

HaloLink™ Resin for Protein Pull-Down and Analysis

HaloLink™ Resin : HaloTag™ タンパク質のプルダウンおよび分析

By Marjeta urh, Ph.D.¹, Dan Simpson, Ph.D.¹, Jacqui Sankbeil, M.S.¹, Danette Hartzell, Ph.D.¹, Natasha Karassina, M.S.¹, Nadine Nassif, M.S.¹, Jami English, M.S.¹, Ji Zhu, Ph.D.², Poncho Meisenheimer, Ph.D.², Dieter Klaubert, Ph.D.², Dob Bulleit, Ph.D.¹, Keith V. Wood, Ph.D.¹, ¹Promega Corporation, ²Promega Biosciences, Inc.

アブストラクト

HaloLink™ Resinは、タンパク質をレジン表面に、方向性を維持した状態で特異的に共有結合させる方法を提供します。本稿では、HaloLink™ Resinの高い結合容量と、きわめて低い非特異的結合性を明示するほか、HaloTag™の共有結合が希釈および強い洗浄にも安定で、レジン表面に結合したHaloTag™融合タンパク質がほとんど失われないことも示します。また、HaloLink™ Resinに結合した融合タンパク質が機能を維持することについても、いくつかの融合タンパク質のタンパク質間相互作用および酵素活性を分析することにより明らかにします。HaloLink™ Resinは精製レジンではありませんが、プロテアーゼによる切断と併用すれば、目的タンパク質の単離に使用できます。

新製品HaloLink™ Resinは、固相表面にHaloTag™融合タンパク質を、方向性を維持した状態で共有結合させることができます。

イントロダクション

プロテオミクスはタンパク質とその機能の研究に必要な技術革新とともに進んできた成長著しい領域です。我々が現在直面している課題は、あらゆるタンパク質の機能と、重要な細胞プロセスを担う複雑なタンパク質ネットワークが構築される機序を解明することです。このような取り組みには、表面ベース（タンパク質の固定化担体など）のプロテオミクスツールが重要な役割を果たすものと予想されます。表面ベースのプロテオミクスには、タンパク質の構造あるいは機能を損なうことなく、タンパク質を固相表面上に既知の方向性で固定化する一般的かつ容易な手法が必要です。さらに、このような固定化法は高い結合容量およびきわめて低い非特異的吸着性を示す必要があります(1)。

HaloLink™ Resinは、固相表面にHaloTag™融合タンパク質を、方向性を維持した状態で共有結合させることができます。このレジンには、Sephacrose® ビーズ表面にHaloTag™ Ligandが結合したもので、高い結合容量および低い非特異的結合性を示します。HaloTag™ はリガンドと共有結合するため、希釈および強い洗浄に耐え、表面に結合したHaloTag™融合タンパク質はほとんど失われません。我々は、数種類のアプリケーション(in vivoおよびin vitroにおけるタンパク質間相互作用、表面に結合したタンパク質の酵素活性分析、プロテアーゼによる特異的切断との併用による目的タンパク質の精製など)におけるHaloLink™ Resinの有用性を明らかにします。HaloLink™ Resinを用いた固相支持体へのタンパク質の固定化は、60～90分で完了できる簡単な手順で行えます(図1)。この方法は、無細胞発現系(in vitro)あるいは哺乳動物細胞で発現させたタンパク質に最も適した条件に設定されています。

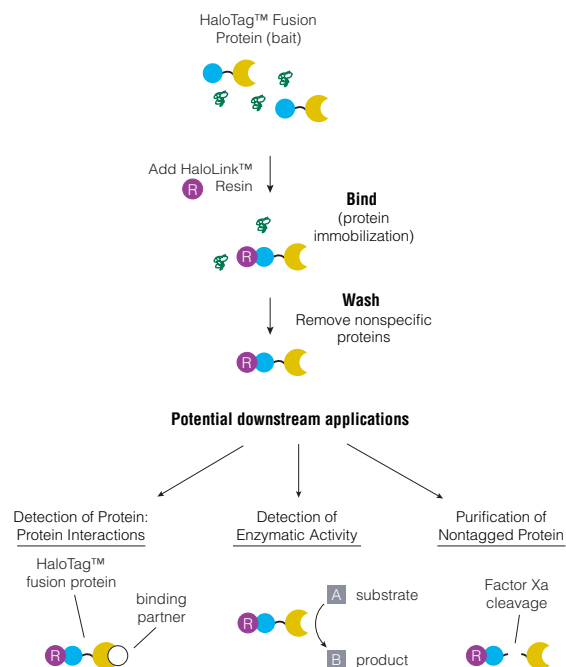


図1. HaloLink™ Resinへの固定化プロトコルおよび想定されるアプリケーションの概要

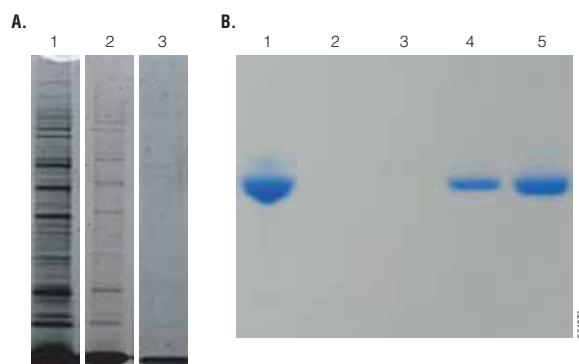


図2. HaloLink™ Resinに対するHaloTag™ 融合タンパク質の特異的かつ安定な結合
 パネルA. HaloLink™ Resinへの低い非特異的タンパク質結合。HaloLink™ Resin (50μl) は、同製品のプロトコル (参考文献5) に従って、ウサギ網状赤血球ライセート400μgで処理し、SDSローディングバッファー中で煮沸後、上清をSDS-PAGEにより分析した (レーン3)。Sypro® Ruby Fluorescent Dye (Molecular Probesカタログ番号12000) を用いて、タンパク質を検出した。レーン1、ウサギ網状赤血球ライセートの500倍希釈液; レーン2、ウサギ網状赤血球ライセートの1,000倍希釈液。パネルB. HaloTag™-GST融合タンパク質は、HaloLink™ Resinに安定的に結合する。同量 (25μl) の沈殿状態のHaloLink™ ResinおよびGST結合レジンを、それぞれHaloTag™-GST融合タンパク質160μgと混合し、インキュベーションした。レジンを洗浄し、PBSに再懸濁した。4. でインキュベーション後、上清を分取し、SDS-PAGEにより分析した。レーン1、添加したHaloTag™-GST融合タンパク質の10%量; レーン2、HaloLink™ Resinから10分後に分取した上清; レーン3、HaloLink™ Resinから24時間後に分取した上清; レーン4、GST結合レジンから10分後に分取した上清; レーン5、GST結合レジンから24時間後に分取した上清。

HaloLink™ Resin : 結合容量、特異性および安定性の高いタンパク質結合

アフィニティー結合レジンの重要な特性のひとつは結合容量です。HaloLink™ Resinは固定化レジンであって精製レジンではないため、結合容量は溶出タンパク質量ではなく、レジン結合タンパク質量により推定します。我々は、このような実験に基づき、HaloLink™ Resinの結合容量が、沈殿状態のレジン1mL当たり、HaloTag™融合タンパク質7mg以上であることを確認しています。この結合容量は、他のアフィニティー結合レジンの結合容量と同等です。

アフィニティー結合レジンのもうひとつの重要な特性は、非特異的なタンパク質結合性が非常に低いことです。この特性が特に重要となるのは、プルダウンアッセイにおけるタンパク質間相互作用の分析にレジンを使用する場合です。我々は、HaloTag™ Resinをin vitroタンパク質発現に使用されるウサギ網状赤血球ライセートで処理することにより、非特異的結合を評価しました。非特異的に結合したタンパク質を除去するため、レジンをSDSローディングバッファー中で煮沸し、バッファー上清と、反応に用いたライセートの希釈液を分析しました。レジンを添加して煮沸したSDSバッファー上清のレーンには、ほぼ検出下限未満のタンパク質が含まれるに過ぎなかったことから、HaloLink™ Resinは非特異的結合性が低いものと考えられます (図2、パネルA)。

タンパク質分析に使用される多くのアプリケーションでは、徹底した洗浄により、非特異的に結合したタンパク質を除去する必要があります。HaloLink™ Resinのユニークな特徴は、タンパク質がレジンに共有結合するため、融合タンパク質の結合を維持しながら、非特異的に結合したタンパク質を洗浄できることです。この点を実証するため、HaloTag™-GST融合タンパク質を、HaloTag™ ResinあるいはGST結合レジンに結合させました。結合および洗浄後、タンパク質を結合させたレジンをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に再懸濁しました。インキュベーション後、上清を分取し、タンパク質の有無を分析しました。レジンをバッファーに再度懸濁し、さらに24時間インキュベーション後、上清を分析しました。実験の結果、HaloTag™ Resinでは、上清からタンパク質が検出されなかったことから、HaloTag™-GST融合タンパク質の安定的な結合が明らかになりました。一方、GST結合レジンでは、レジンからのHaloTag™-GST融合タンパク質の浸出が、各希釈倍率で認められました (図2、パネルB)。

タンパク質間相互作用の検出

プルダウンアッセイを行えば、アフィニティータグと目的タンパク質からなる融合タンパク質 (bait) と、同タンパク質と相互作用を示すパートナー (prey) の溶液中での相互作用を検討できます。bait-prey複合体は、baitのアフィニティーレジンの特異的結合により、溶液から分離されます。最も一般的なプルダウンアッセイ法は、GSTアフィニティータグを用いる方法です(2)。

我々は、HaloTag™ タンパク質とHaloLink™ Resinを用いたプルダウン実験を実施しました。HaloTag™ タンパク質が持つ特性は、相互作用パートナーの単離成功率を高める重要な利点となります。第一の特性として、HaloTag™ タンパク質はレジンに共有結合します。このため、非特異的に結合したタンパク質を除去するために徹底した洗浄を行うことができます。第二の特性として、HaloTag™ タンパク質はレジンに高親和性でしかも迅速に結合します。このような特徴により、低濃度タンパク質 (無細胞発現系で発現させたタンパク質など) を効率的に固定化することができます。このため、HaloTag™ タンパク質とHaloLink™ Resinを併用すれば、これまで困難だったin vitroで発現させたタンパク質同士 (bait/prey) の相互作用を検出することができます。

我々は、HaloLink™ Resinのプルダウン機能を明らかにするため、特性が十分検討されている相互作用パートナー (c-Junとc-Fos) (3)を用いました。pFC8Aベクターにc-fos配列を挿入することにより、c-FosとHaloTag™ を融合しました(4)。c-jun配列はpF1Aベクター (カタログ番号C8441, 4) に挿入しました。両タンパク質はin vitroで別個に発現させました。c-Jun (prey) は検出しやすいよう、³⁵S]メチオニン標識しました。c-Fos-HaloTag™ 融合タンパク質 (bait) を発現する無細胞反応液にHaloLink™ Resinを添加し、baitをレジン表面に固定化しました。HaloLink™ Resinと、baitを含有しない無細胞発現系からなる対照反応液も準備しました。³⁵S]-標識c-Junを発現する無細胞反応液を両レジン、すなわち被験検体 (bait含有) および対照 (bait不含有) に添加しました。baitとpreyを相互作用させた後、少量の非イオン性界面活性剤を含むバッファーで洗浄しました(5)。捕捉されたpreyを溶出させるため、レジンをSDSローディングバッファーに再懸濁し、煮沸後、分析しました。図3の結果は、preyタンパク質がbaitを有するレジンのみから回収され、対照検体からは回収されなかったことを示すものです。対照レーンからpreyタンパク質が検出されなかったことから判断して、c-Fos-HaloTag™ 融合タンパク質によるc-Junのプルダウンは効率的かつ特異的なものでした。

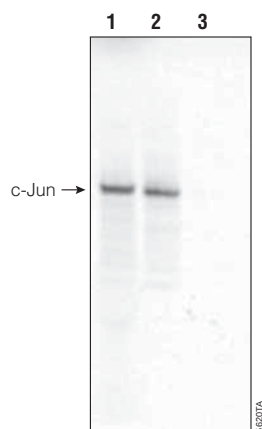


図3. ブルダウン実験におけるタンパク質間相互作用の検出。

c-Fos-HaloTag™ 融合タンパク質をTnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号L1170) で発現させた。c-Fos-HaloTag™ 融合タンパク質を含有するTnT®反応液20μlを、HaloLink™ Resin 50μlに添加し、同製品のプロトコルに従って固定化した(5)。preyタンパク質 (c-Jun) をin vitroで合成、[³⁵S]-メチオニン標識し、c-Fos-HaloTag™ 融合タンパク質を固定化したHaloLink™ Resinに、このTnT®反応液20μlを添加した。これと併行して、baitを固定化していないレジンにpreyを添加する対照実験も実施した。インキュベーションおよび徹底した洗浄後 [0.05% IGEPAL® (Sigmaカタログ番号CA-630) および1%BSA洗浄液1mlを用いた洗浄ステップを5回]、レジンをSDSローディングバッファー中で煮沸することにより、タンパク質を溶出させ、SDS-PAGEにより分離した。結果は、Typhoon® Imagerを用いてスキャンした。レーン1、発現させた³⁵S-メチオニン標識c-Junを含有するin vitro反応液；レーン2、c-Fos-HaloTag™:c-Junブルダウン反応液；レーン3、対照反応 (c-Fos-HaloTag™タンパク質をレジンに固定化していない条件)。

調節を受けるタンパク質間相互作用の検出

上記のブルダウン実験では、HaloLink™ Resinにbaitタンパク質をあらかじめ捕捉させた後、preyを添加しました。次に、さらに2つの検討事項を加えました。1) タンパク質結合パートナー同士を相互作用させた後、同複合体にレジンを添加してブルダウンを行なった場合、タンパク質間相互作用の効率的な検出は可能か。2) 低分子により調節されるタンパク質間相互作用の形成を追跡できるか。

これらのパラメーターを検討するため、FK506結合タンパク質 (FKBP) と、mTOR (FRB) タンパク質のFKBP-ラパマイシン結合領域の相互作用を分析しました (6-8)。FKBPとFRBの相互作用には、ラパマイシンが必要であり、FKBP-ラパマイシン複合体が形成された後、FRBが結合します(6)。三元複合体 (FKBP-ラパマイシン-FRB) の形成は、ラパマイシン濃度の変化により調節されると考えられます。ラパマイシン濃度が上昇すると、FKBP-FRB間の相互作用が増大することから、ラパマイシン濃度上昇により、ブルダウン反応から回収されるpreyタンパク質 (FRB) 量が増加するものと予想されます。また、ラパマイシン非共存下では、FRBが検出されないはずで

す。C末端にHaloTag™ を融合させたFKBPタンパク質を得るため、FKBPタンパク質の遺伝子をpFC8A Vectorに挿入しました。FRBタンパク質は、pFN2A (カタログ番号C8461; 4) プラスミドを用いて、GST融合タンパク質として発現させました。インキュベーション後、HaloLink™ Resinにより、タンパク質複合体をブルダウンしました。両タンパク質を無細胞系で発現させ、各種濃度のラパマイシン共存下で混合しました。図4に示すように、蛍光標識したpreyタンパク質の回収量は結合反応中のラパマイシン濃度に応じて変化し、ラパマイシン非共存下ではFRBが検出されませんでした。

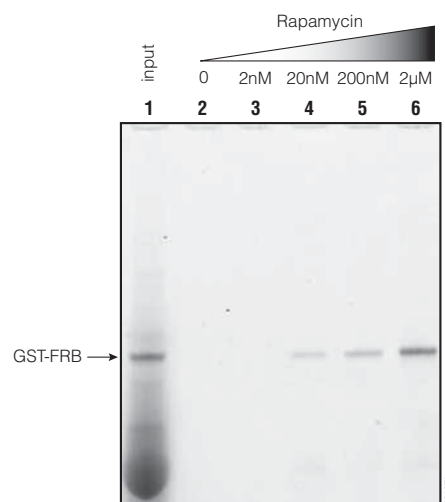


図4. 調節を受けるタンパク質間相互作用の検出

GST-FRBおよびHaloTag™ FKBP融合タンパク質は、TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号L1170) を用いて発現させた。FluoroTect™ Green_{lys} Labeling System (カタログ番号L5001) を用いて、preyを標識した。図中に示した濃度のラパマイシン共存下で、両反応液を混合した (20μl)。検体を1時間インキュベーションし、タンパク質を結合させた後、HaloLink™ Resin (50μl) を添加し、複合体をブルダウンした。反応液を攪拌しながら、室温で1時間インキュベーションした。その後、preyタンパク質をSDSローディングバッファーで溶出させ、SDS-PAGEにより分析した。Typhoon® scannerを用いて、蛍光シグナルを検出した。レーン1、添加したGST-FRBを含有するin vitro転写/翻訳反応液；レーン2、ラパマイシン非共存条件での対照反応；レーン3~6、ラパマイシン共存条件での反応。

タンパク質間相互作用検出の成否は、固相支持体に結合するbaitタンパク質濃度に大きく左右されます。したがって、ほとんどの場合、高濃度を確保するため、baitタンパク質の合成には細菌発現系を用います。無細胞発現系によるタンパク質含量は、細菌発現系と比較して大幅に少ないのが通例です。しかし、細菌発現系は多大な時間を要するほか、哺乳類タンパク質の多くは細菌で発現させることが困難です。無細胞発現系を用いた方が合成速度は速く、可溶性タンパク質が得られる確率が高まります。上記のように、HaloLink™ Resinは、in vitroで合成したbait、preyの両タンパク質のタンパク質間相互作用を効率的に検出できます。我々は、in vitroで合成したタンパク質を用いて、GSTブルダウンとHaloLink™ Resinブルダウンの効率を比較しました。これらの実験には、タンパク質ペアc-Jun:c-Fosを使用しました。c-FosはGSTと融合させ、c-JunはHaloTag™ タンパク質と融合させました。このタンパク質ペアは、GST結合レジンまたはHaloLink™ Resinを用いて単離できます (図5)。HaloLink™ Resinは、GST結合レジンと比較して効率および特異性が高い方法であることが確認されました。HaloLink™ Resinを用いれば、GSTレジンをを用いるより多くのpreyタンパク質が単離されます。通常、対照検体では、相当量のpreyタンパク質がGSTレジんに非特異的結合する一方、HaloLink™ Resinに対する非特異的結合はほとんど検出されません (データ未掲載)。

in vivoにおけるタンパク質間相互作用の検出

in vitroにおけるタンパク質間相互作用の検出は、タンパク質の機能を解明する上で重要ですが、in vivoにおけるタンパク質間相互作用を分析することも同様に重要です。我々は、HaloLink™ Resinを用いて、哺乳動物細胞からタンパク質複合体を単離できることを実証するため、

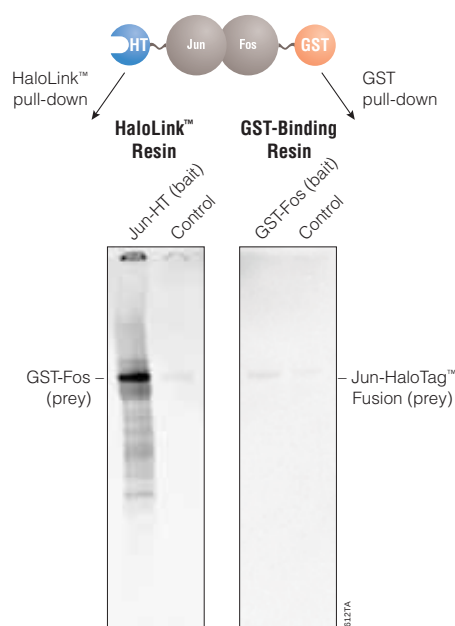


図5. HaloLink™ Resinを用いたプルダウン法とGSTを用いたプルダウン法の比較
GST-c-Fosおよびc-Jun-HaloTag™ 融合タンパク質を無細胞発現系で合成し、未標識のまま bait として用いるか、³⁵[S]-メチオニン標識して prey として用いた。合成完了後、未標識タンパク質および標識タンパク質パートナーからなる2組の反応液を混合し、タンパク質を結合させた。HaloLink™ Resin (左パネル) または GST-結合レジン (右パネル) を用いて、タンパク質複合体をプルダウンした。結合: HaloLink™ または GST レジンをを用いた GST-c-Fos または c-Jun-HaloTag™ タンパク質のプルダウン (左レーン)。対照: HaloLink™ または GST レジンのみ (右レーン)。

p65とIκBの相互作用を利用しました。HeLa細胞に、p65-HaloTag™ 融合タンパク質をエンコードするpFC8A Vectorをトランジェントにトランスフェクションしました。トランスフェクション24時間後の細胞を回収した後、機械的に破壊し溶解しました。溶解したトランスフェクション細胞を含む反応液と、非トランスフェクション細胞を含む対照反応液に、レジンを追加しました。HaloLink™ Resinに共有結合したタンパク質を、抗IκB抗体を用いたウェスタンブロット法により分析しました。図6に示す結果は、IκBが、p65-HaloTag™ 融合タンパク質との相互作用の結果として、トランスフェクション細胞のみから検出され、p65-HaloTag™ 融合パートナーを含有しない非トランスフェクション細胞では検出されないことを明示しています。

HaloLink™ Resin表面への酵素の固定化

HaloLink™ Resinを用いれば、複数タンパク質からなる混合液より酵素を捕捉・固定化することもできます。我々は、レジン表面に結合した酵素が活性を維持するか否かを、HaloTag™ 融合ルシフェラーゼの酵素活性を測定することにより検討しました。HaloTag™ 融合ルシフェラーゼおよびタグが付加されていないルシフェラーゼを、in vitroで発現させました。HaloLink™ Resinを両抽出液に添加し、Technical Manual (7) 記載のプロトコルに従って、タンパク質を固定化しました。HaloTag™ 融合ルシフェラーゼの全酵素活性の60%以上が、HaloLink™ Resin上で検出されたことから (図7)、レジン表面に結合した融合タンパク質の酵素活性が維持されるものと考えられました。残りの酵素活性は、非結合分画から検出されました。以上の結果は、HaloLink™

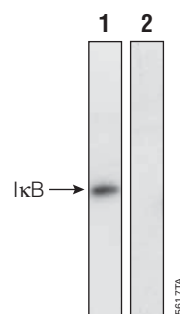


図6. タンパク質間相互作用のin vivoにおける検出

HeLa細胞にp65-HaloTag™ 融合タンパク質をエンコードするpFC8Aをトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後の細胞をバッファー1mlに回収後、ガラスホモジナイザーを用いて溶解した。細胞ライセート全体 (100μl) に HaloLink™ Resin (100μl) を添加した。これと併行として、非トランスフェクション細胞も処理し、陰性対照とした。レジンと細胞ライセートを室温で1時間インキュベーション後、洗浄し、preyタンパク質をSDSローディングバッファー中で溶出させた。タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、抗IκB抗体を用いたウェスタンブロット法により分析した。レーン1、レジンから溶出したトランスフェクション細胞由来タンパク質; レーン2、対照検体 (非トランスフェクション細胞)。

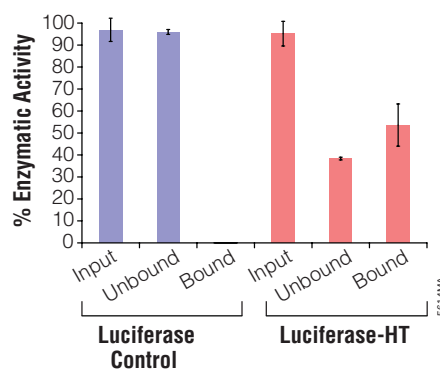


図7. HaloLink™ Resin上に固定化したタンパク質の酵素活性検出

HaloTag™ 融合ルシフェラーゼをin vitroで合成し、反応液20μlをHaloLink™ Resin 50μlに添加した。結合の特異性を評価するため、タグが付加していないルシフェラーゼを発現させ、陰性対照としてレジンに添加した。グラフには、各分画における酵素活性の比率 (%) を示す。添加した材料 (in vitro転写/翻訳反応液) の活性は100%であり、非結合分画およびレジン表面の酵素活性は、それぞれ40%および60%。

Resin表面に固定化されたタンパク質が、固有の高次構造および酵素活性を維持することを明示するものです。予想通り、HaloTag™ タンパク質と融合していないルシフェラーゼとともにインキュベーションしたレジンからは、酵素活性は検出されませんでした。このことから、レジンに対する結合は特異的かつHaloTag™ タンパク質依存的であると結論付けられます。

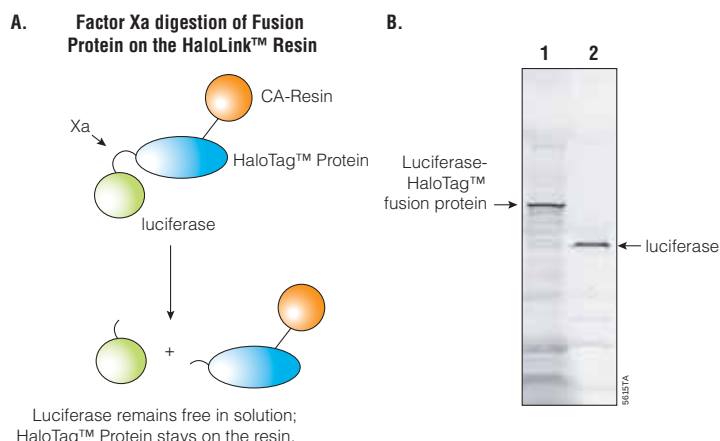


図8. プロテアーゼによる切断を利用したレジンからの融合タンパク質の遊離

パネルA. Factor Xaを用いたHaloLink™ Resinからの融合タンパク質の遊離を示す概略図。パネルB. HaloTag™ 融合ルシフェラーゼをin vitroで発現させ、FluoroTect™ Green_{Lys} Labeling System (カタログ番号L5001)を用いて標識した。反応液の一部(20μl)をHaloLink™ Resin 50μlに添加し、室温で30分間インキュベーション後、洗浄した(7)。HaloTag™ 融合ルシフェラーゼを表面に捕捉したレジンにFactor Xaを添加し、室温で1時間インキュベーションした。上清を回収し、タグが付加していないルシフェラーゼの存在をSDS-PAGEにより分析後、Typhoon® imagerでスキャンした。レーン1、HaloTag™ 融合ルシフェラーゼを含有するin vitro転写/翻訳反応液4μl(同反応液50μlをHaloLink™ Resinに添加)。レーン2、Factor Xaによる切断後に回収した上清; 切断反応液50μl中4μlをロードした。

HaloLink™ Resinを用いたタンパク質の精製

HaloLink™ Resinは、表面にタンパク質を永続的に結合させます。このため、HaloTag™ 融合タンパク質は簡単な溶出では精製できません。しかし、pFC8AおよびpFC8K Vectorは、HaloTag™ タンパク質-目的タンパク質間のリンカー配列内に、プロテアーゼ (Factor Xa) により切断される部位を含有します。このため、Factor Xaプロテアーゼで切断すると、目的タンパク質をHaloLink™ Resinから遊離させることができます。混入タンパク質は切断反応前の徹底した洗浄により除去でき、切断はレジンに結合したタンパク質上で行なわれるため、遊離された目的タンパク質にはタグが付加されていません。我々は、in vitroで発現させたHaloTag™ 融合ルシフェラーゼを用いて、これを実証しました。固定化後、融合タンパク質をFactor Xaで切断した後、上清を回収して分析しました。タグが付加されていないルシフェラーゼの遊離について図8に示します。

まとめ

HaloLink™ Resinは、HaloTag™ 融合タンパク質を固相支持体に、方向性を保った状態で共有結合させることにより簡便に固定化する方法を提供します。我々は、HaloLink™ Resinを用いることによって、多様なアッセイを駆使したタンパク質機能研究が実現できることを明らかにしました。固定化されたタンパク質をタンパク質プルダウンアッセイに用いれば、タンパク質結合パートナーのin vivo (哺乳動物細胞) またはin vitroにおける単離に使用できるほか、その酵素活性を評価することもできます。目的タンパク質は、プロテアーゼによる切断によりレジンから遊離させることができるため、高純度のタンパク質が得られます。HaloLink™ Resin表面へのタンパク質の固定化は、共有結合によるもので、迅速かつ選択的であるため、固定化前にタンパク質を精製あるいは修飾しなくても、効率的に結合させることができます。以上のような特性をもつHaloTag™ タンパク質およびHaloLink™ Resinは、in vivoおよびin vitroにおけるタンパク質機能の研究に最適です。

参考文献

- Luy, Y.Y. *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9024–32.
- Kaelin, W.G. *et al.* (1991) *Cell* **64**, 521–32.
- Vogt, P.N. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 465–9.
- FlexR® Vector Systems Technical Manual #TM254*, Promega Corporation
- HaloLink™ Resin Technical Manual #TM250*, Promega Corporation.
- Banaszynski L.A. *et al.* (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4715–21.
- Thurl E.H. and Lawrence C.J. (2003) *Sci. STKE* (<http://stke.sciencemag.org/>) **212**, re15.
- Chen J. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4947–51.

プロトコル

- ◆ *HaloLink™ Resin Technical Manual #TM250*, Promega Corporation.
www.promega.com/tbs/tm250/tm250.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
HaloLink™ Resin	2 ml	G1911	27,000
	5 ml	G1912	58,000