

電氣的ブロットィング法を用いる cDNA クローンの抗体スクリーニング

増村威宏, 北村敦則*, 日尾野隆, 多田三樹**,
柴田大輔, 竹葉 剛***, 田中國介, 藤井昭治

TAKEHIRO MASUMURA, ATSUNORI KITAMURA, TAKASHI HIBINO, MIKI TADA,
DAISUKE SHIBATA, GO TAKEBA, KUNISUKE TANAKA,
and SHOJI FUJII

Immunological screening of cDNA
clones using electroblotting

要旨: 大腸菌発現ベクター pUC 9 を用いて作製した cDNA ライブラリーから電氣的ブロットィング法を用いる抗体スクリーニングを行った。ここに示す電氣的ブロットィング法を使用すると、従来の抗体スクリーニング法で障害となる非特異的吸着によるバックグラウンドをほとんど除去出来た。ここでは、登熟期イネ種子について作製した cDNA ライブラリーより、プロラミン抗体を用いてプロラミン cDNA の一つをスクリーニングする過程を例として示し、この方法の特徴を解説する。

緒 言

これまで行われてきた抗体スクリーニング法では、抗体が菌体へ非特異的に吸着するため、バックグラウンドが高くなり、ポジティブクローンとの区別が非常に難しかった。その改良のために菌体をニトロセルロースフィルター (NCF) から物理的にこすり落とす方法、界面活性剤を含むバッファーで何度も洗浄する方法、抗体をあらかじめ加熱処理した菌体と接触させ、菌体に吸着する抗

体を除去する方法などを組み合わせバックグラウンドを下げ、抗体ポジティブクローンとの差を出すことにより検出する試みがなされてきた¹⁾²⁾。しかしながら、これらの方法は操作が煩雑であるばかりでなく、ポジティブクローンを見分けるのに熟練を要することなど多くの欠点があった。

最近タンパク質のブロットィング法が、タンパク質の分析にさかんに利用されている。これは、主に、ポリアクリルアミドゲルからニトロセルロースやナイロンのメンブランフィルターへ電氣的

京都府立大学農学部生物化学教室

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto Japan

* トーア生活科学研究所

Toa Seikatsukagakukenyujo, Osaka Japan

** 日清食品株式会社

Nissin Shokuhin Co. Ltd., Osaka Japan

*** 京都府立大学生活科学部応用生物学教室

Laboratory of Applied Biology, Faculty of Living Science, Kyoto Prefectural University, Kyoto Japan

にタンパク質を移動・吸着させ、そのフィルター上の目的タンパク質を抗体によって検出する方法³⁾である。

我々は、タンパク質を電氣的にメンブランフィルターに移動するという点に着目し、菌体タンパク質を NCF に結合させ、目的タンパク質に対する抗体と反応させ、抗体ポジティブクローンを検出する方法を提案する。この改良方法の特徴は、①菌体をまずグラスファイバーフィルター (GFF) に生育させた後、裏面より電氣的にプロットするため NCF 上に菌体が付着する心配がない。② GFF は滅菌可能であり、NCF よりも低価格である。③プロットした NCF は、ウェスタンプロット法と同様に市販の抗体検出用のキットがそのまま使用出来る。④検出感度の高い二次抗体を用いれば、微量のタンパク質でも検出可能であり、バックグラウンドをほとんど除去することが可能である。

我々は、大腸菌発現ベクター pUC 9 を用いイネ登熟種子について cDNA ライブラリーを作製し、イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンに対するウサギ抗体を用いて、この改良法で抗体スクリーニングを行った。1 万個の組換体をスクリーニングし、10 数個の抗体ポジティブクローンを得た。このうち、ライブラリー中で存在割合の高いクローンを解析したところ、イネ種子貯蔵タンパク質プロラミンの一つである 10kDa ポリペプチドを生産していることが明らかになった。

実験材料及び方法

1. イネ登熟種子 mRNA の調製と cDNA ライブラリーの作製

イネ: *Oryza sativa*, L. (cv 日本晴) の開花後 10 日目の登熟期前期の種子を用いた。常法に従って、SDS-フェノール法、及びオリゴ (dT) セルロースカラムクロマトグラフィー法により poly(A)⁺RNA を得た。この poly(A)⁺RNA より Gubler & Hoffman の方法⁴⁾に従って ds cDNA を合成し、G・C ティリング法により大腸菌発現ベクター pUC 9 に組み込み、大腸菌 DH5 α 株を形質転換した。約 3 万個の組換体をもつ cDNA ライブラリーを作製した。

2. プロラミン抗体の作製

登熟期のイネ種子よりアルブミン、グロブリン抽出を行い、水溶性、塩溶性のタンパク質を除き、55% n-プロパノールでアルコール可溶性タンパク質プロラミンを得る⁵⁾。電気泳動で純度を検定し、

ウサギを用いて常法に従ってプロラミンに対する抗体を作製した。

3. cDNA ライブラリーの抗体スクリーニング法

1) コロニーの生育

グリセロール保存の cDNA ライブラリーを X-gal, IPTG を含む LM 寒天培地上に、一枚当たりおよそ 1,000 コロニーになるように希釈後、植菌する。37°C で一晚培養後、白い組換体コロニーを別の新しい LM 寒天培地につまようじで移す (Fig. 1-1)。この際区画し、番号をつけたインディケータ

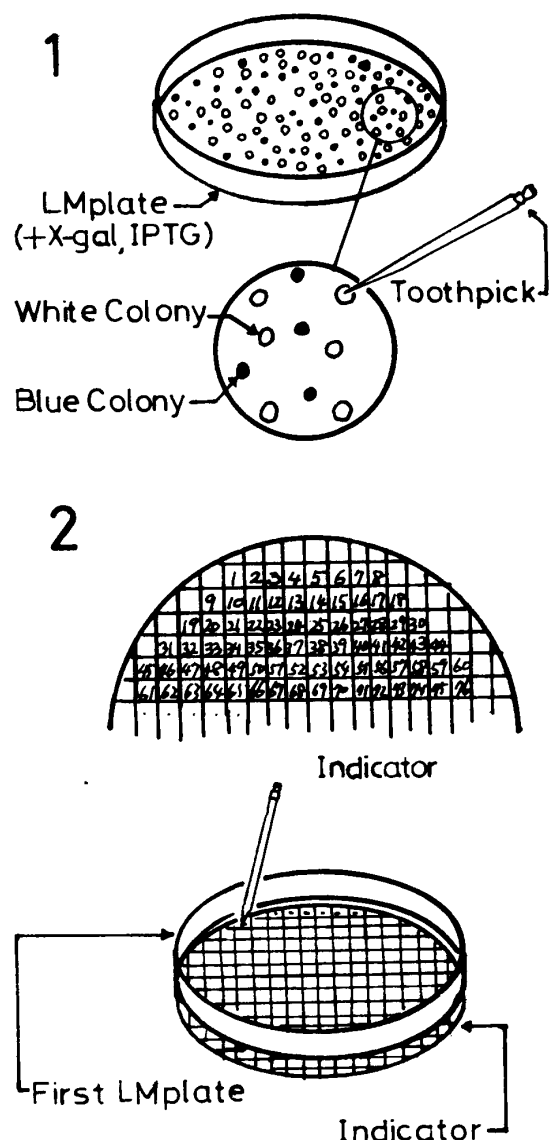


Fig. 1. Growth of bacterial colonies.
1. Pick up white colonies with toothpicks.
2. Inoculation of white colonies on a first LM plate.

ーをシャーレの下に置き、数字に従って順番に植菌する (Fig 1-2)。1枚当たり170コロニーを移し取り、37°Cで一晩培養する。培養後、滅菌したGFF (TOYO, GS25, ϕ 90mm) をのせてコロニーを移し取り、別のLM寒天培地上でコロニーを上にして、37°Cで数時間培養を続ける (Fig. 2)。尚、スクリーニングするコロニー数が多い場合は、最初の寒天培地より直接GFFに1,000コロニーを移し取ることも可能である。

2) 菌体の溶菌

GFF上にコロニーが生育したら寒天培地より丁寧にGFFをはがし、クロロホルム気相中に20分間さらす (Fig 3-1)。菌体の膜を破壊した後、溶菌液 (50mM Tris · Cl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20, 1 μ g/ml DNase I, 40 μ g/ml Lysozyme) 5 mlが入っているシャーレに菌体を上にしてGFFを浸し、室温で一晩処理する (Fig. 3-2)。

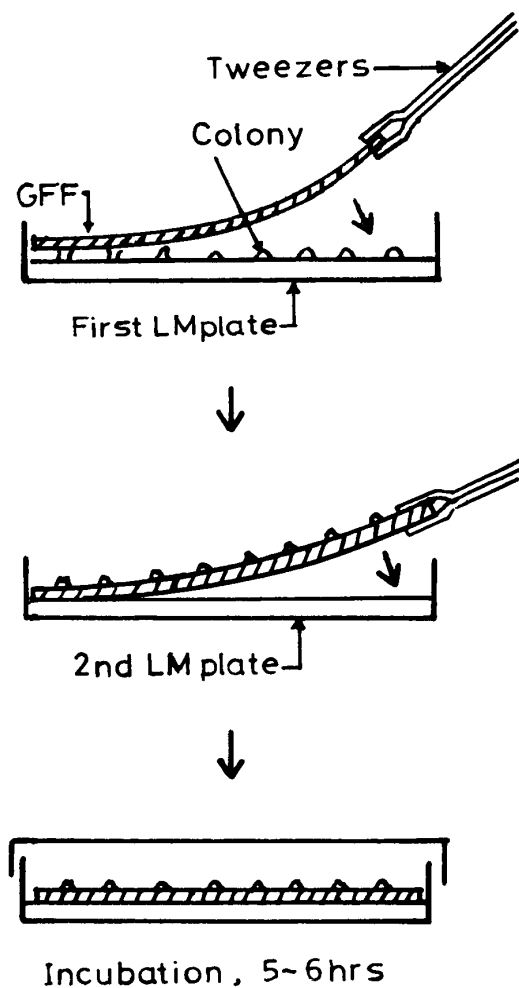


Fig. 2. Transfer of bacterial colonies to GFF.

3) 電気的プロットティング

溶菌したコロニーより大腸菌が生産したタンパク質を電気的にNCFに転写する。この際GFFの菌体のない側とNCFを密着し、さらにその両側を口紙 (TOYO 526) 3枚ずつではさみ込み、転写バッファー (25mM Tris · Cl, pH 8.3, 192mM Glycine, 20% MeOH, 1% SDS) の中で40V, 2時間プロットティングを行う (Fig. 4)。転写終了後、GFFとNCFを貫通するように注射針 (テルモ22G \times 1 $\frac{1}{4}$ など) で数ヶ穴をあけ、GFFとNCFの位置を決定する。NCFは0.45 μ M, 82mmを使用した。

4) 抗体による検出

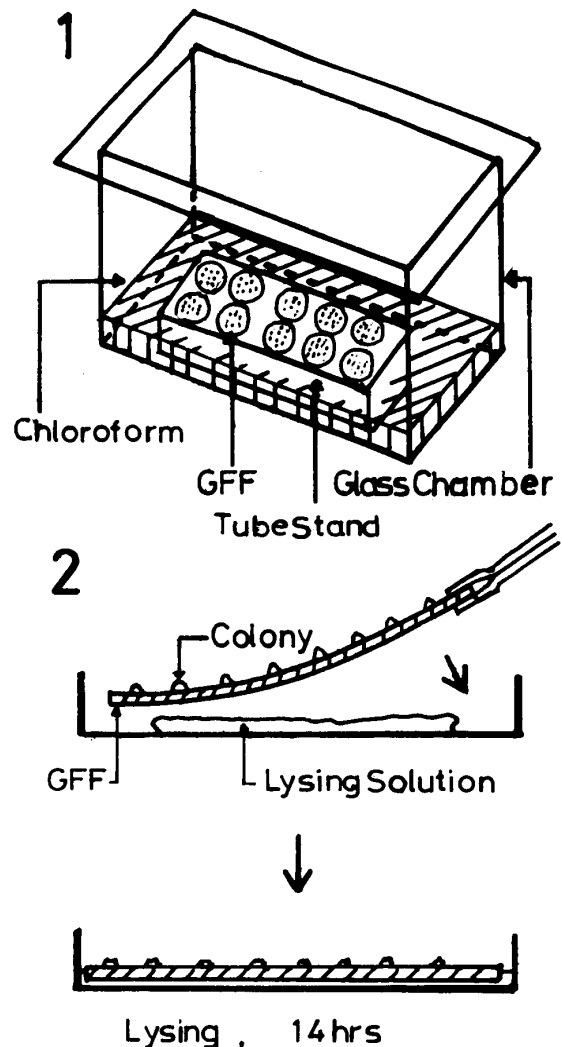


Fig. 3. Lysing of bacterial colonies.

1. Bacterial colonies on GFF exposed to chloroform vapor.
2. Lysing of bacterial colonies in Lysing solution.

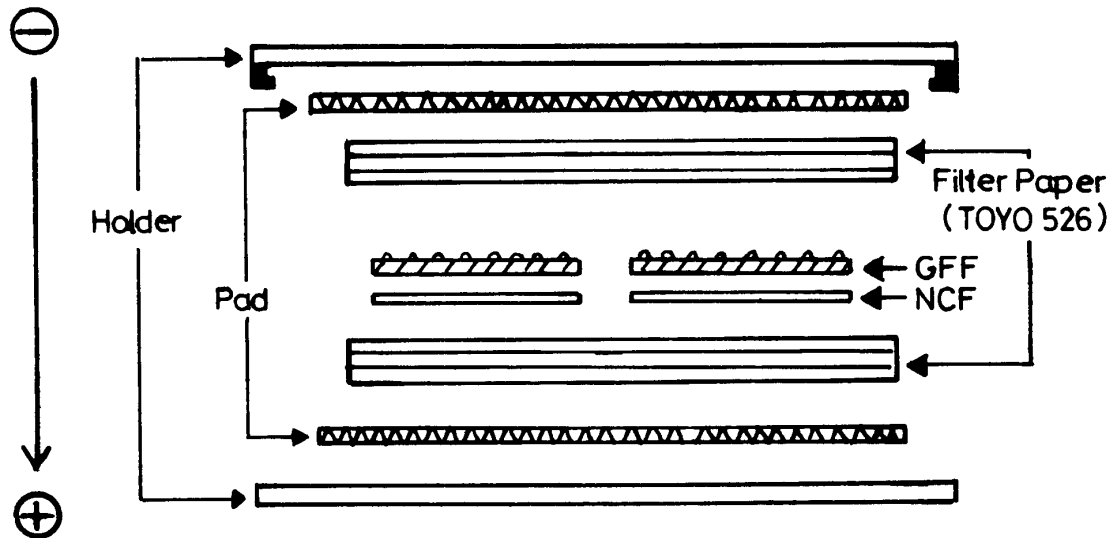


Fig. 4. Electroblothing of bacterial protein to NCF.

こうしてプロットした菌体タンパク質から目的とするタンパク質に対する抗体を用いてスクリーニングを行う。

まず、プロットされたNCFをTBST(10mM Tris・Cl, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20)中で洗浄する。10分間、2回。次に、菌体タンパク質の未吸着部分を3% Gelatinを含むTBSTで1時間ブロッキングする。

ブロッキング終了後、目的タンパク質に対する抗体を含むTBST中で1時間反応する。

尚、ここで使用する抗体は、①抗体量を予め決めておく。抗体量は100倍～10,000倍希釈の範囲でバックグラウンドが現われない条件でかつ抗体量が多い希釈率に設定する。②抗体を宿主菌体で処理し、非特異的の反応を除去する。宿主大腸菌(DH5 α)を37℃で一晩液体培地(100ml)中で培養し、菌体を回収後、蒸留水(1ml)で懸濁し、沸騰水中で10分間加熱する。加熱処理した菌体懸濁液と抗体液を1:100の割合で混合し、4℃、2時間静置する。遠心分離で大腸菌を除き、上清を一次抗体液として使用する。

一次抗体の反応終了後、再びTBSTで10分間、2回洗浄を行い、二次抗体を含むTBST中で1時間反応する。二次抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ結合アフィニティー精製ヤギ抗ウサギIgG(Bio-Rad社)又は、アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(Promega Biotec社)を用いた。アルカリホスファターゼ結合抗体の方が感度が高く、抗体スクリーニング法により適している。

二次抗体の反応終了後、TBSTで10分間、2回洗浄を行い、基質、発色剤を加えて発色反応を行う。ペルオキシダーゼの場合は、H₂O₂、4-クロロ-1-ナフトールを、アルカリホスファターゼの場合は、ニトロブルーテトラゾリウム、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェートを用いる。コントラストのはっきりしたところで反応を停止する。

又、GFFの方は、0.1%アミドブラック、40%メタノール、10%酢酸で染色し、90%メタノール、2%酢酸で脱色を行い菌体タンパク質の染色を行う。

5) ポジティブコロニーの二次スクリーニング
 一次スクリーニングでポジティブコロニーが得られたら、そのコロニーを再度生育させ、ブロッティング法で抗体スクリーニングを行う。二次スクリーニングは1プレート当りのコロニー数を少なくし、菌体量を増やして行くと検出が容易になる。

4. ポジティブクローンの解析

こうして得られたポジティブコロニーについて、常法に従い以下の解析を進める。

1) ポジティブコロニーよりプラスミドを単離し、cDNAの大きさなどを調べる。

2) クローン化された挿入cDNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法により全長cDNAを捜し出す。

3) クローン化されたcDNAのライブラリー中での存在割合を調べる。

4) 制限酵素地図を作製する

5) 塩基配列を決定する。データベース (Gen Bank) 等を用いホモロジー検索を行う。

6) 塩基配列から得たアミノ酸配列に基づき、そのポリペプチドの特性を調査する。

7) ノーザンブロッティング法などで RNA のサイズ及び量を調べる。

8) ハイブリッド・セレクトッド・トランスレーション法により、得られた cDNA クローンがコードするポリペプチドの同定を行う。

ハイブリッド・セレクトッド・トランスレーション法⁶⁾は、得られたポジティブクローンよりプラスミド DNA をアルカリ・リシス法で調製し、塩化セシウム密度勾配超遠心法で単離する。このプラスミド DNA (20 μ g) を制限酵素 EcoRI で切断し、直鎖化した後、加熱処理し、等量の 1 M NaOH を加え室温で 20 分間反応し、アルカリ変性させる。半分量の中和溶液 (1 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム, 0.5 M Tris-Cl, pH 8.0, 1 M HCl) を加え、NCF に DNA 溶液を吸収させる。乾燥後 6 \times SSC (0.9 M NaCl, 9 mM クエン酸ナトリウム, pH 7.0) で洗浄乾燥し、80 $^{\circ}$ C で一晩固定する。DNA が吸着した NCF を、70 $^{\circ}$ C、10 分間処理した RNA 溶液 (100 μ g/ml poly(A)⁺RNA, 65% ホルムアミド, 20 mM PIPES, pH 6.4, 0.2% SDS, 0.04 M NaCl, 100 μ g/ml tRNA) と反応し、50 $^{\circ}$ C、3 時間ハイブリダイズさせる。フィルターより非特異的に吸着した RNA を除くために、洗浄を行う。洗浄には、まず A 液 (10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% SDS) で 9 回洗浄後、SDS を除いた B 液で 2 回洗浄する。十分洗浄を行った後、水で DNA にハイブリダイズしている mRNA を溶出し、エタノール沈殿物として回収する。小麦胚芽抽出液 (Amersham 社, RPN-1) を用い *in vitro* 無細胞翻訳系 (Total volume 22.5 μ l 反応系) で、³H-Leu (Amersham 社 130 mCi/mmol) を 12.5 μ Ci 用いて、25 $^{\circ}$ C、1 時間反応した。翻訳産物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後、フルオログラフィーを行った。

結 果

1. 抗体スクリーニングの結果

イネ登熟種子についての cDNA ライブラリーより約 1 万個の組換え体コロニーをプロラミン抗体を用いてスクリーニングした。抗体ポジティブと認められるコロニーを 10 数個得た。1 枚のプレート

当たり 170 コロニーを植菌し、ブロットした NCF 上に 2 コロニーがはっきり抗体と反応し発色している例を Fig. 5-2 に示す。アミドブラックによるタンパク質染色による GFF 上のコロニーの位置を Fig. 5-1 に示したが、両者の位置は対応しており、これらを 1 次スクリーニングポジティブコロニーとした。

次に 1 プレート当たり数個のコロニーを生育させ、同様にブロット法で 2 次スクリーニングを行ったところ強い発色反応を示すコロニーが NCF 上に認められた。Fig. 6-2 の楕円形部分で示す。一方挿入配列のないベクターのみからなるプラスミドをもつコロニーは、抗体と反応するポリペプチドを生産しておらず NCF 上には発色が認められないが、GFF 上では Fig. 6-1 に示すようにアミドブラック染色ではコロニー部分が観察される (四角形部分)。

このことからプロラミン抗体と反応する産物は、挿入配列に基づくことがわかる。

2. ポジティブクロンの解析

抗体と反応したポジティブクロンのうち、インサート DNA の最も長いものを調べると 483 bp であった。このクローンを pHIB 1 と名付け、以後このクローンについて解析を行った。これまでに明らかとなった特徴としては、

1) pHIB 1 の cDNA ライブラリー中の存在割合は約 2.5% であること。

2) 塩基配列決定より pHIB 1 は pUC 9 クローニング部位 PstI サイトで、インフレームになるようにクローニングされていた。その為に大腸菌内でタンパク質が生産された。

3) 他の種のプロラミン (トウモロコシのゼイン、小麦のグリアジン、大麦のホルデニンなど) で既にみつまっているように、塩基配列の相同性が内部にあり、繰り返し構造をとっていること。

4) アミノ酸配列に読み換えたところ、非常に疎水性に富んだポリペプチドであった。

5) トウモロコシのプロラミンであるゼイン (19 kDa) の 1 つとシグナルペプチド部分で相同性が極めて高かった。

6) RNA のサイズとして約 840 nt であり、又この時期の種子中に RNA 量が多いこと。

等がわかった。

我々は、さらに、ハイブリッド・セレクトッド・トランスレーション法を用いて pHIB 1 がコードするポリペプチドを同定したところ、既に小麦胚

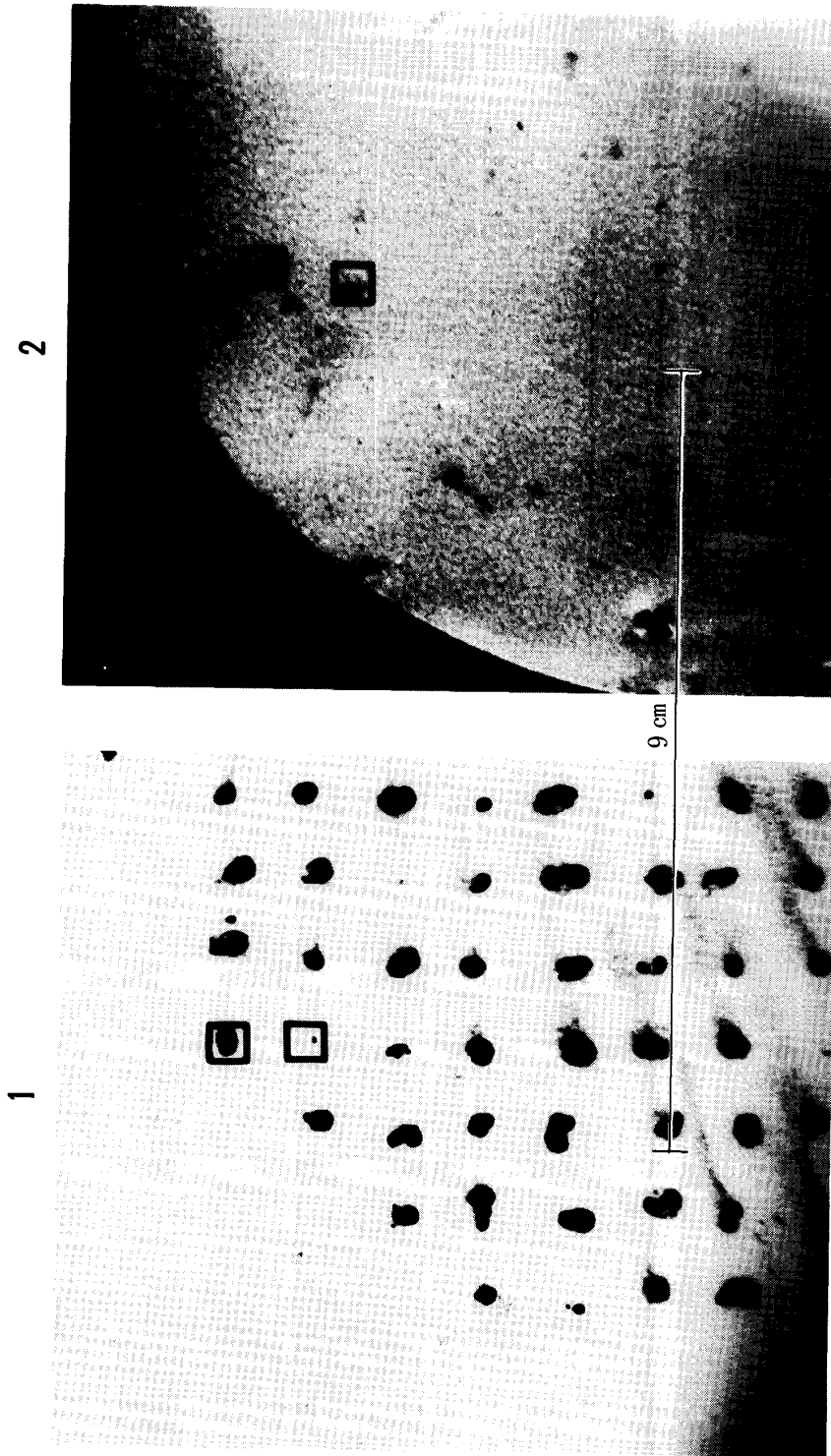


Fig. 5. Immunological detection of a rice prolamín cDNA clone. (First screening)
1. Protein staining of GFF with Amido Black.
2. Immunological reaction with an antibody against rice prolamín.
Squares indicate positive clones.

芽無細胞系での翻訳産物のうちプロラミンの前駆体であると確認されているポリペプチドの1つであることがわかった。Fig. 7のレーン2で観察されるこのポリペプチドは、プロラミンの10kDaのポリペプチドに相当する。

以上の事から、抗体スクリーニングで得られたポジティブクローンより得られた pHIB 1はプロラミンをコードする cDNA を持つことが確認された。

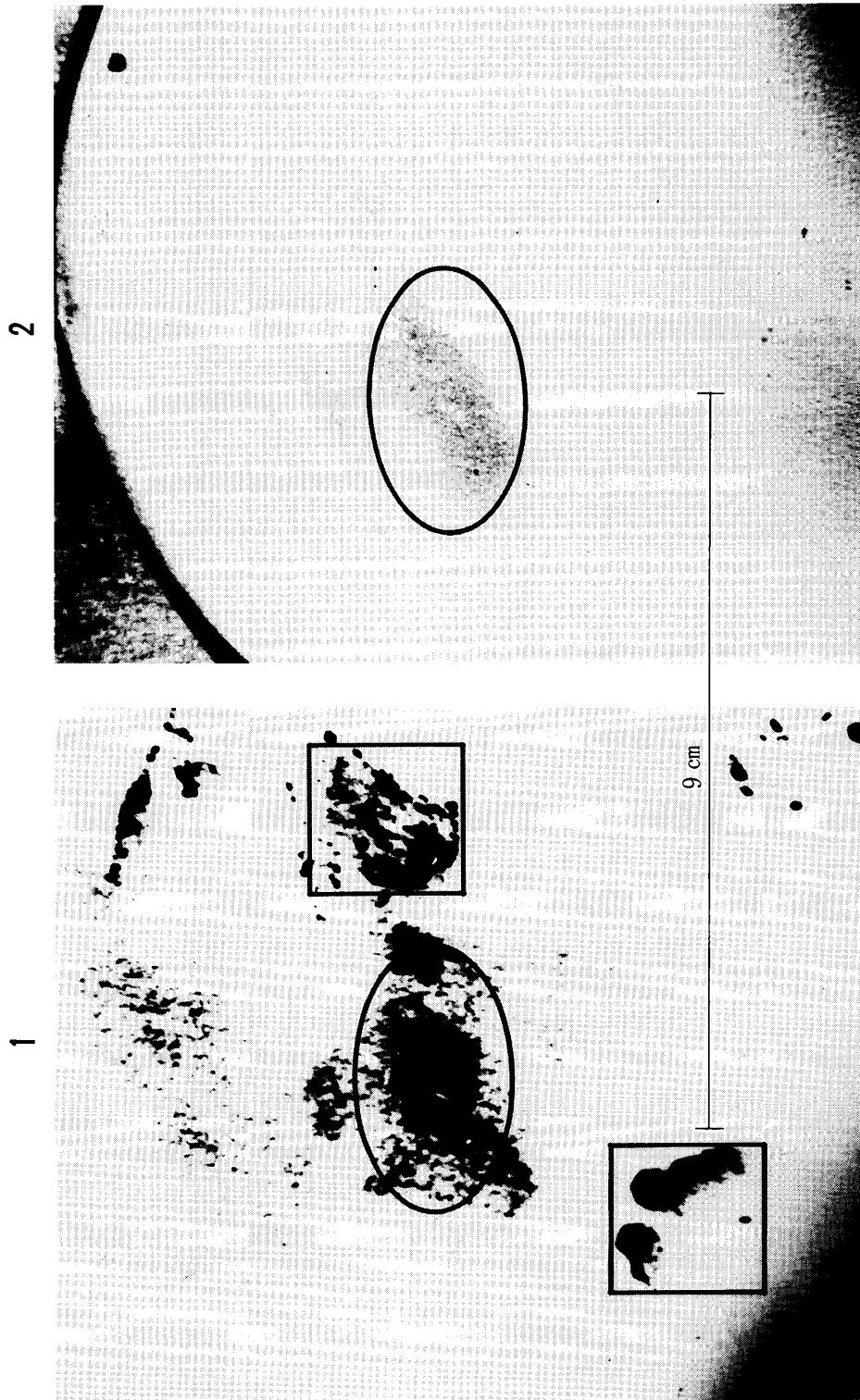


Fig. 6. Immunological detection of a rice prolamin cDNA clone. (2nd screening)
1. Protein staining of GFF with Amido Black.
2. Immunological reaction on NCF with an antibody against rice prolamin.
Area of ellipses : positive area obtained by pHIB 1 clone.
Area of squares : control area growing bacteria carrying pUC 9.

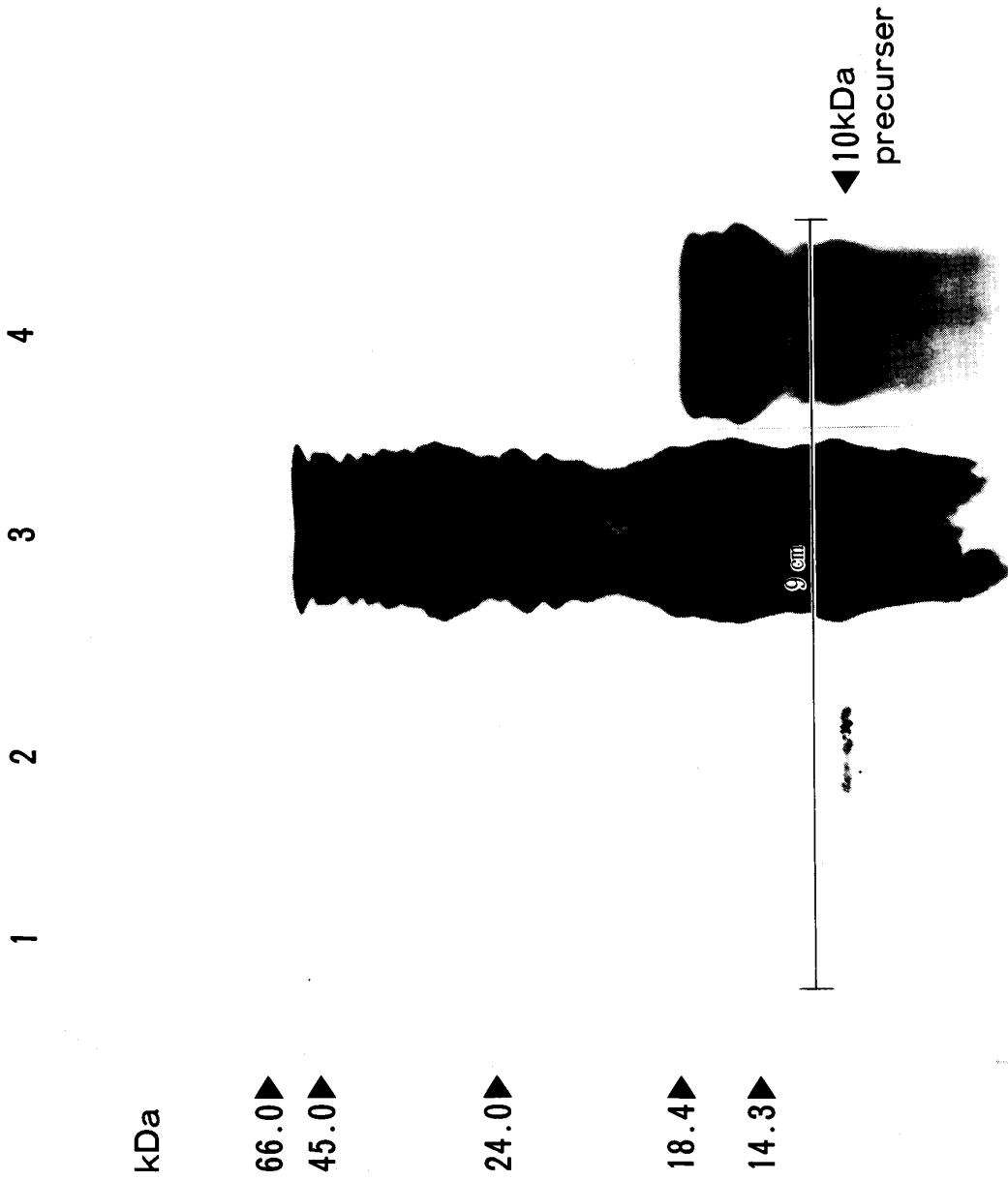


Fig. 7. Hybrid selected translation.
Lane 1. Translation of mRNA hybrid selected by pUC 9 DNA.
Lane 2. Translation of mRNA hybrid selected by pHIB 1 DNA.
Lane 3. Translation products of rice poly(A)⁺RNA.
Lane 4. 60% n-Propanol extract of translation products of rice poly(A)⁺RNA.

考 察

cDNA ライブラリーから目的のポリペプチドをコードしているプラスミドを持つクローンを探り当てる場合、そのクローンが活性タンパク質を産生している場合は、その生物活性を指標にクローンを同定できる。しかし、多くの場合は、生物活性を直接検出することは不可能であったり困難を伴う。また、生物活性を利用出来ない貯蔵タンパク質遺伝子等のクローニングの場合はこの方法は利用出来ない。

従って、目標タンパク質に関して既に蓄積されている情報が利用される。例えば、目標タンパク質の同定に利用出来る塩基配列が得られる場合や、目標ポリペプチドのアミノ酸配列が一部でも明らかにされている場合は、DNA プローブが作製出来るので、これを用いてスクリーニングする方法が一般的である。一方、DNA プローブが利用出来なくても目標タンパク質が精製され、その抗体がある場合は、cDNA ライブラリーを発現ベクターを用いて作製し、大腸菌にタンパク質を生産させ、その産物と抗体との反応から目標のクローンを同定することは可能である。この抗体スクリーニング法は、近年頻繁に使用される方法の1つである。しかし、この方法は非特異的反応に基づくバックグラウンドを常に伴うため目標クローンとそれ以外のものを見分けに熟練を要する。この点が抗体スクリーニングの最大の欠点であると云える。そのために、これまでにいくつかの改良が試みられてきた。それらのうち有効と思われるものを列挙すると、1) 抗体の純度を高くする。具体的には IgG 画分にする。2) 抗体を加熱した大腸菌と接触させ、非特異的反応を予め除く。これはバックグラウンドを下げるのにかなり効力を発揮する。3) 菌体を溶菌後 NCF 上の菌体残渣をキムワイプ等で物理的に除去する。この処理で菌体残渣に付着している抗体に基づく非特異的反応をかなり除去することが出来るが、NCF を傷つけることや手間がかかることなどが欠点である。4) NCF の洗浄時に、各種の界面活性剤 (SDS, DOC, TritonX-100, Tween-20, etc.) を加えて洗浄力を高め、非特異的に吸着している抗体を洗い落とす。これも洗浄回数が増え、NCF の大量処理の時などには煩雑になる。5) 検出感度の高い 2 次抗体を用いる。これらの改良を行うことにより目標クローンのスクリーニング法として抗体スクリーニング法はかなり信頼度の

高い方法となってきたが、上述のような煩雑な処理対策が必須である。

しかしながら、ここに述べたように、電気的プロット法を用いることにより、この抗体スクリーニング法をかなり簡便化することが出来ると共に、一層信頼度の高い方法とすることが出来た。特に、菌体と NCF を直接接触することなく菌体タンパク質のみを NCF に吸着させることが出来るため、上記改良法のうちでも、3) は全く不要になる。また、菌体に基づく抗体の非特異的吸着が無くなるため 4) の処理は不要か大きく軽減させることが出来る。しかし、1), 2), 5) の処理や対策は本法を行うについても重要であるため、従来通り配慮する必要のあることは云うまでもない。

従って、ここに述べた電気的プロット法を従来の改良点と組み合わせることにより、発現ベクターを用いる cDNA ライブラリーからの抗体スクリーニングが、一層信頼度の高い方法として利用出来るようになったと考えられる。

引用文献

- 1) D.M.Helfman, J.R.Feramisco, J.C.Fiddes, G.P.Thomas, S.H.Hughes(1983) : Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a cDNA expression Library, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 31-35
- 2) C.L.Verweij, C.J.M. de Vries, B.Distel, A.J. van Zonneveld, A.G. van Kessel, J.A. van Mourik, H.Pannekoek(1985) : Construction of cDNA coding for human von Willebrand factor using antibody probes for colony-screening and mapping of the chromosomal gene, Nucleic Acids Res., **13**, 4699-4717
- 3) H.Towbin, T.Staehelin, J. Gordon(1979) : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 4350-4354
- 4) U.Gubler, B.J.Hoffman(1983) : A simple and very efficient method for generating cDNA libraries, Gene, **25**, 263-268
- 5) T.Sugimoto, K.Tanaka, Z.Kasai(1986) : Improved extraction of Rice Prolamin, Agric. Biol. Chem., **50**, 2409-2411

- 6) T.Maniatis, E.F.Fritsch, J.Sambrook (1982) : Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 329-334
- 7) H.Yamagata, K.Tamura, K.Tanaka, Z. Kasai(1986) : Cell-free synthesis of Rice Prolamin, Plant Cell Physiol., **27**, 1419-1422

Abbreviation

NCF	Nitro cellulose filter
GFF	Glass fiber filter
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
poly(A)	poly adenylic acid
RNA	ribonucleic acid

ds cDNA	double stranded cDNA
G-C	guanine-cytosine
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
DNase I	deoxyribonuclease I
MeOH	Methanol
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBST	Tris buffered saline + Tween-20
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic Acid)
tRNA	transfer RNA
DOC	Deoxycholic Acid

Summary

A cDNA library constructed using plasmid expression vector, pUC 9, was screened immunologically after the products of the transformed cells were electrically transferred to nitrocellulose filter. Electroblothing technic mentioned here reduced remarkably the back-

ground which interfered strongly the identification of the target clones. In this paper, an example is shown in which a clone carrying rice prolamin cDNA sequence was screened from a cDNA library for developing rice seed using the electroblotting technic.