

### 3. 遺伝子導入と発現シリーズ

## バクテリアを利用した遺伝子導入とタンパク質の大量発現 (2)

松村 智裕

日本医科大学大学院医学研究科医科生物化学

### 3. Gene Delivery and Expression Series

#### Overexpression of Recombinant Protein in Bacterial Cells (2)

Tomohiro Matsumura

Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

#### Abstract

The protein expression system in bacteria is widely used to overproduce recombinant proteins. Many established expression vectors are on the market. The *Escherichia coli* expression system is extremely useful for biochemical and biophysical analysis. Here, we describe the results of the expression of mammalian protein in *E. coli* and an experiment on the structural analysis of recombinant protein.

(日本医科大学医学会雑誌 2011; 7: 169-174)

**Key words:** expression vector, *Escherichia coli*, overexpression

#### はじめに

大腸菌をはじめとする原核生物を用いたタンパク質発現系は長い歴史を持ち、操作が簡便であることから広く用いられている。バクテリアでタンパク質を発現させるベクターには、多くの種類が作製され市販されている。なかでも大腸菌でタンパク質を大量に発現させる発現ベクターは、細胞内でのコピー数や発現させるプロモーターの強さなど、様々な改変がなされている。タンパク質を大量発現させる目的は、タンパク質を高純度かつ大量に得ることであり、タンパク質の持つ固有の機能を生化学的な手法で解析するためにある。例えば、ゲノム解析などによって見つかる遺伝子の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) において、その機能の違いを解析するには、タ

ンパク質に部位特異的な変異を導入して個別に物性や構造変化を解析することで、一残基の差異について詳細な検討が可能となる。このような遺伝子組換えタンパク質の調製に大腸菌を用いると、非常に簡便でかつ迅速に研究できる。ここでは、特に大腸菌内でタンパク質を作らせるための発現ベクターを利用した研究について、実際に哺乳類の遺伝子を用いて発現させた実験の結果を例に挙げて、発現したタンパク質の解析結果を示しながら、大腸菌発現系の有用性について述べる。

#### 大腸菌発現ベクターの構造

発現させたタンパク質をどのように利用するか、目的に応じて利用可能な種々のベクターが開発されている。大腸菌内でタンパク質の発現誘導をするプロモーター

Correspondence to Tomohiro Matsumura, Division of Metabolism and Nutrition, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: tm28@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

ターとしてよく用いられているのは、lac オペロンを応用した lac プロモーターおよびその派生のプロモーターである。培地にラクトースのアナログ化合物である IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) を添加することで遺伝子の発現を誘導でき、人為的に発現をコントロールしやすい。これらのほか、実際によく用いられる発現ベクターとして、pET vector の例を挙げる<sup>1-3</sup>。pET vector のシリーズには現在、40 種類以上のベクターがあり、詳細はカタログなどを参照されたい。pET vector で用いられている発現プロモーターは T7 バクテリオファージ由来であるため、通常の大腸菌内では遺伝子の発現は誘導されない。そのため、大腸菌にとって有害な遺伝子であっても比較的、安定にクローニングできるという長所がある。構築したベクターを用いてタンパク質を発現させるためには、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ宿主大腸菌を利用する。この T7 RNA ポリメラーゼの発現誘導に lac プロモーターが使われているため、結果として pET vector 上の遺伝子も IPTG によってタンパク質の発現誘導が可能となる。pET vector によるタンパク質の発現は非常に強力で、大腸菌の全タンパク質の 50% 以上を占めることもある。

このほかに、温度に依存して発現が誘導されるベクターも市販されている。このベクターでは大腸菌を低温下 (15°C など) で培養することでタンパク質の発現が誘導される<sup>4</sup>。低温誘導の発現系では、大腸菌自身が持つタンパク質の発現が抑制されることで、より高純度の発現タンパク質が得られることや、低温によりタンパク質のフォールディングが穏やかになることで、発現させたタンパク質の可溶性の向上が期待できる。実際、pET vector で封入体を生じてしまうケースでも可溶性となる例が多くある。

また、細胞内は還元された状態にあるためシステイン残基のジスルフィド結合 (S-S) を形成するタンパク質発現がうまくいかないことがある。これを改善するために、ペリプラズムにタンパク質を分泌させることで S-S 結合の形成を促進する発現ベクターもある。このような発現ベクターの発展系として、グラム陽性菌であるブレバチルス (*Bacillus brevis*) で発現させ菌体外にタンパク質を分泌させる発現ベクターも市販されている<sup>5</sup>。この系では発現させたタンパク質が菌体外に分泌されることで大量に蓄積し、発現効率の向上も期待できる。

## 融合タンパク質の発現

発現ベクターでは特別な配列 (タグ配列) を本来の遺伝子配列に結合させた融合タンパク質として発現させるベクターも多用されている。よく使用されるタグ配列としてヒスチジン (His) 残基を 6 残基程度、連続してつなげたヒスチジントグ (His-Tag) 配列がある。His-Tag を結合させて発現させると、金属イオンをカラムに固定させた金属アフィニティーカラムを利用して、比較的簡単な操作で純度の高いタンパク質を精製でき、非常に有用である。同様に、短いペプチド配列で構成されるタグ配列に T7-tag、S-Tag などがある。ほかには、myc, HA, FLAG などのペプチドタグ配列がある。基本的にこれらのペプチドタグ配列を持った融合タンパク質は、抗体を利用したアフィニティーカラムを用いた精製が可能である。

ペプチドタグ配列以外にも、チオレドキシシン (Trx) やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) といったタンパク質を融合させて発現するベクター<sup>6</sup>も市販されている。これらのタンパク質は大腸菌細胞内の量が多く、発現ベクターによって大量発現させた時も安定して可溶性画分に回収されることから、融合させたタンパク質の可溶性を上昇させることがある。Trx や GST が特異的に結合するアフィニティーカラムも市販されているので、精製も容易になる。ただし、ペプチドタグ配列に比べ分子量が大きい (Trx が約 11,000, GST が約 26,000) ことから、タンパク質の高次構造や酵素活性などに影響を及ぼすことが考えられるため、発現タンパク質の解析結果の評価には注意を要する。

ペプチドタグ配列やタンパク質タグ配列を含む融合タンパク質発現ベクターは、融合させるタンパク質との間の長さ (スペーサー配列) や位置 (N-末端, C-末端のどちらに融合させるか) を変えることで劇的に改良されることもあるので、様々な条件を検討するとよい。また、融合させたタグ配列部分を切り離せるように特異的なプロテアーゼの認識配列を含む発現ベクターも多い。このようなベクターは、タグ配列を利用してアフィニティーカラムで精製した後、プロテアーゼの部分分解によってタグを切断することで、より本来の構造に近いタンパク質として精製することも可能である。

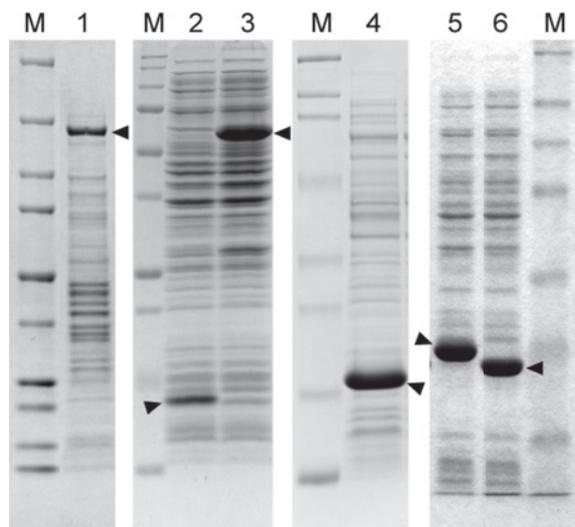


Fig. 1 種々の発現ベクターを用いたタンパク質発現実験

ヒト cDNA を発現ベクターに組み込み、タンパク質を発現誘導させた大腸菌を SDS-PAGE で解析した. lane 1; pTrc99A vector, lane 2, 3; pET15B vector, lane 4, pET30a vector (N-末端 His-Tag), lane 5; pET28a vector (N-末端 His-Tag), lane 6; pET30a vector, M; 分子量マーカー

レーン 5 および 6 はバルオキシレドキシシン (Prx I) の発現を確認した.

### 大腸菌での大量発現実験

以下に哺乳類のタンパク質を大腸菌で発現させる場合を例として実際の実験結果を示していく. タンパク質を大腸菌で発現する際に成功する可能性が高いのは、もとの細胞で可溶性画分に分布しているようなタンパク質である. 可溶性タンパク質であっても、核に遺伝子がコードされ細胞内のオルガネラ (ミトコンドリアなど) に輸送されるタンパク質の場合は、輸送のためのシグナルペプチドが除去されて成熟型のタンパク質になることが多いため、大腸菌で発現させる際にはあらかじめこのシグナルペプチドを除いて発現させるほうが成功する確率が上がる. 一般に、膜タンパク質の大量発現は大腸菌には不適なことが多い. これは大腸菌にはオルガネラが存在せず、膜タンパク質の蓄積の場となる細胞膜が物理的に少ないため、タンパク質が安定に発現できないことが多いためである. さらに、例えば分泌タンパク質の多くは糖鎖による修飾を受けているが、特殊な発現系を除いて大腸菌内で糖鎖修飾することはできない.

Fig. 1 に実際にわれわれの研究室で行った大腸菌で

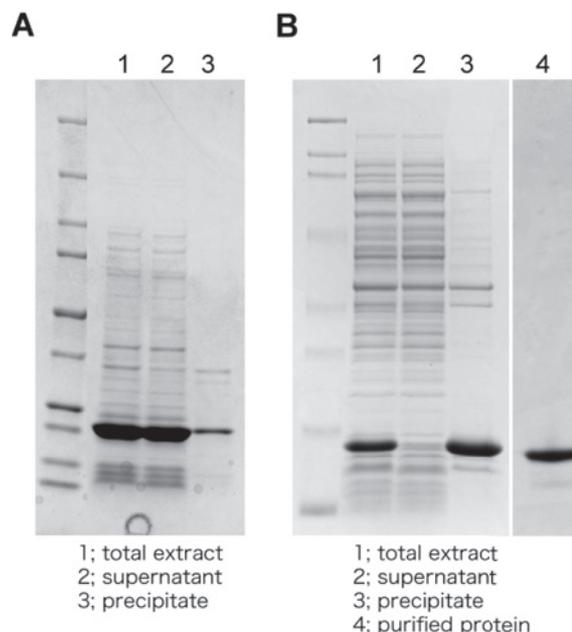


Fig. 2 大腸菌で発現させたタンパク質の可溶性タンパク質を発現誘導させた菌体を超音波破碎により抽出し、15,000 g の遠心で上清と沈殿に分離した. A: タンパク質 (Prx I) は大部分が可溶性で発現 (lane2). B: プロテオーム解析で同定された機能未知の 12KDa タンパク質を、N 末端に His-Tag 付きで発現させたところ、組換えタンパク質のほぼすべてが封入体を形成し沈殿した (lane3). 沈殿画分のタンパク質をリフォールディングさせ可溶性タンパク質として精製 (lane4)

発現したタンパク質を抽出して電気泳動によって解析した実験の例を挙げる. いずれの場合でも SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) 上で目的のタンパク質が確認できるほど、大量に発現していることがわかる. Fig. 2 では、大量発現させたタンパク質を抽出し、可溶性で発現しているかどうかを確認した結果を示した. いずれの場合も非常に大量のタンパク質が発現しているが、大量に発現しても、可溶性画分に回収されないケースもある (Fig. 2, B). このような場合、多くは封入体 (inclusion body) を形成して大腸菌細胞内でタンパク質が沈殿している. 封入体に回収されたタンパク質であっても、尿素やグアニジン塩酸などの変性剤を用いて可溶化し、透析によって徐々に変性剤の濃度を下げながらタンパク質のフォールディングを行って可溶化する方法もある. Fig. 2, B; lane 4 は封入体に回収されたタンパク質を 8 M 尿素, 10 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol; DTT) を含む Tris 緩衝液で可溶化した後、透析によって尿素の濃度を徐々に低下させ、最終的に Tris 緩衝液のみの溶液で可溶性のタンパク質として回収し、精製に成功し

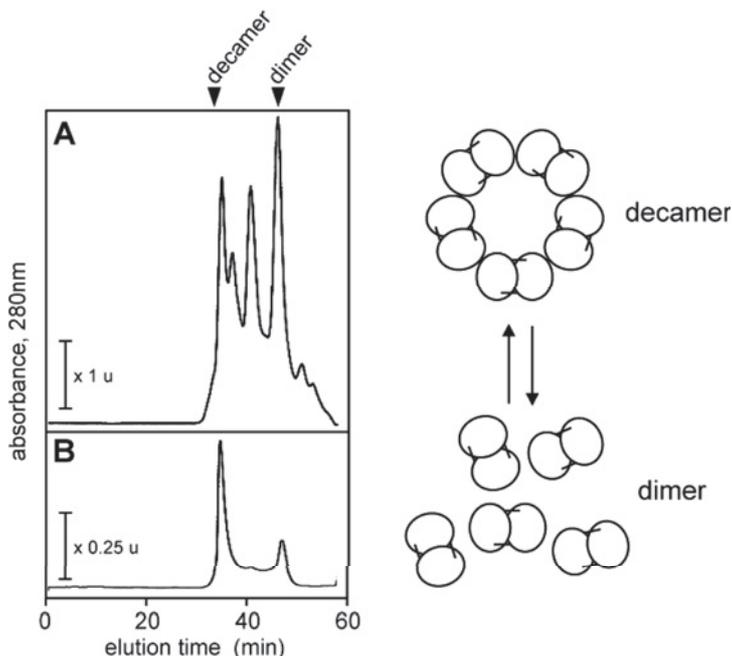


Fig. 3 Prx I組換え蛋白質のHPLCによるゲルろ過解析  
 A: 精製した組換えタンパク質をゲルろ過カラムで分取. B: Aで分取した10量体の画分を再度ゲルろ過カラムで分離すると10量体に加え2量体の分子が存在した

た例である.

タンパク質が封入体を形成してしまう理由として、発現のためのプロモーターが強力であるため、短時間にタンパク質が高濃度になることで凝集している可能性もあるので、発現させる際の培養温度を低温にしたり、シャペロンタンパク質を共発現させる、といった手法で改善される場合もある.

#### 発現させたタンパク質の解析

われわれの研究室において大量発現に成功した例として、ペルオキシレドキシシン (peroxiredoxin; Prx) を用いた研究を以下に示す. 抗酸化タンパク質の一つ Prx は、タンパク質ファミリーを形成して原核生物から真核生物まで幅広く分布し、哺乳類には、少なくとも局在の異なる6種類の Prx が知られている<sup>7</sup>. そのうちの一つ、Prx I は、肝臓など種々の組織に存在し、細胞質で機能するタンパク質である. Prx の触媒する反応は、活性中心にあるジスルフィド (S-S) 結合がチオレドキシシンなどの還元型チオール基によって還元されることで活性型酵素としてペルオキシダーゼの反応を触媒する.

ラット Prx I は、肝臓からの粗抽出液のゲルろ過解析の結果、同一サブユニットが集合して多量体を形成

し、しかも多量体の形態に複数の状態 (10量体と2量体など) があることが示唆された. 細胞内においても多量体の存在形態に複数の状態があり、これが Prx I の機能に深く関わっていると考えられた<sup>8</sup>. この Prx I を pET vector を用いて大腸菌内で発現させると、大腸菌内で可溶性に回収された (Fig. 1, lane 5, 6). 発現量は非常に多く、大腸菌の全可溶性タンパク質の20%以上を占めているものと考えられる (Fig. 2, A). 発現させたタンパク質を精製し、高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography; HPLC) によるゲルろ過を行うと10量体と2量体のほかにも複数のピークが見られ (Fig. 3, A), 肝臓の抽出物で見られた多量体構造の形成を示唆する結果と一致していた. 10量体のタンパク質画分を同じゲルろ過カラムで再分画すると10量体に加え2量体のピークが現れていることから、10量体から2量体への構造変換が起こりうるということが示された (Fig. 3, B).

Prx I は一次構造上4カ所のシステイン残基 (Cys52, Cys71, Cys83, Cys173) を含んでおり、それらの中にペルオキシダーゼ活性に必要なシステイン残基がある. これらの Cys 残基を部位特異的の変異によりセリン残基に変えた変異型タンパク質を調製し解析した. その結果2つのシステイン残基 (Cys52, Cys

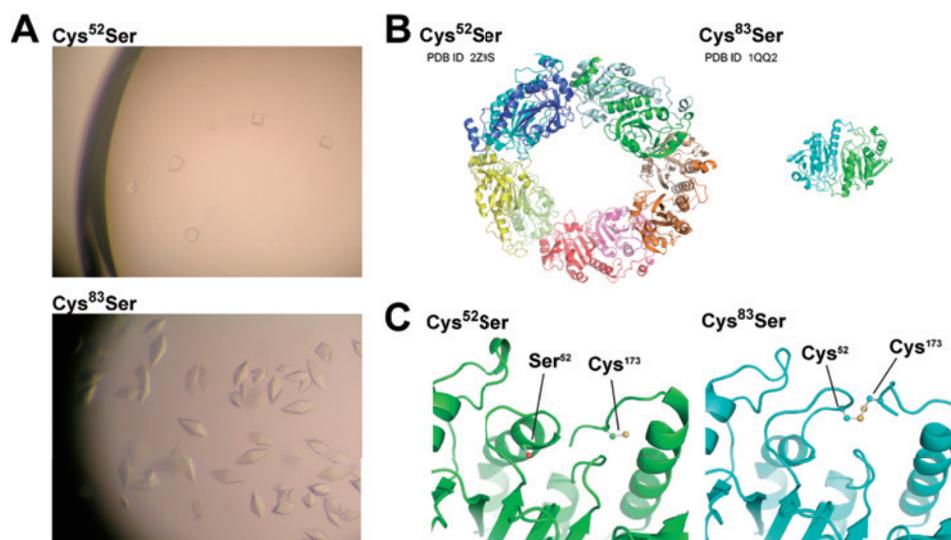


Fig. 4 変異型 Prx I の結晶構造解析

A: 変異型タンパク質の結晶。

B, C: X線結晶構造解析により明らかになった Prx I の立体構造。

173) をセリン残基に変異させると、ペルオキシダーゼ活性は喪失し、これらが活性中心であることが明らかとなった<sup>89</sup>。活性に重要な残基の機能解析にも大腸菌の発現系を利用した組換えタンパク質は非常に有用であることを示す一例である。

さらに、Cys52Ser 変異体は、ゲルろ過解析の結果から大部分が 10 量体で存在することが分かった。また Cys83 残基をセリンに変えた Cys83Ser 変異体は、Cys52Ser 変異体とは逆に 10 量体はほとんど存在せず 2 量体で安定的に存在することが分かった。これらの変異体は野生型の Prx I で見られる多量体の構造変換 (10 量体から 2 量体へ、または 2 量体から 10 量体へ) がおこらなくなった結果、それぞれ 10 量体、2 量体の形態をとるものと考えられる。野生型の Prx I も含め、いずれの組換えタンパク質も大量に精製できるため、結晶化による X 線結晶構造解析を試みたところ、野生型酵素の結晶化は成功しなかったが、Cys52Ser、Cys83Ser 変異体の結晶化に成功し、それぞれ 10 量体、2 量体での立体構造が明らかになった (Fig. 4, A, B)。Cys52Ser 変異体の 10 量体の構造は 2 量体のタンパク質が 5 つリング状に連なった構造であった。また、この 10 量体構造において、それぞれの 2 量体サブユニット同士が近接する領域に Cys83 残基が存在しており、5 カ所の近接部位のうちの 1 つにサブユニット間で Cys83 の S-S 結合が確認できた。このことから Cys83 残基が S-S 結合を介して Prx I の多量体形成を安定化させる可能性が示唆された。また、Cys83Ser の 2 量体構造では、活性に重要な Cys52、

Cys173 残基が 2 つのサブユニット間でジスルフィド (S-S) 結合を形成した酸化型の Prx であった。Cys52Ser 変異体では変異によりこの S-S 結合は形成できないため、それぞれの構造は反応の中間体としての酸化型、還元型の立体構造を示しているものと考えられる (Fig. 4, C)。

#### おわりに

近年、多くの生物でゲノムの解読が終了し、特定の細胞でのタンパク質の発現変化などを調べる手段としてトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によって網羅的な解析が盛んに行われている。新たに見つかったタンパク質は、アミノ酸配列や対応する遺伝子の塩基配列からその機能や構造を推測することが可能なこともあるが、実際にその機能を明らかにするには組換えタンパク質を調製して解析することが非常に有効である。ここで示したペルオキシレドキシンの発現系は非常に成功した例で、大腸菌で発現・精製することで、タンパク質の結晶化に供することが可能なほど大量に調製でき、変異型酵素を作製することで動的に高次構造が変化するタンパク質を特定の形態に偏らせ安定な立体構造の解明に成功した。この成果はタンパク質の機能を分子レベルで議論し更なる研究の発展につながるものである。大腸菌での大量発現が可能であるか否かについては、ある程度、予測可能な場合もあるが、とにかく発現ベクターを構築して発現を試みるのがよい。基本的に大腸菌内でタンパク質の発現

を行うと、真核生物で見られるような翻訳後修飾はできないので、特別な修飾がおこるようなタンパク質、具体的にはリン酸化や糖鎖修飾された形で大量に発現させたい場合は、真核細胞を用いた発現系（バキュロウィルスを用いた昆虫細胞での発現系や酵母を用いた発現系）を検討する必要がある。

#### 文 献

1. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990; 185: 60-89.
2. Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW: Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 1987; 56: 125-135.
3. Studier FW, Moffatt BA: Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986; 189: 113-130.
4. Inouye M, Fu X, Shinde U: Substrate-induced activation of a trapped IMC-mediated protein folding intermediate. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 321-325.
5. Yamagata H, Nakahama K, Suzuki Y, Kakinuma A, Tsukagoshi N, Udaka S: Use of *Bacillus brevis* for efficient synthesis and secretion of human epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 3589-3593.
6. Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, et al: Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 1992; 70: 351-364.
7. Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L: Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002; 383: 347-364. Review.
8. Matsumura T, Okamoto K, Abe Y, et al: Dimer-oligomer interconversion of wild-type and mutant rat 2-Cys peroxiredoxin: disulfide formation at dimer-dimer interfaces is not essential for decamerization. *J Biol Chem* 2008; 283: 284-293.
9. Hirotsu S, Abe Y, Okada K, et al: Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12333-12338.

(受付：2011年9月1日)

(受理：2011年9月7日)