

In-Fusion[®]クローニングによる簡単な遺伝子設計

本稿で述べられている研究はB. Zhu, G. Cai, E.O. Hallおよび G.J. Freemanがハーバード大学医学部¹⁾で行った研究で、*BioTechniques* (1)に掲載されたものである。

本稿はそれから引用したものである。

1) Dana-Farber Cancer Institute, Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

In-Fusion[®] は、末端に15 bpのオーバーラップをもつ任意の2つのDNA断片を連結することができ、15 bpのオーバーラップ領域での相同組換えと同じ結果をもたらす。15 bpのオーバーラップは、2つのDNA断片のPCR増幅に用いるフォワードプライマーとリバースプライマーに組み込むことで作製できる。In-Fusionによって制限酵素消化プラスミドに1つのDNA断片を挿入できることが最初に報告されていたが、In-Fusionによって4つのDNA断片を1回の反応で効率よく連結できることを我々は見出した。我々は、この方法を用いて、シームレスな融合タンパク質および容易に相互交換可能なセグメントを含むモジュラーベクターを作製した。In-Fusionに用いるDNAモジュールを、配列やサイズに関係なく、制限酵素消化をせずに同時に連結することができるため、新たなクローニングの可能性が開けた。

DNAコンストラクトは、典型的には、相補的な制限酵素サイトを末端にもつ2つの異なる制限酵素消化DNA断片をライゲーションして作製する。クローニングの選択肢は、ベクターおよび目的遺伝子の中に利用可能なユニーク制限酵素サイトがないことによってしばしば制限される。それとは対照的に、In-Fusion技術では、制限酵素消化をする必要がなく、15 bpの同じ配列を末端に共有する2つのDNA断片を連結することができる。15 bpのオーバーラップは、DNA断片のPCR増幅に用いるプライマーに組み込むことができる。またDNA断片は、PCRまたはプラスミドの制限酵素消化（生成する末端が突出末端でも平滑末端でも構わない）によって作製することができる。

In-Fusionのメカニズムはリガーゼ依存性で、ポックスウイルスDNAポリメラーゼの特殊な性質を利用している（2-4）。Mg²⁺および低濃度のdNTPの存在下で、同じ末端をもつ直鎖状二本鎖DNAsとインキュベートすると、本酵素の3'-5'校正活性によって3'末端からヌクレオチドが除去されていく。これにより、DNA断片上に相補的な領域が現れ、塩基対合によってDNA断片同士が自発的にアニールする。その結果、ニック、1~5塩基のギャップまたは短いオーバーハングと隣接するハイブリッド領域を含む連結分子が生成する。本酵素は二本鎖末端よりもニックまたはギャップの入ったDNA末端に対して親和性が弱いいため、アニールした構造は比較的長く存在する。このアニールしたDNAを大腸菌に導入すると、一本鎖のギャップが修復される。本研究では、In-Fusionの末端連結能を利用して2つだけではなく4つのDNA断片を1回の反応で連結し、シームレスな融合タンパク質およびモジュラー発現ベクターの作製を試みた。

コンストラクトのデザイン

マウス(m) PD-L2分子の細胞外ドメイン（5）、マウス免疫グロブリンG2a (IgG2a) のFc領域（5）、およびマウスIgAのテールピース（6, 7）をコードするDNA配列セグメントを、Sequencher[™] プログラム（Gene Codes社）を用いて哺乳類発現ベクターに*in silico* でアッセンブルした。目的はマウス免疫グロブリン融合タンパク質12量体（6, 7）を創製することであった。コンストラクト内の隣接するセグメントとオーバーラップする15 bpの配列と20~30 bpのセグメント特異的配列を含むセンスおよびアンチセンスPCRプライマーを設計した（図1および表1参照）。In-Fusion酵素はクローニング反応の過程で余分なヌクレオチドを付加することがないため、複数のDNA断片がシームレスに連結された。

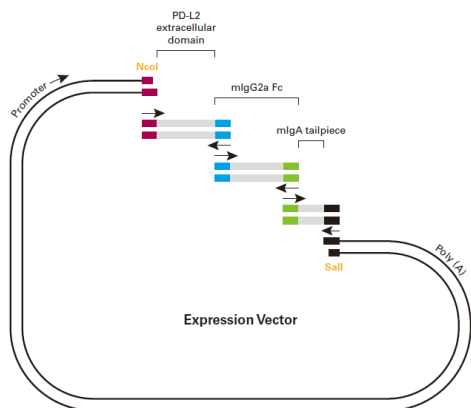


図 1. 4つのDNA断片を用いたIn-Fusion反応による3ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質のシームレスな構築
隣接するセグメントとオーバーラップする15 bpの配列と20~30 bpのセグメント特異的配列を含むPCRプライマーを用いて各セグメントを複製した。着色した領域は15 bpのオーバーラップ領域を示す。矢印はPCRプライマーを示す。リガーゼフリーのIn-Fusion反応で、それらのセグメントをNcoI-SalI消化発現ベクターに連結した。

表 1. PD-L2 細胞外ドメイン、IgG2a Fc領域、およびIgA テールピースのPCR増幅に用いるプライマー
NcoI消化発現ベクターとIgG2a Fc領域にオーバーラップする15 bp領域を含むPD-L2 細胞外ドメイン、639 bp PCR産物
センスプライマー (下線はNcoIサイトを示す) 5'-TTCAAATCCACCATG <u>G</u> GAGACAGACACTCTGCTAT-3'
アンチセンスプライマー 5'-CTTGATTGTGGGCCCTCTGGGGACTTTGGGTTCCATCCGA-3'
IgG2a Fc領域、678 bp PCR産物
センスプライマー 5'-GGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTC-3'
アンチセンスプライマー 5'-CCGGGAGAAGCTCTTAGTC-3'
IgG2a Fc領域とSalI消化発現ベクターにオーバーラップする15 bp領域を含むIgA テールピース、100 bp PCR産物
センスプライマー 5'-AAGAGCTTCTCCCGGCTGTCGGGTAAACCCACCAATGTCAG-3'
アンチセンスプライマー (下線はSalIサイトを示す) 5'-AGTAACGTTAGTCGACTCAGTAGCAGATGCCATCTC-3'

* : 図 1 と照合できるようにオーバーラップ配列には対応する色を着けている。

ここに示すすべてのDNA断片を、クロンテックのIn-Fusion PCR Cloning Kit User Manual (PT3650-1; www.clontech.com参照) の説明に従って設計したオーバーラッププライマーを用いて、適切な鋳型からPCR増幅した。クロンテックはプライマー設計用のオンラインツールを提供している (www.clontech.com/support/tools.asp)。PCRで調製した断片を高フィデリティーのホットスタートポリメラーゼで増幅した後、ゲル精製し、吸光度測定により定量した。

本研究で骨格として使用するベクターをNcoIおよびSalIで制限酵素消化した。しかし、高フィデリティーのDNAポリメラーゼを用いたPCRでも、15 bpオーバーハングをもつベクター骨格を調製することもできる(データ省略)。

クロンテックのIn-Fusion PCR Cloning Kit User Manual (PT3650-1)に従って、In-Fusion反応をセットアップした。25~100 ngのベクターと各DNAセグメントを1:2のモル比で10 µlの水の中で混合し、In-Fusion Dry-Down反応ミックスを含むチューブに加えた。インキュベーション後、In-Fusion反応液をTEで希釈し、In-Fusion User Manualに従って大腸菌コンピテントセルに化学的に導入した。形質転換した大腸菌からDNAを少量調製(ミニプレップ)し、制限酵素消化およびシーケンシングによりDNA配列の特性を調べた。

マルチ断片クローニングの結果

標準的なクローニング法の主な制約は、DNA末端の連結に用いられる制限酵素サイトにコードされている不必要なアミノ酸が付加されてしまうことである。このことは、融合タンパク質や組換え抗体を作製する場合に特に不都合である。不必要なアミノ酸によって構造が乱され、発現が減少したり、抗原性が生まれたりする可能性があるからである。我々は、PD-L2 細胞外ドメイン、IgG2a Fcドメイン、IgA テールピース、およびDHFR選択カセットを含む発現ベクターをコードする4つのDNA断片を連結することにより、シームレスなマウス

PD-L2-IgG2a Fc-IgAテールピース融合タンパク質を作製した。NcoIおよびSallサイトはベクターの直鎖化に利用されたため、直鎖化されたベクター骨格の末端に相補的な15 bpのオーバーハングの部分として、5'および3'セグメント断片に取り込まれた(表1参照)。

融合タンパク質ドメインの間には制限酵素サイトは取り込まれなかった。In-Fusion技術を用いる場合、インサートの制限酵素消化を行う必要がないため、増幅断片内にNcoIおよびSallサイトが存在してもクローニングの妨げになることはない。In-Fusion反応の後、4つのコロニーからDNAを少量調製(ミニプレップ)し、NcoIおよびSall制限酵素で消化した。4つのすべてのミニプレップに4つのDNA断片が含まれていることが明らかになった(データ省略)。次に2つのクローンに対してシーケンシングを行ったところ、PD-L2-IgG2a Fc-IgAテールピース融合体を含む1.5 kbのコード領域にエラーが存在しないことが明らかになった(表2)。

表2. 4つの断片のIn-Fusion反応の形質転換効率					
PD-L2 細胞外ドメイン	IgG2a Fcドメイン	IgA テールピース	ベクター	形質転換体の総数	エラーなし/シーケンスしたコロニー数
693 bp	678 bp	100 bp	11,365 bp	120	2/2
6.1 ng	6.0 ng	0.9 ng	50 ng		

次に、このプラスミドをMluIで消化して直鎖化し、DHFR欠損CHO細胞にトランスフェクトし、DHFR発現細胞を選択した。タンパク質を発現させて精製したところ、12 mg/Lの収量で65 kDaの融合タンパク質が得られた(図2)。このデータは、In-Fusion技術を用いることによって3つ以上のDNA断片をシームレスに連結し、可溶性の組換え抗体多量体を高発現できることを示している。

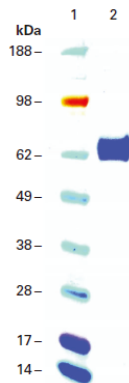


図2. 組換え抗体タンパク質の生産

1 µgの精製タンパク質を還元条件下でSDS-PAGEを用いて分析し、クマシーブルーで染色した。レーン1: タンパク質の分子量マーカー(サイズをkDaで示す)。レーン2: マウスPD-L2-IgG2a Fc-IgAテールピース融合タンパク質。

考察

1つよりも2つの制限酵素でプラスミドを消化して挿入部位を作製した方がバックグラウンド・コロニーが少ないことが認められた。ベクターのホスファターゼ処理は必要なく、また処理をするとクローニング効率が減少した。複数の断片のIn-Fusionクローニングをうまく行うための最も重要なファクターは、ベクターおよびDNAセグメントの正確な定量とそれらの比率であった。17のコンストラクトを作製し、そのうち38クローンについてシーケンシングを行ったところ、28クローンでエラーが見つからなかった。目的の配列を得るには、3クローンよりも多い数のクローンをシーケンシングする必要はなかった。不適切なクローンで最もよく見られたエラーは、ジャンクション領域での1 bpまたは2 bpの欠失であった。これは、15 bpのオーバーラップ領域が完全に一本鎖に変換されなかったことによる修復反応のエラーに起因するものであると思われる。

マルチ断片のIn-Fusionクローニングには高効率(1 10^9 cfu/µg)の大腸菌コンピテントセルを使用するのが望ましい。In-Fusion反応で用いるDNA断片の数が多いほど形質転換体の数が減少するからである。2、3、4断片のIn-Fusion反応では、形質転換反応液(全量 0.3 ml)の0.1 mlをプレートに播いた時に得られたコロニー数の平均はそれぞれ671、539、56であった。我々の経験では、In-Fusion反応の効率はDNAセグメントの長さによって左右されることはない。83 bp~12 kbの種々の長さのDNAセグメントを試してみたが、効率にはほとんど差が見られなかった。

主な用途

In-Fusion反応を利用したマルチ断片クローニングにより、モジュラーベクターの構築（図3）や変異、合成遺伝子の導入が容易になる（1）。これは、無限の組合せで容易に連結させることができるIn-Fusion-Ready DNAモジュール（In-Fusion反応に用いるDNAセグメント）のツールボックスを開発することにより達成できる。

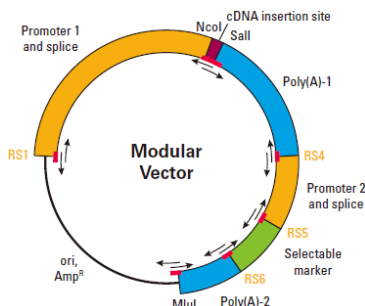


図3. モジュラーベクター

赤のバーは、各セグメントのジャンクション（接合点）を示す。セグメントの増幅に用いるプライマーを介して、種々のユニーク制限酵素サイト（RS）をジャンクションに導入することができる。隣接するセグメントとオーバーラップする15 bpの配列を含むプライマーを用いて各セグメントを増幅する。In-Fusion反応によりDNAセグメントが連結される。そのため、制限酵素消化は不要である。NcoIは翻訳開始サイトを含んでいるので有用である。MluIは、トランスフェクションの前のベクターの直鎖化に便利なサイトである。

融合タンパク質のパートナー[Fc、緑色蛍光タンパク質（AcGFP1）など]や、エピトープ・タグ、リンカー、プロモーター、ポリAサイト、選択マーカー、複製起点などをフラグメントとして利用できる。相補的な15 bp オーバーハングを含むように、隣接するモジュールを設計する。これにより、制限酵素サイトとは無関係に4つまでのモジュールを同時にIn-Fusionクローニングすることができる。必要であれば、モジュールの増幅に用いるプライマーにユニーク制限酵素サイトを組み込むことができる。制限酵素サイト、翻訳開始サイト、リンカーまたはエピトープ・タグをプライマー配列に組み込むことにより、モジュラーベクターにさらなる特長を付加することができる。In-Fusion反応により4つまでの断片を同時に連結できるため、個々のコンポーネントの制限酵素による切り出し、および（または）In-Fusion反応による置換を行うことができるモジュラーベクターを創製することができる。

In-Fusion反応を用いることにより複数の断片をクローニングできることが本研究で示された。制限酵素消化をすることなく、複数のPCR増幅産物を直鎖状のベクター骨格に1ステップ反応で同時にクローニングできるという事実は、新たなクローニングの可能性を開くものである。2断片のIn-Fusion反応は、すでにハイスループットクローニングに用いられている（4, 8）。In-Fusionマルチ断片クローニングのハイスループットアプリケーションへの適用は、In-Fusion技術の可能性をさらに広げる次のステップである。

参考文献

1. Zhu, B. et al. (2007) *BioTechniques* **43**(3):354–359.
2. Evans, D.H. et al. (2003) In patent application 20030162265, USA, pp. 1–52.
3. Hamilton, M.D. et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**(1):143–151.
4. Marsischky, G. & LaBaer, J. (2004) *Genome Res.* **14**(10B):2020–2028.
5. Latchman, Y. et al. (2001) *Nature Immunol.* **2**(3):261–268.
6. Hirano, N. et al. (2006) *Blood.* **107**(4):1528–1536.
7. Arthos, J. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(13):11456–11464.
8. Berrow, N.S. et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**(6):e45.

製品ガイド

- ▶ In-Fusion® HDクローニングキット (5 x プレミックスタイプ)
- ▶ In-Fusion® HD EcoDryクローニングキット (凍結乾燥品)
- ▶ Stellar コンピテントセル