989).
- 6) Schwartz, D. C. and Koval, M.: *Nature*, **338**, 520 (1989).
- 7) Chu, G. *et al.*: *Science*, **234**, 1582 (1986).
- 8) Huang, L. R. *et al.*: *Nature Biotech.*, **20**, 1048 (2002).
- 9) Riethman, H. *et al.*: *Genome analysis, a laboratory manual, Vol. 1 Analyzing DNA*, p.83, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1997).
- 10) 小笠原直毅ら：生物化学実験法46ホールゲノムショットガン法によるゲノム解析とアノテーション, p.1, 学会出版センター (2001).
- 11) Widiyanto, D. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 89 (2003).
- 12) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).