

Solid-phase Hybridization(EASY ANCHOR)

1. EASY ANCHOR の原理

核酸をセルロースなどの固相担体に結合させる試みは古く、すでに1960年代より行われ、核酸に存在するアミノ基や水酸基と固相担体とを架橋させる方法が主流であった。しかし、その多くは水溶液中で行われるため、その効率は極めて低い上に結合可能な対象は、一本鎖のDNAやRNAであり、二本鎖DNAにおいてはほとんど不可能に近い状況だった。最近、DNA合成装置が普及し、有機溶媒中でDNA末端に反応性の高いアミノ基の導入が可能となり、合成した一本鎖を効率よく固相担体に結合させることが可能になった。しかし、生体より抽出した種々の二本鎖DNAを効率よく結合させる方法は限られている。この方法が可能であれば、その特異的配列を利用したハイブリダイゼーションにより、類似DNA配列の検出、分離、あるいは二本鎖DNAの状態でのDNA結合タンパク質の分離精製などに応用できると考えられる。我々は、DNAを固相担体上に効率よく結合させる方法を開発し、さらにリガーゼ反応を用いて特異DNA断片を固相担体に固定するEASY ANCHORを開発した(特許申請中)。

EASY ANCHORは、リガーゼ反応を可能にするため、固相担体上に合成された短い二本鎖DNA“アンカーDNA”が末端結合しているため、以下のような大きな特長を持つ全く新しいタイプの製品である。

リガーゼ反応を用いて簡単にDNA断片の固相化が可能であり、制限酵素による切り出しも可能である。固相化されたDNAは、熱変性させ一本鎖DNA状態でハイブリダイゼーションプローブとして、また、二本鎖DNAの状態でのDNA結合タンパク質の精製に利用できる。アンカーDNAの構造を変えることにより、さまざまな用途に使用できる柔軟性を持っている。

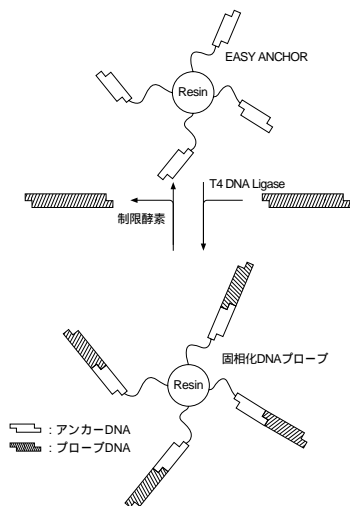
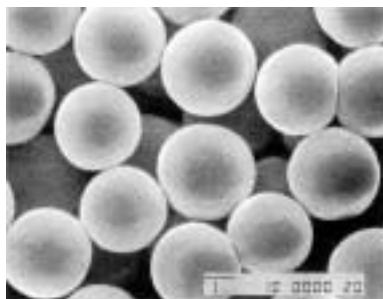


図1 EASY ANCHORの原理



EASY ANCHORの電子顕微鏡写真

2. EASY ANCHOR の使用方法

EASY ANCHORは、直径2.5µmの非多孔質性樹脂上に特殊技術を用いて非常に多くのアンカーDNAを共有結合させたものである。樹脂は極めて親水性であるが、懸濁液水面あるいはチューブ壁面に白い膜状粒子が見られることがある。これは、使用している樹脂の中の親水性の低い粒子と思われる。しかし、ほとんどの実験に支障はない。

EASY ANCHORの表面は、非特異的にタンパク質、核酸が結合しないような処理をしているので、非特異的な結合をほとんど無視することができる。しかし、安全のためBSAなどのタンパク質(0.02~0.04%)を加えて反応する方が良い。遠心分離は、微量遠心機5,000rpm(2K×g)あるいはチビタンのような簡易微量遠心機(約2K×g)を用いて10~20秒間でほとんど沈殿する。この遠心条件下および穏やかなピペット操作による攪拌において、ニッポンジーンでは長いDNA断片(20~30kbp)をほぼ完全な形で固相化できることを確認しているが、結合させたいDNA断片の長さや濃度により、ピーズ間でDNAの架橋を形成する場合がある。その場合、リガーゼ反応後の懸濁は非常に困難で、ピペット操作などで無理に懸濁すると、DNAの細断片化が起こる。効率よく完全な形で固相化を行える条件(例えば、リガーゼ反応時の樹脂濃度やDNA濃度)を予備実験を行って、確認しておくことを奨める。

EASY ANCHORへのDNA断片(制限酵素で切り出したもの)の固相化はT4 DNAリガーゼを用いて行う。従って、固相化の状態は、溶液中でのリガーゼ反応の様式に従う。例えば、1つの制限酵素で切り出されたDNA断片は“head-to-head”あるいは“head-to-tail”のランダムな連なりとなって固相化される。この場合は、プローブのモル比を上昇させる結果となるので、DNA結合タンパク質の分離実験には適しているかもしれない。しかし、ハイブリダイゼーションプローブとして使用したり、鎖の方向性が重要な場合には適していないかもしれない。このような場合には、DNA断片の一方を脱りん酸化しておくこととタンデムに連なる固相化を防ぎ、方向性も規定できる。いずれにしても固相化を行う場合、DNA断片の調製方法は、あらかじめ十分検討する必要があると思われる。



図2 EASY ANCHORの種類

3. EASY ANCHOR の実験例

EASY ANCHOR への DNA 断片の固相化例

1) 材料と方法

DNA断片の調製

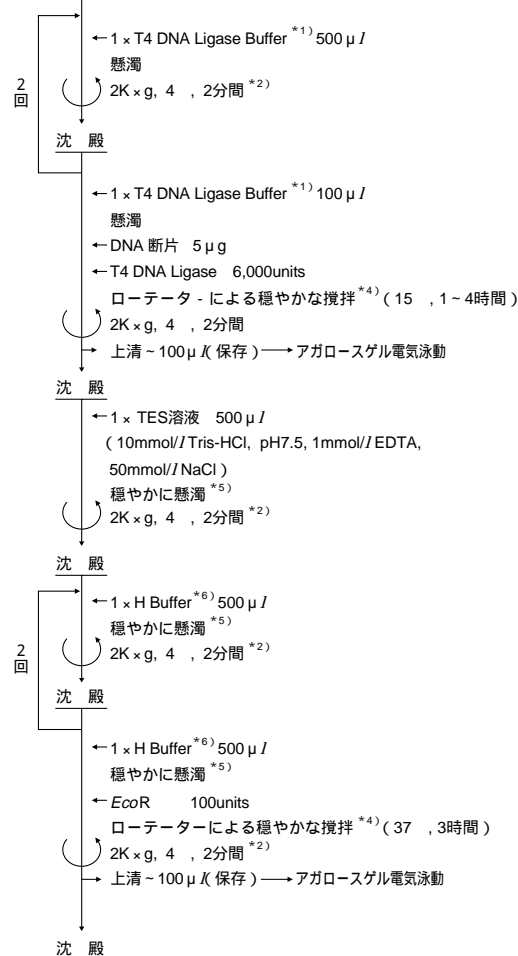
a) P/HBE断片の調製

プラスミド pUC19 をまず *Hind* で消化し、脱りん酸化後 *EcoR* で処理し、低融点アガロースゲル電気泳動後、約2.7kbpのDNA断片を抽出した。

- b) P/E 断片の調製
 プラスミドpUC19をEcoR で完全消化し、約2.7kbpのDNA断片を調製した。
- c) /EcoR 断片の調製
 DNAをEcoR で消化した。最大断片長は約21kbpである。

EASY ANCHOR EcoR -Nを用いたDNA断片の固相化

EASY ANCHOR EcoR -N (体積50 µl: ゲル体積 5 µl)



- *1) 50mmol/l Tris-HCl (pH7.9), 10mmol/l MgCl₂, 20mmol/l DTT, 1mmol/l ATP, 0.4mg/ml BSA(ニッポンジーン製品 Ligation Pack 中に含まれる10x Ligation Bufferの10倍希釈溶液にBSAを加えたものである。)
- *2) 0.5~1.5m/lの微量遠心の場合、パーソナル遠心分離機「チビタン」による20秒間の遠心分離でも可能である。
- *3) 遠心分離後の沈殿表面にゼラチン様の透明な薄層が生じることがあるが、この部分を取り除いてもDNAアンカー機能に影響はない。
- *4) 7~8K x gで回転させるが、樹脂が懸濁状態を保てるようにすることが重要である。ローテーターがない場合、静置して反応させてもよいが、10~20分間ごとに穏やかに撹拌しなければならない。
- *5) できるかぎり穏やかに、過剰のピペット操作やミキサーによる撹拌は避ける。
- *6) 100mmol/l NaCl, 50mmol/l Tris-HCl (pH7.5), 10mmol/l MgCl₂, 1mmol/l DTT(ニッポンジーン製品 EcoR に添付されている10x H Bufferの10倍希釈溶液である。)

固相化の評価

EASY ANCHOR 上へのDNA断片の固相化の評価は、次のように行った。リガーゼ反応後、固相担体を洗浄し、固相上に結合したDNA断片制限酵素で切り出し、遊離してきたDNA断片を0.8%アガロースゲル電気泳動を行い、DNA断片の結合量および結合様式を推定した。

2) 結果と考察

DNA断片の固相化量

A P/HBE断片



二量体
単位長

B P/E断片



単位長

標準DNA量 (µg) 添加DNA量 (P/HBEあるいはP/E断片 : µg)

Lane 1 : 0.0016	Lane 5, 10 : 0.5
Lane 2 : 0.008	Lane 6, 11 : 1
Lane 3 : 0.04	Lane 7, 12 : 2
Lane 4 : 0.2	Lane 8, 13 : 5
	Lane 9, 14 : 10

図3 DNA断片の固相化量

EASY ANCHOR EcoR -Nに、0.5, 1, 2, 5, 10µgのP/HBE断片あるいはP/E断片を各々加え、T4 DNA Ligaseによるリガーゼ反応を行った(図3)。それぞれのリガーゼ反応後の遠心上清(Lane5~9)は、

- a) P/HBE断片の場合、二量体を形成した。
- b) P/E断片の場合、断片どうしが線状に多数結合したものと環状化したものが認められた。
- 次に、EASY ANCHOR EcoR -Nに結合したDNA断片をEcoR で切断した。それぞれのEcoR 処理後の遠心上清(Lane 10~14)は、
- c) P/HBE断片の場合、約2.6kbpにのみバンドが認められ、2µg以上DNA断片を添加した場合は、EcoR により切り出されたDNA量の増加は認められなかった。
- d) P/E断片の場合、リガーゼ反応に用いたDNA断片量に比例して約2.6kbpのDNA量が増加した。

以上の結果は、一端を脱りん酸化したDNA断片(P/HBE断片)を用いることにより、樹脂上にプローブの方向性を規定した固相化が可能であることを示している。また、今回の実験条件下での固相化量は、添加DNA量が約2µgで飽和に達している。しかし、脱りん酸化しない場合には、加えたDNA量に比例して固相化量が増加したことを示している。

DNA断片の固相化状態

の「DNA断片の固相化量」を調べた実験でP/E断片を使用した場合、加えたDNA量に比例して固相化量も増大したが、P/HBE断片の場合には飽和点を観察した。このことから、

P/E断片はタンデムな連なりとなって固相化され、かつ方向性が規定されていると予想される。そこで、以下のようにしてこの固相化状態を確認した。使用したEASY ANCHORのアンカーDNA中に存在する*Not* 部位を*Not* で切断し、遊離してくるDNAをアガロースゲル電気泳動で評価した(図4)。

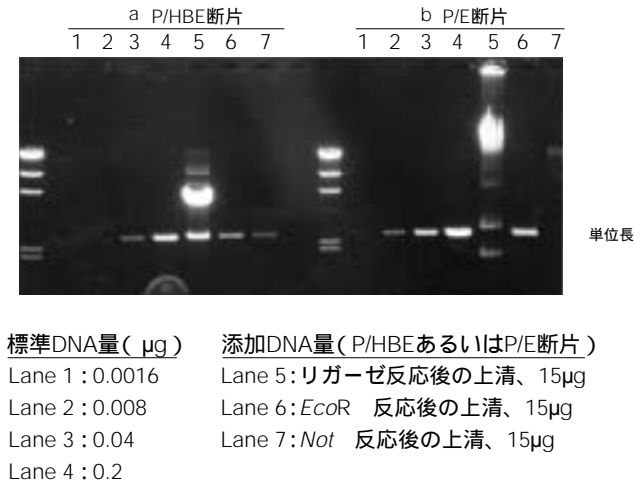


図4 DNA断片の固相化状態

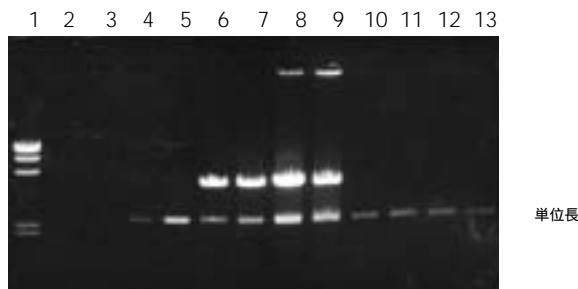
- a P/HBE断片を使用した場合、Lane 6、7で単位長のDNA断片が回収され、回収率は約7%であった。
- b P/E断片を使用した場合、Lane 6(*EcoR* 反応)ではP/E断片の単位長のDNA断片として、Lane 7では単位長よりも大きな分子として、すなわちタンデムな連なりとなった形でDNAが回収された。

以上の結果より、P/HBE断片を使用した場合にはDNA断片の一端が脱りん酸化されているため方向性を規定された一つの断片が、P/E断片を使用した場合にはタンデムな連なりとなって樹脂上に固相化されていることがわかった。

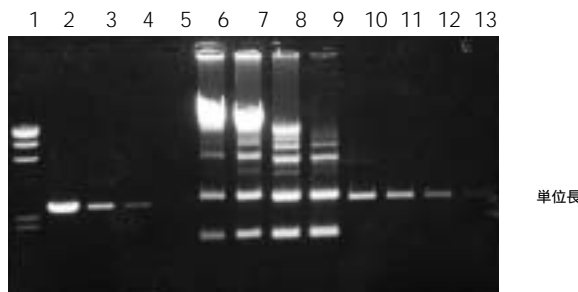
リガーゼ反応における反応体積による効果

これまでの実験は、反応時のEASY ANCHOR濃度、反応体積(100μl)を一定にして行ったが、次の実験では添加するEASY ANCHORとDNA量を一定にし、リガーゼ反応時の体積を変化させて固相化状態を観察した(図5)。

A P/HBE断片



B P/E断片



Lane 1: / <i>Hind</i>	Lane 8: " (500μl) "
Lane 2: 標準DNA量(μg) 0.2	Lane 9: " (1,000μl) "
Lane 3: " 0.04	Lane 10: 6の <i>EcoR</i> 処理後の上清
Lane 4: " 0.008	Lane 11: 7 "
Lane 5: " 0.0016	Lane 12: 8 "
Lane 6: リガーゼ反応 50μl 後の上清	Lane 13: 9 "
Lane 7: " (100μl) "	

図5 リガーゼ反応における反応体積と固相化状態

P/HBE断片の場合、反応体積を変化(50, 100, 500, 1,000μl)させても、リガーゼ反応上清(Lane 10~13)においてほとんど変化は認められないが、P/E断片の場合、リガーゼ反応上清(Lane 6~9)では反応体積が大きくなるとDNA断片の環状化分子が増大し、逆に高分子の結合産物が減少し、固相化されるDNA量も減少した。

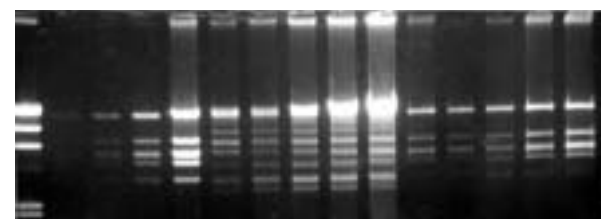
以上の結果は、固相化したいDNA断片の一端を脱りん酸化することにより、反応体積に影響をほとんど受けない固相化が行えることを示している。これは、DNA断片のりん酸基末端が固相上のアンカーDNA末端と出会う機会が増大するためと予想される。

固相化可能なDNA断片長の検討

これまでのモデル実験に使用したDNA断片は、pUC19 DNAより調製した約2.7kbp長のものであった。この程度の長さでは今回行った条件および操作(ピペット操作、遠心操作など)において、ほとんど細断化を受けていない。実際の実験には、それほど長いDNA断片を固相化する機会は少ないと思われるが、以下EASY ANCHOR上へDNA断片の固相化を行うにあたり、どの程度の長さが可能であるかを調べた(図6)。使用したDNA断片は、フェージDNAを*EcoR* で切断したもので、最長断片は21,226bpである。Lane 11~15は、固相化されたフェージDNA/*EcoR* を再び*EcoR* で切断し回収したもので、回収されたDNA断片は、ほとんど細断化を受けていないことがわかる。このことは21,226bpの断片でも固相化が十分可能であることを示している。

しかし、同様のDNA断片を用い、>10μg/10μlの濃度でリガーゼ反応を行ったところ、EASY ANCHORの懸濁が非常に困難になる場合があった。これは、DNA断片を介して樹脂間が架橋されたためと思われ、ピペット操作により無理に懸濁したところDNA断片に細断化が起こった。このような場合、DNA濃度あるいはT4 DNA Ligase量を加減するなどしてできる限り樹脂間でのDNA鎖による架橋形成を抑えることが必要である。

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



Lane 1: / <i>Hind</i>	Lane 9: " 5.0
Lane 2: 標準DNA量(μg) 0.0016	Lane 10: " 10.0
Lane 3: " 0.008	Lane 11: 6の <i>EcoR</i> 処理後の上清
Lane 4: " 0.04	Lane 12: 7 "
Lane 5: " 0.2	Lane 13: 8 "
Lane 6: 添加 / <i>EcoR</i> DNA(μg) 0.5	Lane 14: 9 "
Lane 7: " 1.0	Lane 15: 10 "
Lane 8: " 2.0	

図6 /*EcoR* 断片の固相化

EASY ANCHORを用いた糸状菌CCAAT配列結合因子の精製

1) 方法

チューブ、ピペットマンチップはシリコナイズしたものを使用する。

ゲルシフト・フットプリント解析から明らかになったAnCP^{*1}の結合部位の合成DNA (20-BB) を調製する。

両端が連結可能なように *Bam*H と *Bgl*I 部位が導入してある。

20-BB :



AnCP が結合しないネガティブコントロール実験として、結合部位の配列を改変した合成 DNA (20M-BB) を調製する。このコントロール DNA に AnCP が結合しないことはあらかじめゲルシフト解析により確認してある。

20M-BB :

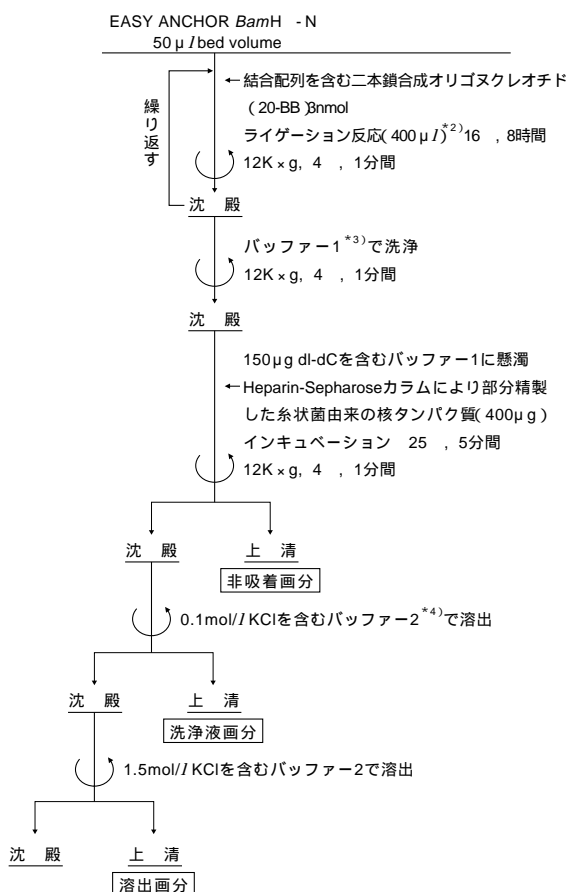


ライゲーション反応により の合成 DNA をそれぞれ EASY ANCHOR *Bam*H -N に固定する。

で作成した樹脂をまず、DNA-タンパク質結合反応に用いる緩衝液で平衡化しておき、そこに dl-dC と核タンパク質を加える。この核タンパク質はヘパリンセファロースカラムにより分画したものをを用いている。

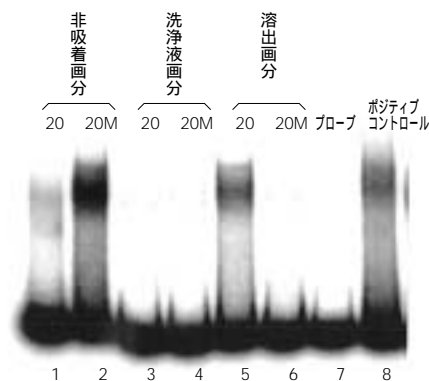
核タンパク質を吸着させた後に、少量の塩 (KCl) を含む緩衝液で洗浄する。

目的とする因子 AnCP をさらに塩濃度を上げた緩衝液で溶出する。



- *1) CCAAT 配列結合因子の一つで、糸状菌 *カビ* のアミラーゼ遺伝子の発現を顕著に促進する因子
- *2) EASY ANCHOR と合成オリゴヌクレオチドを含んだ反応溶液の total volume
- *3) パッファー1組成
60mmol/l KCl, 25mmol/l HEPES-KOH, 25mmol/l EDTA, 1mmol/l DTT, 0.1mmol/l PMSF, 1 µg/ml antipain, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml chymostatin, 1 µg/ml pepstatin, 10% (w/v) glycerol, 0.01% (w/v) Triton-X100, pH7.9
- *4) パッファー2組成
15mmol/l HEPES-KOH, 25mmol/l EDTA, 1mmol/l DTT, 0.1mmol/l PMSF, 10% (w/v) glycerol, pH7.9

2) 結果と考察



- Lane 1 スクレオチド20-BBを用いた時の非吸着画分 10 µl
- Lane 2 スクレオチド20M-BBを用いた時の非吸着画分 10 µl
- Lane 3 スクレオチド20-BBを用いた時の洗浄液画分 15 µl
- Lane 4 スクレオチド20M-BBを用いた時の洗浄液画分 15 µl
- Lane 5 スクレオチド20-BBを用いた時の溶出画分 15 µl
- Lane 6 スクレオチド20M-BBを用いた時の溶出画分 15 µl
- Lane 7 プロープのみ
- Lane 8 ポジティブコントロール (部分精製核抽出物)

ゲルシフト法による解析から、結合配列を含むオリゴヌクレオチド (20-BB) を用いた場合、その結合活性の大部分が 0.27mol/l KCl 溶出画分に見られるのに対し、コントロール DNA (20M-BB) を用いた場合ではほとんどの結合活性が非吸着画分に存在していることがわかる。この結果は制御因子 AnCP がヌクレオチド 20-BB を用いた時に特異的に樹脂に結合し塩によって溶出し得ることを示している。核抽出物における AnCP の含有量は非常に低いので、この段階では SDS-PAGE 上で AnCP に由来するバンドを検出できなかった。しかしながら、このアフィニティー精製1ステップのみで本因子を約100倍に精製することに成功しており、このアフィニティー精製法が簡便でかつ有効な手段となり得ることがわかる。

参考文献

- 1) Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N.: *Mol. Gen. Genet.*, **254**, 119 (1997)
- 2) Kato, M., Aoyama, A., Naruse, F., Tateyama, Y., Hayashi, K., Miyazaki, M., Papagiannopoulos, P., Davis, M. A., Hynes, M. J., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N.: *Mol. Gen. Genet.*, **257**, 404 (1998)

(提供: 名古屋大学大学院生命農学研究科)

生物機構・機能科学専攻 分子細胞機構学講座

加藤雅士先生)