

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22603005
 研究課題名 (和文) Watasenia scintillans 生物発光における ATP の作用機構の解明
 研究課題名 (英文) Study on role of ATP in Watasenia scintillans bioluminescence

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 (和文)： Watasenia scintillans 生物発光における ATP の作用機構の解明研究において、①使用する発光関連酵素の純度を高める方法を見出した、②ATP の消費における ADP の生成を測定した結果、発光生成物よりも量論的に低いことが判明した、③ATP は発光関連酵素と非共有結合で結合-解離による平衡作用していることが判明した、④発光関連酵素は不溶性の固体状態でのみ発光活性を有することが判明した。

研究成果の概要 (英文)： In a study on role of ATP in the bioluminescence of Watasenia scintillans, 1) a method of purification of luminescence enzyme has been developed, 2) it was shown that the amount of ADP production in the luminescence reaction is lower than that of luminescence product, 3) it was shown that ATP equilibriumly binds and dissociate without covalent binding, 4) water-insoluble luminescence enzyme is active in the solid state.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：発光

1. 研究開始当初の背景

生物が光を放出する現象は生物発光とよばれ、光のエネルギー源は発光基質の酸化反応による反応エネルギーであるのが一般的である。生物発光の分子レ

ベルでの分子化学的研究は1960年代から活発に行われており、ホテル、発光クラゲ、ウミホテルなどの生物発光において研究成果が蓄積されてきた。生物発光には、発光基質、酵素、および分子状酸

素の化学反応によるルシフェリナーゼシフェラーゼ反応によるものと、発光クラゲに代表されるように発光基質がタンパク質内に取り込まれた発光タンパク質によるものの2種類の発光機構が明らかにされている。いずれの発光系においても発光基質と酵素あるいはタンパク質との間で厳格な分子認識が働き、きわめて高い効率で酸化反応エネルギーが光に変換される。

生物発光反応における基質特異性や高発光効率などの特性をもとに、1990年代からこれらの生物発光は生命科学分野における微量成分分析や可視化技術の基盤となり、現在も生命科学の必要不可欠な技術として進歩し続けている。このように生物発光は生命科学の重要な先端技術の基盤となっているが、発光発現機構が解明されているのは8種にすぎない。日本海を中心として生息する *Watasenia scintillans* (ホタルイカ) は、輝度の高い青色光を瞬間的に発する発光生物である。その輝度はホタルの10倍ほどであり、地球上の多くの発光生物の中でも生息数をもっとも多く、研究材料としてその量は豊富である。にもかかわらず、その発光機構の化学的研究は、Shimomura をはじめとする多くの研究者により約50年以上前から研究されているが未解明である。*Watasenia scintillans* の発光機構の解明は、生物発光分野において難攻不落の研究課題とされている。

Watasenia scintillans の生物発光における発光基質に関しては、Goto らによる発光器からのセレンテラジンジスルホニル化合物 **1** の単離と構造決定 (T.Goto, et al. *Tetrahedron Lett.* **17**, 2971-2974, 1976) により、化合物 **1** が発光基質であると示唆された。その後、申請者らは発光器から抽出・部分精製した発光関連酵素系を用い、化学合成した化合物 **1** およびその部分構造改变化合物

を発光基質に用いた研究により、励起発光分子種を確定した (K. Teranishi, O. Shimomura, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 784-792, 2008)。

一方、*Watasenia scintillans* の発光関連酵素系に関しては、その不安定性のため -80°C での数日間の保存も不可能であり、また発光器からの抽出・精製も成功していない状況にあった。しかし、近年、申請者らは発光関連酵素系の安定化法、発光器からの発光関連酵素系の簡便な抽出法および部分精製法を見出した。これにより、*Watasenia scintillans* の生物発光現象を *in vitro* で随時容易に再現することに成功し、発光反応に関する特性 (高いATP特異性、発光反応の最適温度 5°C 、発光反応の最適pH8.3、ホタルに次ぐ高い発光量子収率0.36、pH・温度依存安定性、著しく高い基質特異性など) を明らかとした。

Watasenia scintillans の発光にはATPが必要であることが実験で示され (F.Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4629-4632, 1985)、ATPと化合物**1**よりアデニル化セレンテラジン化合物が生成すると反応機構が提唱された (F. Tsuji, *Biochem. Biophys. Acta*, **1564**, 189-197, 2002)。しかし、申請者らはこの機構が誤りであることを実証した。

2. 研究の目的

申請者らは、*Watasenia scintillans* の生物発光に関した上記の基礎的な研究成果を得ることに成功したが、発光発現機構におけるATPの作用機構や発光関連酵素系の正体は未だ解明できていない。ATPを必要とする生物発光にはホタルの発光があり、この場合、初期反応としてATPと発光基質が反応し、その後、この中間生成物が酸化反応し光を生成する。申請者のこれまでの研究より、*Watasenia scintillans* 生物発光ではATPはこれまでに知られているような作用

機構ではなく、新規な役割を担っている可能性が考えられる。本研究では、*Watasenia scintillans* の生物発光における ATP の役割を解明する。

3. 研究の方法

期間は3年を設定し、この間の目標を以下とした。

①発光関連酵素系の高純度化

本研究の目標であるATPの作用機構の解明には、高純度の発光関連酵素系(複数の酵素が発光発現に関係している可能性がある)が必要である。そのため、申請者が報告している部分精製法により発光関連酵素系を部分精製し、さらに純度を高めるための精製法を検討・確立する。

②ATPの量論的变化の解析

精製した発光関連酵素系を用いてATP依存の発光反応を行い、ATPの量論的变化を解析する。

③発光関連酵素系とATPとの反応

発光基質とATPとの共有結合形成反応の可能性は、既に否定しているので、発光関連酵素系とATPとの反応においてATPの化学構造の変化を伴う共有結合形成反応(例えばリン酸化)あるいは化学構造変化を伴わない結合反応の有無に関し解析する。これらの解析によりATPの初期段階での作用機能に関し知見を得る。

④ATPラベル化

発光関連酵素系にATPが何らかの様式で共有結合する可能性が示唆されれば、その可能性をATPラベル化し実証する。ATPがラベル化されればATPが作用する発光関連酵素の特定に利用できる。

⑤ATPラベル化合物を分子設計および化学合成

発光関連酵素系にATPが非共有結合する可能性が示唆されれば、ATPが非共有結合するタンパク質を特定するためのATPラベル化合物を分子設計および化学合成し、ATPのラベル化を検討する。

⑥ATP が作用する酵素あるいはタンパク質の特定

上記の④あるいは⑤でラベル化された発光関連酵素の分離・精製を行い、ATP が作用する酵素あるいはタンパク質の特定を行う。

⑦発光関連酵素系化合物の水溶化

発光関連酵素系化合物の化学構造を解明するには、発光関連酵素系化合物から発光反応に必要な酵素を単離する必要がある。これまでの研究では、市販の多種のタンパク質可溶化剤を用い可溶化を試みたが、発光活性の喪失および可溶化できない結果であった。これまでの研究では、イオン系可溶化剤での発光活性の喪失が顕著であり、非イオン系可溶化剤の方が発光活性の失活程度がひどいことが判明していた。今回、シクロデキストリンと脂質を用いた非イオン系可溶化剤を化学合成し、発光関連酵素系化合物の発光活性を保持した状態での可溶化を検討した。

4. 研究成果

①発光関連酵素系の高純度化

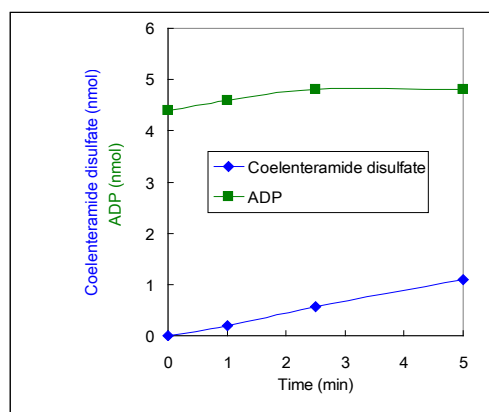
発光関連酵素系の高純度化を以下の操作で行った。

論文記載 (K. Teranishi, O. Shimomura, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 784-792, 2008) の方法で得たホタルイカ第4腕の発光器から発光関連酵素系化合物懸濁液から遠心分離により発光関連酵素系化合物を沈殿物とし

てえ、メルカプトエタノール・ショ糖液で攪拌後、再度遠心分離し沈殿物を得る。この操作を3回繰り返すことによって発光関連酵素系化合物の純度を高めた。

②ATPの量論的変化の解析

①で得られた発光関連酵素系化合物を用いて、ATP、発光基質を用いた発光反応を行い、経時的に発光基質の酸化化合物量とADP量をHPLCにより測定した(下図)。その結果、ADP量の増加は発光酸化化合物の増加量の約1/3であり、ADPは発光酸化化合物に対し当量生成しないことが確認された。



③発光関連酵素系とATPとの反応

発光関連酵素系化合物にATPを添加し、速やかに遠心分離を行い、発光関連酵素系化合物を沈殿物として得、この発光関連酵素系化合物に発光基質を添加しても発光反応が進行しないことが判明した。このことは、発光関連酵素系化合物とATPとの相互作用が強くなく、相互作用における結合と解離が生じていることを示した。相互作用とは、吸着と共有結合のいずれかを意味するが、どちらの相互作用であるかは断定できない。共有結合である場合、化学結合後に結合の切断が生じている可能性は否定できない。

④ATPラベル化

③の結果からATPは発光関連酵素系化合物から速やかに遊離することが判明し、ATPのラベルを行うことは有意義ではないと判断した。

⑤ATPラベル化合物を分子設計および化学合成

④に示した理由から本実験を実施しなかった。

⑥ATPが作用する酵素あるいはタンパク質の特定

④に示した理由から本実験を実施しなかった。

⑦発光関連酵素系化合物の水溶化

シクロデキストリン分子にC18炭素鎖の脂質を分子比1:1, 1:2, 1:3, 1:7で化学結合させた界面活性化合物を作製した。これらの化合物を発光関連酵素系化合物と混合し発光酵素の可溶化を試みたが、まったく可溶化せず不成功に終わった。

まとめとして、今回の研究において発光関連酵素系化合物とATPとの相互作用は弱く水溶液中では容易に遊離することが判明した。この結果より、ATPの結合個所の特定法としてラベル化を予定していたが、この方法は有効でないと判断し、今後は別の手法による相互作用点の特定が必要であると判断した。また、1分子の発光基質の発光反応において等量のATPは消費されないことが明らかとなった。本研究中、他の研究グループは不溶性発光関連化合物をSDSで可溶化し電気泳動を行い2種のタンパク質からなっていることを示したが、SDSによる可溶化では発光活性が喪失し、発光に必要な酵素の特定には至ってお

らず、また、ATP の作用機序も不明のままであり、可溶化が今後も大きな課題である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

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科・教授

研究者番号： 20237001