

# The Single Step (KRX) Competent Cells: Efficient Cloning and High Protein Yields

## Single Step ( KRX ) Competent Cells : 効率的なクローニングと高いタンパク質収量

By Jim Hartnett, M.S., Jill Gracyalny, B.S., and Michael R. Slater, Ph.D., Promega Corporation

### アブストラクト

我々は、クローニングおよびスクリーニングにおける利点に加え、厳密なタンパク質発現をコントロールするために遺伝子改変された新しい大腸菌株を紹介いたします。この新しいKRX菌株は青/白スクリーニングが行え、高いコンピテンシーを有しています。また、KRXはT7 RNAポリメラーゼをベースとするタンパク質発現（特徴が明らかなプロモーターで伸張速度の速いポリメラーゼであることから最も広く使用されている発現系の1つ）を行えます。この菌株ではT7 RNAポリメラーゼ遺伝子はラムノースプロモーターによりコントロールされています。ホタルルシフェラーゼタンパク質の発現において、BL21 (DE3) 由来菌の漏洩しやすいIPTG誘導T7 RNAポリメラーゼシステムでは8~43倍であった誘導倍率（誘導前のタンパク質発現レベルが高いことが第一要因）が、KRX菌株を使用した場合、ラムノースオペロンの正確なコントロールの結果、ラムノース添加により1,700倍という非常に高い誘導倍率が得られました。さらに検討されたKRXにおける3種類のタンパク質発現レベルは、BL21 (DE3) 由来菌でのレベルと同等以上の結果が得られました。

### イントロダクション

多くの研究者が、使いやすさ、確立されたプロトコル、菌体の迅速な増殖あるいは低コストな培養などの理由により、機能解析のためのリコンビナントタンパク質合成系として大腸菌を第一に選択します。BL21 (DE3) は比較的高い収率でリコンビナントタンパク質を生産するため、発現実験に最も汎用されています。しかし、BL21 (DE3) は低いトランスフォーメーション効率と非誘導条件下における発現のリークが知られています。研究者は最初にトランスフォーメーション効率の高い宿主菌を用いてクローニングした後に発現用の宿主菌に目的のクローンを移し変える必要にせまられる場合が多くあります。我々が開発したKRXは、タンパク質収量がBL21 (DE3) と同等でありながら、よりトランスフォーメーション効率の高い新しい大腸菌株です。この新しいKRXは1種類の菌株でクローニングとタンパク質の過剰発現が両方行えます。KRXは*E. coli* K12株に由来し、コンピテンシーが高く、クローニングやスクリーニングに関する特長に突出した菌株です。また、この菌株は、タンパク質発現の制御を最適化するために改変されています。この菌株のクローニングに優れた特質として、部分的な制限システムの欠損 (*hsd*, *e14*)、プラスミドDNA精製時に大腸菌より混入する最も一般的なヌクレアーゼの欠如 (*endA*-)、不要なリコンビネーションを最低減に抑えるための変異 (*recA*-) などが挙げられます。また、KRXは、*lacZ* 遺伝子がゲノムおよびエピソームの両方で欠失するためにおこるβ-ガラクトシダーゼの活性欠損を利用した青/白スクリーニングにも使用することができます。エピソーム上 (F' 因子) に存在する部分欠失した*lacZ* 遺伝子 ( $\Delta$  (*lacZ*) M15) が、プラスミドクローニングベクターにコードされる機能性α-ペプチドにより補完されます。α-相補が起こるとX-Gal培地上に形成されるバクテリアコロニーは青色を呈し、α-相補が起こらないと白色を呈します。

KRXは優れたタンパク質発現菌株としても優れた特性を有しています。*ompT*-および*ompP*-変異は、大腸菌において過剰発現したタンパク質の分解要因の1つを排除します。KRXは、T7プロモーターによるリコンビナントタンパク質発現を厳密に制御するためのラムノースプロ

モーター (*rhaP*AD) 駆動T7 RNAポリメラーゼ遺伝子が染色体に組み込まれています。T7 RNAポリメラーゼをベースとしたシステム(3)は、発現システムの中でも最も広く用いられているものの1つです。その理由として、大腸菌RNAポリメラーゼプロモーターとは完全に独立していることや、大腸菌RNAポリメラーゼの約5倍という伸張速度の速さなど非常に良く特徴づけられていることが挙げられます。これらのシステムは20年にわたり使用され、Flexi® Vectorを含めT7プロモーターを用いた大腸菌での過剰発現を行える多くのベクターが市販されてきました。

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子は、*rhaP*ADプロモーターにより制御されて発現する*rhaB*AD遺伝子と置換されています。このプロモーターはグルコースにより異化代謝産物抑制を受け、培地にラムノースを添加することにより活性化します。これによりT7 RNAポリメラーゼの存在量が正確にコントロールされ、結果としてリコンビナントタンパク質の合成も正確に制御されることになります。*rhaP*ADにより駆動する発現は、2つのアクティベーターの調節カスケードを通して正に調節されています。ラムノースはアクティベーターRhaRを誘導し、これがさらにRhaSを誘導します。RhaSは*rhaP*ADプロモーターからの転写を活性化します(1, 2)。KRXではイソメラーゼ (RhaA)、キナーゼ (RhaB)、アルドラーゼ (RhaD) が欠如し、T7 RNAポリメラーゼ遺伝子で置換されているため、この菌株はラムノースを代謝できず、増殖中に消費されることはありません。

### 高いトランスフォーメーション効率

KRXのトランスフォーメーション効率をテストするためにHanahan法の変法(4)に従い3種類のコンピテントセルを個別に調製し、50μlまたは200μlずつ小分けにし、-70℃で保存しました。トランスフォーメーション効率の測定にはpGEM®-3Z Vector (カタログ番号 P2151) を使用しました。2つの分注サイズごとに異なる方法でトランスフォーメーションを行いました。50μlサイズでは10pgのプラスミドDNAを溶かしたKRX菌株を含む1.5ml遠心チューブに直接加えました。DNAと菌体を氷上で30分間インキュベーションし、42℃で25秒ヒートショックをかけました。この菌体を氷上で2分間静置した後、菌体を回収するために氷温のSOC培地450μlを添加しました。チューブの側面をタッピングして菌体を回収し、振とう(225rpm)しながら37℃で1時間インキュベーションしました。200μlサイズのコンピテントセルでは、溶かしたコンピテントセルKRX 100μlおよびプラスミドDNA 100pgを氷冷した17×100mmポリプロピレンチューブに加えました。DNAおよび菌体を氷上で10分間インキュベーションし、42℃で47秒ヒートショックをかけました。菌体を氷上で2分間静置した後、氷温のSOC培地900μlを添加しました。菌体は、振とう(225rpm、角度30°)しながら37℃で1時間インキュベーションして回収しました。その後、アンピシリンを含むLBプレートにプレーティングし、37℃で一昼夜インキュベーションしました。トランスフォーメーション効率を測定するためにアンピシリン耐性コロニーをカウントしました。50μlまたは200μlサイズのSingle Step (KRX) Competent cellsのトランスフォーメーション効率はそれぞれ $3.36 \pm 0.27 \times 10^6$  cfu/μgおよび $3.21 \pm 0.71 \times 10^6$  cfu/μgでした。この効率の高さは、JM109 Competent Cells (カタログ番号 L2001) など市販される高効率のコンピテントセルと同等でした。

## 収量を犠牲にすることのない低い誘導前発現レベル

BL21 ( DE3 ) に由来する発現用菌株は野生型 *lac* プロモーターから3箇所の点変異の入ったL8-UV5 *lac* プロモーター ( 5, 6 ) を使用しています。3つ全ての点変異はプロモーターをより強力にしており、その中の2つの点変異はcAMPレベルへの依存性を低下させ、残りの変異はグルコースに対するプロモーターの感度を低減します。これらの変異は、IPTG添加によるT7 RNAポリメラーゼの生産を高レベルに引き上げると同時に、基底レベルのT7 RNAポリメラーゼ発現をも増大させ、大腸菌に対して毒性を持つ遺伝子のクローニングと発現を行う上で問題となる場合が有ります(7)。このような問題を解決する方法の1つとして、pLysSプラスミドが持つ阻害物T7リゾチームを発現させて基底レベルのT7 RNAポリメラーゼ発現を低減させる方法があります(8)。

KRXにおける転写制御を分析するために、pF1K T7 Flexi® Vector ( カタログ番号 C8451 ) のT7プロモーター制御下のホタルルシフェラーゼ発現を測定しました。我々はKRXのパフォーマンスとBL21 ( DE3 ) 由来菌BL21 ( DE3 ) pLysSあるいはRosetta™ 2 pLysSを比較しました。開始時の培養は37 °Cで一昼夜行い、翌朝 Terrific Brothで100倍に希釈しました。培養液のO.D.<sub>600</sub>値が0.8~1.0に達したら、25 °Cインキュベーターに移し、さらにO.D.<sub>600</sub>値が1.0~1.5に達した時点で0.1%ラムノース ( KRX菌株 ) または1mM IPTG [ BL21 ( DE3 ) 由来菌 ] で誘導し、25 °Cで一昼夜培養しました。誘導前後のサンプルをルシフェラーゼアッセイに供しました。ルシフェラーゼ活性を測定し、得られた結果を図1に示しました。発光は相対発光ユニット ( RLU ) で表し、菌密度 ( O.D.<sub>600</sub> ) で補正しました。

図1ではKRXおよびBL21 ( DE3 ) 由来菌株における誘導前の発現レベルを比較しました。ルシフェラーゼの誘導発現では、BL21 ( DE3 ) 菌株よりもラムノース制御下のT7 RNAポリメラーゼを用いたKRXの方が7~20倍低い値を示しました。ラムノース駆動T7 RNAポリメラーゼによる厳密な制御は、大腸菌に対して毒性を持つタンパク質のクローニングを可能にします。さらに、誘導後のルシフェラーゼ発現レベルはKRXでより高く、IPTG制御下のT7 RNAポリメラーゼを用いる菌株よりも活性化ルシフェラーゼの産生は2~29倍高いものでした。ラムノースオペロンの厳密なコントロールでは、ルシフェラーゼの誘導倍率は1,702倍という高い値を示す一方、リークの起こりやすいIPTG誘導システムの誘導倍率は8~43倍に留まりました ( 図1 )。より重要なポイントは、誘導前のタンパク質発現レベルが低く抑えられていても総タンパク質収量を犠牲にすることが無いことです。

## 高いタンパク質収量

我々はKRXおよび先と同じBL21 ( DE3 ) 由来菌株を用い、さらに3種類のタンパク質 ( 哺乳動物のコードン使用 ) を加えて発現レベルを比較しました。hRLはウミシタケルシフェラーゼの改変型で、コードンをウミシタケのものからヒト遺伝子で使用頻度の高いものに変更しています。PKRACAはヒト-プロテインキナーゼAのα触媒サブユニット ( GenBank® accession number NM\_002730 ) で、CRBP2はヒト-細胞性レチノール結合タンパク質 II ( GenBank® accession number U13831 ) です。ホタルルシフェラーゼ、hRLおよびCRBP2のタンパク質コード領域はpF1K T7 Flexi® Vectorにクローニングしました。また、PKRACAは、N末端にHQタグ ( 金属親和性タグ ) を付加するpFN6K ( HQ ) Flexi® Vector ( カタログ番号 C8521 ) にクローニングしました。全てのFlexi® Vectorは、転写およびタンパク質発現の制御にT7プロモーターを使用しています。菌体培養は25 °Cで一昼夜行い、タンパク質発現の誘導はホタルルシフェラーゼの場合と同様に行いました。各培養液の菌密度 ( O.D.<sub>600</sub> ) を測定し、同数の菌体を遠心に供しました。菌体ペレットをTEバッファーで再懸濁し、Mini-BeadBeater-1™ ( BioSpec

Products, Inc. ) で溶解しました。不溶性の残渣を遠心で除去し、可溶性の上清画分をSDS-PAGEで分析しました。結果を図2に示しました。

SDS-PAGEで観察したホタルルシフェラーゼのタンパク質発現レベル ( 図2、パネルA ) は、1つの例外を除いてルシフェラーゼ酵素活性の測定結果と同様でした ( 図1 ) BL21 ( DE3 ) およびRosetta™ 2 ( DE3 ) pLysSでは誘導前でも61kDaのホタルルシフェラーゼタンパク質が明瞭に視認できました。誘導後、KRXは最も高いルシフェラーゼ収量を示しましたが、BL21 ( DE3 ) pLysSでのタンパク質収量は乏しく、タンパク質のバンドも辛うじて確認できる程度でした。BL21 ( DE3 ) の誘導後レベルは、図1で示したルシフェラーゼ活性の測定結果から予想されるものよりも非常に高いものでした。これはBL21 ( DE3 ) で発現したルシフェラーゼの多くが機能を持たないものであることを示唆していました。31kDaのhRLタンパク質は、誘導前でもいくつかのBL21 ( DE3 ) 由来菌株で36kDaのバンドとして明瞭に確認されました。KRXでは、誘導後

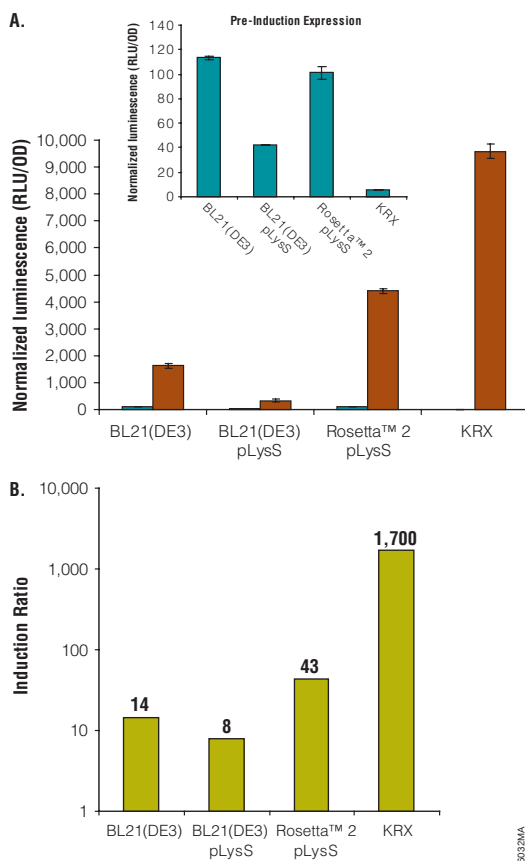


図1. ホタルルシフェラーゼの誘導前後の発現レベルの比較

各大腸菌にホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むpF1K T7 Flexi® Vectorをトランスフォームした。一次培養は、0.2%グルコースおよび30μg/mlカナマイシンを含むLB培地を用いて37 °Cで振盪 ( 275rpm ) しながら一昼夜培養した。一昼夜培養液30μlを30μg/mlカナマイシンを含むTerrific Broth 3mlに接種した。菌体培養液は最適な菌密度 ( O.D.<sub>600</sub>値0.8~1.0 ) に達するまで37 °Cで振盪培養 ( 275rpm ) した。その後、培養液を恒温振とう器 ( 25 °C ) に移した。O.D.<sub>600</sub>値1.0~1.5に到達した時点で、0.1%ラムノースまたは1mM IPTGを添加し、タンパク質発現を誘導した。さらに培養液を一昼夜25 °Cで振盪培養 ( 275rpm ) した。サンプルはルシフェラーゼアッセイを行うために誘導前 ( O.D.<sub>600</sub>値1.04~1.15 ) と誘導後 ( O.D.<sub>600</sub>値9.64~10.88 ) に分取した。パネルA. ホタルルシフェラーゼの発現レベルは、水18μlおよびBright-Glo™ Luciferase Assay Reagent 20μlに2μlの培養液を加えることにより測定した。発光はTD 20/20 Luminometerで10秒間測定した。誘導前後のホタルルシフェラーゼ発光レベルは発光値をO.D.<sub>600</sub>値 ( n=3 ) で割ることにより菌体数で補正した。パネルB. 誘導倍率は誘導後の発光値を誘導前の発光値で割って算出した。

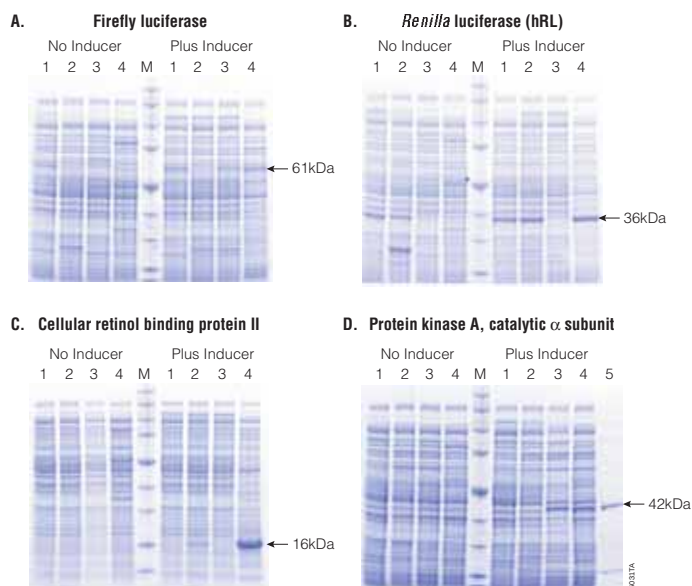


図2. KRXおよびBL21 (DE3) 由来菌株におけるタンパク質過剰発現の比較  
 一次培養は、0.2% グルコースおよび30μg/mlカナマイシンを含むLB培地を用いて37℃で振盪（275rpm）しながら一昼夜培養した。一昼夜培養液30μlを30μg/ml カナマイシンを含むTerrific Broth 3mlに接種した。菌体培養液は最適な菌密度（O.D.600値0.8～1.0）に達するまで37℃で振盪培養（275rpm）した。その後、培養液を恒温振とう器（25℃）に移した。O.D.600値1.0～1.5に到達した時点で、0.1%ラムノースまたは1mM IPTGを添加し、タンパク質発現を誘導した。さらに培養液を一昼夜25℃で振盪培養（275rpm）した。翌朝、菌数による補正を行うために、各培養液の菌密度（O.D.600値）を測定した。培養液はマイクロ遠心器で10分間、10,000rpmで遠心した。菌体ペレットはTEバッファー450μlで再懸濁し、Mini-BeadBeater-1™で溶解した（5,000rpmで20秒を2回）。不溶性の残渣は、マイクロ遠心器で14,000rpm、5分間遠心して除去した。可溶性画分は4-12% NuPAGE® gel（Invitrogen）で分析し、SimplyBlue™ Safestain（Invitrogen）で染色した。レーン1, BL21 (DE3)；レーン2, BL21 (DE3) pLysS；レーン3, Rosetta™ 2 (DE3) pLysS；レーン4, KRX；レーン5, HQ-タグ プロテインキナーゼA 触媒α-サブユニット（製品添付マニュアルTM060に従いMagneHis™ Protein Purification Systemを用いて精製）；レーンM, タンパク質分子量マーカー

の発現がBL21(DE3)やBL21(DE3)pLysSと同等であるにもかかわらず、誘導前の発現はほとんど観察されませんでした（図2、パネルB）。意外にもRosetta™ 2 (DE3) pLysSではhRLの発現はほとんど示されませんでした。16kDaのCRBP2タンパク質の場合、KRXで非常に高い発現を示しましたが、BL21 (DE3) 由来菌では非常に低い発現しか示しませんでした（図2、パネルC）。HQタグを付加した42kDa PKRACAは、KRXおよびRosetta™ 2 (DE3) pLysSの両方で優れた発現を示しましたがその他のBL21 (DE3) 由来菌では低い発現を示しました（図2、パネルD）。

我々がタンパク質発現の比較実験を行った際に得られたKRXとBL21 (DE3) 由来菌株のその他の違いについても付記します。一昼夜培養液の希釈後から指数関数的な増殖を迎えるまでの誘導期がKRXでは短いことが分かりました。我々はホタルルシフェラーゼをクローニングしたpF1K T7 Flexi® Vectorを保持する4種類の菌株について、希釈液からO.D.600値0.8に到達するまでに必要な時間を測定しました。その結果KRXの誘導期は約3.25時間でした。BL21 (DE3) pLysSの誘導期は2倍の7.5時間、Rosetta™ 2 (DE3) pLysSでは10時間、BL21 (DE3) では11時間を要しました。この誘導期の長さにより、BL21 (DE3) 由来菌でタンパク質発現を評価する実験を平日だけで実施することを困難にします。

## まとめ

新しいKRXタンパク質発現菌株は効率的なトランスフォーメーションとタンパク質発現の厳密な制御を行うためにデザインされています。トランスフォーメーション効率は $>10^8$ cfu/μgで、これは他の高効率なコンピテントセルと同等です。Single Step (KRX) Competent Cellsには、シングルトランスフォーメーション用の200μlサイズとマルチトランスフォーメーション用の50μlサイズがあります。KRXは、調製したプラスミドDNAの分解に関する主要なヌクレアーゼが欠損し（*endA*-）、不要なリコンビネーションが最低限に抑えられ（*recA*-）、青/白スクリーニングにも適応するため、一般的なクローニングにも有用です。クローニングされたタンパク質を過剰発現させる上で、KRXはT7プロモーターからのタンパク質コード領域の発現を劇的にコントロールすることができます。誘導前の発現レベルはBL21 (DE3) 由来菌株よりも非常に低く（7～20倍）しかも、誘導後の発現レベルはBL21 (DE3) 由来菌株と同等以上です。KRX菌株は*ompT*および*ompP*プロテアーゼが欠損しており、大腸菌におけるタンパク質分解の原因の1つを排除します。この菌株1つに優れたクローニング用菌株と優れたタンパク質発現菌株の特性が備わっており、発現時にベクターを菌株間で移し変える必要がありません。また、KRXはBL21 (DE3) 由来菌より短時間で誘導期から対数増殖期に移るため時間を節約でき、より簡便に発現誘導実験が行えます。

## 参考文献

- Egan, S.M. and Schleif, R.F. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 87–98.
- Haldimann, A., Daniels, L. and Wanner, B. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1277–86.
- Studier, F.W. and Moffat, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30.
- Hanahan, D. (1985) *DNA Cloning*, Vol. 1, Glover, D., ed., IRL Press, Ltd., 109.
- Grossman, T.H. *et al.* (1998) *Gene* **209**, 95–103.
- Pan, S.H. and Malcolm B.A. (2000) *Biotechniques* **29**, 1234.
- Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44.
- Moffat, B.A. and Studier, F.W. (1987) *Cell* **49**, 221–7.

## プロトコル

- ◆ Single Step (KRX) Competent Cells Technical Bulletin #TB352  
 Promega Corporation  
[www.promega.com/tbs/tb352/tb352.html](http://www.promega.com/tbs/tb352/tb352.html)

## 製品案内

| 製品名                               | サイズ        | カタログ番号 | 価格(¥)  |
|-----------------------------------|------------|--------|--------|
| Single Step (KRX) Competent Cells | 5 × 200 μl | L3001  | 29,000 |
|                                   | 20 × 50 μl | L3002  | 35,000 |