

骨格筋特異的に発現する
カルシウム依存性プロテアーゼの
構造と機能に関する考察

反町 祥之

①

目次

1	序	1
2	1. 骨格筋特異的に発現する	2
3	カルシウム依存性プロテアーゼの	3
4	構造と機能に関する考察	4
5	2. 骨格筋特異的に発現する	5
6	カルシウム依存性プロテアーゼの	6
7	構造と機能に関する考察	7
8	3. 骨格筋特異的に発現する	8
9	カルシウム依存性プロテアーゼの	9
10	構造と機能に関する考察	10
11	4. 骨格筋特異的に発現する	11
12	カルシウム依存性プロテアーゼの	12
13	構造と機能に関する考察	13
14	5. 骨格筋特異的に発現する	14
15	カルシウム依存性プロテアーゼの	15
16	構造と機能に関する考察	16
17	6. 骨格筋特異的に発現する	17
18	カルシウム依存性プロテアーゼの	18
19	構造と機能に関する考察	19
20	7. 骨格筋特異的に発現する	20
21	カルシウム依存性プロテアーゼの	21
22	構造と機能に関する考察	22
23	8. 骨格筋特異的に発現する	23
24	カルシウム依存性プロテアーゼの	24
25	構造と機能に関する考察	25
26	9. 骨格筋特異的に発現する	26
27	カルシウム依存性プロテアーゼの	27
28	構造と機能に関する考察	28
29	10. 骨格筋特異的に発現する	29
30	カルシウム依存性プロテアーゼの	30
31	構造と機能に関する考察	31
32	11. 骨格筋特異的に発現する	32
33	カルシウム依存性プロテアーゼの	33
34	構造と機能に関する考察	34
35	12. 骨格筋特異的に発現する	35
36	カルシウム依存性プロテアーゼの	36
37	構造と機能に関する考察	37
38	13. 骨格筋特異的に発現する	38
39	カルシウム依存性プロテアーゼの	39
40	構造と機能に関する考察	40
41	14. 骨格筋特異的に発現する	41
42	カルシウム依存性プロテアーゼの	42
43	構造と機能に関する考察	43
44	15. 骨格筋特異的に発現する	44
45	カルシウム依存性プロテアーゼの	45
46	構造と機能に関する考察	46
47	16. 骨格筋特異的に発現する	47
48	カルシウム依存性プロテアーゼの	48
49	構造と機能に関する考察	49
50	17. 骨格筋特異的に発現する	50
51	カルシウム依存性プロテアーゼの	51
52	構造と機能に関する考察	52
53	18. 骨格筋特異的に発現する	53
54	カルシウム依存性プロテアーゼの	54
55	構造と機能に関する考察	55
56	19. 骨格筋特異的に発現する	56
57	カルシウム依存性プロテアーゼの	57
58	構造と機能に関する考察	58
59	20. 骨格筋特異的に発現する	59
60	カルシウム依存性プロテアーゼの	60
61	構造と機能に関する考察	61
62	21. 骨格筋特異的に発現する	62
63	カルシウム依存性プロテアーゼの	63
64	構造と機能に関する考察	64
65	22. 骨格筋特異的に発現する	65
66	カルシウム依存性プロテアーゼの	66
67	構造と機能に関する考察	67
68	23. 骨格筋特異的に発現する	68
69	カルシウム依存性プロテアーゼの	69
70	構造と機能に関する考察	70
71	24. 骨格筋特異的に発現する	71
72	カルシウム依存性プロテアーゼの	72
73	構造と機能に関する考察	73
74	25. 骨格筋特異的に発現する	74
75	カルシウム依存性プロテアーゼの	75
76	構造と機能に関する考察	76
77	26. 骨格筋特異的に発現する	77
78	カルシウム依存性プロテアーゼの	78
79	構造と機能に関する考察	79
80	27. 骨格筋特異的に発現する	80
81	カルシウム依存性プロテアーゼの	81
82	構造と機能に関する考察	82
83	28. 骨格筋特異的に発現する	83
84	カルシウム依存性プロテアーゼの	84
85	構造と機能に関する考察	85
86	29. 骨格筋特異的に発現する	86
87	カルシウム依存性プロテアーゼの	87
88	構造と機能に関する考察	88
89	30. 骨格筋特異的に発現する	89
90	カルシウム依存性プロテアーゼの	90
91	構造と機能に関する考察	91
92	31. 骨格筋特異的に発現する	92
93	カルシウム依存性プロテアーゼの	93
94	構造と機能に関する考察	94
95	32. 骨格筋特異的に発現する	95
96	カルシウム依存性プロテアーゼの	96
97	構造と機能に関する考察	97
98	33. 骨格筋特異的に発現する	98
99	カルシウム依存性プロテアーゼの	99
100	構造と機能に関する考察	100

反町 洋之

目次

I. 略語	頁 4
II. 序論	6
III. 実験材料	16
[1] ラット(<i>Rattus norvegicus</i>)	16
[2] 培養細胞	16
[3] 大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)	16
[4] 試薬類	16
[5] 装置類	18
[6] ソフトウェア類	18
[7] 調製溶液類	18
IV. 実験方法	35
[1] 核酸溶液の濃縮	35
[2] フェノール・クロロホルム抽出、フェノール抽出、 クロロホルム抽出	35
[3] ショート・カラム・クロマトグラフィー	35
[4] DNAの電気泳動	35
[5] DNA断片のゲルからの回収	36
[6] オリゴヌクレオチドの合成	37
[7] ペプチドの合成	37
[8] キャリアーDNAの作成	37
[9] DNAの標識	37
[10] 全DNAの抽出(高分子染色体DNAの調製)	38
[11] 全RNAの抽出	38
[12] 核酸のトランスファー	39
[13] ハイブリダイゼーション	40
[14] cDNAライブラリーの作製	42
[15] スクリーニング	44
[16] 一方向性欠失クローン群の作製	47
[17] 一本鎖DNAの調製	48
[18] PCR法	49
[19] 塩基配列の決定	49
[20] cDNA断片のlacプロモーター(pUC18)下流への挿入	50
[21] 大腸菌におけるcDNA断片のタンパク発現	50
[22] cDNA断片のT7プロモーター下流への挿入	51
[23] <i>in vitro</i> 翻訳系を用いたcDNA断片のタンパク発現	51
[24] Site-Directed Mutagenesis	51
[25] cDNA断片のSV40プロモーター下流への挿入	52
[26] 抗ペプチドポリクローナル抗体の作成	52
[27] タンパク質の電気泳動(SDS-PAGE)	53
[28] ウェスタンブロット	53
[29] ラット骨格筋の分画	53

[30]	細胞の継代	54
[31]	細胞へのトランスフェクション	54
[32]	蛍光抗体法による免疫組織染色	55
[33]	免疫沈降	56
[34]	<i>in vitro</i> 活性測定	56
V. 結果及び討論		57
[1]	p94の発見と構造決定	57
[2]	p94のmRNAの発現分布	60
[3]	p94遺伝子構造の解析	61
[4]	p94のタンパク質レベルでの解析	61
[5]	COS細胞に発現させたp94の細胞内局在	68
[6]	p94のプロテアーゼ活性	69
VI. 総合討論		71
[1]	はじめに	71
[2]	p94の一次構造について	71
[3]	p94のプロテアーゼ活性について	75
[4]	p94の骨格筋特異性の意義について	78
[5]	カルパインが複数存在することの意義について	81
[6]	カルパインの分子進化について	84
[7]	終わりに	87
VII. 文献		89
VIII. 謝辞		97

I. 略語

AMV	Avian Myeloblastoma Virus
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BAP	Bacterial Alkaline Phosphatase
BPB	Bromophenol Blue
BSA	Bovine Serum Albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CTP	Cytidine 5'-triphosphate
dATP	2'-Deoxyadenosine-5'-triphosphate
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	2'-Deoxycytidine-5'-triphosphate
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidine-5'-triphosphate
dGTP	2'-Deoxyguanosine-5'-triphosphate
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosine-5'-triphosphate
dTTP	2'-Deoxyribothymidine-5'-triphosphate
ddTTP	2',3'-Dideoxyribothymidine-5'-triphosphate
DMS	Dimethylsulfate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNaseI	Deoxyribonuclease I
DPase	DNA Polymerase
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
dc7GTP	2'-Deoxy-7-deaza-guanosine-5'-triphosphate
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MBS	m-maleimidobenzoyl-N-hydroxy succinimide ester
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid
MOPS	Morpholinopropanesulfonic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIPES	Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]
PMSF	Phenylmethanesulfonyl Fluoride
RNA	Ribonucleic Acid
RNaseA	Ribonuclease A
RNasin	RNase Inhibitor
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
SAM	S-Adenosylmethionine
SDS	Sodium Laurylsulfate
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

TTP	Ribothymidine 5'-triphosphate
Tris (トリス)	2-Amino-2-hydroxymethylaminopropane-1,3-diol
XC	Xylenecanol

Amino Acids	A	L-Alanine
	C	L-Cysteine
	D	L-Aspartic acid
	E	L-Glutamic acid
	F	L-Phenylalanine
	G	Glycine
	H	L-Histidine
	I	L-Isoleucine
	K	L-Lysine
	L	L-Leucine
	M	L-Methionine
	N	L-Asparagine
	P	L-Proline
	Q	L-Glutamine
	R	L-Arginine
	S	L-Serine
	T	L-Threonine
	V	L-Valine
	W	L-Tryptophan
	Y	L-Tyrosine
Nucleotides	A	Adenosine
	C	Cytidine
	G	Guanosine
	T	Ribosylthymine(Ribothymidine)
	U	Uridine
	dA	Deoxyadenosine
	dC	Deoxycytidine
	dG	Deoxyguanosine
	dT	Deoxyribothymidine(Deoxyribosylthymine)

II. 序論

細胞は自己の生命を維持していくために、絶えず外界の情報を知る必要があり、さらに得た情報を伝達、処理し、自己の生命活動に有利なように反応を起こさなくてはならない。即ち、細胞内の構成物質を柔軟に変化させ、再び外界に働きかけることによって、他の細胞と情報交換をしながら、最終的には一個体を繁栄の方向へと導くように絶えず矯正している。増大し続けるエントロピーと戦うために、細胞が長い進化の過程で獲得したものが細胞内情報伝達系である。外界の情報を絶えずモニターする膨大な種類のレセプター群、そのシグナルを解釈し伝達するGTP結合タンパク質群、フォスホリパーゼ群、プロテインキナーゼ群、プロテインフォスファターゼ群、さらにはシグナルを遺伝子へと中継する転写因子群などがその主経路を構成している。これらの細胞内「部品」の重要性は最近特に注目され、現状のように広範にわたって活発に研究が進められているのは周知の通りである。レセプター、プロテインキナーゼ群などの重要性は書き述べるまでもないが、これらの実際に情報伝達系を構成する「部品」が働くためには陰で働くさらに多くの「部品」が存在している事を忘れてはならない。それは、一つにはcAMP、イノシトールリン酸などのセカンドメッセンジャーと呼ばれる化学物質群と、もう一つは、「部品」のメインテナンス機構である。もちろんこれらも含めて細胞の情報伝達機構と呼ぶときも多いのだが、とかく花形的に見られるレセプター、プロテインキナーゼといった実際に情報伝達の経路に位置しているものと、ここでは一応区別して考えたいと思う。

すべての「部品」は炭素原子を骨格としており、炭素原子の物性(価電子が4つあること)に由来して非常に複雑なタンパク質、核酸、糖、脂質などの化合物を創り得た訳だが、その反面無機化合物に比べるとかなり分解され易いという弱点も持っている。しかしながら、多くの「部品」は巨大な化合物(炭素数が数千個)となっており、逆に無機物と同様の挙動性を得るまで分解される(例えばタンパク質が完全にアミノ酸に、核酸が完全にモノヌクレオチドに分解される)には自然状態では途方もない時間がかかってしまう。そこでメインテナンス機構が必要となってくるわけである。

タンパク質である「部品」はまずmRNAから造り出されるわけであるが、この量の調節は、

- ① そのmRNAを転写する量の制御(転写レベルでの調節)、
- ② mRNAから翻訳される量の制御(翻訳レベルでの調節)、
- ③ 生じたタンパク質のターンオーバー速度の制御(後翻訳レベルでの調節)、

の3つの段階で行われている。①は遺伝子のプロモーター、エンハンサーに結合する転写因子群、 σ 因子群が直接には関与している。しかし、これらだけでは不十分であり、転写量の調節はむしろこれら転写因子の活性を持つものと持たないものとで調節されている。即ち、そこにはプロテインキナーゼ群、プロテインフォスファターゼ群及び細胞内プロテアーゼ群が関与している。②は、mRNAの量はほとんど同じレベルであるにも関わらずタンパクの量のみが変動するという現象で、卵制御因子であるmosタンパク質などで観察されている。実際に細胞内プロテアーゼがmRNAに結合しその翻訳を阻害する事も報告されている。③は完全に細胞内プロテアーゼ群によって制御されるものである。これら、細胞内プロテアーゼ群による役割をまとめると次のようになる。

- ① 「部品」が必要な時に必要なだけ存在するようにその産出量を調節する役割、
- ② 酷使され続けた末に一部分解してしまい正常に働けなくなった「部品」や役目が終わり不必要になった「部品」をすみやかに分解する役割、

③ 「部品」が情報伝達に際して適切な機能を果たせるようにこれを修飾する役割、

である。すなわち、細胞質内に存在して、「部品」であるタンパク質を分解する活性を持った特殊な「部品」というわけである。産出量の調節と同時に細胞内プロテアーゼは、機能を果たすために産出量の増えた「部品」の量をその役割の終結と同時に急速に分解する（いわゆるダウンレギュレーション）ためや、長時間にわたる使用によって一部分解して機能を果たせなくなってしまう「部品」の速やかな分解のためにも重要である。スイッチがONになった「部品」がそのままでは、細胞は正常な生命活動を続ける事が出来なくなり、多くの場合は細胞及び個体にとって最悪の状態であるガン化状態に陥ってしまう（ちなみに、ガン化とは永久の増殖を細胞が獲得することであり、栄養源とスペースとが無限にある状況なら細胞にとって「最高」の状態であるのだが、すべての生命体にとって栄養源とスペースとは極めて厳しく限られているものであるために、ガン化はすべての細胞の「共倒れ」を引き起こし、結局のところ「最悪」になる）。また、壊れた「部品」がそのまま細胞内に蓄積されたなら細胞は数日のうちに正常に機能する「部品」が無くなってしまいこれも重篤な結果を導く。即ち、「部品」の材料をリサイクルするという意味でも「部品」の分解は重要である。さらに細胞内プロテアーゼが直接「部品」を限定分解する事によって「部品」の活性を制御している事を示唆する報告も多い⁽²⁾⁽¹⁰⁾。

細胞内プロテアーゼはこのように多方面にわたっての機能が示唆され、細胞の基本的生命活動の維持に必須なものであるが、反面もしプロテアーゼ活性が発現し過ぎると当然細胞にとっては非常に危険な状態となる。細胞内にプロテアーゼが存在するという事はいつでも細胞内の重要なタンパク質にアクセスできるという事であり、それ故に厳密な活性の制御が同時に必須である。即ち、細胞内プロテアーゼを考える時にその活性化機構及びそのインヒビターを同時に考察しなくては本当の生理機能は理解し得ない。この点がリソゾーム系の酵素と大きく異なっている。古くからこれら細胞内プロテアーゼについては、「部品」の処理経路が主な研究課題ではあったが、数多くの報告が有る。具体的には次の3種がよく研究されている。

- ① ユビキチン、ATP依存性プロテアーゼ複合体
- ② マルチキャタリティックプロテイナーゼまたはプロテアソーム (Multicatalytic Proteinase, Proteasome, Ingensin, ATP Dependent Protease, Macropain : EC 3.4.24.5)
- ③ カルパインまたはカルシウム依存性プロテアーゼ (Calpain, Calcium Dependent Protease, Calcium Activated Neutral Protease : EC 3.4.22.17)

古くは1953年ごろから⁽¹¹⁾一部の細胞内のタンパク質分解にATPを要求することが示唆されていたが、その後この現象はユビキチンとATP依存性プロテアーゼ複合体によって引き起こされていることが明らかになりつつある。ATPはユビキチンを分解するターゲットのタンパク質に結合させる段階と、その後実際にそのタンパク質を分解する段階の両方に必要である⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾。この系に関与するプロテアーゼは推定分子量1000～1500 kDaと異常な大きさを示し、さらに約700 kDaのもう一つのユニットが存在すると報告されている⁽¹⁵⁾⁽¹⁷⁾。しかし、何分にも分子量の巨大性から詳しい構造研究は難航していると言えよう。

マルチキャタリティックプロテイナーゼは 1980年に Wilk と Orłowski とが牛脳下垂体から精製し、初めて記述した⁽¹⁸⁾。その後現在までに調べられたすべての真核生物の組織と古細菌 (Archaeobacterium) に存在している事が確認されている⁽¹⁹⁾⁽²¹⁾。そして、過去にいろいろな名称で呼ばれたものがどうやらすべて同種のものではないかと考えられ始めてきている。表Ⅱ-I に過去に呼ばれた名称を挙げたがどれも電子顕微鏡的に非常に良く類似している事から、これらを総称して「マルチキャタリティックプロテイナーゼ (Multicatalytic

(表 II - I) 様々な名称を付けられたマルチキャタリティックプロテイナーゼ

名称	決定者	文献	年号
High Molecular Weight Peptide Hydrolase	Edmunds & Pennington	(24)	1982
High Molecular Weight Enzyme	Hardy et al.	(25)	1983
High Molecular Weight Cysteine Proteinase II/III	Dahlmann et al.	(26)	1983
Proteinase YscE	Achstetter et al.	(27)	1984
Multicatalytic Proteinase	Dahlmann et al.	(28)	1985
Neutral Endopeptidase	Ray & Harris	(29)	1985
Ingensin	Ishiura et al.	(30)	1985
Alkaline Protease	Rivett	(31)	1985
Multifunctional Protease	Tanaka et al.	(32)	1986
Macropain	McGuire & DeMartino	(33)	1986
20 S Protease	Hough et al.	(34)	1987
Endopeptidase-24.5	Zolfaghari et al.	(35)	1987
Alkaline Serine Proteinase	Mykles	(36)	1987
Large Alkaline Multifunctional Protease (Proteasome)	Arrigo et al.	(37)	1988

Proteinase、略称：MCP）」と呼ぶ事に、1988年に下田で行われた 7th International Symposium on Intracellular Protein Catabolism の会議上で決定された(22)(23)。ただし、どうやら完全に均一かつ同一の物質であるわけではないらしい。

マルチキヤトリティックプロテイナーゼはATP依存性プロテアーゼと比較すると活性にATPの加水解を伴わないことが相違点であるが、両者の関連性はこれからの研究課題である。現在までにマルチキヤトリティックプロテイナーゼに関して明らかになっている事は、① ヒトからイースト及び古細菌 *Thermoplasma acidophilum* に至るまで現在までに調べられたすべての真核生物のすべての器官に存在する。② 真核生物のMCPは各々25~35 kDaの分子量を持つ十数個の異なるサブユニットから構成されており、全体では700 kDa前後あり、沈降係数は19~22Sである。その電子顕微鏡による形態は中央に穴のあいた直径12 nm、高さ23 nm の円柱状をしている。③ 一方古細菌のMCPは、2種類のサブユニットのみから構成されているが、電子顕微鏡下の形態は真核生物のものに酷似している。④ 細胞内では細胞質と核内の両方に検出される。⑤ プロテアーゼとしては少なくとも2種類の独立した活性が存在し、それぞれが異なるpH依存性を示す。⑥ 細胞内のATP依存的なタンパク質分解経路に関与している事を示唆する報告もある(38)(39)。⑦ プロテアーゼ以外にもRNA結合活性、RNase活性、熱ショック応答性などとの関連も報告されており(40)(43)、非常に多機能な酵素複合体であると考えられる。⑧ サブユニットの構造についてはそのcDNAのいくつかが既にクローニングされ、一次構造が決定されている(44)(45)。アミノ酸配列は他のタンパク質のアミノ酸配列とは全く相同性を有しておらず、しかしその一方で、サブユニット同士は相同性を有している。

以上に述べてきたように、MCPは細胞の基本的かつ必須な機能の一つあるいは複数を担っていると考えられるのだが、その分子量の巨大性などとも相まって、未だに構造と機能の相関をつけられずにいる。より詳細な構造解析の必要性が強く感じられる。筆者らも細胞内プロテアーゼの総合理解という立場からプロテアソームの構造決定も行ったのだが、論旨がはやるのでこれについては別の機会にゆずる。

さて、本論文の主題のカルパインであるが、その歴史はMCPよりもずっと古く、Guroffにより1964年にラット脳のプロテアーゼとして発見された。しかし、その存在がクローズアップされてきたのはCa²⁺の重要性が理解され始めた頃からであり、それ以降は分子生物学の急速な発展に伴いカルパインの構造は次々と解明されていき、現在では最も構造研究の進んだプロテアーゼの一つとなっている。歴史的背景も絡まってその名称については、MCPほどではないが多くの名前がつけられていた時期があった。CANP (Calcium-Activated Neutral Protease)、CDP (Calcium-Dependent Protease)、CDSP (Calcium-Dependent Sulfhydryl Protease) などが使われたがこれらは、MCPとは異なり、完全に同一の分子を指している事も既に判明しており、名称の統一の必要性が高まっていた。そんな中、1990年にドイツで行われた第8回タンパク質分解に関する国際会議 (International Conference On Proteolysis: ICOP) において、常にカルパインの研究の指導者的立場に有った Suzuki によって名称統一の呼びかけが行われ、以降カルパイン (Calpain) と統一される事となった(46)。後述するがカルパインには少なくとも2種のアイソザイムが存在しそれぞれの名称もこのとき同時にm-カルパイン及びμ-カルパインと呼ぶ事に決定された。また、これも後で詳述するがカルパインには特異的なインヒビターが存在し、この名称についても数種存在したが、これもカルバスタチンに統一された。時まさに東西ドイツが統一された年であった。

カルバインについては優れた総説が多数書かれている(47)-(60)。これらを参考にしつつカルバインの生化学的な性質についてまとめてみたいが、カルバインについて論ずるためにはまず最初にカルバインと呼ぶためのクライテリアを定める必要がある。そこでこの論文では以下の4つを同時に満たしたときに、かつそのときのみ、その分子をカルバインと呼ぶ事にする。

- ① プロテアーゼである。
- ② システインが活性中心に存在し、かつ活性に必須である。
- ③ その活性はカルシウムイオンに依存する。
- ④ 細胞質内に存在する。

簡単に言うに「カルバインを細胞内カルシウム依存性システインプロテアーゼと定義する」ということである。さて、このクライテリアに合致するカルバインは、少なくとも高等生物のほぼあらゆる組織に存在している。研究の大部分は脊椎動物に集中しているが、これ以外でも軟体動物のイカ、節足動物のエビ(61)、カニ(62)、ショウジョウバエ(63)、扁形動物の住血吸虫(*Schistosoma mansoni*)(64)でもカルバインの存在が報告されている。即ち、動物細胞においてはおそらく普遍的に存在する分子であると考えられる。菌界においては、真核菌類ツボカビ門のカワリミズカビ(*Allomyces arbuscula*)(65)でカルシウム依存性システインプロテアーゼの存在が報告されているが、これは上のクライテリアの中で④において当てはまるかどうか判然としない。また、プロテアーゼインヒビターの阻害実験などから真核菌類子囊菌門の出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のカルバインではないかと考えられていた α 因子プロセッシングプロテアーゼであるKex2は、残念ながらカルシウム依存性セリンプロテアーゼと同定された。即ち、上記②の点をクリアできなかった。しかし、カワリミズカビで見つかったものが本物のカルバインならば、出芽酵母にもカルバインが存在しても不思議ではない。余り進んでいるとはいえないカルバインの生理機能の解明のために酵母は実験材料として非常に興味深いものであるから、今後カルバインの探索が続けられる事であろう。原核菌類(細菌類)では全く報告が無い。植物界においては、今までカルバインが存在したという報告は無い。のみならず、単子葉類のカナダモ(*Elaeagnus*)ではカルシウム依存的なプロテアーゼ活性が無いという報告(66)まである。しかし、カルバインが細胞の根本的な機能と関連しているのならば、必ずや植物細胞にも存在しているはずである。こちらもさらなる検討が必要であると考えられる。以上見てきたように、カルバインは分子進化的にも興味深いタンパク質であると考えられ、そのためにより広範な生物種における研究が今後必要となってくるであろう。

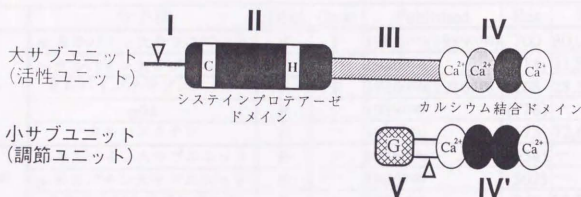
研究の進んでいる哺乳類、鳥類のカルバインについてはcDNA、遺伝子のクローニングなども網羅的に行われており、生化学的性質はかなり詳細に判明している。まず、カルバインには少なくとも2種類のアイソザイムが存在し、それぞれは基質を分解するときに要求するカルシウムイオン濃度が異なっている。1つは μ M程度のカルシウム濃度において*in vitro*でカゼイン分解活性を発現する分子で、 μ -カルバインと名付けられた。もう一方はmM程度のカルシウム濃度において*in vitro*活性を発現するものでm-カルバインと呼ばれる。両者はどちらも分子量110 kDa程度であり、大小2つのサブユニットから構成されているヘテロダイマーである。そして両者はそれぞれ異なる大サブユニットを持つが、小サブユニットは同一のものを有する。大サブユニットは分子量約80 kDaで触媒部位を含んでおり、図II-1に示したように4つのドメインから構成されている。すなわち、N-端(プロペプチド)ドメイン(第Iドメイン)、システインプロテアーゼドメイン(第IIドメイン)、カルシウム結合ドメイン(第IVドメイン)、および機能のまだ明確でないドメインIIIの四つである。一方の小サブユニットはm-, μ -カルバインに共通であり、約30 kDaの分子量を持ち、大サブユニットの第IVドメインと相同性があるカルシウム結合ドメイン

(第Ⅳ'ドメイン)と、グリシンが40%程度を占め、他には疎水性アミノ酸が多いドメイン(第Ⅴドメイン)とから成る(図Ⅱ-1)。カルシウム結合領域である第Ⅳ、Ⅳ'ドメインはカルモジュリンと相同性を持ち、それぞれE-Fハンド構造を4つづつ含んでいるので、一分子のカルバインは構造的には8個のカルシウム結合領域を持っていることになる。実際には一分子当たり4~6分子のカルシウムが結合していることが報告されている⁽⁶⁷⁾⁻⁽⁶⁹⁾。

様々な種においてカルバインサブユニットのcDNAのクローニングが行われ、その一次構造が決定された。構造決定が行われた過程とその結果は表Ⅱ-2及び図Ⅱ-2にまとめた。表からわかるようにm-、μ-カルバイン大サブユニットどちらも哺乳類の中で全長が決定されているのはヒトだけである。カルバイン小サブユニットの方はヒト、ウサギ、ブタ、ウシの4種で全長が決定されているが、ニワトリではまだ決定されていない。逆にm-カルバイン大サブユニットはニワトリで全長が決定されているが、ここで一つの問題が生じる。それはm-型とμ-型の定義である。そのカルバインがm-型であるか、μ-型であるかのクレンジアとして、現段階では次の4つが考えられる。

- ① 蛋白質化学的に、より低濃度のカルシウムイオンで活性化されるカルバインをμ-型、より高濃度のカルシウムイオンで活性化されるものをm-型とする。
 - ② 蛋白質化学的にDEAE系のカラムにかけて塩化ナトリウムの濃度勾配で溶出したとき先に溶出されるものをμ-型、後に溶出されるものをm-型とする。
 - ③ ヒトカルバイン大サブユニットと全体の相同性を調べ、よりヒトμ-型に近い方をμ-型、m-型に近い方をm-型とする。
 - ④ 分子進化的にみてヒトμ-型の系譜にのっているものはμ-型、m-型の系譜にのるものはm-型とする。
- ④については補足が必要であろう。カルバインの祖先遺伝子は、もともと独立した遺伝子であったシステインプロテアーゼの祖先遺伝子と、カルモジュリンの祖先遺伝子との少なくとも2者が融合したものであったと考えられるが、この祖先遺伝子がかなり古い時期にμ-型、m-型の2つに遺伝子重複によって増幅したのならば、その時期より後に分化した生物種ではそのカルバイン遺伝子上にμ-型祖先遺伝子、m-型祖先遺伝子の痕跡を残しているはずである。その痕跡(すなわちヌクレオチドあるいはアミノ酸配列の相同性)によってμ-型、m-型に分類するという事である。よって、この分類はμ-型、m-型への分化がその生物種への分化の時期よりも古い事象であるときにしか適用できない(「総合討論」で詳細に述べた)。

哺乳類においては上記のすべての定義は同一の結果を導く。しかし、鳥類を含めると状況は変わる。③の定義によると、現在ニワトリm-カルバイン大サブユニットと呼んでいるものはむしろμ-型に近くなってしまふ(詳しくは「総合討論」を参照)。もともとμ-型、m-型の名称の由来はカゼイン分解活性を指標とした上記①に基づいたものであったので、②の定義は余り意味を持たない。それでは①の定義が最も良いかというところは拡張性の点で問題がある。すなわち、今後μ-型、m-型以外のカルバインが見いだされた場合に(実際にこの論文で後述するわけだが)今までのμ-型、m-型という名称を変更する必要がある可能性がある。ここまで考えてくるとそもそもμ-型、m-型という名称自体、適切なものであるかどうかという問題が出てくるわけだが、いずれにしても現在のデータのみからきちんとした定義を導く事は不可能となる。すなわち、すべてのカルバインを持つ生物種が2種のカルバインを持つかどうかとも判



(図II-1) カルパインのサブユニット、ドメイン構造

I～Vはドメインの番号を表し、ドメインIIに記したC, Hは活性中心のシステイン、ヒスチジン残基を表している。ドメインI, Vの白三角はその位置で最終的に自己消化が起ることを示している。ドメインVの中のGと記した部位はグリシンが連続する領域である。ドメインIV, IV'の一つの楕円は一つのE-Fハンド構造に対応しており、その濃淡は実際にカルシウムを結合しているかどうかを示している。すなわち、明るい1, 4番目は大小どちらのサブユニットも Ca^{2+} を結合していることを示し、大サブユニットの2番目の中間の明るさの部分はm-カルパイン大サブユニットのみでカルシウムイオンとの結合が示唆されていることを、他の3つの色の濃い部分は、実際にはカルシウムイオンを結合していないことを示している。

(表II-II) カルバインサブユニット、カルバスタチンの構造

"cDNA"、"Gene"の欄は、それぞれcDNA、遺伝子が全長にわたって決定されているか(F)、一部のみか(P)を表し、"Published"は、cDNAの構造が発表された年(()内は遺伝子の構造が決定された年、上付の数字は文献を表す)、"Res."は、決定されたアミノ酸残基の数(()は全長でないことを示している)、"Mr"は全長が決定されているものに関してその計算される分子量(relative molecular mass)を表記した。

種	分子種	cDNA	Gene	Published	Res.	Mr
ヒト	m-カルバイン大サブユニット	F	P	1988 ⁽¹¹⁵⁾ (1989 ⁽¹¹⁶⁾)	700	80,005
	μ-カルバイン大サブユニット	F	—	1986 ⁽¹¹⁷⁾	714	81,889
	カルバイン小サブユニット	F	F	1986 ⁽¹¹⁸⁾ (1986 ⁽¹¹⁹⁾)	268	28,315
	p94	P	—	1989 ⁽¹²⁰⁾	(778)	—
	カルバスタチン	F	—	1989 ⁽¹²¹⁾	673	72,605
ウサギ	m-カルバイン大サブユニット	P	—	1986 ⁽¹²²⁾	(654)	—
	μ-カルバイン大サブユニット	P	—	1986 ⁽¹²²⁾	(302)	—
	カルバイン小サブユニット	F	—	1986 ⁽¹²³⁾	266	28,238
	カルバスタチン	F	—	1987 ⁽¹²⁴⁾	718	76,964
ラット	m-カルバイン大サブユニット	—	P	(1990 ⁽¹²⁵⁾)	(60)	—
	カルバイン小サブユニット	P	—	1992*	(266)	28,586**
	p94	F	—	1989 ⁽¹²⁰⁾	821	94,084
	カルバスタチン	F	—	1991 ⁽¹²⁶⁾	603	65,881
ブタ	カルバイン小サブユニット	F	—	1985 ⁽¹²⁷⁾	266	28,068
	カルバスタチン	F	—	1988 ⁽¹²⁸⁾	713	77,122
ウシ	カルバイン小サブユニット	F	—	1989 ⁽¹²⁹⁾	263	27,931
ニワトリ	m-カルバイン大サブユニット	F	F	1984 ⁽⁹¹⁾ (1986 ⁽¹³⁰⁾)	705	80,350
	μ-カルバイン大サブユニット	P	—	1992*	—	—
	p94	F	—	1992*	811	93,748
ジストマ	カルバイン大サブユニット	F	—	1991 ⁽⁶⁴⁾	758	86,862

*: in this study, manuscript in preparation.

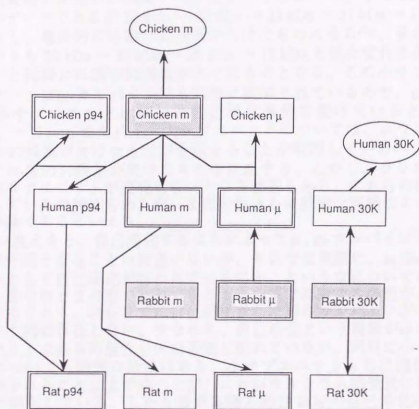
**： N-端の4残基をMFLVと仮定した値。

然としていないし、ましてやアミノ酸配列の情報に至っては哺乳類、鳥類以外では上述した住血吸虫の一種が決まっているだけである。これでは分子進化的な考察をするのはかなり厳しい。現在のところは①～④とを合わせて総合的に（曖昧さが残るが） μ -型、 m -型の定義としたい。ニワトリ m -カルパインは上記のカゼイン分解活性を指標としたアッセイでは K_a （最大活性の50%を示すカルシウム濃度）が $150\ \mu\text{M}$ 、ヒトの μ -型、 m -型がそれぞれ、 $35\ \mu\text{M}$ 及び $520\ \mu\text{M}$ であるのでこれだけではニワトリ m -カルパインが μ -型か m -型か判然としない。配列の相同性からも上で述べたように明確でない。しかし、一時は存在しないと考えられていたニワトリ μ -カルパインが精製され、そのクローニングが行われつつあるので（本論文にもデータを含む）、これと比較対照する事でニワトリ m -カルパインはやはり m -型であると結論ができる。この点についてはこの論文の「総合討論」で詳しく論じたい。そして、そのほかの生物種のカルパインを含めた総合的な分子進化的考察をするためにも、より詳細なカルパインサブユニットの一次構造についての情報が必要である。本論文ではこの点について検討を加えるため新たに数種のカルパインサブユニットについてクローニングを行った。さらにカルパインの分子進化を考える上でも興味深いのは μ -型、 m -型以外のカルパイン分子の存在である。この論文ではp94という m - μ -カルパイン大サブユニットの双方に相同性を持ち、かつ両者とも異なるいわば第三のカルパイン大サブユニットというべきタンパク質をコードするcDNAをクローニングし、 μ -型、 m -型と比較検討を加えた。

カルパイン小サブユニットについては哺乳類では1種しか見いだされていないが、マウスの培養繊維芽細胞、BALB/c 3T3のcDNAライブラリーからカルパイン小サブユニットと相同性を有するタンパク質をコードすると考えられるcDNAがクローニングされている⁽⁷⁰⁾。この分子がカルパインと関係する（すなわち上述したカルパインの定義に当てはまる分子の一部あるいはそれと複合体を作っている）かどうかはまだ不明だが、さらに他にもこのような分子が存在する可能性はある。この点についても本論文で考察を加えた。

カルパインの構造については、以上述べたように哺乳類でかなり詳細に解析されてきたものの分子進化的考察を加えるにはまだデータが十分とはいえない。本論文では、我々の結果と過去の報告とを合わせて、カルパインの分子進化論的総合理解を得る事を一つの目標としている。

次にカルパインの活性化機構について触れてみたい。以前から問題となっており、現在も完全に解決されていない問題として、カルパインの活性化に必要なカルシウムイオン濃度の値がある。細胞内のカルシウムイオン濃度は 10^{-6}M 以下で変動しており、特に m -カルパインなどが $m\text{M}$ オーダーの濃度で活性化される事はとても生理的に意味のある事とは考えられない。 μ -カルパインにしても細胞内カルシウムイオン濃度の最大値よりもまだ数十倍高い濃度を必要としている。しかし、試験管内のアッセイで得られたこれらの K_a 値は、カゼインという非生理的な基質を用いており、かつ温度も 30°C と生体の温度に比較すると低い値を使っている。pH値やコファクターも含めて、試験管内で現在までに調べられた範囲ではこれらの条件が最適であった事はまちがいないが、それは逆にいえばこれらの条件が生理的条件とはかなり異なっている事を自ら示している事にもなる。すなわち、 37°C ではカルパインの失活によって 30°C におけるプロテアーゼ活性よりも低くなってしまいう条件が生体内で再現されているとは考えにくい。細胞内には他のタンパク質、脂質、細胞膜などが高濃度で存在しているので、これらがカルパインを安定化し、かつ K_a 値を下げている事は十分に考えられるし、実際にそれを支持する報告もある⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾。これらの



(図Ⅱ-2) カルバインサブユニットcDNAの構造決定の過程

矢印の始点はそれをプローブに用いたことを、終点はそれを同定したことを示している。網掛で示したものはタンパク質の一次構造からオリゴヌクレオチドプローブを合成し、これを用いて同定したことを示している。四角はcDNAを、楕円は遺伝子を表している。二重線で囲んであるものは、全構造が判明しているものを示している。

点はカルバインを細胞内情報伝達系のプロセッシングプロテアーゼとして捉えるときに避けて通れない問題であり、今後ともさらなる解析を続ける必要がある。

もう一つの問題は自己消化である。 μ -, m-カルバイン双方とも上で述べたカルシウムイオン濃度以上になると自己消化を起こし分子量が小さくなり、同時にカルシウムイオン感受性が高くなる (K_a が一桁以上小さくなる) という現象が報告されている⁽⁷⁴⁾⁻⁽⁸⁷⁾。つまり、カルバインのカルシウム感受性と言うときは、実は自己消化の際に必要なカルシウム濃度のことを指していた訳である。現在までに調べられた限りでは、まず、ウサギ μ -カルバインでは大サブユニットは分子量が 80 kDa \rightarrow 79 kDa \rightarrow 77 kDa \rightarrow 76 kDa と段階的にプロセスされて、最終的にN-端の27残基が欠けたものとなる⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾。小サブユニットの方はウシのデータであるが 30 kDa \rightarrow 27 kDa \rightarrow 23 kDa \rightarrow 21 kDa \rightarrow 18 kDa と分子量が減少し、最終的にN-端の91残基が欠けたものになる⁽⁹⁰⁾。また、ブタ小サブユニットも 30 kDa \rightarrow 29 kDa \rightarrow 26 kDa \rightarrow 18 kDa と似た変化を遂げ、最終的にはウシと同様にN-端の91残基が欠けたものとなる。この小サブユニットの消化パターンはm-カルバインでも同様に観測されているので、 μ -型、m-型に共通な小サブユニットは同一の自己消化修飾を受けていると考えられる⁽⁷²⁾⁽⁷⁹⁾⁽⁸⁵⁾。一方、m-カルバイン大サブユニットについては、ニワトリで最終的にN-端の17残基が欠けたものが生成することが判明している⁽⁹¹⁾。ウサギでも最終的にN-端の19残基が欠けたものを生成する。しかし、ウシでは自己消化前後で大サブユニットが変化しないという報告もある。これらの報告が単に種差を示している可能性もあるが、まだ今後さらに厳密な実験によって解明されるべき事象であるといえる。

言い換えると、自己消化することによって μ -, m-カルバインともカルシウム感受性が高くなることは間違いないが、それでは実際に、*in vivo*の活性化機構の一つとして自己消化が行われているのか、という点については細胞内のカルバインをそのままの形で観測できるような系で再考する必要があると考えられる。少なくとも、現在までに自己消化された形のカルバインが生体材料から検出された例は存在しない。すなわち、自己消化という現象が*in vitro*でのアーティファクトである可能性を未だ否定し切れていない。同時に小サブユニットの役割についても研究の余地はある。小サブユニットも自己消化によってN-端が切断されることは上で述べたが、これはカルシウム感受性に影響を与えないことが判明している。しかも最終産物の約18 kDaの自己消化小サブユニットは、ほとんどドメインIV'のみを残す形となっており、ドメインIV'が大サブユニットのドメインIVと相同性が高く、大部分がカルシウム結合部位であることから考えて、この時点での小サブユニットの意義はカルバイン分子全体の安定性の寄与ぐらいしかないと考えられる。もちろん前駆体として、ドメインVを有しているときにその最大の存在価値があると考えられる。しかし、このドメインVもリン脂質との結合には関与するが生体膜との結合には関与しないことが知られている⁽⁹²⁾⁽⁹³⁾。この点は、カルバイン分子の進化的成立過程を考える上でも興味深く、本論文で新たに発見したp94分子がこの小サブユニットに当たるものを有しているかどうかという点を含めて後に考察した。

いずれにしても、カルバインの細胞内での活性化機構はカルバインの生理機能を考える上で重要な点であり、現在までにカルバイン活性化因子⁽⁹⁴⁾、分子間活性化機構⁽⁸⁸⁾、細胞核分画のm-カルバインカルシウム感受性高揚効果⁽⁹⁵⁾なども示唆されているが残念ながらどれも完全にカルバインの活性化機構を説明しているとは考えられない。さらに深い研究が必要とされている。

前述したように、カルバインが細胞内情報伝達系において「部品」を修飾する、いわゆるプロセッシング酵素として機能していることを示唆するデータは、かなりの数に上っている。そのひとつは、短寿命である必要性があるタ

ンパク質群（正確には、短寿命であることに必要性があると証明されてはいないが、とにかく短寿命であるタンパク質のことであるが、無意味にせつかく作りだした「部品」を破壊することは、生理的にも進化的にも無理があるので、「必要性のある」と表現した）の分解である。残念ながらカルパインとの直接的関係を示すデータはまだ存在しないが、短寿命タンパクの一次構造の中に高い確率で見いだされる、PEST配列（プロリン（P）、グルタミン酸（E）、セリン（S）、スレオニン（T）残基に富む配列）がカルパイン分解へのシグナルではないかとの見方が強まっている⁽⁹⁹⁾⁽⁹⁶⁾。PEST配列を有する分子としては、細胞内情報伝達系の「部品」である、プロテインキナーゼC、フォスホオリパーゼC、*mos*、*jun*、*fos* タンパク質などがあげられ、*in vitro*では実際にこれらの分子がカルパインによって限定分解を受けることも判明している。中でもプロテインキナーゼCは活性化後の分解（ダウンレギュレーション）がよく研究されており、このときプロテインキナーゼCのキナーゼドメインのみを残した形のPKMと呼ばれるものが生成され、その後速やかに消失していく⁽²⁾⁽⁴⁾。この分解がカルパインの抗体やロイペプチンで阻害されるため⁽⁴⁾、カルパインによる現象である可能性が高い。実際に、*in vitro*の結果ではあるが、カルパインがプロテインキナーゼCをその活性ドメインと制御ドメインとをつなぐ領域で切断することが確認されている⁽⁵⁾。但し、プロテインキナーゼCのダウンレギュレーションにはプロテインキナーゼCの自己リン酸化が関与しているとも考えられており⁽⁹⁷⁾、分解のシグナルについては未だ不明の点が多い。また、卵受精時に急速に消失し、卵を分裂へと導くと考えられている卵成熟に関与する因子、*mos* タンパク質も、その消失にカルパインが関与している⁽⁹⁸⁾。さらに、培養細胞の系でもカルパインが細胞分裂に関与しているという報告もある⁽⁹⁹⁾。卵成熟、細胞分裂は高度にプログラミングされた過程であり、細胞の生命活動の基本をなすものである。外界からの刺激こそ単純であるが細胞内での情報伝達は他の刺激に対する応答と同様な経路を取っていると考えられ、むしろその厳密性（誤応答、即ち、分裂時期の誤りは細胞死に直接つながるという重大性）故にその応答は最高の精度をもって制御されている必要がある。そこにカルパインが関与していることは、たいへん興味深い。この他にも、N-CAM⁽¹⁰⁰⁾、cAMP依存性プロテインキナーゼ（プロテインキナーゼA）⁽¹⁰¹⁾、フォドリン⁽¹⁰¹⁾、インターロイキン α 前駆体⁽¹⁰²⁾、などをカルパインが切断するという報告がある。いずれもカルパインのプロセッシング酵素としての機能を示唆するものであり、今後もこのような報告が蓄積することによってカルパインの情報伝達経路における位置付けが明確になっていくことであろう。

これらの報告が示すカルパインの機能を明確にするもう一つの方法は、カルパインと病態との関連を研究することである。古くから言われていることの一つは、筋ジストロフィー症におけるカルパイン活性の昂進であるが、生化学的に大切なことはこれが原因であるか結果であるかということである。残念ながら、筋ジストロフィー症におけるカルパインの活性化は、ジストロフィンタンパク質の欠乏による「結果」であると現在では理解されている⁽¹⁰³⁾。この他にもミラノ高血圧症⁽¹⁰⁴⁾、モントリオール血小板症⁽¹⁰⁵⁾などでもカルパインが関与するという報告がある。しかし、現在までに μ -、m-タイプのどちらのカルパインにしても完全に欠損しているという症例は存在しない。これは、カルパインが細胞の生命活動に必須な機能をはたしていることの間接的な証拠となるものではあるが、カルパインの機能を探る上で残念ではある。この点を解析するためには線虫、酵母などの生命活動がより単純な系でのカルパインの探索が有力であると考えられる。これからの課題であり、本論文でも第3のカルパイン、p94も含めて考察した。

もう一点見逃してはならないのは、カルパインには特異的なインヒビターが存在するという点である。これはカルバスタチンと呼ばれるもので、現

在までにウサギ、ブタ、ヒト、ラットでそのcDNAクローニングが行われている。計算される分子量は、ウサギ、ブタで約77kDa、ヒトで約72kDa、ラットで約67kDaと変動しており、お互いの相同性も77%程度である。これはカルバインサブユニットが非常によく保存されている(哺乳類間では93%以上)ことと対照をなしている(詳しくは「総合討論」を参照)。エキソンのalternative splicingも数種見つかっており、かなりdivergeした分子であるが、例えばウサギのカルバスタチンはウサギのm-カルバインにもヒトの μ -カルバインにも同程度に、よく阻害活性を示す。しかもその阻害活性はカルバイン特異的であり、かつ、カルバインに比較的好く阻害活性を示すといわれるロイペプチンやE-64の数100分の1のモル濃度で効果を現す。明らかにカルバインの活性制御のためにカルバインと共進化してきた分子であると考えられ、その活性制御の様式には非常に興味もたれる。阻害の分子機構については、基質と拮抗阻害をするように観測されるが⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁷⁾、活性中心のシステイン残基に直接結合しているかどうかは不明である。興味深いことにカルバスタチンにはアミノ酸約140残基からなる4回の繰り返し構造が存在し、互いの相同性はそれほど高くないがそれぞれが独立に1分子のカルバインを阻害することが判明している⁽¹⁰⁸⁾。各繰り返し領域の中心付近には、4つの繰り返し構造の間のみならず、異種間でもよく保存された「TIPPYR」という配列が存在し、この配列を含む少なくとも27残基の合成ペプチドには μ -, m-カルバインの両方を拮抗的にかつ特異的に阻害すること、この配列を含まず十分に長いペプチドでは阻害活性が見られないことが明らかになっている⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁹⁾。カルバスタチンの阻害様式で重要なことの一つは、カルバインの分子内の自己消化を阻害しないということである⁽⁸⁸⁾。このことは、カルバイン分子内の自己消化を受ける部位(N-末端)はカルバスタチンの存在如何に関わらず活性中心とアクセスでき、かつカルバインもプロテアーゼ活性を発揮できるということを物語っている。ということは、おそらくカルバスタチンの阻害様式は、基質とカルバインとの親和定数(K_m)と同程度の親和定数で、カルバインの活性中心とは別の「カルバスタチン結合サイト」に結合し、活性中心を覆い隠すことによってカルバインの活性を阻害すると考えられる。この点についての研究は現在進行中であるが、機能の不明なままであるカルバインドメインⅢと関連して注目され始めている。前に述べたように細胞内プロテアーゼとは両刃の剣であるためその活性制御には極めて厳密なシステムが要求される。カルバインの生理機能を理解しようとする上でカルバスタチンの存在を考え合わせることは必要不可欠であると言えよう。分子進化の境地から、本論文でもカルバイン-カルバスタチン系の進化過程について考察を加えてみた。

カルバインの生理機能を考えるにあたって、忘れてはならないのがカルバインの細胞内局在(localization)、及び局所化(translocation)ということである。カルバインに限らず情報伝達を達成するためには、すべての「部品」が漫然と細胞質のスープの中に浮かんでいるだけではいけない。然るべき「部品」が然るべき所に在って、あるいは、移動して初めて情報伝達「経路」というものが動く。カルバイン、カルバスタチンについては、基本的に細胞質に拡散的に存在するものと膜、オルガネラに結合して存在するものの両方がある⁽⁵⁶⁾⁽¹¹⁰⁾⁽¹¹¹⁾。細胞分裂において膜や核に移行するらしい⁽⁹⁹⁾⁽¹¹⁴⁾という報告もあるがそれ以上のことは判明していない。今後、抗体を用いた研究によってさらに詳しいことが解明されていくと思われるが、細胞骨格系の研究と同時進行するべきものであり、かつそうして初めて細胞という非常に巧妙に組み立てられた生存機械の全体像が見えてくることであろう。その道のりはカルバインに限らず、すべての「部品」を研究している者にとって同等に厳しく、永いものであるに違いないが、いつか細胞の仕組みがすべて明確になる日がくるであろう。

カルバインを考える上で、最後につけ加えたい事は、「プロテアーゼ」として以外の活性である。カルバインは既に述べたように4つのドメインから形成され、そのⅢドメインは未だに機能がはっきりしていない。このドメインがまだ同定されていない機能を持つ可能性は十分にある。即ち、カルシウム依存的に、例えば他のタンパク質に結合するなどして、「部品」の機能を制御しているのかも知れない。もちろん、カルバインの高次構造を形成する上で機能しているのかも知れないが、大事なことはプロテアーゼということに心を奪われ過ぎないことである。プロテアーゼは、生体の「部品」であるタンパク質を分解するという非常に動的な作用を持っているため、往々にしてそのタンパク質分解活性に目を奪われる。もちろんプロテアーゼ活性もそれ自体でたいへん重要な機能であることに間違いない。プロテアーゼ活性のみがその分子の機能と考えられる場合はその活性のみを探索すれば良いわけだが、カルバインやMCPなどのように細胞内にあって、複雑な機能を担っていることが強く予測される時は十分に慎重にその構造-機能相関を考えなくてはならない。特に今回新たに見いだされたp94分子は m - μ -カルバイン大サブユニットに加えてさらに未知の構造を含んでいる。この点を含めて本論文でも考察を加えた。

以上長々と述べてきたように、カルバインについては、特にその構造や生化学的性質に関してかなり詳しく研究されてきているものの、細胞内プロテアーゼとして重要な機能であると考えられる細胞内情報伝達系酵素との *in vivo* における相互作用の詳細についてはまだまだ深い研究が必要である。しかしながら、カルバインの *in vivo* の機能を考える上で、カルバインが、特にある組織で強いということもなく、ほぼ全ての組織に発現していることは、カルバインの普遍性を示唆はするものの、実験系が組み立て難いという大きな欠点を含んでいる。すなわち、細胞の基本的な生命活動に関わりが深ければ深いほど、これに摂動をかけたときに細胞が受ける影響も大きく、一度に多くの事象が誘導されすぎるために、カルバインの直接の作用を特定し難くなる。これらの問題点を克服するためには機能の限定したカルバインの存在が助けになると考えられる。本論文で新たに見いだしたp94は構造的に見ると、 m - μ -カルバイン大サブユニットと同一の機能を担っていても不思議ではない分子である。しかし、p94は骨格筋特異的な発現を示す他、多くの興味深い性質を有していた。この点は、p94を発現していない細胞、組織が多く存在し、ここにp94を発現させてその影響を見るなどの実験系を簡単に組めることを意味している。また、骨格筋はある意味で特殊な器官であり、非常に合目的な組織であるため、逆にp94の機能を考察するための材料が容易に手に入り得るとも考えられる。そして、もちろんp94の特異的な機能は骨格筋の機能を考える上で必須であり、逆に m - μ -カルバインと共通する点はカルバインの生理機能を考える上で重要となってくる。さらに、p94と m - μ -カルバインとの関係の進化的考察を加えることによりカルバインの機能に対する新たな側面を見いだすことができるかも知れない。つまりこの論文は、まずカルバインの新しいメンバーであるp94を構造的に詳しく解析し、次にp94に特異的に見られる現象を解析し、これらを総合的かつ分子進化論的に考察し最終的には、細胞内プロテアーゼとして細胞内の情報伝達経路に関与する、カルバインの機能的位置付けについて考察を加えたものである。かなり *over-speculation* が含まれているが、ここに述べられる推察が少しでも、今後カルバインの生理機能の解明に役立てば幸いである。

III. 実験材料

[1] ラット(*Rattus norvegicus*)

ラット(ノルウェーラット)は東京都臨床医学総合研究所実験動物研究部門より供与していただいた。ラットの各種臓器は解剖して摘出した後、直ち使用するか、あるいはドライアイス/エタノールまたは液体窒素中で凍結させ、使用時まで-80℃で保存した。

[2] 培養細胞

COS1及びCOS7細胞(サル腎臓由来)及びL8細胞(ラット筋芽細胞)は、東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門秋田朗子博士、西道隆臣博士及び同免疫研究部門反町典子博士より供与して頂いた。

[3] 大腸菌(*Escherichia coli*)

大腸菌K12株の誘導体である MM294, C600Hfr⁻, XL-1blue, LE392, YA21は、東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門榎森康文博士(現東京大学理学部生物化学科助教授)及び東洋紡績株式会社(東京)より寄与して頂いた。CJ231, BMH71-18mutSは宝酒造株式会社(京都)より購入した。

[4] 試薬類

<1> 各種酵素

AMV逆転写酵素はBio Rad社(Richmond, U.S.A.)、大腸菌DNAポリメラーゼIとその Klenow fragment、大腸菌アルカリ性ホスファターゼ(BAP)、牛牛小腸アルカリ性ホスファターゼ(CIAP)、T4DNAポリメラーゼ、T4DNAリガーゼ、T4ポリヌクレオチドキナーゼ、エキソヌクレアーゼⅢ及び耐熱性DNAポリメラーゼ(AmpliTaq™)は宝酒造株式会社、ヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤(RNasin)はPromega Biotec社(Madison, U.S.A.)、EcoRIメチラーゼはNew England Biolabs社(Beverly, U.S.A.)、ウシ脾臓リボヌクレアーゼA(RNaseA)、ウシ脾臓デオキシリボヌクレアーゼI(DNaseI)、卵白リゾチームはSigma社(St. Louis, U.S.A.)、ヌクレアーゼS1はPharmacia社(Uppsala, Sweden)、各種制限酵素は宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社、PL-Biochemicals社(Milwaukee, U.S.A.)、プロテインナーゼKはベーリンガー・マイハイム山之内株式会社(東京)より購入した。

<2> ヌクレオチド

λgt10ベクターアームはPromega Biotec社、pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, pTV118N, pTV119NベクターDNA、dATP, dCTP, dGTP, dTTP, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTPは宝酒造株式会社、λファージDNAは宝酒造株式会社、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈はPL-Biochemicals社、ATP、dc⁷GTPはベーリンガー・マイハイム山之内株式会社より購入した。また、T7プロモーター発現ベクターはPromega Biotec社のpGEM-2にβ-グロブリンのリーダー配列を挿入したもの⁽¹⁾⁻⁽³⁾を東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門の平井秀一博士より寄与して頂いた。

<3> キット

cDNA合成キットはPharmacia社の、*in vitro* バックケイジニングキットはStratagene Cloning Systems社(San Diego, U.S.A.)のGigapack II Gold、DNAラベリング及びハイブリダイゼーションキットはAmersham社(Buckinghamshire, England)のラピッドハイブリダイゼーションマルチプライムキット、欠失クローニングキットはPharmacia社の、*in vitro* 部位指向的突然変異導入キットは宝酒造株式会社のMutan-KTM、DNA自動シーケンサー用のシーケンス解析反応にはアプライドバイオシステムズジャパン社(California, U.S.A.)のTaq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit、PCRの反応には宝酒造株式会社のGeneAmpTM DNA Amplification Reagent Kit with AmpliTaqTM、ウェスタンブロット用ペルオキシダーゼ発色キット、アルカリフォスファターゼ発色キットはVector Laboratories社(California, U.S.A.)のVectastain ABCキット、ABC-APキット及びアルカリフォスファターゼ基質キット、DNA分離精製用キットは旭硝子株式会社(東京)のDNA PREPを用いた。

<4> アイソトープ

[α -³²P]dCTP(約 110 TBq/mmol)はNew England Nuclear Research Products社(Boston, U.S.A.)、[γ -³²P]ATP(約 220 TBq/mmol)及び[³⁵S]Met(約 45 TBq/mmol)はAmersham社より購入した。

<5> クロマトグラフィー担体、メンブランフィルター

オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースはPL-Biochemicals社、OligotexTM-(dT)₃₀は日本ロッッシュ株式会社(東京)、セファロースCL-4B、セファデックスG-50、セファデックスG-100、プロテインAセファロースCL-4B、DEAE-Dextran、PD-10カラムはPharmacia社より購入し、核酸ブロット用のナイロンフィルターはAmersham社のHybondTM-N及びHybondTM-N⁺または日本ボール社(東京)のBiodyne、タンパク質転写用メンブレンはアトー株式会社(東京)のクリアブロット・P膜、FPLC用イオン交換カラムはDEAE-5PW(TSK-gel)、を用いた。

<6> タンパク質

キーホールリンベット・ヘモシアニン(KLH)はCalbiochem社(California, U.S.A.)の*Megathura crenulata*由来のもの、MBSはPierce Chemical社(Illinois, U.S.A.)、フロイント・コンプリート・アジュバント及びフロイント・インコンプリート・アジュバントは和光純薬工業(大阪)、二次抗体はVector Laboratories社のアフィニティ精製ビオチン化抗ウサギIgG(H+L)ヤギ血清、及びTAGO社(California, U.S.A.)のアフィニティ精製アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギIgG(H+L)ヤギ血清を用いた。

<7> 培地

大腸菌の培養に用いた培地は、トリプトン、イーストエキストラクト、ビタミンアッセイカザミノ酸、バクトアガーがDIFCO Laboratories(Michigan, U.S.A.)、NZアミンが和光純薬工業のもので、真核細胞の培養に用いた培地は、DMEM培地、PBSが日水製薬株式会社(東京)、抗生物質、グルタミン溶液、2%トリプシン溶液、Foetal Bovine SerumはFlow Laboratories(Scotland)のものを用いた。

<8> 特殊試薬

DMSO はドータイドスベクトロトゾールのグレードのものをを用いた(和光純薬より購入)。

[5] 装置類

自動DNAシークエンサー、自動DNAシンセサイザー、及び自動ペプチドシンセサイザーはApplied Biosystems社のモデル373A、モデル380B、及びモデル430A、パイオイメーリアナライザはFUJIX(東京)のBAS2000システム、エレクトロポレーション・トランスフェクション装置はBIO-RAD Laboratories社(California, U.S.A.)のジーンバルサー及びキャパシタンスエクステンダー、PCR反応装置はPerkin Elmer Cetus社のDNA Thermal Cycler、デンシトメーターはACIジャパンのTIAS画像処理・電気泳動測定システム、ホモジナイザーは日音医理科器械製作所のヒスコトロン、超音波破砕器はBRANSON(Connecticut, U.S.A.)のSonifier Model 185、コンピューターは日本電気株式会社(東京)のPC-9801 VM2, VX4, RA2, DA/U2, NS/E、Apple 社(California, U.S.A.)のMachintosh IIfx, IIfx、プリンターは京セラのL-880、L-880S、キャノンのレーザーライター、日本電気株式会社のPR-3000PS、ワークステーションは東京都臨床医学総合研究所のApollo社(Masachusetts, U.S.A.)製DOMAIN Series 3500を用いた。

[6] ソフトウェア類

核酸・タンパク質データベースはPIR(Protein Identification Resource National Biomedical Research Foundation)リリース29.0(1991年6月)、GenBankリリース69.0(1991年9月)、及びEMBL Nucleotide Sequence Data Libraryリリース27.0(1991年5月)をワークステーション上の核酸・タンパク質解析プログラムIDEAS(Integrated Database and Extended Analysis System for nucleic acids and proteins: 京都大学化学研究所、金久實博士により作製された)を利用して、核酸・タンパク質の配列分析にはソフトウェア開発株式会社(東京)のGENETYX Ver. 5.1、英文ワードプロセッサにはMicro Pro International Corp. (東京)のWord Star Ver. 5.0、マイクロソフト株式会社(東京)のWord for Windows™、和文ワードプロセッサにはジャストシステム(徳島)の太一郎Ver. 4.3、作図、作画にはジャストシステムの花子Ver. 2.0及びClariscorp.(California, U.S.A.)、SystemSoft Corp.(福岡)のマックドローⅡ Ver. 1.1を用いた。

[7] 調製溶液類

特に指示したものを除き、試薬類は和光純薬工業株式会社(大阪)およびナカライテスク株式会社(京都)の試薬特級、生化学実験用、またはクロマトグラフィー用試薬を用いて、所定の濃度に溶解しオートクレーブにかけてから使用した。

<1> 基本試薬

<1>-(a) 3 M ナトリウム/酢酸緩衝液(pH 5.5):

酢酸ナトリウム溶液を酢酸でpH 5.5に合わせ、最終的にナトリウムイオン濃度が3Mになるようにした。使用時は必要に応じて適当に希釈した。

<1>-(b) 1 M トリス/塩酸緩衝液:

トリス溶液を塩酸で適当なpH(7.0~9.5)に合わせ、最終的にトリスの濃度が1 Mになるようにした。使用時は必要に応じて適当に希釈した。

<1>-(c) フェノール溶液:

65°Cで溶解したフェノールに0.2% 2-メルカプトエタノール/0.1 M トリス/塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えてよく攪拌してから水層を捨てた。この操作を、水層のpHが中性になるまで行って、最後は水層を1 cmほど残し、褐色瓶中で冷暗所に保存した。

<1>-(d) フェノール・クロロホルム溶液:

フェノール溶液に等量のクロロホルムを加えたもの。水層を1 cmほど残し、褐色瓶中で冷暗所に保存した。

<1>-(e) 0.5 M EDTA(pH 8.0):

EDTA(エチレンジアミン四酢酸)溶液を水酸化ナトリウム溶液でpH 8.0に合わせ、最終的にEDTAが0.5 Mになるようにした。使用時は必要に応じて適当に希釈した。

<1>-(f) TE:

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

1 mM EDTA(pH 8.0)

使用時は必要に応じて適当に希釈した。

<2> 制限酵素消化用緩衝液

次に示す組成のものを用いた(滅菌、除菌してある溶液を混合して作った)。

	10×L	10×M	10×H	5×SalI	10×SmaI
トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)	100 mM	100 mM	500 mM	250 mM	100 mM
塩化マグネシウム	100 mM	100 mM	100 mM	50 mM	100 mM
DTT(ジチオスレイトール)	10 mM	10 mM	10 mM	5 mM	10 mM
塩化ナトリウム	—	500 mM	1 M	1 M	—
塩化カリウム	—	—	—	—	100 mM

以上の緩衝液は最終的に1×の濃度になるようにして、以下に示す制限酵素に用いた。

10×L	<i>HpaII, KpnI, SacI</i>
10×M	<i>AluI, BstEII, DdeI, EcoRV, HaeIII, HincII, HindIII, MspI, PvuII, RsaI, Sau3A-I, XbaI</i>
10×H	<i>BamHI, BglII, EcoRI, PstI, ScaI, SphI</i>
5×SalI	<i>SalI</i>
10×SmaI	<i>SmaI</i>

<3> 電気泳動用試薬

<3>-(a) 50×TAE:

242.0 g トリス

57.1 ml 酢酸

18.6 g EDTA

純水で溶解し1lに合わせた。

使用時は最終的に1×の濃度になるようにした。

<3>-(b) 10×TBE:

108 g トリス

55 g ホウ酸

9.3 g EDTA

880 ml 純水

混合して溶解した。

<3>-(c) アガロース電気泳動用色素:

0.25% ブロムフェノールブルー(BPB)

0.25% キシレンシアノール(XC)

25% フィコール

<3>-(d) 40%アクリルアミド溶液:

38% アクリルアミド

2% N,N'-メチレンビスアクリルアミド

褐色瓶中で冷暗所に保存した。(オートクレーブはしない。)

<3>-(e) ゲル溶出液:

500 mM 酢酸アンモニウム

10 mM 酢酸マグネシウム

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 % SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)

<3>-(f) SDS-PAGE泳動緩衝液:

25 mM トリス

19.2 mM グリシン

0.1 % SDS

オートクレーブは必要ない。

<3>-(g) SDS-PAGE分離ゲル用緩衝液:

1.5 M トリス/塩酸緩衝液(pH 8.8)

1.6 % SDS

オートクレーブは必要ない。

<3>-(h) SDS-PAGE濃縮ゲル用緩衝液:

0.5 M トリス/塩酸緩衝液(pH 6.8)

1.6 % SDS

オートクレーブは必要ない。

<3>-(i) SDS-PAGEサンプル緩衝液:

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 6.8)

20 % グリセリン

4.0% SDS

0.4% BPB

オートクレーブは必要ない。

<3>-(j) 30%アクリルアミド溶液:

29.2% アクリルアミド

0.8% N,N'-メチレンビスアクリルアミド

褐色瓶中で冷暗所に保存した。(オートクレーブはしない。)

<3>-(k) SDS-PAGE洗浄液:

7.5 % 酢酸

5.0% メタノール

水道水に溶解した。(オートクレーブはしない。)

<3>-(l) SDS-PAGE染色液

50% メタノール

10% 酢酸

0.1% CBB

<4> ウェスタンブロット用試薬

<4>-(a) ウェスタンブロットプロットング緩衝液:

100 mM トリス
192 mM グリシン
20 % メタノール
SDS(最終濃度0.1 %)は、必要に応じて加えた。
<4>-(b) ウェスタンブロット洗浄用緩衝液:

0.5 M 塩化ナトリウム
25 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 7.5)
0.05% ツイーン20

<4>-(c) ブロッキング溶液:

5% スkimミルク
ウェスタンブロット洗浄用緩衝液に溶解した。

<4>-(d) 二次抗体溶液

0.5% ビオチン化二次抗体

又は

0.5% アルカリフォスファターゼ結合二次抗体

使用直前にブロッキング溶液に溶解した。

<4>-(e) ABC混液:

10 mlのウェスタンブロット洗浄用緩衝液にキットのアビジン溶液90 μ lと
ビオチン化ペルオキシダーゼ溶液90 μ lとを混合し、水中に30分間保温した後
に用いた(用時調製した)。

<4>-(f) ABC-AP混液:

10 mlのウェスタンブロット洗浄用緩衝液にキットのアビジン溶液90 μ lと
ビオチン化アルカリフォスファターゼ溶液90 μ lとを混合し、水中に30分間保
温したあとに用いた(用時調製した)。

<4>-(g) ペルオキシダーゼ基質溶液:

0.5% *o*-dianisidine

0.5% 4-chloro-1-naphthol

メタノールに溶解し-20℃に保存した。

<4>-(h) ペルオキシダーゼ発色液:

10 ml 純水

200 μ l ペルオキシダーゼ基質溶液

167 μ l 3M ナトリウム/酢酸緩衝液(pH 5.5)

1 μ l 31% 過酸化水素水

使用直前に混合し調製した。

<4>-(i) アルカリフォスファターゼ基質溶液

10 ml 0.1 M トリス/塩酸緩衝液(pH 8.2 または pH 9.5)

90 μ l 溶液1(キットに付属のもの)

90 μ l 溶液2(キットに付属のもの)

90 μ l 溶液3(キットに付属のもの)

使用直前に混合し調製した。

<5> DNAリン酸化試薬

<5>-(a) 10×リン酸化緩衝液:

500 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

100 mM 塩化マグネシウム

50 mM DTT

1 mM スペルミジン
<5>-(b) 5×リン酸化緩衝液:
500 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)
50 mM 塩化マグネシウム
35 mM DTT
5 mM ATP

<6> DNA, RNA抽出用試薬

<6>-(a) DNA抽出緩衝液:
500 mM EDTA
50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)
0.5 % ザルコシル
<6>-(b) 6 M グアニジニウムチオシアネート:
6 M グアニジニウムチオシアネート
5 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)
0.5 % ザルコシル

以上の濃度の溶液を調製し、オートクレーブはせずに保存して、使用する直前に0.713 % (v/v)の2-メルカプトエタノールを加えた。(これにより、2-メルカプトエタノールの濃度は0.1 Mとなる。)

<6>-(c) 5.7 M 塩化セシウム:
5.7 M 塩化セシウム
0.1 M EDTAナトリウム
水酸化ナトリウムでpHを7.5に合わせた。

<6>-(d) TE/SDS:
10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.4)
5 mM EDTA(pH 8.0)
1 % SDS

<6>-(e) 溶液D
250 g グアニジニウムチオシアネート
293 ml 純水
17.6 ml 0.75 M ナトリウム/クエン酸緩衝液(pH 7.0)
26.4 ml 10 % ザルコシル酸ナトリウム
混合して溶解し、(オートクレーブは必要ない)使用直前に
0.72 %の2-メルカプトエタノール
を加えて使用した。

<6>-(f) クロロフォルム/イソアミルアルコール混液A
クロロフォルム、イソアミルアルコールを24:1の割合で混合した。

<7> 核酸トランスファー用試薬

<7>-(a) アルカリ変性剤:
0.5 M 水酸化ナトリウム
1.5 M 塩化ナトリウム
<7>-(b) 中和剤:
0.5 M トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)
1.5 M 塩化ナトリウム
<7>-(c) 20×SSC:
3 M 塩化ナトリウム

0.3 M クエン酸三ナトリウム

使用時は必要に応じて適当に希釈した(0.1 × ~ 6 ×)。また、必要に応じて最終濃度0.1 %のSDSを加えて用いた。

<8> ハイブリダイゼーション用試薬

<8>-(a) 5×Denhardt's溶液:

1 % BSA

1 % ポリビニルピロリドン

1 % フィコール

0.22 μmのフィルターを通して除菌し、冷所に保存した。

<8>-(b) 10/3×NET:

3.33 M 塩化ナトリウム

33.3 mM EDTA

167 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

<8>-(c) 10×MOPS緩衝液:

0.4 M MOPS(モルフォリノプロバンスルホン酸)

0.1 M 酢酸ナトリウム

10 mM EDTA

水酸化ナトリウムで pH を 7.0 に合わせた。

<9> 培地、培養液

<9>-(a) χ-ブローズ A:

2.5 % トリプトン

1 % 酵母抽出物

0.1 % グルコース

20 mM 硫酸マグネシウム

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

必要に応じて1/1000量の100 mg/mlアンピシリン(水溶液、オートクレーブはしない)を加えて使用した。

<9>-(b) χ-ブローズ B:

2.5 % トリプトン

1 % 酵母抽出物

0.1 % グルコース

0.6 % 塩化ナトリウム

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

必要に応じて1/1000量の40 mg/mlテトラサイクリンを加えて使用した。

<9>-(c) LB:

1 % トリプトン

0.5 % 酵母抽出物

1 % 塩化ナトリウム

必要に応じて1/1000量の100 mg/mlアンピシリンまたは、40 mg/mlテトラサイクリンを加えて使用した。

<9>-(d) NZCYM:

1 % NZアミン

0.5 % 塩化ナトリウム

0.5 % 酵母抽出物

0.1% カザミノ酸

0.2% 硫酸マグネシウム・7水和物

最終的に水酸化ナトリウム溶液でpHを7.5に合わせた。

<9>-(e) SOB(Son of a bith (I) buffer):

2% トリプトン

0.5% 酵母抽出物

10 mM 塩化ナトリウム

2.5 mM 塩化カリウム

以上の組成の溶液をオートクレーブにかけた後、1/100 量の1 M 塩化マグネシウム/1 M 硫酸マグネシウムを加えた。

<9>-(f) SOC:

SOBに1/100量の2 M グルコース(オートクレーブはせず、0.22 μ mのフィルターを通して除菌したもの)を加えた。

<9>-(g) M9^(*)medium:

1.0 g 塩化アンモニウム

6.0 g リン酸水素二ナトリウム

3.0 g リン酸二水素カリウム

0.5 g 塩化ナトリウム

以上の試薬を純水約800mlに溶解し、水酸化ナトリウム溶液(または塩酸)でpHを7.4に合わせた後に純水で総量を968 mlにする。これをオートクレーブした後に、予め0.22 μ mのフィルターを通して滅菌してある以下の溶液を次のように加えた。

20 ml 10% カザミノ酸

10 ml 20% ブドウ糖

2 ml 1 M 硫酸マグネシウム

0.1 ml 1 M 塩化カルシウム

さらに使用する直前に使用する分だけ分注し37℃に平衡化し、以下の溶液を次のように加えた。

1/1000量 1 M IPTG

1/2000量 100 mg/ml Ampicillin

<9>-(h) NZプレート:

NZCYMに1.5%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、滅菌プレート(大または小)に適量を流し込んで固まらせた。

<9>-(i) アガロースプレート:

NZCYMに1%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、滅菌プレート(小)に適量を流し込んで固まらせた。

<9>-(j) 抗生物質含有プレート:

LBまたは χ -ブロースA, Bに1.5%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、約50℃まで冷却した後、1/1000量の適当な抗生物質を加えて混合し、すばやく滅菌プレート(小)に適量を流し込んで固まらせた。

<9>-(k) ソフトアガロース:

NZCYMに0.7%のアガーを加えてオートクレーブにより滅菌溶解し、約50℃まで冷却しその温度で使用時まで保温した。

<9>-(l) Terrific Broth

A液: 12 g トリプトン

24 g 酵母抽出物

4 ml グリセリン

純水で960 mlにし、オートクレーブにかけた。

B液: 23.1 g リン酸二水素カリウム

125.4 g リン酸水素二カリウム

純水で400 mlにし、オートクレーブにかけた。

60℃に冷却後、A液に40 mlのB液を加えて用いる。 *

<10> 抗生物質

抗生物質は、以下に示す濃度に()内に示す溶媒を用いて調整した。

アンピシリン 100 mg/ml (50% エタノール)

テトラサイクリン 40 mg/ml (エタノール)

クロラムフェニコール 34 mg/ml (エタノール)

カナマイシン 35 mg/ml (エタノール)

ストレプトマイシン 30 mg/ml (純水)

<11> cDNA合成用試薬

以下の試薬はすべて正確に、かつ、専用に調製した。

<11>-(a) 2×ローディング緩衝液:

40 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

1 M 塩化ナトリウム

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 % SDS

使用時は必要に応じて2倍に希釈した。

<11>-(b) 洗浄緩衝液:

20 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

0.1 M 塩化ナトリウム

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 % SDS

<11>-(c) 溶出緩衝液:

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 % SDS

<11>-(d) 10×オリゴテックス溶出緩衝液:

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

10 mM EDTA(pH 8.0)

1 % SDS

<11>-(e) オリゴテックス洗浄緩衝液:

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

100 mM 塩化ナトリウム

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 % SDS

<11>-(f) 1M トリス/塩酸緩衝液(pH 8.3 at 42°C):

12.1 g トリス

80 ml 純水

混合して溶解し、正確に42℃に合わせてから塩酸でpH 8.3に調製し、最終的に純水で100 mlに合わせた。

<11>-(g) 4×二次鎮反応緩衝液:

80 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

20 mM 塩化マグネシウム

40 mM 硫酸アンモニウム

400 mM 塩化カリウム

400 mM 4dNTPs

200 mg/ml BSA

<11>-(h) 10×T4 DPase緩衝液:

330 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.9)

660 mM 酢酸カリウム

100 mM 酢酸マグネシウム

5 mM DTT

1 mg/ml BSA

<11>-(i) 3×メチル化用緩衝液:

150 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

3 mM EDTA(pH 8.0)

15 mM DTT

30 mM SAM(S-アデノシルメチオニン)

<11>-(j) 消化用緩衝液:

200 mM 塩化ナトリウム

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

10 mM 硫酸マグネシウム

<11>-(k) 2×TM:

20 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

20 mM 塩化マグネシウム

<11>-(l) アルカリ-アガロースゲル:

1 % アガロース

30 mM 水酸化ナトリウム

5 mM EDTA(pH 8.0)

<11>-(m) アルカリ-アガロースゲル泳動緩衝液:

30 mM 水酸化ナトリウム

5 mM EDTA(pH 8.0)

<12> ファージDNA精製用試薬

<12>-(a) SM溶液:

100 mM 塩化ナトリウム

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

0.2 % 硫酸マグネシウム・7水和物

0.01 % ゼラチン

<12>-(b) 20 % PEG/SM:

20 % ポリエチレングリコール#6000

2 M 塩化ナトリウム

以上の濃度になるようにSM溶液に溶解した。

<13> 形質転換用試薬

<13>-(a) 10×CIAP buffer

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.3)

10 mM 塩化亜鉛

<13>-(b) 2×TSS:

20 % ポリエチレングリコール#8000

10 % Dimethylsulfoxide(DMSO)

5 mM 硫酸マグネシウム

1 % トリプトン

0.5% 酵母抽出物

1 % 塩化ナトリウム

最終的に水酸化ナトリウム溶液でpHを6.5に合わせた。

<13>-(c) 10×ライゲーション緩衝液:

100 mM 塩化マグネシウム

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)

10 mM DTT

5 mM ATP

1 mg/ml BSA

滅菌、除菌してある溶液を混合して作った。

<13>-(d) トランスフォーメーション緩衝液:

10 mM MES (2-(N-モノホリノ)エタンスルホン酸)/カリウム緩衝液(pH 6.3)

100 mM 塩化ルビジウム

45 mM 塩化マンガン

10 mM 塩化カルシウム

3 mM 塩化ヘキサアンミンコバルト(III)

以上の濃度になるようにMili Qを通した純水に溶解した後、0.22 μ mのフィルターを通して除菌し、冷暗所に保存した。

<13>-(e) 2.25 M DTT:

2.25 MDTT

40 mM 酢酸/カリウム緩衝液(pH 6.0)

滅菌、除菌してある溶液を混合して作った。

<14> プラスミドDNA精製用試薬

<14>-(a) リゾチーム緩衝液:

50 mM グルコース

10 mM EDTA(pH 8.0)

25 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

<14>-(b) アルカリSDS溶液:

0.2 M 水酸化ナトリウム

1 % SDS

<14>-(c) ハイソルト溶液:

147.2 g 酢酸カリウム

57.5 ml 酢酸

純水に溶解し500 mlにする。

<14>-(d) STET-L:

100 mM 塩化ナトリウム

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

1 mM EDTA(pH 8.0)

5 % トライトンX-100

2.5 M 塩化リチウム

<14>-(e) 20 %PEG #6000溶液:
20 % ポリエチレングリコール(#6000)
2.5 M 塩化ナトリウム
<14>-(f) 20 %PEG #8000溶液:
20 % ポリエチレングリコール(#8000)
2.5 M 塩化ナトリウム
<14>-(g) STE:
100 mM 塩化ナトリウム
10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)
1 mM EDTA(pH 8.0)

<15> 一方向性欠失クローン作成用試薬

<15>-(a) 10×S1緩衝液:
0.3 M カリウム-酢酸緩衝液(pH 4.6)
2.25 M 塩化ナトリウム
45 % グリセリン
2.7 mg/ml 硫酸亜鉛
<15>-(b) 5×リガーゼ緩衝液:
250 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.6)
25 mM 塩化マグネシウム
5 mM DTT
5 mM ATP
25 % PEG# 6000
<15>-(c) 1×エキソⅢ緩衝液:
66 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)
0.66 mM 塩化マグネシウム
<15>-(d) S1混液:
27 μl 10×S1緩衝液
172 μl 純水
60 units S1ヌクレアーゼ
<15>-(e) S1停止液:
0.3 M トリス
50 mM EDTA
<15>-(f) クレノウ混液:
3 μl 0.1 M トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)
6 μl 1M 塩化マグネシウム
20 μl 純水
3 units DNAポリメラーゼクレノウ断片
<15>-(g) リガーゼ混液:
0.8 ml 純水
0.2 ml 5×リガーゼ緩衝液
5 units T4DNAリガーゼ
<15>-(h) ヌクレオチド溶液A:
12.5 mM dATP
12.5 mM dCTP
12.5 mM dGTP

12.5 mM dTTP

<16> 一本鎖DNA調製用試薬

<16>-(a) フェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール混液

フェノール, クロロフォルム, イソアミルアルコールを25:24:1の割合で混合した。

<16>-(b) クロロフォルム/イソアミルアルコール混液B

クロロフォルム, イソアミルアルコールを24:1の割合で混合した。

<17> PCR用試薬

<17>-(a) 10×Taq緩衝液

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.3 at 25°C)

500 mM 塩化カリウム

15 mM 塩化マグネシウム

0.1 % ゼラチン

<17>-(b) スクレオチド溶液B

1.25 mM dATP

1.25 mM dCTP

1.25 mM dGTP

1.25 mM dTTP

<18> ジデオキシ配列分析用試薬

<18>-(a) 10×シーケンス緩衝液

100 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)

1 mM EDTA(pH 8.0)

50 mM 塩化ナトリウム

70 mM 塩化マグネシウム

58 mM 2-メルカプトエタノール

<18>-(b) RI法クレノウ用チェイス溶液:

1 mM dATP

1 mM dCTP

1 mM dGTP

1 mM dTTP

<18>-(c) RI法クレノウ用ジデオキシミックス:

以下に示す濃度に調製した。

	G mix	A mix	T mix	C mix
dGTP	12.4 μ M	82.6 μ M	82.6 μ M	62.5 μ M
dATP	82.6 μ M	12.4 μ M	82.6 μ M	62.5 μ M
dTTP	82.6 μ M	82.6 μ M	12.4 μ M	62.5 μ M
dCTP	12.4 μ M	12.4 μ M	12.4 μ M	12.5 μ M
トリス/塩酸 緩衝液(pH 7.5)	16.5 mM	16.5 mM	16.5 mM	12.5 mM
EDTA	165 μ M	165 μ M	165 μ M	125 μ M
ddGTP	66.1 μ M	0 μ M	0 μ M	0 μ M

ddATP	0 μ M	124 μ M	0 μ M	0 μ M
ddTTP	0 μ M	0 μ M	248 μ M	0 μ M
ddCTP	0 μ M	0 μ M	0 μ M	125 μ M

<18>-(d) RI法クレノウ用ローディング緩衝液

1 mM EDTA(pH 8.0)

0.1 %ブロムフェノールブルー

0.1 %キシレンシアノール

フォルムアミドに溶解した。

<18>-(e) 色素終結法用反応混合液(20反応分)

80 μ l 5×TACS緩衝液 (キットに付属)

20 μ l スクレオチドミックス (キットに付属)

10 μ l A-ターミネーターミックス (キットに付属)

10 μ l C-ターミネーターミックス (キットに付属)

10 μ l G-ターミネーターミックス (キットに付属)

10 μ l T-ターミネーターミックス (キットに付属)

5 μ l AmpliTaq™ DNAポリメラーゼ (キットに付属)

<18>-(f) 色素終結法ローディング緩衝液

50 mM EDTA(pH 8.0)とフォルムアミドとを体積比で1:5に混合した。

<19> タンパク質分析用試薬

<19>-(a) カルバイン用緩衝液A

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

1 mM EDTA(pH 8.0)

1 mM 2-メルカプトエタノール

Milli Q水を用いて使用直前に調製した。

<19>-(b) カルバイン用緩衝液B

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

1 mM EDTA(pH 8.0)

1 mM 2-メルカプトエタノール

0.5 M 塩化ナトリウム

Milli Q水を用いて使用直前に調製した。

<19>-(c) カルバイン用緩衝液C⁽⁺⁾

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

5 mM EDTA(pH 8.0)

5 mM 2-メルカプトエタノール

使用直前に調製した。

<19>-(d) カルバイン用緩衝液C⁽⁺⁾

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

5 mM EDTA(pH 8.0)

5 mM 2-メルカプトエタノール

2 mM PMSF

10 μ g/ml ロイペプチン

10 μ g/ml E-64

使用直前に調製した。

<19>-(e) カルバイン用緩衝液D

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

10 mM EDTA(pH 8.0)

5 mM 2-メルカプトエタノール

使用前に調製した。

<19>-(f) カルバイン用緩衝液E

100 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

5 mM 2-メルカプトエタノール

0.7 mg/ml カゼイン

使用前に調製した。

<19>-(g) PBS^(c)

5 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 7.0)

150 mM 塩化ナトリウム

<19>-(h) PBS^(d)

5 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 7.0)

150 mM 塩化ナトリウム

2 mM PMSF

10 µg/ml ロイペプチン

10 µg/ml E-64

使用前に調製した。

<19>-(i) Hasselbach-Schneider 緩衝液

600 mM 塩化カリウム

100 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 6.4)

1 mM 塩化マグネシウム

<20> *in vitro*転写, 翻訳用試薬

<20>-(a) トランスレーションプリミックス(10サンプル分)

50 µl L-[³⁵S]-Met

55 µl 翻訳反応用カクテル(キットに付属)

20 µl 1M 酢酸カリウム(キットに付属)

5 µl 32.5 mM 酢酸マグネシウム(キットに付属)

<21> Site-directed Mutagenesis 用試薬

<21>-(a) アニール緩衝液

200 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

100 mM 塩化マグネシウム

500 mM 塩化ナトリウム

10 mM DTT

<21>-(b) エクステンション緩衝液

50 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 8.0)

60 mM 酢酸アンモニウム

5 mM 塩化マグネシウム

5 mM DTT

1 mM NAD

0.5 mM dATP

0.5 mM dCTP

0.5 mM dGTP

0.5 mM dTTP

<22> 抗体作製用試薬

<22>-(a) 脱保護用試薬:

0.75 g フェノール
0.25 ml 1,2-エタンジチオール
0.5 ml チオアニソール
0.5 ml 純水
10 ml TFA

<23> 細胞培養用試薬

<23>-(a) DMEM培地

市販のダルベッコ変法イーグル培地9.5gを純水に溶解して1lにした。組成は次のようになる。

6400.0 mg	塩化ナトリウム
400.0 mg	塩化カリウム
200.0 mg	塩化カルシウム
97.7 mg	硫酸マグネシウム
108.0 mg	リン酸二水素ナトリウム
0.1 mg	硝酸鉄(III)・9水和物
1000.0 mg	グルコース
110.0 mg	ビルビン酸ナトリウム
106.0 mg	コハク酸
27.0 mg	コハク酸ナトリウム・6水和物
84.0 mg	L-アルギニン
70.3 mg	L-システイン・1水和物
30.0 mg	グリシン
42.0 mg	L-ヒスチジン・1水和物
104.8 mg	L-イソロイシン
104.8 mg	L-ロイシン
146.2 mg	L-リジン塩酸塩
30.0 mg	L-メチオニン
66.0 mg	L-フェニルアラニン
42.0 mg	L-セリン
95.2 mg	L-スレオニン
16.0 mg	L-トリプトファン
89.5 mg	L-チロシン二ナトリウム塩
93.6 mg	L-バリン
7.2 mg	重酒石酸コリン
4.0 mg	葉酸
4.0 mg	ニコチン酸
4.0 mg	パントテン酸カルシウム
4.0 mg	塩酸ピリドキサル
0.4 mg	リボフラビン
7.2 mg	i-イノシトール
5.0 mg	フェノールレッド

これをオートクレーブで滅菌後、以下の試薬を加えた。

20 ml	200 mM グルタミン
25 ml	1 % 炭酸水素ナトリウム溶液
20 ml	ペニシリン, ストレプトマイシン溶液
10 ml	1M HEPES(pH 7.5)
100 ml	ウシ胎児血清

<23>-(b) PBS^(E+)

市販のダルベッコのPBS^(C) 9.6gを純水に溶解して1lにした。この組成は次のようになる。

8.00 g	塩化ナトリウム
0.20 g	塩化カリウム
1.15 g	リン酸水素二ナトリウム
0.20 g	リン酸二水素カリウム

<23>-(c) 20×TBS

25 mM	トリス/塩酸緩衝液(pH 7.4)
137 mM	塩化ナトリウム
5 mM	塩化カリウム
0.7 mM	塩化カルシウム
0.5 mM	塩化カルシウム

<23>-(d) 1×TBS

25 ml	20×TBS
0.3 ml	リン酸水素二ナトリウム

475 ml ガラス再蒸留水

別個にオートクレーブ滅菌したものを混合した。

<23>-(e) DEAE-dextran 溶液

10 mg DEAE-dextranを使用直前に10 mlの1×TBSに溶解した。

<23>-(f) DNA-DEAE-dextran混液(プレート1枚分)

3 µgの目的のDNAをTEで総量50 µlに合わせ、以下の試薬を加えた。

450 µl 1×TBS

500 µl DEAE-dextran 溶液

<23>-(g) トリブシン溶液:

1 ml 2%トリブシン溶液

99 ml/PBS^(E+)

混合し、分注して-20℃で保存した。

<23>-(h) 10×K-PBS

308 mM	塩化ナトリウム
1207 mM	塩化カリウム
81 mM	リン酸水素二ナトリウム
14.6 mM	リン酸二水素カリウム

<23>-(i) K-PBS

2 ml 10×K-PBS

50 ml 1 M 塩化マグネシウム

総量を滅菌水で20mlとした。

<24> 免疫沈降用試薬

<24>-(a) プロテインAセファロースCL-4B懸濁液

0.02 %アジ化ナトリウムを含む100 mMカリウム/リン酸緩衝液(pH 7.5) 0.5 mlに0.5 mlのプロテインAセファロースCL-4Bを加え、エッペンドルフチューブ中で混合し、1,700 g、4℃、1分間遠心し、上清をできる限り除去し、沈澱と等量の0.02%アジ化ナトリウムを含む100 mMカリウム/リン酸緩衝液(pH 7.5)を加え、懸濁して、用いた。

<24>-(b) 免疫沈降洗浄緩衝液

10 mM トリス/塩酸緩衝液(pH 7.5)

500 mM 塩化ナトリウム

0.5 % ノニデットP-40

<25> 免疫組織染色用試薬

<25>-(a) 3 %ホルマリン溶液

34 %ホルムアルデヒド溶液(市販ホルマリン)をPBS^①で11倍に希釈した。

<25>-(b) 0.2 % Triton X-100 溶液

Triton X-100をPBS^①で500倍に希釈した。

<25>-(c) 1 %及び0.1 %BSA溶液

BSAを1 %及び0.1 % (w/v) になるようにPBS^①で希釈した。

<25>-(d) 1M 炭酸/ナトリウム緩衝液(pH 9.5)

1M 炭酸ナトリウム溶液に1M 炭酸水素ナトリウム溶液を加えていき、pHを9.5に合わせた。

<25>-(e) グリセリン緩衝液

90 % グリセリン

50 mMナトリウム/炭酸緩衝液(pH 9.5)

1 % DafcoTM(退色防止剤)

IV. 実験方法

下線を引いた試薬の組成は、「実験材料」に述べた。

[1] 核酸溶液の濃縮⁽¹⁾⁽²⁾

<1> エタノール沈澱、イソプロパノール沈澱

核酸を含む溶液に、1/10量の3 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)及び、2~3倍量のエタノールを加えてエタノール沈澱を行った。または、1/10量の3 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)及び、3/5量のイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈澱を行った。核酸の沈澱は-80℃で10分以上静置した後(DNA、RNAの量が少ないときはこの時間を延長した)、0℃、13,000 x g で10~30分間遠心し、沈澱を70%エタノールで洗浄後、減圧下乾固させた。最後にこの沈澱を適量の純水またはTEに溶かした。

<2> 1-ブタノールによる濃縮

核酸を含む溶液に2~3倍量の1-ブタノールを入れ、よく攪拌してから軽く遠心し、1-ブタノール層を取り除いた。この繰り返しによって、水層が適当な量になるまで濃縮した。

<3> 凍結乾燥

核酸を含む溶液をシリコンコートしたエッペンドルフチューブに入れ、-80℃で凍結させ、これを遠心しながら減圧し、適当な量になるまで濃縮した。

[2] フェノール・クロロホルム抽出、フェノール抽出、クロロホルム抽出⁽¹⁾⁽²⁾

この操作は、核酸を含む溶液の除タンパク質に用いた。

核酸を含む溶液に等量のフェノール・クロロホルム溶液、フェノール溶液、またはクロロホルムを加え、十分に攪拌した後、室温で、5,000~13,000 x g、5分間遠心し、その水層を回収した。必要に応じてこの操作は複数回繰り返した。

[3] ショート・カラム・クロマトグラフィー⁽¹⁾⁽²⁾

径0.5 cm 長さ12 cm のシリコンコートしたバスツールピペットに、シリコンコートしたグラスウールを詰め、これに予め20倍量のTEを加えてオートクレーブにかけてあるセファデックス G-50、G-100またはセファロース CL-4Bを充填して総容積2.4 mlのカラムをつくり、これに試料を載せ、TEまたは1/10×TEで溶出し、6滴(約140 µl)ずつ分画した。

[4] DNAの電気泳動⁽¹⁾⁽²⁾

<1> アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルは0.5 µg/mlのエチジウムブロマイドを含む1×TAEに0.6~1.5%となるようにアガロースを加え、加熱溶解して作製した。検出はト

ランスイルミネーターを用いて、紫外線(波長 $\lambda=254\text{nm}$)照射により行い、ポラロイドフィルムに記録した。

<2> ポリアクリルアミドゲル電気泳動

<2>-(a) 非変性ゲル

表IV-Iに示した組成の液を混合し、これを、組み立てたゲル作製用ガラス板に流し込み、しばらく放置してゲル化させた。泳動試料には1/10量の電気泳動用色素を加え、 $1\times\text{TBE}$ 中、180~200 V 定電圧(約10 V/cm)で泳動した。検出は0.5 $\mu\text{g/ml}$ エチジウムブロマイド溶液で染色後、アガロースゲルと同様に検出・記録した。

<2>-(b) 変性ゲル(塩基配列決定用)

表IV-Iに示した組成の液を溶解して10分間脱気し、100~120 μl のTEMED(N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン)を加え、直ちに組み立てておいた60 cm \times 30 cmのシーケンサー用ガラス板(自動シーケンサーを用いるときは無蛍光ガラス板)に流し込みゲル化させた。泳動は30 mA 定電流、1600~2400 V 定電圧(30~40 V/cm)、または20 W 定電力で電気泳動した。泳動後、オートラジオグラフィまたは、自動シーケンサーの解析プログラムによって配列を検出・解析した。

[5] DNA断片のゲルからの回収

<1> DNA断片のアクリルアミドゲルからの回収

アクリルアミドゲルで電気泳動後、ランスイルミネーター(波長 $\lambda=354\text{nm}$)の上で目的のバンドを切り取り、シリコンコートしたガラス遠心管(COREX 15 ml)に入れガラス棒で十分にホモジネートした。これに1.5 mlのゲル溶出液を加え37°Cで3時間以上保温した後、室温、12,000 x gで10分間遠心し上清をとって0.22 μm のフィルターで濾過した。沈殿にさらに1 mlのゲル溶出液を加え、再び遠心し、上清はフィルターを通して先の上清と合わせ、この濾過液に7 mlのエタノールを加えてエタノール沈殿をした。0.3 mlの0.3 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)に溶かし、この液を1.5 ml チューブに移してからフェノール・クロロホルム抽出し、イソプロパノール沈殿で回収したDNAを最終的に30~40 μl の水またはTEに溶かしした。

<2> DNA断片のアガロースゲルからの回収

アガロースゲルで電気泳動後、ランスイルミネーター(波長 $\lambda=354\text{nm}$)の上で目的のバンドを切り取り、エッペンドルフチューブに入れ3倍容のヨウ化ナトリウム溶液(キットに付いているもの)を加えて55°Cに加熱、溶解した。これに、5 μl のガラスパウダー(キット付属)を加え、激しく混合後水中で5分間放置した。10,000 rpm、4°C、10秒間遠心して上清を除去し、今度は約1 mlの洗浄用緩衝液に沈殿を懸濁し、再び10,000 rpm、4°C、10秒間遠心して上清を除去した。沈殿を1 mlの洗浄用緩衝液でさらに2回洗浄した後、5 μl の純水を加えて懸濁し、55°Cで2~5分保温した。直ちに、10,000 rpm、4°C、30秒間遠心して上清を回収し、沈殿には、再び5 μl の純水を加えて懸濁し、55°Cで2~5分保温した。10,000 rpm、4°C、30秒間遠心して上清を回収し、先にとった上清と合わせてDNA溶液とした。

(表Ⅳ-I) DNA電気泳動用のポリアクリルアミドゲルの組成

各試薬は「実験材料」を参照。色素の移動度は各ゲルで各色素と同程度の移動度を示すDNA断片の長さを示している。

		非変性ゲル				変性ゲル	
		分析用 (1mm厚)		分取用 (2mm厚)		分析用 (1mm厚)	
		4%	6%	4%	6%	6%	8%
10×TBE		2.5 ml	2.5	5.0	5.0	10	10
40 % ポリアクリルアミド溶液		2.5 ml	5.0	5.0	10	15	20
尿素		—	—	—	—	50 g	50
純水		19.8 ml	17.3	39.6	34.6	38	33
10 % 過硫酸アンモニウム溶液		0.2 ml	0.2	0.4	0.4	0.3	0.3
TEMED		50 μ l	50	100	100	110	100
色素の移動度	BPB	90 bp	45	90	45	26	19
	XC	400 bp	160	400	160	106	75

[6] オリゴヌクレオチドの合成

ブローブ・ミュータジェネシスに用いたオリゴヌクレオチド(表IV-Ⅱ、図IV-1)はDNA合成機(Applied Biosystem Model 380B)を用いて合成した。

[7] ペプチドの合成

ペプチド抗体に用いたオリゴヌクレオチド(表IV-Ⅲ、図IV-1)はペプチド合成機(Applied Biosystem Model 430A)を用いて合成した。

[8] キャリアーDNAの作成

<1> 大腸菌DNAの抽出

1lの χ -培地に大腸菌 MM294 を接種し、37℃で一晩振とう培養した。翌日、7,000 rpm、室温で10分間遠心することによって集菌し沈澱を15mlのTEに懸濁した。これをソニファイアーで5分間は超音波破砕し、再び12,000 rpm、4℃で15分間遠心した。この上清を等量のフェノール溶液で抽出し、水層をエタノール沈澱後、5mlのTEに溶解した。これに0.1mgのRNaseAを加え、37℃で15分間保温し、続けて250 μ lの10% SDSと200 μ lの20mg/mlのプロテインゼンK溶液とを加えた。これを65℃に15分間保温してからフェノール抽出を2回行い、2-プロパノール沈澱した。沈澱は70%エタノールで洗浄後乾固し、最終的に10mg/mlになるようにTEに溶解した。

<2> サケ精子DNAの調製

市販のサケ精子DNAを約5mg/mlの濃度になるようにTEに溶解し、ソニファイアーで液状がさらさらになるまで超音波破砕を行った。これをフェノール抽出、フェノール・クロロフォルム抽出をおこない2-プロパノール沈澱した。沈澱は70%エタノールで洗浄後乾固し、最終的に10mg/mlになるようにTEに溶解した。

キャリアーDNAとして用いるときは、<1>と<2>を等量混合して用いた。

[9] DNAの標識

<1> 5'-末端標識

DNA約50 pmolに2 mlの10 \times リン酸化緩衝液と5 μ lの[γ -³²P]ATP(約1.85 MBq)とを混合し、総量が18 μ lとなるように水を加えた後、2 μ l(約10ユニット)のT4ポリヌクレオチドキナーゼを入れて37℃で30分間反応させた。反応後1 μ lの0.5 M EDTA(pH 8.0)と20 μ lのTEとを加え、フェノール・クロロホルム抽出し、10 μ gのキャリアーDNA(大腸菌DNA)を加えてセファデックス G-50 ショートカラムクロマトグラフィーを通して、標識されたDNAを未反応の基質と分けて回収した。

標識されたDNAはエンハンサー溶液なしでガラスバイアルに入れ、液体シンチレーターのトリチウムレンジで6秒間計数してその取り込み量を定量した。この条件では計測効率は約45%であった。即ち、1cpmは約2.2 dpmに相当した。

<2> ランダムプライミングによるDNA断片の標識⁽¹⁾

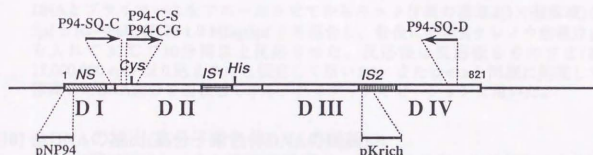
(表IV-II) 合成したオリゴデオキシヌクレオチドの配列

Wild Type Sequenceは実際の配列を示しており、この配列と異なる部位を下線で示した。いる。P94-SQ-C、P94-SQ-Dはそれぞれ変異部位を確認するためのシーケンスプライマーとして用いた。

Wild Type Sequence	5'- ... CTA GGG GAC TGC TGG CTT CTT... -3'
p94-C-S: 18mer	5'- CTA GGG GAC <u>AGC</u> TGG CTT -3'
p94-C-G: 21mer	5'- CTA GGG GAC <u>CCG</u> TGG CTT CTT -3'
p94-SQ-C: 20mer	5'-TTC GTC TGG AAG AGA CCT CC-3'
p94-SQ-D: 20mer	5'-GGT GAT GAT GTC ATA GAG TT-3'

(表IV-III) 合成したペプチドの配列

pNP94:	19 mer	NH ₂ -PTVISPTVAPRTGAEP RSC-COOH
pK-rich:	23 mer	NH ₂ -K RNTISVDRPVKKKKKNKPIIFVC-COOH



(図IV-1) 合成したオリゴヌクレオチド、ペプチドの位置

p 94 の模式図については「結果」を参照。模式図の上部に示してあるのがオリゴヌクレオチドの位置とその方向 (5'→3')、下部に示してあるのがペプチドの位置である。

DNA10~50 ng をエッペンドルフチューブに分取し、純水で体積を28 μ l に合わせ、沸騰水中で5分間加熱した後、氷水中で急冷する事によってDNAを変性させた。これにラビッドハイブリダイゼーションマルチプライムキットに付属している溶液1(5 \times 緩衝液)を10 μ l、5 μ l の溶液2(プライマーミックス)、5 μ l の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (約 1.9 MBq)を混合し、最後に溶液3(クレノウ溶液)2 μ l を入れて37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間反応させた。反応後は反応液をそのまま(約 15,000,000 cpm 取り込まれたと仮定して用いた)、または $<1>$ と同様に処理して標識したDNA画分を回収してから、ハイブリダイゼーションに用いた。

<3> ランダムプライミングによるDNA断片の標識⁽²⁾

DNA10~50 ng をエッペンドルフチューブに分取し、純水で体積を28 μ l に合わせ、これにメガプライムキットに付属している溶液1(プライマーミックス)を5 μ l 加え、沸騰水中で5分間加熱した。加熱後室温に放置し、変成したDNAとプライマーとをアニールさせてからキット付属の溶液2(5 \times 緩衝液)を5 μ l と $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (約 1.9 MBq)5 μ l とを混合し、最後に溶液3(クレノウ溶液)2 μ l を入れて37 $^{\circ}\text{C}$ で10分間以上反応させた。反応後は反応液をそのまま(約 15,000,000 cpm 取り込まれたと仮定して用いた)、または $<1>$ と同様に処理して標識したDNA画分を回収してから、ハイブリダイゼーションに用いた。

[10] 全DNAの抽出(高分子染色体DNAの調製)⁽³⁾

-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結してある臓器(肝臓)約2 g を、予め冷却した乳鉢中でよく粉砕してからガラス遠心管(COREX 15 ml)に移し、4 ml のDNA抽出緩衝液および40 μ l の20 mg/ml プロテイナーゼK溶液を加えて50 $^{\circ}\text{C}$ で4~6時間、ときどきゆっくりと攪拌しながら保温した。遠心(13,000 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間)の後、水層を別の遠心管に移し、3 ml のフェノール溶液を加えて、さらに5時間程ゆっくり攪拌し、フェノール抽出を行った。この操作を計3回行った後、水層を約5 l のTEに対して2回以上透析した。

透析した粗DNA溶液をエッペンドルフチューブに0.5 ml ずつ移し、それぞれに10 μ g のRNaseAを加えて37 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間保温した。フェノール・クロロホルム抽出を2回行ってRNaseAを除いた後、同様に透析した。

[11] 全RNAの抽出

<1> グアニジニウムチオシアネート/塩化セシウム法⁽¹⁾⁽²⁾

-80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結してあった1~3gの臓器を木槌で粉砕し、ファルコン 2070 チューブに移し、5倍量の6Mグアニジニウムチオシアネートを加え、直ちに2~3分間ホモジナイザーで均一にした後、15 $^{\circ}\text{C}$ 、13,000 \times g で20分間遠心した。上清を前もって2.5 ml の5.7 M塩化セシウムを入れた超遠心チューブに上層し、日立RPS-40Tローターで15 $^{\circ}\text{C}$ 、35,000 rpm で、15時間超遠心した。上清を除いた後、沈澱を手早く80%エタノールで洗浄し、減圧下乾固した。これを1mlのTE/SDSと1mlのフェノール溶液とを同時に加え、激しく攪拌して溶解・フェノール抽出を行いガラス遠心管(COREX 15 ml)に移し、1mlのクロロホルムを加え混合し、15 $^{\circ}\text{C}$ 、13,000 \times g で5分間遠心した。水層にエタノールを加えてエタノール沈澱し、遠心(13,000 \times g、0 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間)で集めた。沈澱を乾固し、1mlの水に溶解した。

<2> 小スケールシングルステップ法⁽⁴⁾

この方法は主に8cmのプレートに生育させた培養細胞からRNAを抽出するときに用いた。

プレート上の培養細胞を5mlのPBS⁽⁵⁾で2回洗浄した後、PBS⁽⁵⁾をよく吸い取ってから0.4 mlの溶液Dを加え、すばやくラバーポリスマンで細胞と溶液とを激しく攪拌した。これをエッペンドルフチューブ中に回収し、40 μ lの2 M ナトリウム/酢酸緩衝液(pH 4.0)及び0.4 mlのフェノール溶液を加えて激しく振とうした。さらに80 μ lのクロロホルム/イソアミルアルコール混液Aを加えて再び激しく攪拌してから氷中で10分間保温した。これを13,000 x g、4℃、15分間遠心し、上清を回収した後これに0.45 mlの2-プロパノールを加えて-20℃で10分間冷却した。再び13,000 x g、4℃、15分間遠心し、上清を完全に除去してから70%エタノールで洗浄し、その後0.3 mlの溶液Dに溶解した。次に0.3 mlの2-プロパノールを加えて-20℃で10分間冷却し、13,000 x g、4℃、15分間の遠心の後、上清を完全に除去してから70%エタノールで洗浄した。得られた沈澱は減圧乾固してから50 μ lの純水に溶解した。

[12] 核酸のトランスファー⁽¹⁾⁽²⁾

<1> サザンブロッティング

制限酵素消化したDNAを0.7%~1% アガロースゲル電気泳動した後、ゲルをアルカリ変性液に浸し、室温で30分間ゆっくり振とうしてDNAを変性させた(場合によっては次にゲルを中和液に移してさらに30分間振とうし中和した)。ラップを敷いた平らな台の上にゲルを載せ、ゲルの上にナイロンメンブレンを、その上に、前もって2×SSCに浸したWhatman 3MM濾紙、乾いた濾紙、乾いたペーパータオル(2~3cm分)を順に載せ、さらに、平らなガラス板と約1kgのおもりを重ね、室温で6時間以上放置してDNAをフィルターに転写させた。フィルター上にボールペンでゲルのスロットの位置をマークしてからフィルターを剥し、2×SSCに浸して、すばやく洗浄した後、ペーパータオルでよく水分を拭き取り、80℃で15分間乾燥させた。続けて紫外線トランスイルミネーターまたは紫外線殺菌灯を用いて3分または10分間紫外線を照射する事によって、DNAをナイロンメンブレン上に固定した。

<2> ノーザンブロッティング

RNAに1 μ lの10×MOPS緩衝液、3.5 μ lのホルムアルデヒド、10 μ lのホルムアミドを加え、水で総量を20 μ lにした後、55℃で15分間変性させ、氷中で冷却し、これをRNA用1%アガロースゲルで、2~4 V/cm 定電圧、1×MOPS緩衝液中で電気泳動した。泳動後のゲルは5分間水洗し、50mM水酸化ナトリウム/10mM塩化ナトリウム中に30分間、続いて、0.1 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)中で45分間、さらに、20×SSC中に1時間、振とうしながら浸した。この後<1>のサザンブロッティングと同様に、ナイロンメンブレン上にRNAを転写し、固定した。

<3> ブラーク及びコロニーリフティング

ブラークあるいはコロニーの生じたプレートの上に、丸型のナイロンメンブレンを密着させた。フィルターとプレートには針で穴を開けて位置をマークした後で、静かにピンセットでフィルターを剥し、平らな机の上で、アルカリ変性液の上にのせ、5分間静置した。次に、中和液の上にフィルターをのせ

中和させた。もう一度中和液上に5分間のせた後、最後に、 $2\times$ SSC上に5分間浸した。フィルターはペーパータオルの上で余分な水分を除き、 80°C で完全に乾燥させた後、紫外線をブラックあるいはコロニーが付着した面に10分間照射してDNAを固定した。

[13] ハイブリダイゼーション⁽¹⁾⁽²⁾

<1> サザンハイブリダイゼーション

<1>-(a) プレハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーション溶液 1 ml 当り 200 μg のキャリアーDNAを水中で希釈して 480 μl にし、沸騰水中で 10 分間加熱した後に氷水中で急冷した。これに 20 μl の 10% SDS、200 μl の 5 \times Denhardt's 溶液、300 μl の 10/3 \times NETを加えて、予洗液(3 \times SSC/0.1% SDS)中で洗ったフィルターと共にポリバッグにシールした。保温は<1>-(c)で最終的に洗浄に用いる温度で水浴中で 5 時間以上行った。

<1>-(b) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは(a)のプレハイブリダイゼーションと同様の組成の液にキャリアーDNAと共にプローブDNAを約 1×10^7 – 10^6 cpm/ml となるように加えた溶液を用意し、同様の手順で 20 時間以上行った。

<1>-(c) 洗浄

① 合成オリゴヌクレオチドプローブの場合

ハイブリダイゼーション後のメンブランフィルターを $6\times$ SSC/0.1% SDS 中、室温で二回洗浄し、さらに、G-C対を 4°C 、A-T対を 2°C として計算したDNAの融解温度(T_m)より 2 – 4°C 低い温度を洗浄温度に設定して $6\times$ SSC/0.1% SDS中で1–2回洗浄し、最後は風乾させた。

② ランダムプライムで作製したプローブの場合

フィルターはまず $2\times$ SSC/0.1% SDS中、室温で2回洗浄した後、 $2\times$ SSC/0.1% SDSまたは $0.1\times$ SSC/0.1% SDS中、 65°C で1–2回洗浄し、最後は風乾させた。

<1>-(d) オートラジオグラフィー

① X線フィルムへの露光

風乾したフィルターを Whatman 3MM 濾紙に貼付け、増感用スクリーン(Dupont Lightning Plus)を用いて -80°C でX線フィルムに露光させた。

② イメージングプレートへの露光

風乾したフィルターを Whatman 3MM 濾紙に貼付けサランラップで完全に包み込み、イメージングプレートに室温で露光させた。

<2> ノーザンハイブリダイゼーション

<2>-(a) プレハイブリダイゼーション

プレハイブリダイゼーション液は 100 μl の水溶液中に 240 μg のキャリアーDNAを加え、0.6 ml のホルムアミドの混合して、沸騰水中で10分間熱変性させた後に、氷水中で急冷した。これに、0.5 ml のRNAブロット用ハイブリダイゼーション溶液と 24 μl の10% SDSとを加えた。これを<1>と同様、フィルターと共にポリバッグ中にシールし、 42°C 水浴中で、4時間以上保温した。

<2>-(b) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション液はプレハイブリダイゼーションと同様の組成の溶液に、プローブDNAを約 1×10^6 cpm/ml になるように加えたものを用いて同様に20時間以上行った。

<2>-(c) 洗浄

洗浄は、55℃で、 $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS中で1回、 $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS中で2回行った。

<2>-(d) オートラジオグラフィー

<1>と同様に行った。

<3> コロニー及びブランクハイブリダイゼーション

<1>のサザンハイブリダイゼーションと同様の方法で行った。但し、フィルターの数が多い場合はプレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーション溶液をフィルターの間に少量ずつはさむように加えて、各フィルターに溶液が均一になるように注意した。

<4> ラピッドハイブリダイゼーション

この方法は、<1><2><3>のすべてに置換して用いる事が出来、シグナルもより強いものが得られるが、バックグラウンドが高いときもあるので必要に応じて使い分けた。

<4>-(a) プレハイブリダイゼーション

予め65℃に加熱したラピッドハイブリダイゼーション溶液をメンブレン 100cm^2 当たり2ml用意し、予洗液($3 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS)中で洗ったフィルターと共にポリバッグにシールした。保温は<1>と同様に水浴中で10分以上行った。

<4>-(b) ハイブリダイゼーション

まず使用するプローブの量を次のように計算しこれをエッペンドルフチューブに分取した。

[メンブレンの面積] $\times 0.02 \times$ [プローブの濃度] (cpm)

但し、プローブの濃度は以下のようにして用いた

- 1,000,000 cpm/ml: ノーザンプロットハイブリダイゼーション
(RNA含量が少ないと考えられるとき)
遺伝子サザンプロットハイブリダイゼーション
- 500,000 cpm/ml: ノーザンプロットハイブリダイゼーション
(RNA含量は普通のレベルであると考えられるとき)
- 300,000 cpm/ml: ブランクハイブリダイゼーション
(プローブにホモログを用いた場合)
クロンDNAサザンプロットハイブリダイゼーション
(プローブにホモログを用いた場合)
- 100,000 cpm/ml: コロニーハイブリダイゼーション
ブランクハイブリダイゼーション
(プローブに同一配列を持つDNAを用いた場合)
クロンDNAサザンプロットハイブリダイゼーション
(プローブに同一配列を持つDNAを用いた場合)

次にこれを純水で希釈して体積を0.5 ml程度にし、沸騰水中で五分間加熱し、続けて氷水中で急冷する事によってDNAを変成させた。このプローブ溶液を予め65℃に保温してあるラピッドハイブリダイゼーション溶液と混合し、ハイブリダイゼーションさせていたメンブレンを取り出して新たにこの混合液と共にビニール袋にシールした。保温は、適当な温度の水浴中で、ノーザンプロットハイブリダイゼーション・遺伝子サザンプロットハイブリダイゼーションのときは15時間、ブランクハイブリダイゼーション・クロンDNAサ

ザンプロットハイブリダイゼーション・コロニーハイブリダイゼーションの場合
は1-5時間行った。

<4>-(c) 洗浄

洗浄は<1>と同様に行った。

<4>-(d) オートラジオグラフィー

これも<1>と同様に行った。

[14] cDNAライブラリーの作製⁽¹⁾⁽²⁾⁽⁵⁾

<1> poly(A)+RNAの濃縮

<1>-(a) オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラムによる方法

オリゴ(dT)₁₂₋₁₈セルロースカラム(総容積~1ml)は、前もって1mlの0.1 M水酸化ナトリウム/5mM EDTA、続いて5mlの1×ローディング緩衝液を流すことによって平衡化しておく。[8]で抽出した全RNA1mgを含むRNA水溶液0.5 mlを65℃で5分間変性し、0.5 mlの2×ローディング緩衝液を加えて、室温まで冷却させた後、平衡化したカラムにチャージした。素通り画分をもう一度65℃で5分間熱処理してから室温まで冷却し、再びカラムにチャージした。次に、3mlの1×ローディング緩衝液を加えて洗った後、さらに2mlの洗浄緩衝液で洗い、最後に3mlの溶出緩衝液で吸着したRNAを溶出させた。分画は各0.5~1mlずつ行い、各々の260 nmの吸光度を測定して、溶出緩衝液で溶出された分画を集め、エタノール沈澱した。乾固した沈澱は、0.3 M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)に溶かして、もう一度エタノール沈澱を行い、最終的に1mg/mlの濃度になるように、水に溶解した。

<1>-(b) オリゴテックスによる方法

[11]で抽出した全RNA 0.5 mgを純水で総量450μlに希釈し、50μlの10×オリゴテックス溶出緩衝液を加えた。これによく攪拌したオリゴテックス(約2% w/v)を0.5 ml加え、65℃で5分間保温し、続けて氷水中に入れて冷却した。これに100 μlの5 M塩化ナトリウムを加え、37℃で10分間保温し、13,000 x g、4℃、15分間遠心し、その上清を棄却した(またはこれをリボゾーマルRNAとして回収した)。次に沈澱を0.5 mlのオリゴテックス洗浄液によく懸濁し、再び13,000 x g、4℃、15分間遠心し、その上清を棄却した。沈澱に、今度は0.4 mlの純水を加え、65℃で5分間加熱し、13,000 x g、4℃、15分間遠心し、その上清を新しいエペンドルフチューブに回収した。これをエタノール沈澱した後滅菌乾固し、10~15μlの純水に溶解した。

<2> cDNA合成

<2>-(a) 1本鎖cDNA合成

5μgのpoly(A)+RNAを水10 μlに溶解し、1μlの100 mM水酸化メチル水銀を加えて室温で5分間放置する。水中に移し2μlの700 mM β-メルカプトエタノール及び1μl(40ユニット)のRNasinを加え、さらに、10 μlの1mg/mlオリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマー、5μlの1Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.3 at 42℃)、7μlの1M塩化カリウム、2μlの250 mM塩化マグネシウム、5μlの10 mMデオキシヌクレオチドミックス、1μl(10 μCi)の[α-³²P]dCTP、及び6μlの水を加えて混合した。最後に2μl(40 ユニット)の逆転写酵素を入れてよく攪拌し、42℃で2時間反応した。1.5 μlの0.5 M EDTAを加えて反応を止め、フェノール・クロロホルム抽出を行った後、セファデックス G-100 ショートカラムを通し、cDNA:mRNAハイ

ブリッド画分を放射活性のピークとして集め、凍結乾燥によって、約 30 μ l になるまで濃縮した。

試料の一部は、1% アルカリアガロースゲルで電気泳動し、これをオートラジオグラフィによって cDNA の長さを検討した。

<2>-(b) 2本鎖 cDNA 合成

(a) で濃縮した溶液を水で総量 34 μ l とし、これに、12.5 μ l の 4 \times 二次鎖反応緩衝液、1 μ l (10 μ Ci) の [α - 32 P]dCTP、及び 2.5 μ l (25 ユニットの) T4DNA ポリメラーゼを加え、さらに 37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。1.5 μ l の 0.5 M EDTA を加えて反応を止め、フェノール・クロロホルム抽出を行った。その水層をセファデックス G-100 ショートカラムに通すことによって、2本鎖 cDNA 画分を集め、凍結乾燥によって約 30 μ l に濃縮した。

<2>-(c) EcoRI リンカーの付加

合成した 2本鎖 cDNA 溶液に水を加えて総量 31.3 μ l とし、さらに、16.7 μ l の 3 \times メチル化用緩衝液と 2.5 μ l (50 ユニットの) EcoRI メチラーゼとを加えて混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。反応後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、水層をセファロース CL-4B ショートカラムに通すことによって、メチル化した 2本鎖 cDNA 画分を集めた。凍結乾燥によって約 20 μ l に濃縮した後、エタノール沈澱を行った。

一方、2本鎖 cDNA に付加する EcoRI リンカー (5'-d[CGGAATTC CG]-3') 5 μ g は、50 μ l 反応液中で 5'-リン酸化反応 ((10)(i) に準ずる) をおこなった後、80 $^{\circ}$ C で 10 分間、56 $^{\circ}$ C で 30 分間、37 $^{\circ}$ C で 60 分間、25 $^{\circ}$ C で 60 分間、10 $^{\circ}$ C で 10 分間、順に保温してアニールさせ、2本鎖リンカーとして氷中または -20 $^{\circ}$ C で保存した。

エタノール沈澱後乾固した 2本鎖 cDNA に、上記のように調製した EcoRI リンカー 9 μ l (約 1 μ g) と 1 μ l の 10 mM ATP を加えて溶解し、1 μ l の T4DNA リガーゼを入れて 12 $^{\circ}$ C で 24 時間以上保温し、EcoRI リンカーと cDNA の連結反応を行った。これに、11 μ l の消化用緩衝液を加え、70 $^{\circ}$ C で 10 分間処理して T4DNA リガーゼを失活させた後、30 μ l の 1 \times High を入れ、EcoRI 120 ユニットで消化し、末端に EcoRI の粘着末端を形成させた。反応後、フェノール・クロロホルム抽出を行い、水層をセファロース CL-4B ショートカラムに通した後、凍結乾燥によって約 50 μ l に濃縮した。

<2>-(d) cDNA の長さによる画分

EcoRI リンカーを連結した 2本鎖 cDNA 約 600 ng を、低融点アガロースゲルで電気泳動し、遺伝子ライブラリーの作製 ((10) 時と同様に、約 0.5 kbp 以上の cDNA を分離・精製した。最終的に約 20 μ l に濃縮した溶液に、約 0.3 μ g の λ gt10 ベクターアーム DNA を加えた後エタノール沈澱し、沈澱を 10 μ l の TE に溶解した (これで約 30 ng/ μ l となった)。

<2>-(e) λ gt10 ベクター[®]への連結

0.5 kbp 以上の cDNA 1 μ l (30 ng)、1 μ l (500 ng) の λ gt10 ベクター、2 μ l の 2 \times TM を混合して、42 $^{\circ}$ C で 15 分間、室温で 15 分間放置してから氷中に移し、0.5 μ l の 0.1 M DTT、0.5 μ l の 10 mM ATP、及び 0.5 μ l の T4DNA リガーゼを加えて 13 $^{\circ}$ C で一晩連結反応した。これに、市販のパッケージングキットを用いて、22 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させることによって、連結した DNA をファージ粒子へパッケージした。パッケージング反応後、0.5-1 ml の SM 溶液と 2 滴のクロロホルムとを加え、軽く攪拌してから、4 $^{\circ}$ C で保存した。

<2>-(f) ファージの力価測定

① 指示菌の調製

0.2%のマルトースを含むNZCYM 20 ml に、予めプレートにストリークして独立したコロニーを形成させた指示菌(大腸菌 C600Hfr)を入れて一晩振とう培養した。4℃、2500 x g で 10 分間遠心して菌体を集め、予め4℃に冷却してある 10 ml の 10 mM 硫酸マグネシウムに懸濁した。

② ファージの感染

指示菌 100 μ l に、ファージ液(<2>-(e)で調製したものを 0.1~1 μ l)を加え、37℃で 15 分間保温した後、溶解して 50℃に保温しておいた 2.5 ml のソフトアガロースを加え、直ちにNZプレートにプレートした。37℃で一晩保温してプラークを生じさせた。

[15] スクリーニング⁽¹⁾⁽²⁾

<1> 単プラーク単離

プラークハイブリダイゼーションによって陽性となったプラークをマークの位置からプレート上に同定し、その部分のプレートをアガーごとバスターピペットで吸い取り、1滴のクロロホルムの入った 1 ml の SM 溶液中に入れよく攪拌し、室温で 1 時間以上放置した。この液のファージ力価を測定した後、1 プレート当たりプラーク $1-5 \times 10^4$ 個となるように NZ プレートにプレートし、ナイロンフィルターを作製してプラークハイブリダイゼーションを行い、独立した 1 つのプラークに由来する陽性プラークを単離した。目的のプラークを、同じくプレートのアガーごとバスターピペットで吸い取り、0.3 ml の SM 溶液中に入れ、よく攪拌しつつ室温で 1 時間以上放置してから 4℃で保存した。

<2> ファージ DNA の精製

(i) で単離したファージ懸濁液 50 μ l に、指示菌 (LE392) 150 μ l を加え、37℃で 15 分間保温してから、2.5 ml のソフトアガロースを加え、アガロースプレートにプレートした。37℃で一晩保温し、プレート全面が容菌斑で被われていることを確認し、これに 5 ml の SM 溶液と 2 滴のクロロホルムを加え、室温で 1 時間以上振とうした。ファージ粒子が遊離した懸濁液を遠心管に移し、0℃、13,000 x g で 5 分間遠心して菌残渣を除き、DNaseI 及び RNaseA を各 10 μ g 加えて 37℃で 25 分間消化した。これに 5 ml の 20% PEG/SM を加え氷中で 1 時間おいてから、0℃、13,000 x g で 10 分間遠心し、上清を除いた。沈澱には 0.5 ml の SM 溶液を入れてよく懸濁し、エッペンドルフチューブに移した。10 μ l の 10% SDS と 10 μ l の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加え、65℃で 10 分間保温してタンパク質を変性させた後に、フェノール・クロロホルム抽出を 3 回行った。水層の DNA はエタノール沈澱で集め、最終的に 30 μ l の TE に溶解し、-20℃で保存した。

<3> サブクロニング

<3>-(a) pUC8、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119 ベクターの調製

500 ng の pUC8 (または pUC18、pUC19、pUC118、pUC119) を過剰量の適当な制限酵素を用いて完全消化した後、続けてその反応液に 1/50 量の 2M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) 及び 1.5 μ l (0.6~0.8 ユニット) の BAP を加えて (あるいは、1/10 量の 10 \times CIAP 緩衝液及び 5 U の CIAP を加えて)、37℃で 1 時間保温することによって、切断末端のリン酸基を除いた。フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行った後、エタノール沈澱をして、最終的に 40 μ l の水に溶解した。

<3>-(b) インサートDNAの調製

ファージDNA溶液 10-20 μ l を 40-80 ユニットの *SalI* または *EcoRI* を用いて消化し、反応後、フェノール・クロロホルム抽出を2回行ってからエタノール沈澱をして、最終的に 10-30 μ l の水溶液とした。(約 10 ng/ μ l となるようにした。)

<3>-(c) 連結反応

(a) で調製した pUC8 (または pUC18) ベクター 10 ng (1 μ l)、(b) で調製したインサートDNA 30 ng (3 μ l)、及び 2 μ l の 10 \times ライゲーション緩衝液を混合し、水で総量を 20 μ l にした後、0.5 μ l の T4DNA リガーゼを加え、15 $^{\circ}$ C で 5 時間以上連結反応を行った。

<3>-(d) 形質転換

以下の3種の方法は、形質転換を行う時に用いるDNAの量に応じて使い分けた。即ち、形質転換の効率は①が 10 6 -10 7 であり、②が①の10分の1、③が②のさらに10分の1ぐらいであった。

① 塩化ルビジウム法^(a)

①-(i) コンピテント細胞の調製

大腸菌 XL-1 Blue または MM294 を SOB で一晩振とう培養し、その培養液 10 μ l を、300 ml の三角フラスコ中の 30ml の SOB に植え継ぎ、37 $^{\circ}$ C 水浴中で振とう培養した。A₅₅₀ の濁度が 0.3 になるまで培養した後(3-5時間)、氷中で 10 分間冷却した。ファルコン 2070 チューブに移して、4 $^{\circ}$ C、2,000 x g で 5 分間遠心して菌体を集めた。10 ml の トランスフォーメーション緩衝液に懸濁し、氷中に 10 分間放置した後、遠心(4 $^{\circ}$ C、2,000 x g、4 分間)で菌体を集め、2.4 ml の トランスフォーメーション緩衝液に懸濁した。これに 84 μ l の DMSO を加え、氷中で 5 分間放置した後、2.25 M DTT を 84 μ l 加えた。氷中で 10 分間放置し、さらに 84 μ l の DMSO を加え、氷中に 5 分間放置した後、コンピテント細胞とした。

①-(ii) 形質転換

ファルコン 2059 チューブにコンピテント細胞 210 μ l を取り、<3>-(c) で調製したDNA 10 μ l を加え、氷中に 30 分間放置した。42 $^{\circ}$ C の水浴中で 85 秒間の熱ショックを与え、氷中に戻した。これに、0.8 ml の SOC を加え、37 $^{\circ}$ C の水浴中で 1 時間振とう培養した。遠心(4 $^{\circ}$ C、1500 x g、3 分間)で沈澱を集め、適当な抗生物質を含んだ LB プレートに塗付した。プレートを 37 $^{\circ}$ C で一晩保温することによりコロニーを生じさせた。

② 塩化カルシウム法^{(b)(c)}

②-(i) コンピテント細胞の調製

大腸菌 XL-1 Blue または MM294 を SOB で一晩振とう培養し、その培養液 10 μ l を、300 ml の三角フラスコ中の 30ml の SOB に植え継ぎ、37 $^{\circ}$ C 水浴中で 3-5 時間振とう培養した。A₅₅₀ の濁度が 0.4 になるまで培養した後、氷中で 10 分間冷却した。ファルコン 2070 チューブに移して、4 $^{\circ}$ C、2,000 x g で 5 分間遠心して菌体を集めた。10 ml の 10 mM 硫酸マグネシウム溶液に懸濁し、氷中に 10 分間放置した後、遠心(4 $^{\circ}$ C、2,000 x g、4 分間)で菌体を集め、2.0 ml の 50 mM 塩化カルシウム溶液に懸濁した。これを氷中に 5 分-2 日間放置した後、コンピテント細胞とした(1 日放置のものが最も効率がよい)。

②-(ii) 形質転換

ファルコン 2059 チューブにコンピテント細胞 210 μ l を取り、<3>-(c) で調製したDNA 10 μ l を加え、氷中に 30 分間放置した。42 $^{\circ}$ C の水浴中で 90 秒間の

熱ショックを与え、水中に戻した後、これに1mlのSOCを加え、37℃の水浴中で1時間振とう培養した。遠心(4℃、1500 x g、3分間)で沈澱を集め、適当な抗生物質を含んだLBプレートに塗付した。プレートは37℃で一晩保温してコロニーを生じさせた。

③ ポリエチレングリコール法⁽⁹⁾

大腸菌 XL-1 Blue または MM294 を SOB で一晩振とう培養し、その培養液 100 μ l に 2 x TSS を 100 μ l と <3>-(c) で調製した DNA 10 μ l とを加え、水中に5分間放置した。そして、アンピシリンまたはテトラサイクリンまたはその両方を含んだ LB プレートに塗付し、37℃で一晩保温してコロニーを生じさせた。

<3>-(e) コロニーハイブリダイゼーション

生じたコロニーをフィルターに移し([12]<3>)、コロニーハイブリダイゼーション([13]<3>)によって陽性クローンを選定した。

<4> プラスミドDNAの調製⁽¹⁾⁽²⁾

<4>-(a) 小スケール法

① アルカリ法

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを、100 μ g/ml のアンピシリンを含む χ -培地 0.8 ml に植え、エッペンドルフチューブ中、37℃で4-6時間振とう培養した。培養液が十分な濁度に達したところで、15,000 x g、15秒間遠心して集菌し、これを 5mg/ml のリゾチームを含むリゾチーム緩衝液 80 ml に懸濁し、水中に15分以上放置した。次に、200 μ l のアルカリ SDS 溶液を加えて混合し、水中で5分間放置した後、150 μ l のハイソルト溶液を加えて攪拌し、水中に15分間以上放置した。遠心(0℃、14,000 x g、5分間)した後、上清を取ってフェノール・クロホルム抽出、エタノール沈澱した。沈澱は、乾固した後 100 μ l の TE に溶かし、100 μ l の 5M 塩化リチウムを加えて、水中に15分間以上放置した。遠心(0℃、15,000 x g、5分間)して上清を取り、エタノール沈澱によって DNA を回収し、最終的に 50 μ l の TE に溶解した。

② ボイリング法

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを 0.8 ml のアンピシリン(100 μ g/ml)を含む χ -培地に植え、37℃で4-6時間振とう培養し、培養液が十分な濁度に達したところで、13,000 x g、15秒間遠心して集菌し、沈澱を 80 μ l の STET-L によく懸濁した。この懸濁液に 20 μ l の 20 mg/ml のリゾチームを含む STET-L を加えて、攪拌してから室温で2分間放置した。次にこれを沸騰水中に置いて60秒間保温した後取り出し、2分ほど室温で冷却してから 13,000 x g、4℃、15分間遠心した。遠心後、沈澱を爪楊枝などを用いて丁寧に取り除き、残った上清に 60 μ l の 2-プロパノールを加えて、室温で10分間放置した。この後 13,000 x g、室温、15分間遠心し、得られた沈澱を 70% エタノールで洗浄してから減圧乾固し、最終的に 50 μ l の TE に溶解した。

<4>-(b) 中スケール法

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを、アンピシリンを含む 30 ml の χ -培地に植え継ぎ、37℃で一晩振とう培養した後、4℃、2,000 x g で7分間遠心することによって集菌した。5mg/ml リゾチームを含むリゾチーム緩衝液 1ml に沈澱した菌体を懸濁し、ガラス遠心管(COREX 15 ml)に移し、水中で15分間放置した。2ml のアルカリ SDS 溶液を加え、再び水中で5分間放置した後、1.5 ml の 3M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)を加えて混合し、水中でさらに15分間以上放置した。遠心(0℃、15,000 x g、10分間)して上清を回収し、フェノール・クロ

ロホルム抽出した後、水層に3mlのイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈澱を行った。遠心で集めた沈澱は、乾固した後、400 μ lのTEに溶解し、エッペンドルフチューブに移してから 10 μ gのRNaseAを加え、37°Cで30分間保温した。フェノール・クロロホルム抽出を3回行ってRNaseAを除いた後、水層を取りエーテル抽出をして残っているフェノールを除き、これに240 μ lの20%PEG#6000溶液を加えてよく混合し、水中に45分間以上放置した。遠心(0°C、15,000 x g、15分間)してDNAの沈澱を集め、80%エタノールで沈澱をよく洗ってから減圧乾固し、最終的に 150 μ lの水に溶解した。

<4>-(c) 大スケール法

プラスミドを含む大腸菌のコロニーを、アンピシリンを含む55 mlの χ -培地に植え継ぎ、37°Cで600nmの吸光度が0.6になるまで振とう培養した後、1lのアンピシリンを含むLB培地に加え37°Cで2.5時間振とう培養した。その後、5mlの34mg/mlのクロラムフェニコールを加え、続けて37°Cで一晩振とう培養した。4°C、13,000 x g、25分間遠心して集菌した後、沈澱した菌体を100mlのSTEに懸濁し、再び遠心して上清を棄却した。沈澱を18mlのリゾチーム緩衝液に懸濁し、これに10mg/mlのリゾチームを含むリゾチーム緩衝液2mlを加えて室温で5分間放置した後、40mlのアルカリSDS溶液を加え、再び室温で5分間放置した。その後、30 mlの3M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.7)を加えて混合し、水中でさらに10分間以上放置した。遠心(0°C、15,000 x g、10分間)して上清を取り、0.22 μ mのフィルターを通してから54mlのイソプロパノールを加えてイソプロパノール沈澱を行った。遠心で集めた沈澱は、乾固した後6mlのTEに溶解し、続けて6mlの5M塩化リチウム溶液を加えて水中に5分間静置した。遠心して上清を回収し、これに12mlの2-プロパノールを加えて直ちに室温で10分間遠心して沈澱を回収した。沈澱は70%エタノールで洗浄した後減圧乾固し、1mlのTEに溶解した後エッペンドルフチューブに移した。そこへ40 μ gのRNaseAを加え、37°Cで20分間保温した。反応液に471 μ lの20%PEG#8000溶液を加え、水中に5分間静置し、13,000 x g、4°C、5分間遠心し上清を完全に除去した後沈澱を400 μ lのTEに溶解した。これをフェノール・フェノール/クロロフォルム・クロロフォルムを用いてこの順番で抽出を行い、最終的に得られた水層に100 μ lの10M酢酸アンモニウム溶液及び1mlのエタノールを加えてエタノール沈澱した。沈澱は70%エタノールでよく洗ってから室温に30分間放置して自然乾固し、最終的に500 μ lの純水に溶解した。

[16] 方向性欠失クローン群の作製⁽¹⁰⁾

DNAのある位置から一方向に欠失したクローン群を作製するためにまず、その位置付近に2種の制限酵素切断部位を検索した。欠失させたい方向の末端にある方の制限酵素にはEcoRIなどのように5'-突出の形でDNAを切断する制限酵素を用い、欠失させたくない方の末端はPstIなどのように3'-突出の形でDNAを切断する制限酵素を用いた。5~10 μ gのDNAを上記のように2種の制限酵素で切断した後、フェノール・クロロフォルム抽出及びエタノール沈澱を行い60 μ lの1×エキソIII緩衝液に溶解した。これを37°Cで5分間保温し、次に500ユニットのエクソヌクレアーゼIIIを加えた後にすばやく攪拌し、以後30秒おきに2.5 μ lを採取し前もって7.5 μ lのS1混液を入れてあるエッペンドルフチューブに入れて室温で30分間放置した(25回行った)。そこに1 μ lのS1停止液を加えて70°Cで10分間加熱した。この段階で各チューブから2 μ lずつをサンプリング

し、アガロース電気泳動によって欠失度を確認した。続けて、チューブを37℃の保温機に移し、1μlのクレノウ混液を加え、2分後にさらに1μlの12.5 mM \times クレオチド溶液を加えて5分間保温した。この後室温に移して40μlのリガーゼ混液を加えて、室温で30分間放置してから大腸菌MM294 または XL-1blue に形質転換し、適当に欠失したクローンをクローニングし<4>に従ってプラスミドを精製した。

[17] 一本鎖DNAの調製⁽¹⁾⁽²⁾

<1> ヘルパーファージの調製

適当量(100-1000 pfu)のM13KO7ヘルパーファージを4ml チューブに分取し、0.5 ml の XL-1Blue 指示菌懸濁液を加え37℃で15分間放置してファージを感染させた後、予め50℃に平衡化させておいた3 ml のソフトアガロースを加え、カナマイシン含有のLBプレートの上に広げた。37℃で一晩保温して形成されたプラークの中から、孤立しているタービットプラークを一つパスツールピペットを用いて単離し、35 μg/mlの濃度のカナマイシンを含む2×YT培地20mlに接種し、激しく攪拌しながら37℃で15時間保温した。培養液が濁っている事を確認してからこれを 13,000 x g、4℃、10分間遠心して上清を回収し、5滴ほどクロロフォルムを滴下し4℃で保存した。XL-1Blue に対して力価を測り、 $1-2 \times 10^{11}$ /mlの濃度があることを確認した。

<2> 小スケール法

pUC118、pTV118N などのファージミドベクターに組み込んだ目的のDNAを大腸菌XL-1blue に形質転換し、テトラサイクリン及びアンピシリンを含む培地で選択して得られたシングルコロニーをファルコン2059チューブに入れた2ml のアンピシリン含有2×YT培地に殖継ぎ、最終濃度が 2×10^7 pfu/mlとなるようにヘルパーファージM13KO7を加え37℃、1時間激しく攪拌しながら保温した。その後カナマイシンを最終濃度70μg/ml になるように加えて、さらに37℃で14-18時間激しく攪拌しながら保温した。培地が濁っているのを確認してこれをエッペンドルフチューブに移し、13,000 x g、4℃、5分間遠心した。上清を200μl の20%PEG#8000溶液の入っているエッペンドルフチューブに移してよく混合し、室温で15分間放置し、13,000 x g、4℃、5分間遠心して、上清を完全に除去した。次に沈澱を100μlのTEに溶解し、50μl のフェノールを加え、30秒間激しく攪拌し、1分間室温に静置し、さらに30秒間激しく攪拌した。13,000 x g、室温で1分間遠心した後水層を回収し、300μl のエタノール/酢酸ナトリウム混液を加えて室温に15分間放置した。その後、13,000 x g、4℃、10分間遠心して上清を棄却し、70%エタノールで洗浄し、減圧乾固してから30μlのTEに溶解した。

<3> 大スケール法

目的のDNAを大腸菌XL-1blue に形質転換し、テトラサイクリン及びアンピシリンを含む培地で選択して得られたシングルコロニーをファルコン2059チューブに入れたアンピシリンを含む2×YT培地2 ml に殖継ぎ、37℃で激しく攪拌しながら保温した。培地が濁ってきたらこの1ml を500ml のフラスコに入れたアンピシリンを含む2×YT培地100 ml に加え、さらに最終濃度が 2×10^7 pfu/mlとなるようにヘルパーファージM13KO7を加えて37℃、30分間静置し

て保温した。この後カナマイシンを最終濃度70 μ g/mlになるように加えて、さらに37℃で16~18時間激しく攪拌しながら保温した。培地が濁っているのを確認してこれを遠心管に移し、13,000 x g、4℃、5分間遠心した。上清に25mlの20%PEG#8000溶液を加えてよく混合し、室温で10分間放置し、13,000 x g、4℃、5分間遠心して、上清を完全に除去した。次に沈澱を5mlのTEに溶解し、5mlのフェノールを加えて、激しく攪拌し、10分間室温に静置した。13,000 x g、室温で1分間遠心し、水層を同様にフェノール/クロロフォルム/イソアミルアルコール混液、クロロフォルム/イソアミルアルコール混液Bで抽出し、最後にその上清に150 μ lの10M酢酸アンモニウムと5mlの2-プロパノールとを加えて混合した。これを13,000 x g、4℃、10分間遠心して上清を棄却し、70%エタノールで洗浄し、減圧乾固してから200 μ lのTEに溶解した。

[18] PCR法⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

0.5 ml チューブに以下の試薬及びDNAを混合した。

試薬	量	最終濃度
10×PCR緩衝液	3.0 μ l	1×
1.25 mM ヌクレオチド混液	4.8 μ l	各 0.2 mM
10 pmol/ μ l プライマー溶液 (フォワード・リバーズ)	各 1.5 μ l	各 0.5 μ M
テンプレートDNA	0.1~100 ng	
5 U/ μ l AmpliTaq™ DNAポリメラーゼ	0.15 μ l	0.75 unit
純水	総量を30 μ lになるように加えた。	

以上をよく攪拌した後ミネラルオイルを1滴(約50 μ l)上層して、PCR反応装置にセットした。温度の設定は標準的には以下のようにした。(なお、以下の設定の場合、今後 [①→94℃($\Delta=0$)②94℃・1分③→55℃($\Delta=0$)④55℃・2分⑤→72℃($\Delta=0$)⑥72℃・3分] ×27、と表記する事にする。)

- ① 最大加熱で94℃に平衡化。
- ② 94℃で1分間保温。
- ③ 最大冷却で55℃に平衡化。
- ④ 55℃で2分間保温。
- ⑤ 最大加熱で72℃に平衡化。
- ⑥ 72℃で3分間保温。
- ⑦ ①に戻る。

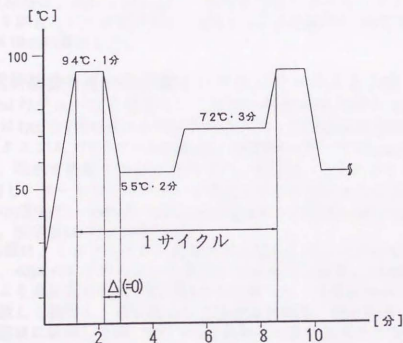
以上を27サイクル繰り返した。(図IV-2参照)

[19] 塩基配列の決定

<1> RIを用いたダイデオキシ法⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

pUCベクターにサブクローニングしたDNA断片はダイデオキシ法によって、そのヌクレオチド配列を決定した。

プラスミドDNAの水溶液 18 μ l(3~6 μ gのプラスミドDNAを含む)に、2 μ lの2M水酸化ナトリウムを加え、室温で5分間変性させた。これに、16 μ lの2.5 M酢酸アンモニウムと100 μ lのエタノールとを加え、よく混合してから-80℃で5分間静置した。遠心(0℃、14,000 x g、5分間)して沈澱を1mlの80%エタノー



(図IV-2) PCR反応の例

説明については、本文を参照。

ルで洗った後、減圧下乾固した。沈澱に、1pmolのシーケンズプライマー(M13プライマーまたはリバースM13プライマー)と、1.5 μ lの10 \times シーケンズ緩衝液と、8.5 μ lの水とを加え、よく混合して溶かした後に、順に 60℃で20分間、42℃で20分間、室温で20分間静置した。これに、10 μ Ciの[α - 32 P]dCTPと、5ユニットの大腸菌DNAポリメラーゼ Klenow 断片とを加え、穏やかに混合してから、3.2 μ lずつを予め4種のジデオキシミックス(2 μ l)の入っているエッペンドリフチューブにそれぞれすばやく分注し、直ちに 42℃で20分間保温した。1 μ lのチェイス溶液を加えて、さらに 42℃で20分間保温した後、6 μ lのホルムアミド色素を加えて 90℃で3分間変性し、直ちに氷水中に冷却した。

電気泳動は、[4]<2>-(b)に従って作製したポリアクリルアミドゲルを用いた。泳動を終えたゲルは使用済みのX線フィルムに転写し-80℃中でX線フィルム(Fuji RX film)に露出した。

<2> 色素終結法を用いた自動シーケンサーによる方法

0.5 ml のチューブを用意し、これに一本鎖DNAの時は 0.5 μ g、二本鎖DNAの時は1 μ gのDNA(最大 8.75 μ lまで)を入れ、色素終結法用反応混合液 7.25 μ l とシーケンズプライマー 0.8 pmol(一本鎖DNA)或いは 3.2 pmol(二本鎖DNA)とを加え、純水で総量を 20 μ l に合わせた。混合後、ミネラルオイルを一滴(約 50 μ l)重層し、サーマルサイクラーで遮光しながら次のように反応した：[①→96℃(Δ =0)②96℃・30秒③→50℃(Δ =0)④50℃・15秒⑤→60℃(Δ =0)⑥60℃・4分]×25。反応後は4℃に保存した。

反応液は、ミネラルオイルがなるべく混入しないようにピペットマンで吸い取り、40 μ lの2-プロパノールを加えて室温で15分間、14,000 x g で遠心することにより未反応の色素と反応物とを分離した。沈澱は1mlの70%エタノールを加え激しく攪拌し、再び遠心して沈澱を回収後、減圧乾固し、4 μ lのホルムアミド溶液に溶解した後、90℃で2分加熱した後に氷水中で急冷し、直ちにゲルにアプライした。

電気泳動は、[4]<2>-(b)に従って作ったポリアクリルアミドゲルを用い、自動シーケンサーの解析プログラムによって配列を検出・解析した。

[20] cDNA断片のlacプロモーター(pUC18)下流への挿入

ラットp94・ヒトm-カルバイン大サブユニット・ヒト μ -カルバイン大サブユニット・ウサギカルバイン小サブユニット・ラットカルバイン小サブユニットcDNAを(表IV-IV)に示したように適当な制限酵素・S1ヌクレアーゼ・DNAポリメラーゼクレノウ断片・大腸菌アルカリ性脱リン酸化酵素で消化した。これによって得られた目的断片と、同様に適当な酵素で消化したpTV118NまたはpTV119Nとをライゲーションさせ([15]<3>-(c)参照)、大腸菌MM294に形質転換すること([15]<3>-(d)参照)によって正しくコンストラクトされたものをクロニングし、大量に精製した。

[21] 大腸菌におけるcDNA断片のタンパク発現

[20]で精製したDNAは大腸菌 MM294 または YA21 に再び形質転換し([15]<3>-(d)参照)、アンピシリンプレート上に得られたシングルコロニーを5 ml の χ -ブロース(100 μ g/ml のアンピシリンを含む)中37℃、一晚振盪培養した。翌日、4℃、3000rpm、10分間遠心し上清を捨て沈澱を20mlのM29^(a) medium に

(表IV-IV) カルバインサブユニットの*lac*プロモーター下流への挿入と発現タンパク質の配列

特に断らない限り、制限酵素消化は1 µgのDNAを50 µlスケールで行った。続けてS1スクレアーゼで消化するときは、10 µlの純水、10 µlの10×S1緩衝液、5 ユニットのS1スクレアーゼを加え、37℃で5分間保温した後、フェノール・クロロフォルム抽出をし、エタノール沈澱をした。続けてDNAポリメラーゼクレノウ断片で消化するときは、溶液が1×H緩衝液の濃度になるように適量の塩化ナトリウム溶液、塩化マグネシウム溶液、トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加え、1.5ユニットのDNAポリメラーゼクレノウ断片を加えて37℃で5分間保温した後にフェノール・クロロフォルム抽出をし、エタノール沈澱をした。続けて大腸菌アルカリ性脱リン酸化酵素で消化するときは、1 µlの2Mトリス塩酸緩衝液 (pH 9.5)、0.2ユニットの大腸菌アルカリ性脱リン酸化酵素を加えて37℃で60分間保温した後にフェノール・クロロフォルム抽出をし、エタノール沈澱をした。複数の制限酵素で消化する場合は、同一の緩衝液を使用できるときは同時に、異なる緩衝液を用いるべき時は、低塩濃度の緩衝液を使用する方を先に消化し、その後適量の塩化ナトリウム溶液、塩化マグネシウム溶液、トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加え、緩衝液の濃度を調整し、もう一方の制限酵素で消化した。N-端の配列における太字はcDNA由来の部分を示し、さらに下線を引いたアミノ酸残基は本来のタンパク質の配列と一致する部位を示している。

名前	種	cDNAとその切断法	ベクターとその切断法	N-端の配列と生成されるアミノ酸配列
plac-P94	rat	pRNC-1 /DraI/SacI	pTV118N/ EcoRI/S1/SacI	ATG GCC ATG ATT ACG AAA AAC GTC TTC CTT CCA AAG TTG CCT GCC ATG CCG M A M I T K N V F L P K L P A M P
plac-m'	human	ΔHS21/BbeI	pTV119N /S1/SpeI	ATG GGC CGC CGG GAC GGC AGC ATG CCG M G R R D R S M A
plac-m	human	plac-m/NcoI/Klenow/EcoS21 partial/Klenow/Sel ligation		
plac-μ	human	p31/EcoRI /S1/BamHI	pTV118N/EcoRI /S1/BamHI	ATG GCC ATG ATT ACG GGG ACT GCA GGG ACC CGC AAA CAC CGC TCC CCC AGG ATG TCG M A M I T G T A A T P K H P S P R M S
plac-RT30K	rat	pR30-20のもの		ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG M T M I T N S
plac-RB30K	rabbit	pLYE530 /HpaI/SphI	pUC18/EcoRI /S1/SphI	ATG ACC ATG ATT ACG AAG TCG M T M I T N S
pGC30K	rabbit	南嶺文博士より 寄与		ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCG AGC TCG GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TCA GTC ATC M T M I T N S S S V P G D P L E S Y I
plac-P94/RT30K	rat/rabbit	plac-P94/HincII/SphI plac-RB30K/DraI/SphI		p94を含んだオベロンとカルバイン小サブユニットを含んだオベロンの両方が一つのプラスミドに含まれている。
plac-RT30K	human	plac-m/DraI		m-カルバイン大サブユニットを含んだオベロンと小サブユニットを含んだオベロンの両方が一つのプラスミドに含まれている。
plac-μ/RT30K	human	plac-RT30K/HincII/BAP		μ-カルバイン大サブユニットを含んだオベロンと小サブユニットを含んだオベロンの両方が一つのプラスミドに含まれている。

再懸濁した。直ちに37℃で2時間、激しく振盪培養した。遠心チューブに移し4℃、3000rpm、15分間遠心し上清を捨て沈澱を1mlのカルバイン用緩衝液(C⁴⁴)に再懸濁した。これをソニファイアで超音波破碎し、90,000 x g、4℃、60分超遠心にかけ、沈澱は、0.5 ml の・上清の両画分はSDS-PAGEあるいは続けてのウェスタンブロットによって解析した。

[22] cDNA断片のT7プロモーター下流への挿入

ラットp94・ヒトμ-カルバイン大サブユニットcDNAを(表IV-V)に示したように適当な制限酵素・S1ヌクレアーゼ・で消化して得られた目的の断片と、同様に適当な酵素で消化したT7プロモーターベクターとをライゲーションさせ([15]<3>-(c)参照)、大腸菌MM294に形質転換すること([15]<3>-(d)参照)によって正しくコンストラクトされたものをクローニングし、大量に精製した。

[23] *in vitro*翻訳系を用いたcDNA断片のタンパク発現

<1> 転写 (transcription)

T7プロモーターの下流にcDNAを組み込んだプラスミド([22]参照)10μgを適当な制限酵素(EcoRI など)を用いて3'-端を切断して直鎖状にし、1μg/μl プロテイナーゼK(キットに付属、なお以下で用いる試薬もすべてキットに付属している)1μlを加え37℃で30分インキュベートした。次にフェノール・クロロフォルム抽出を2回、続けてクロロフォルム抽出を行い、エタノール沈澱した後にDNA濃度が1μg/μlとなるようにTEに溶解した。このうちの1μlに5×転写緩衝液・ヌクレオチド混液・キャップアナログ溶液・0.75 M DTT・純水をそれぞれ5μl・1μl・2.5μl・1μl・14μl加えて混合後、最後に0.5μlの20 U/μl T7RNAポリメラーゼを加えて37℃30分間保温した。さらに10ユニットのRNase-free DNaseIを加えて37℃で5分間保温した後、100μlの純水を加えてフェノール・クロロフォルム抽出を行った。その水層をエタノール沈澱し、25μlのTEに溶解し定量及びアガロース電気泳動による品質検査を行った(ほぼ500ng/μlのRNA溶液が得られた)。

<2> 翻訳 (translation)

<1>で作成したRNA1~4μg (4.5 μl 以下)に10.5 μlのトランスレーションブリックス及び10 μlのウサギ網状赤血球ライゼートをこの順番で加え、さらに、場合によってはこれに1μlの30mg/ml ロイペプチンを加えて37℃で40分間保温した。反応液の一部は等量のSDSサンプル緩衝液を加えてSDS電気泳動を行った後、ゲルをアスプレーターで吸引加熱乾固し、オートラジオグラフィーにより解析した。残りの反応液は3μlのグリセリンを加えて-80℃に保存した。また、取り込まれた³⁵S-Metを定量するために1cm角に斬った3MM濾紙に反応液の1μlを浸透させ、10%(W/V)トリクロロ酢酸溶液中で洗浄後、新しい10%トリクロロ酢酸に再び入れて10分間煮沸した。その後氷中で室温以下に平衡化し、純水・エタノール・アセトンでこの順番に2回ずつ洗浄、乾固し、液体シンチレーター用カクテル(3~5 ml)の中に沈め液体シンチレーター(¹⁴Cモード)で1分間計数した。

[24] Site-Directed Mutagenesis⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

(表IV-V) カルパインサブユニットのT7プロモーター下流への挿入と発現タンパク質の配列

特に断らない限り、制限酵素消化は1 µgのDNAを50 µlスケールで行い、続いてS1ヌクレアーゼで消化するときは、40 µlの純水、10 µlの10×S1緩衝液、5ユニットのS1ヌクレアーゼを加え、37℃で5分間保温した後、フェノール、クロロフォルム抽出をし、エタノール沈澱をした。複数の制限酵素で消化する場合は、同一の緩衝液を使用できるときは同時に、異なる緩衝液を用いるべき時は、低塩濃度の緩衝液を使用する法をさきに消化し、その後適量の塩化ナトリウム溶液、塩化マグネシウム溶液、トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加え、緩衝液の濃度を調整し、もう一方の制限酵素で消化した。N-端の配列における太字はcDNA由来の部分を示し、さらに下線を引いたアミノ酸残基は本来のタンパク質の配列と一致する部位を示している。

名前	種	cDNAとその切断法	ベクターとその切断法	N-端の配列と生成されるアミノ酸配列
pT7-P94	rat	pRNC-1-4 /DraI/SacI	pGEM-2* /NcoI/S1/SacI	... GGGAG. 66 bp. AC AAAACGCTCTTCCTCCAAAGTTGCCTGCC ATG CCG M P
pT7-µ	human	p31/Eco811 /S1/BamHI	pGEM-2/ HindIII/S1/BamHI	... GGGAGACCGGAGGACTGCAGCAGCCCCAAACACCCCTCCCCAGG ATG TCG M S

ここで用いたpGEM-2ベクターは東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門平井秀一博士より寄与して頂いたもので、pGEM-2のHindIII切断部位とPstI切断部位との間にβ-グロビンのリーダーシーケンス (5'-非翻訳領域、NcoI切断部位を含む：下図下線部) と、それに続くc-junのcDNAが含まれていた (下図)。そのHindIIIまたはNcoI切断部位を用いてc-junのcDNAとカルパインのcDNAを交換する形でプラスミドを構築した。

β-グロビンリーダーシーケンス c-jun cDNA Poly Linker
 ...AAGCTTGGTACATTTCCTCTGACAGAACTGCTTCACTAGCAACCTCAACAGACAGCATTGCTGCAAGATGGAAAGCCTCTCTACGA...CTGCAG...GAATTC
 HindIII NcoI PstI EcoRI

目的の遺伝子(pUC118, pTV118Nなどのファージミッドに組み込んであるもの)を大腸菌CJ236に形質転換し、アンピシリン及びクロラムフェニコールを含む培地で選択し、得られたコロニー1つから[17]の方法で一本鎖DNAを精製した。そして、そのうちの0.2 pmol(全長5-6 kbpで約0.4 µg)にアニーリング緩衝液を1µl加え、純水で10µlに合わせて一本鎖DNA混液とした。一方、用いる合成オリゴヌクレオチドの10 pmolに5×リン酸化緩衝液2µlを加え、最終的に純水で10µlに合わせ10ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼを加えて37℃、15分、続けて70℃、10分処理して5'端のリン酸化を行った。このリン酸化オリゴヌクレオチド1µlに先に調製した一本鎖DNA混液1µlを加えて、DNAサーマルサイクラーを用いて、①→65℃(Δ=0)②65℃15分③→37℃(Δ=20分)④37℃5分⑤→25℃(Δ=10分)⑥25℃保温というプログラムでプライマーとDNAとをアニールさせた。これにキット付属のエクステンション緩衝液25µl・大腸菌DNAリガーゼ60ユニット・T4DNAポリメラーゼ1ユニットを加え、25℃で2時間反応させた。1.2 µlの0.5 M EDTAを加えて65℃で5分間加熱することによって反応を停止させ、反応液のうちの10µlを大腸菌BMH71-18株に形質転換してトラサイクリン培地で選択した。得られたコロニーのいくつかから[15]<4>-(a)に従ってプラスミドを単離し、目的のプラスミドを同定した後再び大腸菌XL-blueに形質転換して目的のプラスミドをクローン化し、大量に精製した。

[25] cDNA断片のSV40プロモーター下流への挿入

ラットp94・ヒトm及びµ-カルパイン大サブユニット・ウサギカルパイン小サブユニットcDNAを表IV-VIに示したように適当な制限酵素・S1スクレーパーで消化し、得られた目的断片と、同様に適当な酵素で消化したpSRD(東京都臨床医学総合研究所遺伝情報研究部門大野茂男博士、今野保彦博士より寄与して頂いた)⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾とをライゲーションさせ([15]<3>-(c)参照)、大腸菌MM294に形質転換すること([15]<3>-(d)参照)によって正しくコンストラクトされたものをクローニングし、大量に精製した。

[26] 抗ペプチドポリクローナル抗体の作成⁽¹⁹⁾

<1> 抗原ペプチドの調製

50 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 7.5)1.5 mlに、担体として用いるKLHを0.5 mlと40 µlのMBS (*m*-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液をPD-10カラムにかけ、上記の緩衝液2.5-4.5 mlの間で溶出される画分をKLH-MBSコンプレックスとして回収した。次に、アブライドバイオシステムズ430Aで合成したペプチドは脱保護用試薬で脱保護し、冷ジエチルエーテルでガラスフィルターを用いて吸引洗浄し、一晩凍結乾燥した。このペプチド約10 mgを4.5 mlの100 mM カリウム/リン酸緩衝液(pH 7.5)に溶解し、これに上記のKLH-MBSコンプレックス分画0.5 mlを混合し、室温で3時間攪拌して反応させ、KLH-MBS-ペプチドコンプレックスを生成させた。反応物は4℃で保存した。

<2> ウサギへの免疫

<1>で作製したKLH-MBS-ペプチドコンプレックス溶液1mlに、2mlのフロイントコンプリートアジュバントを加え、2個の注射器を結合器で結合させたものの中で数百回混合し、完全に均一にした。シャーレに水を入れたものに

(表IV-VI)

カルバインサブユニットcDNAのSV40プロモーター下流への挿入
表記法などは表IV-IV、表IV-Vを参照。

名前	種	cDNAと その切断法	ベクターと その切断法	N-端の配列と精製されるアミノ酸配列
pWT-P94	rat	pRNC-1-4 /DraI/SacI/Klenow	pSRD/EcoRI/CIAP /Klenow	.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
pWT-P94-E'	rat	pRNC-1-4 /DraI/SacI/Klenow	pSRD/EcoRI/CIAP /S1 GAAAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
pWT- μ	human	p31/ApaI/Klenow	pSRD/EcoRI/CIAP /Klenow	.. GAATTGGCCCTGCCCTGA... ACCCTCCCCCAGG ATG TCG M S
pWT-m	human	plac-m /NcoI/DraI/S1	pSRD/EcoRI/CIAP /Klenow GAATTGGCCCGCCGGACCGCAGC ATG CCG M A
pWT-30K	rabbit	pLYE530/ApaI /Klenow	pSRD/EcoRI/CIAP /Klenow	.. GAATTGGCCCGCCCTCC... TGAGCCGCAGCC ATG TTC M F
p Δ IS2	rat	pWT-P94/EcoRI/Klenow/BalI \rightarrow 5.5 kbp fragment/CIAP+1.1 kbp fragment		.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
pfs-IS2-i	rat	pWT-P94-E/EcoRI/Klenow/Self ligation		.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
pfs-IS2-d	rat	pWT-P94-E/EcoRI/S1/Self ligation		.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
p Δ BK	rat	pWT-P94/BalI/KpnI/Klenow /Self ligation		.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P
p Δ n (n=1-12)	rat	pWT-P94/BalI/KpnI/Exo III/S1/Klenow /Self ligation		.. GAATTA AAAACGTCTTCTTCCAAAAGTTGCTGCCC ATG CCG M P

一滴滴下して混合物がそのままの形をとどめていることを確認して、結合器をはずし、21Gの注射針を用いてウサギ(ニュージーランドホワイト種)の左右腹腔及び左右前肢指間に0.3~0.4 mlずつ注射した。2週間後、コンプリートアジュバントの代わりにインコンプリートアジュバントを用いて同様の混合液を作成し、ウサギの背部前後左右の4カ所注射した。さらに2週間後、ペプチド-KLH溶液をPBSで2倍に希釈し、26Gの注射針を用いて、ウサギの背部6~8箇所注射し、この1週間後に耳動脈から採血を行った(10~50 ml)。

採取した血液はビーカーの中に入れて37℃で1時間保温し、続けて4℃で一晩放置し上清を回収し、3000rpm、4℃、10分間遠心し、血清画分とした。血清は56℃で30分間処理をして不活化し、そのうちの1mlには最終的に1mg/mlの濃度になるようにKLHを加えて、ウェスタンブロット・免疫沈降などに使用した。残りは分注して-80℃で保存した。

[27] タンパク質の電気泳動(SDS-PAGE)(20)(21)

表IV-VIIに示した組成の分離ゲル溶液を混合して、100~120 μ lのTEMEDを加え、直ちに組み立てておいた15cm \times 15cmのSDS-PAGE用ガラス板に流し込み、続いて、約0.4 mlの1-ブタノールを重層してゲル化させた。固化した後に1-ブタノールを除き、よく水洗してから、今度は表IV-VIIに示した組成の濃縮ゲル溶液を混合して、100~120 μ lのTEMEDを加え、分離ゲルの上に流し込み固化させた。泳動はSDS-PAGE泳動緩衝液を用いて15 mA~30 mA定電流で電気泳動した。泳動後は、ウェスタンブロット([28])に進むか、ゲルを直接CBB染色液に浸し、室温で10分間ほど振とうしながら染色し、続いてゲル脱色液に浸して室温で3~5時間振とうしながら脱染した。

[28] ウェスタンブロット(21)

電気泳動の終わったSDSポリアクリルアミドゲルをウェスタンブロット緩衝液に浸して室温で30分間振とうした。セミドライ方式のプロットング装置を用いて、タンパク質転写用メンブレンに2mA/cm²定電流で2時間ブロットした。ブロットしたメンブレンは乾燥させないように直ちにブロッキング溶液中に入れ、30分以上室温で振とうしブロッキングを行った(すぐに次の操作に入らないときは、この状態のままで4℃に保管した)。次に、目的の抗血清を1/500から1/2000にブロッキング溶液で希釈したものを、メンブレン100 cm²当たり4ml用意し、ビニールバックを用いてメンブレンに浸透させ、37℃で1時間以上あるいは4℃で一晩保温した。メンブレンを取り出し、ウェスタンブロット洗浄緩衝液中、室温、7分間振とう洗浄を3回繰り返した後、ビニールバックを用いて二次抗体溶液に37℃で30分以上メンブレンを浸透させた。再び、メンブレンを取り出し、洗浄緩衝液中、室温、7分間の振とう洗浄を3回繰り返した後、さらにABC混液あるいはABC-AP混液に室温で30分以上振とうしながら浸透した(二次抗体にアルカリフォスファターゼ結合抗体を用いたときはこのステップは省略した)。続いて、メンブレンをPBS中、7分間、室温で振とう洗浄し(3回)、最後にメンブレンを10~20mlの発色液に浸透し、室温で5分~30分間振とうさせながら発色させた。

[29] ラット骨格筋の分画(22)

<1> 遠心力・緩衝液による分画

(表IV-VII) SDS-PAGE用ゲルの組成

以下はゲル5枚分の量を示した。左矢印は左と同量であることを、ハイフンはその試薬を加えないということをそれぞれ表している。

	分離用ゲル				濃縮用ゲル
	7 %	10 %	12.5 %	15 %	4 %
30 % ポリアクリルアミド溶液	23.3 ml	33.3	41.7	50.0	5.3 ml
SDS-PAGE分離ゲル用緩衝液	25.0 ml	←	←	←	—
SDS-PAGE濃縮ゲル用緩衝液	—	—	—	—	10.0 ml
純水	50.8 ml	40.8	32.4	24.1	24.3 ml
10 % 過硫酸アンモニウム溶液	0.5 ml	←	←	←	0.4 ml
TEMED	80 μ l	←	←	←	27 μ l
総量	100.0 ml	←	←	←	40.0 ml

[31] 脱ヘマトランスフェクション

1. 10 ml アニスリン溶液

20gのラット骨格筋(死亡後5分以内のものまたは死亡後5分以内に-80℃で凍結・保存してあったもの)を約1cm角に切断し、160mlのPBS⁽⁶⁴⁾の中に入れ、ヒスコロンホモジナイザーで氷水で冷却しながらホモジナイズした(30秒間ホモジナイズし、1分間冷却を3回行った)。これを7,000 x g、2℃、30分間遠心し、上清をグラスフィルターでろ過して表面の脂肪を除去してから、さらに150,000 x g、2℃、60分間遠心し、得られた上清を①可溶性画分とした。沈澱はPBS⁽⁶⁴⁾で1回洗浄してから7mlのPBS⁽⁶⁴⁾に懸濁し(総量9ml)となった。②ミクロゾーム画分とした。一方、7,000 x gの遠心で得られた沈澱は、一度PBS⁽⁶⁴⁾140mlに懸濁して再び7,000 x g、2℃、30分間遠心し、その沈澱を今度は100mlのHasselbach-Schneider溶液にヒスコロンホモジナイザーを用いて懸濁し、氷中で50分間主にミオシンを抽出した。これを7,000 x g、2℃、30分間遠心し、上清を③ミオシン画分(総量120ml)とし、沈澱は2回Hasselbach-Schneider溶液(23)で洗浄した。さらに1mM炭酸水素ナトリウム溶液に懸濁して遠心するという過程を3回繰り返した後、溶液のpHをほぼ7にし、最終的に50mlの1mM炭酸水素ナトリウム溶液に懸濁し、氷中で一晩、主にアクチンを抽出した。再びこれを7,000 x g、2℃、30分間遠心し、上清を④アクチン画分(総量65ml)、沈澱は1mM炭酸水素ナトリウム溶液に懸濁して洗浄してから、20mlのPBS⁽⁶⁴⁾に懸濁して⑤不溶性画分とした(総量30ml)となった。①-⑤の各画分はそれぞれその0.5 mlを分取し、0.5 mlのSDS-PAGEサンプル緩衝液を加えて、100℃で5分間加熱し、SDS-PAGEのサンプルとした。

<2> イオン交換FPLCによる分画

<1>で得た画分①可溶性画分の2mlを分取し、18mlの純水と5μlの2 M トリス塩酸緩衝液(pH 9.5)を加え(pHはこのとき7.5であった)、0.22 μmのフィルターを通してからDEAE-TSKgel 5PW カラム(容量5ml)を用いたFPLCにかけた。緩衝液はカルバイン緩衝液Aを用い、グラジエントは0→0.5Mの塩化ナトリウムでかけ(全所用時間は60分とした)、流速は1.2 ml/分で1mlずつ分取した。各画分は、エペンドルフチューブ組み込み式の限外濾過膜を用いて約20倍に濃縮してから等量のSDSサンプル緩衝液を加え、100℃で5分間加熱し、SDS-PAGEのサンプルとした。

[30] 細胞の継代⁽²⁴⁾

ほぼコンフルエントになった細胞の培養液をアスピレーターを用いて完全に吸引棄却し、予め37℃に暖めておいたPBS⁽⁶⁴⁾5mlを加え、プレート全体に行き渡らせてから室温に5分間放置した。その後、再びアスピレーターで液を吸い取り、今度は0.3 mlのトリプシン溶液を加えてプレート全体に行き渡らせた。室温で5分間放置してからプレートを両手で支えて二、三回激しく叩き(タッピング)、細胞をプレートから遊離させた。直ちに3~5mlのDMEM培地を注ぎ細胞をよく懸濁して、その一部を取り、細胞数を測定した。そして、2-5 × 10⁵(8cm プレート)または1~3 × 10⁶(20cm ボトル)個分の細胞を分取し、7mlのDMEM培地の入った8cm プレートまたは25mlのDMEM培地の入った20cm ボトル中に入れ、37℃のCO₂インキュベーターで保温した。

[31] 細胞へのトランスフェクション

<1> DEAEデキストラン法⁽²⁵⁾

8cm ディッシュに、トランスフェクションを行う24時間前に 1×10^6 個の細胞を殖継いだものを5mlの $1 \times \text{TBS}$ で2回洗浄し($1 \times \text{TBS}$ をディッシュ上に注ぎ再びパスツールピペットで吸引棄却した)、DNA-DEAE-dextran混液をディッシュの中央に1~2滴/秒で滴下した。5分~10分おきにゆっくりと攪拌しながら室温に30分置き、次に10mlの $1 \times \text{TBS}$ で洗浄し、5mlの0.1 mM クロロキンリン酸含有DMEM培地を加えて 37°C 、5%二酸化炭素中5.5時間保温した。再び5mlの $1 \times \text{TBS}$ で洗浄し、最終的に10mlのDMEM培地を加えて 37°C 、5%二酸化炭素中48~72時間保温した後に細胞を回収した。

<2> エレクトロポレーション法⁽²⁶⁾

トリプシン処理によってディッシュから剥離した細胞(COS及びL8細胞)を([30]参照)DMEM培地で一回洗浄し(約40mlの培地に懸濁し1,100rpm、室温、5分間遠心して上清を棄却した)、次に $1 \times \text{PBS}$ で二回洗浄し、さらに $1 \times \text{K-PBS}$ で一回洗浄し、最終的に $1.2 \times 10^7/\text{ml}$ (COS細胞の場合)または $3 \times 10^7/\text{ml}$ (L8細胞の場合)の濃度になるように $1 \times \text{K-PBS}$ に懸濁した。この懸濁液500 μl (COS細胞の場合)または200 μl (L8細胞の場合)にトランスフェクトするDNA10~40 μg を加えて混合し、専用のキュベットに移し氷中に10分間静置した。220V、960 μF の条件下で電圧をかけ、再び氷中に10分間静置した後に500 μl の無血清DMEM培地を加え、室温でさらに10分間静置した。これを40mlの20%のウシ血清を含むDMEM培地に懸濁し8cm ディッシュ4枚に分注して 37°C 、5%二酸化炭素中48~72時間保温した後に細胞を回収した。

[32] 蛍光抗体法による免疫組織染色

<1> 蛍光標識二次抗体の細胞破砕物による吸収

免疫組織染色時における非特異的吸着を回避するために二次免疫反応に用いる蛍光標識抗体は、以下のようにブロッキングを行った。 2×10^7 個のCOS細胞をトリプシン処理によって回収し、0.5 mlの $\text{PBS}^{(9)}$ に懸濁し、超音波を用いて破砕し、この懸濁液に約3mm角に細断したタンパク質転写用メンブレン5cm²分を浸透し、緩やかに攪拌しながら室温で1時間放置した後、BSAブロッキング溶液10mlの中に移し、さらに室温で1時間振とうした。この後、BSAブロッキング溶液の大部分を棄却し、さらに残りをエッペンドルフチューブに移し、軽く遠心してメンブレンを底部に集め、溶液をできる限り棄却した。このメンブレンに蛍光標識抗ウサギIgG(L+H)抗体溶液を加え、室温で緩やかに攪拌しながら1時間放置した。再び軽く遠心し、上清を回収し、<2>の免疫組織染色に用いた。

<2> 免疫組織染色

エレクトロポレーション法([31]<2>)によって目的のDNAをトランスフェクトしたCOS細胞を、トランスフェクト後1日たってから直径1.4 cmのガラスプレート(松浪硝子工業株式会社(大阪)のMicro Cover Glass)を敷いた24穴プラスチックプレート(Falcon 3047)に細胞継代した。2日経ってからガラスプレートを回収し、 $\text{PBS}^{(9)}$ で洗浄後3%ホルマリン溶液を加えて室温で15分間放置して細胞を固定した。次にガラスプレートを0.2% Triton X-100溶液中に入れ20分間室温に放置後、 $\text{PBS}^{(9)}$ 中で3回洗浄し、さらに一枚当たり40 μl の1%BSA溶液を滴下して室温で30分間ブロッキングした。そして、1%BSA溶液で500倍に希釈した抗血清($\alpha\text{-pNS}$)をプレート1枚当たり100 μl 滴下し、室温で1時間放置した。

時間がきたら抗血清希釈液を吸い取り、0.1%BSA溶液の中に浸して3回洗浄した。今度は、予め<1>でブロッキングした蛍光標識二次抗体溶液 100 μ l を滴下し、室温で30分間以上放置した。再び0.1%BSA溶液の中に浸して2回洗浄してから、PBS③中で洗浄し、さらに3%ホルマリン溶液を加えて室温で5分間放置した。プレートをスライドガラスに乗せ、最後にグリセリン緩衝液を数滴滴下してからカバーガラスを静かに乗せ、これをマニキュアで封入し蛍光顕微鏡にて観察を行った。

[33] 免疫沈降

サンプル溶液(場合によっては、プロテアーゼインヒビターを入れる)に2~10 μ l の抗体(抗血清)を加え、氷中で3時間から一晩放置した。次に、20 μ l のプロテインAセファロースCL-4B懸濁液(膨潤させたプロテインAセファロースCL-4Bの1mlは乾燥重量で約0.3gのプロテインAセファロースCL-4Bを含み、20mgのヒトIgGを結合できる。一般に、血清は10~15 mg/mlのIgG濃度を持つと考えて良いので10 μ lの抗血清を用いたとしても1 μ lのプロテインAセファロースCL-4Bで十分であるから、過剰量を用いている事になる)を加え、4℃で攪拌しながら、30分~3時間保温した。これを1,700 x g、4℃、1分間遠心し、上清を注意深く完全に除き、次に1mlのプロテインAセファロース洗浄緩衝液を加えてよく攪拌し、再び1,700 x g、4℃、1分間遠心して上清を注意深く完全に除いた。この洗浄緩衝液での洗浄を3回繰り返した後(免疫沈降物をSDS-PAGE・ウェスタンブロットで見ただけの時は、さらに0.1%SDSを含む洗浄緩衝液で洗浄してから)沈澱を適当な緩衝液に懸濁した。例えば、SDS-PAGEのサンプルにするときは、20 μ lのSDS-PAGEサンプル緩衝液を加え、よく懸濁してから、100℃で5分間加熱して、そのままSDS-PAGEにロードした。

[34] *in vitro*活性測定

pSRD、pWT-P94、p Δ IS2、pWT-m、pWT- μ 、各40 μ gとpWT-30K 40 μ gの混合したものを、500 μ lのK-PBSに懸濁した 6×10^6 個の細胞に加え、[31]<2>の方法でトランスフェクトした。60時間後細胞をPBS③で3回洗浄し、ラバーポリスマンで細胞を回収した後、直ちに5,000rpm、4℃で5分間遠心し、上清を棄却し、沈澱を100 μ lのカルバイン緩衝液Dに懸濁した。これを氷水中で超音波によって破砕し、360,000 x g、4℃で1時間遠心後上清と沈澱とに分取した。沈澱は、1mlのカルバイン緩衝液Dで1回洗浄したあと、100 μ lのカルバイン緩衝液Dに超音波で懸濁した。この懸濁液10 μ lにEDTA10mMあるいは塩化カルシウムをそれぞれ12 μ M、30 μ M、210 μ M、2mM、20mMの濃度で含んだカルバイン緩衝液Eを10 μ l加え、30℃で3時間保温した。最後に20 μ lのSDS-PAGEサンプル緩衝液を加えて反応を停止し、100℃で5分間加熱してからSDS-PAGEにかけて解析した。また、免疫沈降物を活性測定に用いるときは最終沈澱物(抗原と抗体とプロテインAセファロースCL4Bの複合体)を100 μ lのカルバイン緩衝液Dに懸濁し、この懸濁液を10 μ lずつ上記のように活性測定した。