



HisLink™ Protein Purification Resinのご紹介

By Dan Simpson, Ph. D., and Becky Godat, M. A., Promega Corporation

アブストラクト

HisLink™ Protein Purification Resinは、柔軟性があり、使いやすいタンパク質精製レジンです。非特異的結合を抑え、Hisタグ融合タンパク質の補足能力に優れた修飾シリカ担体がレジンをに用いられています。HisLink™ Resinは、多くのタンパク質精製法に適応し、カラムクロマトグラフィー、バッチクロマトグラフィー、FPLCなどの自動化にも使用することができます。

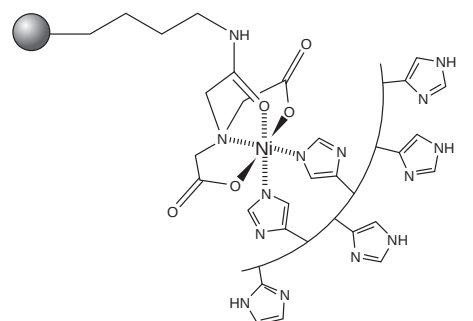


図1. HisLink™ ResinとHisタグの相互作用の概要

Hisタグが結合できるサイトが2箇所あり、Hisタグ-ポリペプチドの存在下でヒスチジンがすみやかに配位される。

HisLink™ Protein Purification Resinは使いやすい、様々な種類のタンパク質精製技術に適応します。

はじめに

アフィニティータグ融合タンパク質の発現および精製は、組換えタンパク質を大量に得る主要な方法の1つです。汎用されているアフィニティータグとしてポリ-ヒスチジン (His-タグ)、グルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST)、マルトース結合タンパク質およびカルモジュリンなどが挙げられます。これらのタグの中でHis-タグは最も広く使用され、以下のような利点を有しています。1) サイズが小さいため免疫原性が低く、多くの場合、精製タンパク質からタグを除去せずに下流のアプリケーションで使用できる。2) Hisタグタンパク質の発現ベクターが数多く市販され、入手が容易。3) タグはN末端およびC末端のどちらにも配置可能。4) Hisタグの相互作用はタグの構造に依存しないため、不溶性タンパク質を変性条件下で可溶化させて精製可能。

Hisタグによる精製の基本原理であるアフィニティー相互作用は、ポリヒスチジン内のイミダゾール環に存在する片方の窒素が金属の不飽和な配位座に配位するためであると考えられています (図1)。この金属 (多くの場合ニッケル) は、担体に共有結合されたキレート基との錯体形成により担体に固定化されています。最も汎用されている2つの担体として、アガロースとシリカゲルが挙げられます。クロマトグラフィーの固定相としても使用されるシリカは、膨潤しにくく、圧力や流量の大きな変化にも耐え、崩壊および変形を来さない強固な機械的構造を有することから、有用な材料といえます。また、タンパク質などの大きな生体分子に対して高い結合容量を備えたマクロ多孔性シリカをはじめ、広範なポアサイズ、粒子サイズのシリカが利用できます。しかし、アフィニティー精製の固相としてのシリカの欠点の1つは、使用できる化学薬品に制限があり、表面の修飾効率が比較的低いことです。

これらの制限を克服するために、四座配位金属キレート複合体を提示する新しいシリカ表面修飾プロセスを新規に開発しました。この支持体は高い結合容量を持つとともに、未修飾シリカの特徴である非特異的結合も抑えられています。我々は1ml レジンあたり35mgヒス-タグタンパク質 相当の高い結合容量を持つポアサイズを有するレジンを選定しました。本稿ではHisLink™ Protein Purification Resinをご紹介します。迅速性、利便性を持つ多様なフォーマットでmg単位のHis-タグタンパク質を精製するために必要な汎用性について実証します。

HisLink™ Resin の物性

HisLink™ Resinは、1000 Åポアサイズを有する純度の高い球状のシリカゲルです。レジンは、ニッケルイオンと四座配位錯体(1)を形成する特殊なキレート配位子で修飾 (1mlレジンあたり20mmolの過剰量) され、通常のシリカゲルで認められる非特異的な表面の相互作用が抑えられています。図2ではこのレジンの結合能力を示します。61kDaの精製Hisタグ-タンパク質量のタイトレーションを行った場合、飽和条件での結合レベルは約100 µg/mgレジんで、このタンパク質の理論上の結合容量が40 mg/ml以上であることを示唆していました。

表1では、表面の修飾により非特異的相互作用が低下していることを示しています。培養した非形質転換型の大腸菌ライセート (*E. coli* S30 lysate) を用いて、流出分画、3回の洗浄分画、溶出分画からの非Hisタグ-タンパク質量をブラッドフォードアッセイにより測定しました。このライセートは非形質転換型大腸菌より得られたため、溶出液中の全てのタンパク質が、標準的な精製で得られるバックグラウンドであると考えられます。溶出分画に認められる非特異的タンパク質レベルの低さは、効果的な表面修飾が反応性の高いシリカ表面との非特異的相互作用を防ぐという結論を支持していました。

Hisタグ-タンパク質の精製

金属レジンを用いてHisタグ-タンパク質を精製する際、次のような簡単なプロトコルが用いられます。細胞ライセート中のHisタグ-タンパク質を結合させ、非特異的タンパク質を除くためにレジン进行を洗浄し、目的のタンパク質を溶出します。その手順は迅速かつ効率的で、リコンビナントタンパク質を得る有用な方法となっています。HisLink™ Resinは、通常、ライセートからHisタグ-タンパク質を精製する場合 様々なフォーマットで機能します。これらの方法には、バッチ方式および重力、吸引やFPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) など加圧によるカラム方式があります。これらの異なる方法についての使いやすいプロトコルを用いれば、テストを行ったタンパク質について同様の回収率と純度が得られます (2)。この多用性により、研究者自身が精製のために利用できる最も適した機器と時間に合った精製法を選ぶことができます。

HisLink™ Resin に適応するバッファー

ヒスチジンにあるイミダゾール環の窒素を介して、Hisタグ-タンパクをニッケルに結合させるためには、結合と洗浄のステップでは、イミダゾール側鎖に適したpH（～6.0）を十分に超えたpH領域に保たれる必要があります。適したバッファーとしてHEPES、Trisとリン酸ナトリウムがあります（表2）。塩化ナトリウムのような塩は非特異的な相互作用を制御するためにしばしば用いられますが、溶出されるタンパク質の純度が低下する可能性があります。また、非特異的な相互作用を低減させるため、多くの結合バッファーに低濃度のイミダゾールが含まれています。しかし、Hisタグのニッケルへの結合が抑制されないように、イミダゾールの濃度を十分にコントロールする必要があります。

レジンから結合したタンパク質を溶出する場合、イミダゾールを用いる方法が最も一般的で、有効です。通常、HisLink™ Resinに結合したHisタグ-タンパク質は、10～100mMのイミダゾール濃度では、レジンから顕著に溶出されず、結合状態が保たれます。タンパクの種類によりますが、250～500mMのイミダゾール濃度範囲で最もよく溶出されます。

ここで報告する実験では、HEPESバッファースystemを用いています（表2）。このバッファースystemは、精製効率と精製タンパクの安定性の両面に優れています。HEPES以外のバッファーを使用する場合、プロテアーゼ阻害剤を使用せずに精製を行うと、分解したタンパク質量が明らかに変化することをCoomassie® 染色により観察しました（データ未掲載）。完全長のタンパク質とともに不要なHisタグ-タンパク質断片も共に精製されることがあるため、この分解をコントロールすることは重要です。また、HEPESは非特異的な相互作用を抑える塩の働きにあまり依存していないため、多くの場合、タンパクを高い純度で溶出するために塩を添加する必要はありません。推奨されるバッファースystemの組成を、表2に示します。

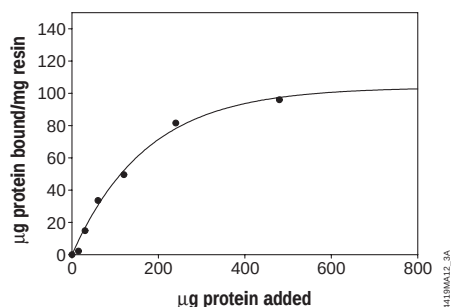


図2. HisLink™ Resinの61kDa Hisタグ-タンパク質に対する結合能力

1mgのHisLink™ Resinに対して、異なる量の精製タンパク質を添加した。流出分画に残存するタンパク質量は、ブラッドフォードアッセイにより測定した。流出分画とカラムに添加したタンパク質量の差を結合したタンパク質量とした。レジンの飽和結合能力100μg/mgは、1mlレジンあたり40mg以上のタンパク質結合量と同等。

Hisタグ-タンパク質のカラム精製

HisLink™ Resinを用いてカラム精製を行う場合、従来のHisタグ-タンパク質精製法を用いることができ、適当なベッドボリュームをもつカラムだけが必要となります。重力落下による精製を行うために1mlをパルクした場合、HisLink™レジンの平均流量は約1ml/分です。一般的には、1mlのレジンあたり1～2ml/分の流量がHisタグ-タンパク質を最も効率的に結合させます。2種類の中等度に発現したタンパク質をカラム精製した結果を図3に示します。

表1. HisLink™ Resinへの非特異的な大腸菌タンパク質の結合

100μl に分注された*E. coli* S30ライセートをHisLink™ Resin 1mgに添加した。HisLink™ Resinとともにライセートをインキュベーションした後、レジンを洗浄し、標準的な条件下で溶出を行った。流出分画、3回の洗浄分画、溶出分画を分取し、ブラッドフォード法によりタンパク質を定量し、添加したタンパク質量を100%とした場合の相対値（%）を求めた。本実験において、ライセートのタンパク質量に対する溶出液に含まれるタンパク質量の割合は0.3%。

Fraction	% of Total Protein (Adjusted)
Flowthrough	92
Wash 1	5.2
Wash 2	1.6
Wash 3	0.3
Elute	0.3
Total	99.4

表2. HisLink™ Protein Purification Resinに推奨されるバッファースystem

HEPES

Binding:	100mM HEPES, 10mM imidazole (pH 7.5)
Wash:	100mM HEPES, 10–100mM imidazole (pH 7.5)
Elution:	100mM HEPES, 250–1000mM imidazole (pH 7.5)

Tris

Binding/Wash:	100mM Tris, 10mM imidazole (pH 7.5)
Elution:	100mM Tris, 500mM imidazole (pH 7.5)

Sodium Phosphate

Binding/Wash:	50mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 10mM imidazole (pH 8.0)
Elution:	50mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 250mM imidazole (pH 8.0)

Hisタグ-タンパク質のバッチ精製

HisLink™ Resinの主な特長の1つに、バッチ精製での使用があります。バッチモードでは、約30分間、4～22℃の温度範囲でライセートを混和することで目的のタンパク質をレジンに結合させます。タンパク質と結合させた後、レジンを容器の底に沈殿させ、不要なライセートを除去します。洗浄では、適当な洗浄バッファーでレジンを懸濁し、レジンが底に沈殿するまでしばらくの間待つだけです。その後、洗浄バッファーを慎重に排棄します。この過程を必要な回数繰り返します。最後の溶出段階では、HisLink™ Resinをカラムに移すことによりタンパク質分画を溶出することができます。

バッチ精製の利点として、つぎの3点が挙げられます。1) 洗浄にかかる時間が短い 2) 大量のライセートの処理が可能 3) 精製前のライセートの清澄化が不要。HisLink™ Resinを用いて、清澄化を伴う（または伴わない）重力流出カラム法またはバッチ法によるタンパク質の精製結果を図4に示します。精製タンパク質の質と量は、精製に用いられた方法に依存していませんでした。

FPLCによる精製

HisLink™ Resinは、シリカベースの堅固な粒子構造を持つため、ライセートのロード、洗浄、レジンからのタンパク質溶出を加圧により行うアプリケーションに最適です。これらのアプリケーションには、陽圧（例：FPLC）や陰圧（例：吸引システム）の条件下で行われるマニュアルまたは自動化のシステムの両方が含まれます。

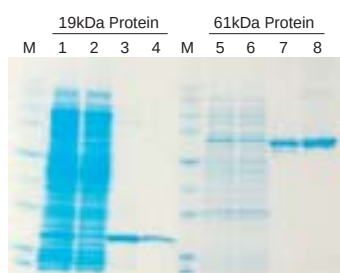


図3. HisLink™ Resinを用いた19kDaと61kDaの融合タンパク質の精製

19kDaのHisタグ-タンパク質をIPTGで誘導した1Lの培養液をスピンドウンし、1/50量になるように溶解した（20ml ライセート）。61kDaのHisタグ-タンパク質の発現をIPTGで誘導した1Lの大腸菌培養液は10倍に濃縮した。清澄化した後、1mlのHisLink™ Resinカラムを用いてタンパク質を精製した。洗浄、溶出には、100mM HEPES, 10mM イミダゾール（pH7.5）の結合/洗浄バッファーおよび100mM HEPES, 500mM イミダゾール（pH7.5）の溶出バッファーを用いた。レーン1, 5; 6 x Hisタグ-タンパク質を発現する大腸菌ライセート、レーン2, 6; ライセートの流出液、レーン3, 4および7, 8; 各タンパク質の連続する精製タンパク質溶出分画、レーンM; Broad Range Protein Markers（カタログ番号 V8491）。

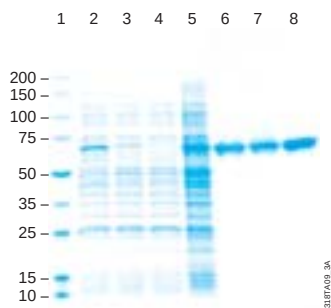


図4. HisLink™ Resinを用いたカラム法およびバッチ法によるクリアまたはクルードなライセートからの6X Hisタグ融合タンパク質の精製

レーン1: Broad Range Protein Markers（カタログ番号 V8491）; レーン2: 6X Hisタグ-タンパク質を発現する大腸菌ライセート; レーン3: クリアライセートの流出液（カラム法）; レーン4: クリアライセートの流出液（バッチ法）; レーン5: クルードライセートの流出液（バッチ法）; レーン6: クリアライセートからの溶出液（カラム法）; レーン7: クリアライセートからの溶出液（バッチ法）; レーン8: クルードライセートからの溶出液（バッチ法）。結合/洗浄バッファーは図3と同様。

自動化法でのHisLink™ Resinの使用を呈示するため、Amersham社のAKTA explorerを用いました。mg量のHisタグ-タンパク質を1Lの培養液より精製しました。培養液は、20mlの結合/洗浄バッファー中で溶解し、1mlのHisLink™ Resinを充填したカラムに移しました。図5に280nmで精製過程をモニタリングしたクロマトグラムおよびライセート、流出液、溶出液分画のゲル分析を示します。回収された全タンパク質量は、オリジナルのライセートに発現していたタンパク質の75～95%に相当すると見積もられました。

結論

HisLink™ Protein Purification Resinは、大腸菌で発現したHisタグ融合タンパク質を効率よく補足/精製するための、四座配位ニッケル錯体で高レベルに修飾されたマクロ多孔性シリカレジン（沈殿状態のレジン1mlあたり>20mmol）です。このレジンは、シリカに特徴的にみられる非特異的結合が抑えられています。HisLink™ Resinの結合能力は、8kDaのタンパク質に対し、15mg/ml 以上(>1,000nmol/ml)です。61kDaのタンパク質 (>500nmol/ml) に対しても、35 mg/mlと高い回収率が認められています。

HisLink™ Resinは、使用しやすく、通常のカラムクロマトグラフィー、バッチクロマトグラフィー、FPLCのような自動化法を含む、様々なタンパク質精製法に利用できます。HisLink™ Resinを用いたバッチモードは、結合/洗浄溶液から容易に分離できるという優位性があり、通常、精製工程のスピードアップや精製に先立つライセート清澄化操作の省略が可能です。

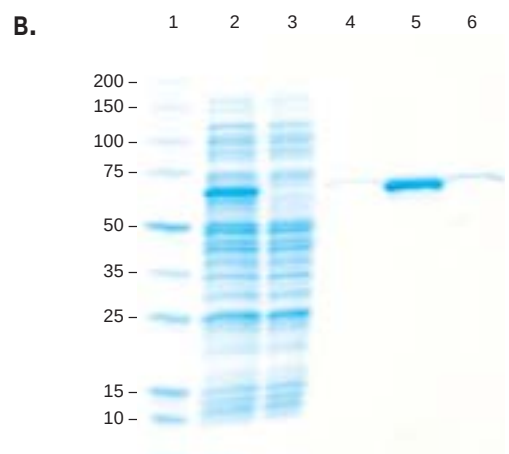
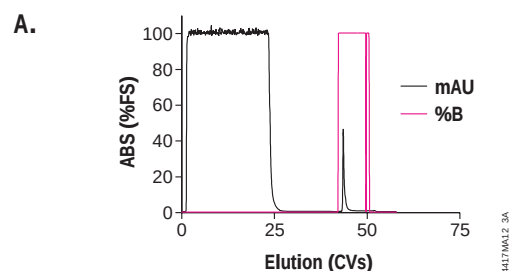


図5. HisLink™ ResinおよびAKTA explorer（Amersham Biosciences）を用いた6X Hisタグ融合タンパク質の精製

システムでは、ライセートを50ml superloopからロードし、洗浄バッファー20Xカラム容量で洗浄した後、直ちに溶出し、分画を採取するようにプログラミングした。結合/洗浄バッファーおよび溶出バッファーは図3と同様。パネルA: クロマトグラムは280nmでモニタリングした。ピンク色の線はバッファーの濃度勾配を示す。パネルB: レーン1: Broad Range Protein Markers（カタログ番号 V8491）、レーン2: 6X Hisタグ-タンパク質を発現する大腸菌ライセート、レーン3: ライセートの流出液、レーン4, 5および6; 連続する精製タンパク質溶出分画。

プロトコル

- ◆ HisLink™ Protein Purification Resin Technical Bulletin #TB327, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tb327/tb327.html)

参考文献

1. Motekaitis, R.J. and Martell, A.E. (1974) *Inorg. Chem.* **13**, 550–9.
2. HisLink™ Protein Purification Resin Technical Bulletin #TB327, Promega Corporation.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HisLink™ Protein Purification Resin	50ml	V8821	44,000