

大腸菌を宿主としたガウシアルシフェラーゼ発現系の改良		
黒田研究室	学籍番号： 11251093	青木 将

【背景・目的】

海洋性プランクトンであるカイアシ類 *Gaussia Princeps* 由来の生物発光酵素ガウシアルシフェラーゼ(以下、GLuc)はその分子量が小さいこと、発光強度が強いこと、そしてATPに依存しない化学反応による発光を行う点から、バイオイメーjingの分野における次世代のレポーター蛋白質としての応用が期待されている。しかしながら、大腸菌を宿主とした組み換え体の発現系は効率が悪いことから、発光機能の改変を効率的に行うことができないという問題がある。当研究室では立体構造解析に向けて精製法の改良は行われてきたが、元来GLucの収量はLB培地において約3mg/Lであり、これはGLuc配列中にレアコドンが多く存在するためだと考えられた。本研究では、大腸菌用にコドンが最適化されたGLuc遺伝子(以下、Optimized-GLuc)を用いて新たに組み換えベクターを構築し、LB培地における発現量および精製後の収量の増加を目指した。

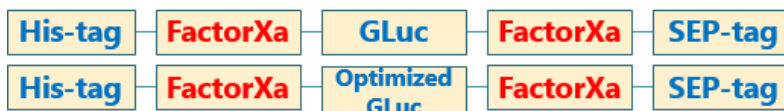
【研究方法】

先行研究で開発された溶解性向上タグ(SEP-tag : (GDDD)₃ または (GRRR)₃)をGLucのC末端に付加したプラスミド pAED4-GLuc-C9D および pAED4-GLuc-C9R(以下、それぞれC9D, C9R)を基に、サブクローニングにより最適化配列が組み込まれた pAED4-Optimized-GLuc-C9D および pAED4-Optimized-GLuc-C9R(以下、それぞれOpC9D, OpC9R) を作製した(Fig.1)。これらのプラスミドを用いて大腸菌株 BL21 (DE3) pLysS 株を形質転換し 5 ml LB 培地において 37°C で培養した。O.D_{590nm}=0.6 に達した後、25°C, 4h, IPTG 終濃度 1mM で発現誘導を行い SDS-PAGE 上で発現量の増大を確認した。最も発現量の増大がみられた pAED4-Optimized-GLuc-C9D(以下、OpC9D)を用いて 1 L スケールで大量培養を行い、His-tag アフィニティーカラムおよび逆相 HPLC カラムにより精製し凍結乾燥させた。乾燥後の粉末を MALDI-TOF-MS による質量分析および活性測定を行うことで目的蛋白質であることを確認し、HPLC のピーク面積から収量を定量した。

【結果及び考察】

最適化後の配列はコドンの使用頻度を表す指標としてよく用いられる Codon Adaptation Index の値にして 0.64 から 0.89 まで向上した。SDS-PAGE 上における目的バンド上清画分とマーカーとのバンド強度を Image J で定量化した結果、従来の C9D よりコドンを最適化した OpC9D はおよそ 2 倍量発現していることがわかった(Fig.2)。また、1 L スケールで発現精製したところ His-tag, C9D-tag 切断前時点で 5 mg の収量が得られ、これは従来の約 1.6 倍であった。発光活性についても従来と同程度であった(Fig.3)。

以上の結果から、コドンを最適化することで発現量および収量の増加が示され、発現系を改良することに成功した。今後は、このプラスミドを用いた立体構造解析へ向けた研究が期待される。



※SEP-tag=G DDDGDDD GDDDまたはG RRRGRRRGRRR Fig.1 作成したプラスミド

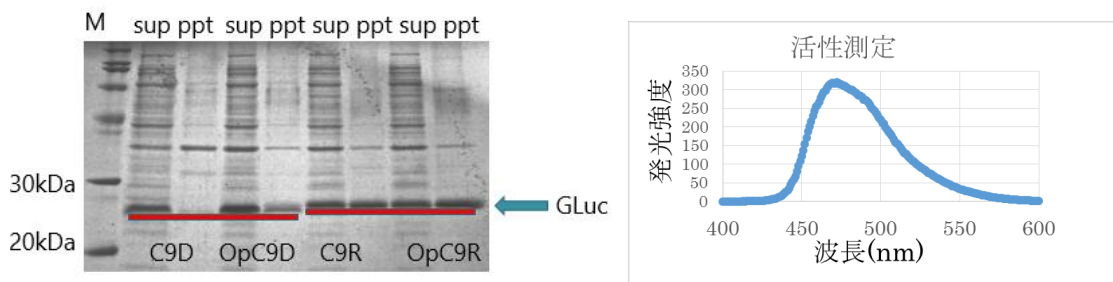


Fig. 2(左) 発現量の増大を確認した SDS-PAGE。

M はマーカー、sup は上清画分、ppt は沈殿画分を示している。

Fig.3(右) セレンテラジンをを用いた発光活性測定