◆技術講座◆

酵母 two-hybrid system を用いた 遺伝子クローニング法

岩 田 修 永*

Molecular Cloning Using the Yeast Two-hybrid System

Nobuhisa IWATA*

Key words : yeast, two-hybrid system, cloning, protein-protein interaction

---

はじめに

生体内でおりなされる無数の生命現象の中でタンパク質同士が相互作用することにより、または複合体を形成することによって、情報を伝達したり機能を発現する例がしばしば見受けられる。プロテインキナーゼとその基質タンパク質、成長因子やサイトカインとその受容体などの関係は一時的なタンパク質の接触による相互作用であり、リボゾームやスプライソゾームなどの場合は巨大な複合体 (machinery) を形成することにより機能する。また、apoptosis inhibitor と apoptosis inducer の量的バランスで決定される細胞の生死の調節においては、Bclファミリータンパク質間での dimer 構造の形成時にその相手方の組み合わせの違いによって全体として異なる作用を示し、タンパク質相互作用の重要性を示すよい例となっている。このように、生体内では恒常的にタンパク質相互作用によって細胞機能の維持・調節がなされると同時に、細胞間ネットワークが組まれており、あるタンパク質の機能を知る上で、それと相互

作用するタンパク質を知ることは極めて重要である。

本稿では、対象タンパクと相互作用し機能を発揮する真のパートナー (標的タンパク) の検索を行う上で、現在最も汎用されている方法である酵母 two-hybrid system を用いた遺伝子クローニング技術について紹介する。詳細な実験手法はほかの実験書に譲ることにし、本法を行う上での基本的な考え方ならびに注意点に重点を置き記述する。

原 理

Two-hybrid system は、Stanley Fields とその共同研究者らによって開発された方法^{1)~6)}で、2種の融合タンパク質間の相互作用 (または複合体形成) を発芽酵母細胞内でレポーター遺伝子 (*HIS3* : ヒスチジン生合成活性, *lac Z* : β -ガラクトシダーゼ活性) の転写の活性化を指標にして検出する実験法である。その後、幾つかの研究グループによって改良が加えられている^{7)~11)}。GAL 4 を含む多くの転写活性化因子は

---

* 理化学研究所脳科学総合研究センター 神経蛋白制御研究チーム [〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1] Proteolytic Science Laboratory, RIKEN Brain Science Institute, (2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan.) ; e-mail address, iwatan@brain.riken.go.jp

GAL4 BD, $GAL4_{(1-147)}$ binding domain; GAL4 AD, $GAL4_{(768-881)}$ activation domain; protein X, bait protein; protein Y, target protein

Fig. 1 A schematic representation of the yeast two-hybrid system.

物理的に区分される二つの領域（DNA 結合領域（BD）と転写活性化領域（AD））から構成されている。前者はこの転写因子により制御される遺伝子群の上流のプロモーター領域に位置する特定の塩基配列に結合し、後者は転写の開始に必要なタンパク質複合体と結合するため、正常な転写の活性化を引き起こすためにはこの2つの領域が必要であり、単独では転写の活性化は起こらない。図1に示したように、本法ではこの2つの必須領域を分離し、その各々のDNA配列をそれぞれ対象タンパク質Xと標的タンパク質Yの遺伝子に連結させて、2種類のベクターに組み込み細胞内で発現させる。もし、対象タンパク（X）と標的タンパク（Y）が相互作用すれば、その結合を介してDNA結合領域と転写活性化領域が再構成されることになり、レポーター遺伝子の発現が認められることになる。しかし、対象タンパク質Xと標的タンパク質Yが相互作用しなければ、DNA結合領域と

転写活性化領域は再構成されず、結果としてレポーター遺伝子の発現は認められない。このように、レポーター遺伝子の発現が認められれば、対象タンパク質Xと標的タンパク質Yが相互作用したと判断されるわけである。本法によるタンパク相互作用は酵母細胞内で行われるため、他のタンパク相互作用を検出する実験法に比べてタンパク質の高次構造など *in vivo* により近い形で検出する利点がある。

実験の概略

図2に実験の概略をフローチャートで示した。先ず酵母転写因子 GAL 4 の DNA 結合ドメインに *in frame* で融合する形で目的とする遺伝子をつなぎ、ベイトプラスミド（pGBT9）を構築する。このプラスミドを酵母に導入しトリプトファン（-）選択を行う^{注1）}。その際、融合遺伝子による融合タンパクの酵母内での発現を

注1）ベイト用のプラスミド、pGBT9には、トリプトファン産生遺伝子が組み込まれているので、このプラスミドが導入された酵母は、トリプトファンデフォルト培地によって選択することができる。

Fig. 2 A flow chart of method for the yeast two-hybrid system.

Western blot 法^{注2)}などで確認すると共に、ベイトタンパク自身が単独で *LacZ* の転写を促進してしまわないか検証しておく必要がある^{注3)}。以上のことを確認した後に、2つ目のプラスミド (pGAD10) として cDNA ライブラリーを導入し、スクリーニングする^{注4)}。ここで用いるラ

イブラリーは、GAL4 の転写のアクチベータードメイン (GAL4 AD) を連結させたものである。ヒスチジン (-) 培地上で出現したコロニーを、X-gal を基質とした β -ガラクトシダーゼ活性を指標にさらにスクリーニングする。ここで得られた *HIS*⁺, *Lac Z*⁺ のコロニーを陽性ク

注2) ベイトタンパクに対する特異抗体を使用することが望ましいが、HA などのタグの配列をベイト用プラスミドに導入しておけば特異抗体がなくとも、市販の抗体で容易に検出することが可能である。

注3) 特に、転写に関与するような因子をベイトタンパクとする場合、そのもの自身が *lacZ* の転写を促進してしまうことがある。

注4) なるべく薄くまいて大きなコロニーを作らせるのが良い。

ローンとする。さらに、この陽性クローンの精製と陽性の再確認の目的で、2 次スクリーニングを行う。この段階で、陽性となった酵母細胞からライブラリー由来のプラスミドを大腸菌に回収する^{注5)}。陽性クローンに含まれる各々のプラスミドにつき DNA sequencing を行い、得られた DNA 配列を Genbank にアクセスし BLAST search を利用するなどして解析する。

現在、幾つかのメーカーから本法を行うためのプラスミドや宿主酵母を含んだキットならびに premade のライブラリーが販売されている。各社とも高発現用のプラスミドにしたり、転写活性化因子を変化させたりするなどして特色を出しているの、用途によって使い分けることが望ましい。BIO101 社から、本法を確立した各研究室の method および各社から販売されているキットの概要を比較した小冊子 (Two-hybrid Systems-Utilizing Yeast Transcription Activation) が提供されているので、適宜問い合わせてみると良いだろう。また、特別注文でライブラリーの作製を請け負うメーカーもある。

注意点

Two-hybrid system は機能的タンパク質の検索と cDNA のクローニングを一挙に達成することができる。それによって、標的としたタンパク質の新たな機能やタンパク network を発見することもしばしば見受けられ、非常に魅力的な実験系であることは言うまでもない。陽性クローンとして pick up したものをベイトのタンパクとしてさらにスクリーニングを続けるといった実験例も頻繁に行われている。しかしながら、本実験法の感度の高さから生じる疑陽性クローニングシグナルの発現とその排除に十分に注意を払う必要がある(後述)。それ故、本法によって得られた陽性クローンとのタンパクータンパク相互作用を Far Western blot (Western Western blot) 法、免疫沈降法または本誌 8 巻

5 号の本項で紹介されたように表面プラズモン共鳴を用いたバイオセンサーなどでさらに確認することを勧める。換言すると、論文投稿時にそれらをレフリーから要求されることが多い。さらに、標的タンパク質が陽性クローンとタンパク相互作用した結果、何らかの機能が発現したことを証明できればなお良い。また、pick up されたクローンは cDNA の全長を含まず断片として得られる場合が多いので、その際は 5'-RACE, 3'-RACE PCR 法や phage などを用いた通常の方法を用いて全長をクローニングしなければならない。従って、当然のごとく全長 cDNA にコードされたタンパクがベイトタンパクと相互作用するかは再確認する必要がある。

本法は、基本的な遺伝子操作技術や大腸菌の取り扱いを取得している研究者であれば、比較的速かに取り組むことができると思われるが、酵母細胞の取り扱い、特に効率の良い形質転換法の確立、ライブラリーの選択、標的タンパク cDNA の全長またはどの部位(ドメイン)をベイトプラスミドへ導入するかなど、ある程度の技術的または戦略的試行錯誤が良い成果をあげるために必要である。特に、ヒトのライブラリーを使用する場合は、剖検サンプルよりも株化細胞から作製したものを使用した方が、成功率が高いようである。特定の遺伝子 family に属していてホモロジーの高い領域を含むようなタンパク質または上述のように転写に関与するような因子を標的タンパク質として選定する場合は、cDNA の全領域を幾つかに分けるなどして、何通りものベイトプラスミドを用意し同時にスクリーニングを始めた方が、結果的には早道である場合もある。

疑陽性クローンの排除

疑陽性クローンとは、His⁺ でかつ β -ガラクトシダーゼ活性が陽性であるにもかかわらず、

注5) HB101 のように leu⁻ 株を用いることによって、ライブラリー側の pGAD10 のみを回収する。

表 1 疑陽性クローン排除のための形質転換の組み合わせと β -ガラクトシダーゼ活性の結果

プラスミド 1		プラスミド 2 (相互作用タンパクの候補)	β -ガラクトシダーゼ 活性の結果
1.	BD-目的タンパク X	—	陰性
2.	BD-目的タンパク X	AD のみ	陰性
3.	BD-目的タンパク X	AD-negative control タンパク Z	陰性
4.	—	AD-候補タンパク Y	陰性
5.	BD のみ	AD-候補タンパク Y	陰性
6.	BD-目的タンパク X	AD-候補タンパク Y	陽性
7.	BD-候補タンパク Y	AD-目的タンパク X	陽性
8.	BD-negative control タンパク Z	AD-候補タンパク Y	陰性

BD, GAL4 DNA 結合ドメイン; AD, GAL 4 転写活性化ドメイン

注 1) No. 1, 2. は, スクリーニング前に検証のこと

直接相互作用をする融合タンパク質をコードしていないプラスミドをいう。酵母 two-hybrid system ではさまざまな要因によりこの疑陽性クローンが検出される。従って、得られた陽性クローンの中から疑陽性クローンを除く手段の一つとして表 1 に示すようなプラスミドの組み合わせで再度形質転換して確認する必要がある。真の陽性クローンであれば、表の右側のような結果になるはずである。

疑陽性クローニングシグナルの多さは TIBS 誌に本法の酷評が掲載される所以である¹²⁾。特に疑陽性クローンとして検出されるものとして、heat shock protein, ribosomal protein, cytochrome oxidase, mitochondrial proteins, proteasome subunit, ferritin, transfer-RNA synthase 等が記述されている。このような疑陽性クローニングシグナルは用いたライブラリーの種類にも依存するようで、肝細胞のライブラリーからは、albumin 遺伝子が、血球系からは globin 遺伝子が頻繁に検出される。また、スクリーニング時の β -ガラクトシダーゼフィルターアッセイは 30°C, over night で行われることが多いが、どの程度の青さをもって陽性とするか研究者自身の判断にもよる。著者の経験から、強いタンパク相互作用を示すものであれば、over night で待たずとも、数十分から数時間で真っ青な色を呈するはずである。その他、ライブラリーの種類、ロットや増幅の仕方によっても微妙に影響を受ける。

応用例

Ginsberg とその共同研究者らは Integrin β_3 subunit の cytoplasmic domain (aa 716-762) と相互作用するタンパクをこの yeast two-hybrid system を用いて EBV-transformed peripheral blood B lymphocyte のライブラリーからクローニングすることに成功し、 β_3 -Endonexin と名付けた¹³⁾。彼らはこの論文の中でさらに、 β -ガラクトシダーゼ活性を指標にして、Integrin β_3 subunit cytoplasmic domain と β_3 -Endonexin との相互作用は cytoplasmic domain の 752 番目のセリンをプロリンに置換することで 64% まで減少すること、 α IIb, β_1 , β_2 subunit とは相互作用しないことを実証した。彼らはこのスクリーニングを行うにあたり、ベクター系として pGBT9 と pACT, host の yeast strain に Y190 を用いている。ちなみに、Y190 ではバックグランド (多数の小さなコロニー) が観察されるため、選択培地に 3-aminotriazole (25 mM) が加えられている。1.7×10⁶ の形質転換株がスクリーニングされ、そのうち 90 コロニーが His 陽性であり、さらに 7 つのコロニーが β -ガラクトシダーゼ活性が陽性であった。疑陽性クローンの排除には、表 1 に示した組み合わせで、negative control cDNA には AD 側には SV40 large T antigen を BD 側には Lamin C を用いて形質転換を行い、 β -ガラクトシダーゼ活性の有無を検証して

いる。陽性クローンの全長は、5'-RACE PCR 法により決定し、全長を用いて再度タンパク相互作用を確認している。さらに、Integrin β_3 subunit cytoplasmic domain と β_3 -Endonexin との相互作用は、*in vitro* および *in vivo* での共沈実験で実証した。

この研究グループの最近の研究では、両因子の詳細な結合部位が two-hybrid system により決定されている¹⁴⁾。

終わりに

従来、遺伝子のクローニングはファージ-大腸菌の系を用いた方法によってなされてきたが、昨今このような単なる遺伝子のクローニングではなく、機能タンパクをクローン化する技術として、今回ここに紹介した酵母 two-hybrid スクリーニングや Differential Display などの手法が多用されるようになってきた。今後このような味付けをされたクローニング技術がますます汎用され、さらに開発されてくるだろう。

著者もこの酵母 two-hybrid スクリーニングを用いて、pre-mRNA のスプライシング時にスプライス部位の選択・決定に関与する因子をベイトのタンパクとして幾つかの相互作用タンパクを pick up している。実際に行ってみると、陽性クローンを得てから疑陽性クローンの排除、共沈実験、結合部位の決定などかなりの時間と労力を必要とすることがわかる。また、どのような機能タンパクが得られるか、陽性クローンが pick up されるまで分からないので、前もってその後の characterization の準備をすることができないことが論文としてまとめるのに時間がかかってしまう原因にもなっている。散々時間を費やしたあげく最終的には疑陽性であったと結論されるという不幸な結果に終わってしまった話も聞いている。最終的に不幸な結果にならぬよう疑陽性クローンの排除をなるべく慎重に行うことが、成功を引き出す最大の秘訣である。

文 献

- 1) Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246, 1989.
- 2) Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S: The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9578-9582, 1991.
- 3) Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S: Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, in Hartley DA (ed) *Cellular Interactions in Development: Practical Approach*, Oxford, Oxford University Press, 1993, 153-179.
- 4) Bartel P, Chien CT, Sternglanz R, Fields S: Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* **14**: 920-924, 1993.
- 5) Fields S, Sternglanz R: The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* **10**: 286-29, 1994.
- 6) Bartel PL, Fields S: Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* **254**: 241-263, 1995.
- 7) Guarente L: Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1639-1641, 1993.
- 8) Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ: The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555-569, 1993.
- 9) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816, 1993.
- 10) Hollenberg SM, Sternglanz R, Cheng PF, Weintraub H: Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3813-3822, 1995.

-
- 11) Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R: Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803, 1993.
  - 12) Hengen PN: Methods and reagents-false positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 33-34, 1997.
  - 13) Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, Thon V, Williams M, Babior BM, Ginsberg MH: β_3 -Endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin β_3 subunit. *J. Cell Biol.* **131**: 807-816, 1995.
  - 14) Eigenthaler M, Höfferer L, Eigenthaler M, Ginsberg MH: A conserved sequence motif in the integrin β_3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with β_3 -endonexin. *J. Biol. Chem.* **272**: 7693-7698, 1997.
-