

生物発光における精密構造認識機構の解明と 分子機構の研究への展開

Bioluminescence, Molecular Mechanism of Fine Structure Recognition

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00504)

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

コアメンバー

松田 幹 名古屋大学大学院生命農学研究科・教授

高井 章 名古屋大学大学院医学研究科・助教授

研究協力者

甲斐 英則 鳥取大学農学部・教授



1. 研究目的

本研究プロジェクトでは、有機化学に馴染みの深い質量分析の最近の進歩を取り入れ改良し、構造生物学・分子生物学など利用可能なあらゆる手段を駆使して新天然物科学の方法論的・総合的な展開を目的とした。具体的には、「発光素子と発光タンパク質」、「カイコ休眠卵中の時計タンパク質」、「タンパク質脱燐酸素阻害剤」について研究を推進した。

2. 研究成果概要

2.2 質量分析方法の確立

nano-LC-Q-TOF-MS, MS/MS [ハイブリッド型質量分析機、100~3000 ナノリッター/分・流速の超微量液体クロマトグラフ装置に、試料反応装置-試料濃縮装置を前置し、検出部分にハイブリッド型のESI(エレクトロスプレー)イオン源とQ(4重極)マスに続いてコリジョンチェンバーとTOF(飛行時間型)を接続した装置を用いて、すでに技術を確立した] およびMALDI-TOFによる超微量分析法を用いて、複合体の全分子量・タンパク質の分子量・糖タンパクの糖鎖構造・糖鎖の結合位置・金属タンパク質の金属を含めた分子量・その金属リガンドと周辺構造・酵素消化ペプチドの配列・部位特異的修飾タンパクの修飾アミノ酸の解析などが可能となった。さらに、重水展開によるLC-MS/MS分析、重水素交換数やフラグメントイオンを含めた分子の新種構造情報を得る手法の確立にも成功した。



図1 沖縄産トビイカ(左)と発光している写真(右)

2.2 発光素子と発光タンパク質

沖縄産トビイカ(図1)の発光タンパク質シンプレクチンは、分子量が60kDaで疎水性が強く0.6M濃度以上のKCl塩溶液でのみ溶解する

わめて取り扱い困難なタンパク質である。化学分析と質量分析およびcDNA法により、501個の全アミノ酸配列を決定した。部分水解タンパク(40kDa:133A~501S)も発光能を示す。

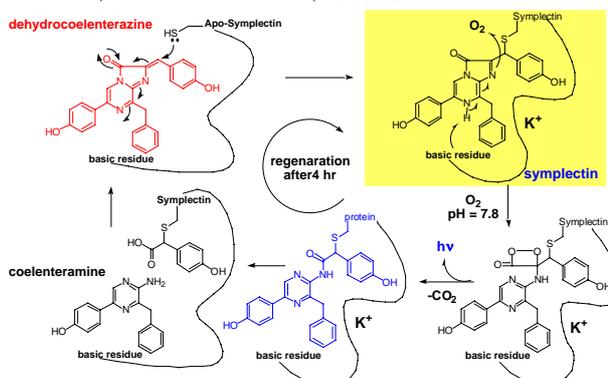


図2 発光タンパク質 Symplectin の発光分子機構

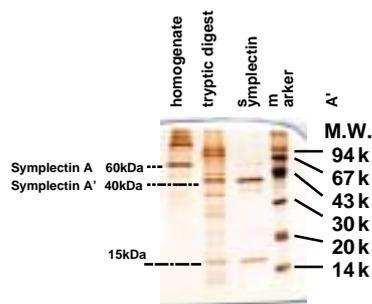


図3 Symplectin と Symp-A' の SDS-PAGE

```

1      11      21      31      41      50
YVRPVSSWKV AVFEHQVIPP KTDMETREEA LDALKLNSDV YHEAVLESRS
KGVKMIIVFPE YGLYDINTLT RTRMDLMAEK VPHPKHGHRN PCDEPEYQTQ
SSEMLRFTFC MAKENDMYMV VNMAGREPCR RATEPEPCPD KQLLYNTNVA
FNNEGDVVAR YYKTHLFWER GWFNSKNYE MALWDTPIGK FGTFCDFDQ
AVQLLEQYNV RHIAYPASVW NLPPIYQSIQ SHSAFARPAK INLLAASVHR
LETSTYSGSI YSPNGAEIFY FRPDIPKSKL LVAEILPIHV KKPEQTVVNF
DNPVFPSEDD DVQDLDFDRGD FAFLLKYKRM T RAGTVEVCQ KSFCKARYA
VKDRFKEVYA VGVYDGLLSA GANNLYFQIC TVIQCPHKKC GLKISKVTRTH
FKYLNLRADG WLDRYVFPYS TVMYNNYIAL DPFVWNYTVA GGIETKPGTS
TPLHSANLVA RIYAKDSSKH VQPHPIDEG VIKMAVKYML YVMAAYVAA
S

```

図4 マスとcDNAによる Symplectin の全アミノ酸配列

アポシンプレクチンと結合する推定炭素原子に標識率100%の¹³Cのデヒドロセレンテラジンを合成し、グルタチオンペプチドをタンパク分子モデルとした発光素子複合体を調製し、

超高磁場(600MHz)NMRにより結合位置と立体化学の詳細を決定した。フッ素化デヒドロセレンテラジンも合成し、nano-LC-Q-TOF-MS/MSによって生体条件下で結合することと、モデルペプチドでのタンデムマスペクトルの解析もできた。この手法を実際のタンパク質シンプレクチンに適用する手法ができた。ついで、フッ素化発光素子をアポシンプレクチンに組み込んだ。pH5.6で組み込んだ後直ちに塩酸グアニジンで変性させた後 pH8 でトリプシン消化を行った発光前ペプチド混合物と、組み込んだ後 pH7.8で発光させた後同様に処理した発光後ペプチド混合物とを、nano-LC-Q-TOF-MSで詳細に比較した。シンプレクチンの全13個のシステイン残基のうち発光素子と結合するものを、予備的な結果ではあるがフッ素化デヒドロセレンテラジンと nano-LC-Q-TOF-MSを用いることにより、Cys390らしいことを突き止めている。非水溶性の発光素子がタンパク質に移行する過程、発光後の素子がタンパク質から脱落する分子過程(セレンテラミンの生成までおよそ4~5時間必要)について、作業仮説であった図2のスキームを証明した。

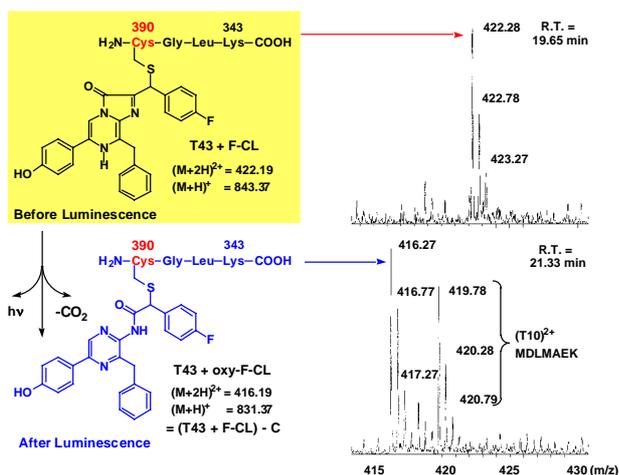


図5 ^{13}C -デヒドロセレンテラジン-GSHによる結合モデルと COSY-NMR [Tetrahedron 2000, 56, 2629]

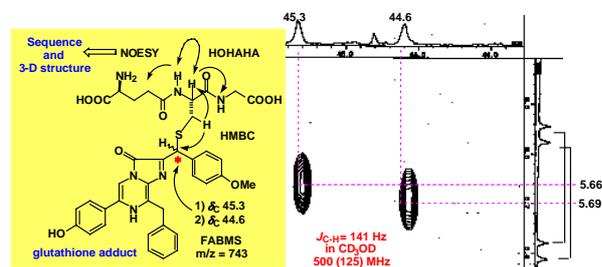


図6 F化デヒドロセレンテラジンアナログ-T43相当 nano-LC-Q-TOF-MS (上=発光前: 下=発光後)

2.3 カイコ休眠卵中の時計タンパク質

カイコの休眠卵中の時計タンパク質 EA4 は、PIN ペプチドと安定な複合体を形成し、休眠覚醒の際に解離し時間を読む役割を果たす。基本骨格は Cu-Zn 型の SOD と類似し、結晶構造既知の SOD と比較しつつ、Cu イオン周辺のアミノ酸群を水酸化ラジカルによる高部位特異

的に酸化修飾しそれを解析する実験技法を用いて高次構造を証明した。[市販の SOD の部位特異的修飾・解析する方法を確立した。発表論文(3)] EA4 で SOD と類似性の低い部分は高次構造では一面に集合し、その中央から N-結合型の糖鎖をもち、カイコの品種別により、糖鎖の構成数やアミノ酸の構成に多様性が見られた。これらの構造と時間読みの関連を理解することができた。

3. 結論

発光タンパク質や昆虫卵から得られる極微量な実タンパク質の分子種について、その一次~高次構造解析法や高部位特異的修飾解析法および生物有機化学的な研究を推進する新手法を確立することができた。タンパク質脱リン酸化素阻害剤と pp1y についても、トートマイシンとオカダ酸との型区別と構造との関係について解明した。ここで開拓した質量分析を活用した手法はポストゲノム研究においてきわめて有力である。

4. 主な発表論文

- (1) A Novel 60kDa-Photoprotein from Okinawan Squid (*Symplectoteuthis oualaniensis*) with Sequence Similarity to Mammalian Carbon-Nitrogen Hydrolase Domain Fujii, T.; Ahn, J.-Y.; Kuse, M.; Mori, H.; Matsuda, T.; Isobe, M. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, to be submitted.
- (2) ^{19}F -Dehydrocoelenterazine as Probe to Investigate the Active Site of Symplectin Isobe, M.; Fujii, T.; Kuse, M.; Miyamoto, K.; Koga, K. *Tetrahedron*, 2002, 58, 2117-2126.
- (3) Extensive Investigations on Oxidized Amino Acid Residues in H_2O_2 -Treated Cu,Zn-SOD Protein with LC-ESI-Q-TOF-MS, MS/MS for the Determination of the Copper-Binding Site Kurahashi, T.; Miyazaki, A.; Suwan, S.; Isobe, M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 9268-9278.
- (4) 7,8-Dihydropterin-6-carboxylic Acid as Light Emitter of Luminous Millipede, *Luminodesmus sequoiae* Kuse, M.; Kanakubo, A.; Suwan, S.; Koga, K.; Isobe, M.; Shimomura, O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11, 1037-1040.
- (5) Carbohydrate Moiety of Time-Interval Measuring Enzyme Regulates Time Measurement through Its Interaction with Time-Holding Peptide PIN Tani, N.; Kamada, G.; Ochiai, K.; Isobe, M.; Suwan, S.; Kai, H. *J. Biochem.* 2001, 129, 221-227.
- (6) Effects of modification of the hydrophobic C1-C16 segment of tautomycin on its affinity to type 1 and type 2A protein phosphatases Takai, A.; Tsuboi, K.; Koyasu, M.; Isobe, M. *Biochemical Journal* 2000, 350, 81-88.
- (7) Synthesis of ^{13}C -Dehydrocoelenterazine and NMR Studies on Bioluminescence of *Symplectoteuthis* model Kuse, M.; Isobe, M. *Tetrahedron* 2000, 56, 2629-2639.