

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¹, 玉井淳史², 土肥浩二², 森正之², 大木進野¹

(北陸先端大学院大¹, 石川県立大²)

A protein sample preparation using suspension-cultured plant cells and an inducible virus vectors

M. Takeuchi¹, A. Tamai², K. Dohi², M. Mori², S. Ohki¹

(JAIST¹, and Ishikawa Pref. Univ.²)

A new method for preparing uniformly stable isotope-labeled proteins was successfully established using suspension-cultured plant cells infected with an inducible virus vector. Some proteins, which were confirmed to express in the *Escherichia coli.*, were employed as models. These ¹H-¹⁵N HSQC spectra clearly indicated that their structures were identical to those of their counterparts reported previously. In addition, we examined the growth of BY-2 in several different culture medium conditions to check the possibility of ¹³C-labeling. The results indicate the possibility of uniform ¹³C-labeling using this system.

<序論>

タンパク質のNMR研究では、一般的に大腸菌や酵母を利用した試料作製が行われている。それらが採用されている主な理由は¹⁵Nや¹³Cを含む安定同位体標識試薬を利用しやすく、取り扱いが比較的簡便なためである。近年では、生きた細胞では発現が困難な毒性のあるタンパク質でさえ無細胞タンパク質合成系による作製が可能になってきている。各タンパク質発現系が異なる特徴を有するため、発現系の多様化は多くのチャンスを研究者に与えるようになったが、未だどの発現系を使用しても調製できないタンパク質や封入体として得られるため巻き戻し困難なタンパク質も多い。これら諸問題を解決する可能性の高い方法のひとつは、今日まで利用されていなかった生物種を採用した新規なタンパク質発現系を確立することである。

我々はウイルスベクターと植物細胞を用いたタンパク質発現系をNMR試料調製に最適化しようとして試みている。今回は、この系を利用して数種の安定同位体標識タンパク質試料の調製ができたこと、ならびに、培地の条件を検討した結果を報告したい。

キーワード：植物細胞, ウイルスベクター, 安定同位体標識, タンパク質

発表者指名：たけうちまこと, たまいあつし, どひこうじ, もりまさし, おおきしんや

<実験>

目的タンパク質の遺伝子を組み込んだトマトモザイクウイルス由来のウイルスベクターを、植物細胞(タバコ培養細胞 BY-2)に取り込ませた(参考文献 1)。目的タンパク質として、DHFR (dihydrofolate reductase)、CaM (calmodulin)、および CPI-17(22-120) (functional domain of a 17kDa PP1 inhibitor) を用いた。この細胞を前培養し、発現誘導物質であるエストラジオールを添加してから 72 時間後に細胞を回収した。培地の炭素・窒素源は、スクロース (3%(w/v))、1.9 g/L KNO₃、および 1.65 g/L NH₄NO₃ である。¹⁵N 標識のためには市販の標識 KNO₃ と NH₄NO₃ を利用した。また、スクロースを他の試薬に置き換えた培地で BY-2 を培養し、¹³C 標識の可能性を検討した。

¹⁵N 標識タンパク質の精製は、大腸菌で目的タンパク質を発現した際と同様に行った。調製した試料の NMR スペクトルを Varian INOVA750 (750MHz) で測定し、得られたデータを NMRPipe/NMRDraw を用いて処理/表示した。

<結果と考察>

上記 3 種類のタンパク質の NMR 用 ¹⁵N 標識試料の調製と測定ができた。培地 50mL あたり数 mg 回収できるタンパク質もあり、NMR 測定に十分な量を得ることができた。これらの ¹⁵N 標識タンパク質の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルは、これまでに研究された結果と同一のスペクトルが得られた。

また、各種炭素源の利用可能性について調べたところ、スクロースの他にも幾つかの異なる物質 (フルクトースやグルコース、あるいはそれらの混合物) でも BY-2 細胞を増殖できるという結果が得られた。以上より、NMR 用試料作製に対するこの系の利用可能性がさらに高まったといえる。

<参考文献>

- 1) Dohi, K., Nishikori, M. Tamai, A. Ishiwaka, M., Meshi, T., and Mori, M. (2006) *Archives of Virology* **151**, 1075-1084.