

クロンテック製品の組合せ使用による簡単・迅速なタンパク質の発現と精製

クロンテック (株) 化学・酵素学・タンパク質精製 (CEPP) グループおよび生産グループ

遺伝子のクローニングと精製タンパク質の大量調製の過程は時間がかかり、困難を伴います。本研究では、クロンテック製品を組み合わせて用いて、遺伝子のクローニング、発現、および精製を迅速かつ容易に行う方法をご紹介します。In-Fusion® PCR Cloning Kit を用いて、AcGFP1をコードする遺伝子をBacPAK™ トランスファーベクターにクローニングしました。次にこのコンストラクトをBacPAK Baculovirus発現システムで使用し、6×HNタグ融合AcGFP1を高発現させ、TALON® Superflow Resinで精製しました。これらの製品をすべて組み合わせて使用することにより、大量の高精製AcGFP1を迅速かつ効率的に得ることができました。

バキュロウイルス発現システム

バキュロウイルス発現システムは、昆虫細胞を宿主として用いて大量の組換えタンパク質を発現させるシステムです (1, 2)。昆虫細胞は哺乳類細胞と同様な翻訳後修飾を行うことができるため、天然型と同様な構造、生物活性、および免疫反応性をもつ組換えタンパク質を生産します。

BacPAK発現システムは組換えウイルスを効率よく生産する

外来タンパク質の発現に最も良く用いられているバキュロウイルスは、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcMNPV; 3, 4) です。しかし、AcMNPVゲノムは134 kbと巨大であるため (5)、それを直接取り扱うことは困難です。この問題を解決するために、クロンテックは組換えバキュロウイルス発現ベクターの構築と選択を容易にするBacPAK Baculovirus Expression Systemを開発しました。

BacPAKシステムではバキュロウイルス発現ベクターを2段階で作製します。まず、比較的小さな (<6 kb) トランスファーベクターのマルチクローニングサイト (MCS) に目的遺伝子をクローニングします。MCSは、長いAcMNPV配列に隣接して存在する、強力なバキュロウイルス・ポリヘドリンプロモーターとポリアデニレーションシグナルの間に位置します。目的遺伝子をトランスファーベクターにクローニングした後、このコンストラクトを、直鎖化したBacPAK6 ウイルスDNA (Bsu 36 I 消化BacPAK6 ウイルスDNA) とともにIPLB-Sf21昆虫細胞にトランスフェクトします。直鎖化したBacPAK6バキュロウイルスDNAとトランスファーベクターの相同性のAcMNPV配列間で組換えが起こり、その結果、目的遺伝子がトランスファーベクターからBacPAK6 DNAに移ります。この2段階法により、組換えウイルスが100%に近い頻度で非常に効率よく生成します。

In-Fusion Ready BacPAKトランスファーベクターへの容易なクローニング

In-Fusion Ready BacPAKベクターセットを用いると、BacPAK バキュロウイルス発現システムとTALONタンパク質精製システムへの移行をスムーズに行えます (図1)。このセットには、In-Fusion PCRクローニング (制限酵素消化やライゲーション反応を必要としない) を行うことができる2つの直鎖化したトランスファーベクターが含まれており、N末端またはC末端に6×HNタグをもつ目的タンパク質を調製することができます。6×HN精製タグが付くため、TALON Superflow resinを用いて組換えタンパク質を容易に精製することができます。

本研究では、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質AcGFP1をコードする遺伝子を目的遺伝子として用いました。発現すると、AcGFP1は明るい緑色の蛍光を発するため、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターでタンパク質発現を検出することができます。クロンテックのLiving Colors® pAcGFP1-C1 Vectorを鋳型とし、Advantage® HD DNA Polymerase MixとIn-Fusion PCR Cloning Kitの説明書に従って設計したプライマーを用いてAcGFP1遺伝子をPCR増幅しました。N末端またはC末端に6×HNタグをもつAcGFP1を調製するために、In-Fusion PCR Cloning Kitを用いてこのPCR増幅産物をpBacPAK-Nterm 6×HN および-Cterm 6×HNトランスファーベクターにクローニングしました。クローニング反応産物を用いてFusion-Blue™ Competent Cellsを形質転換しました。生成した形質転換体をLB-アンピシリンプレートで選択し、目的のAcGFP1インサートを含むクローンをコロニーPCRでスクリーニングしました。クローニング効率は平均80%でした。陽性クローンの配列を確認した後、NucleoBond Plasmid Midi Kitを用いてトランスフェクショングレードのDNAを調製しました。

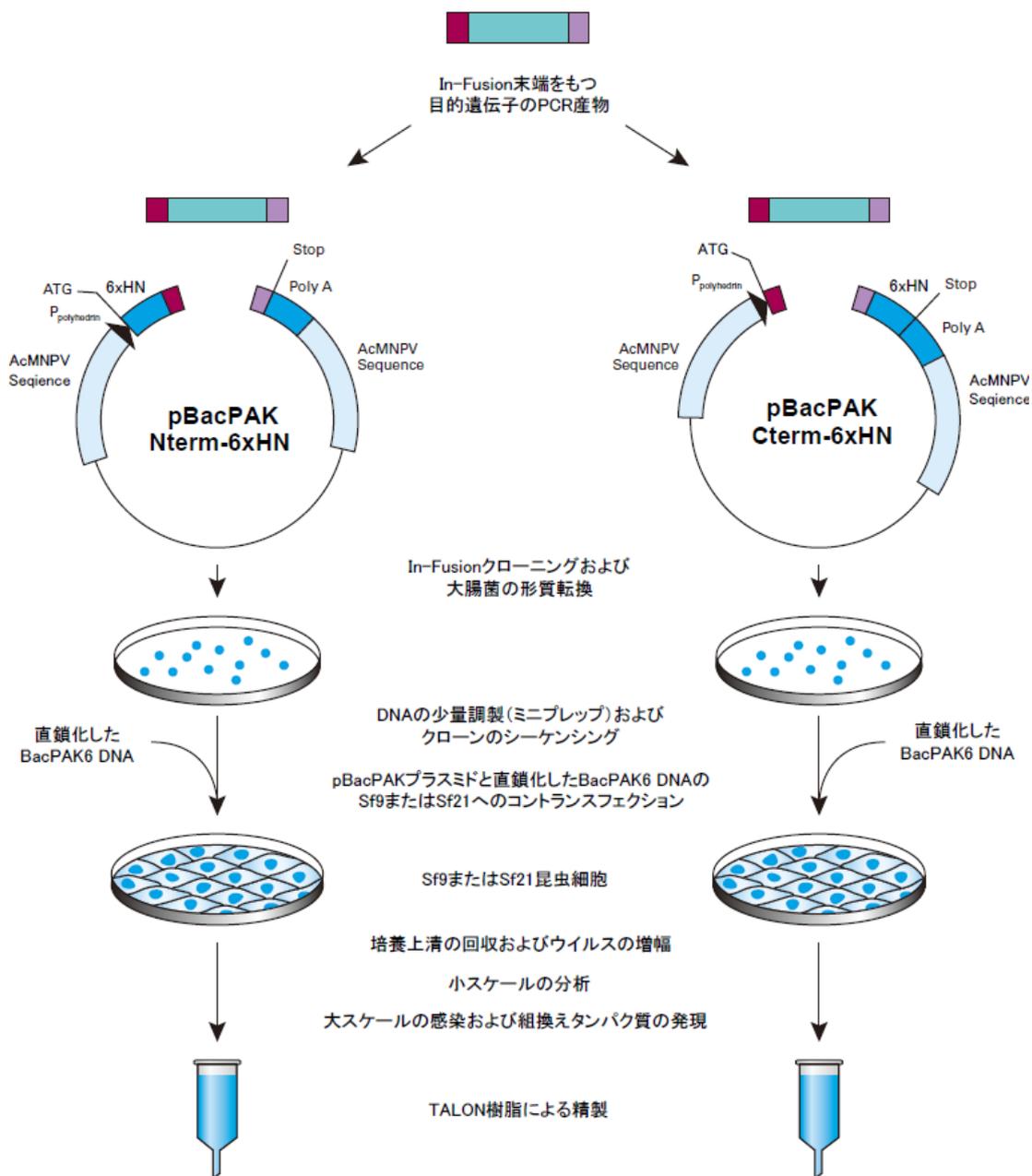


図1. In-Fusion Ready BacPAKベクターセットとバキュロウイルス発現システム

N末端またはC末端に6×HNタグをもつコンストラクトを調製するために、目的遺伝子を含むPCR断片をIn-Fusion Ready BacPAKベクターセットのいずれかのベクターにクローニングする。配列が確認されたクローンとBacPAK6DNAを昆虫細胞にコトランスフェクトする。相同組換えにより、目的遺伝子がBacPAK6ウイルスDNAに移る。組換えウイルスを複製・増幅し、昆虫培養細胞に感染させる。感染した細胞は組換えタンパク質を生産する。これをTALON樹脂で精製する。

AcGFP1組換えバキュロウイルス・ストック液の調製

N末端またはC末端に6×HNタグをもつAcGFP1を発現する組換えバキュロウイルスを調製するために、pBacPAK-Nterm-6×HN-AcGFP1 またはpBacPAK-Cterm-AcGFP1-6×HNトランスファーベクターと直鎖化したバキュロウイルスBacPAK6 DNA (Bsu36I 消化産物) を、単層培養したSf21昆虫細胞にコトランスフェクトしました。トランスフェクションの72時間後に、トランスフェクトされた細胞の培養上清(組換えウイルスを含む)を回収し、遠心して細胞残渣を除いた後、上清を4℃、暗所で保存しました。さらにウイルスを得るために、残りの細胞に新鮮な培地を加えて27℃で2日間培養しました。培地を回収した後、トランスフェクションの72時間後に回収した培養上清(組換えウイルスを含む)とともにプールし、組換え

ウイルスの初代ストック液を調製しました。この初代ストック液の一部を別のSf21単層培養細胞に感染させ、27°Cで3日間培養し、初代ストック液を増幅しました。増幅されたウイルス上清を回収し、バキュロウイルスタイターキットを用いてウイルス力価を測定しました。

AcGFP1の大量生産

AcGFP1の発現に必要な時間と感染多重度 (MOI) を最適化した後、N末端またはC末端に6×HNタグが付いたAcGFP1タンパク質の生産をスケールアップしました。再びSf21単層培養細胞にN末端またはC末端6×HNタグ融合AcGFP1組換えバキュロウイルスをMOI=5で46時間感染させました。感染した培養細胞を位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察しました (図2)。また、各目的タンパク質の純度と収率を比較するために、約100 mgの細胞を集め、**TALON Superflow**または Ni^{2+} -NTA Superflow resinで精製しました。

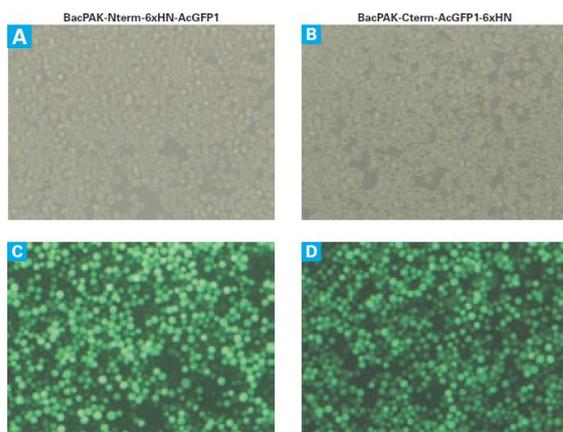


図2. 組換えバキュロウイルスは昆虫細胞に効率よく遺伝子を導入し、その昆虫細胞は6×HNタグ融合AcGFP1タンパク質を高発現する

Sf21単層細胞にNterm-6×HN-AcGFP1 (パネルAおよびC) または Cterm-6×HN AcGFP1 (パネルBおよびD) をMOI=5 で46 時間感染させた。次に位相差顕微鏡 (パネルAおよびB) および緑色蛍光タンパク質 (GFP) 用フィルターを装着したZeiss Axioskop™ 蛍光顕微鏡 (パネルCおよびD) で細胞を観察した。6×HN-AcGFP1の高発現が認められたことからわかるように (パネルCおよびD)、組換えバキュロウイルスにより実質的にすべての昆虫細胞に遺伝子が導入された。

IMAC Superflow レジン

タンパク質精製の過程で、いくつかの要因により目的タンパク質の収率が減少します。抽出・精製過程でpHが過度に低いあるいは高いと、またプロテアーゼが存在すると、精製タンパク質の質と収率が著しく損なわれます。精製過程を短縮し、穏和な精製条件を用いることにより、これらの悪影響を減少あるいは避けることができます。精製をうまく行うには、高選択性のレジンと穏和なローディングおよび溶出条件を用いて操作を比較的迅速に行う必要があります。固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) では、タンパク質に天然に存在する、あるいはタグまたは点変異として人為的に導入した比較的小さなヒスチジンのクラスターに選択的に結合するリガンド [例えば金属イオンと錯体を形成したTALON、ニトリロ三酢酸 (NTA)、イミノ二酢酸 (IDA)] を使用しています。高レベルの精製を達成するためには、多量の不純物を吸着せずに目的タンパク質のみを選択的に吸着できるレジンも必要です。目的タンパク質を選択的に吸着できるIMACレジンの性能は、バキュロウイルス発現システムを用いる場合には特に重要です。このシステムでは、ポリヒスチジンポリペプチドを含む内在性のタンパク質も生産されることが知られているからです (6)。TALON Superflow Metal Affinity Resinは、Superflow resinの強固でオープンな構造と、キレートした選択性の高いコバルト吸着中心を併せ持っているため、ヒスチジン残基を効率よく選択的に吸着することができます。

TALONと Ni^{2+} -NTAの比較

TALON Superflow resinと Ni^{2+} -NTA Superflow resinを比較するために、各レジンを用いてN末端6×HNタグ融合AcGFP1タンパク質を各メーカーの推奨する抽出・精製条件に従って精製しました。図3は、TALON Superflow または Ni^{2+} -NTA Superflow resinを充填したHR 10/2 FPLCカラム (GE Healthcare社) を用いて6×HNタグ融合AcGFP1タンパク質をIMAC精製したときの比較結果を示しています。TALON Superflow resinを用いたクロマトグラフィーの場合には精製時間はわずか25分で、 Ni^{2+} -NTA Superflow resinを用いた場合の約半分でした。この違いの主な理由は、TALON Superflowは Ni^{2+} -NTA Superflow resinの場合よりもはるかに速い流速を使用できるからです。また、 Ni^{2+} -NTA Superflow resinはポリヒスチジンタグ融合タンパク質に対する結合の選択性が低いため、溶出の前に20 mMイミダゾール洗浄 (TALONを用いる場合には10 mMイミダゾール洗浄) をする必要があることも注意すべきです。 Ni^{2+} -NTA Superflow resinでは精製に35分という長い時間を要することは、タンパク質を単離する際に問題となります。特に室温では、プロテアーゼ活性によって目的タンパク質が分解する可能性が高くなります。また、 Ni^{2+} -NTA Superflow resin

で用いる抽出/精製バッファー（pH 8.0）はアルカリ性ですので、精製された目的タンパク質の収率だけではなく生物活性も減少するおそれもあります。それとは対照的に、選択性の高いコバルト吸着中心をもつ TALON Superflow resinでは、精製過程で用いるバッファーのpHは中性であり、途中の洗浄ステップも10 mMイミダゾールで短時間行うだけで済みます。このように、TALON Superflow resinを用いる精製は、時間を節約できるだけでなく、目的タンパク質の分解の防止にも役立ちます。

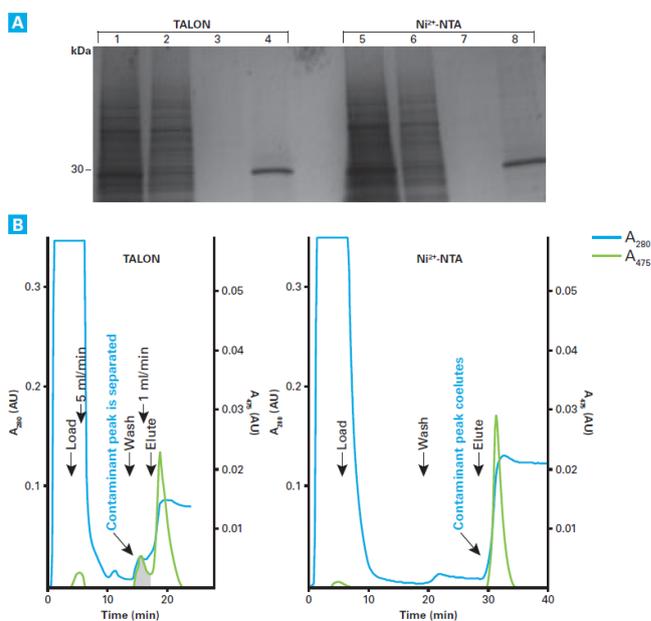


図3. IMAC精製—TALONとNi²⁺-NTAの比較

6×HN-AcGFP1を発現するSf21細胞のペレット100 mgを溶解し、得られた抽出液をTALON（パネルA、レーン1）またはNi²⁺-NTA（パネルA、レーン5）FPLCカラムに1 ml/minの流速でロードした（レーン2と6は、それぞれ素通り画分を示す）。カラムを10 mM（レーン3）または20 mM（レーン7）イミダゾールで洗浄した。150 mMイミダゾールをTALON Superflowカラムに5 ml/minの流速で（レーン4）、また250 mMイミダゾールをNi²⁺-NTA Superflowカラムに1 ml/minの流速で（レーン8）流してタンパク質を溶出した。各レジンはメーカーの説明書に従って使用した。パネルBは各カラム（左側：TALON；右側：Ni²⁺-NTA）のクロマトグラムを示す。280 nmの吸光度（青色の線）は、各画分に存在する総タンパク質の量を示す。475 nmの吸光度（緑色の線）は、各画分に存在するAcGFP1の量を示す。TALONレジンは、475 nmの波長の光を吸収する夾雑物とAcGFP1のピークを分離することができる。それとは対照的にNi²⁺-NTA resinの場合では、その夾雑物とAcGFP1のピークが分離されずに同時に溶出される。精製に必要な時間が各レジンで異なることに注意されたい。

TALONで精製したタンパク質は純度が高い

IMACの各画分のタンパク質濃度をBCA法で測定し、6×HN-AcGFP1の回収率を蛍光スペクトロスコピーで求めた。各サンプルの特異蛍光（specific fluorescence）を計算すると、TALONとNi²⁺-NTAから得られた溶出画分の純度が明らかに異なることがわかります（表1）。特異蛍光（溶出液の総蛍光を溶出液の総タンパク量で割った値）は、精製された目的タンパク質の純度と生物活性を正確に示すものです。TALON Superflow resinで精製した6×HNタグ融合AcGFP1はNi²⁺-NTA Superflow resinで精製した同じタンパク質よりも高い特異蛍光をもっています。キレートしたコバルト吸着中心をもつTALONはNi²⁺-NTAよりも優れた選択性をもつことを、データは示しています。またNi²⁺-NTAでは、非特異的な結合を減少させるために、TALONに比べ、抽出、平衡化、洗浄および溶出バッファー中のイミダゾール濃度を高くする必要があります。データは示しています。さらに、TALONでは目的タンパク質の溶出に150 mMのイミダゾールを用いるのに対し、Ni²⁺-NTAではより高濃度（250 mM）のイミダゾールを用いるため、精製タンパク質からイミダゾールを除くために、より長い透析ステップが必要です。

タンパク質 (mg)	TALON 画分	総蛍光	タンパク質 (mg)	Ni ²⁺ -NTA 画分	総蛍光
6.57	ロード	25,810	6.86	ロード	24,562
6.12	素通り	252	6.32	素通り	0
0.03	洗浄	0	0.02	洗浄	0
0.34	溶出	21,329	0.56	溶出	22,602
特異蛍光 ¹⁾ = 62,671			特異蛍光 ¹⁾ = 40,361		
特異蛍光比 (TALON/ Ni ²⁺ -NTA) = 155%					

1) 特異蛍光 = 溶出液の蛍光 / 溶出液のタンパク量 (mg) (純度と生物活性を示す)

結語

本研究で、種々のクロンテック製品—特にIn-Fusion Ready BacPAK Vector Set、BacPAK Baculovirus Expression System、およびTALON Superflow Metal Affinity Resin—を組み合わせると、目的タンパク質AcGFP1のクローニング、発現、および精製が非常に容易になることがわかりました。In-Fusion PCR クローニング技術は、AcGFP1をIn-Fusion Ready BacPAK Vector Setにクローニングするための効率的で簡便な方法であることが明らかになりました。BacPAK Baculovirus Expression Systemにより高レベルのAcGFP1を簡単に生産することができ、またTALON Superflow resin（ユニークなコバルトキレート剤をもち、速い流速で使用できる）により非常に純度の高いタンパク質を得ることができました。クロンテック製品を組み合わせることで、簡便、迅速、かつ使いやすい実験計画を立てることができます。

参考文献

1. Kitts, P. A., & Possee, R. D. (1993) *Biotechniques* **14**(5):810–817.
2. Kitts, P. A. *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**(19):5667–5672.
3. Luckow, V. A. (1991) In *Recombinant DNA Technology & Applications*, Eds. Prokop, A. *et al.* (McGraw-Hill, Inc., N.Y.) pp. 97–152.
4. Bishop, D. H. L. & Possee, R. D. (1990) *Adv. Gene Technol.* **1**:55–72.
5. Ayers, M. D. *et al.* (1994) *Virology* **202**(2):586–605.
6. Satoh, T. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(18):8423–8427.

製品ガイド

- ・ In-Fusion PCRクローニング関連製品
 - ▶ In-Fusio® HDクローニングキット（5×プレミックスタイプ）
 - ▶ In-Fusion® HD EcoDryクローニングキット（凍結乾燥品）
 - ▶ In-Fusion® Ready Products
 - ▶ Stellar コンピテントセル
- ・ バキュロウイルス関連製品
 - ▶ BacPAK™ バキュロウイルス発現システム
 - ▶ In-Fusion® Ready BacPAK ベクターセット
 - ▶ BacPAK™ バキュロウイルス迅速タイター測定キット
 - ▶ BacPAK™ qPCR タイター測定キット
- ・ TALONレジン関連製品
 - ▶ TALON® His タグ融合タンパク質精製樹脂
 - ▶ HisTALON™カートリッジ & HisTALON Gravity カラム