

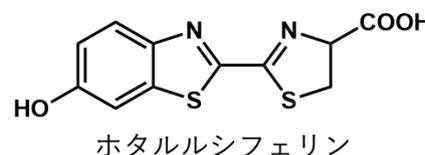
## 論文題目

ホタルルシフェリンの生合成研究

## 博士論文要約

### 1. 序論

ホタルルシフェリンはホタルをはじめとする発光性甲虫の発光の鍵となる天然有機化合物である。ホタルルシフェリンは ATP, Mg<sup>2+</sup>, O<sub>2</sub> 存在下でルシフェラーゼと呼ばれる酵素によりオキシルシフェリンへと酸化され、その際に光が生み出される。近年、その発光システムは次世代シーケンシングや遺伝子発現の追跡など様々な用途に使われているため、そのシステムの鍵物質と呼べるホタルルシフェリンは我々にとって利用価値のある化合物であるといえる。ホタルルシフェリンの化学構造はベンゾチアゾール環とチアゾリン環の二つの複素環を有する構造であり、そのような化学構造を有する天然有機化合物は珍しい。そのため、名古屋大学の後藤俊夫らをはじめとした研究者が生合成研究に取り組むなど、その生合成には興味を持たれてきた。これまでに生きたヘイケボタル (*Luciola lateralis*) に対する安定同位体標識化合物の取り込み実験から、ホタルルシフェリンは一分子のヒドロキノンもしくは *p*-ベンゾキノンと二分子の L-システインから生合成されることが明らかになっている。しかしながら、単離構造決定から半世紀以上を経てなお、生合成の詳細は不明である。そこで、本研究ではホタルルシフェリンの生合成の全容解明を目的とし、有機化学的な視点から研究を行った。

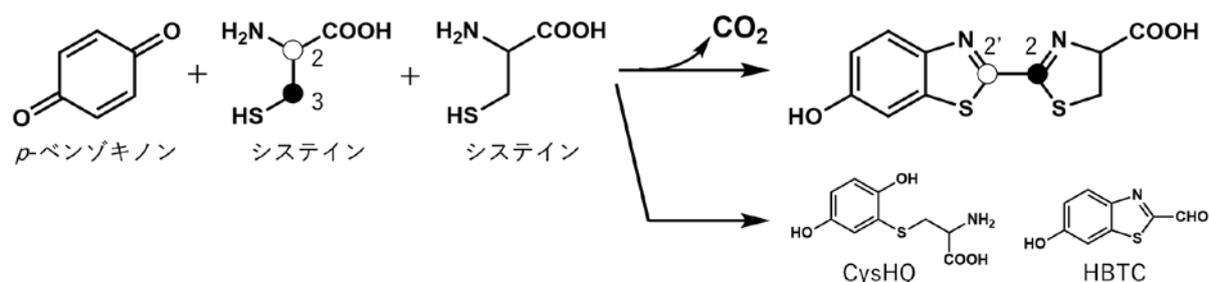


### 2. 本論

#### 2.1 ホタルルシフェリンのワンポット生成現象のメカニズムの解析

筆者は *p*-ベンゾキノンとシステインに着目した生合成研究を進める過程で、*p*-ベンゾキノンとシステインを大気下、中性バッファー中で混ぜるだけで非酵素的にホタルルシフェリンが生成すること（ホタルルシフェリンのワンポット生成現象）を見出した。生合成も突き詰めて考えれば一種の有機化学反応であるといえ、トロピノンに関する研究など、水溶液中での有機化学反応の研究が生合成の理解につながった例も報告されている。筆者はホタルルシフェリンのワンポット生成現象からホタルルシフェリンの生合成解明のための新たな手がかりが得られるのではと考え、そのメカニズムの解明を試みた。反応条件に関して、*p*-ベンゾキノンとシステインを様々な溶媒中で反応させる、窒素雰囲気下で反応させる、原料のモル比を変えて反応させる等、各種

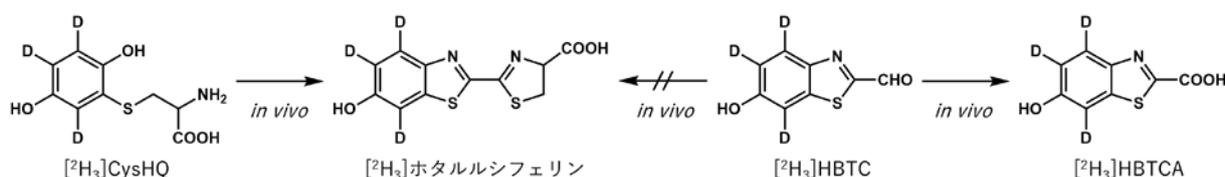
条件でのホタルルシフェリンの収率を調べた結果、ホタルルシフェリンの生成には、システインに対して1当量を超えないように *p*-ベンゾキノンを使用すること、反応溶媒として中性バッファーを用いること、酸素の存在下で反応を行うことが必要であることが明らかになった。ホタルルシフェリンのベンゾチアゾール環の形成メカニズムに関して、*p*-ベンゾキノンと L-[1-<sup>13</sup>C]システインもしくは L-[3-<sup>13</sup>C]システインのワンポット反応から得られたホタルルシフェリンを HMBC 解析に供することで、得られたホタルルシフェリンのどの炭素が <sup>13</sup>C 標識されているのかを調べた。その結果、ホタルルシフェリンの生成過程でベンゾチアゾール環を構成するシステインの脱炭酸が起きていること、また、そのシステインの 2 位と 3 位の炭素がホタルルシフェリンの 2' 位と 2 位の炭素となるように炭素-硫黄結合の転位が起きていることが明らかになった。そのベンチアゾール環形成の際に脱炭酸するという知見は、ホタルルシフェリンの生合成過程で起きるシステインの脱炭酸の知見と一致していた。*p*-ベンゾキノンとシステインのワンポット反応で生成するホタルルシフェリンの立体配置に関して、生成したホタルルシフェリンをキラル HPLC 分析に供した結果、反応に L-システインを用いた場合には L 体のホタルルシフェリンが生成し、D-システインを用いた場合には D 体のホタルルシフェリンが生成することが明らかになった。また、*p*-ベンゾキノンとシステインのワンポット反応で得られたホタルルシフェリン以外の生成物を HPLC, NMR, MS 解析に供した結果、そのワンポット反応においてホタルルシフェリンへとつながる中間体の可能性がある 2-*S*-cysteinylhydroquinone (CysHQ) と 6-hydroxybenzothiazole-2-carbaldehyde (HBTC) が生成していることも明らかになった。



## 2.2 ホタルルシフェリンの生合成中間体の特定

筆者が見出したホタルルシフェリンのワンポット生成現象と生合成との間には原料という点だけでなく、ホタルルシフェリン生成過程でのシステインからの脱炭酸という点でも類似性が見出された。そのため、筆者は前述の CysHQ と HBTC が生合成中間体なのではないかと考えた。そこで、CysHQ と HBTC が生合成中間体か否かを確かめるため、[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]CysHQ と [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]HBTC を化学合成し、ホタル生体への取り込み実験を行うこととした。取り込み実験では、[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]CysHQ と [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]HBTC をさなぎから成虫にかけての異なる成長段階のヘイケボタル (*L. lateralis*) 生体へ注射し、その後、各個体から抽出したホタルルシフェリンを MS 解析に供することで [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]ホタルルシフェリンが生成しているか否かを調べた。その結果、[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]CysHQ を注射した個体で [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]

ホタルルシフェリンが生成することが明らかとなった。さらに、各成長段階での $[^2\text{H}_3]$ ホタルルシフェリンの生成量を比較すると、 $[^2\text{H}_3]$ ホタルルシフェリンの生成量は成虫よりもさなぎで多かった。この結果は、ホタルルシフェリンが成虫よりもさなぎで活発に生合成されることを示唆する。また、CysHQ とホタル抽出物を混合することで *in vitro* でも CysHQ からホタルルシフェリンが生成することを確認した。ただし、 $[^2\text{H}_3]$ HBTC を注射した個体では、6-hydroxy $[^2\text{H}_3]$ benzothiazole-2-carboxylic acid ( $[^2\text{H}_3]$ HBTCA) の生成が確認できた一方、 $[^2\text{H}_3]$ ホタルルシフェリンの生成は確認できなかった。この結果は、HBTC が生合成中間体ではないことを示唆する。



### 3. 総括

本研究では、有機化学的な視点からホタルルシフェリンの生合成研究を行うことで、天然に存在する *p*-ベンゾキノンとシステインを中性バッファー中で混ぜるだけでホタルルシフェリンが生成するという俄には信じられない現象を見出し、そのメカニズムの一端を解明した。さらに、その現象のメカニズムの解析の過程で見出した化合物である CysHQ がホタルルシフェリンの生合成中間体であることを明らかにし、ホタル抽出物を用いた *in vitro* 実験でも CysHQ からホタルルシフェリンが生成することを確認した。これら成果はホタルルシフェリンの生合成の全容解明、そして、簡便で環境負荷の少ない化学的あるいは生物工学的なホタルルシフェリンの合成法につながるものと期待される。