

N 末端 C 末端の類似性を利用した新規蛍光タンパク質のスクリーニング

Screening of Fluorescent Protein using Similarity of N-terminus and C-terminus of CDS

山形大院理工¹ ○^(M1)野中 歩夏¹, 堀内 友貴¹, 羽鳥 晋由¹, 真壁 幸樹¹,
堀田 純一¹

Yamagata Univ.¹, ○^(M1)Ayuka Nonaka¹, Yuki Horiuchi¹, Kuniyuki Hatori¹, Koki Makabe¹,
Jun-ichi Hotta¹

E-mail: E-mail: n.ayuka0805@gmail.com

蛍光タンパク質は、生物学、医学、化学など様々な分野で細胞をイメージングするために広く使用されている。これまでに GFP 等の既存の蛍光タンパク質に変異を導入し、光による退色や発色団の形成効率等の改善に関する研究が数多くなされてきたが、近年実用化された超解像蛍光顕微鏡においては、従来の蛍光タンパク質とは異なる光化学特性が求められている。我々は、これまでに新規蛍光タンパク質のスクリーニングを目指して、発現クローニングによりコモチカギノテクラゲの蛍光タンパク質 ScSuFP をスクリーニングすることに成功した[1]。今回、PCR 法を利用した新規蛍光タンパク質のスクリーニングに成功したので報告する。

日本近海産イソギンチャクから抽出した Total RNA から、Oligo dT Primer を用いた逆転写により cDNA を合成した。既存の蛍光タンパク質遺伝子の CDS の N 末端と C 末端からプライマーを設計し、日本近海産イソギンチャクの cDNA をテンプレートとして PCR 反応を行った。PCR 産物をゲル電気泳動により解析し、蛍光タンパク質遺伝子と同様のサイズである 700 bp 付近のバンドから DNA を抽出した。抽出した DNA をプライマー設計時に導入した制限酵素サイトを用いて発現ベクター pRSET B にクローニングし、大腸菌 (JM109(DE3)株) の形質転換を行った。その結果、弱く蛍光を発するコロニーが出現したので、ミニプレップによりプラスミド精製を行いシーケンシングにより蛍光タンパク質の DNA 配列を決定した。スクリーニングした蛍光タンパク質を精製し、吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定したところ、発色団の吸収極大は 487 nm、蛍光極大は 503 nm であることがわかった (Fig. 1)。

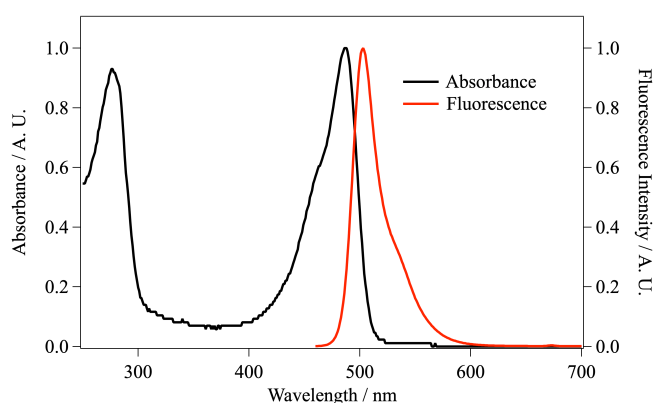


Fig. 1 Absorption and fluorescence spectra of the screened fluorescent protein.

[1] Y. Horiuchi, D. Laskaratou, M. Sliwa, C. Ruckebusch, K. Hatori, H. Mizuno, J. Hotta, *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 371 (2018).