

製品コード 3340

研究用

Takara

Chaperone Plasmid Set
(シャペロンプラスミドセット)

説明書

v202012Da

ポストゲノムの課題として、タンパク質がクローズアップされてきており、タンパク質の構造解析・機能解析が重要視されています。タンパク質の構造・機能解析のためには目的のタンパク質を組換え体として大量に発現させることが不可欠であり、現在様々なタンパク質発現系が開発されています。なかでも、大腸菌による発現は最も簡単で発現系も豊富なため、よく用いられています。しかしながら、大腸菌で異種タンパク質を発現させた場合、発現タンパク質がインクルージョンボディを形成したり、プロテアーゼによる分解を受けたりするケースがしばしば見られます。これは、発現タンパク質が、正しく折りたたまれないことが原因である場合が多く、タンパク質機能研究の大きな障害でした。タンパク質の折りたたみには、それを介助する分子シャペロンの存在が知られており、*in vivo*でのタンパク質の折りたたみの規序を解明するため、多くの研究がなされています。なかでも株式会社 HSP 研究所は、シャペロン研究分野で多くの業績を残しています。本セットに含まれる5種類のプラスミドは株式会社 HSP 研究所で開発されたものであり、タンパク質の折りたたみに共同して働いていることが知られている複数の分子シャペロンが、それぞれ一つのプラスミド上にコードされ、シャペロンチームとして効率良く発現するように設計されています。これらのシャペロンチームのいずれかと、目的タンパク質を共発現することにより、従来インクルージョンボディを形成していたタンパク質の可溶性画分への回収効率を高めることが報告されています(図1参照)。

I. 内容

1. Plasmid pG-KJE8	10 ng/ μ l	100 μ l
2. Plasmid pGro7	10 ng/ μ l	100 μ l
3. Plasmid pKJE7	10 ng/ μ l	100 μ l
4. Plasmid pG-Tf2	10 ng/ μ l	100 μ l
5. Plasmid pTf16	10 ng/ μ l	100 μ l

表1. 各プラスミドにコードされるシャペロンチーム (マップは5ページ参照)

No.	Plasmid	Chaperone	Promoter	Inducer	Resistant Marker	References
1	pG-KJE8	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm	4, 5
2	pGro7	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	4
3	pKJE7	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	4
4	pG-Tf2	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>Pzt-1</i>	Tetracyclin	Cm	5
5	pTf16	<i>tig</i>	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm	5

<利用できる大腸菌発現系>

本シャペロンプラスミドは pACYC の複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm^r 遺伝子) を利用しているため、最もよく利用されている ColE1 タイプのアンピシリン耐性遺伝子をマーカーとした大腸菌発現系に共存させて使用できます。各シャペロン遺伝子は *araB* あるいは *Pzt-1* (tet) プロモーター下流に配置されており、目的遺伝子を *lac* など他のプロモーターのコントロール下におけば、目的タンパク質とシャペロンを別々に誘導することが可能です。各プロモーターに必要なコンポーネント (*araC* あるいは *tetR*) はプラスミド上に配置されています。ただし、クロラムフェニコール耐性を示す大腸菌を宿主とすることやクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む発現プラスミドとの組み合わせでは利用できません。例えば、pET システムなどで用いられる *E. coli* BL21 (DE3) は宿主として選択可能ですが、Cm^r 遺伝子が挿入されており、pACYC の複製起点を持つ pLysS や pLysE を保持する *E. coli* BL21 (DE3) pLysS、*E. coli* BL21 (DE3) pLysE などは利用できません。その他、使用可能な宿主としては、*E. coli* JM109 などがあります。

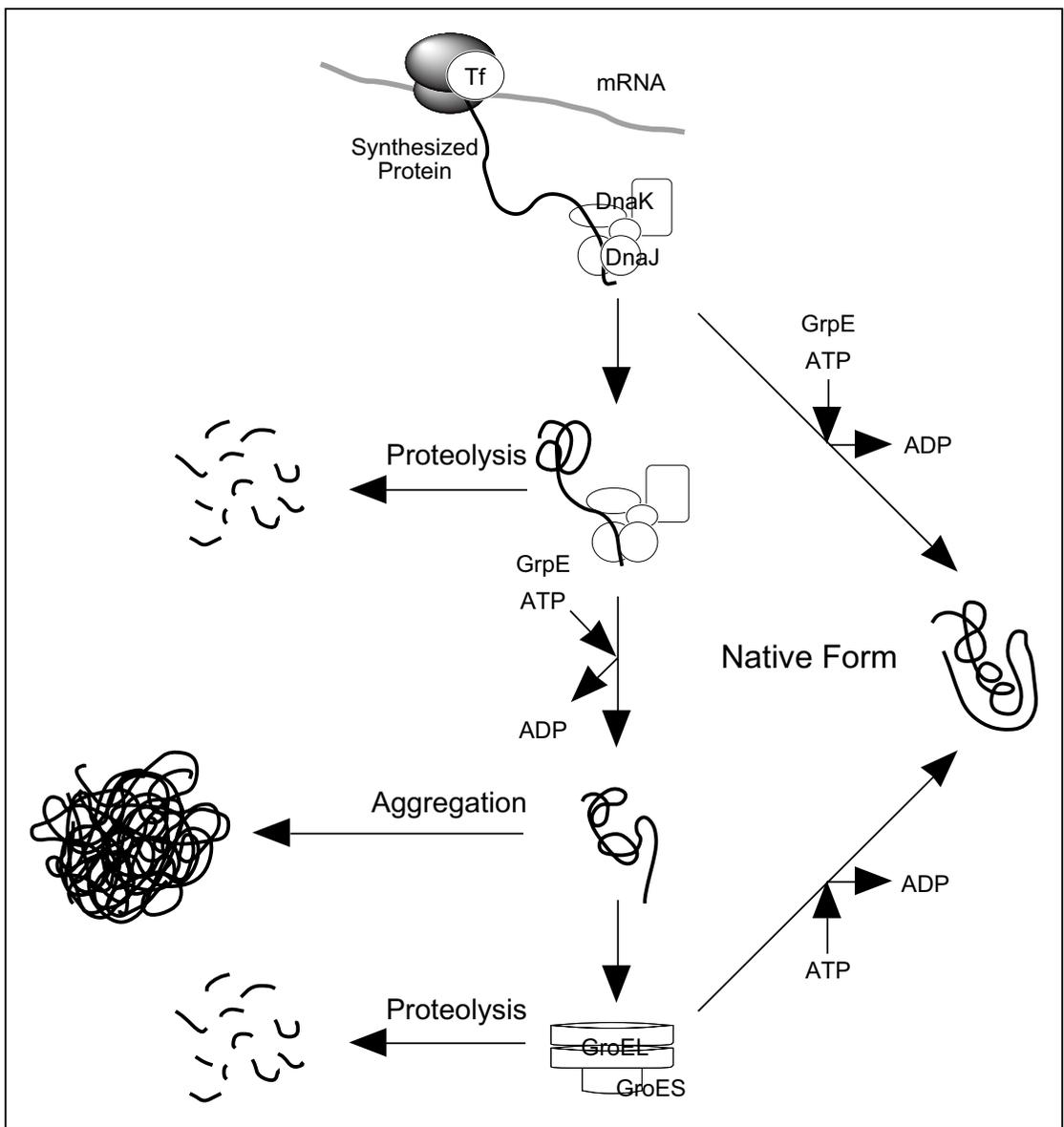


図1. *in vivo* タンパク質合成系におけるシャペロンのはたらき (文献1より)

II. 保存

– 20℃

※ 適切に保存し、受取り後2年を目途にご使用ください。

III. 使用方法

< シャペロン共発現 >

有効なシャペロンの種類や培養条件（培地、培養温度、エアレーション条件、誘導のタイミング、誘導剤の濃度、誘導時間など）は目的タンパク質により異なっています。以下に一般的な使用例を示しますが、目的タンパク質に応じて至適条件を検討されることをお勧めします。

1. 共発現系の構築

目的タンパク質とシャペロンの共発現系の構築は、まずシャペロンプラスミドで形質転換した大腸菌を作製し、その後、目的タンパク質の発現プラスミドで形質転換する2段階の方法が効果的です。

なお、シャペロンプラスミドと目的タンパク質の発現プラスミドを同時に形質転換する1段階法や、発現プラスミドで形質転換した後にシャペロンプラスミドで形質転換する2段階法は、経験的に形質転換効率が非常に低くなるため、お勧めできません。

- (1) 大腸菌発現用の、目的タンパク質の発現プラスミドを構築する。
- (2) 発現用の宿主大腸菌を培養し、常法に従ってコンピテントセルを調製する（あるいは市販のコンピテントセルを用いても良い）。
- (3) (2) で調製したコンピテントセルを本キットのプラスミドのいずれかで形質転換し、クロラムフェニコール (20 µg/ml) を含む選択培地プレート上で形質転換体を選択する。（プラスミド使用量は、1回の形質転換あたり1 µlが目安）
- (4) シャペロンプラスミドの形質転換体をクロラムフェニコール (20 µg/ml) を含む液体培地で培養し、常法に従いコンピテントセルを調製する。
- (5) (4) で調製したコンピテントセルを目的タンパク質の発現プラスミドにより再度形質転換し、クロラムフェニコール (20 µg/ml) と発現プラスミド選択用の薬剤を含む選択プレート上で生育する形質転換体を選択する。

2. 共発現実験

以下に、*lac* プロモーターの下流に目的遺伝子を挿入した pUC 系プラスミド（アンピシリン耐性マーカー）と本キットのシャペロン共発現の実験例を示します。さらに詳細な培養条件については文献を参考に、条件検討を行ってください。

- (1) 共発現大腸菌を、プラスミド選択用に 20 µg/ml クロラムフェニコールと 50 µg/ml アンピシリン、およびシャペロン発現誘導用に 0.5 ~ 4 mg/ml L-アラビノースおよび（あるいは）1 ~ 10 ng/ml テトラサイクリン*を含む L 培地に接種し、30 ~ 37℃で培養する。pG-KJE8 の場合は L-アラビノースとテトラサイクリンの両方、pGro7、pKJE7、pTf16 の場合は L-アラビノースのみ、pG-Tf2 の場合はテトラサイクリンのみを使用する。
低濃度のテトラサイクリンは、大腸菌の生育に大きな影響は与えません。
- (2) 培養液の OD₆₀₀ が 0.4 ~ 0.6 となった時点で、終濃度 0.1 ~ 1 mM となるように IPTG を添加し、さらに 30 ~ 37℃にて 1 ~ 4 時間培養する。
- (3) 培養終了後、SDS-PAGE や活性測定などにより目的産物の発現量や可溶化量を測定し、培養条件（培地、培養温度、エアレーション条件、誘導のタイミング、誘導剤の濃度、誘導時間など）の至適化を検討する。

*：まずは 0.5 mg/ml L-アラビノース、5 ng/ml テトラサイクリンでお試ください。

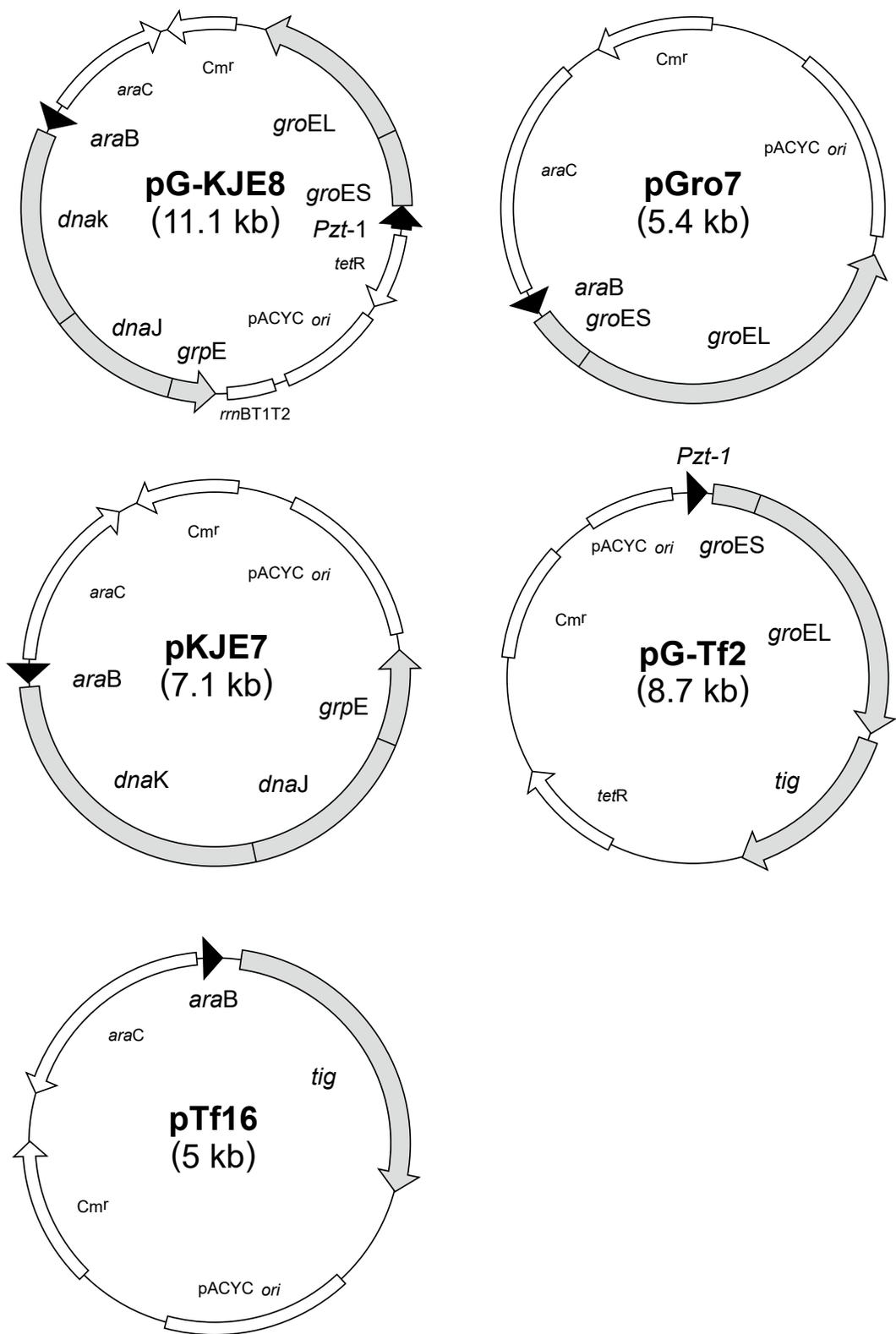


図2. プラスミドベクター

IV. Q & A

Q1. 発現するシャペロンタンパク質のサイズは？

A1. GroEL (約 60 kDa)、GroES (約 10 kDa)、DnaK (約 70 kDa)、DnaJ (約 40 kDa)、Tf (約 56 kDa)、GrpE (約 22 kDa) です。ただし、これらの数字は文献上の数値で実際の泳動では違って見えることがあります。GrpE は電気泳動では 29 kDa のマーカーより上にバンドが確認されます。

Q2. 発現タンパク質を精製したいが？

A2. 発現タンパク質の精製には、His タグなどを利用したアフィニティー精製が便利です。GST タグを利用して精製した場合に、稀に精製後の SDS-PAGE でシャペロンタンパク質のバンドが見られることがあります。これは、シャペロンタンパク質が目的タンパク質を介して、あるいは非特異な吸着でグルタチオン樹脂に残ってきたものであると考えられています。

このような場合、下記のような方法で改善できたという報告があります。

- ・イオン交換樹脂で分離する。[*Proc Natl Acad Sci USA*. (1995) **92**: 1048]
- ・ATP-Agarose 担体で分離する。[*J Biol Chem*. (1984) **259**: 8820]
- ・融合タンパク質を吸着させた樹脂を 3 mM Mg-ATP を含むバッファーで洗浄する。
- ・融合タンパク質を吸着させた樹脂を 10 mM Mg-ATP、5 mg/ml casein を含むバッファー中、室温で数十分間保温する。

His タグを用いた場合には上記のような現象は起こっておりません。

発現タンパク質の精製には His タグを用いた精製をお勧めします。

V. 参考文献

[総説]

- 1) Thomas, J. G., *et al.* Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl Biochem Biotech.* (1997) **66**: 197-238.
- 2) 柳、西原 組換えタンパク質の発現に困ったら… — シャペロン機能の強化とタンパク質分解活性の抑制 バイオサイエンスとインダストリー (1999) **57**: 38-39.
- 3) 西原 大腸菌における外来蛋白質発現系の改善を目指して — 分子シャペロン発現ベクター・プロテアーゼ多重変異の利用 化学と生物 (1999) **37**: 151-153.

[シャペロンを共発現させた組換えタンパク質の可溶性発現]

- 4) Nishihara, K., *et al.* Chaperone Coexpression Plasmids: Differential and Synergistic Roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in Assisting Folding of an Allergen of Japanese Cedar Pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* (1998) **64**: 1694-1699.
- 5) Nishihara, K., *et al.* Overexpression of Trigger Factor Prevents Aggregation of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* (2000) **66**: 884-889.

[コンピテントセルの調製法と形質転換]

- 6) D. M. GLOVER, B. D. HAMES 共編 加藤郁之進 監訳 「DNA クローニング 1」— 基本技術 — 第一章 大腸菌形質転換技術 (1997) p1-35
- 7) 藤本明子 実験医学別冊バイオマニュアルアップシリーズ「遺伝子工学の基礎技術」(1993) p93-102

VI. 関連製品

[コールドショック発現ベクターシリーズ]
pCold™ Vector Set (製品コード 3360)
pCold™ I DNA (製品コード 3361)
pCold™ II DNA (製品コード 3362)
pCold™ III DNA (製品コード 3363)
pCold™ IV DNA (製品コード 3364)
pCold™ TF DNA (製品コード 3365)
pCold™ ProS2 DNA (製品コード 3371)
pCold™ GST DNA (製品コード 3372)

[シャペロンコンピテントセルシリーズ] *
Chaperone Competent Cells BL21 Set (製品コード 9120)
Chaperone Competent Cells pG-KJE8/BL21 (製品コード 9121)
Chaperone Competent Cells pGro7/BL21 (製品コード 9122)
Chaperone Competent Cells pKJE7/BL21 (製品コード 9123)
Chaperone Competent Cells pG-Tf2/BL21 (製品コード 9124)
Chaperone Competent Cells pTf16/BL21 (製品コード 9125)
TaKaRa Competent Cells BL21 (製品コード 9126)

* : シャペロンプラスミドを含む BL21 株から調製したコンピテントセルです。特にコールドショック発現ベクター pCold DNA シリーズ (製品コード 3360 ~ 3364) との組合せで高い効果が期待できます。なお、宿主に用いている BL21 株は T7 RNA Polymerase を発現していないため、pET システムなどの T7 プロモーターを利用した発現系には使用できません。

VII. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ pCold はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

本製品のうち、Chaperone Plasmid pG-KJE8, pGro7, pKJE7, pTf16 には *Salmonella typhimurium* 由来の *araB* プロモーターおよび *araC* 遺伝子が含まれます。これらのプラスミドで大腸菌を形質転換すると、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」の遺伝子組換え生物等に該当します。ご使用の際は、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成 16 年文科省・環境省令第 1 号) および組織内の安全委員会の指示に従って行ってください。

本製品は研究目的にのみ使用が許可されています。スクリーニングや生産など商用目的での使用にあたっては、ライセンス付のベクター製品をご購入ください。この製品については弊社までお問い合わせください。また本製品を許可無く改変したり、プラスミド調製のために使用することは禁じられています。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社