



# Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analog : in vitro キャップ付加された転写産物の調整

## Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analog : A Reagent for Preparing in vitro Capped Transcripts

プロメガのRibo m<sup>7</sup>G Cap Analog (カタログ番号 P1711、P1712)は、Riboprobe® System<sup>(a)</sup>や RiboMAX™ Large Scale RNA Production System<sup>(b,c)</sup>で5' m<sup>7</sup>Gキャップ構造を持つRNA転写産物を生成するためにご利用いただけます。これらのキャップ構造は、キャップに結合するタンパク質(翻訳開始因子またはeIF4E)のmRNAへの結合のためのアンカーとなり、翻訳を促進します。

### はじめに

真核生物のmRNA分子のほとんどは、5' 7-メチルグループ(m<sup>7</sup>G)で修飾された5'-5' 3リン酸に結合したグアニンを含む特別な5'構造を持ちます。このキャップ構造は、RNAポリメラーゼIIによって合成された転写産物に核内酵素のグアニリルトランスフェラーゼとメチルトランスフェラーゼによって添加されます。RNAのキャップ構造は、細胞のいくつかの機能に影響し、そのなかで翻訳への影響がもっともよく研究されています。翻訳開始の主要なステップは、キャップ結合タンパク質(真核生物翻訳開始因子4E; eIF4E)のRNA m<sup>7</sup>Gキャップ構造の認識とそれへの結合です。天然のm<sup>7</sup>Gキャップ構造を持つレオウイルスRNAを使った初期の研究により、これらのキャップ構造は小麦胚芽抽出液における効率的な翻訳に必須であることが示されました。RNAのm<sup>7</sup>Gキャップのほかの役割は、核と細胞質中のmRNAを安定化し、半減期を増加させ、mRNA前のスプライシングを促進し、RNAを核から細胞質へと輸送することです。

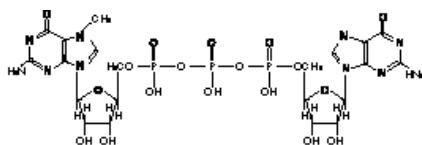


図1. Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analogの化学構造

### in vitro転写のためのキャップ構造

in vitroでT7、SP6、またはT3ファージRNAポリメラーゼによって作られるRNA転写産物は、m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G(図1)などのキャップアナログが反応に加えられると、キャップ構造を持つように合成できます。これらのファージポリメラーゼは、翻訳開始のためのヌクレオチドとしてGTPを必要とし、m<sup>7</sup>Gアナログが反応中にGTPよりも高モル濃度で存在する場合は特にそれを5'のヌクレオチドとして取り込みます。キャップジヌクレオチドの取り込みによって、天然のキャップされたRNAや、逆にキャップを持つRNAの種と類似のRNAが生成されます。

m<sup>7</sup>Gキャップアナログを使ってin vitroで生成されたRNA転写産物は、多くの異なるアプリケーションで利用できます。例えば、ウサギ網状赤血球や小麦胚芽から作られたin vitro翻訳抽出液では、キャップ構造を持つ転写産物からのほうが持たない転写産物からよりも多くのタンパク質が合成されることが報告されています。最近の研究では、細胞を含まない抽出液に付加されたインゲンマメ南部モザイクウイルスについて、ゲノムRNAのオープンリーディングフレーム2の認識における5'キャップ構造の重要性が示されています。ウイルスの機能のほかの研究は、ウイルスの感染性をキャップ構造を持たないRNAではなくキャップ構造を持つRNAと関連付けています。in vitroでm<sup>7</sup>Gキャップアナログを使って生成されたRNA転写産物は、RNAの安定性、翻訳、および核・細胞質間の輸送を研究するためにXenopusの卵細胞にも注入されています。プロメガのRibo m<sup>7</sup>G Cap Analog (カタログ番号: P1711、P1712)は、Riboprobe® Systems (カタログ番号: P1420、

P1430、P1440、P1450、P1460)およびRiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems (カタログ番号: P1280、P1290、P1300)で、5' m<sup>7</sup>Gキャップ構造を持つRNA転写産物を合成するためにご利用いただけます。Riboprobe® Systemは、プローブ用にラジオアイソトープでラベルできるRNAを合成するようにデザインされています。RiboMAX™ Systemは、DNAテンプレートあたりより多量のRNAを合成するようにデザインされています。

図2は、Ribo m<sup>7</sup>G Cap AnalogをRiboprobe® System (カタログ番号: P1440)で使って合成されたキャップされたRNA転写産物とキャップされていないRNA転写産物の分離を示しています。転写産物は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離されました。ジヌクレオチドキャップアナログを取り込んだキャップされた転写産物は、キャップされていない転写産物と比べて大きく、移動もよりゆっくりです。GTPの濃度に対するキャップアナログの割合が増加すると、キャップされた転写産物の割合が増加します。

### キャップアナログの効果: RNA産出量におけるGTPの割合

キャップアナログを使うときは、in vitro転写反応でATP、CTP、UTPに対して低濃度のGTPが使われます。図3では、GTPの濃度を減らし、キャップアナログとGTPを様々なモル比で使ったとき(条件下で)の1,916ヌクレオチドの転写産物の生成量におけるその効果を示しています。これらのデータに示されるように、GTP濃度の減少はRNAの生産量の減少と対応しています。一定量のGTP濃度におけるキャップアナログのモル比はRNAの生産量にほとんど影響しません。

キャップジヌクレオチドアナログが、GTPと同程度に転写産物の中に取り込まれるとすると、RNAの生産量は7.5mM GTPのサンプルと、7.5mMのキャップアナログと0.75mMのGTPを使ったキャップアナログとGTPの比が10:1のサンプルと同じ程度にな

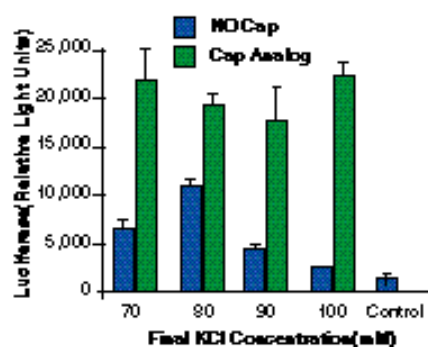


図2. RNAのキャップ付加による網状赤血球抽出液での翻訳効率の上昇  
T7 RNA PolymeraseをRiboMAX™ System(P1300)に用いてRNAを合成した。直鎖状のDT7-Luciferase DNAを鋳型として用いた。『No Cap』の反応では最終濃度7.5mM GTP、『Cap Analog』の反応では最終濃度0.6mM GTPと3mM Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analogが加えられた。転写反応後、サンプルを RQ1 RNase-Free DNase(M6101)で処理し、遠心でSephadex® G-50 spin column(Amersham Pharmacia Biotech)を通し、260nmの吸光度により定量した。1μgの各RNAをFlexi® Rabbit Reticulocyte Lysate Translation System(L4540)に加えた。2.5M KClを最終濃度70mM、80mM、90mM、100mMとなるように加えた。50μlの翻訳反応液から5μlをサンプルとしてLuciferase Assay System®(E1500)によりルシフェラーゼ活性を測定した。光量はLumiscan®ルミメーター(LabSystems)を使って定量した。グラフではルシフェラーゼタンパク質の活性を示す相対的な光ユニット(Relative Light Units; RLU)で表した。Controlのカラムは1μgのLuciferase Control RNA®を100mM KClとreticulocyte lysateに加えた時に得られたRLUを示す。

ると考えられます。しかし、これらのデータはキャップアナログがこれらのin vitro転写反応でGTPに直接代わるものではないことを示唆しています。

### キャップアナログ、KClはin vitro翻訳に影響する

m<sup>7</sup>Gキャップ構造の存在が発現されるタンパク質量に影響するかどうかを調べるために、キャップ構造を持つルシフェラーゼRNAと持たないRNAを、Flexi® Rabbit Reticulocyte Lysate System<sup>(b)</sup>(カタログ番号: L4540)で試験しました。ウサギ網状赤血球および小麦胚芽の抽出液に基づく翻訳システムでは、キャップされた転写産物で翻訳効率の増加が示されました。この実験では、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするDNAテンプレートを、Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analogの存在下または非存在下で、T7 RNAポリメラーゼの系のRiboMAX™ Systemで標準の条件下で転写しました。RNA濃度はOD<sub>260</sub>における吸光度で定量されました。

RNA濃度の定量法の信頼性を確認するために、いくつかの手順が実施されました。転写後、吸光度を定量する前に、テンプレートRNAを除くために両方のサンプルをRNase-Free DNase (カタログ番号: M6101)で処理しました。Sephadex® G-50スピンカラム (Amersham Pharmacia Biotech)で、フリーのヌクレオチドを選択的に除去しました。Sephadex® G-50による分離は、RNAサンプルからin vitro翻訳反応への残留の可能性のあるフリーのキャップアナログを除く効果もあります。フリーのキャップアナログは、キャップされたmRNAのin vitroにおける翻訳を阻害することが報告されています。1μgのRNAサンプルが、ウサギ網状赤血球抽出液の反応に加えられました。反応ごとにKClの濃度を変えるほかは、標準の反応条件が使われました。in vitro翻訳反応中のKClの濃度は、キャップ構造を持つ転写産物と持たない転写産物の翻訳効率に影響することが報告されています。KCl濃度が高いとキャップ構造を持つ転写産物よりも多くの翻訳をされます。

in vitro翻訳反応でルシフェラーゼが生産され、その量がルシフェラーゼアッセイで相対的光ユニット(RLU)を測定することにより数値化されました(図4)。キャップ構造を持つ転写産物のほうがキャップ構造を持たない転写産物よりも多くのKCl濃度でも高いタンパク質の発現量を示しています。さらに、この特定のキャップ構造を持つ転写産物から翻訳されたタンパク質の量は、試験されたKClの範囲では比較的一定していました。その一方で、対応するキャップ構造を持たない転写産物から生産されるタンパク質の量はKClの濃度が増加するにしたがい減少しました。最大の翻訳効率を得るために、翻訳反応の抽出液中で、各々の特定の転写産物についてキャップ構造を持つ転写産物と持たない転写産物の効果を比較することと、様々な濃度のKClを試験することをお勧めします。

### まとめ

Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analogは、5' m<sup>7</sup>Gキャップ構造を持つRNA転写産物を作るためにRiboprobe® SystemsやRiboMAX™ Large Scale RNA Production Systemsと組み合わせて使うことができます。キャップされたRNA転写産物は、in vitro翻訳のアプリケーションのほか、スプライシング、RNAプロセッシング、細胞内輸送、ウイルスによる感染性と翻訳などのプロセスにおける細胞内RNAの機能の研究にご利用いただけます。

a, b, c, f: 特許に関する記載についてはPromega Notes No.74 20ページをご覧ください。