

λ gt11 ライブラリーを使用した心筋の α -アクチニン cDNA の単離 －熊本地震後の研究－

豊田 直二（熊本学園大学社会福祉学部教授）

Isolation of cardiac α -actinin cDNA with λ gt11 library after Kumamoto earthquake

Naoji TOYOTA

はじめに

熊本県に 2 回にわたり震度 7 クラスの大地震があった（2016 年 4 月 14 日および 16 日）。余震も激しく、アパートの部屋もいつ倒壊するか分からないので自家用車に泊まった。食事にも満足にとれず、公園の炊き出しに並び、やっとお結びを得ることができた。その後、大学に来てみると研究室はドアが開かなくなっていた。体当たりしてようやく開けることができた。ドアの下には分厚いカタログ類が落ちて重なり、ロッカーも移動して倒れ、ドアをふさいでいた。ドアから 4 メートルの机までたどり着けなかった。コンピュータ 2 台が机から落ち、コードでぶら下がっている状態だった。しかしスイッチを入れると正常に動きだし安心した。その他、機械類、ガラス器具とアクリル樹脂機器はかなりの数が破損していた。

少し落ち着くと今までの研究を考えるようになった。たしかテーマは横紋筋の α -アクチニンだった。 α -アクチニンは横紋筋の Z 板に存在し、Z 板の主要蛋白質であり、アクチンフィラメントを強固に結合している。横紋構造を特徴づける蛋白質である（図 1）。

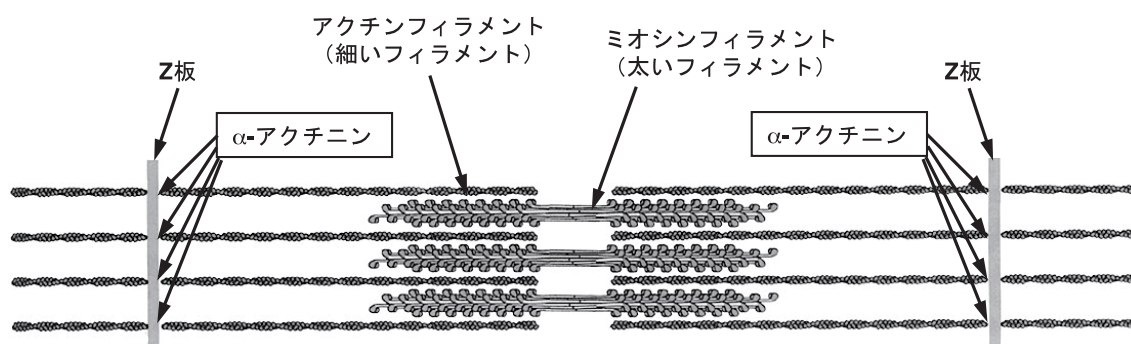


図 1、 α -アクチニンは筋原繊維の Z 板の主要蛋白質であり、アクチンフィラメントを強く結合している。 α -アクチニンは横紋筋の横紋構造を特徴付けている重要な蛋白質である。

α -アクチニンはこれまでによく調べられた蛋白質であり、4 種類の異なったアイソフォーム (分子種: α -アクチニン 1、2、3、4) がある。これらの α -アクチニンはそれぞれに対応した遺伝子 (ACTN1、2、3、4) から合成されることが分かっている。ACTN1 は骨格筋以外に発現し、ACTN2 は骨格筋、心筋などに発現する。ACTN3 は速筋繊維のみに発現している。ACTN4 は平滑筋に存在する⁽¹⁾。しかしこれらは主に哺乳類で調べられたもので、当研究の材料であるニワトリではやや異なっている。ACTN4 は平滑筋の他に骨格筋にも発現している。心筋では α -アクチニン 2 か 4 あるいは未知の α -アクチニンなのか、まだ十分に調べられていない。

培養心筋細胞を顕微鏡下で観察すると、それぞれの細胞は個別なリズムで拍動している。しかし細胞が接触するとそれらの細胞の拍動リズムは同調することが知られている⁽²⁾。心筋細胞が接触した部分には介在板が形成され Z 板のような構造もでき、そこから各細胞の長軸方向に筋原繊維が形成される。Z 板の主要成分は α -アクチニンであることから、この蛋白質が筋原繊維形成と同調拍動に大きな役割をしていると思われる。また Z 板の内部構造は不明な点が多く、横紋構造に残された大きな課題である。光学顕微鏡では心筋の Z 板は厚く、骨格筋は薄いので、心筋の α -アクチニンは骨格筋と異なると考えられる。心筋の Z 板は厚いので骨格筋より多くの構成要素から成り、それらの要素の結合領域などもあると思われ、骨格筋より複雑であると予想される。このように心筋の α -アクチニンに関しては調べる点が多い。当研究はニワトリの心筋と骨格筋の α -アクチニン cDNA を作成し、それらの共通点と相違性について調査することを目的としている。

cDNA の一般論

逆転写酵素と cDNA

一般論としてゲノム DNA の暗号は転写酵素により mRNA に転写され、転写された暗号はリボソームの上で翻訳され、蛋白質に合成される。mRNA の分解酵素 (RNase) はガラス器具や手など、いたるところに存在し、mRNA を分解してしまうので扱いがとても難しい。しかし逆転写酵素が発見され、mRNA を分解されにくい DNA に置き換えることができるようになり、安定して遺伝子組み替ができるようになった。この様に mRNA を鋳型として逆転写酵素によって作られた DNA を complimentary DNA (cDNA; 相補的 DNA) という。逆転写酵素と cDNA は分子生物学を飛躍的に発展させた物質として良く知られている。

プラスミッド

基本的に cDNA を増やすにはバクテリア (大腸菌) を使用する。大腸菌には本来のゲノム DNA とは別にプラスミッドと呼ばれる小型の DNA (4-6kb) が存在する。大腸菌は増殖速度が早いので、プラスミッドの複製も早い。しかもたくさん複製する。これを利用してプラスミッドに cDNA を組み込むと cDNA を多く調製することができる。心筋の mRNA を調製し、cDNA を作り、プラスミッドに組込んだ物は、心筋の蛋白質について様々な情報が詰まっている。これは多くの情報を持っているという意味で心筋の cDNA 図書館 (ライブラリー) という。このライブラリーから特定の蛋白質の cDNA を選別 (スクリーニング) す

ることができる。スクリーニングの手法は様々で、ここでは省くが、すでに遺伝子組み換え技術では確立した方法となっている。

バクテリオファージ

ここで使用するバクテリオファージはλgt11（約 43.7kb）である。ファージ DNA はプラスミッドの DNA より大きいので、長い cDNA を組込むことができる。ファージはいわば大腸菌のウイルスの様な物でバクテリアに感染し、増殖する。λファージは頭部と尾部がある。頭部は蛋白質の正確な多面体で覆われていて、ここに DNA が入っている。尾部が大腸菌に付着すると DNA を菌へ注入する。大腸菌内ではファージ DNA が複製し、菌内の蛋白質を使ってファージを増殖させ、菌は破裂してしまう。バクテリアの外に出た菌はまた別の大腸菌へと感染してゆく。大腸菌への感染方法もプラスミッドより容易となる。プラスチックシャーレにバクテリアとファージを含んだ培地をまくと、バクテリアがシャーレ全体にはえる。ファージが感染していると直径 1mm 程度の透明な穴（プラーク）が開き確認することができる。

λgt11 には lacZ 遺伝子（β-ガラクトシダーゼ）が組み込まれている。lacZ はアオカビの緑色になる遺伝子で、ここに cDNA を組み込むクローニングサイト（EcoRI site）が設けられている（図 2 a）。もし cDNA が組み込まれていなければ lacZ はそのまま発現し、緑色のプラークが出る。cDNA が組み込まれていれば lacZ は分断され、無色透明のプラークになる。

λgt11 のもう一つの特徴は lacZ と cDNA の融合蛋白質を作ることである（図 2 b）。λgt11 の心筋 cDNA ライブラリーには心筋のミオシン、アクチン、α-アクチニンなど様々な蛋白質の cDNA 含んでいて、それぞれの cDNA と融合蛋白質を作る。このライブラリーを α-アクチニン抗体を使ってスクリーニングした場合、α-アクチニン融合蛋白質のプラークが抗体と反応すれば、そのプラークが α-アクチニンの cDNA を含んでいることになる。実際は緑と無色のプラークが混在し、そこから α-アクチニン抗体と反応したプラークを分離する。

α-アクチニン cDNA のクローニングの実際（使用する試薬は下に記載）

既に述べたように抗体を使って cDNA を単離するには λgt11 の cDNA ライブラリーが必要になる。ライブラリーは 10 年以上市販されていないので自分で作成することにしたが、なかなかうまくいかない。しかし地震の後、奇跡的に以前使用していた λgt11 cDNA ライブラリーが見つかった。冷蔵庫の中は薬品も散乱しているだろうと思い、扉を開けると、中央に小さなエッペンドルフチューブが 2 本落ちていた。なにかなと思って拾うと十数年前に購入した、ニワトリ心臓 λgt11 cDNA ライブラリーだった。そのほかにニワトリ 10 日胚全身の λgt11 の cDNA ライブラリーもあった。熊本へ引っ越す時に捨てたと思い込んでいたライブラリーがそこに有った。「私を使ってください。」と言っているように思えた。それ以外の薬品は何事もなかったように整然と冷蔵庫に存在していた。誠に不思議だ。

以前この λgt11 ライブラリーと抗体を使用して心筋と骨格筋のトロポニン（T, I, C）の cDNA を単離したことがある（3-7）。しかし約 20 年前の λgt11 の cDNA ライブラリーはまだ使えるか分からないが、これを使うことが近道と考えた。骨格筋の α-アクチニンは以前に

精製し、抗体を作成していたので、この抗体を使って α -アクチニンの cDNA を単離することにした。

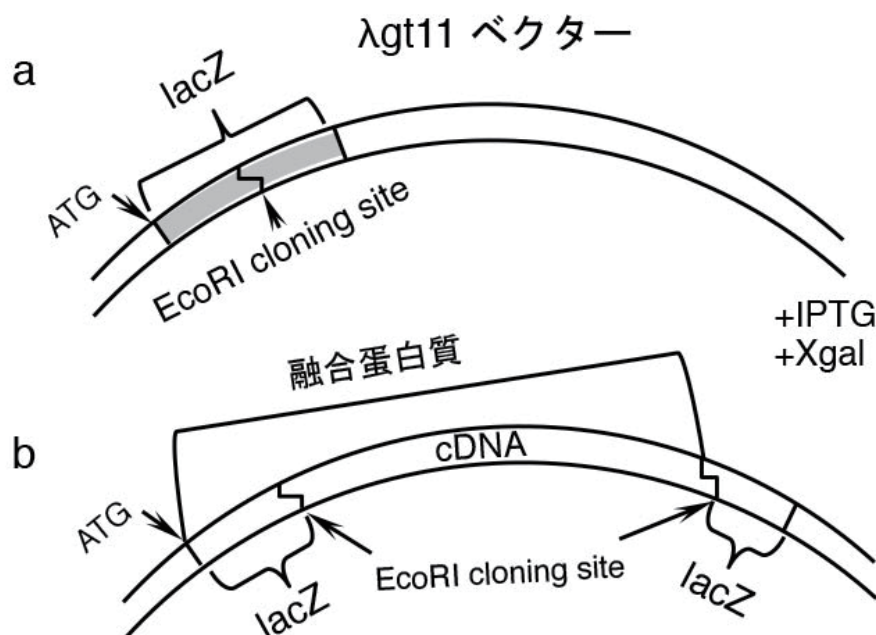


図 2. λgt11 にはアオカビの緑色を発現する遺伝子 lacZ が組み込まれている。λgt11 をホスト Y1090 に IPTG と Xgal と共に感染させると lacZ が発現し、緑色のプラークが出る (a)。lacZ には EcoRI サイト (cDNA を組み込める場所) があり、ここに cDNA を組み込むと、lacZ は分断され、緑色とはならず、透明のプラークとなる。lacZ 遺伝子の先端には蛋白質合成開始の暗号 (ATG) が有り、後ろにつながる cDNA との融合蛋白質をつくる (b)。

方法

1. 抗体処理

λgt11 ライブラリーから抗体を使用して cDNA を単離する場合、重要な処理がある。めんどくさくても目的の蛋白質、抗原を精製し、ポリクロナール抗体を作成する。あるいは目的のポリクロナール抗体を持っている研究者に相談し、譲ってもらう。ポリクロナール抗体は抗原全体に複数の認識部分が存在し、cDNA にヒットする確率が高い。モノクロナール抗体を使用した例もある⁽⁸⁾。

ポリクロナール抗体を使う場合、抗体に吸収処理をする必要がある。ポリクロナール抗体はウサギ、ラット、ヤギ、ヒツジなど動物を免疫し、その血清から作られる。これらの動物は腸内に多種類の細菌を持っており、それら菌に対する自己免疫抗体を作っている。自己抗体の中には λgt11 のホスト Y1090 と反応するものが混在していることになる。そのまま使うとすべてポジティブ反応になりクローニングはできなくなる。

これを避けるため Y1090 との共通抗原を取り除く吸収操作を行う。操作は簡単で Y1090 を 300ml LB で 2 本オーバーナイト培養し、500 × g、10 分遠心し、沈殿をそれぞれ 5ml PBS に溶かす。抗体 5ml に Y1090 1 本分を加える。室温に 30 分放置し、4℃で 3 時間放置する。500 × g、10 分遠心して上清を取る。再度残りの Y1090 を加え、同様に反応させ 700 × g、20 分遠心して上清を使う。たいていこれで共通抗原は取り除けるがスクリーニングしてまだ全体にポジティブ反応がでるようなら再度吸収する。

2. スクリーニング

150 × 15mm のプラスチックシャーレに LB bottom agar を注ぐ。厚さ 4-5mm 程度でよい。4-6 枚程度作る。固まったらパラフィルムでシールし、上下逆にして 4℃に保存する。ふたの裏に水滴が付くようにし、寒天表面は乾いた状態にする。1 週間程度使用可能

a) Y1090 をおこす

同様に 90mm プラスチックシャーレに LB bottom agar を注ぎ、パラフィルムでシールし、上下逆にして 4℃に保存しておく。-80℃にストックしておいた Y1090 を白金耳で取り、寒天表面になすりつける。37℃で 24 時間程度保温し、Y1090 のコロニーが分散して出るようにする。このディッシュは再度パラフィルムでシールし、使用するまで上下逆にして 4℃に保存する。約 1 ヶ月使用できる。

50ml のディスポーザブルプラスチックチューブに LB を 20 ml を加え、Y1090 の 1 コロニー加える。さらに 200 μl の 1M MgCl₂、200 μl の 20% Maltose、20 μl の 25mg/ml の ampicillin を加え 37℃でオーバーナイト（約 16 時間）培養する。

50ml チューブが充分濁って菌が繁殖していることを確認し、500 × g、10 分遠心する。沈殿した菌を 5ml の 10mM MgSO₄ に溶かし、4℃に保存する。2-3 日は充分使用できる。

b) λgt11cDNA ライブラリーを Y1090 に感染させる。まず保存しておいた 150 × 15mm のプラスチックシャーレの bottom agar プレートに 42℃のインキュベーターに入れ、暖める。その他、振とう型ウォーターバスを 42-50℃にし、さらに top agar 用ウォーターバスを 50℃にする。

LB bottom agar を注いだプラスチックシャーレを取り出し、agar 表面を観察し、水滴などが落ちていないことを確認する。シールをはがし、上下逆（agar 表面は下向き）にしてインキュベーターに入れ、42℃で保温する。

λgt11cDNA ライブラリーを 1/10²、1/10⁴、1/10⁶、1/10⁸ の連続希釈液を作る。薄める時は SM 溶液を使用する。

100ml の Top agar を溶かし、50℃に保温する。これに 1ml の 1M MgCl_2 、0.1ml の 25mg/ml Ampicillin を加える。

15ml のディスポーザブルプラスチックチューブに 226 μl の Y1090 と希釈した $\lambda\text{gt}11\text{cDNA}$ ライブラリーを 1 μl を加え、37℃で 20 分インキュベートする。振とうウォーターバスでやや激しくゆする。

暖めていた bottom agar のプレートを取り出し、agar 面を上にしておく。

20 分後、15ml チューブへ 7.5ml の top agar、140 μl の X-gal と 140 μl の IPTG を加える。キャップを付け 2 回逆転させてよく混ぜ、すぐ bottom agar へ注ぐ。Agar がプレート全体へいきわたるよう充分注意する。表面が平滑なことが重要で、そのために bottom agar を暖めておくことが重要になる。

泡があればライターの炎を近づけつぶしておく。

10 分ほど室温で固め、42℃のインキュベーターで 3.5-4 時間保温する。約 3.5 時間で agar 面が白くなってくる。これは Y1090 が育ってきたもので、そこに小さな透明な点（プラーク）が見えてくる。透明なプラークは $\lambda\text{gt}11$ に cDNA がインサートされているもの、緑色のプラークは $\lambda\text{gt}11$ のみで cDNA がないものである。緑色が出てくるのは少し時間がかかる。

ここでは $\lambda\text{gt}11\text{cDNA}$ ライブラリーをどの程度希釈して感染させれば良いかを見る。プラークが重ならない程度の希釈濃度を選ぶ。希釈が決まれば、同様に Y1090 に $\lambda\text{gt}11\text{cDNA}$ ライブラリーを感染させる。その際にはプラークのホワイトブルーは必要ないので、X-gal と IPTG は加えない。

c) ニトロセルロース膜の IPTG 処理

42℃、3-4 時間待つ間に Whatman のニトロセルロース膜、直径 132mm を 10mM の IPTG に浸した後、乾燥させておく。

プラークが見えてきたらインキュベーターからディッシュを取り出して、agar 面にニトロセルロース膜を広げる。全体に広がるよう、しわがよらないよう充分注意する。

温度を下げ、37℃でさらに 3-4 時間インキュベートする。IPTG の存在下で融合蛋白質が発現しニトロセルロース膜へ写し取られる。

d) 抗体の反応

基本的に Western blotting と同じ。Vectastain ABC elite kit (フナコシ) を使用する。約 3-4 時間後、ニトロセルロース膜を注意深くはがし、agar に接していた面を上にし、別々の容器 (150mm プラスチックシャーレーなど) に入れ、処理する。以下全てニトロセル

ロース膜 1 枚についての処理である。

10ml の TBST に浸し、シーソー型のロッキングミキサーで 5-10 分間ゆする。次に TBST+3% の BSA に取り替え 15 分揺する。

10ml TBST+1% BSA に取り替え、2 μ l の α -アクチニンのポリクロナール抗体を加える。抗体の濃度は蛍光抗体法で確実に観察できる濃度にする。

さらに Goat の血清 (15 μ l/10ml TBST) を 5 滴加える。

抗体は 4℃ で overnight シーソー型のロッキングミキサーでゆすりながら反応させる。もっと長くても問題は起きない。

抗体は再使用のため保存する。

10ml の NNP 液で洗う。5-10 分ロッキングミキサーでゆする。これ以降 NNP を使用する。TBST は界面活性剤 Tween 20 が含まれているので抗体も流してしまう可能性がある。

Biotinylated anti-mormot IgG を 15 μ l くわえ、45 分ゆすりながら反応させる。

次に 10ml の NNP を加え 5-10 分、3 回洗う。

ゆすっている間に avidin-HRP (Vectastain ABC elite kit の A 液 B 液を各 1 滴、10ml の NNP 液に溶かし、30 分反応させた溶液) を 10ml 加える。

45 分ゆすりながら反応させる。10ml の NNP を加え 5-10 分、3 回洗う。

e) 発色

Diaminobenzidine (DAB) 溶液をつくる。(DAB は発がん性があるのでビニール手袋を装着して作業する) 100ml のメスシリンダーに 100mg の DAB を加え、20ml 程度の蒸留水に溶かす。1M Tris pH7.6 を 10ml 加え、蒸留水で 100ml にする。

3% の H₂O₂ (原液の H₂O₂ を 10 倍に薄めたもの) を 650 μ l 加える。直ちにシリンダーをパラフィルムで押さえ、逆転させて混ぜる。100ml でニトロセルロース 6 枚分なのでスケールダウンは可能である。

10ml をニトロセルロース膜に加え、発色させる。α-アクチニンの cDNA があれば 5-20 分で褐色のスポットが現れる。

結果



図 3. λ gt11cDNA ライブラリー使用して得られた α -アクチニン抗体のポジティブプラーク。
褐色のスポット

20 数年前に購入した λ gt11cDNA ライブラリーは生きていて使用することができた。 α -アクチニン抗体を使用し、数個のポジティブプラークを得ることができた。4 枚の 150mm プラスチックシャーレを使用し、4 つのポジティブプラークを得た。これらのポジティブプラークは α -アクチニンの cDNA が入っていると考えられる。このうちの 1 コについて塩基配列の解析を依頼した (北海道システム・サイエンス株)。結果は α -アクチニンの cDNA の 3' 側から 2225 塩基を含んでいることがわかった。現在 5' 末までの解析を行っている。

α -アクチニンのモノクローナル抗体 EA-53 (シグマアルドリッチ) も使用して、スクリーニングを行った。この抗体は蛍光染色にも Western blotting にも使用できる良い抗体であるが、ポジティブプラークは得られなかった。モノクローナル抗体は抗原の認識範囲が狭いので cDNA にヒットする確率は低いと考えられる。

考察

λ gt11 の cDNA ライブラリーと抗体の cDNA をクローニングは既に古典的になっているのかもしれない。cDNA のクローニングには高価な試薬 (ニトロセルロース膜や Vectastain ABC elite kit など) を使用する。特に Whatman のニトロセルロース膜、直径 132 mm は必要だが輸入品になる。ニトロセルロース膜 2 セット (12 万円) と Vectastain ABC elite kit (5 万円) 程度になる。しかし抗体を使用し cDNA を得るには λ gt11 が良いと考えている。現在、生物学は様々な動植物のゲノム DNA が解読され、その後の研究に焦点が当てられ、ポストゲノム時代に入っている。ゲノムが解読されても DNA のどこから mRNA が転写され蛋白質が翻訳されるのか、実際に RNA や蛋白質を調べないと分からない。そういう意味で抗体を使用して cDNA と mRNA を研究するのは重要なことと思われる。

使用する試薬

LB 培養液 (1 リッターに付き)

10g の NaCl、10g の trypton、5g の yeast extract を 900ml の蒸留水に溶かし、NaOH で pH7.0 にする。最終的に 1 リッターにし、オートクレーブ滅菌する。

滅菌後に Ampicillin を 1ml 加える。

LB bottom ager (1 リッターに付き)

LB 培養液に 20g の ager (寒天) を加え、オートクレーブ滅菌する。

滅菌後 Ampicillin を 1 ml 加える。

Top ager (1 リッターに付き)

LB 培養液に 10g の ager (寒天) を加え、オートクレーブ滅菌する。

あるいは bottom ager に等量の LB を加え薄めてもよい。滅菌はする。

滅菌後 Ampicillin を 1ml 加える。

20% Maltose 1M MgCl₂ 25mg/ml の Ampicillin

20mg の X-gal を 1ml の dimethyl formamide に溶かす。

20mg の IPTG を 1ml の水に溶かす。

10mM の IPTG を 20ml

SM 溶液

50mM Tris-HCl pH7.5, 0.1M NaCl, 7mM MgSO₄, 0.01% Gelatin オートクレーブ滅菌する。

使用する試薬は全て特級クラス、水はすべて蒸留水を使用する。

特に Whatman のニトロセルロース膜、直径 132mm は必要だが既に市販されていない。
薬品会社への輸入依頼となる。発注してから 2-3 週かかる。

TBST 溶液

50mM Tris pH8.0、150mM NaCl、0.05% Tween 20

NNP 溶液

10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.0

0.9%NaCl

当研究は熊本大学の遺伝子研究施設を使用させていただきました (登録番号 1039)。熊本学園大学の研究助成金を使用しています。

参考文献

1. Screening of λ gt11 cDNA Libraries Using Monoclonal Antibodies. Webster DF1, Melvin WT, Burke MD, Carr FJ. *Methods Mol Biol.* 1992 ; 80 : 451-60.
2. Suppression of cardiac troponin T induces reduction of contractility and structural disorganization in chicken cardiomyocytes. Toyota N, Takano-Ohmuro H, Yoshida LS, Araki M, Yoshinobu K, Suzuki-Toyota F. *Cell Struct Funct.* 2008 ; 33 (2) : 193-201.
3. Assembly of force-expressed troponin-I isoforms in myofibrils of cultured cardiac and fast skeletal muscle cells as studied by epitope tagging. Toyota N, Uzawa H, Shimada Y. *J Muscle Res Cell Motil.* 1998 Nov ; 19 (8) : 937-47.
4. Expression of troponin C genes during development in the chicken. Toyota N. *Int J Dev Biol.* 1993 Dec ; 37 (4) : 531-7.
5. Structure and developmental expression of troponin I isoforms. cDNA clone analysis of avian cardiac troponin I mRNA. Hastings KE, Koppe RI, Marmor E, Bader D, Shimada Y, Toyota N. *J Biol Chem.* 1991 Oct 15 ; 266 (29) : 19659-65.
6. Molecular cloning and expression of chicken cardiac troponin C. Toyota N, Shimada Y, Bader D. *Circ Res.* 1989 Nov ; 65 (5) : 1241-6.
7. Synchronizatin of pulsation rates in isolated cardiac myocytes. DeHaan RL, Hirakow R. . *Exp Cell Res.* 1972 Jan ; 70 (1) : 214-20.