

進化型酵母ハイブリッドシステムによる陽性クローンの確実な取得

Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System

製品コード 630489 1 Set ¥127,000

Matchmaker™ Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System

製品コード 630491 1 Set ¥213,000

*本製品はClontech Laboratories社の製品です。

- タンパク質-タンパク質間、タンパク質-DNA間相互作用を同定
- 新しいレポーターシステムにより偽陽性クローンの出現が大幅に低減
- 酵母形質転換済みcDNAライブラリーなど多数の関連製品も新発売

Clontech社のMatchmaker™システムは、未知のタンパク質-タンパク質間あるいはタンパク質-DNA間相互作用を酵母 *in vivo* で簡便に検出、同定できる非常に優れたタンパク質相互作用解析ツールです。新製品のMatchmaker™ Goldシステムでは、抗真菌抗生物質耐性遺伝子を用いる新しいレポーターシステムの採用により、偽陽性クローンの出現が大幅に低減しています。本稿では、酵母ハイブリッドシステムの基本原理と新しい「Gold」バージョンの利点ならびに関連製品についてご紹介します。

■ Matchmaker™ 酵母ハイブリッドシステムの基本原理

GAL4タンパク質は酵母由来のガラクトース代謝関連遺伝子の転写活性化因子で、GAL4応答性プロモーターに結合するDNA結合ドメイン(DNA-BD)と、プロモーター下流遺伝子のRNAポリメラーゼIIによる転写活性を上昇させる転写活性化ドメイン(AD)を有します。これらGAL4タンパク質のドメイン機能は、ドメインごとに分割発現させた場合にも維持されます。Matchmaker™システムでは、こうしたGAL4タンパク質の性質を巧みに応用して、タンパク質相互作用を解析します。

(1) ツーハイブリッドシステム

酵母ツーハイブリッドシステムでは、宿主酵母細胞内でGAL4 DNA-BDと融合発現した“bait(おとり)”タンパク質とGAL4 ADと融合発現した“prey(獲物)”タンパク質が相互作用することで、宿主酵母のゲノムに組み込まれたGAL4応答性プロモーター下流のレポーター遺伝子の転写が活性化されます。Matchmaker™ Gold酵母ツーハイブリッドシステムでは、宿主酵母Y2HGold株のゲノムに組み込まれた3種類のGAL4応答性プロモーター(M1、G1、G2)から転写される4種類のレポーター遺伝子 *AURI-C*、*HIS3*、*ADE2*、*MEL1* (α -galactosidase)を用いてタンパク質-タンパク質間相互作用を検出します(図1)。なお、*AURI-C* 遺伝子は、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の抗真

菌抗生物質 Aureobasidin A (AbA) に対する耐性遺伝子で、本システムで新たに採用しました。

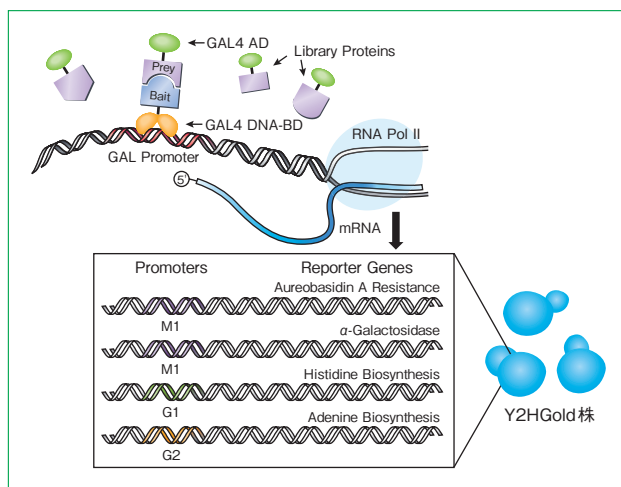


図1 ツーハイブリッドシステムによるタンパク質-タンパク質間相互作用の検出原理 (M1 : MEL1、G1 : GAL1、G2 : GAL2)

(2) ワンハイブリッドシステム

Matchmaker™ Gold酵母ワンハイブリッドシステムでは、GAL4 ADと融合して発現する“prey”タンパク質が、宿主酵母のゲノムに組み込んだ標的DNA配列(“bait”配列)に相互作用することで、*AURI-C*レポーター遺伝子が活性化され、タンパク質-DNA間相互作用が検出されます(図2)。

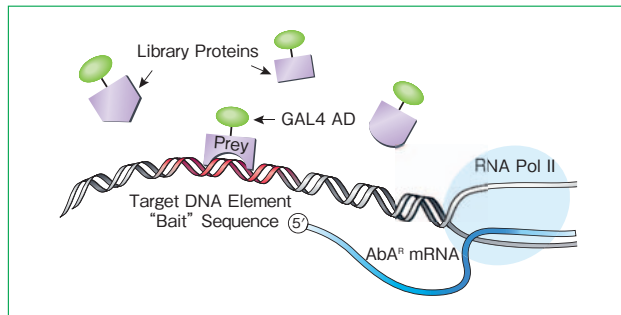


図2 ワンハイブリッドシステムによるタンパク質-DNA間相互作用の検出原理

■ Matchmaker™ Goldシステムの利点

Matchmaker™ Goldシステムで新たに採用した *AURI-C* 遺伝子は、出芽酵母 *S. cerevisiae* に強い殺菌作用を示す抗生物質 AbA に対する耐性を宿主酵母株に付与できる、これまでにない新しいレポーター遺伝子です。従来の

Matchmaker™ システムで利用されていた *HIS3* レポーター遺伝子 (ヒスチジン合成遺伝子) による相互作用のスクリーニングでは、発現リークが起こりやすく、偽陽性クローンが出現する確率が高くなる傾向がありました。一方、AbA は *AURI-C* レポーター遺伝子を発現していない酵母を強力に死滅させるため、AbA 選択培地で相互作用の検出を行うことで、真の相互作用の結果として生育可能となった陽性クローンが高い割合で得られます。また、選択培地中の AbA 濃度による選択圧の調節も可能となるため、これを利用した相互作用強度の解析も行えます (図3)。

さらに、Matchmaker™ Gold 酵母ツーハイブリッドシステムでは、3種類の GAL4 応答性プロモーターから転写される4種類のレポーター遺伝子を用いてタンパク質-タンパク質間相互作用を検出するため、ある prey タンパク質が3種の GAL4 応答性プロモーター領域のいずれかに非特異的に結合する場合でも、これを偽陽性として検出する危険性を排除することができます。

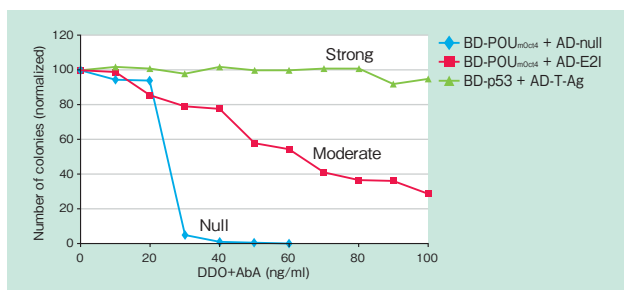


図3 ツーハイブリッドシステムを用いた3種類のbait/preyペアのAbA耐性比較

3種類の bait/prey 融合タンパク質ペアをそれぞれ発現する Y2HGold 酵母株を用いて、各濃度の AbA を含む DDO (SD/-Trp/-Leu) 寒天培地地上でのコロニー形成能を調べた。各酵母のコロニー形成能は bait/prey 融合タンパク質ペア間の相互作用の強度を反映している。

- ・ 陰性コントロールペア (BD-POU_{Oct4} + AD-null)
- ・ 相互作用が推定されるペア (BD-POU_{Oct4} + AD-E2I)
- ・ 陽性コントロールペア (BD-p53 + AD-T-Ag)

■ 独自の prey ライブラリー作製法

Clontech 社独自の SMART 技術による cDNA 合成と酵母内での相同組換え反応を利用することで、微量 (0.1 μg 以

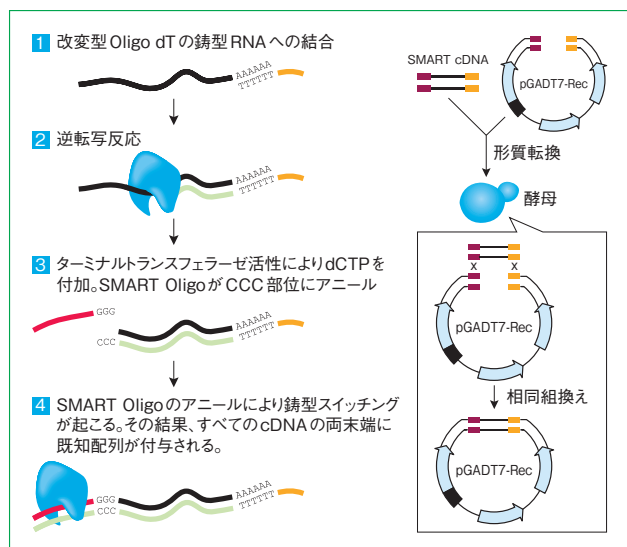


図4 SMART 反応による cDNA 合成の原理と、酵母内相同組換えによるライブラリー作製

上) の total RNA から直接接合スクリーニングに利用できる prey 酵母ライブラリーの作製が可能です (図4)。

Matchmaker™ Gold ツーハイブリッドシステムでは、bait タンパク質を発現する Y2HGold 株 (*MATa*) と prey タンパク質を発現する形質転換済み酵母ライブラリー (Y187 株: *MATα*) の接合により、非常に簡単に相互作用スクリーニングを行えます。

このように Matchmaker™ Gold システムを用いることで、*in vitro* での煩雑な操作を最小限に抑えて、既知タンパク質相互作用解析や未知タンパク質相互作用のスクリーニングを行うことができます。

■ Matchmaker™ Gold システムの各種キットと関連製品

Matchmaker™ Gold システムの登場に伴い、酵母ツーハイブリッド、ワンハイブリッドシステムが一新されました。関連する多数の新製品を以下にご紹介します。

次ページ購入ガイド (図5) もご参照ください。

① Matchmaker™ Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System

prey タンパク質発現用の AD ベクター (pGADT7-Rec AD Cloning Vector、linearized)、標的 DNA 配列 (bait 配列) 挿入用 *AURI-C* レポーターベクター (pAbAi Vector)、酵母宿主株 (Y1HGold)、prey タンパク質 cDNA ライブラリー作製に必要な SMART 反作用試薬など、ワンハイブリッドシステムによるタンパク質-DNA 間相互作用の解析、スクリーニングに必要なほぼすべてのコンポーネントを一つにまとめたキットです。酵母ワンハイブリッドによる各種実験を始める際に本製品をご購入ください。

② Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System

bait タンパク質発現用 DNA-BD ベクター (pGBKT7 DNA-BD Cloning Vector)、prey タンパク質発現用 AD ベクター (pGADT7 AD Cloning Vector)、酵母宿主株 (Y2HGold、Y187) などツーハイブリッドシステムによるタンパク質-タンパク質間相互作用解析に必要な不可欠な最小限のコンポーネントからなるキットです。酵母ツーハイブリッドシステムをご利用の際はまずこの製品をご購入ください。ツーハイブリッドスクリーニングを行うためには、別途ライブラリー作製キット (③) または酵母形質転換済みライブラリー (④) をご購入ください。

③ Make Your Own "Mate & Plate™" Library System

酵母ツーハイブリッド用 prey タンパク質発現 cDNA ライブラリー作製に必要な SMART 反作用試薬、prey タンパク質発現用 AD ベクター (pGADT7-Rec AD Cloning Vector、linearized)、酵母宿主株 (Y187) などからなるキットです。Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System と併用して、未知タンパク質間相互作用のスクリーニングにご利用いただけます。

④ Mate & Plate™ Library

Mate & Plate™ ライブラリーシリーズは、あらかじめ酵母 Y187 株に形質転換済みの酵母ツーハイブリッドシステム用 prey タンパク質発現 cDNA ライブラリーです。本ライブラリーを、bait タンパク質を発現している酵母 Y2HGold 株と共培養し、接合させるだけの簡単な操作 (Mate & Plate™ プロトコール、図6) で、ライブラリーから相互作用タンパク質のスクリーニングを開始できます。Mate & Plate™ ライブラリーシリーズでは、ヒト、マウス各組織由来の cDNA ラ

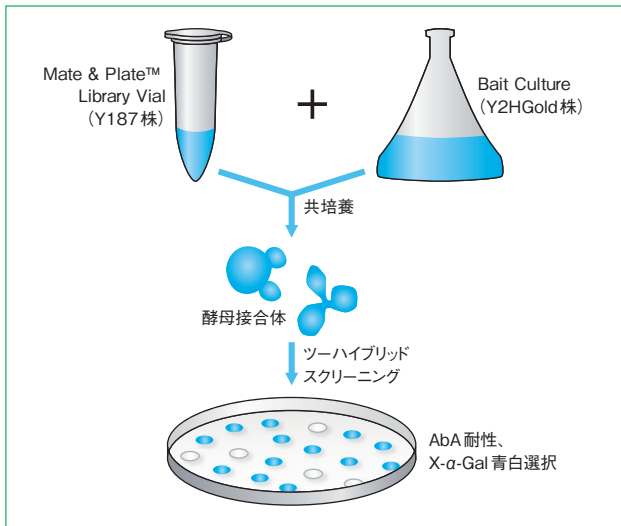


図6 Mate & Plate™ プロトコールによるツーハイブリッドスクリーニング

Matchmaker™ Gold システムでは、まず2種類のレポーター遺伝子 (*AUR1-C*、*MEL1*) による一次スクリーニングを行い、続いて4種類のレポーター遺伝子 (*AUR1-C*、*MEL1*、*HIS3*、*ADE2*) により厳密な選択を行う2段階スクリーニングを推奨しています。

イブラリーや均一化処理済みのノーマライズドライブラリー、さらに Universal RNA を使用したライブラリーも取りそろえています。

⑤ 酵母用培地

Matchmaker™ Gold 酵母ハイブリッドシステムによる相互作用解析には複数のアミノ酸欠失培地などの酵母生育培地と培地添加剤 (AbA、X-α-Gal) が必要です。Clontech 社ではこれら培地添加剤と簡便にご利用いただけるプレミックスタイプの酵母生育培地をご用意しています。Yeast Media Set 1 Plus、Yeast Media Set 2 Plus では、Matchmaker™ Gold 酵母ワンハイブリッド、ツーハイブリッドシステムに必要な培地添加剤、複数のプレミックスタイプ培地がそれぞれセットになっています。

⑥ アプリケーションキット

ワンハイブリッドシステムでは、まず、標的 DNA 配列 (bait 配列) 挿入済みの *AUR1-C* レポーターベクター (pBait-AbAi) を酵母宿主株 (Y1HGold) ゲノムの *URA3* 配列部位へ相同組換えにより挿入します。Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 1 は、pBait-AbAi の酵母宿主ゲノム DNA への挿入の有無をコロニー PCR により確認するためのプレミックスタイプ PCR 試薬です。また、Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 2 は、pGADT7-Rec AD Cloning Vector で構築した prey タンパク質 cDNA ライブラリーから得られた陽性クローンのインサートチェック用プレミックス PCR 試薬です。その他、スピнкаラムを用いて陽性クローンから目的 cDNA 配列を有するプラスミドを簡便に調製できる Easy Yeast Plasmid Isolation Kit などをご用意しています。

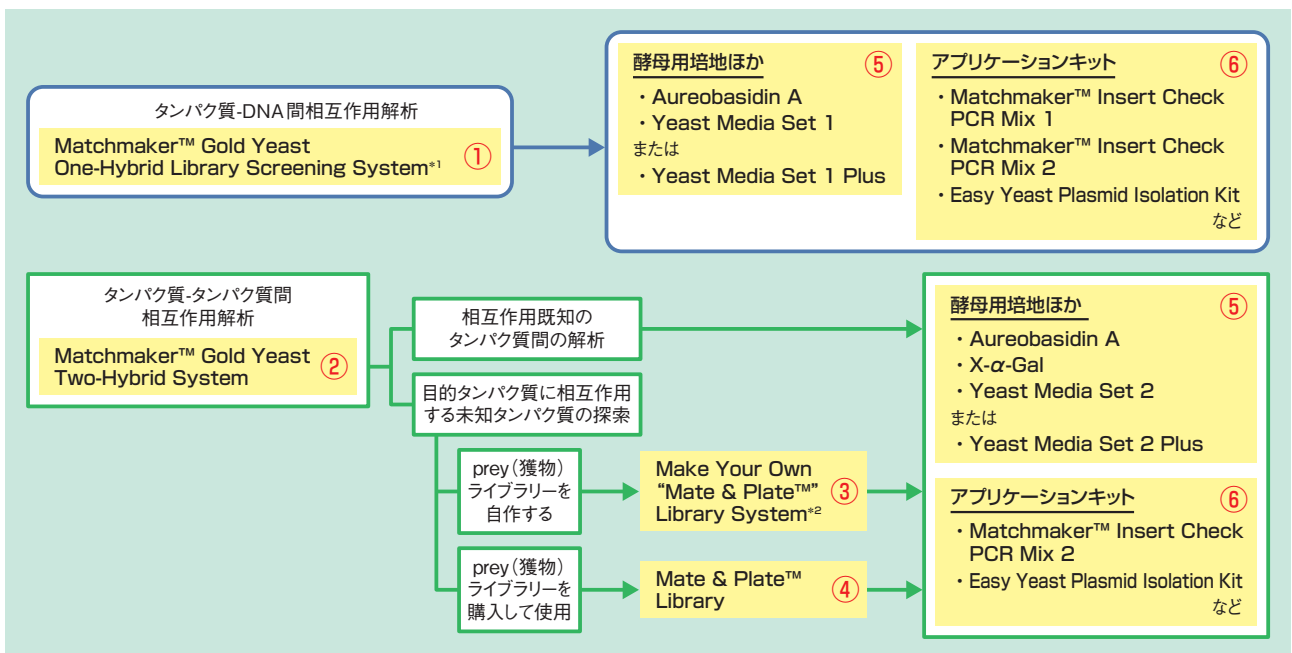


図5 Matchmaker™ Gold システム関連製品購入ガイド

* 1 : ライブラリーの構築には、Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech 社) などの PCR 酵素、*Bst*B I (NEB 社) または *Bbs* I (NEB 社) の購入が別途必要です。
* 2 : ライブラリーの構築には、Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech 社) などの PCR 酵素の購入が別途必要です。

■ Matchmaker™ Gold システム製品一覧

製品名	製品コード	容量	価格
① 酵母ワンハイブリッドシステム NEW			
Matchmaker™ Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System	630491	1 Set	¥213,000
② 酵母ツーハイブリッドシステム			
Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System	630489	1 Set	¥127,000
③ ツーハイブリッド用ライブラリーを自作			
Make Your Own “Mate & Plate™” Library System	630490	5 回	¥197,000
④ Mate & Plate™ Libraries			
Mate & Plate™ Library-Human Liver	630468	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Fetal Brain	630469	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Testis	630470	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Heart	630471	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Skeletal Muscle	630473	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Ovary	630474	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Bone Marrow	630477	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Mouse Embryo 17-day	630476	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Mouse Embryo 11-day	630478	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-HeLa S3 (Normalized)	630479	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Human Brain (Normalized) NEW	630486	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Mouse Embryonic Stem Cell (Normalized) NEW	630484	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Mouse Brain (Normalized) NEW	630488	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Universal Human (Normalized)	630480	1 ml × 5	¥163,000
	630481	1 ml × 2	¥80,000
Mate & Plate™ Library-Universal Mouse (Normalized)	630482	1 ml × 2	¥80,000
	630483	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Universal Drosophila (Normalized) NEW	630485	1 ml × 5	¥163,000
Mate & Plate™ Library-Universal Arabidopsis (Normalized) NEW	630487	1 ml × 5	¥163,000
⑤ 酵母用培地ほか			
Yeast Media Set 1 NEW	630492	1 Set	¥35,000
Yeast Media Set 1 Plus NEW	630493	1 Set	¥58,000
Yeast Media Set 2	630494	1 Set	¥38,000
Yeast Media Set 2 Plus	630495	1 Set	¥77,000
Aureobasidin A	630466	1 mg	¥20,000
X-α-Gal	630407	25 mg	¥28,000
	630462	100 mg	¥39,000
	630463	250 mg	¥56,000
⑥ アプリケーションキット			
Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 1 NEW	630496	100 回	¥23,000
Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 2 NEW	630497	100 回	¥23,000
Easy Yeast Plasmid Isolation Kit	630467	50 回	¥29,000
Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2	630439	1 Set	¥66,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は53～54ページをご覧ください。38 39 40 41