

磁性体粒子MagneGST™ ParticlesによるGST融合タンパク質の精製

By Marjeta Urh, Ph.D., Don Creswell, B.S., Jacqui Sankbeil, M.S., Dan Simpson, Ph.D., Rod Flemming, Ph.D., Cris Cowan, Ph.D., and Gary Kobs, B.S., Promega Corporation

MagneGST™ Protein Purification Systemはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質を高効率、低バックグラウンドで精製するシンプル、迅速、信頼性のある方法を提供します。磁性体粒子を用いたパッチによる精製法は複数の遠心操作を繰返す必要が無く、マニュアルまたはロボットプラットフォームによるシンプルな精製が行えます。細胞ペレットからのGST融合タンパク質の精製は2時間以内に完了することができ、クルードまたはクリアーライセートからでも精製できます。

**MagneGST™ Glutathione Particlesは迅速、
便利なタンパク質精製ツールで、ハイスループット
スクリーニングにも使用できます。**

はじめに

タンパク質機能の解明は、今日の研究者が直面する主な課題の1つです。細胞の発達における異なるステージでのタンパク質発現制御、タンパク質修飾、タンパク質間相互作用、タンパク質機能に関する情報は、様々な生物の発達や生理を理解する上で必要です。そのため、タンパク質研究を加速させるツールの開発が重要です。近年、個々のタンパク質を研究する多くのツールが開発されました。しかし、数百もの異なるタンパク質を迅速に発現させ、単離する能力が重要になってきているため、現在の力点はハイスループットスケールでのタンパク質研究に変わってきています。

アフィニティー精製タグは、目的のどのようなタンパク質にでも融合させることができ、タグの親和性を利用して、迅速、簡単に精製することができます(1)。現在、タンパク質の精製や検出に様々なアフィニティー精製タグが使用されています。異なるタグはそれぞれの特性を持っており、菌体内でタグが付加されることによりタンパク質の安定性、可溶性、発現に影響を与えます(2)。近年の報告では、ランダムに選んだヒトcDNAの巨大なセットをクローニングし、4つの異なるタグとの融合タンパク質を発現させ、収量、精製度、安定性について特徴付けています(3)。この研究およびその他でも、GSTアフィニティー精製タグは、菌体で発現させた多くの真核生物タンパク質の可溶性を向上させていることを示していました。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) アフィニティータグによるタンパク質精製は、1988年SmithおよびJohnson (4)により紹介され、GSTとの強い親和性を持つグルタチオンコートマトリクスがベースになっています。グルタチオンへのGST融合タンパク質の結合は可逆的であるため、還元型グルタチオンを溶出バッファーに加えることにより結合したGST融合タンパク質を効率的に溶出することができます。また、穏やかな溶出条件により、透析を必要とせずにGST融合タンパク質の下流アプリケーション用のタンパク質精製に使用することができます。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼは真核生物に存在し、多くの機能を持つ細胞質タンパク質ファミリーの1つです(5,6)。GSTのアイソフォームはバクテリアでは通常見られず、内在性のバクテリアタンパク

質で精製用レジンへのGST融合タンパク質の結合に競合するタンパク質はありません。この報告で使用するGST精製タグは26kDaのタンパク質で寄生虫*Schistosoma japonicum*に由来します(4)。

ハイスループットスクリーニングを可能にさせる迅速、便利な精製を行うために磁性GST精製レジン、MagneGST™ Glutathione Particles (カタログ番号 V8611)を開発しました。この粒子を用いれば、多くの遠心操作やチューブへのサンプル分注操作（磁性レジン以外でタンパク質のパッチ精製を行う場合に必要）を伴わずにGSTタンパク質を精製することができます。

優れたタンパク質精製レジンは非特異的タンパク質の結合が最低限、高い融合タンパク質結合容量、効率的な回収などいくつかの基準で特徴付けられます。本稿ではこれらの基準にMagneGST™ Glutathione Particlesが合致し、異なるタンパク質発現レベルでも広範な分子量のタンパク質が精製できることを示しています。さらに、MagneGST™ Particlesを便利な“walk-away”精製を可能にする自動化液体分注プラットフォームで使うことができます。

GST融合タンパク質精製法

図1に示すとおり、MagneGST™ Particlesを用いたGST融合タンパク質精製には基本となる4つのステップがあります。各ステップは、精製度の高いGST融合タンパク質を効率的に回収するために最適化されています。磁性レジンの特性上、精製は1本のチューブで行われるため、精製工程を単純化、短縮化することができます。

精製度の高いGST-融合タンパク質の高効率な回収

タンパク質精製において重要な点は、不純物が全く、またはほとんど無くタンパク質を回収することです。弱く誘導されたタンパク質を精製する場合、非特異的に結合したタンパク質を除去することは特に重要です。図2、パネルAでは低レベルに発現したGST融合タンパク質の精製結果を示します。高い収量、純度で精製されたタンパク質は非特異的結合も低く抑えられていました。図2、パネルBでは、GST融合タンパク質の過剰発現しない条件で、MagneGST™ Resinへの非特異的結合について調べました。パネルBでは、溶出画分にもS30抽出液タンパク質が存在しないことから、競合が存在しなくても事実上レジンへの非特異的結合が無いことを示していました（図2、パネルB）。

精製レジンのもう一つの重要な特性は結合容量です。MagneGST™ ParticlesのGST融合タンパク質の結合容量を概算すると1ml 固定レジンあたり7mgタンパク質で、他の市販されている精製用磁性レジン（概算2mg/ml 固定レジン）よりも非常に高い結合容量を持ちます。GST融合タンパク質の結合容量は非磁性GST精製レジンと同程度です。MagneGST™ Resinは高収量、高純度でGST融合タンパク質を回収する経済的で効率的な方法を提供します。

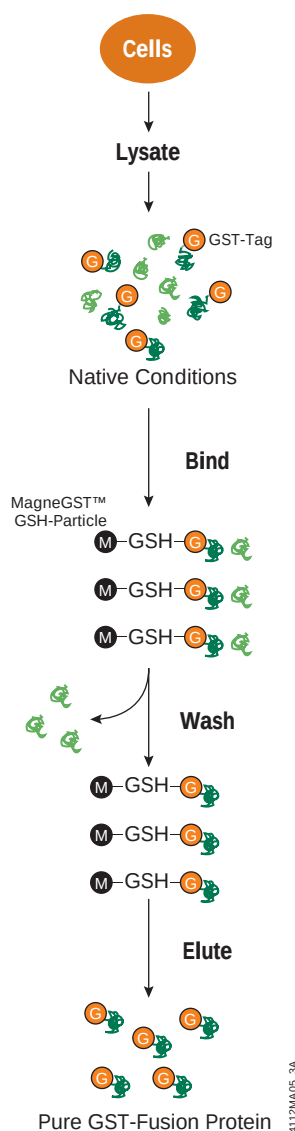


図1. MagneGST™ Protein Purification Systemの操作概要

GST融合タンパク質の発現を誘導した菌体をペレット状にし、酵素的または機械的な方法で溶解した。MagneGST™ Glutathione Particlesをクリアーまたはクルードなライセートに直接添加した。室温または4°Cでのインキュベーションの間にGST融合タンパク質は粒子に結合し、未結合および非特異的結合タンパク質を洗浄除去した（洗浄は3回行った）。GST融合タンパク質は、10–50mM 還元型グルタチオン（pH 8）の添加により粒子から溶出された。

クルードな菌体ライセートからの迅速なGST融合タンパク質の精製

複数のサンプルから同時にタンパク質を精製する場合、細胞の溶解に使用するフレンチプレスや超音波処理は面倒で時間がかかります。MagneGST™ Protein Purification Systemには溶解を迅速、簡便に行うためのCell Lysis Reagentが含まれています。誘導処理をした、菌体培養液を軽い遠心でペレット状にし、MagneGST™ Cell Lysis Reagentで再懸濁した後、20–30分間インキュベーションします。

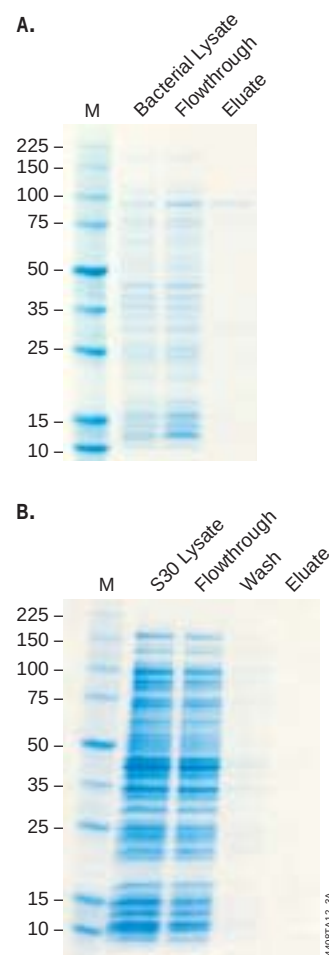


図2. MagneGST™ Particlesによる非特異的結合が最低限に抑えられた低発現タンパク質の精製

パネルA. GST融合ルシフェラーゼタンパク質を発現する菌体培養液1mlからクルードな菌体ライセートを調製した。融合タンパク質はMagneGST™ Particle 100μlを用いて図1の操作概要に従い精製した。**パネルB.** *E. coli* S30 Extract (30μl) およびMagneGST™ Particles 100μlを用いた場合、粒子への非特異的なタンパク質結合は最低レベル。全てのサンプルはSDS-PAGEで分析し、Coomassie® blue染色により可視化した。レーンM: Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)。

従来のカラム法やバッチ法を用いたGSTタグ-タンパク質の精製法では、GST結合レジンを添加する前に細胞残渣を高速遠心で除去する“ライセートの清澄化”処理を行う必要があります。このステップは時間がかかり自動化プラットフォームでタンパク質を精製する場合障害となります。ライセートを清澄化する必要がないため、MagneGST™ Glutathione Particlesをクルードな菌体ライセートに直接添加し、操作をより迅速、効率的に進めることができます。図3にはMagneGST™ Systemを用いてクルードまたはクリアーライセートから精製したタンパク質の分析結果を示しています。どちらの方法で精製したタンパク質も同様の純度と収量を示しました。

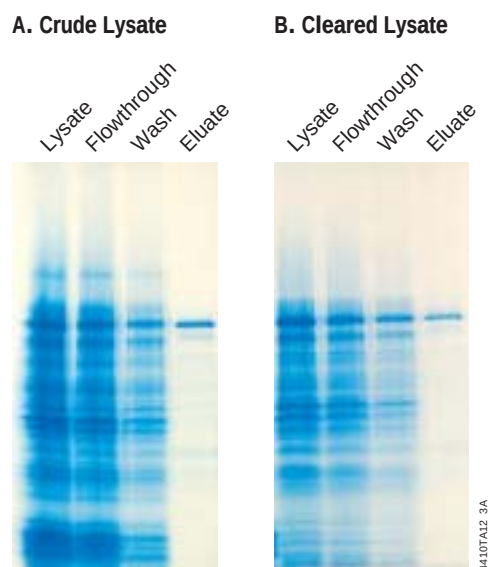


図3. クルドおよびクリアーな菌体ライセートからの精製

菌体培養液 (1m) をペレット状にして溶解した。1つのライセートは細胞残渣を除去せずにMagneGST™ Particle 100μlを直接加えた (パネルA)。他方のライセートはMagneGST™ Particle 100μlを加える前に12,000×gで40分間遠心して清澄化した (パネルB)。両方のサンプルは図1に示すMagneGST™ Systemの精製プロトコルに従って処理した。

高密度で培養したBL21 (DE3) pLysS菌株のクルドなライセートからロボットでタンパク質精製を行う場合、大量のGST融合タンパク質とともに不純物が精製されることがありました。これは溶解した細胞から核酸が開放され、これがサンプルの粘性を上げてタンパク質精製を妨げていました。クルドなライセートにRQ1 RNase-Free DNase (カタログ番号 M6101) を添加するとGST融合タンパク質の精製度が顕著に向上しました (データ未掲載)。MagneGST™ SystemにはRQ1 RNase-Free DNaseが含まれており、ライセートの粘性が高い場合には精製を補助します (精製中におけるDNaseの添加はオプション)。

異なるサイズのGST融合タンパク質の精製

タンパク質のサイズを大きくすると、グルタチオンレジンへのGST融合タンパク質の親和性が低下するという報告がいくつかあります。また、タンパク質の分子量とグルタチオンアガロース結合容量の関連性も示されています(7, 8)。これを考慮に入れて26kDa~87kDaのタンパク質精製について検討しました。テストした全てのタンパク質は、高収量と高純度で回収されました (図4)。このように、MagneGST™ Resinは様々な異なるサイズのタンパク質精製に使用できます。

GSTタグ-タンパク質精製のスケールアップ

GSTタグ-タンパク質の特性は、通常最適な発現を示すクローンを同定するために、小スケールの培養 (例; 1ml 培養液) で多くのクローンをスクリーニングする際に必要とされます。最適な宿主菌や培養条件を決定する際も小スケールでの最適化が必要な場合があります。しかし、分析のためにより多くのタンパク質が必要な場合があるため、同じ基本プロトコルでレジンとバッファーの比率を維持したままスケールアップし、大容量 (5, 10, 50ml菌体培養液) からのタンパク質精製についてテストしました。

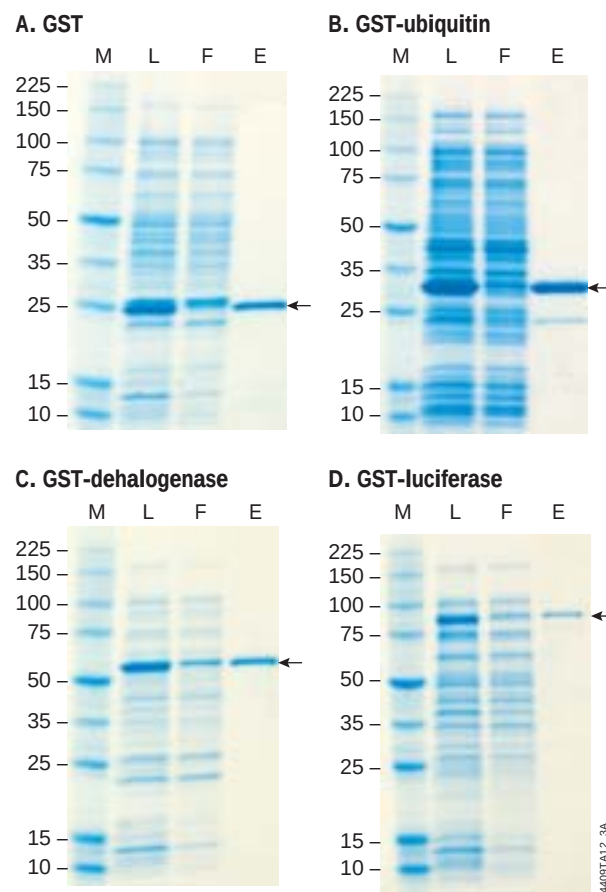


図4. 異なるサイズのGST融合タンパク質の精製

4つの異なるサイズのタンパク質をMagneGST™ Protein Purification Systemで精製した。クルドな菌体ライセート1mlとMagneGST™ Particle 100μlを混和し、図1に示すプロトコルに従い精製した。サンプルはウェスタンブロッティングにより分析した。各パネルの右に位置する矢印は精製タンパク質を示す。パネルA: GST-ubiquitin、パネルB: GST-ユビキチン、パネルC: GST-デハロゲナーゼ、パネルD: GST-ルシフェラーゼ。M; Broad Range Protein Molecular Weight Markers (カタログ番号 V8491)、L; ライセート、F; 流出液、E; 溶出液。

我々の経験上、MagneGST™ Systemでは図1で記載された方法の比例的にスケール変更した変法で、少量または大量のタンパク質を精製できました。

In Vitroで発現したGSTタグ-タンパク質の精製

研究者は目的のタンパク質を合成する手段としてin vitro発現システムを使用する機会が増えています。しかし、合成量が非常に少ない (通常 150~300ng) ためin vitroで発現させたタンパク質の精製は困難です。E.coli S30 Extract System for Circular DNA (カタログ番号 L1130) で合成したGSTデハロゲナーゼを精製を行うために、MagneGST™ Systemのスケールダウン用プロトコルを採用しました。GST融合タンパク質は、抗GST抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出することができ (データ未掲載)、発現レベルが非常に低い場合でもin vitroタンパク質発現システムからGST融合タンパク質を回収できることを示していました。

GSTタグタンパク質の自動精製

プロテオミクス分野の進歩にともなって、ハイスループットな用途、ロボットプラットフォームでの使用に耐える製品が必要とされています。MagneGST™ Systemは少数サンプルのマニュアル処理に適しているだけでなく、ロボットプラットフォームで多くのサンプルを同時に処理するためにもデザインされています。我々はベックマン・コールター社のBiomek® 2000およびFXを用いて、それぞれ2.5時間および1.25時間で、最大 96のGST融合タンパク質を精製できる方法を開発しました(9)。96ウェルディープウェルプレートで菌体培養を行い、遠心後に培地を除去し、精製処理を行うためにロボットプラットフォームにセットしました。



図5. MagneGST™ Purification Resinを用いたGST-デハロゲナーゼ融合タンパク質の自動精製

Biomek® 2000およびMagneGST™ Particleによる96ウェルフォーマットで図1の方法に従い、1ml菌体培養液からGST-デハロゲナーゼを精製した。サンプルをランダムに選り、溶出液（2.5%）の一部をSDS-PAGEで分析した。このデータではプレート内で一貫した収量を示した。記号A1-H8はプレート上のウェル位置を示す。レーンM：Broad Range Protein Molecular Weight Markers（カタログ番号 V8491）。

ウェル間のバラツキを調べるために、GST融合デハロゲナーゼを発現するBL21（DE3）を100ml培養し、96ウェルプレートの各ウェルに1mlずつ分注しました（実験の目的上、培養中に起こるウェル間の潜在的バラツキを排除するため、直接96ウェルプレートでの培養は行っていません）。タンパク質精製はベックマン・コールター社のBiomek® 2000で実施しました。図5では、プレート内のウェル間で一貫した収量を示しています。ベックマン・コールター社のBiomek FXでも同様の結果が得られました（データ未掲載）。

結論

本稿で示されたデータにより、MagneGST™ Particleは、異なる分子量のGST-融合タンパク質を優れた収量、低バックグラウンドで効率的に精製することが示されました。MagneGST™ Particleの結合容量（固定粒子1mlあたり7mg GST-融合タンパク質）は非マグネットタイプの精製レジンと同等です。MagneGST™ Particleをベースとした精製は、菌体溶解バッファーを含むタンパク質精製に必要な全てのバッファーが付属する完全なシステムです。プロトコルでは、溶解後に細胞残渣の除去を必要とせず、クールドなライセートからタンパク質が精製できるように最適化されています。また、プロトコルは分かりやすく、GST融合タンパク質を2時間以内に精製することができます。マニュアル精製に加え、ベックマン・コールター社のBiomek® 2000およびFXを用いた

自動精製プロトコルも開発しています。MagneGST™ Systemの主な用途は小スケールの精製（1ml 培養液）ですが、大量の培養液（50ml）からの精製やin vitroシステムで発現させた微量のタンパク質の精製にも使用することができました。

参考文献

1. Nilsson, J. *et al.* (1997) *Prot. Exp. Purif.* **11**, 1–16.
2. Stevens, R.C., Yokoyama, S., Wilson, I.A. (2001) *Prot. Sci.* **294**, 89–92.
3. Braun, P. *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2654–69.
4. Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* **67**, 31–40.
5. Mannervik, B. and Danielson, U.H. (1988) *Crit. Rev. Biochem.* **23**, 283–337.
6. Armstrong, R.N. (1997) *Chem. Res. Tox.* **10**, 2–8.
7. Smith, D. (2000) *Meth. Enzymol.* **326**, 254–70.
8. Frangioni, J.V. and Neel, B.G. (1993) *Anal. Biochem.* **210**, 179–87.
9. For information about automated methods online, visit: www.promega.com/automethods/

プロトコル

- ◆ MagneGST™ Protein Purification System Technical Manual #TM240, Promega Corporation.
(www.promega.com/tbs/tm240/tm240.html)

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
MagneGST™ Protein Purification System	40 回分	V8600	24,000
	200 回分	V8603	80,000
MagneGST™ Glutathione Particles	4ml	V8611	18,000
	20ml	V8612	65,000