



Expressing Mammalian Proteins Using Insect and Rabbit Cell-Free Lysates

昆虫およびウサギの無細胞ライセートを用いた哺乳類タンパク質の発現

By Lynn Litterer, Promega Corporation

原文 (英語) は http://www.promega.com/pnotes/101/17252_19/17252_19.pdf 参照

アブストラクト

TNT®システムのような真核生物無細胞タンパク質発現システムは、迅速なタンパク質発現を可能にする方法で、しかもバクテリアで発現したときに見られるような不溶化の問題を避けることができます。可溶性でかつ機能を持ったタンパク質を、プラスミドDNAから1~4時間で得ることができます。本稿では、発現の困難な10種類のタンパク質を取り上げ、TNT® T7 Insect Cell ExtractとTNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いて真核無細胞発現の利点を示します。

イントロダクション

無細胞ライセートを用いた転写および翻訳カップリングシステム (TNT®システム) は、コード配列から目的タンパク質を迅速に合成できる方法です。多くの真核生物タンパク質はバクテリアのシステムでの発現が困難です。コドン使用頻度の違い、ヘルパータンパク質の必要性、封入体形成など全てが、目的タンパク質の回収を妨げる要因になります。真核培養システムであればこれらの問題を避けることができますが、時間がかかる上にタンパク質の標識には適していません。何日も時間を要するバクテリアやバキュロウイルス、哺乳類細胞培養での発現とは対照的に、真核無細胞ライセートなら数時間で機能を持った可溶性タンパク質を合成することができます。真核無細胞ライセートの利点を示すために、新しいTNT® T7 Insect Cell Extract (ICE) Protein Expression Systemと、すでに評価が確立しているウサギの網赤血球ライセート (RRL) を用いたTNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemを用いて、10種類の困難なタンパク質の発現を行いました。

可溶性タンパク質を容易に発現

ここでは、大腸菌株BL21で発現すると不溶性になる10種類のヒトタンパク質を選びました (1)。これらのタンパク質サイズは、9,658Daから254,630Daの広範囲をカバーしています (表1)。これらのタンパク質コード領域はRRL発現のためにFlexi®ベクター-pF1AまたはpF1Kにクローンニングしました。さらにコード領域を簡単な移行反応により (2)、pF25AまたはpF25K ICE T7 Flexi® Vectorに移しました。これらのベクターにはポリヘドリンの5'-および3'-非翻訳領域が付加され、人工的なポリA配列が対象遺伝子のメッセンジャーRNAに付加されることで、昆虫細胞抽出液での発現が向上します。pF1およびpF25 Flexi®ベクターは共にT7プロモーター配列と転写終結配列を有していますが、元のアミノ酸配列に親和性タグや溶解度を上げるためのタグが付加されることはありません。プラスミドDNAはPureYield™ Plasmid MiniprepおよびMidiprep Systemで精製しました。また、TNT® T7 ICEに用いるDNAはエタノール沈殿で濃縮しました。

TNT®反応は、TNT® Quick CoupledおよびT7 ICE Systemのマニュアルの記述に従って行いました (3,4)。どちらのシステムでも、転写・翻訳に必要な鋳型プラスミド以外の全ての成分を含んだマスターミックスフォーマットを用います。また、どちらのシステムにおいても、標識したアミノ酸をオプションとして加えることで新しく合成されたタンパク質を容易に検出することができます。これらの実験で合成したタンパク質では、1µlのFluoroTect™ Green_{Lys} tRNAを加えてリジン残基を蛍光標識しました。タンパク質はゲル電気泳動後にイメージングを行い解析しました。発現したタンパク質が可溶性であるかどうかを判断するため、各反応の一部を15分間14,000rpmで遠心して不溶性物質を沈殿させた後の上澄を、一方では残りの反応液で翻訳された全タンパク質

表1. 発現と溶解度をテストしたヒトタンパク質

タンパク質	略語	GenBank® 登録番号	分子量 (Da)	リジン 残基数
1 Small muscular protein	SMPX	BC005948	9,658	9
2 Melanoma antigen recognized by T cells (MLANA)	MAR1	BC014423	13,256	6
3 B-cell translocation gene 1 anti-proliferative	BTG1	NM_001731	19,308	8
4 Caspase-6, apoptosis-related cysteine protease	CASP6	BC000305	33,409	20
5 Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	NM_001315	41,393	16
6 Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	NM_017460	57,542	38
7 Protein kinase C, gamma	PRKCG	NM_002739	78,547	37
8 Minichromosome maintenance deficient 5 cell division cycle 46	MCM5	NM_006739	82,385	47
9 v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	ERBB2	NM_004448	138,026	39
10 Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	PTPRZ1	NM_002851	254,630	109

ク質を検出しました。ここでテストした目的タンパク質の全てにおいて、可溶性タンパク質と全タンパク質の間に違いはありませんでした(データ未掲載)。これにより、TNT®反応では今回テストした全てのタンパク質が完全に可溶性であることが分かりました。

10種類全てのタンパク質の発現が確認されましたが、発現タンパク質の検出量はタンパク質とライセートの種類によって異なりました(図1)。バンドの強度は、合成されたタンパク質量とタンパク質において標識されたリジン残基数を反映しています(表1)。RRLシステムでは、サイズの小さいタンパク質のSDS-PAGE分析はRRLがヘモグロビンを含有しているため不明瞭です。ヘモグロビンのバンドはゲル上で11から19kDaの範囲に広がり内因性の蛍光を示します。しかも、ヘムの赤色によって吸光度ベースの活性測定を行う場合にバックグラウンドが上がることもあります。対照的にICEライセートは透明で、蛍光検出においても内因性タンパク質はかすかなバンドとして認められるだけでした。結果として、ICEシステムを用いて発現を行うと13.2kDaのMAR 1タンパク質を検出することができました。MAR 1タンパク質には標識されるリジンが6残基しか含まれておらず、この研究で示したパネル中のタンパク質あたりのリジン残基数では最も少ない数となっています。

全体的にICE反応ではRRL反応よりもタンパク質収量が多くなる傾向があります(5)。この傾向は、ICEライセート中でのFluoroTect™ Green_{Lys} tRNAの標識効率が低いため、シグナル強度には直接反映されません。しかし、どちらのライセートでより活性タンパク質の収率が高くなるかはタンパク質によって異なります。

活性を有するタンパク質の発現

発現させるタンパク質によっては、精製せずにTNT®反応液から直接酵素活性を検出できるものもあります。その実例として、ICEとRRLシステムの両方でプロカパーゼ6を発現させ、Caspase-Glo® 6 Assayを用いて酵素活性を測定しました(図2)。RRLも良好な全長タンパク質を発現させることができたが(図1のレーン6)、ICE反応からのサンプルはRRL反応よりも非常に高い活性を示しました。どちらのサンプルにおいてもカスパーゼ6酵素を活性化するための処理を行っていません。ICEがより多くのタンパク質を生産しているか、あるいはRRLには存在しない内因性のカスパーゼ活性化タンパク質がICEに含まれることで、プロカパーゼ6のタンパク質分解による活性化が進むものと考えられます。

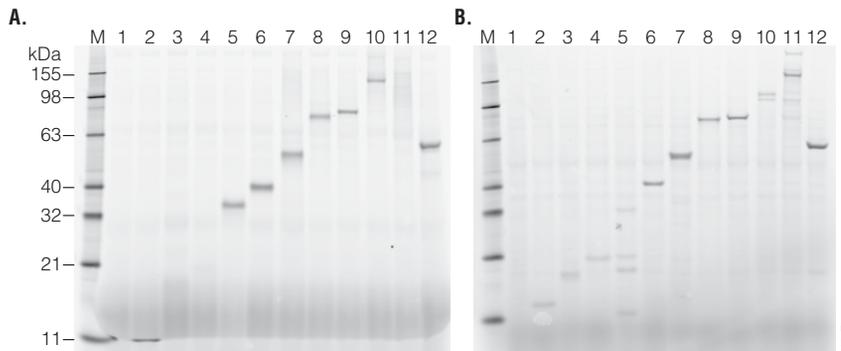


図1. TNT®抽出液で発現した様々なサイズの真核生物タンパク質

反応はTNT® Quick Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号 L1170) (パネルA) またはTNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System (カタログ番号 L1102; パネルB) で推奨される方法で、1μlのFluoroTect™ Green_{Lys} tRNA (カタログ番号 L5001) を加えて行った。翻訳終了後、各TNT®反応のうち5μlに、1μlのRNase ONE™ Ribonuclease (カタログ番号 M4261) と4μlの水を加えて室温で15分間インキュベートし、取り込まれなかったFluoroTect™ tRNAを除去した。RNase-ONE™ Ribonucleaseで処理したサンプルのうちの4μlをサンプルバッファーと共に10分間70℃でインキュベートし、4-12% NuPAGE® Bis-Tris SDSポリアクリルアミドゲルで解析した。タンパク質は、フルオレセインに適したフィルターを用いたTyphoon® 9410で蛍光スキャンにより検出した。レーンM、蛍光マーカー (Invitrogen) ; レーン1、鋳型なしのネガティブコントロール反応 ; レーン2-11、表1に列挙したタンパク質1-10 ; レーン12、ルシフェラーゼのコントロール反応。

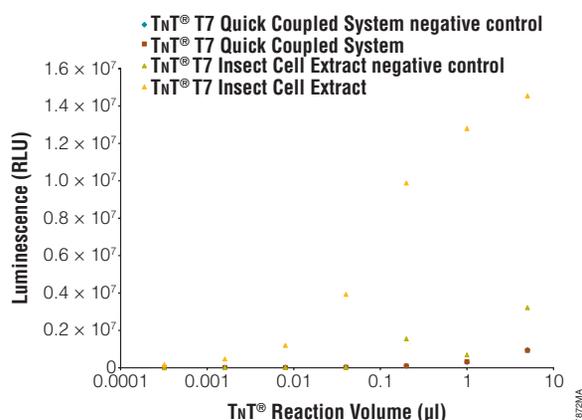


図2. Caspase-Glo® 6活性

PBSでカスパーゼ6 TNT®反応液を10倍ずつ連続希釈した。各サンプルには、希釈したTNT®反応液100µlとCaspase-Glo® 6試薬100µlが含まれる。サンプルはプレートシェーカー上で30分間、室温でインキュベートした後、GloMax® 96ルミノメーターで発光を測定した。

まとめ

真核無細胞発現TNT®システムはタンパク質を迅速に発現する有効な手段です。これらのシステムによって時間を節約することができ、バクテリアでの発現で見られる不溶化の問題を回避することができます。可溶性で機能を持つタンパク質が、プラスミドDNAから1~4時間で合成できます。TNT®システムによって、標識アミノ酸を合成タンパク質に取り込ませることもできます。これによって、新しく合成されたタンパク質をSDS-PAGEで追跡することも容易になり、またそれ以降のアプリケーションにも役立ちます。

参考文献

- Slater, M. *et al.* (2005) *Promega Notes* **91**, 21–5.
- Slater, M. (2006) *Promega Notes* **93**, 8–10.
- TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Technical Manual* #TM305, Promega Corporation.
- TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System Technical Manual* #TM045, Promega Corporation.
- Leippe, D. *et al.* (2008) *Promega Notes* **100**, 11–2.

プロトコル

- ◆ *TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression Technical Manual* #TM305, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tm305/tm305.html
- ◆ *TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System Technical Manual* #TM045, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tm045/tm045.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	40 反応分	L1102	82,000
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System†	10 反応分	L1101	23,000
	40 反応分	L1170	68,000
	5 反応分	L1171	18,000
pF25A ICE T7 Flexi® Vector	20 µg	L1061	48,000
pF25K ICE T7 Flexi® Vector	20 µg	L1081	48,000
Flexi® System, Entry/Transfer	5/20 回分	C8640	30,000
Flexi® System, Transfer	100 回分	C8820	98,000
PureYield™ Plasmid Miniprep System*	50 回分	A1221	12,000
PureYield™ Plasmid Midiprep System*	25 回分	A2492	27,000
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System†	40 反応分	L5001	50,000
Caspase-Glo® 6 Assay*†	10 ml	G0970	66,000
RNase ONE™ Ribonuclease*†	1,000 U	M4261	13,000
GloMax® 96 Microplate Luminometer		E6501	2,500,000

*Additional sizes available. † For Laboratory Use.