

タンパク質発現 プロトコール

発現系の選択から精製までの原理と操作

序 ————— 永田恭介

1 章 タンパク質の性質を知る 11

1 タンパク質が必要になるとき — 奥脇 暢, 永田恭介, 加藤広介, 川口敦史 12

①タンパク質を解析するために

1 精製タンパク質の意義 2 タンパク質発現系の利用 3 タンパク質の種類

②タンパク質を手に入れるための戦略

1 未知因子の精製 2 既知因子の精製

③本書の特徴および概要

2 タンパク質の性質は? ————— 加藤広介 16

①タンパク質の構造

②タンパク質固有の性質を知る

1 分子量と等電点 (pI) 2 タンパク質のドメイン構成 3 複合体の有無 4 細胞毒性 5 修飾の有無 6 細胞内局在

③タンパク質の安定性や溶解性に影響する要因

1 温度 2 pH 3 塩濃度 4 界面活性剤 5 変性剤 6 二価金属と金属キレート試薬 7 プロテアーゼとプロテアーゼ阻害剤 8 SH基保護剤, 酸化防止剤 9 その他のタンパク質安定化因子

④未知タンパク質の性質を調べる方法

⑤タンパク質のデータベースや解析ツール

3 タンパク質を精製する ————— 川口敦史, 若井ちとせ 26

①精製法の選択

1 精製法選択の判断材料 2 精製法選択の考え方

②タグの選択とタグを用いた精製の原理

1 金属キレートによる精製 2 アフィニティー精製 3 抗原抗体反応による精製 4 タグの切断

③カラムクロマトグラフィーによる精製

1 各精製段階での選択肢 2 イオン交換クロマトグラフィー 3 疎水性相互作用クロマトグラフィー 4 ゲル濾過クロマトグラフィー 5 アフィニティークロマトグラフィー

④変性と再生操作

2章 タンパク質発現系の種類と原理

35

1 発現系の種類と特徴 ————— 内藤忠相, 川口敦史 36

①各発現系で発現するタンパク質の特徴

②各発現系の発現量の目安

1 発現量の調節 2 宿主の培養スケールの選択

③目的に適した発現系を選択する

1 結合活性を知りたい場合 2 抗原を調製する場合 3 酵素活性を測定する場合 4 結晶化する場
合 5 放射性標識をする場合

④各発現系のベクターの特徴

⑤コストと時間

2 大腸菌 ————— 浅賀正充 45

①大腸菌発現系の背景と原理

1 DNA複製メカニズム 2 RNA転写メカニズム 3 タンパク質翻訳メカニズム 4 バクテリオファージ
5 大腸菌を用いた外来タンパク質発現系の確立

②ベクターの構造と特徴

1 ベクター改良の歴史 2 ベクターの複製と不和合性 3 タンパク質発現ベクターの構成 4 タンパ
ク発現システム 5 抗生物質と薬剤耐性遺伝子 6 プロテアーゼによるタグの除去

3 昆虫細胞 ————— 久武幸司, 福田 綾 58

①昆虫細胞発現系の背景と原理

1 バキュロウイルスについて 2 バキュロウイルスの増殖メカニズム 3 ウイルスのDNA複製メカニ
ズム 4 ウイルスのRNA転写メカニズム 5 ウイルスのタンパク質翻訳メカニズム 6 外来タンパク
質発現系の確立

②ベクターの構造と特徴

1 昆虫細胞内での組換えに用いるトランスファーベクター 2 大腸菌内での組換えに用いるベクター

4 酵 母 ————— 内藤忠相, 杉山賢司 66

①酵母の種類と各発現系の概略

1 出芽酵母 2 ピキア酵母 3 分裂酵母

②酵母発現系の背景と原理

1 DNA複製メカニズム 2 RNA転写メカニズム 3 タンパク質翻訳メカニズム 4 栄養要求性マーカ
ーの確立 5 DNAの導入とトランスフォーメーション 6 出芽酵母におけるプロモーターの選択 7 メ
タノール資化性ピキア酵母 8 その他の発現系

③ベクターの構造と特徴

1 複製起点 2 プロモーター 3 酵母ゲノムへの発現ユニットの組み込み

5 哺乳動物細胞 ————— 村野健作, 加藤広介 79

①哺乳動物細胞発現系の背景と原理

1 DNAの複製メカニズム 2 RNAの転写メカニズム 3 タンパク質の翻訳メカニズム 4 遺伝子導入
の歴史・発展

②ベクターの構造と特徴

1 プロモーター 2 スプライシングおよびポリA付加シグナル 3 Kozak配列 4 複製起点
5 恒常発現細胞株の構築 6 IRESを用いたバイシストロニックな遺伝子発現 7 融合遺伝子

6 無細胞翻訳系 川口敦史 88

① 無細胞翻訳系の背景と原理

- 1 細胞抽出液の種類 2 翻訳反応 3 翻訳反応を阻害する要因

② ベクターの構造と特徴

- 1 プロモーターとターミネーター 2 キャップ構造およびポリA鎖 3 翻訳効率, mRNAの安定性を高める

3章 タンパク質発現プロトコール 93

1 大腸菌 浅賀正充, 朴 三用 94

① 大腸菌株とベクターの種類

- 1 大腸菌株の種類と特徴 2 ベクターの種類と特徴

② コンピテントセルの調製とベクターの導入

- 1 コンピテントセルの調製 2 ベクターの導入—コンピテンシーチェックを例に

③ 大腸菌の培養とタンパク質の発現

④ 大腸菌の破碎とタンパク質の抽出

- 1 凍結融解法 2 酵素 (リゾチーム) 消化法 3 超音波処理法 4 封入体に蓄積したタンパク質のオトロピック塩による可溶化

⑤ 大量精製の際の培養とタンパク質発現

- 1 培養方法 2 培地 3 培養条件 4 細胞破碎 5 タンパク質精製

2 昆虫細胞 久武幸司, 福田 綾 120

① 細胞株とベクターの種類

- 1 細胞株の種類と特徴 2 トランスファーベクターの種類と特徴

② 昆虫細胞の培養

- 1 培地の準備 2 細胞培養

③ ウイルスの調製と PFU の決定

④ ウイルス感染とタンパク質発現

⑤ 細胞の破碎とタンパク質の抽出

3 酵母 内藤忠相, 杉山賢司 145

① 酵母株とベクターの種類

- 1 出芽酵母 2 分裂酵母 3 ピキア酵母 4 ベクターの種類と特徴

② 酵母の培養とベクターの導入

- 1 培地 2 酢酸リチウム法によるベクターの導入 3 グリセロールストック作製法

③ タンパク質の発現

- 1 出芽酵母における GAL-1 プロモーターを利用したタンパク質発現 2 ピキア酵母におけるメタノールを用いたタンパク質発現—小スケールでの発現チェックおよび培養条件の至適化 3 ピキア酵母におけるメタノールを用いたタンパク質発現—大スケール

④ 細胞の破碎とタンパク質の抽出

- 1 タンパク質発現の確認のみを目的とした方法 2 ガラスビーズを用いた小スケールの方法 3 フレンチプレスを用いた大スケールの方法

4 哺乳動物細胞 村野健作, 加藤広介 172

① 培養細胞の選択

- 1 普遍的な細胞機能の解析 2 細胞分化および組織機能の解析 3 がん研究 4 ウイルス研究

- ②ベクターの種類と特徴
- ③細胞培養
 - 1 細胞を凍結ストックから起こす場合 2 接着細胞の継代 (HeLa細胞) 3 浮遊細胞の継代 (HeLa-S3)
- ④遺伝子導入
 - 1 リポフェクション法 2 リン酸カルシウム共沈殿法 3 エレクトロポレーション法
- ⑤細胞の破碎とタンパク質の抽出
 - 1 発現の確認のみを目的とした細胞抽出液の調製 2 精製を目的とした細胞抽出液の調製

5 無細胞翻訳系 五島直樹, 山口 圭 197

- ①鋳型 DNA の調製と発現ベクターの種類
 - 1 ウサギ網状赤血球発現系とその発現ベクター 2 コムギ胚芽発現系とその発現ベクター 3 PCR法による鋳型 DNA の調製
- ②タンパク質発現
 - 1 ウサギ網状赤血球発現系 2 コムギ胚芽発現系

6 タンパク質の精製 加藤広介 212

- ①タグによる精製
 - 1 His タグ精製 2 GST タグ精製 3 FLAG タグ精製
- ②クロマトグラフィーによる精製
 - 1 抽出液の調製 2 カラムの作製法 3 各種クロマトグラフィーによる分離操作
- ③その後の実験のために
 - 1 透析によるバッファー交換 2 変性・再生操作 3 タンパク質の定量法 4 試料の保存

4章 遺伝子組換え実験の法律および省令 241

1 問題となる法律および省令 竹内 薫 242

- 1 カルタヘナ議定書 2 カルタヘナ法 3 二種省令 4 各研究機関の規程

2 申請の具体例 竹内 薫 246

- ①種々の宿主を用いた実験の具体例
 - 1 大腸菌を宿主に用いた遺伝子組換え実験 2 酵母を宿主に用いた遺伝子組換え実験 3 培養細胞および無細胞翻訳系でのタンパク質発現 4 ウイルスを用いたタンパク質発現
- ②注意が必要な遺伝子組換え実験
 - 1 病原体タンパク質の発現 2 大臣確認が必要となる実験 3 遺伝子導入した培養細胞の動物個体への移植 4 遺伝子組換え生物の譲渡
- ③遺伝子組換え実験申請書作成の具体例

付録 培地・試薬の調製法 253

索引 263