

学位（博士）論文の和文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程 平成 25 年度入学 学籍番号 13831108	生命工学専攻	氏名 吳 楠	印
主指導教員氏名	黒田 裕			
論文題目	大腸菌の自己溶菌を用いた <i>Gaussia luciferase</i> のスクリーニング法の開発及びその発光特徴の改変			
論文要旨（2000 字程度）				
<p>ルシフェラーゼは、バイオイメージングのマーカースとして汎用されている発光酵素である。本博士論文では、近年注目されている海洋生物ガウシア由来の <i>Gaussia Luciferase</i> (GLuc) を改変するための新規探索法を開発し、赤色偏移の GLuc 変異体を複数同定した研究を報告した。</p> <p>第一章では、本研究の概略について述べ、研究の意義を示した。GLuc は coelenterazine luciferase の一種で、現在同定されているルシフェラーゼの中で分子量が最も小さいが、発光強度は最も強いため、レポーター蛋白質としてその実用性が近年注目されている。しかし、GLuc の発光の最大波長は 480nm であるため、生体内バイオイメージングに応用した場合、その発光波長は生体組織に吸収されやすい。そのため、生体組織に発光波長が吸収され難い赤色発光変異体の開発が重要だと考えられている。しかし、GLuc の構造はまだ未解明であるため、その変異体開発に関する研究は十分に行われていない。そのため、本研究では、大腸菌における GLuc の変異体の探索（スクリーニング）を行った。また、探索の効率を向上させるため、大腸菌溶菌蛋白質 VanX を利用し、GLuc に適用する簡便な探索法の開発も本研究の目的の一つである。</p> <p>第二章では、GLuc の変異体探索について必要な先行研究を纏めた、GLuc の活性部位を予測した。まず GLuc に関する大腸菌発現系の構築及び天然状態の折り畳みに関する研究について論じた。その後、先行研究で解明された GLuc 分子に関する情報：GLuc 分子は発光活性を持つ 2 つの相同的なドメイン(27-97, 98-168)から成ること、及び発光に関係する部位であろうアミノ酸が改変された 4 種類の GLuc 変異体の研究を纏め、先行研究の変異部位はほぼドメイン 1 であることが分かった。そこで新たにドメイン 2 の相同な部位に同様の変異を導入することで更なる赤色発光変異体が創出できないかと考えた。その後、配列の相同性検索を用い、GLuc の活性部位を予測した。まず BLAST を用いて GLuc と高い配列類似性を持つ 12 個のルシフェラーゼを選出した。その後、CLUSTAL W を用いてそれら 12 種類ルシフェラーゼと GLuc 間で保存度が高い領域を探した。その結果、ドメイン 1 の 52-77 配列とドメイン 2 の 123-148 配列の 2 つの保存度が高い領域が認識され、各ドメインの活性領域と考えた。また、その両領域間で高い配列類似性が示され、各領域内にある 4 つのシステインの配置も類似性が見られた。そのため、両活性ドメイン</p>				

内の活性部位の配列も類似していると推測された。また、2011年キム博士らにより開発された赤色発光変異体 MONSTA の4ヶ所の変異部位中の F72 と I73(ドメイン1)に対応しているドメイン2の部位として W143 と L144 が保存領域 123-148 配列内に存在し、これがドメイン2の活性部位と予測し、次章の探索法の標的部位とした。

また、本章では赤色発光変異体 MONSTA の4ヶ所の変異 F72W, I73L, H78E, Y80W を本研究室により構築した野生発光特性を持つ変異体 GLuc-TG に導入し、GLuc-MONSTA を構築した。発現精製後の GLuc-MONSTA は 8nm 赤色偏移した波長を示した。GLuc-MONSTA を GLuc の探索の鋳型とした。

第三章では、先行研究によって開発された VanX の共発現溶菌系を最適化し、GLuc のように外部からの基質を必要とする酵素の探索に適した溶菌探索法を開発した。その探索法は VanX と GLuc を共発現させ、VanX による溶菌作用で培地に漏出した GLuc の発光活性を培地中で測定する方法である。共発現溶菌法で測定した GLuc (GLuc-TG 及び GLuc-MONSTA) のスペクトルと通常が発現・精製後に測定したものが重なることが確認され、溶菌後に培地中で測定した結果の精度を証明した。また、19個の個々のコロニーを種として共発現させた培地から回収した GLuc の発光波長が最大 1.5nm の差があったため、これをこの系の測定精度と考え、今後の探索で得られた変異体の測定対象は発光波長が 1.5nm 以上偏移した変異体とすることとした。

その後、最適化した共発現溶菌法を利用し、第二章で予測したドメイン2にある活性サイト W143 と L144、及び他のドメイン1内の活性部位と配列類似性があるドメイン2のサイト F113、I114、A149、F151、全6か所のランダムスクリーニングを行った。結果、3nm 赤色偏移した変異体 W143V と L144A が同定された。両変異体を精製し発光波長を測定した後も同様の偏移を示した。また、変異体 L144A は GLuc-MONSTA より高い熱安定性を示した。

第四章「結論」では、得られた成果を要約し、本研究の総括を行った。

TITLE	Re-design <i>Gaussia</i> luciferase using a novel Screening Protocol based VanX mediated Autoysis
NAME	Nan WU
<p style="text-align: center;">ABSTRACT</p> <p>This thesis is composed of four chapters. Chapter 1 is a summary of current research on <i>Gaussia</i> luciferase (GLuc) and bacterial lysis. It ends by giving the aim and significance of this research: Establish a convenient protein screening protocol using VanX mediated mild bacterial lysis, and apply this protocol to improve GLuc's bioluminescence characteristics.</p> <p>In chapter 2, I review all literature focusing on GLuc domain analysis and mutagenesis redesign. I also review the bacterial production of natively folded GLuc with special emphasis on its disulfide bond formation. After that, I discuss and predict the domain structure and location of the catalytic region based on literature and on bioinformatics analysis. The mutation sites of W143 and L144 were selected out of potential active sites in the second catalytic domain. In this same chapter, I bacterially expressed and characterized the bioluminescence activity of reported GLuc variants GLuc-MONSTA and demonstrated GLuc-MONSTA exhibits an 8nm red-shift luminescence spectrum compared with that of GLuc-TG (wild type wavelength) under strictly controlled <i>in vitro</i> conditions.</p> <p>In chapter 3, I report a novel bacterial screening protocol based on a prior study which established a co-expression autolysis system. In this protocol, the target protein GLuc was co-expressed with VanX, an enzyme which mediates <i>Escherichia coil</i> (<i>E.coli</i>)'s autolysis, resulting in GLuc being released into the</p>	

culture medium. The luminescence of GLuc was conveniently measured from crude medium without any cell breakage. I proved this protocol was able to detect luminescence wavelength shifts as small as 1.5nm. The performance and versatility of this protocol was demonstrated by applying it to a semi-rational search for GLuc variants with red-shifted bioluminescence. Six GLuc's sites, F113, I114, W143, L144, A149 and F151, were randomly mutated, and for each site, 50 colonies were cultivated in 3mL samples, from which bioluminescence was measured without purification. I identified a GLuc single mutation variant L144A that further red-shifted than the GLuc-MONSTA variant. Furthermore, the bioluminescence and biophysical characterizations of HPLC purified variants indicated that L144A's thermal stability was higher than that of any of the other GLuc variants, making it suitable for high temperature bio-imaging applications.

In chapter 4, all results are briefly summarized.