

機関番号：13302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510198

研究課題名（和文） 試料発現の新展開：高等植物細胞を利用した成熟型タンパク質の大量発現と選択標識

研究課題名（英文） A new approach for sample preparation: expression and stable-isotope labeling of mature proteins using plant cells

研究代表者 大木 進野 (OHKI SHINYA)

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・准教授

研究者番号：70250420

研究成果の概要（和文）：

植物細胞とウイルスベクターを利用した新規のタンパク質試料調製法を確立した。また、これを用いて、一般的な大腸菌利用の系では調製できないタンパク質の発現に成功した。この系を用いて安定同位体標識サンプルが調製できるようになった。このシステムの有用性を示すため、大腸菌などでは調製困難な1つのタンパク質を例にとり、タンパク質の発現・標識・3次元構造解析を行った。本研究を通じて、多くの調製困難なタンパク質を解析できるかもしれない新しい技術が確立できた。

研究成果の概要（英文）：

We developed a novel protein expression method using plant cells and virus vector. We prepared a protein, which cannot be expressed with popular E. coli systems. We established a protocol for preparing the stable-isotope labeled proteins with this system. To show the workability, we performed protein expression, stable-isotope labeling, and structure determination of a protein, of which expression is tough. In summary, this work had suggested a new method, which has a potential to study challenging proteins, to prepare samples, of which expression is known as difficult.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：タンパク質 NMR

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：タンパク質，生体分子，バイオテクノロジー，ウイルス，植物

1. 研究開始当初の背景

NMRなどの構造生物学や分子生物学分野でタンパク質試料を調製する方法としては、組み替え遺伝子技術を利用した大腸菌を使うことが一般的であるが、これでは調製困難なタンパク質が多く有ることが知られていた。

例えば、リン酸化やメチル化などの翻訳後修飾が施されたタンパク質や、ジスルフィド結合(SS結合)がかかったタンパク質を調製することは殆ど不可能か、あるいは、極端に難しいことが知られている。そのようなタンパク質の中にこそ、産業応用が望まれるものや

医学的に重要なものが含まれているにも関わらず、試料調製の困難さから基礎的な研究があまり進んでいなかった。実際の研究の現場では、このようなタンパク質は動物細胞や昆虫細胞など特殊なタンパク質調製システムを利用して作られていた。しかしながら、そのような手法を用いるにはコストや経験、設備の面で大きなハードルがあり、限られた研究室でしか研究が出来ない状況だった。従って、簡便な手法を用いた試料調製技術の確立が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸菌や酵母などの一般的な手法では調製困難なタンパク質を調製する簡便な方法を確立することである。この目的のために、本研究では植物培養細胞と誘導可能なウイルスベクターを利用した。

この手法は、私たちが開発して来たオリジナルの方法であり、培地 50mL 程度の細胞培養で数ミリグラムの目的タンパク質が調製できる超高効率システムである。これを高度化して調製困難なタンパク質を発現できるようにすること、さらにはこのシステムを用いて、NMR 実験用に安定同位体標識が施された試料を調製するプロトコルを確立することを目的にした。

3. 研究の方法

植物細胞にウイルスベクターを組み込み、目的タンパク質を大量調製した。目的タンパク質の性質によって、それらの細胞内の局在や細胞外への分泌をコントロールした。具体的には、産生タンパク質の行き先を決める、いわゆる荷札の働きをするシグナルペプチドをタグとして積極的に利用した。また、培地に加える試薬によって安定同位体標識を達成した。窒素源には標準的な MS (ムラシゲ・スクーク) 培地に準じた試薬を 15N 標識のものに置き換えることで達成した。また、13C 標識に関しては、培地に加える標準的な炭素源であるシュクロースを 13C 標識した試薬で行った。そのほかの炭素源としてグルコースやアミノ酸などの利用可能性についても検討した。

4. 研究成果

タンパク質試料を発現する為に一般的に利用されている大腸菌や酵母では調製困難な試料を、植物細胞とウイルスベクターを用いて調製するための技術を開発した。

まず、発現したタンパク質が小胞体に局在する系、あるいは培地へ分泌する系を確立した。幾つかのタンパク質をこれで発現することができた。

次に、これらを用いて 15N 均一標識サンプルを調製した。質量分析の結果から標識率は

ほぼ 100%であることが確認できた。このサンプルを用いて、2次元あるいは各種3次元の NMR スペクトルを測定し、その有用性を証明した。

さらにここに 13C 標識シュクロースを利用して、13C/15N 均一標識サンプルを調製した。質量分析の結果から標識率は 90%以上であることが判明した。この試料を利用して各種の多核種多次元 NMR スペクトルを測定し、本手法の有用性を実証出来た。実用面から考えると 13C 標識シュクロースの価格が非常に高額なことが問題になると予想された。そこで、より安価な試薬での 13C 標識の可能性を模索した。その結果、グルコースを炭素源とする培地においても細胞が生育することや、一部の種類のアミノ酸を細胞が栄養として取り込むこと、また別の種類のアミノ酸は細胞の生育を阻害することなど、多くの基礎的な興味深い知見を得ることが出来た。最終年度には、確立した新技術を使って試料を選択的に安定同位体 13C 標識するプロトコルを開発した。結果の一部は学術論文として投稿準備中である。

また、重水素標識の可能性も模索した。重水素標識は高分子量 NMR サンプルにおいて多用されつつ有るほか、中性子散乱のサンプルでも必要である。まず、重水含有の液体培地を利用して細胞の増殖を観察した。次に、生育の良い細胞を選別し、徐々に液体培地の重水含有率を高くした。このような継代操作により高度に重水を含む培地においても細胞を増殖させることが出来るようになった。

以上のように本課題を通じて開発して来たタンパク質試料調製のための新技術の有用性を広くアピールするため、応用研究を遂行した。採択最終年度には、3次元立体構造が未知のタンパク質の調製にも成功した。このタンパク質は、大腸菌や酵母では全く調製が出来ず、化学合成も極めて困難であった。本技術を用いた場合、目的タンパク質は可溶化分画に発現し、巻き戻し等の操作は全く必要なかった。このリコンビナントのタンパク質は天然から調製した野生型タンパク質と同等の生理活性を持つことが明らかになった。

開発した技術を駆使して安定同位体標識サンプルを調製し、このタンパク質の各種多核種多次元 NMR データを取得した。NMR データを詳細に解析し、標準的な NMR 構造解析の手法を用いてタンパク質の 3次元立体構造を決定することが出来た。さらに、この構造をもとにして類縁タンパク質の立体構造を次々とモデリングで予測することが出来た。明らかになった 3次元構造からこのタンパク質ファミリーの作用機序が推定できた。

そこで、分子モデリングの技法を利用してこのタンパク質の活性が無くなると予想さ

れる変異体を設計し、それらを本タンパク質発現システムで調製した。変異体の活性を測定した一連の実験の結果、このタンパク質の作用機序が議論できるようになった。結果の一部は学術論文として投稿中である。

最後に、本技術を利用してリン酸化された状態のタンパク質の調製も試みた。調製されたタンパク質試料のほぼ半分がリン酸化された状態で調製できることを確認した。今後の本技術の高度化によってリン酸化状態のタンパク質試料を調製する手法が確立できると期待できる。また、膜タンパク質についても、その発現に関して予備的ではあるが有望な結果を得ることが出来た。

以上のように、本研究課題により新しいタンパク質調製システムの開発とその応用事例を示す開発研究を実行することが出来た。大腸菌等の一般的なタンパク質調製システムでの試料調製がうまくいかない場合、今後は、本技術がその困難な状況を打開するための選択肢の1つとなることが出来るだろう。

膜タンパク質などへの応用事例を示すことによって本技術が広く認知されることが今後の普及へ向けた課題と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① N. Isozumi, A. Nakatomi, N. Nemoto, M. Yazawa & S. Ohki (2011) "Structure of Calmodulin Binding Region of mGluR 7 and Its Interaction with Calmodulin" *J. Biochem.* 149, 463-476. 査読有り.
- ② S. Ohki, K. Dohi, A. Tamai & M. Mori. (2008) "Stable-Isotope Labeling using an Inducible Virus Vector and Suspension Cultured Plant Cells" *J. Biomol. NMR* 42, 271-277. 査読有り.

[学会発表] (計7件)

- ① 気孔密度を正に制御するストマジエンの構造解析, 竹内誠, 菅野茂夫, 嶋田知生, 西村いくこ, 森正之, 大木進野, 第49回NMR討論会, 東京, 2010年11月15-17日
- ② Protein sample preparation with plant cells; expression and labeling, S. Ohki, M. Takeuchi, A. Tamai, and M. Mori, 24th ICMRBS, Cairns, Australia, 2010年8月22-27日
- ③ 新規な手法で調製したタンパク質試料の品質評価, 森正之, 竹内誠, 大木進野, 第8回ナノテクシンポジウム, 奈良, 2010年3月19日
- ④ 植物培養細胞と誘導可能なウイルスベクターを利用したタンパク質試料の調製, 竹内誠, 玉井淳史, 森正之, 大木進野, 第48

回NMR討論会, 福岡, 2009年11月10-12日

- ⑤ タンパク質試料調製技術の開発と評価, 大木進野, 第6回ナノテクシンポジウム, 金沢, 2009年3月13日
- ⑥ Stable-Isotope labeling using plant cells and Inducible-virus vector, S. Ohki, K. Dohi, A. Tamai, M. Takeuchi, and M. Mori, 23rd ICMRBS, San Diego, USA, 2008年8月24-29日
- ⑦ 植物培養細胞と誘導可能なウイルスベクターを利用したタンパク質試料の調製, 竹内誠, 玉井淳史, 土肥浩二, 森正之, 大木進野, 第47回NMR討論会, つくば, 2008年11月12-14日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
所属機関の研究者総覧
http://www.jaist.ac.jp/profiles/info.php?profile_id=00338
に研究業績を記載。
また、研究室のホームページ
<http://www.jaist.ac.jp/nmcenter/labs/s-ohki-www/>
にも研究内容を紹介。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大木 進野 (OHKI SHINYA)
北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・准教授
研究者番号: 70250420

(2)研究分担者

森 正之 (MORI MASASHI)

石川県立大学・生物資源工学研究所・准教授

研究者番号：00320911

(3)連携研究者

()

研究者番号：