

バク質をコードする遺伝子であったが、複合体を形成して多くの遺伝子発現を制御する転写調節遺伝子に遺伝子量効果があれば、複合体形成のバランスが変化することで、多くの遺伝子の発現に影響を与え、多面的 (pleiotropic) な表現型を賦与し得るであろう¹⁶⁾。また、導入遺伝子については、コピー数が増えれば遺伝子サイレンシングが起こり得ることは良く知られており¹¹⁾、これは外来性遺伝子の導入に伴う遺伝子量効果による過剰発現を抑制するためのものかも知れない。内在性遺伝子の遺伝子量効果とゲノム進化や育種との関連についても議論されている¹⁶⁾。即ち、遺伝子増幅や染色体の倍数化などはゲノム進化の重要な機構であり、それらによって生じた多重遺伝子族 (multigene family) 間の相互作用にも遺伝子量効果は関連していそうである。また、多くの遺伝子に遺伝子量効果があつて、1コピーで野生型と同様の表現型を賦与するに十分な遺伝子発現をしているのであれば、雑種強勢にも係わるものと思われる。従つて、本稿で論じた遺伝子量効果に係わる諸現象は、メンデルの観察や不完全優性に止まらず、遺伝子サイレンシングからゲノム進化、育種に至るまで広範な生物現象に深く係わる古くて新しい問題であろう。

- Morgan, T.H. (1926) The theory of the gene. Yale University Press, New Heaven.
- Watson, J.D., Baker, T.A., Bell, S.P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2008) Molecular biology of the gene. 6th edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Habu, Y., Hisatomi, Y., & Iida, S. (1998) *Plant J.*, **16**, 371-376.
- Johzuka-Hisatomi, Y., Noguchi, H., & Iida, S. (2010) *J. Plant Res.*, **123**, 299-304.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., & Ohmiya, A. (2008) *Plant J.*, **54**, 733-749.
- Martin, C. & Gerats, T. (1993) In *The Molecular Biology of Flowering* (Jordan, B.R. ed.), pp. 219-255, CAB International.
- Yamauchi, T., Johzuka-Hisatomi, Y., Fukada-Tanaka, S., Terada, R., Nakamura, I., & Iida, S. (2009) *Plant J.*, **60**, 386-396.
- Bollmann, J., Carpenter, R., & Coen, E.S. (1991) *Plant Cell*, **3**, 1327-1336.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. (2009) *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 94-108.
- Chawla, R., Ariza-Nieto, M., Wilson, A.J., Moore, S.K., & Srivastava, V. (2006) *Plant Biotechnol. J.*, **4**, 209-218.
- Butaye, K.M.J., Cammue, B.P.A., Delauré, S.L., & De Bolle, M.F.C. (2005) *Mol. Breed.*, **16**, 79-91.
- Oltmanns, H., Frame, B., Lee, L.-Y., Johnson, S., Li, B., Wang, K., & Gelvin, S.B. (2010) *Plant Physiol.*, **152**, 1158-1166.
- Terada, R., Johzuka-Hisatomi, Y., Saitoh, M., Asao, H., & Iida,

S. (2007) *Plant Physiol.*, **144**, 846-856.

- Johzuka-Hisatomi, Y., Terada, R., & Iida, S. (2008) *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4727-4735.
- Springer, M., Weissman, J.S., & Kirschner, M.W. (2010) *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 368.
- Birchler, J.A., Riddle, N.C., Auger, D.L., & Veitia, R.A. (2005) *Trends Genet.*, **21**, 219-226.

定塚 (久富) 恵世¹, 山内 卓樹², 飯田 滋^{1,3}

¹ 静岡県立大学大学院薬学研究科

² 名古屋大学大学院生命農学研究科

³ 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

Incomplete dominance in Mendelian laws and gene dosage effects in plants

Yasuyo Johzuka-Hisatomi¹, Takaki Yamauchi² and Shigeru Iida^{1,3} (¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-Ku, Shizuoka 422-8526, Japan; ²Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-Ku, Nagoya 464-8601, Japan; ³Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-Ku, Shizuoka 422-8526, Japan)

暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素 ～ニトロゲナーゼとの構造的類似性から見る 酵素の多様性と進化～

1. はじめに

クロロフィル (Chl) は、光合成に必須のテトラピロール性色素である。地球上の生命が太陽エネルギーに依存していることを考えると、太陽の光を捕集する Chl は、まさに生命を支える色素である。Chl は、四つのピロール環と一つの5員環からなる環状構造の中央に Mg²⁺ を配位するという共通した構造的特徴をもつ。このように複雑な分子が、光合成生物の細胞内でどのように生合成されるのか、その分子機構の解明は、植物生理学の重要課題の一つである。

プロトクロロフィリド (Pchl_{ide}) 還元酵素は、Pchl_{ide} の D 環の二重結合 (C17=C18) を立体特異的に還元し、Chl *a* の直接の前駆体クロロフィリド *a* を生成する (図 1 a)。Chl *a* 生合成経路の最後から 2 番目の反応であるが、この反応によって色素は Chl *a* としての光学的特性を獲得することから、Chl *a* の吸収スペクトルを決定づける最終反応と見なすことができる。この反応を触媒する酵素は 2

種類存在する¹⁾。一つは光依存型 Pchlide 還元酵素 (LPOR) であり、もう一つは暗所作動型 (光非依存型) Pchlide 還元酵素 (DPOR) である。これら両酵素は同じ反応を触媒するにもかかわらず一次構造的な類似性がまったく認められない。LPOR は、短鎖デヒドロゲナーゼ/レダクターゼファミリーに属し、NADPH を還元力とし、触媒活性自体に光を要求するユニークな酵素である²⁾。一方、DPOR はニトロゲナーゼと類似した酵素で、フェレドキシンからの還元力と ATP 加水分解によって光に依存することなく Pchlide 還元を行う³⁾。本稿では、最近筆者らが、Chl 生合成系の酵素として初めて結晶構造を決定した DPOR の構造解析⁴⁾とニトロゲナーゼとの構造比較から見えてくる酵素の進化について紹介する。

2. 植物の暗所での緑化を決定づける酵素：DPOR

ダイズなどの被子植物は、暗所で芽生えさせると緑にならず黄色い“もやし”になってしまう。これは、被子植物が Pchlide 還元 LPOR のみを用いているため、暗所では LPOR が機能せず Chl 生合成が Pchlide の段階で停止することによる。これに対して、クロマツなどの裸子植物は、暗所でも Chl を生合成することができる。1 世紀以上前に裸子植物の芽生えの観察から暗所で緑化する能力が裸子植物に広く分布することが報告された⁵⁾が、その分子基盤は長く不明であった。筆者らや海外の研究グループのラン藻や緑藻の分子遺伝学的解析の結果、暗所での Chl 生合成は、三つのサブユニット L, N, B から成る DPOR という酵素が機能することによって可能となっていることがわかった^{3,6)}。なお、これらのサブユニットはラン藻や植物では各々 ChlL, ChlN, ChlB, 光合成細菌では BchL, BchN, BchB と呼ばれる。興味深いことに、DPOR のサブユニットの推定一次構造は、ニトロゲナーゼのサブユニット (NifH, NifD, NifK) と各々有意な類似性を示すことから、DPOR はニトロゲナーゼと類似した酵素であることが示唆された。

ニトロゲナーゼは、窒素分子 (N_2) をアンモニアに還元する反応を触媒する酵素で、容易に分離される二つのコンポーネント、Fe タンパク質と MoFe タンパク質から構成されている (図 1b, d, 表 1)⁷⁾。Fe タンパク質は、ATP 結合モチーフをもつ NifH の二量体であり、二量体当たり一つの [4Fe-4S] クラスタを保持し、ATP 加水分解に共役して電子を [4Fe-4S] クラスタから MoFe タンパク質に伝達する還元コンポーネントとしての機能を担う。触媒コンポーネント MoFe タンパク質は、P クラスタ ([8Fe-

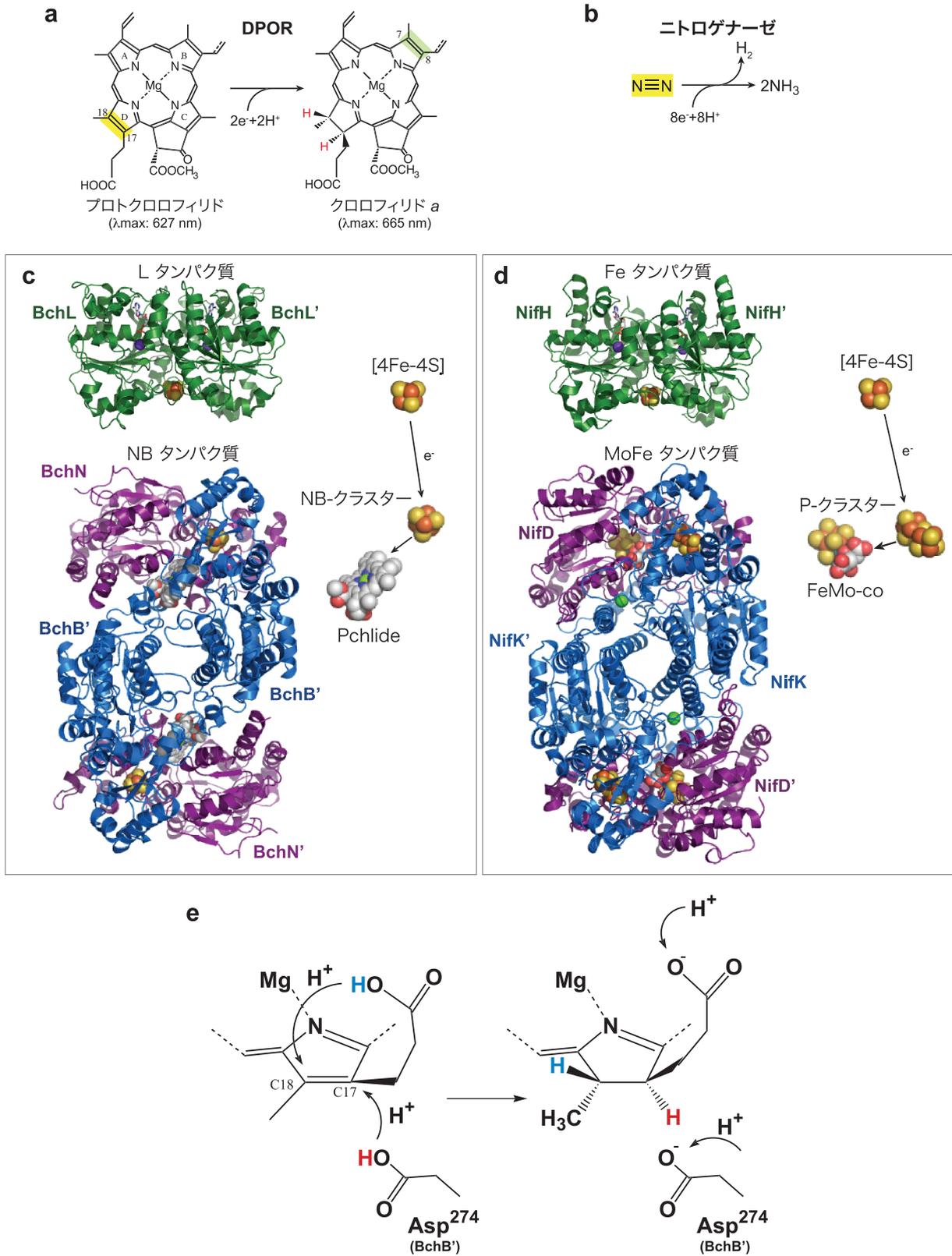
7S] クラスタ) と鉄モリブデンコファクター (FeMo-co; [1Mo-7Fe-9S-X-ホモクエン酸] (X は帰属不明な原子)) とよばれる複雑な金属中心をもつ。Fe タンパク質の [4Fe-4S] クラスタからの電子は、まず P-クラスタに送られ、これを中継点として最終的には FeMo-co 近傍に結合する窒素分子が還元される (図 1d)。ニトロゲナーゼは、農業的にも地球規模の窒素循環においてもたいへん重要な酵素であり、活発に研究されてきた。すでに各コンポーネントや複合体の結晶構造が報告され、構造に基づく研究が展開されてきたが、複数の複雑な金属中心が混合した酸化還元状態を示すことが主な妨げとなり、未だに反応機構が充分理解されていない⁷⁾。

筆者らは、光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* から精製したタンパク質による DPOR 活性の再構成に初めて成功し、DPOR がニトロゲナーゼと類似した酵素であることを実験的に証明した⁴⁾。DPOR は、二つのコンポーネント L タンパク質と NB タンパク質から構成され、各々ニトロゲナーゼの Fe タンパク質と MoFe タンパク質に類似する (図 1c, d, 表 1)。L タンパク質の結晶構造解析から、L タンパク質による ATP 依存的な電子伝達機構がニトロゲナーゼ Fe タンパク質と共通していることが構造的に裏付けられた⁹⁾。

3. DPOR の結晶構造解析～ニトロゲナーゼとの共通基本構造～

筆者は、Pchlide 還元機構の分子機構を明らかにするため、*R. capsulatus* の NB タンパク質について基質結合型と非結合型の結晶構造解析を行った。得られた構造は、予想外の驚きに満ちていた (図 1c)⁴⁾。以下その特徴を列挙する。

- (1) NB タンパク質は、BchN と BchB が一つの機能単位を形成し、それらが疑似二回対称的に集合した二量体構造 ((BchN-BchB)₂) をとる。
- (2) BchN と BchB の境界面に一つの [4Fe-4S] クラスタが確認されたが、三つのシステイン残基に加え、アスパラギン酸残基 (BchB-Asp36) が関与する新規なクラスタであった (“NB-クラスタ”と命名)。
- (3) Pchlide 分子は、多くの疎水性残基によって形成される結合ポケットに保持されており、NB-クラスタから 10 Å と直接の電子伝達が可能な距離に配置されている。
- (4) 基質結合型と基質非結合型の構造を比較すると、基質結合に伴って、隣の機能単位に属する BchB の C 末端の α ヘリックスが中央付近から巻き戻り、基質ポケットの Pchlide に対し蓋をするような相互作用をとる構造変化を



起こすことが推察された。

(5) Pchlide還元は、二つの電子と二つのプロトンが必要だが、プロトン供与体の空間配置が反応の立体特異性を決定づけると推定される。構造的な特徴からC17の直下に位置するBchBのAsp274とPchlide自身のC17位のプロピオン酸残基が各々C17とC18へのプロトン供与体と推察された。したがって、Asp274と基質自身のプロピオン酸のひずんだ空間配置が、Pchlideの立体特異的還元反応の分子基盤と考えられる(図1e)。

最後に、最も大きな驚きは、NB-クラスターとPchlideの空間配置が、MoFeタンパク質のP-クラスターとFeMo-coのそれとよく一致していたことである(図1c, d)。このことは、安定なポルフィリン二重結合や窒素分子の三重結合といった化学的に安定な多重結合を還元する共通の構造基盤が存在することを意味している。FeMo-coは、MoFeタンパク質から抽出可能であり、FeMo-coを欠いたアポ型MoFeタンパク質に抽出したFeMo-coを加えるとホロ型MoFeタンパク質が再構成できる¹⁰⁾。このような挙動をする金属中心は他に例がなく、FeMo-coの特異な特徴であった。基質N₂はFeMo-coに結合することを勘案すると、MoFeタンパク質の祖先型酵素はN₂分子を結合したFeMo-co全体を“基質”として認識し、結合していたのではないだろうか。この性質が現在のMoFeタンパク質のFeMo-coの抽出特性として残されているのかもしれない。なお、筆者らの論文の3ヶ月後、ドイツのグループによりラン藻のNBタンパク質(基質非結合型)の結晶構造が報告され、その構造は*R. capsulatus*のものとはよく一致していた¹¹⁾。

4. ニトロゲナーゼ類似酵素群

ニトロゲナーゼ類似酵素は、DPORだけではなく、バクテリオクロロフィル生合成系においてB環のC7=C8二重結合(図1a)を還元するクロロフィリド*a*還元酵素(COR)もまたニトロゲナーゼやDPORと同じように還元コンポーネントXタンパク質((BchX)₂)と触媒コンポーネン

トYZタンパク質((BchY-BchZ)₂)から成る(表1)¹²⁾。バクテリオクロロフィル(Bchl)生合成系では、DPORによるD環還元を引き続き、CORによるB環還元が起こり、Bchlの基本骨格バクテリオクロリン環が完成する。

FeMo-co生合成においてFeMo-coを組み立てる足場として機能するタンパク質NifENもまたMoFeタンパク質と類似し、その活性にFeタンパク質を要求する。最近、FeMo-co前駆体を結合した状態(NB-タンパク質のPchlide結合型に対応する)でのNifENの結晶構造が報告され、MoFeタンパク質だけでなくDPORとの構造的類似性が考察されている¹³⁾。

ニトロゲナーゼ類似酵素群の発見は、ある共通祖先酵素からニトロゲナーゼやDPORなどの多様な酵素へと進化してきたことを示唆している¹⁴⁾。この共通祖先は、多重結合をもつ比較的大きな分子(例えば、Pchlideは分子量613、FeMo-coはXを除きN₂を含め分子量1,008)を結合し、その近傍に存在する鉄硫黄クラスターからの電子でその多重結合を還元できる潜在的な能力をもっていたと推察される。実際、ニトロゲナーゼは、窒素分子以外にもシアン化物、アジド、アセチレンなど多重結合をもつ多様な物質も還元する広い基質特異性を示す(表1)⁷⁾。また、NifENは、部分的なニトロゲナーゼ活性(アジド還元、アセチレン還元活性)を示すことが報告された¹⁵⁾。最近、Moの代わりにVを有するV型ニトロゲナーゼが、COからエチレン、エタン、プロパンを生成する活性を有することが報告され¹⁶⁾、ニトロゲナーゼの潜在能力の高さが再認識されている。

DPORなどのニトロゲナーゼ類似酵素群は、ニトロゲナーゼに比べ単純な金属クラスター構成であることから、反応機構解析は、ニトロゲナーゼの反応機構解明への重要な手がかりとなることが期待されている。

5. おわりに

現在、70億に達しようとする世界人口は、窒素という観点でいえば、ニトロゲナーゼによる生物学的窒素固定と

図1 DPORとニトロゲナーゼ

a) DPORによって触媒されるPchlide還元反応。PchlideのC17=C18二重結合(黄色)が立体特異的に還元されクロロフィリド*a*が生成する。バクテリオクロロフィル生合成系では、クロロフィリド*a*のC7=C8二重結合(薄緑)がもう一つのニトロゲナーゼ類似酵素CORによって還元され、バクテリオクロロフィル*a*の基本骨格が完成する。b) ニトロゲナーゼ反応。c) DPORを構成するLタンパク質(左上)とNBタンパク質(左下)の立体構造。右は、Lタンパク質-NBタンパク質複合体の想定立体構造に基づく電子伝達反応に関わる[4Fe-4S]クラスター、NB-クラスター及びPchlide分子の立体配置。d) ニトロゲナーゼを構成するFeタンパク質(左上)とMoFeタンパク質(左下)の立体構造。右は、Feタンパク質-MoFeタンパク質複合体の立体構造に基づく電子伝達反応に関わる[4Fe-4S]クラスター、P-クラスター及びFeMo-coの立体配置。e) NBタンパク質の立体構造から推定されるPchlideのC17=C18二重結合の立体特異的還元反応機構。

表1 ニトロゲナーゼと DPOR 等のニトロゲナーゼ類似酵素

酵 素	ニトロゲナーゼ	NifEN	DPOR	COR
反 応	$N_2 + 8H^+ + 8e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2^{*1}$ $C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow C_2H_4$ $HCN + 6H^+ + 6e^- \rightarrow CH_4 + NH_3$ $N_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2 + NH_3$	FeMo-co アセンブル $C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow C_2H_4$ $N_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Pchl _{ide} + 2H ⁺ + 2e ⁻ → クロロフィリド <i>a</i>	クロロフィリド <i>a</i> + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 3-ビニルバクテリ オクロロフィリド <i>a</i>
還 元 コ ン ポ ー ネ ント ^{*2}	名 称 タンパク質 構 成 金属中心	Fe タンパク質 ^{*3} (NifH) ₂ [4Fe-4S]	L タンパク質 (BchL) ₂ ^{*4} [4Fe-4S]	X タンパク質 (BchX) ₂ [4Fe-4S]
触 媒 コ ン ポ ー ネ ント ^{*5}	名 称 タンパク質 構 成 金属中心1 金属中心2 基 質	MoFe タンパク質 (NifD-NifK) ₂ P-クラスター ([8Fe-7S]) FeMo-co ^{*7} ([Mo-7Fe-9S-X-ホモクエン酸])	NifEN (NifE-NifN) ₂ [4Fe-4S] FeMo-co 前駆体 ^{*8}	NB タンパク質 (BchN-BchB) ₂ ^{*6} NB-クラスター ([4Fe-4S]) プロトクロロフィリド クロロフィリド <i>a</i>

*1 ここに示した反応以外にも多様な分子の還元反応を触媒する。

*2 ATP の加水分解に共役して電子を触媒コンポーネントの金属中心1に伝達する機能をもつ。

*3 NifEN に対しては単に還元コンポーネントとしての役割以外に、NifEN 上でアセンブルしつつある FeMo-co 前駆体に Mo とホモクエン酸を挿入する活性をもつ。

*4 バクテリオクロロフィル生合成系 (光合成細菌) でのタンパク質構成。クロロフィル生合成系 (ラン藻や植物) では (ChL)₂。

*5 還元コンポーネントからの電子を、金属中心1を介して金属中心2/基質に伝達し反応を完結する。

*6 バクテリオクロロフィル生合成系 (光合成細菌) でのタンパク質構成。クロロフィル生合成系 (ラン藻や植物) では (ChIN-ChIB)₂。

*7 鉄モリブデンコファクターの略称。

*8 Mo とホモクエン酸を含まない未成熟な FeMo-co. [8Fe-9S] と推定されている。

ハーバー-ボッシュ法による工業的窒素固定の2大プロセスによって固定される窒素によって支えられている。このような重要性にもかかわらず、日本ではニトロゲナーゼの生化学的研究はほとんどなされてこなかった。ニトロゲナーゼとニトロゲナーゼ類似酵素の潜在性は、応用面を含めて新たな酵素化学の創出につながる可能性を秘めている。DPOR の構造解析が、日本に新しい研究の潮流を生み出すきっかけとなることを期待している。

謝辞

DPOR の生化学的解析は、主に野亦次郎博士 (東京工業大学資源化学研究所) によって行われました。結晶構造解析は、村木則文博士・栗栖源嗣教授 (大阪大学蛋白質研究所) との共同研究です。構造の図 (図 1c, d) を描いていただいた村木・栗栖両氏に感謝いたします。

1) Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata,

- J., Kurisu, G., Fujita, Y., & Reinbothe, S. (2010) *Trends Plant Sci.*, **15**, 614-624.
- 2) Masuda, T. & Takamiya, K. (2004) *Photosynth. Res.*, **81**, 1-29.
- 3) Fujita, Y. & Bauer, C.E. (2003) in *Chlorophylls and Bilins: Biosynthesis, Synthesis, and Degradation* (Kadish, K., Smith, K.M., & Guillard, R. eds.), pp. 109-156, Academic Press, Amsterdam.
- 4) Muraki, N., Nomata, J., Ebata, K., Mizoguchi, T., Shiba, T., Tamiaki, H., Kurisu, G., & Fujita, Y. (2010) *Nature*, **465**, 110-114.
- 5) Burgerstein, A. (1900) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **18**, 168-184.
- 6) Fujita, Y. (1996) *Plant Cell Physiol.*, **37**, 411-421.
- 7) Seefeldt, L., Hoffman, B., & Dean, D. (2009) *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 701-722.
- 8) Fujita, Y. & Bauer, C.E. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 23583-23588.
- 9) Sarma, R., Barney, B., Hamilton, T., Jones, A., Seefeldt, L., & Peters, J. (2008) *Biochemistry*, **47**, 13004-13015.
- 10) Shah, V. & Brill, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3249-3253.
- 11) Bröcker, M.J., Schomburg, S., Heinz, D.W., Jahn, D., Schubert,

- W.-D., & Moser, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 27336-27345.
- 12) Nomata, J., Mizoguchi, T., Tamiaki, H., & Fujita, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 15021-15028.
- 13) Kaiser, J.T., Hu, Y., Wiig, J.A., Rees, D.C., & Ribbe, M.W. (2011) *Science*, **331**, 91-94.
- 14) Raymond, J., Siefert, J., Staples, C., & Blankenship, R. (2004) *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 541-554.
- 15) Hu, Y., Yoshizawa, J., Fay, A., Lee, C., Wiig, J., & Ribbe, M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 16962-16966.
- 16) Lee, C., Hu, Y., & Ribbe, M. (2010) *Science*, **329**, 642.

藤田 祐一

(名古屋大学大学院生命農学研究科・JST さきがけ)

Dark-operative protochlorophyllide reductase: structural framework common to nitrogenase and evolutionary aspects
Yuichi Fujita (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan)

膵β細胞における甘味受容体の機能

1. はじめに

インスリン分泌を調節する最も重要な因子はグルコースで、その作用機構についてはこれまで多くの研究がなされてきた。膵β細胞においてグルコースはグルコース輸送体 Glut2 を介して細胞内に取り込まれる。その後、解糖系やミトコンドリアで代謝されることにより産生された細胞内 ATP の濃度あるいは ATP/ADP 比が増加することで ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) が閉鎖する。それにより細胞膜が脱分極し、やがて膜電位が閾値を超えると電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) が開口し、 Ca^{2+} が細胞内に流入する。この細胞に流入した Ca^{2+} がトリガーとなりインスリン顆粒の開口放出が開始される¹⁾。さらにグルコースの代謝に依存してはいるが、 K_{ATP} チャンネルには依存していないシグナル経路も存在している²⁾。いずれもグルコース代謝に依存する形でインスリン分泌が促進されることから、グルコースがこのような経路によりインスリン分泌を促進するという考え方は「代謝説」と呼ばれてきた。この説によれば、グルコースは細胞内で代謝されたのちにその作用を発揮することから、直ちに作用を発揮することはできないはずである。実際、グルコースの添加後、β細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化をモニターすると 1~数分のタイム

ラグの後に Ca^{2+} 濃度の上昇がみられる³⁾。

我々はβ細胞におけるシグナル伝達に興味をもち、β細胞内で起こるシグナル伝達を可視化する実験を行ってきた。その過程で、上記の代謝説では説明がつかないシグナル変化に遭遇することになった。図1は膵β細胞株である MIN6 細胞にグルコースを添加した際の C キナーゼ (PKC) 活性化をリアルタイムにモニターしたものである。PKC 活性化の指標として、GFP を融合した myristolated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) を使用した⁴⁾。MARCKS は PKC の基質となるタンパク質で、非刺激時 (脱リン酸化状態) には細胞膜に局在する。リン酸化を受けると MARCKS は細胞膜から細胞質へ移行する。高濃度グルコースを添加すると、刺激直後、細胞質の MARCKS の蛍光強度は急速に増加する。この上昇は一過的で徐々に減衰するが、数分後、再び上昇に転じ、増加は持続する。グルコースの代謝を抑制する D-mannoheptulose をグルコースとともに添加すると、第二相の持続的な増加は消失したが、最初の素早い増加は影響を受けなかった。一方、代謝を受けないグルコースアナログ 2-deoxy-D-glucose の添加によって素早い蛍光強度の増強を再現することができた。この結果は、最初の数秒以内に起こる素早い PKC の活性化がグルコースの代謝に依存しないことを強く示唆している。また MARCKS の局在変化の代わりに、conventional PKC である PKC α のトランスロケーションをモニターしても、同様にグルコースが素早く、かつ二相性の変化を示す。この第一相の素早い活性化は、グルコース代謝に依存しない。conventional PKC の調節領域には C1 ドメインと

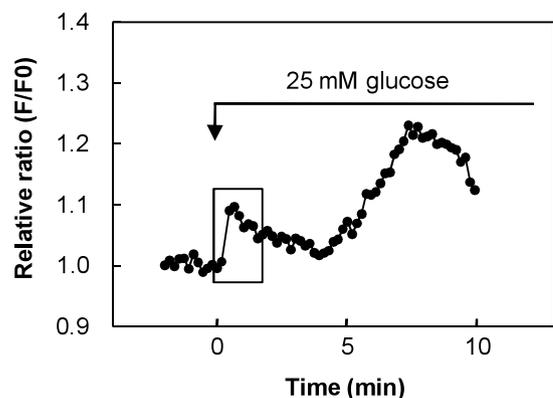


図1 グルコース刺激による PKC 活性化

MARCKS-GFP を発現させた MIN6 細胞を用いて、細胞質の発光強度を指標に PKC 活性化を経時的に観察した。グルコースにより細胞質の発光強度は上昇した。四角で囲んだように数秒以内に PKC 活性化が観察された。その数分後に 2 度目の大きな PKC 活性化がみられた。