

シリーズ「生理学者のための分子生物技術講座」

神経活動によって発現変化する遺伝子のクローニング法

児 島 伸 彦*・井 ノ 口 馨**

(*生理学研究所 神経化学研究部門・

**三菱化学生命科学研究所 プロジェクト研究センター)

はじめに

成熟した神経細胞ではその後分裂、分化は行われないことは周知のとおりであるが、近年、分化後の神経細胞も外的な要因に应答して非常に動的に遺伝子発現制御を行っていることが明らかになってきた。神経伝達物質、ホルモン、栄養因子、ストレスなど様々な外的刺激が細胞内のタンパク質リン酸化反応を含む情報伝達系のカスケードを介して核内に伝わり、多様な遺伝子発現パターンの変化が引き起こされる。

これらの应答として最初に誘導されてくる遺伝子群は「最初期遺伝子(immediate early gene, 以下 IEG)」と呼ばれている。現在までに神経細胞も含め、多種類の細胞で発現誘導される IEG が報告されている(Ref. 1)。その中には遺伝子発現を制御する転写調節因子、ある種の細胞栄養因子、細胞骨格系タンパク質などが含まれている。その発現がタンパク質合成に非依存的事であること(すなわち、遺伝子発現変化に関して一次的である。), 発現の増加が一過性であるという点でこれらの遺伝子は共通している。IEG の中で最も古くから知られ、その発現の分子機構が明らかとされているものは癌遺伝子のホモログのひとつ、c-fos であろう。神経細胞においては、脱分極刺激、神経栄養因子、神経伝達物質やホルモン、ストレスなど神経活動を活性化する様々な刺激が c-fos の発現を引き起こすので、その発現は神経活動の良い指標となっている(Ref. 2)。c-fos 遺伝子のコードするタンパク質 Fos は他の IEG 産物である Jun と二量体を形成して、DNA の AP-1 結合部位に結合し、その下流の遺伝子発現を誘導する。こ

れら IEG が神経細胞でどのような働きをするのかについては必ずしも明らかではないが、とりわけ脳においてこれらの発現が重要であると考えられる理由の一つは、長期記憶の形成にこれら新たに発現誘導されるタンパク質が関わっている可能性があることである。長期の記憶の成立には神経回路の特定シナプスの伝達効率の強化だけでなく、シナプス結合の安定化、シナプスの分枝、さらには回路のつなぎ替えが必要であると考えられており、このような構造変化は新たに発現誘導されるタンパク質によって制御されていると考えられている。実際に、可塑性あるいは学習・記憶の実験モデル系として良く研究されているシナプス伝達の長期増強(LTP)の維持やキンドリングの成立にはタンパク質合成が必要であることが知られており(Ref. 3)、またこれらの現象に際して様々な遺伝子発現が誘導されることも報告されている(Ref. 4)。したがってここで新たに合成される遺伝子産物は「可塑性分子」あるいは「記憶分子」としての機能が期待されている。しかしながら最も活発に研究されている海馬の LTP でさえ、核内における分子反応や遺伝子調節、更には、シナプス結合の安定化や新生における発現遺伝子産物の働きなどについては不明である。複雑で多様な神経系の遺伝子発現変化を調節する転写調節因子はまだ未知のものが多く存在すると考えられ、またそれらの下流に位置し、記憶の固定化に伴う神経細胞の形態変化に関与するであろう後期遺伝子群についての知見はほとんどないといってよい。そこで長期記憶を分子レベルで理解するためには、記憶の形成時に誘導され記憶の保持に関わる遺伝子群を同定

し、それらの機能を明らかにする必要がある。近年これらの遺伝子を単離する試みが世界中の研究室で始まっている (Ref. 5)。本稿では、神経活動、あるいはキンドリング、LTP に代表される長期可塑性変化に伴って発現が誘導される遺伝子、あるいはある生理的条件見出すために有効な分子生物学的手法をご紹介します。

現在、異なる組織、細胞間、異なる発生段階での発現の異なる遺伝子を同定する、あるいはある処理後に発現量が変化するものを同定する方法がいくつか確立している。これらには、未同定の cDNA を検索する方法はライブラリーから 2 種類の cDNA プローブを用いて単離する方法、cDNA のうちあらかじめ共通成分を差し引く方法などがある。また最近 RT-PCR の手法を発展させて、複数のサンプル中の mRNA をシーケンスゲル上に展開して表示する differential display 法が確立されてきた。それぞれには一長一短があるので、目的に応じて方法を選ぶとよい。

1. differential スクリーニング法(プラスマイナス法)

最も簡単に A、B 両組織間において発現量の異なる cDNA クローンを単離する方法は、A、B それぞれの mRNA を鋳型として ^{32}P 標識した cDNA プローブを用いて同一の cDNA ライブラリーを differential にスクリーニングする方法である。図 1 にその概略を示した。以下は、遺伝子発現誘導した組織 A と無処理の組織 B 間で発現量の異なる cDNA クローン単離の手順の実際である。

スクリーニング用ナイロン膜の作成

スクリーニングに用いる cDNA ライブラリーは組織 A 由来のもので、 λ ファージベクターに挿入されているのがよい。これを適当な宿主菌に感染させて寒天プレートにまく。このときの密度はその後のスクリーニングの際に重要であるので、あらかじめファージ懸濁液のタイターを調べておく必要がある。個々のプ

ラークが単離されている程度の密度 (1,000 ~ 2,000 プラーク / 150 mm 径) がよい。個々のプラークの直径が 1 mm 程度に成長したら、プレートを 4℃ で冷やす。その後、一枚のプレートから 2 枚のナイロン膜のレプリカを取る。この際にあとでプレートと膜の位置関係がわかるように、周辺の非対称な 3 箇所に注射針などで穴を開けておく。2 枚目の穴は一枚目に開けた穴と重なるように開けておくスクリーニングの操作がたやすい。プラークを転写後 UV 照射によって DNA を膜に固定する。寒天プレートはスクリーニングの時まで乾燥やかびや雑菌などによるコンタミを避けるためにビニール袋に密封して 4℃ で保存する。

cDNA プローブの作成

組織 A、B から調製した poly (A) RNA を鋳型として [α - ^{32}P] dCTP 存在下で逆転写酵素 (MMLV 逆転写酵素) によって cDNA を合成する。poly (A) RNA は、なるべく同時に同じ方法で調製したものをを用いたい。具体的な調製方法は別稿にゆずる。

1. 組織 A、B から調製した poly (A) RNA 1 μg に oligo dT プライマーあるいはランダムヘキサマー (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 10 μl を加えて 70℃ で 5 分間加熱し、氷中で急冷する。

2. 以下の試薬を加える。

RNase inhibitor (50 U/ μl)	0.5 μl
10 x buffer	3 μl
dATP, GTP, TTP (それぞれ 10 mM)	2 μl
100 μM dCTP	2 μl
[^{32}P] dCTP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	10 μl
MMLV 逆転写酵素 (200 U/ μl)	1 μl
	30 μl

37℃ で 1 時間インキュベートする。

10 x buffer 組成
0.5 M Tris-Cl (pH 7.6)
20 mM DTT
50 mM MgCl_2

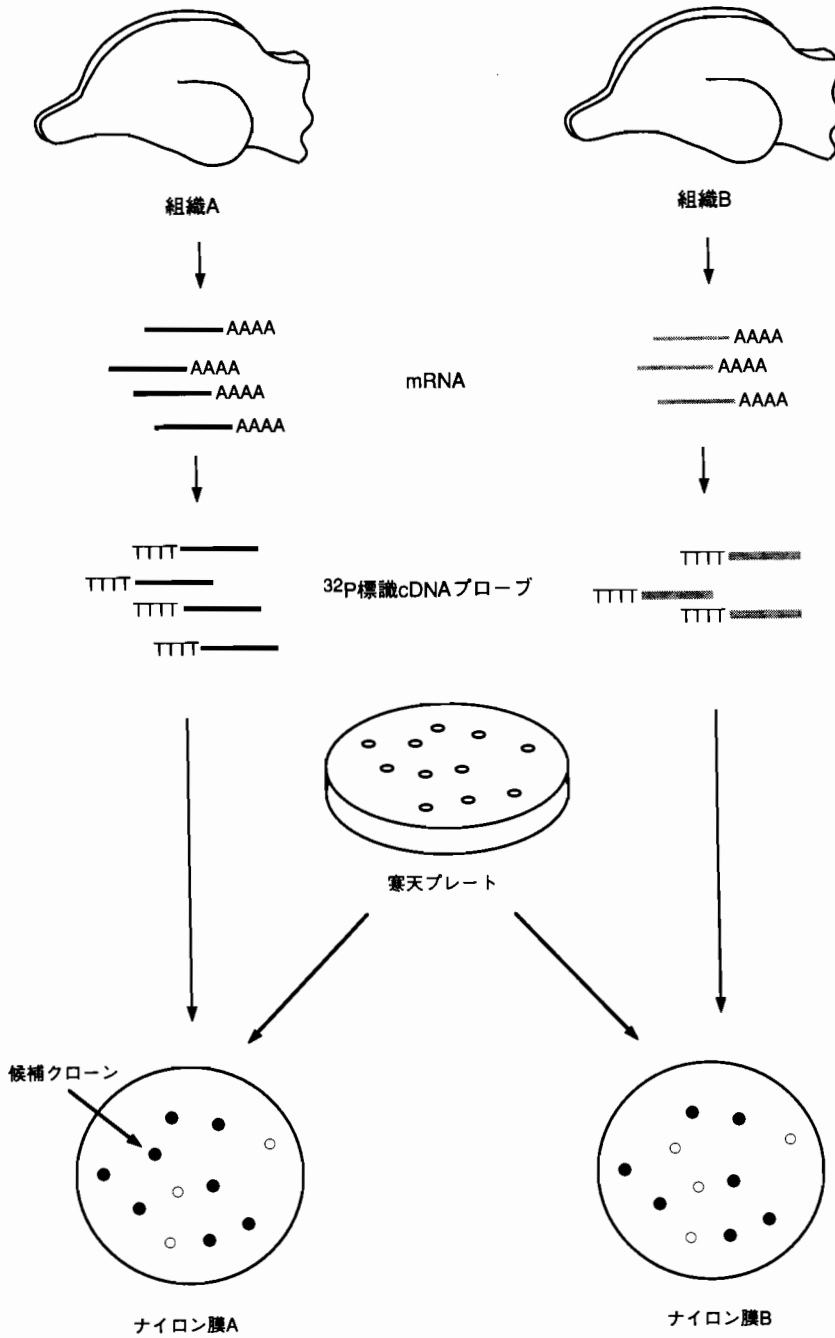


図1. differential スクリーニング法 適当な密度でライブラリーをまいた寒天プレートから2枚のナイロン膜のレプリカを作成し、それぞれに異なる組織から作成したcDNA プローブを反応させる。オートラジオグラフィーのパターンを比較して一方のプローブとのみ反応するクローンを単離する。

0.4 M KCl

3. 0.5 μ l の 0.2 M EDTA を加えて反応を止める。
4. 2 μ l の 5 N NaOH を反応液に加え、68°C で30分間加熱し、RNA を加水分解する。
5. 10 μ l の 1 M Tris-Cl (pH 7.4) と 5 μ l の 1 N HCl を加える。TE で全量を 100 μ l とし、フェノール抽出する。
6. 放射活性をモニターしながら、Sephadex G-50 カラム (ニックカラム, Pharmacia) で cDNA の画分 (400 μ l の画分で通常 3 ~ 5 番目の画分に回収される。) を回収し未反応の [32 P]dCTP を除く。およそ 30% の [32 P]dCTP が cDNA 画分に回収される。

ハイブリダイゼーション

1. cDNA ライブラリーを転写したナイロン膜のプレハイブリダイゼーションを行う。65°C で1時間以上。
2. 2枚を A, B それぞれの cDNA プローブ 1×10^7 cpm 存在下で 68°C で一晩ハイブリダイゼーションを行う。

3. ナイロン膜を $2 \times$ SSC, 0.1% SDS で洗う (55°C で30分, 3回)。

4. オートラジオグラフィーでシグナルを検出する。

候補クローンの単離

同一プレートから取ったナイロン膜 2 枚のオートラジオグラムを 3 つの針穴を指標としてライトボックス上で合わせて A, B それぞれの cDNA プローブのハイブリダイゼーションパターンを比較する (図 2)。クローンのシグナルの強さが組織中に含まれる mRNA 量を反映しているならば、共通に存在するクローンは A, B で同じ強度で検出されるはずであり、どちらか一方でのみ検出されるクローンは mRNA の存在量が A, B 間で異なると考えられる。

これらの候補が実際に両組織間で発現量に差のあるものであるかどうかについては慎重に検討する必要がある。

方法の利点と欠点

この方法で前提となる条件は、cDNA ライブ

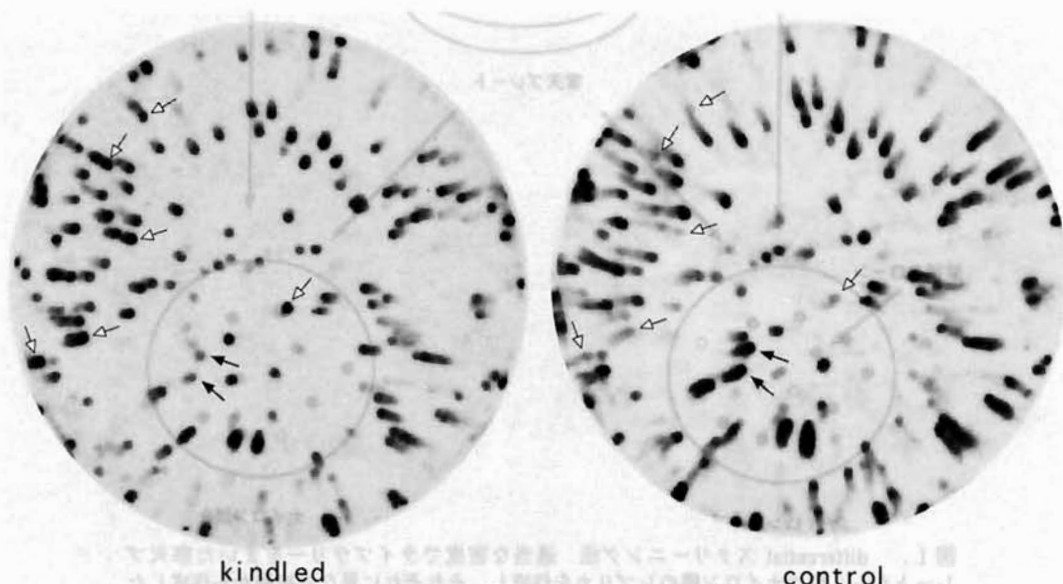


図 2. differential スクリーニングの実際 キンドリング脳で作成した cDNA ライブラリーから作成した 2 枚の膜をキンドリング脳 cDNA プローブ (kindled) とコントロール脳 cDNA プローブ (control) と反応させた。白ぬきの矢印は kindled cDNA プローブに強く反応するクローンで、黒矢印は control cDNA プローブに強く反応するクローンである。

ライリーの各クローンの存在比と標識する cDNA プローブが生体中の mRNA の存在比を十分反映していることである。また、ハイブリダイゼーションに用いる A、B 両 cDNA プローブの放射活性が同じ程度であることが重要である。他の方法に比べて操作は簡便であり、実験操作過程で加わるバイアスが比較的少ないので、得られる候補クローンが真に A、B 間で発現量の異なるものである期待が高い。また、発現が誘導されるものと、逆に抑制されるものの両方を一度にみることができる。スクリーニングするプレートの数にもよるが、10,000 から 30,000 程度を一度にスクリーニングすることができる。一方で、全 RNA を標識したものをプローブとするので、当然ながらコピー数の多いものは放射活性が高く、少ないものは低い。通常の動物細胞には 10,000 種以上の mRNA が含まれている(神経細胞ではその 2~3 倍多いとされている。)ので、コピー数の少ないものの放射活性は非常に低い。この方法で得られる mRNA は全 mRNA 中の 0.05% 以上の abundance を持つものとされ、それ以下のものは検出が困難である。

II. サブトラクション法

A、B 間で共通に存在する成分を差し引いて残ったものをライブラリーのスクリーニングの際のプローブとしたり、それらをベクターにつなげてライブラリーを作成する方法がある。この方法によれば差のある mRNA (あるいは cDNA) の存在比があがるため、検出感度は向上する。組織 A の cDNA (テスター) に対して過剰量の組織 B の mRNA (ドライバー) をハイブリダイズさせて、両者に共通して発現している cDNA と mRNA とでハイブリッド分子を形成させる。組織 A に特異的あるいは極端に多い cDNA は一本鎖で存在することになる。したがって cDNA と mRNA とのハイブリッド分子を選択的に除去することができれば組織 A に特異的に存在する cDNA が単離できる(図 3)。共通成分を除去する方法には、従来一本鎖と二本鎖で親和性の異なるハイドロキシアパタイト

カラムを用いる方法(Ref.6)や、あらかじめドライバー mRNA をフォトビオチン標識しておき、cDNA:mRNA ハイブリッド分子をストレプトアビジンとの複合体としてフェノール抽出によって除去する方法(subtractorTM, Invitrogen), あるいは oligo(dT) ラテックス粒子(OligotexTM-dT 30, 日本ロッシュ)上でドライバー cDNA を合成し、固相法でテスター mRNA 中の共通成分を除去する方法(Ref.7)など様々な工夫が考案されているが、最近 PCR の手法を用いたサブトラクション法が開発されてきた(Ref.8)。この方法は出発する mRNA 量が少なくてもよいこと、比較的効率の良いなどの利点があるので、以下にこの原理と実際の手順について記す。

PCR を用いたサブトラクション法の概略

方法の概略を図 4 に示す。まず対象となる組織 A と共通成分を含む組織 B それぞれの poly (A) RNA から二本鎖 cDNA を合成する。これを平滑末端を生ずる 4 塩基認識の制限酵素 RsaI で切断する。次に A 由来の cDNA を半分に分け、それぞれの 5' 末端に異なる配列のアダプターを結合する。5' 末端にアダプターを結合した A 由来の cDNA に対して過剰量のドライバー cDNA を加えて、両者を変性後ハイブリダイズさせる。その結果図 4 a-d に示すようなハイブリッド分子が生ずる。この際 A 特異的に存在する cDNA は a、c どちらかの形態をとると予想される。また abundance の高いものはそれだけ速やかにハイブリッド分子を形成するので、abundance の高低はこの過程で平均化される。次に 2 つの反応物を混合して再度過剰量のドライバー cDNA とハイブリダイズを行う。この結果 A 特異的に存在する cDNA で異なるアダプターを末端に持つ e という分子が生ずる。両末端を埋めて両アダプターの配列に相補的な配列をプライマーとして PCR を行うと、両端に異なるアダプターが連結された分子 e のみが指数関数的に増幅される。分子 c すなわち一方のアダプター分子しか持たないものの

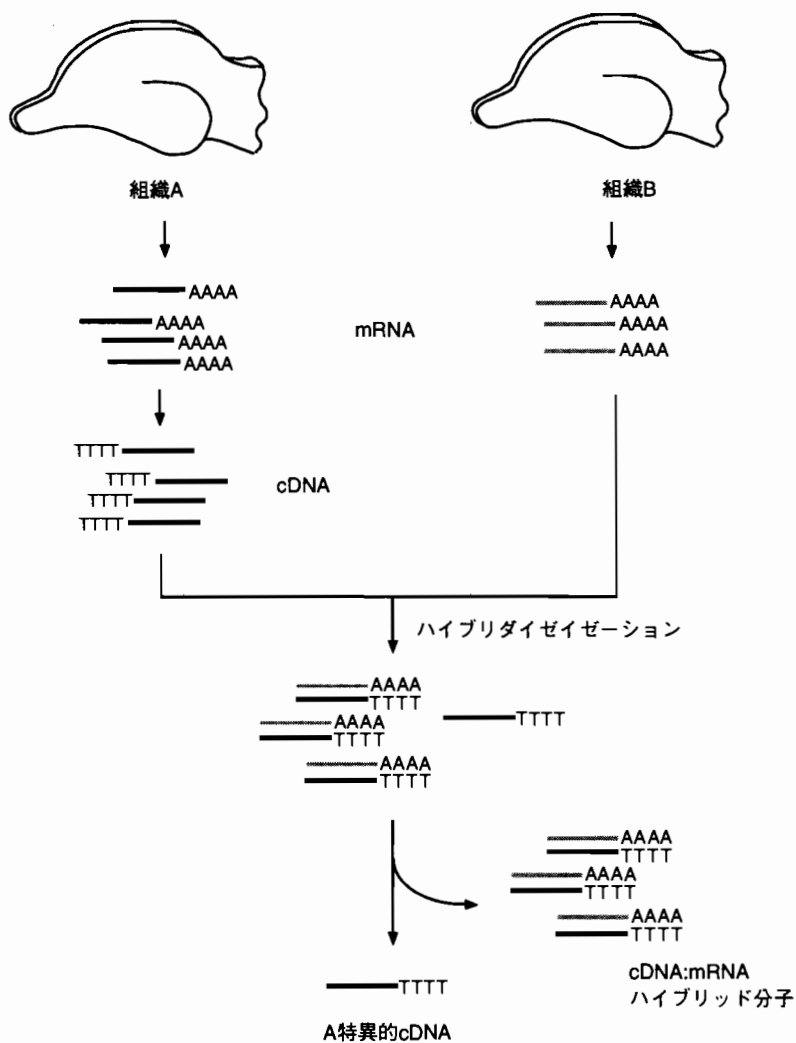


図3. サブトラクション法 組織 A cDNA(テスター)を、過剰量の組織 B mRNA(ドライバ)とハイブリダイズさせて、共通成分を cDNA:mRNA のハイブリッド分子として除去し、組織A特異的 cDNA を単離する。ハイブリッド分子を除去するための方法は様々である(本文参照)。

増幅は直線的にすぎず、その他のものは増幅されない。分子aすなわち両端に同じアダプターが連結したものはアニーリングの過程でヘアピン構造を取り増幅が効率良く起こらない(サブプレッション PCR)。次に PCR 産物を両アダプターの 3' 側の配列に相補的なプライマーを用いて再度 PCR を行い、非特異的な産物を減らす。こうして得られた PCR 産物には A 特異的に存在する cDNA が濃縮されている。これを

プローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングする。あるいはこれをプラスミドベクターにサブクローニングして、直接解析することもできる。なお、このサブトラクションのために必要な試薬はセットで clontech 社から入手できる (PCR-SELECT™ cDNA サブトラクションキット)。以下に、実際のサブトラクション法の手順を述べる。

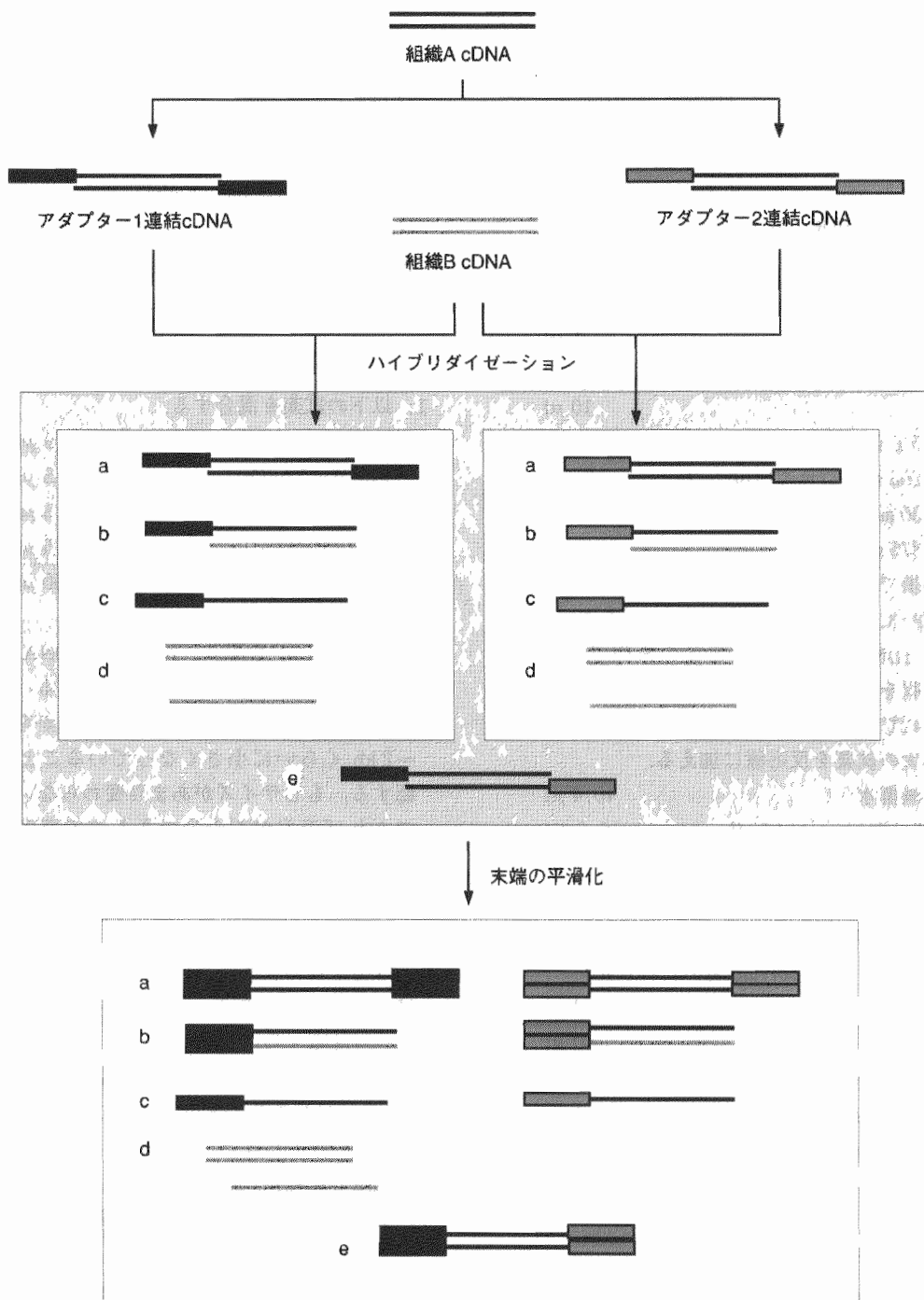


図4. PCRによるサブトラクション法(本文参照).

cDNA 合成

1. テスター, ドライバーそれぞれの poly (A) RNA 2 μ g を別々に滅菌した 0.5-ml チューブに取り, 1 μ l の oligodT プライマー (10 μ M) と混合し, 滅菌水で全量を 5 μ l とする.
2. 70°C で 15 分間加熱し, 氷上で 2 分間冷却する.

3. 以下の試薬を加える.

5 x 1st strand buffer	2 μ l
10 mM dNTP mix	1 μ l
滅菌水	1 μ l
MMLV 逆転写酵素 (200U/ μ l)	1 μ l
	10 μ l

5 x 1 st strand buffer 組成
 250 mM Tris-Cl (pH 8.3)
 30 mM MgCl₂
 375 mM KCl

* 必須ではないが, この反応に 1 μ l の [α -³²P] dCTP (3,000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) を加えておくと cDNA 合成率, その後の操作での cDNA の回収をモニターすることができる.

4. 42°C で 1.5 時間反応させる.
5. 次の試薬を反応液に加える.

滅菌水	40.4 μ l
5 x 2 nd strand buffer	16.0 μ l
10 mM dNTP mix	1.6 μ l
DNA polymeraseI (6 U/ μ l)	4 μ l
RNaseH (0.2 U/ μ l)	4 μ l
E. coli DNA polymerase (1.2 U/ μ l)	4 μ l
	80 μ l

5 x 2 nd strand buffer 組成
 100 mM Tris-Cl (pH 7.5)
 500 mM KCl
 50 mM 硫酸アンモニウム
 25 mM MgCl₂
 0.75 mM β -NAD
 0.25 mg/ml BSA

6. 16°C で 2 hr 反応させる.
7. 2 μ l の T4 DNA polymease (5U/ μ l) を加えて更に 16°C で 30 分間反応させる.

8. 0.2 M EDTA を 4 μ l 加えて反応を止め, フェノール抽出する.
9. 水層を別のチューブに移しクロロホルム抽出する.
10. 水層に 2 M 酢酸アンモニウム存在下でエタノール沈殿させる.
11. 遠心 (14,000 rpm, 20 分間) により DNA を沈殿させ, 80% エタノールによってリンスし, 再度遠心によって上清を除く.
12. 沈殿を風乾後, 10 μ l の滅菌水に溶かす.

RsaI 消化, アダプターの連結

1. 以下の試薬を混合する.

cDNA	9 μ l
10 x Rsa I buffer	5 μ l
滅菌水	33.5 μ l
Rsa I (10 U/ μ l)	1.5 μ l
	50 μ l

2. 37°C で 2 hr 反応させる.
3. 反応液 5 μ l を取り, 消化前の cDNA と電気泳動して分子量サイズを比較する. RsaI 消化後分子量サイズは 0.5~10 kb から 0.1~2 kb くらいに小さくなっていることを確認する. もしサイズがあまり変わらないのであれば消化が不十分であるので再度フェノール抽出, エタノール沈殿からやり直す.
4. 2.5 μ l の 0.2 M EDTA を加えて反応を止め, フェノール抽出する.
5. 水層を別のチューブに移し, クロロホルム抽出後, 2 M 酢酸アンモニウム存在下でエタノール沈殿する.
6. 沈殿を遠心 (14,000 rpm, 20 分間) によって回収し, 80% エタノールによってリンスする.
7. 再度の遠心によって上清を除く.
8. 沈殿を風乾後, 5.5 μ l の滅菌水に溶かす.
9. ドライバー cDNA はこれで完成である. セクションのハイブリダイズのステップまで -20°C で保存する. テスター cDNA は以下の操作によってアダプターを連結する.
10. テスター cDNA 1 μ l に滅菌水 5 μ l で希釈し, そのうちの 2 μ l を 2 本のチューブに取

り, 以下のようにそれぞれに異なるアダプターを加える.

	チューブ#1 (μ l)	チューブ#2 (μ l)
テスター cDNA	2	2
アダプター-1 (10 μ M)	2	—
アダプター-2 (10 μ M)	—	2
滅菌水	3	3
5 x ligation buffer	2	2
T4 DNA ligase (400 U/ μ l)	1	1
	10	10

5 x ligation buffer 組成

250 mM Tris-Cl (pH 7.8)

50 mM MgCl₂

10 mM DTT

0.25 mg/ml BSA

アダプター 1 および 2

40塩基程度の配列にその 3' 側相補鎖10塩基を対とした, 5' 脱リン酸化アダプターを2種類用意する. 配列は GC contents が極端に低く (40%以下) なければ何でもよい. 配列中に適当な制限酵素認識部位を含めたものをデザインすれば, その後のサブクローニングが容易である. *後述のサブトラクション効率チェックのためにチューブ#3として, アダプター 1 と 2 両方を連結するものも用意しておく.

11. 16℃で一晩反応させる.

12. 1 μ l の 0.2 M EDTA を加えて反応を止め, 72℃で5分間加熱する.

13. 反応液を-20℃で保存する.

ハイブリダイゼーション

1. 以下のようにアダプターを連結したそれぞれの cDNA に過剰量のドライバー cDNA を加える.

	チューブ#1 (μ l)	チューブ#2 (μ l)
アダプター-1連結 cDNA	1.5	—
アダプター-2連結 cDNA	—	1.5
ドライバー cDNA	1.5	1.5
4 x hybridization buffer	1	1
	4	4

2. ミネラルオイルを一滴重層し, 98℃で1.5分間加熱する.

3. 68℃で8時間以上反応させる.

4. ドライバー cDNA 1 μ l を別のチューブに入れ, ミネラルオイルを一滴重層し, 98℃で1.5分間加熱する.

5. 68℃までチューブを冷やし, 1 のチューブ #1 と 2 の反応液を加えて混合する.

6. 68℃で8時間以上反応させる.

7. 200 μ l の TE buffer で希釈し, -20℃で保存する.

PCR による増幅

1. ハイブリダイゼーション後のサンプル 1 μ l に以下の試薬を混合する.

滅菌水	18.5 μ l
10 x PCR buffer	2.5 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.5 μ l
PCR プライマー 1 (10 μ M)	1 μ l
PCR プライマー 2 (10 μ M)	1 μ l
50 x Taq polymerase mix	0.5 μ l
	25 μ l

10 x PCR buffer 組成

100 mM Tris-Cl (pH 8.3)

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

0.01%ゼラチン

PCR プライマー 1 (アダプター 1 の 5' 側1/2の配列)

PCR プライマー 2 (アダプター 2 の 5' 側1/2の配列)

50 x Taq polymerase mix

AmpliTaq DNA polymerase

(5U/ μ l, Perkin-Elmer) 15 μ l

TaqStart antibody (1.1 mg/ml, Clontech)

15 μ l

2. 50 μ l のミネラルオイルを重層し, 75℃で5分間加熱することにより, アダプター配列の相補鎖を埋める.

3. 以下の条件で PCR を行う.

94℃ 30秒
68℃ 30秒
72℃ 2.5分
30サイクル

4. PCR 産物を TE により10倍希釈しその 1 μ l に以下の試薬を混合する.

滅菌水	18.5 μ l
10 x PCR buffer	2.5 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.5 μ l
PCR プライマー 3 (10 μ M)	1 μ l
PCR プライマー 4 (10 μ M)	1 μ l
50 x Taq polymerase mix	0.5 μ l

25 μ l

PCR プライマー 3 (アダプター 1 の 3' 側1/2 の配列)

PCR プライマー 4 (アダプター 2 の 3' 側1/2 の配列)

2. 50 μ l のミネラルオイルを重層し, 再度同じ条件で PCR を行う.

3. -20℃で保存する.

このようにしてできた PCR 産物中にはテスターとして用いた組織に発現誘導されている cDNA が多く含まれ, 共通して存在するものは少なくなっていることが期待される. 実際にそのようなになっているかどうかをキンドリングけいれん直後の脳から調製した poly (A) RNA をテスター, コントロール脳から調製した poly (A) RNA をドライバーとして行ったサブトラクションを例として, 発現誘導される cDNA として c-fos, 共通成分として発現量の変動がないハウスキーピング遺伝子 G3PDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ) について以下のように検討した.

サブトラクションの効率のチェック

1. サブトラクト前と後の PCR 産物を滅菌水で1/10に希釈する.

2. 以下の試薬を混合する.

PCR 産物	1 μ l
滅菌水	18.5 μ l

10 x PCR buffer	2.5 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.5 μ l
5' PCR プライマー (10 μ M)	1 μ l
3' PCR プライマー (10 μ M)	1 μ l
Taq polymerase mix	0.5 μ l

25 μ l3. 50 μ l のミネラルオイルを重層し, 以下の条件で PCR を行う.

94℃ 30秒
68℃ 30秒
72℃ 2.5分

4. 18~20回目で反応を一時停止し, 5 μ l を別のチューブに移す. 残りを再度 PCR にかける.5. その後5回サイクルが終了するごとに5 μ l の反応液を取る.

6. それぞれの反応液をアガロースゲル電気泳動し, PCR 産物を検出する.

c-fos と G3PDH, それぞれの PCR の結果を図5に示した. サブトラクション前の試料では23サイクルで G3PDH に特異的な産物が検出されるのに対して, サブトラクション後の試料では, 32サイクルの PCR によっても G3PDH は検出されなかった. 一方, c-fos の PCR 産物はサブトラクション前の試料では30サイクル以上の PCR が必要だったのに対して, サブトラクション後では25サイクルで検出できた. PCR のサイクル数5回の差は少なくとも10倍程度の量的な差があるとすれば, 共通成分である G3PDH は1/100以下にまで除去され, c-fos は10倍以上濃縮されたことになる.

この PCR 産物をプローブとしてテスター由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングして候補クローンを単離する. プローブにはなお共通成分が混在している可能性があるため, これによって単離された cDNA クローンが実際に発現誘導されているかどうかについては, Northern blot 解析やリボヌクレアーゼプロテクションアッセイなどによって, mRNA を定量比較して確認する必要がある.

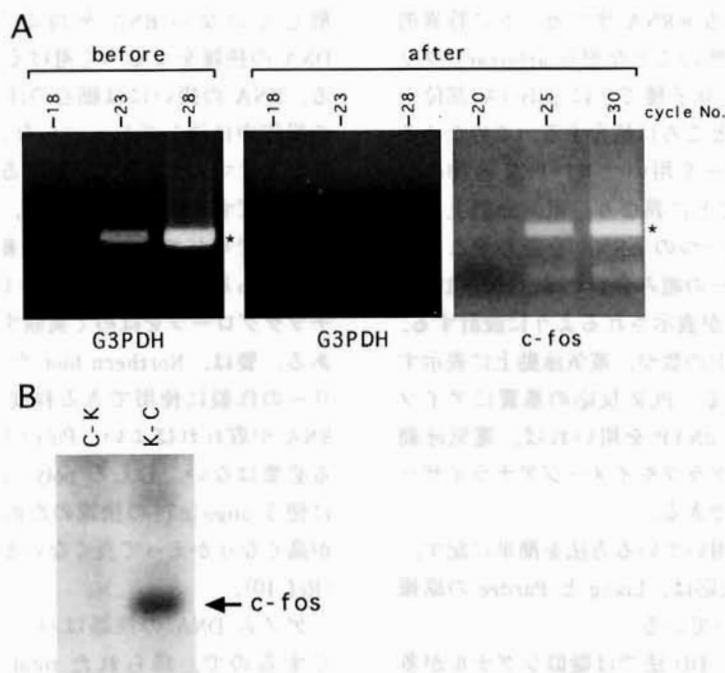


図5. PCRによるサブトラクションの実際 (A)サブトラクションを行う前(before)と後(after)のキンドリング刺激後の脳 cDNA から、G3PDH と c-fos に特異的な PCR を行った。共通成分である G3PDH はサブトラクション前には23サイクルの PCR で検出が十分だったが、サブトラクション後では28サイクル以上の PCR によっても検出ができなかった。逆に c-fos の検出には30サイクル以上の PCR が必要であったが(ここではデータを示していない)、サブトラクション後では25サイクルで十分検出できた。(B) サブトラクション後の cDNA を電気泳動して c-fos の cDNA プローブとハイブリダイズした。C-K:コントロール-キンドリングのサブトラクション、K-C:キンドリング-コントロールのサブトラクション。

Ⅲ. mRNA differential display (DD)法

DD 法の原理

DD 法は reverse transcription-polymelase chain reaction 法 (RT-PCR 法) を応用し、あるサブセットの mRNA に由来した cDNA の一部分を PCR で増幅して、電気泳動上に表示する方法である。組織特異的に発現する遺伝子、あるいは何らかの刺激にともない発現変化する遺伝子などを単離するのに優れた方法である。1992年に Liang と Pardee (Ref.9) によって報告されて以来さまざまな変法が考えられてきたが、基本的な原理はいずれも同じである(図5)。

ポイントは、巧妙にデザインされた2つのプライマーを用いることである。1つはアンカー

プライマーと呼ばれるもので mRNA の 3' 端に存在する poly(A) 部位に結合する。このプライマーは oligo(dT) の 3' 端に2つ余分な塩基を付している。例えばプライマー $T_{12}MA$ (MはA, C, G の mixture) は、poly(A) のすぐ上流に 5'-TC, 5'-TG, 5'-TT のいずれかの配列をもっているサブセットの mRNA 分子に結合し、このクラスの mRNA のみを cDNA に逆転写する。アンカープライマーには、 $T_{12}MA$, $T_{12}MC$, $T_{12}MG$, $T_{12}MT$ の4種類を使うが、各反応にはそのうちの1種類のみを使用し、各プライマーに特異的なサブセットの cDNA を合成する。

もう一つは 10-mer 程度の任意の短い配列を持った arbitrary プライマーで、たまたまこの

配列を持っている mRNA サブセットに特異的に結合する。当然のことながら arbitrary プライマーは mRNA 分子種ごとに poly (A) 部位から異なる距離のところに結合する。このためこれらのプライマーを用いた RT-PCR 産物のサイズは mRNA ごとに異なり、電気泳動上それぞれのバンドは一つの mRNA を表わすことになる。プライマーの組み合わせは、100~150程度の cDNA 断片が表示されるように設計する。この程度のバンドの数が、電気泳動上に表示する上で至適である。PCR 反応の基質にアイソトープ標識した dNTP を用いれば、電気泳動後オートラジオグラフやイメージアナライザー上に結果を表示できる。

以下に我々が用いている方法を簡単に記す。逆転写と PCR 反応は、Liang と Pardee の原報 (Ref. 9, 10) に従っている。

<ポイント> DD 法では疑似シグナルが多数検出される。これらを除外するため、スクリーニングには必ず同じ条件の細胞や組織から独立に調製した 2 セットの RNA を用意し、どちらを用いて DD を行なっても発現量の変化に再現性のあるバンドのみをポジティブなものとして拾う。3 セット用いると確実である。我々の経験では、3 回再現性のあったバンドは、ほとんどのクローンについて Northern blot や in situ hybridization で発現変化を確認することができた。「DD 法で得られた cDNA クローンは Northern など他の方法で発現の変化が確認できないことが多いので、DD 法は信頼性に欠ける」と言っている例は、DD 法によるスクリーニングの際に再現性をしっかりと確認していない場合がほとんどのようである。cDNA 断片のクローン化などあとあとの手間を考えると、最初の DD の段階の手間など大したことはない。

Total cellular RNA の調製

RNA の質が DD 法の正否を決定する。我々は acid-guanidinium-phenol-chloroform 法 (Ref. 11) で total cellular RNA を調製している。分

解していない RNA を得ることと、ゲノム DNA の挟雑をなるべく避けることが重要である。RNA の扱いには細心の注意を払う。RNA の操作中は決してしゃべらないこと (おしゃべりな人はマスクをして実験するとよい。また他人が飛ばす唾液も強敵なので、背中に「話しかけないでください」と書いた紙を貼り RNA 実験中であることがわかるようにする)、プラスチックグローブをはめて実験することは常識である。要は、Northern blot や cDNA ライブラリーの作製に使用できる程度の純度をもった RNA が取ればよい。Poly (A) RNA を調製する必要はない。むしろ poly (A) RNA は調製時に使う oligo(dT) の挟雑のためバックグラウンドが高くなりかえって良くないと報告されている (Ref. 10)。

ゲノム DNA の挟雑はバックグラウンドを高くするので、得られた total RNA を RNasin (Promega) 存在下で DNase I (RNase free のものを使う) 処理を行なってゲノム DNA を除く。反応後、フェノール/クロロホルム (3:1) 抽出を一回、エーテル抽出を一回行なう。酢酸ナトリウム (0.3 M, pH 5.2) の存在下でエタノール沈殿を行ない RNA を回収する。冷えたエタノールで洗ったあと、speed-vac で乾燥する。RNA は最終濃度が $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように dH₂O に溶解する。

我々は各 RNA 毎に逆転写酵素を入れずに処理したコントロールサンプルを PCR、電気泳動まで行い、ゲノム DNA 由来のシグナルがないことを確認している。

逆転写反応

1. RNA ($0.5 \mu\text{g}$) 溶液を 70°C 、5 分間処理し、直ちに氷上で冷やす。
2. 最終濃度が以下になるように、泡がでないように注意しながらストック溶液を加え $20 \mu\text{l}$ にする。
 $0.5 \mu\text{g}$ RNA
 $1 \times$ 逆転写反応 buffer (酵素についているものでよい)

2.5 μ M アンカープライマー (T12MN)

20 μ M dNTP mixture

10 mM DTT

40 U RNasin

10分間室温に放置する。

3. 300 U MMLV 逆転写酵素を加えて35℃で1時間反応する。

4. 95℃で5分間処理し、酵素を失活させる。
この溶液のうち2 μ l を以下の PCR 反応に用いる。多数のプライマーを用いて DD を行なうときは、逆転写反応をスケールアップする。

PCR 反応

1. 氷中で冷やしたチューブに以下の最終濃度の溶液 (4.5 μ l) を作製する。

1 x PCR buffer (酵素についているものでよい)

1.0 μ M T12MN

0.5 μ M arbitrary プライマー

2 μ M dNTP mix

0.5 μ M [α -³²P] dCTP (1,200 Ci/m mol)

Ampli-Taq DNA ポリメラーゼ

2. 逆転写反応の溶液 (0.5 μ l) を加え、直ちに PCR マシンにかける。この際、チューブの数が多いときは、氷中で冷やす。

3. プライミング反応 (94℃, 3分; 40℃, 5分; 72℃, 5分) を1サイクル行なう。

4. 以下の条件で PCR を35サイクル行なう。

94℃, 30秒; 40℃, 2分; 72℃, 30秒

*この条件では、30サイクルから40サイクルの間では結果に差がない。25サイクル以下になると検出できるバンドの数が激減する。

5. 最後に、72℃, 5分間伸長反応を行なう。

*逆転写から PCR までが行なえる DD 法のキットが、宝酒造や Gene hunter 社などから市販されている。筆者らはこれらのキットを使用したことがないので再現性のよい結果が得られるかどうかかわからないが、分子生物学的な手法に慣れていない方には一度試してみる価値があると思う。10-mer の arbitrary プライマーは

色々な配列のものが Operon 社から販売されている。

電気泳動

DNA 塩基配列決定用の6%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィカイメージアナライザーでバンドを検出する。再現性よく発現量に変化を示すものを選択する。

目的のバンドのクローニング

電気泳動上は1本のバンドに見えても、実は複数の cDNA からなることがよくある。このため PCR で増幅した DNA 断片をそのまま次の解析に使用しないほうがよい。必ずベクターにクローニングし純化してから使用する。得られた複数の cDNA クローンのうちどれが本物であるのかを調べなければならない。我々は、以下の方法で検定している。目的のバンドをゲルから回収後ラジオアイソトープ抜きで PCR 増幅し、TA クローニングなどで適当なベクターに入れる。大腸菌にトランスフォームして得られたコロニーをランダムに拾う。溶菌後、DD に使用したのと同じ組み合わせのプライマーで PCR を行ない、DD の時と同じサイズを示すものを選ぶ。プラスミド DNA を調製し、スロットプロットを行なう。プローブはアイソトープ標識した DD 産物を用いる。

DD 法の長所と短所

この方法の一番の利点は、網羅的に遺伝子探索をすることが可能な点である。前述の differential スクリーニングや従来のサブトラクション法ではその原理上、比較的発現量の多い mRNA 分子種の同定は容易であり、むしろ同一 mRNA が重複して単離されてくるが、発現量の少ない遺伝子の単離は難しかった。DD 法では個々の mRNA が表示される確率は、プライマーの配列を個々の mRNA が持っているかどうかによるため、この確率は発現量の多寡にかかわらず等しい。従ってある数のプライ

マーの組み合わせを用いて DD を行った場合に何%の mRNA が表示されたかは、理論的に次の式で表わされる。

$$P = 1 - (1 - S/H)^n$$

従って、 $n = \log(1 - P) / \log(1 - S/H)$

P = DD で表示される mRNA の割合

n = DD の反応数 (プライマーの組み合わせの数)

H = 注目している細胞群で発現している mRNA の種類

S = DD の各反応毎に検出されるシグナル数 (電気泳動で 1 つのレーンに表示されるバンド数)

例えば、50,000種類の異なる mRNA が発現していると予想される組織を用い、各反応で150バンドが電気泳動上に表示される条件の場合、100組のプライマーの組み合わせで DD を行うと、

$$P = 1 - (1 - 150/50000)^{100} = 0.26$$

つまり26%の mRNA が表示される計算になる。この条件では500組のプライマーを用いると92%が表示可能であり、ある条件で発現している遺伝子のカタログを作成することが可能である。

第2の利点は、PCRを応用しているため、少量の RNA 試料で解析できることである。小さな組織や調製するのに手間のかかるサンプルを扱うときに有用である。筆者らは一匹のラット海馬から調製した RNA を用いて、400組以上のプライマー反応を行なっている。同様の理由で細胞あたりの発現量の低い mRNA を同定することも可能である。また poly (A) RNA を必要とせず、total RNA で充分であることから試料が少量ですむ。poly (A) RNA は調製時に使う oligo (dT) の挟雑のためバックグラウンドが高くなりかえって良くないと報告されている (Ref. 10)。

3番目に、複数の条件下のサンプルを同時に

比較できることが挙げられる。多くの組織間での比較や、刺激後の発現の経時変化を一度に表示できる。また発現が増大する遺伝子のみでなく、減少するものを単離することも可能である。

一方 DD 法にも短所がないわけではない。DD 法を行なった多くの人が変化を示すバンドに再現性が乏しいことを指摘している。この原因の一つは、上述したように DD スクリーニングの際に再現性をしっかりと確認していない場合である。もう一つのそしてより重要な問題は、見かけ上一本に見えるバンドでも実際には複数の cDNA 断片からなることがままあることである。この場合個々の cDNA 断片をクローニングし、目的のものを探し出さなければならぬ。実際にやってみるとよく解るが、この段階に非常に時間がかかることがある。また増幅した cDNA 断片のサイズが小さいので、これをプローブに cDNA ライブラリーをスクリーニングして長いものをとってから構造解析を行わないと得られた cDNA が何であるかわからない。

DD 法の実例：LTP の成立にともない発現誘導される遺伝子のカタログ化

我々は、海馬 LTP の持続に関わる遺伝子群の全体像を明らかにする目的で、in vivo 歯状回の LTP に伴い発現調節される遺伝子群の網羅的探索を行なった (R. Matsuo, A. Kato, Y. Sakaki, and K. Inokuchi 論文作成中)。In vivo で歯状回の LTP を誘発した海馬から経時的に調製した RNA を、459組のプライマーセットを用い RT-PCR で増幅した (図 6)。1 次スクリーニングには、独立に調製した 2 セットの RNA を用いた。電気泳動の各レーンには平均約150本のバンドが表示された。海馬で発現している mRNA の種類を30,000と仮定するとそのうちの90%、50,000と仮定すると75%の mRNA 分子種に相当する約75,000本のバンドを電気泳動上に表示した。1 次スクリーニングでは、LTP にともない再現性よく発現変化を

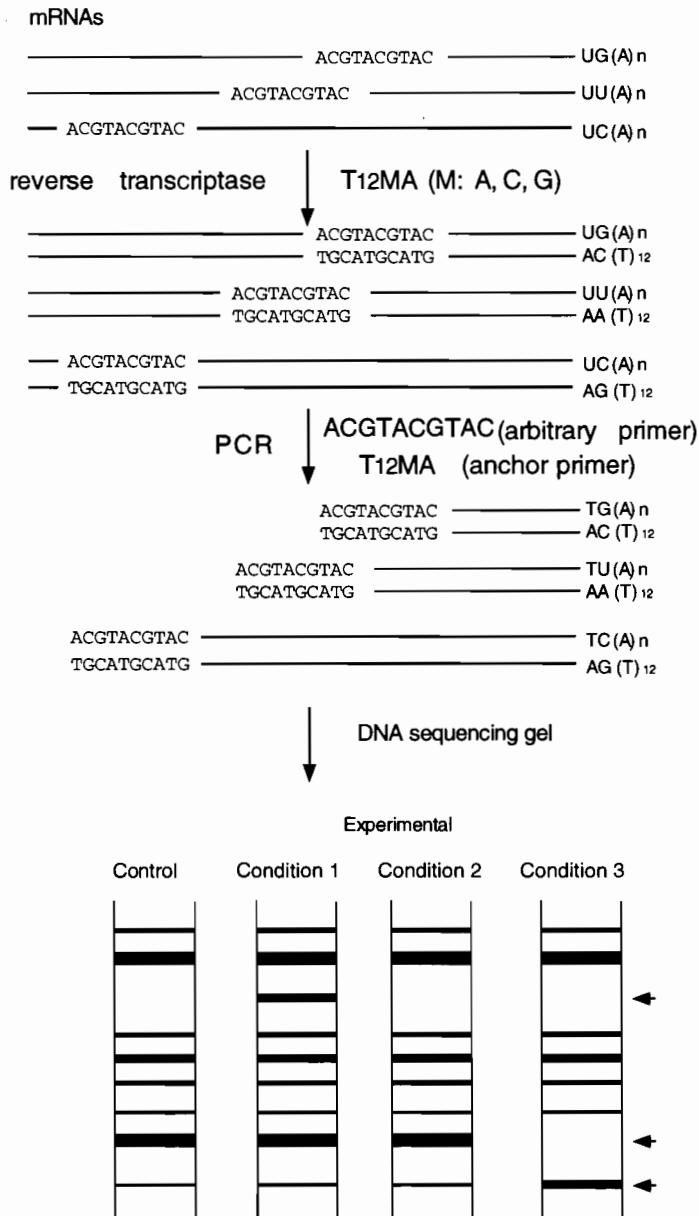


図6. differential display 法 mRNA を $T_{12}MA$, $T_{12}MC$, $T_{12}MG$, $T_{12}MT$ いずれかのアンカープライマーによって cDNA に転換し (図では $T_{12}MA$)、その後任意の 10-mer プライマー (arbitrary プライマー) とアンカープライマーで PCR を行い、増幅された PCR 産物をシーケンス用ゲルにて展開する。異なるサンプル間でオートラジオグラフィのパターンを比較して異なるバンド (矢印) を見出す。

示したのは216バンドであった。これらについて、第3の RNA セットを用いて2次スクリーニングを行なった。その結果、80本のバンドについて大きな発現変化を確認した。コントロー

ル, LTP 誘発後45分, 3時間の3つの状態での発現量の変化を分類すると, a) 45分で一過的に発現が上昇するもの (初期遺伝子群, タイプ1), b) 45分, 3時間の両方で上昇するも

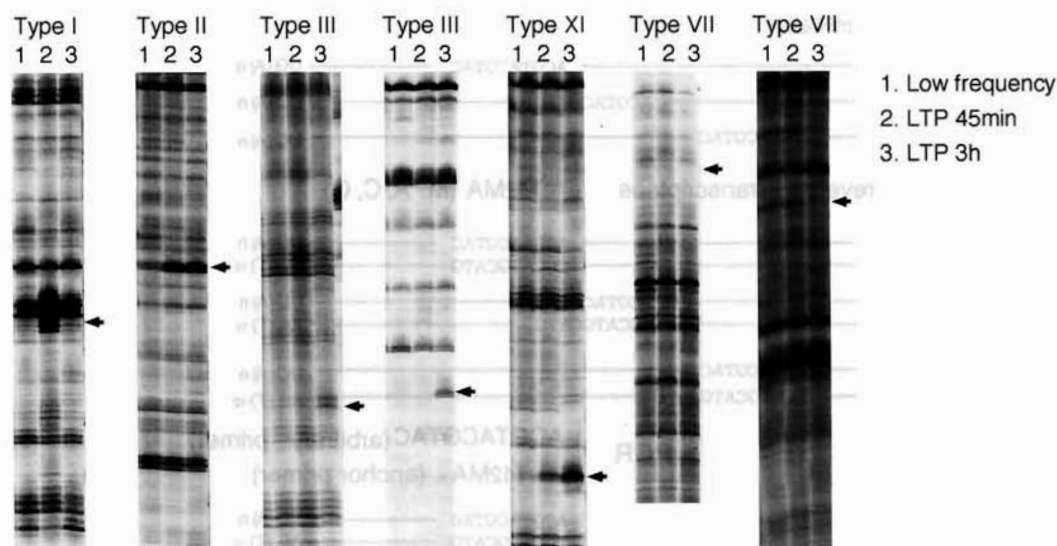


図7. differential display 法の実験 in vivo で菌状回の LTP 誘導後に発現変化する mRNA を DD 法によって検索した。LTP を誘導しない低頻度刺激後をコントロール (レーン 1) として、LTP 誘導後 45 分 (レーン 2)、3 時間 (レーン 3) で増幅量の変化するバンドを矢印で示した。

の (タイプ 2)、および、c) 3 時間でのみ上昇するもの (後期遺伝子群、タイプ 3) が多くを占めたが、その他の変化パターンを示すものも見出された (図 7)。これらの遺伝子の発現の経時変化には種々のパターンがあり、LTP の維持、更には長期記憶を支える分子群の働きに複雑な階層性があることが示唆される。

今後の展望

DD 法はその原理から、網羅的な遺伝子探索に向いている。DD 法による組織特異的な発現を示す遺伝子のカタログ化やある生理的条件下で発現が誘導される遺伝子のカタログ化は筆者の知る限り未だ報告されていないが、今後増えてくるものと思われる。特にゲノムプロジェクトの完成が現実のものとなった現在、いろいろな条件下において発現している cDNA のカタログ化の有用性は言うまでもない。ここでは触れなかったが、蛍光標識したプライマーを用いて反応を行ない、auto-sequencer で解析する FDD (fluoro DD) 法なども今後大いに使用されると思われる。

Expression profiles of LTP-induced genes

Type	Control	LTP 45 min	LTP 3 h	Number of signals
I	—	—	—	27
II	—	—	—	20
III	—	—	—	14
IV	—	—	—	6
V	—	—	—	4
VI	—	—	—	7
VII	—	—	—	1
VIII	—	—	—	1

図8. 菌状回の LTP 誘導後に発現変化する mRNA 群 DD 法による検索で得られた 80 本のバンドの発現量の変化のパターンを分類した。バンドの太さは実際のオートラジオグラフィーのバンドの濃さを模式的に示したものである (詳しくは本文参照)。

おわりに

以上、ある種の生理条件下で発現変化するような遺伝子を単離する方法の代表 3 つをご紹介します。この手法では他の系ですでに単離、同定されたものも含めて様々な遺伝子産物が得られ

る。これらの遺伝子の発現がある生理条件下で制御されているからには、それらがその後の生体反応に密接に関わっていると考えたい。しかしながら一般的に未同定の遺伝子産物の生理機能を解明することは困難であり、その発現と生理学的変化の因果関係を明かにすることは容易ではない。これら新たに同定された遺伝子産物の生理機能を調べる方法に王道はないが、例えば、細胞あるいは動物個体で過剰発現させたり、またその逆に mRNA に対するアンチセンス鎖の導入や、遺伝子をノックアウトする方法で発現を抑えて、その効果を調べる試みが生理機能解明の糸口となった例もある。いずれにしてもこれらの遺伝子の単離は生理研究の出発点に過ぎず、生理学への貢献はその後の地道な研究にあるだろう。また、生体内の現象は一つ二つの分子で説明されることは少なくむしろ複数の産物の複雑な相互作用でなされていることを考えれば、得られた遺伝子産物がどのような系の中でどのようなタンパク質との協調で働いているかを調べることも重要な課題となろう。

謝 辞

ここに述べた研究成果は筆者らの研究室で得られたものである。特に後半の DD 法に関しては、小澤史子、加藤明彦、松尾亮太の各氏に感謝したい。

文 献

- 1) Sheng M & Greenberg M. E (1990) *Neuron* **4**: 477-485.
- 2) Morgan J. I & Curran T (1991) *Ann. Rev. Neurosci.* **14**: 421-451.
- 3) Frey U., Krug M., Reymann K. & Matthies H (1988) *Brain Res.* **452**: 57-65.
Frey U., Huang Y.-Y. & Kandel E. R. (1993) *Science* **260**: 1661-1664.
Huang Y.-Y., Li X. X. & Kandel E. R. (1994) *Cell* **79**: 69-79.
Nguyen P. V., Abel T & Kandel E. R. (1994) *Science* **265**: 1104-1107.
- 4) Dragunow M., Currie R. W., Faull R. L. M. et al. (1989) *Neurosci. Biobehav. Rev.* **13**: 301-323.
Wisden W., Errington M. L., Williams S., Dunnett S. B., Waters C., Hitchcock D., Evan G., Bliss T. V. P. & Hunt S. P. (1990) *Neuron* **4**: 603-614.
Ernfors P., Bengzon J., Kokaia Z., et al. (1991) *Neuron* **7**: 165-176.
Qian, Z., Gilbert, M. E., Colicos, M. A., Kandel, E. R. & Kuhl, D. (1993) *Nature*, **361**, 453-457.
Worley P. F., Bhat R. V., Baraban J. M., Erickson C. A., McNaughton B. L. & Barnes C. A. (1993) *J. Neurosci.* **13**: 4776-4786.
- 5) Nedivi, E., Hevroni, D., Israeli, D. & Citri, Y. *Nature*, **363**, 718 (1993).
Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A. & Worley, P. F., *Neuron*, **11**, 371-386 (1993).
Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. & Worley, P. F., *Neuron*, **14**, 433-445 (1995).
Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U. & Kuhl, D., *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5734-5738 (1995).
Inokuchi, K., Kato, A., Hirai, K., Hishinuma, F., Inoue, M. & Ozawa, F. (1996) *FEBS Letters* **382**: 48-52.
Inokuchi, K., Murayama, A. & Ozawa, F. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**: 430-436.
- 6) Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- 7) Kuribayashi K., Hikata M., Hiraoka O., Miyamoto C. & Furuichi Y. (1988) *Nucleic Acids Res. Symposium Series* **19**: 61-64.
- 8) Hubank M. & Schatz D. G. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**: 5640-5648.
- 9) Liang P. & Pardee A. B. (1992) *Science* **257**: 967-971.
- 10) Liang P., Averboukh L. & Pardee A. B. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**: 3269-3275.
- 11) Chomczynski P. & Sacchi N. (1987) *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.