

KRX Autoinduction Protocol: A Convenient Method for Protein Expression

KRXを用いた自動誘導プロトコル：簡便なタンパク質発現法

By Trista Schagat, Rachel Friedman, Ohana, Paul Otto, Jim Hartnett and Michael Slater, Promega Corporation

アブストラクト

細菌での組換えタンパク質発現は比較的容易ですが時間のかかるプロセスです。通常、細菌を一晩培養して定期的に到達させ、希釈して最適な菌体密度まで増殖させた後、発現誘導を行います。このプロセスを簡略化するため、弊社では大腸菌KRX菌株におけるグルコースとラムノースによる厳密なタンパク質発現制御を利用しました。これにより、菌体密度をモニターしたり別途誘導操作を行う必要の無い自動誘導プロトコルを開発しました。本稿ではLB培地を用いた迅速(early)および遅延(late)自動誘導プロトコルについてご紹介し、3種類のタンパク質を自動発現誘導した例について説明します。

イントロダクション

Single Step (KRX) Competent Cellsは形質転換、クローニング、スクリーニング、タンパク質発現を効率的に行うことができ(1)、分子生物学研究で必要とされる基本的要素をすべて兼ね備えています。

KRXは、ラムノースプロモーター (rhaP_{BAD}) 制御下のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が染色体に組み込まれている大腸菌K株です(図1)。rhaP_{BAD} プロモーターは、グルコースによりサイクリックAMP (cAMP) とcAMP受容体タンパク質を介した異化代謝産物抑制を受けています(2)。rhaP_{BAD} プロモーターはラムノース存在下で活性化されますが、それは培養液からグルコースが完全に消費された場合に限られます。これによりT7プロモーターを介してタンパク質発現を非常に効率的に制御することができます。また、発現誘導前におけるタンパク質発現レベルは極めて低値です(1)。

KRXではラムノースの代謝に不可欠なタンパク質 [イソメラーゼ (RhaA)、キナーゼ (RhaB)、アルドラーゼ (RhaD)] が欠如しています。そのため、ラムノースが KRX によって代謝されることはなく、KRXの増殖中に消費されることもありませんので、ラムノース存在下長期間培養することができます。

弊社では、グルコース濃度とラムノース濃度を調節することにより、菌体密度をモニターしたり別途誘導操作を行う必要のない自動誘導プロトコルを開発しました。このプロセスに培地の種類が及ぼす影響について検討し、3種類のタンパク質を発現させることでこのプロトコルの有用性を検討しました。

グルコースとラムノースの濃度調節

KRXのタンパク質発現にグルコース濃度とラムノース濃度が及ぼす影響について試験するため、様々な条件下で組換えルシフェラーゼの産生タイミングと産生量を検討しました(図2)。ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼのどちらにおいても、8時間後の時点において、最高グルコース濃度と最低グルコース濃度(それぞれ0.15%と0.05%)の間に有意なタンパク質発現量の差が認められました。タンパク質発現量の差がもっとも大きかったのは、ホタルルシフェラーゼの場合が8時間から16時間の間で(10~100倍、図2、パネルA)、ウミシイタケルシフェラーゼの場合は8時間の時点でした(100倍、図2、パネルB)。いずれの培地においても、24時間後までにはルシフェラーゼ活性レベルは同等になりました。

グルコース濃度が高い培地ではラムノース濃度を変化させても、ホタルルシフェラーゼの発現量に大きな変化は見られませんでした。図2のパネルAに示した例では、グルコース濃度とラムノース濃度がどちら

も高い場合に16時間目の時点でホタルルシフェラーゼ活性が低値となつていますが、この作用の度合いについては実験ごとにばらつきが見られ、またウミシイタケルシフェラーゼでは認められませんでした。

培地が自動誘導に及ぼす影響

Luria Bertani (LB) 培地は細菌の培養とタンパク質発現に最もよく用いられている培地です。高密度培養では Terrific Broth (TB) などの富栄養培地を用いることができ、標準化のため増殖を制限する場合には M9 最小培地を用いることができます(3,4)。図3はTB培地での自動誘導の結果を示したものです。TB 培地でもKRXの自動誘導を行うことは可能ですが、グルコース濃度やラムノース濃度を変化させても発現レベルに有意な差は見られず、タンパク質発現率は16~24時間でプラトーに達しました。試験した条件下ではウミシイタケルシフェラーゼの発現量にもグルコース濃度やラムノース濃度による変化は見られませんでした(データは示していません)。炭素エネルギー源の操作が容易な M9 最小培地を用いた場合には、迅速誘導用プロトコルと遅延誘導用プロトコルのどちらでも容易に自動誘導を行うことができます(データ未掲載)。自動誘導は糖によって制御されますので、使用する培地の種類が誘導のタイミングやグルコースとラムノースの至適条件に影響を及ぼします。そのため、最適化を行うことをお勧めします。表1に、試験した各培地のエネルギー源(5)と得られた結果の概要を示します。

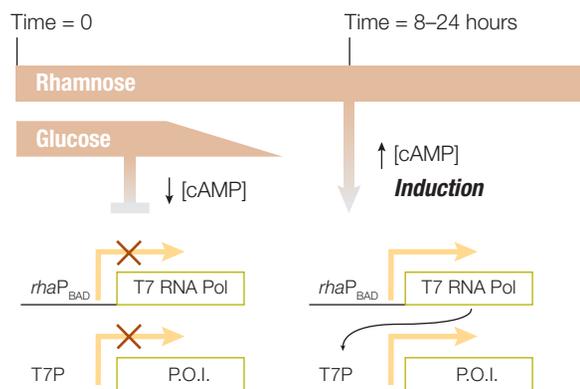
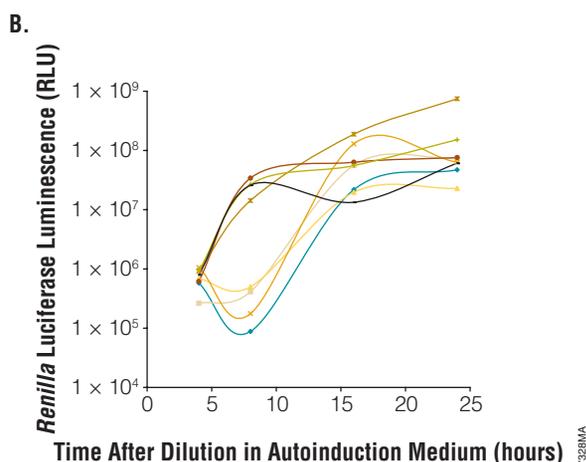
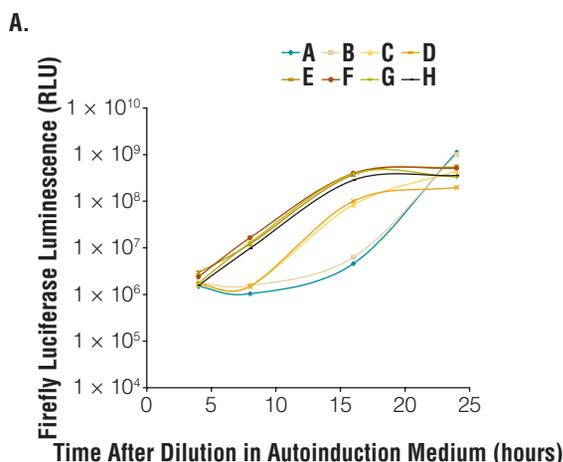


図1. 糖によりKRX菌株のタンパク質発現を制御する自動誘導プロトコル

KRX菌株にはラムノースプロモーター (rhaP_{BAD}) 制御下のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が染色体に組み込まれている。rhaP_{BAD} プロモーターは、グルコースによりサイクリックAMP (cAMP) とcAMP受容体タンパク質を介した異化代謝産物抑制を受けている。グルコースが枯渇するとラムノースによってT7プロモーターが活性化される。これによりT7 RNAポリメラーゼの量を正確に制御できるので、T7プロモーター (T7P) を介した目的組換えタンパク質 (POI) の産生も正確に制御できる。

KRXを用いた自動誘導プロトコル：簡便なタンパク質発現法



Medium Supplements for Autoinduction		
Sample	Glucose (% final)	Rhamnose (% final)
A		0.2
B		0.1
C	0.15	0.05
D		0.02
E		0.2
F		0.1
G	0.05	0.05
H		0.02

図2. KRX菌株におけるグルコースとラムノースの濃度調節によるホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの発現自動誘導

pFN6A-lucを導入したKRX菌株（パネルA、ホタルルシフェラーゼ）とpFN6A-hRlucを導入したKRX菌株（パネルB、ウミシイタケルシフェラーゼ）をLB培地で一晚増殖させた。一晚培養した菌液をさまざまな発現誘導用LB培地（パネルCに示す成分を補充したLB培地）3mlで1:100に希釈し、25℃で振盪培養した（希釈時を0時間とする）。所定の時間に培養液を水で1:10に希釈してタンパク質活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の測定にはONE-Glo™ Luciferase Assay System（カタログ番号 E6110; 100μl 希釈培養液 + 100μl試薬）を用い、ウミシイタケルシフェラーゼ活性の測定にはRenilla Luciferase Assay System（カタログ番号 E2810; 10μl希釈培養液 + 100μl試薬）を用いた。光量の測定にはGloMax®-Multi Detection System（カタログ番号 E7031）を用いた。データは、レプリケートの測定値の平均相対発光ユニット (RLU) として示す。データは独立した2回の実験から取得した。

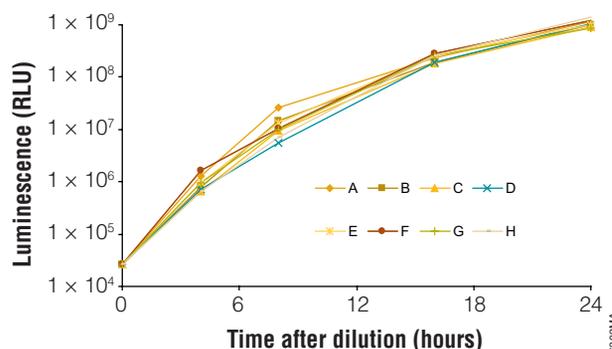


図3. Terrific Brothを用いた場合には、グルコースとラムノースの濃度調節はどちらもホタルルシフェラーゼ発現に影響を及ぼさなかった

pFN6A-lucを導入したKRX菌株をLB培地で一晚増殖させた。一晚培養した菌液を発現誘導用のTB培地（図2のパネルCに示す成分を補充）3 mlで1:100に希釈し、25℃で振盪培養した（希釈時を0時間とする）。ホタルルシフェラーゼ活性は図2に記載した方法で測定した。

CRBP IIの自動誘導

ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを用いたグルコースとラムノースの濃度調節実験に基づき、当社ではLB培地を用いた場合の迅速自動誘導法と遅延自動誘導法を標準化しました。

迅速自動誘導 (Early autoinduction)：一晚培養した菌液をLB培地 (0.05% グルコース、0.1% ラムノース含有) で1:100に希釈する。約8時間後に菌体を回収する。

遅延自動誘導 (Late autoinduction)：一晚培養した菌液をLB培地 (0.15% グルコース、0.1% ラムノース含有) で1:100に希釈する。約16~24時間に菌体を回収する。

この2つの方法を使って、別のタンパク質であるヒト細胞性レチノール結合タンパク質II (CRBP II) をKRX菌株で発現させました。図4のパネルAでは、迅速自動誘導用の培地において8時間後にCRBP IIが誘導されていることがはっきり分かります。図4のパネルBでは24時間後まで顕著なタンパク質発現は見られず、遅延自動誘導用の培地がCRBP IIの発現に影響を及ぼしていることが分かります。

表1. KRX自動誘導実験に影響を与える培地組成

培地	エネルギー供給源	自動誘導法
M9最小培地	20% 炭素源 (例: グルコース)	迅速および遅延自動誘導 (データ未掲載)
Luria-Bertani (LB) 培地	酵母抽出液 0.5% (w/v)	迅速および遅延自動誘導 (図2, 4)
Terrific Broth (TB)	酵母抽出液 2.4% (w/v) グリセロール 0.4% (w/v)	迅速および遅延自動誘導で変化無し (図3)

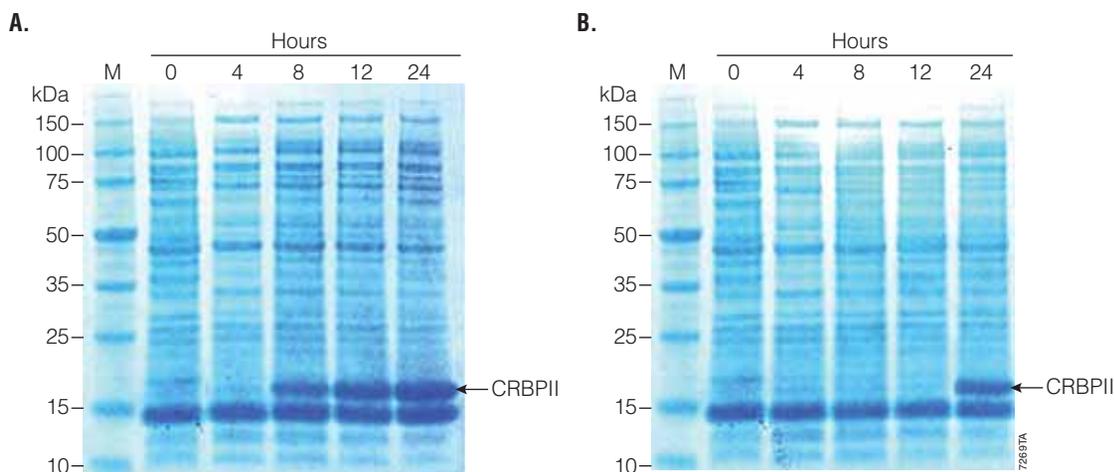


図4. KRX菌株における細胞性レチノール結合タンパク質 II (CRBP II) 発現の自動誘導

LB培地を用いた迅速誘導用 (パネルA) と遅延誘導用 (パネルB) の自動誘導プロトコルについて試験した。pFN6A-CRBP II を導入したKRX菌株をLB培地 (+0.2% グルコース) で一晩増殖させた。この菌液を迅速自動誘導用培地 (LB培地+0.05 %グルコース + 0.1% ラムノース) または遅延自動誘導用培地 (LB培地+0.15 %グルコース + 0.1% ラムノース) 50 ml で1:100に希釈し (希釈時を0時間とする)、25℃で振盪培養した。所定の時点において、0.1 O.D.₆₀₀のKRX菌体を1倍濃度の FastBreak™ Reagent (カタログ番号 V8571) で溶解した。得られたタンパク質を4~12%のNovex NuPAGE® Bis-Trisゲルで泳動し、SimplyBlue™ Safestain (Invitrogen) で染色した。レーンM, Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)。

結論

KRX菌株において組換えタンパク質発現を厳密に制御することにより、タンパク質発現を自動誘導することができます。手順はシンプルで、代表的な大腸菌増殖培地にグルコースとラムノースを添加するだけです。培地にグルコースを添加した場合には、細菌が利用できるエネルギー源を豊富に提供することとなり、増殖は促進されますが、ラムノースによる発現誘導は遅延します。発現誘導培地のグルコース量を調節することにより、タンパク質が発現誘導されるまでの時間を制御することができます。具体的には、迅速に誘導するにはグルコースを低濃度とし、遅延誘導するには高濃度とします。その他のタンパク質や培養容量を用いる場合は最適化が必要となることがあります。特に本稿に示した以外の培地を用いる場合は、最適化が推奨されます。このような自動誘導プロトコルを用いることにより、発現誘導前に菌体密度をモニターする必要がなくなります。一晩培養した菌液を自動誘導用の培地で直接希釈し、8~24時間後に菌体を回収するだけです。これらのプロトコルはKRX菌株での厳密なタンパク質発現制御を立証しています。このことは毒性を有するタンパク質や発現しにくいタンパク質の発現を最適化させる場合に大きな利点となります。

参考文献

- Hartnett, J. *et al.* (2006) *Promega Notes* **94**, 27-30.
- Holcroft, C.C. and Egan, S.M. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 3529-35.
- Zhao, K.Q. *et al.* (2007) *Promega Notes* **96**, 24-6.
- Zhao, K.Q. *et al.* (2007) *Promega Notes* **97**, 28-9.
- Sambrook J. and Russell, D.W. (2001) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., A2.2-2.4.

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
L-Rhamnose Monohydrate	10 g	L5701	6,000
	50 g	L5702	21,000