

ベンザミアナタバコを用いたサイトカイン類の生産とその精製

宇土 秋良 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 三浦 謙治 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

現在、組換えタンパク質の生産には大腸菌や動物細胞など様々なプラットフォームが利用されている。その中でも植物は、低コストかつ安全性が高いことから注目されている。ただ、ほかの発現系と比較して収量が低いという欠点があった。本研究では、その問題点の克服のために、当研究室で開発された「つくばシステム」を利用した。つくばシステムはジェミニウイルス由来のローリングサークル複製システムとダブルターミネーターを組み合わせることで、より短期間で大量のタンパク質を一過的に発現させるシステムである。この一過的発現系の宿主としてベンザミアナタバコを用いられている。

サイトカイン類は主に免疫細胞で産生されるタンパク質で、生体内で多様な機能を示す。また、再生医療やがん治療などの医療分野および動物細胞を用いた実験にも細胞培養や維持などの目的で利用されている。しかし、こうしたサイトカイン類は非常に高価で、線維芽細胞成長因子 (FGF)、インターロイキン (IL) では 10~25 μ L で 3~4 万円程度である。研究や医療コストの観点から、その生産コストの削減が望まれている。

これらのことから本研究では、再生医療等への使用を目的としてベンザミアナタバコを用いてサイトカイン類の大量生産及び精製を試みた。

の有無を確認した。加えて、LC-MSMS によってタンパク質の同定を行った。

また、ウエスタンブロットティングと imageJ を用いて新鮮重あたりの収量を計算した。

【結果・考察】

詳細は発表会にて報告する。

【材料・方法】

材料としてベンザミアナタバコを用いた。

①ベクターの作製

ベクターにはつくばシステムに用いるプラスミドにサイトカイン遺伝子の発現カセット、プロテアーゼ認識部位、解析及び生成に用いる His タグ、小胞体滞留シグナルを組み込んだものを用いた。

②アグロインフィルトレーション

エレクトロポレーション法によってベクターをアグロバクテリウムに導入し、適切に培養した。この培養液を OD600 が 0.5 になるように調製し、感染溶液とした。これをバキュームを用いてタバコに感染させた。その後、細胞壊死抑制のためにアスコルビン酸ナトリウム水溶液を噴霧した。

③タンパク質精製

感染から 4 日後、植物体から葉をすべて切り取り液体窒素を用いて凍結させたのち、ミキサーで粉碎した。バッファーを加え液状にしたのち、ミラクロスで濾過、遠心分離、硫酸分画によって不純物を取り除いた。

80%の硫酸分画で得られたペレットを binding buffer で溶かし、同 buffer で透析を行った。これを TALON Resin を用いたアフィニティクロマトグラフィによって Flow Through, e1, e2, e3, e4, e5 の 6 つのフラクションを得た。

④解析

30%, 80%硫酸分画産物、FT, e1~e5 について poly-his 抗体を用いたウエスタンブロットティングによって、タンパク質