

平成21年 3月 31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510215

研究課題名（和文）ホタルイカ生物発光の発光発現機構の化学的解明

研究課題名（英文）Chemical study on bioluminescence mechanism of *Watasenia scintillance*

研究代表者 寺西 克倫 (Teranishi Katsunori)

三重大学・大学院生物資源学研究科・教授

研究者番号：20237001

研究成果の概要：本研究は、ホタルイカ生物発光の分子機構の解明を目的に行った。この発光機構に関しては、すでに発光に必要な化学成分は明らかにされていた。しかし、発光にかかわる成分が極めて不安定であるため、発光に関する研究は進んでいなかった。申請者は、この発光にかかわる成分の安定化法を見出し、また、簡便な粗精製法を見出し、*in vitro*で発光反応を再現できるようにした。これにより、この発光反応に関する各種の基礎的データを取得し、その発光の特性を明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：発光

## 1. 研究開始当初の背景

地球上には数多くの発光生物が生息している。その中で発光発現機構が解明されているのは、ホタル、発光クラゲ、ウミホタルなど一部にすぎない。ホタルイカは日本を代表する発光生物であり、その発光機構は50年以上の研究にもかかわらず未解明である。ホタルイカの分子レベルでの発光機構に関する研究の歴史に

おいて、ホタルイカの生物発光における発光基質は、セレンテラジンジサルファイト化合物が発光基質であると考えられている。Tsujiは発光器の粉碎液から発光発現に関与する成分（酵素あるいはタンパク質と考えられているが実際のところ不明である）が水溶液に遊離しないことを理由に膜タンパク質であると推定し、また、ATP、マグネシウムイオンおよびセ

レンテラジンジサルファイト化合物が発光に必要なことを理由に反応機構を提唱している。現在までにホタルイカの発光機構に関して報告されているものはこれらの論文のみであり、これらの推定機構を証明する化学的根拠はまったくなく、発光機構は不明の状態である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ホタルイカの発光発現機構を早急に解明し、発光機構を科学者に提供し、さらにはこの発光系を基盤とする生命科学技術を開発することにある。

## 3. 研究の方法

ホタルイカの発光器の中でも腕発光器は外部刺激により極めて明るい瞬間的な発光する。本研究では、この腕発光器を研究対象とした。

### (1) ホタルイカ腕発光器からの発光関連物質の安定化

ホタルイカの発光は、その死体においては認められない。また、外見の活動が弱くなった固体においては発光は著しく弱い。生きている固体の腕発光器を粉碎した場合には、その時点で発光は喪失する。発光を人工的に再現するには、発光器から発光関連物質を取り出し、発光反応を開始するための化学反応を行う必要がある。これまでの報告では、腕発光器から発光関連物質を取り出すために、発光器を $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した場合、人工的に発光を行わせる場合の発光活性は数日で失われる。また、発光器の粉碎液の人工的な発光を行う際の発光活性は $0^{\circ}\text{C}$ では3時間で喪失する。このように発光器に存在する発光関連物質は不安定であり、保存が不可能であった。したがって、本研究のはじめでは、発光器に存在する発光関連物質の安定化を検討した。

### (2) ホタルイカ腕発光器からの発光関連物質の抽出

(1)の発光関連物質の安定化法を基に、発光関連物質の発光活性の低下が起らない方法を検討した。

### (3) ホタルイカ腕発光器発光の *in vitro* における発光挙動

(2)より得られた発光器からの発光関連物質および化学合成した発光基質を用いた *in vitro* 人工発光反応の最適条件を検討した。

この発光条件を基とし、発光強度を指標とした発光反応挙動に関する情報を得た。たとえば、反応液 pH、発光反応における発光基質濃度、発光反応温度、発光の量子収率、発光スペクトル、発光種、発光基質構造特異性、発光反応による生成物の確認、等に関する検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ホタルイカ腕発光器からの発光関連物質の安定化

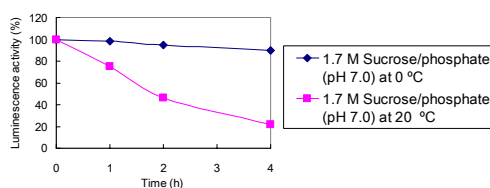
発光器の発光関連物質は、2 M スクロース水溶液を用いて粉碎し、その後、スクロース濃度を変えることによる遠心分離操作により、発光関連物質の不安定化を助長する化合物の除去を行うことが、安定化につながる事が判明した。

### (2) ホタルイカ腕発光器からの発光関連物質の抽出

発光器を 2 M スクロース水溶液を用いて粉碎し、その後、スクロース濃度を変えることによる遠心分離操作により、発光関連物質以外の多くの化合物の除去を行った。これにより得られた発光関連物質は、下図に示すようにスクロース濃度が高いほど $-80^{\circ}\text{C}$ において長期間の保存が可能となった。

Concentration of sucrose (M)	Luciferase activity	
	after 15 days	after 45 days
0.29	70%	59%
0.58	80%	77%
1.7	100%	100%

また、1.7M スクロース溶液中の発光関連物質の4時間後の発光活性は、 $0^{\circ}\text{C}$ においては、90%以上を保持することが判明した(下図)。



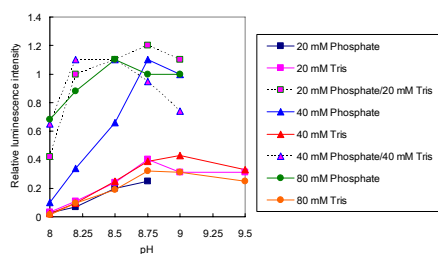
以上示したように高濃度スクロース溶液を用いることにより、これまで不安定であり、かつ抽出ができなかった発光関連物質の抽出および保存を可能にした。このことにより発光関連物質は、通年使用することが可能となり、また、同一ロットでの各種の試験が可能とした。

以上の方法で得られた発光関連物質は、約1ミクロンほどの微粒子であり、可溶化されてはいないことが、メンブランフィルターを

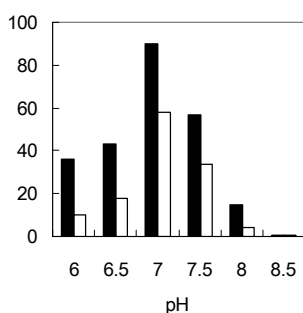
用いた実験から判明した。この微粒子の溶解を膜タンパク質溶解用界面活性剤をはじめとした方法を試みたが、可溶化にはいたらなかった。よって、以降の実験では、この微粒子のけん濁液を使用した。

(3) ホタルイカ腕発光器発光の *in vitro* における発光挙動

(2)で得られた発光関連物質を用いて *in vitro* 発光反応を行った。発光反応における反応溶液の pH と発光強度との関係は、使用する緩衝液の種類によって多少異なっていた(下図)。pH8.7-9.0 が、発光反応初期発光強度が高く、トリス緩衝液よりも磷酸緩衝液の使用のほうが、初期発光強度が高いことが判明した。また、トリス緩衝液と磷酸緩衝液の混合の場合、pH8.3 が発光反応初期発光強度が高かった。

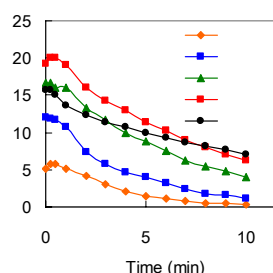


0.08 M 磷酸緩衝溶液中の発光関連物質の発光活性の保持は、pH7 がもっとも安定であり、pH8 以上では著しく低下する(下図)。

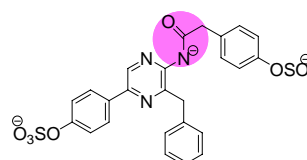


発光反応初期発光強度は、pH8.7-9 で高いが、高 pH 域での発光関連物質の安定性は低いため、高 pH 域での発光反応においては、発光強度は持続しない。このことを考慮し、以後の発光反応は pH8.3 で行うこととした。

発光反応を pH8.3 磷酸緩衝溶液を用いた場合、発光における反応温度は、5°C前後において発光活性が高いことが判明した(下図)。



発光反応において、発光反応の進行に伴い、セレンテラミドジサルファイトが生成し、発光体はセレンテラミドジサウファイトであることが判明した。セレンテラジンジサウファイトの DMSO 中および水溶液中での化学発光、セレンテラミドジサルファイトの蛍光スペクトル、発光関連物質を用いた発光の発光スペクトルなどの比較から、発光種は、セレンテラミドジサルファイトのアミドアニオン体であることが判明した(下図)。



Amide anion form of coelenteramide disulfate

総発光量とセレンテラミドジサルファイトの生成量から発光の量子収率は 0.36 と決定した。この量子収率は、ウミホタルの量子収率に近いものである。

発光基質であるセレンテラジンジサルファイトフィドの基質特異性を調べるため、17種のセレンテラジンジサルファイトを化学合成し、それらの発光活性を調べた。その結果、基質特異性はかなり高いことが判明した。

Tsuji が提唱している発光反応機構は以下である。セレンテラジンジサルファイトと ATP が反応し、AMP-セレンテラジンジサルファイト体が生成する。その後、AMP-セレンテラジンジサルファイト体から AMP が脱離し、分子状酸素とセレンテラジンジサルファイトが反応する。この機構を支持する化学的証拠はない。本研究では、この機構の是非を示し、さらには真の機構の解明を行うため、発光反応において AMP や ADP の生成が生じるのかを検証した。その結果、AMP や ADP の生成量は、セレンテラミドジサルファイトの生成量よりも少なく、また、セレンテラジンジサルファイトを加えない、

すなわち発光反応が生じない場合にも、AMPやADPの生成が生じることが判明し、発光にはAMPやADPの生成反応は関係なく、AMP-セレンテラジンジサルファイト体の生成も生じないことが明らかとなった。これらの結果は、Tsujiが提唱した反応機構によって発光反応が起こっているのではないことを立証した。しかし、本研究では、真の機構の解明にはいたっていない。

以上、ホタルイカ腕発光器から抽出した発光関連物質を用いた *in vitro* 発光反応を行い、発光反応に関する基礎データを得た。今後、この発光機構の解明を進めていく予定である。

#### 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1件)

1. K. Teranishi, O. Shimomura,  
Bioluminescence of the arm light organs of the  
luminous squid *Watasenia scintillans*,  
*Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 784-792 (2008).  
査読有

[学会発表] (計2件)

1. 寺西克倫、Osamu Shimomura  
ホタルイカの発光発現機構に関する研究  
第3回化学生態学研究会  
2008, 7, 4.  
函館市

2. K. Teranishi, O. Shimomura  
Study on ATP-dependent luminescence reaction  
of the arm light organs of the luminous squid  
*Watasenia scintillans*  
The 15<sup>th</sup> International Symposium on  
Bioluminescence and Chemiluminescence  
2008, 5, 15  
Shanghai, China

[図書] (計1件)

1. K. Teranishi, O. Shimomura  
Bioluminescence and Chemiluminescence, World  
Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 67-70 (2009).

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺西 克倫 (Teranishi Katsunori)  
三重大学・大学院生物資源学研究所・教授  
研究者番号：20237001

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者