

最小ガウシアルシフェラーゼの作製		
黒田研究室	学籍番号：12251004	石山 幸樹

【背景・目的】

海洋性プランクトンのカイアシ類 *Gaussia princeps* 由来のガウシアルシフェラーゼ (*Gaussia* Luciferase, GLuc) は発光強度が強く、その反応は ATP に依存しない。また分子量は 19.9 KDa と他のルシフェラーゼより小さい。これらの特徴から次世代のレポータータンパク質として期待されている。その一方でガウシアルシフェラーゼは構造が未知であるので先行研究では NMR による帰属が行われた。その際にゆらぎが大きく、構造決定の妨げの原因となっていると考えられたプレ配列部分を削除した最小ガウシアルシフェラーゼを作製した (DelGLuc)。DelGLuc と従来の変異体との発現量を比較し、その利用価値について検討を行い最小ガウシアルシフェラーゼの可能性を示した。

【研究方法】

本実験では先行研究で作製された GLuc 中のレアコドンが大腸菌向けのコドンに最適化した GLuc (Optimized-GLuc) を元にプレ配列のコード領域を削除した (opti-DelGLuc) を作製した。Opti-DelGLuc と Opti-GLuc について 5ml スケールの試験管培地を用いて大腸菌株に *JM109 (DE3)*, *JM109 pLys*, *BL21 (DE3)*, *BL21 pLys* を使用し SDS-PAGE により発現量を比較した。その際に Opti-DelGLuc および Opti-GLuc は発現しないことが判明したため、GLuc 中のレアコドンの一部最適化した変異体 (9-Opti-GLuc) と GLuc を用いて *BL21 (DE3)* を宿主セルとし形質転換を行い 2L 容量の LB 培地条件下での発現量を比較した。

【結果及び考察】

Optimized-GLuc および本実験で作製した Opti-DelGLuc は大腸菌株に *JM109*, *JM109pLys*, *BL21 DE3*, *BL21 pLys* を使用した 5ml スケール LB 培地条件下では発現が確認されなかった。Optimized-GLuc および Opti-DelGLuc とともに 5ml スケールでは発現しなかったことから、今回削除したプレ配列のコード領域が発現量に関係のある部位かどうかを決定することができなかった。

2L 容量の LB 培地ではレアコドンの一部最適化した変異体 (9-Opti-GLuc) の発現量は 2.98 mg、最適化前の GLuc は 1.66 mg だった。GLuc 中のレアコドンの一部を大腸菌向けに最適化したことにより従来の GLuc よりも発現量は 1.8 倍に増加した。

Optimized-GLuc および Opti-DelGLuc が発現しないことから Optimized-GLuc のプレ配列部分を削除することでは構造決定に有力な最小 GLuc を作製することは困難であったが、2L 容量での発現量を増加させることに成功したことが確認された 9-OptiGLuc を鋳型とした最小化 GLuc の作製を行うことにより GLuc の構造決定を進めることのできる可能性を示した。

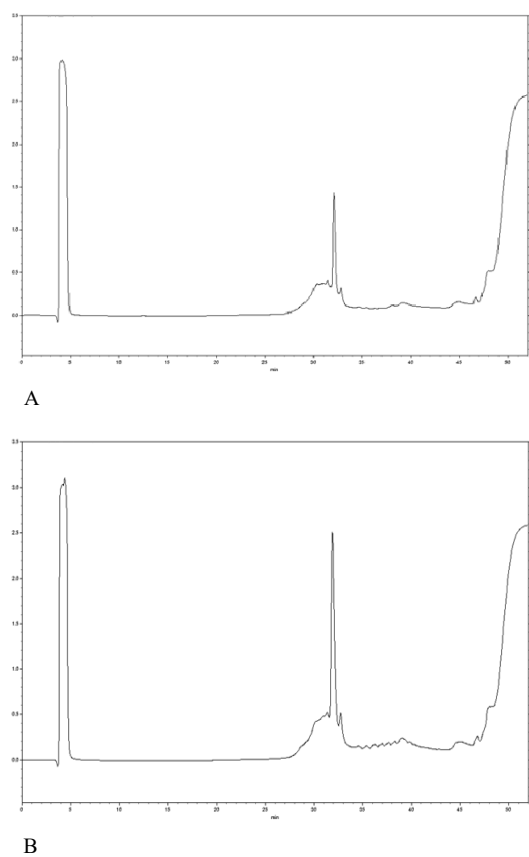


図1 HPLCのチャート (A:最適化前のGLuc
B:9-OptiGLuc)