講座

遺伝子工学実験講座

XIV. 動物細胞における遺伝子クローンの発現†

鮎沢 大

国立遺伝学研究所分子遺伝研究系

411 静岡県三島市谷田1111

Key Words: mammalian cell mutant, gene transfer, gene expression

はじめに

動物細胞で遺伝子クローンを発現させることは、基礎から応用分野にいたるまで欠くことのできない手段となっている。実験を行うためには、細胞培養技術・遺伝子工学・体細胞遺伝学など最近の先端技術を結集させなければならない。すでに多くの培養細胞系においていろいろな遺伝子クローンの発現が試みられているが本実験講座ではそれらに言及しない。筆者自身の実験系であるプリンピリミジン合成経路のとくにチミジル酸合成酵素(TS)を例にとり、遺伝子クローン発現の実験のための基本的技術について簡単に紹介する。

1. 動物細胞における遺伝子クローン発現のための基本技術

1-1 細胞培養と遺伝子受容細胞株の分離

近年動物細胞を培養する技術が急速に向上し、誰でも簡単に細胞を培養できるようになった。細胞株によって培養条件はやや異なるが、適切な培地を購入し血清を必要量加えればよい。血清のチェックは行う必要がある。

筆者は労力を最小にするために、浮遊系のマウス乳がん由来 FM3A 細胞株を通常用いている。浮遊細胞の継代は新鮮な培地で希釈するだけでよい。シャーレに接着する足場依存性細胞の場合には、トリプシンで細胞をはがす操作が加わる。また、FM3A 株は核型

(偽2倍体)が安定であり、アガロース平板培地上でのコロニー形成率(PE)が良好(〜90%)である。この二つの要素は遺伝実験に必須である。

筆者はFM3A株からTS欠損変異株(チミジン要求性を示す)を代謝阻害法を用いて分離した¹⁾。その方法を記す。培地〔ES(日水)+2%牛胎児血清〕で対数増殖する細胞へ変異原MNNG(最終1μg/ml)を3時間与えた後、細胞を遠心(1000rpm×5分)で集めチミジン20μMを含む同培地で5日間培養する。通常、細胞は10mlの培地を含むプラスチックシャーレ(100mm)に植え込み、シャーレは炭酸ガス培養器(5%CO₂, 95%湿度)内で保温(37℃)する。変異を誘発した細胞は1回培地〔ES+2%透析血清+20μMチミジン〕で洗ったのち、同培地に2×10⁶個/mlとなるように懸濁する。細胞密度は、セルカウンタまたは血球計算盤で計測する。細胞懸濁液を0.1mlずつとり、アガロース平板選択培地上へ滴下し、表面上にまんべんなく広げる。アガロース平板基礎培地の処方: オートクレーブした0.7%アガロース溶液(電気泳動用)と2倍濃度のES培地(ともに42℃保温)を等容混合し、5%透析血清を加えてから、10mlずつシャーレ(100mm)に分注し室温で固化させる。TS-変異株の選択平板はさらに20μMチミジン、0.2μMメソトレキセート(アメソプテリンも可)、1μM5-メチルトetraヒドロ葉酸を添加している。チミジン要求株の選択原理は他を参照してもらいたい^{1),2)}。約10日間培養すると、TS-コロニーの出現が肉眼で観察できる(頻度約10⁻⁵/生細胞)。コロニーをチップで吸いとり、増殖培地〔ES+2%血清+20μMチミジン〕で増幅したのち、チミジン要求性の有無を調べる。チミジン要求株はTS欠損変異株である。

† Introduction to the Experiments of Genetic Engineering. XIV. Gene expression of cloned genes in mammalian cells. Dai AYUSAWA: Department of Molecular Genetics, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka-Pref. 411, Japan.

まったく同じ選択原理で、ヒト Namalwa TS-変異株およびラット 3 Y1 TS-変異株を分離している。ヒト Namalwa 株はアガロース平板を用いたが、3 Y1 株は接着性細胞なので、変異原処理した細胞を10万個ずつ液体選択培地を含むシャーレに植え込み、コロニーの出現を待った。コロニーを分離するときは、培地を吸い取ったのち円筒（アルミ製、ワセリンを下の縁にぬる）でコロニーを仕切る。筒内ヘトリプシン液を注入して細胞を剥がし、そのまま選択培地を含むシャーレに移す。物理的な剥脱はよくない。

1・2 細胞内遺伝子導入法

細胞内ヘクローン化遺伝子 DNA を導入する方法は、現在10種以上報告されている。しかし実用的には、リン酸カルシウム共沈殿法・電気パルス穿孔法・微量注入法の3種を使い分ければ充分である。リン酸カルシウム法は装置は不要であり、壁面に接着性を示す細胞ならほとんど応用できる。しかし浮遊系の細胞やある種の細胞には使えない。細胞毒性が無視できないからである。遺伝子導入頻度は処理細胞当たり 10^{-3} 前後である。電気パルス穿孔法は細胞の種類や形状を問題にせず、遺伝子導入頻度も生細胞当たり 10^{-3} 前後でリン

酸カルシウム法に劣らない。ただし通常のパルス印加条件では細胞の生存率は約10%に低下するので、実験目的に合わないことがある。微量注入法は特定の細胞（核）ヘキャピラリを突き刺し DNA を注入するので、処理細胞数に制限があり、少し熟練を要する。受精卵や初期胚ヘ確実に DNA を注入できることが強みである。

細胞における遺伝子クローンの発現の研究には、リン酸カルシウム法と電気パルス穿孔法を併用することをすすめたい。以下に実験手順を記す。

1・2・1 リン酸カルシウム DNA 共沈殿法

本講座基礎編では、Okayama-Berg の cDNA ライブラリーから分離したヒト TS cDNA クローン pcHTS-1（図1）を遺伝子供与体として用いた実験例を述べる³⁾。高分子 DNA を遺伝子供与体として用いるときは、DNA の精製には細心の注意を払う必要があるが、プラスミド DNA など低分子 DNA を用いるときには、DNA の調製法にとくに問題はない。しかし、除蛋白質は充分に行うことが肝要である。なお、細胞 DNA などの高分子 DNA の調製法およびその遺伝子導入法については他書を参照してもらいたい⁴⁾⁻⁶⁾。

リン酸カルシウム DNA 共沈殿物は DNA 消化酵素

による分解を受けにくく、細胞の食作用によって細胞質ヘ取り込まれてから核内ヘ移行する。

<保存液>

- ① 0.5 M HEPES(Na 塩) 緩衝液(pH7.1),
- ② 2.8 M 食塩水, ③ 15 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.1), ④ 2.5 M CaCl_2 , ⑤ DNA 希釈液[1 mM Tris HCl(pH 8.0), 0.1 mM EDTA], ⑥ 滅菌水

<DNA-リン酸カルシウム共沈殿の作成>

- (1) DNA(pcHTS-1) を水で薄めて 0.8 ml(1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA) にする
- (2) 50 μl ずつ HEPES 緩衝液, 食塩水, リン酸緩衝液を加え混合する。
- (3) 最後に 50 μl の CaCl_2 溶液をすばやく加え混合する。
- (4) しばらく(5-20分)静置し, 均質な白色沈殿が生成したことを確認してから, 0.5 ml をチップでとり受容細胞(後述)の上ヘ重層する。

1・2・2 電気パルス穿孔法

本法は電気パルスによって細胞膜に穴を

図1 ヒト TS cDNA を組み込んだシャトルベクター(岡山-Berg のヒト cDNA ライブラリーよりクローニングされた7個の TS cDNA クローンの一つ)

■ ヒト TS cDNA, ▨ SV 40 初期プロモーターおよびポリ A 付着部位, □ 大腸菌ラクタマーゼ遺伝子, 細線は pBR 322 ベクター

あけ、DNA を強制的に細胞内へ移行させるものである。短時間に多くの細胞を処理できること、リン酸カルシウム法には不向きな系にも有効であるなどの長所に富むが、過度の細胞死が避けられない。

＜方法＞

(1) 対数期の細胞 (FM3A TS⁻, 3Y1 TS⁻, Namalwa TS⁻株) を集め、1 回低電解質溶液 [0.25 M マニトール, 0.2 mM HEPES (pH 7.3), 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂] で洗い、同溶液で 5×10^7 個/ml になるように懸濁する。

(2) DNA を最終 100 μ g/ml となるように加え、チェンバに移す。平行電極型チェンバが使いやすく、通常の遺伝実験では容量 40–500 μ l、電極間 2 mm のチェンバを用いる。

(3) パルス印加を 2–4 回行う。パルスは 2–3 kV/cm, 20–50 マイクロ秒の矩型波を標準として用いる。なおパルスアナライザによってチェンバ内の実測値を制御すれば、再現性ある結果が得られる。

(4) しばらく (10–20 分間) 液が乾燥しないように静置したのち、細胞を増殖培地へ植え込む。

1・2・3 リン酸カルシウム共沈殿法のための受容細胞の準備

正常培地 [ES+2% 血清+チミジン] で対数増殖する FM3A TS⁻細胞を集め、低血清培地 [ES+0.5% 血清+チミジン] で 1 回洗ったのち、同培地で 5×10^5 個/ml に懸濁する。これの 5 ml ずつを培養用プラスチックシャーレ (65 mm) に植え込む。30–60 分間培養すると細胞はシャーレの底に附着し、単層の細胞層を形成する。FM3A 細胞は本来浮遊細胞系であるが、培地の血清濃度を下げると壁面接着性を生じる⁷⁾。

ラット 3Y1 TS⁻株 (CHO 株やマウス L 細胞株も同様) の場合には、前日トリプシンで細胞をはがしたとき 5×10^5 個の細胞を 5 ml の培地 [ES+10% 血清+チミジン] を含むシャーレ (65 mm) に植え込む。当日 DNA を与える数時間前に新鮮な培地 [ES+5% 血清+チミジン] と交換する。

1・3 形質転換細胞の分離

上記の DNA-リン酸カルシウム共沈殿を FM3A TS⁻細胞の上に重層したのち 5–6 時間培養する (高分子 DNA を用いた場合は、10% DMSO を最後の 30 分間添加する)。培地を正常培地と交換して、20 時間培養を続ける。FM3A 細胞は 1 晩正常培地 (2% 血清) で培養すると、軽いピペット操作でシャーレ底から容易に離れる。パルス穿孔法の場合にも、正常培地で 20 時

表 1 TS cDNA クローン pcHTS-1 の形質転換頻度

受容体株	形質転換体/10 ⁶ 生細胞	
	リン酸カルシウム法*	パルス穿孔法**
FM3A TS ⁻	600	500
3Y1 TS ⁻	200	300
Namalwa TS ⁻	—	100

*リン酸カルシウム共沈殿 (10 μ gDNA/65 mm シャーレ) を 8 時間細胞へ取り込ませた (10% DMSO 処理最後の 30 分間)

**パルス条件: FM3A 株 50 μ 秒 $\times$ 2 回, 他 50 μ 秒 $\times$ 4 回

間培養する。

細胞を遠心で集め、培地 [ES+2% 透析血清] で 2 回洗ったのち、同培地に懸濁する (細胞密度 $2-5 \times 10^6$ 個/ml)。細胞懸濁液 0.1 ml ずつを前述の アガロース平板基礎選択培地の上に滴下し、まんべんなく表面に広げる。約 10 日間培養すると、FM3A TS⁺形質転換クロンがコロニーとなって現れる。

Namalwa TS⁻株は FM3A TS⁻株とまったく同様にして TS⁺コロニーを分離できる。3Y1 TS⁻株の場合には、DNA を導入してから 20 時間培養する操作までは FM3A 細胞の場合と同様である。翌日細胞をトリプシンではがし、2 回培地 [ES+10% 透析血清] で洗ったのち、同培地 10 ml を含むシャーレ (100 mm) に 1 万個ずつ植え込む。約 2 週間培養したのち、TS⁺コロニーを前に述べたように分離する。表 1 に、リン酸カルシウム法とパルス穿孔法による遺伝子導入の頻度を示した。

1・4 形質転換細胞の同定

選択培地に生じたコロニーが形質転換クロンであることを証明するためには、導入された遺伝子 DNA が宿主ゲノムに組み込まれているか、予想される mRNA または遺伝子産物が検出されるかどうかを調べなければならない。ここでは FM3A TS⁺クロンについて、二つの事柄について解析した結果を紹介する³⁾。

1・4・1 遺伝子産物の同定

選択平板培地の上に生じた FM3A TS⁺コロニーが実際にヒト型 TS を産生しているかどうか調べた。TS は補酵素 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸と基質アナログ 5-FdUMP と不可逆的に反応し、共有結合を介した 3 元複合体を生成する。そこで、[³²P]5-FdUMP を合成し、これに細胞抽出液と補酵素を反応させた。生

図 2 pcHTS-1 の遺伝子導入によって得られた TS⁺ 形質転換クローンにおけるヒト型 TS の検出

TS-[³²P]FdUMP-5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸三元複合体を形成させ、ポリアクリルアミド電気泳動後、オートラジオグラムを取った。TS は分子量 33 000 ダルトンのサブユニットからなる 2 量体であるため、通常 FdUMP を 1 個結合した複合体 (上のバンド) および 2 個結合した複合体 (下のバンド) の混合体が生じる。FM3A TS⁻, 遺伝子受容体; FM3A TS⁺, マウス野生型; Raji および HeLa, ヒト型対照

じた 3 元複合体を通常の 7.5% ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、ゲルのオートラジオグラムをとった

(図 2)。ヒト型とマウス型の複合体は移動度が違うために容易に区別できる。図 2 から明かなように、

TS⁺ クローンはすべてヒト型 TS だけを産生していることが分かる。

1・4・2 導入遺伝子の検出

ヒト TS を産生している形質転換クローンについて、導入遺伝子がどのように宿主ゲノムに組み込まれているかどうかサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いて調べた。DNA 抽出、制限酵素による消化、アガロースゲル電気泳動、フィルタへのサザンブロットを順次行い、標識したヒト TS cDNA をプローブとしてフィルタ上の DNA と分子雑種形成を行った。図 3 にそのオートラジオグラムを示したが、*Eco* RI (導入遺伝子を 1 か所切断する) で細胞 DNA を消化すると pcHTS-1 モノマーの長さに相当する濃いバンドが現われ、その上下にプラスミドの組込み部位から由来するバンドが散在している (図のレーン 1, 3)。他方、いくつかの TS⁺ クローンではプラスミドが 1-3 コピ

図 3 pcHTS-1 の遺伝子導入によって得られた TS⁺ 形質転換クローンにおける導入遺伝子の存在様式

DNA を *Eco* RI または *Hind* III で消化、アガロースゲル電気泳動、サザンブロットを行い、³²P-TS cDNA をプローブとして分子雑種形成を行った。pcHTS-1 の単位長は 5.6 kb。サンプル記号は図 2 に同じ

ーしか組み込まれていない(図のレーン 2,4)。宿主ゲノムへ組み込まれた導入遺伝子のコピーが1から数1000まで変化していたにもかかわらず、TS活性はあまりっていない。したがって、大部分の増幅したプラスミドは遺伝子産物を産生していないと思われる。以上の結果より、細胞内へ導入された pcHTS-1 は増幅したのちあるいはゲノムに組み込まれてから増幅されやすいことが観察された。これはベクターの性質を反映すると思われる。

2. 動物細胞における遺伝子クローン発現を用いた研究例

2.1 安定な遺伝子発現を用いた ヒト TS 遺伝子クローンの発現

TS は活発に増殖する細胞で高く、休止期あるいは分化した細胞で低いか検出されないで、汎用制がん剤の主要な標的とされてきた。変異株を用いた研究から、TS は DNA 複製の鍵酵素の一つであり、DNA 前駆体プールの不均衡を誘起することによって遺伝子および染色体変化を強く誘発することを明らかにした^{8),9)}。ヒト TS 遺伝子は前節で少しふれたように、マウス TS⁻細胞へヒト細胞 DNA を導入し、TS⁺形質転換クローンからヒト TS 遺伝子をヒトの散在性中程度反復配列 *Alu* をプローブとして回収された¹⁰⁾。

ヒト TS 遺伝子は7個のエクソンより構成される約20kbの長さの遺伝子であり(図4)、その全塩基配列

が最近決定された¹¹⁾。TS 遺伝子は細胞周期に依存した発現を示すので、細胞周期に関与する遺伝子領域を特定することを試みた。こうした目的には、TS 遺伝子を改変してから細胞周期の同調化に優れたラット 3 Y 1 TS⁻細胞へ遺伝子導入し、安定に宿主ゲノムに組み込まれた遺伝子の細胞周期依存性を調べることが常となっている。しかし、TS 遺伝子は長すぎてそのまま用いることは困難であるために、正常な遺伝子機能を保持したミニ遺伝子の作製を試みた¹²⁾。

2.1.1 方法

後述するように、ヒト遺伝子のプロモータは ATG コドンの上流約 300 塩基対 (bp) までの領域に存在することが明らかになっている。そこで、第1エクソンの5'側上流4キロ塩基対(kb)、第7エクソンの3'側下流1.7 kb を含む、イントロンをまったく含まないクローン (pmHTS-0)、第1イントロンのみ持つもの (pmHTS-1)、第2イントロンのみ持つもの (pmHTS-2) をそれぞれ作成した。図5に作成したミニ遺伝子の略図を示した。なお、遺伝子クローン作成の詳細は本講座では省略した。

基礎編で記したリン酸カルシウム共沈殿法に従って、ミニ遺伝子プラスミド DNA を FM3 A TS⁻株および 3 Y 1 TS⁻株へ遺伝子導入を行い、安定な TS⁺形質転換クローンの出現頻度を調べた。多くの実験例から、形質転換の頻度と遺伝子発現の能力とは正比例することが分かっている。実際 TS 遺伝子系について

図4 ヒト TS 遺伝子の構造

図 5 ヒト TS ミニ遺伝子のデザイン (シンボルは図 1 に同じ)

表 2 TS ミニ遺伝子の形質転換活性

遺伝子	形質転換体/10 ⁶ 細胞	
	マウス FM 3 A TS 欠損細胞	ラット 3 Y 1 TS 欠損細胞
pmHTS-1	244	90
pmHTS-2	<1	<1
pmHTS-0	3	17
pcHTS-1	120	200

リン酸カルシウム DNA 共沈殿 (5 μ g/65 mm シャーレ) を 6 時間細胞へ取り込ませた。

も、TS 活性、TS mRNA、および形質転換頻度はほぼ平行関係にある。

2.1.2 結果

表 2 に示したように、2 個の種の異なる FM 3 A TS⁻ および 3 Y 1 TS⁻ 株を受容細胞体として用いたとき、ほぼ同様な結果が得られた。なお、TS 遺伝子の対照として前述の pcHTS-1 を用いたが、この cDNA クローンは SV 40 ウイルスの初期遺伝子プロモータを利用しているために、正常なヒト TS 遺伝子に匹敵する遺伝子活性を持つ。ミニ遺伝子 pmHTS-1 は対照の pcHTS-1 と同等な遺伝子活性を示したが、ミニ遺伝子 pmHTS-2 はまったく遺伝子活性を示さず、またミニ遺伝子 pmHTS-0 は低いながらも有意に遺伝子活性を示した。したがって、ヒト TS 遺伝子発現には第 1 イントロンだけが存在すれば充分であり、またイントロンの存在は必ずしも遺伝子発現には必須でないことが明らかになった。第 1 イントロンがなぜヒト TS 遺伝子の正常な遺伝子発現に必要なかは現在分かっている。のちに説明するような CAT アッセイ法を用いて、第 1 エクソンと第 1 イントロンの境界に強いエンハンサが存在することが確認されている¹³⁾。このエンハンサは一般に受け入れられているエンハンサと違って、プロモータの下流に存在しないとエンハンサ活性を示さない。

以上の結果より、第 1 イントロンだけ含むミニ遺伝子 pmHTS-1 は正常な遺伝子発現能力を持つことが分かったが、それが正常に細胞周期に依存した調節を受

けるかどうか分からない。そこで次節では、pmHTS-1 を用いて細胞周期の移行に伴う TS mRNA の変動を解析した。

2.2 細胞周期と TS mRNA の変化

ヒト正常 2 倍体線維芽細胞を低血清培地におくと GO 期で休止する。これに血清を添加して細胞増殖を再開させると、TS mRNA の蓄積が約 6 時間後から開始し、12 時間後から DNA 合成が始まる。24 時間後には DNA 合成活性がピークに達し、このとき TS mRNA 量は GO 期の約 30 倍に増大する¹⁴⁾。上の実験条件をそのまま採用して、前節で示した正常な遺伝子発現能力を持つミニ遺伝子 pmHTS-1 が細胞周期に依存した遺伝子発現を示すかどうか、ノザンブロット法を用いて解析した¹⁵⁾。

2.2.1 方法

ミニ遺伝子 pmHTS-1 および cDNA クローン pcHTS-1 で形質転換された 3 Y 1 TS⁺ 細胞集団 (この実験では細胞のクローニングを行わない) を培地 [ES+10% 牛胎児血清] でコンフルエント (confluent) の手前まで増殖させた。遺伝子受容体 3 Y 1 TS⁻ 細胞の培養には、同培地へチミジンを添加した。培地を捨て、1 回 PBS で細胞表面を洗ったのち、低血清培地 [ES+0.1% 血清 (3 Y 1 TS⁻ 株はチミジン)] を加えた。2 日目と 4 日目に新鮮な同培地で交換し、5 日目に半分の枚数のシャーレ (通常 10 枚) に血清を最終 10% となるように加え、24 時間後にラバーポリスマンを用いて細胞を底からはがした。細胞を遠心で集め、ペレットへ 5 ml の細胞溶解液 GADE [8 M グアニジン塩酸, 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2), 1 mM ジチオスレイトール, 20 mM EDTA] をミキサーで混合しながら加え、細胞を完全に溶かす。超音波処理 (1 分間) を行い、DNA を細片化したのち、0.6 容量のエタノールを加え -20 °C に静置 (2 時間以上) する。冷却遠心 (11 000 rpm × 20 分) で沈殿を集め、風乾後再び 5 ml の GADE を加え沈殿を溶解する。これに 0.6 容量のエタノールを加え、同様にして沈殿を回収したあと、沈殿を溶液 [1 mM EDTA (pH 8.0) + 0.1% SDS] に加温 (65 °C, 30 分) しながら溶解させる。フェノール (0.1 M Tris HCl, pH 9.0, 飽和) で 1 回抽出したのち、水層へ 2 容のエタノールを加え、-80 °C に静置したのち、沈殿を遠心で集める。沈殿は風乾後水に溶かし、冷凍保存

する。以上の RNA の精製の操作は、リボスクレアーゼの混入をできるだけ防ぐよう努力する。器具はオートクレーブしたものかあるいはディスポーザブルなものを用い、溶液はオートクレーブをかけて使う。

つぎに、RNA サンプルの電気泳動および RNA のノザンブロットを行う。アガロースゲルの作り方：0.65 g のアガロースを 36 ml の水に加えオートクレーブし、5 ml の 10×MOPC 溶液[0.2 M MOPS(pH 7.0), 150 mM 酢酸ナトリウム, 10 mM EDTA] と 9 ml のホルムアルデヒド原液(37%)を加えて泳動用の箱へ流し込み固化させる。この間に、RNA サンプルを作る。RNA 溶液を 4.5 μ l (20 μ g RNA を含む) とし、これに 2 μ l の 10×MOPC 溶液、3.5 μ l のホルムアルデヒド原液、10 μ l のホルムアミドを加え混合する。この混合物を 60℃ で 15 分間加熱したのち、氷上で急冷させる。ついで 2 μ l のローディング溶液(50% グリセリン, 1 mM EDTA, 0.4% プロモフェノールブルー, 0.4% ザイレンシアノール)を添加してから全量をアガロースゲルの穴に入れる。1×MOPC 溶液を泳動緩衝液に用いて 3-4 時間 100V で電気泳動を行う。ゲルを取り出し、サザンブロット(DNA の場合)法と同じ要領で分離した RNA をフィルタへ移す(ノザンブロットという)。DNA のサザンブ

ロットと異なり、ゲルの前処理は不要である。ニトロセルロースを用いるときは 20×SSC をブロットニングに用いるが、筆者が通常用いている Gene Screen (NEN) ナイロンフィルタの場合は、マニュアルに従って 0.025 M リン酸緩衝液(pH 6.5)をトランスファおよびフィルタの洗いに用いている。いままでの DNA あるいは RNA のフィルタ上へのトランスファは液の浸透現象(キャピラリブロットニング)を利用したものであるが、最近では真空ポンプを使った真空ブロットニングがとって代りつつある。RNA のフィルタへの固定は乾熱(80-90℃, 2 時間)または UV 照射を用いる。

つぎに、ヒト TS cDNA を 32 P で標識し、それをプローブとしてフィルタ上の TS mRNA と DNA-RNA 分子雑種形成を行うが、どんな方法でもかまわない。筆者は、分子雑種形成およびフィルタの洗浄ともマニュアルの方法に従っている。なお、プローブの標識法、分子雑種形成、フィルタの洗浄などの詳細は、すでに前号で紹介されているので省略した。

2.2.2 結果

図 6 にフィルタのオートラジオグラムを示した。まず cDNA クローン pcHTS-1 の発現は、S 期の細胞よりも GO 期の細胞で高い値を示した。細胞当たりの

RNA 含量は、GO 期の細胞より S 期の細胞のほうが 2-3 倍多い。したがって、もし TS mRNA 量が細胞当たりで一定ならば、全 RNA で補正すれば上記のような結果が期待できる。ミニ遺伝子 pmHTS-1 の発現は GO 期では検出されないほど低く、血清添加によって誘導された。したがって、ヒト正常 2 倍体細胞の TS 遺伝子と同様に、ミニ遺伝子 pmHTS-1 は当初の計画の細胞周期の研究に使えることが実証された。なお都合がよいことに、遺伝子受容体 3Y1 TS-細胞ではバンドが見られなかった。また、ミニ遺伝子から読まれる TS mRNA の長さは 1.6 kb であり、正常な TS 遺伝子から由来する mRNA と変わらなかった。

図 6 3Y1 TS⁺ 形質転換細胞におけるヒト TS mRNA 産生の細胞周期依存性

TS cDNA クローン pcHTS-1 およびミニ遺伝子 pmHTS-1 によって形質転換されたラット 3Y1 TS⁺ 細胞集団を低血清培地で GO 期に同調し、それぞれ片方 10% 血清を添加して増殖刺激した。24 時間後に細胞から全 RNA を抽出し、20 μ g ずつアガロースゲル電気泳動、ノザンブロットを行い、 32 P-TS cDNA をプローブとして分子雑種形成を行った。矢印、TS mRNA。HeLa, ヒト対照; noDNA, 受容体 3Y1 TS⁻

た。cDNA クローン pcHTS-1 から生じる TS mRNA は 1.6 kb よりやや長い。

ここで、TS mRNA が細胞内に蓄積する理由についてちょっと触れる。mRNA が増大する理由として、一つは遺伝子の RNA ポリメラーゼによる転写が高まることであり、もう一つは合成された mRNA の転写後の調節が変化することが挙げられる。増殖必須遺伝子および分化関連遺伝子とも上の機構の一方または両者を使い分けているが、ヒト正常2倍体細胞を用いた研究では TS 遺伝子も上の両者を使ってその mRNA 量を調節していることが分かっている。

2.3 一時的形質発現を用いた遺伝子クローンの発現

遺伝子クローンの発現法には、細胞へ取り込まれた遺伝子が宿主ゲノムへ組み込まれる前に、遺伝子発現をみる方法がある¹⁶⁾。遺伝子は細胞内へ導入されるとただちに発現を開始し、約24時間後に細胞当たりの遺伝子産物は極大値を示す。その後48時間まで、遺伝子産物量はゆっくりと減少する。筆者はこの種の実験では、生存率の高いリン酸カルシウム共沈殿法をおもに採用している。すでにこの方法を用いて、TS mRNA の5'側非翻訳領域に存在する特異な繰返し構造が、TS産生に影響を与えること見出し出している¹⁷⁾。ここでは、CAT アッセイを利用してヒト TS 遺伝子のプロモータ領域を決定した実験例を紹介する¹³⁾。

2.3.1 方法

TS cDNA クローン pcHTS-1 と同様に、SV 40 初期遺伝子プロモータの下流に細菌クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を連結したプラスミド (pSV 2 CAT) は、動物細胞内で CAT 遺伝子を発現する。このプラスミドのプロモータ部分を削除したクローン pSV 0 CAT は、欠失部位へ検定する DNA 断片を挿入することによって、そのプロモータ活性を調べられる。そこで、図7に示したようなヒト TS 遺伝子の ATG コドンの5'側上流のいくつかの DNA 断片を pSV 0 CAT へ挿入し、それぞれのプラスミドクローンを調製した。

ヒト HeLa 細胞を 10 ml の培地 [ES+10%血清] を含む 100 mm シャーレに植え込み、前コンフルエントの状態まで増殖させる。新鮮な培地と交換してから、プラスミド DNA をリン酸カルシウム共沈殿法を用いて細胞へトランスフェクションを行った。5-6 時間 DNA を取り込ませたあと、培地交換を行い、24 時間後に細胞を集める。方法の詳細は基礎編に記したと

図7 CATアッセイ法を用いたヒト TS 遺伝子のプロモータ領域の決定

矢印で示した DNA 断片をプロモータを除去した pSV 0 CAT に挿入し、CAT 活性を測定した。詳細は本文を参照。実線は CAT 遺伝子と同方向へ、波線は逆向きに挿入した

おりである。

細胞を PBS で 1 回洗ってから 0.25 M Tris HCl (pH 7.8) 溶液に懸濁し、3 回凍結融解を繰り返したのち、超音波処理 (10 秒間) を行い均一な細胞破砕液を作る。ついで蛋白質濃度を測定しておく。酵素反応液の組成は、150 μ l の細胞破砕液 (0.25 M Tris HCl (pH 7.8) で薄める)、20 μ l アセチル CoA、4 μ l の 14 C-クロラムフェニコール (2.22 GBq (60 mCi)/mmol) のとおりで、これを 37 $^{\circ}$ C で 1 晩保温する。反応物は 2 回 0.5 ml の酢酸エチルで抽出してから、スピードバックで乾固し、最後に 30 μ l の酢酸エチルに溶解した。一部をシリカゲル薄層プレートの上にスポットし、クロロホルム：メタノール (19:1) で 3 時間展開後オートラジオグラムをとった。反応産物 (アセチルクロラムフェニコール) に由来するスポットをデンスitometa で定量し、数値化した。

2.3.2 CAT アッセイ

結果を図7の右端に示した。数値は対照の pSV 2 CAT の示す CAT 活性を 100% とし、検定したプラスミドの活性を % で表してある。図から明らかなように、開始コドン ATG の上流 1 kb 以内に確かにプロモータが存在することが示された。また、DNA 断片を逆向きに検定プラスミドへ挿入してもプロモータ活

Human	-520	(5')	CTGGCGGTTTTTAATCAA	-503
Mouse	-465	(5')	CAGAAGGTCCTCTACCCA	-448
Human	-502	GTAGAAAAGCTGCA--TTATACACT-TGCTTCGGTTGCTTCAAGTGAACGAAGAAATG	-446	
Mouse	-447	ATTCATTCTATGAAGCCAAATTAAGTGTGGTTCCTAAACTACATAAGATCCAAGTACAA	-388	
Human	-445	GAAATGCAAAATCCCTTATTAGTTAGTGAAGAAAGATCTCAAAACAGC-AGTTTGTG	-390	
Mouse	-387	GTATCGTATAAGCCAAAGGCTCTTTTGAAGACTGGGTCTCAAGTACCTAGGCTGGCCTTG	-328	
Human	-389	ACAAGACCGCAGGAAACGTGGGAACGTGCTGCTG-GCTTAGAAGAGCGCGGTGCA	-332	
Mouse	-327	AAGTTGCTATGAAGTGAAGGCTTGCCTTAAACTCCAGATCCTCTAGCCGACTCAATCTC	-268	
Human	-331	CAGACGGTTCCTCCAAAGGCGCAGTCTTCCCAAGCCACCGCACT--GCATCCAGGTTC	-275	
Mouse	-267	CAGGAGCTGGGATTTAATGGCATGCACTCCCAACCCCTGATCTCATAGGCTCTTAATGCC	-208	
Human	-274	CGGGTTTCTTAAGACTCTCAGCTGTGGCCCTGGGCTCCGTTCTGTGCC--ACACCCGTG	-218	
Mouse	-207	ATAATAGGCTAA-ATACAGATTTGAGAAAGTGGG-CAGGTCTTGGCTTGCAAGCTGTA	-151	
Human	-217	GCTCTCGCTTTCCTCCCTGGCGGACCTCT--CTAGAGCGGGGGCCGCGCAACCCGCC	-160	
Mouse	-150	ACCACTTC-TGTCACGTGGGGCGGGTCTGCCACGGATTCTGGCGGCCG-GAAGTTTCC	-93	
Human	-159	GAGCAGGAAGAGGCGGAGCGGGACGGCCGACGGCCGCGGAAAAAG-GCGCGCGGAAGGGGCTCTG	-101	
Mouse	-92	CAGCAGGAAGAGGCGG--GCTGG-TGTTGGAGGAAAAAGAGCGCCAGGAA--GGTCTCTG	-40	
Human	-100	CCA-----CCGC-GCCACTTGGCTGCCTCCGT-----CCCG	-70	
Human	-69	CCGC-GCCACTTGGCTGCCTCCGT-----CCCG	-42	
Human	-41	CCGC-GCCACTTGGCTGCCTCCGTCCCCGCGCGCCGCGGCC	-1	
Mouse	-39	GTTTTCGCTGACTACTACTGCTGCCA---GACTG-CTCCGT-----	-1	
Human	+1	ATG (3')		+3
Mouse	+1	ATG (3')		+3

図 8 ヒトおよびマウス TS 遺伝子のプロモータ領域の塩基配列
 矢線はヒト遺伝子の ATG 上流に存在する繰返し配列 (図 4 参照);
 ▼, △, 転写開始部位; 下つき波線, GC ボックス (GGGCGG); マウス
 TATA ボックス (-381--298); マウス CAAT ボックス (-449--446)。

性を示すことも示された。増殖必須遺伝子のプロモータでは両方向へプロモータ活性を示す例はすでに報告されている。プロモータ領域をさらに絞るために、前述のミニ遺伝子 pmHTS-1 の ATG 上流を欠失させたクローンをいくつか作成し、その形質転換能力を調べた。その結果、ATG の上流約 300 bp が残っていれば、TS 遺伝子は発現されることが分かった。こうして決定されたヒト TS 遺伝子のプロモータ領域の塩基配列をマウスの相当する塩基配列とともに図 8 に示した。一般に、分化遺伝子のプロモータには TATA および CAAT ボックスが存在し、増殖必須遺伝子のプロモータには逆に TATA あるいは CAAT ボックスが存在せず、また GC 含量が高く GC ボックス (SP1 の結合部位) が存在する。ところが不思議なことに、マウス TS 遺伝子のプロモータ領域には TATA, CAAT および GC ボックスが見られ、ヒト TS 遺伝子のプロモータ域には特徴的な塩基配列は何も見られなかった。したがって、現時点では塩基配列からのもの

ごとを論じることは危険である。もし意味のある塩基配列を想定したならば、実際に細胞内因子がそれに作用するかどうか確認しなければならない。一時的形質発現法は、トランスに作用するような細胞内因子を推定するために有効である。細胞内因子が結合すると考えられる DNA 断片と正常な遺伝子を同時に細胞内へ導入 (コトランスフェクション) してやれば、細胞内因子は競合的に DNA 断片に奪われ、導入遺伝子の発現が弱まる。つぎに、細胞抽出液とその DNA 断片と反応させれば、DNA 断片のどこに細胞内因子が結合するか調べられる (Ⅶ章 (Vol.37, No. 4 掲載) 参照)。

おわりに

本稿ではクローン化された遺伝子の発現を例にとったが、細胞から抽出した高分子 DNA を遺伝子供与体として、

特定の遺伝子の発現を調べることもできる。この場合、適当な選択手段あるいは検出手段があれば、遺伝マーカーは増殖必須遺伝マーカーか分化遺伝マーカーかは問わない。たとえば、適当なマウス細胞へヒト DNA を導入し、分化遺伝マーカーの出現を調べることによって、その構造遺伝子および調節遺伝子の役割を知ることができる。導入されたヒト DNA を回収すれば、遺伝子クローニングが完了したことを意味する。

いままでの遺伝子発現の研究では、遺伝子の宿主ゲノムへの組込みは非相長的遺伝子組換えにまかされたものであり、導入部位や頻度には関心が払われていない。最近、細胞へ導入された遺伝子と宿主ゲノム上の対立遺伝子との間の相長的遺伝子組換え (targeted recombination) が可能となりつつある。これを利用すると、欠損遺伝子の正常化、正常遺伝子の破壊により細胞および個体のレベルで未知遺伝子の機能を知ること、特定部位への遺伝子導入など多くのことが実現で

きる。今後、遺伝子発現の研究もゲノム上の本来の場でかつ自然に近い姿で行われるようになるだろう。

文 献

- 1) Ayusawa, D., Koyama, H., Iwata, K. et al.: *Somatic Cell Genet.*, **7**, 523-534 (1981)
- 2) 瀬野悍二, 鮎沢 大:「培養突然変異株細胞とその応用, 遺伝子のクローン化と解析, 医科分子生物学」, 村松正実編, pp.180-195, 南江堂, 東京 (1987)
- 3) Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 14361-14364 (1984)
- 4) 鮎沢 大:蛋白質・核酸・酵素, 別冊,**27**, 345-347 (1984)
- 5) 鮎沢 大:細胞工学 別冊, **4**, 11-22 (1988)
- 6) 鮎沢 大: *BIOMedica*, **3**, 156-161, 382-387, 596-600 (1988)
- 7) Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 48-53 (1983)
- 8) 堀 雅明, 鮎沢 大, 瀬野悍二:細胞工学, **4**, 666-678 (1985)
- 9) 鮎沢 大, , 瀬野悍二, 堀 雅明: 遺伝, **39**, 105-111 (1985)
- 10) Takeishi, K., Ayusawa, D., Kaneda, S. et al.: *J. Biochem.*, **95**, 1477-1483 (1984)
- 11) 金田澄子, 竹石桂一, 鮎沢 大, 他: 第46回日本癌学会総会記事, p.133 (1987)
- 12) Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K. et al.: *Genome*, **30**, Suppl. 1, p. 234 (1988)
- 13) 金田澄子, 鮎沢 大, 瀬野悍二, 他: 第11回日本分子生物学会年会プログラム講演要旨集, p. 221 (1988)
- 14) Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H. et al.: *J. Mol. Biol.*, **190**, 559-567 (1986)
- 15) Ayusawa, D., Kaneda, S., Shimizu, K. et al.: *Cell Struct. Func.*, **13**, 348-349(1988)
- 16) Kaneda, S., Takeishi, K., Ayusawa, D. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **13**, 2035-2043 (1985)
- 17) 鮎沢 大, 金田澄子: 組織培養, **11**, 207-212 (1985)