

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657045

研究課題名（和文） ルシフェリン合成系を導入した完全人工発光植物の創製

研究課題名（英文） Creation of artificial luminescent plant induced by luciferin biosynthesis system

研究代表者

近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)

独立研究法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究部門長

研究者番号：20223951

研究成果の概要（和文）：ルシフェラーゼ遺伝子を導入した発光植物を作出し、さらにこの発光植物にルシフェリン合成経路関連遺伝子を導入、人工完全発光植物の創出を目指した。その結果、ホタルルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子導入植物を作出した。一方、ホタルルシフェラーゼ導入発光植物にホタルルシフェリン合成経路の鍵酵素であるチオエステラーゼ酵素を導入、ルシフェリン前駆体のルシフェリン合成を再現したが、チオエステラーゼ酵素の導入による副次効果で発光が阻害された。異なる鍵酵素の導入が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To establish the bioluminescent plants, we transfect the luciferase genes and the luciferin synthesis related genes to plants. At the first step, we established the firefly luciferase gene expressed and Cypridina luciferase expressed plants and confirmed the potential of bioluminescence after adding two luciferins. At the next step, we transfected the mammalian thioesterase gene, which is a key enzyme from pre-luciferin to luciferin, to firefly luciferase expressed plants. However, in two genes expressed plants, pre-luciferin cannot convert to luciferin, so we have to transfect another key-enzyme.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：組み換え植物、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、イメージング、有用物質生産

1. 研究開始当初の背景

(1) 生命科学では基礎・応用研究の幅広い分野においてルシフェラーゼ遺伝子を人為的

に導入した光る生物群が作られ、多くの生命現象の解明に貢献すると共に、創薬研究等に活用されている。しかしながら、人為的に作

製した光る生物群は、全て発光反応の基質であるルシフェリンを外から加える必要があり、自己システムで完全に光る生物は作られていない。

(2) 我々はホタルルシフェリンの生合成経路を解明、生体物質及び異性化酵素を用いることで効率よくルシフェリンを合成できることを証明した (Niwa K, et. al, *FEBS Lett* 580, 5283-7, 2006, Niwa K, et al. *Anal Biochem.* 396 (2):316-318, 2010)。

(3) ホタル以外にもウミホタルや発光性渦鞭毛藻ルシフェリンの生合成経路の解明が急がれるが、それらの発光遺伝子導入した生物群は十分に作出されていない。

2. 研究の目的

(1) 人工完全発光生物の創製を目指し、ホタルルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子群を導入した発光植物群を作出する。

(2) 発光植物群にルシフェリン生合成経路の酵素群を導入、ルシフェリン前駆体でも発光する発光植物を創製する。

3. 研究の方法

(1) 発光ルシフェラーゼ遺伝子導入植物の作出：発光遺伝子としてはホタル(発光甲虫由来の東洋紡製 Eluc)、ウミホタルルシフェラーゼ (NEB 社製 pCluc、アトー社製 pClucY) 遺伝子を用いる。実験は図 1 に示したように

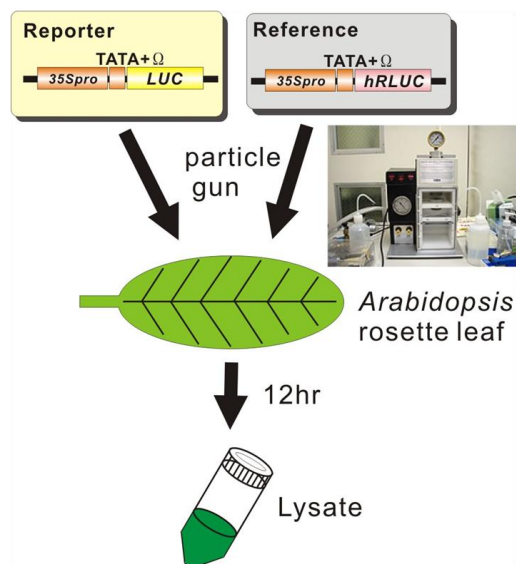


図 1 ルシフェラーゼ遺伝子の導入法

35S プロモータ下流に挿入したベクターを構築、パークティルガンを用いてシロイヌナズナに導入する。12 時間後、発光を確認する。なお、遺伝子導入のコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子ベクターを用いた。

(2) ホタルルシフェリン生合成関連酵素のルシフェラーゼ植物への導入: 従来、活性型 D 体ホタルルシフェリンは Cys 残基と 8 - キノンを出発物質とした 2 - シアノ 6 - ヒドロキシベンゾチアゾール (CHBT) から L 体ホタルルシフェリンが合成され、それが異性化酵素によって効率的に合成されると考えられている。合成経路の導入の第一段階として、L 体→D 体の変換に注目し、異性化酵素の一つであるチオエステラーゼ遺伝子をホタル遺伝子発現植物に 2 重導入、ルシフェリン、ルシフェリン前駆体を加え、発光強度を測定する。

4. 研究成果

(1) ホタル(発光甲虫由来の東洋紡製 Eluc)、ウミホタルルシフェラーゼ (NEB 社製 pCluc 及びアトー社製 pClucY) 遺伝子を 35S プロモータ下流に挿入したベクターを構築した。遺伝子ベクターはパークティルガンを用いてシロイヌナズナに導入した。この際、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子として哺乳類細胞で発現量が最適化された Cluc 遺伝子と酵母細胞で発現量が最適化された ClucY を用いた。

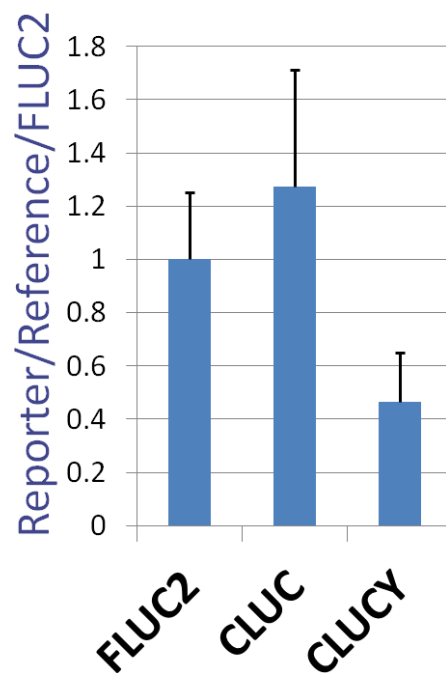


図 2 シロイヌナズナにおけるホタル、ウミホタルルシフェラーゼの相対発光活性

(2) 図2はホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入シロイヌナズナの抽出物(含む FLUC2)の発光量に対して、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子導入体の抽出物 CLUC、CLUCY の発光量を比較した結果である。ホタル、ウミホタルルシフェラーゼ共に植物細胞でよく発現すること明らかになった。ホタルルシフェラーゼは既に報告があるが、ウミホタルルシフェラーゼの植物細胞での検討は初めてであり、ホタルルシフェラーゼより発現効率が高いことが明らかになった。一方、植物細胞では酵母で発現が最適化された遺伝子では発現が悪いことも明らかになった。本件は、現在、論文作成中である。

(3) ルシフェリン合成の最終段階において L 体ルシフェリンは活性型 D 体ルシフェリンへと変換される。この際、異性化酵素が必要であり、その候補としてチオエステラーゼ酵素がある。そこで、哺乳類チオエステラーゼを遺伝子情報から検索、遺伝子情報を元にクローニングした。クローニングされた遺伝子を植物細胞発現ベクターに挿入、シロイヌナズナ植物に遺伝子導入した。従来、動物細胞では L 体ルシフェリンにエステラーゼ酵素を加えることで発光活性が増加する点は明らかであった。しかしながらエステラーゼ酵素を発現するホタルルシフェラーゼ遺伝子導入シロイヌナズナ植物では L 体ルシフェリンでは発光の増加が認められず、逆に発現したエステラーゼ酵素が発光を阻害した。これはエステラーゼ酵素によってルシフェリン合成が阻害されたか、或いはエステラーゼ酵素の2次的な反応によって生み出された副産物がルシフェラーゼを直接阻害した可能性を示唆している。

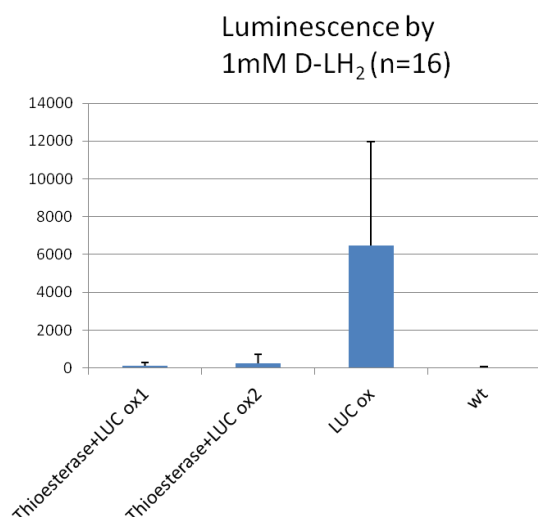


図3 シロイヌナズナにおけるチオエステラーゼが及ぼすルシフェラーゼの活性阻害

(4) 図3ではルシフェラーゼのみ発現したシロイヌナズナとルシフェラーゼとチオエステラーゼの2つが同時に発現したシロイヌナズナにおいて活性型 D 体ルシフェリンによる発光活性を比較した。その結果、非活性型 L 体ルシフェリンと同様にチオエステラーゼが発現することで活性が阻害されること、つまり、チオエステラーゼが生合成経路を阻害するのではなくエステラーゼ酵素の2次生成物がルシフェリン、ルシフェラーゼ反応を直接、阻害することを示唆する結果が得られた。よって、本エステラーゼ酵素以外の異性化酵素を探す必要がある点が明らかになった。

(4) ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子を導入したシロイヌナズナ植物を作出に成功したので、これによって今後、ウミホタルルシフェリンの合成経路の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2件)

- ① Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, Ohmiya Y, Fujimura T, Yamasaki K, Aiba S: In Vivo Imaging Demonstrates ATP Release from Murine Keratinocytes and Its Involvement in Cutaneous Inflammation after Tape Stripping. J Invest Dermatol in press
- ② Kato DI, Hiraishi Y, Maenaka M, Yokoyama K, Niwa K, Ohmiya Y, Takeo M, Negoro S: Interconversion of ketoprofen recognition in firefly luciferase-catalyzed enantioselective thioesterification reaction using from *Pyrocoelia miyako* (PmL) and *Hotaria parvura* (Hpl) just by mutating two amino acid residues. J Biotechnol in press

[学会発表] (計 1件)

- ① OHMIYA YOSHIHIRO、Bioluminescence multicolor imaging using secreted and non-secreted luciferase、組織培養学会年次発表会、2013年5月30日、産総研共用行動(茨城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江谷克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門・研究部門長

研究者番号：20223951

(2) 研究分担者

光田 展隆 (MITSUDA NOBUTAKA)
産業技術総合研究所生物プロセス研究部
門・主任研究員
研究者番号：80450667