

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01929

研究課題名(和文) 発光ゴカイにおける新規分泌型発光分子機構の解明

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms of luminous fireworm

研究代表者

三谷 恭雄 (Mitani, Yasuo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：10358103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに富山湾に生息する発光ゴカイについてそのルシフェラーゼ遺伝子を同定し、これまでにない新規なものであることを明らかにしていた。本研究では、そのルシフェラーゼの生産効率を高めるとともに、新規構造を持つルシフェリンについて質量分析により部分的な構造を特定した。得られた構造に基づき有機化学合成を行なったが、発光活性の確認には至らなかった。さらに側鎖等の検討を行う必要があると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で取り扱う発光ゴカイの発光分子機構は、これまでに類を見ないものであり、発光生物の多様性を解明する上で、重要な知見である。米国西海岸やカリブ海にも本種の近縁種が生息するがその発光分子実態は不明であり、本研究を機に地理的に隔絶された種間での発光機構比較への道が拓けた。また、ルシフェリンの構造が決定でき、かつ、有機化学合成が可能となれば、新たな発光プローブとしての活用が可能になり、応用研究の幅が広がる。

研究成果の概要(英文)：Before this study, we found a novel luciferase gene from a fireworm living in Toyama. In this study, we improved the producibility of the recombinant luciferase and characterized partial structure of luciferin from this animal through mass spectrometry. We artificially synthesized this molecule base on the obtained structure. However, we were not able to detect its activity as luciferin. Further analysis and synthesis would be necessary.

研究分野：分子生物学

キーワード：生物発光 ルシフェリン ルシフェラーゼ 発光ゴカイ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生物発光を利用した生体イメージングがインパクトの高い成果を挙げている一方で、発光機構が未解明の発光生物も多い。特に 700 属に及ぶ発光生物の 8 割を占めると言われる海棲発光生物においてはその分子機構が未解明な種が多く残されている。かつて数万に及ぶ大量の個体から精製したルシフェラーゼ (発光酵素) やルシフェリン (発光基質) による生化学的解析がなされ新規発光分子機構が示唆されたものもあるが、その後手付かずのものも多く、解明に至ったものはわずかしかない。しかしながら、こうした未解明の発光生物を大量に入手することは今や困難な場合が多く、その発光分子機構解明への道筋を見いだすことはますます厳しくなっている。

発光ゴカイはこれまでに発光分子機構が解明された生物発光系にはない 510 nm 付近の青緑色の発光粘液を分泌し、国内では富山や三浦半島、海外ではバミューダやカリフォルニアでの採取報告がある。やはり量の確保は困難であり、かつてバミューダの発光ゴカイ数千匹からそのルシフェリンを抽出・精製し、性状を解析した報告があるが、ルシフェリン、ルシフェラーゼともに未だ明らかにされていない。また、富山湾の発光ゴカイは、通常は棲管と呼ばれる砂つづなどを分泌粘液で固めた管の中に潜んでいるために、試料採取が極めて難しい。年間を通じて、唯一と言ってもいい採取のチャンスは秋口の 2 週間ほどの期間だけで、しかも、日没後わずかな時間に限られる。この時期には、発光ゴカイが繁殖行動を示し、メスが発光液を分泌しながら海面付近を円を描くように泳ぎ、その光に向かって、オスが近づいてくる。この光に寄せられる性質を我々は利用して、強力な懐中電灯の灯火により試料採取を行なった。

我々は、これまでの研究で発光ゴカイ (図 1) の分泌する発光液はごく微量であるものの、夾雑物が極めて少ないという特徴に着目し、MS/MS による微量 de novo アミノ酸配列分析や次世代シーケンス解析技術を駆使した手法により、わずか数匹の発光ゴカイをもとにそのルシフェラーゼ遺伝子を同定・単離した (引用文献①)。興味深いことには、このルシフェラーゼは既知のいかなるタンパク質とも有意な相同性を示さず極めて新規性が高い。さらに、発光ゴカイルシフェラーゼは既知のルシフェリンとは一切交差反応を示さないことから、ルシフェリンに関しても新規性の高い分子構造を持つことが予想された。予備的な発光の解析から 1 匹のゴカイ発光液中には 100 ng オーダーのルシフェリンが含まれると推定され、我々の方法で得た粗抽出液の吸収スペクトルは過去に報告された精製品のものとはよく一致することから、低分子画分についてもほとんど夾雑物がないと推測された。こうした一連のデータの蓄積を踏まえ、発光反応を効率的に再現するために組換えルシフェラーゼ生産系を確立し、さらに、ゴカイルシフェリンの構造解析を行い、有機化学合成による活性型アナログを取得することで、これまでにない全く新しい生物発光系の解明を目指した。



図 1 富山湾で採取した発光ゴカイ  
(*Odontosyllis undecimdongata*)

## 2. 研究の目的

本研究では、発光ゴカイの発光分子機構を明らかにすることを目的とし、高効率なルシフェラーゼ発現系構築およびルシフェリンの構造解析に向けた研究を行なった。以前の研究で発光ゴカイのルシフェラーゼについて組換え生産することはできており、天然酵素同様の発光スペクトルも確認できていた (図 2) が、生産性に問題があり、ルシフェリンの解析を行うに際して、良質な組換えタンパク質を安定的に供給できる生産系を確立することとした。特に、ゴカイ発光液は体外に分泌されることや、その発光酵素配列には N 末端に分泌シグナルと予想される配列を持つことから、分泌タンパク質であることが示唆されるが、動物培養細胞で組換え発現させたタンパク質はそのほとんどが細胞内に留まっていることがわかっており、この点の改良を目指した。また、ルシフェリンの解析においては、ゴカイ発光液を LC/MS/MS 解析に供することで、分子量及び

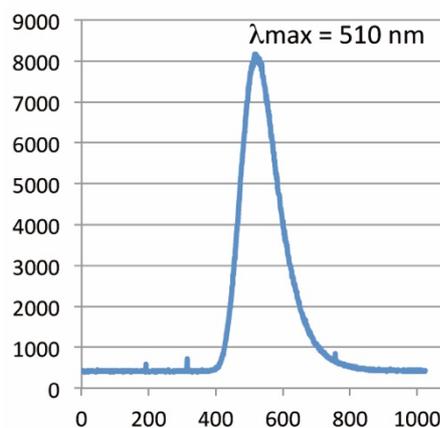


図 2 発光スペクトル解析

基本骨格を決定すると共に、基本骨格に付随する側鎖構造を同定し、できるだけ詳細な構造決定を行うことを目指した。解析に供することができる試料には限界があり、NMR等による構造決定は困難であると予想されたことから、ある程度の基本骨格を決定した時点で、分子式から予想される構造のアナログを有機合成により作製し、組換えルシフェラーゼとの交差反応を確認することで、活性型のアナログを取得することを目指した。

### 3. 研究の方法

ルシフェラーゼの生産については、分泌シグナル配列は天然のものをそのまま利用していたが、各種哺乳類由来配列への改変を行い、分泌効率を確認した。また、全長配列についても宿主に応じたコドンの最適化を行なった。さらに、いくつかの異なる培養細胞での発現を行い、分泌効率のより高い宿主細胞を探索した。

ルシフェリンに関しては、発光液中の夾雑物とルシフェリンそのものの量が解析を進める上で鍵となる。これまでの実験結果から、発光ゴカイの分泌する発光液には夾雑物がほとんどなく、しかも高濃度でルシフェラーゼが含まれていることが確認できていた(図3)。予備的な発光測定の結果から、発光ゴカイの発光分泌液に含まれるルシフェリン量は100 ngオーダーと推察されたことから、まずは数十個体程度の材料からLC/MS/MSによる解析を行なった

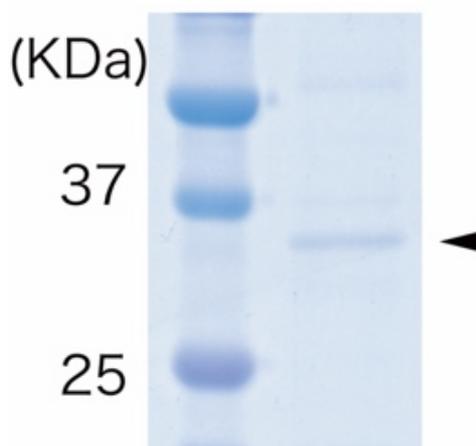


図3 発光分泌液の SDS-PAGE 解析  
矢頭がルシフェラーゼ

ルシフェリンの解析では、発光反応前後(ルシフェリン及びオキシルシフェリン)の関連した構造を持ちながら異なる2種の分子をLC/MS/MS分析に供し、骨格となる構造を解析した。得られたルシフェリン抽出物はLC/MS解析に供し、330 nmの吸収を指標にルシフェリンのピークを検出した。LC/MS解析によって得られた分子量1000以下のピークについて、さらにMS/MS解析を行い、大まかな分子骨格を推定した。

### 4. 研究成果

ルシフェラーゼの組換え生産においては、分泌シグナル配列の改変では分泌発現効率の向上が認められたものがなかったが、培養細胞をこれまでに使用していたCOSからHEK293に代えることで約0.9%であった分泌効率を18.4%程度にまで上昇させることができた。この結果は関連するカリブ海の発光ゴカイに関する論文にて公表した(引用文献②)。

ルシフェラーゼ解析の経験から、ゴカイ発光分泌液はタンパク質成分としてはほぼルシフェラーゼのみからなることがわかってきたため、同様に低分子成分もその大半はルシフェリン(あるいはその分解物等)からなるものと想定して、各種解析を行なった。具体的には、生きた発光ゴカイから発光分泌液のみを回収し、溶剤での抽出を行ない、薄層クロマトグラフィーにて分画し、液体クロマトグラフィー(LC)でさらに解析したところ、いくつかの主要なピークが見られたため、これらについてさらに解析を進めた。また、我々はすでに精製済み組換え発光ゴカイルシフェラーゼを得ていたため、ルシフェラーゼとルシフェリン粗抽出を反応させ、その前後でのLCのピークパターンの変化に着目し、質量分析を行うターゲットを絞り込み、解析を進めた。質量分析から予想されるルシフェリンの分子量や予想される側鎖構造などに基づき、その基本骨格部分から有機化学合成を始めた。得られた一部の合成物に対して、発光反応を試してみたが、基質となりうるものは得られなかった。このため、発光反応には側鎖構造が必須であると考えられた。

#### <引用文献>

- ① Mitani, Y., Yasuno, R., Isaka, M., Mitsuda, N., Futahashi, R., Kamagata, Y., Ohmiya, Y. Novel gene encoding a unique luciferase from the fireworm *Odontosyllis undecimdongata*. *Sci. Rep.* 8, 12789 (2018).
- ② Mitani, Y., Yasuno, R., Futahashi, R., Oakley, T.H., Ohmiya, Y. Luciferase gene of a Caribbean fireworm (Syllidae) from Puerto Rico. *Sci. Rep.* 9, 13015 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mitani Yasuo, Yasuno Rie, Isaka Minato, Mitsuda Nobutaka, Futahashi Ryo, Kamagata Yoichi, Ohmiya Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel gene encoding a unique luciferase from the fireworm <i>Odontosyllis undecimdonga</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-31086-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitani Yasuo, Yasuno Rie, Futahashi Ryo, Oakley Todd H., Ohmiya Yoshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Luciferase gene of a Caribbean fireworm (Syllidae) from Puerto Rico	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-49538-7">https://doi.org/10.1038/s41598-019-49538-7</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mitani Y, Yasuno R, Oakley HT, Ohmiya Y
2. 発表標題 Global scale diversity of a novel luciferase candidate gene from the genus <i>Odontosyllis</i> .
3. 学会等名 ISBC 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三谷 恭雄
2. 発表標題 発光ゴカイにみる新規発光系の解明へ向けて
3. 学会等名 化学生態学研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 発光酵素タンパク質	発明者 近江谷克裕、三谷恭 雄、安野理恵	権利者 産業技術総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、6441534	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 <a href="https://unit.aist.go.jp/bpri/">https://unit.aist.go.jp/bpri/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	小島 直  (Kojima Naoshi)  (30356985)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員  (82626)	