

新規PURE system -PUREflex™- の開発

○金森 崇^{1,2}、村上 朋重²、中村 美紀子¹、速水 友紀¹、對比地 久美子¹、加藤 静恵¹、
古城 周久¹、上田 卓也² (¹ジーンフロンティア(株)、²東大院・新領域)

Development of novel PURE system -PUREflex™-

○Takashi Kanamori^{1,2}, Tomoe Murakami², Mikiko Nakamura¹, Yuki Hayami¹, Kumiko Tsuihiji¹, Shizue Kato¹,
Kanehisa Kojoh¹ and Takuya Ueda² (¹GeneFrontier Corp., ²Grad. Sch. of Frontier Sci., Univ. of Tokyo)

要旨

PURE systemは、翻訳反応に必要なリポソームなどの構成因子を個別に精製した後、再構成した再構成型無細胞タンパク質合成系である。PURE systemは、タンパク質合成反応を阻害するRNaseやプロテアーゼなどの混入が少ない、使用に応じて反応液内の構成因子の組成を自由に調節できるなど、他の無細胞タンパク質合成系にはない特長を有している。そのため、タクソク質の調製目的以外にも、タンパク質生産、特にリポソームディスプレイ(RD)などのin vitroディスプレイにも利用され始めている。しかし、従来のPURE systemの反応液では、RDを行った際の効率や再現性、安定性などに問題があった。

我々は、從来指摘された問題の原因が、構成因子の精製時に混入する夾雜物、特にリボ多糖にあると考え、すべての構成因子の精製方法を最適化する検討を進めた。その結果、リボ多糖混入量を従来に比べて1/1000に減少させた新規PURE system (PUREflex™) の開発に成功した。PUREflexでは、リボ多糖だけでなくRNaseなど他の夾雜物の混入量も同時に減少させることができ、実際にRDを行なうと、従来のPURE systemを使用した場合と比較して選択効率が10倍以上改善された。この結果は、開発したPUREflexの優位性、および実用的なRDが可能になったことを示すものである。

次に、本来の活性であるタンパク質合成能を検証したところ、PUREflexを用いた通常の合成反応では、リポソームあたりの合成量が2倍以上に増大していることが分かった。さらに、膜タンパク質およびペルルフィル結合を有するタンパク質の合成についても検討し、反応液の構成因子を追加することで、それぞれ活性を有するタンパク質が合成できることが確認された。これらの結果は、今回、開発したPUREflexが、タンパク質生産分野だけでなく、タンパク質の調製目的において幅広くかつ効率的に使用できることを示すものである。

3. PUREflexの特徴

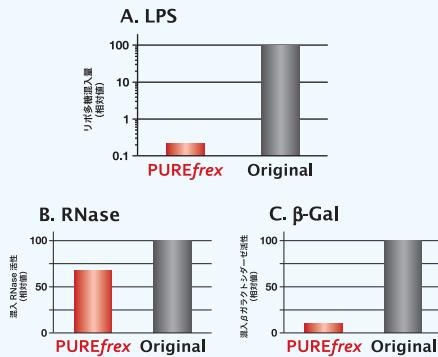


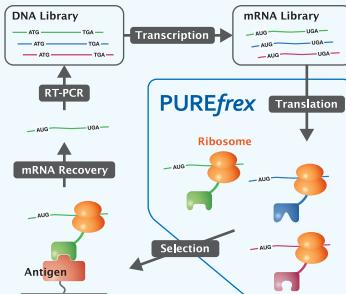
Figure 3-1.

PUREflexに混入している夾雜物量は、従来の反応液より低減している

A. リボ多糖 (LPS)

従来のPURE systemに含まれている夾雜物のうち、代表的な3種類の夾雜物の混入量を、それぞれ常法により測定した。従来の反応液(Original)に混入している夾雜物量を100とした相対値で示す。

A.



	PURE system	E.coli
PUREflex	4-25°C	4-25°C
Original	4-25°C	4°C
Enrichment / round	100,000	1,000-10,000
SDS-PAGE	20-250	

Figure 3-2.

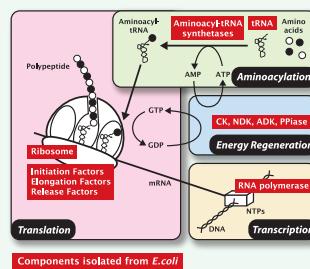
PUREflexを使用したリポソームディスプレイでは、選択効率が10倍以上改善される

A. リポソームディスプレイの概略

B. PURE systemと大腸菌抽出液を使用したリポソームディスプレイの比較

1. PURE system (再構成型無細胞タンパク質合成系)

転写・翻訳反応に必要なリポソームなどの構成因子を個別に精製した後、再構成した無細胞タンパク質合成系



特長

タンパク質合成を阻害する因子の混入が少ない
反応液の構成の調節が容易

利点

タンパク質調製
SS結合含有タンパク質
膜タンパク質
非天然アミノ酸含有タンパク質
タンパク質研究
翻訳・フォールディング
In vitro ディスプレイ
リポソームディスプレイ
mRNA ディスプレイ

しかし、精製が不十分な構成因子由來の夾雜物が含まれていた。

2. PURE systemの改良

純度を向上させた新規 PURE system の開発

1. 構成因子の調製方法の変更

	New	Original
Proteins		
Tag	None	His-tag
Number of column	3	1
Wash with detergent	+	-
Ribosome		
Wash with detergent	+	-
tRNA		
Wash with detergent	+	-

(Original; Shimizu et al. (2005) Methods, vol.36, p.299)

2. 構成因子の添加濃度の変更

新規 PURE system → PUREflex™

4. PUREflexを用いたタンパク質合成

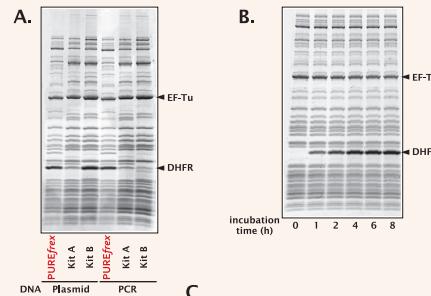


Figure 4-1.
PUREflexを用いたDHFRの合成

A. プラスミド (環状DNA)とPCR産物 (直鎖状DNA)のいずれのDNAからも合成できる

PUREflex、及び市販の2種類のPURE systemキットを使用して、PCR産物、プラスミドからDHFRを合成した。合成反応液をSDS-PAGEにかけ、Oriole (Bio-Rad)でゲルを染色した。

B. 4時間までタンパク質合成が持続する

PUREflexを使用してDHFRの合成を行った。図に示す合成時間の反応液をSDS-PAGEにかけ、Orioleでゲルを染色した。

C. 酶素の添加量を増やすと合成量が増加する

酵素量、リポソーム量を増やしてPUREflexを使用してDHFRの合成を行った。合成反応液をSDS-PAGEにかけ、Orioleでバンドを染色して定量した。1x酵素、1 μM リポソームの反応液の合成量を100とした値で示す。

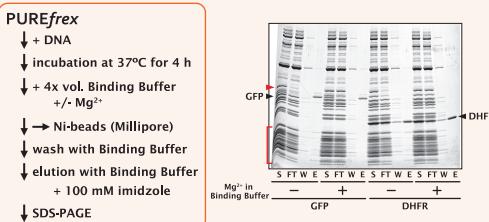
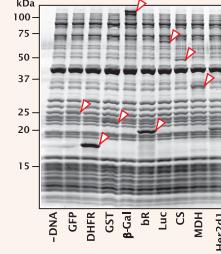


Figure 4-2.
PUREflexでは、His-tag付タンパク質を簡単に合成・精製できる

PUREflexを使用して、His-tag付GFP、及びHis-tag付DHFRの合成を行った。合成後、Binding Bufferで5倍に希釈した後、N₂洗浄後、1時間反応させた。Ni磁気ビーズをBinding Bufferで洗浄後、100 mM imidazoleで溶出させた。各サンプルをSDS-PAGEにかけ、Orioleでゲルを染色した。

合成したGFP、及びDHFRを、▶で示す。また、赤色は、反応後希釈により離脱したリポソームタンパク質を示す。



GFP : Green fluorescent protein
DHFR : Dihydrofolate reductase
GST : Glutathione S-transferase
β-Gal : β-Galactosidase
bR : Bacteriorhodopsin
Luc : Luciferase
CS : Citrate synthase
MDH : Malate dehydrogenase
Her2d1 : Domain1 of Her2

Figure 4-3.

PUREflexでは、様々なタンパク質を合成できる

PUREflexに、様々なタンパク質をコードするDNAを添加して37°Cで4時間反応させた後、SDS-PAGEにかけ、Orioleでゲルを染色した。

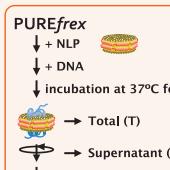


Figure 4-4.

PUREflexでは、膜タンパク質を合成できる

NLPを添加したPUREflexを使用して、バクテリオリオドロブシン(bR)を合成した。合成後、遠心により上清を回収し、合成分(T)および上清画分(S)をSDS-PAGEにかけ、SyproOrange (Invitrogen)でゲルを染色した。

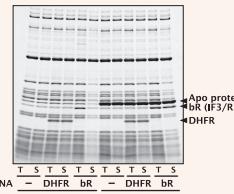


Figure 4-4.

PUREflexでは、膜タンパク質を合成できる

NLPを添加したPUREflexを使用して、バクテリオリオドロブシン(bR)を合成した。合成後、遠心により上清を回収し、合成分(T)および上清画分(S)をSDS-PAGEにかけ、SyproOrange (Invitrogen)でゲルを染色した。

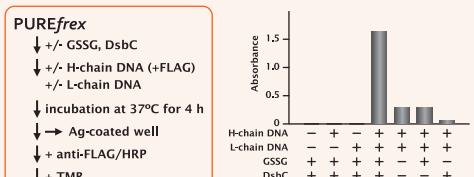


Figure 4-5.

PUREflexでは、SS結合含有タンパク質を活性型で合成できる

酸化型グルタチオン(GSSG)、及びDsbCを添加したPUREflexを使用して、上記のようにFabを合成した。抗原を固定したELISAプレートに、希釈した合成反応液を反応させた後、結合したFab anti-FLAG/HRPで検出した。

まとめ

- 構成因子の調製方法を改良することにより、従来のPURE systemよりも高純度なPUREflex™を開発した。
- PUREflex™は、タンパク質合成効率が高く、膜タンパク質を含む様々なタンパク質の合成が可能である。