

ヒト培養細胞を用いた組換え蛋白質の発現

-293 系統細胞によるスタンダードプロトコール-

¹九州大学医学研究院、²九州大学生体防御医学研究所

橋口 隆生¹、梶川 瑞穂²、竹田 誠¹、柳 雄介¹、前仲 勝実²

(投稿日 2008/4/30、再投稿日 2008/5/14、受理日 2008/5/15)

キーワード：ヒト培養細胞、組換え蛋白質、293SGnTI(-)細胞、293T 細胞、
大量発現、X 線結晶構造解析

概要

大腸菌発現系は安価で簡便だが、適切な構造を保った状態での発現や封入体からのリフォールディングが困難な場合がある。そこで、本プロトコールでは大腸菌発現系では発現が困難な組換え蛋白質をヒト培養細胞株を用いることで大量発現させるための方法を述べる。本方法により得られた蛋白質は生化学的な機能解析のみならず、X 線結晶構造解析にも適している。

装置、器具、試薬

クリーンベンチ 細胞培養用 (各社)

細胞培養用 CO₂ インキュベーター (各社)

CO₂ ポンペ (各社)

15cm 細胞培養用ディッシュ (各社)

細胞培養用ローラーボトル (各社)

ローラーボトル培養用インキュベーター (各社)

恒温水槽 培地を 37.0°C に温める際に使用 (各社)

滅菌フィルター (各社)

細胞：293T 細胞または 293 細胞 主に機能解析用 (各社)

293SGnTI(-)細胞 主に X 線結晶構造解析用 (要問い合わせ)

DMEM 培地 1.9L (ディッシュ) または 7.5L (ローラーボトル) (各社)

牛胎児血清(FCS) 120mL または 425mL (各社)

L-グルタミン(200mM) 100X で使用 (各社)

非必須アミノ酸(10mM) 100X で使用 (GIBCO、code :11140-050)

ポリエチレンイミン(P. E. I.) 1mg/mL 水溶液で使用 (Aldrich、code :408727)

セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合 :

L-メチオニン、L-システインの入っていない DMEM に L-セレノメチオニン(30mg/L) と L-システイン(63mg/L)を加える (各社)

10xPBS(-): 1L 分。これを 10 倍希釈して使用。

| | |
|--|-------|
| NaCl | 80g |
| KCl | 2g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |
| Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O | 21.6g |

トリプシン溶液 PBS(-)でトリプシンの最終濃度が 0.1%になるように溶かす。さらに、最終濃度が 0.02% になるよう EDTA を加える。

プラスミドベクター ヒト培養細胞で発現可能なもの (各社)

(著者らは SV40 ori を持った蛋白質発現用プラスミドを使用し、同時に SV40 large T antigen 発現プラスミドを 1/10 等量入れて目的蛋白質の収量を上げている)

実験手順

まずは 10% FCS DMEM と 293 系統の細胞を 9cm ディッシュ 1 枚分、準備しておく。

-15cm ディッシュを用いる場合(図 1A) -

最終的に 15cm ディッシュ 33 枚分まで増やす。

第 1 日目

細胞の継代。(15cm ディッシュ 3 枚へ)

第 2-3 日目

細胞培養。

第 4 日目

細胞の継代。(15cm ディッシュ 33 枚へ)

第 5 日目

細胞培養。

第 6 日目

1. 0% FCS DMEM を準備。
2. プラスミドのトランスフェクション。

第 7-9 日目

細胞培養。(蛋白質発現)

第 10 日目

1. 蛋白質の回収。
2. ディッシュをオートクレーブ。

-ローラーボトルを用いる場合(図 1B)-

最終的にローラーボトル 15 本分まで増やす。

第 1 日目

細胞の継代。(15cm ディッシュ 3 枚へ)

第 2-3 日目

細胞培養。

第 4 日目

細胞の継代。(15cm ディッシュ 15 枚へ)

第 5 日目

細胞培養。

第 6 日目

細胞の継代。(ローラーボトル 15 本へ)

第 7-8 日目

細胞培養。

第 9 日目

1. 0% FCS DMEM を準備。
2. プラスミドのトランスフェクション。

第 10-11 日目

細胞培養。(蛋白質発現)

第 12 日目

1. 蛋白質の回収。
2. ローラーボトルをオートクレーブ。

実験の詳細

ディッシュを用いる場合

第1日目

9cm ディッシュにほぼコンフルエント (培養細胞が接着面いっぱいに広がっている状態) になった 293SGnTI(-) 細胞を PBS(-) 4mL で洗い、取り除いた後、トリプシン溶液 0.4mL を加え細胞を剥がす。この間に 15cm ディッシュ 3 枚へ 10% FCS DMEM を 22mL ずつ分注しておく。トリプシン処理をした細胞のディッシュに 10% FCS DMEM を 9mL 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 15cm ディッシュ 1 枚当たり 3mL ずつ注ぎ均一になるように混ぜる。最終的に 3 枚分になる。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第2-3日目

細胞培養。(ほぼコンフルエントになるまで)

第4日目

まず、830mL の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15cm ディッシュ 3 枚のほぼコンフルエントになった細胞を 1 枚当たり PBS(-) 4mL で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8mL を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9mL 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 830mL の 10% FCS DMEM に懸濁させる。新しい 15cm ディッシュに 1 枚当たり 25mL ずつ、33 枚注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第5日目

細胞培養。

第6日目

細胞が 80-90%コンフルエントになっているので、トランスフェクションを行う。

1. 0%FCS DMEM 75mL にプラスミド 1800 μ g を混ぜたもの
2. 0%FCS DMEM 75mL に P. E. I. 2.7mL (1mg/mL) を混ぜたもの

を用意し、2 を 1 に混ぜ、20 分待つ。

20 分後、FCS の最終濃度が 2% になるように調整した DMEM 900mL に加える (トランスフェクション溶液: 合計 1.05L)。次に、細胞が育っているディッシュから

培地を全て抜く。その各ディッシュにトランスフェクション溶液を 31mL ずつ注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

(セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合は、この段階で L-メチオニン、L-システインのっていない DMEM に L-セレノメチオニン(30mg/L) と L-システイン(63mg/L)を加えた培地を使う。その他の作業は同様である。)

第 7-9 日目

細胞培養。(蛋白質発現)

第 10 日目

分泌蛋白質として発現させた場合は上清を回収。我々は基本的に可溶型にして発現させているので上清から目的蛋白質を回収するが、細胞内蛋白質の場合、培地を除き、PBS(-)で洗った後、セルスクレイパーで細胞を剥がす。それを PBS(-)に懸濁させて遠心(4°C、200xg、5min)して集め、上清を取り除いた後に細胞溶解バッファーで溶かす(細胞内蛋白質の場合、ダメージが大きいため蛋白質発現の際の培養期間を 2 日程度にした方が良い)。その後、精製へ。細胞培養に使ったディッシュはオートクレーブにより滅菌処理を行い、捨てる。

ローラーボトルを用いる場合 (表面積 850cm²)

第 1 日目

9cm ディッシュに 90%コンフルエントになった 293SGnTI (-)細胞を PBS (-)4mL で洗い、取り除いた後トリプシン溶液 0.4mL を加え細胞を剥がす。この間に 15cm ディッシュ 3 枚へ 10% FCS DMEM を 22mL ずつ分注しておく。トリプシン処理をした細胞のディッシュに 10% FCS DMEM を 9mL 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 15cm ディッシュ 1 枚当たり 3mL ずつ注ぎ均一になるように混ぜる。最終的に 3 枚分になる。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 2-3 日目

細胞培養。

第 4 日目

まず、380mL の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15cm ディッシュ 3 枚の 90%コンフルエントになった細胞を 1 枚当たり PBS (-)4mL で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8mL を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9mL 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 380mL の 10% FCS DMEM に懸濁させる。各ディッシュ当たり 25mL ずつ、15 枚注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 5 日目

細胞培養。

第 6 日目

まず、3L の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15cm ディッシュ 15 枚の細胞がほぼコンフルエントになっているので、ローラーボトル (850cm²) へ細胞を継代する。(15cm ディッシュ 1 枚をローラーボトル 1 本へ継代することになる。) 1 枚当たり PBS (-)4mL で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8mL を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9mL 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 3L の 10% FCS DMEM に懸濁させる。(我々は 1L の IWAKI のガラスのボトル 3 本を用意して、1L の培地に 15cm ディッシュ 5 枚分の細胞懸濁液を混ぜて継代している。) 各ローラーボトル当たり 200mL ずつ、15 本注ぐ。そこへ 0.22

μm フィルターを通した CO_2 をパスツールで直接 5 秒ほど送り込み、フタをして密閉する (図 2)。これを 37.0°C のローラーボトル用培養機内で培養する。ローラーボトルに細胞懸濁液を注いだ後は、速やかに培養機へと移す。

(CO_2 の充填は培地の pH 変化を小さくするための措置で、ローラーボトル培養装置内に CO_2 が充填できる場合は、ローラーボトル内に直接 CO_2 を充填する必要は無い)

第 7-8 日目

細胞培養。

第 9 日目

細胞が 70-80%コンフルエントになっているので、トランスフェクションの準備をする。(細胞の育ち具合は目視で。職人的な感が頼り。70-90%コンフルエント。ローラーボトルを間に挟めるタイプの顕微鏡があればより正確に確認できる。)

時間がかかるので、7.5 本分ずつ用意してトランスフェクションする。

1. 0% FCS DMEM 100mL にプラスミド 1.8mg を混ぜたもの ($240\ \mu\text{g}$ /ローラーボトル 1 本)
2. 0% FCS DMEM 100mL に P. E. I. 2.7mL (1mg/mL) を混ぜたもの ($360\ \mu\text{g}$ /ローラーボトル 1 本)

を用意し、2 を 1 に混ぜ、20 分待つ。

20 分後、FCS の最終濃度が 2%になるように調整した DMEM 1700mL に加える (トランスフェクション溶液 : 合計 1.9L)。次に、細胞が育っているローラーボトルから培地を全て抜く。その各ローラーボトルにトランスフェクション溶液を 250mL ずつ注ぐ。そこへ $0.22\ \mu\text{m}$ フィルターを通した CO_2 をパスツールで直接 5 秒ほど送り込み、フタをして密閉する。これを 37.0°C のローラーボトル用培養機内で培養する。これを 2 セット繰り返して、計 15 本のローラーボトルにトランスフェクションを行う。ローラーボトルにトランスフェクション溶液を注いだ後は速やかに培養機 (37.0°C 、0.5rpm) へと移す。

(セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合は、この段階で L-メチオニン、L-システインのっていない DMEM に L-セレノメチオニン (30mg/L) と L-システイン (63mg/L) を加えた培地を使う。その他の作業は同様である。)

第 10-11 日目

細胞培養。(蛋白質発現)

第 12 日目

分泌蛋白質として発現させた場合は上清を回収。我々は基本的に可溶型にして発現させているので上清から目的蛋白質を回収するが、細胞内蛋白質の場合、培地を除き、PBS(-)で洗った後、0.02% EDTA 入りの PBS(-)を入れたボトルを軽くふって細胞を剥がす。その細胞懸濁液を遠心 (4°C、200xg、5min) して集め、上清を取り除いた後に細胞溶解バッファで溶かす (細胞内蛋白質の場合、ローラーボトルの培養だと細胞のダメージが大きいのでディッシュを用いた方法をお勧めする)。その後、精製へ。細胞培養に使ったローラーボトルはオートクレーブにより滅菌処理を行い捨てる。

工夫とコツ

ディッシュを用いた蛋白質の大量発現

現在は多くの研究室に細胞培養のための設備が整っているので、ディッシュを使えば新たな設備投資は必要ないのですぐに本方法を導入できる。ディッシュはNUNCの15cm ディッシュ (商品 code :168381) を使っている。

ローラーボトルによる蛋白質の大量発現

新たな設備投資が必要になってくるが、発現系を大きくしたいときはローラーボトルを用いることで限られたスペースで細胞培養面積を拡大することが出来る。ローラーボトルはCORNINGの内容容量2L 表面積850cm²のものを使用している。(商品 code :430849)

細胞培養用培地

著者は細胞培養に使うDMEMを10Lの粉末タイプとしてMP Biosciencesから購入している。水に溶かして0.22 μ m フィルターに通す(滅菌処理) 必要があるが、より安価である。また、トランスフェクション前に細胞を元気な状態に保ちたいことや蛋白質発現時に血清を2%に抑えるのでL-グルタミンや非必須アミノ酸やHEPESを添加している。

DMEM 500mL に対して、

7.5% NaHCO₃ 水溶液 10mL

100X L-グルタミン水溶液 5mL

100X 非必須アミノ酸 (10mM) 5mL (GIBCO、code :11140-050)

1M HEPES 1.5mL

FCS 各濃度 (10%や2%)

ポリエチレンイミン(Polyethlenimine, P.E.I.)

一般にヒト細胞へのプラスミドのトランスフェクションには非常に高価なトランスフェクション試薬が使われているが、そのような試薬を使うと莫大なコストがかかるので、本実験系では極めて安価なポリエチレンイミンという試薬を使っている。これを使うことで安価に、そして、容易にヒト培養細胞での蛋白質の大量発現を行うことが出来るようになった。著者らはAldrich (code :408727) を使っている。約1000倍に水で希釈して使うので一度購入すると一生かかっても使いきれないほどの量がある。

ヒト培養細胞

ヒト細胞を使うメリットは得られる蛋白質の大部分が適切な構造を保っている点である。我々は大腸菌発現系では封入体を形成させた後に可溶化し、それをリフォールディングするという方法をとっているが、ヒト細胞の場合そうしたリフォールディングの条件検討や時間を省くことが出来る。ただし、大腸菌に比べ作業工程に日数を要する、収量が低く、コストが非常にかかるというデメリットもある。また、糖タンパク質の場合、しばしば糖鎖が結晶化の阻害要因になる。しかし、293SGnTI(-)細胞 (N-acetylglucosaminyltransferase I 活性を欠損させた HEK293S 細胞。文献 1-5 参照) を用いれば、均一なハイマンノース型 (Man5GlcNAc2) の糖蛋白質を得ることが出来、さらに EndoH 処理により糖鎖を除去することも出来る。

謝辞

本発現系の導入においては英国 Oxford Univ. の Jones, E. Y.、Davis, S. J.、Aricescu, A. R.、各氏ににお世話になりました。

文献

- 1) Hashiguchi T. et. al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **104**, 19535-40 (2007)
- 2) Hashiguchi T. et. al., *J Virol Methods.*, **149**, 171-4 (2008)
- 3) Aricescu A. R. et.al., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*, **62**, 1114-24 (2006)
- 4) Chang V.T. et.al., *Structure.*, **15**, 267-73 (2007)
- 5) Reeves P.J. et.al., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 13419-24 (2002)

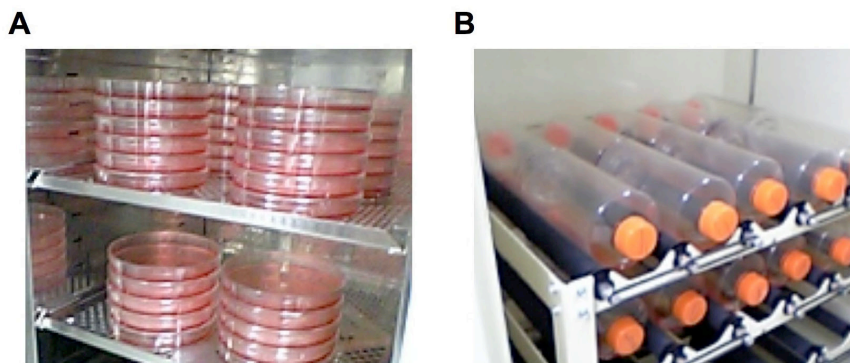


図1 :ヒト細胞発現系の写真

(A)15 cm ディッシュを用いて37.0℃,5.0% CO₂の環境下で細胞培養を行っている。
(B)ローラーボトルを用いて37.0℃,0.5 rpmの環境下で細胞培養を行っている。



図2 : ローラーボトルへの N_2 の充填

作業はクリーンベンチ内で行い、チューブの間に0.22 μ mのフィルターをつないで先端にはパストゥールピペットを取り付けている。各実験ごとにパストゥールピペットを付け替えればコンタミは防げる。培養液面が軽く凹む程度の圧力で N_2 を5秒ほど充填し、すぐにフタをして密閉する。