

リン酸基で修飾したジルコニア粒子を用いた His タグタンパク質精製

SATテクノロジー・ショーケース2023

■ はじめに

遺伝子組換えタンパク質の製造過程は、1) 遺伝子組換えタンパク質の設計と、2) 設計したタンパク質の発現・培養、3) 夾雑物からの目的タンパク質の精製の3つの過程に大別される。遺伝子組換えタンパク質生産コストは、精製の過程が大半を占めている。

Hisタグは、6残基のヒスチジン(His)からなるペプチドであり、カラム充填剤に固定化した金属イオンに特異的に結合する性質を持つことから、目的タンパク質の精製に広く利用されている。Hisタグを融合したタンパク質(以下、Hisタグタンパク質)の精製には、吸着と溶出の過程がある。吸着過程ではHisタグタンパク質を金属イオンに結合させて夾雑物を分離し、溶出過程では低いpHの溶液かイミダゾールを含んだ溶液で金属イオンに結合したHisタグタンパク質を解離する。しかし、溶出過程における低pH溶液の使用はタンパク質の変性を引き起こし、他方、精製後の試料溶液に残存したイミダゾールは目的タンパク質のNMR測定や結晶構造解析に影響を与えるという欠点がある^{1,2}。そのため、Hisタグタンパク質の精製後に、リフォールディングの操作やイミダゾールの除去の工程が必要で、さらに製造コストが増大する。

本研究では、Hisタグタンパク質の新たな精製法としてリン酸基を修飾したジルコニア粒子を用いた方法を提案する。この精製法は、中性のリン酸緩衝液(PB)の濃度を変化させるだけでHisタグタンパク質の吸着と溶出が制御できる。そのため、タンパク質を変性させず、イミダゾールの混入もないため、簡便な精製法になる。

■ 活動内容

1. Hisタグのジルコニア粒子への吸着・溶出

ジルコニア粒子へのHisタグの吸着・溶出の可否を調査するため、ジルコニア粒子を充填したカラム(ジルコニアカラム)をクロマトグラフィーシステムに搭載し、Hisタグの吸着・溶出実験を行った。その結果、Hisタグは、低塩濃度溶液中(5 mM PB (pH 7.0))ではカラムに吸着し、高塩濃度溶液中(500 mM PB (pH 7.0))ではカラムから溶出した。このことから、塩濃度を変化させるだけで、ジルコニアカラムにHisタグを吸着・溶出させることが可能であることがわかった。

2. Hisタグタンパク質の精製

ジルコニアカラムによるHisタグタンパク質精製の可否を調査するため、3種のHisタグタンパク質(His-tagged Green fluorescence protein (GFP-His)、His-tagged Horseradish peroxidase (His-HRP)、His-tagged Alkaline phosphatase (PhoA-His))の精製実験を行った。ステップワイズ溶出による精製を実施したところ、純度は次のように向上した[GFP-His: 99.7%、His-HRP: 56%、PhoA-His: 72%](Fig.1)。さらに、グラジエント溶出によってHis-HRP及びPhoA-Hisの精製を行ったところ、それぞれ85%及び98%にまで純度が向上した。

本研究結果は、本精製法が温和な条件かつ簡便な手法でHisタグタンパク質の高純度精製が可能であることを示しており、新たなHisタグタンパク質精製手法としての利用が期待される。

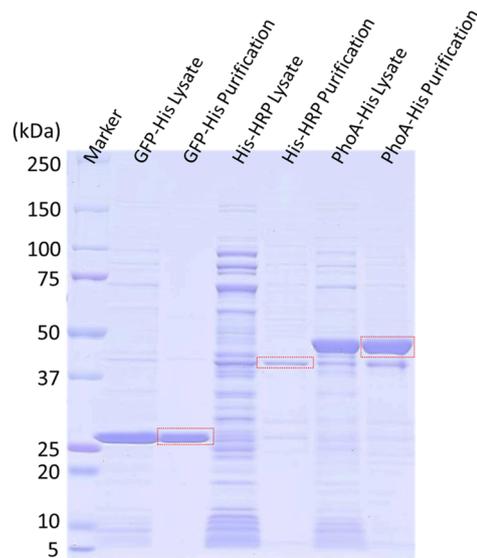


Fig.1 SDS-PAGE profiles of three His-tagged proteins

■ 関連情報等

- 1) Hefti, M. H.; et al., Anal. Biochem. 2001, 295 (2), 180-185.
- 2) Terpe, K., Applied Microbiology and Biotechnology. Springer Verlag 2003, pp 523-533.

代表発表者 狩野 彰吾(かのう しょうご)
 所属 筑波大学大学院 理工情報生命学術院
 数理物質科学研究群
 産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門
 CNT 機能制御グループ
 問合せ先 〒305-8573 つくば市天王台1丁目1-1 筑波大学
 第3エリア G棟 313号室
 TEL:080-7749-6092
 Kanohshogo0812@gmail.com

■キーワード: (1) タンパク質精製
 (2) ヒスチジンタグ (His タグ)
 (3) リン酸基修飾ジルコニア

■共同研究者: 白木賢太郎¹, 和田百代², 田中丈士², 北村昌大³, 加藤且也⁴, 平野篤²
 1) 筑波大・数理, 2) 産総研・ナノ材料, 3) 日本特殊陶業, 4) 産総研・マルチマテリアル