

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560440

研究課題名(和文)海棲発光動物の発光における分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of bioluminescence from marine luminous animals

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・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：10358103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：発光生物の光は古くから科学者のみならず多くの人を魅了してきた。発光生物は多様であり、およそ700属に及ぶとされ特に陸棲動物では甲虫など多くの種で発光の分子機構が解明されている。その一方で、700属のうち8割は海棲だと言われるが、そのほとんどのものが手付かずのまま残されており、そこに新規発光分子機構の発見の可能性がある。本研究では、主に発光ゴカイを対象に研究を進め発光酵素であるルシフェラーゼの単離を行った。

研究成果の概要(英文)：Luminous animals attracted mankind from the old days. The diversity of luminous animals is very wide, but only a few of them including luminous beetles have been analyzed. It is known that more than 700 genera include luminous animals and 80% of them are living in ocean, but only a few of them have been elucidated. Thus, these luminous animals would be the frontier for the exploration of novel type luminous mechanisms. In this study, we mainly analyzed luminous sea worm and isolated novel type luciferase gene from Japanese fire sea form.

研究分野：分子生物学

キーワード：発光生物 ルシフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

発光生物は700属におよぶ生物に見られる極めて多様性の高い現象であるが、そのうち8割を占めるとされる海棲の発光生物に関しては未解明なものが多い。19世紀末にデュボアが生物発光の基本原則を発見し、発光に関与する基質・酵素を総称してルシフェリン・ルシフェラーゼと名付けて以来、発光甲虫や発光細菌を用いた科学的な研究が進展した。陸棲の甲虫ではホタル、ヒカリコメツキムシ、鉄道虫など多様な種について、欧州、アジア、北中南米など幅広く収集され、発光における分子機構が明らかにされている。海棲動物においては、刺胞、環形、軟体、節足、棘皮動物など幅広い動物群において、それぞれ数万におよぶ大量の個体から10種類以上のルシフェラーゼが精製され生化学的解析がなされ、陸棲の発光生物には見られない多様性が示唆されている。こうしたことから、海棲発光生物には新規な発光分子機構の存在が示唆されるが、遺伝子の同定やタンパク質構造解析といった分子機構に関する報告がある種は限定的であった。しかしながら、詳細な発光機構が未解明なまま残された発光生物は、一部の例外を除き、少数の個体しか入手できない。さらには、護岸工事等の環境変化により棲息域の変化や減少も頻繁に起こっていると考えられる。このため、限られた個体数から効率的に研究を進める方法が求められていた。

2. 研究の目的

発光生物の持つ発光原理はホタル、オワンクラゲ、ウミホタルなどいくつかの種で解析がなされ、急速に応用面での研究が進展し、発光生物由来の分子機構を利用した生体イメージングなどのインパクトの高い応用研究が盛んに展開され、高い関心を集めている。その一方で、多様な発光色や発光様式を持ち、学術的にも応用面でも価値が高いと考えられる海棲発光生物についての研究は予想外に進んでいない。本研究では、発光の分子機構が未解明な海棲発光生物について解析し、発光の実体を担うルシフェラーゼ遺伝子を同定し、その機能を明らかにすることを目的として、研究を進めた。

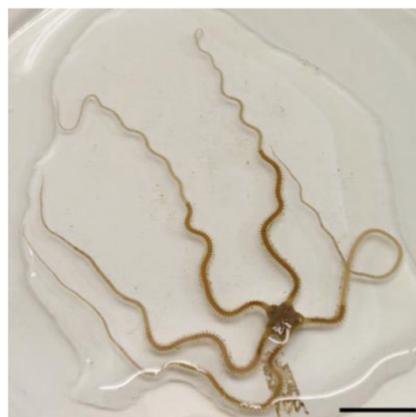
3. 研究の方法

本研究では、特に発光ゴカイ(図1)及び発光クモヒトデ(図2)を対象として研究を進めた。発光ゴカイは、米国西海岸、カリブ海に加えて、日本国内でも生息することが知られており、まずは、試料の入手の観点から国内産発光ゴカイを手がかりに、その発光機構を解明することを目指した。発光ゴカイは、緑と青の中ほどの発光液を分泌し、通常の室内照明程度の明かりのもとでも発光が確認できることから、発光強度が強く、将来的には細

胞内イメージングなどの応用研究においても有用性が高いと考えられる。また、発光クモヒトデに関しては、ベルギーの研究協力者と共同研究を進めており、そこから分与いただいた試料をもとに解析を行った。



(図1) 本研究で使用した発光ゴカイ (*Odontosyllis undecimdata*)。右下が頭部で左上が尾部。周期的な2本の黒いすじが認められる。スケールバー=2ミリメートル



(図2) 本研究で使用した発光クモヒトデ (*Amphiura filiformis*)。長くのびた腕にある発光器が青い光を発する。スケールバー=10ミリメートル

発光ゴカイについては、国内では、富山湾での生息を確認しており、本研究においても富山湾でのサンプリングを実施した。発光ゴカイは通常海底付近の棲管に閉じこもっているため、採取することは難しいが、秋口の一定時期になると繁殖を目的として海面付近を泳ぐことが知られており、本研究においても、この短いタイミングに合わせてサンプリングを実施した。採取可能な時期が限られ、さらに、一匹一匹を熱帯魚用の小さな網ですくう手作業での採取となることから、得られる試料の数には限りがある。実際、本研究において得られた発光ゴカイは1シーズン延べ10人程で採取を行って、200個体程度であった。なお、採取にあたっては魚津水族館の皆様にご多大なるご協力をいただいた。

発光ゴカイの発光機構は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ型 (LL 型) といわれているものの、発光基質であるルシフェリンも発光酵素であるルシフェラーゼも未同定である。そのため、まずは、LL 型の発光を確認するために、酵素や基質の抽出方法を検討した。ゴカイは通常の室内光程度の中でも十分に確認できるほど明るい発光液を分泌する (図3)。ルシフェラーゼの抽出には通常、低温の緩衝液が用いられ、ルシフェリンの抽出には高温の緩衝液ないしは有機溶媒が用いられている。本研究においてもこれに従い、各要素の抽出を行った。



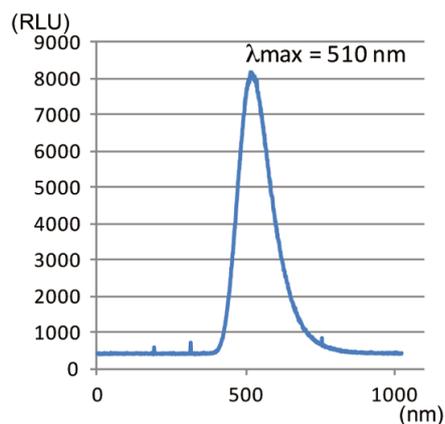
(図3) 発光ゴカイの発光の様子。特に尾部付近から青緑色の発光液を分泌する。粘液とともに分泌されるためすぐには拡散せず、体表面を覆うように発光が見られる。

発光クモヒトデも LL 型発光を示すとされており、その基質は、オワンクラゲと同じくセレンテラジンであるといわれている。ルシフェラーゼに関しては、ゴカイの場合と同様に低温緩衝液を用いて抽出を行った。ルシフェリンに関しては、合成セレンテラジンを購入し、LL 型反応試験に供した。

4. 研究成果

発光ゴカイに関しては、低温緩衝液による抽出物と有機溶媒抽出物を用いることで LL 型反応が確認できた。また、低温緩衝液による抽出物と既知で入手可能なルシフェリン (セレンテラジン、フリマジン、ウミホタルルシフェリン、ホタルルシフェリンなど) との交差反応を試みたが、いずれも発光は全く認められなかった。このため、発光ゴカイのルシフェリンは既知のものとは異なる構造を持つものであると考えられた。なお、低温緩衝液にて抽出したルシフェラーゼ溶液にはルシフェリンも多く含まれ、抽出直後には肉眼で十分観察できるほどの発光を伴っているため、そのままでは LL 反応を確認することができない。そのため、当該溶液を冷蔵庫内で一晩放置することで、共抽出されたルシフェリンを完全に消費させ、発光がなくなっていることを確認した上で、LL 反応に供した。

次に、採取した発光ゴカイのルシフェラーゼ抽出液を回収・分離し、SDS-PAGE にてシングルバンドとなることを確認した。また、分離したタンパク質はルシフェリン粗抽出液の添加により発光が確認できた。このためこの画分にルシフェラーゼが含まれる可能性が示唆された。そこで、このタンパク質に関して、アミノ酸配列の同定を行い、部分的な配列情報を取得した。並行して発光ゴカイ抽出物から RNA を精製、ライブラリーを作製したのち、RNA-seq 解析を行った。得られたデータをもとに de novo アッセムブリーを行い網羅的な cDNA の情報を取得した。この cDNA 情報をもとに、上述のアミノ酸配列に対する BLAST 検索を行いヒットする cDNA 配列を取得した。ヒットした cDNA は一つだけであり、その翻訳産物の分子量はルシフェラーゼ抽出液から分離したタンパク質の分子量とほぼ合致した。このことから、得られた cDNA の配列がルシフェラーゼ抽出液由来タンパク質をコードする遺伝子である可能性が示唆された。また、相同性検索の結果、この cDNA 配列は、いずれの既知のルシフェラーゼとも相同性を示さなかったことから、新規のルシフェラーゼをコードする可能性が示唆された。次に得られた遺伝子配列をもとに、発現ベクターを構築し、組換えタンパク質の生産を行った。得られた組換えタンパク質粗抽出液とゴカイ発光基質抽出物を混合したところ、発光が確認された。また、この組換えタンパク質による発光スペクトルを確認したところ、発光ゴカイそのものによるスペクトルと完全に一致し、510 nm に発光のピークを持つことが確認できた (図4)。このことから本研究において同定した遺伝子は発光ゴカイルシフェラーゼをコードすることが示唆された。



(図4) 発光ゴカイの発光スペクトル
510 nm付近にピークを示し、組換えタンパク質のスペクトルもこれに一致する。

また、得られた cDNA 配列をもとにプライマーを設計し、発光ゴカイから抽出した全ゲノム DNA を鋳型として、PCR を行ったところ、約 4.8 kbp の DNA 断片の増幅が確認できた。この断片をクローニングし、全長配列

を決定したところ、当該 cDNA はゲノム上に 8 つのエキソンからなる遺伝子としてコードされていることが明らかになった。これら一連の結果から、本研究で同定された遺伝子はゴカイそのものが発現しているものであり、ルシフェラーゼとして機能する可能性が示唆された。また、組換え発現タンパク質に関しては、粗精製物を冷蔵庫内で保管しても少なくとも 1 ヶ月以上は安定に活性を保持していることから、本ルシフェラーゼは相当に安定なタンパク質であると考えられる。この安定性はゴカイそのものからのルシフェラーゼ（低温緩衝液抽出物）についても同様の観察結果が得られており、応用研究に際して極めて有用な特性となりうると考えられる。

発光クモヒトデに関しては、ベルギーの研究グループとの共同研究として進めた。発光を伴うクモヒトデは複数の種が知られており、我々は 2 つの種に関して予備的なデータを得ている。このうち 1 種は腕の付根から先端にかけて順次緑色の光を点滅させる発光を行い、もう 1 種は腕の動きにあわせて腕全体を青白く明滅させる。このように比較的近縁な種間で発光様式や発光色が異なる現象はその生態的な意味づけを含めて極めて興味深い現象と考えられる。本研究では、発光基質に関する情報があり、かつ、その再現性が確認できた青色に発光するクモヒトデについて、まずは研究を進めることとした。低温緩衝液による抽出物とセレンテラジンを反応させることで発光が確認できたことから、本研究で対象とした発光クモヒトデはセレンテラジンを基質とする LL 型反応による発光を示すことが示唆された。

次に、発光クモヒトデのルシフェラーゼに関してその分離を試みたが、予想したほどのルシフェラーゼの発現量は確認できなかったため、直接ルシフェラーゼを特定するアプローチは困難であると判断し、発現ライブラリーを作製し、セレンテラジンとの交差反応により発光を示すクローンを得ることを試みた。発光クモヒトデ発光器を回収し、精製した mRNA から cDNA ライブラリーを構築した。構築したライブラリーからランダムに 100 個程度のクローンを選び、シーケンスを確認したところ、1~3 kbp 程度の配列が確認できたため、発現ライブラリーとして使用可能であると考えられた。発光ゴカイの研究進捗状況を鑑み、発光クモヒトデに関しては、一旦保留として、構築済み発現ライブラリーを凍結保存しているが、今後、状況をみて継続的に取り組みを続ける予定である。

本研究においては、当初、発光ゴカイと発光クモヒトデを材料として研究を進めたが、発光ゴカイにおいて大きな進展があったため、特に研究期間の後半では、研究時間、研究予算とも発光ゴカイの解析に重点をおいて解析

を進めた。結果として、発光ゴカイではルシフェラーゼの同定、in vitro での発光の再現に至ることができた。また、発光ゴカイにおいて得られた成果は極めて新規性が高く、産業上の有用性も高いと考えられたため、知財化を優先させる方針で取りまとめを進め、本科研費最終年度の平成 27 年度中に特許出願を行った。このため、学会や論文による発表は現段階では行っていない。なお、特許に関しては国際出願も想定している。

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 0 件)

[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：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：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2016-048403 号

出願年月日：平成 28 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-gene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 恭雄 (MITANI, Yasuo)

研究者番号：1 0 3 5 8 1 0 3

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・主任研究員

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

近江谷克裕 (OHMIYA, Yoshihiro)

研究者番号：2 0 2 2 3 9 5 1

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究部門長