

Vol. 1 HaloTag®による膜蛋白質の大量精製例

東京大学分子細胞生物学研究所 高難度蛋白質立体構造解析センター
小川 治夫 先生

はじめに

細胞は細胞膜に存在する膜蛋白質を通じ、情報の伝達や栄養分等の取り込み・排出などを行ないます。今後の医薬品の標的の大半は哺乳類由来の膜蛋白質であるとされ、哺乳類由来膜蛋白質を高純度で大量に精製する技術が学術・社会的に求められています。最近我々は、変異アデノウィルス/哺乳類培養細胞系を用いた大量発現とHaloTag®による精製を組み合わせ、ウサギ由来のカルシウムポンプ蛋白質SERCA1a (分子量約110k) の大量発現・精製に成功しました。培養液1L当たり約4 mgと驚異的な発現量を達成しています。また、結晶化にも成功し、X線結晶構造解析の結果を最近Nature誌 (参考文献) に発表しました。我々の研究室では、本手法を用いて他の多数の膜蛋白質の発現・精製にも成功しております。本手法は今後の膜蛋白質の機能・構造解析にも有用なツールの1つとなると思われるので、ここで紹介をさせて頂きたいと思っております。

1. コンストラクトの設計

膜蛋白質のアミノ酸N末端やC末端には、その蛋白質の機能調節に必須な部位がある場合も多いです。また、膜蛋白質の場合N末端には膜透過のためのシグナルペプチドを持つ場合も多く、これに対する配慮も必要でしょう。我々は、蛋白質の特性をわきまえ、N末端への融合にはpFN21Kを、C末端にはpFC14Kを用いています。両プラスミドはCMVプロモーター下流にクローニングサイトを持つので、哺乳類培養細胞へのトランスフェクションにより目的蛋白質の一過発現が可能です。通常我々は、まず一過発現を行うことで、発現蛋白質の安定性のチェックを行ないます。その後、HaloTag®を融合させた遺伝子を最終的にアデノウィルス作成のためのシャトルベクターへ組み込み、変異アデノウィルスの作成を行っています。

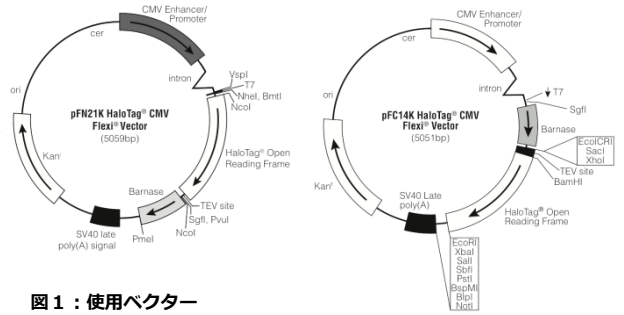


図1：使用ベクター

HaloTag®蛋白質のN末端への融合にはpFN21Kを、C末端の融合にはpFC14Kを用いています。

HaloTag®を選んだ理由

発現蛋白質の精製のタグ代表的なもの1つにHisタグがありますが、SERCA1aのような110kもある大きな膜蛋白質の精製には不向きな場合も多いです。一方、HaloTag®はHaloTag®リガンドとの間で共有結合を形成することから、発現量が少なくても精製を効率よく行えるのではないかと期待がありました。また蛍光リガンドも豊富に用意されており、共焦点レーザー顕微鏡などで発現蛋白質の局在を調べることや、発現した蛋白質量を蛍光により定量的に直接測定できるのではないかと期待があったためです。HaloTag®のように商品として流通しており、精製と蛍光ラベルの両者を簡便に行なうことが可能なタグは現在のところ存在しないのではないかと考えられます。

2. 発現した膜蛋白質の局在・発現量のチェック

まずは、発現した膜蛋白質が細胞内の期待される場所に局在しているかを調べます。それには蛍光HaloTag®リガンドを利用します。我々はHaloTag® TMRリガンドとHaloTag® Alexa Fluor® 488リガンドの2種類を主に使用しています。TMRリガンドは細胞膜を透過する性質を持つため、SERCA1aのような小胞体膜等に局在する膜蛋白質を容易にラベル可能です。一方、Alexa Fluor® 488リガンドは細胞膜を透過しないため、細胞外に局在するHaloTag®のみをラベルします。蛍光ラベル後に共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、目的膜蛋白質の局在を簡便に調べることが可能です (図2左)。発現のチェックには、通常の抗HaloTag®蛋白質を用いたウェスタンブロッティング法も良いですが、HaloTag®蛋白質の特性を活かした簡便な系である、蛍光HaloTag®リガンドを用いた検出法をお勧めします。操作の簡素化が計れ、実験の時間短縮が望めます (図2中、右)。

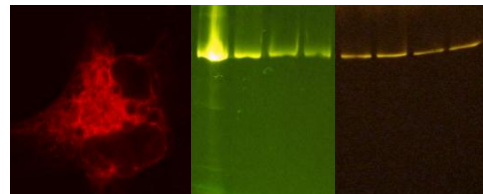
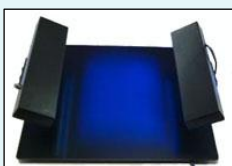


図2：発現した蛋白質の局在と蛍光による発現の確認

(左) SERCA1aを発現した細胞にHaloTag® TMRリガンドを反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行ないました。発現SERCA1aの小胞体膜への局在が分かります。(中、右) 発現したSERCA1aを蛍光HaloTag®リガンドでラベルし、電気泳動を行なった結果です。Alexa Fluor® 488リガンド (中) とTMRリガンド (右) を利用しました。蛍光撮影装置 (後述) により、発現蛋白質を簡便に検出できます。

これを使いました ～蛍光撮影装置～



励起光源部 (青色)
(リライオン社製)

蛍光ラベルを行なったサンプルの電気泳動後の検出には、高価な蛍光ゲルスキャナ (約1千万円) の利用が常識でした。我々の研究室では、そのように目的も限られている上に高価な器機は持ち合わせていなく、実験開始当時は苦心しました。幸いAlexa Fluor® 488は励起波長がGFPと近いため、GFPの蛍光撮影用に購入していた蛍光撮影装置 (リライオン社製：約30万円) を用いることで高感度の観察・撮影が可能でしたが (図2中)、TMR用の簡便に観察・撮影可能な装置がありませんでした。実際HaloTag® TMRリガンドは細胞膜を透過する性質を持つため、細胞に直接試薬を加えることでSERCA1aのように小胞体膜に局在する膜蛋白質も容易にラベル可能です。従って、Alexa Fluor® 488リガンドに比べ利点が大きいです。そこで、リライオン社に相談したところ、光源部分 (緑色) を約12万円で作成して下さり、現在では図2右のようなイメージを容易にかつ高感度で得ることが可能になりました。

3. 精製

3-1. 最適界面活性剤の選別

膜蛋白質の精製で最も重要なことの1つに、最適な界面活性剤の選択があります。界面活性剤には多くの種類（疎水性部分や親水性部分の性質に違いがある）があり、1つの膜蛋白質に最適なものが他のものに有用であるとは限りません。我々は、膜蛋白質と界面活性剤の相性を、膜蛋白質の活性を評価する事で行なっています。例えば、膜受容体などの場合には、リガンド結合活性の維持などがその指標となるでしょう。

3-2. HaloTag®レジンによる精製

HaloTag®蛋白質はレジンに結合したHaloTag®リガンドとの間で共有結合を形成するため、発現したHaloTag®融合蛋白質を特異的に結合します。HaloTag®蛋白質とのリンカー部位にはTEVプロテアーゼ認識部位があるため、TEVプロテアーゼの溶出溶液への添加で、目的蛋白質のみの回収が可能です。純度の高い精製標品を得るには多少の工夫も必要です。例えば、融合蛋白質に対するHaloTag®レジンの許容量の測定も必要でしょう（実際、目的蛋白質や精製条件により大きく変わります）。必要最小限のレジンを用いることで非特異的に結合するコンタミ蛋白質を最小限に抑える事が可能です。また、カラムウォッシュ等の際に活性保持に必須な脂質が流れ出てしまい、結果的に失活してしまう例も多いです。精製最中の活性保持のための脂質添加も考慮されることの1つでしょう。SERCA1aの場合、マイクロソーム画分の約20%がHaloTag®融合SERCA1aで（図3②）、そのほぼ全てを界面活性剤C₁₂E₈で抽出できました（図3③）。また、レジンに結合した蛋白質の大半をTEVプロテアーゼの添加により回収できました（図3④）。これでも~90%の純度ですが、結晶化のためには更にもう一段の精製を行なっています（図3⑤）。

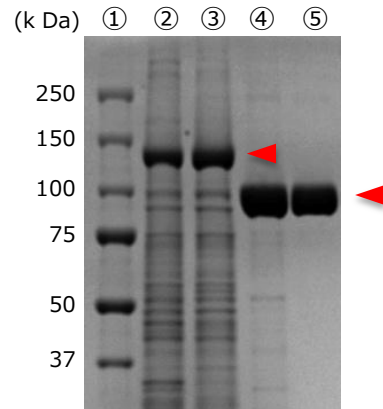


図3：発現SERCA1aの精製

変異アデノウイルスにより発現したSERCA1aの精製を行ないました。①はMWマーカー、②は発現した細胞のマイクロソーム画分、③は界面活性剤C₁₂E₈で可溶化を行なったもの、④はHaloTag®精製時の溶出画分、⑤は他カラムで更に精製したものを示します。各レーン5 µgずつロードし、CBB染色を行なっています。赤矢印はSERCA1aの位置を示します。②③ではHaloTag®が融合しているため、MWは約144kDaですが、④⑤はHaloTag®蛋白質（約34kDa）除去後のため、約110kDaにあることが分かります。

こんなところで苦労しました

HaloTag®は本プロジェクトの開始時（今から約7年前）に丁度出てきた商品であり、最初の頃は疑心暗鬼で実験を行っていました。当時はプロメガでもイメージングを全面に出す宣伝ばかりで、精製に関しては膜蛋白質はおろか水溶性蛋白質でも応用例が報告されておらず、ほぼ全てを自分達で検証してゆく必要がありました。例えば、レジンへの結合はマニュアルでは低温（4℃）でも可能とのことでしたが、SERCA1aの場合は、低温（4℃）では結合せず、最適な温度を色々試す必要がありました。また、レジンの許容量も公称値とは大きく異なりました。当たり前のことであるでしょうが、どの膜蛋白質にも個性があり、それに応じた対処が必要なのだと思います。その点、我々はSERCA1aの性質を知り尽くしており、これが本プロジェクトの遂行のためにも多に役立ちました。つまりは、自分の標的蛋白質を良く理解するというのが、成功への近道なのかもしれません。

参考文献

Toyoshima, C., Iwasawa, S., Ogawa, H., Hirata, A., Tsueda, J., Inesi, G.
Nature **495**:260-4 (2013). Crystal structures of the calcium pump and sarcolipin in the Mg²⁺-bound E1 state.

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Flexi® ORF Clone (Flexi® HaloTag® Type)	1クローン	オンラインカタログをご覧ください	50,000~
pFN21K HaloTag® Flexi® Vector	20µg	G2831	51,000
pFC14K HaloTag® CMV Flexi® Vector	20µg	G9661	51,000
HaloTag® TMR Ligand	30µl	G8251	80,000
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	30µl	G1001	80,000
HaloTag® Mammalian Protein Purification System	1システム	G6790	89,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス ● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 ● E-mail: prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

販売店: