

Introducing the Flexi® Vector System

タンパク質コード領域のクローニングおよび発現のための新しいシステム

By Michael Slater, Ph.D., Jim Hartnett, M.S., Natalie Betz, Ph.D., Jami English, M.S., Ethan Strauss, Ph.D., Becky Pferdehirt, B.S., and Elaine Schenborn, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

Flexi® Vector Systemは、発現ベクターやペプチドタグ融合ベクターなどを含むベクターシリーズ間で迅速、効率的にタンパク質コード領域を移し換えることのできる信頼性高い方法を提供します。制限酵素処理後、インサートはFlexi® Vector間で方向性、読み枠を維持したまま効率よく移し換えることができます。最初のクローニングステップでは、Flexi® Vectorに含まれる致死遺伝子により、インサートライゲーションの成否判定のためのポジティブセレクションが行えます。また、抗生物質耐性遺伝子は次ステップとなる他のFlexi® Vectorへのサブクローニング時のセレクションをシンプルにします。

Flexi® Vector を用いたクローニングはインサートの方向性、読み枠を維持する方法を採用しているため、インサートを移し換えるたびにシーケンシングを行う必要はありません。

イントロダクション

Flexi® Vector Systemは、2種類のレアカッター制限酵素 *Sgf I* および *Pme I* を使用して、タンパク質コード配列のシンプルかつ確実なディレクショナルクローニング法を提供します。インサートは *Sgf I* および *Pme I* で消化した後、片方のFlexi® Vectorから他方へ効率的に移し換えることができ、しかもインサートの方向性および読み枠は維持されており、移し換えた後にインサートを再度シーケンシングする必要もありません（図1）。このアプローチはハイスループットフォーマットにも容易に対応します。

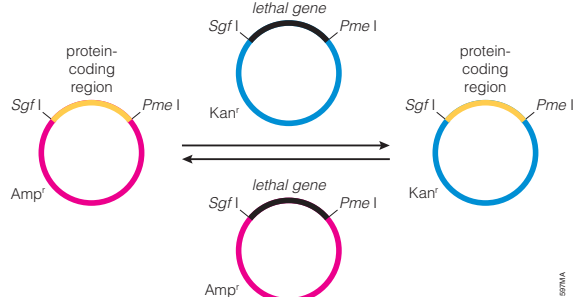


図1. Flexi® Vector Systemにおけるタンパク質コード領域の移し換え

Flexi® Vector Systemは、タンパク質コード領域（ペプチド融合タグ有または無）を発現させるための柔軟性のあるディレクショナルクローニング法を採用。発現に必要な特徴やタンパク質融合タグはベクターのバックボーンに含まれており、タンパク質コード領域は2種類のレアカッター制限酵素（*Sgf I* および *Pme I*）を用いてベクター間で簡単に移し換え可能。Flexi® Vectorは、タンパク質コード配列のポジティブセレクション用の致死遺伝子（パーナーゼ）およびFlexi® Vectorを保持するコロニー選択用の抗生物質マーカーを含む。

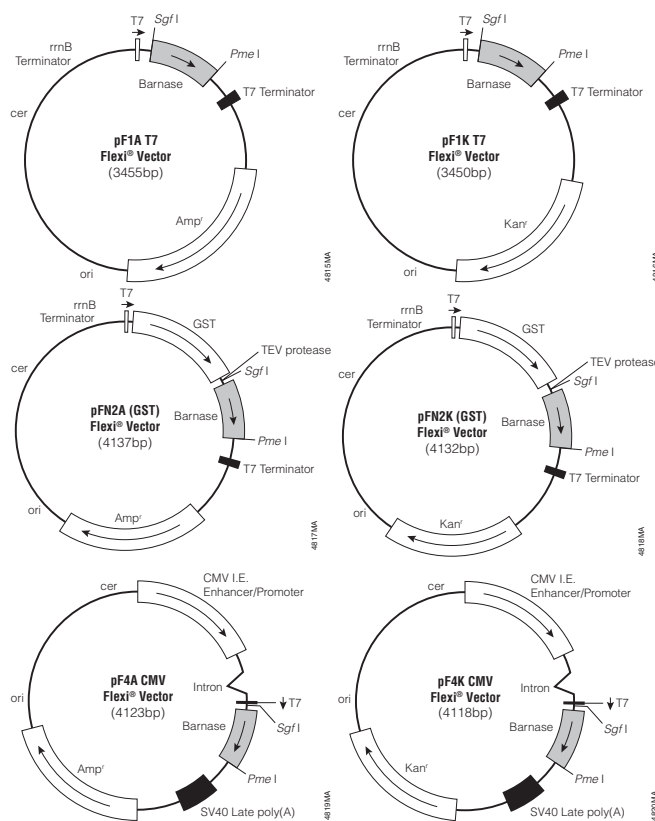


図2. Flexi® Vector

pF1AおよびpF1K T7 Flexi® Vectorは、T7 RNAポリメラーゼプロモーターを介した大腸菌およびin vitroでのタンパク質発現用にデザインされた。pFN2AおよびpFN2K (GST) Flexi® Vectorでは、タンパク質のN末端側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) が付加される。このGSTペプチドタグはTEVプロテアーゼによる切断/除去が可能。pF4A およびpF4K CMV Flexi® Vectorは、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) intermediate-earlyエンハンサー/プロモーターによる哺乳動物細胞内での恒常的なタンパク質発現が可能。全てのFlexi® Vectorには、in vitroタンパク質発現のためのT7 RNAポリメラーゼプロモーターおよびプラスミド多量体を単量体にする*E. coli* XerCDリコンビナーゼのためのcerサイト（200bp）が含まれる。

表1. オープンリーディングフレームにおける制限酵素サイトの出現頻度

生物種	ORF平均			Pme I																
	ORF数	サイズ(bp)	%GC	Sgf I	Pme I	or Sgf I	Pac I	Swa I	Asc I	BsiW I	Nru I	SnaB I	Pvu I	FspA I	Mlu I	Rsr II	Fse I	Not I	Srf I	
Homo sapiens	27,974	1503.8	52.42	0.42	0.70	1.12	0.87	2.01	2.15	3.23	3.36	3.56	3.63	3.85	4.04	4.46	4.53	5.73	6.02	
Mus musculus	26,538	1370.5	51.65	0.32	0.81	1.13	0.59	1.43	1.10	3.02	3.04	3.34	4.04	3.88	3.36	3.15	2.49	3.37	3.38	
Rattus norvegicus	22,845	1535.9	51.73	0.35	0.81	1.15	0.63	1.48	1.08	3.58	3.51	3.86	4.67	3.85	4.04	3.99	2.65	3.47	3.45	
Caenorhabditis elegans	21,124	1312.1	42.80	0.81	0.75	1.54	0.77	2.86	0.23	7.44	15.72	7.27	20.51	1.94	9.54	3.37	0.34	0.89	0.18	
Arabidopsis thaliana	28,951	1253.8	44.20	0.64	1.76	2.39	0.50	1.13	0.08	6.16	8.80	7.71	10.99	1.38	6.59	3.01	0.25	0.37	0.10	
Saccharomyces cerevisiae	5,869	1492.4	39.62	0.46	2.52	2.96	3.27	6.13	0.22	8.96	8.43	14.26	8.86	2.42	5.40	1.43	0.15	0.49	0.17	
Drosophila melanogaster	18,748	1692.7	53.82	5.03	0.71	5.66	0.62	1.86	2.02	14.90	28.02	8.81	33.37	11.33	15.45	10.65	1.43	5.51	1.27	
Escherichia coli K124255	4,255	961.5	51.85	4.82	1.67	6.35	1.55	1.29	3.62	11.66	25.10	10.20	23.43	8.04	22.91	7.97	0.09	0.45	0.94	

ヒト-オープンリーディングフレーム (ORF) 内で最も出現頻度の低い制限酵素サイト 15種類をリストアップした。出現頻度は、表示された制限酵素サイトを含むORFの割合 (%) で示した。データはRefSeq Release 6より入手した。(RefSeq Release 6: 2004年7月5日までの利用可能なゲノム、転写物、タンパク質のデータが統合されており、2,467種の生物から1,050,975個のタンパク質および配列を含む。現行のRefSeq Release は <http://ftp.ncbi.nih.gov/refseq/release/>より利用可能)

部位特異的なリコンビネーションによるベクターシステムと異なり、Flexi® Vector Systemは目的のタンパク質に複数のアミノ酸を付加する必要ありません。さらに、本システムは保存用のエントリーベクターも不要で、多くの場合、実験に最適なベクターへ直接組み込むことができます(例、哺乳動物発現あるいはN末端側GST融合ベクター)。

どのFlexi® Vector も、両端にSgf IおよびPme Iサイトを持つタンパク質コード領域のアクセプターとして機能します。全てのFlexi® Vector は致死遺伝子(パーナーゼ)が組み込まれており、目的のDNA断片と置換されます。そのため、プラスミドの増幅やタンパク質発現で一般的に使用される大腸菌株で、インサートのポジティブセレクションが行えます。Flexi® Vector に含まれる抗生物質耐性遺伝子は、ベクター間のタンパク質コード領域の移し換えを容易にします。Flexi® Vector には発現用ベクターまたはタグを付加できるベクターが揃っており、タンパク質の構造、機能あるいはタンパク質間相互作用の研究を行うために必要なネイティブタンパク質や融合タンパク質を発現させることができます(図2)。

PCRを用いたFlexi® Vector SystemによるORFの収集

Flexi® Vector System は2つのレアカッター制限酵素: Sgf IおよびPme Iを利用するシステムです。Sgf Iはヒトのオープンリーディングフレーム (ORF) 配列内の切断サイトが最も少ない制限酵素で、Pme Iは2番目に少ない制限酵素です。また、これらの酵素の切断サイトは、その他多くの生物のORFにもほとんど存在しません(表1)。アノテーションされたヒトORFのほとんど(99%)では、これら制限酵素を用いたディレクショナルクローニングに影響を与えませんでした。しかし、目的のタンパク質コード領域内のSgf IまたはPme Iサイトをスクリーニングすることを推奨します。もしタンパク質コード領域にこれらのサイトが含まれる場合、タンパク質コード領域の一部のみをクローニングすることや、タンパク質コード領域内のSgf IおよびPme Iサイトを消化から防護するためにRec Aタンパク質の使用をご検討ください(1)。また、PCRベースの部位特異的変異導入法(2, 3)により、アミノ酸配列を変えずに制限酵素サイトを変更することもできます。

Sgf IおよびPme Iサイトは、PCRによりタンパク質コード領域に付加することができます。クローニングを容易にするために、タンパク質コード領域の増幅用5' (フォワード) プライマーにはSgf Iサイトを、3' (リバース) プライマーにはPme Iを付加します(図3)。Sgf Iサイトはスタートコドンの1ベース上流に配置します。これは、融合タンパク質を作製しないFlexi® Vectorではネイティブな翻訳開始サイトからのde novoイニシエーションを起こさせ、また、N末端融合タンパク質を作製するFlexi® VectorではSgf Iサイトを翻訳させるためです。Pme IサイトはC末端側に配置すると、タンパク質コード領域の最後のアミノ酸にバリン残基が1つ付加されることになります。バリンのコードGTTはオーカーストップコドンTAAの直前に位置します。

Sgf IおよびPme Iサイトを両端に持つタンパク質コード領域を、Sgf IおよびPme Iで消化したベクターにクローニングすると、翻訳停止コドンが再生します。また、ネイティブなストップコドンの下流にPme Iサイトを配置させると、翻訳がネイティブなストップコドンで停止するため、目的のタンパク質にバリンを付加せずに翻訳させることができます。しかし、この方法を行えば、将来的にC末端にタグを融合させたタンパク質の発現が行えなくなります。C末端融合タンパク質は、タンパク質コード領域にPme Iサイトと異なる制限酵素(例: EcoICR I)で作製した平滑末端を持つ配列を融合させることにより作製することができます。プライマーデザイン用のソフトウェアは以下のサイトでご利用頂けます(www.promega.com/techserv/tools/flexivector/)。

pF1A T7 Flexi® Vectorへのウミシイタケルシフェラーゼのクローニング

哺乳動物での発現に最適化されたコドンを持つ合成ウミシイタケルシフェラーゼ(hRL)タンパク質コード領域(933bp)をPfu DNAポリメラーゼを使用してPCR増幅しました。クローニング戦略の概要は図4に示し、プロトコルの詳細についてはFlexi® Vector Systems Technical Manual #TM254でご確認頂けます。要約すると、まず、958bpのウミシイタケルシフェラーゼPCR産物を精製した後、Flexi® Enzyme Blend (Sgf IおよびPme I)で消化し、941bpの断片を生成しました。さらに、制限酵素消化により生じた短いオリゴヌクレオチドを除去するために洗浄しました。増幅後および制限酵素消化後の精製

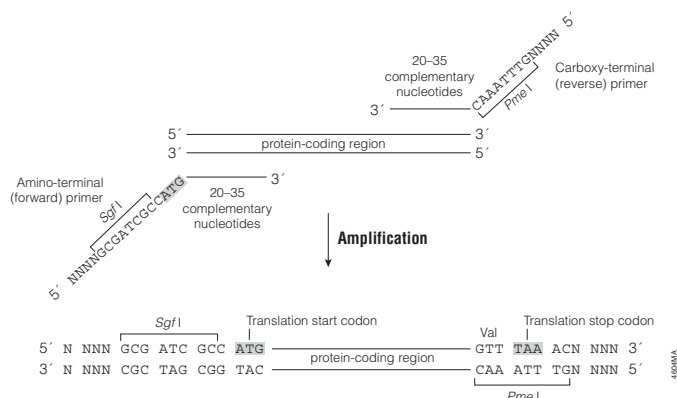


図3. *Sgf I*および*Pme I*サイトを付加するためのPCR増幅

*Sgf I*サイトはスタートコドンの上流に配置。これは、ベクターバックボーンにより、スタートサイトでのde novoイニシエーションまたはアミノ末端融合ペプチドを付加するための翻訳を可能にする。*Pme I*サイトの付加は、タンパク質コード領域の3'末端に単一のバリン-コドンをつけ加えた、翻訳停止またはC末端融合ペプチドを付加するための翻訳を可能にする(ベクターバックボーンによる)。ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を増幅するために、N末端(5')プライマー配列はGTCAGCGATCGCCATGGCTTCCAAGGTGTACGAC、C末端(3')プライマー配列をCTTCGTTTAAACCTGCTCGTTCCTCAGCACGCとした。

はWizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (カタログ番号 A9281)を用いて行いました。941bpのhRL産物は、Flexi® Enzyme Blend (*Sgf I*および*Pme I*)で消化したpF1A T7 Flexi® Vectorにライゲーションしました。ライゲーション混合液をコンピテントセルJM109 (DE3)にトランスフォームし、アンピシリンを含むLBプレートで選別しました。

選別されたクローンはウミシイタケルシフェラーゼ活性および*Sgf I*および*Pme I*サイトの有無によりスクリーニングされました。アンピシリン耐性クローンのほとんど(93.7%, 267/285)にはhRLタンパク質コード領域が含まれており、それらhRLポジティブクローンの94.5%(86/91)は、アガロースゲル電気泳動により*Sgf I*および*Pme I*の両制限酵素で消化されることを確認することができました。スクリーニングに要するコロニー数(N)を算出するために、ハイ・フィデリティーな増幅の精度を99%(4)と仮定し、目的のクローンを見つける可能性を99.9%とした。

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

要求する確率をP (= 0.999)、要求するクローンが得られる確率をf (= 増幅精度 × 挿入頻度 × 再切断頻度)とした場合

$$f = (0.990)(0.937)(0.945) = 0.8766 \text{ となり、その結果 } N = 3.3$$

そのため、目的のクローンは3~4つのコロニーをスクリーニングするだけで同定することができることになります。インサートの配列を確認するために、3つのpF1A-hRLクローンをシーケンシングした結果、変異は認められませんでした。次の実験に使用するために、クローンを1つ選びました。

高効率なFlexi® Vector間の移し換え

正しいサイズの合成ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をコードする*Sgf I*/*Pme I*消化DNA断片の存在からプラスミドDNAをスクリーニングすることによりFlexi® Vector間の移し換えの成功率を計測しました。ドナー側のhRL-Flexi® Vectorは、異なる薬剤耐性を持つアクセプター側のFlexi® Vectorとペアを作ります。ドナー側とアクセプター側のプラスミドDNAを合わせ、Flexi® Enzyme Blend (*Sgf I*および*Pme I*)で同時に消化し、ライゲーションを行います(図5)。連結された産物はJM109 (DE3)にトランスフォームし、アクセプター側のベクターを選別するために適切な薬剤を添加したLBプレートで菌体を選別します。その結果得られたクローンは、ウミシイタケ活性および*Sgf I*および*Pme I*サイトの有無を調べてスクリーニングされます。Flexi® Vector間の移し換えの成功率は89.5%~100%で、平均95.2%を示しました(表2)。平均および最低の移し換え成功率でもそれぞれN=2.3および3.1を示しました。これは、この実験で2~3個のクローがあれば充分であることを示しています。

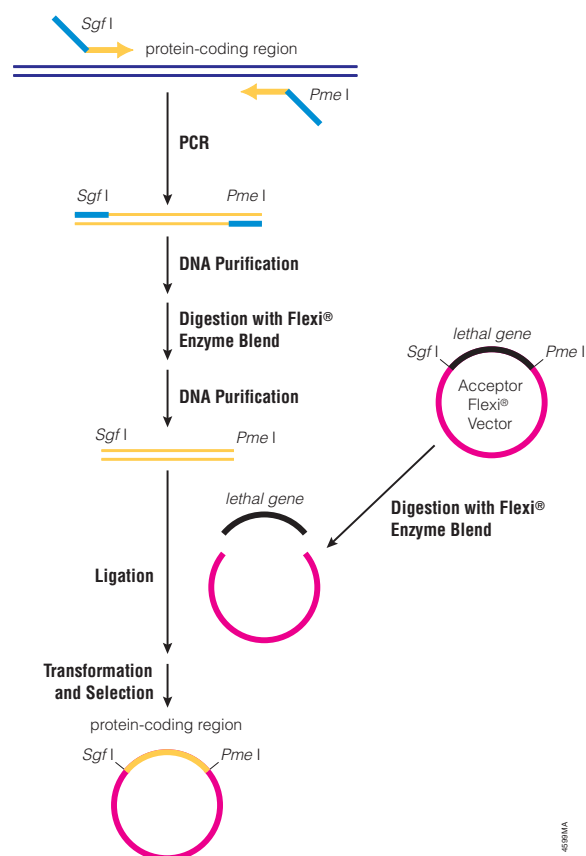


図4. Flexi® Vectorへのタンパク質コード領域のクローニング

PCRプライマーには、タンパク質コード領域の一部に*Sgf I*または*Pme I*サイトを付加。増幅後、DNAポリメラーゼやプライマーを除くためにPCR産物を精製。制限酵素処理後に生じた小さなオリゴヌクレオチドを除去するために再度DNAの精製を行う。消化したPCR産物は、同様に*Sgf I*および*Pme I*で消化したアクセプターとなるFlexi® Vectorにライゲーション。トランスフォーメーションの後、使用するアクセプターFlexi® Vectorに対応する適切な抗生物質で大腸菌を選別。

表2. Flexi® Vector間の移し換えの成功率

Flexi® Vector (ドナー側)	Flexi® Vector (アクセプター側)				
	pF1A	pF1K	pFN2A	pFN2K	pF4K
pF1A-hRL		95.3%		97.8%	89.5%
pF1K-hRL	95.6%		91.0%		96.9%
pF2A-hRL		100%		93.3%	96.8%
pF4K-hRL	96.7%		93.8%		95.8%

pF1A-hRL から pF1K Vector へ hRL 配列を移し換えるために、190個のコロニーを分析した。その他の移し換えについては、89~96個のコロニー (平均93個) を分析した。

表3. JM109 (DE3) におけるウミシイタケルシフェラーゼ活性

ベクター	発光値の平均 (RLU)*
Untransformed JM109(DE3)	100 ± 10
pF1K-hRL	42,487 ± 1,775
pFN2K-hRL	151,329 ± 17,444

* RLU factor = 1.0; delay time = 2.0 秒; read time = 2.0 秒。
結果は平均 ± 標準偏差で示した (n=4)。

JM109 (DE3) におけるウミシイタケルシフェラーゼの発現

JM109 (DE3) にトランスフォームした pF1K-hRL および pFN2K-hRL vector からのウミシイタケルシフェラーゼの発現レベルを測定しました。JM109 (DE3) は IPTG 誘導性プロモーターにより制御される T7 RNA ポリメラーゼを発現する菌株です。IPTG で誘導後、各培養菌を LB 培地で 1000 倍に希釈し、15 µl を 2X *Renilla* Luciferase Assay Lysis Buffer 15 µl と混和しました。菌体を最大限溶解するために、この混合液を 1 回 -70 °C で凍結/融解しました。*Renilla* Luciferase Assay Reagent (100 µl, カタログ番号 E2810) を添加し、EG&G plate-reading luminometer で発光を測定しました。両方のベクターはウミシイタケルシフェラーゼを発現していました (表3)。Coomassie® 染色した SDS ポリアクリルアミドゲルにより、ネイティブなタンパク質 (pF1K-hRL) および GST 融合タンパク質 (pFN2K-hRL) が正しいサイズで、しかも検出可能な分解が見られないことを示しました (データ未掲載)。このことは pF1K および pFN2K Flexi® Vector に含まれる T7 RNA ポリメラーゼプロモーターが大腸菌内でネイティブおよび GST 融合タンパク質の発現を駆動する機能を有していることが示されました。

表4 pF4K-hRL または phRL-CMV Vector をトランスフェクションした CHO 細胞のウミシイタケルシフェラーゼ活性

ベクター	発光値の平均 (RLU)*
pF4K-hRL	2,806,000 ± 377,754
phRL-CMV	3,456,183 ± 768,855

*結果は平均 ± 標準偏差で示した (n=3)。

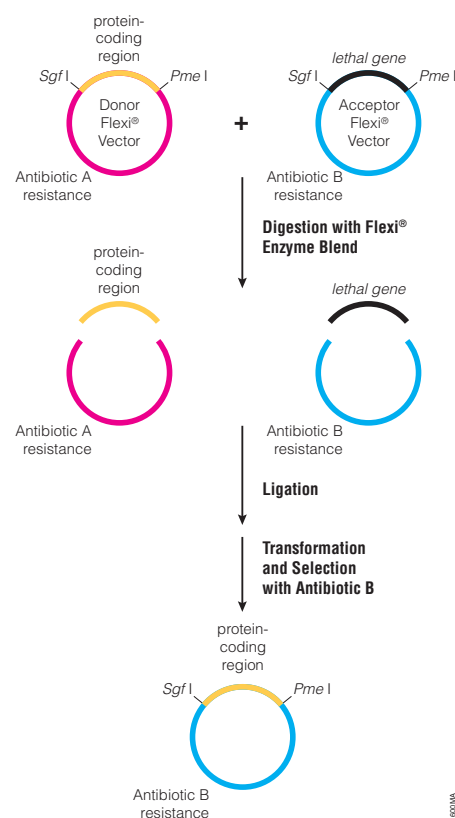


図5. Flexi® Vector間でのタンパク質コード領域の移し換え

ドナー側のタンパク質コード領域を含む Flexi® Vector と、ドナー側と異なる抗生物質耐性を持つアクセプター側 Flexi® Vector とを混和。この2種類のプラスミドを Flexi® Enzyme Blend (Sgf I および Pme I) で消化し、この混合液をライゲーションした後、大腸菌にトランスフォーメーションした。アクセプター側 Flexi® Vector に対して適切な選択培地に菌体を播種。

哺乳動物細胞におけるウミシイタケルシフェラーゼの発現

pF4K-hRL または phRL-CMV Vector (カタログ番号 E6271) を TransFast™ Transfection Reagent (カタログ番号 E2431) で CHO 細胞にトランスフェクションしました。ホタルルシフェラーゼを恒常的に発現する pGL4.13 [Luc2/SV40] Vector (カタログ番号 E6681) は、トランスフェクション効率の違いを補正するためにコトランスフェクションしました。ルシフェラーゼレベルは、Dual-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号 E2920) を用いて測定しました。ウミシイタケルシフェラーゼレベルは表4に示しました。ホタルルシフェラーゼレベルとウミシイタケルシフェラーゼレベル比は、pF4K-hRL と phRL-CMV Vector で同様の値を示しました。これは pF4 Flexi® Vector からのタンパク質発現レベルがその他の CMV 駆動発現ベクターと同程度であることを表しています。

表5 TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemによる翻訳後のウミシイタケルシフェラーゼ活性

ベクター	発光値の平均 (RLU) $\pm$ SD
No-DNA control	167.5 $\pm$ 12.0
pF1K-hRL	1,106,418 $\pm$ 155,552
pFN2K-hRL	292,691 $\pm$ 38,055
pF4K-hRL	838,061 $\pm$ 61,998
pRL-SV40 (Cat.# E2231)	190,797 $\pm$ 54,347
phRL-null (Cat.# E6231)	462,695 $\pm$ 7,525

* delay time=2.0 秒; read time = 5秒。結果は平均 $\pm$ 標準偏差で示した (pF1K-hRL, pFN2K-hRL および pF4K-hRL vector では n=9、pRL-SV40 および phRL-null Vector では n=3、no-DNA control では n=2)。

TnT® ライセートにおけるウミシイタケルシフェラーゼの発現

Flexi® Vector クローンからの合成ウミシイタケルシフェラーゼの in vitro 発現は、TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (ウサギ網状赤血球ライセート系、カタログ番号 L1170) を利用しました。プラスミド DNA (500ng) は TnT® 反応 25 μ l に添加し、30、90 分間インキュベーションしました。また、pRL-SV40 (カタログ番号 E2231) および phRL-null (カタログ番号 E6231) を用いて、2つのポジティブコントロール実験も実施しました。合成タンパク質は、FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System (カタログ番号 L5001) で標識しました。TnT® 反応液の一部 (2.5 μ l) を、Renilla Luciferase Assay Reagent 100 μ l に加え、Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems) で測光しました。その結果を表5に示しました。また、タンパク質は SDS-PAGE で分離し、合成ウミシイタケルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼ-GST 融合タンパク質が予想したサイズであることを確認しました (データ未掲載)。これらの結果は、TnT® System によるタンパク質発現に際して Flexi® Vector 上の T7 RNA ポリメラーゼプロモーターが機能することを実証していました。異なるベクターからの発現レベルはそれぞれ異なり、この要因は、融合タンパク質合成やタンパク質コード領域 5' および 3' 両端の配列の違いなどが考えられます。

結論

我々は、2つの希少な切断頻度を持つ制限酵素 (Sgf I, Pme I) をベースにしたタンパク質コード配列の新しいディレクションクロニングシステムを開発しました。Flexi® Vector System は、様々なベクター間でタンパク質コード領域を移し換えることのできる迅速、効率的で、しかも精度の高い方法を提供します。部位特異的なリコンビネーションによるベクターシステムと異なり、Flexi® Vector System は、目的のタンパク質やドメインの N、C 末端に余分なアミノ酸を付加する必要がありません。さらに、本システムは、日常的に使用する、確実な分子生物学的手法および試薬を利用します。

我々は、PCR 後にインサートであるタンパク質コード領域を Flexi® Vector に効率的にクローニングできることを示しました。インサートは、Sgf I および Pme I で消化した他方の Flexi® Vector へ 90% 以上の効率で簡単に移し換えることができます。このクローニング法によりインサートは方向性と読み枠を維持することができるため、移し換えた後にインサートを再度シーケンシングする必要がありません。我々は、Flexi® Vector が大腸菌、哺乳動物細胞、in vitro 翻訳システムで、ネイティブまたは融合タンパク質を発現することを実証しました。将来的に、新しい発現機能 (C 末端融合タンパク質発現) を持つベクターを発売する予定です。

参考文献

1. Schoenfeld, T., Harper, T. and Slater, M. (1995) *Promega Notes* **50**, 9–13.
2. Higuchi, R., Krummel, B. and Saiki, R.K. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 7351–67.
3. Ho, S.N. et al. (1989) *Gene* **77**, 51–9.
4. Slater, M. et al. (1998) *Promega Notes* **68**, 7–10.

プロトコル

- ◆ Flexi® Vector Systems Technical Manual #TM254. Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm254/tm254.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
pF1A T7 Flexi® Vector	20 μ g	C8441	42,000
pF1K T7 Flexi® Vector	20 μ g	C8451	42,000
pFN2A (GST) Flexi® Vector	20 μ g	C8461	45,000
pFN2K (GST) Flexi® Vector	20 μ g	C8471	45,000
pF4A CMV Flexi® Vector	20 μ g	C8481	45,000
pF4K CMV Flexi® Vector	20 μ g	C8491	45,000
Flexi® System, Entry/Transfer	1 system	C8640	30,000
Flexi® Vector System, Transfer	1 system	C8820	98,000
10X Flexi® Enzyme Blend (Sgf I and Pme I)	25 μ l	R1851	12,000
	100 μ l	R1852	40,000