

More Cell-Free Protein from a Single Tube

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System : 発現レベルが向上した小麦胚芽 転写/翻訳 システム

Robin Hurst, M.S., Don Creswell, B.S., Michael Slater, Ph.D., and Elaine Schenborn, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、シングルチューブで高レベルのタンパク質を合成する無細胞転写/翻訳システムです。本システムには小麦胚芽抽出液をはじめ、SP6 RNAポリメラーゼを介した転写/翻訳反応に必要な全ての成分が含まれています。本稿ではTnT® SP6 High-Yield Systemと従来の小麦胚芽転写/翻訳システムとのタンパク質収量を比較しました。また、小麦胚芽抽出液系のタンパク質発現用にデザインされたFlexi® Vectorとの組合せが良好であることを示しました。

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、高レベルの無細胞タンパク質発現とハイスルーブットフォーマットへの適応性により、無細胞系を用いた機能的プロテオミクスに重要な役割を果たすものと期待されます。

本稿では、新しいTnT® SP6 High-Yield Protein Expression SystemとTnT® SP6 Coupled Wheat Germ System (カタログ番号 L 4130) とのパフォーマンスを比較し、Flexi® Vectorへの適応性について実証します。

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、高レベルの無細胞タンパク質発現とハイスルーブットフォーマットへの適応性により、無細胞系を用いた機能的プロテオミクスに重要な役割を果たすものと期待されます。

イントロダクション

これまでの無細胞小麦胚芽翻訳システム(1, 2)は翻訳効率の低さが課題になっていました(1, 2)。近年、改良型無細胞小麦胚芽翻訳発現システム(3, 4)の出現により、翻訳効率が大幅に向上しました。しかし、これらの改良型システムでも鋳型となるmRNAをin vitroで転写し、翻訳反応のために高純度に精製する必要があるなどの不便な点が残っています。TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号 L3260) の場合、SP6 RNAポリメラーゼとその他の必要な成分とともに高活性小麦胚芽抽出液が供給されます。転写と翻訳をカップリングさせることによりTnT® SP6 High-Yield Systemでは高レベルのタンパク質発現を維持しながら、mRNA調製のためのin vitro転写および精製の各ステップを省略することができます。このシステムでは、SP6プロモーターおよび目的タンパク質をコードする領域を含む精製された鋳型プラスミドDNAを鋳型として用います。

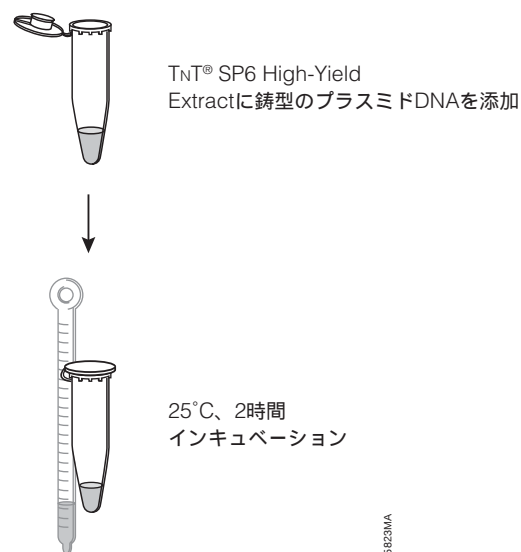


図1. TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemの概略

シングルチューブフォーマット

TnT® SP6 High-Yield Extractは使いやすく、最適な発現を実現するためにデザインされました。鋳型プラスミドDNA、タンパク質標識試薬（オプション）を除く転写/翻訳に必要な全ての成分がこの抽出液に含まれます。鋳型となるDNAにはSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが標的タンパク質のコード領域上流に配置される必要があります。放射性アミノ酸や化学修飾されたアミノ酸をチャージしたtRNA（Transcend™ [カタログ番号 L5070, L5080] またはFluoroTect™ [カタログ番号 L5001]）はTnT® SP6 High-Yield Systemでタンパク質の標識に使用することができます。

標準的な反応ボリューム50μlでは、TnT® SP6 High-Yield Extract 30μlと鋳型となるスーパーコイルプラスミドDNA、オプションとしての標識試薬、Nuclease-Free Waterからなる20μlを用います。反応は25℃でインキュベーションし、タンパク質発現は通常2時間以内に完了します。ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼまたはHaloTag™タンパク質の各遺伝子をクローニングしたpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorを用いてタンパク質合成の時間推移を検討した結果、全3種類のタンパク質の収量とも、90～180分で最高値に達しました（データ未掲載）。

TnT® SP6 High-Yield Extractには、転写に必要なSP6 RNAポリメラーゼおよび全てのリボヌクレオチド、翻訳に必要なアミノ酸、RNasin® Plus、エネルギー再生系が含まれます。SP6 RNAポリメラーゼによる転写と無細胞系によるタンパク質翻訳では、至適反応条件が異なります。反応条件は、転写の至適条件と翻訳の至適条件のバランスを調節しているので、高レベルのタンパク質発現が保たれます。

直鎖化が不要で良質なプラスミドDNAを使用

鋳型となるスーパーコイルプラスミドDNAは直鎖化せずに直接抽出液に添加できます。プラスミドDNAは純度の高いものを使用します。TnT® SP6 High-Yield System用のプラスミド鋳型の精製にはPureYield™ Plasmid Midiprep、Maxiprep System（カタログ番号 A2492、A2392）などの精製システムが使用できます。

小麦胚芽抽出液系のタンパク質発現用にデザインされた市販のベクターは、pSP64 Poly(A) Vector（カタログ番号 P1241）、pF3A (BYDV)、pF3K (BYDV) Flexi® Vector（カタログ番号 L5671、L5681：図2）などです。これら2種類のFlexi® Vectorは、ベクターバックボーンにアンピシリン- (A) またはカナマイシン- (K) 耐性遺伝子が組み込まれているため、適切な遺伝子組換えベクターのセクションを行うことができます(5)。これら2つのFlexi® Vectorとも、*SgfI* および *PmeI* クローニング領域の上流にSP6およびT7 RNAポリメラーゼプロモーターが直列に並んでいます。また、このクローニング領域の両端には、オオムギ黄萎ウイルス (barley yellow dwarf virus) (BYDV) 由来の配列が隣接します。BYDV由来の配列は、小麦胚芽抽出液におけるタンパク質翻訳をキャップ非依存的に促進することが報告されています(6,7)。pSP64 Poly(A) Vector より転写されるタンパク質コードRNAの3'末端には30個のアデノシン(A)残基が付加され、無細胞抽出液中におけるタンパク質への翻訳を向上させる可能性があります(8)。

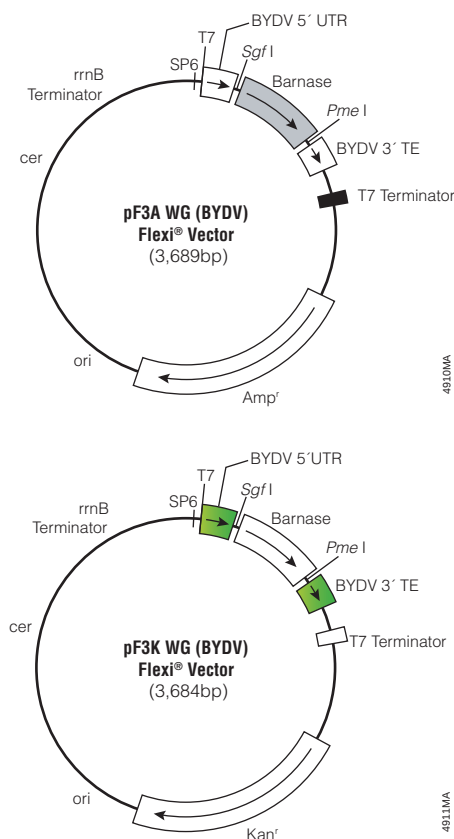


図2. Wheat Germ Flexi® Vector

pF3A WG (BYDV) およびpF3K WG (BYDV) Vector（カタログ番号L5671および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ている。これらのベクターは、SP6およびT7 RNAポリメラーゼプロモーターが直列に並び、オオムギ黄萎ウイルス (Barley Yellow Dwarf Virus [BYDV]) 由来の配列を目的タンパク質のコード領域上流および下流に持つ。ベクターにはディレクショナルクロー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し換えを容易にする *SgfI* および *PmeI* 制限酵素サイトが含まれる。バーナーゼ致死遺伝子を含むベクターのポジティブセクションを可能にする。また、アンピシリン (A) またはカナマイシン (K) の各耐性遺伝子は大腸菌でのセクションを可能にする。

従来の小麦胚芽システムよりも向上したタンパク質収量

新製品TnT® SP6 High-Yield Extractを用いると、pF3 WG (BYDV) Flexi® VectorまたはpSP64 Poly(A) Vectorからのタンパク質発現量が従来製品TnT® SP6 Coupled Wheat Germ System (カタログ番号L4130)を用いた場合より大幅に向上します。しかし、最高レベルのタンパク質合成が得られるプラスミドDNAの濃度プロファイルは、2種類のベクター間で異なります。

図3に、プラスミドDNA濃度のほか、ベクターバックボーンの種類が機能タンパク質の合成レベルに及ぼす影響を比較した実験結果を示します。ホタルルシフェラーゼタンパク質は、TnT®反応液中でpF3K WG (BYDV) Flexi® VectorまたはSP64 Poly(A) Vector (Luciferase SP6 Control DNA ; カタログ番号L4741) から発現させました。TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Systemにおけるタンパク質発現量は、ベクターバックボーンの種類を問わず、DNA添加濃度が約20ng/μlの条件で最も高くなりました。新製品TnT® SP6 High-Yield Protein Expression SystemでpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorを用い、タンパク質合成量が最高値に達したのは、DNA添加濃度が約60ng/μlの条件でした。Luciferase SP6 Control DNA濃度が240~280ng/μlの条件でTnT® SP6 High-Yield Extractを用いると、タンパク質発現レベルはさらに上昇しました。このルシフェラーゼ活性レベルは約120μg/mlに相当します。総合的にみて、TnT® SP6 High-Yield Extractを用いた場合の機能タンパク質の合成レベルは、標準的なTnT® SP6 Wheat Germ Extractと比較して約12倍高くなりました (表1)。

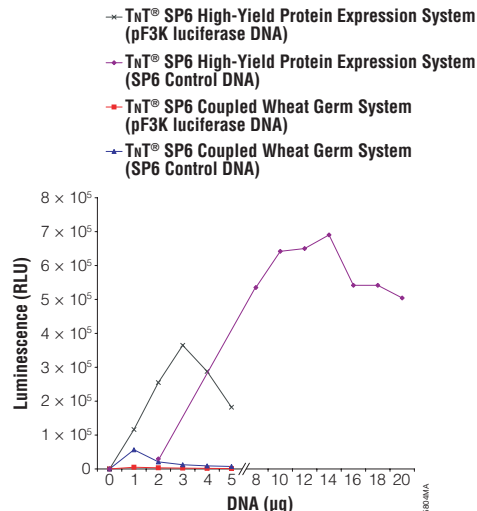


図3. ホタルルシフェラーゼタンパク質の各種鋳型DNAからの発現プロファイルの比較

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号L3260) (25、3時間) およびTnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4130) (30、3時間) における、環状pF3KホタルルシフェラーゼDNAおよびLuciferase SP6 Control DNA (カタログ番号L4741) のタイトレーションを比較した。転写/翻訳カップリング反応は、それぞれTechnical Manual #TM282および#TB165に従って実施した。pF3KホタルルシフェラーゼDNAは、PureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号A2492) を用いて、Technical Manual #TM253に記載された遠心法および吸引法により単離した。ホタルルシフェラーゼ活性は、Technical Manual #TM051に従って、Steady-Glo® Luciferase Assay System (カタログ番号E2510) を用いて測定した。反応はTD-20eルミノメーター (Turner Biosystems) により測定した。

鋳型 pF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorからの機能的ウミシイタケルシフェラーゼタンパク質の発現についてTnT® SP6 High-YieldおよびTnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extractで直接比較した結果を図4に示します。機能的タンパク質を最も高レベルで発現したものはTnT® SP6 High-Yield ExtractでDNA添加量40-60ng/μlの場合でした。このタンパク質収量は、従来製品TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract中で合成されたタンパク質収量 (DNA添加濃度が20ng/μlで最適) より50倍以上高いものでした (表1)。同様の比較実験はpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorを鋳型とした機能性HaloTag™ タンパク質の発現でも行いました (図5)。TnT® SP6 High-Yield Extract による機能タンパク質の最高発現レベルを、ゲル分離法およびHaloTag™ TMR Ligand (カタログ番号G825) に対する結合により測定した結果、タンパク質発現レベルが最高に達したのはDNA添加濃度40ng/μlの条件でした。HaloTag™タンパク質の発現レベルは、TnT® SP6 High-Yield Extractを用いた方が大幅に高く、蛍光イメージング解析を用いて、精製HaloTag™タンパク質のタイトレーションと比較したところ、約110μg/mlと推定されました。

表1 TnT® SP6 High-Yield Protein ExpressionをTnT® SP6 Coupled Wheat Germ Systemと比較した場合のタンパク質発現量の増加倍率

ベクター	タンパク質	増加倍率	DNA
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	Firefly luciferase	72	40-60ng/μl
SP64 Poly(A) Vector	Firefly luciferase	12.2	140-280ng/μl
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	Renilla luciferase	61.5	40-60ng/μl

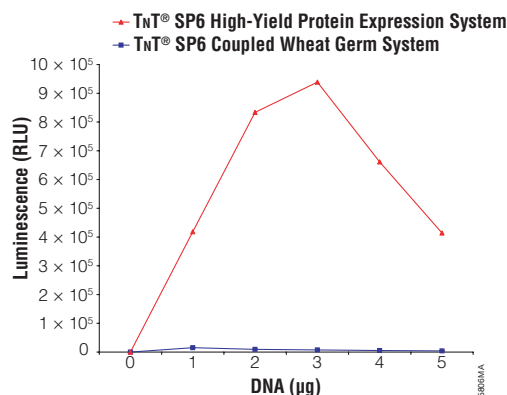


図4. ウミシイタケルシフェラーゼ発現の比較

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号L3260) (25、3時間) およびTnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4130) (30、3時間) における環状pF3K hRenilla Luciferase DNA (pF3K hRen) のタイトレーションを比較した。転写/翻訳カップリング反応は、それぞれTechnical Manual #TM282および#TB165に従って実施した。pF3K hRenVectorは、PureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号A2492) を用いて、Technical Manual #TM253に記載された遠心法および吸引法により単離した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性は、Renilla Luciferase Assay System (カタログ番号E2810) にわずかな変更を加えた条件で測定した。各反応液から分注した2.5μlを、1×Renilla Luciferase Assay Lysis Bufferで1:1に希釈し、室温で5分間インキュベーションした。Renilla Luciferase Assay Substrate / BufferはTechnical Manual #TM055に従って調製し、希釈した発現反応液2.5μlを基質/緩衝液100μlに添加した。反応はTD-20/20ルミノメーター (Turner Biosystems) により測定した。

pF3K WG (BYDV) Flexi® VectorやpF3A WG (BYDV) Flexi® VectorなどBYDVを含むベクターを用いる場合、鋳型DNA量は40-60ng/μlが最適である一方、BYDV配列を持たないベクターにおけるタンパク質発現量を最大限に高めるためには、鋳型DNA濃度をさらに高くする必要があります。その他のBYDV配列を持たないSP6発現ベクターは、鋳型DNAの至適濃度がLuciferase SP6 Control DNAと異なるものと考えられるため（データ未掲載）、鋳型DNAのタイトレーションを実施し、最大限の発現が得られる鋳型DNAの適正量を確認することを推奨します。TnT® SP6 High-Yield SystemでpSP64 Poly(A) Vectorを用いれば、TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Systemの使用時よりタンパク質合成レベルを高めることができますが、鋳型DNA濃度も上げる必要があります（表1）。

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemの性能特性、すなわちタンパク質発現レベルが相対的に高いこと、試薬の添加量がきわめて少ないこと、インキュベーション時間が短く室温で実施できることなどは、ハイスループット用途に適しています。

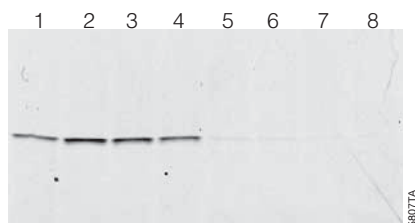


図5. HaloTag™ タンパク質発現の比較

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号L3260) (25、3時間) (レーン1~4) およびTnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4130) (30、3時間) (レーン5~8) を用いて、様々な量の環状pF3K HaloTag™ Vectorを転写/翻訳した。レーン1および5はDNA 1μgでの反応、レーン2および6はDNA 2μgでの反応、レーン3および7はDNA 3μgでの反応、レーン4および8はDNA 4μgでの反応。転写/翻訳カップリング反応は、Technical Manual #TM282および#TB165に従って実施した。pF3K HaloTag™ DNAは、PureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号A2492) を用いて、Technical Manual #TM253に記載された遠心法および吸引法により単離した。HaloTag™ Proteinは、転写/翻訳カップリング反応液1μlをPBS 10μlで希釈後、HaloTag™ TMR Ligand 8μM (カタログ番号G8251) で室温、1時間インキュベーションすることにより定量した。インキュベーション後、2×SDSサンプルバッファー10μlを添加し、反応液を95℃で2分間インキュベーションした。サンプルを冷却後、4~20% トリス-グリシゲル (Invitrogen カタログ番号EC6028) にロードした。ゲルはTyphoon® 9410のFluorescenceモードで画像化した (600V、526 SP / Green [532nm])。

まとめ

新製品TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、従来製品TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Systemの無細胞系および転写/翻訳カップリング条件の特長である使いやすさを保持しながら、従来製品よりタンパク質収量が大幅に向上したことが明らかになりました。従来品TnT® Wheat Germ Extractにおけるタンパク質合成は、DNA添加濃度20ng/μlで概ねピークに達した一方、TnT® SP6 High-Yield Extractにおけるタンパク質合成量はこれより高く、より高濃度の鋳型DNAが必要でした。さらに、TnT® SP6 High-Yield Systemで、タンパク質コード領域にBYDV翻訳増強配列が隣接するベクターを用いた場合には、鋳型プラスミド濃度を40~60ng/μlとすれば、タンパク質収量が一貫して高くなります。これらの特長から、新製品TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、無細胞系を用いた機能的プロテオミクスに重要な役割を果たすものと期待されます。

参考文献

1. Roberts, B.E. and Paterson, B.M. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2330-4.
2. Erickson, A.H. and Blobel, G. (1983) *Meth. of Enzymol.* **96**, 38-50.
3. Madin, K. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 559-64.
4. Hurst, R. *et al.* (2005) *Promega Notes* **90**, 19-21.
5. Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2001) *Mol. Cell* **7**, 1103-9.
6. Gallie, D.R. and Tanguay, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17166-73.
7. Guo, L., Allen, E.M. and Miller, W.A. (2000) *RNA* **6**, 1808-20.
8. *Flexi® Vector Systems Technical Manual*, #TM254, Promega Corporation.

プロトコル

- ◆ *TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System Technical Manual*, #TB165, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tb165/tb165.html
- ◆ *Flexi® Vector Systems Technical Manual*, #TM254, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm254/tm254.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System	10 回分	L3261	22,000
	40 回分	L3260	75,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
pF3A WG (BYDV) Flexi® Vector	20 μg	L5671	45,000
pF3K WG (BYDV) Flexi® Vector	20 μg	L5681	45,000
pSP64 Poly(A) Vector	20 μg	P1241	13,000