

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19850033
研究課題名（和文）ホタルルシフェリン生合成酵素の単離

研究課題名（英文）Isolation of a firefly luciferin biosynthetic enzyme

研究代表者

丹羽 一樹 (NIWA KAZUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：30443211

研究成果の概要：

ホタルルシフェリンの生合成酵素の単離を目指し、種々の角度から研究を行った。まず生合成反応活性を有する酵素の探索を行い、ヒトおよび大腸菌の遺伝子ライブラリーから、この活性が認められる遺伝子を見出した。今後はホタルから、同じ活性を有する酵素の単離を行う。また、この成果に関連して、生合成を利用した新しい生物発光反応の応用術の開発も試みた。そして生体内シス테인分子を短時間かつ低コストで分析する方法を確立することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,350,000	0	1,350,000
20年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：4706

キーワード：生物発光、天然物有機化学、生物学的分析、光生物、分子進化

1. 研究開始当初の背景

ホタルの発光現象は古くから研究されていて、発光基質ルシフェリンの構造および人工合成方法は50年前に報告されている。しかし、ホタルの発光メカニズムにも未解明の問題が残されている。例えばルシフェリンの生合成経路、すなわち自然界での合成され方や、高い量子収率で光るメカニズムなどがある。これらは学術的に興味深いだけでなく、解明が困難な問題でもある。

2. 研究の目的

本研究代表者はこれまでに、ルシフェリンが自身の光学異性体から生合成されることを明らかにしてきた。本研究では生合成を中心に、ホタルの光に残された謎に挑んだ。特にこれまで研究成果を基に、生合成に関与すると考えられるルシフェリル CoA のチオエステル加水分解酵素に注目し、この酵素の単離を目指した。

3. 研究の方法

過去の研究で、ルシフェリン生合成の最終段階がルシフェリル CoA チオエステル加水分解反応であることを明らかとしていた。そこでルシフェリル CoA チオエステル加水分解酵素を単離することとし、ふたつの方法で、生合成酵素の単離を目指した。

(1) ひとつめの方法は、ルシフェリル CoA のチオエステル加水分解酵素と類似の酵素活性を有するタンパク質を、ゲノム情報が既に明らかな他の生物に求め、それを足がかりにホタルの生合成酵素遺伝子に迫る方法である。

CoA は全ての生物に共通な補酵素で、脂肪酸が代謝される時に脂肪酸との複合体アシル CoA となり、このものを基質としてエネルギー代謝反応に入る。そのため、アシル CoA チオエステラーゼは、アシル基 (脂肪酸部分) と CoA を加水分解する酵素であり、脂肪酸の蓄積と消費の分岐に関連する、生物にとって極めて重要な酵素である。ホタルルシフェリンの生合成に関わるルシフェリル CoA チオエステラーゼも、このアシル CoA チオエステラーゼから進化したよく似た酵素であることが予想される。また、他の生物のアシル CoA チオエステラーゼに、ルシフェリル CoA チオエステラーゼ活性を有する可能性も有り、その場合、ホタル発光反応系を他の生物に導入して応用する際に、その生物のアシル CoA チオエステラーゼを利用することも可能になるかもしれない。そこで、ヒトあるいは大腸菌のアシル CoA チオエステラーゼを探索し、これとアミノ酸配列が似た酵素をホタルから単離する、という方法を計画した。

(2) もうひとつの方法として、ルシフェリル CoA 加水分解反応活性を指標に、ホタルから活性酵素を直接単離する方法である。これは更にふたつの方法がある。

ひとつは生きたホタルから酵素を精製する方法であり、精製した酵素を用いてアミノ酸配列を解析し、そこからその酵素の遺伝子を単離する方法である。もうひとつはホタルの遺伝子ライブラリーを用いてそれぞれの遺伝子がコードするタンパク質を発現させる発現ライブラリーを構築し、ここから目的の酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を分離する方法である。

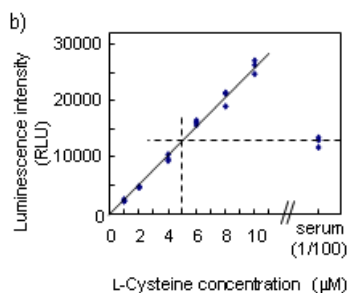
4. 研究成果

(1) まず、文献および遺伝子データベースにて調査を行い、ホタルになるべく近い生物で既知のアシル CoA チオエステラーゼを検索した。しかしながら、ゲノム情報が全て明らかにされているショウジョウバエにも、既知の同酵素と相同性の高いタンパク質遺伝子は見出せなかった。昆虫では特有のアシル CoA 加水分解を有していることが示唆される。そのため、目的の酵素遺伝子をクローニングするためには、酵素活性を指標として酵素そのものを精製し、これを解析する(2)の方法が現実的であることがわかった。

しかしながらホタルからではなくても、他の生物のアシル CoA チオエステラーゼのうち、生合成反応を触媒する酵素の遺伝子は、産業上有用であり、また(2)の方法で酵素を精製する系を構築する際のポジティブコントロールとしても利用できる。そこで、ヒトおよび大腸菌のアシル CoA チオエステラーゼについて実験を行った。ヒトでは、複数の酵素が報告されていたが、それらのうち、ペルオキシダーゼに局在し、さらに基質アシル CoA に対する特異性が低い ACOT8 を選んだ。これは、ホタルの発光反応は細胞内のペルオキシダーゼ内で起きていると考えられているからである。また、原各生物大腸菌からは TESA、TESB 遺伝子を選んだ。これらの酵素の遺伝子をクローニングし、リコンビナント発現系を構築した。これら大腸菌を用いて発現させ、HisTag 法により精製し、酵素活性を解析した結果、いずれからもルシフェリル CoA チオエステル加水分解反応活性が認められた。

この結果は、ルシフェリン生合成の最終段階が、生物にとって普遍的な反応を進化の過程で“流用”してきたことを強く示唆している。また、ホタル生物発光反応をヒトなどの生物に導入して応用する際に、ルシフェリンの生合成に関してはヒトの遺伝子をそのまま利用することができ、ホタルの遺伝子を導入しない方法の開発の可能性を示している。

更に、この成果に関連して、生合成を利用した新しい生物発光反応の応用術の開発も試みた。生合成の出発物質のひとつが L-システインと考えられているが、この物質は生物のタンパク質を構成するアミノ酸の1つであり、その血液中の濃度を簡便に測定する技術は医学的にも意義がある。発光反応は比較的小型で安価な測定装置で検出することが可能であり、L-システインの濃度に応じて発光反応が起きるような反応溶液系を構築すれば、簡便な分析試薬として応用が可能となる。そこで、L-システインを発光反応を用いて短時間かつ低コストで分析する方法の開発を行った。



その結果、図のように、L-システインの濃度に応じた発光量を与える試薬を開発することができた。また、人の血清を用いてこの方法でシステイン濃度を測定したところ、従来の HPLC を用いた方法と統計的に同等の濃度を与える結果となった。

更に、ホタル発光反応の最も普及した応用技術のひとつである、ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現解析において、発光基質 D-ルシフェリンの代わりに、生合成出発物質である L-システインと、2-cyano-6-hydroxibenzo-thiazole を用いることが可能であることが明らかとなった。

(2) ルシフェリル CoA チオエステル加水分解反応活性をホタルから直接単離するふたつの方法のうち、生きたホタルから純粋な酵素を精製方法は、材料の入手の面で非常に困難である。まず、酵素を精製するためには大量のサンプルが必要であるが、日本のホタルを大量に捕獲することは現実的なやり方とは言えない。またホタルを飼育するためには餌であるタニシ等を大量に飼育しなくてはならず、大きな設備が必要となり、現実的ではなかった。シグマ社では乾燥したホタルをある程度の量なら購入することが可能であるが、これが充分量である保証はなく、また、うまく酵素を精製してアミノ酸配列が明らかになったとしても、米国のホタルの遺伝子をクローニングするためには新鮮な生きたホタルから mRNA を抽出して解析する必要があり、遺伝資源の国外持ち出しという意味でその後の研究展開にいくらかの制約が予想される。

一方、ホタルの遺伝子ライブラリーからスクリーニングを行う方法は現実的である。ライブラリー構築に必要なホタルのサンプルは数匹分で充分なので、購入することも飼育することも可能である。また(1)の成果により、ポジティブコントロールとして、目的の活性を持つ酵素の遺伝子を利用できる。

生合成酵素の活性は、発光反応により検出することができる。目的の酵素が生合成の最終段階に関与しているため、その前段階物質

を加えて、更にルシフェラーゼを加えて発光するクローンが目的の生合成酵素遺伝子となる。

該当する前段階の物質は、ルシフェリル CoA である。しかしながら、(1)で述べたように、大腸菌に内在するアシル CoA チオエステラーゼによって分解されて目的のルシフェリンが生成する。そのため、バックグラウンドの発光と、目的の酵素の活性により強化された発光を区別する必要があり、そのためには正確に発光量を測定する技術の開発が必要である。現在、発光量を正確に測定するシステムの検討を行っているところである。

また、これに関連して、ホタルの光におけるもう1つの謎である量子収率の測定に関して、生化学的な観点で研究支援を行った。発光反応の明るさは、量子収率と酵素反応の速度の両方に依存する。そのため、量子収率の測定は生物発光反応の基盤技術と言える。ホタル発光反応の量子収率を測定するために必要な、目的に合った反応系を構築した。この反応系を用いて測定された量子収率は41%という結果で、過去に報告された88%という値に再考を促すこととなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 安東頼子、丹羽一樹、他6名、Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission, *Nature Photonics*, 2, pp44-47, 2008、査読有
- ② 安東頼子、丹羽一樹、他6名、Development of a Quantitative Bio / Chemiluminescence Spectrometer Determining Quantum Yields: Re-examination of the Aqueous Luminol Chemiluminescence Standard, *Photochemistry and Photobiology*, 83, pp1205-1210, 2007、査読有

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：ホタルルシフェリンを用いないルシフェラーゼの光活性測定方法

発明者：近江谷克裕、丹羽一樹、野口貴子

権利者：

種類：特願

番号：2007-258413

出願年月日：平 19.10.2

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 一樹 (NIWA KAZUKI)

産業技術総合研究所・セルエンジニアリング

研究部門・研究員

研究者番号：30443211

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者