

ウミボタル系発光酵素の酵素特性と活性発現機構

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学大学院電子科学研究科 公開日: 2008-04-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 孝次 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/1418

氏名・(本籍)	小 林 孝 次 (長野県)		
学位の種類	博 士 (工 学)		
学位記番号	工博甲第 240 号		
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規程第 5 条第 1 項該当		
研究科・専攻の名称	電子科学研究科 電子応用工学		
学位論文題目	ウミボタル系発光酵素の酵素特性と活性発現機構		
論文審査委員	(委員長)		
	教授	長 村 利 彦	教授 山 田 真 吉
	教授	板 垣 秀 幸	助教授 近江谷 克 裕

論 文 内 容 の 要 旨

生物発光は地球上における最も効率の良いエネルギー変換系で、熱を伴わない発光であることから"冷光"と呼ばれている。この発光は生物体内でのルシフェリン・ルシフェラーゼ反応と呼ばれる化学反応によってもたらされており、発光生物はこの光を求愛、防御、威嚇等に利用している。これまでにホタル、発光クラゲ等の生物発光系は解明されており、近年、その発光系の特色を利用し ATP、カルシウムイオン等の微量物質の検出や、遺伝子発現のモニタリングが行われている。

日本に生息する代表的な発光生物であるウミボタルは、日本には *Vargula hilgendorffii*、*Cypridina noctiluca*、*Cypridina innermis* の 3 種が生息している。この生物は発光器官より発光基質ルシフェリン、酵素ルシフェラーゼを海水中に放出し、波長 460 nm の鮮青色の発光を呈する。この発光はルシフェリン、ルシフェラーゼ、酸素分子によって引き起こされる特異性の高い酵素反応である。ルシフェリンはイミダゾピラジノン骨格を有する分子量 478 のトリペプチド由来の化合物であり、ルシフェラーゼも cDNA がクローン化され、アミノ酸 555 個からなる糖タンパクであることが明らかにされている。1990 年代より、この発光系は遺伝子発現研究におけるレポータとして利用されている。以前のレポータには CAT、 β Gal、ホタルルシフェラーゼなどの酵素が使用されていたが、これらの酵素は定量時に細胞破壊が必要なため、継続的なモニタリングが不可能であった。これに対し

V.hilgendorffii ルシフェラーゼには分泌特性があり、タンパク発現後、細胞外に分泌されることから、継続的なモニタリングの問題を解消した。これまでに *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼを用いて、細胞表面の分泌口より放出されるタンパクをリアルタイムでモニタリングした報告や、成長ホルモンプロモータ活性を継続的にモニタリングした報告がされている。今後、*V.hilgendorffii* 発光系は遺伝子発現研究の有用なツールとして更に需要が高まると予想される。しかしながら、この発光系には不明な点が存在し、特にルシフェラーゼでは、分泌シグナル、活性部位、糖鎖機能など分子構造の

詳細が未だ明らかにされていない。本研究はルシフェラーゼの分子機構の解明を目指し、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの新規精製法を確立し、精製ルシフェラーゼの特性解析を行った。また、*C.noctiluca* からルシフェラーゼ cDNA のクローニングを行い、哺乳類細胞で発現したルシフェラーゼの特性解析を行った。*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの新規精製法は、*V.hilgendorfii* が発光時にルシフェリン、ルシフェラーゼ以外の物質を放出しないことに着目し、発光液からゲルろ過クロマトグラフィーで精製を行うシンプルな精製法である。新規精製法では、作業は24時間以内に完了し、収率も従来の約6.6倍であった。精製したルシフェラーゼは約2,000-3,000 Da の N 結合型糖鎖を持つ、分子量61.9 kDa の糖タンパクであった。今回測定された分子量は、cDNA より計算された分子量よりも300-500 Da 小さい値であり、予想される分泌シグナル配列は、15~30アミノ酸残基と推定される。一方、*C.noctiluca* ルシフェラーゼの cDNA クローニングから、*C.noctiluca* ルシフェラーゼはアミノ酸553個から成る分子量61.4 kDa のタンパクであることを確認した。これは分泌型ルシフェラーゼの cDNA クローニングとしては 2 例目である。*C.noctiluca* ルシフェラーゼは *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼと高い相同性を持ち、塩基配列では79.2%、アミノ酸配列では83.1%相同であった。哺乳類細胞で発現したルシフェラーゼの酵素特性はほぼ同じであるが、細胞からの分泌特性が異なり、*C.noctiluca* ルシフェラーゼの方が分泌性に優れていた。*C.noctiluca* ルシフェラーゼには 2 箇所の N 結合型糖鎖修飾部位があり、配列中の位置は *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼと一致した。ルシフェラーゼにおける糖鎖機能を解明するため、ルシフェラーゼの N 結合型糖鎖切断酵素処理とアミノ酸置換による脱糖変異体の作成及び特性解析を行った。その結果、酵素処理による活性の減少は見られなかったが、182番目のアスパラギンに結合した糖鎖の除去によりタンパク安定性は顕著に低下し、404番目のアスパラギンに結合した糖鎖の除去によりタンパクの分泌量が減少した。この結果より、ルシフェラーゼの糖鎖は安定性、分泌に関与しており、活性には関与していないことが解明された。

論文審査結果の要旨

延伸操作は、決められた方向に分子鎖を引き揃えることによって、材料に強度や弾性率の向上をもたらす加工手段である。本論文では、合成高分子材料の一軸延伸における延伸性と、得られる材料強度について、ポリマーブレンドの立場から FTIR、熱分析、X 線回折、顕微鏡および引っ張り試験によって検討した。研究対象として着目した高分子材料は、ポリビニルアルコール(PVA)および超高分子量ポリエチレン(UHMWPE)である。

第 1 章では、産業用高分子材料の現状と要求される課題すなわち低コスト・高強度・環境調和性を満たす材料へ向けての位置づけと研究目的が詳述されている。

第 2 章および第 3 章は PVA に関するものである。PVA は近年、アスベストの代替材料になりうる安全な高分子材料として着目されているが、側鎖の OH 基間に生じる分子間水素結合が妨げとなり、延伸による高強度化が難しい。この分子間相互作用を緩和し、延伸を容易にする希釈剤または可塑剤としての役割をポリエチレンオキサイド(PEO)に求めた。異なる分子量の PEO をもちい、そのブレンド比、ブレンド条件において、第 2 章では PVA の高次組織と延伸性について検討し、第 3 章では PVA と PEO の相互作用性と延伸試料の力学特性について検討した結果、低分子量 PEO の分子鎖末端 OH が、PVA に対して可塑剂的に作用することを明らかにし、PVA の高強度化の可能性を示唆した。

第 4 章および第 5 章は UHMWPE に関するものである。分子鎖のコンフォメーションが PVA と同様に平面ジグザグ構造をとるが、OH 基がすべて H に置き換わったかたちをとる UHMWPE は、その分子間にファンデルワールス力しか作用しないため延伸が容易で、いわゆるゲル紡糸などの手法によって超延伸・高強度材料の作製が可能である。しかし PE はその化学安定性ゆえに自然環境中で分解しない。そこで、この UHMWPE と、側鎖に低分子量 PE に類似したオクタデシル基をもち、骨格にエーテル結合をもつトリ-O-オクタデシルセルロース(C18)とのブレンドをおこない、第 4 章では主に両者の相互作用と延伸性を検討した。その結果、オクタデシル基およびセルロース鎖が PE 分子鎖と同様に配向することを確認した。さらに第 5 章では、置換度の異なるオクタデシルセルロースとの相互作用性、ブレンド試料のセルラーゼ分解性および土中での分解性について検討し、オクタデシル基の置換度を低めた C18 とのブレンド試料についても同様の延伸性が得られることおよび、ブレンドによる生分解性の向上が確認された。

第 6 章は結論であり、本論文の研究内容をまとめ、今後の課題と展望が述べられている。

以上のように本論文は、高分子科学および産業に有用な新たな知見を提案しており、博士(工学)の学位を授与するに足る内容を持つものと認定する。