

基底発現量が極めて少ない大腸菌用タンパク質発現ベクターの開発

大腸菌用タンパク質発現ベクター-pEF（弊社開発品）は、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）と同程度のタンパク質発現が可能です。pEFベクターはT7 promotorの上流と下流に2種類のlac operatorを配置することでLacIによる強い抑制がかかるように設計されているため、基底発現が強く抑制されており、大腸菌に生育阻害を引き起こすようなタンパク質（ヌクレアーゼ等）の発現にも有効です。

しかし、pEFベクターを用いても大腸菌の生育に影響が出てしまい目的タンパク質の発現ができないケースが存在します。そこでpEFベクターよりもさらに厳密な発現抑制が可能な新規ベクター（pEF2k、図1）の開発を行いました。
開発した新規ベクター（pEF2k）の特徴

- ① pEFベクターと比較してより活性の強いlac operatorを採用
- ② LacIの結合を最適化するため2つのlac operatorの間隔を最適化

新規ベクター（pEF2k）の性能評価は以下の方法で行いました。

・基底発現量の評価

一般的なpETベクター、pEFkベクターおよびpEF2kベクターにEGFP遺伝子をクローニングし、発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換しました。各形質転換体を37°Cで一晩培養し、発現非誘導条件下でのEGFPの発現量を比較しました。

・タンパク質の発現

pEF2kベクターに、EGFP遺伝子および大腸菌の生育に悪影響を与える酵素遺伝子（ヌクレアーゼA）をクローニングして発現用大腸菌BL21(DE3)を形質転換しました。IPTG添加によるタンパク質発現を行い、得られたタンパク質のHisタグ精製およびSDS-PAGEを行いました。

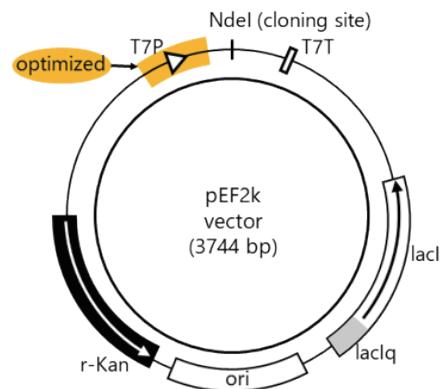


図1 pEF2kのベクターマップ

新規ベクター（pEF2k）による強力な基底発現の抑制

pETベクターではIPTG非添加（発現非誘導条件）でも37°C一晩の培養でEGFPの強い蛍光が観察されました（EGFPの基底発現）。また、pEFkベクターでもpETベクターよりは弱いもののEGFPの蛍光が観察されました。これら2つのベクターと比較し、pEF2kベクターでは、EGFPの蛍光はほぼ観察されませんでした（図2）。また、pEF2kベクターの利用によりEGFPや大腸菌に生育阻害を引き起こすタンパク質（ヌクレアーゼA）の発現も確認できています（図3）。

pEF2kベクターはT7 promotor前後の配列の最適化により、基底発現が非常に低く抑えられています。また、pEFベクターと同様にpEF2kベクターはハイコピー・プラスミドなので取扱いが容易という特徴もあわせ持っています。

基底発現による大腸菌の生育阻害にお悩みの方は、弊社人工遺伝子合成サービスへお問い合わせください。

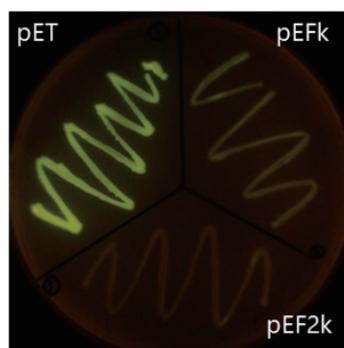


図2 各ベクターのEGFP基底発現

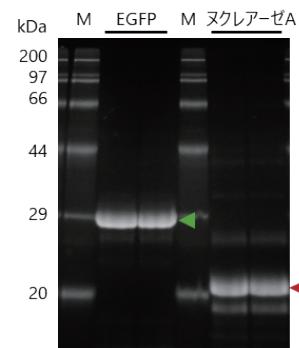


図3 EGFPおよびヌクレアーゼAの発現