

# 高い生産効率と可溶性発現を実現するコールドショック発現系に新規可溶化タグを搭載した新ベクターが登場!

## pCold® ProS2 DNA

製品コード 3371 25 µg ¥96,000

▶ pCold® ProS2 DNA を用いた発現の確認に

## Anti-ProS2, Monoclonal

製品コード M200 0.1 mg ¥60,000

- 粘液細菌由来の可溶性タンパク質 Protein S を利用した新規可溶化タグ ProS2 (約 23 kDa) を採用
- Protease 処理により、発現タンパク質から可溶化タグを効率良く除去
- 発現タンパク質は、His タグ配列により精製可能
- 特異性の高い抗 ProS2 モノクローナル抗体により、発現の有無を容易に検出

タカラバイオと米国ニュージャージー医科歯科大学 井上正順教授が共同で開発した大腸菌コールドショック発現ベクター (pCold® DNA) は、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 配列を利用した画期的な発現ベクターです。大腸菌の培養温度を低温にシフトすることにより目的タンパク質を効率良く高純度で得ることができ、また可溶性度も向上します。本稿では pCold® DNA シリーズに新しく加わった pCold® ProS2 DNA について、実験例を交えてご紹介します。

### ■ 製品の概要

pCold® ProS2 DNA は、Protein S に由来する可溶化タグ ProS2 を配した融合型発現ベクターです。Protein S はグラム陰性の粘液細菌 *Myxococcus xanthus* が形成する胞子の外殻に存在している非常に安定な可溶性タンパク質です。Protein S の NTD (N-terminal domain) をタンデムに 2 つ繋いだ ProS2 タグを目的タンパク質の 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良く発現し、可溶性の増大も期待できます。また、ProS2 タグはシャペロン由来の TF タグとは異なり他のタンパク質との相互作用が低いため、目的タンパク質部分と可溶化タグの効率的な分離が可能です。

さらに、同時発売の ProS2 モノクローナル抗体 (Anti-ProS2, Monoclonal) を用いれば、融合タンパク質の発現の有無をウェスタンブロットなどにより容易に検出できます。

本ベクターを用いて発現したタンパク質は N 末端側に His タグ配列を有しており、Clontech 社の TALON® 樹脂や His60 Ni Superflow 樹脂などによる金属アフィニティークロマトグラフィーで、効率良く回収、精製できます。さらに、融合タンパク質から ProS2 タグ部分を確実に切断、除去するために、本ベクターには 3 種類の配列特異的プロテアーゼ (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あり (図 1)、タグ配列を含まない目的タンパク質を可溶性タンパク質として単離、回収することができます。また、pCold® ProS2 DNA は大腸菌のプロモーターを用いているため、他の pCold® DNA シリーズと同様に、ほとんどの大腸菌株を発現宿主として利用することができます。

pCold® ProS2 DNA を利用すれば、コールドショックベクターの高効率なタンパク質発現能と ProS2 の可溶化タグ機能および分離の容易さを利用した発現/精製系の構築が可能になります。

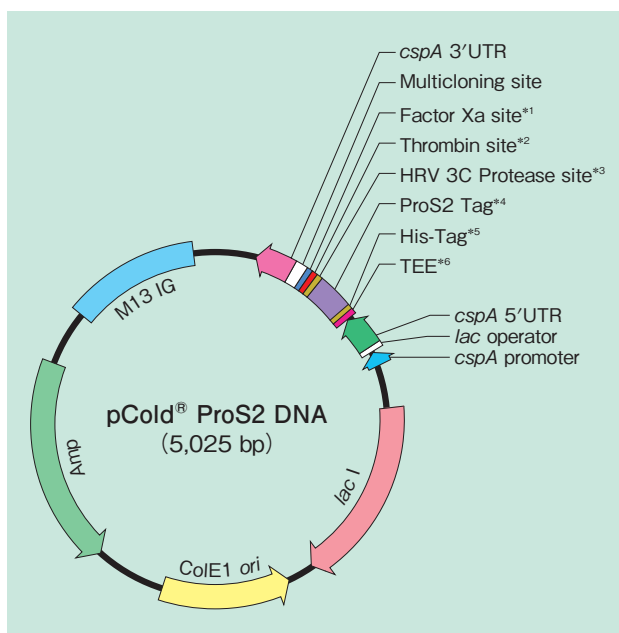


図 1 pCold ProS2 DNA ベクターマップ

- \* 1, 2, 3 : Protease 認識配列
- \* 4 : ProS2 タグ配列 (約 23 kDa)
- \* 5 : His タグ配列
- \* 6 : translation enhancing element の略称、翻訳を促進する機能を有する。

### ■ 実験例 1 : pCold® ProS2 DNA による可溶化発現 [方法]

酵素タンパク質 A (推定分子量 43.3 kDa) をコードする遺伝子を pCold® I DNA および pCold® ProS2 DNA に導入し、宿主大腸菌株として BL21 を用いて発現実験を行った。プロトコルに従って培養および発現誘導を行い、目的タンパク質の発現を SDS-PAGE で確認した。

## 【結果】

pCold® I DNA を用いた場合、目的タンパク質 (推定分子量 43.3 kDa) の発現は確認できましたが、その大部分は不溶性画分に存在しました (図2-A)。一方、pCold® ProS2 DNA では、約 66 kDa (43.3 kDa + 23 kDa) の目的融合タンパク質の大部分が可溶性画分に存在することが確認できました (図2-B)。

以上の結果より、ProS2の可溶化発現タグとしての有用性が確認できました。

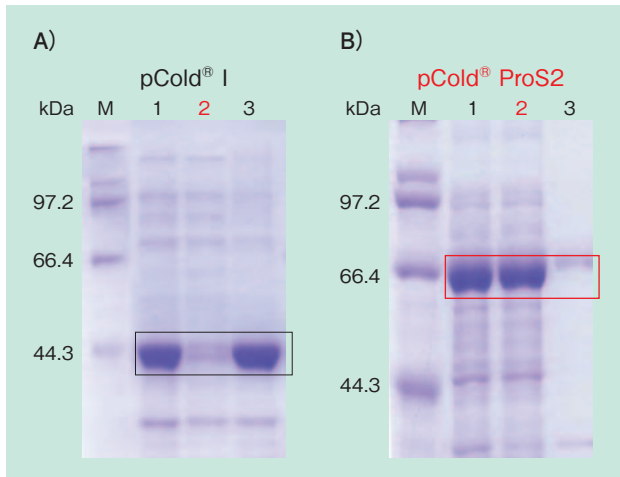


図2 酵素タンパク質Aの発現

レーン1: 大腸菌ライセート  
2: 可溶性画分 (10,000×g 上清)  
3: 不溶性画分 (10,000×g 沈殿物)  
M: Protein MW Marker (Broad)

## ■ 実験例 2 : 融合発現タンパク質からのProS2タグの効率的な除去

### 【方法】

実験例1 (図2-B) で得られた His タグ-ProS2 タグ-酵素 A 融合タンパク質を Ni-キレートアフィニティーカラムで精製した。得られた精製済み目的融合タンパク質を HRV 3C Protease を用いて処理後、再度、Ni-キレートアフィニティーカラムにて精製し、酵素タンパク質 A とタグ領域の分離を SDS-PAGE により確認した。

### 【結果】

精製済み融合タンパク質を HRV 3C Protease で処理することにより、ProS2 タグ部分を切断することができました (図3、レーン2)。また、プロテアーゼ処理後の His タグ配列を含む ProS2 タグ (推定分子量 23 kDa、図3、レーン5) と目的タンパク質 A (推定分子量 43.3 kDa、図3、レーン4) は、Ni-キレートアフィニティーカラムを用いて効率良く分離することができました。

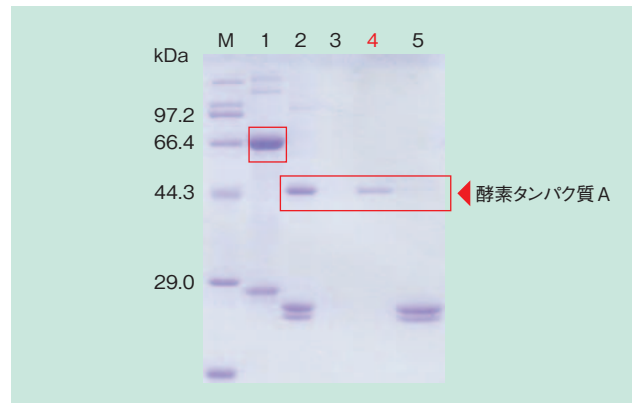


図3 酵素タンパク質AとProS2タグの分離

レーン1: Protease (HRV 3C) 処理前サンプル  
2: Protease (HRV 3C) 処理後サンプル  
3: Ni カラム非吸着画分  
4: Ni カラム洗浄画分 (タンパク質 A)  
5: Ni カラム溶出画分  
M: Protein MW marker (Broad)

## ■ 実験例 3 : ProS2モノクローナル抗体によるProS2タグ融合タンパク質の特異的検出

### 【方法】

ヒト由来タンパク質 B (推定分子量 38.6 kDa) とヒト由来タンパク質 C (推定分子量 22.7 kDa) をコードする遺伝子をそれぞれ pCold® ProS2 DNA に導入し、BL21 株を宿主として誘導発現した。各大腸菌ライセートを SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレン上の ProS2 タグ融合タンパク質の検出は、一次抗体 (Anti-ProS2, Monoclonal: 1 µg/ml) および二次抗体 (抗マウス IgG-HRP 標識抗体) で反応後、TMB 発色試薬を用いて行った (WB-1)。また、コントロールとして、pCold® ProS2 DNA および pCold® I DNA (いずれも挿入遺伝子なし) を BL21 株に導入して得られた大腸菌ライセートからも同様の検出を行った。

### 【結果】

pCold® I DNA のみを導入した大腸菌ライセートからはシグナルは検出されず (図4、WB-1; レーン1)、挿入遺伝子の有無にかかわらず pCold® ProS2 DNA を導入した大腸菌ライセートからは、それぞれ「ProS2 タグ」 (図4、WB-1; レーン2)、「ProS2 タグ+目的タンパク質」 (図4、WB-1; レーン3 & 4) のサイズ付近にシグナルが検出されました。

以上の結果から、ProS2モノクローナル抗体を用いることで、ProS2タグ融合タンパク質を特異的に検出できることが確認できました。

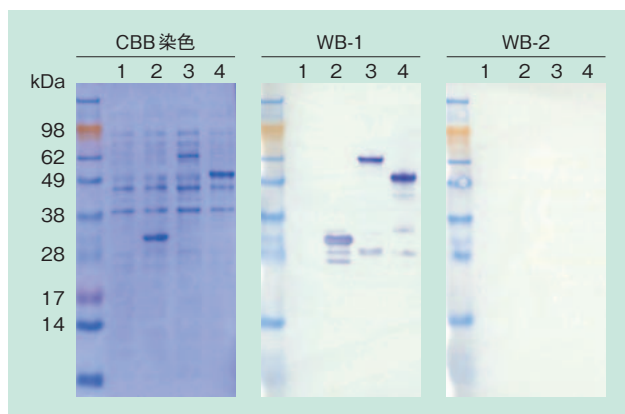


図4 ProS2モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット検出

WB-1 : ProS2モノクローナル抗体+HRP標識二次抗体

WB-2 : HRP標識二次抗体のみ

レーン1 : pCold I DNA 導入大腸菌ライセート

2 : pCold ProS2 導入大腸菌ライセート

3 : pCold ProS2-B 導入大腸菌ライセート

4 : pCold ProS2-C 導入大腸菌ライセート

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は54～55ページをご覧ください。

[6][9][14][47]

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。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください。

## ■ 関連製品

製品名	製品コード	容量	価格
<b>発現用<i>E. coli</i> コンピテントセル</b>			
TaKaRa Competent Cell BL21	9126	100 $\mu$ l $\times$ 10	¥31,000
Origami™ B Competent Cells	70836-4*	1 ml	¥31,200
Origami™ 2 Competent Cells	71344-4*	1 ml	¥32,700
Rosetta™ 2 Competent Cells	71402-4*	1 ml	¥32,700
<b>Hisタグ融合タンパク精製関連試薬</b>			
TALON® Metal Affinity Resin	635502	25 ml	¥48,000
	635503	100 ml	¥168,000
	635504	250 ml	¥378,000
TALON® Buffer Kit	635514	1 Set	¥40,000
His60 Ni Superflow Resin	635660	25 ml	¥38,000
	635661	25 ml $\times$ 4	¥141,000
	635662	250 ml	¥335,000
His60 Ni Buffer Set	635665	20 回	¥33,000
Universal His Western Blot Kit 2.0	635642	1 Kit	¥59,000
<b>タグ配列切断プロテアーゼ</b>			
Factor Xa, Restriction Grade	69036-3*	400 U	¥18,400
Factor Xa Cleavage Capture Kit	69037-3*	1 Kit	¥42,900
Thrombin, Restriction Grade	69671-3*	50 U	¥18,400
Biotinylated Thrombin	69672-3*	50 U	¥38,500
Thrombin Cleavage Capture Kit	69022-3*	1 Kit	¥46,200
HRV 3C Protease	71493-3*	500 U	¥20,000
<b>その他</b>			
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)	9030	5 g	¥19,000
Chaperone Plasmid Set	3340	1 Kit	¥21,000
pCold® Vector Set	3360	1 Set (各5 $\mu$ g)	¥101,000
pCold® I~IV DNA	3361~3364	各25 $\mu$ g	各¥50,000
pCold® TF DNA	3365	25 $\mu$ g	¥99,000

\* : メルク社 (Novagen) の製品です。