

pUC プラスミドにまつわるエトセトラ

橋本 義輝

プラスミドは“細胞内で宿主染色体とは別に自律複製・増殖し、かつ細胞分裂に際し子孫の細胞に受け渡され安定に維持される遺伝因子”と定義され、遺伝子組換え実験には必要不可欠なツールである¹⁾。研究者・技術者・学生が日常的に使用しているさまざまなプラスミドの中でも、“pUC19/pUC18(以下、pUC プラスミド)”²⁾は“pET系プラスミド”³⁾と並び、誰しも一度はその名を聞いたことがあると思う。このように有名なpUCプラスミドであるが、意外と知られていない点が多いように感じる。今回は、覚えておいて損のないpUCプラスミドにまつわる豆知識・トリビアをいくつか紹介する。

pUC プラスミド²⁾は、挿入DNA断片の有無をコロニーの色の変化で判別できる。DNA断片が挿入されれば白コロニー、挿入されなければ青コロニーとなるので、形質転換後白コロニーをつついて培養すれば目的プラスミドが調製できる。pUC プラスミドは1細胞当たり500–700のプラスミドが保持される多コピープラスミドであり、大腸菌の通常培養温度37°Cで培養すると1.5 mlの培養液からでもかなりの量のプラスミドが調製できる。その特徴を利用して通常のサブクローニング実験やプラスミドの大量調製に利用されている。一方、pET系プラスミド³⁾は、T7プロモーター支配下に目的遺伝子を連結し、T7 RNA polymeraseによるT7プロモーターからの特異的転写を利用した誘導型高発現プラスミドとして主に利用される。pET系プラスミドは1細胞当たり15–20コピーのプラスミドしか保持されず、1.5 mlの大腸菌培養液からだとわずかな量のプラスミドしか調製できない。このようにpUCプラスミドとpET系プラスミドのコピー数はまったく(1オーダー以上)異なるが、両者はともにColE1型レプリコンのプラスミドであり、その複製機構は同一である。

ColE1型プラスミドの複製機構

ColE1型プラスミドの複製機構⁴⁾は、以下の通りである。

- (1) 複製起点 (*ori*) の550塩基上流のプロモーターから複製起点の約150塩基下流までRNA II前駆体が転写される(図1)。RNA II前駆体の5'側は複雑な二次構造を形成(図2)するが、その3'末端側は複製開始部

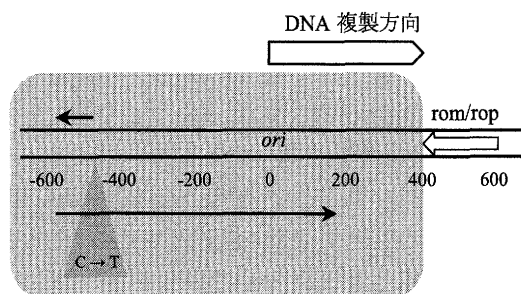


図1. ColE1型プラスミドの複製領域(全体)およびpUCプラスミドの複製領域(グレー部分)

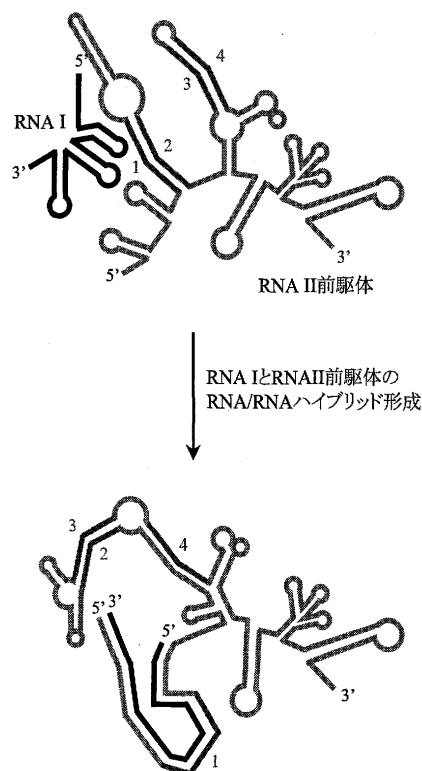


図2. ColE1型プラスミドの複製調節機構。RNAIとRNAII前駆体がハイブリッドを形成すると、RNAII前駆体の2次構造が変化する。そのため、RNaseHにより切断を受けず、プラスミド複製のプライマーとして機能する成熟型RNAIIが生成されないため、プラスミド複製は抑制される。

位と相補鎖形成 (RNA/DNA ハイブリッド) できる。

- (2) RNA II 前駆体は RNaseH によりいくつか切断され成熟型 RNA II となり、生じた 3' 末端に DNA polymerase I が結合し、成熟型 RNA II をプライマーとして複製起点からプラスミドのリーディング鎖合成を開始する。この時、成熟型 RNA II より下流に存在し DNA 上に残っている (RNA II 前駆体由来する) RNA は、DNA polymerase I が保持する 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性により除去されながら DNA 合成が進む。
- (3) DNA 伸長反応の途中で、酵素は DNA polymerase I から DNA polymerase III に変わり、なおもリーディング鎖合成は進む。
- (4) 伸長に伴い、ラギング鎖の不連続合成に関わる DNA 部分が出現するが、成熟型 RNA II に邪魔されラギング鎖合成は途中で遮断される。その結果、DNA 複製が一方向にしか進行しない θ 型のプラスミド複製となる。

ColE1 型のプラスミド複製機構において、RNA II はプラスミドの DNA 合成開始頻度に影響を与えるため、正の制御因子として機能する。一方、ColE1 型のプラスミド複製開始は、複製起点の上流 455 塩基から逆向きに転写される RNA I によって抑制される (図 1)。RNA I は 108 塩基からなる RNA II のアンチセンス RNA で、RNA II の 5' 末端側と完全に相補的な配列であるため、RNA I は RNA II 前駆体と二本鎖形成することが可能である。RNA I と RNA/RNA ハイブリッド形成した RNA II 前駆体は、転写後調節によりその立体構造が変化 (図 2) して (プラスミド複製のプライマーとして機能し得る) 成熟型 RNA II となることができない。それ故、RNA I は ColE1 型プラスミド DNA 合成開始の負の制御 (複製抑制効果) 因子として機能する。また、細胞内に存在する RNA I 量によりプラスミド複製の ON/OFF がコントロールされるため、プラスミドのコピー数を制御する役割を担う。

さらに、ColE1 型プラスミドの複製開始地点から 400 塩基下流に、Rom (RNA one modulator) あるいは Rop (repressor of primer) と呼ばれるタンパク質が存在する (図 1)。Rom/Rop はわずか 63 アミノ酸からなるタンパク質であるが、ホモ 2 量体を形成し、さらに RNA I および RNA II に結合することで、“kissing complex” と呼ばれる、より安定な RNA I/RNA II 前駆体ハイブリッドを形成する。そのため、Rom/Rop は RNA I による複製抑制効果を増強する因子として機能する。

後述する初期型クローニングベクター pBR322 や pET 系プラスミドは、この ColE1 型プラスミドの複製機構

により複製されるため、プラスミドは 1 細胞あたり 15–20 のコピー数となる (コピー数の値は論文によって異なるが、本稿では Molecular Cloning の数値を記載)。

ColE1 型プラスミドのコピー数増加

ColE1 型プラスミド複製に関わる正の制御因子は RNA 分子であり、プラスミド上にコードされる複製タンパク質を必要としない。そのかわり、宿主から供給される RNaseH、DNA polymerase I、DNA polymerase III などの酵素・タンパク質を利用する。これらの酵素・タンパク質はすべて長寿命であり、宿主細胞の新たなタンパク質合成が阻害されてもプラスミド複製を続けることができる。一方、宿主細胞の染色体 DNA 複製は新たなタンパク質合成が阻害された場合にはストップしてしまう。この仕組みを利用し、少ないコピー数を増加させる方法としてクロラムフェニコール添加がある。ColE1 型プラスミドを持つ大腸菌を培養時の対数増殖期中期にクロラムフェニコールを高濃度 (170 $\mu\text{g/ml}$) で添加、さらに 8 時間培養し、その後プラスミドを調製する方法である。添加したクロラムフェニコールは宿主大腸菌内の新たなタンパク質合成を阻害し、結果として宿主大腸菌の染色体複製はストップする。しかし、プラスミドの複製は継続し、さらにはプラスミド複製抑制効果を増強する Rom/Rop タンパク質の合成も阻害されることにより、1 細胞当たりのプラスミドコピー数は増加し続け、プラスミドの収率は飛躍的に増加する¹⁾。pET 系プラスミドの大量調製に利用可能であり、知っておいて損のない効果的な方法である。

pUC19/pUC18 の誕生

1977 年、初期型クローニングベクター最終形として pBR322 が構築された⁴⁾。サイズの小さいプラスミドであるにも関わらず、アンピシリンあるいはテトラサイクリン耐性遺伝子内部の制限酵素サイトを利用して目的遺伝子のクローニングが可能である。2つの抗生物質耐性遺伝子を持つため、目的遺伝子を導入した後も抗生物質耐性が残る (アンピシリン耐性遺伝子内部に目的遺伝子をクローニングした場合には、テトラサイクリン耐性・アンピシリン感受性の表現型で選抜) ことから、使い勝手のよいクローニングベクターとして 1970 年代後半世界中の研究室で使用されていた。しかし、pBR322 の複製機構は ColE1 型であるため、そのコピー数は (クロラムフェニコールを添加した時は増加するが) 1 細胞当たり 15–20 のままであった。

pBR322 出現以降もプラスミドの改良は重ねられ、

1980年代前半、革命的なクローニングベクター (pUC系プラスミド) が誕生し¹⁾, その最終版とも言える pUC19 が1985年に構築された²⁾. pUC19のマルチクローニングサイト内には, HindIII, SphI, PstI, SalI, AccI, HincII, XbaI, BamHI, SmaI, XmaI, KpnI, SacI, EcoRIの13もの制限酵素サイトが整列し, マルチクローニングサイトは β -ガラクトシダーゼの α フラグメントに埋め込まれている. 目的遺伝子がマルチクローニングサイト内に導入されないままだと, β -ガラクトシダーゼの α フラグメントが生成し, (染色体DNAに組み込まれた *lacZ*ΔM15 に由来する) β -ガラクトシダーゼの ω フラグメントと複合体を形成する. β -ガラクトシダーゼの α フラグメント, ω フラグメントはそれぞれ単独では β -ガラクトシダーゼ活性を示さないが, 複合体は β -ガラクトシダーゼ活性を示す (β -ガラクトシダーゼの α 相補性) ため, X-gal + IPTG 存在下で青色コロニーとなる. 目的遺伝子がマルチクローニングサイト内に導入されると, β -ガラクトシダーゼの α フラグメントが生成せず, 複合体ができないため, β -ガラクトシダーゼ活性を示さず, X-gal + IPTG 存在下で白色コロニーとなる. pUC19はアンピシリン耐性遺伝子しか持っていないが, 目的遺伝子を (アンピシリン耐性遺伝子内部ではなく) マルチクローニングサイト内に導入するため, クローニング後もアンピシリン耐性で選抜できる. pBR322のようにクローニングできたかどうかを調べるために, 2つの抗生物質耐性を調べる必要もない.

pUC19/pUC18のコピー数

pBR322のプラスミド複製領域を利用して構築された pUC19は, pBR322と同じColE1型レプリコンにも関わらず, 37°Cで培養するとコピー数は1細胞当たり数百以上とpBR322とは比べものにならないくらい多コピープラスミドである. よって, プラスミドの収率を増やすために, クロラムフェニコールを添加する必要はなくなる.

pUC19のプラスミド複製領域は, (1) Rom/Ropタンパク質の欠失, (2) RNA II転写産物内で, RNA I転写開始地点のすぐ上流 (-1地点) の位置に1塩基の点変異 (C→T, RNA II転写産物としてはC→U), の2点が pBR322のプラスミド複製領域とは異なっている (図1グレー部分). 37°C培養でコピー数が増加するためには, (1) Rom/Ropタンパク質の欠失, (2) 点変異のどちらか片方だけでは不十分で, 両方がそろっている必要がある³⁾. 興味深いことに, 改変されたColE1型レプリコンを持つ pUC19は, 培養温度を下げた場合 (30°C培養) に

pBR322と同程度までそのコピー数が減少してしまう. 逆に, 培養温度を上げた場合 (42°C培養) 37°Cで培養した時以上に多コピー化する. 改変前のColE1型レプリコンを持つ pBR322では, 培養温度によるコピー数変化はみられない. このpUCプラスミド (正確に言えば, 改変されたColE1型レプリコン) の特徴はいくつかの実験に応用できる. (1) 培養温度を42°Cにするだけでプラスミドの収率を飛躍的に増加させることができる. (2) 目的遺伝子をpUCプラスミドにクローニングする場合, 通常の形質転換を行っても目的プラスミドが構築できないケースがまれにある. 多コピーが原因 (目的遺伝子が宿主に毒性を付与してしまう可能性など) と考えられる場合には, 形質転換後30°Cで培養することでコピー数を下げ, 目的プラスミドが構築できる場合もある.

異なるプラスミドの共存

pUCプラスミドとpET系プラスミドはどちらもColE1型レプリコンを有すると前述したが, 両者のように複製機構が同一・類似しているプラスミド同士は, 選択圧がなければ同一宿主内で多世代にわたって安定的に共存することができない (これを不和合性と呼ぶ). 2種の同一レプリコンのプラスミドが同一細胞内に導入された場合でもコピー数は変わらず (コピー数Nのプラスミドであれば, 1細胞あたり2種のプラスミドの総数がN) [図3(A)], 細胞分裂直前にはコピー数が2倍になるまでプラスミドが複製 (1細胞あたり2種のプラスミドの総数が2N) し [図3(C)], 分裂時に2つの娘細胞に通常のコピー数になるようにランダムかつ均等に分配される

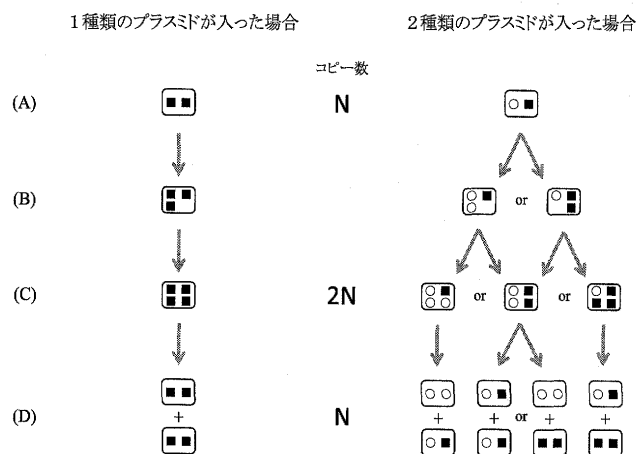


図3. 2種の不和合性レプリコンプラスミドの複製と分配. コピー数2の場合を想定し, 単純化した. 2回の複製で2N (コピー数4) に達するとする. (A) 分裂直後の細胞, (B) 1回目の複製直後の細胞, (C) 2回目の複製直後 (= 分裂直前) の細胞, (D) 1世代分裂直後の細胞.

[図3(D)]. ここでプラスミドが1種類の場合(図3左)は、それが唯一の鋳型となり複製・分裂を繰り返して1種類のプラスミドを持つ細胞のみが増殖する。一方、2種の同一レプリコンのプラスミドが一つの細胞に導入された場合(図3右)には、2種のプラスミドからランダムに選ばれた1つのプラスミドを鋳型として複製が起こる[図3(B)]. 次の複製で2Nになるが[図3(C)], 細胞が分裂するときには一方のプラスミドが除去された細胞が現れる[図3(D)]. この(2種類のプラスミドを持つ親細胞から生まれた)1種のプラスミドのみを有する娘細胞は、そのプラスミドのみを有する孫細胞しか残さない。2Nになった細胞が分裂する時に、2種のプラスミドが共存した細胞も現れるが[図3(D)], 細胞分裂を繰り返すうちに、その割合は減少していくことになる。よって、コロニーが生じるくらいまで分裂を繰り返すと、1つのプラスミドしか残っていない細胞が残ることになる。不和合性を「同一・類似した複製機構を持つプラスミド同士は、一つの宿主内で複製できないため、どちらかのプラスミドが残った細胞になる」と勘違いしてしまうことがしばしば見受けられるが、「同一・類似した複製機構を持つプラスミド同士は、一つの宿主内で複製できるが、子孫には安定して受け継がれないため、結果としてどちらかのプラスミドが残った細胞になる」というのが正しい解釈であろう。実際に、同一のレプリコンをもつ2種のプラスミドが導入された細胞を培養すると、その数はわずかであるが、ある確率で、2種のプラスミドが共存している細胞が出現する。特に選択圧を整えれば、そのような細胞を選抜することも可能である。pUC19/pUC18(アンピシリン耐性)と同じレプリコンを持つpHSG399/398(クロラムフェニコール耐性)⁷⁾、pHSG299/298(カナマイシン耐性)⁷⁾の3種のプラスミド(表1)を使って大腸菌を形質転換すると、1種のプラスミドのみ保持している大腸菌、2種のプラスミドが共存している大腸菌、3種のプラスミドが共存する大腸菌が出現するが、アンピシリン+クロラムフェニコール+カナマイシン含有培地で選択すれば、3種のプラスミドが共存する大腸菌を単離できる。3種のプラスミドの

存在比をコントロールすることは難しいと思われるが、1細胞あたり500–700コピーで3種のプラスミドを導入できる実験系は可能である(ただし、安定な方法ではないため、筆者の知る限りこれに類似した方法を論文などで見たことはない)。

一方、複製機構が異なるプラスミド同士は同一宿主内で共存することが可能である(これを和合性と呼ぶ)。ColE1型レプリコンと和合性を示す複製機構として、pACYC系プラスミドのp15Aレプリコン⁸⁾、pSC101系プラスミドのpSC101レプリコン⁹⁾などがある(表1)。よって、大腸菌内でColE1型レプリコンを持つプラスミドとp15Aレプリコンを持つプラスミドを共存させることが可能である。pET系プラスミドを利用して異種タンパク質発現を行う時、目的遺伝子が大腸菌で使用頻度の低いコドンを用いている場合には通常の大腸菌[BL21(DE3)など]を宿主とすると、発現しないあるいは発現が非常に弱いことがよくある。このようなケースでは、大腸菌での使用頻度の低いコドンに対応するtRNAを増強した大腸菌[BL21-CodonPlus(DE3)-RIL¹⁰⁾やRosetta(DE3)¹¹⁾など]に宿主を変更すると、目的遺伝子産物の発現に成功する場合が多い。BL21-CodonPlus(DE3)-RILやRosetta(DE3)は、大腸菌で使用頻度の低いコドンに対応するtRNAをpACYC系プラスミド(p15Aレプリコン:クロラムフェニコール耐性)に組み込み、大腸菌に導入した株であり、これにpET系プラスミド(ColE1型レプリコン:アンピシリンあるいはカナマイシン耐性)を導入するため、形質転換体内では2つのプラスミドが安定的に共存している。この実験系では、ColE1型レプリコンを持つプラスミドとp15Aレプリコンを持つプラスミドの和合性を利用している。

さらに、pSC101レプリコンを持つプラスミドは、ColE1型レプリコンを持つプラスミドと和合性を示すだけでなく、p15Aレプリコンを持つプラスミドとも和合性を示す。pUC19/pUC18(アンピシリン耐性)と同じマルチクロニングサイトを持つp15AレプリコンのプラスミドpSTV29/pSTV28(クロラムフェニコール耐

表1. 各種プラスミドの特徴

レプリコン	コピー数	抗生物質耐性		
		アンピシリン耐性	クロラムフェニコール耐性	カナマイシン耐性
改変ColE1型	500–700	pUC19/18	pHSG399/398	pHSG299/298
p15A	18–22		pSTV29/28	
pSC101	~5			pMW219/218

性)¹²⁾やpSC101レプリコンのプラスミドpMW219/pMW218 (カナマイシン耐性)¹³⁾が構築されている(表1)。いずれも β -ガラクトシダーゼの α 相補性を利用して目的DNA断片の挿入を容易に判別でき、IPTGで誘導発現ができる便利なプラスミドである。これらを使用すれば、大腸菌内で3つのプラスミドを安定的に共存させることが可能となる。たとえば、1つめのプラスミドに発現させたい目的遺伝子、2つめのプラスミドに大腸菌で使用頻度の低いコドンに対応するtRNA、3つめのプラスミドにシャペロンタンパク質を乗せる、など工夫次第でさまざまな実験系を創り出すことができる。

おわりに

本稿で執筆した内容は、Molecular Cloningや、いろいろなカタログ（特に、巻末にあるAppendix）からの情報がほとんどである。本稿を執筆するにあたり、手元にあるMolecular Cloningの最新版（Third edition）を再度読み直し、筆者が学生時代に購入したSecond editionと比較してみると、古典的な内容にも関わらず詳細かつ豊富な内容が追加されていた。本稿ではそれらの一部しか紹介できなかったが、プラスミドに関する知識を持てば

持つほど、実験系の選択肢が増えるのは間違いない。本稿が、読者の遺伝子組換え実験（特に、トラブルシューティング）にいくらかでも貢献できれば幸いである。

文 献

- 1) Sambrook, J. and Russell, D. W.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. (2001).
- 2) Yanisch-Perron, C. *et al.*: *Gene*, **33**, 103 (1985).
- 3) http://www.merck-chemicals.jp/life-science-research/vector-table-novagen-pet-vector-table/japanese/c_HdSb.s1O77QAAAEhPqsLdcab
- 4) Bolivar, F. *et al.*: *Gene*, **2**, 95 (1977).
- 5) Vieira, J. and Messing, J.: *Gene*, **19**, 259 (1982).
- 6) Lin-Chao, S. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **6**, 3385 (1992).
- 7) Takeshita, S. *et al.*: *Gene*, **61**, 63 (1987).
- 8) Chan, A. C. Y. and Cohen, S. N.: *J. Bacteriol.*, **134**, 1141 (1978).
- 9) Stoker, N. G. *et al.*: *Gene*, **18**, 335 (1982).
- 10) <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=300506>
- 11) http://www.takara-bio.co.jp/goods/bioview/pdfs/39_42-44.pdf
- 12) http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100003450
- 13) http://nippongene.com/pages/products/clomod/dna_vec/pmw219/pmw219.html