

正しいS-S結合を形成したガウシアルシフェラーゼの大量発現系の開発		
黒田研究室	学籍番号： 04251063	牧野 恵里香

### 【背景・目的】

生物発光は、甲虫・甲殻類・バクテリアなど多くの生物で観測されている。この発光反応は、ルシフェラーゼと呼ばれる酵素が、基質であるルシフェリンの酸化反応を触媒することによって引き起こされている。系統的に離れた生物種のルシフェラーゼは起源が異なるため、構造や配列の類似性・相同性というものは全く存在しない。本研究室では、数あるルシフェラーゼの中でも 19.9kDa、185 残基と現在知られているルシフェラーゼの中では最も小さい、海洋カイアシ類 *Gaussia princeps* 由来のルシフェラーゼ (GLuc) に注目した。GLuc はホタル由来のルシフェラーゼ (62kDa、550 残基) より小さく、また発光強度が約 200 倍強いため、レポータータンパクとしての活用が期待されている。しかしその一方で、GLuc の配列中にある 10 個のシステインが正しい S-S 結合を形成することを妨げており、大腸菌などの微生物を用いて組み換え GLuc を安価に生産することができていない。そこで本研究では、大腸菌を宿主として正しい S-S 結合を形成した GLuc の大量発現系を開発し、発光活性や熱安定性等の機能解析を行うことを目的とした。

### 【研究方法】

これまで本研究室で使用されていた pGEX\_6p2\_GLuc (25°Cで発現) に代わり、低温発現用ベクター (pCold) を用いて、His タグ、GLuc を組み込んだコンストラクトを構築した。また、JM109 (DE3) を宿主に用いて IPTG 誘導後 15°Cで 24 時間培養し、菌体破碎によって上清画分を回収した。この上清画分を His アフィニティーカラムによって精製した後に、逆相 HPLC カラムによる精製を行った。得られた GLuc を用いて、2 次構造の温度依存性や巻き戻り効率、塩添加に対する発光活性の依存性を調べた。

### 【結果および考察】

pCold\_GLuc 発現系を用いることで、これまでの pGEX 発現系に比べて上清画分に発現する割合が大幅に増加した。また His アフィニティー精製の結果、25kDa 付近にシングルバンドが SDS ページで確認された。この GLuc が正しい S-S 結合を有しているか調べるため、逆相 HPLC の解析を行った。その結果、不溶性画分から巻き戻した GLuc には逆相 HPLC で複数のピークが現れたが、低温で上清画分に発現した GLuc は、小さな肩を持っていたものの大きな 1 本のメインピークとなって現れた。メインピークの発光活性は非常に強く、文献で報告されている通り NaCl の添加は発光強度を増加させていた (fig1)。以上のことから、低温で発現した GLuc の HPLC メインピークは正しい S-S 結合を形成した GLuc のものであり、肩部分は非天然 S-S 結合を形成した GLuc であると推察することができた。

さらに、円偏光二色性分光法 (CD) を用いて 2 次構造含量の温度依存性を調べたところ、45°C 辺りから温度上昇と共に徐々に構造が壊れ始め、95°Cで完全に変性した (fig2)。また 75°C に 5 分晒してから巻き戻した後に再び 15°Cに戻して CD 測定を行ったところ、構造はほぼ完全に巻き戻っていることが確認できた。したがって、HPLC 精製した GLuc の熱変性は可逆であることが示唆された。

以上、本研究では、pCold 発現系を用いて組み換え GLuc を低温で発現させることで、上清画分に大量のタンパク質を得ることに成功した。また上清画分から HPLC 精製した組み換え GLuc は正しい S-S 結合を形成し、高い活性を持つ天然状態の GLuc であることを確認できた。さらに、組み換え GLuc の熱安定性は高いことが確認されたので、今後は本手法で精製した GLuc の結晶化に向けて研究を進めていく予定である。

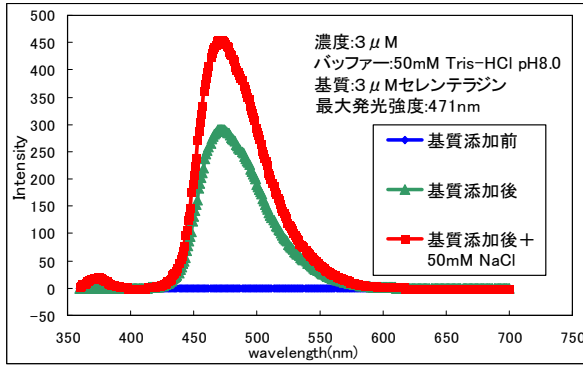


Fig1: 上清に発現させた pCold\_GLuc の  
 トル  
 発光スペクトル  
 し)

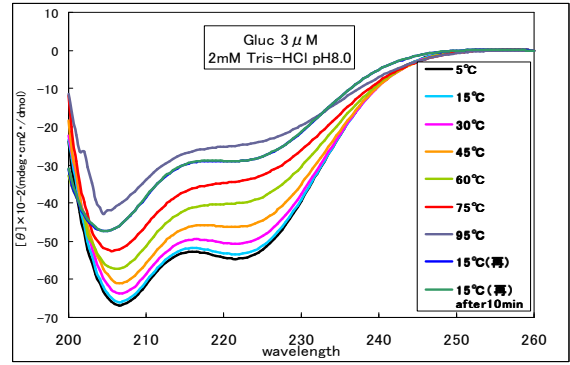


Fig2: pCold\_GLuc の遠紫外 CD スペク  
 (温度依存性と 2 次構造の巻き戻