

NPC1-ルシフェラーゼ融合タンパク質発現ベクターの構築と増幅



川端 彩希



大金賢司*

お茶の水女子大学理学部化学科

概要

本アプリケーションノートにおいては、大腸菌を用いた組換えや増幅に難のある NPC1 遺伝子を含む哺乳類細胞用発現ベクターを OriCiro® Cell-free Cloning System を用いて構築し、継代増幅を行なった例を報告する。

1. 研究背景

著者らは、遺伝性の難病・希少疾病であるニーマンピック病 C 型に対する治療薬候補の探索を行なっている。この疾患は、主に NPC1 遺伝子に変異が入ることによって起こる神経変性疾患である。NPC1 遺伝子は、細胞内のコレステロール輸送に必須な膜タンパク質 NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1) をコードしている。NPC1 はリソソームおよび後期エンドソームに局在する 13 回膜貫通タンパク質であり、細胞外から取り込んだコレステロールを他のオルガネラへと輸送している。NPC1 に変異が入り、そのコレステロール輸送機能に障害が起こることで、リソソーム・後期エンドソームにコレステロールが蓄積する。これまでにこの疾患の原因として NPC1 上の 100 以上の変異が報告されており、その多くは NPC1 タンパク質の安定性やフォールディング (翻訳されてから三次元構造を形成する過程) に異常があることがわかっている (Yamamoto et al., 2004; Gelsthorpe et al., 2008; Shamma et al., 2019)。著者らは、NPC1 変異体の不安定性やフォールディング異常を改善する、「薬理的シャペロン」と呼ばれる低分子化合物の探索を行っている。これまで、NPC1 変異体と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質 (NPC1^{H1061T}-GFP) を培養細胞に発現させることで、化合物の活性評価・探索を行ってきた (Ohgane et al., 2013; Shioi et al., 2020)。今回、活性評価のスループットや感度を改善する目的で、GFP をルシフェラーゼに置き換えることを目指し、OriCiro® Cell-free Cloning System を利用した。

2. なぜ Cell-free cloning を用いたのか

一般的には、培養細胞に遺伝子導入をする際に用いるプラスミドは、大腸菌を用いて調製する。遺伝子工学的にプラスミドを組換えたり、作成したプラスミドを増やすのにも、大腸菌にプラスミドを導入し、プラスミドで形質転換された大腸菌を培養し、プラスミドを精製するという手順を経る。著者らが NPC1 の研究を開始してすぐ、NPC1-GFP を発現させるための哺乳類細胞発現用プラスミドベクターの調製で困ったことが起きた。大腸菌

に NPC1-GFP 発現ベクター (10.4kb) を導入し、大腸菌を増やしてプラスミドを抽出しても、元のプラスミドがほとんど回収できず、部分的に欠失が起きた小さいプラスミドばかり回収されるという現象を経験した。比較的大小のプラスミドではあるが、ほぼ同じサイズの NPC1 ホモログである NPC1-like 1 (NPC1L1) 遺伝子と同じベクターに導入したプラスミドは何の問題もなく増えていることから、大腸菌中で CMV プロモーターから少量発現した NPC1 自体の毒性、あるいは NPC1 に含まれる何らかの配列に原因があることが考えられる (Lewin et al., 2005)。類似の現象は、ある種の ABC トランスポーターにおいても経験し、ナトリウムイオンチャネルでは文献報告がある (Feldmann & Lossin, 2014)。苦労して実験を繰り返し、検討を重ねた結果、NPC1-GFP 発現ベクターをそのままの状態で保持している大腸菌は増殖速度が遅く、寒天培地上のコロニーもかなり小さいことがわかった。生きのいい大きなコロニー (大きいといっても通常のサイズ) を拾ってプラスミドを精製しても、様々なサイズの小さいプラスミドしか取れなかった。小さいコロニーを拾ってやや低い温度で液体培養し、プラスミドを精製することで欠失が起きていないプラスミドが取れる確率は上がった。しかしながら、それでも 10 個程度のコロニーを拾ってやっとアガロースゲルレベルで正しいサイズのプラスミドが得られるレベルであり、配列確認で小さな欠失が起きていないプラスミドを得るのにはかなりの時間と労力がかかった。さらに通常のプラスミドと比べて 10 分の 1 以下の量しか取れず、十分な量を確保するのに難があり、気軽には発現ベクターの変更ができない状況であった。OriCiro® Cell-free cloning system では大腸菌を使用しないため上記の問題点が解決できる可能性が高いことから、今回、以前から作りたいたいと思いつ手が出せていなかった、GFP のルシフェラーゼへの変更をこのキットを用いて行った。

3. 実験内容と結果

NPC1^{I1061T}-ELuc 発現ベクターの構築

これまで用いていた発現ベクター (pCMV-NPC1^{I1061T}-GFP) の GFP をルシフェラーゼ ELuc に置き換えることが目的であるが、この発現ベクターには複製起点として ColE1 型の配列が含まれており、cell-free amplification に使用できないことから、oriC 配列へと置き換える必要があった。そこで、キットに付属の oriC cassette をテンプレートとして増幅した oriC 断片、pCMV-NPC1^{I1061T}-GFP をテンプレートとして PCR 増幅した NPC1 断片 (アンピシリン耐性遺伝子や CMV プロモーター等も含む)、そして pCMV-HaloTag-ELuc をテンプレートとして PCR 増幅した ELuc 断片 (安定発現細胞作成に必要なネオマイシン耐性遺伝子などを含む)、の三つの断片の連結により作成する計画を立てた (図 1)。

各断片の調製は、高正確性ポリメラーゼとして KOD-plus- を用いて増幅後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的サイズの断片を切り出して精製することで行なった。なお、これら 3 つの断片には PCR の段階で 40 塩基対ほどの配列のオーバーラップを組み込んでいるため、その相同性により 3 断片が目的の順序で連結される。連結反応はキットの標準プロトコルで行った。モル比を揃えた各断片 (計 2.5 μ L) と 2 \times RA mix 2.5 μ L を混合し、

サーマルサイクラーにて 42 $^{\circ}$ C で 30 分、65 $^{\circ}$ C で 2 分反応させた。そのうち 1 μ L を増幅反応液 9 μ L と混合し、33 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。添付のバッファー III で反応液を 2 倍希釈して同温度でさらに 30 分処理を行なった。この反応液およびその BamHI 消化物をアガロースゲル電気泳動により分析したところ、図 2 に示すようにスーパーコイルのバンドが観測されるとともに、NPC1 フラグメントと oriC 内に切断部位のある BamHI 消化では予想されるサイズの断片が得られた。また、プラスミドを精製後、サンガーシーケンスによっても目的のプラスミドが得られていることを確認した。

NPC1^{I1061T}-Eluc 発現ベクターの継代増幅

構築したプラスミドを必要量作成するため、このプラスミドをテンプレートとして標準プロトコルの 6 倍スケールにて再度増幅反応を行った (継代増幅)。得られたプラスミド溶液を 10⁶ 倍希釈した溶液を 6 μ L 用い、合計 60 μ L で増幅反応を行なった。こちらも問題なく進行し、先ほどと同様のパターンが検出できている。

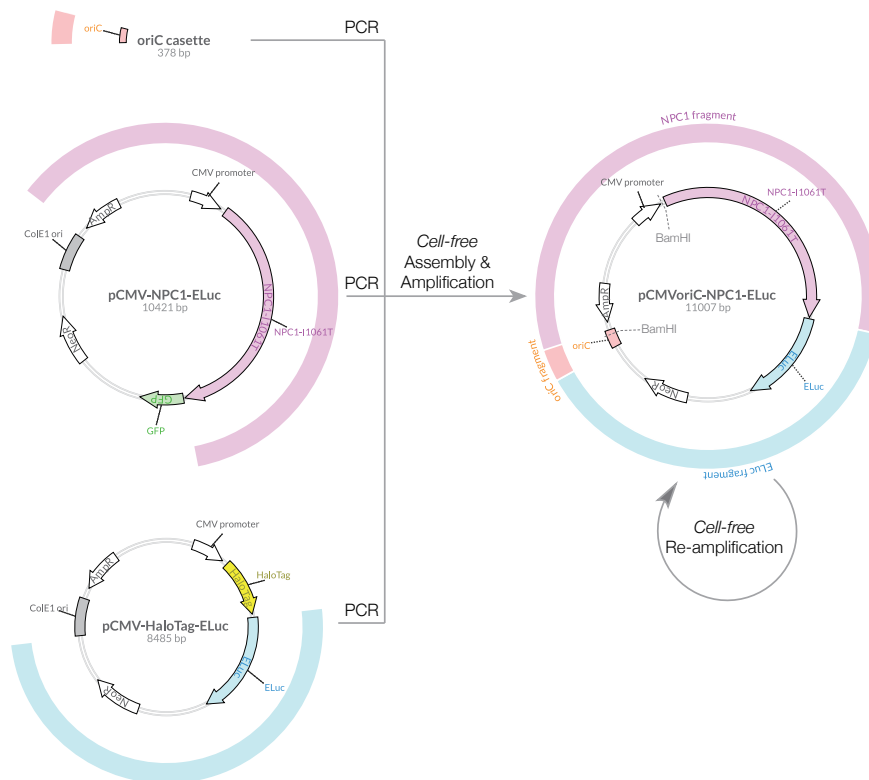


図 1: 目的プラスミドを作成する流れ。3 つのフラグメントを PCR により調製し、それらを連結・増幅した。また、得られたプラスミドは継代増幅により再増幅を行なった。

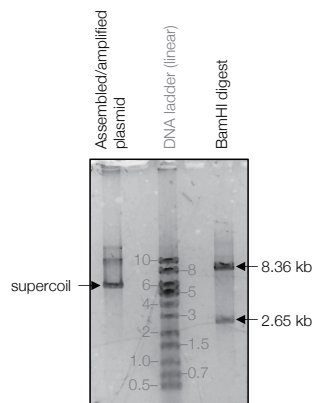
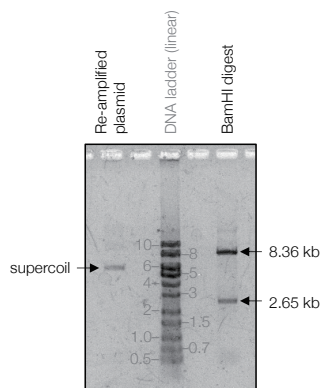
A Assembly & 1st amplification

B Re-amplification of the plasmid


図2: 図1に示した実験のアガロースゲル電気泳動結果。

A. 3つのPCR断片を連結・増幅した反応液のアガロースゲル電気泳動結果。切断部位が2か所あるBamHI消化により、予想されるサイズの断片が2本得られ、約11kbの目的のプラスミドが得られていることが確認できる。

B. 得られたプラスミドの10⁶倍希釈液から継代増幅を行なった際のアガロースゲル電気泳動結果。

4. まとめ

今回、大腸菌での増幅に難がある遺伝子 NPC1 を含むプラスミドを OriCiro[®] Cell-free Cloning キットにより構築・増幅した。大腸菌中で起きていた配列の部分欠失などは見られず、特別な実験条件の検討もなく、目的のプラスミドの構築ができた(なお、一連の実験は研究室に配属されたばかりの学部4年生が行っている)。現状、収量やコストの面では大腸菌を用いた手法には及ばないと思われるが、NPC1のように扱いに難のある遺伝子を扱うには非常に有用なツールとなりうると思われる。

References

- Feldman, D.H., and Lossin, C. (2014). The Nav channel bench series: Plasmid preparation. *MethodsX* 1, 6–11.
- Gelsthorpe, M.E., Baumann, N., Millard, E., Gale, S.E., Langmade, S.J., Schaffer, J.E., and Ory, D.S. (2008). Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *J. Biol. Chem.* 283, 8229–8236.
- Lewin, A., Mayer, M., Chusainow, J., Jacob, D., and Appel, B. (2005). Viral promoters can initiate expression of toxin genes introduced into *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology* 5, 19.
- Ohgane, K., Karaki, F., Dodo, K., and Hashimoto, Y. (2013). Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem Biol* 20, 391–402.
- Shammas, H., Kuech, E.-M., Rizk, S., Das, A.M., and Naim, H.Y. (2019). Different Niemann-Pick C1 Genotypes Generate Protein Phenotypes that Vary in their Intracellular Processing, Trafficking and Localization. *Sci. Rep.* 9, 5292.
- Shioi, R., Karaki, F., Yoshioka, H., Noguchi-Yachide, T., Ishikawa, M., Dodo, K., Hashimoto, Y., Sodeoka, M., and Ohgane, K. (2020). Image-based screen capturing misfolding status of Niemann-Pick type C1 identifies potential candidates for chaperone drugs. *PLoS ONE* 15, e0243746.
- Yamamoto, T., Feng, J.-H., Higaki, K., Taniguchi, M., Nanba, E., Ninomiya, H., and Ohno, K. (2004). Increased NPC1 mRNA in skin fibroblasts from Niemann-Pick disease type C patients. *Brain Dev* 26, 245–250.

OriCiro[®] Cell-free Cloning System



OriCiro[®] Cell-free Cloning System は無細胞で最大 50 種の DNA 断片を同時連結して環状化し、その連結産物を高濃度 (最大 100ng/μL) に増幅する。また、最大 50 kb の長鎖環状 DNA の増幅が可能であり、PCR や大腸菌では困難な GC リッチや AT リッチ、リピート、細胞毒性をもつ配列も増幅可能である。なお、増幅反応には環状 DNA が oriC 配列 (OriCiro[®] Cell-Free Cloning System に付属) を含んでいる必要がある。