

遺伝子発現に重要なベクターの要素

はじめに

ロンザの技術サポートチームには、よく次のような質問が寄せられます。「さまざまなベクターバックボーンを使用した場合同じ遺伝子発現レベルが得られないのはなぜか？」1つのベクターに対し、遺伝子発現レベルに影響を与える可能性のある成分が数多く存在します。以下は、ベクターに着目した場合に考慮すべき10の最も重要な要素です。

適切な発現ベクターを選択することは効率的な遺伝子発現を行うのに非常に重要です。図1をご覧ください。

ロンザは、異なるバックボーンと発現カセットで同一のルシフェラーゼを発現する10の異なるベクターを試み、極めて変化に富む発現レベルを得ました。

■ プロモーター強度

ご使用のプロモーターは目的の細胞型に適したものでですか？ 表1では、ロンザがAmaxa™最適化プロトコルを有する多様な細胞のCMVプロモーター強度の相対パーセントとして、プロモーター強度が示されています。CMVプロモーターの活性度は、参考文献のCATアッセイ値をもとに100%に設定されています。CMVは多くの哺乳動物細胞において強力なプロモーターですが、使用する細胞で、別のプロモーターがさらに強力な発現を惹起する場合があります（例：BHK-21細胞におけるプロモーターSV40）。

■ イントロン

多くの研究者は、構造的に接合されたイントロンが最適な遺伝子発現には不可欠であると考えています。しかしこの考えは常に正しいとは限りません。イントロンの位置と強度は、転写、mRNAの核外輸送およびポリアデニル化に影響を与える可能性があります。このように、その位置によってはイントロンが遺伝子発現を弱めることさえあります。

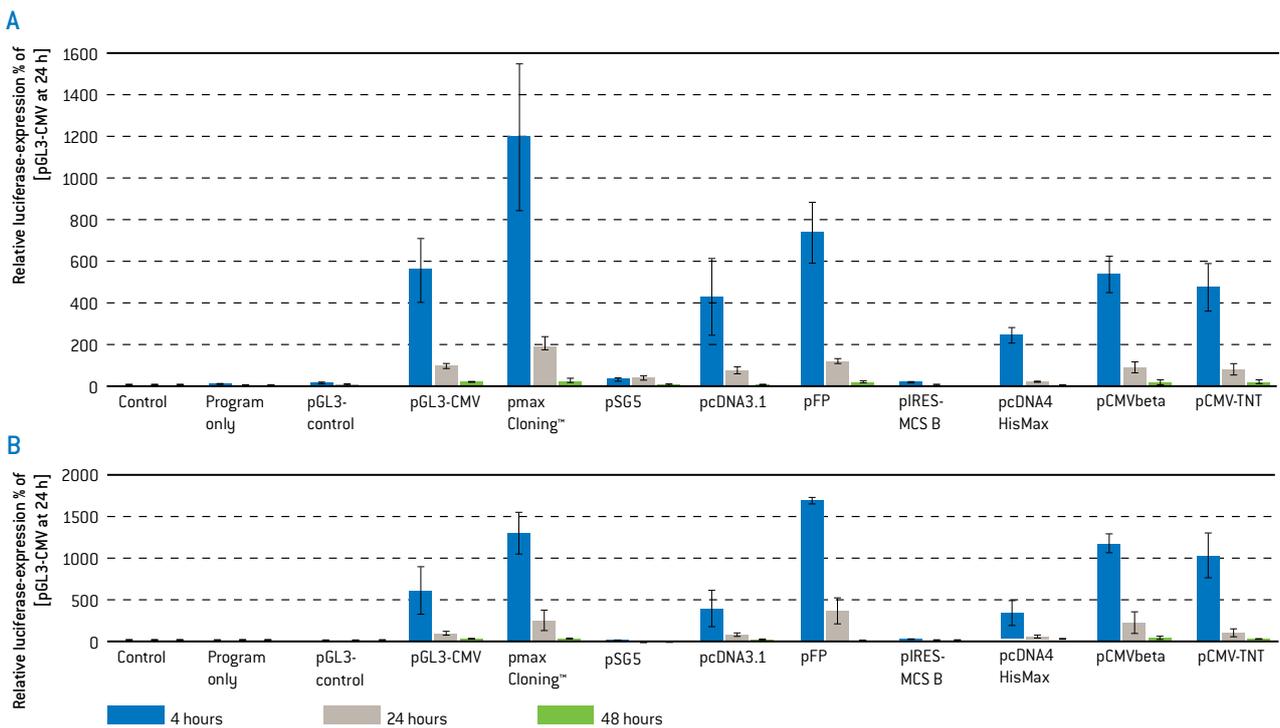


図1. Luciferase expression levels depend on vector backbones. We looked at luciferase expression at 4, 24 and 48 hours in THP-1 and HUVEC cells. The amount of DNA was held at equimolar amounts based on plasmid size. For THP-1, the DNA amount ranged from 0.3 – 0.5 µg per reaction [A]. For HUVECS, we used 2.5 – 4.4 µg of plasmid [B].

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

表1：細胞型別プロモーター強度

細胞株	細胞源	SV40	EF1a	RSV	CMV	参考文献
293	ヒト胚腎臓	5%		74%	100%	4, 6
BHK-21	ハムスター腎臓	200%		200%	100%	4
C6	ラット神経膠腫	44%			100%	5
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣	16%		11%	100%	2, 4, 5
Cos-7	アフリカモドリザル腎臓	7%	15%	7%	100%	1, 2, 4, 5, 8
HeLa	ヒト子宮頸がん	43%	73%	29%	100%	2, 3, 4, 5, 6, 8
N2A (Neuro-2A)	マウス神経芽腫	50%			100%	5
NIH-3T3	マウス線維芽細胞	67%	143%	107%	100%	2, 3, 7, 8

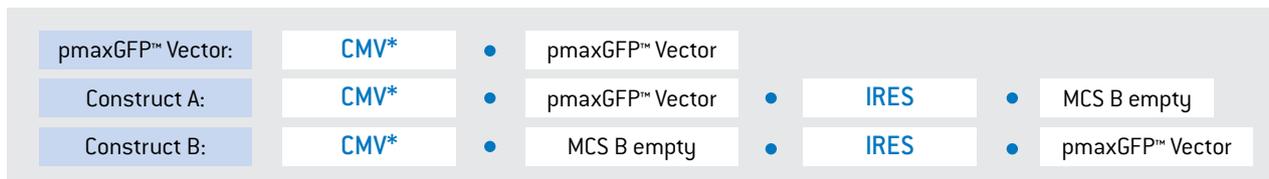
■ IRES プラスミド

IRESプラスミドによって、プロモーターは2つの遺伝子発現を惹起します。これらは複製される遺伝子（通常は上流遺伝子）とGFPタンパク質をコードするレポーター遺伝子（下流遺伝子）です。IRESプラスミドから発現する mRNAは2シストロン性のメッセージです。つまり、両遺伝子とも同じmRNA分子上に出現します。各遺伝子のコードmRNAは等量ずつ母集団に出現します。しかし、2つの遺伝子の翻訳開始効率は大きく異なっています。上流遺伝子の開始領域に対するリボソーム結合は非常に効率的ですが、IRESは下流遺伝子のリボソーム結合と翻訳開始をしばしば著しく低レベルにします。下流遺伝子は通常GFPであるため、GFPの発現レベ

ルは、IRES配列のないプラスミドと比較した場合は通常見られるよりも低くなります。目的のタンパク質とGFPは、両タンパク質の結合、2つの発現カセットを含むコンストラクト、または共遺伝子導入によって、等量ずつ取得できます。

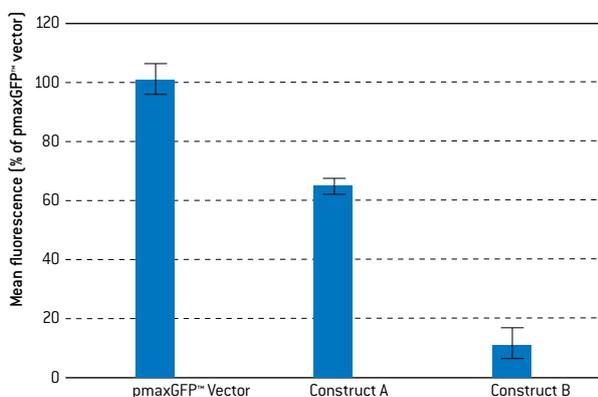
ロンザは、IRESの多重クローニング部位（MCS）の上流（コンストラクトA）またはIRESの下流（コンストラクトB、図2）いずれかで複製されたレポーター（GFP）を有する、pIRES発現ベクター（Clontech）に着目しました。図2Bは、GFPがIRESの下流に位置する場合にGFP発現が著しく減少することを示しています。この研究はGFPレポーター遺伝子について示されているものですが、ルシ

A



B

HL-60 における発現



HUVEC における発現

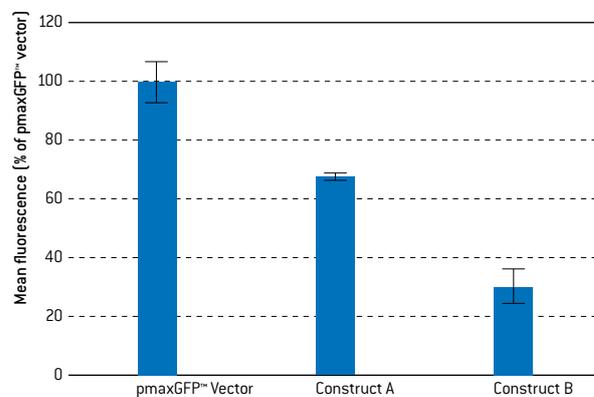


図2. Reporter gene expression is dependent on the position in an IRES expression vector. HL-60 and HUVEC cells were transfected by Nucleofection™ with either pmaxGFP⁺ Vector or pIRES variants containing maxGFP⁺ Reporter Protein cloned in either the Multiple Cloning Site (MCS) upstream (construct A) or downstream of the IRES sequence (construct B; 2A). Figure (2B) shows reduced GFP expression using IRES plasmids especially if GFP is located downstream of the IRES sequence.

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

フェラーゼを用いても行われ、同様の結果が得られています。

ご使用のプラスミドにはIRES配列が含まれていますか？ その場合、どこで使用していますか？ 2シストロン性mRNAの安定性は、挿入された遺伝子のいずれかによって影響される可能性があります。第一および第二遺伝子で発現されるタンパク質のレベルは特定できません。またこれによって、分析や解釈に問題が生じる可能性があります。結果的に、プラスミドの真の効率を使用するレポーターの低い発現レベルにより、過小評価される場合があります。IRESの下流にあるレポーター遺伝子については、高感度の検出方法を使用するようにしてください。

■ LTR (ウイルス性長末端反復)

発現プラスミドの中には、レトロウイルスの長末端反復配列 (LTR) から得られるプロモーターやエンハンサーを利用するものがあります。またこれらの発現プラスミドが特定の細胞に遺伝子導入される場合、複製される遺伝子の発現がその細胞によって抑制される可能性があります。抑制のメカニズムは完全には明らかになっていませんが、レトロウイルスのLTRに由来するプロモーターまたはエンハンサーを含むプラスミドが、初代細胞や特定の細胞株で十分に機能しない可能性は高いといえます。Nucleofection™が初代細胞における唯一の効果的な方法であることも多いため、このような抑制効果がNucleofection™においてより頻繁に観察される場合があります。効果的な代替手段として挙げられるのは、研究対象の遺伝子をCMV (例: pmaxCloning™Vector)、EF1aまたはSV-40などの従来型プロモーターを使用する別の発現プラスミドに、再クローニングすることです。

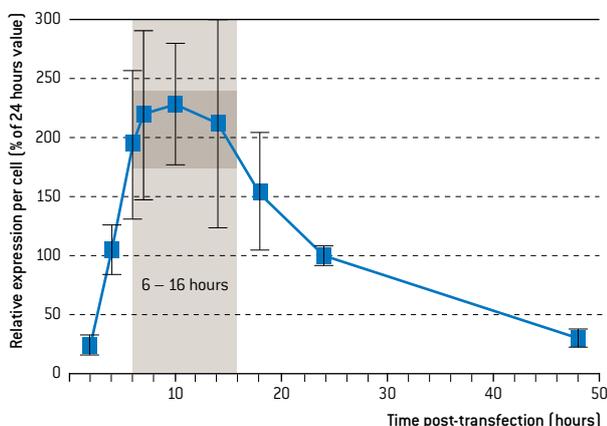
■ ベクターのサイズ

ロンザの研究所では、4~7 kb のプラスミドが日常的に使用されており、Nucleofection™可能なプラスミドは最大で約 20 kb に達する場合もあります。これより大きなプラスミドを使用すると遺伝子導入効率が低下する可能性が非常に高くなります。原則として、プラスミドが大きくなるほど細胞内への導入が難しくなります。これはエレクトロポレーションまたは脂質媒介型遺伝子導入の両方にあてはまります。それでもなお、Nucleofection™を用いたいくつかの結果において、遺伝子導入効率は低いもののBACベクターでも同様に導入されることが示されています。^{9, 10}

■ レポーター

どのような種類のレポーターを使用していますか？ 安全で再現性があり、定量的で、かつ感度が良好であることが必要です。使用するレポーターは、細胞によって内生的に高レベルで発現するものではなく、カスタマーの下流アッセイにおいて十分に機能するものを選択します。レポーターを変更する場合、または遺伝子導入方法を変更する場合、現行の遺伝子導入方法を用いたそのレポーターの発現動態を評価し、最適な時点で分析を行う必要があります。例えばルシフェラーゼは、遺伝子導入がNucleofection™ (遺伝子導入後6~16時間で最大の発現) によってなされるか、または脂質媒介型遺伝子導入 (遺伝子導入後24時間で最大の発現) によってなされるかによって、大きく異なる発現カインेटクスをもちます。ロンザは、ルシフェラーゼの発現カインेटクスが遺伝子導入方法に関連しており、ベクターのバックボーンや使用される細胞型には関係しないことを発見しました。レポーターの発現動態はmRNAやタンパク質の安定性にも依存するため、ロンザはNucleofection™後のルシフェラーゼの発現カインेटクスを、β-galと比較

HUVEC におけるルシフェラーゼ発現のカインेटクス (タンパク質/ウェル、24時間の値=100%)



HUVEC におけるβ-gal 発現のカインेटクス (タンパク質/ウェル、24時間の値=100%)

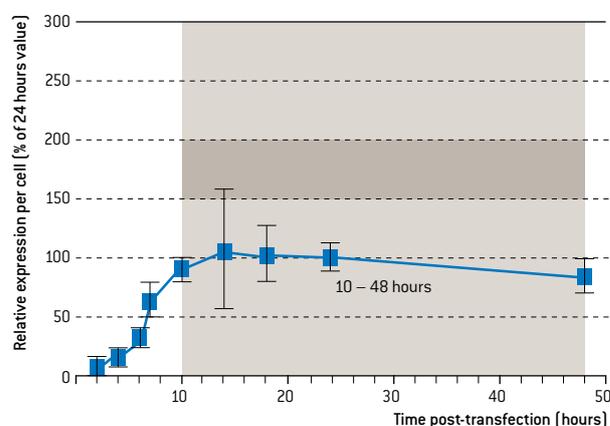


図3. Expression kinetics are reporter gene dependent. HUVEC cells were transfected by Nucleofection™ with either a luciferase or a β-gal expression vector. While luciferase expression shows a maximum 6 – 16 hours post-transfection, β-gal expression is sustained for several days after transfection.

遺伝子発現に重要なベクターの要素

続き

しました（図3）。これらのデータは、ルシフェラーゼベクターおよび β -galベクターを用いた、HUVEC細胞の共遺伝子導入から取得したものです。

両レポーターとも、非常に高レベルでは過小評価される可能性があります。しかし、各レポーターの発現カイネティクスは大きく異なります。ルシフェラーゼは、遺伝子導入後16時間に発現が非常に顕著に低下します。

しかし β -galの発現は遺伝子導入の10時間後に最大に達し、その後一定に保たれます。例えば24時間といった1点が選択される場合、ルシフェラーゼの最大発現は観察されず、ベクターの導入効率は過小評価される可能性があります。

結論として、ロンザはNucleofection™の6～16時間後にルシフェラーゼ解析を行うようお勧めします。一方 β -galまたはGFPの発現は、Nucleofection™の10～48時間後が最適な解析のタイミングとなります。

■ 検出方法

検出方法はレポーターごとに規定されています。レポーターの中には、複数の方法で測定できるものがあります。例えばGFPは、蛍光顕微鏡、フローサイトメーター、蛍光プレートリーダーによる読み取りが可能です。定性的画像が1つ必要なだけなら、蛍光顕微鏡が費用対効果の高い選択肢となります。定量的データが必要な場合はフローサイトメーターまたは蛍光プレートリーダーによって、より正確なデータが得られます。

■ 融合ベクターvs.共遺伝子導入

融合タンパク質の発現は、融合タンパク質の折り畳みや安定性だけでなく、タンパク質の局在化、転写と翻訳にも依存します。

発現を改善するには、タンパク質が融合する末端を変更することが望ましい場合があります。融合ベクターの代わりに、共遺伝子導入を使用することもできます。

1つ目のプラスミドにはレポーター遺伝子（すなわちGFP）が含まれ、2つ目のプラスミドに発現する遺伝子が含まれます。プロモーターの強度やベクターの大きさに応じて2つのベクターの比率を最適化する必要があります。

■ 遺伝子産物におけるヘアピン構造

RNAにおいて形成されるヘアピン構造は遺伝子の翻訳に影響を与える可能性があります。例えば、発現させる遺伝子に変異を導入する場合にはこの点を考慮する必要があります。

■ コザック配列

コザック配列はリボソームによるスキャニング速度を低下させる場合があります。またATG開始コドンでの翻訳開始を認識することによって、その確率を高める可能性があります。コザック配列がATG開始コドンから連続している場合、目的遺伝子の翻訳と全体的発現効率を著しく増大させる可能性があります。

■ 参考文献

1. Cheng *et al.*, [1995] *Int J Radiat Biol* 67(3): 261-267
2. Foeking *et al.*, [1986] *Gene* 45(1): 101-105
3. Davis *et al.*, [1988] *Biotechnol Appl Biochem* 10(1): 6-12
4. Liu *et al.*, [1997] *Anal Biochem* 246(1): 150-152
5. Wenger *et al.*, [1994] *Anal Biochem* 221(2): 416-418
6. Kronman *et al.*, [1992] *Gene* 121(2): 295-304
7. Thompson *et al.*, [1993] *In Vitro Cell Dev Biol* 29A(2): 165-170
8. Thompson *et al.*, [1990] *Gene* 96(2): 257-262
9. Marshall *et al.*, [2005] *J Biol Chem* 280(39): 33357-33367
10. Wang *et al.*, [2006] *J Virol* 80(12): 6003-6012