

PROTEIOS™ コムギ胚芽無細胞タンパク質合成キットを用いたブタインターロイキン-2の合成

(独) 農業技術研究機構 動物衛生研究所 犬丸 茂樹 國保 健浩

はじめに

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は内在性の生物活性が低いことが知られています。これは、休眠状態にあるコムギ種子の胚芽の抽出物を用いているためです。このため未精製のまま発現産物の生物活性を測定しても合成系由来の物質による影響を受けにくいという利点を生むとともに、他の発現系に比べて発現されたタンパク質がプロテアーゼなどによる分解を受けにくいという利点もあると考えられます。

しかし前駆体の一部が切断されて初めて活性を示す成熟型になるタンパク質の場合は、大腸菌など原核生物を用いた合成系同様あらかじめ成熟型タンパク質に近いタンパク質が合成されるように導入する遺伝子配列を改変しておく必要があると考えられます。そこで今回はN末端に20残基の分泌シグナルペプチドを持つブタインターロイキン-2 (polL-2) 遺伝子を用い、シグナルペプチド領域を含む全長のORFとシグナルペプチド領域を切除したORFのcDNAを、PROTEIOS™キットに導入してタンパク質を生産し、反応液中のIL-2活性をそのまま測定に用いました。

方法

コムギ胚芽無細胞タンパク質発現用ベクター (pEU3-N) に導入するcDNAは、コンカナバリンAで刺激したブタ末梢血リンパ球からRT-PCRでクローニングしたpolL-2のcDNAをテンプレートとするPCRによって調製しました(図1)。シグナルペプチド領域を含む154アミノ酸残基からなるpolL-2前駆体をコードするcDNAはSpe サイトを導入した上流プライマー (S1 primer) とBamH1 サイトを導入した下流プライマー (A primer) を用いてKOD-Plus-によるPCRで増幅し、コムギ胚芽無細胞タンパク質発現用ベクター (pEU3-N) のマルチクローニングサイト (MCS) に導入して前駆体発現プラスミド (pEU-PorIL2/S+) を構築しました。また、シグナルペプチドの切断された成熟型polL2をコードするcDNAは、成熟型rpolL-2のN末端である21番目のアラニン残基の前に開始コドン (メチオニン) を導入した上流プライマー (S2 primer) を用い、同様の方法でN末端にシグナルペプチド配列のない成熟型発現プラスミド (pEU-PorIL2/S-) を構築しました (pEU3-N の翻訳増強配列である配列は、下流に存在する最初のAUGから翻訳を開始する)。構築したそれぞれのプラスミドからThermo T7 RNA polymeraseによりm

RNAの合成を行いアガロース電気泳動にてmRNAの合成を確認後、PROTEIOS™キットのプロトコールに従って試薬を調製し、PG-Mate®を用いて26℃で17時間、重層法によるタンパク質の合成を行いました。

反応液中のrpolL-2はtricine-SDS PAGEおよびウエスタンブロット法によって検出しました。また生物活性は、発現後溶液を精製せずに培養液で希釈してIL-2依存性CTLL2細胞の培地に添加し、Cell Counting Kit-8 (和光純薬) を用いて細胞の増殖性を測定することにより確認しました。

結果及び考察

反応液をそのまま (total) あるいは遠心の沈渣 (ppt) と上清 (sup) に分画した後にTricine-SDS PAGEで展開してCBB染色したところ(図2)、成熟型IL-2をコードするcDNAを発現した反応液 (S-) のtotalとsupに新規のバンド(矢印)が一本観察されただけでしたが、抗rpolL-2抗体を用いたウエスタンブロットを行うと(図3)前駆体をコードするcDNAを発現した反応液 (S+) のtotal、supおよびpptで1本、S-のtotalとsupでは2本のバンドが確認されました。この違いは分子サイズの大きい方のバンドがCBB染色ではコムギ胚芽抽出物由来のバンドと重なったために生じたことが分かります。実際、図2のS+のtotalでは相当するバンドが濃くなっています。S-のtotalとsupで観察される分子サイズの小さいバンドは成熟型polL-2が生産されたことを示しています。分子サイズの大きい方のバンドはどのような構造のものか今のところ明らかではありません。

生物活性を調べると、Control (mRNA非添加) には活性が全く無く、S-、S+はともに生物活性が確認されましたが、S+の方が一桁低いという結果が得られました(図4)。S-の活性をrpolL-2のタンパク質量当たりで比較するとバキュロウイルス/昆虫細胞系で生産した成熟型精製rpolL-2で得られたデータとほぼ一致しました。ウエスタンブロットの結果から発現量はS+の方が多いと思われることからシグナルペプチドが切断されていないことが活性に影響を与えていると考えられます。S+は大部分が沈澱したために反応しにくいという可能性もあるとは思われますが、上清中のrpolL-2量はS+の方が必ずしも少なくないのでこ

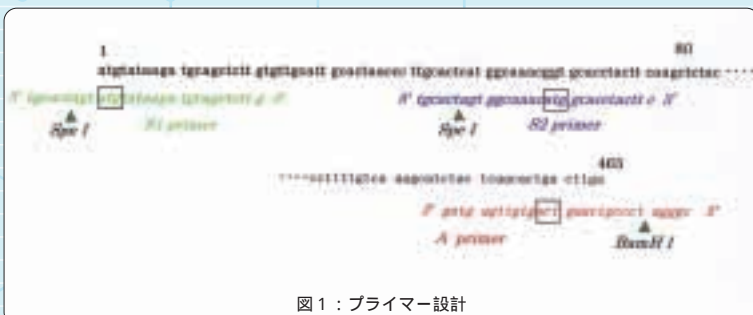


図1：プライマー設計

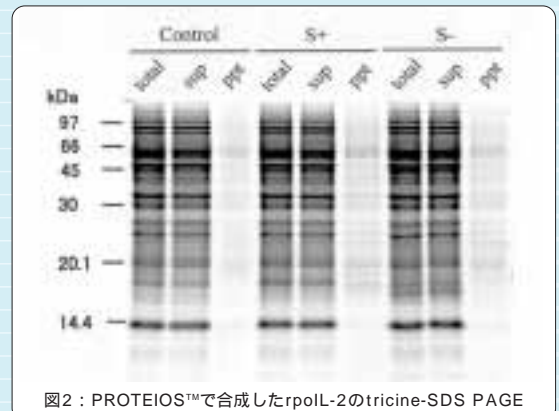


図2：PROTEIOS™で合成したrpolL-2のtricine-SDS PAGE

の可能性は低いと考えられます。

以上のように、PROTEIOS™システムで発現したrpoIL-2は精製することなく生物活性を測定することができ、シグナルペプチドを除去した成熟型はバキュロウイルス遺伝子発現系で生産したrpoIL-2と同等の生理活性を有していること、PROTEIOS™シス

テムではシグナルペプチドの切断は起こらないこと、シグナルペプチドの切断がpoIL-2の生物活性に大きく影響することがわかりました。また今回の結果から、PROTEIOS™システムは、複数の変異体を平行して同時に発現し、精製せずに活性を比較できるハイスループットなシステムとなり得ることが示唆されました。

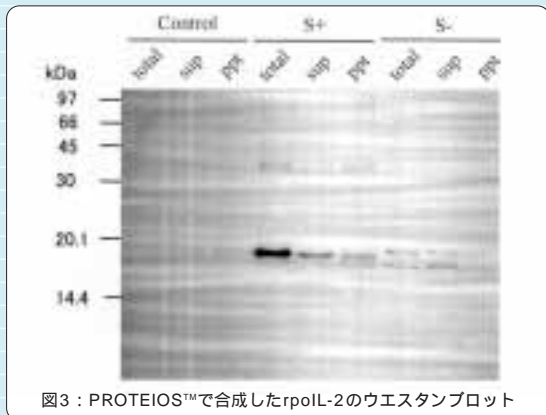


図3：PROTEIOS™で合成したrpoIL-2のウエスタンブロット

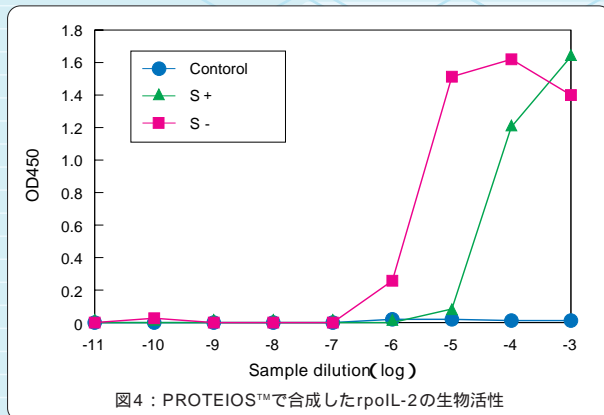


図4：PROTEIOS™で合成したrpoIL-2の生物活性

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
PROTEIOS™ set*** ●Wheat germ cell-free protein synthesis core kit* Wheat germ extract Creatine kinase (10mg/ml) Buffer #1 Buffer #2 ●Plasmid set** pEU-DHFR (0.2 µg/µl) pEU3-N (0.2 µg/µl)	(20回用) 0.22ml 0.1ml 2.2ml 2.5ml	-80	CPS-601	¥140,000
PROTEIOS™ set*** ●Wheat germ cell-free protein synthesis core kit* Wheat germ extract Creatine kinase (10mg/ml) Buffer #1 Buffer #2 ●Plasmid set** pEU-DHFR (0.2 µg/µl) pEU3-N (0.2 µg/µl)	(60回用) 0.66ml 0.3ml 6.6ml 7.5ml	-80	CPS-603	¥270,000
PROTEIOS™ set Mini*** ●Wheat germ cell-free protein synthesis core kit Mini* Wheat germ extract Creatine kinase (10mg/ml) Buffer #1 Buffer #2 ●Plasmid set Mini** pEU-DHFR (0.2 µg/µl) pEU3-N (0.2 µg/µl)	(5回用) 55 µl 30 µl 550 µl 630 µl	-80	CPS-601M	¥50,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
PCR用酵素 KOD -Plus-	200U x 1本	-20	KOD-201	¥30,000
	200U x 5本	-20	KOD-202	¥120,000
	200U x 11本	-20	KOD-203	¥230,000
RNase inhibitor*	2,500U x 1本	-20	SIN-101	¥9,000
	2,500U x 5本	-20	SIN-102	¥36,000
Thermo T7 RNA polymerase 《TT7》*	7,500U x 1本	-20	TRL-201	¥12,000
Nucleotides rNTP Set(各100mM)[rATP,rCTP,rGTP,rUTP]	各0.5ml	-20	NTP-111	¥45,000
Nucleotides rNTPs Mixture(各25mM)	0.5ml	-20	NTP-211	¥18,000
PG-Mate® 無細胞タンパク質合成装置	1式	-	IVT-2001	¥480,000

* Wheat germ cell-free protein synthesis core kitにはRNase inhibitor、およびRNA polymeraseは添付されていません。また、mRNAの精製にG-25マイクロスピナラムが必要となります。別途ご準備ください。

**Plasmid setはインビトロテック株式会社からの受託製造・販売品です。

***弊社からの販売は非営利組織に限られます。