

On Column Refolding 法による大腸菌封入体からの蛋白質精製

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

竹原 清日

(投稿日 2008/5/12、再投稿日 2008/5/26、受理日 2008/5/26)

キーワード：精製、Refolding、封入体、IMAC、His-tag

概要

On Column Refolding とは、蛋白質を変性条件下でカラムに固定し、移動相の変性剤濃度を徐々に下げて、カラム上で Refolding させる手法のことである。組換え型蛋白質の生産において、大腸菌が持つ低コスト・高生産効率は圧倒的であるが、この系ではしばしば、多量発現された目的蛋白質が菌体内で封入体を形成する。利用者はまず、目的蛋白質をいかにして多く上清画分に得るか工夫を凝らすのが、それが困難な場合、封入体を変性させて Refolding させる方法を検討する。Refolding には、希釈、透析、ゲル濾過などの方法があるが、まずは希釈法を試すのが定法である。本稿では、希釈法で行詰った場合の第二・第三の選択肢として、His-tag (Histidine tag) を持つ蛋白質を IMAC (Immobilized Metal-Affinity Chromatography) 担体に固定し、On Column Refolding させる手法について紹介する。

実験手順の概要

封入体の精製と変性 [1 日]

↓

IMAC 担体の準備 [30 分]

↓

IMAC 担体に変性させた His-tag 蛋白質を結合 (バッチ法) [30 分]

↓

担体をカラムに詰め、平衡化する [60 分]

↓

変性状態で His-tag 蛋白質を溶出 (変性状態での精製) [15 分]

↓

溶出蛋白質を再びバッチ法で Ni-キレート担体に結合 [30 分]

↓

担体をカラムに詰め、カラムを平衡化する [60 分]

↓

蛋白質の On Column Refolding [1 時間～overnight]

↓

Refolding した His-tag 蛋白質を溶出する [15 分]

On Column Refolding 法を実施する前に：検討事項チェックリスト

On Column 法を試す前に、以下の条件をクリアしているかどうか確認すること。

- 目的蛋白質に His-tag が付いている
- Ni-NTA(QIAGEN 社製) のような IMAC 担体が研究室にある
- XK カラム (GE Healthcare 社製) のような空カラムが研究室にある
- 濃度勾配がつけられる FPLC または HPLC システムが研究室にある
- 目的蛋白質は、pH7~8 くらいの条件で Refolding が可能である
- 目的蛋白質は Cys を含まない

まず、カラムへの固定に His-tag を利用するので、His-tag 蛋白質であることが必須である。そして、IMAC 担体やカラム、Refolding のための FPLC システム等が必要である。これらの器具・機器は、組換え型蛋白質の精製を実施している研究室では保有している場合が多いが、比較的高価な品なので、On Column 法をトライするためだけに新規購入するのは高リスクである。また、IMAC の性質上、pH7~8 くらいの条件で Refolding できる蛋白質でなければならない。

この手法の一番の問題点は、Cys を含む蛋白質では実施が極めて困難なことである(文献上では成功例がいくつもある)。含 Cys 蛋白質の Refolding には酸化・還元反応のコントロールが重要であるが、IMAC は原則還元条件下では行えない。最近では比較的還元剤に強い担体が販売されているが、それでも長時間(overnight)、変性剤存在下での使用に耐える商品は、筆者がこれまで色々試した範囲では無かった。希釈法で上手くいかない蛋白質の多くが Cys を含むだけに、この欠点はなり痛い。以下に挙げる On Column Refolding 法の成功例(1-9)や総説(10, 11)等を実施の参考にして頂きたい。

On Column Refolding 法の利点

- カラムに固定することで蛋白質分子間に一定の距離が確保できる。従って、Refolding 中間体どうしが結合して起こる凝集反応が阻止できる。
- Refolding ステージごとに温度や buffer の組成を自在に変えることができる。例えば、初期段階では界面活性剤を添加し、4°C で Refolding させることで急激な構造形成による mis-folding を抑制する。その後は 25°C にて界面活性剤と変性剤を速やかに減らし、迅速に Refolding を進める---など、条件を自在に変えることができる。
- バッチ法で担体を繰り返し利用するので、ゲル濾過のようにカラムを壊す心配がない。

On Column Refolding 法の成功例

蛋白質名(UniProt 番号、酵素番号、アミノ酸残基数、参考文献)で表記する。

- human prion protein(P04156, 253AA, 文献 1)

- bovine prion protein(P10279, 264AA, 文献 2)
- Interleukin-4(P05112, 153AA, 文献 3)
- DevS histidine protein kinase(P95194, EC 2.7.3.-, 578AA, 文献 4)
- Glutamyl-tRNA reductase(P0A6X1, EC 1.2.1.70, 418AA, 文献 5)
- α -Tocopherol transfer protein(P49638, 278AA, 文献 6)
- β -glucosidase(P49235, EC 3.2.1.21, 566AA, 文献 7)
- exopolyphosphatase(Q7Z032, EC 3.6.1.11, 383AA, 文献 8)
- N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase(Q44185, EC 3.5.1.77, 304AA, 文献 9)

試薬・器具

Ni-NTA agarose (QIAGEN 社製 30230) [*1]

XK16/20 カラム (GE Healthcare 社製 18-8773-01) [*2]

グラスフィルター：内径 67mm くらいが使いやすい

グアニジン塩酸塩(Gdn-HCl, SIGMA 社製 G4630) [*3]

buffer A : 6M Gdn-HCl-10mM imidazole-0.1M NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8 [*4][*5]

buffer B : 6M Gdn-HCl-300mM imidazole-0.1M NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8

buffer C : 6M Gdn-HCl-0.1M NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8

buffer D : 10% glycerol-6M Gdn-HCl-0.1M NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8 [*6][*7]

buffer E : 10% glycerol-0.1M NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8 [*6][*7]

buffer F : 10mM imidazole-20mM NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8

buffer G : 300mM imidazole-20mM NaCl-20mM Na-リン酸, pH7.8

Lysis buffer : 20mM Na-リン酸-0.5M NaCl-10mM imidazole-1mM EDTA, pH7.8

Washing buffer : 0.1% Triton X-100-20mM Na-リン酸-0.1M NaCl-10mM imidazole, pH7.8

塩化リゾチーム (SIGMA 社製 L2879 など)

プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche 社製 11-873-580-001 など)

【Tips】

*1 : Ni Sepharose (GE Healthcare 社製) や、予算が許せば Talyon (Clontech 社製) でも可。
担体洗浄時に 0.5M NaOH を使用するの、これに耐える支持体であること。

*2 : 担体の入れ替えが簡単で、恒温槽に接続して温度コントロールができる XK カラムが
お勧め。サイズは 16/20 くらいが使いやすい。

*3 ★重要★ 変性剤はグアニジン塩酸塩 (Gdn-HCl) を使用する。

文献では、変性剤に尿素を使用する例が圧倒的に多いが、これは変性剤を大量に使用するこの系において、Gdn-HCl が尿素より高コストであるためだと筆者は推測している。
しかし、尿素に比べ Gdn-HCl は以下の点で使いやすい。

(1) 尿素溶液は pH が上昇しやすく原則用時調製だが、Gdn-HCl 溶液は数週間保存可能。

(2) Gdn-HClの方が変性能が高く、8M尿素で完全に変性しない蛋白質が、6M Gdn-HClではランダム状態にまで変性する場合が多々ある。

(3) 8M尿素は4°Cでは尿素が析出するため使用できないが、6M Gdn-HClは4°CでもGdn-HClが析出せず使用可能。

On Column Refoldingにおいて、封入体の変性が不完全な場合、Refolding効率が下がる傾向がある。よって、筆者はGdn-HClの使用を強く勧める。コストに関しては、SIGMA社製G4630(5kgで約¥25,000)を使用すれば尿素と大きな差はない。この製品は固化防止剤として0.4%のSiO₂を含むが、bufferに溶解後、遠心し、フィルターで濾過すれば除くことができる。また、SiO₂を含まない5kgで4万円弱の製品もいくつか販売されている。

*4: 緩衝液にTris、HEPES、MOPS系を使用しない(Niイオンを還元するため)。リン酸またはリン酸-クエン酸系を使用する。

*5: imidazoleは非His-tag蛋白質の結合を避けるために添加する(0~20mM)。

*6: 長時間カラムに流し続けるbufferなので、imidazoleを添加しない。

*7: glycerolは蛋白質の凝集抑制のための添加剤である。目的蛋白質の性質により、他の糖や界面活性剤、Argなどを添加しても良い。また、このような添加剤を全く使用しなくても良い。

実験手順の詳細

以下はCysを含まない蛋白質で実施する場合の手順である。

I. 封入体の精製と変性

(1) 5~10gの菌体をよく冷やしたLysis bufferに懸濁し、プロテアーゼインヒビターカクテル(適量)と40mgの塩化リゾチームを加えて全量40mLとなるよう調製する。これを、氷水上で30分間インキュベーションする。

(2) 容器を氷水につけたまま超音波破碎機で菌体を破碎し、その後3500gで15分間遠心する。

(3) 得られた不溶性画分を約100mLのWashing bufferに懸濁する。この時、Washing bufferは少しずつ加えて菌体がダマにならないようにする。ガラス棒やボルテックスミキサーを駆使しても均一に懸濁できない場合は、超音波破碎機を使う。

(4) 遠心→沈殿画分の回収→Washing bufferへの懸濁を5~10回繰り返して封入体を精製する。白い片栗粉のような沈殿物のみになればOK。沈殿物の上に茶色のブヨブヨしたものが残っている場合は洗浄が不十分である。

- (5) 沈殿物を buffer F に懸濁し、遠心して沈殿画分を回収する。この洗浄操作を 2 回繰り返す。
- (6) 得られた沈殿画分をガラス棒等でかき混ぜてよくほぐしてから(重要!）、30mL の buffer A を加え、素早くガラス棒とボルテックスミキサーを駆使してかき混ぜ沈殿を溶かす。少々沈殿が溶けずに残っても次のステップで溶けるので心配はない。
- (7) 遠沈管にフタをし、室温にて 15~60 分間シェーカー上でゆっくりと転がして蛋白質を変性させる。60 分以上振とうしても沈殿が残る場合は超音波破碎機を使用してもよい。
- (8) 変性蛋白質溶液を 10000g で 20 分間遠心し、上清をフタ付き瓶(250mL くらいでガラスよりも樹脂製がよい)に回収する。これを 4°C で保存し、16 時間以内に次のステップへ進む。数日置く場合は、手順(5)が済んだ段階の沈殿を-25°C で保存する。

II. 変性状態での精製

- (9) Ni 付加済みの Ni-NTA agarose (約 50mL、以下 Ni-NTA と略する)をガラスフィルターにあげ、減圧しながら純水で洗浄する。
- (10) buffer A を 100mL 注ぎ、スパテラで担体を傷めないよう軽く混ぜ、自然落下で buffer が落ち切るのを待つ。この操作を 2 回繰り返す。
- (11) buffer A で洗った Ni-NTA を手順(8)で準備した変性蛋白質溶液に入れる。始めはスパテラを使って入れ、ガラスフィルターやスパテラに残った Ni-NTA は洗瓶に入れた buffer A で洗い流して入れる。
- (12) 室温で 30~60 分間、シェーカー上で容器をゆっくりと転がして担体に His-tag 蛋白質を結合させる。
- (13) XK カラムを buffer A でリンスした後、上記担体を buffer A で洗いながらカラムに詰める。少々泡や隙間があっても問題ないので、手早く詰めること。
- (14) カラムを FPLC (または HPLC) システムに接続し、3 ベッド容量の buffer A をカラムに流して担体を洗浄する。流速は、カラムの耐圧範囲であれば、5mL/min くらいまで OK。
- (15) buffer B を流して His-Tag 蛋白質を溶出する。圧が許せば流速は 5mL/min でよい。
- (16) 目的蛋白質に相当するピーク画分を手順(8)と同様のフタ付き瓶に回収する。その後、OD₂₈₀ などにより、蛋白質濃度を定量する。

【Tips】

*この「II. 変性状態での精製」を行うところがこのプロトコールのポイントである。文献で報告されている On Column Refolding 法のほとんどは、この精製ステップを省略している。しかし、封入体変性物からいきなり Refolding すると、目的蛋白質がプロテアーゼに切られたり mis-folding したりする割合が増え、収率が著しく低下する。また蛋白質量が不明であるため、Refolding 条件を一定にすることが困難である。変性状態で一度アフィニティー精製し、蛋白質量を明確にしてから、On Column Refolding へ進むことを強く推奨する。

III. 蛋白質の On Column Refolding

- (17) 手順(16)の蛋白質液を buffer C で 10 倍希釈し、imidazole 濃度を下げる。
- (18) 以下、手順(9)～(14)と同様にして蛋白質を Ni-NTA に結合し、カラムの準備をする。ただし、Ni-NTA の量は蛋白質量に応じて調整する。[*8][*9]
また当然ながら、II で使用した Ni-NTA を未洗浄のまま使用してはならない。できれば前日までに、II と III で使用するに足る洗浄済 Ni-NTA を準備しておく。
- (19) FPLC システムに buffer D、buffer E をセットする。また、カラムと恒温槽を適当なチューブで繋いで、目的の温度セットにする。
- (20) 流速は 1～2mL/min(または線流速 0.5～1cm/min)で、2 ベッド容量の buffer D をカラムに流す。
- (21) FPLC の濃度勾配プログラムを使って Gdn-HCl 濃度を徐々下げ、蛋白質を Refolding させる。[*10]
- (22) 流速 1～2mL/min(または線流速 0.5～1cm/min)で、2 ベッド容量の buffer F をカラムに流す。
- (23) buffer G で His-Tag 蛋白質を溶出する。圧が許せば流速は 5mL/min でよい。
- (24) 目的蛋白質に相当するピーク画分を回収し、イオン交換クロマトグラフィーなどで更に精製を進める。[*11]

【Tips】

*8 : 先の「II. 変性状態での精製」ではプレパックカラムを使用しても良いが、On Column Refolding は必ずバッチ法で蛋白質を担体に結合させること。すでにカラムに詰められた担体に蛋白質を結合させると、カラムの上流に蛋白質が集中し、Refolding 効率が低下する。

- *9: Ni-NTA は 1mL 当たり、5~10mg の蛋白質結合容量を有するが、蛋白質濃度が高いと Refolding 効率が低下する。筆者は蛋白質 10mg に対し、50mL の Ni-NTA を使用している。
- *10: Refolding 条件(温度、濃度勾配のパターン、添加剤の有無など)は蛋白質により千差万別なので、まずは文献を参考に決める。しかし、既に folding 過程がある程度分かっているものであれば、それを基に系を構築すれば良い。よく使われる条件は、25°Cにおいて8ベッド容量の buffer を線流速 0.5~2cm/min で流し、変性剤をリニアで 0 M にまで下げていくというパターンである。
- *11: この試料は相当量の mis-folding 蛋白質を含むので、更なる精製が不可欠である。しかし、この試料をいきなり Mono-Q などに通すと、mis-folding した蛋白質がカラムに結合し、カラムにかかる圧が急上昇して、最悪の場合、カラムを壊す破目になる。筆者のお勧めは、まずはこの試料を HiTrap Q HP (GE Healthcare 社製 17-1154-01) に通して mis-folding 蛋白質を除き、その後必要に応じて Mono-Q やゲル濾過で精製する方法である。HiTrap Q HP はこの試料を流しても圧の上昇が少なく、定法通りの NaCl 濃度勾配では fold した蛋白質が溶出し、mis-folding した蛋白質はカラムに貼り付いて出てこないなので、mis-folding 蛋白質のふるい分けができる。このカラムに貼り付いた mis-folding 蛋白質は、0.5M NaOH-1M NaCl をカラムに通せば落ちるので、HiTrap Q HP カラムの再生・再利用は可能である。

Ni-NTA の洗浄

カラム上で蛋白質を Refolding させるため、相当量の mis-folding 蛋白質が非特異的相互作用で担体に結合する。よって担体は以下の手順で速やかに洗浄し、再生すること。ただし、蛋白質により、下記に示した NaOH での洗浄に加え、界面活性剤や酢酸、プロパノール等を用いた洗浄も必要な場合がある。また、「II. 変性状態での精製」で使用した Ni-NTA は、下記(3)(4)のステップを省略して洗浄すればよい。

試薬

- 0.3M EDTA-Na-1M NaCl, pH8.0
- 0.5M NaOH-1M NaCl
- 0.1M Na-リン酸-1M NaCl buffer, pH7.8
- 0.1M NiSO₄

- (1) Ni-NTA をカラムからガラスフィルターへ移す。Ni-NTA は高価なので、洗瓶に入れた純水でカラムを洗い、極力無駄のないようガラスフィルターへ移す。
- (2) 0.3M EDTA-Na-1M NaCl (pH8.0) を約 100mL 注ぎ、スパテラで担体を傷めないよう軽く混ぜ、自然落下で液が落ち切るのを待つ。この操作を 2 回繰り返す。Ni の青味が残っている場合は、更にこの操作を繰り返す。

- (3) 0.5M NaOH-1M NaCl を約 100mL 注ぎ、手順(2)と同様の操作を 2 回繰り返す。
- (4) 減圧しながら約 500mL の 0.1M Na-リン酸-1M NaCl buffer で担体を洗う。
- (5) 減圧しながら純水で担体を十分に洗う。
- (6) 0.1M NiSO₄を約 100mL 注ぎ、スパテラで担体を傷めないよう軽く混ぜ、自然落下で液が落ち切るのを待つ。
- (7) 手順(5)と同様に洗浄する。
- (8) 1 週間以内に使用する場合は 4℃にてミリ Q 水中で保存する。しばらく使用しない場合は 4℃にて 20%エタノール中で保存する。

参考文献

- 1) Zahn R., et al, *FEBS Lett.*, **417**, 400-4 (1997)
- 2) Yin S-M., et al, *Protein Expr. Purif.*, **32**, 104-9 (2003)
- 3) Razeghifard MR, *Protein Expr. Purif.*, **37**, 180-6 (2004)
- 4) Saini DK., et al, *Protein Expr. Purif.*, **25**, 203-208 (2002)
- 5) Schauer S., et al, *Protein Expr. Purif.*, **31**, 271-275 (2003)
- 6) Panagabko C., et al, *Protein Expr. Purif.*, **24**, 395-403 (2002)
- 7) Zouhar J., et al, *Protein Expr. Purif.*, **17**, 153-162 (1999)
- 8) Lemercier G., et al, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **786**, 305-309 (2003)
- 9) Chen HM., et al, *Biotechnol. Prog.*, **19**, 864-873 (2003)
- 10) Holzinger A., et al, *QIAGEN News*, **4**, 14-15 (1996)
- 11) Jungbauer A., et al, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 487-94 (2004)