

新規アフィニティータグ“PA タグ”の利用法～蛋白質の精製および検出～

¹ 阪大・生機、² 阪大・蛋白研、³ 東北大・医

藤井 勇樹^{1,2}、金子 美華³、加藤 幸成³、高木 淳一^{1,2}

”PA tag”, a novel affinity tag system that enables protein purification and detection

¹Graduate School of Frontier Bioscience, Osaka University, ²Institute for Protein Research, Osaka University, ³Tohoku University School of Medicine
Yuki Fujii^{1,2}, Mika Kaneko³, Yukinari Kato³, Junichi Takagi^{1,2}

(投稿日 2014/4/2、再投稿日 2014/4/17、受理日 2014/4/22)

キーワード：蛋白質精製、エピトープタグ、モノクローナル抗体、カラムクロマトグラフィー、免疫検出

概要

PA タグシステムは一段階かつ非常に高い純度で目的蛋白質を精製できる新規アフィニティータグシステムである。さらに、PA タグはウェスタンブロッティングやフローサイトメトリー等の免疫検出においても使用可能である。本稿では、PA タグシステムを用いた蛋白質精製法および PA タグを用いたウェスタンブロッティングについて、実験結果を交えながら解説する。また、PA タグを用いた精製や検出の操作は一日以内に十分可能である。なお、PA タグシステムは 2014 年 3 月現在ではまだ販売されていないが、今後市販される予定である。

目的・イントロダクション

蛋白質の機能を解析する上で純度が高い蛋白質を得ることは非常に重要である。現在蛋白質精製において、最もポピュラーな手法としてアフィニティータグシステムがある。なかでも「エピトープタグ」と総称される、ペプチドタグとそれに対するモノクローナル抗体からなるシステムは、FLAG、HA、Myc 等の多くの種類のタグが開発され、販売されている。しかし、どのタグシステムも一長一短であり、欠点全てが克服されたようなタグシステムはなかなか存在しない。そこで私は、数々の欠点を克服した新規アフィニティータグシステム「PA タグシステム」を開発した。PA タグは、



という 12 アミノ酸残基から成り、ラットモノクローナル抗体 NZ-1 と特異的に結合する。PA タグシステムは、現存するタグシステムと比較し、数々の利点を兼ね備えている。具体的には、12 アミノ酸残基という短い配列、非常に高い親和性と特異性、目的蛋白質の溶出および NZ-1 を固定化したレジンの再生が容易に可能、等である。実際、私たちの研究室では PA タグシステムを利用し、既に 20 種類以上の蛋白質の精製に成功している。

一方、精製だけではなく検出にも使えることはタグの可能性を大きく広げ、より有用性を高めるが、PA タグは免疫学的手法によって目的の蛋白質のみを手早くかつ低コストで検出することも可能にする。セクションIでは、具体的な精製例も示しつつ、PA タグシステムを用いた蛋白質の精製法、特に哺乳類動物細胞発現系を用いた場合について解説する。そしてセクションIIではPA タグシステムを利用したウェスタンブロッティングでの抗原検出法について解説する。なお、本稿ではふれないが、PA タグ/NZ-1 のシステムはフローサイトメトリーや免疫細胞化学的な検出 (Immunocytochemistry : ICC) にも使用可能である(1, 2)。

装置・器具・試薬

遠心機 (各社)

インキュベーター (各社)

震盪装置 (各社)

ローテーター (各社)

SDS ゲル電気泳動装置 (各社)

Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-rad)

ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare)

PEI (Sigma-Aldrich #408727)

DMEM (各社)

ウシ胎児血清 (各社)

CNBr-activated Sepharose 4FF (GE Healthcare)

エコノカラム (Bio-rad)

MES (各社)

MgCl₂ (各社)

Oriole 染色キット (Bio-rad)

HRP-conjugated rabbit anti-rat IgG ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)

ECL Prime (GE Healthcare)

PA タグペプチド (NH₂-EGGVAMPGAEDDVV-COOH) (標準的な fmoc 法や tBoc 法で合成する。ペプチド受託合成サービスを利用すると良い。HPLC で純度 95%以上に精製し、凍結乾燥したものは非常に良く水に溶ける。TFA 塩のままでは通常は特に差し支えない。)

実験手順

I 蛋白質精製

- 1) 哺乳類動物細胞へのトランスフェクション
- 2) 培養上清の回収および蛋白質のレジンへのキャプチャー
- 3) レジンの回収
- 4) レジンの wash
- 5) レジンからの溶出
- 6) レジンの再生

II ウェスタンブロッティング

- 1) SDS-PAGE およびトランスファー

- 2) ブロッキング
- 3) 一次抗体反応
- 4) 二次抗体反応
- 5) 検出

実験の詳細

I 蛋白質精製

基本的なトランスフェクション方法は、文献 3 の dish を用いた場合と同様である(3)。本稿ではアフィニティークラムクロマトグラフィーのプロトコールは PA タグシステムに特化して記述している。また、PA タグシステムによる蛋白質精製の概略図を図 1 に示した。

1) 哺乳類細胞へのトランスフェクション

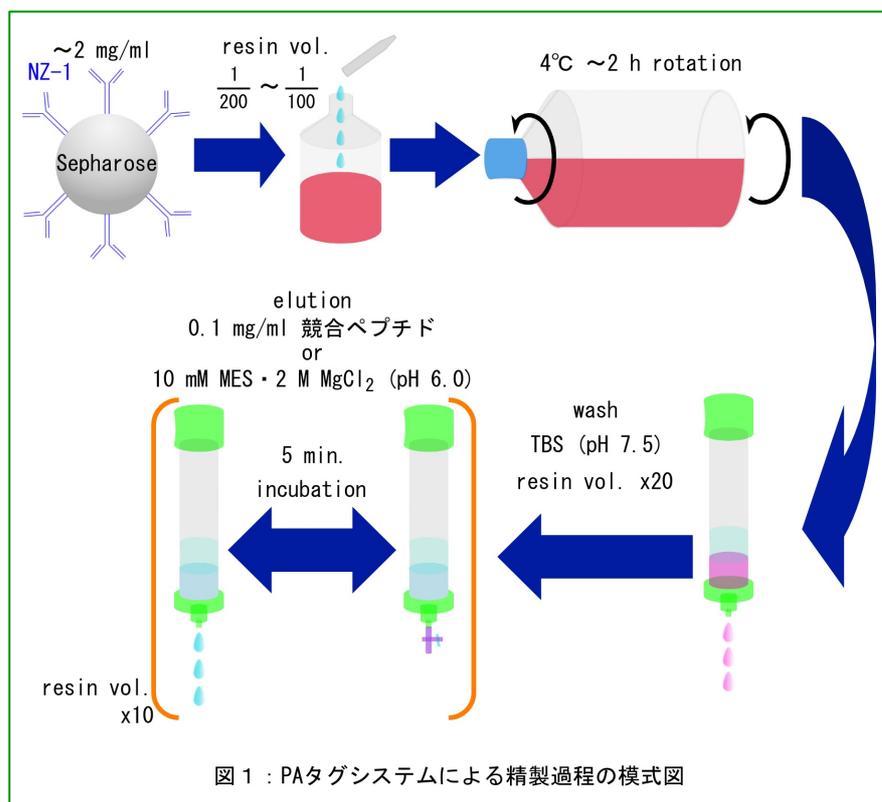
本稿ではモデル蛋白質として、C 末端に PA タグを付加させた mouse Neuropilin-1 の細胞外ドメイン (mNRP1_{ec}) の分泌型蛋白質を用いている。トランスフェクションは、15 cm dish (~25 ml medium) に約 4-6 割の HEK293T 細胞へ PEI (Sigma-Aldrich) を用いている。そして、15 cm dish 一枚に対し、20 μg の DNA を使用し、その 5 倍量の PEI (100 μg) を加えている。

2) 培養上清の回収および蛋白質のレジンへのキャプチャー

トランスフェクションした培養細胞を 37°C 5% CO₂ 条件下で約 72 時間インキュベーションする。その後、培養上清を回収し、終濃度が 10 mM になるように 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え中和させる。そして、8000 rpm で 20 分以上遠心し、フィルターに通すことにより夾雑物を取り除く。そこに、NZ-1 抗体を CNBr-activated Sepharose 4FF に約 2 mg/ml になるように固定化したもの (NZ-1 Sepharose) を medium 量の 1/100 から 1/200 量加え、4°C で約 2 時間ゆっくり混和し、目的蛋白質をレジンへキャプチャーさせる。また、本稿ではバッチ法により精製を行っているが、カラム法による精製ももちろん可能である。

3) レジンの回収

目的蛋白質をキャプチャーさせたレジンと培養上清ごとデカンテーションでエコノカラム (Bio-rad) に移す。このとき、なるべくレジンの取りこぼしがないように、フロースルー液でレジン懸濁液が入っていた容器を何回か洗い込む。また、エコノカラムの径はレジン量や時間との兼ね合いで任意に決定する。



4) レジンの wash

カラムへの充填が終わったら、レジンの20倍量の wash buffer を流して洗浄する。本稿では TBS (pH 7.5) [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl] でレジンの4倍量×5回 wash を行っている。なお wash buffer には非常に低い pH (5.0 以下) や、非常に高塩濃度 (1 M NaCl など) のものでなければ、任意の buffer を使用可能である。

5) レジンからの溶出

wash が完了したレジンから、0.1 mg/ml の競合ペプチド 溶液 (NH₂-EGGVAMPG AEDDVV-COOH) あるいは 10 mM MES・2 M MgCl₂ (pH 6.0) で溶出を行う。基本的にどちらの場合でも、レジンの10倍量の溶液で溶出を行えばキャプチャーされた蛋白質を9

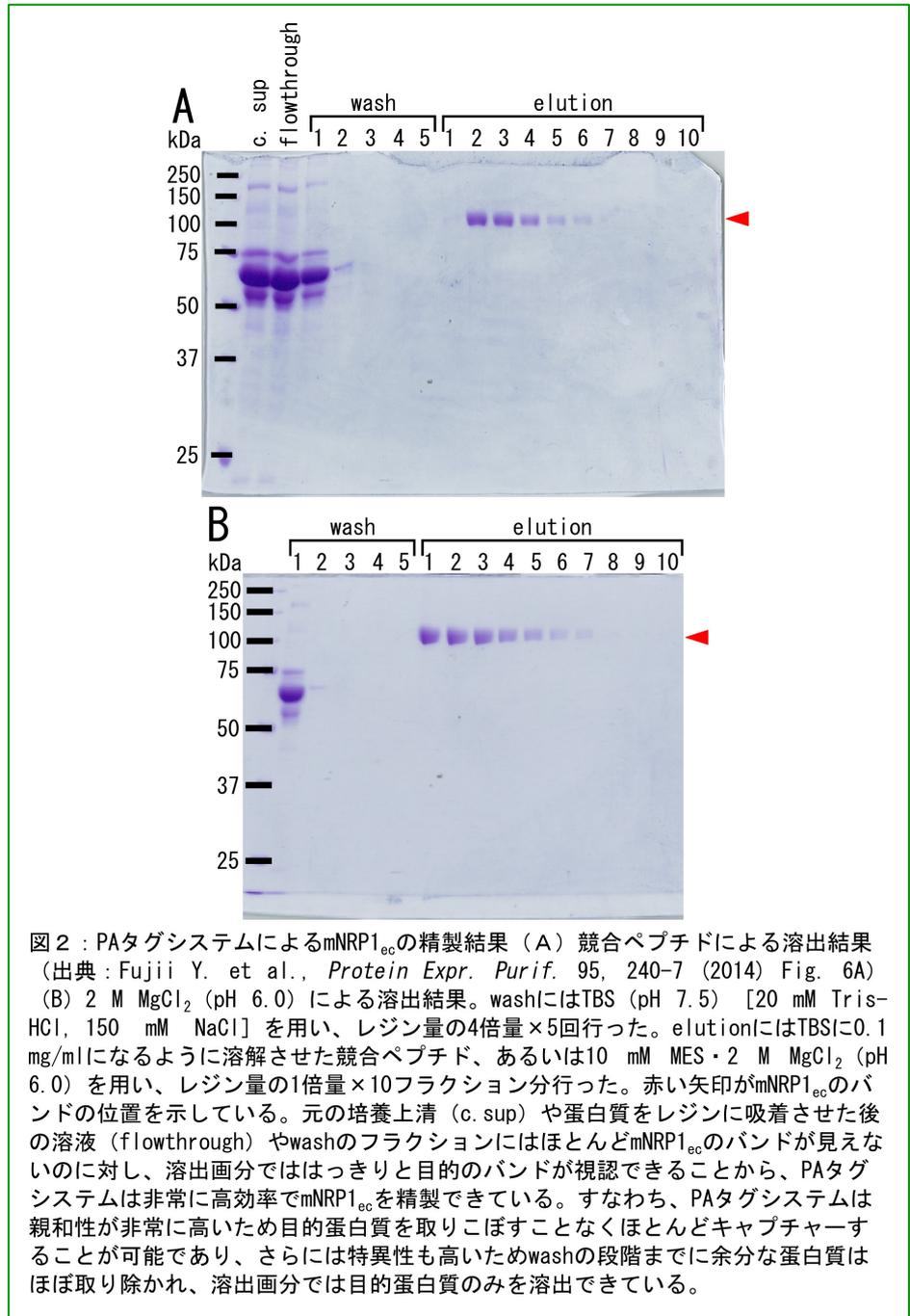


図2 : PAタグシステムによるmNRP1_{ec}の精製結果 (A) 競合ペプチドによる溶出結果 (出典 : Fujii Y. et al., *Protein Expr. Purif.* 95, 240-7 (2014) Fig. 6A) (B) 2 M MgCl₂ (pH 6.0) による溶出結果。washにはTBS (pH 7.5) [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl] を用い、レジンの4倍量×5回行った。elutionにはTBSに0.1 mg/mlになるように溶解させた競合ペプチド、あるいは10 mM MES・2 M MgCl₂ (pH 6.0) を用い、レジンの1倍量×10フラクション分を行った。赤い矢印がmNRP1_{ec}のバンドの位置を示している。元の培養上清 (c. sup) や蛋白質をレジンに吸着させた後の溶液 (flowthrough) やwashのフラクションにはほとんどmNRP1_{ec}のバンドが見えないのに対し、溶出画分でははっきりと目的のバンドが視認できることから、PAタグシステムは非常に高効率でmNRP1_{ec}を精製できている。すなわち、PAタグシステムは親和性が非常に高いため目的蛋白質を取りこぼすことなくほとんどキャプチャーすることが可能であり、さらには特異性も高いためwashの段階までに余分な蛋白質はほぼ取り除かれ、溶出画分では目的蛋白質のみを溶出できている。

割以上溶出することが可能である。図2にはキャプチャーまでを同じ条件で行い、2種類の方法で溶出 (レジンの1倍量×10フラクション) した結果の比較を示す。なお競合ペプチド溶出の際には、elution buffer を一定量加えてレジン内に染み込ませた後、毎回5分以上インキュベーション (静置で良い) することが重要である。これはPAタグのNZ-1からの解離が遅いため、フリーのペプチドが競合するのに十分な時間を与えることが必要だからである。溶出法として競合ペプチドと高濃度マグネシウム溶液のどちらを選ぶかは、精製蛋白質のその後の使用用途や蛋白質自体への影響も考えて決めるとよい。

6) レジンの再生

使用済みのレジンは、10 mM MES・3 M MgCl₂ (pH 6.0) で再生することが可能である。レジン量に対し 10 倍量の上記再生液を加え、室温で 10 分以上ゆっくり混和する。この作業を buffer 交換しながら 3 回繰り返すことにより再生する。最後に、TBS 等でよく洗浄してマグネシウムを取り除けば、次回以降も使用することが可能である。ただし、使用後のレジンから SDS で溶出されてくる蛋白質を電気泳動してみると (図 3)、レジンから外れてくる NZ-1 抗体のバンド

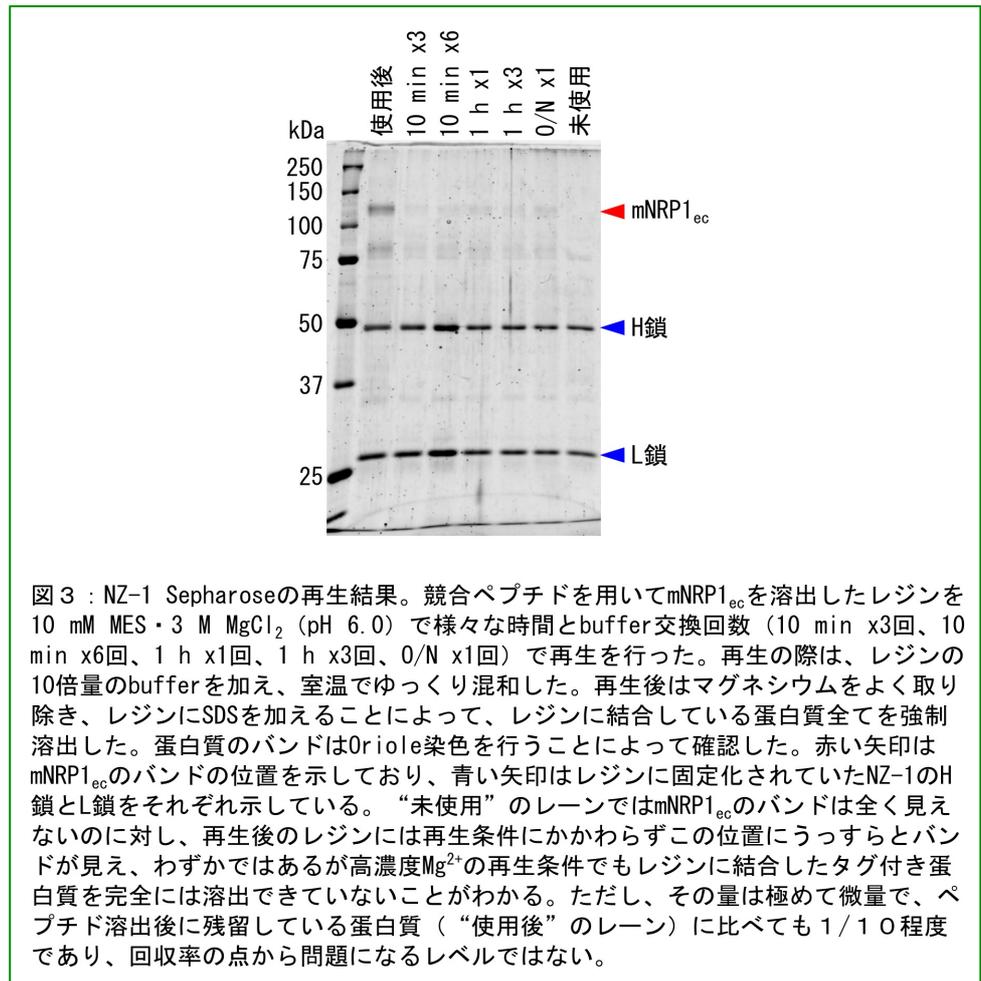


図 3 : NZ-1 Sepharoseの再生結果。競合ペプチドを用いてmNRP1_{ec}を溶出したレジンを 10 mM MES・3 M MgCl₂ (pH 6.0) で様々な時間とbuffer交換回数 (10 min x3回、10 min x6回、1 h x1回、1 h x3回、0/N x1回) で再生を行った。再生の際は、レジンの10倍量のbufferを加え、室温でゆっくり混和した。再生後はマグネシウムをよく取り除き、レジンにSDSを加えることによって、レジンに結合している蛋白質全てを強制溶出した。蛋白質のバンドはOriole染色を行うことによって確認した。赤い矢印はmNRP1_{ec}のバンドの位置を示しており、青い矢印はレジンに固定化されていたNZ-1のH鎖とL鎖をそれぞれ示している。“未使用”のレーンではmNRP1_{ec}のバンドは全く見えないのに対し、再生後のレジンには再生条件にかかわらずこの位置にうっすらとバンドが見え、わずかではあるが高濃度Mg²⁺の再生条件でもレジンに結合したタグ付き蛋白質を完全には溶出できていないことがわかる。ただし、その量は極めて微量で、ペプチド溶出後に残留している蛋白質 (“使用後”のレーン) に比べても1/10程度であり、回収率の点から問題になるレベルではない。

以外に、再生液で溶出されずに結合したままだったタグ付き蛋白質のバンドがうっすらと見えてしまうことがあり、100%の溶出・再生はできていないことがわかる。再生したレジンは蛋白質精製に繰り返し使用可能であることは確認済みだが、異なる蛋白質の精製を同じレジンで行う時にはコンタミネーションの可能性について注意が必要である。

II ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングにおける手法や注意点は、文献 4 と同様である(4)。本稿では PA タグを用いた手法に特化して記述していく。

1) SDS-PAGE およびトランスファー

任意の量のサンプルを用意し、SDS-PAGE を行う。PA タグシステムは非常に高感度なので、サンプル量が多すぎると目的とするバンドが大きくなりすぎてしまい、そのバンド周辺については正確な情報が得られなくなってしまう。よって、正確なデータを出すためには、サンプル量を何回か検討し、最適なサンプル量を見極めることが必要である。本稿では、サンプルとして osteosarcoma 細胞に発現させたイソクエン酸脱水素酵素 (IDH1) を用いた。この IDH1 は C 末端側にタンデムに FLAG タグと PA タグを付加させている (IDH1-FLAG-PA)。そして、1 レーンあたり 10 μg の蛋白質 (サンプル全体の蛋白質量)

を SDS-PAGE した。SDS-PAGE 後のゲルはなるべく手で触れずに転写膜 (PVDF あるいはニトロセルロース) へとのせ、膜への転写を行う。本稿では、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-rad) を用いて PVDF 膜への転写を行った。もし、蛋白質がしっかりと膜へ転写できているかどうか不安な場合や、Stained のマーカーを持っていなかった場合は、ポンソーS で転写膜を染色すれば膜に転写された蛋白質を全て確認することができる。

2) ブロッキング

基本的には 4% スキムミルク/TBST (pH 8.0) [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20] あるいは 4% スキムミルク/PBST [PBS (pH 7.4), 0.05% Tween 20] 中で、室温で 15 分間震盪することによってブロッキングを行う。もし、スキムミルクでのブロッキングが上手く行かなかったならば、4% スキムミルクの代わりに 2% BSA を用いてもブロッキングは可能である。また、ブロッキング後は転写膜を TBST に浸し、buffer を交換しながら室温で 5 分間×4 回震盪することによって、転写膜を wash する。

3) 一次抗体反応

一次抗体が NZ-1 の場合では 1 μ g/ml になるように TBST で希釈したもので濃度は十分である。そして、転写膜を一次抗体溶液に浸した状態で、室温で 30 分間震盪させることによって、NZ-1 を転写膜上の PA タグ付き蛋白質に結合させる。なお、一次抗体溶液は回収し、4°C で保存しておけば、複数回使い回すことが可能である。また、一次抗体反応後はブロッキング後と同様に転写膜を wash する。

4) 二次抗体反応

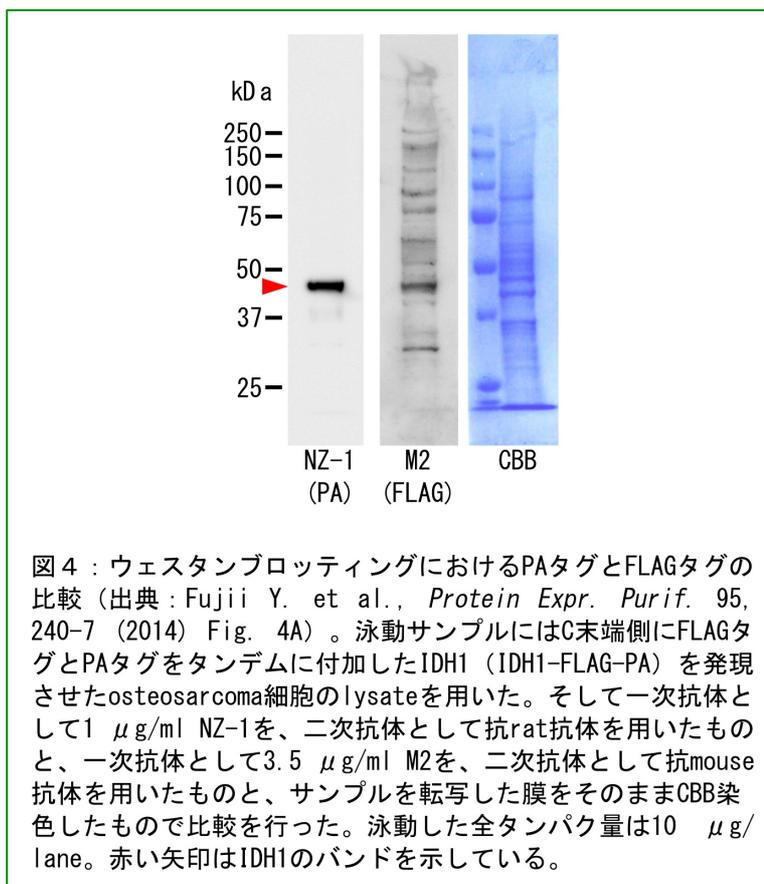
NZ-1 は rat 抗体であり、検出には一般的なペルオキシダーゼ (HRP) の酵素反応を用いるので、本稿では二次抗体に HRP-conjugated rabbit anti-rat IgG ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体も TBST で希釈しているが、購入した二次抗体のロットによって感度は異なってくるため、各々で確立している濃度で使用すればよい。参考までに私たちの研究室では、1/6000 希釈で用いている。そして、転写膜を二次抗体溶液に浸した状態で、室温で 30 分間震盪させることによって、二次抗体を転写膜上の NZ-1 に結合させる。また、二次抗体反応後はブロッキング後と同様に転写膜を wash する。

5) 検出

本稿では HRP 反応の検出試薬に ECL Prime (GE Healthcare) を用いているが、他の HRP 用検出試薬でも問題はない。また、発光の検出には ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) を用いている。本稿の条件では、基本的には 10 秒も露光すれば十分なバンドを確認することができる。ただし、これは検出試薬やイメージャーの感度、そして検出したい蛋白質の濃度に依存するので、適宜最適化を行う必要がある。

実際のウェスタンブロッティングの結果として、PA タグと FLAG タグのウェスタンブロッティングの結果および転写膜をそのまま CBB 染色した結果の比較の図をのせた (図 4)。PA タグのウェスタンブロッティングの手法は前述通りだが、FLAG タグ抗体でのウェスタンブロッティングの方法は、一次抗体として 3.5 μ g/ml の抗 FLAG タグ M2 抗体

(Sigma-Aldrich)、二次抗体に 1/6000 希釈 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG ポリクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を用いている他は、上記の PA タグの場合と全く同様に行った。二次抗体が異なるため単純な比較はできないが、この PA タグによるウェスタンブロッティングのレーンと、FLAG タグによるウェスタンブロッティングのレーンと、転写膜自体を CBB 染色し転写された蛋白質全てを可視化したレーンを比較すると、PA タグのレーンは非特異的なバンドがほとんど見えず、目的のバンドを明確に確認することができる。さらに PA タグ/NZ-1 のシステムは、NZ-1 の濃度を低く ($0.01 \mu\text{g/ml}$) あるいはインキュベーション時間を短く (1 min) しても目的蛋白質のバンドが検出可能なことから(1)、ウェスタンブロッティングにおける感度は十分に高いことが確認できる。



工夫とコツ

溶出時のインキュベーション

溶出時に5分以上インキュベーションすることは非常に重要である。フラクションごとにインキュベーションをせずに連続的に蛋白質の溶出を行うと、シャープな溶出ができず、広い範囲にわたって低濃度の試料を含む溶出フラクションが出てきてしまう。そのため最終的な精製蛋白質が希釈され、同時に蛋白質収量の低下を導いてしまう。

MgCl₂の取り扱い

高濃度マグネシウム溶液は、水酸化物イオンの存在下では難溶性の水酸化マグネシウム (Mg(OH)₂) が形成されてしまうため、非常に沈殿しやすい。そのため、高濃度マグネシウム溶液を作製する際には、まず pH を合わせた高濃度 MES 溶液等を作製しておき、それに MilliQ 水と MgCl₂ を加えることにより調整する。すると、NaOH を使わずともほぼ目的通りの pH に調整することができる。また、SDS-PAGE のサンプルを調製する際にも沈殿が生じてしまうので不便だが、この問題はサンプルを TBS 等の buffer で 1/10 希釈してマグネシウム濃度を落としてから SDS-PAGE し、銀染色や蛍光色素染色などの高感度法でバンドを可視化することや、TCA 沈殿などで脱塩してから泳動することで避けられる。また、2 M MgCl₂ を用いて溶出したサンプルを透析で buffer 交換する際には、体積が2倍程度まで増えてしまうので、透析チューブはその分を見越して長めに切って使用する必要がある。

吸光度計を用いた精製蛋白質の定量

PA タグペプチドの配列は NH₂-EGGVAMPGAEDDVV-COOH であるため芳香族アミノ酸を含んでいない。よって、SDS-PAGE を行う前に、各溶出フラクションの A280 を測定することによって、どのフラクションに蛋白質が多く溶出されているのか簡便に見積もることが可能である。

PEI によるトランスフェクション

PEI には細胞毒性があるが販売会社ごとにその特性は異なっている。そのため、実際にトランスフェクションを行う場合には、商品ごとに条件検討を行う必要がある。参考までに私たちは、Sigma-Aldrich 社製の PEI (#408727) を用いて DNA:PEI=1:5 になるように調整し、トランスフェクションを行っている。

NZ-1 のサブクラス

NZ-1 は rat IgG_{2a} lambda に分類される。そして、一般的なこのサブクラスの抗体と同様に、Protein G とは結合するが、Protein A とは結合しにくく、kappa 鎖に対して結合する Protein L には結合しない。

ポドプラニン発現細胞株

元々 NZ-1 はヒトポドプラニンに対する抗体である(5)。そして、HEK293T、COS-1、COS-7 細胞にはポドプラニンが発現しており、NZ-1 と反応してしまう。そのため、これらの細胞株の lysate をウェスタンブロッティングすると 37 kDa 近辺にポドプラニンのバンドが見えてしまう。さらに、ポドプラニンは細胞表面に発現しているため、これらの細

胞株はフローサイトメトリーを用いた PA タグ付加受容体などの解析には使用することができない。しかし、ポドプラニン¹は medium 中には全く分泌あるいはシェディングされない¹ので、分泌型の蛋白質の発現精製には問題なくこれらの細胞株でも使用可能である。また、HEK 細胞で発現した膜蛋白質の精製を行うと、不思議なことに精製試料の中にポドプラニンは混入してこない¹。ポドプラニンは糖蛋白質であり、PA タグ配列の直後に O 型糖鎖が付加されることが知られているので、細胞上に発現したポドプラニンに対する NZ-1 の親和性は PA タグに対するそれよりかなり低いのかもしれない。ちなみに、ポドプラニン中の PA タグに相当する部分の配列はヒト（サルと同一）とそれ以外の動物（マウス、ラット、ハムスターなど）で大きく異なっており、NZ-1 はこれらの動物種由来の細胞には全く反応しない。

文献

- 1) Fujii Y. et al., *Protein Expr. Purif.* **95**, 240-7 (2014)
- 2) Kato-Kaneko M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **432**, 40-5 (2013)
- 3) 橋口隆生ら, *蛋白質科学会アーカイブ*, **1**, e017 (2008)
- 4) 恩田真紀, *蛋白質科学会アーカイブ*, **1**, e012 (2008)
- 5) Kato Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 1301-7 (2006)