

Functional Protein Production in the TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemによる機能性タンパク質の合成

By Kate Qin Zhao, Ph.D., Robin Hurst, M.S., Sarah Wheeler, B.S., Becky Godat, M.S., Jami English, M.S., Jim Hartnett, M.S., and Michael Slater, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

小麦胚芽無細胞発現システムTnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemは、高レベルの機能タンパク質を合成します。機能タンパク質の収量は、バッチモードで100µg/ml、透析モードで400～500µg/mlに達します。本稿では、同じベクターから、機能タンパク質であるプロカスパーゼ-3とその成熟タンパク質であるカスパーゼ-3を、タンパク質合成モードの使い分けにより合成する方法を示します。完全長プロカスパーゼ-3 (>70µg/ml) は、バッチモードにより合成され、機能的プロセッシングを受けたカスパーゼ-3 (約400～500µg/ml) は、透析モードにより合成されました。

イントロダクション

機能的および構造的プロテオミクスにおいては、無細胞系を用いたタンパク質合成が、セルベースのタンパク質発現系に代わる強力な手段となっています。小麦胚芽無細胞タンパク質合成系には、他の無細胞ライセートを凌ぐユニークな特長があります。室温でインキュベーションできること、時間が節約できること(バッチモードの所要時間は約2時間)、ハイスループットスクリーニングに適応性を示すこと(タンパク質活性部位の変異体をスクリーニングする場合など; 1)、補助成分の添加に柔軟に対応すること、非天然アミノ酸の標識および部位特異的な導入に修飾tRNAを使用できること(2)、細胞毒性を有するタンパク質を発現できること、タンパク質の折り畳みおよび機能をスクリーニングできることなどです(3,4)。この発現系は真核細胞由来であり、弊社が55種類のヒトタンパク質(8～151kDa; 5)の発現実験で明らかにしたように、可溶性および機能タンパク質を合成できることから、大腸菌ベースの無細胞発現系に代わる手段として普及しているほか、より高いタンパク質収量が求められるアプリケーションでは、ウサギ網状赤血球ライセート系と相互補完的に使用できます。

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号L3260) は、小麦胚芽転写/翻訳カップリングシステムを改良した製品であり、SP6プロモーターおよび目的タンパク質のコード配列を含む精製プラスミドDNA鋳型を添加するだけでタンパク質を合成できます。本製品は高レベルのタンパク質発現を維持しながら、mRNAのin vitro転写および精製のステップを省略することができます(6)。

小麦胚芽発現系は、透析モードに対応しているため(5,7)、タンパク質合成量をバッチモードの4～7倍にすることができます。TnT® SP6 High-Yield Systemの透析モードを使用すれば、タンパク質の合成を約10時間継続でき、バッチモードを使用すれば、タンパク質の合成量が約2時間にわたり直線的に増加します。

我々は、新製品TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemを用いて高レベルのタンパク質を合成し、SDS PAGEゲルのCoomassie® blue染色により視覚化しました。また、TnT® SP6 High-Yield Systemによる機能タンパク質プロカスパーゼ-3およびカスパーゼ-3の合成も検討し、機能タンパク質プロカスパーゼ-3の合成およびプロセッシングが、合成モードの切り替え(バッチまたは透析)により変化することを示します。

タンパク質の発現、標識および解析

タンパク質の合成レベルを検証するため、ホタルルシフェラーゼ、Monster Green® 蛍光タンパク質および改変ウミシイタケルシフェラーゼのタンパク質コード領域のN末端側にHQタグ(金属アフィニティータグ)が組み込まれた、あるいは組み込まれていないpF3K WG (BYDV) Flexi® Vector (カタログ番号L5681)にクローニングしました。精製したスーパーコイルプラスミドDNA鋳型は、直鎖化せず、TnT® SP6 High-Yield Extractに直接添加しました。FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System (カタログ番号L5001)を用いて、リジン残基のε位を蛍光物質BODIPY®-FLで標識した目的タンパク質を、バッチモードで合成しました。標識タンパク質は、SDS PAGE (図1、パネルA)により分離し、レーザーベースの蛍光ゲルスキャナーを用いて検出しました。このような蛍光標識を行うため、放射能を使用する必要はありません。透析モードを用いて合成したタンパク質は、ゲル電気泳動後、Coomassie® Blue染色により同定しました(図1、パネルB)。Coomassie® Blue染色の検出下限は、バンドあたりタンパク質0.1～0.5µgであることから、発現バンドの視認は、TnT® SP6 High-Yield Systemによるタンパク質合成レベルが0.1µg/µlを上回っていることを意味します。最後に、N末端側にHQタグが融合したタンパク質は、ワンステップMagneHis™ Protein Purification System (カタログ番号V8500)を用いて精製しました(図1、パネルC)。このような方法による目的タンパク質の収量は、バッチモードで100µg/ml、透析モードで約400～500µg/mlに達します。

ケーススタディ: プロカスパーゼ-3

プロカスパーゼ-3はまず、酵素原(酵素前駆体)として発現し、分子内が切断されて生成する小サブユニットと大サブユニットからなるヘテロテトラマーの成熟型となります(図2; 8)。アポトーシスに関与するカスパーゼは、一般に2種類(イニシエーターカスパーゼとエフェクターカスパーゼ)に分類されます。

カスパーゼの活性化機序を解明することは、アポトーシスをもたらす一連のイベントを明確にするため、きわめて重要です。カスパーゼ-8などのイニシエーターカスパーゼは、活性化を受ける前はモノマーとして存在するのが一般的で、オリゴマー形成と、その後の自己プロセッシングにより活性化されます(9)。一方、カスパーゼ-3などのエフェクタープロテアーゼは、活性化を受ける前の酵素原は低いプロテアーゼ活性をもつモノダイマーであると考えられています。酵素前駆体がイニシエーターカスパーゼにより、大ドメインと小ドメインの間で部分的にプロセッシングされると、生成した活性中間体は自己触媒のプロセッシングにより、大サブユニットからプロドメインを切断し、成熟型酵素となります(10)。両経路とも直線的に進行し、完全に活性化された(成熟型)カスパーゼは、前駆体に対して効率的に作用しません(9-11)。

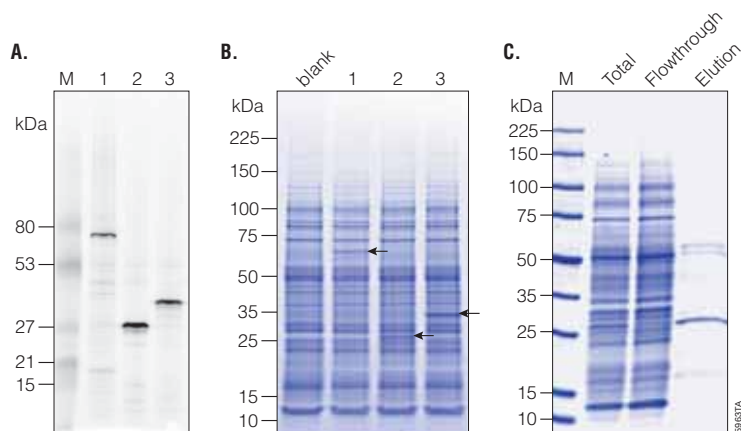


図1. TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemを用いたタンパク質の合成および精製

全パネルの各レーンは反応液1μl相当。目的タンパク質はすべて、N末端側にHQタグを付加した。分析に使用したゲルは、4~20%のTris-Glycineゲル(Invitrogen)。レーン1、ホタルルシフェラーゼ；レーン2、Monster Green® Fluorescent Protein；レーン3、改変ウミシイタケルシフェラーゼ。矢印は発現タンパク質を示す。パネルA、タンパク質は、反応液50μlにプラスミドDNA 2μgおよびFluoroTect™ GreenLys 1μlを添加し、パッチモードにて発現させた。反応液は25℃で2時間インキュベーションした。合成されたタンパク質はTyphoon® 8600スキャナーを用いて検出した。レーンM、Fluorescent Molecular Weight Marker(Sigma)。パネルB、Coomassie® 染色した SDS PAGEゲル。タンパク質は、プラスミド8μgおよびTnT® SP6 High-Yield Extract 60μlを添加した反応液100μlを用いて、透析モードで発現させた。反応液は透析カップ (MWCO 12,000 BioTec International、第一化学薬品が販売、DBCコード212956) およびUniplate (Whatman®) で透析バッファー2.5mlを用いて、25℃で18時間インキュベーションした。透析バッファーの組成は、12mM HEPES、0.5mM スペルミジン、5mM DTT、80μM アミノ酸、70mM KOAc、1.7mM ATP、0.6mM GTP、0.6mM CTP、6mM UTP、20mM CP、3.5mM Mg(OAc)₂。パネルC、Coomassie® 染色した SDS PAGEゲル。N末端側にHQタグを付加した Monster Green® Fluorescent Proteinは、150μlのMagneHis™ Binding/Wash Buffer、NaCl (最終濃度500mM) および30μlのMagneHis™ Magnetic Particleを反応ライゼート50μlに添加することにより精製した。混合液は、粒子が沈降しないよう断続的に混合しながら、25℃で5分間インキュベーションした。その後、磁気スタンドに設置してMagneHis™ Particleを捕捉し、上清を除去した。得られた粒子は、500mM NaClおよび20mM イミダゾールを含有する150μlのMagneHis™ Binding/Wash Bufferで洗浄した。磁気スタンドを用いて粒子を捕捉し、上清を除去した。洗浄プロセスを計3回繰り返し、最終洗浄液はイミダゾール濃度を100mMとした。結合タンパク質はMagneHis™ Elution Buffer 100μlで溶出した。レーンM、Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)。

プロカパーゼ-3の活性化機序の研究には、TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (T7プロモーターに関してはカタログ番号L1170、SP6プロモーターに関してはカタログ番号L2080) が広範に使用されてきました。このような研究では、³⁵S標識メチオニンで酵素原を標識し、活性化パターンの検出に使用していました(10)。TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemを用いても同様の実験を実施できるかどうかを評価するため、N末端側にHQタグが組み込まれた、あるいは組み込まれていないpF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorに、プロカパーゼ-3をクローニングしました。タンパク質は、TnT® SP6 High-Yield Systemを用いて発現させ、FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling Systemを用いて標識しました。

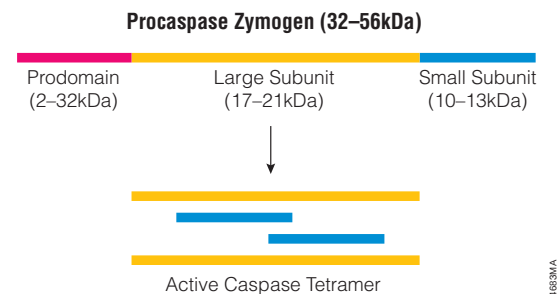


図2. カスパーゼの活性化

カスパーゼの酵素原は大サブユニットと小サブユニットの間に切断され、プロドメインが除去される。活性部位は、大サブユニット、小サブユニット各1個を含むヘテロダイマーにより形成される。2個のヘテロダイマーが会合することにより、完全な活性を有するテトラマーが形成される。

完全長プロカパーゼ-3の合成

TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemをパッチモードで用いたところ、プラスミドDNA鋳型からの完全長プロカパーゼ-3の合成量は、我々がRNAベースのWheat Germ Extract Plus (カタログ番号L3250; 1) で確認した合成量と比較して多いものでした。TnT® SP6 High-Yield Systemは、TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemと比較して、活性化分析用の機能タンパク質を10倍以上多く合成しました(データ未掲載)。合成された酵素原はカスパーゼ-8により活性化されます(図3、パネルAおよびB)。FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling Systemを使用しても、カスパーゼ-3の活性(図3、パネルB)またはカスパーゼ-8によるその活性化に有意な影響がなかったことから、放射能を使用することなく、下流におけるプロカパーゼ-3の活性化を検討することができます。

完全長プロカパーゼ-3は大腸菌でも合成できますが、酵素原が内因性に活性化されるため、ベクターを大腸菌に導入する際の操作に注意を要します(12)。また、プロカパーゼ-3のコード配列を組み込んだpF1A T7 Flexi® Vector (カタログ番号 C8441) およびpFN6K (HQ) Flexi® Vector (カタログ番号 C8521) を、Single Step (KRX) Competent Cell (カタログ番号 L3001; 図4) に導入した条件でも検討を行ったところ、プロセシング部位が異なるカスパーゼ-3の合成が観察されました。

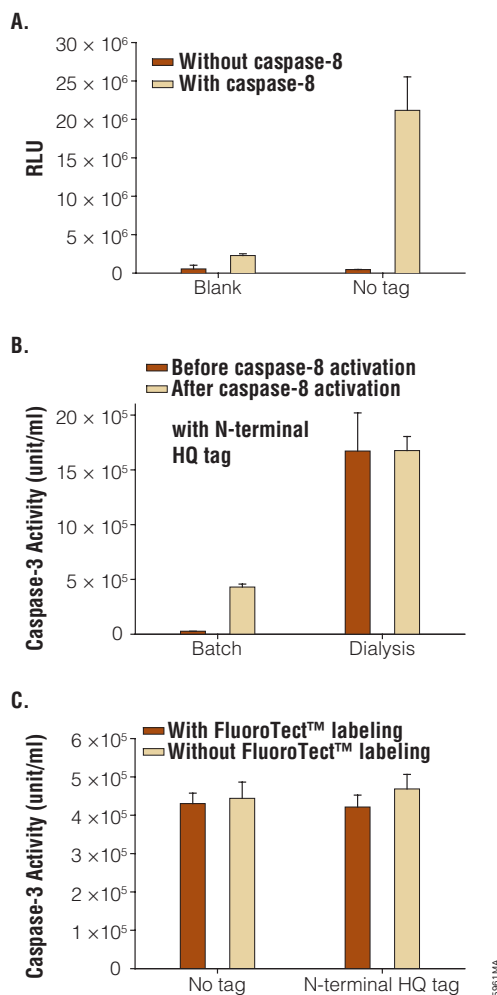


図3. カスパーゼ-3 活性の測定

カスパーゼ3活性は、Caspase-Glo® 3/7 Assay (カタログ番号 G8091) で測定した。プロカスパーゼ-3は、ライセート10μlを100U (1μl) のカスパーゼ-8 (BioMol) で37℃、1時間処理することで活性化された。対応する未処理のライセートには1μlの10mM HEPES (pH 7.5) を加え、37℃で1時間インキュベーションした。カスパーゼ8処理あるいは未処理の後、ライセートは10mM HEPES (pH 7.5) で1:20,000の濃度に希釈した。Caspase-Glo® 3/7 Assay測定は、定常状態で行った(試薬添加の約20分後)。結果はカスパーゼ活性 (U/ml) として表示した。カスパーゼ活性は、比活性 (BioMolでは、1活性ユニットは200μMのAc-DEVD-pNAを用いて30℃で1pmol/分のDNA産物を生成する酵素量と定義) が5,982.9 U/μgの遺伝子組換えヒトカスパーゼ-3 (BioMolSE-169、インプットRNAを含まないWheat Germ Extract Plusで、200U/mlから1:20,000の濃度に希釈) を用いて求めた標準曲線 ($r^2=0.999$) から算出した。パネルA. カスパーゼ-8によるプロカスパーゼ-3活性化のCaspase-Glo® 3/7 Assayによる検出。相対発光量 (RLU) データは、カスパーゼ-8でなく、カスパーゼ-3活性が特異的に測定されていることを示すものである。“Blank”はDNA鋳型未添加の反応である。パネルB. バッチモードと透析モードを用いて発現させたN末端側HQタグ融合カスパーゼ-3のカスパーゼ-8処理または未処理条件における活性の比較。収量はそれぞれ78 ± 6および444 ± 58μg/ml無細胞反応液と推定された。パネルC. バッチモードにより合成したプロカスパーゼ-3は、N末端側へのHQタグ付加の有無を問わず、FluoroTect™ Green_{Lys}標識により、カスパーゼ-3活性またはカスパーゼ-8による活性化が阻害されない。

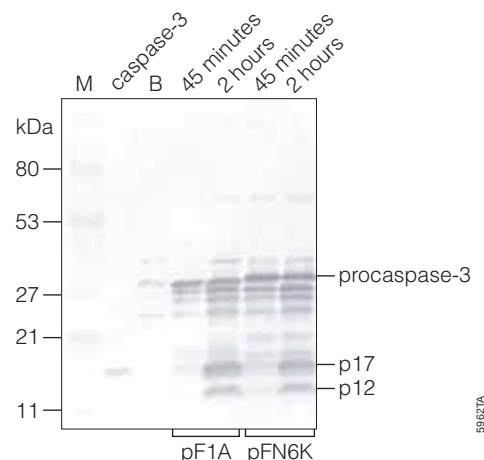


図4. 大腸菌KRX菌株におけるカスパーゼ-3の発現

プロカスパーゼ-3 (GenBank® Accession #U26943) のコード領域をpF1A Flexi® Vectorにクローニングし、pFN6K Flexi® Vectorに移し換えた。得られたプラスミドで、ラムノース誘導性の発現を示すSingle Step (KRX) Competent Cells (カタログ番号 L3001) を形質転換した(13)。単一のコロニーを適切な抗生物質が添加されたLB培地10mlに播種し、37℃で一晩培養した。培養液1mlを適切な抗生物質が添加されたLB培地50mlに添加し、O.D.₆₀₀が約0.6~0.8に達するまで培養した。その後、最終濃度0.2% (w/v) のL-ラムノース (Sigma) で誘導をかけ、37℃で培養した。ロード用のサンプルとして、誘導前に培養液1mlを採取し(レーンB)、誘導45分および2時間後にも培養液を採取した。対照としては、50Uのカスパーゼ-3 (BioMol) をロードした。細胞は遠沈後、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含有する1×FastBreak™ Cell Lysis Reagent (カタログ番号 V8571) 100μlに再懸濁した。各レーンに細胞ライセート計2.5μlをロードした。カスパーゼ-3酵素 (BioMol) を標準物質として使用し、一次抗体としてウサギ抗カスパーゼ-3ポリクローナル抗体 (BioMol、1:1,000×希釈液を使用) を用いた。一次抗体は、カスパーゼ-3の小サブユニット (p12) より大サブユニット (p17) と強く反応した。ヤギ抗ウサギIgG-ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合体の1:200×希釈液を用いた。TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase (カタログ番号 W4121) を用いて検出を行った。

カスパーゼ-8によるプロカスパーゼ-3のプロセシング

プロカスパーゼのプロセシングは、TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systemにて、³⁵S-メチオニン標識を用いて検討されてきました(8,9)。我々は、TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemにてプロカスパーゼ-3を合成し、タンパク質をFluoroTect™ Systemにて標識しました。活性化パターンは、ウェスタン分析により確認しました(図5、パネルA)。プロカスパーゼ-3のプロセシング部位を暫定的に割り当てたところ(図5、パネルB) 文献に報告されている部位と一致しました(10)。

プロカスパーゼ-3のプロセシングは直線性に進行し、成熟型カスパーゼ-3は、プロカスパーゼ-3をプロセシングしません(9,10)。この機序を裏づけるデータが得られました(図5、パネルC)。しかし、インキュベーション時間を延長すると、成熟型カスパーゼ-3によるプロカスパーゼ-3のプロセシングもわずかながら検出されました(図5、パネルD)。

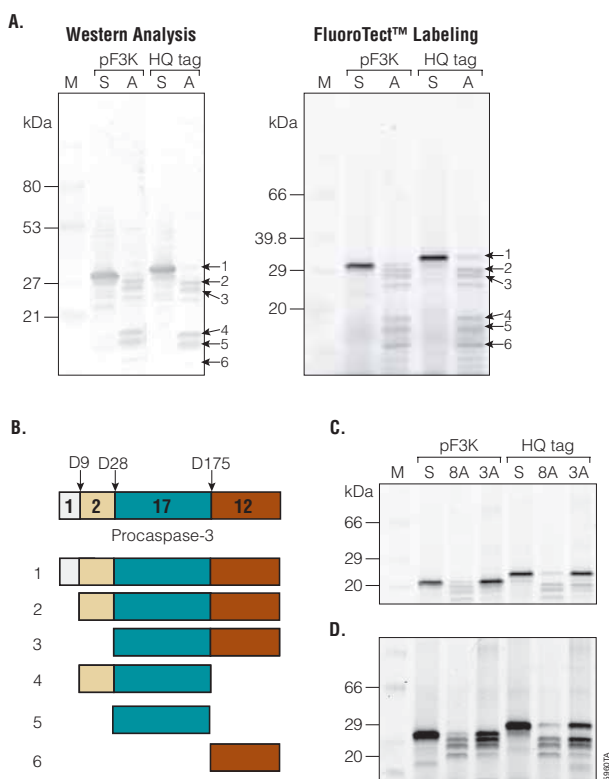


図5. バッチモードで合成したFluoroTect™ GreenLys標識プロカスパーゼ-3のプロセシングの検出

N末端側にHQタグが付加された、あるいは付加されていないFluoroTect™ GreenLys標識プロカスパーゼ-3 (pF3K WG (BYDV) Flexi® Vectorにクローニング) は、バッチモードを用いて合成した。プロカスパーゼ-3 (パネルA) は、ライセート10μlを100U (1μl) のカスパーゼ-8またはカスパーゼ-3 (BioMol) で37℃、1時間処理することで活性化された。対応する未処理のライセート上清 (S) には1μlの10mM HEPES (pH 7.5) を加え、37℃で1時間インキュベーションした。各レーンは反応液1μlを添加したものである。パネルA. 蛍光標識またはウェスタン分析を用いた検出により、プロカスパーゼ-3の活性化パターンが認められた。レーンS、カスパーゼ-8未処理の上清、レーンA、カスパーゼ-8処理後の上清、レーンM、蛍光標識にはFluorescent Molecular Weight Marker (Sigma) を用い、ウェスタン分析にはProSieve® Color Protein Marker (Cambrex) を用いた。ウェスタン分析は図4に示したように実施した。パネルB. 残基D9、D28 (プロドメインの除去) およびD175 (最初の活性化) で切断されたバンドのプロセシング部位を暫定的に割り当てる。バー内部の数字は、各フラグメントの分子量の概算値 (kDa) である。p17は、ほぼD28とD175の間のタンパク質フラグメントであり、p12はこのタンパク質のC末端側のフラグメントである。パネルC. 37℃、1時間処理では、プロカスパーゼ-3のカスパーゼ-8による幅広いプロセシングが認められる一方 (レーン8A)、カスパーゼ-3によるプロセシングは認められない (レーン3A)。パネルD. パネルCより反応時間を延長し、さらに4℃で24時間インキュベーションした結果、プロカスパーゼ-3のカスパーゼ-3によるわずかなプロセシングが認められた (レーン3A)。パネルCおよびDのレーンM、Fluorescent Molecular Weight Marker (Sigma)。

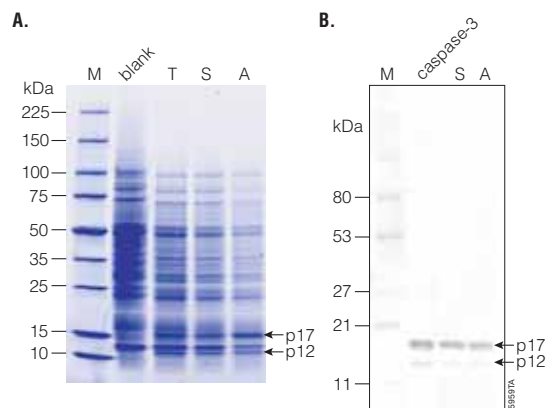


図6. 透析モードにおける成熟型カスパーゼ-3の合成

パネルA. Coomassie® blue染色したSDS-PAGEゲル。各レーンは反応ライセート1μlを添加したものである。ブランク反応はDNA鋳型を未添加の条件で実施した；レーンTは全体；レーンSは可溶性画分に含まれるタンパク質；レーンAはカスパーゼ-8処理により活性化されたタンパク質を示す。矢印はp17およびp12サブユニットを示す。レーンM、Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)。パネルB. 合成タンパク質のウェスタン分析。カスパーゼ-3標準物質 (BioMol) 100Uおよび各反応液0.1μlをロードした。検出は図5に示した方法で実施した。矢印はカスパーゼ-3の大サブユニットおよび小サブユニットを示す。レーンM、ProSieve® Color Protein marker (Cambrex)。

透析モードによる成熟型カスパーゼ-3の合成

活性化前のプロカスパーゼ-3は、活性部位周囲の構造的拘束に起因すると考えられる低い基礎活性を示しますが(10)、0.2mg/mlより高濃度では、濃度依存的な自己活性化が報告されています(13)。透析モードでは、0.4mg/mlを超えるタンパク質が合成されるため、おそらく酵素原が濃度依存的に活性化され、その結果として、同じコンストラクトから成熟型カスパーゼ-3が合成できるものと考えられます。しかし、他の因子がプロカスパーゼ-3の活性化をもたらす可能性も否定できません。小サブユニット (12kDa) をCoomassie® blue染色により視覚化し (図6、パネルA)、ウェスタンブロット分析により詳細に検証しました (図6、パネルB)。その結果、カスパーゼ-3は、カスパーゼ-8による活性化前に完全に活性化されていました (図3、パネルB)。以上の結果から、目的タンパク質の性質および機能状態によっては、TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemの実験設定モードの使い分けにより、合成されるタンパク質の量および種類を変更できることが示唆されました。

結論

本稿は、TnT® SP6 High-Yield Protein Expression Systemにより透析モードで十分量のタンパク質が合成でき、目的タンパク質がゲルのCoomassie® 染色により同定できることを示しました。タンパク質にHQタグが付与されている場合には、Niアフニティーレジンにより精製することができます。さらに、本システムでは、機能タンパク質を合成することができます。プロカスパーゼ-3に関しては、合成条件を使い分けることにより、同じコンストラクトから酵素原、成熟型酵素の両方が合成されました。パッチモードによる酵素原プロカスパーゼ-3の収量は約70µg/ml、透析モードによる成熟型カスパーゼ-3の収量は約400~500µg/mlと推定されました。最後に、FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling Systemはプロカスパーゼ-3の活性に有意な影響を及ぼさないことから、放射能標識を用いることなく、酵素原の活性化を検討することができます。

参考文献

1. Iffland, A. *et al.* (2005) *Biochem.* **14**, 8312–25.
2. Kiga, D. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9715–20.
3. Morita, E.H. *et al.* (2003) *Protein Sci.* **12**, 1216–21.
4. Vinarov, D.A. *et al.* (2004) *Nature Methods* **1**, 149–53.
5. Slater, M.R. *et al.* (2005) *Promega Notes* **91**, 21–5.
6. Hurst, R. *et al.* (2006) *Promega Notes* **93**, 15–8.
7. Madin *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** 559–564.
8. Abraham, M.C. and Shaham S. (2004) *Trends Cell Biol.* **14**, 184–93.
9. Chang, D.W. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16466–9.
10. Liu, H., Chang D.W. and Yang X. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11578–82.
11. Chang, D.W. *et al.* (2003) *EMBO J.* **22**, 4132–42.
12. Roy, S. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 6132–7.
13. Harnett, J., Gracyalny, J. and Slater, M.R. (2006) *Promega Notes* **94**, 27–30.
14. BioMol Product Data SE-730. (2006).

プロトコル

- ◆ TnT® SP6 High-Yield Protein Production System Technical Manual #TM282, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm282/tm282.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	40 × 50µl reactions	L3260	75,000
	10 × 50µl reactions	L3261	22,000
FluoroTect™ GreenLys in vitro Translation Labeling System	40 reactions	L5001	50,000

文献における使用例

Suzuki, T. *et al.* (2003) LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 238–49.

この研究では、オーファン受容体Dax-1とAd4bp/SF-1の相互作用が検討されました。この2種類のタンパク質を酵母および哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムを用いて検討したところ、特異的な相互作用が検出されました。相互作用の特性を詳細に検討するため、in vitro プルダウンアッセイを実施しました。Dax-1タンパク質またはLXXLLモチーフ欠損dax-1変異タンパク質は、TnT® T7 Quick SystemおよびFluoroTect™ GreenLys tRNAを用いて、in vitroにて転写および翻訳しました。蛍光標識タンパク質は、アミロースレジンに固定化したAd4BP/SF-1-マルトース結合タンパク質 (MBP) 融合タンパク質と相互作用を示しました。蛍光標識タンパク質は溶離およびSDS-PAGE後、Hitachi FMBIO® II Fluorescence Imaging Systemを用いて検出しました。Dax-1とAd4BP/SF-1の相互作用はLXXLLモチーフ依存性を示しました。

文献におけるその他の使用例については、
www.promega.com/citations/をご覧ください。