

ユーロフィンのコドン使用頻度最適化ソフト「GENEius」と他の最適化ソフトとのタンパク質発現量比較

Uwe Köhler¹, Sebastian Kubny¹, Julia Wiesemann¹, Naohisa Ogata²

1. Gene Synthesis Department of Eurofins Genomics, Ebersberg
2. Eurofins Genomics, K.K., Tokyo

人工遺伝子合成サービスでは、異種生物におけるタンパク質発現量を向上するためのコドン使用頻度最適化サービスを無償で提供しています。

ユーロフィンでは、遺伝子合成およびタンパク質発現における10年以上の経験を元にし、バイオインフォマティクスのスペシャリストであるBioLink GmbHとの緊密な協力関係のもと、個々の配列ごとに対象となる生物種のコドン使用頻度を最適化するソフト「GENEius」を開発しました。GENEiusは様々な生物種において最良のタンパク質発現を実現する遺伝子配列のデザインを可能にしています。

緒言

多くの人工遺伝子合成受託メーカーがコドン使用頻度の最適化を行うためのソフトウェアを開発しています。今回は、当社のGENEiusとこれらのソフトとの最適化後の配列を用いたタンパク質発現量の比較実験を行いました。クラゲの一種 *Aequorea victoria* (オワンクラゲ) 由来の野生型GFPを用い、それぞれのソフトウェアを用いてコドン使用頻度を大腸菌に最適化し、合成された遺伝子大腸菌内発現させ、GFPの蛍光強度による比較を行いました。

GENEiusの機能

GENEiusによる最適化では、DNA配列をランダムに組み立て、指定された生物種のコドン使用頻度表と比較することによって解析を行います。このコドン使用頻度表は通常、Kazusa Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon>) を利用しますが (Kazusa Databaseでは現在、3万5,000種類以上の生物のコドン使用頻度表が利用可能)、お客様からご提供頂いたコドン使用頻度表を用いて最適化することも可能です。GENEiusは、単純にコドン使用頻度表から使用頻度の高いコドンを選択するだけでなく、以下のパラメーターも考慮に入れ、合成に最適な配列を設計します。

1. コドン使用頻度
2. 制限酵素部位
3. 合成する遺伝子中に含まれてほしくない指定された配列
4. GC、AT%と配列中での分布
5. RNA二次構造の回避 (反復配列、逆反復配列など)

これらのパラメーターに対して配列の適合化を繰り返し行い、最終的な配列をGENEiusは提示します。そのため、ほとんどの場合に使用頻度の高いコドンが選択されますが、上記の項目を最適化するために使用頻度がそれほど高くないコドンを選択するケースもあります。

GENEiusでは最適化を実施するたびに異なるDNA配列が得られますが、これは個々の項目や部分最適化を目的としたソフトウェアではなく、配列全体の最適化を目的としているためです。ほとんどのアミノ酸は複数のトリプレット (コドン) によりコード化されていますが、一つのアミノ酸配列に対して可能性のあるDNA配列の数は膨大な数になります。(1つのコドンのみでコード化されているアミノ酸は2個であり (MetおよびTrp)、他のアミノ酸は複数のコドンでコード化されている。例えば、Cys、Lys、Asnは2種類のトリプレットによりコード化され、Ileは3種類のトリプレットによりコード化されて2種類のトリプレットによりコ

ード化され、Ileは3種類のトリプレットによりコード化されている。Ala、Gly、Thr は、4 種類のコドンでコード化され、6 種類のトリプレットによりコード化されたアミノ酸も3 個認められる(Arg、Leu、Ser)。平均で、1 個のアミノ酸は3 種類のトリプレットでコード化されており、したがって、100 個のアミノ酸からなるタンパク質には、3100(5.2×10^4)種類のDNA 配列があるものと考えられます)

また、GENEius の特徴として2 種類の宿主での発現用に遺伝子を最適化することも可能で、例えばある遺伝子を哺乳類細胞と昆虫細胞の両方で高発現させることを目的に最適化を行うことができます。

実験方法

Aequorea victoria の野生型GFP をGENEius を用いて8 回最適化し、8 種類のDNA 配列を得ました。これら8 種類の配列を元に、CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>)プログラムを用いて樹状図を作成し、合成された最も配列の似ていないGFP 配列を2 つ選択しました(図1 では、GENEius_GFP4 およびGENEius_GFP5)。

2 種類のGENEius 配列と他社の最適化プログラムで最適化した配列のクローニングには、pTrc ベクター(Invitrogen)を用い、ATG 下流の BamHI サイトとHindIII サイトに全ての遺伝子を導入した。

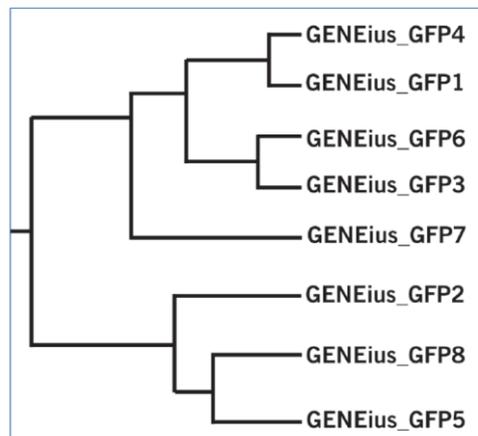


図1 GENEius で8 回最適化し、設計されたそれぞれの配列の樹形図

結果

GENEius と他社ソフトウェアを使用し、クローニング部位であるBamHI とHindIII を避けて、野生型GFP を大腸菌のコドン使用頻度表を用いて最適化を行いました。それらの遺伝子を合成、改変型pTrc にクローニングし、配列確認を行いました。発現には大腸菌のTOP10 細胞を用い、OD₆₀₀ が0.4~0.6 になるまで37°C・150 rpm で培養後、終濃度1 mM になるようIPTG を添加し、GFP の発現を誘導しました。誘導後、25°Cで6 時間培養し、その後4°Cで一晩インキュベーションを行いました(この操作は、クラゲ由来のGFP を正しく折り畳むために必要)。大腸菌濃度を揃えた培養液の蛍光を日立F2500 蛍光分光光度計により測定し、比較を行いました。

図2 はそれぞれの最適化されたGFP を10 回発現実験した時の平均化したデータを示しており、この中で最も平均蛍光値の高かったGENEius_GFP5 の蛍光値を100%とした時の相対値をそれぞれ示しています。実験当初、GENEius で得られた2 種類の最適化配列の発現実験を行った所、発現量が極めて類似していたため、他社の最適化配列においても平均蛍光値は大きな差異はないのではと予想しましたが、他社の蛍光値は14~59%低い事がわかりました。

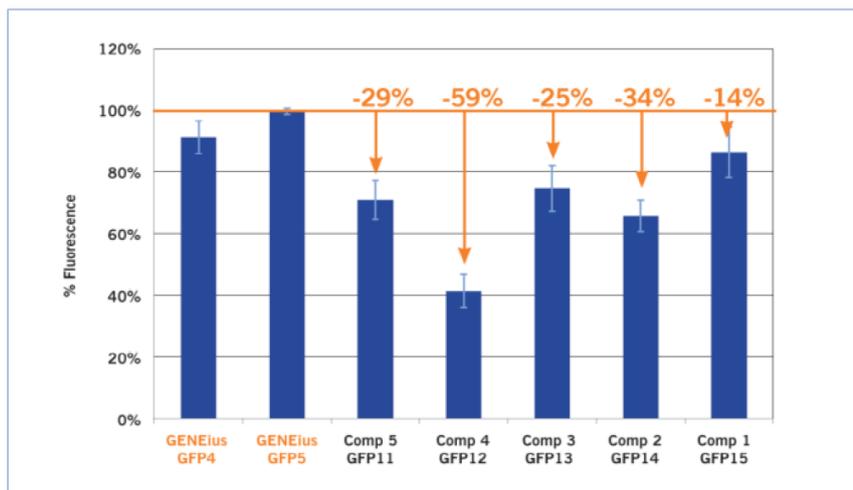


図2 それぞれのソフトウェアで最適化したGFP 蛍光量の相対値

結論

以上の結果から、当社が開発したコドン使用頻度最適化ソフトGENEiusは、コドン使用頻度の適合および遺伝子配列の最適化にきわめて優れていることが明らかとなりました。GFP以外にも大腸菌におけるタンパク質発現量がきわめて高くなること多くのお客様より報告されています。また、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母(*S. cerevisiae*および*P. pastoris*)、植物(単子葉植物および双子葉植物)など他の発現系においてもGENEiusで最適化した遺伝子はきわめて良好に発現することが報告されています。

問い合わせ先

尾形 直久 Ph.D

Eurofins Genomics K.K.

Lab Manager of Gene Synthesis

Email: gsy-jp@eurofins.com