

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21780111
 研究課題名(和文)：発光タンパク質シンプレクチンの活性酸素錯体による発光誘発機構に関する研究
 研究課題名(英文)：Triggering mechanism on the symplectin bioluminescence by reactive oxygen species
 研究代表者：
 久世 雅樹 (KUSE MASAKI)
 名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教
 研究者番号：40335013

研究成果の概要(和文)：デヒドロセレンテラジン(DCL)でクロモフォアを形成して発光する発光タンパク質について、その発光誘発機構に関する研究を行った。鉄イオンを含む活性酸素錯体による発光速度は速くなり、一方、次亜塩素酸の過酸化物による発光速度は遅くなることが判明した。これにより、発光タンパク質の発光速度を活性酸素の特異的な検出手段として利用することが可能となった。また、基質となるDCLを簡便に合成する手法も確立できた。

研究成果の概要(英文)：Triggering mechanism of photoproteins has been investigated. The photoproteins have chromophore which is constituted from dehydrocoelenterazine (DCL). It demonstrated that oxo-complex of Fe ion made the luminescence speed fast, on the other hand, peroxide of hypochlorite made the luminescence speed slow. This specific reaction rate was proved to be useful for the identification of reactive oxygen species by using photoproteins. A convenient synthetic method was also established to prepare many kinds of DCLs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物発光、発光タンパク質、活性酸素、発光速度、クロモフォア

1. 研究開始当初の背景

発光生物は、低分子量の有機化合物を発光素子(発光反応の基質)として利用し、ルシフェラーゼ(酵素:Lase)や発光タンパク質の中で酸化することで発光している。例えば、ホタルはルシフェリンを基質として利用し、ATPと酸素の存在下Laseにより発光する。また、オワンクラゲ発光タンパク質(イクオリ

ン)はセレンテラジン(CL)を基質として利用し、カルシウムイオン(Ca^{2+})により発光する。これら発光現象は発光の引き金となるATPや Ca^{2+} を微量で検出する手段として応用できる。ATPで発光するLaseは病原菌(生細胞のみATPが存在する)の検出に、またイクオリンは細胞内シグナル伝達に関連する Ca^{2+} 濃度変化の検出手段として利用されている。

生物発光を利用した検出方法は超微量で高感度検出でき、生細胞を直接観察でき、そ

して放射性物質など出さない環境調和型手段である特徴がある。下村先生がイクオリン研究に関してノーベル化学賞を受賞され、生物発光に関する基礎研究の重要性が再認識されている。

近年、様々な疾病の発症には活性酸素が深く関与しているとされ、活性酸素の検出システムの構築が盛んに行われている。Chang, D.J.ら (UC Berkeley) のグループは分子プローブを設計し、これがミトコンドリア内のストレス誘発で発生する過酸化水素のみを可視化できることを報告した (*J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9638)。この分子プローブが生体内にある多くの活性酸素の中で過酸化水素とのみ反応するので重要な研究といえる。

生体内には、過酸化水素をはじめ、スーパーオキシド、一酸化窒素、ヒドロキシラジカルなど様々な種類の活性酸素種が存在するが、これらを選択的にモニターすることは非常に困難である。

申請者はこれまで、トビイカ発光タンパク質 (シンプレクチン) の発光活性発現の分子機構研究を行ってきた (Isobe・Kuseら *Proc. Japan. Acad. SerB* **2008**, *84*, 386)。シンプレクチンはデヒドロセレンテラジン (DCL) を発光素子として利用し、CL 型クロモフォアを形成している (図1)。

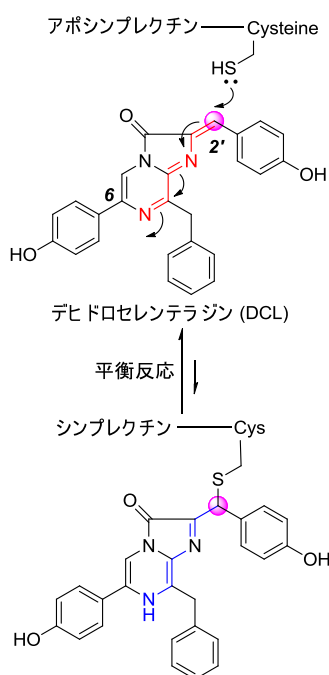


図1：クロモフォアの生成機構

2. 研究の目的

シンプレクチンは酸素の存在下発光するが、長い間発光の引き金については不明であった。高濃度のカリウムイオンやナトリウムイオンによりシンプレクチンの発光は誘発されるが、これらのイオン濃度をゼロにするとシンプレクチンが沈殿してしまうために、発光開始因子とは考えにくかった。

最近、カタラーゼと過酸化水素で発生する活性酸素錯体が、シンプレクチンを強力に発光させることを見つけて以来、この活性酸素錯体が発光開始因子であると考えている。

活性酸素錯体は、ペルオキシソームなど生体内オルガネラなどに広く存在しており、感染・疾患等の刺激で誘発され生成することから、シンプレクチンが活性酸素の特異的検出プローブとして利用できる可能性が開けた。そこで、本研究では「発光タンパク質シンプレクチンの活性酸素錯体による発光誘発機構の解明」を目的とした。

3. 研究の方法

① 活性酸素錯体の調製

カタラーゼと過酸化水素を混ぜて生成する活性酸素錯体 (Compound I、II、III) をそれぞれ安定に調製する条件を探索する。特にカタラーゼに対する過酸化水素の等量と、緩衝液の組成、液性について最適化する。活性酸素錯体はそれぞれ紫外可視吸収スペクトル (UV/Vis) が異なるので、UV/Vis データを基にして活性酸素錯体をそれぞれ発生させる最適な条件を見つける。その後、それぞれの活性酸素錯体を DCL 誘導体で活性化したシンプレクチンへ混合し、発光パターンの変化を調べる。

② 活性酸素錯体は何を加速するのか?

シンプレクチンクロモフォアが発光するまでの段階をさらに詳細に考察すると、プロトン引き抜き、酸素の付加、そして発光を伴った過酸化物の分解と3段階あることがわかる。活性酸素錯体はその構造によってそれぞれ機能が異なることが考えられるが、このいずれかの段階を加速、もしくは触媒作用することで発光を強力に誘発していると考えられる。そこで、活性酸素錯体を、2 価の

鉄イオンと過酸化水素でモデル化できるかどうか検討する。これは Fenton 試薬としてよく知られており、生物発光研究でよく利用されている。

③ DCL 発光タンパク質の探索

これまで DCL で発光する生物として報告されている例は、現在まで沖縄産トビイカのシンプレクチンと、最近申請者が明らかにした二枚貝発光タンパク質（フォラシン）(Kuse・Tanaka・Nishikawa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5657.) の2つのみである。フォラシンは 120 年もの長い間、発光素子が不明であった発光タンパク質である。フォラシンが DCL で発光することに気づいたきっかけは、活性酸素錯体によるシンプレクチンの発光開始現象がヒントとなっている。

一方 CL で発光する生物は、クラゲを始め、ウミホタル、ウミエラ、ホタルイカなど数多く報告されており、イクオリンを応用した論文は 1,400 を超える (MEDLINE にて検索)。本事実「DCL で発光する生物が少ない」のではなく、DCL を発光素子としていることに気がついていないケースがあるため考えている。そこで、ほかの生物発光タンパク質が DCL で発光するかどうかについても調査することとする。手がかりとして、活性酸素で発光する生物に着目する。あらかじめ文献を調べたところ、ツバサゴカイ、ウミウロコムシなどの報告例があることがわかってきた。そこで、これらの発光タンパク質も DCL で発光するかどうか調べる。ウミウロコムシは沖縄沿岸でよく見られるので調査・採集し、DCL を基質とする発光タンパク質であるかどうか検討することにする。

4. 研究成果

- ① シンプレクチン以外の発光タンパク質であるヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシン）も DCL で発光することを証明し、実際に天然フォラシンより DCL を抽出・単離することに成功した（発表論文 2）。この結果が引き金になって、英国の研究者と活性酸素による発光開始機構解明のための共同研究がスタートで

きた。

- ② フォラシンには DCL が共有結合してクロモフォアが形成されていると予想している。それを証明するための分子プローブの合成に取り組んだ。グリシンと無水酢酸という安価な出発原料から DCL アナログを種々供給できる化学合成ルートが確立できた (図 2)。

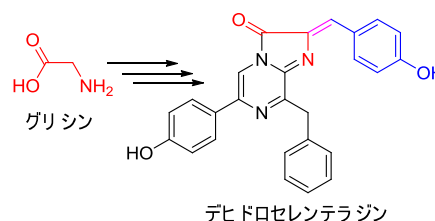


図 2 : DCL アナログの新規合成経路

- ③ 活性酸素種による発光開始機構をリアルタイムに追跡するために臭素化 DCL を合成し、それを用いて再構成したフォラシンは次亜塩素酸による発光誘発において特徴的な発光パターンを示すことを明らかにした。
- ④ 数年間に一度大量発生するキシヤヤスデの体表には蛍光があることを見つけた。抽出精製した結果、プテリンカルボン酸であった (図 3)。このキシヤヤスデ抽出物は過酸化水素により発光することも明らかになった。フォラシンとは異なる活性酸素の検出システムとしての利用が期待できることになった。

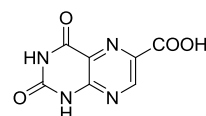


図 3 : プテリンカルボン酸の構造

- ⑤ フォラシンのクロモフォア形成部位の特定を試みた。フォラシン活性部位にあるシステイン残基が DCL に結合して活性型クロモフォアを形成していると予想している。そこで、遊離システイン残基の特定を試みた。選択的なシステイン残基のアルキル化法によって、1カ所のシステイン残基だけが遊離していることが明らかとなった。

次に、DCL を用いてクロモフォアを含むペプチド断片の直接的解析を試みた。その結果、先ほど遊離であると考えられたシステイン残基にクロモフォア（酸化型）が結合したと考えられるペプチド断片を特定することができた。活性部位のシステイン残基の特定は、今後フォラシンを遺伝子発現させて活性型フォラシンを調製する上での重要な知見となった。

- ⑥ フォラシンの発光を誘発する活性酸素種の特定について詳細に検討した。その結果、鉄イオンを含む活性酸素錯体による発光速度は速く、次亜塩素酸の過酸化物による発光速度は遅いことが明らかになった。このことは、フォラシンによる発光速度を調べることで、活性酸素の種類を特定することができる可能性が高まったといえる。その他の活性酸素種による発光誘発機構についても継続して検討している。

【意義】フォラシンは活性酸素種の診断キットとして市販されていたが、基質構造が不明であったのであまり利用されていなかった。本研究成果に、フォラシンの活性酸素に対する特異性を利用した応用研究が可能となった。また、活性部位の特定により、フォラシンのサイズを小さくしたアナログ発光タンパク質の創製も期待できることになった。

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 8 件）

1. Masaki Kuse, Miho Yanagi, Eiko Tanaka, Naoki Tani, Toshio Nishikawa. Identification of a fluorescent compound in the cuticle of the train millipede *Parafontaria laminata armigera*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**,74, 2307-2309.
2. Eiko Tanaka, Masaki Kuse, and Toshio Nishikawa. Dehydrocoelenterazine is the organic substance constituting the prosthetic group of pholasin. *ChemBioChem* **2009**, 10, 2725-2729.
3. Yosuke Nakashima, Vorawan Kongjinda, Naoki Tani, Masaki Kuse and Minoru Isobe. Chemistry for biology of symplectin

bioluminescence with
fluoro-dehydrocoelenterazine.

Chemiluminescence and Bioluminescence **2009**, 51-54.

4. Issei Doi, Masaki Kuse, Yosuke Nakashima, Naoki Tani, Minoru Isobe. Differentiation of coelenteramide sulfate from phosphate by hydrogen/deuterium exchange coupled with ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2009**, 57, 89-95.
5. Magne O. Sydnes, Masaki Kuse, Issei Doi, Minoru Isobe. ¹H NMR Aided Elucidation of Products Derived from Photodegradation of Ethyl 3-azido-4,6-difluorobenzoate in 2,2,2-Trifluoroethanol. *Tetrahedron*, **2009**, 65, 3863-3870.
6. Issei Doi, Masaki Kuse, Toshio Nishikawa and Minoru Isobe. Selective oxidation by the hydroperoxide in the photoprotein, aequorin. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 3399-3404.
7. Makarasen, A.; Kuse, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. Substituent effect of imino-O-arenesulfonates, a coupling partner in Suzuki-Miyaura Reaction for substitution of the Pyrazine Ring: A Study for the Synthesis of Coelenterazine Analogs. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2009**, 82, 870-878.
8. Kagenishi, T.; Yokawa, K.; Kuse, M.; Isobe, M.; Bouteau, F.; Kawano, T. Prevention of Copper-Induced Calcium Influx and Cell Death by Prion-Derived Peptide in Suspension-Cultured Tobacco Cells. *Zeitschrift für Naturforschung* **2009**, 64c, 411-417.

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 田中瑛子、久世雅樹、西川俊夫：ヒカリカモメガイ発光タンパク質の発光機構に関する研究。日本農芸化学会 2011 年度大会（京都）**2011**.3.26-28.
2. Masaki Kuse, Miho Yanagi, Eiko Tanaka, and Toshio Nishikawa. Identification of a fluorescent compound in a train millipede. The 9th Joint Seminar JSPS-NRCT Core University Program. Bangkok, December 8-9, **2010**.
3. Masaki Kuse, Eiko Tanaka, and Toshio

- Nishikawa. Bioluminescence of a bivalve mollusk, *Pholas dactylus*. 5th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia. Taipei, November 7-11, **2010**.
4. 久世雅樹、田中瑛子、西川俊夫：細胞内シグナル伝達機構解明の為の生物発光基質の創出。日本植物学会 第 74 回大会、中部大学、愛知、**2010. 9.10**. (招待講演)
 5. 田中瑛子、久世雅樹、西川俊夫：ヒカリカモメガイ発光タンパクの発光基質に関する研究。日本農芸化学会 2010 年度大会（東京）**2010.3.27-29**.
 6. 柳 美帆、田中瑛子、谷 直紀、久世雅樹、西川俊夫：キシヤヤスデの蛍光物質に関する研究。日本農芸化学会 2010 年度大会（東京）**2010.3.27-29**.
 7. 田中瑛子、久世雅樹、西川俊夫：二枚貝発光タンパクの発光機構に関する研究。日本農芸化学会 第 156 回 中部支部例会、名古屋、**2009.10.3**.
 8. 柳 美帆、田中瑛子、谷 直紀、久世雅樹、西川俊夫：キシヤヤスデの蛍光物質に関する研究。日本農芸化学会 第 156

- 回 中部支部例会、名古屋、**2009.10.3**.
9. Masaki Kuse. Chemical Biology of the marine bioluminescence with coelenterazines. The Seminar of the JSPS-NRCT Core University Program. Hat Yai (Thailand), September 8, **2009**.
 10. 久世雅樹：二枚貝発光タンパク質に関する生物有機化学的研究。生物発光化学発光研究会 第 26 回学術講演会。東京、**2009.6.6**. (招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cic.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久世 雅樹 (KUSE MASAKI)

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：40335013