

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310159

研究課題名(和文)新しい分子イメージング技術の開発に向けたルシフェリン生合成系の解明

研究課題名(英文)Studies on the biosynthesis of firefly luciferin

研究代表者

大場 裕一(OBA, YUICHI)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40332704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,100,000円、(間接経費) 2,430,000円

研究成果の概要(和文)：ホタルルシフェリンが、1分子のヒドロキノン(またはベンゾキノン)と2分子のL-システインから生合成されること実験により初めて明らかにした。また、毒性のあるヒドロキノンはそのままの形ではホタル体内には存在せず、そのかわりグルコースが付加したアルブチンの存在が認められた。このことはホタルが体内でヒドロキノンとシステインからルシフェリンを生合成していることを示している。

研究成果の概要(英文)：We found that firefly luciferin is biosynthesized from one molecule of hydroquinone/benzoquinone and two molecules of L-cysteine in the adult firefly, accompanied by the decarboxylation of L-cysteine. Furthermore, we could not detect hydroquinone/benzoquinone, but significant amount of arbutin, a glycosylated 'non toxic' form of hydroquinone, in firefly.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ルシフェリン 生合成 分子イメージング ホタル

### 1. 研究開始当初の背景

発光生物は、合計 700 属にもおよぶ多様な分類群にわたって広く知られているが、そのうち発光メカニズムが明らかになっているものは、ホタル類 (Lampyridae)、ウミホタル、発光クラゲ、ウミシイタケ、発光バクテリア、深海エビ、カイアシ類 (copepoda) などごく一部のグループに限られる。これらは、それぞれ基本的に異なる構造のルシフェリン (基質) と異なるルシフェラーゼ (酵素) を持っているが、これらのルシフェリンの生合成経路については殆どなにも分かっていなかった。

海洋発光生物が使っているルシフェリンの中で代表的なものは、ウミホタルルシフェリンとセレンテラジンであるが、これらの生合成ユニットについては、これまでに我々のグループにより明らかとなっている。すなわち、ウミホタルルシフェリンはウミホタルの体内でイソロイシン・アルギニン・トリプトファン の 3 アミノ酸が縮合したもので、セレンテラジンは 2 分子のチロシンと 1 分子のフェニルアラニンから生合成されることもカイアシ類 (*Metridia pacifica*) を用いた実験から明らかにしている。これらの結果は、一見複雑に見える分子が、ありふれた分子 (ここではアミノ酸) から生合成されていたことを示している。

ホタルルシフェリンの生合成については、1970 年代に放射性標識化合物を用いた取り込み実験により、ベンゾキノンもしくはヒドロキノンがその生合成基質であることが示唆されていたが、実験に放射性 ( $^{14}\text{C}$ ) 化合物を用いていたため、マススペクトルによる取り込み位置の特定などはできず、その詳細は不明であった。また、実際にホタルが毒性の高いベンゾキノンやヒドロキノンを保有しているのかも明らかではなかった。システインが生合成基質である可能性については、その構造から予想されており、またホタルではない発光性昆虫 (ヒカリコメツキ、コメツキムシ科) では、放射性ラベル体システインのルシフェリンへの取り込みが確認されていたが、ホタルでは示された例はなかった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、ルシフェリンの生合成経路を解明することにより、新しいバイオイメージング技術の開発を目指した。具体的には、ルシフェリンの生合成基質ユニットの解明、生合成経路の推定、それに関わる酵素の同定を目標とする。とくに、いくつか知られているルシフェリン分子の中でも、もっとも応用可能性が高いホタルルシフェリンの生合成経路解明に力を入れた。

ホタルルシフェラーゼ遺伝子を培養細胞や植物体に導入してレポーターとして用いる技術は以前から確立されていたが、その際には発光の基質となるホタルルシフェリンは外部から注射もしくは投与する必要があ

った。しかし、もしホタルルシフェリンの生合成系を、ルシフェラーゼ遺伝子とともに培養細胞や植物体に導入することができれば、外部からルシフェリンを注入するという侵襲性と不均一性の問題が回避され、安定かつ長期間の連続的な遺伝子発現モニタリングが実現するだろう。

### 3. 研究の方法

まずは、実験材料を飼育することから開始した。材料にはホタルの中でも飼育が比較的容易なヘイケボタル (*Luciola lateralis*) を選んだ。

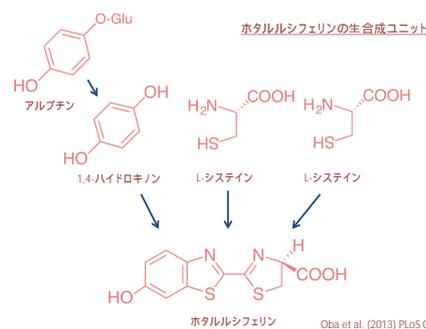
次に、ホタルルシフェリンの生合成基質ユニットを明らかにするために、生合成基質の候補となる分子を安定同位体 (重水素もしくは  $^{13}\text{C}$ ) でラベルしたものを用意し、これをホタル体内 (腹部内) に注射してルシフェリン分子への安定同位体取り込み実験を行なった。分析には LC-MS を用いた。さらに、その生合成プロセスを推定するために、さまざまな位置に標識した生合成ユニットの取り込みを行い MS/MS 分析によりルシフェリンへの取り込み位置を厳密に特定することで、転移反応メカニズムの解明を試みた。

### 4. 研究成果

ホタルの飼育については、トライ & エラーの結果、ようやく安定した大量供給の道が開けた。これが成功した要因としては、幼虫のエサ (サカマキガイ) の飼育系が安定したこと、また蛹化の際に用いる土の湿度が種々の検討により定まったことが大きい。

安定同位体標識化合物の取り込み実験の結果、ホタルルシフェリンは、1 分子のヒドロキノンと 2 分子のシステインから生合成されることがはじめて明らかとなった (下図)。ヒドロキノンの代わりにベンゾキノンを用いると、その毒性の高さのために注射したホタルの多くが死亡してしまうが、そのかわり取り込み効率は高くなる。このことは、ホタルのルシフェリン生合成過程においては、いちどヒドロキノンがベンゾキノンに変換されてからシステインと結合する可能性を示唆する。

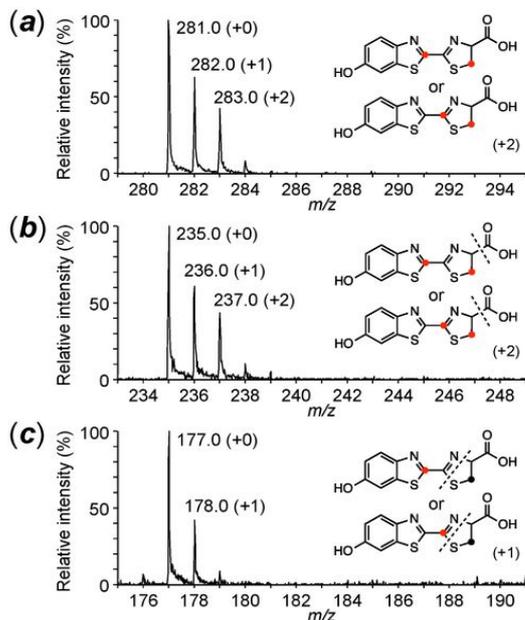
さらに、ホタルルシフェリンには不斉中心がひとつあるが、これが D-システイン (非天然型) と同じ配置になっているにもかかわらず、L-システイン (天然型) からホタルの体



内で生合成されうることもわかった。実際は、D-システイン（非天然型）からも生合成するが、D-システインはホタルからは検出されなかった。ホタルの体内には、L-ルシフェリンを D-ルシフェリンに変換する活性があるという報告があるが、我々の結果はその報告を裏付けているのかもしれない。

また、ヒドロキノンには（ベンゾキノンほどではないものの）生物毒性があるが、ホタルはこの基質を毒性の低い糖付加体（アルブチン）として保有していることも、HPLC 分析の結果から明らかとなった。具体的には、ホタルの粗抽出物を HPLC で分析すると、アルブチン標品と同じ位置にピークが見られた。さらに、このピークを分取し、塩酸で加水分解を行なったところ、HPLC 分析によりヒドロキノンに相当するピークが検出された。なお、ヒドロキノンとベンゾキノン自体は、加水分解を行なっていないホタルの抽出物からは検出されなかった。アルブチンは、植物ではコケモモやウワウルシ、ナシなどから多量に検出される他、さまざまな植物からもその存在が確認されている。昆虫においては、コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) そのほかいくつかの甲虫とシロアリから検出されているので、比較的いろいろな生物が普遍的にもっている物質であることが予想される。とくに、コクヌストモドキでは、実際に毒物質の産生の際につかうヒドロキノンをアルブチンとして保有していることが示唆されている。ホタルはこれとどのような仕組みで毒性の高い物質を体内に保有し、おそらくルシフェリンの生合成に合わせて随時ヒドロキノンへと変換していることが想像される。

さらに、MS/MS 解析の結果から、ホタルルシフェリン分子のベンゾチアゾール構造が作られる際に、システイン分子から1つの炭素の脱離を伴った転移反応によって作られることが明らかとなった（下図）。これは、



今後、詳細な生合成経路を知る上で重要な鍵情報となる。

以上の結果より、ルシフェリンの生合成ユニットは、全ての生物がもっている通常のアミノ酸のひとつ（L-システイン）と、多くの植物やいくつかの昆虫でその存在が知られているアルブチンであることが明らかとなった。このことは、一見複雑に見える分子や遺伝子も、あり合わせのものから作られるという進化の原理（ジャコブの「プリコラージュ」）の確かな証左であり、また、ルシフェリン生合成系を異種生物（細胞）に導入することが十分に可能であることを強く示唆する発見であると言える。

以上の結果は、米科学総合誌 PLoS ONE に掲載され、学会でも発表を行なった。また、サイエンスカフェや放送大学の講義を通じて広く一般にも紹介することができた。

## 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1件)

1. Oba, Y., Yoshida, N., Kanie, S., Ojika, M. and Inouye, S. (2013) Biosynthesis of firefly luciferin in adult lantern: Decarboxylation of L-cysteine is a key step for benzothiazole ring formation in firefly luciferin synthesis. *PLoS ONE* 8: e84023. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 蟹江秀星・大場裕一・吉田尚生・小鹿一・井上敏 (2014) ホタル生体への安定同位体標識化合物のインジェクションと LC/MS を用いたホタルルシフェリンの生合成に関する研究. 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 生田市, 明治大学.
2. 大場裕一 (2014) ホタルの発光メカニズムの進化: ルシフェリンはどこから来て、どのようにしてルシフェラーゼの基質になったのか? 日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム「生命現象の鍵として働く化合物とその標的タンパク質の化学と生物」, 2014 年 3 月 29 日, 生田市, 明治大学.
3. 蟹江秀星・吉田尚生・大場裕一 (2013) ホタルルシフェリンの生合成経路に関する研究. 日本農芸化学会中部支部 168 回例会, 2013 年 10 月 12 日, 名古屋市, 名古屋大学.
4. 大場裕一 (2013) 分子の目でみるホタルノヒカリ. 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ「虫の会 (まじめ版) 輝け昆虫少年」, 2013 年 3 月 29 日, 神戸,

国際展示場 .

〔図書〕(計1件)

1. 大場裕一 (2013) ホタルの光は、なぞだらけ . くもん出版 (単著) 総ページ数 119 ページ

〔その他〕

サイエンスカフェ

1. 大場裕一 (2013) ホタルの光は、なぞだらけ . 日本農芸化学会サイエンスカフェ in 名古屋市科学館 . 2013 年 11 月 16 日 , 名古屋市 , 名古屋市科学館

ホームページ等

<http://obayuiichi.web.fc2.com>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大場 裕一 (OBA YUICHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号 : 40332704

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :