

In-Fusion[®] 技術を用いたシグナル伝達系タンパク質ドメイン発現 コンストラクトの正確なハイスルーブット・クローニング

N.S. Berrow¹⁾ , L. Bird, D. Alderton, S. Sainsbury, J. Nettleship, R. Assenberg, N. Rahman, and R.J. Owens

The Oxford Protein Production Facility, Division of Structural Biology, Henry Wellcome Building for Genomic Medicine, University of Oxford, Roosevelt Drive, Oxford, OX3 7BN UK

1) Present address: Protein Expression Unit, Institute for Research in Biomedicine, Parc Científic de Barcelona, Carrer de Josep Samitier, 1-5 08028 Barcelona, Spain

本稿は*Nucleic Acids Research* (1)に発表された論文の一部を引用したものである。

組換えタンパク質を結晶化に適した可溶性の形で得ることは、ハイスルーブット (HTP) な構造生物学のネックとなっている。Oxford Protein Production Facility (オックスフォードタンパク質生産施設) は、クロンテックのIn-Fusionクローニングシステムを用いて、その目的に使用するpOPINベクターセットを作製した。In-Fusion酵素と組み合わせたこのカスタムベクターセットは、ハイスルーブットな構造生物学研究に直ちに利用できる、融通性の高い正確な (すなわち、翻訳されたタンパク質に不要な残基が含まれない) 1ステップクローニングプロセスを提供する。In-Fusionシステムを我々のHTPパイプラインに取り込むことにより、パラレルなベクター構築、発現スクリーニング、および精製が可能になり、タンパク質生産プロセスが促進された。

はじめに

Oxford Protein Production Facility (OPPF)はOxford Module Consortium (OMC)と関係する構造プロテオミクス研究施設で、生物医学に関連するタンパク質の高品質な構造データの作成に焦点を当てている。そのようなタンパク質の例として、ヒトに感染するウイルスおよび細菌病原体のタンパク質やヒトの疾病に関連する他のタンパク質などが挙げられる。我々は最近、多数のコンストラクトのクローニングや発現をパラレルに行うハイスルーブット・パイプラインを開発した。まず我々は、クローニングおよびベクター構築に必要な以下の基準を定めた。

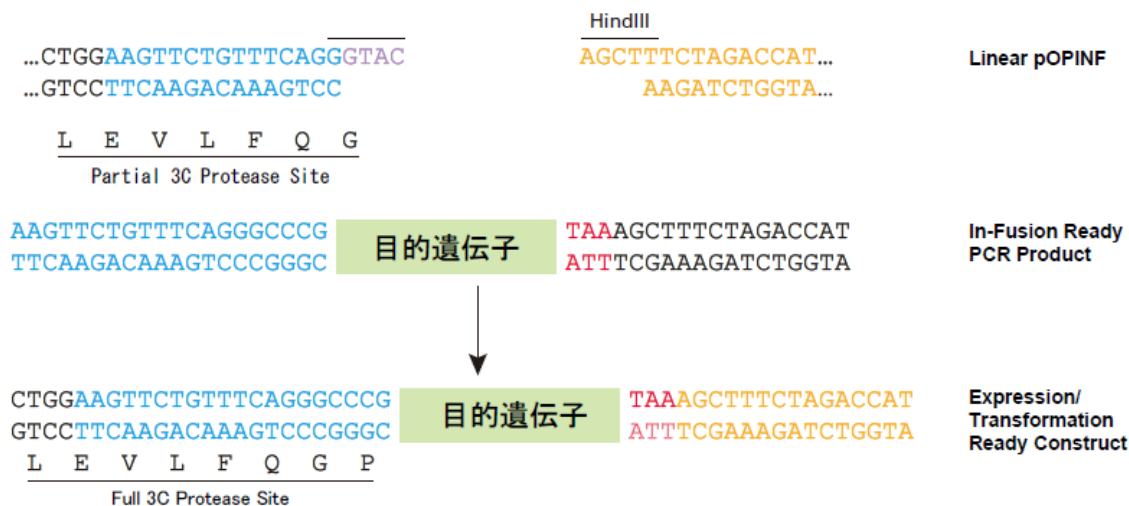
1. **HTPに対応** : 1つのPCR産物を、異なる融合パートナーを含む複数のベクターに挿入できる。
2. **迅速な1ステップ反応** : 効率よく安価にベクターをパラレルに構築できる。
3. **シームレス** : 別のベクターを使わずに、あるいは発現タンパク質に制限酵素サイト由来の余分なアミノ酸が付加されない形で、正確にコンストラクトを作製できる。
4. **高い融通性** : 配列に依存しない挿入。
5. **最適化が不要** : 広範囲のインサートサイズおよび濃度範囲で有効である。すなわち、PCR産物の濃度のノーマライゼーションが不要である。
6. **宿主を選ばない** : コンストラクトは多数の宿主でタンパク質を発現できる必要がある。
7. **HTP精製が可能** : タンパク質を共通のアフィニティー精製“タグ”と融合した形で発現させる。必要であれば、結晶化の前に制限酵素消化によってタグを除去できる。

既存のクローニングシステムには限界があるため、我々は上記の基準を満たす、In-Fusion酵素の特長を利用したHTPクローニング・発現パイプラインを開発することにした。我々は種々のソースや多数のプロジェクト (本稿で述べる細胞シグナル伝達系のドメインの発現もこれに含まれる) に由来する多様な配列のクローニング、発現および精製に適した作業工程にIn-Fusionを取り入れた。

In-Fusion Ready pOPINセットの構築

我々はまずタンパク質またはタンパク質ドメインを発現させるための融通性のあるベクターセットを作製した。これらには精製目的のためのタグを組み込み、またタグを除去するためのプロテアーゼ切断サイト（例えば、3Cプロテアーゼ認識サイト；2）をIn-Fusion反応の相同領域として組み込んだ（図1）。哺乳類またはウイルスの大きなマルチドメインタンパク質の大腸菌での発現には、標的タンパク質の収量の低さ、あるいはミスフォールディングという問題がある。これらのベクターはタンパク質を5'または3'タグ（種々の可溶性発現タグや精製用タグなど）が付いた形で発現できる。切断サイトにより、結晶化前にタグを除去することができる。このことは、天然のタンパク質構造を解析するには重要である。15 bpの相同領域に切断サイトをコードすることにより、外来の組換え部位またはベクター由来のアミノ酸を含まない、あるいはそれらが最小限のタンパク質を容易に生産できる。

さらに、ここで述べるベクターは、1つのコンストラクトを大腸菌、哺乳類または昆虫宿主でのタンパク質発現に使えるように、複数のプロモーターシステムを用いている。また、効率的に直鎖化されなかったベクターと組換えコンストラクトを標準的な青/白スクリーニングによって識別できるように、直鎖化部位の間に*lacZ*インサートを挿入している。これらのベクターはpOPINベクター（plasmids for **OPPF In-Fusion**; 1）と命名された。詳細はOPPFウェブサイト（www.oppf.ox.ac.uk）に掲載されている。



青は5' In-Fusionサイトを示す。
琥珀色は3' In-Fusionサイトを示す。
赤は目的遺伝子の3'末端に付加された翻訳停止コドンを示す。
緑は目的遺伝子を示す。
紫はIn-Fusion酵素の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性によって除去される塩基を示す。

図1. In-Fusionクローニングではシームレスな融合タンパク質が生成する

In-Fusionに用いる前に、pOPINFをKpnIおよびHindIIIで消化した。3Cプロテアーゼサイトを5' In-Fusionサイトとして用いているため、“シームレス”な融合タンパクが生成する。融合タンパク質を3Cプロテアーゼで切断すると、切断されたタンパク質のN末端にグリシン残基とプロリン残基が残る。

pOPINベクターシリーズ構築のベースとして3プロモーターベクターpTriEx2（Novagen社）を用いた（1）。

編者註：本稿で述べられているOPPF作業工程には使われていないが、クロンテックはいくつかのIn-Fusion Readyベクター（予め直鎖化されている）を提供している。これらは同様なプロトコールにより哺乳類システム（蛍光ベクター）、細菌システム（pEcoliベクター）、または昆虫宿主細胞（pBacPAKベクター）での発現に使用できる。さらなる情報については、クロンテックのウェブサイト（www.clontech.com）を参照されたい。

In-Fusionクローニング

まず我々は、目的のポリヒスチジンタグの付いたタンパク質を発現させるためのIn-Fusionクローニングをうまく行うために、pOPINベクターの直鎖化サイトに相関な15 bpの配列を含む適切なPCRプライマーを設計した（プライマー配列の詳細については表1を参照されたい）。次に適切なプライマー対を96バッチで組み合わせた。鑄型の位置が適切なプライマー対の位置と対応するように、増幅用の鑄型を96ウェルフォーマットで増幅して調製した。高フィデリティー酵素（Novagen社）を用いて各プライマー/鑄型の組み合わせについて、96ウェルプレートでPCR反応を行った。得られたPCR産物を標準的な結合-溶出法で精製し、クローニング反応の前にアガロースゲル電気泳動でそれらの品質を確認した。予め直鎖化したpOPINベクターと各PCR産物（約10~200 ng）をIn-Fusion Dry-Down 96ウェルプレートの各ウェル内で混合し、30分間インキュベートした。OPPFクローニング・発現スクリーニング作業工程の概要については図2を参照されたい。

表1. 選択したpOPINベクターのIn-Fusionサイト配列と特性				
ベクター	Genbank アクセシ ョン番号	融合タグ	プライマー延長配列	直鎖化に使用 した制限酵素
pOPIN E	EF372397	C末端 ...KHHHHHH	Forward: AGGAGATATACCATG Reverse: GTGATGGTGATGTTT	NcoIおよび PmeI
pOPIN F ¹	EF372398	N末端 MAHHHHHHSSGLEVLQ↓ ² GP...	Forward: AAGTTCTGTTTCAGGGCCCG Reverse: ATGGTCTAGAAAGCTTITA	KpnIおよび HindIII
pOPIN J ¹	EF372395	N末端 MAHHHHHHSSG-GST-LEVLQ↓ ² GP...	Forward: AAGTTCTGTTTCAGGGCCCG Reverse: ATGGTCTAGAAAGCTTITA	KpnIおよび HindIII
pOPIN M ¹	EF372396	N末端 MAHHHHHHSSG-MBP-LEVLQ↓ ² GP...	Forward: AAGTTCTGTTTCAGGGCCCG Reverse: ATGGTCTAGAAAGCTTITA	KpnIおよび HindIII

1: これらのベクターは同じプライマー延長配列を用いているため、印を付けたすべてのベクターに同じPCR産物をクローニングすることができる。下線を付けた配列は翻訳開始コドン（メチオニン）または翻訳停止コドンを表し、遺伝子特異的プライマーから除外されることもある。C末端のポリヒスチジンタグの最初のリジン残基は、カルボキシペプチダーゼAによるC末端のポリヒスチジンタグの除去過程におけるアミノ酸の“ロック”として働く。

2: ↓は3Cプロテアーゼの切断サイトを表す。

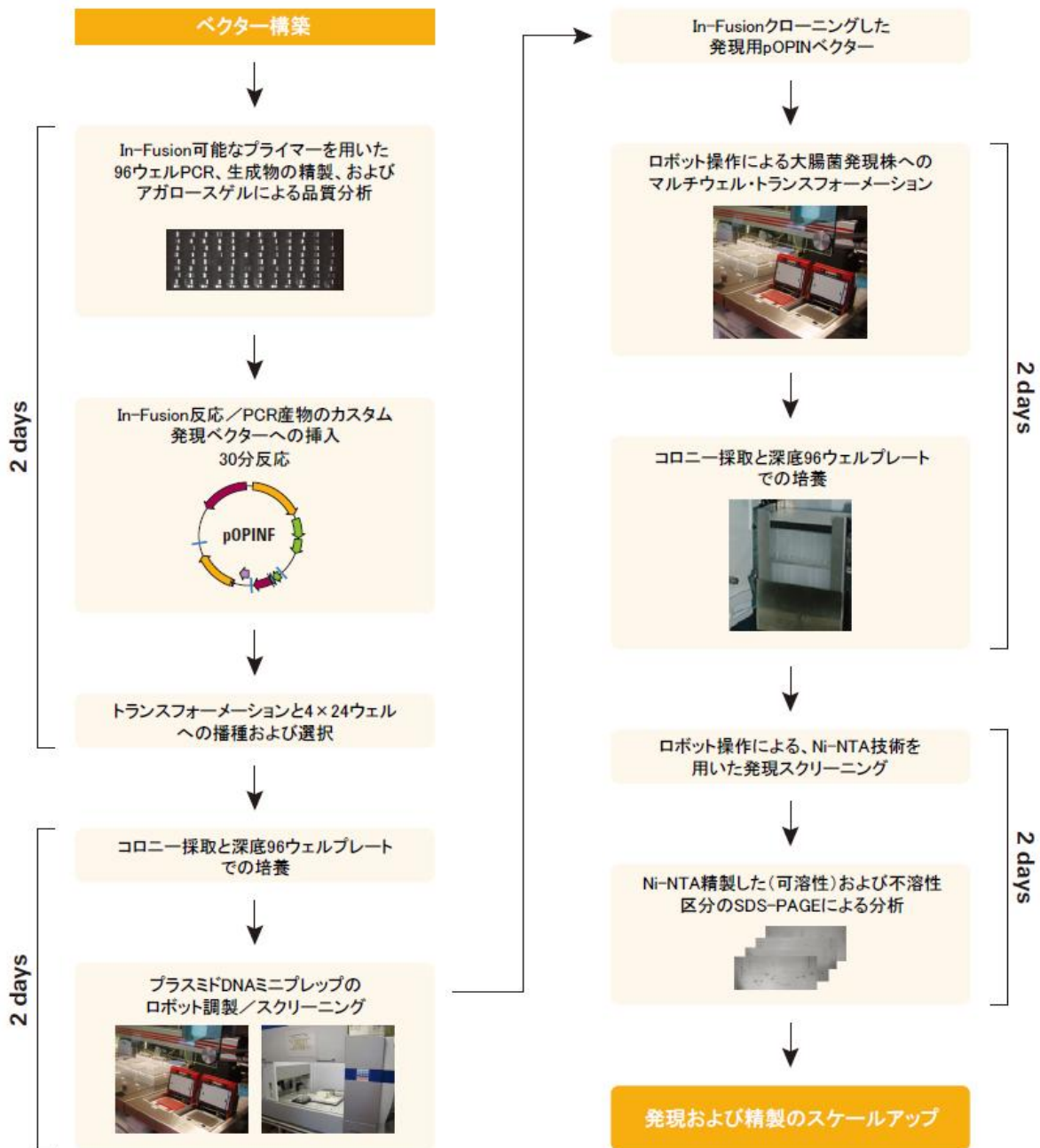


図2. OPPFクローニング・発現スクリーニング作業工程

標的配列のPCR増幅からPCRによる配列確認まで（左のパネル）と、大腸菌での発現スクリーニング（右のパネル）のフローチャート。クローニングおよび発現プロセスの大部分のステップは2つのロボットプラットフォームを介して全自動で行った(1)。

大腸菌での発現

タンパク質発現のスクリーニングを行うために、PCRで配列の正しさが確認された発現コンストラクトを96ウェルプレートで大腸菌にトランスフォームした(3)。細胞を回収後、細胞ペレットを溶解させ、発現スクリーニングを行った。ポリヒスチジン-タグを含む発現タンパク質を抽出し、Ni-NTA磁性ビーズで精製し、SDS-PAGEで分析した(図3)。

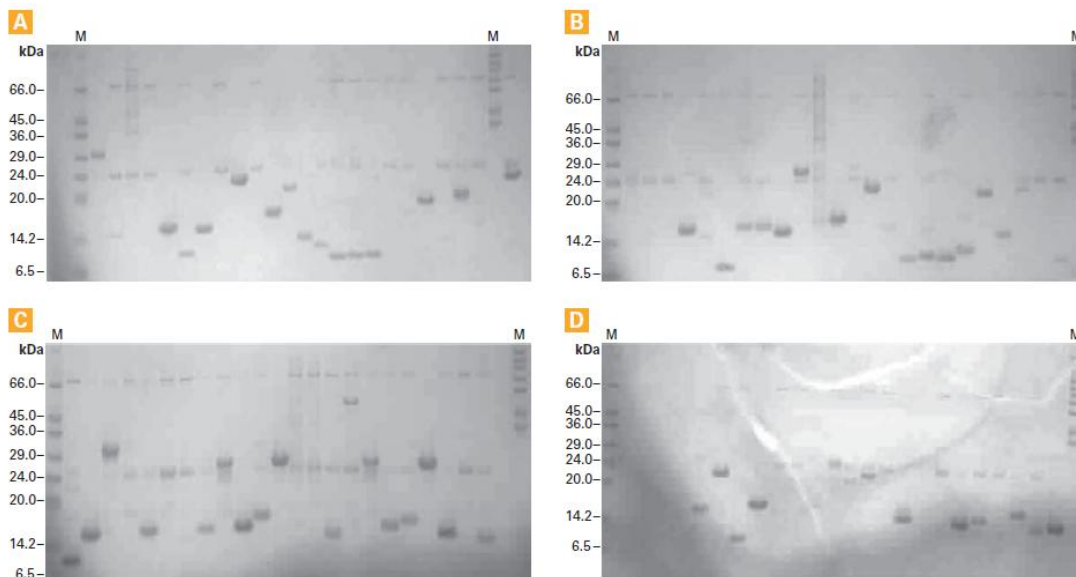


図3. 大腸菌でのOMC pOPINコンストラクト (N-His-3Cタグ融合タンパク質) の発現スクリーニング

In-Fusion反応液をトランスフォームした後、各コンストラクトに対して4つのクローンを単離し、それらから各コンストラクトに対する単クローン(PCRで配列を確認)を選択し、96 OMC pOPINコンストラクトのプラスミドマスタープレートをアSEMBLした。このマスターミックスはプレート中のターゲットの94%をカバーし、Rosetta™ pLysS cells (Novagen社)にトランスフォームして発現スクリーニングに用いた。培地としてOvernight Express™ Instant TB Medium (Novagen社)を用いた。得られた細胞を溶解し、ポリヒスチジンタグの付いた可溶性のタンパク質をNi-NTA磁性ビーズを用いたQIAGEN BioRobot® 8000装置で精製し、SDS-PAGEで分析した。可溶性発現は、クローン化したターゲットの78%で認められた。マーカーレーン(M)を除く各レーンは、単一のポリヒスチジンタグ融合コンストラクトから発現した精製タンパク質を示す。各ゲル(パネルA~D)は96ウェルブロックの3つの縦列を示す。

編者註：本稿で掲載されたゲル像は解釈が困難ではないかと考えている。これらのゲルは科学データの一部として重要であり、それゆえ必要である。我々は、全ての科学データを忠実に再現し、元のフォーマットでゲルを示すべきであると考えます。

OPPF In-Fusion発現スクリーニングの結果

pOPINベクターセットとIn-Fusion酵素の組み合わせにより、我々は2週間の時間枠で96のすべての標的タンパク質の発現スクリーニングを行うことができた。全体のクローニング効率は94%で、タンパク質の78%は大腸菌内で可溶性タンパク質として発現された(図3)。12か月の期間で、OPPFはIn-Fusionを用いて703のPCR産物から全部で661のベクターを構築し、全体のクローニング効率は94%であった。In-Fusionシステムで得られたクローニング効率は、Gateway®組換えシステム(例えば79%; 4)または“古典的な”制限酵素消化-ライゲーション法(例えば87%; 5)を用いた他のHTP構造ゲノミクスコンソーシアムで報告されたデータと比べてかなり良いものであった。

結語

In-Fusion酵素と任意の15 bp相同領域を組み合わせて用いることにより、ライゲーション反応を行わずにPCR産物をクローニングすることができる。In-Fusionクローニングは、発現タンパク質に余分なアミノ酸を付加することなく目的のコンストラクトを作製できる。他のシステムとは違って、In-Fusionは同じインサートを、自身で設計した複数のベクターにクローニングすることができる。そのため、メーカーの特定のベクターや酵素に合わせてクローニングするためにインサートをわざわざ調製する余分なステップが不要である。我々は、これらの性質とマルチプロモーターベクターを組み合わせることにより、組換えタンパク質の発現のためのクローニングプロセスを著しく促進する簡単で便利なシステムを開発した。

ここ2年間で、OPPFはIn-Fusionを用いて種々のソースに由来する1000以上の遺伝子配列をpOPINベクターにクローニングした。これらのコンストラクトは、構造機能解析のために、大腸菌だけでなく、昆虫細胞や哺乳類細胞でのタンパク質発現に用いられた。

謝辞

我々は、ベクター設計について助言を頂いたクロンテック社のAndrew Farmer氏に感謝したい。Oxford Protein Production FacilityはMedical Research Council UK and Vizier(European Commission FP6 contract: LSHG-CT-2004-511960)により設立された。Oxford Module Consortiumは、John Fell Fund (オックスフォード大学)の基金によってOPPFとの共同研究を始め、現在はMedical Research Council UKの基金によって運営されている。

参考文献

1. Berrow, N.S. *et al.* (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**(6):e45.
2. Cordingley, M.G. *et al.* (1989) *J. Virol.* **63**(12):5037–5045.
3. Studier, F.W. (2005) *Protein Expr. Purif.* **41**(1):207–234.
4. Walhout, A.J. *et al.* (2000) *Methods Enzymol.* **328**:575–592.
5. Klock, H.E. *et al.* (2005) *J. Struct. Funct. Genomics* **6**(2-3):89–94.

製品ガイド

- ▶ In-Fusion® HDクローニングキット (5×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)
- ▶ In-Fusion® Ready Products
- ▶ Stellar コンピテントセル