

令和 元年 5月 10日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07715

研究課題名（和文）発光キノコの発光反応メカニズムの解明

研究課題名（英文）Bioluminescence reaction mechanism of luminous mushroom

研究代表者

大場 裕一（OBA, Yuichi）

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：40332704

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：不明であった発光キノコの発光メカニズムの解明を目的に、発光反応産物（ルシフェリン酸化物）の化学構造の解明と、ルシフェラーゼ（発光酵素）の特定を試みた結果、そのどちらも明らかにすることができた。また、ルシフェリン酸化物がカフェ酸を介して再びルシフェリンへとリサイクルされることを発見し、発光キノコが持続的に発光する仕組みを解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発光キノコの発光メカニズムが明らかになったことで、発光イメージングツールとしての基礎科学への応用可能性が開かれた。同時に発見されたルシフェリン生合成酵素とルシフェリン再生酵素を異種発現（発光しない生物に発光キノコの発光に関連するこれらの遺伝子を導入する）ことで、本来発光しない生物を緑色に発光させることができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We successfully determined the chemical structure of the oxyluciferin and luciferase gene involving in the bioluminescence of luminous mushroom. We also found the recycling mechanism of luciferin from oxyluciferin via caffeic acid.

研究分野：発光生物学

キーワード：生物発光 キノコ ルシフェリン ルシフェラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発光キノコの発光メカニズムは長年の謎としてこれまでも多くの研究が世界中で行われてきたが、明確な答えが見つからないままであった。しかし、2015年に我々とロシア科学アカデミーの共同研究により、発光反応基質(ルシフェリン)とその前駆体の化学構造がそれぞれ3-ヒドロキシヒスピジンとヒスピジンであることが決定された(Purtov et al., 2015. *Angew Chem*)。残された問題は、3-ヒドロキシヒスピジンがどのような酵素(ルシフェラーゼ)によりどのような反応を起こして発光するかである。

2. 研究の目的

上記の通り、本研究課題では、3-ヒドロキシヒスピジンが発光反応した時に生じるルシフェリン酸化物(オキシルシフェリン)の化学構造を特定することと、ルシフェラーゼの特定を目的とした。

3. 研究の方法

オキシルシフェリンの特定に関しては、3-ヒドロキシヒスピジンに対し発光キノコから抽出したルシフェラーゼを混合し発光反応を起こしたあとの生成物を集め、構造決定を行った。ルシフェラーゼに関しては、3-ヒドロキシヒスピジンを使って発現クローニングを行って目的遺伝子を特定し、そのリコンビナントタンパク質を作成してその発光活性を確認することでルシフェラーゼ遺伝子を決定した。

<引用文献>

① Purtov, K.V., Petushkov, V.N., Baranov, M.S., Mineev, K.S., Rodionova, N.S., Kaskova, Z.M., Tsarkova, A.S., Petunin, A.I., Bondar, V.S., Rodicheva, E.K., Medvedeva, S.E., Oba, Y., Oba, Y., Arseniev, A.S., Lukyanov, S., Gitelson, J.I., Yampolsky, I.V. (2015) The chemical basis of fungal bioluminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 8124-8128. DOI: 10.1002/anie.201501779

4. 研究成果

(1) ロシア科学アカデミーとブラジル・サンパウロ大学との国際共同研究により、発光キノコのオキシルシフェリンの化学構造が決定された。ルシフェリンに発光キノコから抽出したルシフェラーゼを加えた時に起こる発光反応の生成物を調べたところカフェ酸の蓄積が見られたため、さらに詳しく反応生成物の経時的な変化量を調べたところ、オキシルシフェリンがカフェ酸に変換されていると予想された。そこで、カフェ酸の生成よりも早く増加しカフェ酸の生成とともに減少するような挙動を示す物質を特定したところ、オキシルシフェリンはルシフェリン(3-ヒドロキシヒスピジン)のピロン環が開環した新規な構造であることが明らかとなった(Kaskova et al., 2017)。

(2) さらに、この結果に基づき反応中間体と反応メカニズムの解明を試みた。なお、発光反応は基本的にルシフェラーゼの触媒活性であり、ルシフェリンが酸素分子と反応して酸化される。このとき高エネルギー励起状態のオキシルシフェリンを生成し、これが基底状態に戻る時に光としてエネルギーが放出される。明らかになったオキシルシフェリンの化学構造から推定し、反応中間体は3-ヒドロキシヒスピジンのピロン環側にエンドペルオキシドが形成したものであると仮定した。この仮定に基づき、同位体ラベルした酸素分子の取り込み実験を行った結果、この予測が支持された(Kaskova et al., 2017)。エンドペルオキシド中間体は、ルミノール反応など化学発光では知られているが生物発光では例がなかったため、反応様式としても目新しい。

(3) オキシルシフェリンの構造から、ルシフェリンのカテコール基側は酸化反応に関与しないことがわかったため、この部分を様々に置換した誘導体を作成したところ、やはりルシフェラーゼの基質となり発光反応が起こることがわかった。このとき重要なのは、置換基の種類によって発光色が変化したことである。例えば、この部分をインドールに置換すると発光色は青色にシフトし、ナフトールに置換すると発光色は橙色に変わった(Kaskova et al., 2017)。このことは、ライトエミッター(光を出す化学物質の本体)が3-ヒドロキシヒスピジンに由来するものであることを改めて証拠付けるとともに、発光色を自在に変えて応用に使えるポテンシャルを証明するものである。

(4) 上述の通り発光反応後の生成物としてオキシルシフェリン以上にカフェ酸が見られたため、カフェ酸が再びルシフェリンへとリサイクルされる経路を想定し、実験的にこの証明を試みた。ルシフェラーゼ抽出物に対してカフェ酸とマロニル CoA と ATP(ルシフェリン前駆体であるヒスピジンの生合成に必要なコンポーネント)を添加したところ、予想通り発光キノコの発光に似た持続的な発光がインヴィトロで確認された(Oba et al., 2017)。このことは、発光反応後に生じるオキシルシフェリンが速やかにカフェ酸へと変換されたあと、ヒスピジンの生合成経路によりヒスピジンが生産され、これがルシフェリン(3-ヒドロキシヒスピジン)へと再生されることを意味する。すなわち、ルシフェリン生合成酵素遺伝子が解明されれば、ルシフ

エラーゼ遺伝子とともに細胞に遺伝子導入すると、植物細胞の場合ならば（植物はカフェ酸を普遍的に持っている）外部からルシフェリンを添加しなくても自発的に発光させることが可能となることを示唆する。

（５）上記の通り、発光反応サイクルにおいては、既知物質であるヒスピジンが鍵となるが、発光キノコの子実体にヒスピジンが含まれていることが証明されていなかった。そこで、日本産ヤコウタケ *Mycena chlorophos* とツキヨタケ *Omphalotus japonicus* ならびにブラジル産発光キノコ *Neonothopanus gardneri* からヒスピジンを抽出・定量を行ったところ、その存在が初めて確認できたとともに、その含有量がひじょうに僅か（25-100 pmol/g）であることが明らかとなった（Oba et al., 2017）。この結果は、上記のリサイクルシステムの関与を強く示唆するものであり、発光キノコはルシフェリン前駆体およびルシフェリンを僅かずつ産生しリサイクルしながら特徴的な持続的発光を可能にしていることが考察された。

（６）発光キノコの発光反応にはルシフェリンの生合成が重要であることが分かったので、試みにヤコウタケの幼菌（子実体の傘が開く前の状態で、発光していない）に対してヒスピジンを投与したところ、わずか数秒以内に発光が開始されることが分かった（Oba et al., 2017）。この結果は、幼菌においてはすでにルシフェラーゼタンパク質が存在するが、ルシフェリン生合成系が動いていないために発光していないことを説明する。さらに、なぜ発光しない幼菌においてもルシフェラーゼが多く発現しているのかという次なる疑問が呈されたことになる。ルシフェラーゼには発光以外の何らかの機能があるのかもしれない。

（７）ルシフェラーゼは不溶性のタンパク質である。ルシフェラーゼ遺伝子の特定は、古典的なタンパク精製による方法ではなく、3-ヒドロキシヒスピジンを使った発現クローニングによって特定された。発光菌株から得られた RNA セットをピキア酵母に導入し、寒天プレート上でコロニー群を形成させた。これに合成した 3-ヒドロキシヒスピジンをスプレーしたところ、明確に発光するコロニーが見つかった。シーケンスおよびリコンビナントタンパク質のアッセイの結果、これがルシフェラーゼ遺伝子であることが明らかとなった。*luz* と名付けられたルシフェラーゼ遺伝子は、28.5 kDa のタンパク質をコードしていた。細胞内局在は不明であるが、N 末に膜貫通ヘリックスを持つ。発光反応の至適 pH は約 8 で、熱には弱く、30°C・10 分でほぼ失活した。これまでに知られているタンパク質とは高い相同性が見られなかった。*luz* を大腸菌、ピキア酵母、アフリカツメガエル卵、ならびにヒト HEK293 細胞に発現させ、ルシフェリンを投与すると緑色の発光が確認された。また、マウス癌細胞 CT26 に *luz* を発現させマウスに皮下投与したのちルシフェリンを腹腔内投与すると、その発光をイメージング検出することができた（Kotlobay et al., 2017）。これらのことは、*luz* がさまざまな生物種においてもイメージングツールとして有効であることを意味する。

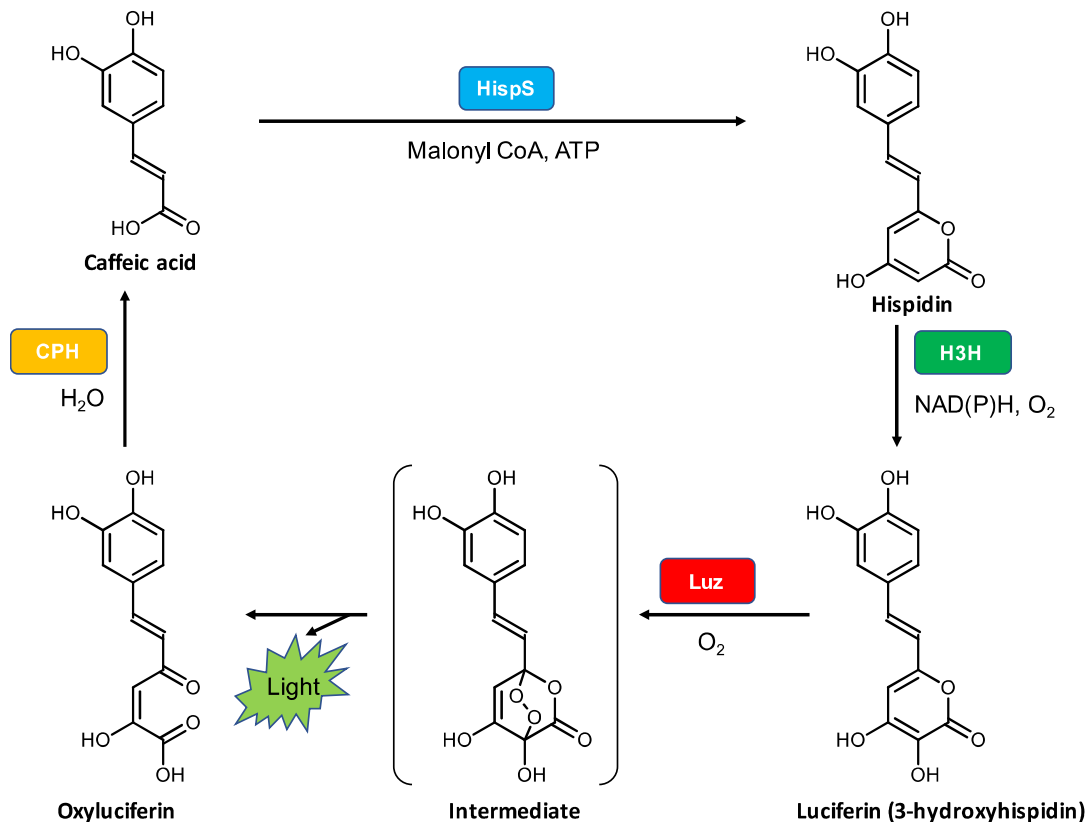


図 1 明らかになった発光キノコの発光反応リサイクルメカニズムの概略

(8) 発光性菌類の全ゲノムを解析した結果、ルシフェリン生合成酵素遺伝子 *hisps* と *h3h*、さらにルシフェリン再生酵素 *cph* が、*luz* と同じ座位にタンデムに並んでいることがわかった。このタンデムな遺伝子クラスターは、さまざまな発光性菌類の種に保存されており(ただし、*cph* をクラスター内に欠いている種や、*hisps* だけクラスター近傍にない種もある) また非発光性の菌類においてはこのクラスターが存在しないか、*luz* に欠損がある。これらのことは、このクラスターが真の発光関連遺伝子であることに加えて、発光性菌類の発光メカニズムが種を超えて共通であることを強く示唆する。*HispS* は、ポリケチド合成酵素ファミリーの酵素で、クマル酸からヒスピジンを生合成する酵素だと考えられる。*H3H* は、ヒスピジンを 3-ヒドロキシヒスピジンに変換する酵素で、この反応には NAD(P)H が必要である (Kotlobay et al., 2017)。これらの結果は、先のルシフェリンのリサイクル系が存在することの結果 (Oba et al., 2017) を遺伝子の点から強く支持するものである (図 1)。また、これらの遺伝子を今後改変することで、ツールとしてより使いやすいものに作り変えることのできる可能性が示されたと言える。

(9) 明らかとなった発光関連遺伝子の機能を確かめるために、ルシフェリン生合成遺伝子 *hisps*, *h3h* とルシフェラーゼ *luz* に加えて、糸状菌由来の 4-ホスホパンテテイントランスフェラーゼの合計 4 遺伝子をピキア酵母に発現させた。次に、培地にカフェ酸を加えたところ、酵母から発光キノコと同じ緑色の発光が確認された (Kotlobay et al., 2017)。なお、4-ホスホパンテテイントランスフェラーゼの追加は酵母におけるポリケチド合成に必要であると考えられ、これがないと発光はしなかった。カフェ酸はリグニン合成の中間体として植物すべてに含まれ、またヒスピジンを含む植物も知られている。したがって、この結果は、*luz*, *hisps*, *h3h* の 3 つもしくはそれ以下の数の遺伝子を植物に導入するだけで、植物を自力発光させることができる可能性を示唆する(ちなみに、高等植物に発光種は 1 種も知られていない)。例えば、観賞用の光る花や光る街路樹といったアイデアさえも、今後は実現の可能性が見えてきたと言えるだろう。

(10) さらに、上記 4 遺伝子に加えて、チロシンからカフェ酸を生合成する 2 つの酵素 (チロシアンモニアリアーゼと 4-ヒドロキシフェニル酢酸-3-モノオキシゲナーゼ) をピキア酵母に導入したところ、外部から何も基質を加えなくても発光が確認された (Kotlobay et al., 2017)。このことは、植物に限らずとも自力発光する細胞や生物を作出できる可能性を強く示唆する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kotlobay, A. A., Sarkisyan, K. S., Mokrushina, Y. A., Marcet-Houben, M., Serebrovskaya, E. O., Markina, N. M., Somermyer, L. G., Gorokhovatsky, A. Y., Vvedensky, A., Purtov, K. V., Petushkov, V. N., Rodionova, N. S., Chepurnyh, T. V., Fakhranurova, L. I., Guglya, E. B., Ziganshin, R., Tsarkova, A. S., Kaskova, Z. M., Shender, V., Abakumov, M., Abakumova, T. O., Povolotskaya, I. S., Eroshkin, F. M., Zaraisky, A. G., Mishin, A. S., Dolgov, S. V., Mitiouchkina, T. Y., Kopantzev, E. P., Waldenmaier, H. E., Oliveira, A. G., Oba, Y., Barsova, E., Bogdanova, E. A., Gabaldon, T., Stevani, C. V., Lukyanov, S., Smirnov, I. V., Gitelson, J. I., Kondrashov, F. A., Yampolsky, I. V. (2018) Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *PNAS* 115, 12728-12732.
DOI:org/10.1073/pnas.1803615115 査読あり

Oba, Y., Suzuki, Y., Martins, G. N. R., Carvalho, R. P., Pereira, T. A., Waldenmaier, H. E., Kanie, S., Naito, M., Oliveira, A. G., Dörr, F. A., Pinto, E., Yampolsky, I. V., Stevani, C. V. (2017) Identification of hispidin as a bioluminescent active compound and its recycling biosynthesis in the luminous fungal fruiting body. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 1435-1440.
DOI:10.1039/c7pp00216e 査読あり

Kaskova, Z. M., Dörr, F. A., Petushkov, V. N., Purtov, K. V., Tsarkova, A. S., Rodionova, N. S., Mineev, K. S., Guglya, E. B., Kotlobay, A., Baleeva, N. S., Baranov, M. S., Arseniev, A. S., Gitelson, J. I., Lukyanov, S., Suzuki, Y., Kanie, S., Pinto, E., Di Mascio, P., Waldenmaier, H. E., Pereira, T. A., Carvalho, R. P., Oliveira, A. G., Oba, Y., Bastos, E. L., Stevani, C. V., Yampolsky, I. V. (2017) Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. *Sci. Adv.* 3, e1602847.
DOI: 10.1126/sciadv.1602847 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Oba, Y., Suzuki, Y., Martin, G. N. R., Carvalho, R. P., Pereira, T. A., Waldenmaier, H. E., Kanie, S., Naito, M., Oliveira, A. G., Dörr, F. A., Pinto, E., Yampolsky, I. V. and Stevani, C. V. (2018) Recycling system of hispidin in luminous mushroom. 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (oral).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。