

第1章

PCRの基本原理

座古 保

1-1 はじめに

PCR(Polymerase Chain Reaction, ポリメラーゼ連鎖反応)は、それ抜きでは近年の分子生物学の発展はあり得なかった画期的な技術である。PCRにより、それまで実験的に非常に労力を要していた目的遺伝子の単離が簡単にできるようになった。発明者の Kary Mullis 博士(後述)が述べているように、病院にある標本、1本の髪、犯罪現場に残された^{けっこん}血痕、永久凍土に閉じ込められたマンモスからでも——原理的にはDNAが1分子でもそこに存在していれば——目的の遺伝子のみを「簡単に」10億倍にも増やすことができる。PCRの発明により、分子生物学は新しい局面に入ったといえる。現在、DNAを扱う生物系研究者でPCRを使わない人はほぼ皆無であろう。

近年、ヒトをはじめとしてさまざまな動植物・バクテリアのゲノム解析がなされている。ゲノム解析とは、それらの生命体が持っているDNAの全塩基配列を決定することである。ゲノム自体は後述のようにA、C、G、Tの4つの塩基が30億個(ヒトの場合)つらなったヒモに過ぎないが、その中にそれぞれ別個の機能に対応した遺伝子を約3万個持つと考えられている。「ポストゲノム」と呼ばれるゲノム解析終了後の研究では、この遺伝子の機能を解析する仕事がメインになる。そのためには目的の遺伝子のみを単離する作業が必要であり、PCRが必須の技術なのである。PCRの原理は単純だが、しかし得てしてそういうもののほど奥が深いものである。実験条件によっては目的の塩基配列が増幅されないことも多々あるし、現在でもPCRを用いたさまざまな応用実験が専門誌に発表され続けている。本章では、まずPCRの原理を説明し、相補性、DNAポリメラーゼ、プライマーなどの重要な概念を理解することを目的とする。

1-2 ゲノムの中の遺伝子

PCRの原理を説明する前に、まず「ゲノムの中の遺伝子」について説明する。ゲノム、DNA、遺伝子と一見同じように見える言葉が違う意味で使われるので、しばしば混乱を招く。特に、「遺伝子」という単語は多義語であり、それぞれの文脈により意味を正しく把握する必要がある。遺伝子の元々の意味は「生物の遺伝的形質を決定する因子」である。子が親に似る——姿や形だけでなく体内機能なども——ことは古代から知られており、それは「遺伝子」によるものだと考えられてきた。その実体がDNAによるものであることがわかったのは20世紀に入ってからである。DNAはデオキシリボ核酸(Deoxyribonucleic

acid)を略したものであり、その化学構造に由来する名前である。DNAの最小単位はヌクレオチド(nucleotide)と呼ばれ、塩基、糖、リン酸の3つの部位が共有結合でつながった構造を持つ。塩基にはアデニン(Adenine)、シトシン(Cytosine)、グアニン(Guanine)、チミン(Thymine)の4種類がある。ヌクレオチドが共有結合でつながったものがDNAである。Oswald Averyらは2種類の肺炎双球菌^{はいえんそうきゅうきん}を用いて、一方の菌にDNAを加えると細菌の性質が変化し、その変化が次世代以降にも引き継がれることを実験的に示し、遺伝子はDNAであることを証明した。

一方、ゲノム(Genome)は「ある生物をその生物たらしめるために必要な遺伝情報」と定義される。元々は遺伝子(Gene)と染色体(Chromosome)あるいは総数を意味する-omeを掛け合わせた造語であり、ウイルスなど特殊な場合を除いて、染色体に含まれる全塩基配列を意味する。数十億個のヌクレオチドがつながったのがゲノムであるが、そのうち転写・翻訳されて最終的にタンパク質になる部分はわずか1%程度と推定されている。このタンパク質になる部分が狭義での「遺伝子」である。ゲノムの残りはRNAに転写されるが、スプライシングによって除去されるイントロン部位(24%)と、遺伝子と遺伝子の間をつなぐ部位(75%)とされている。ただし以前は、これら遺伝子以外のDNAは意味がないとされていたが、生命機能維持になんらかの役割を果たしている可能性もあり、役割は未知といってよい。

1つのタンパク質に対応する(=「コードする」と表現する)遺伝子の長さはさまざまであるが、例えば300個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする遺伝子長は900塩基になる。PCRは30億塩基のヒトゲノムから、この目的の900塩基からなる1つの遺伝子のみを選択的に増幅することができる。例えていうなら、1,520[文字／ページ]×176[ページ]=267,520[文字]の本書11,000冊分から、1ページに満たない文字列を選び出し増幅することになる。PCR原理の本質の1つはこの「選択性」にある。もちろんPCRではタンパク質をコードする遺伝子に限らず、全ゲノムから特定の部位のみを選択的に増幅できる。

1-3 塩基の相補性

PCRの原理を理解するためには、塩基間の相補性についての理解が不可欠である。DNA分子はヌクレオチドがつながった鎖であると述べたが、DNAはそのつながり方のために化学的な方向性を有する。鎖の始端、終端はヌクレオチド間の化学結合の位置により、それぞれ5'末端、3'末端と呼ぶ(図1-1)。そしてDNAは2本のヌクレオチド鎖が互いに逆向きにらせん状に組み合っており、それぞれの鎖の塩基が相補的に向き合っている(図

用語解説

スプライシング：DNAから転写されたmRNAにはイントロンとよばれるタンパク質のアミノ酸配列を決定していない部分が存在する。イントロンを除去し、タンパク質に翻訳されるエクソン部分を結合する過程をスプライシングと呼ぶ。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

1-2). この「相補」ということが重要で、AはTと、GはCと対をつくる。どちらも2つの環からなるプリン塩基(A、G)と1つの環からなるピリミジン塩基(T、C)の対になっている。これらの決まった塩基対ができるのは、これらの塩基間にできる水素結合のためである(図1-3)。このように、DNA分子の片方の鎖は、もう片方の鎖と相補的な塩基配列を持つことになる。言い換えると、片方の鎖の塩基配列が決まれば、もう片方は自動的に決まる。

最も重要な点は、この二重構造からDNA複製のメカニズムを説明できることにある。1953年にワトソンとクリックがDNAの二重らせん構造を提案する前までは、細胞が2個の娘細胞に分裂する際に、どのように正確にコピーされているかが不明であった。しかしこの「互いに逆平行な2本の鎖が相補的に向き合っている」という構造から、以下に示すDNA複製のメカニズムが明らかになった。基本的にはPCRもこのメカニズムを利用

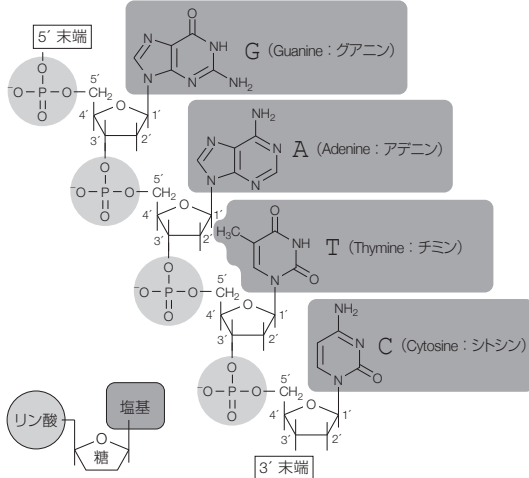


図 1-1 DNA の化学構造

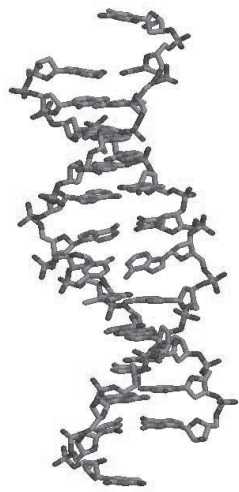


図 1-2 DNA の二重らせん構造

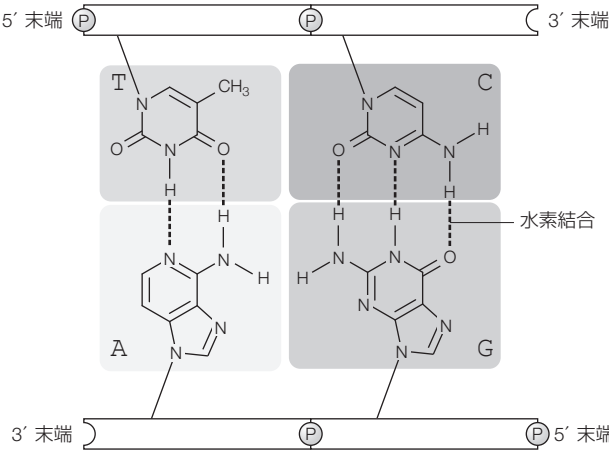


図 1-3 塩基間の水素結合

プロトコール

- 1) 反応溶液に等量のフェノール／クロロホルム溶液もしくはフェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール溶液を加え、攪拌する。ただし DNA 鎖が切れるおそれがあるので、4℃で穏やかに 10 分攪拌してもよい。



- 2) 10,000 × *g* で 5 分間遠心する。



- 3) 上層(水相)を回収する。



この中に DNA が入っている。変性したタンパク質は上層と下層(有機溶媒相)の界面に白い塊で存在するので、チップの先が触れないように注意する。

4-4 クロロホルム／エーテル抽出

この作業は上記のフェノール／クロロホルム抽出で混入したフェノールを完全に除去するために行う。溶液中にフェノールが残存していると、その後の酵素反応に影響がある。エーテルは揮発性が高いため、作業はドラフト内で行う。

準備

- クロロホルム
□ エーテル

プロトコール

- 1) DNA を含む溶液(100 ~ 500 μL)に等量のクロロホルムを加え、攪拌する。



- 2) 10,000 × *g* で 5 分間遠心する。



- 3) 上層(水相)を回収し、500 μL のエーテルを加え、攪拌する。



- 4) 上層(エーテル層)を取り除き、再度 500 μL のエーテルを加え、攪拌する。



- 5) 上層(エーテル層)をできる限り取り除く。



- 6) ドラフト内でチューブの蓋を開けたまま約 10 分間放置し、エーテルを完全に揮発させる。

4-5 DNA のアルコール沈殿

DNA, RNA, オリゴヌクレオチドを 0.3M 酢酸ナトリウム存在下で、70%エタノールもしくは 50%イソプロパノールで沈殿させる。DNA が少量のときは、グリコーゲン溶液をあらかじめ最終濃度が 40 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加えておくと沈殿効率が向上する。最後に溶解させる溶液 (TE バッファーもしくは超純水) の量を少なくすることで、DNA を含む溶液の DNA 濃度を濃くできる。

準備

- ☐ 100%エタノール もしくは 100%イソプロパノール
- ☐ 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)
- ☐ 70%エタノール

プロトコール

- ☐ 1) DNA を含む溶液に 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、2.5 倍量の 100%エタノールもしくは等量のイソプロパノール溶液を加え、混合する。-20°C で 2 時間もしくは -80°C で 10 分冷却する。
↓
- ☐ 2) 10,000 $\times g$ で 10 分間遠心する。
↓
- ☐ 3) 上清を取り除く。このときチップの先端が沈殿物に触れないように注意する。
↓
- ☐ 4) 卓上遠心器で軽く遠心し、チューブ壁面のエタノール溶液を下部に集め除去する。
↓
- ☐ 5) 70%エタノール溶液 (200 μL) を加える。このとき沈殿物が浮き上がらないように注意する。
↓
- ☐ 6) 10,000 $\times g$ で 2 分間遠心する。上清を完全に取り除く。
↓
- ☐ 7) ドラフト内で蓋を開けて 1 ~ 2 分放置して乾燥させ、少量の TE バッファーもしくは超純水に溶解する。

4-6 DNA 吸着担体を詰めたスピンカラムによる DNA 精製

上記の方法以外に、各社から PCR 反応サンプルから DNA を精製するキットが販売さ