

植物でタンパク質を大量に作る技術を開発
～一過的発現システムの改良～

研究成果のポイント

1. 様々な植物においてタンパク質を一過的に発現させるシステムの改良を行い、タンパク質の高発現を達成しました。
2. 特に、ベンサミアナタバコを用いた場合は、大腸菌などの発現システムに匹敵する発現量が得られました。
3. このシステムを有効利用することで、医療や農業に有用なタンパク質の生産が可能となります。

国立大学法人 筑波大学 生命環境系(つくば機能植物イノベーション研究センター)三浦謙治教授、江面浩教授、星川健助教らの研究グループは、アリゾナ州立大学のMason博士との共同研究により、植物において一過的に大量のタンパク質を発現できるシステムを構築しました。

遺伝子の機能解析や有用タンパク質の大量作製を可能にするタンパク質高発現技術が注目されています。植物におけるタンパク質作製はコストが安いとの試算がありますが、発現量が低いため、あまり用いられていないのが現状です。その発現量を上げる方法として、発現させたい遺伝子をもつベクターを用いたアグロインフィルトレーション法^{注1)}を用いて、一過的に植物細胞内でタンパク質を発現させる方法が存在します。この際に用いるベクターの種類によって、発現量に違いが出ます。当研究グループでは、このベクターを改良することで、タンパク質の大量発現に成功しました。ベクターとしては、ジェミニウイルス^{注2)}の発現システムにダブルターミネーター^{注3)}を導入したことで、これまでにジェミニウイルスの発現システムのみの場合の3倍の発現量を達成しました。量としてはベンサミアナタバコ^{注4)}1gあたり約4mgの発現量と大腸菌などの発現システムに匹敵する量のタンパク質発現が可能であることを示しています。

また、ベンサミアナタバコのみならず、レタス、ナス、トマト、トウガラシ、メロン、コチヨウランなど様々な植物においてもタンパク質発現が可能となり、それぞれの植物における遺伝子の機能解析等にも用いることができる可能性を示しています。

本研究は、植物におけるタンパク質発現システムのスタンダードとなり得るベクターの構築に成功した重要な成果であり、特許協力条約(PCT)に基づく国際特許出願済みです。将来的には本ベクターを用いることで、有用タンパク質を安価に大量に作製することが可能になると期待されます。

本研究の成果は、2018年3月19日(日本時間19日19時)付で*Scientific Reports* 誌オンライン版で公開されます。

* 本研究の一部は、科学研究費補助金新学術領域研究(課題番号:JP16H01458)および基盤研究(C)(課題番号:JP16K07390)によって実施されました。

研究の背景

遺伝子の機能解析や有用タンパク質の大量作製を可能にするタンパク質高発現技術が注目されています。例えば、エボラ出血熱への対応として未承認薬として投与された ZMapp はタバコ葉から抽出したヒト化モノクローナル抗体を混合した薬です。但し、現状では、微生物、昆虫、動物細胞の培養細胞を用いる方法が一般的です。一方で、植物におけるタンパク質作製は、コストが安い等の試算がされていますが、発現量が低いため、あまり用いられていないのが現状です。よく使われる手法としては、タンパク質を過剰発現させる遺伝子組換え植物を作製する方法があります。しかしこの方法では、大量のタンパク質発現量を確保するのはきわめて難しいというのが実情です。そのため、遺伝子組換え植物を作出せずに植物においてタンパク質を発現させる方法として、アグロインフィルトレーション法が開発されました。この方法は、過剰発現させたいタンパク質をコードする遺伝子をもつベクターを土壌細菌であるアグロバクテリウムに導入し、アグロバクテリウムを植物に感染させることで一過的にタンパク質を発現させる方法です。この手法では、遺伝子組換え植物を作出する手間が省ける上に、遺伝子組換え植物よりも多くのタンパク質を発現させられることが知られています。実際にアグロインフィルトレーション法を用いた一過的タンパク質発現により、ワクチン抗原等の生産が行われており、微生物培養や昆虫などの発現システムに比べて、安全でしかも低コストかつ短時間で大量生産できるとの評価も得られています。また、植物ウイルスとは違い、感染した場所以外には拡散しません。本研究では、アグロインフィルトレーション法に用いるベクターを改良することで、タンパク質高発現が達成可能となりました。

研究内容と成果

アグロインフィルトレーション法に用いるベクターとしては、植物ウイルスのDNA複製システムを用いたベクターが使われています。本研究でも、ジェミニウイルスのDNA複製システムを用いています。ただし、ジェミニウイルスのDNA複製システムだけでは、ベンサミアナタバコ1gあたり約1.5mgのタンパク質の発現しか得られませんでした。遺伝子が発現するには、プロモーターとターミネーターが必要です。プロモーターとしては、大量発現が可能なカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターをタンデムにつないだものを利用しており、現状の最強だと思われます。そこで、ターミネーターの改良を主に試みました。ターミネーターが1つだけの場合、熱ショックタンパク質ターミネーターを用いることで若干の発現量上昇が見られました。さらに、熱ショックタンパク質ターミネーターおよびエクステンシンターミネーターをタンデムにつなげることで、タンパク質発現量の上昇が確認でき、アグロインフィルトレーション(アグロバクテリウムの感染)を行ってから3日後にはベンサミアナタバコ1gあたり約4mgのタンパク質の発現に至りました。

本ベクターがどれぐらいの発現量があるかを明らかにするため、magnICONとよばれる植物一過的タンパク質発現システムでよく用いられているベクターと比較したところ、当研究室の条件において、約1.4倍の発現量を示しました。magnICONベクターはトバモウイルス由来の複製システムを用いており、本ベクターとは複製システムが異なります。ただ、magnICONベクターは商用で用いられているベクターであることから、本ベクターは植物における一過的タンパク質発現システムのスタンダードとなる可能性を秘めていることが考えられます。

また、本ベクターはベンサミアナタバコでの発現に比べると発現量は低下しますが、ナス、トマト、トウガラシ、メロン、レタス、コチョウランと様々な植物においてタンパク質の発現が可能です。特にトマトやトウガラシでは、ジェミニウイルスの複製システムのみではタンパク質の発現が見られませんが、本ベクターを用いることでタンパク質の発現が可能となります。このことから、様々な植物においてタンパク質の機能を解析する方法として用いることが可能となります。

今後の展開

本研究により、植物における一過的タンパク質発現システムが構築できたことから、このシステムを用いて医療や

農業に役に立つ有用タンパク質の生産が可能となりました。また、新たなタンパク質発現システムとして、大腸菌などの発現システムで発現が難しいタンパク質の新たな選択肢となる可能性があります。

参考図

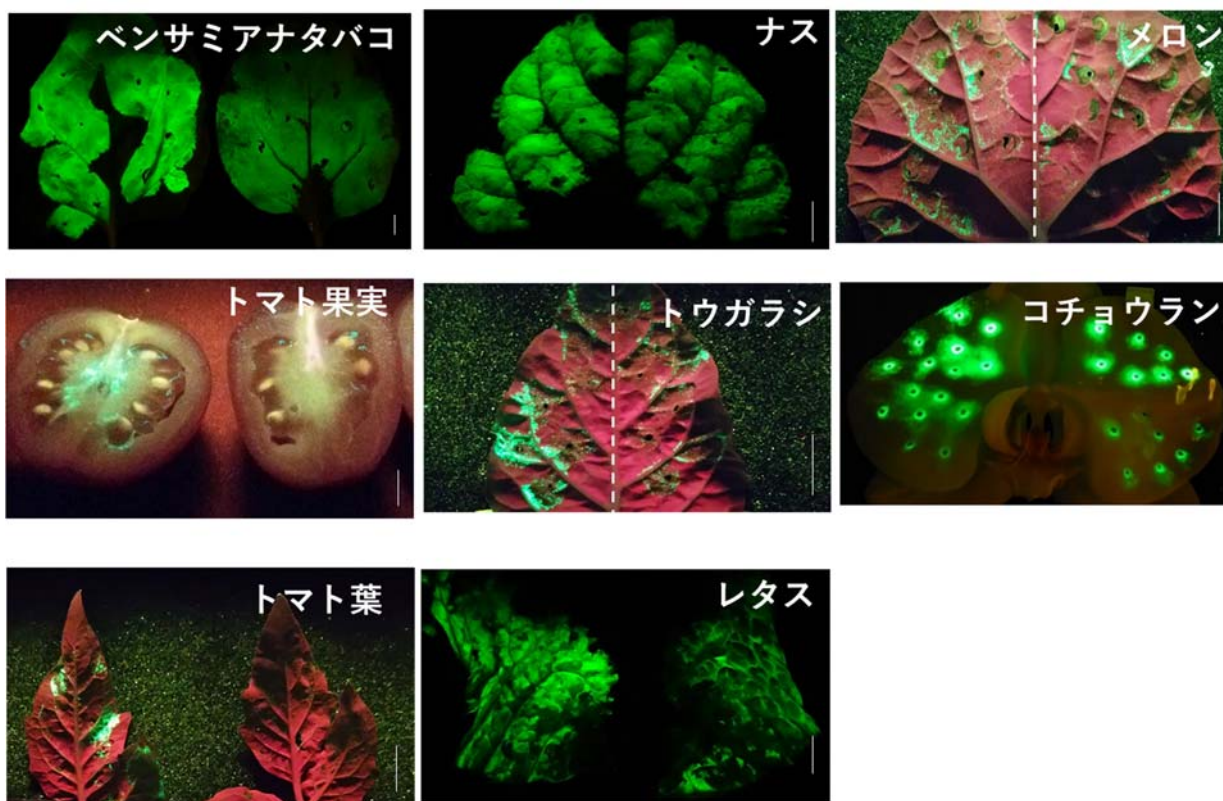


図1 様々な植物に一過的タンパク質発現システムを適用した結果の比較。左側が本ベクターで、右側が改良前のベクターによって緑色蛍光タンパク質を発現させたもの。緑色蛍光が強いほど、発現しているタンパク質の量が多い。本ベクターでは軒並み、緑色の蛍光が強く見られた。緑蛍光が緑色蛍光タンパク質由来の蛍光で、赤色は葉緑体由来の自家蛍光。

用語解説

注1) アグロインフィルトレーション法

特定の遺伝子を組み込んだアグロバクテリウムを植物体に感染させ、当該タンパク質を発現させる技術です。感染後、数日でタンパク質の発現が見られます。

注2) ジェミニウイルス

植物に感染するウイルスです。一本鎖の環状 DNA をゲノムとして持ち、ウイルス自体の構造は、正二十面体が2つつながった形をしているため、ジェミニ(双子)と名付けられました。

注3) ダブルターミネーター

ターミネーターとは、DNA の塩基配列を RNA に写し取られる転写を終結させる DNA 領域。ダブルターミネーターは、ターミネーターを2つ連結させたもの。ターミネーター活性が不十分だと、転写干渉とよばれ、下流の転写の発現量を低下させることがあります。ターミネーターを2つ連結させることで、ターミネーターとしての活性を増強させ、転写干渉の影響を抑える効果が期待されます。

注4) ベンサミアナタバコ

一般的なタバコ植物の仲間であるが、病原菌からの感染を守る植物免疫システムに欠陥があり、病原菌感染の実験や一過的タンパク質発現によく用いられています。2012年にアメリカのグループによりゲノムが解読されました。

掲載論文

【題名】 Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants
(組換えタンパク質生産のための植物における一過的タンパク質発現システムの改良)

【著者名】 Tsuyoshi Yamamoto^{1*}, Ken Hoshikawa^{1*}, Kentaro Ezura¹, Risa Okazawa¹, Satoshi Fujita², Miyo Takaoka¹, Hugh S. Mason², Hiroshi Ezura¹, Kenji Miura^{1§}

¹筑波大学、²アリゾナ州立大学

(*Co-first author; [§]Corresponding author)

【掲載誌】 *Scientific Reports*

DOI:10.1038/s41598-018-23024-

問い合わせ先

三浦 謙治 (みうら けんじ)

筑波大学 生命環境系 教授

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1