

TALON[®]樹脂は還元剤としてβ-メルカプトエタノールが存在する非変性条件下でも6xHisタグ融合タンパク質を精製できる

クロンテック（株）化学・酵素学・タンパク質精製グループ

クロンテックのTALON Metal Affinity Resinは、ポリヒスチジンタグ融合タンパク質の精製のためにデザインされた、コバルトイオンを固定化した金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 樹脂で、耐久性があり、広い用途があります。この樹脂のTALONリガンドは金属イオンの漏出を防ぎ、分離能を増加させ、還元剤 (30 mMまでのβ-メルカプトエタノール) の存在下でも機能し、他の市販のIMAC樹脂の欠点を克服しています(1, 2)。

多くのタンパク質はその生物活性を維持するために遊離のスルフィドリル (-SH) 基を必要とするため、β-メルカプトエタノール (β-ME) などの還元剤の存在下で精製する必要がある場合があります。しかし、ほとんどのIMAC樹脂は還元剤の存在下では使用できません (3, 4)。それとは対照的に、TALON樹脂はβ-MEの存在下でポリヒスチジンタグ融合タンパク質を精製することができます。

高純度のタンパク質が得られ、β-MEによる金属イオンの漏出がない

マウス・ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) をポリヒスチジン (6xHis) タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ、TALON樹脂を用いて還元剤β-MEの存在下で精製し、その純度を調べました。30 mMまでのβ-MEを含む非変性バッファーを用いても、得られた6xHis DHFRの純度は優れていました (図1)。フロースルー画分のレーンでは25 kDaのDHFRバンドは認められませんでした。このことは、β-MEの存在下でもTALON樹脂は優れた性能を保持していることを示しています。

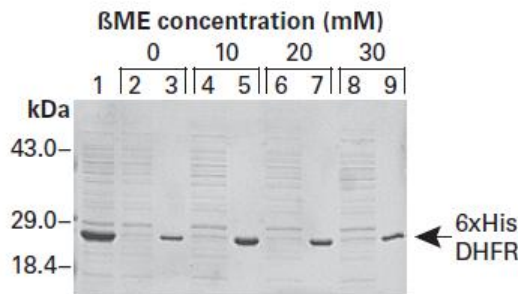


図1. β-ME濃度を漸増させた非変性条件下でのTALONを用いた6xHis DHFRの精製

N末端に6xHisタグを付けたマウスDHFR (19.5 kDa) を大腸菌で発現させた。培養液 (25 ml) から菌体を回収し、菌体を2 mlのsonicationバッファー (pH 8.0) に懸濁し、凍結融解して破壊した。清澄化したライセート (2.66 ml、総タンパク質濃度: 4 mg/ml) を、200 μlのTALONを充填した自然落下カラム (sonicationバッファーで平衡化しておいたもの) にアブライした。カラムをsonicationバッファー (pH 8.0) で3回洗浄した。TALONに結合した全タンパク質を600 μlの100 mM EDTAで溶出した。バッファーには、図に示した濃度のβ-MEが含まれている。サンプルを12%ポリアクリルアミド/SDSゲルで電気泳動し、ゲルをクマシーブルーで染色した。レーン1: 20 μlの細胞ライセート。レーン2, 4, 6, & 8: 20 μlのフロースルー。レーン3, 5, 7, & 9: 5 μlの溶出液。

TALONは、ポリヒスチジンタグ融合タンパク質を結合させるために、ニッケルの代わりに、特殊な2価金属イオンであるコバルトを用いています。コバルトイオンは、八面体型金属イオンの結合に理想的な多座配位金属キレーターによってSepharose[®]に強く固定化されています。その点で、TALONは他のIMAC樹脂よりもかなり優れています。すなわち、他のIMAC樹脂では金属イオンが強固に結合していないため、精製の過程で金属イオンが失われてしまうおそれがあります。さらに、Co²⁺はβ-MEによる還元をNi²⁺よりもはるかに受けにくいという性質があります。

β-MEを用いた場合、TALONはNi-NTAよりも収率が高い

TALONと他社のNi-NTAを用いて、30 mMまでのβ-MEを含むバッファーを用いた非変性条件下で6xHisタグ融合タンパク質を精製し、両者の収率を比較しました。10、20、30 mM β-MEの存在下では、精製された6xHis DHFRの収率はTALONを用いた場合の方がNi-NTAを用いた場合よりもはるかに高いという結果が得られました（図2）。さらに図2のデータは、TALONを用いた場合では、低濃度のβ-MEを含むバッファーを用いる方が6xHis DHFRの収率が上がることを示しています。

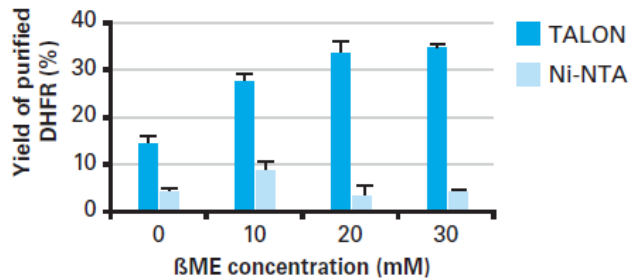


図2. β-ME存在下でTALONまたはニッケル-NTAを用いて組換え6xHis DHFRを細胞抽出液から精製した時の収率
N末端に6xHisタグを付けたマウスDHFRを大腸菌で発現させ、図1で述べた非変性条件下で精製した。タンパク質の濃度はBradfordアッセイ(5)により求めた。収率は、細胞ライセート中の総タンパク質に対する%として示した。

還元剤として30 mM までのβ-ME を含む非変性条件下で、TALON樹脂を用いてポリヒスチジンタグ融合タンパク質を精製すると、優れた精製結果が得られます。高い収率と純度が得られるため、天然のコンホメーションを採っていることが必要なタンパク質の生物活性や他の目的の研究を充分に行える量と質を兼ね備えた組換えタンパク質を、迅速かつ容易に得ることができます。

参考文献

1. TALON Resin (April 1995) *Clontechiques* X(2):8–9.
2. Porath, J. (1992) *Protein Express. Pur.* 3(4):263–281.
3. Hochuli, E., et al. (1987) *J. Chromat.* 411:177–184.
4. Sawadogo, M., et al. (1995) *Genet. Eng.* 17:53–65.
5. Bradford, M. (1976) *Anal. Biochem* 72:248.

製品ガイド

- ▶ TALON® His タグ融合タンパク質精製樹脂