

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560432

研究課題名(和文)天然型SS結合を有する分子量1万の最小レポータ蛋白質の大腸菌を用いた改変

研究課題名(英文) Screening of a minimal reporter protein with correct SS-bonds using a novel VanX mediated E-coli autolysis protocol

研究代表者

黒田 裕 (Kuroda, Yutaka)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10312240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ガウシア・ルシフェラーゼ(GLuc; 168残基)は、優れた最小のレポータ蛋白質となる可能性を秘めているが、その構造は未知であり応用が遅れている。本計画において2つの成果を得た。まず、GLuc配列中にランダム変異を導入し、発光波長が野生型と異なる変異体の探索(スクリーニング)を行った。探索には、VanX酵素による大腸菌の自己溶菌効果を用いることでGLucを菌体内から溶出させた。その結果、未精製GLucのスクリーニングが可能になり、最大発光波長が5nmレッドシフトした変異体を同定した。さらに、核磁気共鳴法(NMR)を用いたGLucの構造解析から、主鎖原子の7割の帰属と二次構造を同定した。

研究成果の概要(英文)：Gaussia Luciferase (GLuc; 168 aa) is among the smallest luciferase and could serve as a reported protein in biochemical research. Its identification is relatively recent, and its structure and biophysical properties remain to be fully characterized. Here, we developed a novel method for screening GLuc, where VanX is coexpressed with Gluc in order to autolyse E-coli and release GLuc into the culture media. This, in turn, enables GLuc's bioluminescence measurement directly in the crude media without purification greatly increasing the screening efficiency. Using this protocol we identified several single mutation GLuc variants with light emission red shift by up to 5 nm, and a double mutation variant with red shift of 15 nm (but with weaker light emission intensity). In addition to this, we started a heteronuclear NMR analysis of recombinant GLuc, and we assigned about 70% of its main chain peak and their secondary structures.

研究分野：生物物理・蛋白質の物理化学

キーワード：蛋白質工学 生物活性物質の探索 SS結合 探索法 ランダム変異

### 1. 研究開始当初の背景

ルシフェラーゼは、バイオイメージングに必要なレポータ蛋白質として、バイオ研究において利用価値の高い酵素である(Shimomura O. *Nobel Lect*, 2008)。現在、蛍(550 残基)やレニラ(308 残基)ルシフェラーゼが主に使用されるなか、我々は、最小のレポータ蛋白質として期待されるガウシア・ルシフェラーゼ(168 残基; 以下、GLuc)に注目した(Remy I et al. *Nat Methods*, 2006)。しかし、大腸菌を宿主として GLuc を発現させた場合、10 個のシステイン残基が非天然型 SS 結合を形成してしまうため、組換え GLuc の大量生成は困難であり、その解析及び応用が他のルシフェラーゼに比べて遅れている(図1)。

とりわけ、GLuc の発光最大波長は 480nm であり、生体組織に吸収されやすい発光波長であるため、吸収が少ない赤色発光変異体の開発は重要だと考えられている。また、GLuc の物性及び構造解析があまり進められていないことも、GLuc の機能改良が遅れている原因の一つと考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では、発光波長が野生型と異なる GLuc 変異体の探索を目指した。そのため、迅速な探索を容易にする大腸菌の自己溶菌に基づく新規スクリーニングプロトコルの開発を行った。さらに、核磁気共鳴法(NMR)による GLuc 解析を進め、高分解能な構造情報を初めて得ることを目的とした。本研究の特徴は、研究代表者が解明した VanX 酵素による大腸菌の自己溶菌機構を用いることで、GLuc を精製せずに培地中で探索可能となるスクリーニングプロトコルを実現することと、さらに、GLuc に関する構造情報が全くない現在、NMR から得られる情報は、変異体設計において貴重であることである。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず、GLuc 発現量を向上させた発現系を構築し、正しい SS 結合を形成する GLuc が培地中に十分量(1mg/L 以上)放出される条件を求める。次に、PCR によるランダム変異を GLuc に導入し、発光波長に変化が見ら

れた、又は発光強度が増加したクローンをスクリーニングする。スクリーニングでは、培地中に放出された未精製の GLuc をマイクロプレートに移し、そこに基質のセレンテラジンを添加、発光活性を測定する。上記工程を 2~3 回繰り返す、発光色制御に最適な配列を導き出す。以上の実験を通じて、優れた最小のレポータ蛋白質が開発されると同時に、大腸菌では扱い難い複数の SS 結合を有する蛋白質の改変を可能にする汎用的なスクリーニング法を開発する。

### 4. 研究成果

当初本研究に用いることを予定していた GLuc の N 末端ドメイン(GLuc の 1-97 残基; 以下、GLucN)が発光活性を有することを 26 年度に確認していた。しかし、様々な試行錯誤実施したにも関わらず、GLucN の発光強度は弱く、さらに、大腸菌を宿主として発現した GLucN の収率は悪かった。そのため、本計画では、GLucN の代わりに全長 GLuc を対象として実施することを決定した。

本研究では、VanX の大腸菌溶菌効果を利用した新しい探索(スクリーニング)プロトコルを開発し、GLuc の変異体の探索に応用した。さらに、NMR による構造解析を試みた。研究成果の詳細は以下の通りである。

(1) 本計画ではまず、発現量を低下させるレアコドン(rare codon)を除いた GLuc の遺伝子配列から成る GLuc の発現系を作製した。発現系は pET15 (Novagen 社)を基にしており、その収量は従来の発現系を用いた時の約 1.5~2 倍に向上した(~2mg/L)。

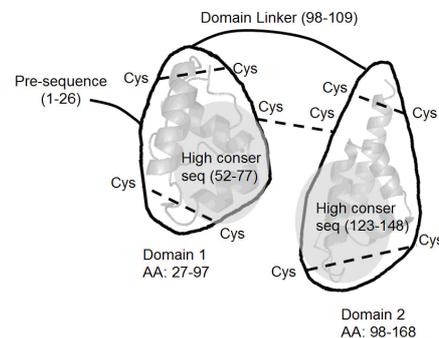


図 1: バイオインフォマテイクス解析から推定した GLuc のモデル構造。ドメインが 2 つあることと、ヘリックスが多い蛋白質であることが示唆された(研究業績 4 より転記)。

(2) 次に、ランダム・プライマーを用いて GLuc 配列中に変異を導入し、発光波長が野生型と異なる変異体をスクリーニングした。スクリーニングには、研究代表者が先行研究で解明した VanX 酵素による大腸菌の自己溶菌効果を応用した(研究業績 7)。VanX の溶菌効果を用いることで、GLuc を菌体内からマイルドに抽出し、未精製状態で、培地中で探索することを可能にした。

さらに、ランダム変異の導入箇所を決めるために GLuc に関する先行研究を精査した(研究業績 1)。その結果、GLuc 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、GLuc がヘリックス蛋白質であることが、配列解析から予測された。とりわけ、ドメイン1の52-77配列とドメイン2の123-148配列の2つに保存度が高い領域が認識された。また、その両領域に含まれるそれぞれ4つのシステイン残基の配置も類似性が見られた。以上の解析より、先行研究での変異部位が殆どドメイン1にあることが明らかとなった。本研究から、ドメイン1で発光機能が改良された残基の相同な部位にあるドメイン2の残基にランダム変異を導入することで更なる赤色発光変異体が期待された。具体的なランダム変異導入位置としては、2011年キム博士らにより開発された赤色発光変異体 MONSTA (Kim SB, *Anal Chem*, 2011) 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の残基として W143 と L144 が保存領域 123-148 配列内に存在し、これを探索の標的部位とした。その結果、最大発光ピークの波長が5nm レッドシフトした変異体を複数同定することに成功した(図2)。

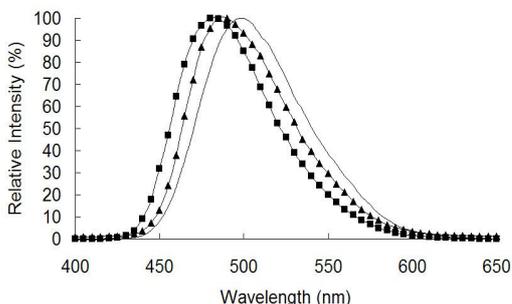


図 2 : GLuc 変異体の発光スペクトル。本計画で同定した VA 変異体を実線、GLuc-MONSTA を、野生型 GLuc-TG を ( ) で示す(研究業績 1 より転記)。

(3) 最後に、上記(1)において GLuc の発現量を向上できたため、NMR を用いた構造解析を開始した(図 3)。現在までに、15N・13C 標識した GLuc を 0.5mg 精製し、NMR を測定、主鎖原子の7割の帰属と二次構造の同定に成功している(図 4)。測定には、理化学研究所横浜キャンパスの Bruker800 および 900 装置を用いた。近い将来、GLuc の構造を初めて明らかにできると考えている。

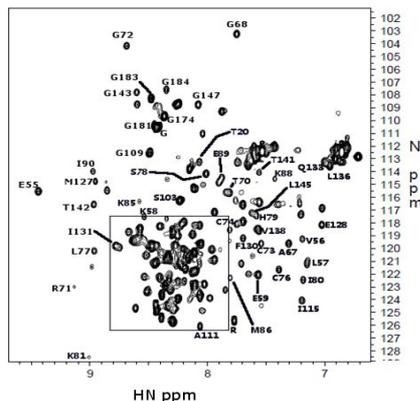


図 3: GLuc の HSQC スペクトル。GLuc 濃度は約 200uM, pH7.0, 20mM NaPi (pH7.0)+2mM NaN3。

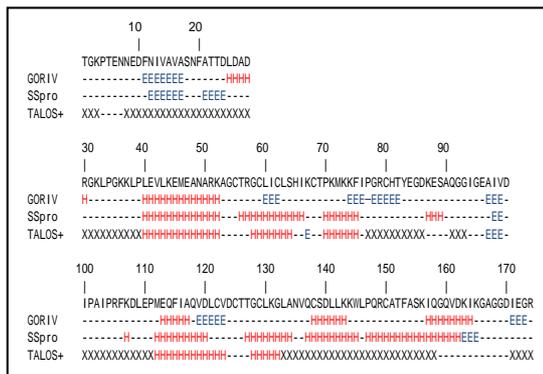


図 4 : GLuc の配列と 2 次構造。H がヘリックス、E がストランド、- がコイル、X が未帰属なため TALOS による二次構造が予測不可能な残基を示す。推定ドメイン 1 及び 2 をそれぞれ中段と下段に示す。TALOS は、NMR 化学シフトによる二次構造予測を示す。GORIV と SSpro はアミノ酸配列情報から予測した二次構造を示す。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Wu Nan, Tetsuya Kamioka, Yutaka Kuroda, A novel screening system based on VanX mediated autolysis - application to *Gaussia luciferase*, *Biotechnol Bioeng*, 査読有, 113(7), 2016, 1413-1420  
DOI:10.1002/bit.25910

Manjiri R Kulkarni, Mohammad M Islam, Nobutaka Numoto, Montasir Elahi, Mamunur R Mahib, Nobutoshi Ito, Yutaka Kuroda, Structural and biophysical analysis of sero-specific immune responses using epitope grafted Dengue ED3 mutants, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1854, 2015, pp1438-1443  
DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.07.004

Mohammad M Islam, Shigeyoshi Nakamura, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Shun-ichi Kidokoro, Yutaka Kuroda, Analysis and Control of Protein Crystallization Using Short Peptide Tags That Change Solubility without Affecting Structure, Thermal Stability, and Function, *Crystal Growth & Design*, 査読有, 15(6), 2015, pp 2703-2711  
DOI: 10.1021/acs.cgd.5b00010

Wu Nan, Rathnayaka Tharangani, Yutaka Kuroda, Bacterial expression and re-engineering of *Gaussia princeps luciferase* and its use as a reporter protein, *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 1854, 2015, pp1392-1399  
DOI:10.1016/j.bbapap.2015.05.008

如澤浩樹, 座古保, 前田瑞夫, 千葉一裕, 黒田裕, 蛍光セルフクエンチを用いたアモルファス凝集形成機構の解析, 月刊「バイオインダストリー」シーエムシー出版, 査読無, 32, 2015年9月号, 36-41

Atsushi Kurotani, Yutaka Yamada, Kazuo Shinozaki, Yutaka Kuroda, Tetsuya Sakurai, Plant-PrAS: A database of physicochemical and structural properties, and novel functional regions in plant proteomes, *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 56(1), 2015, e11  
DOI: 10.1093/pcp/pcu176

Shihori Sohya, Tetsuya Kamioka, Chisako Fujita, Tei Maki, Yoshihiro Ohta, Yutaka Kuroda, Biochemical and biophysical characterization of an unexpected bacteriolysis activity of

VanX- a member of the vancomycin -resistance vanA gene cluster-, *J Biol Chem*, 査読有, 289(52), 2014, 35686-35694  
DOI: 10.1074/jbc.M114. 590265

Tepei Ebina, Suzuki Ryouhei, Ryotaro Tsuji, Yutaka Kuroda, H-DROP: an SVM based helical domain linker predictor trained with features optimized by combining random forest and stepwise selection, *J Comput Aided Mol Des*, 査読有, 28(8), 2014, 831-839  
DOI: 10.1007/s10822-014-9763-x

Atsushi Kurotani, Alexander A Tokmakov, Yutaka Kuroda, Yasuo Fukami, Kazuo Shinozaki, Tetsuya Sakurai, Correlations between protein disorder and post-translational modifications in plants, *Bioinformatics*, 査読有, 30(8), 2014, 1095-1103  
DOI: 10.1093/bioinformatics/btt762

[学会発表](計22件)

Atsushi Kurotani, Alexander Tokmakov, Yutaka Kuroda, Kazuo Shinozaki, Tetsuya Sakurai, Plant-PrAS: a database of physicochemical and structural properties and the comparative analysis in plant proteomes, 第57回植物生理学会年会, 2016年3月18日, 岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)

黒田裕, ペプチド溶解性の分子動力学シミュレーション, 第5回日本生物物理学会関東支部会(招待講演), 2016年3月10日~11日, (財)桐生地域地場産業振興センター(群馬県桐生市)

黒田裕, 分子動力学シミュレーションを用いたタンパク質・ペプチドの溶解性解析, 大阪大学蛋白質研究所セミナー:構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 2016年3月1日~2日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区)

Kulkarni Manjiri, Nobutaka Numoto, Nobutoshi Ito, Yutaka Kuroda, Modeling and experimental assessment of buried Leu-Ile mutation in DEN4 ED3, 大阪大学蛋白質研究所セミナー:構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 2016年3月1日~2日, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区)  
河村直樹, 鈴木涼祐, 黒田裕, 格

子モデルを用いたタンパク質凝集のシミュレーション, 大阪大学蛋白質研究所セミナー:構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 2016年3月1日~2日, 東京大学 先端科学技術研究センター(東京都目黒区)

井出宗一郎, Tambi Richa, 鈴木涼祐, 蝦名鉄平, 黒田裕, 機械学習法 SVM を用いたヘリカルリンカー予測機 H-DRIP, 大阪大学 蛋白質研究所セミナー:構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 2016年3月1日~2日, 東京大学 先端科学技術研究センター(東京都目黒区)

小須田慧司, 末永敦, 森本元太郎, 泰地真弘人, 黒田裕, 全原子 MD シミュレーションによるアラニンスキャニング変異を導入したアミロイド形成ペプチドの凝集解析, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日~15日, 金沢大学 角間キャンパス(石川県金沢市)

黒田裕, 佐藤雄士, 末永敦, 泰地真弘人, 多数ペプチドから成る系の全原子分子動力学シミュレーションによるペプチド溶解性, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日~15日, 金沢大学 角間キャンパス(石川県金沢市)

Md. Golam Kabir, Mohammad Monirul Islam, Yutaka Kuroda, Control of protein aggregation and oligomerization using short SEP (Solubility Enhancing Peptide) tags, 第53回日本生物物理学会年会, 2015年9月13日~15日, 金沢大学 角間キャンパス(石川県金沢市)

Tambi Richa, Ide Soichiro, Suzuki Ryosuke, Ebina Teppei, Yutaka Kuroda, Accelerated H-DRIP: An SVM based Helical Domain linker pRedictor trained with OPTimized features, 第53回日本生物物理学会年会(招待講演), 2015年9月13日~15日, 金沢大学 角間キャンパス(石川県金沢市)

Yutaka Kuroda, Peptides solubility estimated by all-atom molecular dynamics simulation of multi-peptide systems concur with experimental values, IUPAC 45<sup>th</sup> World Chemistry Congress (招待講演), 2015年8月7日~14日, 釜山(韓国)

小須田慧司, 末永敦, 泰地真弘人, 黒田裕, 複数ペプチドの全原子分子動力学シミュレーションを用いたアミロイド形成機構の解析, 第4回日本生物物理

学会関東支部会, 2015年3月9、10日, 日本大学文理学部(東京都世田谷区)

Mohammad Monirul Islam, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Shun-ichi Kidokoro, Yutaka Kuroda, Structural and thermodynamic study of extensively simplified BPTIs reveals a novel enthalpy stabilization mechanism through multiple alanine substitution, 第37回日本分子生物学会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Manjiri Ravindra Kulkarni, Monirul M. Islam, Montasir Elahi, Nobutaka Numoto, Nobutoshi Ito, Yutaka Kuroda, X-ray crystallography and ELISA interaction studies reveal the sero-specificity in dengue virus, 第37回日本分子生物学会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

15. 小須田慧司, 末永敦, 佐藤雄士, 泰地真弘人, 黒田裕, 全原子 MD シミュレーションによるアラニンスキャニング変異を導入したアミロイド形成ペプチドの凝集解析, 第37回日本分子生物学会, 2014年11月25日~27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Yutaka Kuroda, Analysis and control of amorphous protein aggregation using short peptide tags, JSPS Japan Hungary Joint Seminar, 2014年11月18日~20日, 大阪大学蛋白質研究所(招待講演)(大阪吹田市)

黒田裕, Mohammad M Islam, Analysis of protein crystallization using short Solubility Controlling Peptide, 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25日~27日, 北海道札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Manjiri Kulkarni, Montasir Elahi, Monirul Islam, Yutaka Kuroda, Epitope grafted mutants provide molecular insights into sero-specific interactions of Dengue's ED3 with its monoclonal antibody, 2nd UTISA Symposium-2014 :主催-University of Tokyo Indian Students' Association (UTISA), 2014年6月27日, 在日本インド大使館(ベストポスター賞)(東京都千代田区)

黒田裕, 疎水性・親水性モデルを用いないタンパク質溶解性の解析, 第14回日本蛋白質科学学会年会, 2014年6月25日~27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県横浜市)

呉楠, 上岡哲矢, 黒田裕, VanX の溶菌活性を用いた新規スクリーニング法の開発, 第14回日本蛋白質科学学会年会,

2014年6月25日～27日，ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県横浜市)

- ⑳ Md. Golam Kabir, Tamotsu Zako, Mizuo Maeda, Yutaka Kuroda, Analysis of Protein Aggregation by using Dynamic Light Scattering and Static Light Scattering Techniques, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25日～27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県横浜市)
- ㉑ Mohammad M Islam, Alam M Khan, Yutaka Kuroda, Biophysical analysis of protein aggregation kinetics using Solubility Controlling Peptide (SCP) tags, 第14回日本蛋白質科学会年会, 2014年6月25日～27日, ワークピア横浜/横浜産貿ホール マリネリア(神奈川県横浜市)

6 .

研究組織

(1)研究代表者

黒田 裕 (KURODA, Yutaka)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：10312240

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし