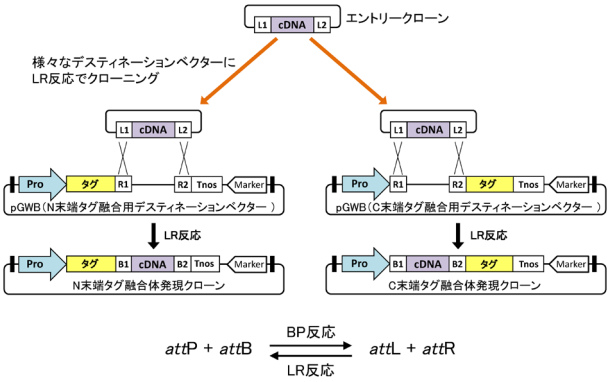
プロダクトイノベーション

# Gatewayバイナリベクターの開発

## 簡単・確実に多彩なクローニングが可能な植物用Gatewayバイナリベクターの開発

島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門
中川　強




キーワード：植物，形質転換，バイナリベクター

## はじめに

DNAクローニングはバイオ研究，生命科学研究における基幹技術の一つであり，農芸化学分野でも頻繁に利用されている．DNAクローニングが行われるようになって以降かなりの期間，制限酵素で切断してリガーゼで結合するという方法が用いられてきた．適切な制限酵素を選んで洗練されたクローニング戦略を考え出すのはパズルを解くようで楽しい面もあるが，日常的にこなすためには，容易に戦略がたてられ，簡単で確実にクローニングできる方法が望ましい．

詳細は解説書[1]を参照していただきたいが，植物の形質転換で最も広く使われているのはアグロバクテリウムとバイナリベクターを用いる方法で，筆者も長年にわたってバイナリベクターを取り扱ってきた．通常の大腸菌ベクターと比較するとバイナリベクターでは使用可能な制限酵素が少なく，また大腸菌の形質転換効率も低いため，制限酵素とリガーゼを用いる伝統的な手法ではコンストラクト構築に困難を伴うことが多かった．当時（2000年初頭）を振り返ってみると，クローニングの失敗が続き時間だけが過ぎていく毎日に苦悩していたことが思い出される．そのような時にGatewayクローニングに出会い，バイナリベクターへの利用を進めた．自作のGatewayバイナリベクターを初めて使用してみて，こんなにうまくクローニングができるのかと感動したことを今でも憶えている．本稿では筆者らが開発してきた様々な植物形質転換用Gatewayバイナリベクターについて紹介する．

## Gatewayクローニング

Gatewayクローニングはλファージゲノムが大腸菌ゲノムに組み込まれる反応とその逆の切り出だされる反応を利用したクローニング技術で，組換え配列と組換え酵素を用いてインビトロでベクターへのクローニングを行うシステムである．*attP*（233 bp）＋*attB*（25 bp）→*attL*（100 bp）＋*attR*（124 bp）の反応をBP反応と呼び，BPクロナーゼが用いられる．逆の*attL*＋*attR*→*attP*＋*attB*をLR反応と呼び，LRクロナーゼが用いられる．Gatewayクローニングでは天然の*att*配列を改変した6組の*att*配列（*att*1～*att*6）が用意されており，これらは*attP*1＋*attB*1→*attL*1＋*attR*1，*attP*2＋*attB*2→*attL*2＋*attR*2のように同じ番号の*att*配列の組み合わせでのみ組換え反応がおこる．この特異性を利用して方向性を維持したクローニングが可能である[2]．

Gatewayクローニングを用いてcDNAを組み込む方法を図1に示す．まず，*attL*1-cDNA-*attL*2の構造を持つエントリークローンを作製する．通常，アダプターPCRで*attB*1-cDNA-*attB*2を増幅し，*attP*1-*attP*2を持つpDONRベクターにBP反応で組み込む方法が用いられる．次いでエントリークローンと，*attR*1-*attR*2を持つデスティネーションベクターでLR反応を行い，*attB*1-cDNA-*attB*2の形で組み込まれた最終構築体を得る．過剰

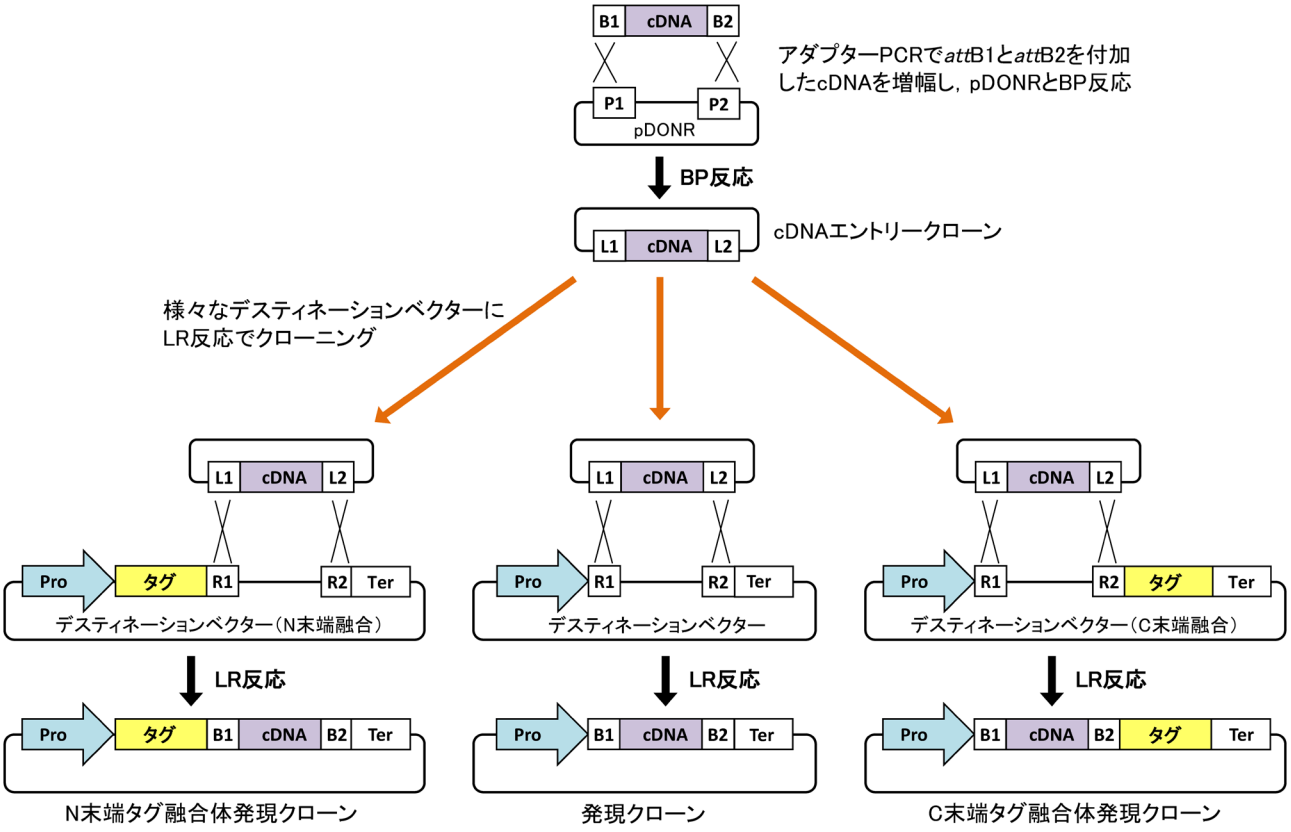



図1 ■ Gatewayクローニングの概要

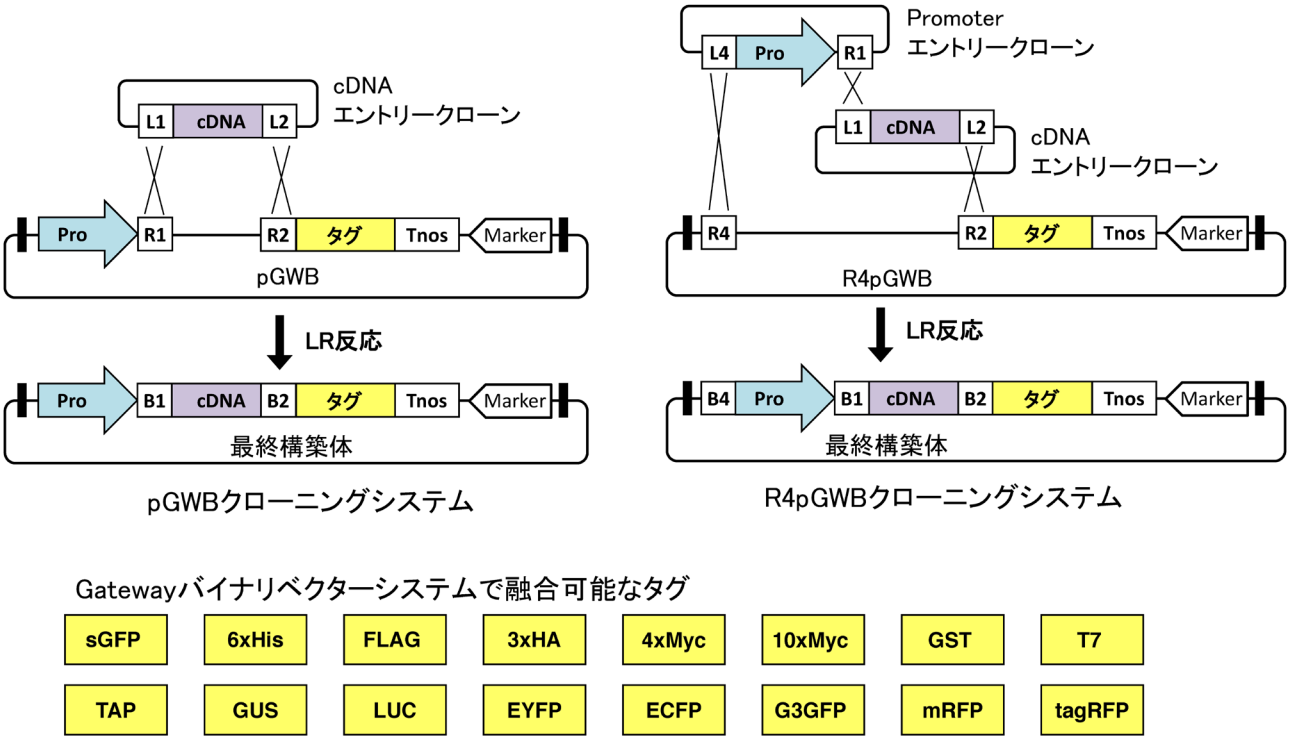
発現用，発現誘導用，タグ融合体構築用など様々なデスティネーションベクターが作られており，目的に応じたデスティネーションベクターを選んでコンストラクションを行う．Gatewayクローニングでは*att*B配列を介してタグとの融合（cDNA-*att*B2-GFPなど）を行うが，*att*B配列に対するフレームの合わせ方が統一されている（統一することになっている）ため，どのデスティネーションベクターを用いてもインフレームの融合体となる．以上のようにGatewayクローニングでは制限酵素・リガーゼを使用することなく，柔軟で多彩なクローニングが可能である[3]．

## 植物形質転換用Gatewayバイナリベクター

筆者らは，制限酵素サイトを気にせず簡単な操作で確実にコンストラクト構築が可能なGatewayクローニング対応型バイナリベクターの構築を進めてきた．最初に目指したのは，各種タグ融合体を過剰発現させるベクターを構築するためのシリーズで，エピトープや蛍光タンパク質など12種類のタグをN末端またはC末端に融合できるベクターシステムを開発した[4]．また，蛍光タンパク質の種類を増やし，植物選択にカナマイシン，ハイグロマイシン，バスタ，ツニカマイシンをそれぞれ使用できるベクターシステムも開発した[5~7]．これらpGWBと名付けたベクターはスタンダードな*att*R1-*att*R2の受容部位を持ち，cDNAなどの目的DNAを1個クローニングするシンプルなタイプである．形質転換効率も高く非常に使いやすいベクターとなっている（図2）．

次にプロモーター交換用として*att*R4-*att*R2の受容部位を持つR4pGWBベクターの開発を行った．Gatewayクローニングではプロモーターのクローニングに*att*L4-promoter-*att*R1の構造を持つプロモーターエントリークローンが使われる．図2のように*att*L4-promoter-*att*R1, *att*L1-cDNA-*att*L2, R4pGWBの3者でLR反応を行うことで，プロモーターとcDNAを連結してクローニングすることができる．各種タグ融合用R4pGWBシリーズも揃え，プロモーター，cDNA，タグを自由に組み合わせたコンストラクト（*att*B4-promoter-*att*B1-cDNA-*att*B2-GFPなど）が構築可能なシステムになっている[6~8]．

以上解説したpGWBは，プロモーターとcDNAの2断片を連結して組み込むものも含め，目的DNA（cDNAやpromoter:cDNAなど）を1個だけクローニングするタイプである．実験によっては，目的DNAを2個導入することが望まれるため，*att*5と*att*6配列も活用して2




Gatewayバイナリベクターシステムで融合可能なタグ

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sGFP | 6xHis | FLAG | 3xHA | 4xMyc | 10xMyc | GST | T7 |
| TAP | GUS | LUC | EYFP | ECFP | G3GFP | mRFP | tagRFP |

図2■pGWBとR4pGWBを用いた植物用コンストラクト構築

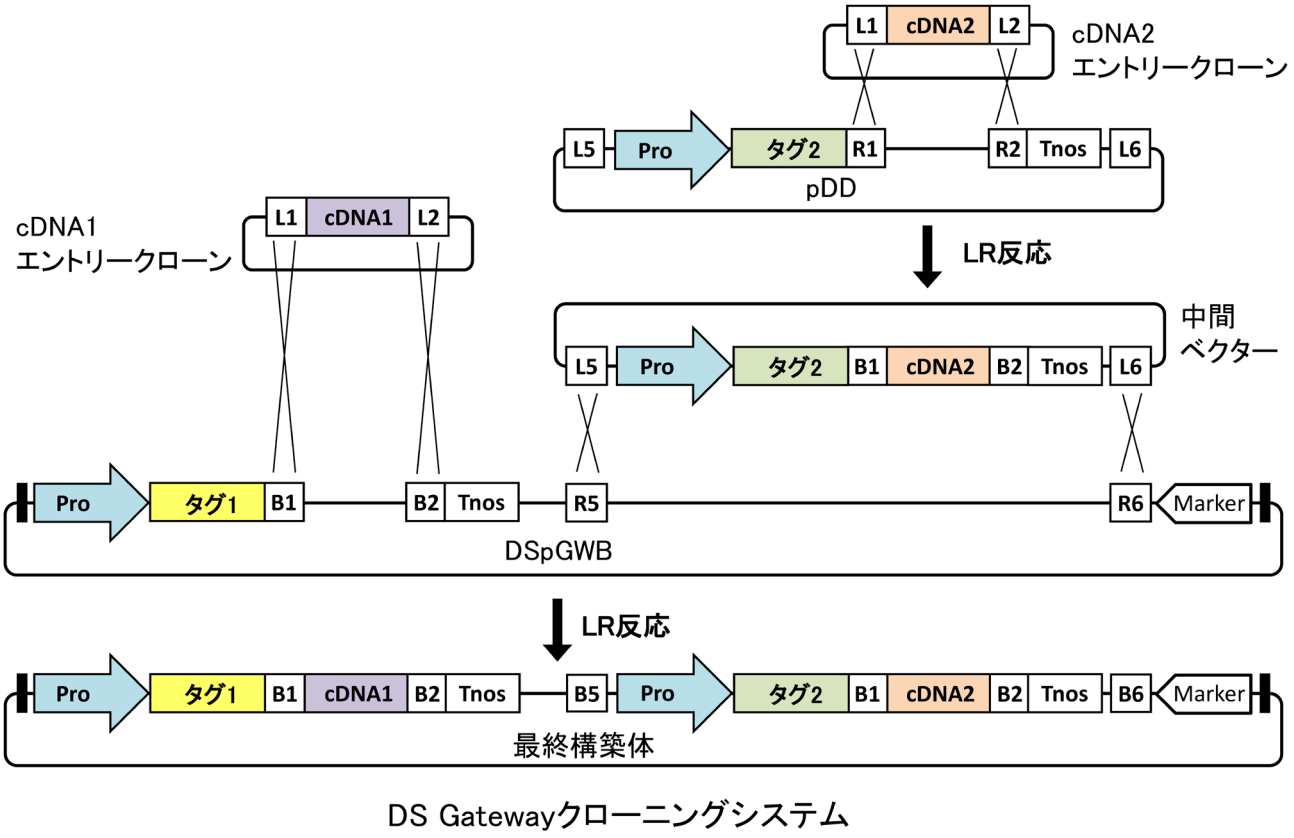
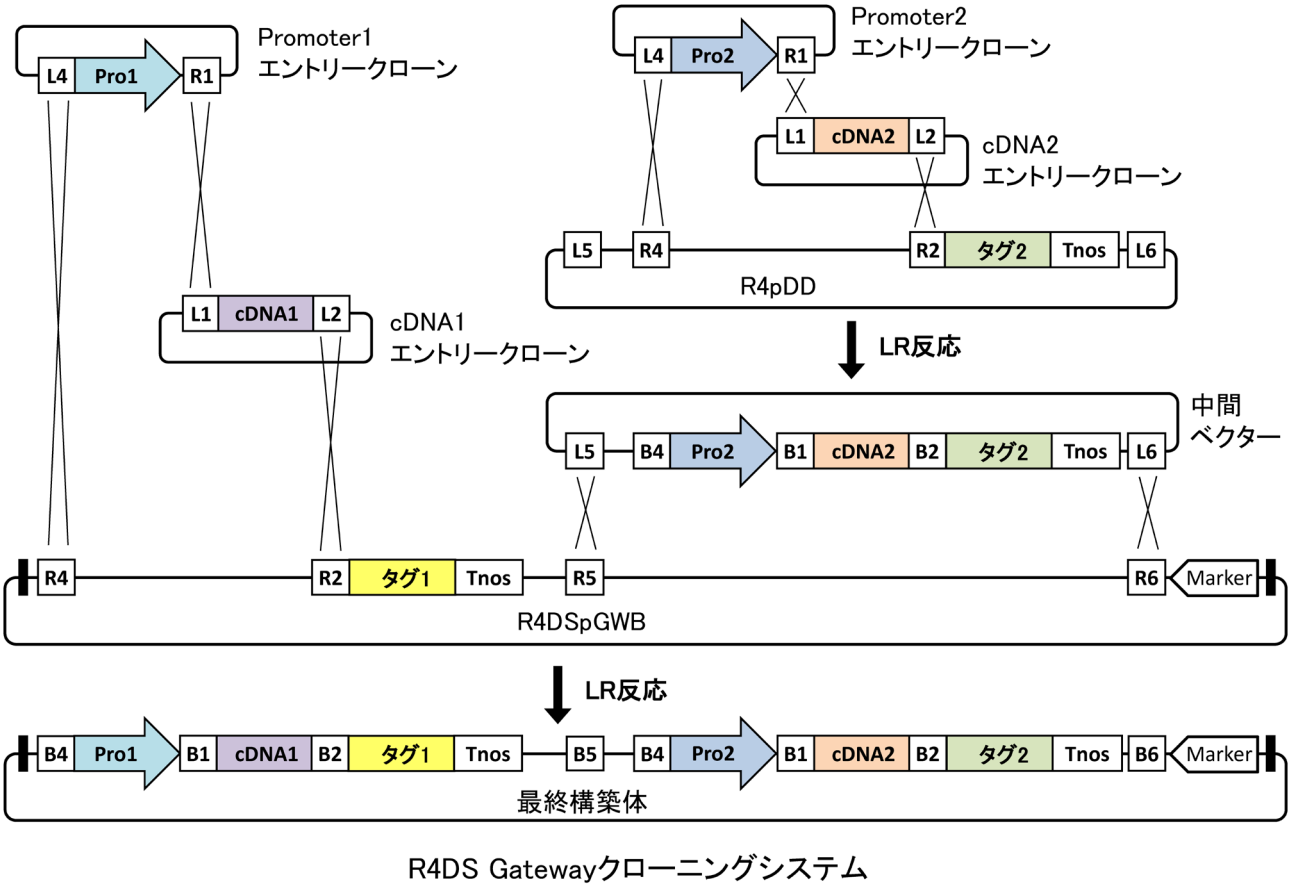



図3■DS Gatewayクローニングシステムの概要




R4DS Gatewayクローニングシステム

**図4 ■ R4DS Gatewayクローニングシステムの概要**

個の目的DNAを組み込むDual Site Gateway（DS Gateway）クローニングシステム[9]およびプロモーターを交換して2個の目的DNAを組み込むR4 Dual Site Gateway（R4DS Gateway）クローニングシステム[10]を開発した．これらのシステムでは目的DNA1（cDNA1）は直接バイナリベクターに，目的DNA2（cDNA2）はpDDベクターを介してバイナリベクターに組み込まれる．**図3**に示すように，DS GatewayクローニングシステムではまずcDNA2のエントリークローンとpDDでLR反応を行うことにより，*att*L5-*att*B1-cDNA2-*att*B2-*att*L6の中間ベクターを作製する．次いでcDNA1のエントリークローン，作製した中間ベクター，DSpGWBの3者でLR反応を行い，2個の目的DNA（cDNA1とcDNA2）が組み込まれたバイナリコンストラクトを得る．R4DS Gatewayクローニングシステムでは，promoter2のエントリークローン，cDNA2のエントリークローン，R4pDDの3者でLR反応を行うことにより，*att*L5-*att*B4-promoter2-*att*B1-cDNA2-*att*B2-*att*L6の中間ベクターを作製する．次にpromoter1のエントリークローン，cDNA1のエントリークローン，作製した中間ベクター，R4DSpGWBの4者でLR反応を行い，2個の目的DNA（promoter1: cDNA1とpromoter2: cDNA2）が組み込まれた最終構築体を得る（**図4**）．いずれのシステムでも各種タグ融合用のpDD（R4pDD）シリーズおよびDSpGWB（R4DSpGWB）シリーズが揃っており，2個の目的DNAそれぞれにタグを融合することが可能である．Gatewayクローニングでは，「一度エントリークローンを作製しておけば，それをそのまま環状プラスミドの形で様々なコンストラクションに使い回せる」ということが大きな強みになっている（図2）．そのため筆者らも「エントリークローン最優先」をポリシーとしてDS（R4DS）Gatewayクローニングシステムの開発を進めた．図3と4をご覧になって，ややこしいベクターを作ったな，という印象を持たれた方がおられるかもしれない．まさにその通りで，エントリークローンをそのまま利用することが可能な2遺伝子クローニングを実現するため，デスティネーションベクターpDD（R4pDD）およびDSpGWB（R4DSpGWB）は*att*配列が何個も配置された複雑な構造となっている．構造は複雑であるが実験操作自体は非常にシンプルで，これらベクターの

LR反応だけで簡単に目的の2遺伝子コンストラクトを構築することできるユーザーフレンドリーなシステムになっている．

以上述べてきたGatewayバイナリベクターは世界中の多くの研究室で利用され，植物遺伝子研究の発展に大きく貢献してきている．紹介したベクターの詳細な情報が島根大学総合科学研究支援センターのウェブサイト[11]に掲載されているのでぜひご覧いただきたい．また大部分のベクターが理研BRC実験植物開発室[12]またはaddgene[13]に寄託されており，これら機関より入手することが可能である．

## シームレスクローニングとGatewayクローニング

現在ではシームレスクローニングが普及し，Gap-repair cloning[14]，Hot Fusion[15]，TEDA[16]，SLiCE[17]のように各研究室で試薬等を調製するもの，iVEC3[18]のように公的機関から分譲されるもの，Gibson Assembly[19]やIn Fusion[20]のようにキットが販売されているものなど，多くの方法が利用可能である．これらはDNA末端の相同配列を利用した組換えによりDNA断片を連結する方法で，例えばプラスミドをクローニングサイトで切断（PCRで直鎖状プラスミドを調製しても良い）して目的DNA断片を組み込む場合，切断部位末端の15–20塩基の配列を付加したプライマーで目的DNAをPCR増幅し，両端にオーバーラップ配列を付加した目的DNA断片を調製する．次いでオーバーラップ配列付加DNA断片と切断プラスミドを混合し，上記のシームレスクローニング法により連結して組換えプラスミドを得る．どのような配列でもオーバーラップに使えるため極めて自由度が高く，文字通り縫い目のないクローニングを行うことができる．また複数のDNA断片の末端を順次オーバーラップさせ，正しい順序で連結してクローニングすることもできる．筆者らは3断片クローニングまでの経験しかないが，さらに多数の断片を連結してクローニングすることも可能と言われており，応用範囲が広い大変有用な技術である．

以上のようなシームレスクローニングと比較して，Gatewayクローニングでは*att*1～*att*6の6種類の配列のみが組換え反応に使用可能であり，7種類以上の組換え配列を必要とするような多数のDNA断片連結クローニングには不適である．またpromoter-*att*B1-cDNA-*att*B2-GFPのように最終構築体に組換え配列*att*Bが存在することになる．*att*B配列の影響，例えば開始コドン上流の*att*B1による翻訳開始への影響や*att*B2配列のペプチドを介したレポーター融合による機能への影響はほとんどないとされているが，不具合が生じた場合は*att*Bを使用せずに回避する，といった対応を行うことができない．では，シームレスクローニングではなく，あえてGatewayクローニングを用いるメリットはあるのだろうか．大いにあると筆者は考える．前述したようにGatewayクローニングの強みはエントリークローンをそのままプラスミドの形で使用できることである．末端の相同配列を利用するシームレスクローニングではPCRなどにより直鎖状の目的DNA断片を調製しなければならないのに対して，Gatewayクローニングでは一度作製したエントリークローンを環状プラスミドのまま使用することができる．また，多くの場合デスティネーションベクターも環状プラスミドのままで使用可能（制限酵素切断により直鎖状プラスミドにして組換え反応効率を上げる場合もある）であり，ストックされているプラスミドをそのまま混ぜて反応させコンストラクト構築を行うことができる．この手軽さは大きな利点である．また，世界中の研究室で作製されたエントリークローンおよびデスティネーションベクター全てで*att*B配列のフレームが統一されているため，これら莫大な数のリソースをそのまま融合コンストラクト構築に利用することができる．このような高い共用性もGatewayクローニングの強みであろう．

## おわりに

クローニングやコンストラクト作製は言わば実験のための準備であり，迅速，簡単，確実，そして安価であることが望ましい．シームレスクローニングでエントリークローンを作製，Gatewayクローニングでバイナリコンストラクトを構築，のようにいくつかの方法を組み合わせることも最適化に有効であろう．遺伝子合成サービスを利用すると配列入力・オーダーでコンストラクトが納品され大変便利であるが，現時点でのコストを考えると全てのコンストラクションを遺伝子合成でまかなうのはまだ難しいと思われる．しばらくは研究室のリソース，スキル，経済状況などに応じて適切なクローニング方法が用いられて行くのであろう．その選択肢の一つとして筆者らのGatewayバイナリーベクターシリーズがお役に立てれば大変光栄である．

## 文献

1) 中村真也，中川　強：“Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル”，今本文男編，シュプリンガー・ジャパン，

2009, p. 61.
2) ライフテクノロジーズジャパン：“Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル”，今本文男編，シュプリンガー・ジャパン，2009, p. 3.
3) ライフテクノロジーズジャパン：“Gatewayを用いた遺伝子導入マニュアル”，今本文男編，シュプリンガー・ジャパン，2009, p. 7.
4) T. Nakagawa, T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo & T. Kimura: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 34 (2007).
5) T. Nakagawa, T. Suzuki, S. Murata, S. Nakamura, T. Hino, K. Maeo, R. Tabata, T. Kawai, K. Tanaka, Y. Niwa *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2095 (2007).
6) S. Nakamura, S. Mano, Y. Tanaka, M. Ohnishi, C. Nakamori, M. Araki, T. Niwa, M. Nishimura, H. Kaminaka, T. Nakagawa *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 1315 (2010).
7) Y. Tanaka, S. Nakamura, M. Kawamukai, N. Koizumi & T. Nakagawa: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 804 (2011).
8) T. Nakagawa, S. Nakamura, K. Tanaka, M. Kawamukai, T. Suzuki, K. Nakamura, T. Kimura & S. Ishiguro: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 624 (2008).
9) M. Aboulela, Y. Tanaka, K. Nishimura, S. Mano, T. Kimura & T. Nakagawa: *Plasmid*, **92**, 1 (2017).
10) M. Aboulela, Y. Tanaka, K. Nishimura, S. Mano, M. Nishimura, S. Ishiguro, T. Kimura & T. Nakagawa: *PLoS One*, **12**, e0177889 (2017).
11) 島根大学総合科学研究支援センター：Information of Gateway Binary Vector (Pgwb), https://shimane-u.org/nakagawa/gbv.htm
12) 理研BRC実験植物開発室：植物遺伝子材料カタログ，https://epd.brc.riken.jp/ja/resource/catalog_plantm
13) addgene: addgene homepage, https://www.addgene.org
14) 永野幸生，飯笹英一：生物工学，**93**, 623 (2015).
15) C. Fu, W. P. Donovan, O. Shikapwashya-Hasser, X. Ye & R. H. Cole: *PLoS One*, **9**, e115318 (2014).
16) Y. Xia, K. Li, J. Li, T. Wang, L. Gu & L. Xun: *Nucleic Acids Res.*, **47**, e15 (2019).
17) 本橋　健：生物工学，**96**, 20 (2018).
18) NBRP E.coli Strain: iVEC3株の解説及び使用方法，https://shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/download/pdf/strainGeneMutant/iVEC3_jp_20170706.pdf, 2017.
19) D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison III & H. O. Smith: *Nat. Methods*, **6**, 343 (2009).
20) B. Zhu, G. Cai, E. O. Hall & G. J. Freeman: *Biotechniques*, **43**, 354 (2007).

## プロフィール

**中川　強**（Tsuyoshi NAKAGAWA）
＜略歴＞1984年名古屋大学農学部農芸化学科卒業／1986年同大学農学研究科博士課程前期課程農芸化学専攻修了／1989年同大学農学研究科博士課程後期課程農芸化学専攻修了／同年島根大学農学部助手／1990年島根大学遺伝子実験施設講師／1993年同助教授／2003年島根大学総合科学研究支援センター遺伝子機能解析部門助教授／2007年同教授＜研究テーマと抱負＞植物遺伝子研究ツールの開発，植物の発達を制御する遺伝子の機能解析＜趣味＞読書，巨樹探訪＜所属研究室ホームページ＞http://shimane-u.org

Copyright © 2022 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.60.538