昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における発現ベクター pTD1の性能

○鈴木　崇, 江連　徹, 小林　慎一郎, 伊東　昌章, 四方　正光
島津製作所・ライフサイエンス研究所

無細胞タンパク質合成試薬キット
Transdirect™ *insect cell*

はじめに

プロテオーム研究においてタンパク質を作る技術は非常に重要である。我々は無細胞タンパク質合成系に着目し、昆虫培養細胞Sf21の抽出液をベースとした新しい無細胞タンパク質合成試薬キットTransdirect™ *insect cell*を開発した。

タンパク質合成を行う場合、細胞抽出液と発現ベクターの性能が合成量に大きく影響する。ここでは、翻訳促進配列としてバキュロウィルスのポリヘドリン遺伝子由来5'非翻訳領域(UTR)を組み込んで構築した、キット添付の発現ベクターpTD1の性能について報告する。

結果と考察

●翻訳促進配列の効果(Fig. 2)

・pTD1は、翻訳促進配列を有さないベクターと比較して、50倍～100倍程度効果的な翻訳効率を示した。
・cap構造を付加したものと同程度(pTD1由来)、もしくは約3～5倍(pBluescript由来)の翻訳効率を示した。
⇒pTD1ベクターに目的遺伝子を挿入することで、cap構造を付加することなく、効果的な翻訳反応を達成できることが示唆された。

●既報の翻訳促進配列との比較(Fig. 3)

・Transdirect™ *insect cell*において、pTD1ベクターは既報の翻訳促進配列であるΩ配列やβ-グロビン配列と比較して2倍以上の翻訳促進効果を示した。
・pTD1ベクターは、小麦胚芽抽出液やウサギ網状赤血球抽出液などの無細胞タンパク質合成系でも効果的な翻訳効率を示した。
⇒Transdirect™ *insect cell*には、pTD1が最適な発現ベクターである。さらに、pTD1ベクターは他の真核生物由来の無細胞タンパク質合成系においても、効果的な発現ベクターとして使用できることが明らかとなった。

●合成タンパク質の精製(Fig. 4)

・*Strep*タグ精製を行うことで、非常に明瞭なバンドとして検出できた。
・タグ配列を導入する方向に依存するが、反応液1mlあたり10μg以上の精製タンパク質を取得することができた。
⇒簡便に目的タンパク質を精製できる系を確立することができた。1キットのTransdirect™ *insect cell*では、約20μg～30μgの精製タンパク質の回収が期待できる。また、上記収量は目的タンパク質の機能解析を行うのに十分な量であると考えられる。

結論

効果的な翻訳効率を示すpTD1ベクターと至適化されたSf21抽出液を組合わせることで、高効率な翻訳反応(反応液1 mlあたり30～50μg)を達成することができた。また目的タンパク質にタグを導入することで、機能解析に十分量の精製タンパク質を取得できる系(反応液1 mlあたり10μg)を確立することができた。本製品がプロテオーム解析を推進する強力なツールとなることを期待している。

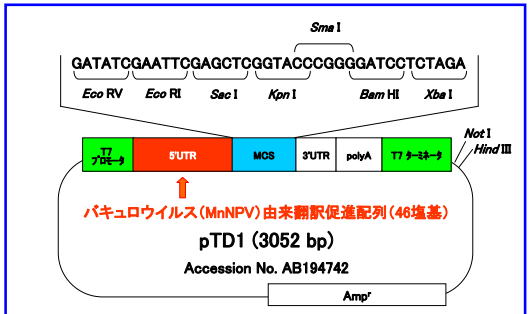


Fig. 1　発現ベクターマップ

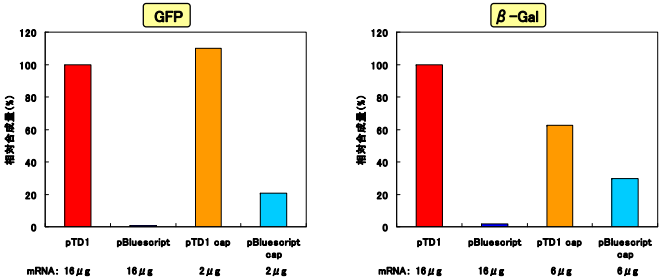
バキュロウィルス(MnNPV)5'UTRの効果を検討するために、本配列を有さないpBluescript(Stratagene社製)を用いて発現ベクターを作製し、それらの合成量の比較を行った。5'UTRのみの影響を検討するため、開始コドン以下の配列はpTD1と同一になるように設計した。またcap構造付加の影響も同じベクターを用いて検討した。

● pTD1由来mRNAの5'末端側の配列

5'-GGAGUAUUUUUAUUCUUUCGUAAAAAAAUUAGAAAAAUAAAAUAUAAAGAUAUG
バキュロウィルス(MnNPV)5'-UTR　翻訳開始

● pBluescript由来mRNAの5'末端側の配列

5'-GGGCGAAUUGGGUACCGGGCCCCCCCUCGAGGUCGACGGUAUCGAUAAGCUUGAUAUG
翻訳開始



合成反応:　cap構造の付加は、Ribo m^7G cap analog(Promega社製)を用いて行った。
50μlスケールで25℃、5時間反応を行った。mRNA添加量はグラフ下段に記載
活性測定:　GFP – プレートリーダー(Genios, TECAN)で蛍光強度を測定.
Gal– 測定キット(E2000, プロメガ)を使用

Fig. 2　翻訳促進配列の効果

実験に使用した発現ベクター

ベクター	翻訳促進配列	翻訳促進配列と開始コドン間の介在配列
pTD1	ポリヘドリン	GAT
pEU3-N II TOYOBO社製	Ω	GAT
pTNT Promega社製	β-グロビン	無し

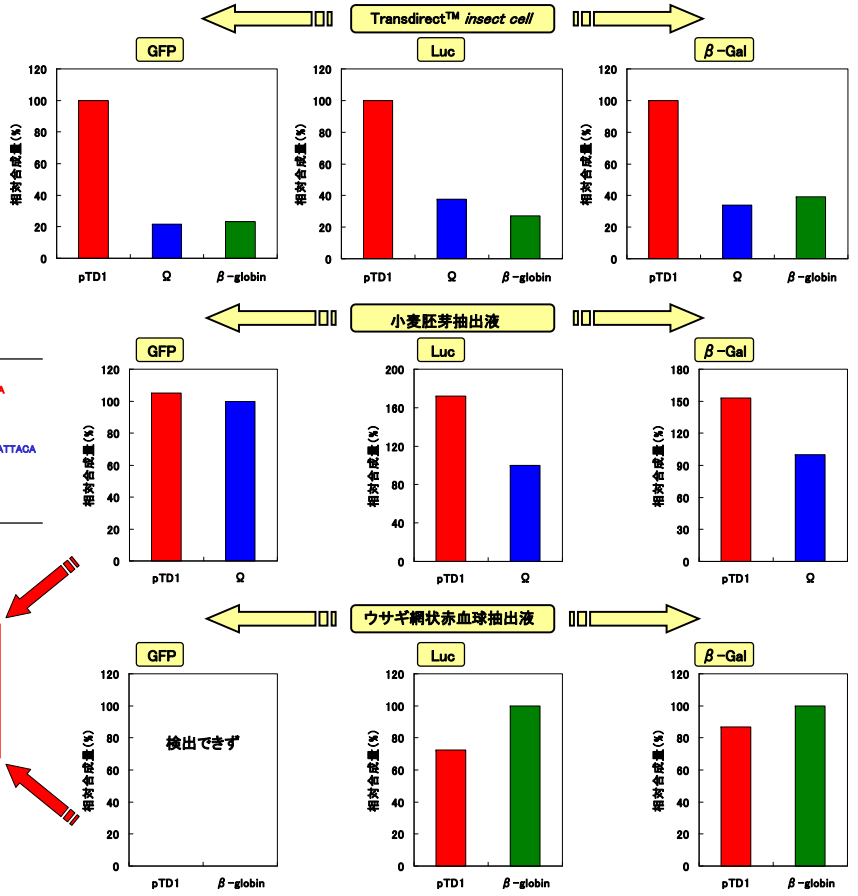
各種翻訳促進配列と抽出液の組み合わせ

ポリヘドリン5'-UTR－Transdirect™ *insect cell*
5'-AGTATTTTTATTCTTTCGTAAAAAAATTAGAAAAATAAAATATAAA

Ω配列－小麦胚芽抽出液
5'-TATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAAACAACAACAACATTACA
TTTTACATTGTACAACTACA

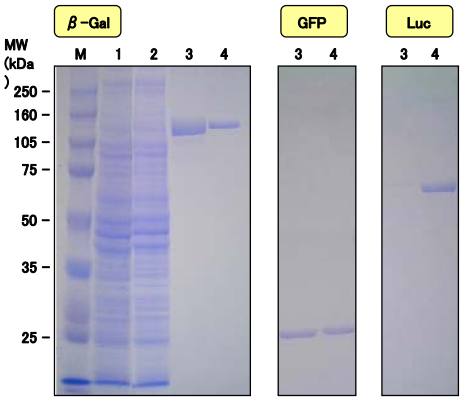
β-グロビンリーダー配列－ウサギ網状赤血球抽出液
5'-GAATACAAGCTACTTGTTCTTTTTGCA

pTD1ベクターは、昆虫系以外の無細胞タンパク質合成系においても効果的な翻訳促進効果を示す。



反応条件:　すべての反応はバッチ反応で行った。
Transdirect™ *insect cell*-25℃、5時間、16μg mRNA/ 50μl 反応系
小麦胚芽抽出液(PROTEIOS™, TOYOBO)-25℃、5時間、12μg mRNA/ 50μl反応系
ウサギ網状赤血球(Rabbit Reticulocyte Lysate System, nuclease treated, Promega)-30℃、90分、2μg/ 50μl反応系
活性測定:　ルシフェラーゼアッセイキット(E1500, プロメガ)を使用

Fig. 3　既報の翻訳促進配列との比較



M.　分子量マーカー　3. N末 *Strep* タグ 精製
1.　反応前　4. C末 *Strep* タグ精製
2.　反応5時間後
Strep タグ : WSHPQFEK

反応液1 mlあたりのタンパク質収量(μg)

	N末タグ	C末タグ
β-Gal	18	3.5
GFP	22	18
Luc	1.2	12

・各種遺伝子のN末またはC末に*Strep*タグをPCRにより導入→pTD1にサブクローニング
・発現プラスミドよりmRNAを合成
・1 mlスケールでタンパク質合成(25℃、5時間)
・反応液をBufferA(50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH8.0)で平衡化した Strep-Tactin Superflow(0.5 ml, QIAGEN社製)にアプライ
・2.5 mlのBufferAで洗浄
・1.5 mlの2 mM desthiobiotinを含むBufferAで溶出
・MWCO = 10 kDaの限外ろ過膜を用いて、溶出液を60μl程度まで濃縮

Fig. 4　合成タンパク質の精製

SHIMADZU BIOTECH
bringing analysis to life