



高輝度発光型デヒドロセレンテラジン類のデザイン と合成および発光タンパク質フォラシンへの展開

森口, 舞子

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Date of Publication)

2026-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8080号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008080>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 森口 舞子

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目（外国語の場合は、その和訳を併記すること。）

高輝度発光型デヒドロセレンテラジン類のデザインと合成

および発光タンパク質フォラシンへの展開

指導教員 久世 雅樹

（氏名：森口 舞子 NO.1 ）

ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質であるフォラシンはデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として利用し、ROS の刺激により発光することが知られており、近年、これを利用した ROS 検出の為のキットが市販されるなど、フォラシンは ROS を検出・可視化し、経時変化に基づく動的解析を可能にする手段として期待されている。しかしながら現状では、試験管内で、かつ細胞外の環境でしか利用できない。生体内への適用が可能であり、直接的で定量可能な ROS の高感度検出手段としてフォラシンを利用するためには、輝度が十分ではなく、発光効率を高める必要があるという問題点が残されていた。そこで、本研究ではフォラシンへの改良型クロモフォアの導入による高輝度発光系の創製を研究課題とした。

本論文の 1 章では様々な生物の発光現象について概説しており、2 章で本研究の目的を述べている。3 章では DCL の 8 位に酸素原子を導入した 8-OAr-DCL 誘導体の化学合成を行い、4 章では DCL の 8 位に窒素原子を導入した 8-NAr-DCL 誘導体の化学合成を行っている。また、5 章では様々な DCL 誘導体の化学合成を行っている。6 章では市販のフォラシンを用いた合成基質の発光活性測定を行っており、7 章ではカイコ・バキュロウイルス系を用いたアポフォラシンの発現と活性化を行った後に合成基質を用いた発光活性測定を行っている。8 章では得られた結果を総括し、研究成果と今後の展望について論じている。

2 章ではフォラシンを明るく光らせるための分子デザインについて説明している。フォラシンの発光は、クロモフォアが酸分解して生成する酸化物の励起状態に由来している。特にアミドカルボニル部分が励起状態の中心を担っていると考えられている。DCL の構造を改変することで、このカルボニルの π 電子へ何らかの電子的効果をもたらすことができれば、フォラシンの発光効率を改変できるのではないかと考えた。DCL の 8 位にヘテロ原子を導入すれば、非共有電子対がカルボニルの励起状態に電子的効果を及ぼすことが可能になる。さらに、8 位ベンゼン環を介してフッ素基が導入できれば、ヘテロ原子の電子的効果をフッ素基により調節することが可能になると考えた。一方、DCL の 2 位と 6 位のベンゼン環に存在するヒドロキシ基はタンパクによる基質認識に必須の置換基であり、修飾できないことが先行研究により明らかになっている。また、6 位芳香環はピラジン環と少しねじれた方が安定であり、励起状態には電子的に関与しないと考えられている。これまで合成してきた 8 位に硫黄原子を導入した DCL 誘導体は、過剰に存在してしまう DCL が ROS と反応してしまうために、天然型基質よりもフォラシンの発光量が低下してしまう欠点があった。そこで本研究では、硫黄原子以外のヘテロ原子を導入してこの問題を回避すること、そして効率よく様々な置換基を導入する方法を確立し、フォラシンをより明るく光らせることを目指した。

そこで 3 章では DCL の 8 位に酸素原子を導入した 8-OAr-DCL、さらに 8 位に隣接するベンゼン環上にフッ素原子を導入した 8-OAr-DCL 誘導体の化学合成に取り組んでいる。市販の 2-アミノピラジンを臭素化したジブロモ体を用いて、位置選択的なクロスカップリン

(氏名：森口 舞子 NO.2)

グ反応を行うことにより、DCLの前駆体であるセレンテラミンへと誘導し、最後に4-ヒドロキシフェニルビルビン酸との縮合を行うことにより 8-*OAr*-DCL 類の短段階かつ高収率で DCL 誘導体を合成する経路を確立した。4 章では 3 章で確立した合成経路を基に 8 位に窒素原子を導入した 8-*NAr*-DCL の合成、さらに 8 位窒素原子上にメチル基を導入した 8-*N(Me)Ar*-DCL の合成を達成している。5 章では 8 位に臭素を導入した DCL 誘導体、8 位または 8 位と 6 位に置換基の無い DCL 誘導体の合成をおこなっている。

6 章では市販のフォラシンを用いて、3、4 および 5 章で合成した 10 種類の DCL 誘導体の発光活性測定を行っている。活性測定の結果から、8 位に酸素原子を導入した誘導体は全て活性があり、8-*OAr*-DCL が最も高輝度発光する基質であったのに対し、窒素原子を導入した 8-*NAr*-DCL 誘導体では、総じて天然型 DCL よりも総発光量が低下した。8-*OAr*-DCL 誘導体の中でも、電子供与基であるメトキシ基を導入したものが高輝度発光を示し、フッ素原子のような電子吸引基を導入した 8-*OAr*-DCL 誘導体において総発光量は減少した。以上のことから 8-*OAr*-DCL の置換基は電子供与基が適しているといえる。しかしながら活性測定に用いている市販のフォラシンには天然由来の基質が含まれているため、発光活性の評価を正確に行うことができないという欠点があった。そこで 7 章では天然基質の存在しない完璧なアポフォラシンの発現と活性化を課題とした。

DCL 誘導体の正確な発光活性の評価を行うために、組み換えアポフォラシンを用いた発光活性測定系の確立を行った。種々検討した結果、発光活性には糖鎖修飾が必要であることが分かった。そのためカイコバキュロウイルス系を用いて遺伝子発現させた組み換えアポフォラシンを調製した。FLAG[®]タグによるアフィニティ精製を行うことで高純度のアポフォラシンを得ることができ、発現精製系を確立できた。これまでに組み換えアポフォラシンの発光に成功した例はなかったが、精製アポフォラシンに DCL を加えてフォラシンを再構成した後、過酸化水素-ペルオキシダーゼ (H₂O₂-HRP) を加えて ROS を発生させることにより発光させることに成功した。また、HRP の代わりにカタラーゼ、H₂O₂ の代わりに TBHP を使い、組み合わせを変えて発光活性の測定を行ったが、H₂O₂-HRP の組み合わせが最も活性を強くした。また、天然フォラシンが示す発光と比較し、再構成系による発光は測定値が一定であり DCL 誘導体の効果をより正確に評価できることが確認された。DCL 誘導体の正確な活性評価の結果から、フォラシン発光の構造活性相関を明らかにすることができると考えられる。7 章の内容は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 30, 127177 に掲載されている。

また、発現させたアポフォラシンと市販の Pholasin[®]との相対的な発光量を棒グラフで表したところ、発光活性は同様の傾向を示した。このことから市販のフォラシンを用いた時の発光機構を次のように解釈することができる。市販のフォラシンに含まれる天然由来のクロモフォアはアポタンパクと平衡の関係にあるため、基質が一旦外れると別の基質が活性部位に入ることが可能となる。そのため、天然由来の DCL から過剰に存在する DCL 誘

(氏名：森口 舞子 NO.3)

導体へと基質が入れ替わり再びクロモフォアを形成して発光する発光機構が考えられる。

本研究では、カイコバキュロウイルス系を用いたアポフォラシンの発現と活性化を行い、8-*OAr*-DCL が最も高輝度活性を示す基質であることを明らかにした。本研究成果は遺伝子発現させたアポフォラシンを光らせることができた世界初の例であり、これにより化学修飾した DCL 誘導体の正確な発光活性の評価を行うことが可能となった。

氏名	森 口 舞 子		
論文 題目	高輝度発光型デヒドロセレンテラジン類のデザインと合成 および発光タンパク質フォラシンへの展開		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	准教授	久 世 雅 樹
	副 査	教 授	三 宅 秀 芳
	副 査	教 授	杉 本 幸 裕
	副 査	教 授	宇 野 知 秀
	副 査		
要 旨			
ヒカリカモメガイ由来の発光タンパク質 (pholasin: フォラシン) は、デヒドロセレンテラジン (DCL) を基質として発光を司るクロモフォアを形成しており、分子状酸素の存在下、活性酸素種 (ROS) の刺激により発光する。この性質を利用し、フォラシンは ROS 検出キット (Pholasin) として市販されており、ROS を検出・可視化し、経時変化に基づく動的解析を可能にする手段として利用されている。しかしながら、試験管内で、かつ細胞外の環境でしか利用できないという制約がある。また、フォラシンの発光輝度が十分ではないため、発光効率を高める必要があるという問題点も残されていた。本研究では、細胞内への適用が可能であり、直接的で定量可能な ROS の高感度検出手段としてフォラシンを利用することを目指し、発光効率を高めるための DCL 誘導体のデザインと合成、そして非天然型 DCL 誘導体をフォラシンに導入することで、ROS 依存型の高輝度発光系を創製することを目的とした。 1 章では様々な生物の発光現象について概説しており、2 章で本研究の目的を述べている。3 章では DCL の 8 位に酸素原子を導入した 8-OAr-DCL 誘導体の化学合成を行い、4 章では DCL の 8 位に窒素原子を導入した 8-NAr-DCL 誘導体の化学合成を行っている。また、5 章では様々な DCL 誘導体の化学合成を行っている。6 章では市販のフォラシンを用いた合成基質の発光活性測定を行っており、7 章ではカイコーバキュロウイルス系を用いたアポフォラシンの発現と活性化、そして DCL 誘導体を用いた発光活性測定を行っている。8 章では得られた結果を総括し、研究成果と今後の展望について論じている。 2 章では、高輝度発光のための分子デザインについて説明している。DCL とタンパク質が結合して生成するクロモフォアが発光反応を担っており、クロモフォアが酸化分解して生成する酸化物のアミドカルボニルが励起状態の中心を担っている。DCL の構造を改変することで、このカルボニルの π 電子へ何らかの電子的効果をもたらすことができれば、発光効率を改変できるのではないかと考えた。そこで DCL の 8 位にヘテロ原子を導入することで、非共有電子対がカルボニルの励起状態に電子的効果を及ぼすことを期待した分子をデザインした。さらに、8 位ベンゼン環にフッ素基が導入できれば、ヘテロ原子の電子的効果をフッ素基により調節することも可能になると考えた。一方、DCL の 2 位と 6 位のベンゼン環のヒドロキシ基はタンパクによる基質認識に必須であり、修飾できないことが先行研究により明らかになっている。また、6 位芳香環はピラジン環と少しねじれた方が安定であり、励起状態には電子的に関与しないと考えられている。これまで合成してきた 8 位に硫黄原子を導入した DCL 誘導体は、過剰に存在してしまう DCL が ROS と反応してしまうために、天然型基質よりもフォラシンの発光量が低下してしまう欠点があった。そこで本研究では、硫黄原子以外のヘテロ原子を導入してこの問題を回避すること、そして効率よく様々な置換基を導入する方法を確立し、フォラシンをより明るく光らせることを目指した。			

氏名	森 口 舞 子
----	---------

3 章では DCL の 8 位に酸素原子を導入した 8-OAr-DCL、さらに 8 位に隣接するベンゼン環上にフッ素原子を導入した 8-OAr-DCL 誘導体の化学合成に取り組んでいる。市販の 2-アミノピラジンを臭素化したジプロモ体を用いて、位置選択的なクロスカップリング反応を行うことにより、DCL の前駆体であるセレンテラミンへと誘導し、最後に 4-ヒドロキシフェニルビルビン酸との縮合を行うことにより 8-OAr-DCL 類の短段階かつ高収率で DCL 誘導体を合成する経路を確立した。

4 章では 3 章で確立した合成経路を基に 8 位に窒素原子を導入した 8-NAr-DCL の合成、さらに 8 位窒素原子上にメチル基を導入した 8-N(Me)Ar-DCL の合成を達成している。

5 章では 8 位に臭素を導入した DCL 誘導体、8 位または 8 位と 6 位に置換基の無い DCL 誘導体の合成をおこなっている。

6 章では市販のフォラシンを用いて、3、4 および 5 章で合成した 10 種類の DCL 誘導体の発光活性測定を行っている。活性測定の結果から、8 位に酸素原子を導入した誘導体は全て活性があり、8-OAr-DCL が最も高輝度発光する基質であったのに対し、窒素原子を導入した 8-NAr-DCL 誘導体では、総じて天然型 DCL よりも総発光量が低下した。8-OAr-DCL 誘導体の中でも、電子供与基であるメトキシ基を導入したものが高輝度発光を示し、フッ素原子のような電子吸引基を導入した 8-OAr-DCL 誘導体において総発光量は減少した。以上のことから 8-OAr-DCL の置換基は電子供与基が適しているといえる。しかしながら活性測定に用いている市販のフォラシンには天然由来の基質が含まれているため、発光活性の評価を正確に行うことができない欠点があった。そこで 7 章では天然基質の存在しない完璧なアポフォラシンの発現と活性化を課題とした。

7 章では DCL 誘導体の正確な発光活性の評価を行うために、組み換えアポフォラシンを用いた発光活性測定系の確立を行った。種々検討した結果、発光活性には糖鎖修飾が必要であることが分かった。そのためカイコーバキュロウイルス系を用いて遺伝子発現させた組み換えアポフォラシンを調製した。FLAG® タグによるアフィニティ精製を行うことで高純度のアポフォラシンを得ることができ、発現精製系を確立できた。これまでに組み換えアポフォラシンの発光に成功した例はなかったが、精製アポフォラシンに DCL を加えてフォラシンを再構成した後、過酸化水素-ペルオキシダーゼ (H₂O₂-HRP) を加えて ROS を発生させることにより発光させることに成功した。また、HRP の代わりにカタラーゼ、H₂O₂ の代わりに TBHP (t-ブチルヒドロペルオキシド) を用いて再構成フォラシンの発光活性の測定を行ったが、H₂O₂-HRP の組み合わせが最も強い発光活性を示した。また、天然フォラシンが示す発光と比較すると、再構成系による発光は測定値が一定であり DCL 誘導体の効果をより正確に評価できることが確認された。DCL 誘導体の正確な活性評価の結果から、フォラシン発光の構造活性相関を明らかにすることができた。また、発現させたアポフォラシンと市販の Pholasin との相対的な発光量を比較したところ、発光活性はいずれも同様の傾向を示した。このことから市販のフォラシンを用いて、DCL 誘導体と混合した時の発光機構を以下のように説明することが可能になった。市販のフォラシンに含まれる天然由来のクロモフォアはアポタンパク質と平衡状態であり、基質が一旦外れると別の基質が活性部位に入ることが可能となる。そのため、天然由来の DCL から過剰に存在する DCL 誘導体へと基質が交換し、クロモフォアを再形成して発光する発光機構を新たに提唱することができた。

本研究では、カイコーバキュロウイルス系を用いたアポフォラシンの発現と活性化に成功し、8-OAr-DCL が最も高輝度活性を示す非天然型基質であることを明らかにした。本研究は、遺伝子発現させたアポフォラシンと DCL で再構成した人工フォラシンを発光させることに世界で初めて成功し、化学修飾した DCL 誘導体の正確な発光活性の評価を可能にしたものであり、ROS 依存型の発光タンパク質について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の森口舞子は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。