

植物におけるタンパク質の一過的発現システム用いたヒノキ花粉アレルゲンの生産

長嶋 玲（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）

【背景・目的】

花粉症は植物の花粉が原因で発症するアレルギー疾患である。原因として最も知られているのはスギ花粉だが、スギ花粉とヒノキ花粉はアミノ酸配列が約 80 %一致し、相同性が高い。そのため、スギ花粉症患者の 7 割以上がヒノキ花粉にも反応することが知られている。現在、花粉症罹患者は 40 %を超え、生産性の低下や医療費の増大が深刻な社会問題となっている。さらに、罹患者数は年々増加しており、低コストかつ安全な治療法の開発が急務となっている。

一般的な花粉症治療は、抗ヒスタミン剤や抗ロイコトリエン剤を用いた対症療法が主流である。しかし、これらはアレルギー症状を一時的に緩和するに過ぎない。一方、アレルゲン免疫療法は、根本的な花粉症治療を可能にし、対症療法で生じる副作用を軽減する有効な手段として注目されている。この治療法は、少量の花粉アレルゲンを患者の体内に段階的に投与し、免疫寛容を誘導するものである。投与方法には皮下注射と舌下投与の 2 種類があるが、舌下投与は安全性が高く、効果的であると考えられ、主流となりつつある。ただし、舌下投与では皮下注射に比べて 5~10 倍のアレルゲンが必要となる。

現在、アレルゲン免疫療法に用いられる花粉アレルゲンは、主に花粉エキスを抽出されているが、治療に必要な量の花粉を樹木から直接集めることは困難である。この課題を解決するため、遺伝子組換えタンパク質を生産する方法が考えられる。スギやヒノキのアレルゲンは、大腸菌などではタンパク質の生産が困難であることが知られている。

そこで、本研究では花粉アレルゲンという植物由来のタンパク質であることから、植物を利用した大量タンパク質生産システム「つくばシステム」を用い、花粉アレルゲンの大量生産、精製を行うことを目的とした。「つくばシステム」は、ジェミニウイルス由来の複製システムとダブルターミネーターを組み合わせ、植物における一過的タンパク質発現システムであり、短期間で大量のタンパク質を生産可能である。特に、ベンサミアナタバコを宿主とした場合、GFP の収量は 4 mg/g 新鮮重であることが知られている。本研究により、植物を用いたタンパク質発現システムにより、アレルゲン免疫療法に必要な花粉アレルゲンの安定供給が可能となり、花粉症治療への貢献が期待される。

【材料・方法】

材料として、ベンサミアナタバコを用いた。

1. ベンサミアナタバコの栽培

N.benthamiana を栽培室において 25 °C で 16 時間明期/8 時間暗期の光周期で 6-8 週間生育した。

2. ベクター作製

つくばシステムのベクターをもとに、目的タンパク質を発現する遺伝子発現カセットおよび精製に用いる His タグを組み込んだ。

3. アグロインフィльтраーション

エレクトロポレーション法によりベクターをアグロバクテリウムに導入し、前培養を 2 日間行ったのち、本培養を一晩行った。この培養液の OD600 を 0.2 に調製し、感染液とした。この感染液をバキュームによりベンサミアナタバコに感染させた。

4. タンパク質精製

感染から 4 日後、植物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。その後、凍結した葉をミキサーで粉碎し、Lysis buffer に溶解した。次に、超音波処理を行い、不純物を除去するためにミラクロスでろ過し、遠心分離を実施した。続いて、30 %の硫酸分画を行い、得られた上清を Binding Buffer で透析した。透析後のサンプルを TARON レジンに流し込み、目的タンパク質を吸着させた。レジンを通した液体 (Flow Through) を回収した後、全サンプル液が通過した後にレジン洗浄し、目的タンパク質を溶出させるために Elution Buffer を加えた。溶出した液体はカラム下部から回収し、c1 から c5 の分画として得た。

最終的に、得られた FT および c1-c5 についてウエスタンブロットティングを実施し、目的タンパク質の存在を確認した。

【結果及び考察】

詳細は発表会にて報告する。