

植物一過的タンパク質発現システムを用いた診断薬の生産可能性について

岡 佳穂 (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)

1. 背景・目的

診断薬には、特定のタンパク質が必要とされ、そのタンパク質には診断薬に応じて多くの種類がある。また、目的タンパク質の生産のために様々な生産方法が試みられている。

しかし、診断薬のなかには、発現に時間がかかるうえに、得られる量が少ないことから、非常に高価な診断薬が存在する。そのため、研究や医療コストの観点から、これらの生産コストの削減が望まれている。

現在、特定の目的タンパク質の生産方法として、組換えタンパク質の生産がある。本研究では、上記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。つくばシステムとは、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で、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、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。

組換えタンパク質の生産には、大腸菌、動物細胞、植物など多くのプラットフォームが利用されている。その中でも植物は、栽培が容易であり、植物に感染する病原体のほとんどは哺乳類に病原性を示さないといったことから、低コストかつ安全性が高い宿主として注目されている。

これらのことから本研究では、植物のベンサミアナタバコを用いて、診断薬に用いることができる医療用タンパク質を、短期間に大量に生産することを試みた。

2. 材料・方法

材料として、ベンサミアナタバコを用いた。

(1) ベクター作製

つくばシステムに用いるプラスミドに、目的タンパク質遺伝子の発現カセット、解析及び精製に用いる His タグ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、カナマイシン濃度を 50 $\mu\text{l/ml}$ 、ゲンタマイシン濃度を 30 $\mu\text{l/ml}$ 、リファンピシン濃度を 5 $\mu\text{l/ml}$ として、5 ml の LB 培地で 2 日、その後 800 ml の LB 培地で一晩、適切に培養した。この培養液の OD600 値を 0.5 に調製し、感染溶液とした。これをバキューム、もしくはシリンジを用いてベンサミアナタバコに感染させた。

(3) タンパク質精製

感染から 4 日後、植物体の葉の感染部位を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。これにバッファーを加え液状にしたのち、濾過、遠心分離によって不溶性画分を取り除いた。次いで、硫酸分画を 30 %飽和の硫酸アンモニウムで

行い、上清と沈殿に分けた。その後、沈殿部分のフォールディングされていないタンパク質や凝集したタンパク質を除き、上清部分のみを透析チューブを用いて透析をかけ、タンパク質を精製した。続いて、TALON レジンを用いて目的タンパク質を取り出した。

(4) 目的タンパク質の四量体化

ビオチン、ストレプトアビジンを用いて目的タンパク質の四量体化を行った。詳細は発表会にて報告する。

3. 結果

詳細は発表会にて報告する。

4. 考察

詳細は発表会にて報告する。