

# タンパク質安定発現株作製のためのベクター設計

---

モチベーション：培養細胞へ融合タンパク質をトランスフェクションし、安定発現株を作製したい。そのために、融合タンパクをコードするプラスミドを作成する必要があるから、そのためにプラスミドベクターを設計したい。設計に直接関わってこない知識についてもうっすら勉強しておきたい。前提知識：一般的な分子生物学系の学部生よりちょっと少ないくらい。注意：内容の保証はできません。むしろ間違いがあったら指摘してほしいです。内容は随時更新されます。

---

## ベクターの種類と用途

ベクターは大きく分けてウイルスベクターとプラスミドベクター、あと人工染色体ベクターに分けられる。

ウイルスベクターは今回は検討していないし当分使う予定もないので知りたい人はこちらを参照：[脳科学辞典](#)。やれることは今回使うtol2ベクターとあまり変わらないのかな。

人工染色体ベクターも目的に合致していない(もっと大きいスケールの話)なので今回は割愛。

プラスミドベクターは、目的がタンパク質の一過性発現か安定発現かなどで設計が異なる(タンパク質でなくRNAが目的の場合でも同様)。導入が一過性で良い場合は普通のプラスミドを細胞になんらかの方法で入れてやれば良い。しかし、今回は、安定発現株の作製を目標にするため、恒久的にタンパク質を発現させる、すなわち培養細胞のゲノムDNAに導入遺伝子を組み込む必要がある。そこで用いられるのが、トランスポゾン配列を持つプラスミドによる遺伝子組み込みである。詳細は、こちらの[総説](#)(参考文献-1)が参考になる。

## tol2プラスミドベクターの設計

以下に、参考にしたサイトを挙げながらどのようにプラスミドを設計したかをまとめる。

使用したツールは[Benchiling](#)、[Addgene](#)の二つ。[Benchiling](#)はオンラインで実験を設計、記録、共有できるツールで、今回はプラスミドの設計に使用した。ここはそれぞれの研究施設で使っているツールで構わない。[Addgene](#)はプラスミドのデータと現物をまとめている非営利組織のサイトで、ここを経由すると他の研究室から安価にプラスミドをもらうことができる。今回は使用するプラスミドがここ経由で入手したものであったため、配列をとってくるために使用した。使い方は[こちらのサイト](#)を参照すると良い。

### 1. 既存のベクターを入手する

ラボがすでに持っているものを使うかAddgeneで調べて入手するかのいずれか。今回はラボの先輩が持っているmRuby2融合タンパク質のtol2ベクターを使用した。入手したベクターの配列はダウンロードして[Benchiling](#)にインポートしておくといい。ダウンロード形式はgenbank file(.gbk)でもsnapgene file(.dna)でもよい。

### 2. ベクターをある程度読んで理解する

大抵の場合たくさんannotation(注釈)がついていて、これを読んでどこを変更するべきか考える。annotationは、プロモーター、複製起点、プライマー結合領域、酵素切断部位、CDS(CoDing Sequence、タンパク質をコードする領域)、ORF(Open Reading Frame、開始コドン～終始コドンの間の領域のこと)のいずれかであることが多そう。ベクターは、多くの場合、1方向ではなく、2方向に塩基を並べるように設計

してある。これは、大腸菌内で作用し、プラスミドが複製されるために必要な遺伝子と、培養細胞内に入った際に作用し、タンパク質を発現させるために必要な遺伝子の2種類を分けてそれぞれ発現させるためである。詳細は[このサイト](#)(参考文献-4)が参考になる

### 3. ベクターを編集する

実際にベクターを編集していく。Benchilingでは該当箇所を削除->同一の箇所に入れたい配列をinsertで置換ができた。自分は先輩にベクターの配列のみをもらっていたので、annotationをつけながら必要に応じて置換を行った。自分はシームレスクローニングをする予定だったため特に気にすることはなかったが、制限酵素を用いた組み換えを行う際には酵素切断部位を気にする必要がある。

### 4. 実際にベクターを作製する

設計に応じた実験を行う。

## 参考文献

読むと参考になるかもしれない

1. 中西秀之, et al. "[トランスポゾンに基づく持続発現型ベクターの開発と治療応用](#)." YAKUGAKU ZASSHI 129.12 (2009): 1433-1443.  
トランスポゾンを用いた遺伝子導入の総説。ちょっと古いけど参考になった。
2. [生物工学会誌『生物学基礎講座—バイオよもやま話—』](#)  
今回直接は参考にしなかったけど周辺の技術の話がたくさん載ってていつもお世話になっているやつ。
3. Kawakami, Koichi. "Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates." Genome biology 8 (2007): 1-10. doi:10.1186/gb-2007-8-s1-s7  
tol2ベクターの総説。tol2ベクターの詳細はこれを読むと良いらしい。自分はちゃんと読んでない。
4. Thermofisher HP 「[ベクターマップの読み方〜クローニング・タンパク質発現で迷子にならないために 第1回 プラスミドベクターの構造とマップから分かること](#)」
5. [高知大学「遺伝子工学的実験法 2018」HP](#)  
多分高知大の実習ページ。解説が多少載っている。