

MagneHis™ Protein Purification System: 多様なフォーマットを用いたHisタグ融合タンパク質の精製

By Becky Godat, M.A., Laurie Orr, B.S., Dan Simpson, Ph.D., Tonny Johnson, Ph.D., and Gary Kobs, B.S., Promega Corporation

アブストラクト

MagneHis™ Protein Purification Systemを用いることにより、Hisタグ融合タンパク質を迅速かつ効率的に高収量・低バックグラウンドで精製することができます。プロトコルは柔軟性が高く、スモールスケールでの精製にもラージスケールでの精製にも対応し、マニュアルでも自動化プラットフォームでも操作することができます。独自開発のMagneHis™ Cell Lysis Reagentにより、菌体の溶解を迅速・簡便に行うことができます。

MagneHis™ Cell Lysis Reagent を用いることにより、不必要な操作を最小限に抑え、菌体溶解に要する時間を短縮することができます。

はじめに

発現系を用いた組換えタンパク質の生成は、研究室で一般的に用いられる手法です。このような方法で合成されたタンパク質は、酵素測定法 (1-3)、分子間相互作用解析法 (タンパク質-タンパク質相互作用、核酸-タンパク質相互作用など; 1,4-6)、構造解析法 (X線結晶構造解析、NMR など; 7,8) などのいくつかのアプリケーションで使用することができます。

融合タグは、組換えタンパク質のN末端またはC末端に付加された短いアミノ酸配列です。融合タグを特異的な発現ベクターに組み込むことにより、組換えタンパク質の精製・検出が容易になります。タグとしては、特異的な抗原によって精製・検出が可能なエピトープをコードするものや、精製フォーマットに利用可能な特定の物理的特性 (リガンド結合性など) を有するものなどが用いられます。

ヒスチジン残基は固相化したニッケルに対して親和性を持つため、ヒスチジン残基を有するタンパク質を選択的に精製することができます (9,10)。このような知見に基づき、発現タンパク質のC末端またはN末端のいずれかに5~10個のヒスチジン残基を持つ特異的なクローニングベクターがデザインされました。Hisタグの使用には、他のタグを使用する場合と比べて下記のようないくつかの利点があります。

- 6 × Hisタグの場合は、タンパク質の質量が0.84kDa増加するだけで、GSTやプロテインAの場合はそれぞれ26kDaおよび30kDa増加します。
- 短いヒスチジン配列は免疫原性を示しません。したがって、抗体産生用の動物に注射する場合にも、予めタグを除去する必要がありません。
- 精製にとって三次構造は重要ではありません。したがって、Hisタグ融合タンパク質は変性条件下でも精製することができます。

発現されたHisタグ融合タンパク質を効果的に精製するには、次の4つの主要基準を満たす必要があります。1) 菌体を効率的に溶解すること。2) 非特異的結合がほとんど生じないこと。3) ニッケル基質に対してHisタグ融合タンパク質が最大限の結合性を示すこと。4) 結合したタンパク質を効率的に溶出すること。

MagneHis™ Protein Purification Systemは、これらの基準すべてを満たします。

標準的なHisタグ融合タンパク質精製手順

Hisタグ融合タンパク質の精製に用いる代表的手順は、次の4つの基本ステップで構成されます。

菌体の溶解：このステップは、非酵素的な方法 (超音波処理、French Pressなど) または加水分解酵素 (リゾチームなど) を用いた方法によって行います。

Ni-Particlesへの結合：菌体溶解後、遠心により菌体残渣を除去します。上清にNi粒子を適量添加するか、上清をNi粒子のカラムにアプライします。

洗浄：Hisタグ融合タンパク質がいったん結合してしまえば、未結合のタンパク質は2~3回の洗浄ステップで完全に洗い流すことができます。

溶出：結合したHisタグ融合タンパク質を溶出するには2つの方法があります。1つ目は、pHを一定に保ったままイミダゾール濃度を上げることにより、Ni粒子からヒスチジン配列を遊離させる方法です。2つ目はpHを下げる方法です。低pH (<4.5) ではヒスチジンがプロトン化され、Ni粒子と相互作用しなくなります。

MagneHis™ Protein Purification Systemでは、これらの各ステップが最適化されています。

収量が高く、非特異的バックグラウンドはほとんどまたは全くありません

市販されている製品のほとんどはNi粒子のタンパク質結合能が300µg/mlしかありません。プロメガの製品の場合、MagneHis™ Ni-Particlesのタンパク質結合能は最大1mg/mlです。結合能が高いため、Hisタグ-タンパク質の経済的な精製法としてご利用いただけます。

Hisタグ融合タンパク質の精製において重要となるもう1つの側面は、非特異的タンパク質の結合を最小限に抑えることです。これは、発現量の少ないHisタグ融合タンパク質を精製する場合に特に重要となります。図1に、発現量の少ないHisタグ融合RNase H1の精製結果を示しました。このような低い発現レベルでも、MagneHis™ Ni-Particlesを用いることにより、非特異的バックグラウンドを最小限に抑えた精製を容易に行うことができます。

MagneHis™ Ni-Particlesでは、製造バッチごとに非特異的タンパク質に対する結合性を評価しております。品質管理仕様は、Hisタグ融合タンパク質を含有しない大腸菌ライセートを用いることにより確認されています (図2)。この測定法での非特異的結合は10%未満です。

Hisタグ融合タンパク質の迅速な分析・精製法

複数のサンプルを処理する場合、超音波処理やFrench Pressを用いたサンプル溶解は非常に煩雑です。リゾチームを用いた方法では、溶解手順に30分の余計なインキュベーション時間が加わるようになります。プロメガのMagneHis™ Cell Lysis Reagentを用いれば、不必要な操

作を最小限に抑え、菌体溶解に要する時間を短縮することができます。菌体を短時間遠心したのち、沈殿物をMagneHis™ Cell Lysis Reagentに再懸濁してください。10分間のインキュベーションで菌体が溶解されます。

一般的な手順では、菌体溶解後に菌体残渣を除去してからNi粒子にタンパク質を結合させるよう推奨しています。そのような方法では所要時間が延び、特にいくつかのサンプルを一度に処理する場合には時間がかかってしまいます。MagneHis™ Cell Lysis Reagentを用いれば、MagneHis™ Ni-Particlesの添加前に菌体残渣を除去しておく必要はありません(図3)。

Hisタグ融合タンパク質のラージスケール精製

組換えHisタグ融合タンパク質の特性を調べるため、通常はまずいくつかのクローンをスモールスケール(菌体培養液1mlなど)でスクリーニングし、最適な発現が得られるクローンを同定します。スモールスケールでの発現についてさらに至適化を行う必要が生じる場合もあります(宿主菌株や増殖条件の変更など)。

構造研究や機能研究を目的としたラージスケールでのHisタグ融合タンパク質精製では、通常はカラムを使った方法が用いられます。カラム法による精製には数時間を要することがあります。MagneHis™ Protein Purification Systemを用いれば、1Lの菌体培養液からタンパク質を30分未満で精製することができます。図4は、MagneHis™ Systemの場合はスモールスケールフォーマットでもラージスケールフォーマットでも基本的な手順を変更することなく使用できることを示したものです。

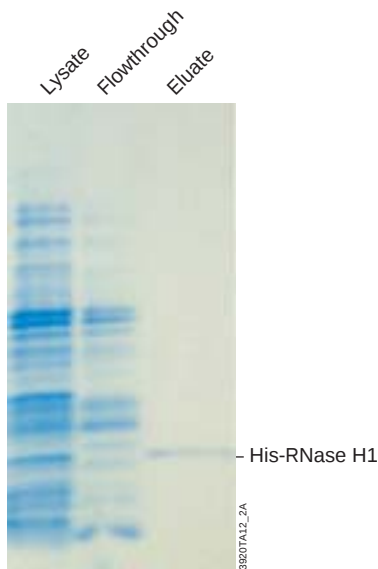


図1. 発現レベルの低いHisタグ融合RNase H1の精製

Hisタグ融合RNase H1を発現している菌体培養液を、13,000 × gで10分間遠心した。上清を除去し、沈殿物を-70℃で凍結した。この沈殿物をMagneHis™ Cell Lysis Reagentで再懸濁し、振とうしながら室温で10分間インキュベーションした。サンプルを13,000 × gで10分間遠心し、上清200μlを30μlのMagneHis™ Ni-Particlesに添加した。サンプルをピペティングにより混和し、室温で2分間インキュベーションした。このサンプルを磁気スタンドに設置し、フロースルーを回収した。得られたMagneHis™ Ni-Particlesを、100mM HEPES、10mMイミダゾールを含有するMagneHis™ Binding/Wash Buffer (pH 7.5)で3回洗浄した。Hisタグ融合RNase H1は、100μlのMagneHis™ Elution Buffer (100mM HEPES、500mMイミダゾール [pH 7.5])で溶出した。サンプルをSDS-PAGEで分析し、GelCode Blue染色により視覚化した。

MagneHis™ Cell Lysis Reagentの利点

MagneHis™ Cell Lysis Reagentを用いれば、長時間のインキュベーションを要するリゾチーム消化法よりも迅速・効率的に菌体を溶解することができます。本試薬に用いられている当社独自の組成により、菌体タンパク質を10分で最大限に遊離させることができるため、ハイスループットアプリケーションにおいて律速的なインキュベーションステップを簡略化することができます。菌体溶解の程度は市販の専用溶解剤と同等です。図5Aは、MagneHis™ Cell Lysis Reagentを使用した場合と他の2種類の市販製品を使用した場合について、菌体溶解によって遊離した総タンパク質量を比較したものです。MagneHis™ Cell Lysis Reagentには、もう1つの利点としてタンパク質構造の安定化作用があると考えられ、それにより酵素活性を高レベルで保持することができます。この安定化作用は、ホタルルシフェラーゼを発現するクローンの溶解で確認されています(図5B)。この作用はβガラクトシダーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼでも確認されています(データは示していません)。

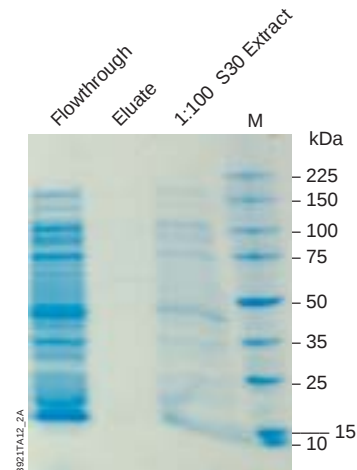


図2. MagneHis™ Ni-Particlesに対する非特異的なタンパク結合はきわめて少ない
E. coli S30 ExtractをMagneHis™ Binding/Wash Bufferで1:10に希釈し、この希釈液100μlをMagneHis™ Ni-Particles 30μlに添加した。図1の方法にしたがい、MagneHis™を用いて精製した。サンプルをSDS-PAGEで分析し、GelCode Blue染色により視覚化した。

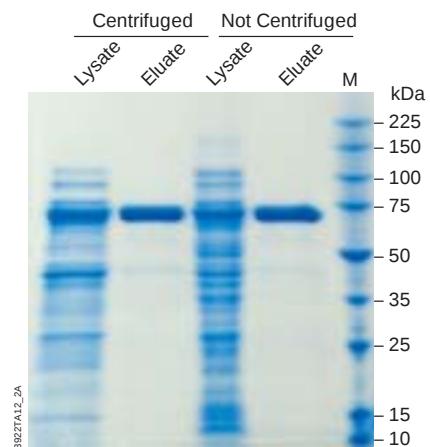


図3. 遠心した場合と遠心しない場合についての精製結果の比較

Hisタグ融合メチオニルRNA合成酵素を発現している菌体ペレットにMagneHis™ Cell Lysis Reagentを添加し、振とうしながら室温で10分間インキュベーションした。ライセートはそのままMagneHis™で精製するか、遠心により菌体残渣を取り除いたあの上清を用いてMagneHis™で精製した。MagneHis™での精製は、図1の方法にしたがって実施した。サンプルをSDS-PAGEで分析し、GelCode Blue染色により視覚化した。

Hisタグ融合タンパク質の自動化精製

プロテオミクスの分野では、ハイスループットスケールで使用可能な製品が必要とされるため、自動化プラットフォームで利用できるプロトコルへの要求度が高まっています。MagneHis™ Protein Purification Systemは、マニュアルによる1検体ずつの精製に用いることができるだけでなく、多様な自動化プラットフォームにも対応できるようにデザインされています。ハイスループットアプリケーションの詳細については、本冊子中の6ページをご参照ください (11)。

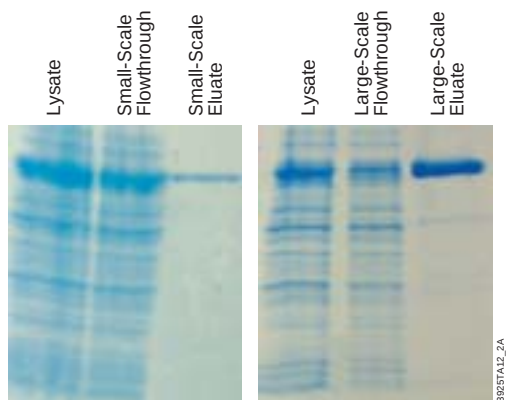


図4. スモールスケール精製とラージスケール精製の比較

Hisタグ融合メチオニルtRNA合成酵素を発現している菌体培養液100mlを、6,000rpmで15分間遠心した。上清を廃棄し、沈殿物を-70℃で凍結した。この沈殿物を10mlのMagneHis™ Cell Lysis Reagentに再懸濁し、振とうしながら室温で10分間インキュベーションした。上清を用い、Hisタグのスモールスケールでの精製とラージスケールでの精製を比較した。

スモールスケール：上清 100μlをMagneHis™ Ni-Particles 30μlに添加し、図1の方法にしたがって精製した。

ラージスケール：2.4mlのMagneHis™ Ni-Particlesを添加したコニカルチューブに8mlのライセートを添加し、室温で2分間転倒混和したのち磁気スタンドに設置した。フロースルーを流出し、1分画を回収した。得られたMagneHis™ Ni-Particlesを、100mM HEPES、10mMイミダゾールを含有するMagneHis™ Binding/Wash Buffer (pH 7.5) 12mlで3回洗浄した。Hisタグ融合タンパク質は、800μlのMagneHis™ Elution Buffer (100mM HEPES、500mMイミダゾール [pH 7.5]) で溶出した。サンプル (200μl) をSDS-PAGEで分析し、GelCode Blue染色により視覚化した。

参考文献

- Jung, H. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 15504–10.
- Thess, A. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 36321–8.
- Fodor, S.K. and Vogt, V.M. (2002) *J. Virol.* **76**, 4341–9.
- Lee, J.H., Voo K.S. and Skalniak, D.G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 44669–76.
- Tian, B. and Mathews, M.B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 9936–44.
- Wada, M. et al. (2002) *J. Biochem.* **131**, 307–11.
- Sivaraman, J. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44214–9.
- Ko, T.P. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47474–82.
- Yip, T.T., Nakagawa, Y. and Porath, J. (1989) *Anal. Biochem.* **183**, 159–71.
- Hutchens, T.W. and Yip, T.T. (1990) *J. Chromatogr.* **500**, 531–42.
- Bjerke, M. et al. (2003) *Promega Notes* **83**, 6–9.

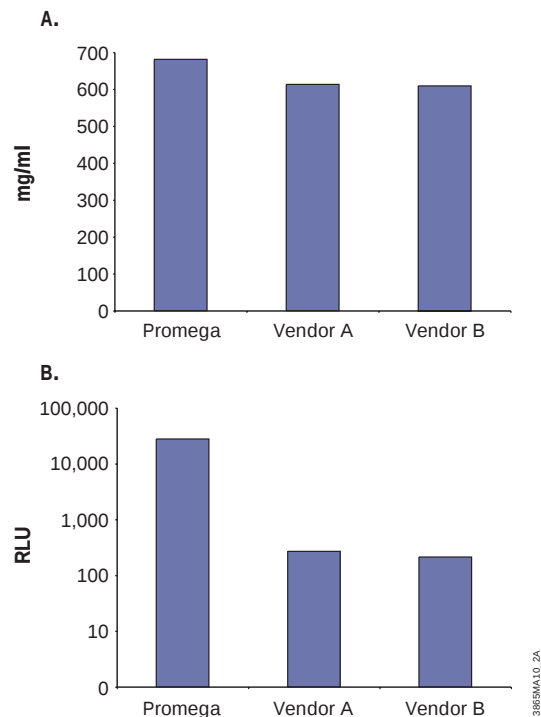


図5. MagneHis™ Cell Lysis Reagentと他社菌体溶解剤との比較

6 × Hisタグ-ホタルルシフェラーゼを発現している菌体を、MagneHis™ Cell Lysis Reagent、他社A製品、他社B製品を使用して、各製造業者のプロトコルにしたがい溶解した。各ライセートについて、タンパク質含量 (BCA法) (パネルA)、ルシフェラーゼ活性 (パネルB) を測定した。

プロトコール

◆MagneHis™ Protein Purification System Technical Manual #TM060, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MagneHis™ Protein Purification System	2ml	V8500	26,000
	10ml	V8550	90,000
MagneHis™ Ni-Particles	2ml	V8560	19,000
	10ml	V8565	65,000
Magnetic Separation Stand (2穴)	0.5ml	Z5331	6,000
	1.5ml	Z5332	6,000
	12 × 75mm	Z5333	6,000
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand (12穴)	0.5ml	Z5341	20,000
	1.5ml	Z5342	20,000
	12 × 75mm	Z5343	20,000
PolyAtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	1 個	Z5410	15,000