

膜蛋白質のオンカラムナノディスク再構成

千葉大学大学院理学研究院・千葉大学量子構造創薬研究センター
小笠原 諭

The protocol for reconstitution of nanodisc using on-column purification method

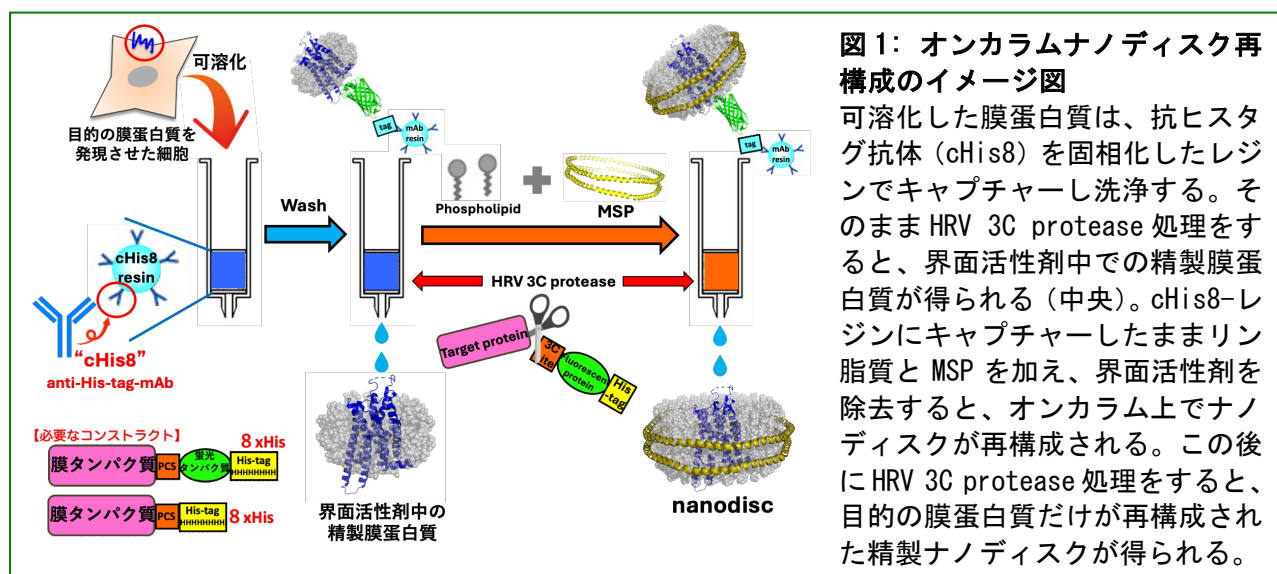
Graduate School of Science, Center of Quantum Life Science for Structural Therapeutics (cQUEST), Chiba University
Satoshi Ogasawara

(投稿日2026/8/18、再投稿日2026/9/13、受理日2026/9/15)

キーワード：膜蛋白質、ナノディスク、MSP (membrane scaffold protein)、オンカラム

概要

ナノディスクへ再構成された膜蛋白質は、機能解析だけではなく、クライオ電子顕微鏡単粒子解析にも広く用いられるようになってきている。しかし、ナノディスク再構成に苦労する話もよく耳にする。考えられる問題点として、(1) 再構成のための操作が煩雑、(2) 界面活性剤の除去方法や完全に除去できたのか判断しづらい、(3) 使用するリン脂質／membrane scaffold protein (MSP)、混合する量比、など、検討すべきパラメーターが多く、一度に複数条件の検討が難しい、(4) 空のナノディスクのコンタミ、などが挙げられると思う。我々は独自の抗ヒスタグ抗体を用いたオンカラムアフィニティ精製を確立しており、これを発展させ、オンカラムによるナノディスク再構成法へ応用している。オンカラム精製のイメージは図1の通りである。この方法は、前述した問題点に対して、(1) 通常のオンカラム精製過程に、操作をプラスアルファするだけなので、取っ付きやすい、(2) 界面活性剤の除去が容易、(3) 同時に複数の条件を検討できる、(4) 精製の原理上、空のナノディスクのコンタミがほとんどない、のような利点があると考えている。



ここでは、最も手軽に実施できるスケールのオンカラムナノディスク再構成の方法について紹介したい。出来るだけ分かりやすく文章や図で解説するが、スケールダウン／スケールアップも可能である。不明な点やご相談等があれば、お気軽に問い合わせて頂きたい。

装置・器具・試薬

オンカラムナノディスク再構成には以下のものを使用する。

装置

- ・ミックスローター（シーソー機能がある方が望ましい）
- ・ゲルろ過クロマトグラフィー装置
- ・ソニケーター（BRANSON 社など）
- ・遠心エバポレーター
- ・SDS-PAGE の泳動装置

器具

- ・ポリプレップカラムと付属の上下のキャップ（BioRad 社）
- ・ゲルベットサポート（エコノパックカラム（BioRad 社）に同梱されている）
- ・カラムホルダー（50 ml tube のフタを直径 2 cm のコルクボーラーで穴をあけたもの）
- ・ピンセット（先が尖っていないもの）
- ・カラムスタンドなどのオープンカラム精製できる一式

試薬など

- ・界面活性剤
- ・cHis8-resin（当研究室から提供可能、他の精製タグシステムでも応用可能）
- ・精製した MSP（Addgene 社からプラスミド、Sigma 社などから精製蛋白質が購入可能）
- ・各種リン脂質（Avanti Polar Lipids 社など）
- ・ポリスチレンビーズ（Bio-Beads SM-2 : BioRad 社、アンバーライト XAD-2 : Sigma 社など）
- ・HRV 3C protease（His-tag が除かれたもの、複数メーカーから精製蛋白質が購入可能）
- ・濃縮用の限外ろ過スピンカラム（Merck-Millipore 社のアミコンシリーズなど）
- ・SDS-PAGE のゲル、マーカーなど

実験手順

- 1) ナノディスク再構成条件の検討項目
- 2) オンカラム精製のための準備
- 3) ナノディスク再構成のための準備
- 4) ナノディスク再構成

実験の詳細

1) ナノディスク再構成条件の検討項目

膜蛋白質をナノディスクへ再構成する成功（高効率化）には、リン脂質の種類、MSP のサイズ、膜蛋白質：MSP：リン脂質の比率、界面活性剤の除去時間などの検討が必要である。パラメーターが多過ぎるので、用いるリン脂質やMSPの種類については、自分の研究対象とする膜蛋白質に近いホモログ、オルソログ、あるいは分子量や膜貫通の回数が近い分子のナノディスク再構成、あるいはリポソーム再構成の実施例を文献などで検索することをおすすめする。リン脂質については、用途により天然物抽出脂質と合成脂質を使い分けるのが良い。前者の場合、ターゲットの膜蛋白質が発現している組織のリン脂質組成に近いものを使用するのが、経験的に成功率が高いように思う。ナノディスク再構成でこれまでに報告されている膜蛋白質：MSP：リン脂質のモル比率は、1：1～10：100～500 と幅広い。表1に、当研究室でナノディスク再構成に成功している膜蛋白質の一部について、膜蛋白質：MSP：脂質のモル比率などをまとめた。

表1: ナノディスク再構成における膜蛋白質：MSP：脂質の例

membrane protein	MW (kDa)	TM	weight ratio	molar ratio	MSP	lipid
V-ATPase	700	11	100:16:20	1:4:200	1E3D1	POPC
A2a	35	7	100:37:588	1:10:500	1D1	POPC
P-glycoprotein	140	12	100:141:122	1:10:350	1D1	Brain polar extract
Thermophilic Rhodopsin	85	7x3	100:149:160	3:4:160	1E3D1	POPC
hERG (hERGt) Ver. 1	330	6x4	100:114:105	1:10:400	1E3D1	POPE:POPC:POPA=5:5:1
hERG (hERGt) Ver. 2	330	6x4	100:157:105	1:10:400	2N2	POPE:POPC:POPA=5:5:1

V-ATPase は *Enterococcus hirae* 由来、Thermophilic Rhodopsin (TR) は *Thermus thermophilus* 由来、それ以外はヒト由来の膜蛋白質である。TR は 3 量体、hERG は 4 量体である。

2) オンカラム精製のための準備

2-1) 精製用のコンストラクト

精製はオンカラムで行う。ここでは、当研究室で開発した 8 残基以上のヒスチジンタグに高親和性で結合するモノクローナル抗体の「cHis8」固定化レジン（cHis8-resin と呼ぶ）を用いた方法を紹介する（文献 1、2）。ナノディスク再構成を行う前に、通常の detergent 精製において、cHis8-resin を用いて問題なく精製できるか、を確認し、レジン 1 ml あたりのターゲットの膜蛋白質の吸着量を概算してナノディスク再構成に進むのが良い。

発現コンストラクトの基本構成は「膜タンパク質-HRV 3C protease site-8xHis」が良いが、当研究室では発現量をトレースするための蛍光タンパク質と（当研究室では緑色でモノマータイプの mNeonGreen を使用しているが、他の種類／色でも可）、HRV 3C protease の消化効率を高めるために、HRV 3C protease 認識配列の前後にリンカー配列を導入している。

また原理的には精製用の他のタグシステムでも応用可能である。ターゲットの溶出をプロテアーゼで行うことを避けたい場合など、エピトープペプチドで溶出効率の良いタグシステムを利用するのも良いだろう。

2-2) 界面活性剤中でのオンカラム精製の検討

ここでは、1 ml の cHis8-resin を使用したオンカラム精製を行う。1 ml の cHis8-resin には、ターゲットの膜蛋白質が約 0.3~1 mg 吸着されるため、効率良く精製できれば、ゲルろ過クロマトグラフィーに供して UV 検出ができ、精製の良し悪しが判断できる。

発現宿主から界面活性剤で可溶化した上清に 1 ml の cHis8-resin を加えて 2 時間程度、4℃で穏やかに攪拌し、吸着させる。その後、ポリプレップカラムにアプライして上清を除き、さらにバッファーで 30~50 CV で洗浄する。洗浄後、HRV 3C protease を添加して 4℃で一晩、穏やかに攪拌し、翌日に回収する。回収した画分を濃縮し、ゲルろ過クロマトグラフィーに供して、ピーク画分を SDS-PAGE で確認する。精製純度や回収量から、可溶化上清や、HRV 3C protease の添加量などを加減する。

3) ナノディスク再構成のための準備

3-1) MSP の準備

MSP は、ナノディスク化する時に膜蛋白質と脂質を巻き込むベルトのような役割をするタンパク質である。MSP はアポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) を改変して作られたもので、サイズ（ベルトの長さ）が異なるいくつかの種類が存在する。用いる MSP の種類は、ナノディスク化したいターゲットの膜蛋白質のサイズに応じて選択するのが良い（文献 3）。MSP は Addgene 社からプラスミドが、Sigma 社などから精製標品が、購入可能である。プラスミドを購入する場合、精製方法は販売元のデータシートに記載の参考文献を参照するのが良い。MSP は大腸菌を宿主として発現し、通常の His-tag 精製から得られるが、本稿では cHis8-resin を使用するので、最終的には His-tag を除去した MSP を用いる。我々はこの MSP に対して高親和性で結合するモノクローナル抗体の「biND5」を開発している（文献 4）。この抗体を用いることで、SPR などの分子間相互作用解析など、ナノディスクを用いた機能解析を行うことが可能である。MSP の派生型で NWxx と呼ばれるものもある（文献 5）。筆者らは検討していないが、アミノ酸配列は MSP のものを利用しているので、「biND5」が結合できる可能性が高い。

3-2) 脂質の可溶化

脂質は前述したように、検討すべき種類が多いパラメーターの一つである。報告としては天然脂質よりも、合成脂質を使用する例が多いと思う。我々は 1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC) を第一選択肢として用いることが多い。

脂質は 10 mg/ml 程度でクロロホルムに溶かして保存し、必要量を 1.5ml tube などに測り取る。チューブを回しながら窒素ガスを吹き付けてクロロホルムを蒸発させながら、チューブの壁面に脂質をフィルム上に広げ、さらに遠心エバポレーターで完全に乾固する。その後、精製に使用するバッファー（界面活性剤を添加していない）で 2-10 mg/ml 程度に懸濁し、ソニケーターで脂質を微細化させる（白濁するが、ソニケーションすることで半透明になる）。その後、界面活性剤（POPC で DDM なら 0.1%程度、LMNG なら 0.01%程度）で溶液が透明になるまで完全に可溶化させる（ソニケーションしても良い）。

3-3) ポリスチレンビーズの前処理

ポリスチレンビーズは事前に前処理を行っておく。ビーズは静電気を帯びて扱いにくいので、チューブにある目盛り程度で大まかに測り取るので良い。ビーズ約 10 ml 容量を 100

ml チューブに分取し、約 10 ml のメタノールを加えて十分に混和する。ビーズがメタノールに浸った状態で 1 時間おきくらいに攪拌して静置する、を約半日繰り返す。その後、メタノールを除去し、精製水を約 100 ml 加えて十分に混和し、一晚静置する。浮遊したビーズは除去し、精製水をデカンテーションによって除く。再び精製水を約 100 ml 加えて、混和後にビーズが沈むまで静置する。この精製水による洗浄操作を約 5 回繰り返す。最終的には、ナノディスク再構成する時の膜蛋白質に使用している界面活性剤無しのバッファーに置換しておく。

4) ナノディスク再構成

4-1) 操作の概要

ナノディスク再構成は 3 日間の工程で行う。操作の内容とおおよその所要時間は以下の通りである。

1 日目：

ターゲット膜蛋白質の可溶化と遠心分離 (3hr)

cHis8-resin への吸着と洗浄 (3hr)

MSP&脂質とのインキュベートとポリスチレンビーズ添加 (2hr)

2 日目：

ポリスチレンビーズの交換 (0.1hr)

洗浄と HRV 3C protease の添加 (1hr)

3 日目：

ナノディスク画分の回収 (1hr)

ナノディスク画分の濃縮 (1hr)

ゲルろ過クロマトグラフィー (2hr)

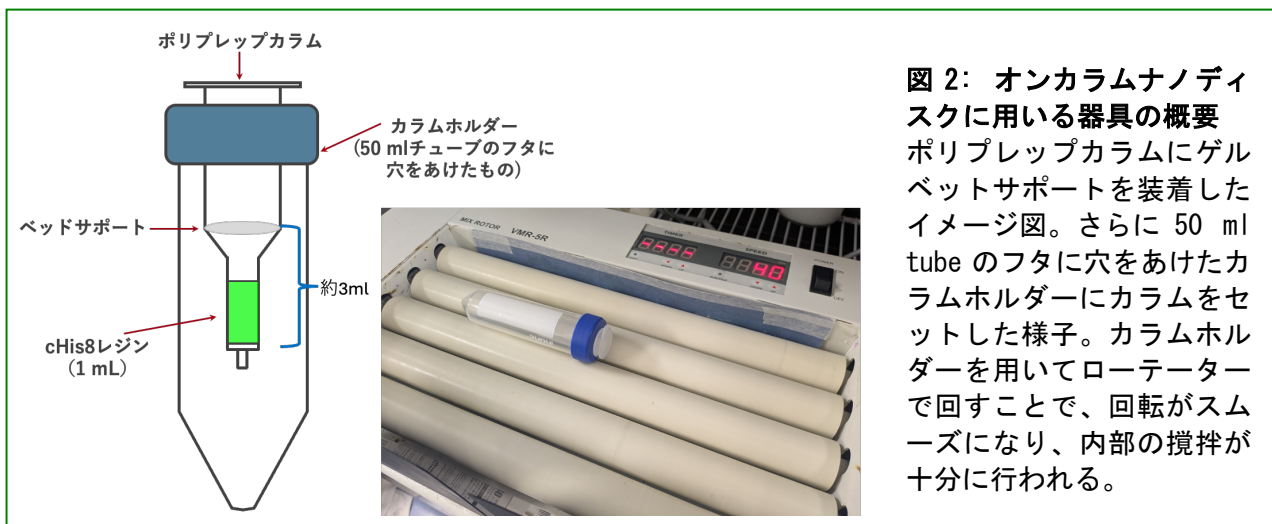
SDS-PAGE&CBB 染色&脱色 (3hr)

4-2) 操作の詳細

1 日目

まず、ターゲットの膜蛋白質を発現させた細胞や菌体を界面活性剤で可溶化する。我々は 2 時間程度で可溶化を行い、遠心、または超遠心にて可溶化上清を得る。15 ml または 50 ml tube に可溶化上清と cHis8-resin を 1 ml 加え、ローテーターで 4°C、2 時間程度インキュベートする。回転速度は 40 rpm で行っている。インキュベート後、ポリプレップカラムを準備し、レジンの懸濁液をアプライする。30-50 CV のバッファーで洗浄後、下方のキャップをしてカラムに残っているレジンと適量の MSP と脂質、バッファーで合計 2 ml 程度となるように添加し、ゲルベットサポートを載せる (ゲルベットサポートに挟まれた空間は約 3 ml の容量である)。ゲルベットサポートはピンセットなどで少し押し込むが、この時、液面とゲルベットサポートの間に泡立たないように注意する。上方のキャップをし、自作した 50 ml tube のポリプレップカラムホルダーにカラムをセットして、ローテーターで 4°C、1 時間程度インキュベートする (図 2)。この操作で、ターゲットの膜蛋白質の周囲に脂質と MSP が存在する環境になっている。インキュベート後、カラムの上方のキャッ

プを外し、前処理したポリスチレンビーズを 1 ml 程度入れて、再びキャップをして、カラムホルダーにカラムをセットし、ローテーターで 4℃、一晚、インキュベートする。



2 日目

カラムの上方のキャップを外し、中のポリスチレンビーズを除く。新たなポリスチレンビーズを 1 ml 程度入れて、再びキャップをして、カラムホルダーにカラムをセットし、ローテーターで 4℃、6 時間程度インキュベートする。インキュベート後、カラムの上方のキャップを外し、中のポリスチレンビーズを除く。次にゲルベットサポートを外し、下方のカップを外して界面活性剤無しのバッファーで 10-20 CV で洗浄する。ここまでの操作で、空のナノディスクは洗い流され、ナノディスク化されたターゲットの膜蛋白質のみが、cHis8-resin 上にキャプチャーされていることになる。下方のキャップをし、バッファー 1 ml と適量の HRV 3C protease を添加する。上方のキャップをして、カラムホルダーにカラムをセットし、ローテーターで 4℃、一晚インキュベートする（この時、ゲルベットサポートを装着しても良い）。

3 日目

カラムの上下のキャップを外し、溶出液を回収する。さらに 1-2CV のバッファーを滴下し、これも回収する。回収したナノディスク画分は、適切な cut-off の限外ろ過スピンカラムで濃縮を行い、ゲルろ過クロマトグラフィーに供して、ピーク画分を分取する。必要があれば再び濃縮を行って目的の解析へと進む。上記の操作途中で適宜、サンプリングを行い、SDS-PAGE にてナノディスク再構成を確認する。目的のナノディスクが再構成されていれば、ターゲットの膜蛋白質と MSP の 2 つのバンドが確認できるはずである。なお、MSP は CBB 染色では染色されにくい性質がある。cHis8-resin は再生できるので、pH 2.5 前後の 100 mM グリシン塩酸バッファーで洗浄後、精製で使用するバッファーなどで洗浄して中和後に保存する。

工夫とコツ

使用する界面活性剤

界面活性剤は、目的の膜蛋白質が安定に存在でき、かつ可溶化効率の良いものを選択すべきであるが、それぞれの臨界ミセル濃度（Critical Micelle Concentration: CMC）に注意していただきたい。特に CMC の低い界面活性剤（例えば Lauryl Maltose Neopentyl Glycol: LMNG）の場合は、ポリスチレンビーズの添加量や交換回数、HRV 3C protease 添加前の洗浄量を増やすなどすると良い。

脂質の可溶化

脂質の種類によって界面活性剤への可溶化のしやすさが異なるので検討が必要である。界面活性剤は再構成中に除去しなければいけないので、できるだけ低めの濃度で調製するようにする。

ゲルベッドサポートの取り付けと液量

ポリプレップカラムへゲルベッドサポートを押し込む時は、25 ml や 50 ml のディスポーザブルのプラスチックピペットを水平にカットしたものを準備すると、均等に力がかかりやり易い。

液面とゲルベッドサポートの間に泡があるとうまく攪拌されず、上方にあるポリスチレンビーズと接触できない結果、界面活性剤が除去されない、という状況になる。慣れないうちは、ゲルベッドサポートまでの空間の 3 ml をバッファーで満たし、ゲルベッドサポートを取り付けた段階でバッファーがゲルベッドサポートを少し超える程度の液量にするとうい（ただし、除去すべき界面活性剤の量が増えるので注意する）。

ポリスチレンビーズの扱い

cHis8-resin に目的の膜蛋白質がキャプチャーされ、ゲルベッドサポートにより隔てられるので、ポリスチレンビーズの添加、除去は大雑把に行う（筆者は洗ビンでバッファーを吹きつけて洗い落としている）。

また、本稿ではポリスチレンビーズをメタノールによる前処理する方法を紹介しているが、再構成後に凝集体が多い場合は、バッファーによる湿潤／洗浄だけを行ったポリスチレンビーズを用いてみるとよい。

実験の安全

脂質を溶解しているクロロホルムは揮発性が強く有毒である。この薬品の分注、乾燥操作をする場合には必ずドラフト中で行うこと。

ポリスチレンビーズの前処理に使用するメタノールの廃液は、所属する研究機関の排出規定に従うこと。

カラムホルダーに使用する 50 ml tube の穴あけの際はコルクボーラーを使用することをお勧めする。ハサミなどでも代用可能であるが、怪我に十分注意すること。

文献

- 1) Asai T. et al., *Structure*, **29**, 203–212 (2021)
- 2) Hamaguchi-Suzuki N. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **709**, 149855 (2024)
- 3) Cannon K. S. et al., *J. Struct. Biol.*, **215**, 107989 (2023)
- 4) Nakagawa F. et al., *Sci. Rep.*, **13**, 11627 (2023)
- 5) Arcario M. J. et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, **1867**, 184451 (2025)



このコンテンツはクリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0国際 ライセンスの下に提供されています。

© 日本蛋白質科学会 2026 Licensed under クリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0国際 ライセンス