

カイアシ類（海洋プランクトン）ルシフェラーゼの構造と進化

竹中 康浩¹, 山口 篤², 茂里 康³

1. はじめに

発光生物は、自らの細胞または発光細菌の共生によって光を発する生き物であり、細菌のような単細胞から軟体動物、節足動物、昆虫、魚類など幅広い生物種でその存在が確認されている。その記述は古くはアリストテレスや古代ローマの哲学者プリニウスの著書『博物誌』から現代にまで至るが、大部分は発光現象の観察や発光種の同定等であった。分子レベルで生物発光研究が大きく進展したのは、フランスの研究者デュボアがルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L反応)を報告した1885年以降である。その後発光基質であるルシフェリンの構造決定や合成の研究が先行し、遺伝子組換え技術の登場とともに発光反応を触媒する酵素ルシフェラーゼの遺伝子が、ホタルや発光細菌において単離された。現在まで数多くの発光生物からルシフェラーゼ遺伝子のクローニングが行われ、その一次構造が解明されている。カイアシ類(橈脚類)は海洋における動物プランクトンの中で最もバイオマスの大きい分類群であり、全世界の動物プランクトン相に普遍的に優占する。カイアシ類の中に発光能を示す種が存在することについては19世紀ごろから報告されてきたが、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングについては、2002年の*Gaussia princeps*(熱帯~亜熱帯域に生息する大型カイアシ類)の分泌型ルシフェラーゼ(GLuc)の報告が初めてであり、発光生物の研究材料としては比較的歴史が浅い。本稿では、カイアシ類ルシフェラーゼの特徴、これまでの研

究の歴史、その応用技術を概説し、さらにその分子進化についても考察する。

2. カイアシ類ルシフェラーゼ遺伝子のクローニング

前述のようにカイアシ類ルシフェラーゼの研究は2002年の*Gaussia*ルシフェラーゼGLucの単離に端を発する¹⁾。この論文ではビオチン化GLucを用いたマイクロプレート上でのDNAハイブリダイゼーションアッセイという応用的研究報告が中心になっており、当初からカイアシ類ルシフェラーゼの知的財産化と商品化を意識した内容になっている。GLucの基質であるルシフェリンは、ウミシイタケルシフェラーゼと同じ発光基質セレンテラジンである。2004年には*G. princeps*と同じMetridinidae科の*Metridia longa*より、やはり分泌型のルシフェラーゼ遺伝子(MLuc)が大腸菌を用いた発現スクリーニングでクローニングされた²⁾。MLucはアミノ酸配列においてGLucと高い相同性を示し同じくセレンテラジンを基質とする。次いで2008年にはGLucとMLucのアミノ酸配列で相同性の高い領域をもとに設計した縮重プライマーを用いて*Metridia pacifica*より二つの新規な分泌型ルシフェラーゼ遺伝子(MpLuc1およびMpLuc2)がPCRクローニングされた³⁾。この*M. pacifica*は成体の体長が2~4mmで、カイアシ類としては中型の種であり、北太平洋、オホーツク海、ベーリング海、日本海等、亜寒帯域に生息している。これらの海域では、ほかにも多くの発光カイアシ類が観察される。これらのカイアシ類からさらに新規なルシフェラーゼを単離し、その構造を比較することにより、保存されているアミノ酸やドメイン構造などを明らかにすることは、カイアシ類ルシフェラーゼの進化の考察や、変異導入によりさらに優れたルシフェラーゼを創出する上で重要であると考えられた。そこで北海道釧路沖にてプランクトンネットを用いて発光カイアシ類をサンプリングし、*M. pacifica*のクローニングと同様の手法によりAugaptiloidea上科のカイアシ類から21の新たなルシフェラーゼを単離した^{4,5)}。この研究によりカイアシ類ルシフェラーゼの一次構造上に共通に認められる特徴が明らかとなった。

¹ 埼玉医科大学内内分泌内科・糖尿病内科 (〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町大字毛呂本郷38番地)

² 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物学分野浮游生物学領域 (〒041-0821 函館市港町3-1-1)

³ 産業技術総合研究所関西センター (〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31)

Structure, application, and evolution of copepod luciferases
Yasuhiro Takenaka¹, Atsushi Yamaguchi² and Yasushi Shigeri³
(¹Department of Diabetes and Endocrinology, Saitama Medical University, 38 Morohongo, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan, ²Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, 3-1-1 Minato-cho, Hakodate 041-0821, Japan, ³Kansai Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870138

© 2015 公益社団法人日本生化学会

3. カイアシ類ルシフェラーゼの構造

これまでに単離されたカイアシ類ルシフェラーゼはすべてN末端に約20アミノ酸からなる細胞外分泌シグナルを持つ分泌型ルシフェラーゼであり、哺乳類等の培養細胞で培地中に効率よく分泌発現することが可能である。またカイアシ類ルシフェラーゼはホタルなどカイアシ類以外のルシフェラーゼと比べて分子量が小さい(表1)。全カイアシ類ルシフェラーゼのアミノ酸配列をアライメントす

ることにより、カイアシ類ルシフェラーゼ中にC-x(3)-C-L-x(2)-L-x(4)-C-x(8)-P-x-R-C (xはアミノ酸残基) というコンセンサス配列が存在することが明らかとなった(図1)⁵⁾。この配列はルシフェラーゼ中に2か所存在し、それぞれが機能性を持つドメインを構成していると考えられる。GLucではこの二つの類似ドメインには全長のGLucと比較してそれぞれ弱いながらもルシフェラーゼ活性があることが報告されている⁶⁾。またコンセンサス配列中にシステインが四つ存在することからもわかるように、カイアシ

表1 主要なカイアシ類ルシフェラーゼとカイアシ類以外のルシフェラーゼ

ルシフェラーゼ	俗称 由来生物名	分子量 ($\times 10^3$)	分泌発現	発光基質	販売・製造元 (商品名) 主な利用技術
MoLuc1	カイアシ類 <i>Metridia okhotensis</i>	23.5	Yes	セレンテラジン	未定 —
MoLuc2	カイアシ類 <i>Metridia okhotensis</i>	20.4	Yes	セレンテラジン	未定 —
PaLuc1	カイアシ類 <i>Pleuromamma abdominalis</i>	23.1	Yes	セレンテラジン	未定 —
PaLuc2	カイアシ類 <i>Pleuromamma abdominalis</i>	20.2	Yes	セレンテラジン	未定 —
HtLuc1	カイアシ類 <i>Heterorhabdus tanneri</i>	19	Yes	セレンテラジン	未定 —
HtLuc2	カイアシ類 <i>Heterorhabdus tanneri</i>	21.1	Yes	セレンテラジン	未定 —
MpLuc1	カイアシ類 <i>Metridia pacifica</i>	22.7	Yes	セレンテラジン	未定 —
MpLuc2	カイアシ類 <i>Metridia pacifica</i>	20.3	Yes	セレンテラジン	未定 —
GLuc	カイアシ類 <i>Gaussia princeps</i>	19.9	Yes	セレンテラジン	ニュー・イングランド・バイオラボ (BioLux) 分泌プロモーターアッセイ
MLuc	カイアシ類 <i>Metridia longa</i>	23.9	Yes	セレンテラジン	タカラバイオ (MetLuc, Ready-To-Glow) 分泌プロモーターアッセイ
VLuc	ウミホタル <i>Vargula hilgendorffii</i>	61.7	Yes	ウミホタルルシフェリン	— —
CLuc	ウミホタル <i>Cypridina noctiluca</i>	61.5	Yes	ウミホタルルシフェリン	アトー (CLuc) 分泌プロモーターアッセイ
RLuc	ウミシイタケ <i>Renilla reniformis</i>	36	No	セレンテラジン	プロメガ, 東洋ビーネット (Dual-Glo 他, ピッカジーンデュアル) デュアルプロモーターアッセイ
ELuc	ヒカリコメツキムシ <i>Pyrearinus termitilluminans</i>	60.7	No	ホタルルシフェリン	東洋紡 (Emerald Luc) プロモーターアッセイ
FLuc	ホタル <i>Photinus pyralis</i>	60.7	No	ホタルルシフェリン	プロメガ, 東洋ビーネット (Steady-Glo 他, ピッカジーン) プロモーターアッセイ, 微生物検出, 発光ツウハイブリッド システム, siRNAの効果検証等

類ルシフェラーゼのアミノ酸配列中には多くのシステイン残基が存在する。たとえばMpLuc1は11個(5.2%)のシステイン残基を含み、これらをアラニンやセリン残基に置換すると完全に活性が失われることから、カイアシ類ルシフェラーゼの構造や活性にはシステイン残基が重要な役割を果たしていることが推測される。またMpLuc1およびMpLuc2は95°C、数十分間の熱処理でも失活しない等きわめて優れた耐熱性を示すが³⁾、この耐熱性とシステイン残基との関連性も今後解析が進んでいくものと思われる。一方で大腸菌や培養細胞等で組換えルシフェラーゼを産生する際に、これらのシステイン残基が間違っただスルフィド結合を形成するため、発現した大部分のタンパク質が不溶化し、活性を持たない状態であるとの報告もある⁷⁾。いずれにせよ、システイン残基を多く持ち、上述のコンセンサス配列を有することが、カイアシ類ルシフェラーゼの一次構造における最も明確な特徴といえよう。数多くのルシフェラーゼ遺伝子を単離することにより得られた情報はその後、長時間・強発光型の改変ルシフェラーゼを創出する際に有効に活用された⁸⁾。ところで多くのカイアシ類では、一つの種から複数のルシフェラーゼ遺伝子が単離されている。たとえば*M. okhotensis*ではN末端側アミノ酸配列が大きく異なった二つのルシフェラーゼ遺伝子が見いだされ、それぞれMoLuc1, MoLuc2と命名された⁴⁾。MoLuc1, MoLuc2のゲノム配列を調べてみるといくつかのイントロンが存在するが、MoLuc1とMoLuc2の間でイントロンの数や長さが異なっており、それぞれ別の遺伝子座から転写されていることがわかる。これはカイアシ類ルシフェラーゼの進化の過程で、祖先遺伝子に遺伝子重複が起こったことを推測させる。個々のアイソフォームの酵素化学的特性の違いや、個体における発現量・局在等については、今後の解析を期待したい。

4. カイアシ類ルシフェラーゼの応用

カイアシ類ルシフェラーゼの発光には発光基質セレンテラジンのみが必要で、これは発光にATPやMg²⁺を必要とするホタルやヒカリコメツキムシのルシフェラーゼと大きく異なる点である。また比活性が高く、GLucについてはこれまで最も強く発光するルシフェラーゼである、との報告もある。前述のようにタンパク質としても非常に安定であり、冷蔵保存や繰り返しの凍結融解等でも活性の大幅な低下は認められない。またカイアシ類ルシフェラーゼは分泌型であるため、培養細胞等で発現させると効率よく培地中に分泌される。このためルシフェラーゼ活性を測定する際、細胞を洗浄・溶解して細胞抽出液を調製する必要がなく、簡便かつ迅速な非侵襲的アッセイを行うことが可能であり、ハイスループット解析に適している。また細胞を

回収することなく経時的に遺伝子発現変動を解析するライブセルモニタリングにも応用できる。特に発光が従来のルシフェラーゼより強いという点から、それまで検出が困難であった*in vivo*発光検出系等への応用が行われてきた⁹⁾。その他GLucを用いた技術として、siRNAの効果を迅速に査定する系、タンパク質間相互作用の検出、分泌型デュアルレポーターアッセイ¹⁰⁾、コルチゾルなどのホルモン検出¹¹⁾等が報告されている。またMLucについてはGタンパク質共役型受容体の非侵襲的プロモーターアッセイ、iPS細胞の作製におけるレポーター遺伝子、アデノウイルスを用いた血中循環腫瘍細胞の検出¹²⁾等への応用が報告されており、今後もバイオ分野において簡便かつ高感度という特性を活かした技術開発が期待される。

5. カイアシ類ルシフェラーゼの進化

序文でもふれたとおり地球上には数多くの発光生物が存在し、ルシフェラーゼ遺伝子の単離が行われてきた。しかしその基質特異性やアミノ酸配列の違いから、すべてのルシフェラーゼが共通の起源を持つというわけではなく、ホタルはホタルの、カイアシ類はカイアシ類の祖先ルシフェラーゼ遺伝子から独自に進化してきたと考えられている。すなわち光を放つという表現型を持つように、ルシフェラーゼという遺伝子は異なる系統間で収斂進化してきたともいえる。個々のグループのルシフェラーゼの起源をたどることにより、その生物における発光のメカニズムや意義がみえてくる可能性があるが、直接産業応用に結びつくわけではないので、ルシフェラーゼの起源や分子進化に関する研究はあまり進展していない。唯一の例外はホタル等の甲虫のルシフェラーゼで、脂肪酸アシルCoA合成酵素と配列の相同性を持ち、実際に脂肪酸アシルCoA合成酵素活性を示すことが報告された¹³⁾。さらに発光能を持たないコメツキムシの脂肪酸アシルCoA合成酵素の数アミノ酸を置換したところ、ルシフェラーゼ活性を発揮することが明らかとなり¹⁴⁾、ルシフェラーゼと脂肪酸の代謝酵素が共通の起源を持つことが示唆された。このようにデータベース検索を行ってアミノ酸配列の相同性が高いルシフェラーゼ以外の遺伝子が見いだされた場合は解析の糸口が見つかるのだが、残念ながらカイアシ類ルシフェラーゼについては現在のところルシフェラーゼ以外に高いアミノ酸配列の相同性を示すタンパク質は見つかっていない。また前述のコンセンサス配列を持つタンパク質についても見いだされておらず、その起源については推測することすら困難な状況である。そこでこれまでに明らかになったAugaptiloidea上科のカイアシ類ルシフェラーゼのアミノ酸配列をもとに系統樹(図2)から最尤法(maximum likelihood estimation)により祖先遺伝子(aCopLucと呼ぶ)の配列が

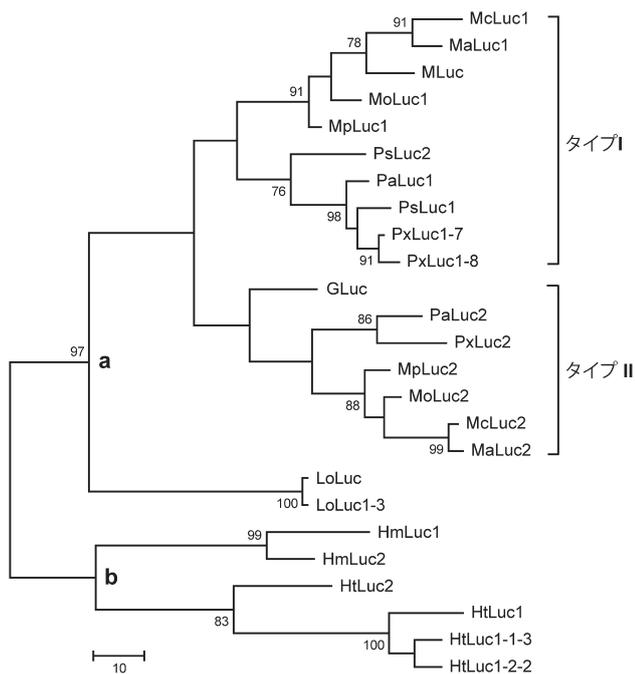


図2 最尤法によるカイアシ類ルシフェラーゼの分子系統樹。ブートストラップ値が75%以上の場合のみ示した。Metridiidae科のカイアシ類ではルシフェラーゼ遺伝子が二つ以上見つかり、それぞれタイプI、タイプIIと分類した。系統樹では種の違いを超えてそれぞれのタイプでクレードを形成しており、種の分化の前に遺伝子重複によって二つ以上のルシフェラーゼ遺伝子が誕生したことを予想させる。二つの祖先カイアシ類遺伝子がこの系統樹をもとに予測され、その系統樹上の位置はそれぞれノードaおよびbになる。

推定された（図1, aCopLuc43とaCopLuc48）。このアミノ酸配列をもとにaCopLuc遺伝子を合成し、培養細胞に発現させたところ、どちらのaCopLucも微弱ながらもルシフェラーゼ活性を持つことが示された⁵⁾。また基質特異性についても現存のルシフェラーゼと同様の結果を示した。すなわち現存するルシフェラーゼの大もととなる祖先遺伝子にも、すでにルシフェラーゼ活性があったことを示唆しており、今後カイアシ類ルシフェラーゼの進化を考察する上で重要な知見である。

6. おわりに

カイアシ類ルシフェラーゼはホタルなどほかの発光生物に比べて10年以上遅れて分子レベルでの研究が開始されたにも関わらず、その安定性や強い発光が認識されてこの

10年間で急激にレポータータンパク質として応用技術が整備されつつある。今後さらに改良が加えられて比活性が高く長時間発光する変異体等が生まれ出され、生命現象の解明において重要なツールとなることが期待される。また基礎研究としては結晶構造解析等による高次構造の解明や、それをもとにした基質の改良などが行われていくであろう。一方カイアシ類*M. pacifica*は発光基質のセレンテラジンを生合成していることが報告されており¹⁵⁾、今後生合成に関与する酵素等が同定されれば、基質を添加しなくても培養細胞内で基質を合成させて発光させることが可能になるかもしれない。またカイアシ類ルシフェラーゼの起源については今後カイアシ類を含む海洋プランクトンのルシフェラーゼ遺伝子がさらに同定され、海洋生物のメタゲノム解析が進展すれば、糸口が得られるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Verhaegen, M. & Christopoulos, T. (2002) *Anal. Chem.*, **74**, 4378–4385.
- 2) Markova, S.V., Golz, S., Frank, L.A., Kalthof, B., & Vysotski, E.S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 3212–3217.
- 3) Takenaka, Y., Masuda, H., Yamaguchi, A., Nishikawa, S., Shigeri, Y., Yoshida, Y., & Mizuno, H. (2008) *Gene*, **425**, 28–35.
- 4) Takenaka, Y., Yamaguchi, A., Tsuruoka, N., Torimura, M., Gojobori, T., & Shigeri, Y. (2012) *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 1669–1681.
- 5) Takenaka, Y., Noda-Ogura, A., Imanishi, T., Yamaguchi, A., Gojobori, T., & Shigeri, Y. (2013) *Gene*, **528**, 201–205.
- 6) Inouye, S. & Sahara, Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **365**, 96–101.
- 7) Markova, S.V., Burakova, L.P., & Vysotski, E.S. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 98–103.
- 8) Kim, S.B., Torimura, M., & Tao, H. (2013) *Bioconjug. Chem.*, **24**, 2067–2075.
- 9) Wurdinger, T., Badr, C., Pike, L., de Kleine, R., Weissleder, R., Breakefield, X.O., & Tannous, B.A. (2008) *Nat. Methods*, **5**, 171–173.
- 10) Wu, C., Suzuki-Ogoh, C., & Ohmiya, Y. (2007) *Biotechniques*, **42**, 290–292.
- 11) Kim, S.B., Takenaka, Y., & Torimura, M. (2011) *Bioconjug. Chem.*, **22**, 1835–1841.
- 12) Wu, P., Sokoll, L.J., Kudrolli, T.A., Chowdhury, W.H., Ma, R., Liu, M.M., Rodriguez, R., & Lupold, S.E. (2014) *Prostate*, **74**, 1286–1296.
- 13) Oba, Y., Ojika, M., & Inouye, S. (2003) *FEBS Lett.*, **540**, 251–254.
- 14) Oba, Y., Iida, K., & Inouye, S. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 2004–2008.
- 15) Oba, Y., Kato, S., Ojika, M., & Inouye, S. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 684–688.

 著者寸描

●竹中 康浩 (たけなか やすひろ)

埼玉医科大学特任研究員, 博士 (農学).

■略歴 1972年大阪府に生る. 95年大分大学工学部卒業. 2002年筑波大学大学院農学研究科博士課程修了. 農業生物資源研究所, 産業技術総合研究所等を経て11年より現職.

■研究テーマと抱負 海洋生物の生物発光, 原生動物の性と老化, 脂肪細胞の分化メカニズム.

■趣味 ジャズ, クラシック音楽の多聴乱聴, ビール, ワイン, 日本酒の探求.

●山口 篤 (やまぐち あつし)



北海道大学大学院水産科学院准教授, 博士 (水産学).

■略歴 1971年宮城県生まれ, 94年北海道大学水産学部卒業, 2008年より現職.

■研究テーマと抱負 海産動物プランクトン, とくにカイアシ類の生態学が専門. 生化学の材料としてのカイアシ類に興味があり, 共同研究テーマを募集中.

■ウェブサイト [http://www.hucc.hokudai.](http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~h21292/)

[ac.jp/~h21292/](http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~h21292/) (「北大プランクトン」で検索)

■趣味 水泳, 釣り.

●茂里 康 (しげり やすし)



(独)産業技術総合研究所関西センター総括研究主幹, 博士 (工学).

■略歴 1963年大阪府堺市に生る. 89年京都大学大学院理学研究科修士課程修了, 同年塩野義製薬入社, 95年通商産業省入省 (大阪工業技術研究所研究員), 2001年産業技術総合研究所企画本部, 10年より現職.

■研究テーマと抱負 質量分析法等を用いた, 機能性分子の探索と創製.

■ウェブサイト <http://www.aist.go.jp>

■趣味 子育て.