

ショウジョウバエ S2 細胞による蛋白質の発現

九州大学大学院・システム生命科学府・システム生命科学専攻

柴田 俊生、小柴 琢己、川畑 俊一郎

(投稿日 2009/6/29、再投稿日 2009/8/17、受理日 2009/8/17)

キーワード：昆虫細胞、ショウジョウバエ

概要

S2 細胞は、マクロファージ様活性を示すショウジョウバエ胚由来の培養細胞株である。この S2 細胞を使った組換え蛋白質の発現系は、大腸菌では不可能な高度な翻訳後修飾（ジスルフィド結合形成や糖鎖修飾）を行うことができ、活性を保持した酵素の発現も可能であるので、一般的に広く用いられている。また、一般的に発現量は哺乳細胞発現システムより多く、数百 μg ～数十 mg/L である。筆者らは高度なジスルフィド結合が形成されていると推定されている蛋白質において、活性のある目的蛋白質を 1 L 培養あたり約 2 mg 得ることができた。他にも、糖鎖修飾のある哺乳細胞の酵素や受容体などの高収率な発現も多数報告されている (1, 2)。培養時には CO_2 インキュベーターを必要とせず、接着性もほとんどないため、培養は容易である。遺伝子を導入、発現させるときに必要なのは、発現用のプラスミドとトランスフェクション試薬、および発現用試薬のみで、他の昆虫細胞株である Sf9 細胞の発現系のようにバキュロウイルスなどを別途必要とせず、操作も比較的容易である。また、リン酸カルシウム沈殿法により一度プラスミドをトランスフェクションさせれば、数百コピーの目的遺伝子がゲノムに組み込まれ、安定発現株を得ることもできる。早ければ一ヶ月程度で安定発現株を得ることが可能である。このような利点のあるショウジョウバエ S2 細胞発現系による蛋白質の発現の実際について紹介する。

装置・器具・試薬

クリーンベンチ

細胞培養用インキュベーター

恒温水槽

倒立顕微鏡

10cm 細胞培養用プレート (各社)

6-well プレート (各社)

クライオバイアル (各社)

ヘモサイトメーター (各社)

Drosophila S2 cells (Invitrogen)

Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco)

Serum Free Medium (Gibco)

L-グルタミン (Sigma)
Fetal Bovine Serum (Gibco)
ペニシリン-ストレプトマイシン (Sigma)
リン酸入り HBS (各社)
CuSO₄ (各社)
S2 cells 用発現ベクター (Invitrogen)
選択用ベクター (pCoHygro or pCoBlast など) (Invitrogen)
選択用抗生物質 (各社)
PBS (各社)

(なお、発現用の細胞やプラスミド、試薬などがセットになったキットが Invitrogen から発売されている。)

実験手順

[下準備]

- 1 日目
細胞を起こす。培地の作成。
- 2 日目～
細胞培養。

[一過性発現]

- 1 日目
細胞を 6-well プレートにまく (2×10^6 cells)。
- 2 日目
プラスミドのトランスフェクション。
- 3 日目
発現誘導。
- 4 日目～
蛋白質の回収、発現チェック。

[安定発現]

- 1 日目
細胞を 6-well プレートにまく (2×10^6 cells)。
- 2 日目
プラスミドのトランスフェクション。

5 日目

選択開始。

3 週間～

大量培養、発現誘導、蛋白質の回収、精製。

実験の詳細

[通常培地]

Shneider's *Drosophila* Medium に、65°C で 30 分間処理した Fetal Bovine Serum (10%)、ペニシリン (50 units/mL)、ストレプトマイシン (50 μ g/mL)、L-グルタミン (1 mM) を各終濃度になるようにそれぞれ加える。これをフィルター滅菌し、乾熱滅菌済みの試薬瓶に入れる。使用前に 30°C の高温水槽で温めておく。

[継代方法]

1×10^7 cells/mL の S2 細胞が入っているクライオバイアルを液体窒素から取り出し、軽くふたを開けて、30°C の恒温水槽で解凍する (DMSO が入っているので手早く融解作業を行う)。ピペッティングによる懸濁を行った後、10 mL の培地が入った 10 cm プレートにまんべんなく滴下する。その後、28°C で 30 分間インキュベートする。インキュベート後、細胞を 15 mL チューブに回収し、1,000 rpm で細胞を落とし、上清を捨てる。新たに培地 10 mL を加え、懸濁し、再びプレートにまき、28°C で培養する。

コンフルエント (1×10^7 cells/mL 程度) になったら、 $2-4 \times 10^6$ cells/mL になるように 10 mL の培地入り 10 cm プレートで継代する。S2 細胞は単層で増えるため、コンフルエントになると細胞塊を形成し、浮遊した状態になるものが出てくる。なお、28°C のインキュベーターの場合、およそ 3 日でコンフルエントになる。5 mL ピペットを使い、穏やかなピペッティングにより細胞をはがす。接着性は弱いのでピペッティングで簡単にはがすことができる。起こした細胞を 3 回程度継代する。起こしたばかりは元気がないのでしばらく培養を続ける。また、継代時にストック用としてプレート数枚分に増やしておく。

[細胞ストック方法]

培養しているプレートの一部でストックを作る。コンフルエントになった細胞を回収し、ヘモサイトメーターにより細胞密度をカウントの後、1,000 rpm で細胞を回収する。このとき培養上清 (conditioned medium) は別チューブに移しておく。

培養上清: 培地 : DMSO = 45 : 45 : 10 の割合でストック用液を作る。細胞をこのストック用液により 1×10^7 cells/mL になるように希釈し、1 mL ずつクライオバイアルに分注する。このクライオバイアルを小型の発泡スチロールや専用の容器に入れて、-80°C でオーバーナイト冷凍する。その後、液体窒素中で保存する。

[トランスフェクション]

まずは一過性発現により迅速な目的蛋白質の発現確認や予備的な機能解析を行い、その後、安定発現に移行する。

1日目

6-well プレートに 1×10^6 cells/mL の細胞を 2 mL まく。28°C で 12 時間程度培養し、 $2-4 \times 10^6$ cells/mL にする。

2日目

リン酸カルシウム沈殿法により、トランスフェクション用溶液を作成する。まず、以下のプラスミド溶液を作成する。

recombinant vector	19 μ g
pCoHygro or pCoBlast	1 μ g (安定発現時のみ使用)
2M CaCl ₂	24 μ L
H ₂ O で 200 μ L にする。	

上記溶液を、1.5 mL チューブ内の等容量の HBS (50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, 280 mM NaCl, pH7.1) にゆっくり滴下する。このとき、チューブを穏やかに vortex しながら混ぜる。混合液を室温で 30 分間静置後、細胞が入った 6-well プレートにまんべんなく均等に滴下する。その後 28°C で 24 時間培養する。

[一過性発現]

3日目 (6-well プレートにまいてから)

リン酸カルシウムが入った培地を取り除き、細胞をチューブに遠心により回収後、培地で 2 回洗浄する。同プレートを用いて 28°C で培養する。トランスフェクション後 24 時間経過したら CuSO₄ を終濃度 500 μ M 加える。

4日目～

誘導後、12 時間、1 日、2 日、3 日、4 日後にそれぞれ培養上清または細胞を回収し、発現チェックを行う。誘導中は新しい培地に変えない。筆者らが試したなかでは、おおむね誘導後 3 日後に最も多くの目的蛋白質が確認できた。

[発現チェック]

細胞内発現のときは、細胞をチューブに回収後、PBS で洗浄を行った後に、可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl, pH7.8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40) を加え、氷上で 10 分間可溶化する。その後、遠心により細胞の残骸を沈殿させ、上清を用いて発現を確認する。分泌発現のときは、培地上清をチューブに回収後、1,000 rpm で 5 分間遠心して細胞を落とし、上清を用いて発現確認を行う。発現コンストラクトに応じた検出方法を用いる。筆者らは発現上清を Ni-NTA によるバッチ法にて精製後、His 抗体と V5 エピトープ抗体、ま

た目的蛋白質特異的抗体によるウエスタンブロットにより確認を行った。

[安定発現]

3日目 (6-well プレートにまいてから)

リン酸カルシウムが入った培地を取り除き、細胞をチューブに遠心により回収後、培地で2回洗浄する。同プレートで28°C、2日間培養する。

5日目

細胞を遠心により回収し、トランスフェクション時に使った選択ベクターに対応する抗生物質入りの培地に交換する (hygromycin または blasticidin)。3日から5日おきに、同プレート上で抗生物質入り培地に交換する。一気に培養速度が遅くなるが、3週間程度抗生物質入り培地で培養を続けると、通常培地と同程度の増殖速度となる。

3週間～

1×10^7 cells/mL に達したら 10 cm プレートに継代する。また、細胞ストック用、大量培養用に、プレートを複数枚に増やしていく。継代の際は、常に抗生物質入りの培地を使用する。

[大量培養]

コンフルエントになった 10 cm プレートを数枚用意する。培地を取り除き、1プレートあたり 5 mL の培地に懸濁しチューブに回収する。細胞密度をカウントし、125 mL ボトル1本あたり 50 mL、 1×10^6 cells/mL になるように培地で希釈する。28°C で振盪培養 (100 rpm 程度、細胞が沈まないくらい) を行う。数本用意し、1本は継代用、残りは発現用とする。継代に際しては、細胞数が $2-16 \times 10^6$ cells/mL の範囲になるように留意し、数日置きに 1×10^6 cells/mL になるよう継代を続ける。

発現用のボトルは、 1×10^7 cells/mL になったら CuSO_4 による誘導を開始する。一過性発現時でチェックした至適誘導時間になったら回収する。大量培養時には至適誘導時間がプレートでの発現とは異なることもあるので、新たにチェックしたほうが良い。また、発現する際に用いるボトル内の培地の容量によって、培地あたりの発現する蛋白質量が変化することもある。至適容量を見つけるために、いくつか条件を振ってみることをおすすめする。筆者らは 1 L のボトルを使用し、500 mL の系で発現誘導を行った。その後、Ni-NTA カラムを用いた精製を行った結果、およそ 1 mg の活性を有した蛋白質を得ることができた。

工夫とコツ

無血清培地について

本培養のときは無血清培地を使うと持ち込み蛋白質が少なくなると良い。ただし、若干細胞の育ちが悪くなる傾向にある。これは継代のときに conditioned medium を加えると改善される。また、通常の血清培地で培養中も細胞の調子が悪くなったら conditioned medium を加えることにより、よく増殖するようになる。

分泌発現後の Ni-NTA による精製時の注意

分泌発現による大量培養時には、pH 調整のため 10×平衡化バッファー (500 mM NaH₂PO₄, pH8.0, 3 M NaCl) を conditioned medium の 1/10 量加え、12,000 rpm で 20 分間遠心した後、Ni-NTA による精製を行った。

Kozak 配列の確認

極端に発現量が少ない場合、Kozak 配列の有無を確認する。ショウジョウバエでは、ほぼ例外なく、(C/A)AA(A/C)AUG というコンセンサス配列を持つことが報告されている(3)。

発現用プラスミド

Invitrogen から各種発現用プラスミドが発売されている。目的によって使い分けると良い。筆者らの研究室では主に pMT/V5-His と pMT/ViP/V5-His を用いている。

- pMT/V5-His : 細胞内発現時に使用。
- pMT/ViP/V5-His : 分泌シグナル BiP による細胞外発現が可能。
- pMT/BioEase™-DEST : ビオチン化された蛋白質の発現が可能。
- pMT/V5-His-TOPOR : TA クローニングによる迅速なコンストラクト作成が可能
- pAc5.1/V5-His : アクチンプロモーターによる恒常的な発現が可能。

トランスフェクション試薬

本法ではリン酸カルシウム沈殿法によるプラスミドのトランスフェクションを紹介したが、Cellfectin (Invitrogen) による発現も確認した。トランスフェクションがうまくいかない場合はこのようなりポフェクション試薬も試してみると良い。

文献

- 1) Li, B. et al., *Biochem. J.*, **313**, 57-64 (1996)
- 2) Johanson, K. et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 9459-71 (1995)
- 3) Douglas R. Cavener. *Nucleic Acids Research*, **15**, 1353-61 (1987)