

## 生物情報の解明と制御

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	佐々木, 堯
巻/号	11巻5号
掲載ページ	p. 37-41
発行年月	1988年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 生物情報の解明と制御

—共通基盤技術—

佐々木 堯

### はじめに

生物機能の発現をコントロールしている生体内の情報、いわゆる「生物情報」を担うものは酵素（蛋白質）、ホルモン、神経伝達物質、C-AMPやITPなどの低分子有機化合物、ある種の糖（鎖）など、生物活性な化学物質である。これらはまた、その性質上、情報伝達物質とも呼ばれている。生体内の刺激によって生じた生物情報が、正確に目的部位に伝達され、生物機能として発現するプロセスでは、これらの化学物質とそのレセプター（或は基質）との間に、認識・応答の複雑かつ精緻なメカニズムが働いている。しかもこのメカニズムは、生物種を問わず下等から高等に至るまで、分子レベルでは多くの共通項をもつと予想される。従って、種々の生物活性物質が受けもつ情報の認識・伝達のメカニズムを、それらの分子構造との関連において解明することが必要である。

また、一般にこれら生物活性物質は生体内に微量しか含まれず、しかも不安定であることが多い。さらに、それによって起こされる反応も、機能発現に至るプロセスの中で増幅されるとはいえ、各々のステップでは極めてマイクロなものである。そこで、これらの微量物質を検出、分離・同定したり、微小生体反応を測定するためには可能な限り、迅速・簡便な超微量分析や、非破壊・無侵襲の微小生体反応計測手法の開発が必須となる。

以上のように、ここでは、「生物情報の解明と制御による新農林水産技術の開発に関する総合研究」の中で、各分野にわたる共通的な基盤技術として重要な、分子認識と制御機構の解明及び超微量分析技

術の開発を行うことを目的とする。

### 1. 生体内における分子認識と制御機構の解明

#### 1) 酵素の構造と機能発現

##### ① 天然酵素の構造と機能

生命現象を司る生体内の主要な反応部分は、ほとんどが酵素反応によるといっても過言ではない。そのため、酵素は温和な条件下で高い基質特異性と触媒能を有しており、酵素の構造、特に基質認識部位の構造と機能に関する知見は、分子認識・応答に関する多くの示唆を与えてくれるはずである。

酵素は蛋白質を主成分とする生体触媒であり、ポリペプチド鎖の特異的な立体構造とアミノ酸残基によって形成される活性中心において、基質分子を正確に認識する。酵素と結合した基質は、活性化エネルギーを低下させつつ、いくつかの素過程を経て生成物に変換される。近年のX線結晶学の進歩により、基質と結合状態にある酵素の立体構造の解析が可能になった。それによれば、基質は酵素蛋白質のアミノ酸残基と水素結合、疎水結合、静電引力、ファンデルワールス力などによってかなり厳密に固定されており、特に水素結合は方向と距離が規定されているので、この結合を主体とする基質には高い特異性を示す。一方、静電引力では電荷間に方向性がないため、これを主体とする基質に対しては、一般に特異性が低いとされる。

図1は、タカアミラーゼ (*Aspergillus oryzae* のアミラーゼ) における触媒部位のアミノ酸残基と、基質（デンプン）との結合の様子を模式的に示したものである<sup>1)</sup>。タカアミラーゼは、一次構造（アミノ酸配列）と三次構造（立体構造）が決定された数少ない酵素の一つである。全部で478個のアミノ酸からなり、立体構造の端に近い部分に大きなくぼみをも

Takashi SASAKI: Basic technology for elucidation and control of bio-signal system

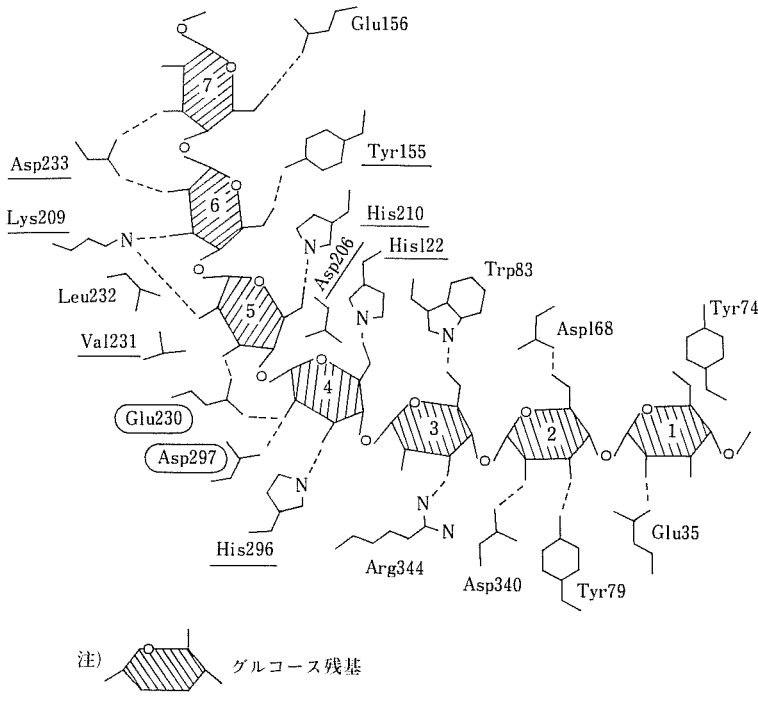
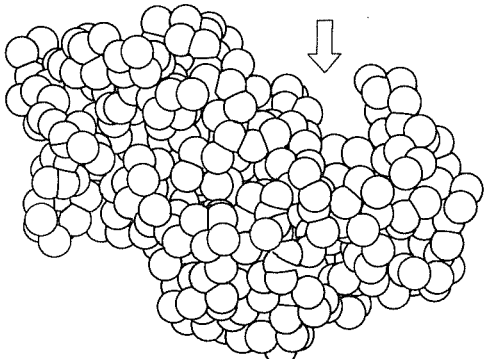


図1 タカミラーゼの触媒部位におけるアミノ酸残基と基質との結合

つ(図2の矢印)。このくぼみはサブサイトと呼ばれ、グルコース残基7個分に相当する長い溝を形成しており、その中央付近に活性中心となるアミノ酸残基 Glu 230と Asp 297が存在する。これから明らかかなように、サブサイトにおいては、酵素の特定のアミノ酸残基がグルコースの水酸基を認識することによって両者間に水素結合が形成され、基質がサブサイト上に固定される。そして、サブサイト4とサブサイト5の近傍に位置する Asp 297と Glu 230に



注) ⇨は基質結合部位のくぼみを示す  
図2 タカミラーゼの立体構造の模式図

より、プロトンの移動反応が起こり、触媒活性が発揮されると考えられている。

構造と機能の解明には、このように蛋白質化学、酵素化学、結晶工学など、基礎的知見の地道な蓄積が不可欠である。本プロジェクトの中では、アミラーゼ、プロテアーゼ、β-グルカナーゼなどの代表的な酵素と膜結合性蛋白質などについて、一次構造と三次構造、特に活性部位の分子構造と基質(または生体膜)の認識機構の解明を中心に研究を進める。

② 蛋白質工学(プロテインエンジニアリング)

近年、酵素の構造と機能との関係が分子レベルで明らかになるにつれ、酵素の

特性を設計して変更しようとする考えが生れてきている。特に、遺伝子工学の進展により、DNA上の塩基配列の操作によってアミノ酸残基を変更することや、コンピューターによる高次構造の推測及びグラフィックデザインができるようになったことにより、蛋白質の分子設計が実現可能となった。このような技術を蛋白質工学(プロテインエンジニアリング)と称している<sup>2)</sup>。蛋白質工学で目指すものは、蛋白質の機能や安定性の改変・改良であり、そのために変異や修飾の技術を用いるが、従来のように偶然性に強く支配されたものではなく、蛋白質の構造と機能、安定性との関連を把握し設計(プロテインデザイン)した上で、意図的に行うものである。従って、遺伝子工学、酵素化学及びコンピューターグラフィックスの手法を駆使した総合的な取組みが必要である。これまでに蛋白質工学により、機能改良した酵素の主なものを表1に示した。

ここでは、①で述べた酵素・蛋白質の基質特異性の改変や、熱・酸などに対する安定性の増大、さらには、他の酵素の性質を組込んだキメラ酵素の創出などを旨とする。

③ 人工酵素

前述のように、酵素は温和な条件下で高い基質特

表1 蛋白質工学により機能改変した酵素の例

酵 素	改変した機能
トリプシン <sup>4)</sup>	特異性の変更
アンチトリプシン <sup>4)</sup>	特異性・安定性の変更
ファージリゾチーム <sup>5)</sup>	安定性の変更
サブチリシン <sup>6)</sup>	安定性・至適pHの変更
L-乳酸脱水素酵素 <sup>7)</sup>	アロステリックな制御作用の変更

異性と活性を有するすぐれた触媒であるが、本体は蛋白質であることから、温度、酸・アルカリ、有機溶媒、物理的攪拌などによって変性、分解しやすい弱点も持っている。そこで、天然酵素に替るものとして、人工酵素の考えが生れてくる。プロテインエンジニアリングは人為的に酵素機能を改良する有力な手段であり、人工的デザインに基づいて天然に存在しないものを創出する点において、人工酵素作出の一手段といってもよいであろう。しかし、酵素の構造と機能発現の関連性の究明は、高分子の複雑さ故にそれ程容易なことではない。そこで、もっと簡便に、しかももっと安定な非蛋白性の化合物を用いて同様な機能を発揮させようとする試みがなされて

いる。現在、研究が進められているこのような人工酵素には大別して2種類がある。一つは、フェニルアラニンとヒスチジンの環状ダイマーなどの合成ペプチドで、アミノ酸残基の不斉や $\alpha$ -ヘリックスなどの二次構造を利用して、不斉シアンヒドリンの合成や不斉エポキシ化が研究されている。今一つは、サイクロデキストリンやクラウンエーテルなどの大環状化合物及びその誘導体、基質取込み作用を利用するものである。図3に、サイクロデキストリンのもつ酵素類似作用を示した。

低分子有機化合物を利用した人工酵素は、現時点では、触媒活性、特異性の両面で天然酵素に遠く及ばず、実用の域に達していない。しかし、天然酵素の構造と機能発現の解明が進むにつれて、さらに効率の良い人工酵素の開発が進むと共に、その知見が天然酵素の活性発現機構の解明に、重要な手掛りを与えてくれる可能性もある。ここでは、サイクロデキストリンとその誘導体を中心に、人工酵素開発のための研究を行う。

## 2) レクチンによる糖鎖構造の認識

生物情報の分子レベルでの認識・応答機構に関して、糖鎖構造の差異に基づく認識システムの存在と、こうした情報を認識する物質としてのレクチン（糖

結合性蛋白質）が注目されている。病原性、寄生性をもつウイルスや微生物のほとんどは特定の宿主にのみ感染するし、動物の免疫担当細胞は自己・非自己細胞を厳密に識別する。また、根粒菌は豆科植物とのみ、特異的に共生関係を形成する。これらの現象には、細胞表面分子の糖鎖構造と、これを認識して結合するリセプター…レクチンの関与が明らかになってきた。

レクチンが認識する細胞表面の糖鎖構造は、レクチンの起源や種類によって異なっている。例えば、インフルエンザウイルスのリセプターでは、シアル酸を含む糖鎖を識別し、大腸菌では、線毛上に存在するレクチン

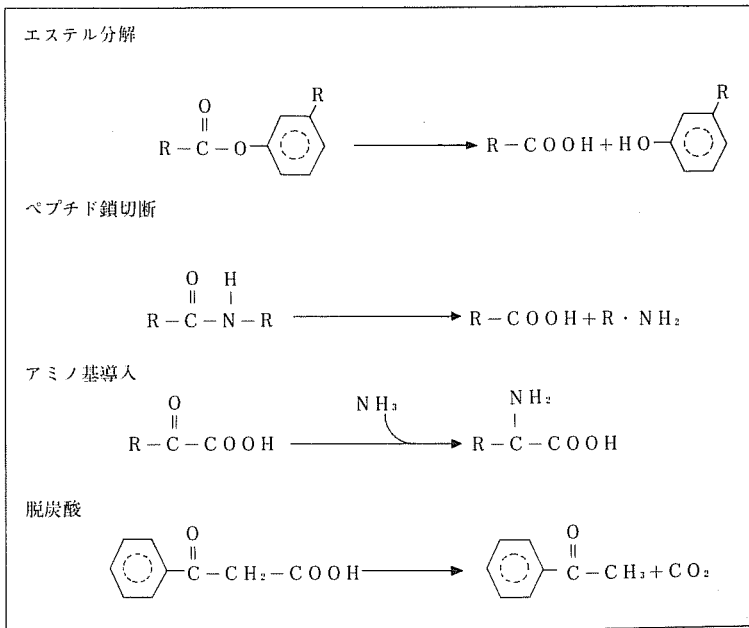


図3 サイクロデキストリンのもつ酵素類似機能

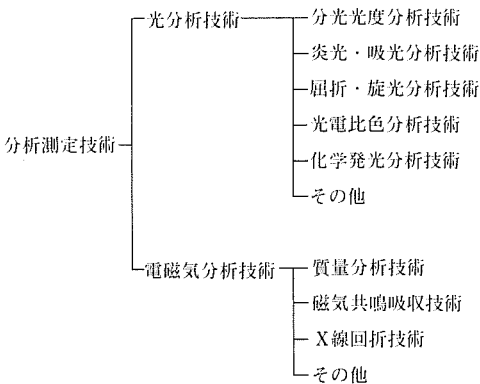
がマンノースを含むオリゴ糖を識別するといわれる。また、肝臓細胞の表層には、血清糖蛋白質の非環元末端ガラクトース/N-アセチルガラクトサミンを認識するレクチンが存在し、血清糖蛋白質の代謝を制御しているらしいことが推察されている。さらに最近では、植物病原菌や宿主植物の細胞壁由来のオリゴ糖が、ファイトアレキシンの産生を誘導することや、培養細胞の分化・生長に大きな影響を与えるなど、次々に興味深い事実が明らかにされている。

今後、研究の進展にともなって、新しい構造と機能をもったレクチンが発見され、生物情報の認識・伝達におけるレクチンの役割・重要性が益々高まって行くものと思われる。

## 2. 超微量分析手法の開発

生体内計測技術は、光学、電子、超音波などの各種顕微鏡を主体とする形態観察技術と、光分析、電磁気分析、電気化学分析などからなる分析測定技術に大別される。生物活性物質の分析に用いられるのは主として後者であり、その中でも光分析、電磁気分析が中心となる(表2)。ここでは、微量生体成分の分析法として蛍光法、微小生体反応の解析法としてNMR分析法を中心に述べる。

表2 微量分析に用いられる測定技術



### 1) 微量生体成分分析法

#### ① 蛍光分析法

実験室で汎用的に用いられる手法として、最も感度の高い分析法の一つである。蛍光試薬は、化合物のもつ塩基性(アミノ基, グアニジル基), 中性(水酸基, チオール基), 酸性(カルボキシル基)などの官能基に結合するものであり、原理的には生体成分の大部分に応用できるはずである。これまでも数

多くの蛍光賦与試薬が開発され、ペプチド, アミノ酸, 低分子有機化合物の定性・定量に用いられている。ダンシル誘導体やフルオレセインイソチオシアネート(FITC)による、ペプチドや蛋白質の定量は最もよく知られた例であり(図4), フルオレサミンやO-フタルジアルデヒドも感度の高い試薬として、アミノ基, チオール基などの定量に用いられている。

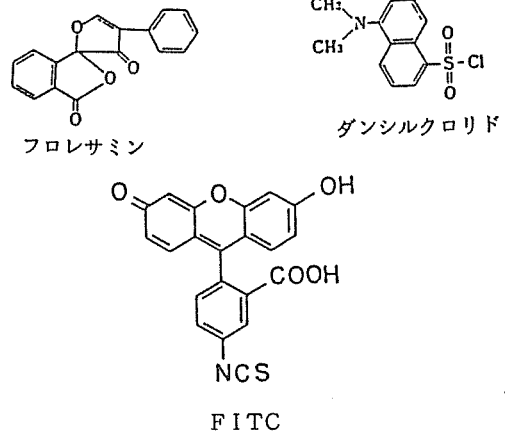


図4 蛍光試薬(アミノ基)の例

本プロジェクトでは、N-(9-アクリジニル)マレイミド(チオール基), 9-ブロモメチルアクリジン(カルボ酸), ジフェニルピレニルフォスフィン(過酸化)などの新たな蛍光賦与試薬の合成と、次に述べるレーザー光源や、高感度光電子増倍管を用いた機器の試作などにより超微量化を図る。

#### ② 短パルスレーザー解析法

$10^{-9}$ ~ $10^{-12}$ 秒の短パルスレーザーを用いることにより、微量、微小な生体成分や反応の解析が可能となりつつある。例えば、従来の蛍光やラマン分光と組合せることにより、フェムトモル( $10^{-15}$ モル)からアトモル( $10^{-18}$ モル)レベルまで感度向上が期待され(従来法ではナノモル… $10^{-9}$ モルからピコモル… $10^{-12}$ モル), さらに理想状態では分子1個を識別することが可能といわれる。これに加え、短パルスレーザー照射により発生する熱や超音波を、それぞれ光熱変換分光装置, 光音響分光装置で検出することにより、分子の集合状態や、熱的, 弾性的性質を知ることができる。

### 2) 微小生体反応の解析法

#### ① NMR分析法

NMRは、タンパク質, 核酸, 糖などの生体成分

の構造解析に用いられてきたが、近年、超電導磁場を用いる高性能機種の開発や、測定手法の改良などにより飛躍的展開をみせている。特に、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{31}\text{P}$ などの安定同位体を指標として、生体内の特定成分や微小反応の状況を非破壊的に追跡する方法は、生物情報研究にとって強力な支援技術となりつつある。すでに医療関係では、臓器における代謝の解析や代謝異常の診断、筋収縮におけるリン酸化合物の終時変化など、組織レベルでの観測が行われている。

NMRの特徴は、使用する電磁波の波長が生体にとって透過性の高い領域に存在することの他、プローブとして多くの核種が使用でき(表3)、しかも選択性にすぐれていることなどである。本プロジェクトの中では、酵素による基質分子の認識機構を原子レベルで解析するために、tRNA合成酵素をモデルに、転移核オーバーハウザー法(TRNOE)並に二次元NMR法を用いて解析する。また、細胞膜や脂質、蛋白質の構造変化や、これにともなう二次代謝産物の挙動の解析から、各種ストレス条件下に

おける植物体内の生理的变化を、非破壊的に観測する手法の開発を目指す、さらに、生体内における各種元素の存在状態や生理的役割を明らかにするため、元素動態の解析技術を開発する。

② その他

電子スピン共鳴法(ESR)による生体組織の代謝過程や生理作用の解析、誘導結合プラズマ発光分析法(ICP)と原子吸光法を組合せた生体内微量金属元素の測定法、昆虫の中樞神経系の電位変化を利用した、微量生物活性物質の定量法の開発などを行う。

(食品総合研究所 食品資源部長)

参考文献

- 1) 大西正健, 坂野好幸, 谷口肇編「アミラーゼ」, 学会出版センター(1986)
- 2) Ulmer, K.M.: *Science*, **219**, 666 (1983)
- 3) Craik, C.S., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P. J., Fletterick, R. and Rutter, W. J.: *Science*, **228**, 291 (1985)
- 4) Courtney, M., Jallat, S., Tessier, L-H., Bena-vente, A., Crystal, R. G. and Lecocq, J-P.: *Nature*, **313** (1985)
- 5) Perry, L. J. and Wetzel, R.: *Science*, **226**, 555 (1984)
- 6) Estell, D. A., Graycar, T. P. and Wells, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 6518 (1985)
- 7) Machida, M., Yokoyama, S., Matsuzawa, H., Miyazawa, T. and Ohta, T.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 16143 (1985)

他に、「生物機能の発現と情報伝達・制御に関する最近の研究動向」(農林水産技術会議研究開発課刊, 1987年), 「プロテインエンジニアリング」(シーエムシー, 1985)を参照した。

表3 生体測定に利用されるNMRの核種

核種	スピン	天然存在比	共鳴周波数*
$^1\text{H}$	1/2	99.985	500.1
$^2\text{H}$	1	$1.5 \times 10^{-2}$	76.767
$^{13}\text{C}$	1/2	1.108	125.759
$^{14}\text{N}$	1	99.63	36.126
$^{15}\text{N}$	-1/2	.37	50.674
$^{17}\text{O}$	-5/2	$3.7 \times 10^{-2}$	67.797
$^{19}\text{F}$	1/2	100	470.478
$^{23}\text{Na}$	3/2	100	132.283
$^{25}\text{Mg}$	-5/2	10.13	30.601
$^{31}\text{P}$	1/2	100	202.442
$^{113}\text{Cd}$	-1/2	12.26	110.941

注) \*11.75テスラの値

