

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22627

研究課題名(和文)発光魚キンメモドキがウミホタルから発光酵素を取込む分子機構とその進化の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism involved in the uptake of ostracod luciferase into luminous fish *Parapriacanthus*

研究代表者

別所 学(別所一上原学)(Bessho-Uehara, Manabu)

名古屋大学・高等研究院(理)・特任助教

研究者番号：80880434

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):キンメモドキのルシフェラーゼタンパク質取り込み機構解明のために、ルシフェラーゼと相互作用し取り込みに寄与する分子実体の解明を目指す。期間中に、リコンビナントルシフェラーゼの作成と投与実験の検討を行い、取り込みには数日以上 longer 期間が必要であることを明らかにした。新型コロナウイルス感染症の流行のため、研究が断続的に中断されてしまい飼育実験を精力的に行うことが不可能であった。さらに、本研究費も申請額の直接経費3000千円に対して、説明もなく2200千円の減額交付であったため、研究に必須の発光測定器の購入が困難となり、さらなる外部資金獲得が必要となり、研究の進展が非常に遅延した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々動物は植物など他の多細胞生物に比較して消化管を持つことで区別される。動物のドグマともいべき消化システムは、摂食されたタンパク質を分解し、生育に不可欠のアミノ酸の獲得において全ての動物で保存された仕組みである。しかし、キンメモドキは、トガリウミホタルを捕食することにより、ルシフェラーゼタンパク質を消化分解せずに発光細胞に取り込む。この驚くべき例外がどのように実現されているかを理解するために、本研究では、餌由来タンパク質の取込みに関わる分子メカニズムはどのようなものなのか、という問いに答えようとするものである。

研究成果の概要(英文): In order to reveal the mechanism of luciferase protein uptake in the golden sweeper, we aim to elucidate the molecular entities that interact with luciferase and contribute to its uptake. During the period, we examined the preparation of recombinant luciferase and administration experiments, and found that uptake requires a longer period of time than a few days. Due to the outbreak of the new coronavirus infection, the research was intermittently interrupted and it was impossible to conduct the breeding experiments vigorously. Furthermore, the research grant was reduced from the direct cost of 3 million yen to 2.2 million yen without explanation, which made it difficult to purchase the luminescence measurement equipment necessary for the research.

研究分野: Biology

キーワード: Bioluminescence Kleptoprotein Luciferase Protein uptake Parapriacanthus Cypridina Vargula Molecular biology

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

ユニークな形質を持つ生物は、それらが独自の遺伝子をゲノム中に進化させてきたと考えられてきた。ところが、発光魚キンメドキ *Parapriacanthu ransonneti* は、発光に必要な酵素遺伝子をゲノム中に持たず、餌であるトガリウミホタル *Cypridina noctiluca* から発光酵素（ルシフェラーゼ）を獲得していることが、申請者の研究により明らかとなった。「餌由来のタンパク質が消化されずに特定の器官の細胞に取り込まれ、さらに、本来の酵素機能が保持される」現象は、申請者により初めて発見されたものである。盗タンパク質と名付けられたこの現象において、その取り込みの分子生物学的・細胞生物学的・生理学的メカニズム及び進化的起源は未知である。

## 2. 研究の目的

ルシフェラーゼの取り込みに関与する分子実体の同定を目指す。抗ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫組織学的観察から、ルシフェラーゼは発光器官の発光細胞の細胞膜表面に多く局在し、細胞質にも顆粒状に存在することから、ルシフェラーゼの取り込みには膜受容体を介したエンドサイトーシスの関与が考えられる。そこで、本研究ではルシフェラーゼをリガンドとしてルシフェラーゼタンパク質と結合するようなタンパク質を見出し、そのタンパク質の盗タンパク質への関与を明らかにする。

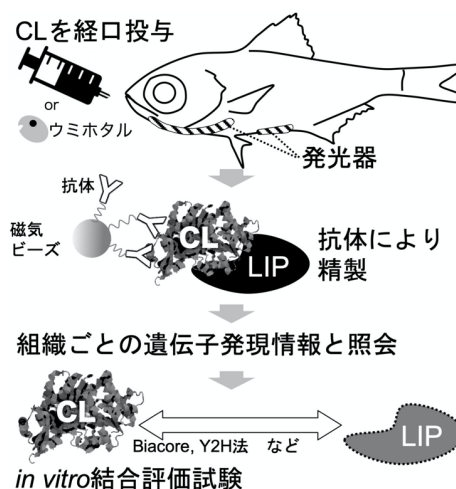
## 3. 研究の方法

トガリウミホタルルシフェラーゼに蛍光タンパク質（Venus）、Myc タグを付加したリコンビナントタンパク質を作成し、キンメドキに経口投与することで、飼育下での取込み実験系を確立する。ルシフェラーゼ取込みの実験系を確立したあとに、共免疫沈降法によりルシフェラーゼと相互作用するタンパク質を同定する。

ウミホタル類のルシフェラーゼのリコンビナントタンパク質の発現にはメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いる。ウミホタル類のルシフェラーゼは約 550 aa のうち 30 個以上の Cys が分子内ジスルフィド結合を形成するため、大腸菌での異種発現が困難である。そこで、真核生物であり、発現実績のある酵母を用いたリコンビナントタンパク質の作成を選択した。また、蛍光タンパク質や Myc タグ配列を付加することで取り込まれたルシフェラーゼをウェスタンブロットや免疫組織化学、蛍光顕微鏡などで検出を容易にする。

作成したリコンビナントタンパク質をキンメドキの生体に経口投与する。キンメドキの発光器から見つかったウミホタルのルシフェラーゼ（Cypridinid Luciferase; CL）は、消化器官を通過するにも関わらず分解されず、発光細胞に貯蔵されている。したがって、キンメドキは CL を能動的に取り込む仕組みを持つと考えられ、CL と相互作用する未知の分子

（Luciferase interactive proteins, LIP）を持つと予想される。



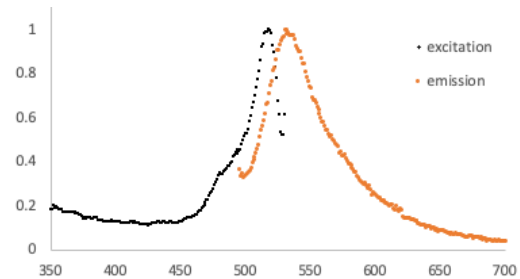
Myc や Flag などのタグを融合させたリコンビナント CL をキンメドキに経口投与する。ウェスタンブロット法および免疫組織化学法により、CL が発光細胞内へ取込まれる条件（投与量 10 µg-1 mg/回/匹；期間 2-48 時間）を検討する。CL と相互作用する分子を、タグ抗体を用いて精製し、質量分析法により網羅的に同定する。

#### 4. 研究成果

##### リコンビナントトガリウミホタルルシフェラーゼの作成

ルシフェラーゼ受容体を分析するために、リガンドとなるトガリウミホタルルシフェラーゼのタンパク質異種発現を行った。トガリウミホタルルシフェラーゼは複雑な高次構造を持つため、大腸菌を用いては発現することができず、酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現実験を行なった。リガンドタンパク質は大量に必要となると予想されるため、発現条件やタンパク質精製の検討を行なった。その結果、ワンステップの精製で培養液あたりの収量を 2-4 mg/L まで向上した条件を見出し、これを採用した。精製タンパク質はウミホタルルシフェリン (Vargulin) に対し、発光活性をもち (右図)、また、Venus による蛍光を示すことを確認しており高次構造が適切に形成されていることを示唆している。

作成したリコンビナントトガリウミホタルルシフェラーゼをキンメドキに投与したところ、投与後 1 日から 3 日では発光器でのルシフェラーゼ活性の取り込みを検出することができた。しかしながら、ウェスタンブロットや質量分析法によりこれらのサンプルからリコンビナントトガリウミホタルルシフェラーゼの検出を試みたが、検出できなかった。これらの結果は取り込みには十分な時間が必要であることを示唆している。これまでの研究から、ウミホタル *Vargula hilgendorfi* の 2 週間にわたる投与で、ウミホタルルシフェラーゼの発光器における取り込みは確認されている。今後は、実験期間を 1 週間に設定して投与実験を行うことで、ルシフェラーゼタンパク質の取込みを見出し、タンパク質共沈降法により、相互作用タンパク質の同定を目指す。



##### 新型コロナウイルス感染症の流行による影響

新型コロナウイルス感染症の流行のため、研究が断続的に中断されてしまいタンパク質発現実験を計画通りに進めることが困難であった。

また、協力関係にあった水族館もコロナ禍影響を受けての閉館に至ったため、生体サンプルの供給に大きな問題が生じた。そのため、飼育実験を精力的に行うことが不可能であった。

##### キンメドキの不漁による影響

キンメドキは環境変動や海峡の変化の影響をうけてか、2020-2021 年度は稀に見る全国的な不漁となった。全国の漁業関係者や水族館関係者から情報収集をおこなったが、このような大規模な不漁はここ数十年で初めてのことであった。SCUBA ダイビングによる分布調査を検討し、潜水士の資格を取得し、実際に SCUBA ダイビングによる調査を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 盗タンパク質による生物発光～ウミホタルを食べて光るキンメモドキ～
3. 学会等名 盗機能生物研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘ウミホタルから発光分子を盗むキンメモドキ’
3. 学会等名 アドバンス生命理学特論（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 盗タンパク質による生物発光～ウミホタルを食べて光るキンメモドキ～
3. 学会等名 Science0me（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 Kleptoprotein Bioluminescence: Protein uptake in a fish from luminous crustacean
3. 学会等名 2nd Asia Evo Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘深海サンゴ（花虫綱）の生物発光メカニズムの比較と進化’
3. 学会等名 第23回進化学会（東京オンライン大会・ハイブリッド形式）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘盗タンパク質による生物発光：トガリウミホタルから光を盗むキンメドキ’
3. 学会等名 第92回動物学会（米子オンライン大会・ハイブリッド形式）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘キンメドキのユニークな発光器官’
3. 学会等名 第6回ユニーク会（ハイブリッド形式・東京・名古屋・オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 Kleptoprotein Bioluminescence: A fish obtains luciferase from a luminous ostracod prey
3. 学会等名 Living Light（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘盗タンパク質による生物発光：ウミホタルを食べて光るキンメモドキ’
3. 学会等名 基礎生物学研究所部門公開セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘太古の海の光る森’
3. 学会等名 名古屋大学出前授業（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘餌生物の能力をコピー！？キンメモドキの盗タンパク質’
3. 学会等名 第22回静岡ライフサイエンスシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘生物発光の進化と盗タンパク質’
3. 学会等名 第2回ERATO共生進化機構先端セミナーオンライン（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘キンメモドキの盗タンパク質による生物発光’
3. 学会等名 盗機能生物研究集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘第2のKleptoproteinの発見’
3. 学会等名 ACT-X「生命と化学」第3回領域会議（東京オンライン大会・ハイブリッド形式）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 ‘盗タンパク質をもつ発光生物の発見’
3. 学会等名 JST創発の場（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別所上原学
2. 発表標題 盗タンパク質による生物発光～ウミホタルを食べて光るキンメモドキ～
3. 学会等名 よさこい生態学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------