

## 大腸菌の菌株の特徴を知ろう

林 勇樹

大腸菌は、遺伝子工学において、もっとも広く利用されている生物種の一つである。遺伝子工学に使用する大腸菌にはいろんな菌株 (strain) が存在し、それぞれがさまざまな特徴を有している。大腸菌を扱う実験では、大腸菌株の特徴を理解し、実験に適した株を使用する事で実験をスムーズに遂行することができる。大腸菌株の特徴は、各株の遺伝子型 (genotype) を見ればおおむね把握することができる。そこで、本稿では、大腸菌の遺伝子型について概説した後、大腸菌を使う実験に適した代表的な株について紹介したい。

### 大腸菌株の特徴を表すために

大腸菌の菌株の特徴は、その株が有する遺伝子により決定される。大腸菌株の特徴を表すために、その株が有するすべての遺伝子を記述する訳にはいかない。そこで、大腸菌株の特徴を表す遺伝子型は、以下の基本的なルールに沿って記述する<sup>1-3)</sup>。

(1) 遺伝子は機能を示す3文字の小文字と4文字目の大文字で命名され、斜体で表記する。

(例) *lacZ*: β-D-ガラクトシダーゼ遺伝子

その遺伝子産物 (タンパク質・酵素) は最初の文字を大文字に表し、斜体ではなく標準体で表記する。

(例) *LacZ*: β-D-ガラクトシダーゼ

遺伝子がオペロン・クラスターを構成している場合には、機能を示す3文字の小文字の後に4文字目の大文字を続けて表記することができる。

(例) *lacZ-lacY-lacA* → *lacZYA*

(2) 機能が欠損した遺伝子を記述する。ただし、機能が正常である、もしくは欠損していることを強調したいときは、遺伝子名の右肩にそれぞれ+, もしくは-と表記する。記述のない遺伝子については、機能が正常であるか不明である。

(3) 制限系 (*r*: restriction) の有無を, *r*<sup>+</sup>, *r*<sup>-</sup>と表す。メチル化系 (*m*: methylation) の有無を, *m*<sup>+</sup>, *m*<sup>-</sup>と表す。

(例) *hsdR2* (*r*<sub>K</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>K</sub><sup>+</sup>): *hsdR2* 遺伝子を欠損しており, *EcoK* 制限系は機能せず, メチル化していない DNA を制限しないが, 自身が有する DNA はメチル化される。

(4) 連続した複数の遺伝子が欠失している場合、欠失 (deletion) を表す“Δ”の後の( ) 内に、欠失している領域の最初の遺伝子と最後の遺伝子を、“-” (ハイフン) で結ぶ。

(例) Δ(*lac-proAB*): *lac* オペロンから *proAB* 遺伝子までの領域を欠失している。

(5) 溶原性ファージやプラスミドの有無を強調して記述する。

(例) F<sup>+</sup>: F 因子 (F プラスミド) を有する。

F<sup>-</sup>: F 因子を持たない。

λ<sup>-</sup>: 溶原性λファージを有していない。

e14<sup>-</sup>: *mcrA* 遺伝子をコードしたプロファージ様 DNA を有しておらず, *McrA*<sup>-</sup> を表している。

(6) 例外的に表現型を表す場合、括弧内に表記し、最初の文字を大文字にし、その表現型の有無を, +, -, r (resistant: 抵抗性), s (sensitive: 感受性) を右肩に併記する。

(例) (Lac<sup>-</sup>): ラクトースのみを炭素源として生育することはできない。

(Amp<sup>r</sup>): 抗生物質アンピシリン耐性を表している。

(7) 遺伝子の置換は, “::” で表される。“::” の前に置換され欠損した遺伝子名を, 後に置換した遺伝子を記述する。

(例) *gor522::Tn10*: *gor522* 遺伝子がテトラサイクリン耐性遺伝子をコードするトランスポゾン

(Tn10) の挿入により置換され, 遺伝子破壊されたことを表している。

### クローニングによく使われる大腸菌

遺伝子クローニングや外来遺伝子の高発現などに使用するベクタープラスミドの調製を行う際に以下の大腸菌株がよく利用されている (表1)<sup>3-6,8,10)</sup>。その多くは K12 株に由来する。

表1. クローニングによく使われる大腸菌の遺伝子型

菌株名	遺伝子型
JM109	F <sup>-</sup> [ <i>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>r</sup> lacZΔM15</i> ] / Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>glnV44 e14<sup>-</sup> gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>
DH5α <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) phoA glnV44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i>
DH10B <sup>TM</sup>	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup> rpsL nupG</i>
XL-1 Blue	F <sup>+</sup> [ <i>proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>r</sup>ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac</i> ]

では、なぜこれらの菌株が一般的に用いられているのであろうか。構築したベクターDNA（プラスミド、バクテリオファージ）を大腸菌で調製するためには、(a) 制限系の回避：構築したベクターDNAで大腸菌を形質転換し、(b) 相同的組換えの抑制：組換えによる塩基欠失や置換を起こすことなく、大腸菌内でベクターDNAが複製され、最終的に、(c) DNA分解酵素からの保護：大腸菌破砕液からベクターDNAをできるだけ無傷で精製する必要がある。実験現場では、構築したベクターDNAで形質転換して得られた大腸菌のコロニー集団から、外来DNAが組み込まれたプラスミドを有する大腸菌コロニーを選択しなければならない。しかし、寒天培地上に生育したコロニーの様子から、外来DNAが挿入されたプラスミドを有するコロニーか否かを判断することができない。そこで、(d) 陽性クローンの選択：β-D-ガラクトシダーゼを利用した青白選抜がよく使われる。以下、詳しく説明していこう。

**(a) 制限系の回避** 多くの微生物は、バクテリオファージなどの侵入を防ぐ機構を持っている。自己と非自己のDNAを区別するために、自己DNAのメチル化をしている。大腸菌ではメチル化していないDNAを外来DNAと判断し、制限酵素が分解する(*EcoK*制限系)。通常のPCR産物を連結したプラスミドDNAはメチル化されておらず、大腸菌に入ると、外来DNAとして認識され分解される場合がある。しかし、上記4種の菌株には、共通して遺伝子型 *hsdR*が見られる。*hsdR*は、*EcoK*制限系を構成する遺伝子の一部を欠損しており、メチル化していないDNAを制限して分解することができない。そのため、PCR産物や大腸菌以外の外来DNAをプラスミドに連結し、大腸菌を形質転換しても、外来DNAとして分解されず保持される。その他の制限系では、メチル化されたDNAを認識・制限する *Mcr*制限系、*Mrr*制限系が知られている。メチル化されたDNAを含むベク

ターDNAで大腸菌を形質転換する場合、*mcrA* (*e14<sup>-</sup>*でも可)、*mcrB*、*mcrC*のいずれか、あるいは、*mrr*の遺伝子型であることが望ましい。

**(b) 相同的組換えの抑制** 大腸菌は、相同的組換え能を有しており、大腸菌に導入したプラスミドDNAに染色体DNAと相同的な塩基配列があると、染色体DNAと組換えを起こし、その結果、導入したプラスミド上の遺伝子の欠失や置換、あるいはプラスミドDNA自身の脱落が生じてしまう場合がある。また、プラスミド同士で組換えを起こす場合もある。しかし、上記4種の菌株に共通する遺伝子型 *recA1*は、相同的組換えに関わる遺伝子の一部を欠損しているため、組換えの頻度は低い。そのため、この株に導入したプラスミドDNAは欠失、置換や脱落を起こすことなく、安定的に複製・保持される。

**(c) DNA分解酵素からの保護** プラスミドDNAを精製する場合、大腸菌を増殖させ、最終的に集菌・破砕する。このとき、大腸菌がもつDNA分解酵素によりプラスミドが分解されてしまう危険性がある。たとえばDNA分解酵素の一つである非特異的エンドヌクレアーゼIを有する *EndA<sup>+</sup>*株から調製したプラスミドDNAは、その精製過程において *EndA*の作用により、非特異的な切断を受ける可能性がある。しかし、上記4種の菌株には共通して遺伝子型 *endA*が見られる(*EndA*の機能欠損)。そのため、これらの菌株を用いることで、非特異的損傷を抑えた、高品質なプラスミドDNAの調製が期待できる。

**(d) 陽性クローンの選択** クローニング実験では、外来DNAとベクターDNAの結合産物で大腸菌を形質転換あるいは形質導入し、得られたコロニーを培養する。この際、外来DNAがプラスミドに挿入されたかどうかはどのようにして判断できるのだろうか。一連の実験操作の中で、できるだけ早い段階で外来DNAがベクターDNAに挿入されたかどうか判断することができれば、実験を迅速に進めることが可能である。そこで利用されるのが、β-D-ガラクトシダーゼの活性消失を指標とする外来DNA挿入の判別(青白選別)である<sup>7-9)</sup>。β-D-ガラクトシダーゼの基質である青色色素X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)を寒天培地に加えておくと、β-D-ガラクトシダーゼの作用により分解されコロニーは青色になる。一方で、この酵素活性を欠くコロニーは白色となる。JM109株は*lacZ* (β-D-ガラクトシダーゼ遺伝子) 遺伝子を含む*lac*オペロンを欠失しているため、β-D-ガラクトシダーゼ活性を示さないが、F因子上にβ-D-ガラクトシダーゼのωフラグメントを

コードする *lacZ*ΔM15 を有する<sup>8,9)</sup>。プラスミドやファージを介してαフラグメントが合成されると、ωフラグメントに結合し、β-D-ガラクトシダーゼ複合体が形成される。αフラグメント、ωフラグメントは、それぞれ、単独ではβ-D-ガラクトシダーゼ活性を示さない。共存して複合体を形成することではじめて、活性を示す(β-D-ガラクトシダーゼのα-相補)。代表的なプラスミドベクターである pUC19 のマルチクロニングサイトは、*lac* プロモーター制御下にあるαフラグメント遺伝子の内部に埋め込まれている<sup>7-9)</sup>。外来DNAがマルチクロニングサイトに挿入され大腸菌に導入されると、β-D-ガラクトシダーゼのαフラグメント遺伝子は破壊されるため、大腸菌内でαフラグメントは発現しない。もし、その大腸菌株が、*lacZ*欠損かつ*lacZ*ΔM15保持であれば、β-D-ガラクトシダーゼのωフラグメントのみしか作られず、β-D-ガラクトシダーゼ複合体が形成されないためX-galは分解されない。よって寒天培地のコロニーは白くなる。一方、外来DNAがプラスミド pUC19 に挿入されていない場合の大腸菌コロニーは、pUC19 からαフラグメント、大腸菌株からωフラグメントがそれぞれ作られ、β-D-ガラクトシダーゼ複合体を形成することでβ-D-ガラクトシダーゼ活性を示すため、X-galを分解し青色を呈する。このように、白色のコロニーを選択することで、外来DNAが挿入されたプラスミドを持つ大腸菌を一目で選択することが可能となる。なお、バクテリオファージをベクターDNAに使用した場合、プラークの色(青色か透明か)で区別される。

これらの性質を有するために上記4種の大腸菌株は、クローニングによく用いられるのである。大腸菌 JM109 株を例に他の遺伝子型にも触れておきたい<sup>8)</sup>。本菌は F 因子を有している (F<sup>+</sup>)。[ ]内は、F 因子上の遺伝子型を表している。染色体DNAのラクトースオペロンから *proAB* 遺伝子までの領域が欠失している (Δ(*lac-proAB*))。一方で、F 因子上に *proAB* 遺伝子を有する (*proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>*) ことで染色体DNA上の *proAB* 変異を相補するため、JM109 株は自身でプロリンの生合成を行うことができる。F 因子が脱落した JM109 株は、*proAB* 遺伝子を持たないため、プロリンを合成することができずプロリン要求性となる。そのため、プロリンを含まない最少培地で培養すると生育できず、結果として F 因子を持つ JM109 株のみを選択的に得ることができる。栄養培地で植え継ぐと、重要な遺伝子を F 因子ごと欠損する場合があるが、そのような大腸菌はプロリン要求性を利用して除去できる。e14 は、前述のとおり *mcrA* 遺伝子を持たず、Mcr 制限系は機能しないことを示す。したがっ

て、メチル化された外来DNAの導入は制限されない。また、*recA* 遺伝子が欠損しているため、導入されたプラスミドDNAと染色体DNAとの間での相長的組換えの頻度は非常に低い。非特異的エンドヌクレアーゼ遺伝子を欠損している (*endA*) ため、*endA* 株から調製したプラスミドDNAは分解されにくい。JM109 株は誕生して20年以上が経つが、今もって利用され続けるのは本株が組換えDNA実験用宿主として優れた性質を有しているからである。

### クローニングに使われる特色のある大腸菌株

クローニング実験で汎用される他の菌株についても簡単に紹介しよう(表2)<sup>4,6)</sup>。

表2. クローニングに使用される特色のある大腸菌とその特徴

菌株名	特徴
ABLE <sup>®</sup> C/K	毒性のあるタンパク質をコードしたプラスミドDNAの増幅に適している。
NEB <sup>®</sup> Turbo	ベクターDNA構築やプラスミドDNAの調製に適した遺伝子型であり、増殖速度が速いため6.5時間ほどでコロニーが出現する。
Mach1 <sup>™</sup> -T1 <sup>R</sup>	ベクターDNA構築やプラスミドDNAの調製に適した遺伝子型であり、増殖が速く8時間でコロニーが出現する。
SURE <sup>®</sup>	真核細胞由来DNAに見られる不安定なDNAのクローニングに適している。
XL-10 Gold	大きなサイズのDNAを用いた形質転換に適している。既知の制限系は全て欠失しており、導入するDNAのメチル化の有無を問わずクローニングに使用可能。

プラスミドは多コピーであるため、そこにクローン化された外来DNAは宿主大腸菌の生育に好ましくない場合がある。ABLE<sup>®</sup> C/K株は、大腸菌内におけるプラスミドDNAの保持に毒性がある場合、そのコピー数を抑えることで、その毒性を軽減する。JM109 株ではクローン化できないDNAもこれらの菌株では可能になる場合がある。NEB<sup>®</sup> Turbo株、Mach1<sup>™</sup>-T1<sup>R</sup>株はいずれも、遺伝子型 *hsdS* (もしくは、*hsdR*)、*recA*、*endA* であり、ベクターDNA構築やプラスミドDNAの調製に適している。さらに増殖速度が非常に速いため、実験時間の短縮につながる。SURE<sup>®</sup>株は、真核細胞のDNAに見られる逆位リピートやZ-DNAなどのDNAの二次構造や三次構造を排除するような遺伝子を欠損することで、物理的理由により不安定なDNAのクローニングを可能にしている。XL-10 Gold株は、大きなサイズのプラスミドDNAに対しても高効率な形質転換能を有している。また、EcoK制限系、Mcr制限系、Mrr制限系のいずれ

も欠失していることから、形質転換に用いるDNAのメチル化の有無による制限を受けない。

### タンパク質発現に使用する大腸菌株

X線結晶解析やNMRを用いてタンパク質の構造を決定するためには、目的タンパク質を高純度、高品質に大量に取得する必要がある。しかし、タンパク質の性質によっては、大量発現や精製が難しいものも数多く存在する。そうしたタンパク質の収量や品質を向上させるために、タンパク質発現用大腸菌を選択することも重要である。

通常、大腸菌を用いて目的タンパク質を大量発現する場合、目的タンパク質遺伝子をクローン化した発現ベクターを用い、特異的な誘導発現を行う。本稿では、もっとも多用されるpETベクターに代表される、T7プロモーター発現系を用いた例について説明したい<sup>10,11)</sup>。

pETベクターを用いた大腸菌によるタンパク質発現でよく使用される菌株について以下に示す(表3)。本システムでは大腸菌はK12株系統ではなく、B株系統が使われる。BL21 (DE3) 株は、λファージDE3が染色体上に溶原化している。ここには変異により転写活性が強化された*lac*プロモーター (*lacUV5*プロモーター) に制御されたT7 RNAポリメラーゼ遺伝子 (*gene1*) が存在する<sup>12)</sup>。そのため、発現誘導剤であるIPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) の添加によりT7 RNAポリメラーゼが発現し、これがT7プロモーター下流の目的タンパク質遺伝子の転写を行う。(DE3)はT7プロモーター発現系を利用する宿主には必須の遺伝子型である。pETシステムについては、いくつかのインターネットサイトでも紹介されているので参照していただきたい<sup>10,11)</sup>。

表3. タンパク質の発現によく使われる大腸菌の遺伝子型

菌株名	遺伝子型
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3) (λ(DE3):<i>lacI ind1 sam7 Δnin5 lacUV5-T7gene1</i>)*</i>
BL21(DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3) (λ(DE3):<i>lacI ind1 sam7 Δnin5 lacUV5-T7gene1</i>)* pLysS (Cam<sup>R</sup>)</i>

\*溶原化したλファージDE3のDNA上には*lacI ind1 sam7 Δnin5 lacUV5-T7gene1*の遺伝子がコードされている。

タンパク質を高収量、高品質で得るには、(a) タンパク質分解酵素の抑制：発現から大腸菌破碎後の精製過程までに分解されないことが重要である。また、(b) 目的タンパク質の大腸菌への影響を低減：発現した目的タンパク質による宿主大腸菌の増殖への影響を抑え、(c)

発現したタンパク質の安定化：発現した目的タンパク質が大腸菌内で、正しく折りたたまれ、変性、凝集しないことも重要である。これらを達成するために大腸菌に施された改良を紹介する。

(a) **タンパク質分解酵素の抑制** BL21株は、*E. coli* B株 (*EcoB*) 由来であり、*lon* 遺伝子産物であるLonプロテアーゼと、外膜タンパク質であるOmpTプロテアーゼも欠損している。タンパク質の発現・精製過程においてこうしたタンパク質分解酵素による目的タンパク質の損傷を抑えることができる。

(b) **目的タンパク質の大腸菌への影響を低減** BL21 (DE3) 株では、発現誘導剤の添加がなくても、微量ながらT7 RNAポリメラーゼが発現しており、それに伴い、目的タンパク質も発現していることがある<sup>11)</sup>。もし、発現した目的タンパク質の機能が宿主大腸菌の増殖へ悪影響を及ぼす場合、この大腸菌の増殖を阻害し、結果として目的タンパク質の収量が少ない、あるいは得る事ができない。BL21 (DE3) pLysS株は、T7 RNAポリメラーゼに結合し、その機能を阻害するT7リゾチームを発現するプラスミドpLysSを有している。そのため、T7リゾチームが、発現誘導剤なしに発現した微量のT7 RNAポリメラーゼに結合・阻害することで、目的タンパク質の発現を抑え、大腸菌の増殖への悪影響を抑制する(pLysSのpは、プラスミドを表しており、BL21 (DE3) pLysS株は、T7リゾチーム遺伝子をコードしたプラスミドを(pLysS) 有することを示す)。T7リゾチーム遺伝子の発現量が増加したBL21 (DE3) pLysE株も存在する。

(c) **発現したタンパク質の安定化** 大腸菌の細胞質は還元条件であるため、通常、発現した目的タンパク質はジスルフィド結合を形成していない。タンパク質を精製するために、大腸菌を破碎すると、還元条件から解放され酸化条件となり、タンパク質はジスルフィド結合を形成するが、分子内、分子間で誤ったジスルフィド結合が形成されると、変性、ときには凝集する。Origami<sup>TM</sup> 2 (DE3) 株、Origami<sup>TM</sup> B (DE3) 株は、細胞質内の還元条件を生みだすグルタチオン還元酵素をコードする遺伝子 (*gor*) と、チオレドキシシン還元酵素をコードする遺伝子 (*trxB*) を欠損しており、細胞質内は酸化条件となり、タンパク質発現後の折りたたみ過程において、ジスルフィド結合形成を促進することで、誤ったジスルフィド結合形成を抑えている(表4)。

(d) **その他** アミノ酸を特定するコドンは、生物種において共通しているが、その使用頻度 (codon usage) は異なる。大腸菌とはcodon usageが異なる生物

表4. ジスルフィド結合を有するタンパク質の発現に用いられる大腸菌株

菌株名	遺伝子型
Origami <sup>TM</sup> 2 (DE3)	$\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII$ <i>phoR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> $F^+[lac^+ lac^f pro] \lambda(DE3) gor522::Tn10$ <i>trxB</i> (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )
Origami <sup>TM</sup> B (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ <i>gal dcm lacY1</i> <i>aphC</i> $\lambda(DE3) gor522::Tn10$ <i>trxB</i> (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )

いずれも  $\lambda(DE3)$ : *lacI, ind1 sam7 Anin5 lacUV5-T7geneI*

種由来のタンパク質を大腸菌で発現する場合、大腸菌でほとんど使用されないコドン（レアコドン）が多いと、翻訳効率は著しく低下し、ときには、短くなったタンパク質が発現する。Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) 株, Rosetta<sup>TM</sup> 2 (DE3) 株は、それぞれプラスミド pRARE, pRARE2 を有し、そうした大腸菌のレアコドンに対応する tRNA を供給することで、codon usage の違いによる発現への影響を抑えている。

大腸菌によるタンパク質発現に使用する T7 プロモーターは強力なプロモーターであり、その発現量は多い。しかし、過剰に発現することで、目的タンパク質の凝集を引き起こすことがある。Tuner<sup>TM</sup> (DE3) 株, Lemo21 (DE3) 株は、それぞれ異なる仕組みで、発現誘導剤の濃度依存的に目的タンパク質の発現量を調節することができる。以下に特徴のあるタンパク質発現用大腸菌株をまとめた(表5)<sup>5,6,10</sup>。

### 遺伝子型を調べるには

ここで紹介した大腸菌はいずれも市販されており、販売しているメーカーのカタログに遺伝子型、欠損している遺伝子について詳細に記載されているので参照されたい<sup>4-6,10</sup>。カタログに記載のない遺伝子（遺伝子型）を調べるには、以下の二つのデータベース、PEC<sup>13-15</sup> (Profiling of E.coli Chromosome), Ecocyc<sup>16,17</sup> (Ecocyc E. coli Database) を参照してほしい。

### 望みの遺伝子型を持つ大腸菌株を入手するには

市販の大腸菌以外にもさまざまな大腸菌株が存在している。研究を進める上で望ましい遺伝子型を持つ大腸菌は市販されているとは限らない。近年、ゲノム組換えやゲノム編集が容易になりつつあるが、それでもやはり望ましい遺伝子型を持つ大腸菌を自分で作製することは容易ではない。ではどうすればいいのだろうか。先代の研究者たちは、さまざまな遺伝子型を有する大腸菌の菌株をカルチャーコレクションとして収集してきた。国立遺

表5. タンパク質発現に用いられる特徴的な大腸菌株

菌株名	特徴
Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)/ Rosetta <sup>TM</sup> 2(DE3)	プラスミド pRARE, pRARE2 から大腸菌レアコドンに対応する tRNA を発現。大腸菌レアコドンを多数有する目的タンパク質遺伝子の発現に有効
Rosetta-gami <sup>TM</sup> 2(DE3)	プラスミド pRARE2 を有する Origami <sup>TM</sup> 2(DE3) 株
Rosetta-gami <sup>TM</sup> B(DE3)	プラスミド pRARE を有する Origami <sup>TM</sup> B(DE3) 株
Tuner <sup>TM</sup> (DE3)	$\beta$ -ガラクトシドパーミアーゼ LacY の欠損により、発現誘導剤 IPTG による濃度依存的なタンパク質発現が可能
Lemo21(DE3)	IPTG 添加による T7RNA ポリメラーゼの発現誘導と同時に、ラムノース添加による濃度依存的な T7 リゾチーム (T7RNA ポリメラーゼに結合し阻害する) の発現を誘導し、T7RNA ポリメラーゼの活性を調節することで、目的タンパク質遺伝子の転写量を調節することができる。
SHuffle <sup>®</sup>	細胞質内で正しいジスルフィド結合の形成促進とシャペロン活性を有するタンパク質をコードする遺伝子 <i>dsbC</i> を発現
BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3)	RNA 分解酵素 RNaseE を欠損した BL21(DE3) 株。目的タンパク質の mRNA の分解を抑制

伝学研究所では、生物資源としてそうしたコレクションを取りまとめ、研究者が必要とする大腸菌株を安価に分譲していただける<sup>18</sup>。他には、アメリカの Yale 大学の E. coli Genetic Stock Center も有名である<sup>19</sup>。また、世界最大の生物資源バンクである ATCC<sup>®</sup> (American Type Culture Collection) では、有償で大腸菌の菌株の分譲を行っている<sup>20</sup>。望みの遺伝子型を持つ大腸菌株を探している方は、まずはこうした大腸菌コレクションを当たってみてほしい。望みの遺伝子型を持つ菌株がないならば、その菌株を持つ研究者に分譲を依頼するか、自分で作製するしかない。

### 最後に

日頃、研究室で特に意識することなく使用している大腸菌の菌株の遺伝子型は研究を進める上で非常に重要である。大腸菌株の遺伝子型を理解し、実験目的に合った菌株を使用することで研究をスムーズに遂行することができる。これを機に、研究室で使っている大腸菌の遺伝子型を調べて、実験目的に適しているか確認してみようだろうか。

(補足) 代表的な遺伝子型について

表6. 代表的な遺伝子型の表記とその特徴<sup>2,16,17)</sup>

遺伝子型	特徴
<i>ara</i>	アラビノース代謝に必要な遺伝子を欠損しており、アラビノースを資化できない、 <i>ara</i> <sup>+</sup> 遺伝子を持つプラスミドの選択に利用可能。
<i>dam</i>	塩基配列 GATC の A (アデニン) のメチル化を行う DNA アデニンメチルトランスフェラーゼの欠損。このアデニンのメチル化のため切断できない制限酵素の利用が可能となる。
<i>dcm</i>	塩基配列 CC(A/T)GG の 2 番目の C (シトシン) のメチル化を行う DNA シトシンメチルトランスフェラーゼの欠損。このシトシンのメチル化のため切断できない制限酵素の利用が可能となる。
(DE3)	<i>lacUV5</i> プロモーター制御下の T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 ( <i>gene1</i> ) をコードした λDE ライソジェンをゲノムに保持。発現誘導剤 IPTG の添加により T7 RNA ポリメラーゼが発現する。pET システムを用いたタンパク質発現には必須である。
<i>e14</i> <sup>-</sup>	Mcr 制限能を欠損しており、 <i>mcrA</i> 株である。
<i>endA</i>	非特異的エンドヌクレアーゼ I 遺伝子を欠損している。プラスミドの調製に適している。
F'	F 因子を保有。ファージディスプレイ法で使用。
<i>hsdR</i>	<i>EcoK</i> 制限系の制限酵素を欠損。この大腸菌への DNA の導入はそのメチル化の有無に制限されないが、メチル化は受ける。( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> , <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>+</sup> )
<i>hsdS</i>	<i>EcoB</i> 制限系を完全に欠損。この大腸菌への DNA の導入は、そのメチル化の有無に制限されず、かつメチル化も受けない。( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> , <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> )
<i>lac</i> <sup>F</sup>	ラクトースリプレッサーの過剰発現株。過剰発現したラクトースリプレッサーがラクトースプロモーター領域のオペレーターに結合し、転写を抑制する。
Δ( <i>lac-proAB</i> )	(β-D-ガラクトシダーゼをコードする <i>lacZ</i> 遺伝子を含む) ラクトースオペロンから <i>proAB</i> 遺伝子までの領域を欠失している。
<i>lacY</i>	β-D-ガラクトシドパーミアラーゼの欠損。ラクトース類の取り込みが濃度依存的になり、IPTG による濃度依存的な発現誘導が可能となる。
<i>lacZ</i> ΔM15	N 末端の一部を欠損した β-D-ガラクトシダーゼ (ω フラグメント) をコードする遺伝子。N 末端部分のタンパク質 (α フラグメント) と共存させると複合体を形成し、β-D-ガラクトシダーゼの機能を相補 (α-相補) する。本酵素は X-gal を分解し青色を呈するため、ベクター DNA に外来 DNA がクローニングされたときに、コロニーの白色化やブランクの透明化で選抜が可能となる。
<i>lon</i>	誤って折り畳まれたタンパク質の分解に関わる Lon プロテアーゼの欠損。ある種のタンパク質の発現においてある程度分解を抑える。BL21 株等の <i>E. coli</i> B 株は <i>ompT</i> 遺伝子 (膜プロテアーゼ、下記) とともに <i>lon</i> 遺伝子を欠損している。
<i>mcrA</i>	Mcr 制限系に関わり、5-メチル化シトシンを認識する DNA 分解酵素。ある種のメチル化された DNA の導入を制限しない。
<i>mcrB</i>	Mcr 制限系に関わる酵素の欠損。ある種のメチル化された DNA の導入を制限しない。
Δ( <i>mcrC-mrr</i> )	<i>mcrC-mcrB-hsdS-hsdM-hsdR-mrr</i> の 6 つの制限系に関わる遺伝子を欠失。メチル化された DNA の導入を制限しない。

<i>mrr</i>	M <sup>6</sup> -メチル化アデニン、C <sup>5</sup> -メチル化シトシンを認識し、分解する酵素を欠損。メチル化された DNA の導入を制限しない。
<i>ompT</i>	外膜にあるタンパク質分解酵素を欠損。目的タンパク質の発現に際し、損傷の少ないタンパク質の精製が期待できる。 <i>E. coli</i> B 株は、 <i>lon</i> 遺伝子とともに <i>ompT</i> 遺伝子を欠損している。
<i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup>	プロリンの生合成に関与する遺伝子 <i>proAB</i> を有する。
<i>recA</i>	相同組換えに関与する酵素 RecA を欠損。プラスミドの調製に適している。
Su <sup>-</sup>	アンバー終止コドンを認識するサプレッサー tRNA を持たない。
<i>supE (glnV)</i>	グルタミル tRNA の変異により、アンバー終止コドン (UAG) にグルタミンを導入し、終止コドンをリードスルー (読み過ぎ) する。
<i>supF (tyrT)</i>	チロシル tRNA の変異により、アンバー終止コドン (UAG) にチロシンを導入し、終止コドンをリードスルー (読み過ぎ) する。
Tn5	カナマイシン耐性遺伝子をコードするトランスポゾンをも有する。カナマイシン耐性。
Tn10	テトラサイクリン耐性遺伝子をコードするトランスポゾンをも有する。テトラサイクリン耐性。
<i>traD</i>	F 因子の自己移送能力が著しく低下した変異をも有する。
-----	
(表現型に関する表記)	
Hte	形質転換効率が向上した表現型。サイズの大きなプラスミドの形質転換に適している。
Hee	エレクトロポレーション法による形質転換効率が向上した表現型。

文 献

- Demerec, M. *et al.*: *Genetics*, **54**, 61 (1966).
- 野島 博: 遺伝子工学—基礎から応用まで—, p. 70. 東京化学同人 (2013).
- Green, M. R. *et al.*: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012).
- アジレント・テクノロジーズ社: <http://www.chem-agilent.com/> (2016/01/16)
- Thermo Fisher Scientific 社: <https://www.thermofisher.com/> (2016/01/16)
- New England BioLabs 社: <http://www.nebj.jp/> (2016/01/16)
- 橋本義輝: 生物工学, **89**, 609 (2011).
- Yanisch-Perron, C. *et al.*: *Gene*, **33**, 103 (1985).
- Messing, J.: *Gene*, **100**, 3 (1991).
- Merck Millipore 社: <http://www.merckmillipore.com/> (2016/01/16)
- 東端啓貴: 生物工学, **91**, 96 (2013).
- Studier, F. W. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **189**, 113–130 (1986).
- Profiling of *E. coli* Chromosome: <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/> (2016/01/16)
- Hashimoto, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **55**, 137 (2005).
- Kato, J. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 132 (2007).
- EcoCyc *E. coli* Database: <http://ecocyc.org/> (2016/01/16)
- Keseler, I. M. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **41**, D605 (2013).
- 国立遺伝学研究所 ナショナルリソースプロジェクト (大腸菌): <http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/> (2016/01/16)
- Yale 大学 *E. coli* Genetic Stock Center: <http://cgsc.biology.yale.edu> (2016/01/16)
- ATCC®: <http://www.atcc.org> (2016/01/16)