

MazF(mRNA Interferase)を利用した目的タンパク質のみの誘導発現システム。同位体標識に最適!!

Single Protein Production System(SPP System™)

SPP System™ Set	製品コード 3366	1 Set	¥120,000
SPP System™ I	製品コード 3367	1 Set	¥60,000
SPP System™ II	製品コード 3368	1 Set	¥60,000
SPP System™ III	製品コード 3369	1 Set	¥60,000
SPP System™ IV	製品コード 3370	1 Set	¥60,000

一本鎖 RNA を ACA 配列特異的に切断する MazF を共発現し、宿主由来のタンパク質発現をシャットアウトします。

効率よく可溶化発現を実現するコールドショック発現ベクター系です。

目的タンパク質のみを高効率に発現誘導できるため、目的タンパク質の特異的な安定同位体標識が可能です。

米国 New Jersey 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。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。タカラバイオでは、このシステムを利用したタンパク質発現キット(SPP System™)を新たに製品化しました。

SPP System™ の概要

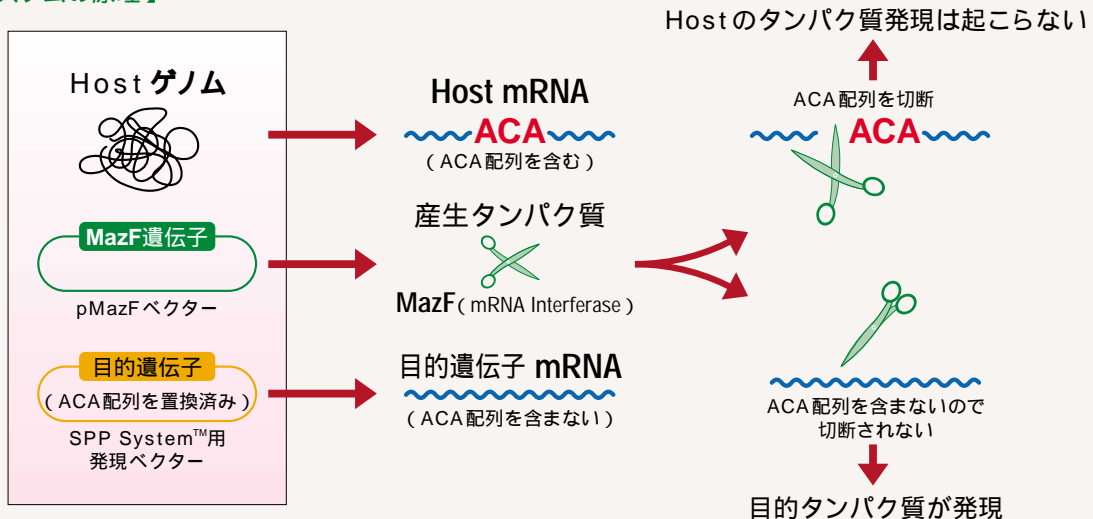
SPP System™ では、アミノ酸配列を保持したまま、発現させたい遺伝子内の ACA 配列を異なる配列に置換し、MazF

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。本製品では、既存の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、本製品では目的以外のタンパク質の発現をさらに抑制でき、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ので、NMR(核磁気共鳴)などによるタンパク質構造解析への応用が期待できます。

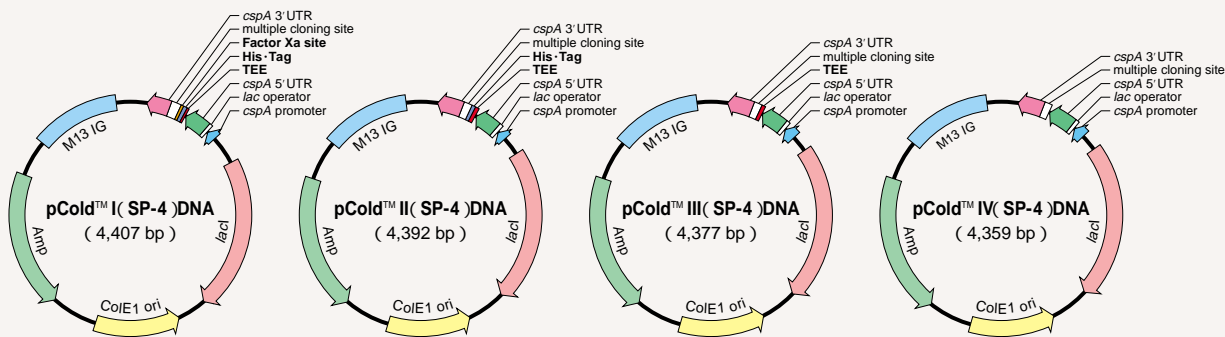
本製品には、転写領域内の ACA 配列を他の配列に置換した SPP System™ 用コールドショック発現ベクター、pCold™(SP-4)DNA と、適度な発現量を実現する MazF 発現プラスミドが含まれています。

なお、目的タンパク質遺伝子中の ACA 配列の他の配列への置換および pCold™(SP-4)ベクターへのクローン化を、「SPP System™ ベクター構築受託サービス」として承ります。

【SPPシステムの原理】



【SPP System™用コールドショック発現ベクターの概略】



製品の内容(SPP System™ Set の場合)

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

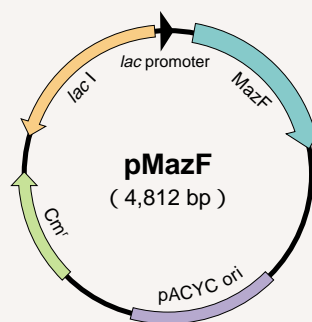
MazF 発現プラスミド

- pMazF DNA

Positive Control

- pCold™ I (SP-4) envZB DNA : SPP System™用大腸菌由来 envZB 発現プラスミド(発現タンパク質推定分子量 19.6 kDa)

【MazF 発現プラスミド pMazF の概略】



実験例 1 : Positive Control envZB DNA の発現およびパルスラベル実験

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示します。

宿主に大腸菌 BL21 株を使用し、プロトコールに従って M9 グルコース培地を用いた培養、発現誘導、パルスラベルを行いました。一定量の培養液をサンプルとして、SDS-PAGE に供しました。envZB の発現量は MazF + と MazF - で同等で

目的タンパク質の SPP System™ による発現方法

ACA 配列をアミノ酸配列が変わらないように他の配列に置換した目的タンパク質の遺伝子を SPP System™ 用コールドショック発現ベクターに挿入して発現用プラスミドを作製

発現用プラスミドと MazF 発現プラスミドで宿主大腸菌 (BL21 など) を形質転換 (アンピシリンとクロラムフェニコールで選択)

アンピシリンとクロラムフェニコールを含む培地(パルスラベルを行う場合は M9 グルコース培地などの最少培地)に形質転換体を植菌し、37 °C で振とう培養

OD₆₀₀ = 0.5 付近で培養液を 15 °C に冷却し 45 分間静置

培養液に IPTG を加え、15 °C でさらに 24 時間振とう培養 (パルスラベルを行う場合はサンプリング時に放射性同位体標識アミノ酸を加え、さらに 15 °C で 15 分間静置)

集菌、菌体破碎

SDS-PAGE などによる目的タンパク質の解析

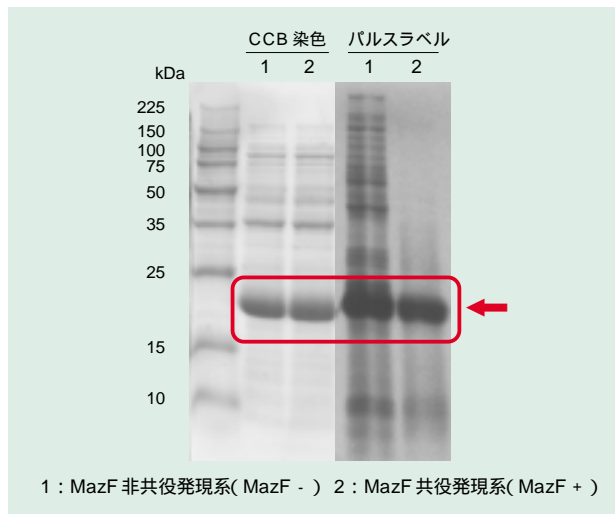


図1 envZB タンパク質の発現(菌体可溶性画分の CCB 染色およびパルスラベル)

した(図1 矢印)。一方、envZB 以外の標識タンパク質の発現量は、MazF - に比べ、MazF + で大きく減少し(図1 パルスラベル) MazF タンパク質の発現によって宿主由来のタンパク質の新規発現が抑制されていることがわかります。

実験例 2 : チオレドキシンの発現およびパルスラベル実験

SPP System™ 用コールドショック発現ベクター pCold™ I (SP-4) ~ pCold™ IV (SP-4) DNA を用い、MazF 共役発現系 (MazF +) と非共役発現系 (MazF -) でチオレドキシンの発現を試みた例を示します。

宿主に大腸菌 BL21 株を使用し、プロトコルに従って、M9 グルコース培地を用いた培養、発現誘導、パルスラベルを行いました。一定量の培養液をサンプルとして、SDS-PAGE に供しました。どの SPP System™ 用コールドショック発現ベクターを用いた場合でも、チオレドキシンの発現量は MazF + と MazF - で同等でした(図2 矢印)。一方、チオレドキシンの発現以外の標識タンパク質の発現量は、MazF - に比べ、MazF + で大きく減少しました。

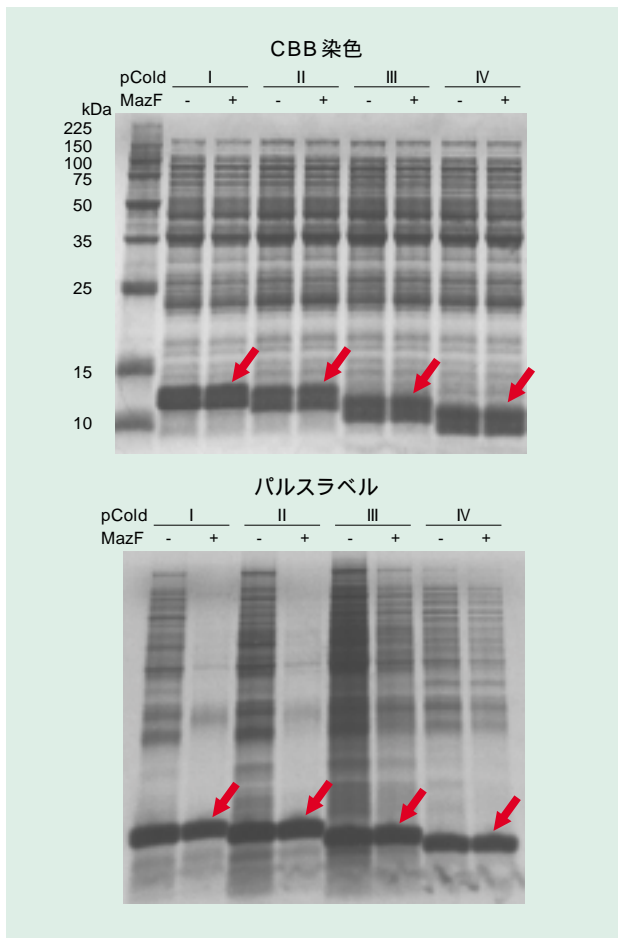


図2 チオレドキシンの発現

実験例 3 : エオタキシンの誘導発現の経時変化

MazF 共役発現系 (MazF +) と非共役発現系 (MazF -) でエオタキシンの発現の経時変化をパルスラベル実験で追った例を示します。

SPP System™ 用コールドショック発現ベクターは pCold™ I (SP-4) DNA を、宿主は大腸菌 BL21 株を使用し、プロトコルに従って、M9 グルコース培地を用いた培養、発現誘導を行い、発現誘導後の各時間でサンプリングした菌体をそれぞれパルスラベルしました。一定量の培養液をサンプルとして、SDS-PAGE に供しました。エオタキシン以外の標識タンパク質は、MazF - に比べて MazF + で大きく減少しました。エオタキシンの発現量が保たれたまま、それ以外の標識タンパク質の発現量が減少した状態が、発現誘導後 72 時間まで持続しました(図3 矢印)。

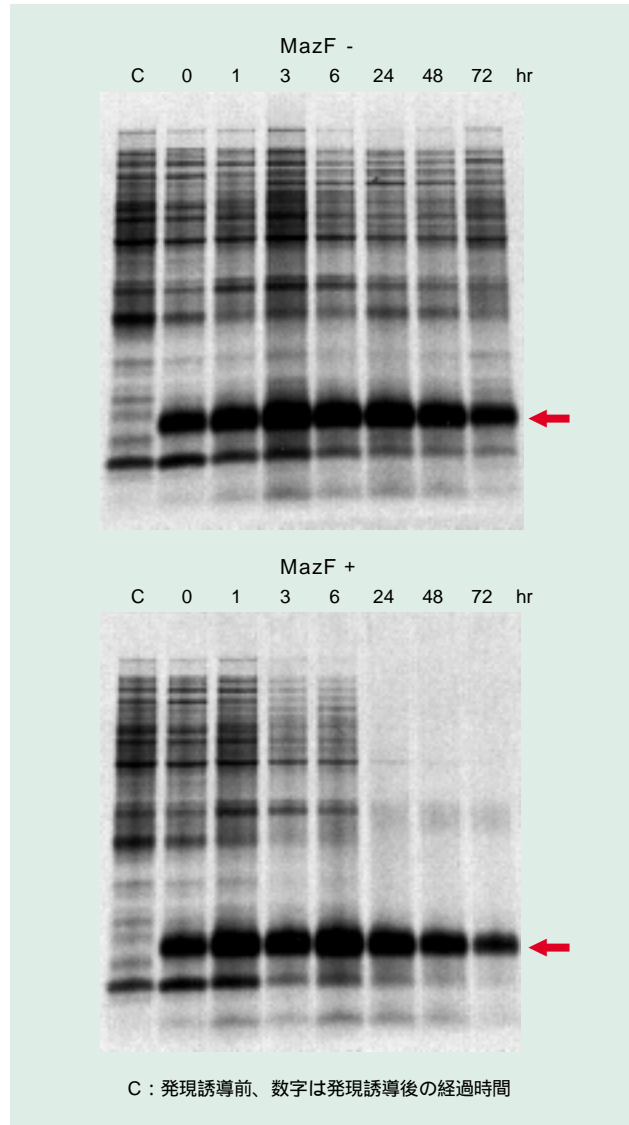


図3 エオタキシンの発現(パルスラベル)

【参考文献】

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

関連製品

- ・ pCold™ ベクターシリーズ **製品コード** 3360 ~ 3364
 - ・ TaKaRa Competent Cell BL21 **製品コード** 9126
 - ・ IPTG **製品コード** 9030
- [His タグ精製キット]
- ・ TALON Purification Kit **製品コード** 635515 (Clontech Laboratories 社の製品です)

SPP System™ベクター構築受託サービスについて

SPP System™では、発現させたい遺伝子内のACA配列を除去(置換)することが必要です。タカラバイオでは、お客様からの遺伝子配列情報をもとに、ACA配列を置換した目的遺伝子の作製およびpCold™(SP-4)ベクターへのクローニングの受託サービスを承っています。遺伝子をご提供いただく必要はありません。塩基配列情報のみをご用意いただければ、弊社で塩基配列を設計してベクター構築を行い、プラスミドDNAを納品いたします。

【価格・納期】

サービス項目	価格	標準納期
SPP System™ベクター構築(~ 1 kbp)	¥300,000(1プラスミドあたり)	4 週間
SPP System™ベクター構築(1 ~ 2 kbp)	¥500,000(1プラスミドあたり)	4 週間 ~
SPP System™ベクター構築(2 kbp ~)	別途ご相談	

詳細につきましては、お気軽にお問い合わせください。

【お問い合わせ先】

タカラバイオ(株)ドラゴンジェノミクスセンター TEL : 0593-29-8560 FAX : 0593-29-8556

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は43ページをご覧ください。[6](#)[9](#)
 なお、SPP System™シリーズのご購入に際してはライセンス同意書が必要です(詳細はタカラバイオホームページをご覧ください)