



神戸大学大学院農学研究科 准教授 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

1. はじめに

生物発光に関する生物有機化学的研究の目的と意義は、以下のとおりである。

- 神秘的に発光する生物を目の当たりにし、「一体どのようにして発光しているのだろうか?」と素朴に抱く疑問が本研究における原点である。有機化学でどのように答えられるのか、という天然物化学の中心的題目に挑戦する学術的意義がある。生物種によって発光機構は異なるため、個々の生物に対する研究手法を確立しなければならない難しさが常につきまとう。そうした状況において本研究では、発光を司る化学構造に着目し、有機合成化学を駆使して分子プローブを合理的に設計し、機器分析を用いた分子間相互作用の解析による生物発光機構の解明を目指している。
- 生物発光に必要な分子種(生体成分)が明らかになると、これら生体成分の可視化手段として生物発光は利用できる。そのため、研究成果は周辺の研究分野における利用価値が極めて大きい。本研究は有機合成化学を基盤として展開しており、研究結果に基づいて非天然型分子を合理的に設計し、化学合成により供給できる長所がある。発光効率の向上や発光波長の改変が発光基質の化学修飾によって可能になるので、共同研究を展開するうえで大きく貢献できる。

本研究では、海洋発光生物であるトビイカとヒカリカモメガイについて、その発光タンパク質に関する生物有機化学的研究を行ってきた。この発光タンパク質は活性酸素種(ROS)で発光を開始する特徴があるので、ROSシグナル伝達の新しい可視化手段として利用が期待されるが、発光機構の詳細は不明であった。この発光を司る化学構造に着目し、発光機構を解明することを目的とした一連の研究により、以下に詳細を示す成果を上げることができた。

2. 発光タンパク質について

発光タンパク質には、アポタンパク質と発光基質が結合したクロモフォア(発光を司る化学構造)があり、このクロモフォアが酸化されると発光する。この酸化には発光を誘発する因子が必要であり、トビイカとヒカリカモメガイの発光タンパク質ではROSである。クロモフォアは酸化され過酸化物となり、これが分解するときに生じるエネルギーを光として放出し、発光後は酸化物となる(図1)。

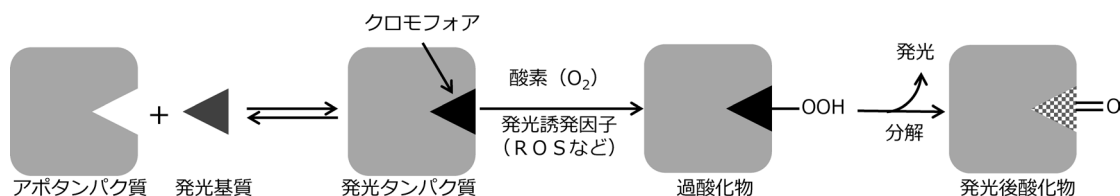


図1 発光タンパク質における発光機構の概略図

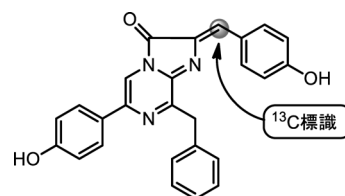
3. トビイカの発光タンパク質(シンプレクチン)

シンプレクチンは発光基質としてデヒドロセレンテラジン(DCL)を利用し、クロモフォア(発光を司る化学構造)を形成する発光タンパク質である。このクロモフォアの構造を証明するために、DCLを ^{13}C (100%)で同位体標識する独自の化学合成経路を開発した。安価なヨウ化メタン- ^{13}C を出発原料としてDCLを同位体標識することができた(図2)。

この ^{13}C 標識DCLと低分子チオール化合物からシンプレクチンモデルを再構成し、シンプレクチンの発光を再現することに成功した。同位体標識した炭素を手がかりに、発光前と発光後のクロモフォア構造を解析することで、シンプレクチンの発光機構を明らかにした。

次に、クロモフォア形成部位の特定を試みた。クロモフォアはシンプレクチンの状態では安定だが、ペプチド断片としたところ、DCLが脱落してしまい形成部位は解析できなかった。クロモフォアはDCLと平衡関係にあり、シンプレクチン中ではクロモフォアに偏っているが、タンパク質による安定化が消失するとDCLを放出した遊離型のほうが安定であった。そこで、DCLにフッ素を導入した非天然型基質を創製したところ、安定なクロモフォアが不可逆的に生成することがわかった(図3)。このフッ素化DCLを用いてシンプレクチンを再構成し、発光前と発光後のシンプレクチンをプロテアーゼで消化し、クロモフォアを含むペプチド断片を切り出し、質量分析で解析した。その結果、390番目のシステイン残基にDCLが結合してクロモフォアを形成していることを明らかにした(図3)。これはDCLを発光基質としている発光系で最初の証明例となった。

フッ素を2個導入したDCL誘導体は天然型基質よりも明るく発光することを明らかにし、シンプレクチンを生体成分の高感度検出手段として利用するうえで、最適な非天然型基質が創製できた。実際、フッ素化誘導体は共同研究者らにより植物細



デヒドロセレンテラジン (DCL)

図2 デヒドロセレンテラジンの構造と同位体標識部位

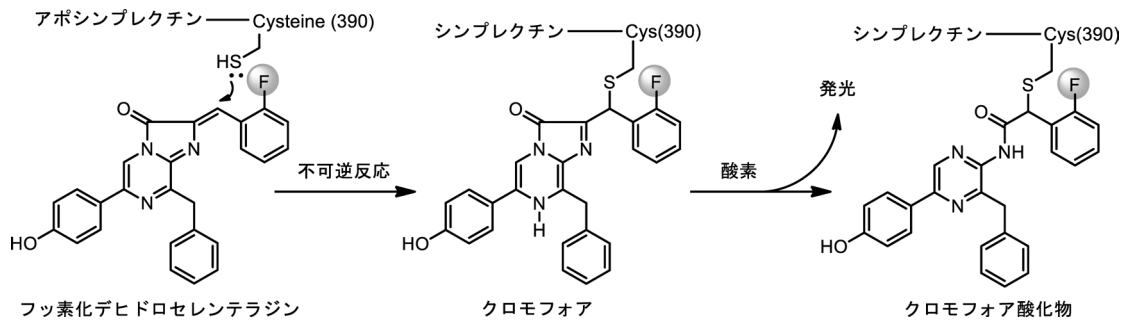


図3 フッ素化DCLはシンプレクチンの390番目のシステイン残基と安定なクロモフォアを不可逆的に生成し発光する

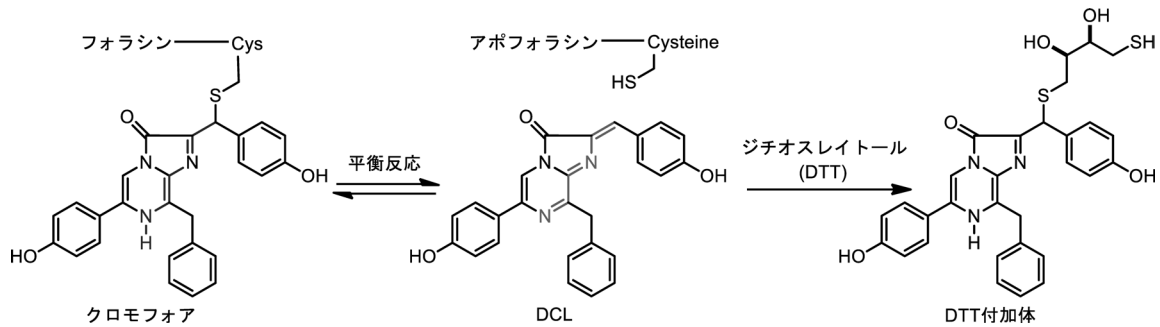


図4 フォラシリンのクロモフォアはDTTで処理するとDCLのDTT付加体へと変換される

胞におけるカルシウムイオンの可視化に利用されており、本研究成果を学際的な領域へと展開することができた。

また、発光タンパク質と基質がどのように相互作用して効率の良い発光を可能としているのか解明するために、光親和性基を導入した誘導体を合成した。この誘導体を用いた光標識実験により、活性部位における発光タンパク質の構造変化を明らかにした。これにより、発光タンパク質の活性部位における分子間相互作用を解明するための研究手法も確立できた。

4. ヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシリン）

フォラシリンはROSで発光するヒカリカモメガイの発光タンパク質であるが、発光に関与している低分子有機化合物の構造は120年以上も謎のままであった。ROSで発光する点がシンプレクチンと類似していることに着目し、DCLが発光基質ではないかと予想して研究を進めた。その結果、DCLを加えるとフォラシリンの発光強度が増加することを明らかにした。

フォラシリンにはクロモフォアがあることは予想されていたが、誰もその構造を決定することには成功していなかった。実際にクロモフォアの抽出を試みたが、タンパク質に安定に結合しているため直接抽出できなかった。DCLとタンパク質が安定に結合しているならば抽出は容易でないが、過剰の低分子チオールを加えれば、このクロモフォアを誘導体へと変換して溶出できるのではないかと予想した。実際にフォラシリンをジチオスレイトール (DTT) で処理したところ、DCLのDTT付加体としてクロモフォアを溶出させることに成功し、その分子構造を決定することに成功した。

以上の成果に加え、DCLを加えて再構成したフォラシリンの発光スペクトルが天然型フォラシリンの発光スペクトルと一致したことから、フォラシリンの発光基質はDCLであり、タンパク質と結合して発光を司るクロモフォアを形成していることを世界で

初めて解明し、120年以上続いた謎に終止符を打った(図4)。

おわりに

以上、DCLを基質とする発光タンパク質について、「発光を司る化学構造」に着目し、クロモフォア構造の解析手法の確立、効率よく発光する非天然型基質の創製、そして未解明だった分子種を特定し、発光機構を解明することに成功した。ROSで発光するタンパク質に関するこれらの生物有機化学的研究は世界的に例のない独創的なものであり、周辺領域への応用を見据えた学際的な研究へと発展させることができた。本研究成果はROSシグナル伝達を可視化する新たな手段を提供するものであり、今後の農芸化学分野において大きな貢献が期待できるものである。

謝辞 本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科、名古屋大学化学測定機器センター、名古屋大学物質科学国際研究センター、神戸大学大学院農学研究科において行われたものです。本研究の機会を与えてくださり、終始、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました磯部 稔先生(名古屋大学名誉教授、台湾國立清華大學教授)に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり有益なご助言や多くの励ましを賜りました西川俊夫先生(名古屋大学大学院生命農学研究科教授)、ならびに滝川浩郷先生(神戸大学大学院農学研究科教授)に心より感謝いたします。松田 幹先生(名古屋大学大学院農学研究科教授)、古市卓也博士(名古屋大学エコトピア科学研究所)をはじめ、本研究を支えてくださった多くの共同研究者の皆様に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただき、暖かい励ましを賜りました日本農芸化学会関西支部長・加納健司先生に厚く御礼申し上げます。