

The Next-Generation Assay for Mammalian Protein Interactions: The CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System

次世代の哺乳動物細胞におけるタンパク質間相互作用のアッセイ： CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System

By Elaine Schenborn, Ph.D., Pete Stecha, B.S., Michael Slater, Ph.D., and Frank Fan, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

タンパク質間相互作用の解析は、タンパク質の機能を解明する上で欠くことのできない要素です。哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムは、哺乳動物細胞環境内でのタンパク質相互作用を検出および確認する上で優れた方法を提供します。次世代のCheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemは、操作性の向上および性能の拡充を目指して、いくつかの機能が追加されています。本製品のクローニングベクターはFlexi® Vector Systemに対応していますので、タンパク質コード領域を特定の機能を有する他のFlexi® Vectorに容易に移し換えることができます。レポーターベクターは、反応性が向上した改良型のホタルルシフェラーゼおよび安定した細胞株の樹立に使用できるハイグロマイシン耐性マーカーをコードしています。本稿では、タンパク質コード領域をCheckMate™/Flexi® Vectorに効率的に移し換えること、ならびに相互作用パートナーが容易にスクリーニングできることを示します。また、この哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムを用いて、安定した細胞株を樹立する方法、ならびに安定したトランスフェクト細胞株で低分子により調節されるタンパク質間相互作用の実験についても示します。

イントロダクション

膨大な塩基配列データおよびゲノム情報が多様な生物から得られています。このようなゲノム情報の多くによりコードされるタンパク質の研究は、生物学者にとって最も重要な課題です。分子遺伝学的手法が進歩すれば、研究者はゲノミクスとプロテオミクスを結ぶ橋渡しの役割を果たすことができます。目的タンパク質の構造、修飾や、細胞内および細胞外機能を解明するためには、そのタンパク質と相互作用する他のタンパク質および分子に関する情報が必要になることもあります。タンパク質間相互作用は、細胞制御機構（転写、翻訳、シグナル伝達経路、代謝など）に中心的な役割を果たします。タンパク質間相互作用の特定および確認には、いくつかの手法が使用されます。Fieldsらにより導入された酵母ツーハイブリッドシステムは、酵母遺伝学の力をスクリーニングに利用して、cDNAクローンにコードされるタンパク質の中から、相互作用パートナーのペアを容易に特定する目的で開発されました(1)。このアッセイのスケールを拡大することにより、様々な構成物により形成された複合体に含まれる多様なタンパク質間相互作用に関する情報のみならず、数百ものタンパク質がネットワーク状に相互作用する複雑な仕組みに関する情報も得られています(2,3)。

酵母ツーハイブリッドシステムは、タンパク質パートナーを最初に特定するためのスクリーニングツールとしてすでに確立されています。その後、タンパク質パートナー間の相互作用をさらに確認および試験するためには、その他のin vitroおよびin vivoでの手法が使用されます。研究対象が哺乳動物タンパク質の場合には、翻訳後修飾および細胞内分布がタンパク質の機能に影響を及ぼす可能性があるため、哺乳動物細胞環境内でタンパク質を試験することが重要です。酵母と哺乳動物細胞では、糖鎖付加、リン酸化、アシル化といった翻訳後修飾のパターンに違いがあります(4)。現在、哺乳動物細胞内でタンパク質相互作用を検討する検証のアッセイは数種類存在します。その例としては、免疫組織化学的検討による共存関係の確認や、相互作用タンパク質の

一方を“おとり (bait)”として固定化し、これに結合する細胞内タンパク質を単離し、その特性を調べるin vitro “プルダウン”アプローチなどが挙げられます。さらに、CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System (カタログ番号 C9360) などの哺乳動物細胞ベースのin vivoアッセイは、タンパク質間相互作用の特定、確認、研究に使用できるより強力な手法を提供します。

哺乳動物細胞ツーハイブリッドアッセイ

新製品CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemおよび従来製品CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System (カタログ番号 E2440) は、酵母ツーハイブリッドシステムの変法です(1, 5-7)。本システムは、目的タンパク質の一方 (“X”) をGAL4のDNA結合ドメインと融合させ、他方 (“Y”) をVP16の転写活性化ドメインと融合させるよう設計されています。“X” と “Y” が相互作用すると、GAL4のDNA結合ドメインとVP16の転写活性化ドメインが会合します。GAL4のDNA結合ドメインが、特別に設計されたレポーターベクター上のGAL4結合部位に結合すると、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写が活性化されます (図1)。ホタルルシフェラーゼ活性は、簡便、迅速かつ高感度に測定でき、タンパク質 “X” と “Y” の相互作用と相関性を示します。

哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムは、多くのプロセスに重要な役割を果たすタンパク質間相互作用の研究に使用されています (表1)。例えば、MAPK11とヒストンデアセチラーゼ-3の相互作用が哺乳動物細胞ツーハイブリッドアッセイにより検証され、TNF α による炎症シグナルカスケードと、転写活性を調節するクロマチンのヒストン修飾が結びついていることを示しました(8)。発生分化(9-11) および癌(12) に関与するタンパク質複合体の転写活性化・抑制機能も、このアッセイフォーマットにより立証されました。また、哺乳動物細胞内におけるコクサッキーウイルスタンパク質および変異タンパク質のホモ多量体化およびヘテロ多量体化も、哺乳動物細胞ツーハイブリッドアッセイを用いて研究されました(13)。

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemに追加された機能

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemは、3種類のベクターを基盤としており、これらのベクターを哺乳動物細胞にコトランスフェクションする必要があります。3種類のベクターとは、レポーターベクター（pGL4.31[*luc2P*/GAL4UAS/Hygro]）、タンパク質“X”をGAL4のDNA結合ドメインと融合させるように設計されたベクター [pFN10A (ACT) Flexi® Vector]、ならびにタンパク質“Y”をVP16の転写活性化ドメインと融合させるように設計されたベクター [pFN11A (BIND) Flexi® Vector] です。新製品CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemと従来製品CheckMate™ Systemの違いは、この3種類のベクターの性質にあります。

pGL4.31 [*luc2P*/GAL4UAS/Hygro] Vectorは従来製品のレポーターベクターと同様、ルシフェラーゼ遺伝子レポーターの発現を誘導するアデノウイルスプロモーターのminimal TATAボックス上流にGAL4結合部位（GAL4UAS）が5回繰り返し返されています。また、新製品のレポーターベクターには、哺乳動物細胞内での発現量増大、ならびにタンパク質分解配列PESTの付加による反応性の迅速化を目的として組み換えられた改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子（*luc2P*）が組み込まれています。その他の従来製品との違いは、ハイグロマイシン耐性遺伝子を付加したことです。この遺伝子は、安定したトランスフェクト細胞株の選別に長期間使用することができます。

pFN10A (ACT) Flexi® VectorおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorは、第1世代CheckMate™ Systemのベクターといくつかの機能が類似しています。pFN10A (ACT) Flexi® Vectorは、目的タンパク質のN末端側にVP16の活性化ドメインを融合させたタンパク質を発現するように設計されています。同ベクターには、SV40初期プロモーターにより駆動するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子も組み込まれているため、抗生物質G-418（Geneticin®）をトランスフェクト細胞に添加することにより、安定したトランスフェクト細胞の選別に長期間使用できます。pFN11A (BIND) Flexi® Vectorは、目的タンパク質のN末端側にGAL4のDNA結合ドメインを融合させたタンパク質を発現するように設計されています。同ベクターは、ウミシイタケルシフェラーゼも同時発現するように設計されており、同一実験内におけるサンプル間の遺伝子導入効率の違いを補正するために使用することができます。Dual-Luciferase® Reporter Assay System（カタログ番号 E1910）は、同じライセートサンプル中の2種類のルシフェラーゼ（ウミシイタケルシフェラーゼおよびホタルルシフェラーゼ）活性を簡便に測定できます。両Flexi® Vectorとも、融合の完全性を確認する手段として、融合タンパク質配列の上流にT7 RNAポリメラーゼプロモーターが組み込まれています。そのため、融合タンパク質配列は、TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System（カタログ番号 L1170）を用いてin vitro転写・翻訳することができます。

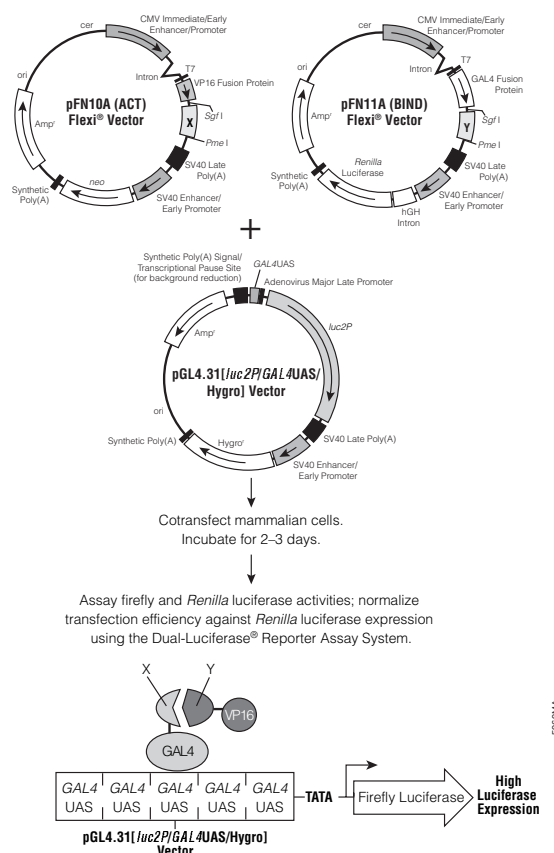


図1. CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemを用いたタンパク質間相互作用解析法の概要

pFN11A (BIND)-XおよびpFN10A (ACT)-Y Flexi® Vectorを、pGL4.31[*luc2P*/GAL4UAS/Hygro] Vectorとともに哺乳動物細胞にコトランスフェクションした。pGL4.31 Vectorは、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に位置するminimal TATAボックス上流にGAL4結合サイトの5回繰り返し返し配列が配置されている。この細胞を2～3日間インキュベーション後、溶解し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System（カタログ番号 E1910）を用いてホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの酵素活性を測定した。両タンパク質（“X”と“Y”）の相互作用により、両融合タンパク質（GAL4-XとVP16-Y）が会合し、pGL4.31 Vectorから高レベルのルシフェラーゼが発現する。

表1. 哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムを用いて研究されたタンパク質間相互作用プロセス	
研究領域	文献
Signal transduction	Cho, Y.Y. et al. (2005) <i>Cancer Res.</i> 65, 3596–603. Mahlknecht, U. et al. (2004) <i>J. Immunol.</i> 173, 3979–90.
Transcriptional regulation	Suico, M. et al. (2004) <i>J. Biol. Chem.</i> 279, 19091–8. Tsuzuki, S. et al. (2004) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 24, 6824–36. Dang, C.V. et al. (1991) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 11, 954–62.
Pathology and cancer	Deltour, S. et al. (2002) <i>Mol. Cell. Biol.</i> 22, 4890–901. Deltour, S., Guerardel, C. and Leprince, D. (1999) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 96, 14831–6.
Developmental biology	Zhou, R. et al. (2002) <i>Nucleic Acids Res.</i> 30, 3245–52. Finkel, T. et al. (1993) <i>J. Biol. Chem.</i> 268, 5–8.
Viral protein interactions and functions	Wessels, E. et al. (2005) <i>J. Virol.</i> 79, 5163–73. de Jong, A.S. et al. (2002) <i>J. General Virol.</i> 83, 783–9

pFN10A (ACT) Flexi® VectorおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorのユニークな特長は、Flexi® Vector Systemと互換性を示すことです。そのため、他の様々なFlexi® Vector間でのディレクショナルクロニングおよびタンパク質コード領域の迅速、効率的かつ高精度の移し換えが実現できます(14)。すべてのFlexi® Vectorには、タンパク質コード配列の両側に2種類のレアカッター制限酵素サイト *SgfI* および *PmeI* が組み込まれています。また、同クロニングベクターには、クロニング段階でポジティブセレクションが行えるよう、致死遺伝子（バーナーゼ）も組み込まれています。目的タンパク質のコード領域は、別のFlexi® Vectorから移し換えることができます。ただし、2種類のCheckMate™/Flexi® Vectorとも、大腸菌のアムピシリン耐性をコードしているため、ドナー側のベクターとして望ましいのはカナマイシン耐性をコードしているベクターです。もう一つの選択肢としては、*SgfI* および *PmeI* プライマーを用いてタンパク質コード配列を増幅し、増幅産物をベクターに取り込ませる方法があります。2種類のCheckMate™/Flexi® Vectorとも、タンパク質コード領域と、規定のペプチドリンカー配列を連結させたN末端側の融合パートナーがインフレームになるよう設計されています。

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemには、細胞に直接トランスフェクションできるPositive Control VectorおよびNegative Control Vectorが同梱されていますが、これらのベクターは別売もされています。Positive Control Vectorには、それぞれpBIND-Id およびpACT-MyoDが組み込まれていますので、CheckMate™レポーターベクターとともにコトランスフェクションすると、ホタルルシフェラーゼが発現します。IdとMyoDは筋細胞の分化に関与するマウスタンパク質で、強い相互作用を示すため、ルシフェラーゼシグナルの陽性対照として使用できます(15-17)。CheckMate™/Flexi® Vectorは、*SgfI* サイトと *PmeI* サイトの間にタンパク質コード配列が挿入されていない状態で哺乳動物細胞に直接導入すると、バーナーゼ遺伝子が哺乳動物細胞を死に至らしめます。したがって、陰性対照として、pFN10A (ACT) Flexi® VectorおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorの代わりにpACT VectorおよびpBIND Vectorを使用すれば、レポーターベクター共存下における相互作用のバックグラウンドレベルを評価することができます。

タンパク質相互作用パートナーのスクリーニング

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemにより、無作為に選定されたタンパク質の中から特異的な相互作用パートナーを特定できることを実証するため、“bait”タンパク質（すなわちMyoD）を固定した条件で、スクリーニングパネル（無作為に選定した他のタンパク質57種類を含む）から、“prey”タンパク質（すなわちId）をスクリーニングする実験を実施しました。スクリーニングパネルには、代表的な受容体、転写因子、キナーゼおよびプロテアーゼを含めました。タンパク質コード配列は複数の供給源から入手しました。そのうち、Origene（MD, 米）およびかずさDNA研究所（千葉、日本）から入手した配列は、Flexi® Vectorバックボーンにすでに組み込まれたものであり、IMAGEコンソーシアムおよびMGC（米国バージニア州のATCC経由、VA, 米）から入手した配列は、増幅しFlexi® Vectorにクロニングしました。ドナー側のFlexi® Vectorクローン57種類は、Flexi® Vector Systems Technical Manual #TM254に従って、それぞれアクセプター側のベクター、すなわちpFN10A (ACT) Flexi® VectorまたはpFN11A (BIND) Flexi® Vectorとともに、酵素（*SgfI* および *PmeI*）で同時に消化しました。連結された産物を細胞にトランスフォームしプレートに播種後、各コンストラクトにつき3コロニーを選別しました。その後、両制限酵素（*SgfI* および *PmeI*）で消化し、インサートのサイズが予

表2. Flexi® Vector 間でのタンパク質コード領域の効率的な移し換え

Acceptor Vector	3 of 3 Correct Clones	Correct Clones Transferred
pFN10A (ACT) Flexi® Vector	50/57 (88%)	163/171 (95%)
pFN11A (BIND) Flexi® Vector	51/57 (90%)	163/171 (95%)

想通りであるかどうかを試験しました。目的のコンストラクトはすべて、各3個のコロニーをスクリーニングするだけで得ることができました（表2参照）。全般的にみて、選別したコロニーの約95%に、正しいクローンが組み込まれたプラスミドが含まれていたことから、Flexi® Vector Systemによる効率的な移し換えが実証されました。MyoDまたはIdのタンパク質コード配列を増幅し、それぞれpFN10A (ACT) Flexi® VectorまたはpFN11A (BIND) Flexi® Vectorの *SgfI* サイトと *PmeI* サイトの間にクロニングしました。各コンストラクトにつき代表的な1クローンを選別し、トランスフェクション実験のため、プラスミドDNAを精製しました。

1種類目の実験では、96ウェルプレートで培養したNIH/3T3細胞に3種類のプラスミド、すなわち pFN10A (ACT)-MyoD、57種類のpFN11A (BIND) Flexi® Vectorクローンのうちの1種類またはId陽性対照、ならびにpGL4.31 Vectorを同時にコトランスフェクションしました。ルシフェラーゼ活性の測定結果を図2に示します。57種類のpFN11A (BIND) Flexi® Vector クローンをトランスフェクションした場合の発光シグナルは、いずれも陰性対照と同等であったことから、無作為に選定した 57 種類のタンパク質はいずれも、MyoDタンパク質と有意な相互作用を示さなかったといえます。これに対し、pFN10A (ACT)-MyoDとpFN11A (BIND)-Idの組み合わせは、バックグラウンドの100倍以上というきわめて高い発光シグナルを示したことから、これらのタンパク質間の相互作用が示唆されました。

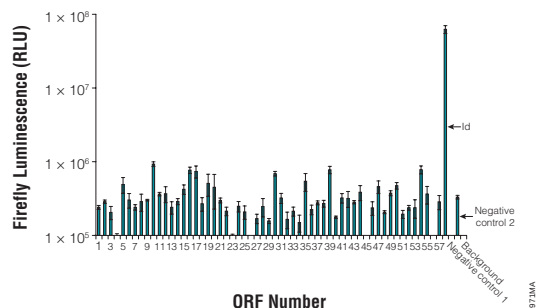


図2. baitタンパク質としてMyoDを使用した場合の特異的なタンパク質相互作用パートナーのスクリーニング

NIH/3T3細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000個播種し、一晚放置してプレートに接着させた。1ウェルにつき、DNA200ng（pGL4.31 [Luc2P/GAL4UAS/Hygro] Vector、pFN10A (ACT)-MyoDおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorを等量混和）およびTransFast™ Reagent 0.6μlを無血清培地40μlに溶解したもの添加した。1時間後、血清を含む完全培地160μlを重層し、24～48時間インキュベーションした。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光活性を、Dual-Glo™ Luciferase Reagentを用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の補正値は、各ウェルのホタルルシフェラーゼの相対発光強度（relative light unit: RLU）をウミシイタケルシフェラーゼのRLUで除することにより算出した。サンプル1～57は、pFN11A (BIND) Flexi® Vectorにクロニングしたタンパク質コード配列パネルである。サンプル58がpFN11A-Idである。対照サンプルはpACTおよびpBIND Vectorとした（バックグラウンド）。

もう1種類の実験では、pFN11A (BIND) -Idと、57種類のpFN10A (ACT) クローンまたはMyoDを同時にトランスフェクションした条件で検討を行いました。この実験でも同様に、Myoのみがbaitタンパク質Idの相互作用パートナーであることが確認されました (データ未掲載)。

低分子によるタンパク質間相互作用の調節

タンパク質間相互作用は細胞の機能に重要な役割を果たすため、創薬研究の標的とされています(18)。CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemが、低分子によるタンパク質間相互作用の調節モニタリングに使用できることを実証するため、ラパマイシンを介したFKBP-FRB相互作用をモデル系として使用しました。ラパマイシンは免疫抑制作用を有する細胞透過性の低分子量有機化合物であり、FKBP (FK506結合タンパク質12) およびFRB (FKBP-rapamycin-associated protein [FKBP-ラパマイシン付随タンパク質] のFKBP-ラパマイシン結合領域) と結合して三元複合体を形成します(19)。FKBPとFRBを哺乳動物細胞に同時発現させても、両タンパク質間にはわずかな相互作用が生じるにすぎません。しかし、ラパマイシンを添加すると、FKBPとFRBはラパマイシンとの結合を介して、接近します。この両タンパク質間および両タンパク質の融合コンストラクト間の相互作用は、ラパマイシン濃度により変化します(20)。

我々は、CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemに追加されたいくつかの機能を実証するため、このFKBP-ラパマイシン-FRBモデル系を用いました (図3)。CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemの第一の用途としては、同梱されているpGL4.31 Vectorを用いて安定した細胞株を樹立後、pFN10A (ACT) Flexi® VectorとpFN11A (BIND) Flexi® Vectorクローンをトランスフェクションすれば、タンパク質間相互作用を直接試験できます。第二の用途としては、CheckMate™/Flexi® Vector Systemを用いて、低分子によるタンパク質間相互作用の調節をモニタリングできます。このモデル系においては、ラパマイシン非添加条件では、細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性が低値で、陰性対照サンプル (pBIND VectorとpFN10A-FKBP、pFN10A-FRBまたはpACT Vectorをトランスフェクション) を用いて測定したバックグラウンドレベルと同等であったことから、FKBPタンパク質とFRBタンパク質の間に有意な相互作用が認められませんでした。しかし、ラパマイシン添加条件では、FKBPタンパク質とFRBタンパク質の間に架橋が形成され、発光シグナルが顕著に上昇しました。このシグナルは、このアッセイで予想されるFKBP融合タンパク質とFRB融合タンパク質の相互作用により得られたものです。また、ラパマイシンは、FKBPタンパク質とFRBタンパク質の間の結合を用量依存的に媒介します (データ未掲載)。

pFN10A (ACT) Flexi® VectorとpFN11A (BIND) Flexi® Vectorの融合パートナーを入れ替えても有意な影響はみられず、ラパマイシン添加条件によるFKBP-FRBペアの発光シグナルの上昇倍率は同等でした。また、MyoD:Idをトランスフェクションした陽性対照サンプルでは、高レベルのルシフェラーゼが発現し、ラパマイシンの添加により有意な変化を認めなかったことから、ラパマイシンの作用はFKBP:FRBタンパク質間相互作用に特異的なものであることが示唆されました。この実験から、CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemは、低分子による特異的タンパク質間相互作用の調節モニタリングおよびアッセイに使用できることが実証されました。

結論

CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid Systemは、哺乳動物細胞内でのタンパク質間相互作用のモニタリングおよび特性検討に使用できる優れたin vivoアプローチです。この第2世代のシステムは、従来製品CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid Systemの特長をすべて備えているばかりでなく、Flexi® Vector Systemの機能も取り入れています。Flexi® Vector Systemの機能としては、目的タンパク質のコード領域を容易にクローニングできること、発現および精製手段が異なる他のFlexi® Vectorにコントラクトを容易かつ簡便に移し換えることができることなどが挙げられます。Flexi® Vector間でタンパク質コード領域を容易かつ効率的に移し換えることができるため、多くのクローンの移し換えおよび評価を最小限の労力で行うことができます。また、哺乳動物細胞を用いた実験をスケールアップし、1種類以上の目的タンパク質を“ bait ”とし、相互作用パートナーをクローンパネルからスクリーニングすることもできます。本製品のレポーターベクターがコードするルシフェラーゼは、従来製品がもつ高い検出感度を維持しながら、哺乳動物細胞における発現量および反応速度を向上させた遺伝子組換え酵素です。最後に、新たな機能として、トランスフェクト細胞にハイグロマイシン耐性が付与されるため、安定した細胞株を単離し、目的とするACTおよびBIND融合ベクターを用いた遺伝子導入実験にも使用することができます。

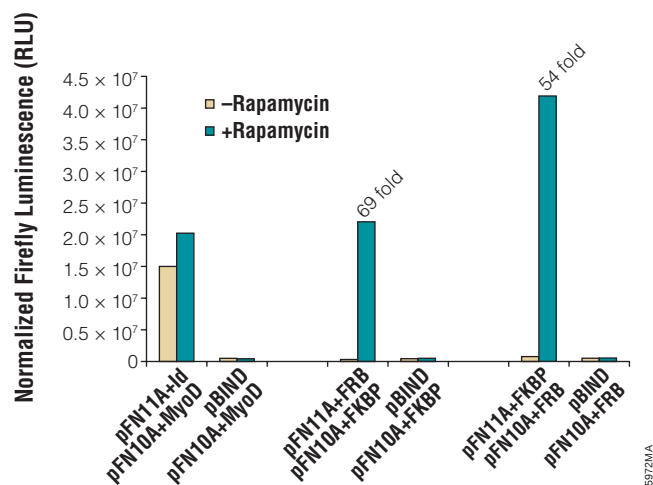


図3. 低分子によるタンパク質間相互作用の特異的調節は、レポーターベクターを用いて樹立した細胞株を用いて測定できる。

安定したHeLa pGL4.31細胞株は、HeLa細胞にpGL4.31[*luc2P*/GAL4UAS/Hygro] Vectorをトランスフェクション後、G-418 (500μg/ml) により選別し、その後、限界希釈法でクローニングすることにより樹立した。この安定した細胞株を96ウェルプレートに1ウェルあたり10,000個播種し、一晚放置してプレートに接着させた。1ウェルにつき、DNA 200ng (pFN10A (ACT) Flexi® VectorおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorを等量混和) およびTransFast™ Reagent (カタログ番号 E2431) 0.6μlを無血清培地40μlに溶解したものを添加した。1時間後、ラパマイシン (Biomolカタログ番号 A-275) 200nM添加/無添加血清を含む完全培地160μlを重層し、24~48時間インキュベーションした。ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発光活性を、Dual-Glo™ Luciferase Reagent を用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の補正値は、各ウェルのホタルルシフェラーゼの相対発光強度 (relative light unit : RLU) をウミシイタケルシフェラーゼのRLUで除することにより算出した。陽性対照サンプルは、MyoDおよびIdをそれぞれpFN10A (ACT) Flexi® VectorおよびpFN11A (BIND) Flexi® Vectorにクローニングしたものとした。陰性対照サンプルは、pACT VectorおよびpBIND Vectorとした。被験サンプルは、FKBPおよびFRBをpFN10A (ACT) Flexi® VectorまたはpFN11A (BIND) Flexi® Vectorにクローニングしたものとした。両ベクターに導入する結合パートナーを入れ替えても実験結果に差が認められないことを確認するため、両方向で検討を行った。

参考文献

1. Fields, S. and Song, O. (1989) *Nature* **340**, 245–6.
2. Fromont-Racine, M., Rain, J.C. and Legrain, P. (1997) *Nature Genet.* **16**, 277–82.
3. Li, D. *et al.* (2006) *Proteomics* **6**, 456–61.
4. Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A.G. (1991) *Biotechnology* **9**, 1067–72.
5. Dang, C.V. *et al.* (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 954–62.
6. Chien, C. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578–82.
7. Fearon, E.R. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7958–62.
8. Mahlknecht, U. *et al.* (2004) *J. Immunol.* **173**, 3979–90.
9. Deltour, S., Guerardel, C. and Leprince, D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 14831–6.
10. Zhou, R. *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, 3245–52.
11. Yu, Z., Syu, L. and Mellerick, D.M. (2005) *Nucleic Acids Res.* **33**, 1–12.
12. Deltour, S. *et al.* (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4890–901.
13. de Jong, A.S. *et al.* (2002) *J. General Virol.* **83**, 783–93.
14. Slater, M. (2006) *Promega Notes* **93**, 8–10.
15. Benezra, R. *et al.* (1990) *Cell* **61**, 49–59.
16. Weintraub, H. *et al.* (1991) *Science* **251**, 761–6.
17. Davis, R.L., Weintraub, H. and Lassar, A.B. (1987) *Cell* **51**, 987–1000.
18. Sankar, U. (2005) *Genetic Engineering News*, **25**, 30.
19. Choi, J. *et al.* (1996) *Science* **273**, 239–42.
20. Rossi, F., Charlton, C.A. and Blau, H.M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8405–10.

プロトコル

- ◆ CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System Technical Manual #TM283, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm283/tm283.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System	each	C9360	110,000
pGL4.31[Luc2P/GAL4UAS/Hygro] Vector	20 µg	C9351	58,000
CheckMate™ Positive Control Vectors	1 set	C9370	30,000
CheckMate™ Negative Control Vectors	1 set	C9380	20,000
pFN10A(ACT) Flexi® Vector	20 µg	C9331	48,000
pFN11A(BIND) Flexi® Vector	20 µg	C9341	48,000