

# Cloning and Characterization of cDNA(pCR18) Sequences for Bovine Retina-specific m-RNAs

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7804">http://hdl.handle.net/2297/7804</a>

## ウシ網膜に特異的な cDNA (pCR 18) の クローニングとその解析

金沢大学がん研究所薬理部 (主任: 三木直正教授)

中 川 勇 三

(昭和60年5月31日受付)

網膜に特異的な cDNA (pCR307) をプローブとして, Okayama-Berg 法によって作製したウシ網膜 cDNA ライブラリーから新たに完全長 cDNA の選択を行った。約 12,000 個のコロニーからコロニーハイブリダイゼーション法によりスクリーニングを行った。単離した 22 個の内, 21 個のクローンは pCR307 と同じ制限酵素地図を示した。一方, 残りの一つのクローンは, 最も長いインサートを有するクローン (pCR18) であった。pCR18 クローンは 905 塩基対インサートを有していたが, pCR307 とは異なる制限酵素地図を示した。Northern プロット解析において, pCR18 はウシ網膜の約 12 S (約 1,000 ヌクレオチド) の大きさを示す mRNA 種とのみハイブリダイズし, また脳および肝臓の mRNA とは反応しなかった。pCR18 の cDNA インサートの塩基配列から, 約 15,700 ダルトンの分子量のポリペプチドをコードする推定 open reading frame (147 アミノ酸残基) が存在することがわかった。約 3,100 種の既知蛋白質ライブラリーから, 本実験で推定したポリペプチドのアミノ酸配列のホモロジー検索を行ったが, ホモロジーの認められるものはなかった。pCR18 と mRNA は, 網状赤血球由来の蛋白合成系において約 19,000 ダルトンのポリペプチドを翻訳した。Southern プロット解析によって, pCR18 の遺伝子がウシゲノム中に単一コピーとして存在していることが示された。さらに, RNA dot プロット解析において, ヒト網膜芽細胞腫 (Y79 および WERI) からのポリ (A) RNA が pCR18 とハイブリダイズし, その強さはウシ網膜と同程度であった。以上の結果は, 新規にクローン化した pCR18 は, 網膜に特異的な新しい蛋白質をコードしていること, さらに pCR18 クローンの遺伝子がヒト網膜芽細胞腫細胞株にも発現していることが明らかとなった。しかし, この蛋白質の網膜組織内分布および機能については今後の研究が必要である。

---

**Key words** retina specific cDNA, neural retina, molecular cloning

---

神経組織では他の組織に比べて, 非常に多くの特異的な遺伝子が発現していることが知られている<sup>1)2)</sup>。したがって, これら神経系に特異的な遺伝子, およびその産物についての研究は, 神経の分化や機能の解明のみならず, 神経系疾患の原因究明および診断, 治療に役立つものと考えられ, また, 薬理学的観点からは, 神経作用薬, 特に向精神薬の作用点や耐性の機構の理解に重要な知見を与えるものと思われる。

近年, 組換え DNA 技術を用いたクローニングの手

法により, 神経系に特異的な遺伝子の解析が可能となってきた<sup>3)</sup>。特に, Scheller ら<sup>4)</sup>によるアメフラシの産卵行動を制御する遺伝子クローニングの報告や, ラット脳に共通した 82-ヌクレオチド配列 (identifier sequence) の存在, およびその特異的な遺伝子発現に関する Sutcliffe ら<sup>5)</sup>の報告が挙げられる。

そこで, 比較的単純な構造をもつ網膜をとり上げ, 網膜に特異的に発現する遺伝子について検討すること

---

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; mRNA, messenger RNA; PIPES, piperazine-N-N'-bis (2-ethane-sulfonic acid); SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, solution containing 0.15M NaCl+0.015M sodium citrate;

とした。網膜組織は、神経細胞の種類が限られており<sup>9)</sup>、それらの電気生理学的研究やシナプス相互作用に関しての知見が数多く報告されているので<sup>7)</sup>、網膜組織は、中枢神経系の機能の研究に有用なモデル系と考えられる。

一方、Kuo ら<sup>8)</sup>は、ウシ網膜に特異的な cDNA (complementary DNA) をすでに数種類クローニングしている。これらの cDNA クローンの一つ (pCR394) は、オプシンをコードするクローンであることが判明している。

本実験では、pCR394 とは明白に制限酵素地図が異なる網膜に特異的な cDNA クローン (pCR307) をプローブとして選び、Okayama-Berg 法<sup>9)</sup>による cDNA ライブラリーから新たにスクリーニングを行った。その結果、mRNA (messenger RNA) の長さに近い一つのクローン (pCR18) を単離し、そのクローンの諸性質および DNA 塩基配列の解析を行い、網膜に特異的な蛋白質を推定したので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 実験動物および培養細胞

ウシの網膜、脳および肝臓は、石川県食肉センターより、ヒト網膜芽細胞腫の細胞株 Y79 は、Croce 博士 (Wistar Institute, Philadelphia) より、WER $\gamma$  は McFall 博士 (Wills Eye Hospital, Philadelphia) より、マウス神経芽細胞腫×ラット膠腫雑種 NG108-15 細胞は、Nirenberg 博士 (National Heart, Lung and Blood Institute, National Institute of Health, Bethesda) より分与されたものを用いた。腫瘍細胞は、10%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium を用い、90%空気/10%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養を行った。

##### 2. RNA の単離

RNA の単離は、Chirgwin ら<sup>10)</sup>の方法に従った。組織および細胞を 6M グアニジンチオシアネート溶液で抽出し、さらに抽出物を 5.7 M 塩化セシウムに重層し、40,000 r. p. m. 12 時間の遠心により全 RNA を得た。ポリ(A)RNA は、Aviv ら<sup>11)</sup>の方法に従い、オリゴ(dT)セルロースカラムクロマトグラフィーを行いポリ(A)RNA 分画を調製した。

##### 3. cDNA ライブラリーの作製

本研究は、金沢大学組換え DNA 安全委員会の承認を得て行った。ウシ網膜 cDNA ライブラリーは、Okayama-Berg 法<sup>9)</sup>によって作製した。すなわち、cDNA・プラスミド組換え体は、dT 鎖一付加ベクター・プライマーとウシ網膜のポリ(A)RNA に逆転写酵素を用い、一本鎖 cDNA を合成した。次に、ター

ミナルトランスフェラーゼを用い dC 鎖を付加し、Hind III 消化後、dG 鎖一付加のリンカー-DNA および DNA リガーゼを用い、環状化させた。最後に、リボヌクレアーゼ H、DNA ポリメラーゼ I および DNA リガーゼを用い、RNA を DNA に置換して環状化ベクター・cDNA 標品を得た。この組換え DNA 標品を、カルシウム処理した大腸菌 HB101 のコンピテント細胞内に導入し、形質転換させた<sup>12)</sup>。得られた菌を、50 倍容の培養液中で振とう培養し、アンピシリン (100  $\mu$ g/ml) を加え、さらに一昼夜培養を行ったものを cDNA ライブラリーとした。約 1  $\mu$ g のポリ(A)RNA から  $3 \times 10^7$  個のトランスフォーマントが得られた。

##### 4. ニックトランスレーション法による標識 DNA の調製

[<sup>32</sup>P]標識 DNA の調製は、ニックトランスレーション法<sup>13)</sup>に従った。反応組成は、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.2)、10 mM 硫酸マグネシウム、0.1 mM ジチオスレイトール、50  $\mu$ g/ml ウシ血清アルブミン、[<sup>32</sup>P] dCTP、各々 33  $\mu$ M dATP、dGTP、dTTP、デオキシヌクレアーゼ I (250 ng/ml) および DNA ポリメラーゼ I (11 単位) からなる。15°C、2 時間反応後、セファデックス G-50 のスピナカラムにより標識 DNA を分離した。上記の方法により、通常  $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g の標品を得た。

##### 5. コロニーハイブリダイゼーション

ニトロセルロース上に形成させたアンピシリン耐性コロニーを、クロラムフェニコールを含んだ培地に移し、プラスミドの増幅を行った。Grunstein ら<sup>14)</sup>の方法に従い、プラスミド DNA を *in situ* の状態でアルカリによる溶菌と DNA の変性によりフィルターに固定した。ニックトランスレーションで得られた [<sup>32</sup>P] 標識 DNA プローブを用いて、コロニーをスクリーニングした。フィルターを 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5)、1 M 塩化ナトリウム、10 mM EDTA、10 倍量 Denhardt 溶液 (0.2%: ウシ血清アルブミン、フィコール、ポリビニルピロリドン)、0.1%ラウロイルサルコシン、5  $\mu$ g/ml 変性 pBR322 DNA および 50  $\mu$ g/ml 変性ヤツメウナギ DNA を含むハイブリダイゼーション混液中で 65°C、3 時間前処理後、プローブを含むハイブリダイゼーション混液中で 65°C、12 時間反応させた。次に、フィルターを 0.1 倍量 SSC (1 倍量 SSC: 0.15 M 塩化ナトリウム、0.015 M クエン酸ナトリウム)、0.1%ラウロイルサルコシンの溶液で 65°C、20 分間ずつ 3 回洗い乾燥させた後、増感スクリーニングを用いて -70°C でオートラジオグラフィーを行った。

##### 6. プラスミド DNA の単離

5 ml 培養液からのプラスミドは、Holmes ら<sup>15)</sup>の boiling 法を用いる簡便法で得た。また、大量のプラスミド DNA は、リゾチーム・トライトン X-100 を用いる Maniatis ら<sup>16)</sup>の方法で単離したのち、Beckman VTi65 ローターを用いて、47,000 r. p. m, 12 時間の塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。

#### 7. 制限酵素地図の作成

制限酵素消化 DNA を、0.8%–1.5% アガロースゲルまたは 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、臭化エチジウムで染色後、紫外線照射による発色より DNA 断片の長さを決定した。泳動緩衝液は両ゲル系とも トリス-ホウ酸緩衝液 (pH 8.3) を用いた。

#### 8. Northern プロット解析

ウシ網膜、脳および肝臓から調製したポリ (A) RNA をグリオキサール下で変性させ<sup>17)</sup>、1% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後、Southern 法<sup>18)</sup>の手順に従って、ポリ (A) RNA をニトロセルロースフィルターにプロットした。フィルターを 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7)、1 倍量 Denhardt 溶液、0.75 M 塩化ナトリウム、25 mM EDTA、0.2% SDS、50% ホルムアミドおよび 50  $\mu$ g/ml 変性ヤツメウナギ DNA を含むハイブリダイゼーション混液中で 43°C、8 時間前処理後、<sup>[32P]</sup>標識 DNA プローブを含むハイブリダイゼーション混液中で 43°C、17 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、2 倍量 SSC、0.2% SDS (室温)、続いて 0.1 倍量 SSC、0.2% SDS 溶液 (50°C) でそれぞれ 30 分間洗浄し、オートラジオグラフィを行った。

#### 9. DNA 塩基配列の決定

塩基配列は Maxam ら<sup>19)</sup>による化学的配列決定法および Sanger ら<sup>20)</sup>が開発し、Messing<sup>21)</sup>によって改良された M13 ファージを用いたジデオキシ法に従って行った。前者の方法は、DNA の 5'末端をアルカリホスファターゼ処理で脱リン酸した後、<sup>[ $\gamma$ -32P]</sup>ATP 存在下、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い 5'末端標識を行った。制限酵素を用い切断した DNA を、アクリルアミドゲル電気泳動で分離し、回収した。<sup>[32P]</sup>標識 DNA 断片を 4 等分し、G, T+C, C および A>C に特異的な塩基の化学修飾を行った後、20% および 8% ポリアクリルアミド (8 M 尿素を含む) ゲル電気泳動を行い、DNA の塩基配列をオートラジオグラフィで決定した。一方、後者の方法は、DNA 断片をファージ M13mp8 および mp9 のベクターに組み込み、大腸菌 JM101 に導入した。プラーク選択後、ファージ本鎖 DNA を増殖し、分離した。相補鎖 DNA の合成は、ジデオキシヌクレオチドおよび DNA ポリメラーゼ I の Klenow フラグメント存在下、プライマーを用いて

行った。塩基配列は、8% ポリアクリルアミド (7 M 尿素を含む) ゲル電気泳動後、オートラジオグラフィにより決定した。

#### 10. ハイブリッド-選択法による翻訳実験

ハイブリッド-選択法の手順は、Cleveland ら<sup>22)</sup>の方法に従って行った。Hind III 消化プラスミド DNA (20  $\mu$ g) を 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (1 mM EDTA を含む, pH 7.5) 中で 10 分間沸騰後、0.5 N 水酸化ナトリウム溶液で変性させた。DNA を 6 倍量 SSC で希釈し、1.5 cm 平方のニトロセルロースフィルター上にスポットした。フィルターを 6 倍量 SSC で洗い、80°C、2 時間加熱後、10 mM PIPES (pH 6.4)、40 mM 塩化ナトリウム、4 mM EDTA、50% ホルムアミドおよび 0.5 mg/ml 麦芽 tRNA からなるハイブリダイゼーション混液中で 41°C、12 時間処理した。次に、このフィルターを、20  $\mu$ g のウシ網膜ポリ (A) RNA を含むハイブリダイゼーション混液中で、41°C、15 時間反応させた。フィルターの洗浄は、次の手順で行った。1) 1 mM の 1 倍量 SSC、0.5% SDS 溶液で 15 分間室温で 2 回、2) 1 ml の 0.1 倍量 SSC、0.5% SDS で 15 分間室温で 3 回、3) 同溶液で 15 分間 50°C で 1 回、4) 10 mM トリス-塩酸、2 mM EDTA (pH 8) の溶液で 60°C、15 分間行った。非特異的な mRNA をフィルターより除いた後、蒸留水を加え、90 秒の加熱処理を行い、cDNA と特異的にハイブリダイズしていた mRNA をフィルターから溶出させた。麦芽 tRNA をキャリアーとして mRNA をエタノール沈澱によって回収した。この mRNA を 1  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、<sup>[35S]</sup>メチオニン存在下、ウサギ網状赤血球由来の無細胞蛋白合成系で翻訳させた。<sup>[35S]</sup>メチオニン標識蛋白の分析は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による Laemmli<sup>23)</sup>の方法に従った。その検出は、Borner ら<sup>24)</sup>の方法によるフルオログラフィーに従った。

#### 11. Southern プロット解析

高分子量 DNA は、Blin ら<sup>25)</sup>の方法に従い、ウシ脳から調製した。得られた DNA を数種類の制限酵素で処理したのち、0.8% アガロースゲルで DNA 断片を分離した。泳動後、Southern 法<sup>18)</sup>によりニトロセルロースフィルターにプロットした。フィルターを 20 mM HEPES (pH 7)、1 mM EDTA、3 倍量 SSC、0.5 倍量 Denhardt 溶液、50% ホルムアミド、100  $\mu$ g/ml 麦芽 tRNA および 10  $\mu$ g/ml 変性ヤツメウナギ DNA を含むハイブリダイゼーション混液中で 41°C、45 時間ハイブリダイゼーションを行った。反応後、フィルターを 0.1 倍量 SSC、0.1% SDS 溶液中、50°C、20 分間 3 回洗浄し、オートラジオグラフィを行った。

## 12. Dot プロット解析

RNA の dot プロットは、White ら<sup>26)</sup>の方法に従った。RNA を 7.4%ホルムアルデヒド、6 倍量 SSC、5 mM EDTA を含む溶液で懸濁し、RNA を 60°C、15 分間処理で変性させた後、ニトロセルロースフィルター上にスポットした。フィルターを、50 mMHEPES (pH 7)、3 倍量 SSC、1 倍量 Denhardt 溶液、200  $\mu$ g 麦芽 tRNA および 50  $\mu$ g/ml 変性ヤツメウナギ DNA を含むハイブリダイゼーション混液中で、42°C、2 時間の前処理を行った後、<sup>[32P]</sup>標識 DNA プローブを含むハイブリダイゼーション混液中で 42°C、15 時間反応させた。フィルターを 2 倍量 SSC で室温、1 時間、次に 0.1 倍量 SSC、0.1%SDS 溶液で 55°C、45 分間洗浄後、オートラジオグラフィを行った。

## 13. 試薬類

実験に使用した酵素および薬品は下記から得た。トリ骨髄芽症ウイルス逆転写酵素、セファデックス G-50 は生化学工業より、ターミナルトランスフェラーゼ、DNA ポリメラーゼ I は BRL (米国) より購入した。麦芽 tRNA、クロラムフェニコール、イソプロピル  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、アガロースは Sigma (米国) より、ウサギ網状赤血球ライゼート、M13mp8 および mp9 ベクター、<sup>[35S]</sup>メチオニン (>800 Ci /mmol)、<sup>[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]</sup>dCTP (~3000 Ci /mmol) および Amplify は Amersham (英国) から購入した。DNA sequencing system、<sup>[32P]</sup>は NEM (米国) より、アンピシリンナトリウムは明治製菓より、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ、バクテリアアルカリホスファターゼおよび T4 DNA リガーゼは宝酒造より購入した。制限酵素、NarI および RsaI は和光純薬より、AluI、BamHI、BglII、EcoRI、HhaI、HincII、HindIII、PstI、PvuII、SalI、Sau3AI、SmaI、TthIII および XhoI は宝酒造より購入した。ニトロセルロースフィルターは Schleicher & Scherell (米国) より、X線フィルムは Kodak (米国) より購入した。その他の化学薬品はすべて市販の特級品を用いた。

## 成 績

## 1. pCR18 のクローニング

pCR307 のインサートは 480 塩基対であり、相当する mRNA (約 1,000 スクレオチド) に比べてずっと短かく<sup>8)</sup>、解析には適当でない。そこで、完全長の cDNA を単離するために、Okayama-Berg 法で新たに作製した cDNA ライブラリーを用いてクローニングを行った。pCR307 のインサートを <sup>[32P]</sup>標識したものをプローブとして使い、コロニーハイブリダイゼーション

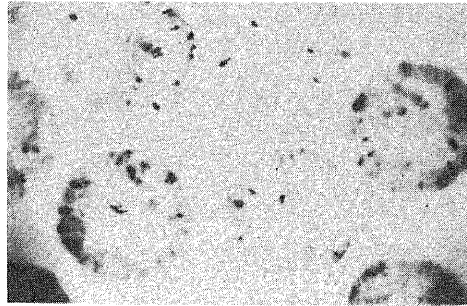


Fig. 1. Screening of retina-specific clones.

The library of bovine retina cDNA was constructed by the method of Okayama and Berg. cDNA-plasmid recombinant molecules were prepared using poly (A) RNA from the bovine retina, dT-tailed vector-primer and dG-tailed linker. The cyclized vector-cDNA preparation was used to transform the competent *E. coli* HB101. Ampicillin-resistant (Ap<sup>R</sup>) and tetracycline-sensitive (Tc<sup>S</sup>) colonies were picked onto agar plates containing ampicillin and grown overnight at 37°C. About 12,000 colonies from replicated nitrocellulose filters were screened by using the nick-translated insert (PstI-PstI) of pCR307.

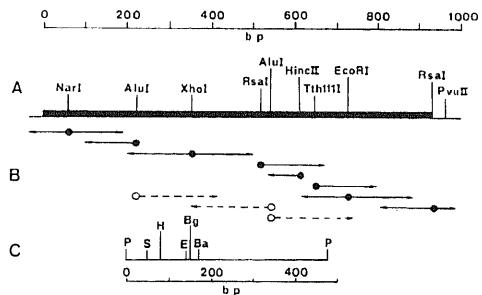


Fig. 2. Restriction enzyme mapping and sequence strategy of pCR18.

A. Restriction map of pCR18. The plasmid DNA was digested with several restriction endonucleases and resulting DNA fragments were electrophoresed on 5% polyacrylamide gel or 1.0–1.5% agarose gels. HaeIII-digested ColEI and HindIII-digested  $\lambda$ DNA were electrophoresed as molecular size markers.

B. Sequencing strategy. The sequence was performed according to the method of Maxam and Gilbert (●→) and the dideoxy termination method of Sanger *et al.* (○→→).

C. Restriction map of pCR307 which was used for pCR18 cloning as a probe. P, PstI; S, SalI; H, HincII; E, EcoRI; Bg, BglII; Ba, BamHI;

を行った。その結果、12,000個のコロニーの約1%がpCR307プローブとハイブリダイズした(図1)。その中から30個のコロニーを再スクリーニングにかけ、最終的に22個の単一コロニーを得た。それらのコロニーからプラスミドDNAを単離し、アガロース電気泳動によってそのcDNAインサートの長さの決定および制限酵素地図を作成した。21個のクローンはプローブ(pCR307)と同じ制限酵素地図を示し、400~600塩基対の長さであった。一方、pCR307と異なる制限酵素地図を示すクローンが一つ存在した。これはインサートの長さが約1000塩基対であった(図2)。そこで、この一番長いクローン(pCR18)を用いて、さらに解析

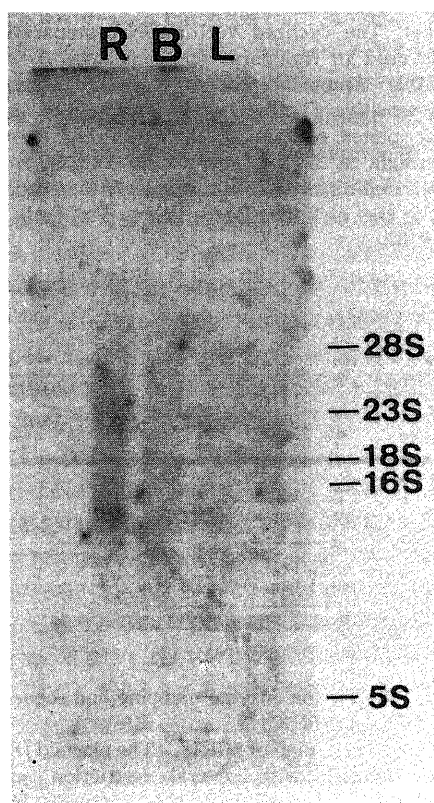


Fig. 3. Northern blot analysis of pCR18. Poly (A) RNAs from the bovine retina, brain and liver were electrophoretically fractionated in an agarose gel and blot-transferred to a nitrocellulose paper. The filter blot was hybridized to the nick-translated ( $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g) insert (NarI-EcoRI) of pCR18. Each lane contains 5 $\mu$ g of poly (A) RNA from bovine retina (R), brain (B) and liver (L). Bovine (28S, 18S) and *E. coli* (23S, 16S, 5S) rRNA were used as molecular size markers.

を進めた。

## 2. pCR18のNorthernプロットによる解析

pCR18クローンの網膜組織特異性およびmRNAの大きさを確かめるために、Northernプロット解析を行った。ウシの各種組織から抽出したポリ(A)RNAをグリオキサールにより変性させ、1%アガロースゲル電気泳動した。ニトロセルロースペーパーに移した後、ニックトランスレーション法によって得られた $[^{32}P]$ 標識DNAプローブ(pCR18)とハイブリダイゼーションを行った。その結果、pCR18は網膜組織からのポリ(A)RNAとのみハイブリダイズし、脳および肝臓の組織からのポリ(A)RNAとはハイブリッド形成が認められなかった(図3)。したがって、pCR18のcDNAインサートは網膜に特異的であり、かつmRNAの長さにほぼ近いことが明らかとなった。

## 3. DNA塩基配列の決定

mRNAによって翻訳される蛋白質を同定するため、pCR18のcDNAインサートの塩基配列の決定を行った。図2にpCR18の制限酵素表図、および各断片の塩基配列を決定した方向を示す。pCR18のcDNAインサートは、Maxam-Gilbert法およびジデオキシ法を用いてDNA塩基配列を決定した。図4にその一次構造を示す。cDNAインサートの長さは905ヌクレオチドで、3'-末端部分に81塩基のポリ(A)鎖を含んでいた。また、ポリ(A)鎖から20~25番目上流にAATAAAのポリ(A)付加シグナルが認められた。他の特徴的な配列として、対称配列(TGTAT[C]TATGT, 758-768)およびくりかえし配列(CCCGTCC, 23-29と75-81: CGCGGCG, 30-36と108-114: CAAATCAA, 630-637と650-657)が認められた。インサートの5'-末端から138-140番目にメチオニンコドン(ATG)が認められた。これらのメチオニンコドンから579-581番目の終止コドン(TCA)まで連続したopen reading frameが存在した。推定される蛋白質のアミノ酸残基は147個であった。この蛋白質と既知の蛋白質(約3,100種)とのホモロジーを大型コンピューターで検索した。その結果、本蛋白質と類似性を有する蛋白質をデータベースから見出すことはできなかった。

## 4. 無細胞蛋白質合成系による、ウシ網膜mRNAの翻訳産物の解析

ウシ網膜全ポリ(A)RNAとpCR18との間のRNA-DNAハイブリッド形成法によって、mRNAを選別した。そのmRNAをウサギ網状赤血球由来の無細胞系蛋白質合成系を用いて、*in vitro*で翻訳させた。翻訳産物をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、オートラジオグラフィにより検出し

た(図5). pCR18とハイブリッドした mRNA は、約 19,000 ダルトンのゲル移動度をもつ蛋白質をコードした。また、このバンドは対照反応系には認められなかった。

#### 5. pCR18の Southern プロット解析

ゲノム DNA 上に pCR18 遺伝子のコピーが複数個存在するかどうかを確かめるために、Southern プロッ

トハイブリダイゼーション法によりを調べた。ゲノム DNA をウシ脳から抽出した後、cDNA インサートに切断部位のない制限酵素 HindIII, PstI および BamHI で DNA を消化した。生じた断片をアガロースゲル電気泳動により分離し、ニトロセルロースペーパーに移した後、 $[^{32}\text{P}]$  標識 DNA プローブ (pCR18) と DNA-DNA のハイブリッド形成反応を行った。そ

```

TTTAGCCTCAGCCGTGA
17
CCGGCCCCGTCCC GCGGCGCCGGGAGTTCGTGTGAACGGGTAGGTGTACCGACTTCGCC
77
GTCCGTGAATCCCGTGGTCGCAAAGCCCGCGCGGGCCGGGTTCTGCCGATACCTTA
137
MetGlyCysAlaArgGlyGluProGlnLeuGlnValGlyArgGlyAspArgHisAlaGly
ATGGGCTGTGCGCAGGAGAGCCTCAATTGCAAGTTGGTCGAGGAGATCGCCACGCTGGT
197
AlaGluLeuAlaSerLeuValAlaAlaSerValGlyArgCysThrProThrPheArgLys
GCAGAGCTGGCCTCACTAGTTGCGGCTAGTGTAGGACGTTGTA CTCCGACATTCCGCAAG
257
ProPheHisThrAspSerProSerIleGlnGlyGlnTrpHisProPheThrAsnLysPro
CCCTTCCACACGGACAGTCTAGCATCCAGGGTCAGTGGCACCCCTTCCACCAACAAACCG
317
ThrAlaLeuGlyCysSerSerArgGlyProGluSerCysProAspProAlaAlaSerThr
ACAGCACTGGGGTGCTCCTCGAGAGGTCAGAATCCTGCCCGACCCAGCGGCCAGCACA
377
MetLysThrAsnSerIleProThrValTrpThrPheThrProAlaGluGlyGlySerCys
ATGAAGACCAACTCCATACCCACAGTTTGGACTTTTACTCCAGCAGAGGGTGGTTCTCTGC
437
SerTrpPheAlaSerArgGluThrAspGluAlaThrAsnGlyValLeuLeuAlaTrpAsp
TCCTGGTTTGCTTACGCGGAGACAGATGAAGCCACCAATGGGGTACTTCTTGCTGGGAT
497
LysGluGluLeuProValSerPheAspValHisArgGluAlaGlyThrValSerLeuLeu
AAAGAAGAGCTGCCTGTCTCTTTTGATGTCCACCGTGAGGCAGGGACTGTGAGTCTCCTC
557

IleLeuSerGlnLeuThrSer***
ATTCTTAGCCAGTTGACATCCTGAAACCCTGAGAATCTTCAGAGATTTGACTTGGTCTTC
617

ATTTCTAAATCAAATCAATAATAGTGATCTCAAATCAAGTGAGGGCTTTCAAGGCTGG
677

CTTCTGAAGAATTCCTTTTGGCCTGTTTCTGTAGCCAGTGACCAAGAGAGTCTGCTGTGA
737

GCTGGCATTGGGCTAGGCCTTGTATCTATGTGATGTTTGTGTGCAGTTAGAAAACCTGAAG
797

TTAATAAAATTTGCCAAGGTCACACTTG(A)81

```

Fig. 4. Nucleotide sequence of the retina-specific cDNA clone, pCR18.

The nucleotide sequence starts at the position 1 of the first nucleotide (T) following the oligo (dG) segment. The amino acid sequence begins with the first in-phase ATG codon for a single long open-reading frame. Termination codon is marked with\*\*\*. Possible polyadenylation signal, AATAAA, is underlined. The numbers below the sequence are nucleotide position.

の結果, HindIII, PstI および BamHI 消化は, それぞれ 3.25 K塩基, 3.4 K塩基, 3.1 K塩基を示す一つの DNA 断片が検出された (図 6). したがって, これらの結果は, pCR18 遺伝子がウシゲノム中に単一コピーとして存在していることを示唆している.

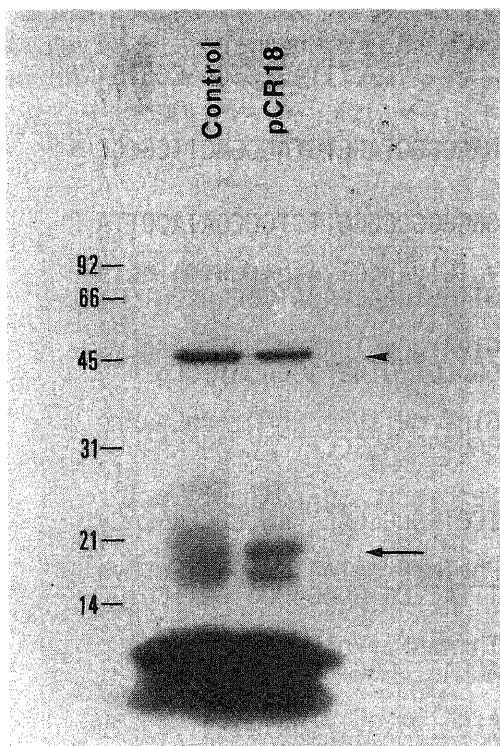


Fig. 5. *In vitro* translation of pCR18-selected retina mRNA.

pCR18 DNA was linearized by HindIII, denatured and spotted onto a nitrocellulose filter. The filter was hybridized to poly (A) RNA from the bovine retina. Hybridized RNA was eluted with distilled water. Eluted RNA or distilled water (as control) was translated in a rabbit reticulocyte lysate containing  $^{35}\text{S}$ -methionine. The radiolabeled products were electrophoresed on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel. The band shown by arrowhead ( $\blacktriangleleft$ ) is a translation product of the endogenous RNA in the reticulocyte lysate used. The arrow ( $\blackleftarrow$ ) indicates a band of 19,000 daltons, which was a translational product from pCR18-selected mRNA and not seen in the control. The molecular weight standards used are as follows: phosphorylase b (MW=92,500), bovine serum albumin (MW=66,200), ovalbumin (MW=45,000), carbonic anhydrase (MW=31,000), soybean trypsin inhibitor (MW=21,500), lysozyme (MW=14,400).

#### 6. 網膜芽細胞腫 mRNA への交叉-ハイブリダイゼーション

種々の腫瘍神経細胞において, pCR18 に対する mRNA が発現しているかどうかを調べるために, RNA の dot プロット解析を行った. ヒト網膜芽細胞腫 (Y79 細胞株, WERI 細胞株) およびマウス神経芽細胞腫×ラット膠腫雑種 (NG108-15) の細胞株からポリ (A) RNA を抽出し, 0.625  $\mu\text{g}$  から 5  $\mu\text{g}$  の範囲の RNA 量をニトロセルロースにプロットし, [ $^{32}\text{P}$ ]標識 DNA プローブ (pCR18) とハイブリダイゼーションを行った (図 7). その結果, Y 79 および WERI 細胞株において, ハイブリダイズが認められた. 一方, 同一条件下, ウシ脳および NG108-15 細胞にはハイブリダ

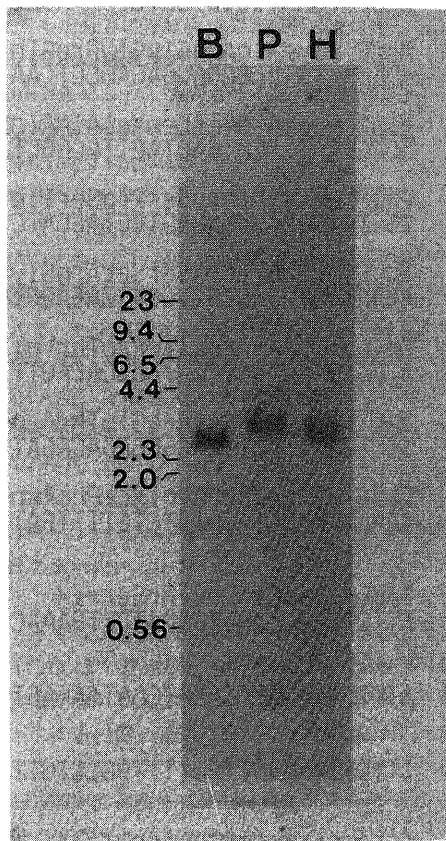


Fig. 6. Southern blot analysis of pCR18. Genomic bovine brain DNA (10  $\mu\text{g}$ /lane) was digested with HindIII (H), PstI (P) or BamHI (B), electrophoresed on a 0.8% agarose gel and transferred to a nitrocellulose paper. The filter was then hybridized to the nick-translated ( $1 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) insert (NarI-EcoRI) of pCR18. Band sizes are ; 3.25kb (HindIII), 3.4kb (PstI) and 3.1kb (BamHI). A HindIII-digested  $\lambda$ phage DNA was used as a size standard.



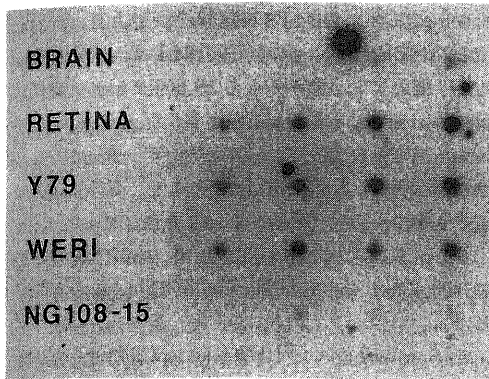


Fig. 7. Dot hybridization of the RNAs from various sources with pCR18.

Poly (A) RNA was isolated from neural tissues and neuronal cell lines. Serial diluted samples of each RNA were spotted directly onto a nitrocellulose filter and hybridized with the nick-translated insert (NarI-EcoRI) of pCR18. The RNAs were from the bovine brain, bovine retina, human retinoblastoma Y79 and WERI cells, and mouse neuroblastoma × rat glioma hybrid NG108-15 cells. The amount of RNA spotted was, from the left to right, 0.625, 1.25, 2.5 and 5.0  $\mu$ g in each line.

イズは検出されなかった。また網膜芽細胞腫 RNA への交叉-ハイブリダイゼーションは、ウシ網膜組織とほぼ同じレベルであった。したがって、これらの結果は、ヒトの網膜にも pCR18 とハイブリダイズする遺伝子が発現されていることを示唆している。

## 考 察

今回の実験において、最初のコロニースクリーニングの時にプローブとして用いた pCR307 は、ウシの網膜と脳組織の間でのプラス/マイナス (+/-) 法によって得られた cDNA の一つで<sup>9)</sup>、Northern プロット解析によっても網膜に特異的な cDNA であることが確認されたものである。しかし、pCR307 のインサートは 480 塩基対で、相当する mRNA は約 1,000 ヌクレオチドであるため、完全長の cDNA を得ることを計画した。従来のポリ dC 法による cDNA ライブラリーの作製では、 $S_1$  スクレアゼ処理時に 5'-末端配列が失われるという欠点があった。今回は、その欠点を克服するために開発された Okayama-Berg 法を採用し、cDNA ライブラリーを作製した。約 12,000 個のウシ網膜 cDNA ライブラリーからクローニングを行い、得られたクローンの中から一番長いインサートを有するクローン (pCR18) を単離した。しかし、この pCR18

クローンは pCR307 と異なる制限酵素地図を示した。そこで、pCR18 の組織特異性を Northern プロット解析によって検討した。この結果、pCR18 は網膜組織に特異的であり、mRNA の長さは約 12 S (約 1,000 ヌクレオチド) であることがわかった。用いたプローブと異なる制限酵素地図を示した cDNA をクローニングした例は、Yabusaki ら<sup>27)</sup> の 3-メチルコランスレン誘導チトクローム P450 のクローニングで報告されており、これはチトクローム P450 のファミリーであることが明らかにされている。したがって、pCR307 と今回得られた pCR18 は、塩基配列にホモロジーのある同じファミリーと考えられるが、このことを確認するには両 cDNA の塩基配列の決定が必須である。

得られた pCR18 のインサートの長さは 905 塩基対、それに対して mRNA の長さは約 1,000 ヌクレオチドであるため、pCR18 が完全長の長さからどの程度 5'-末端部分を欠いているかを正確に決定するには、primer extension 実験が必要であり、現在計画中である。

pCR18 の塩基配列の決定により、次の様な特徴が認められた。まず、5'-側に GC-豊富な部分が存在すること、また CCCGTCC および CGCGGCG のくり返し配列が認められた。一方、3'-側は AT-豊富であること、特に 800~805 番目に AATAAA のポリ (A) 付加シグナルが存在し、その 20 塩基下流にポリ (A) 鎖が 81 個付いていた。また、CAAATCAA のくりかえし配列および TGTAT [C] TATGT の対称配列が認められた。

pCR18 の塩基配列を、現在知られている網膜に特異的に存在する opsin<sup>28)</sup> や transducin<sup>29)</sup> の塩基配列と比較したが、ホモロジーは認められなかった。

終止コドンは 579~581 番目の TGA であるが、開始コドンは 138~140 番目のメチオニンが考えられる。開始コドンより上流の塩基配列およびハイブリッド-選択翻訳実験より得られた情報から、138 番目のメチオニンから開始する推定 open reading frame をとった。推定される蛋白質の分子量は 15,700 であった。しかし、最終的な開始コドンの決定には、蛋白質の精製を行い、その N 末アミノ酸を同定する必要がある。また、蛋白質分解を受ける部位、糖のつく部位および N 末部分におけるリーダー配列<sup>30)</sup> は認められなかった。

本実験から推定された蛋白質と 3,100 種の蛋白質のデータベース (金沢大学; Nakashima's protein sequence library) からホモロジーを調べたところ、一部のアミノ酸配列について、20~30% のホモロジーで、ニワトリ脾臓 Ig ラムダ型軽鎖およびタバコモザイクウイルス 30 K 蛋白質などが検索されたが、結論的に

は、有意なホモロジーのある蛋白質をとり出すことはできなかった。したがって、本蛋白質は新しい蛋白質と考えられる。

本蛋白質が網膜組織に特異的であることは、Northern プロットおよび dot プロット解析によって確かめられたが、さらには、一部のアミノ酸を合成し、これに対する抗体を作成し、免疫組織化学的検索を行うことによって本蛋白質の網膜組織内分布およびその機能が推察される可能性がある。

本研究のように、遺伝子工学の手法を用いたクローニングにより、分化や組織に対して特異的に発現される遺伝子およびその産物を解析する研究はまだ端緒をついたばかりであるが、いくつか報告されている。まず、分化については、ウニ外胚葉の分化 (Carpenter ら<sup>31)</sup>)、マウス脂肪細胞の分化 (Bernlohr ら<sup>32)</sup>)、ラット線維芽細胞の分化 (Matrisian ら<sup>33)</sup>) およびマウス肥満細胞の分化 (Yokota ら<sup>34)</sup>) が挙げられる。一方、アメフラシの各種ニューロンに特異的 (Scheller ら<sup>35)</sup>)、Taussig ら<sup>36)</sup>)、Nambu ら<sup>37)</sup>) およびラット脳に特異的 (Sutcliffe ら<sup>38)</sup>) な cDNA クローニング等も報告されている。

Southern プロット解析により、ゲノム DNA 上に単一コピー存在することが明らかとなった。しかし、ゲノム DNA 上での大きさやイントロンの存在などについては、分後、明らかにしなければならない。

dot プロットによる解析から、ヒト由来の網膜芽細胞腫に交叉-ハイブリダイズする mRNA が存在することは、種を超えて本蛋白質が網膜に存在していることを示す。したがって、今後さらに解析を進め、網膜における機能的役割を明らかにすることが重要になるであろう。また、ウシ網膜に匹敵する程度、pCR18 に交叉する mRNA が Y79 および WERI 細胞株に発現していたことより、ヒト網膜芽細胞腫は本蛋白質の機能を解明するのに格好の材料になると考えられる。

## 結 論

網膜組織に特異的に発現する遺伝子およびその産物を解明する目的で、ウシ網膜に特異的な cDNA のクローニングを行い、以下の結論を得た。

1) ウシ網膜 cDNA ライブラリーから、すでに得られた網膜に特異的な cDNA (pCR307) を用いてスクリーニングを行い、pCR307 とは異なる制限酵素地図を示す新たなクローン (pCR18) を単離した。pCR18 のインサートは 905 塩基対であった。

2) pCR18 は、ウシ網膜の約 12 S (約 1,000 ヌクレオチド) の大きさをもつ mRNA とのみハイブリダイズし、脳や肝臓とは反応しなかった。

3) pCR18 の DNA 塩基配列の決定より、一つの open reading frame の存在が認められ、その配列から 147 個のアミノ酸からなる 15,700 ダルトンの蛋白質をコードしていることが推定された。

4) 推定蛋白質のアミノ酸配列とデータバンクの既知蛋白質 (3,100 種) とを比較したが、有意なホモロジーをもつものは見出すことはできなかった。

5) pCR18 によって選択された mRNA は、約 19,000 ダルトンの分子量の蛋白質を *in vitro* で翻訳した。

6) Southern プロット解析から、pCR18 遺伝子がウシゲノム DNA 中に単一コピーとして含まれていることが示された。

7) 各種腫瘍細胞について、pCR18 に対する mRNA の発現を調べた実験から、pCR18 と交叉-ハイブリダイズする遺伝子がヒト由来の網膜芽細胞腫にも存在することが示された。

以上の結果から、pCR18 は網膜に特異的な新しい蛋白質をコードするクローンであること、および pCR18 の遺伝子がヒト網膜芽細胞腫にも発現していることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三木直正教授に心から謝意を表わします。また、本研究の機会を与えてくださった郭哲輝博士 (がん研・薬理部) に心から感謝いたします。あわせて、有益な御討論をいただいた高橋守信教授 (金大・がん研・免疫生物部)、野中勝博士 (同 免疫生物部)、中島廣志講師 (金大・医短部)、加藤聖助教授 (金大・医・神経情報研) ならびにがん研薬理部各位に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Chikaraishi, D. M., Deeb, S. S. & Sueoka, N.: Sequence complexity of nuclear RNAs in adult rat tissues. *Cell*, **13**, 111-120 (1978).
- 2) Milner, R. J. & Sutcliffe, J. G.: Gene expression in rat brain. *Nucl. Acid Res.*, **11**, 5497-5520 (1983).
- 3) Kandel, E. R.: Neurobiology and molecular biology: The second encounter. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **48**, 891-908 (1983).
- 4) Scheller, R. H., Jackson, J. F., McAllister, L. B., Schwartz, J. H., Kandel, E. R. & Axel, R.: A family of genes that codes for ELH, a neuropeptide eliciting a stereotyped pattern of behavior in *Aplysia*. *Cell*, **28**, 707-719 (1982).
- 5) Sutcliffe, J. G., Milner, R. J., Bloom, F. E. &

- Lerner, R. A.: Common 82-nucleotide sequence unique to brain RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4942-4946 (1982).
- 6) Dowling, J. E.: Information processing by local circuits: The vertebrate retina as a model system. p163-181, In Schmitt, F. O. & Worden, F. G. (eds.), The Neurosciences; Fourth Study Program. Cambridge, Mass., MIT Press, 1979.
- 7) Kaneko, A.: Physiology of the retina. Ann. Rev. Neurosci., 2, 169-191 (1979).
- 8) Kuo, C-H. & Miki, N.: Isolation of retina-specific cDNA and their characterization. Neurochem. Res., 9, 1162 (Abstr) (1984).
- 9) Okayama, H. & Berg, P.: High-efficiency cloning of full-length cDNA. Molec. Cell Biol., 2, 161-170 (1982).
- 10) Chirgwin, J. M., Rzybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979).
- 11) Aviv, H. & Leder, P.: Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidilic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1408-1412 (1972).
- 12) Dagert, M. & Ehrlich, S. D.: Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cell. Gene, 6, 23-28 (1979).
- 13) Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., & Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., 113, 237-251 (1977).
- 14) Grunstein, M. & Hogness, D. S.: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961-3965 (1975).
- 15) Holmes, D. S. & Qnigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Ann. Biochem., 114, 193-197 (1981).
- 16) Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.: Molecular cloning, A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory) (1982).
- 17) Thomas, P. S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201-5205 (1980).
- 18) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98, 503-517 (1975).
- 19) Maxam, A. & Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Meth. Enzymol., 65, 499-560 (1980).
- 20) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977).
- 21) Messing, J.: New M13 vectors for cloning. Meth. Enzymol., 101, 20-78 (1983).
- 22) Cleveland, D. W., Lopata, M. A., MacDonald, R. J., Cowan, N. J., Rutter, W. J. & Kirschner, M. W.: Number and evolutionary conservation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin and cytoplasmic  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin genes using specific cloned cDNA probes. Cell, 20, 95-105 (1980).
- 23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970).
- 24) Borner, W. M. & Laskey, R. A.: A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem., 46, 83-88 (1974).
- 25) Blin, N. & Stafford, D. W.: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucl. Acids Res., 3, 2303-2308 (1976).
- 26) White, B. A. & Bancroft, F. C.: Cytoplasmic dot hybridization: Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small cell or tissue samples. J. Biol. Chem., 257, 8569-8572 (1982).
- 27) Yabusaki, Y., Shimizu, M., Murakami, H., Nakamura, K., Oeda, K. & Ohkawa, H.: Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for 3-methylcholanthrene-induced rat liver cytochrome P-450MC. Nucl. Acids Res., 12, 2929-2938 (1984).
- 28) Nathans, J. & Hogness, D. S.: Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. Cell, 34, 807-814 (1983).
- 29) Hurley, J. B., Fong, H. K. W., Teplow, D. B., Dreyer, W. J. & Simon, M. I.: Isolation and characterization of a cDNA clone for the  $\gamma$  subunit of bovine retinal transducin. Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 81, 6948-6952 (1984).

30) **Blobel, G. & Dobberstein, B.**: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.*, **67**, 835-851 (1975).

31) **Carpenter, C. D., Bruskin, A. M., Hardin, P. E., Keast, M. J., Anstrom, J., Tyner, A. L., Brandhorst, B. P. & Klein, W. H.**: Novel proteins belonging to the troponin C superfamily are encoded by a set of mRNAs in sea urchin embryos. *Cell*, **36**, 663-671 (1984).

32) **Bernlohr, D. A., Angus, C. W., Lane, M. D., Bolanowski, M. A. & Kelly, T. J.**: Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: Identification of a mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5468-5472 (1984).

33) **Matrisian, L. M., Rautmann, G., Magun, B. E. & Breathnach, R.**: Epidermal growth factor or serum stimulation of rat fibroblasts induces an elevation in mRNA levels for lactate dehydrogenase and other glycolytic enzymes. *Nucl Acid Res.*, **13**, 711-726 (1985).

34) **Yokota, T., Lee, F., Rennick, D., Hall, C., Arai, N., Mosmann, T., Nabel, G., Cantor, H. & Arai, K-I.**: Isolation and characterization of a mouse cDNA clone that expresses mast-cell growth-factor activity in monkey cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1070-1074 (1984).

35) **Scheller, R. H., Jackson, J. F., McAllister, L. B., Rothman, B. S., Mayeri, E. & Axel, R.**: A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell*, **32**, 7-22 (1983).

36) **Taussig, R., Koldany, R-R. & Scheller, R. H.**: A cDNA clone encoding neuropeptides isolated from *Aplysia* neuron L11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4988-4992 (1984).

37) **Nambu, J. R., Taussig, R., Mahon, A. C. & Scheller, R. H.**: Gene isolation with cDNA probes from identified *Aplysia* neurons: Neuropeptide modulators of cardiovascular physiology. *Cell*, **35**, 47-56 (1983).

38) **Sutcliffe, J. G., Milner, R. J., Shinnick, T. M. & Bloom, F. E.**: Identifying the protein products of brain-specific genes with antibodies to chemically synthesized peptides. *Cell*, **33**, 671-682 (1983).

**Cloning and Characterization of cDNA (pCR18) Sequences for Bovine Retina-specific mRNAs** Yuzo Nakagawa, Department of Pharmacology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J.Juzen Med. Soc., **94**, 622-633 (1985)

**Key words:** retina-specific cDNA, neural retina, molecular cloning

#### Abstract

A full-length cDNA specific for the retina was selected from a bovine retinal cDNA library constructed by the method of Okayama and Berg, by using the retina-specific cDNA(pCR307) as a probe which had been previously cloned in this laboratory. About 12,000 colonies were screened by the colony hybridization. Twenty-one clones of 22 clones hybridized with pCR307 and showed the same restriction map as pCR307, but the remaining one (pCR18) with the largest size had a different restriction map. pCR18 contained the cDNA insert of 905 base pairs in length. In Northern blot analysis, pCR18 hybridized to mRNA species (about 12S) from the bovine retina but not those from the brain or liver. The nucleotide sequence of the cDNA insert in pCR18 revealed a tentative single long open-reading frame which encoded a 147 amino acid polypeptide of about 15,700 daltons. No significant sequence homology with the deduced protein was found in the protein sequence library of about 3,100. Messenger RNA species which

were hybridized with pCR18 and then released, directed a polypeptide of 19,000 daltons in a reticulocyte translation system. Southern blot analysis indicated that the bovine genome contained a single copy of this gene. Furthermore, RNA dot blot analysis showed that the poly-(A)RNA from the human retinoblastoma cell lines (Y79 and WERI) hybridized with pCR18, which was of comparable degree to the bovine retina. The results indicate that cDNA clone (pCR18) which has been newly cloned is encoding a novel protein specific for the retina and that the gene for pCR18 clone is also expressed in the human retinoblastoma cells, although its protein function is unknown.