

電子科学研究科

GD

K

0005500285

R

409

静岡大学附属図書館

静岡大学 博士論文

甲虫生物発光における
酵素反応制御に関する研究



2005年1月

大学院電子科学研究科

電子応用工学専攻

龍福 正行

〈目次〉

第1章 序論

1.1 研究の背景	1
1.1.1 発光生物	
1.1.2 生物発光反応	
1.1.3 発光甲虫によるルシフェリン／ルシフェラーゼ反応	
1.1.4 発光甲虫における多様な発光とルシフェラーゼの構造	
1.1.5 発光甲虫による発光反応の用途	
1.1.6 発光甲虫による発光反応の産業への応用	
1.2 研究目的	22

第2章 カイコ産生鉄道虫 *Phrixothrix* 由来

赤色ルシフェラーゼ酵素の特性解析

2.1 研究の目的	25
2.2 実験方法	26
2.2.1 カイコ生産システムによる鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発現	
2.2.2 赤色ルシフェラーゼの分子量測定	
2.2.3 赤色ルシフェラーゼの発光スペクトル	
2.2.4 赤色ルシフェラーゼの発光反応ー1	
2.2.5 赤色ルシフェラーゼの発光反応ー2	
2.2.6 赤色ルシフェラーゼの熱安定性	
2.2.7 赤色ルシフェラーゼの pH 安定性	
2.3 結果及び考察	29
2.3.1 カイコ生産システムによる鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発現	
2.3.2 赤色ルシフェラーゼの発光スペクトル	
2.3.3 赤色ルシフェラーゼの発光反応	
2.3.4 赤色ルシフェラーゼの熱安定性	
2.3.5 赤色ルシフェラーゼの pH 安定性	
2.4 結論	38

第3章 還元剤 DTT に代わる有機イオウ試薬による反応制御

3.1	研究の目的	40
3.2	実験方法	41
3.2.1	試薬	
3.2.2	ルシフェラーゼ酵素溶液の調製	
3.2.3	発光試薬の調製	
3.2.4	ルシフェラーゼアッセイの測定法	
3.2.5	各種有機イオウ試薬による発光反応への影響	
3.2.6	各種有機イオウ試薬による発光キネティクスへの影響	
3.2.7	有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度による発光反応への影響	
3.2.8	有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度によるルシフェラーゼ酵素への影響	
3.3	結果及び考察	45
3.3.1	各種有機イオウ試薬による発光反応への影響	
3.3.2	ジチオカルバミン酸以外の有機イオウ試薬による発光反応への影響	
3.3.3	各種有機イオウ試薬による発光キネティクスへの影響	
3.3.4	有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度による発光反応への影響	
3.3.5	有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度によるルシフェラーゼ酵素への影響	
3.4	結論	56

第4章 産業用途への展開を目指した

ピロリン酸による発光甲虫発光反応の制御

4.1	研究の目的	58
4.2	実験方法	59
4.2.1	試薬	
4.2.2	発光試薬の調製	
4.2.3	発光試薬反応の測定法	
4.2.3.1	発光反応開始から 100 秒間までの短時間測定	
4.2.3.2	発光反応開始から 3 から 5 時間における長時間測定	
4.2.4	ルシフェラーゼアッセイ法 (短時間測定) におけるピロリン酸の作用	

4.2.5	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用	
4.2.6	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における ピロリン酸と有機イオウ試薬の影響	
4.2.7	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における異なるピロリン酸塩の影響	
4.2.8	ATPアッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用	
4.2.9	イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼの作成	
4.2.10	発光甲虫ルシフェラーゼの発光反応系への適用	
4.3	結果及び考察	66
4.3.1	ルシフェラーゼアッセイ法（短時間測定）におけるピロリン酸の作用	
4.3.2	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用	
4.3.3	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における ピロリン酸と有機イオウ試薬の影響	
4.3.4	ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における異なるピロリン酸塩の影響	
4.3.5	ATPアッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用	
4.3.6	イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼの発光スペクトル	
4.3.7	発光甲虫ルシフェラーゼの発光反応系への適用	
4.4	結論	83
第5章	結語	86
	引用文献	89
	研究業績一覧	95
	謝辞	96

〈略語〉

AED, diethyldithiocarbamate ammonium salt; ATP, adenosine triphosphate; AMP, adenosine monophosphate; BSA, bovine serum albumin; CBB, coomassie brilliant blue; cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CoA, coenzyme A; Da, daltons; DAD, diethyldithiocarbamic acid diethylammonium; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DNA, deoxyribonucleic acid; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HACCP, hazard analysis critical control point; HEPES, *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid); HTS, high-throughput screening; MaxRLU, maximum relative light units; mRNA, messenger ribonucleic acid; PPD, piperidine pentamethylene dithiocarbamic acid; PPI, pyrophosphoric acid; PPIK, Pyrophosphate potassium salt, PPINa, pyrophosphate sodium salt; RLU, relative light units; SBD, dibutyldithiocarbamate sodium salt; SBzD, dibenzylthiocarbamate sodium salt; SDS, sodium dodecyl sulfate; SED, diethyldithiocarbamate sodium salt; SMD, dimethyldithiocarbamate sodium salt; SMB-40, 2-mercaptobenzothiazole sodium salt; Tris, 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol;

第1章 序論

1. 1 研究の背景

1.1.1. 発光生物

甲虫のホタルに代表される発光生物が生み出す光は生物発光 (Bioluminescence) と呼ばれ、これを行う発光生物は、微生物、夜光虫、渦鞭毛藻の単細胞生物から、脊椎動物である魚類まで幅広い生物層にわたっている。Table1-1.に主たる発光生物ならびにその発光反応系を示す。

Table 1-1 発光生物の分類

分類(門・綱・目・科)	主な生物		発光系
細菌植物門	発光バクテリア	<i>Photobacterium</i>	L-L 反応
真菌植物門	発光キノコ	<i>Collybia</i>	L-L 反応
原生動物門			
鞭毛綱	夜光虫	<i>Noctiluca</i>	L-L 反応
渦鞭毛中類	発光性渦鞭毛藻	<i>Pyrocystis</i>	L-L 反応
腔腸動物門			
ハイドロゾア綱	オワンクラゲ	<i>Aequorea</i>	発光タンパク
花虫綱	ウミシイタケ	<i>Renilla</i>	L-L 反応
環形動物門			
多毛綱	発光ミミズ	<i>Microscolex</i>	?
	発光ゴカイ	<i>Odontosyllis</i>	L-L 反応
軟体動物門			
腹足類	ヒカリウミウシ	<i>Pilocamopherus</i>	L-L 反応?
頭足類	ホタルイカ	<i>Watasenia</i>	L-L 反応
	ラチア(淡水産笠貝)	<i>Latia</i>	L-L 反応

節足動物門

甲殻類

介形目	ウミホタル	<i>Cypridina</i>	L-L 反応
十脚目	深海発光エビ	<i>Oplophorus</i>	L-L 反応

昆虫類

ホタル科	北米産ホタル	<i>Photinus</i>	L-L 反応
	ゲンジボタル	<i>Luciola</i>	L-L 反応
ヒカリコメツキ科	ヒカリコメツキ	<i>Pyrophorus</i>	L-L 反応
ホタルモドキ科	鉄道虫	<i>Phrixothrix</i>	L-L 反応
イリオモテボタル科	イリオモテボタル	<i>Rhagophthalmidae</i>	L-L 反応

原素動物門

ギボシムシ	<i>Balanoglossus</i>	L-L 反応
-------	----------------------	--------

脊椎動物門

硬骨魚綱	ヒカリイシモチ	<i>Siphamia</i>	L-L 反応
	ヒカリキンメダイ	<i>Monocentris</i>	バクテリア共生
	チョウチンアンコウ	<i>Himatolophius</i>	バクテリア共生

生物発光は生物によってもたらされる発光の総称で、ホタルや夜光虫のように体内で光るものと、ウミホタルやラチア（淡水性笠貝）のように発光液を体外に放出して光る分泌型とがあるが、いずれの場合にも、発光物質を酸化するとき生じる化学エネルギーを光に変換させることにより発光させており、これら生物発光による反応は酵素系を触媒とした化学発光の一種とみなすことができる。化学発光とは、化学反応によって生じたエネルギー準位の高い1重項励起状態(S_1)の生成物が基底状態(S_0)の生成物に戻る際のエネルギー変化として蛍光を発する現象である (Fig.1-1) (1)。生物発光では1重項励起状態を経て基底状態生成物の生成に伴う化学反応により生じる発光までの一連の反応を酵素が触媒する。生物発光の大きな特徴に、高いエネルギー変換効率があり、この反応は熱を伴わない発光であることから「冷光」と

も呼ばれている。

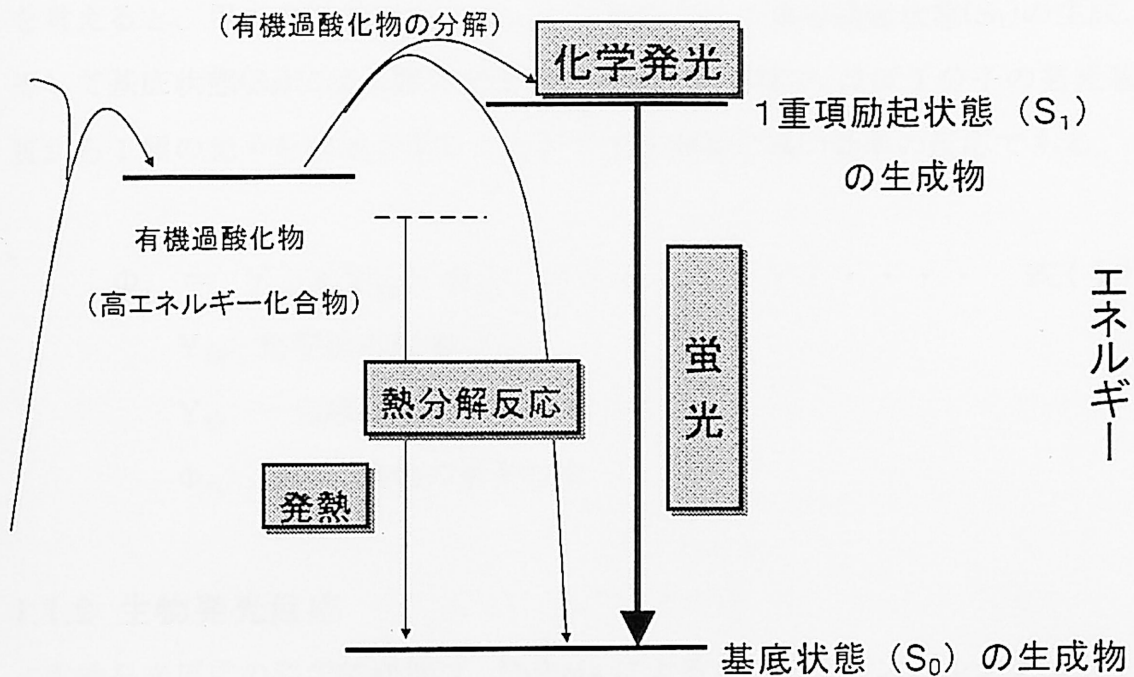


Fig.1-1 生物発光の化学エネルギーの概念図

主な生物発光の発光量子収率 (Φ_l) を Table1-2 に示す(2)。甲虫ホタルの発光量子収率は 0.88 ± 0.25 と報告されており(3)、知られている生物発光及び化学発光の中で最も高い効率のエネルギー変換系である。

Table 1-2 生物発光および化学発光の量子収率

	生物	量子収率
生物発光	発光細菌	0.12~0.17
	ウミホタル	0.28
	ウミシイタケ	0.05
	甲虫ホタル	0.88 ± 0.25
	オワンクラゲ	0.23
化学発光	Luminol	0.036

生物発光における発光量子収率 (Φ_L) は、以下の(1)式で表される(4)ことを考えると、甲虫の発光反応では、化学反応から1重項励起状態(S_1)の生成、そして基底状態(S_0)に戻る際の光子の発生までの過程で、ほぼ1分子の発光基質から1個の光子を放出させることができる非常に高い効率の反応である。

$$\Phi_L = Y_{CR} \times Y_{EX} \times \Phi_{FL} \quad \dots \dots \dots \quad \text{式(1)}$$

Y_{CR} : 化学反応収率

Y_{EX} : 一重項励起状態の収率

Φ_{FL} : 励起生成物の蛍光収率

1.1.2 生物発光反応

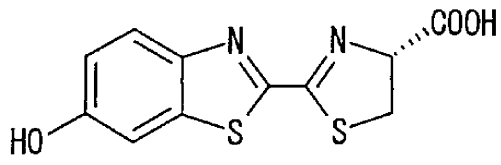
生物発光反応の科学的研究は、Duboisによるルシフェリン/ルシフェラーゼ反応(L-L反応)の提唱から開始されたと記録されている(5)。Duboisは1885年にヒカリコメツキ *Pyrophorus* の発光器官をすりつぶした破砕物の冷水及び熱水抽出を行い、発光反応が消失した冷水抽出液に熱水抽出液を室温で添加混合することにより *in vitro* で発光反応が再び開始されることを観察した。その後1911年にはカモメガイ *Pholas dactylus* でも同様にして発光反応を確認したことから、熱水抽出物には熱に安定な基質が、また冷水抽出物には熱に不安定な酵素が存在すると考え、そこでこれらに「光り輝くもの」という意味を持つ天使ルシフェルの名前から、基質にルシフェリン、酵素にルシフェラーゼと命名し、この両物質の混合によって引き起こされる発光反応をルシフェリン/ルシフェラーゼ反応(L-L反応)と呼んだ(5)。その後、Harveyの研究により、北米産ホタルや日本のウミボタル、バミューダ諸島のオヨギゴカイがL-L反応により発光反応を行っていることが確認(6)され、その後、Table1-1に示すとおり、多くの発光生物がL-L反応を行うことが見出されている。L-L反応以外の生物発光では、発光タンパクによる反応系が報告されている。この発光反応系では、アポタンパク、セラントラジン、酵素

分子の複合体にカルシウムイオンが結合することにより発光反応が生じる。発光タンパクによる発光系としては、北アメリカ沖に生息するオワンクラゲ *Aequorea Victoria* から、下村らによって発見されたエクオリンが知られている(7)。

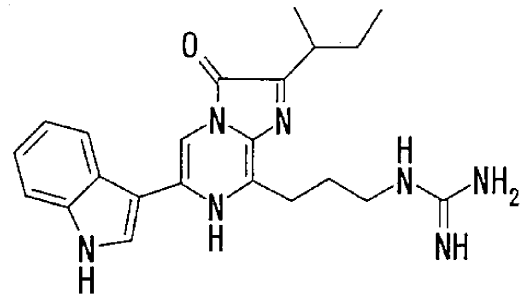
L-L 生物発光系の発光基質をルシフェリン、発光酵素をルシフェラーゼと総称しているが、これら基質と酵素は生物発光を行う反応ごとにそれぞれ異なる構造を持つ物質である。またそれぞれの生物由来の L-L 反応は特異性の高い酵素反応であることから、異なった生物由来の L-L は相互に互換性を示さないのが一般的である。

これまでに構造が決定された主な発光基質ルシフェリンには、ホタルルシフェリン(8)、ウミホタル(*Cypridina*)ルシフェリン (9)、ニュージーランド産発光貝ラチア (*Latia neritoides*)のルシフェリン(10)、北アメリカ産発光ミミズ(*Diplocardia*)ルシフェリン(11)、オワンクラゲやウミシイタケ等の海洋に生息する発光生物において最も多く使われている発光基質セランテラジン (Coelenterazine)(12-15)、発光性渦鞭毛藻(*Dinoflagellate*)ルシフェリン(16)があり、Fig.1-2 にそれらの構造を示す。広い生物種にわたって多種多様の発光生物が見出されているにもかかわらず、多くの発光生物は同じ構造の発光基質を共有している場合が多い。海洋発光生物では、発光基質としてセランテラジン、ウミホタルルシフェリンが広く用いられており、節足動物門の甲虫類の発光甲虫では、共通したホタルルシフェリンを用いて発光反応を行っている。

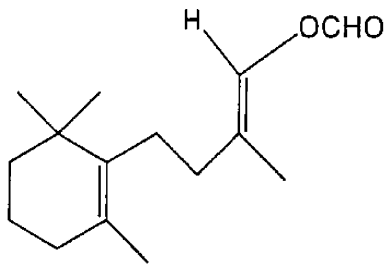
これに対して発光酵素であるルシフェラーゼは、個々の発光生物において異なっており、同じ構造のルシフェリンを有していてもルシフェラーゼ構造は異なる。これまでに甲虫ホタル科の北米産ホタル *Photinus pyralis* (17)やゲンジボタル *Luciola cruciata* (18)を始め、ウミボタル *Vargula hilgendorffii* (19)、ウミシイタケ *Renilla reniformis* (20)、渦鞭毛藻 *Lingulodinium polyedrum* (21)、など各種発光生物のルシフェラーゼ酵素の cDNA クローニ



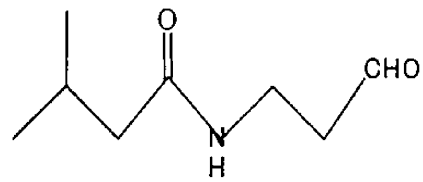
ホタルルシフェリン



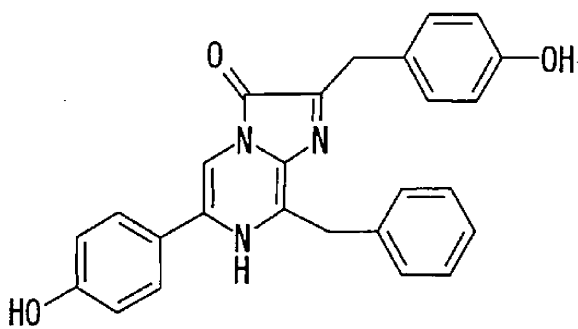
ウミホタルルシフェリン



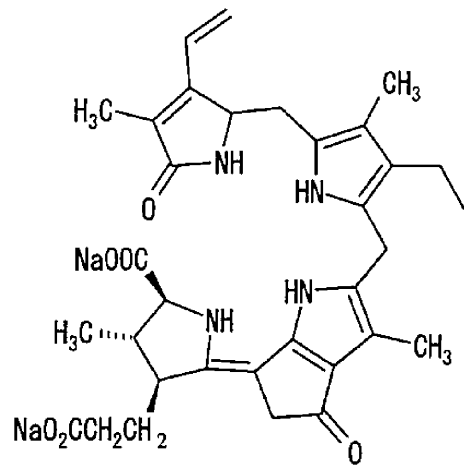
発光貝ラチアルシフェリン



発光ミミズルシフェリン



セランテラジン



渦鞭毛藻ルシフェリン

Fig.1-2 発光生物のルシフェリン

ングが行われ、タンパクの一次構造が決定されている。これらの研究により、それぞれの発光生物が持つルシフェラーゼ酵素は、生物分類で門や綱での相違はもちろん、種のレベルでさえ互いに異なる遺伝子配列、さらにはアミノ酸配列が異なるタンパク質であることが示されている(2)。

1.1.3 発光甲虫によるルシフェリン/ルシフェラーゼ反応

多くの発光生物由来ルシフェラーゼの中でも、陸棲で収集が容易なこともあり、早くから研究が開始されたのが発光甲虫である。発光甲虫は正確には節足動物、昆虫亜綱、鞘翅目に属し、ホタル科、ヒカリコメツキ科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科の4科から構成される。それぞれの科を代表するルシフェラーゼの一次構造は明らかとなっており、これら一連の発光甲虫のルシフェラーゼは、アミノ酸543~550個から成る分子量約60kDaのタンパク質であり、共通する発光基質(d-ルシフェリン: d-(·)-2-(6'-hydroxy-2'-benzothiazoryl)-Δ²-thiazone-4-carbonic acid)さらにはATP(Adenosine-triphosphate)、マグネシウムを用いて生物発光反応を行う(2)。

発光甲虫のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応では、発光基質であるホタルルシフェリンは、Mg²⁺イオンの存在下、ルシフェラーゼ酵素の作用によりATPとエステル化してルシフェリル-AMP(アデノシン-1リン酸)に変換される。続いてルシフェラーゼ酵素は、ルシフェリル-AMPと酸素とを反応させ、パーオキシドアニオンを経た後に酵素内にて不安定なジオキセタンを生成させる(22, 23)。このジオキセタン構造は、ルシフェラーゼ酵素内でCO₂とオキシルシフェリンの2種類のカルボニルに開裂する際、一重項励起状態のオキシルシフェリンを生成し、これが過剰のエネルギーを放出して基底状態に戻る際に光を発する。発光甲虫のルシフェラーゼ酵素は、Fig.1-3に示すこれら一連の反応を触媒する(24, 25)。

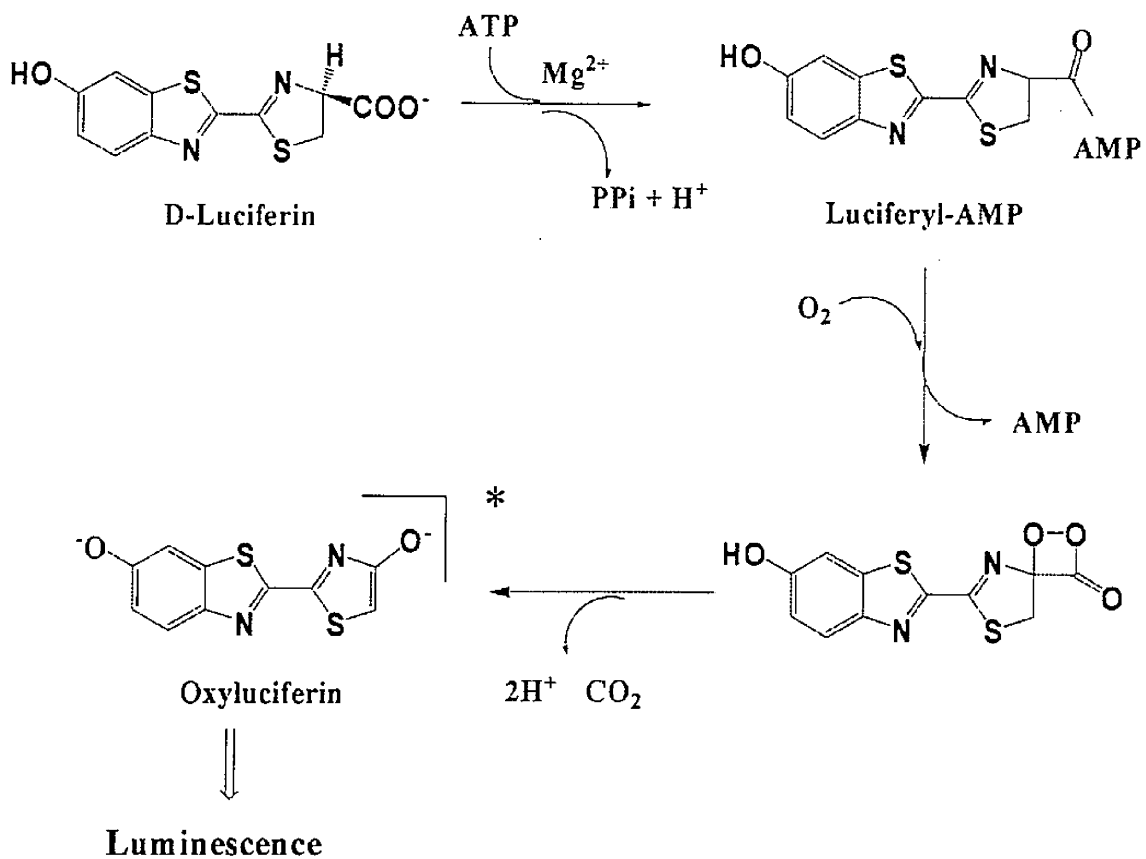
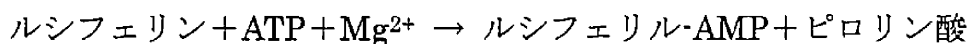


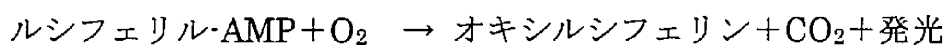
Fig.1-3 ホタルルシフェリンの化学発光反応式

このように発光甲虫ルシフェラーゼ酵素は、発光基質ルシフェリンを用いて、以下に示す(a)ATP リガーゼ活性に続き、(b)オキシゲナーゼ活性の2種類の酵素反応活性を併せ持つものと考えられる。

(a) ATP リガーゼ活性



(b) オキシゲナーゼ活性



発光甲虫の発光器官内で普通に行われているこの発光反応を、試験管内 (*in vitro*) で再現させようとする場合、従来、発光は瞬間的に立ち上がる一方その後急速に減衰する Flash タイプの発光パターンのみが得られていた。これ

に対し、補酵素 A(Coenzyme A : CoA)とジチオスレイトール(Dithiothreitol : DTT)とを北米産ホタルルシフェリン/ルシフェラーゼにおける *in vitro* 反応系に加えることにより、得られる発光量自体が著しく増強され、かつ発光の減衰が抑えられた Fig.1-4 に示すような長時間発光を継続する Glow タイプの反応系が確認された(26-28)。

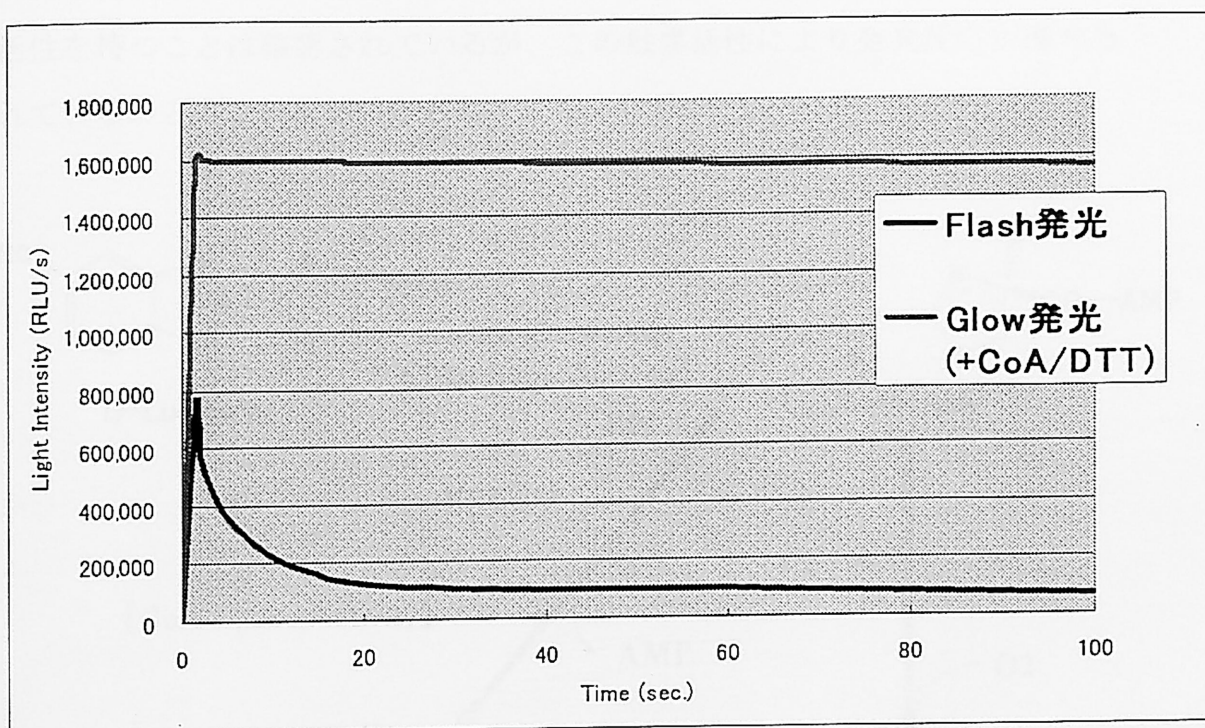


Fig.1-4 従来の Flash 発光と CoA/DTT 添加による Glow 発光との比較

in vitro 反応系で、Flash タイプの発光から Glow タイプの発光が得られるようになった理由を説明すべく幾つかの試みが為されている。まず Airth らは、発光反応の結果生成されるルシフェラーゼ酵素の活性部位に結合したまま以降の酵素によるターンオーバーを強く阻害するオキシルシフェリンに CoA が作用し、オキシルシフェリル-CoA を形成することから、ルシフェラーゼ酵素活性部位からのオキシルシフェリンの遊離を促す可能性を提案した(29)。また Wood は、発光甲虫由来ルシフェラーゼが、長鎖脂肪酸 CoA リガーゼや

中短鎖アセテート CoA リガーゼ、植物系 4-クマレート CoA リガーゼと高い相同性を有していることに着目し、ルシフェラーゼには前述の(a)ATP リガーゼ活性、(b)オキシゲナーゼ活性に加え、(c)CoA リガーゼ活性を併せ持つと推測し、ルシフェリル-AMP に CoA が作用しルシフェリル-CoA を形成した後、酸化されて発光が生じるといった Fig.1-5 に示す新たな発光反応のスキームを提唱した(30)。ただし、甲虫ルシフェラーゼが ATP 依存性の CoA リガーゼ活性を持つことは確認されているが、この触媒活性により発光反応が進められているかどうかの検証はなされていない(31)。

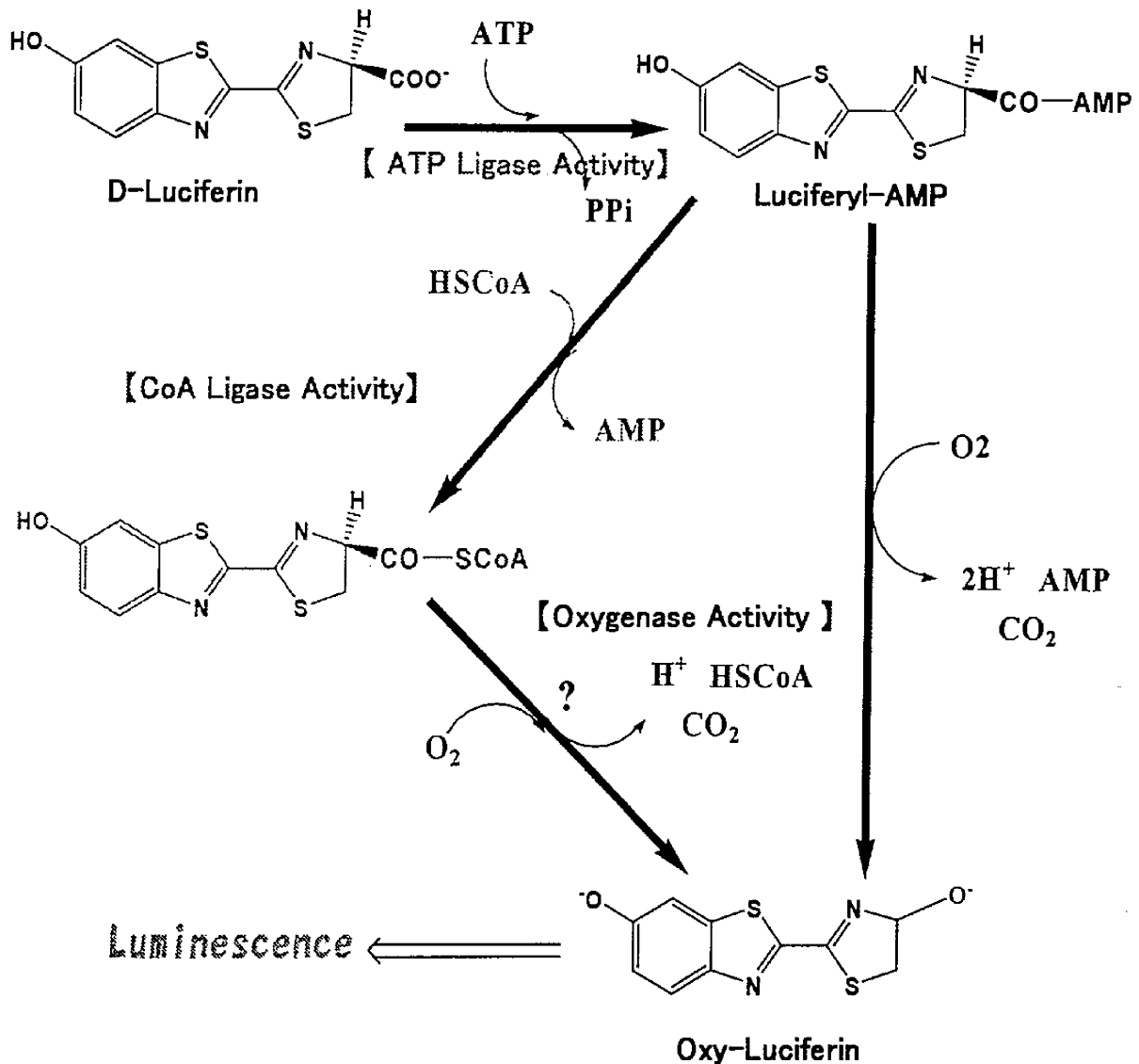


Fig.1-5 CoA を介した際に推定される発光甲虫ルシフェラーゼによる発光反応

DTT は、その構造に SH 基（チオール基）を持ち、一般的には反応溶液中の還元剤として用いられており、Ford らは 5mmol/L の DTT が溶液中でのルシフェラーゼ酵素を安定化させる効果を報告している(32)。また CoA に比べ 10~100 倍と非常に高い濃度の DTT を用いることで、長時間持続する発光反応が得られているが、これはルシフェラーゼ酵素の不活性化が DTT によって抑制されたためと考えた(27)。さらに過剰濃度の DTT は、CoA の SH 基を還元型に維持することから CoA の持つ発光活性を保持する働きがある、との説もある(33)。しかしながら数ある還元剤の中で DTT だけがなぜ用いられているのか、またそれほどの高濃度を必要とするのかについての詳細は、未だ明らかにされていない。また、システイン残基を変異させたホタルルシフェラーゼはその発光活性に著しい変化が認められないことから、酵素が持つチオール基の側鎖は必ずしも発光反応に必要ではないことが示されている(34)。このように *in vitro* での発光甲虫ホタルによるルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応を Flash 発光から Glow 発光へと長時間継続させる効果を持つ CoA ならびに DTT ではあるが、両者が果たす発光反応の制御におけるメカニズムは明らかとされないままとなっている。なお CoA と DTT はその化学構造に共にチオール基を有しているため、広義にチオール類あるいはチオール試薬と呼ばれる。これらチオール試薬類は、その構造上チオール基を持つため、特に高濃度の水溶液中では劣化し易く、溶存酸素などにより酸化もしくは劣化されたチオール試薬類は、ルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光反応を著しく阻害する。

チオール試薬以外で *in vitro* での発光甲虫による発光反応を長時間持続させる方法としては 2 種類ある。ひとつは、反応系に AMP を添加し、ルシフェリル-AMP からジオキセタンへの反応プロセスを競合阻害させる方法(35)、もう一方は炭酸ガスを反応溶液に溶解させ、ジオキセタンからオキシルシフェリンへの反応プロセスを競合阻害させる方法(36)である。両方法とも共通してチオール試薬による反応の長時間発光化とは異なるアプローチとして競

合阻害を利用しており、一連の発光反応で生じる反応生成物を介在させることにより発光反応の速度を制御し、発光反応の長時間持続を可能としたものと推察される。これに対し、ルシフェリンからルシフェリル-AMPへの反応プロセスにおける反応生成物であるピロリン酸を反応系に添加することにより、AMPや炭酸ガスと同様の発光反応の阻害による長時間発光化への効果が同様に期待される。しかしながらピロリン酸は発光甲虫ホタルルシフェリン/ルシフェラーゼによる生物発光反応に対して阻害的に作用する(37)と広く考えられている。ただし、生物発光反応がある程度進行して発光強度が低下した時点でピロリン酸を反応溶液に供給するという特殊な条件下であれば一時的に強い発光が生じる現象が観察されるといった報告(38)以外、発光反応の長時間化における研究例はない。ピロリン酸による発光強度の一時的な向上は、発光後にオキシルシフェリンはルシフェラーゼと複合体を形成し阻害剤として働くが、ピロリン酸の存在によりシフェラーゼの解離を促進し、酵素のターンオーバーを回復させるためであると考察されている(39)。この作用は Airth が唱えた CoA と同様の作用(29)をピロリン酸も持つことを意味するが、両化合物についてこれらの効果の検証や応用を目的とした研究例はない。

1.1.4 発光甲虫における多様な発光とルシフェラーゼの構造

4科に分類される発光甲虫が持つルシフェラーゼ酵素におけるアミノ酸残基の一次構造の相同性は、ホタル科の北米産ホタルを対照とすると、ホタル科内で60~90%、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科で50~60%、ヒカリコメツキ科で50%程度と、互いに遺伝子やアミノ酸の一次構造上において顕著な相違が進化の過程で生じていることが示されている(40)。

科の異なる甲虫由来のルシフェラーゼ反応において、ゲンジボタルや北米産ホタルに代表されるホタル科の発光甲虫成虫では、オスとメスの交尾に先立つ交信のために鋭く明滅するフラッシュ状の発光を示すこともあるが、ホ

タルモドキ科に属する鉄道虫、イリオモテボタル科に属する発光甲虫では、より持続的な発光を示すことが知られている。さらには、成虫では鋭い明滅を行うゲンジボタルでも、幼虫や蛹の状態では、長時間にわたり持続的な発光をしていることが観察されている。これらの発光パターンの相違が、それぞれの発光甲虫が持つ個々のルシフェラーゼにおける構造上の違い、あるいはそれぞれの発光反応に及ぼすルシフェラーゼ酵素の分子機構の違いに依るものとの推察されているが、その詳細については不明な点が多い。

さらに、発光甲虫が行う発光反応の違いで際だった例としては、発光色の違いがあり、これまで北米産ホタルでは黄緑色(41)、ヒカリコメツキでは緑色からオレンジ色(42)、ホタルモドキ科の鉄道虫では緑から赤色(43)など、互いに異なる多彩な発光色を放つことが報告されている。

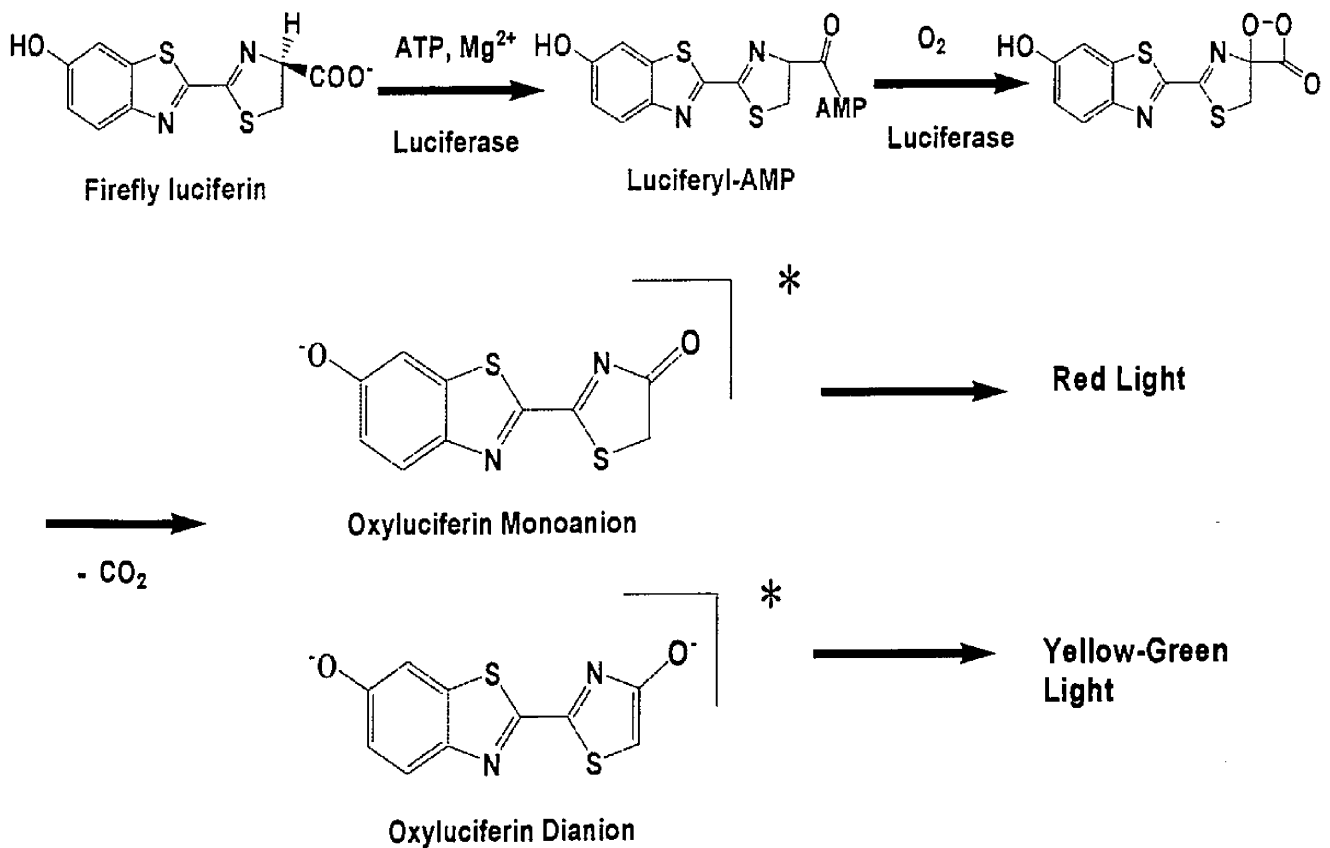


Fig.1-6 ホタルルシフェリンの化学発光反応式

発光甲虫ホタルにおけるルシフェリン／ルシフェラーゼ反応で異なる発光色が生じるメカニズムとして、一重項励起状態のオキシルシフェリンモノアニオンの化学構造が基底状態に戻る時には赤色の発光が、またモノアニオンが脱プロトン化された励起一重項状態のジアニオン構造を経て基底状態に戻る時には黄緑色の光を発するといった、Fig.1-6 に示す化学発光の反応式による説明(23-25)がなされている。この赤色もしくは黄緑色の発光色の相違は、反応溶液中の pH、あるいは酵素活性部位内の構造によって生じると考えられている(4)。その考え方に拠れば、ホタル科由来のルシフェラーゼによる発光反応では、反応溶液中の pH により異なる発光色が得られる。これは一重項励起状態でのオキシルシフェリンからの反応が、酸性条件下では脱プロトン化が行われていないモノアニオン型励起状態を経由するため赤色に発光し、中性付近の反応溶液やホタル体内ではジアニオン型励起状態を経るため黄緑色に発光するからであると考えられている(45)。すなわち発光反応溶液の pH が励起状態のオキシルシフェリンにおける脱プロトン化の有無ならびに互変異性に影響を与えることにより発光色の相違が生じる、と化学発光の反応メカニズムにより説明されている(46)。

一方、ホタルモドキ科、ヒカリコメツキ科、イリモモチボタル科などホタル科以外の発光甲虫由来の発光反応では、反応溶液中の pH 変化では発光色が変化しない特徴を持つルシフェラーゼであることが確認されている(47)。このためホタル科由来のルシフェラーゼを pH 感受性、それ以外を pH 非感受性と定義し、それぞれについてさまざまな変異体を用いた研究が進められた(40)。その過程で、同一の発光基質を用いる発光反応でありながら2種類のタイプの酵素で pH に対する発光色の感受性が生じる理由として、双方のルシフェラーゼ酵素の活性中心構造の差異が影響している(48)と考察されている。

進化の過程で科や種に分岐したそれぞれの発光甲虫ルシフェラーゼ酵素一次構造の相同性に明らかな相違が見出されている(40)ことは、発光甲虫由来

のそれぞれのルシフェラーゼが構造的に広範な多様性を持っていることを示している。このルシフェラーゼ酵素の構造が持つ多様性により、共通の発光基質ルシフェリンを用いていながら、異なる発光パターンや pH 感受性、さらには多彩な発光色など、個々の発光甲虫が示す発光特性が影響されていると考えられている(2)。特に発光色については、科や種によって異なるばかりでなく、ルシフェラーゼのアミノ酸残基を一つ改変するだけでも発光色が多彩に変化することが確認されている(49-53)。また、さまざまな発光甲虫が行う発光色の違いは、オキシルシフェリンの励起状態が、モノアニオンかジアニオンかを定めるルシフェラーゼ活性部位により決定されることが考えられている(4)ため、酵素内活性部位構造上におけるオキシルシフェリンの励起状態に影響を与えるアミノ酸残基を特定する試みが注目された(40)。これまでさまざまなルシフェラーゼの一次構造と遺伝子工学的手法を用いた変異体との構造相関性などにより、発光色の変化に影響を与えるいくつかのアミノ酸残基が特定され、活性部位の構造と発光色の変化における多くの知見が集積されてきている(40)。

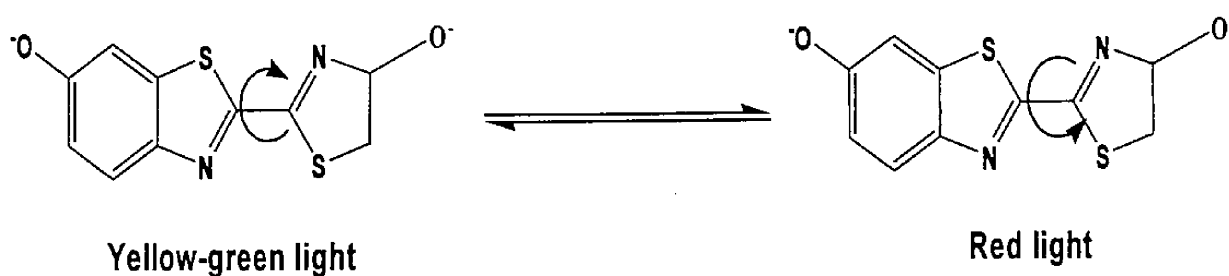


Fig.1-7 発光甲虫ホタルの発光色の決定(回転角理論)

発光色は赤色から緑色、つまり最大発光波長 530nm から 620nm にわたり、単純にルシフェラーゼ酵素活性部位における励起状態のオキシルシフェリンによる互変異性では説明できないと考え、McCapra により、ホタルルシフェリンはベンゾチアゾリン環とチアゾール環が C-C 結合で結合した特異な構造

を有しており、ルシフェラーゼ活性部位内の構造によって決定されるこの二つの環の間で生じる二面角の角度によって、オキシルシフェリンの π 共役系に影響を与え、発光色に大きな影響を与えるとの説（回転角理論）も発表されている(Fig.1-7)(54)。この説を証明するためには、異なる角度を持つルシフェリンとルシフェラーゼ複合体の高次構造の解析を行い、その結果を待たなければならない。

ルシフェリンやそのアナログとの複合体としての酵素の構造解析は解明されていないため、活性部位の明確な解明には至っていない。発光甲虫が行う多様な発光反応や発光機構は、ルシフェラーゼ酵素の構造自体に大きく依存しているため、今後、発光甲虫が行う発光パターンや pH 感受性、さらには発光色の違いなどの多様な発光反応について、ルシフェラーゼの高次構造モデルを基に解明が進むことが期待されている。

1.1.5 発光甲虫による発光反応の用途

人類が知る上で最も高効率な反応である特徴を利用した発光甲虫由来のルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光反応システムは、既に幾つかの用途で実用化されている。このシステムはホタル科の北米産ホタル由来の発光反応系を主として用いており、発光で生み出された可視光が持つ感度の高さと極めて低いバックグラウンドなどの特長により、その適用分野が飛躍的に拡大されている。発光甲虫ホタル由来のルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光反応を活用するにあたり、大別して2つの方向から進められている。

第一の方法は、発光基質ルシフェリン、補因子 ATP と Mg^{2+} が過剰に存在する反応条件では、得られる発光量はルシフェラーゼ酵素量と直線的な一次相関となる点を利用したルシフェラーゼ量の測定（ルシフェラーゼアッセイ法）がある。また第二の方向は、発光基質ルシフェリン、ルシフェラーゼ酵素と補因子 Mg^{2+} が過剰に存在する反応条件では、得られる発光量は ATP 量と直線的な一次相関となる点を利用した ATP 量の測定（ATP アッセイ法）が

あり、それぞれが実用化されている(40)。

ルシフェラーゼアッセイ法の主要な用途には、遺伝子の作用機序や細胞内の代謝機構などを明らかにするためのレポーター遺伝子アッセイ法(56)がある。レポーター遺伝子とは、細胞などに DNA の形態で導入（トランスフェクション）されて、DNA から mRNA を経て酵素が合成される過程をモニターする研究において用いられる。一般的に、DNA から mRNA が合成される過程は転写と呼ばれるが、レポーター遺伝子アッセイでは、最終産物の酵素量を計測することにより、遺伝子が発現された度合いを示す「転写活性」を測定することを主たる目的としている。

この用途では、発光甲虫由来のルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用い、細胞内に導入されたルシフェラーゼ遺伝子(DNA)から合成されるルシフェラーゼ酵素の量を測定することから転写活性を測定する。細胞内で合成されたルシフェラーゼ酵素の量は、これと一次相関する発光の量として計測される。例えば、解析対象のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたベクターを培養細胞にトランスフェクションし、培養を行う。細胞の増殖過程で、プロモーターの転写活性が強ければ細胞内に多くのルシフェラーゼ酵素が産生され、また、活性が弱ければルシフェラーゼ酵素の産生量が低下する。一定時間経過後、細胞を破砕し、発光基質ルシフェリンや ATP などを含む基質溶液（ルシフェラーゼアッセイ発光試薬）を加え、ルシフェリン／ルシフェラーゼの発光反応を行わせることにより、ルシフェラーゼ酵素の量を高感度かつ簡便に定量することができ(57)、これにより遺伝子の転写活性も評価できる。ルシフェラーゼアッセイ法は、遺伝子発現の解析（プロモーター、エンハンサーの転写活性解析）(58)、細胞中の mRNA の作用機序の解析(59)、レセプターや転写因子など遺伝子調節機能を持つ蛋白質の構造と作用機序の解明(60)、トランスジェニック植物・動物における器官特異的な発現様式の解析(61)、ウイルスや細胞のマーカー(62)などに利用することができる。

発光甲虫ホタルによるルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の産業用途へ最も早く適用された手法が ATP アッセイ法である(63, 64)。ATP は分子量 507.2 の高エネルギー物質であり、生物における種々の代謝活動に関与している。動物、植物、微生物など全ての生物は、代謝経路を介してエネルギーを一時的に ATP という形で体内に貯蔵し、必要に応じて ATP を分解し、エネルギーを得ている。そのため ATP は、生命代謝に必須な物質とされ、生命活動を行っているどのような細胞にもこの ATP が存在する。そのため、ATP 量を定量する事で、生細胞がどの程度存在しているかが推定することができる。発光甲虫ホタルによる発光反応を用いた ATP アッセイ法により、高感度 ($10^{-12}M$)かつ広いダイナミックレンジ(3~6桁)において ATP 量の定量を行うことができる。

ATP アッセイ法の主要な用途としては大別して2分野がある。ひとつは食品の衛生管理に関わる分野であり、近年は食品製造環境における衛生管理手法のひとつとして原材料から製品に至るまでの一連の行程における安全性の管理を目的とする HACCP(Hazard Analysis Critical Control Point)が重要視されている傾向から、食品中の微生物が持つ ATP 量を迅速に測定する生菌数測定への用途(65)を始め、食品加工ラインにおける清浄度管理として生物に起因する汚染の指標を ATP 量として測定する方法(66)が広く用いられてきている。もうひとつの ATP アッセイ法の主要な用途には研究分野があり、アポトーシス(細胞の自然死)に関わる研究で重要な酵素と考えられているアピラーゼ(ATP 分解酵素)の活性測定として ATP 量の減少を測定する方法(67)を始め、細胞が持つ ATP 量から細胞数を測定する手法(68)、さらにはその延長線上に、細胞の増殖試験(69)や細胞に対する薬剤の毒性試験(70)等への用途が実用化され広く用いられている。

1.1.6 発光甲虫による発光反応の産業への応用

これらルシフェラーゼアッセイ法ならびに ATP アッセイ法として既に実用

化された発光甲虫ホタル由来のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応では、*in vitro*での発光反応を行わせ、専用のルミノメーターと呼ばれる測定機により得られる発光量の測定が行われる。従来、*in vitro*で発光反応を行わせた場合、その発光パターンはFlash発光のみが得られ、発光量の急激な増加の後に短時間に減衰し消失してしまう特徴が、産業用途への実用化に向けた最大の問題とされていた。このため生物発光反応を正確に測定する場合には、感度と精度を維持するために反応時間の厳密な制御と、発光反応の開始とともに始まる瞬間的なFlash発光を捉えるための試薬が自動注入できる特別な機構を持つ装置（ルミノメーター）が必要とされていた。

これを改善すべく、ルシフェラーゼアッセイ法では1.1.3で前述したCoAやDTTなどSH基を持つチオール試薬を添加することから発光反応を制御する方法が試みられ、これにより発光の半減期（※発光反応開始からその発光強度が半分に減衰するまでに要する時間）がおよそ5分間と延長され、かつ発光量を増大させた*in vitro*でのGlow発光系が確立された(27)。この方法により、ルシフェラーゼによる発光量の正確な測定が試薬の自動注入装置を持たないルミノメーターや液体シンチレーションカウンターによっても可能となり、培養細胞の中でレポーターとして発現されたルシフェラーゼを高感度で測定するレポーター遺伝子アッセイ法に広く用いられるようになった。

その後、発光甲虫ホタル由来のルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子アッセイ法により、遺伝子の転写活性に薬効が期待される薬剤開発に利用される研究開発が注目され、製薬メーカーにおける薬剤開発の一環として多検体のサンプルに対するハイスループットスクリーニング(High-throughput Screening : HTS)法が発光甲虫ホタルのルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応によって実施されるようになった。このHTS法では、各製薬メーカーが保管する薬効が確認または未知なリード化合物を基本骨格として、合成可能なあらゆる置換基等を付加した化合物を数十万種類から数百万種類合成し、それぞれの化合物が持つある特定の遺伝子に対する転写活性が測定されスク

リーニングが行われる。本手法ではできるだけ多量の化合物の検体をどれだけ迅速かつ効率的に測定できるかが重要となっている。HTS 法では、発光反応を開始させるための試薬の分注装置、発光量の測定装置など一連の機器類がロボット化され、発光反応を行う測定プレート（96 検体／枚、384 検体／枚、1156 検体／枚など）上の全ての検体からの発光量を順次測定し、データ解析を行う。このため、CoA や DTT などのチオール試薬によって制御された発光半減期 5 分間程度の発光反応では、各々のサンプルに対して随時試薬を添加してその度ごとに発光量の測定をしなければならないため、HTS 法に適した発光反応としては充分ではなかった。HTS 法では、一旦開始された発光反応ができるだけ長時間にわたり一定な発光強度を示すよう、数時間レベルまでの発光半減期の延長が望まれていた。このニーズに対応し、チオール試薬で制御された発光反応系にさらに AMP を添加する方法(35)や、炭酸ガスを溶解させる方法(36)で発光反応を制御し、発光反応開始後、数時間レベルまで発光半減期の延長を可能とする手法が確立された。これらホタル発光反応に対する制御法の開発により、ルシフェラーゼアッセイ法は創薬市場における HTS 法のスタンダードな手法として実用化され定着されてきている。しかしながら、これら *in vitro* 発光反応に必須の CoA や DTT のチオール試薬は、試薬として非常に高価であり、また前述したチオール基の酸化や劣化による発光阻害を防ぐため -80°C の保管に努めなければならない等、これらチオール試薬を産業用途で使用するにあたってはコスト面での問題を残している。

ルシフェラーゼアッセイ法と同様に、ATP アッセイ法においてもリード化合物から合成された化合物の細胞に対する毒性試験や増殖試験を行うにあたり、HTS 法の導入が開始されている。このようにこれまで実用化されてきた *in vitro* での発光甲虫ホタルによるルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応を活用した二つの用途では、その反応を制御することにより、できるだけ一定な発光強度を持つ発光反応系の実現が、産業用途での応用を円滑にするために強く望まれている。

1.1.4.で前述したさまざまな発光甲虫から得られる発光反応の色調の違いを活用した検出系を実用化させることにより、既存の発光甲虫による発光反応の高機能化につながり、産業用途でさらに活用されることが期待されている。

上述のルシフェラーゼアッセイ法では、発光甲虫ホタルによる発光反応は実際の実験系ではさまざまな外的要因により得られる発光量が大きく影響を受け、厳密な意味での転写活性の比較データの評価が困難とされている(71)。このため、基質特異性の異なる別種のルシフェラーゼ遺伝子（例えばウミシイタケルシフェラーゼなど）を内部標準レポーターとして併せて細胞に導入し、二種類のルシフェラーゼ活性を個々に測定することから内部標準レポーターに対する対象レポーター（ホタルルシフェラーゼ）の転写活性効率を決定する、いわゆる、デュアルルシフェラーゼアッセイ法も研究分野では一般的に用いられている(72)。しかしながら、本法ではホタルルシフェリンに比べて極めて高価なセランテラジン（ウミシイタケルシフェリン）を使用し、かつ一方の発光反応（ホタル）を消光させてからもう一方の発光反応（ウミシイタケ）を測定するなど複数の測定ステップを必要とすることから、HTS法など産業用途への適用が進んでいなかった。

これに対し、発光甲虫由来で発光色の異なるルシフェラーゼは共通の発光基質で発光反応を行う。そこでウミシイタケルシフェラーゼの代わりに、例えば鉄道虫由来の赤色発光ルシフェラーゼを用い、従来用いられてきた黄緑色の北米産ホタルルシフェラーゼを同時に発光させ、それぞれの色調の差異と発光量を示す発光スペクトルをフィルターで分離できれば、それぞれの発光量を一回の測定ステップで定量できる。この発光甲虫の多様性のひとつである発光色の違いを活用することにより、従来の1反応1シグナルから、ひとつの反応で複数のシグナルが同時に得られ、発光反応によって得られる情報量が格段に向上する。Nakajimaらは、鉄道虫由来の赤色および緑色ルシフェラーゼを用い、二つの転写活性を同時かつ簡便に評価できることを示し

た(73)。1回の反応で複数の遺伝子情報が同時に測定できるアッセイ系が今後産業用途において実用化された場合、現在創薬メーカーで盛んに進められている単色光（単一シグナル）ルシフェラーゼによるゲノム創薬開発にむけた HTS 法の効率を格段に向上させることが期待されている。

このように発熱を伴わないエネルギー効率が最も高い発光甲虫による発光反応は、その発光反応自体の制御への可能性や発光色などの多様性をさらに有効に活用させることにより、産業用途においても用途は飛躍的に拡大することが期待されている。

1.2 研究目的

発光甲虫が行うルシフェリン/ルシフェラーゼ反応において、その発光パターンや発光色、さらには pH に対する感受性などの特性は、由来する科や種さらにはアミノ酸の変異により異なった特性を示すといった興味深い特徴を持つ。これら発光反応における多様性は、反応を触媒するルシフェラーゼ酵素が持つ構造の差異に大きく依存しているが、さまざまな特性を示す発光甲虫の発光反応とルシフェラーゼ酵素が持つ構造との相互作用については未だ不明な点を多く残している。

発光甲虫による発光反応の産業用途への応用展開において、新たに見出されてきたホタル科以外の発光甲虫由来のルシフェラーゼ発光反応では分離可能な異なる色調を持ち、さらには pH に色調が影響されない特徴を活かすことにより、多色同時発光系などさらに高機能化された生物発光反応の用途開発が検討され始めている。しかしながら、これらホタル科以外の発光甲虫由来ルシフェラーゼによる発光反応は、それぞれが個々の生態に適応した固有の発光のパターンを持ち、進化の過程でそれぞれのルシフェラーゼの構造においても顕著な多様性を持つ。このため同一の発光基質ルシフェリンと ATP、 Mg^{2+} イオンを用いて発光反応を行うにもかかわらず、個々の発光反応につい

て、従来試みられてきたホタル科北米産ホタル由来のルシフェラーゼとは異なったそれぞれの最適化された反応条件、言い換えれば最終目的である *in vitro* で計測を可能とする発光反応系の構築が必要とされる。これまで多くのアプローチにより試みられてきたホタル科由来ルシフェラーゼによる発光反応を制御する際に得られたさまざまな知見をベースに、さらにはこれまで部分的に明らかとされてきた各種ルシフェラーゼ酵素の構造が与える発光反応への影響に対する知見を活かし、本研究では、ホタル科以外の新規の発光甲虫による発光反応についても実用化を目指すべく研究を行った。本研究において検討した発光甲虫として、ホタルモドキ科由来のルシフェラーゼとして鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来の赤色ルシフェラーゼ(51)を中心に、さらにはイリオモテボタル科由来のルシフェラーゼとして *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ(74)、さらにはその部位特異的変異体として作成した橙色ルシフェラーゼを用いた。

発光甲虫由来のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応の用途展開において、その先駆けとしてホタル科由来の北米産ホタル由来ルシフェラーゼは、ルシフェラーゼアッセイ法やATPアッセイ法において産業用途へ向けた実用化が積極的に進められている。これまで *in vitro* での Flash 発光を Glow 発光へと発光反応を制御する試みを始めとして、人為的にホタルの発光反応を制御するさまざまな試みが行われてきたが、ルシフェラーゼが触媒する発光反応をより計測し易くするための改良の余地は、コスト面の問題を始め未だ多く残されており、これは HTS 法により発光反応を利用する産業用途においては特に必要とされている。これまで人為的にホタル発光反応を制御することを目的に多くの反応補因子の導入が行われてきたが、その制御機構は十分に解明されていない。そこで本研究では、発光甲虫による発光反応をより人為的に制御することを目標に、発光反応の分子メカニズムの再検討を行うことにした。

以上、本研究では、発光甲虫ルシフェラーゼが触媒する発光反応において

新たに3種の因子を用いた制御ならびに作用メカニズムの解析を通して、甲虫生物発光における酵素反応の産業用途での実用化促進を目的とした。第一の因子として、ホタル科以外の発光甲虫由来ルシフェラーゼに属するホタルモドキ科由来の鉄道虫赤色ルシフェラーゼを用い、その *in vitro* 発光反応系の解析から、異種のルシフェラーゼ酵素を用いた発光反応系の制御ならびに実用化の可能性を検討した。また、これまで広く用いられてきた北米産ホタル由来ルシフェラーゼによる発光反応系の実用化では還元剤 DTT が必須とされてきたが、これに代わる有機イオウ試薬を第二の因子としてその効果を検討し、発光反応系への制御及びそれに与る反応制御メカニズムの解明を試みた。さらに第三の因子としてピロリン酸を適用し、産業用途への展開を主眼としたホタルルシフェラーゼによる発光反応、ならびに発光甲虫ルシフェラーゼによる *in vitro* 発光反応系の制御を試み、多様性に富んだ発光特性を示す発光甲虫による生物発光反応系のさらなる展開ならびにその実用化を図った。

第2章 カイコ産生鉄道虫 *Phrixothrix* 由来

赤色ルシフェラーゼ酵素の特性解析

2.1 研究の目的

ホタル科、ヒカリコメツキ科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科の4科より構成される発光甲虫は陸棲の発光生物であり、異なる発光パターンや発光色によって個体間のコミュニケーションを行い、種が保たれている(75)。発光甲虫ではルシフェリン構造が全てにおいて共通（ホタルルシフェリン）であり、またその発光反応には Mg^{2+} と ATP を必要とする。しかしながら、北米産ホタルに代表されるホタル科とホタルモドキ科由来におけるルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応においては、発光色や pH 感受性などに際違った相違があり、この違いはルシフェラーゼ構造の違いによると考えられている(40)。

北米産ホタルと同じ発光基質でありながら、異なる発光色の変化挙動を示すホタル科とホタルモドキ科のルシフェラーゼ特性を比較議論することは重要である。さらにはこれまで詳細な解析が為されていないホタルモドキ科由来のルシフェラーゼを *in vitro* 発光反応系に適用することにより、従来のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応にない特徴を有する発光反応系が得られ、新たな産業用途への展開への可能性が期待できる。そのためにもホタルモドキ科由来ルシフェラーゼによる発光反応の特性を詳細に解析する必要があるが、従来、ホタルモドキ科由来のルシフェラーゼを大腸菌、酵母や哺乳類細胞で効率良く、発現することはできなかった(50)ため、発光反応の特性解析を充分に進めることは困難であった。その一方で、ホタル科の北米産ホタルルシフェラーゼは、これまで片倉工業㈱のカイコのタンパク生産システムを用いることにより、大量の酵素標品生産することに成功している(76)。

そこで、ホタル科及びホタルモドキ科由来ルシフェラーゼも同じく発光甲虫由来であることから、同じ昆虫に属するカイコによるタンパク発現システ

ムに着目、カイコ産生のホタルモドキ科由来ルシフェラーゼを調製し、得られたリコンビナントタンパクによる発光反応の特性解析を目的とした。具体的には、カイコ産生ホタルモドキ科由来赤色ルシフェラーゼ酵素を用い、*in vitro* 発光反応の特性を解析することから、異なるルシフェラーゼ酵素による発光反応系の制御ならびに実用化の可能性を検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 カイコ生産システムによる鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発現

ホタルモドキ科ルシフェラーゼとして鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来の赤色ルシフェラーゼ遺伝子(50)を挿入したプラスミド pB-ReL を、片倉工業株式会社の Superworm タンパク質生産サービスより、pB-ReL 遺伝子を封入した AB ν バキュロウィルスのカイコへの接種・感染(77)を行った。目的とするリコンビナント赤色ルシフェラーゼは、カイコ蛹を破碎後、その上清より抽出した。なお、破碎液のタンパク量はプロテインアッセイ (Bio-Rad 社製)を用いウシアルブミンを標準として算出した。また、発光活性はピッカジーン発光試薬 (東洋インキ製造株式会社製)を用い、ルミノメータ LB9506 (Berthold 社製)により測定した。また、酵素特性の比較としてカイコ産生北米産ホタルルシフェラーゼスタンダード酵素 (東洋インキ製造株式会社製)を用いた。各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.2 赤色ルシフェラーゼの分子量測定

カイコ産生赤色ルシフェラーゼの分子量はウエスタンブロット法により決定した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 10%の分離ゲルを用い、Laemmli の方法に従った(78)。サンプルタンパク量 20 μ g を、2% SDS/10%グリセロール/40 mM DTT/0.01% ブロモフェノールブルー/62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)で 25 μ L 調製し、泳動を行った。分子量マーカーにはプレステインマーカー (6-175 kDa) (New England Biolabs 社製)を用いた。電

気泳動は2枚行い、終了後、1枚のゲルはCBB（クマシーブリリアントブルー）法により染色した。また、もう1枚のゲルはTowbinらの方法に従い、セミドライタイププロット装置（Bio-Rad社製）を用い、ニトロセルロースメンブレンへブロットティングした(79)。ブロッキングは5%（w/v）スキムミルクを含むTTBS（20 mM Tris-HCl(pH 7.5) / 50 mM NaCl / 0.05% Tween-20）を用い、室温で1晩行った。一次抗体反応は、1%（w/v）ゼラチンを含むTTBSで2,000倍に希釈した抗ホタルルシフェラーゼ抗血清を用い、室温で1時間行った。続いて二次抗体反応はAnti-Rabbit IgG（H+L）（Jackson Immuno Research Laboratory社製）を3,000倍に希釈したものを用い室温1時間で行った。検出はECLTM（Amersham Bioscience社製）で行った。抗ホタルルシフェラーゼ抗血清は北米産ホタル *Photinus pyralis* ルシフェラーゼ（R&D System社製）をウサギに免疫して2ヵ月後に得られた抗血清を用いた。各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.3 赤色ルシフェラーゼの発光スペクトル

カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液5 μ l（1/10に希釈）にルシフェリン溶液（470 μ M ルシフェリン / 530 μ M ATP / 8mM MgSO₄ / 20mM Tris buffer(pH8.0)）25 μ lを添加し、AB-1850 スペクトルフォトメータ（アトー社製）にて、スリット幅1mm、測定時間60秒で356nmから838nmの発光強度をスキャンニングし測定した。各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.4 赤色ルシフェラーゼの発光反応-1

—30分間にわたる発光反応における発光量の経時変化—

カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液20 μ lに、ルシフェリン溶液100 μ lを添加および混合し、ルミノメータJNR AB-2100（アトー社製）にて、室温(25 $^{\circ}$ C)、0.1秒積算値を30秒間隔で30分間測定した。同様の方法

で、北米産ホタルルシフェラーゼスタンダード酵素 8ng を測定した。ルシフェリン溶液の組成は 470 μ M ルシフェリン/530 μ M ATP/8mM MgSO₄/270 μ M CoA/33.3mM DTT/20mM Tris (pH8.0)である。各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.5 赤色ルシフェラーゼの発光反応－2

－初期発光反応(開始後 200 秒間)における発光量の経時変化－

カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液 20 μ l に、ルシフェリン溶液 100 μ l を添加および混合し、ルミノメータ LB9506 にて、室温(25°C)、1 秒積算値を 10 秒間隔で 200 秒間測定した。同様の方法で、北米産ホタルルシフェラーゼスタンダード酵素 8ng を測定した。ルシフェリン溶液の組成は 470 μ M ルシフェリン/530 μ M ATP/8mM MgSO₄/270 μ M CoA/33.3mM DTT/20mM Tris (pH8.0)である。さらに上記ルシフェリン溶液と同じ組成で CoA のみを除いたものも別途調製し、CoA の存在および非存在下でのカイコ赤色ルシフェラーゼによる発光反応を比較した。なお各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.6 赤色ルシフェラーゼの熱安定性

カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液を 1/10 に希釈、37°C と氷上 (0°C) に放置し、0 分、5 分、15 分、30 分、45 分後の活性を測定した。活性測定は、カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液 20 μ l に、ルシフェリン溶液(470 μ M ルシフェリン/530 μ M ATP/8mM MgSO₄/20mM Tris(pH8.0)) 100 μ l を添加し、ルミノメータ LB9506 にて、室温 (25°C) で 1 分間の積算値を測定した。各試薬は全て生化学グレードである。

2.2.7 赤色ルシフェラーゼの pH 安定性

2M NaOH もしくは 1M HCl で pH を調整した広域緩衝液 0.15M GTA

buffer (等モル濃度の 3,3-ジメチルグルタル酸、トリス(ヒドロキシアミノ)メタン、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールの溶液) を用いて、pH5.0～10.0 のルシフェリン溶液(470 μ M ルシフェリン/530 μ M ATP/8mM MgSO₄/50mM GTA buffer)を調製した。カイコ産生赤色ルシフェラーゼを含む感染蛹磨砕液 20 μ l に各 pH のルシフェリン溶液 100 μ l を添加して、ルミノメータ LB9506 にて、室温で 1 分間の積算値を測定した。同様の方法で、北米産ホタルルシフェラーゼスタンダード酵素 (東洋インキ製造株式会社製) 8ng を測定した。各試薬は全て生化学グレードである。

2.3 結果及び考察

2.3.1 カイコ産生システムによる鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発現

鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼ遺伝子 pB-ReL を形質転換し、大腸菌 BL21 でタンパク発現させた場合、20°C、180rpm の培養条件で 24 時間培養することによって活性のあるルシフェラーゼが発現、粗抽出されるが、発現量及び活性はわずかであり、ウエスタンブロットで検出できるレベルではなかった(50)。また、酵母や哺乳類細胞でも同様であり、大量のリコンビナントタンパクを得ることはできなかつた。そこで目的とするタンパクが発光甲虫由来であることから、同じ昆虫に属するカイコのタンパク発現システムに着目した。片倉工業株式会社のカイコを用いた Superworm タンパク質生産システムは、システインプロテアーゼ遺伝子欠損型の ABv バキュロウィルスを基本とし、既存のベクターをウィルスに封入、カイコに感染させることで、簡便に目的としたタンパクを生産できるシステムである。片倉工業株式会社において、精製した pB-ReL をウィルスに封入、カイコに感染させた後、蛹に成長させ個体を破碎、抽出液を得た。破碎液の発光活性は 2.9×10^5 RLU (Relative Light Units) /sec $\cdot\mu$ L であり、カイコ産生北米産ホタルルシフェラーゼ標準酵素の発光活性がおよそ 2.4×10^5 RLU/sec \cdot ng であることより換算すると、破碎液中のルシフェラーゼ濃度は約 1.2ng/ μ L となる。破碎液は 5

匹の蛹で約 35mL、1 匹あたり 350 μ g のルシフェラーゼを得ることができた。発現ルシフェラーゼの分子量を確認するため、電気泳動及びウエスタンブロットを行った。Fig.2-1 のレーン 2 は pB-ReL を発現させたもの、レーン 3 は非発現カイコ抽出物である。同時に、抗北米産ホタル抗血清によりウエスタンブロットした結果をレーン 5、6 とした。レーン 5 には分子量約 60kDa のカイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの単一バンドが確認、一方、レー

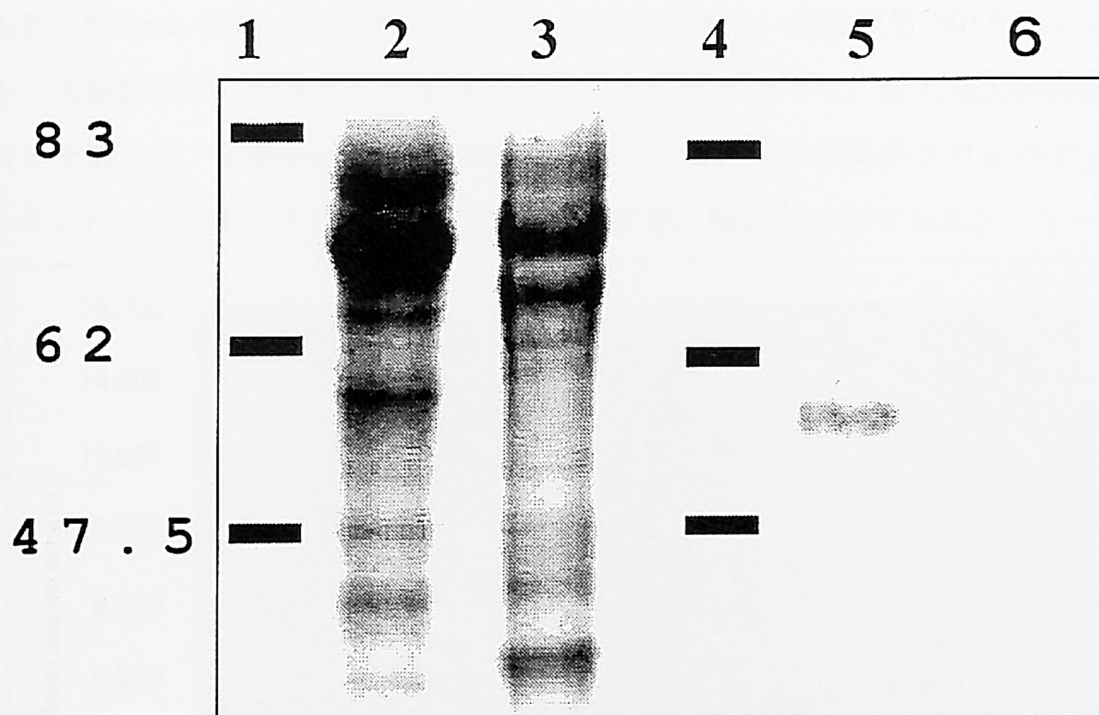


Fig.2-1 pB-ReL を発現させたカイコ抽出液の電気泳動及びウエスタンブロットティング

レーン1およびレーン4は、予備染色された分子量マーカー(Bio-Rad 社製)、レーン2は pB-ReL をカイコに感染させたものに対し、レーン3は pB-ReL を感染させていないカイコ抽出物である。レーン5と6は抗北米産ホタル抗血清によりそれぞれレーン2および3に相当するカイコ抽出物をウエスタンブロットした結果である。SDS-PAGE 電気泳動ならびにウエスタンブロットティングは 10%のゲルを使用した。

ン 6 では本抗体と交差するタンパクは認められなかった。なおレーン 1 および 4 は、予め染色された分子量マーカーである。このルシフェラーゼの発現はレーン 2 における CBB 染色像からも確認できた。

2.3.2 赤色ルシフェラーゼの発光スペクトル

Fig.2-2 はカイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発光スペクトルである。620nm を最大発光波長、半値幅 66nm である。従来報告(50)されている、大腸菌由来の鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼと比べて、最大発光波長は同じであるが、半値幅は 11nm 程広がっている。この差異がリコンビナントタンパクを生産した生物の違いによるかは更に検討が必要である。

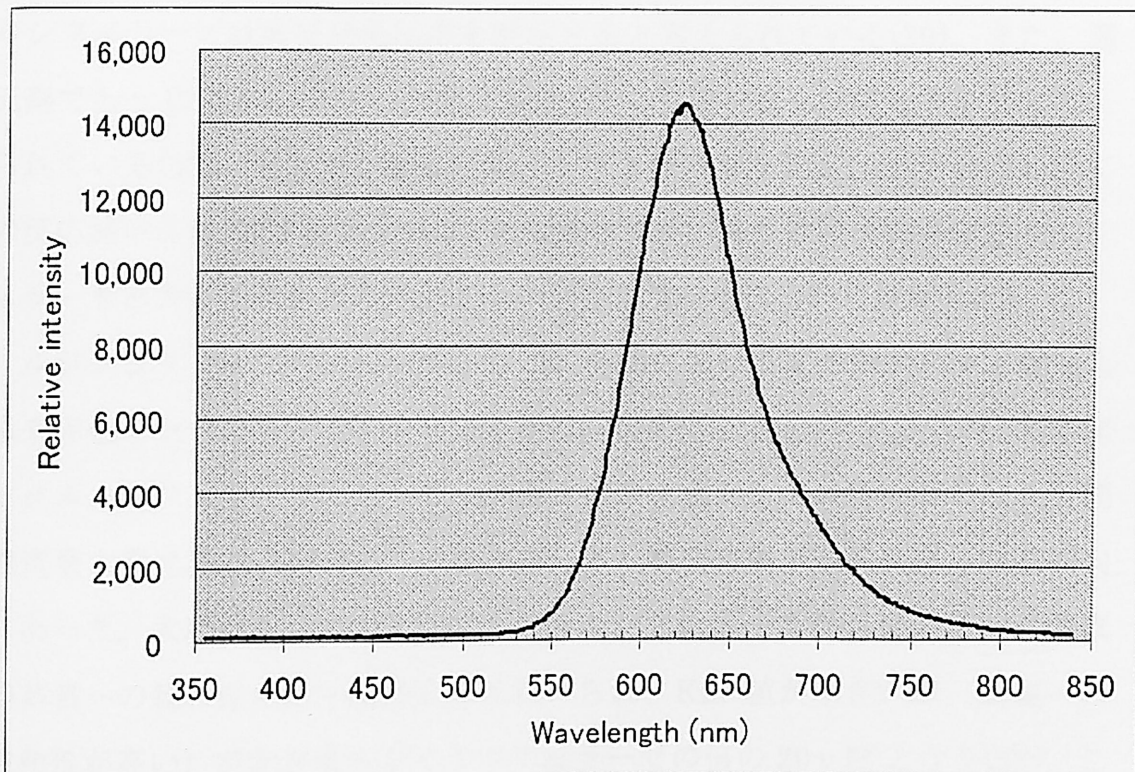


Fig.2-2 鉄道虫(Phrixothrix)由来の赤色ルシフェラーゼを含むカイコ抽出液の発光スペクトル

pB-ReL を感染させたカイコ抽出液の発光スペクトルとして、AB-1850 スペクトルフォトメータ (アトー社製)により自動校正されたデータを示した。

2.3.3 赤色ルシフェラーゼの発光反応

発光甲虫の発光反応では、ホタルルシフェリンが Mg^{2+} の存在下、ルシフェラーゼの作用で ATP と反応して AMP 化されルシフェリン-AMP が生じ、次にルシフェラーゼの作用で酸素と反応、パーオキシドアニオンを生成する。さらに酵素内で不安定なジオキセタンに変換、ジオキセタン構造は酵素内で開裂し、 CO_2 とオキシルシフェリンを生成、光子を発する(23, 24)。発光後のオキシルシフェリンはルシフェラーゼの基質結合部位に留まることから酵素反応の阻害剤として働き、ルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを抑制する。このとき、反応溶液中に補酵素 A (CoA) が存在すれば、オキシルシフェリン-CoA 複合体が形成され、オキシルシフェリンによる阻害効果は抑制され、ルシフェラーゼが再び発光反応を触媒すると考えられている(29)。また、還元剤である DTT は、タンパクを安定化させ、安定な発光反応を支えると考えられている(33)。そこで、測定中のルシフェラーゼを安定化させるため全ての反応液中には DTT を加え、CoA の効果をカイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼとカイコ産生北米産ホタルルシフェラーゼについて検討した。

ルシフェリン溶液を添加してから 30 分間における北米産ホタルと鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光量の経時変化を Fig.2-3 に示した。北米産ホタルルシフェラーゼに比べて、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼでは 5 分間程度最大発光活性に達するまで要する一方、減衰時間が顕著に遅くなる傾向にあった。大腸菌産生の鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼでは K_m 値 (※酵素の基質への親和性を示す指標として用いられ、 K_m 値が小さい程、基質への親和性が高い) が北米産ホタルルシフェラーゼの倍の $20 \mu M$ となり(50)、この違いが発光反応の立ち上がりまでの違いに反映した可能性がある。一方、発光の減衰が遅くなる結果は、オキシルシフェリンと CoA の複合体形成が鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼではよりスムーズに行われ、これが酵素のターンオーバーの向上に働いて発光反応が持続したことを示している、と考察される。

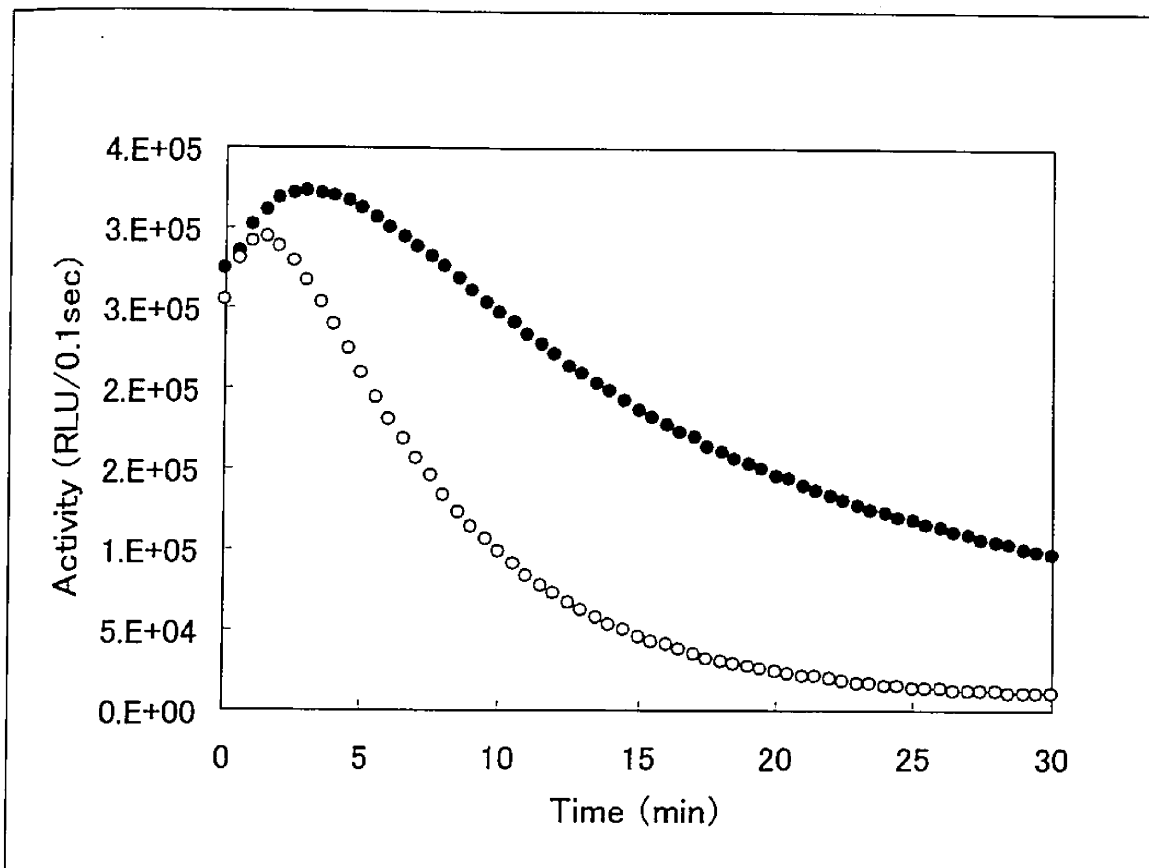


Fig.2-3 Phrixothrix 赤色ルシフェラーゼを含むカイコ抽出液による発光反応開始から 30 分間における発光経時変化(●):対照として北米産ホタルルシフェラーゼは(○)で示した。

発光反応条件:470 μ M Luciferin/530 μ M ATP/3.74mM MgSO₄/
270 μ M CoA/33.3mM DTT/8ng Luciferase, pH7.9, 20°C

北米産ホタル由来ルシフェラーゼによる発光反応の用途として実用化されているルシフェラーゼアッセイ法や ATP アッセイ法では、通常、発光反応の開始時点から数 10 秒、あるいは 100 秒間以内の発光量を計測し、その測定値を求める方法が広く行われている。そこで、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応に対して、反応開始から 200 秒間の経時発光量を測定し、北米産ホタルによるものと対比した結果を Fig.2-4 に示す。北米産ホタル由来ルシフェラーゼによる発光反応は、その反応の開始から 200 秒間にわたってほぼ一定となる安定な発光キネティクスを示した。これは本実験で用いたル

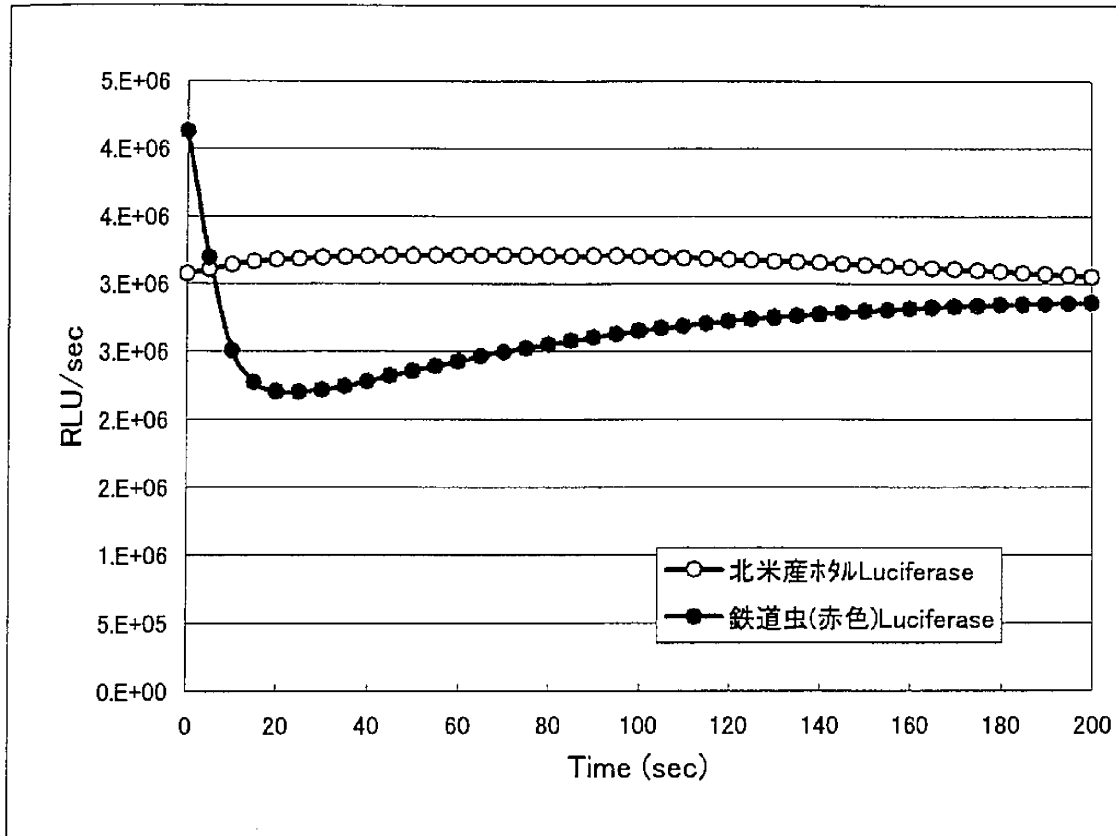


Fig.2-4 Phrixothrix 赤色ルシフェラーゼを含むカイコ抽出液による発光反応開始から 200 秒間における発光経時変化(●):対照として北米産ホタルルシフェラーゼは(O)で示した。

発光反応条件:470 μ M Luciferin/530 μ M ATP/3.74mM MgSO₄/
270 μ M CoA/33.3mM DTT/8ng Luciferase, pH7.9, 20°C

シフェリン溶液が北米産ホタル由来ルシフェラーゼ発光反応に最適とされる CoA ならびに 33.3mM の高濃度の DTT が含まれて(27)いたためと考えられる。これに対し、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応は、一時的に Flash 状に発光が立ち上がり急速に減衰した後、ゆっくりと発光強度が増加する傾向が見られた。この現象は先の 30 分間における経時発光反応の測定では確認できなかったが、発光開始直後の発光現象を詳細に検討した本実験によって初めて明らかとなった。Fig.2-3 の結果と併せて、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光の経時変化は、反応開始後、急速な減衰の後にゆ

っくりと増加して5分後にピークとなり、その後、北米産ホタル由来ルシフェラーゼによる発光反応に比べ緩やかに減衰する傾向となることを確認した。

さらに鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応における減衰を遅くさせる要因として、オキシルシフェリンと CoA の複合体形成が北米産ホタル由来ルシフェラーゼに比べよりスムーズに行われていると考察したが、発光反応の場に CoA の有無による影響を比較検討した(Fig.2-5)。鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応は、Flash 状の発光の後、急速に減衰するまでは CoA の有無により有意な差異はないが、CoA が介在する場合にはその後発光強度がゆっくりと増加する一方、CoA が存在しない反応系では、発光強度はそのまま速やかに減衰したままとなり、その後増加する現象は確認でき

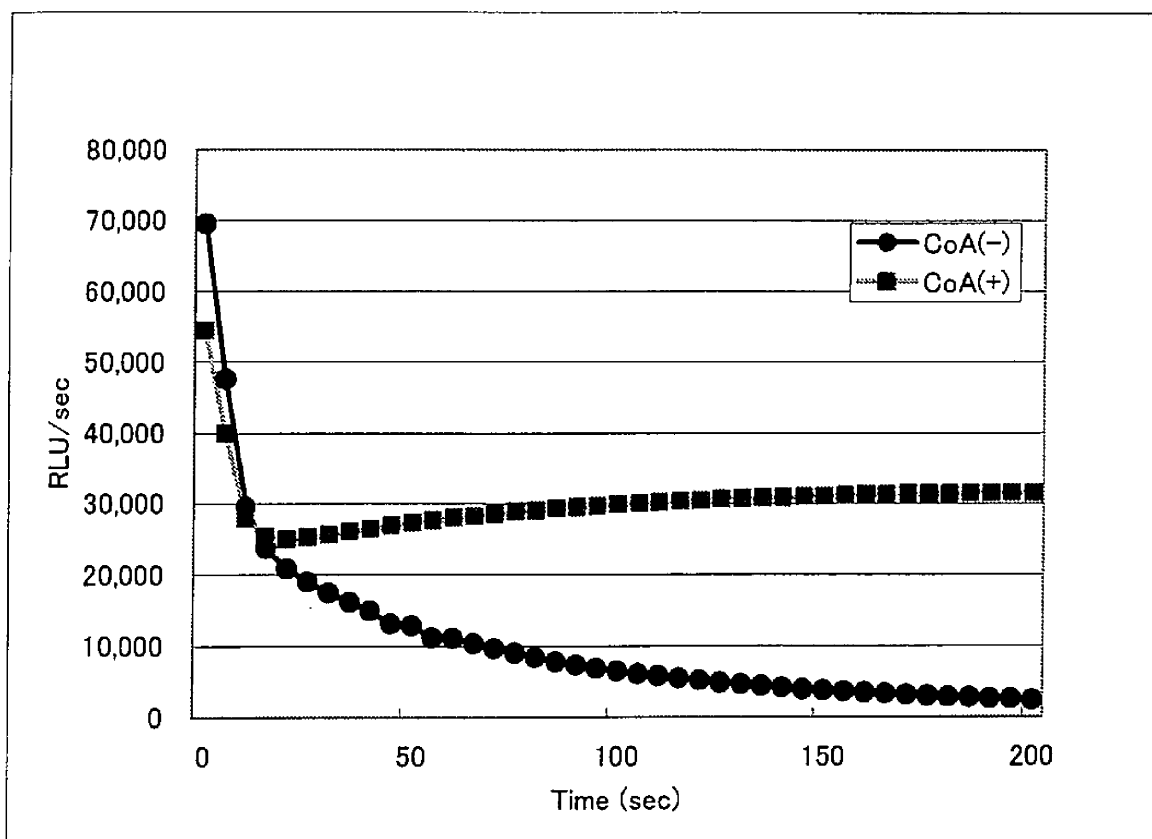


Fig.2-5 Phrixothrix 赤色ルシフェラーゼを含むカイコ抽出液による発光反応開始から 200 秒間における発光経時変化:対反応系に CoA を含む反応系を(■)、対照として CoA を含まない反応系を(●)で示した。

なかった。よって CoA は鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応についても北米産ホタル由来ルシフェラーゼに対するのと同様に、オキシルシフェリン-CoA 複合体を形成して活性部位に留まったオキシルシフェリンによる阻害効果を抑制することから、ルシフェラーゼに再び発光反応を触媒させる働きを示すことが確認された。

鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼと北米産ホタル由来ルシフェラーゼによるそれぞれの発光反応の違いは、ルシフェリンに対するルシフェラーゼによる触媒作用の違いを表わしており、アミノ酸一次構造レベルの相同性が50%程度である(40) 2つのルシフェラーゼの間では、活性を支える構造に違いがあるものと考えられる。

2.3.4 赤色ルシフェラーゼの熱安定性

Fig.2-6 ではカイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの氷上、及び37°Cでの発光活性の経時変化から熱安定性を評価した。

カイコ抽出液中の赤色ルシフェラーゼは37°Cの条件下では、急激に活性が減衰・失活した。また、氷上であっても、徐々に発光活性は減衰し、1時間後には、ほぼ半分の活性となった。この傾向は同時に行ったカイコ産生北米産ホタルルシフェラーゼ標準酵素でも確認されている(77)。一般に、発光甲虫の熱安定性は低く、本結果でもその生物種由来に関係なく不安定であった。また、大腸菌等におけるリコンビナントタンパクの低い生産量は、このルシフェラーゼの熱不安定性に起因している可能性が大きい。

2.3.5 赤色ルシフェラーゼの pH 安定性

Fig.2-7 はカイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発光活性-pH 相関曲線である。GTA グットバッファーを使用することで pH5.0 から 10.0 まで、広い範囲で測定を行った。カイコ産生鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼは pH6.5 から 9.5 まで 80%以上の活性が保持され、広い範囲の最適 pH を示し

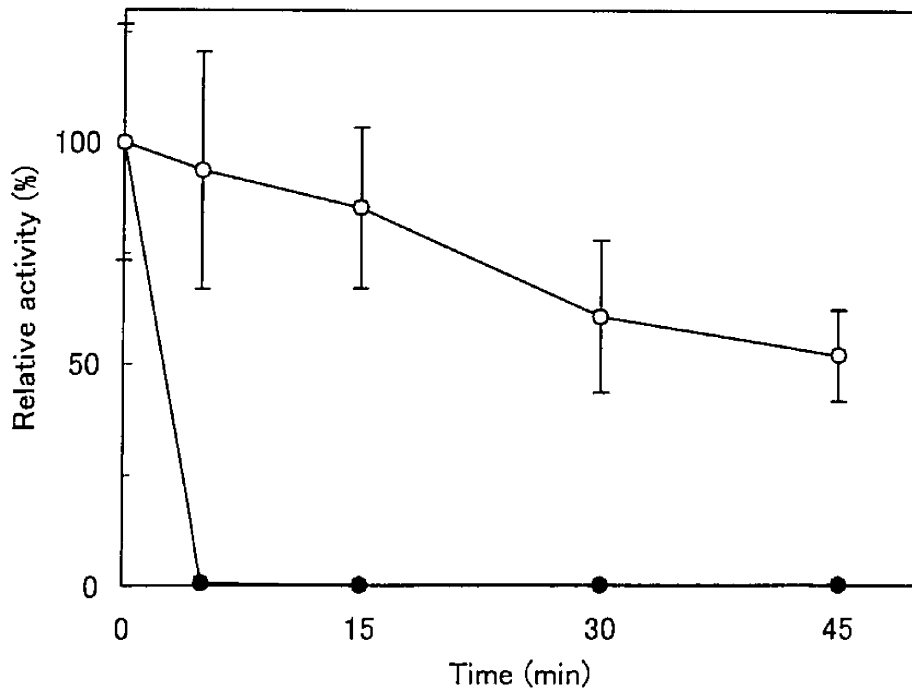


Fig.2-6 Phrixothrix 赤色ルシフェラーゼの 37°C(●)および氷上(○)安定性

た。大腸菌より産生した鉄道虫由来赤色リコンビナントルシフェラーゼの最適 pH は 8.1 と報告されている(50)が、詳しい pH 依存曲線が明記されていないので、直接比較することができない。そのため、この広い pH 特性がカイコ由来ルシフェラーゼの特徴によるものかは現時点で判断できない。一方、北米産ホタルルシフェラーゼの発光活性の最適 pH は 8 前後であり、同条件で生産された 2 つのルシフェラーゼの際立った違いであった。通常、ホタル科ルシフェラーゼの発光スペクトルは pH の変化に連動、回りの pH が酸性に傾くと黄緑色から赤色に、つまりルシフェリンのエネルギー状態が低い方向へ変化する。それに対し、鉄道虫を含むホタルモドキ科等のルシフェラーゼでは pH 変化に関係なく、スペクトルは一定である(40)。pH 変化はアミノ酸側鎖の電荷を変化させ、それに伴い、酵素の 3 次元構造、特に活性部位の構造を変化させ、最終的に酵素活性が変化する。これら 2 タイプのルシフェ

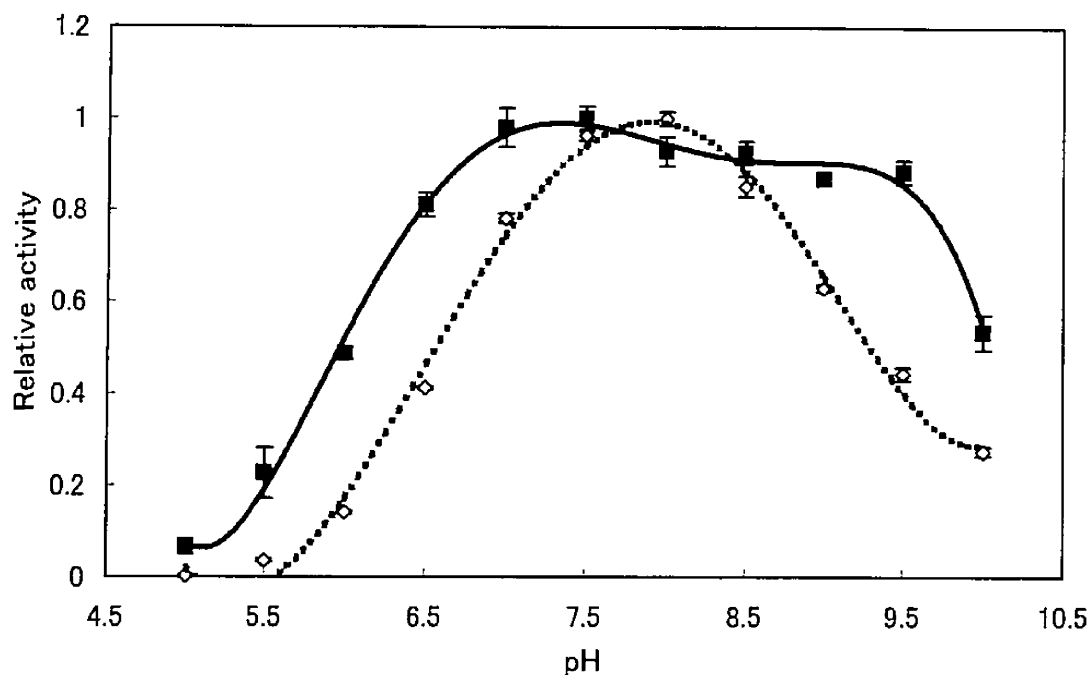


Fig.2-7 Phrixothrix 赤色(■)および北米産ホタルルシフェラーゼ(○)
発光活性の pH 依存性

ラーゼ pH 依存性の違いは、鉄道虫赤色ルシフェラーゼの活性部位が pH 変化に対してより安定な構造であることを示している。本結果より鉄道虫赤色ルシフェラーゼは周囲の pH 変化に依存することなく同じ発光スペクトルとなる特性を持つが、これは、より安定な活性部位の構造によることが示唆された。

2.4 結論

カイコタンパク発現システムを利用することで、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼを効率良く生産できることが可能となった。これはホタルとカイコ間において遺伝子のコドン使用頻度やタンパクのフォールディング機構が類似することに起因すると考えられる。また、カイコで産生した鉄道虫由来赤色

ルシフェラーゼ及び北米産ホタルルシフェラーゼを比較した結果、ルシフェリン/ルシフェラーゼ間における相互作用に起因すると考えられる発光反応経時変化の顕著な相違や、pH 変化に伴う構造変化に違いがあることが明らかとなった。2つのルシフェラーゼ間にある発光色の pH 依存性の違いは、この pH 変化に伴う活性部位の構造変化に相関する可能性が示唆された。今後、高次構造解析を含めて、研究を続ける必要がある。

さらに発光反応の面において、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼは広く用いられている北米産ホタル由来ルシフェラーゼと同様に、CoA の介在によって発光反応におけるターンオーバーが向上することが確認された。しかしながら北米産ホタル由来ルシフェラーゼの場合、CoA と還元剤である DTT を介在させることによって、Flash 発光から一定な発光強度を示す Glow 発光へと発光キネティクスを改変させることができる(27)のに対し、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応のキネティクスでは、反応開始直後の Flash 状の立ち上がり続く急速な減衰が CoA と DTT の存在下でも変化することはなかった。この両者における相違は、ルシフェリンとルシフェラーゼ間の相互作用に影響を与える両酵素の活性部位の構造の違いや、発光反応に作用する CoA や還元剤などの補因子により左右されるものと考えられる。

本研究において、北米産ホタルの代わりに鉄道虫赤色ルシフェラーゼを用いることにより、ホタルルシフェラーゼとは異なる特徴を持つ発光反応系が得られることを確認した。これは、異種ルシフェラーゼを適用することにより発光反応系が制御でき、多彩な特徴を持つ *in vitro* 発光反応系の構築に結びつけられる可能性を示している。今後、さまざまな異種ルシフェラーゼによる発光反応を検討し実用化を図るにあたり、北米産ホタルが属するホタル科と鉄道虫が属するホタルモドキ科を初め、他の科に由来するルシフェラーゼ酵素の構造による発光反応機構の違いや、発光反応に与るさまざまな成分の作用を含めた発光メカニズムの解明へ向けたさらなる研究が必要と考える。

第3章 還元剤 DTT に代わる

有機イオウ試薬による反応制御

3.1 研究の目的

発光甲虫ホタルによるルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応を *in vitro* で行う場合、瞬間的に立ち上がる一方その後速やかに減衰する Flash タイプの発光パターンのみが得られていたが、チオール試薬である CoA ならびに DTT を発光反応系に共存させることにより、発光量自体の増強ならびに発光の減衰が抑えられた Glow タイプの反応系が得られる(26-28)。この発光反応の制御法を転機として、発光甲虫ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応は、レポーター遺伝子アッセイ法に適した *in vitro* 反応系として、産業用途において実用化が進められた。

これらチオール試薬の中でも、発光甲虫ホタル由来ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応に及ぼす DTT の役割は十分に理解されていない。DTT はその構造にチオール基を持ち、一般的には還元剤として用いられているが、広義には有機イオウ試薬に含まれる。しかしながらホタル発光反応においてチオール基を持たない DTT 以外の有機イオウ試薬がどのような効果を示すか検討した例はない。そこで還元剤 DTT に代わるジチオカルバミン酸類などの有機イオウ試薬に着目した。ジチオカルバミン酸類は、ゴムの硬化反応などに用いられており、試薬あるいは工業原料として入手でき、また連鎖移動剤としてポリブタジエン・ゴムなどにおいて高度な架橋構造を形成させる働きを持つ(80)。これらジチオカルバミン酸類が、発光反応において従来用いられてきた DTT 以上の効果を示す可能性も考えられる。

そこで本研究では、還元剤 DTT に代わりジチオカルバミン酸類を含む種々の有機イオウ試薬を用いることによるルシフェラーゼアッセイ反応へ与える影響ならびに効果を検証し、発光反応の制御系の可能性を検討することを目的とした。

3.2 実験方法

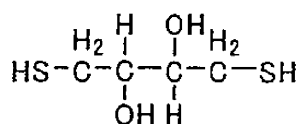
3.2.1 試薬

ホタルルシフェラーゼ酵素標品は、市販の「ルシフェラーゼ・スタンダード酵素(東洋インキ製造(株)製: 10 μ g/mL)」を全ての実験に使用した。また発光基質であるホタル・ルシフェリン(d-(-)-luciferin・K 塩)は Promega 社製 (Cat.No.E160X)を、また ATP は Amersham Bioscience 社製(Disodium Crystalline、製品 No.21-1006)を、CoA-Li₃ はオリエンタル酵母工業(株)製を使用した。

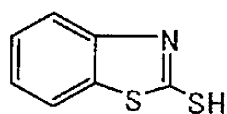
使用した各種有機イオウ試薬の化成品名および略語を以下に示す。またそれぞれの構造式は、Fig.3-1 に示す。

DTT(Dithiothritol) (和光純薬工業(株)製)
2-mercaptobenzothiazole (川口化学工業(株)製)
2-mercaptobenzothiazole Na 塩(SMB-40) (川口化学工業(株)製)
piperidine pentamethylene dithiocarbamate(PPD) (川口化学工業(株)製)
dimethyldithiocarbamate・Na 塩(SMD) (川口化学工業(株)製)
diethyldithiocarbamate・Na 塩(SED) (川口化学工業(株)製)
dibutyldithiocarbamate・Na 塩(SBD) (川口化学工業(株)製)
dibenzoyldithiocarbamate・Na 塩(SBzD) (Aldrich 社製)
diethyldithiocarbamate・NH₄ 塩(AED) (Aldrich 社製)
xanthogenata・Na 塩 (東京化成工業(株)製)
xanthogenate・K 塩 (東京化成工業(株)製)
diethyldithiocarbamic acid diethylammonium 塩(DAD)
(東京化成工業(株)製)

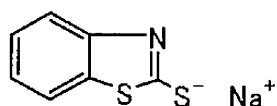
また、上記以外の試薬は和光純薬工業(株)製を使用した。



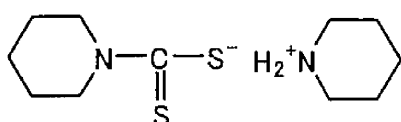
DTT(Dithithreitol)



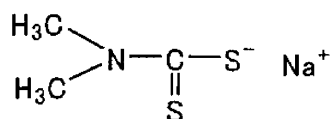
2-Mercaptobenzothiazole



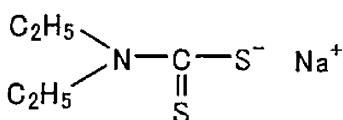
2-Mercaptobenzothiazole Na塩
(SMB-40)



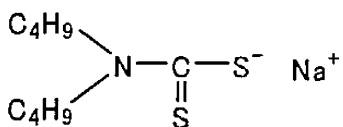
Piperidine pentamethylene dithiocarbamate
(PPD)



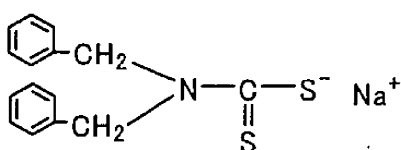
Dimethyldithiocarbamate Na塩
(SMD)



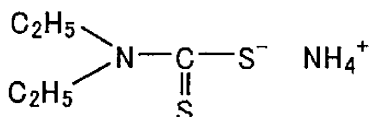
Diethyldithiocarbamate Na塩
(SED)



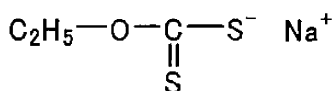
Dibutyldithiocarbamate Na塩
(SBD)



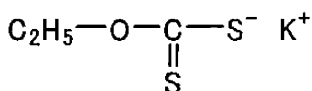
Dibenzoyldithiocarbamate Na塩
(SBzD)



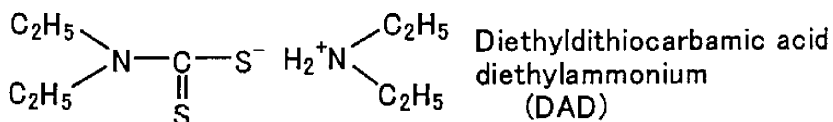
Diethyldithiocarbamate NH₄塩
(AED)



Xanthogenata Na塩



Xanthogenata K塩



Diethyldithiocarbamic acid
diethylammonium
(DAD)

Fig.3-1 本研究に使用した有機イオウ試薬とその構造式

3.2.2 ルシフェラーゼ酵素溶液の調製

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のホタルルシフェラーゼ酵素標品を 25 mM Tris-リン酸/10 % グリセリン/1 % TritonX-100 ,pH 7.0 を用い、100 ng/mL に希釈して調製したものをを用いた。

3.2.3 発光試薬の調製

ルシフェラーゼアッセイ用の発光試薬の構成成分ならびに最終濃度は、20 mM Tricine (N- [Tris(hydroxymethyl)methyl] glycine) /1.07 mM Mg carbonate/2.67 mM MgSO_4 /0.1 mM EDTA/270 μM CoA/470 μM d-Luciferin/530 μM ATP (pH 7.9)とし、各種の実験系において使用するそれぞれの有機イオウ試薬を必要量加えたが、これらを除く上記試薬成分の組成および濃度は全ての実験系で同一とした。

3.2.4 ルシフェラーゼアッセイの測定法

調製した各種発光試薬は、測定前に予め 23°C の室温またはインキュベーター内に 30 分間以上静置し、溶液の温度を一定に保持した。実際の測定は、まず専用測定チューブ(SARSTEDT 社製 No.55.484)の底部にルシフェラーゼ酵素溶液を採り、発光試薬 100 μL を添加し、添加直後から 200 秒間の発光量を経時測定した。発光活性の測定はルミノメータ LB9506 を用いた。測定は 3 回行いその平均値を用いた。ホタルルシフェラーゼによる発光反応は、測定時の温度によって大きく影響されるため、全ての測定操作は 23°C の温度に一定に保たれた恒温室内で行った。

3.2.5 各種有機イオウ試薬による発光反応への影響

上記 11 種類の有機イオウ試薬を最終濃度 3.3 mM となるように発光試薬に加え、それぞれによる発光反応の変化を測定し、それらを 3.3 mM DTT を加えた場合と比較した。それぞれの発光反応は、200 秒間測定における最大発

光量(MaxRLU/s)と、200秒間の総発光量を総計した積算発光量(RLU/200 s)の2種類の測定値で比較・評価した。ここでRLUとは、発光量測定装置ルミノメータによって出力される測定値で、相対発光単位(Relative Light Unit)である。なお、それぞれの測定装置から得られるRLUは測定装置固有のものであり、同じ機種間でも異なる場合が多いため、一般的な発光量の測定は同一の装置で行った相対値で実験データを用いることにした。

3.2.6 各種有機イオウ試薬による発光反応キネティクスへの影響

還元剤 DTT を含む各種の有機イオウ試薬が及ぼす発光反応への効果をより詳細に検討するため、最終濃度を 3.3mM に調製した DTT、SMD、AED を含む発光試薬ならびに有機イオウ試薬を全く含まない発光試薬を調製し、ルシフェラーゼアッセイを行い、それぞれの発光開始から 200 秒間における発光量のキネティクスを測定した。

3.2.7 有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度による発光反応への影響

各種有機イオウ試薬の濃度依存性を比較するため、DTT、SMD、AED の最終濃度を 0.01 mM、0.3 mM、3.3 mM、33.3 mM となるよう発光試薬を調製し、ルシフェラーゼアッセイを行い、発光反応開始から 200 秒間における最大発光量ならびに積算発光量を比較した。

3.2.8 有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度によるルシフェラーゼ酵素への影響

ルシフェラーゼ酵素自体への各種の有機イオウ試薬による影響を確認するため、ルシフェラーゼ酵素溶液に DTT、SMD、AED をそれぞれ最終濃度 0.01 mM、0.3 mM、3.3 mM、33.3 mM となるよう加え、室温で 1 時間静置、その前後での発光活性の変化を、静置前の発光活性を 100%として比較した。

3.3 結果及び考察

3.3.1 各種有機イオウ試薬による発光反応への影響

発光甲虫ホタル由来のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応に必須の成分は ATP、Mg²⁺、酸素分子である。ところがルシフェラーゼアッセイ法における *in vitro* 発光反応では、Flash タイプを制御して Glow タイプの発光を得るためには、上記の必須成分に加え、CoA と DTT の両成分を加える必要がある。ここで還元剤としての DTT の役割については、一般的に考えられてきたタンパクを安定化させる効果(32)以外には明かにされていない。そこで本研究では、DTT を含むさまざまな有機イオウ試薬が及ぼすホタル生物発光への効果を比較検討することとした。それぞれの有機イオウ試薬の効果によって得られる発光反応の変化は、2種類のパラメーターによって評価した。まず最大発光量(MaxRLU/s)はそれぞれの反応性を表し、また 200 秒間における積算発光量(RLU/200s)は発光反応の持続性を示し、これらの値は反応環境によるルシフェラーゼ酵素への不活性化もしくはターンオーバーの効率により影響されると考えられている。

Fig.3-2 では、7種類のジチオカルバミン酸の最終濃度 3.3 mM とした場合の各々の発光反応における MaxRLU/s と RLU/200 s の相対発光量を示した。それぞれの値は、DTT を 3.3 mM 加えた場合の MaxRLU/s ならびに RLU/200 s を 100%とした相対値で表している。有機イオウ試薬を含まない反応系に比べて、各種のジチオカルバミン酸を含む多くの発光反応系において MaxRLU/s ならびに RLU/200s の両パラメーターにおける発光活性の増加が認められた。有機イオウ試薬を含まない反応系では、MaxRLU/s が DTT 存在下の 85%程度の発光活性であったのに対し、RLU/200s では約 65%と積算発光量が顕著に減少する傾向が認められ、発光反応の持続性が DTT に比べ大幅に低下したことが確認された。これに対し、SBzD を除く全てのジチオカルバミン酸で、DTT の場合に比べて RLU/200s の相対値が MaxRLU/s に比べ高い値を示す傾向が認められた。これは、反応性を示す MaxRLU/s に比べ

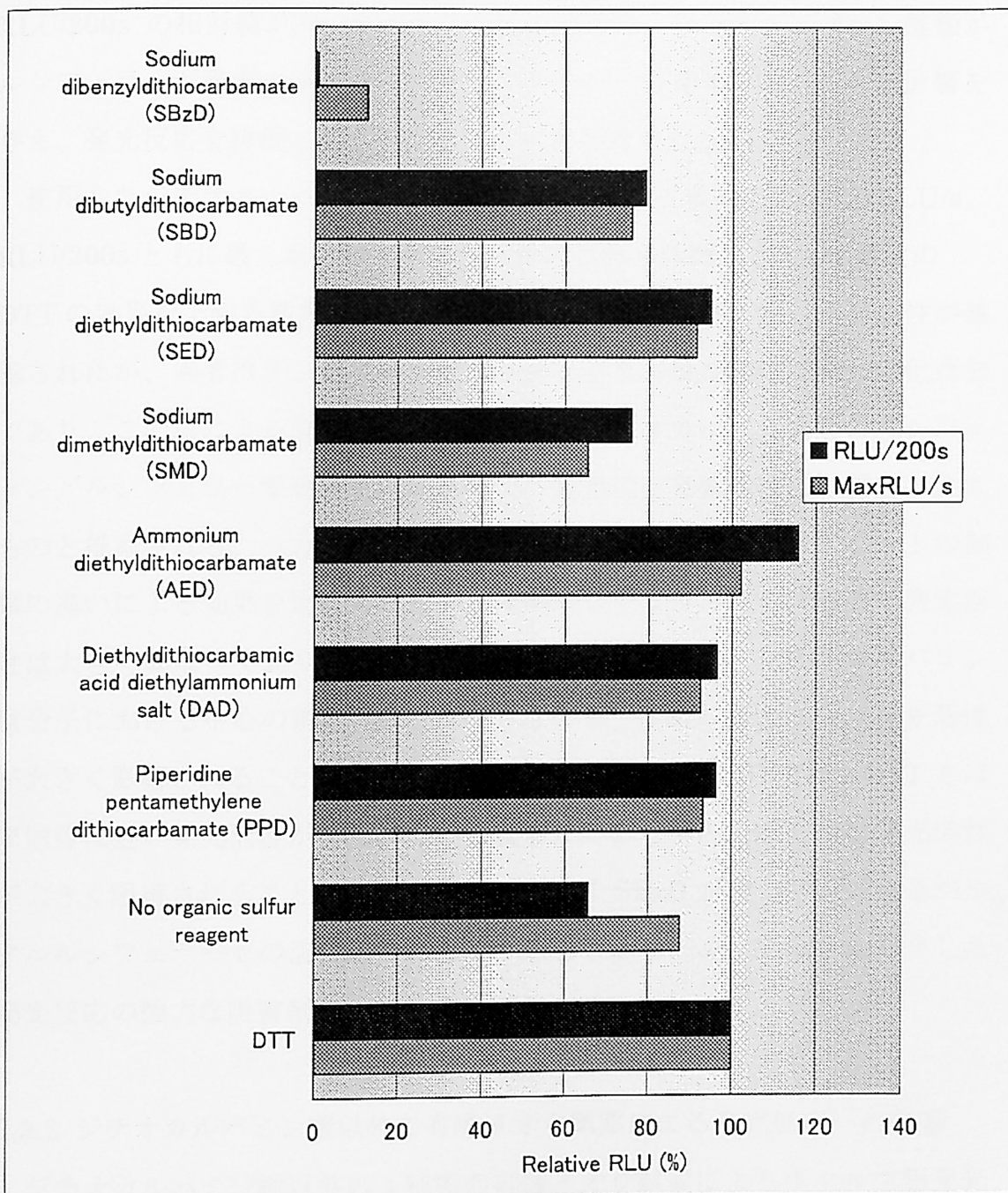


Fig.3-2 各種ジチオカルバミン酸による相対発光量比較

終濃度 3.3mM の各種ジチオカルバミン酸誘導体を含む発光試薬によって得られる相対発光量(RLU: Relative Light Units)として最大発光量(MaxRLU/s)と 200 秒間の積算発光量(RLU/200s)とを、対照として有機イオウ試薬類を含まない場合の発光量を比較した。なお、それぞれのカラムは、3.3mM の DTT を発光試薬に添加した場合を 100%とした相対値で表した。

RLU/200s の相対値が高い値を示した反応系では、ジチオカルバミン酸類がルシフェラーゼ酵素の不活性化やターンオーバーの効率を向上させる影響を与え、発光反応を持続させる効果を示したためと考えられる。

使用したジチオカルバミン酸の中で、AEDを加えた反応系で、MaxRLU/s、RLU/200sともに最も高い値を示し、しかもこれらは同じ3.3mM濃度のDTTの効果を上回る結果となった。AEDはSEDに比べて高い発光活性が確認されたが、両者はアンモニウム塩及びナトリウム塩を除けば同一の化合物であり、この塩による溶解性や解離の相違がジチオカルバミン酸のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応に作用し、最終的な発光活性に影響を与えたものと推察される。一方で、ジチオカルバミン酸が持つ第2級アミン上の側鎖の違いによる効果を比較すると、4種類のジチオカルバミン酸間で発光活性は大きく異なっており(S_{ED}>S_{BD}>S_{MD}>>S_{BzD})、ジチオカルバミン酸分子における中心の構造(-N-CS-S-)ではなく、側鎖の構造により発光活性が大きく影響されることが認められた。また、PPDとDADでは、DTTとほぼ同等に近い発光活性が得られているにもかかわらず、S_{BzD}では発光活性が大きく阻害されることが確認された。これはS_{BzD}が持つベンジル基がホタルルシフェラーゼの活性部位に作用することから、ルシフェリンを介した発光反応の強力な阻害剤として働いた可能性が考えられる。

3.3.2 ジチオカルバミン酸以外の有機イオウ試薬による発光反応への影響

ジチオカルバミン酸以外の4種類の有機イオウ試薬によるホタル生物発光反応への影響を、2種類のパラメーターMaxRLU/sならびにRLU/200sの相対値で示した結果がFig.3-3である。2-メルカプトベンゾチアゾール(遊離の酸)がDTTと同等の発光活性を示したのに対し、そのナトリウム塩(SMB-40)では顕著な反応の阻害が認められた。2-メルカプロベンゾチアゾールの構造は、発光反応の結果生じるホタルオキシルシフェリンの分解産物である2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾールの構造に類似している(81)。

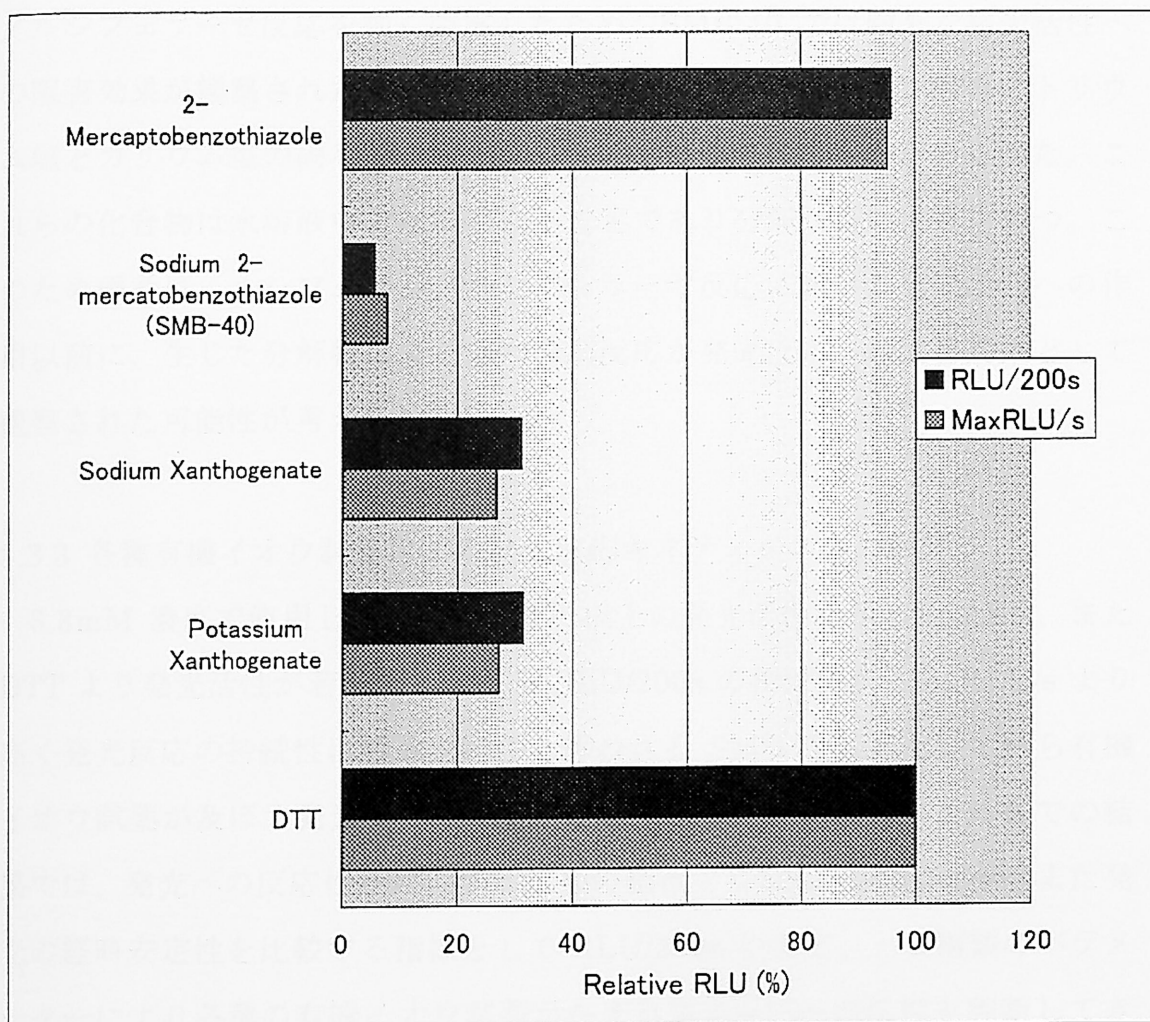


Fig.3-3 ジチオカルバミン酸以外の有機イオウ試薬による相対発光量比較

終濃度 3.3mM の各種ジチオカルバミン酸以外の有機イオウ試薬を含む発光試薬によって得られる相対発光量(RLU: Relative Light Units)として最大発光量(MaxRLU/s)と 200 秒間の積算発光量(RLU/200s)とを比較した。なお、それぞれのカラムは、3.3mM の DTT を発光試薬に添加した場合を 100%とした相対値で表した。

SMB-40 はナトリウム塩のため反応溶液への溶解性が高いため、本実験系における濃度では発光活性に対する反応性よりも阻害剤としての効果が顕著に現されたものと考えられる。すなわち反応溶液中に溶解した 2-メルカプトベンゾチアゾールは、ルシフェラーゼ酵素の活性部位に結合し、ルシフェリン

／ルシフェラーゼ反応を強く阻害したため、SMB-40 では顕著な発光活性への阻害効果が観察されたものと推察される。またキサントゲン酸のナトリウム塩とカリウム塩の両方で、発光反応に対する阻害の傾向が認められた。これらの化合物は水溶液中では非常に不安定であり分解し易い性質を持つ。このため両者は、ルシフェリン／ルシフェラーゼ反応における発光活性への作用以前に、生じた分解物による未知の副反応が発光反応への阻害効果として観察された可能性が考えられる。

3.3.3 各種有機イオウ試薬による発光反応キネティクスへの影響

3.3mM 濃度で使用した場合に DTT 以上の発光活性を示した AED、また DTT より発光活性が若干低めながら RLU/200s の相対値が MaxRLU/s より高く発光反応の持続性に特徴を持つと思われる SMD を選択し、これら有機イオウ試薬が及ぼす発光反応への影響をより詳細に検討した。これまでの結果では、発光への反応性を比較するための指標として MaxRLU/s を、また発光の経時安定性を比較する指標として RLU/200s の測定、と 2 種類のパラメーターにより各種の有機イオウ試薬が与える発光反応への活性を判断してきたが、さらに Fig.3-4 において、発光反応開始から 200 秒までの実際の発光経時変化(キネティクス)を測定した。それぞれの有機イオウ試薬 DTT、AED、SED の最終濃度はいずれもこれまでの測定値で相違が認められた 3.3 mM である。また、実際の有機イオウ試薬の添加による効果を明確にするため、ネガティブコントロールとして、同一組成ながら、有機イオウ試薬を一切含まない発光試薬によるキネティクスもプロットした。

有機イオウ試薬を全く含まないネガティブコントロールでは、他の添加したものに比べ、反応開始で示される MaxRLU/s が低く、また 200 秒間の測定時間中に発光量の顕著な減衰が観察された。このことから、有機イオウ試薬の添加は、本実験で測定された 200 秒間を通してのルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応を増強させる効果を持つことが確認された。一方 DTT を 3.3

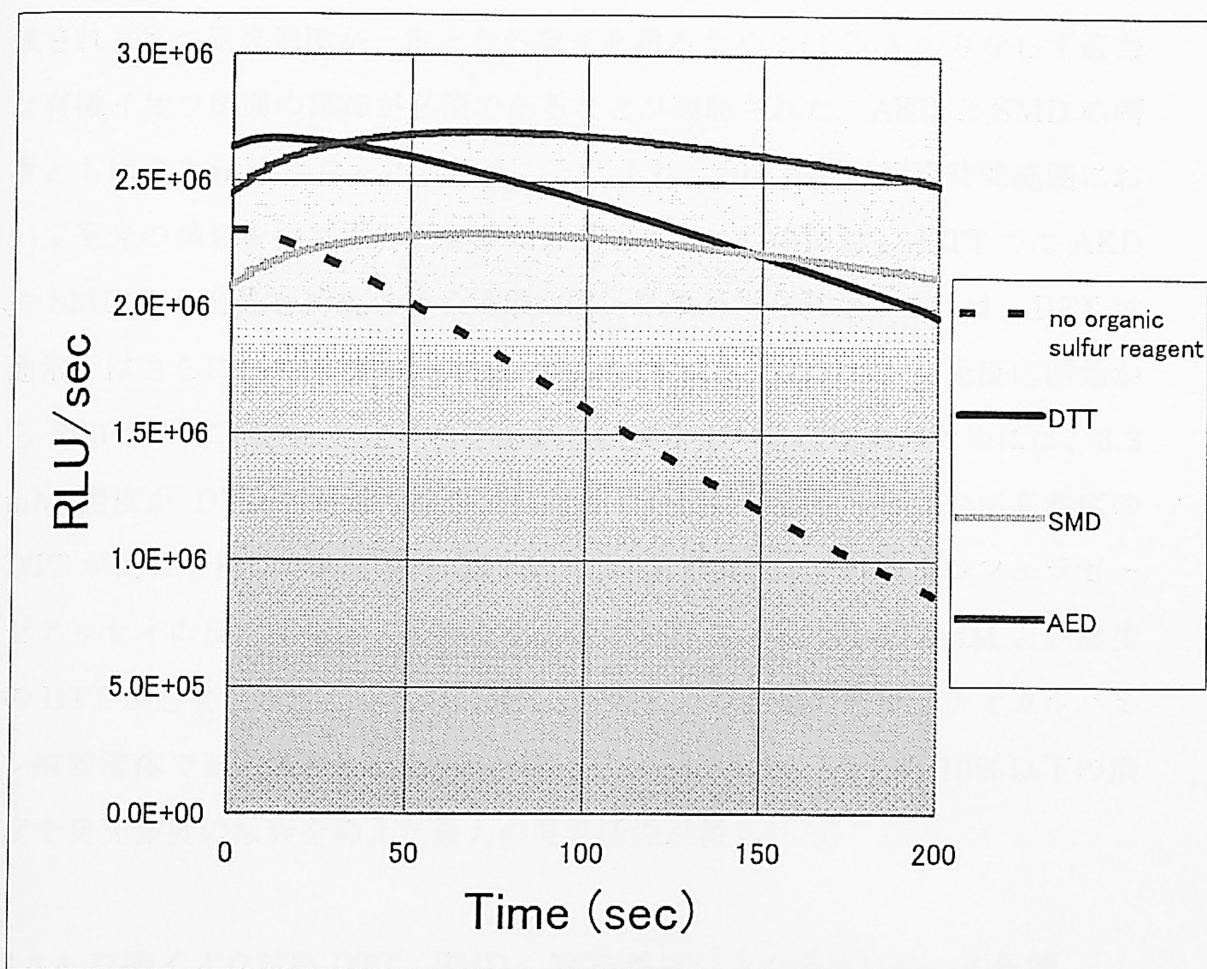


Fig.3-4 ジチオカルバミンによる発光反応 Kinetics の比較

4種類の発光試薬による 200 秒間における発光反応の経時変化(発光反応 Kinetics)を示した。使用した有機イオウ試薬は DTT、SMD、AED で、何れも終濃度を 3.3mM として含む発光試薬を調製した。対照として、有機イオウ試薬を含まない発光試薬による発光反応キネティクスも併せて示した。

mM 加えた反応系では、反応開始直後に最も高い MaxRLU/s を示したものの、同濃度加えた AED や SMD より早く発光が減衰する傾向となった。

これに対し、AED または SMD を添加した反応系では、反応開始直後から発光強度の減衰が抑えられた安定な発光キネティクスを示す傾向が認められた。これらネガティブコントロールを含む全ての発光反応系には充分量の CoA が含まれていることから、ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応で増

強され、且つ発光強度が一定となる発光を得るためには CoA のみならず適当な有機イオウ試薬の添加が必須であることが確認された。AED と SMD の両者ともに 3.3 mM 濃度を添加することにより、200 秒間の測定時間範囲において発光の減衰を抑制する顕著な効果が認められたのに対し、DTT では AED や SMD より発光を持続させる効果は弱い結果が得られた。これは、DTT は通常ではさらに高い濃度 33.3 mM で使用されている(27)が、発光反応開始から 200 秒間における発光キネティクスの安定化および増強のためには、3.3 mM 濃度が DTT の最適な条件ではなく、理由ははっきりしないが高濃度の DTT が効果を持つためと考えられる。これまで実用化されたルシフェラーゼアッセイの反応系では、最適な発光活性を得るためには 33.3mM と高濃度の DTT が必要とされていたのに対し、有機イオウ試薬の中でジチオカルバミン酸誘導体である AED と SMD を用いることにより、DTT の 10%以下の濃度で発光強度の減衰を抑えた最大の発光活性が得られた。

3.3.4 有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度による発光反応への影響

これまでの検討では、各種の有機イオウ試薬濃度を一律に 3.3 mM として比較してきたが、前節 3.3.3 の結果より、発光強度の持続性を測定開始から 200 秒間の発光キネティクスで評価する場合、それぞれの還元剤を使用する濃度の違いにより、発光活性に顕著な影響が生じてしまうことが確認された。そこでそれぞれに特徴を持つ発光活性を示してきた AED、SMD、DTT の添加濃度を 0.01 mM、0.3 mM、3.3 mM、33.3 mM とし、それぞれにおけるルシフェリン/ルシフェラーゼの発光反応へ与える影響を検討した。

Fig.3-5(A)では、それぞれ異なる有機イオウ試薬の濃度における MaxRLU/s をプロットしたもの、また Fig.3-5(B)では、RLU/200 s の値を示した。DTT の濃度上昇に伴い、MaxRLUs 及び RLU/200s とともに増加する傾向が認められ、33.3 mM において両者は最高の発光活性を示した。これとは対照的に、ジチオカルバミン酸類の AED と SMD の発光活性はその濃度に著しく影響さ

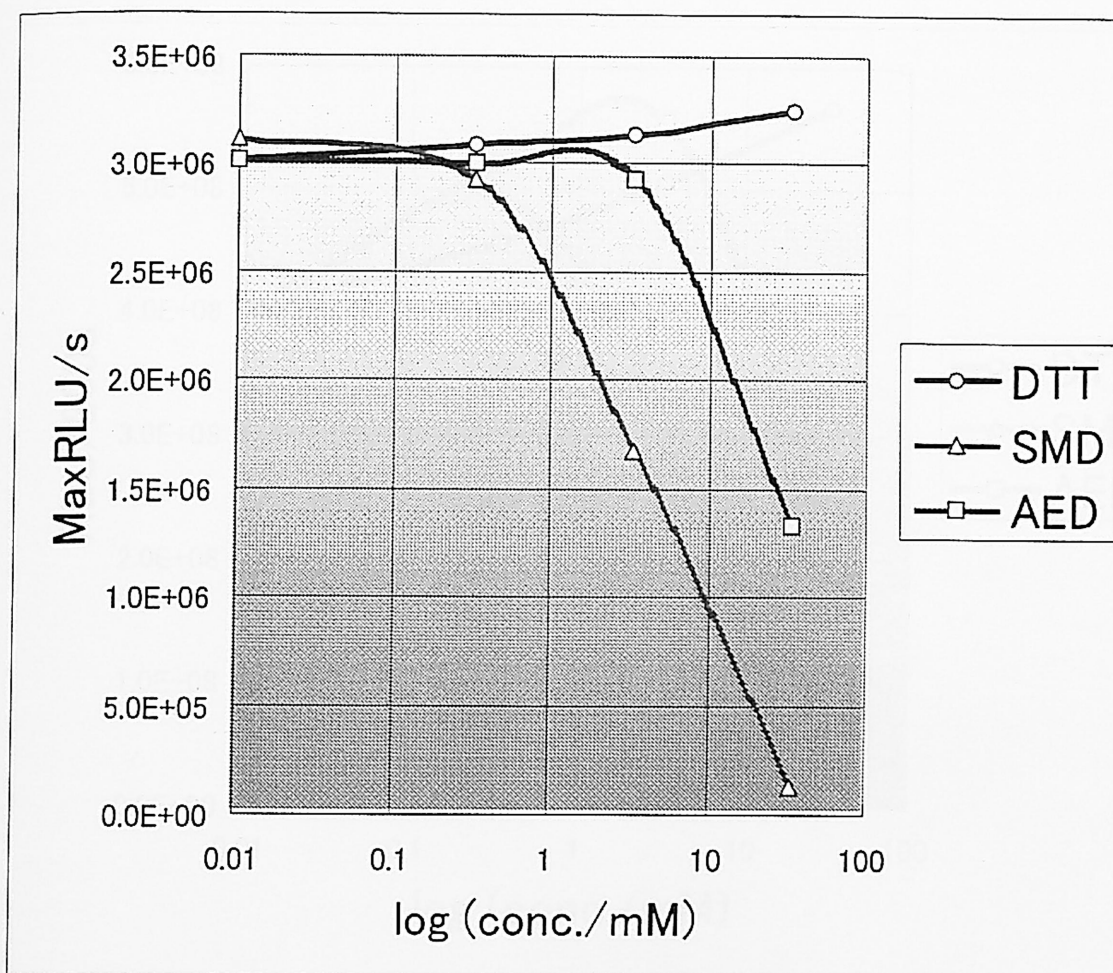


Fig.3-5(A) 最大発光量に及ぼす有機イオウ試薬濃度の影響

各種有機イオウ試薬 (DTT、SMD、AED) の添加濃度を変化させて調製した発光試薬による発光反応で、200 秒間の発光反応における発光経時変化を測定し、その際の最大発光量(MaxRLU/s)の与える影響を示した。

れており、AED の場合はおよそ 3.3 mM、SMD の場合はおよそ 0.3 mM で最高の発光活性を示すなど、低濃度でそれぞれの最適濃度条件が存在することが認められた。さらに興味深いことは、ジチオカルバミン酸に属するこれら有機イオウ試薬は、それぞれの最適な濃度以上の添加条件では、発光活性を急激に減少させる傾向を示した点である。このことから、AED 及び SMD は低濃度ではホタル・ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応を安定化し増強させるが、高濃度条件では極めて強力な阻害効果を持つことが明かとなった。

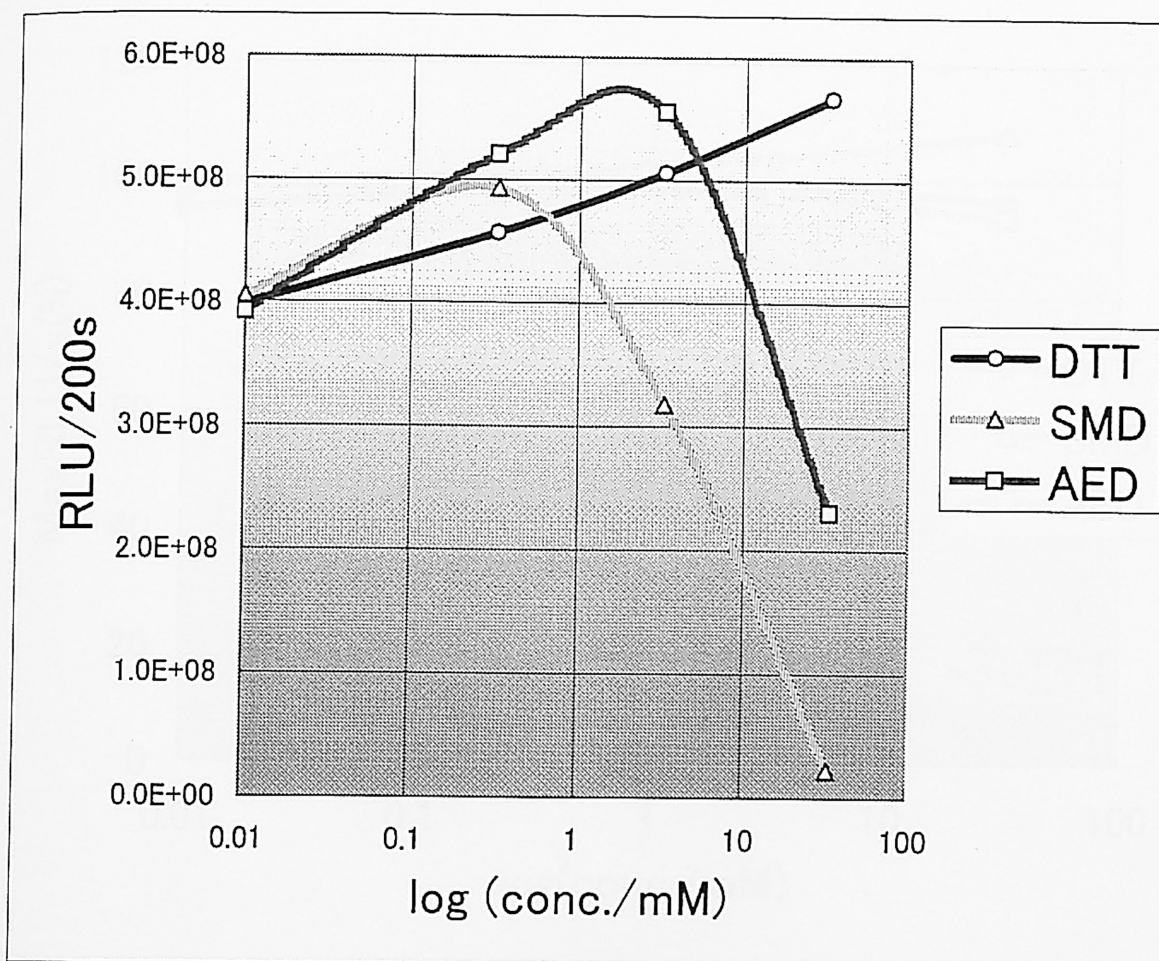


Fig.3-5(B) 積算発光量(200 秒間)に及ぼす有機イオウ試薬濃度の影響

各種有機イオウ試薬(DTT、SMD、AED)の添加濃度を変化させて調製した発光試薬による発光反応で、200 秒間の発光反応における発光経時変化を測定し、その際の 200 秒間にわたる積算発光量(RLU/200s)に与える影響を示した。

3.3.5. 有機イオウ試薬 DTT、SMD、AED 濃度によるルシフェラーゼ酵素への影響

ルシフェラーゼ酵素溶液中に DTT、SMD、AED を各種濃度添加した条件下で、室温(25°C)で1時間静置した際の最大発光量ならびに積算発光量の相対変化量を示した結果を Fig.3-6(A)および Fig.3-6(B)に示した。0.01mM から 33.3mM にわたる高範囲の濃度条件下において、室温1時間では同様の酵素活性保持効果を示した。この結果は、高濃度環境下における SMD や AED

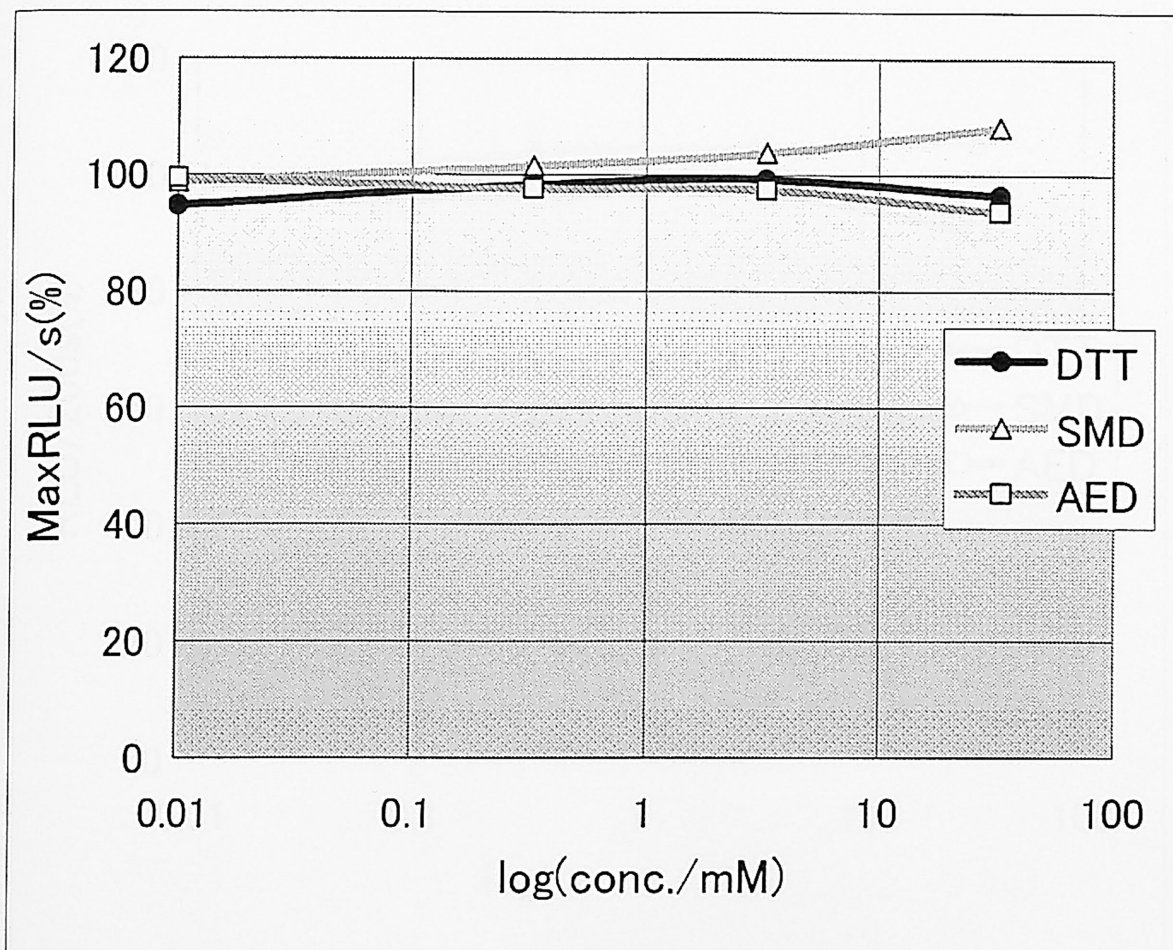


Fig.3-6(A) 各種有機イオウ試薬によるルシフェラーゼ酵素への活性保持(最大発光量)への影響

各種有機イオウ試薬(DTT、SMD、AED)を 0.01mM、0.3mM、3.3mM、33.3mM と異なる濃度にてルシフェラーゼ酵素溶液に加え、室温で1時間インキュベーションする前と後とでの最大発光量(MaxRLU/s)の相対変化率(%)を示した。

などのジチオカルバミン酸による発光活性の低下が、ルシフェラーゼ酵素自体に変性などの作用に起因しないことを示している。特に顕著な発光量低下が観察された 33.3mM に 1 時間酵素を処理した条件下でも、ルシフェラーゼ酵素はほぼ 100%の発光活性が維持している。よって、SMD や AED がタンパクの構造など酵素自体に作用し変性等の効果をもっているのならば、本実験において有機イオウ試薬の濃度に比例した発光活性の低下が認められるは

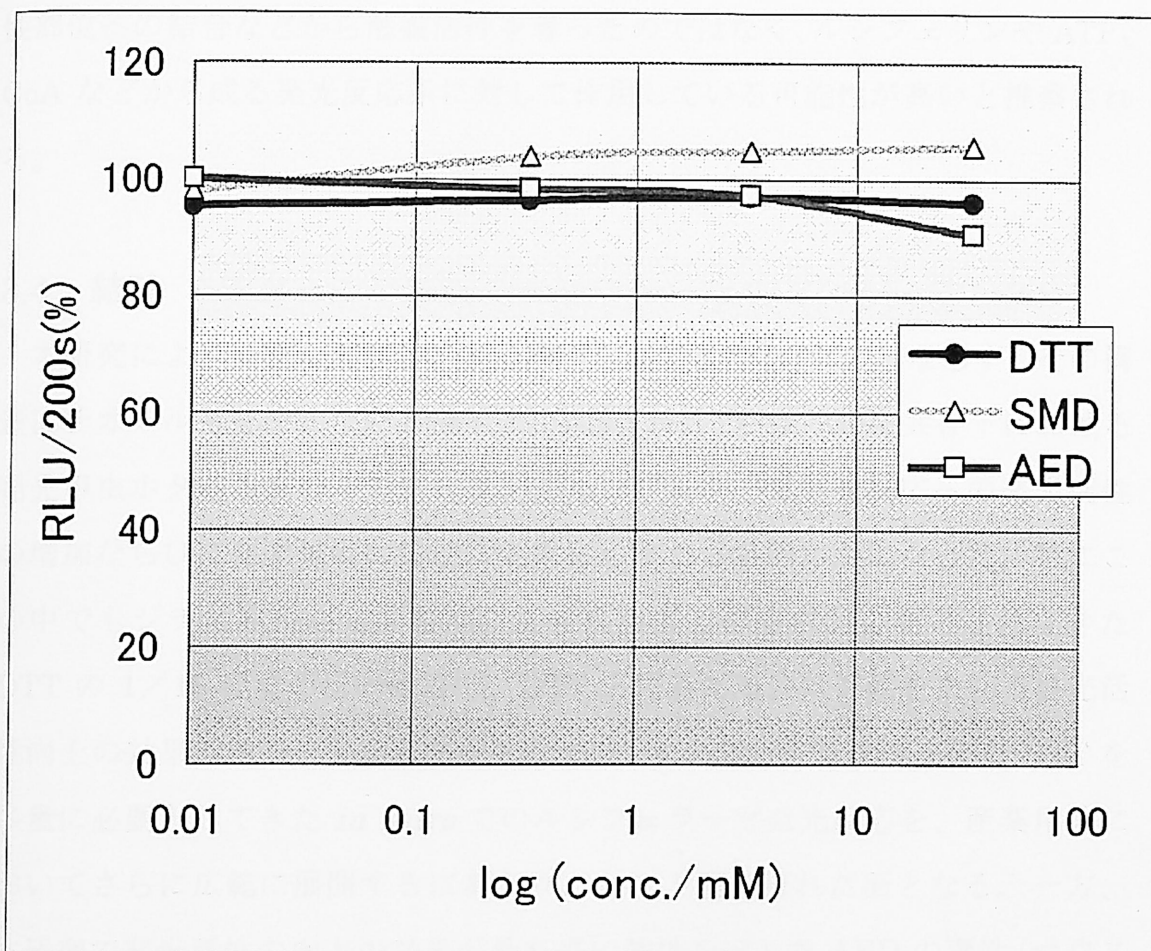


Fig.3-6(B) 各種有機イオウ試薬によるルシフェラーゼ酵素への活性保持(200 秒間の積算発光量)への影響

各種有機イオウ試薬(DTT、SMD、AED)を0.01mM、0.3mM、3.3mM、33.3mMと異なる濃度にてルシフェラーゼ酵素溶液に加え、室温で1時間インキュベーションする前と後とでの200秒間の積算発光量(RLU/200s)の相対変化率(%)を示した。

ずである。また反応性を示す MaxRLU/s において各種濃度における発光活性の差異が認められなかった結果より、高濃度の SED や AED 条件下では多量のジチオカルバミン酸分子がルシフェラーゼ酵素の活性部位に結合し発光活性を阻害するといったオキシルシフェリンと同様の阻害活性を示す可能性も考え難い。つまり高濃度のジチオカルバミン酸により発光活性が急激に低下させる効果は、SMD や AED が酵素タンパクの構造に直接作用し、変性や活

性部位への結合などから触媒活性を奪ったのではなく、ルシフェリンや ATP、CoA などから成る発光反応系に対して作用している可能性が高いと推察される。

3.4 結論

本研究により、還元剤として広く用いられてきた DTT のみならず、その構造にチオール基を持たない有機イオウ試薬においても、CoA 共存下における発光甲虫ホタル由来のルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応への発光活性の増加ならびに発光強度の持続に効果を示すことが明らかになった。特にこの中でもジチオカルバミン酸は、従来高濃度での使用が必要とされてきた DTT の 1/10 程度の低い濃度で、DTT と同等あるいはこれを上回る発光活性向上の効果を持つことが明らかとなった。これは、これまで高価な DTT を多量に必要としてきた *in vitro* でのルシフェラーゼ発光反応を、産業用途においてさらに広範に展開するにあたり、コスト面で優れた面となる。一方、本研究で発光活性の向上の効果が最も高い特性を示した AED の毒性（マウス静脈内 LD₅₀ : 1750mg/kg(82)）は、従来使用されてきた DTT の毒性（マウス静脈内 LD₅₀ : 94mg/kg(83)）に比べ、およそ 20 倍近く低い特徴を持つ。化合物自体の毒性の低さに加え DTT の 1/10 の低濃度で使用可能なジチオカルバミン酸の特性は、前述のコスト面のみならず、使用者に対する安全性などの観点からも優位性を持つ反応系の構築ならびに実用化が期待できる。

発光甲虫によるルシフェリン/ルシフェラーゼ反応において、DTT は反応の過程において酵素の失活を保護し(32)、あるいは CoA のチオール基を還元型に維持する効果(33)が考えられてきた。本研究で用いられた SMD や AED に代表されるジチオカルバミン酸類が、ルシフェラーゼ酵素の構造を変性させるなどして触媒活性を損なう効果を持たないことは確認したが、ルシフェラーゼ酵素の保護や CoA が持つチオール基を還元型に維持するなどの効果を持つかどうかの確認は、今後の研究を待たなければならない。DTT が 33.3mM

の高濃度で発光反応活性の増加に効果を発揮するのに対し、ジチオカルバミン酸類では高濃度で発光反応を著しく阻害するなど、その作用機構には何らかの相違があることが予想される。両者が発光反応に与えるそれぞれの影響についても、ルシフェラーゼ酵素において発光反応を触媒する活性部位における、ルシフェリン、ATP、 Mg^{2+} 、そして CoA を含めた相互作用を検討する必要がある。発光甲虫ホタル科由来のルシフェリン／ルシフェラーゼによる発光反応に影響を及ぼす DTT を含む有機イオウ試薬の作用メカニズムは未だ明らかとされてはいないが、本研究により、有機イオウ試薬は、ホタル発光反応の促進あるいは阻害の両面において反応制御に関与する重要な補因子であることが確認された。今後、有機イオウ試薬に関するさらなる研究は、ルシフェラーゼアッセイ法における CoA の役割、さらには本反応系における発光に至るまでの全てのプロセス解明に向けて、重要な知見を与えてくれるであろうと考えられる。

第4章 産業用途への展開を目指した

ピロリン酸による発光甲虫発光反応の制御

4.1 研究の目的

発光甲虫が行うルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応において、ルシフェリンからルシフェリル-AMP への反応プロセスはルシフェラーゼが持つ ATP リガーゼ活性によって触媒されるが、反応生成物であるピロリン酸は、この反応に対して阻害的に働く(37)と考えられる一方、ルシフェラーゼのターンオーバーを回復させ発光を増強させる(39)と、ホタル発光反応系に対して相反する作用が報告されている。これらピロリン酸の作用及び応用は未だ詳細に検証されていないが、2種類の作用を利用することにより、発光反応の制御系へ適用できる可能性がある。

これまでルシフェラーゼ酵素は、ホタル科に属する北米産ホタル(*Photilus pyralis*)から得られたルシフェラーゼが広く用いられており、その主要な適用用途であるルシフェラーゼアッセイ法及び ATP アッセイ法では、1.1.6 で前述したように産業用途において HTS 法に対応するべく発光反応の制御技術が利用されている。現行の HTS 法では、一定の発光強度を長時間持続できるよう、発光の減衰率が低く発光半減期が数時間レベルの発光反応の実現、かつ発光反応に用いる試薬の供給や管理にかかるコストの低減が求められている。発光半減期の延長に関しては、一連の発光反応における中間生産物を介在させる競合阻害を利用した AMP を添加する方法(35)や炭酸ガスを溶存させる方法(36)が実用化されてきているが、両手法においてもチオール試薬の使用を必要としており、供給や管理に関わるコスト面で問題を残している。また、これらチオール試薬による発光反応系の制御は、ルシフェラーゼアッセイ法においてのみ顕著な効果を発揮するのに対し、ATP アッセイ法における発光反応の制御法としては十分な効果を示さない。これまで ATP アッセイ法における発光反応の制御法としては、塩濃度を増加させることによってル

ルシフェラーゼの発光反応を阻害、半減期を延長させる方法(84)のみが実用化されている。発光反応の初期反応であるルシフェリル・AMP への反応プロセス、及びルシフェラーゼ酵素のターンオーバー向上、の想定される2種類のピロリン酸による制御作用は、ホタル発光反応の長時間化へ有効な効果を示す可能性がある。またピロリン酸はチオール試薬に比べ試薬として安価で安定であるため、産業用途面での適用が容易に進められる可能性も期待できる。

そこで本研究では、ピロリン酸を用いることにより発光甲虫が行うルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応系へ与える影響ならびに効果を検証し、産業用途に適した発光反応の制御系への可能性を検討することを目的とした。具体的には、ホタルルシフェラーゼにおける発光反応では、ルシフェラーゼアッセイ法ならびに ATP アッセイ法において、HTS 法での展開を可能とする長時間発光系に制御すべくピロリン酸の適用を最適化し、チオール試薬に依存しないホタル発光反応系の構築を目標とした。

また一方、発光甲虫による発光反応の産業用途への応用展開において、ホタル科以外の発光甲虫ルシフェラーゼが持つ多彩な異なる発光色、さらには pH 変動によっても色調が影響されない発光色の特徴を活かした、多色同時発光系やさらに高機能化された生物発光反応の用途開発が検討され始めている。そこで、ホタル科以外の発光甲虫由来ルシフェラーゼによるルシフェラーゼアッセイ法の反応系構築を併せて目的として、ホタルモドキ科由来のルシフェラーゼとして鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来の赤色ルシフェラーゼ(50)、またイリオモテボタル科由来のルシフェラーゼとして *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ(74)、さらにはその部位特異的変異体により橙色ルシフェラーゼを作成し、それぞれの発光甲虫ルシフェラーゼによる *in vitro* 発光反応系の制御を試みた。具体的には、それぞれの発光甲虫ルシフェラーゼが行う *in vitro* 発光反応における発光強度やキネティクスに対するピロリン酸による制御効果を解析し、各種発光反応の実用化の可能性を検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 試薬

ホタルルシフェラーゼ酵素標品は、 $10 \mu\text{g/mL}$ を使用した。ホタルルシフェリン(d-(-)-luciferin・K 塩)は Promega 社製(Cat.No.E160X)を、ATP は Amersham Bioscience 社製(Disodium Crystalline、製品 No.21-1006)を、 $\text{CoA}\cdot\text{Li}_3$ はオリエンタル酵母工業(株)製を、ジエチルジチオカルバミン酸アンモニウム塩(AED)は Aldrich 社製を使用した。また上記以外の試薬は、和光純薬工業(株)製の生化学グレードのものを使用した。

4.2.2 発光試薬の調製

ルシフェラーゼアッセイ法用の発光反応(a)、ならびに ATP アッセイ用発光反応(b)に対するピロリン酸の作用を検討した。前者は各実験においてピロリン酸の添加に加え、(a)ルシフェラーゼ発光測定標準試薬： $20\text{mM Tricine}/1.07\text{mM } (\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/2.67\text{mM MgSO}_4/0.1\text{mM EDTA}/33.3\text{mM DTT}/270 \mu\text{M CoA}/470 \mu\text{M d-Luciferin}/530 \mu\text{M ATP}$ (pH 7.9~8.0) の組成ならびに最終濃度を用いた。後者は、(b)ATP 発光測定標準試薬： $25\text{mM Tris-Acetate}/0.1\text{mM EDTA}/50\text{mM Mg Acetate}/0.5\text{mM DTT}/10\% \text{Glycerol(v/v)}/1.5\text{mg/mL BSA(Bovine Serum Albumin)}/750 \mu\text{M d-Luciferin}/5 \mu\text{g/mL Luciferase(pH 7.75)}$ とし、ピロリン酸を添加した。

4.2.3 発光反応の測定法

4.2.3-1 発光反応開始から 100 秒間までの短時間測定

ルシフェラーゼ酵素溶液(100ng/mL)を専用の測定チューブ(SARSTEDT 社製 No.55.484)の底部に $20 \mu\text{L}$ 採り、続いて調製した各種ルシフェラーゼ発光測定試薬 $100 \mu\text{L}$ を添加、速やかにルミノメータ LB9506 にセットし、試薬添加直後から 5 秒間経過ごとの経時発光量(RLU/秒)を 100 秒後まで測定した。なお、発光甲虫ホタル由来ルシフェリン/ルシフェラーゼによる発光

反応は温度によって顕著に影響されることが知られていることから、酵素溶液を除く全ての調製試薬類は使用前に 23℃に平衡化させ、また測定作業も 23℃の恒温室で行った。測定は 3 回行いその平均値を用いた。

4.2.3-2 発光反応開始から 3 から 5 時間における長時間測定

ルシフェラーゼアッセイ法の場合にはルシフェラーゼ酵素溶液(100ng/mL)を、また ATP アッセイ法の場合には ATP 溶液 (1×10^{-12} M/25mM HEPES(pH7.0))を、マイクロタイタープレート(Corning 社製 No.3912)のウェル内に 10 μ L ずつ分注し、続いて調製したルシフェラーゼ発光測定試薬あるいは ATP 発光測定試薬をそれぞれのウェルに 100 μ L ずつ加え、速やかにルミノメータ (Berthold 製 LB96V Plus)内に移し装置内で測定を開始してから 3 ~ 5 時間の経時発光量の変動を測定した。さらに得られた発光反応の特徴を示すパラメータとして以下の項目を設定し、それぞれの計算値を求めそれぞれの発光反応パターンを比較・評価した。設定したパラメータは、

- ① 最大発光量(MaxRLU/秒)：発光反応計測時に得られた 1 秒間当たりの
発光強度の最大値
- ② 最大発光時間(MaxTime)：最大発光量が得られる迄の反応経過時間
- ③ 減衰率(Red.Ratio)：測定時間内での 1 分間当たり平均の発光減衰量
- ④ 発光半減期(Half Life)：最大発光量を示した後、発光強度が 1/2 になる
までに要する時間

なお甲虫ホタル由来ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応は温度によって大きく影響を受ける為、全ての操作ならびにルミノメータによる測定は 23℃に設定された恒温室にて行った。また測定 3 回行い、その平均値を求め、図表に記した。

4.2.4 ルシフェラーゼアッセイ法 (短時間測定) におけるピロリン酸の作用

ルシフェラーゼアッセイ法において発光反応の制御に効果があるとされる

CoA や DTT による影響を除き、ピロリン酸による効果と対比させるため、チオール類を含まない組成によるルシフェラーゼ発光測定試薬の調製を行った。すなわち 20mM HEPES/5mM MgSO₄/530 μM ATP/470 μM ルシフェリン/2mM AED(pH 7.9)を調製し、これに対してピロリン酸カリウム(PPiK)を最終濃度がそれぞれ 0 μM、50 μM、100 μM、200 μM、500 μM、1mM となるように加え、それぞれ PPiK 濃度の異なるルシフェラーゼ発光測定試薬とした。また対照としてチオール試薬を含み、従来用いられてきたルシフェラーゼ発光測定標準試薬を用い、発光特性を比較した。

4.2.5 ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用

長時間の発光半減期を持つ発光反応系における経時変化を比較するため、チオール試薬を含むルシフェラーゼ発光測定標準試薬に最終濃度 10%(v/v)となるようグリセリンを加えた。これは反応溶液中でのルシフェラーゼ酵素の安定性を向上させるためである。さらに最終濃度 1.5mM となるように高濃度の PPiK を加えたルシフェラーゼ発光測定試薬を調製した。対照として、PPiK を含まないものも併せて調製し、これら 2 種類のルシフェラーゼ発光測定試薬による 5 時間の発光特性を比較した。

4.2.6 ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における

ピロリン酸と有機イオウ試薬の影響

ピロリン酸による発光反応への安定化に寄与する作用に加え、同様に発光反応の制御に効果があるとされる還元剤 DTT に代わる有機イオウ試薬による効果を検討した。チオール試薬の CoA ならびに DTT を含まず、10%グリセリン(v/v)を含むルシフェラーゼ発光測定試薬を調製し、これをルシフェラーゼ発光測定試薬 A とした。続いてこれを用いて、最終濃度 2mM の PPiK を添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 B、また最終濃度 2mM の AED を添加したルシフェラーゼ発光試薬 C、さらには最終濃度 2mM の AED 及び最

終濃度 2 mM の PPiK とを併せて添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 D、の 4 種類をそれぞれ調製した。続いて、これら 4 種類の発光測定試薬による 3 時間の発光特性を比較した。

4.2.7 ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における

異なるピロリン酸塩の影響

ピロリン酸の供給源としてカリウム塩以外のピロリン酸塩による差異を確認するため、4.2.6 と同様にチオール試薬の CoA ならびに DTT を含まないが 2mM AED ならびに 10%グリセリン(v/v)を含むルシフェラーゼ発光測定試薬を調製し、これをルシフェラーゼ発光測定試薬 E とした。続いてこれにピロリン酸ナトリウム (PPiNa) を最終濃度 2mM 添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 F、またピロリン酸(PPi)を最終濃度 2mM 添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 G、さらにピロリン酸カリウム (PPiK) を最終濃度 2mM 添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 D (上記 4.2.6 と同一の組成)、の 4 種類をそれぞれ調製した。続いて、これら 4 種類の発光測定試薬による 5 時間の発光特性を比較した。

4.2.8 ATP アッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用

ATP アッセイ法における発光反応へのピロリン酸の効果を検討するため ATP 発光測定標準試薬と、これに PPiK を最終濃度 1mM となるよう加えた ATP 発光測定試薬を調製し、これら 2 種類の ATP 発光測定試薬によるそれぞれ 5 時間の発光特性を比較した。

4.2.9. イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼの作成

イリオモテボタル科由来のルシフェラーゼとして *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ遺伝子を大腸菌発現ベクター pBluescript に導入した pB-RoL ベクター(74)を用い、226 番目のトレオニン残基をアスパ

ラギン酸に置換した部位特異的変異体を作成した。部位特異的変異体の作成には、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE 社製, Cat.No.200518))を用い、pB-RoL と変異挿入プライマー(5'CCC TTA TTC GGC AAT AGA ACT ATT CC3')及びその相補鎖を用いた Non-PCR 熱サイクル法による DNA 増幅反応を行った。増幅反応後、制限酵素 *Dpn* I 消化により、変異の導入されていないプラスミドを除き、大腸菌 XL1-Blue に形質転換し、形成された部位特異的変異プラスミドを増幅・回収した。得られたプラスミドは、Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Bioscience 社製)、DNA シーケンサー Gene Rapid(Amersham Bioscience 社製)を用いて塩基配列を決定しプラスミド上の部位特異的変異を確認した。

変異体プラスミドが発現したルシフェラーゼの発光スペクトルは、F-4500 型分光光度計(日立製作所社製)を用い、菌体抽出液 0.2mL に対してシフェリン溶液(0.5mM d-Luciferin/2mM ATP/4mM MgSO₄/0.5mM CoA/1% TritonX-100(v/v)/0.1mM sodium phosphate buffer(pH8.0)) 1.8mL を添加し、スキャンスピード 240mm/min、フォトマル感度 700V にて 450nm から 700nm の波長域を測定した。

4.2.10 発光甲虫ルシフェラーゼの発光反応系への適用

ホタル科の北米産ホタル由来ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応へのピロリン酸による影響に加え、ホタル科以外の発光甲虫ルシフェラーゼによる発光反応への影響を検討した。対象としたホタル科以外のルシフェラーゼは、ホタルモドキ科ルシフェラーゼとして鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来の赤色ルシフェラーゼ(50)、さらにはイリオモテボタル科由来のルシフェラーゼとして *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ(74)と、この 226 番目のトレオニン残基をアスパラギン酸に置換した部位特異的変異体の橙色ルシフェラーゼを作成しこれを用いた。これら 3 種のルシフェラーゼは

第2章で述べたホタルモドキ科由来の鉄道虫赤色ルシフェラーゼ以外、酵素標品が調製されていない。そこで、それぞれの遺伝子を組み込んだベクターを哺乳細胞に導入し、細胞内で発現されたルシフェラーゼに対してルシフェラーゼアッセイ法を行い、その際にピロリンが与える発光活性への影響を比較した。細胞内で3種類のルシフェラーゼを発現させるために使用した3種類のプラスミドは、pEX-Red (ホタルモドキ科の鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来の赤色ルシフェラーゼ)、pEX-ROL(イリオモテボタル科の *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ)、pEX-ROLO(イリオモテボタル科の *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の橙色ルシフェラーゼ)であり、それぞれ pGV-C2 発現ベクター (東洋インキ製造(株)製) 上の *luc+* 遺伝子と各々のルシフェラーゼ構造遺伝子とを置換して作成した。

37°C、5%の CO₂ 濃度に調整した CO₂ インキュベーター (三洋電機製 MCO-17IC) で DMEM(+serum, -P/S : SIGMA 社製)培地により培養した COS7 細胞を用いた。6 ウェルプレート (NUNC 社製 No.140675) に COS7 細胞が 3×10⁵ cells/well/2mL となるよう培養し、トランスフェクション用試薬 (Invitrogen 社製) を用いて 1 μg の各プラスミドを COS7 内に導入 (トランスフェクション) した。CO₂ インキュベーターにて 48 時間培養した後 500 μL の「シーパンジー用細胞溶解剤(東洋インキ製造株式会社 : 製品番号 PLD-30)」を各 well に加え細胞を溶解させルシフェラーゼ酵素を抽出した。室温で5分間静置後、異なるプラスミド3種を発現させた細胞から得られたライセート 20 μL をルミノメータ LB9506 用のキュベットに加えた。

ホタル科以外のルシフェラーゼ発光測定試薬として、20mM HEPES / 5mM MgSO₄ / 530 μM ATP / 470 μM ルシフェリン / 2mM AED(pH 7.9)を調製し、これに対して PPIK を終濃度がそれぞれ 0 μM、25 μM、50 μM、75 μM、100 μM、125 μM となるよう PPIK 濃度の異なる6種類のルシフェラーゼ発光測定発光試薬を調製した。3種のプラスミド pEX-Red、pEX-ROL、pEX-ROLO を細胞導入した哺乳細胞のそれぞれの抽出物 (ライセート) 20

μL に対して、PPiK 濃度の異なる 6 種類のルシフェラーゼ発光測定試薬を各々 $100\ \mu\text{L}$ 添加し、得られる短時間測定での発光量を比較した。

4.3 結果および考察

4.3.1 ルシフェラーゼアッセイ法（短時間測定）におけるピロリン酸の作用

北米産ホタル由来ルシフェラーゼ酵素を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、発光試薬にピロリン酸を加えた場合の発光反応の経時変化を Fig.4-1 に示した。比較となるルシフェラーゼ発光標準測定試薬（標準試薬）では、CoA と DTT のチオール試薬の作用により、反応開始から 100 秒間にわたり安定な発光強度が得られ、発光反応開始から 100 秒間後での発光強度の残存率は 96% 強であることが確認された。これに対し、本実験で調製したチオール類を含まない組成によるルシフェラーゼ発光測定試薬の発光反応では、ピロリン酸カリウム(PPiK)を全く含まない場合、試薬添加直後から急速に発光が減衰し、極めて低いレベルで発光強度が推移する Flash 発光が観察され、反応開始から 100 秒間で 9% の発光が残存するのみであった。

しかしながら、PPiK 添加濃度を $50\ \mu\text{M}$ 以上とすることにより、発光反応の減衰が緩和される傾向となり、 $100\ \mu\text{M}$ 以上の PPiK 濃度では、発光反応開始から 100 秒間経過時において 83~86% と、ほぼ一定の発光強度が保持された。特に $100\ \mu\text{M}$ 濃度の PPiK 共存下では、発光強度はルシフェラーゼ発光標準測定試薬（標準試薬）には及ばないまでも、反応開始から 100 秒間にわたって比較的安定な発光強度を保っていた。このことから、CoA や DTT など、発光反応における発光強度の増加や安定化に効果があるとされたチオール試薬を用いない反応系でも、PPiK 添加により Flash 発光を抑えた Glow 発光反応へ改良することが可能であることが明らかとなった。その一方で、PPiK 濃度を $200\ \mu\text{M}$ 以上に増加させることにより、反応の開始時点から発光強度が低く抑制される作用が認められ、この初期発光の阻害効果は PPiK 濃度に依存した。よって、 $200\ \mu\text{M}$ 以上では、初期の発光強度が低下すること

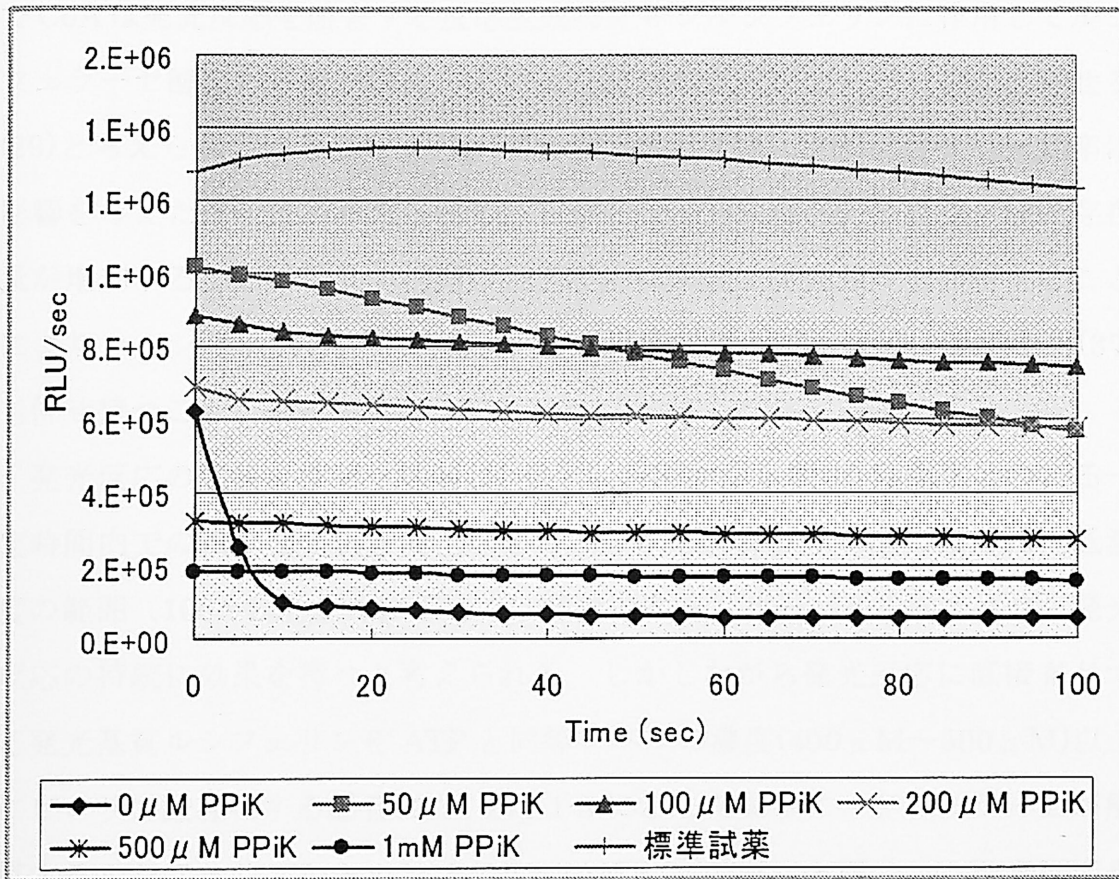


Fig.4-1 ルシフェラーゼアッセイにおけるピロリンによる発光経時変化への影響

ピロリン酸カリウム(PPIK)を $0 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $500 \mu\text{M}$ 、 1mM を含むルシフェラーゼ発光測定試薬(組成は本文中に記載)を北米産ホタル由来ルシフェラーゼと反応させた際の発光経時変化。対照としてルシフェラーゼ発光測定標準試薬(図中では「標準試薬」と記載)も併せてプロットした。ルシフェラーゼ酵素溶液に発光試薬を添加した時点を発光反応開始とし、その後100秒間の発光強度の変化(RLU/秒)を示した。

が明らかとなった。

ホタルルシフェラーゼによる発光反応の発光強度の増加ならびに安定化に DTT 以上の効果が報告されている AED を含んだ反応系で、PPIK が存在しない場合には急速に立ち上がり速やかに発光強度が減衰する Flash 発光が観察された。この急速な減衰は PPIK の添加により緩和されることから、これま

で CoA は発光反応を阻害する反応生成物オキシルシフェリンに作用してルシフェラーゼ酵素から取り除くことにより酵素のターンオーバーを向上させる(29)と考えられていることから、ピロリン酸が同様にターンオーバー効率に影響を与えた可能性が考えられる。しかしながら同時に、ピロリン酸の存在量が増加することにより、初期の発光反応において発光強度を抑制することにより、ルシフェリン/ルシフェラーゼ反応に対して阻害的に働く作用(37)も併せ持つことが確認された。

発光反応の急激な減衰を抑制し、発光反応開始から数 10 秒間までのある一定時間内での積算発光量を向上させることから、ピロリン酸は限られた低濃度の範囲 (100~200 μM 以下) では酵素のターンオーバーを向上させ、発光反応の持続に効果を持つと考えられる。しかしながら発光反応に直接寄与する発光基質ルシフェリンや ATP と同等レベルの濃度(400 μM ~500 μM)以上にピロリン酸存在する場合には、Fig.1-3 に示したようにルシフェラーゼが触媒するルシフェリンからルシフェリル-AMP への反応と競合し、発光反応自体を阻害する方向に働くものと考えられる。

4.3.2 ルシフェラーゼアッセイ法 (長時間測定) におけるピロリン酸の作用
ピロリン酸の相反する 2 種の作用を活用することにより、ルシフェラーゼアッセイ法の反応において、初期発光量と発光の減衰をピロリン酸濃度によって制御することができる可能性が示唆された。特に初期発光量を抑える効果はこれまで報告されている炭酸ガス(36)や AMP(35)を介在させ、ホタルルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応を長時間持続させる効果に類似している。4.3.1 では発光反応開始から 100 秒間の発光の安定性を確認したに過ぎないが、ルシフェラーゼ酵素の安定化剤としてグリセリン共存下、ピロリン酸添加濃度をさらに増加させた場合の反応開始から数時間までの発光量の変化を計測した結果を Fig.4-2、またその際の発光反応の特徴を示す各種パラメータを Table4-1 に示した。チオール試薬を含むが、PPiK を含まないルシフェラー

ゼ発光測定試薬による発光反応は、測定開始より高い発光量を示したが、徐々に減衰し、測定開始後 60 分間で発光量はおよそ 50%にまで低下し、発光半減期は約 61 分間となった。これに対して 1.5mM の PPIK を添加した 1.5mM PPIK を含むルシフェラーゼ発光測定試薬による発光反応では、最大発光量は前者の 28%と低めに抑えられたものの、発光反応開始から 10 分後に発光量 (RLU/秒) は一定値を取りながら徐々に減衰した。その後 5 時間を経過した時点でも最大発光量の 60%以上の発光量を保持しており、発光半減期はおよそ 5.5 時間であった。また発光の減衰率も顕著に抑制され、1 分間あたりの発光強度の減少が大幅に抑制され、一定な発光反応が得られた。

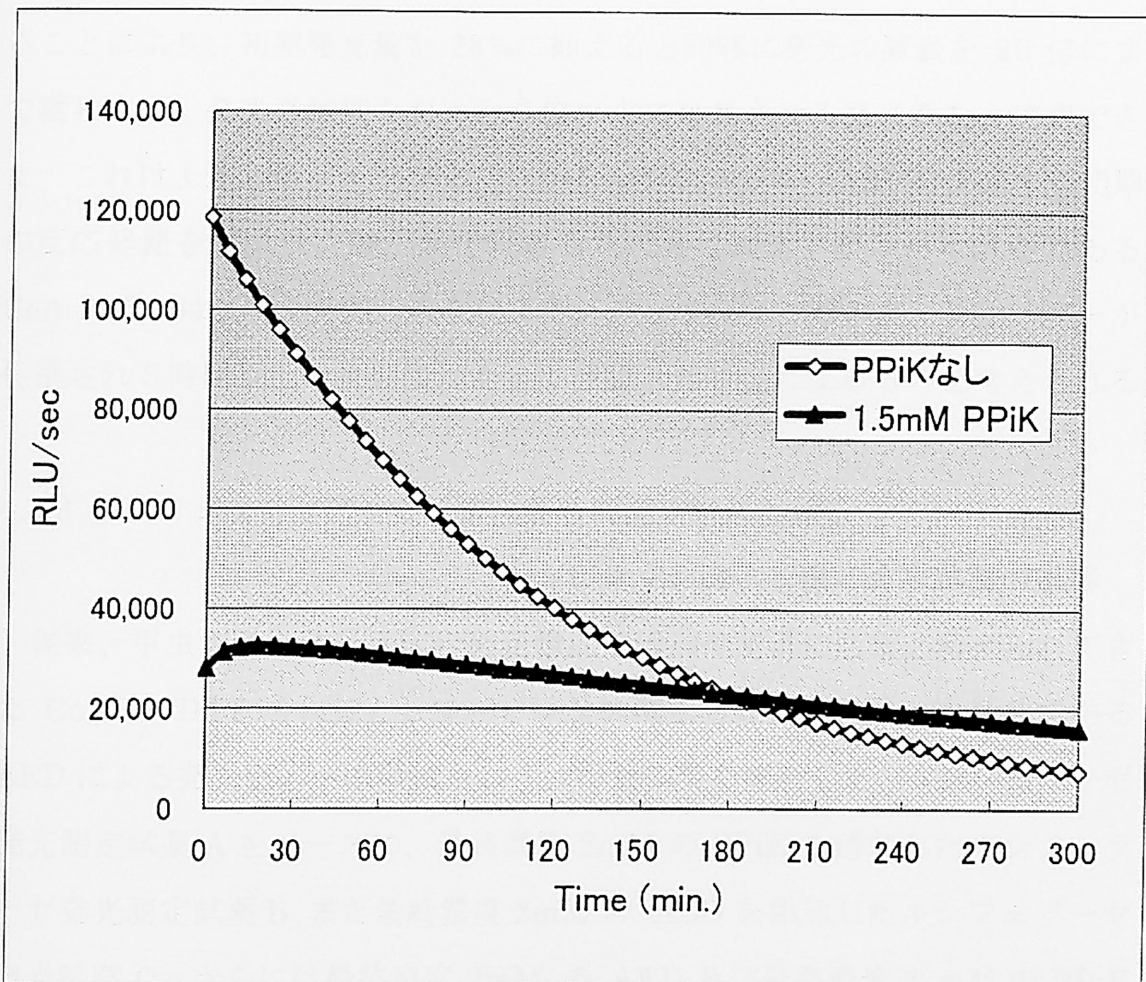


Fig. 4-2 ルシフェラーゼアッセイ法におけるピロリン酸添加の効果

1.5mM のピロリン酸カリウムを含んだルシフェラーゼ発光測定試薬と含まない試薬とでの、5 時間における発光反応の発光強度の時間経過を示した。

Table 4-1 ルシフェラーゼアッセイ法におけるピロリン酸の効果(パラメータ比較)

	最大発光量 (MaxRLU/秒)	最大発光時間 (分後)	減衰率 (RLU/分)	発光半減期 (分間)	相対最大 発光量 (%)
ピロリン酸なし	124054	0	1017	61	100
1.5 mM PPIK	34120	18	52	329	28

ルシフェリン(470 μ M)や ATP(530 μ M)の2倍以上の濃度に PPIK を加えることにより、初期発光量を 28%に抑えると同時に発光の減衰を 20 倍にまで緩和させ、発光半減期をおよそ 5 倍以上に延長させる発光系を、確認できた。これは上述した、ルシフェリンからルシフェリル-AMP を生成する初期の反応経路をピロリン酸が競合阻害したことに加え、チオール試薬である CoA あるいはピロリン酸の存在により、ルシフェラーゼのターンオーバーが促進され 5 時間以上の長期にわたって持続したことによるものと考えられる。

4.3.3 ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における

ピロリン酸と有機イオウ試薬の影響

従来、甲虫ホタル発光反応の発光強度の増加や制御に必須と考えられてきた CoA や DTT の代替として、ピロリン酸ならびに有機イオウ試薬である AED による発光反応への単独もしくは相乗効果を検討した。ルシフェラーゼ発光測定試薬 A をベースに、最終濃度 2mM の PPIK を添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 B、また最終濃度 2mM の AED を添加したルシフェラーゼ発光試薬 C、さらには最終濃度 2mM の AED 及び最終濃度 2 mM の PPIK とを併せて添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 D、これら 4 種類の発光試薬によって得られるそれぞれの発光量の経時変化を Fig.4-3 に、また各々の発

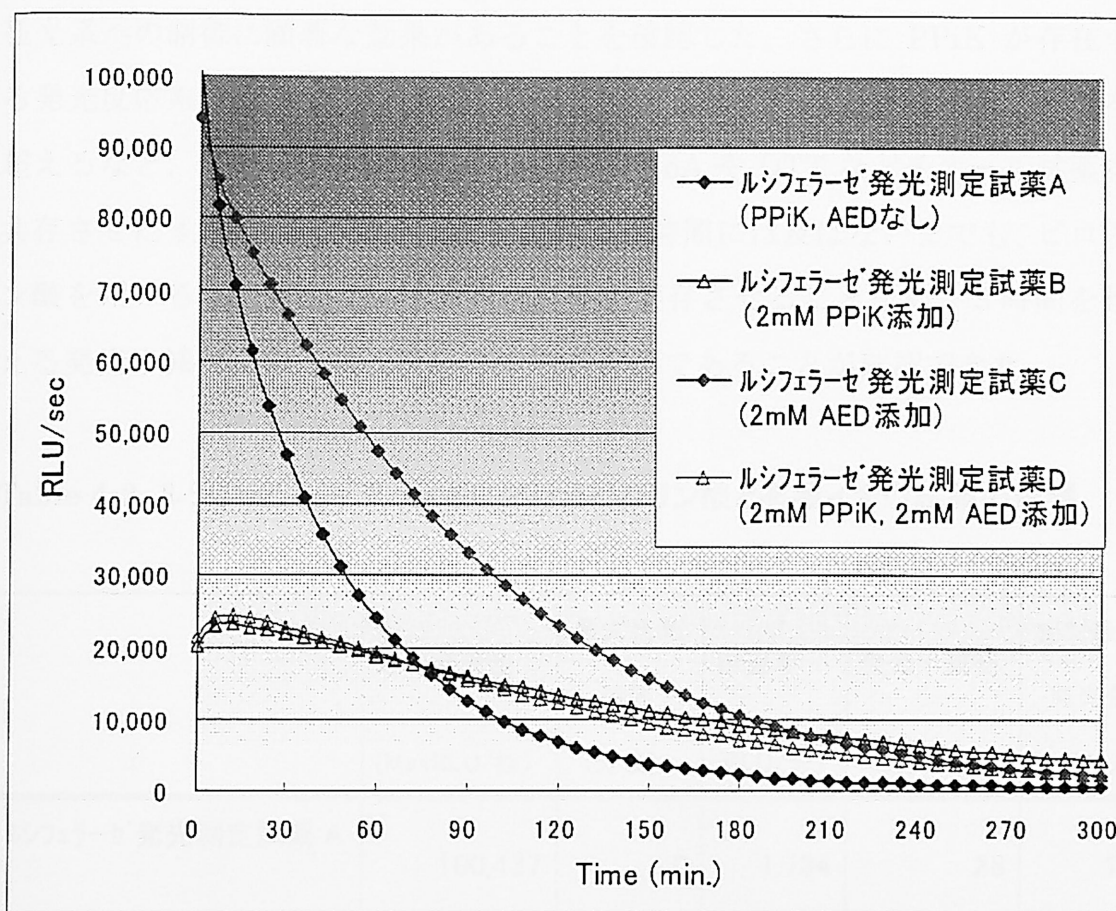


Fig.4-3 ルシフェラーゼアッセイ法におけるピロリン酸と有機イオウ試薬の影響

ルシフェラーゼ発光試薬におけるピロリン酸カリウム(PPIK)およびジエチルジチオカルバミンソーダ(AED)の存在・非存在下でのホタルルシフェリン／ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示した。

光反応の特徴をまとめたものを Table 4-2 に示した。PPIK を含まない発光反応系では、高い発光強度を示した後に急速に減衰したが、有機イオウ試薬である AED が共存することによって、その減衰は若干緩和される傾向になった。しかしながら AED の有無において、発光半減期はそれぞれ約 30 分と 50 分と大差なく、有機イオウ試薬のみでは発光反応における発光強度を持続させる効果は充分でないと考えられた。これに対し、2mM PPIK の添加により初期発光強度の増加が抑えられ、かつ発光反応の急速な減衰が抑えられることから、発光半減期の延長ならびに減衰率の抑制から、発光強度が一定となる

発光系への制御に顕著な効果があることを確認した。さらに PPIK が存在する発光反応系では、AED の有無に関わらず、それぞれの半減期が 180 分間を超えるなど、発光寿命が延長した。さらに CoA や DTT などチオール試薬を共存させた 4.3.2 で得られた発光半減期 5.5 時間には及ばないまでも、ピロリン酸を用いることにより、チオール試薬を共存させることなく、3 時間を超える発光半減期を持つ発光反応の制御が可能であることが確認できた。

Table 4-2 ルシフェラーゼアッセイにおけるピロリン酸と有機イオウ試薬の影響

(パラメータ比較)

	最大発光量 (MaxRLU/秒)	最大発光 時間 (分後)	減衰率 (RLU/分)	発光半減期 (分間)	相対最大 発光量 (%)
ルシフェラーゼ発光測定試薬 A	100,437	0	1,794	28	100
ルシフェラーゼ発光測定試薬 B (2mM PPIK)	23,211	12	62	187	23
ルシフェラーゼ発光測定試薬 C (2mM AED)	94,160	0	923	51	94
ルシフェラーゼ発光測定試薬 D (2mM PPIK, 2mM AED)	24,373	12	67	181	24

CoA 存在下におけるホタルルシフェラーゼアッセイ用の発光反応を数十秒単位で計測する際には、その発光反応における発光強度の増加と発光キネティクスの安定化において AED などの有機イオウ試薬の存在は顕著な効果を示した。しかしながら CoA を除き、かつ発光持続時間を数時間レベルまで拡大させた反応系では、AED は発光の減衰を抑制することにより若干の発光強

度を維持する効果を示したが、ピロリン酸による効果の方が遙かに顕著に観察される結果となった。これはピロリン酸自身がホタルルシフェリン/ルシフェラーゼ反応により直接的に作用し、発光反応の制御に働くのに対し、有意イオウ試薬はその補助的な役割を担っていることに依ると推察される。

4.3.4 ルシフェラーゼアッセイ法（長時間測定）における

異なるピロリン酸塩の影響

PPiK 以外のピロリン酸供給源が及ぼす発光経時変化を Fig.4-4 に示した。

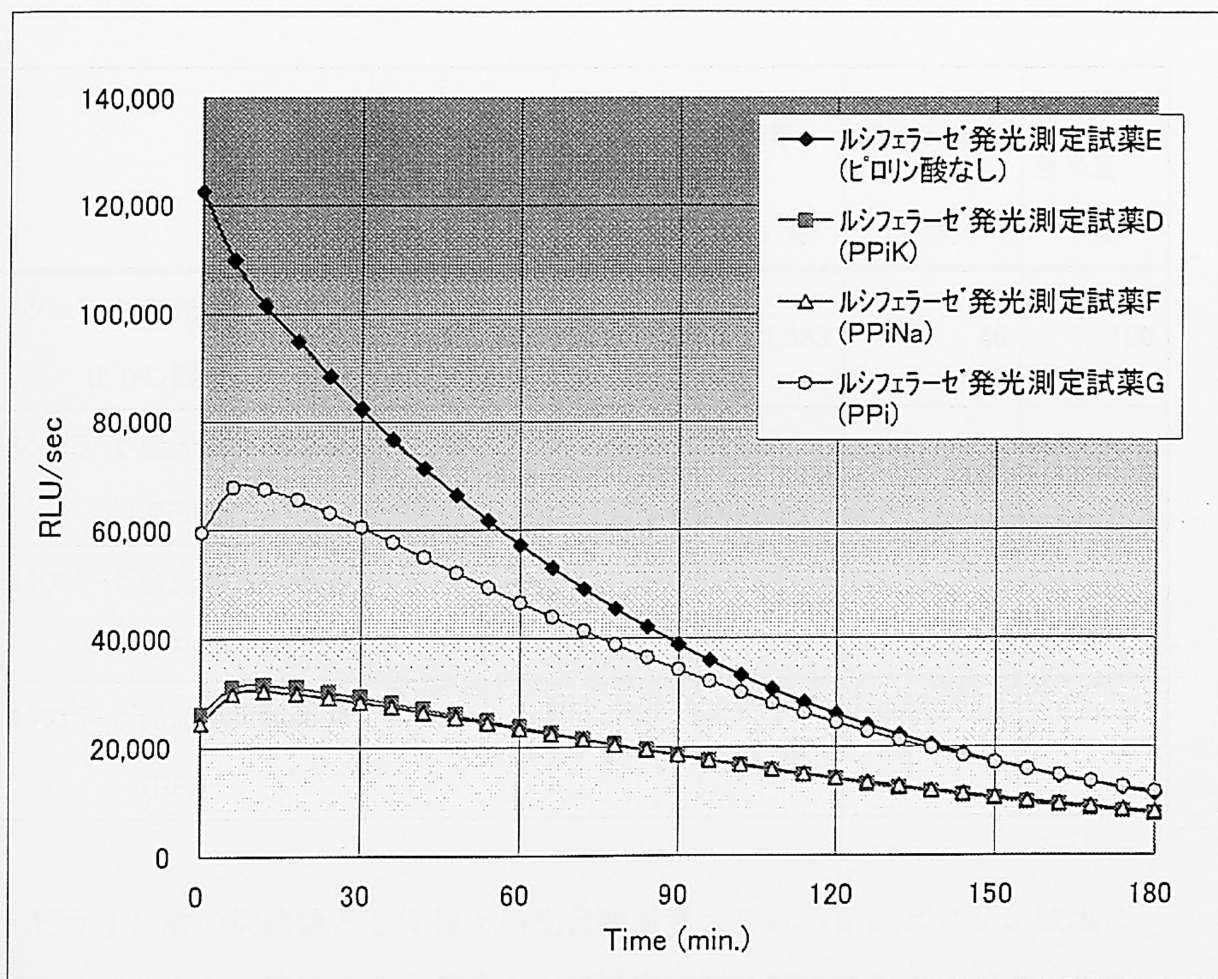


Fig. 4-4 種々のピロリン酸塩によるルシフェラーゼ発光反応への影響

ルシフェラーゼ発光試薬におけるピロリン酸(PPi)、ピロリン酸カリウム(PPiK)またはピロリン酸ナトリウム(PPiNa)の存在下・非存在下(ピロリン酸なし)でのホタルルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示した。

ここで、ピロリン酸を含まないものをルシフェラーゼ発光測定試薬 E とし、これをベースにピロリン酸ナトリウム (PPiNa) を最終濃度 2mM 添加したものをルシフェラーゼ発光測定試薬 F、また遊離のピロリン酸(PPi)を最終濃度 2mM 添加したものをルシフェラーゼ発光測定試薬 G、さらにピロリン酸カリウム (PPiK) を最終濃度 2mM 添加したルシフェラーゼ発光測定試薬 D とした。また各々の発光反応の特徴をまとめたものを Table 4-3 に示した。

Table 4-3 ピロリン酸供給源による発光反応への影響(パラメータ比較)

	最大発光量 (MaxRLU/秒)	最大発光 時間 (分後)	減衰率 (RLU/分)	発光半減期 (分間)	相対最大 発光量 (%)
ルシフェラーゼ発光測定試薬 E (ピロリン酸なし)	122,651	0	1,333	46	100
ルシフェラーゼ発光測定試薬 D (PPiK)	31,448	12	87	181	26
ルシフェラーゼ発光測定試薬 F (PPiNa)	30,291	12	81	186	24
ルシフェラーゼ発光測定試薬 G (PPi)	67,904	6	306	111	55

ピロリン酸の供給源として種々の化合物が考えられるが、ピロリン酸塩には水に不溶または難溶のものが多く、本研究には水溶性でごく一般に入手できる3種を比較検討した。ピロリン酸を全く含まない反応系では、測定開始より高い発光量を示し、その後速やかに減衰を続け、測定開始後 60 分間で発光量は 50%以下まで低下し、発光半減期は 46 分間であった。これに対して

ピロリン酸ならびにピロリン酸塩を加えた発光反応では、開始してから 6 から 12 分後に発光量(RLU/秒)は最大値となりほぼ一定の発光強度を保持しながら徐々に減衰した。PPi を加えた反応系では、加えないものに比べ最大発光量は 55%に減少し、発光半減期は 111 分間に延長された。さらにピロリン酸塩として PPK および PPiNa を加えた発光反応系では、最大発光量はそれぞれピロリン酸を加えない反応系に比べ 25%程度に抑えられたが、3 時間以上の発光半減期と安定した発光反応が得られ、この両者に有意な差異は認められなかった。

PPi に比べて、2mM と同濃度の PPK や PPiNa のピロリン酸塩はより強く発光を抑制する効果が認められたが、これは水溶液中にピロリン酸イオンの解離の効率の違いによるものと考えられる。反応液中でピロリン酸イオンを遊離する化合物であれば、その作用の強弱は解離定数が異なるにしても、ルシフェラーゼアッセイ法において発光反応を制御する効果を持つものと考察される。

4.3.5 ATP アッセイ法（長時間測定）におけるピロリン酸の作用

PPiK を添加した際の ATP 発光測定試薬の発光経時変化を、添加しない ATP 発光測定試薬と比較した結果を Fig. 4-5 ならびに Table 4-4 に示した。PPiK を反応系に含まない ATP 発光測定試薬の発光反応では、最大初期発光を示した後に急激に減衰し、発光開始後 15 分間で最大発光量のおよそ 50% 以下にまで低下した。これに対し、1mM の PPK を共存させることにより、初期発光をおよそ 20%に抑えながらも、1 分間あたりの発光減衰率(315 RLU)が最大発光量(189,865RLU)の 0.16%に抑えられた、長時間にわたって発光強度が一定となる発光反応が得られ、反応開始 5 時間後でも 50%以上の発光強度を維持した。

これまでルシフェラーゼアッセイ法の用途では、発光反応を制御する手法として CoA や DTT によるチオール類、さらには炭酸ガスや AMP を添加す

る手法が試みられ、発光反応の半減期を制御することから実用化が進められてきた。しかしながらホタルルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応のもうひとつの主要な用途として活用されている ATP アッセイ法における発光反応系では、これまで反応の制御ならびに実用化において効果を示した CoA や DTT などチオール類、炭酸ガス、AMP など何れの反応系への添加においても、発光半減期の延長に対する効果は確認されなかった。これに対し、ピロリン酸を反応溶液中に共存させることにより、ルシフェラーゼアッセイ法と同様に、初期発光の抑制に続く発光の減衰を緩和させ発光半減期の延長を促進する効果が認められた。上述したようにピロリン酸は初期発光反応を抑制

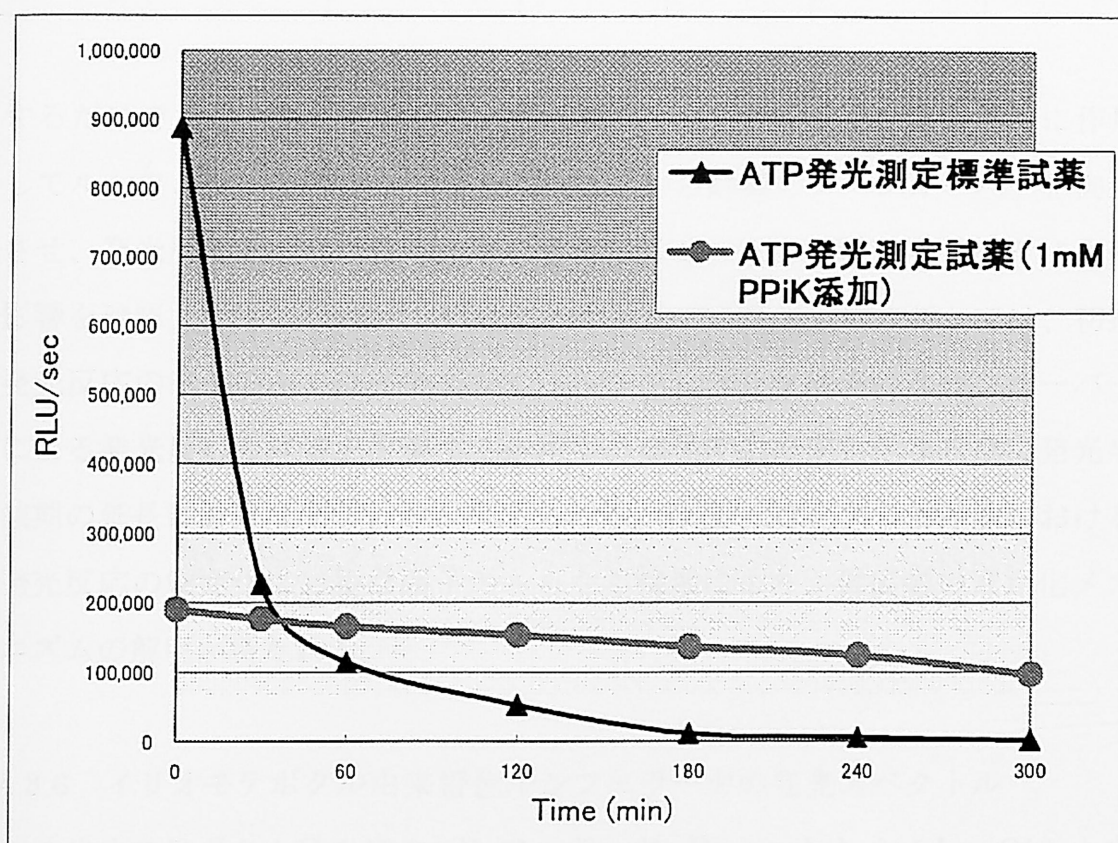


Fig. 4-5 ATP アッセイ法におけるピロリン酸の作用

ATP 発光測定試薬におけるピロリン酸カリウムの存在・非存在下でのホタルルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応の発光強度の時間経過を示した。

ATP アッセイ法測定条件: 750 μ M ルシフェリン/5 μ g/mL ルシフェラーゼ
/50mM 酢酸 Mg/0.5mM DTT/1.5mg/mL BSA/10% グリセリン(v/v) (pH 7.75)

Table 4-4 ATP アッセイ法におけるピロリン酸の効果(パラメータ比較)

	最大発光量 (MaxRLU/秒)	最大発光 時間 (分後)	減衰率 (RLU/分)	発光半減期 (分間)	相対最大 発光量 (%)
ATP 発光測定標準試薬	887,689	0	2,965	23	100
ATP 発光測定試薬 (1mM PPIK 添加)	189,865	0	315	301	21

するだけでなく、発光反応を阻害する反応生成物オキシルシフェリンに作用してルシフェラーゼ酵素から取り除くことから酵素のターンオーバーを向上させ、発光反応を持続させる作用も考えられている。本研究で AMP による影響を確認してはいないが、ATP アッセイ法での発光反応に対しては、初期発光反応の制御のみでは充分でなく、ルシフェラーゼ酵素のターンオーバーによる発光反応の継続を促進する作用も、発光反応の安定化ならびに発光半減期の延長に必要なではないかと考えられる。今後、ATP アッセイ法における発光反応の安定化に必要な因子のさらなる探索により、同反応の安定化メカニズムの解明が待たれる。

4.3.6 イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼの発光スペクトル

イリオモテボタル科由来のルシフェラーゼ *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来の緑色ルシフェラーゼ遺伝子 pB-RoL(74)を用い、226 番目のトレオニン残基をアスパラギン酸に置換した部位特異的変異体による発光スペクトルを Fig.4-6 に示す。野生型の緑色ルシフェラーゼの最大発光波長が 548nm に対し、変異体では最大発光波長が 582nm となる橙色の発光色が得られた。

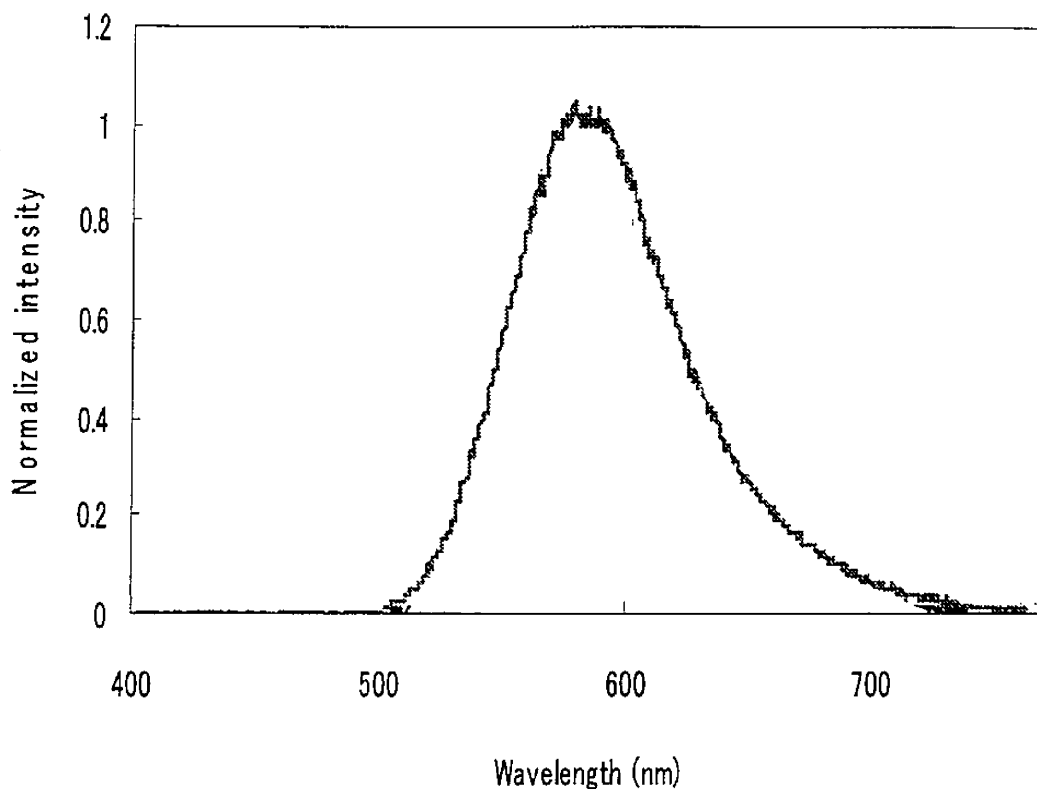


Fig. 4-6 イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼの発光スペクトル

4.3.7 発光甲虫ルシフェラーゼの発光反応系への適用

ホタル科以外の発光甲虫ルシフェラーゼを発現させるため哺乳細胞の COS7 細胞に pEX-Red、pEX-ROL、pEX-ROLO のそれぞれのプラスミドをトランスフェクションして得られたルシフェラーゼを含むライセートに、ピロリン酸濃度の異なる発光試薬を反応させた、発光の経時変化を測定した (Fig.4-7、Fig.4-8、Fig.4-9)。

ホタルモドキ科由来の鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応において、ピロリン酸を含まない反応系では発光は Flash 状に立ち上がり、その後急速に減衰し続けて行く傾向が確認された。またこの急速な減衰の継続は、

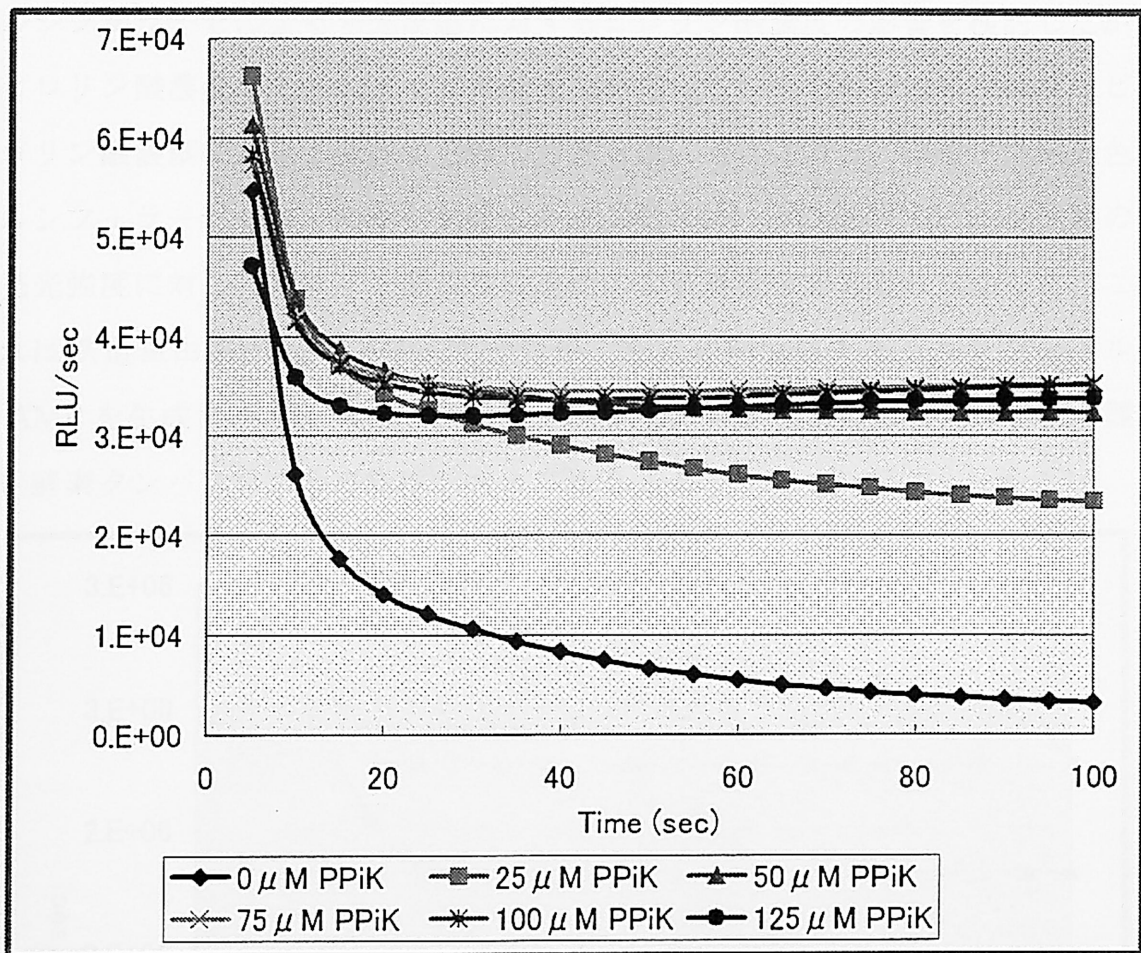


Fig.4-7 鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼ発光反応へのピロリン酸の影響

pEX-Red を発現させたラーセートにピロリン酸濃度の異なる発光試薬を添加し、100 秒間の発光経時変化を測定した。

反応系にピロリン酸を加えることによって改善された。この傾向は、第2章で記載した Fig. 2-5 における CoA の有無によって得られた発光キネティクスと非常に類似している。このことから、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼによる発光反応で、ピロリン酸添加により発光の減衰が抑えられる効果は、前述した CoA の作用と同様に、ルシフェラーゼ酵素のターンオーバーの向上に依るものと考えられる。

ピロリン酸濃度を増加させた場合、50 μM 以上の濃度で初期発光後の減衰で、ほぼ一定の発光強度を保つことが確認された。4.3.1.で北米産ホタル由来

ルシフェラーゼによる発光反応に対するピロリン酸濃度の影響を検討したが、ピロリン酸濃度の上昇により初期発光量が抑えられ、その際の発光強度はピロリン酸濃度に大きく依存する傾向であった。これに対し、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼでは、初期発光反応の強度ならびにその後の Glow 発光時の発光強度に対してピロリン酸濃度の違いによる影響は認められなかった。これは鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼが、発光初期反応であるルシフェリル-AMP を生成する ATP リガーゼ活性に対するピロリン酸の阻害効果を受け難い酵素タンパクである可能性が考えられる。

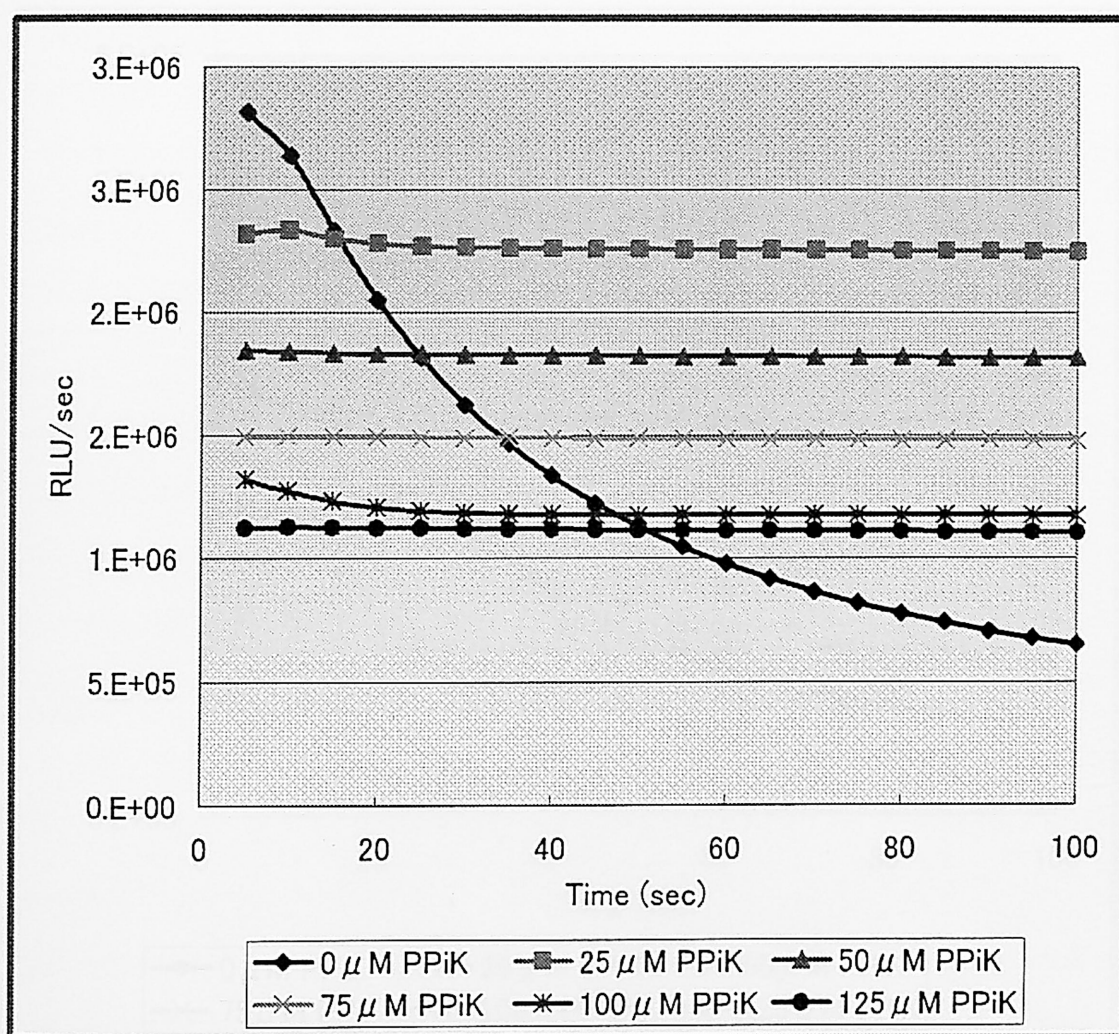


Fig.4-8 イリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼ発光反応へのピロリン酸の影響
pEX-ROL を発現させたラーセートにピロリン酸濃度の異なる発光試薬を添加し、100 秒間の発光経時変化を測定した。

一方、イリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼ(Fig. 4-8)、ならびに橙色ルシフェラーゼに対するピロリン酸による影響(Fig.4-9)の両反応において、発光反応の急速な減衰がピロリン酸の存在によって顕著に抑えられる傾向が確認された。また、イリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼによる発光反応では、ピロリン酸濃度に比例して顕著に初期発光強度が抑制され、これはホタルルシフェラーゼと同様の傾向であった。これに対し、橙色ルシフェラーゼに対する初期発光強度へのピロリン酸による影響では、緑色ルシフェラーゼほどの大きな抑制効果は認められなかった。

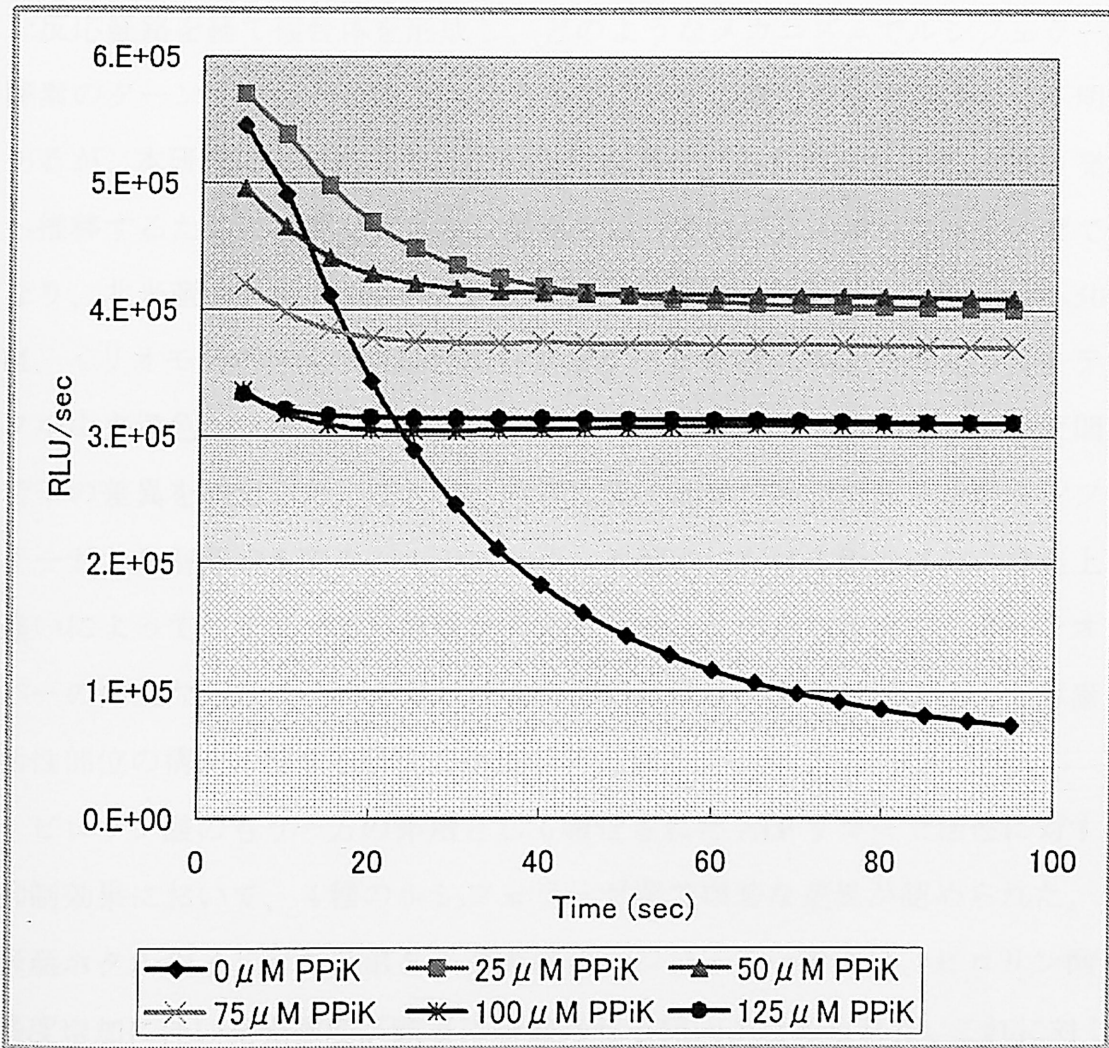


Fig.4-9 イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼ発光反応へのピロリン酸の影響

pEX-ROLO を発現させたラーセートにピロリン酸濃度の異なる発光試薬を添加し、100 秒間の発光経時変化を測定した。

ホタル科を初め、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科の全ての甲虫ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応において、ピロリン酸の添加により発光反応の減衰を抑え Glow 発光へと制御する効果を持つことが明らかとなった。Rhodes は、ルシフェラーゼ活性部位に結合した発光反応生成物でありかつ発光反応の強力な阻害剤であるオキシルシフェリンとピロリン酸が結合体を形成し、ルシフェラーゼからの脱離を促すことにより、ルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを向上させる CoA と同様の効果をピロリン酸が持つとの仮説を提唱した(39)。ピロリン酸が、阻害剤であるオキシルシフェリンとどのような反応経路を経て複合体を形成し、どのようなメカニズムでルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを向上させるかについての詳細な研究例はなく不明であるが、本研究による結果ではこの仮説を裏付けるものとなった。Glow 発光へ推移するために必要なピロリン酸濃度は、それぞれのルシフェラーゼで異なり、北米産ホタルで 100 μ M 以上、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼで 50 μ M、イリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼで 25 μ M、またイリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼでは 50 μ M であり、各々のルシフェラーゼ間で若干の差異を確認した。これは、阻害に働くオキシルシフェリンがルシフェラーゼから解離する際の、ルシフェラーゼ酵素における活性部位の構造上の違いによって生じている可能性が考えられる。この点も含めて、ターンオーバーの向上ならびにそのメカニズムの解明に向け、各ルシフェラーゼ酵素の活性部位の構造に関する研究の進展が待たれる。

ピロリン酸のもう一方の作用として報告された ATP リガーゼ活性に対する抑制効果において、4種のルシフェラーゼ間で顕著な差異が認められた。北米産ホタルやイリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼでは、ピロリン酸の濃度増加に伴い発光強度が顕著に制御される傾向が認められた。これに対し、イリオモテボタル由来橙色ルシフェラーゼでは、これらより低い抑制効果が、またホタルモドキ科の鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼでは、ピロリン酸の濃度による発光強度への影響がほとんど認められなかった。これらの相違は、

それぞれのルシフェラーゼが持つ ATP リガーゼ活性の触媒部位の構造の違いに依ると考えられる。特にイリオモテボタル由来のルシフェラーゼにおいて、226 番目のトレオニン残基を 1 カ所置換しただけで、ピロリン酸による ATP リガーゼ活性への抑制効果が大きく変化することが明らかとなった。アミノ酸残基の置換による発光スペクトルに与える影響は既に報告したが、今後、これに加え変異体におけるピロリン酸による抑制効果を調べることにより、各種の発光甲虫ルシフェラーゼにおける ATP リガーゼ活性、さらには発光強度の制御を可能とする活性部位の構造が明らかとされる可能性が期待できる。

4.4 結論

本研究により、発光甲虫による *in vitro* ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光反応のキネティクスや発光強度に影響を与えるピロリン酸の効果を明らかとし、ピロリン酸が産業用途に適した発光反応系の制御に向けて有望な因子となる可能性を確認した。

既に産業用途で広く活用されているホタルルシフェラーゼによる発光反応では、ピロリン酸の使用により発光強度ならびに発光半減期を制御できることを明らかにした。またピロリン酸を最適な濃度で使用するにより、ルシフェラーゼアッセイ法のみならず ATP アッセイ法においても、実用化に広く用いられてきたチオール試薬を用いることなく、発光強度が一定で、数時間レベルの発光半減期を持つ HTS 法で展開が可能な発光反応系の構築が可能となることを確認した。これは、初期発光反応を制御し、かつルシフェラーゼ酵素のターンオーバーを促進させるピロリン酸の 2 種類の作用によって、長時間にわたって発光反応を持続できる発光反応系が構築できたものと考えられる。しかしながら、本仮説の詳細な検証ならびに明確な作用メカニズムは未だ明らかとされていない。また従来 CoA が存在する発光反応系では、DTT などの有機イオウ試薬の存在が必要とされたが、ピロリン酸によって可能となった数時間レベルの発光半減期を持つ発光反応系において、AED が反応へ

及ぼす顕著な効果は確認されなかった。ピロリン酸を用いた発光反応系での有機イオウ試薬の役割についてもさらに詳細な検討が必要と考える。

一方、ホタル科以外の発光甲虫由来3種のルシフェラーゼによる発光反応へのピロリン酸による効果の検討では、必要とされる濃度は個々のルシフェラーゼによって異なるものの、本研究で試みた全てのルシフェラーゼ発光反応においてピロリン酸の添加による制御の結果、発光強度が一定となり、積算発光量が再現性を持って定量可能な発光反応キネティクスが得られた。これは、3種の新規発光甲虫ルシフェラーゼによる *in vitro* 発光反応系が、ピロリン酸の反応制御作用を活用することにより産業用途で実用化できる可能性を示している。今後さらなる最適化を行うことにより、3種の異なる発光色を利用した応用例の確立が期待できる。

ホタル科以外のルシフェラーゼによる発光反応の制御に関して、本研究では発光反応開始から100秒間までの短時間発光反応について検討した。今後、これら発光色に特徴を持つホタル科以外の発光甲虫由来ルシフェラーゼによる発光反応を広く産業用途へ適用するにあたり、より長時間の発光半減期を持つ発光反応系の構築が必要とされる。そのためにはまずターンオーバーの向上が課題となる。本研究では、ピロリン酸濃度の相違によりそれぞれのルシフェラーゼによる発光反応の減衰の抑制が影響される効果を確認したが、これをベースに発光を阻害するオキシルシフェリンの酵素からの解離に関するメカニズムさらには活性部位構造との相互作用の解明により、ルシフェラーゼのターンオーバー向上に結びつく研究成果が待たれる。また一方で、本研究で試みたピロリン酸による初期発光反応である ATP リガーゼ活性の制御に向けた検討も、長時間の発光半減期を持つ発光反応系の構築には必要と考える。ピロリン酸による ATP リガーゼ活性への抑制効果の違いは、この反応を触媒するルシフェラーゼの活性部位の構造の違いに依るものと考えられる。今後、この活性部位の構造に関する知見の集積、さらには構造の改変により個々のルシフェラーゼ発光反応の発光強度が人為的にコントロール可能とな

れば、発光甲虫による発光反応の産業用途での適用分野はさらに開拓されて行くものと期待できる。

第5章 結語

高いエネルギー変換効率を持つ発光甲虫による生物発光反応は、ホタル科に属するホタルシフェリン/*Photinus pyralis* 由来ルシフェラーゼ発光反応を中心に、ATP アッセイ法やルシフェラーゼアッセイ法など、産業用途での実用化が進められている。実用化の背景には *in vitro* 発光反応では光が瞬間的に Flash 状に立ち上がり、その後急速に減衰するため発光量の測定が困難であった Flash 発光を、CoA や DTT のチオール試薬等の補因子を用いることにより一定な発光強度を持続させる Glow 発光へ人為的に制御させる手法が確立されたためである。しかしながら、このホタル発光反応は既に実用化が行われ広く用いられているにもかかわらず、チオール試薬を初めとするさまざまな補因子による発光反応への制御メカニズムは未だ明らかとされていない。そこで、発光反応の制御を目的として、異種のルシフェラーゼ酵素、還元剤 DTT に代わる有機イオウ試薬、ピロリン酸など、これまで検討されることが無かった諸因子が及ぼす発光反応への影響の解析を試みた。

鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの特性解析では、周囲の pH 変動によって発光活性が影響されない特性に加え、ホタルルシフェラーゼの発光制御に効果を示すチオール試薬を添加した反応条件においても Flash 状の発光キネティクスを示すなど、ホタルルシフェラーゼによる発光反応とは顕著に異なる特性が明らかになった。また、Flash 発光後の急速な発光の減衰は CoA の添加により抑制されることを確認し、異種ルシフェラーゼを適用することにより発光反応系が制御でき、多彩な特徴を持つ *in vitro* 発光反応系の構築に結びつけられる可能性を示した。

既に実用化が進められている CoA を用いたホタルルシフェラーゼ発光反応において、還元剤として使用されてきた DTT の代替に有機イオウ試薬であるジチオカルバミン酸を用いることにより、DTT の 1/10 程度の濃度で同等あるいはこれを上回る発光活性向上の効果を確認し、産業用途においてコスト

面のみならず使用者の安全性への観点からも優れた発光反応系を提供できることを確認した。CoA が共存しない反応系では発光活性向上への顕著な効果を確認されなかったが、本研究で明らかになった、高濃度条件下でルシフェラーゼ酵素を不活性化することなく発光反応を抑制するジチオカルバミン酸による作用は、今後、発光反応を制御する新規の手法として応用できる可能性が期待できる。

また、ホタルルシフェラーゼによる発光反応において、ピロリン酸を反応溶液中のルシフェリン濃度よりも高濃度添加することにより、ルシフェラーゼアッセイ法に加え、従来の制御法では困難であった ATP アッセイ法における発光反応系でも発光キネティクスの向上、ならびに数時間レベルでの発光半減期の延長に、顕著な発光反応の制御効果を示すことを明らかにした。本研究成果によって新たに示された、有機イオウ試薬ならびにピロリン酸などの補因子がホタル発光反応の制御へ及ぼす効果ならびに発光反応系は、従来使用が必須とされていた高価で劣化し易いチオール試薬を必要としないため産業用途への展開を加速するにあたり、コストや適用性の点で大きな意義を持つと考える。今後、ピロリン酸による制御作用を中心に、ジチオカルバミン酸など有機イオウ試薬による効果を組み合わせることにより、ホタルルシフェラーゼによる *in vitro* 発光反応系で、特に HTS 法を必要とする産業用途での展開が加速されることが期待できる。

一方、ホタル科以外の発光甲虫による発光反応は、異なる発光色や pH 変動に影響されない発光色など、多彩な発光反応を示し、多色同時発光反応系など、従来の発光反応をさらに高機能化させた用途開発が期待されている。しかしながら、実用化に向けた発光反応の特性解析や発光反応の制御に関する試みは行われていない。本研究では、鉄道虫 *Phrixothrix hirtus* 由来赤色ルシフェラーゼ、イリオモテボタル *Rhagophthalmidae Ohbai* 由来緑色ルシフェラーゼ、ならびにその部位特異的変異体の橙色ルシフェラーゼを用い、それぞれの発光反応に対する補因子を作用させることにより、反応の制御な

らびにメカニズムの解明を試みた。CoA の代わりにピロリン酸を発光反応系に添加させることにより、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼのみならず、北米産ホタル、イリオモテボタル由来緑色、橙色ルシフェラーゼの何れの発光反応においても、発光強度の減衰が抑制された Glow 発光系へ制御できることが、本研究によって明らかになった。ピロリン酸が、CoA と同様にルシフェラーゼのターンオーバー効率に影響を与える可能性が考えられる一方で、互いに構造の大きく異なるホタル科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科由来の発光色に特徴を持つあらゆるルシフェラーゼ発光反応を、Glow 発光へ制御可能とするピロリン酸の広範な適用性を確認した。さらにピロリン酸は、各種ルシフェラーゼによる初期発光反応の発光強度を制御する作用を併せ持ち、これは ATP リガーゼ活性への抑制効果と推察されるが、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼに対してこの効果は確認できなかった。この相違は ATP リガーゼ活性を触媒するルシフェラーゼの活性部位の違いに依るものと考えられ、各種の発光甲虫ルシフェラーゼにおける ATP リガーゼ活性部位の構造が及ぼす発光反応強度への影響の今後の検討が望まれる。本研究で推定されたターンオーバー効率の促進と初期発光強度の抑制といったピロリン酸による 2 種類の作用を最適化あるいは向上させることにより、今後、構造的さらには発光反応特性においても多様性を示す、あらゆる発光甲虫ルシフェラーゼの発光キネティクスを制御した発光反応系が構築可能となり、それぞれの *in vitro* 発光反応系が実用化されることが期待できる。

本研究により、発光甲虫による発光反応に与るルシフェリン、ATP、 Mg^{2+} 以外の因子として、有機イオウ試薬やピロリン酸が発光反応の制御に重要な効果を与えることを明らかにした。今後、CoA を初め発光反応に与る補因子の作用やメカニズムを含めた、発光反応機構と活性部位の構造に関する研究が必要と考える。それら知見集積の延長線上に、多彩な特徴を持つ発光甲虫による発光反応を、産業用途におけるさらなる応用展開に結びつけたい。

引用文献

1. 丹羽治樹 (1996) 遺伝, 50, 35-41
2. 今井一洋 「生物発光と化学発光」, (1989), 広川書店
3. McElroy, W. D., and Seliger, H.H. (1960) *Arch.Biochem. Biophys.* 88,136-141.
4. ルミネッセンスの測定と応用～生物－化学発光の基礎と各種領域への応用～監修：稲葉文夫、後藤俊夫、中野稔 (1990) エヌ・ティー・エス発行
5. Dubois, M. R. (1885) *C.R.Soc.Biol.* 37, 559-562.
6. Harvey, N. (1952) In *Bioluminescence* (Edited by N.Harvey), Academic Press, New York, 297-331.
7. Shimomura O., F. H. Johnson, and Y. Saiga (1961) *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-239.
8. White, E.H., McCapra, F., and Field, G.F. (1963) *J.Am.Chem.Soc.*, 85,335.
9. Kishi,Y., Goto, T., Hirata, Y., Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1966) *Tetrahedron Lett.* 3427.
10. Shimomura, O., and Johnson, F.H. (1968) *Biochemistry* 7, 1734.
11. Rudie, N.G., Ohtsuka, H.,and Wampler, J.E. (1976) *Photochem.Photobiol.* 23, 71.
12. Goto, T., Lio, H., Inoue, S., and Kakoi, H. (1974) *Tetrahedron Lett.* 2321.
13. Inoue, S., Sugiura, S., Kakoi, H., Hashizume, K., Goto, T., and Lio, H. (1975) *Chem.Lett.* 141.
14. Inoue, S., Kakoi, H., and Goto,T.(1976) *Tetrahedron Lett.* 2971.
15. Inoue, S., Taguchi, H., Murata, M.,Kakoi, H., and Goto, T. (1977) *Chem. Lett.* 259.

16. Nakamura, H., Kishi, Y., Shimomura, O., Morse, D., and Hasting, J.W. (1989) *J.Am.Chem.Soc.* 111, 7607.
17. de Wet, J.R., Wood, K.V., Deluca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 725.
18. Tatsumi, H., Masuda, T., Kajiyama, N., and Nakano, E. (1989) *J. Biolum. Chemilum.* 3, 75-78.
19. Thompson, E.M., Nagata, S. and Tsuji, F.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6567-6571.
20. Lorenz, W.W., McCann, R.O., Logiaru, M., and Cormier, M.J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4438-4442.
21. Bae, Y.M., and Hasting, J.W. (1994) *Biochem. Biophys. Acta*, 1219, 449-456.
22. McElroy, W.D., Seliker, H.H., and DeLuca, M. (1974) *In the Physiology of Insecta* (Rockstein, M. ed) 4111-460, Academic Press, New York
23. McElroy, W.D., and DeLuca, M. (1978) *Chemistry of Firefly Luminescence in Action* (Herring, P.J.ed.)109-127, Academic Press, New York
24. Seliger, M.H., and Mcelroy, W.D. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 52, 75-81.
25. Kishi, Y., Matsumura, S., Inoue, S., Shimomura, O., and Goto, T. (1968) *Tetrahedron Lett.*, 25, 2847-2850.
26. Wood K.V. (1991) *Bioluminescence and Chemiluminescence Current Status*, Stanley PE,Kricka LJ(eds).Wiley·New York,469-546
27. Wood K.V.Promega Corporation: US Patent 5,650,289,(1997).
28. Ford S.R.,Buck L.M., and Keach F.R.(1995) *Biochem.Biophys.Acta*, 1525:180-184.

29. Airth R.L., Rhodes W.C., and McElroy W.D. (1958)
Biochim. Biophys. Acta, 27:519-532
30. Wood K.V., *Modern Enzymology: Problems and Trends*, Kuganov B.I., Kochetkov S.N., and Tishkov V.I.(eds), Nova Science: New York, 1994; 497-506
31. Oba, Y., Ojika, M., and Inoue, S., (2003) *FEBS Lett.* 540, 251-254.
32. Ford S.R., Hall M.S., and Leach F.R., (1992) *J. Biolumin. and Chemilumin.*, 7, 185-193.
33. Jiyang E., Andrade J.D.(2001)*Luminescence*, 16, 57-63.
34. Ohmiya Y. and Tsuji F.I. (1997) *FEBS Lett.* 404, 115-117.
35. Scheire, W. Packard Instrument Co., Inc. US Patent 5,618,862 (1997)
36. Ryufuku, M., Tanaka, H., Toyo Ink Mfg. Co., Ltd., US Patent 6,060,261 (2000)
37. 「化学大辞典 9」、(1987年2月15日)、化学大辞典編集委員会編、共立出版(株)発行、835項
38. McElroy, W.D., Hasting, J., W., Coulombre, J., and Sonnenfeld, V. (1953) *Arch. Biochem. Biophys.* 46, 399-416.
39. Rhodes, W. C. and McElroy, W. D., *J. Biol. Chem.* 233, 1528-1537 (1958)
40. 近江谷克裕, 生化学 第76卷、第1号, 5-15, (2004)
41. Biggley, W., Lloyd, H., and Seliger, H.H. (1967) *J. Gen. Physiol.* 50, 1681-1692.
42. Colepiccolo, N.P., Costa, C., and Bechara, E.J.H. (1986) *Insect Biochem.* 16, 803-810.
43. Viviani, V.R., and Bechara, E.J.H. (1993) *Photochem. Photobiol.* 58, 615-673.
44. White, E.H., and Branchini, B. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1243-1245.

45. White, L.J., Rapport, R., Seliger, H.H., and Hopkins, T.A. (1971) *Bioorg. Chem.* 1, 92-122
46. McCapra, F. and Richardson, D.R. (1964) *Tetrahedron Lett.* 3167-3172
47. Viviani, V.R. and Bechara, E.J.H. (1995) *Photochem. Photobiol.* 62, 490-495
48. Wood, K.V. (1995) *Photochem. Photobiol.* 62, 662-673.
49. Wood, K. V., Lam Y.A., Seliger H.H., and McElroy W.D. (1989) *Science* 244, 700-702.
50. Viviani, V.R., Bechara, E.J.H, and Ohmiya, Y. *Biochemistry* (1999) 38, 8271-827.
51. Viviani, V.R. Silva, A.C.R., Perez, G.L.O., Santelli, R.V., Bechara, E.J.H., and Reinach, F.C. (1999) *Photochem. Photobiol.* 70, 254.
52. Kajiyama, N., and Nakano, E. (1991) *Protein Eng.* 4, 691-693.
53. Mamaev, S., V., Laikhte, A.L.R., Arslan, T., and Hecht, S.M. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* 118, 7243-7244.
54. McCapra, F., Gifoye, D.J., Young, D.W., Church, N.J., and Spencer, P. (1994) *Bioluminescence and Chemiluminescence – Fundamental & Applied Aspects* (Campbell, A.K., Kricka L., and Stanley, P.E. eds.) 387-391, John Wiley & Sons, Chichester
55. Conti, E., Franks, N.P., and Brick, P. (1996) *Structure* 4, 287-298.
56. Alam, J., and Cook, J.L. (1990) *Anal. Biochem.* 188, 245-254.
57. Wood, K.V., de Wet, J.R., Dewji, N., and DeLuca M.(1984) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 124, 592-596.
58. DiLella, A.G., Hope, D.A., Chen, H., Trumbauer, M., Schwartz, R.J., and Smith, R.G. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 4159.
59. Callis, J., Fromm, M., and Walbor, V. (1987) *Genes and Development*, 1, 1183-1200.

60. Waterman, M.L., Adler, S., Nelson, C., Green, G.L., Evans, R.M., and Roscnfeld, (1988) *Mol. Endocr.* 2, 14-21.
61. Ow, D.W., Wood, K.V., DeLuca, M., de Wet[, J.R., Hlinski, D.R., and Howell, S.H. (1986) *Science* 234, 856-859.
62. Rodriguez, J.F., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., McGowan, E.B., and Esteban, M. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 1667-1671.
63. Brodin, S., and Wettermark, G. *Bioluminescence Analysis*. VCH:New York(1992).
64. Wang, C., Hitz, S., Andrade, J.D., and Stewart, R.J. *Anal. Biochem.* (1997) 246, 133-139.
65. 中野衛一, (1992) 化学と生物, vol.29, No.7, 446-452.
66. 本間茂, (1996) 食品と開発, Vol.31, No.1, 22-25.
67. Strehler, B.J., (1968) "Method of Biochemical Analysis" Vol.16(Glick, D. ed.), Interscience Publishers, N.Y., 99-181.
68. Lundin, A., *et al.* (1986) *Meth. Enzymol.* 133, 27-42.
69. Petty, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M., and Cree, I.A. (1995) *J. Biolum. Chemilum.* 10, 29-34.
70. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J., and Fletcher, J. (1993) *J. Immunol. Meth.* 160, 81-88.
71. 細胞工学「脱アイソトープ実戦プロトコール②キット簡単編」、野村慎太郎、渡邊俊樹 監修, 秀潤社 (1998), p.334-346.
72. Grentzmann, G., Ingraman, J.J.A., Kelly, P.J., Gesteland, R.F., and Atkins, J.F. (1998) *RNA* 4, 479-486.
73. Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y., and Honma, K., (2004) *FEBS Lett.* 565, 122-126.
74. Sumiya, M., Viviani, V.R., Ohba,N., and Ohmiya,Y. (1998) *In Bioluminescence and Chmiluminescence. Proceeding of 10th*

International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence
(Roda, A., Pazzagli, M., Kricka, L., and Stanley, P.E., eds.), pp.433-436,
Bolona, Italy.

75. 大場信義「図解親子で楽しむホタルの飼い方と観察」ハート出版, (1993).
76. 島村玲郎, 片倉工業株式会社, 特開平 8-238086 (1995).
77. 鈴木健夫 (2002) ブレインテクノニュース 90, 5-9.
78. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685.
79. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
80. 「化学大辞典 4」、(1980年9月15日)、化学大辞典編集委員会編、共立出版(株)発行、321頁
81. Bowie LJ. *Methods in Enzymology*, MA DeLuca (ed) Academic Press, (1978) 57, 15-28.
82. Sax, N.I., and Lewis, R.J. *Dangerous Properties of Industrial Materials, Seventh Edition, Vol. II*(1989) Van Nostrand Reinhold, 1224-1225.
83. Sax, N.I., and Lewis, R.J. *Dangerous Properties of Industrial Materials, Seventh Edition, Vol. II*(1989) Van Nostrand Reinhold, 1510.
84. Harry, van L., and Jan, ter W., Packard Bioscience B.V. US Patent 6,503,732 (2003)

研究業績一覧

〈論文〉

- Masayuki Ryufuku, Michiyo Fujimoto, Hozumi Tanaka, and Yoshihiro Ohmiya: Low amount of diethyldithiocarbamate enhances the light activity in beetle bioluminescence system in vitro., *ITE Lett.*, 2002, 3, 713-719.
(本文関連箇所 第3章)
- 龍福正行, 鈴木智恵, 近江谷克裕: カイコ産生鉄道虫 *Phrixothrix* 由来赤色ルシフェラーゼの酵素特性, 静岡大学大学院電子科学研究科研究報告 第24号 p.1-4 (2003).
(本文関連箇所 第2章)
- Vadim Viviani, A.Uchida, N.Suenaga, M.Ryufuku, and Y.Ohmiya: Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases., *Biochem. Biophys. (2001) Res. Commun.* 280, 1286-1291.
(本文関連箇所 第4章)

〈特許〉

- 龍福正行, 田中穂積, 鈴木智恵: 有機イオウ試薬還元剤
(特願2002-257330)
(本文関連箇所 第3章)
- 龍福正行, 野村亮介: ピロリン酸
(特願2004-229197)
(本文関連箇所 第4章)
- 龍福正行, 鈴木智恵, 栗田昭宏: 多色同時測定用発光反応
(特願2004-353964)
(本文関連箇所 第4章)

謝辞

本研究は、静岡大学教育学部化学講座生化学教室、東洋ビーネット株式会社つくばバイオ技術センター及び独立行政法人産業研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループにて、近江谷克裕博士（静岡大学大学院電子科学研究科助教授、独立行政法人産業研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループリーダー兼任）の指導の下で行ったものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また本研究を遂行するにあたり、絶えずご助言をいただいた田中穂積博士（元東洋インキ製造株式会社筑波研究所技術部長）に感謝致します。

共同研究者として研究推進をサポートしてくれた、東洋ビーネット株式会社から独立行政法人産業研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループへ出向中の鈴木智恵さん、同社つくばバイオ技術センター研究員の野村亮介君、栗田昭宏君、ならびに元研究員の藤本教予さん、山村昌子さん、菊池淳美さんに感謝致します。

研究活動実施をさまざまな側面から支援いただきました、静岡大学教育学部化学講座生化学教室、東洋ビーネット株式会社バイオプロダクツ部、東洋インキ製造株式会社筑波研究所、及び独立行政法人産業研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループのみなさんに心より感謝致します。

末筆ながら、大学院進学に理解を示し、精神的、経済的に援助いただいた東洋ビーネット株式会社の小笠原政次元社長、後藤宣夫前社長、西沖晃社長、勝間田元常務、また同社社員の方々に心より感謝致します。さらに学位取得の機会を提案し、公私にわたりご支援いただいた故有吉信役員には深い感謝を捧げると共に、ご冥福をお祈り致します。