

L1112-02	ガウシアルシフェラーゼの大量発現系構築及び機能解析					
	氏名	田輪 みな子	主査	黒田	副査	朝倉・長澤・大野・稲田

【背景・目的】

生物発光は甲虫・甲殻類・バクテリアなど、多岐にわたる生物で観測され、その光はルシフェリン（発光基質の総称）を酸化する反応によって発せられる。この酸化反応を触媒する酵素をルシフェラーゼといい、系統の離れた生物種間のルシフェラーゼの起源が異なることから、構造や配列の相同性は無く、ルシフェリンも生物種によって異なることが知られている。

我々は、高い輝度を有する分子量の小さい分泌性タンパクということから新たなレポータータンパク質としての期待が集められている、海洋カイアシ類 *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ（ガウシアルシフェラーゼ；以下 GLuc）に注目した。GLuc はルシフェリンとしてセレンテラジンを用いて、470nm に最大発光波長を持つ発光反応を触媒する。他のルシフェラーゼに比べ分子量がはるかに小さい（169 残基、ホタル由来が 550 残基）が、機能・性質を調べた報告は極めて少なく、特に大量発現系の詳細な報告は（2 件の報告を除いて）存在せず、in vitro でのレポータータンパク質の研究は殆ど進められていない。そこで、本研究では、GLuc のレポータータンパク質の可能性を調査する第一段階として、*E.coli* を宿主とする大量発現系を構築し、精製法を確立し、その機能の特徴付けることを目的とした。

【実験方法】

pGEX-6P-2 の GST 部分を欠損させたベクターを用いて、His タグ、ガウシアルシフェラーゼを組み込んだコンストラクトを構築した。また、そのコンストラクトを BL21(DE3)pLysS を用いて発現させ、沈殿画分の His アフィニティー精製、リフォールディングを行い、リフォールディング後に得られたルシフェラーゼの活性、構造安定性、配列中の 10 個のシステイン残基の酸化状態などを調べた。

【結果および考察】

His タグ融合ガウシアルシフェラーゼ（NHis_GLuc）は、アフィニティーカラムでの精製の結果、可溶性、不溶性ともに発現を確認した。そこで、最も多く発現している不溶性画分を 6 MGdnHCl で可溶化させ、透析することで、大半の GLuc を沈殿から巻き戻すことができ上清画分で回収した。

NHis_GLuc に NaCl と基質を添加し発光スペクトル測定したところ、474nm に最大発光波長を得たことから、活性が確認できた。（図 1）また、遠紫外部 CD スペクトル法を用いた 2 次構造含量の温度依存性を調べたところ、30 までは安定に構造を保っているが、45 から構造が壊れ始め、60 以降では完全に構造が壊れてしまっていることを確認した。（図 2）よって、沈殿画分より回収、巻き戻した NHis_GLuc は活性・構造を持つことが明らかとなり、封入体から活性を持つルシフェラーゼの精製に成功したと考えられる。今後は、GLuc の巻き戻し効率と、構造解析にむけて研究を進め、発光活性の改良を目指す予定である。

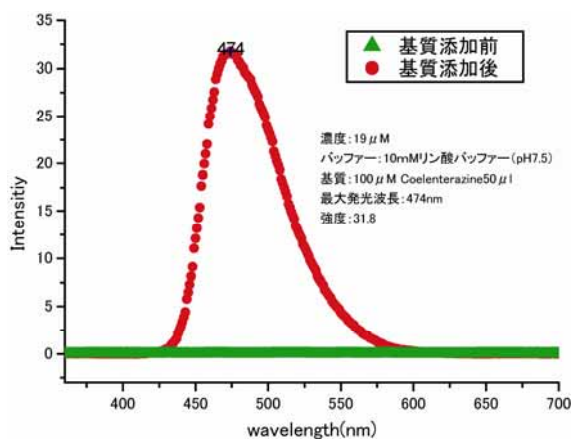


図 1 沈殿から巻き戻したルシフェラーゼの発光スペクトル

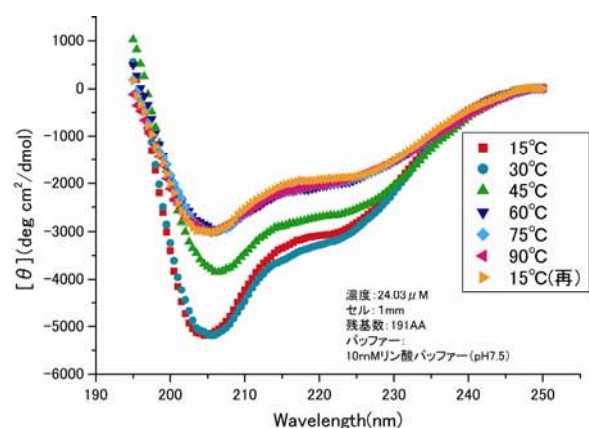


図 2 沈殿から巻き戻したルシフェラーゼの遠紫外 CD スペクトル