

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410185

研究課題名(和文) ホタルルシフェリン生合成経路の解明とキラルフリー発光システムへの応用

研究課題名(英文) Biosynthesis-inspired deracemization production of firefly D-luciferin

研究代表者

加藤 太一郎 (Kato, Dai-ichiro)

鹿児島大学・理工学域理学系・助教

研究者番号：60423901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホタルD-ルシフェリンの生合成経路を利用したキラルフリー発光システムの構築を目的とした研究を行った。ホタル体内では、発光基質D-ルシフェリンがその鏡像異性体であるL-ルシフェリンのチオエステル化、立体反転、加水分解というデラセミ化プロセスによって調製されるという仮説のもと、まずモデル反応として、細菌由来チオエステラーゼとホタルルシフェラーゼを組み合わせた反応系を作成し、L-からD-体への立体反転を伴った発光反応が確かに進行することを確かめた。また、本プロセスに参与する遺伝子群を、成虫のトランスクリプトーム解析を行うことによって特定することも試みた。

研究成果の概要(英文)： In this project, we tried to establish a chiral free bioluminescence system inspired by the biosynthetic pathway of firefly D-luciferin. In fireflies, L-luciferin is the biosynthetic precursor of D-luciferin, which is produced from the L-form undergoing deracemization. This deracemization consists of three successive reactions: L-enantioselective thioesterification by luciferase, in situ epimerization, and hydrolysis by thioesterase. At first, a deracemization bioluminescence system using a combination of firefly luciferase and fatty acyl-CoA thioesterase from bacteria was constructed. We could confirm that this firefly luciferase-thioesterase combination system worked well and can improve bioanalysis applications using the firefly bioluminescence reaction by efficient deracemization of D-luciferin. We also performed a transcriptome analysis toward adult firefly.

研究分野：生物有機化学

キーワード：バイオテクノロジー ホタル 生物発光 生合成経路 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

ホタルの発光は、酵素ホタルルシフェラーゼが、基質 D-ルシフェリンをオキシルシフェリンへと化学変換することで実現される。本現象は化学発光の一種であり、蛍光発光と比較して S/N 比が高いこと、細胞深部の標的でも検出可能であること等の優位性から、医療・食品など様々な分野における検出やバイオイメージング手法として応用されている。このように今や我々の生活に欠かせない存在となっている発光反応であるが、次に示す問題点を解決できれば、その利用価値はより高いものになると研究代表者は考えた。

その問題点とは、「キラル化合物」という点である。つまり、ホタルルシフェリン分子は1つの不斉炭素を有しており、D-体 L-体という一組の光学活性体が存在する(図1)。これらの内、現状の発光反応条件下では D-体が発光基質として利用できる一方、L-体は強い発光阻害剤として働き、定量的な発光反応の発現を妨げたり、再現性を低下させたりする原因となっていた。またルシフェリン分子は、中性付近でも容易にラセミ化することが知られており、系中における光学純度の維持が困難な場合もあった。通常このような状況では、ラセミ化を如何に防ぐかが研究の主眼となりがちであるが、研究代表者らは D-ルシフェリンの生合成経路に着目することで、D-体 L-体いずれからでも効率よく発光するキラルフリーシステムが極めて現実的な解決法であるという着想に至った。

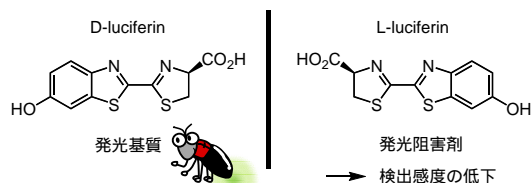


図1. D-体L-体いずれからでも発光するキラルフリーシステムの開発

また、L-ルシフェリンは、ホタルルシフェラーゼに対して、発光とは全く違う触媒活性、立体選択的チオエステル化活性を発現させる[D.Kato et al., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2011, 69, 140-146.]. 本活性は L-ルシフェリンの発光阻害の解除に関わっていると考えられている。つまり活性部位に強く結合している L-ルシフェリンは、本活性によって補酵素 A(CoASH)と反応し L-ルシフェリル-CoA へと変換される。これによって酵素との親和性が低下し、阻害が解除されるというわけである。しかし研究代表者らは、上記チオエステル化活性が、実は D-ルシフェリン生合成のために利用されているのではないかと考えるに至った。

この理由は以下の点からである。まず、丹羽(研究分担者)らは、これまでホタル抽出物を利用した生合成経路の解析を行っており、D-体の前駆体として L-ルシフェリンの存在を指摘していた[K.Niwa et al., FEBS Lett., 2006, 580, 5283-5287.]. また反応進行のために

は CoASH の添加が必須であった。一方、加藤(研究代表者)らはホタルルシフェラーゼのチオエステル化について、酵素の不斉点識別機構の解明を行ってきた[[D.Kato et al., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 2011, 69, 140-146.]]. また、本酵素とエピメリ化酵素、加水分解酵素の3種を組み合わせることで、立体反転を伴ってラセミ体から光学活性体を 100%の収率にて得ることが可能なデラセミ化プロセスを構築していた[D.Kato et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 7234-7242.].

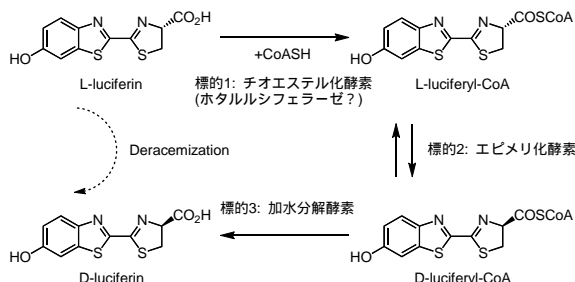


図2. 研究代表者らが想定するホタル体内でのLからD-ルシフェリン変換プロセス

2. 研究の目的

上記の研究背景のもと研究代表者は、ホタル体内でも図2のようなデラセミ化様立体反転プロセスが進行し、Lから D-ルシフェリンが生合成されているのではないかとこの着想を得、このデラセミ化経路を利用することで基質の不斉によらないキラルフリーな発光システムの構築ができると考えた。また、ホタルのゲノム解析やトランスクリプトーム解析を行うことで、本生合成に関与する酵素群を明らかにすることも可能だと考え、本研究を行うこととした。具体的な目標は以下のとおりである。

ホタル体内では、発光基質 D-ルシフェリンがその鏡像異性体である L-ルシフェリンのチオエステル化、立体反転、加水分解というデラセミ化プロセスによって調製されるという仮説のもと、まずモデル反応として、細菌由来チオエステラーゼとホタルルシフェラーゼを組み合わせた反応系を作成し、Lから D-体への立体反転を伴った発光反応が確かに進行することを確かめる。

本プロセスに関与する遺伝子群を、成虫のトランスクリプトーム解析およびゲノム解析を行うことによって同定する。

3. 研究の方法

本研究では、ホタル D-ルシフェリンの生合成経路を解明すると共に、生合成経路を利用したキラルフリー発光システムの構築を目的とした研究を行った。

ホタル体内では、発光基質 D-ルシフェリンがその鏡像異性体である L-ルシフェリンの立体反転によって調製されるという仮説のもと、まず、デラセミ化経路の妥当性を評価するために in vitro でのモデル反応系を構築した。一方、本プロセスに関与する遺伝子群

をホタル成虫に対するトランスクリプトーム解析およびゲノム解析によって特定した。また、実際にマウスの時計遺伝子発現系をモデルとした *in vivo* イメージング系の構築を目指した。

4. 研究成果

1. デラセミ化経路の妥当性確認

ホタル D-ルシフェリンの生合成経路として研究代表者は、本発光基質が、ホタル体内にてその鏡像異性体である L-ルシフェリンから立体反転を伴ったデラセミ化反応によって合成されているという仮説を立てた。具体的には、まずチオエステル化酵素によって L-ルシフェリンと CoASH からチオエステル体を生成する。次に、本チオエステル体に対してエピメリ化酵素が作用、立体が反転し、最後に加水分解酵素によって D-ルシフェリンが得られるという経路である(図 2)。

本経路の妥当性を確かめるためにまずモデル反応として大腸菌由来チオエステラーゼ(TESB)と、ホタルルシフェラーゼ(LUC-G)を *in vitro* にて組み合わせた系(LUC-G-TESB の 2 成分系)を作成し、pH8 の *in vitro* にて L から D-体への立体反転を伴った発光反応が予想通り進行することを確認した(図 3, 4)。本系は LUC-G および TESB の比率によって効率に違いが出るのが分かった。最終的に LUC-G/TESB=1/0.1 が最適な酵素量比であることを確認した。また中性から酸性 pH では立体反転効率が低下したが、細菌由来エピメリーゼ (AMACR) を共存させた LUC-G-AMACR-TESB の 3 成分系によって pH8 と同等の効率を達成できることを確認した。

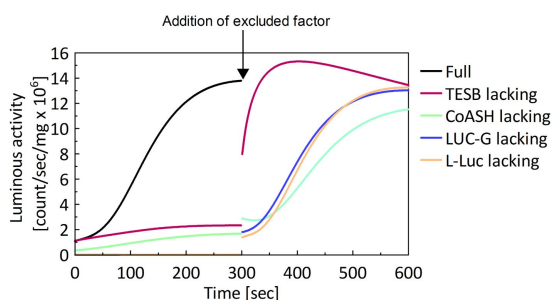


図3. LUC-G-TESBの2成分系でのキラルフリー発光結果

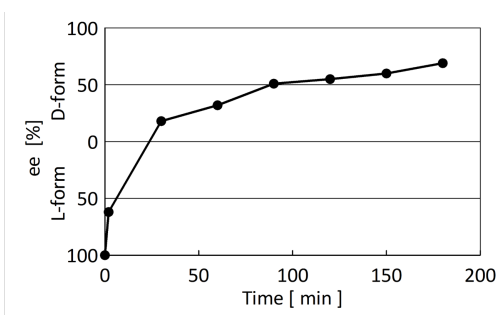


図4. LUC-G-TESBの2成分系でのL-体からD-ルシフェリンへの立体変換

2. ホタル成虫に対するトランスクリプトーム解析およびゲノム解析

ホタルに対するトランスクリプトーム解析(遺伝子発現解析)を行い、デラセミ化仮説を裏付けるような酵素遺伝子が発現しているかをゲンジボタルおよびヘイケボタルの成虫を利用して確認した。解析はゲノム支援(文部科学省科学研究費新学術領域研究「生命科学系3分野支援活動」)に採択されたため、ゲンジボタルおよびヘイケボタルの成虫発光器に対するトランスクリプトーム解析(RNA-seq 解析)、および、ゲンジボタルおよびヘイケボタルの全ゲノム配列解析を委託できた。

まず、ゲンジボタルおよびヘイケボタルの成虫発光器に対するトランスクリプトーム解析を行った。ホタル成虫発光器より抽出した totalRNA に対して Agilent Strand kit を用いたライブラリー調製を行い、イルミナ社製 HiSeq2500 にて Pair End 100bp の条件でシーケンスを実行した(得られた情報は DDBJ データベースに登録済、現状非公開)。本解析より得られた情報を基に、DDBJ Read Annotation Pipeline により *de novo* アセンブリを行った。推定されたタンパク質はゲンジボタル 89,717 配列、ヘイケボタル 178,083 配列となった。

得られたトランスクリプトーム解析の結果から、デラセミ化立体反転プロセスに参与する候補チオエステラーゼ遺伝子を探索したところ、有望な 4 種類を予想することができた。そこでこれらの遺伝子をクローニングし、大腸菌にて発現させることを試みた。その結果、タンパク質の発現は確認できたものすべてが不溶性であった。タグの選定、発現大腸菌の変更、グアニジンによる巻き戻し等、様々な改善策を試みたが、本科研費研究終了時までには候補タンパク質を可溶性タンパク質として得ることはできなかった。ただし、本研究の過程で様々な生物種由来のチオエステラーゼについて検討を行い、それらの中には興味深い特性を示すものを見つけることができた(現在特許出願準備中)。

また、ゲンジボタルおよびヘイケボタルに対する全ゲノム配列を決定する試みも行った。当初 DNA 抽出源として幼虫を用いたが、共生細菌と思われる *Rickettsia* や *Pseudomonas* 等少なくとも 5,6 種類の細菌の配列コンタミネーションが見られ、それらすべてを取り除くことは困難であった。そこで成虫を DNA 抽出源とした検討に切り替えた。その結果、ゲンジボタルに対して配列長閾値を 1 kbp とした場合、Contig N50 サイズ 0.3 Mbp、Scaffold N50 サイズ 11.9 Mbp (3,247 配列)を達成した。推定ゲノムサイズは 667.9 Mbp であった。一方同様の閾値でのヘイケボタルのゲノムサイズはおよそ 1 Gbp と大きく、k-mer 頻度からヘテロ接合度が極めて高いことが示唆された(Contig N50 サイズ:33.7 kbp、

Scaffold N50:416.8 kbp、20,747 配列)。これらの配列情報はデータベース未登録の状態である。現在までにアセンブル、およびアノテーションの一部を終了している。今後、より詳細なアノテーションを完了させることで、ホタル D-ルシフェリンの生合成経路に関わる酵素遺伝子候補を選定するための強力なデータベースを作成するつもりである。

3. 細胞内での in vivo デラセミ化反応系の構築

マウスの時計遺伝子発現系にチオエステラーゼ TESB 遺伝子を導入した細胞株を樹立し、それを用いた L-ルシフェリンからの発光を試みたが、残念ながらバックグラウンドとの有意差は見られなかった。TESB タンパク質が発現していない可能性やルシフェラーゼとの発現量のバランスが悪かった可能性等が考えられる。今後はホタル由来のチオエステラーゼ遺伝子を用いた検討も行っていく予定である。

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 5 件)

1. J.Maeda, D.Kato, M.Okuda, M.Takeo, S.Negoro, K.Arima, Y.Ito, K.Niwa, “Biosynthesis-inspired deracemization production of D-luciferin by combining luciferase and thioesterase”, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects* (査読有), 1861(8), pp 2112–2118, 2017.
2. R.A.Prado, C.R.Santos, D.Kato, M.T.Murakami, V.Viviani, “The dark and bright sides of an enzyme: threedimensional structure of the N-terminal domain of Zophobas morio luciferase-like enzyme, inferences on the biological function and origin of oxygenase/luciferase activity”, *Photochem. Photobiol. Sci.* (査読有), 15(5), 654-665, 2016.
3. D.Kato, D.Shirakawa, R.Polz, M.Maenaka, M.Takeo, S.Negoro, K.Niwa, “Firefly inspired one-pot chemiluminescence system using n-propylphosphonic anhydride (T3P)”, *Photochem. Photobiol. Sci.* (査読有), 13(12), pp 1640-1645, 2014.
4. R.Prado, D.Kato, M.Murakami, V.Viviani, “Thioesterification activity and the biological function of the enigmatic luciferase-like enzyme of Zophobas morio (Coleoptera; Tenebrionidae) Malpighian Tubules”, *Luminescence* (査読有), 29(S1), pp. 89, 2014.
5. K.Niwa, D.Kato, M.Maenaka, Y.Ohmiya, “Quantum yield and spectrum of D-aminoluciferin bioluminescence reaction”, *Luminescence* (査読有), 29(S1), pp. 85-86,

2014.

[学会発表](計 18 件)

1. V.R.Viviani, R.A.Prado, C.R.Santos, D.Kato, M.T.Murakami, “The dark and bright sides of Zophobas morio luciferase-like enzyme: threedimensional structure, biological function and origin of oxygenase/luciferase activity”, ISBC2016, (May 29-June 2, Tsukuba International Congress Center (Ibaraki, Tsukuba), 2016), pp. B4-6 (口頭発表).
2. D.Kato, J.Maeda, M.Okuda, M.Takeo, S.Negoro, Y.Ito, K.Niwa, “Chiral inversion of firefly luciferin by luciferase-thioesterase combined deracemization reaction”, ISBC2016, (May 29-June 2, Tsukuba International Congress Center (Ibaraki, Tsukuba), 2016), pp. PA-20 (ポスター発表).
3. D.Kato, Y.Yanagita, D.Shirakawa, M.Takeo, S.Negoro, Y.Ito, K.Niwa, “An important factor for D-aminoluciferin bioluminescence by firefly luciferase”, ISBC2016, (May 29-June 2, Tsukuba International Congress Center (Ibaraki, Tsukuba), 2016), pp. PA-21 (ポスター発表).
4. V.R.Viviani, R.A.Prado, C.R.Santos, D.Kato, M.T.Murakami, “The dark and bright sides of Zophobas morio luciferase-like enzyme: threedimensional structure, biological function and origin of oxygenase/luciferase activity”, ISBC2016, (May 29-June 2, Tsukuba International Congress Center (Ibaraki, Tsukuba), 2016), pp. PA-46 (ポスター発表).
5. D.Shirakawa, D.Kato, M.Maenaka, M.Takeo, S.Negoro, K.Niwa, “Recognition of D-aminoluciferin in the active site of firefly luciferase”, *Active Enzyme Molecule 2014*, (December 17-19, Toyama International Conference Center (Toyama, Toyama), 2014), pp. P-13 (ポスター発表).
6. M.Okuda, D.Kato, K.Niwa, M.Takeo, S.Negoro, “Chiral free firefly bioluminescence system using deracemization reaction”, *Active Enzyme Molecule 2014*, (December 17-19, Toyama International Conference Center (Toyama, Toyama), 2014), pp. P-14 (ポスター発表).
7. K.Niwa, D.Kato, M.Maenaka, Y.Ohmiya, “Quantum yield and spectrum of D-aminoluciferin bioluminescence reaction”, ISBC2014, (June 23-28, Uppsala (Sweden), 2014), pp. P0051 (ポスター発表).
8. R.Prado, D.Kato, M.Murakami, V.Viviani, “Thioesterification activity and the biological function of the enigmatic luciferase-like enzyme of Zophobas morio (Coleoptera; Tenebrionidae) Malpighian Tubules”, ISBC2014, (June 23-28, Uppsala (Sweden),

- 2014), pp. P0056 (ポスター発表).
9. 加藤太一郎:「バイオテクノロジーの発展に寄与するホタルの発光反応」, 三学会(日本動物学会, 日本生態学会, 九州沖縄植物学会)合同鹿児島例会講演要旨集, (平成28年12月17日, 鹿児島大学理学部(鹿児島県・鹿児島市), pp. (一般招待講演発表).
 10. 前田樹里, 加藤太一郎, 奥田真利, 武尾正弘, 根来誠司, 伊東祐二, 丹羽一樹:「デラセミ化反応を用いるホタル生物発光のキラルフリー化戦略」, 第40回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム講演要旨集, (平成28年8月26-28日, 鹿児島指宿ベイテラス(鹿児島県・指宿市), pp. P-17 (ポスター発表). 最優秀ポスター賞
 11. 加藤太一郎, 白川大暉, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司, 伊東祐二:「ホタルルシフェリンの簡便な化学発光システム」, 生物発光化学発光研究会第32回学術講演会要旨集, (平成27年10月31日, 電気通信大学附属図書館マルチメディアホール(東京都・国立市)), pp. P-04 (ポスター発表).
 12. 加藤太一郎, 奥田真利, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司, 伊東祐二:「キラルフリーホタル発光システム」, 第67回日本生物工学会大会講演要旨集, (平成27年10月26-28日, 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)), pp. 2P-050 (ポスター発表).
 13. 加藤太一郎:「発光とチオエステル化 ホタルルシフェラーゼはどうして2つの触媒活性を持っているのか?」, 第39回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム講演要旨集, (平成27年9月10-12日, 別府 豊泉荘(大分県・別府市), pp. 25 (ショートトーク2) (ショートトーク, 口頭).
 14. 加藤太一郎, 丹羽一樹, 奥田真利, 根来誠司, 伊東祐二:「デラセミ化反応を用いたL-ルシフェリンからのホタル発光システム」, 平成27年度日本生化学会九州支部例会プログラム要旨集, (平成27年5月16-17日, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県・福岡市), pp. 64 (B30) (一般講演発表, 口頭).
 15. 白川大暉, 加藤太一郎, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司, 伊東祐二:「無水プロピルホスホン酸(T3P)を用いた新しいホタルルシフェリン化学発光システム」, 生物発光化学発光研究会第31回学術講演会「信州に集う発光研究」要旨集, (平成26年11月2日, 信州大学繊維学部(上田市)講堂(山梨県・上田市)), pp. P15 (ポスター発表). ポスター賞
 16. 加藤太一郎, 白川大暉, 前中美華, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司:「化学・生物発光特性から考察するホタルルシフェラーゼによるアミノルシフェリンの認識方法」, 第66回日本生物工学会大会講演要旨集,

(平成26年9月9-11日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)), pp. 1P-093 (ポスター発表).

17. 加藤太一郎, 奥田真利, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司:「L-ルシフェリンを用いたホタル発光システム」, 第66回日本生物工学会大会講演要旨集, (平成26年9月9-11日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)), pp. 1P-094 (ポスター発表).
18. 加藤太一郎, 奥田真利, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司:「L-ルシフェリンからの発光を実現するデラセミ化プロセスの構築」, 文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議要旨集, (平成26年8月20-21日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)), pp. 027 (ポスター発表).

〔図書〕(計 1件)

1. D.Kato, “Firefly Luciferase as Biocatalysts”, Editors: Tomoko Matsuda, Future Directions in Biocatalysis, 2nd Edition, Chapter 8 (Elsevier), 2017年6月発刊予定.

〔産業財産権〕

現在1件出願準備中

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~yito/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 太一郎 (KATO, Dai-ichiro)
鹿児島大学・理工学域理学系・助教
研究者番号: 60423901

(2)研究分担者

丹羽 一樹 (NIWA, Kazuki)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員
研究者番号: 30443211

(3)連携研究者

根来 誠司 (NEGORO, Seiji)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90156159

武尾 正弘 (TAKEO, Masahiro)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 40236443

(4)研究協力者

中島 芳浩 (NAKAJIMA, Yoshihiro)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長
白川 大暉 (SHIRAKAWA, Daiki)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・学生
奥田 真利 (OKUDA, Masatoshi)
兵庫県立大学・大学院工学研究科・学生
前田 樹里 (MAEDA, Juri)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・学生