

PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis kitを用いたCalf Rhodaneseの合成

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 黒板 敏弘

はじめに

PROTEIOS™ Wheat germ cell-free protein synthesis kitは愛媛大・遠藤教授らにより開発されたコムギ胚芽抽出液¹⁾²⁾を用いた高効率無細胞タンパク質合成キットです。本キットは真核生物（コムギ）の翻訳システムを用いてCBB染色で検出できる程度のタンパク質（最大20 μg / 1 反応）を合成でき、酵素活性測定などの種々の解析に直接使用可能であるという特徴を有しています。

原核生物と真核生物のタンパク質合成速度やフォールディングシステムは若干異なっていることが報告されており³⁾、真核生物由来のタンパク質を合成する場合は真核生物由来の翻訳システムを用いることは有利な方法であると考えられます。そこで本号では、凝集しやすいタンパク質として知られているウシ由来Rhodanese(チオ硫酸サルファートランスフェラーゼ： $S-SO_3^- + CN^- \rightarrow SO_3^{2-} + SCN^-$)に着目し、大腸菌のシステムとPROTEIOS™を用いた無細胞タンパク質合成システムを用いて合成し、比較を行った例をご紹介します。

方法

Calf Rhodanese cDNAはCalf cDNAプールよりKOD -Plus-を用いてPCR増幅しクローニングしました。具体的にはNdeIサイトを導入した上流プライマーとBamHIサイトを導入した下流プライマーにてPCRを行い、増幅断片をBamHI処理後、無細胞タンパク質合成用のpEU3-NIIベクターのEcoRV-BamHIサイトに挿入しました（KOD -Plus-にて増幅された断片の末端は平滑化されているため5'側はそのまま使用）。また、挿入断片の塩基配列を確認した後、NdeIとBamHIを用いてRhodanese遺伝子を大腸菌発現用ベクターへサブクローニングしました。

大腸菌とPROTEIOS™を用いた場合のタンパク質発現実験のフローを図1、2に示します。

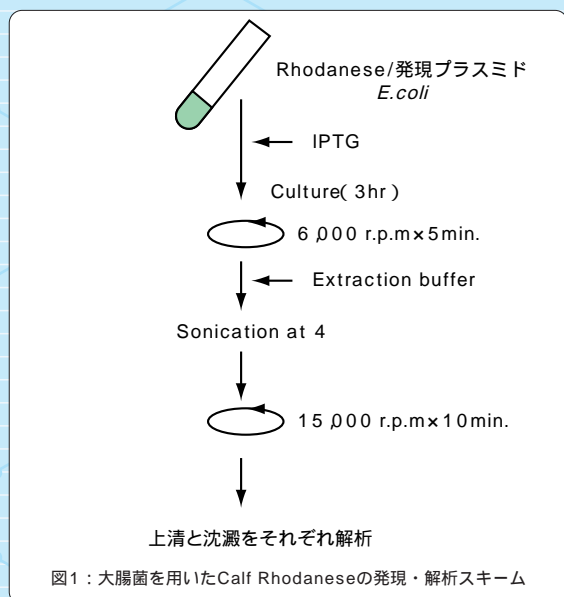
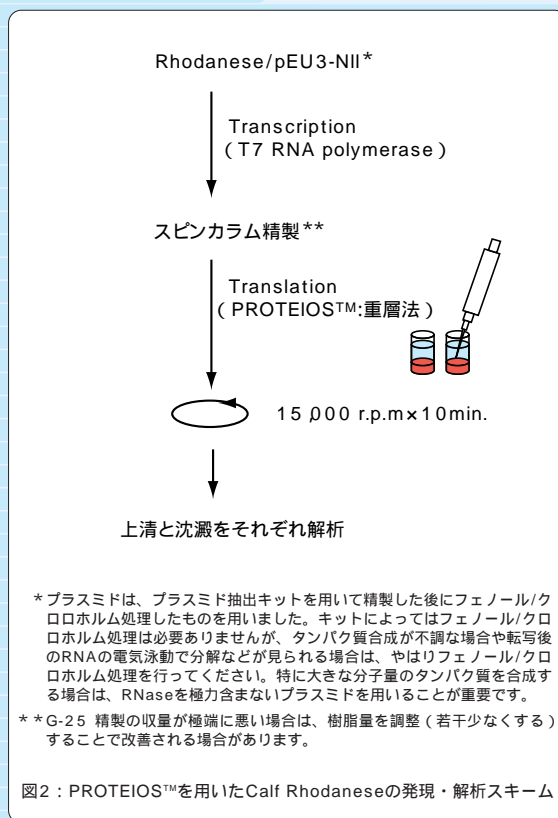


図1：大腸菌を用いたCalf Rhodaneseの発現・解析スキーム



結果および考察

大腸菌で発現させたRhodaneseのSDS-PAGE解析の結果を図3に示します。大腸菌システムにおいてはRhodaneseの合成は認められましたが、そのほとんどは沈殿画分に回収されることが分かりました。一方、PROTEIOS™システムを用いて無細胞合成したものについては、上清画分に明瞭なバンドが認められ、合成されたタンパク質が可溶性画分に存在することが分かりました（図4）。

次に、PROTEIOS™システムを用いて合成したRhodaneseについて、常法⁴⁾に従って酵素活性を測定しました。酵素反応には合成反応終了液をそのまま用いました。その結果、反応液（Total）および遠心上清（Sup）にほぼ同等の活性を確認することが出来ました（図5）。今回の検討では残念ながら天然型の酵素と比活性の比較は出来ませんでした。今までに調べた数種の酵素についてはほぼ同等の比活性を有していることを確認しています。

Rhodaneseは凝集しやすい性質を有しており、古くからシャペロン等の研究に使用されてきました。よって今回大腸菌で合成したタンパク質は、菌体内で封入体（インクルージョンボディ）を形成している可能性が高いと考えられます。一方、コムギ胚芽システムによる合成においては、合成速度や条件が至適条件に比較的近かったため、活性を有した形でタンパク質が合成できたものと推察されます。

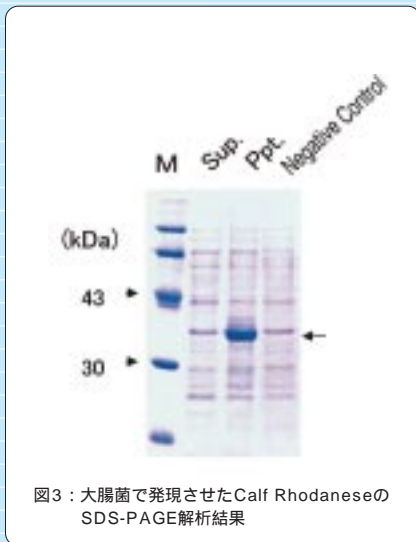


図3：大腸菌で発現させたCalf Rhodaneseの SDS-PAGE解析結果

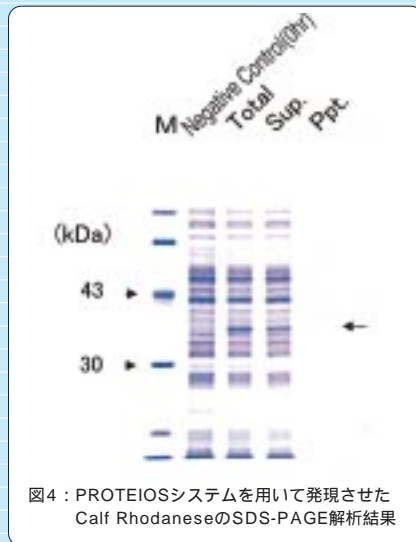


図4：PROTEIOSシステムを用いて発現させた Calf RhodaneseのSDS-PAGE解析結果

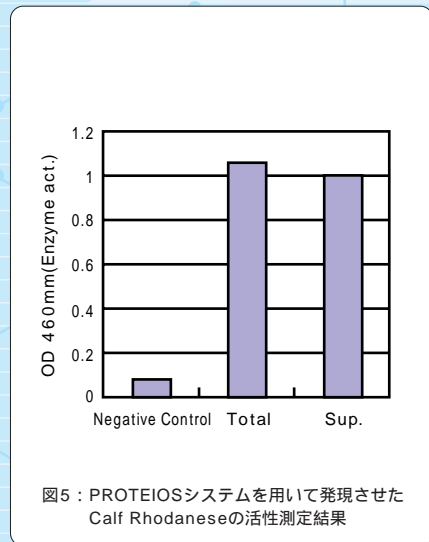


図5：PROTEIOSシステムを用いて発現させた Calf Rhodaneseの活性測定結果

まとめ

本号では、凝集しやすい性質を有する真核生物（Calf）由来の酵素（Rhodanese）に着目し、本酵素の合成におけるPROTEIOS™の優位性をご紹介致しました。冒頭にも述べましたようにPROTEIOS™は大腸菌などを用いた生産システムに比べ、真核生物由来のタンパク質合成により適したシステムであると思われます。

今後、更に様々なタンパク質の合成・応用例を収集する予定です。是非一度PROTEIOS™をお試しください。

- 1) Madin K., Sawasaki T. Ogasawara T., and Endo Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(2):559-564(2000)
- 2) 遠藤弥重太, *BIO INDUSTRY*, 17:20-27 (2000)
- 3) William J. Netzer & F. Ulrich Hartl, *Nature*, 388:343-349 (1997)
- 4) *Methods Enzymol.*, 77:285-91(1981)

関連商品

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 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
RNase inhibitor*	2,500U×1本 2,500U×5本	-20	SIN-101 SIN-102	¥9,000 ¥36,000
Thermo T7 RNA polymerase*	7,500U	-20	TRL-201	¥12,000
PG-Mate™ 無細胞タンパク質合成装置 ***	1セット	—	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。別途御準備ください。

**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。