

正しくフォールディングしたガウシアルルシフェラーゼの発現・精製及びNMR 解析用サンプルの作製		
黒田研究室	学籍番号： 07251048	田中 亮太

【背景・目的】

自然界にはホタルを始めとして生物発光を行う多くの甲虫、甲殻類、バクテリアなどが存在している。これらはいずれも酵素であるルシフェラーゼが基質のルシフェリンの酸化反応を触媒することによって発光を行っている。これと同様の基質を利用するルシフェラーゼとして、カイアシ類の *Gaussia princeps* が持つルシフェラーゼ (GLuc) が挙げられるが、これは他のルシフェラーゼと比較すると分子量が 19.9 kDa と小さく、発光強度は数百倍、反応は ATP 非依存的であるという特徴からレポータータンパクとしての活用が期待されている。しかし、GLuc の構造は、10 個のシステインによる 5 つのジスルフィド結合を有するという以上の詳細については未だ不明のままである。そこで本研究では構造決定へ向け、GLuc の変異体を作製し、結晶化や NMR 解析により適したタンパク質へと改良すると同時に、それぞれの最適条件を探索することを目的とした。

【研究方法】

先行研究にて発現量が多く、菌体破碎の際に上清画分にタンパク質が多く現れるとされた組み換え GLuc (pAED-GLuc C9D タグ付き) に対し、アミノ酸残基を挿入する(Fig.1)。これによって得られたプラスミドで BL21 (DE3) を形質転換し培養後、更に IPTG でタンパク質発現を誘導し 25°C で 4 時間培養する。得られた菌体を破碎後、タンパク質を His アフィニティーカラム、逆相 HPLC カラムをもちいて精製をする。その後、精製タンパク質をプロテアーゼである Factor Xa にて処理して GLuc の両端に付属する His タグ、C9D タグを切断し構造解析が可能な状態にする。また NMR 解析用にその変異体を用い、最小培地でラベリングした GLuc の作製と測定条件の設定を行う。

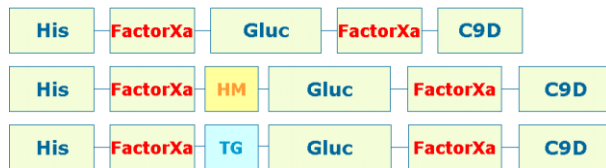


Fig.1 : 変異を挿入した部位

【結果および考察】

His タグと GLuc の間にヒスチジン、メチオニンの二残基を挿入したところ、これまで切断可能であった C9D タグだけではなく、His タグも処理可能となり、GLuc 部位のみでの構造解析を試みる事が可能となった。しかし、タンパク質の収量はこれまでの約 40% に減少してしまった。そこで挿入する残基を、トレオニン、グリシンの二残基へと変更したところ、両タグが処理可能な上、タンパク質の収量は残基挿入前と比較してほとんど減少は見られなかった (Fig.2)。また、NMR 解析ではより高濃度のサンプルを用い、そのタグを切断して pH をより低く設定する必要があることがわかった。今後はこの変異体を利用して精度の高い NMR 解析や結晶構造解析など、更なる GLuc の構造解析を進めていく予定である。

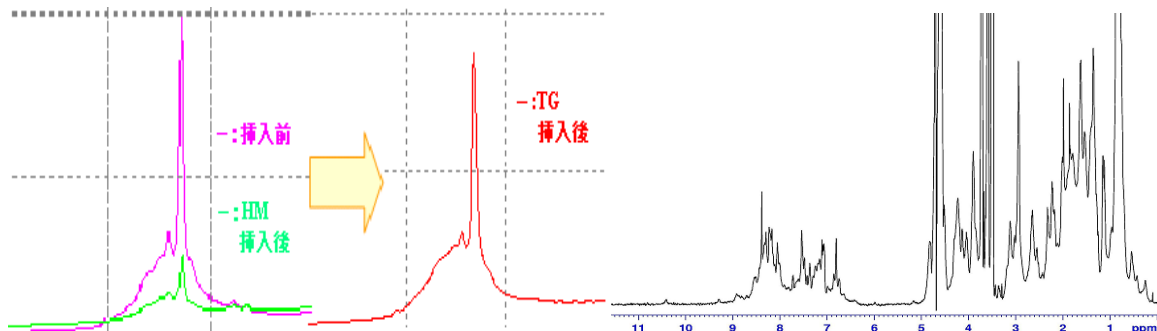


Fig.2 : 挿入前後の HPLC チャート

Fig.3 : 測定した 1 次元 NMR スペクトル