

キーワード：PCR、ポリメラーゼ、連鎖反応、バイオテクノロジー、DNA、増幅反応

概要

バイオ産業を支えていく上で、多くの新しい装置や技術が開発されています。例えば、微量のDNA（デオキシリボ核酸）を高感度で検出するためには、従来は、感度の点から放射線プローブを使用しなければいけないという問題がありました。Mullisらによって1986年に開発されたPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法は、この問題を解決する画期的なDNAの増幅技術で、ごく微量のDNAさえ存在すれば、大量のコピーを作製することができ、高感度の検出が容易に行えるようになりました。彼はこの業績によって、1993年にノーベル化学賞を授与されています。ここでは、PCR法の原理およびPCR反応装置について説明します。

PCR法の原理

PCR法の基本原理は、図1に示すように、3段階からなるDNAの合成反応を繰り返し行うこ

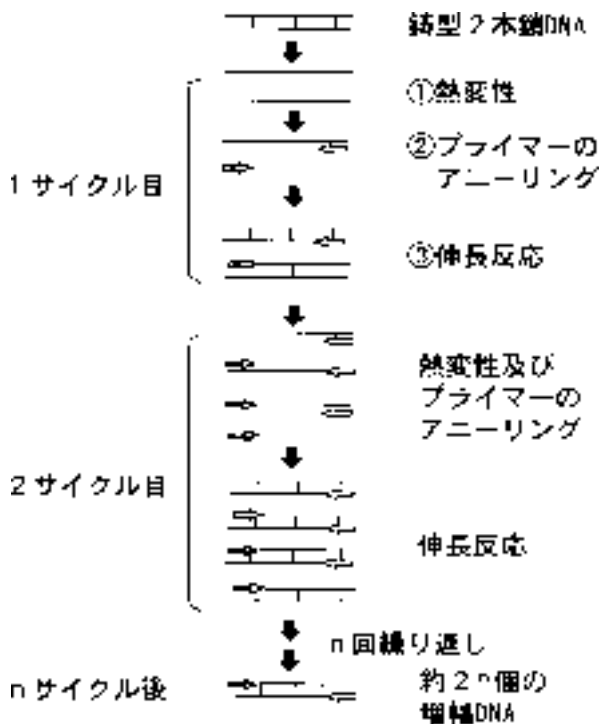


図1 PCR法の原理

とにあります。増幅しようとする鋳型となる2本鎖DNAを加熱して変性し、ばらばらの1本鎖に分離します。増幅したい特定部位のDNAの両端に、相補する2種類のプライマーを加えて温度を下げると、これらのプライマーがDNA鎖に結合します（アニーリング）。この状態で、DNAポリメラーゼと呼ばれるDNAのポリマーをつくる酵素を作用させると、鋳型DNA上でDNAの伸長反応が進んでいきます。これらの反応を1サイクルとして、反応サイクルを繰り返すことにより、目的の領域は、その反応の名称の通り連鎖反应的に、かつ指数関数的に増幅されます。理論的には、20サイクルで約百万倍に増幅することが可能です（図2）。

次に、PCR反応での1サイクル中の温度変化を図3に示します。

熱変性（94℃、30秒～1分）

プライマーのアニーリング（50℃～60℃、1～2分）

伸長反応（72℃、1～2分）

各ステップでの反応温度、反応時間、および反応サイクル数は、サンプルにより増幅の最大効率を得る条件が異なりますので、設定条件を

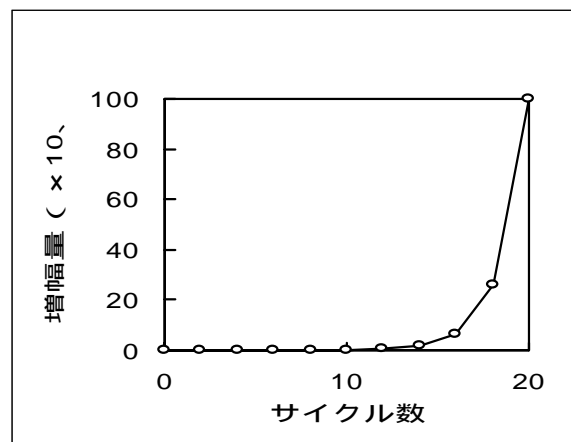


図2 PCR反応における理論増幅量

変更する必要があります。いずれにしても、数十万倍の増幅反応が短時間に行われます。

このように、目的とする領域を短時間に増幅することができるため、たとえサンプルがごく微量しかなくても、高感度の検出が可能となりました。そのため、従来感度が問題とされていた非RI（ラジオアイソトープ）法による検出が可能となり、特別な設備を必要とするRIを用いた実験をする必要がなくなりました。

DNA ポリメラーゼ

PCR法が始められた頃は、ポリメラーゼ反応には、熱に対して不安定な酵素が用いられていました。この場合、熱変性ステップで酵素も変性失活してしまうため、新しいサイクルごとに酵素を追加する必要があり、実用性に乏しいものでした。

後に、熱に強い（熱変性ステップの94℃でも耐えられる）酵素が開発され、PCR反応に応用されました。その結果、酵素の追加の必要がなくなり、プロセスが簡単になっただけでなく、反応全体の効率すら上がることが明らかになりました。

PCR 反応装置

PCR反応装置は、基本的には上記のような温度と時間変化を、プログラムされたとおり自動的に何回でも繰り返すことができる恒温装置です。最も一般的なものは、0.6mlのマイクロチューブを用いるヒートブロック方式の装置です。これは、加熱・冷却機能のついたヒートブロックに、反応液の入ったマイクロチューブを入れ反応を行なうものです。機種によって、さらにいろいろな機能が盛り込まれているものもあります。

冷却方式には2種類あり、1つは普通の冷蔵庫やエアコンと同様、コンプレッサーを用いたものです。もう一つは、ペルティエ冷却（熱電冷却）方式のものです。異種の導体または半導体の接点に電流を流すとペルティエ効果による吸熱が起こることを利用しています。また、最近ではブロックを加熱・冷却するのではなく、3

つの独立したインキュベータに順次浸けていくことで、PCR反応の3つの温度ステップを行うタイプの装置もあります。

PCRの利用分野

上記のようにPCR法は、目的とするDNA領域を増幅させるという単純ではありますが、画期的な方法です。そのため、基礎的な研究分野への応用だけに留まらず、さまざまな分野で応用されています。

例えば、醸造分野では、清酒の製造過程において最も恐れられている火落菌の混入検査をPCR法を用いて行うことにより、従来法よりも短時間に高感度で行うことができます。食品分野では、食品中に存在する汚染菌の検出や組換え食品の検出に利用することができます。医学分野では、遺伝子疾患などの病気の診断、集団食中毒の原因菌のベロ毒素に關与する遺伝子の検出などに利用されています。法医学の分野でも、1本の髪の毛から個人の同定が可能となっています。さらにこれら以外にも、考古学などの分野でも利用されています。

参考文献

中山広樹，バイオ実験イラストレイテッド 3，秀潤社，1996

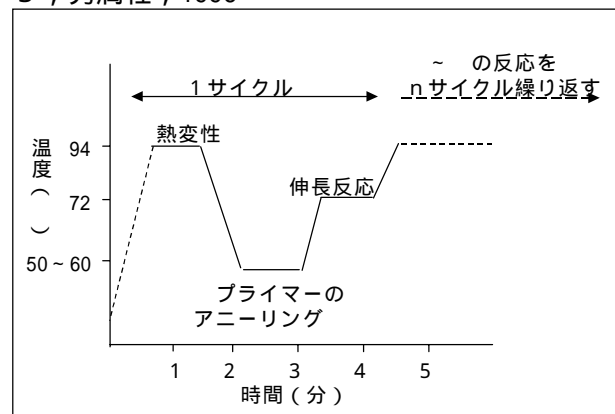


図3 PCR反応における反応行程