総合論文

オワンクラゲ生物発光の分子過程
——化学発光・生物発光における励起分子生成機構

平野　誉*・大橋　守*

Molecular Processes in Bioluminescence of the Jellyfish *Aequorea victoria*
——Mechanisms for Generating an Excited Molecule in Chemi- and Bioluminescent Reactions

Takashi HIRANO* and Mamoru OHASHI*

The photoprotein aequorin isolated from the jellyfish *Aequorea victoria* emits blue light in the presence of Ca^{2+} with a high quantum yield. Aequorin consists of apoaequorin (apoprotein), coelenterazine, and molecular oxygen. Coelenterazine also has a chemiluminescent reactivity with oxygen. *In vivo*, the excited energy generated by aequorin is transferred to a green fluorescent protein (GFP), which emits green light after energy transfer. The molecular processes in the jellyfish bioluminescence have been studied for designing a highly efficient luminescent compound and for establishing the supramolecular interaction between coelenterazine and apoaequorin as well as the interaction between aequorin and GFP. This review describes the chemiluminescent reaction mechanism of coelenterazine, the supramolecular structure and the bioluminescent character of aequorin investigated by the use of chemically modified coelenterazines and apoaequorin mutants, and the character of GFP.

Key words：Aequorin, Coelenterazine, Green fluorescent protein, Bioluminescence, Chemiluminescence.

1. はじめに

発光蛋白質エクオリンはカルシウムイオンとの結合により発光が開始されるカルシウム受容蛋白質である。現在，エクオリンは生きた細胞内のカルシウムイオン濃度を測定する指示薬として生物学における応用が注目されている[1,2]。すなわちエクオリンのアポ蛋白質の遺伝子を標的とする生物の遺伝子に組み込み，生体内で発現させる。そして発光基質を細胞内に供給すると細胞内のカルシウムイオン濃度に従った発光が観測されるわけである[3,4]。一方，エクオリンは発光量子収率20%を超える効率で青色の瞬間発光を行うので，この高効率生物発光メカニズムの解明が求められている。高効率発光物質を開発するための指標が発光基質の物性と発光反応メカニズムに潜んでいると考えられるからである。もうひとつの興味はこの発光反応をアポ蛋白質が作る環境が制御して高効率化に寄与しているという点にある。とくにアポ蛋白質の構造と励起分子の生成過程や励起分子の特性との相関は光合成をはじめとする光生物学とも共通の問題点である。本稿ではこれまでの基礎的研究から得られた結果を上記の2つの興味に沿って紹介する。

2. エクオリンの一般的性質

アメリカ合衆国ワシントン州サンファン諸島のフライデーハーバー付近に生息するオワンクラゲ(*Aequorea victoria*)は直径10 cm程の大型のクラゲであり，機械的刺激を与えると傘の縁が緑色に発光する。1962年下村とJohnsonによりオワンクラゲからはじめてエクオリンが単離された[5]。エクオリンはアポエクオリン(アポ蛋白質)と酵素分子と発光基質であるセレンテラジン1から構成され，カルシウムイオンと結合すると蛋白質部分

* 電気通信大学電子物性工学科（[redacted]）
* Department of Applied Physics and Chemistry, The University of Electro-Communications（[redacted]）

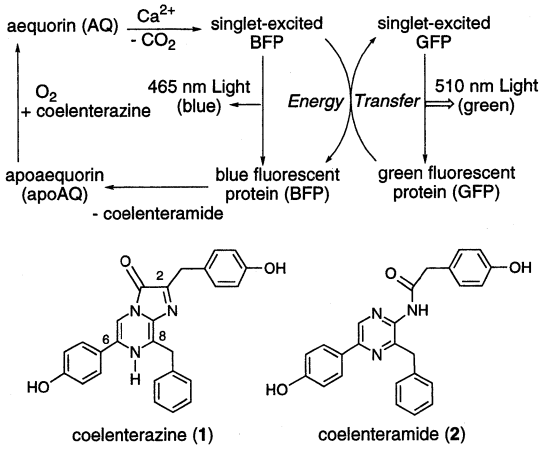


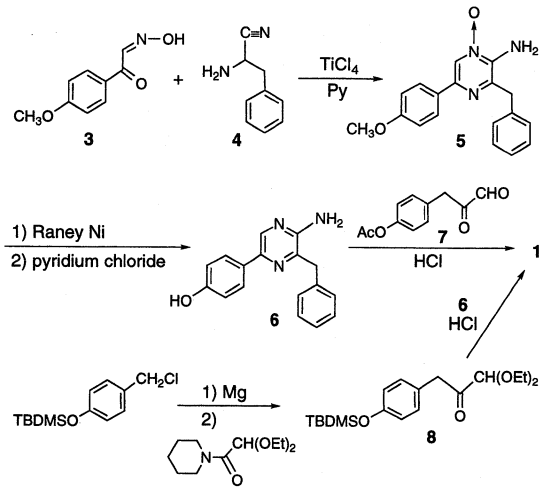
Fig. 1 Bioluminescence of the jellyfish *Aequorea victoria*.

の高次構造が変化してセレンテラジンの酸素酸化反応が加速されて青色(発光極大 465 nm)の瞬間発光を示す[5,6]。ホタルなどの発光生物に見られる酵素ルシフェラーゼが発光基質ルシフェリンの発光反応を触媒するルシフェリン-ルシフェラーゼ反応とは異なり，エクオリンはアポエクオリンとセレンテラジン 1 および酸素分子から発光可能な構造を形成し，開始剤であるカルシウムイオンの作用によって発光する発光蛋白質の反応様式をとっている。生成物は青色蛍光蛋白質(BFP)と二酸化炭素で，BFP はアポエクオリンとセレンテラミド 2 からなる[7]。2 はセレンテラジンからの発光反応生成物である。発光後に得られた BFP からゲルろ過によってアポエクオリンと 2 を分離し，得られたアポエクオリンより EDTA の共存下でカルシウムイオンを除き，酸素存在下セレンテラジンとインキュベートすることで再び発光可能なエクオリンを得ることができる[8]。エクオリンの生物発光および再生過程を図 1 にまとめた。現在では遺伝子組み替え技術によって大腸菌からアポエクオリンを大量に発現することができる[9~11]。オワンクラゲから単離されるエクオリンは 10 種類のイソエクオリンの混合物である[12]。アポエクオリンは 189 アミノ酸残基からなる分子量 21,400 支部図の一本鎖ペプチドであり，一次構造は DNA シークエンスから確立された。3 箇所の EF ハンド構造と呼ばれるカルシウムイオン結合部位を有し[9]，3 個のカルシウムイオンの配位が可能である。このうち発光開始に有効なカルシウムイオンの配位数は滴定の結果より 2 であると報告されている[13]。エクオリンはカルシウム受容蛋白質として有名なカルモジュリンと比較しても高い相同生を持っている[14]。エクオリンの三次構造を明らかにするために，単結晶の X 線回折像を得るまでは成功しているが[15]，その解析結果は得られておらず，三次構造は明らかではない。オワンクラゲからはエクオリンとともに緑色蛍光蛋白質(GFP)という蛍光性蛋白質が単離されている[16]。GFP も単一のペプチド鎖からなり，ペプチド鎖中の 3 つのアミノ酸残基から形成された蛍光色素を有している[17,18]。クラゲの体内ではエクオリンから生成した励起 BFP の励起エネルギーを GFP にエネルギー移動して励起 GFP が生成して 508 nm に発光極大を持つ緑色発光が見られる(図 1)[16,19,20]。

3. セレンテラジンの化学発光メカニズム

3.1. セレンテラジンの化学発光

セレンテラジンはウミホタルやホタルイカの発光基質と共通の 3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-a]ピラジン-3-オン環を基本骨格として有する。このイミダゾピラジノン環は生合成としてはトリペプチドから合成されると考えられている[21]。実験室ではオキシム 3 とアミノニトリル 4 からアミノピラジン-*N*-オキシド 5 を構築し，還元，脱メチル化後に得られるセレンテラミン 6 とケトアルデヒド 7 との酸性条件下での縮合反応により合成される[22~24]。我々はケトアルデヒド 7 の代わりに簡便に合成可能なケトアセタール 8 を用いた合成法を見いだした[25]。



セレンテラジンを含めイミダゾピラジノン誘導体はアポエクオリンなどの蛋白質が関与しなくても非プロトン性溶媒中，酸素存在下にて発光する。この反応を化学発光，ルシフェラーゼやアポ蛋白質の関与する場合を生物発光と呼んでいる。イミダゾピラジノン誘導体の発光反

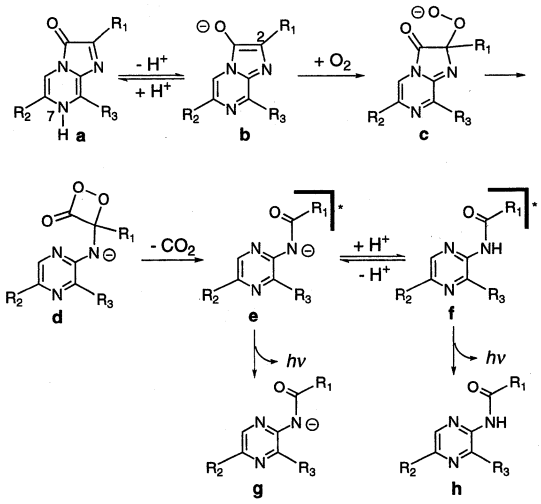


Fig. 2 Luminescent reaction of an imidazopyrazinone derivative.

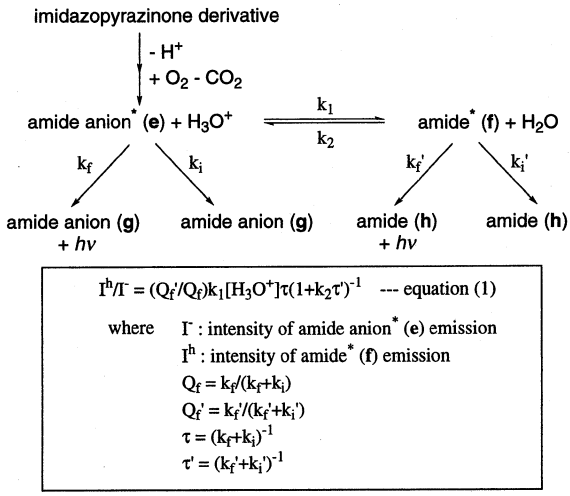
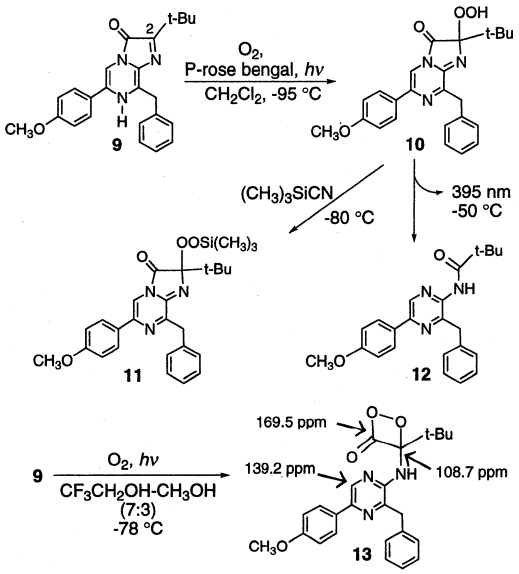


Fig. 3 Emission processes of the singlet excited states of amide anion (g) and amide (h).

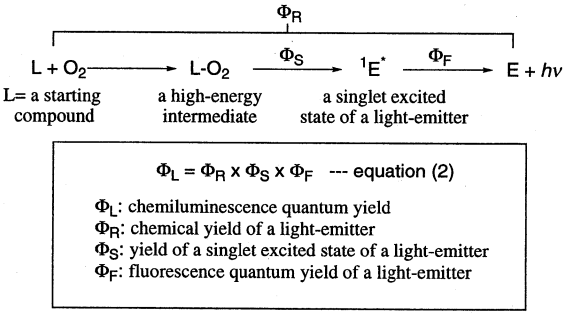
応は化学発光も生物発光も同じ過程を経て進行すると仮定されているが疑問点も多い。化学発光反応経路は図2に示すように提唱されている[26,27]。まず7位のNHプロトンが解離してアニオンbが生成し，2位で酸素と反応してペルオキシドcとなる。これが環化してジオキセタノン中間体dが生成した後，熱分解によって一重項励起状態のアミドアニオンeを生成し，発光する。容易にプロトン化する条件では中性アミドの一重項励起状態fとなり発光する。イミダゾピラジノン誘導体の酸解離定数は水中で7.6と測定されている[28]。また，イミダゾピラジノン誘導体の酸化電位はDMSO中で0.4 V (vs SCE)付近であり，イミダゾピラジノン誘導体はプロトン解離しやすく，また酸素と充分反応しうることがわかる。さらに酸素 $^{18}O_2$ を用いた発光反応を行うと ^{18}O が二酸化炭素に取り込まれることにより発光反応に酸素が関与することが確認された[29]。セレンテラジンのDMSO中での化学発光では460 nmに発光極大が観測され，2.6%v/vの酢酸緩衝液(pH 5.6)を含むジグリム中では410 nmに発光極大が観測される[24,30]。それぞれの溶媒中の生成物はセレンテラミドであり，化学発光時の励起セレンテラミドの構造はDMSO中ではアミドアニオンe，ジグリム-酢酸緩衝液中では中性構造fである。アミドアニオンへのプロトン化と蛍光発光過程および無輻射失活過程は図3にまとめられ，中性種からの発光強度(I^h)とアニオンからの発光強度(I^-)の比(I^h/I^-)が式1で表される[31,32]。I^h/I^- は主に溶媒中のプロトン濃度と励起状態の蛍光寿命に依存することがわかる。実際に，アミドアニオンeの一重項励起状態の寿命が短いときはアニオンeからの強度が増加する[32]。I^h/I^- は溶媒中の重水素効果によっても影響される。これはアニオン種へのプロトン付加速度が低下するためであり，重水から調整した酢酸緩衝液を加えたジグリム中では比が低下する[31]。中間体の構造に関する情報として，近年寺西らによってペルオキシドに相当する誘導体の合成がなされた。セレンテラジンアナログ9を−95℃にて一重項酸素酸化して2-ヒドロペルオキシド10が得られた[33]。10の構造はシリル化して安定化した11により確立された。10は温度を



−95°C から−50°C に上昇すると発光し，生成物は対応するセレンテラミドアナログ12であった。よって，実際のセレンテラジンの化学発光でも2-ペルオキシドを経由して反応が進行しているものと考えられる。さらに最近，磯部らによって9の光酸素化反応によってジオキセタノン中間体13がNMRにより確認されたことが報じられた[34]。ジオキセタノン中間体は直接励起分子を与える鍵を握る化合物であり，励起一重項生成効率を支配する要因を解明するためのブレイクスルーとなる可能性がある。

3.2. ジオキセタノンからの励起分子の生成とCIEEL機構

エクオリン生物発光および化学発光の量子収率はそれぞれ20%，0.2%と測定されている[12,24,35]。この値は発光反応の標準物質として用いられるルミノールの量子収率1%と比べても高い効率をもつ発光物質の部類に入る。発光反応の量子収率Φ_Lは発光種となる物質の生成収率Φ_Rと励起分子生成過程における一重項励起分子の生成効率Φ_Sおよび発光体の一重項励起状態の蛍光量子収率Φ_Fの3つの積で表される(式2)。セレンテラジン



の化学発光ではセレンテラミド生成収率は高い[24]。またセレンテラミドは中性でもアミドアニオン体でも蛍光量子収率が20%付近の高い値を有するので[36]，生物発光時にはジオキセタノン中間体の熱分解による一重項励起分子の生成効率Φ_Sも高いことが予想される。1,2-ジオキセタン誘導体は形式的にWoodward-Hoffmann則において光反応許容な[2+2]環化付化反応の逆反応により励起分子を生成する。しかし3,3,4,4-テトラメチルジオキセタンなど数多くのアルキル置換ジオキセタンの熱分解では三重項励起分子を高収率で与え，一重項励起分子の収率が低いことが確認されている[37]。よって，単純な1,2-ジオキセタンの熱分解反応ではセレンテラジンの一重項励起分子を効率よく与える反応は説明できない。

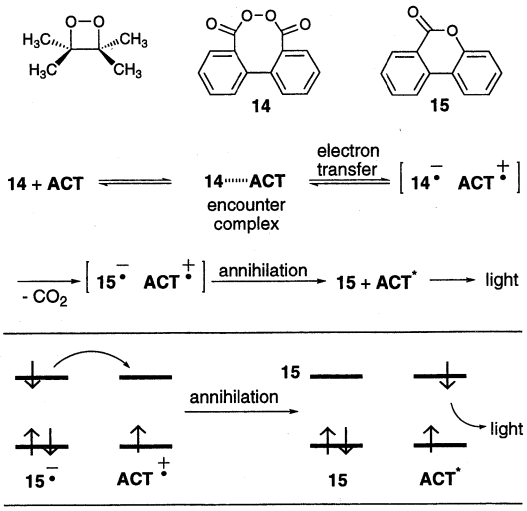


Fig. 4 Chemiluminescence of diphenoyl peroxide 14.

一方，電子受容体と電子供与体の分子間で高効率発光が起こる反応が発見された。この反応は電子の授受を伴ったCIEEL (chemically induced electron exchange luminescence)機構により高効率化されていると説明された[38]。代表的な反応はジフェノイルペルオキシド14とペリレンなどの蛍光性化合物(ACT)の組み合わせによる化学発光である[39]。反応はまず14とACTとの間で遭遇錯体(encounter complex)の生成を経て電子移動が起こり，生成した14のラジカルアニオンが脱炭酸してベンゾクマリン15のラジカルアニオンを与える(図4)。最後に15のラジカルアニオンとACTのラジカルカチオンとの間で電荷消滅する際にACTの一重項励起状態を与え，発光するというものである。反応の律速段階は14とACTとの間の電子移動であり，電子供与性の高いACTを用いるほど反応速度が大きい。発光効率に関与する過程は電荷消滅過程である。エネルギー的にはベンゾクマリン15のラジカルアニオンとACTのラジカルカチオンの間での電子移動に伴う発熱量ΔGの値で評価でき，Rehm-Weller式により算出したΔGがACTの一重項エネルギー$E_{0\text{-}0}$よりも大きい場合に励起分子を生成しうる(式3)。

$$\Delta G = E_D^{ox} - E_A^{red} - (e^2/\varepsilon r) > E_{O\text{-}O} \quad \text{--- equation (3)}$$

E_D^{ox}: an oxidation poteitial of ACT
E_A^{red}: the reduction poteitial of benzocoumarin **15**
ε: a solvent dielectric constant
r: a radii of ACT and benzocoumarin **15**
$E_{O\text{-}O}$: a singlet energy of ACT

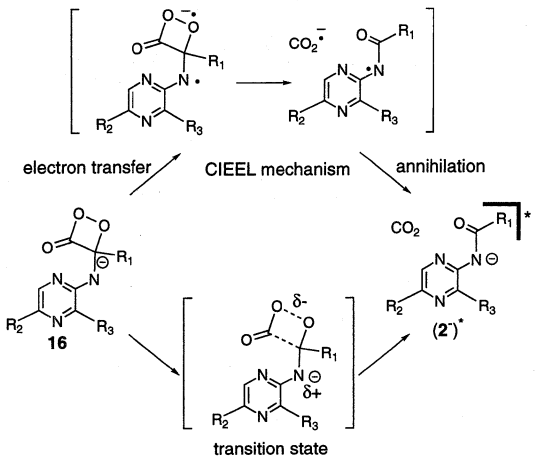
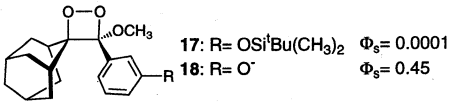


Fig. 5 Generation of the singlet excited state of coelenteramide anion in coelenterazine chemiluminescence.

このような分子間の電子移動によるCIEEL機構の考えは高効率発光を行う生物発光に関与するホタルルシフェリンやセレンテラジンの発光反応にも適用された[40]。セレンテラジンの場合，ジオキセタノン中間体16において電子供与性のピラジルアミンアニオン部からジオキセタノンのO-O結合の非占有軌道に分子内電子移動し，続くジオキセタノン部の熱分解により二酸化炭素のラジカルアニオンとピラジルアミンラジカルが生成する。最後に両者の間で電子移動してセレンテラミドアニオンの一重項励起分子が生成して発光するという反応機構である(図5)。しかし，近年CIEEL機構を提唱するのに用いられた14と蛍光性化合物による化学発光反応の効率があまり高くないことが明らかとなり，CIEEL機構に疑問を投げかける向きがでてきた[41]。実際にラジカルアニオンとラジカルカチオンの間で電子移動する際に統計的にみて一重項励起分子を与える必然性がないことも指摘されている。一方でフェノラートアニオンの置換したジオキセタン誘導体が高効率で一重項励起分子を与えることが見いだされた[42]。ジオキセタン17の発光量子収率は0.001%と大変低いが，フェノラート18の発光量子収率はアセトニトリル中9%に上昇する。このとき一重項励起状態の生成効率は45%にも達することから，高効率発光において電子供与性置換基が重要な役割を果していることが明らかである。このような背景から現在ではジオキセタノン中間体が熱分解する際に遷移状態が電荷移動性を持った構造をとって励起一重項状態を効率よく与えると説明されている(図5)[43,44]。電子供与性置換基は歪んだジオキセタン環との電子反発によって結合開裂を加速させる。これによってスピン禁制な三重項状態への系間交差する前に一重項励起分子を与えると考えられる。また，電子供与性置換基により誘起された遷移状態の電荷分布の偏りが基底状態の電子配置よりも電荷分布の偏った励起一重項状態の電子配置に近い性質を持つために励起一重項状態を与えやすいのではないかと予想される。

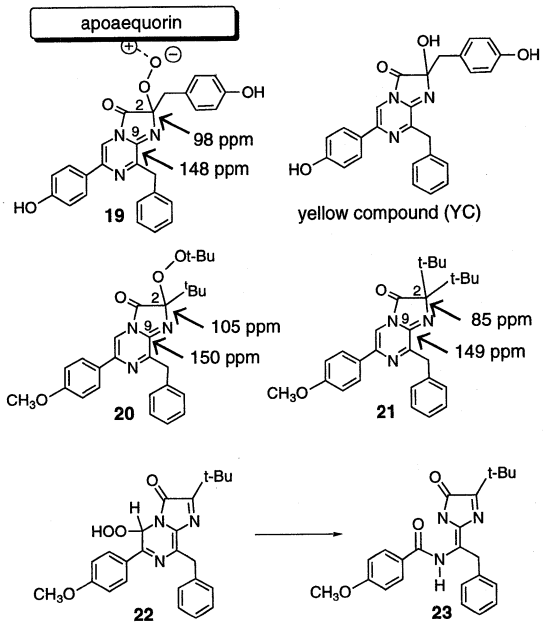


4. エクオリン生物発光と超分子構造

エクオリンの生物発光効率はセレンテラジンのDMSO中の化学発光効率よりも二桁高く，アポエクオリンの作る蛋白質環境場でセレンテラジンの高効率発光性が発揮されていることがわかる。アポエクオリン内での発光反応の高効率化に必要な因子を探し出すためには，エクオリンの三次構造を明らかにする必要がある。しかし，X線解析結果が得られていないため，エクオリンの超分子構造と生物発光特性の関係は部位特異的変異法により作成したアポエクオリン変異体や化学修飾したセレンテラジンアナログを用いるなどして間接的に検討されてきた。これらの方法で得られたエクオリンの構造と生物発光活性の相関について次に述べる。

4.1. エクオリン内におけるセレンテラジンの構造

エクオリンは酸素の存在しない条件でも生物発光することから，既に酸素分子がエクオリンの構成成分として組み込まれている[5]。エクオリン内でセレンテラジンと酸素分子がどのような構造で取り込まれているのかを調べるためにエクオリンを亜硫酸水素ナトリウムで処理した結果，不安定な黄色化合物(YC)が単離された。YCの構造は2-ヒドロキシセレンテラジンと決められたことからエクオリン内のセレンテラジンの構造は2位のペルオキシド19と考えられた[45]。さらに^{13}Cラベルしたセレンテラジンを用いてエクオリンを再生させて^{13}C NMRを測定したところ，2位と9位の炭素が4級炭素としてそれぞれ98 ppm，148 ppmに観測された。2位の炭素は-CO-C(OR)(NHR)R構造を持つ炭素の化学シフトとして妥当な値であり，YCの構造を支持している[46]。さらにこの結果を確立する目的で寺西らはセレンテラジンアナログ9から誘導した2-ペルオキシド20と2,2-ジt-ブチル体21の^{13}C NMRの化学シフト値を帰属した[47]。20の2位の炭素は105 ppmと若干低磁場シフトがみら



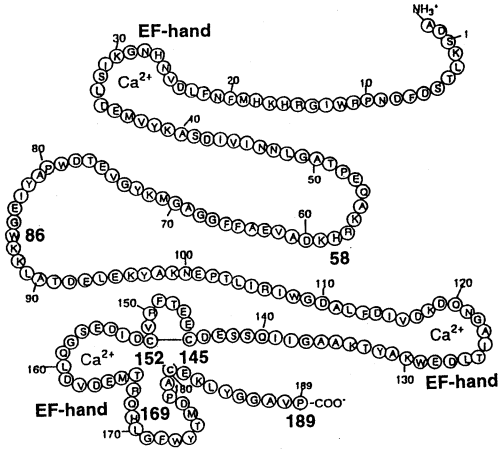


Fig. 6 Amino acid sequence of recombinant aequorin.

れるもののエクオリンの測定値に近い値であった。しかし，21ではより高磁場に観測され，2位に酸素が結合してはじめてエクオリンの測定値を満足することがわかる。9位の炭素の化学シフトには構造による大きな変化が認められなかった。以上の結果，セレンテラジンはエクオリン内で2-ペルオキシド19として存在することが確認された。また，YCとモデル化合物のUV吸収スペクトルを比較した結果，エクオリン内で5-ペルオキシドとして存在する可能性も示唆された[48]。しかし，寺西は5-ヒドロペルオキシド22の合成に成功し，その熱反応では開環した23が得られるのみなので[49]。セレンテラミドを与える反応性の面からも2-ペルオキシド19が妥当であることが確立された。

4.2. エクオリン生物発光におけるアミノ酸残基の役割

アポエクオリンの特定のアミノ酸残基は遺伝子組み換え技術である部位特異的変異法により他のアミノ酸残基に置換され，その役割を調べることができる。この手法によりセレンテラジンの化学発光特性をコントロールしているアミノ酸残基の探索が行われた。分泌型アポエクオリンの一次構造を図6に示す。アポエクオリンはカルモジュリンなどの多くのカルシウム受容蛋白質と比較するとヒスチジン，システイン，トリプトファンを多く含んでいるという特徴がある[14]。これらのアミノ酸残基は発光特性と深く関わっている可能性があるため，これらのアミノ酸残基の置換を中心に調べられた。

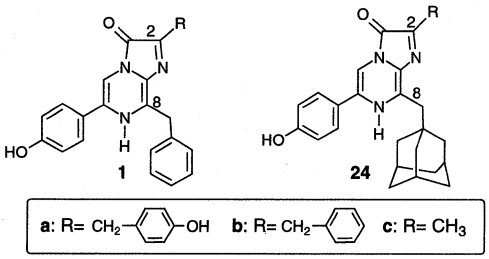
ヒスチジンは加水分解酵素などの触媒作用の中心的役割を果たすことが多い。実際にエクオリンとアポエクオリンのヒスチジン残基をそれぞれエトキシホルミル化する化学修飾を施すと，アポエクオリンでのみ化学修飾により発光活性が低下する[50]。アポエクオリンには5つのヒスチジン残基が存在し，それぞれを置換した変異体を作成して発光活性を調べたところ，58および169番目を置換した変異体で大きな発光活性の低下が見られた[50,51]。よって58と169番目のヒスチジン残基が発光活性部位を構成している可能性が高い。システイン残基はジスルフィド架橋によって蛋白質の三次元構造を安定化する。アポエクオリンの3個のシステイン残基をすべてセリンに置換した変異体でも発光活性は維持されていたので本質的な役割が見いだされなかった[52]。質量分析法を用いた研究より3個のシステインのうち145番目と152番目のシステインがジスルフィド架橋を形成しやすいことが認められ，構造的に近い位置に存在していることがわかっている[53]。アポエクオリンのC末端にはプロリンが存在し，これを除去すると発光活性が大きく低下する。よってC末端プロリンは3次構造を維持するうえで重要であると考えられている[54,55]。また，エクオリンは2個のカルシウムイオンの配位によって発光が開始される[13]。3箇所のEFハンド部位のどれが発光に必要かを調べるためにそれぞれの部位に含まれるグリシンをアルギニンに置換した変異体が作成され，N末端に近い2個のEFハンドが重要であることがわかっている[51]。さらにアポエクオリンには6個のトリプトファン残基が存在し，それぞれを置換した変異体が作成された[56]。この中で86番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換した変異体が465 nmの発光極大とともに400 nmにも

発光の肩が現れるようになった。よって86番目のトリプトファンはエクオリン内のセレンテラジンの近傍に位置して発光色の制御に働いている。以上の結果から発光特性に重要なアミノ酸残基がいくつか見いだされた。これに加え，我々は最近光アフィニティーラベル用の光反応性置換基を導入したセレンテラジンアナログの合成に成功した[57]。この光アフィニティーラベル法による結果も含め，生物発光に関与する活性部位の構造が明らかになりつつある。

4.3. 半合成エクオリン

セレンテラジンはイミダゾピラジノン環の2位に4-ヒドロキシフェニルメチル基，6位に4-ヒドロキシフェニル基，8位にベンジル基を有する。これら3個の置換基を他の置換基に置き換えた種々のセレンテラジンアナログが合成され，アポエクオリン共存下でインキュベートして半合成エクオリン合成し，カルシウムイオンを添加したときの発光特性が調べられた。これによりアポエクオリン活性部位とセレンテラジンのもつ置換基との相互作用の様式および生物発光特性に及ぼす効果が明らかにされた。

セレンテラジンの各置換基の変換による半合成エクオリンの生物発光の有無を図7にまとめた。6位を4-メトキシフェニル基や3-ヒドロキシフェニル基に置換すると生物発光活性がなくなるが，4-アミノフェニル基でも小さいながら発光活性を残しているので6位のフェニル基上の水酸基の位置が厳密に認識され，アポエクオリン活性部位と水酸基の間に静電的相互作用が働いていることがわかる[58]。2位をベンジル基に置換したときは生物発光活性を残しているが，シクロヘキシルメチル基やイソプロピル基では発光活性が大きく低下するので，4-ヒドロキシフェニルメチル基の平面なベンゼン環部位と活性部位とで疎水性相互作用すると考えられる[30,58]。8位をメチル基に置換すると生物発光活性を持たないが，シクロヘキシルメチル基やアダマンチルメチル基に置換しても良好な発光活性を残している[25),58]。よって8位の側鎖はある程度の大きさが必要であり，アポエクオリンとの疎水性相互作用によりセレンテラジンが発光するために都合の良いコンホメーションを保っていると考えられる。以上の結果をもとにエクオリン内のセレンテラジンの構造と活性部位との相互作用の様子を図8にまとめた。セレンテラジンの持つ複数の置換基間での生物発光能に及ぼす影響の関係を調べるために，セレンテラジン1aと2位をベンジル基とメチル基に置換したアナログ1b，1cの生物発光活性の比率を8-アダマンチルメチル基に置換した対応するアナログ24a，24b，24cの生物



発光活性比と比較した[25]。この結果，相対生物発光活性比1a：1b：1cは，1.0：0.35：0.01，24a：24b：24cは2.0：0.73：0.02であり，8-アダマンチルメチル体の方が全体的に良い発光活性を示したものの，3者間の比はほぼ一致していることからセレンテラジンの2位と8位の置換基はアポエクオリンの活性部位AとBによって

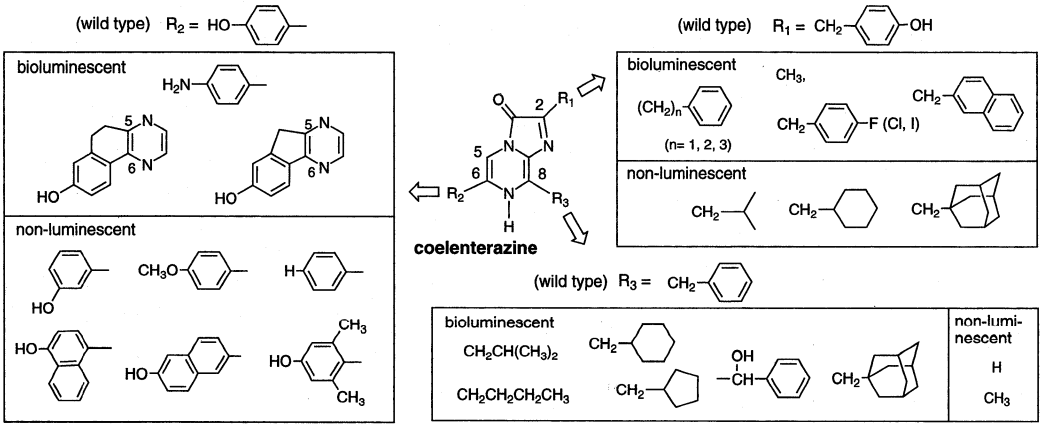


Fig. 7 Bioluminescence acitivity of semi-synthetic aequorin.

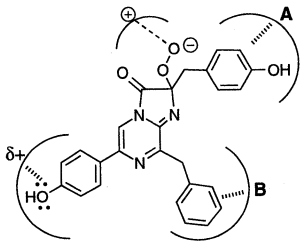
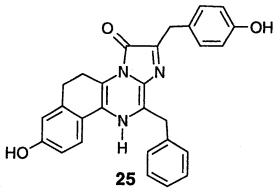


Fig. 8 An interaction between coelenterazine and an active site of apoaequorin.

独立して認識され，生物発光活性に相乗性があることがわかった。

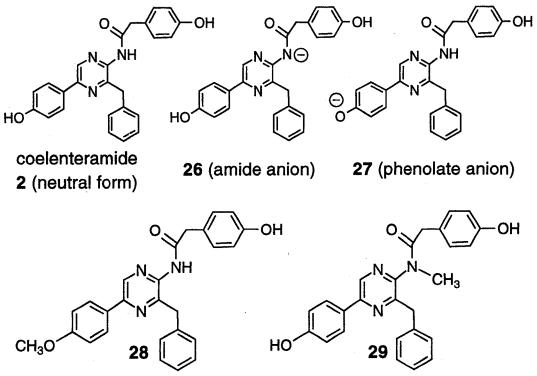
生物発光活性が確認された半合成エクオリンには天然型にはない発光特性を持つものがいくつか見られる。例えばエクオリンにカルシウムイオンを加えると，2秒ほどで終了する瞬間発光が観測される。このときの発光強度が最大時の半分まで立ち上がるまでの時間(half-rise time)や発光強度が最大時の半分まで下がるまでの時間(half-decay time)が半合成エクオリンの特徴を反映する[58]。また，天然型エクオリンの発光極大が465 nmなのに対し，8位がシクロヘキシルメチル基やアダマンチルメチル基に置換したアナログから合成した半合成エクオリンでは440 nmに観測され，8位の側鎖が生成するセレンテラミドの一重項励起状態の発光特性に影響している[25,58]。さらに6員環アナログ25を用いた半合成エ



クオリンでは465 nmとともに400 nmに発光極大が観測された。しかも465 nmと400 nmにおける発光強度の比(I_{400}/I_{465})が添加するカルシウムイオン濃度を増加すると増大する[58]。この発光挙動はアポエクオリンのトリプトファン-86変異体を用いた場合に類似していることから25のエタノ架橋部位が86位トリプトファンに近い位置に存在しており，8位の側鎖と同様に励起セレンテラミドの性質を制御している。

4.4. 生物発光色をきめるセレンテラミドの構造

エクオリンの生物発光極大と発光後に得られるBFPの蛍光極大(465 nm)が一致するのでBFPが発光体である。実際にはBFPに含まれるセレンテラミドがこの蛍光を発している[7]。セレンテラミドは水溶液中ではたいへん弱い蛍光を示すのみであるが，BFPの蛍光量子収率は10%を超えるほど強いので[19]，アポエクオリンはセレンテラミドが効率よく蛍光発光するための環境を与えている。セレンテラジンの化学発光との比較からエクオリン生物発光はアミドアニオン構造26からの発光と帰属されていた[60]。しかし，セレンテラミドはフェノール性水酸基とアミド基を有するため，それぞれのプロトン解離によって蛍光波長が変化する他に，イオン解離しなくても中性種2自身の蛍光極大が溶媒極性の上昇に対して大きく長波長シフトする[61]。さらに，基底状態で酸性度の低いアミドのNHがBFP中で容易に解離することに対する疑問点もあり，生物発光機構の解明のためにも生物発光時の一重項励起セレンテラミドの構造を正確に帰属する必要があった。



BFP内のセレンテラミド構造に関する情報を得る手段としてアポエクオリンとセレンテラミドを共存させることによりBFPを再構成することができる[7]。再構成したBFPも465 nmに蛍光極大を示す。同様にセレンテラミドの脱プロトン化位置をメチル基で保護した28と29を用いて半合成BFPの再構成を試みた[62]。28はトリス緩衝液中で28自身の蛍光が強いためにアポエクオリン共存時の蛍光強度の増加が認められず評価に至らなかった。*N*-メチル体29は緩衝溶液中では蛍光が弱かったが，アポエクオリンとインキュベートすると蛍光が増大し，蛍光極大が485 nmに観測された。この蛍光極大は天然型BFPよりも長波長であるが，アミドアニオンとなっていないNH体2でも465 nm発光におけるセレンテラミドの構造が説明できることを示している。

6員環アナログ25を用いた半合成エクオリンおよびアポエクオリンのトリプトファン-86変異体を用いた生物発光では465 nmと400 nmに発光極大が観測され

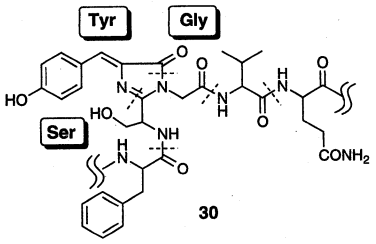
た[56,58]。この生物発光ではセレンテラミド励起状態の2種類の構造が関与していると考えられる。我々は2種類の発光種の生成にプロトン解離過程が関与していると考え，セレンテラミドの構造は465 nm発光がフェノレートイオン27で400 nm発光が中性種2と帰属した[62]。

従来，化学発光と生物発光は同一の反応機構と考えられてきたが，蛋白質中で進行する生物発光は溶媒中の化学発光とは著しく異なることが判明した。化学発光で明らかになった溶液中の反応プロセスをそのまま生物発光系に適用するのは極めて危険であろう。

4.5. GFPへのエネルギー移動

オワンクラゲの体内ではエクオリンが作る励起エネルギーをもう1つの蛋白質，緑色蛍光蛋白質(GFP)にエネルギー移動して緑色に発光する。GFPの蛍光色素骨格はポリペプチド主鎖の3つのアミノ酸残基からなり，DNAからの翻訳後に酵素の作用を受けずに酸素存在下にて自動的に形成されるので，GFPのDNAを大腸菌などの数々の生物に導入したときにも遺伝子発現とともに緑色蛍光が見られる[63),64)]。GFPの励起光に480 nm付近の励起波長を用いれば生体に損傷を与えないため，GFP遺伝子はDNAの発現の有無を緑色蛍光で確認することのできるマーカー遺伝子として近年その応用性に注目が集まっている。また，エクオリンとGFPとでエネルギー移動に都合の良い超分子構造を形成する点にも興味が持たれる。

GFPは238個のアミノ酸残基よりなり，65番目のセリン，66番目のチロシン，67番目のグリシンからの脱水と酸化によりイミダゾロン骨格を有する蛍光色素30が形成されていると考えられている[17,18]。GFPは400 nmと470 nmに吸収極大をもち，蛍光極大は508 nmに観測されている。蛍光量子収率は80%である[19]。GFPはイオン強度や温度，pHの変化により変性し蛍光発光性を失う[65]。硫酸第一鉄などの還元剤の作用により蛍光性を失うが酸素存在下では再び蛍光性を取り戻す[66]。GFPのパパイン分解物からクロモペプチドが単離され，色素骨格30を含むヘキサペプチドであることが確認されている[18]。色素骨格ではチロシン由来の4-ヒドロキシフェニルメチレン基の共役が重要であり，部位特異的変異法により66番目のチロシンをヒスチジン残基に置換したGFP変異体では蛍光が青色になる[67]。色素骨格がイミダゾロン環を持つことを確認するためにモデル化合物の合成と物性の検討が続けられている。GFPは高い蛍光量子収率を持つのに対し，単離されたクロモペプチドが蛍光性を持たないので，GFPのポリペプチド鎖によって色素骨格が蛍光輻射するのに都合の良い環境場が与えられていることがわかる。



エクオリンとGFPとの間のエネルギー移動過程に関しては，単なる2つの蛋白質の混合溶液中では蛋白質間の相互作用が少なくトリヴィアル過程(Trivial Process)であるが，膜上にこの2つの蛋白質を固定するとフェルスター型(Förster Type)の移動が起こるといわれている[19,20]。さらに電子移動の可能性もある。超分子形成に伴うエネルギー移動機構は未知の分野であり，楽しみである。

5. おわりに

カルシウムイオンセンサーとして有効なエクオリンとともに遺伝子マーカーとして脚光を浴びているGFPは生化学の分野での応用が進んでいる。同時にセレンテラジンの化学発光機構の研究ではセレンテラジンアナログのヒドロペルオキシド体が合成され，ジオキセタノン中間体がNMRにより検出されるなど有機化学からの進展がめざましい。最近中村らによってセレンテラミンの新しい合成法も見いだされた[68]。さらに生化学サイドからも部位特異的変異法によりエクオリン生物発光で重要な役割を担っているアミノ酸残基が明らかになってきた。有機化学者と生化学者の共同研究によって半合成エクオリンの発光特性の研究が進んでいる。残念ながらX線結晶解析の結果が明らかになっていないが，光アフィニティーラベル実験などによりエクオリンの生物発光と構造の相関が明らかとなりつつある。このようにエクオリン生物発光およびGFPの研究は有機化学者，光化学者，生化学者の共同研究によって進展しつつある。オワンクラゲの生物発光メカニズムの解明を進める中から発光反応を制御するアミノ酸残基の役割，ペプチド環境場の中の励起分子の性質，さらに高効率化学発光物質の開発に必要な条件などの多くの情報が得られることが期待される。

謝　辞　本稿で紹介した我々の研究はカリフォルニア大学サンディエゴ校スクリプス海洋研究所フレデリック辻教授，電気通信大学丹羽治樹教授，理研近江谷克裕博士，川村理研陳鳳啓博士，チッソ横浜研究所井上敏博士およ

び電気通信大学学生諸氏との共同研究によるものであり，共同研究者の方々に心から感謝いたします。また，我々を本研究分野に導いていただきました名古屋大学故後藤俊夫先生に深く感謝します。本研究分野で熱心なご議論を賜りましたウッズホール海洋生物研究所下村　脩博士，名古屋大学磯部　稔教授，三重大学寺西克倫博士，筑波大学藤森　憲博士，愛知教育大学戸谷義明博士に厚くお礼申し上げます。

本研究は文部省科学研究費補助金によってなされたものであり，ここに深謝いたします。

（平成8年3月11日受理）

文　献

1) (a) O. Shimomura, *Cell Calcium*, **12**, 635 (1991); (b) O. Shimomura, B. Musicki, Y. Kishi, S. Inouye, *Cell Calcium*, **14**, 373 (1993)
2) 飯田秀利，嶋田淳子，*BIOmedica*, **6**, 83 (1991)
3) J. Nakajima-Shimada, H. Iida, F.I. Tsuji, Y. Anraku, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6878 (1991)
4) R. Rizzuto, A.W.M. Simpson, M. Brini, T. Pozzan, *Nature*, **358**, 325 (1992)
5) O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223 (1962)
6) F.H. Johnson, O. Shimomura, *Methods Enzymol.*, **57**, 71 (1978)
7) O. Shimomura, F.H. Johnson, *Tetrahedron Lett.*, 2963 (1973)
8) O. Shimomura, F.H. Johnson, *Nature*, **258**, 236 (1975)
9) S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sasaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F.I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**, 3154 (1985)
10) D.C. Prasher, R.O. MacCann, M. Longiaru, M.J. Cormier, *Biochemistry*, **26**, 1326 (1987)
11) S. Inouye, S. Aoyama, T. Miyata, F.I. Tsuji, Y. Sasaki, *J. Biochem.*, **105**, 473 (1989)
12) O. Shimomura, *Biochem. J.*, **234**, 271 (1986)
13) O. Shimomura, A. Shimomura, *FEBS Lett.*, **138**, 201 (1982); O. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 359 (1995)
14) F.I. Tsuji, Y. Ohmiya, T.F. Fagan, H. Toh, S. Inouye, *Photochem. Photobiol.*, **62**, 657 (1995)
15) L.I. Hannick, D.C. Prasher, L.W. Schultz, J.R. Deschamps, K.B. Ward, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **15**, 103 (1993)
16) F.H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L.C. Gershman, G.T. Reynolds, J.R. Waters, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **60**, 85 (1962)
17) O. Shimomura, *FEBS Lett.*, **104**, 220 (1979)
18) C.W. Cody, D.C. Prasher, W.M. Westler, F.G. Prendergast, W.W. Ward, *Biochemistry*, **32**, 1212 (1993)
19) H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson, J. Winant, *Biochemistry*, **13**, 2656 (1974)
20) (a) W.W. Ward, M.J. Cormier, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2289 (1976); (b) *idem*, *J. Biol. Chem.*, **254**, 781 (1979)
21) F. McCapra, M.J. Manning, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973** 467
22) Y. Kishi, H. Tanino, T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 1609
23) S. Inoue, S. Sugiura, H. Kakoi, K. Hashizume, T. Goto, H. Iio, *Chem. Lett.*, **1975**, 141
24) (a) K. Teranishi, T. Goto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 3132 (1990); (b) *idem*, *Chem. Lett.*, **1989**, 1423
25) T. Hirano, R. Negishi, M. Yamaguchi, F.Q. Chen. Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, M. Ohashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1335
26) F. McCapra, Y.C. Chang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1967**, 1011
27) (a) T. Goto, Y. Kishi, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **7**, 407 (1968); (b) T. Goto, *Pure Appl. Chem.*, **17**, 421 (1968)
28) K. Fujimori, H. Nakajima, K. Akutsu, M. Mitani, H. Sawada, M. Nakayama, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2405 (1993)
29) O. Shimomura, F.H. Johnson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 340 (1971)
30) (a) F.Q. Chen, Y. Gomi, M. Ohashi, Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1307; (b) F.Q. Chen Y. Gomi, T. Hirano, M. Ohashi, Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, 1607
31) T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura, K. Nishikawa, M. Isobe, Y. Abe, *Tetrahederon Lett.*, **1968**, 4035
32) T. Hirano, Y. Gomi, T. Takahashi, K. Kitahara, F.Q. Chen, I. Mizoguchi, S. Kyushin, M. Ohashi, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 5771 (1992)
33) K. Teranishi, K. Ueda, H. Nakao, M. Hisamatsu, T. Yamada, *Tetrahedron Lett*, **35**, 8181 (1994)
34) K. Usami, M. Isobe, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8613 (1995)
35) O. Shimomura, F.H. Johnson, *Nature*, **227**, 1356 (1970)
36) 平野　誉，溝口　巌，大橋　守，寺西克倫，山田哲也，“光化学討論会講演要旨集”，1992年，p.343
37) (a) W. Adam, A. Beinhauer, H. Hauer, “Handbook of Organic Photochemistry”, vol.Ⅱ, chap.12, ed. by J.C. Scaiano, CRC Press, Ottawa, 1989; (b) 後藤俊夫，有合化，37，275 (1979)

38) G.B. Schuster, *Acc. Chem. Res.*, **12**, 366 (1979)
39) J.Y. Koo, G.B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 6107 (1977); *idem*, *ibid.*,**100**, 4496 (1978)
40) McCapra, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.*, **1977**, 946
41) L.H. Cartalani, T. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2633 (1989)
42) A.P. Schaap, T.S. Chen, R.S. Handley, R. DeSilva, B.P. Giri, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1155 (1987)
43) F. McCapra, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **51**, 21 (1990)
44) T. Wilson, *Photochem. Photobiol.*, **62**, 601 (1995)
45) (a) O. Shimomura, F.H. Johnson, H. Morise, *Biochemistry*, **13**, 3278 (1974); (b) O. Shimomura, F.H. Johnoson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2611 (1978)
46) B. Musicki, Y. Kishi, O. Shimomura, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.*,**1986**, 1566
47) (a) K. Teranishi, M. Isobe, T. Yamada, *Tetrahedeon Lett.*, **35**, 2565 (1994); (b) K. Teranishi, K. Ueda, M. Hisamatsu, T. Yamada, *Biosci.*, *Biotechnol.*, *Biochem.*, **59**, 104 (1995)
48) K. Teranishi, M. Isobe, T. Yamada, T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 1303 (1992)
49) 寺西克倫, "文部省科学研究費総合研究(A)「高効率発光を志向した化学発光・生物発光の基礎的研究」第2回研究発表会講演予稿集", 1995年, p.12
50) Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, *FEBS Lett.*, **320**, 267 (1993)
51) F.I. Tsuji, S. Inouye, T. Goto, Y. Sasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8107 (1986)
52) K. Kurose, S. Inouye, Y. Sasaki, F.I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 80 (1989)
53) Y. Ohmiya, S. Kurono, M. Ohashi, T.F. Fagan, F.I. Tsuji, *FEBS Lett.*,**332**, 226 (1993)
54) M. Nomura, S. Inouye, Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, *FEBS Lett*, **295**, 63 (1991)
55) N.J. Watkins, A.K. Campbell, *Biochem. J.*, **293**, 181 (1993)
56) Y. Ohmiya, M. Ohashi, F.I. Tsuji, *FEBS Lett.* **301**, 197 (1992)
57) (a) F.Q. Chen, T. Hirano, Y. Hashizume, Y. Ohmiya, M. Ohashi, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.*, 2405 (1994); (b) F.Q. Chen, J.L. Zheng, T. Hirano, H. Niwa, Y. Ohmiya, M. Ohashi, *J. Chem. Soc.*, *Perkin Trans. 1*, **1995**, 2129
58) (a) O. Shimomura, B. Musicki, Y. Kishi, *Biochem. J.*, **251**, 405 (1988); (b) *idem*, *ibid*, **261**, 913 (1989); (c) O. Shimomura, S. Inouye, B. Musicki, Y. Kishi, *ibid.*, **270**, 309 (1990); (d) O. Shimomura, Y. Kishi, S. Inouye, *ibid.*, **296**, 549 (1993)
59) Y. Ohmiya, K. Teranishi, M. Akutagawa, M. Ohashi, F.I. Tsuji, *Chem. Lett.*, **1993**, 2149
60) K. Hori, J.E. Wampler, M.J. Cormier, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.* **1973**, 492
61) O. Shimomura, *Biochem. J.*, **306**, 537 (1995)
62) T. Hirano, I. Mizoguchi, M. Yamaguchi, F.Q. Chen, M. Ohashi, Y. Ohmiya, F.I. Tsuji, *J. Chem. Soc.*, *Chem. Commun.*, **1994**, 165
63) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher, *Science*, **263**, 802 (1994)
64) S. Inouye, F.I. Tsuji, *FEBS Lett.*, **341**, 277 (1994)
65) (a) S.H. Bokman, W.W. Ward, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1372 (1981); (b) W.W. Ward, H.J. Prentice, A.F. Roth, C.W. Cody, S.C. Reeves, *Photochem. Photobiol.*, **32**, 803 (1982)
66) S. Inouye, F.I. Tsuji, *FEBS Lett.*, **351**, 211 (1994)
67) R. Heim, D.C. Prasher, R.Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 12501 (1994)
68) H. Nakamura, D. Takeuchi, A. Murai, *Synlett.*, **1995**, 1227