

学位（博士）論文の和文要旨 後半に英文要旨

論文提出者	工学府博士後期課程生命工学専攻 平成20年度入学 学籍番号08831109 氏名 RATHNAYAKA THARANGANI (ラトナヤカ ランガニ) 印		
主指導教員 氏名	黒田 裕	副指導教員 氏名	朝倉 哲夫
論文題目	天然型 SS 結合と天然発光活性を有する組み換えガウシアルシフェラーゼの大腸菌を宿主にした発現系の開発及びその解析		
<p>論文要旨</p> <p>本論文は4章から構成されている。第1章「緒言」では、最近発見されたガウシア由来のルシフェラーゼに関する現在までの研究について総括した。ルシフェラーゼは、甲虫・甲殻類・バクテリアなど、多岐にわたる生物で観測される生物発光を触媒する酵素である（「ルシフェラーゼ」とはアミノ酸配列に相同性が無く系統的な起源が全く無関係な酵素も指す）。蛍由来のルシフェラーゼは、従来から多くの生化学実験でレポータータンパク質として用いられている産業価値の高い酵素である。我々は、高い輝度を有し、かつ分子量が小さいため新たなレポータータンパク質としての期待が高まっている海洋カイアシ類 <i>Gaussia princeps</i> 由来のルシフェラーゼ（ガウシアルシフェラーゼ；以下 GLuc）に注目した。GLuc はルシフェリンとしてセレンテラジンを用いて、470nm に最大発光波長を持つ発光反応を触媒する。既存ルシフェラーゼの中で分子量が最も小さい（169 残基、蛍由来は 550 残基）が、GLuc を対象とする研究はまだ極めて少ない。組換え GLuc の大量発現に関する報告は現在2件しか存在せず、特に <i>in vitro</i> でのレポータータンパク質の研究はまだ進められていない。その大きな原因は、菌体内で発現させた GLuc の 10 個のシステインが天然型 SS 結合を形成することが極めて難しい点にあると考えられる。特に、安価な大量発現が可能な大腸菌では、天然型 SS 結合を形成していないタンパク質は大量に発現されるが、すべて凝集するため、GLuc の大量生成は確立されていなかった。最後に、新しいレポータータンパク質の開発に向けて、組換え GLuc の大量発現系を開発し、その機能解析及び構造解析を進める重要性について述べて、本章をまとめた。</p> <p>第2章では、大腸菌を宿主とした組換え GLuc の発現・精製法を確立し、その活性や熱安定性を初めて生物物理学的な手法で測定した結果を述べた。まず、非天然型 SS 結合</p>			

の問題に対して、タカラバイオ社の pCold 発現系を用いて発現温度を 16°C に下げ、上清画分で発現された GLuc のみを回収する工夫を施すことで、培養液 1L 当たり 2mg の組換え GLuc を得ることが可能となった。この手法で得た組換え 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）以上であることを示した。さらに、円偏光二色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。

第 3 章では、GLuc が常温培養で可溶性画分に発現しない主な原因が、GLuc の溶解度が低いことにあると考え、本研究室で以前に開発されたペプチド系溶解度向上タグ配列 (Kato A. et al, *Biopolymers* 85:12-18, (2007)) を GLuc の C 末端に付加することで、可溶性画分での発現向上を試みた。タグを付加した GLuc を 25°C で発現したところ、8 割以上の GLuc が可溶性画分に発現していた。また、タグを付加した GLuc の逆相 HPLC の溶出パターンを解析した。タグを付加しない GLuc では、非天然 SS 結合を有する GLuc が混合しているため、多数のブロードなピークが HPLC で観測されたことに対して、Tag を付加した GLuc の溶出パターンは、1 本のシャープなピークを示した。このことから、GLuc の全分子で同じシステイン残基対で SS 結合を形成する事が示唆された。さらに、HPLC 精製した GLuc の発光活性が強いこと、その 1 次元 NMR（核磁気共鳴分光法）スペクトルが天然状態にあるタンパク質の典型的なものであったことから、常温で大腸菌から大量に組換え GLuc を生成する方法が確立したことが示された。

最後に、第 4 章「結論」では本研究で得られた成果を要約し、研究の意義を述べた。大腸菌を宿主とする天然型 SS 結合パターンを有する組換え GLuc の高純度の生成は、GLuc の構造解析及び機能制御を進める上での非常に重要なステップであり、新たなレポータータンパク質の創設への期待が膨らむ。さらに、本研究で開発された手法は、抗体試薬など複数の SS 結合を有するタンパク質の生成に応用することで創薬研究への寄与も期待される。

TITLE	Characterization and bacterial expression of recombinant <i>Gaussia</i> Luciferase with native-like disulfide bonds and bioluminescence activity
NAME	Tharangani Rathnayaka
<p style="text-align: center;">ABSTRACT</p> <p>This thesis is composed of 4 chapters. In chapter 1 we discussed the general aspect of widely used luciferases and <i>Gaussia</i> luciferase (GLuc) as a leading reporter protein. The recently isolated GLuc from the marine copepod <i>Gaussia princeps</i> is the smallest, strongly active and highly stable bioluminescence protein and consists of 185 amino acids with 19.9kDa molecular weight, making it very attractive as a reporter protein. It catalyzes the oxidative decarboxylation of coelenterazine, which produces the excited state of coelenteramide by emitting blue light with intensity maximum at 480 nm. GLuc contains ten cysteines that need to form native disulfide bonds, which represent a major hurdle toward the production of functionally active recombinant GLuc in bacterial, especially <i>Escherichia coli</i> (<i>E. Coli</i>), cells. The disulfide bonds of recombinant proteins expressed in <i>E. Coli</i> cells are normally reduced and are air-oxidized into non-native disulfide bonds upon cell breakage or during the purification process. Thus, both its biophysical characterization and reengineering limiting its use in bioluminescence imaging.</p> <p>In chapter 2, we combined various protein expression methods to produce GLuc that fold preferably into functional GLuc with native-like disulfide bonds.</p> <p>Expressed the protein at low temperature in an <i>E. coli</i> under cold induced expression system (pCold). As a result, a large fraction of the protein was expressed in the soluble fraction and yielded 2 milligrams of Soluble-GLuc from 1L culture, with a homogeneous disulfide bond pattern as assessed by reverse phase HPLC. This is the very first report of a large scale production of pure GLuc with strong bioluminescence activity in <i>E. Coli</i>. The high homogeneity of our sample, enabled to perform a biophysical and biochemical properties of recombinant GLuc using circular dichroism (CD) spectroscopy, reverse phase analytical HPLC and</p>	

bioluminescence measurements. Overall, our biophysical studies indicate that GLuc has a very high thermal stability ( $T_m$  of 56° C; and 65% bioluminescence activity after incubation at 95° C), and this robust thermostability may open the way to novel biotechnology applications, under harsh conditions, where traditional reporter proteins are of limited use.

In chapter 3, we increased the solubility of GLuc by fusing a SEP-Tag, which are 5- to 10-residue polypeptides that increase *in vitro* protein solubility [Kato A. et al, Biopolymers 85:12-18. (2007)]. Because of the poor solubility in its reduced form, aggregation seemed to compete unfavorably with the folding reaction. In this study, we fused nine aspartic acid SEP-Tag to GLuc C-terminus (GLuc-C9D). As a result, the SEP Tag significantly increased the amount of GLuc-C9D expressed in the soluble fraction even at 25°C with a much shorter expression time. GLuc-C9D was fully functional with native-like disulfide bonds and the final protein yield was five to six times higher than with our previous pCold expression system. Thus, SEP-Tags could provide a generic and efficient tool for producing large amounts of fully active multiple disulfide-bonded proteins in *E. Coli*.

In chapter 4 (conclusion), the result achieved in the present study was summarized, and the future aspects of the research was described. Our novel expression system is convenient for the production of fully active and stable GLuc in amounts appropriate for molecular engineering, crystallization and structural analysis by opening the way to novel applications, both in-vitro and in vivo, as a reporter protein. In addition, contribution to the research for the development of new drugs is expected in applying the technique developed in the present study to the generation of the protein that has two or more SS uniting such as the antibody reagent.