

A120 His-Tagタンパク質特異的精製機能を有する高分子多孔膜の開発

(神戸大院工)○(学)田林 俊介 (正)丸山 達生* (神戸大研究環)(正)田中 勉
(神戸大院工)(正)大向 吉景 (正)松山 秀人

1. 緒言

近年、様々な研究開発、分析現場において、作業の省力化や試料の減量、またデータの精密化を目的として、多種多様な試料や情報を一度に同時処理しようとするハイスループト化が進められている。そこで本研究では、タンパク質精製が一段階で可能な機能性高分子多孔膜の開発を行った。ここでは目的タンパク質に導入したペプチドタグ (Hexahistidine-tag) と親和性を示す官能基を高分子多孔膜に導入し、タンパク質精製機能を有するフィルター膜の作製を目指した。フィルター膜は、取り扱いが容易であること、使い捨てできることなど多くの利点を有しているため、タンパク質精製、開発のハイスループト化に大きく役立つことが期待される。

2. 実験方法

N-hydroxysuccinimide(NHS)化したオレイン酸に、N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid (A B-NTA) を添加し、室温で20時間反応させ、AB-NTA界面活性剤を得た。次に、高分子として酢酸セルロース (20 wt%) とAB-NTA界面活性剤 (1 wt%) を、溶媒にトリエチレングリコールを用い、熱誘起相分離法 (TIPS法) により多孔膜を得た。多孔膜作製時は相分離を利用するので、界面活性剤化したAB-NTAが相分離界面、つまり膜表面にでてくると期待される。この作製した膜表面のA B-NTAに、Ni(II)(0.1 M)を加えることにより錯形成させ、His-tag をN末端に有するenhanced green fluorescence protein (His-tag EGFP) (0.04 mg/ml) を加えると、ヒスチジンタグ部分がNi(II)に配位し、膜表面に結合される (Fig. 1)。ここで作製した膜に、His-tag EGFP溶液を添加した際の溶出液を[N on-adsorption fraction]とした。次に純水で洗浄した際の溶出画分を[Passing fraction]とし、イミダゾール

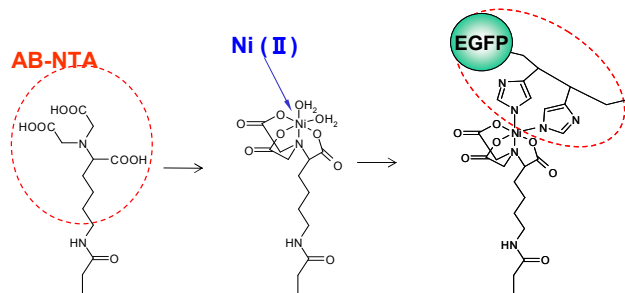


Fig.1 Immobilization of His-tag protein to surface to the membrane

ール(500 mM)でHis-tag EGFPを溶出し回収した [Elution fraction]。

3. 結果及び考察

Fig. 2に、His-tag EGFPとTRITC蛍光標識化BSAの混合溶液を、作製した膜に透過させた際の、それぞれの画分のEGFP、BSA量を示した。図より、作製した膜を用いて、BSA混合溶液中からHis-tag EGFPを選択的に捕捉 (吸着) 可能であることが確認できた。また、吸着His-tag EGFPをイミダゾール溶液で溶出可能であることが確認できた。

Fig. 3に、酢酸セルロースに様々な割合でAB-NTA界面活性剤を添加し膜作製した際のHis-tag EGFP捕捉量を示した。図より、酢酸セルロースにAB-NTA界面活性剤を1/20程度添加すると、His-tag EGFP捕捉量は飽和した。

以上により、AB-NTA界面活性剤を混合した酢酸セルロース膜を用いることで、タンパク質混合溶液中から、目的タンパク質を選択的に吸着分離することが可能となった。

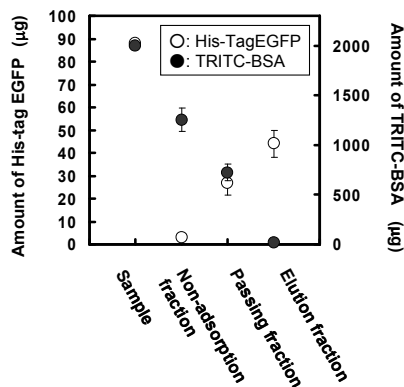


Fig. 2 Protein amount in fractions eluted from the CA-ABNTA membrane.

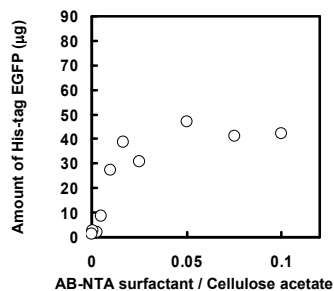


Fig. 3 Effect of AB-NTA surfactant on the protein binding capacity of CA-ABNTA membrane.

* TEL/FAX: 078-803-6070

E-mail: tmarutcm@crystal.kobe-u.ac.jp