

2014年7月31日(木)、8月1日(金) 9:00~17:00

首都大学東京「大腸菌からのDNA分離解析と塩基配列決定」

講師

加藤潤一先生

古屋伸久先生

実験①「塩基配列の決定」

実験前の説明

- ・大腸菌が一番よくわかっている生物
- ・全体のスケジュールについて
- ・ピペットマンの使い方

Sequencing 反応の講義

今でもサンガー法での塩基配列決定法を行っている。
操作自体はとっても簡単。

よく使われている大腸菌の菌株
460万bp
すべての塩基配列が公開されている。
データベースがある。

「PEC」で検索するとでてくる。
遺伝子の名前で検索すると、「配列」や「すでにわかっている機能」、「環状DNAでの位置」
などがでてくる。

今日はparCという遺伝子を使う。

※parはpartitionからきている。細胞分裂のときに染色体がうまく分裂しなくなる。

ある遺伝子が「必要なものかどうか」は配列をみただけ
ではわからない。

大腸菌は、そのへんがよく研究されているので、成果が蓄積されており、それを利用する
ことができる。

たとえば、生存に必須であれば「essential」とでてくる(それまでの研究でわかっている)。

緑は「non essential」

赤は「essential」

その遺伝子をとっても生きていけるか、という実験から同定されている。

自然界から大腸菌をとってくると、実験で用いている大腸菌とはけっこう違っている。
バクテリアというのは、遺伝子の水平移動がけっこう起きている。

O157のような、病院等で薬剤による選択圧がかかっているようなものはけっこう変わる。

ふつうの大腸菌と1000個くらい違うものがある。

ふつうの大腸菌しかもたない遺伝子やその逆もある。

サンガー法の説明

DNAポリメラーゼの役割は、「3'末端に新しいヌクレオチドをくっつけて伸長していく」こと。

DNAの複製時には、開いたDNA二本鎖にRNAが結合することで始まる。だから、DNAの複製に先立ってRNAの合成が起こる。

ギャップのところでは、まずRNAを取り除き、そこに新たなDNAを付加する必要がある。

複製で使うポリメラーゼと、ギャップを埋めるポリメラーゼ。

塩基配列決定に使うのは、「ギャップを埋めるポリメラーゼ」。こちらの方が単純なのでよい。

「複製で使うポリメラーゼ」は、10種類以上のタンパク質の複合体なので、難しい。

用意しておくのは、「普通の（水酸基あり）ヌクレオチド」と「特殊な（水酸基なしの）ヌクレオチド」。

ランダムにある確率で取り込まれる。

数十塩基位の短いプライマーで十分。

人工的にDNAを増幅するときには、DNAプライマーでもOK。

人工的なDNAの合成は短いものしかできない。

反応後はエタノール沈殿で回収

※得られたゲノム配列が完全に正しいわけではないことに注意。

一回に読めるのはせいぜい長くて1000塩基。

その短いDNAの重なりでつなげていく。

ショットガンシーケンシングだと、もっと短い数十塩基のものを大量に読んでつなげていく。

実験について

DNAのどちらの鎖を読むかを決める必要がある。

原理的には片方を読めば、もう片方は自動的に決定できるはず。

しかし、シーケンスのエラーがあるので、確実にしたいときには、両方の鎖を読む。
ノイズが入ったりしてちゃんと読めてなかったりもあるが、両側から読めば補える。

プライマーの設計は業者に発注すればやってもらえる。一塩基あたり100円とかで1～2日で作ってくれる。

野生型 (W) と温度感受性変異体 (T s)
両方向のシーケンスを2回別々に行う (F と R など で 区 別 する)

2名一組で10班。
班ごとに、WかT sを選ぶ (F と R はそれぞれ行う)

① (1) Sequencing 反応の為の準備

プライマーDNA、鋳型DNA、反応用酵素 (熱耐性DNAポリメラーゼ、蛍光標識された基質など) を混合
その後、サーマルサイクラーに装着。

※アニーリング時に、プライマーと大腸菌の環状DNAがくっついたときに、環状DNAの残りの部分も適当に塩基対を形成することがある。

伸長反応にはヘリカーゼが必要なのでは??でも、大丈夫。

そんなに全長にわたって塩基対を再形成するわけではない。

数塩基とかなら、DNAポリメラーゼがおしのけていく。

あんまりがっちりくっついていたら伸長反応は失敗することもある。

でも、何サイクルもやるから大丈夫。

※環状DNAではないDNAのPCR反応などでもステムループをつくったりしているらしい。

でも、DNAポリメラーゼがおしのけていく。

※DNAポリメラーゼには、ヌクレアーゼ活性もあったりする。それで、いろんなことを解決しながら伸長反応を進めることができる。

今回使用しているポリメラーゼにはヌクレアーゼ活性はない。

サーマルサイクラー開始

① (2) エタノール沈殿

反応液+EDTA (DNA分解酵素の活性をなくす) +エタノール

15分精置

ここでDNAが沈殿してくるはず。

20分間遠心分離

上清を捨て、70%エタノール加える。

その後、2分間遠心分離。

上清を除き、5分間乾燥（乾燥遠心器）

①（3）Sequencerによる塩基配列の決定

ホルムアミドでDNAを変性させる（すべてを1本鎖にしてから電気泳動にかけるため。共有結合には影響なし）。

さらに、加熱処理でDNAを変性させる。

95℃2分間加熱

専用チューブに内容物を移して、Sequencerにかける。

※ここで一晩置く。

解析結果の読みとり

野生型（W）と温度感受性株（Ts）の配列を比較して、変異がどこに入っているかを分析する。

●読みとり・解析のポイント

・F（フォワード）とR（リバース）では、読む方向が逆向きなので、「逆向き、かつ相補的な配列」にすると一致する。

●生データの面白さ

・シーケンサーでも読みとれないことがある！

・一つのピークなのに、あるときには「塩基1個」あるときには「塩基2個」と配列の数が異なるように出力してくることがある。

・コンピューターが出力してきた「塩基配列」は、あるアルゴリズムの結果としてのアウトプット。ここで違いがみられたら、「ピークの形」もみる。明らかに違っていることが確認できるはず。

→コンピューターだと、ピークがうまく検出できていないこともある。このへん、人間の目の方がおおざっぱに全体をとらえることが得意なので有利なこともある！

生徒課題例

●配付資料

・4種類の解析データ（WF、WR、TsF、TsR）

・調べた領域の塩基配列とアミノ酸配列（場合によってはなくてもよいかも）

●課題

課題1 WFとTsFを比較して、変異の入っている位置を見つけよ。

課題2 WRとTsRを比較して、変異の入っている位置を見つけよ。

課題3 課題1と課題2で見つけた変異の位置の前後の配列が、FとRで「逆向きかつ相

補的」になっていることを確認し、見つけた変異の位置が双方で同じ場所に対応していることを確認せよ。

課題4 見つけた変異の位置が、実際の遺伝子の何番目の塩基が変異したものか、資料をもとに指摘せよ。また、その塩基置換により、指定するアミノ酸が何から何に変化しているか確認せよ。

課題5 課題4からわかったアミノ酸の変換は、タンパク質の立体構造と機能にどのような影響を及ぼすと考えられるか、アミノ酸の性質の違いにふれて説明せよ。

課題6 「生データ」の解析をして気づいたことをまとめよ（コンピューターはどんなことが得意？どんなことが苦手？人間はどんなことが得意？どんなことが苦手？）

実験②「大腸菌へのプラスミドの導入とDNA、RNAの解析」

大腸菌へのプラスミドの導入（講義）

大腸菌は、37℃で栄養状態がよいと20分に一回分裂可能。

ゲノムDNAは環状。プラスミドDNAも環状。
増えるための「装置」がある。その装置を持っているから、どちらも増殖可能。

●大腸菌にDNAを取り込ませる

肺炎双球菌は、なにもしなくてもDNAを取り込む能力がある。

大腸菌はそういう能力はない。

だから、あらかじめ「処理」しておく必要がある。

塩化カルシウムの溶液に浸すだけでよい。

※対数増殖期の大腸菌はうまくいくことが多いが、定常期ではうまくいかないことが多い
(経験的な理解)

枯草菌なんかは、DNAを取り込む「装置」についてある程度わかっている。

大腸菌については、DNAを取り込むしくみはよくわかっていない。

でも、うまくいくから世界中で使われている。

●エレクトロポレーション

2.5kV、5ms、電圧をかける。

細胞膜に穴があく。

数10%の菌は死ぬ。

でも、残った菌は、かなりの頻度で取り込む。

※あらかじめ、塩を取り除くのにグリセロールで何回も洗う必要あり。

②(1) 大腸菌へのプラスミドの導入（形質転換）

午前中は、大腸菌培養のしかけ。

LB培地に一晚培養した大腸菌1ccを入れる。

→しんとう培養1時間

バーナーをたいて、そのそばで操作を行う。

※カビがコンタミしても、大腸菌の方が増殖が速いからけっこう大丈夫。

一晚の培養で、1ccに10の9乗匹くらいいる。

増殖した大腸菌の確認、遠心用チューブへ移す（バーナー近くで無菌操作）

遠心分離（3500rpm、5分）

遠心分離後、上清を捨て、残った液でけんだく。そこに再び10cc塩化カルシウム溶液を加えて10分精置。

13 : 15 遠心分離2回目開始

※カルタヘナ法により、遺伝子操作をした生物は必ず殺してから廃棄する。上清にもいるので、水道には流さない！

※大腸菌は塩化カルシウムに入れてからは激しい操作をしない方がよいといわれている。

今回使用するプラスミド

pACYC184

4.2Kbp

抗生物質耐性遺伝子あり（クロラムフェニコールに対して耐性あり）

※DNA分解酵素はほとんどのものがMg要求性。だから、キレート剤としてEDTAと入れておく。

※RNA分解酵素は煮沸したときには活性がなくなるけど、冷やすとまた活性がでる。ターミネーターのようなやつだ。

市販のRNA分解酵素をそのまま使うと、実はDNA分解酵素も入っている。だから、そのまま使うと、RNAを分解したつもりが、DNAを分解しちゃうことになる。説明書には、「使用前に加熱せよ」と書いてある（DNA分解酵素のみが失活）。

遠心分離後、できる限り上清を除く。

これ以後、冷やしながらか操作。

0.1M CaCl₂ 溶液 0.2ml を加えてください。

それを、0.1ml ずつ、以下の2種類のチューブにそれぞれ加える。

- ・プラスミドDNA（0.01ml になっている）
- ・TE（トリスバッファー、0.1ml になっている）こちらは単なるコントロール

0℃、10分間精置

※この段階でDNAはコンピテントセルとなった大腸菌にとりつき、細胞内に取り込まれるものもある。

42℃、3分間保温（ヒートショック）

※これをする、取り込みの効率がよくなるといわれている（しなくてもよいらしい）

その後、0℃、3分間精置

LB培地 1ml に全量を加え、37℃、30分培養

（大腸菌を増やすことが目的ではなく、取り込まれたプラスミド由来の遺伝子を発現させることが目的。そうでないと、薬剤耐性を発揮できずに死んでしまう）

チューブをかくはんし、0.1ml をとって寒天培地にまき、スプレッダーで広げる。

※スプレッダーはエタノールで滅菌しておく。その後、バーナーであぶる（滅菌ではなく、エタノールを除くことが目的）。エタノールが完全になくなるまで熱するけれど、熱すぎる

と大腸菌が死んでしまう。寒天で冷やすとよい。

※プラスミドは細胞分裂以外のときでも複製されているのか？

プラスミドには様々な種類がある。

F 因子という性別を決めるプラスミドは1細胞に1コピーだけ。

今回使っているプラスミドなどは、20コピー程度。

もっと多数のコピーをもっているものもある。

※いつどれくらいコピーされるのかはどうやって決まる？

わかっているものもある。

まずは複製開始点の「ori」。これは、その部分の塩基配列が重要。

細胞内のタンパク質がその配列にくっつくだけで複製が開始するものもある。

そのほかに、そのプラスミドの遺伝子が発現してできたタンパク質が「ori」にはたらいて複製が始まるものもある。

いずれにせよ、「複製するための装置」がそれぞれのプラスミドで異なる。

② (2) 大腸菌へのプラスミドの導入 (エレクトロポレーション)

グリセロールで3回ほど洗う。

※塩が残っていると電圧をかけたときにイオンの存在で電流が流れて大腸菌が「焼け死ぬ」。

だから、できる限り塩を取り除きたい。

グリセロールが電離しないので、エレクトロポレーションに適している。

大腸菌と DNA をまぜ、専用のキュベットに入れて電圧をかける (一瞬)。その後、培養液を加える。

※電圧をかけた後、できる限り素早く培地を加えてやることが生存率に重要。

実験③「大腸菌からのDNA、RNAの抽出」

大腸菌染色体DNAの抽出

●細胞表層の違い

- ・グラム陰性菌（大腸菌など）

細胞膜が二重。

細胞膜と細胞膜の間の空間（ペリプラズム）にうすい細胞壁がある（ペプチドグリカン）。

- ・グラム陽性菌（枯草菌など）

細胞膜が一重。

その外側に厚い細胞壁がある。

染色体DNAを抽出するには、これらを壊すのが大事。

●手順

大腸菌（1mlに10の10～11乗）

これに

- ・タンパク質分解酵素（ProteinaseK）
- ・SDS

を加えて、mixerで混ぜる。

その後、42℃で2時間。

細胞壁は「ペプチドグリカン」

糖が共有結合がつながったものに、ところどころペプチドがでていて、それらも共有結合している。

このペプチドの架橋を切るためにタンパク質分解酵素を使う（細胞壁の強度を下げる）。

ただ細胞壁を壊してもダメ。

DNA分解酵素や何か

細胞を壊すと同時にタンパク質を変性させないといけない（DNA分解酵素などは普段は制御されているが、細胞が壊れると制御はきかなくなる）。

だからSDSでタンパク質を変性させる。

ProteinaseKはとっても強い酵素なので、SDS処理でも活性が残る。

2時間待ち

DNAの回収

これで、「染色体DNA」の準備はOK。

プラスミドDNA、RNAの抽出

2種類の大腸菌（プラスミドを持つもの、持たないもの）それぞれで操作を進める。

円心分離で大腸菌を落とす。その後、上清を捨てる。
以下の3種類の溶液を入れる。

溶液1：トリス（緩衝液）、EDTA（キレート、DNAaseをおさえる）、リゾチーム（細胞壁の糖の分解）、グルコース（高張液）
※この時点で細胞壁がなくなるが、ここで溶菌するとSDS等タンパク質を変性させるものがないので困る。

溶液2：水酸化ナトリウム（アルカリでタンパク質を変性）、SDS（界面活性材）

溶液3：酢酸カリウム（アルカリの中和、カリウムの効果）
SDSはナトリウム塩。すごく溶解度が高い。でも、カリウムを加えると、カリウム塩になり、溶解度が下がる。
SDSがはたらかなくなると、タンパク質が溶解できなくなり、白く析出してくる。
このとき、染色体DNAは大きいので、一緒の沈殿に。
プラスミドDNAは小さいので上清に。

操作開始

溶液1 + 溶液2

溶液が透明になったことを確認（細胞が溶けて中のDNAが溶けたということ）

溶液3

白く濁る（タンパク質が析出）

遠心分離5分

上清だけを取り、再び遠心分離5分

上清だけを取り、イソプロピルアルコール中に移す
ここでプラスミドとRNAが沈殿してくる。

遠心分離5分

エタノールを加える（沈殿を残すためにかくはんしない！）

遠心分離1分

上清を捨てて、ふたをあけて10分乾燥

TEを加えて、電気泳動用のサンプル完成。

※イソプロピルアルコールの方が脱水力が強いので、より強く落とすことができる。
その後、アルコールを使うのは洗いのため。

電気泳動

調整できた材料は

「染色体DNA」

「NO（RNAのみ）」

「322（プラスミド+RNA）」

溶液は、

1、TM

2、TM+DNase

3、TM+RNase

A NO+1

B 3 2 2 + 1

C NO+2

D 3 2 2 + 2

E NO+3

F 3 2 2 + 3

G 染色体DNA

λ (マーカー)

の8レーン

混ぜたら、37℃で10分間(酵素反応させる)

その後、マーカーを加えて電気泳動開始。

TM: トリス+マグネシウム

S: マーカー(酵素反応ストップさせるはたらきもある)

電気泳動開始

終了後、写真撮影までやってもらえる。

紫外線を当ててゲルの観察(デモ)

それぞれの班の結果の写真を配布。それぞれで考察。

※RNAに関して

rRNAがほとんど。tRNAも多い。mRNAはほんの少し。

しかも、mRNAは様々な長さのものがあるので、あったとしてもバンドとしては見えない。

※DNase処理によってRNAのバンドが小さくなった(比較的分子量の大きな方のバンドが消えた)。なぜか?

DNaseにRNaseがコンタミしていた可能性。

※λファージ 50Kbp。それをヒンジIIIで切断したものがマーカー。

これは、「線状DNA」のマーカー。

23、9、6、4.4、2.5、2.0、0.6

プラスミドは、同じ分子量のものよりも移動度が大きい。これは環状かつスーパーコイルであるため。

環状構造がゆるんだものについては移動度が下がること(少し上にバンドが見えることがある)。

その他の質問

●トポイソメラーゼについて
からんだ DNA をほどくのが「トポイソメラーゼ」。

DNAに関するトポロジーの問題は2つ。

①「ゆるんだ環状」と「超らせん」

同じ物質だけど、トポロジーが違う、と表現できる。

ねじれる方向によって、「ネガティブな超らせん」と「ポジティブな超らせん」がある。

細胞内ではすべて「ネガティブな超らせん」をとっている。

トポイソメラーゼは、このねじれを「切って」「もどして」「つなげる」ことをやっている。

トポイソメラーゼを阻害すると、細胞は死ぬ。

トポイソメラーゼの阻害剤としても使われる（抗生物質の一種）。

抗ガン剤としても使われる。

②環状DNAがつながっている場合

二つの輪がつながっていたら、「切って」「もどして」「つなげる」ことをする（先ほどと同じ）

トポイソメラーゼには様々な種類があり、

「切る」「つなげる」「ねじれをほどく」「ねじれを生み出す」

などの活性がある。

複製フォークの問題点

複製フォークの前方に「ポジティブなねじれ」ができてしまうことがある。

これを解消するのが **topo II (gyrase)**

これが解消しないで残ってしまい複製が終わると、「カテナン」という、環状2つがつながった輪になってしまう。

これを解消するのが **topoIV**（加藤先生が発見）

●条件致死

多くの場合には **Ts**（高温感受性）の変異株としてとってくる。

25℃くらいから増殖して42℃くらいまでいきる。

42℃だと生育できないものがある。これが条件致死（42℃になると、立体構造がとれなくなって活性を失うから致死、ということ??）

●プラスミドに2種類の抗生物質耐性遺伝子が必要な理由

セレクションのため（古くからのセレクション）。

●相同組換え

高等真核生物は相同組換えの活性は減数分裂のときだけ高い。

そのために、切断の傷を修復するのが不得意。

原核生物や下等真核生物だと、傷がついても、相同組換えが常に活性が高いので、それで修復できたりする。