

S. pombe 細胞からタンパク質を精製するには、tag をつけたタンパク質を発現させ、tag に高い affinity を示すタンパク質や抗体などを結合させたカラムを用いてアフィニティ精製を行う方法が一般的である。Tag には、Hisx6, GST, 3xHA, Pk, Myc, TAP などがよく使われる。pREP vector を用いて tag 付きタンパク質を大量発現させる方法と、ゲノム上の遺伝子に tag を導入し、single copy の遺伝子から発現させる方法がある。Hisx6, GST は pREP Vector を用いて大量発現させたタンパク質の精製に、HA, myc は抗体を用いた免疫沈降法に、TAP はタンパク質複合体の精製によく用いられている。

1. pREP vectors

pREP vector を使う場合、thiamine 存在下で発現が抑制され、thiamine 非存在下で発現が誘導される。promotor の強さによって、発現量は pREP1 (pREP2)>pREP41 (pREP42)>pREP81 (pREP82)となる。Thiamine 存在下、非存在下での相対的な promotor 活性は、以下のとおり (Gene 123, 131-136 (1993))。

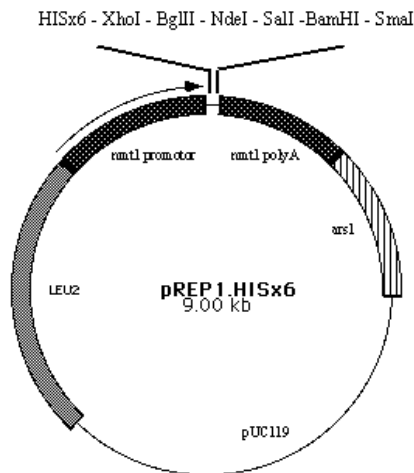
表1。

Vector	Promotor	Relative promotor activity	
		- thiamine	+ thiamine
pREP1	nmt1	80	1
pREP41	nmt41	12	0.06
pREP81	nmt81	1	0.004

現在、lab にある tag 付きの pREP vector については、表2を参照。

表2。

Vector	Marker	Promotor	Fusion	from
pLB33	LEU2	nmt1	GST (N-terminal)	Olaf Nielsen
pREP1Hisx6	LEU2	nmt1	Hisx6 (N-term)	HM
pREP1N.3HA	LEU2	nmt1	3xHA (C-term)	M. Yanagida
pREP41HM	LEU2	nmt41	Hisx6+myc (N-term)	Iain Hagan
pREP42HM	ura4+	nmt41	Hisx6+myc (N-term)	Iain Hagan
pREP41HALEU2	nmt41	3xHA (N-term)		Iain Hagan
pREP42HAura4+	nmt41	3xHA (N-term)		Iain Hagan
pTN59	ura4+	nmt41	FLAG (N-term)	T. Nakamura
pTN189	LEU2	nmt41	GST (N-term)	T. Nakamura
pTN329	LEU2	nmt41	Pk (N-term)	T. Nakamura
pTN63	ura4+	nmt41	FLAG (C-term)	T. Nakamura
pTN201	LEU2	nmt41	myc (C-term)	T. Nakamura
pTN211	ura4+	nmt41	myc (C-term)	T. Nakamura
pREP41Pk.C	LEU2	nmt41	Pk (C-term)	A.M. Carr
pREP42Pk.C	ura4+	nmt41	Pk (C-term)	A.M. Carr
pTN330	LEU2	nmt81	Pk (N-term)	T. Nakamura
pTN280	LEU2	nmt81	HA (C-term)	T. Nakamura



M G S S H H H H H A S R T D L
 TAC ATG GGT AGC AGC CAC CAT CAT CAC CAT CAT GCC TCG AGA ACA GAT CTT

 H M S T L E D P R
 CAT ATG TCG ACT CTA GAG GAT CCC CGG G

 NdeI Sall (XbaI) BamHI SmaI

2. Hisx6 tag をつけたタンパク質の発現と精製

2.1 Transformation と発現のチェック

- pREP vector (pREP1.Hisx6 や pREP41HM など)へ発現させたいタンパク質をコードする遺伝子をサブクローニングする。
- vector を用いて EMM2-leu+thiamine プレート上で leu1-32 株 (LEU2 marker の場合)を形質転換させる。
- コロニーを得たら、EMM2-leu+thiamine プレート上に広げる。
- 細胞が増えたら、EMM2-leu+10 μ M thiamine 液体培地(2-5 ml)で培養する。Overnight。(プレート上の細胞をかき取って glycerol stock を作る。thiamine 非存在下の phenotype を見るために、EMM2-leu-thiamine プレートに塗り広げて、一日 incubate。)
- mid-exponential phase まで培養。細胞数をカウント。10⁷ 細胞を遠心で集めて、500 μ l EMM2 で2回洗う。1 ml EMM2 に細胞を resuspend する。
- 50 ml tube に 5 ml の EMM2-leu-thiamine と 100 μ l 分の細胞(10⁶ cells)を加える。(2 x 10⁵ cells/ml となる)。
- 30°C で 24 hr 培養する。
- 細胞を集めて、氷冷した 1 ml H₂O で洗う。
- 100 μ l H₂O に resuspend して、5分間 boil。
- Glass beads で破壊して、SDS-PAGE 用のサンプルを作る。(SDS-PAGE/Blot の項を参照)。
- 抗 Hisx6 抗体や抗 myc 抗体(pREP41HM 等の場合)を用いて、immunoblot で発現をチェック。

2.2 大量培養

- 500 ml EMM2-leu/2L flask, 1~4本準備する。
- EMM2-leu+thiamine で前培養した細胞(500 ml あたり 10⁸ cells 必要)を EMM2 で洗い、2 x 10⁵ cells/ml で inoculate。
- 30°C, 225rpm, 24 hr 培養。
- 集菌。4,000rpm x 20 min。
- 10 ml の氷冷した STOP buffer (40 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EGTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃N, pH8.0)を加え、resuspend。
- 50 ml tube に移して遠心。3,500 rpm x 5 min。
- 上清を捨てて、もう一度遠心。3,500 rpm x 2 min。
- 細胞の重さを量る。

- 液体窒素中で細胞を凍結。-150°C保存。

2.3 CRYOPRESS による細胞破壊

- 氷上で凍結細胞を溶かす(CRYOPRESS 一回あたり 1g 以下の細胞を使う)。

- 5 ml の TN buffer (40 mM Tris-HCl (pH8), 0.5M NaCl, 10% glycerol) + PI(Roche)* + PI (X)**を加え、resuspend。 * Protease Inhibitor cocktail (Complete-EDTA free). **chymostatin, pepstatin, leupeptin 10 mg/ml in DMSO, 1/1,000 添加。

- 遠心。3,500 rpm x 5 min.

- 上清を捨てて、遠心。35,000 rpm x 2 min.

- 液体窒素中で凍結。

- CRYOPRESS の最も大きいサンプルセルの中に凍結細胞を入れて、破壊 (30sec x 5 回)。破壊の程度を顕微鏡でチェック。

- 2 ml tube へ凍結破壊細胞を移す。

2.4 タンパク質の精製

- 1 g cells あたり 4 ml of TN (+ PI)に溶かす。2 ml tube を2本使う。

- cfg. 15,000 rpm x 15 min.

- sup に 0.02 % NP-40 と 40 mM imidazole (pH8)を加える。

- TN + PI + NP-40 + 40 mM imidazole で平衡化した Nickel ProBond resin (100-150 μ l/tube)に sup を加え、懸濁。

- rotator で tube を回しながら 1 hr 懸濁、4C。

- 1.6 ml の TN + 40 mM imidazole+ PI(X)で 2 回洗う(4,000rpm, flash)。

- 2本の tube の resin を一本にまとめて、更に2回洗う。

- resin の2倍量の Elution buffer (TN + 300 mM imidazole + PI(X))を加えて混ぜる。5分間懸濁。

- 遠心。4,000 rpm, flash. Sup を回収(S1)。

- resin の2倍量の Elution buffer を再度加えて混ぜる。5分間懸濁。

- 遠心。4,000 rpm, flash. Sup を回収(S2)。

- タンパク濃度を測る。

- 必要があれば、透析。

- 分注して、液体窒素中で凍結。-80, or -150°Cで保存。