

発光生物研究 40 年

下 村 脩 (昭26)

薬専を卒業後、良い就職先も無いまま長大薬学部、安永峻吾先生のもとで分析実習の手伝いをしていた。1955年に内地留学をさせて頂く事になり、安永先生が名古屋大学理学部に連れて行って下さったが、当てにしていた江上不二夫教授(生化)があいにく出張中でお会い出来なかった。ところがたまたまお会いした平田義正教授(有機)が、安永先生の話が聞かれた途端、「私が引き受けました」とおっしゃり、私は平田研に研究生として入門する事になってしまった。江上教授の不在が私の運命を決めた事になる。

平田先生から頂いたテーマは、海ポタルルシフェリンの精製であった。この物質は非常に酸化され易く、アメリカではその20年も前から何人かの人が純粋なルシフェリンを得ようと努力していたが成功していなかった。言うまでもなく純品無しでは構造決定は出来ない。私は一生懸命頑張り、1年程でかなり高純度のルシフェリンを得る方法を確立したが結晶化が出来なかった。その当時は純度を証明し、且つ純度を上げるには結晶化が一番良い方法であったのである。

原料の乾燥ウミポタルの脱脂、抽出、精製をすべて水素ガス中で行い(現在では考えられないような危険な工程)、精製物の結晶化を色々と試みた。ルシフェリンの酸化分解をどうしても完全に

防ぐ事が出来なかったので、実験は昼夜兼行で1週間以内に済ませなければならなかった。失敗また失敗と、20回くらい繰り返した後、結晶化は偶然の事から解決した。

ある寒い夜であったが、もう新しい方法も思いつかず万策尽きた状態であった。少し残っているルシフェリンは翌日アミノ酸分析にまわすつもりで濃塩酸を加え、その暗赤色の溶液をそのまま空气中に放置して帰宅した。ところが翌朝来てみるとどうした事かその溶液が見当たらない。よく見ると溶液はあるのだが淡いピンク色で透明になり黒いものが少しばかり沈澱していた。その沈澱を顕微鏡で見て赤い針状結晶である事を確認した時の驚きと感激は今でも忘れる事が出来ない。ルシフェリンはペプチッド様塩基性物質であり、濃塩酸で結晶化するなど夢にも思わなかった。解決法は思いがけない所であったのである。

1959年プリンストン大学のジョンソン教授から招聘を受けた。小林五郎学部長はじめ薬学部の諸先生のご厚意で長大から暇を頂き、1960年夏、渡米した。フルブライト・スカラーとして横浜から「氷川丸」の最後の航海に乗せてもらったが、13日間の北洋航海の後、シアトルに着き、朝もやの中から忽然と現われたスミスタワーを中心とするスカイラインを見た時にはしみじみと異国に来た事

を感じた。そのあと、東海岸まで大陸横断3昼夜の汽車の旅では、アメリカの広さを身をもって感じた。近頃では容易に望めないようなぜい沢な旅をさせてもらったと思う。

プリンストンの生活にも慣れた翌1961年夏、ジョンソン博士のワゴン車に実験器具と共に乗り込み、西海岸まで5,000キロをドライブ、フライデーハーバー（シアトル北方の小島）の臨海実験所でオワンクラゲの発光物質の抽出に取り組んだ。当時、すべての発光生物はどれもルシフェリン（基質）とルシフェラーゼ（酵素）の反応で発光すると考えられていたが、オワンクラゲの場合は、ルシフェリンとルシフェラーゼの2成分を想定した実験ではどう工夫してもうまくいかない。それで、ルシフェリンとルシフェラーゼを抽出するのはあきらめて発光する物質自体を（それがどんな物質であっても）抽出する事をジョンソン博士に提案したが、ルシフェリンとルシフェラーゼが必ず存在する筈だと言って私の考えを理解してくれなかった。仕方なく彼とは別のテーブルで自分勝手な実験をする事になり、大変気まずい雰囲気になってしまった。私の実験方針は間違いないとの自信はあったが、さて実際に実験をする段になると、たった2〜3日で行き詰まってしまった。クラゲを絞ると、一分間位光る液が得られるが、発光物質を抽出するためには、発光を可逆的に止める方法が必要である。しかし、その可逆的に発光を止める方法が見つからないのである。毎日景色の良い海岸にすわったり、ボートに乗ったりして考える日が続いた。

一週間ぐらい経った時、はっと一つの考えが浮かんだ。“生物の発光にはたとえルシフェラーゼが関係していなくても、他の蛋白質が関係しているであろう。そうであればその蛋白質の活性は溶媒の酸性度によって変わり得る”。クラゲを絞った発光液を少しずつ酸性にしたところpH 4で発光が止まり、中性に戻すと再び光り出した。つまりpH 4で発光を可逆的に阻害して発光物質を抽出する方法がわかったのである。あとは簡単でその日のうちに発光にはカルシウムイオンが必要な事がわかり、従って発光の阻害にはEDTAの方が酸性より優れている事がわかった。数カ月後には純粋な発光蛋白質を単離する事に成功し、オワンクラ

ゲ（Aequorea）の名にちなんでイクオリン（Aequorin）と命名した。

イクオリンは大量のエネルギーを内蔵した奇妙な蛋白質で、カルシウムイオンと結合すると、そのエネルギーを青い光として放出する。充電したバッテリーを針金で短絡するのに似ており、発見当時は信用しない人がいたのも無理ない事と思う。しかし現在ではイクオリンの名は生物学者の間に広く知られ、慣用語としてオックスフォード英語辞典に載っている。

1963年に帰国、名古屋大学理学部水研の助教授として生物発光の研究を続けながら、水圏の研究をする事になった。水圏研究の重要性は増大する一方であり、将来を保障された言わば快適な地位であった。しかし「二兎を追う者は一兎をも得ず」という諺もあり、色々と熟考の上、2年後には名大を辞職して再びプリンストンで発光生物の研究をする事にした。研究に専念するためには競争の激しいアメリカ政府のグラント（研究資金）を獲得して、研究費用のみならず、サラリーや大学の諸費用などのすべてを賄わなければならない。つまり私は自由と引き替えに厳しい道を選んだのである。

1966年にルシフェリン—ルシフェラーゼ発光系に対抗するフォトプロテイン（photoprotein）発光系の概念を提出した。フォトプロテインはルシフェラーゼ無しで発光する蛋白質発光物質と考えてよく、イクオリンがその代表例で、他にも10数種のフォトプロテインが種々の発光生物中に存在する（ツバサゴカイ、ウロコムシなど）。フォトプロテインという語もオックスフォード英語辞典に載るようになった。

カルシウムイオンが生体内で色々重要な役割りを果たしている事は良く知られている。1970年頃から細胞内カルシウムの研究にイクオリンが使われ始め、イクオリンによる生物学的に重要な発見が次々と発表され、それは現在も続いている。イクオリンの発光機構の解明は当初は夢と思われていたが、1970年代に発光団の化学構造を解明し、その後1985年にはイクオリンの蛋白質部分のクロンが遺伝子操作で日本と米国ジョージア州で同時に達成されたため、今では人工イクオリンを細胞生物学者に提供出来るようになった。また、イク

オリンの発光基の研究過程で発見されたセレンテラジン (Coelenterazine) は、おびただしい種類の海棲発光生物のルシフェリンである事がわかった (クラゲ, ウミエラ, イカ, エビ, 深海魚など)。有名なホタルイカの発光もセレンテラジンに関係しているが詳細はまだ解明されていない。

1970年に、ある著名な研究者がホタルルシフェリンの発光は、直線状過酸化物の分解によって起こると発表、その翌年には私が海ボタルルシフェリンの発光は四員環過酸化物 (dioxetane) の分解によって起こるとの結論を発表した。ホタルルシフェリンと海ボタルルシフェリンの化学構造の違いで過酸化物が異なるとは考え難く、この問題はその後6年間にわたる激しい論争となった。その間、直線状過酸化物説を支持する付和雷同的研究が次々と発表されて私は辛い立ち場に立たされた。しかし、1977年に至り、ホタルルシフェリンの発光も四員環過酸化物の分解によって起こる事を私の研究室で証明して、やっとこの論争に終止符を打つ事が出来た。直線状過酸化物説は実験結果の誤解釈により生じたのである。

ニュージーランドの巻貝ラチア (Latia) は世界唯一の淡水発光貝で溪流に棲み黄色に光る粘液を分泌する。そのルシフェリンはセスキテルペンの enol-formate で水中で速やかに加水分解して活性を失う。この貝がどういう目的で光るのか、何故この様に水に不安定な物質を水中での発光に利用しているのかなど謎は尽きない。オキアミのルシフェリン (tetrapyrrole) は酸にも酸素にも極度に不安定なためその精製法の開発には大変苦労し2年以上もかかった。しかし、その甲斐あってハーバード大学の岸教授との共同研究で1988年に構造を決定した。続いて、類似構造を持つ鞭毛虫類 (夜光虫を含む) のルシフェリンの構造も判明した。

私は1982年以来、マサチューセッツ州ウッズホールのMBL (Marine Biological Laboratory) で研究を続けており、この数年は自宅の裏山に発生する発光キノコの研究に取り組んでいる。ウッズホールには研究所が幾つもあり、処女航海で氷山に当たって沈没した豪華客船タイタニック号を深海潜水艇で探し出したのはWHOI (Woods Hole Oceanographic Institution) である。MBLは生物学者のメッカと呼ばれる程由緒ある研究所で1975年には昭和天皇のご訪問を受けた。普段は150名位の研究者がいるが、夏には世界各地から生物学者が押しかけて、1,000名位の大研究所に変貌する。

この40年間に生物発光の化学は格段の進歩を遂げた。現在構造がわかっているルシフェリンは8種類で (ホタル, 海ボタル, 発光バクテリア, ミミズ, ラチア, オキアミ, 鞭毛虫類, セレンテラジン), その中の6種類は他では見られない様な特異な構造を持つ化合物である。まだ研究されていない発光生物が無数にある事を考えると、発光生物は珍奇な新化合物の宝庫であると言える。フォトプロテイン類で発光反応が今までに解明出来たのは、イクオリンと、これに類似のフォトプロテインだけである。生物発光の応用面での研究は最近特に目覚ましい。ホタル発光系によるATPの定量、イクオリンによる細胞内カルシウムの測定、発光バクテリアによる有毒物質の検出を始めとして、種々の物質に対する検出反応の感度を上げるために各種生物発光系、例えば発光バクテリアや海ボタルをラベルとして利用するなど、多数の研究が毎年発表されているが、基礎面での研究論文は数える程しかない。言うまでもなく基礎知識の進歩が無くては応用面での画期的発展は望めない。

発光生物の発光機構解明のような基礎面での研究者がもっと現われるのを切望してやまない。