

酵素標識プローブによるシングルコピー 遺伝子の検出^{*1}

安積 大治^{*2} 原田 竹雄^{*3}

佐藤 毅^{*2} 松川 勲^{*2}

酵素の化学反応を標識として利用した、サザンハイブリダイゼーションによるシングルコピー遺伝子の検出について検討した。材料としてトマト上位葉から抽出した全 DNA を用いた。DNA を制限酵素で分解した後に電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。プローブとしてトマト核 DNA のリブローズ-1, 6-2 リン酸カルボキシラーゼ (Rubisco) の小サブユニット 3 A のクローンをを用い、プローブ DNA の標識は、ECL 遺伝子検出システム (アマシャムジャパン社) 法によった。サザンハイブリダイゼーションの結果、シングルコピー遺伝子である Rubisco 小サブユニット 3 A が検出された。トマトのゲノムサイズから概算すると検出感度は約 5 pg であった。また、プローブとして DNA だけでなく RNA も利用できることが示唆された。

I 緒 言

植物の有用遺伝子を単離、解析することは、遺伝子工学的手法による作物の新品種育成の第 1 段階となる。これらの手法を用いるに当たり、特定の DNA 配列を持つ遺伝子断片を検出するサザンプロットハイブリダイゼーション^{*)} 法¹⁰⁾ は特に重要な技術であり、各種の遺伝子の検出や RFLP (制限酵素断片長多形)²⁾ などに広く利用されている。しかし本法は通常、放射性同位元素によって検出を行うため、³²P などによってプローブ DNA を標識しなくてはならない。そのため、実験に際して特別な施設や器機を用いなければならず、また取扱にも細心の注意が必要である。

近年、放射性同位元素を用いずにプローブを標識する方法がいくつか開発され、実用化されている。主な手法としてはビオチンやフォトビオチンを用いるもの^{5,3)}、またジゴキシゲニンを用い

るものなどがあげられる。しかし、これらの方法は放射性同位元素による標識法と比較して検出感度が低く、1 細胞当りのコピー数の多い葉緑体やミトコンドリアなどの遺伝子の検出は可能であるが、1 細胞当り 1 コピーしか存在しない、核ゲノム上のシングルコピー遺伝子の検出は困難であった。

ホースラディッシュのパーオキシターゼによる DNA の標識は Renz M. and Kruz C. (1984) によって報告されている⁹⁾。またパーオキシターゼの化学ルミネセンス反応については Kricka L. J. et al. (1983) によってヨーロッパの特許に登録されている。さらにこの反応を利用し、ドットプロットハイブリダイゼーションによってプラスミド pBR 322 遺伝子が検出された⁷⁾。そして近年この手法を応用した DNA 検出用のキットがアマシャムジャパン社から発売されている (ECL 遺伝子検出システム)。

そこで我々はこの手法を用い、DNA プローブのホースラディッシュパーオキシターゼによる化学ルミネセンス反応を標識として利用した、植物

1990 年 10 月 2 日受理

^{*1} 本報の一部は、1989 年度日本育種学会、作物学会北海道談話会講演で発表した。

^{*2} 北海道立中央農業試験場、069-13 夕張郡長沼町

^{*3} 同上 (現、弘前大学農学部、036 弘前市文京町)

^{*)} 語註参照

のシングルコピー遺伝子の検出について検討し、さらにプローブとして RNA を利用する場合についても検討を行った。

II 試験方法

1. 供試材料

供試植物として、トマトの栽培品種、「強力米寿2号」を用いた。発芽2～3週間後の幼植物体の上位葉約0.2gから臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)法⁹⁾によって、全DNAを抽出し、実験に供した。

2. 実験方法

トマトの全DNA 0.25～1.0 μ g をそれぞれ4種類の制限酵素、HindIII, Sal I, Kpn I, Pst I で分解した後に、0.8%アガロースゲルで16時間電気泳動した。電気泳動後、DNAを0.4Mの水酸化ナトリウム(NaOH)でナイロンメンブレン(アマシャムジャパン社 Hybond-N+)にトランスファーした。ゲルの前処理や、トランスファーした後のベーキングなどの操作は行わなかった。

フィルターにハイブリダイゼーションバッファー(アマシャムジャパン社 ECL 遺伝子検出システム)を加え、42°Cで振とうして、20～30分間プレハイブリダイゼーションを行った。

プローブとして用いるDNAまたはRNAは0.2 μ g/20 μ lに調整した。DNAプローブは沸騰水中で5分間熱変性し、RNAプローブは熱変性を行わずに、これに標識試薬であるホースラディッシュパーオキシターゼ(HRP)-ポリエチレンイミン(PEI)複合体(アマシャムジャパン社 ECL 遺伝子検出システム)を20 μ l加えた。続いてグルタルアルデヒド溶液(アマシャムジャパン社 ECL 遺伝子検出システム)を20 μ l加え、軽く攪拌して、37°Cで10分間インキュベーションした。

インキュベーションの間に負電荷を有するDNAと正電荷を帯びた標識試薬とがグルタルアルデヒドを介して結合し、プローブDNAが標識される。標識されたプローブをプレハイブリダイゼーションバッファーに加え、振とうしながら42°Cで約16時間ハイブリダイゼーションを行った。

16時間後、一次洗滌液(6M尿素, 0.4%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS), 0.5×SSC**)で42°C, 20分間の洗浄を2回、続いて二次洗滌液(2×SSC)で室温, 5分間の洗浄を2回行い、フィルターから非特異的に結合しているプローブを除去した。フィルターを検出試薬1, 2(アマシャムジャパン社 ECL 遺伝子検出システム)の混合液に1分間浸し、サランラップでフィルターを覆った後、暗室内で高感度フィルム(アマシャムジャパン社 Hyperfilm-ECL)を重ねて化学ルミネセンス反応による励起光を1～60分間露光させ、これを現像した。

III 結果

1. 葉緑体DNAの検出

まず1細胞当りの遺伝子コピー数の多い葉緑体DNAについて検出を行った。トマトの全DNAを0.25 μ gずつ取り、それぞれSal I, Kpn I, Pst Iで分解した。プローブとしてイネ葉緑体DNAのクローンであるBamH I -1 (19 kbp)を用いてハイブリダイズしたところ、Sal Iでは22 kbpの1本、Kpn Iでは12 kbp, 6.7 kbp, 6.4 kbp, 3.3 kbpの4本、Pst Iでは22 kbp, 19 kbpの2本の断片が検出された(図1)。プローブとし

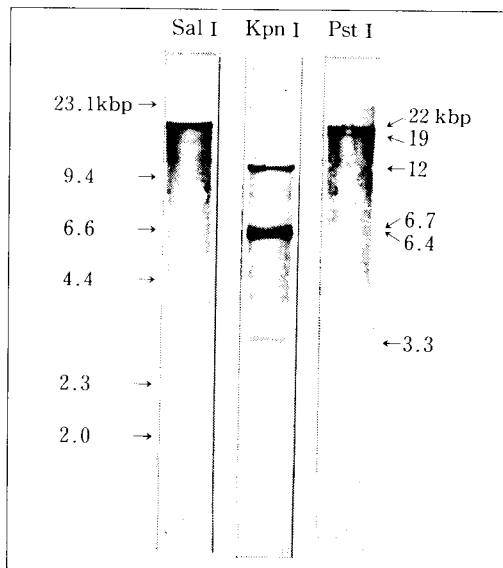


図1 トマト葉緑体遺伝子の検出

トマト全DNA 0.25 μ g を Sal I, Kpn I, Pst I で分解後イネ葉緑体DNAのクローンであるBamH I -1 (19 kbp) をプローブとしてハイブリダイズした。

** 語註参照

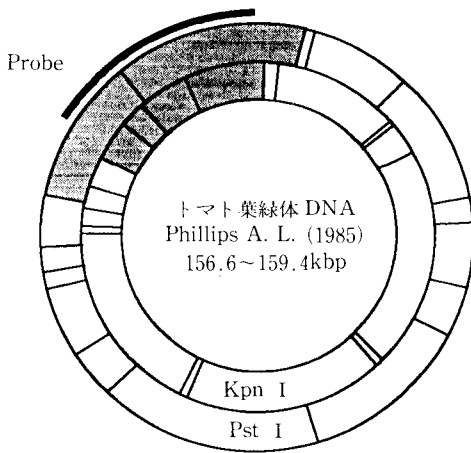


図2 トマト葉緑体制限酵素地図
Phillips A.L.(1985)
品種：Alisa Craig
網かけ部：Probeに対応する断片

て用いた 19 kbp のイネ葉緑体 DNA のクローン BamH I - 1 は、Phillips (1985)⁹⁾ の示したトマトの葉緑体の制限酵素地図 (図2) に対応しており、Kpn I, Pst I についてはそれぞれ図2の4つの断片、および2つの断片のサイズに一致していた。したがって BamH I - 1 をプローブとして検出された断片は、トマト葉緑体 DNA の相同領域と考えられる。

2. シングルコピー遺伝子の検出

続いて1細胞当たり1コピーしか存在しないシングルコピー遺伝子の検出を試みた。検出する遺伝子として核 DNA に存在する Rubisco の小サブユニットの遺伝子を選んだ。

Sugita M. et al. (1987)¹⁰⁾ によればトマトの Rubisco の小サブユニットの遺伝子 (rbcS) は、図3のように rbcS-1, 2, 3 の3つに分けられ、rbcS-3 はさらに rbcS-3 A, 3 B, 3 C に分けられる。ここで rbcS-1, 3 は2番の染色体上に、rbcS-2 は3番の染色体上に存在する。また、rbcS-1, 3 A, 3 B, 3 C にはそれぞれ2つの、そして rbcS-2 には3つのイントロン***が存在し、rbcS-1, 3 のイントロンは類似している。エクソン***領域の塩基配列は rbcS-1, 2, 3 の間で

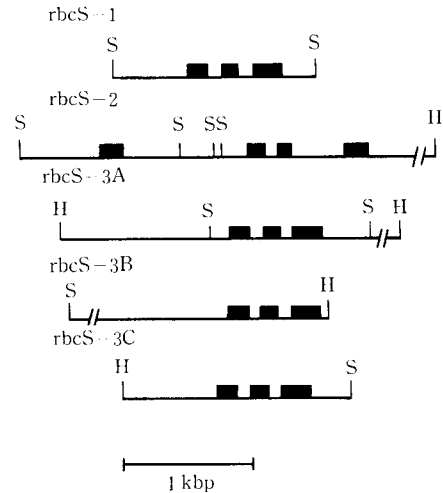


図3 トマト Rubisco 小サブユニット遺伝子
Sugita M. et al. (1987)
品種：VENT LA 1221 cherry line
S : Sau3A I
H : Hind III
■ : エクソン領域

10~14%程度異なっているが、rbcS-3 A, 3 B, 3 C は相同性が高く、rbcS-3 A と 3 C は同一である。本試験では、プローブとして rbcS-3 A の遺伝子のクローンを用い、トマトの Rubisco 遺伝子の検出を行った。

まず rbcS-3 A の Hind III 断片、3.9 kbp をプローブとしてハイブリダイズを行った。フィルターは葉緑体 DNA の検出に用いたのと同じものを用い、これにリプロービングを行った。Sal I では 16 kbp, Kpn I では 18 kbp, そして Pst I では 15 kbp にそれぞれ1本の断片が検出された (図4)。コントロールとして Pst I により線状化した pUC 19 をプローブとしてハイブリダイズしたところ、検出断片が得られないことから検出された断片は rbcS-3 A の Hind III 断片の相同領域と判断された。

プローブとして、rbcS-3 A の Sau 3 A I 断片 (1.4 kbp) を用いて同じフィルターにリプロービングした (図5)。3.9 kbp の Hind III 断片をプローブとした時と同じサイズの断片が検出されたが、シグナルは低くなった。

*** 語註参照

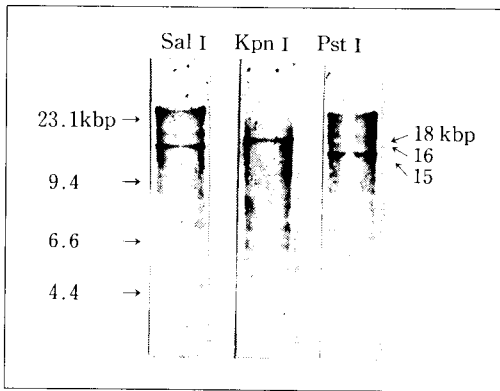


図4 トマト Rubisco 小サブユニット遺伝子の検出 1
トマト全 DNA 0.25 μ g を Sal I, Kpn I, Pst I で分
解後 rbcS-3A/HindIII (3.9kbp) をプローブとして
ハイブリダイズした。

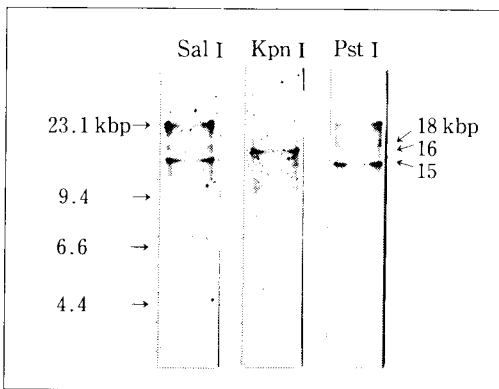


図5 トマト Rubisco 小サブユニット遺伝子の検出 2
トマト全 DNA 0.25 μ g を Sal I, Kpn I, Pst I で分
解後 rbcS-3A/Sau3A I (1.4kbp) をプローブとして
ハイブリダイズした。

3. RNA プローブによる rbcS-3 A 遺伝子の 検出

RNA プローブを用いて rbcS-3 A 遺伝子の検出を試みた。プラスミド BLUESCRIPT を用いた *in vitro* 転写システムにより合成した RNA をプローブとして使用した。

BLUESCRIPT はマルチクローニングサイトの両側に T₇, T₃ プロモーターが存在し、各々のプロモーターの下流域から RNA 転写を開始できる。今回は BLUESCRIPT の BamH I 断片に rbcS-3 A の Sau 3 A I 断片を挿入し(図6), これを Pst I で切断した後に T₇ RNA ポリメラーゼを加え, rbcS-3 A の Sau 3 A I 断片に対応する 1.4 kb の RNA を作成した。

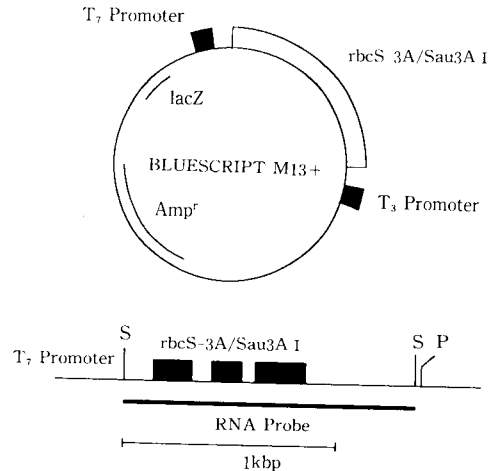


図6 BLUESCRIPT による RNA プローブの合成
BLUESCRIPT M13+ の BamH I サイトに rbcS-3 A/Sau3A I 断片を挿入し, T₇ RNA polymerase に
より, rbcS-3A/Sau3A I (1.4kbp) の RNA 断片が
合成される。
S : Sau3A I
P : Pst I

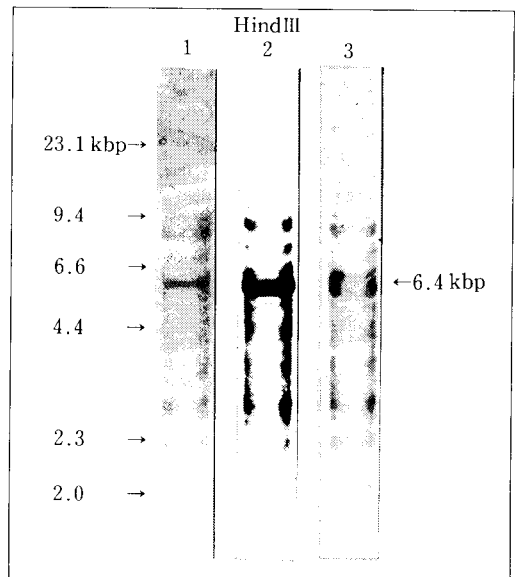


図7 トマト Rubisco 小サブユニット遺伝子の検出 3
トマト全 DNA 1.0 μ g を HindIII で分解後 rbcS-3A/
Sau3A I (1.4kbp) に対応する RNA をプローブと
してハイブリダイズした。
1: プローブ rbcS3A/Sau3A I に対応する RNA
(1.4kb)
2: プローブ rbcS3A/HindIII (3.9kbp)
3: プローブ rbcS3A/Sau3A I (1.4kbp)

試料としてトマト全 DNA 1.0 μ g を HindIII で分解したものをを用いた。rbcS-3 A の Sau 3 A I 断片に対応する RNA (1.4 kb) をプローブとしてハイブリダイズしたところ、数本の断片が検出された (図 7)。また、3.9 kbp, 1.4 kbp の rbcS-3 A の DNA 断片をプローブとしたときにも同一サイズの断片が検出された。しかし、RNA プローブのシグナルは、DNA をプローブとして用いたときよりも低くなった。これはハイブリダイゼーションの条件が DNA と RNA では異なることや、またハイブリダイゼーション中に RNA プローブが RNase によって分解されてしまったなどの原因が考えられる。なお、これらの断片のうち、最も強いシグナルが得られた 6.4 kbp の断片が、rbcS-3 A に由来するものであり、その他の断片は他の Rubisco 遺伝子由来のものと考えられる。

IV 考 察

ホースラディッシュのパーオキシターゼによって標識されたプローブを用い、サザンブロットハイブリダイゼーション法を行ったところ、コピー数の多い葉緑体遺伝子だけでなく、シングルコピー遺伝子である Rubisco の小サブユニット遺伝子が検出された。原田 (1988)⁴⁾によれば、トマトの全ゲノムサイズは約 7.14×10^8 bp である。本試験では、全 DNA を 0.25 μ g 供試した時に 15 kbp の断片が検出されたことから概算すると検出感度は 5 pg ほどであり、シングルコピー遺伝子の検出は十分に可能であった。

放射性同位元素を用いたハイブリダイゼーションでは、フィルムへの感光をプローブの標識に用いた放射性同位元素の半減期に応じて長時間 (32 P の半減期は約 2 週間) 行えることから、短いプローブを用いた高感度の検出が可能である。しかし、ECL 遺伝子検出システム法では、パーオキシターゼの酵素反応による励起光の発光は約 2 時間であり、またプローブへの標識が通常 30 塩基に 1 つ程度である (アマシャムジャパン社 ECL 遺伝子検出システムマニュアルによる) ため、塩基数が極端に少ないプローブを使用する場合には検出が困難となる。そのため、プローブとして用いる DNA はサイズが大きい方が検出感度が高く、本試験では 3.9 kbp と 1.4 kbp のプローブを比較したが、3.9 kbp のプローブによる方が断片がより明瞭に

検出された。しかし最近、本法によって、40 bp 程度の短いプローブを用いた検出が可能であったとの報告¹⁾もあることから、今後、より短いプローブを用いた検出条件の検討が必要である。

また、プローブとして DNA だけでなく、RNA も利用できることが示唆された。RNA プローブが利用可能であれば、*in vitro* 転写システムにより、任意の断片長の RNA プローブを容易に得ることができ、さらにノーザンブロットハイブリダイゼーションの条件を検討することによって遺伝子の転写、発現の解析が可能となる。本試験では RNA プローブを用いてもシングルコピー遺伝子の断片が検出されたが、DNA プローブと同条件でのハイブリダイゼーションでは検出感度が低く、今後プローブとして RNA を用いるためには、ハイブリダイゼーションバッファーなどの条件を検討する必要がある。

ECL 遺伝子検出システムは特別な施設や器機を必要とせず、通常の実験室内で行える。また、電気泳動後のナイロンメンブレンへのトランスファーに際して、ゲルの前処理やベークングも必要なく、検出は 10 分から 1 時間程度で終わり、プローブへの標識も簡便である。さらに同一のフィルターに複数回リプロービングでき、RNA プローブも条件を検討することによっては使用が可能となるなどの長所があげられる。今後は多種類のプローブを利用する RFLP への利用や、*Agrobacterium* などによって植物に導入された遺伝子の確認などに広く利用されることが期待できる。しかし、検出感度が放射性同位元素を用いる方法に比べて低いこと、またプローブ長が数十 bp 以上必要であるなどの短所もあり、従来の放射性同位元素を用いた方法との使い分けが必要と考えられる。

謝 辞 プローブとして用いたトマト、イネの DNA クローンは名古屋大学遺伝子実験施設の杉浦教授、杉田助教授より分譲をうけた。ここに記して御礼申し上げる。

語 註

*1) サザンブロットハイブリダイゼーション

制限酵素で分解した DNA 断片を、アガロース電気泳動で分画した後に、分画パターンそのままの形でフィルターに転写、固定し、これに放射性

同位元素等で標識したDNAまたはRNAプローブをハイブリダイズさせて、プローブと相補的な特定の塩基配列を持つDNA断片を検出する手法。これに対して、フィルターに転写、固定されたRNAに、プローブをハイブリダイズさせて特定の塩基配列を持つRNA分子を検出する手法をノーザンプロットハイブリダイゼーションという。

**) SSC

1 × SSC の組成は以下の通り

0.3 M 塩化ナトリウム

0.03 M クエン酸ナトリウム

****) エクソン、イントロン

真核細胞の染色体DNAのうち、RNAに転写された後、タンパク質に翻訳される部分をエクソン、RNAに転写された後、m-RNAに構成される過程で切り捨てられ、タンパク質に翻訳されない部分をイントロンと呼ぶ。

参 考 文 献

- 1) アマシャムジャパン株式会社。"ECL 遺伝子検出システムアドバンスレポート", NO. 2, 1990.
- 2) Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M.; Davis, R. W. "Constraction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism", Am. J. Hum. Genet., **32**, 314-331 (1980).
- 3) Forster, A. C.; McInnes, J. L.; Skingle, D. C.; Symons, R. H. "Non-radioactive hybridization probed by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", Nucleic Acids Res., **13**, 745-761 (1985).
- 4) 原田久也。"イネ科作物における RFLP の利用", 農林水産技術研究ジャーナル, **11** (6), 24-31 (1988).
- 5) Leary, J. J.; Brigati, D. J.; Ward, D. C. "Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotinlabeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bioblots", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **80**, 4045-4049 (1983).
- 6) Lichtenstein, C.; Draper, J. "Genetic engineering of plants", DNA cloning, Vol. 2, Glover D. M. ed. Oxford, IRL PRESS, 1985, p. 107
- 7) Matthews, J. A.; Batki, A.; Hynds C.; Kricka, L. J. "Enhanced chemiluminescent method for the detection of DNA dothybridization assays", Anal. Biochem., **151**, 205-209 (1985).
- 8) Phillips, A. L. "Restriction map and clone bank of tomato plastid DNA", Curr. Genet., **10**, 147-152 (1985).
- 9) Renz, M.; Kruz, C. "A colorimetric method for DNA hybridization", Nucleic Acids Res., **12**, 3435-3444 (1984).
- 10) Southern, E.M. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).
- 11) Sugita, M.; Manzara, T.; Pichensky, E.; Cashmore, A.; Gruissem, W. "Genomic organization, sequence anarysis and expression of all five genes encoding the small subunit of ribulose-1, 5 biphosphate carboxylase / oxygenase from tomato", Mol. Gen. Genet., **209**, 247-256 (1987).

Detection of Singlecopy Gene by Enhanced Chemiluminescence Using Horseradish Peroxidase Labeled Probe

Daiji ASAKA, Takeo HARADA,
Takashi SATO and Isao MATSUKAWA

Summary

Southern blot hybridization is one of the indispensable techniques in gene technology. For the detection of low copy sequence by this technique, the DNA probe which labeled by the radioisotope ^{32}P -CTP have been widely used. This particular label presents a hazard to the operator and is unstable, giving the labeled probe a very short useful life. Furthermore, the experiments must operate in the specific facility where permitted by the government.

Recently, a number of non-radioactive alternatives have now become available which utilize an enzyme label. Then, we tried the detection of a single copy gene by the methods of the enhanced chemiluminescence using probes labeled with peroxidase.

Total nucleic acids which extracted from the leaves of tomato plant were digested with restriction enzymes. The reacted products were electrophoresed, transferred to nylon membrane and hybridized with the probe *rbcS-3 A* (Rubisco small subunit 3 A of tomato) which labeled with horseradish peroxidase. As the sequence specific fragments were clearly detected on X-rays films, it was revealed that the single copy sequence could be detected by the non-radioactive nucleic detection system.

The applications of this method will be gradually being popularized.