

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25660010

研究課題名(和文)植物発現組換えタンパク質の安定的蓄積に関する研究

研究課題名(英文)Improvement of recombinant protein stability in plants

研究代表者

松尾 幸毅 (Matsuo, Kouki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10358012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、植物を利用した組換えタンパク質の生産において、植物細胞内での組換えタンパク質の分解を防ぐことによって、その生産量を向上させるための技術開発を行うことを目的とした。各種生物由来のプロテアーゼインヒビターを、モデルタンパク質と植物体内で共発現させた結果、一部のプロテアーゼインヒビターにおいてモデルタンパク質の生産性の向上が確認された。このことから、植物体内における組換えタンパク質の安定性が向上し、その蓄積量を大幅に増加させることが可能であると考えられる。また、植物細胞内における不安定さから生産困難であると考えられる組換えタンパク質の生産が可能になることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Recombinant proteins produced in plant cells are frequently degraded by endogenous plant proteases. To avoid recombinant protein degradation in plant cells, co-expression of protease inhibitors with the recombinant proteins would be efficient. In this study, it was clear that some protease inhibitor could improve recombinant protein yield in *Nicotiana benthamiana* plants.

In the present study, a simple transient gene expression system based on *Agrobacterium*-mediated transformation was developed. Vacuum infiltration was applied to leaf discs from *Nicotiana benthamiana* plants with *Agrobacterium* suspension solution under conventional vacuum conditions in a needleless plastic syringe. This method can be conducted without specialized apparatuses or large amounts of *Agrobacterium* suspension solutions; thus, the simultaneous evaluation of multiple vectors will be easily possible.

研究分野：分子生物学

キーワード：プロテアーゼインヒビター アグロインフィルトレーション 組換えタンパク質生産 一過性発現

1. 研究開始当初の背景

植物による組換えタンパク質生産において、導入した遺伝子に由来する mRNA の発現は認められるが、その翻訳産物の生産が認められない場合がある。この現象は、組換えタンパク質が植物細胞内で速やかに分解されているためと推察される。そこで、植物細胞中での組換えタンパク質分解を防ぐことを目的として、組換えタンパク質と各種プロテアーゼインヒビターを同時に植物体において発現させ、その効果を検討した。

2. 研究の目的

植物を利用した組換えタンパク質の生産において、植物細胞内での組換えタンパク質の分解を防ぐことによって、その生産量を向上させるための技術開発を行うことを目的とした。このことにより、植物体内における組換えタンパク質の安定性が向上し、その蓄積量を大幅に増加させることが可能であると考えられる。また、植物細胞内における不安定さから生産困難であると考えられる組換えタンパク質の生産が可能になることも期待される。

3. 研究の方法

各種生物種から内在性プロテアーゼインヒビター遺伝子を複数単離した。次に、プロテアーゼインヒビターを、本研究のモデル植物であるタバコの一つ *Nicotiana benthamiana* において一過性もしくは形質転換することにより恒常的に発現させ、植物細胞内におけるタンパク質分解酵素の機能を不全もしくは弱め、植物体内での組換えタンパク質分解の抑制を試みる。プロテアーゼインヒビター非発現株との間で組換えタンパク質生産量の比較を行う。植物での生産が困難なタンパク質に対し、開発した技術を応用し生産性の向上を試みた。

4. 研究成果

(1)プロテアーゼインヒビターの供発現による植物における組換えタンパク質安定性向上

プロテアーゼインヒビター遺伝子の単離と発現ベクターの構築

ヒト、イネ、トマト、大腸菌等に由来する cDNA ライブラリーから、各種内在性プロテアーゼインヒビター遺伝子を RT-PCR により増幅・単離した (図 1)。各遺伝子を植物発現用バイナリーベクターへとクローニングし、これらベクターにより *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株の形質転換を行った。本アグロバクテリウムを *N. benthamiana* における一過性発現試験をバキュームインフィルトレーション法に用いた。

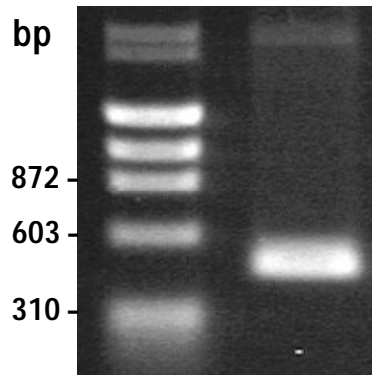


図 1. プロテアーゼインヒビター遺伝子の単離例。大腸菌内在性プロテアーゼインヒビターである Ecotin 遺伝子を RT-PCR により単離した。

プロテアーゼインヒビターと組換えタンパク質の共発現試験

モデル蛋白質として、ヒト骨形成タンパク質 2 (Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2) を用いた。BMP2 及びプロテアーゼインヒビターを 35S プロモーター下で発現するようベクターを構築し、それぞれによりアグロバクテリウムを形質転換した。BMP2 発現用及びプロテアーゼインヒビター発現用アグロバクテリウム懸濁液を混合し、*N. benthamiana* をアグロインフィルトレーションに供した。インフィルトレーション処理後 3 日目の葉試料について BMP2 発現状況をウエスタンブロットにより解析した結果、BMP2 単独で発現させた際には BMP2 タンパク質の生産は認められなかった。一方、BMP2 とプロテアーゼインヒビターを共発現させた場合、予想される分子量と同じ位置に、抗 BMP2 抗体に特異的に反応するバンドが検出された (図 2)。本研究の結果、植物において組換えタンパク質をプロテアーゼインヒビターと共発現させることで、安定な生産が可能となることが示唆された。

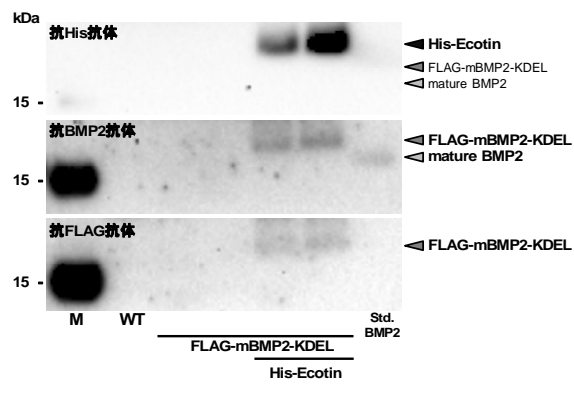


図 2. 組換えタンパク質生産におけるプロテアーゼインヒビターの効果

(2) 簡便なアグロインフィルトレーション法の開発

植物における遺伝子の一過性発現は、形質転換植物体を作成するより簡便・迅速に実施可能であることから、プロモーター解析、構築した遺伝子コンストラクトの機能確認、発現遺伝子の機能解析等幅広く利用されている。近年、植物の一過性発現系としてはウイルスベクター法やアグロインフィルトレーション法が多用されているが、ウイルスベクター法は、ウイルスの増殖能を利用した非常に強力な発現ツールである一方、利用可能な植物種が、用いた植物ウイルス感染可能な種に限定され、また、遺伝子拡散防止の観点から実用的な取扱いが難しいことから利用が限られている。一方、非常に有効な手段として数多くの報告があるアグロインフィルトレーション法においても、アグロバクテリウム的大量培養が必要、真空ポンプ等の装置類が必要、適当な大きさの、成長度を合わせた複数の被接種植物体が必要、インフィルトレーション後の育成のために十分な大きさのインキュベーターや温室が必要、インフィルトレーション後のアグロバクテリウムの飛散・漏洩を防ぐ必要、などの問題がある。これらの理由から、複数の遺伝子を対象として同時に実験を行うことが煩雑、かつ困難であることも問題である。このような状況から、より簡便なインフィルトレーション法が必要とされている。本研究において、特別な装置やアグロバクテリウム菌体的大量培養が必要無いアグロインフィルトレーション法を開発した。

本研究で、一過性発現のモデルタンパク質として、GFP (緑色蛍光タンパク質) 及び GUS (β-グルクロニダーゼ) の発現を試みた。それぞれの遺伝子発現のためのアグロバクテリウムは、基本的にアグロインフィルトレーション法と同様の菌体液を調製した。すなわち、抗生物質を含む培地で振とう培養後、遠心分離により集菌、菌体を緩衝液で懸濁し、接種溶液とした。一方、温室において育成した *N. benthamiana* よりコルクポーターを用いてリーフディスクを作製し、滅菌することなく実験に供した。シリンジにリーフディスクと菌体液を入れ、シリンジ内の空気を可能な限り除いた後に密閉し、プランジャーを動かすことにより、シリンジ内を常圧状態から減圧状態、減圧状態から常圧状態へと複数回変化させることでリーフディスク内に菌体液を浸潤させた。リーフディスクは菌体液を拭いた後、植物培養用寒天培地上に静置し、インキュベーター内で 3 日間培養した。この結果、供試したリーフディスクのほとんどにおいて GFP 蛍光及び GUS 活性が観察された (図 3)。本方法によって、植物細胞内において簡便に遺伝子の発現が可能であることが明らかとなった。

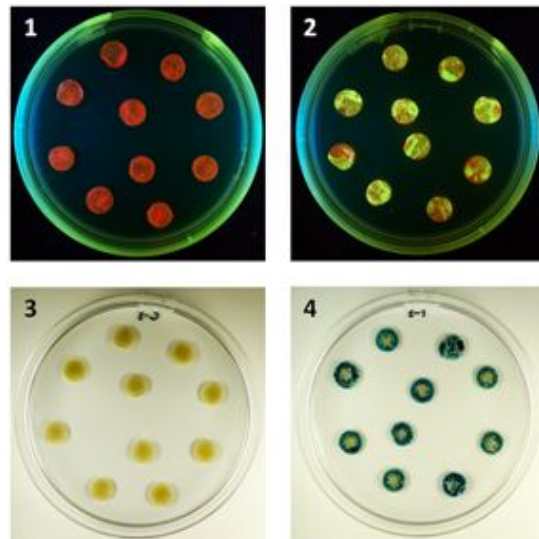


図 3 . リーフディスクインフィルトレーション法による GFP 及び GUS 遺伝子の発現
1. 未処理 (青色 LED 照射下) 2. GFP 発現 (青色 LED 照射下) 3. 未処理 (GUS 染色処理済み) 4. GUS 発現 (GUS 染色処理済み)

本方法の応用性を検討するため、RNA サイレncing サプレッサーの機能解析を実施した。ヒト酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF) と代表的な RNA サイレncing サプレッサーである p19 と Hc-Pro 遺伝子を本方法によりリーフディスクにおいて共発現させた。その結果、RNA サイレncing サプレッサーと共発現させた際には、aFGF 遺伝子由来 mRNA と aFGF タンパク質量が大幅に増加することが明らかとなった (図 4)。これは RNA サイレncing サプレッサーにより aFGF 遺伝子由来 mRNA の分解が防がれていることを意味し、リーフディスク内においても RNA サイレncing サプレッサーが機能していることが明らかとなった。このことから、本方法を用いることで、簡便に遺伝子機能の解析が可能であることが明らかとなった。

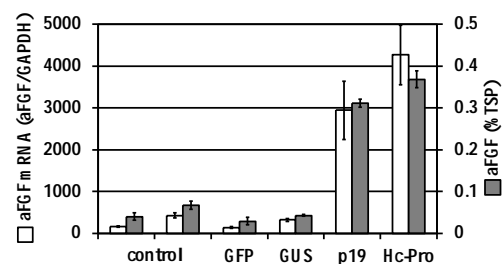


図 4 . リーフディスクを用いた RNA サイレncing サプレッサーの機能解析結果

本方法は、リーフディスクとシリンジの他に特別な装置類が必要無く、必要なアグロバクテリウム培養液も数 ml で十分であり、容易に、かつ迅速に複数遺伝子の解析も同時に行える方法であることが示唆された。今後、遺伝子発現用ベクターの評価・各種スクリーニング等に应用可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Matsuo Kouki, Fukuzawa Noriho, Matsumura Takeshi. A simple agroinfiltration method for transient gene expression in plant leaf discs. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読あり、122 (2016) 351-356.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.02.001.

〔学会発表〕(計1件)

松尾 幸毅、植物内在性プロテアーゼ阻害による組換えタンパク質生産性の向上、第33回日本植物細胞分子生物学会(東京)大会・シンポジウム、2015年8月12日、東京大学農学部キャンパス(弥生キャンパス、東京都文京区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 幸毅 (MATSUO, Kouki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号: 10358012