

Expression of Recombinant Proteins in Cultured Human Cells Standard Protocol with 293 Strain Cells

¹Institute for Virus Biology and Regenerative Medicine, Kyoto University, ²Kyushu University Graduate School of Medicine, ³Showa Pharmaceutical University, ⁴National Institute of Infectious Diseases, ⁵Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

Takao Hashiguchi¹, Kaijo Suzuki², Mizuho Kajikawa³, Makoto Takeda⁴, Yusuke Yanagi², Katsumi Maenaka⁵

(Submission date: 2008/4/30, Re-submission date: 2008/5/14, Acceptance date: 2008/5/15, Revision acceptance date 2021/6/16) Keyword(s): Human cultured cells, Recombinant protein, 293SGnT1(-) cells, 293T cells, Massive expression, X-ray crystallography

Summary

E. coli expression system is inexpensive and simple, but it is sometimes difficult to maintain the proper structure of the protein or to refold the protein from the inclusion body. Therefore, in this protocol, we will use recombinant proteins that are difficult to express in the *E. coli* expression system. This protocol describes a method for mass expression of recombinant proteins that are difficult to express in the *E. coli* expression system using human cell lines. The proteins obtained by this method are suitable not only for biochemical analysis but also for X-ray crystallography and cryo-electron microscopy.

Equipment, instruments and reagents

Clean bench: For cell culture (each company)

incubator for cell culture (each company)

CO₂ cylinders (from each company)

15 cm cell culture dish (each company)

Roller bottle for cell culture (each company)

Incubator for roller bottle culture (each company)

Thermostatic water bath: Used for warming culture medium to 37.0°C (each company)

Sterile filter (each company)

Cells: 293T cells or 293 lineage cells Mainly for functional analysis and cryo-EM structural analysis

293SGnT1(-) cells Mainly for X-ray crystallography (please inquire)

DMEM medium: 1.9 L (dish) or 7.5 L (roller bottle) (each company)

Fetal Cow Serum (FCS): 120 ml or 425 ml (each company)

Sodium bicarbonate (NaHCO₃) (7.5%): 100X (each company)

Non-essential amino acids: used at 100X (Nakalai, code: 06344-56)

Penicillin-streptomycin: used at 100X (Gibco, code: 15140-163)

Polyethyleneimine "Max" (PEI MAX): used in 1 mg/ml aqueous solution (pH 7)

(Polysciences, code: 24765-1)

For expression of selenomethionine derivative proteins:

L-selenomethionine (30 mg/L) in DMEM without L-methionine and L-cysteine and L-cysteine (63 mg/L) to DMEM without L-methionine and L-cysteine (each company)

10x PBS(-): 1 L min. Dilute 10x PBS(-): 1 L min.

NaCl 80 g

KCl 2 g

KH₂PO₄ 2 g

Na₂HPO₄·7H₂O 21.6 g

Trypsin solution: Dissolve in PBS(-) to a final trypsin concentration of 0.1%. Add EDTA to make the final concentration 0.02%.

Plasmid vectors: those that can be expressed in human cultured cells (from various companies)

(The authors used a plasmid for protein expression with SV40 ori, and at the same time, a plasmid for SV40 large T antigen expression plasmid in equal amounts to increase the yield of the target protein.)

Experimental Procedure

First, prepare a 9 cm dish of 10% FCS DMEM and 293 cell lines.

- Using a 15 cm dish (Figure 1A) – Eventually increase to 33 15 cm dishes.

Day 1

Cell passaging (to 3 15 cm dishes)

Days 2-3

Cell culture

Day 4

Cell passages (to 33 15 cm dishes)

Day 5

Cell culture

Day 6

1. Prepare 0% FCS DMEM.

2. transfection of plasmid

Days 7-9

Cell culture (protein expression)

Day 10

1. protein collection

2. autoclave dish

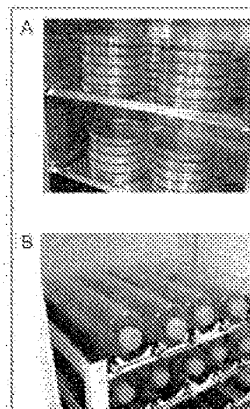


Figure 1: Photograph of human cell expression system
(A) Using a 15 cm dish the cells are cultured at 37.0°C and 5.0% CO₂.
(B) Cells are cultured in a roller bottle at 37.0°C and 5.0% CO₂.

- if using roller bottles (Figure 1B) Eventually, increase to 15 roller bottles.

Day 1

Cell passaging (onto 3 15 cm dish sheets)

Days 2-3

Cell culture

Day 4

Cell passaging (onto 15 cm dish)

Day 5

Cell culture

Day 6

Cell passages (to 15 roller bottles)

Days 7-8

Cell culture

Day 9

1. Prepare 0% FCS DMEM.

2. transfection of plasmid

Day 10-11

Cell culture. (Protein expression)

Day 12

1. protein collection

2. autoclave the roller bottle

Experimental Details

- When using a 15 cm dish -

Day 1

Wash 293SGnTI(-) cells in 4 ml of PBS(-) in a 9 cm dish to near confluence (cells spread over the entire surface of adhesion) and remove. After washing, 0.4 ml of trypsin solution is added and the cells are peeled off. Meanwhile, pour 22 ml of 10% FCS DMEM into three 15 cm dishes. Add 9 ml of 10% FCS DMEM to the dish containing the trypsin-treated cells. Pipet the cells to loosen them. Pour 3 ml of this cell suspension per 15 cm dish and mix uniformly. The final mixture is divided into 3 dishes. Incubate at 37.0°C, 5% CO₂ in a cell culture incubator.

Days 2-3

Cell culture. (until cells are almost confluent).

Day 4

First, warm 830 ml of 10% FCS DMEM to 37.0°C. Wash three 15 cm dishes of nearly confluent cells in PBS (-4 ml) per dish. Wash the cells with 4 ml of PBS(-) per dish, remove the cells, and then peel off the cells by adding 0.8 ml of trypsin solution to each dish. Add 9 ml of 10% FCS DMEM to each dish, and loosen the cells by pipetting. Suspend the cell suspension in 830 ml of 10% FCS DMEM at 37.0°C. Place cells in a new 15 cm dish. Place 33 new 15 cm dishes, each containing 25 ml of the cell suspension in a cell culture incubator at 37.0°C, 5% CO₂.

Day 5

Cell culture

Day 6

Cells are 80-90% confluent and transfection is performed.

1. 75 ml of 0% FCS DMEM mixed with 1800 µg of plasmid

2. 75 ml of 0% FCS DMEM mixed with 5.4 ml (1 mg/ml) of PEI MAX

Mix 2 with 1 and wait for 20 minutes.

After 20 minutes, add to 900 ml of DMEM adjusted to a final concentration of 2% FCS (transfection solution: 1.05 L total). Next, remove all of the medium from the dish in which the cells are growing. Pour 31 ml of transfection solution into each dish. This is then placed in a cell culture incubator at 37.0°C, 5% CO₂

(In the case of expression of selenomethionine derivative proteins, L-selenomethionine (30 mg/L) and L-cysteine (63 mg/L) are added to DMEM without L-methionine or L-cysteine.

(All other procedures are the same.)

Days 7-9

Cell culture (protein expression)

Day 10

If expressed as a secreted protein, the supernatant is collected. We basically express proteins in soluble form, so we collect the target proteins from the supernatant. In the case of intracellular proteins, the medium is removed, washed with PBS(-), and the cells are peeled off with a cell scraper. The cells are then suspended in PBS(-) and centrifuged (4°C, 200 x g, 5 min). Remove the supernatant, and dissolve the cells in cell lysis buffer. (In the case of intracellular proteins, the incubation period during protein expression should be kept to about 2 days because of the high degree of damage). Then, proceed to purification. Sterilize the dishes used for cell culture by autoclaving and discard. Autoclave the dishes used for cell culture and discard.

- When using a roller bottle (surface area 850 cm²)

Day 1

Wash 90% confluent 293SGnTI(-) cells in 4 ml of PBS(-) in a 9 cm dish. Wash the cells with 4 ml of PBS(-), remove them, add 0.4 ml of trypsin solution, and detach the cells. During this time, the cells were washed onto three 15-cm disks with 10% FCS. Place 22 ml of 10% FCS DMEM in three 15-cm dishes with trypsin-treated cells. Pipet 9 ml of 10% FCS DMEM into the dish of trypsin-treated cells and loosen the cells by pipetting. Pipet the cell suspension into a 15 cm dish. Pour 3 ml of the cell suspension into each 15 cm dish and mix uniformly. The final mixture will be divided into 3 disks. Incubate the cells in a cell culture incubator at 37.0°C, 5% CO₂.

Days 2-3

Cell culture

Day 4

First, warm 380 ml of 10% FCS DMEM to 37.0°C. Wash three 15 cm dishes of 90% confluent cells with 4 ml of PBS(-) per dish and remove cells. After washing and removing the cells, add 0.8 ml of trypsin solution per dish and peel off the cells. Pipet 9 ml of 10% FCS DMEM into each dish of trypsin-treated cells and loosen the cells by pipetting. Suspend the cell suspension in 380 ml of 10% FCS DMEM at 37.0°C. Add 25 ml of DMEM per dish. Pour 15 disks of 25 ml per dish. Incubate in a cell culture incubator at 37.0°C, 5% CO₂.

Day 5

Cell culture

Day 6

First, warm 3 L of 10% FCS DMEM to 37.0°C. Place 15 cm dish 15. One sheet of cells is almost confluent. Transfer cells to roller bottles (850 cm²) (1 15 cm dish to 1 roller bottle). Wash each dish with 4 ml of PBS(-). After washing with 4 ml of PBS(-) per dish and removing the cells, add 0.8 ml of trypsin solution per dish. In each dish of trypsin-treated cells, inject 9 ml of 10% FCS DMEM. Pipet the cells to loosen them. Suspend the cell suspension in 3 L of 10% FCS DMEM warmed to 37.0°C. (We used three 1 L IWAKI glass bottles and mixed 1 L of medium with five 15 cm dish volumes of cell suspension for passaging). Pour 15 roller bottles of 200 ml each into the medium. Pass CO₂ through a 0.22-μm filter

directly into the bottle for about 5 seconds, cover with a lid, and seal the bottles with lids (Figure 2). Incubate in a roller bottle incubator at 37.0°C. After pouring the cell suspension into the roller bottle, transfer it immediately to the incubator. If the roller bottle incubator can be filled with CO₂ (CO₂ is a measure to minimize the pH change of the medium), the cells are transferred to the incubator immediately. If CO₂ can be filled in the roller bottle incubator, it is not necessary to fill the roller bottle directly with CO₂).

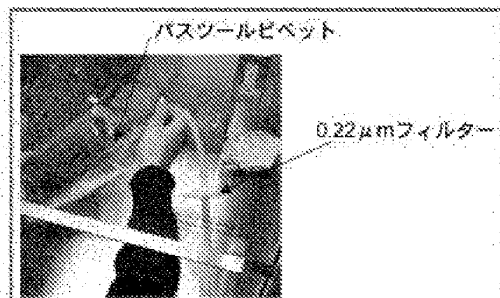


Figure 2: Filling a roller bottle with N₂

Work was performed on a clean bench with a 0.22 μm filter connected between the tubes and a Pasteur pipette attached to the tip of the filter. The Pasteur pipette can be replaced for each experiment to prevent contamination. N₂ is applied for about 5 seconds at a pressure that lightly depresses the surface of the culture medium. Immediately seal with the lid.

Days 7-8

Cell culture

Day 9

Cells are 70-80% confluent and ready for transfection.

(Cell growth is checked visually until 70-90% confluent. A microscope of the type that can fit between the bottles will allow for more accurate confirmation.)

Prepare and transfect 7.5 bottles at a time, as it is time consuming.

1. 100 ml of 0% FCS DMEM mixed with 1.8 mg of plasmid (240 μg/roller bottle)
2. 100 ml of 0% FCS DMEM mixed with 5.4 ml (1 mg/ml) of PEI MAX (360 μg/roller bottle)

Prepare a mixture of 1 and 2, mix 2 into 1, and wait for 20 minutes.

After 20 minutes, add to 1700 ml of DMEM adjusted to a final concentration of 2% FCS (transfection solution: total 1 mg/ml). (transfection solution: 1.9 L total). Next, remove all medium from the roller bottle in which the cells are growing. Pour 250 ml of transfection solution into each roller bottle. Then, directly feed CO₂ through a 0.22 μm filter for about 5 seconds using a Pasteurizer, and seal the bottles with lids. Incubate in a roller bottle incubator at 37.0 °C. This is done in two sets.

Repeat for a total of 15 roller bottles for transfection. After pouring the transfection solution into the roller bottles, transfer immediately to an incubator (37.0°C, 0.5 rpm).

(For expression of selenomethionine derivative proteins, L-selenomethionine (30 mg/L) and L-cysteine (63 mg/L) are added to DMEM without L-methionine or L-cysteine at this stage. All other procedures are the same.)

Days 10-11

Cell culture (protein expression)

Day 12

If the protein is expressed as a secreted protein, collect the supernatant. Since we basically express proteins in soluble form, we collect target proteins from the supernatant. In the case of intracellular proteins, the medium is removed, washed with PBS(-). After washing with PBS(-), the cells are detached by gently swishing a bottle of PBS(-) containing 0.02% EDTA. The cell suspension is collected by centrifugation (4°C, 200 x g, 5 min), and after removing the supernatant, the cells are lysed with lysis buffer. (For intracellular proteins, we recommend using a dish because of the large cellular damage caused by culturing in a roller bottle). Then, proceed to purification. The roller bottle used for cell culture should be autoclaved. Sterilize the roller bottle used for cell culture by autoclaving and discard.

Devices and Tips

Massive Expression of Proteins Using Dishes

Since many laboratories are now equipped with cell culture facilities, this method can be introduced immediately by using dishes. The method can be introduced immediately without any investment in new facilities. The dish is NUNC's 15 cm dish (code: 150468).

Massive Expression of Proteins in Roller Bottles

Although new equipment investment is required, the use of roller bottles can be used to increase the size of the expression system. The use of roller bottles allows for an increase in the area of cell culture in a limited space. The roller bottle is a CORNING bottle with a content of 2 L and a surface area of 850 cm² (code: 430849).

Cell culture medium

The author uses Fujifilm Wako's D-MEM (high glucose) (L-glutamine, phenol red, and pyruvate) as DMEM for cell culture (containing L-glutamine, phenol red, and sodium pyruvate) (code: 043-30085). The cells were energized prior to transfection. In addition, we wanted to keep the cells in a healthy state prior to transfection and to keep the serum at 2% at the time of protein expression. NaHCO₃ and nonessential amino acids are added to keep the serum to 2% during protein expression. To 500 ml of DMEM, we added
5 ml of 100 x penicillin-streptomycin
(not added to the 2% FCS-containing DMEM used during transfection)
5 ml of 7.5% NaHCO₃ solution
5 ml of 100X nonessential amino acids
FCS concentrations (10% or 2%)

Polyethyleneimine "MAX" (Polyethyleneimine MAX, PEI MAX)

Generally, very expensive transfection reagents are used for transfection of plasmids into human cells. However, the use of such reagents is very expensive. In this experimental system, an extremely inexpensive reagent called polyethyleneimine "MAX" is used. The use of this reagent is inexpensive and easy to use. This reagent is very inexpensive, and it is easy to perform mass expression of proteins in cultured human cells. The authors have developed a new reagent called "MAX", a polyethyleneimine. The authors use PEI MAX (code: 24765-1) manufactured by Polysciences. The amount of PEI MAX is diluted about 1,000 times with water, so once purchased, the amount of PEI MAX is too large to use even if it takes a lifetime.

Cultured human cells

The advantage of using human cells is that most of the obtained proteins have the proper structure. In our *E. coli* expression system, we form inclusions, solubilize them, and refold them. In the case of human cells, however, it is possible to avoid the time and effort required for refolding. Such refolding conditions and time can be omitted. However, the disadvantages of this method are that it requires more days for the process, the yield is lower, and the cost is very high compared to *E. coli*. In addition, in the case of glycoproteins, glycans are often an inhibitor of crystallization. However, a homogeneous high man (Man5GlcNAc2) glycoprotein can be obtained using HEK293S cells deficient in N-acetylglucosaminyltransferase I activity (see Ref. 5). The glycan chains can also be removed by EndoH treatment.

Acknowledgements.

We thank Jones, E. Y., Davis, S. J., Aricescu, A. R., and Aricescu, A. R. of the Oxford Univ. in the U.K. for their help with the introduction of this expression system.

References

1. Hashiguchi, T. et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 19535-19540 (2007)
2. Hashiguchi, T. et. al, J. Virol. Methods, 149, 171-174 (2008)
3. Aricescu, A. R. et. al, Acta Crystallogr. (2006)
4. Chang, V. T. et. al, Structure, 15, 267-273 (2007)
5. Reeves, P. J. et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 13419-13424 (2002)

ヒト培養細胞を用いた組換え蛋白質の発現

— 293 系統細胞によるスタンダードプロトコール —

¹京都大学ウイルス・再生医学研究所、²九州大学医学研究院、³昭和薬科大学、⁴国立感染症研究所、⁵北海道大学薬学研究院

橋口 隆生¹、鈴木 干城²、梶川 瑞穂³、竹田 誠⁴、柳 雄介²、前仲 勝実⁵

(投稿日 2008/4/30、再投稿日 2008/5/14、受理日 2008/5/15、改訂受理日 2021/6/16)

キーワード：ヒト培養細胞、組換え蛋白質、293SGnTI(-)細胞、293T 細胞、大量発現、X 線結晶構造解析

概要

大腸菌発現系は安価で簡便だが、適切な構造を保った状態での発現や封入体からのリフォールディングが困難な場合がある。そこで、本プロトコールでは大腸菌発現系では発現が困難な組換え蛋白質をヒト培養細胞株を用いることで大量発現させるための方法を述べる。本方法により得られた蛋白質は生化学的な機能解析のみならず、X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡構造解析にも適している。

装置・器具・試薬

クリーンベンチ：細胞培養用（各社）
細胞培養用 CO₂ インキュベーター（各社）
CO₂ ポンペ（各社）
15 cm 細胞培養用ディッシュ（各社）
細胞培養用ローラーボトル（各社）
ローラーボトル培養用インキュベーター（各社）
恒温水槽：培地を 37.0°C に温める際に使用（各社）
滅菌フィルター（各社）

細胞：293T 細胞または 293 系統細胞 主に機能解析、クライオ電子顕微鏡構造解析用（各社）

293SGnTI(-)細胞 主に X 線結晶構造解析用（要問い合わせ）
DMEM 培地：1.9 L（ディッシュ）または 7.5 L（ローラーボトル）（各社）
牛胎児血清（FCS）：120 ml または 425 ml（各社）
炭酸水素ナトリウム（NaHCO₃）（7.5%）：100X で使用（各社）
非必須アミノ酸：100X で使用（ナカライ, code：06344-56）
ペニシリン・ストレプトマイシン：100X で使用（Gibco, code：15140-163）
ポリエチレンイミン “マックス”（PEI MAX）：1 mg/ml 水溶液（pH7）で使用（Polysciences, code：24765-1）

セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合：

L-メチオニン、L-システインの入っていない DMEM に L-セレノメチオニン (30 mg/L) と L-システイン (63 mg/L) を加える (各社)

10x PBS(-)：1 L 分。これを 10 倍希釈して使用。

NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	21.6 g

トリプシン溶液：PBS(-)でトリプシンの最終濃度が 0.1% になるように溶かす。さらに、最終濃度が 0.02% になるよう EDTA を加える。

プラスミドベクター：ヒト培養細胞で発現可能なもの (各社)

(著者らは SV40 ori を持った蛋白質発現用プラスミドを使用し、同時に SV40 large T antigen 発現プラスミドを 1/10 等量入れて目的蛋白質の収量を上げている)

実験手順

まずは 10% FCS DMEM と 293 系統の細胞を 9 cm ディッシュ 1 枚分、準備しておく。

– 15 cm ディッシュを用いる場合 (図 1A) –

最終的に 15 cm ディッシュ 33 枚分まで増やす。

第 1 日目

細胞の継代 (15 cm ディッシュ 3 枚へ)

第 2-3 日目

細胞培養

第 4 日目

細胞の継代 (15 cm ディッシュ 33 枚へ)

第 5 日目

細胞培養

第 6 日目

1. 0% FCS DMEM を準備。

2. プラスミドのトランスフェクション

第 7-9 日目

細胞培養 (蛋白質発現)

第 10 日目

1. 蛋白質の回収

2. ディッシュをオートクレーブ

– ロールーボトルを用いる場合 (図 1B) –

最終的にロールーボトル 15 本分まで増やす。

第 1 日目

細胞の継代 (15 cm ディッシュ 3 枚へ)

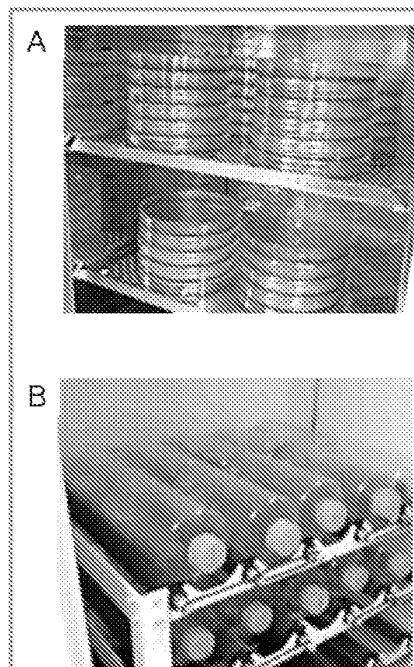


図 1：ヒト細胞発現系の写真

(A) 15 cm ディッシュを用いて 37.0°C、5.0% CO₂ の環境下で細胞培養を行なっている。(B) ロールーボトルを用いて 37.0°C、5rpm の環境下で細胞培養を行なっている。

第 2-3 日目

細胞培養

第 4 日目

細胞の継代 (15 cm ディッシュ 15 枚へ)

第 5 日目

細胞培養

第 6 日目

細胞の継代 (ローラーボトル 15 本へ)

第 7-8 日目

細胞培養

第 9 日目

1. 0% FCS DMEM を準備。
2. プラスミドのトランスフェクション。

第 10-11 日目

細胞培養。(蛋白質発現)

第 12 日目

1. 蛋白質の回収。
2. ローラーボトルをオートクレーブ。

実験の詳細

– 15 cm ディッシュを用いる場合 –

第 1 日目

9 cm ディッシュにほぼコンフルエント（培養細胞が接着面いっぱい広がっている状態）になった 293SGnTI(-) 細胞を PBS(-) 4 ml で洗い、取り除いた後、トリプシン溶液 0.4 ml を加え細胞を剥がす。この間に 15 cm ディッシュ 3 枚へ 10% FCS DMEM を 22 ml ずつ分注しておく。トリプシン処理をした細胞のディッシュに 10% FCS DMEM を 9 ml 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 15 cm ディッシュ 1 枚当たり 3 ml ずつ注ぎ均一になるように混ぜる。最終的に 3 枚分になる。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 2-3 日目

細胞培養。（ほぼコンフルエントになるまで）

第 4 日目

まず、830 ml の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15 cm ディッシュ 3 枚のほぼコンフルエントになった細胞を 1 枚当たり PBS(-) 4 ml で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8 ml を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9 ml 注ぎ、ピペッティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 830 ml の 10% FCS DMEM に懸濁させる。新しい 15 cm ディッシュに 1 枚当たり 25 ml ずつ、33 枚注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 5 日目

細胞培養

第 6 日目

細胞が 80-90%コンフルエントになっているので、トランスフェクションを行う。

1. 0% FCS DMEM 75 ml にプラスミド 1800 µg を混ぜたもの
2. 0% FCS DMEM 75 ml に PEI MAX 5.4 ml (1 mg/ml) を混ぜたもの

を用意し、2 を 1 に混ぜ、20 分待つ。

20 分後、FCS の最終濃度が 2% になるように調整した DMEM 900 ml に加える（トランスフェクション溶液：合計 1.05 L）。次に、細胞が育っているディッシュから培地を全て抜く。その各ディッシュにトランスフェクション溶液を 31 ml ずつ注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

（セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合は、この段階で L-メチオニン、L-システインの入っていない DMEM に L-セレノメチオニン (30 mg/L) と L-システイン (63 mg/L) を加えた培地を使う。その他の作業は同様である）

第 7-9 日目

細胞培養（蛋白質発現）

第 10 日目

分泌蛋白質として発現させた場合は上清を回収。我々は基本的に可溶型にして発現させているので上清から目的蛋白質を回収するが、細胞内蛋白質の場合、培地を除き、PBS(-)で洗った後、セルスクレイパーで細胞を剥がす。それを PBS(-) に懸濁させて遠心 (4°C, 200 x g, 5 min) して集め、上清を取り除いた後に細胞溶解バッファーで溶かす (細胞内蛋白質の場合、ダメージが大きいので蛋白発現の際の培養期間を 2 日程度にした方がよい)。その後、精製へ。細胞培養に使ったディッシュはオートクレーブにより滅菌処理を行い、捨てる。

– ローラーボトルを用いる場合 (表面積 850 cm²) –

第 1 日目

9 cm ディッシュに 90%コンフルエントになった 293SGnTI(-) 細胞を PBS(-) 4 ml で洗い、取り除いた後トリプシン溶液 0.4 ml を加え細胞を剥がす。この間に 15 cm ディッシュ 3 枚へ 10% FCS DMEM を 22 ml ずつ分注しておく。トリプシン処理をした細胞のディッシュに 10% FCS DMEM を 9 ml 注ぎ、ピペティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 15 cm ディッシュ 1 枚当たり 3 ml ずつ注ぎ均一になるように混ぜる。最終的に 3 枚分になる。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 2-3 日目

細胞培養

第 4 日目

まず、380 ml の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15 cm ディッシュ 3 枚の 90%コンフルエントになった細胞を 1 枚当たり PBS(-) 4 ml で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8 ml を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9 ml 注ぎ、ピペティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 380 ml の 10% FCS DMEM に懸濁させる。各ディッシュ当たり 25 ml ずつ、15 枚注ぐ。これを 37.0°C、5% CO₂ の細胞培養用インキュベーター内で培養する。

第 5 日目

細胞培養

第 6 日目

まず、3 L の 10% FCS DMEM を 37.0°C に温める。15 cm ディッシュ 15 枚の細胞がほぼコンフルエントになっているので、ローラーボトル (850 cm²) へ細胞を継代する (15 cm ディッシュ 1 枚をローラーボトル 1 本へ継代することになる)。1 枚当たり PBS(-) 4 ml で洗い、取り除いた後、各ディッシュ当たりトリプシン溶液 0.8 ml を加え細胞を剥がす。トリプシン処理をした細胞の各ディッシュに 10% FCS DMEM を 9 ml 注ぎ、ピペティングで細胞をほぐす。この細胞懸濁液を 37.0°C に温めた 3 L の 10% FCS DMEM に懸濁させる (我々は 1 L の IWAKI のガラスのボトル 3 本を用意して、1 L の培地に 15 cm ディッシュ 5 枚分の細胞懸濁液を混ぜて継代している)。各ローラーボトル当たり 200 ml ずつ、15 本注ぐ。そこへ 0.22 μ m フィルターを通した CO₂ をパスツールで直接 5 秒ほど送り込み、フタをして密閉する (図 2)。これを 37.0°C のローラーボトル用培養機内で培養する。ローラーボトルに細胞懸濁液を注いだ後は、速やかに培養機へと移す。

(CO₂ の充填は培地の pH 変化を小さくするための措置で、ローラーボトル培養装置内に CO₂ が充填できる場合は、ローラーボトル内に直接 CO₂ を充填する必要は無い)

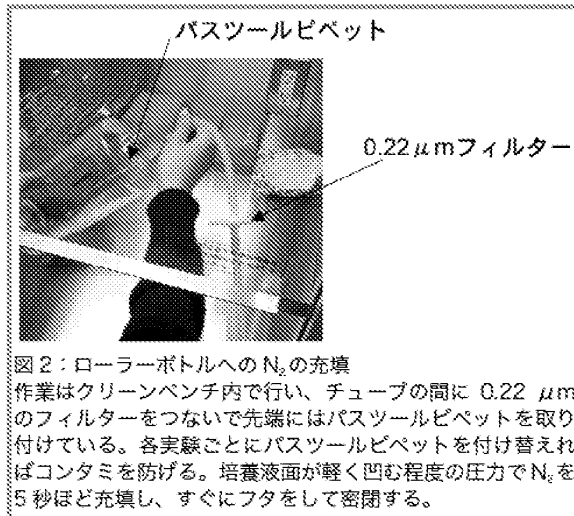


図 2: ローラーボトルへの N₂ の充填

作業はクリーンベンチ内で行い、チューブの間に 0.22 μ m のフィルターをつないで先端にはパスツールピペットを取り付けている。各実験ごとにパスツールピペットを付け替えればコンタミを防げる。培養液面が軽く凹む程度の圧力で N₂ を 5 秒ほど充填し、すぐにフタをして密閉する。

第 7-8 日目

細胞培養

第 9 日目

細胞が 70-80% コンフルエントになっているので、トランスフェクションの準備をする (細胞の育ち具合は目視で。職人的な感が頼り。70-90% コンフルエント。ローラーボトルを間に挟めるタイプの顕微鏡があればより正確に確認できる)。

時間がかかるので、7.5 本分ずつ用意してトランスフェクションする。

1. 0% FCS DMEM 100 ml にプラスミド 1.8 mg を混ぜたもの (240 μ g/ローラーボトル 1 本)
2. 0% FCS DMEM 100 ml に PEI MAX 5.4 ml (1 mg/ml) を混ぜたもの (360 μ g/ローラーボトル 1 本)

を用意し、2 を 1 に混ぜ、20 分待つ。

20 分後、FCS の最終濃度が 2% になるように調整した DMEM 1700 ml に加える (トランスフェクション溶液: 合計 1.9 L)。次に、細胞が育っているローラーボトルから培地を全て抜く。その各ローラーボトルにトランスフェクション溶液を 250 ml ずつ注ぐ。そこへ 0.22 μ m フィルターを通した CO₂ をパスツールで直接 5 秒ほど送り込み、フタをして密閉する。これを 37.0°C のローラーボトル用培養機内で培養する。これを 2 セッ

ト繰り返して、計 15 本のローラーボトルにトランスフェクションを行う。ローラーボトルにトランスフェクション溶液を注いだ後は速やかに培養機 (37.0°C、0.5 rpm) へと移す。

(セレノメチオニン誘導体蛋白質を発現させる場合は、この段階で L-メチオニン、L-システインの入っていない DMEM に L-セレノメチオニン (30 mg/L) と L-システイン (63 mg/L) を加えた培地を使う。その他の作業は同様である。)

第 10-11 日目

細胞培養 (蛋白質発現)

第 12 日目

分泌蛋白質として発現させた場合は上清を回収。我々は基本的に可溶型にして発現させているので上清から目的蛋白質を回収するが、細胞内蛋白質の場合、培地を除き、PBS(-) で洗った後、0.02% EDTA 入りの PBS(-) を入れたボトルを軽くふって細胞を剥がす。その細胞懸濁液を遠心 (4°C、200 x g、5 min) して集め、上清を取り除いた後に細胞溶解バッファーで溶かす (細胞内蛋白質の場合、ローラーボトルの培養だと細胞のダメージが大きいののでディッシュを用いた方法をお勧めする)。その後、精製へ。細胞培養に使ったローラーボトルはオートクレーブにより滅菌処理を行い捨てる。

工夫とコツ

ディッシュを用いた蛋白質の大量発現

現在は多くの研究室に細胞培養のための設備が整っているので、ディッシュを使えば新たな設備投資は必要ないのですぐに本方法を導入できる。ディッシュは NUNC の 15 cm ディッシュ (code: 150468) を使っている。

ローラーボトルによる蛋白質の大量発現

新たな設備投資が必要になってくるが、発現系を大きくしたいときはローラーボトルを用いることで限られたスペースで細胞培養面積を拡大することが出来る。ローラーボトルは CORNING の内容量 2 L 表面積 850 cm² のものを使用している (code: 430849)。

細胞培養用培地

著者は細胞培養に使う DMEM は富士フイルム和光の D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン, フェノールレッド, ビルビン酸ナトリウム含有) (code: 043-30085) を使用している。また、トランスフェクション前に細胞を元気な状態に保ちたいことや蛋白質発現時に血清を 2% に抑えるので NaHCO₃ や非必須アミノ酸を添加している。

DMEM 500 ml に対して、

100x ペニシリン・ストレプトマイシン 5 ml

(トランスフェクション時使用の 2% FCS 含有 DMEM には加えない)

7.5% NaHCO₃ 水溶液 5 ml

100X 非必須アミノ酸 5 ml

FCS 各濃度 (10% や 2%)

ポリエチレンイミン "MAX" (Polyethylenimine MAX, PEI MAX)

一般にヒト細胞へのプラスミドのトランスフェクションには非常に高価なトランスフェクション試薬が使われているが、そのような試薬を使うと莫大なコストがかかるので、本実験系では極めて安価なポリエチレンイミン "MAX" という試薬を使っている。これを使うことで安価に、そして、容易にヒト培養細胞での蛋白質の大量発現を行うことが出来るようになった。著者らは Polysciences 社製の PEI MAX (code: 24765-1) を使っている。約 1000 倍に水で希釈して使うので一度購入すると一生かかっても使いきれないほどの量がある。

ヒト培養細胞

ヒト細胞を使うメリットは得られる蛋白質の大部分が適切な構造を保っている点である。我々は大腸菌発現系では封入体を形成させた後に可溶化し、それをリフォールディングするという方法をとっているが、ヒト細胞の場合そうしたリフォールディングの条件検討や時間を省くことが出来る。ただし、大腸菌に比べ作業工程に日数を要する、収量が低く、コストが非常にかかるというデメリットもある。また、糖タンパク質の場合、しばしば糖鎖が結晶化の阻害要因になる。しかし、293SGnT1(-) 細胞 (N-acetylglucosaminyltransferase I 活性を欠損させた HEK293S 細胞。文献 5 参照) を用いれば、均一なハイマンノース型 (Man₆GlcNAc₂) の糖蛋白質を得ることが出来、さらに EndoH 処理により糖鎖を除去することも出来る。

謝辞

本発現系の導入においては英国 Oxford Univ.の Jones, E. Y., Davis, S. J., Aricescu, A. R. 各氏にお世話になりました。

文献

1. Hashiguchi, T. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19535–19540 (2007)
2. Hashiguchi, T. et. al., *J. Virol. Methods*, **149**, 171–174 (2008)
3. Aricescu, A. R. et. al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 1114–1124 (2006)
4. Chang, V. T. et. al., *Structure*, **15**, 267–273 (2007)
5. Reeves, P. J. et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13419–13424 (2002)



このコンテンツはクリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。

© 日本蛋白質科学会 2008 Licensed under クリエイティブ・コモンズ 表示 - 非営利 - 改変禁止 4.0 国際 ライセンス