

Gateway®テクノロジー

Gateway の 基本原理

Gateway®テクノロジーは、λファージが大腸菌染色体へ侵入する際に関与する部位特異的組換えシステムを基礎としています (Ptashne, 1992)。Gateway®テクノロジーでは、λファージの組換えシステムのコンポーネントを改変することで、組み換え反応の特異性および効率を高めています (Bushman et al, 1985)。このセクションでは、Gateway®テクノロジーの基礎となっているλファージの組換え反応の概要について説明します。

組換えに関与する コンポーネント

λファージの組換えシステムは、以下の 2 つの主要コンポーネントから構成されています。

- DNA 組換え配列 (*att* 配列)
- 組換え反応を仲介するタンパク質 (クロナーゼ™酵素ミックス)

この 2 つのコンポーネントについては以下で説明します。

組換え反応の 特徴

λファージの大腸菌染色体へのインテグレーションは、λファージおよび大腸菌にコードされた組換えタンパク質の混合物 (クロナーゼ™酵素ミックス) によって仲介される DNA 分子間の組換えによって起こります。以下に、λファージの組換え反応の特徴を挙げます。

- 組換えは、特異的に相互作用する DNA 配列 (*att* 配列) 間で起こります。
- 組換えは保存的 (ヌクレオチド数に変化はない) であり、DNA 合成を必要としません。組換え後の *att* 配列が、各親ベクター由来の配列から構成されるハイブリッド配列になるように、組換え部位に隣接する DNA 断片が置換されます。例えば、*attL* 配列は、*attB* 配列と *attP* 配列から構成されています。
- DNA 鎖の交換は、すべての *att* 配列に共通するコア領域内で起こります (以下を参照)。
- 組換え効率は異なりますが、どのようなトポロジーの DNA (直鎖状 DNA、スーパーコイル状 DNA、またはリラックス状 DNA) の間でも組換えは起こります。

λファージの組換えに関する詳細は、参考文献および総説 (Landy, 1989; Ptashne, 1992) を参照してください。

att 配列

λファージの組換えは、部位特異的な組み換え部位間 (大腸菌染色体上の *attB* 配列とλファージ染色体上の *attP* 配列) で起こります。*att* 配列には組換えタンパク質が結合する部位があり、その特徴はよく調べられています (Weisberg & Landy, 1983)。λファージの組込みの際に、*attB* 配列と *attP* 配列との間で組換えが起り、*attL* 配列と *attR* 配列が生じます。実際の交差は、2 つの *att* 配列の相同な 15 bp のコア領域で起こりますが、組換えタンパク質の結合部位がある周囲の配列も重要です (Landy, 1989)。

次ページに続く

Gateway®テクノロジー（続き）

組換えに関与するタンパク質

λファージの組換え反応は、複数の酵素の混合物により触媒されます。この酵素混合物がゲノム上の特異的な配列 (*att* 配列) に結合し、組み換え部位を引き寄せ切断し、DNA を再度結合します。2 対の DNA 鎖が交差し、その後 DNA のライゲーションが起こることにより組換えが完結します。反応に関与するタンパク質は、λファージが溶菌経路（大腸菌ゲノムからの切り出し）を利用するのか溶原化経路（大腸菌ゲノムへの組込み）を利用するのかによって異なります（以下に示す表を参照）。

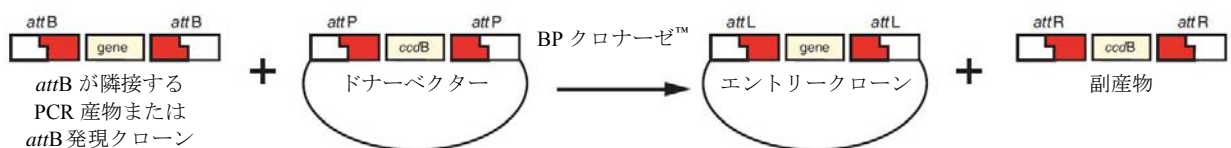
溶原化経路は、λファージのインテグラーゼ (Int) と大腸菌の組込み宿主因子 (IHF) タンパク質 (BP クロナーゼ™酵素ミックス) が関与し、溶菌経路は、Int、IHF の他、λファージ由来の切り出し酵素 (Xis) (LR クロナーゼ™酵素ミックス) が関与します。組換え酵素に関する詳細は、参考文献および総説 (Landy, 1989; Ptashne, 1992) を参照してください。

経路	反応	触媒酵素
溶原化	$attB \times attP \rightarrow attL \times attR$	BP クロナーゼ™ II (Int, IHF)
溶菌	$attL \times attR \rightarrow attB \times attP$	LR クロナーゼ™ II (Int, Xis, IHF)

Gateway®組換え反応

Gateway®テクノロジーは、λファージの組換えシステムを利用して、ベクター間で、改変した *att* 配列に挟まれた DNA 配列の交換反応を行う技術です (Hartley et al, 2000)。Gateway®テクノロジーは、以下に示す 2 つの組換え反応から構成されています。

- **BP 反応:** *attP* を持つ DNA (ドナーベクター) と *attB* を持つ DNA (*attB*-PCR 産物または直鎖状の *attB* 発現クローン) との組換えを行い、*attL* を持つエントリークローンを生成します (以下に示す図を参照)。BP クロナーゼ™酵素ミックスがこの反応を仲介します。



- **LR 反応:** *attR* を持つ DNA (デスティネーションベクター) と *attL* を持つ DNA (エントリークローン) の組換えを行い、*attB* を持つ発現クローンを生成します (以下に示す図を参照)。LR クロナーゼ™酵素ミックスがこの反応を仲介します。



Gateway®BP および LR 組換え反応

はじめに

野生型 λ ファージの *att* 組換え配列を改変し、Gateway®BP および LR 組換え反応の効率および特異性を向上させています。このセクションではこの改変について説明すると共に、*attB* 配列 × *attP* 配列と *attL* 配列 × *attR* 配列間の Gateway® 組換え反応の例を示します。

att 配列の改変

Gateway®システムでは、野生型 λ ファージの *att* 組換え配列を以下に示す方法で改変し、Gateway®BP および LR 組換え反応の効率および特異性を高めています。

- 終止コドン除去し、かつ組換え反応の特異性を上げて挿入方向とリーディングフレームを維持できるよう *att* 配列のコア領域に変異が導入されています。
- 一本鎖状の *attB* プラスミド（ファージミド ssDNA または mRNA など）の二次構造形成を最小限にするために、*attB* 配列の 15 bp コア領域に隣接する短い（5 bp）領域に変異が導入されています。
- *attR* 配列の 43 bp を除去し、*in vitro* の *attL* × *attR* 反応を不可逆的かつより効率的にしています（Bushman et al, 1985）。



重要

上記の改変に加えて、複数の *att* 配列に部位特異的変異を導入して組換え効率を高めています。その結果、*att* 配列に多型が存在する場合があります。例えば、pDONR™201 の *attP1* 配列は pDONR™221 の *attP1* 配列とわずかに異なっています。ただし、このような配列の多型は、特異的な組換え反応やベクターの機能に影響を及ぼしません。

改変された att 配列の特徴

改変された *att* 配列には、以下のような特徴および特異性があります。詳細については 6 ページおよび 7 ページの図を参照してください。

att 配列	長さ	存在場所
<i>attB</i>	25 bp	発現ベクター 発現クローン
<i>attP</i>	200 bp	ドナーベクター
<i>attL</i>	100 bp	エントリーベクター エントリークローン
<i>attR</i>	125 bp	デスティネーションベクター

特異性：

- *attB1* 配列は、*attP1* 配列とのみ反応します。
- *attB2* 配列は、*attP2* 配列とのみ反応します。
- *attL1* 配列は、*attR1* 配列とのみ反応します。
- *attL2* 配列は、*attR2* 配列とのみ反応します。

次ページに続く

Gateway® BP および LR 組換え反応（続き）

attB × *attP* 組換え反応の例

以下の図は、*attB*-PCR 産物と pDONR™221 または pDONR™/Zeo ベクターとの間の BP 組換え反応のスキームを示しています。この組換え反応によって、エントリークローンと副産物が生成します。

注：pDONR™221 と pDONR™/Zeo 以外のドナーベクターを使用する場合、組換え領域の配列がわずかに異なることがあります。この組換えの機序は同じです。

組換え領域の特色：

- 網掛け領域は、組換えにより *attB*-PCR 産物からエントリークローンに移し換わった配列です。*attL* 配列が、*attB* 配列と *attP* 配列で構成されていることに注目してください。
- 囲み線の領域は、組換えにより pDONR™221 または pDONR™/Zeo から副産物に移し換わった配列です。

attB-PCR 産物

```
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-----ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC
CCCTGTTCAAACATGTTTTTCGTCGCA-----TGGGTCGAAAGAACATGTTTCACCAGGGG
```

PCR PRODUCT

attB1 *attB2*

X

ドナーベクター

```
vector---N75-CCAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC-N100-----N100-GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG-N75---vector
vector---N75-GGTGAAACATGTTTTTCGACTTG-N100-----N100-CAAGTCGAAAGAACATGTTTCAACC-N75---vector
```

attP1 *attP2*

BP Clonase™

エントリークローン

```
vector---N75-CCAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-----ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGG-N75---vector
vector---N75-GGTGAAACATGTTTTTCGTCGCA-----TGGGTCGAAAGAACATGTTTCAACC-N75---vector
```

attL1 *attL2*

+

副産物

```
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC-N100-----N100-GTTCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC
CCCTGTTCAAACATGTTTTTCGACTTG-N100-----N100-CAAGTCGAAAGAACATGTTTCACCAGGGG
```

attR1 *attR2*

Gateway® BP および LR 組換え反応（続き）

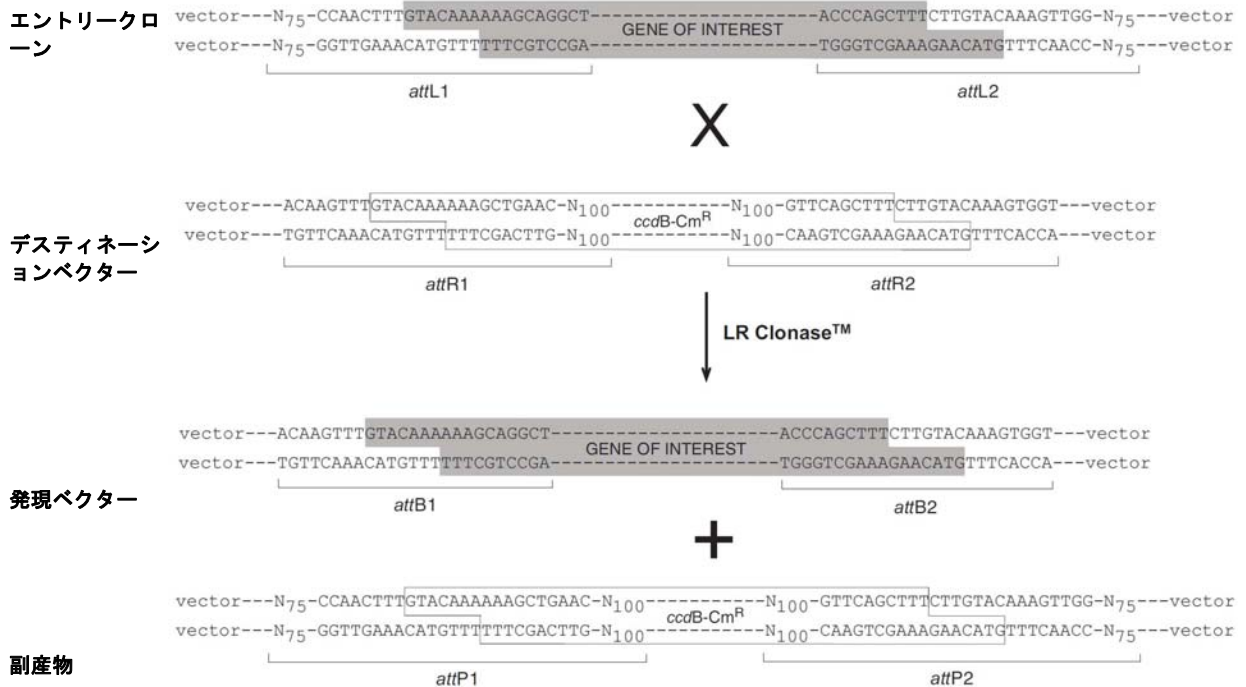
attL × *attR* 組換え反応の例

以下の図は、pENTR™/D-TOPO®を用いて作成したエントリークローンと pcDNA™6.2/V5-DEST（デスティネーションベクター）との間の LR 組換え反応を示しています。この組換え反応によって、発現クローンと副産物が生成します。

注：他のベクターを使用する場合、組換え領域の配列がわずかに異なることがあります。組換えの機序は同じです。

組換え領域の特色：

- 網掛け領域は、組換えによりエントリークローンから発現クローンに移し換わった配列です。*attB* 配列が、*attL* 配列と *attR* 配列で構成されていることに注目してください。
- 囲み線の領域は、組換えにより pcDNA™6.2/V5-DEST から副産物に移し換わった配列です。



Gateway®ベクターの特色

Gateway® ベクター

弊社では、Gateway®に適した3タイプのベクターを販売しております。

Gateway®ベクター	特徴
ドナーベクター (pDONR™)	<i>attP</i> 配列を含んでいます。 <i>attB</i> 配列を両端に付加した PCR 産物 (<i>attB</i> -目的遺伝子- <i>attB</i>) をクローニングして、エントリークローンを作成するために使用します。
エントリーベクター (pENTR™)	<i>attL</i> 配列を含んでいます。 <i>att</i> 配列を含まない PCR 産物または制限酵素切断断片をクローニングして、エントリークローンを作成するために使用します。
デスティネーションベクター	<i>attR</i> 配列を含んでいます。 LR 組換え反応において、エントリークローンと組換えを行い、発現クローンを作成します。 各発現システム (大腸菌、哺乳類、酵母、昆虫) で目的遺伝子を発現させるのに必要な構成要素を含んでいます。

Gateway® ベクターに 共通する特色

エントリークローンまたは発現クローンの組換えクローニングを効率的に行うために、大部分の Gateway®ベクターは、2つの *att* 配列に挟まれた以下の遺伝子からなるカセットを含んでいます。

- ネガティブセレクション用の *ccdB* 遺伝子 (以下を参照) (ドナーベクター、デスティネーションベクターとスーパーコイル状のエントリーベクターに存在します)。
- カウンターセレクション用のクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*Cm^R*) (ドナーベクターとデスティネーションベクターに存在します)。

BP 組換え反応または LR 組換え反応の際に、この遺伝子カセットが目的遺伝子と入れ換わり、BP 組換え反応後にはエントリークローンが、LR 組換え反応後には発現クローンが生成されます。

ccdB 遺伝子

ccdB 遺伝子が存在するため、組み換え、形質転換後に、大腸菌の中でドナーベクターおよびデスティネーションベクター (およびいくつかのエントリーベクター) のネガティブセレクションを行えます。*CcdB* タンパク質は、大腸菌の DNA ジャイレースを阻害することで (Bernard & Couturier, 1992)、大部分の大腸菌株 (OmniMAX™2-T1^R、DH5α™、TOP10 など) の増殖を阻害します。組換えがデスティネーションベクターとエントリークローン、ドナーベクターと *attB*-PCR 産物との間で起こる場合、*ccdB* 遺伝子は目的遺伝子と入れ換わります。*ccdB* 遺伝子を含む組換え反応を起こしていないベクター、および *ccdB* 遺伝子を持つ副産物を取り込んだ細胞は増殖することができません。これにより、目的のクローンを高効率に回収することができます。

Gateway® ベクターの増幅

CcdB タンパク質には致死作用があるので、*ccdB* 遺伝子を含む Gateway®ベクターは必ず、*CcdB* の致死作用に耐性のある大腸菌株で増幅してください。*CcdB* の致死作用に耐性のある *ccdB* サバイバル 2T1^R 大腸菌株のご使用をお奨めします (カタログ番号 A10460)。

Gateway®の命名法

命名法

Gateway®ベクターおよびクローンを簡単に分類できるように、一例として以下の命名法を提案しています。

プラスミド型	説明	各ベクター/クローンの名称
<i>attL</i> ベクター	エントリーベクター	pENTR1、pENTR2、...
<i>attL</i> サブクローン	エントリークローン	pENTR3-gus、... ; pENTR221-gus 数字の3はエントリーベクターを表します。 221はエントリークローンの作製に使用したドナーベクターを表します。 gusはサブクローニングした遺伝子の名称です。
<i>attR</i> ベクター	DESTイネーションベクター	pDEST1、pDEST2、pDEST3... ; p...-DEST
<i>attB</i> ベクター	発現ベクター	pEXP501、pEXP502、... このベクターは発現 cDNA ライブラリーの作成に使用します。
<i>attB</i> サブクローン	発現クローン	pEXP14-cat、... ; pcDNA/GW-47/cat 14および47は、発現クローンの作製に使用したDESTイネーションベクター（それぞれ pDEST™14 と pcDNA-DEST47™）を表します。 catはサブクローニングした遺伝子の名称です。
<i>attP</i> ベクター	ドナーベクター	pDONR201、pDONR221、...

例：LR 反応

1. pENTR201-tet × pDEST14 → pEXP14-tet
2. pENTR221-cat × pcDNA-DEST47 → pcDNA/GW-47/cat

例：BP 反応

1. *attB*-p53 PCR 産物 × pDONR221 → pENTR221-p53
2. pEXP14-lacZ × pDONR201 → pENTR201-lacZ