

# —— mt DNAの調整方法とアガロースゲル電気泳動法 ——

## モエビ類 mt DNAを用いた分画実験

佐藤 友美

### 1 目的

近年各種タンパク質や核酸物質を分子レベルで解析・精製する手法の一つとして、電気泳動法が多用されている。電気泳動法とは、緩衝液に溶かしこんだ物質に電圧をかけて一定サイズのゲル孔を通過させることによって物質を分画する方法で(ゲル電気泳動法)、分子の大きさと荷電の違いがゲル中での分子移動速度を決定することを利用している。この方法では、ペーパークロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーに比べ、分子量が同じであってもその荷電の違いによって物質を分画できるため、精度の高い結果が得られる。反面、精度の高い分画程度対象物質を限定しておかないと、分画バンドが無数に現われ分析や精製が困難になる。そこで、生物組織のような未調整物質を扱う場合には、電気泳動前に試料を調整する工程と、実際の泳動で目的物質を分画する工程が必要となる。

分画技術は、“対象生物”での“対象物質”の“何”を(例えば“大腸菌”の“グルコース分析酵素”の“活性量”を)調

べるのかという目的毎に方法が大きく異なる。本実験は電気泳動の技術修得を目的としているが、現在海産無脊椎動物における生化学的手法を用いた系統学的知見の乏しいことに着目し、“モエビ類(*Heptacarpus*)”の“ミトコンドリアDNA(mt DNA)”の“地域変化”を、電気泳動法の活用で調べることにする。

今回泳動試料に選んだ mt DNA は、真核生物の細胞小器官であるミトコンドリア中に存在し、14~16kbp(キロ塩基対)の環状二本鎖DNAである<sup>1)</sup>。親から子への遺伝は、核DNAとは別に母性遺伝(卵母細胞質遺伝)で行なわれると考えられ、ミトコンドリア当り数コピー<sup>1)</sup>、細胞当り $10^2 \sim 10^3$ コピー<sup>2)</sup>存在している。mt DNA は、最近高等動物(ヒト、マウス、ウシ)で全塩基配列が決定され、その結果、遺伝子相互の位置関係やゲノムの大きさにはほとんど変化がない一方、塩基置換率は核DNAの約10倍速いことが解ってきた<sup>1)</sup>。同一種内においても制限酵素地図\*の違いによる Polymorphism\*は大きいとされている<sup>1)</sup>。すなわち、mt DNA は核DNA

---

\*制限酵素地図：数種の制限酵素で切断された切断点と切断片の長さをDNAに示した図。塩基配列の相違によって切断点が異なる。

と比べ①分子量が小さく同一コピーが $10^2 \sim 10^3$ 個/Cell 存在する(制限酵素分析に適する), ②環状構造である(核DNAからの単離が容易), ③塩基置換率が高い, という特徴を持ち, それ故に, 比較的近縁な動物種間の系統や地域個体群間の系統を分析する優れた材料となる<sup>2)</sup>。しかし海産無脊椎動物を使った mt DNA の研究はほとんど報告されておらず, その分画技術は, 確立されたものとはいえない。本実験では, 電気泳動を試みるとともに, 長尾類の mt DNA を適切に調整する方法の開発をも試みる。

## 2 材料

千葉県小湊地域のタイドループに棲息する 2 属 3 種のモエビ類, (*Heptacarpus futilirostris*, *Heptacarpus rectirostris*, *Eualus sinensis*) を対象材料とする。サンプリングは, タイドプール別に行い, 採集したモエビは生かしたまま持ち帰る。死亡個体や, 冷凍個体を利用した場合, 良い状態(環状構造を保った状態)の mt DNA の収量が減るため, mt DNA の抽出材料は新鮮な物が好ましい<sup>2)</sup>。持ち帰ったモエビ類は種別, 性別を明らかにし氷冷(0~4℃)した Chappell-Perry 緩衝液中で解剖し, 血管, キチン質等の組織片をできるだけ除却して, 均一な腹筋肉組織を取り出す。筋肉組織は少なくとも 10g~30g 必要と思われる(組

織 10g から数十  $\mu\text{g}$  の mt DNA が抽出)り。

— 準備するもの —

- ① 解剖バサミ, ピンセット。DNase を失活させるため滅菌処理をしておくのが好ましい。
- ② 実体鏡微鏡
- ③ Chappell-Perry 緩衝液 (0.1M KCl - 50mM Tris - HCl (PH8.0) - 1mM NaATP - 5mM MgCl<sub>2</sub> - 1mM EDTA)<sup>3)</sup>。筋肉組織では粘性が高くなることと筋肉に多い Ca<sup>2+</sup>を除去するために, EDTA や MgCl<sub>2</sub>を含んだ緩衝液を用いる。また海産動物では哺乳類より浸透圧が高いため, Chappell-Perry 溶液にさらに 0.4M NaCl を加え浸透圧調整した溶液を用いる。今回も 0.4M NaCl を加えた Chappell-Perry 緩衝液を使用する(以下これを CP 溶液とする)。緩衝液中に混入した DNase を失活させるためには, 滅菌処理が必要。

## 3 方法

### 3-1 試料の調整

#### (1) ミトコンドリアの抽出

— 手順 —

- ① 解剖で得られた筋肉組織は, 細切し, 組織 10g に対し 90ml の CP 溶液を加え 600rpm/min<sup>4)</sup>, 3~5 ストローク<sup>2)</sup>でホモジェネートする。この時組織がホモジェネートの 20%以上になると収量が

---

\*Polymorphism: 同一種内の個体(ここでは mt DNA)が示す同一遺伝子の形態・形質における多形性。

落ちる可能性がある<sup>4)</sup>。操作は 0 ~ 4 °C にて行う。

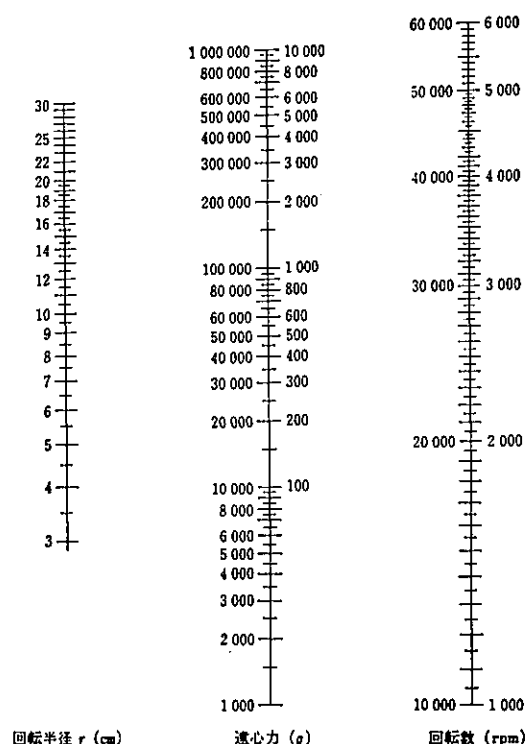
- ② ホモジェネートにより PH が低下するので 1N KOH を滴下して PH を 8.0 に合わせる<sup>3)</sup>。
- ③ 800 g, 10min, 2 ~ 4 °C で遠心し、上澄 (S<sub>1</sub>) を集める。
- ④ 沈澱 (P<sub>1</sub>:核, 筋組織, 細胞片, 細胞膜など) に 10% ホモジェネートとなるように CP 溶液を加え 1 ストロークのホモジェネートを行う。
- ⑤ ②, ③ を繰り返し、上澄を S<sub>1</sub> に合わせる。
- ⑥ S<sub>1</sub> を 10,000 g, 10min, 2 ~ 4 °C で遠心し上澄 (S<sub>2</sub>) を捨てる。

- ⑦ 沈澱 (S<sub>2</sub>:粗ミトコンドリア分画) の一部を 1 ~ 2 滴の 0.25M ショ糖溶液中で検鏡し、核が混入していたら③~⑥の操作を繰り返す<sup>2)</sup>。

すぐ使用しない場合は -20 °C で約 2 ヶ月の保存が可能だが、OC 画分(環状構造のくずれた mt DNA)が多くなり、mt DNA の劣化が起こる<sup>2)</sup>。

— 準備するもの —

- ① CP 溶液, KOH
- ② Potter-Elvehjem 型ホモジェナイザー
- ③ 遠心機。遠心機の表示は rpm で示されているものが多い。重力 (g) と回転数 (rpm) と回転半径 (r) との関係図を添える<sup>3)</sup>。
- ④ 遠沈管。ガラス遠沈管を使用する場合は、ガラス表面に DNA が付着するのを防ぐためにシリコン処理が必要と



回轉半径の値と回轉数の値を定規で結んで、中央の線との交わりから遠心力の値が得られる。

なる<sup>5)</sup>。高速遠心に耐え、有機溶媒に強いポリアロマーなどの素材の物が好ましい。事前に滅菌処理を行なった物を使用する。

### ⑤ PH メーター

#### (2) mt DNA の抽出

— 手順 —

- ① P<sub>2</sub>分画約 1 g に対し EST 溶液を 10 ml 加え、沈澱を溶かす<sup>2)</sup>。
- ② ①に 1/14 容の 25% SDS 溶液 (約 1/5 容の 10% SDS) を加え、60 °C, 10min の熱処理を行う<sup>2)</sup>。この時プロテイナーゼ K (SDS 存在下でも失活しにくい) などの酵素処理を同時に行うと、タン

- パク質からDNAが遊離し易くなる<sup>6)</sup>。
- ③ ②に等容の水飽和フェノールを加え、室温で30min振盪する。
- ④ 10,000g, 5min, 2~4℃で遠心し水層を採取する。変性タンパクはフェノール層に移行し、水層にはDNAが残る。
- ⑤ 水層を取った残りに最初の1/2~1容のEST溶液を加え5min振盪し、④と同方法で水層を取る。これを2~3回繰り返す<sup>2)</sup>。
- ⑥ 水層をSSC溶液で終夜透析し、フェノールを除く<sup>2)</sup>。フェノールをクロロホルムやエーテルで置換し除去する方法もあるが、この方法ではDNAが切断され易い<sup>6)</sup>。透析は4℃で1000倍量の外液を目安に行う。
- ⑦ 透析内液に1.5M酢酸ナトリウムを1/10容加え<sup>7)</sup>、さらに2容の冷エタノール(-20℃)を加えた混液を<sup>6)</sup>を-20℃で一夜放置する(-80℃なら1~2hrでエタノール沈澱が起こる)<sup>2)</sup>。
- ⑧ 27,000g, 15min, 2~4℃<sup>2)</sup>(DNAの濃度が非常に低い場合により高速で長時間の遠心が必要)<sup>6)</sup>で沈澱(P<sub>3</sub>)を集める。
- ⑨ P<sub>3</sub>はデシケータ中で1~2hr真空乾燥する<sup>6)</sup>。乾燥したP<sub>3</sub>(mt DNA)はTE緩衝液に溶解させ4℃で保存する。cc DNA(環状DNA)とoc DNA(環の開いたDNA)を分画するためにはこの後さらにCsCl-臭化エチジウム(EtBr)平衡密度遠心法を行う必要がある<sup>2)</sup>。またRNAを除去するためには、RNaseで処理した後透析する工程が必要となる<sup>2)</sup>。
- 準備するもの —
- ① EST溶液(0.1M EDTA-0.4M NaCl-10mM Tris. base PH8.0)。通常NaClは0.15Mであるが、海産動物ということで0.4Mに調整してみる。
- ② 25% SDSおよびプロテナーゼK。ミトコンドリア膜を変質・分解させる。
- ③ 水飽和フェノール。特級フェノールを再蒸留したものを0.1M Tris-HCl (PH8.0)に飽和させたもの。保存する時は抗酸化剤として0.1% (w/v) 8-ヒドロキシキノリン(オキシシン)を加え-20℃褐色ビンに保存する。この場合フェノールが黄色に着色しているので、フェノール層と水層を見分ける際便利である<sup>6)</sup>。
- ④ SSC溶液(0.4M NaCl-0.015M グエン酸ナトリウム)。この場合もNaClの濃度は通常の0.15Mより高くしてみる。
- ⑤ 1.5M酢酸ナトリウムおよびエタノール
- ⑥ 高速冷却遠心機。CsCl-EtBr平衡密度遠心法には超高速機が必要。
- ⑦ 透析用セルロースチューブ。前処理として①5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で15min煮沸, ②蒸留水で洗浄, ③1% EDTA (w/v) PH7で15min煮沸, ④蒸留水で洗浄後0.1mM EDTA (PH8.0)で4℃に保存, の工程が必要<sup>2)</sup>。
- ⑧ RNAの除去を行う場合: RNase A, RNase T<sub>1</sub>, 0.6% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム-10mM

EDTA-10mM Tris-HCl (PH8.0)<sup>2)</sup>。

⑨ 保存する場合：T E 溶液 (1mM EDTA-10mM Tris-HCl PH8.0)。

⑩ デシケーター

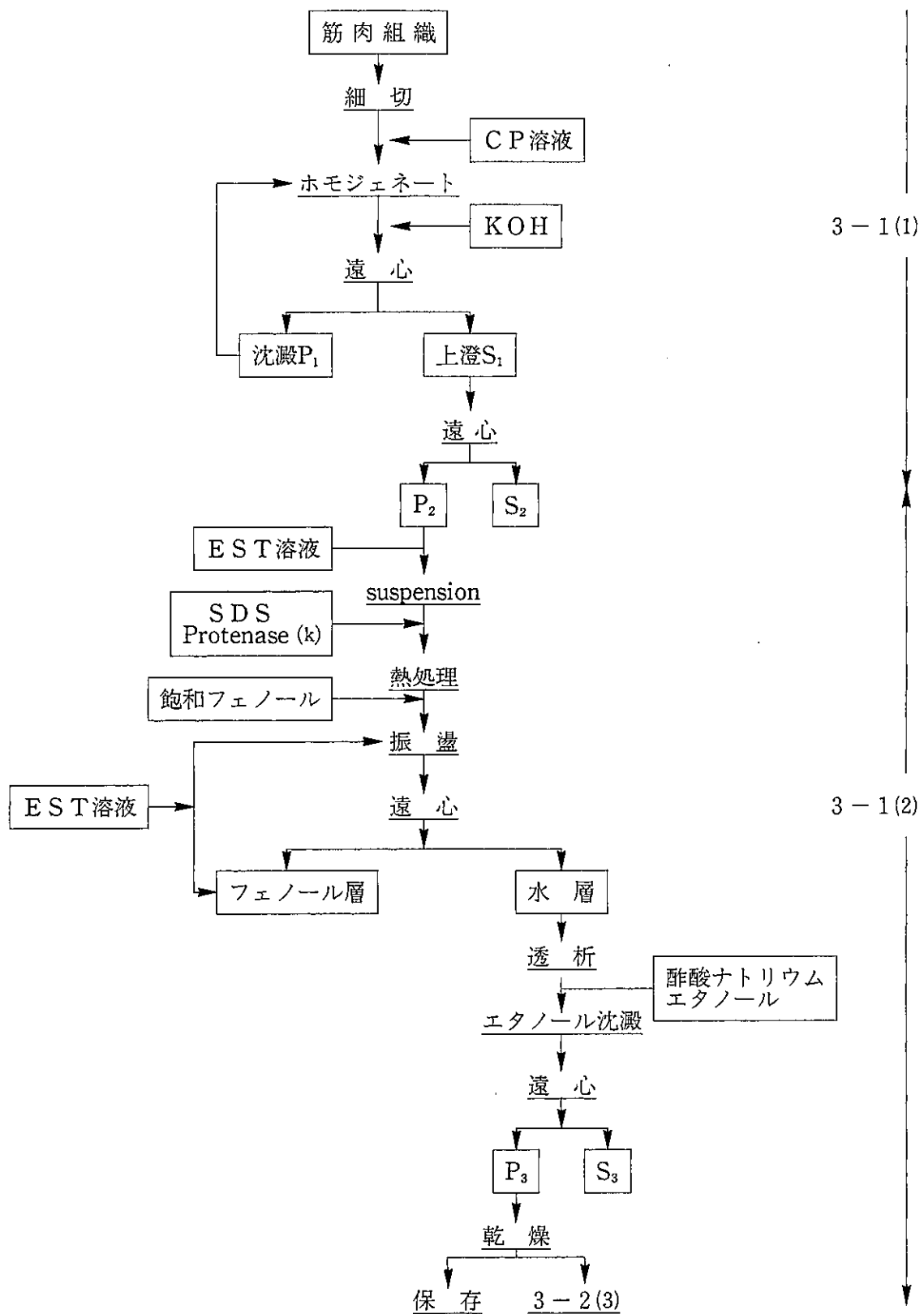
(3) 制限酵素による mt DNA の切断

沈澱分画した mt DNA (P<sub>3</sub>分画) は、そのおよその最終濃度を調べ、制限酵素で切断する。種、あるいは属レベルで塩

基配列の違いがあれば、同じ制限酵素を用いても切断点が異なり、泳動される DNA 片の数や分子量に差がでることになる。未知 DNA の場合、差異が解析し易い制限酵素も未知であり、一種あるいは数種の制限酵素をとり合せ検討してみる必要がある。主な制限酵素とその切断部位および緩衝液の種類を示した表を添える<sup>7)</sup>。

表 1 制限酵素

酵 素	緩 衝 液	温 度	認 識 部 位
Acc I	M	37℃	GT↓ AG AC
Atu I	M	37	AG↓CT
Ava I	M	37	G↓PyGGPuG
Ava II	M	37	G↓G <sup>A</sup> T <sup>CC</sup>
Avr II	L	37	CCTAGG
Bam HI	M	37	G↓GATCC
Bbv I	L	37	GC  <sup>A</sup> T GC
Bcl I	M	37	T↓GATCA
Bgl I	M	37	GCCNNNN↓NGGC
Bgl II	L	37	A↓GATCT
Bst EII	M	60	G <sup>GTNACC</sup>
Bst NI	L	60	CC  <sup>A</sup> T GG
Dde I	M	37	C↓TNAG
Dpn I, Sau 3A	M	37	G <sup>Me</sup> A↓TC
Eco RI	H	37	G↓AATTC
Eco RII, Atu I, Apy I	H	37	↓CC  <sup>A</sup> T GG
Fnu 4HI	L	37	GC↓NGC
Fnu DH, ThaI	L	37	CG↓CG
Hae I	L	37	<sup>A</sup> T GG↓CC  <sup>T</sup> A
Hae II	L	37	PuGCGC↓Py
Hae III	M	37	GG↓CC
Hae I, Cfa I	M	37	GCG↓C
Hinc II	M	37	GTPy PuAC
Hind II	M	37	GTPy↓PuAC
Hind III	M	37~55	A↓AGCTT
Hinf I	M	37	G↓ANTC
Hpa I	L	37	GTT↓AAC
Hpa II	L	37	C↓CGG
Kpn I	L	37	CCTAC↓G
Mbo I, Sau3A	H	37	↓GATC
Mnt I	H	37	CCTC
Msp I	L	37	C↓CGG
			C↓C <sup>Me</sup> GG
Pst I	M	21~37	CTCGA↓G
Pvu I	H	37	CGATCG
Pvu II	M	37	CAG↓CTG
Rsa I	M	37	CT↓AC
Sac I, Sst I	L	37	GAGCT↓C



— 手 順 —

- ① 黒い紙の上にサランラップを広げ、その上に検体液 (P<sub>3</sub>) の1滴を置く。
- ② 濃度の対照用として種々の濃度に希釈した濃度既知のDNA (分子量マーカーである  $\lambda$  DNA などを利用) 溶液を作り (0.5~20 $\mu$ g/ml), サランラップ上に1滴ずつ置く。
- ③ EtBr (終末濃度0.5 $\mu$ g/lを目安, ストックは10mg/l程度) を各スポットのDNAに滴下する。
- ④ スポットに紫外線 (暗室で行うこと) を均等に照射し, 検体と濃度対照スポットの蛍光を比色して, およその濃度を決定する<sup>6)</sup>。  
以上の方法は蛍光法による定量だが, 260nm (紫外線短波長) の吸光度から濃度を求める方法 (吸光光度法) もある<sup>6)</sup>。
- ⑤ チューブ (エッペンドルフ等) に mt DNA 溶液を入れ1/10<sup>7)</sup>~1/5<sup>2)</sup>容の10倍緩衝液を加える。容量はできるだけ小さく (50 $\mu$ l<sup>></sup>) する<sup>7)</sup>。
- ⑥ チューブを爪ではじいて液を混ぜ, 2~3 sec 遠心して液をチューブの底

に集める<sup>2)</sup>。

- ⑦ ④で測った mt DNAの終末濃度に合わせて, 数 unite\*の制限酵素を加え, 酵素の要求する温度で1~2 hr 反応させる<sup>7)</sup>。反応がうまく進行しない場合, DNAの除タンパク, フェノール等の阻害物質の除去が完全でないと考えられる。
- ⑧ 1/5容色素溶液を加えて反応を停止させる。

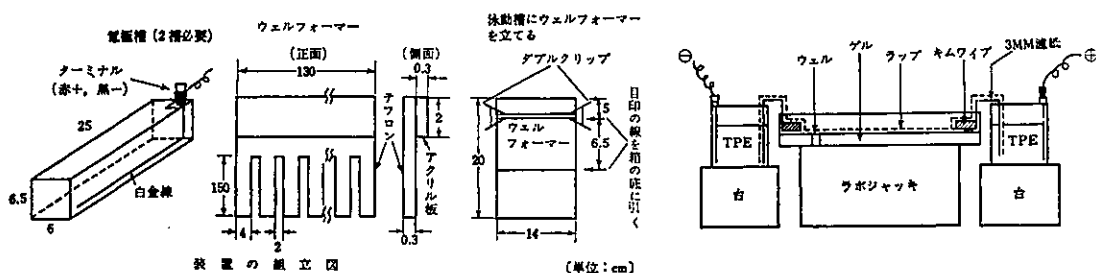
— 準備するもの —

- ① 既知濃度DNA ( $\lambda$  DNA)
- ② EtBr (強い変異原性を持つので手袋を着用して扱う。濃アルカリで分解)。
- ③ 短波長紫外線ランプ
- ④ 制限酵素及び10倍緩衝液
- ⑤ 色素溶液 (0.1% BPB-50% ショ糖-7M 尿素-10mM EDTA PH8.0)<sup>2)</sup>
- ⑥ エッペンドルフ型遠沈管 (滅菌済)。
- ⑦ マイクロピペット (滅菌済)。

### 3-2 電気泳動

#### (1) アガロースゲルの調整

泳動するDNAの分子サイズによりゲ



\*1 unite: 1Mg/lの $\lambda$  DNAを1hrで消化する量

ルの種類と濃度を選択する必要がある(表参照)<sup>6)</sup>。今回は mt DNA のサイズから考え、厚さ 4 mm の 1% アガロースゲルを

調整する。使用する泳動槽は水平型のものを用いる。装置の一例を図に示す<sup>2)</sup>。

表 2 電気泳動用ゲルと DNA 分画範囲

アガロースゲル (%)	DNA のサイズ ( $\times 10^3$ 塩基対)	ポリアクリルアミドゲル (%)	DNA のサイズ (塩基対)
0.3	5-60	3.5	100-1000
0.5	1-30	5.0	80-500
1.0	0.5-7	10	50-300
1.5	0.2-4	15	30-200
2.0	0.1-3	20	10-100

— 手 順 —

- ① 2 g のアガロースに対して蒸留水を 180ml 加え<sup>2)</sup>、オートクレーブ(電子レンジ)で溶かす。
- ② 20ml の 10 $\times$ TEP, 100 $\mu$ l の 4.6mg/ml EtBr<sup>2)</sup>を加える。
- ③ 60 $^{\circ}$ C 程度に液を冷やし、事前にセットしてある泳動床に厚さが 4 mm になるよう均一にゲルを流し込む。
- ④ ウェルウォーマーをセットし、完全に固化するまで放置する。
- ⑤ ウェルウォーマー付近に緩衝液 (TEP) をかけながら静かに引き抜き、ゲル一面に緩衝液を広げる (5ml 程度)<sup>7)</sup>。

DNA の染色は、ゲルにあらかじめ EtBr を加えておく他に、泳動後ゲルを染色液につけて染色する方法もある。

— 準備するもの —

- ① アガロース(泳動後 Southern トランスファーなどを行なう時は、純度の高い物が必要)。
- ② TEP 緩衝液 $\times 10$  (360mM Tris. base - 300mM NaHPO - 10mM

EDTA $\cdot 2$ Na)

- ③ EtBr
- ④ 水平型アガロース電気泳動装置 (アガロースゲルはポリアクリルアミドに比べてやわらかいため、垂直型はあまり適さない)<sup>8)</sup>。

(2) 電気泳動

— 手 順 —

- ① mt DNA 試料に 1/10 量の試料用色素を加える<sup>7)</sup>。制限酵素の反応を停止させるための溶液 (EDTA) に色素を加えてある今回の方法では、省略できる。
- ② mt DNA 試料をウェルに入れ (50 $\sim$ 80 $\mu$ l, 0.2 $\sim$ 0.5 $\mu$ gmt DNA)<sup>8)</sup>、ウェルの上部、ゲルの表面を TEP 緩衝液で満たす<sup>2)</sup>。
- ③ ゲル床とタンクをセットし、端子をパワーサプライに接続し、80mA の定電圧で約 4 $\sim$ 5 hr 通電する<sup>2)</sup> (通電時間の目安は試料用色素 B P B が 6.5cm 移動する程度)<sup>2)</sup>。セットする際、ウェル側が陰極になるようセットすること。



また泳動中の発熱によるゲル乾燥を防ぐため、ゲル一面にラップを密着させる。

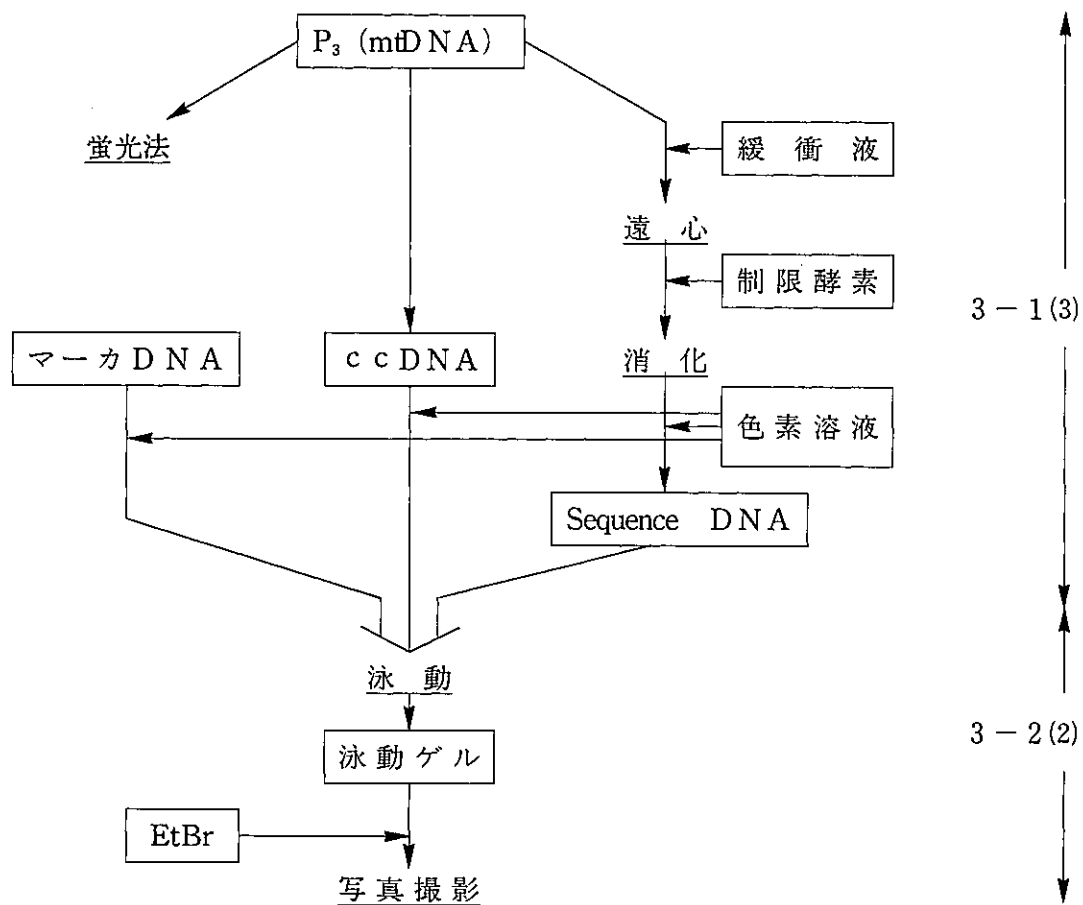
- ④ ゲルを泳動槽から取り出し、水分を切る。染色していない場合、あるいはゲルの観察に反射型の紫外線を用いる場合、 $0.1\mu\text{g/ml}$  EtBr 溶液にゲルをつけ、20~40min 室温で放置する<sup>7)</sup>。
- ⑤ ゲルの水分をよく切り、紫外線を照射してバンドを観察する。記録は赤色フィルターを付けたカメラを用い、高感度フィルムで撮影する(全開で10sec 露出)<sup>5)</sup>。

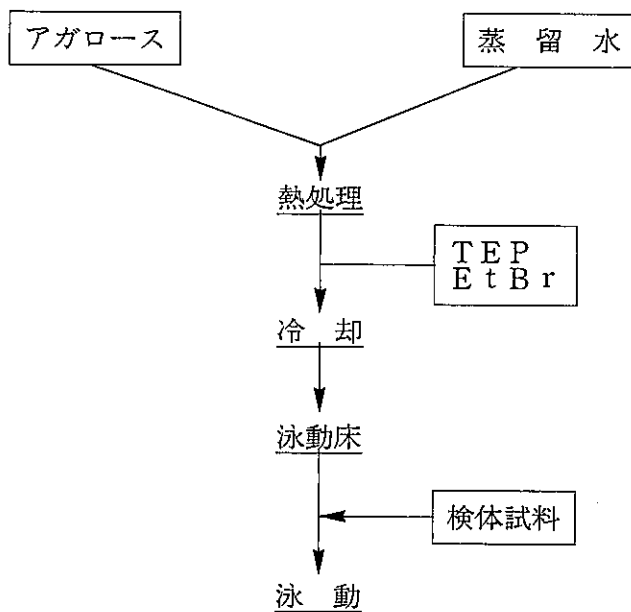
— 準備するもの —

- ① 試料用色素(50%グリセロール-0.25% B P B-0.25% キシレンシアノー

ル)。

- ② T E P 緩衝液
- ③ EtBr。
- ④ パワーサプライ (ミニゲル泳動装置の場合必要ないこともある)。
- ⑤ マイクロピペット
- ⑥ 短波長紫外線ランプ。トランイルミネーター (透過型) が最適。
- ⑦ 赤色フィルター, UVフィルター。カメラはポラロイド型 (Type667) が最適。
- ⑧ 高感度フィルム。
- ⑨ 分子量マーカー( $\lambda$  DNA)。バンドの位置と大まかな分子量を照合させるために利用。





3-2(1)

#### 4 解析

写真撮影したバンドの様子をトレースし、制限酵素切断のマップを作る。分子量マーカーと切断処理を行っていない cc DNA をコントロールとして、バンドの数、切断片の位置を比較し、種別、属別、タイドプール別、性別に関する比較を行う。泳動後の処理、あるいはゲルの厚さによって、ゲルの収縮率や泳動距離に違いが生じるので<sup>8)</sup>、比較したい検体は、同一ゲル上に同一時に泳動するのが好ましい。

#### 5 実験経過

1988年1月18日に小湊でモエビの採集を行い、2つのタイドプールから *Heptacarpus futirostris* 及び *H. rectirostris* の2種のモエビを採集した。モエビはタイドプール別、種別、性別に分け、上述して

きた方法に従い mt DNA の分画を行なった。しかし、この実験はミトコンドリア分画 (P<sub>2</sub>分画) はとれたものの mt DNA を分画できないという結果に終わった。

失敗の原因として以下の項目が考えられた。

- ① 筋肉組織の湿重量が1~2gと少なかったため、既存の遠心回転率ではうまく mt DNA が沈澱しなかった。
- ② ホモジェネートが強すぎ、ミトコンドリアの膜の破損がおきていたため、DNA が途中で切断され (3-1(2)) cc DNA の収集が落ちた。
- ③ SDS の処理時間が不足で、タンパク変性が充分でなかったため、DNA がタンパクに結合したままフェノール層に移行してしまった。
- ④ 飽和フェノールが完全な飽和状態ではなかったか、あるいはフェノールが

劣化していたため、水層とフェノール層の分離がうまくいかなかった。

- ⑤ 浸透圧の調整が適切でなく、膜構造が壊れていたため、DNAが途中で切断された。

以上、考えられる問題点を整理し、それに基づき現在二度目の実験を進めている。結果は、機会があれば再び発表する予定である。

## 6 参考文献

- 1) 平良真規, 小池克郎。(1985) 動物細胞のミトコンドリア遺伝子とその機能。細胞工学, Vol14, No.1 : 14~28。
- 2) 米川博通, 森脇和郎 (1984)。ミトコンドリアDNAの変異。実験生物学講座13, 遺伝生物学, 丸善株式会社 : 319~350。
- 3) 香川靖雄 (1984)。実験生物学講座 6, 細胞分画法, 丸善株式会社 : 3~25, 141~151。
- 4) 松田義宏, 山田毅 (1985)。生物化学実験のてびき, 1 生物試料調整法, 化学同人 : 47~55, 57~75。
- 5) 高木康敬 (1980), 遺伝子操作実験法, 講談社。
- 6) 泉美治, 他共編 (1986)。生物化学実験のてびき, 3 核酸の分離・分析法, 化学同人。

7) 三宅端, 他共編 (1984)。昆虫のバイオテクノロジーマニュアル, 講談社。

8) 坂岸良克 訳 (A.H.Gordon) (1974)。ゲル電気泳動法, 東京化学同人。

## 速報

1988年3月に、市販の活クルマエビを用いて、二度目の実験を行なった。

まだ制限酵素でDNAを切断する作業は行なっていないが、mt DNAを分画し、cc DNAのまま電気泳動を行なったところ、15~20Kbpの位置に、クルマエビのcc DNA (mt DNA) バンドが認められた。

二度目の実験で、前回実験の失敗の原因は、完全な飽和フェノールを使用していなかったためと判明した。飽和フェノールは、65℃で溶解させたフェノールにTris・base 緩衝液を加え完全に水層とフェノール層に分離させた後のフェノール層部分を使用しなければならない。又、今回は透析を行わず、替りにクロロホルム処理をしたが、それでも充分 mt DNAを分画できることがわかった。

今後は制限酵素を用い、mt DNAを切断した後泳動にかける実験を行なう予定である。