

3Ap-4

クラミドモナスのカーボニックアンヒドラーゼcDNAのクローニングについて

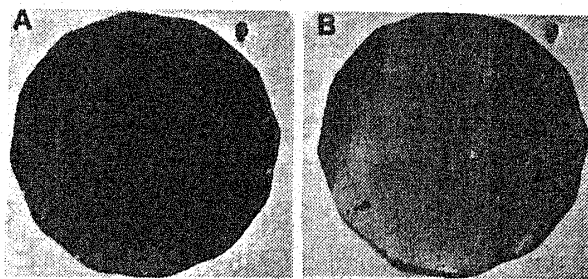
門上洋一, 岡部敬一郎 (アドバンス細胞工学研), 島地重遠 (東大応微研)

緑藻クラミドモナスのカーボニックアンヒドラーゼ(CA)は、主として細胞表層に存在する分子量約55kDaの糖タンパク質であり、低CO₂濃度下で誘導される。この誘導機構は転写段階で制御されることが示唆されているが、これらの機構をより詳細に調べるためcDNAのクローニングを試みたので報告する。

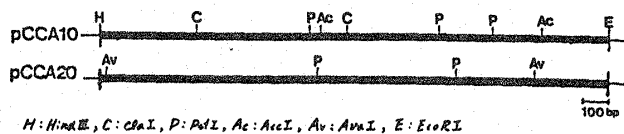
cDNAライブラリーを構築するに当り、CA mRNAの特異的濃縮を次のように行った。まず、高CO₂条件(4%)で生育させた細胞からmRNAを精製し、このcDNAを合成した。次に、低CO₂条件(0.04%)で生育させ、CAを十分発現させた細胞からmRNAを精製し、先に合成したcDNAとハイブリダイズした。低CO₂条件下で誘導されたmRNAは、この結果、遊離状態にあるはずであり、これらmRNAをポリ(U)フィルターに吸着させ濃縮した。cDNAライブラリーは主としてHeidecker-Messing法に依ったが、操作時間を節約するため、アルカリシ糖密度勾配遠心を用いず、2M酢酸アンモニウム存在下でのイソプロパノール沈澱を用いた。これにより上記の操作は、RNA精製から始め、1日で遂行でき、2×10⁵のライブラリーが作製できた。CAクローンの検出にはCAの活性、即ちCO₂+H₂O⇌H⁺+HCO₃⁻によるpH変化と利用し、CO₂噴霧によって引き起されるBTBの色変化で識別した(図1)。この結果20クローン得たが、最大長をもつクローンは少なくとも2型に分類された(図2)。当研究室では既にCAの主要タンパク質が精製され、そのN末端の部分的アミノ酸配列が決定されていた(戸栗, 私信)ので、これにより14merのDNAを合成し、プローブとして、先の20クローンについてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところpCCA10のみが強くハイブリダイズした。さらに確認するため、このクローンpCCA10と、低CO₂条件下で生育した細胞から精製したmRNAとをハイブリダイズし、*in vitro*トランスレーションしたところ図3に示すように、完全にアレストされることがわかった。

以上により、pCCA10はクラミドモナスの主要CAのcDNAとクローンしており、N末端とコードした全鎖長を含むものであると考えられる。(GEP61-II-1-17)

(図1) CO₂噴霧によるCA発現クローンの検出



(図2) CAクローンの制限酵素地図



0 1 2



(図3) ハイブリッドアレストド・インビトロトランスレーション

Lane 0: mRNAのみ (200ng)

Lane 1: mRNA (200ng) + pCCA10 (6ng)

Lane 2: mRNA (200ng) + pCCA10 (12ng)