



発現タンパク質の溶解性を高める大腸菌でのタンパク質発現システム

問題点 Problem

大腸菌を用いたタンパク質発現システムにおいて、最も多い問題点は発現タンパク質の不溶性です。このため、より時間がかかり、収量も少ない酵母や昆虫細胞、哺乳類細胞などの発現システムに移行せざるを得ませんでした。

解決法 Solution

ストラタジーン社のVariFlex™ Bacterial Protein Expression Systemは、溶解性を高めるタグ (SET: Solubility Enhancement Tags) や精製用のタグ (SBP: Streptavidin Binding Peptide Tag) を、pETをベースにしたプラスミドに付加させた大腸菌でのタンパク質発現システムです。このVariFlex™ システムを用いることで、様々な問題を解決することができます。

発現タンパク質の不溶性の問題を解決

タンパク質の凝集は、不完全なプロセシングや不十分な折り畳みにより生じ、特にpET系ベクターで過剰に発現させた時によく見られます。この凝集により、発現したタンパク質が水溶液に対して不溶性を呈してしまう場合があります。

ストラタジーン社のVariFlex™ Solubility Enhancement Tags (SET)は、大腸菌でのタンパク質発現系における不溶性の問題の多くを解決します。SETが目的のタンパク質に融合すると、タンパク質全体の負の電荷を増加させます。負の電荷が増加することにより、多くのタンパク質で可溶性が向上します。

SETには3種類ありますが、いずれもアミノ酸が40~45個程度の短いペプチドなので目的のタンパク質の機能に影響を及ぼすことはありません。SETはT7遺伝子の10B塩基配列 (T7B)に由来し、SET1はT7Bの野生型で負の電荷が-6になっています。これに対してSET2とSET3はT7Bの変異型で、負の電荷はそれぞれ-12と-18になっています。

SETの可溶性化能力を検証するために、大腸菌で高温下で過剰発現させた場合に不溶性を呈するβガラクトシダーゼを用いて実験を行いました。それぞれのSETをN-末端に持つ発現ベクターにβガラクトシダーゼをクローニングし、可溶性分画において機能している (正常に折り畳まれている) βガラクトシダーゼ活性を測定しました (図1A)。この結果、βガラクトシダーゼはSETにより可溶性が飛躍的に高められ、また、この場合SET2が最も可溶性を高めることが分かりました。SETにより全ての不溶性の問題が解決するわけではありませんが、VariFlex™ SETにより可溶性が変化するかどうかを様々なタンパク質で検証しました (表1)。

SBP精製タグによる穏やかな精製

目的の発現タンパク質の精製過程は、次の実験にも大きく影響を及ぼすため、ストラタジーン社では、VariFlex™ Streptavidin Binding Peptide (SBP) タグをSETベクターと共に提供しています。このSBP精製タグをベクターに

加えることによって、ベクターの利便性が大きく向上しますが、余分なアミノ酸がタンパク質に加えられることによって、SETタグの効果にも影響を与えることも考えられます。この影響を検証するために、それぞれのSETタグに対してSBPタグの有無で生じる影響を、不溶性タンパク質の1つであるβガラクトシダーゼの活性を測定することで検証しました (図1B)。

柔軟な製品構成

SETによる可溶性の変化は各タンパク質により異なり、またどのSETが最適なのかは実際に試してみるまで分かりません。そのため、VariFlex™でSETタグの付いたベクターを購入すると、3種類のSETタグ全てが含まれています。

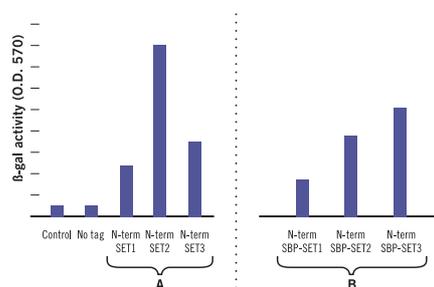


図1 SETによるタンパク質の可溶性の変化

不溶性で知られるβガラクトシダーゼをBL21-Gold (DE3) Competent Cellsで発現させました。全てのSETにおいて、SETだけの場合 (A) とSBP精製タグと併用した場合 (B) でβガラクトシダーゼ活性を測定したところ、SETにより飛躍的に可溶性が高まっていることが分かりました。

VariFlex™製品は、SETもしくはSBPだけのものや、両方が付いたもの、またStreptavidin レジンが付いたもの等、様々な組み合わせで販売しています。VariFlex™製品に関する詳細は以下のサイトをご覧ください。

www.stratagene.com/variflex

表1 SETによる可溶性の変化

タンパク質	分子量 (kDa)	SETによる効果
CAR D1	13.8	+
MPOex	14.2	+
Inidazoleglycerolphosphate dehydratase (IGPD)	23.8	+
5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	24.1	-
RAD10	24.3	-
aeGFP	26.9	-
Exosome complex exonuclease RRP41	27.6	+*
UMP pyrophosphorylase	28.8	+*
Prohibitin	31.3	-
RSV integrase	31.6	-
HIV integrase	32.2	-
clpX	46.2	+
ilvI	62.8	+
β-galactosidase#	123.5	+

+ タンパク質の可溶性が改善
 - 可溶性の改善なし
 * 室温で可溶性
 # 高温で過剰発現させた場合不溶性

VariFlex™ 製品		
製品	カタログ#	価格(税別)
VariFlex™ N-Terminal SBP Vector Set	240162	¥113,000
VariFlex™ N-Terminal SBP System	240163	¥166,000
VariFlex™ N-Terminal SBP-SET Vector Set	240164	¥170,000
VariFlex™ N-Terminal SBP-SET Expression System	240165	¥186,000
VariFlex™ N-Terminal SET Vector Set	240172	¥183,000
VariFlex™ C-Terminal SBP Vector Set	240174	¥86,000
VariFlex™ C-Terminal SBP System	240175	¥144,000
VariFlex™ C-Terminal SBP-SET Vector Set	240176	¥144,000
VariFlex™ C-Terminal SBP-SET Expression System	240177	¥199,000
VariFlex™ C-Terminal SET Vector Set	240184	¥151,000