

単結晶X線構造解析 基礎講座

第10回 X線構造解析のためのタンパク質の発現

松本 崇*

1. はじめに

生体内で起こる様々な生命現象を明らかにするためには、タンパク質の構造を解明することが非常に重要である。この回ではX線構造解析に向けたタンパク質の発現について解説する。

構造解析を行う上で、最初に直面する課題は発現系の確立である。構造解析を実行するには、高純度なタンパク質を大量に入手する必要がある。そのためには、タンパク質の大量発現・精製を可能とする系の確立が必須である。もともと生体内ではわずかにしか存在しないようなタンパク質でも、遺伝子工学の手法と適切な宿主を用いることで、目的タンパク質（組み換えタンパク質）を大量に発現させることが可能である。このときに重要となるのが、多数存在するタンパク質の発現系の中から、適切な発現系を選択することである。興味のあるタンパク質が原核生物由来か真核生物由来かによっても、使用できる発現系が異なったり難易度が上昇したりする。時として、マルチドメイ

ンタンパク質や構造変化が大きいことが予測される場合には、ドメインのみの領域を選択し発現させる場合がある。構造変化を抑えるためである。また、一般的に発現させたタンパク質を迅速に精製するために、N末端やC末端に精製タグを付加することが多い。時には発現したタンパク質が適切なフォールディングをとらず、発現しているにもかかわらず“封入体”と呼ばれる状態となり、そのままでは精製の出発材料として使用できないことがある。このように、いくつものハードルを越えて初めて、構造解析を行うための出発材料として使用することができるタンパク質を取得することができる。

2. 各発現系の特徴

発現系には原核生物や真核生物を利用するいくつかの種類がある（表1）。

もっとも広く使用されているのが、原核生物である大腸菌を使用する系である。豊富なツールが市販され

表1. 各発現系の特徴.

発現系	メリット	デメリット
大腸菌	低コストで高発現 豊富なツール（ベクター、宿主） 取り扱いが簡便	封入体形成 翻訳後修飾に限りがある
酵母	高発現 糖鎖修飾が可能な場合もある	糖鎖修飾の種類が異なる
昆虫細胞	高発現 糖鎖修飾が可能	高コスト タンパク質分解が起こる 糖鎖修飾が限定される
動物細胞	活性型構造の形成確率が高い 翻訳後修飾が可能	高コスト
無細胞	毒性タンパク質の発現が可能 添加剤存在下での発現が可能 (リボソーム等)	発現量に限度 高コスト

*株式会社リガク X線機器事業部 応用技術センター

ているため、簡便に発現系を構築することができる。高発現も可能で、安価に大量のタンパク質を入手することに適している。しかしデメリットもある。組み換えタンパク質は、宿主細胞本来のタンパク質ではないため、時として、発現量、発現速度およびタンパク質の素性によっては、適切なフォールディングをとらない“封入体”と呼ばれる不溶性の凝集体を形成する。封入体は適切なフォールディングを持たないので、そのままでは精製には使用することができず、発現量や速度のコントロールや宿主変更を行う必要がある。別の手段として、封入体を一度変性させた後に再びフォールディングさせる“リフォールディング”のステップを行い、適切な構造を持つタンパク質の形成を促す方法がある。そのほかにも、真核生物由来のタンパク質の発現にはレアコドンや翻訳後修飾が限定されるため、問題が起こる場合がある。同じアミノ酸をコードするコドンが複数存在する場合があります。生物が通常使用しないコドンのことをレアコドンと呼ぶ。原核生物と真核生物ではレアコドンが異なるため、真核生物のタンパク質を原核生物の宿主で発現させるときに、レアコドンのところで翻訳が停止してしまう場合があり、その結果著しい発現量の低下が見られる。さらに翻訳後修飾にも問題が起こる場合がある。大腸菌では翻訳後修飾が限定されているため、糖鎖修飾のある糖タンパク質であっても糖鎖が付加されない。このような場合には、真核生物を用いた発現系を用いる必要がある。

真核生物である酵母発現系や昆虫細胞発現系では糖鎖修飾が可能であるが、動物細胞とは異なる糖鎖修飾や、限定された糖鎖修飾しか行うことができない。しかしながら発現量が比較的多く、発現コストが下記の動物細胞ほど高くないなどの点から、用いられる場合がある。もちろん、糖鎖修飾が異なっても活性が認められる場合に限定される。昆虫細胞発現系には、発現したタンパク質が分解されてしまうという問題がある。このため、発現と分解の進行具合を把握し、うまくコントロールする必要がある。

一方、動物細胞発現系は動物細胞そのものを利用するため、必要な翻訳後修飾が起こり活性型構造を入手できる可能性が高いというメリットがある。しかし発現コストが非常に高いこと、専用の設備が必要であることから、大量にタンパク質の調整を行うにはハードルが高いといえる。

発現させるタンパク質に毒性がある場合には、封入体を形成したり、まったく発現しなかったり、宿主細胞が溶菌してしまったりする。宿主細胞の保護のためといわれている。このようなときには、無細胞発現系が有効となる可能性がある。無細胞発現系は、大腸菌等の細胞を使用せずに小麦胚芽や大腸菌等の酵素を使

用して、組み換えタンパク質を発現する方法をとる。細胞を使用しないため、毒性のあるタンパク質でも発現できる可能性が高まる。一方発現系のスケールアップのコストが高くなるという欠点もある。

3. 大腸菌発現系構築の手順

もっとも一般的な大腸菌を用いた発現系について記述する。大腸菌発現系では、様々な会社から販売されている発現ベクターを利用する。発現ベクターへ目的タンパク質をコードする遺伝子配列（目的遺伝子配列）を組み込んで使用する。

3.1. 大腸菌発現系ベクター構築

最初に、発現させる領域を選択する。類似タンパク質間でのアミノ酸シーケンスアライメントを行い、構造を知りたい機能ドメインの場所が推測できる場合には、このドメインだけを発現させる場合もある。また、結晶化においては、タンパク質分子中に揺らぎの大きい領域や、一定のフォールディングを持たない領域などが存在する場合、結晶化に悪影響を与えることがある。このため、二次構造予測や類似タンパク質の構造から、揺らぎが大きいと推測できる領域が存在する場合には、揺らぎが大きい領域を削った組み換えタンパク質を発現させれば、結晶化の成功率が上昇すると考えられる。ドメイン間に大きな一定のフォールディングを持たないと推測される領域やループ構造が存在するような場合には、この部分を削除し適当なリンカーで結合することも一つの手段となる。発現領域を決定後に、制限酵素切断配列付きのプライマーを使用しPCRで目的遺伝子配列を増幅し、次に発現ベクターへ目的遺伝子配列を組み込む。このときに各発現ベクターのマルチクローニングサイト（MCS）を使用する。MCSには複数の制限酵素切断配列があるので、PCRで使用した制限酵素切断配列と同じものを利用し、発現ベクターと目的遺伝子配列をつなぐ。

しばしば、組み換えタンパク質を迅速に精製するための“アフィニティータグ（タグ）”を、組み換えタンパク質のN末端かC末端に付加する。タグをつけることで、アフィニティー精製が利用できるようになり、1ステップの精製で純度が格段に上がる。タグには、いろいろな種類があるが、主に使用されているものはHis（Histidine）タグとGST（Glutathione S-transferase）タグの2種類になる。Hisタグは通常6残基連続したHisを、N末端かC末端に付加する。GSTタグは約23 kDaのGSTを、組み換えタンパク質のN末端に融合する。GSTタグはタンパク質であるので、GSTタグと組み換えタンパク質の間にプロテアーゼ切断サイトを入れておき、精製終了後にGSTタグを切り離すのが一般的である。発現ベクターにGSTタグと目的タンパク質の遺伝子配列のクローニングサイトの間に、プロテ

アーゼ切断配列が組み込まれたものが販売されているので、簡単に利用することができる。His タグの場合には、付加したアミノ酸が 6 残基程度であるので、切断除去を行わなくても結晶化に大きな影響は出ない場合が多いため切断しないことが多い。時には結晶のパッキングへの悪影響（分解能の低下）を避けるため、切断除去を行う場合もある。His タグでも、プロテアーゼ切断配列が組み込まれた発現ベクターが販売されているため、手軽に試すことができる。

3.2. 大腸菌の選択および組み込み

大腸菌発現系に用いる大腸菌には、様々な種類がある。広く使用されている BL21 株のほかに、毒素タンパク質に対して耐性のある株、レアコドンに補う株などが販売されている。まずは一般的な BL21 株へ組み込み、発現をチェックし、発現が少ない場合や封入体が多く形成している場合に、他の大腸菌株への組み込みを試みる。発現ベクターの大腸菌への組み込みには、コンピテントセルを利用し形質転換を行う。コンピテントセルは各社より販売されているが、コンピテントセルの自作もさほど難しくないので、目的や状況に応じて使い分ける。コンピテントセルへ作成した発現ベクターを組み込んだ後、発現ベクターの持つ薬剤耐性遺伝子に合わせた寒天培地で大腸菌をスプレッドし培養することにより、発現ベクターが入っているあるいは入っていない大腸菌を選別することができる。発現ベクターを持つ大腸菌は、薬剤耐性を持つので生育することができるが、持たないものは生育することができない。

3.3. 発現の確認

寒天培地で生育した大腸菌（コロニー）を、薬剤存在下の液体培地（LB 培地等）で培養する。まず試験管で 5 ml 程度を前培養し、次に三角フラスコで 50 ml 程度の本培養を行う。発現誘導を行う前の大腸菌を 10 ml 程分取する。誘導前の大腸菌は、誘導前後で目的タンパク質の発現度合いを見るために使用する。対数増殖期に発現開始試薬（isopropyl β -D-thiogalactopyranoside 等）を添加し、タンパク質発現を誘導する。最初の培養・誘導温度は 37°C で行う。誘導開始数時間後に大

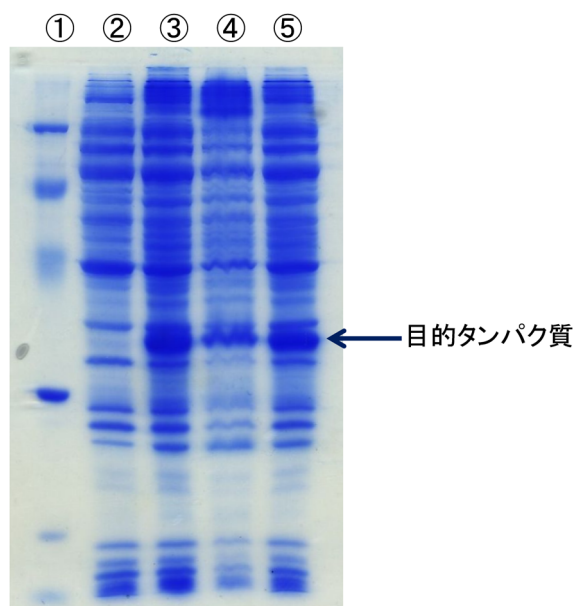


図 1. SDS-PAGE 電気泳動によるタンパク質発現チェックの例。
①：分子量マーカー ②：誘導前 ③：誘導後
④：不溶性画分 ⑤：可溶性画分

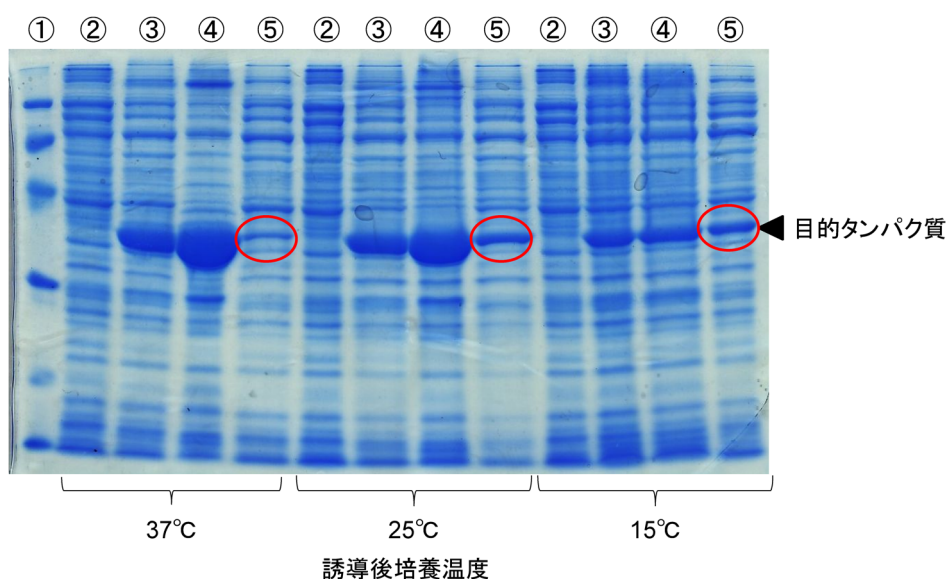


図 2. 発現誘導温度を変化させたときの SDS-PAGE 例。
低温での誘導を行うことで目的タンパク質の発現量は低下しているが、可溶性画分での存在量が増加している。
①：分子量マーカー ②：誘導前 ③：誘導後 ④：不溶性画分 ⑤：可溶性画分

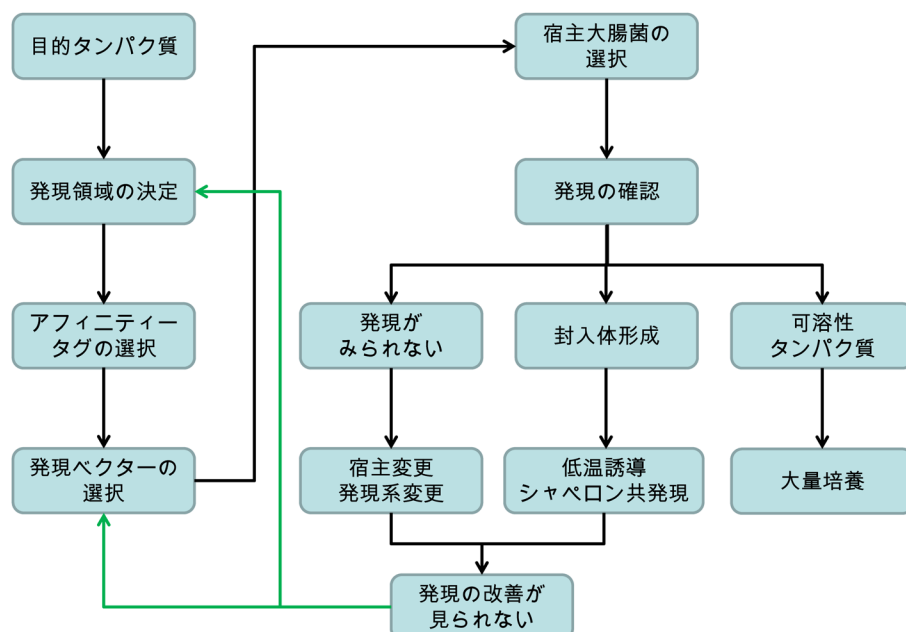


図3. 大腸菌発現系構築および発現チェックのフローチャート。

腸菌の遠心分離を行い集菌する。集菌した大腸菌を数回緩衝液で洗浄後、超音波破碎機で破碎する。破碎後遠心分離を行い、不溶性画分と可溶性画分に分ける。発現誘導前、発現誘導後、不溶性画分および可溶性画分を用いてSDS-PAGEを行い、目的タンパク質が発現しているか、可溶性タンパク質として発現しているかをチェックする（図1）。

3.4. 発現条件の最適化

発現チェックの状態に合わせて、発現条件の最適化を行う。目的タンパク質が可溶性画分に発現しており、かつ発現量も十分な場合には結晶化に向けた大量培養へ進む。可溶性画分に発現はしているが、発現量が少ない場合には、大腸菌自身の発現密度を増加させるため、より栄養分の高い培地を使用して発現チェックを試みる。目的タンパク質が発現はしているが封入体を形成している場合には、誘導時の培養温度を下げる。通常の誘導時の培養温度は37℃で行うが、発現量が非常に多い場合にはフォールディングがうまく行われずに封入体を形成してしまうことがある。このときには、誘導時の培養温度を37℃から25℃、15℃等に応じて誘導培養を行う。低温での誘導培養を行うと発現量は下がるが、一部の目的タンパク質が正しくフォールディングされ、可溶性画分に現れる可能性がある（図2）。低温発現でも改善が見られない場合には、シャペロンタンパク質をコードしたベクターが販売されているので、目的タンパク質とシャペロンを共発現させることも可能である。シャペロンが豊富に存在するこ

とで、正しいフォールディングが促され、可溶性画分に現れる可能性がある。

目的タンパク質の発現が見られない場合には、大腸菌にとって毒性が高いため、発現しない可能性が考えられる。その場合、宿主大腸菌を毒に耐性のある株に変更することで、発現改善を試みる。目的タンパク質がヒト等真核生物由来のタンパク質の場合にはレアコドンの問題で発現しない場合がある。真核生物由来のタンパク質を発現させる場合には、レアコドンを補う宿主大腸菌を使用することで、発現が上昇する可能性が上がる。

最適化を試みても目的タンパク質の発現量が改善しないときや、可溶性の改善（封入体から可溶性画分への移行）が見られない場合には、発現ベクターの変更や発現領域の再検討を行う。

4. まとめ

大腸菌を用いた発現系は、各社から多様なツール、ベクターおよび宿主大腸菌が用意されており簡便に低コストで高発現が期待できる。さらに真核生物のレアコドン問題に対応した宿主大腸菌も販売されており、大腸菌を用いた真核生物のタンパク質の発現例も多数見られる。目的タンパク質が原核生物や真核生物由来であれ、まずは大腸菌発現系を試み（図3）、発現量や封入体が改善されない場合には、真核生物由来の発現系を試みるという手順が良いと考えられる。