

甲虫生物発光における酵素反応制御に関する研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学大学院電子科学研究科 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 龍福, 正行 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/1202

氏名・(本籍)	龍 福 正 行 (神奈川県)		
学位の種類	博 士 (工 学)		
学位記番号	工博甲第 261 号		
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学位規程第 5 条第 1 項該当		
研究科・専攻の名称	電子科学研究科 電子応用工学		
学位論文題目	甲虫生物発光における酵素反応制御に関する研究		
論文審査委員	(委員長)		
	教授	板 垣 秀 幸	教授 山 田 眞 吉
	教授	藤 波 達 雄	教授 近江谷 克 裕

論 文 内 容 の 要 旨

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 *Photinus pyralis* 由来ホタルシフェリン/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。最近、ホタル科以外の発光甲虫による発光反応が注目されている。これは、共通のルシフェリンを使用していながら、異なる発光色や pH 変動に影響されない発光色など、多様な発光反応を示し、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からである。しかしながら、実用化に向けた発光甲虫による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。そこで本研究では、ホタル発光反応の制御機構を確立、本発光反応の産業応用への展開を進めるため基盤構築を目標にした。具体的には鉄道虫 *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。また、ホタル発光反応は既に実用化が行われているにもかかわらず、チオール試薬など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ことから、還元剤やピロリン酸など従来とは異なる補因子が及ぼす発光反応への影響の解析を試みた。

本研究の結果、鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼの発光特性解析では、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人為的発光制御に効果を示したチオール

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になるなど、ホタルルシフェラーゼによる発光反応とは異なる特性を明らかにした。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た。さらに、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 発光へ制御できることを明らかにした。特にピロリン酸の効果は実用化においても重要な知見であるが、これは 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に、或いは、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持ち合わせる事から ATP リガーゼ活性への抑制効果によると推察した。興味深いことに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が、これは 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る。よって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 種類の制御作用を最適化させることにより、構造的、さらには発光反応特性において多様性を示す発光甲虫ルシフェラーゼの *in vitro* 発光反応系の制御が可能になることを明らかにした。

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たが、CoA が共存しない反応系では効果は確認されなかった。しかしながら、ジチオカルバミン酸は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作用を発見し、発光反応を制御する新規の手法としての応用の可能性が明らかとなった。一方で、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、ホタル発光反応の主要用途である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効果を示すことを明らかにした。還元剤ならびにピロリン酸などホタル発光反応の制御へ及ぼす新たな補因子による効果により、高価で劣化し易いチオール試薬を必要としない発光甲虫ルシフェラーゼによる *in vitro* 発光反応系の確立が可能となった。本反応系は、産業用途への発光甲虫発光反応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優位性を持つと考えられる。

論文審査結果の要旨

発光甲虫の生物発光反応は発光基質ルシフェリンの酸化を酵素ルシフェラーゼが触媒する化学反応であり、量子収率88%という地上で最も高効率のエネルギー変換システムである。ルシフェリンは化学的に合成可能であり、また、ルシフェラーゼは遺伝子レベルで解析が進み大腸菌や哺乳類細胞で生産できることから、ATP定量や細胞内の遺伝子発現をモニターするレポーターアッセイとして研究支援産業や健康管理産業で実用化、製品化が進められている。しかしながら、実用化を進めるにあたり、ルシフェリンとルシフェラーゼの化学反応を如何に制御するかが問題となっている。とりわけ反応制御を考える上での課題は、計測器で測定しやすい安定した発光パターン、情報検出の多様化などルシフェリン・ルシフェラーゼの高機能化などである。そこで、本研究ではホタル生物発光反応系を制御することやホタル以外の発光甲虫に目を向けることで上記の課題にせまり研究を行った。

第1章では、研究の背景となるホタルの生物発光システムの酵素学的及び化学的な基礎、また産業応用の現状について述べ、実用化を進める上での基盤研究の必要性を的確に指摘、研究目的を導いている。

第2章では、ルシフェラーゼを用いた情報検出の多様化の可能性を秘めた鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼを、カイコ生産システムを利用して生産し、その酵素特性を明らかにした。

第3章では、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を制御可能な因子として有機イオウ試薬に注目し、従来発光反応を持続させることに効果のある還元剤ジチオスライトールに代わりジチオカルバミン酸が同様な効果を持つことを明らかにした。詳細な反応機構の解明には至っていないが、安価で生物学的にも優しい試薬を見出した。

第4章では、イリオモテボタル由来緑色ルシフェラーゼを遺伝子工学的に改変することで橙色ルシフェラーゼの作成に成功した。さらに、このルシフェラーゼを含めた発光甲虫由来ルシフェラーゼの発光反応制御を目指し、反応生産物の一つであるピロリン酸に着目し、本化合物がATPリガーゼ活性への抑制効果を発揮することで発光反応が制御され、安定な発光が得られることを明らかにした。

最終章の第5章では、結論を述べ、全体を総括、研究をまとめた。

以上のように、本研究では、生化学的、生物工学的観点から見て多くの有意義な知見を得ている。よって、本論文は博士(工学)の学位を授与するのに相応しうる内容を具備していることを認める。