

# RT-PCR を用いた新規アフリカツメガエルムシン遺伝子の探索

生物資源科学部応用生物科学科一年 金津嘉徳 B04E013

指導教員 分子生物学講座 阿部達也

岩下 淳

## 1. はじめに

哺乳類の腸管や気道から分泌される糖タンパク質の一種にムシンがある。ムシンの一種はカエルの腸管や皮膚といった体外にあたる器官でも粘液として分泌されている。このことから、ムシンが進化上どのような機能を持って受け継がれてきたのかという疑問が生じる。一方、ムシンはカエルの卵からも分泌されている。個体発生の際にもムシンは何らかの機能を担っていると考えられる。こうした系統発生上と個体発生上の問題からムシンのことを解明するヒントを求めた。

現在、ヒトの糖タンパク質である vWF (von Willebrand Factor) とアフリカツメガエルの粘液ムシン FIM (Frog Integumentary Mucin)-b1 のアミノ酸配列には類似性があることがわかっている。

<sup>1)</sup> 本実験では、その類似性を利用して Degenerate primer を作成した。この二つにさらに類似するツメガエルムシンがあれば、この Degenerate primer で増幅が可能なはずである。本研究では未報告のアフリカツメガエルムシンの遺伝子を発見し、その配列決定をすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 1) RNA 抽出

雌のアフリカツメガエル (*Xenopus leavis*) から卵巣, 大腸, 小腸, 背の皮膚, 腹の皮膚を採取し, Trizol Regent を使った方法により RNA を抽出した。70%エタノールで洗浄した RNA ペレットに 50  $\mu$ l の dH<sub>2</sub>O を加えた。RNA または DNA サンプルを 50 倍に薄め, 260 nm の吸光度を測ることでサンプルの濃度を算出した。

### 2) Degenerate primer (MUC MIX) の設計

Table 1 Se プライマーの配列

アミノ酸	G	C	D	V	C	T	C
	Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys
対応するコドン	GGC	UGU	GAU	GUU	UGU	ACC	UG
(Se の配列)	GGA	UGC	GAC	GUC	UGC	ACA	

ヒトの vWF とアフリカツメガエルの FIM-b1 タンパク質には共通または類似したアミノ酸配列があることが報告されている。<sup>1)</sup> Sense (Se) プライマーは両者に共通するアミノ酸配列 GCDVCTC に対する DNA 領域を設計した。例えば, N 末端アミノ酸グリシンに対応するコドンは GGC, GGA, GGT, GGG の 4 種類あるが, *Xenopus* DNA で用いられている頻度の高い二つを選択した。他のアミノ酸についても同様である。C 末端システインの塩基はマッチングを高くするためわざと UG

で止めた。Table 1 に Se プライマーの配列を示した。Se プライマーは  $2^6=64$  種類できることになる。Antisense (As) プライマーとして、FIM-b1 のアミノ酸配列 CCGYCEP と vWF の類似アミノ酸配列 CCGRCLP に対応する領域を選んだ。As プライマーは上記二つのアミノ酸配列をコードする DNA に相補的な配列である。Table 2 に As プライマーの配列を示した。As プライマーは 1024 種類できることになる。

Table 2 As プライマーの配列

アミノ酸	C Cys	C Cys	G Gly	Y or R Tyr or Arg	C Cys	E or L Glu or Leu	P Pro
対応するコドン	UGU UGC	UGU UGC	GGC GGA	UGU CAC	UGU UGC	GAA CUG	CC
上に対応する As の配列	ACA ACG	ACA ACG	CCG CCU	ACA GUG	ACA ACG	CUU GAC	GG

### 3) RT-PCR 法

逆転写反応は通常の方法で行った。RNA サンプル, X10 PCR バッファー, dNTP, RNase inhibitor, As プライマー, Reverse transcriptase を混合し, 全量が  $20\mu\text{l}$  になるように  $\text{dH}_2\text{O}$  で調整した。逆転写反応で得られた cDNA を PCR で増幅した。RT サンプル, X10 PCR バッファー, 2.5 mM dNTP, 25 mM  $\text{MgCl}_2$ , rTaq Polymerase, Se または As プライマーを全量 20~50  $\mu\text{l}$  で PCR を行った。PCR 産物の確認にはアガロースゲル電気泳動を行った。

### 4) クローニング

PCR で増幅した cDNA は末端に塩基 A が付いている。この性質を利用して T ベクタープラスミドに cDNA をインサートし, それを大腸菌に導入してクローニングを行った。今回使用した T ベクター (pGEM-T Easy) は, cDNA インサートベクターを持つ大腸菌を Blue-White Selection できるものである。また, インサートのない状態の pGEM-T Easy を, 専用プライマー T7 と SP6 を使って PCR を行うと 181 bp のプロダクトが増幅されるようになっている。

Degenerate primer で増幅した PCR product をエタノール沈殿で回収し,  $\text{dH}_2\text{O}$  ( $3\mu\text{l}$ ) に溶かした。この  $2\mu\text{l}$  に pGEM-T Easy ( $1\mu\text{l}$ ), 2X Rapid Ligation Buffer ( $3.8\mu\text{l}$ ), T4 DNA Ligase ( $0.8\mu\text{l}$ ) を混合し,  $25^\circ\text{C}$  で 1 時間置いた。その  $4\mu\text{l}$  を大腸菌に加えベクターを導入した。これらを X-gal, アンピシリン含有の培地で Blue-White 選別した。

### 5) Miniprep

アルカリ SDS 法により T ベクターを大腸菌から精製した。1.5 ml の培養大腸菌を遠心し, ペレットを得た。Solution I ( $100\mu\text{l}$ ) を加え室温で 5 分置いた。Solution II ( $200\mu\text{l}$ ) 加え 5 分氷冷した後, Solution III を加えさらに 5 分氷冷した。遠心して上清 ( $350\mu\text{l}$ ) を取り, 等量のイソプロパノールを加えて沈殿した。DNA ペレットに  $\text{dH}_2\text{O}$  ( $100\mu\text{l}$ ) を加え, その  $10\mu\text{l}$  をアガロース電気泳動した。

### 6) DNA シーケンスのための PCR

濃縮したプラスミド DNA 溶液 ( $5\mu\text{l}$ ) にプライマー (MUC MIX  $3.2\text{pmol}/\mu\text{l}$ ,  $1\mu\text{l}$ ), Big dye ( $8\mu\text{l}$ ),  $\text{dH}_2\text{O}$  ( $6\mu\text{l}$ ) を加え,  $96^\circ\text{C}$  : 1 分の後,  $96^\circ\text{C}$  : 30 秒,  $51^\circ\text{C}$  : 15 秒,  $60^\circ\text{C}$  : 4 分で PCR

サイクルを 28 回繰り返した。エタノール沈殿の後、シーケンスアナライザー用バッファー (15  $\mu$ l) に溶かし、シーケンス用チューブに移して 96°C で 2 分加熱してから氷冷し、DNA シーケンサーにかけた。

### 3. 結果

#### 1) RNA の抽出

ツメガエルの卵巣、小腸、大腸、腹の皮膚、背の皮膚の五ヶ所から取り出した RNA の定量結果を Tabel 3 に示す。

Table 3 RNA 定量の結果

サンプルをとった部位	吸光度 (ABS)	サンプルの濃度 ( $\mu$ g/ml)
皮膚・腹	0.150	300
皮膚・背	0.076	152
大腸	0.221	442
小腸	0.095	190
卵巣	0.026	52

#### 2) RT-PCR の予備実験

PCR の操作に慣れるためにいくつかの実験をした。卵巣 RNA (3  $\mu$ l) を使って FIM-b1 の専用プライマーで RT-PCR を行い、FIM-b1 の増幅に成功した。FIM-c1 のプライマーとツメガエル  $\beta$ -actin のプライマーによる RT-PCR でも FIM-c1 とアクチンがそれぞれ増幅できた。

#### 3) Degenerate primer による RT-PCR とクローニング

次に目的の実験を行った。卵巣の RNA (3  $\mu$ l) 使用し、MUC MIX プライマーによる RT-PCR を行った。アニーリング温度は 51°C、サイクル数は 45 で増幅に成功し、百数十 bp のプロダクトを得た (Fig. 1)。この PCR プロダクトを T ベクターにインサートして、大腸菌でクローニングした。Blue-White 選別で得られたホワイトコロニーを 12 個選びナンバリングした。得られたコロニーからプラスミド DNA を精製し、アガロース電気泳動したところ、No. 4, 5, 6, 8, 10, 11 の T ベクターのサイズがわずかに大きく、インサートがあるように思われた (Fig. 2)。

No. 1~12 のコロニーの中、No. 4~11 のコロニーの試験管 8 本を 10 倍に薄め、T ベクターの中のインサート部位を増幅することを目的に PCR を行った。プライマーは pGEM-T Easy 専用の T7 と SP6 を使い、条件をアニーリング温度 55°C、40 サイクルに設定したが、PCR プロダクトは増幅されなかった。

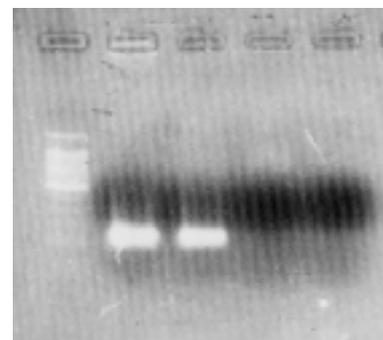


Fig.1 MUC MIX プライマーによる RT-PCR

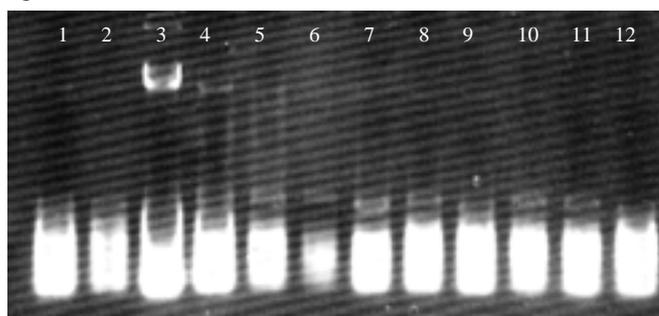


Fig. 2 ホワイトコロニープラスミドの泳動

そこで、再度クローニングし直し、精製した新たなプラスミド DNA を使い、アニーリング温度を変え PCR を行ったがプロダクトは増幅されなかった。そこで、プライマーを MUC MIX に変え、条件をアニーリング温度 51℃、45 サイクルとして再度 PCR を行ったが、増幅されたプロダクトのサイズは 100 bp 以下であった。この PCR プロダクトをエタノール沈殿で集めたところ、得られた DNA ペレットの濃度は 4.75 ng/ $\mu$ l であった。この DNA のシーケンスを行ったが、バックグラウンドが多く、目的の配列決定には至らなかった。

No. 1~12 のクローンの Miniprep によって取り出した T ベクターにインサートがあるかどうかを再度確かめるため、PCR を行った。T7, SP6 をプライマーとし、アニーリング温度を 55℃、サイクル数を 45 回とした。すべてに約 200 bp 未満のプロダクトが得られたことから、目的のインサートはなかったことが分かった。

#### 4. 考察

今回の実験でなぜ目的の配列決定に至らなかったのかを考えると、まず MUC MIX を使った卵巣の RT-PCR で得られたプロダクトのサイズは百数十 bp だったのに対し、T ベクターを基質として MUC MIX を用いて増幅させた際のプロダクトは百 bp ほどであった。二つの実験で増幅されたものが違うとなると、T ベクターへ目的領域以外のものがインサートされていたのではないかと考えられる。デジェネレートプライマーは何十種類ものプライマーを混合して使うものなので、目的の領域以外の DNA が増幅されることがある。つまり、小さいサイズの DNA がインサートされて、クローニングの結果ホワイトコロニーとして現れたということになるのではないかと思われる。

新規ムシン遺伝子を探索する意義は、既存のものと比較することで新しいムシンの機能が発見できるかもしれない点にある。また他の遺伝子との類似性を比較することで、系統進化したムシンがどんな変化・発達をしてきたかを理解するヒントとなるだろう。

本研究では新規ムシンの単離はできなかったが、その後分子生物学講座で卒業研究を行っている西田あかねさんにより MUC MIX プライマーによりツメガエルの新規ムシンコアタンパク質の遺伝子が単離された。

#### 5. 参考文献・論文

1) J probst & E gerzen & W hoffmann: An integumentary Mucin (FIM-b1) from *Xenopus leavis* homologous with Von Willebrand Factor. *Biochemistry* 29: 6240-6244 (1990).

謝辞：実験を指導してくださった分子生物学講座の阿部先生、岩下先生にお礼申し上げます。