

蛍光タンパク質の各種変異体を用いた生命系学生実験教材の開発

中井 忠志*

(令和元年10月31日受付)

Development of a Fluorescent Protein-based Laboratory Course for Life Science Students

Tadashi NAKAI

(Received Oct. 31, 2019)

概要

DNA からタンパク質への遺伝情報の流れは生命系の学生にとって重要で基礎的な学修内容であるが、深い学びのためには学生実験でDNAとその産物のタンパク質とともに細胞から抽出・精製し、それらの性質を調べるといった実習が望まれる。しかし、学生実験では1つのテーマに割ける時間は限られているので、短期間でそれらの関連分野をまとめて学修できる内容を検討した。その結果、緑、赤、藍、橙の4色の蛍光タンパク質(それぞれ、GFP、RFP、CFP、OPF)の各遺伝子を大腸菌に導入し、少量の培養液から各蛍光タンパク質を精製できる系を開発した。構築したプラスミドは、高コピーの複製起点とアンピシリン耐性遺伝子を持ち、ポリヒスチジンタグを融合させた各蛍光タンパク質の高発現を可能とする。各蛍光タンパク質を発現した大腸菌はいずれも明瞭な色を呈し、Niアフィニティカラムにより容易に発現タンパク質を精製できる。

Key Words: fluorescent protein, protein expression, protein purification, GFP mutant

1. はじめに

大学の生命学部でもっとも重要で基礎的な学修内容の一つとしてセントラルドグマがあげられる。DNAの遺伝情報に基づいてタンパク質が細胞内で生合成されるという流れやその仕組みは大学の授業科目でも初期に学ぶ内容であるが、学生実験においてもその分野に対応するテーマを扱うことにより、より理解が深まることが期待できる。また、この分野は遺伝子組換えによるタンパク質の生産というバイオテクノロジーによる物質生産の重要なテーマであるため、工業的応用という意味でも実践的な学びが期待される。本学では2020年にカリキュラム改訂を行うが、その機会に食品生命科学科の学生実験の1テーマとしてDNAからタンパク質、遺伝子型と表現型の分野の実験内容を再検討し、学生実験教材の開発を進めることとした。その際

には以下の条件を設定した。

- 主要な生体分子として遺伝子(DNA)とタンパク質の両方を物質として取り扱う。
 - 遺伝子型と表現型を簡単に観察できる。
 - DNAとタンパク質を精製し、電気泳動で検出する。
- これらの条件を満たすものとして、発現タンパク質自体が色をもち、目視で観察が可能な蛍光タンパク質やそれらの各種変異体が有用であると考え、学生実験で扱いやすいプラスミドの構築と実験プログラムの検討を行った。

緑色蛍光タンパク質(GFP; green fluorescent protein)は、最初に単離された蛍光タンパク質で、野生型では238アミノ酸残基から構成される(1)。GFPの由来はオワンクラゲ *Aequorea victoria* であり、1962年に下村脩によりタンパク質が単離された(2)。その後、1992年に Douglas Prasher により全長の遺伝子がクローン化され(1)、1994年

* 広島工業大学生命学部食品生命科学科

に Martin Chalfie により細菌や線虫で発現させても蛍光を示すことが証明された(3)。このことは、蛍光をもつために外来の基質や他の遺伝子が不要であること意味しており、その後は急速に GFP を利用した研究が拡大した(4)。

GFP は11本の β ストランドからなる樽形の β バレル構造をもち、その内部を通るポリペプチド鎖に位置する 3 アミノ酸残基 (Ser65, Tyr66, Gly67) が発色団を自己触媒的に形成することで蛍光を示す。Roger Y. Tsien らは、GFP 遺伝子のクローン化の直後から変異導入を開始し、1994年に青、藍、黄の蛍光タンパク質 (それぞれ、blue, cyan, yellow の頭文字とり、BFP, CFP, YFP と略される) を作製するとともに(5)、1996年に Remington らと GFP の結晶構造を決定し(6)、発色団の構造と機能の関係を明らかにした。2008年には下村、Chalfie、Tsien の 3 氏にノーベル化学賞が授与された。

蛍光タンパク質の色は GFP への変異導入により青、藍、黄が初期に開発されたが、赤などの黄よりも長波長の蛍光タンパク質を GFP の変異により作り出すことは困難であった(4)。赤色蛍光タンパク質 (RFP; red fluorescent protein) としては、1999年にサンゴ類に属するイソギンチャク的一种 *Discosoma striata* から DsRed が単離され、遺伝子がクローン化された(7)。DsRed は低いながらも GFP と相同性をもち (アミノ酸配列上は19%が同一残基)、その立体構造も GFP に類似した β バレル構造をもち、DsRed の野生型は四量体で存在するため、融合タンパク質として用いるには扱いづらいという欠点があったが、変異導入により単量体化した mRFP1 が開発された。その後、赤付近に他の蛍光色をもつ mRFP1 変異体 (orange fluorescent protein (OFP) である mOrange をはじめ、mCherry、mStrawberry など蛍光波長が異なるもの) が開発された。GFP や mRFP1 の誘導体である様々な蛍光タンパク質は、生物系の研究で広く用いられており、現在これらの融合タンパク質は、遺伝子発現やタンパク質の局在マーカーとして多方面で利用されている。

GFP を用いた学生実験用の教材としては、バイオラッド社の製品である pGLO プラスミドが知られている。pGLO は、GFP 遺伝子、アンピシリン (Ap) 耐性遺伝子、*araC* 遺伝子、ColE1 複製起点を含む5,371bp のプラスミドである。GFP 遺伝子の上流にはアラビノースオペロンのプロモーター (P_{BAD}) が配置され、pGLO で形質転換した大腸菌はアラビノースを含む培地で培養することで GFP を発現し、アラビノースを含まない培地では GFP が発現しないため、原核生物での遺伝子発現調節を学ぶためにも有用である。一方、pGLO は cycle-3 GFP (8) という改良型の変異型遺伝子をもつが、それより高性能な EGFP (9) がもつ F64L と S65T の変異 (成熟が早く輝度が高い特長を

もたらす) が cycle-3 GFP には含まれない。また、組み換え型タンパク質の精製において現在主流の方法ではアフィニティタグを用いて少ないステップで高純度に精製するが、pGLO の GFP にはそのようなタグが付加されておらず疎水性カラムクロマトグラフィー等で精製することが想定されている。そのため、pGLO を用いて純度の高い精製タンパク質を得るためには複数の種類のカラムクロマトグラフィーが必要であるという欠点が存在する。

既報の GFP の精製を題材とした教育プログラムとしては、ポリヒスチジンタグ (H_6 タグ) 融合 GFP タンパク質を用いて、ニッケル (Ni) アフィニティクロマトグラフィーで精製を行うという内容が東京薬科大学の玉腰により報告されている(10)。そこでは、タンパク質の高発現のために幅広く用いられている pET 系発現プラスミドと宿主として大腸菌 BL21 (DE3) を用いて GFP を生産し、Ni-NTA 樹脂を用いてアフィニティ精製が行われている。用いた GFP の変異についての記述はないので、その安定性や輝度については不明である。一方、プラスミド DNA を調製する場合にはタンパク質発現用の上記大腸菌とは異なる遺伝子操作用の株 (例えば、JM109 や DH5a など) を通常用いる。また、pET プラスミドを用いた場合には、pUC プラスミドの 1 割程度のプラスミド DNA の収量となり、収率が低いことも初心者には不利となる。したがって、実習内で発現タンパク質だけでなくプラスミド DNA の精製も行う場合には、時間の制約を考慮すると同一の大腸菌株を用い、収量の高い pUC などの高コピーのプラスミドベクターの使用が望まれる。

本研究では、新しいカリキュラム内の学生実験で用いる実験教材として、限られた実習時間の中で効率よく手法を学ぶために、以下の 2 つの条件を満たす GFP 発現系の開発を試みた。(1) 蛍光タンパク質の発現プラスミド DNA と発現した蛍光タンパク質そのものを、同じ大腸菌株を宿主として大量に生産できる。(2) Ni キレートアフィニティークロマトグラフィーにより、一段階で蛍光タンパク質の高純度精製ができる。一方、これまでの蛍光タンパク質研究の進歩により、様々な特長をもつ蛍光タンパク質変異体が報告されている。その中には、より高い安定性をもち扱いやすく、より蛍光強度が高く、緑以外にも幅広い色を示すものなど多くの報告がなされている(4)。そこで、本研究では、種々の既知の蛍光タンパク質から 4 種類のアミノ酸配列情報を利用して、上にあげた条件を満たす発現系の構築を試みた。その結果、4 種類いずれの配列の場合でもすべての条件を満たす実験系を開発できたので報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

プラスミドの構築およびタンパク質の発現には大腸菌 JM109株のコンピテントセル (ECOS Competent *E. coli* JM109, ニッポンジーン) を使用した。大腸菌の培養は LB 培地 (液体培地の組成は1.0% トリプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウムを用い、固形培地ではさらに1.5% 寒天を加えた) を用い、好気性条件下、37°Cで行った。プラスミドの形質転換体の培養では、各プラスミド内の薬剤耐性遺伝子に対応する抗生物質を以下の終濃度になるよう培地に加えた。50μg/mL Ap、30μg/mL ストレプトマイシン (Sm)。

カルボキシ末端 (C末端) にH₆ タグを付加したタンパク質の発現プラスミドを作製するため、C末端 H₆ タグ融合 sQhpC タンパク質の発現プラスミド (pBBR-sQhpC-H₆) (11) を骨格として使用した。このプラスミドは、T7プロモーター下流の NdeI/BamHI 部位に sQhpC 遺伝子、NheI 部位、6 個の His コドン、終止コドンとその順序で挿入したものである。その中の NdeI/NheI 部位に目的遺伝子を挿入することで、C末端側にアミノ酸配列 ASHHHHHH (AS は NheI 部位の 6 塩基に対応) が付加されたタンパク質が発現できる。制限酵素はすべて New England Biolabs Japan の製品を用い、NdeI を

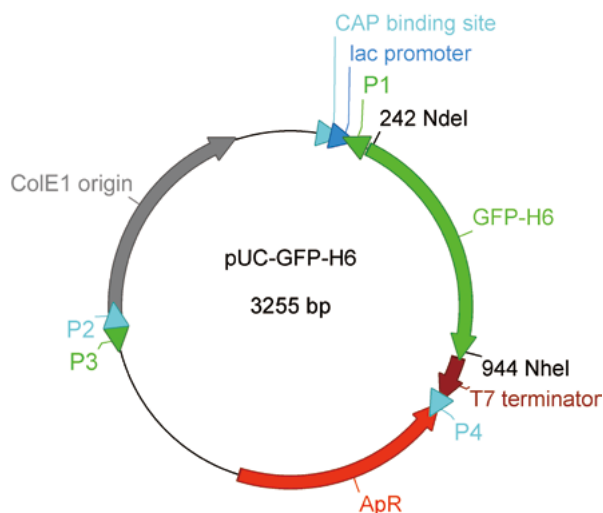


図1 プラスミド pUC-GFP-H₆ の模式図

除いてハイフィデリティー (HF) 版を使用した。PCR に用いたプライマーの配列を表 1 に示した。

2.2 蛍光タンパク質発現プラスミドの構築

構築した 4 種類のプラスミドを代表して pUC-GFP-H₆ の模式図を図 1 に示した。その他のプラスミド (pUC-RFP-H₆、pUC-CFP-H₆、pUC-OFP-H₆) については、pUC-GFP-H₆ の GFP 遺伝子 (NdeI/NheI 間の703bp) をその他の蛍光タンパク質遺伝子で置換することにより構築した。いずれの蛍光タンパク質遺伝子も化学合成した人工遺伝子を用い、N 末端側に NdeI、C 末端側に NheI の制限酵素部位を配置した (表 2)。また、大腸菌において発現量が最大になるように使用コドンが大腸菌にあわせて最適化した塩基配列を使用した (表 2)。

pUC-GFP-H₆ の構築方法を以下に示す。pBBR-sQhpC-H₆ の pBBR1 複製起点を含む領域 (XbaI/PstI 間の1704bp)、Sm 耐性遺伝子を含む領域 (SphI/EcoRV 間の1373bp)、sQhpC をコードする領域 (NdeI/NheI 間の158bp) を、それぞれ、プラスミド pUC19 の ColE1 複製起点を含む領域 (図 1 の XbaI/PstI 間の1056 bp、表 1 のプライマー P1、P2 が対応)、pUC19 の Ap 耐性遺伝子を含む領域 (SphI/StuI 間の1245bp、表 1 のプライマー P3、P4 が対応)、GFP 遺伝子 (図 1 の NdeI/NheI 間の703bp) で置換することにより構築した。その過程では、必要な制限酵素部位を 5' 末端に付加したプライマー (表 1) を用い、pUC19 を鋳型として PCR により増幅して得られた断片を制限酵素で切断した。次いで各断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用いて抽出・精製した。T4 DNA リガーゼ (DNA Ligation Kit, Mighty Mix, タカラバイオ) を用いて断片同士を接続した後、ライゲーション反応溶液を用いて形質転換した大腸菌を LB 寒天培地 (Ap 入り) に塗布し、37°C で一晚培養することで形質転換体のコロニーを得た。シングルコロニーを 2 mL の LB 培地 (Ap 入り) に移し、37°C で一晚振盪培養した。培養液を 6,000rpm、10 分間の遠心分離により集菌し、菌体からのプラスミドの精製は、基本的にはアルカリ抽出法(12)にスピナラム法を組み合わせた方法(13)に従い、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) を用

表 1 プラスミド構築に用いたプライマー

プライマー名	塩基配列 ^a	制限酵素部位
P1	5' -GCTCTAGAGGGGAATTGTATCCGCTCACAAT-3'	XbaI
P2	5' -TATACTGCAGTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG-3'	PstI
P3	5' -TATAGCATGCACTCTCAGTACAATCTGCT-3'	SphI
P4	5' -CCTTACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'	StuI

^a 制限酵素部位を下線で示した。P4 は StuI の制限酵素部位の半分を含む。

いて行った。構築した4種類の発現プラスミドはすべて DNA シークエンシングを行い、塩基配列に意図しない変

表2 本研究で用いた蛍光タンパク質の人工遺伝子

遺伝子名	塩基配列 ^a						
GFP	<u>CATATGCGCA</u>	AAGGTGAAGA	ACTGTTTACC	GGTGTGTTC	CGATTCTGAT	TGAACTGGAT	
	GGTGATGTGA	ATGGCCATAA	ATTCTTTGTT	CGTGGTGAAG	GCGAAGGTGA	TGCAACCATT	
	GGTAAACTGA	GCCTGAAATT	TATCTGTACC	ACCGGCAAAAC	TGCCGGTTCC	GTGGCCGACC	
	CTGGTTACCA	CCCTGACCTA	TGGTGTTCAG	TGTTTTAGCC	GTTATCCGGA	TCACATGAAA	
	CGCCACGATT	TTTTCAAAAAG	CGCAATGCCG	GAAGGTTATG	TTCAAGAACG	TACCATCTAT	
	TTCAAAAGATG	ACGGCACCTA	TAAAACCCGT	GCCGAAGTTA	AATTTGAAGG	TGATACCCTG	
	GTGAATCGCA	TTGAACTGAA	AGGCATCGAT	TTTAAAGAAG	ATGGCAATAT	CCTGGGCCAC	
	AAACTGGAAT	ATAATTTTAA	CAGCCACAAA	GTGTACATCA	CCGAGATAA	ACAGAACAAT	
	GGCATCAAAG	CCAATTTTAC	CATTCGCCAT	AATGTGGAAG	ATGGTAGCGT	GCAGCTGGCA	
	GATCATTATC	AGCAGAATAC	CCCGATTGGT	GATGGTCCGG	TTGATCTGCC	GGATGATCAC	
	TATCTGAGCA	CCCAGACCAT	TCTGAGCAAA	GATCTGAATG	AAAAACGCGA	TCACATGGTG	
	CTGCTGGAAT	ATGTTACCGC	AGCAGGTATT	ACCGATGCAA	<u>GCGCTAGC</u>		
	RFP	<u>CATATGGGCG</u>	AAGAGGATAA	TATGGCCATC	ATCAAAGAAT	TTATGCGCTT	TAAAGTGCAC
		ATGGAAGGTA	GCGTTAATGG	CCATGAATTT	GAAATTGAAG	GTGAAGGCGA	AGGTCATCCG
		TATGAAGGCA	CCCAGACCGC	AAAAGTGAAG	GTTACCAAAG	GTGGTCCGCT	GCCGTTTGCA
TGGGATATTC		TGAGTCCGCA	GTTTATGTAT	GGTAGCAAAG	CCTATGTTAA	ACATCCGGCA	
GATATCCCGG		ATTATCTGAA	ACTGAGCTTT	CCGGAAGGTT	TTACCTGGGA	ACGTGTTATG	
AATTTTGAAG		ATGGTGGTGT	TGTTACCGTT	ACCCAGGATA	GCAGCCTGCA	GGATGGTGAA	
TTTATCTATA		AAGTTAAACT	GCTGGGCACC	AATTTTCCGA	GTGATGGTCC	GGTTATGCAG	
AAAAAAACCA		ATGGTTGGGA	AGCAAGCACC	GAACGTATGT	ATCCGGAAGA	TGGCGCACTG	
AAAGTGAAAA		TTAATCAGCG	CCTGAAACTG	AAAGATGGTG	GCCATTATGA	TGCAGAAGTT	
AAAACCACCT		ATAAAGCCAA	AAAACCGGTT	CAGCTGCCTG	GTGCATATAA	CGTTGATATT	
AAACTGGATA		TCACCAGCCA	CAACGAGGAT	TATACCATTG	TTGAACAGTA	TGAACGTGCA	
GAAGGTCGTC		ATAGCACCGG	TGGTGCTAGC				
CFP		<u>CATATGTCAA</u>	AAGGCGAAGA	GCTGTTTACC	GGCGTAGTAC	CGATTCTGGT	TGAACTGGAT
		GGCGATGTTA	ACGGCCATAA	ATTCACTGTT	CGTGGCGAAG	GAGAAGGTGA	TGCGACTAAT
		GGCAAATTGA	CCCTGAAATT	CATCTGTACG	ACGGGAAAAC	TGCCTGTGCC	GTGGCCTACC
	CTGGTGACGA	CGCTTACTTG	GGGTGTACAG	TGCTTTTCTC	GCTATCCAGA	CCACATGAAA	
	CGCCATGACT	TCTTCAAAAAG	TGCTATGCCG	GAAGGCTATG	TGCAAGAACG	TACCATCAGC	
	TTTAAGGACG	ATGGGACCTA	CAAAAACCCGT	GCAGAAGTCA	AGTTCGAGGG	TGATACCTTA	
	GTGAATCGCA	TTGAACTGAA	AGGGATTGAC	TTTAAAGAAG	ATGGCAATAT	CTTGGGCCAT	
	AAGCTGGAGT	ACAACTTTAA	CTCGCATAAC	GTCTACATTA	CCGCTGATAA	ACAGAAGAAT	
	GGAATCAAGG	CCAACTTCAA	AATCCGCCAC	AACGTTGAAG	ATGGTTCCGGT	CCAACTTGCG	
	GATCACTATC	AGCAGAATAC	TCCGATTGGG	GACGGTCCAG	TGTTATTACC	CGATAACCAC	
	TATCTCAGCA	CACAGAGCAA	ACTGTCCAAA	GACCCCAATG	AGAAAACGGGA	TCACATGGTG	
	TTGCTGGAGT	TTGTGACAGC	AGCGGGTATT	ACGCATGGTA	TGGACGAACT	<u>CTATAAAGCT</u>	
	AGC						
	OFP	<u>CATATGGTTT</u>	CGAAAGGCGA	AGAGAACAAC	ATGGCGATTA	TTAAGGAATT	TATGCGCTTT
		AAAGTCCGCA	TGGAAGGGAG	CGTAAATGGC	CATGAGTTTG	AGATTGAGGG	TGAAGGCGAA
GGGCGTCCCT		ATGAAGGCTT	CCAAACCGCG	AAACTGAAAG	TGACGAAAGG	CGGCCCATTG	
CCCTTTGCAT		GGGATATTTT	GTCACCACAG	TTCACTTATG	GAAGCAAAGC	CTACGTGAAA	
CATCCGGCGG		ACATTCCGGA	CTATTTCAAA	CTGTCTGTTT	CTGAAGGGTT	TAAATGGGAG	
CGCGTAATGA		ACTTCGAAGA	TGGTGGTGTG	GTAACCGTGA	CGCAGGACTC	TAGCCTCCAG	
GATGGTGAGT		TCATCTACAA	GGTGAATTA	CGCGGCACCA	ACTTTCGGTC	GGATGGCCCG	
GTCATGCAGA		AGAAAACCTAT	GGGTGGGAA	GCTAGTTCCG	AACGCATGTA	TCCGGAAGAT	
GGAGCCCTGA		AAGGGGAGAT	CAAAAATGCGC	TTAAAACCTGA	AGGACGGTGG	CCACTACACC	
AGCGAGGTTA		AGACCACGTA	TAAAGCCAAG	AAACCGGTTT	AACTGCCTGG	AGCCTATATT	
GTGGGTATCA		AACTCGACAT	CACCAGTCAC	AATGAAGATT	ACACGATTGT	GGAACAGTAC	
GAACGTGCGG		AAGGTCGTCA	TTCAACTGGT	GGCATGGATG	AGCTGTACAA	<u>AGCTAGC</u>	

^aセンス鎖の塩基配列 (5'→3') のみを示し、制限酵素部位 (NdeI, NheI) を下線で示した。

表3 本研究で用いた蛍光タンパク質のアミノ酸配列

蛍光タンパク質名	アミノ酸配列 ^a
GFP-H ₆	MRKGEELFTG VVPILIELDG DVNGHKFFVR GEGEGDATIG KLSLKFICTT GKLPVPWPPTL VTTLTYGVQC FSRYPDHMKR HDFSFKSAMPE GYVQERTIYF KDDGTYKTRA EVKFEQDGLV NRIELKIGIDF KEDGNILGHK LEYNFNESHKV YITADKQNNG IKANFTIRHN VEDGVSQDLAD HYQQNTPIGD GPVLDLPDDHY LSTQTILSKD LNEKRDHMLV LEYVTAAGIT DASASHHHHH H
RFP-H ₆	MGEEDNMAII KEFMRFKVHM EGSVNGHEFE IEGEGEGHPY EGTQTAKLKV TKGGPLPFAW DILSPQFMYG SKAYVKHPAD IPDYLKLSFP EGFTWERVMN FEDGGVVTVT QDSSLQDGEF IYKVKLLGTN FPSDGPVMQK KTNNGWEASTE RMYPEDGALK GEINQRLKLV DGGHYDAEVK TTYKAKKPVQ LPGAYNVDIK LDITSHNEDY TIVEQYERAE GRHSTGGASH HHHHH
CFP-H ₆	MSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVR GEGEGDATNG KLTLKFICTT GKLPVPWPPTL VTTLTWGVQC FSRYPDHMKR HDFSFKSAMPE GYVQERTISF KDDGTYKTRA EVKFEQDGLV NRIELKIGIDF KEDGNILGHK LEYNFNESHNV YITADKQKNG IKANFKIRHN VEDGVSQDLAD HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LSTQSKLSKD PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDELYKAS HHHHHH
OPF-H ₆	MVSKGEENNM AIIKEFMRFK VRMEGSVNGH EFEIEGEGEG RPYEGFQTAK LKVTKGGPLP FAWDILSPQF TYGSKAYVKH PADIPDYFKL SFPEGFKWER VMNFEDGGVV TVTQDSSLQD GEFIYKVKLR GTNFPSDGPV MQKKTMGWEA SSERMYPEDG ALKGEIKMRL KLDKGGHYTS EVKTTYKAKK PVQLPGAYIV GIKLDITSHN EDYTIVEQYE RAEGRHSTGG MDELYKASHH HHHH

^a各蛍光タンパク質において発色団を構成する3アミノ酸残基（GFPのThr65, Tyr66, Gly67, RFPのMet65, Tyr66, Gly67, CFPのThr65, Trp66, Gly67, OPFのThr65, Tyr66, Gly67）を下線で示した。

異が入っていないことを確認した。

2.3 蛍光タンパク質の発現と精製

それぞれの蛍光タンパク質発現プラスミドで大腸菌を形質転換し、LB寒天培地（Ap入り）を用いて37℃で一晩培養することでコロニーを得た。シングルコロニー1個を100mLのLB培地（Ap入り）に移し、37℃で24時間振盪培養した。培養終了後、培養液を50mLの遠沈管に移し、6,000rpm、4℃、20分間の遠心分離を2回繰り返すことで、100mLの培養液中の菌体を1本の遠沈管に沈殿として集めた。遠沈管の上澄みの培地を取り除いた後、使用するまで菌体を遠沈管内で-20℃にて冷凍保存した。

氷上で解凍した菌体に40mLの溶菌バッファー（10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、500mM塩化ナトリウム）を加え十分に懸濁した後、超音波破碎を行い20,000×g、4℃、60分の遠心分離により上清を回収し、抽出液を得た。なお、超音波破碎では、菌懸濁液の入った遠沈管を氷上に置き、超音波破碎機 Sonifier250（Branson）を用い、output5、duty50%、1分破碎、1分休止の過程を合計3回繰り返した。

遠心後の各抽出液は、溶菌バッファーで平衡化したNiキレートカラム（ベッド体積1mL、cOmpete His-tag purification resin、ロシュ）に吸着させた。次いで、洗浄バッファー（10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、

500mM塩化ナトリウム）10mLで非特異的にカラムに結合した夾雑タンパク質を洗浄し、溶出バッファー（10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、500mM塩化ナトリウムを含む、500mMイミダゾール）で溶出した。蛍光タンパク質を含む溶出液は、いずれも特有の色をもつため目視により蛍光タンパク質を含む溶出液を試験管に分取した。各画分について、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を行った。なお、SDS-PAGEでは、基本的にはLaemmliの方法(14)に従ったが、ゲルには市販品であるAny kDミニプロテインTGXプレキャストゲル（バイオラッド）を用いた。泳動後のゲルはコロイドCBB染色(15)を行い、タンパク質バンドを検出した。精製タンパク質濃度の定量はBradford法(16)に従い、プロテインアッセイCBB溶液（5倍濃縮）（ナカライ）を用いて定量した。

3. 結果

3.1 蛍光タンパク質のアミノ酸配列の選択

本研究では蛍光波長の異なる4種類の蛍光タンパク質の人工遺伝子を用いた。使用したアミノ酸配列を表3に示した。GFPについては、高い構造安定性をもつsuperfolder（sf）型のGFP（sfGFP）をさらに改良したGFP_{opt}のアミノ酸配列(17)を用いた。なお、GFP_{opt}は3本のポリペプチ

ド鎖に分割して発現させても、それらの再会合により蛍光を示す改変型 GFP である(17)。RFP については、単量体である mCherry の高安定型の sfCherry のアミノ酸配列(18)を用いた。CFP についても、単量体であり高安定型の sfCFP のアミノ酸配列(19)を用いた。OFP については、単量体である mOrange のアミノ酸配列(20)を用いた。

3.2 形質転換体コロニーの発色とプラスミド DNA の精製

構築した 4 種類の蛍光タンパク質発現プラスミドで形質転換され、LB 寒天培地に生じた大腸菌コロニーは白色光では着色はわずかであり、ほぼ白色を示した。一方、プラスミドを調製するために、シングルコロニーを 2mL の LB 培地に接種し 37°C で一晚培養した場合には、集菌後の菌体はそれぞれに特有な色を呈していた(後述の発現時の培養液と同様の着色)。また、最初に生じた白色のシングルコロニーを、終濃度 1mM の IPTG を含む LB 寒天培地に接種して一晚培養した場合には寒天培地上で強い着色がみられ、青色光を照射することで特有の蛍光色を示した(図 2)。これらの 2mL の培養液から、いずれのプラスミドについても約 10 μ g の DNA が精製により得られた。

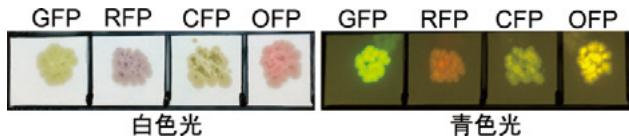


図 2 寒天培地で培養した蛍光タンパク質発現大腸菌の写真。白色光(左)と青色光(右)を下から照射して撮影した。青色光使用時には橙色フィルターを用いた。

3.3 蛍光タンパク質の発現と精製

蛍光タンパク質発現プラスミドで形質転換した大腸菌をそれぞれ培養し、各蛍光タンパク質を発現させた後、集菌した(図 3)。次に菌体の抽出液から、H₆ タグを融合した蛍光タンパク質を Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製した(図 4)。精製タンパク質の各種条件下の写真を図 5 に示した。溶出画分の精製タンパク質の収量は、

1 回の培養液 100mL あたり、0.9mg (GFP-H₆)、0.7mg (RFP-H₆)、3.5mg (CFP-H₆)、3.6mg (OFP-H₆) であった。精製タンパク質の SDS-PAGE を行い、タンパク質バンドを CBB 染色で検出したところ、いずれの蛍光タンパク質も 90% 以上の純度で溶出画分に存在していることが判明した(図 6)。

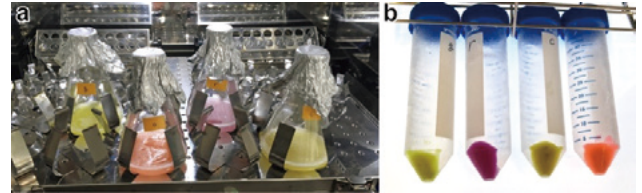


図 3 集菌前の培養液(a)と集菌後の菌体(b)の写真

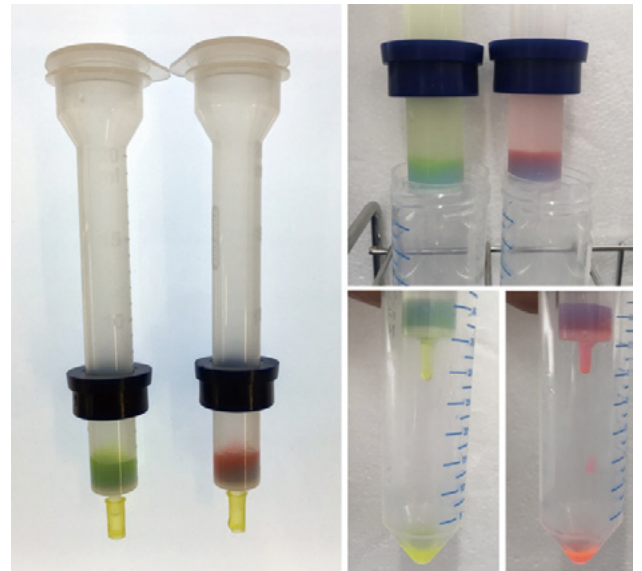


図 4 蛍光タンパク質の Ni アフィニティークロマトグラフィー精製。CFP と OFP の場合についてのみに示す。精製では、Ni アフィニティ樹脂をエコノバッククロマトグラフィー用カラム(#7321010、バイオラッド)に充填し、PD-10 Spin Adapter (GE ヘルスケア)を用いてカラムを 50mL 遠沈管に装着して精製をすすめた。

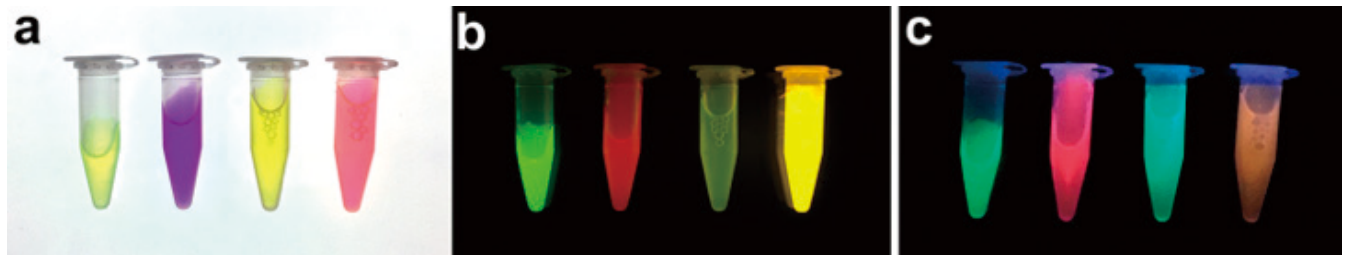


図 5 精製した蛍光タンパク質の写真。白色光(a)、青色光(b)、紫外線(c)を照射して撮影した。左から、GFP-H₆、RFP-H₆、CFP-H₆、OFP-H₆ の順に蛍光タンパク質の入ったマイクロチューブを配置した。

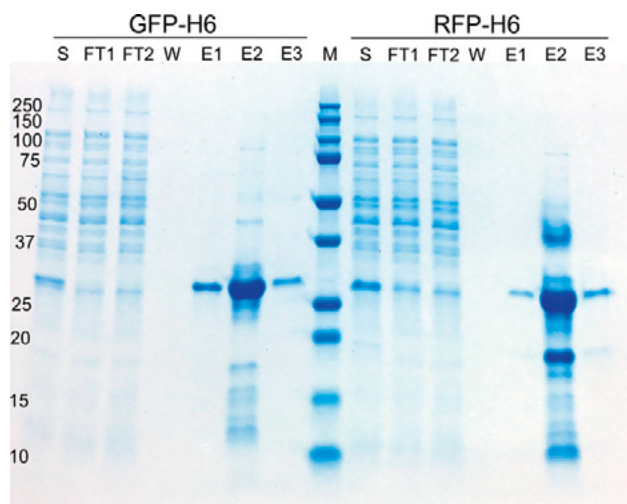


図6 蛍光タンパク質のNi アフィニティ精製。精製時の各画分について SDS-PAGE を行った。可溶性 (S)、素通り (FT1、FT2)、洗浄 (W)、溶出 (E1、E2、E3) の画分について電気泳動した。溶出画分の主要なバンドが GFP-H₆ (27.3kDa) および RFP-H₆ (26.5kDa) に対応する。

3.4 連続5日間の実習案の作成

半期14回の学生実験を3教員で分担するため、1教員あたり4~5回の実習内容を今後用意したいが、まずその準備として連続5日間の実習案を作成した。そこでは、一週間の集中講座で使いやすいような内容とした。

1日目：寒天培地 (IPTG の添加の有無による2種類) と液体培地 (2mL、100mL) の準備、蛍光タンパク質発現プラスミドによる大腸菌の形質転換、形質転換体の寒天培地への塗布。

2日目：寒天培地の観察 (IPTG の添加の有無による着色の違いを考察)、シングルコロニーを1個ずつ液体培地 (2mL と100mL の2種類) に植菌して、培養を開始。

3日目：培養液 (2mL) からのプラスミド精製、制限酵素による切断処理、アガロースゲル電気泳動。培養液 (100mL) の遠心分離による蛍光タンパク質発現大腸菌の集菌と冷凍保存。

4日目：菌体 (前日凍結したものを解凍) の超音波破碎による発現タンパク質の抽出と Ni キレートカラムクロマトグラフィーによる精製 (複数の光源を利用した精製タンパク質の観察)。すべての画分を冷蔵保存。

5日目：精製画分の SDS-PAGE と CBB 染色。タンパク質バンドの解析 (精製タンパク質の分子量の計算)。

4. 考察

本研究では4種類の蛍光タンパク質 (GFP-H₆、RFP-H₆、CFP-H₆、OFP-H₆) のC末端に H₆ タグを融合した発現プラスミドを構築し、それぞれのタンパク質を高収量で精製できることを示した。その際に、プラスミド DNA の

生産とタンパク質の発現を同じ菌株を宿主として用い、DNA とタンパク質をともに十分な収量で精製することができた。2種類の宿主を用いる pET を用いた系に比べると簡潔であり、プラスミド DNA の調製とタンパク質の精製を短期間で修得できるという点で有利な系が構築できたと考える。

今回構築したプラスミドでも、これまでの多くの報告例と同様であるが、ラクトースプロモーターを用いて IPTG の添加により発現の誘導が可能であることが判明した。その一方で、IPTG などの誘導物質を添加しないでも、プラスミド調製やタンパク質発現における長時間培養 (一晚以上) では発現が誘導されることが判明した。これは、ラクトースプロモーター上流に存在する CAP 結合部位 (図1) の存在によるものと考えられる。長時間培養にともなうグルコース枯渇により cAMP が増加し、生じた CAP-cAMP 複合体が CAP 結合部位に結合することで転写が活性化されたためと解釈できる。このように、誘導物質を加えなくても長時間の培養により組み換えタンパク質を高発現できるという性質は実習においても有用と考えられる。誘導物質の添加のタイミングが重要である場合、誘導のために継続した注意が必要であるし、並行して他の実験を進めることは初心者には難しいためである。一方、もう一つの利点として、今回発現に用いたラクトースプロモーターによる発現調節機構は生命系学生の必修の内容であるため、授業科目とともに本実習に参加することにより相乗効果が期待できる。既製品の pGLO による発現調節ではアラビノースプロモーターが使われ、より正確な発現調節が可能であるという利点をもつが、分子生物学を初めて学ぶ生命系の学生にはより基本的な内容であるラクトースプロモーターの方がふさわしいと考える。

今回開発した系の特長として次の点が挙げられる。まず、緑色だけではなく、その他の色の蛍光タンパク質も容易に精製可能な点である。次に、いずれの蛍光タンパク質でも、コロニーや培養液のまま着色を観察でき、発現の有無を判定できる点である。また、宿主の大腸菌株としてカルタヘナ法の規制対象外の JM109 株 (それ自体は遺伝子組換え体でない) を利用することもあげられる。pET 系を用いる場合には BL21 (DE3) 株 (DE3 がゲノム DNA に組み込まれた遺伝子組換え体) などのカルタヘナ法の規制対象の菌株を購入する必要があるため、組織の事情等で入手が難しい場合にも本実験系なら利用が可能である。

本研究により、いずれの蛍光タンパクとも、100mL の培養液から 0.7~3.6mg の精製物を 90% 以上の純度で容易に調製できることが判明した。この程度の収量であれば、この系を用いたタンパク質の結晶化実験の実習にも用いられるかもしれない (結晶化の可否は前もって調べておく

必要がある)。タンパク質の結晶が析出した際には低分子の塩の結晶と見分ける必要があるが、それ自体に色をもつ蛍光タンパク質なら容易に判別が可能である。また、その他に追加できる実習内容として、変異導入実験があげられる。蛍光タンパク質は1アミノ酸の変異により、GFPからCFP、BFP、YFPへの変換が可能であるため(5)、本系に適用することで目的の変異導入の有無をコロニーのままに蛍光色の違いにより判定できると考えられる。したがって、遺伝子型を変異導入により変化させることにより、生きた細胞のまま容易に表現型の変化を観察できることを意味し、変異導入の実習のための実験系としても本系が有用であろう。今後の課題として、本稿で示した実習案を1週間おきの学生実験にどのように調整するかをさらに検討する必要があるが、今回構築した蛍光タンパク質の発現プラスミドは上述のように応用範囲も広いため、さまざまな実習の基礎となる実験教材として有用と考える。プラスミドの入手を希望される方は筆者まで連絡していただきたい。

謝 辞

広島工業大学生命学部食品生命科学科の宮城尚弥氏、横田愛実氏、高見直樹氏、土屋響生氏、松場匠哉氏、湯場亮太氏、芳田陸氏には開発途中の教材を用いた実験練習に参加いただいた。この場を借りて感謝申し上げる。

文 献

- (1) Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene*, **111**, 2, 229-233 (1992).
- (2) Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223-39 (1962).
- (3) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, **263**, 5148, 802-805 (1994).
- (4) Day, R. N., Davidson, M. W., The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging, *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2887-2921 (2009).
- (5) Heim, R., Prasher, D. C., Tsien, R. Y., Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 26, 12501-12504 (1994).
- (6) Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J., Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, **273**, 5280, 1392-1395 (1996).
- (7) Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., Lukyanov, S. A., Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species, *Nat. Biotechnol.*, **17**, 10, 969-973 (1999).
- (8) Cramer, A., Whitehorn, E. A., Tate, E., Stemmer, W. P., Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, *Nat Biotechnol.*, **14**, 3, 315-319 (1996).
- (9) Heim, R., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y., Improved green fluorescence, *Nature*, **373**, 6516, 663-664 (1995).
- (10) 玉腰雅忠、緑色蛍光タンパク質の精製を題材とした教育プログラム、東京薬科大学研究紀要、**14**, 35-41 (2011).
- (11) Nakai, T., Ito, H., Kobayashi, K., Takahashi, Y., Hori, H., Tsubaki, M., Tanizawa, K., Okajima, T., The radical S-adenosyl-L-methionine enzyme QhpD catalyzes sequential formation of intra-protein sulfur-to-methylene carbon thioether bonds, *J. Biol. Chem.*, **290**, 17, 11144-11166 (2015).
- (12) Birnboim, H. C., Doly J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, **7**, 6, 1513-1523 (1979).
- (13) 高木昌宏、いまさら聞けないプラスミド抽出法の原理、*生物工程*, **89**, 9, 544-548 (2011)
- (14) Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 5259, 680-685 (1970).
- (15) Dyballa, N., Metzger, S. Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.* **30**, 1431 (2009).
- (16) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- (17) Cabantous, S., Nguyen, H. B., Pedelacq, J.-D., Koraïchi, F., Chaudhary, A., Ganguly, K., Lockard, M. a, Favre, G., Terwilliger, T. C., Waldo, G. S., A new protein-protein interaction sensor based on tripartite split-GFP association, *Sci. Rep.* **3**, 2854 (2013).
- (18) Nguyen, H. B., Hung, L.-W., Yeates, T. O., Terwilliger, T. C., Waldo, G. S., Split green fluorescent protein as a modular binding partner for protein crystallization, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 2513-2523 (2013).
- (19) Takacs, C. N., Kloos, Z. A., Scott, M., Rosa, P. A., Jacobs-Wagner, C., Fluorescent proteins, promoters,

and selectable markers for applications in the lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*, *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, (2018).

(20) Shaner, N. C. *et al.*, Improved monomeric red,

orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.* **22**, 12, 1567–1572 (2004).