

大腸菌における染色体挿入型ワンコピー発現系の応用

上垣 浩一^{1*}・中村 努¹・駒 大輔²・大本 貴士²

はじめに

新しいタンパク質を研究対象に選んだ時、最初に心配することはターゲットのタンパク質が可溶化状態で発現するか否かではないだろうか。現在、大腸菌でのタンパク質の高発現系のファーストチョイスはT7RNAポリメラーゼ/T7プロモーターを利用したpETシステムであろう。本システムはT7RNAポリメラーゼの強力な転写活性のおかげで、場合によれば培地1Lあたり数十ミリグラムのタンパク質を容易に得ることができる。しかしこの強力な転写活性が災いすることもある。pETシステムでタンパク質を発現すると封入体と呼ばれる凝集体を形成してしまうことを、多くの研究者は経験している。いったん封入体を形成すると非常に煩雑なりフォールディング操作が必要になることは、周知の通りである。

封入体を形成する原因の一つは一細胞あたり数十～数百コピー存在するプラスミドから一斉にタンパク質合成が開始された結果、溶解度を超えてしまう、あるいはタンパク質のフォールディングを手助けするシャペロンタンパク質のキャパシティを超えてしまうなどの原因が考えられている。タンパク質が封入体を形成してしまうと、解決策として、①発現誘導後の培養温度を低下させる、②誘導剤の濃度を低下させる、③*groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*などを発現するシャペロンベクターを利用する(chaperone plasmid, タカラバイオ社)、④低温誘導系のベクターに乗せ換える(pColdベクター, タカラバイオ社)、⑤可溶化タグとキメラ化して発現系を組む、などが考えられる。特に①～④は発現量をうまくコントロールし可溶化しようとする方法である。また、プラスミドのコピー数を制御した発現プラスミド(pSC101系プラスミド, およそ5コピー)なども考案されている。しかし、極端にコピー数が少ないプラスミドは調製が面倒である。そもそも発現ベクターの変更は時間のかかる煩雑な作業であり、できれば避けたい。これらの諸条件の検討を行っても効果はケースバイケースであり、必ずしも満足のいく結果は得られないことが多い。また大腸菌に代わる発現系(*in vitro*, 培養細胞, 酵母)も種々考案されているが、いずれの方法も一長一短があり、大腸

菌ほど広く利用されていない。

染色体からの発現法

上述したように封入体の回避法は種々提案されているが、本稿では発現コピー数のコントロールにフォーカスしたいので、T7RNAポリメラーゼ/T7プロモーターを利用しながら発現コピー数を制限できる染色体からのワンコピー発現方法の有効性について述べる。表1は現在用いられている発現方法を比較したものである。表1から分かるように、コピー数が500以上と言われるpUC系は言うに及ばず、比較的コピー数が少ないと言われているpET系ですら一菌体当たり20前後のコピー数を持っており、ワンコピー発現から見れば一桁以上強力な発現系であると考えられる。

従来、染色体への部位特異的遺伝子挿入はファージのアタッチメントサイトを利用する方法¹⁾がよく使われてきたが、筆者らは遺伝子破壊に利用されてきたRedシステム(Red-mediated recombination system)を利用した。Redシステムとは、バクテリオファージλが持つリコンビナーゼ(*gam*, *bet*, *exo*の三つの遺伝子)を利用することで染色体の任意の場所に目的遺伝子の挿入/置換を行う系である²⁻⁷⁾。このRedシステムでは、染色体と50塩基程度の相同な配列を前後に含む直鎖上のDNA断片(PCRフラグメント)を、バクテリオファージのリコンビナーゼ発現ベクターpKD46²⁾を持つ大腸菌に形質転換するだけでよい。このような簡便な利点を持つため、本法はKeioコレクションと呼ばれる大腸菌の一遺伝子ノックアウト変異体の作製にも利用された⁸⁾。挿入するPCRフラグメントにはカナマイシン耐性遺伝子が含まれており、遺伝子破壊株をカナマイシンで選択することが

表1. 大腸菌を利用した発現方法の比較

プラスミド発現		染色体発現
発現ベクターの種類		
pET系, pCold系	pUC系	—
一菌体当たりのコピー数		
15~20	500~700	1

* 著者紹介 (国研) 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門(研究グループ長) E-mail: k-uegaki@aist.go.jp

¹ (国研) 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門² (地独) 大阪産業技術研究所 森之宮センター 環境技術研究部

できる⁸⁾。筆者らは本システムを応用することでT7RNAポリメラーゼ/T7プロモーターを利用した*lacZ*遺伝子の発現系を大腸菌染色体に挿入できることを示し、また本方法を用いてシキミ酸経路を改変することに成功している^{9,10)}。さらに、プラスミド発現系では封入体を形成し

ていたタンパク質を、結晶構造解析に供するに十分な量で得ることに成功し、染色体ワンコピー発現が封入体回避に対しても有用であることを示した¹¹⁾。

本システムをタンパク質発現に利用するためには、図1に示すようにカナマイシン耐性遺伝子 (FRT-Km-FRTカセット) をpETベクターにクローニングしたプラスミド (FRT-pET21あるいはFRT-pET19) を準備しておき、このベクターに従来通り目的の遺伝子をクローニングすればよい⁹⁾。このカナマイシン耐性遺伝子はFRT配列という酵母の持つフリッパーゼタンパク質による認識配列にはさまれており、必要であればフリッパーゼを利用してカナマイシン耐性遺伝子を染色体から削除することができる¹²⁾。図1に染色体挿入法の手順を示す。

筆者らはこのシステムを超好熱性古細菌*Pyrococcus*属の持つ二糖脱アセチル化酵素の構造解析に適用した。本酵素はpET系発現ベクターではほとんど可溶性画分には発現が認められず、リフォールディング操作をして調製する必要があった。そのため、変性剤を使った封入体の可溶化、精製、希釈法を用いたリフォールディングと、かなりの労力が必要であった¹³⁾。そこでRedシステムを用いて、BL21 (DE3) のメチオニン代謝に関与している遺伝子*metA*と置換するように、外来遺伝子の挿入を行った。用いた挿入用プライマーと挿入確認用プライマーは表2に示す。また*metA*遺伝子を破壊することにより大腸菌はメチオニン要求性となり、結晶解析を行

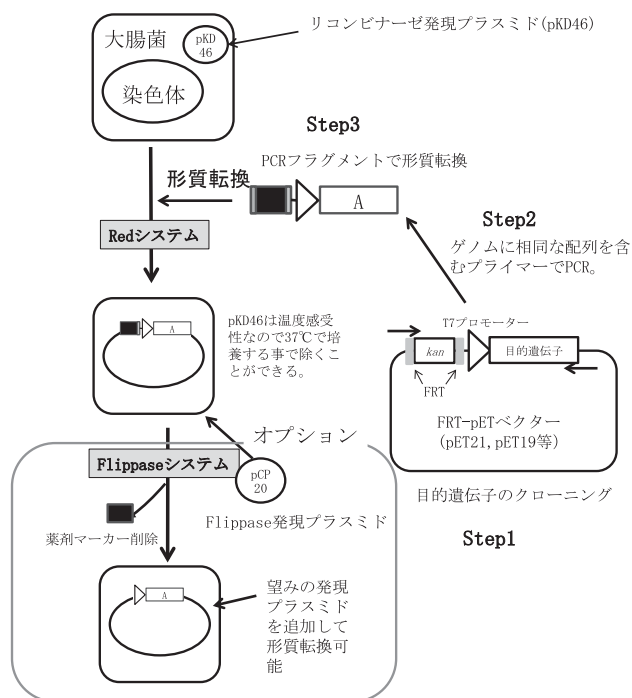


図1. Redシステムを用いた染色体への挿入スキーム

表2. BL21を宿主として用いる場合の挿入プライマーと挿入確認用プライマーおよびその塩基配列。太字・斜体はゲノムに相同な配列。下線はpETベクターに相同な配列。*FRT-pET21かFRT-pET19かで下線部の配列が違う。Km1, Km2はカナマイシン耐性遺伝子に相補な配列, U-*metA*は*metA*遺伝子上流約500 bpに、D-*metA*は*metA*遺伝子下流400 bpに相補な配列である。Km1 + U-*metA*の組合せでおよそ1 kbp, Km2 + D-*metA*の組合せで700 bp + 目的遺伝子のbp, のサイズのPCRフラグメントが得られる。

目的	名前	配列
metA siteへの挿入	Δ metA-F	5'-ATCTGGATGTCTAAACGTATAAGCGTATGTAGTGAGGTAATC AGGTTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'
	Δ metA-FRT-R (pET21)*	5'-ATCGCTTAACGATCGACTATCACAGAAGATTAATCCAGCGTT GGATTCATATTCGCCAATCCGGATATAG-3'
	Δ metA-FRT-R (pET19)*	5'-ATCGCTTAACGATCGACTATCACAGAAGATTAATCCAGCGTT GGATTCATGCGGGATATCCGGATATAG-3'
挿入確認用	Km1	5'CAGTCATAGCCGAATAGCCTC3'
	Km2	5'CGGTGCCCTGAATGAACTGC3'
	U- <i>metA</i>	5'GTTCCGGTGCCATCGAGAG3'
	D- <i>metA</i>	5'CGCTGCCAGAAGTTTATTGCG3'

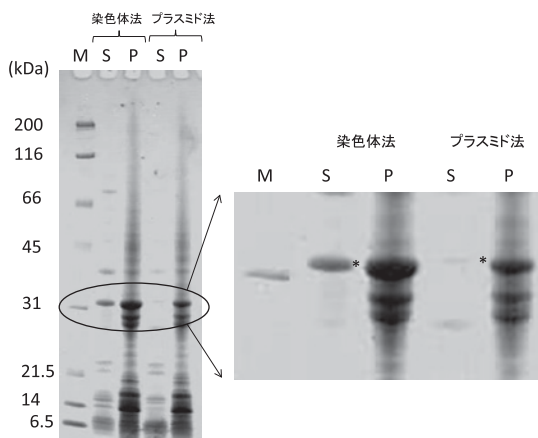


図2. 染色体発現法とプラスミド法の比較. 染色体発現法の方は約2倍のタンパク質量をロード. M: 分子量マーカー, S: 85°C, 30分加熱処理後の上清, P: 超音波破碎後の不溶性画分, *は目的の2糖脱アセチル化酵素を示す.

う際に必要なセレノメチオニンラベルが容易に行えるようになった。

発現誘導は定法通り、OD₆₆₀がおよそ0.5前後でIPTG（終濃度1 mM）を添加した。図2にプラスミド法と染色体発現法のSDS-PAGE/CBB染色による比較を示す。プラスミドではほとんど可溶性にみられなかったが染色体発現を行うことでSDS-PAGE/CBB染色で確認できるようになった。

定法通りキレートカラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを利用したカラムクロマトグラフィーを行い、可溶性状態でのタンパク質（40 mg/L培地）を得ることができ、結晶構造解析に成功した¹¹⁾。本方法のもう一つの利点は、プラスミドを持たないため菌体の増殖が速く誘導後も菌の増殖が見られることで、最終的に得られる菌体数はプラスミド法の約2倍に達した。これは他の複数のタンパク質発現でも経験している。しかし留意すべきは、染色体発現でも依然としてかなりの封入体が形成されている点である。上述したようにpET系ベクターのコピー数から予想する発現量は一桁少ないはずであるが、それでもかなりの発現が見られる。すなわち大量に発現し封入体を形成するタンパク質の場合、T7系を利用する限り、たとえワンコピーからの発現レベルでも発現しすぎていると考えられる。では実際にpET系のプラスミド発現と染色体ワンコピー発現では、どのくらい発現量の差があるのだろうか。筆者らはβガラクトシダーゼの活性、あるいはGFPの発現量をプラスミド発現と比較した。その結果、染色体ワンコピー発現ではおよそ1/8量と見積もることができた。pET系ベクターのコピー数を考えると想定（1/20～1/15）よりも多く

発現していた。そこで、P1トランスダクションを利用して複数の遺伝子を染色体に導入する方法⁹⁾により遺伝子コピー数とタンパク質発現量の関係を調べたところ、6～8コピー辺りでプラトーに達することがわかった（未発表）。これは、pET系ベクターでもコピー数は十分飽和していることを意味している。したがって、封入体を大量に形成する場合、コピー数ではなくプロモーターの選択など、転写活性のコントロールが必要と思われる。さらに細胞内のコピー数が極端に少ないといわれるpSC101系プラスミド（～5コピー）でも場合によっては過剰発現してしまう恐れがある。またコピー数と発現量の関係からT7系を利用する限りpET系プラスミドで十分コピー数は足りているようなので、発現量を増やそうとやみくもにコピー数が多いベクターを探索するより、発現条件を丹念に最適化した方がよいであろう。

染色体発現の有用性

Redシステムを用いた染色体からの発現系は、FRT-Km-FRTカセットを挿入した発現プラスミドから簡単に構築できる（図1）。したがって、プラスミド発現を試したうえで、封入体を形成する場合にはただちに染色体発現に移行することができる。本方法は本質的にT7RNAポリメラーゼ/T7プロモーターの発現系であり、今まで通りの封入体の回避法、たとえば低温培養、IPTG濃度の最適化、シャペロンベクターの共発現などと組み合わせることが可能である。もちろんpET発現シリーズとして販売されている融合発現系に簡単に拡張できる。さらに他の修飾酵素を共発現させたい場合もpETシステムのプラスミドとの共存が可能である。また本稿で示したように普段使っている大腸菌にアミノ酸要求性を付与しながらタンパク質発現を行うことが可能となるので、たとえばNMRを用いた構造機能解析の際のアミノ酸特異的ラベルにも利用できる利点もある。

今後の展望

Redシステムを利用した染色体発現法は、簡便でかつタンパク質の可溶性発現に有効な場合がある。もちろん本方法でもまったくダメな場合もあるが、筆者らのグループではすでに複数種類の異種タンパク質で可溶性発現に成功している。うまくいくかどうかの見極めに関しては、プラスミド発現を行ったときに少しでも可溶性画分に発現が見られる場合、成功する確率が高いように思われる。本方法の拡張として、P1トランスダクションと組み合わせる複数遺伝子の発現系を一つの大腸菌で実現することができる⁹⁾。この方法を利用することでヘテ

ロオリゴマータンパク質の発現系の構築, あるいは複数シャペロンの同時発現大腸菌の作製なども可能となる。現在, 研究を進展させているので近いうちに報告したい。

最後に, 染色体挿入に用いるプライマーはKeioコレクションを作製した際に用いたプライマーがリスト化(文献8のSupplementary MaterialのTable 2)⁸⁾されているので, それを入手し参考にするのが簡便である。ただし大腸菌K12株とBL21株はわずかであるが塩基配列が異なっているので実験を行う際は注意してほしい。またpKD46, pCP20はYale大学のColi Genetic Stock Center(CGSC)から入手可能である。

文 献

- 1) Haldimann, A. and Wanner, B. L.: *J. Bacteriol.*, **183**, 6384 (2001).
- 2) Datsenko, K. A. and Wanner, B. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6640 (2000).
- 3) Murphy, K. C.: *EcoSal Plus*, **7**(1) (2016).
- 4) Murphy, K. C. *et al.*: *Gene*, **246**, 321 (2000).
- 5) Tischer, B. K. *et al.*: *Biotechniques*, **40**, 191 (2006).
- 6) Yu, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5978 (2000).
- 7) Yu, D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7207 (2003).
- 8) Baba, T. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **2**, 2006.0008 (2006).
- 9) Koma, D. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 815 (2012).
- 10) Koma, D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 6203 (2012).
- 11) Mine, S. *et al.*: *FEBS J.*, **281**, 2584 (2014).
- 12) Posfai, G. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2392 (1994).
- 13) Mine, S. *et al.*: *Protein Expr. Purif.*, **84**, 265 (2012).