

3S-Ba03 発光酵素の反応分割による迅速高感度な相互作用検出系の開発

○上田 宏
(東工大・資源研)
ueda@res.titech.ac.jp

【目的】分子間相互作用検出法は、ポストゲノム時代の創薬・診断など、幅広い分野で応用可能な重要技術である。現在、細胞内で実施可能な高感度な相互作用検出系として、ホタルルシフェラーゼ (Fluc) をはじめとするレポーター蛋白質を二つに分割し、それぞれに結合させた相互作用蛋白質の作用でそれらが近接・会合した際に発光などの活性が回復することを利用した Protein-fragment Complementation Assay (PCA) が知られている。しかし、これらを精製蛋白質として試験管内で再構成させても、期待したような応答は得られず、事実上使えないことも多い。最近我々は、このような蛋白質の物理的再構成でなく、機能的な再構成を利用した、触媒活性に重要な残基に変異を施した Fluc 酵素を用いた、新原理の検出法の開発に成功した。今回は、その検出原理を含めた本法の特長と、その幅広い応用の可能性について紹介させていただく。

【測定原理】Fluc は、大きく分けて (1) 基質であるルシフェリン (LH₂) のアデニル化と、(2) これにより生じた反応中間体 LH₂-AMP を用いた酸化的発光反応の 2 種類の半反応を触媒することで発光反応を行う。近年の酵素学的、構造生物学的研究により、Fluc のこの 2 つの半反応は、別々の立体構造上の異なる活性残基によって担われることが示唆されてきている。事実、これまでに (1) のみが遅い変異体 K529A/Q/R、(2) のみが遅い変異体 K443A が知られており、さらに我々も独自に (2) の反応が遅く LH₂-AMP を酵素外に放出する変異体 H245D を見出している。そこで、これらの変異体を組み合わせることで、二つの蛋白質が近接した場合に反応速度が向上し、発光強度が上昇するような系を作れると考え、試行錯誤の結果、そのような変異体ペアを同定した。

【実験例】例として、免疫抑制剤ラバマイシン依存的な信号伝達蛋白質 FKBP12 / FRB の会合を検出した例を示す。Fluc の二段階の半反応の一段階目の変異体である K529Q (以下 K5Q)、及び二段階目の変異体で反応中間体を酵素外に顕著に放出する H245D/K443A/L530R (以下 H245D+) の N 末側に、FKBP12 あるいは FRB を融合させ、大腸菌で発現、精製した。そして両者を混合し、各濃度のラバマイシン存在下で FKBP12 と FRB を相互作用させ、基質 LH₂ と ATP を添加した際 H245D+ から放出された反応中間体が K5Q に消費されることによる、発光活性の変化を検討した。

この結果、50-500 nM の混合液にラバマイシンを加えた場合、基質添加から 1 秒以内に顕著な発光量の増大が見られた。発光量変化はラバマイシンの有無で最大 20 倍以上、かつ検出限界は最小 6.3 fmol であった。また、FKBP12/FRB と酵素間にリンカーとして 7 nm 長のドメインを挿入しても相互作用の検出に成功したことから、本法は FRET/BRET 等の従来法より距離や配向に関する制限が少ないことが、また、PCA に比べてより高い熱安定性を持つことが明らかとなった。さらに同じ蛋白質を動物細胞で発現させた場合にも、ラバマイシン依存的な発光量変化を観察できた。

【応用と今後の展望】この他、相互作用ドメインとして抗リゾチーム (HEL) 抗体 VH/VL を用いて抗原 HEL の検出が、がん細胞の増殖信号伝達に重要な p53-Mdm2 相互作用の検出からその阻害剤が同定出来た。以上より、本法は、細胞内外で利用可能な汎用性のある迅速・高感度な分子間相互作用検出系であると考えられる。現在、更なる性能向上と他の相互作用検出への応用を進めている。

謝辞:本研究の多くは科学技術振興機構 研究成果展開事業【先端計測分析技術・機器開発プログラム】による支援を受けて行われた。

Rapid and sensitive interaction detection assay by dividing the half-reactions of luminescent enzyme

○Hiroshi Ueda
(Chem. Res. Lab., Tokyo Tech)

Key words biosensor, protein interaction, protein engineering, bioluminescence

3S-Ba04 ウミホタル発光の基礎と応用

○近江谷 克裕
(産総研・バイオメディカル)
y-ohmiya@aist.go.jp

ヒトの染色体の情報が解読された今、染色体に書き込まれた生命活動のための多様な情報をリアルタイムに観察、これを生命現象の理解に利用、医学研究に展開することが大変に重要である。生体情報を読み解く手法の一つとして、生物発光を利用した生体情報解析や光イメージングがある。生物発光とは化学エネルギーを光エネルギーに変換する生体システムであり、ルシフェリン (基質) の酸化をルシフェラーゼ (発光酵素/発光タンパク質) が触媒する酵素反応である。この発光反応をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応と同じ言葉で表すが、そのシステムは多種多様で、発光生物により発光基質、酵素の構造は大きく異なっている。したがって、生物発光を十分に活用するためには、その物質的背景を理解し、その特性を十分に考慮する必要がある。私の研究対象の一つであるウミホタルは甲殻類介形虫に属する発光生物であり、日本では北は青森から南は西表島まで生息が確認されている (Ogoh k et.al Mol Biol Evol 2005)。刺激された際にルシフェリン、ルシフェラーゼを噴出して青色の発光の煙幕を作る。ルシフェリンは 3 つのアミノ酸 (アルギニン、トリプトファン、イソロイシン) からなるトリペプチドから生合成されると予想されている。ウミホタルルシフェリンはホタルルシフェリンと同様に酸化されエネルギー状態の高いジオキセタン構造の中間体を経て光を発する。ウミホタルの発光はホタルと異なり ATP などの補因子を必要としない単純な酵素反応であり、ホタルに次いで高い発光反応量子収率 (約 0.3) である。この反応を触媒するルシフェラーゼは分子量約 6 万の糖タンパクであり、最大の特徴は細胞外への分泌を可能とする分泌シグナルペプチド配列を有する点である。これまでに日本沿岸に生息するベントス性 (低生生物) の *Vargula hilgendorfii* と浮遊性の *Cypridina noctiluca* の 2 種のルシフェラーゼ遺伝子がクローン化されている。分泌性ルシフェラーゼであることから哺乳類細胞や酵母細胞にウミホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入すれば、細胞内で合成されたウミホタルルシフェラーゼは細胞外に分泌される。また、体内に長期間にわたり貯蔵されることから酵素としての安定性が高く、室温状態での酵素活性の半減期 (酵素活性が半分になる時間) は 72 時間以上である。この安定性はタンパク内の Cys 残基が 34 個存在、その S-S 結合に由来する。我々はウミホタルルシフェラーゼのクローニング (Nakajima Y et.al BBB 2004)、ルシフェリンの安価化学合成法の開発 (Wu C et.al Tetrahedron Let 2006)、更には遺伝子発現解析法 (Yamagishi K et.al Anal. Biochem. 2007)、イムノアッセイ (Wu C et.al Anal. Chem. 2007)、インビロイメージング (Wu C et.al PNAS 2007)、そして病理標本イメージング (Wu C et.al Luminescence 2012) などの基礎応用研究に取り組んできた。本講演ではウミホタル生物発光の世界を紹介する。

Basic and application of Ostracod bioluminescence

○Yoshihiro Ohmiya
(Biomed. Res. Inst., AIST)

Key words enzyme, bioassay