

提出日：平成 29 年 4 月 25 日

平成 28 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	血小板凝集因子ポドプラニンの立体構造解析		
研究代表者	氏名	加藤 幸成	
	所属機関名・部局名	東北大学・大学院医学系研究科	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	高木 淳一		
<p>東北大学ではこれまで、血小板凝集因子であるポドプラニンの遺伝子クローニングに成功し、その機能解析を実施してきた。さらに、大阪大学蛋白研と共同で、ポドプラニンに対する NZ-1 抗体を使い、PA タグシステムを開発した。平成 28 年度は、PA タグシステムの新たな利用法についてさらに研究を進めた。PA タグシステムにおいては、NZ-1 抗体が大量に必要となる。本年度は、NZ-1 抗体の高密度培養を行った。まず、無血清培地 (Hybridoma-SFM) に NZ-1 ハイブリドーマを段階的に馴化させ、バイオリクターを用いた高密度培養を開始した。その結果、500 mg/L 以上の収率で NZ-1 抗体が精製することが可能となった。</p> <p>大阪大学蛋白研を中心として、PA タグシステムを用いて、これまで多くの膜タンパク質の精製に成功した。他のタグシステムと比較し、簡便で精密な精製が可能であることは明らかであった。本研究では、東北大学で実施中の抗体作製の抗原調整に、どの程度 PA タグシステムが威力を発揮するかを検討した。PA タグシステムを用いて精製したタンパク質をマウスに免疫をしたところ、PA タグに対する抗体はほとんどできず、目的のタンパク質に対する抗体が効率よく作製できた。よって、PA タグを切断しなくても、そのまま免疫原として利用可能であることが実証できた。FLAG タグシステムを用いた場合には、FLAG タグに対する抗体が多くできてしまうことが報告されている。その点、PA タグは免疫原の調整だけでなく、抗体作製が効率的に実施できるという利用法が明らかとなった。</p> <p>東北大学ではこれまで、CRISPR/Cas9 システムを用い、HEK-293T 細胞のポドプラニンノックアウト細胞を樹立してきた。本研究では、ポドプラニンが発現していることが知られている COS-7 についても、ポドプラニンノックアウト細胞の樹立を試みた。ヒトポドプラニンの CRISPR/Cas9 をリポフェクション法により導入し、flow cytometry 法および限界希釈法によりシングルセルクローニングを実施した。その結果、COS-7 のポドプラニンノックアウト細胞 (PDIS-4) を樹立した。</p> <p>今後、東北大学での抗体作製において、さらに PA タグシステムを活用していく予定である。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 29 年 5 月 19 日 (金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp