ニッケルイオン固定多孔性中空糸膜を用いた His-tag タンパク質の アフィニティ精製

金 慶子¹⁾・萩原京平¹⁾・梅野太輔¹⁾・斎藤恭一^{1)*}・須郷高信²⁾

1) 千葉大学 工学部 共生応用化学科 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

2) 株式会社環境浄化研究所 〒370-0833 群馬県高崎市新田町 5-2

Purification of His-Tagged Protein Using an Immobilized Nickel Affinity Porous Hollow-Fiber Membrane

Keiko Kin¹⁾, Kyohei Hagiwara¹⁾, Daisuke Umeno¹⁾,
Kyoichi Saito^{1)*}, and Takanobu Sugo²⁾

1) Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Chiba University, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan

2) Environment Purification Research Institute Co., Takasaki, Gunma 370-0833, Japan

An immobilized metal affinity porous membrane of a hollow-fiber form was applied to the purification of genetically engineered histidine (His)-tagged fusion protein. An iminodiacetate (IDA) group ($-N(CH_2COOH)_2$) was introduced into the poly-glycidyl methacrylate chain grafted onto a polyethylene-made porous hollow-fiber membrane. Subsequently, nickel ions were bound to the IDA group before the permeation of a His-tagged green fluorescent protein (GFP) solution through the porous membrane. The resultant immobilized nickel affinity porous membrane (immobilized Ni membrane) had a ligand density of 0.36 mol/kg and a phosphate buffer flux of 0.4 m/h at a permeation pressure of 0.1 MPa and 298 K. His-tagged GFP adsorbed to the immobilized Ni membrane was eluted by permeating a 0.5 M imidazole solution through the porous membrane. From an SDS-PAGE analysis, the purity of the protein was found to be improved from 35 to 97%.

Key words : graft chain / immobilized metal affinity / porous hollow-fiber membrane / histidine-tagged fusion protein / green fluorescent protein

1. 緒 言

医療や基礎研究に役立つタンパク質を、遺伝子組み換え技術によって、大腸菌に作らせる技術が発展してきた。ある特定の化学構造（以後、リガンドと呼ぶ）に特異的な親和性（以後、アフィニティと呼ぶ）を示す“タグ”を有用タンパク質に付与すると、リガンドを固定した材料を使って、タグが付与された組み換えタンパク質をアフィニティに基

づいて精製することができる¹⁾。タグの中でも、ヒスチジンが金属イオンとキレート形成してアフィニティを示すため、ポリヒスチジンタグ (His-tag) が多用されている。His-tag が付与された組み換えタンパク質（以後、His-tag タンパク質と呼ぶ）の精製には、金属イオンを固定した材料が用いられる^{2~7)}。

金属イオンを細孔表面に固定した多孔性ビーズが市販されている⁸⁾。この多孔性ビーズのマトリクスとしてアガロースという親水性の材質を選んでいるので、タンパク質の非選択的吸着が抑制されている。しかしながら、金属イオン固定多孔性ビーズを使うと、濃度勾配を駆動力とした拡散によってタンパク質がビーズ内部へ移動するため、His-tag タンパク質

* Corresponding author

Tel & Fax : 043-290-3439

E-mail : marukyo@faculty.chiba-u.jp

Fig. 1 Preparation scheme for immobilized Ni membrane.

の精製に時間がかかるという欠点がある。

われわれはこれまでに、放射線グラフト重合法を適用して、精密濾過用のポリエチレン製多孔性中空糸膜の孔表面にさまざまな官能基をもつグラフト高分子鎖を付与してきた^{9~12)}。その膜の孔にタンパク質溶液を透過させることによって、グラフト高分子鎖の近傍まで透過流に乗せてタンパク質を輸送できるので、タンパク質の拡散物質移動抵抗を無視できる精製を達成できる。グラフト高分子鎖にスルホン酸基およびジエチルアミノ基を導入してイオン交換多孔性中空糸膜を作製し、それぞれリゾチームおよびアルブミン溶液を透過させて、高い透過流量でも動的吸着容量が透過流量に依存せずに一定であることを示してきた^{13,14)}。

Iwata *et al.*⁹⁾ はイミノ二酢酸 (IDA) 基をグラフト高分子鎖に導入し、Cu イオン固定多孔性中空糸膜を用いて、ヒスチジン残基をもつウシ血清アルブミン (BSA) を高速で回収できることを実証した。しかしながら、BSA と Cu イオンとのアフィニティが強いため、BSA の吸着操作時に Cu イオンの一部がグラフト高分子鎖から漏出した。また、この報告は BSA という単一のモデルタンパク質をアフィニティ回収したという基礎研究であった。

本研究の目的は、Ni イオンを固定した多孔性中空糸膜を用いて、His-tag タンパク質を発現させた大腸菌の破碎液から、His-tag タンパク質を高容量に吸着し高純度に精製することである。精製する His-tag タンパク質には、定量が容易であるという理由から、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP_{UV}, M_w 27,000)¹⁵⁾ を選択した。

2. 実験

2.1 材料および試薬

精密濾過用として工業的に利用されているポリエチレン製多孔性中空糸膜 (旭化成ケミカルズ (株) 製) を基材膜として用いた。この多孔性中空糸膜の内径、外径、空孔率、および平均孔径は、それぞれ 1.8 mm, 3.1 mm, 70%, および 0.34 μm である。グリシジルメタクリレート (GMA, $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$) および硫酸ニッケル (NiSO_4) はナカライテスク (株) から購入し、イミノ二酢酸 2 ナトリウム ($\text{NH}(\text{CH}_3\text{COONa})_2$) は和光純薬工業 (株) から購入した。

2.2 Ni イオン固定膜の作製

Ni イオン固定膜の作製は、基材膜への電子線の照射、GMA のグラフト重合、イミノ二酢酸 (IDA) 基の導入、および Ni イオンの固定という 4 つの工程から成る (Fig. 1)。まず、多孔性中空糸膜に電子線 200 kGy を照射し、ラジカルを発生させた。つぎに、その膜を 5 (v/v) % の GMA/メタノール溶液に 30 分間浸した。反応温度を 40 $^{\circ}\text{C}$ とした。グラフト重合に伴う重量増加量から、次式によってグラフト率を算出した。

$$\text{グラフト率 [\%]} = 100 \left(\frac{\text{グラフト高分子鎖の重量}}{\text{基材膜の重量}} \right) \quad (1)$$

本研究では膜の物理的強度を保つため、グラフト率を 170% に設定した。得られた膜を GMA 膜と呼ぶ。

Fig. 2 Experimental apparatus for immobilization of Ni ions, determination of phosphate buffer flux, and measurement of adsorption and elution curves of His-tagged-GFP.

Fig. 3 Structure of pUC19-GFPuv/His.

さらに、GMA膜を0.425 M イミノ二酢酸2ナトリウム溶液に80℃で浸漬し、エポキシ基の一部にIDA基を導入した。この溶液の溶媒をジオキサンと水の混合溶媒（ジオキサン：水の体積比＝40：60）とした。ここで、エポキシ基からIDA基へのモル転化率を次式によって定義し、IDA基導入反応に伴う膜の重量増加量から算出した。

$$\begin{aligned} & \text{エポキシ基からIDA基へのモル転化率 [\%]} \\ &= 100 \left(\frac{\text{導入したIDA基のモル数}}{\text{反応前のエポキシ基のモル数}} \right) \quad (2) \end{aligned}$$

引き続き、0.5 M 硫酸溶液に80℃で2 h 浸漬し、残存エポキシ基を水酸基が2つ並んだジオール (diol) 基に変換した。得られた膜をIDA-diol膜と呼ぶ。最後に、Fig. 2に示す装置を用いて、IDA-diol膜の内面から外面に10 mM 硫酸ニッケル溶液（10 mM 酢酸緩衝液, pH 5.0）を透過して、NiイオンをIDA基とのキレート形成によって膜に固定した。得られた膜をNiイオン固定膜と呼ぶ。

2.3 His-tag GFPを含む大腸菌破碎液の調製

His-tag GFPを含む大腸菌破碎液の調製は、大腸菌を用いたHis-tag GFPの合成および大腸菌の破碎の2つの工程から成る。

2.3.1 大腸菌を用いたHis-tag GFPの合成

pGFPuv (Clontech 社) のGFPuv構造遺伝子から、NdeI (CATATG) サイトを除去するために、77残基目のコドンに、ExSite™法 (Stratagene 社) を用いてCAT (His) →CAC (His) のサイレント変異を導入した。つぎに、GFPuvの構造遺伝子をPCR増幅した。このとき、開始コドン (ATG) の前にEcoRIサイトを、終止コドン (TAA) の直前に6個のヒスチジンコドン、そして終止コドンの下流にNdeIサイトを付加した。このPCR産物をpUC19のEcoRI-NdeIサイトに導入した。さらに、Lacプロモータ下流のLacZ (αサブユニット) 遺伝子部分を除去するため、ExSite PCRを行なった。得られたpUC19-GFPuv/HisをFig. 3に示す。

pUC19-GFPuv/Hisを大腸菌DH10B (Invitrogen 社) に形質転換し、単一コロニーから、2 cm³試験管内で

前培養 (LB 液体培地, 270 μ M アンピシリン, 310 K, 15 h) した. これを 1 cm³ とり, 800 cm³ LB 液体培地 (270 μ M アンピシリン, 310 K) に植え継ぎ, 12 h 培養した.

2.3.2 His-tag GFP を含む大腸菌の破碎

培養液を遠心集菌して得たペレットを, 50 mM リン酸緩衝液 (150 mM NaCl, 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル, pH 8.0) 50 mL に懸濁させた. リゾチームを最終濃度が 14 μ M になるように添加し. 液体窒素を用いて凍結と融解操作を 3 回繰り返して溶菌した. この細胞破碎液を遠心し, 上澄み液を分取した. その上澄みをミクロフィルタ (0.22 μ m, 富士フィルム (株) 製) を使って濾過し, His-tag GFP を含む大腸菌破碎液を得た.

2.4 Ni イオン固定膜を用いた His-tag GFP の精製

His-tag GFP を含む大腸菌破碎液を Fig. 2 に示す装置を用いて, 有効長 3 cm の Ni イオン固定膜の内面から外面に流量一定 (30 mL/h) で透過した. 流出液中の His-tag GFP を, 励起および発光波長を, それぞれ 355 および 538 nm にして蛍光強度を測定することによって定量した. 流出液中の His-tag GFP 濃度が供給液中のその半分に達した時点で吸着操作を止めた.

得られた破過曲線から, 供給液中の His-tag GFP 濃度に対する Ni イオン固定膜の His-tag GFP の動的吸着容量を次式によって算出した.

$$\text{His-tag GFP の動的吸着容量 [mg/g-GMA 膜]} = \int_0^{V_B} (C_0 - C) dV / W \quad (3)$$

ここで, C_0 および C は, それぞれ供給液中および流出液中の His-tag GFP 濃度 [mg/L] であり, V , V_B , および W は, それぞれ流出液量 [L], $C = 0.1 C_0$ となる流出液量 [L], および GMA 膜の重量 [g] である. この動的吸着容量を次式によって多層集積度に換算した.

$$\text{多層集積度 [-]} = (\text{動的吸着容量}) / (\text{BSA の理論単層吸着容量}) \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \text{BSA の理論単層吸着容量 [mg/g-GMA 膜]} \\ = 1000 (\text{GMA 膜の比表面積}) / \\ (\text{BSA 1 分子あたりの占有面積}) \\ \times (\text{分子量}) / (\text{アボガドロ数}) \end{aligned} \quad (5)$$

ここで, BSA1 分子あたりの占有面積は, end-on および side-on 型吸着を仮定して算出される占有面積の

Fig. 4 Dynamic binding capacity and phosphate buffer flux of immobilized Ni membrane as a function of molar conversion of epoxy group into IDA group.

平均値とした¹⁶⁾.

つぎに, 10 mM イミダゾール溶液 (20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M NaCl, pH 7.4) を透過して Ni イオン固定膜内に残っている未吸着タンパク質を洗浄した. さらに, 500 mM イミダゾール溶液 (20 mM リン酸ナトリウム, 0.5 M NaCl, pH 7.4) を透過して His-tag GFP を溶出した. 溶出操作によって得られた流出液 (以後, 溶出液と呼ぶ) 中の His-tag GFP を, BSA 濃度換算の値として, Bradford 法 (595 nm)¹⁷⁾ によって定量した.

大腸菌破碎液および溶出液中に含まれるタンパク質を, SDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) 解析した. 得られたバンドの濃さおよび面積を, image-J¹⁸⁾ を用いて画像解析した. 大腸菌破碎液および溶出液中の全タンパク質に対する His-tag GFP の純度を算出した.

吸着, 洗浄, および溶出操作における透過圧力を連続的に測定した. 緩衝液透過流束を次式によって定義し, 透過圧力と透過流量から算出した.

$$\begin{aligned} \text{緩衝液透過流束 (0.1 MPa, 298 K) [m}^3\text{/(m}^2\text{ h)]} \\ = (\text{緩衝液の透過流量}) / \\ (\text{Ni イオン固定膜の内表面積}) \end{aligned} \quad (6)$$

3. 結果および考察

3.1 Ni イオン固定膜の His-tag GFP の動的吸着容量および緩衝液透過流束

モル転化率を 2.7 から 22% までの範囲で変えて作製した IDA-diol 膜に Ni イオンを固定した膜の His-tag GFP の動的吸着容量および 緩衝液透過流束を Fig. 4

Fig. 5 Breakthrough and elution curves of immobilized Ni membrane for His-tagged GFP.

に示す. His-tag GFPの動的吸着容量は, モル転化率が高くなるにつれて増加した. モル転化率22%のIDA-diol膜にNiイオンを固定したNiイオン固定膜(Niイオン固定量0.55 mmol/g)のHis-tag GFPの動的吸着容量および多層集積度は, それぞれ200 mg/g-GMA膜および6.8であった. これまで, グラフト高分子鎖にイオン交換基を導入したときには, イオン交換基同士の荷電反発によってグラフト高分子鎖が伸長し, その鎖間にタンパク質が多層に集積することを報告してきた¹⁹⁾. 本研究では, アフィニティリガンドの導入反応時の溶媒を選ぶことによってグラフト高分子鎖を伸長させ, その鎖間にタンパク質が多層に集積することを実証した. この動的吸着容量200 mg/g-GMA膜は, GMA膜体積あたりに換算すると68 mg/cm³-GMA膜であり, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ(株)およびGEヘルスケア(株)製のNiイオンを固定したビーズ状樹脂の動的吸着容量(それぞれ15および40 mg/cm³)^{20, 21)}の4および1.5倍に相当した.

Niイオン固定膜の緩衝液透過流束は, モル転化率が高くなるにつれて減少した. これは, モル転化率が高くなるとグラフト高分子鎖が伸長して細孔径が小さくなる²²⁾からである. 以下に述べる大腸菌破碎液からのHis-tag GFPの精製では, 動的吸着容量と緩衝液透過流束とのバランスを考えて, モル転化率10%のIDA-diol膜にNiイオンを固定したNiイオン固定膜(Niイオン固定量0.36 mmol/g)を用いた.

3.2 Niイオン固定膜のHis-tag GFPの吸着および溶出特性

モル転化率10%のIDA-diol膜にNiイオンを固定したNiイオン固定膜に, 吸着操作としてHis-tag GFP

Fig. 6 SDS-PAGE analysis throughout the purification procedures for His-tagged-GFP using immobilized Ni membrane. Lane a is molecular mass standard. Lane b corresponds to His-tagged-GFP-containing cytoplasmic extract. Lanes c~h correspond to the points identified in Fig. 5 by arrowheads.

を含む大腸菌破碎液, 引き続いて溶出操作としてイミダゾール溶液を透過して得られる破過および溶出曲線をFig. 5に示す. ここで, 横軸および縦軸は, それぞれ流出量を中空部を除いた膜体積で割った値および流出液中のHis-tag GFP濃度を供給液のそれで割った値である. 流出液中のHis-tag GFP濃度が供給液中のその半分(流出流量が中空部を除いた膜体積の400倍)に達した時点で, His-tag GFPの吸着量および多層集積度は, それぞれ100 mg/g-GMA膜および3.4に相当した. 溶出曲線のピークでのHis-tag GFPの濃度は, 大腸菌破碎液のその60倍であった. また, 吸着したHis-tag GFPをすべて溶出できた.

Niイオン固定膜へのHis-tag GFPの吸着, 洗浄, および溶出という一連の操作から得られる流出液に含まれるタンパク質をSDS-PAGE解析し, Fig. 6に示す. レーンaおよびbは分子量マーカーおよび大

腸菌破碎液である。レーンの記号c～hは、Fig. 5中で矢印によって示したプロットに対応している。レーンc～eは吸着操作での流出液、レーンfは洗浄操作での流出液、およびレーンgとhは溶出液に対応する。レーンc～eでは、His-tag GFP (分子量 27,800) のバンドが他のタンパク質のバンドに比べて薄くなったことから、His-tag GFPが選択的にNiイオン固定膜に吸着されることがわかる。レーンfでは、タンパク質は検出されなかった。レーンgおよびhでは、His-tag GFPのバンドが濃く現れた。バンドの濃さおよび面積から、大腸菌破碎液および溶出液中のHis-tag GFPの純度は、それぞれ35および97%であった。以上のことから、His-tag GFPを含む大腸菌破碎液からNiイオン固定膜を使ってHis-tag GFPを精製できることを実証できた。

4. 結 言

His-tag タンパク質の分離精製材料の開発をめざして、多孔性中空糸膜にグラフト高分子鎖を付与した後、Niイオンを固定し、得られたNiイオン固定膜を用いて、大腸菌破碎液からHis-tag GFPを精製した。その結果、つぎの結論を得た。

- (1) Niイオン固定膜 (Niイオン固定量 0.55 mmol/g) のHis-tag GFPの動的吸着容量および多層集積度は、それぞれ200 mg/g-GMA膜および6.8であった。
- (2) Niイオン固定膜 (Niイオン固定量 0.36 mmol/g) に吸着操作としてHis-tag GFPを含む大腸菌破碎液、引き続いて溶出操作としてイミダゾール溶液を透過し溶出液を得た。大腸菌破碎液および溶出液をSDS-PAGE解析した。バンドの濃さおよび面積から、大腸菌破碎液および溶出液中のHis-tag GFPの純度は、それぞれ35および97%であった。

本研究では、金属イオン固定多孔性中空糸膜を使って、大腸菌破碎液からHis-tag タンパク質を多層にアフィニティ吸着できる、すなわちHis-tag タンパク質を高容量に吸着し、その後の溶出によって高純度に精製できることを実証した。

謝 辞

基材膜である多孔性中空糸膜を旭化成ケミカルズ株式会社膜・水処理事業部の久保田昇氏から提供していただきました。ありがとうございました。

文 献

- 1) 笠井献一, 松本勲武, 別府正敏: アフィニティクロマトグラフィー, 東京化学同人 (1991)

- 2) Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G : *Nature*, **258**, 598-599 (1975)
- 3) Hochuli E : *J. Chromatogr.*, **444**, 293-302 (1988)
- 4) Tallet B, Astier-Gin T, Castroviejo M, Santarelli X : *J. Chromatogr. B*, **753**, 17-22 (2001)
- 5) Kumar A, Khalil AAM, Galaev IY, Mattiasson B : *Enzyme Microb. Tech.*, **33**, 113-117 (2003)
- 6) Dieryck W, Noubhani AM, Coulon D, Santarelli X : *J. Chromatogr. B*, **786**, 153-159 (2003)
- 7) Noubhani AM, Dieryck W, Bakalara N, Latxague L, Santarelli X : *J. Chromatogr. B*, **790**, 153-159 (2003)
- 8) Liao Y, Cheng Y, Li Q : *J. Chromatogr. A*, **1143**, 65-71 (2007)
- 9) Iwata H, Saito K, Furusaki S, Sugo T, Okamoto J : *Biotechnol. Prog.*, **7**, 412-418 (1991)
- 10) Kawai T, Sugita K, Saito K, Sugo T : *Macromolecules*, **33**, 1306-1309 (2000)
- 11) Koguma I, Sugita K, Saito K, Sugo T : *Biotechnol. Prog.*, **16**, 456-461 (2000)
- 12) Hagiwara K, Yoneda S, Saito K, Shiraishi T, Sugo T, Tojyo T, Katayama E : *J. Chromatogr. B*, **821**, 153-158 (2005)
- 13) Shinano H, Tsuneda S, Saito K, Furusaki S, Sugo T : *Biotechnol. Prog.*, **9**, 193-198 (1993)
- 14) Tsuneda S, Saito K, Furusaki S, Sugo T : *J. Chromatogr. A*, **689**, 211-218 (1995)
- 15) 宮脇敦史: 「GFPとバイオイメージング: 蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで」, pp. 5-70, 羊土社 (2000)
- 16) Kubota N, Kounosu M, Saito K, Sugita K, Watanabe K, Sugo T : *J. Chromatogr. A*, **718**, 27-34 (1995)
- 17) Bradford MM : *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976)
- 18) Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ : *Biophotonics International*, **11**, 36-42 (2004)
- 19) Saito K, Tsuneda S, Kim M, Kubota N, Sugita K, Sugo T : *Radiat. Phys. Chem.*, **54**, 517-525 (1999)
- 20) 「ライフサイエンス事業部総合カタログ」, pp. 38-39, バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 (2008)
- 21) 「総合製品カタログ」, pp. 2-76, GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社 (2007)
- 22) Hagiwara K, Umeno D, Saito K, Sugo T : submitted to *Biotechnol. Prog.*

(Received 24 February 2009 ;

Accepted 18 May 2009)