

研究課題別評価

1 研究課題名:光制御可能な細胞発光素子

2 研究者氏名:近江谷 克裕

ポスドク研究員:秋元秀俊(研究期間 平成 14 年 2 月～平成 17 年 3 月)

技術員:谷川尚美 (研究期間 平成 14 年 4 月～平成 16 年 11 月)

3 研究のねらい:

生物の中には光の ON/OFF によって細胞機能を制御するシステム“生体光スイッチ”が存在する。一方、多彩な発光色を持つ生物発光システムが単離され、本システムを導入した発光細胞がセンサー化されつつある。本研究では究極の光 光制御システムの構築を目標に、光存在下では「光を受ける・光合成」を、光非存在下の夜間は「光を出す・生物発光」を活発に行い、そのシステムの調節が「光が制御する・生体光スイッチ」によって厳密にコントロールされている発光性渦鞭毛藻の発光・受容・光スイッチングシステムを研究し、生体光スイッチのコンポーネント化、さらには光制御可能な細胞発光素子を構成できる基盤技術の構築を目指す。

4 研究結果:

(1)ルシフェリン合成系の探索

ルシフェリンの生合成の初期段階を解明するために、始めに *Lingulodinium polyedra*(Lp) 内でのクロロフィル量、ルシフェリン量及び比較として発光能を調べた結果、昼夜通してクロロフィル量がほぼ一定であるのに対して、ルシフェリン量は夜間に急激に増加、それに伴って発光量も増加することを明らかにした。次に、クロロフィル関連物質の *in vivo*でのトレーサー実験として¹⁵Nでラベルしたグリシンやグルタミン酸を用い、質量分析法でルシフェリンがラベル化されるかどうかを調べた。その結果、ルシフェリンとクロロフィル a のテトラピロール環すべての窒素部分にラベル体を取り込まれること、さらにはラベル化アミノ酸の取りこみ率を比較し、間接的ではあるが、ルシフェリンがクロロフィル代謝産物であることを証明した。

(2)光 ON/OFF に連動し発現が変動するタンパク群の解析

Lp は 1950 年代より、光合成、運動性、生物発光、細胞分裂などの生理現象に関する数多くの研究が行われてきた。そこで、我々は、表現型の実態を示すタンパク質の変化を網羅的に解析する道、つまり Lp の時間軸プロテオーム解析を行った。その結果、約 900 種のタンパクスポットに分離、24 時間周期で変動するタンパク群を 35 種単離、その変動パターンが大きく 3 種に分類できることを明らかにした。特に注目すべき点は TCA 回路に関連するコハク酸デヒドロゲナーゼ及びイソクエン酸デヒドロゲナーゼの変動が異なるパターンを示す点であり、生物の最も基本的な代謝経の一つである TCA 回路が 2 つの異なるリズムで制御され、その制御には光 On/Off が関わる可能性が高いことが明らかになった点である。

(3)光 OFF 前後に発現する遺伝子の網羅的解析

光 OFF 後発現する遺伝子群が Lp のルシフェリン生合成系に関与する可能性が高いことから、光 OFF 後の発現した mRNA 遺伝子だけを解析する方法、EST(Expressed Sequence Tag)解析を行った。我々が作成したライブラリーは重複クローンを除いて 2111 個の独立クローンが存在、これらは全て国立遺伝学研究所 DDBJ データベースに登録した (BP742156 - BP744266 ; http://www.ddbj.nig.ac.jp/ddbjnew/hold_date-j.html にて公開中)。我々が作成した EST ライブラリーは、全発現遺伝子のおよそ 40%をカバーし、現時点で世界で最も充実したライブラリーである。

(4) 渦鞭毛藻由来発光酵素遺伝子導入細胞の構築と評価

ルシフェリン生合成コンポーネントが多くの生物種の細胞で作動するかを検証するため、既にクローン化された渦鞭毛藻由来発光酵素遺伝子を哺乳類細胞への導入を試みた。その結果、代表的なプロモータでタンパク発現は調節され、且つタンパクは生産され、発光活性を測定できた。従来の発光酵素と大きく異なる点は、酸性pHでも発光活性が高いことである。酸性化で生息する酵母においても発光細胞素子を構築できる可能性がある。

5 自己評価:

3年間の研究を終了するにあたり、生命科学分野全体の進展は目を見張るものがあった。その一番の例は、当初、遺伝子からのアプローチはサブトラクション法などの特異的な遺伝子の特定だけを考えていたが、一研究室1ゲノムプロジェクトや一研究室1ESTライブラリープロジェクトのような網羅的な遺伝子解析が、小グループでも可能になった点である。この生命科学の研究手法の発展を受けて、当初計画を変更しESTライブラリーを構築できたことは、プロジェクトにおける最も大きな財産の一つとなっている。併せて、プロテオーム解析による1000近くのタンパク種のマップデータ、さらに、代謝経路のマイルストーンの積み重ねは、確実に、光On/Off制御系の解明や夜間の発光を支えるルシフェリン合成系の解明に向かいつつあるとの感触を得ている。今後の方針として、現在、進行中のクロロフィルからルシフェリンが作られる代謝経路に関連する酵素群の特定とコンポーネント化である。一方、光制御系に関してはTCA回路に関わる酵素群と光との相関がポイントと考えている。代謝酵素の制御系のコンポーネント化を目指す予定である。発光細胞素子の開発には至っていないが、それを可能とする遺伝子等の“ものの財”や情報といった“知の財”の蓄積が着実に進んだと考えている。

6 研究総括の見解:

近江谷氏は、発光性渦鞭毛藻の発光・受容・光スイッチングシステムを研究し、生体光スイッチのコンポーネント化、さらには光制御可能な細胞発光素子を構成できる基盤技術の構築を目指した。近江谷氏の研究成果は、生体光スイッチに関与するコンポーネントの分離と特定に寄与した。

第一の成果は、光off前後に発現する遺伝子の網羅的解析を行った。そこに現れるmRNA遺伝子のみを解析して、重複クローンを除く2111個の独立クローンの存在をライブラリーとして国立遺伝学研究所DDBJデータベースに登録した。第二には、ルシフェリンの生合成の初期段階に現れるクロロフィル量、ルシフェリン量、及び発光能の相関を調べ、ルシフェリン量は夜間に急激に増加し、それに伴って発光量が増加することを明らかにした。さらに¹⁵Nでラベルしたグリシンやグルタミン酸を用い、ラベル化アミノ酸の取り込み率を比較して、ルシフェリンがクロロフィル代謝物であることも示した。第三に、光on/offに連動して発現が変動するタンパク群の解析を行った。

第一期に選ばれた研究員とアドバイザーも、ほとんど無機の結晶を取り扱う物理屋と電子工学関係者の中で、近江谷氏は異分野の最右翼であった。しかし、近江谷氏の話術の達人ぶりとオープンな性格を発揮して、この輪の中に溶け込み、異分野交流に貢献した。更に、二期研究員に複数の優秀なバイオの研究者の参入を呼び込み、活発な異分野の交流をもたらした。

7 主な論文等:

論文

1. Wu C., Akimoto, H. and Ohmiya Y.; Tracer studies on dinoflagellate luciferin with [¹⁵N]-glycine and [¹⁵N]-L-glutamic acid in the dinoflagellate. *Pyrocystis lunula*; **Tetrahedron Letters** 44, 1263-1266, 2002
2. Akimoto H, Wu C, Kinumi T and Ohmiya Y: Biological rhythmicity in expressed proteins of the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* demonstrated by chronological proteomics. **Biochem Biophys Res Commun** 315, 306-12, 2004

3. Otsuji T, Okuda-Ashitaka E, Kojima S, Akiyama H, Ito S, and Ohmiya Y: Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase. *Anal. Biochem.* 329, 230-237. 2004
4. Tanikawa N, Akimoto H, Ogoh K, Wu C, and Ohmiya Y: Expressed Sequence Tag Analysis of the Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* During Dark Phase. *Photochem Photobiol.* 80, 31-35, 2004.
5. Suzuki C, Nakajima Y, A, Wu C and Ohmiya Y.: Dinoflagellate (*Pyrocystis lunula*) luciferase is a new additive reporter enzyme for monitoring multiple-gene expressions in mammalian cell *Gene* in press.
6. 近江谷克裕：光制御可能な細胞発光素子、応用物理 72、691-696、2003
7. 秋元秀俊、呉純、近江谷克裕：光に連動した海洋性発光鞭毛藻の生物発光システム、月刊海洋 390、652-658、2003
8. 近江谷克裕：発光甲虫の生物発光機構の基礎と応用-生物発光によって細胞情報を探る、生化学 76、5-15、2004
9. 近江谷克裕：ホタルの発光化学と分子進化 - 応用へのアプローチ、昆虫と自然 39、19-22、2004

学会（海外）

- 1) Hidetoshi Akimoto, Chun Wu, Naomi Tanikawa and Yoshihiro Ohmiya: Dark Induced Proteins from Marine Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* detected by a 2D Gel Electrophoresis, 30th Annual Meeting of the American Society for Photobiology, Quebec City, Canada, July, 2002.
- 2) Hidetoshi Akimoto, Tomoya Kinumi, Chun Wu, Naomi Tanikawa and Yoshihiro Ohmiya, Comprehensive Analysis of biological clock Proteins in Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* with the Use of Proteomic Technology, 31st annual meeting of the American Society for Photobiology, Baltimore, USA, July 2003.

他 5 件

依頼講演

1. 秋元秀俊、近江谷克裕：海洋性発光渦鞭毛藻の光に連動した生物発光システム．東京大学海洋研究所共同利用研究集会「海洋発光生物研究の現状と展望」，2003 年 1 月，東京．
2. 近江谷克裕：生体情報を検出するための可視化法，光電相互変換第 125 委員会「本委員会第 184 回研究会」，2004 年 5 月、東京
3. 近江谷克裕：生物発光・蛍光を利用した細胞内ダイナミズム解析の基礎と応用，第 81 回日本生理学会大会 教育講演，2004 年 6 月，札幌

他 3 件

国内一般講演 4 件

国際学会の座長及びオーガナイズ 4 件