

〔原著〕 発現型 cDNA ライブラリーを用いた遺伝子
クローニングの検討とマウスメラノーマ
抗原遺伝子 cDNA のクローン化

松 原 久 裕*

(平成2年5月15日受付, 平成2年5月31日受理)

要 旨

HTLV-1 と SV40のプロモーターを用いた発現型 cDNA ライブラリーとモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原遺伝子の cDNA クローン化の条件を種々検討した。

COS 7細胞への遺伝子導入の効率をプロトプラスト融合法と DEAE- デキストラン法において FACS を用いて比較検討した結果, DEAE- デキストラン法において導入効率が数倍高かった。また, DEAE- デキストラン法において導入 DNA 量と形質発現に至るまでの時間の検討を FACS を用いて行った結果, 10 μ g の DNA を用いて遺伝子導入を行い48時間後が最も形質発現の効率が高かった。さらに目的とする遺伝子クローンを選別するための遺伝子導入—パニング—Hirt 法による遺伝子回収という方法における enrichment の効率をヒト IL-2 レセプター cDNA, 抗ヒト IL-2 レセプター抗体を用いてコロニーハイブリダイゼーション法により解析した。この結果, 目的とする cDNA が 1/10⁴以上含まれていれば 1 回の操作で約30倍に濃縮され, 本法が表面抗原をコードする遺伝子のクローニングに有用であることを示した。

次に B16マウスメラノーマ細胞より作製した cDNA ライブラリーを用い, マウスメラノーマ抗原遺伝子の cDNA クローニングに成功した。また, 種々の細胞, 臓器におけるこの遺伝子の発現様式を ノザンプロット法により 解析したところ, マウスメラノーマ細胞に遺伝子発現を認めたが正常組織には検出できなかった。

Key words: メラノーマ抗原, SR α プロモーター, 発現型 cDNA ライブラリー, DEAE-デキストラン法, FACS, Hirt 法, モノクローナル抗体。

略語一覧: cDNA: complementary DNA, FCS: fetal calf serum, D'MEM: Dulbecco's modified Eagle's medium, PBS: phosphate buffered saline, FACS: fluorescence activated cell sorter, FITC: fluorescein isothiocyanate, SV40: simian virus 40, HTLV-1: human T-cell leukemia virus type 1

I. 緒 言

腫瘍に対する免疫監視機構を解明するためには宿主の免疫系が認識する腫瘍抗原を明らかにすることが大切で

ある。この腫瘍抗原の発現機構の解析が腫瘍からの生体防御機能, 腫瘍の増殖, 転移などの解明への第1段階となる。そこでマウスメラノーマの系において抗マウスメラノーマ抗体 (M562, M622)¹⁾ の認識するメラノーマ

* 千葉大学医学部外科学第二講座

Hisahiro MATSUBARA: Study of the Gene Cloning with cDNA Library Transfection Procedure and Isolation of the Gene Encoding Mouse Melanoma Antigen.

Second Department of Surgery, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received May 15, 1990. Accepted May 31, 1990.

腫瘍抗原の抗原同定を試みた。この抗体は自然発生した B16マウスメラノーマ細胞と特異的に反応し、他のマウスの腫瘍細胞やヒトのメラノーマ細胞とは反応しない。また、免疫沈降法により、この2つの抗体は同じ80kDの糖タンパクを認識していることが判明している²⁾。一方、この抗体によって認識されるメラノーマ腫瘍抗原の生物学的活性は次のようである。(1) M562抗体は、B-16メラノーマ細胞に対する CD4⁻/CD8⁻キラーT細胞の細胞障害活性をその効果相において阻害する³⁾。(2) マウスへM562抗体を投与することにより静注したメラノーマ細胞の肺への着床を著明に減少させる⁴⁾。以上のことはM562抗体を認識する抗原がメラノーマに対して生体の免疫系が発動する機構の中で極めて重要な役割を担っていると考えられ、この抗原を解析することは抗メラノーマキラーT細胞の抗原認識様式の解明、腫瘍の増殖、腫瘍の生体からのエスケープ、さらに腫瘍の他の臓器への転移のメカニズムなどの解明に非常に有益な手段を与えるだろう。

最近 Seed が発現型ベクターを用いて作製した cDNA ライブラリーを細胞内に遺伝子導入し細胞表面抗原分子の遺伝子をクローニングできることを報告した⁵⁻⁷⁾。また、Takebe らにより Simian Virus 40 (SV40) のプロモーターとヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の Long Terminal Repeat (LTR) とからなる新しいプロモーター (SR α) が遺伝子の発現を増強することが報告されている⁸⁾。そこで、この新しいプロモーターシステムをもつ発現型ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作製し、細胞表面抗原遺伝子の cDNA クローニングの条件を種々に検討し、有効性を示した。このライブラリー cDNA を COS 7 細胞に導入してシャーレに被覆した抗メラノーマ抗体を用いてメラノーマ腫瘍抗原を発現した細胞を選別した。次にこの抗原陽性細胞よりエピゾームに存在する cDNA を Hirt 法⁹⁾により回収し、得られた DNA を再度 COS 7 細胞に導入した。このプロセスを繰り返し80kD のマウスメラノーマ抗原をコードする cDNA クローンを分離したので報告する。

II. 実験方法

1) 細胞・抗体

本研究に用いたマウスメラノーマ細胞は C57BL/6 由来の自然発生メラノーマ細胞 B16 であり、4%FCS-RPMI 1640 (FCS, RPMI ともギブコ社) 培養液中にて培養した。また、サルの fibroblast 由来の COS 7 細胞は10% FCS-D'MEM 培養液 (ギブコ社) にて培養し

た。この細胞は replication defective な SV 40に感染しており複製に必要なT抗原を発現している。

また、抗マウスメラノーマモノクローナル抗体、M-562, M622 (IgM, κ) は P3U1 (BALB/c 由来の骨髓腫細胞) と B16メラノーマ細胞を免疫した C57BL/6 脾細胞との細胞融合によって作製されたものである¹⁾。この2種の抗体はB16マウスメラノーマ細胞とのみ特異的に反応する¹⁾。

コントロール抗体として特異的な結合能をもたない C57BL/6 マウス由来の T141抗体 (IgM, κ) を用いた。

2) 発現型ベクターを用いた B16 cDNA ライブラリーの作製

今回用いた発現ベクターは Okayama と Berg により作製された pcD に Takebe らにより開発された SR α プロモーターを導入した pcDL-SR α 296である。

本実験に用いた cDNA ライブラリーの作製は基本的には Okayama-Berg による方法^{10,11)} とほぼ同様である。pcDV1 プライマーベクターに付加されたポリ (dT) をプライマーとしてポリA 付加 B16 mRNA (2.5 μ g) からトリ骨髄細胞リバーストランスクリプターゼ (ライフ・サイエンス社) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。さらに cDNA の 3' 末端にターミナルデオキシヌクレオタイダルトランスフェラーゼ (ファルマシア社) によってポリ (dG) を付加したのち、オリゴ (dC) を付加した pL1 リンカー DNA を介して大腸菌ライゲース (ファルマシア社) によって cDNA の環状化を行った。この環状化した cDNA を大腸菌 MC1061 にトランスフォームし cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA ライブラリーは10⁶個のコロニーを有し平均インサートのサイズは約1.8kb であった。この cDNA より通常の方法¹²⁾で DNA を調整した。

3) COS 7 細胞への遺伝子導入

COS 7 細胞への遺伝子導入は DEAE-デキストラン法¹³⁻¹⁵⁾によって行った。400 μ g/ml の濃度の DEAE-デキストラン (ファルマシア社) に10 μ g の cDNA を加え、10cm のシャーレ (ファルコン社) に10⁶個の密度でまいた COS 7 細胞と37°C で4時間培養した。その後 DEAE-デキストラン及び cDNA を洗浄し100 μ M のクロロキン (シグマ社) を加え、37°C にて2時間培養した。さらにクロロキンを洗浄した後、48時間後に形質転換細胞の遺伝子発現を調べた。

4) プロトプラスト融合法による遺伝子導入

Sandri-Goldin らの方法²⁰⁾により、プロトプラストを作製した。プラスミドでトランスフォームした大腸菌 MC 1061を LB 培地 (1.0%バクトトリプトン, 0.5%

バクトイーストエキストラクト, 1.0%塩化ナトリウム pH 7.5) にて37°C で振盪培養する。吸光度 (600nm) 0.6~0.8 まで培養したところでクロランフェニコール (シグマ社) を125 μ g/ml となるように加えさらに37°C にて12時間培養し続けた。遠沈して上清を除いた後, 200ml の培養液に対し氷冷した10ml の20%ショ糖/0.05M Tris-HCl (pH 8.0) を加え大腸菌浮遊液を作製し10mg の lysozyme を加えた。氷上にて5分間静置した後, 0.25M EDTA 4ml 加え再び氷上にて5分間静置する。0.05M Tris-HCl (pH 8.0) を4ml 加え, 37°C で5分間反応させた後, 細菌がプロトプラスト化していることを鏡検にて確認して, 氷冷した10%ショ糖, 10mM MgCl₂ を含む40ml の D'MEM を加えた。1 $\times$ 10⁸ の COS7 細胞をまいた径10cm のシャーレの培養液を除去した後, 10ml のプロトプラスト化した大腸菌の浮遊液を加えた。室温にて500g, 5分間遠沈 (CD 100R トミー社), 上清を除去した後3ml の50%ポリエチレングリコール 1500 (BDH 社) を加えた。ただちにポリエチレングリコールを除去し2分間静置した。D'MEM にて1度洗浄した後, 10% FCS, 100 μ g/ml ゲンタマイシン (シグマ社) を含む D'MEM を加え5% CO₂ 37°C で4~6時間炭酸ガス培養器 (フォルマ社) にて培養後, 新しい培養液に替えさらに48, 72, 96時間培養した後抗原発現を検討した。

5) cDNA クローンの回収

形質転換細胞 (10⁶/ml) を100 μ g/ml の M622抗体と1時間氷上にて反応させた後, よく洗浄しウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を吸着させたプレート (SH 90-15, イワキガラス社) に2 $\times$ 10⁶個/プレートの濃度で氷上にて1時間反応させた。10mM EDTA と5% FCS を含んだリン酸緩衝液にてプレートを十分に洗浄しプレートに付着した細胞のみを選別する (パニング法¹⁷⁾)。この細胞に0.01M の EDTA を含む pH 7.5に調整した0.6%ドデシル硫酸ナトリウム (ドージン社) を加え室温に10分間放置した後5M NaCl を加える。この溶液を回収し4°C にて1晩反応させる。17000g にて30分間遠心し (MRX150, トミー社) 上清を分離しこの上清からエタノール沈澱により cDNA を回収した。この DNA を再び MC1061にトランスフォームし enriched cDNA ライブラリーの DNA を得る。

6) 蛍光抗体法と FACS (fluorescence-activated cell sorter) 解析

形質転換細胞を氷上にてM562抗体と1時間反応させた後 fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合させたウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を加え氷上で30分間

反応させた。この細胞を蛍光顕微鏡 (DIALUX22, ライツ社) により観察した。さらに染色した5 $\times$ 10⁵個の細胞を PBS 1ml に浮遊させ, セルソーター (FACS) による解析も同時に行った。(FACStar, ベクトン・ディキンソン社)

7) コロニーハイブリダイゼーション法による効率の検討

前述したパニング法によって回収した DNA を大腸菌 MC 1061にトランスフォームした後50 μ g/ml アンピシリンを含む LB 寒天培地にまき, 37°C にて1晩培養後出現したコロニーをニトロセルロースフィルターに移した。このフィルターを室温にて5分間10%ドデシル硫酸ナトリウムに浸し, 続いて0.5M NaOH/1.5M NaCl に5分間浸し, 最後に0.5M Tris-HCl/1.5M NaCl に5分間浸した。フィルターを2 $\times$ SSC 溶液にてよく洗浄した後80°C にて2時間減圧下でベイクングした。ベイクング後6 $\times$ SSPE (0.9M 塩化ナトリウム, 60mM リン酸ナトリウムバッファー, 6mM EDTA pH 7.4)/2 $\times$ Denhardt 溶液 (0.04%ファイコール400, 0.04%ポリビニルピロリドン, 0.04%ウシ血清アルブミン)/0.5%ドデシル硫酸ナトリウム/100 μ g/ml ニシン熱変性 DNA の中で65°C にて6時間プレハイブリダイゼーションを行った。同じ溶液に10⁷cpm/ml の α -³²P 標識プローブ (アマシャム社) を加え, 65°C にて12時間反応させた。その後フィルター2 $\times$ SSC (0.3M 塩化ナトリウム, 0.03Mクエン酸ナトリウム pH 7.0)/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにて4回室温にて洗浄さらに0.2 $\times$ SSC/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムにて65°C で4回洗浄した。風乾したフィルターをX線用フィルム (XAR-5, コダック社) に-80°C で感光, オートラジオグラムを撮り, 陽性のコロニーの数を計算した。

8) ノザンブロット法

Chirgwin らの方法¹⁸⁾に従い RNA は調整した。20 μ g の RNA を2.2M ホルムアルデヒド, 40mM MO-PS pH 7.0, 10mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, を含んだ1.2%アガロースゲルにて泳動, ゲル内 RNA をノザンブロット法¹⁹⁾に従いニトロセルロースフィルター (シュライヒャー・アンド・シュエル社) へブロットティングした。このフィルターを80°C 2時間減圧下にてベイクングした。前述のコロニーハイブリダイゼーション法と同様にハイブリダイズした後オートラジオグラムを作製した。

9) サザンブロット法

BamH I 制限酵素にて切断した DNA を0.8%アガロースゲルにて泳動, サザンブロット法²⁰⁾にしたがってニ

トロセルロースフィルターにブロットイングした。ブロットイングしたフィルターを前述したコロニーハイブリダイゼーション法と同様な方法にてオートラジオグラムを作製した。

III. 結 果

1) COS7 細胞における遺伝子導入法の検討

COS7 細胞への遺伝子導入の効率をプロトプラスト法と DEAE-デキストラン法において比較検討した。両者の方法を用いて、後述するメラノーマ抗原遺伝子 H52 cDNA を導入して得られた形質転換細胞をモノクローナル抗メラノーマ抗体にて間接蛍光抗体染色を行い FACS により解析したのが図 1 である。この解析結果を比較してみると抗原陽性細胞において、蛍光強度の強さで示される抗原の発現量はほぼ同じだが抗原を発現している細胞の数は DEAE-デキストラン法に多いことが判明した。プロトプラスト融合法による遺伝子導入効率は約 5% であり、DEAE-デキストラン法では約 35% であった。さらに DEAE-デキストラン法による遺伝子導入について DNA 使用量と導入から形質発現に至るまでの時間の検討を行った (図 2)。 10^6 個の COS7 細胞当り H52 cDNA の量をそれぞれ 3, 10, 30 μ g 用いて遺伝子導入を行い、また導入後 48, 72, 96 時間後において形質発現を間接蛍光抗体染色法を用いた FACS 解析により比較した。この結果、明らかに 10 μ g の DNA を用いて遺伝子導入を行い 48 時間後に解析したものに抗原発現陽性の細胞が多く存在し、この条件のもとで遺伝子

導入—パニングを行い抗原発現陽性細胞を選択するのが最も効率的であると考えられる。

2) 遺伝子導入—パニング法における enrichment 効率の検討

目的とする遺伝子クローンの選別のための遺伝子導入—パニング—Hirt 法による遺伝子回収という方法の enrichment の効率をコロニーハイブリダイゼーション法により解析した。SR α プロモーターを有するヒト IL-2 レセプターをコードする cDNA を B16 ライブラリーに $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ 量混入し DEAE-デキストラン法によって COS7 細胞に遺伝子導入を行った。このそれぞれから得られた形質転換細胞をマウス抗ヒト IL-2 レセプターと反応させ、抗マウス免疫グロブリン抗体をコートしたプレートを用いてパニングを行った。プレートに付着した細胞より DNA を回収し大腸菌 MC 1061 をトランスフォームさせ出現したコロニーをニトロセルロースフィルターに移し、ヒト IL-2 レセプターの cDNA より作製したプローブを用いてハイブリダイズさせ、陽性コロニー数を計算した。この結果を表 1 に示す。ヒト IL-2 レセプター cDNA を全く混入しないもの、 $1/10^5$ 量混入したものでは陽性コロニーは全く検出されないが、 $1/10^4$, $1/10^3$ 量混入したものではそれぞれ 12 個 (全コロニーの 0.4%), 89 個 (3.0%) の陽性コロニーを検出し、それぞれ 40, 30 倍に濃縮されたことがわかった。

3) パニング法による H52 cDNA の enrichment およびそのクローン化過程の検討

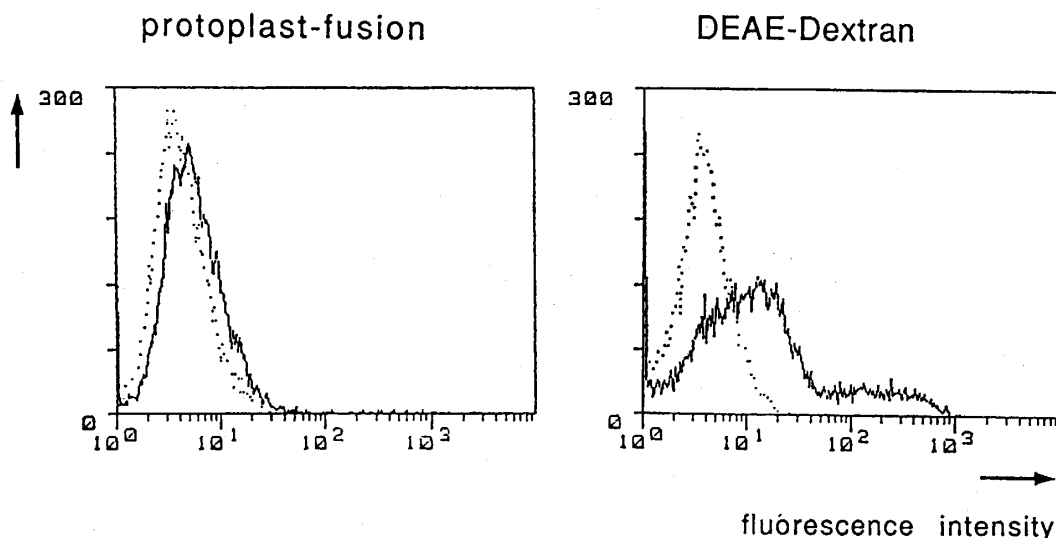


図 1. プロトプラスト融合法と DEAE-デキストラン法の遺伝子導入効率の比較：

H52 cDNA を COS 7 細胞に遺伝子導入して、形質転換細胞を間接蛍光抗体染色して FACS により解析した。左がプロトプラスト融合法、右が DEAE-デキストラン法による形質転換細胞の染色パターンである。実線が M562 抗体、点線が T141 抗体による染色である。

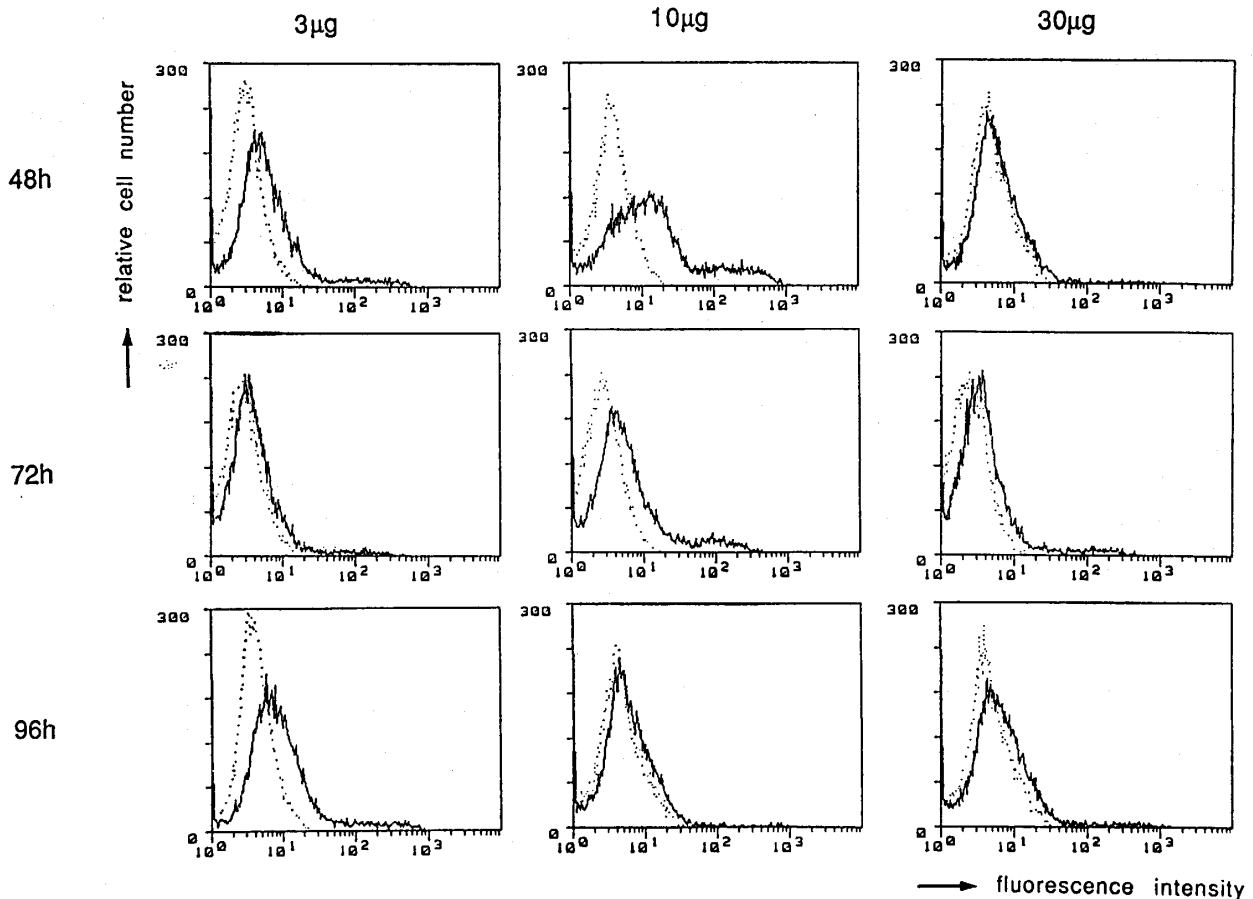


図 2. DEAE-デキストラン法による導入 DNA 量と時間経過による抗原発現の解析：
H52 cDNA を 3, 10, 30 μ g 導入し導入後それぞれ48, 72, 96時間後に形質転換細胞を間接蛍光抗体
染色し FACS により解析した。実線がM562抗体、点線がT141抗体による染色である。

表 1. 遺伝子導入ーパニング法における enrichment 効率

- a) ヒト IL-2 レセプター cDNA をオリジナル B16
メラノーマライブラリーに一定の割合で混入
- b) Hirt 法により回収した DNA で大腸菌にトラン
スフォームし、出現したコロニー数
- c) ヒト IL-2 レセプター cDNA より作製したプロ
ープとハイブリダイズしたコロニー数

Percentage of human IL-2 receptor cDNA ^{a)}	Total colony numbers ^{b)}	Hybridized colony numbers ^{c)} (%)	Efficiency of enrichment
0/10 ⁵	957	0 (0)	0
1/10 ⁵	2,397	0 (0)	0
1/10 ⁴	2,979	12 (0.4)	×40
1/10 ³	2,985	89 (3.0)	×30

後述するように実際に B16 cDNA ライブラリーから
遺伝子導入ーパニングー DNA 回収、という操作を繰
り返した H52 cDNA のクローン化過程をサザンプロ
ット法を用いて解析したものを示す (図 3)。まず、オリ
ジナルの B16 cDNA ライブラリー、1, 2, 3, 4 回目
のパニングから回収した DNA、H52 cDNA のそれぞ

れの DNA を制限酵素 BamH1 によって消化し、イン
サート DNA をベクター DNA より分離した。次にこ
れらをアガロースゲルに泳動し、H52 cDNA 由来のプ
ローブを用いてハイブリダイズした。このプローブは H
52 の一部のフラグメントであるため H52 cDNA 全体の
2.8kb のバンドにハイブリダイズする。最初のライブラ

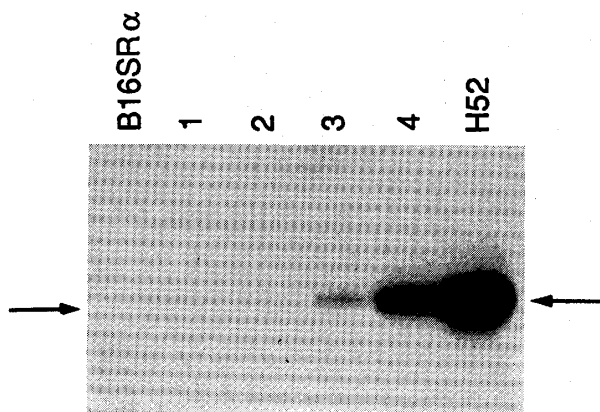


図 3. H52 cDNA の enrichment 過程の解析：
等量 (10 μ g) のオリジナル cDNA ライブラリー (B16 SR α)、各段階のパニング (1-4) から回収した DNA および H52 クローンを BamH1 にて消化し泳動後、H52 より作製したプローブにてハイブリシ解析した。

リー、1, 2 回目のパニングから回収した DNA からではごくわずかなバンドしか検出できなかったが、3, 4 回目のパニング由来の DNA からバンドが明瞭になりパニングの回数を重ねるごとに目的とする DNA クローンが enrich されていることがわかる。

4) マウスメラノーマ抗原をコードする遺伝子のクローン化の実例

B16メラノーマ cDNA ライブラリーを (1) DEAE-デキストラン法を用いて COS7 細胞に導入、(2) 抗メラノーマモノクローナル抗体を用いたパニング法によってメラノーマ抗原を発現している細胞を選別、(3) Hirt 法による導入した遺伝子の回収、(4) enriched cDNA ライブラリーの調整という一連の操作を繰り返すことにより目的とする遺伝子クローンの単離を試みた。1 回目と 2 回目のパニングの過程では抗体をコートしたプレートにはごく少数の細胞のみが付着したにすぎなかった。各段階において回収した DNA を制限酵素 BamH1 にて消化し 0.7% アガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイドにて染色したものを図 4 に示す。BamH1 の消化により 3.4kb のベクターとインサート DNA が分離するはずであるが、1 回目と 2 回目のパニングから得られた DNA でははっきりとしたインサート DNA のバンドは明瞭ではなくスミアとなっていた。すなわちこれは長さの異なる多くの cDNA が非特異的なプレートの結合によって同時に回収されてきたことを示している。

しかし、3 回目のパニングからプレートに付着した細胞数は多くなり、回収された DNA を用いて BamH1 で消化後、アガロースゲルで解析してみるといくつかの明瞭なバンドを認めるようになった。このことは目的と

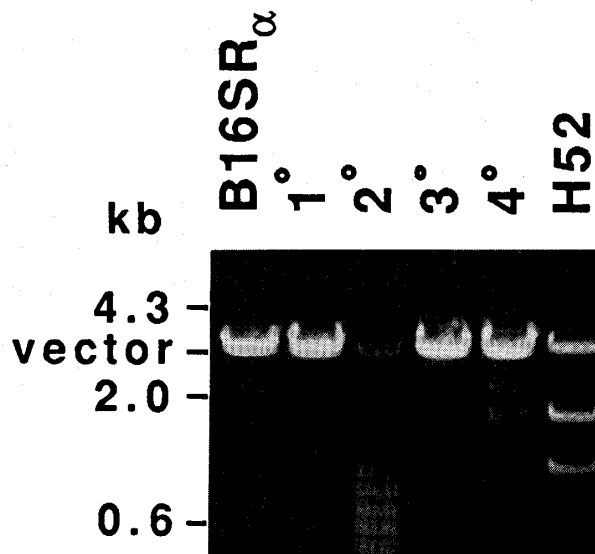


図 4. パニングにより回収した DNA の解析：
オリジナル cDNA ライブラリー (B16 SR α) と遺伝子導入-パニング各段階 (1-4) において回収した DNA を BamH1 により消化し 0.7% アガロースゲルにて泳動した。分子量は λ Hind III マーカーによった。

する DNA が enrich されていることを示唆していると考えられた。一方、4 回目のパニング後に回収された DNA について BamH1 で消化してみると、3 回目まで得られた DNA のゲルのパターンと同一であったことから目的とする DNA の enrichment がこれ以上難しいと思われた。

そこで 4 回の遺伝子導入-パニング- DNA 回収の操作の後に得た DNA を大腸菌 MC1061 にトランスフォームし、得られた 16 個の独立したコロニーを 1 組として計 8 組のグループにまとめた。この 8 組のグループごとに DNA を抽出し、この DNA を COS7 細胞へ DEAE-デキストラン法により遺伝子導入を行い形質転換細胞を得た。そして M562 抗体および FITC 標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体を用いて間接蛍光抗体染色を施行した。この結果、M562 抗体にて蛍光を有するメラノーマ抗原を発現した細胞が存在した 2 組のグループが同定された。図 5 に蛍光顕微鏡にて観察した抗原陽性細胞の写真を示す。この 2 組のグループに属する 32 個のクローン由来 DNA をそれぞれ 1 種類ごとに DEAE-デキストラン法により再び COS7 細胞に導入し、同様に間接蛍光抗体染色により観察した。その結果、2 個のクローン化 DNA を導入した細胞が表面抗原を発現していることが判明した。図 6 にこの内の 1 個のクローン (H52 と命名) を導入した形質転換細胞の蛍光顕微鏡による写真を示す。蛍光抗体により細胞表面に抗原が強く

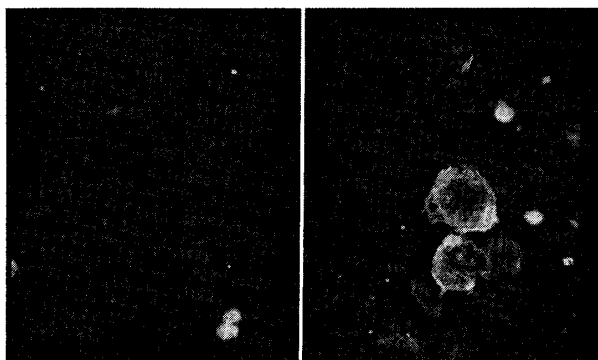


図 5. グループごとに遺伝子導入を施行した形質転換細胞の蛍光染色：
コントロール抗体 T 141 抗体 (A) と M562 抗体 (B) による間接蛍光抗体染色 (×400)

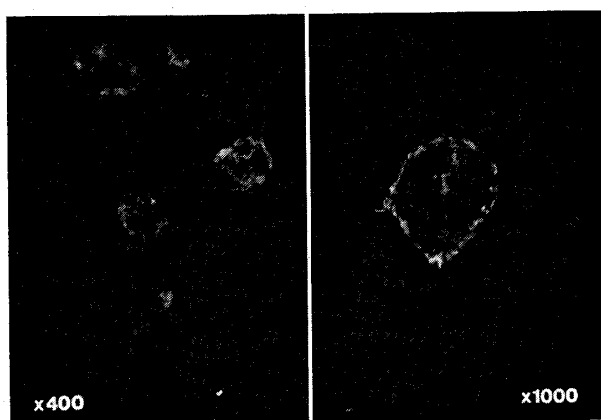


図 6. 蛍光顕微鏡によるクローン化 DNA 導入形質転換細胞の解析：
H52 クローン化 cDNA を遺伝子導入した形質転換細胞を M562 抗体により間接抗体染色を行った。(左は 400 倍、右は 1000 倍の拡大である。)

発現しているのがわかる。さらに間接蛍光抗体染色したこの形質転換細胞を FACS を用いて解析した。結果を図 7 に示す。M562 抗体による染色により表面抗原を発現している細胞が強い蛍光強度を示していることが確認された。また、すべての細胞が抗原の発現を示しているわけではないがこれは DEAE-デキストラン法による COS7 細胞への遺伝子導入の効率による。この結果によれば約 35% の細胞が抗原を発現していると考えられる。

従って、以上の結果より 4 回の遺伝子導入-パニング-DNA 回収の操作によって得られた DNA のうち $2/16 \times 8 = 1/64$ が表面抗原をコードするクローン化 DNA であった。

得られた H52 cDNA は制限酵素 BamH1 により消化し泳動すると図 4 に示すように 2.8kb のインサートを有しているのがわかる。このインサートの長さはメラノ-

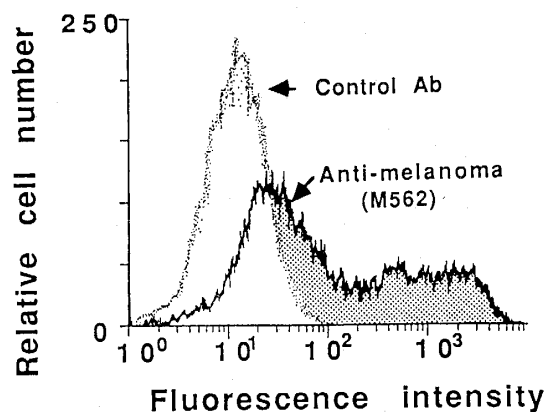


図 7. FACS による H52 cDNA 導入形質転換細胞を間接蛍光抗体染色し、FACStar により解析した。実線が M562 抗体、点線が T 141 抗体による染色。

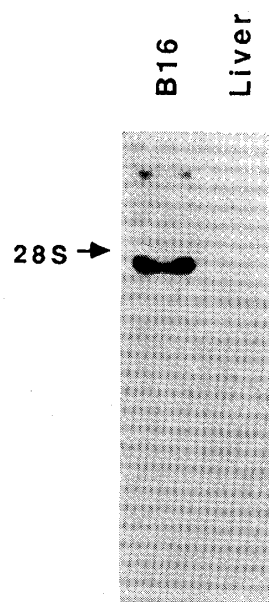


図 8. メラノーマ抗原発現の解析：
B 16 マウスメラノーマ、マウス正常組織 (ここでは Liver を示す) から抽出した RNA を H52 より作製したプローブにてハイブリダイズさせ解析した。28S リボソーム RNA の位置を矢印にて示した。

マ表面抗原として考えられている 80kD の糖タンパクをコードするのに十分な長さを持つ cDNA である。

5) ノザンプロット解析

この遺伝子の発現をこの H52 クローンより作製したプローブを用いてノザンプロット法によって解析した (図 8)。この結果、この遺伝子の転写は B 16 メラノーマに 4kb と 10kb のバンドが検出された。しかし、C57BL/6 マウスの正常組織 (胸腺、肝臓、精巣、小脳、腎臓、副腎など) においては発現を認めなかった。

IV. 考 察

B16マウスメラノーマの cDNA ライブラリーを COS7 細胞に遺伝子導入して、B16 マウス メラノーマ抗原をコードする cDNA クローンを単離した。この遺伝子のクローン化に用いた発現型ライブラリーの SR α プロモーターは SV40の early promotor と HTLV-1の LTR の R-U 5'部を含み、Okayama-Berg タイプの発現型ベクターで用いられる SV40の early promotor 単独の場合より、数十～数百倍の cDNA の発現の増強を認めることが知られている⁸⁾。この強力なプロモーター活性のため、目的とする H52 cDNA のクローン化は極めて容易になったと考えられる。さらにこのプロモーターは COS7 細胞だけでなく L細胞のような他の細胞にも応用可能であった。すなわち今回クローン化した H52 cDNA を L細胞に遺伝子導入することによりメラノーマ抗原を発現している安定した形質転換細胞を得ることができた。しかも抗原発現に関しても、COS7 細胞に導入した場合と同様に強いプロモーター活性を有していた (data not shown)。

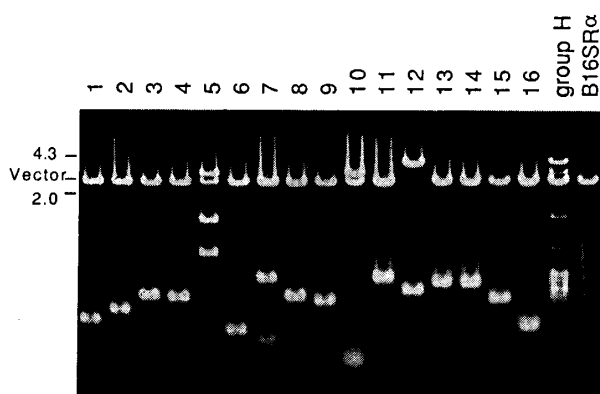


図 9. パニングにより回収された個々の cDNA クローンの解析:

4 回目のパニング施行後回収された個々の cDNA クローン (1-16), 16 個のクローンをまとめた group H, オリジナル cDNA ライブラリー (B16 SR α) を BamH1 で消化し、アガロースゲルにて泳動しエチジウムブロマイドにて染色し解析した。5 のレーンが抗原発現陽性のクローン (H52) であった。

しかしながら、このプロモーターを用いた cDNA ライブラリーは従来の Seed らの cDNA ライブラリー⁵⁾ に比べてその作製段階において cDNA サイズを分画することができないため、比較的小さなサイズの cDNA を有する傾向にあるという欠点がある。特に本法のように遺伝子導入-パニング-DNA 回収の操作を繰り返すことによりこのことは著明になる。図 9 に示したのは 4

回目のパニング後に回収した H52 を含む 1 グループの 16 個のクローンを制限酵素 BamH1 によって消化した後 0.8% アガロースゲルに泳動したものであるが、実際に多くのクローンが 0.7kb 以下の小さなサイズの cDNA であった。これはインサートの短いクローンを含む大腸菌が長いインサートを有するものに比して増殖しやすいためであると考えられる。これは遺伝子導入の際に用いている DEAE-デキストラン法によって 1 つの細胞に導入される DNA のコピー数が多くなることに起因していると考えられる。

この欠点を改善するには遺伝子導入の際に 1 個の細胞当りに導入される DNA のコピー数が小さいプロトプラスト融合法²⁰⁾を用いることが挙げられる。しかし、その際に遺伝子の導入効率を考慮する必要がある。DEAE-デキストラン法がプロトプラスト融合法より約 5 倍導入効率が高いことが判明したため、パニングによりプレートに付着する細胞の数の少ないクローニングの過程の前半では、DEAE-デキストラン法による遺伝子導入が多くをスクリーニングできる点で有利である一方、後半では 1 個の細胞に導入されるコピー数の少ないプロトプラスト融合法が目的とする cDNA の enrichment に有効であると考えられる。

ヒト IL-2 レセプター cDNA を用いた遺伝子導入-パニング法の enrichment 効率の結果から 10^5 に 1 個の頻度の cDNA ではパニング法による陽性クローンの enrichment は難しいが 10^4 に 1 倍以上の割合で存在すれば 1 回のパニングにより約 30 倍に濃縮されうる。従って 4 回程のパニングを繰り返すことにより DNA の enrichment がかなり期待できると考えられる。一般的に細胞表面分子をコードする遺伝子は 10^4 に 1 個の割合でライブラリーに含まれていると考えられているためこの方法はこうした細胞表面分子をコードする cDNA を単離するのに非常に有効な手段であると考えられる。

今回、クローン化された H52 cDNA は M562, M622 両者の抗体によって認識されるマウスメラノーマ抗原をコードしており、またノザンブロット法による解析でこの遺伝子の発現がマウスのメラノーマにおいてみられマウスの正常組織においては認められなかった。

この遺伝子がマウスのメラノーマの癌化における役割の解析など行う上で今後この cDNA の塩基配列を決定し、その構造およびこの遺伝子産物の機能を明らかにしていく必要がある。この遺伝子の発現が腫瘍免疫においてどのように関与しているのかについてもさらに解明すべき問題があり今後検討が必要であると思われる。

稿を結ぶにあたり、終始御指導、御校閲を賜った恩師磯野可一教授ならびに本学高次機能制御研究センター免疫機能分野谷口克教授に心より感謝の意を表します。また、実験に際し技術的御指導、御教示を頂いた田川雅敏博士ならびに免疫学教室各位に謝意を表すとともに平素より御指導、御協力頂いた千葉大学第2外科の諸兄に御礼申し上げます。

SUMMARY

A cDNA of 2.8 kilobase pairs long encoding 80 kilodalton mouse melanoma antigen was isolated by cDNA library transfection technique, which library is expressible due to the SR α promoter in mammalian cells.

The efficiency of this transfection and the selection procedure was examined with human IL-2 receptor cDNA powered by the same promoter, showing that this cloning system is feasible for the gene encoding cell surface antigen. The repeated procedures of cDNA library transfection into COS7 cells with DEAE-dextran, panning out the antigen positive cells by anti-melanoma monoclonal antibody and rescue of plasmids with Hirt method lead us to identify this cDNA. The transfectants of the cloned cDNA were stained with anti-melanoma monoclonal antibody to show the high cell surface expression of the melanoma antigen.

Nothern blotting analysis illustrated that this transcript was detected solely in mouse melanoma cells but not in normal tissues of mouse origin.

文 献

- 1) Wakabayashi S, Saito T, Shinohara N, Okamoto S, Tomioka H and Taniguchi M: Syngenic monoclonal antibodies against melanoma antigens with species specificity and interspecies crossreactivity. *J Investigative Dermatol* **83**: 128-133, 1984.
- 2) Sakiyama H, Matsushita E, Kuwabara I, Nozue M, Takahashi T, Hiraga Y and Taniguchi M: Characterization of a melanoma antigen with a mouse-specific epitope recognized by a monoclonal antibody with anti-metastatic ability. *Cancer Res* **48**: 7173-7178, 1988.
- 3) Ono K, Takahashi K, Hirabayashi Y, Itoh T, Hiraga Y and Taniguchi M: Mouse melanoma antigen recognized by Lyt-2 and L3T4⁺ cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **48**: 2730-2733, 1988.
- 4) Gunji Y and Taniguchi M: Syngenic monoclonal anti-melanoma antibody that inhibits experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Jpn J Cancer Res* **7**: 595-601, 1986.
- 5) Seed B and Aruffo A: molecular cloning of the CD2 antigen, the erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3365-3369, 1987.
- 6) Seed B: An LFA-3 cDNA encodes phospholipid-linked protein homologous to its receptor CD2. *Nature* **329**: 840-842, 1987.
- 7) Aruff A and Seed B: Molecular cloning of CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8573-8577, 1987.
- 8) Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M and Arai N: SR α promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biology* **8**: 466-472, 1988.
- 9) Hirt B: Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**: 365-369, 1967.
- 10) Okayama H and Berg P: High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol Cell Biol* **2**: 161-170, 1982.
- 11) Okayama H and Berg P: A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **3**: 280-389, 1983.
- 12) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: *Molecular Cloning*, pp 86-94, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 13) Sompayrac LM and Danna KJ: Efficient infection of monkey cells with DNA of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7575-7578, 1981.
- 14) Yokota T, Arai N, Lee F, Rennick D, Mossman T and Arai K: Use of a cDNA expression vector for isolation of mouse interleukin 2 cDNA clones: Expression of T-cell growth factor activity after transfection of monkey cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 68-72, 1985.
- 15) Grosschedl R and Baltimore D: Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell* **41**: 885-897, 1985.
- 16) Sandri-Goldin RM, Goldin AL, Levine M and Glorioso JC: High-frequency transfer of cloned herpes simplex virus type 1 sequences to mammalian cells by protoplast fusion. *Mol Cell Biol* **1**: 743-752, 1981.
- 17) Wysocki LJ and Sato VL: "Panning"

- for lymphocytes: A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA 75: 2844-2848, 1978.
- 18) Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Rutter WJ: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18: 5294-5299, 1979.
- 19) Davis LG, Dibner MD and Battey JF: Basic Method in Molecular Biology. pp. 143-146. Elsevier, New York, 1986.
- 20) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J: Molecular Cloning pp. 383-389, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- 21) Oi VT, Morrison SL, Herzenberg LA and Berg P: Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells. Proc Natl Acad Sci USA 80: 825-829, 1983.

新時代の医薬を考えるテイジン

テイジンは、先端的なバイオ技術を生かし、生体のホメオスタシス(恒常性維持)に基盤をおいた、独創的でユニークな医薬品の研究開発に取り組んでいます。



静注用免疫グロブリン製剤

ベニロン®

〔乾燥スルホ化人免疫グロブリン〕



活性型ビタミンD₃製剤

ワンアルファ®

〔アルファカルシドール製剤〕



気道潤滑去痰剤

ムコソルバン®

〔塩酸アンブロキシール製剤〕



滴剤型緩下剤

ラキソベロン®

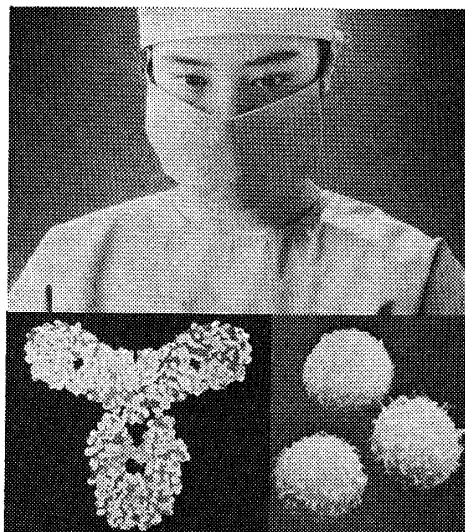
〔ピコスルファートナトリウム製剤〕



付着型アフタ性口内炎治療剤

アフタッチ®

〔トリアムシノロンアセトニド貼付剤〕



抗コリン性気管支収縮予防剤

アトロベント®

〔臭化イプラトロピウム製剤〕



持続性気管支拡張剤

スピロベント®

〔塩酸クレンブテロール製剤〕



人工唾液

サリベクト®



粘膜付着型鼻過敏症治療剤

リノコート®

〔プロピオン酸ベクロメタゾン製剤〕



噴霧式口内炎治療剤

サルコート®

〔プロピオン酸ベクロメタゾン製剤〕

TEIJIN

帝人株式会社