

【背景・目的】

海洋カイアシ類由来の *Gaussia Luciferase* (GLuc) は他のルシフェラーゼと比較して、発光反応が ATP 非依存である、分子サイズが小さい、などの利点がある。その為レポータータンパクとして注目されている。しかし GLuc には配列中に 10 個のシステイン残基が存在し、正しい S-S 結合の形成が難しくフォールディング効率が一定でないという欠点があるため、精製純度が低く未だ構造解析のための結晶化に至っていない。そこで精製条件を最適化する必要がある。本研究では大腸菌を宿主として、GLuc のフォールディング効率を向上させることを目的とした。

【研究方法】

今回用いた GLuc は、pAED ベクターに His タグ、GLuc、C9D タグ (C 末端に 9 つのアスパラギン酸を付加したタグ。このタグの付加により GLuc の上清画分が増加することが先行研究により示されている) を順に挿入した GLuc (GLuc-C9D と名付ける) である。BL21 (DE3) を宿主に用いて 37°C で O.D. 590nm=0.5~0.6 になるまで LB 培地で培養した。IPTG(最終濃度 1 μm) による発現誘導を行ない 25°C で 4 時間培養した。集菌後に超音波破碎し上清画分を回収した。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、buffer 置換の為に外液を 50 mM Tris-Hcl buffer (pH 8.0) で透析を 2 時間行った。透析後の GLuc-C9D を 4°C で静置インキュベーションし、そのフォールディング変化を 1 日経過ごとに逆相 HPLC で分析し、フリーシステイン濃度を計測するため DTNB 測定をし、分光光度計で発光活性を計測した。

【結果および考察】

4°C で 1 日以上インキュベーションすることにより、GLuc は単一の S-S 結合パターン (図 1) を持ち活性が高くなる (図 2) フォールディングを形成することがわかった。図 1 (A) では GLuc を示すピークが複数観測され、単一の S-S 結合パターンを持つ構造ではないと分かった。しかし、図 1-(B) (C) (D) では 1 つのピークになり、単一の S-S 結合パターンの構造を持っていると示唆している。また、図 2 の結果から発光強度が最も高くなる日は 3 日目だと分かった。図 1 と図 2 からフォールディングが変わり 1 つのピークに近づくると活性も高くなる傾向があることが分かった。また DTNB 測定を行なったところ、1 日目から 2 日目にかけてフリーシステイン濃度が著しく減少を確認しており、4°C で 1 日以上インキュベーションにより S-S 結合が形成されることが分かった。これらの結果からインキュベーションを行なうことによりフォールディングが変化し、正しい S-S 結合を形成する GLuc が得られることが分かった。今後は大量培養により結晶化に適した試料の作成につながるだろう。

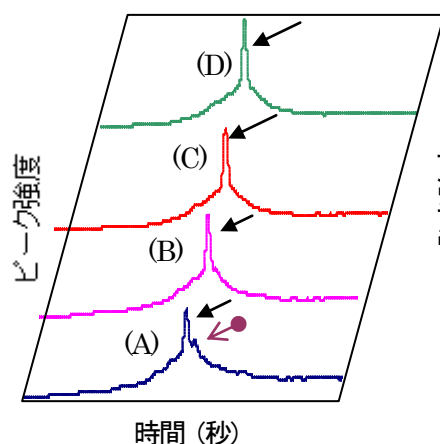


図 1 4°C インキュベーション下の GLuc-C9D の HPLC ピーク。

▲ は正しいフォールディング
● は間違えたフォールディング

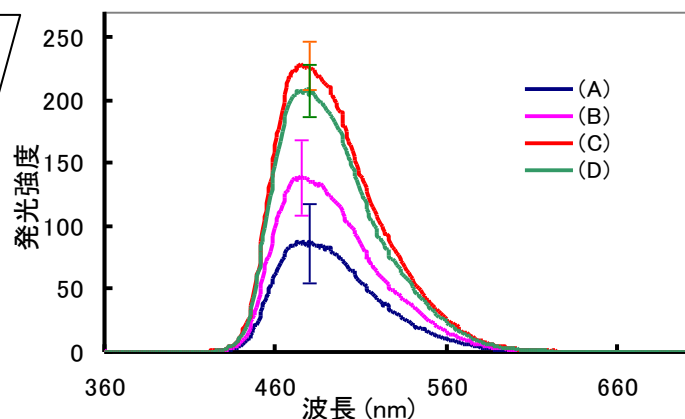


図 2 4°C インキュベーション下の GLuc-C9D の発光強度の変化。

—(A)透析直後 —(B)インキュベーション 2 日目
—(C)インキュベーション 3 日目 —(D)インキュベーション 4 日目