

## アフリカツメガエル卵母細胞を用いた発現実験

アフリカツメガエルは一年を通して実験室内で安定して飼育でき、その卵母細胞の取り扱いが容易で、また、二本差し膜電位固定法という効率のよい電気生理学的解析が可能である。そのためアフリカツメガエル卵母細胞は、膜機能蛋白の *in vitro* 発現系として、よく用いられている。ここでは、その実験の準備段階となる

1. cRNA の合成
2. ツメガエルの飼育
3. 卵母細胞の単離
4. 卵母細胞への cRNA の注入の手技について記す。

### 「1」 cRNA 合成

#### (1) 概略

ほ乳類培養細胞では、プラスミド DNA をリポフェクタミン試薬等により導入し、遺伝子を発現させるが、卵母細胞の場合は、*in vitro* で合成した cRNA を、ガラス針を使って注入することにより発現を誘導する。そのため、実験の第一歩は cRNA を合成することである。最も留意すべき点として、「RNA は、汗、唾液等いたるところに含まれている RNase により簡単に分解されてしまうために、RNase の混入を排除すること」が挙げられる。

#### (2) 必要な消耗品、試薬、溶液

RNAase フリーのチップ、チューブ

Disposable の手袋

エタノール

DEPC で処理したミリ Q 水

DEPC 水-80%エタノール

5M NH<sub>4</sub>Acetate

クロロホルム／イソアミルアルコール=24 : 1

フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール=25 : 24 : 1

Proteinase K (5 mg/ml) (Boehringer Mannheim 社、#1373196)

注射用蒸留水 (大塚)

mMESSAGE mMACHINE Kit (T7 or T3) (Ambion 社) (注 #1)

Nuclease-free Water

Enzyme Mix (RNA polymerase として T7 or T3 を含む)

10×Reaction Buffer

2×NTP/CAP

### (3) cRNA 合成プロトコール

↓ Wizard miniprep (Promega 社、#A7510) 等によりプラスミド DNA を精製 (注 #2)

↓ 制限酵素により、プラスミド DNA をインサートの 3' 端で、直鎖化

DNA in TE (3 µg 分)	31 µl
Buffer	4 µl
制限酵素	5 µl
計	40 µl

↓ 37 °C、1.5hr

↓ Proteinase K 1µl (混入している不純な酵素等を分解するため)

↓ 37 °C、30min

以下、RNA 取り扱い実験となるので、手袋を着用する

チップ、チューブは、RNA 実験用のものを用いる (注 #3)

↓ 3M NaAcetate 20 µl

↓ DEPC 処理水 140 µl

計 200 µl

↓ Phe/Ch 200 µl 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 2 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す

↓ Phe/Ch 200 µl 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 2 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す

↓ Ch 200 µl 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 1 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す

↓ 100% Et (RNA 用) 500 µl

↓ 遠心 (4 °C, 15000 rpm, 20 分) 後、慎重にペレットを残し (注 #4)、  
液を、チップで取り除く

↓ 80% Et (RNA 用) 150 µl

↓ 遠心 (4 °C, 15000 rpm, 5 分) 後、慎重にペレットを残し、液を取り除く

↓ 減圧遠心装置で、2 分程度ペレットを乾燥

↓ 下記 RNA 合成液 20 µl でペレットを溶解

RNA 合成液 (キット内)

Nuclease-free Water 6 µl

2×NTP/CAP 10 µl

10×reaction buffer 2 µl

Enzyme mix (T3 or T7)	2 $\mu$ l
計	20 $\mu$ l

- ↓ 37°C、2hr (注 #5)
- ↓ DEPC 水 180  $\mu$ l 計 200  $\mu$ l になる
- ↓ Phe/Ch 200  $\mu$ l 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 2 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す
- ↓ Phe/Ch 200  $\mu$ l 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 2 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す
- ↓ Ch 200  $\mu$ l 攪拌、遠心 (4 °C, 15000 rpm, 1 分) 後、  
上層を新しいチューブに移す
- ↓ 5M NH<sub>4</sub>Acetate (注 #6) 140  $\mu$ l
- ↓ 100% Et (RNA 用) 860  $\mu$ l
- ↓ 遠心 (4 °C, 15000 rpm, 20 分) 後、慎重にペレットを残し、液を取り除く
- ↓ 80% Et (RNA 用) 150  $\mu$ l
- ↓ 遠心 (4 °C, 15000 rpm, 5 分) 後、慎重にペレットを残し、液を取り除く
- ↓ 減圧遠心装置で、2 分程度ペレットを乾燥
- ↓ 注射水 31  $\mu$ l でペレットを溶解 (注 #7)

1  $\mu$ l は濃度と質の確認のため、電気泳動に使用 (注 #8)

残りは、一回に使用する分 (3  $\mu$ l 程度) づつに分注し、-80°Cで保存

#### (4) 合成 RNA の濃度と質の電気泳動による確認

RNA をゲル電気泳動する際、RNase による分解を防ぐために、細心の注意を払うのが普通である。しかし、このプロトコールでは、ゲル中およびバッファー中に、ホルムアルデヒドを加えることにより、RNase が働くことができないようにしているため、分解の心配はほぼ無用である。

ただし、ホルムアルデヒドを加えると、エチジウムブロマイドによるバックグラウンドが強くなるため、添加量を最少に留める必要がある。そこで、ゲルやランバッファー中にはエチジウムブロマイドを加えずにサンプルに少量混和している。しばらく泳動後、RNA に結合せずに逆送したものは、ゲルから抜け出る前にゲルを切り取って除く。この処置により、エチジウムブロマイドによるバックグラウンドを押さえることができる。

##### (a) 10×RNA ゲルバッファーの作成

HEPES	119.15 g	(500mM)
EDTA	3.72 g	(10 mM)
NaAcetate	6.81 g	(50 mM)

をミリ Q 水 950 ml に溶解後、NaOH で pH7.0 に調整し、1 l にメスアップする

(b) RNA ゲル ランニング バッファーの作成

10×RNA gel buffer      100 ml  
37 % ホルムアルデヒド   180 ml  
ミリ Q 水                      720 ml

を混合し、1 l にメスアップする

(c) RNA ゲル (0.7%) の作成

10×RNA gel buffer      20 ml  
Agarose                      1.4 g  
ミリ Q 水                      144 ml

をビーカーにいれて、電子レンジで、ゲルが溶解するまで加熱

[以下、ドラフト内で行う]

- ↓ 加熱が取れたら、37%ホルムアルデヒド 36 ml を加える
- ↓ メスシリンダーで量を計測し、200 ml になるようにミリ Q 水を追加し、よく攪拌
- ↓ ミューピド皿に流し入れ、コームをさす
- ↓ 固まるまでそのまま置く
- ↓ コームを抜いて、サランラップに包む。保存は4℃

(d) RNA ゲル ローディングバッファーの作成

ホルムアミド	50 µl
37 % ホルムアルデヒド	18 µl
ミリ Q 水	22 µl
BPB 色素を加えた 10 x RNA ゲルバッファー	10 µl
エチジウムブロマイド (5 mg/ml)	5 µl
計	105 µl

(e) RNA の電気泳動 [ドラフト内で行う]

- ↓ 1 µl のサンプルを 10 µl の RNA ゲルローディングバッファーに溶解
- ↓ 1 µl のラダーマーカを 10 µl の RNA ゲルローディングバッファーに溶解
- ↓ 70 °C、3 分
- ↓ 氷上で急冷
- ↓ RNA ゲルと RNA ゲルランニングバッファーを入れ、電気泳動
- ↓ エチジウムブロマイド (黄色) が、DNA や色素液とは逆向きに泳動される  
穴からゲルに入ったら、ゲルから抜け出る前に、ゲルを切り取って除く

(5) 注意点

- #1 この Ambion のキットを強く推奨する。卵母細胞の発現実験用の cRNA 合成の目的で、広く使われており、信頼性も高い。

- #2 Bluescript 系のプラスミドと大腸菌 TG1 を用いると、1.5ml の 2YT media から約 10  $\mu$ g の DNA が得られる。
- #3 ここから RNAase (-) 実験という意識を持ち、手袋を着用する。チップも専用のものを使用する。
- #4 この遠心は長く慎重にする。はじめての人が一番失敗しやすいのがここ。pellet を確認する。
- #5 RNA 合成が終わった後、RNase-free DNase で、template の DNA を分解するやりかたが一般的である。しかし、DNA が残っていても害はなく、むしろ、RNase-free DNase に微量に混在する RNase のためか、DNase 処理すると、しない場合よりも発現は下がるという結果が得られた。このため、DNase 処理は行っていない。
- #6 NH<sub>4</sub>Acetate を使用するのには、取り込まれなかった AGCU の沈殿をいくらかでも避けるため。
- #7 最後に溶解するのは、TE や DEPC 処理水ではなく、注射用水。RNase (-) であるだけでなく、生物（この場合ツメガエル卵母細胞）にとって害がないことが大切。ここで言う注射用水とは、外科手術などで人間の体に入れることが認められている水である。
- #8 出来た RNA は必ずゲルに流して、濃度と質（分解されていないかどうか）をチェックすること。ペレットの大きさはあてにならない。取り込まれなかった AGCU が効いてくるためか、吸光度もあてにできないので、必ずゲルに流して確かめる。

## 「2」 アフリカツメガエルの飼育

### (1) 概略

神経機能素子研究部門では、浜松生物教材社から購入しているが、他にも数社あるので、いろいろ試して、気に入ったところから購入する。

飼育の key points は

「カルキをとばした水を用いること」

「水槽温度を 17 °C 程度にすること」

「感染を防ぐこと」

の 3 点である。

### (2) 生理研方式

生理研の水棲動物室の設備は充実していて、17 °C に設定した冷却装置により飼育用水を循環して温度をコントロールしている。また、少しずつ新しい飼育用水を入れて古いものをあふれさせることにより、水槽水の入れ換えを行っている。さらに、循環する時に砂礫のフィルターを通すことにより清浄度を保っている。エサは、カエル用の小粒の固形飼料を、週に 3 回与えている。

### (3) 簡便方式

水を循環して冷却するには大がかりな装置が必要だが、設備が無い場合でも飼育することは可能である。

- ・ 衣装ケースを複数用意し、水槽代わりとする。
- ・ 水道水を1晩汲みおいてから使用。ハイポ（脱カルキ剤）で処理してもよい。
- ・ 部屋の温度を可能な限り（設定温度 18 °C、実測 22 °C程度?）下げる。
- ・ 清浄度を保つために、水換えではなく、水槽換えを行う。すなわち、洗った水槽に汲み置き水を入れ、エサを与えてしばらくしてからカエルだけを、その水槽に移す。使用後の水槽は、たわしを使って洗い、次の使用に備える。

### (4) 感染した個体

手足や口の先が赤くなったり、皮膚に潰瘍状のものがみられることがある。多くは、感染によるもので、放っておくと同じ水槽の中のカエルが全滅することもある。よって、感染を疑われるカエルは直ちに隔離し、場合によってはやむを得ず安楽死させることも考える。

## 「3」 アフリカツメガエルの卵母細胞の単離

### (1) 概略

麻酔下で腹部を切開して卵母細胞のふさを取り出し、縫合針で閉腹する。麻酔から回復後、水槽に返し、3-4ヶ月後、傷が癒えた時点で再利用する。数回の使用後、最後は、麻酔下で安楽死させる。卵母細胞は、酵素処理によりバラバラにして用いる。

### (2) 試薬溶液類

MBSH 溶液の元になるストック液

Stock A	NaCl	128 g
	KCl	2 g
	NaHCO <sub>3</sub>	5 g
	Hepes	89 g

1l 弱のミリ Q 水に溶解

pH を 1M NaOH で 7.6 に調整後、1l にし、

フィルターして、50 ml チューブに 40 ml ずつ分注

Stock B	Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.8 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.5 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5.0 g

1l のミリ Q 水に溶解

フィルターして、50 ml チューブに 40 ml ずつ分注  
Ca を溶かしてから Mg を加えること。

Stock C	ペニシリン	10 mg / ml
	ストレプトマイシン	10 mg / ml

1 ml ずつエッペンドルフチューブに分注し、-20 °C 保存

MBSH 液の作り方

オートクレーブした miliQ 水 919 ml

Stock A 40 ml

Stock B 40 ml

Stock C 1 ml

あわせて 1l になる。17 °C で短期保存。

麻酔薬 3-Aminobenzoicacid Ethl Ester (Tricaine) (Sigma 社、#A5040)

Collagenase type 1 (Sigma 社、#C0130)

### (3) 器具類

卵母細胞トランスファー用ピペット

(パスツールピペットの先端をアンプルカッターで折りバーナーで丸める。種々の先端径のものを作成し、使いやすいものを選ぶ。)

手術道具 (メス、はさみ、ピンセット 2 本)

小動物用ナイロン糸付き縫合針 (エチコン社、エチロン #1696G)

ファルコン 100 mm 径プラスチックシャーレ

滅菌した蓋付きのバイアル (シンチレーションカウンター用の容器は丁度良い)

### (4) プロトコール

↓ カエルを 1l の 0.15 % Tricaine 入り氷水に 20 分つけて麻酔する

↓ 皮膚層、筋層をメスで切り開く (注 #9)

↓ 卵母細胞をとりだし、MBSH を入れた培養皿に入れる

↓ 糸付き縫合針で縫い合わせて、常温の水に戻し回復してから水槽に戻す (注 #10)

↓ 卵母細胞の房をピンセットで適当に裂き開き、かつ適当な大きさにわせる

↓ 10 ml 程度の MBSH に 2 mg/ml になるよう collagenase を溶かしてフィルターしたものを、無菌のバイアルに用意する

↓ collagenase 溶液に卵母細胞をいれて、rotary shaker でゆっくり回転させながら、5 時間程度、室温で incubate する (注 #11)

↓ 卵母細胞がバラバラになっていることを確認後、MBSH で 5-6 回丁寧にリンスして、collagenase 溶液を完全に取り除き、MBSH 入りの培養皿に入れて、17 °C で保存する。翌日までに RNA 注入を行う。

## (5) 注意点

- #9 完全な無菌操作を意識する必要はない。しかし、腹腔内にメスをいれる手術なので、メス、ピンセット等はエタノールで拭いて滅菌しておく。メスをいれる時、肝臓、膀胱をはずすようにする。傷口は 1cm 弱程度いれる。あまり小さい傷ですませようとすると、取り出すときに卵塊がつぶれてしまうので、ある程度の切開は必要である。卵塊を引っ張り出す際、片側が引っかかっている時は逆側からといったように少しずつ出していく。
- #10 筋層を 3 針、続いて、皮膚を 3 針縫う。
- #11 collagenase は、粗精製のものなので、同じ濃度で用いても、製品、ロットにより、効力が大きく異なるので、前もってテストを行うことが必要である。ここであげたものは、かなり効力が弱く、長い時間を必要とするものである。効力が強いものは、同時に卵母細胞にも害を及ぼすことが多いという印象があるので、使用を避けている。

## 「4」 アフリカツメガエル卵母細胞への cRNA の注入

### (1) 概略

ツメガエルの卵母細胞は、直径 1mm 弱とかなり大きいので、微小操作の困難さはない。「cRNA が確実に卵母細胞に注入されること（注入の操作をしたつもりでは不十分）」  
「卵母細胞に対してダメージをなるべく与えないようにすること」  
の 2 点がポイントである。

### (2) 器具機器類

粗動のマニピュレーター(例えば、ナリシゲ社)  
鉄板 (マニピュレーターをマグネットで固定するため)  
電気式の injector (Drummond 社の Nano-injector が使いやすい) (注 #12)  
中芯のない径 1mm のガラスキャピラリー (例えば Drummond 社製)  
実体顕微鏡 (例えばオリンパス社)  
コールドライト (HOYA-SCHOTT 社、PLO75)  
ガラスピペットのプラー (Sutter 社の P97 が使いやすい。)  
ミネラルオイル (Sigma 社、M5904)  
手術用のガーゼを 2 cm 角程度に切ったもの  
パラフィルム  
トランスファー用のピペット  
17 °C のインキュベーター (加熱、冷却の両方ができるもの)

### (3) プロトコール



- ↓ cRNA を injection に使う分だけ分注し、氷上におく
- ↓ 6 cm 径の培養皿に、MBSH 液を入れてから、ガーゼを沈め入れる
- ↓ 卵母細胞をガーゼの上に適当に並べ (注 #13)、良い細胞のみを残す
- ↓ ガラスピペットに、空気が入らないように細心の注意を払って、ミネラルオイルをつめる (注 #14)
- ↓ ガラスピペットを injector に装着する (注 #15)
- ↓ RNA をパラフィルム上にとり、ピペットの先端から吸い上げる (注 #16)
- ↓ 卵母細胞に 50 nl づつ、cRNA を注入 (注 #17,18)
- ↓ 卵母細胞を 17 °C で数日培養。毎日、新しい 6 cm 培養皿に移す (注 #19)

#### (4) 注意点

- #12 Injector は、この Nanoject を強く奨める。
- #13 ガーゼをしいて、卵母細胞全体がギリギリ水没する程度の量の MBSH 溶液を入れた培養皿に卵母細胞をいれる。いびつな細胞、小さい細胞などを取り除き、使える細胞を大雑把に並べ、端から打っていく。ガーゼは、injection 時に卵母細胞が転がり逃げないように敷く。
- #14 ピペットは横引きのプラーでひいて作成している。熱とマグネットの条件を少しづつ変えて、使いやすいものを作成する。ある程度テーパーがある形のものを作り、先端をピンセットでつまんで折って使うのを奨める。その後、ミネラルオイルをシリンジに細い注射針をつけたものを用いて先端まで fill する。ピペット全体に空気が全くないようにすることが最重要ポイントである。空気が混入すると、圧注入時のクッションとなってしまうため、注入量が極めて不正確になってしまうからである。
- #15 そのピペットを、injector の金属シリンジに装着する。この時も、injector の金属のシリンジとオイルの間に空気が入らないようにすることが重要ポイントである。装着できたら empty ボタンを続けて押してシリンジを進め先端からオイルを出す。この操作により、cRNA を吸い上げる余裕をつくる。
- #16 cRNA をパラフィルムにとる。少量過ぎると、チップの先から離れないことがあるので、3  $\mu$ l 程度をとる。Fill のボタンを押し続けて cRNA を吸い上げる。RNA が全く吸い上げられていなくてもシリンジは動く（この際、シリンジとオイルの間に空気が後ろから漏れ入ってきている）ので、ピペットの中のオイルと RNA の境界が順調に上がってくるのを確認することが重要である。cRNA が順調に吸い上げられてこない時は、出したり入れたりする、ほんの少しピペットの先を折ってみる等を行う。
- #17 ピペットは細ければ細いほど卵母細胞のダメージが少ないので良い。しかし、細すぎると、cRNA の吸い上げが困難になり、また、吸い上げ時に後ろから空気が入ってしまう。cRNA がぎりぎり上手に吸い上げうる、なるべく細いピペットがよいといえる。

- #18 先端がつまっても、empty のボタンを押すと金属針は前進する。よって、機械的にボタンを押すのではなく、「RNA とオイルの境界が前進していること」と、「打たれた卵母細胞がプッとふくらむこと」を確認することが重要である。注入できているかどうか自信が持てないときは、ピペットを空中においた状態で empty ボタンを押し、RNA 溶液が出てくるかどうか確認する。
- #19 17 °Cで培養中は毎日培養皿を交換（液だけでなく培養皿も新しいものにし、卵母細胞を移す）する。死んだ卵母細胞などは感染のもとになるので、取り除く。卵母細胞用のトランスファーピペットは、エタノールにつけて保存する。

#### 参考資料

アフリカツメガエル卵母細胞を用いたクローン化遺伝子の機能分析法 久保義弘

「神経生物学のための遺伝子導入発現研究法（吉川 和明 編）」Springer 社 (1997)  
pp 347-357