

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 蟹江秀星

論文題目 ホタルルシフェリンの
生合成研究

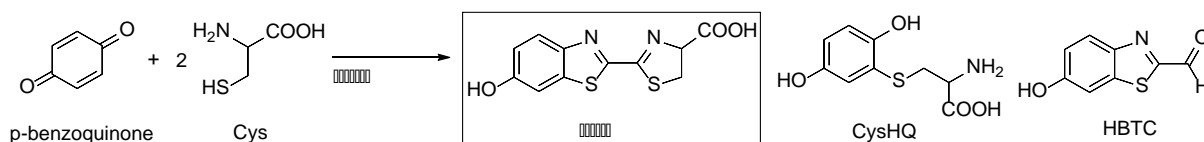
論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	小鹿	一
委員	名古屋大学教授	西川	俊夫
委員	名古屋大学教授	北	将樹
委員	中部大学准教授	大場	裕一

生物発光の中でもホタルの発光は、身近な生命現象として古くから興味の対象となっている。この発光は、低分子化合物ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼの反応によって起こり、その分子メカニズムは詳細に研究されている。近年、その発光の量子収率の高さから、ホタルルシフェリンは生命科学分野で生命現象を可視化するツールとして広く用いられている。具体的な応用例として、特定の遺伝子発現の追跡、次世代シーケンス解析、食品衛生検査などが挙げられる。このようにホタルルシフェリンの発光機構の研究や応用展開には目覚ましい進歩が見られる一方で、ルシフェリンがどのようにホタル体内で生合成されるのか、すなわち原料物質、生合成経路および生合成酵素・遺伝子などが未解明課題として残されていた。申請者らはこれまでに、ヘイケボタル生体に対する安定同位体標識化合物の取り込み実験を確立することで、ホタルルシフェリンが **p-benzoquinone** と 2 分子の **L-cysteine** から生合成されることを示し、原料物質の特定に成功している。本博士論文研究ではこの結果をふまえ、生合成経路の詳細の解明を目標とした。

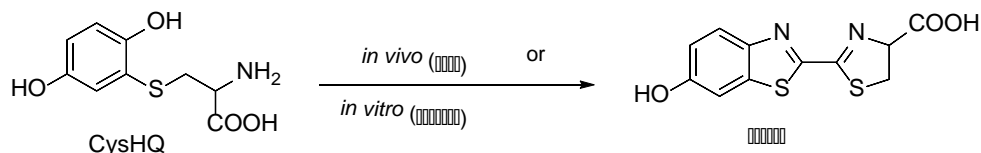
1. ホタルルシフェリン生合成類似反応の発見

申請者は生合成前駆体である **p-benzoquinone** と **Cys** を中性バッファー中、 30°C でインキュベートするだけで、低収率 (**0.3%**) ながらホタルルシフェリンが非酵素的に生成する (ワンポット合成) ことを初めて見出した。このホタルルシフェリンの生成には反応溶媒として中性バッファーを使うこと、酸素の存在下で反応を行うことが必要であり、原料のモル比もホタルルシフェリンの生成に影響することを明らかにした。次いで、ワンポット合成におけるホタルルシフェリンの生成メカニズムの解析を行い、ベンゾチアゾール環が 1 分子の **Cys** の脱炭酸と炭素-硫黄結合の転位を経て形成されること、ホタルルシフェリン以外にその反応中間体と思われる **2-(cystein-S-yl)hydroquinone (CysHQ)** (**26%**) と **6-hydroxybenzothiazole-2-carbaldehyde (HBTC)** (**0.02%**) が生成することを明らかにした。



2. ホタル生体をもちいたルシフェリン生合成中間体の検証

上記のワンポット合成がホタルルシフェリンの生合成に類似の経路で進むのかを検証するため、同時に生成する CysHQ と HBTC が生合成中間体かどうかを、ホタル生体をもちいた取り込み実験により調べた。まず、これらの化合物の重水素標識体を化学合成した。次いで、ヘイケボタルに投与し、1日経過後に抽出し、LC/MS により重水素のルシフェリンへの取込みを調べた。その結果、CysHQ からホタルルシフェリンが *in vivo* で合成され、HBTC からは生合成されないことが判明した。また、その生成量に関しては初期及び中期の蛹で最大値を示し、成虫ではほとんど生合成していなかった。最後に、ホタル蛹抽出物に CysHQ を加えることでもホタルルシフェリンが合成できることを示した。その生成量は前記のワンポット合成に比べ有意に高いことから、蛹抽出物にはルシフェリン生合成酵素が含まれており、CysHQ を基質としうることを初めて示した。このことは CysHQ がホタルルシフェリンの生合成中間体の1つであることを示唆している。



今回の研究ではホタルルシフェリン生合成の全経路の解明、生合成酵素やそれをコードする遺伝子の同定には至っていないが、生合成中間体として可能性の高い物質を特定したこと、ホタル蛹の生合成酵素活性を抽出・検出できたことで、これらの課題解決にとって貴重な知識基盤を提供できた。本博士論文は、当該分野において新規性、独自性等の高度の学術的価値を有するとともに、今後の当該分野の発展に大きく貢献するものであり、博士（農学）に相応しい内容であると判断した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 第	号	氏名	蟹江秀星
試験担当者	主査 小鹿 一、西川俊夫、北 将樹、大場裕一			
<p>(試験の結果の要旨)</p> <p>平成30年2月7日の学位審査委員会において、主論文の内容を中心としてこれに関連する科目の学識および研究能力について試問し審査した結果、合格と判定した。</p>				