

製品コード 3366 ~ 3370

研究用

TakaRa

SPP System™ Set	(製品コード 3366)
SPP System™ I	(製品コード 3367)
SPP System™ II	(製品コード 3368)
SPP System™ III	(製品コード 3369)
SPP System™ IV	(製品コード 3370)

説明書

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	プラスミドの概略図.....	5
V.	純度.....	6
VI.	使用方法	
	1. ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドの構築.....	7
	2. SPP System の構築.....	7
	3. 目的タンパク質のプルスラベル.....	7
VII.	マルチクローニングサイト周辺図.....	8
VIII.	実験例.....	10
IX.	参考文献.....	11
X.	関連製品.....	11
XI.	注意.....	12

I. 製品説明

米国ニュージャージー医科歯科大学の井上正順博士らのグループによって、大腸菌のタンパク質 MazF が、一本鎖 RNA の特定の配列 (ACA) を認識して切断する酵素 (mRNA Interferase) であることが発見されました。さらに、この MazF を利用して宿主由来のタンパク質発現を抑制し、目的タンパク質の発現のみを効率よく行う技術が開発されました。このシステムは Single Protein Production (SPP) System と呼ばれています。

SPP System では、アミノ酸配列を保持したまま、発現させたい遺伝子内の ACA 配列を ACA とは異なる配列に置換し、MazF とともに共発現させます。ほとんどの宿主タンパク質の mRNA は ACA 配列を有するため MazF により分解され、新規の発現が抑制されますが、ACA 配列のない目的タンパク質遺伝子の mRNA は切断されず、目的タンパク質の発現のみを効率よく進行させることができます。本システムではコールドショック発現ベクターを改変して使用しており、目的タンパク質の高純度な生産や安定同位体標識に最適です。コールドショック発現ベクター系でも、目的タンパク質特異的な安定同位体標識が可能ですが、SPP System では目的以外のタンパク質の発現がさらに抑制され、より多種類の目的タンパク質について、さらに高い純度、高い標識効率を得られるようになります。ただし、目的タンパク質によっては、発現量自体がコールドショック発現ベクター単独系よりも低くなる場合があります。

SPP System シリーズの製品には、転写領域内の ACA 配列を他の配列に置換した SPP System 用コールドショック発現ベクターと、適度な発現量を提供する MazF 発現プラスミドが含まれています。SPP System 用コールドショック発現ベクターには、コールドショック発現ベクターと同様に、TEE (translation enhancing element) 配列、His タグ配列、Factor Xa 切断配列の有無が異なる 4 種類があり、目的に応じて選択することができます。

SPP System

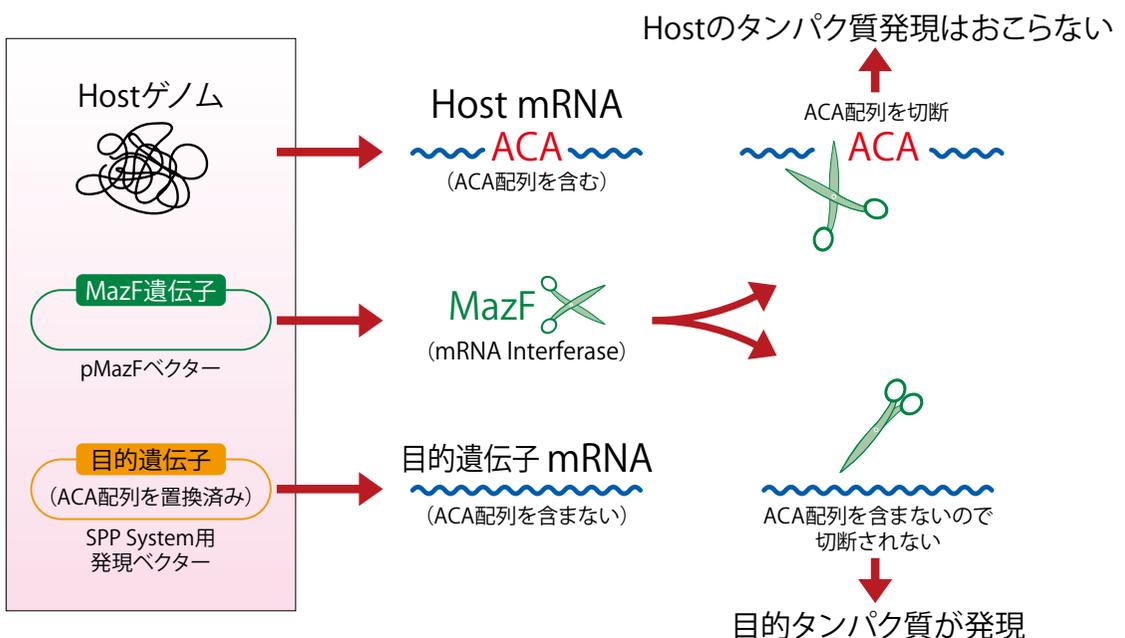


図 1. SPP System 概念図

II. 内容 (10 回分)

SPP System Set (製品コード 3366)

1. SPP System 用コールドショック発現ベクター
pCold™ I (SP-4) DNA、pCold II (SP-4) DNA、
pCold III (SP-4) DNA、pCold IV (SP-4) DNA 各 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
※ pCold I (SP-4) DNA に大腸菌由来タンパク質 envZB の ACA 配列非含有 ORF
が挿入された発現プラスミド
(発現タンパク質推定分子量 19.6 kDa)

SPP System I (製品コード 3367)

1. SPP System 用コールドショック発現ベクター
pCold I (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System II (製品コード 3368)

1. SPP System 用コールドショック発現ベクター
pCold II (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System III (製品コード 3369)

1. SPP System 用コールドショック発現ベクター
pCold III (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

SPP System IV (製品コード 3370)

1. SPP System 用コールドショック発現ベクター
pCold IV (SP-4) DNA 20 μg (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
2. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF DNA 0.5 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
3. Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA 0.2 μg (20 $\text{ng}/\mu\text{l}$)

<形状>

10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA 溶液

<利用できる大腸菌株>

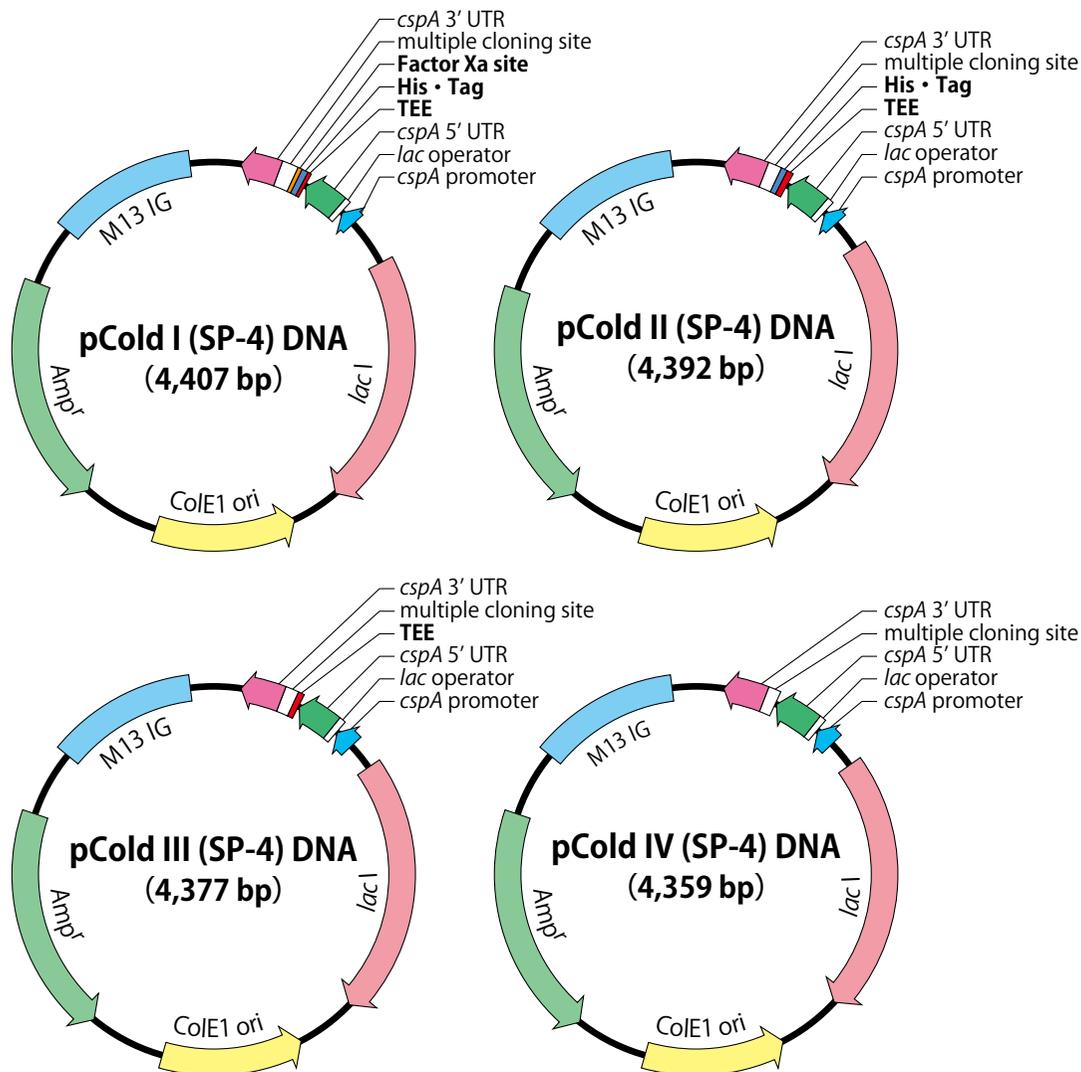
SPP System 用コールドショック発現ベクターは、大腸菌に由来する *cspA* プロモーターを利用しているため、ほとんど全ての大腸菌株を発現用宿主として利用できます。ただし、共発現を行う pMazF DNA に選択マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子を使用しているため、クロラムフェニコール耐性を示す大腸菌 (Rosetta など) を宿主とすることはできません。

III. 保存

- 20°C

※適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

IV. プラスミドの概略図



ベクター	TEE 配列*	His タグ配列	Factor Xa 切断配列
pCold I (SP-4) DNA	○	○	○
pCold II (SP-4) DNA	○	○	—
pCold III (SP-4) DNA	○	—	—
pCold IV (SP-4) DNA	—	—	—

* : TEE : Translation enhancing element の略称で、翻訳を促進する作用を有します。

図 2. SPP System 用コールドショック発現ベクター概略図

GenBank Accession No.

- ・ pCold I (SP-4) AB248600
- ・ pCold II (SP-4) AB248601
- ・ pCold III (SP-4) AB248602
- ・ pCold IV (SP-4) AB248603

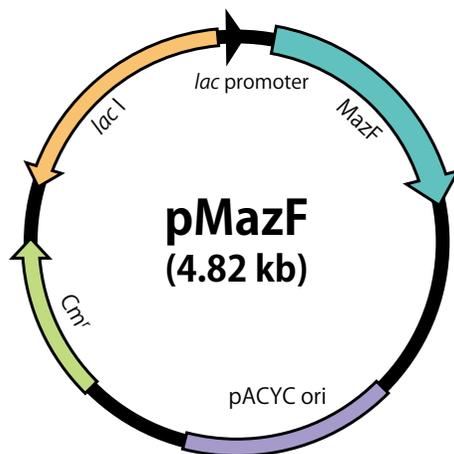


図3. MazF (mRNA Interferase) 発現プラスミド pMazF の概略図

V. 純度

pCold (SP-4) シリーズに関して、

1. dideoxy 法によるシーケンスの結果、クローニングサイトが保持されていることを確認している。
2. 制限酵素 *Nde* I、*Sac* I、*Kpn* I、*Xho* I、*Bam*HI、*Eco*RI、*Hind* III、*Sal* I、*Pst* I、*Xba* I にて1カ所切断できることを確認している。

VI. 使用方法

1. ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドの構築

- 1) アミノ酸配列が変わらないように目的タンパク質の遺伝子配列内の ACA 配列を他の配列に置換した DNA を合成する。
- 2) SPP System 用コールドショック発現ベクター (pCold I ~ IV (SP-4) DNA) に翻訳フレームが合うように挿入し、ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドを構築する。

2. SPP System の構築

1 で得られた ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドと MazF 発現プラスミド (pMazF DNA) で*1、発現宿主となる大腸菌 (BL21 株など) を形質転換する。アンピシリン (100 $\mu\text{g/ml}$) とクロラムフェニコール (34 $\mu\text{g/ml}$) を含む選択培地プレートで共発現形質転換体を選択する。

* 1 : それぞれ約 50 ng のプラスミドを用いれば、充分数の形質転換体を得ることができます。

通常、ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドと MazF 発現プラスミドを同時に形質転換する 1 段階法で行いますが、ACA 非含有目的タンパク質発現用プラスミドを用いてあらかじめ作製した形質転換体を MazF 発現プラスミドで形質転換する 2 段階法も可能です。*2,3

* 2 : この場合、プラスミドの量を 10 ng 程度まで減らすことが可能です。

* 3 : MazF 発現プラスミドを用いて得た形質転換体を、目的タンパク質発現用プラスミドで形質転換する場合は、目的タンパク質の発現が低下する可能性があります。

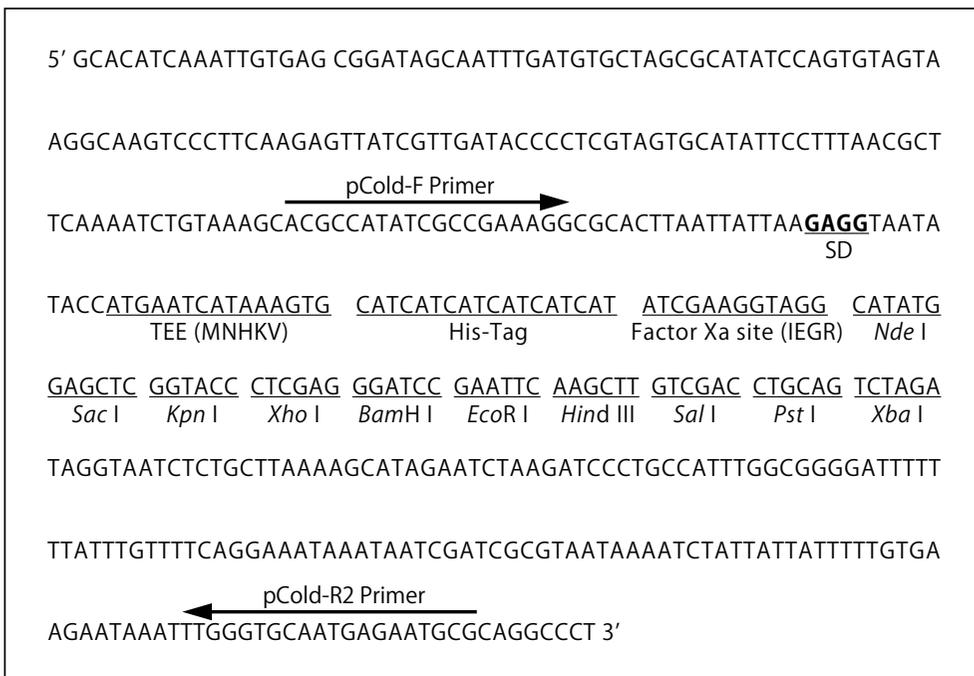
3. 目的タンパク質のパルスラベル

- 1) 2 で得られた共発現形質転換体を、アンピシリン (100 $\mu\text{g/ml}$) とクロラムフェニコール (34 $\mu\text{g/ml}$) を含む M9 グルコース培地*などの最少培地に接種し、37°C で振とう培養する。
- 2) 培養液の OD₆₀₀ が 0.5 付近になった時点で 15°C に冷却し、そのまま 45 分間静置する。
- 3) 最終濃度が 1mM になるように IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) を添加する。
- 4) 15°C で 24 時間振とう培養する。
- 5) ³⁵S-メチオニンを添加し、15°C で 15 分間放置してパルスラベルを行う。
- 6) 培養菌体を集め、SDS-PAGE を行った後、オートラジオグラフィにより標識されたタンパク質を確認する。

* : LB 培地にはわずかに発現誘導物質が含まれているため、低レベルながら MazF の発現が誘導されます。これを制御するため、M9 グルコース培地など最少培地を使用してください。

VII. マルチクローニングサイト周辺図

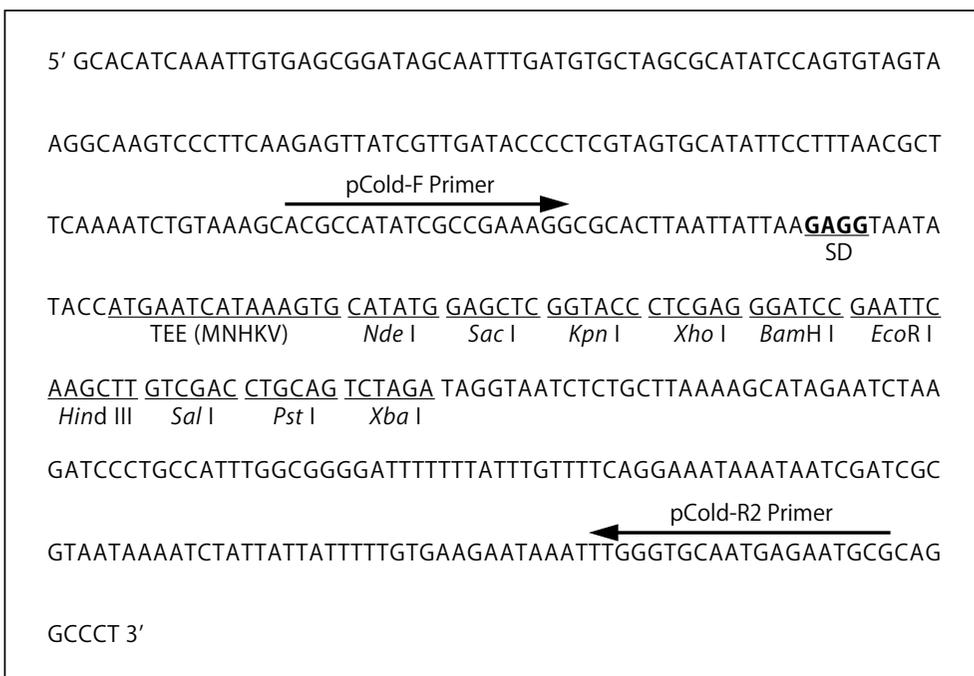
pCold I (SP-4) DNA



pCold II (SP-4) DNA



pCold III (SP-4) DNA



pCold IV (SP-4) DNA



VIII. 実験例

Positive Control pCold I (SP-4) envZB DNA を用い、MazF 共役発現系 (MazF +) と非共役発現系 (MazF -) で発現を試みた例を以下に示す。宿主には大腸菌 BL21 株を使用した。

[M9 グルコース培地を用いた発現およびパルスラベル実験]

プロトコールに従って培養・発現誘導を行い、一定量の培養液を泳動サンプルとした。envZB の発現量は MazF + と MazF - で同等であった。一方、envZB 以外の標識タンパク質は、MazF - に比べ、MazF + で大きく減少し、MazF の発現で宿主由来のタンパク質の発現が抑えられることが確認された。

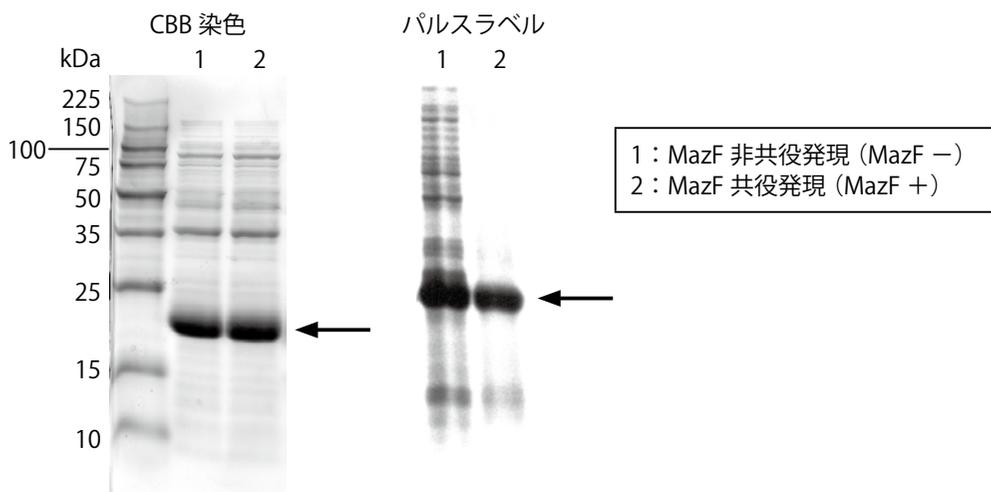


図 4. envZB タンパク質の発現 (菌体可溶性画分の CBB 染色およびパルスラベル)

<参考> LB 培地を用いた発現実験

最少培地のかわりにアンピシリンとクロラムフェニコールを含む LB 培地を用いて培養・発現誘導を行い、OD₆₀₀ = 0.1 量を泳動サンプルとした。

MazF を共役発現させた系では、目的タンパク質以外の新規タンパク質の発現が抑制される。そのため大腸菌自体にも生育ストレスがかかる可能性があり、非共役発現を行った場合より目的タンパク質の発現量が減少する場合もある。

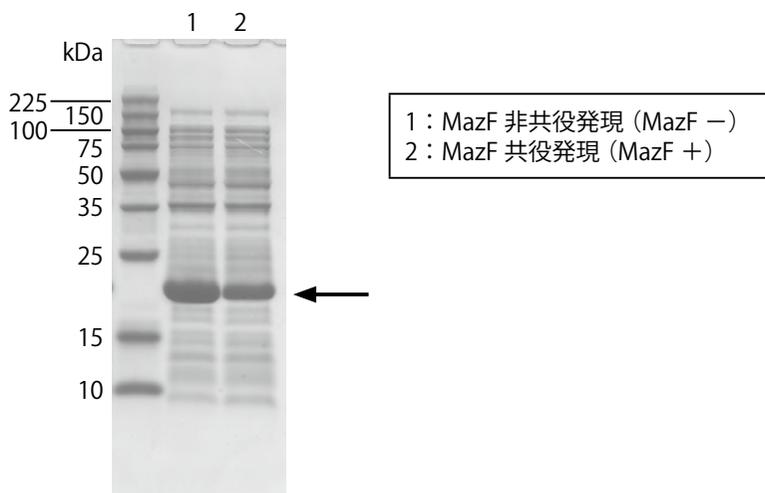


図 5. envZB タンパク質の発現 (菌体可溶性画分の CBB 染色)

IX. 参考文献

- 1) Suzuki M, *et al.* Single protein production (SPP) system in *Escherichia coli*. *Nature Protocols*. (2007) **2**: 1802-1810.
- 2) Suzuki M, *et al.* Bacterial Bioreactors for High Yield Production of Recombinant Protein. *J Biol Chem*. (2006) **281**: 37559-37565.
- 3) Suzuki M, *et al.* Single Protein Production in Living Cells Facilitated by an mRNA Interferase. *Molecular Cell*. (2005) **18**: 253-261.
- 4) Zhang Y, *et al.* Insights into the mRNA cleavage mechanism by MazF, an mRNA interferase. *J Biol Chem*. (2005) **280**: 3143-3150.
- 5) Zhang Y, *et al.* MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*. (2003) **12**: 913-923.
- 6) Qing G, *et al.* Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. (2004) **22**: 877-882.
- 7) D M Glover, B D Hames 共編 加藤郁之進 監訳 「DNA クローニング 1」－基本技術－第一章 大腸菌形質転換技術 (1997) p1-35.

X. 関連製品

mRNA Interferase™-MazF (製品コード 2415A)
pCold™ベクターシリーズ (製品コード 3360/3361/3362/3363/3364/3365/3371/3372)
TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)
IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) (製品コード 9030)

XI. 注意

1. 本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。本製品または、本製品を利用して製造したものを商業目的で使用するには、別途、商業利用契約の締結が必要となります。
 2. 本製品、その構成部分またはその誘導体、ならびにこれらで製造されたものを第三者に譲渡（無料配付、販売）することはできません。
(本製品のご購入の際に、ライセンス同意書を弊社へご提出いただいております。)
- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
 - ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
 - ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
 - ・ SPP System、pCold、Interferase はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社