

機能または組織特異的に発現する未知遺伝子の NASBA を用いた新しい単離法の開発

Developing a NASBA-based subtraction method for identifying unknown genes expressed specifically in one tissue having a biological function and character

研究代表者 秋田県立大学生物資源科学部附属生物工学研究所 助手 中原健二

Research Associate, Biotechnology Institute, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural Univ.

A new method has been developed to detect RNAs differentially expressed in one tissue (tester) compared to those in another (driver). The method is primarily based on subtractive hybridization between short (<300 nucleotides) driver cDNAs, amplified from a single-stranded RNA by NASBA and PCR, and single-stranded complimentary RNAs (cRNAs) by NASBA. After hybridization between these amplicons, the tester cRNAs that do not hybridize with driver cDNAs are exponentially amplified by NASBA and subsequently cloned. The method appears to have several advantages over standard cDNA subtraction methods, including the smaller amounts of total or poly(A)⁺ RNAs required as template and the higher probability of isolating rare RNAs from the tester RNAs. To evaluate the method, we attempted to isolate differentially expressed genes from healthy and *cucumber mosaic virus* (CMV)-infected tomato. Of 120 subtraction-derived clones, 61 preferentially hybridized with cDNA from CMV-infected tomato. Of these, 10 clones were further sequenced and semiquantified by real time PCR. Five of the clones were indeed induced upon CMV-infection and represented genes encoding a transcription factor with ATPase activity, a cytochrome P450, PR-4, ubiquitin-conjugating enzyme E2, and a salt-inducible protein.

1. 研究目的

生物機能の分子機構を解明する上で、それに関わる遺伝子を単離することは、一つの重要な手掛かりになる。多細胞生物は同一の遺伝情報を持ちながら、その発現様式の違いにより、別の機能・形質を示す細胞へと分化していることから、組織特異的に発現する遺伝子は、その機能・形質に深く関わっている可能性が高いと考えられる。従来、この組織特異的な発現遺伝子を単離するための方法の一つとして、cDNA サブトラクション法が用いられてきた。しかし、従来の cDNA サブトラクション法にはいくつかの問題点があり、上記の目的には不十分であった。問題点の一つは、組織内で発現量の少ない遺伝子の単離が難しいことである。しかし、組織内で発現する遺伝子の半分以上の種類は発現量が少ないことが分かっている。また、もう一つの問題点は cDNA サブトラクションを行うためには組織から多くの mRNA を抽出する必要があることである。したがって組織の非常に限られた領域における特異的な発現遺伝子の単離には使えなかった。

上記の問題点を克服するために、最近開発された塩基配列増幅法とサブトラクティブハイブリダイ

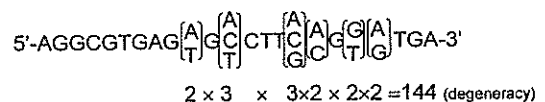
ゼーションを組み合わせた方法、nucleotide sequence amplicon subtraction (NSAS)法を考案した。そして、実際にウイルス感染トマトにおいて特異的に発現する遺伝子の単離を行う過程で本法の最適化と検証を行った。

2. 研究経過

2.1. 方法

RNA の調整 キュウリモザイクウイルス (CMV) 接種後 2 週間のトマトと同時期の健全のトマトから全 RNA を抽出し、オリゴ dT セルロースにより mRNA を精製した。

塩基配列の増幅 RNA サブトラクションに用いる遺伝子 mRNA の部分的な塩基配列集団は下記のような複数の塩基配列からなるディジェネレートプライマーを用いて塩基配列基底増幅法 (NASBA) とポリメラーゼ連続反応 (PCR) により増幅した。



RNA サブトラクション CMV 感染および健全トマト由来の塩基配列集団を用いて Fig. 1 の概略図に示した方法に従って CMV 感染トマトに特異的な塩基配列を濃縮して増幅後、クローニングした。

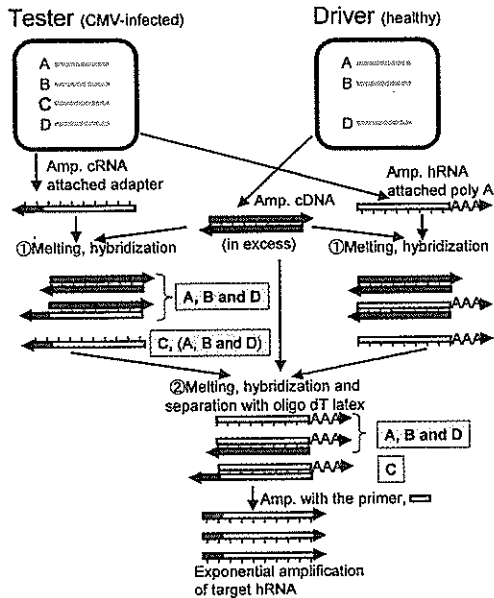


Fig. 1. Schematic protocol for NASBA-based RNA subtraction

方法の検証 RNA サブトラクション、つまり CMV 感染トマトに特異的な塩基配列の濃縮過程については、テスター、ドライバー（それぞれ CMV 感染および健全トマトから増幅した塩基配列集団）および濃縮配列（RNA サブトラクションによる濃縮後の塩基配列集団）に対する cDNA をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションにより検証した。濃縮配列からクローニングおよびシークエンスにより得られた塩基配列それぞれのトマトにおける発現レベルは、real time PCR 法により定量した。

2.2. 結果および考察

方法の最適化 最初に、テスターとドライバーの調整過程について検討した。一般にサブトラクション法では組織からの抽出 RNA のポピュレーションをできるだけ反映したテスターとドライバーを調整する必要がある。さらに NSAS 法では少量の抽出 RNA からそれらを調整することを目指した。そこで、塩基配列増法 (NASBA と PCR) を用いてテスターとドライバーを調整することにした。増幅に際して、鋳型の抽出 RNA のポピュレーションを維持するため、特異性を低めたディジェネレートプライマー (方法を参照) を用いた。プライマーの非特異性 (ディジェネレシー) の違う 3 種のプライマー (それぞれ 144、576、864)

を用いて NASBA により抽出 RNA からテスターの増幅を試みたところ、ディジェネレシーが 144 のプライマーの時、もっとも多様な増幅が観察された。また、抽出 RNA 50 ng から約 1 μg の増幅断片が得られ、RNA サブトラクションに用いるには充分であった。そこで NSAS の過程で必要になる 4 種のディジェネレートプライマーはディジェネレシーが 144 となるように設計して以下の実験で用いた。

次に RNA サブトラクションの過程を検討した。当初は、Fig. 1 で示した概略図の方法においてサブトラクティブハイブリダイゼーションは①の過程のみで行うことを考えていた。実際にこの方法で得られた濃縮配列 (濃縮配列①) を検証したところ、CMV 感染トマトに特異的な塩基配列への濃縮が充分ではないことが分かった。Fig. 2 はその検証の結果で、テスターとドライバーをアガロースゲル電気泳動して (それぞれパネル A のレーン 1 と 2)、ナイロン膜に転写後、濃縮配列①を RI 標識プローブとしてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った (パネル B)。濃縮配列①のプローブはテスターとドライバー双方の cDNA にほぼ同様に結合したことから濃縮が充分でないことが分かったのである。最近報告されたサブトラクションの効率をシュミレーションした論文で、過剰量のドライバー cDNA の存在下で、テスターの相同配列と相補配列が 2 本鎖を形成した配列を選抜する過程、ポジティブセレクションを含めることにより効率的に濃縮できることがシュミレーションされている。この

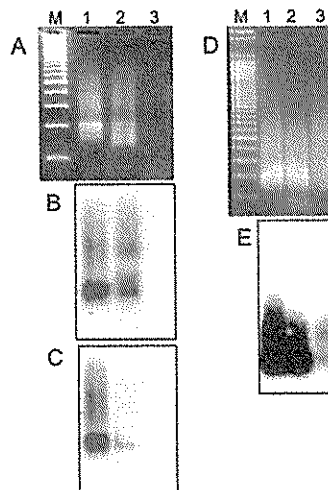


Fig. 2 Southern blot hybridization with ³²P-labeled subtracted cDNAs

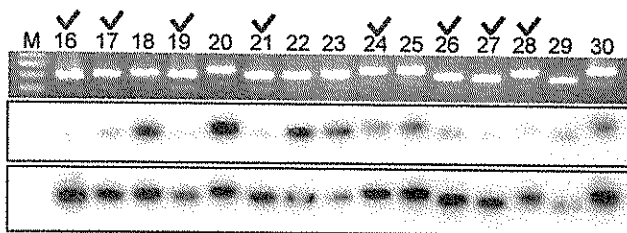


Fig. 3 Screening of subtracted cDNA clones by ^{32}P -labeled tester and driver cDNAs.

ポジティブセレクション (Fig. 1 の②のハイブリダイゼーション) の過程を加えて RNA サブトラクションをやり直したところ (Fig. 2, パネル C)、濃縮配列②のプロープは主に、テスターにのみ結合して濃縮が効率よく行われることが分かった。さらに最適化を進め、最終的に RNA サブトラクションを行った結果が Fig. 2, パネル D と E である。テスター、濃縮配列およびドライバーを電気泳動して (それぞれパネル D のレーン 1, 2, 3)、ナイロン膜に転写後、濃縮配列を RI 標識プロープに用いてサザンプロットハイブリダイゼーションを行った (パネル E)。濃縮配列は、スメアーに検出されたことから多種の塩基配列を含むと思われる。また、そのプロープはドライバーに比べ、自身とテスターに多く結合したことから、有効に濃縮された cDNA 集団であることが考えられた。

特異的な発現遺伝子の単離 濃縮配列から CMV 感染トマトに特異的に発現する遺伝子由来の塩基配列の単離を行った。パネル D のレーン 2 に泳動した濃縮配列を挿入したプラスミドベクターで大腸菌を形質転換してクローニングした。120 のクローン化した塩基配列それぞれについてサザンプロットハイブリダイゼーションにより解析した。その一部を示したのが Fig. 3 である。クローン化した塩基配列それぞれを PCR により増幅して電気泳動し (上段パネル)、ナイロン膜に転写後、ドライバーとテスターを RI 標識してプロープとして用いてハイブリダイゼーションを行った (それぞれ中段および下段パネル)。クローンの塩基配列が CMV 感染トマトに特異的に発現している遺伝子由来の場合、テスタープロープが多く結

合することになる。実際に、Fig. 3 に示した 15 クローン中、チェックした 8 クローンにおいて、ドライバープロープに比べてテスタープロープがより多く結合した。同様に解析した 120 クローンの中では、61 クローンにテスタープロープがより多く結合した。つまり、濃縮配列集団の半分の種類はテスターにより多く存在する塩基配列であることが分かった。そして、それらは CMV 感染トマトに特異的に発現している遺伝子由来である可能性が考えられた。

単離した遺伝子の特異性の検証 上記の実験で単離された塩基配列が実際に、CMV 感染トマト組織において特異的に発現する遺伝子由来であるかどうか検証した。上記の 61 クローンの中で 10 クローンを無作為に選抜して塩基配列を決定した。10 クローンは全て違う塩基配列であり、それぞれ 100 塩基前後の長さであった。それらをそれぞれ特異的に増幅するためのプライマー組を新たに合成して、real time PCR 法によりそれらの塩基配列のトマト組織中における発現量を定量した。その結果、10 クローン中、5 クローンの塩基配列が健全トマトに比べて CMV 感染トマト組織で発現が増強している遺伝子由来であることが分かった (Table 1)。Real time PCR 法ではそれぞれの標的の塩基配列が指数関数的に増幅し始めるサイクル数 (CP) を検出して比較する。 ΔCP は健全および CMV 感染トマトの抽出 RNA を鋳型にして real time PCR により標的塩基配列を増幅した際の CP の差 (健全 - CMV 感染) を示している。例えばその差が 1 サイクルの場合、PCR

Table 1. Identification of subtracted cDNA clones by nucleotide sequencing and degree of up-regulation of them by real time PCR analysis

Clone No.	Homologous genes	mean ΔCP	Fold up-regulated
1	Transcription factor with ATPase	4	16
4	Cytochrome P450	1.9	3.6
58	PR-4, Osmotin	9.7	93
69	Ubiquitin conjugate enzyme E2	3.4	11
72	Salt inducible protein	not determined	Up

では1サイクルで標的配列の数が2倍になることから元の鋳型RNA中における発現量の差が2倍あることが分かる。このようにして4クローンの塩基配列の遺伝子はCMV感染トマトにおいて3.6から93倍に発現量が増強していることが分かった。また、クローン No. 72 の塩基配列は、CMV感染トマトの抽出RNAからだけ特異断片が増幅され、しかも、その鋳型RNA量が500 ng以上の時に増幅されたことからCMV感染時に特異的に発現し、しかもその発現量は非常に少ないことが考えられた。

本来はより多くのクローンについてreal time PCRにより解析しないとできないことであるが、濃縮配列からクローニングにより単離した120クローンの中で半分の60クローンの塩基配列がテスターにより高い割合で存在し、その10クローン中、5クローン、つまり半分が実際にCMV感染トマトにおいて特異的に発現する遺伝子由来であったことから、濃縮配列の1/4の塩基配列がCMV感染トマトに特異的に発現する遺伝子由来であることが考えられた。

Real time PCRによる解析から、濃縮配列のクローン中、Fig. 3のようにしてテスターとドライバーをプローブとして用いたサザンプロット解析により選抜した61個のクローンは半分が擬陽性であることが考えられた。これはテスターとドライバーの調整に遺伝子増幅法を用いているため、増幅の割合が塩基配列によって異なり抽出RNAのポピュレーションとテスターまたはドライバーのそれが異なっていることが原因ではないかと思われる。しかしながら、濃縮配列の1/4的中率は従来法と比べて遜色はなく、遺伝子増幅法を用いることにより少量の抽出RNAから行うことができ、また、塩基配列を決定した10クローンは全て違う塩基配列であったことから濃縮配列の多様性もライブラリーとして充分であったを考慮すると、遺伝子増幅法を用いてテスターとドライバーを調整する方法は利点があり有効であると思われる。

5クローンの塩基配列から予想されるアミノ酸配列をもとにデータベース上で検索したところ、それぞれ既報の遺伝子と相同性があり (Table 1)、クローン No. 4 と 58 の塩基配列と相同性のあるCytochrome P450 と PR-4 (Osmotin)はウイルスや他の病原体の感染により発現が誘導されることが既に報告されている遺伝子であるが、他の遺伝子についてはウイルス感染により発現が誘導されることが本研究で新たに判明した。

3. 研究成果

当初の目的通り、少量の抽出RNAから組織特異的に発現する遺伝子、特に従来法では難しかった発現量の少ない遺伝子も単離することが可能なNSAS法の開発に成功した。

4. 今後の課題と発展

NSAS法では従来法に比べて少量のRNAからジェネレートプライマーを用いた遺伝子増幅法により簡便にテスターとドライバーを調整することが可能である。最近、1細胞中でPCRを行うことが可能になっており、NSAS法を組み合わせて、1細胞中で特異的に発現する未知遺伝子の単離が可能ではないかと考えている。

5. 発表論文リスト

1. NASBA-based RNA subtraction: a method for identifying differences in RNA. Nakahara, K., Yoshida, K., Kitagawa, Y. *Plant Cell Physiol.*, 2000, 41, s81 (Supplement)
2. Nucleotide sequence amplicon subtraction: a method for identifying differences in RNA abundance. Nakahara, K., Yoshida, K., Kitagawa, Y. (in preparation)