

# 新技術紹介

## DNA シークエンシング

KANNO Toru

寒地酪農衛生研究領域 主任研究員 菅野 徹

DNA シークエンシングとは、DNA（核酸）を構成する4つの塩基であるアデニン（A）、チミン（T）、グアニン（G）、シトシン（C）の配列を決定することです。

後にノーベル賞を受賞したサンガーが開発したダイデオキシ法を基にした手法が現在広く使われています。まずDNAを増幅する方法として知られる Polymerase Chain Reaction（PCR）を応用し、配列を読みたいDNAの増幅を20～30サイクル行います（サイクルシークエンシング）。その時にDNA合成材料として各種塩基（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）が必要ですが、同時にDNAの伸長を止めるターミネーター（ダイデオキシリボヌクレオチド：ddATP、ddTTP、ddGTP、ddCTP）を混ぜておきます。その結果、DNA合成が進むにつれ、ターミネーターが取り込まれたことにより伸長が止まった様々な長さのDNA断片が生じます。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動により1塩基単位で分離して検出し、塩基配列を決定するのが基本的な原理です（図1）。

検出のためにはDNA断片を標識することが必要です。以前は標識に放射性物質が用いられていましたが、取り扱いに制約があることから、現在、蛍光物質が使用されるのが一般的です。また反応産物をレーザーと蛍光ディテクターとを組み合わせリアルタイムに検出し解析までを自動に行うDNAシークエンサーを用いるのが主流です（図2）。蛍光標識はプライマー（ダイプライマー法）あるいはターミネーター（ダイターミネーター法）にし

ますが、現在は後者が主流となっています。この方法では4種類のターミネーターがそれぞれ異なる蛍光色素で標識されているため、1つのチューブ内に4種類のターミネーターを加えて反応を行い、それを泳動するだけで塩基配列が決定できます。また、配列を読みたい領域ごとにプライマーを標識する必要がないため、長いDNA配列を決定することが安価にできる長所があげられます。

動物衛生分野では疾病発生の原因となったウイルスや細菌など各種病原体の遺伝子を既知のものと比較するためにシークエンシングがよく行われます。それから得られた結果により病原体の侵入経路や病原性などが推測され、防疫対策等に役立てることが出来ます。

現在のDNAシークエンサーの主流は上記のように蛍光キャピラリーシークエンサーですが、ここ数年の間に次世代シークエンサーと呼ばれる原理の異なるシークエンシング技術が登場しました。蛍光キャピラリーシークエンサーに比べると桁違いの塩基配列を一度に解読することができます。機械そしてランニングコストが高価なこともあり、まだ一般的な使用は困難ですが、さらなる技術の開発によるコストダウンが期待され、将来的には有効利用できるものと思います。

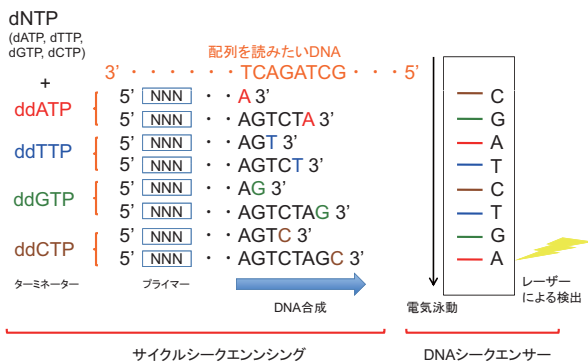


図1. 一般的なDNAシークエンシング手法 (ダイターミネーター法)

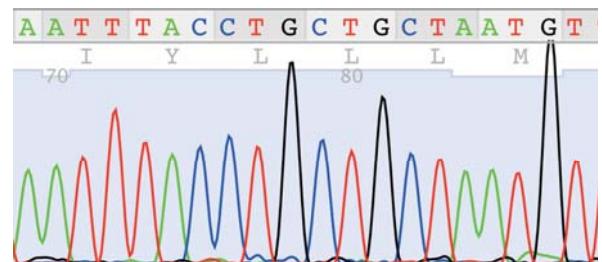


図2. DNAシークエンサーによる解析結果（塩基配列決定）4種類の蛍光色素で標識されたDNA断片を短いものから検出し配列を決定する。ピークの高さは各DNA断片の量を表す。