

## Mutagenesis によるレセプター，チャネルの構造機能相関解析

森 泰 生  
(生理学研究所液性情報部門)

### I. はじめに

形質膜に存在するレセプター・イオンチャネルは生理的に枢要な地位を占めており、多くが薬剤受容体として注目されている。しかしながら、これらは膜貫通蛋白質、或いは高分子量蛋白質であり、X線・電子線解析、NMR等による3次元構造の解析が困難である。そこで、機能的な蛋白質を実験試料とできる利点も相俟って、人工的に導入した変異が蛋白質機能にあたえる影響を調べ、3次元構造モデルを構築する試みが広く採用されている。cDNAクローニング及び組み換え発現系の開発により初めて可能になった本アプローチは、広範な受容体・イオンチャネルに対して適用され、イオン選択性、チャネル孔形成、ゲート開閉、電位センサー、リガンド結合、機能調節蛋白質(酵素)との会合等、諸機能の構造的基盤が解明された。

かつてアミノ酸の変換は、主として化学的修飾を用いて行われてきた。化学的アミノ酸修飾法の大きな欠点としては、特定残基を限定的に高効率で修飾することの困難さが挙げられる。また、副反応生成の回避が可能な、蛋白質分解酵素の配列選択的切断による方法にしても、蛋白質の特定の領域だけを標的にすることは不可能である。さらには、特異性を高めた、特定のアミノ酸配列を選択的に認識し、機能を阻害するような抗体(いわゆる neutralizing antibody)を使用する方法がある。しかし本法は機能破壊的であり、部位の重要性はともかくとして、機能発現における位置付けを明かにすることは難しい。一方、遺伝子工学による人工変異導入(mutagenesis)は、副反応を生じる事なく、部位特異的に化学特性の異なる側鎖(アミノ酸)へ

の置換が可能であるため、表現型を破壊するだけでなく、異なった表現型への変換が可能である。

このように、蛋白質の構成成分であるアミノ酸残基変換・修飾の機能に対する影響の検討をとおした、機能上重要な部位の3次元構造予想の諸アプローチは、その有効性は疑うべくもない。しかし、これらに共通な根本的な弱点がある事を忘れてはならない。それは遠隔的なアロステリック効果である。構成アミノ酸は多かれ少なかれ2次元・3次元構造維持に寄与しており、その残基の変換が2次元・3次元構造変化を誘導し、遠隔或いは、近傍の機能領域に変化を加え、表現型としての機能変化が生じる事を必ず考慮すべきである。前稿において、機能発現法については言及されていることから、本稿においては、主として人工の変異導入の方法について言及したい。

### II. 合成オリゴデオキシヌクレオチドを用いた変異導入法

種々の modifying enzyme (修飾酵素)や制限酵素を組み合わせることによって、純粋に酵素的にcDNA本来の野性型塩基配列を変化させることは可能であるが、導入可能な変異には大きな制限がある。自由自在に、任意の塩基配列を得るためには、化学合成オリゴヌクレオチドに頼るのが有効である。そこでまず、いくつかの合成オリゴヌクレオチドを用いた変異導入法を紹介したい。

#### 1. 合成オリゴヌクレオチドの調製

オリゴヌクレオチドの化学合成は、支持担体に結合させたところに、モノマーを次々に付加

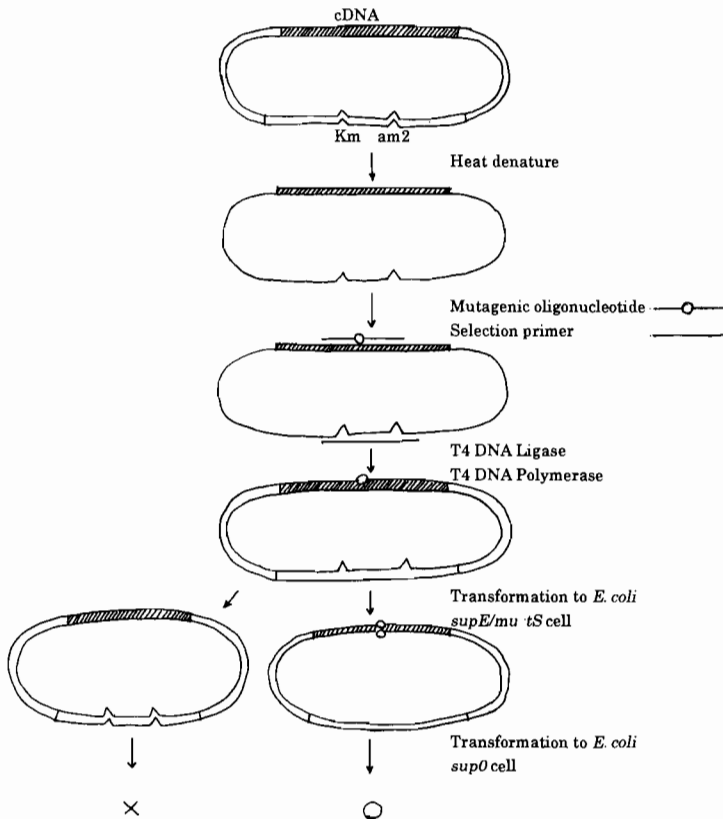


図 1 a. Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法

伸長させていく固相法が主流である。近年、DNA 合成機を備えている研究施設が増えつつあるが、1塩基あたり200円以下(精製込)で外注が可能である。脱保護した合成オリゴヌクレオチドは、フェノール・クロロホルム抽出或いは、Sephadex G20 (Pharmacia) カラムを用いたゲルろ過等により、有機分子夾雑物を除くことが薦められる。

## 2. 1本鎖(変成)DNA template への合成DNAの mismatch annealing による点変異、欠損の導入

### A. Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA)法<sup>1)</sup>

まず、カナマイシン耐性遺伝子上に2重のアンバー変異(Amber mutation; TAG)を有するプラスミドに、変異を導入したいcDNA断片を

挿入する(図1a)。熱変成させた後に、望みの変異に配列を変換した部分cDNAオリゴヌクレオチドと、アンバーを復帰させるためのselection primerをannealさせ、ポリメラーゼ/リガーゼ反応により相補鎖を合成し、mismatch修復酵素を欠損する*supE/mutS*を宿主とすることによりmismatch修復を抑えながら複製を行う。次いで、*sup0*株でのみ増幅できるプラスミドを選択すると、目的の変異組み換え体のみが効率よく得られる。アンピシリン耐性及びテトラサイクリン耐性、或いはクロラムフェニコール耐性を損なう変異を有するプラスミドと耐性を復帰させるためのselection primerを組み合わせるAltered sites法もある。

### B. Gapped duplex法<sup>2)</sup>

M13ファージベクターのアンバー変異体にcDNA断片をサブクローニングし、1本鎖を得

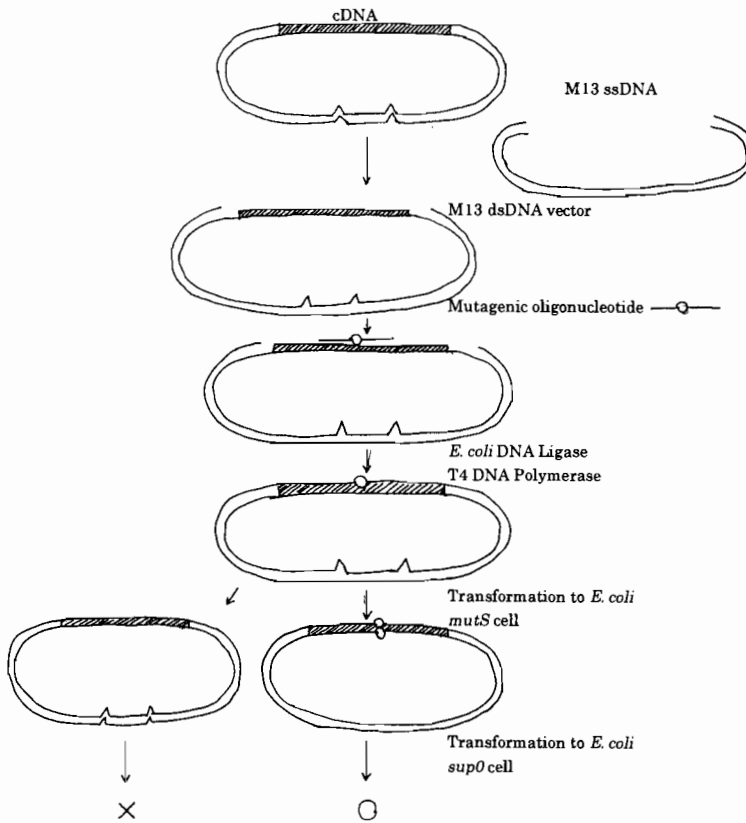


図 1 b. Gapped duplex 法

る(図 1 b). それと, 2 本鎖 M13 ファージのベクター部分とを熱変成後 annealing させ, cDNA 部分が 1 本鎖でベクター部分が 2 本鎖の "Gapped duplex DNA" を形成させる. 次に, 変異配列を含む合成オリゴヌクレオチドを hybridize させ, ポリメラーゼ/リガーゼ反応により Gap をうめる. 上と同様に *mutS* を宿主とすることにより mismatch 修復を抑えながら複製を行い, *sup0* 株でのみ増幅できるアンバーファージを選択すると, 目的の変異体のみが効率よく得られる.

#### C. Kunkel 法<sup>3)</sup>

本法では, dUTPase (Dut) と Uracil-DNA glycosylase (Ung) を欠損し, そのために Thymine の一部が deoxyuracil に置換した DNA を合成する  $F'$ ,  $dut^-$ ,  $ung^-$  の *E. coli* CJ236 を利用する. CJ236 を宿主として cDNA 断片をサ

ブクローニングした M13 ファージの deoxyuracil を含む 1 本鎖を調製する. 変異配列を含む合成オリゴヌクレオチドを hybridize させ, ポリメラーゼ/リガーゼ反応により相補鎖を合成する. *mutS* にトランスフェクションすると, mismatch 修復を抑えながら, 元の deoxyuracil を含む DNA 鎖は Ung によって分解を受け, 合成された DNA 鎖は分解されずに複製される(図 1 c).

#### D. Unique site elimination 法<sup>4)</sup>

プラスミドに, 変異を導入したい cDNA 断片を挿入する(図 1 d). 熱変成させた後に, 望みの変異に配列を変換した部分 cDNA オリゴヌクレオチドと, 制限酵素認識部位の塩基配列を変化させ部位を削除(elimination)する selection primer を anneal させ, ポリメラーゼ/リガーゼ反応により相補鎖を合成する. 得られた

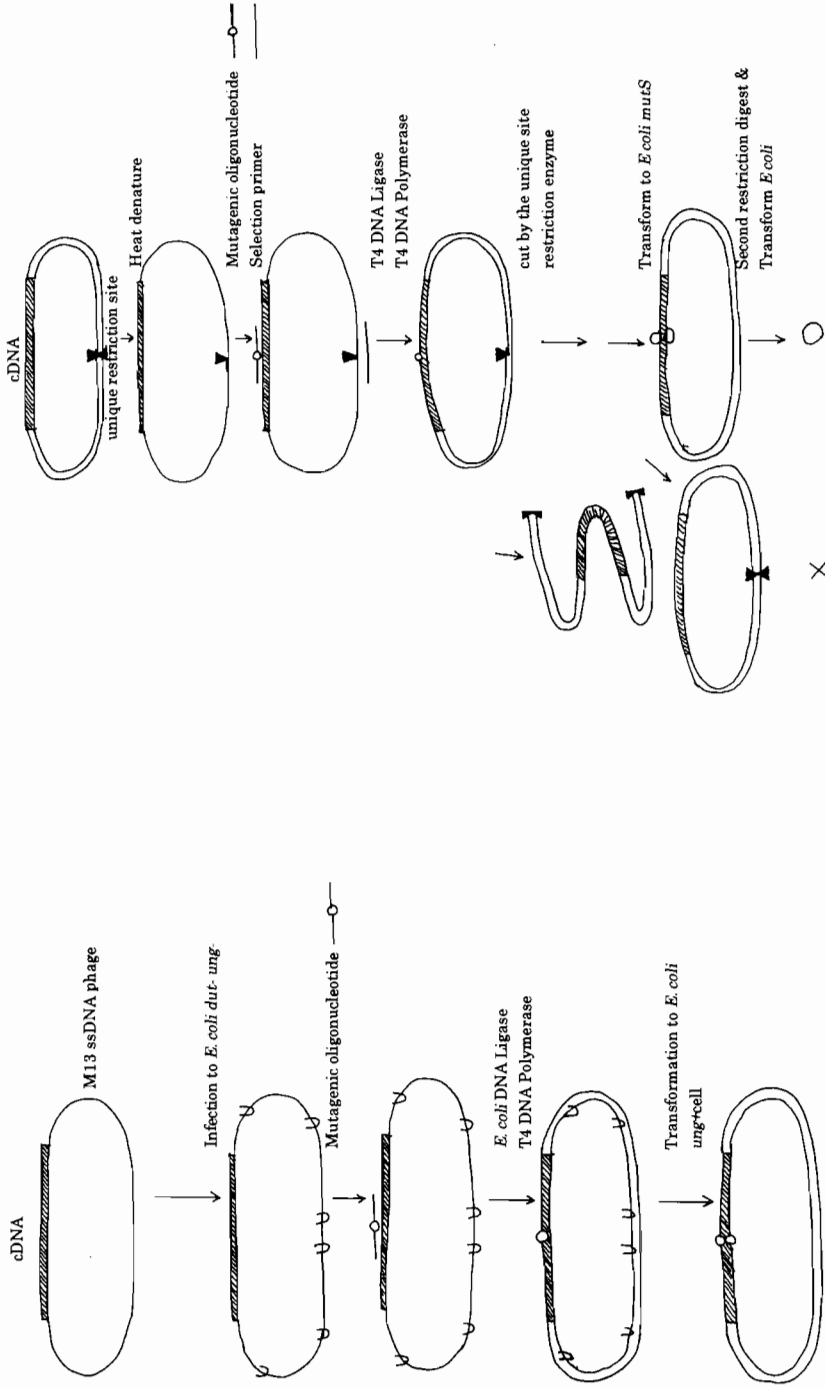


図 1 c. Kunkel 法

図 1 d. Unique site elimination 法

2本鎖 DNA は、元々 selection primer にあたる領域のみをを切断する制限酵素により消化させると、selection primer 側の DNA 鎖には抵抗性があるので切断されず(元のプラスミドだけが切断される), mismatch 修復を欠損する *supE/mutS* を宿主に導入すると mismatch 修復を抑えながら複製される。切断・複製を繰り返して、変異プラスミドが作成される。

#### E. Eckstein 法<sup>5)</sup>

まず、cDNA が挿入されたファージ 1 本鎖 DNA を調製する。変異を有するオリゴヌクレオチドを annealing, ポリメラーゼ/リガーゼ反応により dCTPaS 存在下で相補鎖を合成、環状 2 本鎖 DNA を得る。それを *NsiI* で消化させると S を取り込んでいる DNA 鎖は切断さ

れず、出発材料のファージ 1 本鎖にのみニックがはいるので、その DNA 鎖を cDNA を含む大部分、エキソヌクレアーゼ III で消化する。相補鎖を再びポリメラーゼ/リガーゼ反応により合成し、変異が導入された cDNA を含む 2 本鎖組み換えファージ DNA が得られる(図 1 e)。

#### 2. 配列の合成 DNA カセットによる部分的置き換え

本法は、同一のストラテジーにより特定の領域に複数の変異を導入したものを、多種類作成するのに適しているが、現在ではあまり採られなくなりつつある。2つの異なった制限酵素切断部位を、変異を導入する配列を挟むようにえらぶ。その断片に対応し、変異を有するオリゴヌクレオチドとその相補鎖を合成し、annealing させて本来の断片の代わりに制限酵素切断部位で他の断片に接合する(一度に化学合成するのは50塩基以下が望ましいので、それ以上の長さにはわたる場合は付着端で連結できるように2つ以上の断片に分ける。

#### 3. PCR (Polymerase chain reaction) 法を用いた迅速な変異導入

現在のところ最も汎用性が高く、有効な方法といわれている。上の 1. 法では点変異の導入は可能であるが、2つ以上の異なった蛋白質間のキメラ(chimera)を作成するには向かず、本法(或いは 2. 法)に頼らなければならない。PCR (Polymerase chain reaction) 法そのものは、今や人工的変異導入だけでなく cDNA クローニング、mRNA の同定、遺伝子の解析等、広く使われる強力な技術である。PCR の仕組みについては詳しく今までに記述されており<sup>6)</sup>、説明の必要もないと思われるが、template になる DNA の熱変成、primer の annealing、高温での DNA ポリメラーゼによる DNA 合成伸長反応の、3つの過程を繰り返すことにより特定の cDNA 断片を増幅する技術である。したがって、変異の加わった合成オリゴヌクレオチド primer を用いれば、変異を含む cDNA

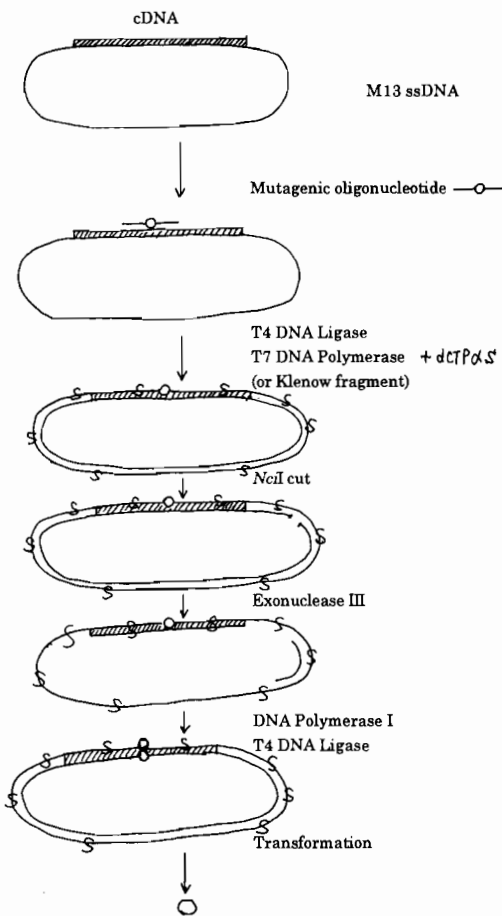


図 1 e. Eckstein 法

断片のみを増幅できる。変異 cDNA 断片を、本来の野性型断片と置き換えるためには、制限酵素切断配列を含むように primer をデザインすることが望ましい(図2)。しかしながら、制限酵素切断配列を primer 中に組み込めない場合は(図2)、切断配列を含む primer を変異導入部位から離れて5'及び3'側にデザインし、それぞれを変異導入部位を含む antisense 及び sense primer と組み合わせ PCR をおこなった後、それらの産物を5'及び3'側 primer と組み合わせて PCR を行うことにより、中央部に変異が導入された断片が得られる。PCR に使われる熱耐性 DNA ポリメラーゼは本来の Taq ポリメラーゼの他に、その欠点を補うような、新たな酵素が開発されている。3'-5' exonuc-

lease 活性を有し PCR 産物を proof reading (template の配列との一致を確認し、合成配列の誤りを削除)する Taq DNA ポリメラーゼ、Vent DNA ポリメラーゼ、Pfu DNA ポリメラーゼ等が、熱安定性を増して市販されている。ミスプライミングによる非特異的 PCR 生成物を防ぐために、従来は、例えば、酵素を含む PCR 反応試薬の一部を反応チューブの温度が60~80℃に達するまで除いておく Manual Hot Start 法、PCR 試薬、反応液をワックスを境に2層に分離する Wax Hot Start 法などの幾つかの改善法が用いられてきた。現在は、より有効な改善が加えられ、PCR による変異導入を非常に有用性を高めている。たとえば、非加熱時には酵素が非活性状態を維持する Taq DNA

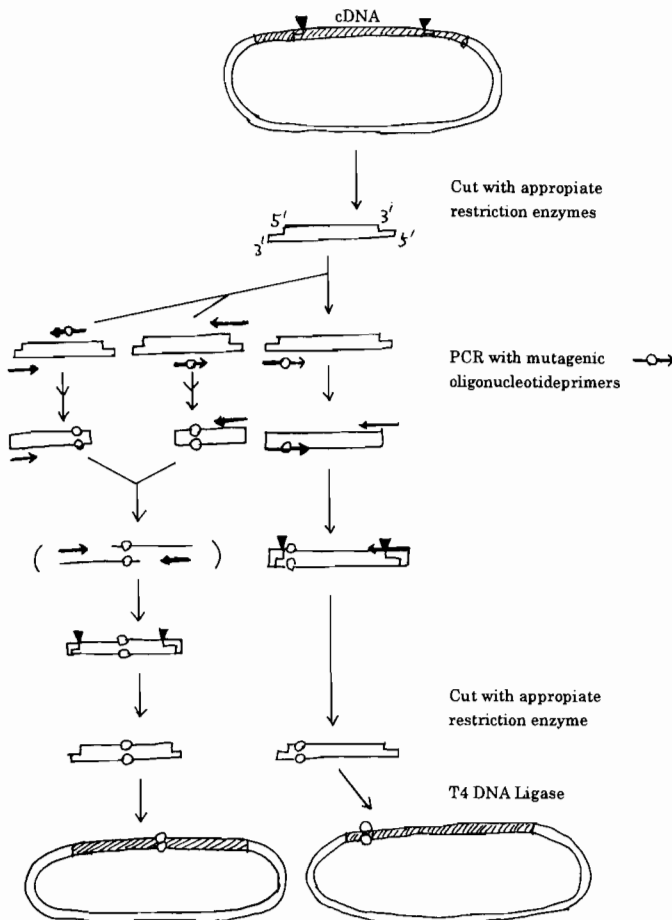


図2. PCR (Polymerase chain reaction) 法を用いた迅速な変異導入

Polymerase を使用する方法(Perkin Elmer 社), 或いは, 65°C 以下では Taq DNA Polymerase 活性を阻害する抗 Taq 抗体を使う方法(Clontech 社)等が, 初期サイクルにおける過剰な酵素活性がもたらす非特異的生成物の抑制に有効である。

### Ⅲ. DNA 分解酵素等を用いた欠損の導入

本法は最も古典的な配列欠損導入法である。現在は上に紹介した各法において, 合成オリゴヌクレオチドの欠損が生じるべくデザイン可能なので, すたれつつあるが, 依然として安価であり, 1 回の試行で多数の欠損変異体の作製が可能であるという長所も持ち合わせている。図 3 に示すような, 一方向性の欠損導入が有効である。即ち, まず消化する側に 5' 突出末端, そのまま保存する側に 3' 突出末端が生じるように, プラスミドにユニークな制限酵素部位を切

断する。ついで, Exonuclease III の 2 本鎖特異的な exonuclease 活性による DNA の 1 本鎖化, Mung Bean Nuclease による 1 本鎖の分解, Klenow Fragment による末端平滑化, Ligase による環状化を経て達成される。反応時間をふり DNA 分解を行った後に, 電気泳動を行い分画・回収する過程を付け加えることにより, 欠損の程度が調整可能である。

### Ⅳ. sequencing による確認

変異導入に用いられた断片への変異が正しいか, あるいは予定外の変異が他の部分に導入されていないかを確認することが薦められる。電気泳動セットを含めて dideoxy 法(Sanger 法)のための Kit が各社より販売されており, 容易に行うことが可能である。また, 自動 sequencer (ABI 社等)が所属研究施設において利用可能ならば, PCR と組み合わせ, より簡便に sequence の確認が可能である。

### Ⅴ. 発 現 系

他稿において記述されることが期待されるので, 紙面の都合からここには, 概要だけを述べたい。組み換え蛋白質の発現系には, 一過性のものと安定的なものがある。発現系としては多様な細胞があり, それぞれに適した発現ベクターが用意されている。

イオンチャネルの発現系として最も広範に用いられてきたのがアフリカツメガエルの卵母細胞における一過性発現である。本細胞には主として, cDNA から *in vitro* 転写して得た cRNA を注入してチャネル蛋白質を発現させる。そのために, 各種 RNA Polymerase (T7, T3, および SP6 等) に対する promoter を有する plasmid に当該チャネルの cDNA を挿入し, RNA Polymerase を用いて *in vitro* 転写, RNA 合成を行う。cDNA 本来, あるいは他 cDNA 由来の poly A 配列が 3' 末端に付加されている必要がある。めざす発現レベルに従って濃度調整した (>2 mg/ml) cRNA が 1 卵母細胞あたり約 50 nl 注入される。

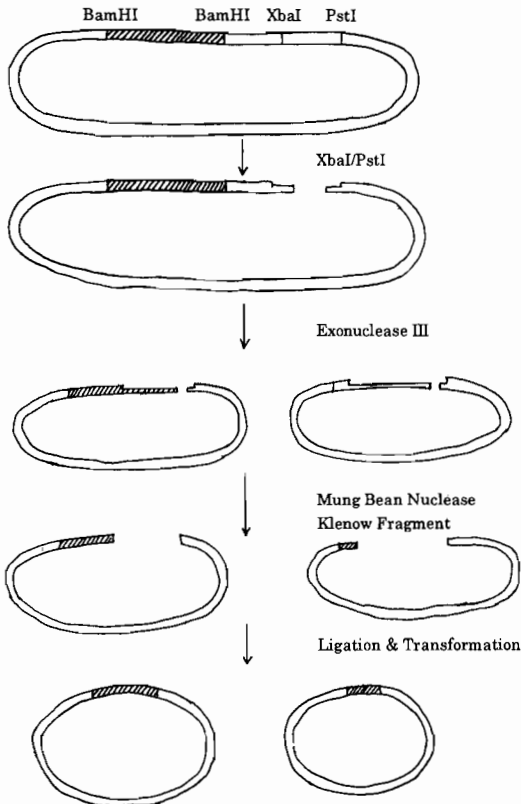


図 3. DNA 分解酵素等を用いた欠損の導入

動物細胞では、一過性(transient)および安定的(stable)発現に human embryonic kidney (HEK) 細胞および chinese hamster ovary (CHO)細胞, 安定的発現に baby hamster kidney (BHK)細胞および L-細胞, 一過性発現に COS 細胞等のいわゆる非興奮性の線維芽細胞が頻繁に使われている。動物細胞発現用の vector は, SV 40 early gene promotor CMV (cytomegaro virus) promotor 等の強発現 promotor を含む。一過性発現用 vector には特に, 染色体外で episome として高コピー数複製するための DNA 配列が重要である。染色体上に安定的に導入 DNA が維持された発現細胞を得るためには, 選択マーカー(抗物質等薬剤に対する耐性を賦与する, あるいは特定の栄養を欠く培地での生育を可能にする酵素の活性)遺伝子を同時に transfection する必要がある。選択マーカーとしては, チミジンキナーゼ(thymidine kinase), ジヒドロ葉酸還元酵素(dihydrofolate reductase), aminoglycoside phosphotransferase 等が代表的であるが, host cell は選択マーカー遺伝子を欠損していることが重要である。これらの系は, baculovirus Sf9 昆虫細胞を含め, 高蛋白質発現量が見込まれるので, アフリカツメガエル卵母細胞よりもレセプター・イオンチャネルの蛋白化学的同定, リガンド結合測定には適している。また, primary culture における一過性発現には, 核への cDNA microinjection が有効である。

発現系の選択をするにあたり非常に重要になってくるのは, 用いる細胞における内在性のレセプター・イオンチャネル活性を知ることである。当然の事ながら, 解析対象蛋白質を内在

的に発現しているものは使用に適さない。この点, 遺伝的に内在蛋白質が欠損した(knock outされた)細胞は, 心配が全くない。その上, 本来の発現組織(環境)に cDNA 導入が可能になるので, G(GTP 結合)蛋白質・細胞内セカンドメッセンジャー系による機能修飾を調べる際に, 異所性発現におけるような“artifact”の懸念に煩わされることなく, “native”の現象を観察できる。

## VI. おわりに

可溶性の球状蛋白におけるように, 今後は X 線・電子線解析, NMR 等 3 次元構造の解析技術の進歩と共に, 詳細な 3 次元構造情報を基にした蛋白質機能発現の構造上の理解が可能なると思われる。しかしながら, 各構造要素の機能的重要性をしるためには依然として変異導入は必須であり, 今後レセプター・イオンチャネル等の生理的に重要な膜蛋白質群に対する理解は, アミノ酸配列(蛋白質 1 次構造)・蛋白質高次構造・機能の 3 側面から, より総合的なものになると考えられる。

## 文 献

- 1) Zoller, M. J. and Smith, M. (1983). *Methods in Enzymology* **100**, 468.
- 2) Kramer, W. and Frits, H. J. (1987). *Methods in Enzymology* **154**, 350.
- 3) Kunkel, T. A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488.
- 4) Deng, W. P. and Nickoloff, J. A. (1992). *Anal. Biochem.* **200**, 81.
- 5) Eckstein, F. and Makamaye, K. I. (1986). *Nucleic Acid Res.* **14**, 9679.
- 6) Dieffenbach, C. W. and Dveksler, G. S. (eds.) (1995). *PCR primer. A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).