

PrimeSTAR[®] Max を使った遺伝子変異導入の実験例

沖野 望

九州大学大学院 農学研究院 生物機能科学部門

■ はじめに

スフィンゴ脂質（スフィンゴ糖脂質やスフィンゴミエリン）は生体膜の構成成分として古くからその存在が知られていたが、機能が不明であったことから、エジプトの謎かけ怪獣「スフィンクス」にちなんでその名前が付けられたと言われている。われわれの研究室では微生物のスクリーニングにより、スフィンゴ脂質の研究に有用な分解酵素を探索していたが、その過程でスフィンゴ糖脂質に作用してセラミドとオリゴ糖を生じるエンドグリコセラミダーゼ、スフィンゴ脂質に作用してそのリゾ体と脂肪酸を生じるスフィンゴ脂質セラミド N-デアシラーゼ、セラミドに作用してスフィンゴシンと脂肪酸を生じるセラミダーゼを生産する細菌等を発見してきた。それらの中でも緑膿菌が生産するセラミダーゼは、その遺伝情報が一部の生物を除いて哺乳動物に至るまで保存されている。われわれは最近になって、大腸菌を用いた緑膿菌セラミダーゼの大量発現とその結晶化に成功し、緑膿菌セラミダーゼの高次構造を明らかにした。

今回われわれは、結晶構造解析から推定した緑膿菌セラミダーゼの酵素反応機構を検証するために、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase を使用した遺伝子変異導入法を用いて緑膿菌セラミダーゼのアミノ酸変異体を作成した。（詳しくは BIO VIEW 53号 15 ページ PrimeSTAR[®] Mutagenesis Basal Kit の項 参照）

■ 実験方法

変異プライマーは標準プロトコールに従って、外向きに PCR 反応が進むように設計した（センスとアンチセンスのプライマーは 5' 側が 15 塩基オーバーラップするように設計する）（図 1C）。また、鋳型は緑膿菌セラミダーゼ遺伝子を pET-23a に組み込んだ発現ベクターを用いた。PCR の反応系は鋳型（5 pg/μl、終濃度）と変異導入プライマー（それぞれ 0.2 μM、終濃度）の混合液に、等量の PrimeSTAR[®] Max を加えて調製した。PCR のサイクルは PrimeSTAR[®] Max のプロトコールに従い、96 °C で 2 分間のプレヒート、[98 °C 10 秒、57 °C 15 秒、72 °C 40 秒（5 秒/kb）] のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72 °C で 7 分間という標準的なプログラムを使用した。増幅したサンプルの一部（10 μl）を使用してアガロースゲル電気泳動により増幅の確認を行い、目的の増幅産物が確認出来たら、残りのサンプルの一部（5 μl）を直接ケミカルコンピテントセル（100 μl）に加えて、トランスフォーメーションを行った。得られたコロニーを幾つか培養し、プラスミドを調製してインサート部分の塩基配列を確認した。

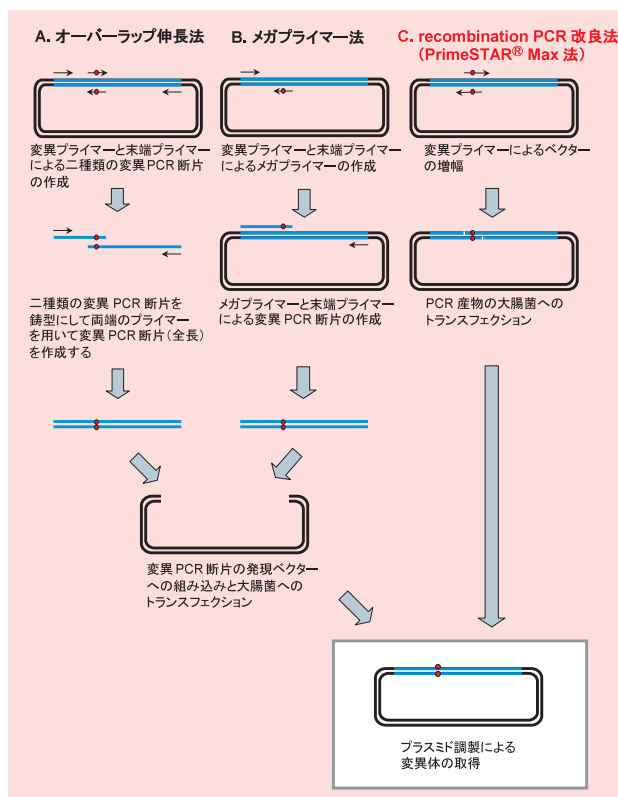


図 1 PCR を用いた各種変異体作成法

■ 結果

本実験では緑膿菌セラミダーゼの発現ベクター（5.7 kb）を使用して高次構造情報から推定された酵素反応に関わるアミノ酸の変異体を作成したが、いずれも良好な PCR 増幅産物を得ることに成功し（図 2）、セラミダーゼの酵素反応機構を明らかにすることが出来た。また、緑膿菌セラミダーゼの他にラットと細胞性粘菌のセラミダーゼに関してもそれぞれの発現ベクター（それぞれ 7.7 kb と 8.8 kb）を用いて変異体を作成したが、図 2 に示すように、良好な PCR 産物の増幅が見られ、塩基配列の解析により変異の導入が確認出来た。これまでに緑膿菌セラミダーゼは 14 種類、ラットは 5 種類、細胞性粘菌は 3 種類の変異体を作成したが、緑膿菌セラミダーゼで PCR がうまく行かなかった一例を除いて変異の導入に成功している。この一例に関しては、作成した変異プライマーがそのままオーバーラップ伸長法（図 1, A）に使用出来るので、オーバーラップ伸長法により変異体を作成した。また、本法により作成した変異ベクターのインサート部分の塩基配列を確認したが、変異導入箇所以外での変異は全く無かった。

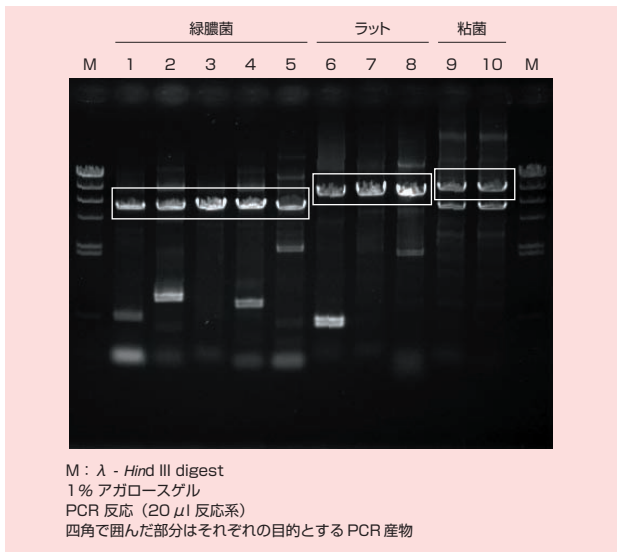


図2 PrimeSTAR® Max を用いたセラミダーゼ(緑膿菌、ラット、細胞性粘菌)遺伝子への変異導入

■ まとめ

以上のように PrimeSTAR® Max を使用することで、ねらった部位にこれまでになく簡単に変異を導入することが可能になった。また、図2に見られるように PCR での増幅産物はシングルバンドにならない場合も多いが、目的のバンドの増幅が確認出来れば切り出し等の抽出操作を行うことなく、そのままトランスフォーメーションに使用しても特に問題はない。

これまでに変異導入キットを使用することなく変異を導入する方法としては、図1に示すように、オーバーラップ伸長法やメガプライマー法が知られているが、いずれも PCR 産物の切り出しや複数回の PCR が必要になり、本法に比べると煩雑であり手軽に変異体の作成が出来るとは言いがたい。本法は変異プライマーの設計に少し慣れが必要であるが、そこさえクリア出来れば後は非常に簡単である。プライマーの設計に関しては推奨されている方法に従えば良いが、PCR による増幅が本方法には必須となるので、プライマーの Tm は出来るだけ近い温度にした方がよい。また、PrimeSTAR® Max は伸長が速い (5 秒/kb) のので、大きめのベクター (~10 kb) を使用したときも PCR の伸長時間が大幅に短縮出来る。著者のこれまでの経験ではプラスミド DNA を鋳型にした場合に 12 kb 程度までは良好な増幅を確認しているため、本法は PCR で増幅が難しい場合を除いてほとんど全ての場合に使用出来ると思われる。また、PrimeSTAR® Max と In-Fusion™ システムを使用すると制限酵素の部位に関係なく目的の部位に遺伝子の挿入が出来るので、PrimeSTAR® Max は変異導入に限らず、ベクターの改変やノックアウトベクターの作成などさまざまな状況で使用出来ると思われる (本誌 特集1 参照)。

■ 本稿でご使用いただいた製品

- PrimeSTAR® Max DNA Polymerase
製品コード R045A 100 回 ¥30,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は47ページをご覧ください。

[2]

—— 沖野先生へのインタビュー ——

Q1.先生の研究内容について簡単に教えてください。

私たちの研究室では糖鎖・脂質と海洋生物資源の有効利用 (マリンバイオ) をキーワードにして、生命科学の研究に役立つ酵素・タンパク質や生理活性物質を探索し、それらを役立てるための基礎的な研究を行っています。最近はオリジナルな酵素の高度利用を目指して、幾つかの酵素の高次構造解析を進めています。

Q2.現在の研究に興味をもたれたきっかけは?

大学院生の時代に行っていた研究が偶然にもレクチン (糖に結合するタンパク質) であったことが直接のきっかけですが、その頃から、糖鎖や脂質にいろいろな生理機能があることが次々に分かってきて、そのおもしろさに惹かれたのだと思います。

Q3.PrimeSTAR® Max DNA Polymerase を研究に取り入れられたのはいつ頃でしょうか? またその理由、きっかけは何でしょうか?

2008 年になってすぐに PrimeSTAR® Max を使った変異体の作成実験を始めたと思います。2006 年から 2007 年にかけて私たちは緑膿菌セラミダーゼの結晶構造を明らかにすることに成功していましたが、その反応機構を確かめるために変異体の作成実験が必要でした。当時はメガプライマー法を使っていましたが、メガプライマー法でたくさんの変異体を作るのは大変なので何か良い方法はないかと探していました。昨年末頃に配布された PrimeSTAR® Max のパンフレットを見てこれだと思いました。

Q4.研究をするにあたり、常に心がけていることはありますか?

研究は自分たちが予想していないような結果が出たときに新しい発見があることが多いと思っています。けれど、そんな発見にいつ出会うかは誰にも分からないので、実験結果を解釈するときに来るだけ先入観を持たないように心がけています。

Q5.今後の研究の方向性について教えてください。

これからは糖鎖や脂質に関する自分たちのオリジナルな酵素を探したり、利用することを続けて行くつもりです。その中で生命現象の一端を解き明かすような研究をしたいと思っています。

今後も先生のご研究を応援させていただきます。
ありがとうございました。