

TNT® T7 Quick for PCR DNAを用いたPCR産物のin vitro転写 / 翻訳

A New TNT® System for Enhanced Expression of PCR DNA

Restriction Site	Bacteriophage Promoter	Spacer	Kozak Translation Initiation Sequence	GeneRestriction Target Sequence (match ~20)
GGATCC	TAATACGACTCACTATAGGG	AG	CCACCATG	N 20
GGATCC	TAATACGACTCACTATAGGG	AG	CCACCATGG	N 20
GGATCC	TAATACGACTCACTATAGG	AACAG	CCACCATG	N 20
NNN	TAATACGACTCACTATAGG	AACAG	CCACCATGG	N 20

表1. 5'側プライマーの配列 (これらは鋳型DNA 上流に付加されることによりin vitro 転写/翻訳が可能であることが確認されたプライマーです)

はじめに

多くの種のゲノム配列が完全に解析され、ヒトゲノムの解析もこの3年以内に完了することは確実です。このように配列情報はますます増え続けて、その配列情報に含まれる遺伝子の同定とそれに対応した機能解析が急速に行われています。これらの研究により細胞、組織などが自然な状況下で働かせる遺伝子の機能解析が進展することでしょう。このことは「ノックアウト/ノックイン」システム(例えばマウスの急速な開発や多様なセルベースアッセイの進捗を促します。しかし、それぞれの方法にはそれぞれの制約があるために、通常遺伝子産物の機能を検出するために多面からのアプローチが求められ、このアプローチには無細胞系の抽出液を用いた迅速な発現実験系も含まれます。これらの機能的な戦略ではDNA/RNAマイクロアレイ(チップ)のような核酸配列からのアプローチとバイオインフォマティクスが相互的に関連します。さらに個人の Single Nucleotide Polymorphism(SNPs)が同定され、テーラーメイド医療の時代を迎えようとしています。これらの研究ではタンパク質の生化学的実験手法やin vitro発現実験法によって機能解析が行われます。

新製品TNT® T7 Quick for PCR DNA

プロメガでは1992年にTNT® Rabbit Reticulocyte Lysate System^(a,b,c,d)を使ったタンパク質発現系を導入しました。この系では鋳型としてDNAを使う特長により以下のように多様なアプリケーションが開発されました。

構築したクローンの確認 / タンパク質機能の確認 / 分子間相互作用や環境中の物質との相互作用の検出 / 翻訳後修飾の検出 / 変異が引き起こす疾病の検出 (PTTまたはIVSP) / 無細胞系でのタンパク質の進化に関する真核リボソームディスプレイシステムの開発 / in vitro発現クローニングを使った新規遺伝子の同定

近年ではPCRで増幅したDNAをTNT® Systemの鋳型として用いられることが多くなりました。そこでプロメガではPCR産物を増幅反応から直接に転写 / 翻訳反応に加えることができる新しいシステムTNT® T7 Quick for PCR DNA^(a,b) (カタログ番号L5540)を開発しました。PCRで合成されたDNAのための転写 / 翻訳反応条件はプラスミドから最適に行う条件と異なります。このキットはPCR産物からの発現に特異化されているのでプラスミドを鋳型とした時、その転写レベルが低下します。そのためプロメガでは、プラスミドからの発現には TNT® T7 Quick System^(a,b,c,d)を推奨します。

プライマーの設計

5' プライマー

TNT® T7 Quick for PCR DNAでは転写の開始のためDNAにT7 RNA Promoterが必要です。鋳型DNAに

T7 RNA Promoterが含まれているならば、T7 RNA Promoterの上流にアニーリングするプライマーをデザインします。また、5' プライマーにT7 RNA Promoter配列を組み込むことで、PCR産物に直接導入することができます。効率的な翻訳のためにはKozak consensus配列も必要です。一般的には、目的の配列の5'-UTRから増幅すれば、元来のKozak配列が含まれます。しかし、AUGから増幅する場合、Kozak配列を挿入しなければなりません(表1)。Kozak配列にはポリモフィズムがあり、ある配列ではin vivoとin vitroの両方で翻訳効率の向上が認められています。T7 RNA Promoterの上流にある程度の長さ(6~10ヌクレオチド)の配列を付加することで、効率的にRNA polymeraseが結合し、RNAを生成することができます。

3' プライマー

一般的に3'プライマーは、遺伝子のカルボキシ末端が終始コドンの下流の22~26塩基をプライマーとして設計します。元来の終止コドンが含まれない場合、3'プライマーにインフレームとなる終止コドンを組み込みます。終止コドンを組み込むことによりベクチル-tRNAからリボソームが解離されるため複数の翻訳反応が行われるようになります。

TNT® T7 Quick for PCR DNAの実験結果

TNT® T7 Quick for PCR DNAに使用可能な鋳型DNAはプロメガのAccess RT-PCR System[®]で得られたPCR産物のみならず、他社の製品により得られたPCR産物も利用できることが確認されています。いずれのPCR産物も精製を行う必要はなく、直接このキットに使用することができます。また、他社の製品では転写、翻訳の反応を2段階に分けて行うのに対して、プロメガのTNT® Systemは転写/翻訳を1段階で1本のチューブ内で行うことができるため、操作を迅速、簡単に行うことができます。TNT® T7 Quick for PCR DNAでは特に、転写/翻訳の活性と忠実性に大きな向上が確認されています。このことは、翻訳産物のSDS-PAGEを行った結果、従来のTNT® T7 Quick Systemと比較すると、PCR産物を鋳型とした場合は、翻訳産物が10倍以上得られることにより確認されました(ただし、プラスミドDNAを鋳型とした場合約50%減少しました)。また従来では弱いバンドとして示されていた微量の翻訳産物が明確なバンドとして確認されました(図1)。さらに、他社の製品と比較したところ、6~25%の転写産物の収率の向上が確認されました。

PCR産物を利用したアプリケーション

PCR産物を鋳型としたTNT® Systemの登場により、多くのアプリケーションが可能となりました。

その中で主だったアプリケーションを紹介します。

PTT : プロテイントランケーションテスト (PTT) では遺伝子変異が原因となっている疾病をタンパク質の変異から検出します。TNT® Systemにより得られた転写/翻訳産物により、ナンセンス変異を探し出すことができます。ナンセンス変異を起こした遺伝子の転写 / 翻訳産物は正常遺伝子のもより低分子量になります。PTTの特長は広範囲 (2~3kb) のDNAおよびRNA断片を調べることが可能な点です。これにより、疾病につながるナンセンス変異のみを検出することができ、疾病には関係のない遺伝子多型の影響を避けることができます。

IVEC : in vitroでの発現クローニング(IVEC)は遺伝子機能の探索、生化学的な目的での遺伝子のスクリーニング、類似タンパク質の探索に広く用いられる方法です。従来のIVECではDNAをプラスミドに組込んで増幅し、得られた50~100クローンをTNT® Systemに用いていました。ベクターに対するプライマーを用い、PCRで増幅すると、これよりも多くのクローンが得られます。TNT® T7 Quick for PCR DNAはPCRで増幅された多数のクローンを効率良く転写 / 翻訳するので、IVECにも有効です。

Ribosome Display : リボソームディスプレイではTNT® SystemによりDNAライブラリーの転写、それに続いてmRNA集団の翻訳が行われます。鋳型DNAの終止コドンを変異させることにより、転写 / 翻訳産物であるタンパク質と、それをコードするmRNAをリボソームに結合させた状態に保つことができます。このようにして得られた、タンパク質-mRNA-リボソームの複合体(ARM)をターゲットに対してスクリーニングします。得られたARMは複合体のままRT-PCRに供することができ、得られたcDNAを解析することによりタンパク質に関するさまざまな情報を得ることができます。

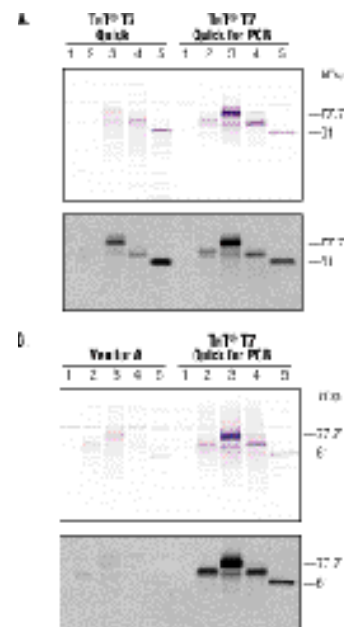


図1. 各PCR産物をTNT® T7 Quick for PCR DNAとTNT® T7 Quick Systemおよび他社製品による転写 / 翻訳産物をSDS-PAGEした結果。翻訳産物へのビオチン化リジンをとり込ませ、リジンをビオチン標識した。泳動後バンドをPVDF膜に転写した。A. 膜に転写したバンドをストレプトアビジン-APと結合させ、Western Blue® Stabilized Substrate(Cat.#L5070またはCat.# S3841)による発色検出を行った。B. 膜に転写したバンドをストレプトアビジン-HRPと結合させた、Transcend™ 化学発光試薬(Cat.# L5080)による化学発光検出を行った。

a, b, c, d, e : 特許に関する記載については Promega Notes No.74 18ページをご覧ください。

<http://www.promega.co.jp>