

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23651213
 研究課題名（和文）タグ技術を用いた多数SS結合蛋白質の新規改変法及び優れた最小ルシフェラーゼの開発
 研究課題名（英文）Novel screening protocol for multi-SS bond proteins using SEP tags and its application to the development of a minimal Luciferase
 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

研究成果の概要（和文）：発光活性を有する標識蛋白質（レポーター蛋白質；GFP など）を用いたバイオイメーキングは、分子生物学の必須なツールとなっている。なかでも、生物発光を触媒する最小酵素であるガウシア由来のルシフェラーゼ（以下、GLuc）への期待は大きい。しかし、システインを多数有する GLuc は、非天然型 SS 結合を形成して凝集しやすいため、その生成は困難である。そのため、GLuc の機能解析及び改変がほとんど進められておらず、バイオイメーキングへの応用はまだ限られている。本研究では、独自に開発した SEP タグ技術（溶解性向上タグ）を用いることで、天然型 SS 結合を形成する GLuc の汎用的な発現精製系を構築し、その機能と物性を解析、発光極大波長をレッドシフトした GLuc 変異体をランダムスクリーニングによって構築した。

研究成果の概要（英文）：Bioluminescent proteins are indispensable tools for bio-imaging, and controlling and manipulating their molecular properties has become an important issue in protein engineering. Here we developed a novel screening method for improving the bioluminescent properties of *Gaussia luciferase* (GLuc). GLuc possesses 10 cysteines forming 5 SS-bonds, which make GLuc manipulation especially difficult, because the cysteines become entangled into non-native SS-bonds when GLuc is expressed in *E-coli* with traditional protocols. In the present study we used SEP tags to solubilize the protein and favor the formation of native SS-bonds in *E-coli*, which is a handy and inexpensive expression host. Using this new technique we isolated novel GLuc variants with red-shifted luminescence. The application range of this method can be extended to other SS-bond containing proteins, and the improved GLuc will contribute to complement the register of reporter proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物物理・蛋白質科学・構造バイオインフォマティクス

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：SS 結合ミスマッチ、折り畳み、溶解度向上タグ、可溶化タグ、逆相 HPLC、天然状態、生物発光、SEP タグ

1. 研究開始当初の背景

近年、ガウシア（海洋カイアシ類 *Gaussia princeps*；海洋性プランクトンの一種）由来

のルシフェラーゼ（以下、GLuc；169 残基）は最も小さなレポーター蛋白質として注目を集めている。GLuc は、蛍ルシフェラーゼ（550

残基)より安定性・活性・汎用性の面で優れたレポーター蛋白質となる可能性を秘めている。しかし、10個のシステインを有する組換え GLuc を従来の方法を用いて大腸菌で発現すると非天然型 SS 結合を形成するため凝集してしまう。そのため、GLuc の機能解析、及び機能改良の研究は進まず、GLuc の応用範囲も未だ限られている。本研究では、大腸菌を宿主とした組換え GLuc の効率的発現・精製法を開発し、初めての物理化学的な手法による機能解析、及び発光活性を改変した GLuc 変異体の構築を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、天然型 SS 結合を有する GLuc の発現量を大きく向上させ、物理化学的な計測法を用いた機能解析を可能にすることである。さらに、GLuc の発光極大波長(色)及び発光強度を独自に開発する手法で改変し、優れたレポーター蛋白質の開発を試みる。本研究の一番のチャレンジは、タグ技術を用いることで、SS 結合を多数有する蛋白質を、安価かつ扱いが容易な大腸菌を用いた汎用的な系で生成可能にすることである。本系は、GLuc 以外の SS 結合を多数有する蛋白質へも応用できると期待される。

3. 研究の方法

SEP タグを GLuc の C 末端に付加することで、正しい天然型の SS 結合を形成する GLuc 変異体を作製した。SEP タグは、研究代表者が先行研究で開発した目的蛋白質の末端に付加することで蛋白質の溶解性を 10 倍近く向上することができるペプチド配列である (Solubility Enhancing Peptide Tag ; 3~12 残基から成る溶解性向上タグ ; Kato A, et al. *Biopolymers*, 2007、発表論文⑤)。SEP タグを用いることで変性状態でも GLuc の溶解性が向上し、凝集せずに天然型 SS 結合が形成されるため、天然型 SS 結合を有する GLuc の収量が向上する。この手法で生成した組換え GLuc の活性を測定し、その構造及び安定性を NMR (核磁気共鳴法)、CD (円偏光二色性分光法) などの分光法を用いて測定する。

次に、PCR によるランダム変異挿入法を用い、GLuc のランダム変異体を作製し、発光極大波

長が変化及び発光強度が増加したクローンを選択 (スクリーニング) する。スクリーニングは、ランダム変異を導入した GLuc を発現させ、独自開発した VanX 酵素による大腸菌の自己溶菌効果を応用した手法 (発表論文②) を用いて、未精製状態で GLuc の発光活性を測定する。上記工程を 2、3 回繰り返して、発光極大波長及び強度の制御に最適な配列を導き出す。以上の実験を通じて、大腸菌では扱いが困難な多数 SS 結合蛋白質を改変するための迅速なスクリーニング法を開発し、GLuc の発光活性を制御する。

4. 研究成果

大腸菌を宿主として発現した組換え GLuc を逆相 HPLC 精製した結果、培養液 1L 当たり 2mg の天然型 SS 結合を形成する組換え GLuc を得ることに成功し、その分子量を MALDI-ToF Mass で確認した。GLuc に 5 つの SS 結合があることを考慮すると、2mg/L は比較的高い収量であると考えられる。高純度の組換え GLuc を用いることで下記のような機能と物性の詳細な物理化学的な解析を可能にした。

GLuc の発光活性は今まで考えられていたよりはるかに強く、蛍ルシフェラーゼの 10 倍 (同酵素濃度比較) 以上であることを解明した。また、円偏光二色性分光法から測定した GLuc の変性温度が 60°C であり、GLuc が広い温度範囲で利用可能であることを示した。さらに、NMR 測定によって、組換え GLuc が単量体で天然状態にフォールドしていることが強く示唆された (図 1、発表論文⑥)。

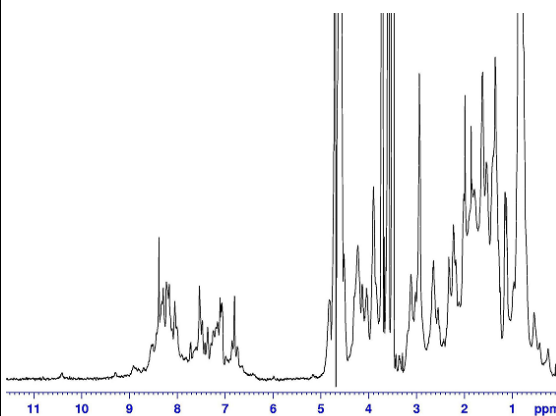


図 1 : 大腸菌を宿主として発現した組換え GLuc の 1 次元 NMR スペクトル

GLuc の機能改変においては、親水性領域の 4 残基をランダム変異させ、独自に開発した VanX の大腸菌の自己溶菌効果を応用したスクリーニング法(発表論文②)を用いて、未精製状態で GLuc の発光活性を測定した。その結果、約 100 個のクローンから発光極大波長が 9nm シフトしている変異体を同定した(図 2)。

現在、SS 結合を有する蛋白質のスクリーニングは、酵母や動物細胞を必要とする。これに対して本研究では、5 本の SS 結合を有する GLuc のスクリーニングを大腸菌で行うことが、大きな特色である。さらに、本研究の対象である GLuc は応用価値が高く、その機能改変によって蛍ルシフェラーゼに勝る優れたレポーター蛋白質として、バイオイメージング分野に大きな波及効果をもたらすと期待される。今後は、発光極大波長をさらにシフトさせ、GLuc の発光色を変えることを目指していきたい。

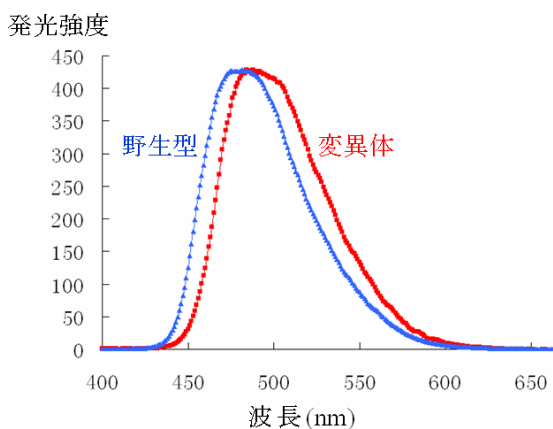


図 2 : 野生型 GLuc と今回同定した GLuc 変異体の発光スペクトル

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は下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Dellarole M, Kobayashi K, Rouget JB, Caro A, Roche J, Islam MM, Garcia-Moreno BE, Kuroda Y, Royer CA, Probing the physical determinants of thermal expansion of folded proteins, J Phys Chem B, 査読有, in press, 2013
2. Kamioka T, Sohya S, Wu N, Maki T, Matsuda T, Ikegami T, Nakamura H, Kuroda Y, Extraction of recombinant

protein from E. coli by using a novel cell autolysis activity of VanX, Analytical Biochemistry, 査読有, in press, 2013

doi:10.1016/j.ab.2013.04.007

3. Elahi M, Islam M M, Noguchi K, Yohda M, Kuroda Y, High resolution crystal structure of dengue-3 envelope protein domain III suggests possible molecular mechanisms for serospecific antibody recognition, Proteins, 査読有, 81(6), 2013, 1090-1095
DOI:10.1002/prot.24237
4. Akiyama S, Suenaga A, Kobayashi T, Kamioka T, Taiji M, Kuroda Y, Experimental identification and theoretical analysis of a thermally stabilized green fluorescent protein variant, Biochemistry, 査読有, 51(40), 2012, 7974-7982
doi:10.1021/bi300580j
5. Islam M M, Khan M M A, Kuroda Y, Analysis of amino acid contributions to protein solubility using short peptide tags fused to a simplified BPTI variant, BBA Proteins and Proteomics, 査読有, 1824(10), 2012, 1144-1150
DOI:10.1016/j.bbapap.2012.06.005
6. Rathnayaka T, Tawa M, Nakamura T, Sohya S, Kuwajima K, Yohda M, Kuroda Y, Solubilization and folding of a fully active recombinant Gaussia luciferase with native disulfide bonds by using a SEP-tag, BBA Proteins and Proteomics, 査読有, 1814(12), 2011, 1775-1778
DOI:10.1016/j.bbapap.2011.09.001
7. 黒田裕, 上岡哲矢, 惣谷志保里, VanX の溶菌活性の解明と菌体内生産物の精製工程の簡略化, 未来材料, 査読無, 11(7), 2011(8月号), 32-36

[学会発表] (計 26 件)

1. Wu Nan, 上岡哲矢, 黒田裕, ガウシアルシフェラーゼのスクリーニングによる改変, 生物物理関東地区研究会, 2013年3月4日, 東京農工大学工学部(東京都)
2. 佐藤雄士, 末永敦, 秋山沙織, 黒田裕, 多数ペプチド系の全原子分子動力学シミュレーションを用いた凝集の解析, 生物物理関東地区研究会, 2013年3月4日, 東京農工大学工学部(東京都)
3. 鈴木涼祐, 蝦名鉄平, 黒田裕, サポートベクターマシン(SVM)を用いたヘリカルリンカー領域の予測, 生物物理関東地区

- 研究会, 2013年3月4日, 東京農工大学工学部(東京都)
4. 鈴木郁也, 今井清博, 黒田裕, システインを含むタグ配列と溶解性向上タグ配列の挿入による GLuc リフォールディングへの影響, 生物物理関東地区研究会, 2013年3月4日, 東京農工大学工学部(東京都)
 5. Yutaka Kuroda, Alam M. Khan, Monirul M Islam, Biophysical Analysis of Protein Aggregation Kinetics Based on a Monomer-Oligomer Model, 新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第6回公開シンポジウム, 2012年12月5日, 京都テルサ(京都府)
 6. Wu Nan, Tetsuya Kamioka, Shihori Sohya, Tomoki Matsuda, Takahisa Ikegami, Haruki Nakamura, Yutaka Kuroda, VanX の溶菌活性を用いたルシフェラーゼのスクリーニングの簡略化, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22-24日, 名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)
 7. Yutaka Kuroda, Alam, M. Khan, Mohammad, M. Islam, 単純化 BPTI に融合したペプチド系タグ配列を用いたアミノ酸溶解性の測定, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22-24日, 名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)
 8. Yuki Umezawa, Teppei Ebina, Yutaka Kuroda, 独立してフォールドする構造ドメインデータベースの構築, 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22-24日, 名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)
 9. 黒田裕, カン・A・モンシュール, イスラム・M・モニール, 単純化 BPTI とペプチド系タグを用いたアミノ酸溶解性の時間的変化・揺らぎの解析, 新学術領域「揺らぎと生体機能」「水和とATP」合同公開シンポジウム(招待講演), 2012年9月14日, 大阪ガーデンパレス(大阪府)
 10. 黒田裕, カン M モハマド, イスラム M モハマド, 単純化 BPTI タンパク質に融合した短いペプチド系タグを用いたアミノ酸溶解性の解析, 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月22日, 名古屋国際会議場(愛知県)
 11. Montasir Elahi, M. Monirul Islam, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Yutaka Kuroda, Two serotypes of dengue viruses show specific local structural difference in their crystal structures of envelope protein domain III (ED3), 第12回日本蛋白質科学会年会, 2012年6月21日, 名古屋国際会議場(愛知県)
 12. Wu Nan, 上岡哲矢, 黒田裕, VanX の大腸菌溶菌活性を利用した新規スクリーニング技術の開発, 生物物理関東地区研究会, 2012年3月5日, 東京農工大学工学部(東京都)
 13. 梅澤祐貴, 蝦名鉄平, 黒田裕, 構造ドメインデータベースの作成およびその Web 提供, 生物物理関東地区研究会, 2012年3月5日, 東京農工大学工学部(東京都)
 14. Montasir Elahi, Mohammad M Islam, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Yutaka Kuroda, High resolution Crystal structure of Dengue 3 envelope protein domain III (ED3), 生物物理関東地区研究会, 2012年3月5日, 東京農工大学工学部(東京都)
 15. Mohammed M. A. Khan, Mohammad M. Islam, Yutaka Kuroda, Contribution of individual amino acids to protein solubility using amino acid tag, 生物物理関東地区研究会, 2012年3月5日, 東京農工大学工学部(東京都)
 16. Mohammad M Islam, Yutaka Kuroda, Effects of short solubility controlling peptide tags on protein's solubility, thermodynamics, structure and function, Conference of the Bangladesh Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2012年2月25-26日, University of Rajshahi (Rajshahi, Bangladesh)
 17. Mohammad M. Islam, Yutaka Kuroda, Host Guest Analysis of Amino Acids contribution to Protein Solubility Using Short SET-Tags Fused to a Simplified BPTI, 揺らぎが機能を決める生命分子の科学第5回公開シンポジウム(招待講演), 2012年1月7日, 東大寺文化センター(奈良県)
 18. Jean-Baptiste Rouget, Mariano Dellarole, Kei Kobayashi, Julien Roche, Yutaka Kuroda, Catherine A. Royer, Understanding protein native expansivity by mutants affecting cavities, surface and order, 6th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP2011), 2011年12月13日, 津市市民会館(滋賀県)
 19. Wu Nan, 上岡哲矢, 惣谷志保里, 黒田裕, VanX の大腸菌溶菌機構を利用した新規スクリーニング法の開発, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月14, 15日, パシフィコ横浜(神奈川県)
 20. Montasir Elahi, Mohammad Monirul Islam, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Yutaka Kuroda, Crystal structure of Dengue 3 envelope protein domain III, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12

- 月14日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
21. Mohammed Monsur Alam Khan, Mohammad Monirul Islam, Yutaka Kuroda, Contribution of individual amino acid to protein solubility using amino acid tag, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
 22. 小林慶, Mohammad Islam, 野口恵一, 養王田正文, 黒田裕, 難結晶化タンパク質変異体に対するヘテロシーディング法, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク (大阪府)
 23. 辻良太郎, 蝦名鉄平, 黒田裕, ヘリックスを含むドメイン境界配列の解析及びその予測, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク (大阪府)
 24. Yutaka Kuroda, Atsushi Kato, Mohammad Islam, Amino Acids Contribution to Polypeptides Solubility Analyzed Using Short Poly-Amino Acid Tags, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク (大阪府)
 25. Mohammad M Islam, Atsushi Kato, Shihori Sohya, Mohammed Khan, Keiichi Noguchi, Masafumi Yohda, Shun-ichi Kidokoro, Yutaka Kuroda, Effects of short solubility controlling peptide tags on protein solubility, thermodynamics, structure and function, 第11回日本蛋白質科学会年会, 2011年6月7日, 阪急エキスポパーク (大阪府)
 26. 黒田裕, 八木寿梓, 長谷川一浩, 青島真人, 佐崎元, 蛋白質異常凝集の原理と制御, 大阪大学蛋白質研究所セミナー(招待講演), 2011年4月27日, 阪大吹田キャンパス (大阪府)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~ykuroda>

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