

これはMST (1-6) がサブチリシンの活性中心に、OM-TKY3と同じ様式で直接的に結合していることを示す。環外のN末端Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup> (P4-P3) が、サブチリシンのGly<sup>100</sup>-Gly<sup>102</sup>と逆平行β-シートを形成し、環状構造で固定された反応中心を含む配列 (P2-P2') を、酵素の活性中心に提示している様子が良く判る。酵素で切断されるアミド結合 (Met<sup>4</sup>-Arg<sup>5</sup>) は、Pro<sup>7</sup>に起因するTyr<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>配列のターンとエステル結合によって固定されている。これら両構造因子が、Arg<sup>5</sup>のN<sup>α</sup>HプロトンとThr<sup>3</sup>-Asp<sup>9</sup>エステルのカルボニル酸素間の水素結合形成を促進している。この環状構造と分子内水素結合が、MST分子の立体構造を安定化している (図2A)。溶液構造では、N末端アミノ酸 (Phe<sup>1</sup>-Ala<sup>2</sup>) はフレキシブルである。しかし、これを除いた二環状部分MST (3-11) の立体構造は、溶液と複合体結晶の両者において顕著な差異は認められない。

### 5. MST構造をモチーフとした阻害剤の開発

MSTを始めとした典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤は、基質と同様の様式で酵素に結合する。従って、殆どの酵素による基質/阻害剤の認識は、溶媒に露出したP1部位をS1ポケットに収容することにより達成される。この側鎖官能基の性質が、酵素との相互作用と特異性を決定する。MSTは、サブチリシン、エラスターゼ等のセリンプロテアーゼを阻害するが、同じくセリンプロテアーゼであるトリプシンには作用しない。P1部位のアミノ酸特異性をサブチリシンのMet/Leuから、トリプシンのそれであるArg/Lysに置換したMSTアナログは、トリプシン阻害剤として作用すると予想される。果たして、MSTのP1部位とP1部位を入れ替え、P1部位にArgを配したアナログは、サブチリシンに対する阻害活性を消失した。そして、トリプシンに対してロイペプチンよりも強い阻害活性を新たに発現した。酵素阻害剤を設計するに当たり、MSTの構造モチーフが有用なツールとなり得ることを実証した。

### 6. おわりに

位置選択的なエステル結合形成反応を援用した化学合成およびNMR・結晶構造解析による、MSTの構造活性相関研究を紹介した。化学合成のアプローチからの研究が、ペプチド・タンパク質の生理機能解明、更にはそれらが関連する病態を解明する研究の一助になれば幸いである。

### 謝辞

本稿で紹介した研究は、以下の方々との共同研究で行わ

れたものです。NMR構造解析は、山崎俊正博士 (農業資源研究所)、X線結晶構造解析は、河原一樹博士、元岡大祐氏、中村昇太博士、大久保忠恭准教授 (大阪大学大学院薬学研究科)、小林祐次教授 (大阪薬科大学) の御尽力により成し得ることができました。この場を借りまして、心より御礼申し上げます。

- 1) Imada, C., Maeda, M., Hara, S., Taga, N., & Simidu, U. (1986) *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 469-476.
- 2) Imada, C., Hara, S., Maeda, M., & Simidu, U. (1986) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1455-1459.
- 3) Kanaori, K., Kamei, K., Taniguchi, M., Koyama, T., Yasui, T., Tanaka, R., & Imada, C. (2005) *Biochemistry*, **44**, 2462-2468.
- 4) Bode, W. & Huber, R. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **204**, 433-451.
- 5) Taichi, M., Yamazaki, T., Kimura, T., & Nishiuchi, Y. (2009) *Tetrahedron Lett.*, **50**, 2377-2380.
- 6) Shiina, I., Ibuka, R., & Kubota, M. (2002) *Chem. Lett.*, 286-287.
- 7) Taniguchi, M., Kamei, K., Kanaori, K., Koyama, T., Yasui, T., Takano, R., Harada, S., Tajima, K., Imada, C., & Hara, S. (2005) *J. Pept. Res.*, **66**, 49-58.
- 8) Taichi, M., Yamazaki, T., Kawahara, K., Nakamura, S., Motooka, D., Harada, S., Teshima, T., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., & Nishiuchi, Y. (2010) *J. Pept. Sci.*, **16**, 329-336.
- 9) Bech, L., Sørensen, S.B., & Breddam, K. (1993) *Biochemistry*, **32**, 2835-2852.

泰地 美沙子, 西内 祐二

((株)ペプチド研究所, 大阪大学大学院理学研究科)

Structure and function of marinostatin, a serine protease inhibitor

Misako Taichi and Yuji Nishiuchi (PeptideInstitute, Inc., Osaka University, Graduate School of Science, SAITO Research Center, Peptide Institute, Inc., Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan)

## ウミホタル生物発光を用いた生体イメージング

### 1. はじめに

ウミホタルは節足動物門甲殻綱介形目ウミホタル科に分類され、米粒のような形をしている夜行性海洋生物である。発光性ウミホタルは日本海沿岸に幅広く棲息し、これまで *Vargula* 属, *Cypridina* 属, *Conchoecia* 属から三つの発光種が見つかった。 *Vargula* 属や *Cypridina* 属の発光ウミホタルは水深2~3メートルの浅い海に棲息し、外

部からの刺激を受けると上唇線と呼ばれる器官から発光液を噴射して青い光を発する。一方、*Conchoecia* 属の発光ウミホタルは水深 300 メートルの深海に棲息し、発光器から青い光を発する。ウミホタル発光反応は典型的なルシフェリン-ルシフェラーゼ反応である。ウミホタルルシフェリンは下村脩らによって結晶化され、その構造は全合成によって決定された<sup>1)</sup>。また、これまで発光反応の触媒であるルシフェラーゼの遺伝子は *Vargula (Cypridina) hilgendorffii* と *Cypridina noctiluca* からクローニングされている<sup>2,3)</sup>。ウミホタルルシフェラーゼは哺乳類細胞においても発現し、細胞外へ分泌される性質を持っていることから、遺伝子発現解析のためのレポータージーンアッセイ、分泌タンパク質のライブイメージングならびに生理活性ペプチドのプロセッシングの検出などにレポータータンパク質として利用されてきた。また、最近筆者らはウミホタルルシフェラーゼをベースにした近赤外線ルシフェラーゼを創製し、生体発光イメージングプローブとしてその有用性を明らかにした。本稿では、ウミホタル発光系に関する基礎研究を振り返りながら、ウミホタル発光系を用いた細胞や個体レベルでの生体分子のイメージングへの応用について述べる。

## 2. ウミホタルルシフェラーゼ VLuc

*V. hilgendorffii* は体長が約 3 ミリメートルで発光ウミホタル類の中で最大であり、ウミホタル発光系の研究材料として古くから用いられた。*V. hilgendorffii* から単離されたウミホタルルシフェリンはイミダゾピラジノン環状骨格を有する化合物である。また、ルシフェリンは不斉中心を持ち、天然のウミホタルルシフェリンは *S* 体である<sup>1)</sup>。ルシフェリンの構造や前駆体の取り込み実験から、ルシフェリンはイソロイシン、アルギニン、トリプトファンの三つのアミノ酸から生合成されると推定された<sup>4)</sup>。*Vargula* ルシフェラーゼ (VLuc) は基質特異性が高く、ほかの発光系のルシフェリンと交差反応しない。ウミホタル VLuc の生物発光量子収率 (ルシフェリン 1 分子の反応から 1 光子が放出される確率) は約 0.3 であり、その反応回転数 (ルシフェラーゼが 1 分に行える反応回数) は 1400 と報告され、既知のルシフェラーゼの反応回転数の中で最も高い値である<sup>5,6)</sup>。また、発光反応の機構は<sup>18</sup>O<sub>2</sub> の取り込み実験や化学量論研究などによって推定され、ルシフェリンがルシフェラーゼによって酸化され、生成された励起状態のオキシルシフェリンから基底状態に戻るとき、発光すると考えられている (図 1A)<sup>7)</sup>。

一方、1989年に *Vargula (Cypridina) hilgendorffii* から VLuc の遺伝子がクローニングされ、そのタンパク質の一次構造が決定された。VLuc は二つの *N* 結合型糖鎖修飾部位を有する 555 アミノ酸残基からなる分子量 62 kDa の糖タンパク質である。また、555 アミノ酸残基中に 34 個システイン残基があり、17 本のジスルフィド結合を形成した安定な構造であることが推定された。その後、VLuc 遺伝子は数種類の哺乳類細胞に導入され、殆どの細胞においてルシフェラーゼが概ね良好な分泌性を示したことから、レポータータンパク質として利用できることが分かった<sup>8)</sup>。また、VLuc 遺伝子を導入した CHO 細胞において、ルシフェラーゼが細胞の表面から分泌されるのを発光反応でモニターすることができた<sup>9)</sup>。さらに、VLuc とシナプス小胞との融合タンパク質を用いることによって、シナプス小胞のエクソサイトーシス過程がウミホタル発光反応によって画像化された<sup>10)</sup>。一方、天然のウミホタルの発光系には蛍光タンパク質が関わっていないが、蛍光タンパク質 YFP を VLuc に融合させることにより、VLuc の発光は共鳴エネルギー移動のドナーとなり、YFP を光らせることが観測された。これは、オワンクラゲで見つかった生物発光共鳴エネルギー移動機構 (bioluminescence resonance energy transfer; BRET) と同じ機構によるものと考えられている (図 1B)。また、BRET の効率発光分子と蛍光分子との距離に依存するため、YFP と VLuc との間に生理活性ペプチドが挿入された融合タンパク質を用いることにより、BRET シグナルの減衰を指標としたペプチドのプロセッシングの測定法が開発された<sup>11)</sup>。

## 3. ウミホタルルシフェラーゼ CLuc

*V. hilgendorffii* の近縁種 *Cypridina noctiluca* のウミホタルルシフェラーゼの遺伝子は 2004 年に単離された<sup>3)</sup>。この *Cypridina* ルシフェラーゼ (CLuc) は VLuc とのアミノ酸配列レベルの相同性が高く、酵素の性質が極めて似ている。一方、二つルシフェラーゼの分泌シグナル配列の相同性があまり高くなく、両ルシフェラーゼは分泌特性において異なる性質を有することが明らかになった<sup>3)</sup>。CLuc は NIH3T3 細胞や HeLa 細胞において明らかに VLuc よりも高い分泌性を示すことが分かった。このことから、CLuc は哺乳類細胞を用いるレポータージーンアッセイにおけるレポータータンパク質としてより優れていることが示唆された。また、CLuc の分泌性を利用し、培地を還流させることにより、CLuc の活性を連続的に測定するシステムも開発された<sup>12)</sup>。このシステムを用いて長時間連続測定を必

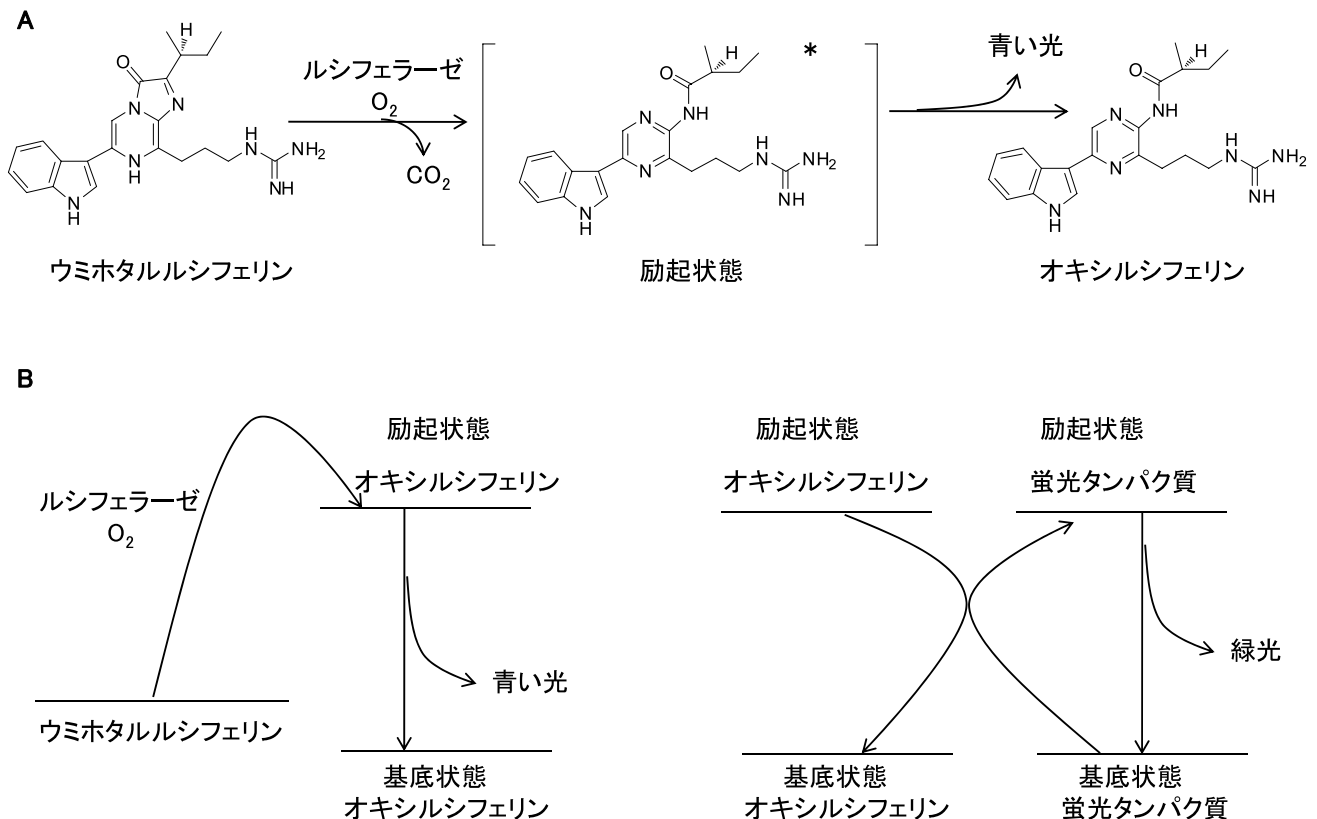


図1 ウミホタル発光とBRETシステム

(A) ウミホタルルシフェリン-ルシフェラーゼ反応機構。(B) 励起状態オキシルシフェリンによる発光及び近傍の蛍光タンパク質への生物発光共鳴エネルギー移動機構。

要とする時計遺伝子の発現変化や薬理効果の経時的な変化をモニターすることができる。しかしながら、当時光学活性体のウミホタルルシフェリンの供給源は天然からの抽出物しかなかったため、ウミホタル発光系のさらなる研究開発を展開する上で大きな障害となっていた。

そこで、筆者らはウミホタルルシフェリンの化学合成ルートを再検討した結果、実験室で光学活性体のウミホタルルシフェリンの大量合成法を開発した<sup>13)</sup>。一方、ほぼ同じ時期に基質特異性の異なるコペポータ (*Gaussia princeps*) 由来の分泌型ルシフェラーゼ (GLuc) の遺伝子が日本国内で発売され、入手することができた。GLucの発光基質であるセレンテラジンはウミホタルルシフェリンと同じイミダゾピラジノン環状骨格を有するが、二つのルシフェラーゼは基質の置換基部分の相違を厳密に認識し、交差反応を示さないことが判明した。そこで、二つの分泌型ルシフェラーゼによるデュアルレポーター遺伝子アッセイシステムの構築を試みた。比較のため、従来汎用されているホタルルシフェラーゼ (FLuc) とウミシイタケのレニ

ラルシフェラーゼ (RLuc) によるデュアルレポーター遺伝子アッセイを並行して行った (図2A)。モデル実験では、時計遺伝子 BMAL1 プロモーター配列の下流に CLuc の遺伝子を、コントロールプロモーターの下流に GLuc の遺伝子を配置した二つのベクターとともに、BMAL1 プロモーターの転写因子である ROR $\alpha$ 4 の発現ベクターを培養細胞に一過性同時に導入した。24 時間後に、培養液の一部 (10  $\mu$ l) をウミホタルルシフェリン溶液あるいはセレンテラジン溶液と混ぜて CLuc と GLuc の発光値を得ることができた。その結果、補正された CLuc の発光活性は転写因子のベクターの量に依存して増えることが分かった。また、FLuc と RLuc を用いたレポーター遺伝子アッセイでは細胞をすりつぶし、二つのルシフェラーゼの活性を測定した。補正された FLuc の活性 (転写因子の活性) は、分泌ルシフェラーゼで得られたのとほぼ同じであった (図2B)<sup>14)</sup>。このように、分泌ルシフェラーゼを用いることにより、レポーター遺伝子アッセイは細胞を破碎する必要がなくなった。現在このデュアルレポーター遺伝子

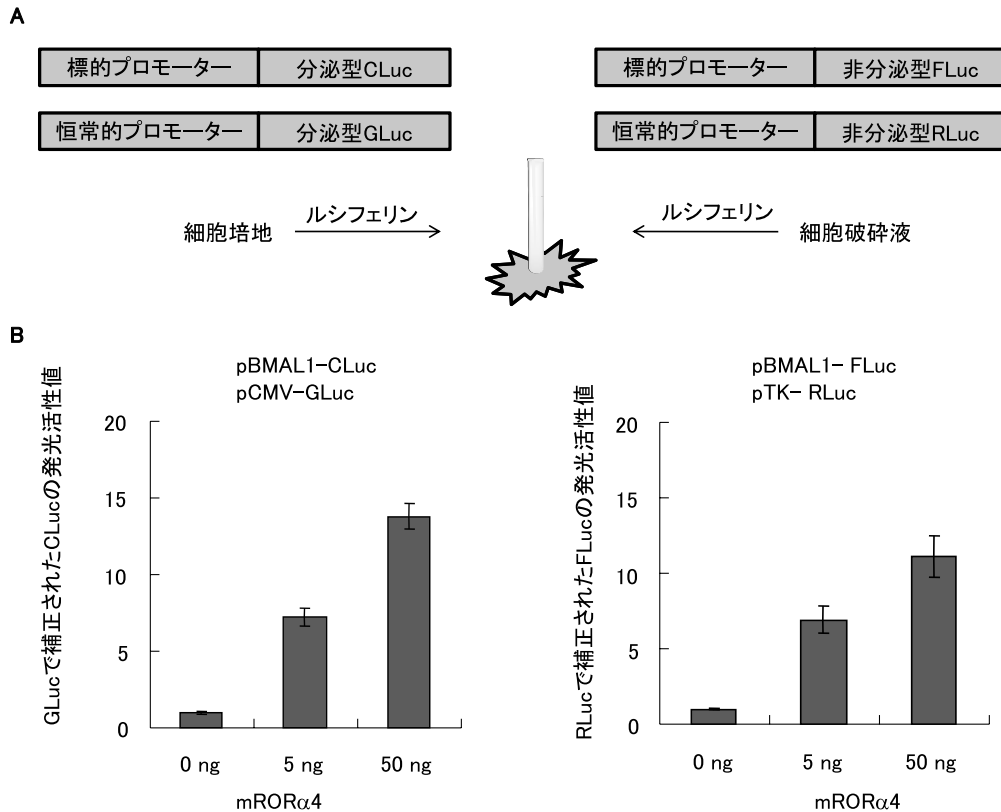


図2 デュアルレポーターアッセイシステム  
(A) 分泌型と非分泌型ルシフェラーゼを用いたデュアルレポーター遺伝子アッセイの概念図。(B) ルシフェラーゼを用いた転写因子 RORα4 による時計遺伝子 BMAL1 プロモーターの活性測定。

アッセイシステムは製品化され、国内外で市販されている。

#### 4. 近赤外線ウミホタル発光タンパク質プロープ

前述のように CLuc は分泌性の糖タンパク質である。筆者らはメタノール資化性酵母やカイコの発現系を利用し、CLuc タンパク質を大量に入手した。また、化学修飾反応や酵素反応によってビオチン化された CLuc は、免疫アッセイにおいて発光標識酵素として利用できることを見出した<sup>15)</sup>。特に、CLuc は免疫アッセイでよく利用されているアルカリホスファターゼ (ALP) や西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に比べて穏やかな生理条件で発光触媒活性を示すので、モノクローナル抗体と連結すれば、動物個体においても細胞表面のバイオマーカーをルシフェラーゼの発光で検出できるのではないかと考えた。

しかしながら、ウミホタルの青い発光は生体内のヘムや酸化ヘムの吸収スペクトルと重なるので、発光シグナルの低下が予想された。そこで、ルシフェラーゼの糖鎖に近赤外線有機蛍光色素 Cy5 を導入した人工的な BRET 機構に

よる長波長へシフトした発光タンパク質プロープの創製を行った<sup>16)</sup>。糖鎖は酵素の反応に直接関わっていないので、化学修飾によるルシフェラーゼの活性への影響が少ないと判断した。CLuc を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、得られたアルデヒド官能基にヒドラジン基を持つ近赤外線蛍光色素を連結させた (図 3A)。修飾したルシフェラーゼの発光スペクトルを測定したところ、緩衝液において 460 nm に発光最大波長を有する本来の発光ピークのほかに、長波長側で新たな極大発光ピークが観測された。この極大発光は BRET によるものと考えられる。興味深いことに、マウスの血液中の発光スペクトルは大きく変化し、BRET のピークは 460 nm での発光ピークよりも 3 倍強となった (図 3B)。そこで、この発光タンパク質を近赤外線発光タンパク質 (far-red bioluminescent protein; FBP) と命名した。CLuc と FBP の発光強度を比較するため、発光イメージング装置で観測した。その結果、血液中での FBP の発光シグナルは CLuc よりも数倍高いことが分かった (図 3C)。

次に、FBPと医療抗体の候補の一つであるモノクローナル抗 Dlk-1 (Delta-like 1 homolog) 抗体をビオチン・アビジン結合で連結させ、Dlk-1 抗原を発現しているヒト肝がん細胞株の可視化を試みた。抗原を発現する HuH7 細胞は抗原・抗体反応によってラベルされ、細胞表面からFBPの発光活性が前述の発光イメージング装置によって観測された (図 3D)。さらに、Dlk-1 抗原を発現するヒト肝がん細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍が 5 mm 程度の大きさに成長した段階でFBPと抗体との複合体を注入し

た (図 3E)。24 時間後にマウスに再びウミホタルシフェリン光学活性体を注射し、生体発光イメージング装置で観察した (図 3F)。その結果、マウスの腫瘍から高い発光シグナルが観測された、観測された発光シグナルはロングパスフィルターによる短波長の光の成分の除去操作を経て、BRET による発光であることが判明した。一方、CLuc に導入されている蛍光色素を利用した蛍光イメージングでは、マウスの自家蛍光の影響で同じ腫瘍から特異的な蛍光シグナルは観測されなかった (図 3G)。このように、FBP

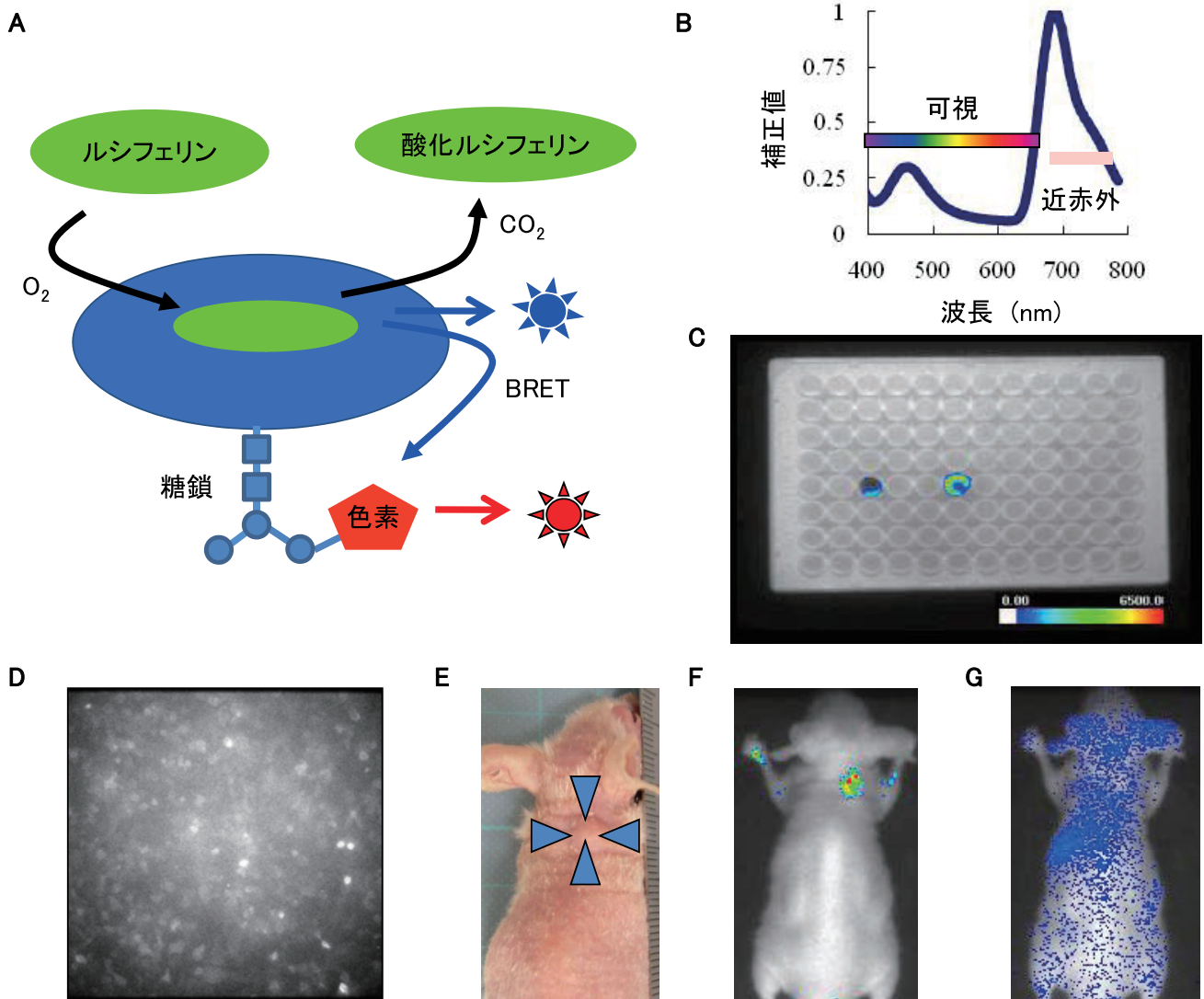


図 3 ウミホタル発光系を利用した生体イメージング

(A) BRET プロブの創製. (B) 血液中の FBP の発光スペクトル. (C) 血液中の CLuc (左) と FBP (右) の発光強度の比較. (D) FBP-Dlk1 抗体による細胞表面抗原のイメージング. (E) 腫瘍マウスの写真. (F) 発光イメージングの結果. (G) 蛍光イメージングの結果.

は培養細胞と動物個体のどちらでも利用可能な近赤外線発光プローブである。現在、このFBPを他種の抗体へ応用できないかについても検討している。

## 5. 終わりに

以上二つの分泌型ウミホタルルシフェラーゼについて紹介した。一方、最近 *Conchoecia* 属の発光ウミホタルルシフェラーゼはウミホタルルシフェリンではなく、セレンテラジンを発光基質とする発光系であることが明らかになった<sup>17)</sup>。しかしこのルシフェラーゼ遺伝子はまだ単離されていないので、詳しいことは不明である。またウミホタルルシフェリンは三つのアミノ酸から生合成されることが推定されたが、ルシフェリンの生合成の酵素はまだ単離されていないので、より詳しい生合成経路の解明が期待されている。

## 謝辞

本稿で紹介したウミホタル発光系を活用した生体イメージングに関する内容は、北海道大学大学院医学研究科の尾崎倫孝教授と近江谷克裕教授ならびに両先生の研究室の方々との共同研究によってなされたものであり、この場を借りてお礼申し上げます。また、Dlk-1抗体をご供与いただきました株式会社リブテックの中村康司博士らに深謝申し上げます。

- 1) Kishi, T., Goto, T., Hirata, Y., Shimomura, O., & Johnson, F.H. (1966) *Tetrahedron Lett.*, **7**, 3427-3436.
- 2) Thompson, E.M., Nagata, S., & Tsuji, F.I. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 6567-6571.
- 3) Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., & Ohmiya, Y. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 565-570.
- 4) Kato, S., Oba, Y., Ojika, M., & Inouye, S. (2004) *Tetrahedron*, **60**, 11427-11434.
- 5) Shimomura, O. & Johnson, F.H. (1970) *Photochem. Photobiol.*, **12**, 291-295.
- 6) Shimomura, O., Johnson, F.H., & Masugi, T. (1969) *Science*, **164**, 1299-1300.
- 7) Shimomura, O. & Johnson, F.H. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 340-346.
- 8) Thompson, E.M., Nagata, S., & Tsuji, F.I. (1990) *Gene*, **96**, 257-262.
- 9) Inouye, S., Ohmiya, Y., Toya, Y., & Tsuji, F.I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 9584-9587.
- 10) Miesenbock, G. & Rothman, J.E. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 3402-3407.
- 11) Otsuji, T., Okuda-Ashitaka, E., Kojima, S., Akiyama, H., Ito, S., & Ohmiya, Y. (2004) *Anal. Biochem.*, **329**, 230-237.
- 12) Yamagishi, K., Enomoto, T., & Ohmiya, Y. (2006) *Anal. Bio-*

*chem.*, **354**, 15-21.

- 13) Wu, C., Kawasaki, K., Ohgiya, S., & Ohmiya, Y. (2006) *Tetrahedron Lett.*, **47**, 753-756.
- 14) Wu, C., Suzuki-Ogoh, C., & Ohmiya, Y. (2007) *BioTechniques*, **42**, 290-291.
- 15) Wu, C., Kawasaki, K., Ogawa, Y., Yoshida, Y., Ohgiya, S., & Ohmiya, Y. (2007) *Anal. Chem.*, **79**, 1634-1638.
- 16) Wu, C., Mino, K., Akimoto, H., Kawabata, M., Nakamura, K., Ozaki, M., & Ohmiya, Y. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 15599-15603.
- 17) Oba, Y., Tsuduki, H., Kato, S., Ojika, M., & Inouye, S. (2004) *ChemBioChem*, **5**, 1495-1499.

呉 純

(産業技術総合研究所関西センター)

Development of the *Cypridina* bioluminescent system for bioluminescence imaging

Chun Wu (AIST, Kansai, Japan, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan)

## チオレドキシンドメインを持つプロスタグランジン合成酵素

### はじめに

プロスタグランジン (PG) は、1930年代に Kurzrok と Kieb や, Goldblatt, von Euler により、精液中や、前立腺および精嚢腺から抽出したものに降圧作用や平滑筋収縮作用がある新物質として発見され、prostaglandin と名付けられたものである。降圧作用を持つものは現在の PGE<sub>1</sub>、子宮筋の収縮など平滑筋収縮作用を示すものは PGF と考えられ、両物質は primary PG と呼ばれる。現在、PG は A から J まで 10 種類が生体に広く分布し、様々な生理活性を惹起することが、多く報告されている。不飽和脂肪酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) により PGH が合成され、さらにそれぞれ特異的酵素により各々の PG が生合成される。前駆体の不飽和脂肪酸がビスホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (8, 11, 14-eicosatrienoic acid) の場合は PGE<sub>1</sub> や PGF<sub>1</sub> のような 1 系列の PG が、アラキドン酸 (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid) の場合は PGE<sub>2</sub> や PGF<sub>2</sub> のように 2 系列の PG が、EPA (5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic acid) の場合は PGE<sub>3</sub> や PGF<sub>3</sub> のように 3 系列の PG が生合成される。本稿ではアラキドン酸から生合成される 2 系列の PG 合成酵素 (主に PGF 合成酵素) について述べるが、2 系列の酵素の多くは、