

A Novel System for Regulated Protein Expression in Mammalian Cells

哺乳動物細胞における新規なタンパク質発現制御システム

By Jolanta Vidugiriene, Ph.D., Jim Hartnett, M.S., Elaine Schenborn, Ph.D., and Michael R. Slater, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

今回、哺乳動物細胞においてタンパク質発現を厳密にコントロールできる Regulated Mammalian Expression System についてご紹介いたします。このシステムは遺伝子の発現制御を行うためにクメリンベースの化合物を使用し、低レベルの基底発現活性から高レベルの発現活性へと誘導することができます。さらに、ノボピオシンの添加により目的遺伝子の発現を停止させることができます。転写活性化因子発現のためのユニークな自己増幅回路によりシステムを頑強にし、潜在的な宿主側の遺伝子発現に及ぼす影響を最低限に抑えることができます。

イントロダクション

哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現制御は、タンパク質の機能や産生に関する解析を行う上で重要な機能です。用量依存的な目的遺伝子の発現により、細胞内に導入した遺伝子の発現時期や発現レベルなどの条件を調節することができます。これは、より生理的条件下に近い実験システムを構築できることを意味しています。

これまでに哺乳動物での発現誘導システムを利用した多くの成功例が報告されています(1-4)。これらのシステムでは、主に誘導時の導入遺伝子発現レベル(あるいは“オン”状態)と、非誘導時の導入遺伝子のバックグラウンド発現レベル(あるいは“オフ”状態)の比率を最大限に上げることを目指していました。しかし、これらのシステムでは、迅速なオン-オフスイッチあるいは強力な活性化因子の過剰発現に起因するスケルチング(squelching)効果の低減など、発現制御システムに望まれるいくつかの機構については実現されていません。

Regulated Mammalian Expression Systemの原理

Regulated Mammalian Expression System (カタログ番号 C9470) は、特別にデザインされた2つのプラスミドがベースとなっており、哺乳動物細胞にコトランスフェクションして安定発現株を構築し、調節用の化合物 クメルマイシンおよびノボピオシンを培地に直接添加します(図1:5)。本システムでは哺乳動物でのタンパク質発現制御用にデザインされた特殊なベクター pF12 RM Flexi® Vector を使用します。このベクターは、それぞれ異なる発現機能を備えたベクター間でタンパク質コード配列を効率的、正確に移し換えることのできる Flexi® Vector System に適応します。Regulated Mammalian Expression System では、まず pF12 RM Flexi® Vector に目的のタンパク質コード配列をクローニングします。次にこのベクターを pReg neo Vector とともに哺乳動物細胞にコトランスフェクションします。細胞内に導入されると、pReg neo Vector 上の SV40 early₁ operator consensus (6 OP) および minimal CMV (mini-CMV) で構成されるハイブリッドプロモーターよりキメラ転写活性化因子を基底レベルで発現します。キメラ転写活性化因子は、1) オペレーター配列に結合する リプレッサー-DNA結合ドメイン(Rep)、2) バクテリア ジャイレースBサブユニットドメイン(GyrB) および 3) NF- κ B p65 転写活性ドメイン(AD; 図1)の3つの領域から構成されます。クメルマイシンの添加により、GyrBドメインによる転写活性化因子のホモ二量体化が起こり、リプレッサードメインの二量体化による pF12 RM Flexi® Vector (12 OP-miniCMV) のプロモーター領域内 オペレーター配列への結合を促進します。

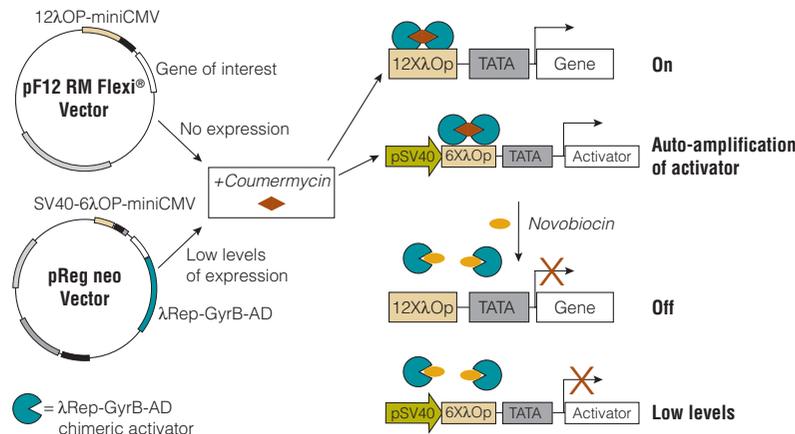


図1. クメルミン制御システムの概略図

本遺伝子発現システムはDr. Shi-Hsiang Shen研究室で開発された技術をベースとしている(5)。

p65 NF- κ B活性化ドメインがプロモーター領域に配置されると、下流域の目的遺伝子の転写が促進されます。さらに、pReg neo Vector上のハイブリットプロモーターは、正のフィードバックループが機能するようにデザインされています。転写活性化因子のホモ二量体化が引き金となり、このハイブリットプロモーター内のオペレーターコンセンサス配列に結合し、キメラ転写活性化因子自体の転写を加速させます。これにより供給される転写活性化因子の分子数が多くなり、結果として制御する目的遺伝子の発現を増進することになります。また、ノボピオシンの添加により発現を迅速に停止（スイッチオフ）することができます。ノボピオシンは、構造的にクメルマイシンの単量体型のようにふるまい、クメルマイシンと効率的に競合し、転写活性化因子の二量体化とそれに続くクメルマイシンによるタンパク質発現誘導を停止させます (6, 7)。

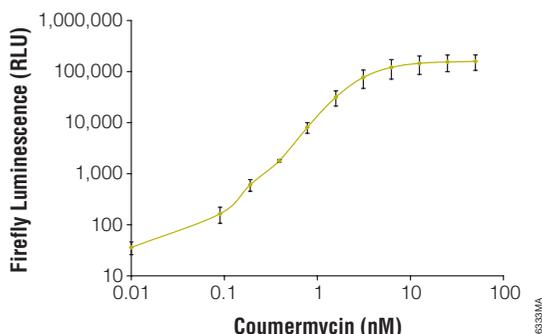


図2. HEK293安定細胞株におけるタンパク質誘導

HEK293安定細胞株は、調節ベクターおよびキメラ転写活性化因子により制御されるホタルルシフェラーゼ発現ベクターを用いて作製した。この細胞株は10,000個/ウェルで96ウェルプレートに播種した。ホタルルシフェラーゼを発現させるために、濃度が上昇するようにクメルマイシンを培地へ直接添加した。ホタルルシフェラーゼ活性は、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号E2650)を用いて誘導24時間後に測定した。各データポイントは4ウェルのリプリーケートサンプルの値。非誘導細胞サンプルで測定した相対発光ユニット (RLU) はルミノメーターのバックグラウンドと同程度。ルミノメーターのバックグラウンドの平均RLU値は、各サンプルから差し引いた。

広いダイナミックレンジを有する誘導性

Regulated Mammalian Expression Systemのパフォーマンスを示すために、我々はホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を安定に発現するHEK293細胞株を用いました。鋭敏な感度と広範なダイナミックレンジを有する生物発光アッセイが行えるホタルルシフェラーゼを目的タンパク質としました。キメラ転写活性化因子およびクメルマイシン依存的な誘導プロモーター制御下のホタルルシフェラーゼの両方を発現する安定化クローンは、Antibiotic G-418により作製、選別されました。次に、この抗生物質耐性クローンは、ルシフェラーゼアッセイによりスクリーニングされ、低い基底発現活性とクメルマイシン共存下での高い誘導率を有する要求に見合ったものを選択しました。図2ではクメルマイシンの用量増加にともなうホタルルシフェラーゼ発現を示しました。クメルマイシン非存在下ではごくわずかなルシフェラーゼ活性が観察されたのみで、これは細胞1個当たり10分子以下に相当します。

クメルマイシンによるルシフェラーゼ発現の誘導は、濃度0.1~5nMで用量依存的でした。クメルマイシンによる明らかなルシフェラーゼの発現誘導は0.1nMという低い濃度でも観察されました。さらなる発現レベルの増加はクメルマイシン濃度が最大 約5nM に達するまで認められました (約1000倍)。誘導後のルシフェラーゼ活性の変化は迅速で、数時間以内に観察することができ、最大誘導24時間後まで続きます (データ未掲載)。これらのデータは、このシステムにより厳密に制御されるタンパク質発現系を有する安定細胞株クローンの作製が可能であることを示していました。ルシフェラーゼ発現は非誘導状態では検出されず、適正かつ広範なクメルマイシン濃度で直線的なタンパク質発現を示しました。

我々はさらにHeLa、CHO、U2OS、K-562およびCOS-7を含む複数の細胞株を用いたRegulated Mammalian Expression Systemのテストを実施しました。安定細胞株は、転写活性化因子および目的遺伝子をそれぞれ発現する2つのベクターを同時にコトランスフェクションして作製し、最初に転写活性化因子のみを発現する“マスター細胞株”を作製する方法は用いませんでした。クメルマイシン誘導制御下で生物発光タンパク質を安定発現するこれらの細胞株を用いることにより、基底発現が非常に低く (検出不能なレベル)、クメルマイシン添加後に1000倍以上誘導される細胞を選び出すことができました。

図3は、クメルマイシン添加後、用量依存的に発現したDRD1-HaloTag® レセプターのTMR標識像です。この実験では、HaloTag® タンパク質がC末端で融合するようにドーパミンレセプターをpF12A RM Flexi® Vectorへクローニングしました。HaloTag® タンパク質にはHaloTag® TMR Ligandなどの特別に設計されたクロロアルカンリガンドが共有結合するため、細胞内やin vitroでHaloTag® タンパク質融合体を蛍光モニタリングすることができます(8)。ホタルルシフェラーゼの結果 (図2)と同様に、制御された発現レベルはクメルマイシン濃度に依存し、クメルマイシン濃度0.1~5nMで用量依存性を示しました。

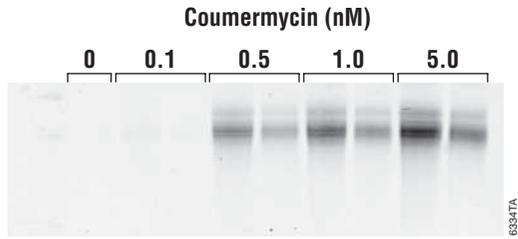


図3. CHO安定発現株におけるHaloTag® タンパク質融合ドーバミン (DRDI) 受容体の用量依存的な発現

CHO細胞にpReg neo Vectorおよび DRDI- HaloTag® 融合クローンを含むpF12A RM Flexi® Vector をコトランスフェクションした。両ベクターはトランスフェクション前にそれぞれ制限酵素 XmnIまたはBstBIで直鎖化した。安定細胞株はG-418選択により作製した。安定細胞株におけるDRDI- HaloTag® 融合受容体の発現レベルは、蛍光標識したHaloTag® TMR Ligand (カタログ番号 G8251) による細胞染色により可視化した。5nM クメルマイシンによる誘導24時間後、高レベルで融合タンパク質を発現する細胞をFACS® 分析により分離した後、培養した。FACS® 分析陽性でソーティングした細胞集団は、添加量を増加させながらクメルマイシンに暴露し、24時間後に細胞をHaloTag® TMR Ligand で染色し、標識された融合タンパク質をSDS-PAGE 分析により決定した。各クメルマイシン濃度ごとに 2×10^7 および 0.5×10^7 個に相当する細胞ライセートをゲルに添加した。レーン0は非誘導細胞。

調節化合物：“オフ”スイッチとしてのノボピオシン

Regulated Mammalian Expression System の1つのユニークな特性は、クメルマイシンにより誘導されたタンパク質発現をノボピオシン (クメルマイシンの競合阻害剤) により迅速にシャットダウンできることです。これを例証するために、我々はノボピオシン存在下または非存在下でホタルルシフェラーゼのクメルマイシン誘導発現レベルを比較しました。過剰量のノボピオシンの存在下で、クメルマイシンにより誘導されたホタルルシフェラーゼ発現を効果的に阻害することができました (99% 以上)。細胞の生存性の低下は、化合物添加24時間後でも観察されませんでした (図4)。

タンパク質発現のノボピオシンによる“スイッチ オフ”効果のカイネティクスについては、制御下のウミシイタケルシフェラーゼを発現するCHO安定細胞株で実験を行いました。ノボピオシン添加後のウミシイタケルシフェラーゼ活性の変化は時間を追って観察しました。図5ではノボピオシン未処理のサンプルでウミシイタケルシフェラーゼ活性が増加したのに対して、ノボピオシンを添加した場合にはウミシイタケルシフェラーゼ活性がその半減期 (約5.5時間) に良く相関するように減少しました。ウミシイタケルシフェラーゼ活性の迅速な低下はノボピオシン添加後4時間という短時間で検出され、12時間後には80%以上減少しました。

クメルマイシンおよびノボピオシンの両化合物は優れた薬物動態特性を有しており、in vivoでの使用に適しています。両化合物はバクテリア GyrBに高親和性で結合し ($K_D = 3.5 \times 10^{-8} M$) (9)、動物あるいは血清中における半減期は5.5~6時間であることが報告されています (10, 11)。さらに、これらの化合物はGyrBのバクテリア型に特異的で、哺乳動物細胞内には高い親和性を有する標的物は報告されていません。

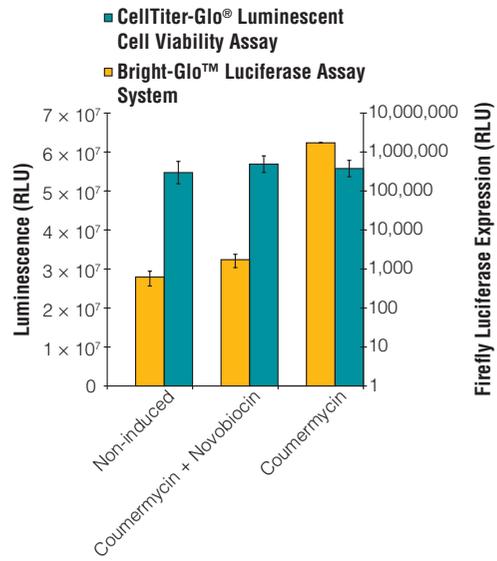


図4. クメルマイシンにより誘導されたタンパク質発現のノボピオシンによる阻害
図2で記述されたHEK293 安定株からの細胞を100,000個/ウェルで12ウェルプレートに播種した。未処理の細胞 (非誘導) 終濃度2nM クメルマイシンで処理した細胞および5nM クメルマイシン + 10 μ Mノボピオシンで処理した細胞を用いた。処理 24時間後に細胞を回収し、ホタルルシフェラーゼ発現および細胞生存性について分析した。各データポイントは4リプリケート。細胞ライセート中のホタルルシフェラーゼ活性は、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号 E 2650) を用いて測定した。細胞生存性はCellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (カタログ番号 G7570) を用いて決定した。

一過性発現におけるパフォーマンス

一過性のトランスフェクション実験では、Regulated Mammalian Expression Systemのパフォーマンスは、目的タンパク質をコードする導入遺伝子上流のminimal CMVプロモーターの基底活性および転写活性化タンパク質発現を駆動するSV40ハイブリットプロモーターの活性に依存します。転写活性化タンパク質が高レベルに存在すると、クメルマイシン非存在下でもホモ二量体化が起こりえます。この現象は、目的遺伝子のコード配列の発現増加に繋がります。転写活性化因子と導入遺伝子を発現させるプロモーターの基底活性は、細胞のタイプやトランスフェクション効率によって異なります。そのため、一過性の発現実験においては活性化のための転写活性化因子の発現と制御プロモーターの可用性の間にある相乗的な特性を考慮することが重要です。

我々は、生物発光レポーターを利用していくつかの細胞株における一過性発現条件下でのタンパク質発現制御について調べました。Minimal CMV プロモーターの基底活性はHeLaおよびCOS-7細胞で低く、バックグラウンドの1.5~2倍程度でした (図6)。これに対してHEK293細胞でのminimal CMVプロモーターからの基底活性は10倍以上高いものでした。しかし、トランスフェクションするプラスミドDNA総量を1/10に抑えることでHEK293細胞での基底活性はバックグラウンドレベル付近まで低下しました。

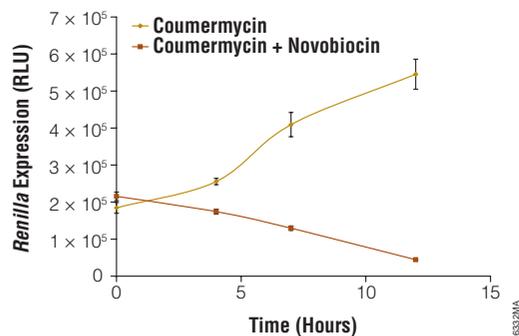


図5. ノボビオシンによる迅速なクメルマイシン誘導タンパク質発現の停止

ウミシイタケルシフェラーゼの発現制御可能なCHO安定細胞株を96ウェルプレートに播種した。EnduRen™ Live Cell Substrate (カタログ番号 E6481) およびクメルマイシン (終濃度5nM) を培地に添加した。細胞播種 14時間後 (0時点) にウミシイタケルシフェラーゼを測定した。その後10 μ M ノボビオシンを選別したウェルに添加した。ウミシイタケルシフェラーゼ発現レベルの変化を調べるために図示された時点でプレート全体を測定した。各データポイントは12リプリケート。

まとめ

新しいRegulated Mammalian Expression System には、哺乳動物細胞におけるタンパク質発現をコントロールするために必須の特性が組み込まれています。これらの特性は、用量依存性であり、厳密、特異的ですがも迅速な“オン”-“オフ”制御、高いタンパク質発現誘導率、毒性の無い調節化合物などが挙げられます。ベクターのエレメントは、低い基底レベルのタンパク質発現とクメルマイシンによる誘導後の高い発現レベルを可能にするために設計されています。タンパク質発現レベルは0.1~5nMのクメルマイシン濃度幅で直接的に相関します。また、ノボビオシンにより誘導されたタンパク質の発現を迅速にシャットダウンできるため、哺乳動物細胞におけるタンパク質機能解析で次段階のコントロールが可能になります。両化合物は、本システムで使用する濃度においては相対的に無毒性であり、in vivoでのアプリケーションにも良く適しています。

システムに含まれるpReg neo Vector には、キメラ転写活性化因子および安定株選別のためのネオマイシンホスホトランスフェラーゼがコードされています。pF12 RM Flexi® Vectorでは、アンピシリンまたはカナマイシン耐性の各ベクターをご利用いただけます。また、pF12 RM Flexi® Vectorは、異なるタンパク質発現システムや他のアプリケーションを提供する他のFlexi® Vector に目的のタンパク質コード領域を移し換えることのできる柔軟性を兼ね備えています。このシステムは一過性の発現実験にも使用することができますが、高度なタンパク質発現コントロールや誘導は安定発現細胞クローンを作製した場合に行うことができます。

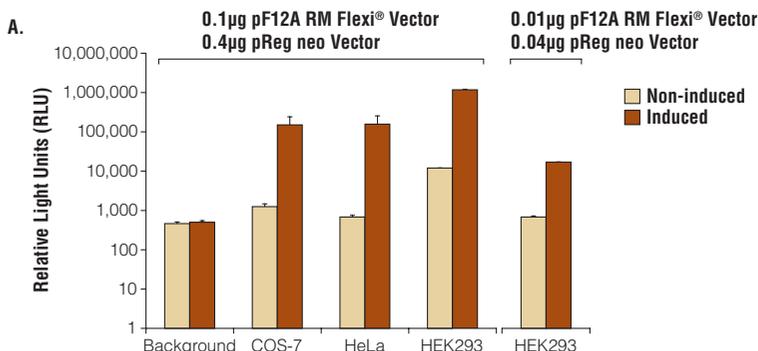


図6. トランスフェクションに使用するpF12A Flexi® およびpReg neo Vector総量の影響

COS-7、HeLa、HEK293 の各細胞を10⁴個/ウェルで12ウェルプレートに播種し、総量1 μ g のDNAをトランスフェクションした。トランスフェクションに用いたDNAは、比率を1:4にしたホタルルシフェラーゼコード配列を含むpF12A RM Flexi® Vector (10%サンプル中に0.1 μ gまたは0.01 μ g)、pReg neo Vector (10%サンプル中に0.4 μ gまたは0.04 μ g) および0.2 μ gのpRL-SV40 DNA。最終DNA量が1 μ gになるようにキャリアDNAを加えた。トランスフェクション3時間後にホタルルシフェラーゼ発現を誘導するためにクメルマイシン (終濃度 5nM) を添加 (誘導) した。また、基底活性をモニタリングするためのコントロールウェルとしてクメルマイシン無添加のもの (非誘導) を準備した。クメルマイシン添加24時間後、回収した細胞はDual-Glo™ Luciferase Assay System (カタログ番号 E2980) でホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。バックグラウンドは非トランスフェクション細胞で測定した。ホタルルシフェラーゼの発現は、内部トランスフェクション補正因子としてのウミシイタケルシフェラーゼで標準化し、相対発光ユニット (RLU) で表示した。

参考文献

- No, D., Yao, T.P., and Evans, R.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3346–51.
- Ho, S.N. *et al.* (1996) *Nature* **382**, 822–6.
- Wang, Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8180–4.
- Gossen, M. *et al.* (1995) *Science* **268**, 1766–9.
- Zhao, H.F. *et al.* (2003) *Hum. Gene Therapy* **14**, 1619–29.
- Gilbert, E.J. and Maxwell, A. (1994) *Mol. Microbiol.* **12**, 365–73.
- Ali, J.A. *et al.* (1993) *Biochemistry* **32**, 2717–24.
- Los, G. *et al.* (2005) *Promega Notes* **89**, 2–6.
- Gormley, N.A. *et al.* (1996) *Biochem.* **35**, 5083–92.
- Godfrey, J.C. and Price, K.E. (1972) *Adv. Appl. Microbiol.* **15**, 231–96.
- Eder, J.P. *et al.* (1991) *Cancer Res.* **51**, 510–13.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Regulated Mammalian Expression System	1 system	C9470	110,000
pF12A RM Flexi® Vector	20 μ g	C9431	48,000
pF12K RM Flexi® Vector	20 μ g	C9441	48,000
pReg neo Vector	20 μ g	C9421	38,000
Coumestrolin A1	5 mg	C9451	10,000
Novobiocin Sodium Salt	1 g	C9461	5,000

営利組織で使用される場合は弊社までご連絡ください。