クラゲの発光タンパク質“エクオリン”

——構造と機能の遺伝子工学的的手法による解析 井上 敏^{*1,2}, 柿 佳之^{*1}

冷たい光が輝く生物発光——ホテルや夜光虫のロマンチックな発光のナゾには多くの化学者が挑戦してきた。特に我が国は、それらの天然有機化学的研究においては世界のトップに立っていることはよく知られている。さらに将来、この解説で述べられるような遺伝子工学的な方法を使って新たな研究分野が開拓される期待が強まってきた。発光機構について、タンパク質、複雑な有機化合物、カルシウム間のいわゆる「力ギと力ギ穴」の相互作用から説明されているところにも、現代化学の動向がうかがえるであろう。

一般に、カルシウムイオンは、筋収縮、細胞の分泌活動、ホルモンの作用、伝達物質の遊離など、細胞間において重要な役割を果たしている。これら多様な機能の発現・制御には多くの場合、カルシウム受容タンパク質が関与している。現在、タンパク質の構造まで詳しく研究されているものとして、カルモジュリン⁽¹⁾、トロポニンC⁽²⁾、パルプアルブミン⁽³⁾などがよく知られている。これから述べる発光という特異な機能を担う“エクオリン”もこれらカルシウム受容タンパク質の一つである。ここでは、“エクオリン”の構造と機能の解明のために筆者らが行ってきた遺伝子工学的アプローチについて紹介するとともに、その応用の可能性についても述べることにする。

1921年、Harveyは、腔腸動物のヒドロゾア目に属する発光オワンクラゲの抽出乾燥物に塩化カルシウム溶液を加えると発光現象が認められることを観察した。これが、カルシウムイオンによって発光する物質がクラゲ内に存在することを示した最初の報告である⁽⁴⁾。その後、1962年、ShimomuraはJohnson, Saigaらとともに、発光オワンクラゲ(*Aequorea aequorea*)からカルシウムイオンと特異的に反応して発光するタンパク質を分離、精製し、“エクオリン”(Aequor-

in)と名づけた⁽⁵⁾。そして、1984年、我々九州大学グループが、組換えDNAの手法を用いて、発光タンパク質エクオリンのcDNAクローニングに成功し⁽⁶⁾、さらに、大腸菌内での発現⁽⁷⁾、塩基特異的変異法によるタンパク質の構造と機能の解析へと進展するに至っている⁽⁸⁾。

生物発光に関する酵素でクローニングされているものとしては、現在までのところ発光バクテリアのルシフェラーゼ⁽⁹⁾、ホテルのルシフェラーゼ⁽¹⁰⁾などが知られている。また、発光生物に関して興味のある方は、文献11)~14)の総説を参照していただきたい。

エクオリンの一般的性質

発光オワンクラゲ(*Aequorea*)は、米国ワシントン州フライデー・ハーバー島近辺に7~9月に発生し、エクオリンはそのクラゲの傘周辺に存在するphotocyteと呼ばれる球状をした細胞構造の中に含まれている。Shimomuraらによれば、約100,000匹のクラゲ(約5トン)から精製エクオリン約200mgが得られたという⁽¹⁵⁾。精製エクオリ

表1 精製エクオリンの一般的性質

分子量	約20,000
等電点	4.2~4.9
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	27.0
溶解度	>30 mg/ml
発光スペクトル	$\lambda_{\text{max}}=465\text{ nm}$
光子収量	$4.3\sim4.5\times10^{15}\text{ photon/mg, }25^\circ\text{C}$
結合Ca ²⁺ 数	2~3個
発光定数	
rise	100~500 sec ⁻¹ , 25°C
decay	0.6~1.2 sec ⁻¹ , 20~25°C

“Aequorin”, A Photoprotein of *Aequorea victoria*—Structural and Functional Analysis by Genetic Engineering

*1 Satoshi INOUE, Yoshiyuki SAKAKI, 九州大学遺伝情報実験施設

*2 現テッソ(株)開発室

図1 エクオリンの発光、再生のメカニズム
→は、 Ca^{2+} 結合可能性部位。2-ME は、2-メルカプトエタノール

リンの性質は表1に示すように詳細に調べられている。

一方、エクオリンで最も興味ある性質は、カルシウムイオンによる発光である。現在までに想像されている発光、再生のメカニズムは図1のようにまとめられる。エクオリンは、タンパク質部分(酵素)であるアポエクオリン1分子に、基質セレンテラジン (coelenterazine) 1分子が、1分子の酸素 (O_2) と複合体を形成した状態で存在していると考えられている (どのようなコンフォメーションでアポエクオリン、分子状酸素、そして基質が保持されているかは、非常に興味深い、正確には不明である)。このような活性化状態にあるエクオリン分子にカルシウムイオンが結合すると、エクオリン分子の高次構造に変化が起こり、波長 465 nm にピークを有する光“冷光”(熱を出さない発光)を発し、酸化したセレンテラジン (セレンテラミド) と CO_2

とを生成する。発光のエネルギー(約 60 kcal/mol)は、セレンテラジンと分子状酸素の複合体が酸化分解する過程の励起エネルギーに由来し、“メガネ状構造”のジオキセタン経由で発光することが示唆されている⁽¹⁶⁾。

一方、発光を終えたエクオリン分子(正確にはアポエクオリタンパク質)は EDTA 存在下、 O_2 、セレンテラジンと 2-メルカプトエタノールとともに 4°C で約 2 時間放置することにより、カルシウムイオンによる発光可能なエクオリンとして再生させることができる⁽¹⁷⁾。

アポエクオリンの cDNA クローニング によるエクオリンの一次構造の推定^(6,18)

1. アポエクオリンの cDNA クローニング

カルシウムイオンにより発光するタンパク質“エクオリン”には少なくとも 8 種類の イソエクオリン (isoequorin) の存在が示されており⁽¹⁵⁾、タンパク質からの一次構造の決定が困難であった。そこで、筆者らは、組換え DNA の手法を用い、アポエクオリタンパク質の cDNA クローニングをすることにより、一次構造を推定しようと試みた。基本的なクローニングの戦略を図2に示した。すなわち、オワンクラゲより cDNA ライブラリーを作成し、天然のエクオリンより決定した部分アミノ酸配列に対応する 14-mer のオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして cDNA ライブラリーよりスクリーニングする方法である。次に、その手順を簡単に示そう。

図2 エクオリンの cDNA クローン取得の方法

- A) Val-Lys-Leu-(Asp)-(Phe)-Asp-Phe-Asp-Asn-Pro...
 Ser
 Gly
 Leu
- B) Val-Lys-Leu-Asn-Thr-Asp-Phe-Asp-Asn-Pro...
 Probe I 5' GAC TTC GAC AAC CC 3'
 T T T T
- C) Met-(Phe or Thr)-Asn-(Phe)-Leu-Asp-Val-Asn...
- D) Met-Asp-Pro-Ala-Cys-Glu-Lys-Leu-Tyr-Gly...
 Probe II 5' ATG GAT CCT GCT TG 3'
 C C C
 G G
 A A

図3 エクオリンの部分アミノ酸配列とプローブに用いた合成オリゴヌクレオチド

i) シアトル近郊のフライデー・ハーバー島で採取した発光オワンクラゲ (*A. victoria*) からクラゲの傘の縁 (発光する部分) をカッターで切り取り、フェノール法で全 mRNA を抽出し、オリゴ (dT) セルロースカラムクロマトグラフィーによりポリ A⁺ RNA を取得した。このポリ A⁺ RNA を Okayama-Berg 法に基づき、逆転写様酵素反応により mRNA→cDNA とし、 1.5×10^4 のライブラリーを作成した⁽¹⁸⁾。

ii) Mayo Foundation の Blinks 博士から購入した天然のエクオリンを用い、N末端近傍のアミノ酸配列とプロモシアン処理した3つの主要フラグメントのN末端のアミノ酸配列を決定し、スクリーニングに用いるプローブである 14-mer の混合オリゴヌクレオチドを合成する (図3)。一方、天然のエクオリンのアミノ酸組成とトリプシン処理したフラグメントのアミノ酸組成 (いわゆるペプチドマッピング) を決定した。

iii) 2種の合成オリゴヌクレオチドをプローブとして cDNA ライブラリーよりコロニーハイブ

リダイゼーションを行ない⁽¹⁹⁾、3個のダブルポジティブな cDNA クローンを得、最長のクローンを pAQ 440 と名づけた (図4)。常法により cDNA クローンの塩基配列を Maxam-Gilbert 法で決定し⁽²⁰⁾、cDNA クローンを得た。

2. cDNAクローンからのエクオリンの一次構造の推定

決定した cDNA の塩基配列 (図5) がアポエクオリンの cDNA であることは、次の3点より強く示唆される。

a) 天然エクオリンのアミノ酸配列の決定結果から、それに対応するアミノ酸配列が cDNA から予想されるアミノ酸配列上に存在すること (図5のハーフトーン部分)。アポエクオリンタンパク質N末端は、アミノ酸配列の結果と考え合わせてバリンとした。

b) ペプチドマッピングから得られたフラグメントが対応する cDNA 上によく一致していること (図5の矢印部分)。アポエクオリンのC末端は、cDNA 塩基配列の終止コドンの TAA の位置とエクオリンと (L, Y, G, G, A, V, P) の組成をもつフラグメントの一致からプロリンと決定した。

c) a), b) の結果から、アポエクオリンは 189 アミノ酸残基よりなり、推定分子量は 21,439 となり、ゲル濾過より得られている分子量の 20,000 ととも一致している。さらに、アミノ

図4 アポエクオリンの cDNA クローン pAQ 440 の制限酵素地図と塩基配列決定計画

I, IIはプローブ I, IIに相当する合成オリゴヌクレオチド

TGCAATTCATCTTTGCATCAAGAATTACATCAAATCTCTAGTTGATCAACTAAATTGTCTCGACAACAACAAGCAAAAC -1
 Met Thr Ser Lys Gln Tyr Ser Val Lys Leu Thr Ser Asp Phe Asp Asn Pro Arg Trp Ile
 ATG ACA AGC AAA CAA TAC TCA GTC AAG CTT ACA TCA GAC TTC GAC AAC CCA AGA TGG ATT 60
 Gly Arg His Lys His Met Phe Asn Phe Leu Asp Val Asn His Asn Gly Lys Ile Ser Leu
 GGA CGA CAC AAG CAT ATG TTC AAT TTC CTT GAT GTC AAC CAC AAT GGA AAA ATC TCT CTT 120
 Asp Glu Met Val Tyr Lys Ala Ser Asp Ile Val Ile Asn Asn Leu Gly Ala Thr Pro Glu
 GAC GAG ATG GTC TAC AAG GCA TCT GAT ATT GTC ATC AAT AAC CTT GGA GCA ACA CCT GAG 180
 Gln Ala Lys Arg His Lys Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Gly Gly Ala Gly Met Lys Tyr
 CAA GCC AAA CGA CAC AAA GAT GCT GTA GAA GCC TTC TTC GGA GGA GCT GGA ATG AAA TAT 240
 Gly Val Glu Thr Asp Trp Pro Ala Tyr Ile Glu Gly Trp Lys Lys Leu Ala Thr Asp Glu
 GGT GTG GAA ACT GAT TGG CCT GCA TAT ATT GAA GGA TGG AAA AAA TTG GCT ACT GAT GAA 300
 Leu Glu Lys Tyr Ala Lys Asn Glu Pro Thr Leu Ile Arg Ile Trp Gly Asp Ala Leu Phe
 TTG GAG AAA TAC GCC AAA AAC GAA CCA ACG CTC ATC CGT ATA TGG GGT GAT GCT TTG TTT 360
 Asp Ile Val Asp Lys Asp Gln Asn Gly Ala Ile Thr Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Thr
 GAT ATC GTT GAC AAA GAT CAA AAT GGA GCC ATT ACA CTG GAT GAA TGG AAA GCA TAC ACC 420
 Lys Ala Ala Gly Ile Ile Gln Ser Ser Glu Asp Cys Glu Glu Thr Phe Arg Val Cys Asp
 AAA GCT GCT GGT ATC ATC CAA TCA TCA GAA GAT TGC GAG GAA ACA TTC AGA GTG TGC GAT 480
 Ile Asp Glu Ser Gly Gln Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His Leu Gly Phe Trp
 ATT GAT GAA AGT GGA CAA CTC GAT GTT GAT GAG ATG ACA AGA CAA CAT TTA GGA TTT TGG 540
 Tyr Thr Met Asp Pro Ala Cys Glu Lys Leu Tyr Gly Gly Ala Val Pro ***
 TAC ACC ATG GAT CCT GCT TGC GAA AAG CTC TAC GGT GGA GCT GTC CCC TAA GAAGCTCTACG 602
 GTGGTGATGCACCTGGGAAGATGATGTGATTTTGAATAAAACACTGATGAATTCATCAAAATTTTCCAAATTTTGA 681
 ACGATTTCATCGTTTGTGTTGATTTTGAATTAGGAACAGATTAATCGAATGATTAGTTGTTTTTAAATCAACAG 760
 AACTTACAAATCGAAAAAGT(A)₆₄

図5 アポエクオリン cDNA pAQ440 の全塩基配列

ハーフトーン部分は、エクオリンのアミノ酸配列と一致した部分、矢印部分は、エクオリンのペプチドマッピングと一致した部分、アンダーライン部分は、予想されるポリA付加シグナル配列

酸組成も非常に一致を示した。

筆者らが cDNA クローニングに成功した後、米国の Charbonneau らにより天然エクオリンの一次構造が決定され、cDNA から予想した一次構造と非常に一致を示している⁽²¹⁾。

エクオリンの発光にはカルシウムイオンが必須である。カルシウム受容タンパク質の一般的性質として、その構造に EF-hand と呼ばれる構造をとることが知られている。その構造は対をな

す α -ヘリックスと、それにはさまれたループ構造を持ち、特にループ部分は O-O-O-Gly-Ile(L) O-O (O は酸素原子を含むアミノ酸残基) の共通配列が存在する。代表的なカルシウム受容タンパク質であるカルモジュリン⁽¹⁾、トロポニン C⁽²⁾、パルプアルブミン⁽³⁾などでは、EF-hand 構造部分でカルシウムイオンが結合することが明らかにされている。アポエクオリンの中には3個所の EF-hand 構造が認められ、この部分にカル

図 6 推定アポエクオリンの一次構造とウシカルモジュリンの一次構造との比較

ハーフトーン部分は、同一アミノ酸残基、*印は、物理的・化学的性質の似たアミノ酸残基、矢印の部分は、EF-hand 構造のループ部分

シュウムイオンが結合する可能性が示唆される。しかし、エクオリンの発光に必要なカルシウムイオンの数としては、2 個なのか 3 個なのかは不明である。

代表的なカルシウム受容タンパク質であるウシカルモジュリンのアミノ酸配列とエクオリンのそれと比較して並べてみた(図 6)。カルモジュリンは 148 個のアミノ酸残基よりなり、4 個所の EF-hand 構造を有する。興味深いことに、両者は非常によい一致を示している。特にカルモジュリンの EF-hand ドメインの 3, 4 番目とエクオリンの 2, 3 番目の EF-hand ドメインは、ドメイン間のアミノ酸の距離も一致しており、カルシウムイオン受容タンパク質として進化的な側面からも興味のある問題である。

図 7 は、Kyte と Doolittle の方法を用いてハイドロパシー (hydropathy)*1 を計算し、アミノ酸 9 残基の平均をプロットしたものである(22)。+側

図 7 ハイドロパシープロット

9 アミノ酸残基の平均をプロットしてある。矢印部分は EF-hand 構造のループ部分

は分子中の疎水性残基部分で、分子に埋もれていることを示し、一側は親水性残基部分で、分子の表面に現われていることを示している。カルシウム受容部分 (←→) は、分子の表面に現われていることがわかる。また、この分子中には 55-60 残基部分に疎水性に富む部分があり、疎水的基質であるセレンテラジン、分子状酸素分子と相互作用する部分と推定される。

大腸菌内におけるアポエクオリンの発現⁽⁷⁾

cDNA クローニングしたクローン pAQ 440 が本当にエクオリンに由来の cDNA であるかどうかを確かめるためには、実際に cDNA を用いて活性を有するタンパク質 (Ca²⁺ イオンで発光するエクオリン) を作ることであり、タンパク質の構造と機能の解析にも欠かせないステップである。

筆者らは、大腸菌内での発現を試みた。大腸菌での発現系を作るための戦略を図 8 に示した。プロモーターとしては、IPTG*2 で誘導のかかる *tac**3 のプロモーターを用い、cDNA クローンの前に、合成リンカーを接続することにより、メチオニンから始まる天然のエクオリンと同一のタンパク質を発現させる計画である。すなわち、プロモーター部分の 91 bp のフラグメントを高コピープラスミドベクター pUC 9 にクローニングし、piC 10 を作成した。この piC 10 の *Bam*H I-*Eco*R I 部分に合成リンカーとアポエクオリンの cDNA の *Hind* III-*Bam*H I のフラグメントを接続し、

*1 筆者らが作り出した言葉で、親水性・疎水性を表わすパラメータ。詳しくは文献(22)を参照。

*2 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

*3 *lac* (ラクトースオペロン系) と *trp* (トリプトファンオペロン系) の融合型の強力なプロモーター

図8 アポエクオリンの大腸菌内での発現の方法
下段にプロモーター近傍の塩基配列を示した。

図9 pAQ440 クローンの大腸菌での発現とN末端近傍のアミノ酸配列
矢印(→)はプロモーターの方向、(←→)はEF-hand構造部分、■は異種アミノ酸配列

piQ5を構築した。このアポエクオリン遺伝子は、IPTGで誘導可能な*lac*、*tac*のプロモーターの支配下にある。

表2 大腸菌内でのアポエクオリンの発現

プラスミド	IPTG	
	-	+
pUC9	0	0
piC10	0	0
pAQ440	0.7	0.6
piQ9-PE	1.9	176.5
piQ9-2HE	0.9	250.8
piQ5	10.5	325.2

×10⁸ photon/sec (培養菌体1ml当たり)

一方、pUC9-2のHindⅢ-EcoRⅠ部分にcDNAのHindⅢ-EcoRⅠフラグメントを挿入し、N末端に*lacZ'*のアミノ酸配列を有する融合タンパク質の型で発現するpUC9-2HEと、pUC9のPstⅠ-EcoRⅠ部分にcDNA PstⅠ-EcoRⅠを挿入したpUC9-PEも作成した(図9)。

酵素活性は、IPTG誘導後2時間培養し、集菌、洗浄し、10mM EDTAを含む30mM Tris-HCl (pH7.6)に溶かし、超音波処理により菌体破碎後、残渣を遠心分離して粗酵素液として測定した。酵素溶液に基質であるセレンテラジン、2-メルカプトエタノールを加え、氷上で2時間放置した後、フォトマルのセル中に移し、30mM CaCl₂をインジェクションし、発光量子を測定した。測定結果を表2に示す。非常に興味深いのは、cDNAクローンであるpAQ440でも微弱ながら活性が検出されたこと、またcDNA領域全体をpUC9に移したpiQ9-PEにおいて相当量の活性が検出されたことで、cDNAの翻訳領域の上流部分にShine-Dalgarno様配列が存在していることを示唆している。

このようにして筆者らは、酵素活性を有するエクオリンタンパク質を大腸菌内で産生させることに成功した。

塩基特異的変異法による構造と機能の解析⁽⁸⁾

1. 塩基特異的変異法

塩基特異的変異法と呼ばれる手法は、DNA の特定の部分に変異を挿入し、解析する方法であるが、一般に変異プライマーとしては合成オリゴヌクレオチドが用いられる。筆者らは、プラスミドを用いたギャップド-ヘテロデュプレックス法により特異的に変異を cDNA に挿入した。この場合、プラスミドを用いてエクオリンの発現系が確立していること、cDNA 領域が短いこと、また適当な制限酵素サイトがあることなどより、一本鎖の M13 フェージを用いた系と比べて有利であるため、ヘテロデュプレックス法を用いた。簡単に、その方法を図 10 に示した。すなわち、変異を挿入しようとする部分に一本鎖を形成させ、変異プライマーがアニーリングできるように、同一のプラスミドから、一方は唯一存在する制限酵素 *Aat* II で切断し、アルカリホスファターゼ処理を行ない（フラグメント I）、他方は *Hind* III-*Eco* R I 処理後、そのフラグメントを分離する（フラグメント II）。両フラグメント I、II を混合し、さらに変異原となる合成オリゴヌクレオチドのプライマーを加え、100℃ で 2 分間処理して一本鎖に変性させる。そして、冷却、アニーリング後、ギャップを持ったヘテロデュプレックス部分にプライマーの付加したプラスミドを形成させ（III）、Klenow フラグメント、dNTP、T4 リガーゼとともに片側鎖に変異の入った修復したプラスミドを作成する（IV）。このプラスミドを大腸菌にトランスフォームし、プライマーをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ない、変異の入ったプラスミド（確率的には 50% が変異プラスミド）を有するトランスフォーマントを得る。さらに、トランスフォーマントからプラスミドを調製し、同様の操作を繰り返す、変異の入ったプラスミドだけを有するトランスフォーマントを得る。

図 10 ギャップド-ヘテロデュプレックス法による塩基特異的変異の導入法

鎖の M13 フェージを用いた系と比べて有利であるため、ヘテロデュプレックス法を用いた。簡単に、その方法を図 10 に示した。すなわち、変異を挿入しようとする部分に一本鎖を形成させ、変異プライマーがアニーリングできるように、同一のプラスミドから、一方は唯一存在する制限酵素 *Aat* II で切断し、アルカリホスファターゼ処理を行ない（フラグメント I）、他方は *Hind* III-*Eco* R I 処理後、そのフラグメントを分離する（フラグメント II）。両フラグメント I、II を混合し、さらに変異原となる合成オリゴヌクレオチドのプライマーを加え、100℃ で 2 分間処理して一本鎖に変性させる。そして、冷却、アニーリング後、ギャップを持ったヘテロデュプレックス部分にプライマーの付加したプラスミドを形成させ（III）、Klenow フラグメント、dNTP、T4 リガーゼとともに片側鎖に変異の入った修復したプラスミドを作成する（IV）。このプラスミドを大腸菌にトランスフォームし、プライマーをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ない、変異の入ったプラスミド（確率的には 50% が変異プラスミド）を有するトランスフォーマントを得る。さらに、トランスフォーマントからプラスミドを調製し、同様の操作を繰り返す、変異の入ったプラスミドだけを有するトランスフォーマントを得る。

2. 変異体エクオリンを用いて得られた情報

1) 発光に關与するカルシウムイオンは几个必要なのか？

アポエクオリンの cDNA の一次構造から推定したカルシウムイオン結合部位（EF-hand ドメイン）は、3 個所ある。発光にカルシウムイオンが必須なことから、少なくとも 1 個所はカルシウムイオンが結合し、既報によれば 2～3 個のカルシウムイオンが発光に關与している。部位特異的変異法により、EF-hand 構造のループ部分でターン構造に必要な Gly をアミノ酸の物理的、化学的性質の異なる Arg へと変換した結果を示した。表 3 からわかるように、ドメイン I、II はその活性の低下から考えて必須であると

表 3 塩基特異的変異法に用いたプライマー合成オリゴヌクレオチド, 変異アミノ酸位置およびその結果

No.	合成オリゴヌクレオチド	変異アミノ酸位置	相 対 活 性 (%)	推定機能部位
対 照	—	—	100	—
#G1R	5' ACCACAATCGAAAAATC 3'	Gly (29)→Arg	0	EF-hand (I)
#G2R	ATCAAAATCGAGCCATT	Gly (122)→Arg	49	EF-hand (II)
#G3R	TGAAAGTCGACAACTCG	Gly (158)→Arg	97	EF-hand (III)
#C1S	CAGAAGATTCCGAGGAA	Cys (145)→Ser	69	-SH group
#C1R	CAGAAGATCGCGAGGAA	Cys (145)→Arg	55	-SH group
#C2S	CAGAGTGTCCGATATTG	Cys (152)→Ser	66	-SH group
#C3S	TCCTGCTTCCGAAAAGC	Cys (180)→Ser	33	-SH group
#HF	CCAAACGATTCAAAGAT	His (58)→Phe	0	活性部位 (?)

考えてよいであろう。一方、ドメインⅢについては活性に変化がみられない。しかし、カルシウム結合ドメインの構造の変化, すなわち実際にどのように立体構造が変化するのか, またカルシウムイオンとの相互作用がまったくなくなっているのか否かは不明であるので, この変換により本当に活性に影響がないのか否かはさらに検討が必要である。

2) システイン残基の影響は？

一般に、カルシウム受容タンパク質にはシステイン残基がほとんど存在しない。しかし、興味深いことに、アポエクオリン中にはシステイン残基が3個存在する。また、アポエクオリンの再生の過程で過剰の 2-メルカプトエタノールが必要であることより、エクオリンが発光した後のアポエクオリンにおいては -S-S- 結合が形成されている可能性がある。実際に、システインをセリンに変換してその機能を調べた結果によると、アミノ酸側鎖の -SH を -OH に変換した場合、その

活性の変化は、表 3 に掲げた合成オリゴヌクレオチドのうち C1S, C2S, C3S は、それぞれ対照の 69%, 66%, 33% となり、再生、発光の過程での何らかの関与が示唆される。一方、1 番目のシステインは、その周辺のアミノ酸残基が負の電荷に富み、他のシステインと異なることから注目されたが、システインをアルギニンに変換した場合 55% と、C1S の場合と比べて大きく変化しないので、活性の低下はタンパク質の 3 次構造の変化による影響ではないように思われる。

3) 基質、酸素と相互作用する可能性のある部分は？

分子状酸素と関与する部分として、ハイドロパシーよりアポエクオリンの疎水性に富む部分 55-60 残基部分で、なおかつ酸素分子を固定するのに都合のよいヒスチジン残基に注目した。ヒスチジン残基のイミダゾール部分を分子の大きさのよく似たフェニル残基を持つフェニルアラニンへと変換した (HF) ところ、活性がまったくなくなっ

たことから、その可能性が強く示唆された。そのモデルを図11に示した。

エクオリンの生命科学への利用

エクオリンの最大の特徴は、発光するということである。この微弱発光は種々の用途に利用することが可能である。それには、エクオリントタンパク質自身

図 11 予想されるアポエクオリンのエクオリンへの再生のメカニズム
2-ME: 2-メルカプトエタノール

を利用する場合とアポエクオリン遺伝子を利用して産生した遺伝子産物（アポエクオリン）を利用する場合とが考えられる。たとえば、

1) 今まで用いられてきたようにカルシウムイオン（ストロンチウムイオンや一部のランタノイド系金属イオン）の発光を利用して、細胞内、外のカルシウムイオンの濃度の測定を行なうことが可能である。

2) 検出感度の良さを利用して、ラジオアイソトープの代替えとしプローブに使用することも考えられる。発光のメカニズムを理解することにより、その可能性は充分高いと考えられる。

3) エクオリンの遺伝子そのものを利用することも可能である。たとえば、検出感度の高いことから、動植物の細胞における遺伝子発現マーカーとして利用できる（大腸菌 $10\ \mu\text{l}$ 以下の培養液においても充分検出可能である）。

4) もちろん、一般的なカルシウム受容タンパク質のモデル研究に利用できることは言うまでもない。

*

現在まで筆者らが行なってきた、カルシウム受容発光タンパク質“エクオリン”の研究について述べてきた。遺伝子の cDNA クローニングの手法を用いることにより、その構造と機能を理解しようと進めてきたが、エクオリンの高次構造（特に3次構造）に関する情報が少なく、必ずしも充分とはいえない。構造と機能、特に発光のメカニズムを正確に理解するには、このような手法と同時に、NMR やX線解析のデータが必要となる。筆者らは、このようなアプローチも導入して研究を展開したいと考えている。

最後に、共同研究者の野口正人、宮田敏行、岩永貞昭、宮田隆、高木康敬、F. I. Tsuji、後藤俊夫の諸先生に感謝いたします。

（昭和61年10月5日受理）

文 献

- 1) D. M. Watterson, F. Sharief & T. C. Vanaman : *J. Biol. Chem.*, **255**, 962 (1980).
- 2) J. H. Collins, J. D. Potter, M. J. Horn, G. Wilshire & N. Jackman : *FEBS Lett.*, **36**, 268 (1973).
- 3) R. H. Kretsinger & C. E. Nockolds : *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313 (1983).

- 4) E. N. Harvey : *Biol. Bull.*, **151**, 89 (1921).
- 5) O. Shimomura, F. H. Johnson & Y. Saiga : *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962).
- 6) S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, T. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata & F. I. Tsuji : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3154 (1985).
- 7) S. Inouye, Y. Sakaki, T. Goto & F. I. Tsuji : *Biochemistry*, **25**, 8425 (1986).
- 8) F. I. Tsuji, S. Inouye, T. Goto & Y. Sakaki : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8107 (1986).
- 9) D. H. Cohen, A. J. Mileham, M. I. Simon, K. H. Neelson, S. K. Rausch, D. Bonam & T. O. Bailwin : *J. Biol. Chem.*, **260**, 6139 (1985).
- 10) J. R. Wet, K. V. Wood, D. R. Helenski & M. DeLuca : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7870 (1985).
- 11) 後藤俊夫：“生物発光”，共立出版，1975.
- 12) 羽根田弥田：“発光生物”，恒星社厚生閣，1985.
- 13) M. A. DeLuca : *Methods in Enzymology*, Vol. 57, Academic Press, 1978.
- 14) J. G. Burr : “Chemi- and Bioluminescence”, Marcel Dekker, Inc., 1985.
- 15) O. Shimomura : *Biochem. J.*, **234**, 271 (1986).
- 16) O. Shimomura & F. H. Johnson : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2611 (1978).
- 17) O. Shimomura & F. H. Johnson : *Nature*, **256**, 236 (1975).
- 18) M. Noguchi, F. I. Tsuji & Y. Sakaki : *Methods in Enzymology*, Academic Press, in press.
- 19) R. B. Wallence, M. J. Johnson, T. Hirose, T. Miyake, K. H. Kawashima & K. Itakura : *Nucleic Acids Res.*, **9**, 879 (1981).
- 20) A. M. Maxam & W. Gilbert : *Methods in Enzymology*, Vol. 65, 1980, p. 499.
- 21) H. Charbonneau, K. A. Walsh, R. O. McCann, F. G. Prendergast, M. J. Comier & T. C. Vanaman : *Biochemistry*, **24**, 6762 (1986).
- 22) J. Kyte & R. F. Doolittle : *J. Mol. Biol.*, **157**, 106 (1982).

教 官 公 募

香川大学農学部附属農場教授

香川大学農学部では上記の教授を公募しています。応募の締切は昭和62年5月17日（必着）です。詳細につきましては下記にお問い合わせ下さい。

〒761-07 香川県木田郡三木町池戸 2393
香川大学農学部 庶務係
☎ 0878-98-1411 (代)