

1997年7月15日
独立行政法人 理化学研究所

世界最高性能のゲノム解析用プラスミド調製装置を開発

理化学研究所（理事長：有馬朗人）ライフサイエンス筑波研究センターは、当所の研究基盤技術部との協力により、ゲノム解析に不可欠な世界最高性能のプラスミド調製装置を開発した。これは、ゲノム解析に必要な塩基配列決定を行う試料の大量調製を自動的に行うものであり、今回この実証試験に成功した。

本装置は、従来機種との200倍以上の性能を有し、1日で4万サンプルの塩基配列決定用試料の作成を可能とした。

なお、本装置に適用した方法は、本年3月発行の *Nucleic Acid Research* ('97, Vol.25, No.6、伊藤昌可、林崎良英他) に掲載されている。

1. 背景

ヒトは、約10万種類の遺伝子を有しており、これらの働きにより全ての生命活動が営まれていると考えられる。これらの遺伝子は、発現する多種のタンパクを介して、非常に複雑な相互作用（多遺伝子間の相互作用）をしている。生命活動のもととなるこれらの遺伝子の相互作用等全体的な機能（ゲノム機能）解明のためには、その基本要素である遺伝子の本体（塩基配列、コードされるアミノ酸配列、ゲノム上の位置等）を知る必要がある。しかし、既存の手段では遺伝子本体を解析することに非常に労力が必要である。

そこで、遺伝子・ゲノム機能をシステムティックに解析する手法が望まれている。

2. 計画の概要

(1) ライフサイエンス筑波研究センターではゲノム科学研究室（林崎良英主任研究員）が主体となり、ゲノム機能の解析を目指して、平成8年度から「汎遺伝子機能探索計画」を進めている。

本計画の当面のねらいは、ヒトの疾病原因等となる遺伝子を迅速に効率良く解明するため、完全な遺伝子の抽出とその遺伝子のゲノム上の位置を決定した、遺伝子高速探索システム（遺伝子エンサイクロペディア）を構築するものである。

(2) 本計画を進めるために計画している具体的な手法は、次のとおり。

1. 理研が独自に開発した手法による完全な遺伝子（完全長 cDNA）の抽出を、マウスの発生段階を含む各ステージ及び各組織について実施する。
2. 完全長 cDNA の重複を除くため、その一部の塩基配列の決定及び同種 cDNA の排除を実施する。
3. 重複のない完全長 cDNA（約10万種類と想定）の全長の塩基配列を決定する。
4. マウスのゲノム DNA 全体の塩基配列を解析し、完全長 cDNA の塩基配列との照合により、完全長 cDNA のゲノム（染色体）上の位置を確定する。
5. 異常マウス（ミュータントマウス）と正常マウスとを比較し、異常の原因遺伝子を特定することにより、遺伝子の機能をシステムティックに解明する。

注)マウスを用いる理由

マウスの遺伝子はヒトの遺伝子とほぼ共通であり、倫理上、ヒトからの採取ができない多くの遺伝子がマウスからは取れ、交配実験や人為的な遺伝子操作が可能であり、マウスの遺伝子から極めて短期間にヒトの遺伝子が取れることから、マウスを通じてヒトの遺伝子機能を解明するもの。

この方法を採用することにより、医療の重要課題である糖尿病、高血圧、動脈硬化、ガン等の多因子遺伝病の解明や、ヒトゲノムの統合的解明が初めて可能となる。

(3)本計画を実行するためには、総計数千万回に及ぶ塩基配列決定のための作業を実施する必要があるが、そのためのネックがいくつかある。その一つは、塩基配列決定のための試料調製である。実験に必要な多数の試料をいかに迅速に用意するかが大きな課題であった。

今回、その課題を解決した(既に開発したPCR装置と相補的であると同時に相乗的な効果をもつ)。

3. 開発成果

シーケンス反応を行う試料として1日で4万サンプルのプラスミドを調製する自動システムを開発した。調製されるプラスミドは非常に高純度であり、それを用いて直接シーケンス反応を実施できる。

開発した装置の特徴は、次のとおり。

(1)原理

解析対象DNAを組込んだプラスミドを含む大腸菌を、プラスミド保持ガラスフィルターとろ過フィルターの2層で構成されるカートリッジ容器に入れ、5種の溶液を各々注入し、カートリッジ下面から吸引ろ過する。その後洗浄等を行い、ガラスフィルターに吸着された純粋なプラスミドを回収する。

(従来法の1例)

遠心で大腸菌を回収、溶菌処理後遠心でプラスミド溶液を回収、プラスミド沈殿試薬添加後遠心で粗プラスミドを回収、洗浄後プラスミドを回収。

(2)構成

96サンプルを同時処理可能なプレートを420枚収納する自動供給装置から、順次1枚ずつ 1. 溶菌 2. プラスミドDNAの吸着 3. 不要物のろ過 4. 洗浄及び 5. プラスミドDNA回収の各工程に連続供給され、最終的に自動収納装置に入れ、次の反応過程に回す。

(3)性能

1. 全工程は、21ステップ(所要時間52分)からなり、17時間でプレート420枚(4万サンプル)のプラスミドDNAの調製が可能である。
2. 本システムでは、0.5mlの大腸菌培養液から数 μg のプラスミドが回収可能である。
3. 無人運転を可能にするため、各種の安全・警告装置を備え、96穴プレートはバーコードで管理している。

4. 今後の展開

大量の塩基配列を決定する手法を中心とした高速 DNA 解析のためには、材料調製、塩基配列決定を含め、数多くのステップが存在する。今回のシステムは、その1段階を飛躍的に効率化したものである。理研においては完全長 cDNA の合成法、新しい反応系の開発等新世代高速 DNA 解析センターを実現するため、独自技術の開発（特許出願中）を行っている。

今後は、本システムを含めた各ステップの改良及び大容量シーケンサーシステムの開発も引続き実施し、全体システムの能力アップを進める予定である。

(問い合わせ先)

〒305 つくば市高野台-1-1

理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター

ゲノム科学研究室 主任研究員

林崎良英

Tel : 0298-36-9145

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所広報室

越間、佃、吉垣

Tel : 048-467-9270

開発したプラスミド調製装置

(RISA プラスミド・プレパレーター)

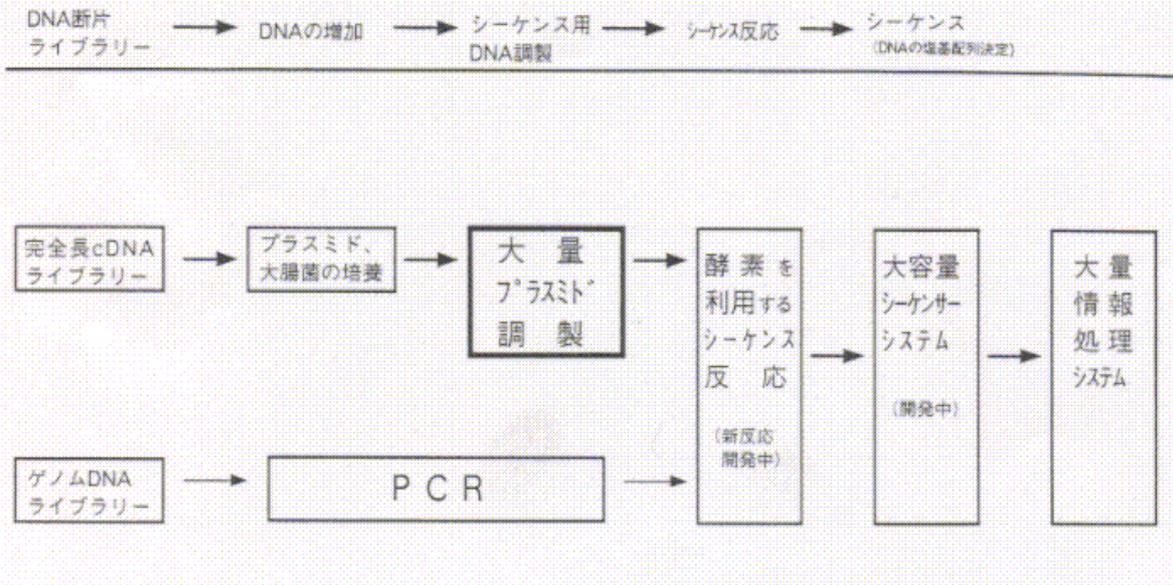


上及び右は開発した装置の全体（除ポンプ）

左側はサンプル自動供給・回収部分であり、中央部がプラスミド調製部分、右側は制御部分

(参考)

塩基配列決定プロセスの概略



<参考>

塩基配列決定プロセスの概略

