

機能発現法による cDNA クローニング

久 保 義 弘

(東京都神経科学総合研究所 神経生理学研究部門)

1. は じ め に

筆者は、イオンチャネルの電気生理学のフィールドから研究を始めた。分子生物学の specialist とはとてもいえない(電気生理学の specialist ともいえないけど)が、この稿を書くにあたって、電気生理学の根っこを持っていて後に分子生物学のフィールドに足をふみいれたという経緯が、同様な道を計画されている生理学者にとって身近なものとして参考になるのではないかと思っている。また、この稿のテーマの機能発現法によるクローニングに限っては、実験の両側面を完全にやった経験から、いくらか血の通った情報を提供できるかと思う。

機能発現法によるクローニングといった場合、その中には、多種の発現系、多種の assay 法が含まれる。この稿では、筆者の実地の経験に基づいて、「アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能発現法による、イオンチャネル、受容体の cDNA クローニング」に限って解説する。

この稿の構成は、以下のとおりである。まず、ほとんど分子生物学になじみのない方のために、他稿と若干重複するかも知れないが、「cDNA」「クローニング」といった言葉の意味について、解説する[2]。次に、機能発現法の特徴を明らかにする意味で、種々のクローニング法について、簡単に紹介する[3]。それから、機能発現法の概略を示し[4]、さらにその各ステップについて解説する[5]。ツメガエル卵母細胞を用いた発現実験は、機能発現法によるクローニングにおいてそのスクリーニングの柱となるばかりでなく、クローニングを離れても、構造機能連関などの機能解析系として一般的に

有用であるので、この部分については、特に詳しく記述する[6-9]。その後、代表的実例として、筆者らの行なったイオンチャネル (IRK 1, 10.) および、G 蛋白質結合型受容体 (sBimR, 11.) のクローニングをとりあげ、実地の体験を通して学んだことを紹介する。そして、最後に、最重要事項を簡潔に要約する[12]。

なお、卵母細胞を用いた発現実験については、種々の秀れた総説、解説が出されているのでこれらも参考にさせていただきたい (ref. 1-9)。

2. 分子生物学の基礎中の基礎

2-(1) cDNA とは

遺伝子の本体は、いうまでもなく、ゲノム DNA である。そして細胞内では、その DNA から、RNA が転写される。ゲノム DNA から転写されたばかりの RNA は、イントロンとエクソンの両方を含んでいるが、スプライシングというステップを経て、イントロンが取り除かれ、エクソンのみになる。このエクソンのみになった、完成した RNA から蛋白質ができる。cDNA (complementary DNA) というのは、この完成した RNA に対応するもので、取り扱いにくい RNA を、逆転写することによって得られるものである。

よって、ゲノム DNA と cDNA の間には、(1) ゲノム DNA はすべての体細胞で共通だが、cDNA は、その遺伝子を発現している細胞からのみ得られる。(Na⁺ チャネルのゲノム DNA は、脳にも、肝臓にもあるが、cDNA (RNA) は、脳にはあっても、肝臓にはない。(2) cDNA の解析から、直接、そのコードする蛋白の一次構造がわかるが、ゲノム DNA の場合は、イントロンがふくまれているために、できてくる蛋白

の一次構造は完全にはわからない、という2つの大きな違いがある。

転写のメカニズムを知るといった目的では、ゲノム DNA の解析を行うことになるが、本章で述べるような、イオンチャネルの一次構造(イオンチャネル蛋白のアミノ酸配列)を知るといった目的では cDNA の解析を行うことになる。よって、この稿で述べる遺伝子のクローニングとは、cDNA の単離を意味する。

2-(2) クローニングとは

ひとつの細胞には、多種多様の RNA が存在する。その中から、自分の関心のあるチャネル分子の RNA (cDNA) だけを、単離してくる過程がクローニングである。基本的には、多種多様の RNA を逆転写により、まず、cDNA (多種多様)にする。その cDNA をベクターにつなぎ(多種多様)、それを、大腸菌にいて、ふやす。全体として多種多様な大腸菌がえられるわけだが(これを cDNA ライブラリーという)、大腸菌1個が分裂して増えてきた各集団(コロニー)は、(1個の大腸菌には、1個のベクターしか入らないために)完全に均一である。すなわち、(cDNA ライブラリーはたくさんのコロニーを

含み多種多様だが)1個のコロニーを選べば、そこに入っている cDNA は一種類である。よって、クローニングとは、(cDNA ライブラリー中の、例えば100万個あるコロニーの中から)自分の目的とする cDNA が入っているコロニーはどれなのかを決定していく作業であるといえる。当てずっぽうでやってもあたるわけではなく、確実に選び出す工夫が必要となる。以下に示すのは、これまでなされてきた種々の工夫である。

3. イオンチャネル受容体の cDNA クローニングの方法

3-(1) チャネル蛋白の精製からいる方法

たとえば、ニコチン性アセチルコリン受容体はこの方法で単離された。蛋白精製の優れた腕が必要である。その手順は以下の通りである。

(a)蛋白を精製する。(b)その精製蛋白の、アミノ酸配列を一部ペプチドシーケンサーにより決定する。(c)そのアミノ酸配列をコードしうるすべての組み合わせの oligo DNA (degenerative oligo DNA)を合成する。(d)その DNA をプローブとして用いて、cDNA ライブラリーをスク

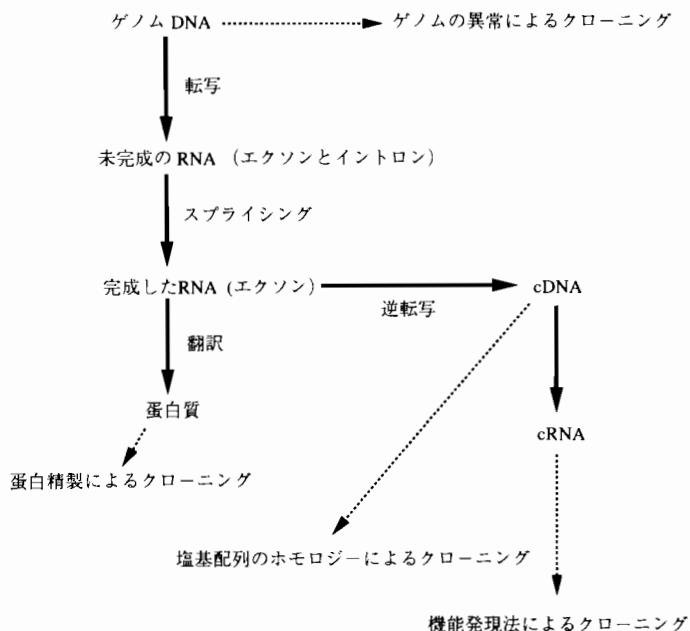


図1. 種々の cDNA クローニング方法

リーンする。

このストラテジーで、肝心なのは、まちがいでなく目的とするチャネル蛋白をできるだけ高純度に精製することである。そのため、(a)そのチャネル蛋白を非常に高度に発現している組織を用いること、(b)精製の際の tag として使える、生物毒や薬剤等があることである。ニコチン性アセチルコリン受容体の場合には、シビレエイの電気器官という、格好のソースがあり、また、 α -bungarotoxin という、精製の際に非常に役に立つ、この分子に特異的に結合する生物毒があった。その結果、cDNA の単離が可能となったのである (ref. 10)。

3-(2) 異常を持つ動物のゲノムのスクリーニングからはいする方法

行動異常を示す動物のストレインをみつけることから始まる。イオンチャネルの異常が疑われた場合、例えば、その筋組織から、電気生理学的記録を行い、ある種のチャネルの欠如、異常等を確認する。その後、そのストレインのゲノムのどこに異常があるのかを、莫大な作業の後に、決定し、ゲノム DNA を単離する。その後、そのゲノム DNA をプローブとして用いて cDNA を単離する。この方法により、単離されたのは、最初の膜電位依存性 K^+ チャネルのクローンで、ショウジョウバエの、羽根が震える変異体、Shaker から単離された (ref. 11)。この方法のデメリットは、とにかくすごい労働力があること、それから、長い努力の末単離されるものが、チャネルそのものではなくて、その調節因子等である可能性があることが挙げられる。

3-(3) 機能発現法によるクローニング

この方法が本稿の主眼である。4. 以降に詳述する。

3-(4) ホモロジーによるクローニング

上記の方法のいずれかで、全く新しい遺伝子が単離されたら、その遺伝子に類似性を持つ種々の遺伝子の単離が、塩基配列のホモロジーにより行われる。多くの場合、チャネルの種類は、ひとつではなく、ほぼ必ず、同じファミリー

に属するものが存在する。方法的には、(a) degenerative oligonucleotide primer を用いた PCR 法により、新規遺伝子の断片を単離し、それをプローブとして、high stringency で cDNA ライブラリーをスクリーンし、新規遺伝子をひろう。PCR 法で得られた断片はもちろんゴミかもしれないし、また、すでに得られているものと全く同じものである可能性もあるので、塩基配列を決定して、同じファミリーに属する類縁の遺伝子であり、かつ、新規のものであることを確かめてから先に進むことになる。(b)すでに単離されている遺伝子そのものをプローブとして、low stringency で cDNA ライブラリーをスクリーンし、新規遺伝子をひろう。この際、もろもろのゴミももちろんひっかってくるので、塩基配列決定により、確かめることが必要となる。この際も、目的は、同じファミリーに属する類縁のもので、かつ新規の遺伝子を単離することである。

4. 機能発現法による cDNA クローニングの大筋

4-(1) 概要

蛋白を精製するに足るソースもなく、適当な異常個体もない状況で、全く、これまでに遺伝子の単離されていないチャネルの遺伝子を単離する際に有効な、全く機能的発現のみを指標にしてスクリーニングを進めていく方法である。具体的には、アフリカツメガエルの卵母細胞を発現系として用い、細分割した cDNA ライブラリー由来の cRNA を注入し、目的とする電流が出るかどうかを電気生理学的にスクリーニングしていく。ライブラリーの、あるプールがポジティブであれば、そのプールをさらに細分割していくという過程を繰り返す、最終的に単一クローンを得るものである。電気生理と分子生物の両方を確実に進めることが必須だが、(例えば、筆者のところのような)極く小さい研究室でもやっていける性質のものである。

アフリカツメガエル卵母細胞が、蛋白発現系として非常に有用であるということを示したの

表1 機能発現法によるクローニングの概要

スクリーニング法

カエル卵母細胞に RNA を注入し、電気生理学的にスクリーンする。

ステップ

- (1) 様々な組織や、細胞株から抽出した RNA をテストし、どれが、最もよいソースかを決定する。
↓
- (2) RNA を大きさで分画し、各分画を試し、目的とする RNA の存在する分画を決定する。
↓
- (3) その RNA 分画から、小さいサブプールよりなる cDNA ライブラリーをつくる。
↓
- (4) 各サブプール由来の cRNA を合成して試し、どのサブプールに当りがあるか決定する。
↓
- (5) あたりのサブプールを、さらに細分割して、同じようにしぼり込みをすすめる。
↓
- (6) 最終的に単一クローンに到達する。

メリット

- (1) 塩基配列の情報や、精製蛋白なしに、全く新規の遺伝子の単離が可能。
- (2) 機能を指標にスクリーンしていくので、取れるときには、必ず機能をもつ遺伝子の全長が取れる。
- (3) 小さい研究室でも、実行可能

デメリット

- (1) 2つのサブユニットがそろわないと機能しないような分子のクローニングは、(理論的には可能だが)実際的には不可能。
- (2) 機能しうる完全長の遺伝子しか取れないので、完全長の逆転写が難しい、長い分子はとりにくい。
- (3) カエルの卵母細胞にもともと似たチャネルがある場合は、cRNA による発現の有無の判定が難しいので、実際的には困難。
- (4) 電気生理のアッセイが唯一の指標なので、そのアッセイがあやふやだとどつぱにはまる。わずかな発現があるのを見逃すのも、ありもしない発現があると思ってしまうのも、どちらもまずい。
- (5) 卵母細胞の調子に依存しているので、卵母細胞が良好でないときには、どう工夫してもうまくいかない。

は、1971年の Gurdon らの論文 (ref.12) で、この発現系を用いたイオンチャネル型受容体の電気生理学的記録を示したのは、1983年の Miledi らの論文 (ref.13) である。そして、この発現系を利用して、電気生理学的スクリーニングに

表2 これまでに機能発現法で単離されたイオンチャネル、受容体の例(網羅的なものではない。)

- | | |
|-----------------|---|
| (a) G 蛋白質結合型受容体 | substance K 受容体 (ref. 14) |
| | 5-HT _{1c} 受容体 (ref. 17) |
| | PAF 受容体 (ref. 18) |
| | metabotropic glutamate 受容体 (ref. 19) |
| | oxytocin 受容体 (ref. 20) |
| | 細胞外 Ca ²⁺ 受容体 (ref. 21) |
| | ATP 受容体 (ref. 22) |
| | bifunctional metabotropic Ca ²⁺ /glutamate 受容体 (ref. 23) |
| (b) イオンチャネル型受容体 | kainate type glutamate 受容体チャネル (ref. 24) |
| | NMDA type glutamate 受容体チャネル (ref. 25) |
| | 5-HT ₃ 受容体チャネル (ref. 26) |
| | ATP 受容体チャネル (ref. 27) |
| (c) イオンチャネル | 1 回膜貫通型外向き K ⁺ チャネル (ref. 28) |
| | 膜電位依存性 K ⁺ チャネル (ref. 29, drk1) |
| | ATP regulated K ⁺ チャネル (ref. 30, ROMK1) |
| | 内向き整流性 K ⁺ チャネル (ref. 31, IRK1) |
| | G protein coupled K ⁺ チャネル (ref. 32, KGA) |
| | 弱い内向き整流性を示す K ⁺ チャネル (ref. 33, sWIRK) |
| | 2 回膜貫通型 Na ⁺ チャネル (ref. 34) |
| | Cl ⁻ チャネル (ref. 35) |
| | Cl ⁻ チャネル (ref. 15, by suppression cloning) |
| | Ca ²⁺ チャネル (ref. 16, by suppression cloning) |

よる cDNA クローニングを世界で最初に行なったのは、京都大学の中西重忠先生と久野宗先生のグループである (ref.14, Masu, Nakayama, Tamaki, Harada, Kuno & Nakanishi, 1987)。実行可能かどうかかわからない時に挑戦して、成功し、方法を確立したことに筆者は感動をおぼえる。この substance K 受容体のクローニング以来、機能発現法は、生理学的に存在が知られているチャネルや受容体の新規の遺伝子の単離に広く用いられるようになった(表2)。とられた種々の cDNA の impact 以前に、この画期的な系の発見および手法の開発自体の価値と意義を、(いまさら筆者がいうまでもないとは思いますが)あえてここで強調したい。

4(2) そのメリット

- (a) 全く塩基配列やアミノ酸配列などにさわらないで一番最後までクローニングが進む。
- (b) 全く塩基配列の情報のない、全く未知の、新しいクローンを得ることが可能である。

(c) 蛋白の精製をしたり, 変異動物を解析したりといった特殊な技術は要求されない。ただガラス電極さえあればよい。

(d) なによりも大きな特徴は, とれるときには, まちがいなく機能を持つ full length のクローンがとれる。この点において, 塩基配列のホモロジーで釣った fragment を combine したりするクローニングとは随分違う。ピタリときまればすばらしく強力である。

4-(3) デメリット

しかし, イオンチャネル, 受容体であるならなんでもこのやりかたでとれるかというと, そういうわけではない。以下に困難が予想される例を示す。

(a) 「nicotinic ACh 受容体」は, 複数の sub-unit が発現に必要なから不可能。nicotinic ACh 受容体は 4 種のサブユニットが集まってはじめて機能する。複数の分子が機能発現に要求される場合は, 分割したライブラリーのスクリーニングを行う際, すべてのコンビネーションをつくさなければならない。實際上, ほぼ不可能に近い。

(b) 「 Na^+ チャネルや Ca^{2+} チャネル」は非常に長い分子なので, 不可能。機能でスクリーニングして, とれるときには full length ということは, うらを返せば, 長い分子のほとんどがはいっていても, ほんのちよっとでもはしっこが欠けていれば, (機能しなくなるために) 絶対に

みつからないことになる。長い分子の場合, 一発で完全長というのは難しいので, 実際上不可能に近い。

(c) 「 Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルや stretch-activated チャネル」は, 卵母細胞自身に性質の似たチャネルがあるから不可能。スクリーニングの最初のころは, ごく小さい電流がでるに過ぎない。よって, 発現してくるものと良く似たものが卵にあると, 発現した分大きくなっているかといったとてつもなく微妙な判断をしなければならない。よって実際上不可能に近い。この際, しかし, あるブロッカーが卵の内因性の電流には効かないけど, 発現してきたものには効くといった質的な違いがあれば, やれる。

4-(4) よって適用できるもの (ねらいうるもの) は

- (a) ひとつのサブユニットで機能しうるもの
- (b) あまり長くないもの (腕によるけど 6 Kb ぐらいが限界か)
- (c) カエル卵に内因性の似たような電流がないこと

これまでに機能発現法により単離された cDNA のごく一部を表 2 に示した。この中で, チャネルや, チャネル型受容体の解析は自明と思うが, G 蛋白質結合型受容体の解析について, 若干説明を加えたい。図 2 に示したように, 卵母細胞には Gq protein-phospholipaseC- IP_3 - Ca^{2+} store からの Ca^{2+} release-細胞内 Ca^{2+} 濃度の

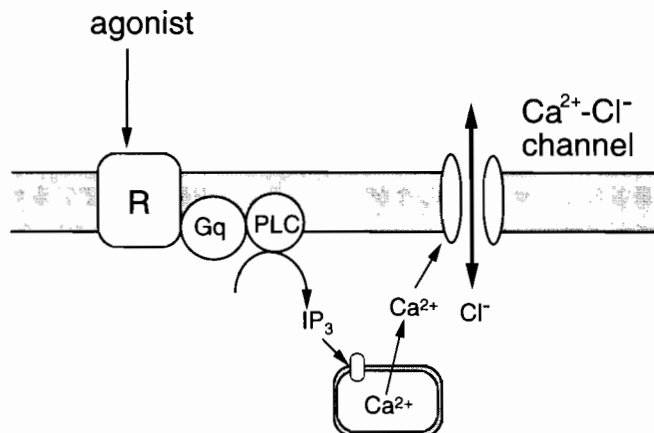


図 2. 卵母細胞を用いた Gq 蛋白質結合型受容体発現の検出のメカニズム

上昇- Ca^{2+} activated Cl^- channel の活性化という機構が備わっている。よって Gq protein に couple する受容体の発現は、 Cl^- 電流の増加としてモニターできるわけである。この 2 次メッセンジャー系による増幅があるため、この種の受容体の単離は、うまくいった例が非常に多数ある。

(注)4-(3)で、長いものはとれないと述べたが、じつは巧妙な方法がある。目的とするチャネルを発現している細胞からとった RNA を注入すると、チャネルが発現する。その RNA から、ライブラリーをつくると、長すぎる分子は、中途半端な長さになってしまっている。しかし、その、antisense 側を読んで、細胞の RNA と共発現させると、その発現をおさえることになる。抑えるのには、full length でなくてよいというところがみそである。ここから、antisense 鎖が抑える力をもっているプールをしばらくこんでいくと、ついには、目的とする遺伝子の partial fragment 得られることになる。これを、プローブとして、全長の cDNA を最終的にはとることができる。この方法は、実際にすでに成功例がある (ref. 15, 16)。

5. 機能発現法によるクローニングの各ステップ

以下の方法が best というわけではないと思うが、筆者自身はこのやり方でたしかにうまくいったし、ここがよかったんだという思い込みもあるので、それを紹介する。なお、イオンチャネルの場合に specific な問題点および、G 蛋白質結合型受容体の場合に specific な問題点、特にその電気生理学的スクリーニングで考慮すべき点については、筆者らの事例を紹介しながら、10, 11. において記述する。

5-(1) 何をとるかを決める。

4. で述べたことを考えて無理でないかよく考える。また機能発現法が方法として best か？も良く考える。ホモロジーでとれるものならホモロジーの方が楽。既にとられているものを、異種の動物から取ったりする場合は、ホモロ

ジーでとる方を選ぶべきである。

とりあえず、組織や細胞から抽出した RNA を注入して、発現するかどうかまで、やってみて、結果をみて進むか退くかを決めるというのは、ひとつの手である。しかし、ここで、進む、つまり、その先の RNA のサイズ分画等に進むときは、重い決心をするべきであると思う。道は平坦ではないし、泥沼にはまることは多いし (おそらく publish されているものより、数倍は多い?)、そして、クローニングはとれなければ、結果としては、何もやらないのといっしょである。だから、やるからには必ずとるという覚悟と目算で望むべきであると思う。

5-(2) 卵母細胞の preparation と RNA の注入、電気生理学的記録

これらは、スクリーニングのすべてのステップで必須の、肝要な点なので、6, 7, 8, 9. に、詳述する。ここでは、注入にも記録にも、順調に進むためには、ガラス電極の太さが重要であるということを強調しておく。

ところで、卵母細胞から、上手に記録がとれるということと、きっちりスクリーニングができる (自信をもって、発現の有無を判定できる) ということの間には、深い河がある。記録をとるのは簡単でも、「どういう条件が、小さい発現電流を内因性の電流と区別してまちがいに検出するのに best か」ということを決めるのは、容易ではない。筆者の場合、いろいろやってだんだんわかってきて、終わるころに、これからもう一度やるのならずっと上手にやれたのになあ…と覚えることが多かった。この事例を 10, 11. で紹介する。

5-(3) どのような細胞株もしくは組織にその RNA が出ているか検討

ケチなことを言わないで、網羅的に調べて、出ている可能性のある、手にはいるすべての組織、細胞株から、poly A⁺ RNA を抽出する。よいソースにあたると、後々楽に進むし、あまりよくないソースにあたると、結局うまくいかないの、best のソースをあくまで探し求めるべきである。まず 10 μg 程度の polyA⁺ RNA

をそれぞれとる。RNA の抽出には、細胞株からなら、圧倒的に Fast Track Kit (Invitrogen) をすすめる。なにより操作が楽だし、はじめてやってもこわれていない長い RNA がとれる。また、筆者は、acid phenol 法によって total RNA を単離した後、poly A⁺ selection をかける場合に比べ、Fast Track よる場合は、格段に rRNA の混在が低い (poly A⁺ の割合が高い) という印象を持っており、この点も気にしている。ただ、組織から単離する場合には、(Fast Track Kit はグアニジンでなく SDS による lysis なので) 組織の RNase のおさえが足りなくて、RNA の quality が下がることがある。この際には、1 kit につっこむ組織の量を減らす。収量は減るが、こわれてないものがとれる。機能発現法において、こわれた RNA はゴミ以外の何物でもない。この RNA を卵母細胞に注入し、スクリーンしてどれが best か決定する。

5-(4) RNA のサイズによる分画

概要をまず説明する。large scale で RNA をとる。poly A⁺ RNA で 100~200 μ g とる (培養細胞だとものすごい dish の数になる)。そして sucrose gradient で分画する。RNase には充分注意するとともに sucrose solution には SDS をいれておく。fraction は 30 ぐらいにわけろ。スクリーンし best のものをきめる。スクリーンと同時に各分画をほんの少量ゲルに流して oligo-dT プローブで northern hybridization を行ない、分画がうまくいっていることと、各分画の RNA の長さ、電流を発現した分画の RNA の長さを知っておく。

目的とする RNA が集まっていて、いらなものが少ない best の分画のみでライブラリーを作成するために、量が少ないからといって、となりと混ぜたりしない。そのためにも充分量の poly A⁺ RNA をとるところから始めるべきである。

大量の培養細胞から精製した 100 μ g 以上の poly A⁺ RNA を全量投じるのは、非常に緊張の高まる瞬間である。そのプレッシャーから、(分画前の poly A⁺ RNA で結構な大きさの電

流が見えた場合など特に) RNA がこわれたら、もともこもないので、危なっかしい分画なんかない方がいいのではないかという気になることもある。しかし、ライブラリー後の最初の電流は格段に小さくなるので、(小さくなくても何とか判定できるようにするために) 目的とする RNA を濃縮するための操作である、分画は絶対に必要である。また、短い RNA が混ざっていると、長い RNA の逆転写が、うまくいきにくくなるという話もあるので、それを防ぐ意味でも、分画は必要である。

筆者は、RNA の分画は次のような条件で行なった。ちようどうまく分離するために、gradient 液の組成と遠心の条件は大切である。なおすべて RNAase free ですすめることはいうまでもない。

(a) gradient solution 作成

5 % 液	5 % sucrose w/v
	0.1 M NaCl
	10 mM Tris pH7.3
	0.5 % SDS
	1 mM EDTA
25 % 液	25 % sucrose w/v
	0.1 M NaCl
	10 mM Tris pH7.3
	0.5 % SDS
	1 mM EDTA

を、RNAase (ー) grade で作成し、小型の gradient maker の奥の方に 5 % 液を 6.5 ml、手前の方に 25 % 液を 6 ml いれる。両液が混ざりながらでてくる (濃い液が先にでてくる) のを 12 ml の超遠心のチューブに受ける。(まずチューブの下に受け、その後、たまった液面に波紋を作らないように、一滴ずつそっと重層していく。)

(b) RNA は 65℃ で 5 分処理し、即氷上で冷却してから、gradient にそっとのせる。

(c) 遠心は、22℃、21 K rpm で、15.5 hour 行ない、blade slow で止める。

(d) 上から 400 μ l ずつ eppendorf tube に分注していく。

(e) エタノール沈殿し、100 μ l の DEPC 処理水に suspend する。5 μ l を oligodT northern 用にとり、残りをもう一度エタノール沈殿し、10 μ l の injection water に suspend する。

(f) このうち、各分画 1 μ l を卵母細胞注入に使い、判定する。(虎の子の RNA なので、この判定のための実験には失敗は許されない。だから、この実験の時は、卵母細胞を 3 batch 程度出して、最も良さそうなものを使う)

(g) 残りの 9 μ l が、次のライブラリー作成の基となる。

5-(5) cDNA ライブラリーの作成

Electroporation により効率のいい transformation ができるようになったので、もはや packaging のメリットはない。つまり、ファージのライブラリーにする必要はなく、後のステップ(繰り返す DNA 抽出)を考えるとプラスミドのライブラリーの方がいい。

そのプラスミドベクターの満たすべき点は、uni-directional にはいること、sense-strand の cRNA が T7 polymerase か、T3 polymerase で読めること。(SP6 は途中下車した短い RNA ができるのでさける)その点をみたすものとしてファルマシアの time saver cDNA library kit と uni-directional cloning tool box の組み合わせはすすめられる。ただ、完全長 cDNA を作るための最大のキモである reverse transcriptase については、筆者は Gibco/BRL の Superscript 2 に強い強い信仰を持っていて、上の kit の内、reverse だけはこれに置き換えてる。(10. で紹介する IRK 1 の時はすべて手製でやったが、11. で紹介する sBimR の時はこの kit の組み合わせでやって問題なくうまくいった)

cDNA ができたら、できているべきサイズに従い、必要なところ以下をすてる。kit では、カラムをつかうことになっているが分離が悪いので、筆者は、cDNA をゲルに流して切出しをかけている。量が少ないため、どっとロスしやすいので、単なる低融点ゲルの溶解でなく、積極的にゲルをこわして cDNA を分離する酵素、gelzyme (Invitrogen) を使用している。

キモは、完全長でないやつは目的とするものを希釈しているごみにすぎないということである。ごみを混ぜて、大きいライブラリーをつくることは、必要でないだけでなく、避けなければならない。極論するなら、当り(完全長の目的 cDNA)がはいってれば、ライブラリーのコロニーの数はひとつでもよい。(頭ではわかっていてもついつい余計にとろうとしてしまいがちなので、注意が必要である。)この点、総合図書館のような、hybridization 用のライブラリーの作成とは全く異なる。

得られた精鋭の cDNA を、ベクターにつなげて、electroporation で大腸菌にいれる。Electro-competent cell は作ろうなんて考えず、Gibco/BRL の DH 12 B を使う。厳しい fractionation をかけているので、10万もコロニーができれば充分。通常このぐらいいは楽勝で出る。これを例えば5000かける20プールにわけると、1プールあたりいくつのコロニーを含むかさえ、きちんとわかっていれば(タイターが決めてあれば)、別にプレートにまく必要はない。いきなり liquid culture してよい。各プールの菌のストックは必ず作る。

5-(6) DNA 抽出, RNA 合成

各プールから wizard miniprep (Promega) により DNA をとる。linearize し in vitro での RNA 合成を行う(この詳細は、この稿の 6. で述べる)。Injection してスクリーンする。

ライブラリー由来の DNA からつくった RNA を発現させてでまがいがない電流ができれば、もう完全長の機能的クローンは手中にある。ライブラリーの細分割が進んでいくと、どんどん電流は大きくなるのでスクリーニングはどんどん容易になり、時間の問題で必ずとれる。

実際は、細胞の RNA では電流がでても、ライブラリーに、full length の機能的クローンがなかなかはいらない。そのため、電流がみえない。小さすぎて見落としてしまう。見落とすまいとして、ありもしないものがそれっぽく思えてしまう。等のトラブルがおき、あきらめる、やりなおす、先へ進んであとでまがいがない気づ

く、といったことになることも多々ある。

とにかくここで、信頼できる電流がでたら上がり!! 内向き整流性チャネルの場合、この最初のシグナルを得るまで14カ月かかり、このシグナルが出てから、単一クローンにするまでは20日(誇張ではありません)だった。

5-(7) ライブラリーの細分割

あるひとつの5000コロニーのプールにあたりがでたら、そのプールを分割する。菌のストックがつくってあるので、まずどのくらいの量でどのくらいの数のコロニーがでるか調べる(タイターを決める)。その上で、ほとんどのクローンが間違いなくはいるように、1000コロニーかける15プール作る。(1000かける5プールでは不十分である。)これも、プレートに撒く必要はない。次に、この15プールの中のどれに当たりがあるか調べる。見つかったら、1/5000から、1/1000に絞り込めたことになり、実際、電流も大きくなる。あとは、全く同じことを繰り返していく。このスクリーニングを行う際、卵の発現力を確かめるために、ひとつ前の round の RNA プールは必ずポジコンとして打ってやる。5-6ラウンド程度繰り返すと、単一クローンが得られる。

6. 繰り返し行なう実験の詳細(A) *in vitro* における RNA 合成

6-(1) 試薬、溶液類

エタノール(封を切ったばかりのものを、50 ml チューブに分注する)

DEPC 処理したミリQ水

DEPC 水-70%エタノール

5 M NH₄ OAc

クロロホルム/イソアミルアルコール=24:1
フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール=25:24:1

proteinase K (5 mg/ml) (Boehringer Mannheim 社)

RNA polymerase (Stratagene 社のキット)

RNA polymerase バッファー (Stratagene)

DTT (0.75 M) (Stratagene)

AGCU 2122 溶液 (rATP, rCTP, rUTP 各 5 mM, r GTP 2.5 mM) (Stratagene)

メチル化 CAP analogue (2.5 mM) (Pharmacia 社 # 27-4635)

RNase Inhibitor (Promega 社, N 251 A)

注射用蒸留水 (日本薬局方)

6-(2) プロトコール

(1) Wizard miniprep (Promega) により、プラスミド DNA を精製(注1)

(2) DNA を制限酵素で直鎖化する

DNA (3 μ g)	15 μ l
TE	25 μ l
10 x 制限酵素用バッファー	5 μ l
制限酵素	5 μ l
計	50 μ l

を37℃で3時間処理

(3) proteinase K で、もろもろの蛋白を分解
上記に proteinase K 1 μ l を加え37℃で30分処理

(4) フェノール/クロロホルム抽出(注2)

上記に

TE	40 μ l
3 M NaOAc	10 μ l

を加え計100 μ l にしてから、

フェノール/クロロホルム抽出 1 回目

フェノール/クロロホルム抽出 2 回目

クロロホルム抽出

(5) エタノール沈殿

上記に

エタノール 250 μ l を加え

-70℃で30分

遠心20分(注3)

RNA 用70%エタノールでリンス

ペレットを乾燥

(6) RNA 合成反応

上記のペレットを下記の反応液で溶解

RNA ポリメラーゼ反応液

5 x バッファー	20 μ l
メチル化 CAP アナログ	20 μ l
AGCU(注4)	17.5 μ l
0.75 MDTT	10 μ l
DEPC 処理水	24 μ l

ポリメラーゼ(注5)	2 μ l
RNase インヒビター	4 μ l
計	97.5 μ l

37℃で30分

rGTP 溶液 2.5 μ l を足して計 100 μ l とする。

37℃で1.5時間(注6)

- (7) フェノール／クロロホルム抽出 1 回目
フェノール／クロロホルム抽出 2 回目
クロロホルム抽出

- (8) エタノール沈殿

上記に

5 M NH₄OAc(注7) 68 μ l

RNA 用エタノール 430 μ l を加え

−70℃で30分

遠心20分

RNA 用70%エタノールでリンス

ペレットを乾燥

- (9) 30 μ l の注射用水で溶解(注8)

- (10) 1 μ l をアガロースゲルに流して、濃度、quality をチェック(注9)

- (11) 残りを−70℃で保存

6-(3) 注意点

(1) Bluescript 系のプラスミドと大腸菌 TG 1 を用いると、1.5 ml の 2YTmedia から約 10 μ g の DNA が得られる。

(2) ここから RNAase(−)world という意識をしっかりとって。

(3) この遠心は長く慎重にやる。はじめてやる人が一番しくじりやすいのがここ。pellet をよくみてなくさないようにやる。

(4) 最初、G だけうすい AGCU 溶液をいれるのは、RNA の頭に、G ではなくて、cap analogue をとりこませるためである。しばらくしてから、G のうすさが yield をさげないように、G だけ足してやる。これが、必ずしもいいのかどうかわからないが、上記の気分でこのようにやっている。もっと極端に G の濃度のみを最初から最後まで 1/10 程度にする方法もあるが、yield は下がるようである。

- (5) T7, T3 polymerase は問題ないけど、

SP6 polymerase は yield も上がらないし、できた RNA も途中でとまった短いのが、多い感じがする。できれば、T7 か T3 を使うようにサブクローニングの際 arrange したい。

(6) RNA 合成が終わった後、RNase-free DNase で、template の DNA を分解するやりかたが一般的である。しかし、DNA がのこっていても別に害はなく、むしろ、RNase-free DNase に微量に混在する RNase のためか、DNase 処理すると、しない場合よりも発現は下がるという結果が得られた。だから、DNase 処理は全く行っていない。

(7) NH₄OAc を使うのは、取り込まれなかった AGCU の沈殿をいくらかでも避けるため。

(8) 最後に溶解するのは、TE や DEPC 処理水ではなくて、注射用水。RNase(−)であるだけでなく、生き物にとって害がないことが大切。ここで言う注射用水とは、外科手術などで人間の体にいれることが認められている水である。

(9) できた RNA は必ず gel に流して、濃度と integrity をチェックすること。ペレットの大きさは、必ずしもあてにできない。とりこまれなかった AGCU が効いてくるためか、O.D. もあてにできない。絶対に、ゲルに流して確かめること。

7. 繰りかえし行なう実験の詳細(B) アフリカツメガエルの飼育、卵母細胞の単離

カエルは大きくて色の黒いものを用いるようにしている。例えば、浜松生物教材、北日本生物教材などからいれている。卵母細胞の condition は、非常に大切である。卵母細胞が良ければ楽勝だし、卵母細胞が悪いときにはどうやってもうまく行かない。カエルを健康に維持すること、卵母細胞を無菌的に飼うことなどが大切である。しかし、どうしてもどのカエルから卵母細胞をだしてもうまくない、全体が低調のときもある。そういう時は、違う業者からカエルをいれてみるとか、しばらく、卵母細胞の実験を止めて、vacation にするといった、思い切っ

た対応も必要である。手足や口の先が赤くなったり、皮膚に潰瘍状のものがみられることがあるが、多くは、感染によるもので、放っておくと、同じ水槽の中のカエルが全滅することもある。よって、感染を疑われるカエルは sacrifice するべきである。

カエルの水槽は、浅めで広めのものを使っている。狭くて泳げないのは不健康な気がする。底に drain を付けて、汚れた水が簡単にかえられるようにしている。水は大きなバケツに数日汲みおいてカルキをとばしてから使っている。すぐく気になるときは、さらに金魚用の脱カルキ剤(ハイポ)をいれてもよい。水槽は、1 回使ったら傷が癒えるまで数カ月休ませるために、使える状態のもの、術後すぐのもの、回復期のもの A、回復期のもの B、などに仕切でわけている。

餌は、カエル用の固形のペレットを与えている。週 2 回、夕方与えて、翌朝、水を換えるようにしている。

7-(1) 試薬溶液類

collagenase type 1 (Sigma)

MBSH 溶液

stock A	NaCl	128 g
	KCl	2 g
	NaHCO ₃	5 g
	Hepes	89 g

1 l 弱のミリ Q 水にとかす。

pH を 1 M NaOH で 7.6 にあわせる。1 l にし、フィルターして、50 ml チューブに 40 ml ずつ分注する。

stock B	Ca(NO ₃) ₂	1.8 g
	CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1.5 g
	MgSO ₄ , 7 H ₂ O	5.0 g

1 l にし、フィルターして、dispo の 50 ml チューブに 40 ml ずつ分注する。Ca を溶かしてから Mg を加えること。

stock C	penicillin	10 mg/ml
	streptomycin	10 mg/ml

1 ml ずつエッペンドルフチューブ

に分注し、-20℃ 保存

つくりかた

autoclave した miliQ 水	919 ml
stock A	40 ml
stock B	40 ml
stock C	1 ml

あわせて 1 l になる。17℃ で短期保存。

7-(2) プロトコール

(1) カエルを 0.1% Tricaine 液、もしくは、氷水に 20 分つけて麻酔する。

(2) 皮膚層、筋層をメスであける(注 1)。

(3) 卵母細胞をとりだし、MBSH をいれた培養皿にいれる。

(4) 針と糸でぬって、常温の水にもどす(注 2)。(回復してから水槽にもどす。)

(5) 卵母細胞の房をピンセットで適当に裂き開き、かつ適当な大きさにわける。

(6) 10 ml 程度の MBSH に 2 mg/ml になるよう collagenase を溶かし、フィルターしたものを、ふたのしめられる無菌のバイアルに用意する。

(7) collagenase 溶液に卵母細胞をいれて、rotary shaker につけて 2 時間室温で incubate する。

(8) 2 時間後にまだあまりばらばらになっていないようなら、新しい collagenase 溶液に移し、さらに 1 時間処理する。

(9) MBSH で 5 ~ 6 回リンスして、collagenase 溶液を完全に取り除き、MBSH をいれた培養皿にいれて、17℃ 保存する。翌日までに injection を行う(注 3)。

7-(3) 注意点

(1) 完全な無菌操作を意識する必要はない。しかし、腹腔内にはいる手術なので、メス、ピンセット等は滅菌しておく。メスをいれるのは、正中部をはずし、肝臓、膀胱をはずすようにする。傷口は 5 mm から 10 mm 程度いれる。あまり小さい傷ですませようとする、卵塊を取り出すときにつぶしてしまうのである。いどのおおきさは必要。卵塊を引っ張り出すときは片側が引っかかっているときは逆側からといった

ように、だましまし出していくようにする。メスで開いたところに卵塊が見つからないときは、よくみえないままでピンセットで腹腔内をまさぐったりしない。腹腔内出血をおこしたりして、結局うまくいかないことが多い。卵母細胞を得られないまま、傷口を閉じて水槽にもどすか、覚悟を決めて、大きく傷口を拡げて、卵母細胞を得た後、sacrifice するかしたほうがよい。

(2) 縫うのは、まず筋層を3針、続いて、皮膚を3針と縫うようにする。きちんと筋や皮膚がよっていればいかような形でもかまわない。

(3) 大事な実験の時は、複数のカエルを用いて、良い方の卵母細胞を使う。卵母細胞自体の内因性の電流の有無などが鍵となる実験の際には複数の種類の卵母細胞を使った方がいいこともある。

8. 繰り返し行なう実験の詳細(C)卵細胞への RNA の注入

カエルの卵母細胞は非常に大きいので、微小操作といった感じはあまりなく、そういった困難さはあまりない。デリケートな生き物相手だと言う気分を持つことがなにより大切である。1回で決められるのはすごく実験の sense のいい人で、しかし、5回やってみてうまくいかないのは相当下手という、その程度の感じの難しさである。気楽に3回ぐらいやってみると感じがわかって上手にやれるようになるのが普通である。

8-(1) 器具機器類

手術用のガーゼ

大きなスポンジと鉄板(簡易防震台として使う。なくてもやれる。)

粗動のマニピュレーター(ナリシゲ社)

ネジ式の injector (Drummond 社, Digital micro-dispenser 10 μ l 用)

実体顕微鏡

コールドライト (HOYA-SCHOTT 社, PLO 75)

ガラスピペット(ヘマトクリット管)

ガラスピペットのブラー(ナリシゲ社, PN 3)
ミネラルオイル(Aldrich社)

パラフィルム

17℃の incubator (加熱, 冷却の両方ができるもの)

卵母細胞の transfer 用のパスツールピペット(卵母細胞が通る太さに先端を直角に折り, fire polish して先端を丸めたもの, いろいろな太さのを試して使い易いものを選ぶ)

8-(2) プロトコール

(1) 1回の injection に使う分だけ, RNA を分注し, 氷上になてる。

(2) 卵母細胞(注1)をガーゼ mesh の上に適当に並べ(注2), 良いもののみ残す。

(3) ガラスピペットにミネラルオイルをつめる(注3)。

(4) ガラスピペットを injector に装着する(注4)。

(5) RNA をパラフィルムにとり, ピペットの先端から吸い上げる(注5)。

(6) 卵母細胞に RNA を注入(注6)。

(7) 卵母細胞を17℃数日培養。毎日液換え(注7)。

8-(3) 注意点

(1) 卵母細胞の操作は, すべて, 先端を折ってから熱で丸めたピペットにニップルをつけたものを用いて行う。全く collagenase 処理等してない卵母細胞は, 強い follicle cell が残っていて injection がやりにくい。そこで, 事前に collagenase 処理によりばらばらにしておくわけである。卵塊がばらけてくるほど, collagenase 処理をかけると, follicle cell は卵母細胞をおおってはいるが, もはや intact ではなく, 楽に injection ができる。follicle cell をピンセットで完全にむいてしまう方法も major である。電気生理学的実験を厳密に行うためには, この方がもちろん望ましいが, follicle cell を完全に取り除いた卵母細胞は, 乾燥に非常に弱い点など, やや取扱が面倒な点があることと, たくさんの卵母細胞を用意するのは大変であることの問題点がある。follicle cell を剥かない方法

では、簡単にたくさんの卵母細胞が用意できるし、取扱も容易で、チャネルや受容体の発現の有無の判定を行うのには全く問題がない。したがって、機能発現法によるクローニングのスクリーニングの際などには、follicle cell を剥かないやり方のほうが適している。follicle cell を剥かないやり方で、定量的な電気生理学の実験を行う時には、follicle cell がほとんどはげかかっているような卵母細胞を選ぶ。follicle cell がびっしりはりついているのが観察されるような卵母細胞は、follicle cell が拡散の障害となるので、チャネルや受容体のブロッカーの効き方を定量的に調べるような実験には適さない。

(2) 卵母細胞をきちんと並べる必要はない。culture dish にガーゼをしいて、卵母細胞が丁度頭のとっぺんまでつかる程度に MBSH 溶液をいれて、そこにバラバラと卵母細胞をいれる。そして、いびつな卵母細胞、小さい卵母細胞などを取り除きながら、残った使える卵母細胞を大雑把に 3 列縦隊程度にならべ、端からうっていけばよい。ガーゼをしくのは、injection しようとしたときに卵母細胞がコロコロ逃げるのを防ぎ、おさえこむためである。multi-well のプレートに一個ずつ並べてから打つ等の方法もあるが、そこまで手をかけなくても充分キチンと打てる。ガーゼを使うやり方を強くすすめる。MBSH 溶液の深さは大切なポイントである。ぎりぎり卵母細胞が水没する程度が丁度いい。

(3) ピペットは横引きのプラーでひいたものを用いている。熱を強く、マグネットを弱く設定すると、すーっと長いものがひけて、ヒーターを弱くマグネットを強く設定すると、テーパの短い腰の強いものがひける。これは、実際にやりながら try and error で決める。まずピペットの先を少しだけピンセットでつまんで折る。その後、ミネラルオイルをシリンジに細い注射針をつけたものを用いて先端まで fill する。抜くときにいれかわりに空気が入りがちなので、シリンジを押しオイルを出しながらゆっくり引

抜き、ピペット全体に空気がないようにする。

(4) そのピペットを、injector の金属シリンジに装着する。この時も、injector の金属のシリンジとオイルの間に空気はいらないようにする。装着できたらダイヤルをねじり、シリンジをすすめて先端からオイルを出す。200目盛分進めると、2 μ l の RNA をすいあげる余裕ができる。

(5) RNA をパラフィルムにとる。こい RNA だと、1 μ l 程度をおしだすのは、チップからすっと切れてくれずに、大変な時がある。先の細いチップを使うのが肝。2.5 μ l 程度なら楽勝で切れる。injector のダイヤルを逆回しして、RNA を吸い上げる。ピペットの中のオイルと RNA の境界が順調に上がってくるのが目安になる。RNA が全くすえなくてもダイヤルはもちろん動く(この場合、シリンジとオイルの間に空気が後ろからもれはいつてきている。)ので、ダイヤルの目盛はあてにならない。一旦空気がはいると、injection するときにエアークッションとなるので、injection が不確実になる。よって空気はいるのはさけなければならない。そのため、RNA が吸えてこない時は、無理して空気が後ろからはいつてしまう前に、ほんの少しずつピペットの先を折ってみる。また、ピペットの先端に RNA 溶液中のゴミがふたのようにおおいかわさっていることもあるので、すったりはいたりして、だましだましやるとうまくいくことも多い。いうまでもなく、ピペットは細ければ細いほど卵母細胞のダメージが少なく、よい。しかし RNA が吸い上げられず、後ろから空気はいつてばかりというのは最悪。よって RNA がぎりぎり上手に吸い上げるなるべく細いピペットがよいといえる。全く try and error の世界。

(6) 打つときは、これもダイヤルの目盛はあてにならない。先端がつまってしまういても目盛は進む(この際は、オイルが後ろからもれている)のであてにならない。50nl いれるには、どのくらいダイヤルを回せばいいのかをつかんだら、いつもその程度まわすようにすればよい。

そして、打つときに見るのは、目盛ではなくて、RNA とオイルの境界が前進していることと、打たれた卵母細胞がプツとふくらむことである。なれてくると、ピペットがつまって RNA が出なくなったら、即気づくようになる。打っているか自信が持てない時は、ピペットを卵母細胞にささないで空でうって RNA 溶液がでくるかどうかみればよい。途中でしくじったくさい卵母細胞や傷ついた卵母細胞は、transfer pipette でとり除く。

(7) 17℃ 培養中は必ず毎日液換え (culture dish も新しいものにとりかえる) する。不健康に見える卵母細胞は捨てる。怪しいものは罰する。無菌操作とはもちろんいえないが、できるだけ無菌的に culture する。皿は、無菌の culture dish を使う。injection の時の mesh も毎回とりかえる。transfer pipette は最も汚れやすいので、使わない時はエタノールに完全にしずめておく。うまくいっていた時に、どんどん手を抜いていったら、全くだめになってしまったことがあり、その原因が bacteria の感染であった。以来気をつけるようにしている。死にそんな卵母細胞をどんどん処分するのも、死んで卵黄がでてくると、bacteria が繁殖しやすくなるからである。dish の蓋を開けたとき臭うなと思ったら感染を疑い、高倍の顕微鏡下でみてみたほうがよい。MBSH が栄養のない塩溶液なので濁るほど増殖することはない。でも、ウヨウヨしていることはあり、それは、必ず、卵母細胞の condition を悪くする。

9. 繰りかえし行なう実験の詳細(D) 2本 刺膜電位固定法による電流記録

この部分は、むしろ、分子生物学の実験を主に行なっている人のために記す。全く電気生理学的実験の経験のないラボで、ゼロから set-up するのは楽しみや喜びも多いけれど、遠回りになることが多いと考えられる。一旦 set が出来上り、きちんと使えるようになれば、簡単なスクリーニングは簡単にできるので、set-up までは、まわりにいる経験のある人を捕まえて、

実際にその人の set をみせてもらったり、自分達の set を見てもらったりすることをすすめる。ここでは、助言してくれる経験者がいるものとして、必要な器具、機器類のリストと、いくつかの注意点を示すのに留める。

9-(1) 器具機器類

防震台

シールドケージ

粗動のマニピュレーター 2台 (ナリシゲ社, MN 153)

実体顕微鏡

コールドライト (HOYA-SCHOTT 社, PLO 75)
膜電位固定用アンプ (Warner 社, OC 725 C-HV)

AD/DA コンバーター (Axon 社, Digidata 1200)

IBM 互換のコンピューター

刺激, データ取込みプログラム (Axon 社, pCLAMP 6)

9-(2) 注意点

(1) 卵母細胞は、腹 (batch) により、その発現力、内因性の電流等、びっくりするぐらいの違いをみせる。よって、ポジティブコントロールとしてよく発現することがわかっているものを、そして、ネガティブコントロールとして RNA を含まない単なる注射用水を、打った卵母細胞を必ず用意すること。

(2) アンプとしては、最もコンプライアンス (膜電位固定する腕力みたいなもの) の高いこのアンプを勧める。単機能で値段も安いけれど、卵母細胞の膜電位固定にかぎっては、すごくよい。

(3) 膜電位固定をうまくやるには、とにかく電極抵抗を下げる。特に電流を流し込むための電極の方の抵抗が大切で、2 Mohm を越えるようではよくない。できれば、0.2 Mohm ぐらいにしたい。ただ、抵抗を下げるということは太くするということで、卵母細胞のダメージによるもれ電流が増えたり、電極内の 3 M KCl がポタポタたれたり、トラブルも多くなる。その2つのファクターのかねあい。できるだけ

太くてできるだけ細い(!!!)もの。

(4) Digidata, IBM computer, pCLAMP のシステムは非常に便利である。これがあれば、オシロスコープも刺激装置も記録装置もいらない。ただコンピューターの key にふれるだけですらすらいく。一度使ったら、なしではやってられないほど楽。お金はかかるけど、初めてやる人にこそ勧めたい。

10. 実例 1 内向き整流性 K^+ チャネル

ユニークな整流性を示す、内向き整流性 K^+ チャネルの存在は、電気生理学的に古くから知られていたが、その一次構造は、1991年の時点では、全く知られていなかった。そこで、筆者らは、その機能発現法による cDNA のクローニング (ref. 31) を行なうことにした。以下にこのクローニングで体験したトラブルと、それをのりこえるために行なったことについて記す。

10-1) 有効なメッセージの濃縮

下記の G 蛋白質結合型受容体の場合には、細胞内情報伝達系による増幅がかかるが、イオンチャネルの場合には、発現したチャネル蛋白をとる電流そのものを観察するのだから、高い発現が必須である。そのためには、とにかく、目的とする RNA が enrich されていなければならない。そのために行なった工夫は以下のとおりである。

(a) 最初に、内向き整流性 K^+ チャネルが発現していることがよく知られている心筋、骨格筋、脳などに由来する RNA を試していた。その中で、脳由来の RNA は若干の内向き整流性 K^+ 電流を発現したので、これをソースとして用いることにして、RNA のサイズによる分画、cDNA ライブラリーの構築へと進んだ。しかし、どうしても cDNA ライブラリーサブプール由来の cRNA からは、電流が検出できなかった。これで、相当長い時間を費やした後、別なソースを用いることにして、種々の細胞株由来の RNA を試した。その結果、マクロファージ由来の細胞株で、非常に大きな電流が検出されることがわかり、これをソースとして、用い

ることにし、結局これが功を奏した。最初から、この RNA を使っていたらもっとずっとはやくとれていただろうと思う。このことから、ソースの決定は慎重にやるべきであるということがいえる。目的とするものが存在する可能性があるソースは、有名、無名にかかわらず、すべて試すべきだと思う。full length の reverse transcription の効率が必ずしも高くないので、細胞由来の RNA を試しているときに比べると、ライブラリーのスクリーニングの際には、うまくやっても電流はゆうに一桁は小さくなる。だから、最初に試した、細胞の RNA で小さな電流がでても、安易にとびついてはいけない。手にはいるもののなかで、best のソースを決定するまでこらえるべきである。

(b) 電流を大きくするためには、厳しいサイズ分画が必要である。そのため、細胞から得る RNA は十分な量がなければならない。全体の量が少ないから 30 分割はできないといって、わけたプールをまとめてしまったりするのは、よくない。30 分画程度にわけて、very best の分画のみで、ライブラリーをつくるべきである。そのため、細胞からの RNA は十分量とる必要がある。100 μ g 程度の poly A^+ RNA を得ようと思うと、培養細胞の場合だと、莫大な培養皿の数になるが、それでもとるべきである。

(c) RNA を分画して、できた cDNA を分画してから、cDNA ライブラリーをつくっても、依然として、短いクローンは混じってくる。そこで、本命の長さのものだけを選択するために、ライブラリー由来の DNA を製し、Not1 で one cut して linealize し、ゲルに流して、8 kb 以上 (インサート 5 Kb 以上) の DNA だけを精製し、re-ligate, re-transform するという操作を行なった。この操作により、5 倍程度の濃縮をかけることができた。増えやすいクローンと増えにくいクローンの abundance のへだたりが激しくなる等の理由により、常識的には決して行なわないことであるが、用のない短いものを切り捨て、長いものだけをとるという目標を達成するには有効である。実際、このやり方

で、長いものを濃縮したライブラリーから筆者らははじめて、発現を観察することができたのである。

10-(2) 内因性の電流との区別

卵母細胞には、高 K^+ 液中で、過分極パルスを与えると、いくらか内向き電流が記録される。これが、非常に有害であった。内向き整流性 K^+ 電流に似通った電流が内因性にあると、RNA 注入により、その電流がふえたかどうかを判定することになる。これは、発現電流が大きい場合には何も問題ないが、ライブラリースクリーンの第一歩の時には、非常に問題となる。(10が30になれば、はっきりとわかるが、10が11になっても、自信を持って結論はできない。) この状況を救ったのは、発現電流が、 Ba^{2+} により非常によくブロックされるという性質であった。2 mM の Ba^{2+} を用いると内因性の電流も、発現電流もブロックされたが、100 μM の Ba^{2+} によっては、内因性の電流はほとんどブロックされないのに対し、発現電流は非常によくブロックされた。よって、100 μM Ba^{2+} によりブロックされる内向き電流成分の有無ということで、発現が自信をもって確定できた。このことから、内因性の電流と、量的な差で判定を下すのは非常に困難なので、なんとか質的な差異を見いだす努力をするべきであるということを実感した。

11. 実例 2 G蛋白質結合型受容体

アフリカツメガエル卵母細胞は、Gq 蛋白質、PLC, IP3/ Ca^{2+} の情報伝達系を備えているばかりでなく、細胞内 Ca^{2+} によって活性化される Ca^{2+} - Cl^- チャネルを持っているため、Gq 結合型の 7 回膜貫通型の受容体の活性化を、非常に鋭敏に電気生理学的にとらえることができる。このため、非常に多くの受容体が、機能発現法によりクローニングされてきた。

筆者らも、細胞外 Ca^{2+} と glutamate のどちらによっても活性化される Gq 結合型受容体を単離した(ref. 23)。ここでは、その仕事を通して体験的に会得した optimal なスクリーニング

法について記す。

11-(1) これまでの conventional なスクリーニング法

これまでの、Gq 結合型の受容体の機能発現法によるクローニングでは、-80 mV 程度に膜電位を固定し、ligand を投与することによっておこる受容体の活性化を、内向き Ca^{2+} - Cl^- 電流の増加として観察している例がほとんどである。しかし、この Ca^{2+} - Cl^- チャネルは非常に強い外向き整流性を示す。すなわち、過分極電位で内向き電流として観察するよりも、脱分極電位で外向き電流として観察するほうが、ずっと大きな電流として記録できる。筆者らは、その膜電位依存性(外向き整流性)の強さをまのあたりにして驚き、これまでの(過分極に hold しっぱなしという)スクリーニングは感度の点で optimal とは言えないと思った。(なお、この膜電位依存性(外向き整流性)の強さについては、もちろん、以前から知られていなかったわけではない。しかし、なぜか、機能発現法によるクローニングでは、あまり、着目されていなかった。)

11-(2) 用いたスクリーニング法

過分極に固定して脱分極パルスを与えると、このチャネルに特徴的なゆっくりとした活性化過程が観察され、過分極電位に戻すと、脱活性化過程が観察された。そこで、筆者らは、この方法をスクリーニングに用いることにした。すなわち、-80 V に膜電位固定し、2 s おきに +60 mV への、200 ms の脱分極パルスを繰り返し与えながら、その途中で ligand を投与するという方法である(図 3)。受容体が活性化されると、 Ca^{2+} - Cl^- 電流の増加が、膜電位依存的な遅い活性化を示す電流の出現としてとらえられる。別にどうってことのない、ごくごく自然なやりかたである。このスクリーニングの merit は次の 3 点である。

(a) 電流が大きく出るので、小さい応答も見逃しにくい。すなわち、sensitivity が高い。

(b) 特徴的な膜電位依存的活性化に着目するので、単にリークが増えたりした場合とは明確

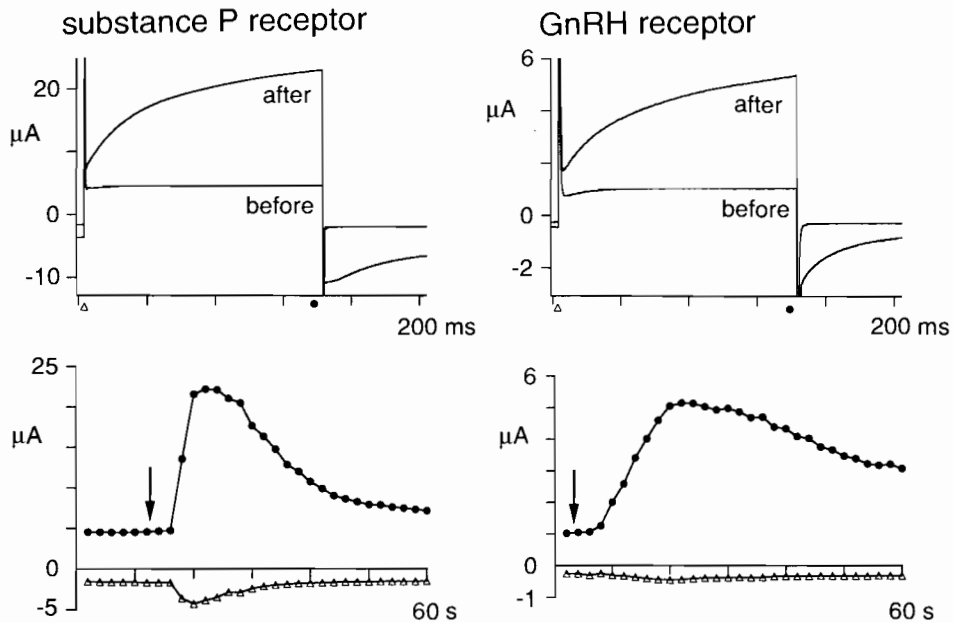


図3. 卵母細胞の $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ チャネルの膜電位依存性

(左) rat substance P 受容体 (ref. 36) を発現させた卵母細胞に, substance P 10 nM を投与した時に観察された $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流. (右) sheep Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) 受容体 (ref. 37) を発現させた卵母細胞に, GnRH 20 nM を投与した時に観察された $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流. どちらの場合も, -80 mV に膜電位固定し, $+60\text{ mV}$ への脱分極パルスを, 2 s おきに繰り返し与えながら, アゴニストを投与した. 上段はアゴニスト投与前の記録と, 応答のピークでの記録を重ね書きしてある. アゴニスト投与により, 緩徐な膜電位依存的活性化を示す, $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流があらわれるのがわかる. これらの記録から, -80 mV での電流値(時間軸上に Δ で示した時点)と $+60\text{ mV}$ での電流値 ($\bullet$ で示した時点)を測定し, 下段に 2 s おきに経時的にプロットした. 矢印は, アゴニスト投与のタイミングを示している. 左右どちらも, -80 mV では電流はごくわずかしが観察されないが, $+60\text{ mV}$ では, はっきりと観察される. 応答が小さい時(右側)には, この傾向がより顕著である.

に区別できる.

(c) agonist を投与する前から base level として $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流が増加している場合に (i. e. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起きている場合に), それを検出する.

以上(a)(b)の理由から, $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流増加として, 受容体発現を検出するためには, 脱分極パルスを与えることを強くすすめたい.

ところで, (c)の点についてだが, base level で $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ 電流が増加していても, 通常の過分極電位に hold しっぱなしの場合には, 若干 holding current が大きい, いわゆるリークが大きめの卵母細胞だと思うだけで, 全く気づく余地はない. しかし, 脱分極パルスを与れば, 特徴的な活性化過程を示す電流が見えるので,

base level で $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ チャネルが活性化している, すなわち, 細胞内 Ca^{2+} の上昇がおきているということに気づきうるのである. 筆者らが, 以下に紹介する sBimR と名付けたクローンを単離した時には, この3つの長所のうち, この(c)の点が非常に幸いした. この点について, 以下紹介する.

11-(3) sBimR のクローニング

筆者らは, サケ科魚類の脳の cDNA ライブラリーより, とあるホルモン受容体の機能発現法によるクローニングを試みていた(これは現時点でまだうまくいっていない). ライブラリーのサブプール由来の cRNA を注入した, 卵母細胞をスクリーニングしていたら, 「 $\text{Ca}^{2+}\text{-Cl}^-$ チャネルが開きやすい脱分極電位へのパルスを

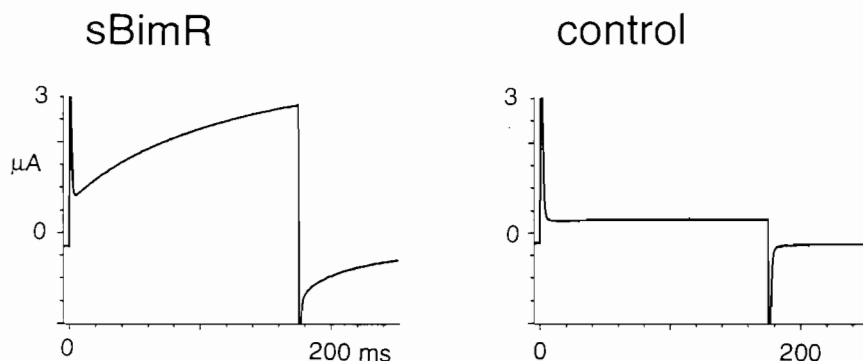


図4. frog ringer 中で観察される sBimR の base level の Ca^{2+} - Cl^- 電流

図3と同じパルスを与えると、sBimR (salmon bifunctional metabotropic receptor, ref. 23) を発現させた卵母細胞では、何のアゴニストをも投与することなく、 Ca^{2+} - Cl^- 電流が増加していた。後に、frog ringer 中に含まれていた 2 mM 程度の Ca^{2+} がこの受容体を刺激していたということがわかった。water injected の negative control の卵では、この電流は、全く観察されない。なお、-80 mV での電流では、両者で、ほとんど区別できない (パルスを与えなければ区別できない) ことに注意して欲しい。

与えると、何のリガンドをも投与することなく basal に Ca^{2+} - Cl^- 電流を示す」プールの存在に気付いた。いったいなんだろうと考えつつ、その原因となるクローンを単離した(図4)。得られたクローンは、7回膜貫通型の代謝型受容体の構造を示し、アミノ酸レベルで、ラット代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)と69%、ヒト副甲状腺の細胞外 Ca^{2+} 受容体(CaR)と24%の identity を示した。basal に Ca^{2+} - Cl^- 電流を示す性質は、(グルタミン酸を全く投与していないので)mGluR1としての性質では説明ができない。そこで、このクローンが、細胞外 Ca^{2+} の受容体としての機能を有しており、bath 溶液中に含まれている Ca^{2+} によって刺激されて、 Ca^{2+} - Cl^- 電流を示したのではないかと考え、種々の実験を行なった。その結果、単離したクローンが確かに細胞外 Ca^{2+} 受容体としての性質を持つことが明らかになった。さらに、rat mGluR1 との高い類似性から当然予測されるように、このクローンはグルタミン酸受容体としての機能も持つことが確認された。よって、このクローン(sBimR: salmon Bifunctional Metabotropic Receptor)は、細胞外 Ca^{2+} とグルタミン酸の両方を感知する代謝型受容体であると結論した。また、sBimR と rat

mGluR1 のホモロジーから、rat mGluR1 も、(これまで全く知られていなかったけれど、実は)細胞外 Ca^{2+} の受容体としての機能を持つのではないかと考え、実験を行なった。その結果、これまで、代謝型グルタミン酸受容体とよばれてきた mGluR1 が、細胞外 Ca^{2+} センサーとしての機能をも併せ持つということが明らかになった(ref. 23)。

11-(4) Gq 蛋白質結合型受容体のケースについてのまとめ

(a) この系でスクリーニングする場合には、second messenger 系によりシグナルの増幅が起こるので、発現している受容体の数は少なくてもなんとかするという点は有利に働く。

(b) しかし、だからこそ、いい卵母細胞を使うことが必須になる。イオンチャネル型の場合は、発現力がすべてという感じであったが、この場合は、それにまして、もっともっと要求度が高い。イオンチャネルの発現は問題なく検出できる batch でも、 Ca^{2+} - Cl^- 電流応答はしょぼしょぼしていることは、多々ある。Gq, PLC, IP3, Ca^{2+} store, Ca^{2+} - Cl^- チャネルと、要求される役者が多いからであろう。必ず、毎回、positive control をおき、発現力だけでなく、 Ca^{2+} 応答がしっかりした batch であることを

確認するべきである。

(c) また、batch によって何も発現させていないコントロールの卵母細胞で、 Ca^{2+} - Cl^- 電流がふらふら、ふえたり減ったりしていることもある。恐らく、 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が、spontaneous に起こっているのだと思われる。(どのような batch でこういうことが起きやすいか系統的に調べたことはないが、動物極の頂点の黒色が薄くなりはじめている、過熟気味の卵母細胞で、多く起こるような印象がある)。このような状況下で、アゴニストを投与した時にたまたま起こった自発放出を、応答だと誤認してしまうと、結局ゆきづまる。よって、injection していない negative control の卵では、応答もどきがみられないことを確認しなければならない。

(d) スクリーニングのやり方としては、既に詳述したように、脱分極パルスを繰り返し与えながら、リガンドを投与するというやり方が、すすめられる。

12. 最重要事項のまとめ

すでに記したことの中から特に肝要と思われる点を以下に再確認する。

(1) 全体を通じて、電流があるのかないのか、みきわめをきびしく！ ありもしないのにあると思って前に進むと時間をロスするだけ。あるところにはある。ないところにはない。あれば必ずとれる。なければ絶対とれない。とれる日まで希望は決して捨てないが、希望的観測は絶対しない。

(2) RNA ソースの決定には充分な時間をかける。ちょっと出ると、ガーンと出るのでは後々の苦勞がまったく違う。手に入るあらゆるものを調べて、best のものを選択する。

(3) RNA のサイズ分画は必ずやる。分画しなくても大きい電流がでていても、有効なメッセージをできる限り濃縮するために、やる。当たりじゃない(長さの違う)RNA は、当たりの RNA を希釈しているゴミに過ぎない。ライブラリーを作るときに完全長のものはぐっと減る

から、できるだけ濃縮しておくことが必要。

(4) ライブラリー構築の時も、たくさんコローニーをだす必要は全くないとキモに銘じる。ごみはいらない。厳しいカットオフして、少数精鋭で勝負。

(5) 特にライブラリースクリーニングの最初の段階では、シグナルが非常に小さいのが普通なので、どんなに小さなシグナルも見落とさないようにする。しかし、もちろん、根性だけでは正解にたどり着けないので、熟考して、最適なスクリーニングを行う。

(6) どんなに小さいシグナルも見落とすといけないが、そう思うあまり、有りもしないものが見えてきてしまうことが(信じられないかも知れないけど)よくある。なんか変だなと感じたらなんか変なことが多い。無理して前にすすんでも結局もとがえりになってしまう。

(7) 卵の発現力を確かめるために、なんでもいいから確実に出るものと、前ラウンドの positive を control として注入する。

(8) 卵母細胞の内因性の電流ではないことを確かめるために水をうった卵を negative control として毎回用意する。卵母細胞は、腹によって全く別物のような振舞うことを肝に銘じること。

(9) 卵母細胞の調子がすごく大切で、すべての鍵を握る。特に卵母細胞の感染に注意。

(10) injection および膜電位固定記録の実験の肝はガラスピペットの太さ。できるだけ太くてできるだけ細いもの!!

(11) スタンダードにやれるところは、「工夫しないこと」。生理学の実験では、正確に測定するために、自分自身でシステムを工夫するという側面が多々あると思う。同じことは、新しい特別な分子生物の手法の開発ではもちろんあると思う。しかし、この章ですでてくるような分子生物学的操作のほとんどは、すでに確立されているものであり、普通にやっとうまくいく。そこで、「工夫好きの生理学者」に対しては、あえて、なるべく工夫しないで、うまくいくことがわかっているプロトコルのとおりにやる

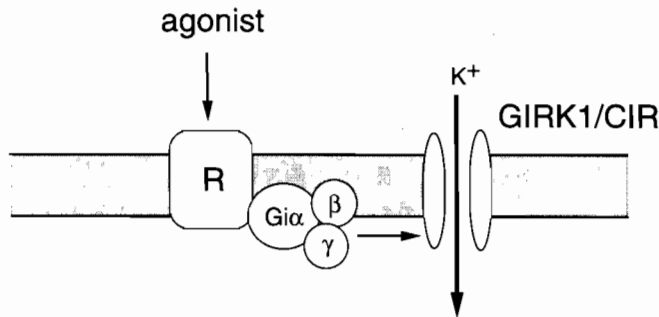


図5. GIRK1/CIR を effector として用いた, 卵母細胞発現系における Gi/Go 結合型受容体の発現の検出のメカニズム

ということをお勧めしたい. とっておきの工夫をいろんなところからひっばってきてもくっつけたりすると, 思わぬところで足をすくわれる. 普通のことをやるには工夫しないで, 確立されている通りにやる.

13. お わ り に

これまで, 卵母細胞による機能発現法によるクローニングの対象は, イオンチャネル分子か, Gq 蛋白質 (IP3/Ca²⁺ 系) にリンクする受容体に限られてきた. 今後, どのような新展開がおこる可能性があるだろうか.

まず, 新たな, 鋭敏な生理学的スクリーニング法を開発することで, 適応できる範囲を拡大できる可能性があるだろう. 例えば, Gi/Go 蛋白質で活性化される内向き整流性 K⁺ チャネル GIRK1/CIR (ref. 38, 39) を reporter として, 共発現させることで, Gi/Go 蛋白質に結合するタイプの受容体の発現がスクリーニングできるかもしれない(図5). また例えば, 高発現するチャネルのコード領域の上流に, 転写因子を同定したい cis-element をつなげた DNA の construct を, 転写因子を発現している細胞のライブラリー由来の RNA と共導入すれば, 転写因子クローンの有無を, reporter channel 電流の増加として捕えられるかも知れない.

次に, このクローニング法において, 大量に RNA を精製する必要があることは大きな障害となっているが, この点も克服されていく可能性があると思われる. 現時点では, 生理学的に

ある特殊な細胞に非常に興味深いチャネルがあることがわかっていても, その細胞がごく少量しかとれない場合は, そのクローニングはこの方法では非常に難しい. しかし, ごく少量の細胞から high quality の library をつくる技術が進歩して, まれな分子にいたるまで full length ではいっているような library さえつくれば, 増やした library DNA の insert 部分を厳しくサイズ分画し, re-ligate, re-transform して, 目的とするクローンを検出可能なレベルまで濃縮することは可能と考えられる.

これまでの筆者の経験からいうと, (クローニングはなんでもそうだと思うが,) 機能発現法によるクローニングでは, 特に「見極め」が非常に大切だと思う. そこに, 電流が見えていとも見えていないとも結論できないようなあやふやなスクリーニングでは, いい結果は生まれ得ない. 電気生理学的な判定を確信をもって下せるなら, 分子生物学の部分はそう困難ではない. 電気生理学的に観察してきた興味深いチャネルや受容体があれば, 憶せず, かつ深く考えつつ, 挑戦してみるとよいと思う. RNA のよいソースがあれば, 成功の可能性は十分あると思われる.

なお, この稿の内容の不明な点等についてのご質問, また, より詳細な点についてご質問がある場合は, ご連絡下さい. わかることであれば, お答えさせていただきます. 誤った点等についてもご指摘下されば幸いです.

(fax: 0423-21-8678, email: ykubo@tmin.ac.jp).

謝 辞

この稿で紹介した、筆者らの IRK1 のクローニングは、University of California, San Francisco の Lily Jan 先生の暖かい励ましのもと、機能発現法のエキスパートの David Julius 先生に貴重なアドバイスをいただきながら、行なったものです。また、sBimR, sWIRK のクローニングは、東大海洋研分子生物の窪川かおる先生、東京都神経研の宮下知之氏といっしょに行ないました。尊敬する先生やよき仲間「改めて」深く感謝したいと思います。

この稿を書きながら、機能発現法によるクローニングを行っていた時の苦しかった日々や、成功した時の感激など、なつかしく思い出しました。(振り返るには、まだ早すぎるけれど。)この稿を執筆する機会を下さった企画編集者の高田明和先生、井本敬二先生、小幡邦彦先生、また、そのきっかけになった、1995年の生理研における技術トレーニングコースで講演する機会を下さった、井本敬二先生、岡田泰伸先生に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Stuhmer, W. & Parekh, A. B. (1995) Electrophysiological Recordings from *Xenopus* oocytes. In Single-Channel Recording Sakmann, B. & Neher, E. (eds), Plenum, New York, pp 341-356.
- 2) Frech, G. C. & Joho, R. H. (1992) Isolation of ion channel genes by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Methods in Enzymology* **207**, 592-604.
- 3) Dascal, N. (1987) The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. *Crit. Rev. Biochem.* **22**, 317-387.
- 4) 中村元直, 清水孝雄 (1993) アフリカツメガエルの卵母細胞を用いたレセプター遺伝子の発現クローニング. 横田 崇, 新井賢一(編) バイオマニユアルシリーズ 3 遺伝子クローニング実験法 羊土社, 東京, pp 138-156.
- 5) 久保義弘 (1997) アフリカツメガエル卵母細胞を用いたクローン化遺伝子の機能分析法. 吉川和明(編) ニューロサイエンスラボマニユアル 2 遺伝子導入発現研究法. シュプリンガーフェアラーク, 東京, pp 347-357.
- 6) 山田隆太郎 (1993) アフリカツメガエル卵母細胞. 横田 崇, 新井賢一(編) バイオマニユアルシリーズ 4 遺伝子クローニング実験法. 羊土社, 東京, pp 151-159.
- 7) 塩川光一郎, 中村寿士 (1994) アフリカツメガエル卵への DNA および RNA 注入による遺伝子機能解析. 中辻憲夫編, 実験医学増刊, 発生工学実験法. 羊土社, 東京, pp 160-172.
- 8) 澄川勝美 (1990) レセプター mRNA 導入方法. 御子柴克彦, 畠中寛編. 実験医学別冊. 神経生化学マニユアル. 羊土社, 東京, pp 10-19.
- 9) 高橋智幸 (1990) 発現レセプターの電気生理学的検出法. 御子柴克彦, 畠中寛編. 実験医学別冊, 神経生化学マニユアル. 羊土社, 東京, pp 20-25.
- 10) Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosata, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S. (1983) Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* **302**, 528-532.
- 11) Papazian, D., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1987) Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**, 749-753.
- 12) Gurdon, J. B., Lane, C. D., Woodland, H. R. & Marbaix, G. (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **223**, 177-182.
- 13) Miledi, R., Parker, I. & Sumikawa, K. (1983) Recording of single gamma-amino-butyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* **218**, 481-484.
- 14) Masu, Y., Nakayama, K., Tamaki, H., Harada, Y., Kuno, M. & Nakanishi, S. (1987) cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* **329**, 836-838.
- 15) Jentsch, T. J., Steinmeyer, K. & Schwarz, G. (1990) Primary structure of Torpedo marmorata chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510-514.
- 16) Gunderson, C. B. & Umbach, J. A. (1992) Suppression cloning of the cDNA for a candidate subunit of a presynaptic calcium channel. *Neuron* **9**, 527-537.
- 17) Julius, D., MacDermott, A. B., Axel, R. & Jessell, T. M. (1988) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin_{1c} receptor. *Science* **241**, 558-564.
- 18) Honda, Z., Nakamura, M. et al. (1991) Cloning by functional expression of platelet-activating factor from guinea-pig lung. *Nature* **349**, 342-346.
- 19) Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R. & Nakanishi, S. (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* **349**, 760-765.
- 20) Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J. & Okayama, H. (1992) Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* **356**, 526-529.
- 21) Brown, E. M., Gamba, G. et al. (1993) Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580.
- 22) Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J. & Julius, D. (1993) Expression cloning of an ATP receptor

- from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5113-5117.
- 23) Kubokawa, K., Miyashita, T., Nagasawa, H. & Kubo, Y. (1996) Cloning and characterization of a bifunctional metabotropic receptor activated by both extracellular calcium and glutamate. *FEBS letters* **392**, 71-76.
- 24) Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. & Heinemann, S. (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* **351**, 745-748.
- 25) Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S. (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**, 31-37.
- 26) Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M. & Julius, D. (1991) Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* **254**, 432-437.
- 27) Brake, A. J., Wagenbach, M. J. & Julius, D. (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **371**, 519-523.
- 28) Takumi, T., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1988) Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* **242**, 1042-1045.
- 29) Frech, G. C., VanDongen, A. M., Schuster, G., Brown, A. M. & Joho, R. H. (1989) A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature* **340**, 642-645.
- 30) Ho, K., Nichols, C. G., Lederer, W. J., Lytton, J., Vassilev, P. M., Kanazarska, M. V., Hebert, S. C. (1993) Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31-38.
- 31) Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127-133.
- 32) Dascal, N., Schreibleymer, W. et al. (1993) Atrial G protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10235-10239.
- 33) Kubo, Y., Miyashita, T. & Kubokawa, K. (1996) A weakly inward rectifying potassium channel of the salmon brain. *J. Biol. Chem.* **271**, 15729-15735.
- 34) Canessa, C. M., Horisberger, J. D. & Rossier, B. C. (1993) Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* **361**, 467-470.
- 35) Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E. & Clapham, D. (1992) New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* **356**, 238-241.
- 36) Yokota, Y., Sasai, Y., Tanaka, K., Fujiwara, T., Tsuchida, K., Shigemoto, R., Kakizuka, A., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. (1989) Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 17649-17652.
- 37) Brooks, J., Taylor, P. L., Saunders, P. T. K., Eidne, K. A., Struthers, W. J. & McNeilly, A. S. (1993) Cloning and sequencing of the sheep pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor and changes in expression of its mRNA during the estrous cycle. *Molec. Cell. Endocrinol.* **94**, R23-R27.
- 38) Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P. A., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1993) Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802-806.
- 39) Krapivinsky, G., Gordon, E. A., Wickman, K., Velimirovic, B., Krapivinsky, L. & Clapham, D. E. (1995) The G-protein-gated atrial K⁺ channel IK_{ACh} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* **374**, 135-141.