

結晶化用膜蛋白質の精製法～SecDF 膜蛋白質をモデルとして～

東京大学・医科学研究所

塚崎 智也

(投稿日 2009/12/22、再投稿日 2010/1/14、受理日 2010/1/14)

キーワード：膜蛋白質, 結晶化, 精製, X線結晶構造解析, Sec トランスロコン

概要

全蛋白質の約 30%が膜蛋白質でありエネルギー生産・シグナル伝達等、様々な生命活動に重要な役割を担っているが、その構造解析は可溶性タンパク質に比べてかなり立ち後れている。現在 PDB に登録されている構造のうち膜蛋白質は 1%にも満たない。本稿では、筆者らが X線結晶構造解析を達成した膜蛋白質 SecDF の調製法を紹介する。SecDF は、蛋白質の膜透過・膜組み込み装置である Sec トランスロコン(1-3)と相互作用して、その高効率化に寄与している(4)。SecDF の精製は、大腸菌の内膜に過剰発現させた後その膜画分から界面活性剤を用いて可溶化させ行った。原著論文(5)ではふれなかった精製過程の詳細を紹介する。

装置・器具・試薬

遠心機、超遠心機 (各社)

テフロンホモジナイザー (各社)、マイクロフルイダイザー (MIZUHO)、

ドデシルマルトシド (DDM) (GLYCON)、Pefabloc (MERCK)、

AKTA explorer 10S (GE Healthcare)、Ni-NTA Superflow (QIAGEN)、

HiTrap Desalting (GE Healthcare)、HiTrapSP (GE Healthcare)、

Superdex 200 (GE Healthcare)、Amicon Ultra (Millipore)、

NanoDrop (Thermo)、透くん (日本ジェネティクス)

実験手順

- | | |
|------------------------|----------|
| 0) 前培養用培地の準備 | (第 0 日目) |
| 1) 大腸菌の大量培養 | (第 1 日目) |
| 2) 大腸菌膜画分の調製 | (第 2 日目) |
| 3) 膜蛋白質の可溶化、Ni-NTA カラム | (第 3 日目) |
| 4) 陽イオン交換カラム | (第 4 日目) |
| 5) ゲル濾過カラム | (第 5 日目) |
| 6) 透析・結晶化 | (第 6 日目) |

実験の詳細

大腸菌培養液 30L からの SecDF 膜蛋白質 (C 末端に精製のため His₆ タグを付加させている) の精製手順の詳細を紹介する。本プロトコルでは、約 3mg の精製タンパク質が得られる。

0) 前培養用培地の準備 (第 0 日目)

滅菌済み LB 培地、300mL を準備する。

1) 大腸菌の大量培養 (第 1 日目)

作製しておいた LB 培地に抗生物質と別途作製した滅菌済み 40% グルコースを加え、300mL の LB-Amp (アンピシリン) (50 μ g/mL)、Cm (クロラムフェニコール) (20 μ g/mL)、グルコース (0.4%) 培地(*1)とする。この培地に、グリセロールストック(*2)から SecDF を発現させる大腸菌 (AD202/pSTD343/pTT206) (*3) (5) をスパチュラーでひとかき植え継ぎ、37°C で 8 時間以上震盪培養する。この間に 30L の LB 培地(*4)を準備する。十分に大腸菌が生育したら、LB-Amp (50 μ g/mL)、1mM IPTG 培地に 1/100 体積量を植え継ぎ 37°C で一晩震盪培養を行う。

*1 前培養は *lac* プロモータによる目的蛋白質の発現をおさえる為、グルコースを添加する。

*2 再現よく高発現させる為に SecDF の発現を確認している大腸菌のグリセロールストックから培養を開始する。

*3 AD202 は野生株 MC4100 の *ompT* 欠損株である。pSTD343 は *lacI*^r のプラスミド、pTT206 は目的タンパク質 SecDF を *lac* プロモータにより発現させる pUC 系のプラスミドである。

*4 我々は 12 個の 5L のバツフル有り三角フラスコに 2.5L ずつの培地を作製している。

2) 大腸菌膜画分の調製 (第 2 日目)

次の日、朝から菌体を回収する。この後の操作はすべて 4°C で行う。大腸菌を遠心 (6,000g \times 12min) で回収し、菌体を洗浄するため適量の 10mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁する。再び遠心 (6,000g \times 20min) により菌体を回収する。ここで十分に上清を取り除いた後、容器ごと重さを量り大腸菌の wet 重量を見積もる (ここでは約 80g の菌体を得られたとする) (*5)。菌体を 20mM Tris-HCl (pH8.0)、0.1mM Pefabloc、3mM EDTA-Na (pH8.0)、1mM DTT 溶液で再懸濁し、全量を約 300mL にする。続いてテフロンホモジナイザーで懸濁液を均一にする (*6)。続いてマイクロフルイダイザー (Microfluidics 15,000psi \times 2) によって細胞壁を破壊する (*7)。粗抽出液から遠心 (10,000g \times 30min) で未破碎細胞と破碎後の細胞片を除いた後、上清を超遠心 (110,000g \times 1h) し膜画分を得る。膜画分は 20mM Tris-HCl (pH8.0)、15% glycerol、300mM NaCl、0.1mM Pefabloc で懸濁する。最終体積は 60mL 程度とし、テフロンホモジナイザーで均一にする。膜画分は液体窒素で凍結させ、-80°C の冷凍庫で保管する (*8)。

*5 あらかじめ容器の重量を測定しておく。菌体の量に合わせて可溶化のバッファーの体積を決定する。

*6 十分に懸濁し均一にしておかないと、マイクロフルイダイザーが詰まる原因となる。

*7 マイクロフルイダイザーの破碎の代わりに、フレンチプレス 7,500psi × 2回を用いることも可能。また、高塩濃度のバッファーはステンレスにさびが生じる原因になるため、できる限り塩濃度が低い方がよい。この段階では NaCl は加えていない。膜蛋白質は膜に埋め込まれた状態で安定であることが多い。

*8 -80°Cでの数ヶ月の保存は結晶化に問題がないことを確認している。グリセロールは蛋白質安定化の為に加えている。本プロトコールでは全膜面分からの精製を行っているが、状況に応じて、大腸菌の内膜と外膜をスクロス密度濃度勾配法によって分離し、内膜画分を回収後、内膜画分から蛋白質を精製することも可能である。内膜画分からの蛋白質精製は純度が向上するという長所もあるが、収量が下がるという短所もある。

3) 膜蛋白質の可溶化、Ni-NTA カラム (第3日目)

膜画分を氷上で溶解し、20mM Tris-HCl (pH8.0)、5% glycerol、300mM NaCl、0.1mM Pefabloc、300mM NaCl のバッファーを用いて約 200mL とする。そこに終濃度が 20mM imidazole-HCl (pH7.0)、2% ドデシルマルトシド (DDM) (*9)となるように、4M imidazole-HCl (pH7.0) 溶液(*10)、および 10% DDM 溶液を加える。緩やかにスターラーで 30min ほど攪拌させることで、膜蛋白質を可溶化させる。可溶化後、超遠心 (110,000g × 30min) により不溶性画分を取り除き、上清を 20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、0.1% DDM、5% glycerol、0.1mM Pefabloc、20mM imidazole-HCl (pH8.0) で平衡化した 5mL Ni-NTA Superflow (QIAGEN) に添加し、バッチ法により SecDF を樹脂に吸着させる。15mL の 20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl、0.1% DDM、5% glycerol、0.1mM Pefabloc、30mM imidazole-HCl (pH7.0) でカラムを洗浄したのち、imidazole-HCl (pH7.0) の濃度を段階的に上昇させ、SecDF 蛋白質を溶出させる(*11)。SDS-PAGE によって溶出蛋白質を確認する (図 1)。

*9 膜蛋白質によって適切な界面活性が異なる。

*10 imidazole は塩基性が強いのであらかじめ pH を調整しておく。

*11 洗浄・溶出に用いたバッファーと体積を以下に示す。

30mM imidazole 溶液	: 15mL
40mM imidazole 溶液	: 30mL
60mM imidazole 溶液	: 5mL
100mM imidazole 溶液	: 5mL
150mM imidazole 溶液	: 5mL
300mM imidazole 溶液	: 20mL

4) 陽イオン交換カラム (第4日目)

SecDFを含む画分(図1 下線部)を回収し、超遠心(110,000g × 30min)で不溶性物質を取り除いた後(*11)、Amicon Ultra-15 30K NMWL (Millipore)を用いて、約4mLまで濃縮を行う。その後、脱塩カラム[HiTrap Desalting (GE Healthcare) 5mL × 3個]でバッファを20mM Tris-HCl (pH7.0)、0.1% DDM、5% glycerol、0.1mM Pefablocに置換しする(*12)。超遠心(100,000g × 30min)により濃縮過程で生じた不溶性物質を取り除く。20mM Tris-HCl (pH7.0)、0.1% DDM、5% glycerol、0.1mM Pefablocで平衡したHiTrapSP 1mL (GE Healthcare)に蛋白質を吸着させ(*13)、平衡化バッファで10mLカラムの洗浄を行い、続いて20mLのNaClの濃度勾配(0-1M NaClの濃度勾配)で蛋白質を溶出させる。SDS-PAGEによって溶出蛋白質を確認する(図2)。

*11 Ni-NTA カラムから溶出した溶液は、不溶性となる物質が多く存在する。超遠心を行うことで不溶性画分を取り除き、続く濃縮過程をスムーズに進めることができる。

*12 Amicon Ultra で何度か濃縮希釈を繰り返して Buffer 交換することも可能である。

*13 大腸菌の蛋白質は陰イオン交換カラムに結合するものが多いため、陽イオン交換カラムを用いることができれば、純度が大幅に向上する(図4)。

5) ゲル濾過カラム (第5日目)

SecDFを高純度で含む画分(図2 下線部)を回収し、Amicon Ultra-15 NMWL 30K (Millipore)を用いて蛋白質を約400 μ Lまで濃縮後、20mM Tris-HCl (pH8.0)、300mM NaCl 0.1% DDM、5% glycerol、0.1mM Pefablocで平衡化したSuperdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)によりゲル濾過カラムを行う(図3)。サンプルは約200 μ Lずつ2回に分けてアプライする(*14)。SDS-PAGEによって溶出蛋白質を確認する(図3)

*14 Superdex 200 10/300 カラムの推奨されているサンプル体積は250 μ L以下であるため、2度に分けて行う。

6) 透析・結晶化 (第6日目)

純度の高い SecDF の画分 (図 3 下線部) (*15) を回収し、濃度を NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC) で測定する。SecDF の場合は $Abs_{280nm}=0.64$ を 1mg/mL として蛋白質量を見積もっている。次に Amicon Ultra-4 30 K NMWL (Millipore) を用いて濃度が 10mg/mL 以上になるように濃縮し、遠心 (10,000g × 20min) を行う。上清を Micro Dialyzer 透くん 分画分子量: 14,000 (日本ジェネティクス) (*16) を用いて 50mL の 0.02% DDM (*17) で透析 (2時間以上 × 2回) を行う。続いて、超遠心 (110,000g × 30min) を行い、その上清を最終精製産物とする。サンプルの濃度を測定し、8mg/mL になるように、透析バッファで希釈し結晶化サンプルとする。通常この精製過程により、約 3mg の結晶化サンプルが得られる (図 4)。この精製 SecDF 溶液と結晶化バッファ (26% PEG400、0.2M 酢酸ナトリウム) を 2:1 で混合し、ハンギングドロップ法で結晶化を進め良好に結晶が成長した場合、図 5 に示した美しい 8 面体の結晶が形成する。結晶化方法の詳細な内容は文献 (5) を参照されたい。4Å分解能を超える X 線の回折データが収集できる SecDF の結晶は 100 個に一つあるか

ないかであるが(*18)、最終的に 3.5Å分解能の X 線回折データの収集に成功し、SecDF の構造解析を達成した (Tsukazaki *et al.*, 論文作製中)。

*15 ゲル濾過カラムから溶出された低純度の画分は結晶しないため、高純度の画分のみ回収する。

*16 微量透析装置はいくつか試したが、微量の透析には透くんが使いやすい。透くんはその仕様上、空気の膨張、収縮の影響をうけるため、使用前に透くんを使用する温度に十分冷やしておく必要がある。

*17 透析バッファーは 0.02%DDM 溶液のみで、塩やバッファーは含まれていない。SecDF は、塩やバッファー等がなくても安定な蛋白質であったので、透析において界面活性剤を除くすべての試薬を取り除くことが可能である。蛋白質溶液から結晶化実験に持ち込むバッファーの影響を最小限にするためにこのような方法をとっている。

*18 SecDF 結晶の質は見かけでは判断がつかないため、比較的大きく成長した 300 μm 以上の結晶はすべて X 線回折像の測定を行う。

工夫とコツ

膜蛋白質の発現確認

膜蛋白質を細胞内に過剰に発現させた場合、通常その膜面分に蓄積するため、細胞あたりの発現量が少なく、検出が容易ではない。筆者はN末端もしくはC末端に精製のためのHis₆ タグを付加させた蛋白質として発現させ、ウエスタンブローディングで確認することが多い。近年タグにGFPを用い、その蛍強度から発現量と蛋白質の安定性を評価できる簡便な方法が発明された(6)。タグの付加は時として蛋白質が機能を失い不安定化する場合があるので注意が必要である。

界面活性剤の選択と可溶化について

膜蛋白質の精製は、膜に埋め込まれている状態から界面活性剤による可溶化が必要であるが、適切な界面活性剤を選択しなければ精製過程で蛋白質が活性を失ったり、沈殿を起こしたりする。よく使用され購入できる界面活性剤だけでも、数十種類にものぼるため、目的蛋白質の精製に適した界面活性剤を選択することは容易ではない。筆者は、はじめに結晶構造解析の例の多いDDMを用いる。DDMを用いて蛋白質が上手く精製できない場合は、数十種類の界面活性剤を用いたスクリーニングを行う。界面活性剤による膜蛋白質の可溶化は文献(7)が詳しい。

脂質の欠落による膜蛋白質の過剰精製

膜蛋白質は生体内で脂質と強く相互作用し膜内に組込まれているが、界面活性剤による可溶化の際、膜蛋白質を覆っていた脂質の多くが界面活性剤に置換されて可溶化する。一部の脂質は膜蛋白質と強く相互作用しており蛋白質と共に精製される。しかしながら、その脂質が精製過程において欠落することがある。脂質の欠落は膜蛋白質の不安定化を引き起こしたり、良質の結晶が得られない原因となったりする(8,9)。

実験の安全

本精製方法は、通常の蛋白質精製と同様に進められる。

文献

- 1) van den Berg, B., *et al.*, *Nature*, **427**, 36-44 (2004)
- 2) Zimmer, J. *et al.*, *Nature*, **455**, 936-43
- 3) Tsukazaki, T. *et al.*, *Nature*, **455**, 988-91 (2008)
- 4) 森 博幸, 塚崎 智也, *蛋白質核酸酵素*, **54**, 685-695 (2009)
- 5) Tsukazaki, T. *et al.*, *Acta. Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **62**, 909-12 (2006)
- 6) Kawate, T. & Gouaux, E. *Structure*, **14**, 673-81 (2006)
- 7) 村上 聡, *タンパク質をつくる* (長谷俊治, 高尾敏文, 高木淳一) 107-133, 化学同人 (2008)
- 8) Zhang, H., L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 5160-3 (2003)
- 9) Guan, L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 1723-26 (2006)

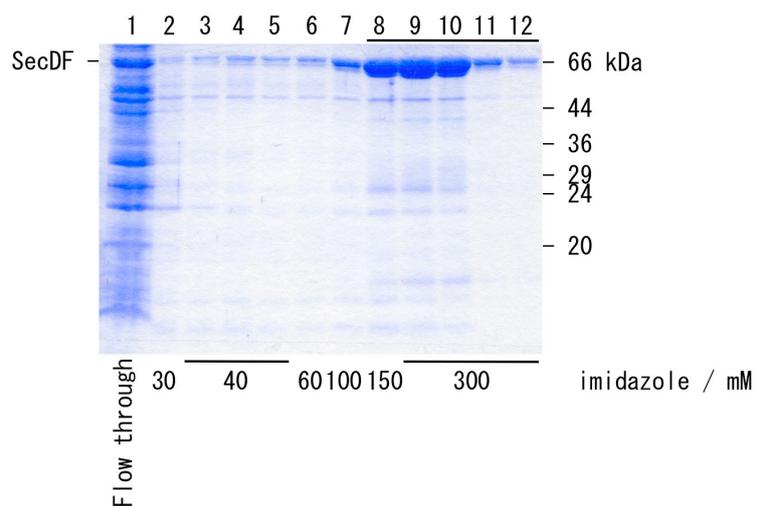


図1 Ni-NTA Superflow による SecDF の精製. バッファーは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 % DDM, 5% glycerol, 0.1 mM Pefabloc を使用し, imidazole の濃度を段階的に上昇させ蛋白質を溶出させた.

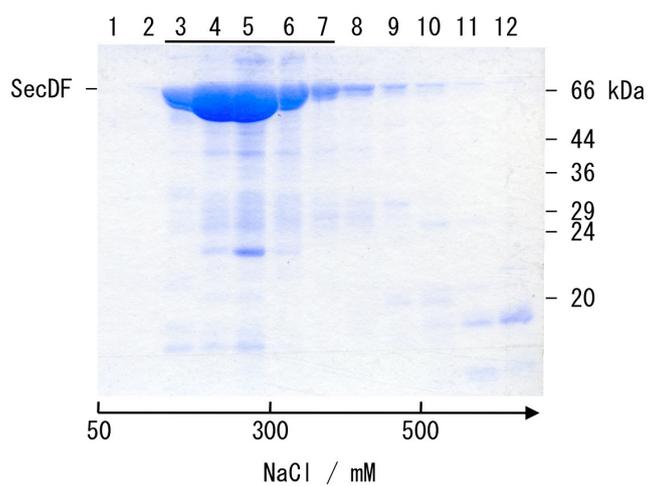


図2 HiTrap SP による SecDF の精製。バッファーは 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 0.1 % DDM, 5% glycerol, 0.1 mM Pefabloc を使用し, 0 - 1 M NaCl の濃度勾配で蛋白質を溶出させた。

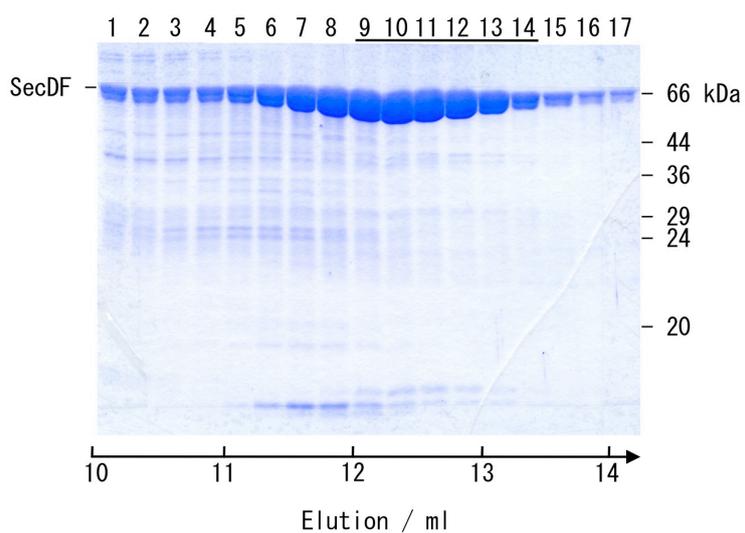


図3 Superdex 200 10/300 GL による SecDF の精製. バッファーは 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 0.1 % DDM, 5% glycerol, 0.1 mM Pefabloc を使用した.

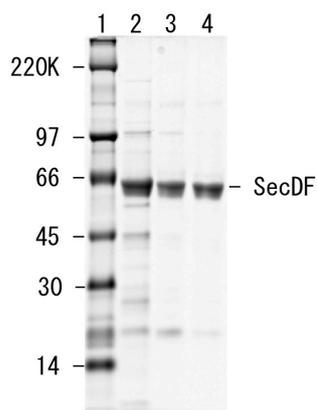


図4 SecDF の精製. 各精製段階でのサンプルをSDS-PAGEで確認した.
Lane1, Ni-NTAカラム後
Lane2, 陽イオン交換カラム後
Lane3, ゲル濾過カラム後

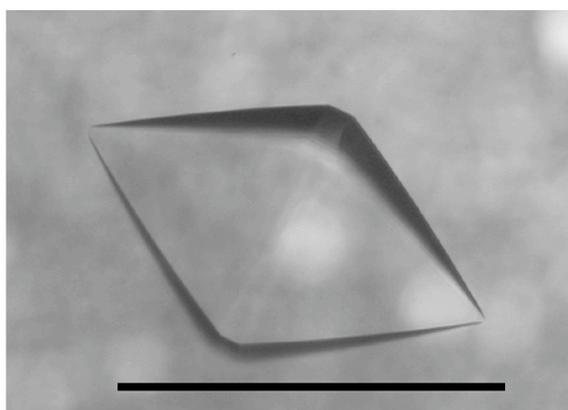


図5 SecDF の結晶. リザーバーに 26% PEG400, 0.2 M 酢酸ナトリウム を用いハンギングドロップ法で得られた. スケールバーは 400 μm .