

タンパク質は必ず 発現させることができる!

タンパク質研究の最前線から
経験と技術の蓄積を伝授



The new force in Life Science tools

quest Map vol.01

※ 本冊子は2011年1月に発行した「Quest Map vol.01」をリブランディングしたものです。
内容は2011年1月当時のものとなります。

The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

タンパク質は、必ず発現させることができる！

多くの研究者が痛感している事実として、タンパク質によってはなかなか発現できないものがあり、本当に苦労させられる。が、その気になれば、たいいていのタンパク質は発現させることができる。しかし、いざ発現しても沈殿となったり不活性型しかとれなかったりすることもあり、タンパク質発現そのものを断念したくなることもしばしばあるかと思われる。本書ではこれまでの経験から、タンパク質発現のコツと様々な対処法をまとめて紹介する。これらの情報を元に果敢にタンパク質発現に取り組む勇気と、“必ずタンパク質は発現できる！”という実感を多くの研究者の方に体感していただきたい。

タンパク質発現用遺伝子のクローニング

クローニングには様々な方法が利用されている (Sambrook et al., 2001) が、大腸菌などを利用して目的とするタンパク質を発現・精製させる際には、① ゲノム DNA や mRNA の塩基配列情報と、② ゲノム DNA または mRNA を利用¹して、Polymerase Chain Reaction (PCR) で遺伝子を増幅することが多い。このとき注意したいのは、ゲノム解析から予想されたタンパク質の N 末端は、実際とは異なっている場合が多いことである。これまで多くの生物のゲノム解析が行われ、その情報がデータベース化されてきているが、スタートコドンが不明なため、「暫定的に」開始点を決めた情報が多々存在する。そのため、N 末端はクローニングをする前に、本来のタンパク質が受けている翻訳後修飾を含めて、質量分析によって確認しておく必要がある (後述)。

増幅させた遺伝子は、大腸菌のベクター DNA (例えば、pT7 Blue などのクローニング用ベクター) へクローニングし、その塩基配列を確認する。なお、PCR を利用してクローニングする際には、3-5 個の異なるクローンの塩基配列を確認するとよい。それらの結果を比較することによって、PCR で遺伝子を増幅した際の誤り (PCR エラー) や、ゲノム情報の誤りもチェックできる。

¹ PCR で遺伝子を増幅する場合、ゲノムの DNA がイントロンを含まない場合はゲノム DNA を、ゲノムの遺伝子がイントロンを含む場合は mRNA を利用する。

pT7Blue-3 Perfectly Blunt Cloning Kit (カタログ番号 70182)

大腸菌を利用したタンパク質発現プラスミドの作製

タンパク質の構造・機能解析を行う際にまず必要とされるのは、目的タンパク質を量産化することである。大腸菌や、酵母、バキュロウイルス / 昆虫細胞、小麦胚、ヒト培養細胞などを利用した発現系、それらの無細胞翻訳系を用いた発現系など多数の製品が市販されているが、中でも大腸菌によるタンパク質発現は、安価に大量の目的タンパク質を得ることができるので、非常に多くの研究者の間で利用されている。

大腸菌を用いた発現系でよく利用される系の一つとして、pET システム (www.merck4bio.jp/pETvector-table) がある。pET システムでは、元来大腸菌の持っていないバクテリオファージ T7 転写・翻訳シグナルの制御下に目的遺伝子がクローニングされるので、タンパク質発現がコントロールできる (Moffatt 1986, Rosenberg 1987, Studier 1990)。pET システムは用途に応じた様々な発現プラスミドが提供されており、複数の発現条件を検討することが可能である (図 1、図 2、表 1)。

図のように、発現プラスミドに遺伝子をクローニングするために、多くの制限酵素切断を持つマルチクローニング部位が用意されている (図 2)。N 末端が触媒基として利用されているタンパク質もあるので、可能な限り、切断後に余分のアミノ酸が付加しないサイト (NdeI や NcoI などの制限酵素部位) に遺伝子を導入するとよい。さらに、翻訳を確実に終結させるために、3' 末端の終止コドンは、TAA を 2 回繰り返すようにプラスミドを設計する。

pET システムの発現系では、大腸菌ゲノム上の T7 RNA ポリメラーゼと発現プラスミド上の目的遺伝子の発現が、lac オペレーターによって制御されている (図 3)。量産化を行うには、まず目的タンパク質の遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、それを用いて宿主大腸菌 (λ DE3 溶原菌) の形質転換を行う。得られた株を液体栄養培地で培養し、対数増殖期にラクトース誘導体である isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加することで、目的タンパク質の大量発現を誘導することができる。

BL21(DE3) Competent Cells (カタログ番号 69450)
100mM IPTG Solution (カタログ番号 70527)

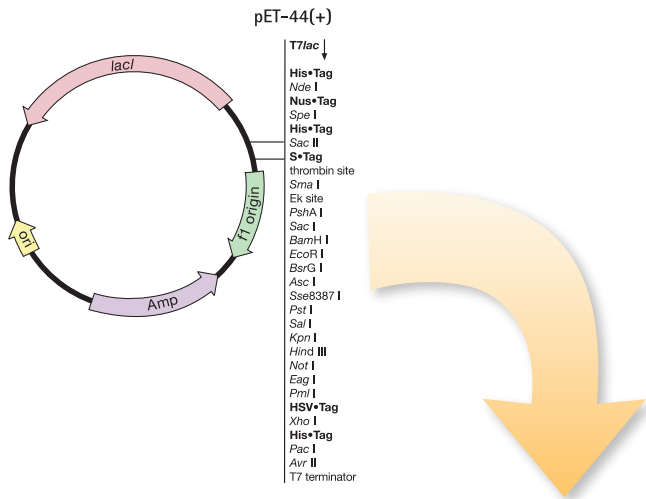


図 1: pET ベクターの環状図 (pET44 (+))

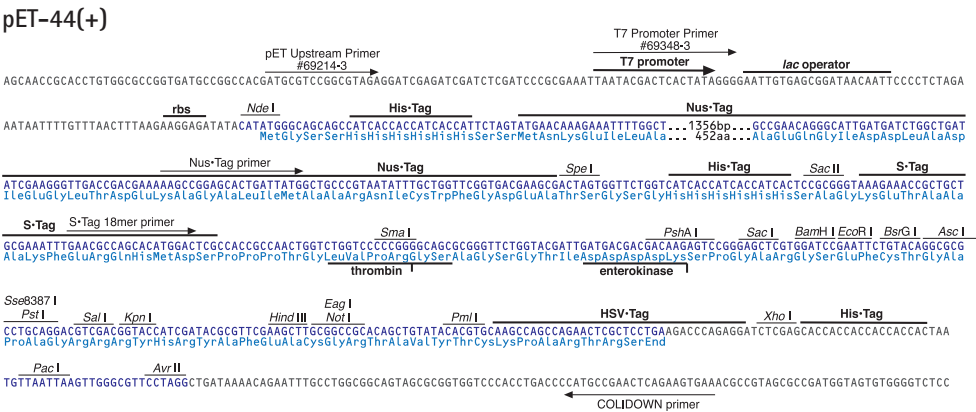


図 2: pET-44 (+) のマルチクローニング部位の塩基配列

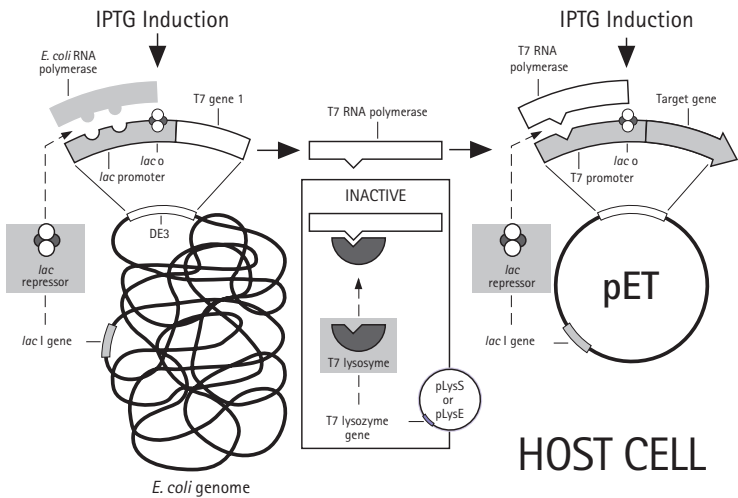


図 3: pET システムの発現系では、大腸菌ゲノム上の T7 RNA ポリメラーゼと発現プラスミド上の目的遺伝子の発現が、lac オペレーターによって制御されている。

タンパク質は、必ず発現させることができる!

表 1 : pET Vector の一覧表

ベクター名	注文番号	Selection		Promoter		Fusion Tags									protease	signal seq.
		Amp ^R	Kan ^R	T7	T7 ^{lac}	His•Tag®	T7•Tag®	S•Tag™	Trx•Tag™	HSV•Tag®	Dsb•Tag™	GST•Tag™	Nus•Tag™	Strep•Tag®II		
pET-3b* ¹	69419-3	●		●			N									
pET-9b* ¹	69432-3		●	●			N									
pET-11b* ¹	69437-3	●			●		N									
pET-17b	69663-3	●		●			N									

N末端に非切除型のT7•Tagを融合した目的タンパク質を発現するようにデザインされています。単一のBamH1クローニングサイトを3つの読み枠で提供します。pET17bベクターは単一の読み枠のマルチクローニングサイトを持っています。

pET-14b	69660-3	●		●		N										T	
pET-15b	69661-3	●			●	N										T	
pET-16b	69662-3	●			●	N										X	
pET-19b	69677-3	●			●	N										E	

N末端にHis•Tagとプロテアーゼ認識部位を含む目的タンパク質を発現するようにデザインされています。

pET-20b(+)	69739-3	●		●		C											●
pET-22b(+)	69744-3	●			●	C											●
pET-25b(+)	69753-3	●			●	C				C							●
pET-26b(+)	69862-3		●		●	C											●
pET-27b(+)	69863-3		●		●	C				C							●

目的タンパクにペリプラズムへの輸送を促進するシグナル配列を融合するようにデザインされています。通常配列は輸送に伴って、シグナルペプチダーゼにより切断されます。

pET-21b* ¹ (+)	69741-3	●			●	C	N										
pET-23b* ¹ (+)	69746-3	●		●		C	N										
pET-24b* ¹ (+)	69750-3		●		●	C	N										

N末端に非切除型のT7•Tagを融合した目的タンパク質を発現するようにデザインされており、C末端にHis•Tagを付加する事も可能です。

pET-28b* ¹ (+)	69865-3		●		●	N,C	I									T	
pET-29b* ¹ (+)	69872-3		●		●	C		N								T	
pET-30b* ¹ (+)	69910-3		●		●	N,C		I								T, E	
pET-30 Ek/LIC	69077-3		●		●	N,C		I								T, E	
pET-30 Xa/LIC	70073-3		●		●	N,C		I								T, X	

N末端に切除可能なHis•Tag/T7•Tag(pET-28)、His•Tag/S•Tag(pET-30)、またはS•Tagのみ(pET-29)を融合した目的タンパク質を発現するように設計されており、C末端にHis•Tagを付加することも可能です。

pET-32b* ¹ (+)	69016-3	●			●	I,C		I	N							T, E	
pET-32 Ek/LIC	69076-3	●			●	I,C		I	N							T, E	
pET-32 Xa/LIC	70072-3	●			●	I,C		I	N							T, X	

Trx•Tag(チオレドキシントタンパク質)を融合させ、高レベルの発現を行なえるように設計されています。通常は大腸菌内で封入体として発現される多くのタンパク質も、Trx•Tagと融合させると、可溶性が高まります。

pET-39b(+)	70090-3		●		●	I,C		I			N					T, E	●
pET-40b(+)	70791-3		●		●	I,C		I			N					T, E	●

DsbA•Tag[pET-39b(+)]またはDsbC•Tag[pET-40b(+)]を融合させ、高レベルな発現を行なえるようにデザインされています。DsbAとDsbCはそれぞれ、ジスルフィド結合の形成とかけ替えを触媒するペリプラズム酵素です。

pET-41b* ¹ (+)	70557-3		●		●	I,C		I				N				T, E	
pET-41 Ek/LIC	71071-3		●		●	I,C		I				N				T, E	
pET-42b* ¹ (+)	70562-3		●		●	I,C		I				N				T, X	

融合タグとしてGST•Tag(グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)が組込まれています。このGST•Tagは、その融合タンパク質の合成を強化し、また場合によっては、可溶性も高めることが報告されています。

pET-43.1b* ¹ (+)	70940-3	●			●	I,C		I		C			N			T, E	
pET-43.1 Ek/LIC	71072-3	●			●	I,C		I		C			N			T, E	
pET-44b* ¹ (+)	71123-3	●			●	N,I,C		I		C			I			T, E	
pET-44 Ek/LIC	71144-3	●			●	N,I,C		I		C			I			T, E	

Nus•Tag(NusAタンパク質)と融合させ、高レベルな発現を行なえるようにデザインされています。NusAタンパク質は、大腸菌データベース中の4,000以上のタンパク質を可溶性モデリングした結果、最も優れた可溶性ポテンシャルを有するとして同定された配列です。



表 1 : pET Vector の一覧表

ベクター名	注文番号	Selection		Promoter		Fusion Tags									protease	signal seq.
		Amp ^R	Kan ^R	T7	T7 _{lac}	His•Tag®	T7•Tag®	S•Tag™	Trx•Tag™	HSV•Tag®	Dsb•Tag™	GST•Tag™	Nus•Tag™	Strep•Tag®II		
pET-45b(+)	71327-3	●			●	N		C							E	
pET-46 Ek/LIC	71335-3	●			●	N		C							E	
pET-47b(+)	71461-3		●		●	N		C							H, T	
pET-48b(+)	71462-3		●		●	I		C	N						H, T	
pET-49b(+)	71463-3		●		●	I		C				N			H, T	
pET-50b(+)	71464-3		●		●	N,I		C					I		H, T	

N末端あるいはC末端に切除可能なタグを融合したタンパク質を発現するようにデザインされています。これらはすべてHis•TagとHRV 3Cプロテアーゼで切り離されるサイトをマルチクロニングサイトの直前にコードしており、C末端にはS•Tag™とトロンピンサイトを持っています。

pET-51b(+)	71553-3	●			●	C								N	E	
pET-51 Ek/LIC	71570-3	●			●	C								N	E	
pET-52b(+)	71554-3	●			●	C								N	H, T	
pET-52 3C/LIC	71571-3	●			●	C								N	H, T	

ビオチン/ストレプトアビジン結合の特異性を利用した製品です。小さなStrep•Tag II配列はビオチンに匹敵する結合特異性を備えた8アミノ酸の融合タグで、Strep•Tactinタンパク質(Strep•Tag II 結合部位をもつストレプトアビジン誘導体)に結合します。Strep•Tag IIのStrep•Tactinタンパク質に対する結合は、ストレプトアビジンよりも100倍近く高められています。溶出は穏やかな生理学的条件の下で行えます。

pETcoco-1	71129-3	*2			●	N				C					E	
pETcoco-2	71148-3	●			●	N				C					E	

pETcoco Systemは、T7プロモーター制御タンパク質発現の利点とプラスミドコピー数の制御能を併せもっています。0.2%グルコースの存在下で、pETcoco組換えプラスミドは1細胞あたり1コピーに保たれます。このシングルコピー状態では、バックグラウンド発現および遺伝子の組換えや欠失はほぼ皆無であるため、pETcocoクローンは極めて安定です。プラスミド作製には、培養培地へのL-アラビノース添加によって、目的遺伝子発現に依存せずにコピー数を細胞あたり約40コピーに増幅することができます。目的遺伝子の発現は、IPTG添加によって誘導されます。

Gateway Nova pET-53-DEST	71856-3	●*3			●	N								C		
Gateway Nova pET-54-DEST	71857-3	●*3			●	N		C								
Gateway Nova pET-55-DEST	71858-3	●*3			●	C										
Gateway Nova pET-56-DEST	71859-3	●*3			●	C		N								
Gateway Nova pET-57-DEST	71860-3	●*3			●	N							N	C	T	
Gateway Nova pET-58-DEST	71861-3	●*3			●	N		C					N		T	
Gateway Nova pET-59-DEST	71862-3	●*3			●	N			N					C	T	
Gateway Nova pET-60-DEST	71863-3	●*3			●	C					N					
Gateway Nova pET-61-DEST	71864-3	●*3			●	N								N		
Gateway Nova pET-62-DEST	71865-3	●*3			●	C								C		

Invitrogenからライセンスを取得して、NovagenブランドのpET発現・精製のノウハウと、迅速で高効率のGatewayクローニングと融合させたデスティネーションベクター(pD-EST)です。pET-DESTベクターはColE1/pBR複製起点をもち、アンピシリン耐性遺伝子をコードしています。

Gateway Nova pCOLA-2-DEST	71867-3		●*3		●	N								C		
Gateway Nova pCOLA-3-DEST	71866-3		●*3		●	C								N		

Invitrogenからライセンスを取得して、NovagenブランドのpET発現・精製のノウハウと、迅速で高効率のGatewayクローニングと融合させたデスティネーションベクター(pD-EST)です。pCOLA-DESTベクターはColA複製起点をもち、カナマイシン耐性遺伝子をコードしています。

略号

C: optional C-terminal tag

E: enterokinase

H: HRV 3C

I: internal tag

LIC: ligation-independent cloning

N: N-terminal tag

signal seq: signal sequence for potential periplasmic localization

T: thrombin

X: Factor Xa

*1: insertの読み枠にあわせて別配列をご用意しております。

*2: pETcoco-1はchloramphenicol耐性です。

*3: pEXPRとして組み込まれるとchloramphenicol耐性となります。

抗生物質の使用濃度は、50μg/ml カルベニシリン (あるいはアンピシリン)、または30μg/ml カナマイシンを推奨します。

この表に掲載されているpETベクターのRepliconはすべてColE1(pBR322)です。

タンパク質は、必ず発現させることができる!

誘導時期

タンパク質によっては、IPTG による誘導を行わなくても十分に発現するものもあるが、原則として IPTG やラクトースで誘導を行ってタンパク質を発現させる。(原理は図 4 参照)

誘導可能な菌数は発現させるタンパク質によって異なる。さらに、発現タンパク質によっては、誘導と共に菌数の増加が停止する場合がある。そこで、培地体積あたりの発現タンパク質量を増やすために、① 最適な誘導時期と、② 集菌する時間とをまず決める。具体的には、菌数が $1 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $2 \times 10^8/\text{ml}$ 、 $4 \times 10^8/\text{ml}$ になった時点で² IPTG による誘導を行い、それぞれの培養液から、1, 2, 4, 8, 16, 24 時間後に一部を抜き取る。抜き取った大腸菌は、集菌後、溶菌し、遠心上澄と沈殿とに分けた後、SDS ゲル電気泳動にかけて目的タンパク質の発現量を比較する。その結果をもとにして、IPTG による誘導時期とその後の培養時間を決める。

通常の培養条件では、IPTG を添加しなくても目的タンパク質がある程度発現してしまう。目的とする発現タンパク質が細胞にとって有毒なタンパク質（例、プロテアーゼ）な場合には、宿主菌の増殖が阻害されるので、培地にグルコースを添加し（0.1%）、非誘導時の発現を抑制することもある。大腸菌によりラクトースが代謝されて生成されるアロラクトースが IPTG と同様のタンパク質発現誘導物質となるが、グルコースを添加すると先にグルコースが代謝されるのでラクトースが分解されることがなく、したがって非誘導時のタンパク質発現が抑えられる。Novagen では、この非誘導時のタンパク質発現をより強力に抑えることができる pLysS³ を導入した宿主を用意している。この pLysS は天然の T7 RNA ポリメラーゼ阻害剤である T7 リゾチーム（Zhang et al 1997, Huang et al. 1999）を微量産生するプラスミドである。T7 リゾチームは大腸菌細胞壁のペプチドグリカンの特定結合を切断する作用（Inouye et al., 1973）も持ち合わせているが、溶菌前では T7 リゾチームが内膜を通過できないため、大腸菌を破壊することはない。

² 大腸菌の菌体数は、吸光度で測定するよりも、一部を抜き取って、直接、光学顕微鏡（位相差顕微鏡）で測定する方がよい。

³ pLysS や pLysE を使用すると、集菌後に大腸菌が溶菌していることがあるので、集菌前に培養液を 4℃ によく冷やしてから、集菌することが望ましい。

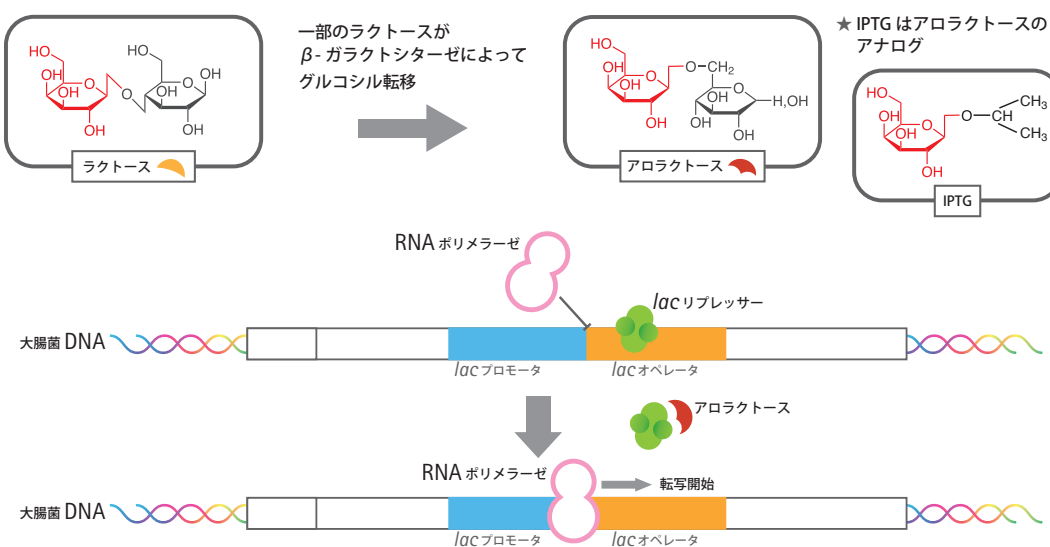


図 4: オーバーナイトエクスプレスの原理

オーバーナイトエクスプレスシステムは、糖のバランスによって IPTG を添加しなくても大腸菌の増殖にしたがって自動的にタンパク質の発現誘導がかかるシステム。このシステム培地にはグルコースとラクトースが含まれており、大腸菌はグルコースを炭素源として初期増殖する。グルコースが枯渇すると C 源がラクトースに切り替わり、そのラクトースがアロラクトースに変換され、lac リプレッサーと結合。その結果、リプレッサーが lac オペレーターより外れて RNA ポリメラーゼがプロモーターに結合し、転写が開始されてタンパク質発現がはじまる。ベクターは lac オペレーターによって制御される宿主株を用いる。

タンパク質が量産化できない場合の対策

通常のプロトコルで十分な発現が認められないタンパク質の場合は、以下のような対処を試みる。

- (1) mRNA の確認
- (2) Open Reading Frame (ORF) の途中で終止コドンがないことの再確認
- (3) ベクターの複製開始点を確認
- (4) 宿主菌の変更
- (5) 培地の成分・製造会社の選択
- (6) タグ付加タンパク質の発現
- (7) N 末端領域のコドンの改変
- (8) 大腸菌培養液の体積が増えるとともに、タンパク質の発現量が減少する場合

(1) mRNA の確認

RNA ポリメラーゼが誘導されず、mRNA ができていない、RNase があって分解されている、全長の mRNA ができていない、などの理由により mRNA がいないためにタンパク質が発現していないことがある。また、大腸菌の場合、mRNA 量とタンパク質発現量はある程度相関があるので、mRNA の量を確認することも有用である。確実に mRNA ができていることを、Northern blotting や RT-PCR などで行う。

(2) Open Reading Frame (ORF) の途中で終止コドンがないことの再確認

大腸菌にとって有害なタンパク質を発現させた場合などには、プラスミド上に突然変異が生じやすい。再度、塩基配列を確認する。また、変異により読み枠がずれてしまっている可能性もある。

(3) ベクターの複製開始点を確認

複数のプラスミドをトランスフェクトして、同時にいくつかのタンパク質を発現させる場合（共発現）、同じ複製起点 (replicon) をもつプラスミドを導入しようとする競合してしまい（不和合性）、1 つのプラスミドだけが維持され、2 つ以上が共存することができない。共発現させる場合には複製起点の異なるベクターを用いる必要がある（表 2）。

表 2 : Plasmid replicon in Novagen *E. coli* expression systems

Plasmid(s)	Replicon (source)	Copy Number
pET (all) pETDuet™-1	ColE1 (pBR322)	~40*
pET*-DEST™	ColE1 (pBR322)	~40
pACYCDuet™-1 pLysS pLysE pLacI pRARE	P15A (pACYC184)	10-12
pRSF (all)	RSF1030	> 100
pCDF (all)	CloDF13	20-40
pETBlue™ (all) pTriEx™ (all)	ColE1 (pUC)	> 500
pETcoco™ (all)	Mini-F/RK2 (2) (pBeloBAC11, RK2)	1, amplifiable to ~40
pCOLA-DEST™	ColA	~20-40
pCOLADuet™-1	ColA	~20-40

* Copy number estimates are based on agarose gel analysis

タンパク質は、必ず発現させることができる!

(4) 宿主菌の変更 (図 5、表 3 参照)

まず、BL21 (DE3) を用いた発現を試みるが、大腸菌株を変えてみると、飛躍的に発現量が増える場合がある。タンパク質発現を IPTG 濃度により厳密にコントロールできる Tuner (DE3) 株や Rosetta2 (DE3)、Rosetta-gami (DE3) などの使用頻度の少ないレアコドンを補充する大腸菌株に変えると効果が得られる可能性がある。同じ名称の菌株でも、研究室などによって発現量が全く異なることもあったが、これは大腸菌のいずれかの遺伝子に変異が入っていたのが原因であろう。最新の次世代 DNA シーケンサーを利用すれば、タンパク質の発現量に影響する遺伝子が同定できるかも知れない。

(5) 培地の成分・製造会社の選択

大腸菌の培地成分である酵母エキスやポリペプトンは多くの製造会社から販売されているが、製品によって発現量に差が出るケースが確認されている。特に酵母エキスは、オートクレーブで滅菌中に加水分解されて、培地の pH が低下する場合があるので、購入口ツが異なるごとに滅菌後の培地の pH を一度は測定しておく必要がある。pH を一定にしたい場合には、培養直前に、あらかじめ滅菌しておいたリン酸緩衝液、Mg²⁺、Ca²⁺などを添加して培地を調製する。

- BL21 (DE3) Competent Cells (カタログ番号 69450)
- Tuner (DE3) Competent Cells (カタログ番号 70623)
- Rosetta2 (DE3) Competent Cells (カタログ番号 71397)
- Rosetta-gamiB (DE3) Competent Cells (カタログ番号 71136)
- Rosetta-gami2 (DE3) Competent Cells (カタログ番号 71351)

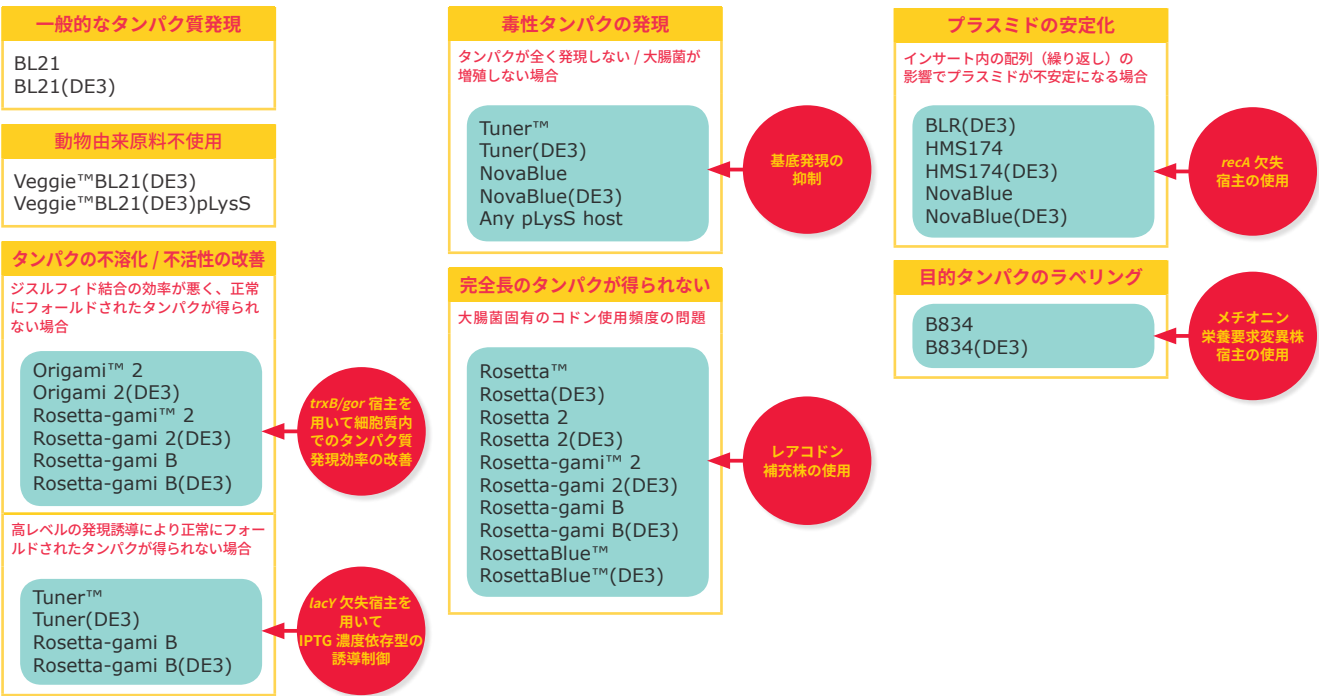


図 5：発現用宿主大腸菌

表 3: 大腸菌株の一覧表

Strain	Strain background	Expression plasmid: pET 1	Expression plasmid: pCDF 1	Expression plasmid: pRSF 1 & pCOLADuet™1	Expression plasmid: pACYCDuet™ 1	Expression plasmid: pETBlue™ 1 & pTriEx™ 1	Expression plasmid: non-T7 3	recA - 4	endA - 5	Blue/white screening 6	lac ^q 7	F' episome 8	ompT - 9	lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13	Rare codon tRNAs 14	pLysS 15	pLac 16	met - 17	dcm - 18	Available as Singles™	Available as HT96™	Chloramphenicol resistance	Kanamycin resistance	Tetracycline resistance	Rifampicin resistance	Overnight Express™ 19	Chemically Competent
B834(DE3)	B	●	●	●	●																									
B834(DE3)pLysS	B	●	●	●									●	●					●	●	●	●			●				●	●
BL21 ¹	B						●							●	●							●							●	●
BL21(DE3)	B	●	●	●	●									●	●							●	●	●					●	●
BL21(DE3)pLysS	B	●	●	●										●	●				●	●	●	●							●	●
BLR ¹	B						●	●						●	●							●					●		●	●
BLR(DE3)	B	●	●	●	●			●						●	●					●	●	●							●	●
BLR(DE3)pLysS	B	●	●	●				●						●	●					●	●	●			●				●	●
HMS174 ¹	K-12						●	●												●								●	●	●
HMS174(DE3)	K-12	●	●	●	●			●																				●	●	●
HMS174(DE3)pLysS	K-12	●	●	●				●											●						●			●	●	●
NovaBlue ¹	K-12						●	●	●	●	●	●										●	●			●			●	●
NovaBlue(DE3)	K-12	●	●	●	●			●	●		●	●			lon - 10	trxB - 11							●						●	●
Origami 2 ¹	K-12						●					●	●		lon - 10	trxB - 11	gor - 12										●		●	●
Origami 2(DE3)	K-12	●	●	●	●						●	●			lon - 10	trxB - 11							●						●	●
Origami 2(DE3)pLysS	K-12	●	●	●															●										●	●
Origami 2(DE3)pLacI	K-12					●					●	●			lon - 10	trxB - 11				●							●		●	●
Origami B ¹	B						●							lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●				●	●		●	●
Origami B(DE3)	B	● ²	●		●									lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●				●	●		●	●
Origami B(DE3)pLysS	B	● ²	●											lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●				●	●		●	●
Origami B(DE3)pLacI	B				●									lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●				●	●		●	●
Rosetta ¹	B						●							lon - 10	trxB - 11				●				●			●			●	●
Rosetta(DE3)	B	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●				●						●	●
Rosetta(DE3)pLysS	B	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta(DE3)pLacI	B					●								lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta™ 2 ¹	B						●							lon - 10	trxB - 11														●	●
Rosetta 2(DE3)	B	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta 2(DE3)pLysS	B	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta 2(DE3)pLacI	B					●								lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
RosettaBlue™ 1	K-12						●	●	●	●	●	●							●						●		●		●	●
RosettaBlue(DE3)	K-12	●	●	●				●	●		●	●							●	●	●	●			●				●	●
RosettaBlue(DE3)pLysS	K-12	●	●	●				●	●		●	●							●	●	●	●			●				●	●
RosettaBlue(DE3)pLacI	K-12					●		●	●		●	●							●	●	●	●			●				●	●
Rosetta-gami 2 ¹	K-12						●							lon - 10	trxB - 11				●								●		●	●
Rosetta-gami 2(DE3)	K-12	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●							●	●
Rosetta-gami 2(DE3)pLysS	K-12	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta-gami 2(DE3)pLacI	K-12					●								lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Rosetta-gami B ¹	B						●							lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●			●	●	●		●	●
Rosetta-gami B(DE3)	B	● ²	●											lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●			●	●	●		●	●
Rosetta-gami B(DE3)pLysS	B	● ²	●											lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●			●	●	●		●	●
Rosetta-gami B(DE3)pLacI	B					●								lon - 10	trxB - 11	gor - 12	lacY - 13					●			●	●	●		●	●
Tuner™ 1	B						●							lon - 10	trxB - 11				●										●	●
Tuner(DE3)	B	●	●	●	●									lon - 10	trxB - 11				●										●	●
Tuner(DE3)pLysS	B	●	●	●										lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●
Tuner(DE3)pLacI	B					●								lon - 10	trxB - 11				●	●	●	●			●				●	●

1. これらのプラスミドはT7プロモーターによってタンパク質発現がコントロールされているのでT7RNAポリメラーゼを持つホスト株が必要です。また、DE3溶原菌を持たないホスト株にバクテリオファージCE6を感染させることでT7ポリメラーゼ遺伝子を導入するキットも用意されており、それを利用したタンパク質発現が可能です。

2. アンピシリン耐性を持つプラスミドと一緒に使えます。しかし、カナマイシン耐性を持つプラスミドとの併用は不可です。

3. E.coliプロモーター (tac, trc, trc/tlo, T5 など) を持つベクターや、CE6を感染させてT7プロモーターを持たせたベクターでの発現に適します。ホスト株と同じ抗生物質に対する耐性を持つベクターは使用不可です。

4. 相同組み換えが起こりません。タンデムリピード配列を持つプラスミドの安定化やプラスミドの多量体形成の防止に有用です。

5. エンドヌクレアーゼを欠損しています。調製プラスミドの質が向上します。

6. lacZΔM15遺伝子のコードするフラグメントがベクターにコードされるフラグメントを補充して、-ガラクトシダーゼ活性を生じます。

7. LacIq遺伝子がLacリプレッサーの過剰発現を促します。これにより、lacオペレーター配列を持つプロモーターを抑制し、基底発現を抑えます。

8. single strandのプラスミドDNAの作成にはF'エキゾームをもつホストで増殖させる必要があります。

9. 目的たんぱく質の精製中に組み替えタンパク質を切断するompT膜プロテアーゼを欠損しています。

10. 細胞質由来のLonプロテアーゼを欠損しています。

11. Thioredoxin reductaseを欠損しているので、細胞質内でのジスルフィド結合を促します。

12. Glutathione reductaseを欠損しているので、trxB mutationが発生すると細胞質内でのジスルフィド結合を強く促します。

13. Lac permeaseを欠損しているので、IPTGによる発現誘導を濃度依存的にコントロールできます。

14. コドンバイアスの解消のために、レアコドンtRNAを補充しています。

15. T7 lysozymeを提供することで目的たんぱく質の基底発現を抑制します。これにより、毒性のあるたんぱく質の発現に適します。pLysEを持つホスト株はさらに強い抑制が可能です。

16. Lacリプレッサーを過剰発現します。これにより、lacオペレーターのコントロール下にある目的遺伝子の基底転写を抑制します。pETBlueやpTriExとの併用に適します。

17. メチオニン要求株はメチオニンをラベリングする目的に適しています。

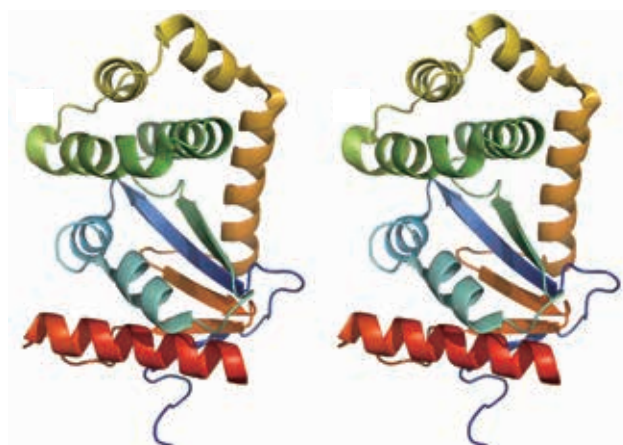
18. CCAGGおよびCCTGG配列のシントシジン残基 (C5位) がメチル化されません。

19. Overnight Express™ Auto-induction Systems使用可能。細胞温度のチェックやIPTGの添加を行わずに簡単に発現誘導を行うことができます。

- これらのプラスミドはT7プロモーターによってタンパク質発現がコントロールされているのでT7RNAポリメラーゼを持つ宿主株が必要です。また、DE3溶原菌を持たない宿主株にバクテリオファージCE6を感染させることでT7ポリメラーゼ遺伝子を導入するキットも用意されており、それを利用したタンパク質発現が可能です。
- アンピシリン耐性を持つプラスミドと一緒に使えます。しかし、カナマイシン耐性を持つプラスミドとの併用は不可です。
- E.coli*プロモーター (*tac*, *trc*, *trc/tla*, *T5*など)を持つベクターや、CE6を感染させてT7プロモーターを持たせたベクターでの発現に適します。宿主株と同じ抗生物質に対する耐性を持つベクターは使用不可です。
- 相同組み換えが起こりません。タンデムリピート配列を持つプラスミドの安定化やプラスミドの多量体形成の防止に有用です。
- エンドヌクレアーゼを欠損しています。調製プラスミドの質が向上します。
- lacZΔM15*遺伝子のコードするフラグメントがベクターにコードされるフラグメントを補充して、-ガラクトシダーゼ活性を生じます。
- LacIq*遺伝子が*LacI*プレッサーの過剰発現を促します。これにより、*lacO*オペレーター配列を持つプロモーターを抑制し、基底発現を抑えます。
- single strandのプラスミドDNAの作成にはF'エピソードをもつ宿主で増殖させる必要があります。
- 目的のたんぱく質の精製中に組み替えタンパク質を切断する*ompT*膜プロテアーゼを欠損しています。
- 細胞質由来の*Lon*プロテアーゼを欠損しています。
- Thioredoxin reductaseを欠損しているため、細胞質内でのジスルフィド結合を促します。
- Glutathione reductaseを欠損しているため、*trxB* mutationが発生すると細胞質内でのジスルフィド結合を強く促します。
- Lac* permeaseを欠損しているため、IPTGによる発現誘導を濃度依存的にコントロールできます。
- コドンバイアスの解消のために、レアコドンtRNAを補充しています。
- T7 lysozymeを提供することで目的のたんぱく質の基底発現を抑制します。これにより、毒性のあるたんぱく質の発現に適します。*pLysE*を持つ宿主株はさらに強い抑制が可能です。
- LacI*プレッサーを過剰発現します。これにより、*lacO*オペレーターのコントロール下にある目的遺伝子の基底転写を抑制します。*pETBlue*や*pTriEx*との併用に適します。
- メチオニン要求株はメチオニンをラベリングする目的に適しています。
- CCAGGおよびCCTGG配列のシトシン残基 (C5位) がメチル化されません。
- Overnight Express™ Auto-induction Systems使用可能。細胞濃度のチェックやIPTGの添加を行わずに簡単に発現誘導を行うことができます。

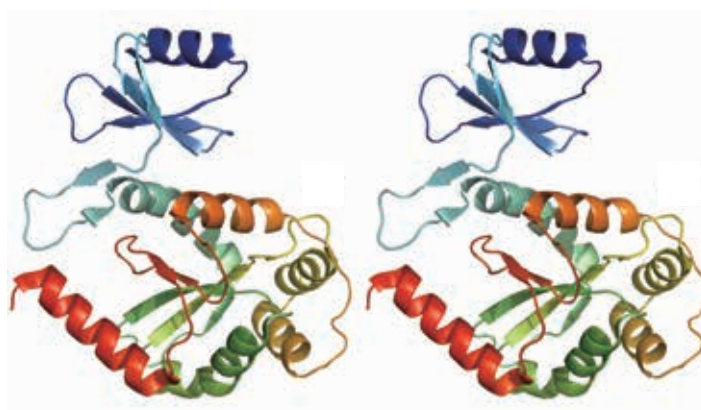
(6) タグ付加タンパク質の発現

タンパク質に付加する tag には、① 目的とするタンパク質の発現や精製、② 相互作用解析の際の基盤への結合、③ 発現タンパク質を可溶化させる、と大きく分けて3つの目的がある。それぞれの目的に応じて、タンパク質との融合発現、その他の用途によって、使い分けるとよいが、それとは別に N 末端に His-tag など付加すると発現が改善することがあるという利点もある。また、tag 付きタンパク質は、精製時にアフィニティークロマトグラフィーが使用できる。ただし、N 末端の tag はプロテアーゼを用いなければ除去できず、また除去を行った場合でも、いくつかのアミノ酸残基が末端に付加されている。特に N 末端が複合体形成や活性に関わっているタンパク質の場合は、このような付加末端が機能解析の妨げになるケースがあるので注意する必要がある。また、タンパク質によっては、tag が付加したことで溶解度が低下し、不溶画分に移行する割合が多くなる。tag を除去するプロテアーゼとして、よく使われるものの認識部位と切断部位を一覧にした (表 4)。エンテロキナーゼや FactorXa は、tag 切断後に発現タンパク質に余分なアミノ酸配列が残らず、タンパク質に対する影響が少ないため第一選択肢としてあげられる。これらのほか、アミノ酸配列 Glu-x-x-Tyr-x-Gln- (Seror Gly) を認識して Gln の C 端側を切断する、特異性の高い TEV プロテアーゼの利用が推奨される。



GST tag (219 aa)

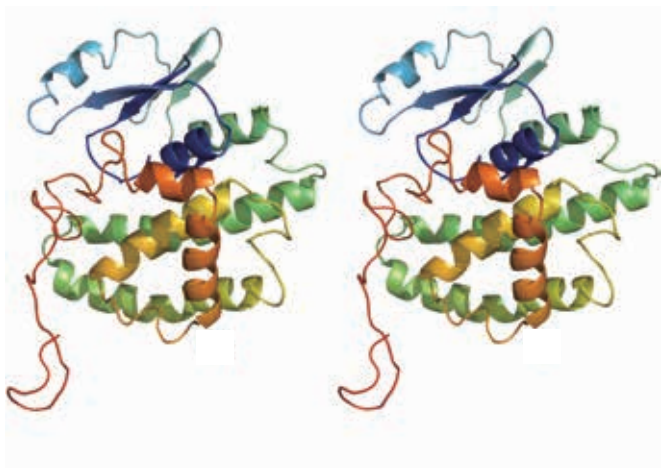
SPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADK
HNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRITAYSKDFETLKVDFLSKLPMLKMFEDRLCHKTYLNGDHSVTHPDFML
YDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSD



DsbA tag (209 aa)

MKKIWLALAGLVAFSASAAQYEDGKQYTTLEKPVAGAPQVLEFFSFPCPHCYQFEVLHISDNVKKKLPEGVKMTK
YHVNFMGGDLGKDLTQAWAVAMALGVEDKVTVPPLFEGVQKTQTIASASDIRDVFINAGIKGEEDAAWNSFVVKSLV
AQQEKAADVQLRGVPAMFVNGKYQLNPQGMDSNMDVVFVQYADTVKYLSEKKG

この立体図は平行法で描かれている。このような立体構造図は PDB より簡単に閲覧することができる。



DsbC tag (236 aa)
MKKGFMLFTLLAAFSGFAQADDAAIQQTLLAKMGIKSSDIQPAPVAGMKTVLTNISGLVYITDDGKHIIQGPYDVS
GTAPVNVNTKMLLKQLNALEKEMIVYKAPQEKHVITVFTDITCGYCHKLHEQMADYNALGITVRYLAFPRQGLDSDAEK
EMKAIWCAKDKNAFDDVMAGKSVAPASCDVDIADHYALGVQLGVSGTPAVVLSNGTLVPGYQPPKEMKEFLDEHQK
MTSGK

His Tag CAC CAC CAT CAC CAT CAC CAT CAC
 His His His His His His His His

S Tag AAA GAA ACC GCT GCT GCG AAA TTT GAA CGC CAG CAC ATG GAC TCG
 Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser

Strep Tag II TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

図 6：tag 部分のアミノ酸配列や構造

表 4：よく使われるタグ切断酵素の認識部位と切断部位

切断酵素	認識/切断部位
Thrombin, Restriction Grade	LeuValProArg↓GlySer
Biotinylated Thrombin	LeuValProArg↓GlySer
Recombinant Enterokinase	AspAspAspAspLys↓
Factor Xa	IleGluGlyArg↓
HRV 3C protease	LeuGluValLeuPheGln↓GlyPro

Thrombin, Restriction Grade
(カタログ番号 69671-3)

Biotinylated Thrombin
(カタログ番号 69672-3)

Thrombin Cleavage Capture kit
(カタログ番号 69672-3)

Recombinant Enterokinase
(カタログ番号 69066-3)

Enterokinase Cleavage Capture kit
(カタログ番号 69067-3)

Factor Xa, Restriction Grade, Bovine Plasma
(カタログ番号 69036-3)

Factor Xa, Cleavage Capture kit
(カタログ番号 69037-3)

Enterokinase HRV 3C protease
(カタログ番号 71493-3)

pLysS DNA
(カタログ番号 69659)

pLysE DNA
(カタログ番号 69658)

(7) N 末端領域のコドンの改変

目的タンパク質の GC 含有率が高いと発現量が下がることがある。その場合には、5' 末端領域 (20 ～ 30 塩基) を、同じアミノ酸をコードする代替コドンに替えて GC% を下げることで発現量が大きく改善されることがある。

(8) 大腸菌培養液の体積が増えるとともに、タンパク質の発現量が減少する場合

培地が 5 ml 程度の小体積の場合は、タンパク質の発現量が多いにもかかわらず、1 リットル、10 リットルと培地の体積を増加させるにしたがって、目的とするタンパク質の発現量比が減少することがある。そのような場合には、T7 ファージのリゾチームを低レベルで発現する pLysS や、より高レベルで発現する pLysE を共存させると、タンパク質の発現量が増えることが多い。この T7 ファージのリゾチームは T7 RNA ポリメラーゼを阻害するので、IPTG による誘導前までは、目的の遺伝子の発現を抑えて、発現タンパク質による大腸菌の生育阻害を防止することができる。

タンパク質が沈殿として発現する場合の対策

タンパク質が沈殿として発現した場合は、以下のような方法で対処を試みる。

(1) 立体構造情報の利用 — タンパク質の立体構造予測の利用 —

多くの研究者の国際的協力により、現時点で、75% 以上の成功率でタンパク質の立体構造が予測できる時代になった (Levitt, 2009)。そのおかげで、アミノ酸配列の相同性が 30% 以上あるタンパク質の立体構造が PDB (RCSB Protein Data Bank; <http://www.rcsb.org/>) に登録されていれば、それをもとにして精度の高いモデルを作成することが可能である。たとえ、そのような立体構造情報が存在しなくても、いくつかの予測法 (Kaufmann *et al.*, 2010; Raman *et al.*, 2009) を利用して立体構造を推定し、表面上に多くの疎水性アミノ酸残基が露出すると予測された場合には、それら分子表面の疎水性残基を水溶性残基に置換することによって、水溶性のタンパク質に変換することができる場合もある。

なお、予測された立体構造は、下記のような方法で確認することが可能である。

- ① 生物種間で保存された活性部位のアミノ酸残基は、タンパク質の狭い場所に集まっている。
- ② ①の保存性が高く、重要と考えられるアミノ酸残基を置換すると、活性に大きな影響が出る⁴。
- ③ 真空紫外の波長領域 (150-200 nm) の円二色性スペクトル (CD スペクトル) から、二次構造 (ヘリックスやシート) の含量が測定できる。
- ④ ペプチド NH の重水素交換速度を質量分析から、タンパク質内部で水素結合している部分が推定できる。
- ⑤ X 線小角散乱から、分子の形状が測定できる。

⁴保存性の高い部位のアミノ酸残基にミュータントを入れると、活性が大きく下がるなどの影響がでることが予測される。特にプロトンポンプに関連するタンパク質の場合はその可能性が高い。

(2) 可溶化を促進するタグの融合

N 末端にタグを付加することで可溶化することがある。pET-43.1 など付加されている NusA タグは大腸菌データベース中の 4,000 以上のタンパク質の中から最も優れた可溶性ポテンシャルを有すると予測された 495 アミノ酸残基のタンパク質である (Harrison 2000, Davis 1999)。4 種類の Nus・tag 融合タンパク質の実験では、発現タンパク質の 85% 以上が可溶性になったと報告されている (Harrison 2000)。そのほか 109 アミノ酸残基の Trx・tag (チオレドキシントンパク質) や、GST・tag (220 アミノ酸残基) などを融合させることでも発現タンパク質の可溶性が上がる可能性がある (表 5)。

pET NusA Fusion System 43.1 (カタログ番号 70942)

また、大腸菌のペリプラズムでタンパク質を発現させることも可溶性タンパク質を得るのに有効である。ペリプラズムは大腸菌の細胞膜内よりも酸化的環境なので、ジスルフィドの形成やフォールディングに好ましい環境である。発現タンパク質をペリプラズムに発現させるための移行シグナル配列を付加したベクターの利用は効果的であるが、-gal をペリプラズムタンパク質に融合させると毒性を示すことがあるので注意が必要である (Snyder and Silhavy, 1995)。

さらに、pET-39b または pET-40b を利用して、ペリプラズムでジスルフィド結合の形成 (DsbA) または異性化 (DsbC) を触媒する酵素と融合するタンパク質 DsbA または DsbC を付加することで、発現タンパク質をペリプラズムに局在させることができれば、タンパク質に直接連結している酵素によって溶解性が増大され、ジスルフィド結合の形成が促進される (Missiakos *et al.*, 1994; Zapun *et al.*, 1995)。

pET Dsb Fusion System 39b (カタログ番号 70789)

pET Dsb Fusion System 40b (カタログ番号 70791)

表 5：それぞれのタグを融合したときのタンパク質が可溶化する計算値

protein	Size (kDa)	Amino acids	Probability of solubility
NusA	54.8	495	95%
BFR	18.5	158	95%
GrpE	21.7	197	92%
thioredoxin	11.7	109	73%
GST	27.1	232	56%
hIL-3	15.1	133	27%
bGH	21.6	189	15%
hINF-	17.1	146	4%
tyrosinase	54.1	494	51%

(3) 目的タンパク質と本来会合しているタンパク質を共発現させる

発現タンパク質が沈殿となった場合には、そのタンパク質が本来、他のタンパク質と強く会合している可能性がある。つまり、他のタンパク質と同時に発現させれば可溶化するかもしれない。そこでまず、目的タンパク質がコードされているゲノム遺伝子のC末端側に His-tagなどを導入し、そのtagを手掛かりにして免疫沈降などによりそのタンパク質に結合するタンパク質を同定する。

次に、結合していたタンパク質群を、大腸菌体内で共発現させて、複合体として精製すればよい。8種類の異なるサブユニットからなるタンパク質でも、同時に発現させる系 (pETDuet など) が用意されている。

pETDuet-1 DNA
(カタログ番号 71146)

(4) 本来の野生型タンパク質が比較的不安定なため、変性状態で沈殿している場合

本来の野生型タンパク質が比較的不安定なため、作製したタンパク質の安定性がさらに低下して、変性状態で沈殿してしまうことがある。研究の目的が、好熱菌のタンパク質で代用できる場合には、それを利用することも有効である。好熱菌のタンパク質を作製する際は、例えば自由に利用できる高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のタンパク質発現プラスミドを、バイオリソースセンター (http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/thermus_ja.html) から入手し、さらにタンパク質発現・精製情報を <http://www.thermus.org> から入手して、研究することが可能である。

膜タンパク質の発現

約 110 残基からなる枯草菌由来の Mistic (Membrane-integrating sequence for translation of integral membrane protein constructs) ドメイン (図 7) を、発現させたい膜タンパク質の N 末端に付加しておく、大腸菌の細胞膜上に発現させることが可能である (Roosild et al., 2005)。我々が 12 回膜貫通タンパク質を含む 12 種類の膜タンパク質の発現を試みたところ、その成功率は約 70% と高かった。

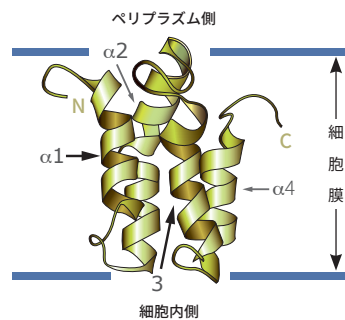


図 7: 約 110 残基からなる枯草菌由来の Mistic ドメイン

組換えタンパク質発現大腸菌の高密度培養

大腸菌を用いてタンパク質を量産化するための様々な試みには、大別して二種類ある。一つは、前述したような種々の試みで、大腸菌体内での目的タンパク質の発現量を上げることである (Sørensen et al., 2005)。もう一つは、発現菌体そのものを大量に培養することであり、培養装置のスケールアップのほか、大腸菌を高密度に培養する方法である。

大腸菌を高密度まで培養するために、培養中の温度、pH、溶存酸素量を制御する、培地の組成を変える、培養中に糖源を添加する、などの方法がなされている。最近では、培養中に酢酸が蓄積すると増殖が停止することから、酢酸を除くための様々な方法が開発されており、これにより湿重量で 1 リットル当たり 500 g 以上の大腸菌を培養することが可能であると言われている (Eiteman et al., 2006)。

培養中の温度・pH・溶存酸素量の管理と糖源（グリセロールとラクトース）の添加のみを行う簡便な高密度培養を行うだけでも、培地 1 リットル当たり湿重量で約 100 g の発現菌体を得ることができる。通常のコルベンを用いて培養した場合に得られる、培地 1 リットル当たり、湿重量で 5 g 程度の大腸菌量に比べると一桁以上多い。一般に、スモールスケールでの目的タンパク質発現量に比べて、高密度培養での発現量は低下する傾向がある。目的タンパク質の発現量を増やすためには、糖源の添加、IPTG 誘導の時期、集菌の時期が重要である。

また、Novagen で取り扱っている **Overnight Express System** のような自動発現誘導培地でも収量が上がる。このシステムにはグルコースとラクトースが含まれており、培養初期には、大腸菌がグルコースを炭素源として増殖する。

Overnight Express Instant
LB Medium
(カタログ番号 71757)

Overnight Express
Autoinduction System 1
(カタログ番号 71300)

タンパク質は、必ず発現させることができる!

グルコースが枯渇すると、C 源がラクトースに切り替わり、その代謝物であるアロラクトース（既出）が IPTG の代わりにタンパク質の発現を誘導する。ゆっくりと誘導されるため、大腸菌に負担がかからず、収量が大量に見込めるうえ、正しくフォールディングされやすいため、可溶化タンパク質をより得られやすくなる (Grabski, 2003)。

タンパク質精製

最近では、液体クロマトグラフィーや樹脂が改良されたため、以前よりもはるかに短時間で、純度の高いタンパク質が精製できるようになった。

タンパク質精製に用いる方法には、① 電荷の違いを利用したイオン交換クロマトグラフィーや電気泳動法、② 溶解度の違いを利用した疎水性クロマトグラフィーや硫酸分画、③ 分子の大きさの違いを利用したゲルろ過法や透析法、④ 親和性を利用した **affinity クロマトグラフィー**⁵ などがある。

タンパク質精製に際しては、親和性カラムクロマトグラフィー（④）が利用可能な場合は、それが最適である。それ以外の場合には、まず、吸着容量の大きいイオン交換クロマトグラフィー（①）や疎水性クロマトグラフィー（②）を使用し、最後にゲルろ過クロマトグラフィー（③）を使用するのが一般的である。

カラムを再生する際には、官能基の種類や、担体の安定性を理解して再生することが重要である。イオン交換クロマトグラフィーの場合、四級アミンは常に正の電荷を持ち、スルホン酸基は解離しているため、カラム再生の際は解離基のイオン化状態を気にする必要はない。しかし、DEAE や CM の場合は、pH によって官能基のプロトン化状態が変化するため、タンパク質溶液を流す前に、カラムから「溶出した液」の pH や伝導度を測定してカラムの再生を確認しておく必要がある。

⁵ 抗体カラム、His タグタンパク質用の金属（Ni²⁺、Zn²⁺）キレートカラム、ヌクレオチド結合ドメインを持つタンパク質用の青色や赤色の色素を結合させたカラム、核酸結合タンパク質用のヘパリンカラムなどが、affinity クロマトグラフィーとして分類される。親和性カラムクロマトグラフィーとも呼ばれる。

HisBind Resin
(カタログ番号 69670)

調製したタンパク質の確認および、本来のタンパク質の翻訳後修飾の解析

精製したタンパク質が、本来そのタンパク質が存在する状態と同じであることを、(1) 質量分析で確認するとともに (2) 活性測定などで確認する。

それらの目的で、まずタンパク質の全長の分子質量を、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計 (FT-ICR MS) を利用して正確に解析する。これによって、精製したタンパク質が目的のものであることが、ほぼ確認できる。本来、そのタンパク質が存在する細胞破砕液などから精製されたタンパク質の場合には、ゲノム情報から推定されるアミノ酸配列情報と比較することによって、翻訳後修飾の有無が正確にわかる。

この FT-ICR MS は分子量が数万でも、有効数字 6 桁以上の高精度で解析でき、飛行型 (Time Of Flight: TOF) よりもはるかに精度が高いので (図 8)、システイン残基間の SS 結合の有無や、糖鎖やリン酸化修飾などの有無もわかる (FT-ICR MS による受託分析は、例えば、阪大理学テクノロジーサーチ <http://www.handairigaku-techno.or.jp/> などでも行っている)。

その後、タンパク質をトリプシンなどのプロテアーゼで消化し、質量分析計の MS/MS 解析でアミノ酸配列を決定する (図 9 にその一例を示す)。そのプロテアーゼ処理を 0.1 M 酢酸アンモニウムのような揮発性緩衝液中で行えば、得られたペプチド混合物溶液を水で約 1/10 に希釈した後、ナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) で分離し、直接、質量分析装置でペプチド断片のアミノ酸配列を 20 残基程度であれば、決めることが可能である。この方法で、80-90% のアミノ酸配列がカバーできるが、それでも全長解析の翻訳後修飾が説明できない場合には、残された約 10-20% に翻訳後修飾が残されている可能性があるため、もとのタンパク質を最初とは異なるプロテアーゼで処理し、同様の解析を行えばよい。

可能ならば、タンパク質の N 末端アミノ酸配列も決めておけばよいが、上記の方法で約 90% がカバーできるので、必ずしも必要ではない。

このように、種々の情報と不屈の闘志を燃やしてさまざまな手法を駆使すれば、どんなタンパク質でも必ず発現させることができる。複数種類のサブユニットからなるタンパク質 (ヘテロダイマー) のサブユニットの一つや、タンパク質以外の分子 (たとえば脂質) が必要なタンパク質、あるいはアミノ酸置換したことによって不安定になったタンパク質などは、沈殿してしまうことがある。しかし、すべての場合において、可溶化タンパク質が必要なわけではない。とりあえず発現すれば解析できる実験系もある。また、不溶化し

ProteoExtract All in One
Trypsin Digestion Kit
(カタログ番号 650212)

たほうが高純度に精製できることもある。研究の目的に合わせて、発現させるゴールを設定し、より快適な研究を進めていただきたい。本書がその一助となることを切に願う。

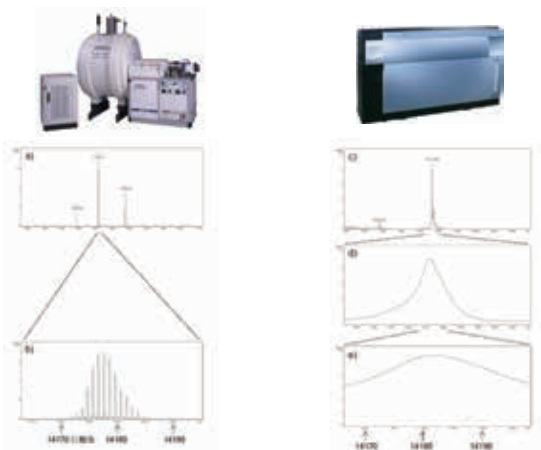


図 8：質量分析計による全長タンパク質の分子量測定
フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計（FT-ICR MS）（左図）と飛行型（Time Of Flight：TOF）との比較。FT-ICR MS は精度が高いため、安定同位体の存在を反映する多くのピークが分離できており、有効数字 6 桁以上の精度で、分子全体の分離量が測定できる。

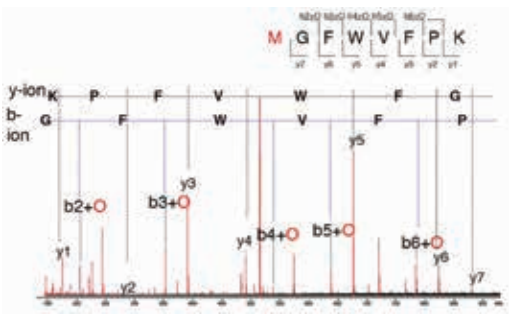


図 9：質量分析計によるアミノ酸配列の分析（一例）
この例では、メチオニン酸化されていることがわかる。

文献：

Albers, S. V. et al. (2006) *Appl Environ Microbiol.* **72**, 102-111.
Davis, G.D., et al. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 382-388.
Eiteman, M. A. et al. (2006) *Trends in Biotechnology* **24**, 530-536.
Grabski, A., et al. (2003) *inNovations* **17**, 3-7.
Harrison, R.G. (2000) *innovation* **11**, 4-7.
Huang, J., Villemain, J., Padilla, R., and Sousa, R. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 457-75.
Inouye, M., Arnheim, N., and Sternglanz, R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7247-7252.
Kaufmann, et al. (2010) *Biochemistry* **49**, 2987-2998.
Levitt, M. (2009) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **106**, 11079-11084.
Missiakas, D., et al. (1994) *EMBO J.* **13**, 2013-20.
Moffatt, B.A. and Studier, F.W. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
Moreno, R. et al. (2005) *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 591-593.
Raman, S. et al. (2009) *Proteins* **77**, Suppl. 9, 89-99.
Roosild, T.P. et al. (2005) *Science* **307**, 1317-1321.
Rosenberg, A.H., et al. (1987) *Gene* **56**, 125-135.
Sambrook, J. et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third ed.) , Cold Spring Harbor.
Snyder, W.B. and Silhavy, T.J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 953-63.
Sørensen, H. P. et al. (2005) *J. Biotechnol.* **115**, 113-128.
Studier, F.W., et al. (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
Zapun, A., et al. (1995) *Biochemistry* **34**, 5075-89.
Zhang, X. and Studier, F.W. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 10-27.

本文中で紹介した製品一覧

ページ	行	製品名	カタログ番号	製品説明
1	17	pT7Blue-3 Perfectly Blunt Cloning Kit	70182	どのポリメラーゼを用いて PCR した DNA でも効率的にクローニング可能
2	18	BL21(DE3) Competent Cells	69450	もっとも使われている発現用コンピテントセルの定番
	19	100mM IPTG Solution	70527	溶液タイプで使いやすい、1.5ml ずつの小分けタイプ
8	2	BL21(DE3) Competent Cells	69450	もっとも使われている発現用コンピテントセルの定番
	3	Tuner (DE3) Competent Cells	70623	培養中のタンパク質発現量を一定のレベルに保持可能
	4	Rosetta2 (DE3) Competent Cells	71397	レアコドンを補充した株
	4	Rosetta-gamiB (DE3) Competent Cells	71136	S-S 結合に有利で IPTG 濃度依存性、さらにレアコドンが補充されている BL21 由来株
11	4	Rosetta-gami2 (DE3) Competent Cells	71351	S-S 結合に有利、さらにレアコドンが補充されている K-12 由来株
	8	pLysS DNA	69659	T7 リゾチームを微量産生するプラスミド
	9	pLysE DNA	69658	T7 リゾチームを微量産生するプラスミド
	表 4	Thrombin, Restriction Grade	69671	高効率かつ特異的な切断を可能にした制限切断グレード
	表 4	Biotinylated Thrombin	69672	共有結合によってビオチンが付加されているトロニン
	表 4	Recombinant Enterokinase	69066	リコンビナントなので、高品質で他のプロテアーゼの混入が一切ありません
	表 4	Factor Xa, Restriction Grade, Bovine Plasma	69036	高効率かつ特異的な切断を可能にした制限切断グレード
	表 4	HRV 3C protease	71493	His タグが融合されているので精製が非常に簡便です
12	21	pET NusA Fusion System 43.1	70942	高い可溶性を持つ Nus タグを持ったベクター
	33	pET Dsb Fusion System 39b	70789	ペリプラズム酵素 DsbA タグを持ったベクター
	33	pET Dsb Fusion System 40b	70791	ペリプラズム酵素 DsbC タグを持ったベクター
13	40	Overnight Express Instant LB Medium	71757	IPTG 不要の自動発現誘導システム 顆粒 LB 培地ベース
	40	Overnight Express Autoinduction System 1	71300	IPTG 不要の自動発現誘導システム
14	7	pETDuet-1 DNA	71146	複数の目的タンパク質を共発現できるベクター
	10	HisBind Resin	69670	汎用されている His タグの精製レジン
	33	ProteoExtract All in One Trypsin Digestion Kit	650212	ゲルや溶液中のサンプルをトリプシン消化するキット

タンパク質は、必ず発現させることができる!

著者紹介

倉光 成紀 くらみつ・せいき

大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 教授

大阪大学 理学部 生物学科を1972年に卒業。同理学研究科生物化学専攻(所属:生物物理化学講座)にて、1977年に学位取得。その後、医学部(大阪医科大学・医化学教室)へ教員として着任。1991年に大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻へ移動し、現在に至る。(※2011年1月時点のプロフィール)

大阪大学 理学部 生物学科にて、学位取得後、医学部(大阪医科大学・医化学教室)へ移り医学部在籍中は蛋白質工学に携わり、数多くの不思議な現象に遭遇するとともに、タンパク質分子の巧妙な仕組みに感動した。さらに、医学部病院の傍に居て、発症のメカニズムが不明な多くの疾患が多く残されていることを実感するとともに、研究面では、「多くの生物に共通で生命活動に基本的なタンパク質(遺伝子)」に関する研究が重要視され難いことを知った。というのは、そのように重要なタンパク質(遺伝子)は、欠損があると生まれて来ることができないため、治療の対象となる可能性が低いであろう。そのことに気付いたことは、自分にとって「コロンブスの卵」であった。

しかし、それら生命の基本を明らかにすることは、理学研究としてとても重要なテーマである。そこで、1991年に現在の大阪大学大学院 理学研究科 生物科学専攻へ移ってからは、「基本的な生命現象の解明」を目指すことにした。そのためのモデル生物として、(1) 当時、遺伝子操作が確立していて、(2) タンパク質が安定な高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を選び、細胞システム全体の生命現象を原子分解能で理解する学問領域の創出を、遠い将来の目標とした。そのためにまずゲノム解析を行い、次に、タンパク質の立体構造を明らかにするボランティアの研究に着手した。世界中の研究者が協力した結果、今ではタンパク質のドメイン(フォールド)単位での立体構造が、75%以上の確率で的中するようになった(Levitt, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 11079-11084)。

立体構造解析と並行して、分子機能解析を進めることになるが、細胞全体を理解しようとする障害になるのが、全体の約1/3残された「機能未知タンパク質の存在」である。しかし考え方を変えれば、多くの大発見をするチャンスが数多く残されていることになる(倉光(2008) *生化学* 80, 1075-1075; 倉光(2009) *生産と技術* 61, 17-26)。その中でも、「ヒトを含めたほとんどの生物に共通で、機能未知のタンパク質(遺伝子)」が、まだ約200個も残されている。我々の研究グループでは、オミックス研究を利用して分子機能の概略を推定した後に、個々のタンパク質分子の機能を確認しているが、その過程で、予想もしなかった分子機能が次々と見だされている。

たとえ一つの細胞といえども、細胞全体を構成分子から理解できるようになるまでには長い時間を要するであろうが、そのような学問領域は必要であろう。本当に原子分解能で生命現象が理解できるようになれば、単なる説明のためのシミュレーションではなく、予測のシミュレーションが可能な時代になるであろう。そのような学問がさらに発展して、多細胞生物にも適用可能な時代になれば、ヒトの疾患治療を行う際に、「考えられる複数の処置方法について、予想治療率が確率で表現されたような表が提示され、自分の好みに合った処置方法を選ぶ」というような時代が到来するかも知れない。



The new force in Life Science tools

quest Map vol.01

※本冊子は2011年1月に発行した「Quest Map vol.01」をリブランディングしたものです。
内容は2011年1月当時のものとなります。



メルク公式アカウント
友だち追加は
コチラ



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
**カタログ
ファインダー**



メルクライフサイエンス公式 Facebook ページ
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス公式 Twitter アカウント
メルクライフサイエンス - Merck で検索



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。記載内容は2011年1月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2019 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit No. Lit. No. BI090-1106-1000

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com

Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859

RBM131-1906-0.5K-M