



Title	Structure-based analysis and evolution of a monomerized red-colored chromoprotein from the <i>Olindias formosa</i> jellyfish for bioimaging
Author(s)	翟, 乐
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/92129">https://doi.org/10.18910/92129</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name ( Z H A I L E )	
Title	Structure-based analysis and evolution of a monomerized red-colored chromoprotein from the <i>Olindias formosa</i> jellyfish for bioimaging (バイオイメージングのためのハナガサクラゲ由来单量体赤色色素タンパク質の立体構造解析と分子進化)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>GFP-like chromoproteins (CPs) with non-fluorescence ability have been used as bioimaging probes. Existing CPs have blanks in the optical absorbing window, which limiting their extensibility. To cope with this situation CPs with new color are required. Previously, Nagai laboratory cloned CPs from the jellyfish, <i>Olindias formosa</i>, and developed a completely non-fluorescent monomeric red CP, R-Velour, with an absorption peak at 528 nm. To analyze the photophysical properties from a structural aspect, I determined the crystal structure of R-Velour at a 2.1 Å resolution. R-Velour has a trans-chromophore similar to Gamillus, a green fluorescence protein (GFP) derived from the same jellyfish. However, in contrast to the two coplanar chromophoric rings in Gamillus, R-Velour has a large torsion inducing non-fluorescence property. Through site-directed mutagenesis, I surveyed residues surrounding the chromophore and found a key residue, Ser155, which contributes to the generation of four-color variants with the bathochromic and hypsochromic shift of the absorption peak, ranging from 506 to 554 nm. Based on the recently proposed spectrum shift theory, I explained the spectrum shift with the difference in the state of the hydrogen bonds from the chromophore phenolate oxygen. That was further supported by disruption of the hydrogen bond in the new crystal structure of the variants M-Velour-554 with the bathochromic shift. To further expand the color palette of CP ranging from 420-480 nm, yellow CP dimTFPs and Y-Velour were successfully created under the mutagenesis study. And Y-Velour has been demonstrated as the best acceptor of Förster resonance energy transfer (FRET) to Sumire, a violet fluorescence protein (VFP) under the in vitro and cellular experiment by two-photon fluorescence lifetime imaging (FLIM). These findings may support further development of CP variants with useful absorption characteristics for bioimaging, including intensiometric FRET imaging, FLIM and photoacoustic imaging (PAI).</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( ZHAI LE )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授 永井 健治
	副 査	教 授 石井 優
	副 査	教 授 中川 敦史
	副 査	教 授 今田 勝巳

## 論文審査の結果の要旨

オワンクラゲ由来のGFPをはじめとする蛍光タンパク質は、多くの波長変異体が開発され、生細胞イメージング技術の発展に大きく貢献してきた。その一方でGFPと同様のβバレル構造を持つが蛍光を発さない色素タンパク質は蛍光寿命イメージングや光音響イメージングでの利用価値が見出されているものの、研究は限定的であった。Le氏は、ハナガサクラゲ由来の色素タンパク質の立体構造をX線結晶構造解析により決定し、色素団を形成する2つの環構造間に大きなねじれがあることにより無蛍光性になることを明らかにした。この知見を発展させ、蛍光性を付与した変異体作成に成功したのみならず、色素団周りのアミノ残基への変異導入による吸収波長変化を、最近提案されたスペクトルシフトに関する理論的研究と結びつけて説明し、波長変異体開発の指針の提案、および波長変異体の開発に成功した。さらに、開発した黄色変異体を紫色蛍光タンパク質からの励起エネルギー移動（FRET）のアクセプター分子として利用するバイオセンサーを構築し、蛍光寿命計測によるマルチカラーイメージングへの道を切り拓く結果を得た。

本論文は、結晶構造解析結果と光吸収・蛍光発光の物理化学理論を融合させた半合理的分子デザインによってタンパク質をエンジニアリングし、さらにバイオセンサーの構築から生細胞イメージングに至る様々な分野の知見とスキルが統合されており、その専門知識と研究能力によってなされた研究成果である。

博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール“iThenticate”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添える。