

[ジスルフィド結合を有するタンパク質の合成2]

通常、無細胞タンパク質合成系は、還元条件下でタンパク質合成を行うために反応液中にDTTなどの還元剤を含みます。このため、ジスルフィド結合を有するタンパク質の場合、不溶化する、活性がないなどの問題が生じています。Transdirect *insect cell* アプリケーションデータ⑤では、還元剤を含まないTransdirect還元剤フリーキット*を用いて大腸菌アルカリフォスファターゼ（S-S結合2本）の活性型での合成例を報告しました。今回は、より複雑なジスルフィド結合を有するヒトリゾチーム（S-S結合4本）を活性型として得るための検討を行いましたので報告します。

* Transdirect還元剤フリーキットは特注品となります。抽出液および反応バッファにDTT等の還元剤が一切含まれません。詳細はお問い合わせください。

実験手順

通常キットと還元剤フリーキット（製造時に還元剤を一切使用せずに調製）、さらに還元剤フリーキットに還元型グルタチオン（GSSG）、酸化型グルタチオン（GSH）およびプロテインジスルフィドイソメラーゼ（PDI）を添加した系においてヒトリゾチームをそれぞれ合成し、活性を比較しました。

さらにアフィニティ精製を行い、その比活性を native 精製品と比較しました。

詳細な方法については裏面を御参照ください

結果

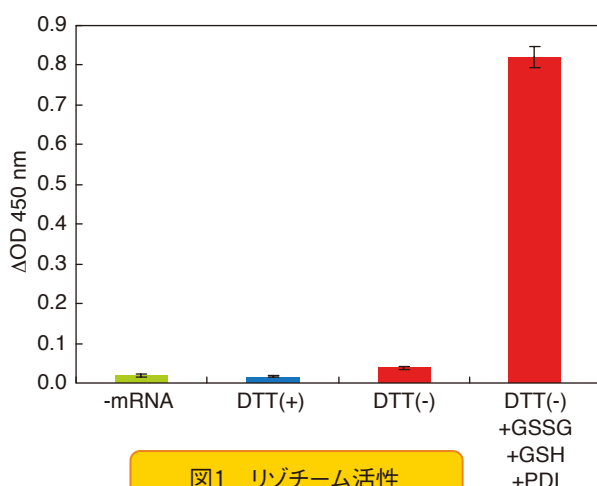


図1 リゾチーム活性

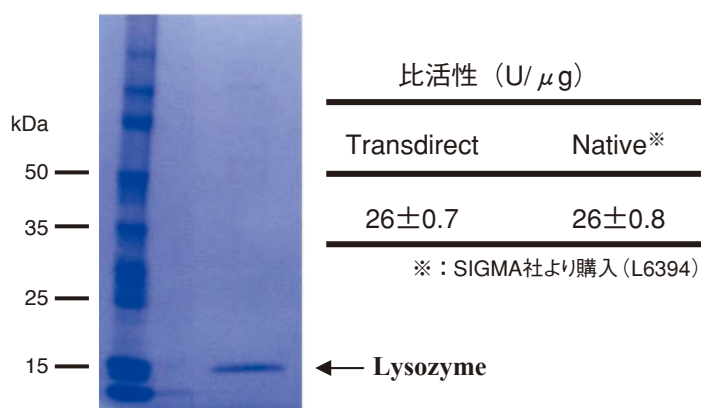


図2 アフィニティ精製リゾチームのSDS-PAGEと比活性

ヒトリゾチームの場合、還元剤フリーの反応系にGSSG、GSHおよびPDIを最適添加することにより、翻訳効率を低下させることなく活性型で合成することが出来ました(図1)。さらにアフィニティ精製により、反応液1 mLあたり約30 μgのタンパク質が得られ、その比活性はnative精製品と同等の値を示しました(図2)。また、このヒトリゾチームのジスルフィド結合はnativeと等しく架橋されていることが質量分析装置を用いた構造解析によって確認されました(文献1)。

以上のように、Transdirect *insect cell* を用いた無細胞タンパク質合成において反応液の組成を改良することにより、タンパク質合成量が低下することなくジスルフィド結合を有するタンパク質が活性型として取得できる例を示すことが出来ました。

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

方法

・発現ベクターへのクローニング及び mRNA の調製

目的タンパク質のC末端にスパーサー配列と Strep-tag®配列が導入される、pTD1 の改変発現ベクターである pTD1-strep を構築した (文献 1)。本発現ベクターにヒトリゾチームのコード領域をクローニングした。その後、キット付属の取扱説明書に従って mRNA の調製を行った。

※ Strep-tag® は、IBA 社の登録商標です。

・タンパク質合成

タンパク質合成は、Transdirect insect cell 付属の取扱説明書と同様の方法で行った。

また、GSSG、GSH、PDI を用いた反応系では、還元剤フリーキットに最終濃度で 0.5 mM GSSG、0.5 mM GSH、200 µg/mL PDI ※となるよう添加し、反応を行った。

※ PDI は、タカラ社製 (コード 7318) を用いた。

・タンパク質精製

還元剤フリーキットに GSSG、GSH および PDI を添加した系において合成したヒトリゾチームを Transdirect insect cell アプリケーションデータ②に記載の方法に従い、精製した。

ただし、限外濾過膜には MWCO = 3kDa のものを用いた。

・合成タンパク質の活性測定

リゾチームの活性測定は、20 µL の反応液を用いて、以下の組成 (800 µL) で行った。

37°C で 30 分間インキュベートし、450nm の濁度を測定し、濁度の減少を算出した。

また、1 U は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 中において、37°C で 1 分間に濁度が 0.001 減少するために必要な酵素量と定義した。

組成: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、240 µg/mL *Micrococcus luteus*

・文献

1: Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Nishimura, O. and Tsunasawa, S., *Proteomics*, 2007, in press

技術に関するお問合せは・・・

分析計測事業部 バイオ・臨床ビジネスユニット

TEL (075) 823-1351

WEB <https://solutions.shimadzu.co.jp/form/biotech/contact.html>

E-Mail t-direct@shimadzu-biotech.jp

Transdirect insect cell (P/N 292-30000-91)

■キット内容 ・Insect Cell Extract (黄) × 5本 ・Reaction Buffer (青) × 1本
・4mM Methionine (赤) × 1本 ・0.5 µg/µL Control DNA (白) × 1本
・0.5 µg/µL pTD1 Vector (緑) × 1本 ・取扱説明書

■反応回数: 40 回 (50 µL 合成反応系)

■保存温度: -80°C

■価格: 31,185円 (税込)

〈ご注意〉・試薬キットロット間の合成量には、多少の差が見られますがご了承ください。

・概観及び仕様は予告なく変更することがありますのでご了承ください。

・本製品の使用は試験研究用のみです。臨床、医薬品・食品製造用途には使用できません。

バルクキット (受注生産のため、詳細はお問い合わせください。)

■価格 (税込)

20キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット20 (P/N 292-30000-92) 404,250円

50キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット50 (P/N 292-30000-93) 924,000円

100キット相当分 Transdirect insect cell バルクキット100 (P/N 292-30000-94) 1,617,000円

バルクキットには、pTD1 Vector と Control DNA は含まれません。



※価格は2008年10月1日現在のものです。

※仕様および価格は改良のため、予告なく変更することがありますので、ご了承ください。

 島津製作所

分析計測事業部 604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1

バイオ・臨床ビジネスユニット

604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1 (075) 823-1351

<http://www.shimadzu-biotech.jp/>

取次店