

L1211-16	VanX の溶菌活性を用いた新規ルシフェラーゼのスクリーニング法の開発				
	氏名	Wu Nan	主査	黒田	副査

[背景・目的]

ルシフェラーゼはバイオイメージングの分野においてレポータータンパク質として重要な役割を果たす酵素である。我々は、今まで知られているルシフェラーゼの中で最も小さいガウシアルルシフェラーゼ (Gluc) に注目した。Gluc の発光活性は他のルシフェラーゼ (Fluc, Rluc) より数倍強いことが報告されているが、微生物での大量発現が難しいことや Gluc の立体構造が未知であるため、発光活性部位の変異を導入して活性を改良することも難しく、まだレポータータンパク質としてはあまり普及していない。その為、Gluc の実用には、様々な発光波長 (色) を有する変異体を作製することは重要な研究課題である。しかし、従来のスクリーニング法では、大量のサンプルを超音波破碎しその活性を検定する必要があるため、多くの時間と手間がかかる。本研究では、黒田研究室の先行研究で発見された VanX の溶菌効果を用いて、超音波破碎を必要としない、新規の簡便な Gluc のスクリーニング法を開発し、Gluc の発光機能を改変した変異体を同定することを目的とした。

[研究方法]

発現系においては、アンピシリン耐性遺伝子を持つ pET21-Gluc とカナマイシン耐性遺伝子を持つ pET26b-VanX を、四種類の大腸菌 (JM109, JM109pLysS, BL21, BL21pLysS) に挿入し、培地内 VanX の収量から溶菌活性を求め、Gluc の発光強度から共発現の安定性を評価し、さらに発現誘導のタイミングを最適化した。次に、スクリーニングの精度を求めめるために、野生型 Gluc と VanX を共発現させ、溶菌後の培地中の Gluc の発光スペクトルを五つのコロニーで測定した。開発した VanX の溶菌効果に基づいたスクリーニング法を用いて、Gluc のランダム変異を検証した。ランダム変異は、Swiss-Prot (蛋白質のデータベース) に対するホモロジー検索と親水性領域で保存性が中程度の部位から、発光活性に関わると推測したアミノ酸 4 残基をランダムプライマーを用いて変異させた。ランダム変異を導入したプラスミドと pET26-VanX を大腸菌に挿入し、Gluc 変異体をスクリーニングした [鋳型は緑の発光色を持つ Monsta 変異体 (2011, Kim et al, Anal Chem) を利用した]。スクリーニングによって選出した変異体を His アフィニティーカラムを用いて精製し、発光活性を検証した。

[結果・考察]

スクリーニング・プロトコルの開発に於いて、共発現の宿主菌として BL21(DE3) が溶菌効率及び Gluc の発現量の安定性の観点から最も優れていた。また、共発現において、OD_{590nm} が 1.5 から 2.0 の間が最適な発現誘導のタイミングであることを解明した。さらに、本プロトコルで同定が可能な変異体は、発光強度が 30% 変化と発光波長が 1nm 以上偏移した酵素であることが分かった。以上のプロトコル (図 1) を用いて、ランダム変異した Gluc のスクリーニング実験を行った。その結果、発光強度が二倍増加した変異体 (図 2) と、最大波長が 3 nm 赤色偏移した変異体を同定した (図 3)。変異体を精製して活性測定を行い、その特徴を確認した。これによって、開発した新規溶菌スクリーニング法の実用性を証明した。今後は、この方法を用いて、Gluc をさらに改変し、色が変わる変異体を作製する。

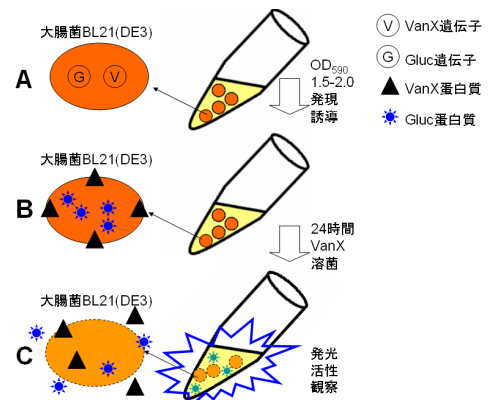


図 1 新規溶菌スクリーニング法

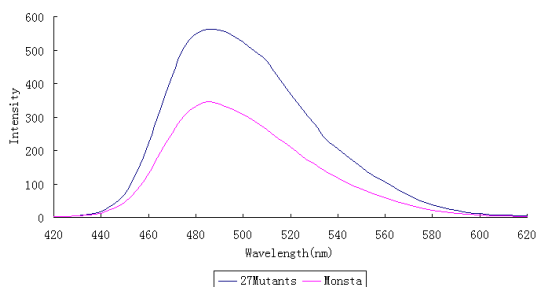


図 2 高発光活性の変異体(#27)

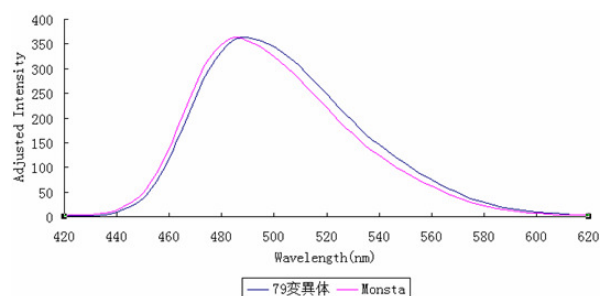


図 3 発光色が変異した変異体(#79)