

# A Guide to Optimizing Protein Synthesis in the S30 T7 High-Yield Protein Expression System

## S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemを用いたタンパク質合成の最適化ガイド

By Kate Qin Zhao and Don Creswell, Promega Corporation

原文 (英語) は [http://www.promega.com/pnotes/101/17252\\_10/17252\\_10.pdf](http://www.promega.com/pnotes/101/17252_10/17252_10.pdf) 参照

### アブストラクト

S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemを用いた際の最適なタンパク質収量は、様々な変動要素に依存します。最適な発現ベクターの使用、良質な鋳型DNAの調製、反応に加える鋳型の適正量、標的タンパク質に対する最適な反応時間と温度などが挙げられます。また、コドン変更、ドメインや融合タグの切除などタンパク質コード配列の組み換え操作も検討項目として考えられます。

### イントロダクション

S30 T7 High-Yield Protein Expression System (カタログ番号L1110) は、大腸菌抽出液ベースの無細胞タンパク質合成システムです (1)。このシステムでは、転写のためのT7 RNAポリメラーゼや翻訳に必要な全ての成分を含んだ抽出液を供給し、T7プロモーターを持つベクターにクローニングしたDNA配列の転写・翻訳を簡略化することができます。この抽出液は大腸菌B株から調製されているので、OmpTエンドプロテイナーゼとlonプロテアーゼ活性がありません。これにより、通常ならプロテアーゼによって分解されるような発現タンパク質でも安定性を高めることができます。最適化されたプレミックスによって、その他全ての必要成分が供給され、その中にはアミノ酸、rNTP、tRNA、ATP再生システム、IPTG、適当量の塩も含まれています。このシステムでは、37°C 1時間の反応で、高収率の組換えタンパク質 (反応液1mlあたり最高で数百µgの組換えタンパク質) を発現させることができます。研究者はT7プロモーターとリボソーム結合部位 (RBS) の下流にタンパク質コード領域を含むクローンDNAを準備するだけです。

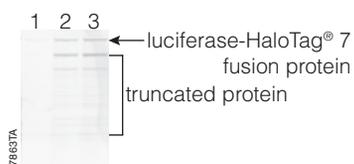


図1. C末端HaloTag®融合ホタルルシフェラーゼ (*luc*) コード領域内部の翻訳開始による不完全タンパク質の発現。

*luc* 遺伝子はpFC20AあるいはpFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vectorにクローニングした。各反応50µlあたり1µgのプラスミドDNAを用いた。反応は37°Cで1時間、振盪器で激しく振とうしながら行った。各反応液のうち5µlを1µlの5µM HaloTag® TMR Ligand (カタログ番号 G8251) と混合し、室温で10分間インキュベートした。SDSローディング色素を加え、95°Cで2分間加熱した後、1レーンあたりに最初の反応液1µlに相当する量を添加し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE; 4-20% トリス-グリシン) で解析し、Typhoon® スキャナーで視覚化して蛍光を検出した。レーン1、DNAなし; レーン2、ルシフェラーゼ-HaloTag® 7融合タンパク質を発現するpFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector (カタログ番号 G1681); レーン3、ルシフェラーゼ-HaloTag® 7融合タンパク質を発現するpFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector (カタログ番号 G1691)。

### S30反応の最適化

#### 適切なコントロールとヌクレアーゼフリーの試薬

無細胞反応はヌクレアーゼの混入に非常に敏感です。無細胞反応を準備するときは常にグローブをして、高純度の鋳型DNA、ヌクレアーゼフリーの水、反応チューブ、フィルター付きピペットチップといった、DNase/RNaseフリーの試薬等を使用してください。適切なポジティブ (S30 T7 Control DNA) およびネガティブ (DNAなし) コントロールは、実験を行う度に用意する必要があります。

#### DNAコード配列とベクターの関係

タンパク質のサイズ、目的の遺伝子、その遺伝子の周縁領域によって遺伝子の発現には大きな差が生じます。RBSに対して遺伝子の相対的な位置を変えることによって発現レベルは変わります (2)。一般的にRBSはAUG開始コドンの約7塩基上流に位置します。

真核生物遺伝子には、コード領域内にメチオニンコドンの前にあるトリボソーム結合部位として機能してしまう配列が多く存在します。このような内部配列の存在が原因で、原核生物のシステムでは、コード領域内部での翻訳開始や予測とは異なる短いタンパク質の合成が起こることがあります。その例が、C末端にHaloTagを融合したホタルルシフェラーゼ (*luc*) 遺伝子の発現でも認められます。我々は*luc*をpFC20KおよびpFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vectorにクローニングし、ホタルルシフェラーゼ-HaloTag® 7 (*luc*-HT) 融合タンパク質の発現ベクターを構築しました。これをS30 T7 High-Yield Systemで発現させ、反応物をHaloTag® TMRリガンド (カタログ番号G8252) で標識し、SDS-PAGE解析の後に蛍光イメージングを行いました。全長の*luc*-HT融合タンパク質より下に異なるサイズのバンドが見られ、内部からの翻訳開始によって短い翻訳産物が生成していることが分かります (図1)。

全長のタンパク質が十分に発現しない場合は、ドメインのみの発現、あるいはN末端・C末端を一方あるいは両方切断したコンストラクトからの発現により、タンパク質収率が向上あるいは高溶解性になる可能性があります (3)。全長タンパク質を確実に発現させるためには、S30システムと同時並行で小麦胚芽抽出物 (4) やウサギ網状赤血球ライセート (5)、昆虫抽出液 (6) など他の無細胞タンパク質発現システムを使用する方法もあります。

S30システムでタンパク質合成に影響を与えることが報告されている他のベクター関連・配列関連の因子としては、以下のものがあります。

- ・ 5'および3'非翻訳領域 (UTR; 7, 8)
- ・ N末端およびC末端融合タグ (9, 10)
- ・ コドン使用頻度 (11)
- ・ mRNA二次構造 (12, 13)
- ・ mRNA安定性 (12, 14)

そのため、タンパク質をコードする配列内部だけでなく、その遺伝子周囲の因子を考慮することで、標的タンパク質の発現を最適化できると考えられます。

## 鋳型DNAの質と量

タンパク質の収量を最大にするためには、高純度に精製した鋳型DNAだけを使用し、濃度は500ng/μl以上であることが望まれます。また、鋳型DNAには高濃度の塩やグリセロールの添加を避ける必要があります。10分間で十分量の高純度DNAを精製する方法として、PureYield™ Plasmid Miniprep System (カタログ番号 A1221; 15) を推奨しています。さらに多量の高純度DNAを得たい場合には、PureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号 A2492) を Eluator™ Vacuum Elution Device (カタログ番号 A1071) と共にご利用いただくことをお勧めします。

最適なタンパク質発現に必要なDNA量は、鋳型によって変わることがあります。T7プロモータを有する5kb以下のサイズのプラスミドDNAでは、50μl反応液あたり0.5-1μgを推奨します。大きなサイズのプラスミドの場合は、より高濃度のDNA (例えば2μg/50μl反応液) を用いることも考えられます。必要ならばDNA添加量の最適化を行うこともできます。鋳型濃度の効果を示すため、ウミシイタケルシフェラーゼ (*hRluc*) のコード配列を含むS30 T7 Control DNAの量を変えてS30反応を行いました。タンパク質発現量は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性をアッセイすることで測定しました。その結果、50μl反応液あたり0.5-2μg DNAを用いると発現量が最大になることが判明しました(図2)。

一般に、最初は50μl反応液あたり1μgのDNAでスタートすることをお勧めします。必要であればDNA濃度の最適化を行うことができますが、DNA量を増やすと内部からの翻訳開始や、翻訳の途中停止による不完全な産物が増加する可能性があります。

## 反応条件

S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemでは、タンパク質の種類によって最適な反応時間・反応温度が異なることが考えられます。ウミシイタケルシフェラーゼとMonster Green® Fluorescent Protein (hMGFP) をpFN6A (HQ) Flexi®ベクター (カタログ番号C8511) にクローニングして発現レベルを調べ、時間と温度の効果を検証しました。ここではウミシイタケルシフェラーゼ活性(図3、パネルA)とMGFPの蛍光シグナル(図3、パネルB)をモニターしました。

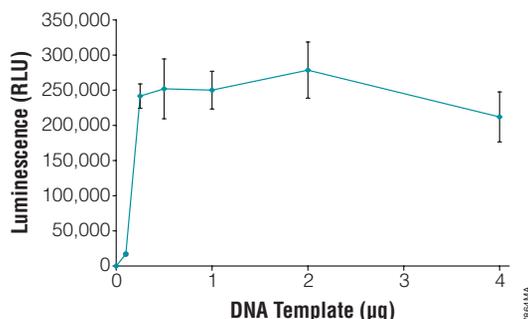


図2. S30 T7 Control DNAのDNAタイトレーション

鋳型DNAはPureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号 A2492) を用いて精製し、3連の50μl反応液に1μgを添加した。翻訳反応は37°Cで1時間、激しく振とうしながら行った。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) で測定した。

ウミシイタケルシフェラーゼの場合、機能を持ったタンパク質は25-37°Cの間で最も多く産生しました。温度を低くすると、同様のhRluc活性を得るためには反応時間を長くする必要がありました。hMGFPの場合、より低い温度 (20, 25, 30°C) のほうが機能を持ったタンパク質を多く産生し、37°Cでインキュベートすると低温で反応させた場合よりも機能性タンパク質が減少しました。そのため、対象のタンパク質それぞれについて、反応温度と時間を検証して機能を持つタンパク質の発現条件を最適化する必要があります。37°Cで1時間、30°Cで2-6時間、25°Cで4-8時間、20°Cで6時間から一晩、という条件を試すことを推奨します。

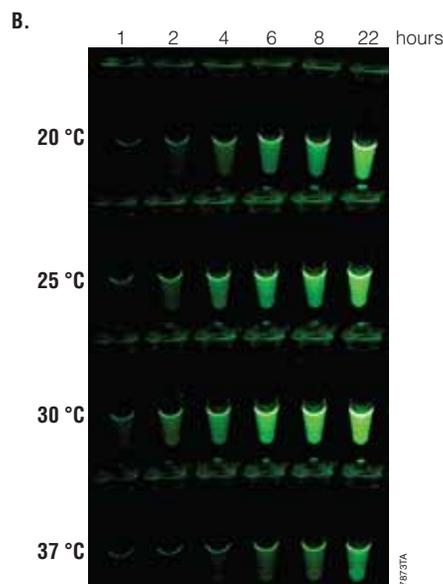
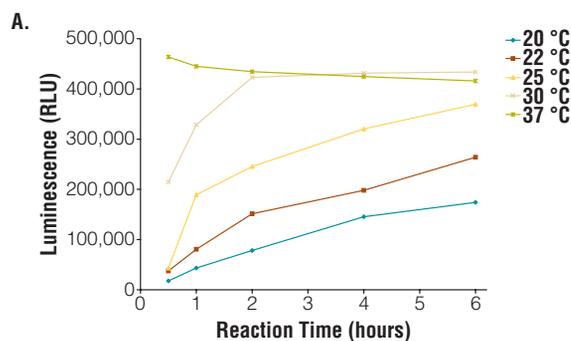


図3. S30 T7 High-Yield Systemでのタンパク質発現における反応時間と温度の効果

プラスミドはPureYield™ Plasmid Midiprep System (カタログ番号 A2492) を用いて精製した。パネルA. 図示した温度で各時間ごとにセットした25μl反応液に、ウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールDNA (0.28μg) を添加した。反応液はEppendorf Thermomixerを用いて定温、1,400rpmで振とうした。サンプルは各時間経過後に取り出し、-20°Cで凍結した。各時間に採取した全サンプルを同時に解析した。ウミシイタケルシフェラーゼの発現は*Renilla* Luciferase Assay System (カタログ番号 E2810) を用いてモニターした。パネルB. Monster Green® Fluorescent Protein (hMGFP) の合成は、20μgのpFN6A-MGFP Flexi® Vectorを添加した1ml反応液で行った。それぞれの温度での反応を並行して行い、図に示した各経過時間において50μlをサンプリングし、それぞれのサンプルは-20°Cで保存した。各経過時間において採取したサンプルは、すべて同時にUVボックスにおいてGFP蛍光をモニターして解析した。

## 結論

タンパク質発現レベルはいくつかの要因に依存しています。S30 T7 High-Yield Protein Expression Systemで最大のタンパク質収率を達成するためには、以下のパラメーターを考慮してください。

1. 適した発現ベクターを選択（推奨ベクターについては参考文献1を参照）。最初は、T7プロモーター制御下にある高レベル大腸菌発現に適したベクターの試用を推奨。
2. 常に適切なポジティブおよびネガティブコントロール反応を実施。
3. 高純度の鋳型DNAを使用。PureYield™ Plasmid Systemで精製した鋳型プラスミドDNAを用いることを推奨。
4. DNA量の最適化。50μg反応液量あたり1μgから始めることを推奨。
5. 反応時間と反応温度の最適化。
6. タンパク質コード配列の最適化：融合タグを用いて大腸菌のコードン使用頻度に合わせる。N末端およびC末端を部分切除したコンストラクトを試す。全長タンパク質のかわりにタンパク質ドメインのみの発現を行う。

## 参考文献

1. Zhao, K., Creswell, D. and Slater, M. (2008) *Promega Notes* **100**, 9–10.
2. Baranov, V.I. and Spirin, A.S. (1993) *Methods Enzymol.* **217**, 123–42.
3. Gourdon, P. *et al.* (2008) *Protein Expr. Purif.* **58**, 103–13.
4. Slater, M.R. *et al.* (2005) *Promega Notes* **91**, 21–5.
5. Hillebrecht, J.R. and Chong, S. (2008) *BMC. Biotechnol.* **8**, 58.
6. Leippe, D. *et al.* (2008) *Promega Notes* **100**, 11–2.
7. Ahn, J.H. *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1346–52.
8. Son, J.M. *et al.* (2006) *Anal. Biochem.* **351**, 187–92.
9. Torizawa, T. *et al.* (2004) *J. Biomol. NMR* **30**, 311–25.
10. Palmer, E. *et al.* (2006) *Protein Sci.* **15**, 2842–6.
11. Chumpolkulwong, N. *et al.* (2006) *J. Struct. Funct. Genomics* **7**, 31–6.
12. Paulus, M., Haslbeck, M. and Watzel, M. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32**, e78.
13. Voges, D. *et al.* (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 601–14.
14. Ahn, J.H., Kang, T.J. and Kim, D.M. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 422–7.
15. Smith, D. and Vincent, E. (2008) *Promega Notes* **100**, 6–8.

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	8 反応分	L1115	25,000
	24 反応分	L1110	65,000
pFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20 μg	G1681	48,000
pFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	20 μg	G1691	48,000
HaloTag® TMR Ligand	15 μl	G8252	45,000
	30 μl	G8251	75,000
pFN6A (HQ) Flexi® Vector	20 μg	C8511	45,000
Renilla Luciferase Assay System	100 回分	E2810	16,500
	1,000 回分	E2820	88,000
Monster Green® Fluorescent Protein phMGFP Vector	20 μg	E6421	86,000
PureYield™ Plasmid Miniprep System	50 回分	A1221	12,000
	250 回分	A1222	48,000
PureYield™ Plasmid Midiprep System	25 回分	A2492	27,000
	100 回分	A2495	96,000
Eluator™ Vacuum Elution Device*	4 個	A1071	20,000

\*For Laboratory Use.