HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on the Biosynthesis of the Luminous Substrate in the Firefly Squid Watasenia scintillans
Author(s)	FARJANA, Nowshin
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16593号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16593
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98203
Type	doctoral thesis
File Information	FARJANA_Nowshin_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（農学）　氏　名 FARJANA Nowshin

審査担当者	主査	客員准教授	菊池　義智
	副査	教　授	森　春英
	副査	客員教授	鎌形　洋一
	副査	客員准教授	北川　航

学位論文題名

Study on the Biosynthesis of the Luminous Substrate in the Firefly Squid *Watasenia scintillans*

（ホタルイカ *Watasenia scintillans* における発光基質の生合成に関する研究）

本論文は英文 65 頁、図 19、表 2、4 章からなり、参考論文 1 編が付されている。

生物発光は、微生物から無脊椎動物、脊椎動物に至るまで、陸上・海洋の多様な生物に見られる生命現象であり、その機構は分子生物学、医学、農学など様々な分野で広く応用されている。しかし、発光の分子機構は生物分類群ごとに多種多様であり、その基質や酵素については未解明の点も多い。ホタルイカ（*Watasenia scintillans*）は、腕、眼、皮膚にある発光器から青色の光を発し、その発光にはセレンテラジンジサルフェート（CTZ 2,6-SO_3H）という特異なルシフェリンが用いられている。この物質は、セレンテラジン（CTZ）の 2 つのフェノール性水酸基が硫酸エステル化されたものであり、酸化により光と副生成物としてセレンテラミドジサルフェート（CTMD 2,6-SO_3H）および CO_2を生成する。

CTZ はホタルイカの餌である海洋プランクトンから検出されるが、CTZ 2,6-SO_3H は既知の食物中からは見つかっておらず、ホタルイカの体内で変換されるものと予測されている。しかし、CTZ から CTZ 2,6-SO_3H を合成する硫酸転移酵素（SULT）はこれまで同定されておらず、その存在や役割は明らかになっていない。また、CTZ を外部からの摂取のみに依存していては、持続的な発光に必要な基質量を確保するのは困難と考えられており、ホタルイカは発光後に生成される CTMD 2,6-SO_3H を CTZ 2,6-SO_3H に再変換するリサイクル経路を持つ可能性が報告されてきた。そこで本論文では、（1）CTZ のフェノール性水酸基を硫酸エステル化する SULT の同定、（2）CTMD 2,6-SO_3H から CTZ 2,6-SO_3H をリサイクルする生合成経路の解明、という二点を目的としている。

1)　ホタルイカ由来の新規セレンテラジン（CTZ）硫酸転移酵素の同定

まずホタルイカが CTZ から CTZ 2,6-SO_3H を生成するための SULT 遺伝子を有しているかを調べるために、発光器の遺伝子発現解析を行ったところ、高発現する SULT と推定される遺伝子を発見した。この遺伝子について大腸菌を用いて異種発現し、得られた組換えタンパク質を精製し、CTZ と硫酸供与体である 3′-ホスホ

アデノシン 5′-ホスホスルフェート（PAPS）を用いて、*in vitro* で硫酸エステル化活性を評価した。UPLC-PDA-MS による反応産物の解析の結果、PAPS 依存的に 2 位のフェノール性水酸基が硫酸エステル化されたセレンテラジンモノサルフェート（CTZ 2-SO_3H）が生成され、当該酵素が SULT として機能することを確認した。しかしながら、CTZ 2,6-SO_3H は試験条件下では検出されず、この化合物の生成には別の酵素が関与する可能性が示唆された。加えて、この SULT のさらなる特性評価のために、6 位のみにフェノール性水酸基をもつ CTZ 類縁体であるセレンテラジン h（*h*-CTZ）に対する硫酸エステル化活性を調べた。その結果、ホタルイカ由来 SULT は *h*-CTZ の 6 位のフェノール性水酸基を硫酸エステル化せず、CTZ の部位特異的な硫酸エステル化活性を有することを明らかにした。

2)　ホタルイカ肝臓における CTZ 2,6-SO_3H 再生合成の中間体候補の同定

ホタルイカの肝臓には、発光器よりも多量の CTZ が存在することが報告されており、発光基質の合成・再利用における肝臓の関与が示唆されていた。本研究では、発光反応生成物である CTMD 2,6-SO_3H が CTZ 2,6-SO_3H へと再生されるリサイクル経路の存在を検討するため、非発光器官である肝臓に注目し調査が行われた。その結果、CTMD 2,6-SO_3H 由来と考えられる中間体、セレンテラミン（CTM）およびセレンテラミンモノサルフェート（CTM-SO_3H）が肝臓中に存在することが初めて明らかとなり、肝臓が CTZ 2,6-SO_3H の再生合成に関与している可能性が示された。この知見は、発光基質のリサイクル型生合成経路の存在を強く示唆し、ホタルイカの肝臓が発光に必要な物質代謝の中心的な役割を担っていることを示すものといえる。

以上、本研究では、ホタルイカにおいて CTZ を CTZ 2-SO_3H に変換する硫酸転移酵素（SULT）を初めて同定することに成功し、また CTZ の再利用における肝臓の役割についてその一端を解明することに成功した。これらの知見は、ホタルイカの青い発光がどのような代謝系によって裏打ちされているのか、その分子基盤を解明する点で学術的価値の高いものだが、同時にホタルイカが持つルシフェリン／ルシフェラーゼ系に基づく新たな発光ツールの開発にも貢献しうる重要な成果であり、新たなバイオセンサーの開発や医療用イメージング技術の開発など、広範な応用展開も期待される。

よって審査員一同は、Nowshin Farjana が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。