

分子生物学的実験のための準備と基礎技術

井 本 敬 二

(生理学研究所)

はじめに

分子生物学的な技術は、過去10年あまりの間にごく一般的な技術となり、生物学・医学の分野の研究における基本的技術の一部となった。cDNA クローニングや cDNA 発現等は、誰にでも出来る技術であるといわれるようになってきている。また生理学の分野でも、cDNA を直接あるいは間接に利用した仕事は増え続けている。cDNA が必要であれば他の研究者から譲渡されればいいのであるが、実際は競争相手であったり多忙のためになかなか送ってくれないなどという理由のために、cDNA を貰い受けることは必ずしも容易ではない。また cDNA を使いこなすにはある程度の操作を自分で行わなくてはならない。分子生物学的技術に関するマニュアル類は多く出版されており、また生物・医学系の雑誌にも技術的な記事が多く掲載されているので、これらの情報を活用して分子生物学的実験をはじめようとしている人は少なからずいると思われる。本稿ではマニュアル類に詳細に述べられている事項は省き、もう少し別の面での事項を取り上げた。しかし分子生物学的な実験を初めて行う場合、より重要であることは、実際に実験が行われているところに出かけ、もし可能であればそこで自分自身で体験してみることである。そのような体験をすることにより、立ち上げの苦勞・時間・出費を少なくすることができる。

1. “大学等における組換え DNA 実験指針”

分子生物学的実験は、たいがいの場合“組換え DNA”の操作を含んでいるため、大学等で分子生物学実験を行う場合は、文部省の“大学

等における組換え DNA 実験指針”(以下、指針)にしたがって行わなければならない。指針は組換え DNA 実験が広く行われるようになった1982年(昭和57年)に定められたが、1991年(平成3年)に全面改訂されその後も部分的な改定が行われている。大学等では“組換え DNA 実験に関する安全委員会”あるいはそれに相当するものが設置されており、その機関での DNA 組換え実験に関する規則(健康診断など)を定めているので、分子生物学的な実験をはじめると当たっては、まず組換え DNA 実験の担当者に相談することが必要である。

指針の定義では、“組換え DNA 実験”とはある生細胞内で増殖可能な DNA (ベクター) と異種の DNA との組換え分子を試験管内で作製し、それを当該生細胞に移入し、異種の DNA を増殖させる実験及び実験の結果得られた組換え体を用いる実験をいう。“組換え体”とは、組換え DNA 実験の結果、組換え DNA 分子を移入された生細胞をいう。したがってイオンチャンネルやトランスポーターなどの cDNA を培養細胞に発現させる実験は、“組換え DNA 実験”である。一方、mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入したり、PCR でプローブを作製して in situ hybridization を行うこと自体は、“組換え DNA 実験”には相当しない。ただし、これらの場合にも mRNA 合成や PCR に用いるテンプレートを作製する過程に、“組換え DNA 実験”に相当する実験が含まれている。

指針では、“組換え DNA 実験”は、“組換え体作製実験”と“組換え体増殖実験”の2つに大別される。“組換え体作製実験”とは、同定されていない異種 DNA を持つ組換え体を得る

実験および当該組換え体を用いる実験と定義されており、cDNA クローニングを行うときのライブラリーのスクリーニングはこの実験に含まれる。また“組換え体増殖実験”は、同定された特定の DNA を持つ組換え体を増殖させる実験及びそれを用いる実験と定義されている。“組換え体増殖実験”は組換え体の増殖のみならず組換え体の構成の変更や組換え体を用いた実験も含まれる。

指針は、“組換え DNA 実験”を安全に行うために、承認・届出などの手続き、備えなくてはならない設備などを付属資料として規定している。組換え体の拡散を防止するために、物理的封じ込めと生物学的封じ込めの2種類の封じ込めの方法を定めている。物理的封じ込めは、もっとも規定のゆるい P1 からもっともきびしい P4 までの4段階に分かれている(表1)。また生物学的封じ込めレベルは、宿主-ベクター系の安全性を考慮したものであるが、通常の宿主-ベクター系は B1 レベルであり、自然条件下での生存能力が特に弱い宿主-ベクター系は B2 レベルとして定められている。

ウイルスを用いる実験や毒素を産生する場合や大量に培養する場合(20リッター以上が目安)などは別の規定に当てはまる。また“組換え DNA 実験”に準ずる実験として“動物個体を

表1. 物理的封じ込めレベル(施設・設備による外界への拡散の防止)

レベル	主 な 設 備
P1	整備された通常の微生物学実験室と同じ程度の設備を備え、かつ、設計が施されていること
P2	安全キャビネットの使用が好ましい 高圧滅菌機を建物内に備える P2レベル実験中の表示を実験室の入り口に掲げること
P3	安全キャビネットの設置 前室を備えている 高圧滅菌機を建物内に備える ろ過装置を備えた空気排出換気装置
P4	P3に加え、更衣室・シャワー・燻蒸消毒室などを必要とする

用いる実験”、“植物を用いる実験”に関しての規定が定められている。ごく普通の実験を行う場合、cDNA クローニングは“組換え体作製実験”であって機関の承認を必要とし、物理的封じ込めレベルは P2、生物学的封じ込めレベルは B1 である。またクローン化された DNA を用いる実験は“組換え体増殖実験”であり、機関の承認を得ると、物理的封じ込めレベルを“組換え体作製実験”よりも一段階下げた P1 で行うことができる。

指針やその他の規定は、組換え体の拡散を防止することを目的としているので、その趣旨を理解し“組換え DNA 実験”で生じる廃棄物は必ずオートクレーブにかけることが大切である。水道のアスピレーターなどで廃液をオートクレーブせずに流すことがないようにしなければならない。

また注意すべきことは、科学研究費補助金で組換え DNA 実験を行う場合には、交付申請を行うまでに組換え DNA 実験の承認を得なくてはならない。

2. 分子生物学的実験をはじめの場合の基本的方針に関して

分子生物学的実験を考える場合、クローン化した cDNA を得ることが基本である。いったんクローン化された cDNA は様々な用途に使用される(図1)。まず cDNA の塩基配列が決定されるとタンパクの一次構造(アミノ酸配列)が推測され、さらにアミノ酸配列から構造の予測が可能となる。またファミリーを形成するタンパクの一次構造を比較することにより、類縁関係や進化過程を推測することができる。アミノ酸配列から合成ペプチドをデザインし抗体の作成が可能となる。cDNA そのものあるいは cDNA を鋳型として合成した RNA (cRNA と呼ばれている)を用いて、DNA プロットイング、RNA プロットイング、in situ ハイブリダイゼーションを行うことが出来る。cDNA を手にする有利な点は、cDNA をそのまま発現させて機能を解析するだけでなく、cDNA に部位特異的

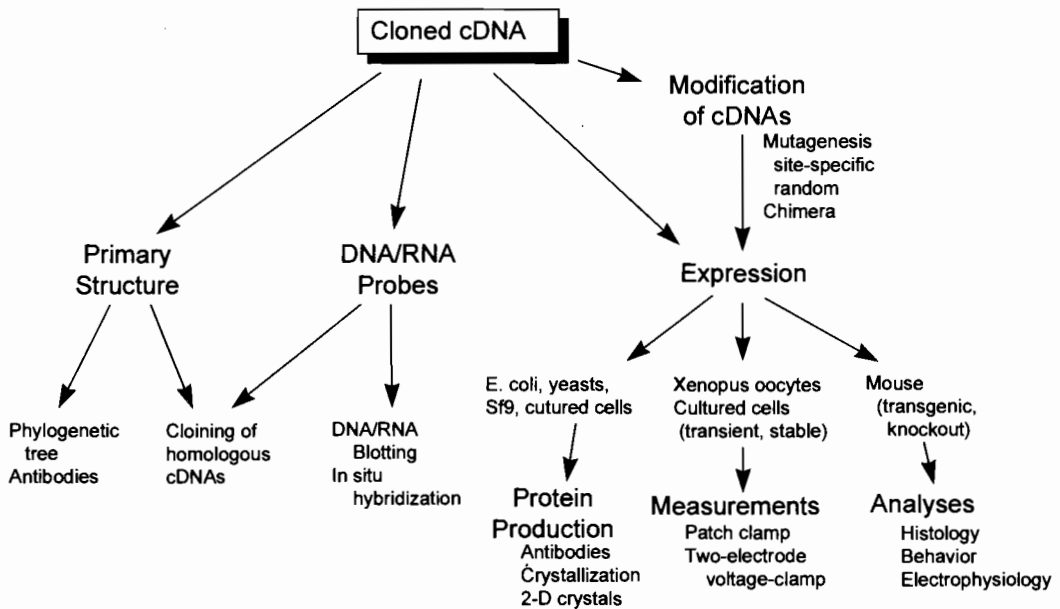


図 1.

変異導入などを行い改変したタンパクを発現させて機能を解析することができる点にある。cDNA の発現には種々のホストが用いられる。たとえば単に抗原用にタンパクを作らせるためには大腸菌、酵母やカイコ由来の Sf9 細胞がよく用いられる。イオンチャネルのように電気生理学的解析を行いたいものにはアフリカツメガエルの卵母細胞へ cRNA を注入する方法が簡便である。また細胞株に cDNA を導入し発現させることもよく行われる。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成には遺伝子を得ることが必要であり、cDNA をプローブとして遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行う。

このようにいったん cDNA を得ると可能な実験の幅が広がるが、分子生物学的技術に過分の期待をすることは禁物である。分子生物学的な実験は、cDNA を得てやっとスタートといった面があり、期待するデータを得るまでには、かなり長期にわたって労力と資金をつぎ込まなければならぬことが多い。

分子生物学的実験のいろいろな基本的手技は、いずれも多くの人の経験と努力の結果

築き上げられてきたものであり、分子生物学的な実験を始める際にはできるだけ基本的手技に忠実に行う方が無難である。可能であれば、分子生物学的な実験が普通に動いているところでトレーニングを受けることが好ましい。

3. 基本的な設備・機器

電気生理の実験機器と異なり、分子生物学の実験機器は一般的に単純であり、購入出るのが大部分である(表 2)。それぞれの機器の購入に際しては、経験者の意見を聴くことが重要である。たとえば、エチジウムブロマイドで染色したアガロースゲルを観察するために用いられるトランスイルミネーターの紫外線の波長は、通常 300 nm 前後であることが多いが、この波長の紫外線にさらされると DNA は損傷を受ける。ゲルの写真を撮るだけであれば問題はないが、ゲルのバンドから DNA を回収して用いる場合には、この波長は不適當であり、エネルギーの低い波長の長いトランスイルミネーターを選ぶべきである。一応そろえるとなると結構な設備投資が必要である。また遺伝子工学的操作に用いる酵素類を一通りそろえるにもかなりの額

表2. 主な分子生物学用機器

☆☆ 一般機器 ☆☆☆

(超)純水製造装置
分光光度計
天秤
pH メーター
インキュベーター・ヒートブロック(酵素反応用)
冷蔵庫
冷蔵庫(-20度, 酵素・DNA の保存)
超低温槽(-80度; RNA, ライブラリー, Competent cell の保存)
乾熱器(180度)
オートクレーブ
電子レンジ(溶液の加熱やアガロースゲルの作製)
マイクロピペット(ピペットマンなど)
チューブ立て
ホモジェナイザー
スタラー
ボルテックスミキサー

☆☆ 分離精製など☆☆☆

(冷却)微量遠心器(1.5 ml チューブ用)
中速遠心器
高速冷却遠心器
凍結乾燥機
電気泳動装置, 電源
トランスイルミネーター(365 nm)
インスタント写真装置
サーマルサイスラー(PCR)

☆☆ 培養関係 ☆☆☆

安全キャビネット
振とう培養器
インキュベーター(プレート用)

☆☆ ガラス器具 ☆☆☆

試薬瓶(ふたを含めてオートクレーブ・乾熱可能なもの)
試験管(ねじ口試験管は少量の培養に使える)
三角コルベン(大腸菌の培養に用いる三角コルベンは、フィンのついたものを用いる, 培養時の栓には、シリコンゴム通気栓が便利)
メスピペット(滅菌缶に入れて乾熱)
コーレックス管(遠心機用)

☆☆ プラスチック類 ☆☆☆

マイクロピペット用チップ
マイクロチューブ(貴重なサンプルを保存する容器でもあるから, 信頼できるものを購入すること)
ポリスピッツ
シャーレ

の投資が必要である(表3)。

DNA シーケンスは、自動シーケンサーで行う方が長く読め労力も少なくて済む。しかし長期にわたって DNA シーケンスを行うのでなく

表3. 分子生物学で用いる主な酵素

- 制限酵素
ある塩基配列を認識して DNA を切断する。
100種類以上の制限酵素が市販されている。
- T4 DNA Ligase
DNA 断片をつなぐ
- T4 DNA Polymerase
DNA 末端の平滑化に使用
- Alkaline phosphatase
DNA 末端のリン酸基を取り除く
- Reverse transcriptase
RNA を鋳型として DNA をつくる
- Taq DNA polymerase
耐熱性の DNA ポリメラーゼ, PCR 反応に用いる。

れば、高価な自動シーケンサーを自分のラボに購入する必要はないであろう。

ライブラリーのスクリーニングや RNA プロット(Northern プロット)などを行う場合には、感度の問題からアイソトープの使用が避けられない。いろいろな non-RI の方法が開発されているが、信頼性のあるデータを得るためにはまだ不十分である。

DNA 合成, ペプチド合成, DNA シーケンスなどを受託で行う会社がいろいろあり、経済的な面を考えるならこのようなカスタムサービスを利用した方がかえって有利な場合もある。

4. 核酸(DNA と RNA)の性質, 分離方法, 定量

核酸を扱う操作を十分に理解するためには、核酸の物理化学的性質を知っておくと役立つ。多様な性質を持つタンパクと異なり、核酸の物理化学的性質はほとんど均一であるため、分子生物学的実験に必要な操作の種類は限られている(表4)。

核酸の精製の第一段階はタンパクとの分離である。タンパクはフェノールで変性し凝固してしまうのに対して、核酸はフェノールに耐性であることを利用して、タンパクを取り除くことができる。核酸は塩類とアルコール(エタノールやイソプロパノールが用いられる)の存在により不溶化し析出する。この性質を利用して、核酸溶液を濃縮したり、塩類やその他の水溶性

表4. タンパクと核酸の比較

	タンパク	核酸(DNA と RNA)
性質	多様	均一
フェノール	変性	OK
70%エタノール	?	OK
凍結	?	OK
増幅	不可	可能(DNA)
変異導入	不可	可能(DNA)
タンパクの存在	存在	?

物質を取り除くことができる。これらの2つの操作が、DNA・RNAを扱う上でのもっとも基本的な操作である。

DNAとRNAの分離は、DNAとRNAのわずかな溶解度の差を利用して行われる。DNAとRNAが混ざりあったものからRNAを取り除くには、RNAをRNaseで細断しておき、ポリエチレングリコール溶液でDNAを凝集させ沈殿させるという方法が用いられる。RNAは2位の水酸基の分だけ親水性でありこの条件では凝集しない性質を利用したものである。またRNAを分離するにはAcid-Phenol法が用いられる。フェノール溶液が酸性であるとDNAは水相からフェノール相へ移行するの対して、RNAは水相に留まる性質を利用したものである。エタノール沈殿の際に通常用いられる酢酸ナトリウムの代わりにLiClを用いるとRNAが選択的に沈殿する。

プラスミドDNAを高純度に精製するには、超遠心機を用いてCsClの密度勾配で精製する方法が一般的であったが、最近ではカラムを用いたプラスミドを精製する方法が幅広く用いられ、超遠心機の必要性は少なくなってきている。RNAの分離には、GTC(guanidium thiocyanate)溶液を用いて超遠心でRNAを沈殿させる方法がよく用いられたが、最近ではAcid-Phenol法がよく用いられている。この方法を改変したRNA分離キットが多数市販されている。またmRNAの分離には、オリゴdTが付いたラテックスを用いる方法が一般的である。

5. DNA・RNAを扱う実験

実験に用いるDNAやRNAの量は、マイク

ログラムの量なので、天秤で量ることはできない。DNA・RNAの定量は分光光度計を用いて260nmの吸収を測定して行う。2本鎖のDNAの場合、1ODの濃度は50 μ g/mlと換算する。サンプルにタンパクが混入している場合には、実際の核酸の量よりも高い値が得られてしまうので、そのような恐れのある場合には、分光光度計で得た値とゲルを流してバンドの濃さから推測される核酸量とを比較しておくことが好ましい。

DNAもRNAも化学的には安定な物質であるが、通常環境ではDNAを切断するDNaseやRNAを切断するRNaseが存在している。したがってDNAやRNAの実験にあったっては、DNaseやRNaseの混入がないように心がけなくてはならない。DNaseは活性のためにマグネシウムイオンを必要とするため、EDTAが十分存在していればDNaseは働かない。またオートクレーブによりDNaseは失活する。

これに対して、RNaseはマグネシウムイオン依存性がなく、オートクレーブで加熱しても失活することはない。RNaseを失活させる方法は、乾熱をかけるか、フェノール処理を行わなくてはならない。したがっていったんRNaseが混入するとRNaseを取り除くのは困難であるため、RNAを扱う実験ではRNaseが混入しないように心がけることが大切である。RNAの実験に用いる器具は、可能な限り180度(数時間)の乾熱をかける。水は“ミリQ水”(前もって乾熱しておいたガラス瓶に入れ)オートクレーブして用いる。チップ・試薬は未開封の物をRNA用として用いる。試薬を測る時にスパーテルなどは使わないようにする。またpHをあわせる必要のある溶液を調整する場合には、一度pHメーターを用いて溶液を調整し、同じ量の試薬を混ぜあわせて溶液を作るか、pHの正確さがあまり大切でない場合には、pH試験紙を用いてpHを合わせる。RNaseはアルコール溶液中では働かないという事なので、RNAのサンプルはエタノール沈殿の形で保存する。

RNAse は組織・細胞の中にはもちろん、汗の中にも含まれているので、RNA 実験中は手袋をはめて出来るだけ RNAse が混入しないようにする。また実験台まわりをきれいにしてから実験に取り掛かることも大切である。

6. データベース

既知の塩基配列の大部分はデータベースに登録されている。主要なデータベースは、Gen Bank, EMBL, DDBJ の3つでありインターネットでアクセスし利用することができる。これらのデータベースは登録された核酸の塩基配列のデータを提供するだけではなく、ホモロジーの検索などのサービスも行っている。インターネットのアドレスは下記のとおりである。

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

EMBL <http://www.ebi.ac.uk/>

DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

7. 危険防止

分子生物学的実験は、合成化学などの分野に比較すると安全であるが、実験中の事故の可能性はいたるところに潜んでいる(表5)。したがって、安全教育、特に初心者への安全教育には十分な配慮が必要であるし、夜間あるいは休日一人で実験を行うことは避けるべきである。

最 後 に

分子生物学的実験をおこなう上で大切であると思われることの私見を列挙してまとめとする。

1. 他人(の失敗)に学ぶ
2. プロトコルを変えるな
3. コントロール実験を常に考える
4. 実験はあせらず慎重に
サンプル・試薬の取り違い、量の計算(暗算)間違いをなくす
5. 記録は丁寧に

表5. 安全のために

1. 試薬の取り扱い
メスピペットを用いる場合には、安全ピペッターを用いる。
絶対に口で吸ってはならない。
試薬が飛び散る可能性は常に存在する。
飛沫から守るために防護眼鏡、実験服の着用が好ましい。
特に下記の試薬に注意
劇薬物：アルカリ、酸、フェノール
毒物：アクリルアミド(神経毒である)、クロロホルム(肝毒性)
発ガン物質：エチジウムプロマイドなどのDNAを染める化合物
爆発物：エチルエーテル
2. オートクレーブ
高温で高圧の状態ですたを開けてはいけない。
100度1気圧になっても、水溶液の入ったビンに機械的な衝撃を加えると、突沸しビンが割れる可能性がある。
3. 電子レンジ
アガロースを溶かすために用いられるが、固く栓をしたビンを使うと爆発する。
4. 紫外線
イランシイルミネーターを使用する場合には、防御用の顔マスクを用いる。
培養室の紫外線灯は、入室時には消す(部屋が明るいと気が付かないことがある)。
5. 高圧電源
電気泳動に用いられる。ゲル・電気泳動槽に触れる場合は、まず電源を切る。
長時間の電気泳動を行う場合には、その場所を離れないようにするのが一番である。
離れる場合は定電圧で流す方が安全である。定電流でゲルを流すと溶液もれなどで回路が途切れた場合に、過大な電圧がかかる。
6. 遠心機
常にバランスを取るよう気をつけることが大切。
7. 火災防止
エチルエーテルなどの引火性の薬品を用いる場合は火の気がないことを確認する。
インキュベーターをオーバーナイトで用いることが多いので、機器の点検は定期的に行う。恒温水槽の水切れが無いようにしてはならない。
冷蔵庫・冷凍庫の後ろなどにたまったごみが燃え出して火事となることがあるので、大掃除のときは普段掃除をしない大型機器の裏も掃除をする。

参 考 書

1. 中山広樹, 西方敬人著: バイオ実験イラストレイテッド 1. 分子生物学実験の基礎. 細胞工学別冊, 目で見る実験ノートシリーズ, 秀潤社, 1995年
(基本的な技術を丁寧に解説した入門書. 分子生物学的実験をはじめるには必読. シリーズ
の他の巻も有用)
2. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
(古典的マニュアルの第2版)
3. 酵素などの試薬を出している各社のカタログ
(付録の部分にいろいろな情報が載っていることがある)