

Dyeing to Detect

MagneHis™ Ni-Particlesで精製したHisタグ-タンパク質の迅速な検出と定量

By Laurie Engel, B.S., Sanchayita Kar, Ph.D., and Tonny Johnson, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

本稿では、Hisタグ-タンパク質の迅速な検出および定量を行うための、Coomassie® Brilliant Blue (CBB)またはBODIPY® 蛍光色素による粒子上での結合アッセイ法についてご報告いたします。我々は、誘導されたHisタグ-タンパク質発現をモニタリングするためにCBBアッセイを利用しました。CBB色素の結合量は、MagneHis™ Ni-Particlesに結合するタンパク質量に比例します。また、我々は、MagneHis™ Ni-Particlesに捕捉されているHisタグ-タンパク質にBODIPY® 蛍光色素も結合させることができました。蛍光色素によるラベリングは、CBBアッセイより高い感度を持つと考えられます。これらのアッセイ法は、多検体処理を必要とする研究に最適です。

はじめに

ポリヒスチジン-タグは、組換えタンパク質の発現と精製に最も汎用されているアフィニティタグの1つです。この方法は、構造解析や機能解析における組換えタンパク質の精製を行う上で魅力的なシステムです。Hisタグ-タンパク質は、構造/機能解析の研究で、大腸菌、酵母、哺乳動物細胞、昆虫細胞（参考文献1の総説参照）、植物（2）など多様な発現システムからの精製に利用されています。

CBB色素結合アッセイは、溶出液のイミダゾール含有に付随した問題を解決するHisタグ-タンパク質の定量法として魅力的な方法です。

このようなタイプの研究で最も重要な前提条件の1つは、発現されたHisタグ-タンパク質の迅速な検出と定量が行える方法が利用できることです。抗体を用いたアプローチは検出の際に定常的に使用されます。Hisタグに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、ウエスタンブロッティングやELISA（3-6）によるHisタグ-タンパク質の検出に使用されます。NTA（nitrotri-acetic acid）修飾酵素-標識物（7）もHisタグ-タンパク質の検出に使用されます。ウエスタンブロッティングは時間がかかり、1度に数百クローンを迅速にスクリーニングする場合には限界があります。溶出バッファーには様々なタンパク質定量法（Bradford法やBCAアッセイなど）を阻害するイミダゾールが高濃度に含まれているため、ゲルで分離されていない溶出Hisタグ-タンパク質の定量は困難です。この問題は、精製されたHisタグ-タンパク質の希釈あるいは透析によるイミダゾールの除去により部分的に解消することができます。しかし、これらの方法は、主に大量発現されたタンパク質を定量する際に使用され、ハイスループットな発現スクリーニングやタンパク質発現システムの最適化を行う上で適した方法とは言えません。

そのため、特にHisタグ-発現タンパク質の1次スクリーニング用ツールとして、Hisタグ-タンパク質を定量/検出するシンプルなシステムの開発が必要です。このような技術は、ウエスタンブロッティングやELISAを使用しない迅速なHisタグ-タンパク質検出法である必要があります。これらの技術が開発されれば、初期条件の最適化やランダムな変異導入（8）、リボゾームディスプレイ（9）あるいはファージディスプレイ（10）などのアプリケーションにおける迅速なスクリーニングに利用できます。興味深いことに、Hisタグ-タンパク質は、そのシンプルな精製

ステップにより上述のアプリケーションで広く使用されています。

本稿では、MagneHis™ Protein Purification Systemにより精製したHisタグ-タンパク質を検出/定量するために開発した、CBBおよび蛍光色素標識を用いた手法を紹介いたします（図1）。

CBB色素結合アッセイによるHisタグ-発現タンパク質の迅速な検出

我々は、Hisタグ-tRNA methionyl synthetaseを含む発現タンパク質を、粒子上でのCBB色素結合アッセイを用いてモニタリングしました。菌体内でのHisタグ-tRNA methionyl synthetase発現を誘導し、様々なタイムポイントで集菌しました。各タイムポイントで、MagneHis™ Systemを用いてHisタグ-タンパク質を精製し、単離したタンパク質を表1のようにCBBで標識しました。標識したタンパク質は、CBBの吸光度（595nm）を測定し、SDS-PAGEで分析しました（図2、パネルB、C）。CBBの結合は、SDS-PAGE分析で示すように、発現レベルおよびNi-Particlesに結合したタンパク質量に比例します。この技術の利点は、タンパク質の発現レベルが分光光度計を使用しなくても目視により確認できることです（図2、パネルA）。

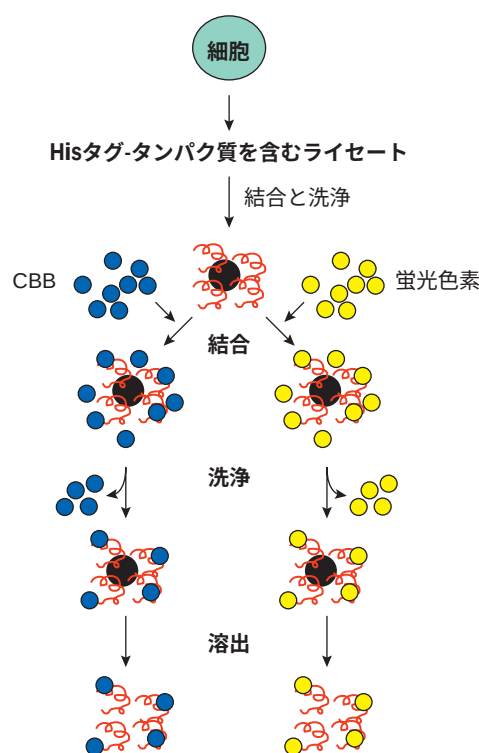
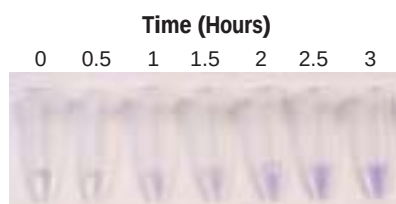


図1. Coomassie® Brilliant Blue (CBB) および蛍光色素による結合アッセイの概要

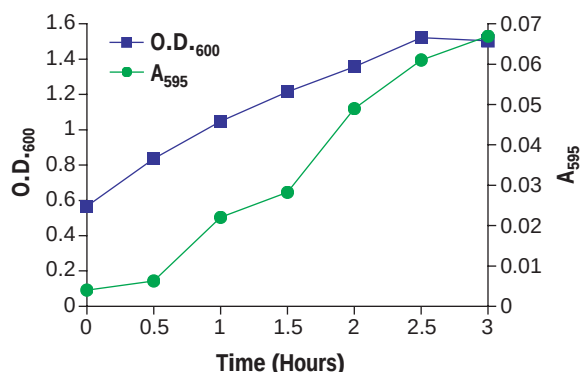
表1. CBB色素結合アッセイ

1. Technical Manual #TM060に記載されるようにMagneHis™ SystemでHisタグ-タンパク質を単離。MagneHis™ Ni-ParticlesからHisタグ-タンパク質を溶出しない。
2. 洗浄後MagneHis™ Ni-Particlesを、Coomassie® Blue 色素液 (0.1% Coomassie® Brilliant Blue R が含有するMagneHis™ Binding/Wash Buffer) 200μlに懸濁。
3. 3~5分間、ピペティングにより混和しながらタンパク質に色素を結合させる。
4. マグネットスタンドでMagneHis™ Ni-Particlesを捕捉。色素液を除去した後、タンパク質/ParticlesをMagneHis™ Binding/Wash Buffer 200μlで計6回洗浄。
5. MagneHis™ Elution Buffer 100μlでタンパク質を溶出。

A.



B.



C.

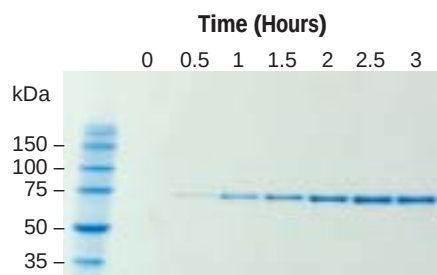


図2. CBB結合アッセイによるHisタグ-タンパク質の迅速な検出

Hisタグ-methionyl tRNA synthetase遺伝子を発現するJM109をO.D.₆₀₀ 0.5669に増殖させ、1mM IPTGで誘導した。3時間まで30分毎にサンプル(1ml)を分取し、O.D.₆₀₀値も測定した。サンプルは表1に準じて処理した。パネルA. CBBで処理した溶出サンプル。パネルB. 溶出したCBB結合タンパク質の吸光度(595nm) とそれに相応する菌体培養液のO.D.₆₀₀値。パネルC. 精製サンプルのSDS-PAGE分析

CBBアッセイは、誘導や培地の条件検討、多様なタンパク質からの選別など、タンパク質発現の1次スクリーニングに有用です。また、この方法は96ウェルフォーマットによる多検体処理にも適応します(データ未掲載)。CBB色素標識による本法は、SDS-PAGE、ウェスタンブロットティング、ELISAなどに比べ、発現の1次スクリーニングにかかる時間の浪費を抑えます。このアプローチは、他のニッケル-レジンやニッケル-粒子でも応用可能(データ未掲載) であると考えられますが、非特異的なタンパク質結合が少ないMagneHis™ Ni-Particlesが得に適しています。

CBB色素結合アッセイの直線性と感度

分子量の異なる2種類のHisタグ-タンパク質をそれぞれ精製するために、標準曲線を作成し、CBB色素結合アッセイの直線性と感度をテストしました。精製されたタンパク質への色素の結合は、タンパク質に依存し、定量的であることを確認しました。色素の結合量と吸光値は、約9 kDaのHisタグ-ユビキチン(図3A)および62 kDaのHisタグ-グルシフェラーゼ(図3B)を用いたテストでMagneHis™ Ni-Particlesに結合したタンパク質量に比例しました。また、SDS-PAGE分析によりこれらの結果を確認しました(データ未掲載)。CBB色素結合アッセイは、溶出液のイミダゾール含有に付随した問題を解決するHisタグ-タンパク質の定量法として魅力的な方法です。さらに、CBB色素結合アッセイは頑健で、複雑なサンプル調製を必要としません。

ネイティブなタンパク質に結合するCBB色素量は、タンパク質の特性に依存するため、ネイティブな条件下における異なるタンパク質のCBB色素結合量は異なります。ネイティブ-タンパク質の正確な量を測定するためには、定量するタンパク質で標準曲線を作成する必要があります。また、変性させた後にタンパク質濃度を測定する場合であれば、1種類の変性Hisタグ-タンパク質で作製した標準曲線を共通に用いることもできます。

蛍光色素標識アッセイによる迅速なHisタグ-タンパク質の検出

MagneHis™ Ni-Particlesに結合した蛍光標識タンパク質量の粒子上でのアッセイ法を開発しました。タンパク質のN末端およびリジン残基のε-アミンに共有結合するアミン反応性色素BODIPY®を利用しました。MagneHis™ Ni-Particlesに結合した様々なBODIPY® 色素標識 Hisタグ-タンパク質のSDS-PAGE分析を図4に示しています。この方法では、染色/脱色ステップを伴わないタンパク質バンドの可視化が可能です。これらの標識タンパク質は、下流のアプリケーションでも使用することができます。例えば、MagneHis™ Systemで精製した蛍光標識タンパク質は、タンパク質間相互作用実験において“おとり”タンパク質として使用することができ、“おとり”に捕捉され精製されたタンパク質には遊離蛍光物質が混入しません。BODIPY®色素の代用または併用に異なる色素を用いることができ、複数の色素で標識されたHisタグ-タンパク質は、マルチプレックス分析に用いることもできます。

BODIPY®色素は、特にプロトンが付加されていない脂肪族アミノグループに結合するため、定量アッセイでの使用には制限があります。CBBと同様にタンパク質と非共有結合する蛍光色素が市販されており、有機溶媒を必要としない蛍光をベースにしたタンパク質定量法開発に使用することができます。蛍光をベースにした方法はCBB色素結合アッセイよりも感度が高いと考えられるため、発現量の低いHisタグ-タンパク質を検出できる可能性があります。

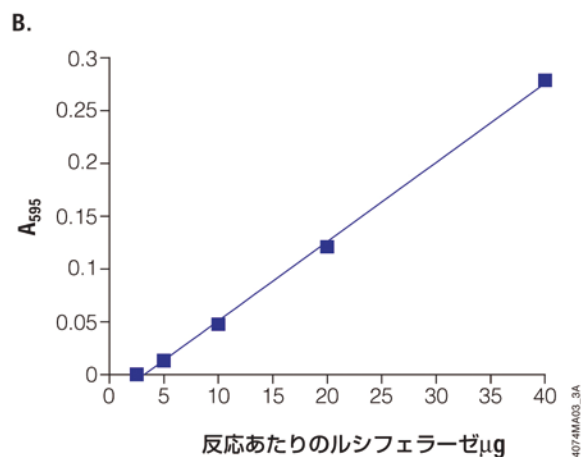
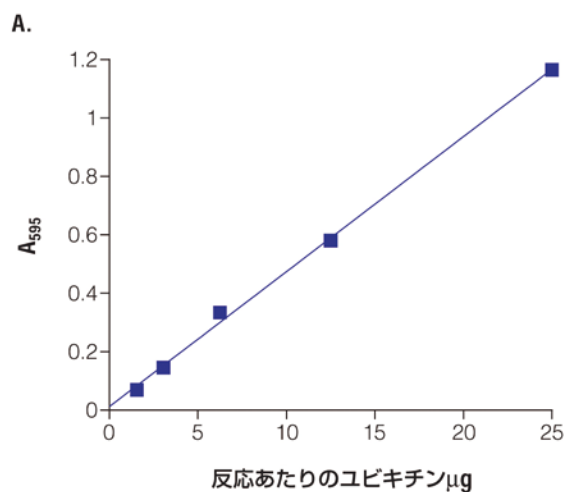


図3. 精製した Hisタグ-ユビキチンおよびホタル-ルシフェラーゼを用いたCBB色素結合アッセイの定量性

図示量の精製Hisタグ-ユビキチンまたはルシフェラーゼ (MagneHis™ Wash/Binding Bufferに溶解) にMagneHis™ Ni-Particles 30μlを混和した。タンパク質/粒子は表1のようにCBBで処理した。各サンプルの吸光度 (595nm)を測定し、バックグラウンド吸光度を差し引いた。パネルA. Hisタグ-ユビキチン。パネルB. Hisタグ-ホタル-ルシフェラーゼ。

結論

本稿では、CBBやBODIPY® 蛍光色素の結合により、Hisタグ-タンパク質を迅速に検出/定量する新しい2つの方法について記述しました。これらの方法のアプリケーションとして1) 高発現Hisタグ-タンパク質選択のための1次スクリーニング、2) 特定のHisタグ-タンパク質の細胞内発現のための培地・温度・添加物・誘導パラメーター・プロモーターの最適化、3) 変異研究におけるHisタグ-タンパク質のハイスループットスクリーニング、4) Hisタグ-タンパク質の定量、5) 下流のアプリケーションで用いるための蛍光標識Hisタグ-タンパク質調製、などが挙げられます。



図4. MagneHis™ Ni-Particlesに付着したHisタグ-タンパク質の蛍光標識

精製したHisタグ-タンパク質は、MagneHis™ Ni-Particles 30μlに結合させた。タンパク質/粒子は表2のようにBODIPY® 色素で処理し、SDS-PAGE後、蛍光イメージスキャニングにより分析した。レーン1; Hisタグ-ホタル-ルシフェラーゼ (62kDa)、レーン2; Hisタグ-ウミシイタケ-ルシフェラーゼ (36kDa)、レーン3; Hisタグ-RNasin® Inhibitor (45kDa)、レーン4; Hisタグ-methionyl tRNA synthetase (76kDa)。

表2. BODIPY® 蛍光色素結合アッセイ

1. Technical Manual #TM060に記載されるようにMagneHis™ SystemでHisタグ-タンパク質を単離。MagneHis™ Ni-ParticlesからHisタグ-タンパク質を溶出ししない。
2. 洗浄後MagneHis™ Ni-Particlesを、BODIPY® 色素溶液 (1mg/ml BODIPY® FL SE色素 [Molecular Probes, Cat# D-2184] を溶解した50%アセトニトリル、100mM HEPES [pH7.5]) 100μlに懸濁。
3. 室温で5分間インキュベーション。
4. マグネットスタンドでMagneHis™ Ni-Particlesを捕捉し、未結合の色素を除去した後、MagneHis™ Binding/Wash Buffer 0.5mlで3回洗浄。
5. MagneHis™ Elution Buffer 100μlでタンパク質を溶出。

参考文献

1. Terpe, K. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–533.
2. Leelavathi, S. and Reddy, V.S. (2003) *Molecular Breeding* **11**, 49–58.
3. Zentgraf, H. et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 3347–3348.
4. O'Shannessy D.J. et al. (1995) *Anal. Biochem.* **229**, 119–124.
5. Pogge von Strandmann E. et al. (1995) *Protein Eng.* **8**, 733–735.
6. Paborsky L.R. et al. (1996) *Anal. Biochem.* **234**, 60–65.
7. Botting C.H. and Randall R.E. (1995) *Biotechniques* **19**, 362–363.
8. Lanio, T., Jeltsch, A. and Pingoud, A. (2000) *Biotechniques* **29**, 338–342.
9. Lamla, T. and Erdmann, V.A. (2001) *FEBS Lett.* **502**, 35–40.
10. Deutscher, S.L. et al. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 207–213.

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	65回分	V8500	26,000
	325回分	V8550	90,000
MagneHis™ Ni-Particles	2ml	V8560	19,000
	10ml	V8565	65,000