

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 公開日: 2017-07-07 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	https://doi.org/10.14945/00010346

電子科学研究科:

GD

K

0003503315

R

329

静岡大学附属図書館

静岡大学 博士論文

ウミボタル系発光酵素の酵素特性と活性発現機構

2003年 2月

大学院電子科学研究科
電子応用工学専攻

小林 孝次



<目次>

第1章 序論

1.1 研究背景.....	1
1.1.1 発光生物	
1.1.2 生物発光研究	
1.1.3 <i>V.hilgendorfii</i> について	
1.1.4 遺伝子発現研究におけるルシフェラーゼの利用	
1.2 研究目的.....	11

第2章 *Vargula hilgendorfii* ルシフェラーゼ新規精製法の確立及び酵素特性

2.1 研究背景.....	12
2.2 実験方法.....	12
2.2.1 <i>V.hilgendorfii</i> の採集及び発光液収集	
2.2.2 SDS-PAGE	
2.2.3 精製手順	
2.2.4 熱安定性	
2.2.5 K_m 値測定	
2.2.6 金属イオン活性阻害	
2.2.7 マススペクトメトリー	
2.2.8 糖鎖確認	
2.3 結果及び考察.....	17
2.3.1 発光液中のタンパクの検出	
2.3.2 精製	
2.3.3 酵素特性	
2.3.4 構造特性	

第3章 *Cypridina noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA クローニング及び糖鎖機能の解明

3.1	研究背景.....	28
3.2	実験方法.....	32
3.2.1	<i>C.noctiluca</i> の採集	
3.2.2	cDNA ライブラリーの構築	
3.2.3	cDNA の同定と配列決定	
3.2.4	細胞培養	
3.2.5	哺乳類細胞発現系の構築	
3.2.6	ウェスタンブロッティング解析	
3.2.7	発光スペクトル測定	
3.2.8	熱安定性測定	
3.2.9	<i>K_m</i> 値測定	
3.2.10	活性阻害剤	
3.2.11	糖鎖切断	
3.2.12	脱糖ルシフェラーゼ変異体作成	
3.2.13	シグナル配列切除	
3.2.14	C 末端配列切除	
3.3	結果及び考察.....	43
3.3.1	<i>C.noctiluca</i> の生態	
3.3.2	<i>C.noctiluca</i> ルシフェラーゼの塩基配列及びアミノ酸配列	
3.3.3	<i>C.noctiluca</i> ルシフェラーゼの哺乳類細胞での発現	
3.3.4	<i>C.noctiluca</i> ルシフェラーゼと <i>V.hilgendorfii</i> ルシフェラーゼの比較	
3.3.5	<i>C.noctiluca</i> ルシフェラーゼと <i>V.hilgendorfii</i> ルシフェラーゼの分泌特性	
3.3.6	<i>C.noctiluca</i> ルシフェラーゼの糖鎖機能	
3.3.7	シグナル配列切除及びC 末端配列切除	

第4章 結語.....	76
引用文献.....	79
研究業績一覧.....	83
謝辞	

<略語>

Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; Da, daltons; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FPLC, fast protein liquid chromatography; Ile, isoleucine; LB, Luria-Bertani; mRNA, messenger ribonucleic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; RLU, relative light units; TFA, trifluoroacetic acid; Thr, threonine; TOF, time of flight; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; Ser, serine; SDS, sodium dodecyl sulfate

第1章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 発光生物

発光生物はバクテリア、夜光虫、渦鞭毛藻などの単細胞生物から脊椎動物である魚類まで、幅広い生物層に見ることができる。発光生物の大半は海洋性であり、周囲を海に囲まれた日本には多くの発光生物が生息する (1,2)。Table 1-1 は日本に生息する発光生物である。

Table 1-1 日本の発光生物

生息地	分類		発光タイプ
陸上	真菌植物門	ツキヨタケ <i>Lampteromyces japonicus</i>	?
	環形動物門		
	多毛綱	発光ミミズ <i>Microscoclex phosphoreum</i>	?
	節足動物門		
	昆虫綱	ゲンジボタル <i>Luciola cruciata</i>	L-L反応
		ヘイケボタル <i>Luciola lateralis</i>	L-L反応
		ミヤコマドボタル <i>Pyrocoelia miyako</i>	L-L反応
		ヒメボタル <i>Hotaria parvula</i>	L-L反応
		(他44種)	
		イリオモテボタル <i>Rhagophthalmus ohbai</i>	L-L反応
海洋	脊椎動物門		
	硬骨魚綱	ヒカリイシモチ <i>Siphamia versicolor</i>	L-L反応
		マツカサウオ <i>Monocentris japonicus</i>	バクテリア共生
		ヒイラギ <i>Gazza minuta</i>	バクテリア共生
		チョウチンアンコウ <i>Himantolophus groenlandicus</i>	バクテリア共生
	腔腸動物門		
	腹足綱	ハナデンシャ <i>Kalinga ornata</i>	L-L反応?
		ヒカリウミウシ <i>Plocamopherus tilesii</i>	L-L反応?
		エダウミウシ <i>Kaloplocamus ramosus</i>	L-L反応?
	サンゴ虫綱	ウミシャボテン <i>Gavernularia obesa</i>	L-L反応
	ハイドロゾア綱	オワンクラゲ <i>Aequorea coerulescens</i>	発光タンパク
	軟体動物門		
	頭足綱	ホタルイカ <i>Watasenia scintillans</i>	L-L反応
	節足動物門		
	甲殻綱	ウミボタル <i>Vargula hilgendorffii</i>	L-L反応
		ヒオドシエビ <i>Oplophorus gracilorostris</i>	L-L反応
原索動物門			
尾索綱	ヒカリボヤ <i>Phyrosoma atlanticum atlanticum</i>	?	
原生動物門			
鞭毛綱	ヤコウチュウ <i>Noctiluca scintillans</i>	L-L反応	

発光生物の発光意義は生物により異なる (Table 1-2)。発光生物の発光意義で最も知られているものは、ホタルが雌雄間の情報伝達に発光を利用し求愛行動を行うことである。これについては既に科学的な検証が行われている。それ以外の発光意義については、推測ではあるが次のようなことが言われている。ウミボタルは捕食者の眼前で発光することにより捕食を回避している。イリオモテボタルやテツドウムシは体を丸めることで、体節にある発光器が巨大な目玉のような形状になり、鳥などの捕食を回避している。また、ニュージーランドに生息するキノコバエ *Arachnocampa luminosa* は自らの発光で他の虫を誘引後、粘着性の糸で捕獲し餌としている。発光バクテリア等の下等発光生物では発光自体に生態学・行動学的な意味は無く、生体内に生じる活性酸素の効率の良い除去方法として利用していると推測されている。

Table 1-2 発光生物の発光意義

発光の意味	発光生物名
求愛	ホタル、ウミボタル
威嚇	イリオモテボタル、テツドウムシ、ウミボタル
採餌	キノコバエ (<i>Arachnocampa luminosa</i>)
照明	深海魚、発光イカ
活性酸素の除去	バクテリア、キノコ

1.1.2 生物発光研究

生物発光は、生物によりもたらされる発光の総称である。生物発光は生体内の化学反応によりもたらされている。この反応系はエネルギー変換効率が高く、熱を伴わない発光であることから“冷光”とも表現される。各生物発光の量子収率は Table 1-3 に示した通りである。

Table 1-3 生物発光の量子収率

	生物	量子収率
生物発光	バクテリア	0.12~0.17
	ウミボタル	0.28
	ウミシイタケ	0.05
	ホタル	0.88
	発光クラゲ	0.23
化学発光	ルミノール	0.036

生物発光についての化学的な研究は、Dubois によるルシフェリン・ルシフェラーゼ反応の提唱に始まる。Dubois は 1885 年にヒカリコメツキムシ *Phyrophorus* から冷水及び熱水抽出を行い、冷水抽出液の発光が消失後、両抽出液の混合により *in vitro* で発光が生じることを確認した。後にカモメガイ *Pholas dactylus* でも同様の発光反応を確認し、冷水抽出液中には熱不安定な酵素が存在し、一方、熱水抽出液中には比較的熱に安定な基質が存在すると考えた。この酵素はルシフェラーゼ、基質はルシフェリンとそれぞれ名付けられ、これらの物質により引き起こされる発光反応をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応 (Fig. 1-1) と呼んだ。

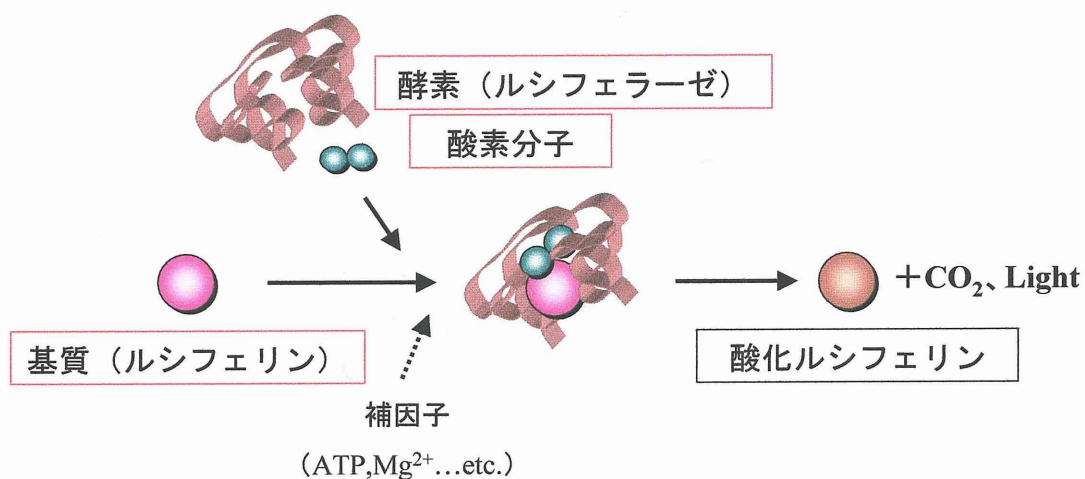
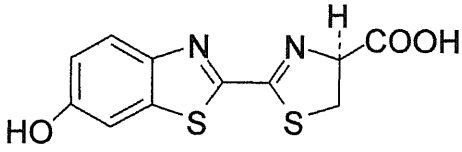


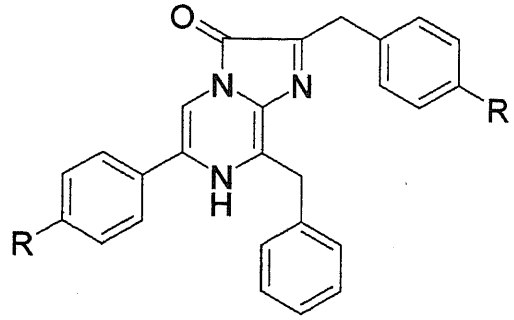
Fig. 1-1 ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応

N.Harvey はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を多数の発光生物で確認した結果、北アメリカのホタル、日本のウミボタル、バミューダ諸島のオヨギゴカイがルシフェリン・ルシフェラーゼ反応により発光していることを確認した。これまでにルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を示す発光生物は、渦鞭毛藻 *Lingulodinium polyedrum*、ウミシイタケ *Renilla reniformis*、ヒオドシエビ *Oplophorus gracilorostris* など多く発見されている。ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応以外の生物発光反応では発光タンパク反応が発見されている。この発光反応系はアポタンパク、セレンテラジン、酸素分子の複合体にカルシウムイオンが引き金となり発光が生じる反応系である。この反応系は北アメリカに生息する発光クラゲ *Aequorea victoria* から、1961年に下村らによって発見された(3)。この反応系を有する発光生物にはツバサゴカイ *Chaetopterus variopedatus* や発光オキアミ *Meganyctiphanes norvegica* がある。

ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応は特異性の高い酵素反応であり、基質、酵素の構造は反応系ごとに異なる。これまでにホタル、ウミボタル、腔腸動物、発光貝 *Latia neritoides*、発光ミミズ、渦鞭毛藻のルシフェリン構造が決定されている (Fig. 1-2)。一方、酵素ルシフェラーゼについても、ウミボタル *Vargula hilgendorffii* (4)、発光甲虫 (ホタル、イリオモテボタル *Ragophthalmus ohbai* (5)、鉄道虫 *Phrixothrix* sp. (6))、ウミシイタケ *Renilla reniformis* (7)、渦鞭毛藻 *Lingulodinium plyedrum* (8)、ヒオドシエビ (9) のルシフェラーゼ cDNA クローニングが行われ、タンパクの一次構造が決定されている。現在、ホタル、ウミシイタケ、ウミボタル生物発光系は、遺伝子工学や細胞生物学研究において細胞内分子挙動のモニタリングツールとしての応用が進んでいる。しかしながら、発光メカニズムが未解明な発光生物は非常に多く、また、全ての発光生物において基質の合成経路は不明である。既に基質、酵素が解明された発光反応系でも、酵素ルシフェラーゼの分子機構の詳細については不明点が多い。

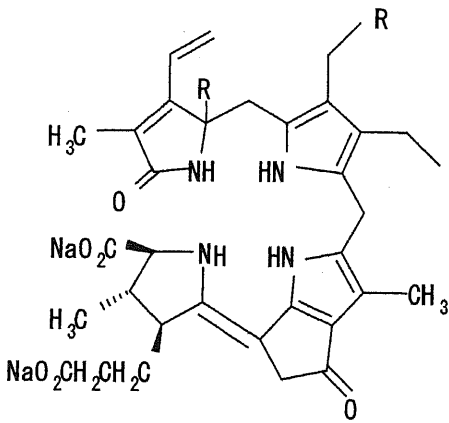


ホタルルシフェリン



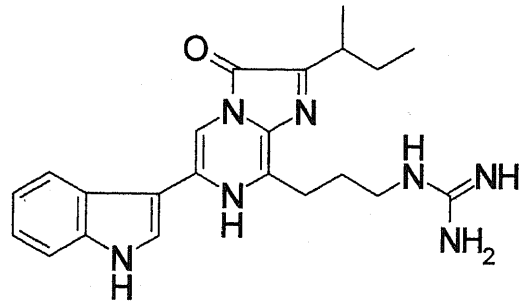
R=OH : セレンテラジン

R=OSO₃H : ホタルイカルシフェリン

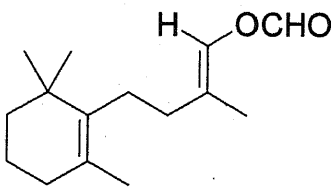


R=H : Dinoflagellateルシフェリン

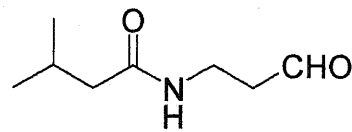
R=OH : Meganyctiphanesルシフェリン



ウミボタルルシフェリン



発光貝Latialルシフェリン

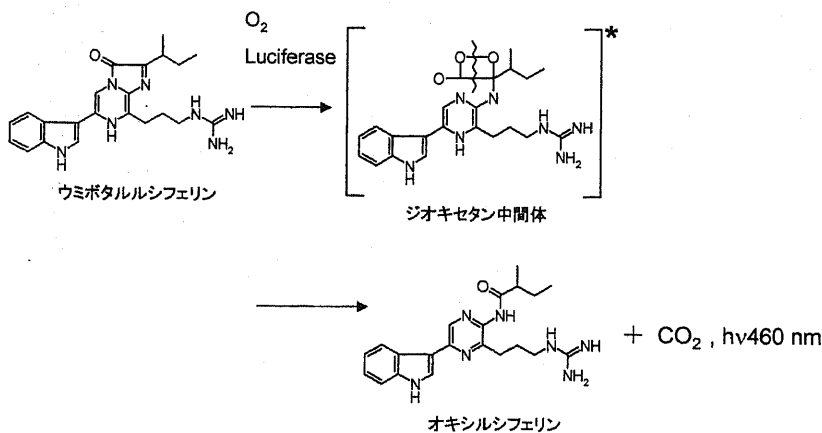


発光ミミズルシフェリン

Fig. 1-2 発光生物のルシフェリン

1.1.3 ウミボタルについて

ウミボタルは、節足動物門甲殻綱介形目ウミボタル科に分類される発光生物である。ウミボタル類は *Vargula*、*Cypridina* 属の2属のみに発光種が見られる。南カリフォルニア湾では *Vargula tsujii*、東南アジアでは *Cypridina serrata*、カリブ海では *Vargula harveyi* などの発光種がこれまでに発見されている。日本近海では *Vargula hilgendorffii* (以下、*V.hilgendorffii* : Fig. 1-3A)、*Cypridina noctiluca* (Syn. *Cypridina dentata*) (以下、*C.noctiluca* : Fig. 1-3B)、そして、*Cypridina innermis* の3種の生息が報告されている(1)。*V.hilgendorffii* は発光種では最大であり、体長は約3 mm である。この種は日本近海に生息しており、青森県陸奥湾から沖縄県西表島までの砂底海岸で見ることができる (Fig. 1-4)。この種の記載は G.W.Müller によって行われた(10)。学名は Müller にサンプルを送った F.F.M.Hilgendorf にちなみ *Cypridina hilgendorffii* と命名された(後に属名が *Vargula* に変更)。この生物は夜行性で昼間は砂中に潜っており、夜間採餌や繁殖等の行動を行う。食性は肉食性で魚の死体等に群がる。*V.hilgendorffii* は、外部より化学的・物理的な刺激(例えば捕食者からの攻撃)を受けると、口腔上部の上唇腺と呼ばれる器官より、発光基質ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼを海水中に放出し、鮮やかな青色の発光を呈する (Fig. 1-3C)。この発光はシンプルかつ特異性の高い酵素反応で、ルシフェリン・ルシフェラーゼ・酸素分子の3要素によって成り立ち、ホタル生物発光反応とは異なり、ATP やマグネシウムイオンなどの補因子を必要としない (11,12,13 : Scheme 1)。



Scheme 1 ウミボタル生物発光反応

V.hilgendorffii 生物発光反応は酸素分子によるルシフェリンの酸化反応で、その結果、酸化ルシフェリン（オキシルシフェリン）、二酸化炭素、そして青色光がもたらされる（14,15）。ルシフェラーゼはルシフェリンの酸化を触媒し、励起状態の酸化ルシフェリンとルシフェラーゼの複合体がこの発光反応における発光体となっている（16）。この生物発光反応についてのこれまでの研究では、ルシフェリン構造が岸・後藤・平田らにより決定され、イミダゾピラジノン骨格を有する分子量 478 の化合物であることが解明されている（17,18,19）。一方、ルシフェラーゼについては、下村、Tsuji らにより精製が行われ、酵素特性が調べられている。更に 1989 年に Thompson らによりルシフェラーゼ cDNA がクローニングされ、アミノ酸 555 個からなる一次構造が決定されている（4）。ウミボタル生物発光系は分泌型発光系であることが特徴として挙げられる。既知の生物発光系で、酵素ルシフェラーゼが分泌特性を持つものはウミボタル、ヒオドシエビ、発光貝 *Latia* の 3 種類である。現在、いくつかの生物発光系は遺伝子工学、細胞生物学研究において細胞内分子挙動のモニタリングツールとして応用が進んでいる。その中で分泌型発光系はウミボタル発光系のみで、今後、この発光系はツールとしての需要は更に増大すると思われる。

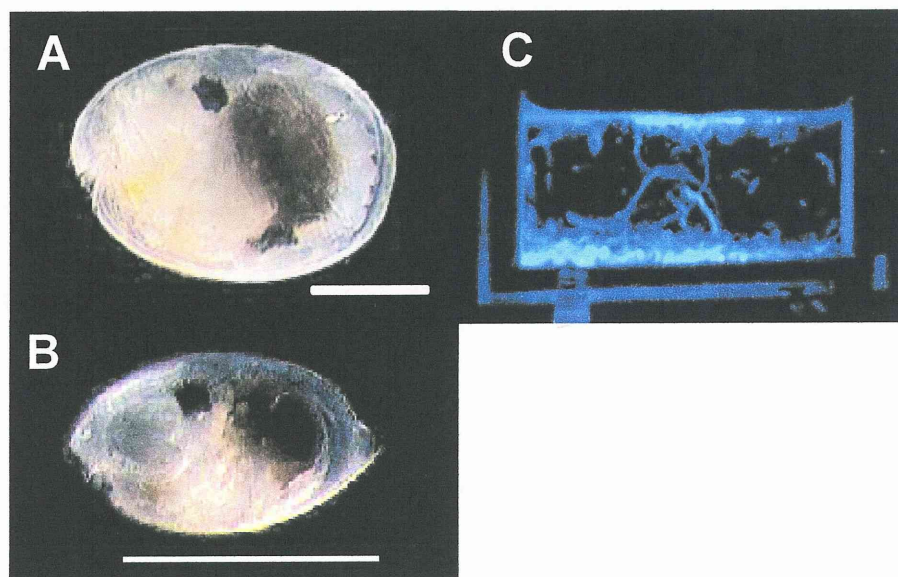


Fig. 1-3 ウミボタル

A : *Vargula hilgendorffii*、スケールバーは 1mm

B : *Cypridina noctiluca*、スケールバーは 1mm

C : ウミボタルの発光

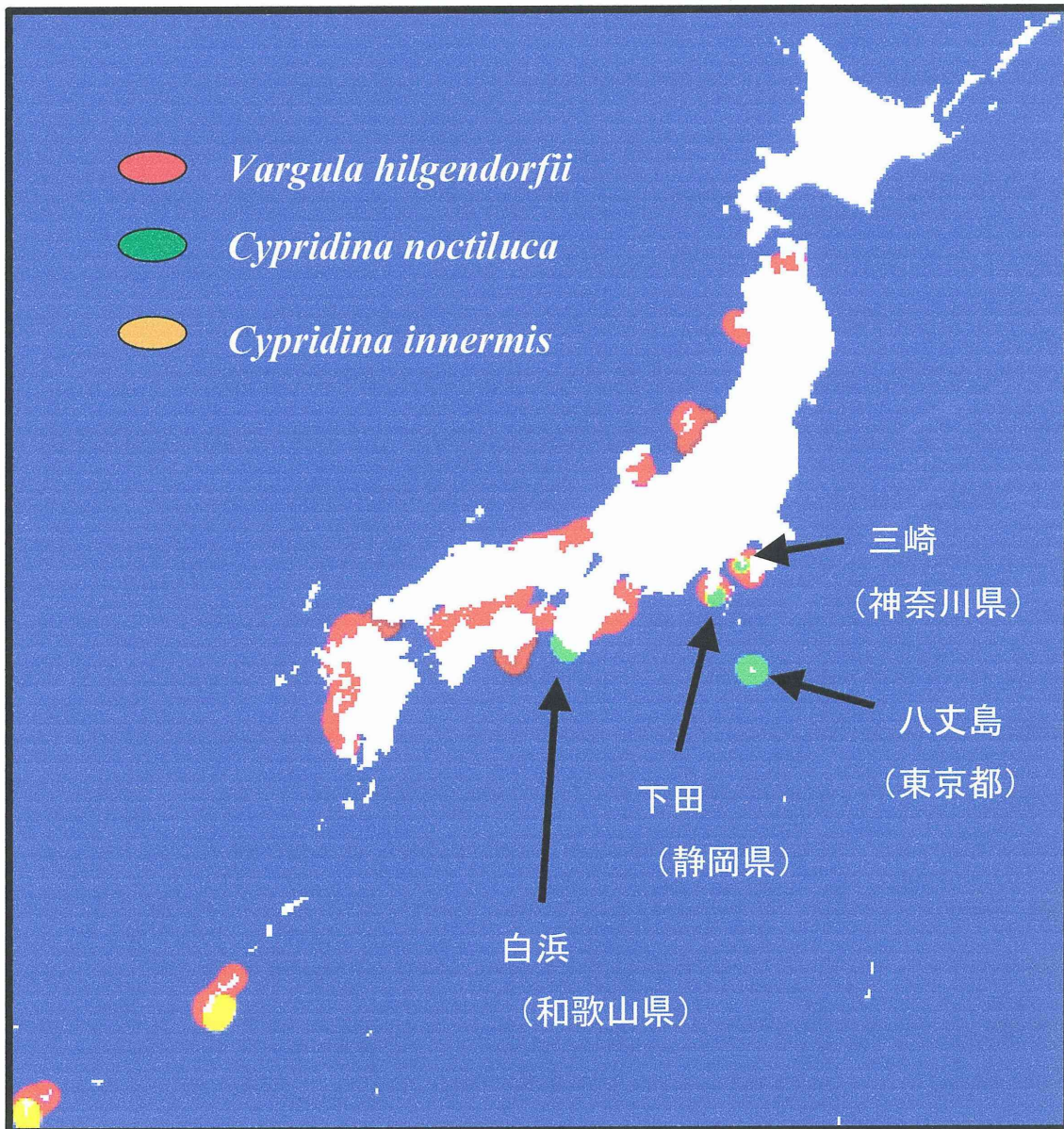


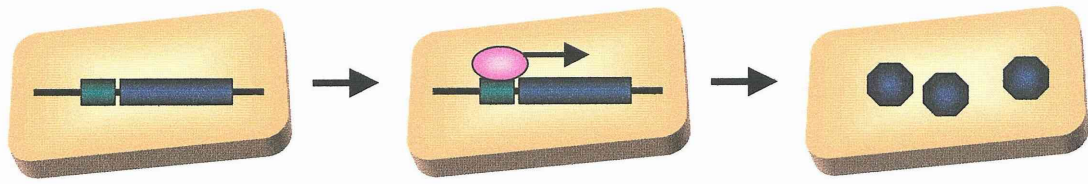
Fig. 1-4 日本におけるウミボタルの分布

Vargula hilgendorffii ●、*Cypridina noctiluca* ●、*Cypridina innermis* ●

1.1.4 遺伝子発現研究におけるルシフェラーゼの利用

ヒトゲノムプロジェクトにより、ヒト遺伝情報が解明された現在、特定遺伝子の発現時期の解明や発現物質の分子挙動解析研究が重要とされている。この研究では優良な分子プローブが必要とされ、そのプローブのひとつに酵素が用いられている。プローブとしての酵素の利点は、蛍光プローブに比べ定量性に優れている点が挙げられる。酵素を用いたモニタリングで最も頻繁に行われているのは、遺伝子転写活性モニタリングである。Fig. 1-6 は遺伝子転写活性モニタリングの模式図である。遺伝子の転写は転写因子が翻訳領域上流部に存在するプロモータ配列を認識し、その下流に位置する翻訳部を転写していく。そのため同一プロモータを有する遺伝子の転写は、同一転写因子によって同時に行われる。この原理を利用し、酵素遺伝子の下流部にプロモータ配列を組み込んだ遺伝子を作成し、細胞内へ遺伝子を導入することで酵素タンパクが発現し、その酵素の定量によって間接的に遺伝子転写活性のモニタリングが行える。従来モニタリングには CAT (Chloramphenicol acetyl transferase)、 β Gal (β -Galactosidase) などの酵素が用いられていたが、これらの酵素は酵素活性測定に手間と時間がかかり、アプリケーションとしては不便であった。酵素定量までの手間の簡便化を図るために、ホタルルシフェラーゼが用いられるようになった。ホタルルシフェラーゼは基質添加後即座に発光が生じるため、測定が迅速かつ容易に行えた。また定量方法が発光検出であるため感度が高く、従来の酵素よりも優れていた。ホタルルシフェラーゼは現在遺伝子転写活性モニタリングに最も利用されているレポータである。ホタルルシフェラーゼの他に、ウミシイタケルシフェラーゼを用いた定量系も確立されており、ホタルルシフェラーゼと組み合わせたデュアルアッセイ系も構築されている。しかしながら、これらのレポータの定量では、細胞破壊が必須であるため、継続的な遺伝子発現研究が行えず、細胞外へ分泌されるレポータが求められていた。1989年にクローニングされた *V.hilgendorfi* ルシフェラーゼは哺乳類細胞で発現し、発現したルシフェラーゼは細胞外へ分泌されることが確認された。またレポータとしての特性も従来のレポータより優れていることが確認されている。この酵素を用いた遺伝子転写活性モニタリングが既に数例報告されており、今後、更なる応用の拡がりが見込まれる。

<通常発現>



<レポーターを伴う発現>

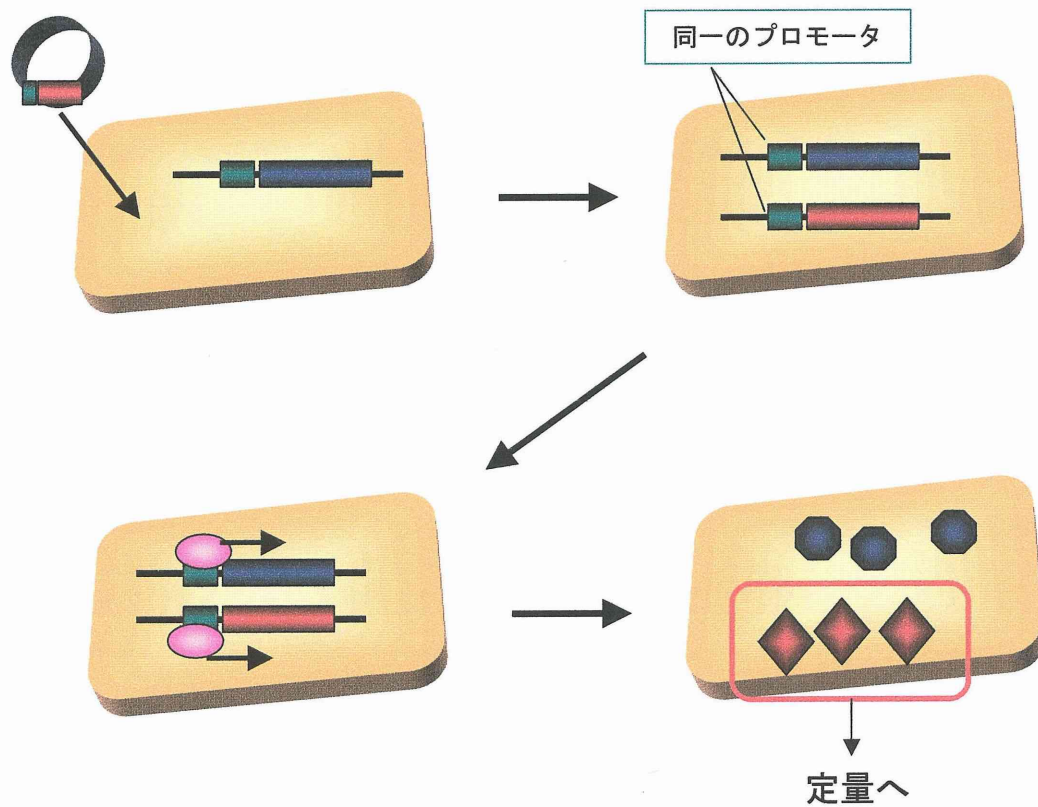






Fig. 1-5 遺伝子発現モニタリング原理模式図

同一プロモータを有するタンパクは、同時に発現する。意図的にレポーターを細胞に形質導入した場合、細胞内のプロモータの活性化により、レポーター酵素が発現する。

-  目的遺伝子
-  レポーター酵素
-  プロモータ
-  転写因子

1.2 研究目的

ウミボタル発光系は過去の研究により、ルシフェリンの構造決定、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングが既に行われている。ウミボタル発光系の最大の特徴は分泌型発光であり、この特徴を利用し、近年では細胞生物学研究におけるモニタリングツールとして応用が行われている。これまでに *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣細胞において、細胞表面の分泌口より分泌されるルシフェラーゼのリアルタイムモニタリングを行った研究 (20) やラット下垂体腺腫細胞内の成長ホルモンプロモータ活性測定を 24 時間継続的に生細胞で行った研究 (21) が報告されている。今後、ウミボタル発光系は高感度分泌型モニタリングツールとして、需要が更に増加すると思われる。しかしながら、この発光系ではルシフェラーゼの分泌シグナル配列、糖鎖機能、活性部位などの酵素として重要な情報が未だ不明である。本研究では、ウミボタル生物発光系における酵素ルシフェラーゼの酵素特性及び構造特性の解析を行うことで、不明点である分泌シグナル配列、糖鎖機能の解明を目指した。具体的な実験は 2 点行った。まず 1 点目として *V.hilgendorfii* 発光液からのルシフェラーゼ新規精製法を確立し、同方法により精製したルシフェラーゼの特性解析を行った。2 点目はウミボタルルシフェラーゼの分子構造的な理解を深めるために、*V.hilgendorfii* 近縁種 *Cypridina noctiluca* (22) よりルシフェラーゼ cDNA をクローニングし、哺乳類細胞で発現したルシフェラーゼについて特性解析を行い、既知の *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼとの比較を行った。また糖鎖機能を解明するために、*C.noctiluca* ルシフェラーゼに対し酵素処理、遺伝子操作による脱糖を行い、脱糖によるルシフェラーゼ特性への影響を確認した。

第2章 *Vargula hilgendorffii* ルシフェラーゼ新規精製法の確立及び酵素特性

2.1 研究背景

V.hilgendorffii ルシフェラーゼの精製は、これまでに下村 (23)、Tsuji (24) のほか数回行われ、精製したルシフェラーゼの特性が報告されている。しかしながら、これらの報告には3つの問題点が存在する。1つ目の問題点は、これらの報告が全て30年以上前のものであり、当時の技術を考慮すると *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼについて再度特性解析が必要であると考えられる点である。2つ目は精製方法である。従来の方法では *V.hilgendorffii* の破碎液を精製材料としており、精製材料に多くタンパクが含まれているため、精製過程が複雑で時間を要し、回収率を上げることが困難であった。加えて、近年の港湾開発や水質汚染により *V.hilgendorffii* の生息個体数が減少しているため、従来方法ではタンパクの大量精製は不可能である点である。3つ目は、これまでの研究では、*V.hilgendorffii* が実際に海水中に放出したルシフェラーゼについては何も報告されていない点である。

本研究では上記の3つの問題点を解決するために、*V.hilgendorffii* が発光器官・上唇腺 (Fig. 2-1) より、ルシフェリン、ルシフェラーゼを海水中へ放出して発光することに注目し、*V.hilgendorffii* 発光後の海水からルシフェラーゼ精製を行う新規精製法を目指した。また、この方法により精製したルシフェラーゼの特性解析を行った。

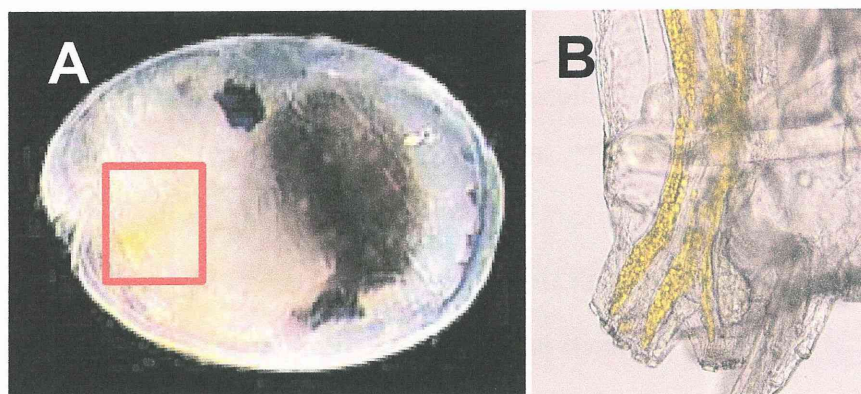


Fig. 2-1 *V. hilgendorffii* 発光器官・上唇腺

(A) 上唇腺位置 (赤線) (B) 上唇腺。黄色の筋はルシフェリン

2.2 実験方法

2.2.1 *V.hilgendorfii* の採集及び発光液収集

V.hilgendorfii の採集は、伊豆半島下田市鍋田湾・外浦湾と千葉県館山市北条海岸で行った。採集はベイトトラップ (Fig. 2-2A) を使用し、餌には豚レバーを用いた。採集は日没後より夜間行った。採集した *V.hilgendorfii* は実験室内において、ろ過海水を用いて飼育を行った。発光液の収集は、約 600 匹の生個体を発光用のアクリル水槽 (Fig. 2-2B) に移し、人工海水 (NaCl 23.447 g, MgCl₂ 4.981 g, Na₂SO₄ 3.917 g, CaCl₂ 1.102 g, KCl 0.664 g, NaHCO₃ 0.192 g, KBr 0.096 g / 1 kg, pH 7.5-8.0) 200 mL を満たした状態で発光させた (Fig. 1-3C)。発光は電気刺激により行った。電気刺激は 20-50 V の交流電圧による刺激を 0.1-0.2 秒、20 回ほど行った。刺激後、*V.hilgendorfii* を除いた海水を実験試料として用いた。

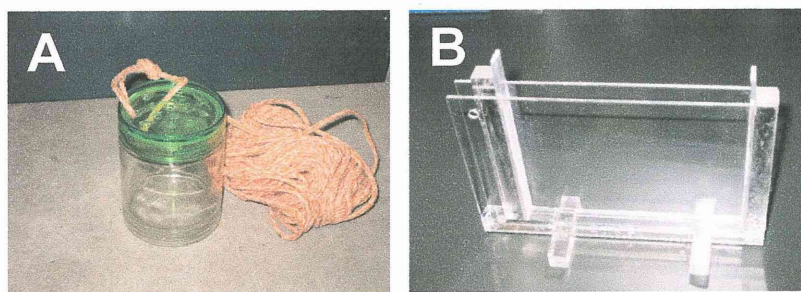


Fig. 2-2 (A) ベイトトラップ (B) 発光用アクリル水槽

2.2.2 SDS-PAGE

SDS-PAGE は 12.5 % の分離ゲルを用い、Laemmli の方法 (25) で行った。サンプルは 2% SDS, 10% グリセロール, 40 mM DTT, 0.01% フェノールレッドを含む 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 で調整した。銀染色はシルバーステインキット (ATTO 社製) を使用し、付属のプロトコールに従い行った。分子量マーカーには LMW Marker (アマシヤム社製)、プレステインマーカー (6~175 kDa) (New England Biolabs.社製) を用いた。二次元電気泳動は PROTEIN IEF Cell (Bio-Rad 社製) を使い、付属のプロトコールに従い行った。一次元目の泳動には IPG Ready strip pH3-10 を用いて行った。

<補足説明> SDS-PAGE について

電気泳動はタンパクや DNA を分子量により分離する際に用いられる最も一般的な方法である。SDS-PAGE は、SDS 添加によりタンパク内非共有結合による相互作用を破壊し、タンパクに負電荷をもたせ、アクリルアミドゲルの分子ふるい作用によりタンパクの分離を行う方法である。Fig. 2-3 は模式図である。

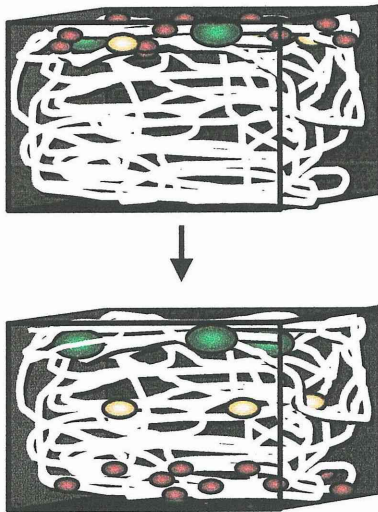


Fig. 2-3 SDS-PAGE 原理模式図

SDS により負電荷を帯びたタンパクをアクリルアミドゲル上へのせ電気を流すと、分子量が小さいタンパクほどゲル中を速く移動するため、分子量に応じてタンパクが分離される。

2.2.3 精製手順

発光液を含む海水 200 mL は、YM-10 メンブレン（ミリポア社製）を使い 6 mL まで濃縮を行った。濃縮した発光液は、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。カラムは Superdex 200 HR 10/30（アマシャム社製）を使用し、分離能を上げるためカラムを 2 本直結して行った。溶媒は 50 mM Tris-HCl, pH7.2 を用い、流速 0.5 mL/min の条件で行った。分子量マーカーにはカタラーゼ（232kDa）、BSA（69kDa）、シトクロム C（12kDa）を用いた。カラムからの溶出液は波長 280 nm の紫外線吸収でモニタリングし、0.5 mL 毎に溶出液を採取した。溶出分画の活性測定は各分画より 1 μ L を取り、50 mM Tris-HCl, pH7.2 で 150 倍に希釈後、1.5 nM のルシフェリン溶液 50 μ L を加え、20 秒間の積算発光量を測定した。発光測定にはルミネッセンサー AB-2000 ルミノメーター（ATTO 社製）を用いた。タンパク量測定は Bio-Rad protein assay（Bio-Rad 社製）を使い、BSA を標準試料として行った。

2.2.4 熱安定性

精製ルシフェラーゼ 12.8 ng、BSA 50 μg を含む 100 μL の 50 mM Tris-HCl, pH7.2 を 30 分間 0~70°C の各温度でインキュベートし活性測定を行った。活性測定は、50 μL の 1.5 nM ルシフェリン溶液を加え、20 秒間の発光活性を測定した。また、37°C での安定性を測定するために、30 分~10 時間インキュベート後の活性も測定した。

2.2.5 K_m 値測定

ルシフェリンに対する K_m 値を計測するために、50 μL の 5.26 ng のルシフェラーゼを含む 50 mM Tris-HCl, pH7.2 に対し、0.1~2.0 μM ルシフェリンを 50 μL 加え、25°C での 20 秒間の積算発光量を測定した。測定は 3 回行った。 K_m 値の算出は、Linweaver-Burk 法で行った。

2.2.6 金属イオン活性阻害

金属イオンの活性への影響を確認するために、100 μL のルシフェラーゼ 12.8 ng、BSA 50 μg を含む 50 mM Tris-HCl, pH7.2 に対し、最終濃度が 0-1.0 M となるように Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} の各金属イオンを加えた。各金属は塩化物を使用した。発光測定は 50 μL の 1.5 nM ルシフェリン溶液を加え、20 秒間の積算発光量を測定した。

2.2.7 マススペクトメトリー

分子量決定は、MALDI-TOF 型質量分析装置で行った。レーザー光源は波長 337 nm、パルス幅 3ns の N_2 レーザーを用いた。加速電圧は 20 kV、グリット電圧は 90%、ガイドワイヤー電圧は 0.3%、ディレイドエクストラクションにおけるディレイタイムは 300 ns で行った。測定はリニアモードの正イオンモードで約 100 回のレーザー照射を行って平均した。マトリックス溶液は 0.1% TFA / 66% アセトニトリル溶液で 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-cinnamic acid を 10 mg/mL に調整したものをを用いた。質量の校正は外部標準法によりミオグロビンと BSA の分子イオン $[\text{M}+\text{H}]^+$ を用いて行った。

<補足説明> MALDI/TOF について

本研究で用いた MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) /TOF (Time Of Flight) 型質量分析装置は、紫外線吸収性の固体マトリックスを用いて紫外線レーザーにより物質をイオン化後、一定電圧をかけイオンの加速を行い、イオンの磁場における飛行時間から質量を測定するものである。

2.2.8 糖鎖確認

ルシフェラーゼ溶液 20 μL に対し、変性バッファー (5% (w/v) SDS、10% β -メルカプトエタノール) 2 μL を加え、100 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間変性を行った。変性後、0.5 M リン酸ナトリウム溶液 (pH7.5) と 10% NP-40 をそれぞれ 2.2 μL 加え、50U の PNGaseF (New England Biolabs.社製) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。酵素処理後のルシフェラーゼ溶液は SDS-PAGE を行い、分子量変化を確認した。

2.3 結果及び考察

2.3.1 発光液中のタンパクの検出

人工海水中で *V.hilgendorfii* を発光させ、回収した発光液について SDS-PAGE を行った。Fig.2-4 はその泳動図である。発光液には約 70kDa 付近にメインバンドが確認でき、その他にタンパクはほとんど確認されなかった。70kDa のバンドは抗 *V.hilgendorfii* 抗体 (20) に対し陽性反応を示すことから、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼであった。発光液の左側には上唇腺を破砕した溶液を泳動した。この泳動図では、発光器官である上唇腺の破砕液でさえルシフェラーゼ以外に非常に多くのタンパクが含まれることを示しており、従来の個体破砕よりも発光液から精製を行う方が、効率が良く精製が行えることをこの結果は示唆している。

上唇腺からの分泌物については、阿部らの研究では複数の消化酵素が発光液中から検出されたとの報告がある (26)。しかし、今回の研究ではタンパクの他に銀染色によって染色されるような物質はルシフェラーゼ以外に検出できなかった。阿部らの研究では、発光液の収集が *V.hilgendorfii* 捕獲直後に行われ、海水で個体を洗浄し、汲み上げた海水中で採集用ネットに *V.hilgendorfii* を入れ、揉み解すようにして刺激を与える方法で発光液を収集していることから、放出物以外の物質が混入している可能性が高いと考えられる。報告では渦鞭毛藻のルシフェラーゼが検出されており、このことは海水からの物質の混入を示している。また、DNase や RNase が検出されたことから *V.hilgendorfii* の共食いもしくは物理的な個体の破損による、発光分泌物以外の物質が混入した可能性も考えられる。この点については、本研究でも発光液収集時に、発光水槽内で *V.hilgendorfii* の共食いが起きた場合、発光液について SDS-PAGE を行ったところ、多数のバンドが検出された。今回の実験結果と以上のことから、*V.hilgendorfii* の発光時に放出されるタンパクはルシフェラーゼ以外に無いと推察される。

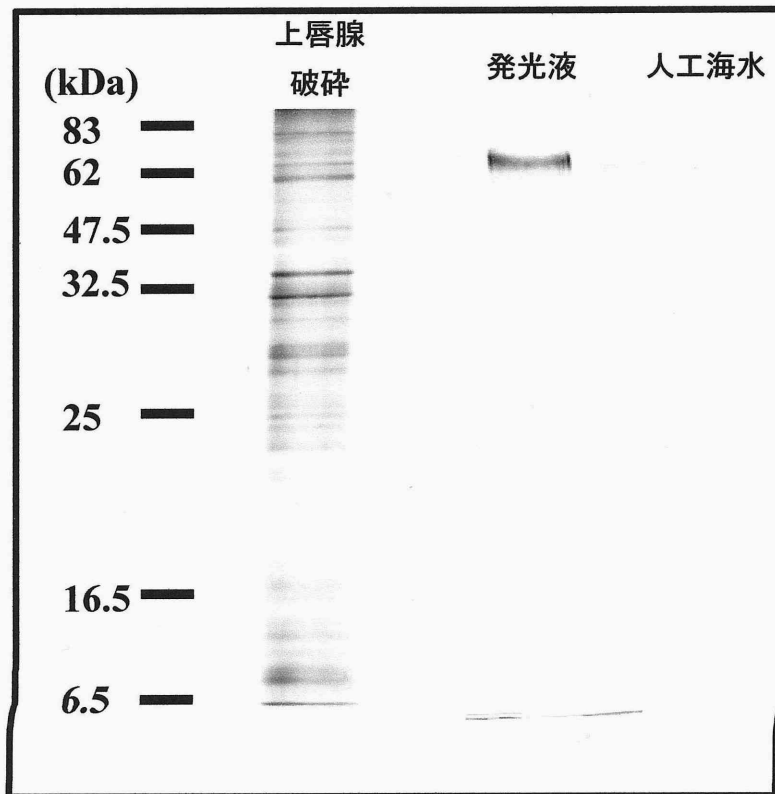


Fig. 2-4 *V. hilgendorfii* 発光液の SDS-PAGE

発光器官・上唇腺破碎液、*V. hilgendorfii* 発光液、人工海水の SDS-PAGE である。サンプルは左から上唇腺、発光液、人工海水の順に泳動している。ゲルは 12.5% アクリルアミドゲルを用い、染色は銀染色を行った。

2.3.2 精製

下村らによる *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの精製法は、個体破碎液に硫酸を加え、その沈殿より DEAE 担体を用いたクロマトグラフィーの繰り返しによるものであった。2.3.1 の結果から、*V.hilgendorffii* の発光液にはルシフェラーゼ以外にタンパクがほとんど含まれていないことを確認したので、*V.hilgendorffii* 発光液からのルシフェラーゼ精製を試みた。今回は、生個体 600 匹をアクリル水槽中で電気刺激により発光させた発光液 200 mL を精製材料とした。この発光液を限外ろ過で 6 mL まで濃縮し、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った。ゲルろ過クロマトグラフィーの選択理由は、ルシフェラーゼ以外のタンパクが少ないため、分子量による選別で精製が可能と推測される点と精製ルシフェラーゼの分子量確認を狙った 2 点によるものである。Fig. 2-5 はゲルろ過クロマトグラフィーのクロマトグラムである。Fig. 2-5 の青線は波長 280 nm の紫外線吸収であり、赤点はルシフェラーゼ活性である。Fig. の縦軸には吸収量、横軸にはカラムからの溶出量である。このクロマトグラムでは 3~4 つの吸収ピークが見られる。このピークの中でルシフェラーゼ活性を示すのは最も左側に位置する約 68kDa のピークだけであった。活性のある分画を回収し、SDS-PAGE を行った結果、約 68kDa 付近にシングルバンドが確認され、ルシフェラーゼ精製が行えたことを確認した。今回の精製では *V.hilgendorffii* 600 匹より 80 μ g のルシフェラーゼ精製が行えた。発光液中の総ルシフェラーゼ活性量は 5.80×10^{11} counts/20sec であり、ゲルろ過後の総ルシフェラーゼ活性量は 1.09×10^{11} counts/20sec であることから、新規精製方法では発光液中全ルシフェラーゼの 18.8% が回収された。Table 2-1 は今回行った新規精製法と下村らの方法の比較である。新規精製法では収率、精製時間、精製手順の 3 点で大幅な改善が行えた。まず、以前の方法では約 500g の乾燥個体より 10 mg のルシフェラーゼが精製され、*V.hilgendorffii* 1g あたりの収率は 20 μ g であった。一方、新規精製法では *V.hilgendorffii* 0.6g あたり 80 μ g の精製ができ、*V.hilgendorffii* 1g あたりの収率は 133 μ g であることから、約 6.6 倍高効率の精製が行えた。精製時間については、新規方法では発光液の収集からゲルろ過クロマトグラフィーの終了までが 24 時間以内に完了するため、数日を要する従来の方法に比べ格段に迅速であると言える。精製手順についても、新規方法は発光液の収集、限外ろ過での濃

縮、ゲルろ過クロマトグラフィーと大幅な簡略化が行えた。また、新規方法は個体への電気刺激時に過剰な刺激を行わなければ、約1週間後に再度同個体よりルシフェラーゼ精製が可能であることから、*V.hilgendorfi* の生息個体数が減少傾向にあっても、大量精製が可能な優れた精製法であった。

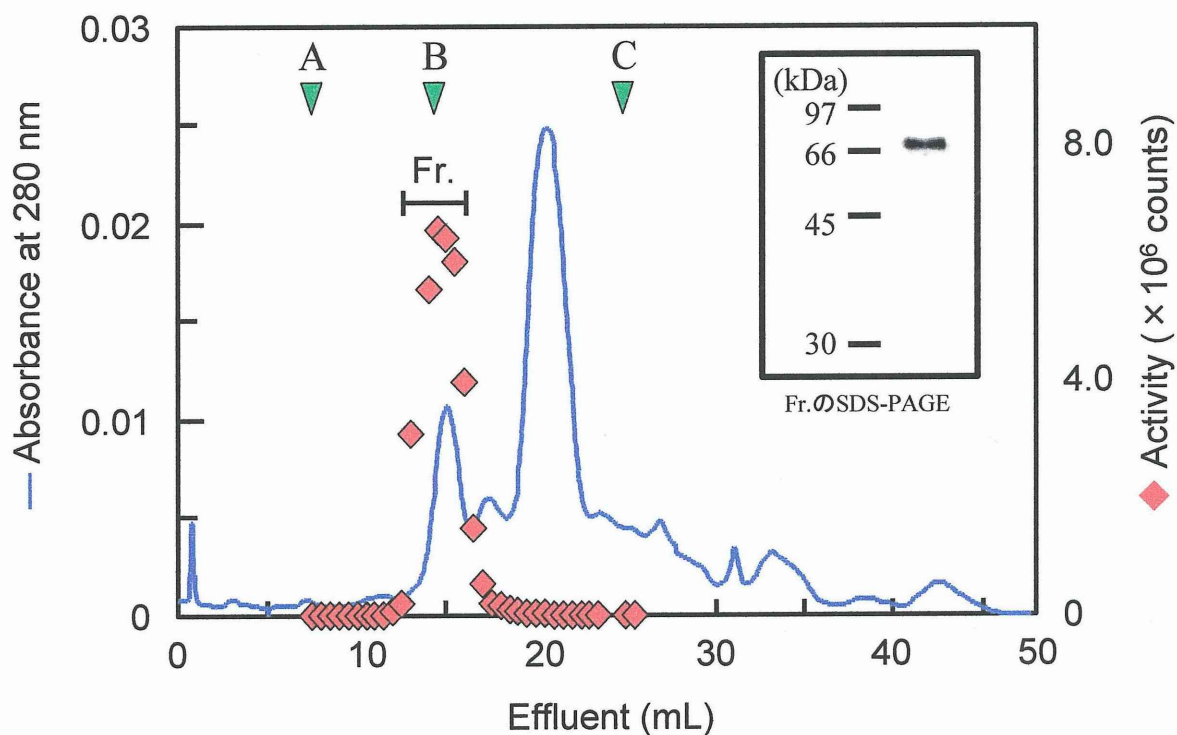


Fig. 2-5 濃縮発光液のゲルろ過クロマトグラフィー

発光液のゲルろ過クロマトグラフィーのパターンである。カラムは Superdex200 HR 10/30 を用い、溶出は 50mM Tris-HCl, pH7.2 を用い、流速 0.5 mL/min 条件下で行った。青線はカラム溶出溶液の 280 nm の吸収パターンで、赤点は溶液分画のルシフェラーゼ活性である。緑色の三角はマーカーとして用いたカタラーゼ (232kDa : A)、BSA (69kDa : B)、シトクロム C (12kDa : C) である。右上の電気泳動図は、ルシフェラーゼ活性のある分画について行った SDS-PAGE (12.5%ゲル、銀染色) である。

Table 2-1. *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ精製比較

本研究で行った精製と下村らによって行われた精製 (23) の比較一覧である。
赤線で囲った部分が本研究で大幅に改善された点である。

	Shimomura (1961)	本研究
使用した <i>V. hilgendorffii</i>	500,000 匹 (500g)	600 匹 (0.6 g)
ルシフェラーゼ精製量	10 mg	80 µg
<i>V. hilgendorffii</i> 1gあたりの ルシフェラーゼ精製量	20 µg	133 µg
精製時間	数日	24時間以内
精製ステップ	6 or 7	2

2.3.3 酵素特性

新規精製法にて精製した *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼについて特性解析を行った。Fig. 2-6 は精製ルシフェラーゼを各温度で 30 分間インキュベート後の発光活性である。この結果では約 40℃までは活性が保持されており、40℃くらいまでがこの酵素の適正温度と思われる。次に 37℃での安定性を確認した。37℃は通常細胞培養に用いられる温度で、この温度における安定性はツールとしてこの酵素を用いる場合の重要な情報となる。Fig. 2-7 は精製ルシフェラーゼの 37℃における安定性である。この結果では 10 時間インキュベーション後でも約 80%の活性が保持されていた。ホタルルシフェラーゼは 37℃、30 分間のインキュベーションで活性が失われる (27)。このことより、同温度で長時間安定な *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼは、ホタルルシフェラーゼよりもツールとして有効であることがこの実験から示唆された。

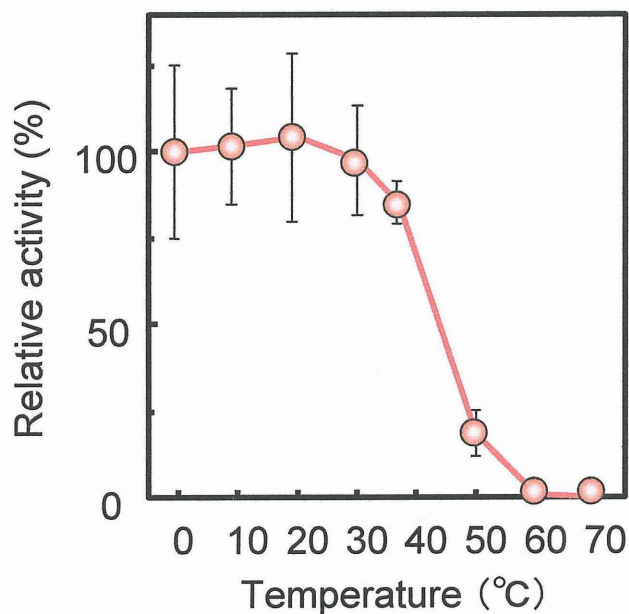


Fig. 2-6 精製ルシフェラーゼ温度別安定性

精製ルシフェラーゼの温度別安定性である。各温度、30 分間インキュベート後に活性測定を行い、0℃、30 分間インキュベート後のルシフェラーゼ活性に対する相対活性値である。

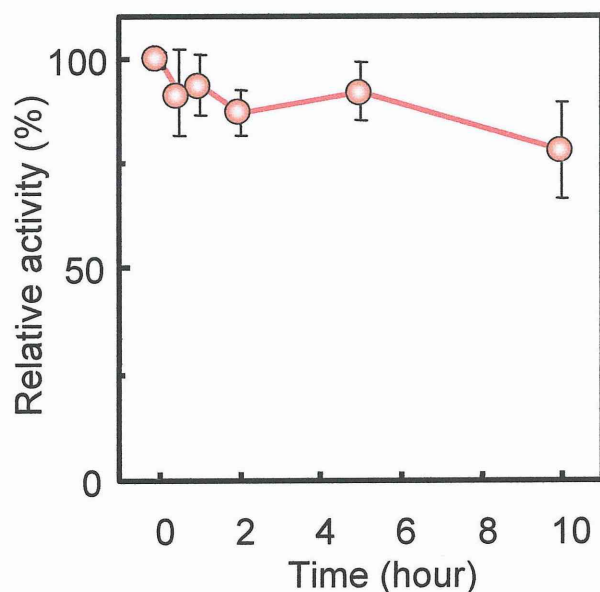


Fig. 2-7 精製ルシフェラーゼの 37°Cにおける安定性

37°Cにおけるインキュベート時間でのルシフェラーゼ活性である。37°Cでインキュベーションを行い、各経過時間でのルシフェラーゼ活性を測定し、各値はインキュベート 0 時間目のルシフェラーゼ活性に対する相対活性値である。

V.hilgendorfii ルシフェラーゼの分子量は、下村らが超遠心法により 45~59kDa (23)、Tsuji らがゲルろ過クロマトグラフィーより 68kDa (±3kDa) (24) とそれぞれ報告している。本研究では精製ルシフェラーゼについて MALDI/TOF を用いて分子量測定を行った。Fig.2-8 はその結果である。MALDI/TOF により求められた分子量は 61,935Da (±0.05%) であった。*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの正確な分子量はこの報告が最初である。クローニングされたルシフェラーゼ cDNA から計算されるルシフェラーゼ分子量は 61,693Da であり、今回の測定から求められた分子量と 300Da の相違が見られた。*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼは N 結合型糖鎖を持つ分泌タンパクであることが知られている (4)。今回ルシフェラーゼの分子量において測定値と理論値に相違が見られた理由は、分泌シグナル配列の切除、糖鎖等の修飾によるためと推測される。

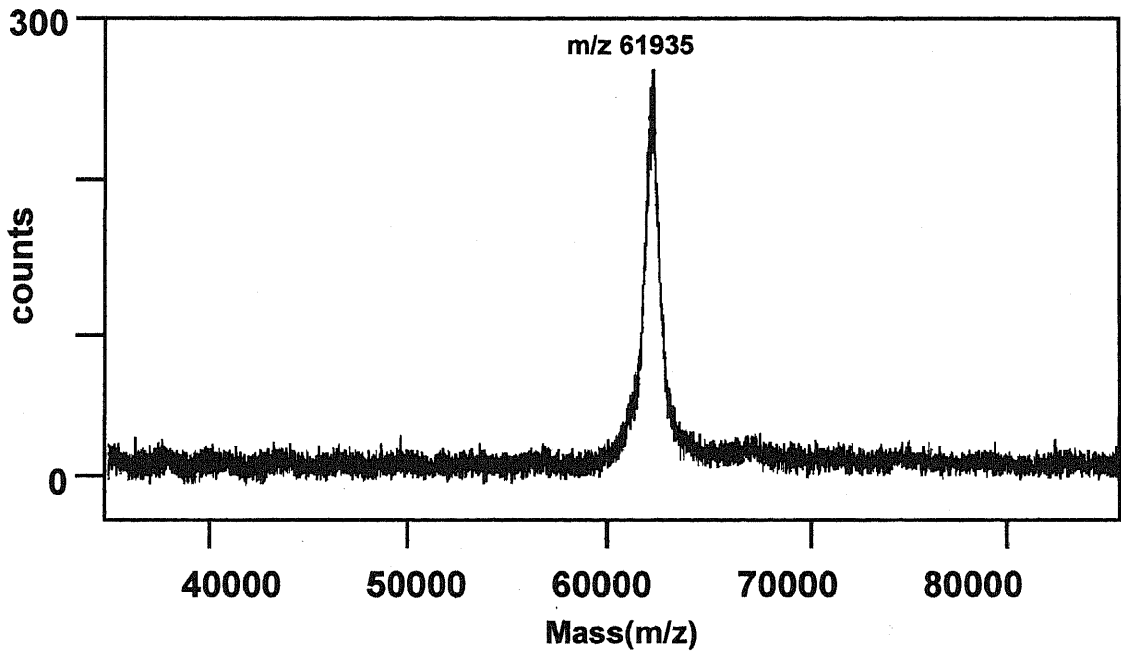


Fig. 2-8 精製 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼのマススペクトロメトリー

精製ルシフェラーゼの分子量である。分子量決定はMALDI-TOF型質量分析装置で行った。質量の校正は外部標準法によりミオグロビンとBSAの分子イオン[M+H]⁺を用いて行った。

Table 2-2 は新規精製法で精製したルシフェラーゼの特性と下村らにより精製されたルシフェラーゼの特性についての一覧である。両者における値の相違が等電点に見られた。これは精製法と等電点の決定法の相違に起因していると考えられる。本研究での精製はゲルろ過カラムで精製後、2次元電気泳動で等電点の決定を行っている。それに対し下村らはイオン交換カラムで精製を行い、等電点電気泳動で等電点を決定しているため、等電点に広がりが見られないと推測される。本研究で精製したルシフェラーゼについて2次元電気泳動を行うと、3.9~5.0と幅広くスポットが見られる。しかし、メインスポットは4.5近辺に見られ、下村らの報告に近似していた。

今回精製したルシフェラーゼは、実際に海水中に放出されたルシフェラーゼを精製したと言う点において、従来の精製ルシフェラーゼと特性の相違があることを予想した。しかし、今回の結果からは大きな相違は確認できなかった。*V.hilgendorfii*は上唇腺内に顆粒状のルシフェラーゼを貯蓄していることが過去の研究で明らかにされている(28)。貯蓄されているルシフェラーゼはタンパクとして成熟した状態で保存されており、そのためタンパク特性の相違が精製材料によって生じなかったと推察される。

Table 2-2 精製 *V. hilgendorfii* ルシフェラーゼの特性比較

今回精製したルシフェラーゼの特性解析を、下村らの報告(23)と比較した。

赤線で囲った数値は初めて報告される値である。

	Shimomura (1961)	本研究
至適温度	—	~40°C
等電点	4.35	3.9-5.0
<i>K_m</i>	0.52 × 10 ⁻⁶ (M)	0.86 × 10 ⁻⁶ (M)
<i>V_{max}</i>	—	2.99 × 10 ⁷ (counts/sec)
分子量	48.5-53 (kDa)	61.9 (kDa)
<活性半減濃度>		
Na ⁺	0.3 (M)	0.5 (M)
K ⁺	0.2 (M)	0.35 (M)
Mg ²⁺	—	0.2 (M)
Ca ²⁺	0.15 (M)	0.05 (M)

2.3.4 構造特性

V.hilgendorffii ルシフェラーゼはN結合型糖鎖を持つ分泌タンパクであることが知られている。Thompson らによるルシフェラーゼ cDNA のクローニングの結果、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼのアミノ酸一次構造が明らかにされた (4)。*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼには2箇所のN結合型糖鎖修飾部位 (Asn-Xaa-Thr/Ser) (29) が、それぞれ186-188番目: Asn-Ile-Thrと408-410番目: Asn-Thr-Serに存在し、N結合型糖鎖切断酵素処理により分子量が2~3kDa小さくなることが報告されている (4)。今回精製したルシフェラーゼについてもN結合型糖鎖切断酵素であるPNGaseF処理を行い、N結合型糖鎖の有無を確認した。Fig.2-9は酵素処理による分子量の変化を確認するためのSDS-PAGEである。この結果、わずかであるが酵素処理によって分子量が小さくなったことから、分泌された*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼもN結合型糖鎖修飾を受けていることが確認できた。本研究では、ルシフェラーゼに結合する糖鎖の構造、分子量は決定できなかった。しかし、N結合型糖鎖は共通した2つのN-アセチルグルコサミンと3つのマンノースからなる基本骨格を持っている。このことから*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼには少なくとも1kDaの糖鎖が付加されていることが推測され、MALDI/TOFで求められた分子量61.9kDaから糖鎖分を差し引くと、cDNAから算出された分子量61.3kDaとアミノ酸数個分の分子量の相違が生じる。この相違は精製されたルシフェラーゼでは分泌シグナル配列が切断され、そのため理論値よりもアミノ酸数個分分子量が小さくなっていると推察される。今回の結果では、糖鎖及び分泌シグナル配列についての議論をするために十分なデータが得られていないので、この点については今後更なる研究が必要である。

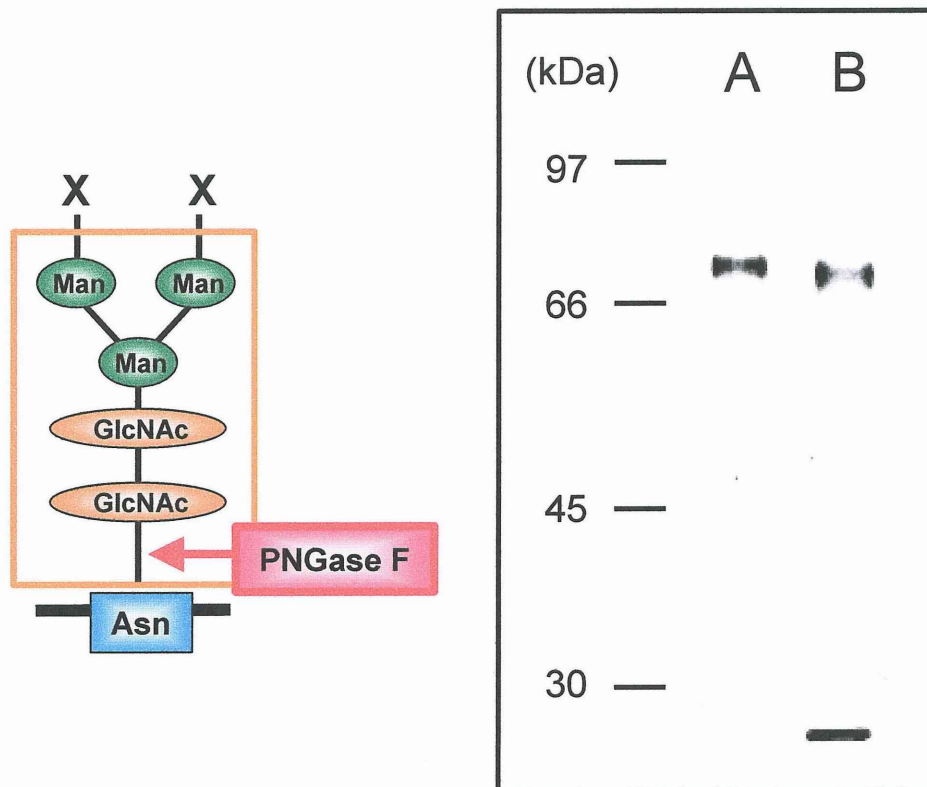


Fig. 2-9 PNGaseF の糖鎖切断個所模式図と PNGaseF 処理による精製ルシフェラーゼの分子量変動

N 結合型糖鎖は、アミノ酸配列中のアスパラギン-Xaa-セリン or トレオニンと連続した配列のアスパラギン残基に結合している (Xaa はどんなアミノ酸でも良い)。左の模式図のオレンジ円は N-アセチルグルコサミン、緑円はマンノース、水色の四角はアスパラギン残基をそれぞれ示している。X 部分は糖鎖により異なる糖が結合する。オレンジで囲った部分は N 結合型糖鎖の基本骨格を示している。PNGaseF はアスパラギン残基と糖鎖の結合部位を切断する酵素である。右の図は PNGaseF 処理を行った精製 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼの SDS-PAGE である。レーン A は PNGaseF 未処理ルシフェラーゼ、レーン B には PNGaseF 処理後のルシフェラーゼである。レーン B の低分子タンパクは PNGaseF である。

第3章 *Cypridina noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA クローニング及び糖鎖機能の解明

3.1 研究背景

V.hilgendorffii ルシフェラーゼは、cDNA がクローニングされている唯一の糖鎖結合型分泌ルシフェラーゼである。1989年に Thompson らによりクローニングされた cDNA には、アミノ酸 555 個からなる分子量 62,171 のタンパクがコードされていた (4)。このルシフェラーゼは近年細胞生物学研究における高感度分泌型モニタリングツールとして注目されている。しかしながら、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの分泌シグナル配列、活性部位、糖鎖機能などの酵素として重要な情報は不明である。本研究では、同一のウミボタル生物発光系を持つ *V.hilgendorffii* の近縁種と *V.hilgendorffii* の発光メカニズムの比較から、ウミボタル生物発光系についての新しい知見の獲得を目指した。

本研究では *V.hilgendorffii* 近縁種として *Cypridina noctiluca* (以下 *C.noctiluca*, Fig. 3-1A) を研究対象とした。*C.noctiluca* の選択理由は2点ある。1点目は *V.hilgendorffii* のルシフェリン・ルシフェラーゼ双方と交差反応することから、同一の発光メカニズムを持つことであり、2点目は、抗 *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体に陽性であることから、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼに類似したタンパクを持っていることである。Fig.3-2 は *C.noctiluca* 破砕液に対し抗 *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を用いて行ったウェスタンブローディングである。この結果は、*C.noctiluca* は *V.hilgendorffii* と同じサイズで抗体認識される非常に良く似た酵素を持っていることを示唆している。

本研究では、ウミボタルルシフェラーゼの酵素特性、活性発現等の不明点の解明を目指し、*C.noctiluca* よりルシフェラーゼ cDNA のクローニングを行い、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼとの分子構造、更に哺乳類細胞で発現したルシフェラーゼでの特性比較を行った。また、ウミボタルルシフェラーゼの糖鎖機能解明のために、N 結合型糖鎖修飾酵素処理、*C.noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子に対する遺伝子操作による脱糖を行い、ルシフェラーゼにおける脱糖の影響を確認した。

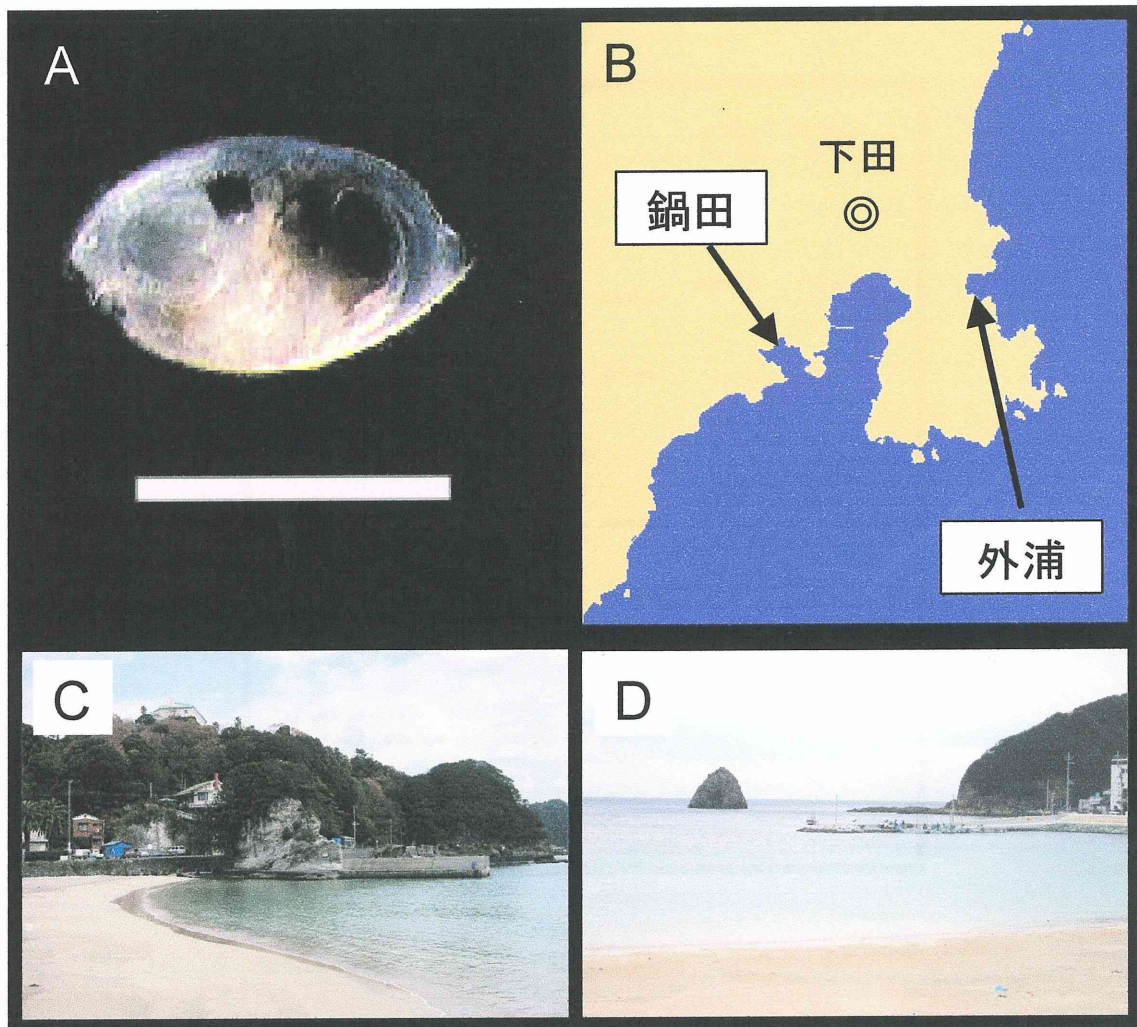


Fig. 3-1 ウミボタル *Cypridina noctiluca*、サンプリングポイント

(A) ウミボタル *Cypridina noctiluca*、スケールバーは1 mm

(B) 鍋田湾、外浦湾地図 (C) 鍋田湾、(D) 外浦湾

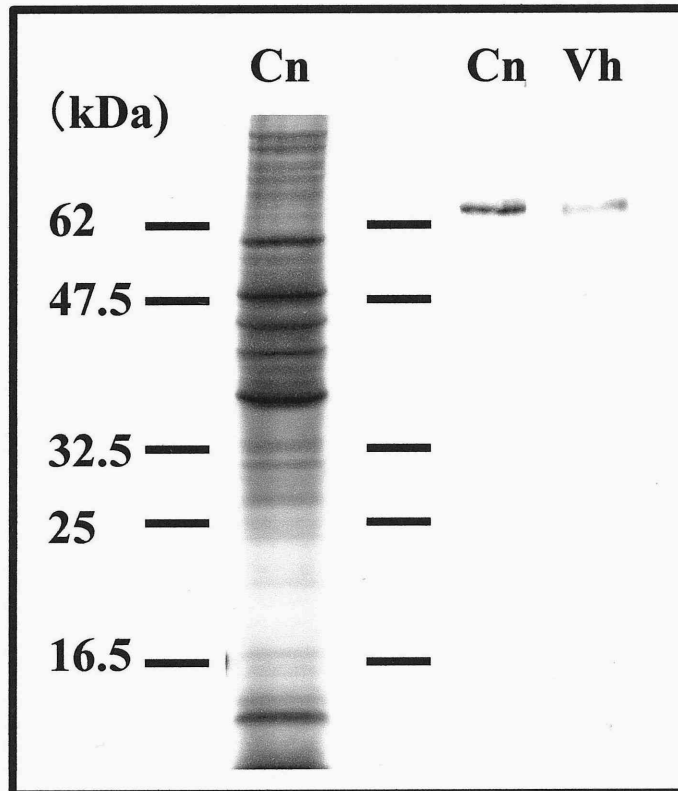


Fig. 3-2 *C. noctiluca* 破砕液の SDS-PAGE

C. noctiluca 破砕液の SDS-PAGE である。左のレーンは破砕液を泳動後、銀染色を行った。右の 2 レーンは破砕液と精製 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼを泳動し、抗 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を用いてウェスタンブロッティング (Fig. 3-3 参照) を行った。Fig. 中の Cn、Vh はそれぞれ *C. noctiluca*、*V. hilgendorffii* の略である。

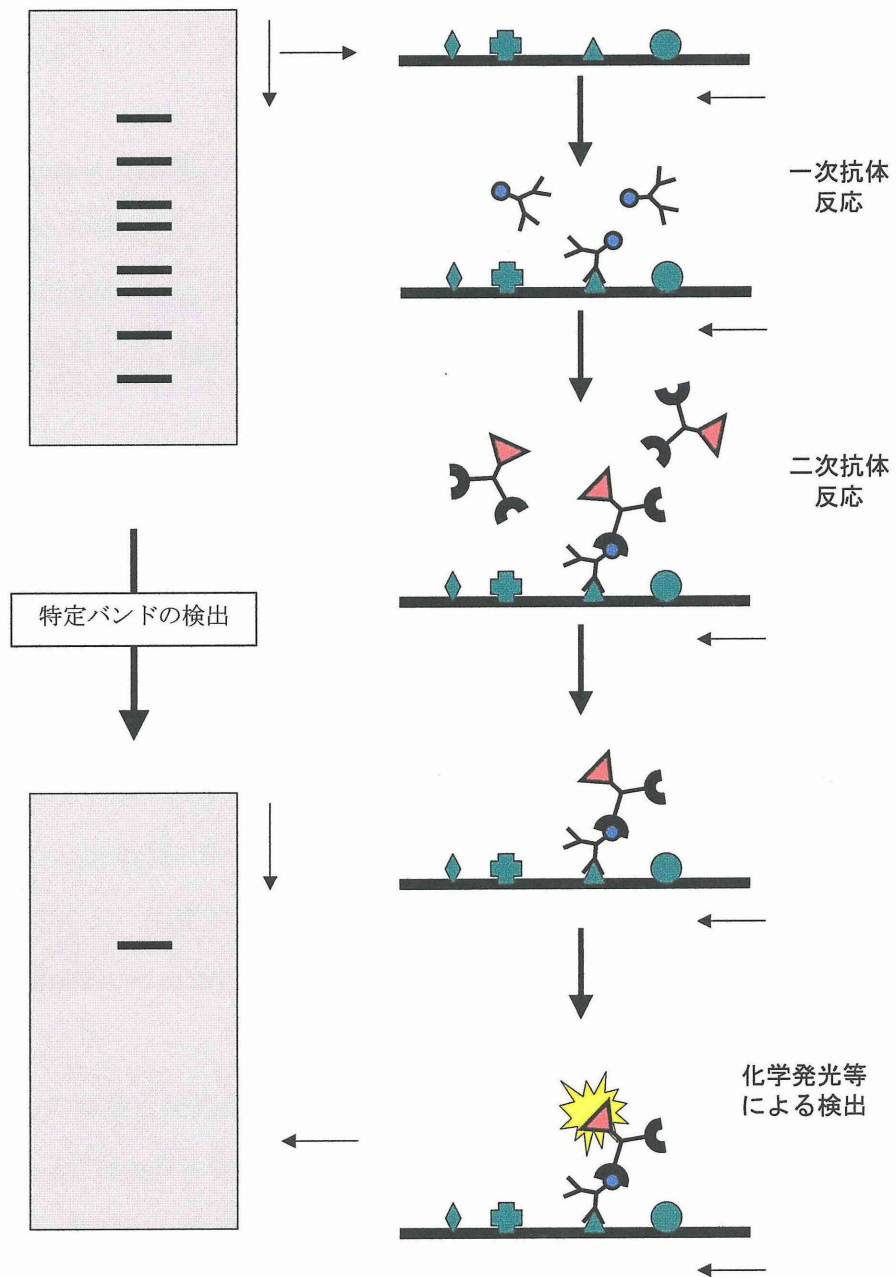


Fig. 3-3 ウェスタブロットティング模式図

ウェスタブロットティングは、SDS-PAGEにより分離された複数のタンパクに、特定タンパクの抗体を反応させ、更に一次抗体を特異的に認識する抗体を反応させ、最終的に化学発光等により複数のタンパクより特定のタンパクを検出する方法である。

3.2 実験方法

3.2.1 *C.noctiluca* の採集

C.noctiluca の採集は、2000年10月から2001年2月にかけて、伊豆半島下田市外浦湾・鍋田湾で行った (Fig. 3-1)。本種は夜間、海表面に浮遊しているためプランクトンネットで採集を行った。採集した個体は、海水を取り除いた後、液体窒素で凍結し-80°Cで保存した。

3.2.2 cDNA ライブラリーの構築

総 RNA は凍結保存した個体より ISOGEN (Nippongene 社製) を用いて抽出した。続いて Oligotex-dt30 (Takara 社製) を用い mRNA を抽出し、Time saver cDNA synthesis kit (Amersham 社製) を用いて cDNA 合成を行った。合成した cDNA は λ ZAP II ベクター (STRATAGENE 社製) に 4°C、12 時間条件下で挿入した。ライゲーション後、GigaPack III (STRATAGENE 社製) を用いて *in vitro* パッケージングを行い、大腸菌 XL1-Blue へ形質導入し、タイター価測定を行った。その結果、 2.3×10^5 pfu/ml (増幅後 2.9×10^8 pfu/ml, plaque forming unit) の cDNA ライブラリーを作成した。

3.2.3 cDNA の同定と配列決定

C.noctiluca cDNA ライブラリーのファージに感染した大腸菌を 15 cm 径 LB プレート 4 枚に広げ、37°C で一晩培養後、 8.0×10^4 プラーク分 (1 プレート 2.0×10^4 プラーク) をナイロンメンブレンに写し取り、ハイブリダイゼーション用のメンブレン処理を行った。メンブレンは変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) を染み込ませたろ紙上で 5 分間変性を行い、次に中和溶液 (1.0 M Tris, pH7.5, 1.5 M NaCl) を染み込ませたろ紙上で 5 分間中和を行った。続いて $2 \times$ SSC (0.15 M クエン酸ナトリウム、1.5 M NaCl, pH7.0) を染み込ませたろ紙上に 15 分放置し、最後に UV クロスリンクを行った (照射量 125 mJoules ; Bio-Rad GS GENE LINKER UV CHAMBER を使用)。プローブは *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼ DNA を制限酵素 *Xba* I で切断した DNA 断片を Alkphos Direct Labeling kit (Amersham 社製) を使い、アルカリフォスタファアーゼでラベリングしたものをを用い

た。ハイブリダイゼーションは 55°C、12~14 時間、Alkphos Direct ハイブリダイゼーションバッファー (Amersham 社製) 中で行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンは一次洗浄液 (2 M 尿素, 0.1% (w/v) SDS, 50 mM リン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) で 55°C、10 分間、2 回洗浄し、続けて二次洗浄液 (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) で室温、5 分間、2 回洗浄を行った。検出は CDP-star (Amersham 社製) を用いて行った。ポジティブプラークは再スクリーニングを行った。同定したポジティブプラークから ExAssist ヘルパーファージ (STRATAGENE 社製) を用い pBluescript ファージミドとしてインサート cDNA を切り出した。インサート cDNA の塩基配列決定は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems 社製) を用い ABI PRISM™ Genetic Analyser 310 で行った。完全長ルシフェラーゼ cDNA の配列決定を行うため、次の手順で PCR を行った。1st PCR では、cDNA ライブラリーをテンプレートとし、プライマー CL-1R : 5'- TTGAACTTGACGACCAGAGC -3' と M13 Reverse : 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3' を用い (1 サイクル : 94°C 2 min, 35 サイクル : 94°C 30 sec, 55°C 1 min, 72°C 1 min 30 sec, 1 サイクル 72°C 7 min) の反応サイクルで PCR を行った。2nd PCR は、1st PCR 産物を 100 倍希釈したものをテンプレートとし、プライマー CL-2R : 5'-GTAGATGGAAGTGTCTGTTCTGGG-3' と T3 : 5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3' を用いて 1st PCR と同じ反応サイクルで行った。プライマー CL-1R と CL-2R はファージスクリーニングにより得られたポジティブクローンの配列から設計した。PCR 産物は pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen 社製) へ挿入し、配列の確認を行った。

<補足説明> プラークハイブリダイゼーションについて

プラークハイブリダイゼーション法は、cDNA クローニングに用いられる一般的な方法の一つである。mRNA より合成した cDNA をファージベクターへ挿入し、タンパクの殻で包んだファージを大腸菌へ感染後、培地上に大腸菌を広げる。数時間後、大腸菌内において感染したファージは増殖し大腸菌を死滅させる (溶菌作用)。培地上で大腸菌が死滅した場所は透明な穴となり、この穴のことをプラークと呼ぶ。プラーク形成後、ナイロンメンブレン上にプラークを転写し、プラークに含まれる DNA をアルカリ処理によって 1 本鎖 DNA とする。ここへアルカリフォスタファージで標識化したプロ

プローブ DNA とメンブレン上の DNA のハイブリダイゼーションを行い、最終的には、プローブ DNA と相補的な配列を含む DNA を化学発光によりメンブレン上から検出する。

Fig. 3-4 はプラークハイブリダイゼーション法の模式図である。

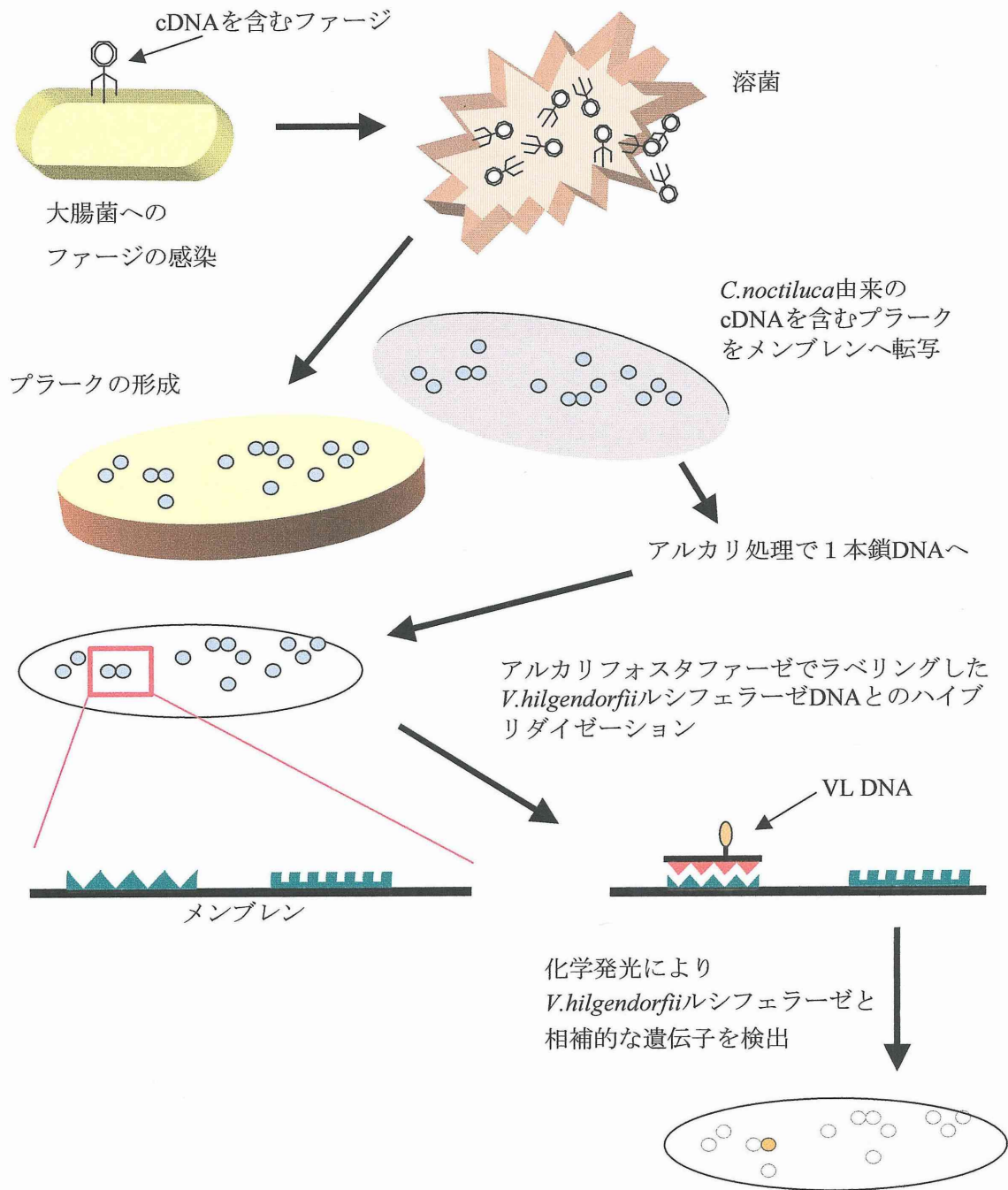


Fig. 3-4 プラークハイブリダイゼーション模式図

3.2.4 細胞培養

細胞培養は37°C、5% CO₂条件下で行った。細胞培養に用いた培地は、アフリカミドリザル腎臓由来細胞 COS-7、マウス胎児由来細胞 NIH3T3、ヒト肺腫由来細胞 A549 細胞には、10%ウシ胎児血清 (ICN Biomedicals 社製)、100 µg/mL ストレプトマイシン、50 U/mL ペニシリンを含む DMEM を用いた。ヒト子宮筋腫瘍由来細胞 Hela S3 細胞には同濃度のウシ胎児血清、ストレプトマイシン、ペニシリンを含む MEM を用いた。

3.2.5 哺乳類細胞発現系の構築

哺乳類細胞での *C.noctiluca* ルシフェラーゼ発現用コンストラクト pcDNA-CL は以下の過程で作成した。*C.noctiluca* ルシフェラーゼをコードする配列は、cDNA ライブラリーより PCR で増幅した。PCR はプライマー CL-N : 5'-ATGAAGACCTTAATTCTTG-3' と CL-C : 5'-CTATTTGCATTCATCTGGTAC-3' を用い、(1 サイクル : 94°C 3 min, 35 サイクル : 94°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min, 1 サイクル : 72°C 7 min) の反応サイクルで行った。反応産物は pCR2.1-TOPO ベクターに挿入しこのコンストラクトを pCR-CL とした。続いて制限酵素 *Bam*HI と *Not*I で切断後、ルシフェラーゼをコードしたフラグメントを pcDNA3 ベクター (Invitrogen 社製) の *Bam*HI、*Not*I サイトへ挿入し pcDNA-CL を作成した (Fig. 3-3)。

タンパク発現の確認には NIH3T3、Hela S3、A549、COS-7 の各細胞を用いた。分泌効率測定には、NIH3T3、Hela S3 を用いた。細胞は 24 ウェルプレートの 1 ウェルにつき 4.0×10^4 個をまき、80%コンフルエント時に Lipofectamin PLUS (Invitrogen 社製) を用いて 0.4 µg の pcDNA-CL を導入した。遺伝子導入から 2 時間後、PBS で 2 回細胞洗浄を行い、2 mL の無血清 DMEM (SIGMA 社製) を加え培養を行った。37 時間後に培地を回収し、細胞は PBS で洗浄を 2 回行い、250 µL の PBS を加え、Ultrasonic homogenizer VP-5S (TAITEC 社製) で 30 秒間超音波破碎した。破碎液は 15,000 rpm、5 分間遠心後、上清を回収した。活性測定は培地、細胞破碎上清 50 µL に対し、50 nM ルシフェリン 50 µL を加え 20 秒間の積算発光量を測定した。

遺伝子導入後のルシフェラーゼ発現の確認は A549 細胞を用いて行った。A549 細

胞は 24 ウェルプレートの 1 ウェルにつき 2.0×10^4 個をまき、80%コンフレント時に Lipofectamin PLUS (Invitrogen 社製) を用いて 0.4 μg の pcDNA-CL を遺伝子導入した。遺伝子導入から 2 時間後、PBS で 2 回細胞洗浄を行い、1 mL の Opti-MEM[®] (GIBCO 社製) を加え培養を行った。培地交換から 3, 6, 9, 18, 28 時間後に 10 μL の培地を回収し、代わりに 10 μL の Opti-MEM[®] を加えた。回収した培地を Opti-MEM[®] で 50 μL にメスアップし、50 nM のルシフェリン溶液 50 μL を加え、20 秒間の積算発光量を測定した。発光量測定は、ルミネッセンサー-PSN AB-2200 ルミノメーター (ATTO 社製) を用いて行った。

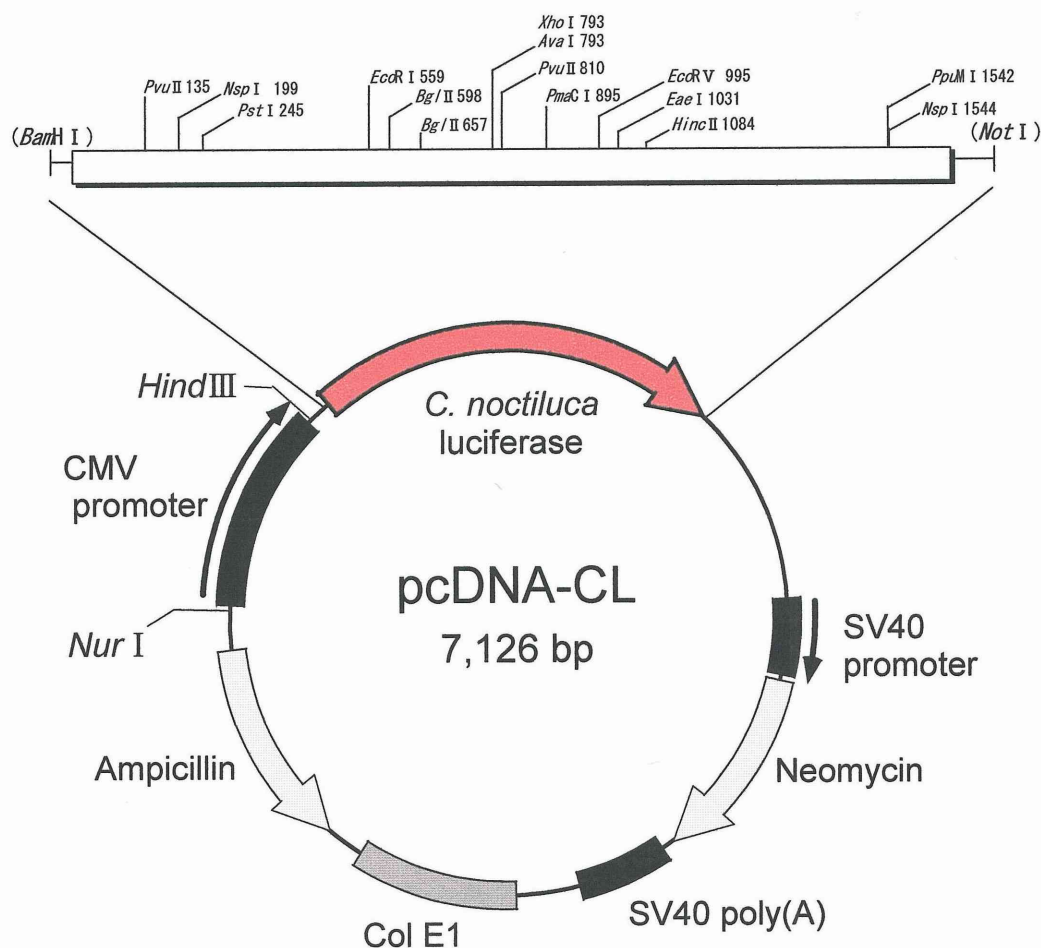


Fig. 3-5 pcDNA-CL プラスミドマップ

哺乳類細胞での *C. noctiluca* ルシフェラーゼ発現用に作成したコンストラクトである。プラスミドの上部に示したマップは、*C. noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA の制限酵素マップである。

3.2.6 ウェスタンブロッティング解析

SDS-PAGE は 12.5 % の分離ゲルを用い、Laemmli の方法 (25) で行った。細胞培地は Microcon YM-10 (Millipore 社製) で濃縮後、0.4% SDS, 2% グリセロール, 20 mM DTT, 0.02% プロモフェノールブルーを含む 10 mM Tris-HCl, pH 6.8 で調整し、100°C、5 分間変性後、泳動を行った。分子量マーカにはプレステインマーカ (6~175 kDa) (New England Biolabs.社製) を用いた。泳動終了後、タンパクを Towbin らの方法 (30) に従い、セミドライタイププロット装置 (Bio-Rad 社製) を用い、ニトロセルロースメンブレンへブロッティングした。メンブレンのブロッキングには 5% (w/v) スキムミルクを含む TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.05% Tween-20) で室温 1 時間行った。一次抗体反応は、1% (w/v) ゼラチンを含む TTBS で 50 倍に希釈した抗 *V.hilgendorfi* ルシフェラーゼ IgG を用い (20)、室温 2 時間行った。続いて二次抗体反応は抗ウサギ IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratory 社製) を 5,000 倍に希釈したものを用い室温 1 時間行った。検出は ECLTM (Amersham 社製) で行った。

3.2.7 発光スペクトル測定

発光スペクトル測定は、スペクトロフォトメーター AB1850 (ATTO 社製) を用いて行った。測定には *C.noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子を導入した COS-7 細胞を培養した培地 1 μ L に対し、500 nM ルシフェリン溶液 20 μ L を加え、20 秒間の積算放出光を測定した。

3.2.8 熱安定性測定

測定に使用したサンプルは次の過程で行った培地を用いた。COS-7 細胞、80% コンフレント時に Lipofectamin PLUS (Invitrogen) を用いて pcDNA-CL 0.4 μ g を導入し、遺伝子導入 2 時間後に、細胞を PBS で二度洗浄し、培地を Dulbecco's Modified Eagle Medium 2 mL に取り換えた。培地交換後、19 時間培養後の培地を取り出し 50 mM MOPS pH 7.0 で 100 倍に希釈した。サンプルは 0-60°C の各温度で 30 分間インキュベーション後、5 分間氷上に置き、その後、1.16nM ルシフェリン 100 μ l を加え、20 秒間の積算発光活性

量を測定した。測定は ATTO 社のルミネッセンサー-PSN AB-2200 ルミノメーターで行った。

3.2.9 K_m 値測定

K_m 、 V_{max} のそれぞれの値を測定するために、ルシフェラーゼ溶液 50 μL に対し、0.01—0.1 μM のルシフェリン 50 μL を加え、25°Cでの 20 秒間の活性を測定した。測定は 3 回行った。 K_m 及び V_{max} は Lineweaver-Burk 法により算出した。

3.2.10 活性阻害剤

COS-7 細胞に pcDNA-CL を導入後、DMEM で培養を行い、培養 19 時間後の培地を回収し、これを *C.noctiluca* ルシフェラーゼの測定サンプルとして実験に用いた。細胞培地は 50 mM Tris-HCl, pH7.5 で希釈した。加えた阻害剤の最終濃度は DTT (0~50mM)、金属イオン (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} の塩化物 0-1 M)、EDTA (0~1 mM)、クエン酸ナトリウム (0~50 mM) である。阻害剤添加後、室温で 5 分間放置し活性を測定した。活性測定はルシフェラーゼ溶液 50 μL に対し、50 nM ルシフェリン 50 μL を加え 20 秒間の発光量を測定した。

3.2.11 糖鎖切断

C.noctiluca ルシフェラーゼを含む細胞培地 20 μL に対し、25U の N-glycosidase F (PNGase F : New England Biolabs.社製) を加え、37°Cで 29、53 時間インキュベート後の活性を測定した。

3.2.12 脱糖ルシフェラーゼ変異体作成

変異体作成のための塩基配列置換は、Stratagene mutagenesis kit (STRATAGENE) を用いて行った。*C.noctiluca* ルシフェラーゼを含むプラスミド (pcDNA-CL) に対し、*pfu turbo* ポリメラーゼと塩基置換設計をした相補的プライマーを使い、(1 サイクル 95°C, 1min; 12 サイクル 95°C, 1min; 55°C, 1 min; 68°C, 17min) の反応サイクルで増幅を行った。変異体 pcDNA-CL N182D と pcDNA-CL N404D の作成には、5'-GAGATGCCAGGCTTC

GACATCACCGTCATAG-3' : (CL N182D)、5'-CGTACAGCTCTCAGGACACTTCCATCTA CTGGC-3' : (CL N404D) をそれぞれ用いた。変異体 N182&404D は pcDNA-CL N182D に対して CL N404D プライマーを用いて作成した。増幅後、制限酵素 *Dpn* I でテンプレートとしたプラスミドを切断し、直接、大腸菌への形質転換を行った。塩基置換はシーケンシングで確認を行った。

変異体の発現確認には哺乳類細胞 NIH3T3 を用いた。NIH3T3 細胞を 24 ウェルプレート 1 ウェルにつき 4.0×10^4 個まき、80%コンフルエント時に 0.4 μ g のプラスミドを導入した。遺伝子導入 2 時間後に DMEM 2 mL に培地交換を行い、37 時間後に培地の回収を行った。一方、細胞は 250 μ L の PBS を加え、Ultrasonic homogenizer VP-5S (TAITEC 社製) で 30 秒間超音波破碎を行い、15,000 rpm、5 分間遠心後、上清を回収した。活性測定は培地、細胞破碎上清 50 μ L に対し、50 nM ルシフェリン 50 μ L を加え 20 秒間の積算発光量を測定した。

<補足説明> 塩基配列置換による変異体作成について

アミノ酸は 3 つの塩基の並びによって決定される。今回の実験では、意図的に塩基配列を変えたプライマーを作成し、DNA ポリメラーゼを用いて塩基が置換されたコンストラクトを作成した。Fig. 3-6 は変異体作成の模式図である。

3.2.13 シグナル配列切除

ルシフェラーゼ N 末端 10, 20, 28, 40, 51 アミノ酸残基を除き、末端にメチオニン残基を付加した変異体を作成した。変異体の作成は PCR で行った。反応サイクルは (1 サイクル : 94°C 3 min, 30 サイクル : 94°C 30 sec, 42°C 1 min, 72°C 1 min 30 sec, 1 サイクル : 72°C 7 min) で行った。PCR 産物を pGEM ベクターへ挿入し、インサート部分は制限酵素 *Hind*III と *Bam*H I で切断後、pcDNA3 ベクターの *Hind*III, *Bam*H I サイトへ挿入された。変異体作成に使用したプライマーは、リバープライマーに 5'-GGA TCCCTATTTGCATTCATCTGGTAC-3' (CL-C *Bam*H I) を使用し、フォワードプライマーは、5'-AAGCTTATGTACTGCGCCACTG-3' (CL-11)、5'-AAGCTTATGTGTCCTTACG AAC-3' (CL-20)、5'-AAGCTTATGACAGTTCCA ACTTCC-3' (CL-29)、

5'-AAGCTTATGGAATGTATTGATAGC-3' (CL-41)、5'-AAGCTTATGAGAGACATACT
ATC-3' (CL-52) をそれぞれ使用した。Fig. 3-7 (A) は作成した変異体の模式図である。

3.2.14 C 末端配列切除

C 末端切除変異体は塩基置換により作成した。変異体は CL-half1 (270 番目グリシン GGT→終止 TAA) , CL-half2 (317 番目プロリン CCC→終止 TAA) , CL-half3 (497 番目セリン AGT→終止 TAA) の 3 つを作成した。シグナル配列切除変異体作成手順と同様の方法で、C 末端切除変異体の作成を行った。プライマーは、フォワードプライマーは 5'-AAGCTTATGAAGACCTTAATTCTTGC-3' (Cn-N *Hind*III)、リバープライマーは、5'-GGATCCTTATTTGCAGTATGCAACGTC-3' (Cn half1)、5'-GGATCCTTAAGCAGC GCACGTCTCCCT-3' (Cn half2)、5'-GGATCCTTAATTGCAGAGTCGTTTCAGC-3' (Cn half3) をそれぞれ使用した。Fig. 3-7 (B) は作成した変異体の模式図である。

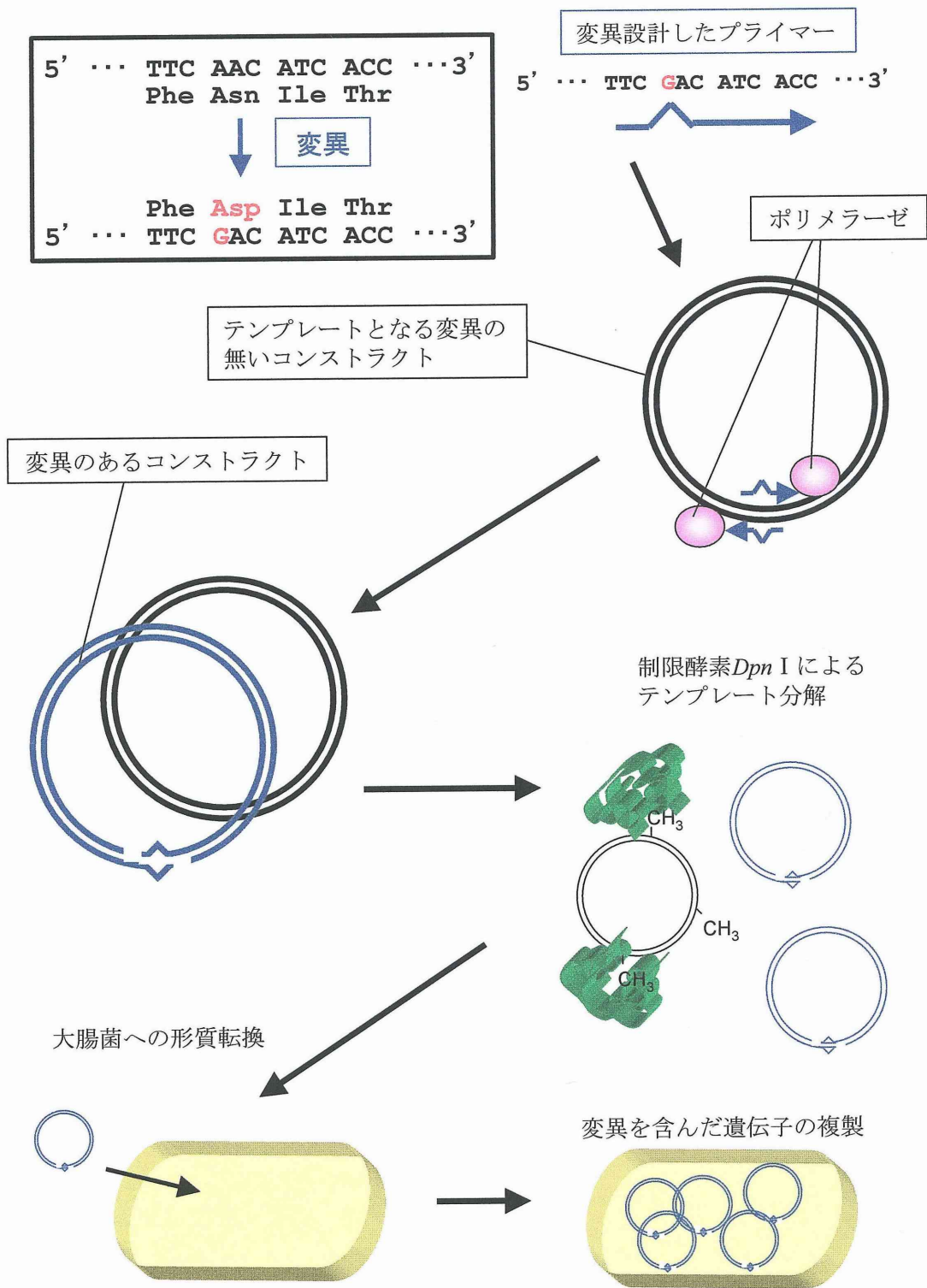
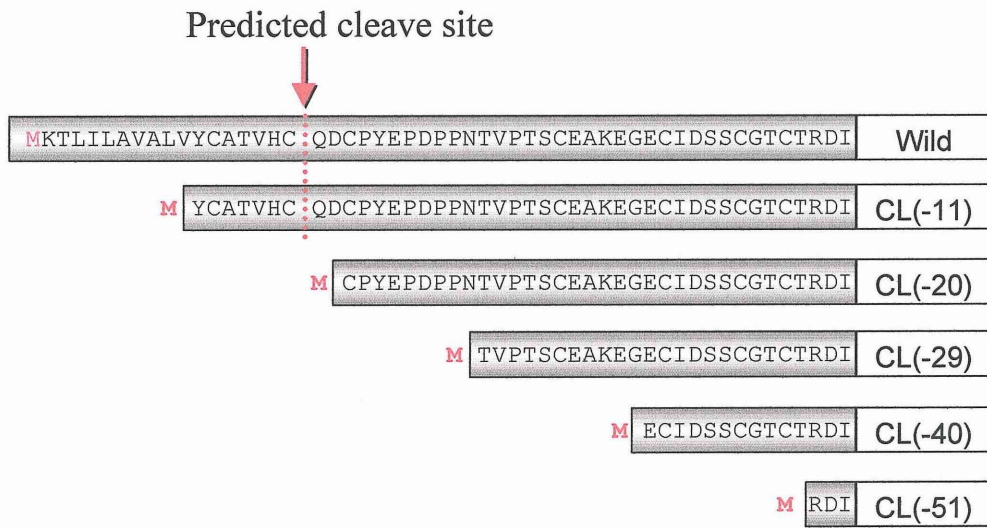


Fig. 3-6 変異体作成模式図

A



B

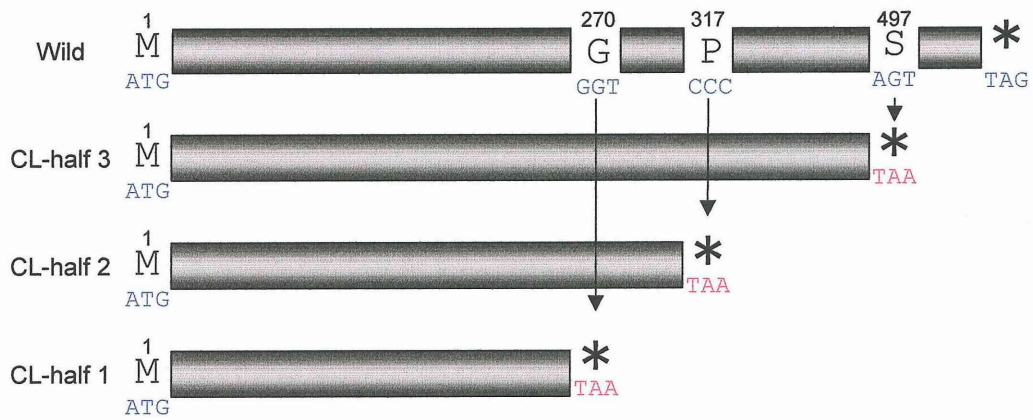


Fig. 3-7 變異體模式圖

(A) N 末端切除體 (B) C 末端切除體

3.3 結果及び考察

3.3.1 *C.noctiluca* の生態

C.noctiluca は浮遊性ウミボタルである。体長は1 mm 程で食性、生活史等を含め生態は不明である。分布域は広く、三浦半島三崎、伊豆半島下田、紀伊半島白浜、八丈島(31) で生息が確認されている。生息数は *V.hilgendorfii* に比べるとかなり少なく、伊豆半島では1日の採集で100匹前後しか採集できなかった。しかし、太平洋側から湾内に南風が吹き込んでいた1月末から2月にかけての1週間では1日の採集で数百匹が採集でき、同種の生息域は風向き、潮汐などの気象条件により大きく左右されることが推測される。本報告では約5ヶ月間の採集で約4g(湿重量)の生個体を採集した。

3.3.2 *C.noctiluca* ルシフェラーゼの塩基配列及びアミノ酸配列

V.hilgendorfii ルシフェラーゼ DNA をプローブに用いたブラクハイブリダイゼーションにより6つの *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ DNA と相同性のあるクローンを検出した。これらのクローンはいずれも *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ DNA と約80%の相同性を持っていた。これらのクローンについてコードされているアミノ酸を解析したところ、約180アミノ酸がコードされていた。しかし、予想される *C.noctiluca* ルシフェラーゼはアミノ酸約550個であり、クローニングされたcDNAは部分配列と考えられた。また、このクローンには翻訳終止コドンはあるものの開始コドンが無いことから、ルシフェラーゼの3'末端側をコードするクローンであると判断した。残りの5'末端側はクローニングされた3'末端側cDNAの配列をもとに設計したプライマーと、ベクターDNA用のプライマーによりPCRでクローニングした。その結果、クローニングされた完全長 *C.noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA は1,815 bp から成っていた。Fig.3-8は *C.noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA の全塩基配列及び塩基配列から予想されるアミノ酸配列である。*C.noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA 中には553個のアミノ酸をコードする1,659 bp の翻訳領域が1つ含まれていた。アミノ酸配列から計算される分子量は61,415であった。プローブとして用いた *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ DNA との塩基配列の相同性は79.2%であった。*C.noctiluca* ルシフェラーゼは *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ同様非常に多くの

システイン残基を多く含んでおり、553 アミノ酸残基中 34 個がシステイン残基であった (Fig. 3-8 赤字黒枠)。またアミノ酸一次配列の 182-184 番目 (Asn-Ile-Thr) と 404-408 番目 (Asn-Ser-Thr) には N 結合型糖鎖修飾部位 (Asn-Xaa-Thr/Ser) (29) があり (Fig. 3-8 緑枠)、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼ同様、N 結合型糖タンパクであると予想される。*C.noctiluca* ルシフェラーゼの N 末端部は、2 番目に塩基性アミノ酸残基であるリシンがあり、4 番目のロイシンから 12 番目のトリプトファンまでは疎水性アミノ酸残基が連続しており、分泌シグナル配列の特徴 (32) が見られた。ヒトをはじめとした真核生物や原核動物の分泌タンパクのデータベースより、分泌シグナル配列を検索するサービスの SignalP (33) で、*C.noctiluca* ルシフェラーゼの分泌シグナル配列を検索したところ、アミノ酸残基 1~18 番目までが分泌シグナル配列と予想された (Fig. 3-8 下線部)。Fig.3-9 は *C.noctiluca*、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの cDNA から予想されるアミノ酸配列である。黄色で囲った部分は両ルシフェラーゼで同一のアミノ酸である。両ルシフェラーゼのアミノ酸配列相同性は高く 83.1%であった。興味深いことに、システイン残基 (Fig.3-9 赤字) の位置は両ルシフェラーゼにおいて完全に一致していた。*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼは全てのシステイン残基がジスルフィド結合を形成している (34)。このことから、*C.noctiluca* ルシフェラーゼでも同様にジスルフィド結合を形成され、両ルシフェラーゼは同じ立体構造を形成していると予想される。また N 結合型糖鎖修飾部位 (Fig.3-9 緑枠) も両ルシフェラーゼ間で完全に一致することから、ルシフェラーゼに対する糖鎖機能も同じと予想される。

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
atc cat aca aac caa tcc acc ATG AAG ACC TTA ATT CTT GCC GTT GCA TTA GTC TAC TGC GCC ACT GTT CAT TGC CAG GAC TGT OCT TAC GAA CCT GAT CCA CCA AAC ACA GTT CCA ACT
1      5      10      15      20      25      30
Met Lys Thr Leu Ile Leu Ala Val Ala Leu Val Tyr Cys Ala Thr Val His Cys Gln Asp Cys Pro Tyr Glu Pro Asp Pro Pro Asn Thr Val Pro Thr
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
TCC TGT GAA GCT AAA GAA GGA GAA TGT ATT GAT AGC AGC TGC GCC ACC TGC ACG AGA GAG ATA CTA TCA GAT GGA CTG TOT GAA AAT AAA CCA GGA AAA ACA TGT TGC AGA ATG TGT CAG
Ser Cys Glu Ala Lys Glu Gly Glu Cys Ile Asp Ser Ser Cys Gly Thr Cys Thr Arg Asp Ile Leu Ser Asp Gly Leu Cys Glu Asn Lys Pro Gly Lys Thr Cys Cys Arg Met Cys Gln
35     40     45     50     55     60     65     70
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
TAT GTA ATT GAA TGC AGA GTA GAG GCT GCA GGA TGG TTT AGA ACA TTC TAT GGA AAG AGA TTC CAG TTC CAG GAA CCT GGT ACA TAC GTG TTG GGT CAA GGA ACC AAG GGC GGC GAC TGG
Tyr Val Ile Glu Cys Arg Val Glu Ala Ala Gly Trp Phe Arg Thr Phe Tyr Gly Lys Arg Phe Gln Phe Gln Glu Pro Gly Thr Tyr Val Leu Glu Gln Gly Thr Lys Gly Asp Arg Met Cys Trp
75     80     85     90     95
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
AAG GTG TCC ATC ACC CTG GAG AAT CTG GAT GGA ACC AAA GGA GCT GTG CTG ACC AAG ACA AGA CTG GAA GTG GCT GGA GAC ATC ATT GAC ATC GCT CAA GCT ACT GAG AAT CCC ATC ACT
Lys Val Ser Ile Thr Leu Glu Asn Leu Asp Gly Thr Lys Gly Ala Val Leu Thr Lys Thr Arg Leu Glu Val Ala Gly Asp Ile Ile Asp Ile Ala Gln Ala Thr Glu Asn Pro Ile Thr
115     120     125     130     135     140     145     150
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
GTG AAG GGT GGA GCT GAC CCT ATC ATC GGC AAG CCG TAC ACC ATC GGC GAG GTC ACC ATC GGT GTT GGT GAG ATG CCA GGC TTC AAC ATC ACC GTC ATT GAA TTC TCA AGA CTG ATC GTG
Val Asn Gly Gly Ala Asp Pro Ile Ile Ala Asn Pro Tyr Thr Ile Gly Glu Val Thr Ile Ala Val Glu MET Pro Gly Phe Asn Ile Thr Val Ile Glu Phe Phe Lys Leu Ile Val
155     160     165     170     175     180     185
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
ATC GAC ATC CTC GGA GGA AGA TCT GTA AGA ATC GCC CCA GAC ACA GCA AAC AAA GGA ATG ATC TCT GCC CTC TGT GGA GAT CTT AAA ATG ATG GAA AGC ACA GAC TTC ACT TCA GAT CCA
Ile Asp Ile Leu Gly Gly Arg Ser Val Arg Ile Ala Pro Asp Thr Ala Asn Lys Gly MET Ile Ser Gly Leu Cys Gly Asp Leu Lys MET MET Glu Asp Thr Asp Phe Thr Ser Asp Pro
195     200     205     210     215     220     225     230
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
GAA CAA CTC GCT ATT CAG CCT AAG ATC AAC CAG GAG TTT GAC GGT TGT CCA CTC TAT GGA AAT CCT GAT GAC GTT GCA TAC TGC AAA GGT CTT CTC GAG CCA TAC AAG GAC AGC TGC GGC
Glu Gln Leu Ala Ile Gln Pro Lys Ile Asn Gln Glu Phe Asp Gly Cys Pro Leu Tyr Gly Asn Pro Asp Asp Val Ala Tyr Cys Lys Gly Leu Leu Glu Pro Tyr Lys Asp Ser Cys Arg
235     240     245     250     255     260     265     270
850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
AAG CCC ATC AAC TTC TAC TAC ACC ATC TCC TGC GCC TTC GCT GCG TGT ATG GGT GGA GAG CCA GGC TCA CAC GTC CTA CTG GAC TAC AGG GAG TGC GCT GCT CCC GAA ACT
Asn Pro Ile Asn Phe Tyr Tyr Thr Thr Ile Ser Cys Ala Phe Ala Arg Cys MET Gly Gly Asp Glu Arg Ala Ser His Val Leu Leu Asp Tyr Arg Glu Thr Cys Ala Ala Pro Glu Thr
275     280     285     290     295     300     305     310
970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
AGA GGA ACC TGC GTT TTG TCT GCA CAT ACT TTC TAC GAT ACA TTT GAC AAA GCA AGA TAT CAA TTC CAG GGT CCC TGC AAG GAG ATT CTT ATG GCC GCC GAC Cys Thr TGT TTC TGG AAC ACT TGG
Arg Gly Thr Cys Val Leu Ser Gly His Thr Phe Tyr Asp Thr Phe Asp Lys Ala Arg Tyr Gln Phe Gln Gly Pro Cys Lys Glu Ile Leu MET Ile Ala Ala Asp Cys Phe Thr Asn Thr Trp
315     320     325     330     335     340     345
1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GAT GTG AAG GTT TCA CAC AGG AAT GTT GAC TCT TAC ACT GAA GTA GAG AAA GTA CGA ATC AGG AAA CAA TCG ACT GTA GTA GAA CTC ATT GTT GAT GGA AAA CAG ATT CTG GTT GGA GGA
Asp Val Lys Val Ser His Arg Asn Val Asp Ser Tyr Thr Thr Glu Val Glu Lys Val Arg Ile Arg Lys Gln Ser Thr Val Val Glu Leu Ile Val Asp Gly Lys Gln Ile Leu Val Gly Gly
355     360     365     370     375     380     385     390
1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320
GAA GCC GTG TCC ATC CCG TAC AGC TCC CAG AAC ACT TCC ATC TAC TGG CAA GAT GGC GAC ATA CTG ACT ACA GCC ATC CTA CCT GAA GCT CTG GTC GTC AAG TTC AAC TTC AAG CAA CTG
Glu Ala Val Ser Ile Pro Tyr Ser Ser Gln Asn Thr Ser Ile Tyr Trp Gln Asp Gly Asp Ile Leu Thr Thr Ala Ile Leu Pro Glu Ala Leu Val Val Lys Phe Asn Phe Lys Gln Leu
395     400     405     410     415     420     425     430
1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440
CTC GTA GTT CAT ATT AGA GAT CCA TTC GAT GGT AAG ACT TGC GGT ATT TCC GGT AAC TAC AAC CAG GAC TTC AGT GAT GAT TCT TTT GAT GCT GAA GGA GCC TGT GAT CTG ACC CCC AAC
Leu Val Val His Ile Arg Asp Pro Phe Asp Gly Lys Thr Cys Gly Ile Cys Gly Asn Tyr Asn Gln Asp Phe Ser Asp Asp Ser Phe Asp Ala Glu Gly Ala Cys Asp Leu Thr Pro Asn
435     440     445     450     455     460     465     470
1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550    1560
CCA CCG GGA TGC ACC GAA GAA CAA OCT GAA GCC GAA GGA CTC TGC AAT AGT CTT TTT GCC GGT CAA AGT GAT CTC GAT CAG AAA TGC AAC GTG TGC CAC AAG CCT GAC CGT GTC GFA
Pro Pro Gly Cys Thr Glu Glu Gln Lys Pro Glu Ala Glu Arg Leu Cys Asn Ser Leu Phe Ala Gly Gln Ser Asp Leu Asp Gln Lys Cys Asn Val Cys His Lys Pro Asp Arg Val Glu
475     480     485     490     495     500     505     510
1570    1580    1590    1600    1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680
CGA TGC ATG TAC GAG TAT TGC CTG AGG GGA CAA CAA GGT TTC TGT GAC CAC GCA TGG GAG TTC AAG AAA GAA TGC TAC ATA AAG CAT GGT GAC ACC CTA GAA GTA CCA GAT GAA TGC AAA
Arg Cys MET Tyr Glu Tyr Cys Leu Arg Gly Gln Gln Gly Phe Cys Asp His Ala Trp Glu Phe Lys Lys Glu Cys Tyr Ile Lys His Gly Asp Thr Leu Glu Val Pro Asp Glu Cys Lys
515     520     525     530     535     540     545     550
1690    1700    1710    1720    1730    1740    1750    1760    1770    1780    1790    1800
TAG agt cat aaa gat ttt caa ttg gaa aca aga atg ggg gaa aag cac aca gct att gta ttt gaa aat tag act tca gtt tat att tat agc taa tga att cta ata aaa tta tat gca
***
1810
gca tta aaa aaa aaa

```

Fig. 3-8 *C. noctiluca* ルシフェラーゼ cDNA 配列及びアミノ酸配列

C. noctiluca ルシフェラーゼ cDNA の全 1,815 bp の塩基配列である。下段の青字は、塩基配列から予想されるアミノ酸残基である。赤字黒枠はシステイン残基を、緑枠は N 結合型糖鎖修飾部位である。下線部は、分泌シグナル配列予想サービス SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) により予想される分泌シグナル配列である。黒数字は塩基数、青数字はアミノ酸残基数である。

C. noctiluca 1 MKTLLILAVAVLVYCATVHCQD-CFYEPPDPP---NTVPPTSC^YEAKEGE^YCIDSS^YCGTCT 51
V. hilgendorffii 1 MKIILSVILAYCVITDNCQDACEVEAEPPSSSTPTVPPTSC^YEAKEGE^YCIDTRCATCK 55

52 RDILSDGLCENKPGKTC^YCRM^YCQYVIE^YCRVEAAGW^YFRTFYGKRF^YFOE^YPGTYVL^YGQ^YGTKGGDW^YKVSI^YT 118
 56 RDILSDGLCENKPGKTC^YCRM^YCQYVIE^YCRVEAAGW^YFRTFYGKRF^YFOE^YPGKYVL^YARGTKGGDWSV^YTLT 122

119 IENLDG^YTKGAVLTK^YTRLEVAGD^YIIDIAQAT^YENPITVNGGADP^YI^YANP^YY^YTIGEV^YTI^YAVVE^YMPGF^YN^YITV 185
 123 MENLDG^YTKGAVLTK^YTRLEVAGD^YVIDITQAT^YADPITVNGGADP^YI^YANP^YFTIGEV^YTI^YAVVE^YMPGF^YN^YITV 189

186 I^YEFFK^YLIV^YIDILGGRSVRIAPDTANK^YGMTISGL^YCG^YDLK^YMMEDT^YDFTSD^YPEQLAIQPK^YINQ^YEFDG^YCP^YLY 252
 190 I^YEFFK^YLIV^YIDILGGRSVRIAPDTANK^YGLISGL^YCG^YNLEMNDAD^YDFTID^YADQLAIQPN^YINKEFDG^YCP^YLY 256

253 GNP^YDDVAY^YCKGL^YLEPY^YKDS^YCRNP^YINFY^YY^YTS^YCAFAR^YCMGG^YDERASHVLLDY^YRET^YCAAPETRGT^YCVL 319
 257 GNP^YSDIEY^YCKGL^YMEPY^YRAV^YCRNN^YINFY^YY^YTS^YCAFAY^YCMGG^YDERAK^YHVLFDY^YRET^YCAAPETRGT^YCVL 323

320 SGHTFYD^YTFDKARYQ^YFQGP^YCKEILMAAD^YCFWNTWDVKVSHRN^YVD^YSYTEVEK^YVR^YIRKQSTVVE^YLIVDG 386
 324 SGHTFYD^YTFDKARYQ^YFQGP^YCKEILMAAD^YCYWN^YTWDVKVSHR^YDV^YESYTEVEK^YVT^YIRKQSTVVD^YLIVDG 390

387 KQ^YILVGG^YEAVSV^YPYSS^YQNT^YSIYWQDGDIL^YTTAILPEALVVKFNFKQLLVVHIRDPFD^YGKT^YCGIC^YGN^YY 453
 391 KQ^YVK^YVGG^YVDVSI^YPYSS^YQNT^YSIYWQDGDIL^YTTAILPEALVVKFNFKQLLVVHIRDPFD^YAKT^YCGIC^YGN^YY 457

452 NQD^YFS^YDD^YSFDAEGAC^YDLTPNPPG^YC^YTTEE^YQKPEAERL^YCNS^YLFAGQSD^YLD^YQK^YCNV^YCHKPDR^YVER^YCMYE^YYC 520
 456 NQD^YST^YDD^YFDAEGAC^YALTPNPPG^YC^YTTEE^YQKPEAERL^YCNN^YLF--DS^YSID^YEK^YCNV^YCHKPDR^YIAR^YCMYE^YYC 522

521 LRGQQGF^YCDHAW^YE^YFKKE^YCYIKHGD^YTLEVP^YDE^YCK 553
 523 LRGQQGF^YCDHAW^YE^YFKKE^YCYIKHGD^YTLEVP^YPE^YCQ 555

Fig. 3-9 *C. noctiluca* 及び *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼのアミノ酸配列

C. noctiluca 及び *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ cDNA より予想されるアミノ酸配列である。上段は *C. noctiluca*、下段は *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼのアミノ酸配列である。*V. hilgendorffii* ルシフェラーゼの配列は Accession No. CAC93772 の塩基配列より予想した。黄色枠は両ルシフェラーゼで共通のアミノ酸残基である。配列中の赤字はシステイン残基、緑枠は N 結合型糖鎖修飾部位である。両端の数字は、配列末端のアミノ酸番号である。

3.3.3 *C.noctiluca* ルシフェラーゼの哺乳類細胞での発現

V.hilgendorffii ルシフェラーゼは分泌特性を持ち、発現したルシフェラーゼは細胞外へ分泌される (34)。*C.noctiluca* ルシフェラーゼの哺乳類細胞での発現及び分泌特性を確認するため、ヒト肺腫瘍由来 A549 細胞に *C.noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、遺伝子導入からの経過時間と細胞培地中のルシフェラーゼ活性測定を行った。Fig.3-10 はその結果である。この実験では遺伝子導入 2 時間後の測定でルシフェラーゼ活性が培地中に確認された。その後時間経過と共に細胞培地中のルシフェラーゼ活性は増加していた。この結果は、細胞内で発現した *C.noctiluca* ルシフェラーゼがコンスタントに細胞外へ分泌されることを示しており、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼ同様分泌特性を持つことを示唆している。

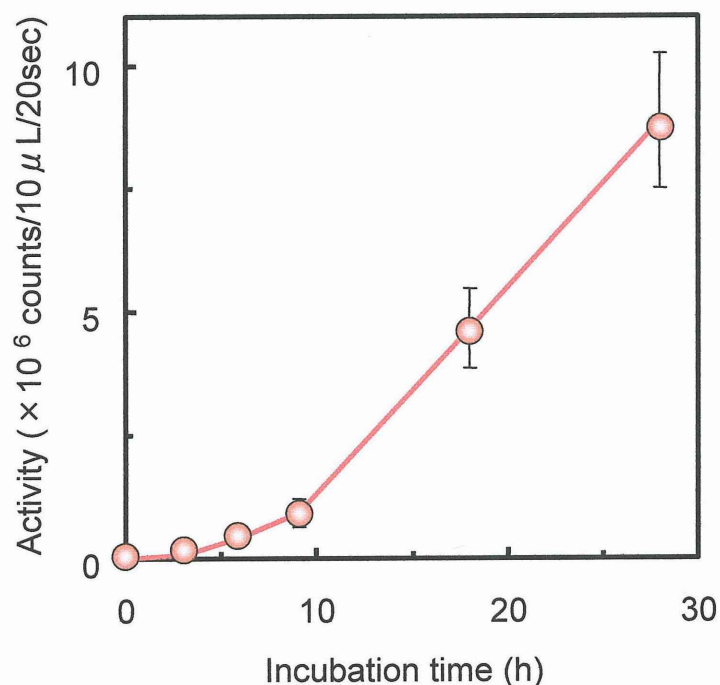


Fig. 3-10 *C. noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子を導入したヒト肺腫瘍細胞 A549 細胞の培養液中のルシフェラーゼ活性

C. noctiluca ルシフェラーゼ遺伝子を A549 細胞へ導入し、導入後の経過時間における細胞培地 10 μ L あたりのルシフェラーゼ活性である。

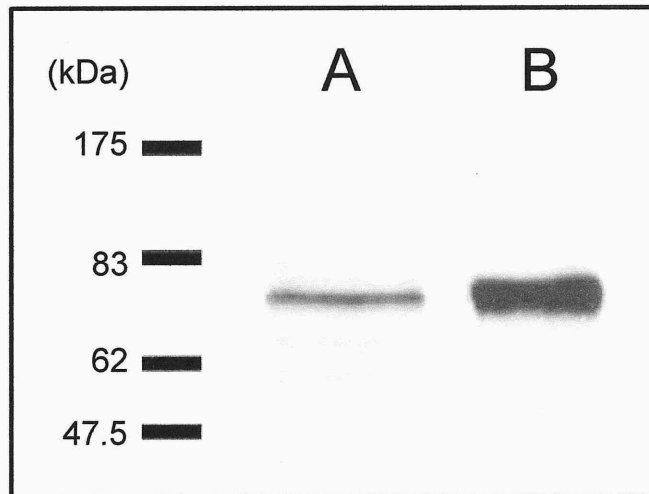


Fig. 3-11 哺乳類細胞で発現した *C. noctiluca* ルシフェラーゼのウェスタンブロット
 サル腎臓由来細胞 COS-7 細胞で発現し、細胞培地に分泌された *C. noctiluca* ルシ
 フェラーゼに対するウェスタンブローティングである。レーン A には *C. noctiluca* ルシ
 フェラーゼ、レーン B には精製 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼをそれぞれ泳動した。
 抗体は抗 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を使用した。

Fig. 3-11 は COS-7 細胞で発現し細胞培地に分泌された *C. noctiluca* ルシフェラーゼを、
 抗 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を用いたウェスタンブローティング解析である。
 レーン A は *C. noctiluca* ルシフェラーゼ、レーン B は精製した *V. hilgendorffii* ルシフェラ
 ーゼである。この結果では、どちらのレーンでも約 70kDa 付近にシングルバンドが確
 認された。レーン A、B でバンドの太さが異なるのは、泳動したタンパク量の相違によ
 るものである。*C. noctiluca* の個体破碎液について抗 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を
 用いてウェスタンブローティングを行った際に、*C. noctiluca* は *V. hilgendorffii* と同サイズの
 ルシフェラーゼを持っていることが確認されている (Fig.3-2)。Fig.3-11 の結果で発現し
 た *C. noctiluca* ルシフェラーゼのバンドサイズが *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼと同じで、
 抗体認識もされることから *C. noctiluca* よりルシフェラーゼ cDNA のクローニングが行
 えたことを改めて確認した。

3.3.4 *C.noctiluca* ルシフェラーゼと *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの比較

哺乳類細胞で発現したリコンビナント *C.noctiluca* ルシフェラーゼについて酵素特性解析を行い、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの酵素特性と比較を行った。Fig. 3-12 は *C.noctiluca*、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼによる生物発光のスペクトルである。A はリコンビナト *C.noctiluca* ルシフェラーゼのスペクトル、B は精製した *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼのスペクトルである。どちらのスペクトルも発光極大 460 nm の肩の無いスペクトルであり、2つのスペクトルでピーク波長、スペクトル幅等に相違は見られないことから、発光昆虫で見られるようなルシフェラーゼの相違による発光色の変化は、ウミボタル類では起きないことが確認された。Fig.3-13 はリコンビナント *C.noctiluca*、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの熱安定性である。赤線は *C.noctiluca* ルシフェラーゼ、青線は *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼである。この結果、どちらのルシフェラーゼもインキュベーション温度の上昇に伴い活性が減少する傾向があった。60°Cでのインキュベーション後では、わずかに *C.noctiluca* ルシフェラーゼの方が安定であったが、温度別安定性について大きな差は見られなかった。Fig. 3-14 は 37°Cでのインキュベーション時間によるルシフェラーゼ活性の変化である。37°Cは哺乳類細胞を培養する際に通常用いられる温度であり、この温度での安定性はアプリケーションとして応用する際の重要な情報である。ホタルルシフェラーゼは 37°C、30 分のインキュベーションで活性が無くなることが報告されている (27)。これに対し *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼは、37°C、10 時間以上のインキュベーション後でも約 80%以上の活性を保持しており (35)、リコンビナント *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼでは、37°Cにおける半減期は約 50 時間という非常に安定性の高いタンパクであった。本研究の結果では、*C.noctiluca* ルシフェラーゼは 53 時間インキュベーション後でもインキュベーション前の活性が約 50%保持されており、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ同様、*C.noctiluca* ルシフェラーゼも安定なタンパクであることが確認された。

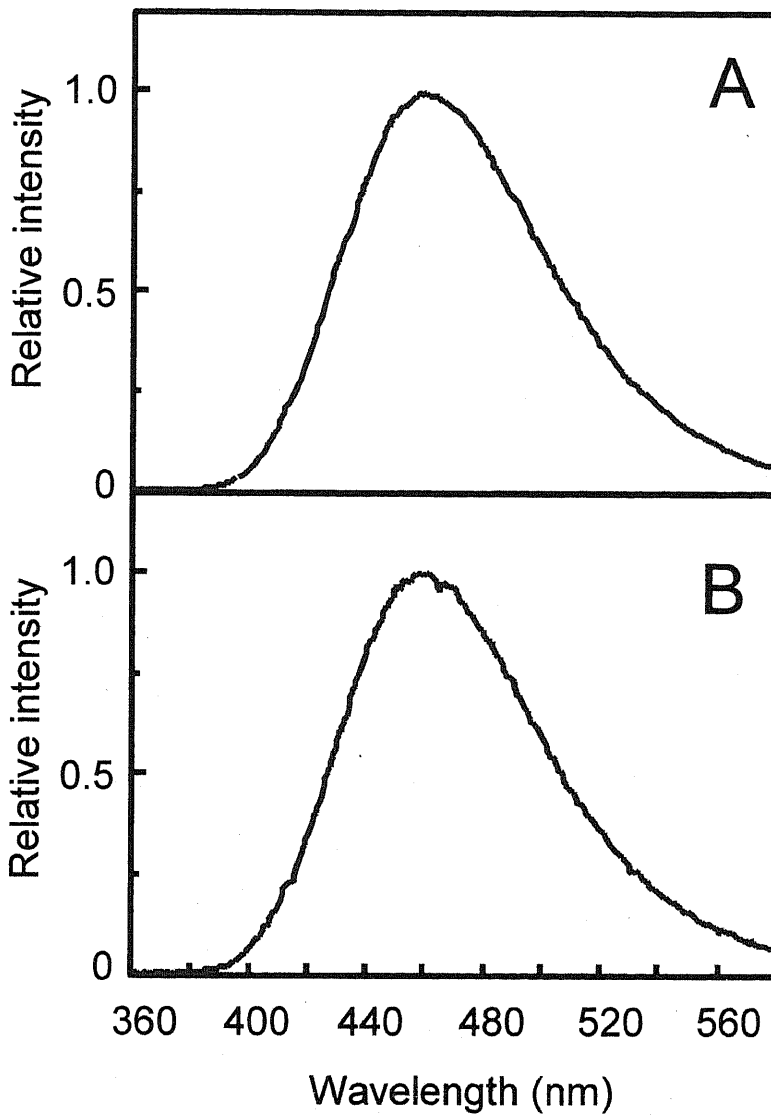


Fig. 3-12 *C. noctiluca*, *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼによる生物発光スペクトル

C. noctiluca, *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼによる生物発光のスペクトルである。Aは哺乳類細胞で発現したリコンビナト *C. noctiluca* ルシフェラーゼによる発光のスペクトル、Bは精製した *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼによる発光のスペクトルである。スペクトルはピーク波長の強度を1.0とする相対強度で表している。

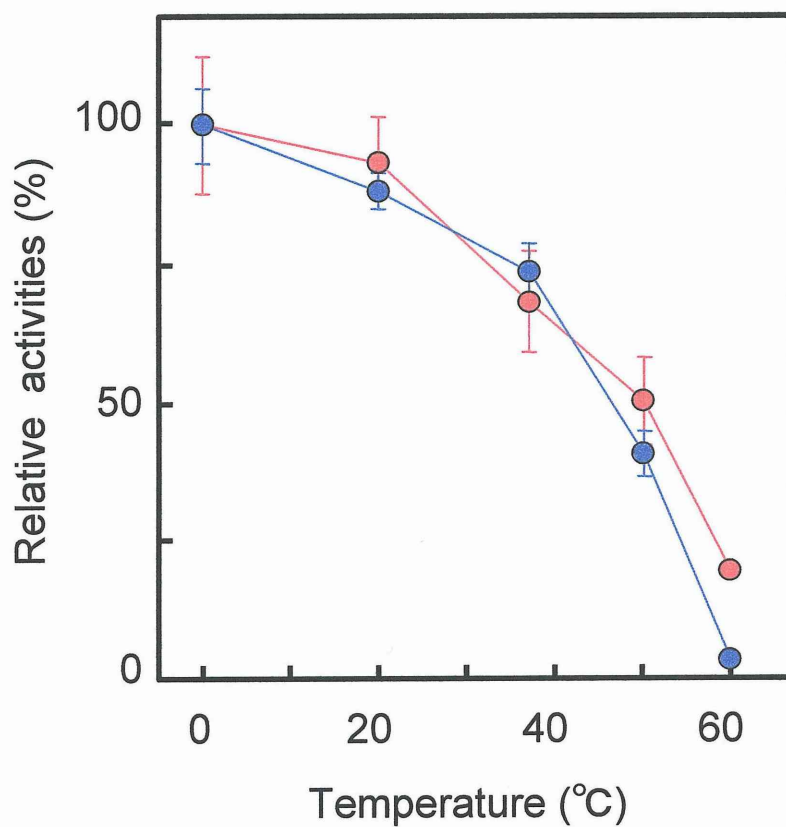


Fig. 3-13 *C. noctiluca*, *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ熱安定性

NIH3T3 細胞で発現したリコンビナトルシフェラーゼを各温度で 30 分間インキュベーション後のルシフェラーゼ活性である。赤色は *C. noctiluca* ルシフェラーゼ、青色は *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼである。各値は 0°C でインキュベートした各ルシフェラーゼの活性に対する相対活性である。

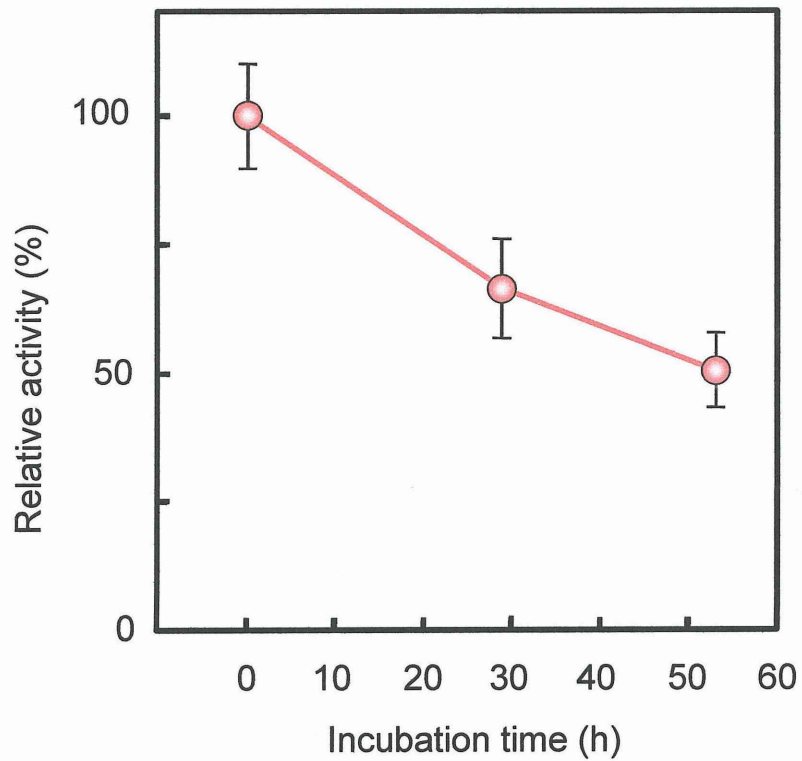


Fig. 3-14 37°Cにおける *C. noctiluca* ルシフェラーゼの安定性

NIH3T3 細胞で発現したリコンビナト *C. noctiluca* ルシフェラーゼ 37°Cでインキュベートし、各経過時間によるルシフェラーゼ活性である。各値はインキュベート0時間の活性に対する相対活性である。

ウミボタルルシフェラーゼの特性を Table 3-1 にまとめた。*C.noctiluca* ルシフェラーゼと *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの酵素特性はほぼ同じであった。 K_m 値において *C.noctiluca* ルシフェラーゼでは 30.0×10^{-6} M、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼでは 11.5×10^{-6} M であること、そして、至適 pH が *C.noctiluca* ルシフェラーゼでは 7.0、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼでは 7.5 であることを除けば、両ルシフェラーゼの酵素特性は同じであった。*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼでは、EDTA、クエン酸ナトリウムなどのキレート剤の他、SDS、金属イオン等により活性が阻害されることが報告されている (23)。*C.noctiluca* ルシフェラーゼについてもこれらの物質による活性阻害効果が確認された。Fig. 3-15 は、*C.noctiluca* ルシフェラーゼに対する EDTA とクエン酸ナトリウムの活性阻害効果を示している。この結果では、EDTA、クエン酸ナトリウムともに濃度上昇に伴いルシフェラーゼ活性は減少し、特に EDTA は低濃度でも活性阻害効果があった。Tsuji らは *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの酵素活性に微量のカルシウムイオンが必要であるという報告をしている (36)。このことから、キレート剤による活性阻害は微量カルシウムがキレートされることで起きていると推測される。EDTA とクエン酸ナトリウムでは阻害効果濃度が大きく異なることより、カルシウムキレート以外の効果が及んでいると思われるが、本研究では、その効果の解明には至らなかったため、今後の研究課題である。Fig.3-16 は Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} の 4 種類の金属イオンによる *C.noctiluca* ルシフェラーゼ活性への影響を示している。*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼでは、 Na^+ 0.5M、 K^+ 0.35M、 Mg^{2+} 0.2M、 Ca^{2+} 0.05M で活性が半減することが報告されている (35)。*C.noctiluca* ルシフェラーゼでも、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼとほぼ同濃度で活性が半減し、また 1 価陽イオンよりも 2 価陽イオンの方がより活性を阻害する同様の傾向が見られた。ウミボタルが生息する海水中の Na^+ イオン濃度は約 0.4M であり、今回の結果では自然界においてウミボタルの発光は、海水中で大幅に阻害されている結果となった。しかし、ウミボタルの発光器官である上唇腺はルシフェリン、ルシフェラーゼ以外にいくつかの物質が貯蔵されており (28)、第 2 章で行った *V.hilgendorffii* 発光液のゲルろ過クロマトグラフィーでも、ルシフェラーゼ以外にいくつかの物質が確認されていることから、実際のウミボタル生物発光は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ以外に別の物質が関与してい

る可能性が示唆される。残念ながら、本研究ではその物質の同定は行えなかったので今後の課題である。Fig.3-17 は DTT による *C.noctiluca* ルシフェラーゼの阻害効果を示している。この結果では、DTT 濃度の上昇に伴いルシフェラーゼ活性の減少が確認された。*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼに対する阻害効果では、1 mM DTT 添加 15 分間後に活性が半減した。DTT は還元剤であり、タンパク内のジスルフィド結合を切断する場合に頻繁に用いられる。*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼは 34 個のシステイン残基を持ち、その全てがジスルフィド結合していると報告されている (24)。このことから、DTT 添加による *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの活性減少は、ジスルフィド結合が切断されルシフェラーゼの分子構造が変化したこと起因すると推測される。ルシフェラーゼ分子内のシステイン残基の同一性を考慮した場合、*C.noctiluca* ルシフェラーゼの DTT 添加による活性減少についても、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ同様、ジスルフィド結合が DTT により切断され、分子構造が変化したことに起因すると推測される。

Table 3-1 ウミボタルルシフェラーゼ諸性質

NIH3T3 細胞で発現したりコンビナント *C. noctiluca*, *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼの特性である。星印がついた値は、cDNA 配列より予想されるアミノ酸を基に計算された値である。

<酵素特性>	<i>C.noctiluca</i>	<i>V.hilgendorffii</i>
アミノ酸残基数	553	555
分子量	61,465*	61,693*
等電点	4.59*	4.51*
<i>Km</i> 値	30.0X10 ⁻⁶ (M)	11.5X10 ⁻⁶ (M)
<i>Vmax</i> 値	1.10X10 ⁴	1.10X10 ⁴
	(counts/sec)	(counts/sec)
至適 pH	7.0	7.5
発光極大	460 (nm)	460 (nm)
システイン残基数	34	34
N結合型糖鎖修飾部位	2	2
分泌	+	+

*:予想されるアミノ酸配列より算出した値

<活性阻害剤>	<i>C.noctiluca</i>	<i>V.hilgendorffii</i>
DTT	+	+
クエン酸ナトリウム	+	+
EDTA	+	+
SDS	+	+

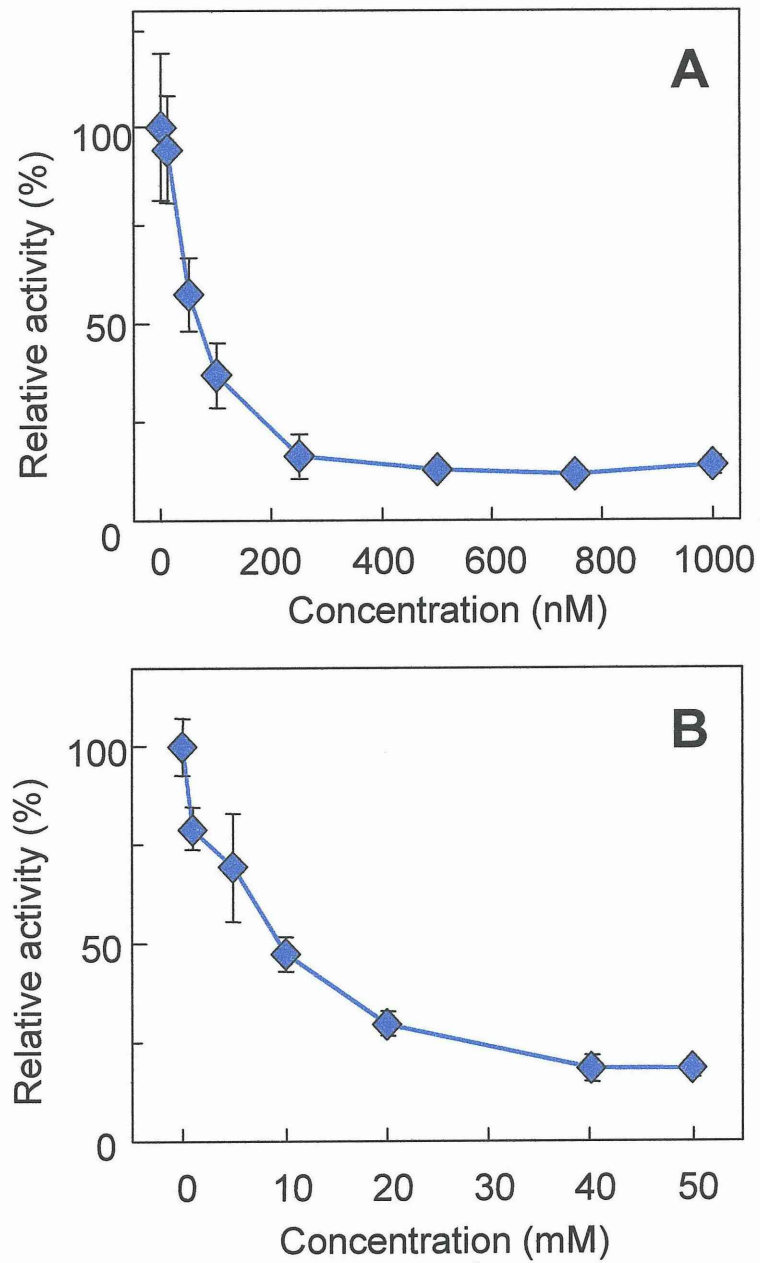


Fig. 3-15 EDTA、クエン酸ナトリウムによる *C. noctiluca* ルシフェラーゼの活性阻害
 キレート剤による *C. noctiluca* ルシフェラーゼの活性阻害である。(A) は EDTA、
 (B) はクエン酸ナトリウムの各濃度におけるルシフェラーゼ活性である。各値はキ
 レート剤濃度 0 M 時のルシフェラーゼ活性に対する相対活性である。

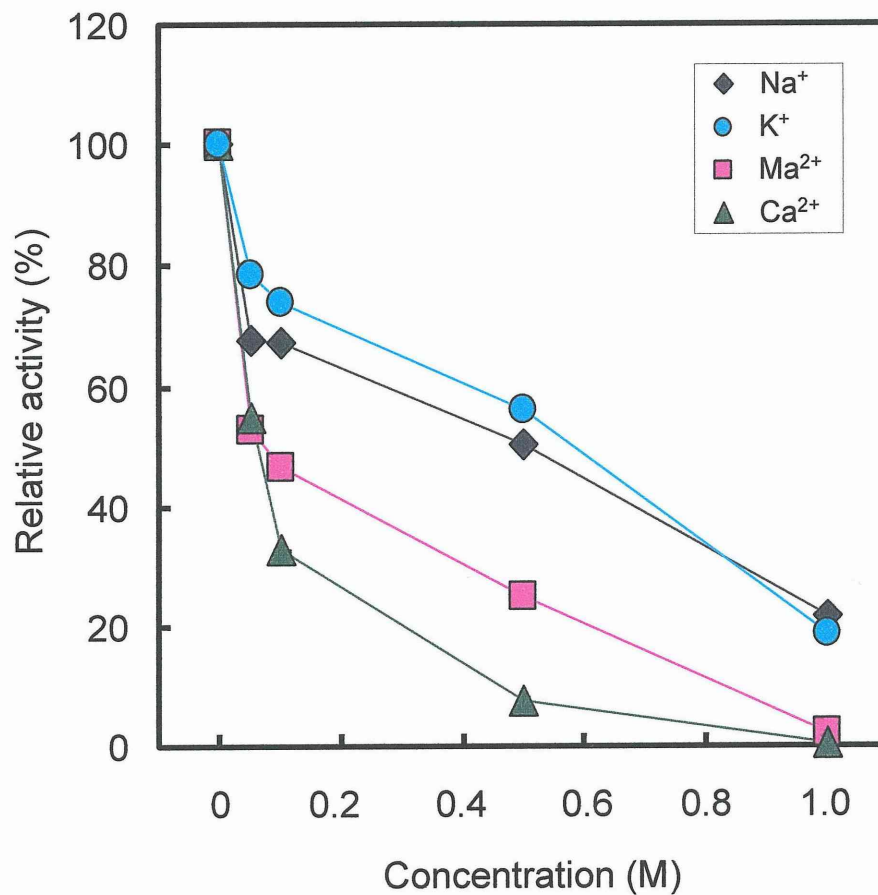


Fig. 3-16 金属イオンによる *C. noctiluca* ルシフェラーゼの活性阻害

Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺の4種類の金属イオンによる活性阻害効果である。横軸は金属イオン濃度、縦軸は金属イオン濃度0M時の活性に対する相対活性値である。各イオンは塩化物を使用しており、青色はNa⁺、水色はK⁺、紫色はMg²⁺、緑色はCa²⁺である。

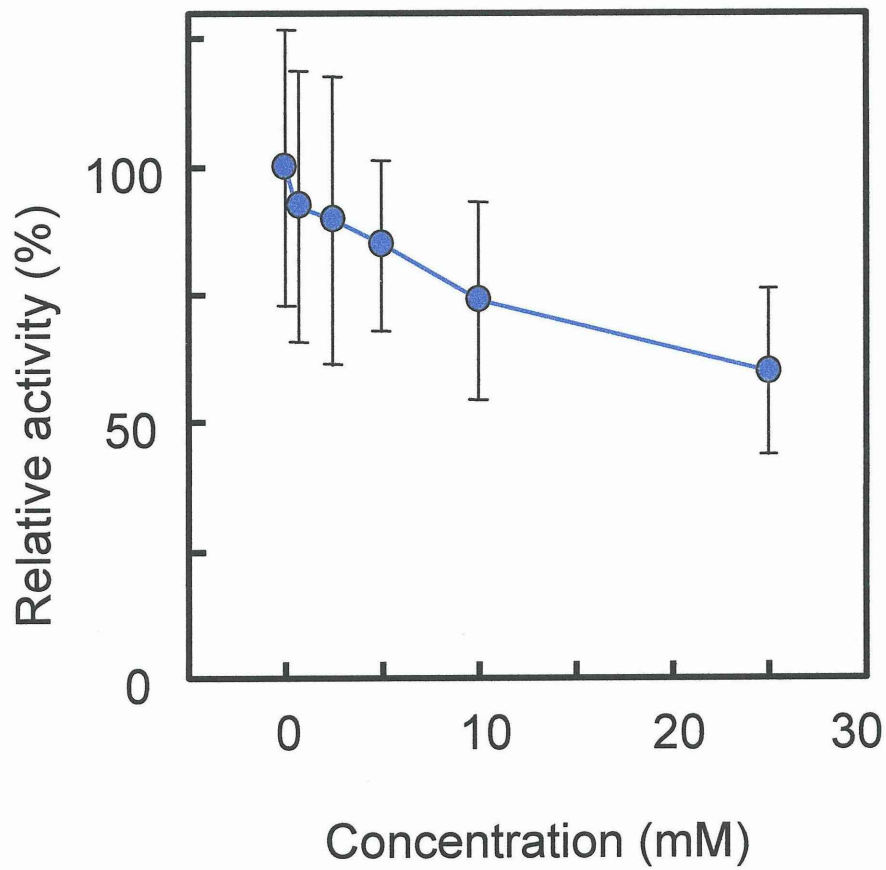


Fig. 3-17 DTTによる *C. noctiluca* ルシフェラーゼの活性阻害

DTT 添加量と *C. noctiluca* ルシフェラーゼの活性相関である。横軸は DTT 濃度、縦軸はルシフェラーゼ活性である。各値は DTT 濃度 0 M のルシフェラーゼ活性に対する相対活性値である。

3.3.5 *C.noctiluca* ルシフェラーゼと *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの分泌特性

酵素特性の比較から *C.noctiluca*、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼはほぼ同じ酵素であることが伺えた。しかしながら、両ルシフェラーゼでは分泌特性において相違が見られた。Fig.3-18 は哺乳類細胞 NIH3T3、Hela S3 に *C.noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、37 時間後の細胞培地及び細胞内のルシフェラーゼ活性を示している。各値は総活性量を導入した遺伝子 0.1 μg あたりの活性に換算して示している。この結果、NIH3T3 細胞ではルシフェラーゼ総発現量の 99.5%、Hela S3 細胞では 89.6%が細胞外へ分泌されていた。Thompson らは *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ遺伝子を数種類の哺乳類細胞に導入し、遺伝子導入 60 時間後の培地及び細胞内のルシフェラーゼ量を報告している (34)。この報告では導入した遺伝子のプロモーターにより値に幅が見られるものの、発現した *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼは NIH3T3 細胞では約 60~90%、Hela 細胞では約 29~52%しか細胞培地中に分泌されないと報告している。両ルシフェラーゼの分泌における相違は、分泌シグナル配列の相違に起因すると考えられる。*C.noctiluca*、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼ共に N 末端のアミノ酸配列は、一般的な分泌シグナル配列の特徴を備えている (4, 第 3 章 3.3.2)。しかしながら、双方の N 末端 33 アミノ酸残基の相同性は 51.5%とルシフェラーゼ全体での相同性 83.1%に比べると低く、また *C.noctiluca* ルシフェラーゼは *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼよりも 4 アミノ酸残基少ない (Fig.3-19)。Fig.3-20 は *C.noctiluca*、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼについて Hopp&Woods パラメーターにより作成した疎水性/親水性グラフを示している。このグラフは横軸が N 末端からのアミノ酸残基番号になっており、グラフの上側がアミノ酸残基の親水性、下側が疎水性をそれぞれ示している。一般に分泌シグナル配列は疎水性アミノ酸が連続した領域の C 末端側において、中性的で側鎖の小さいアミノ酸残基部分で切断される (32)。グラフでは両ルシフェラーゼとも疎水性領域の後に中性領域が見られる。しかし、分泌シグナル配列切断部位と予想される個所において相違が見られた。また、Fig.3-21 は Chou-Fasman 法 (37) による両ルシフェラーゼの二次構造予測を示しており、この結果でも N 末端、特に分泌シグナル配列切断部位と予想される部位に相違が見られた。

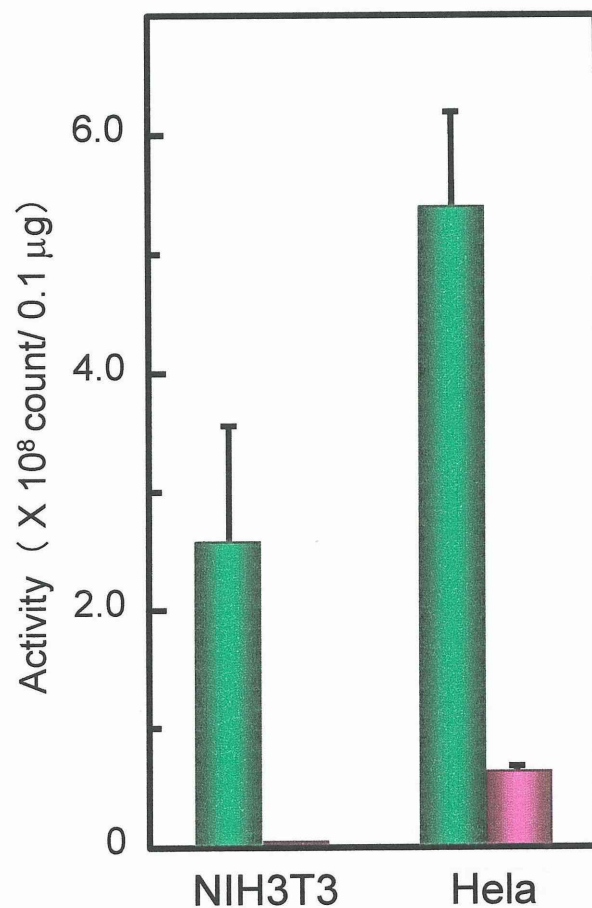


Fig. 3-18 哺乳類細胞へ *C. noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子導入 37 時間後の細胞培地及び細胞内のルシフェラーゼ活性量

NIH3T3、HeLa S3 細胞へ *C. noctiluca* ルシフェラーゼ遺伝子導入後、37°C で 37 時間培養後の細胞培地、細胞破碎液の総ルシフェラーゼ活性を導入遺伝子 0.1 μg あたりのルシフェラーゼ活性量である。緑は培養液中のルシフェラーゼ活性、ピンクは細胞中のルシフェラーゼ活性をそれぞれ示している。

1 MK**TLILAV**LCATVHCQD-CP**YEPDPP**---N *C. noctiluca*
 ** ** * * * * * ** * * * * * **
 1 MK**IIILSV**ILAYCVTDNCQDACP**VEAEPPSSTP** *V. hilgendorffii*

Fig. 3-19 ウミボタルルシフェラーゼのN末端アミノ酸配列

ウミボタルルシフェラーゼのN末端アミノ酸配列である。上段は *C. noctiluca* ルシフェラーゼ、下段は *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼである。共通のアミノ酸は黒字と星印で示した。*C. noctiluca* ルシフェラーゼの配列中の横線は欠如したアミノ酸である。

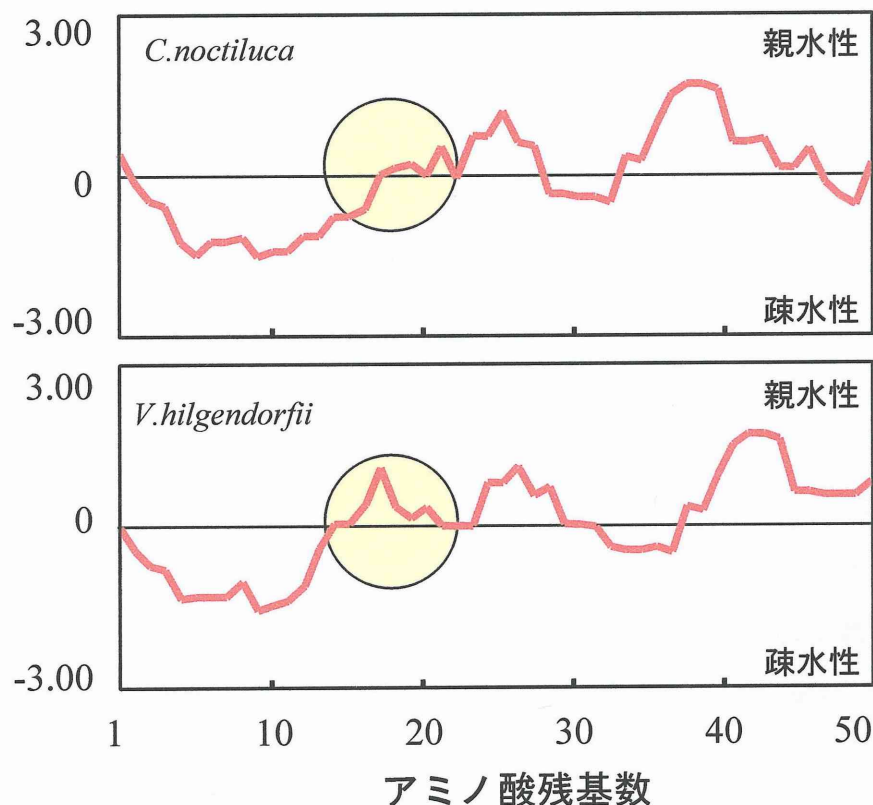


Fig. 3-20 Hopp & Woods パラメーターによる疎水性/親水性グラフ

C. noctiluca、*V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ N 末端アミノ酸 50 残基の疎水性/親水性グラフである。グラフは中央線上部が親水性、中央線下部が疎水性を表している。黄色円は分泌シグナル配列切断部位近辺の両ルシフェラーゼの相違点を示している。

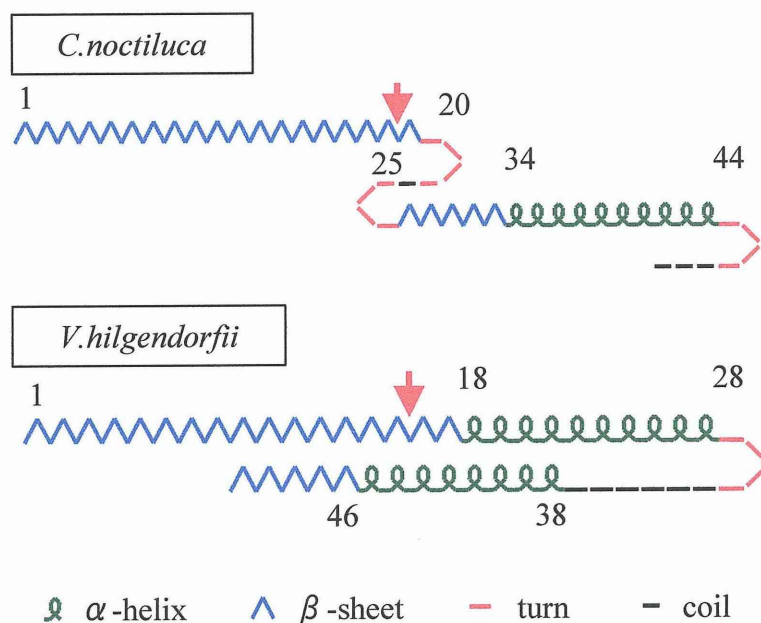


Fig. 3-21 Chou-Fasman 法による二次構造予測

C. noctiluca、*V. hilgendorffii* ルシフェラーゼの N 末端 50 アミノ酸残基について Chou-Fasman 法を用いて予測した二次構造である。上段は *C. noctiluca*、下段は *V. hilgendorffii* である。図中の数字は N 末端からのアミノ酸番号である。青色部分は β-シート構造、緑色部分は α-ヘリックス構造、赤色部分はターン構造、黒色部分はコイル構造である。赤色矢印は SignalP で予想される分泌シグナル配列切断部位である。

分泌タンパクの真核細胞内における分泌経路は、Fig.3-22 に示した通りである。まず、mRNA からリボソームで翻訳されたタンパクは小胞体に導かれ、小胞体内に転位後折りたたみが行われる。タンパクとして正常に折りたたまれたタンパクは、輸送小胞となりゴルジ体へ運ばれる。ゴルジ体ではタンパクの仕分けが行われ、分泌タンパクは分泌顆粒となり細胞外へ分泌される。この分泌過程における分泌シグナル配列の役割は、翻訳されたペプチドを小胞体へ導き、タンパクを小胞体膜内へ転位することである。分泌シグナル配列は膜通過後にシグナルペプチターゼにより切断されるため、最終的に分泌されたタンパクには分泌シグナルは存在しない。*C.noctiluca*、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼで見られる分泌シグナル配列の相違は、細胞内における分泌経路において、分泌シグナル配列の小胞体膜への透過性、そして、その後の分泌シグナル配列切断時にシグナルペプチターゼの配列認識に影響していると推測され、その結果として細胞外へのルシフェラーゼ分泌効率の相違が生じると考えられる。細胞生物学研究における分子挙動モニタリングのレポーターとしてウミボタルルシフェラーゼを用いる場合、細胞内でルシフェラーゼが発現後即座に細胞外へ分泌されることが望ましい。この点については、*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼよりも *C.noctiluca* ルシフェラーゼの方が優れていることが本研究で明らかになった。

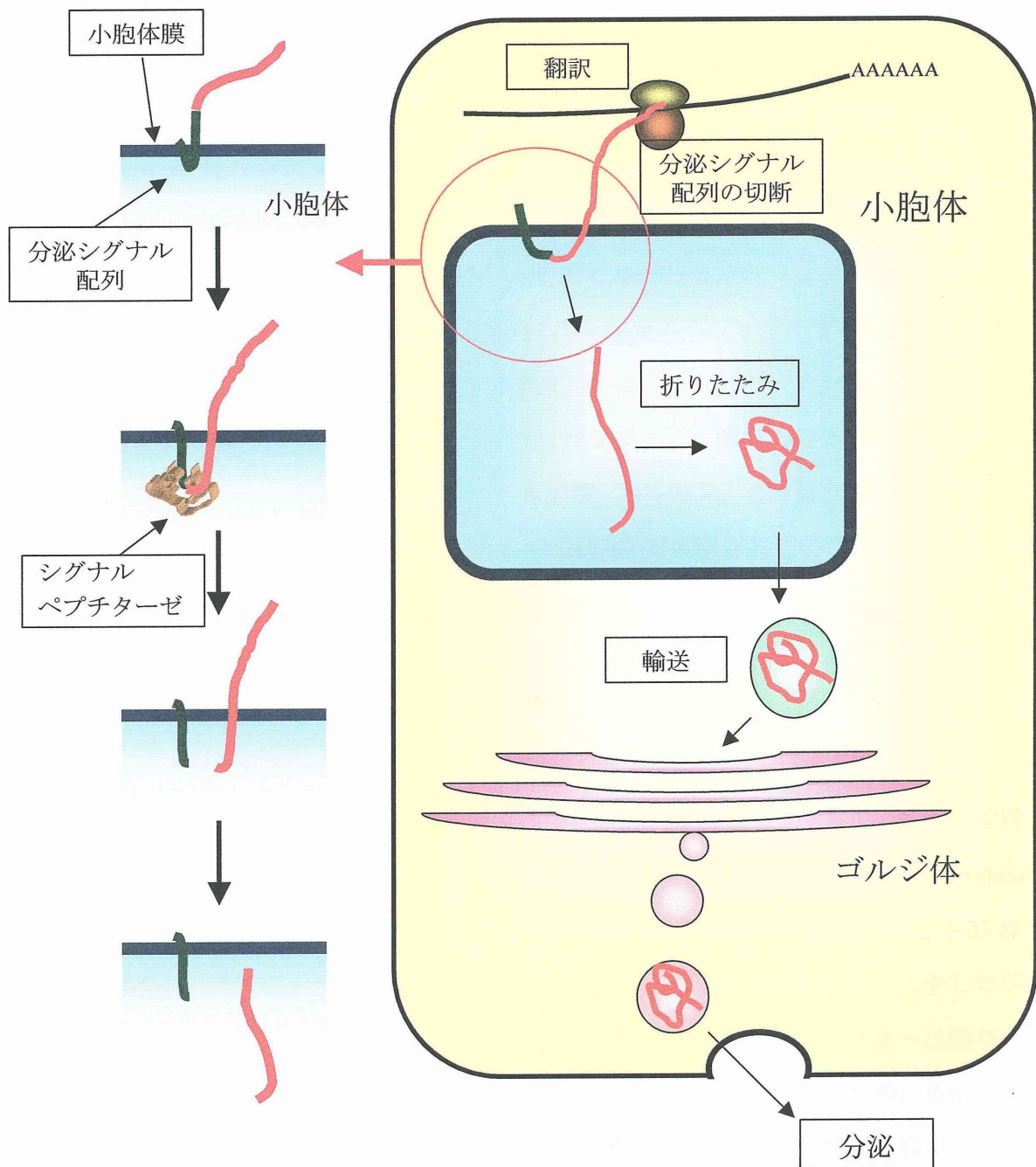


Fig. 3-22 分泌タンパクの輸送経路と小胞体膜での分泌シグナル配列切断模式図

真核細胞における分泌過程の模式図である。赤い太線はタンパク、緑の太線は分泌シグナルを示している。分泌タンパクは小胞体で折りたたまれた後、ゴルジ体へ輸送され、選別後、分泌顆粒として細胞外へ分泌される。この過程において分泌シグナル配列は、タンパクの小胞体への誘導、小胞体膜への透過において重要である。左の流れ図は、小胞体膜でのシグナルペプチターゼによる分泌シグナル配列の切断過程の模式図である。

3.3.6 *C.noctiluca* ルシフェラーゼの糖鎖機能

V.hilgendorffii ルシフェラーゼはN結合型糖タンパクであるが、これまでに糖鎖機能は解明されていない。*C.noctiluca* ルシフェラーゼにもN結合型糖鎖修飾部位が2つ存在し (Fig. 3-9)、N結合型糖鎖切断酵素 PNGaseF で *C.noctiluca* ルシフェラーゼを処理したところ分子量が小さくなった。このことから *C.noctiluca* ルシフェラーゼもN結合型糖タンパクであることが明らかとなった。ウミボタルルシフェラーゼのタンパク一次構造において糖鎖修飾部位は一致していることから、ルシフェラーゼにおける糖鎖機能は同じであると推察される。N結合型糖タンパクは酵素、ホルモン、受容体タンパクなど様々な種類のタンパクが報告され、その一部では糖鎖機能が解明されている。Table 3-2 は解明された糖鎖機能を示している。糖鎖機能はタンパクにより異なるが、タンパクの安定性、機能発現、分子間相互認識などに関与している場合が多い (38)。ウミボタルルシフェラーゼは分泌酵素であることから、酵素活性、分泌、安定性、発現などに関連していることが予想される。今回、ウミボタルルシフェラーゼの糖鎖機能を解明するため、*C.noctiluca* ルシフェラーゼについて糖鎖切断酵素処理、遺伝子操作による脱糖処理を行い、脱糖によるルシフェラーゼ特性の変化を確認した。はじめに PNGase F で *C.noctiluca* ルシフェラーゼを非変性下で処理し、処理による活性への影響を確認した。Fig. 3-23 はその結果を示している。この結果ではインキュベーション時間と共に活性は減少したが、酵素処理の有無による相違は確認できなかった。このことは糖鎖が酵素活性へは関与していない可能性を示している。しかし、糖鎖の切断確認が行えなかったため、ルシフェラーゼ遺伝子に操作を加え、脱糖変異体ルシフェラーゼを作成し、脱糖によるルシフェラーゼ特性への影響を確認した。変異体は糖鎖が結合する 182 番目、404 番目のアスパラギンをアスパラギン酸にアミノ酸置換する方法で作成した。このアミノ酸置換は、非公開ではあるがホタルルシフェラーゼにおいて同様のアミノ酸置換を行っても活性に影響が無いというデータに基づいている。変異体は糖鎖修飾部位 1 か所ずつアミノ酸置換を行った N182D および N404D と、2 か所ともアミノ酸置換を行った N182&404D の 3 つを作成した (Fig. 3-24)。作成した 3 種類の変異体遺伝子と変異を入れない遺伝子をそれぞれ NIH3T3 へ導入し、細胞内及び細胞外の活性を測定した。

Table 3-2 N結合型糖タンパク糖鎖機能

糖鎖機能	N結合型糖タンパク名
分泌	Lipoprotein lipase Hepatic lipase Propapain Erythropoietin
輸送	Alylsulphatase A
酵素活性	HMG-CoA reductase Lecithin: cholesterol acyltransferase Lysosomal β -glucosidase
複合体形成	Glycoprotein hormones (HCG, LH, TSH, prolactin) Haptoglobin Immunogloblin
発現	C3b/C4b receptor CR2/Epstein-Barr virus receptor Lutropin receptor Nicotinic acetylcholine receptor Muscarinic acetylcholine receptor
受容体認識部位	Immunogloblin D
安定性	human gastric lipase Erythropoietin Androgen-binding protein Some(not all) viral coat protein Thyroxine-binding globlin 46kDa mannose-6-phosphate receptor
折りたたみ	B2-Glycoprotein
機能発現 (受容機能)	Corticosteroid-binding globlin Folate-binding protein Lactotransferrin Insulin and insulin-like growth factor-I receptor Basic fibroblast growth factor receptor

Varki, A. (1993) *Glycobiology* 3, 97-130.

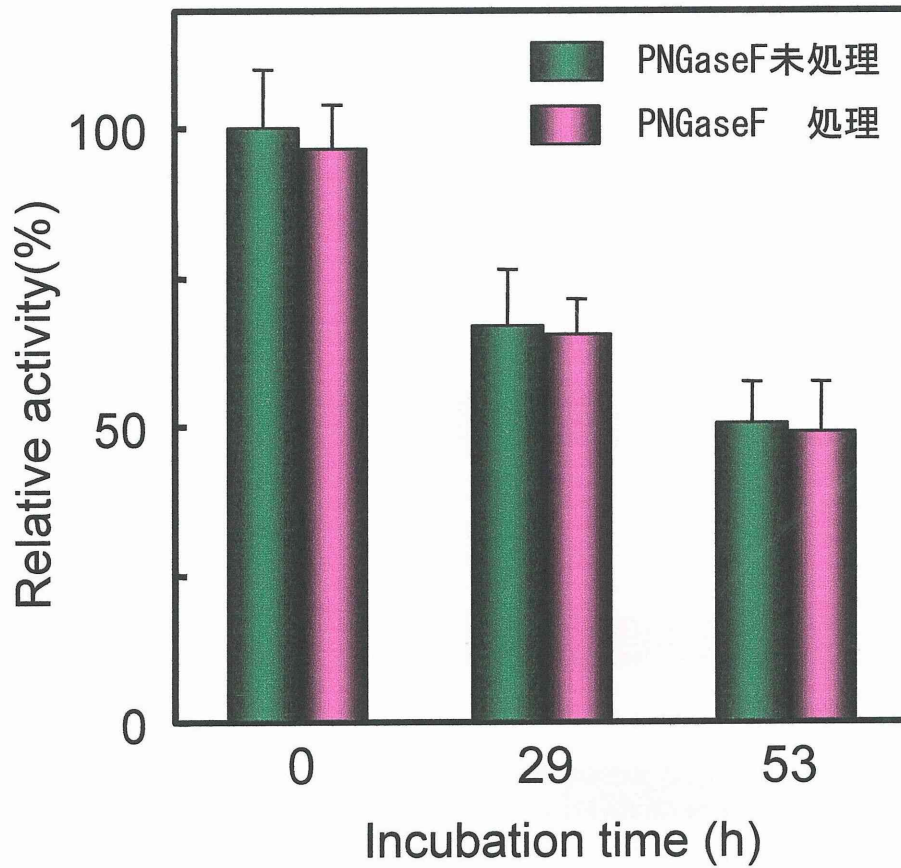


Fig. 3-23 PNGaseF 処理後のルシフェラーゼ活性

C. noctiluca ルシフェラーゼを含む細胞培地を PNGaseF で処理し、処理後のルシフェラーゼ活性である。緑は PNGaseF 未処理ルシフェラーゼの活性、ピンクは PNGaseF 処理をしたルシフェラーゼの活性である。活性値は、PNGaseF 未処理のルシフェラーゼ 0 時間の活性に対する相対値である。

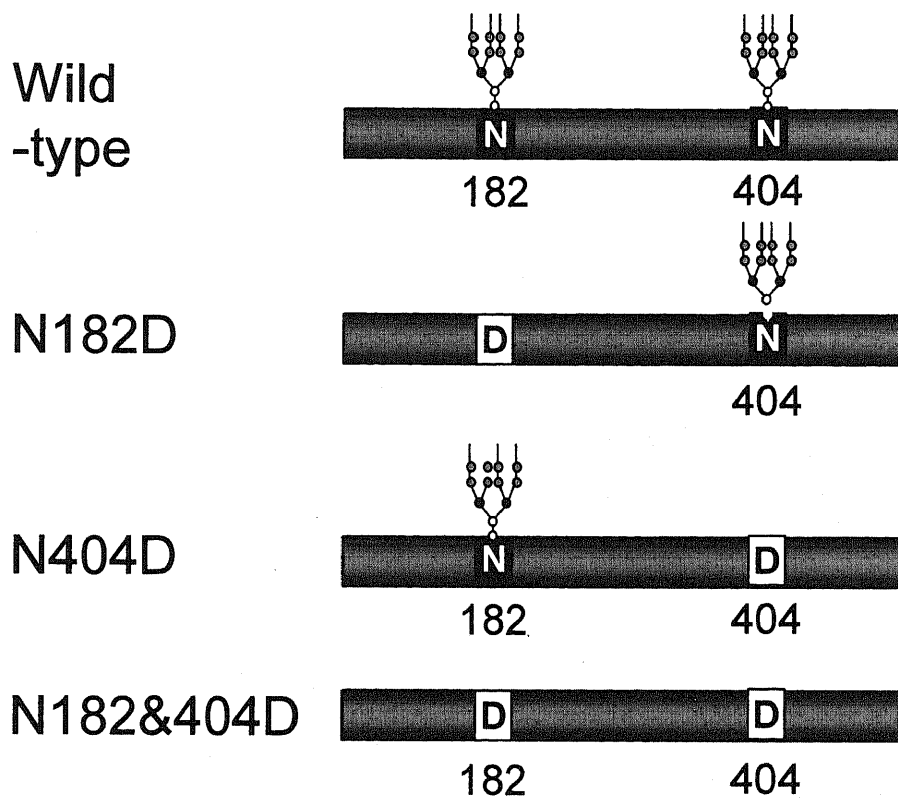


Fig. 3-24 脱糖変異体模式図

作成した脱糖変異体の模式図である。N はアスパラギン、D はアスパラギン酸である。数字はN末端からのアミノ酸残基の位置である。

Fig. 3-25 は 182 番目アスパラギン残基を置換した変異体の細胞培地中と細胞内のルシフェラーゼ活性を示している。この結果では、変異体 N182D は野生型ルシフェラーゼに比べ細胞内外で活性が大幅に減少しており、変異体 N182,404D は細胞内外のいずれにおいても活性が確認されなかった。Fig. 3-26 は、404 番目アスパラギン残基を置換した変異体の細胞内外のルシフェラーゼ活性を示している。この結果では、N182D や N182,404D のような劇的な活性の減少は見られなかった。しかし、変異体 N404D の細胞培地中のルシフェラーゼ活性は野生型ルシフェラーゼに比べ若干減少しており、細胞内におけるルシフェラーゼ活性は、野生型ルシフェラーゼよりも高くなっていた。Fig.3-27 (A) は、NIH3T3 細胞に各ルシフェラーゼ遺伝子を導入後、37 時間培養した細胞培地等量分についてウェスタンブロッティングを行った結果を示している。この結果では、細胞培地中のルシフェラーゼ活性が高かった野生型と変異体 N404D のみバンドが確認され、活性の低い変異体 N182D と変異体 N182,404D ではバンドが確認されなかった。Fig.3-27 (B) は、野生型、N182D、N404D について同等の活性量を泳動し、ウェスタンブロッティングを行った結果を示している。この結果では、どのルシフェラーゼも同等のシグナルが確認されており、このことは野生型ルシフェラーゼと変異体ルシフェラーゼでは比活性に差が無いことを示している。

以上のことをまとめると次の通りである。*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、182 番目アスパラギン残基結合糖鎖を脱糖するとルシフェラーゼ自身の発現量が大幅に減少した。一方、404 番目アスパラギン残基結合糖鎖を脱糖すると、細胞内のルシフェラーゼ量が増加した。ウェスタンブロッティングの結果では、182、404 番目のいずれの糖鎖を脱糖してもルシフェラーゼの比活性に変化が見られないことから、*C.noctiluca* ルシフェラーゼでは糖鎖の活性への関与は無く、182 番目の糖鎖はルシフェラーゼの安定性に強く関与していると考えられ、404 番目の糖鎖はルシフェラーゼの分泌に部分的に関与していると考えられる。

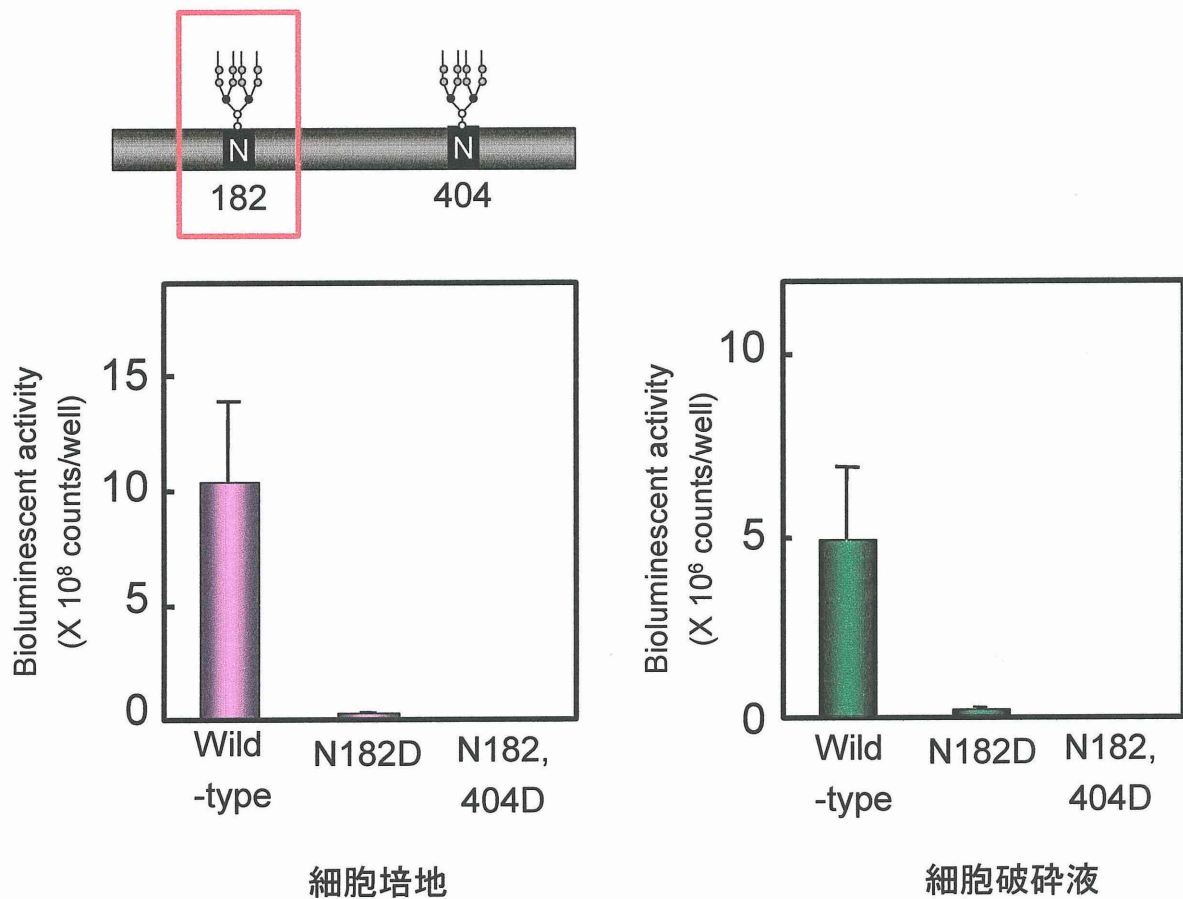


Fig. 3-25 182 番目のアスパラギンに結合した糖鎖の除去による影響

182 番目のアスパラギン残基を置換した脱糖変異体の遺伝子を NIH3T3 細胞へ導入し、37 時間培養後のルシフェラーゼ活性である。左の図は、細胞培地中のルシフェラーゼ活性を、右の図は細胞内のルシフェラーゼ活性である。

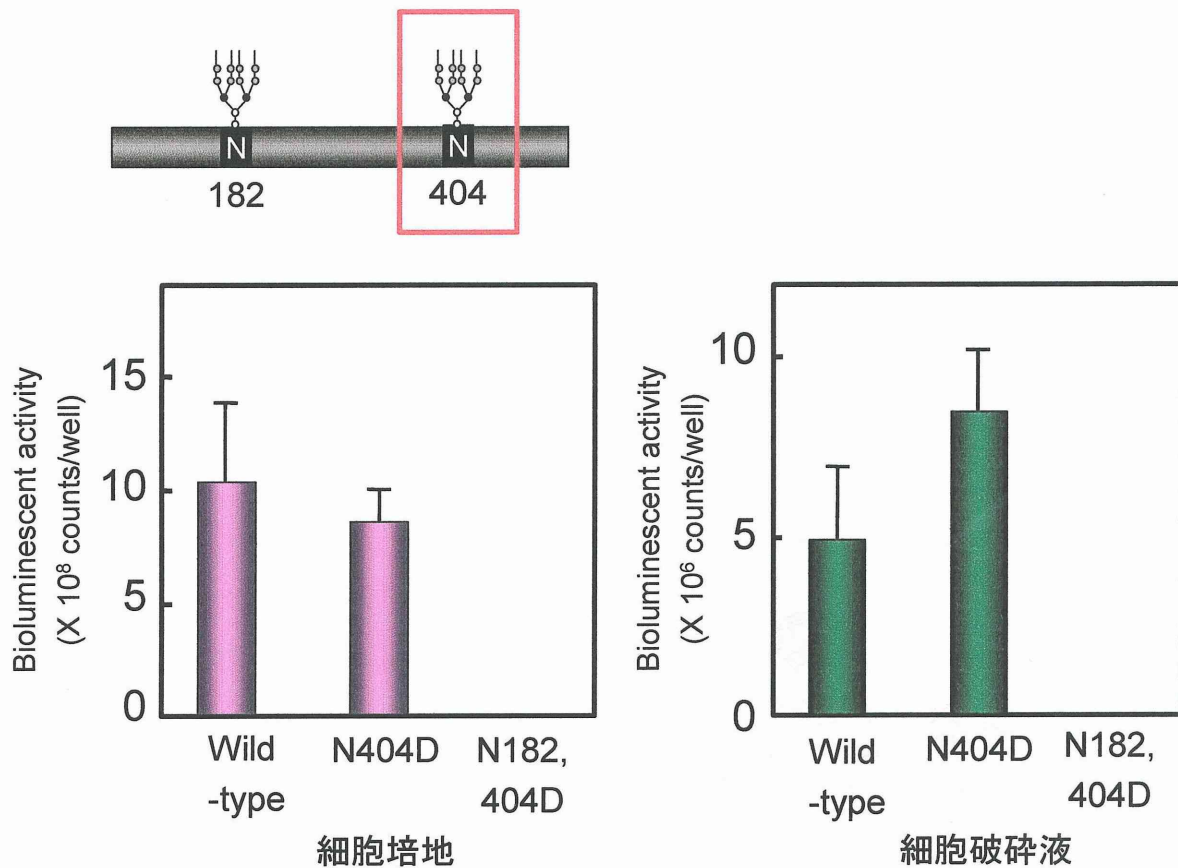


Fig. 3-26 404 番目のアスパラギンに結合した糖鎖の除去による影響

404 番目のアスパラギン残基を置換した脱糖変異体の遺伝子を NIH3T3 細胞へ導入し、37 時間培養後のルシフェラーゼ活性である。左の図は、細胞培地中のルシフェラーゼ活性を、右の図は細胞内のルシフェラーゼ活性である。

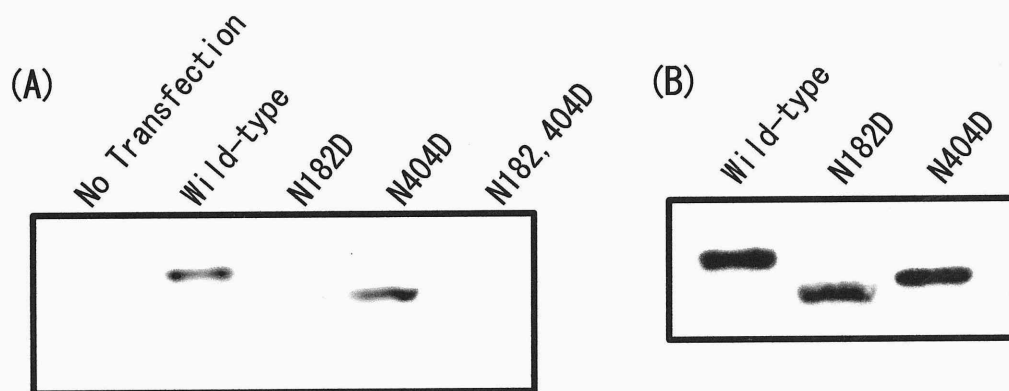


Fig. 3-27 脱糖変異体のウェスタンブロット解析

- (A) 野生型ルシフェラーゼもしくは変異体ルシフェラーゼ遺伝子を NIH3T3 細胞に導入後、37 時間培養した細胞培地 (24 ウェルプレート 1 ウェル分) に対し、抗 *V. hilgendorffii* ルシフェラーゼ抗体を用いたウェスタンブロットティング。
- (B) 野生型ルシフェラーゼ、変異体ルシフェラーゼ N182D、N404D を等活性量分 (1.0×10^9 counts/20sec) に対するウェスタンブロットティング。

N 結合型糖タンパクで糖鎖が細胞内のタンパク安定性に関与している例は少ない。今回 *C.noctiluca* ルシフェラーゼについて行った操作と同様にアミノ酸置換による脱糖実験によって、細胞内でのタンパク安定性が低下するタンパクとして、アンドロゲンバインディングプロテイン (39) やラット肝臓リパーゼ (40) が報告されている。細胞内でのタンパク安定性に糖鎖が関与する理由は、細胞内のタンパク品質管理機構が強く影響していると考えられる。細胞内では生命維持のため非常に厳密なタンパク品質管理機構が存在し、不完全なタンパク、異質なタンパクは即座に除去される。いくつか存在する品質管理機構の中でも小胞体における品質管理機構は N 結合型糖タンパクに強く関係しているという報告がある (41)。Fig.3-27 は小胞体における品質管理機構の模式図を示している。小胞体では N 結合型の糖鎖が付加され、この糖鎖を強く認識するカルネキシンなどのシャペロンがタンパクに結合する。更にこのシャペロンにタンパクの折りたたみに関与するヒートショックプロテインなどのシャペロンがつき、シャペロン複合体によりタンパクの折りたたみが遂行される。この後、正確に折りたたまれたタンパクはゴルジ体へ輸送されるが、不完全なタンパクは再度折りたたみが行われるか、もしくは除去される。このメカニズムでは、小胞体シャペロンとタンパクの結合が重要であり、糖鎖付加が不完全なタンパクは完全な折りたたみが行われず、不完全なタンパクとして除去されている。*C.noctiluca* ルシフェラーゼの場合、182 番目のアスパラギンに結合している糖鎖は、シャペロンの認識に重要であることに加え、複雑な立体構造を形成するための折りたたみにおける分子中の位置的な重要性も考えられる。それ故に 182 番目の脱糖変異体ではタンパクの折りたたみが正確に行えず、品質管理機構によってタンパクが分解されるため、実験結果のような脱糖による劇的な変化が生じたと推察される。一方、404 番目の脱糖変異体では、位置的な関係上折りたたみは遂行するものの、完全な折りたたみに至らず、折りたたみのやり直しが起き、そのため分泌までの時間がかかると考えられる。この知見に関しては、更なる追実験が必要ではあるが、ウミボタルルシフェラーゼの糖鎖機能についての知見としては初めての報告である。

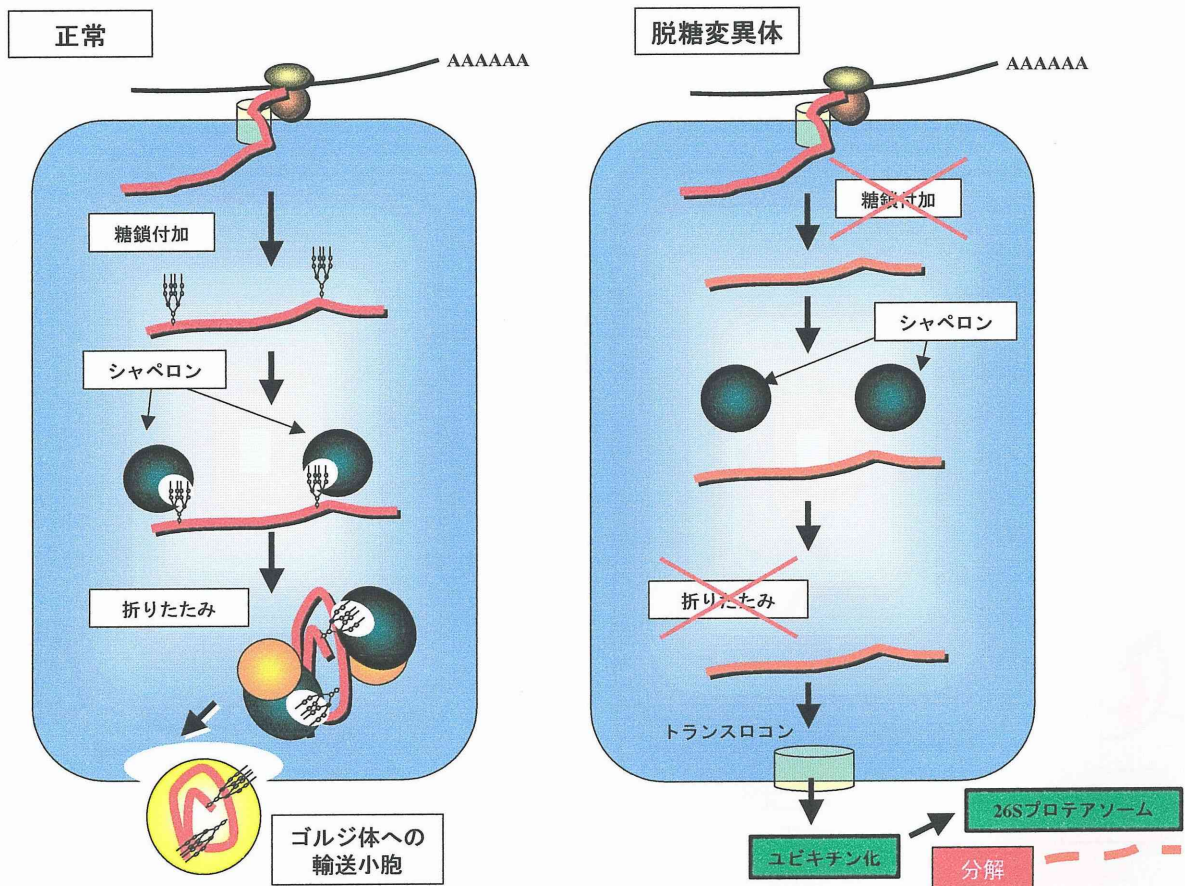


Fig. 3-28 小胞体内でのタンパクの折りたたみ模式図

小胞体における糖鎖を認識しタンパクに結合するシャペロンとタンパクの折りたたみの模式図である。左の経路が通常の場合を示し、右の経路は脱糖変異体の場合である。図中の赤線はペプチド、緑とオレンジの球はそれぞれ小胞体シャペロンである。

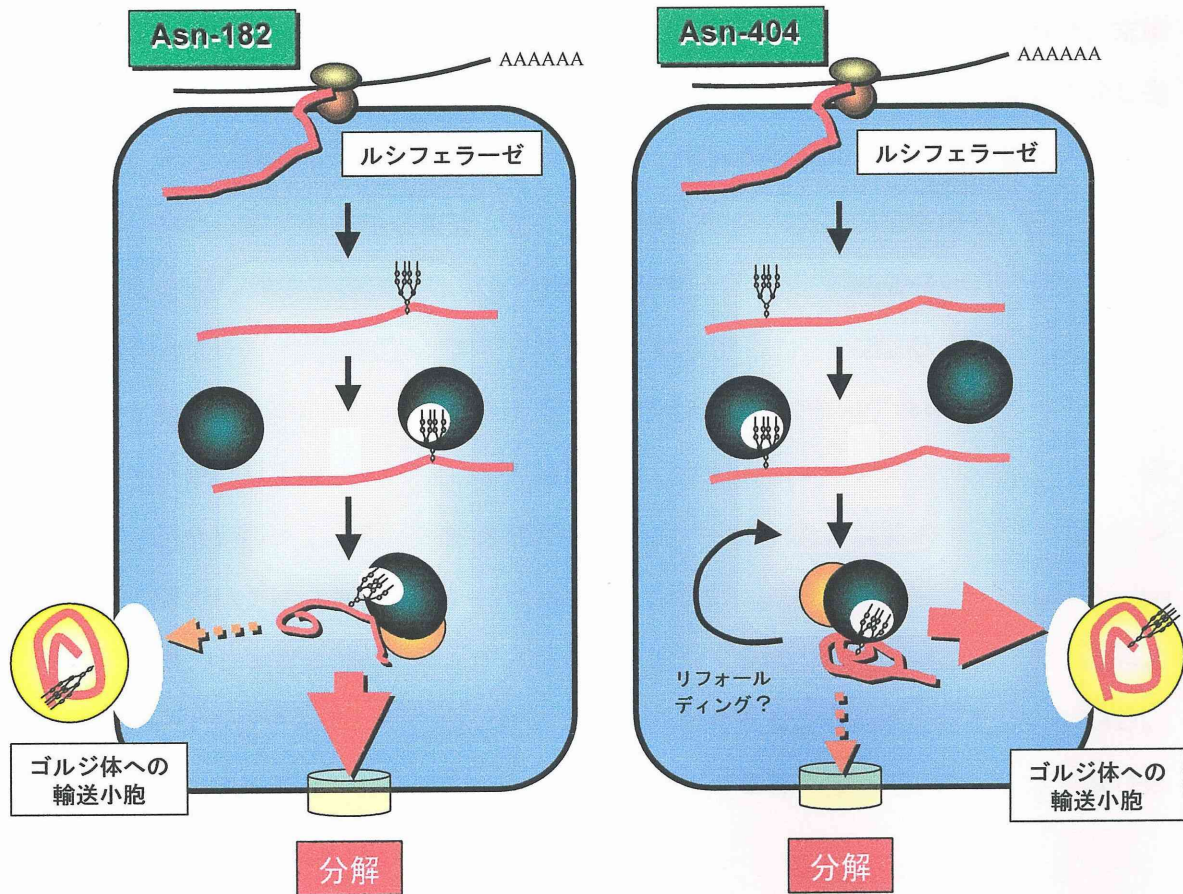


Fig. 3-29 ウミボタルルシフェラーゼにおけるタンパクの折りたたみ予想図

小胞体におけるウミボタルルシフェラーゼの脱糖変異体のシャペロン認識、折りたたみの予想図である。左の経路は182番目の糖鎖を除いた場合、右の経路は404番目の糖鎖を除いた場合である。図中の赤線はペプチド、緑とオレンジの球はそれぞれ小胞体シャペロンである。

3.3.7 シグナル配列切除及び C 末端配列切除

一般に分泌タンパクの N 末端には 15~30 残基ほどの分泌シグナル配列が存在する。精製された *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの N 末端配列決定は試みられているが、末端アミノ酸がブロックされており確認されていない (24, 34)。そこで N 末端を切除し先端にメチオニン残基を付加した変異体を作成し、哺乳類細胞に遺伝子導入後、タンパク発現及び分泌に関する挙動を確認した。その結果、細胞内及び細胞培地のいずれにおいても、N 末端切除変異体は活性が全く確認できず、また抗 *V.hilgendorfii* 抗体を用いたウェスタンブロット解析でもタンパクは検出されなかった。一方、C 末端切除変異体についても発現の確認を行った。しかし、N 末端切除変異体同様いずれの変異体でも活性、発現ともに確認はできなかった。この結果より、*C.noctiluca* ルシフェラーゼ単体での発現には、完全長のアミノ酸配列が必要であることが示された。以前に *V.hilgendorfii* ルシフェラーゼではアミノ酸残基 28~312 番目をマウス V_{NP} シグナル配列と *Staphylococcus aureus* 由来のシングル Fc バインディングドメイン (SpA-D) の下流につなげた際に、*V.hilgendorfii* ルシフェラーゼの部分配列でも活性を有することが報告されている (42)。この場合は、キメラタンパクになったことでタンパク自体の安定性が増し、活性及び発現確認が可能であったと推測される。

第4章 結語

ウミボタル生物発光は反応構成物質が特定され、遺伝子発現のモニタリングツールとしての応用が行われている。しかしながら、酵素ルシフェラーゼの分子機構は明らかにされておらず、活性部位、分泌シグナル配列、糖鎖機能などは解明されていない。本研究は *V.hilgendorffii* と *C.noctiluca* ルシフェラーゼの特性解析からウミボタルルシフェラーゼ分子機構の解明を試みた。

V.hilgendorffii ルシフェラーゼは既に cDNA がクローニングされており、555 個のアミノ酸からなる糖タンパクであることが知られていた。しかし、分子量、分泌シグナル配列の決定はされていなかった。今回、精製した *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼの分子量をマスマスペクトルにより測定したところ、分子量は 61.9 kDa であり、cDNA から計算された分子量よりも 300~500 Da 小さい値であった。この相違は分泌シグナルが切除されたことに起因していると考えられ、ルシフェラーゼに結合している N 結合型糖鎖が約 2,000~3,000 Da であることから、分泌シグナル配列は N 末端の 15~30 アミノ酸残基と推定される。一方、本研究によって初めて明らかにされた浮遊性ウミボタル *C.noctiluca* ルシフェラーゼはアミノ酸 553 個から成るのタンパクであった。*C.noctiluca* ルシフェラーゼは *V.hilgendorffii* 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 *C.noctiluca* ルシフェラーゼの酵素特性は *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼとほぼ同じであるが、*C.noctiluca* ルシフェラーゼは細胞外への分泌効率が高いという特徴を持っていた。これは *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼと *C.noctiluca* ルシフェラーゼの N 末端領域の相同性が 51.5% と他の部位よりも低く分泌シグナル配列が異なることに起因すると推察される。*V.hilgendorffii* ルシフェラーゼに対するアミノ酸シーケンスと *C.noctiluca* ルシフェラーゼの N 末端切除変異体作成により N 末端配列の決定を試みたが、分泌シグナル配列の決定には至らなかった。この点については、今後、N 末端配列の乗せ替え、アミノ酸置換等のタンパク工学的な手法により、分泌シグナル配列の解明を目指したいと考えている。

本研究の大きな成果はウミボタルルシフェラーゼの糖鎖機能について新知見を得たことである。これまでに *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼは N 結合型糖鎖を持つ糖タン

パクであることが知られていた。この糖鎖機能についてはこれまでに研究報告が無く、その機能は不明であった。クローニングした *C.noctiluca* ルシフェラーゼも N 結合型糖鎖を持ち、配列中の糖鎖修飾部位は *V.hilgendorffii* ルシフェラーゼと一致した。ウミボタルルシフェラーゼにおける糖鎖機能を解明するため、*C.noctiluca* ルシフェラーゼに対し、ルシフェラーゼの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、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、脱糖による活性の減少は無いという結果を得た。この結果はウミボタル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示していた。ウミボタルルシフェラーゼは大腸菌で発現しないことが知られている。この理由は、大腸菌での糖鎖修飾が行われないため、タンパクの折りたたみが正確に行われないためと推測される。

引用文献

- (1) 羽根田弥太 (1985) 「発光生物」, 恒星社厚生閣
- (2) 今井一洋 (1989) 「生物発光と化学発光」, 廣川書店
- (3) Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1961) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223-239.
- (4) Thompson, E. M., S. Nagata and F. I. Tsuji (1989) Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6567-6571.
- (5) Sumiya, M., V. R. Viviani, N. Ohba and Y. Ohmiya (1998) Cloning and expression of a luciferase from the Japanese luminous beetle *Ragophthalmus ohbai*. In *Bioluminescence and Chemiluminescence. Proceeding of 10th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence* (Edited by A. Roda, M. Pazzagli, L. J. Kricka and P. E. Stanley) , pp. 433-436, Bologna, Italy.
- (6) V. R. Viviani, E. J. H. Bechara and Y. Ohmiya (1999) Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* **38**, 8271-8279.
- (7) Lorenz, W. W., R. O McCann, M. Longiaru and M. J. Cormier (1991) Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**, 4438-42.
- (8) Bae, Y. M. and Hastings J. W. (1994) Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*. *Biochim Biophys Acta.*, 1219, 449-56.
- (9) Inouye, S., K. Watanabe, H. Nakamura and O. Shimomura (2000) Secretional luciferase of the luminous shrimp *Oplophorus gracilirostris*: cDNA cloning of a novel imidazopyrazinone luciferase. *FEBS Lett.*, **481**, 19-25.
- (10) Müller, G. W. (1890) Neue Cypridiniden., *Zool. Jahrb. System.*, **5**, 211-252.
- (11) Harvey, N. (1952) *Bioluminescence* (Edited by N. Harvey) , pp.297-331, Academic Press,

New York.

- (12) Johnson, F. H. and O. Shimomura (1978) Introduction to the Cypridina system. *Method. in ENZYMOL.* **57**, 331-364.
- (13) Tsuji, F. I. (1978) Cypridina luciferin and luciferase. *Method. in ENZYMOL.* **57**, 364-372.
- (14) Shimomura, O. and F. H. Johnson (1971) Mechanism of the luminescent oxidation of cypridina luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 340-346.
- (15) Stone, H. (1968) The enzyme catalyzed oxidation of Cypridina luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 386-391.
- (16) Shimomura, O., F. H. Johnson and T. Masugi (1969) Cypridina Bioluminescence: light-emitting oxyluciferin-luciferase complex. *Science* **164**, 1299-1300.
- (17) Kishi, Y., T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura and F. H. Johnson (1966) Cypridina bioluminescence I Structure of luciferin. *Tetrahedron Lett.*, **7**, 3427-3436.
- (18) Kishi, Y. and T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura and H. Kishimoto (1966) Cypridina bioluminescence III total synthesis of luciferin, *Tetrahedron Lett.*, **7**, 3445-3450.
- (19) Goto, T. and H. Fukatsu (1969) Cypridina bioluminescence VII. chemiluminescence in micelle solutions — a model system for cypridina bioluminescence, *Tetrahedron Lett.*, **10**, 4299-4302.
- (20) Inouye, S., Y. Ohmiya, Y. Toya, and F. I. Tsuji (1992) Imaging of luciferase secretion from transformed Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 9584-9587.
- (21) Tanahashi, Y., Y. Ohmiya, S. Honma, Y. Katsuno, H. Ohta, H. Nakamura and K. Honma (2001) Continuous measurement of targeted promoter activity by a secreted bioluminescence reporter, *Vargula hilgendorffii* luciferase. *Anal. Biochem.* **289**, 260-266.
- (22) Kajiyama, K. (1912) Study on ostracod of Misaki. *Zool. Mag.*, **289**, 609-618.
- (23) Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga (1961) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223-239
- (24) Tsuji, F. I., R. V. Lynch III and C. L. Stevens (1974) Some properties of luciferase from the bioluminescent crustacean, *Cypridina hilgendorffii*. *Biochemistry*, **13**, 5204-5209.

- (25) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- (26) Abe, K., T. Nagata and H. Hashizume (1996) Digestive enzyme from upper lip of a bioluminescent ostracod, *Vargula hilgendorffii*. Reports of the Faculty of Science, Shizuoka university, **30**, 35-40.
- (27) Sala-Newby, G. B., C. M., Thompson and A. K. Cambell (1996) Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. *Biochem. J.*, **313**, 761-767.
- (28) Saito, T., M. Fukuda and S. Taguchi (1986) Electron microscopic studies on the luminous gland of *Cypridina hilgendorffii*. *Zool. Sci.* **3**, 391-394.
- (29) Marshall, R. D. (1972) Glycoprotein. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 673-702.
- (30) Towbin, H., T., Staehelin and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **76**, 4350-4354.
- (31) Haneda, Y (1955) *The bioluminescence of biological systems* (Edited by F. H. Johnson) , pp.356-358, The American Asso. for the Advancement of Science, Washington D.C.
- (32) von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21.
- (33) Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- (34) Thompson, E. M., S. Nagata and F. I. Tsuji (1990) *Vargula hilgendorffii* luciferase: a secreted reporter enzyme for monitoring gene expression in mammalian cells. *Gene* **96**, 257-262.
- (35) Kobayashi, K., D. Shinohara, T. Nabetani, H. Niwa and Y. Ohmiya (2000) Purification and characteristic properties of the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *ITE Lett.* **1**, 422-426.
- (36) Tsuji, F.I., R.V. Lynch III and C.L. Stevens (1972) Evidence for a calcium requirement in the *Cypridina* bioluminescence reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1544-50.
- (37) Chou, P.Y. and G.D. Fasman (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from

their amino acid sequence. *Adv. in Enzymol.*, **47**, 45-148.

(38) Varki, A. (1993) Biological roles of oligosaccharides. *Glycobiology* **3**, 97-130.

(39) Joseph, D. R., W. Lawrence and B.J. Danzo (1992) The role of asparagine-linked oligosaccharides in the subunit structure, steroid binding, and secretion of Androgen-Binding Protein. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1127-1134.

(40) Stahnke, G., R. C. Davis, M. H. Doolittle, H. Wong, M. C. Schotz and H. Will (1991) Effect of N-linked glycosylation on hepatic lipase activity. *J. Lipid Res.* **32**, 477-484.

(41) Ellgaard, L., M. Molinari and A. Helenius (1999) Setting the standards: Quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888.

(42) Maeda, Y., H. Ueda, J. Kazami, G. Kawano, E. Suzuki and T. Nagamune (1996) Truncation of Vargula luciferase still results in retention of luminescence. *J. Biochem.* **119**, 601-603.

研究業績一覧

<論文>

- Koji Kobayashi, Daisaku Shinohara, Takuji Nabetani, Haruki Niwa and Yoshihiro Ohmiya: Purification and characteristic properties of the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfi*., *ITE Lett.*, 2000, **1**, 422-426.
(本文関連箇所 第2章)
- 小林孝次、中島芳浩、近江谷克裕：浮遊性介形虫 *Cypridina noctiluca* 由来ルシフェラーゼ遺伝子のクローニング及び特性解析. 電子科学研究科研究報告 2003年3月、第24号
(本文関連箇所 第3章)
- Koji Kobayashi, Yoshihiro Nakajima, Toshiteru Enomoto and Yoshihiro Ohmiya: Cloning and characterization of glycochain bound luciferase cDNA from the luminous marine ostracod *Cypridina noctiluca*., *Photochem. Photobio.* Submitted for publication.
(本文関連箇所 第3章)

<報文>

- Koji Kobayashi, Daisaku Shinohara, Takuji Nabetani, Haruki Niwa, and Yoshihiro Ohmiya: Purification and properties of the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfi*., *Proceedings of the 11th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence*, pp.87-90.
(本文関連箇所 第2章)

<特許>

- 小林孝次、榎本敏照、近江谷克裕：高分泌型ウミホタル類緑発光酵素
(2002年12月6日特許出願)
(本文関連箇所 第3章)

<学会発表（口頭発表）>

- Koji Kobayashi, Daisaku Shinohara, Takuji Nabetani, Haruki Niwa and Yoshihiro Ohmiya:
Purification and properties of the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfii*.
11th International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence (2000,
Monterey) .
(本文関連箇所 第2章)
- Koji Kobayashi, Daisaku Shinohara, Takuji Nabetani, Haruki Niwa and Yoshihiro Ohmiya:
Purification and properties of the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfii*.
14th International Symposium on Ostracoda (2001, Shizuoka)
(本文関連箇所 第2章)
- Koji Kobayashi, Yoshihiro Nakajima, Hidehiro Kubota and Yoshihiro Ohmiya: Cloning
and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Cypridina noctiluca*.
30th Annual Meeting of the American Society for Photobiology. (2002, Quebec city)
(本文関連箇所 第3章)
- 小林孝次、中島芳浩、久保田英博、近江谷克裕：浮遊性 *Cypridina noctiluca* 由来分
泌ルシフェラーゼ cDNA のクローニング及び構造特性解析
第75回 日本生化学会大会 (2002, 京都) 生化学 Vol.74, No.8, p.888.
(本文関連箇所 第3章)

謝辞

本研究は静岡大学大学院 電子科学研究科 生体制御講座及び産業技術総合研究所 関西センター 人間系特別研究体 細胞機能操作研究グループにおいて近江谷克裕先生のご指導のもと行われたものであり、修士課程より5年間、学術的なご指導の他、多くの貴重な経験をさせて頂き、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり懇切丁寧にご指導頂いた産業技術総合研究所の小島正己研究員、中島芳浩研究員に厚く御礼申し上げます。

共同研究としてご助言、ご指導頂いた電気通信大学 丹羽治樹教授、株式会社アトー久保田英博さん、榎本敏照さんに厚く御礼申し上げます。

ウミボタル研究でルシフェリンをご提供頂いた元名古屋大学 故中村英士教授に感謝を捧げると共にご冥福をお祈り致します。

共同研究者としてサポートして頂いた篠原大策さん、鍋谷卓司さん、本研究へのご助言、ご指導頂いた小島哲さん、サンプル採集にご協力頂いた小江克典さん、若山典央さんに感謝申し上げます。

研究活動及び日常生活においてお世話頂いた静岡大学教育学部近江谷研究室の皆様、産業技術総合研究所 細胞機能操作グループの皆様に感謝申し上げます。

最後に、

大学院進学を理解し、精神的・経済的な支援を頂いた両親及び家族に感謝申し上げます。

2003年 2月 5日

小林孝次