

29-0063

昆虫細胞 Sf+を用いたヒト P 糖タンパク質の大量精製

○寺角 香菜子^{1,2}, 小段 篤史², 佐藤 友美¹, 柴田 洋之², 植田 和光³, 加藤 博章^{1,2} (¹京大院薬, ²理研播磨, ³京大院農)

[目的]P-glycoprotein(MDR1)は ATP 駆動型トランスポーターであり、ATP の加水分解に伴い多種多様な低分子異物を細胞外に排出する機能を有している。この分子メカニズムを明らかにするためには、高い分解能で立体構造を決定する必要がある。そこで本研究では、X 線結晶構造解析を行うため、MDR1 の大量発現・単離精製方法を検討した。

[方法と結果]MDR1 cDNA をバキュロウィルス用の transfer vector pVL1392 に挿入した。この際、MDR1 の C 末端側に His-tag を融合した。組み換えバキュロウィルスを昆虫細胞 Sf+に感染させたところ、細胞膜画分に分子量約 14 万の MDR1 が発現した。この膜画分を、界面活性剤(dodecyl maltoside)を含む緩衝液により可溶化し、アフィニティ精製を行った。さらにゲルろ過を行い、電気泳動上で単一バンドにまで精製することができた。リポソームに再構成した精製 MDR1 は、基質輸送に伴う ATP 加水分解活性を示したことから、生理的機能を保持していると判明した。最終的に、1L の培養から約 3 mg の精製 MDR1 を調製することができた。今回、昆虫細胞 Sf+を用いることにより、Sf9 と同等以上の MDR1 を発現させることが可能となった。現在、精製した MDR1 を用いて、結晶化条件の検討を行っている。