

糖蛋白質-抗体複合体の精製と結晶化～ $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン-SG/19 Fab 断片複合体を例として～

理化学研究所・基幹研究所・糖鎖構造生物学研究チーム

長江 雅倫

Purification and crystallization of glycoprotein in complex with Fab fragment

Structural Glycobiology Team, RIKEN Advanced Science Institute
Masamichi Nagae

(投稿日 2011/8/5、再投稿日 2011/8/29、受理日 2011/9/1)

キーワード：動物細胞、抗体、結晶化

概要

動物細胞で働く蛋白質は、一般に糖鎖修飾やプロセッシングなどの複雑な翻訳後修飾が生理活性に必須である場合が多い。こうした複雑に細工が施された蛋白質をリコンビナントで大量に作るには、バクテリアの発現系よりも動物細胞を用いた発現系が向いている。最近では、大腸菌ほどではないにしてもパッケージ化が進み、誰でも簡便に利用できるようになっており、動物細胞を利用した蛋白質の立体構造解析は急速に発展しているところである。

本稿では動物細胞で発現させた糖蛋白質の解析事例として、筆者が大阪大学蛋白質研究所の高木淳一教授の研究室に在籍した際に行った、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン細胞外ドメインと機能阻害抗体である SG/19 Fab 断片との複合体の精製、結晶化について詳述する。またそれに加えて、表題とは少し外れるが筆者らが苦労した抗体の一次配列決定法についても詳細を述べる。

イントロダクション

インテグリンは細胞接着に重要な役割を果たす分子であり、細胞外でコラーゲンやラミニニン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスと、細胞内でアクチンフィラメントなどの細胞骨格系とを繋いでいる(1)。その最も大きな特徴は、細胞外の情報を細胞内へ (outside-in signal)、細胞内の情報を細胞外へ (inside-out signal) と伝達する双方向性の受容体として働くことである。インテグリンは α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体から成り立っており、ヒトでは α 鎖が18種類、 β 鎖が8種類存在するがヘテロ二量体としての組み合わせは24種類に限定されている。この組み合わせの違いによって、インテグリンのリガンドである細胞外マトリックスに対する特異性などが異なっている。

インテグリンにはリガンドに対する親和性の低い状態 (低親和性状態) と高い状態 (高

親和性状態) の二つの状態がある。これらの状態の切り替えメカニズムは” 起き上がりモデル” として説明されている(2)。このモデルではリガンドに対する親和性の違いが細胞外ドメインの構造変化と相関しており、全体が大きく折れ曲がった状態が低親和性状態、全体が起き上がって足(α 鎖と β 鎖のC末端側)が開いた状態が高親和性状態になっている。つまり、モジュラー構造をとっているインテグリンの細胞外ドメインは、細胞内外の刺激に応じてドメイン間の角度が変化し、リガンドに対する親和性が変化すると考えられているのである。

$\alpha 5 \beta 1$ インテグリンは最も早く発見されたインテグリンで細胞外マトリックスであるフィブロネクチンの受容体である(3)。この二つの蛋白質の相互作用は、初期発生時の細胞移動の際に重要な役割を果たしており、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン及びフィブロネクチンのノックアウトマウスは同じような表現型を示し、共に胚性致死である。このインテグリンは、抗 $\beta 1$ 抗体であるSG/19という抗体によってアロステリックにリガンド結合が阻害されることが知られている(4)。つまりドメイン間の角度を強制的に低親和性状態に固定させることによって、リガンド結合を妨げているのである。

今回、筆者らは $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン細胞外ドメインとSG/19 Fab断片との複合体のX線結晶構造解析に取り組み、2.9Å分解能での構造解析に成功した(5)。本稿ではその時に使用した実験プロトコルを余すところなく公開する。

装置・器具・試薬

装置

遠心機 (ベックマン HP-30、ローターは JLA10.500)

精製装置 (AKTAFPLC (GE Healthcare)、カラムは Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare))

結晶化装置 (微量分注装置として Mosquito (TTP Biotech)、プレートとして MRC-2 plate (Hampton Research))

その他 SDS ゲル電気泳動装置、クリーンベンチ、インキュベータ、ソニケーター、PCR 装置など

器具

ローラーボトル (Corning)

エコノカラム (Bio-rad)

限外濾過濃縮器 (Corning, Spin-X)

限外濾過濃縮器 (少量) (Millipore, Bio-max)

透析チューブ (Spectra/Por Dialysis Tubing)

試薬

Minimum Essential Medium (MEM) alpha (Invitrogen)

Foetal bovine serum (EuroClone)

MEM Non-essential amino acids (NEAA) 100x (Sigma)

Sodium Pyruvate 100x (Gibco)

Penicillin Streptomycin (Pen Strep) (Sigma)

G418 sulfate (Calbiochem)
Puromycin (Sigma)
硫酸アンモニウム (試薬特級)
CNBr-activated sepharose 4B (GE Healthcare)
rProteinA sepharose (GE Healthcare)
Immobilized papain (Thermo Scientific)
Antibody Binding and Elution Buffers (Thermo Scientific)
L-システイン (試薬特級)
SV40 Total RNA isolation (Promega)
One-step RT-PCR kit (Qiagen)
Ig-primer set (Novagen)
PCR cloning kit (Qiagen)

実験手順

- 1) $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの調製
- 2) SG/19 Fab 断片の調製
- 3) $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン - SG/19 Fab 断片複合体の調製
- 4) $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン - SG/19 Fab 断片複合体の結晶化
- 5) SG/19 Fab 断片の一次配列決定

実験の詳細

1) $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの調製

本研究では $\alpha 5\beta 1$ インテグリン細胞外ドメインのうち $\alpha 5$ 鎖についてはN末端から623番目までを、 $\beta 1$ 鎖についてはN末端から445番目までを使用している。形質転換体の作成に使う培養細胞は、CHO細胞のLec変異体であるCHO-lec3.2.8.1細胞を用いた。この細胞を用いて目的の糖蛋白質を発現させると、得られた糖蛋白質上のN型糖鎖もO型糖鎖も共に均一になることが知られている(6)。より詳細には、N型糖鎖の場合高マンノース型のMan5GlcNAc2という構造の糖鎖がアスパラギン残基の先に付加し、O型糖鎖の場合GalNAcの単糖のみがセリンもしくはスレオニンの先に付加される。 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンには多くの糖鎖修飾部位が存在し、今回デザインしたコンストラクトにも $\alpha 5$ 鎖に9箇所、 $\beta 1$ 鎖に8箇所のN型糖鎖修飾モチーフが存在する。これらの糖鎖修飾は、発現や活性に重要であることが既に調べられている(7)。今回は、これらの二つの遺伝子を同時にCHO-lec3.2.8.1細胞に導入し、共発現する安定発現株を樹立している。安定発現株の樹立は限界希釈法を用いた。詳細な方法については蛋白質科学会アーカイブのプロトコール#0508)と概ね同じである。培地はMEM alpha培地 (MEM alpha + 5%(v/v) Foetal Bovine Serum + 1%(v/v) 100x sodium pyruvate + 1%(v/v) 100x MEM NEAA + 0.5%(v/v) Pen Strept) に選択マーカーとして0.5 mg/mL G418と5 μ g/mL puromycinを添加したものをを用いた。大量培養はローラーボトルを使用した。1本のローラーボトルにつき $\sim 10^7$ 個の細胞を撒きこみ、300mLのMEM alpha培地を添加した。ローラーボトルは、37°Cに設定したローラーインキュベータ中で毎分5回転程度の速度でゆっくりと転倒混和した。培地の交換は1週間に1度行い、1本のローラーボトルを2~3カ月間培養した。

今回用いているコンストラクトはインテグリン細胞外ドメイン全体からみるとN末端の半分に相当する。これらを何の工夫もなしに発現させると、容易に二つのサブユニットが乖離してしまう。そこでコンストラクト作成時の工夫として、 $\alpha 5$ 鎖と $\beta 1$ 鎖の互いのC末端を結び付けて発現させることにした。具体的にはそれぞれのサブユニットのC末端側にそれぞれ人工的なロイシンジッパー様ヘリックスを付与し、 α 鎖側には酸性残基を多く配置させ (Acidic zipper; A-zip)、一方の β 鎖側には塩基性残基を多く配置させた (Basic zipper; B-zip)。さらに、これらの人工ヘリックスの一箇所に人工的なジスルフィド結合を導入することによって、サブユニット間を強固に固定させることでヘテロ二量体として安定に精製できるようにしている。こうしたバインダーを何も考えずに付加すると、肝心の目的蛋白質の構造そのものを崩してしまう危険がある。そのためアミノ酸配列をよく吟味したうえで何種類かのコンストラクトを作成し、発現量や蛋白質の安定性などを比較することで最適なデザインのコンストラクトを見つけなければならなかった。

精製はまず、安定発現株の培養上清2~3Lを終濃度50%で硫酸沈澱し、遠心($\sim 10,000g$ 、20分間程度、4°C)によって上清と分離するところから始まる。得られた沈澱をbuffer A (20mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂)で懸濁する。目安は1Lの培養上清に対して懸濁液が30mL程度になるようにしている。よく懸濁し溶け残りが無いことを確認したら、3,000~3,500gで15分間遠心し、目に見えるゴミなどを除いておく。次の段階の精製は、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンのうち $\beta 1$ 鎖のC末端に付与したB-zip配列に対する抗体(文献未発表)をCNBrセファロースに結合させた抗体レジンを使用している。懸濁

液と抗体レジンを用いたボトルに詰め、4°Cの低温室内で毎分5回転程度の速度で2~3時間程度攪拌したのち、空のエコノカラムを用いて抗体レジン回収する。レジンを用いた buffer A によって5~10CV 洗浄したのち、溶出は buffer B (50mM tri-ethylamine (pH 11.4), 150mM NaCl, 1mM CaCl₂) で行う (図1左側)。溶出画分は1.5mLを1画分として、合計5画分溶出する。溶出後は、2M Tris-HCl (pH 8.0) 溶液を1画分に50 μ L 加えて速やかに中和してから buffer A に対して透析する。透析チューブは分子量カットオフで1万2千から4千程度のものを使用する。透析後は、限外濾過 (分子量カットオフ10,000) によって1~2mg/mL 程度になるように濃縮する。濃縮後は TEV protease を重量比で20分の1程度添加して、20°C、一昼夜かけてタグを切断する。切断の確認は、10%アクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動によって行う (図1右側)。筆者らは、この方法によって1Lの培養上清から $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン精製蛋白質を約1mg程度得ている。

インテグリンの発現、精製に関して幾つかのコメントを以下に述べる。

今回得られた $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの糖鎖が、本当に均一であるかどうかの詳細な解析はしていない。しかし図1の SDS 電気泳動のゲルを見る限り、それなりに均一であることがわかる。糖鎖修飾の経路に変異が入っていない細胞を使って糖蛋白質を発現させるともつとバンドが拡散する。

精製に関しては、タグの除去する際に TEV protease の切断効率がいつも100%にならず、やや切れ残ってしまった (図1右側及び図3なども参照)。実は TEV protease の代わりにエンドペプチダーゼである AspN を用いると、TEV protease よりも高効率で、しかもより多くの余分な領域を除去することができる。筆者がこのことを見出した当初は、最終的な結晶の分解能の向上などを期待して大いに喜んだものだが、実際には分解能の向上には全く繋がらず逆に低下する結果となった。本研究で用いている SG/19 はタグの有無に関わらず $\beta 1$ に結合することができる。今回使用しているタグは各サブユニットそれぞれ40アミノ酸残基程度あり、さすがにこれを付けたままで結晶化を試したことはないのだが、ひよっとすると適度に切れ残ったタグが結晶の質に効いているのかもしれない。

また抗体カラムからインテグリンを溶出する溶液組成については、酸性条件で溶出するとインテグリン自体が変性し、しかも中性条件では溶出できなかったため、アルカリ条件で溶出することにした。

抗体からの目的蛋白質の溶出条件については、色々な溶液条件が知られおりそれらは Thermo Scientific のホームページにまとめられている。興味のある方は参照して下さい。

(http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_6645.pdf)

2) SG/19 Fab 断片の調製

SG/19 はマウス由来でサブクラスが IgG1 に属している。SG/19 Fab 断片の調製は、まず IgG の回収から始まる。SG/19 ハイブリドーマの培養上清を回収し、遠心 (3,000~3,500g, 15min, 4°C) によって細胞と上清とを分離したのち、NaCl と Tris-HCl (pH 8.8) を終濃度でそれぞれ 3.0M と 0.1M になるように添加する。ポアサイズが 0.44 μ m のフィルター濾過に

よってゴミなどを除いたのち、rProteinA sepharose と混合し転倒混和する。筆者らは、ハイブリドーマの培養上清 600mL に対して rProteinA sepharose を、Bed volume で 10mL 程度添加することを目安に使用している。混合溶液は空のエコノカラムを通すことでレジンを回収し、Thermo Scientific 社製の Binding solution (成分非公開) で十分に洗浄し、Elution solution (成分非公開) によって IgG を溶出する。回収した IgG は Phosphate Buffered Saline (PBS) に対して透析し、限外濾過によって濃縮する。

ここから Fab 断片を精製するには、まず得られた IgG を PE buffer (20mM Na/K phosphate (pH7.0), 10mM EDTA) に対して透析し、濃縮したのちに、immobilized papain resin と混合する。そのままでは切断が進まないのを終濃度 250mM になるように L-Cysteine 溶液 (pH7.0) を添加する。注意点としては L-Cysteine をただ水に溶かすと酸性になるので NaOH などでも中性になるように調製する。37°C に設定したインキュベータの中にローテータを入れ、resin 混合溶液をゆっくりと攪拌する。筆者らは ~30mg の IgG に対して、immobilized papain resin を 600 μ L (Bed volume) 程度使用し、3~5 時間程度の反応時間で切断が完了するようにしている。切断の確認は 15% アクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動で行う (図 2 左側)。反応溶液には L-Cysteine が含まれているため、切断が適切に行われているかは還元条件下で比較する。切断反応が終了していることを確認した後、resin 混合溶液を空のエコノカラムに通すことで papain resin を分離し、素通り画分を集めて PBS に透析する (分子量カットオフ 3,500)。透析をすると、L-Cysteine が沈澱して白く濁り、特有の臭いがすることがある。こうした際には、2~3 時間おきに数回透析外液を交換し L-Cysteine が抜けきるように心掛ける。透析終了後は遠心 (3,000~3,500g, 15min, 4°C) によって不溶物を除く。得られた上清は、等量の Thermo Scientific 社製の Binding solution と混合し、エコノカラムに詰めた rProtein A sepharose にかき、素通り画分を回収する。このときの rProtein A sepharose の Bed volume は IgG を精製した際と同量使用する。この素通り画分に Fab 断片が含まれているはずだが、念のため rProteinA sepharose から Elution solution を用いて未反応の IgG 及び Fc 断片を回収しておく。得られた Fab 断片は HBS buffer (20mM Hepes-NaOH (pH 7.0), 100mM NaCl) に対して透析し (分子量カットオフ 3500)、濃縮したのち BCA 法などの適当な方法を用いて蛋白質濃度を測定する。また精製純度は 15% アクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動によって確認する (図 2)。

SG/19 Fab 断片の精製に関して幾つかのコメントを以下に述べる。

まず今回の精製には rProtein A sepharose を使用している。マウスの IgG1 であれば、Protein G sepharose を使用することも、勿論可能である。筆者らが rProtein A を使用したのは、たまたま研究室にあったものを使用したところ上手く精製ができたからである。Bed volume の目安も、培養上清 600mL に対して 10mL 程度としたが、最適化の結果というよりはこのくらい大量にレジンを使用すれば漏れなく回収できると考えたからである。実際、筆者らは複数種類の抗体を同様な方法で精製した経験があるが、少なくともキャパシティを超えて IgG なり Fc 断片が素通りしてしまったということはなかった。

抗体の精製に使用した溶液は、Thermo Scientific 社から販売されている溶液セットを

そのまま使用した。それらの大まかな成分は以下の URL に公開されている。今回、筆者らは精製に使用する溶液の最適化などは行わなかった。なぜなら常に不足するのはインテグリンの精製蛋白質の方であり、どんな方法をとっても抗体は相対的に大過剰でとれてしまうからである。従って、抗体の精製方法自体に関しては改良の余地は充分にあるかもしれない。

<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01010401>

3) $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン - SG/19 Fab 断片複合体の調製

$\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと SG/19 Fab 断片複合体の調製は、まず量比を決定するところから行う。精製した $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンと SG/19 Fab 断片を少量ずつ分取し、量比を変えながら数回ゲル濾過カラム (Superdex200 10/300GL) にかけて、複合体の形成具合を見積もる。使用する溶液は buffer C (20mM Tris-HCl (pH8.0), 100mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂) である。筆者らの経験では、BCA 法などから計算した蛋白質濃度を用いて SG/19 Fab 断片の量と $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンの量を等量程度混合したのでは、SG/19 Fab 断片の量が不足してしまった。SG/19 Fab 断片は容易に大量調製が可能のため、思い切って Fab 断片を 5 倍程度過剰に加えるようにしていた。(SG/19 と $\beta 1$ との結合親和性は報告されていないが、勿論これほど抗体過多にする必要はない。) 得られた $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン-SG/19 Fab 断片複合体は、SDS 電気泳動で純度を確認し 6~10mg/mL 程度になるまで濃縮する (図 3)。

SG/19 Fab 断片は、精製直後には SDS 電気泳動の非還元条件で単一のバンドとして観察されたが、4°C で数日保存すると図 3 のように二つのバンドに分かれてしまった。幾種類かのプロテアーゼを用いて、より均一にしようと試みたものの状況は改善されなかった。いずれのサンプルを使っても結晶化には影響がなかったため、気にせずに用いることとした。

4) $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン - SG/19 Fab 断片複合体の結晶化

結晶化条件の初期スクリーニングは、スクリーニング試薬として Crystal Screen, Index (Hampton Research), Precipitant Synergy (Emerald BioScience) を用いた。1 回の精製サイクルで得られる蛋白質量は容量にして 100 μ L 程度と微量であったため、Mosquito (TTP biotech) という微量分注装置を用いて 1 条件辺り蛋白質と結晶化試薬をそれぞれ 100nL ずつ分注した。プレートは MRC-2 の 96 ウェルプレートを使用し、シッティングドロップ蒸気拡散法にて行った。このときのリザーバー量は 100 μ L とした。初期スクリーニング (全部で 256 条件) は精製ロット三回分を使用して行った。温度は 20°C のみを検討した。また蛋白質濃度の検討は特に行わなかった。その結果、Index における二つの条件で結晶が析出した。これらの条件は共に PEG を沈澱剤とし、中性の pH 条件で、低塩濃度であった。インテグリンは一般にイオン強度を高くすると α 鎖と β 鎖が乖離してしまうため、こうした条件が結晶の形成に適していたと考えられる。

結晶化条件の最適化は 24-well plate (TPP) を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法にて手作業で行った。ドロップは蛋白質溶液とリザーバー溶液をそれぞれ 0.3 μ L ずつカバーガラスの上で混合し、ウェルには 500 μ L のリザーバー溶液を入れるようにした。研究当初、結晶の再現性が低く苦勞したが、マイクロシーディング法により結晶核を導入することで再

現性が飛躍的に向上した。

5) SG/19 Fab 断片の一次配列決定

結晶構造解析には、当然のことながら結晶中に含まれている分子の一次配列情報を得ることが欠かせない。今回構造解析に使用した SG/19 は一次配列が未知であったため、その一次配列を我々自身で決定する必要があった。筆者らはこのような作業に不慣れであったせいか、思いのほか苦労したので、ここに方法を記述する。

まず SG/19 ハイブリドーマの培養液 10mL 分から SV40 Total RNA isolation (Promega 社) を用いてクリーンベンチ内で mRNA を回収する。回収量は 10mL 分の細胞培養液から 20~40 μ g 程度の RNA が得られた。

次に逆転写 PCR (RT-PCR) を行うのだが、使用するプライマーは、forward 側は Novagen から販売されている Ig-primer set に含まれるリーダー配列に対する縮重プライマーを使用した。また reverse 側は抗体研究で著名な Kabat のデータベースを参照し、IgG の重鎖 (VH, CH1) と軽鎖 (VL, CL) に関して網羅的に配列を調べて独自にデザインした。RT-PCR のサイクルとステップ数は以下の通り。

- ステップ 1 ; 50°C、30 分間×1 サイクル
- ステップ 2 ; 95°C、15 分間×1 サイクル
- ステップ 3 ; (94°C、1 分間、50°C、1 分間、72°C、1 分間) ×40 サイクル
- ステップ 4 ; 72°C、10 分間×1 サイクル

RT-PCR の結果、アガロース電気泳動により重鎖も軽鎖も順調に転写産物の増幅が見られたため、TA-cloning によって cDNA を pDrive vector (Qiagen) に組み込んだ。コロニーの青白判別によって目的遺伝子が組み込まれたベクターを選別し、塩基配列を決定した。得られた塩基配列と結晶中の電子密度を比較すると、重鎖は完全に一致したものの、軽鎖では全く電子密度と一致せず、しかも途中で終止コドンの入った偽の塩基配列しか得られなかった。RT-PCR の温度やサイクル数、使用する酵素などを検討したが改善が得られなかったため、SG/19 蛋白質の N 末端アミノ酸配列解析を行い、そこから縮重プライマーを設計し直すことにした。

まず SG/19 IgG 蛋白質 10 μ g 程度を 10%アクリルアミドゲルで SDS 電気泳動に流し、それを PVDF 膜に転写したのち、軽鎖のバンドを切り出してエドマン分解による N 末端アミノ酸配列解析を行った。得られた配列に対して図 4 のように三種類の縮重プライマーをデザインした。これらを forward 側にして再度 RT-PCR を行い、塩基配列決定をしたところ電子密度と完全に符合するアミノ酸配列を得ることができた。

筆者らは SG/19 以外の抗体についても配列解析と構造解析の両方を行った経験があるのだが、電子密度に合わない偽配列が配列解析から得られることはままあるようである。我々のケースでは、得られた配列の妥当性が構造解析によって検証できるのだが、そうでない場合も充分あり得ることと思われる。こうした研究の難しさ、怖さを垣間見た思いである。

工夫とコツ

マイクロシーディング法のストック溶液の作成

今回の結晶構造解析は、マイクロシーディング法によって結晶化の再現性を向上させることが必須であった。そこで、コツとして筆者らが行ったマイクロシーディング法の詳細を述べる。まず、結晶を数 μL のリザーバーのドロップにナイロンループなどですくって移す。次に結晶をドロップ内で粉碎し、粉碎した破片をさらにリザーバー溶液を追加してピペッティングによってよく懸濁する。懸濁液を 1.5mL のチューブに詰め、室温でソニケーター (Branson Model2510 などの、いわゆる眼鏡洗浄機) で数十秒間程度ソニケーションを加えて、さらに細かく砕く。目安として、 $100 \times 100 \times 20 \mu\text{m}$ 程度の板状結晶を 250 μL 程度のリザーバー溶液で懸濁する。この懸濁液をマイクロシーディング溶液として、結晶化条件と同じ 20°C に保存する。使用する際は、軽く指で叩くなどしてチューブ内を攪拌するようにした。時間的には結晶化ドロップを作成してから少なくとも 1 日程度経過していることを目安に、ドロップのカバーガラスを外し P2 のピペットマンで結晶化ドロップの 10 分の 1 量程度を目安に添加した。マイクロシーディング溶液は 20°C で少なくとも一カ月程度は保存可能だった。

縮重プライマーのデザイン

筆者らは一連の配列決定の作業について文献 9 などを参考にして行ったのであるが、ここでは縮重プライマーの組み合わせの総数は千以下になるようにするのが望ましいとあった。今回の場合でも、図 4 のプライマー①では 128 種類、②では 768 種類、③では 3072 種類の混合プライマーになるが、すべてで目的遺伝子の増幅が見られた。ただその際に 3' 末端側の配列 (図 4 では c) が一義的に決定されているのが重要であるようで、ここを n (4 種類の混合) とすると全く遺伝子の増幅が見られなかった。

実験の安全

特に危険な作業などはありません。細胞の取り扱いはクリーンベンチ内で行いましょう。

謝辞

本研究は、筆者が大阪大学蛋白質研究所プロテオミクス総合研究センターに在籍した際に行ったものである。高木淳一教授には研究全般に渡って数多くのご指導、ご助言をいただいた。また結晶構造解析については禾晃和博士 (現、横浜市立大学准教授) にお力添えをいただいた。その他、個々の実験に関しては、川上恵子さん、野田舞子さん、三原恵美子さん、清原丈嗣くんに助けていただいた。

文献

- 1) Hynes *Cell*, **110**, 673–87 (2002)
- 2) Carman, C.V. & Springer, T.A., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 547–56 (2003)
- 3) Pytela, R. *et al.*, *Cell*, **40**, 191–8 (1985)
- 4) Luo, B.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**, 27466–71 (2004)
- 5) Nagae *et al.*, *in preparation*
- 6) Stanley, P., *Mol. Cell Biol.*, **9**, 377–383 (1989)
- 7) Isaji, T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281**, 33258–33267 (2006)

蛋白質科学会アーカイブ, 5, e064 (2012)

8) 浅野竜太郎, 蛋白質科学会アーカイブ, 2, e050 (2009)

9) 中山広樹, バイオ実験イラストレイテッド, 本当にふえる PCR, 秀潤社

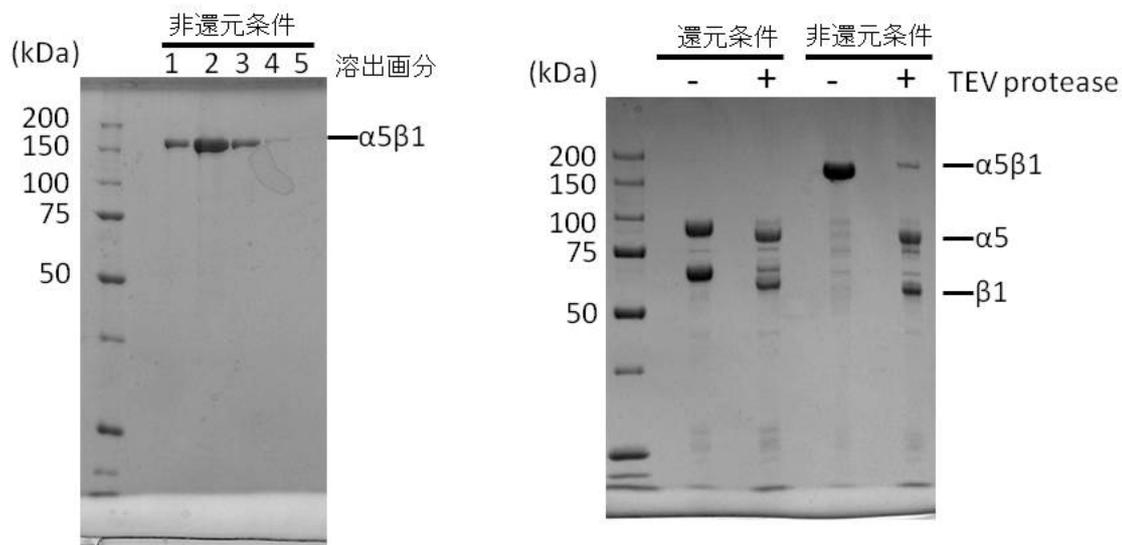


図1. $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン細胞外ドメインの精製
抗体カラムからの溶出画分のSDSゲル電気泳動の結果
(左側)、TEVプロテアーゼによる切断反応の
SDSゲル電気泳動の結果(右側)

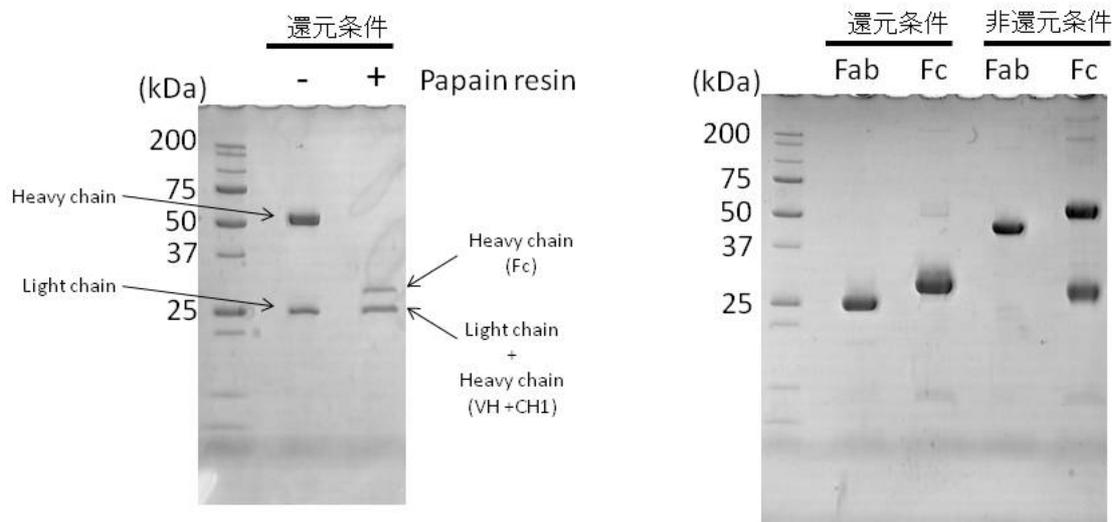


図2. SG/19 Fab断片の精製
パパインによる切断反応のSDSゲル電気泳動の結果(左側)
rProteinA sepharoseによるFabの分離のSDSゲル電気泳動の結果(右側)

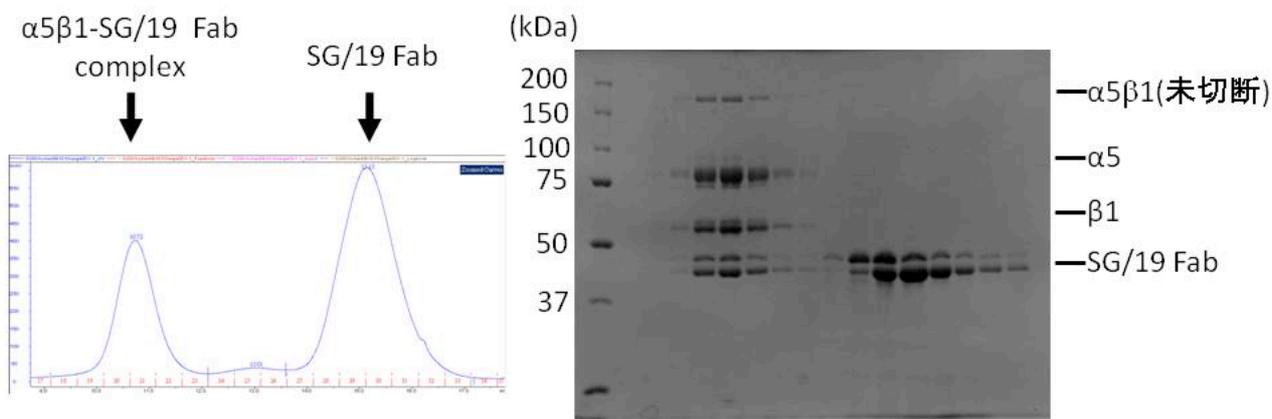


図3. α5β1インテグリン細胞外ドメイン-SG/19 Fab断片複合体の精製。ゲル濾過カラムの溶出チャート(左側)とSDSゲル電気泳動(右側)。

N末端アミノ酸分析によって得られた配列(左側がN末端)と対応するコドン

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Thr	Pro	Ser
GAC	AUA	GUA	AUG	ACA	CAA	GCA	ACA	CCA	UCA
GAU	AUC	GUC		ACC	CAG	GCC	ACC	CCC	UCC
	AUU	GUU		ACU		GCU	ACU	CCU	UCU
		GUG		ACG		GCG	ACG	CCG	UCG
									AGC
									AGU

略称表示 (K=G or T, H=not G, N=any, R=A or G, W=A or T, S=C or G)

GAK	AUH	GUN	AUG	ACN	CAR	GCN	ACN	CCN	WSN
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

プライマー① →

プライマー② →

プライマー③ →

図4. N末端アミノ酸分析の結果と縮重プライマーのデザイン