



無細胞くんによるタンパク質の発現例

SARS-CoV-2 ウイルスタンパク質

SARS-CoV-2 ウイルスの 3 種のタンパク質(S1_RBD, 3CL_Pro, M)について無細胞くんを用いたタンパク質合成とその合成条件の最適化検討例を紹介します。無細胞くんによる無細胞タンパク質合成と、PCR を用いたタンパク質発現用鑄型作成方法を組み合わせることで、遺伝子組み換え生物を作成することなく SARS-CoV-2 ウイルスタンパク質の合成実験が可能です。

注意:SARS-CoV-2 関連遺伝子およびタンパク質を取り扱われる際は、必ずご所属先の安全管理基準等に準じてください。

1. 方法

合成対象のタンパク質は公共データベース UniProt(<https://www.uniprot.org>)に公開された配列より選択しました(表 1)。それぞれタンパク質の対象領域のアミノ酸配列を逆翻訳した後、PCR 用のリンカー配列(NL1, CL1)¹⁾を付加した配列を設計し、人工遺伝子合成を行いました。逆翻訳と DNA 合成はユーロフィンジェノミクス株式会社の人工遺伝子合成遺伝子サービス(<https://www.eurofinsgenomics.jp/jp/home/>) を利用し、納品形態は直鎖状 DNA として作成しました。次いで、直鎖状 DNA 断片に、T7P fragment (T7 promotor と N 末端の高発現用タグ配列を含む)、T7T fragment (終止コドン、T7 terminator を含む)を PCR により付加しました。得られた産物を再度 PCR により増量し、タンパク質合成用の鑄型 DNA を作成しました(図 1)。未精製の PCR 産物を鑄型としてタンパク質合成キット無細胞くんを用い、各種条件にてタンパク質合成反応を実施しました。合成反応液の全画分、および遠心上清画分を SDS-PAGE にて分析しました(図 2)。

表 1. 合成対象タンパク質

| No. | 名称 | UniProt ID (start a.a. – end a.a.) | 備考 |
|-----|---------|------------------------------------|-----------------------|
| 1 | S1_RBD | PODTC2 (319-541) | 細胞外、Disulfide bond あり |
| 2 | 3CL_Pro | PODTD1 (3264-3569) | 細胞内、Protease |
| 3 | M | PODTC5 (1-222) | 膜タンパク質 |

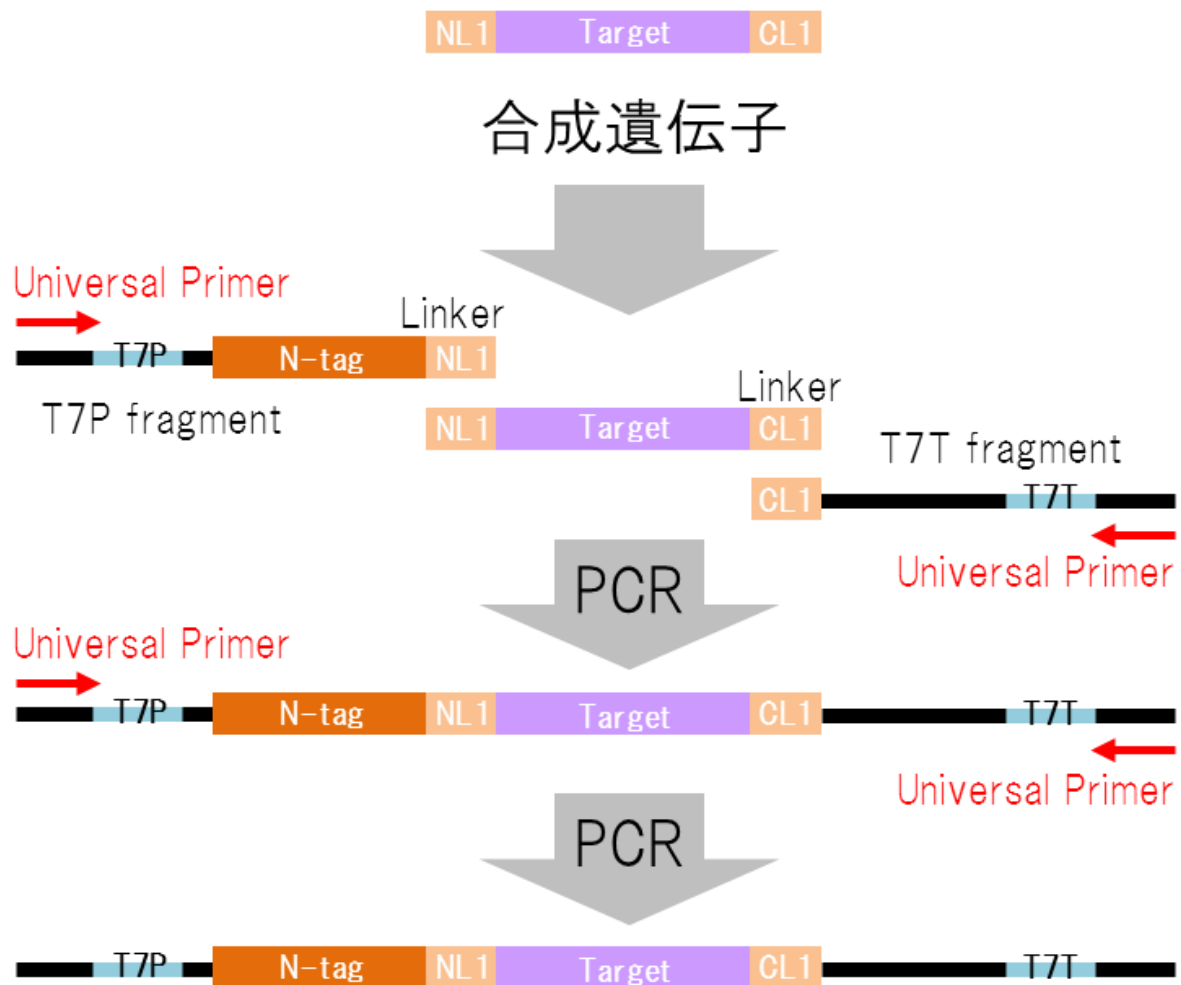


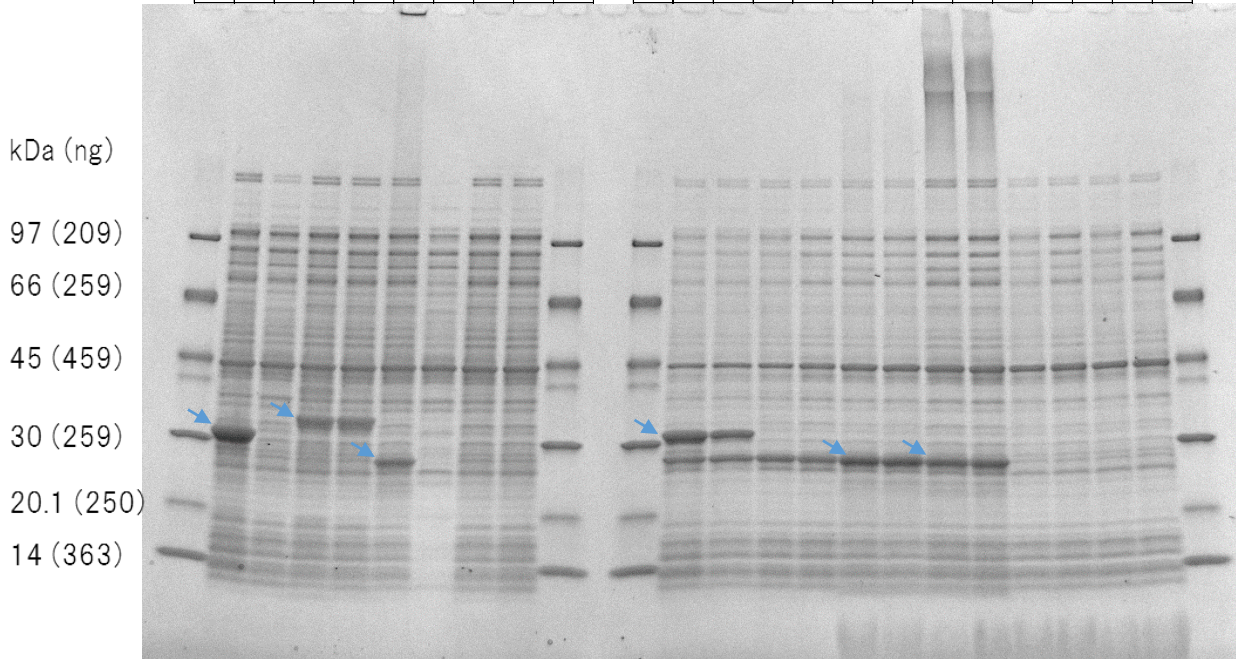
図 1. タンパク質発現用鋳型 DNA の作成

2. 結果

まず、各タンパク質の合成可否の確認のため、無細胞くん SI を用いた合成を実施しました。その結果、すべてのタンパク質について CBB 染色で十分検出可能なバンドとして合成されることが確認できました(Lane 1-3)。S1_RBD と M については本合成条件では不溶性を示しました。

次に、タンパク質の可溶性を向上させるため、各タンパク質の性質に適する合成条件を検討しました。S1_RBD は分子内に Disulfide bond を含むことから、無細胞くん SI SS(PEG 不含)の酸化的条件下、25°C で合成したところ可溶体の増加を確認できました(Lane 5)。膜タンパク質である M に対しては、無細胞くん SI(PEG 不含)に膜タンパク質合成用添加剤 SetA-M1 および M2 を添加して合成したところ、いずれの条件においてもタンパク質を可溶体として合成することができました(Lane 7, 8)。添加剤 M2 を使用した場合には高分子量の会合体と思われる産物が多く観測されました(Lane 8)。

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--------|---------|------|---|-----------|---|--------|--------|------|------|--------|--------|----|---|
| Lane | M | 1 | 2 | 3 | 4 | M | M | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | M |
| Kit | SI | | | | SI SS-PEG | | | | | | SI-PEG | | | |
| Temp. | 30 °C | | | | 25 °C | | | | | | 30 °C | | | |
| Additive | - | | | | C5 | | M1 | M2 | M1 | M2 | | | | |
| Sample | S1_RBD | 3CL_Pro | M | | No DNA | | S1_RBD | No DNA | M | M | No DNA | No DNA | | |
| MW [kDa] | 30.9 | 39.6 | 31.0 | | - | | 30.9 | - | 31.0 | 31.0 | - | - | | |
| Fraction | T | S | T | S | T | S | T | S | T | S | T | S | T | S |



| | |
|------------|---|
| Template | 2.5 μ L PCR product (unpurified) in 50 μ L scale reaction mixture |
| Incubation | 30 or 25 °C, 15 h |
| Additive | C5, SI SS(PEG 不含)キット酸化還元添加剤 C5; M1 および M2, 膜タンパク質合成用添加剤 SetA-M1 および M2 |
| Fraction | T, 全画分; S, 遠心上清画分 |
| Load | 0.5 μ L 無細胞タンパク質合成反応液相当量 / lane |
| Marker | GE LMW calibration kit (GE healthcare, 17-0446-01) |
| Gel | 4-20% TGX (BioRad, 5671095) |
| Staining | Bullet CBB (nacalai, 13542-81) |

図 2. タンパク質合成反応液の SDS-PAGE

3. 本合成事例で使用した製品

| 製品番号 | 製品名 |
|-----------------------|----------------------|
| A29-0059 | 無細胞くん SI |
| A241-0307 | 無細胞くん SI SS (PEG 不含) |
| A173-0230 | 無細胞くん SI (PEG 不含) |
| A226-0290 New! | 膜タンパク質合成用添加剤 SetA |

4. おわりに

無細胞くんと PCR によるタンパク質発現用直鎖状 DNA 鋳型作成法を組み合わせることで、遺伝子組み換え生物を一切用いることなく SARS-CoV-2 ウイルスタンパク質 3 種を発現することができました。それぞれのタンパク質の性質に応じた合成条件最適化検討により、3 種の性質の異なるタンパク質 (Disulfide bond を持つ細胞外タンパク質 S1_RBD、細胞質内タンパク質 3CL_Pro、膜タンパク質 M) のいずれも可溶体として合成することができました。

本合成事例の場合、合成遺伝子を手入れ後、2 日間で目的タンパク質を得ることができました。無細胞くんは、遺伝子組み換え操作を必要とせず、迅速にウイルス関連タンパク質を含む様々なタンパク質を簡単に合成できるツールです。タンパク質を合成される際のファーストチョイスとして、ぜひご検討ください。

5. 参考文献

Yabuki, T., Motoda, Y., Hanada, K., Nunokawa, E., Saito, M., Inoue, M., Kigawa, T., Yokoyama, S. *J Struct. Funct. Genomics*. **2007**, 8(4), 173-191

お問い合わせ

大陽日酸株式会社 メディカル事業本部 SI 事業部
〒142-8558 東京都品川区小山 1-3-26 東洋 bldg.

TEL: 03-5788-8550 FAX: 03-6866-0564
E-mail: isotope.TNS@tn-sanso.co.jp
HP: <https://stableisotope.tn-sanso.co.jp>