



Higher Yields Plus Single-Tube Format

タンパク質 収量が増加したWheat Germ Extract Plus

By Robin Hurst, M.S., Elaine Schenborn, Ph.D., John Shultz, Ph.D., Sanchayita Kar, Ph.D., Donna Leippe, Ph.D., and Don Creswell, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では複数のタンパク質をコードする様々な転写産物を用いて、Wheat Germ Extract Plusと従来法 (Wheat Germ Extract) を用いた場合のタンパク質収量について社内比較を行いました。その結果、Wheat Germ Extract Plusを用いることにより最大22倍の収量が得られました。また、最適な鋳型mRNAを合成するために2つの新しいWheat Germ Flexi® Vectorを組み合わせることもできます。

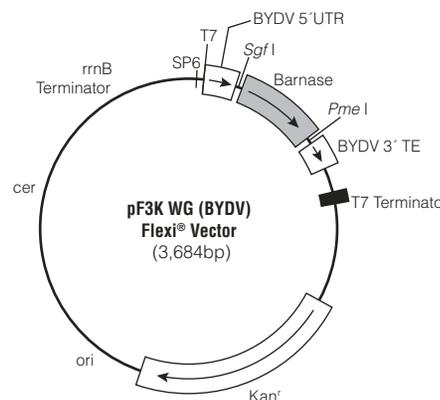
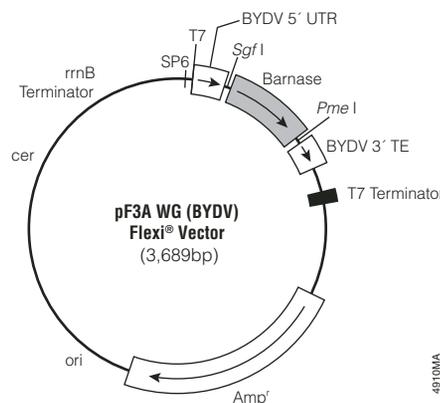


図1. Wheat Germ Flexi® Vectorの概略図

pF3A WG (BYDV) およびpF3K WG (BYDV) Flexi® Vector (カタログ番号 L5671、L5681) は、小麦胚芽抽出液でのタンパク質発現用にデザインされた。これらのベクターはオオムギ黄萎ウイルス (Barley Yellow Dwarf Virus [BYDV]) 由来の配列を目的のタンパク質コード領域の上流および下流に導入する。ベクターにはディレクショナルクロニングおよび他の発現機能を有する他種Flexi® Vectorへのタンパク質コード配列の移動を容易にする *Sgf I* および *Pme I* 制限酵素サイトが含まれる。バーナーゼ致死遺伝子はインサートを含むベクターのポジティブセレクションを可能にする。また、アンピシリン [pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector] およびカナマイシン [pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector] の各耐性遺伝子は大腸菌でのセレクションを可能にする。本ベクターについての詳細については図5またはFlexi® Vector Systems Technical Manual #TM254 参照。

翻訳効率およびタンパク質発現の比較

Wheat Germ Extract Plusは、広範な鋳型mRNAを効率的に翻訳させるために必要な全ての構成成分を含む最適化された抽出液です。後述の実験では、異なるタンパク質をコードする様々な5'または3'末端特殊配列を有するRNAをin vitroで合成し、精製しました (表1)。転写産物は、直鎖状の鋳型プラスミドからT7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (カタログ番号 P1320) により合成され、ゲル濾過により洗浄しました。

Wheat Germ Extract Plusはシングル チューブフォーマットを採用しており10~80µg/mlのタンパク質を発現させることができます。

イントロダクション

この数十年で小麦胚芽からの抽出液は真核生物のセルフリー翻訳に使用されてきましたが、優れた忠実度を持ちながら翻訳効率の低さがネックになっていました (1-3)。我々はコストパフォーマンスに優れ、頑健で高効率なWheat Germ Extract Plusを開発しました。このシステムはシングル チューブフォーマットを採用しており10~80µg/mlのタンパク質を発現させることができます。

Wheat Germ Extract Plusは様々なmRNA (キャッピング [有または無]、5'末端のウイルスリーダ配列や3'末端 ポリAテール、ウイルス翻訳エンハンサーの付加されたもの) を用いた翻訳に最適化されています。ポリAテールや3'ウイルス翻訳エンハンサーはWheat Germ Extract Plusにおける翻訳効率を顕著に増加させます。これはmRNAループを形成するためだと考えられます (4)。

翻訳アプリケーションに供するmRNAのin vitro合成にオオムギ黄萎ウイルス (Barley Yellow Dwarf Virus [BYDV]) (ルテオウイルスの1種類) 由来の5'UTR -3'TE (翻訳エンハンサー) 領域を組み込むことのできるWheat Germ Flexi® Vector (カタログ番号 L5671、L5681; 図1) を利用することができます。BYDVエレメントは相互作用して閉環ループを形成させ、mRNAのキャップやポリAデニレーションの依存状態を回避し、小麦胚芽抽出液における翻訳を相乗的に促進させることが報告されています (5-8)。Flexi® Wheat Germ Vectorを用いれば、mRNAの合成にT7とSP6両方のRNAポリメラーゼを使用することができ、同等のタンパク質が得られます。また、直鎖状または環状のプラスミドでも転写用の鋳型として使用できます。

本稿では、5つの異なるタンパク質をコードする転写産物を用いて、新しいWheat Germ Extract PlusとWheat Germ Extract (カタログ番号 L4380) の翻訳効率を比較しました。

タンパク質 収量が増加したWheat Germ Extract Plus

表1. 転写産物と発現タンパク質の特徴

転写物名	タンパク質	分子量	ソース	翻訳エレメント
poly(A) luciferase	firefly luciferase	61kDa	Luciferase Control RNA (Cat.# L4561)	poly(A) tail; no 5' cap
BYDV luciferase	firefly luciferase	61kDa	pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector clone	5' and 3' BYDV enhancers
poly(A) <i>Renilla</i> luciferase	<i>Renilla</i> luciferase	36kDa	pLVSK clone (pF3K precursor)	poly(A) tail; no 5' cap
BYDV <i>Renilla</i> luciferase	<i>Renilla</i> luciferase	36kDa	pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector clone	5' and 3' BYDV enhancers
poly(A) GST	glutathione S-transferase	26kDa	pLVSK clone (pF3K precursor)	poly(A) tail; no 5' cap
BYDV GST	glutathione S-transferase	26kDa	pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector clone	5' and 3' BYDV enhancers
poly(A) HaloTag™	haloalkane dehalogenase	33kDa	pLVSK clone (pF3K precursor)	poly(A) tail; no 5' cap
BYDV HaloTag™	haloalkane dehalogenase	33kDa	pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector clone	5' and 3' BYDV enhancers
BYDV β-gal	β-galactosidase	135kDa	pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector clone	5' and 3' BYDV enhancers

-gal RNAは環状プラスミドDNAに由来します。我々はWheat Germ Extract Plusで翻訳反応を行う場合、1反応あたり0.12~0.16μg/μlの転写産物を使用することを推奨します。

図2では、ホタルルシフェラーゼをコードするポリAルシフェラーゼおよびBYDVルシフェラーゼ転写産物（表1）を用いたバッチ法によるWheat Germ Extract Plusの翻訳実験において60分間にわたるタイムコースで直線性が得られることを示しています。このタイムコース実験では³⁵Sメチオニンでもモニタリングしましたが、結果はルシフェラーゼ活性の測定実験と同様でした（データ未掲載）。

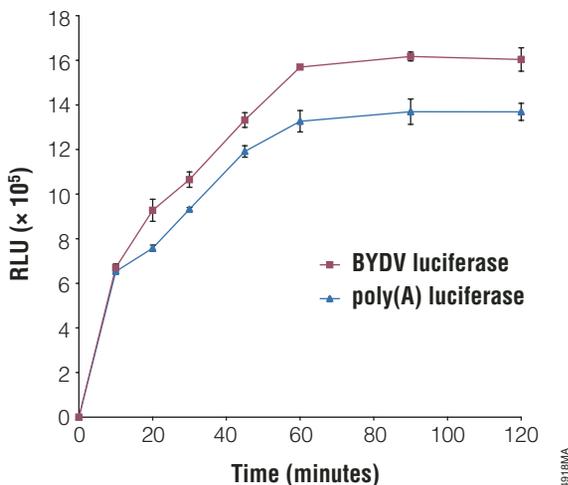


図2. Wheat Germ Extract Plusによる活性化ホタルルシフェラーゼ発現のタイムコース

転写産物はNAP™-10カラムで精製し、反応あたり0.16μg/μlの濃度で使用した。各反応は表示時間まで25℃でインキュベーションし、その反応液から2.5μlを50μlのLuciferase Assay Reagent (LAR)でアッセイし、測光はTuner TD20/20 Luminometerを用いた。測定結果は相対光ユニット (RLU)でトリプリケートの反応の平均および標準偏差として表した。

図3では³⁵Sメチオニンの取り込みによりモニタリングし、タンパク質の合成レベルを比較しました。図3に示される反応では、サイズ26~61kDaの幅の4種類のタンパク質をコードする8つの異なる転写産物（表1）を用いました。ゲルから得られた定量データでは、従来の抽出液に比べ8.5~17倍のタンパク質がWheat Germ Extract Plusで得られることを示しています。これらの結果は、RI標識メチオニンの導入によるタンパク質発現のモニタリングにも使用できることを示していました。また、タンパク質の発現はFluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System (カタログ番号 L5001) やTranscend™ Non-Radioactive Translation Detection System (カタログ番号 L5070, L5080)を用いたNon-RIモニタリングも可能です（データ未掲載）。さらに図3では、BYDV配列を持つ鋳型RNAはより高レベルのタンパク質を発現し、増加の程度はタンパク質に依存することも示していました。

GSTおよびホタルルシフェラーゼタンパク質についても、それぞれイムノアッセイおよび活性試験によりライセートから直接定量されました。表2にその結果をまとめています。Wheat Germ Extract Plusは、従来製品のWheat Germ ExtractよりもGSTでは約16~22倍以上、活性化ホタルルシフェラーゼタンパク質は約15倍以上合成しました。さらにGST+BYDV配列のRNA転写産物はポリAテールのみを持つ（BYDV配列を持たない）転写産物に比べ3倍のGSTタンパク質を生成しました。



図3. Wheat Germ Extract Plus (WGE+) と従来のWheat Germ Extract (WGE) による反応の比較

全ての反応は³⁵Sメチオニン (>1,000Ci/mmol) およびmRNA 0.16μg/μlを用いて実施し、25℃、2時間インキュベーションした。各反応から1μlを4~20%ポリアクリルアミドゲルに添加した。ゲルをPVDFメンブレンに転写し、2時間、ホスホイメージングカセットに暴露した。カセットはTyphoon™ 9410 workstationで読み取り、定量した。レーン1、2、5および6はWheat Germ Extract Plus、レーン3、4、7および8はWheat Germ Extract。レーン9はmRNAを含まないWheat Germ Extract Plus。パネルA. レーン1、3はBYDV HaloTag™ 転写産物。レーン2、4はポリA HaloTag™ 転写産物。レーン5、7はBYDVルシフェラーゼ転写産物。6、8はポリAルシフェラーゼ転写産物。パネルB. レーン1、3はBYDVウミシイタケルシフェラーゼ転写産物。レーン2、4はポリAウミシイタケルシフェラーゼ転写産物。レーン5、7はBYDV GST転写産物、レーン6、8はポリA GST 転写産物。転写産物の詳細は表1参照。

表2. Wheat Germ Extract PlusおよびWheat Germ ExtractによるGSTおよびホタルルシフェラーゼタンパク質レベルの比較

ライセート	BYDV GST	ポリA GST	BYDV ルシフェラーゼ	ポリA ルシフェラーゼ
Wheat Germ Extract Plus	82.8µg/ml	24.1µg/ml	56µg/ml	51µg/ml
Wheat Germ Extract	3.7µg/ml	1.5µg/ml	3.5µg/ml	3.5µg/ml

GSTタンパク質はGST 96 Well Detection Module (GE Healthcare, Cat.# 27-4592-01)を用いたイムノアッセイにより定量した。ルシフェラーゼはQuantilum® Recombinant Luciferase (カタログ番号 E1701) で得られた標準活性曲線をもとに定量した。

図4では様々な量の鋳型mRNAを用いた2種類の小麦胚芽抽出液によるタンパク質の大量発現について比較しています。Wheat Germ Extract Plusでは、テストした全ての鋳型濃度で135kDaのβ-ガラクトシダーゼを効率よく発現しました。定量分析ではWheat Germ Extract Plusは、0.16µg/µl鋳型mRNAを用いた場合、従来の抽出液に対して6倍の完全長β-ガラクトシダーゼが発現されていることを示しています。

その他のFlexi® Vector

Flexi® Vectorのシリーズには本稿で紹介したpF3A WG (BYDV) およびpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorの他にタンパク質発現機能を備えたベクターが揃っています。これらFlexi® Vector Systemは、2つのレアカッター制限酵素Sgf IおよびPme Iを利用したシンプルで確実なディレクショナルクローニングシステムです。これらのベクターを用いれば、目的のタンパク質コード領域を様々な機能を持つベクター（哺乳動物細胞発現ベクター、GSTタグベクター、in vitro転写用ベクター[図5参照]）へ簡便に移し変えることができます。

まとめ

真核生物系のセルフリー翻訳システムWheat Germ Extract Plusは、バッチでの翻訳活性が増加し、10~80µg/mlのタンパク質発現レベルを示すため、従来の小麦胚芽抽出液に比べ非常に優れた利点を有しています。Wheat Germ Extract Plusは広範な鋳型RNAを効率的に翻訳するための最適化された成分から構成されています。この簡単なシングルチューブ形式では、鋳型mRNAおよび望みの標識物を除く翻訳に必要な全てのものが供給されます。また、翻訳エンハンサー配列を持つFlexi® Vectorもin vitroタンパク質発現の増進に利用することができます。

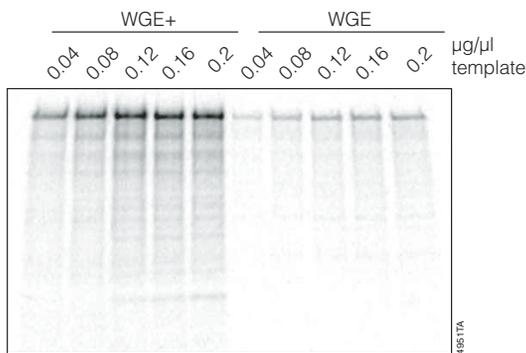


図4. Wheat Germ Extract PlusおよびWheat Germ Extract を用いたBYDV β-ガラクトシダーゼmRNAのタイトレーション

Wheat Germ Extract Plus (WGE+) およびWheat Germ Extract (WGE) の各反応で表示濃度のNAP™-5精製済みmRNAを使用した。タンパク質の合成レベルは、4~20%ポリアクリルアミドゲルからTyphoon™ 6410 workstationを用いて[³⁵S]メチオン取り込みをモニタリングして行った。

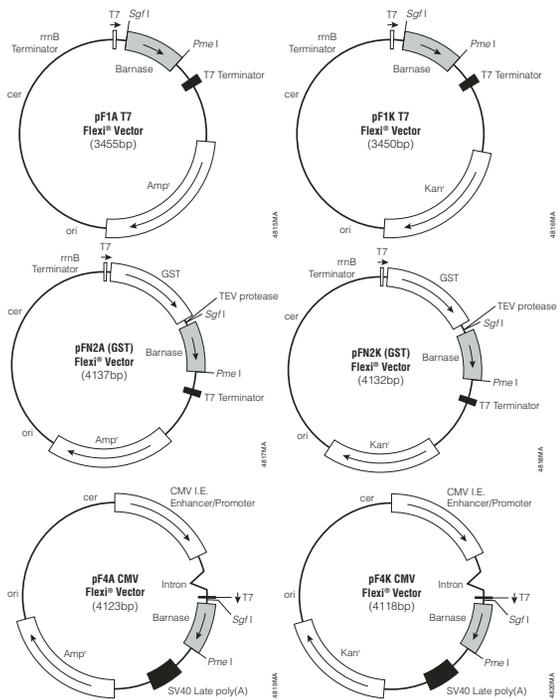


図5. Flexi® Vector

pF1AおよびpF1K T7 Flexi® Vectorは、T7 RNAポリメラーゼプロモーターを介した大腸菌およびin vitroでのタンパク質発現用ベクター。pFN2AおよびpFN2K (GST) Flexi® Vectorは、タンパク質のN末端側にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を付加するためのベクター。このGSTペプチドタグはTEVプロテアーゼによる切断/除去が可能。pF4A およびpF4K CMV Flexi® Vectorは、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) intermediate-earlyエンハンサー/プロモーターによる哺乳動物細胞内での恒常的なタンパク質発現用ベクター。

参考文献

- Roberts, B.E. and Paterson, B.M. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2330-4.
- Erickson, A.H. and Blobel, G. (1983) *Methods Enzymol.* **96**, 38-50.
- Seal, S.N., Schmidt, A. and Marcus, A. (1986) *Methods Enzymol.* **118**, 128-40.
- Gallie, D.R. (1998) *Gene* **216**, 1-11.
- Wang, S. and Miller, W.A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13446-52.
- Wang, S., Browning, K.S. and Miller, W.A. (1997) *EMBO J.* **16**, 4107-16.
- Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2000) *RNA* **6**, 1808-20.
- Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1103-9.

プロトコル

- ◆ *Wheat Germ Extract Plus Technical Manual #TM066*, Promega Corporation. (www.promega.com/tbs/tm066/tm066.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wheat Germ Extract Plus	40 × 50µl反応	L3250	60,000
	10 × 50µl反応	L3251	17,000
pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5671	45,000
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	20µg	L5681	45,000