

論 文

静電配向DNAの指定位置の切断・取得・増幅

黒澤 修^{*,**,**,1}, 鷺津 正夫^{***}

(2003年9月11日受付; 2003年12月3日受理)

Dissection, Acquisition and Amplification of Targetted Position of Electrostatically Stretched DNA

Osamu KUROSAWA^{*,**,**,1} and Masao WASHIZU^{***}

(Received September 11, 2003; Accepted December 3, 2003)

The authors have developed a novel DNA sequencing method based on molecular surgery, where DNA strands are stretched under a high-intensity electrostatic field, positioned onto a solid surface by dielectrophoresis, and then a targetted position is mechanically dissected under a microscope, picked up and recovered. Because thousands of molecules are stretched and aligned with one end straight on the electrode edge, as many fragments from the same location can be dissected simultaneously. The method enables the sequencing of known position on the DNA, so tedious re-construction processes in the present shot-gun sequencing can be eliminated. It has been found that the yield of mechanical dissection and recovery can be close to unity if enough precautions are paid for loss mechanisms in each step, however, molecular damage due to mechanical dissection prohibits the ligation of adapter oligonucleotide, which is necessary for the amplification of the acquired fragment. We show in this paper the use of restriction enzyme to remove the damage on the fragments. Based on the method, we found that the yield of an adapter ligated on one end is about 30%, and on both ends is about 10%, which is adequate for the amplification and sequencing.

1. はじめに

DNAの塩基配列解析は、通常、ショットガン法と呼ばれる方法で行われる。この方法は、解析対象となるDNAを1キロベース以下の断片に切断し、各々の断片の配列を決定した後、各断片の重なり配列を解析して元のDNA配列を再構築することで全体の配列決定を行う。各断片の配列読解自体に関しては、高性能マルチキャピラリーDNAシーケンサーの開発により飛躍的な進歩が遂げられている¹⁾。しかし、再構築の部分に関しては、コンピューターの処理能力やソフトウェアを向上させる程度で、作業量自体を軽減する方法に関してはほとんど研究されていないのが現状である。

DNAは一次元のひも状の物質で、その上に遺伝情報(塩基配列)が書き込まれていることより、DNA分子を引き伸ばして、特定の部位を切断し、切断した断片を回収して解析することができれば、解析対象DNA断片の元のDNA上での位置が明らかとなるので、上述の再構築作業量を軽減できると期待される。

このような見地から、DNA上での位置情報を保存したDNAの断片化と断片の回収法として、アガロースゲル中で伸長させた1本のDNA分子を紫外線レーザーで切断し断片を回収する方法が水野らにより提案されているが²⁾、回収した1分子のDNA断片を如何にして増幅するかに関しては課題として残されたままである。

これに対し、筆者らは、筆者らが開発したDNAの静電操作法で伸長固定したDNAを用いて、図1に示す方法で、DNA上での任意部位の切断・断片の回収および回収断片の増幅を行うことを提案し、研究開発を行ってきた³⁻⁶⁾。

図1で、1) まず、基板上に犠牲層およびキャリア層を堆積し、その上に電極をパターニングする、2) この上に蛍光標識したDNA溶液を滴下し、電極間に電圧を印加することにより、静電伸長および誘電泳動を用いてDNAの一端を電極端に揃えて伸長配向し、キャリア層に固定する、3) 蛍光顕微鏡下で観察しつつ、鋭利な先端を有する

キーワード: 静電気, DNA, 伸長固定, 微細電極, PCR

* (株)アドバンス (103-8354 東京都中央区日本橋小舟町5-7) Advance Co., 5-7 Nihonbashi-kobunecho, Chuo-ku, Tokyo, 103-8354, Japan.

** 生物系特定産業技術研究支援センター (105-0001 東京都港区虎ノ門3-18-19) Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, 3-18-19 Tranomon, Minato-ku, Tokyo, 105-0001, Japan.

*** 東京大学機械工学専攻 (113-8656 東京都文京区本郷7-3-1) Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan.

¹ kurosawa@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

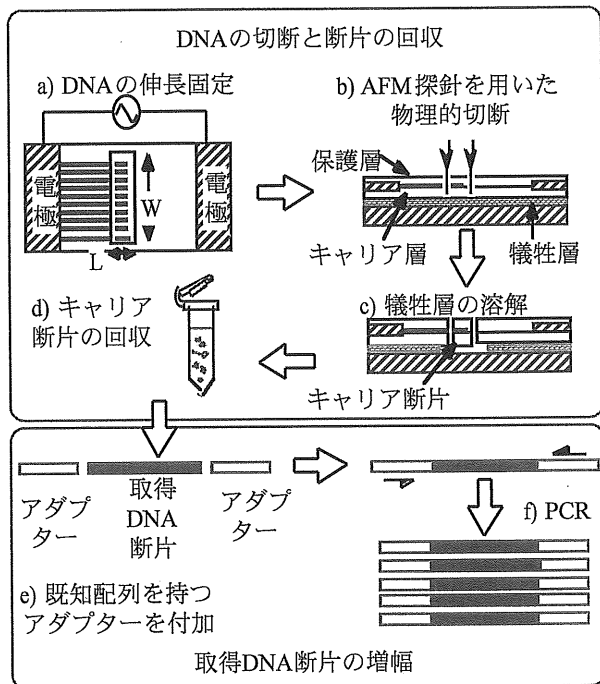


図1 静電配向DNAの部位特異的取得と断片の増幅
Fig.1 Dissection, acquisition and amplification of targeted position of electrostatically stretched DNA.

工具（たとえばAFM探針）を分子加工用メスとして用い、DNAの狙いの部位を、その下にあるキャリア層とともに切断する、4) 切断したキャリア層直下の犠牲層を溶かして去り、DNA断片をキャリア層断片ごと基板から回収する、5) キャリア層断片を溶かし、回収したDNA断片の両端に既知配列の短いオリゴヌクレオチド（アダプターと呼ぶ）を付加し、この配列をもとに断片をPCRで増幅する。

このプロセスは、a) 一端を揃えて固定した多数のDNAを用いることにより、DNA上の同じ部位を一時に大量に切り出すことができる、b) キャリア層にDNAを固定化することにより、ロスのない回収が可能になる、c) DNA断片の増幅においては、両末端にアダプターが付加した断片が存在すれば増幅が可能である等の特徴を有する。

これまでの研究では、48kb（物理長16 μ m）の λ DNAを用い、DNA断片の回収の確認とその回収率について検討を行ってきた。すなわち、前述の手法で伸長固定 λ DNAの末端から約3 μ m（約9kbp）の範囲を蛍光顕微鏡で位置を確認しつつ切り出し、図2に示すような、 λ DNA上の左端付近（L配列：1470bp）、中央付近（C配列：1016bp）および右端付近（R配列：1222bp）を増幅するプライマー（以下LCRプライマーと呼ぶ）を用いてPCR増幅することで、DNAの狙いの位置の回収の確認を行った。2本鎖DNAは電氣的に全く対称で、静電伸長固定は、2つの向きのDNA（L-C-RとR-C-L）の50%づつの混合物となっているので、切り出した約3 μ mの範囲が回収されてい

λ DNA上におけるプライマーの認識部位

| Lプライマー | Cプライマー | Rプライマー |
|------------|-------------|-------------|
| 1646-3115 | 24779-25794 | 44939-46160 |
| L配列:1470bp | C配列:1016bp | R配列:1222bp |

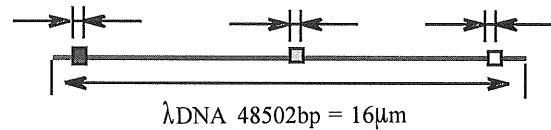


図2 取得断片回収の確認に使用したプライマー
Fig.2 Primers used for the check of cut and recovered fragments.

ば、LまたはRの配列のみが増幅されるはずである。

実験の結果は、以下を示した。

- 取得断片にはLの配列およびRの配列のみが含まれている。すなわち、狙いの断片のみを切り出すことができている⁴⁾。
- 蛍光顕微鏡の励起光、インターカラーター染色DNAの乾燥などは、（おそらく酸化により）DNAに分子損傷を与える⁵⁾。
- 蛍光標識塩基を用いてDNAの両末端のみを蛍光標識し、弱い励起光で可視化すれば、ii)の損傷を避けることができ、ほぼ100%の収率で無損傷のDNA断片を回収できる⁶⁾。

以上により、DNAの切断と断片の回収に関しては、技術的開発がほぼ完了したといえる。

次に、取得したDNA断片の両端にアダプターを付加し、この配列をもとにPCR増幅する手法について検討を行ったところ、次の結果が得られた。

- 物理的に切断された点には分子損傷があり、このままではアダプターのライゲーションが行えない。
- 上記の損傷末端をT4DNAポリメラーゼを用いて修復し、アダプターのライゲーション操作を行った後にPCR増幅し、電気泳動により解析したが、切断片の増幅は検出されなかった⁷⁾。

ii)の原因としては、1) T4DNAポリメラーゼによる修復がうまくいかず、アダプターが付加できなかった、2) アダプターは付加できたが、物理的に切断したDNA断片の大きさが不均一であるため、電気泳動のバンドがスマアーになり検出できなかった、の2つが挙げられる。

そこで、本研究においては、まず、上記1)を確認するため、T4DNAポリメラーゼで処理した物理的切断端にアダプターが付加するかどうかを明らかにした。次に、上記2)を確認するため、物理的切断により得られたDNA断片の末端近くを制限酵素で切断することで、損傷部位を除去した大きさが均一なDNA断片を得て、PCR増幅による断片の増幅を行った。それぞれの結果を以下の第2章と

第3章で報告する。

2. T4DNAポリメラーゼで処理した物理的切断端へのアダプターの付加効率

T4DNAポリメラーゼによる末端損傷修復の機序は、まずこの酵素の3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を利用して2本鎖DNAの損傷端から片方の鎖を消化していき、その後、基質を入れることにより、プラントエンドになるまで埋め戻すというもので、超音波処理により切断したDNA端の修復などに実績がある⁸⁾。この手法が、AFM探針による物理的切断により回収が期待される数千本のDNA断片の末端損傷を修復してアダプターを付加する時に使えるかどうかを調べるため、図3-aに示すようなアダプターとプライマーを準備した。

アダプターは、88bp+3bp(AAA)のヌクレオチドで、片方の端のみでライゲーションが可能にするため、一端を5'pの平滑末端とし、他端をトリプルAの突出末端とした。この非対称な端構造には、自己環状化や多連結体形成を防止する効果もある。

PCRの足場となるプライマーとしては、

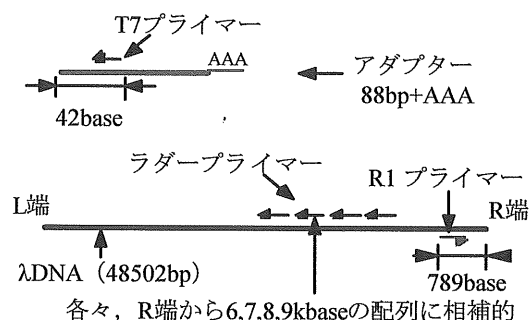
- a) アダプターの平滑末端側21ベースから42ベースの配列に相補的な22mer (以下T7プライマーと呼ぶ)
 - b) λDNAのR端側770ベースから789ベースの配列に相補的な20mer (R1プライマーと呼ぶ)
 - c) λDNAのR端から6,7,8,9キロベースの配列に相補的な各々20mer (ラダープライマーと呼ぶ)
- を用意した。それらの向きは図中に示した。

物理的に切断したDNA断片をT4DNAポリメラーゼで末端平滑化処理した後、アダプターを付加し、上記のプライマーを用いてPCR増幅した場合、次の電気泳動パターンが得られることが予想される (図3-b)。

- A) 切断操作を行っていないDNA端にアダプターがうまく付加された場合には、λDNAのR端近くのR1と、R端についたアダプター上のT7の2つに挟まれた部分から生ずる831bpの断片。
- B) 切断端の分子損傷がT4DNAポリメラーゼによる平滑化処理によりうまく取り除けている場合には、λDNAの切断端 (その位置は、探針による物理切断の位置決め精度の問題から、数百bpのばらつきがあることが予想される) 側に付加されたアダプター上のT7と、切断片上の1キロベースおきにあるラダープライマーから生ずる、1キロベースおきの4つの断片。

94℃・1分、68℃・3分を35サイクルの条件でPCR増幅後の試料をゲル電気泳動にかけた結果が図4である。図中、Mは200bpのDNAラダー、C1,C2は、それぞれ20分子、2000

a) アダプターおよびプライマー



b) アダプター付加により増幅が期待される断片

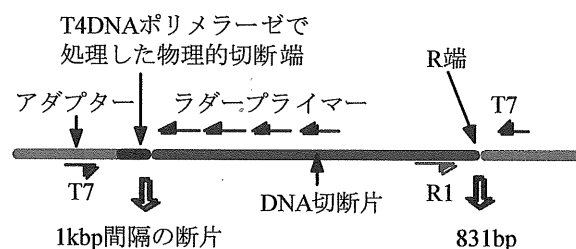


図3 酵素処理した物理的切断端へのアダプター付加の確認に使用したプライマー

Fig.3 Primers used for the check of adapter ligation at the physically cut and enzyme treated molecular ends.

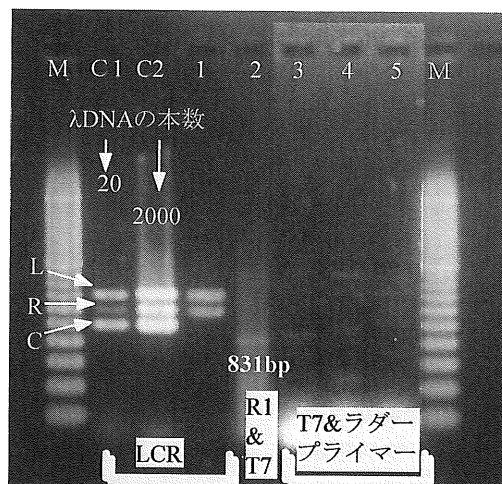


図4 酵素処理した物理的切断端へアダプターを付加してのPCR増幅結果

Fig.4 PCR results of fragments treated with adapter ligation.

分子のλDNAをテンプレートDNAとしてLCRプライマーでPCR増幅したものである。レーン1~5が、上記の実験の結果で、レーン1はLCRプライマーで、レーン2はR1とT7プライマーで、レーン3~5 (この部分のみ画像処理によりコントラストを高めている) はラダープライマーとT7プライマーを用いたPCR増幅の結果である。これらのレーンは、それぞれ、基板から切り出したキャリア断片1枚から得られるDNA断片を試料として用いている。この

断片上には、電極端に静電伸長固定したDNAの本数（6～7本/ μm ）⁹⁾と切断長さの積の、約2000本のDNAがあると見積られるが、そのうち1/2はL端側を、他の1/2はR端側を切断した断片（以下、それぞれL断片、R断片と呼ぶ）であり、ラダープライマーによる増幅に関係するのは、R断片の1000本のみである。

LCRプライマーを用いたレーン1の結果は、LとRのバンドのみを示しており、切断した断片のみが回収できているのがわかる。R1-T7プライマーを用いたレーン2より、831bpの断片の増幅が確認でき、損傷のないDNA端にアダプターが付加していることがわかる。ラダープライマーを用いたレーン3～5において、数本の離散的なバンドが見られるが、その輝度は非常に低く、物理切断端側にアダプターが付加されたものはたかだか2～3本だけ、すなわちアダプター付加効率は0.2～0.3%程度であることがわかる。

以上により、T4DNAポリメラーゼによっては、AFM探針で物理的に切断した切断端の修復が効果的に行われなことが判明した。

3. 制限酵素で切断したDNA断片へのアダプターの付加と断片の増幅

前章の結果より、物理的に切断したDNA断片を増幅するためには、少なくとも、損傷末端を高収率で修復あるいは除去する必要があることが判明したが、DNA端がライゲーション可能な末端端として、高々数千本のDNA断片の両末端にアダプターを付加してPCR増幅することが可能かどうかについても明らかになっていない。

そこで、物理的に切断したDNA断片を制限酵素で切断することで、酵素反応可能なDNA端を持つDNA断片を調製し、この断片の両端にアダプターを付加してのPCR増幅することで、増幅が可能かどうか、可能な場合どの程度の収率で増幅可能かを調べた。

3.1 実験方法

物理的に切断したDNA断片の回収と、制限酵素処理した断片へのアダプターの付加の確認を、図5に示す方法で行った。

キャリア層上に伸長配列固定したλDNAの末端から約3 μm （約9kbp）の位置で切断したDNA断片を含むように、キャリア層を10 $\mu\text{m}^2 \times 300\mu\text{m}^W$ （L,Wは図1-a参照）の矩形に切り出し、犠牲層溶解により矩形のキャリア断片を回収する（図5-a）。このキャリア断片中には、約2000本の切断片、すなわち、1000本程度のL断片およびR断片が存在していると推定される。このLまたはR断片の本数=1000

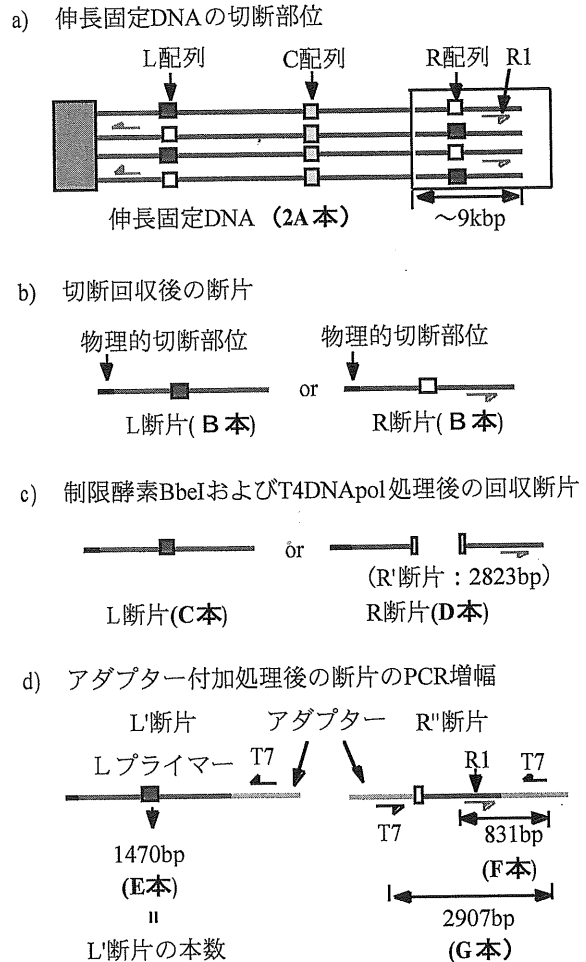


図5 制限酵素で切断した断片へのアダプター付加
Fig.5 Adapter ligation to the fragments cut by restriction enzyme.

表1 制限酵素処理・アダプター付加の実験手順
Table1 The experiment procedure of restriction enzyme treatment and adapter ligation.

- [a] ゼラチンの溶解：滅菌水40 μl を加え、60 $^{\circ}\text{C}$ ・20分加熱。
- [b] 制限酵素による切断：制限酵素BbeI (TaKaRa) 60ユニットとバッファーを加え、36 $^{\circ}\text{C}$ ・20時間で切断の後、60 $^{\circ}\text{C}$ ・10分で酵素の失活処理。
- [c] 末端平滑化処理：16ユニットのT4DNAポリメラーゼ (TaKaRa) , バッファーおよび基質を加え、20 $^{\circ}\text{C}$ ・1時間。
- [d] アダプター付加：アダプター (100pmol/ μl) を4 μl , TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2のI液を16 μl , II液を8 μl 加え、10 $^{\circ}\text{C}$ ・15時間。
- [e] リガーゼの除去：70 $^{\circ}\text{C}$ ・10分の加熱、1.2ユニットのプロテイナーゼKを加え36 $^{\circ}\text{C}$ ・1時間のタンパク分解、さらに最終濃度1%となるようにSDSを加えて36 $^{\circ}\text{C}$ ・1時間。

本をAとする。以上の方法で回収したキャリア断片4枚をひとつのチューブにまとめ、ゼラチンのキャリア断片を溶解してDNA断片をキャリア断片から回収する(表1の手順[a])。ここで、その1/4量を取り、LCRプライマーでPCR増幅する(PCR1)。L配列およびR配列の増幅量から、増幅の元となったLまたはR断片の本数(B)の確認を行う。(図5-b)。

なお、この実験あるいは以下の実験で、用いる試料の量を1/4量などと分数量としてあるのは、すべてのPCR増幅が、切断回収したキャリア断片1枚あたりのDNAから行われるようにするためである。

次に、残りの3/4量の試料に対し、λDNAを1箇所(R端より2823ベースの位置、たまたまR配列と重なっている)切断する制限酵素BbeIにより切断処理を行う(手順[b]: 酵素量および反応時間は、回収DNA断片がほぼ完全分解された条件)。この処理により、L断片はもとの9kbのままであるが、R断片は、R配列で切断された2823bpの断片(R'断片と呼ぶ)と残りの断片とに2分される。さらに、この試料を、末端平滑化処理(手順[c]: もともとの分子端と制限酵素切断を行った端へのアダプターの付加効率がほぼ等しくなった条件)し、エタノール沈殿でDNA精製し、6μlの滅菌水を添加して、再溶解する。

ここで、その1/3量を取り、LCRプライマーでPCR増幅する(PCR2)。L配列の増幅量から推定されるL断片の本数(C)よりエタノール沈殿後の断片の回収損失の有無を、R配列の増幅量から推定されるR断片の本数(D)より制限酵素BbeIによる切断効率の推定を行う(図5-c)。

最後に、残りの試料(全体の2/4量)に対し、アダプター付加(手順[d])を行い、ここで用いたリガーゼによるDNAの凝集を解消するため、リガーゼ除去処理(手順[e])を行い、フェノール抽出により除タンパクを行う¹⁰⁾。この処理によりアダプターの付加されたR'断片をR''断片(2823bp + (88bp+AAA)×2 = 3 kb)、L断片をL'断片(約9kb)と呼ぶ。

さらに、試料中に含まれる未反応のアダプターを除去するため、ゲル電気泳動にかけ、約9kbpのL'断片と約3kbpのR''断片を、それぞれゲルから切り出し回収する。

このようにして回収した断片につき以下を行う(図5-d)。

- 1) 精製したL'断片の1/2量をLCRプライマーでPCR増幅し(PCR3)、L配列の増幅量から最終的に回収されたキャリア断片1枚あたりのL'断片の本数(E)を推定する。
- 2) 精製したR''断片の1/2量をR1プライマーとT7プライマーでPCRし(PCR4)、821bp断片の幅量からR'断片の片方の末端にアダプターが付加した本数(F)を推定する。

- 3) 精製したR''断片の1/2量をT7プライマーのみでPCR増幅し(PCR5)、増幅された2907bp断片の増幅量から両末端にアダプターが付加した本数(G)を推定する。

BとEの本数の比較より最終的な断片の収率を求め、BとGの本数の比較から増幅された断片の収率を求める。

PCRの条件は、94℃・1分、68℃・3分を30サイクルとした。

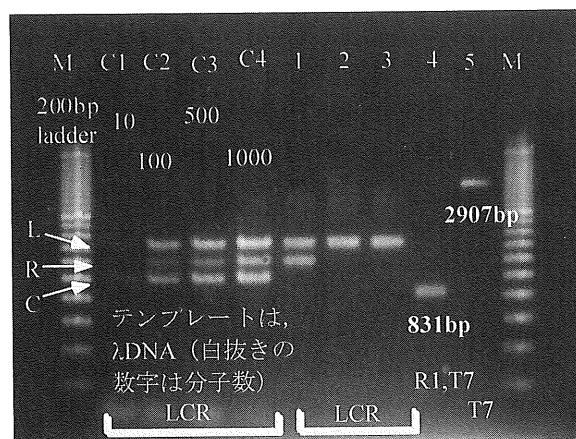


図6 制限酵素切断したDNA断片のPCR増幅結果
Fig.6 PCR results of the fragments cut by restriction enzyme.

表2 各操作ステップごとの収率

Table2 The yield of DNA recovery and adapter ligation.

| | 本数 | 収率 |
|-------------------------|----------|-----------|
| 基板上で切断したLまたはR断片の本数(A) | 約1000本 | |
| キャリア断片上に回収したLまたはR断片(B) | 約1000本 | 回収率約100% |
| エタノール沈殿回収後のL断片(C) | 約1000本 | 回収率約100% |
| BbeIで切断されなかったR断片(D) | 10本以下 | 切断効率99%以上 |
| ゲル電気泳動後回収されたL'断片(E) | 約1000本 | 回収率約100% |
| R'断片のR端にアダプターが付加したもの(F) | 300~400本 | 収率約33% |
| R'断片の両端にアダプターが付加したもの(G) | 約100本 | 収率約10% |

3.2 結果および考察

PCR増幅後の試料をゲル電気泳動にかけた結果が図6である。図中、Mは200bpのDNAラダー、C1,C2,C3,C4は、

それぞれ10分子, 100分子, 500分子, 1000分子の λ DNAをテンプレートDNAとして, LCRプライマーでPCR増幅したもの, レーン1~5は, それぞれPCR1~5の結果を示している。

各レーンで増幅された断片の増幅量をNIH Image (Ver.1.62)¹¹⁾で定量化して, 以下の結果を得た。

- 1) PCR1の結果より, Bの本数は, L断片, R断片ともに, おおよそ1000本程度で, A (約1000本) とほぼ一致していることより, 切断したDNA断片を, 損傷を与えることなしにPCR可能な状態で損失なく回収できている。
- 2) PCR2の結果より, Cの本数は約1000本であり, エタノール沈殿による断片の回収損失はほとんどない。また, R配列の増幅は確認できないことより, ほぼすべてのR断片がBbeIで切断された。
- 3) PCR3の結果より, Eの本数は, 約1000本であり, Bの本数に一致することからも, 断片回収の損失がほとんどないことが確認される。
- 4) PCR4の結果より, もともとの λ DNAの分子端にアダプターがついた断片の本数は, 300~400本である。
- 5) PCR5の結果より, 両端 (もともとの λ DNA端と, 物理切断+制限酵素切断を行った端) にアダプターがついた断片の本数Gは, 100本程度である。

上記4)と5)の結果から, 切断回収の過程はほぼ100%の収率であり, 一端へのアダプターライゲーションの効率は, その端がもともとの分子端であるか, 物理切断+制限酵素切断を行った端であるかを問わず約1/3, 両端へのライゲーションの効率はその自乗の1/10であることがわかる。ステップごとの収率を表2にまとめた。

4. 結論

伸長配向DNAから物理的手段により切り出したDNA断片の両末端にアダプターを付加してPCR増幅するため, 物理的切断により切断端に生ずる損傷を, T4DNAポリメラーゼで修復してアダプターを付加する方法, および制限酵素で切断除去してアダプターを付加する方法につき検討した。得られた結果は, 以下に要約される。

1. AFM探針で物理的に切断したDNA端をT4DNAポリメラーゼで末端修復処理してアダプターが付加する収率はわずか0.2~0.3%程度であり, 実用に適さない。
2. 制限酵素で分子損傷を除去し酵素処理可能な末端とすれば, 断片の一端にアダプターが付加される収率は1/3, 両端に付加される収率は1/10程度である。すなわち, 切断したDNA断片の約10%を増幅することができる。

今回の結果より, 切断したDNA断片の切断端がアダプターライゲーション可能な状態であれば, 図1で示した方法を用いて, DNA上での位置を保存して切断回収したDNA断片を増幅できることが明らかとなった。従って, DNAの切断を, 切断端が酵素修飾可能な状態で行うことができれば, DNA断片の両末端にアダプターを付加することで, 増幅対象であるDNA断片の配列に依存することなしに増幅が可能となることより, 実用に近いものになると期待される。

そこで, 今後は, i) 酵素プローブを用いて切断を行う方法, あるいは, ii) 固定化DNAを制限酵素で切断した後に断片を回収する方法につき検討する。i) に関しては, 酵素活性を保持した酵素固定化法と物理的切断が生じない切断方法, ii) に関しては, 制限酵素による切断が可能でかつ切断後の断片の位置情報を保持できるDNAの伸長固定法およびDNA断片の回収法を開発することが具体的課題として挙げられる。

この研究は, 生研機構新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術の開発」の助成を受け行われたものです。ここに謝意を表します。

参考文献

- 1) H. Kambara and S. Takahashi: Nature, **361** (1993) 565
- 2) M. Nishioka, T. Tanizoe, S. Katsura and A. Mizuno: J. Electrostat., **35**, (1995) 83
- 3) M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki and N. Shimamoto: IEEE Trans. IA., **31** (1995) 447
- 4) O. Kurosawa, K. Okabe and M. Washizu: *Proceedings of the thirteenth annual international conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2000)*, p.311-316 (2000)
- 5) 黒澤修, 加畑博幸, 鷲津正夫: 静電気学会01全国大会講演論文集, p.127-130 (2001)
- 6) 黒沢修, 鷲津正夫: 電気学会E部門誌, IEEJ Trans. FM, **123** (2003) 112
- 7) 黒澤修, 加畑博幸, 鷲津正夫: 静電気学会02全国大会講演論文集, p.291-294 (2002)
- 8) M. D. Adams et al: Science, **287** (2000) 2185
- 9) M. Ueda, H. Iwasaki, O. Kurosawa and M. Washizu: Jpn. J. Appl. Phys., **38** (1999) 2118
- 10) 黒澤修, 岡部敬一郎, 加畑博幸, 鷲津正夫: 静電気学会'00全国大会講演論文集, p.111-114 (2000)
- 11) URL: <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>