

リコンビナント蛋白精製における SUMO タグのメリット・デメリット

住友日香^{#1} 牧(黒田)由紀子^{#1} 瀬尾めぐみ^{#1} 大島玲子^{#1} 三ツ井貴夫^{#1}

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地

受付 2023.3.1 受理 2023.3.10 出版受託 2023.3.25

要旨

リコンビナント蛋白は通常、タグを付加した状態で細胞に発現させた上で精製する。リコンビナント蛋白の中には、非常に不安定で、細胞内で分解されたり、細胞に有害であることがあり、その蛋白の精製が非常に困難なことがある。我々は、SUMO タグの蛋白精製を行う中で、そのメリット・デメリットについて考察した。大腸菌に His 付加、SUMO 付加遺伝子を発現させ、それぞれ精製を行った。また、SUMO 付加タンパクは SUMO プロテアーゼで SUMO 部分を特異的に切断することができることから、SUMO タグの切断を試みた。さらに切断された蛋白を種々の方法で回収した。His 付加タンパクは壊れやすく、タンパク精製に失敗したが、SUMO タグ付加タンパクは精製することができた。しかし、SUMO タグ除去が難しく、SUMO プロテアーゼを低濃度から高濃度 (5U~100U) まで試したが、切断が出来なかった。反応時間も2時間~一晩と試してみたが、変化は認められなかった。SUMO プロテアーゼは凝集性があるため、種々の試薬 (Spermidine, DMSO, NP-40, PEG, グリセロール, Trehalose) を用いて溶解性向上を図った。その中で購入してすぐの SUMO プロテアーゼに10%グリセロールを添加し2時間反応させると、SUMO タグを切断することに成功した。さらに回収は SDS PAGE-リバー染色法にて切断蛋白の回収に成功した。SUMO タグ融合蛋白は His タグと比較して、分解されやすい蛋白発現には有効なタグであるが、タグ除去や切断蛋白の回収が困難であり、用途に応じたタグの選択が大切であることを痛感した。

キーワード: SUMO タグ, リバー染色法

背景と目的

当研究室では、実験にリコンビナント蛋白を頻繁に使用している。リコンビナント蛋白の中には、非常に不安定で、細胞内で分解されたり、細胞に有害であることがあり、その蛋白の精製が非常に困難なことがある。私達は、不安定なタンパクの精製に SUMO タグを使用したことから、その体験を報告する。

材料および方法

大腸菌に His 付加、SUMO 付加させたパーキン Exon3-4 欠損遺伝子を発現させ、それぞれ精製を行った。また、SUMO 付加タンパクは SUMO プロテアーゼで SUMO 部分を特異的に切断することができることから、SUMO タグの切断を試みた。さらに切断された蛋白を種々の方法で回収した。

結果

①His タグ付加タンパクの発現 (図1)
His タグを付加した Exon3.4 欠損の変異パーキン遺伝子を pET 28a Vector に組み込みプラスミド構築を行い、BL21 株の大腸菌に発現させたが、発現できなかった。¹⁾

②SUMO タグ付加タンパクの発現 (図2)
His タグの下流に、SUMO タグを付加させ pET 28a Vector に組み込みプラスミドを構築し、BL21 株を用いて大腸菌発現系にて発現させると目的のバンドが上清で検出された。¹⁾

③SUMO タグ付加タンパクの精製も成功した (図3)
Ni-NTA カラムにて精製を行い、250mM Imidazole で溶出すると CBB 染色で、目的の

Correspondence to: 住友 日香. 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: sumitomo.nichika.wh@mail.hosp.go.jp

バンドが1本検出され、Immuno Blotにおいても抗His抗体でバンドが確認された。

図1 Hisタグ付加タンパクの発現は失敗した

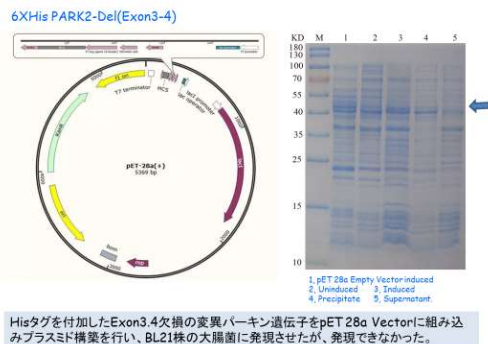


図2 SUMOタグ付加タンパクの発現は成功した

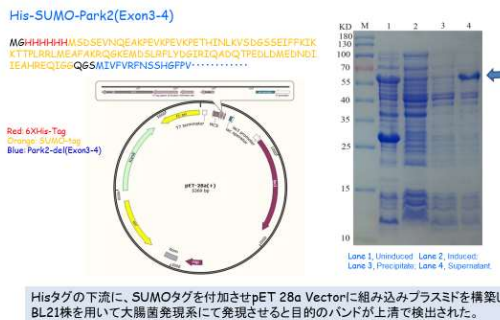
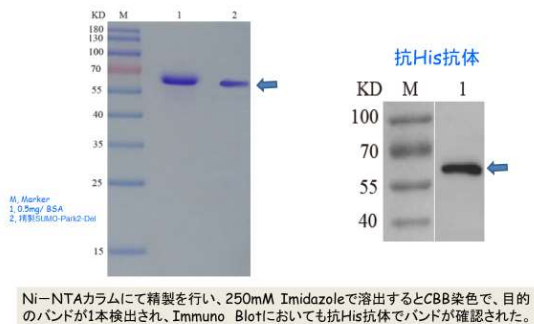
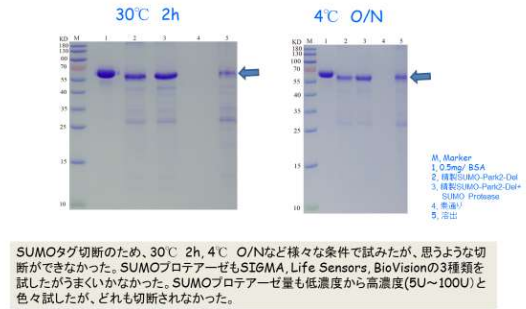


図3 SUMOタグ付加タンパクの精製も成功した



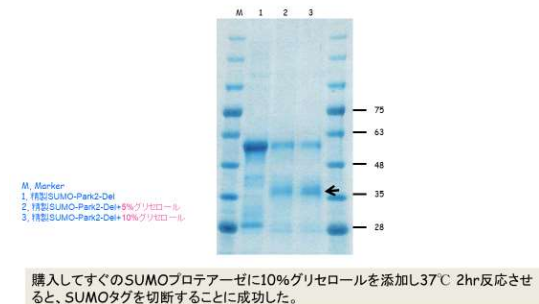
④SUMO プロテアーゼでタグ切断が難しい(図4)
SUMO タグ切断のため、30℃ 2h, 4℃ 0/Nなど様々な条件で試みたが、思うような切断ができなかった。SUMO プロテアーゼもSIGMA, Life Sensors, BioVisionの3種類を試したがうまくいかなかった。SUMO プロテアーゼ量も低濃度から高濃度(5U~100U)と色々試したが、どれも切断されなかった。

図4 SUMOプロテアーゼでタグが切断できない



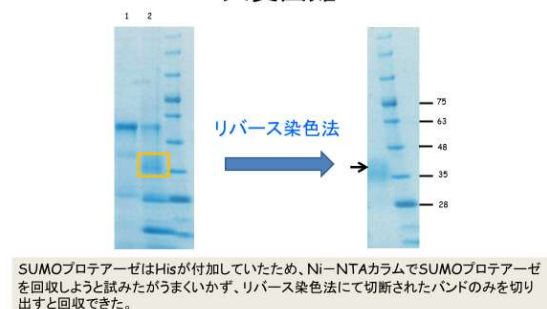
⑤SUMO タグ切断は、10%グリセロールを添加すると成功(図5)
購入してすぐのSUMOプロテアーゼに10%グリセロールを添加し37℃ 2hr反応させると、SUMO タグを切断することに成功した。

図5 SUMOタグ切断は、10%グリセロールを添加すると成功した



⑥SUMO タグ切断蛋白の回収は大変困難(図6)
SUMO プロテアーゼはHisが付加していたため、Ni-NTAカラムでSUMOプロテアーゼを回収しようと試みたがうまくいかず、リバー染色法にて切断されたバンドのみを切り出すと回収できた。

図6 SUMOタグ切断蛋白の回収は大変困難



考察

- ①不安定なタンパクの発現に SUMO タグ付加は、有用であった。
- ②しかし、SUMO タグ切断にてこずった。
- ③やっと SUMO タグが切断できたが、今度は切断された SUMO タグが離れなくて困った。
- ④SUMO タグはメリット、デメリットをよく考えて使用すべきである。

文献

- 1) Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet, 2006;15: 883-895.