

## GFP タグを利用した原核生物由来膜タンパク質の発現系評価

東京大学・医科学研究所・基礎医科学部門

服部 素之

(投稿日 2010/1/7、再投稿日 2010/1/25、受理日 2010/1/26)

キーワード：構造生物学、膜タンパク質、GFP、FSEC

### 概要

その生物学的重要性にも関わらず、膜タンパク質の立体構造解析は今なお一般に困難とされている。その一方、近年、膜タンパク質の構造解析における有力な手法として、GFP タグを用いた Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography (GFP-FSEC) 法が注目を集めている。GFP-FSEC 法では、対象タンパク質を GFP 融合タンパク質として発現させ、可溶化試料に対して蛍光検出機を備えた HPLC を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行う。そして、得られた HPLC のチャートに基づき、発現系の結晶化能評価が行われる。GFP 蛍光は高い感度と特異性を持つため、数 mL 程度の少量培養からの試料を未精製にて発現系の評価を行うことが可能となる。つまり、GFP-FSEC 法を用いることで安価かつより短いタイムスケールでの発現系の結晶化能評価を行うことが可能となる。本稿では、原核生物由来の膜タンパク質の結晶化能評価を目的とした GFP-FSEC 法の実際について述べる。

### イントロダクション

シンクロトロン放射光や解析用ソフトウェアなどにおける近年の数多くの技術的進歩により、構造決定されたタンパク質の数は指数関数的に増加し、現在では Protein Data Bank (PDB) に登録されている構造数は 6 万を超えるに至った。しかしながら、膜タンパク質については PDB 中におけるその登録数は、今なお数百程度に留まっており、その生物学的重要性にも関わらず、膜タンパク質の立体構造解析は依然困難とされている。

タンパク質の構造解析における大きな問題点として

- (1) 組み換えタンパク質としての発現量の乏しさ
- (2) 界面活性剤による可溶化後の膜タンパク質の安定性の低さ

の 2 点が挙げられる。しかしながら、このような膜タンパク質の一般的な傾向とは逆に、

- (1) 組み換えタンパク質としての比較的豊富な発現量
- (2) 界面活性剤溶液中での高い安定性

という上記 2 点の特徴を持った発現系が構造解析を行う上では望ましい。実際、構造解析に成功した膜タンパク質の多くはこれらの特性を満たしており、そのような発現系は高い「結晶化能」を持っていると考えられる。

そのような高い結晶化能を持つ発現系の同定のためには、構造解析対象とするタンパク質の複数のホモログについて発現トライアルを行い、構造解析に適したホモログを同定するというストラテジーが有効である。例えば、筆者らのグループが行ったマグネシウム輸送体 MgtE の構造解析では 7 種類の MgtE ホモログをクローニングし、それらについて発現系の評価を行い、最終的に高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 MgtE を「構造解析に適したホモログ」として同定している(1)。しかしながら、膜タンパク質の発現量、安定性、均一性の評価には、多くの場合、500mL ないし 1L 程度の中規模の培養スケールにて発現・精製を行う必要がある。そのため、多数のホモログに対してこれを行うためには、かなりの時間とコストが要求され、膜タンパク質の構造解析の律速段階となっている。

そのような問題に対する結晶化能評価手法の 1 つとして、GFP タグを利用した Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography (GFP-FSEC) 法がある(2)。GFP-FSEC 法では、対象タンパク質を GFP 融合タンパク質として発現させ、可溶化試料に対して蛍光検出機を備えた HPLC を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行う。対象となるタンパク質の発現量については、ゲルろ過クロマトグラフィーにおけるピークの GFP 蛍光強度の高さにより評価される。また、試料の安定性については、ゲルろ過クロマトグラフィーにおけるピークの形状により評価される。すなわち、「構造解析に適した発現系」はゲルろ過クロマトグラフィーにおいて鋭く、高い単一ピークを示す。GFP 蛍光は高い感度と特異性を持つため、数 mL 程度の少量培養からの試料を未精製にて発現系の評価を行うことが可能である。そのため、GFP-FSEC 法は安価かつより短いタイムスケールでの結晶化能評価を行うことを可能とし、膜タンパク質の構造解析の律速段階のブレイクスルーとなる技術であるといえる。実際、本稿で筆者らが参考とした GFP-FSEC 法の原著論文(2)を発表した Gouaux 博士のグループは GFP-FSEC 法を利用し、膜輸送体の構造解析において大きな成功をおさめている(3-7)。本稿では、原核生物由来の膜タンパク質の結晶化能評価を目的とした GFP-FSEC 法の実際について述べる。

## 装置・器具・試薬

### HPLC

- ・システムコントローラ CBM-20A (島津製作所)
- ・送液ユニット LC-20AD (島津製作所)
- ・オートサンプラ SIL-20AC (島津製作所)
- ・カラムオープン CTO-20A (島津製作所)
- \*システムを低温室に設置する場合は不要
- ・UV-VIS 検出器 SPD-20A (島津製作所)
- ・蛍光検出器 RF-10AXL (島津製作所)
- ・オンラインデガッサ DGU-20A5 (島津製作所)
- ・LC-20AD 用低圧グラディエントユニット (島津製作所)

\*本稿で述べる GFP-FSEC 法には必須ではない。

- 高圧流路切替バルブ FCV-12AH (島津製作所)
- Superose 6 10/300 ゲルろ過クロマトグラフィー用カラム (GE Healthcare)
- 各種バッファー (破碎バッファー、可溶化バッファー、ゲルろ過クロマトグラフィーバッファー)

### 発現プラスミドおよび発現ホスト

- GFP 融合タンパク質発現プラスミド

\*Gouaux 博士より pNGFP-BC (N 末端 GFP 融合タンパク質発現用) および pCGFP-BC (C 末端 GFP 融合タンパク質発現用) の譲渡を受け、それらに対して目的遺伝子をクローニングした。ベクターマップについては筆者らが参考とした原著論文 (2) を参照されたい。

- 大腸菌 C41 (DE3) コンピテントセル (Overexpress)

\*他の BL21 系の大腸菌についても使用可能である

また、大腸菌を用いた組み換えタンパク質の発現については蛋白質科学会アーカイブ「T7 プロモータを利用した大腸菌による組み換え蛋白質の発現」など他稿にその詳細な記述があり、培養および発現のための装置・器具・試薬や実験の詳細についてはそちらを参照されたい。

### 超遠心

- Optima TL 100 ultracentrifuge (Beckman)
- TLA-100.3 rotor (Beckman)

### 超音波碎機

- S-450D (Branson)

### 実験手順

#### 第 1 日

- 1) 目的プラスミドの C41 (DE3) への形質転換

#### 第 2 日

- 2) 前培養

#### 第 3 日

- 3) 本培養と発現誘導

#### 第 4 日

- 4) 膜画分の調製
- 5) 可溶化
- 6) HPLC 分析

\*膜画分については-80 度保管が可能であるため、5) および 6) については後日行うことも可能である

## 実験の詳細

### 第1日

#### 1) 目的プラスミドによる C41 (DE3) の形質転換

ヒートショック法もしくはエレクトロポレーションにて、目的とする遺伝子を含むプラスミドにより C41 (DE3) コンピテントセルを形質転換する。アンピシリンを含む LB プレート上で 37°C 一晚静置。多数の試料について形質転換を行う場合は、ヒートショック法が簡便である。

### 第2日

#### 2) 前培養

前日の各 LB プレートから、コロニーを取り、3mL スケールの LB 培地に植菌して 37°C で一晚振盪培養を行う。GFP-FSEC 法では多数の培養試料を同時に取り扱うことが多く、多数の試料について IPTG による発現誘導の際のタイミングを合わせるためには、各培養試料間の濁度をそろえる必要がある。そのため前培養を行う。

### 第3日

#### 3) 本培養と発現誘導

前日の前培養試料から培地を 0.1mL 取り、3mL スケールの LB 培地に植菌し、37°C で振盪培養を開始する。数時間ほどで培養液の 600nm 付近の OD が 0.5 程となるので IPTG を加え、発現誘導を行う。試料数が数十にも及ぶ場合、全ての試料の OD を測定するのは現実的ではないため、代表していくつかの OD を測定するとよい。加える IPTG 濃度や IPTG 添加後の培養時間、温度については条件検討が必要である。初期条件としては、目的タンパク質一種あたり 0.5mM IPTG 濃度にて

1. 37°C、3 時間培養
2. 37°C、一晚培養(16-20 時間程度)
3. 20°C、一晚培養(16-20 時間程度)

の 3 条件を試みることを推奨する。筆者の経験では 20°C 培養が効果的であることが多い。これは膜タンパク質の過剰発現が細胞に対して毒性を持つことに起因する可能性が指摘されており、低温培養が有効な事例がいくつか報告されている(8)

### 第4日

#### 4) 膜画分の調製

以降の作業は全て氷上もしくは 4°C 下にて行う。前日の 3mL スケールの培養試料について、2 回に分けて 1.5mL エッペンドルフチューブに集菌する。各チューブに 0.5mL の破碎用バッファーを加え、超音波破碎機 S-450D を用いて、1 分間超音波破碎を行う (power level 1, 1 sec on, 1 sec off, total 1 min)。破碎バッファーの組成についての 1 例としては、150mM NaCl、50mM HEPES pH7.0、1mM PMSF、1mM DTT が挙げられる。破碎後、16,000 x g にて 10 分遠心し、上清を新しい超遠心用のチューブに移し、TLA100.3 にて 40,000 rpm (87,000 x g) 1 時間超遠心を行う。超遠心後、エッペンドルフチューブの底

に微量の膜画分があることを確認する。多数の試料を取り扱い、膜画分の調製に時間がかかる場合は、調製後、試料を-80℃に保管し、以降の作業を後日行ってもよい。

#### 5) 可溶化

膜画分を含むエッペンドルフチューブに 0.2mL の可溶化バッファー (150mM NaCl, 50mM HEPES pH 7.0, 2% ドデシルマルトシド(DDM) , 1mM DTT) を加える。他に膜タンパク質の構造解析でしばしば用いられる界面活性剤としては、デシルマルトシドやオクチルグルコシドなどがあげられる。バッファーを加えた際、膜画分はエッペンの底に付着しているため、市販の 1.5mL チューブ用のホモジェナイザーを用いて膜画分を懸濁させる。その後、ローテーターを用いて 1 時間ほど 4℃で振盪させ、可溶化を行う。可溶化後、TLA100.3 にて再度 40,000rpm (87,000 x g) 、1 時間超遠心を行い、上清を新しい 1.5mL チューブに移す。

#### 6) HPLC 分析

HPLC 分析についても 4℃下で行う。ゲルろ過クロマトグラフィー用バッファー (150mM NaCl, 50mM HEPES pH 7.0, 0.05% DDM) により平衡化された Superose 6 10/300 カラムに対して、オートサンプラーを用いて可溶化試料を 0.1mL 注入する。この際の流速は 0.5mL/min とし、1 回の注入あたり 30mL 溶出させる。蛍光検出機 RF-10AXL (島津製作所) の設定は励起/蛍光波長= 480/512 nm、感度: medium sensitivity、ゲイン x4 とする。各種設定は、参考とした原著論文(2)のグループらの設定に基づく。HPLC の溶出プロファイルについては、ASCII 形式で出力することが可能であるため、EXCEL を用いてグラフを作成することができる。図 1 に、筆者らのグループによって得られた HPLC チャートの 1 例を示す。

## 工夫とコツ

### 発現ターゲットの探索

複数のホモログをクローニングし、発現トライアルを行う場合、原核生物由来の輸送体の場合、有望なターゲットを見つけるためには、最低でも 10 種類ほどを試したほうがよい。原核生物のゲノムもしくは菌株については、理化学研究所の微生物材料開発室から比較的安価に入手可能である。

### GFP タグの位置

同じ遺伝子であっても、GFP タグの箇所(N 末、C 末) とで、得られる HPLC チャートに有意な差があることがあるため(2)、可能な限り、N 末、C 末それぞれの GFP 融合発現系を作成することを推奨する。

### オートサンプラーの注意点

オートサンプラーを用いることにより、一度に多数の試料について分析を行うことが可能であるが、その場合、最初に注入された試料と最後に注入された試料とでは、可溶化から HPLC 分析までの時間に大きな差ができることになる。そのため、後半に注入された試料については、時間経過による分解や凝集などが問題となる可能性がある。よって、各試料について整合性のある結果を得るためには、1 回の可溶化で分析する試料数は多くても 1 晩分 (15 から 20 程度) に留め、さらなる分析については後日、別に可溶化を行ったほうがよい。

### GFP を利用した発現量の見積もりについて

HPLC 分析の結果、得られる値は相対的な蛍光強度であり、それ自体では絶対的な発現量の見積もりを行うことはできない。そのため、GFP 単体の精製試料もしくは発現量が知られている GFP 融合膜タンパク質の発現系を用いて、発現量の指標とするのがよい。

## 文献

- 1) Hattori, M., *et al.*, *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **63**, 682-4 (2007)
- 2) Kawate, T. & Gouaux, E. *Structure*, **14**, 673-81 (2006)
- 3) Yamashita, A., *et al.*, *Nature*, **437**, 215-23 (2005)
- 4) Jasti, J., *et al.*, *Nature*, **449**, 316-23 (2007)
- 5) Kawate, T., *et al.*, *Nature*, **460**, 592-8 (2009)
- 6) Shaffer, P. L., *et al.*, *Science*, **325**, 1010-4 (2009)
- 7) Sobolevsky, A. I., *et al.*, *Nature*, **462**, 745-56 (2009)
- 8) Wang, D. N. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1610**, 23-36 (2003)

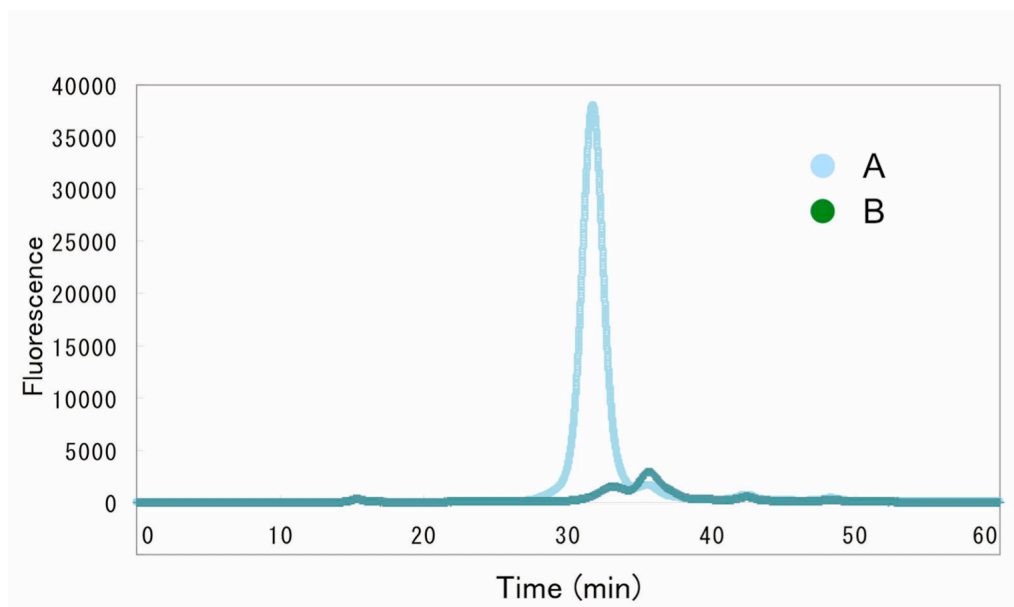


図 1 : GFP-FSEC 法における HPLC チャートの例  
縦軸および横軸はそれぞれ蛍光強度と時間(分)に対応する。発現系 A と B を比較すると、A は、強い蛍光強度と単一の鋭いピークを示しており、有望な発現系であると考えられる。実際、A については、その後、結晶が得られた。