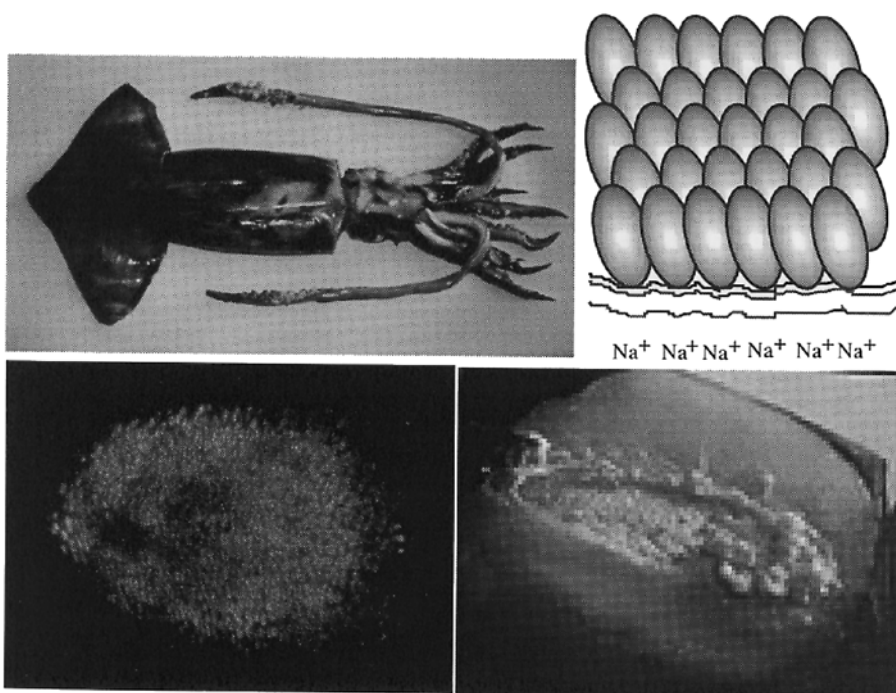


Structure Recognition and Molecular Mechanism in Bioluminescence

生物発光における精密構造認識機構の 解明と分子機構研究への展開

プロジェクトリーダー 磯 部 稔

名古屋大学 大学院生命農学研究科 教授



1. 研究の目的

生理活性天然有機化合物をめぐって、生体が情報伝達する際に引き起こされている分子構造認識機構の根本原理を解明することは重要で急務である。本研究では、まず生物発光という特異な現象に着目し、生物発光においてルシフェリン（発光素子）がタンパクにより酸化をうける反応の際の詳細な反応機構と、発光に関連する分子が相互に精密な分子構造を識別する基礎化学原理を解明し、それを応用した制御系を作出することを目的とする。

生物発光を他の酵素反応と連携させることにより、発光能をもたない分子の変化を光によって検出することが可能である。これを利用して、 γ -GTPase阻害剤に於ける化学防御機構や、昆虫休眠覚醒期における時間読みの分子機構、イオンチャンネルに対するイオン流の制御機構の解明などに利用できる。これを発展させれば、食中毒の予防と新食品衛生産業・迅速高感度診断医薬と生化学分析産業・農業病害虫の予防産業など広範囲での次世代創薬産業の新分野を開拓することができる。

2. 研究の内容

本研究ではいまだに定まった研究法の無い発光タンパク系（いわゆるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を示さず、発光素子をすでに組み込んだタンパク）の基礎的な研究をまず推進する。具体的には、沖縄のトビイカやギボシムシ、アメリカの発光ゴカイ、タイの発光ウミエラなど、材料が豊富に確保できるものについて、発光素子の決定・発光タンパクの精製・発光機構の解明・その生化学反応への応用についての研究を進める。

平行して、社会的課題である食の安全性にもつながる食中毒防止のための迅速分析に生物発光を利用する研究や、現在研究手法が限定されている分野に新手法を提供するための基礎研究を行う。例えば食品中に混在する可能性のあるフグ毒など神経生理学研究分野で、また下痢性貝毒のフォスファターゼ阻害活性の発光分析、昆虫休眠覚醒の時間読みタンパクの発光モニターなど画期的な手法を提供する可能性がある。これらのために、発光タンパクなどの構造をクローニングにより確定し、さらにこれを過剰発現させることにより本研究に給する。

プロジェクトリーダーの研究室では、長年生物発光に関して研究し発光物質や発光の分子機構に関する化学的な研究を推進してきた。一方、極めて複雑な構造の生理活性分子の化学合成を完成させ、本研究の様な活性発現研究に必要な化合物の自給自足を達成し、実際にタンパク構造レベルでの相互作用に迫っているところが大きな特徴である。

生物発光物質の発光分子機構

沖縄産トビイカ発光タンパクは、デヒドロレチジン（DHL）を発光素子とし K^+ や Na^+ イオンをトリガーとして発光し、発光素子は発光タンパク中のSH基が共役付加することにより組み込まれ、発光能のある還元型となる。この動態解析のためH8年度H9年度に渡り本研究費により設置したLC-Q-TOFおよびMALDI-ToF-MS装置を活用している。純化したトビイカ発光タンパクを用いて、部分的に決定したアミノ酸配列順位を求める。これを松田グループの（新鮮な沖縄産トビイカから液体窒素冷却により得たDNAをPCRにより増幅しこれからDNA配列を求め）結果、およびマックスアムス（Maxam）法による結果とあわせて全アミノ酸配列を決定する。また発光素子結合部位を ^{13}C NMR法を用いて、タンパク質中の存在状態を研究し、上記方法と相補的に一次構造決定を完成する。この発光タンパクは複数の発光素子を保有するので、ToF-MSによりタンパク質の構造解析を進め発光素子の発光タンパク中での存在形態を実証し、それを手掛かりに生物発光の分子機構を解明する。

トビイカ発光蛋白質のcDNAクローニング

トビイカ発光器を液体窒素中で粉砕することによりRNAの分解を抑え、約1グラムの発光器組織あたり約1マイクログラムの無傷なRNAが得られた。この発光器全RNA中に目的の発光蛋白質mRNAが存在すると考え、このmRNAを用いてトビイカ発光器cDNAライブラリーを構築し、発光蛋白質のcDNAのスクリーニングを行う。まず、調製した全RNAからオリゴdTラテックスビーズを用いてmRNAを精製し、オリゴdTあるいはランダムプライマーと逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、ファージベクターに組み込み、大腸菌に感染させる。ライブラリーのスクリーニングには、精製蛋白質の部分アミノ酸配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドを ^{32}P で標識したDNAプローブ、および後述するRT-PCR産物として得られるcDNA断片を用いる。また、この部分アミノ酸配列の情報を得るために、発光タンパク質と考えられる分子量60kDaのタンパク質を調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製し、リジルエンドペプチダーゼ、S. aureus V8プロテアーゼを用いて限定分解する。ペプチドフラグメントの混合物をC18の逆相HPLCで分離・精製し、ペプチドシークエンサーによりN-末端アミノ酸配列を決定する。これらの配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、上述したcDNAを鋳型にしてPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を行い、発光蛋白質の部分cDNAを増幅する。得られるcDNA断片をプラスミドに挿入し、DNAシークエンサーにより塩基配列を決定し、シークエンサーデータベースを用いてホモロジー検索を行い、既知蛋白質との類似性を調べる。さらに、これらのcDNA断片を ^{32}P で標識し、オリゴヌクレオチドプローブと併用して上記トビイカ発光器cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、完全長cDNAを得る。完全長cDNAが得られしだい大腸菌発現ベクターに組み込み、大量発現系の構築を目指す。

タンパク質脱離酸酵素阻害の分子機構解明

プロテインフォスファターゼを大腸菌による大量発現で調製する。また、ミクロシチンをリガンドに用いた高性能アフィニティカラムを調製し、ウサギ骨格筋などから、天然の酵素もできる限り多く精製する。トートマイシン分子中のいくつかのn位-n+3位炭素ペア（Cn-Cn+3）を通常の ^{12}C から ^{13}C に完全に置換えたものを合成する。それらの酵素阻害作用性が、置換前のものと異なることを、精製プロテインフォスファターゼ標品を用いて確認する。これらの ^{13}C 置換体単体のNMRスペクトルをとり、 $J_{Cn,Cn+1}$ カップリング定数から、Cn-Cn+1とCn+2-Cn+3との2面角を測定する。また、トートマイシンは、酵素に極めて高親和性に結合する（解離定数はnMオーダー）ので、酵素を添加した際には、 ^{13}C 置換体は、遊離したものをほとんど残さず、ほぼ100%酵素と結合して存在すると考えられるので、解析上極めて有利である。MALDI-TOF/MS, LC-ESI-Q-TOF/MS-MS装置を用い、酵素単体および阻害剤結合体の質量分析を行う。

タイマータンパク質 TIME-EA4 と時間よみ調節ペプチド PIN の計時機構

TIME-EA4のタイマー機能は、その立体構造中に内蔵されていると推察されている。したがって、まずTIME-EA4の立体構造を解明する。次いで、時間よみ調節するペプチドPINの構造が明らかになっているので、PINとTIME-EA4との構造相関から計時機構を追究する。また、TIME-EA4は分化・発生の過程ではたらく計時機構と密接に関係しているので、さらに分化・発生における遺伝子の差別的発現機構との関係を追究する。

3. 研究の体制

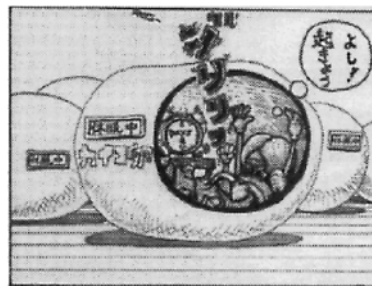
期 間：1996年10月～2001年3月

構 成：プロジェクト・リーダー1名、コアメンバー3名、研究協力者2名

実施場所：名古屋大学



Q-TOF MS 装置と測定風景



休眠卵の時間読み

