

## 植物におけるタンパク質高発現系「つくばシステム」を用いたミスマッチ酵素の精製と検証

居串 謙汰 (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

ゲノム編集とは人工切断酵素を用いて DNA に二本鎖切断 (DSB) を起こし、切断された遺伝子が欠失や置換を起こすことによるノックアウトや、修復する際に外来の配列を導入することによって目的の性質を持つ遺伝子を導入するノックインを扱う技術である。

既存の技術として CRISPR/Cas9 が近年主に使用されている。CRISPR/Cas9 はヌクレアーゼである Cas9 とプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の直前に位置する特異的 DNA 標的部位へ結合するための gRNA から構成されており、デザインの簡便さや複数の標的遺伝子を扱えることに優れているゲノム編集方法である。しかし、PAM 配列での標的制限があることや産業利用として特許のライセンスの問題という懸念が挙げられる。

植物における Enzyme X は、そのアミノ酸配列比較から、ほかの生物における DNA ミスマッチ認識酵素と相同性を示す。通常、これらの DNA ミスマッチ認識酵素は、DNA ミスマッチのみを認識し、ほかのタンパク質と結合することで、ミスマッチを修復する。一方で、植物 Enzyme X はほかの DNA ミスマッチ認識酵素にはないドメインを有していることが配列比較から明らかになっているが、このドメインがどのような機能を有するのか明らかになっていない。そのため、本研究では、植物由来 Enzyme X を発現、精製を行うことで、その生化学的機能を明らかにすることを目的とする。もし、この酵素が DNA ミスマッチを認識することができれば、ゲノム編集酵素として利用することの可能性も考えられる。

植物由来 Enzyme X については、これまで大腸菌でのタンパク質発現システムを用いた実験が行われたが、インクルージョンボディに蓄積して、不溶化するため、生化学的な検証は出来ていない。そこで、当研究室で開発された植物における一過的タンパク質発現系である「つくばシステム」を利用して発現させることを行うこととした。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型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によって、これまでに報告された植物での一過的タンパク質発現システムである magnICON システムと比較して、短時間で大量のタンパク質を発現できるシステムである。ちなみに、これらの発現は、*Nicotiana benthamiana* において行うが、これは、様々な植物種のなかでも、病原菌に対する免疫応答が弱いいため、ウイルス由来のローリングサークル型複製システムが有効にはたらくためと考えられている。

## 方法

1. *Nicotiana benthamiana* への感染

前任の研究者が作製したベクターをエレクトロポレーションによってアグロバクテリウムに導入し、培養過程を行ってから OD<sub>600</sub> が 0.5 になるように調製して感染溶液を作製した。植物の葉を溶液に浸した状態でバキュームをするアグロインフィルトレ

ーションを行い感染させた。細胞壊死を抑制するためアスコルビン酸ナトリウム水溶液を噴霧し、感染 3 日後に葉を回収し、液体窒素によって葉を凍結させた。

## 2. タンパク質精製

凍結した葉をミキサーによって破碎し、バッファーを加えて液状にした。その溶液をホモジナイザーで分画し、ミラクロスで濾過、いくつかの遠心の過程を行った。更に不純物を取り除くため、限外濾過とアミロースレジンを利用したカラムクロマトグラフィーを行い、enzyme X を精製した。

## 結果と考察

詳細は発表会にて報告する。