

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05844

研究課題名(和文) 発光タンパク質フォラシンの活性部位の構造解析と高輝度発光系への応用

研究課題名(英文) Structural analysis of active site in a photoprotein (pholasin) and its application to bright imaging

研究代表者

久世 雅樹 (KUSE, MASAKI)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：40335013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：発光タンパク質フォラシンについて、基質のないアポタンパク質の調製から研究を開始した。遺伝子発現アポフォラシンと基質を用いて、これを発光させる条件を見出した。この条件を用いて、天然型基質よりも明るく発光する基質構造を見出すことに成功した。その後、構造活性相関研究により基質の構造と発光強度に関する知見を集めることができた。これにより高輝度に発光する人工フォラシンを作り出すことに成功し、活性酸素種(ROS)を可視化するための基盤技術を構築することができた。さらに、発光波長を改変させるためのリンカーを基質に導入する手法も確立できた。これにより、様々な波長を用いた応用が可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素種(ROS)は細胞内におけるシグナル伝達において、セカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。様々なROS検出法が確立されているが、ROSを時間・空間で可視化する手段がないため、未だに不明な点も多いのが現状である。本研究で確立した発光タンパク質フォラシンを用いた高輝度発光系は、ROS検出のための手段として利用することができることから、ROSに関連するシグナル伝達の研究分野において利用されることが期待される。さらに発光波長を改変させる可能性もあることから、生体組織中でのROSの可視化手段としての利用も期待される意義がある。

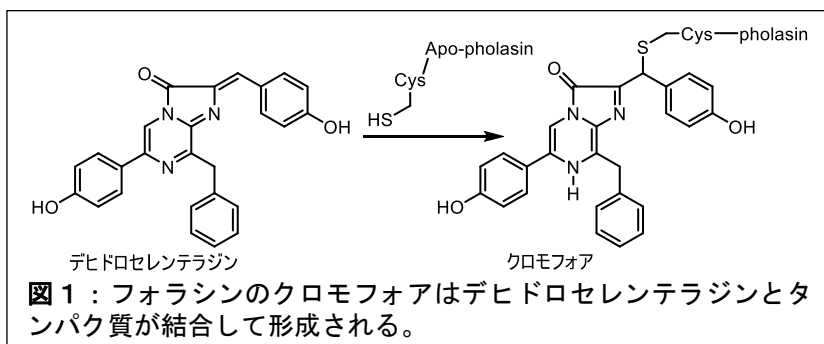
研究成果の概要(英文)：This research of a luminescent protein (pholasin) began with preparing apoproteins without substrates. Then, using the gene-expressed apopholasin and substrate, we found the conditions for activating the reconstituted pholasin. Using these conditions, we found a substrate structure that emits light brighter than the natural substrate. Subsequently, we were able to collect information on the structure and luminescent activity of the substrate through structure-activity relationship studies. This result enabled us to create artificial pholasin, which emitted highly luminescent light and established a fundamental technology for visualizing reactive oxygen species (ROS). Furthermore, we found a method for introducing a linker into the substrate to modify the emission wavelength. These results have enabled applications using various wavelengths.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生体成分 生理活性 蛋白質 有機化学 生物発光

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、トビイカ、ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質について、その発光機構に関する生物有機化学的な研究に従事してきた。トビイカの発光タンパク質(シンプレクチン)は約500個のアミノ酸で構成された疎水性の高い膜タンパク質である。シンプレクチンはDCLを基質として利用してクロモフォアを形成している。シンプレクチンもROSを利用して発光を開始するが、その詳細な発光機構は謎のままであった。とくにROSの役割を明らかにするべく研究を進めていたが、シンプレクチンは沈殿しやすく、取り扱いづらい欠点があった。ROSで光る発光タンパク質は他にもあるのではないかと調べたところ、フォラシンがROS検出キットとして市販されていたことに気が付いた。フォラシンは養殖したヒカリカモメガイから抽出し精製した状態で市販されていたが、そのクロモフォアの構造は不明であった。申請者はシンプレクチンとの類似点から、DCLが発光基質でありクロモフォアを形成しているのではないかと考え、市販のフォラシンにDCLを加えたところ発光強度が増大した。さらに市販のフォラシンからDCLを誘導体として単離し同定することに成功した(ChemBioChem 2009)(図1)。フォラシンは200個のアミノ酸で構成される酸性タンパク質であり、溶解性が高く取り扱いやすく、クロモフォアの詳細な化学構造を解明する対象として優れている。



発光生物の種類は多いが、その発光の仕組みが解明されている生物は数えられる程度と少ない。こうした発光生物に関する基礎研究を展開する研究者は国内外問わず多くない現状である。生物発光で利用される分子の生合成に関する研究(Oba, Y. et. al. PLOS ONE 2013)、発光ミミズの発光物質に関する研究(Petushkov, V.N. et. al. Angew. Chem. Int. Ed. 2014)、発光キノコの発光物質に関する研究(Purtov, K.V. et. al. Angew. Chem. Int. Ed. 2015)といった基礎研究が展開されており、最近ではロシアの研究者が精力的に研究を進めている。DCLを発光基質とするトビイカ・ヒカリカモメガイに関する基礎研究を展開しているのは研究代表者のみであるが、この発光タンパク質はROSで発光するため、ROSが関与する細胞内シグナル伝達を取り扱う研究領域の研究者から注目されている。また、GFPに代表される蛍光タンパク質を利用した応用研究は盛んであり、生体分子の可視化に利用されている(Remington, S.J. Protein Sci. 2011)。また、ホタル発光系は食中毒を引き起こす微生物の検出にも利用されている(Nakanishi, Y. et. al. Jpn. J. Food Microbiol. 1999)。

2. 研究の目的

本研究では、ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質(フォラシン)について、①フォラシンの活性部位に存在するクロモフォアの化学構造を解明し、②発光基質であるデヒドロセレンテラジン(DCL)誘導体の構造活性相関を調べ、③選抜した高活性型DCLとアポフォラシンで再構成したフォラシンを、活性酸素種(ROS)検出のための高輝度発光系として創出すること、を目的とした。まず、天然由来のフォラシンから調製したアポフォラシンと¹³Cで同位体標識したDCLを用いてクロモフォアを再構成し、NMR(核磁気共鳴)測定によりクロモフォアの化学構造を解析する。次に、発光反応の進行に伴うクロモフォアと活性部位のアミノ酸残基の変化について、ラマン・赤外分光法とX線結晶構造解析により解析する。また、様々なDCL誘導体を化学合成し、構造活性相関を調べ、高活性型DCLを選抜する。最後に、高活性型DCLとアポフォラシンからフォラシンを再構成し高輝度フォラシンを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

酸素との結合が予想されるDCLの2位炭素を¹³Cで標識する。DCLの合成に関しては、既にクロスカップリング反応を利用した効率的な経路を完成させている。¹³C標識物質は高価であるが、安価な¹³C標識シアン化ナトリウムを利用し、ギ酸エチルからジエトキシアセトン誘導体を合成する。その後2段階で¹³C標識DCLを合成する。市販のフォラシンから調製したアポフォ

ラシんに ^{13}C 標識 DCL を加え、再構成したフォラシンを NMR で解析し、標識炭素のシグナルを解析し、クロモフォアには酸素が結合しているかどうかを明らかにする。

さらに、DCL の 8'位をヘテロ原子で置換した誘導体を合成する。市販の安価なアミノピラジンを出発物質として、クロスカップリング反応を利用してセレンテラミン誘導体を合成する。その後、 ^{13}C 標識 DCL の合成経路と同じ手法で DCL 誘導体を合成する。ヘテロ原子の効果は隣接するベンゼン環上に配置したフッ素原子によりコントロールできる予備データを得ているので、様々な置換様式のフッ素化ベンゼンも導入して、数多くの DCL 誘導体を合成する。

アポフォラシンは天然型フォラシンから調製する方法を確立しているが、天然由来の DCL が残留してしまう欠点もある。そこで遺伝子発現によるアポフォラシンの調製に取り組む。既にバキュオウイルスを用いたカイコによるアポフォラシンの発現に成功しているので、用いるカイコを増やしてアポフォラシンを大量に発現する。得られた発現アポフォラシんに ^{13}C 標識 DCL を加え、再構成したフォラシンを NMR 測定することで天然型と同じクロモフォアが生成していることを確認する。その後、ラマン分光法、赤外分光法を利用して活性部位をさらに詳細に解析する。アポフォラシン、再構成フォラシン、ROS で発光させた後の発光後フォラシンについて、ラマンスペクトルと赤外吸収スペクトルを比較することで、クロモフォア形成に伴う活性部位の構造変化や ROS によるシスチン形成について解析する。

合成した DCL 誘導体と遺伝子発現したフォラシンによる構造活性相関のデータを基に、DCL 誘導体の構造を最適化し、高輝度型 DCL をデザインし合成する。カイコ発現アポフォラシンと再構成し、高輝度発光フォラシンを創出する手法である。

4. 研究成果

4-1. 人工基質の合成

まず、アポフォラシンの調製から研究に取り組んだ。市販されているフォラシンには天然由来の DCL が含まれており、DCL 誘導体の活性測定の際に、DCL と交換しているのかどうか不明であったため、正確に評価できない問題があった。そこで、遺伝子発現によりアポフォラシンを調製することにした。種々検討した結果、カイコバキュロウイルス発現系でアポフォラシンが産生されることを見出した。これに DCL を添加して、人工フォラシン（天然由来のフォラシンと区別している）を調製した。この人工フォラシンを発光させる条件に付いてさらに精査した結果、発光を誘発させる条件を見出すことにも成功した。遺伝子発現によるアポフォラシンの DCL による再構成と、その発光を誘発させることに世界で初めて成功した。さらに、人工基質の合成研究にも取り組んだ。様々な DCL をクロスカップリング反応を利用して合成した。今回入手に成功した人工フォラシンを用いて、構造活性相関を調べた結果、天然型よりも一桁高輝度に発光する DCL 誘導体を見出すことに成功した。

4-2. 基質の構造と発光活性

次に、遺伝子発現アポフォラシンと DCL でフォラシンを再構成して発光させることに成功していることから、本年度は DCL の構造と発光活性の相関を調べる研究に着手した。まず、DCL にヘテロアリアル基を導入する合成経路について精査した。その結果、窒素原子をもつアリアル基の導入は困難であったが、窒素原子にメチル基を一つ導入すると、N-アリアル基が導入できることを見出した。また、硫黄原子をもつアリアル基は発光させる際の消去剤として反応してしまうが、これをスルホンとすることで問題を回避することにした。これによりスルホニルアリアル基の導入が可能になった。これで、酸素、窒素、硫黄原子をもつヘテロアリアル基を置換基にもつ非天然型分子の合成を達成することができた。また、これら非天然型 DCL における、アリアル基の置換基効果を調べるための誘導体の合成も行った。電子吸引基としてフッ素原子を、電子供与基としてヒドロキシ基、メトキシ基、アルキル基を選抜し、これらを置換基にもつアリアル基を導入した DCL 誘導体を合成することに成功した。

4-3. 発光波長を改変させるための分子修飾

これまでに、遺伝子発現アポフォラシンと DCL でフォラシンを再構成して発光させることに成功しており、昨年度合成した DCL 誘導体を用いた構造活性相関の研究を進めた。その結果、いずれの DCL 誘導体も天然型 DCL よりも発光強度が増加した。また、DCL に導入したヘテロアリアル環上の置換基については、電子吸引基、電子供与基のいずれも発光活性を向上させる効果は確認できなかった。アリアル環については、水素原子だけが最も高輝度に発光することを明らかにできた。この置換基のないヘテロアリアル DCL とアポフォラシンから再構成した人工フォラシンを高輝度発光系として利用する基盤技術を完成させることに成功した。この発光系は可視光の発光を示すが、将来的な利用法を考えると、生体内の ROS 検出を可能にするために、より波長の長い近赤外光へと発光波長を変化させることが必須であると考えた。そこで、これまでに確立した手法を利用し、ヘテロアリアル環からさらにリンカーを伸ばすことにした。種々検

討した結果、昨年度までに確立した化学合成経路を改良した方法により、リンカーを延長できる手法を見出すことができた。これにより、この高輝度発光系の発光波長を変化させるための技術を確立させることができた。

ここで確立した方法は、活性酸素種を高感度で検出するための手段として利用することが可能であり、様々な分野での利用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Maiko Moriguchi, RyoTakahashi, Bubwoong Kang, Masaki Kuse | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Expression of recombinant apopholasin using a baculovirus-silkworm multigene expression system and activation via dehydrocoelenterazine | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 127177-1-5 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127177 | 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 Masaki Kuse | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 Marine Bioluminescence with Dehydrocoelenterazine, an Imidazopyrazinone Compound. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Topics in Heterocyclic Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1-19 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7081_2020_41 | 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 Moriguchi, M., Takahashi, R., Kang, B., Kuse, M. | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Expression of recombinant apopholasin using a baculovirus-silkworm multigene expression system and activation via dehydrocoelenterazine | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bioorg. Med. Chem. Lett. | 6. 最初と最後の頁 127177(1)-(5) |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127177 | 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 Yamamoto, S., Atarashi, T., Kuse, M., Sugimoto Y., Takikawa, H. | 4. 巻 84 |
| 2. 論文標題 Concise synthesis of heliolactone, a non-canonical strigolactone isolated from sunflower. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 1113-1118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1734444 | 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 Takahashi, K., Ogura, Y., Kuse, M., Takikawa, H. | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 First synthesis and absolute configuration of phorbacin H, a diterpene carboxylic acid isolated from the sponge <i>Phorbacin gukulensis</i> | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 2198-2201 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1654850 | 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 Nguyen, H. T. H., Bouteau, F., Mazars, C., Kuse, M., Kawano, T. | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 Enhanced elevations of hypo-osmotic shock-induced cytosolic and nucleic calcium concentrations in tobacco cells by pretreatment with dimethyl sulfoxide | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem. | 6. 最初と最後の頁 318-321 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1533801 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 森口舞子、姜法雄、久世雅樹 |
| 2. 発表標題 Pholasinの発現と活性化 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2021年度大会 (仙台) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 森口舞子、姜法雄、滝川浩郷、久世雅樹 |
| 2. 発表標題 N-Ar-DCL誘導体の合成と発光活性 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森口舞子, 姜 法雄, 滝川浩郷, 久世雅樹 |
| 2. 発表標題 N, O-アリアルデヒドロセレンテラジン誘導体の合成 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会 関西・中部支部 2019年度合同神戸大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 久世雅樹 |
| 2. 発表標題 ヒカリカモメガイの光る仕組みを有機化学で解明する |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第29回 若手シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 神戸大学農学研究科 天然有機分子化学研究室 http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-nprd-chem/index.html |
|--|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 | | |
|---------|-----------------------|-----------------------|--|
| 英国 | Knight Scientific Ltd | Nottingham University | |