

pCI-neoベクターとpcDNA4/HisMaxベクターの比較



By Brian D. Almond, Ph.D., and Elaine T. Schenborn, Ph.D.
Promega Corporation

弊社のpCI-neo Mammalian Expression Vectorにはサイトメガロウイルス(CMV) immediate-early エンハンサー/プロモーター、最適化されたキメライントロンおよびサルウイルス40(SV40) lateポリアデニレーションシグナルが含まれており、これら3つのエレメントにより、哺乳動物細胞でクローン化遺伝子を強力かつ継続して発現させます。また、このベクターには、ステابلにトランスフェクトされたクローン選択のためのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、T7プロモーター、f1複製開始点、ベクター上の各エレメント両端に存在するユニークな制限酵素サイト、ハイコピープラスミドのレプリコン、便利なマルチクローニング領域なども配置されています。本稿では3種類の遺伝子をプロメガのpCI-neoベクターとインビトロジェン社のpcDNA4/HisMaxベクターに導入し、発現レベルを比較しました。

はじめに

プロモーターやベクターの最適化により真核生物での発現レベルを増加させることは、哺乳動物の遺伝子発現の研究領域において主要な推進力になっています。これまで真核生物のウイルスプロモーターユニット(CMV, SV40, RSVなど)がベクターに組み込まれ、それらのプロモーターだけで哺乳動物細胞でのタンパク質発現は可能です。現在、CMVプロモーターは、主要な哺乳動物細胞でトランジェントに導入された遺伝子を高レベルに発現することが示され、標準的な哺乳動物用プロモーター強度として認知されています(1)。導入遺伝子の発現を増加させるために、哺乳動物ベクターには様々な要素が付加されています。それらの要素の1つがあらゆるcDNAインサートの発現を増加させるイントロンの導入です(2,3)。キメライントロンは、ヒトβ-グロブリンの第1イントロンを由来とする5'-ドナーサイトとイムノグロブリン遺伝子のH鎖可変領域のリーダーと本体の間に位置するイントロン由来のランチおよび3'-アクセプターサイトを用いてデザインされています(4)。導入遺伝子の発現を顕著に増加させることが示されているこのキメライントロンは、プロメガの様々な哺乳動物発現ベクターに組み込まれています。

近年、翻訳促進機能を持つマウス血管内皮成長因子(VEGF)遺伝子の5'-非翻訳領域のDNA配列(163bp)を有する発現ベクターがデザインされています。この製品の技術資料によれば、導入遺伝子がこの翻訳促進領域にインフレームでクローニングされ、トランスフェクションできれば、様々な哺乳動物細胞株で導入遺伝子の発現レベルが増加します。

キメライントロン(プロメガ)と翻訳促進領域(インビトロジェン社)を含む各ベクターの導入遺伝子発現の違いを調べるために、3種類のレポーター遺伝子(*luc* [ルシフェラーゼ], *lacZ*, およびグリーンフルオレッセンスプロテイン[GFP])をpCI-neo Mammalian Expression Vector(プロメガ カタログ番号 E1841)とpcDNA4/HisMax(インビトロジェン社)の各真核生物発現ベクターにサブクローニングしました。サブクローニング後、レポーター遺伝子を含む各ベクターを様々な哺乳動物細胞株にトランスフェクションしました。タンパク質の発現レベルはトランスフェクション48時間後に各レポーター遺伝子ごとに測定しました。

ルシフェラーゼの発現

ホタルルシフェラーゼcDNA(*luc*)をpCI-neoおよびpcDNA4/HisMaxの各ベクターにサブクローニングし、pCI-neo+*luc*およびpcDNA4/HisMax+*luc*を構築し、プロメガのトランスフェクション試薬 TransFast™ Transfection Reagent(カタログ番号 E2431)を用いてNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7、HeLa、293の各細胞にトランスフェクションしました。細胞はトランスフェクション48時間後に採取し、Luciferase Assay System(カタログ番号 E1500、図1参照)を用いてルシフェラーゼの発現レベルを測定しました。

その結果、NIH3T3、COS-1、COS-7ではpCI-neo+*luc*からのルシフェラーゼ発現量のほうが、pcDNA4/HisMax+*luc*のものよりも高く、CHO、HeLa、293細胞では同等の発現レベルを示しました。

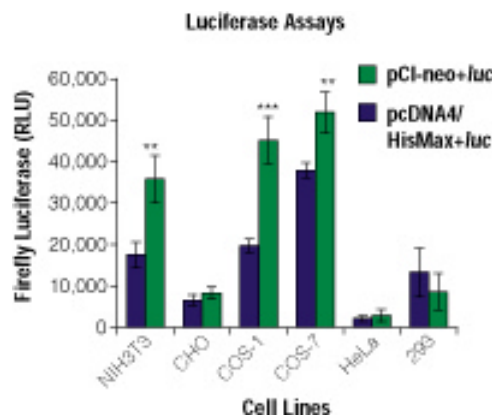


図1. 異なる細胞株におけるpCI-neo+*luc*およびpcDNA4/HisMax+*luc*からのルシフェラーゼ発現の相対レベル

ルシフェラーゼcDNAはpCI-neoおよびpcDNA4/HisMaxにサブクローニングし、TransFast™ Transfection Reagent(カタログ番号 E2431)を用いてNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7、HeLa、293の各細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に細胞を採取し、Luciferase Assay System(カタログ番号 E1500)を用いてルシフェラーゼの発現レベルを測定した。データは各細胞株・コンストラクトについて相対発光ユニット(RLU)の平均および標準偏差値で表した。実験は繰返し行い同様の結果が得られた。** $P < 0.01$ 。*** $P < 0.001$ 。

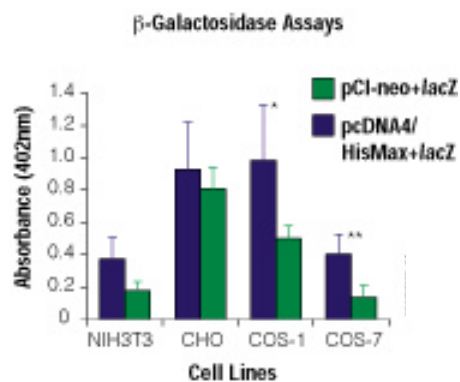


図2. 異なる細胞株におけるpCI-neo+lacZおよびpcDNA4/HisMax+lacZからのβ-ガラクトシダーゼ発現レベル

lacZ遺伝子はpCI-neoおよびpcDNA4/HisMaxにサブクローニングし、TransFast™ Transfection Reagent(カタログ番号 E2431)を用いてNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7の各細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に Reporter Lysis Buffer(カタログ番号 E3971)で細胞を採取し、β-Galactosidase Enzyme Assay System(カタログ番号 E2000)を用いてβ-ガラクトシダーゼの発現を測定した。データは各細胞株・コンストラクトについての平均および標準偏差で表した。データを標準化するためにトランスフェクションコントロール(DNAなし)を用いた。実験は4回繰返し行い同様の結果が得られた。*P < 0.05. **P < 0.01。

β-ガラクトシダーゼの発現

pCI-neo+lacZ(pCI-neoにlacZをサブクローニングしたもの)およびpcDNA4/HisMax+lacZ(pcDNA4/HisMaxにlacZをサブクローニングしたもの)をNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7の各細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクション48時間後に細胞を採取し、β-Galactosidase Enzyme Assay System(カタログ番号 E2000)を用いてβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)の発現レベルを測定しました。

lacZを含む各コンストラクトをトランスフェクションしたNIH3T3、CHO細胞でのβ-gal発現レベルは同等の値を示しました(図2)。しかし、COS-1、COS-7細胞の場合、pcDNA4/HisMax+lacZをトランスフェクションしたものの方がpCI-neo+lacZをトランスフェクションしたものよりも高いβ-gal発現レベルを示しました。COS-1およびCOS-7のデータは統計的に有意性を持ちそれぞれP < 0.05、**P < 0.01でした。

GFPの発現

GFPをコードするcDNA(6,7)をpCI-neoおよびpcDNA4/HisMaxにサブクローニングし、pCI-neo+GFPおよびpcDNA4/HisMax+GFPを構築した後、プロメガのTransFast™を用いてNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7、HeLa、293の各細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクション48時間後に細胞を採取し、フルオロメーターを用いてGFPの発現レベルを解析しました(図3参照)。

CHO細胞の場合、pCI-neo+GFPをトランスフェクションしたものの方がpcDNA4/HisMax+GFPをトランスフェクションしたものよりも約倍のGFPを発現しました(統計的有意性p < 0.001)。一方、COS-7細胞ではpcDNA4/HisMax+GFPをトランスフェクションしたものの方がpCI-neo+GFPをトランスフェクションしたものよりも高い発現レベルを示しました(統計的有意性p < 0.01)。COS-1の場合pcDNA4/HisMax+GFPをトランスフェクションしたものの方がpCI-neo+GFPをトランスフェクションしたものよりも高い発現レベルを示しました(統計的有意性p < 0.05)。各コンストラクトを他の細胞(NIH3T3、HeLa、293)にトランスフェクションした場合は同等のGFP発現が認められました。

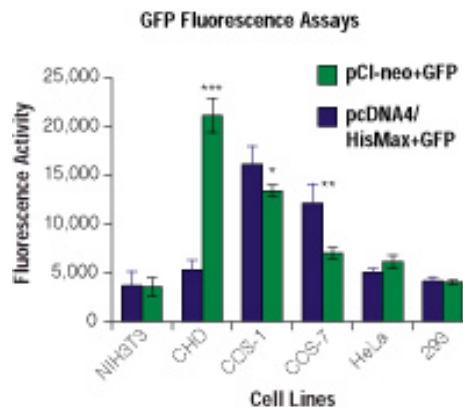


図3. 異なる細胞株におけるpCI-neo+GFPおよびpcDNA4/HisMax+GFPからのGFP発現レベル

GFPのcDNAはpCI-neoおよびpcDNA4/HisMaxにサブクローニングし、TransFast™ Transfection Reagent(カタログ番号 E2431)を用いてNIH3T3、CHO、COS-1、COS-7、HeLa、293の各細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に細胞をトリプシン処理し、GFPの発現をフルオロメーターを用いて測定した。データは各細胞株・コンストラクトについての平均および標準偏差で表した。データを標準化するためのトランスフェクションコントロール(DNAなし)は用いなかった。実験は回繰返し行い同様の結果が得られた。P < 0.05. **P < 0.01. ***P < 0.001。

まとめ

データはプロメガのpCI-neo Mammalian Expression Vectorとインビトロジェン社のpcDNA4/HisMaxの導入遺伝子の発現において本質的な違いが無いことを示唆していました。今回の実験では導入遺伝子の発現レベルは、導入する遺伝子と細胞株の両方によって変わりました。いくつかの実験ではpCI-neo Mammalian Expression Vectorにサブクローニングしトランスフェクションした場合の方が導入遺伝子を高レベルで発現していました。ほとんどの実験では導入遺伝子の発現レベルは同等でした。

重要なことは、プロメガのpCI-neo Mammalian Expression VectorはpcDNA4/HisMaxベクターを凌駕するいくつかの利点を持っていることです。まず、pCI-neoへのサブクローニングはpcDNA4/HisMaxよりも簡単です。pcDNA4/HisMaxベクターシステムには3つの異なるベクター(pcDNA4/HisMax A、B、C)が含まれており、各ベクターのマルチクローニングサイトは異なる翻訳リーディングフレームを有しています。すなわち、pcDNA4/HisMaxベクターにリーディングフレームからずれてサブクローニングされると、目的のタンパク質は発現されないことを意味しています。さらに、もともとのタンパク質機能や構造を維持させるには、導入遺伝子をサブクローニングする際に「非翻訳領域を無くすか、最小限に抑えなければいけません」。

プロメガのpCI-neoの第2の利点は、このベクターからは不要なN-末端フュージョンペプチドが作られない点です。pcDNA4/HisMaxベクターではリーディングフレームを合わせてサブクローニングすると余分なN-末端フュージョンペプチドが合成され、目的タンパク質の折りたたみや機能に悪影響を及ぼす可能性があります。



参考文献

1. Foecking, M.K. and Hofstetter, H. (1986) *Gene* **45**, 101.
2. Brinster, R.L. *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 836.
3. Choi, T. *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3070.
4. Bothwell, A. (1981) *Cell* **24**, 625.
5. Brondyk, W.H. (1994) *Promega Notes* **49**, 7.
6. Heim, R., Cubitt, A.B. and Tsien, R.Y. (1995) *Nature* **373**, 663.
7. Crameri, A. *et al.* (1996) *Nature Biotechnol.* **14**, 315.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
pCI-neo Mammalian Expression Vector	20µg	E1841	37,000
β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer	1system	E2000	16,000
TransFast™ Transfection Reagent	1.2mg	E2431	35,000
Bright-Glo™ Luciferase Assay System ^(d)	100ml	E2620	89,000
Luciferase Assay System	100回分	E1500	13,000
Luciferase 1000 Assay System ^(d)	1,000回分	E4550	76,000
Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, 5X	30ml	E1531	5,000

Bright-Glo and TransFast are trademarks of Promega Corporation.

^(a)U.S. Pat. No. 4,766,072 has been issued to Promega Corporation for transcription vectors having two different bacteriophage RNA polymerase promoter sequences separated by a series of unique restriction sites into which foreign DNA can be inserted.

^(b)The CMV promoter and its use are covered under U.S. Pat. Nos. 5,168,062 and 5,385,839 owned by the University of Iowa Research Foundation, Iowa City, Iowa, and licensed FOR RESEARCH USE ONLY. Commercial users must obtain a license to these patents directly from the University of Iowa Research Foundation.

^(c)The cationic lipid component of the TransFast™ Transfection Reagent is covered by U.S. Pat. Nos. 5,824,812, 5,869,715 and pending foreign patents.

^(d)U.S. Pat. No. 5,283,179, Australian Pat. No. 649289 and other patents. Certain applications of this product may require licenses from others.

^(e)Certain applications of this product may require licenses from others.