

## 大腸菌用タンパク質発現ベクター-pEFkにおける基底発現の抑制

基底発現とは、発現非誘導時でもタンパク質発現ベクターから微量にタンパク質が発現される現象です。目的とするタンパク質が毒性を有する場合には、大腸菌内でのプラスミドの不安定化や大腸菌の増殖阻害、目的タンパク質の収量低下等の要因となります。基底発現を抑制する一般的な方法として、グルコース含有培地やローコピープラスミドの使用、大腸菌株の変更などがあげられます。

pEFkおよびpEFaは弊社で開発した大腸菌用タンパク質発現ベクターで、ハイコピープラスミドでありながら一般的なタンパク質発現ベクター（pET）と同様なタンパク質発現が可能です。pEFkおよびpEFaはT7 promotorの上流にlac O3 operator、下流にsymmetric lac operatorを配置しており、pETベクターよりもLacIによる強い抑制がかかるように設計されています（図1）。本実験ではEGFP遺伝子をクローニングしたpEFkおよびpETベクターを用いて、それぞれのベクターの基底発現量を評価しました。

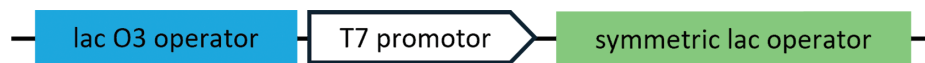


図1 pEFkおよびpEFaのプロモーター領域

## 方法

pET24のNdeI-XhoIサイトにEGFP遺伝子を、pEFkのNdeIサイトにC末端Hisタグ付きEGFP遺伝子をそれぞれクローニングしました（図2）。作製した二種類のEGFP発現ベクターを用いて、タンパク質発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換しました。

形質転換した大腸菌を25 µg/mLのカナマイシンを含むLB寒天培地（IPTGおよびグルコース非添加）にストリークし、37°Cで一晩培養しました。その後、LEDイルミネーターを用いてEGFPの蛍光を観察することにより、各ベクターの基底発現量を評価しました。

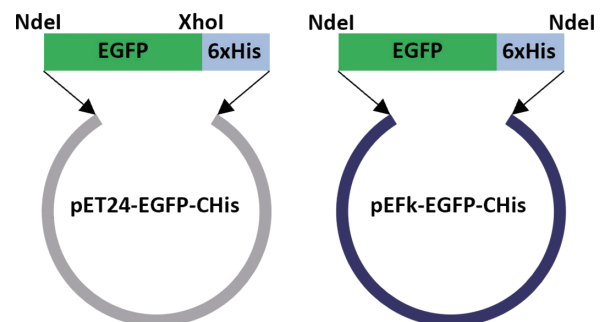


図2 EGFP発現ベクター

## 結果

pETベクターにEGFP遺伝子をクローニングした場合、IPTG非存在下（発現非誘導時）でも、37°Cで一晩培養するとEGFPの蛍光が観察されました。一方、pEFkベクターにEGFP遺伝子をクローニングした場合には、EGFPの蛍光はほぼ観察されませんでした（図3）。この結果から、pETベクターと比較し、pEFkベクターの基底発現量は非常に低く抑えられていることが分かります。

pEFkおよびpEFaは、ハイコピープラスミドであるためベクターの取り扱いが容易です。また今回の実験で示したように、2つのlac operatorにより基底発現が強く抑制されています。このような特徴から、pEFkおよびpEFaベクターは、大腸菌の生育を阻害するようなタンパク質（ヌクレアーゼなど）の発現にも有効です。タンパク質の基底発現にお悩みの際は、pEFk・pEFaベクターを是非ご活用ください。

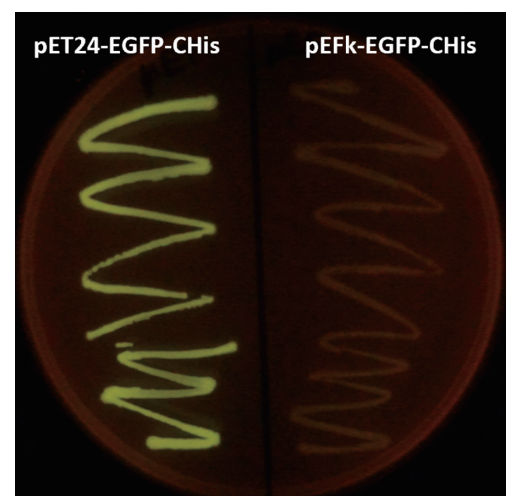


図3 各ベクターのEGFP基底発現