

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07413

研究課題名(和文) 発光タンパク質のクロモフォア構造に関する生物有機化学的研究

研究課題名(英文) Chemistry and Biology of the Chromophore of a Photoprotein

研究代表者

久世 雅樹 (KUSE, Masaki)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40335013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フォラシンのクロモフォア(発光を司る化学構造)を詳細に解明することを目的として、1) ^{13}C 標識デヒドロセレンテラジン(DCL)の化学合成、2) アポ発光タンパク質の調製、3) 高輝度発光する非天然型基質のデザインと合成に取り組んだ。その結果、標識炭素を効率的に合成する経路を確立し、遺伝子発現によるアポタンパク質の調製、高輝度発光DCL誘導体の合成に成功し、発光活性を高める分子デザインにおける指針を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Chemical and biological analyses of the chromophore of a photoprotein (pholasin) were performed in order to clarify the detailed structure of the chromophore, and the following results were obtained: 1) ^{13}C -labeled dehydrocoelenterazine (DCL) was synthesized. 2) Apo-protein was obtained by cloning and expression of the DNA of the photoprotein. 3) Non-natural DCL analogs, which gave more active substance than natural DCL, were designed and synthesized. From these results, the further progress of this research will be expected.

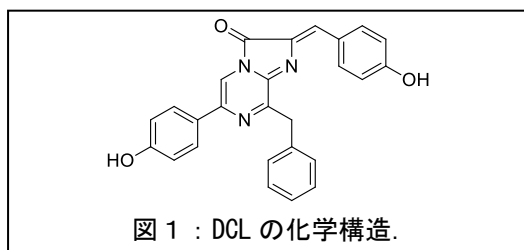
研究分野：生物有機化学

キーワード：生体分子 生理活性 蛋白質 有機化学

1. 研究開始当初の背景

生物発光とは、タンパク質中で基質が酸化され、その酸化物が分解する際に生じるエネルギーを可視光として放出する現象である。発光するためには、タンパク質、基質、そして酸素が必要であるが、さらに発光反応を開始するための生体成分が必須となる。例えば、ホタルでは ATP とマグネシウムイオンであり、オワンクラゲではカルシウムイオン (Ca^{2+}) である。生物発光を利用して、ATP や Ca^{2+} といった生体成分をリアルタイムに可視化し定量することが可能である。実際に生物発光は生命科学研究において、生体成分の微量分析手段として利用されている。

申請者は、活性酸素種 (ROS) を発光開始成分とする生物 (トビイカとヒカリカメガイ) の発光機構に関する生物有機化学的研究を行っている。ヒカリカメガイの発光タンパク質 (フォラシン) には、発光を司る化学構造であるクロモフォアが存在している。申請者はクロモフォアがデヒドロセレンテラジン (DCL: 図1) で形成されていることを明らかにしてきた (Kuse*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 731.; Tanaka, Kuse*, Nishikawa. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2725.)。



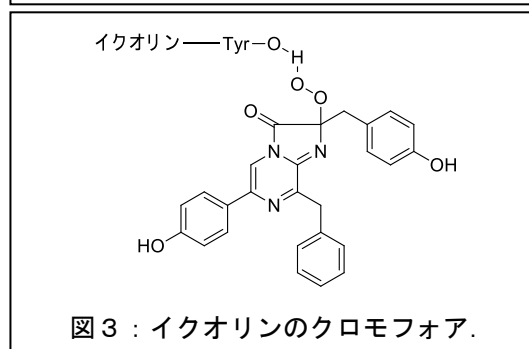
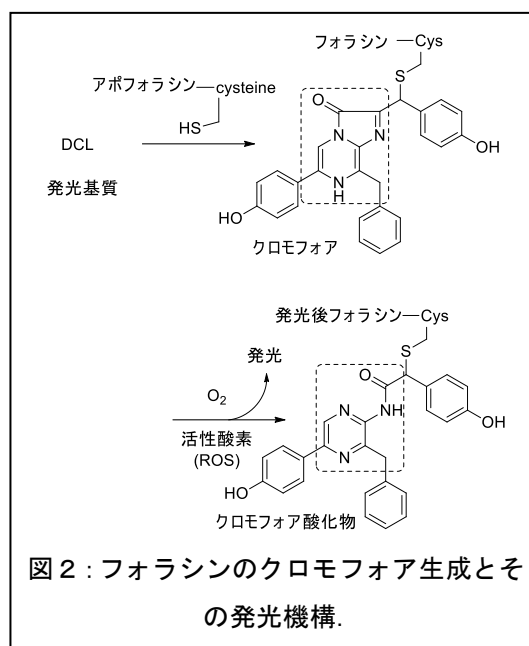
しかしながら、フォラシンのクロモフォアに関する詳細な化学構造と、発光開始段階において ROS が関与する仕組み (分子機構) については未解明である。また、フォラシンを利用していく上で重要となる非天然型基質 (DCL 誘導体) による発光も実現できていない。

2. 研究の目的

フォラシンの発光機構を以下の通り推定している (図2)。アポフォラシンの活性部位にあるシステイン残基に DCL が結合しクロモフォアを形成する。これが ROS の存在下、酸化分解されて発光しながらクロモフォア酸化物を与えるという分子機構である。

(Isobe, Kuse, et al. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* **2008**, *84*, 386.)。このクロモフォアの詳細な化学構造が不明のままとなっている。

オワンクラゲの発光タンパク質 (イクオリン) は、図3に示す化学構造をしたクロモフォアを形成しており、これは基質と酸素がすでに結合した過酸化物である。



Ca^{2+} が結合するとイクオリンの三次元構造が変化し、この過酸化物が分解し発光が始まる。この分子機構と同様のタンパク質の「動き」が、フォラシンにも起きているのではないかと予想した。

フォラシンのプロテオーム解析の結果、7個あるシステイン残基の中で3個のシステイン残基は遊離の状態であった (予備データ)。1個のシステイン残基はクロモフォア形成部位であるが、残り2個がなぜシスチンではなくシステインとして存在しているのか不明であった。発光の前後において何らかの変化があるのではないかと推測した。

また、フォラシンは基質特異性が高く、非天然型 DCL 誘導体を用いると全く発光しない。フォラシンを生命科学研究で様々な用途で利用する際に、この基質特異性は欠点となっている。

そこで本研究では、①フォラシンのクロモフォアに関する化学構造と、発光前後におけるシステイン残基の変化を調べることで、発光の開始段階における詳細な分子機構を解明すること、②非天然型基質によるフォラシンの再構成とその発光を実現すること、の2点を目的としている。

3. 研究の方法

¹³C 標識デヒドロセレンテラジン (DCL) の化学合成

フォラシンのクロモフォアは活性部位のシステイン残基と DCL が結合して生成することを明らかにしてきたが、酸素と結合しているのか否かは不明である。そこで、酸素との結合が予想される炭素を ¹³C で同位体標識すれば、核磁気共鳴装置 (NMR) による測定で、クロモフォアと酸素が結合しているのか否かを明らかにできる。この標識炭素は sp² 混成軌道であるが、酸素と結合すると sp³ 混成軌道となるので、¹³C-NMR スペクトル上で区別が容易となるからである。

DCL の化学合成には様々な手法があるが、申請者は安価なグリシンを出発原料として DCL を合成する手法を開発している。そこで、市販されている ¹³C 標識グリシンを出発原料として ¹³C 標識 DCL を化学合成する。非標識グリシンからオキサゾロン、そしてアズラク톤を調製する段階について詳細に検討し、反応収率が定量的になるように最適化する。その後、フェニルピルビン酸へと加水分解し、セレンテラミンと縮合して DCL を化学合成する段階についても可能な限り反応条件を最適化する。この一連の条件検討により、¹³C 標識の効率を高める。最適化した反応条件に基づいて、¹³C 標識グリシンを出発原料として ¹³C 標識 DCL の化学合成を達成する。

¹³C 標識 DCL を用いたクロモフォアの NMR 測定

市販されているフォラシンには天然由来のクロモフォアがすでに含まれているが、化学合成した DCL でクロモフォアを交換させることは可能である。そこで、重水 (D₂O) で調製した緩衝液に ¹³C 標識 DCL を溶かし、¹³C-NMR を測定して標識炭素の化学シフト値を測定する。この溶液にフォラシン溶液を少しずつ添加して、その化学シフト値の変化を観測する。これにより、標識炭素が sp² 混成軌道か sp³ 混成軌道なのかを区別することができるので、クロモフォアと酸素が結合しているのか否かを明らかにする。

発光前後におけるフォラシンのシステイン残基の質量分析

フォラシンが発光した後、遊離のシステイン残基の変化について調べる。まず、発光前と発光後のフォラシンをプロテアーゼで消化し、次いで得られるペプチド断片を質量分析装置 (LC-MS) で解析する。質量分析において、システイン残基を含むペプチド断片の分子イオンピークの強度は一般に低い。そこで、ヨウ化アセトアミドといったアルキル化剤を用いてシステイン残基を修飾し、ペプチド断片の分子イオン強度を高め、効率よく解析を進め、発光前後におけるシステイン残基

の変化を明らかにする。

非天然型基質 (DCL 誘導体) の創製

イクオリンの基質へ硫黄原子を含む置換基を導入すると、発光波長が長波長シフトし発光活性も向上するという報告がある (Giuliani, G.ら, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5114.)。この基質は DCL とは化学構造が異なるが、クロモフォアの構造は類似しているので、DCL に硫黄原子などのヘテロ原子を含む置換基を導入する。これまで、フェニルピルビン酸の芳香環の置換基を修飾すると発光しないことを明らかにしている。そこで、セレンテラミンの化学構造を修飾する。(図8)。¹³C 標識 DCL の化学合成で確立した手法を用いて、様々な DCL 誘導体を合成し、フォラシンを再構成する。その発光活性を測定し、構造活性相関に基づいて発光活性のある非天然型基質の創製を目指す。

4. 研究成果

フォラシンのクロモフォア (発光を司る化学構造) を核磁気共鳴装置 (NMR) により測定し、クロモフォアに関するより詳細な化学構造の情報を得るために、基質を ¹³C 標識したデヒドロセレンテラジン (DCL) の化学合成を目指した。DCL の化学合成には様々な手法があるが、申請者は安価なグリシンを出発原料として DCL を合成する手法を開発している。そこで、市販されている ¹³C 標識グリシンを出発原料として ¹³C 標識 DCL を化学合成することにした。

まずは、非標識グリシンからオキサゾロン、そしてアズラク톤を調製する段階について詳細に条件検討した結果、反応温度と反応時間を精密に調整することで、反応収率がほぼ定量的になるように最適化できた。その後、フェニルピルビン酸へと加水分解し、セレンテラミンと縮合して DCL を化学合成する段階についても可能な限り反応条件を最適化した。この一連の条件検討の結果、¹³C 標識の効率を高める事に成功し、¹³C 標識グリシンを出発原料として ¹³C 標識 DCL を化学合成する手法が確立できた。

続いて、発光タンパク質 (フォラシン) の発光を司るクロモフォアに関する詳細な化学構造と、発光開始段階において活性酸素種 (ROS) が関与する仕組み (分子機構) の解明を目指し研究に取り組んだ。フォラシンの活性部位の分光学的解析を目指し、発光タンパクのアポ型の調製と人工基質の化学合成について検討した。

市販のフォラシンには天然基質がすでに取り込まれているためにアポ型への変換が難しいという問題点があった。しかしながら、昆虫細胞を用いた発現のための遺伝子を得ることができたので、アポタンパクの遺伝子発現による調製に目途がついた。

ついで人工基質の合成に取り掛かった。基

質である DCL にヘテロ原子を組み込んだ新規誘導体の合成に成功し、天然型 DCL より高輝度に発光する人工基質が完成した。共通の前駆体から様々な誘導体が合成できたので、構造活性相関を調べた。その結果、導入するヘテロ原子の効果は隣接する芳香環上のフッ素原子の数によってコントロールできることが判明した。

さらに、フォラシンの活性部位解析のためのプローブ合成にも取り組んだ。活性部位に取り込まれるものの、発光活性を示さない人工基質を合成した。これをフォラシンに加えたところ、その発光活性が低下した。これは天然基質とこのプローブが交換していることを示しており、この化合物を利用してフォラシンの活性部位を分光学的に解析することが可能になった。フォラシン活性部位の解析のために解決しなければならなかった問題をクリアすることができた。

その後、発光タンパク質（フォラシン）の発光を司る化学構造であるクロモフォアの詳細な化学構造と、発光開始段階における活性酸素種（ROS）が関与する仕組みの解明を目指し研究に取り組んだ。

これまで、フォラシンのアポタンパク質は市販のフォラシンを利用していましたが、内在する天然型 DCL も含まれているために、DCL に関する正確な構造活性相関はできず、昨年度までに合成した非天然型 DCL に関する正確な発光効率を求めることができない状況であった。そこで、遺伝子発現したアポフォラシンに人口基質を加えて半合成フォラシンの調製を目指した。すでに取得したフォラシン人工遺伝子を用いて発現フォラシンの調製を試みた。分泌シグナル領域をもったアポフォラシンを、昆虫細胞により発現させた。その結果、目的とするアポフォラシンが糖鎖修飾された状態で発現させることに成功し、発現量は十分得られることが分かった。アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、純粋なアポフォラシンを得ることができた。これに DCL を加えて半合成フォラシンを再構成し、その発光活性を測定した。コントロールとして市販のフォラシンと比較した。その結果、発現アポフォラシンから再構成した半合成フォラシンの発光効率は、天然型フォラシンに比べると、同一濃度では低いという結果が得られた。糖鎖修飾には問題がないため、シグナル領域の切除とフォールディングについて、さらに精査する必要性が明らかになった。これが解決できれば、人工基質を用いて再構成した半合成フォラシンに関する正確な構造活性相関研究、そしてフォラシンのクロモフォアに関する詳細な化学構造を解明できると考えている。

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 5 件）

1. Kensuke Takahashi, Miki Matusi, Masaki Kuse, Hirosato Takikawa. First synthesis of (S)-(+)-hymenoic acid, a DNA polymerase λ inhibitor isolated from *Hymenochaetaceae* sp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2017**, 82, 1, 42-45.
2. Masaki Kuse*, Maiko Moriguchi, Masashi Hachida, Hirosato Takikawa. Total Synthesis of (\pm)-Ramariolides C and D. *Chem. Lett.* **2017**, 47, 1409-1411.
3. Mikiko Kunishima, Yasuo Yamauchi, Masaharu Mizutani, Masaki Kuse, Hirosato Takikawa, Yukihiro Sugimoto. Leaf Aldehyde in Plants Identification of (Z)-3:(E)-2-Hexenal Isomerases. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 14023-14033.
4. Shun Yamamoto, Masaki Kuse, Hirosato Takikawa. First synthesis of (\pm)-hostasolide A. *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 5808-5810.
5. Hiroshi Kumagai, Mami Fujiwara, Masaki Kuse, Hirosato Takikawa. A concise synthesis of optically active solanacol, the germination stimulant for seeds of root parasitic weeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, 79, 1240-1245.

〔学会発表〕（計 11 件）

1. 森口舞子, 久世雅樹, 滝川浩郷：アルキリデンブテノリド骨格の選択的な構築法による ramariolide 類の合成. 日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋・名城大学）2018.3.16.
2. 小玉彩友美, 久世雅樹, 滝川浩郷：キノリン骨格から誘導されるアライン中間体を利用した環化付加反応. 日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋・名城大学）2018.3.16.
3. 小玉彩友美, 岡 菜里, 久世雅樹, 滝川浩郷：キノリン骨格から誘導されるアライン中間体を利用した環化付加反応. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会（大阪・大阪府立大）2017.9.22.
4. 森口舞子, 久世雅樹, 滝川浩郷：ビニロガス向山アルドール反応を利用したブテノリド骨格の構築. 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会（大阪・大阪府立大）2017.9.22.
5. 井庭早耶香, 久世雅樹, 滝川浩郷：発光タンパク質（フォラシン）阻害剤のデザ

インと合成. 日本農芸化学会 関西・中
四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大
会 (大阪・大阪府立大) 2017.9.22.

6. Masaki Kuse, Rika Ohnishi, Ayaka Matsuoka, Hirosato Takikawa : Design and Synthesis of Substrate Analogs for Pholasin Bioluminescence. 18th Tetrahedron Symposium Asia Editon (Melbourne, Australia) 2017.7. 25.
7. Maiko Moriguchi, Masashi Hachida, Hirosato, Takikawa, Masaki Kuse: Synthesis of Ramariolide A, C, and D. 18th Tetrahedron Symposium Asia Editon (Melbourne, Australia) 2017.7. 25.
8. 久世雅樹: 発光タンパクで利用されるヘテロ芳香環化合物の合成と活性評価. 近畿化学協会 ヘテロ原子部会 平成 29 年度第 1 回懇話会 (岩谷ガス・尼崎) 2017.5.15. (招待講演)
9. 森口舞子, 久世雅樹, 滝川浩郷 : Ramariolide 類の化学合成. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都・京都女子大学) 2017.3.20.
10. 大西里佳, 久世雅樹, 滝川浩郷 : 高輝度発光基質による発光タンパク質フォラシンの再構成と発光活性. 日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都・京都女子大学) 2017.3.20.
11. 大西里佳, 久世雅樹, 滝川浩郷 : 高輝度発光基質による発光タンパク質フォラシンの再構成と発光活性. 日本農芸化学会関西支部第 497 回講演会 (神戸・神戸大学) 2016.12.3.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

神戸大学 大学院農学研究科 天然有機分子
化学研究室ホームページ

[http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-nprd-chem/
index.html](http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-nprd-chem/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久世雅樹 (KUSE, Masaki)

神戸大学大学院農学研究科・准教授

研究者番号 : 40335013