

# コールドショック発現系と シャペロンプラスミドの併用効果

今年5月から販売を開始したpColdベクターシリーズ( Code 3360 ~ 3364 )は、大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモーターを利用した新しいタンパク質発現系です。目的タンパク質の発現量は、最大で菌体タンパク質の60%、新生タンパク質の90%に達します。

従来から汎用されているT7発現系では発現できなかったタンパク質、あるいは発現しても可溶化が難しいタンパク質でも、コールドショック発現系を用いることで、発現が可能となる場合や可溶化率が向上する場合がございます。

しかし、目的タンパク質によっては、pColdベクターを用いても十分な発現や可溶化が困難な場合があります。そのような際には、是非、Chaperone Plasmid Set( Code 3340 )との併用をお試しください。

今回は、pColdベクターとシャペロンプラスミドの共発現により、目的タンパク質の発現および可溶化率が著しく改善した例をご紹介します。

## コールドショック発現ベクター

コールドショック発現ベクターpCold I~IV DNA は、いずれも *ColE1* の複製起点とアンピシリン耐性遺伝子をもつベクターです( BIO VIEW 45号参照)。

今回の実験に使用したpCold I DNA は、*cspA* プロモーターの下流に *lac* operator、5' 非翻訳領域、translation enhancing element (TEE)、His・Tag 配列、Factor Xa 切断配列およびマルチクローニングサイトが配置されています( 図1)。

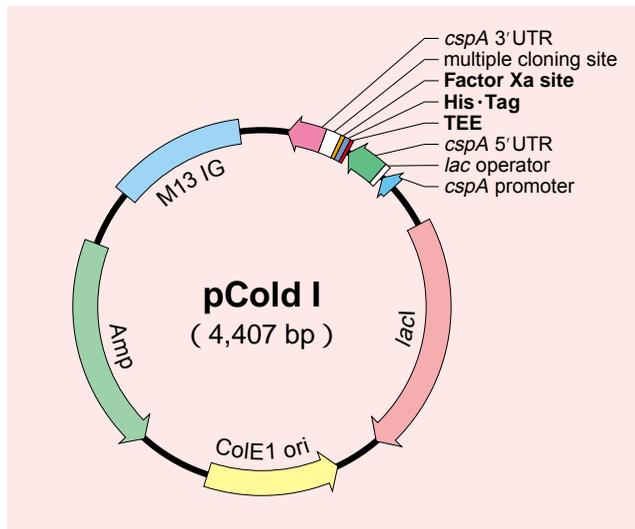


図1 コールドショックベクターの概略図

## シャペロンプラスミドセット

シャペロンプラスミドセットは、タンパク質の折りたたみ(folding)に協同して働くことが知られている大腸菌の分子シャペロンを、組み合わせの異なるシャペロンチームとして発現するように構築した5種類のプラスミドのセットです( 図2)。

pACYCの複製起点とクロラムフェニコール耐性遺伝子を利用していますので、大腸菌内でpColdベクターとの共存が可能であり、シャペロンチームの共発現により、目的タンパク質の発現量や可溶化率の向上が期待できます( BIO VIEW 40号参照)。

今回の実験に使用したシャペロンプラスミドpG-Tf2は、*tig* 配列、*groES* および *groEL* がシャペロンチームとして働くように構築されており、シャペロンチームの発現は *Pzt1* プロモーター(テトラサイクリンで誘導)で制御されています。

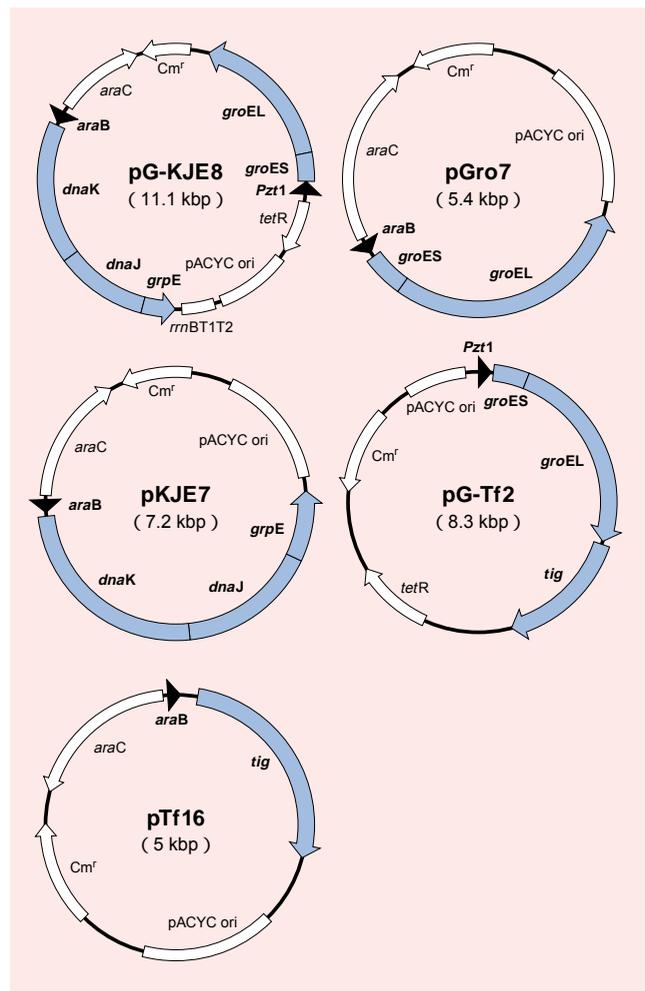


図2 シャペロンプラスミドの概略図

### pCold I DNA と pG-Tf2 との共発現による目的タンパク質の発現方法

大腸菌宿主として BL21 株を用い、下記の手順で共発現実験を行いました。

#### 1. 共発現系の構築

- ① シャペロンプラスミド pG-Tf2 で BL 21 Competent Cells (Code NV472) を形質転換する (クロラムフェニコールで選択)。
- ② 形質転換体 (BL 21/pG-Tf2) を液体培養し、コンピテントセルを調製する。
- ③ 目的遺伝子を挿入した pCold I DNA で BL 21/pG-Tf2 株を形質転換する (クロラムフェニコールとアンピシリンで選択)。
- ④ 共発現大腸菌を得る。

#### 2. 共発現実験

- ① pCold I DNA と pG-Tf2 の共発現大腸菌を、プラスミド選択薬剤 (クロラムフェニコールとアンピシリン) およびシャペロン発現用薬剤 (1 ng/ml テトラサイクリン) を含む L 培地で、37°C で培養する。
- ② OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5 付近で、培養液を 15°C に冷却し、30 分間放置する。
- ③ 培養液に 0.5 mM IPTG を添加し、15°C でさらに 24 時間振とう培養する。
- ④ 集菌、破碎し、SDS-PAGE により、全タンパク質画分、可溶性画分における目的タンパク質の発現量を確認する。

なお、比較のために行った pCold I DNA のみでの発現実験では、目的遺伝子を含む pCold I DNA で形質転換した BL 21 株を、アンピシリンを含む L 培地で OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5 付近まで培養し、培養液を 15°C で 30 分間放置後、培養液に 0.5 mM IPTG を添加してさらに 15°C で 24 時間振とう培養した。

#### 実験例 1 : 可溶化促進の例

ヒト遺伝子 A (推定分子量 70 kDa) は、pCold I DNA 単独の発現系ではほとんどすべてが不溶性発現となりましたが、シャペロンプラスミド pG-Tf2 を共発現させた系では、可溶性画分の発現量が顕著に増加しました (図 3)。

#### 実験例 2 : 発現・可溶化の成功例

ヒト遺伝子 B (推定分子量 24 kDa) は、pCold I DNA 単独の発現系ではほとんど発現が認められませんでした。シャペロンプラスミド pG-Tf2 との共発現を行うことで、目的タンパク質の発現が確認されただけでなく、そのほとんどが可溶化していました (図 4)。

#### まとめ

今回ご紹介した実験例以外にも、コールドショック発現ベクターとシャペロンプラスミドセットを併用することで、目的タンパク質の発現量、可溶化率が著しく改善するケースがしばしば見られています。もし、発現させたいタンパク質が pCold ベクターを用いても十分な発現、可溶化に至らない場合には、是

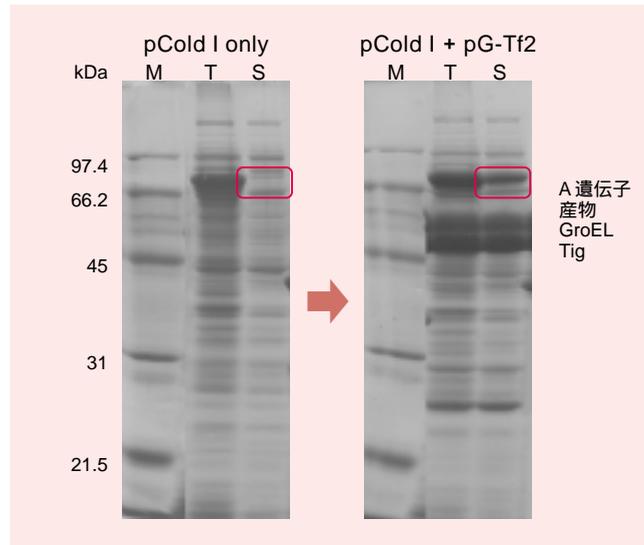


図 3 pG-Tf2 による可溶化促進の例

M : マーカー ; T : total ; S : soluble

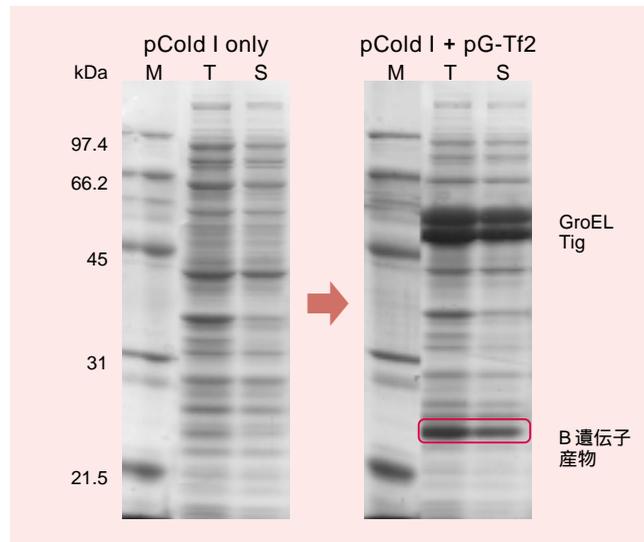


図 4 発現・可溶化の成功例

M : マーカー ; T : total ; S : soluble

非一度、シャペロンプラスミドとの共発現をお試ください。また、ここではデータは示しませんが、pCold ベクターを用いる発現系はシャペロンプラスミドセットの中の tig 配列を含むシャペロンチームとの共発現でより良い結果になる傾向が見られます。pCold ベクターと併用する場合には、pG-Tf2 または pTf16 との共発現から検討を始めることをお勧めします。

なお、タカラバイオでは、各シャペロンプラスミドを含む大腸菌 BL21 株のコンピテントセルの発売を予定しています。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 44 ページをご覧ください。[6][7] なお、pCold ベクターシリーズは、ご購入に際してライセンス同意書が必要です (詳細は弊社ホームページをご覧ください)。

#### 関連製品

- pCold I DNA Code 3361 ¥53,000
- pCold Vector Set Code 3360 ¥110,000
- Chaperone Plasmid Set Code 3340 ¥22,000