

2001年度総合理学研究所共同研究報告書

N. - 両生類胚における内臓左右軸成立機構の分子生物学的研究 -

茂木和枝、重城志緒、豊泉龍児、竹内重夫(責任者)

【研究の背景と目的】

degenerate-PCR法により、アフリカツメガエル胚からCITEDファミリー遺伝子のクローニングを試みた。CITED(CBP/p300 Interacting Transactivator with ED-Rich C-termini)ファミリーは、核ゲノム転写の際にtransactivatorとして働くタンパク質のグループであり、これまでにCITED1, CITED2, CITED3, CITED4がいくつかの脊椎動物から単離されている。これらは、神経胚期以降の成体のさまざまな組織で発現し、心臓、生殖腺、四肢などの形成に関与するとされる。現在報告されている4つのCITEDのうち、最も多くの種で見つかっているのはCITED2で、ニワトリ、マウス、ヒトの胚由来のcDNAがクローニングされている。Thomas Schlangeら(2000)は、ニワトリ胚のCITED2が、原条期と呼ばれる三胚葉が出来て間もない胚形成の初期に、胚の右側方の中胚葉のみに発現し、左側のそれには発現しないことを報告した。これは、現在知られる左右非対称に発現する遺伝子の中でも最も早い時期に発現するものであることから、左右非対称性の決定の分子カスケードの中で、他を支配する上流因子であることが強く期待される。我々が研究材料とするアフリカツメガエル胚は、遺伝子の機能解析に大変適した材料であるが、ツメガエル胚からはCITED3のみがクローニングされており、他のCITEDは未だクローニングされていない。そこで、CITEDファミリー間で保存性の高いアミノ酸領域から設計したprimerを用いて、*Xenopus*胚から新規CITED, 特にCITED2のクローニングを試みた。

【材料と方法】

- (1) 業者から購入し、研究室で飼育・馴化したアフリカツメガエル(*Xenopus leavis*)の雌雄成体に、生殖腺刺激ホルモン(hCGH, 帝国臓器)を注射(♂ 200 unit, ♀ 400 unit)し、自然に受精・産卵させた。卵割期中に、チオグリコール酸溶液(pH=8.5)でゼリー層を除去し、実験に用いる発生段階まで13~26℃、10%Steinberg氏液中で飼育した。
- (2) 尾芽胚期(Nieuwkoop & Faber, 1967による発生段階表のst. 35-40)に達した胚30個から単離・精製したmRNAを1サンプルとし、RT-PCRを行った。塩酸グアニジン法によりtotal RNAを得て、mRNA精製用oligo-dTカラム(宝酒造社)でmRNAを精製した。TaKaRa RNA PCRキット(ver.2.1)を用いてmRNAをcDNAに逆転写後、[熱変性

94℃ 1分、アニーリング55– 65℃(温度勾配をかけた) 1分、伸長72℃ 1分、40 cycle]の条件で増幅した(一部のクローンはPCR条件が異なる)。primerとして、①ニワトリ、マウス、ヒトのCITEDアミノ酸配列のアラインメントファイルをもとに自ら設計した forward primer, reverse primer 各 5 種類、②論文中に記されていたCITEDクローニング用の forward primer 2種類(Sun, H. B. et al., 1998; Leffers, H. et al., 2001)、並びにGENETYX-MACのPCRプライマー部位解析で、それらに対応するプライマーの候補として選び出された reverse primer 1種類を用いた。得られたRT-PCR増幅産物を1.5%アガロースゲル電気泳動し、DNA断片の長さを確認した。そして予想の長さの断片のみ回収した。(4) MinElute™ Gel Extraction kit (QIAGEN社)によって精製したDNA産物をpGEM-T Easy Vector System I (Promega社)を用いてライゲーションし、JM109系統の*E. coli*コンピテントセルにトランスフォーメーションさせた。それをS-gal カラーセクション用寒天plateにまき、Whiteコロニーだけを選択し、ABI Prism Miniprep Kit (Applied Biosystems社)でプラスミドDNAを精製した。それに BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (ABI社)を用いて M13 primerをprimerとして、サイクルシーケンス法によってシーケンシングを行った。得られた塩基配列は、BLASTサーチをかけ、DNAバンクに登録された塩基配列との相同性検索を行った。

【実験結果】

RT-PCR実験に用いた7 pairのprimer pairのうち予想に近い長さのDNA断片の増幅に成功したものが4 pairあったが、そのうち2 pairは予想と異なるサイズの断片も多数、ともに増幅されていた。そのほかに、予想とは長さが異なるが、なんらかのDNA断片が再現性をもって増幅された primer pairが1 pairあった。DNA断片をインサートしたクローン、43個分の両鎖の塩基配列決定の結果、以下の表に示した通りの既知の遺伝子が得られた。

primerの配列	解析クローン数	塩基配列の解析結果
forward; 5'-TGGGCATGGGGCAGTTCSC-3' reverse; 5'-TGAARTACTGGTTGTTGAGCTTCTG-3' 注; 我々が設計した(材料と方法①)	7	ferritin catalase tubulin β-1 chain
forward; 5'-CAGACCGTTCACTTTCAAGT-3' reverse; 5'-TCCAGCCCCATTTTCGATGACTAAGGACATGAGGA-3' 注; forwardは論文中に記されたprimer (材料と方法②)	20	<i>Xenopus</i> 神経胚のEST* <i>Xenopus</i> 卵母細胞のEST fast muscle ATP-ase
forward; 5'-TCTCAGTGCTTCAGTGCTCCCAAGCAC-3' reverse; 5'-TCCAGCCCCATTTTCGATGACTAAGGACATGAGGA-3' 注; forwardは論文中に記されたprimer (材料と方法②)	16	myosin II heavy chain synaptic vesicle membrane protein non-functional folate binding protein myostatin snapin selenoprotein p-like protein

*...ESTとは、Expressed Sequence Tagの略で、cDNA断片の配列でジーンバンク等に登録されたもの。

塩基配列決定にいたらなかったものや、insertを含まないプラスミドそのもの(self

ligationしたもの)も少数あった。以上の結果より、これらのprimer pairではCITEDファミリーの遺伝子を増幅することは困難であると考えられる。

【まとめと今後の展望】

CITEDファミリーは脊椎動物間で、そのアミノ酸配列が非常によく保存されている。中でも、最も保存されている機能ドメインであるCR2領域を認識するdegenerate primerを設計し、CR2ドメインを有するタンパク質をコードする遺伝子としてCITEDをツメガエル胚からクローニングすることを試みたが、primerのdegeneracyに起因するRT-PCR産物の多様性に攪乱されてしまい、ツメガエルCITED遺伝子の単離は困難であった。

primerの設計にあたり、高等な脊椎動物であるニワトリと数種の哺乳類のCITEDのアミノ酸配列をもとにdegenerate primerを設計したが、既に報告されている小型硬骨魚類のゼブラフィッシュのCITED3のアミノ酸配列を重視し、両生類であるツメガエルのCITEDの配列を、いわば魚類と鳥類・哺乳類の両側から"挟み打ち"にすればよかったのかもしれない。しかしながら、数種類のprimer pairをもとに、様々なPCR条件の設定を試みたが、RT-PCRの再現性が見られなかったり、バンドがラダー状になりPCR産物のライゲーション以降の作業に困難をきたしたりなどの我々の経験からは、CR2ドメインを含むcDNAをdegenerate PCRでクローニングするのは困難であると予想される。

degenerate PCR法は、遺伝子ファミリーの未知のメンバーをクローニングする方法として多用されるが、我々の知る限り、CITEDの仲間をdegenerate PCR法でクローニングした例はない。

現在、上記の方法とは全く異なる、ESTクローニングと呼ばれる計算機科学的なアプローチから、ツメガエルCITED2の遺伝子配列の割り出しを行っている。その推定配列からdegeneracyを含まないprimer pairをCR2領域を避けて設計し、ツメガエルCITED2の部分配列のクローニング、ひいては全長のクローニングを行うことを計画している。