

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	舟橋 亞希
題 目	ウナギ筋肉に存在する新奇蛍光タンパク質に関する研究 (Studies on a novel fluorescent protein from eel muscle)
<p>ニホンウナギ (<i>Anguilla japonica</i>) の筋肉に由来する新奇緑色蛍光タンパク質 (eel GFP) は Hayahshi and Todaによって脊椎動物で初めて発見され、その性状と部分アミノ酸配列が報告された。その後、eel GFPにビリルビンがリガンドとして結合することで蛍光発現する分子機序が明らかにされた。本研究では、ウナギ属6種、<i>A. japonica</i>、<i>A. australis</i>、<i>A. anguilla</i>、<i>A. bicolor bicolor</i>、<i>A. bicolor pacifica</i>、<i>A. mossambica</i>からeel GFP遺伝子のクローニングおよびタンパク質の発現を行い、分布およびその性状を調べた。さらにeel GFPを強制発現させた培養細胞を作製し、eel GFP-ビリルビン複合体の機能解析を行った。</p> <p>eel GFPの蛍光観察では、種間で蛍光に強弱の差はあるものの、すべてのウナギ筋肉において蛍光が確認された。ウナギ属6種のcDNAは、全長631-644 bp、ORFは417 bp、演繹アミノ酸は139残基で、脂肪酸結合タンパク質 (FABP) と類似性を示した。エクソン-イントロン構造は、翻訳領域は1stエクソンから始まり4thエクソンで終わり、多くのFABPファミリーとエクソン数やサイズは一致していた。</p> <p>大腸菌に発現させたタンパク質はビリルビンを添加することで蛍光を発し、最大励起波長は490-496 nm、最大蛍光波長は527-530 nmであった。用いたタンパク質発現ベクターの演繹アミノ酸配列では、8カ所のリガンド結合部位と発色団と推定されるGly58-Pro59-Pro60のトリペプチド配列が6種のウナギ属すべてにおいて保存されていた。蛍光強度は<i>A. japonica</i> = <i>A. bicolor</i> &gt; <i>A. mossambica</i> &gt;&gt; <i>A. australis</i> &gt;&gt; <i>A. anguilla</i>の順に高く、2カ所のアミノ酸の置換の組み合わせ (Leu63 - Tyr110 もしくは Phe63 - Leu110) が蛍光強度の差に関与していると推察された。</p> <p>eel GFP の機能を解明する方法の一つとして、培養細胞を用いて増殖速度ならびに酸化ストレスへの影響について調べた。<i>A. japonica</i> 由来の eel GFP 遺伝子結合ベクターをヒト胎児腎臓由来株化培養細胞に導入した HEK293-eel GFP と、対照としてベクターのみおよびオワンクラゲ由来の GFP を含む HEK293-CV と HEK293-jf GFP を用いた。増殖速度の実験において一般的な細胞培養法では抗酸化性のフェノールレッドを加えて行っており、これらと比較してフェノールレッド無添加の条件下では、対照区の HEK293-CV および HEK293-jf GFP での増殖速度は 52%と 31%まで低下する一方で、HEK293-eel GFP では 70%であった。また、HEK293-eel GFP は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の酸化ストレスに対して HEK293-CV および HEK293-jf GFP の約 2 倍の耐性を示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に曝露後、培養細胞の蛍光強度の部分的な減少や消失が観察されたが、これはビリルビンがビリベルジンに酸化され GFP から遊離することが示唆された。これらの結果より、ビリルビンと結合している eel GFP 複合体は、抗酸化能を有する機能を持つことが推察された。</p>	