

Ni-NTA IMACで混入することが多い大腸菌由来のSlyDを結合しない TALON™ Resin

TALON™ Resin Does Not Bind *E. coli* SlyD, a Common Contaminant in Ni-NTA IMAC

Jonathan L. McMurry & Robert M. Macnab, Ph.D.

Department of Molecular Biophysics and Biochemistry
Yale University, New Haven, CT

大腸菌のSlyDはプロリル・イソメラーゼであり、特異的に2価の金属イオンを結合するため、異種的に発現させたHisタグ融合タンパク質をIMACで調製する際に混入物となり問題となる場合があります。TALON Resin (Co²⁺を利用した樹脂) とNi-NTAを直接比較し、SlyDの結合を解析しました。Ni-NTAは非変性と変性条件下でかなりの量のSlyDを結合しましたが、TALON ResinではSlyDの結合が検出されませんでした。TALON ResinはNi-NTA樹脂よりSlyDが混入する傾向が小さいため、特に発現量の少ないタンパク質の精製には最適なIMAC樹脂と言えるでしょう。

固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によるHisタグ融合タンパク質の精製法は広く利用されている方法であり、1段階の操作で多量の高純度タンパク質を容易に得ることができます。IMAC樹脂でよく使用されている2つの金属イオンはCo²⁺とNi²⁺です。TALON Resin (ClontechのCo²⁺を利用した樹脂) と競合品であるNi-NTA樹脂は、非変性と変性条件下でHisタグ融合タンパク質の精製に使用することができます。

SlyDは*E. coli*の27kDaのプロリル・シス/トランス・イソメラーゼであり、2価の金属イオンとの結合により調節されています (1)。SlyDにはC末端にヒスチジンに富む金属結合ドメインが存在します (図1)。SlyDはニッケルイオンに高親和性を示すため (2)、Niを利用したIMACで問題となる可能性があります。実際に最近の報告では、SlyDの改良型精製法でNi-NTAを使用することが記載されており、「変性条件下のIMAC法で混入する唯一の*E. coli* タンパク質」としてSlyDが確認されています (3)。

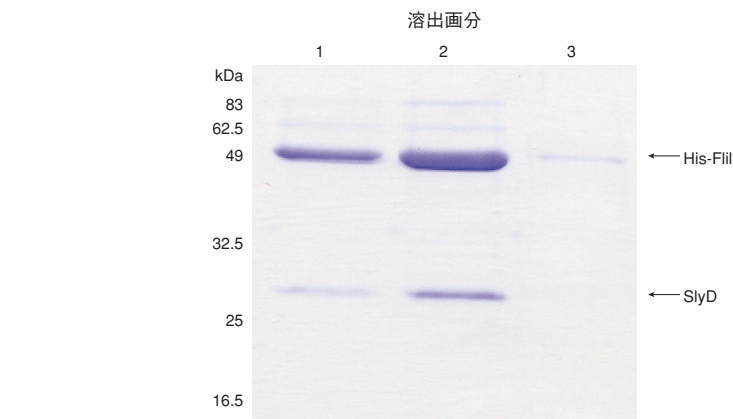


図2 Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーにより精製したHisタグ融合FliI画分に混入するSlyD 250mMイミダゾールで溶出したFliIの3画分を示します。標準分子量の位置は左に示しました。

IMAC樹脂の主な利点はHisタグに対する特異的な高親和性にあり、このため1段階の精製操作でほぼ均一にすることができます。ただし、特に*E. coli*宿主で遺伝子が十分発現されないタンパク質を精製する場合は、Ni-NTAを使用すると多大なSlyDの混入傾向が認められます。かなり高レベルで産生される場合でも、*E. coli*株BL21 (DE3) pLysSで産生し (0.2mM IPTGにより30℃で4時間誘導)、Ni-NTAクロマトグラフィーで精製したHisタグ融合*Salmonella* FliIには、27kDaにかなりの混入バンドが認められます (図2)。N末端のアミノ酸配列を決定した結果、この混入物がSlyDであることが特定されました (Guoyong Liによる未発表データ)。

SlyDの結合に関してNi-NTAとTALON Resinを比較するため、同時並行実験を行いました。インサートを含まないpET19b (Novagen) でBL21 (DE3) pLysSを形質転換しました。アンピシリン100μg/mlを添加したLuria-Bertani培地で一晚培養した後継代培養し、30℃でOD600が0.4になるま

で生育させました。細胞を0.2mM IPTGで誘導し、さらに4時間生育させました。その後、遠心法により細胞を回収し、ペレットを-85℃で一晩保存しました。

同じ培養から得られた等容量の細胞ペレットを解凍し、50mMリン酸緩衝液 (pH8.0)、500mM NaCl、10mMイミダゾール (非変性緩衝液) または6M尿素を含む同緩衝液 (変性緩衝液) に再懸濁しました。懸濁液を超音波処理し、100,000×gで45分間遠心しました。2つの上清 (透明ライセート) をさらに等量ずつ2分割し、250μlのNi-NTAまたはTALONカラムにかけました。20mMイミダゾールを含む20倍容の非変性または変性緩衝液でカラムを洗浄しました。その後、250mMイミダゾールを含む非変性または変性緩衝液を用いて、結合タンパク質を250μlの3画分に溶出させました。得られた画分はSDS-PAGEで解析しました (図3)。

Ni-NTAは非変性条件 (図3A) でも変性条件 (図3B) でも、SlyDに相当するかなりの量の27kDaの混入物を結合しました (非変性条件では6mg/ℓの混入タンパク質、変性条件では2.5mg/ℓのSlyD)。非変性のNi-NTAサンプルには他の混入バンドも存在しました。TALON Resinではいずれの条件下でもSlyDやその他の混入タンパク質は検出されませんでした。

```

1  mkvakdlvvs layqvrtedg vlvdespvsa pldylhghgs lisgletale ghevgdkfdv
61  avgandaygq ydenlvqrqp kdvfmvgvdel qvgmrflaet dqgvpvpeit aveddhvvvd
121 gnhmlagqnl kfnvevvair eateeeahg hvhgahdhhh dhhdgcccg hghdhghehg
181 gegccggkgn ggcgcch

```

図1 *E. coli*のSlyDの配列 C末端のヒスチジンに富む金属結合ドメインは、ヒスチジン残基に下線を付けて太字で表示しています。

Ni-NTA IMACで混入することが多い大腸菌由来のSlyDを結合しない TALON™ Resin...continued

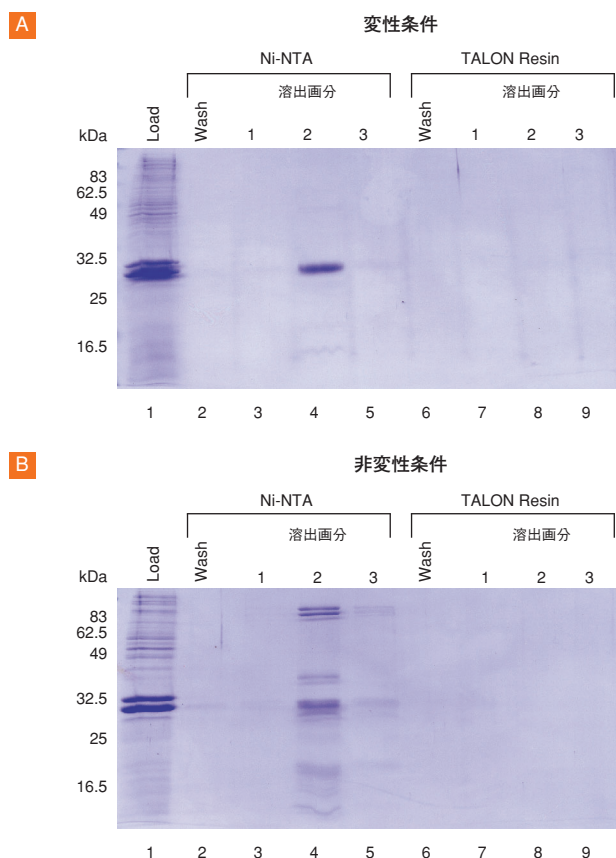


図3 Ni-NTAに結合するSlyDを混入させないTALON Resin Hisタグ融合タンパク質を発現していないBL21 (DE3) pLysS細胞から得られた全細菌ライセートを透明化して、各樹脂に加えしました。パネルA. 変性条件 パネルB. 非変性条件 レーン1: 透明化したライセート レーン2: Ni-NTAの最終洗浄液 レーン3~5: Ni-NTAの溶出画分 レーン6: TALON Resinの最終洗浄液 レーン7~9: TALON Resinの溶出画分

多量のHisタグ融合タンパク質を含むライセートでは、樹脂への結合に関してHisタグ融合タンパク質がSlyDより優位となるため、通常はNi-NTAで精製することができます。樹脂を飽和させることにより、Hisタグ融合タンパク質の高純度サンプルがNi-NTAで得られることが認められています。しかし、無駄の多い操作であり、発現量が少ない遺伝子を扱う場合は実施することが困難です。しかし、TALON Resinを使用すれば、Hisタグ融合タンパク質の産生量が極めて低い条件や、上述のように非存在下の実験でも、SlyDの混入は認められません。このため、均一化するためにクロマトグラフィーまたはその他の段階を追加する必要はありません。

SlyDは Ni^{2+} よりはるかに Co^{2+} に対して低親和性であることが報告されています (2)。TALON Resinは Co^{2+} を利用したIMAC樹脂であるためNi-NTAより大きな利点があり、発現量の低いHisタグ融合タンパク質の精製には特に有効です。結論としてTALON Resinは、ポリヒスチジン領域を本来備えている内因性タンパク質に対して優れた識別能を示すと言えるでしょう。

TALON Resin Products		サイズ	カタログ番号	価格
Metal Affinity Resin				
	10 ml	635501	¥21,000	
	25 ml	635502	¥48,000	
	100 ml	635503	¥168,000	
	250 ml	635504	¥378,000	
Single Step Columns (5 ml)				
	25 本	635628	¥47,000	
TALONspin Columns				
	10 本	635601	¥18,000	
	25 本	635602	¥39,000	
	50 本	635603	¥72,000	
Superflow Metal Affinity Resin				
	25 ml	635506	¥59,000	
	100 ml	635507	¥208,000	
CellThru Resin				
	10 ml	635509	¥26,000	
	100 ml	635510	¥182,000	
Purification Kit				
	1 set	635515	¥59,000	
HT 96-Well Purification Plate				
	1 set	635622	¥53,000	

TALON関連製品

- 2-ml Disposable Gravity Column (Cat. No. 635606)
- Buffer Kit (Cat. No. 635514)
- xTractor Buffer Kit (Cat. No. 635623)
- xTractor Buffer (Cat. No. 635625)

購入される方へのご注意

TALON Resin は米国特許第5,962,641号により保護されています。

参考文献

1. Hottenrott, S., et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:15697 – 15701.
2. Wülfing, C., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:2895 – 2901.
3. Mukherjee, S., et al. (2003) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37:183 – 186.

20mlサイズの TALON Single Step Columnの情報は16ページをご覧ください。