

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05414

研究課題名（和文）イミダゾピラジノン骨格を有する生物発光基質の硫酸化とその機能性

研究課題名（英文）Sulfation of bioluminescent substrates containing imidazopyrazinone structure and their functionality

研究代表者

中村 光裕（NAKAMURA, Mitsuhiro）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（理工学域）・講師

研究者番号：50392056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：セレンテラジンの位置特異的に硫酸化することを目的に、人のスルホトランスフェラーゼとスルホトランスフェラーゼを含むウミホタル抽出液を用いて、酵素的に硫酸化を行った。その結果、どちらもセレンテラジンの一ヶ所が硫酸化されているのを確認した。構造解析の結果、それぞれ異なる位置で硫酸化を確認できた。このように異なるスルホトランスフェラーゼを用いることで、セレンテラジンの位置特異的に硫酸化された化合物を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の硫酸化反応は、生命の維持に不可欠な反応である。セレンテラジンは空気中で不安定であり、その扱いに注意が必要である。セレンテラジンの位置特異的硫酸化を行えることで、セレンテラジンより安定なエノールサルフェートの作成や、新たな機能が期待できるモノサルフェートの作成が可能となるなど新たな発光プローブとしての活用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic sulfation of coelenterazine using human sulfotransferase was identified as their monosulfates at C2 position of coelenterazine. Enzymatic sulfation of coelenterazine using Cypridina extracts containing sulfotransferase was identified as their monosulfates at different position of coelenterazine compare with using human sulfotransferase.

研究分野：天然物化学

キーワード：スルホトランスフェラーゼ セレンテラジン ルシフェリン 硫酸転移反応 基質特異性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

基質の硫酸化は、微生物の抗生物質の生合成や不活性化による生理活性制御、薬などの外的分子やホルモンなどの硫酸化による恒常性維持、ウイルス感染や分泌制御、免疫細胞の結合や細胞接着など様々な生理機能が知られている。このように、生体内の硫酸化反応は、生命の維持に不可欠な反応である。生物の硫酸化反応を触媒する酵素をスルホトランスフェラーゼと呼び、スルホトランスフェラーゼは 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) の硫酸基を基質に転移し、基質を硫酸化する。

海洋生物の生物発光のイミダゾピラジノン骨格を有する発光基質ルシフェリンは、セレンテラジン (CTZ) とウミホタルルシフェリンが知られている (図 1)。ウミホタルルシフェリルサルフェートは、ウミホタルから酸に不安定な化合物として単離された。3'-Phosphoadenosine-5'-phosphate (PAP) 存在下、ウミホタルの抽出液を用いて、ウミホタルルシフェリルサルフェートはウミホタルルシフェリンに変換が可能である (図 2)。さらに PAPS 存在下、ウミホタルルシフェリンは、ウミホタルルシフェリルサルフェートに変換される。この反応を触媒するスルホトランスフェラーゼの反応は、可逆反応であることを示唆している。ウミホタルルシフェリルサルフェートは、中性水溶液中でウミホタルルシフェリンよりもかなり安定であり、生体内でウミホタルルシフェリンの貯蔵型として存在している可能性を示唆している。

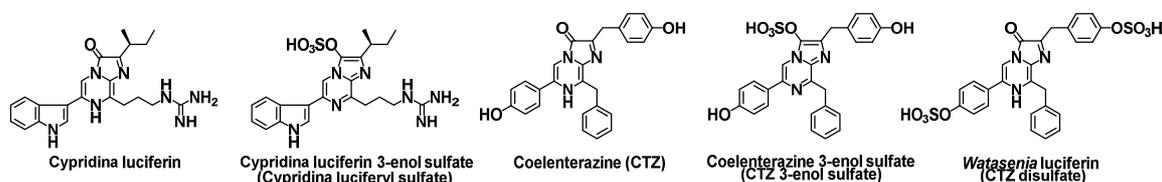


図 1 ウミホタルルシフェリンとセレンテラジン (CTZ) およびその硫酸化付加化合物

ウミホタルルシフェリルサルフェート、ウミホタル抽出液、PAP を用いた酵素反応についてさらに研究を行った。この反応において、PAP の代わりに CoA や 5'-AMP、3'-AMP が反応することを報告した。特に CoA は PAP に匹敵する低濃度 (10^{-6} mol/L) から反応が確認でき、生体内でも CoA が使われている可能性がある。また、この酵素反応に酢酸を添加すると、反応が活性化することを見出した。これは、ウミホタルルシフェリルサルフェートの硫酸基が PAP に転移して PAPS となり、PAPS の硫酸基が酢酸に転移してアセチルサルフェートなる。生成したアセチルサルフェートは水中で容易に加水分解されるため不可逆反応となり、ウミホタルルシフェリルサルフェートからウミホタルルシフェリンへ効率的に反応させることができる。

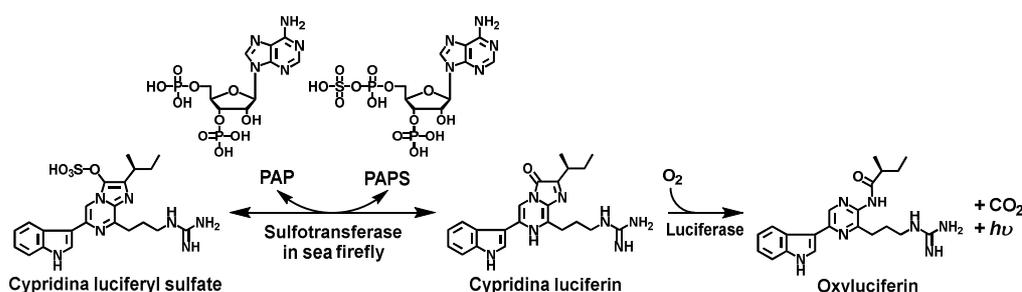


図 2 ウミホタルルシフェリルサルフェートからウミホタルルシフェリンへの酵素的変換

セレンテラジンの硫酸化化合物はこれまで、ジサルフェートとエノールサルフェートの 2 種類知られている。セレンテラジンジサルフェートは、ホタルイカの発光基質ホタルイカルシフェリンとして知られており、セレンテラジン 3 - エノールサルフェートは、ウミホタルルシフェリルサルフェートと同様に中性条件で安定な貯蔵物質と考えられている。このようにセレンテラジンは硫酸化によって、異なる機能を獲得している。

2. 研究の目的

セレンテラジンはイミダゾピラジノン骨格を有し、その骨格の 2 位と 6 位にフェノール部位、3 位がエノールとなった時の 3 ヲ所の硫酸化される場所が存在する。本研究では、スルホトランスフェラーゼを用いてセレンテラジンを位置特異的に酵素的な硫酸化を行うことを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

人のスルホトランスフェラーゼを用いて、セレンテラジンと補酵素 PAPS を用いて反応させ、LC/ESI-TOF-MS で確認した。また、セレンテラジン類縁体を用いて同様の反応を行い、反応部位の特定を行った。

同様に採集したウミホタルを緩衝液で抽出し、抽出液を作成した。この抽出液の中にウミホタルルシフェラーゼやスルホトランスフェラーゼなどの酵素が含まれている。ウミホタルルシフェラーゼは、セレンテラジンを基質として認識しないことを利用し、セレンテラジンにウミホタル抽出液と補酵素 PAPS を加え、硫酸化を行った。反応液を LC/ESI-TOF-MS で分析した。

4. 研究成果

一般的な人のスルホトランスフェラーゼ (SULT1A1) を用いてセレンテラジンの酵素的硫酸化を試みた (図 3)。その結果、セレンテラジンの一ヶ所が硫酸化された。構造解析の結果、2位のフェノールが硫酸化されるのを確認した。

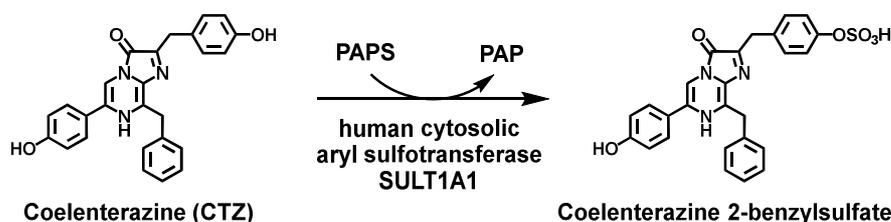


図 3 セレンテラジンからセレンテラジン 2 - ベンジルサルフェートへの酵素的変換

また、セレンテラジンの脱水素型であるデヒドロセレンテラジン、セレンテラジンの発光後の主生成物であるセレンテラミドやセレンテラミンでも同様に硫酸化を行った。その結果、3つの化合物共に一ヶ所の硫酸化を確認した。また、デヒドロセレンテラジンは2位が、セレンテラミンは6位が硫酸化されていることを確認した。

ウミホタルルシフェラーゼは、セレンテラジンを基質として認識しないことを利用し、発光酵素のルシフェラーゼやスルホトランスフェラーゼ等の酵素を含むウミホタル抽出液を用いて、セレンテラジンの酵素的硫酸化を試みた。その結果、セレンテラジンの一ヶ所の硫酸化が確認された。構造解析の結果、セレンテラジンの反応位置は3位のエノールサルフェートであると決定した。

このように異なるスルホトランスフェラーゼを用いることで、セレンテラジンの位置特異的に硫酸化された化合物を得た。

セレンテラジンは水溶液中で不安定であるが、その脱水素型であるデヒドロセレンテラジンは安定な物質である。FMN レダクターゼを用いて、デヒドロセレンテラジンからセレンテラジンへの酵素変換を行った (図 4)。LC/ESI-TOF-MS を用いてその生成を確認した。

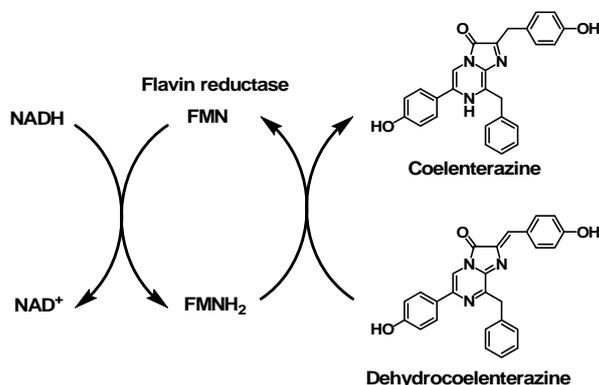


図 4 FMN レダクターゼを用いたデヒドロセレンテラジンからセレンテラジンへの酵素変換

イクオリンはアポタンパク質と (S)-2-ペルオキシセレンテラジンから構成されている。イクオリンを酸処理することにより、主生成物はセレンテラミドではなく、セレンテラミンであり、顕著な発光は観察されなかった。セレンテラミンの対応物として、LC/ESI-TOF-MS により、4-

ヒドロキシフェニルピルビン酸と 4-ヒドロキシフェニル酢酸であると同定した。イクオリンと Ca^{2+} の発光反応では、同量の 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸と 4-ヒドロキシフェニル酢酸が検出され、セレンテラミドからの加水分解ではなく、(S)-2-ペルオキシセレンテラジンからジオキセタノンアニオンを経由する 2 つの経路によってセレンテラミンが形成されることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Inouye Satoshi, Nakamura Mitsuhiro, Hosoya Takamitsu | 4. 巻 587 |
| 2. 論文標題 Enzymatic conversion of dehydrocoelenterazine to coelenterazine using FMN-bound flavin reductase of NAD(P)H:FMN oxidoreductase | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 24 ~ 28 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.11.089 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Inouye Satoshi, Nakamura Mitsuhiro, Hosoya Takamitsu | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Formation of Coelenteramine from 2 Peroxycoelenterazine in the Ca ²⁺ Binding Photoprotein Aequorin | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/php.13590 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Inouye Satoshi, Matsuda Kazuo, Nakamura Mitsuhiro | 4. 巻 665 |
| 2. 論文標題 Enzymatic sulfation of coelenterazine by human cytosolic aryl sulfotransferase SULT1A1: identification of coelenterazine C2-benzyl monosulfate by LC/ESI-TOF-MS | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 133 ~ 140 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|