# 高効率かつ高速な融合タンパク質 発現ベクターの構築法

天野剛志, 合田名都子, 廣明秀一



# 🌽 はじめに

近年,遺伝子配列データベースはますます充実して おり、PCRを用いて容易に目的の遺伝子をクローニン グし、組換えタンパク質を発現させ、構造・機能や相 互作用の解析ができるようになった. これらの実験を 行う場合, まずはじめに遺伝子をクローニングした発 現ベクターを構築する必要がある. 通常, すべての遺 伝子が, 可溶性タンパク質として組換え発現可能なわ けではないので、実験系を立ち上げるには、複数のべ クターを同時に構築し予備実験で発現チェックするこ とになる. こうした作業は分子生物学の基本ではある が、数が多いと時間がかかる、またPCR産物を制限 酵素処理しベクターに接続する場合, 末端に余分な塩 基がないと効率よく切断できずライゲーションが難し くなることが多い1). 制限酵素を使わないクローニン グ法としてはTAクローニングがあるが、この方法は PCR産物の接続に方向性がなく発現用ベクターの構築 法としては不向きである.

そこでわれわれは方向性をもってPCR産物をクロー ニングできるT-ベクター, PRESAT-vector (Potential Restriction Enzyme Selectable Asymmetric T- vector)(図1) を開発した<sup>2)~4)</sup>. PRESAT-vector の長所は、①あらゆるベクターをT-ベクターに変換 できること、②もととなるベクターを制限酵素処理の みでT-ベクターにできること、③TAクローニング なので多サンプル同時調製ができること、④数日間 (図2) で発現チェックまでが容易にできること,で ある. 本稿では、PRESAT-vectorの構築法からク ローニングの方法, 実際の応用例について紹介する.

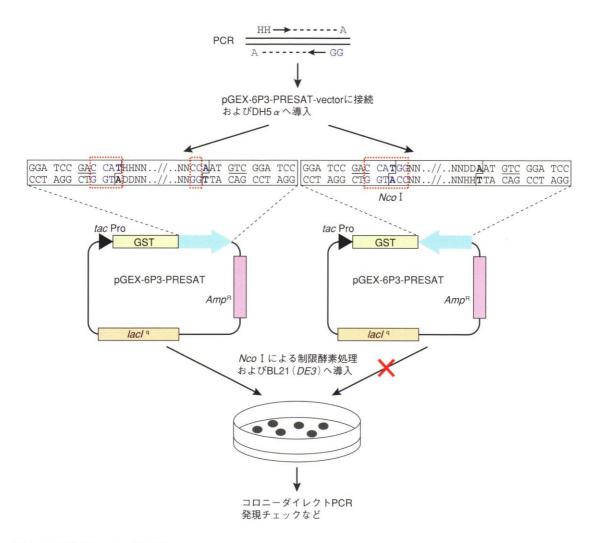


## 原理

ここではわれわれが作製したpGEX-6P3-PRESATvectorを例にしてPRESAT-vectorの原理を紹介す る. pGEX-6P3-PRESAT-vector (図1) は約500 bp のリンカーを挟んで2カ所のAhd Iサイトをもつ. そ の部分のセンス鎖の塩基配列は、上流側は GACCAT/ TGGTC, 下流側はGACCAA/ATGTC である (太文 字は Ahd I 認識配列). このベクターを Ahd I で切断 すると, 両3'末端にT(チミン)が突出し, なおか つ近傍の配列が非対称なT-ベクターとなる. さらに 上流側の末端配列に注目すると CCAT となっており、 Nco I および Nde I の認識配列の一部となっている.

High-throughput construction of fusion protein expression vector for functional and structural genomics

Takeshi Tenno 1)/Natsuko Goda 2)/Hidekazu Hiroaki 2): Graduate School of Engineering, Kyoto University 1)/International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University 2) (京都大学大学院工学研究科1)/横浜市立大学大学院国際総合科学 研究科<sup>2)</sup>)E-mail:hiroakih@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp



### 図1 PRESAT-vectorの原理

5'-GG 以外(5'-HH)ではじまる Forward プライマーと 5'-GG ではじまる Reverse プライマーとを使って PCR を行う. Ahd I で処理した PRESAT-vector と PCR 産物を接続すると、接続方向の異なる 2 種類のプラスミドができる。ベクターと PCR 産物のそれぞれの末端配列(青文字)によって、逆方向(右側の図)に接続されたときのみ新たな Nco I サイトができる(赤破線内)、プラスミド混合物を Nco I 処理しトランスフォーメーションすると、逆方向に接続されたプラスミドは切断排除され、正しい方向で接続されたプラスミドをもつ大腸菌のみが生えてくる

例えば、5'-GGではじまるReverseプライマーと、任意の(ただし5'-GG以外の)配列ではじまるForwardプライマーとで増幅したORFを上記のT-ベクターに接続するとしよう。接続されたDNA断片の方向は図1に示すとおり2通りある。接続部分のDNA配列に注目してほしい。逆方向に接続された場合のみNcoIの認識配列CCATGGとなる。つまりこのプラ

スミドをNco I で処理すると、逆方向に接続しているプラスミドのみ切断され、順方向のものが残る。これを大腸菌に導入すると、形成されたコロニーはきわめて高い確率で順方向に接続した産物を保持している。同様に、5´-ATGではじまる Reverse プライマーを用いると Nde I で ORF の方向性の選別ができる。

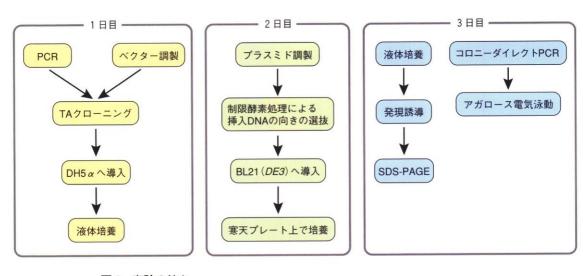


図 2 実験の流れ PRESAT-vector を使って発現系の構築ならびに発現チェックを行う実験の過程を示す

### 準備

### 1 プラスミド

pGEX(GE Healthcare)や pET(Novagen)系のタンパク質大量発現用のプラスミド〔ただし,アンピシリン(Amp)耐性のプラスミドには必ず Ahd I サイトが 1 カ所含まれているので,あらかじめ変異を導入しておく必要がある〕

### 2 オリゴヌクレオチド

- Anti-Ahd I (Amp<sup>R</sup>内の Ahd I サイト変異用プライマー,下線部が変異塩基)
  - 5'-GTTATCTACACCACGGGGAGCCAGGCAACTATGG
- T-linker Forward(TAクローニングサイト作製用プライマー) 5´-GGATCCGACCATTGGTC(X)<sub>15-24</sub>(下線部は Ahd I 認識配 列, X は鋳型の相補配列, 太字のT は Ahd I 切断後突出塩基の Tとなる)
- T-linker Reverse (TA クローニングサイト作製用プライマー) 5′-GGATCCGACATTTGGTC (X)<sub>15-24</sub> (下線部は Ahd I 認識配 列, X は鋳型の相補配列)

#### 3 酵素

- *rTaq*(TaKaRa) などのTA クローニングが可能な DNA ポリメ ラーゼ
- KOD plus (TOYOBO)

- T4 DNA Ligase (Promega)
- Ahd I , BamH I , Nde I , Nco I (NEB)

#### 4 試薬キット

- Gene Editor™ *in vitro* Site-Directed Mutagenesis System (Promega) などの部位特異的変異導入用キット
- Wizard<sup>®</sup> *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) などのプラスミド DNA 精製キット
- Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) などの DNA 精製キット
- アガロース LE Classic (ナカライテスク) など核酸分離用のアガロース

### 5 その他

コンピテントセル DH5α, BL21 (DE3)

# プロトコール

ここではpGEX-6P3-PRESATを例にして、プロトコールを紹介する.

### ■ PRESAT-vectorの作製

- Amp<sup>R</sup>内の Ahd I サイトの変異
  Anti-Ahd I プライマーと部位特異的変異導入キットを用い、 耐性遺伝子 (Amp<sup>R</sup>) 内にある Ahd I 認識配列を破壊する。
- PRESAT リンカーの作製

T-linker Forward および Reverse プライマーを用いて、2 カ 所の Ahd I サイトをもつリンカー\*  $(\sim 500 \text{ bp})$  を増幅する. 増幅産物は Bam H I で切断する.

③ ライゲーション

pGEX-6P3 を *Bam* H I で切断し、 ②で作製したリンカーを挿入する. ライゲーション産物を DH5 *a* に形質転換し、コロニーをセレクションする.

4 リンカーの向きの確認

生えてきたシングルコロニーを数個培養し、それぞれプラスミドを調製する. DNA シークエンスでリンカーの配列と接続方向を確認する.

### 2 プライマーの設計

Forward プライマーは増幅したい ORF の相補配列\*3 (ただし5′-GG を除く), Reverse プライマーは5′-GG ではじめて,

※1 鋳型となる DNA は何でもよいが、 ORF の方向性を選別する制限酵素の配列(今回は Nco I と Nde I の認識配列) を含むとなおよい。

**※2** Ahd I で切断したときに生じる 断片が 500 bp くらいが分離しやすい.

\*\*3 5′末端の塩基が G または A ならなおよい. Taq ポリメラーゼの末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性 (TdT 活性) による 3′末端に A を付加する反応は、末端の塩基の種類によって効率が異なるためである⁵).

その後に増幅したい ORF の相補配列を続ける.

### 3 PCR&TA クローニング

### ① T-ベクターの調製

■で作製したベクターを Ahd I で切断し、アガロース電気泳動で断片を分離し、ベクターを精製する\*4.

### PCR

②で設計したプライマーと Taqポリメラーゼ(TdT 活性のあるもの)を使って目的の ORF を増幅する。長い ORF をエラーなく増幅させたい場合は、KOD plus などの校正機能をもつポリメラーゼで ORF を増幅させた後、dATP と Taq ポリメラーゼによって両 3' 末端に A を付加するとよい。 アガロース電気泳動で PCR 産物の量と純度を確認する\*\*5.

⑤ ライゲーション

切断したベクター、PCR 産物、T4 DNA Ligase、反応バッファーを混合し、4  $\mathbb{C}$ で 8 時間以上インキュベートする。ライゲーション産物を DH5  $\alpha$  などの大腸菌に導入し、Amp 入り (50  $\mu$  g/ml) の LB 液体培地で培養する\*6.

### 4 制限酵素処理

培養した菌体からプラスミドを調製する. 調製したプラスミド  $100 \sim 200$  ng を 10 unit の Nco I で処理する. 制限酵素処理後, 反応液の一部をアガロース電気泳動にかけ, プラスミドの状態 を確認する\*7. プラスミド 5 ng 分の反応液を BL21 (DE3) などの発現用大腸菌に導入し, Amp プレート上でセレクションする.

### ■ PCR 産物の接続方向確認およびタンパク質発現チェック

● 小スケール培養によるタンパク質発現チェック シングルコロニーをマスタープレートと3 mlのLB培地に植え 継ぎ、それぞれ培養する\*8. 液体培養については、約 OD 0.4 で終濃度1 mMのIPTGを添加し発現誘導をかける. 数時間後 に菌体を回収し、SDS-PAGEにて発現確認を行う\*9.

② コロニーダイレクトPCR

マスタープレートからコロニーダイレクトPCRによって目的ORFの有無および方向性を調べる. 使用するプライマーは、ORFの増幅に使用したプライマーとベクターに相補的なプライマーの組合わせで行う.

③ DNA シークエンス

タンパク質の発現を確認し、PCRで目的ORFの有無を確かめたサンプルについて、プラスミドを調製しDNA配列を確認する.

※4 精製したベクターは4℃で保存できる。 - 20℃で凍結させるとライゲーション効率が低下する。

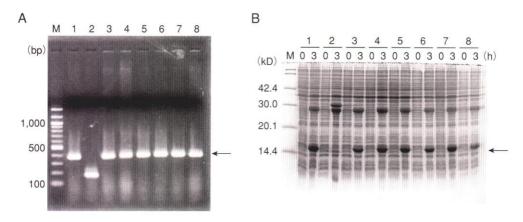
※5 量が多ければ、精製せずにそのままライゲーション反応に用いてよい.

\*\*6 ここでは ORF の方向性が異なる プラスミドの混合物として得るため、液 体培養でよい.

※7 原理的には切断されたバンドと未 切断のバンドの2本のバンドが見えるは ずであるが、切断されたバンドよりも大 きい3本目のバンドがみられることもあ る.正体は不明であるが、このバンドが 存在しても後の実験には影響しない。

**\*\*8** DNA シークエンスに用いるので、 マスターブレートは冷蔵庫に保管して おく.

※9 発現誘導前,発現誘導後の全菌体 および上清画分を一緒に泳動して評価 する.



### 図3 PRESAT-vectorを用いたクローニングならびに発現チェックの結果

A) コロニーダイレクト PCR: M はマーカー、上の数字はクローン番号を示す.遺伝子に相補な Forward プライマーとベクターに相補な Reverse プライマーを用いて PCR を行った.8 クローン中 7 クローン(2 以外)が正しい方向で接続されたプラスミドをもっていることがわかる.B) SDS-PAGE: M はマーカー、上の数字は A と同一のクローン番号,下の 0,3 は IPTG 添加後の培養時間を示す.正しい方向に接続されたプラスミドをもつクローンのみ融合タンパク質を発現していることがわかる



われわれは今までにGST、His-tag、FLAG-tag、Thioredoxin などの融合発現ベクターをPRESAT-vector に改変し、発現系を構築してきた $^{2)\sim4}$ )。ここでは2種類のタグをもつPRESAT-vector を使ったクローニング例を紹介したい。このベクターはN末端側にランタニド結合配列 $^{6}$ )を、C末端側にHIV-Tatを融合発現させるベクターである(論文投稿中)。図2に従って実験を行い、3日目にコロニーダイレクトPCRによるインサートの向きの確認と融合タンパク質の発現の確認を行った。その結果、図3に示したように8試料中7つは正しくクローニングされていて、短時間でタンパク質発現系が作製できた。



PRESAT-vectorと同様にPCR 産物を方向性クローニングする方法としては、インビトロジェン社のTOPO-TA cloning キットやNovagen 社のLIC (liga-

tion independent cloning)法が有名である。しかし前者は開環状プラスミドートポイソメラーゼ複合体を自前で調製するのは容易でない。後者は接合部位の配列に制限が多く、融合タンパク質発現系に限っていえば汎用性が低い。PRESAT-vector法は、ほぼすべてのベクターに適用可能であり、また自前で増幅もできるので、コスト的にも魅力である。ただし短所として、クローニングするPCR産物が長くなると効率が落ちることがあげられる。

今後は、哺乳動物細胞の発現系への応用なども視野に入れて、新たなPRESAT-vectorを開発する予定である。われわれの方法論が遺伝子操作を用いる幅広い分野の研究の効率化に貢献できれば幸いである。

### 文献

- 1)「制限酵素の基礎知識 改訂版」(齋藤 泉/監修),第一化 学薬品,2005
- 2) Goda, N. et al.: Protein Sci., 13: 652-658, 2004
- 3) Tenno, T. et al.: Protein Eng. Des. Sel., 17: 305-314, 2004
- 4) 天野剛志, 他:蛋白質核酸酵素, 49:2587-2594, 2004
- 5) Magnuson, V. L. et al.: BioTechniques, 21: 700-709, 1996
- 6) Franz, K. J. et al.: ChemBioChem., 4: 265-271, 2003