

平成 16 年 3 月 日

氏名 綾部 圭一 印

21世紀COEプログラム

拠点：大学院工学系研究科
応用化学専攻、化学システム工学専攻、
化学生命工学専攻、マテリアル工学専攻

“化学を基盤とするヒューマンマテリアル創成”

平成15年度リサーチ・アシスタント報告書

ふりがな 氏名	あやべ けいち 綾部 圭一	生 年 月 日
所属機関名	東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻	
所在地	東京都文京区本郷7-3-1 東京大学工学部5号館401	
申請時点での 学 年	博士3年	
研究題目	ホタルルシフェラーゼN末端ドメインに関する研究	
指導教官の所属・氏名	上田 宏	

I 研究の成果 (1000字程度)

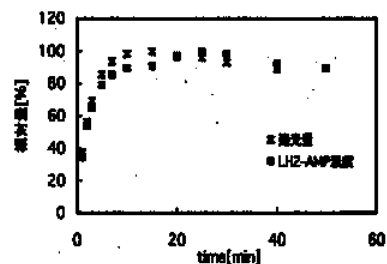
(図表も含めて分かりやすく記入のこと)

ホタルルシフェラーゼは基質ルシフェリンと ATP を用いた生物発光を触媒する酵素であり、特にレポーター遺伝子として生物学分野に広く用いられている。ルシフェラーゼは基質添加後 1 秒以内に発光量が最大に達した後速やかに減衰する(フラッシュ発光)が、そのカインेटクスは複雑であり完全には解明していない。この酵素は N 末端ドメイン(以下 N ドメイン)および C 末端ドメイン(以下 C ドメイン)より構成されるが、結晶構造より活性中心を構成する残基の大部分は N ドメイン由来と推定されている。申請者らは近年 N ドメイン単体でも発光活性があることを見出し(Zako, T., Ayabe, K., *et al.*, BBA, 1649, 183-189 (2003))、この N ドメイン酵素がフラッシュ発光を持たず、数分から数十分かけて発光量が緩やかに上昇する新しい発光プロファイルを示すことを報告した。これは C ドメインがフラッシュ発光に重要な役割を果たすことを示唆するもので、本研究ではこの緩やかな活性上昇の機構について詳細な解析を行った。

申請者は N ドメインを用いて発光反応を数分間行った後の反応液から酵素をフィルター除去し、この濾液に再度 N ドメインを加えると反応開始時から強い発光を起こすことを見出し、この濾液に基質とは異なる低分子の反応中間物質が蓄積していることを示した。またこの中間体は酵素反応の前半に生成する luciferyl-AMP (LH₂-AMP)であることを、合成した LH₂-AMP を

用いた実験より示した。また N ドメイン酵素より生成する LH₂-AMP の大部分は続く反応を起こす前に酵素から遊離して溶液中に蓄積すること、N ドメインの発光量は溶液中の LH₂-AMP の蓄積にほぼ比例して上昇することも明らかにした(Fig.1)。

この知見から、野生型や他の変異体においても反応後の濾液と N ドメインを混合し初期発光量を測定するだけで LH₂-AMP 濃度を測定することが可能になった。野生型ルシフェラーゼを用いた類似の方法が既に報告されているが、N ドメインを用いたこの系では S/N 比が 100 倍以上改善し、mM オーダーの高濃度の基質が存在していても nM オーダーの LH₂-AMP の濃度変化を追跡できた。前述の通りルシフェラーゼ反応は非常に複雑なカインेटクスを持ち、その機構には不明な点も多い。例えば C ドメインの Lys529 を Ala に改変した K529A 変異体はフラッシュ発光を持たないことが報告されているが、反応初期における LH₂-AMP 濃度の推移が野生型とどう異なるのが興味深い。K529A はまた N ドメインの発光プロファイルとも明らかに異なっており、Lys529 および C ドメインの役割についても新たな知見が得られると期待している。

Fig.1 Nドメイン発光とLH₂-AMP濃度の相対的増減(相対的)

II (1) 学術雑誌等に発表した論文A (掲載を決定されたものを含む.)

共著の場合、申請者の役割を記載すること。

(著者、題名、掲載誌名、年月、巻号、頁を記入)

1) Zako T., Ayabe K., and Ueda H.

“Luminescent and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain”

Biochimica et Biophysica Acta 1649 (2003) 183-189

Nドメインに関する活性測定および発光スペクトルの測定

氏 名 綾部 圭一

II (2) 学会において申請者が口頭発表もしくはポスター発表した論文

(共同研究者(全員の氏名)、題名、発表した学会名、場所、年月を記載)

1) Ayabe K., Zako T., and Ueda H "Emission Profile Analysis of Firefly Luciferase N-terminal Domain"

21世紀COE「化学を基盤とするヒューマンマテリアル創製」国際シンポジウム

東京大学弥生講堂、2003.8.27-28、ポスター発表