

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

I 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 酶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 タンパク質発現システム 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 ウィルスのDNA複製メカニズム ④ ウィルスのRNA転写メカニズム ⑤ ウィ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を用いたバイリ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力オトロビ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最適化 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 ウィルス研究

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錆型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法による錆型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** ウィ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