

Non-RIでもっとも高感度な新しいタンパク質ラベル法の紹介： FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System



Promega

By Gary Kobs, B.S., Robin Hurst, M.S., Natalie Betz, Ph.D., and Becky Godat, B.S.
Promega Corporation

要約

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling Systemは*in vitro*の翻訳産物を蛍光標識によって検出できる初めての製品です。FluoroTect™ Systemでは、蛍光物質BODIPY®-FLで標識し、荷電された修飾型リジントランスファーRNA(リジンtRNA)を採用しています。修飾型リジンtRNAは、原核生物および真核生物の両方の*in vitro* 翻訳システムで効率的に使われています。レーザーによる蛍光イメージアナライザーを用いて蛍光標識されたタンパク質を「ゲル中」で検出することにより、数分でデータを得ることができます。この特長により、従来の放射性同位元素や非放射性同位元素の取り込みとこれらの検出方法に関連した多数の操作を行う必要がなくなります。

はじめに

この20年間、無細胞系の発現システムは、目的の遺伝子産物の特徴を迅速に解析するための標準的な手法であり続け、興味深い事に無細胞系の*in vitro*発現系の用途は現在も基礎研究や、分子診断と多検体処理を目的とした創薬研究のアプリケーションで迅速に広がり続けています。さらに、抽出液ベースの発現システムは、伝統的なゲノムとプロテオームのアプローチ間の「架け橋」としてゲノム機能解析のアプリケーションで用いられています(1)。このようにゲノム研究は、遺伝子発現と生細胞内のタンパク質機能の体系的な解析に向かっています。しかしながら、現在、研究者はコンピューターによるバイオインフォマティクスを元にした予想、発現プロファイリング、そして抽出液ベース、細胞ベースおよび動物を使ったアッセイを含む多くのレベルの機能を決定する複数の方法を使わなくてはなりません。このような状況下で、*in vitro*の発現技術は、細胞や動物を用いた発現実験よりもかなりの時間の節約が可能であり、一般的に容易に実施できるため非常に有用です。*in vitro*発現技術の例には、オープンリーディングフレーム発現(2)、突然変異分析(3)、翻訳後修飾分析(4)、タンパク質間相互作用(5)および多検体スクリーニング(6)が含まれます。一般的に、実験の結果は、合成時にタンパク質鎖に取り込まれた³⁵Sメチオニンを検出することにより得られます。

プロメガの新製品FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling Systemでは、データを得るために必要な時間を大幅に削減し(24時間に対し2-5分)、放射性同位元素を扱うときに必要な手法(すなわち、メンブレンへの固定と乾燥または転写)が不要となる簡単な代替法です。また、放射性同位元素を使わない手法で必要なエレクトロブロットングも不要になります。

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation
Labeling System は利用可能な最も高感度な
non-RIのタンパク質標識システムです。

従来の実験方法

in vitro 翻訳システムを用いて合成や特定されたタンパク質の検出に使われている最も共通的な実験方法の1つは、RI標識されたアミノ酸の取り込みです。一般に³⁵Sメチオニンが最適な標識ですが、³⁵Sシステイン、¹⁴Cロイシン、³Hロイシンのような他の標識も同様に使われています。これらの標準的な反応はSDS-PAGEによって分離され、乾燥させた後、シグナルを増強させX線フィルムに6-18時間露光するか、あるいはメンブレンに移し、ホスホイメージャーシステムを用いてスキャンします(7)。

このような手法では、放射性同位元素の使用に伴う安全面、規制および廃棄の問題、さらに長時間にわたる被ばくが根本的な問題として挙げられます。また、タンパク質を泳動したゲルのシグナルの増強、ゲルの固定および乾燥といったステップにより、余計な時間が必要となり、時には、実験の失敗(例えば、ゲルのひび割れ)の原因となる場合があります。

現在市販されているnon-RIの検出システムでは、ビオチンによってリジンのε位が標識された修飾型リジンtRNAsを利用しています。

これらの修飾型リジンtRNAsは翻訳反応に加えることができ、そして修飾型リジンは合成するタンパク質に取り込まれます。また、放射性同位元素の取り込みと同じように、ビオチン化されたタンパク質を含んでいる反応液をSDS-PAGEによって分離した後、タンパク質をニトロセルロースやPVDF膜のような固相のマトリックスにエレクトロブロットしなければなりません。ビオチン化されたタンパク質は、アルカリホスファターゼあるいはホスラディッシュペルオキシダーゼと結合したストレプトアビジンを用いた比色定量法あるいは蛍光検出試薬(8)を使ってnon-RIで検出できます。

しかしながら、利用した翻訳システムのタイプによっては内在性のビオチン化タンパク質が原因となるバックグラウンドバンドの存在により特異的な翻訳産物の検出が妨げられる可能性があります(8)。

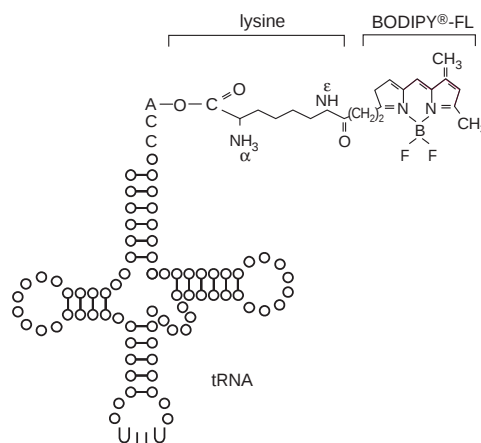


図1. FluoroTect™ Green_{Lys} tRNA の構造

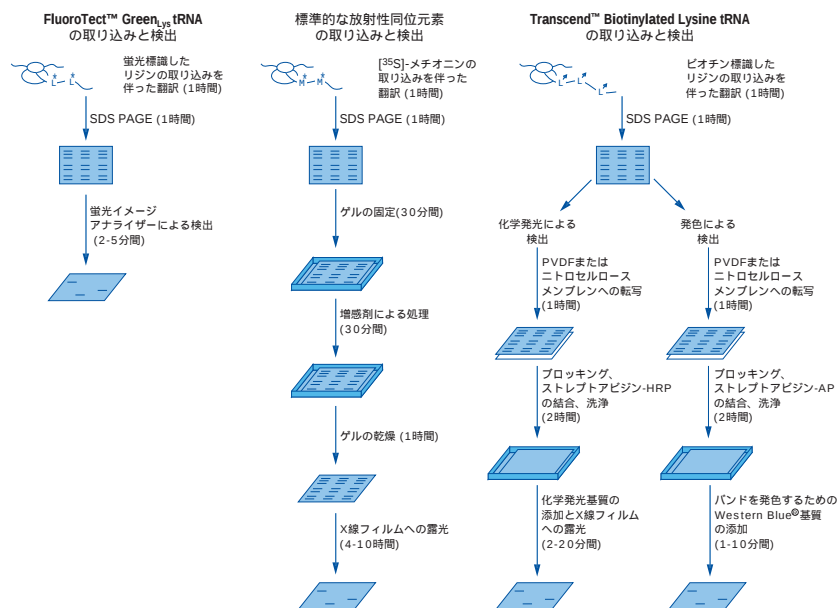


図2. FluoroTect™ Green_{Lys} tRNA、Transcend™ tRNAおよびRI標識されたアミノ酸を用いた取り込みと検出プロトコールの比較

新しいFluoroTect™ Systemの特徴

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling System はリジンのε位において蛍光物質BODIPY®-FLにより標識され、荷電されたリジンtRNA分子を使います(図1)。502nmにおける吸光と510nmにおける蛍光を示すBODIPY®-FL蛍光物質は、広く使われている励起光源や一般的な光学フィルターセットで使えるように開発されました(9)。BODIPY®-FL蛍光物質はJohnsonらによって記述された実験方法(10)を使って荷電されたtRNAに付加されています(10)。標識された FluoroTect™ tRNA は直接翻訳反応に加えられ、標識されたリジンは合成されたタンパク質に取り込まれます。

近年、BODIPY®-FL標識したメチオニンを使った方法で、レーザーによる蛍光イメージアナライザーを用いてナノグラムレベルのタンパク質を検出することが可能であることが示されました(11)。FluoroTect™ Systemでは、標識アミノ酸としてリジンが選択されています。これはリジンが、平均でタンパク質のアミノ酸の6.6%を構成し、かなり頻繁に利用されるアミノ酸の1つであるためです。これはメチオニンの1.7%と対照的です(12)。標識されたタンパク質の検出は、レーザーによる蛍光イメージアナライザーを利用して直接「ゲル中」で行い、2-5分で完了します。このように、ゲルの固定/乾燥といった操作やRI標識されたアミノ酸の使用によって生じる安全性、規制および廃棄の問題がなくなります。non-RIの「ゲル中」での検出は簡便であるため、同じく従来のnon-RIのシステムで長時間を必要としたエレクトロブロットングと検出ステップが不要になります。FluoroTect™ Systemに対するRI標識された翻訳産物の標準的なオートラジオグラフィーを用いた検出およびビオチンを含む翻訳産物の化学発光法と呈色法の比較を図2に示します。

FluoroTect™ Systemの柔軟性

in vitro の翻訳は、2つの基本的なアプローチにより行われます。一つには、mRNAを鋳型として利用し、もう一つには、DNA鋳型(つまり転写/翻訳の組み合わせ)を利用します。正しいシステムの選択は鋳型(mRNAあるいはDNA)、プロモーター領域、翻訳に利用する細胞溶解液もしくは抽出液に存在する第2次タンパク質修飾因子などのいくつかの基準に基づいています。どの系を選択するかに関わらず、これまでは放射性同位元素を使わざるを得ませんでした。また、ビオチンを利用した系では、内在性のビオチン化タンパク質によってバックグラウンドバンドが生成されるため、Wheat Germ Extractには薦められません(7)。FluoroTect™ System はすべ

ての*in vitro* 翻訳システムに適用が可能であり、内在性の蛍光性のタンパク質が存在することはありません。

次に、いくつかの異なったシステムと組み合わせて使った場合における、FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling Systemの機能について検討しました。図3ではTnT® Coupled Reticulocyte Lysate System、TnT® Coupled Wheat Germ Extract System、Rabbit Reticulocyte System カタログ番号L4960)あるいはWheat Germ Extract System(カタログ番号L4380)を使い、Luciferase T7 Control DNA(カタログ番号L4821)あるいはLuciferase Control RNA(カタログ番号L4561)を鋳型にして発現させた結果を示しました。すべてのシステムにおいてルシフェラーゼ鋳型を十分に発現し、蛍光標識ルシフェラーゼtRNAは容易に検出できました。

さまざまな大きさのタンパク質の発現および検出能力も評価しました。異なるサイズの産物が推薦するTnT® T7 Quick for PCR DNA System(カタログ番号L5540)とFluoroTect™ tRNAを使って発現されました。クローンされたAPC(adenomatous polyposis coli)遺伝子座あるいはLuciferase T7 Control DNAを鋳型として用いました。結果を図4に示します。20kDaから85kDaに及びAPC産物と61kDaのルシフェラーゼ産物が、このシステムで発現され、FluoroTect™ fluorescent tRNA標識の有効性が示されました。これらの異なったタンパク質産物には、8個から45個のリジン残基が含まれていました。

FluoroTect™ システムの感度

従来の標識方法(放射性同位元素とビオチン)とプロメガのFluoroTect™ システムの感度レベルを評価する実験を行いました(図5)。その結果、FluoroTect™ Systemは、(2-5分)化学発光法と比べて同等の感度([³⁵S]メチオニン標識とも同等)を示しました。このようにFluoroTect™ Systemは現在市販されている中で最も高感度なnon-RI標識システムです。

結論

FluoroTect™ Green_{Lys} in vitro Translation Labeling Systemは標準的なタンパク質の標識法よりも明らかな優位性を示します。

このキットは、i) 原核生物と真核生物の両方の*in vitro*翻訳システムにおいてタンパク質の蛍光標識を効率的に行える; ii) 蛍光標識されたタンパク質の簡単で、迅速な「ゲル中」での検出ができる; iii) アイソトープ取り扱いと廃棄処理が不要なnon-RI方法であるなどの利点があります。

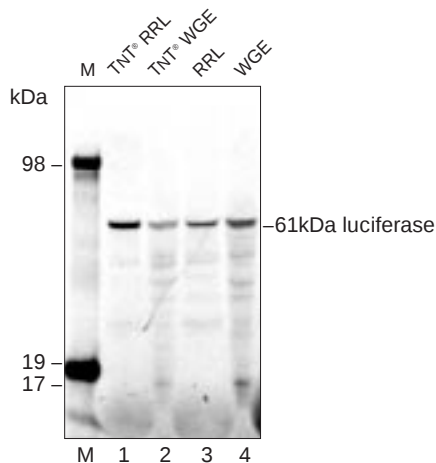


図3. 異なるin vitro翻訳システムにおけるFluoroTect™ Green_{Lys} tRNAの比較
Luciferase T7 Control DNAまたはLuciferase Control RNAを次のシステムで発現した。レーン1、TnT® Coupled Reticulocyte Lysate System (TnT® RRL)。レーン2、TnT® Coupled Wheat Germ System (TnT® WGE)。レーン3、Rabbit Reticulocyte Lysate System (RRL)。レーン4、Wheat Germ Extract System (WGE)。TnT® RRLおよびTnT® WGE Systemでは200ngの直鎖状Luciferase T7 Control Plasmidを鋳型として用いました。RRLあるいはWGE Systemでは、1μgのLuciferase Control RNAを鋳型として用いました。それぞれの反応液の一部(5μl)を10倍希釈したRNase One™ Ribonucleaseを用いて37℃で5分間処理し、LDSサンプルバッファー(Invitrogen)を使ってMES泳動バッファーにより4-12%のNovex NuPAGE™-Bis-Trisゲルで泳動した。ゲルは505のチャンネルでHitachi FMBIO® IIを使って視覚化した。

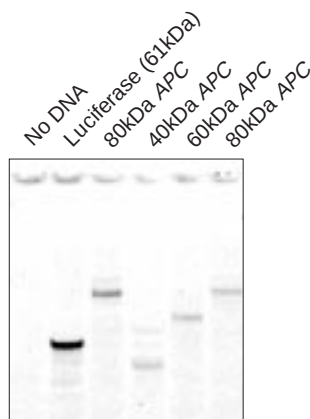
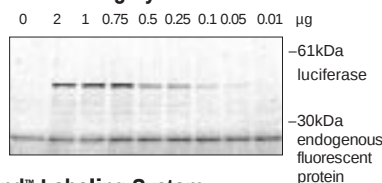
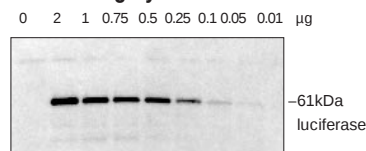


図4. FluoroTect™ System を使ったさまざまな大きさのタンパク質の発現
示された大きさのAPC遺伝子産物をTnT® T7 Quick for PCR DNA SystemとFluoroTect™ Systemを使って発現した。図3に記述されるように、電気泳動と蛍光による検出を行った。

A. FluoroTect™ Labeling System



B. Transcend™ Labeling System



C. [³⁵S]Methionine Labeling

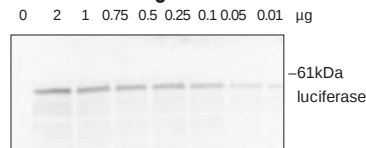


図5. FluoroTect™ tRNA、Transcend™ tRNA と[³⁵S]メチオニン標識による検出感度の比較

図中に示した量のLuciferase Control RNAが3つの異なる標識手法を用いて、Rabbit Reticulocyte Lysate System, Nuclease Treated(カタログ番号L4960)により発現された。

パネルA: 標識反応は1μlのFluoroTect™ Green_{Lys} tRNAを使って行われた。それぞれの反応から5μlをゲル電気泳動し、530 DF 30放射フィルタを使ってFluorImager™ SI(Molecular Dynamics)で視覚化した。

パネルB: Transcend™ Biotinylated tRNA(カタログ番号L5061)を使ってラベリング反応を行った。それぞれの反応液から1μlをゲル電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。産物はTranscend™ Chemiluminescent Detection System(カタログ番号L5080)を用いて検出した。

パネルC: 標識反応は20μCiの[³⁵S]メチオニンを使って行われた。それぞれの反応液から1μlをゲル電気泳動し、パネルBと同様に転写しました。メンブレンはMolecular Dynamics PhosphorImager®を使って一晩露光された。

参考文献

1. Jagus, R. and Beckler, G.S. (1998) In: *Current Protocols in Molecular Biology*, 11.3.2, John Wiley & Sons, New York.
2. Bocco, J.L. et al. (1988) *Mol. Biol. Reports* **13**, 45-51.
3. Roest, P.A.M. et al. (1993) *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1719-1721.
4. Newman, P. et al. (1991) *Biochem. Biophys. Acta.* **1080**, 227-230.
5. Chinnaiyan, A.M. et al. (1995) *Cell* **81**, 505-512
6. Schneider, C. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14536-14451.
7. TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems Technical Manual #TM045, Promega Corporation.
8. Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection Systems Technical Bulletin #182, Promega Corporation.
9. Haugland, R.P. (1996) *HANdbook of Fluorescent probes and Research Chemicals Molecular probes, Inc, Eugene, OR.*
10. Johnson, A.E. et al. (1976) *Biochemistry* **15**, 569-575.
11. Gite, S. et al. (2000) *Anal. Biochem.* **279**, 218-226.
12. Dayhoff, M.O. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure Suppl. 3*, National BioMedical Research Foundation, Washington.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	20-40回分	L5001	50,000
TnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	1 システム	L4610	70,000
TnT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	1 システム	L4140	65,000
Transcend™ Chemiluminescent Non-Radioactive Translation Detection System	1 システム	L5080	43,000
Transcend™ Biotinylated tRNA	30 μl	L5061	23,000