

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、複数のベ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^{2)~4)}。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-PRESAT-vectorを例にしてPRESAT-vectorの原理を紹介する。pGEX-6P3-PRESAT-vector(図1)は約500bp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 Tenno¹⁾/Natsuko Goda²⁾/Hidekazu Hiroaki²⁾: Graduate School of Engineering, Kyoto University¹⁾/International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University²⁾(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²⁾) E-mail: hiroakih@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

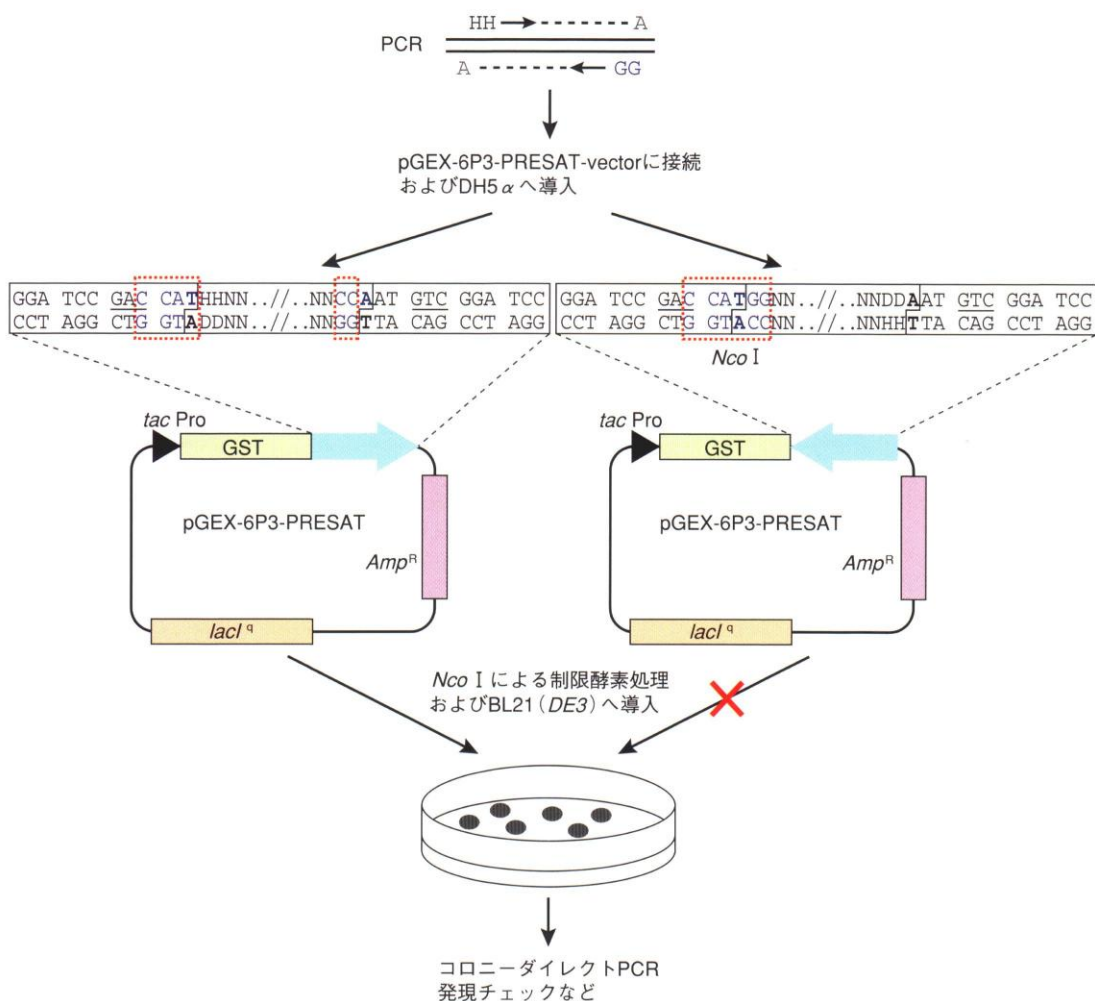


図1 PRESAT-vector の原理

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 Nco I 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。

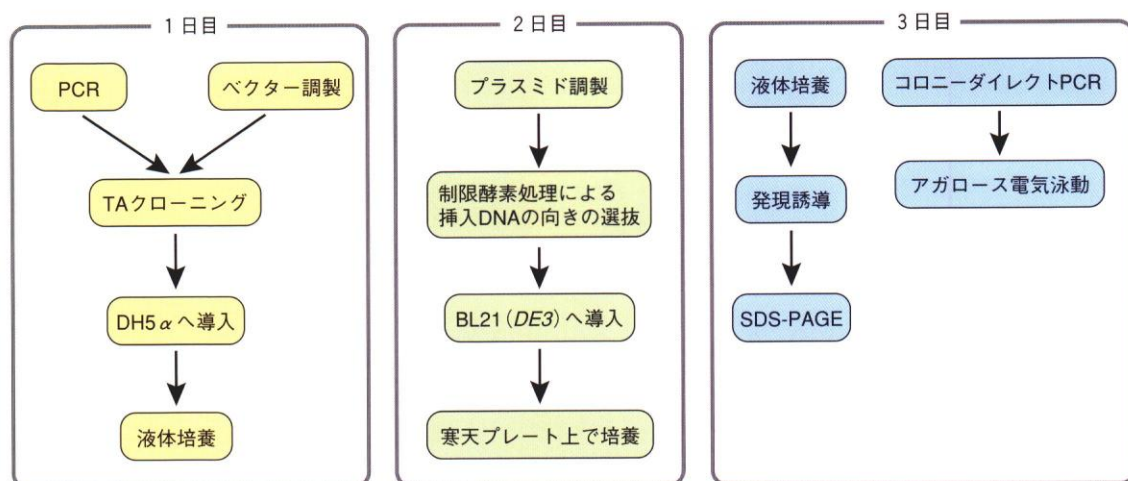


図2 実験の流れ

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^R内の *Ahd* I サイト変異用プライマー、下線部が変異塩基)

5'-GTTATCTACACCACGGGGAGCCCAGGCAACTATGG

- T-linker Forward (TA クローニングサイト作製用プライマー)

5'-GGATCCGACCATTGGTC (X)₁₅₋₂₄ (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)₁₅₋₂₄ (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, *Bam* H 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® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) などのプラスミド DNA 精製キット
- Wizard® 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 DH5 α , 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。

1 PRESAT-vector の作製

① Amp^R 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^R) 内にある *Ahd* I 認識配列を破壊する。

② 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※1 (～500 bp※2) 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 α に形質転換し、コロニーをセクションする。

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

①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}。

② 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}。

③ 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℃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 *a* などの大腸菌に導入し、Amp入り (50 µg/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100～200 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。

5 PCR産物の接続方向確認およびタンパク質発現チェック

① 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、マスタープ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。

