

# 可溶性タンパク質の発現を強力に促進!!

## コールドショック発現ベクター pCold TF DNA

製品コード 3365 25 µg ¥96,000

コールドショック発現とシャペロン共発現の知見を応用した新しい大腸菌コールドショック発現ベクター。トリガーファクターを可溶性タグとする可溶性発現の強力なツール。

大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモーターと 5' UTR 配列を利用したコールドショック発現ベクター (pCold DNA シリーズ) は、従来の大腸菌発現ベクターと比較して、可溶化率や可溶性発現を向上させることができ<sup>1)</sup>、シャペロンプラスミドとの併用によりその効果はさらに高まります。純度の高い目的タンパク質を得ることも可能で、機能解析、構造解析をはじめとするタンパク質研究の重要なツールとして皆様にご利用いただいています。

このたび弊社では、コールドショック発現ベクターならびにシャペロン共発現の知見をもとに、大腸菌シャペロンの 1 種であるトリガーファクター (trigger factor : TF) を可溶性タグとする融合型発現ベクター (pCold TF DNA) を新たに開発しました。不溶化でお困りの方は、ぜひ一度お試しください。

### 本製品の概要と特長

#### (1) 可溶化率が大幅にアップ

細胞内でタンパク質のフォールディングや可溶化を促進するトリガーファクター (TF) を N 末端側に融合発現させることで、目的タンパク質が効率よく発現し、可溶性度も増大します。さらに、シャペロン機能とコールドショック発現システムとの相乗効果により可溶化率が大幅にアップします。

#### (2) 精製が簡単

発現タンパク質は N 末端側に His タグ配列を有しており、融合タンパク質を Ni アフィニティークロマトグラフィーで容易に、効率よく回収、精製できます。

#### (3) タグ配列除去も容易

3 種類のプロテアーゼ (Factor Xa、Thrombin、HRV 3C protease) が認識するアミノ酸配列をタンデムに導入しており、発現後の融合タンパク質から TF 部分を確実に切断、除去することができます。

### 【可溶化率と可溶性度】

可溶化率：複数遺伝子で発現テストを行って、可溶性タンパク質が得られた確率を表し、以下で定義されます。

$$\frac{\text{可溶性となった遺伝子数}}{\text{遺伝子数}}$$

可溶性度：個々の遺伝子で可溶性として発現されるタンパク質の割合を表し、以下で定義されます。

$$\frac{\text{可溶性のタンパク質総量}}{\text{目的のタンパク質総量}}$$

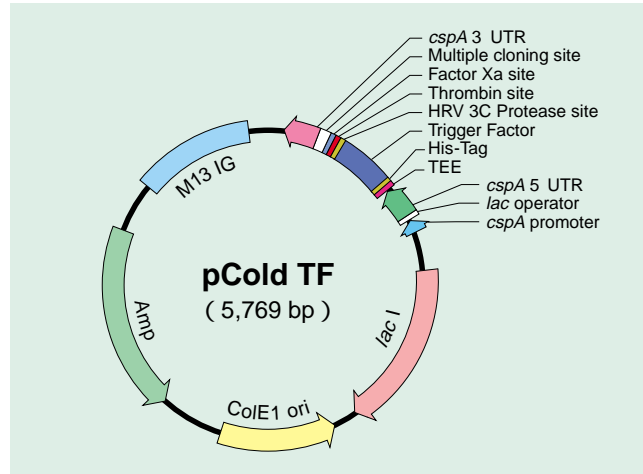


図1 コールドショックベクターの概略図

TF は分子量 48 kDa のタンパク質でリボソームに会合して存在し、タンパク質の翻訳と共役しながら (co-translationally) 新生ポリペプチドのフォールディングを促進すると考えられています<sup>2)</sup>。

TF を組み込んだ pCold TF DNA に目的タンパク質をコードする遺伝子を挿入し、TF との融合タンパク質として発現させることで、発現や可溶化が困難なタンパク質でも発現量、可溶性度が著しく増大します。

pCold TF DNA は従来のコールドショック発現ベクターの特長も有しています。大腸菌コールドショック遺伝子の一つである *cspA* 遺伝子のプロモーターの下流には、5' 非翻訳領域 (5' UTR) と translation enhancing element (TEE) が配置されています。TEE 配列は翻訳を促進する作用を有します。また、プロモーターの下流には発現を厳密に制御するための *lac operator* が挿入されています。大腸菌に由来する *cspA* プロモーターにより転写されるのでほとんどすべての大腸菌株を発現用宿主として利用できるという利点もあります。

pCold TF DNA を利用することでコールドショック発現ベクターの高効率なタンパク質発現能と TF のシャペロン機能により、これまで発現が困難であった遺伝子を可溶性タンパク質として発現させることも可能となります。

### 目的タンパク質の発現方法

目的タンパク質をコードする遺伝子を pCold TF DNA に挿入して発現用プラスミドを作製する

発現用プラスミドで宿主大腸菌を形質転換する

アンピシリンを含む培地に形質転換体を植菌し、37 °C で培養する

OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.5 付近で、培養液を 15 ℃ に冷却し、30 分間放置する

培養液に IPTG を加え、15 ℃ でさらに 24 時間振とう培養する

SDS-PAGE により目的タンパク質の有無、発現量や可溶性度を確認する

### 実施例

pCold TF DNA を用いた発現系を、pCold I DNA 単独発現系およびトリガーファクターを発現するシャペロンプラスミド pTf16 と pCold I DNA のシャペロン共発現系、あるいは T7 プロモーター発現系(他の可溶性タグとの融合発現例を含む)と比較しました。コールドショック発現には、発現用宿主として BL21 を使用しました。T7 プロモーター発現は、発現宿主として BL21(DE3) を用い、常法通り IPTG を添加後 37 ℃ で培養することにより行いました。

#### (1) 発現が可能となった遺伝子の例

ここでは、発現の難しい酵素タンパク質 A (推定分子量 31 kDa) を用いて検討を行いました。pCold I DNA (単独発現、シャペロン共発現) を用いた場合、および T7 プロモーターを用いた発現系では、目的タンパク質の推定分子量 31 kDa 付近には明確なバンドは認められませんでした。一方で、pCold TF DNA を用いた場合にのみ、目的タンパク質の発現が確認され、その大部分は可溶性となりました(図 2)。このことから、発現の難しいタンパク質でも pCold TF DNA を使用すれば、容易にタンパク質発現できることが示唆されます。なお、この酵素タンパク質 A は、融合タンパク質のままでも酵素活性があることを確認しています。

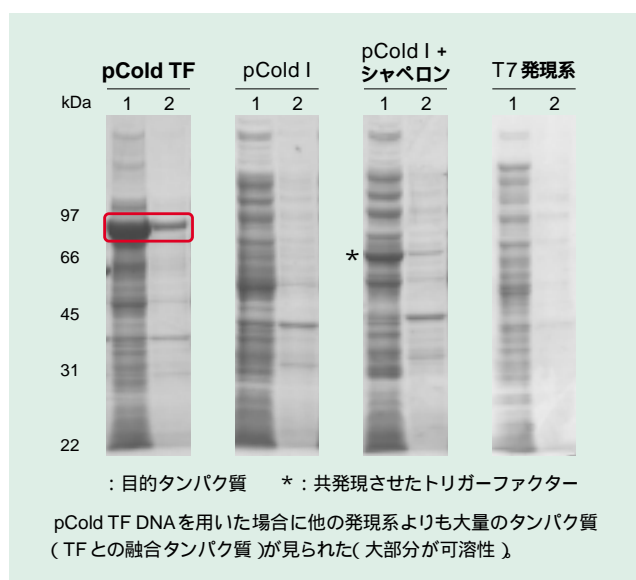


図 2 酵素タンパク質 A の発現

レーン 1 : 可溶性画分 ; 2 : 不溶性画分

#### (2) 可溶性発現量が増大した遺伝子の例

ここでは、可溶化しにくいタンパク質発現の例として、酵素タンパク質 B (推定分子量 63 kDa) を用いて検討しました。

酵素タンパク質 B は、可溶性タグとして知られる Trx タグ (約 12 kDa)、Nus タグ (約 55 kDa)、GST タグ (約 26 kDa) をそれぞれ融合発現する T7 発現ベクターを用いた場合には、ほとんど可溶性発現が認められませんでした。

また、可溶性発現能に優れる pCold I DNA (単独発現、シャペロン共発現) を用いた場合でも、ほとんど可溶性発現が認められませんでした。

ところが、トリガーファクターを融合させた pCold TF DNA を用いた場合は、目的タンパク質の大部分が可溶性画分に得られ、その可溶性度は他のタグと比較して著しく高いことがわかりました(図 3)。このことから、これまで可溶性発現が難しかったタンパク質でも、pCold TF DNA を用いれば、可溶性の発現タンパク質を得られることが期待されます。

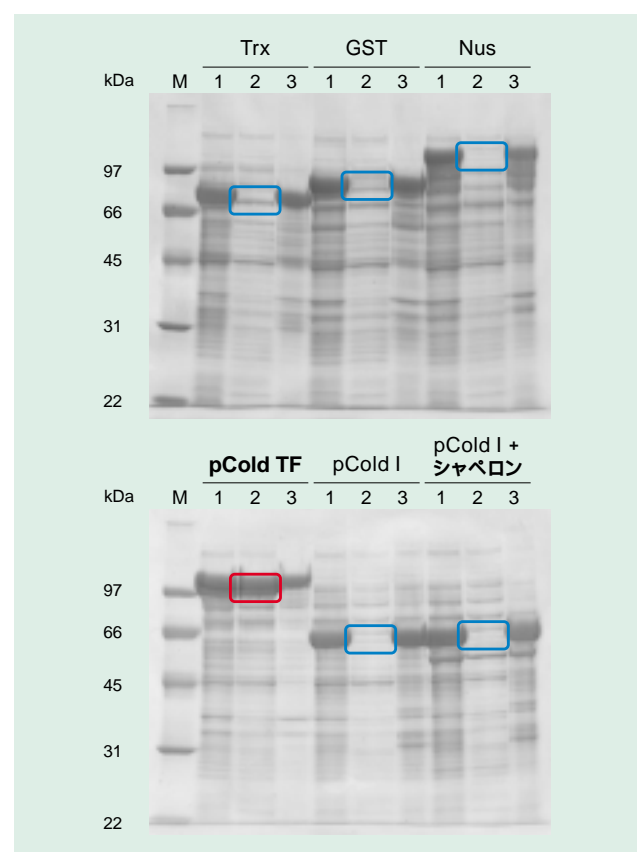


図 3 酵素タンパク質 B の発現

レーン M : 分子量マーカー ; 1 : 細胞抽出液 ; 2 : 可溶性画分 ; 3 : 不溶性画分

#### (3) 融合タンパク質の精製とタグ配列除去

酵素タンパク質 C (推定分子量 13 kDa) は、pCold I DNA (単独発現、シャペロン共発現) および T7 発現ベクターを用いた場合はほとんど可溶性発現が認められませんが(実験データは割愛)、pCold TF DNA を用いた場合は、酵素活性を有する目的タンパク質の大部分が可溶性画分に得られました。可溶性画分を Ni アフィニティーカラムに吸着後、イミダゾールで溶出することにより、融合タンパク質を精製することができました(図 4)。精製した融合タンパク質は Factor Xa、Thrombin、HRV 3C Protease で切断することにより TF タグを切断、除去することができます。融合タンパク質をプロテアーゼで処理した後、目的タンパク質 C は遠心上清に回収

され、TF タグを除いても目的タンパク質Cを可溶性タンパク質として回収することができました(図5)。TF タグを除去した目的タンパク質Cが酵素活性を有することも確認しています。

#### 【参考文献】

- 1)Qing, G., et al. (2004) *Nat. Biotechnol.*, 22, 877-882.
- 2)Gerlind, S., et al. (1995) *EMBO J.*, 14, 4939-4948.

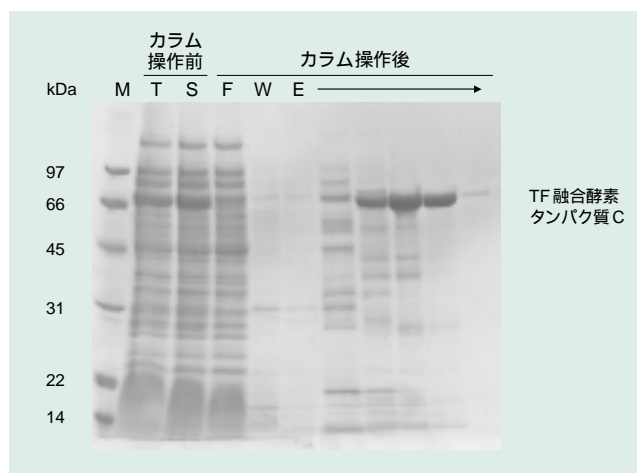


図4 TF融合酵素タンパク質Cの精製

レーン M : 分子量マーカー  
 T : 細胞抽出液  
 S : 可溶性画分  
 F : カラム素通り画分  
 W : カラム洗浄画分  
 E : カラム溶出画分

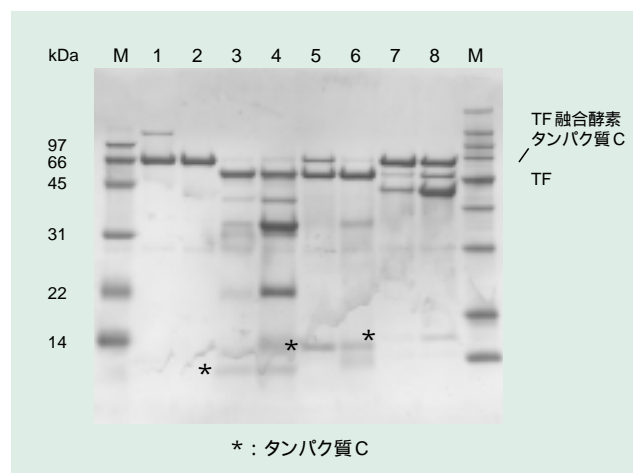


図5 プロテアーゼ消化によるTFタグ除去

レーン M : 分子量マーカー  
 1 : プロテアーゼ未処理  
 2 : TF融合酵素タンパク質C  
 3 : Factor Xa 0.5 U  
 4 : Factor Xa 5 U  
 5 : Thrombin 0.5 U  
 6 : Thrombin 5 U  
 7 : HRV 3C Protease 0.5 U  
 8 : HRV 3C Protease 5 U

#### 関連製品

製品名	製品コード (TaKaRa Code)	容量	価格
コールドショック発現ベクター			
pCold Vector Set (pCold I ~ IV DNA)	3360	1 Set(各5 µg)	¥98,000
pCold I DNA	3361	25 µg	¥48,000
pCold II DNA	3362	25 µg	¥48,000
pCold III DNA	3363	25 µg	¥48,000
pCold IV DNA	3364	25 µg	¥48,000
シャペロンとの共発現実験に			
Chaperon Plasmid Set	3340	1 Kit	¥20,000
His・Tag 融合タンパク質精製関連試薬*			
・大腸菌からのタンパク質抽出試薬			
BugBuster™ Protein Extraction Reagent	70584-3 (NV674)	100 ml	¥11,000
BugBuster™ Protein Extraction Reagent	70584-4 (NV6741)	500 ml	¥42,800
・His・Tag 融合タンパク質精製用樹脂・試薬			
His・Bind Resin	69670-3 (NV5851)	10 ml	¥16,800
His・Bind Resin	69670-4 (NV585)	50 ml	¥66,000
His・Bind Buffer Kit	69755-3 (NV586)	1 Kit	¥19,500
タグ配列切断プロテアーゼ*			
・酵素切断・除去回収用キット			
Factor Xa Cleavage Capture Kit	69037-3 (NV646)	1 Kit	¥35,800
Thrombin Cleavage Capture Kit	69022-3 (NV049)	1 Kit	¥39,000
・低温(4 °C)にて切断活性をもつプロテアーゼ			
HRV 3C Protease	71493-3 (NW269)	500 U	¥18,000

\* : これらの製品は Novagen 社の製品です。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は48ページをご覧ください。[6][7][9]

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)。