

## 遺伝子工学用酵素の最近の進歩

—— 好熱性細菌由来のDNA合成酵素を中心にして

生物分子工学研究所 石野良純

はじめに

海底熱水孔や温泉水のなかから分離される好熱性細菌の産生する酵素は、一般に耐熱性であるが故に、工業的な利用が期待できる。本講演では、工業的に利用されている好熱性微生物由来の耐熱性酵素の中から、特に遺伝子工学領域のPCR（ポリメラーゼチェーンリアクション）用酵素に焦点をあてて、現状と展望を紹介したい。

PCRは分子生物学の領域に革命的影響をもたらした。この技術が短期間のうちに全世界に普及していったのは、操作が自動化されたためであり、今では核酸を取り扱ったことのない研究者でもこの技術を使って簡単に目的のDNA領域を増幅することができるようになった。PCRの自動化に欠くことのできなかった要素として、DNAポリメラーゼの耐熱性がある。好熱性細菌の産生する耐熱性DNAポリメラーゼがPCRに応用されることによってこの技術は見事に実用化された<sup>1)</sup>。最初にPCRに利用された酵素は、高度好熱性細菌 *Thermus aquaticus* 由来のDNAポリメラーゼ（Taqポリメラーゼ）であるが<sup>2)</sup>、その後、海底熱水孔などから分離された超好熱性古細菌由来のDNAポリメラーゼがいくつか商品化され、それぞれの生化学的性質の違いから、目的に応じて利用されている。PCRに用いる耐熱性DNAポリメラーゼは、その商品価値の高さから現在も開発競争が熾烈である。

### I DNAポリメラーゼの分類

DNAポリメラーゼはその働きの上から、全ての生物が有していると考えられる酵素である。分子生物学が発展する以前、DNAポリメラーゼは基質特異性や、阻害剤に対する感受性などから分類されていたが、遺伝子がクローニングされてアミノ酸配列が推定されるようになると、構造的に分類されるようになった。そして、大別して、大腸菌DNAポリメラーゼIに代表される Pol I ファミリーとヒトDNAポリメラーゼ $\alpha$ に代表される $\alpha$ ファミリーに分類されてきた<sup>3,4)</sup>。最近では、50種類以上のDNAポリメラーゼ遺伝子構造が明らかになり、ファミリーA, B, C, Xの4種に分類することが提唱されている<sup>5,6)</sup>。このうち、上記の二つのファミリーはそれぞれAとBであり、Cは大腸菌DNAポリメラーゼIIIに、XはヒトDNAポリメラーゼ $\beta$ や、ターミナルトランスフェラーゼに代表される。同じファミリーに属するものは、共通のアミノ酸配列を有しており、酵素の生化学的性質、例えば、DNA合成速度、プロセッシビティー（酵素が基質DNAに結合してから離れるまでに合成されるヌクレオチドの数）、鋳型-プライマーの種類好みや阻害剤に対する感受性などの性質について、概ね類似していると考えてよい。

さて、PCR に利用することができる DNA ポリメラーゼの絶対条件は耐熱性である。従って好熱性細菌、超好熱性細菌の有する DNA ポリメラーゼが標的となる。現在市販されている主な耐熱性 DNA ポリメラーゼの製品を表 1 にまとめた。これらの酵素は全て好熱性真正細菌由来のものと、超好熱性古細菌由来のものである。真正細菌のものは前述の Pol I ファミリーに属し、古細菌のものは  $\alpha$  ファミリーに属する。Taq ポリメラーゼや、Tth ポリメラーゼ<sup>7)</sup> などの Pol I 型酵素は試験管内での DNA 鎖伸長活性が強く、PCR に適しているが、合成時の読み間違いを校正するための 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が付随していないものが多い。これに対して、 $\alpha$  ファミリーに属する Pfu ポリメラーゼ<sup>8)</sup> や Vent ポリメラーゼ<sup>9)</sup> は 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が強く、DNA 合成の忠実性が高い代わりに伸長活性が弱い。 $\alpha$  型酵素には、伸長性を上げるためにエキソヌクレアーゼ活性を欠失させた変異体も市販されているが、これらの酵素の伸長性も Pol I 型酵素には敵わない。Pol I 型酵素で 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するものとしては、唯一、超好熱性真正細菌 *Thermotoga maritima* 由来の *Ultma* ポリメラーゼが市販されているが、エキソヌクレアーゼ活性は  $\alpha$  型酵素よりも弱い。

以下に他の生化学的性質も併せて具体的に PCR 酵素の特徴を説明する。表 1 の中で BcaBEST ポリメラーゼ<sup>10)</sup> と Bst ポリメラーゼ<sup>11)</sup> は、耐熱性の点で PCR に適さない (後述)。

表 1 耐熱性ポリメラーゼ

ファミリー	由来	製品名	備考
	<i>Bacillus caldotenax</i>	Bca BEST DNA polymerase [TaKaRa]	5'→3' エキソ活性を欠失させた変異体
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bst DNA polymerase [バイオラッド]	//
	<i>Thermus aquaticus</i>	Takara Taq [TaKaRa] <sup>a)</sup> Ampli Taq [パーキンエルマー] <sup>a)</sup> Taq DNA polymerase [ファルマシアなど数社]	5'→3' エキソ活性を欠失させた, Stoffel fragment [パーキンエルマー], Gene Taq [ニッポンジーン], $\Delta$ Taq [アマシャム] もある。
Pol I 型	<i>Thermus thermophilus</i>	Tth DNA polymerase [東洋紡など] <sup>a)</sup> rTth DNA polymerase [パーキンエルマー] <sup>a)</sup>	逆転写活性があり, 1 チューブ RT-PCR に利用可能。 5'→3' エキソ活性を欠失させた $\Delta$ Tth DNA polymerase [東洋紡] もある。
	<i>Thermus flavus</i>	Tfl DNA polymerase [プロメガ]	
	<i>Thermus 'ubiquitos'</i>	Hot Tub DNA polymerase [アマシャム] <sup>a)</sup>	
	<i>Thermotoga maritima</i>	Ultma DNA polymerase [パーキンエルマー] <sup>a)</sup>	3'→5' エキソ活性を有する。5'→3' エキソ活性は壊してある。
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	Pfu DNA polymerase [東洋紡 (Stratagene)] <sup>a)</sup>	3'→5' エキソ活性欠損変異体も市販されている。
$\alpha$ 型	<i>Pyrococcus</i> sp. (GB-D)	Deep Vent DNA polymerase [第一化学 (NEB)]	//
	<i>Thermococcus litoralis</i>	Vent DNA polymerase [第一化学 (NEB)]	//
		Tli DNA polymerase [プロメガ]	
	<i>Pyrococcus woesei</i>	Pwo DNA polymerase [ベーリンガー] <sup>a)</sup>	
		TaKaRa Ex Taq [TaKaRa] <sup>a)</sup> TaKaRa LA Taq [TaKaRa] <sup>a)</sup> rTth DNA polymerase XL [パーキンエルマー] <sup>a)</sup> Taq Plus DNA polymerase [東洋紡 (Stratagene)] <sup>a)</sup> eLONGASE Amplification System [GibucoBRL] <sup>a)</sup> Expand Long Template PCR System [ベーリンガー] <sup>a)</sup>	LA-PCR 用に調製された酵素

a) PCR 用酵素としての権利を有する製品

## II 生化学的性質

### 1. 耐熱性

DNAポリメラーゼの耐熱性はその酵素を産生する好熱性細菌の増殖温度と関係する。我々の測定では、*Taq*ポリメラーゼの耐熱性は、連続的に92.5℃で置くと、160分後も80%以上の活性を保持している。96℃に置くと35分で活性は半減するが、96℃1分、55℃1分、72℃1分のサイクルを行なうと、40サイクルで半減する<sup>12)</sup>。これはPCRには充分な値である。*Taq*ポリメラーゼを産生する*Thermus aquaticus*は80℃でも増殖可能な、高度好熱性真正細菌であるが、*Pfu*ポリメラーゼや*Vent*ポリメラーゼを産生する*Pyrococcus furiosus*や、*Thermococcus litoralis*は超好熱性古細菌であり、100℃でも増殖が可能であることから、酵素の耐熱性もより高い。メーカーによると、*Pfu*ポリメラーゼは95℃60分で95%以上活性は保持されているし、*Vent*及び*Deep Vent*ポリメラーゼは95℃での半減期がそれぞれ、6.7時間、23時間である。*BcaBEST*や*Bst*ポリメラーゼは中等度好熱性の*Bacillus*属由来のものであるから、耐熱性も低く、75℃で30分以内に完全に失活する<sup>10)</sup>。そのためこれらの酵素はPCRには使えない。しかし我々は、*BcaBEST*ポリメラーゼの優れたプライマー伸長活性を見出し（後述）、この酵素をジデオキシシークエンس用酵素として開発した<sup>13)</sup>。

酵素の耐熱性とは別に、反応の至適温度は基質の鑄型-プライマーの安定性が関係してくる。我々は活性化DNAを用いてDNAポリメラーゼの反応至適温度を求めているが、hyperchromicityの上昇から判断すると、85℃以上ではDNAが変性してしまつて基質とならないようである<sup>14)</sup>。PCRの場合もプライマーのアニーリング効率を考えると、伸長反応はDNAポリメラーゼによらず、70-75℃が適していると考えられる。

### 2. DNA鎖伸長能

Pol I型の酵素は試験管内でのDNA鎖伸長活性が強い。例えば、M13ファージの一本鎖DNAにプライマーを一つアニーリングし、DNAポリメラーゼを加えて合成能を比較してみた。Pol I型である*Taq*ポリメラーゼ(TaKaRa)と*BcaBEST*ポリメラーゼ(TaKaRa)と、 $\alpha$ 型酵素の*Pfu*ポリメラーゼ(Stratagene)とを、活性化DNAを鑄型-プライマーにして求めた活性から、同じユニット数(0.6u)を用いてプライマー伸長をスタートさせ、時間経過を追った(図1)。この結果からも*BcaBEST*、*Taq*に比べて、*Pfu*ポリメラーゼの伸長能は明らかに劣っている。約8kbの環状一本鎖M13DNAを一周するのに*BcaBEST*や*Taq*ポリメラーゼでは5分以内であるが、*Pfu*ポリメラーゼだと20分を要する。このことは、後に実例で示すが、PCRにとっては不利な性質である。

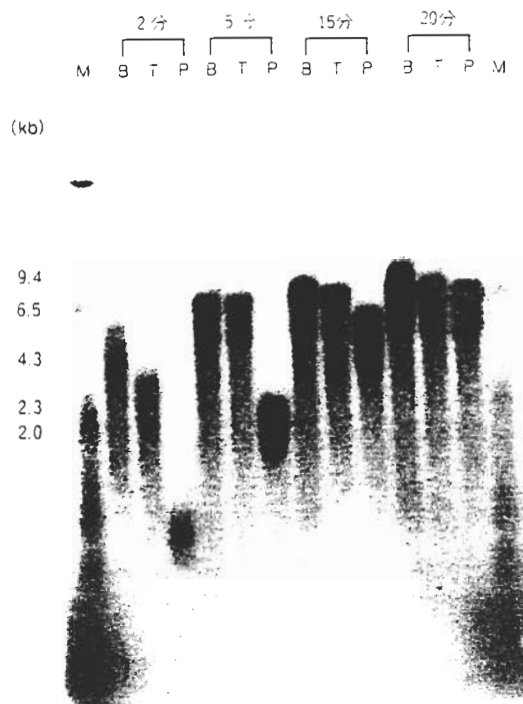


図1 DNAポリメラーゼによるプライマー伸長活性の比較  
 M13 1本鎖DNAに相補的な配列をもつ45鎖のデオキシオリゴヌクレオチドを合成し、両者をアニールさせた。鋳型-プライマー22  $\mu$ gに、 $[\alpha^{32}\text{p}]$ dCTPを含むdNTP混合液と0.6 unitのDNAポリメラーゼを加え伸長反応を開始したのち、2分、5分、10分、20分後それぞれ等量ずつ抜きとって、EDTAで反応を停止させた。BcaBESTは65°C、TaqとPfuは72°Cで行なった。合成鎖はアルカリアガロースゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーを行なった。B: BcaBESTポリメラーゼ、T: Taqポリメラーゼ、P: Pfuポリメラーゼ。

### 3 忠実性 (Fidelity)

DNAポリメラーゼのDNA合成に関する忠実性は、突然変異出現頻度で表わされる。例えば、Taqポリメラーゼで報告されている  $1\text{-}2 \times 10^4$  という数字<sup>1,15,16)</sup>は、一回のDNA鎖合成時に10000ヌクレオチドに1-2個の割合で鋳型DNAとミスマッチをおこす変異が入るという意味である。突然変異頻度測定により、各DNAポリメラーゼの忠実性を比較することができるが、この値は測定条件に大きく影響されるものである。dNTPの濃度、鋳型-プライマーの種類、反応温度、塩や金属イオンの種類、変異検出の方法などの条件が違えば、結果も異なる。従って、DNAポリメラーゼ間の忠実性を比較するときは、同時に同じ条件で変異頻度を測定しなければならない。同じ条件で測定した例としては、表2のような結果が報告されている。これらの結果を見ると、やはり3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が付随している $\alpha$ ファミリーのPfuポリメラーゼやVentポリメラーゼの忠実度はTaqポリメラーゼより高いようである。PCRで目的のDNA領域を増幅する場合、すこしでも忠実度が高い方が望ましいので、特に増幅断片をクローニングに用いたい場合などは、鎖長的に可能ならこれらの酵素を用いるのが良いであろう。

逆に人工的に遺伝子に突然変異を加える場合には、PCRでの増幅時にできるだけ多くの読み間違いをさせて、ランダムに多くの種類の変異体をとるという方法がある。Mutagenic PCRと呼ばれるこの操作では、DNAポリメラーゼの忠実度が低い方が望ましい。Taqポリメラーゼを用いて変異頻度を上げるPCRプロトコルが報告されている<sup>17, 18)</sup>。それによると、ミスマッチ塩基対を安定化させるためにMgCl<sub>2</sub>の濃度を高くし、DNAポリメラーゼの鋳型特異性を下げるために、MnCl<sub>2</sub>を加えるなどの工夫がされている。他のポリメラーゼを用いたMutagenic PCRの報告はない。

表 2 DNA ポリメラーゼによる変異発生頻度の比較

DNA ポリメラーゼ	変異頻度	文献
Taq Vent	$2.0 \times 10^{-4}$ $6.6 \times 10^{-5}$	46, 47
Taq Vent	$7.2 \times 10^{-5}$ $4.5 \times 10^{-5}$	47
Taq Vent	$8.9 \times 10^{-5}$ $2.4 \times 10^{-5}$	48
Taq Pfu	$2 \times 10^{-5}$ $2 \times 10^{-6}$	8
Tfi Vent Vent (エキソ)	$2.1 \times 10^{-4}$ $3 \times 10^{-5}$ $4.4 \times 10^{-4}$	49

#### 4 ターミナルエクステンダーゼ活性

DNAポリメラーゼによって試験管内DNA合成を行った場合、多くのDNAポリメラーゼによる合成鎖は鋳型DNAの3'末端できっちりと止まらず、1ヌクレオチド余分に付加される<sup>19,21)</sup> (図2)。DNAポリメラーゼの持つこのターミナルトランスフェラーゼ活性は特に、ターミナルエクステンダーゼ活性と呼ばれるが<sup>21)</sup>、その強さは、DNAポリメラーゼの種類によって異なり、また同じDNAポリメラーゼを用いても鋳型DNA末端の配列によって異なる。この性質はPCRによる増幅DNA断片をプラスミドベクターに挿入したい場合に問題になる。ターミナルエクステンダーゼ活性による3'末端への一ヌクレオチド付加は100%ではないので、PCR産物の末端は平滑状のものとは一ヌクレオチド突出したものが混ざり合っており、用いたDNAポリメラーゼの種類や、プライマーの配列などにより、その混合比は異なる。このことから、PCR産物とプラスミドベクターをBlunt-end ligationで繋げると目的の形質転換体を得られる効率が非常に悪い。3'-末端に付

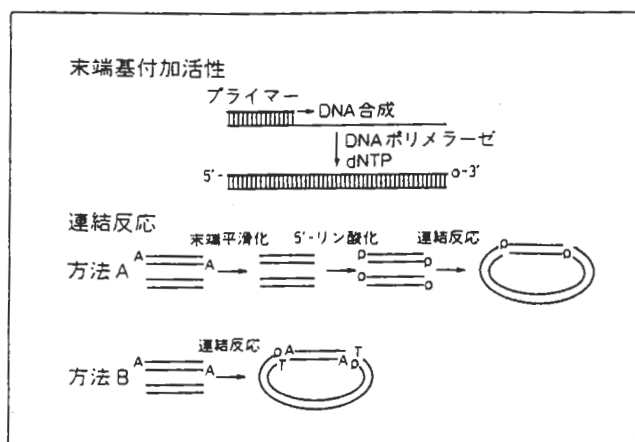


図 2 DNAポリメラーゼの末端基付加活性  
DNAポリメラーゼによるプライマー伸長反応は鋳型DNAの末端で停止せず、1ヌクレオチド突出する。

表 3 PCR産物のクローニング方法の比較

方法	DNAポリメラーゼ	コロニー数		クローニング効率 (%)
		白	青	
(平滑化クローニング)	Taq	400	37	91
	Pfu	550	32	94
(T-クローニング)	Taq	57	21	73
	Pfu	29	32	47

TaqおよびPfuポリメラーゼを用いたPCR産物を250 ng用いて、(A) 平滑化 (TaKaRa Blunting kit), さらに5'リン酸化したのち、HincII-脱リン酸化 pUC 118 50 ng と連結反応を行なった (TaKaRa Ligation kit ver. 2), (B) 50 ng の pT 7 Blue (Novagen) と連結反応を行なった。連結反応液 21  $\mu$ l のうち 10  $\mu$ l を用いて大腸菌 JM109 を形質転換し、1 ml のうち 200  $\mu$ l をプレーティングした結果得られた形質転換体の数を示す。形質転換体は  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性によりカラーセクションを行なった。白コロニーから得られるプラスミドには目的のDNA断片が組み込まれていることを確認した<sup>23)</sup>。

加するヌクレオチドは殆どデオキシアデノシンなので、T-ベクターと呼ばれる、デオキシチミジンが一つ3'-末端に突出した開環状のベクターが開発されている。3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性の強いDNAポリメラーゼは平滑末端を有する産物を生成し、クローニングの際上記の点を考慮しなくてもよいという報告がある<sup>21,22)</sup>。我々はpUC系プラスミドのマルチクローニングサイトに0.5kbpの *Haemophilus influenzae* DNAが挿入されたプラスミドを鋳型にして、クローニングサイトの外側の共通プライマーでPCRを行い、その産物のクローニング実験により、DNAポリメラーゼの違いによる効率の差を調べてみた<sup>23)</sup>。PCR産物をT4 DNAポリメラーゼで平滑化して、さらにT4P.N.キナーゼで5'-リン酸化した後、脱リン酸化ベクターと連結する方法(A)と、直接T-ベクターと連結する方法(B)でクローニングした結果を表3に示した。この結果はPfuポリメラーゼによる産物でも、十分な効率でT-ベクターに直接組み込まれることを示している。実際にPCR産物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ、一ヌクレオチド付加の割合は、*Taq*, *ExTaq*, *Pfu* でそれぞれ産物全体の60-70%, 50-60%, 30-40%であった。

PCR産物が混合物になることはSSCP (Single-stranded conformation polymorphism), DGGE (Denatured gradient gel electrophoresis) などの突然変異検出実験や、マイクロサテライト多型検出実験の場合に電気泳動パターンの判定を困難にする。我々の経験では、*Taq* ポリメラーゼを用いた結果が判定困難な場合は*Pfu* ポリメラーゼを用いても変わらない場合が多い。これらの実験には、どのような配列でもはっきりとどちらかの型(平滑か突出か)の産物を増幅する酵素の開発が望まれる。

## 5 逆転写活性

大腸菌の Pol I に逆転写活性があることは古くから知られていたが<sup>24,25)</sup>、PCRの出現後 *Taq* ポリメラーゼの逆転写活性を用いてmRNA から一度にPCR まで行なう方法が報告された<sup>26,28)</sup>。しかし、増幅には多量(1-5 µg)のRNAを必要としたり、少量のRNAで行なっても検出にサザンハイブリダイゼーション法を必要とするなどの理由から実用的ではなかった。その後、*Tth* ポリメラーゼに、より強い逆転写活性があることが発見され<sup>7)</sup>、シングルチューブRT-PCR (逆転写PCR) が実用化した。*Tth* ポリメラーゼの逆転写活性は金属イオンとしてMn<sup>2+</sup>を用いるとより強いため、MnCl<sub>2</sub>存在下で逆転写反応を行ない、EGTAでキレートした後、MgCl<sub>2</sub>を加えてPCRを行なうというプロトコルが用いられている。このシングルチューブRT-PCRは操作的には簡便であるが、うまく働かない場合もあり、本職の逆転写酵素を用いた2ステップのRT-PCRのほうがより確実なのが現状である。

*Taq*ポリメラーゼと*Tth*ポリメラーゼのアミノ酸配列は非常に類似しているにもかかわらず(88% identity)<sup>29,30)</sup>、逆転写活性は明らかに異なることは、DNAポリメラーゼの構造と活性の関係を解析する上で非常に興味深い。

## 6 基質アナログの取り込み

PCRの応用範囲が広がるにつれ、目的に応じて異なる能力がDNAポリメラーゼに要求される。例えば、反応液へのコンタミネーションを防ぐ目的でdTTPの代わりにdUTPを用いて最初のPCRを行ない、ウラシル-N-グリコシラーゼで処理して混入DNAを分解する場合<sup>31)</sup>や、オリゴヌクレオチドダイレクトミュータゲネシスのために鋳型DNAにdUTPを取り込ませる場合<sup>32)</sup>、また、増幅断片をハイブリダイゼーションのプロープとして用いるために蛍光物質やビオチンを付加したdUTP誘導体を取り込ませる場合<sup>33)</sup>などがある。さらに、GC-richな配列領域を増幅したい場合にdGTPの代わりにd<sup>7</sup>cGTP(7-デアザゲアノシン3リン酸)を用いると成功する場合がある。このように、天然のA, G, T, C以外の塩基を持つヌクレオチドを取り込ませてDNA鎖を合成する場合、Taqポリメラーゼを用いるのが良い。VentポリメラーゼやPfuポリメラーゼではDNA鎖はうまく合成されない<sup>34)</sup>。他のPol I型酵素でも利用可能であると思われるが、あまり報告がない。

基質としてのヌクレオチドのみではなく、プライマー配列中にGの代わりにI(イノシン)を用いたい場合がしばしばある。アミノ酸の部分配列がわかって、それに基いたプライマーを合成したい時、コドンの縮重のためミックスプライマーを合成しなければならない。アミノ酸配列によってはミックスの割合が高くなり、正しい配列の割合が下がりすぎる。このとき、縮重している部分にIを用いる方法がある。この場合もTaqポリメラーゼを用いてPCRを行なうとうまく合成されるが、Pfuポリメラーゼや、Ventポリメラーゼでは働かない<sup>35)</sup>。

3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するα型酵素は基質アナログや鋳型中のイノシンの相手に入った塩基をミスマッチとして除去してしまうと考えられる。3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素としては、唯一Ultmaポリメラーゼを用いてうまく合成されたという報告がある<sup>35)</sup>。

## 7 Long PCR

PCRによって簡単に目的のDNA領域を試験管内で増幅することができるようになったが、前述の増幅配列の正確性とともPCR法のもう一つの大きな問題点として、増幅できるDNA領域の長さには制限があるということがある。従来、PCRでの実用的な増幅鎖長は数kbp程度までであった。α型のDNAポリメラーゼを用いた場合は実用性はさらに下がり、2kbp以下になる。反応条件を至適化することで10kbp以上の増幅が見られることもあるが、一般的に長鎖DNAの増幅は困難であった。

1994年にワシントン大学のBarnesが発表した、Pol I型酵素とα型酵素を混合してPCRに用いる方法は、上記の問題点の改良にとって、優れた方法であった。TaqポリメラーゼでPCRを行なった時の増幅鎖長の限界の原因として、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性がないため、読み間違いをした場合に3'-末端がミスマッチとなり、その後の合成が阻

害されることが考えられるので、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する *Pfu* ポリメラーゼや *Vent* ポリメラーゼを混合して PCR を行なってみたところ、非常に効果があり、簡単に 10 kbp 以上の DNA が増幅できるようになったのである<sup>36)</sup>。この原理に基き、製品化された *TaKaRa ExTaq* ポリメラーゼは *Taq* ポリメラーゼに比べて明らかに伸長能が増し、増幅効率も高い(後述)。さらに、*ExTaq* には 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が含まれているため、忠実性も *Taq* に比べて 4 倍程度よくなっている。現在では、この原理を利用した、長鎖 DNA 増幅用キットとして *TaKaRa LA (long and Acculate) PCR kit* などいくつかの製品が市販されている。LA-PCR については本誌に解説が掲載されているので参照されたい。

### III PCR の実例

各酵素によって PCR パフォーマンスがどの程度異なるかについては、これまで述べてきたように反応条件や、DNA の配列に大きく影響されるが、一つの例として  $\lambda$  ファージ DNA を鋳型に用いて、現在使用されている主な DNA ポリメラーゼを各メーカーの添付するバッファーで反応させて比較した<sup>37)</sup>。

酵素としては、Pol I 型として *Taq* ポリメラーゼ (*TaKaRa*) と *Ultma* ポリメラーゼ (*Perkin-Elmer*) を、 $\alpha$  型として、*Pfu* (*Stratagene*)、*Vent* (*New England Biolabs*)、*Deep Vent* ポリメラーゼ (*New England Biolab*) を用い、さらに混合型として *TaKaRa ExTaq* ポリメラーゼを用いた。 $\lambda$  ファージ DNA を鋳型として、0.5-8 kbp まで増幅領域を変えて PCR を行い、結果をアガロースゲル電気泳動で調べた(図 3)。この実験でもやはり  $\alpha$  型酵素での増幅効率が悪く、増幅領域が長くなるに従い、*Deep Vent*、*Vent*、*Pfu* の順でバンドが検出できなくなっている。*Pfu* ポリメラーゼが最もよいが、4 kbp のバンドが検出できない。*Taq* と *ExTaq* は 8 kbp のバンドまで検出できるが、増幅効率は両者ではっきり差がでていいる。*Taq* では、この反応系で 15 kbp まで確認できたが、*ExTaq* では、図 4 に示すように 40 kbp まで増幅することができた。長鎖増幅 DNA は、制限酵素切断パターンにより目的の領域が正しく増幅されたものであることを確認している。

ここに示したものはメーカーの添付するバッファーを用いて実験した結果であるので、各酵素と鋳型 DNA の組み合わせによってはもっと適した反応条件が有るかも知れない。特にマグネシウム濃度は敏感に影響する(鋳型プライマー DNA や、dNTP の濃度によって反応液中の利用可能なマグネシウムイオンの量は変化する)ので、最近各メーカーとも添付バッファーから塩化マグネシウムを除き、別のチューブで供給して各実験者がマグネシウムの濃度を検討できるようにしつつある。

### VI PCR 用酵素の改良

PCR の反応結果は、用いられる DNA ポリメラーゼによって最も大きく影響をうける。紹介したように多くの種類の DNA ポリメラーゼが PCR 用酵素として市販されており、目的に応じて最適の酵素を用いることが望まれるが、PCR が普及すればするほど、さらに



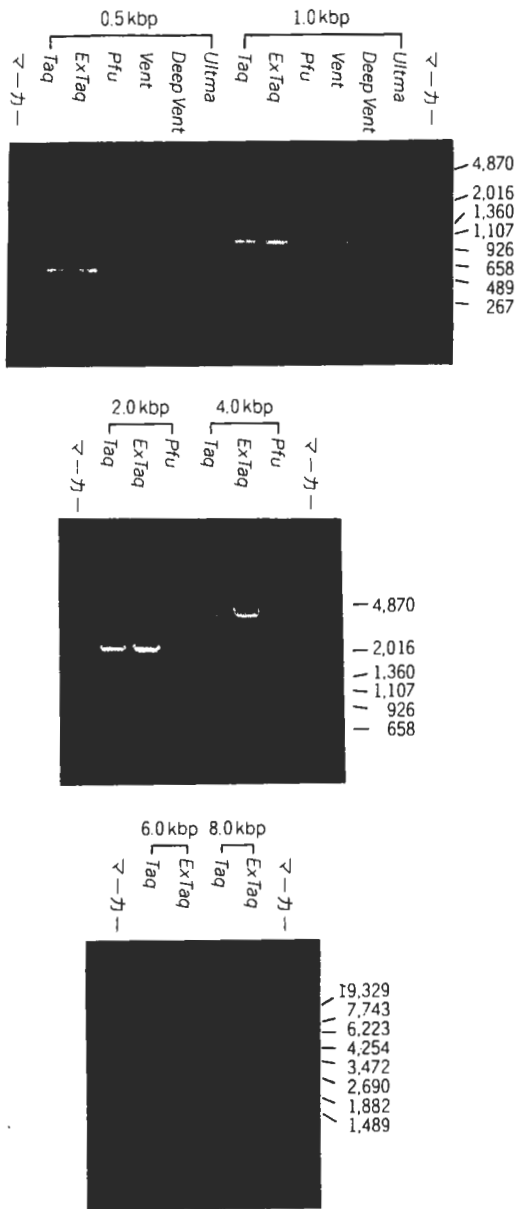


図 3 DNA ポリメラーゼの違いによる PCR 増幅効率の比較

$\lambda$  ファージ DNA 5 ng とプライマー各 10 pmol, dNTP 各 10 nmol を 50  $\mu$ l で PCR した。DNA ポリメラーゼは 2.5 unit 使用し、反応緩衝液はメーカー添付のものを使用した。94°C 0.5 分, 55°C 0.5 分, 72°C 0.5 分で 25 サイクル行なったのち、4  $\mu$ l を 1% アガロースゲル電気泳動により分析した。

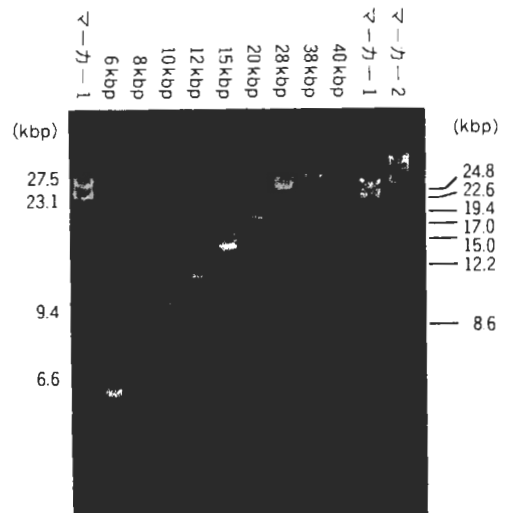


図 4 ExTaq ポリメラーゼによる long PCR

図 3 の実験と同じ反応系で 2.5 unit の ExTaq ポリメラーゼを使用し、94°C 1 分ののち、98°C 10 秒、68°C 20 分を 30 サイクル行なった。反応液 4  $\mu$ l を 0.4% アガロースゲル電気泳動により分析した。

優れた酵素の開発、改良が望まれる。PCR 用酵素として、新しい酵素を探索する方法とはべつに、現在では、既存の酵素を蛋白工学的に改変し、目的に適した DNA ポリメラーゼを作り出すことも可能であり、例えば、Taq ポリメラーゼの中の一アミノ酸をフェニルアラニンからチロシンに変換することで (F667Y)、ジデオキシヌクレオチドの取り込み効率が大きく上昇することの発見<sup>3)</sup>を基にした、改良型酵素がいま有用なサイクルシーケンス用酵素として活躍している (Thermo Sequenase, アマシャム)。また、低温では活性を持たず、高温にすることで活性化される改良型酵素 (AmpliTaq Gold, パーキンエルマー) の開発により、ホットスタート法が著しく容易になった。ホットスタート PCR 法は非特異的な増幅や、プライマー二量体の形成による増幅効率の低下を防ぐ方法として開発されたもので、有用な PCR 操作の一つである。ホットスタート PCR 法を用いるこ

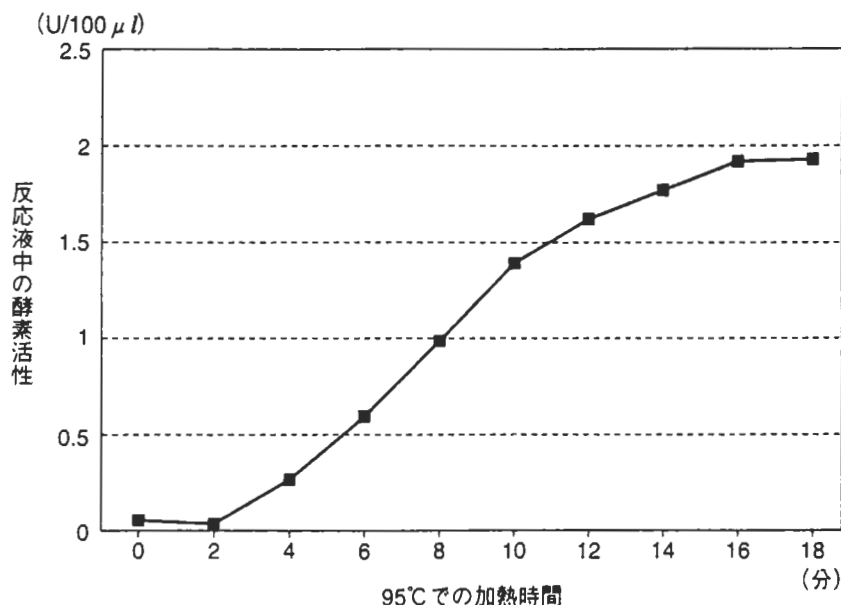


図1 ● AmpliTaq Goldの加熱による活性化

PCRと同じ条件にするため、2.5unitsのAmpliTaQ Goldを10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 各200 μ M dNTPを含む溶液100 μ l中で加熱した。95°Cで2分ごとにサンプリングし、DNA合成活性を測定した。Birch, D. E. et al. : Nature 381, 445-446 (1996) より転載。

とで、特にコピー数の少ない遺伝子を直接ゲノムDNAから増幅したり、Competitive PCRを用いた定量などの実験の精度が上がる。ホットスタートPCRの方法としては、基本的には酵素以外の反応成分を加熱し、高温になったところで酵素を加えるという操作で行うことができるが、酵素添加時に反応チューブを再び開けなければならず、数が多い時には実際的でなく、混入物の可能性も高くなる。そこで、反応液の温度が高温になるまでDNAポリメラーゼが働かないように、ビーズ状ワックスでDNAポリメラーゼと他の反応液組成成分を隔離したり<sup>39)</sup>、DNAポリメラーゼの抗体を用いるなどの方法が実用化されている<sup>40)</sup>。しかし、これらの方法は操作面、コスト面で改良が望まれていた。最近開発されたTaqポリメラーゼの修飾体は、図5のように低温では不活性の状態であるが、高温になると活性化される<sup>41)</sup>。その原理はメーカーによって明らかにされていないが、この酵素の実用化により、従来のPCRと同じプロトコルですべての反応組成物をはじめから混合し、PCR装置にセットするだけでホットスタートPCRができるようになった。AmpliTaQ Goldを活性化するためには、PCRサイクルに入る前に、反応液をプレヒートすればよい。この条件をうまく調整すれば、PCRサイクルの初期における過剰な酵素活性を抑え、鑄型の増加とともに酵素活性を上げることができることから、全サイクルにおいて至適酵素活性でPCRができるという、“Time Release PCR”という概念が導入された。

AmpliTaQ Goldは、クローン化されたTaqポリメラーゼの遺伝子を改変して作製されたリコンビナントTaqポリメラーゼらしいが、別の方法としてTaqポリメラーゼに低温でのみ特異的に結合するオリゴヌクレオチドインヒビターを見つけたという報告がある<sup>42)</sup>。このインヒビター活性は可逆的であるので、他の方法と違って一度高温で活性化した酵素を低温にすると再び不活化することができる。また抗体蛋白のように、そのものの不活化を気にする必要がないので、コストが安く、取扱いも容易であることから、その実用化が期待される。

## おわりに

これまで述べてきたように、現在数多くの耐熱性DNAポリメラーゼがPCRに利用されるようになったが、Taqポリメラーゼ以外はまだまだ使用例が少なく、参考データが限られている。また、同じTaqポリメラーゼでも多数のメーカーから販売されており、製造法の違いによってPCRのパフォーマンスが異なることもある。

今後まだまだ、より優れたPCR用の酵素が開発される可能性はある。PCRのライセンスが、Hoffman La Roche社からいくつかのメーカーに与えられたことにより、PCRの製造、販売の権利を取得したメーカーの間での新規有用酵素の開発が本格的に展開されている。大腸菌DNAポリメラーゼがそうであるようにPol Iの酵素は菌体内では修復酵素と考えられ、複製酵素に比べてDNA鎖伸長能は低いと思われる。従って、好熱性細菌の複製酵素をうまく利用した、Super LA-PCRの開発が考えられる。複製酵素は多くのサブユニット構造から校正されることが予想され、それらを用いた優れたPCR系の開発は非常にむずかしいが、競争はこの方向へむかうであろう。我々もこれまで多くの耐熱性DNAポリメラーゼを単離し、いくつかについては発表してきている<sup>14,43,46</sup>。その中には、超好熱性古細菌から、既存のファミリーには属さない新規DNAポリメラーゼも含まれている。この酵素も含めて、開発競争の結果より優れた、或いは種々の目的に適したDNAポリメラーゼが開発され、それらが分子生物学の発展に貢献し、人類の進歩に役立つことを期待したい。

## 文献

- 1) Saiki, R.K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: *Science*, 239, 487-491 (1988)
- 2) Chien, A., Edgar, D. B., Trela, J. M.: *J. Bacteriol.*, 127, 1550-1557 (1976)
- 3) Wong, S. W., Wahl, A. F., Yuan, P.-M., Arai, N., Pearson, B. E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M. W. Wang, T. S-F.: *EMBO J.*, 7, 37-47 (1988)
- 4) Wang, T. S-F., Wong, S. W. & Korn, D.: *FASEB J.* 3, 14-21 (1989)
- 5) Ito, J., Braithwaite, D. K.: *Nucleic Acids Res.*, 19, 4045-4057 (1991)
- 6) Braithwaite, D. K., Ito, J.: *Nucleic Acids Res.*, 21, 787-802 (1993)
- 7) Myers, T. W., Gelfand, D. H.: *Biochemistry*, 30, 7661-7666 (1991)
- 8) Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A., Mathur, E. J.: *Gene*, 108, 1-6 (1991)
- 9) Kong, H., Kucera, R. B., Jack, W.E.: *J. Biol. Chem.*, 268, 1965-1975 (1993)
- 10) Uemori, T., Ishino, Y., Fujita, K., Asada, K., Kato, I.: *J. Biochem.*, 113, 401-410 (1993)
- 11) Koboev, O. K., Luchkina, L. A., Akhmedov, A. T., Bekker, M. L.: *J. Bacteriol.*, 145, 21-26 (1981)
- 12) Ishino, Y., Ueno, T., Miyagi, M., Uemori, T., Imamura, M., Tsunasawa, S., Kata, I.: *J. Biochem.*, 116, 1019-1024 (1993)
- 13) Ishino, Y.: *Am. Biotechnol. Lab.*, 10, 47 (1992)
- 14) Uemori, T., Ishino, Y., Doi, H., Kato, I.: *J. Bacteriol.*, 177, 2164-2177 (1995)
- 15) Tindall, K. R., Kunkel, T. A.: *Biochemistry*, 27, 6008-13 (1988)
- 16) Keohavong, P., Thilly, W. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 9253-9257 (1989)

- 17) Leung, D. W., Chen, E., Goeddel, D. V.: *Technique*, 1, 11-15 (1989)
- 18) Cadwell, R. C. & Joyce, G. F.: *Mutagenic PCR. PCR Methods Applic.*, 3, S136-140 (1994)
- 19) Clark, J. M., Joyce, C. M. & Beardsley, G. P.: *J. Mol. Biol.*, 198, 123-127 (1987)
- 20) Clark, J. M.: *Nucleic Acids Res.*, 16, 9677-9686 (1988)
- 21) Gengxi, H.: *DNA Cell Biol.* 12, 763-770 (1993)
- 22) Lohff, C. J. & Cease, K. B.: *Nucleic Acids Res.* 20, 144 (1991)
- 23) 石野良純、上野高嗣：細胞工学 Vol.14, No10 印刷中 (1995)
- 24) Karkas, J. D.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 3834-3838 (1973)
- 25) Loeb, L. A., Tartof, K. D., Travaglini, E. C.: *Nature New Biol.*, 242, 66-69 (1973)
- 26) Jones, M. D., Foulkes, N. S.: *Nucleic Acids Res.*, 17, 8387-8388 (1989)
- 27) Tse, W. T., Forget, B. G.: *Gene*, 88, 293-296 (1990)
- 28) Shaffer, A. L., Wojnae, W., Nelson, W.: *Anal. Biochem.*, 190, 292-296 (1990)
- 29) Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. H.: *J. Biol. Chem.*, 264, 6427-6437 (1989)
- 30) Asakura, K., Komatsubara, H., Soga, S., Yomo, T., Oka, M., Emi, S., Urabe, I.: *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 265-269 (1993)
- 31) Longo, M. C., Berninger, M. S., Hartley, J. L.: *Gene*, 93, 125-128 (1990)
- 32) Kunkel, T.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 488-492 (1985)
- 33) Lo, Y-M. D., Mehal, W. Z., Fleming, K. A.: *Nucleic Acids Res.*, 16, 8719 (1988)
- 34) Slupphang, G., Alseth, I., Eftedal, I., Volden, G., Krokan, H. E.: *Anal Biochem.*, 211, 164-169 (1993)
- 35) Fujiwara, H., Fujiwara, K., Hashimoto, K.: *PCR Methods Applic.*, 4, 239-240 (1995)
- 36) Barnes, W. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2216-2220 (1994)
- 37) 石野良純、向井博之：細胞工学 Vol.14, 956-961 (1995)
- 38) Tabor, S., Richardson, C. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6339-6343 (1995)
- 39) Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E. et al.: *Nucleic Acids Res.* 20, 1717-1723 (1992)
- 40) Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S. et al.: *BioTechniques* 16, 1134-1137 (1994)
- 41) Birch, D. E., Kolmodin, L., Wong, J. et al.: *Nature* 381, 445-446 (1996)
- 42) Dang, C., Jayasena, S. D.: *J. Mol. Biol.* 264, 268-278.
- 43) Uemori, T., Ishino, Y., Toh, H., Asada, K., Kato, I.: *Nucleic Acids Res.*, 21, 259-265 (1993)
- 44) Imamura, M., Uemori, T., Kato, I., Ishino, Y.: *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1647-1652 (1995)
- 45) Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., Ishino, Y.: *Genes to Cells*, 2, 499-512 (1997)
- 46) Ishino, Y., Komori, K., Cann, I., Koga, Y.: *J. Bacteriol.* 180, in press (1998)
- 47) Ling, L. L., Keohavong, P., Dias, C., Thilly, W. G.: *PCR Methods Applic.*, 1, 63-69 (1991)
- 48) Cariello, N. F., Swenberg, J. A., Skopek, T. R.: *Nucleic Acids Res.*, 19, 4193-4198 (1991)
- 49) Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., Pitkanen, K.: *Nucleic Acids Res.*, 19, 4967-4973 (1991)

本解説文は以下の2編を改訂したものである。

- 1) 耐熱性DNAポリメラーゼとPCR、石野良純、蛋白質核酸酵素 41, 429-436 (1996)
- 2) PCR用DNAポリメラーゼの改良、石野良純、細胞工学 16, 1207-1211 (1997)