

大腸菌を宿主に用いたガウシア・ルシフェラーゼ及びミニ・ルシフェラーゼの発現と精製		
黒田研究室	学籍番号： 10251506	福原 功巳

【背景・目的】

カイアシ類 *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ (GLuc) は基質のセレンテラジンを酸化することによって発光する。GLuc は 168 残基から成り、その分子量は 19.9 kDa と他のルシフェラーゼよりも小さく、発光強度も強い。またその反応は ATP 非依存的である。これらの特徴からレポータータンパク質への応用が期待されている。しかし、大腸菌を宿主とした組換え GLuc の発現において、配列中の 10 個のシステインが正しい S-S 結合を形成することが難しいという欠点がある。

そこで本研究では、構造解析や物理化学的解析に適した量の GLuc を作製するため、大腸菌を宿主として正しい S-S 結合を形成する GLuc の精製条件の最適化を行った。更に、発光活性を保持したミニ・ルシフェラーゼ(分子量約 1 万 GLuc の一部分)の精製法を検討した。

【研究方法】

先行研究で開発された溶解性向上タグ(C9D)を付加した組換え GLuc の発現ベクター(pAED-GLuc)を用いて BL21 (DE3)を形質転換し、大腸菌を 37°C で培養後、OD_{590nm} が 0.6 に達したらタンパク質を IPTG 添加による発現誘導し、その後 25°C で 4 時間培養した。その後集菌し、菌体を超音波破碎した。GLuc を His タグアフィニティーカラム精製し、3 日程度インキュベーションして S-S 結合を空気酸化により形成させた。本研究では、タンパク質精製後のインキュベーション時における緩衝液温度及び pH、酸化剤(DMSO)及び還元剤(DTT)を添加することによる巻き戻り効率への影響を検討した。各条件における、GLuc の巻き戻り状態を逆相 HPLC により解析し、最適化した精製条件を用いて精製した GLuc の S-S 結合の状態を Ellman's assay を用いて解析した。その後、GLuc に付加した His タグ及び C9D タグを Factor Xa を用いて切断し、発光活性測定や NMR 測定を行った。更に、同様の手順でミニ・ルシフェラーゼ(GLuc1-97C59A)の発現及び精製の最適化を行った。

【結果及び考察】

25°C で精製を行った GLuc は肩(赤及び紫領域)の割合が多く、メインピーク(緑領域)の割合が少ない(図 1A)。一方、4°C で精製を行った GLuc は肩の割合が少なくなり、25°C で精製を行った GLuc よりもメインピークの割合が多い(図 1B)。この結果から、低温で精製及び酸化反応を行うことが GLuc の精製において最適な条件であると示唆された。さらに、全長 GLuc で求めた精製条件を参考にして、ミニ・ルシフェラーゼの精製の最適化を行い、一本のメインピークを得ることができた(図 1C)。しかし、肩の割合はまだ多く、ミニ・ルシフェラーゼの精製においては更なる改善の余地がある。今後は溶解性向上タグを付加したミニ・ルシフェラーゼの発現系を構築し、構造解析のための試料作製を進めていく予定である。

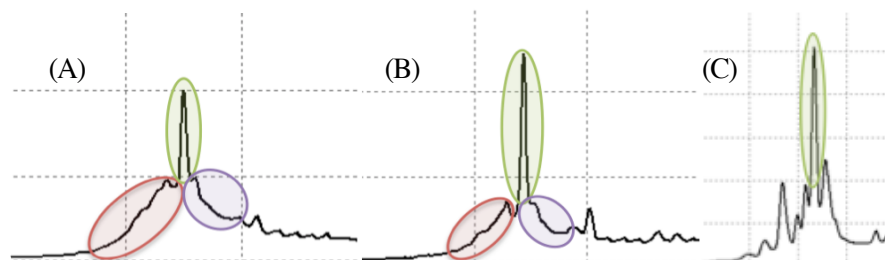


図 1 菌体破碎からインキュベーションまでの精製条件の検討を行った際の(酸化後)の HPLC チャート (A) 25°C 及び (B) 4°C で酸化・精製した全長 GLuc (C) 4°C で酸化・精製したミニ・ルシフェラーゼ 緑領域は正しい S-S 結合を形成した GLuc(メインピーク)、赤領域はミスマッチ S-S 結合を形成した GLuc(ミスフォールディング)、紫領域は酸化が不完全な GLuc(非酸化領域)を示す。