

ヒスチジンタグ融合タンパク質精製の切り札

TALON® Resin

Hisタグなどヒスチジンタグを持つ組換えタンパク質は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)担体との親和性を利用して高純度に精製できることが知られています。現在、ニッケルベースの担体が広範に利用されていますが、「アフィニティー精製のはずなのに純度、収量が悪い」という経験はないでしょうか？ そんな問題をコバルトベースのIMAC精製用高性能樹脂であるTALON® Resinが解決いたします。

本稿では、クロンテック独自の技術に基づくTALON® Resinがいかにして高純度、高収量精製を実現しているのかについてご紹介いたします。

ポイントはコバルトベース！

ニッケルベースの樹脂よりも高純度に精製可能

TALON® Resinの反応中心にはコバルトが存在し、三次元空間的に適切に配置されたヒスチジンのみがこの反応中心でコバルトに結合するため、ヒスチジンタグに対して高い選

択性、親和性を示します(図1)。一方、ニッケルベースのNi-NTA樹脂ではこのような空間的要求性があまり厳密ではなく、しばしばホスト由来の夾雑タンパク質まで結合してしまいます。

コバルトの選択性の高さにより、TALON® Resinでは変性条件、非変性条件にかかわらずヒスチジンタグを持たないタンパク質の非特異的な吸着は見られず、高純度の精製が期待できます(図2)。

金属イオンの脱落が少なく、収量低下を最小限に抑制
金属イオンの脱落は、金属イオンがヒスチジンタグ融合タンパク質ごとキレーターから漏出し、収量が低下する原因となります。そこで、TALON® Resinは、特別な四座配位子を採用し、すべての反応部位が三次元ポケットを形成するように設計されています。このポケット中で、コバルトは3つのカルボキシル基と1つの窒素原子に頑強に結合するため、樹脂からのコバルト漏出を極めて少量に抑えることができます。一方で、ニッケルベースのNi-NTA樹脂では、三次元構造と平面構造の2通りの配位構造が形成可能なため、樹脂の構造が均一ではありません。この歪んだ平面構造では、ニッケルとの結合がそれほど強固でないため、ニッケルの漏出が起こり、収量低下を招いてしまいます。図3に見られるように、TALON® Resinは、Ni-NTA樹脂と比較して、特に変性条件下で高収量、高純度を示します。このように、TALON® Resinは頑強であるため、厳しい変性条件下でも優れた耐久性を保持し、さらには、β-メルカプトエタノールに対する感受性も低くなっています(30 mMまで許容)。また、複数回の使用も可能です。

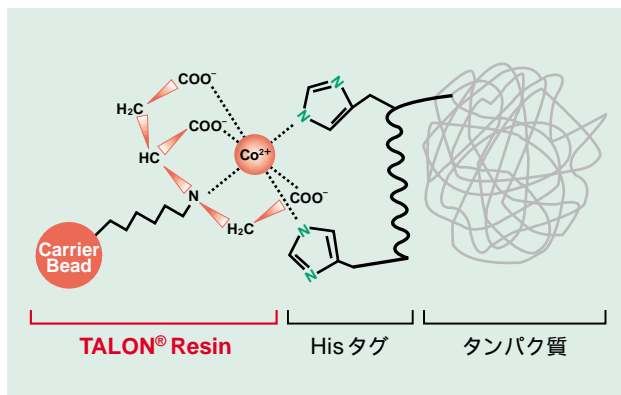


図1 TALON® ResinとHisタグタンパク質の結合模式図

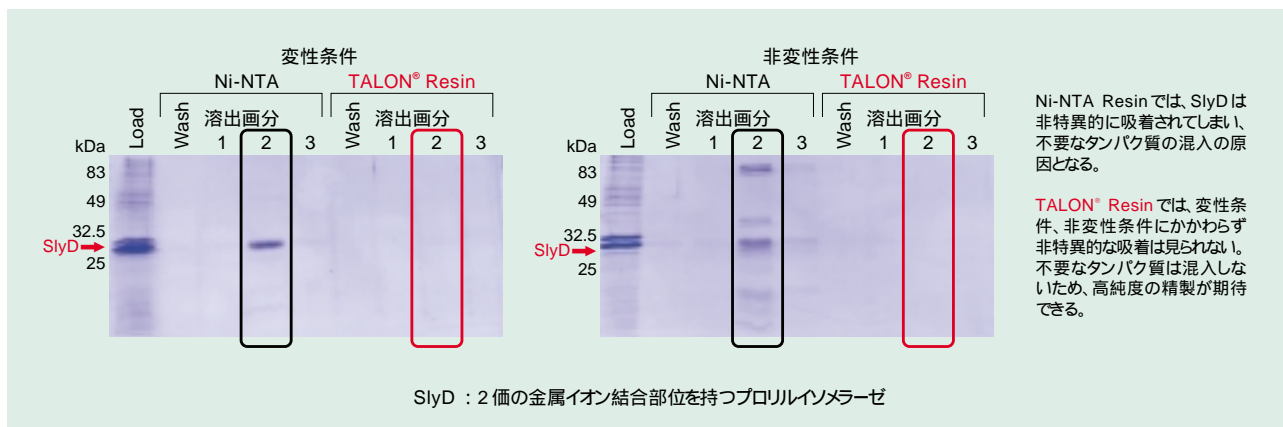


図2 BL21(DE3)pLysS株由来SlyDタンパク質(27 kDa)の非特異的吸着の比較

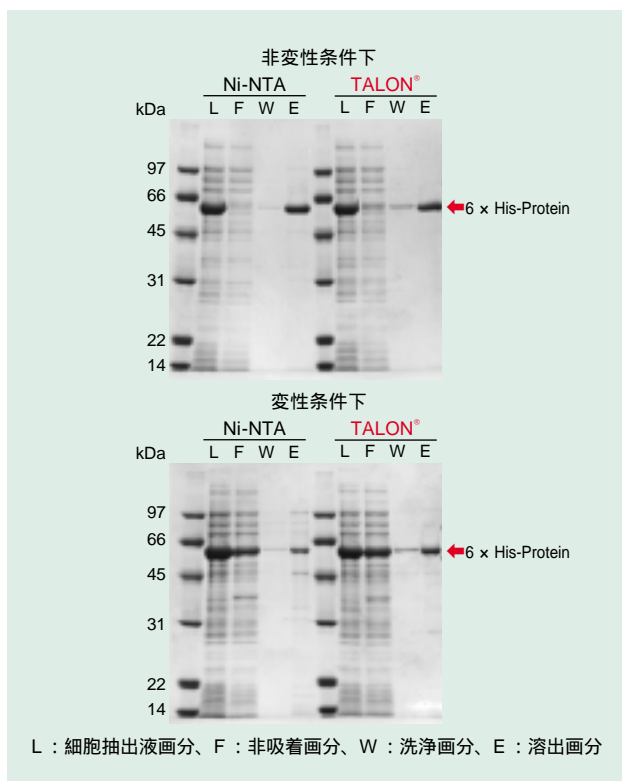


図3 非変性および変性条件下での比較

非変性条件下および変性条件下で、Ni-NTA樹脂とTALON® Resinを用いて、大腸菌破砕液より6 x His-Proteinの精製を行った。精製は、それぞれの標準プロトコールに準じて行い、CBB染色により解析した。

His タグのみでなく、HN タグ、HAT タグとも特異的に結合

ヒスチジントグはタンパク質自身の構造、機能への影響は少ないと考えられていますが、凝集しやすいことが知られています。

HN タグは、His(ヒスチジン)とAsn(アスパラギン)が連続した構造を有し、従来のHisのみが連続するHis タグよりも立体構造的にタンパク質の表面にヒスチジンが提示さ

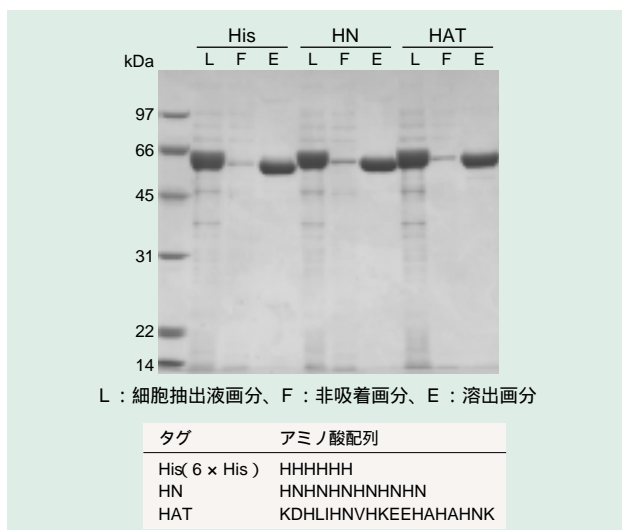


図4 TALON® Resin を用いた His タグ、HN タグ、HAT タグ融合タンパク質の精製

非変性条件下でTALON® Resinを用いて、大腸菌破砕液より各種タグ融合タンパク質の精製を行った。CBB染色像を示す。

れやすく、IMACに結合しやすくなっています。そのため、分子量の大きなタンパク質や発現量の少ない組換えタンパク質でより効率良く精製が可能です。

HAT(Histidine Affinity Tag)は、天然のタンパク質(Chicken lactate dehydrogenase)由来の配列で、偏った電荷を抑えHis タグよりも高い溶解性を示します。その一方で、ヒスチジンが立体的に連続した配列となり、IMACと強い親和性を持ちます。

TALON® Resinは、His タグ、HN タグ、HAT タグのいずれの融合タンパク質でも効率良く精製できることを確認しています(図4)。さらに、HNやHATでは、タンパク質の溶出が中性pHまたは低イミダゾール濃度と生理的な条件に近い穏やかな条件で精製を行えることも利点の一つです。

標準プロトコール(カラム法)

基本的には、Ni-NTAと同様の手法で精製ができ、より質の高いタンパク質を手に入れることができます。結合量は、5 ~ 10 mg ヒスチジントグ融合タンパク質 / 1 ml 樹脂です。

【非変性条件下】

平衡化バッファー / 洗浄バッファー*1 : 50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、pH7.0

溶出バッファー : 50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、150 mM イミダゾール、pH7.0

【変性条件下】

平衡化バッファー / 洗浄バッファー : 50 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、6 M グアニジン、pH7.0

溶出バッファー*2 : 45 mM リン酸ナトリウム、270 mM NaCl、5.4 M グアニジン、150 mM イミダゾール、pH7.0

【操作の概略】

カラムの平衡化

(10 倍量の平衡化バッファー / 洗浄バッファー)

サンプルの添加

カラムの洗浄

(10 倍量の平衡化バッファー / 洗浄バッファー)

サンプルの溶出(5 倍量の溶出バッファー)

高純度の目的タンパク質

*1 : TALON® Resin はニッケルベースのNi-NTA樹脂より穏やかな条件で溶出可能です。したがって、非特異的吸着を防ぐためあらかじめイミダゾールを添加する場合でも、5 mM程度をお勧めします。

*2 : 平衡化バッファーと1.5 M イミダゾール pH7.0 を9 : 1で混合すると簡単に作製することができます。

最後に

ヒスチジントグ融合タンパク質を高収量、高純度に精製可能なTALON® Resinには、小規模、大規模、バッチ形式など様々な形式でご利用いただける多様な製品群が揃っています。