

# TAPS-Sulfonate

封入体からのタンパク質可溶化と巻き戻し補助剤

ユーザーガイド



第 1 版

 片山化学工業株式会社



# 目次

<b>1. 製品概要</b>	
1-1. TAPS-sulfonate とは	P.4
1-2. TAPS-sulfonate の構造	P.4
1-3. ご注文情報	P.4
<b>2. TAPS-sulfonate を用いたタンパク質精製のプロトコール例</b>	P.5～P.12
2-1. 大腸菌でのタンパク質の大量発現～菌体の回収	P.6
2-2. 封入体の回収および洗浄	P.7
2-3. 封入体の変性・還元	P.8
2-4. タンパク質の TAPS 化	P.9
2-5. タンパク質の巻き戻し	P.11
<b>3. 参考文献</b>	P. 13

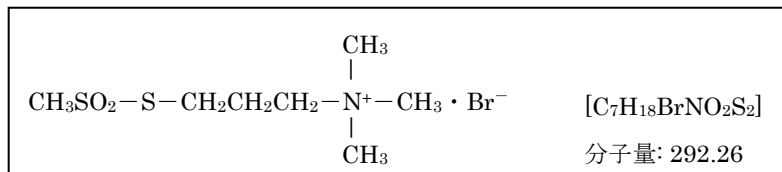
# 1. 製品概要

## 1-1. TAPS-sulfonate とは

大腸菌で組換えタンパク質を発現・精製する際、菌体内でタンパク質が封入体と呼ばれる不溶性の凝集物を形成することがよくあります。タンパク質の発現条件や宿主を検討し、封入体の形成を回避する努力をすることも一案ですが、目的のタンパク質を高純度かつ大量に含む封入体は有望な研究試料です。しかし、封入体のタンパク質を変性剤で溶解した後に活性構造へ巻き戻すことは、必ずしも容易ではありません。その原因の一つは、封入体に混在する非タンパク質性の不純物(主に核酸)が、タンパク質の適切なリフォールディングを阻害するためと考えられています。

TAPS-sulfonate は、変性剤中でタンパク質内のシステイン残基に S-S 結合を介して正電荷を付与する試薬です。この作用により、弱酸性(変性剤なし)での変性タンパク質の溶解性を飛躍的に向上させることができ、非タンパク質性の不純物を選択的に沈殿させて精製することができます。また、この TAPS 化タンパク質は、逆相 HPLC 等でさらに高純度に精製することも可能で、高純度な変性タンパク質を材料としたタンパク質生産や巻き戻しの研究等にご利用いただくことができます。

## 1-2. TAPS-sulfonate の構造



## 1-3. ご注文情報

製品名	包装	コード番号	価格(円)
TAPS-sulfonate	1g	130-5070-1	13,000
	5g	130-5070-3	54,000

- ※ 掲載価格は、全て小売希望価格です。
- ※ 価格には消費税は含まれておりません。
- ※ 予告なしに価格が変更になる場合があります。

## 2. TAPS-sulfonate を用いたタンパク質精製のプロトコール例

ここでは、本試薬を用いたタンパク質精製の手順について記載します。精製の大きな流れは、

1. 大腸菌でのタンパク質の大量発現～菌体の回収
2. 封入体の回収および洗浄
3. 封入体の変性・還元
4. タンパク質の TAPS 化
5. タンパク質の巻き戻し

という順序になります。なお、ここで提示するプロトコールはあくまで一例であり、状況に応じて必要な条件をご検討下さい。

## 2-1. 大腸菌でのタンパク質の大量発現～菌体の回収

このステップでは、pET システムを用いた大腸菌でのタンパク質の発現工程について一般例をご紹介します。

### <操作>

- ① 目的のプラスミドを導入した BL21(DE3) などの大腸菌コンピテントセルを、抗生物質入りの LB プレートに植菌する。
- ② 爪楊枝などでコロニーをピックアップし、適量の抗生物質入り LB 培地に植菌する。
  - ※ タンパク質の種類によっては新鮮なコロニーを用いることで高発現が期待されますので、高発現を求める場合は要時調製をお勧めします。
- ③ 37℃で数時間～一晩、浸とう培養する。
  - ※ この培養が、前培養となります。
- ④ 前培養液を 10mL とり、250～500mL の抗生物質入り LB 培地に添加する。
  - ※ 本培養では、抗生物質無添加の培地において発現量が向上する例があります。
  - ※ 高栄養価の培地 (TB 培地など) を用いると、発現量が向上する例があります。
- ⑤ OD<sub>600</sub> が 0.4～0.6 程度に達するまで 37℃で浸とう培養する。
- ⑥ 培地中に終濃度が 0.4～1mM となるように IPTG を添加し、さらに 3～4 時間培養を続ける。
- ⑦ 誘導後の培養液を 5000rpm 程度で 10～15 分遠心し、菌体を回収する。
- ⑧ 使用するまで、ペレットを -80℃で保存する。
  - ※ この時点で一度ペレットを -80℃にて凍結させておくと、再融解によってある程度菌体が破碎されます。

## 2-2. 封入体の回収および洗浄

このステップでは、封入体を沈殿として菌体から回収し、洗浄する工程をご紹介します。

### <試薬>

#### ・溶菌バッファー

	終濃度
Tris-HCl, pH8.0	20mM
MgCl <sub>2</sub>	2mM
卵白リゾチーム	10 μg/mL
Nuclease	

Nuclease の濃度は、使用される酵素の種類に応じてご検討ください。弊社では、Benzon Pharma A/S社の Benzonase®の 2unit/mLでの使用を推奨しています。

### <操作>

- ① -80℃にて凍結保存した大腸菌を室温で融解する。
- ② 50～100mL の溶菌バッファーに懸濁する。
  - ※菌体の量と、次ステップの超音波破碎に適した溶菌バッファーの量を適宜決定します。
  - ※懸濁直後は溶菌に伴いゲノム DNA が露出するため、粘性が高くなります。
- ③ 1 分間程度×3 回、氷上で超音波破碎を行う。
  - ※ 使用する超音波破碎機によって出力が異なりますので、最適条件の検討が必要です。
- ④ 粘性が十分に低下するまで室温で放置する。
  - ※ 超音波破碎と Nuclease の相乗効果により、溶菌とゲノム DNA の分解が起こり、溶液の粘性が低下します。
- ⑤ 12000rpm, 4℃～室温, 15 分間遠心分離し、沈殿を回収する。
  - ※ 粘性により沈澱と可溶性画分の分離が悪い場合は③のステップに戻ります。
- ⑥ 沈殿を適量の超純水中にて、超音波破碎機を用いて再懸濁する。
  - ※ ~0.2%程度の Tween-20 または Triton-X100 中で懸濁することで、さらに純度の向上が見込める場合があります。ただし、この条件で可溶化してしまう封入体もあるので条件検討が必要です。
- ⑦ 12000rpm, 4℃～室温, 15 分間遠心分離し、沈殿を回収する。
  - ※ 封入体は、-80℃にて凍結保存が可能です。

## 2-3. 封入体の変性・還元

このステップでは、回収した封入体中の目的タンパク質の変性・還元工程についてご紹介します。

### <試薬>

#### ・封入体洗浄バッファー

	終濃度
Tris-HCl, pH8.5	0.1M
EDTA	10mM
塩酸グアニジン	6M

### <操作>

- ① 大腸菌から回収した封入体を、10mL の封入体洗浄バッファーに懸濁し、ピペティングや超音波破碎機などを駆使して塊をほぐし、タンパク質を溶解する。

溶解できない封入体の塊が残る場合は、溶解済みの溶液を別の容器に移した後に、沈殿物に対し新たに変性剤を 5~10mL 添加して溶解操作を継続します。ここで溶解すれば先に溶解済みの溶液と混合しますが、溶解しない場合は、溶解済みの溶液のみを使用します。

これらの操作を繰り返して、できるだけ少量の変性剤中でタンパク質を溶解させる努力を試みてください。また、Cys 残基のチオール基の空気酸化を抑制するため、できるだけ泡立てない様にしてください。

洗浄した封入体ではなく大腸菌ペレットから作業を開始する場合も操作は同様ですが、比較的多くの変性剤が必要です。さらにゲノム DNA の破碎のため、1 分間程度×3 回、超音波破碎を行います。使用する超音波破碎機の出力により条件が異なるので、最適条件を検討してください。

- ② 可能であれば、タンパク質溶液を脱気・窒素置換する。  
※ 溶存酸素を除去することで、還元操作が確実に Rowe れることが期待されます。
- ③ 30mM 程度のジチオスレイトール(DTT)を添加する。  
※ DTT は空気酸化により失活しやすいので、なるべく添加直前に必要量を秤量し、粉末を直接添加します。
- ④ 37°C で1時間程度インキュベートし、タンパク質中のジスルフィド結合を完全に還元させる。



## 2-4. タンパク質の TAPS 化

このステップでは、目的のタンパク質を TAPS 化する工程をご紹介します。TAPS-sulfonate は純水に 2M になるように溶解して褐色瓶中で室温保存が可能なので、溶液を準備しておくくと便利です。

- ① TAPS-sulfonate を変性・還元タンパク質を含む溶液中に、使用した還元剤(モル量)の SH 基の 1.2~1.5 倍 になるように添加する。

タンパク質中の SH 基の量を考慮しても、ほぼこの条件で反応系内の全ての SH 基を酸化(TAPS 化)することができます。前述の条件(30mM の DTT)で還元した場合、DTT は分子内に 2 つの SH 基を含み、SH 基が 60mM となりますので、終濃度が 72~90mM になるよう TAPS-sulfonate 水溶液を添加します。

- ② 室温で 30 分静置する。
- ③ ポリエチレンイミンを終濃度 0.2%になるように添加する。

TAPS 化タンパク質はカチオン性のポリマーとなるため、この後の透析によって塩酸グアニジン除去すると、封入体に混入していた核酸(アニオン性のポリマー)と複合体を形成して不溶化する場合があります。そこで、TAPS 化タンパク質よりもカチオン性が高い、ポリエチレンイミン(平均分子量 約 600; CAS No: 9002-98-6)の 10%水溶液(HCl で pH を 8 に調整したもの)を準備しておき、TAPS 化タンパク質に適宜添加することで、ポリエチレンイミンが核酸と優先的に複合体を形成するため、効率的に不溶化・除去することができます。

- ④ 10%酢酸を溶液の 4 倍量添加する。
- ⑤ 遠心分離により、上清を回収する。  
※ この時、ほとんどの非タンパク質性の不純物が沈殿中に移行します。
- ⑥ 透析チューブに移し、4℃にて純水~0.5%酢酸に対して透析し、変性剤を除去する。  
※ 十分に変性剤が除去されると、沈殿物が生じます。
- ⑨ 12000rpm, 4℃~室温, 15 分間遠心分離し、上清を回収する。
- ⑦ SDS-PAGE により目的とするタンパク質が可溶性画分に回収されていることを確認する。  
※ 大腸菌ペレットではなく封入体を原料とした場合は、この時点で 90%以上の純度が期待されます。
- ⑧ 分光光度計を用いて可溶性画分の紫外部(220~400nm 程度の範囲)の吸収スペクトルをスキャンする。

タンパク質の純度が十分に高ければ、吸収極大は 275~280nm 付近に現れますが、核酸の除去が不十分な場合は 260nm の吸収が高くなります。また、320nm の吸収が高い場合は、会合状態の TAPS 化タンパク質が多く存在することを意味しており、溶解度が飽和に近いことを示しています。

### <オプション1> TAPS 化タンパク質の精製

TAPS 化タンパク質の溶液中に、発現させたタンパク質の分解物や無視できない菌体由来のタンパク質が混入している場合、逆相 HPLC(C1 など)で高純度に分離精製することが可能です。

### <オプション2> TAPS 化タンパク質の in cell folding

TAPS 化タンパク質が動物細胞の細胞内タンパク質である場合、培養細胞の上清に TAPS 化タンパク質を添加することで、TAPS 化タンパク質が細胞表面への静電的な吸着を介して細胞内に移行します。細胞内に移行するタンパク質の多くはエンドソーム様の顆粒内に存在しますが、一部が細胞質内まで到達します。細胞質内は還元的な環境であるため、細胞質内で TAPS が解離し、タンパク質が自発的・またはシャペロン依存的に巻き戻り、生理機能を発揮させることができます。

参考文献: *Biochemistry* (2006) 45, 6124-6132

## 2-5. タンパク質の巻き戻し

このステップでは、変性状態のタンパク質を活性な状態に再生する工程をご紹介します。

タンパク質の変性状態と活性構造は平衡関係にあり、生理条件下では活性構造が熱力学的に安定なため、変性状態のタンパク質は活性構造に自発的に巻き戻るポテンシャルがあります。TAPS 化タンパク質を低濃度の変性剤および還元剤を含む溶液中に希釈すると、この熱力学的安定性を駆動力として、タンパク質を活性構造に巻き戻すことが出来ます。本項では特に、分子内にジスルフィド結合を有する球状タンパク質の巻き戻しについて、代表的な 2 つの巻き戻し条件をご紹介します。

※ タンパク質の種類によっては、細胞内環境と同じシャペロンが必要なタンパク質もありますが、不可逆的な分子間会合(分子間の疎水性相互作用等)を抑制することで、巻き戻し効率を改善できる可能性があります。

- ① TAPS 化タンパク質の濃度を紫外部吸収による測定、または BCA 法などを用いて予め決定しておく。

今回ご紹介する方法で単量体のタンパク質を巻き戻す場合は、終濃度 0.05~0.2 mg/mL で行います。従って、巻き戻しの容量は使用するタンパク濃度に依存します。

- ② タンパク質以外の巻き戻し溶液(2種類の例を下記に示す)を予め調製しておき、スターラーで攪拌をしながら TAPS 化タンパク質を速やかに希釈する。

### ・巻き戻し溶液 1 (塩酸グアニジンを用いるもの)

	終濃度
タンパク質濃度	0.05~0.2 mg/mL
Tris-HCl, pH8.0~8.5	20mM
<b>塩酸グアニジン</b>	<b>0.4 M (#1)</b>
グリセロール	30%
酸化型グルタチオン	0.5mM
還元型グルタチオンまたは 2-メルカプトエタノール	2mM (#2)

### ・巻き戻し溶液 2 (尿素を用いるもの)

	終濃度
タンパク質濃度	0.05~0.2 mg/mL
Tris-HCl, pH8.0~8.5	50mM
<b>尿素</b>	<b>2 M (#3)</b>
グリセロール	30%
酸化型グルタチオン	0.5mM
還元型グルタチオンまたは 2-メルカプトエタノール	2mM (#2)

(#1) 巻き戻し後にイオン交換クロマトグラフィーを行う場合は、塩酸グアニジンが塩溶液として作用しますので、希釈等により塩濃度を適宜下げる必要があります。

(#2) 還元剤に DTT を用いることはできません。DTT は SS 結合を還元的に切断した後、自身は不活性で安定な酸

化型となり、反応が停止します。タンパク質の SS/SH 交換反応を伴う酸化的巻き戻しにおいては、タンパク質が正しい組合せの SS 結合を形成するまで、SS/SH 交換反応を継続させる必要があります。

(#3) グルタチオンの酸化型／還元型のモル比と巻き戻し効率の相関は、個々のタンパク質によって異なります。

(#4) タンパク質の種類によって、疎水相互作用の軽減に塩酸グアニジンを好むもの、尿素を好むもの、さらに他の界面活性剤を好むもの等があります。上記の2種の巻き戻し溶液で十分な活性化が認められなかった場合は、様々な添加剤を試すことをお勧めします。

TAPS 化タンパク質は直接巻き戻し溶液中に希釈しても構いませんが、予め変性剤中で還元してから巻き戻し溶液に希釈すると、巻き戻し速度が上がる場合があります。その場合は、TAPS 化タンパク質溶液に変性剤を添加し、2-メルカプトエタノールで還元します。ここで用いた変性剤・還元剤は巻き戻し溶液に持ち込みますので、終濃度を合わせる必要があります。

③ 4℃～室温で1晩～2日ほど放置する。

④ 巻き戻ったタンパク質はイオン交換クロマトグラフィーなどでさらに精製する。

巻き戻し溶液は変性剤やグリセロールが多く含まれるので、ミスフォールドしたタンパク質も溶解している場合があります。これらは活性型タンパク質よりも溶解度が低いことが多いので、純水で4倍程度希釈すると、ミスフォールドしたタンパク質が沈殿し、精製操作が容易になることがあります。

### 3. 参考文献

- 1) Inoue, M. *et.al.*, (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 28, 207-213
- 2) Seno, M. *et.al.*, (1998) *Growth Factors*, 15, 215-229

