

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580147

研究課題名(和文)生物発光基質アナログによる発光タンパク質の持続的発光の実現

研究課題名(英文)Continuous luminescence of photoprotein with substrate analog

研究代表者

久世 雅樹(KUSE, MASAKI)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40335013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：発光タンパク質を持続的に発光させることを目的として研究を行った。まず発光後クロモフォア酸化物のモデル化合物を合成し、発光タンパク質を再生させる条件を見出した。次に蛍光性基質誘導体を合成した。ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質は基質特異性が高いが、天然型基質に匹敵する発光活性を示す基質誘導体の創製を達成した。本研究成果により、発光タンパク質を持続的に発光させる基盤技術が確立できた。

研究成果の概要(英文)：Attempts have been made to find the condition which enables photoprotein to emit light continuously. A suitable condition for re-generation of photoprotein was obtained by using chemically synthesized oxy-chromophore analog. A fluorescent substance of photoprotein was also synthesized. A substance analog, in which sulfur and fluorine atoms were incorporated, was finally synthesized. The analog showed high bioluminescent activity as natural substance. From these results, fundamental knowledge was accumulated to obtain continuous luminescence of photoprotein.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生体分子 生理活性 蛋白質 有機化学

1. 研究開始当初の背景

生物発光とは、有機化合物(発光基質)がルシフェラーゼ(酵素:Lase)や発光タンパク質中で酸化され、生成した過酸化物が分解するときに生じるエネルギーを光として放出する現象である。例えば、ホタルルシフェリン(基質)はATPと酸素の存在下Laseにより酸化され発光する。また、セレンテラジン(基質)は安定な過酸化物としてオワンクラゲ発光タンパク質(イクオリン)に取り込まれており、カルシウムイオン(Ca²⁺)によりその安定化が解除されて発光する。

このように生物発光は基質とタンパク質以外に補因子であるATPやCa²⁺を必要とするので、これら補因子の特異的検出手段として利用できる。実際にLaseは病原菌(生細胞中)のみATPが存在する)の検出に、またイクオリンは細胞内シグナル応答に関連するCa²⁺濃度変化の検出に利用されている。この検出方法の特徴は超微量で高感度検出できること、生細胞を直接観察できること、そして放射性物質を必要としない環境調和型手段であることが挙げられる。また緑色蛍光タンパク質(GFP)に代表される蛍光タンパク質は細胞内における発現タンパク質のイメージング手段として利用されている。蛍光タンパク質は励起エネルギーを与え続けることで(蛍光タンパク質が壊れない限り)連続的に発光できる特徴がある。

申請者は発光タンパク質を生体成分のイメージング手段として利用する共同研究を行っており、生理条件下で天然型発光基質より安定な発光基質アナログを合成し利用してきた(Kagenishi, Yokawa, Kuse, Isobe. et al. *Zeitschrift für Naturforsch.* **2009**, *64c*, 411.)。この研究において、蛍光タンパク質に比べて発光タンパク質の発光量が小さいことがしばしば問題となった。発光タンパク質の発光量は基質が結合した発光タンパク質のモル数で規定されるため、発光量を増やすためには使用済み基質をタンパク質から除去し、新たな基質を導入し発光タンパク質を再生する必要がある。これが実現できれば発光量を増やすことが可能だと考えた。

2. 研究の目的

本研究では活性酸素種で発光するタンパク質の連続的発光を目指した。具体的には、発光後生成する発光タンパク質の発光機能を回復させることを目的とする。

申請者がこれまで研究してきたデヒドロセレンテラジン(DCL)を発光基質とする発光タンパク質(ヒカリカモメガイのフォラシン、トビイカのシンプレクチン)を研究対象とする(Tanaka, Kuse, et al. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2725.; Isobe, Kuse, et al. *Proc. Japan Acad. Ser. B.* **2008**, *84*, 386)。DCLは発光タンパク質のシステイン残基と結合してクロモフォアを形成し

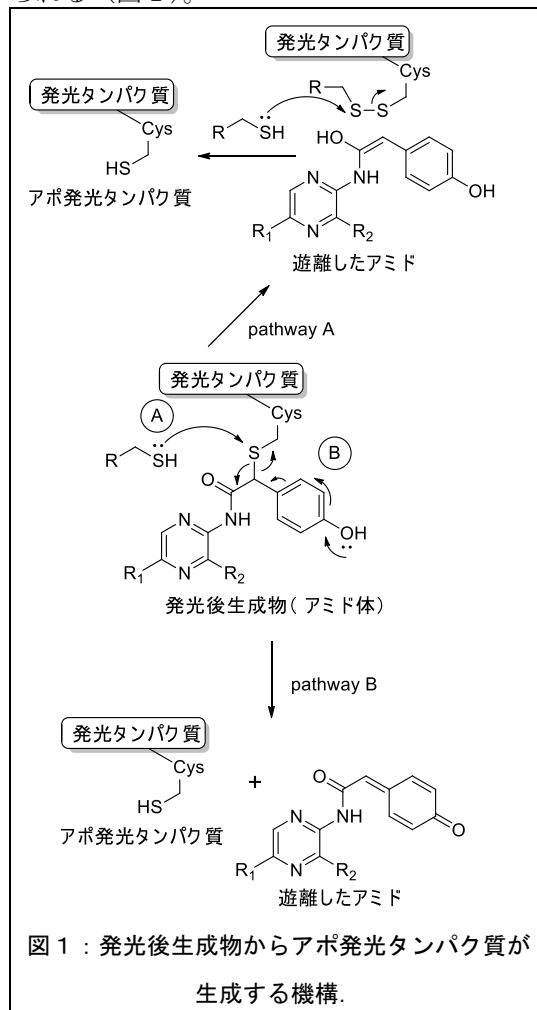
ている。このクロモフォアは活性酸素種と酸素により酸化され、生成した過酸化物が分解する際に発光し発光後生成物(アミド体)を与える。発光タンパク質が連続的に発光するためには、このアミド体から発光タンパク質が遊離し、新たに発光基質がシステイン残基と結合してクロモフォアを再生する必要がある。

これまでクロモフォア構造に注目し、アミド体へと変換される段階の分子機構に関して研究を展開してきたが、このアミド体については発光後生成物であったため詳細な分子情報を入手していなかった。本研究ではこのアミド体に焦点を当て、安定性やタンパク質との解離定数などの詳細な分子化学データを集めることにする。そして得られたデータに基づきアミド体からクロモフォアへの再生に挑戦し、発光タンパク質による連続的生物発光の実現を目指すことにした。

3. 研究の方法

(1) 発光後生成物(アミド体)のアナログの化学合成

発光後生成物(アミド体)からアポ発光タンパク質(クロモフォアを再生できる状態)が再生するには以下に示す2つの経路が考えられる(図1)。



1: 経路Aでは遊離のチオール基がアミド体の硫黄原子(S)を攻撃し、発光タンパク質のシステイン残基はシスチンとなり、アミドが遊離する。その後、発光タンパク質のシステイン残基は遊離のチオール基により還元され、アポ発光タンパク質が再生する。

2: 経路Bではアミド体のフェノール基からの電子供与により発光タンパク質のシステイン残基が解離する。この場合遊離したアミドのフェノール基は酸化されたキノン構造となる。

このどちらかの経路を利用することで、アポ発光タンパク質が再生するかどうかを検討することから開始する。

まずアミド体のアナログを化学合成する。このアナログを利用することで、発光タンパク質を用いずにアミド体について詳細に検討できる。市販のベンズアルデヒドをシアノヒドリンへ誘導し、チオール化合物を導入後加水分解して α -チオフェニル酢酸を合成する。最後にカルボン酸部分を活性化し、アミノピラジンと縮合してアミド体アナログを合成する。この経路は様々なアミド体アナログを合成できる利点がある。

置換基(X)として電子吸引基(ニトロ基、アシル基など)や電子供与基(メトキシ基、アミノ基)が導入された市販のベンズアルデヒドを出発原料として、アミド体アナログを多数合成する。得られたアミド体アナログについて、チオール基の解離条件を検討する。溶液のpHや組成、また還元を促すチオール基(ジチオスレイトールなど)の種類について詳細に調べる。アミドが遊離したかどうかは、高速液体クロマトグラフィーを用いたアミドの紫外吸収や蛍光スペクトルを指標に評価する。

(2) アミドがより遊離しやすくなる発光基質アナログの合成

前年度の研究結果を基にして、アポ発光タンパク質を再生しうる置換基Xを導入した発光基質アナログを化学合成する。申請者らは発光基質アナログをわずか4工程で化学合成することに成功している。ベンズアルデヒドを出発原料としてフェニルピルビン酸へと誘導し、発光基質アナログを調製する。様々なベンズアルデヒド誘導体が市販されているので置換基Xの導入は容易である。次にこの発光基質アナログの発光タンパク質における発光活性を測定する。十分な発光活性をもち、かつアミドが遊離しやすい置換基Xを探索する。

4. 研究成果

(1) システイン残基にクロモフォアが共有結合した発光タンパク質について、そのクロモフォア酸化物のモデル化合物の合成法につ

いて検討した。

ベンズアルデヒドから数段階にて、チオール基が導入されたフェニル酢酸誘導体を合成することができた。次いで、既存の方法で別途化学合成したセレンテラミンとの縮合条件について検討した。これまではカルボン酸部分を酸クロリドへと変換してから縮合していたが、カルボン酸をそのまま縮合する方法を用いることでクロモフォア酸化型アナログが効率よく合成できた。本手法を用いて、発光後クロモフォア酸化物のモデル化合物の合成が完了した。(図2)。

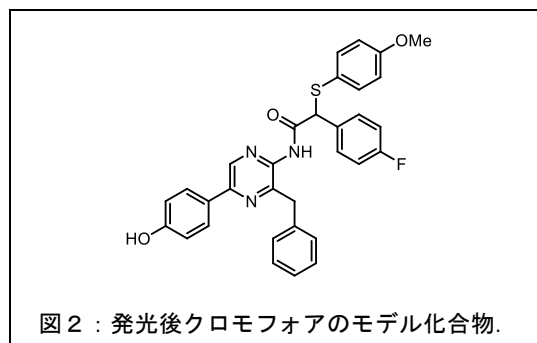


図2: 発光後クロモフォアのモデル化合物。

このクロモフォア酸化物はジチオスレイトールのような還元剤によりチオフェニル基を遊離することが判明し、発光タンパク質のクロモフォアを再生させることは可能であることが明らかになった。

(2) 発光タンパク質の再生の手段が見つかったので、基質誘導体の研究に取り掛かった。本研究で取り扱っている生物発光基質「デヒドロセレンテラジン(DCL)」は蛍光を示さないが、分子修飾により蛍光物質としての機能を付与することができれば、生体機能分子のモニタリングが可能となる。そこで、ベンゾチアゾール(BZT)を導入したDCL誘導体の化学合成を目的とした。

DCL誘導体合成には様々な合成経路があるので、すべての方法について検討した結果、以下の合成経路を採用することにした。まず、市販のBZTアルデヒドとグリシンからピルビン酸誘導体へと導き、次いで、セレンテラミンと縮合してデヒドロアミノ酸を得た。最後に無水酢酸で処理したところ、BZTが導入されたDCL誘導体が合成できた。これを亜鉛イオンで処理すると、分子内で錯体を形成して緑色の蛍光を示し、蛍光性DCL誘導体の合成を達成した(図3)。

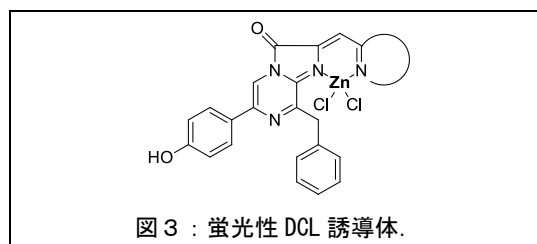


図3: 蛍光性DCL誘導体。

この DCL 誘導体は発光タンパク質に限らず、生体分子におけるシステイン残基などのチオール化合物に選択的に結合する特徴があるので、生細胞内における機能分子のモニタリングが可能になるという意義がある。

(3) ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質(フォラシン)は基質特異性が高く、これまで DCL 誘導体による発光活性は非常に低かった。そこで、より発光活性の高い基質の創生を試みた。

種々検討した結果、基質であるデヒドロセレンテラジン(DCL)の構造にホタル発光基質の構造を融合させた新規 DCL 誘導体の化学合成を検討した。その結果、市販のアミノピラジンを臭素化し、芳香族チオールとの置換反応、そしてクロスカップリング反応により基本骨格が効率よく構築できた。最後にピルビン酸誘導体と縮合して DCL 誘導体の合成を完了した。フッ素と硫黄原子を導入した DCL 誘導体(S-F-DCL)は天然型基質に匹敵する発光量を示し、これまで合成してきた誘導体の中で最高の活性を示すことが明らかになった。

【意義】発光タンパク質の再生手法の確立と、発光活性の高い基質誘導体の創製に成功した以上の成果により、ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質(フォラシン)を利用して生体成分を2成分同時計測することが可能となった。今後、生体内における機能分子の活性発現機構を解明する手段として本研究成果を利用することが期待される。

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6件)

1. Kuse, M. Chromophores in Photoproteins of a Glowing Squid and Mollusk. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 78, 印刷中.doi. 10.1080/09168451.2014.915724. (査読有)
2. 久世雅樹, ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質(フォラシン), 化学と生物, **2014**, 52, 166-171. (査読有)
3. Kohno, Y., Koso, M., Kuse, M., and Takikawa, H. Formal Synthesis of soybean phytoalexin glyceollin I. *Tetrahedron* **2014**, 55, 1826-1828. (査読有)
4. Tanaka, M., Sugimoto, Y., Kuse, M., and Takikawa, H. Synthesis of 7-oxo-5-deoxystrigol, a 7-oxygenated strigolactone analog. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, 77, 832-835. (査読有)
5. Nakazaki, K., Hayashi, K., Hosoe, S., Tashiro, T., Kuse, M., Takikawa, H. First synthesis of decaturin C, an antiinsectant diterpenoid isolated from *Penicillium thiersii*. *Tetrahedron*

2012, 68, 9029-9034. (査読有)

6. Kongjinda, V., Nakashima, Y., Tani, N., Kuse, M., Nishikawa, T., Yu, C.Y. Harada, N., Isobe, M. Dynamic Chirality determines Critical Roles for Bioluminescence in Symplectin-Dehydrocoelenterazine System. *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 2080-2091. (査読有)

〔学会発表〕(計17件)

(招待講演)

1. 久世雅樹: 海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究。日本農芸化学会関西支部会 第482回講演会(神戸:神戸大学)2013.12.7. 講演要旨集 p. 19.
2. 久世雅樹: トビイカとヒカリカモメガイの生物発光に関する研究。第8回化学生態学研究会、湯川プリンスホテル渚亭、函館、2013.6.28. 講演要旨集 p. 1.

(口頭発表)

3. 久世雅樹: 海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究(農芸化学奨励賞 受賞者講演)。日本農芸化学会2013年度大会(仙台:東北大学)2013.3.24. 講演要旨集 p. 25.
4. 山本 駿, 久世雅樹, 滝川浩郷: Hostasolid A の合成研究。日本農芸化学会2014年度大会(神奈川:明治大学)2014.3.29. 講演要旨集 p. 3A07p19.
5. 松岡絢香, 南郷成子, 古市卓也, 久世雅樹, 滝川浩郷: 発光タンパク質(フォラシン)の発光基質誘導体の合成とその発光活性。日本農芸化学会2014年度大会(神奈川:明治大学)2014.3.29. 講演要旨集 p. 3A05a08.
6. 松岡絢香, 南郷成子, 古市卓也, 久世雅樹, 滝川浩郷: 発光波長を改変する生物発光基質アナログの化学合成。日本農芸化学会関西支部会 第482回講演会(神戸:神戸大学)2013.12.7. 講演要旨集 p. 18.
7. 秦 大輔, 北原彩子, 久世雅樹, 滝川浩郷: Sorgomol の光学活性体の合成研究。日本農芸化学会関西支部会 第482回講演会(神戸:神戸大学)2013.12.7. 講演要旨集 p. 17.
8. 秦 大輔, 北原彩子, 久世雅樹, 滝川浩郷: Sorgomol の光学活性体の合成研究。第28回農薬デザイン研究会(京都:メルパルク京都)2013.11.8.
9. 河野雄太, 久世雅樹, 滝川浩郷: Glyceollin I の合成研究。日本農芸化学会2013年度大会(仙台:東北大学)2013.3.25. 講演要旨集 p. 2C25a09.
10. 田中政志, 久世雅樹, 滝川浩郷: 7-Oxoorobanchol の合成。日本農芸化学会2013年度大会(仙台:東北大学)2013.3.25. 講演要旨集 p. 2C25a10.
11. 南郷成子, 久保尚洋, 久世雅樹, 滝川浩

郷：蛍光性デヒドロセレンテラジン類を用いた発光タンパク質の構築. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台: 東北大学) 2013.3.25. 講演要旨集 p. 2C21a04.

12. 河野雄太, 久世雅樹, 滝川浩郷: プテロカルパン骨格の新規構築法に関する研究. 日本農芸化学会関西支部会 第 477 回 講演会 (神戸: 神戸大学) 2012.12.1. 講演要旨集 p. 11.
13. 久世雅樹, 古市卓也, 南郷成子, 久保尚洋, 滝川浩郷: ヒカリカモメガイ発光タンパク質のクロモフォア形成部位に関する研究. 日本農芸化学会関西支部会 第 477 回 講演会 (神戸: 神戸大学) 2012.12.1. 講演要旨集 p. 12.
14. 久世雅樹, 田中瑛子, 古市卓也, 南郷成子, 久保尚洋, 滝川浩郷, 西川俊夫: 発光タンパク質 **Pholasin** の発光機構に関する生物有機化学的研究. 第 5 4 回天然有機化合物討論会 (東京: 東京農業大学) 2012.9.19. 講演要旨集 p. 651-656.
15. 久世雅樹, 田中瑛子, 西川俊夫, 滝川浩郷: 発光タンパク質 **Pholasin** のクロモフォア形成部位に関する研究. 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都: 京都女子大学) 2012.3.24. 講演要旨集 p. 3A05p12.
16. 田中政志, 久世雅樹, 滝川浩郷: 7 位が酸素化された **Strigolactone** 類の合成研究. 日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都: 京都女子大学) 2012.3.24. 講演要旨集 p. 3A07a02.
17. 宮田典明, 久世雅樹, 西川俊夫: 両極性炭素を持つイミダゾロン化合物の化学合成研究. 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会 (京都大学) 2011. 10.2. 講演要旨集 p. 81.

[その他]

(1) 受賞等

久世雅樹

平成 25 年 3 月 24 日 農芸化学奨励賞

表彰団体名: 日本農芸化学会

対象研究テーマ: 海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究

URL:

http://www.jsbba.or.jp/about/awards/about_awards_encouragement.html

(2) ホームページ等

神戸大学 大学院農学研究科 天然有機分子化学研究室ホームページ

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-nprd-chem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久世 雅樹 (KUSE, Masaki)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 40335013