



## 昆虫および哺乳動物細胞からの効率的なHisタグ-タンパク質の精製

By Natalie Betz, Ph.D., Promega Corporation

昆虫、哺乳動物細胞のライセートおよび血清添加または無添加の培地から、FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10XおよびMagneHis™ Protein Purification Systemを用いて、Hisタグ-タンパク質を精製することができます。FastBreak™ Reagent, 10Xを細胞に直接添加すると、遠心や機械的な破碎をとまわずに15分以内で穏やかで効率的に細胞を溶解することができます。また、付着細胞またはペレット状の細胞にFastBreak™ Reagent (1X 濃度)を直接加えることにより、細胞を溶解することができます。MagneHis™ Protein Purification Systemは、Hisタグ-タンパク質の精製に使用することができます。FastBreak™ ReagentとMagneHis™ Protein Purification Systemの組み合わせは、種々のサンプルタイプからの効率的なHisタグ-タンパク質精製に使用することができます。

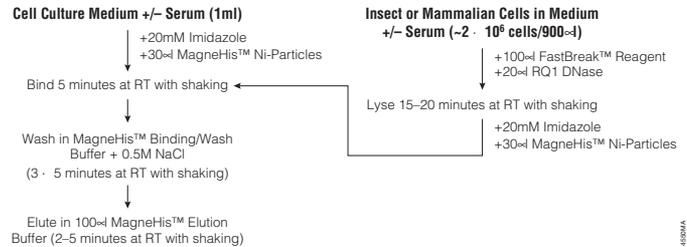


図1. FastBreak™ Cell Lysis Reagent およびMagneHis™ Protein Purification Systemを用いた真核細胞用培地およびライセートからのHisタグ-タンパク質精製フローダイアグラム

### イントロダクション

標的タンパク質の精製を容易にするために、数多くの異なる融合ポリペプチド部位や親和性タグが開発されてきました(1)。Hisタグは、組換え発現タンパク質の精製および検出に最も汎用されるタグです。クローニングベクターは、発現するタンパク質のCまたはN末端に5~10個のヒスチジン残基を含むHisタグ-タンパク質を生成するようにデザインされます。Hisタグは、タンパク質の分子量を0.84kDa増加させるだけで免疫原性はありません。また、このタグの3次元構造は、精製にそれほど重要ではないため、Hisタグ-タンパク質は未変性/変性条件下で精製することができます。固定化したニッケルに対するヒスチジン残基の親和性は、Hisタグ-タンパク質の選択的な精製を可能にします(2,3)。MagneHis™ Protein Purification Systemの構成成分MagneHis™ Ni-Particlesは、1ml粒子あたり最大1mgのHisタグ-タンパク質を結合させることができ(4)、低いバックグラウンドで高収量を実現できる迅速で効率的な方法を提供し、スケールの変更にも柔軟に適応するフォーマットです。

FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10Xは、遠心や機械的な破碎方法を用いずに培養した大腸菌を効果的に溶解するために開発されました。溶解後、放出されたHisタグ-タンパク質はMagneHis™ Ni-Particlesで直接精製することができます(5)。

細菌における組換えHisタグ-タンパク質の発現は、一般的な技術です。しかし、細胞内タンパク質あるいは培地への分泌タンパク質などを組換えタンパク質として発現させる場合、Sf9昆虫細胞やHeLa、CHOといった哺乳動物細胞など他のシステムを利用するケースが増加しています。これらの真核生物発現システムでは、組換えHisタグ-タンパク質がより自然なプロセッシングや修飾を受けるからだと思います(6-8)。

本稿では、昆虫や哺乳動物細胞のライセートおよび培地からのHisタンパク質の精製にFastBreak™ ReagentおよびMagneHis™ Protein Purification Systemを用いた例を報告します。培地および真核細胞からの精製プロトコルのアウトラインを図1に示します。

### 様々な昆虫、哺乳動物細胞用の培地に対するMagneHis™ Ni-Particlesの適応性

一般的に使用される昆虫および哺乳動物細胞の培養液からのHisタグ-タンパク質精製におけるMagneHis™ Ni-Particlesの適応性について検証するために、精製したHisタグ耐熱性ルシフェラーゼ (~5μg)を様々な培地(10%ウシ胎児血清添加または無添加)に添加しました。テストした培地には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、F-12 MediumおよびBacVector® Insect Cell Mediumが含まれます。添付されるTechnical Manual #TM060のプロトコルに従い、1mlの培地からMagneHis™ Systemを用いてHisタグ-ルシフェラーゼを精製しました(30μl 粒子/サンプル)。血清を含むいくつかのサンプルでは、非特異的なタンパク質結合を抑えるために0.5M NaClを含むMagneHis™ Binding/Wash Bufferを用いて洗浄しました。

テストを実施した全ての培地(血清添加または無添加)からMagneHis™ Systemを用いてHisタグ耐熱性ルシフェラーゼを効率的に精製することができました(図2)。MagneHis™ Binding/Wash Bufferに0.5M NaClを添加することにより、粒子に結合した血清中に存在する非特異的なタンパク質のいくつかを除去できました(レーン4と5、7と8、10と11を比較してください)。

FastBreak™ Reagentの存在が精製に及ぼすマイナスの影響を調べるために、FastBreak™ Reagentを含む培地にHisタグ-ルシフェラーゼを加え、MagneHis™ Systemで精製しました。培地中にFastBreak™ Reagentが存在してもHisタグ-ルシフェラーゼの精製に影響を及ぼしませんでした(データ未掲載)。培地へのFastBreak™ Reagent添加は、効率的な精製に界面活性剤を要するより疎水性の高い分泌タンパク質に有利に働くと考えられます。さらに、培地がpH7-7.5であることを確認することにより、他の培地からでも同様に効率的なHisタグ-タンパク質の精製が可能になります。

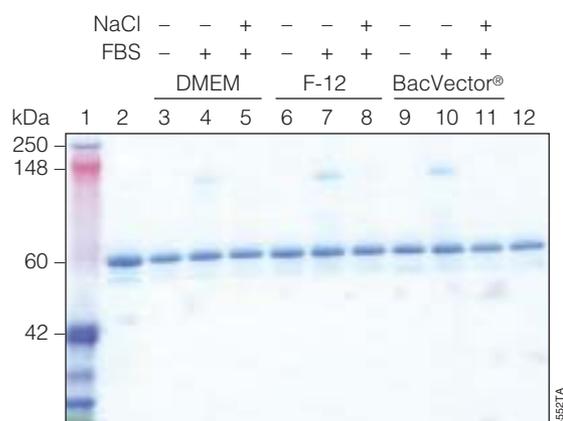


図2. MagneHis™ Protein Purification Systemを用いた昆虫または哺乳動物細胞からのHisタグ耐熱性ルシフェラーゼの精製

精製したHisタグ耐熱性ルシフェラーゼ（約5 $\mu$ g）を10%ウシ胎児血清（FBS）の存在下または非存在下の様々な培地に添加した。添付のTechnical Manual #TM060（30 $\mu$ l粒子/サンプル）のプロトコルに従いMagneHis™ Protein Purification Systemを用いて各1mlの培地から精製した。各精製タンパク質を等量（3 $\mu$ l）用いて4~20% トリス-グリシンアクリルアミドゲル（Invitrogen）で分析し、SimplyBlue™ SafeStain（Invitrogen）で検出した。レーン1, prestained molecular weight marker（MultiMark®; Invitrogen）レーン2, 12, 比較のために添加した等量のルシフェラーゼタンパク質。テストした培地にはDMEM（Invitrogen）、F-12（Invitrogen）、BacVector® Insect Cell Medium（Novagen）が含まれます。0.5M NaClを含むMagneHis™ Binding/Wash Bufferで洗浄したサンプルの場合はその旨を表示。

## 遠心不要の昆虫や哺乳動物細胞ライセートからの直接的なHisタグ-タンパク質の精製

Sf9 昆虫細胞（Novagen）およびHeLa、CHO哺乳動物細胞（ATCC）は適切な培地で培養されました（DMEM, F-12, or BacVector® Insect Cell Medium）。分取した各細胞種（900 $\mu$ l）ごとに100 $\mu$ l FastBreak™ Reagent, 10Xを加え、RQ1 RNase-Free DNase（カタログ番号 M6101）の存在下または非存在下で溶解しました。振とうしながら室温で20分間インキュベーションした後、上澄みおよびペレットの分画を図3に示すように分析しました。上澄み分画に比べてペレット分画にタンパク質が欠如していたことから分かるように、FastBreak™ Reagentは、昆虫および哺乳動物細胞の両方を効率よく溶解しました（図3）。DNaseの有無は溶解効率に変化を与えませんでした。

FastBreak™ Reagentを用いて調製したライセートがHisタグ-タンパク質の精製に適応することを検証するために、終濃度を約 $2 \times 10^6$ 個/mlになるように培地中（血清添加または無添加）で掻取り、採取しました。各細胞ごとの上澄み900 $\mu$ lにFastBreak™ Reagent, 10xを100 $\mu$ lと約5 $\mu$ gの精製したHisタグ耐熱性ルシフェラーゼを加えました。RQ1 RNase-Free DNase（20 $\mu$ l）はサンプルの粘性を下げ、MagneHis™ Ni-Particlesの凝集を防ぎました。RQ1 DNaseの添加は効率的な精製に必要でした（データ未掲載）。サンプルは振とうしながら室温で15~20分間インキュベーションしました。細胞を溶解した後、MagneHis™ Ni-Particles（30 $\mu$ l）およびイミダゾール（終濃度20mM）を加え、粒子を振とうしながら室温で2~5分間インキュベーションしました。結合ステップでイミダゾールを加えることによりライセートや血清に含まれるタンパク質の非特異的な結合を抑えました（データ未掲載）。粒子は、振とうしながら室温で3回500 $\mu$ l MagneHis™ Binding/Wash Bufferにより洗浄しました。これらのパラメーターは、特定の標的タンパク質ごとに最適化する必要があります。

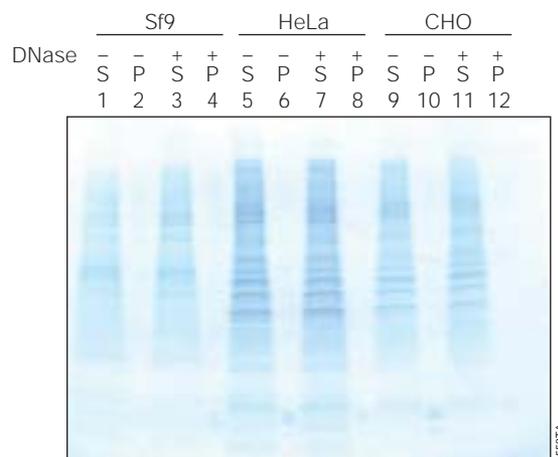


図3. 昆虫および哺乳動物細胞のライセートに対するFastBreak™ Cell Lysis Reagentの影響

20 $\mu$ l RQ1 RNase-Free DNaseの存在下（レーン3 - 4, 7 - 8, 11 - 12）または非存在下（レーン1 - 2, 5 - 6, 9 - 10）で、Sf9昆虫細胞（レーン1 - 4）、HeLa細胞（レーン5 - 8）またはCHO細胞（レーン9 - 12）（それぞれ約 $2 \times 10^6$  cells/ml 900 $\mu$ l）と100 $\mu$ l 10X FastBreak™ Cell Lysis Reagentを混合した。遠心（マイクロ遠心機で14,000rpm, 15分間）により上澄み分画とペレット分画を採取した。奇数番号のレーンには上澄み分画、偶数番号のレーンにはペレット分画が含まれる。ペレット分画は1ml 1X Laemmli sample bufferで再懸濁した。上澄み分画およびペレット分画それぞれ等量（15 $\mu$ l）を4~20%トリス-グリシンポリアクリルアミドゲルで分析した後、SimplyBlue™ SafeStain（Invitrogen）を用いて検出した。

結合したタンパク質はMagneHis™ Elution Bufferで溶出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析しました。この結果は、FastBreak™ ReagentとMagneHis™ Protein Systemの組合せが、昆虫および哺乳動物細胞ライセートからHisタグ-ルシフェラーゼを効率的に精製することを示しています（図4）。0.5M NaCl（終濃度）を洗浄バッファーに加えることにより、非特異的なタンパク質の結合が原因となるバックグラウンドを排除することができました。

## 採取した昆虫または哺乳動物細胞ライセートからのHisタグ-タンパク質の精製

FastBreak™ Reagent, 10Xを培地中の細胞に直接添加して調製した細胞ライセートからのHisタグ-ルシフェラーゼの精製に加え、遠心後の細胞ペレットを1X FastBreak™ Cell Lysis Reagent（水で希釈）で再懸濁して細胞を採取しました。これらのサンプルからでもHisタグ-ルシフェラーゼを効率的に精製できました（データ未掲載）。これは必要に応じて培地を除去してから処理を行うという柔軟性を与えます。洗浄バッファーへの0.5 NaCl添加と同様に、溶解ステップにおけるDNase添加、結合ステップでのイミダゾール添加を推奨します。

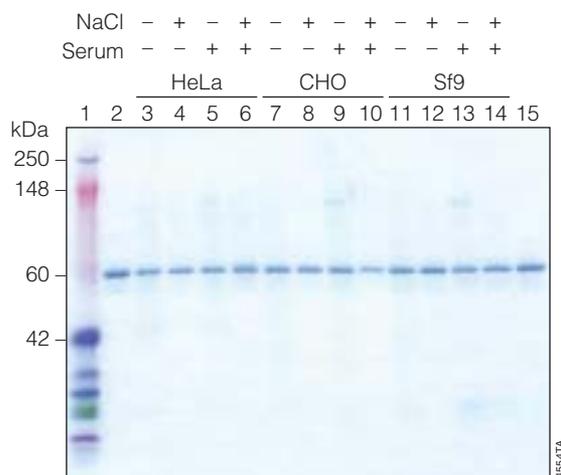


図4. FastBreak™ Cell Lysis ReagentおよびMagneHis™ Protein Purification Systemを用いたHisタグ耐熱性ルシフェラーゼの精製

表示のように血清の存在下または非存在下で培地中で終濃度が約 $2 \times 10^6$  cells/mlになるように細胞を播取り採取した。FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X (100 $\mu$ l)、精製Hisタグ耐熱性ルシフェラーゼ約5 $\mu$ gおよび20 $\mu$ l RQ1 RNase-Free DNaseを各細胞の懸濁液900 $\mu$ lに添加した。サンプルは室温で15~20分間インキュベーションした。細胞溶解後、MagneHis™ Ni-Particles (30 $\mu$ l) およびイミダゾール (終濃度20mM) を加え、振とうしながら室温で粒子を2~5分間インキュベーションした。500 $\mu$ l MagneHis™ Binding/Wash Bufferによる5分間の洗浄を3回繰り返し、100 $\mu$ l MagneHis™ Elution Bufferで溶出した。精製タンパク質を等量 (3 $\mu$ l) ずつ4~20% トリス-グリシン ポリアクリルアミドゲルで分析し、SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) で検出した。レーン1, prestained MultiMark® molecular weight marker (Invitrogen); レーン2, 15, 添加量と等量のルシフェラーゼ (比較のため); レーン3 - 6, DMEM中のHeLa 細胞; レーン 7 - 10, F-12培地中のCHO細胞; レーン11 - 14, BacVector® Insect Cell Medium中のSf9細胞。0.5M NaClを含むMagneHis™ Binding/Wash Bufferで洗浄したサンプルを含むレーンは図中に表示した。

## 結論

昆虫および哺乳動物細胞ライセートからの効率的で手際の良い精製を行うためにFastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10XおよびMagneHis™ Protein Purification Systemを併用することができます。血清の有無にかかわらず一般的に使用される昆虫または哺乳動物細胞の組織培養用培地から、MagneHis™ Protein Purification Systemを用いてHisタグ-タンパク質を精製することができます。細菌培養用の標準プロトコールにマイナーな変更を加えるだけでこれら様々なソースからの精製を可能にします。全ての実験は培地またはライセートにHisタグ-タンパク質を直接添加して実施しましたが、本稿で記載した条件は、ガイドラインとして発現したHisタグ-タンパク質に使用できます。

## 参考文献

1. Terpe, K. (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–33.
2. Yip, T.T., Nakagawa, Y. and Porath, J. (1989) *Anal. Biochem.* **183**, 159–71.
3. Hutchens, T.W. and Yip, T.T. (1990) *J. Chromatogr.* **500**, 531–42.
4. Godat, B. *et al.* (2003) *Promega Notes* **83**, 2–5.
5. Stevens, J. and Kobs, G. (2003) *Promega Notes* **86**, 23–4.
6. Barnes, L.M., Bentley, C.M. and Dickson, A.J. (2003) *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 631–9.
7. Ikonoumou, L., Schneider, Y.J. and Agathos, S.N. (2003) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 1–20.
8. Altmann, F. *et al.* (1999) *Glycoconj. J.* **16**, 109–23.

## プロトコル

- ◆ *MagneHis™ Protein Purification System Technical Manual #TM060*, Promega Corporation.  
([www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html](http://www.promega.com/tbs/tm060/tm060.html))
- ◆ *FastBreak™ Cell Lysis Reagent, 10X, Product Information #9PIV857*, Promega Corporation.  
([www.promega.com/tbs/9piv857/9piv857.html](http://www.promega.com/tbs/9piv857/9piv857.html))

## 製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格( ¥ )
FastBreak™	10ml	V8571	5,000
Cell Lysis Reagent, 10X	40ml	V8572	15,000
	100ml	V8573	30,000
MagneHis™ Protein	65 回分	V8500	26,000
Purification System	325 回分	V8550	90,000
RQ1 RNase-Free DNase	1,000u	M6101	6,000