

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20611005

研究課題名(和文)

甲虫ルシフェラーゼの人工進化によるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の理解と制御

研究課題名(英文)

Understanding of luciferin-luciferase system by the artificial evolution of luciferase

研究代表者：

大場 裕一 (OBA Yuichi)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40332704

研究成果の概要(和文)：

コメツキムシ科の *Agrypnus binodulus* から単離したルシフェラーゼ・ホモログに site-directed mutagenesis を施し、わずか1アミノ酸で発光活性を誘導する人工進化に成功した。この結果にもとづき、さらに発光活性の強いミュータントの作成を試み、約40倍の発光強度をもつ変異体を得たので、現在そのルシフェリン結合部位の構造をモデリング計算により解析している。また、ゲンジボタル (*Luciola cruciata*) から第2のルシフェラーゼを発見し、これを LcLuc2 と名付けた。これによりホタル科が2種類のルシフェラーゼをもっていることが始めて明らかになった。また、この遺伝子は卵に特異的に発現していること(幼虫と成虫には発現していない)、成虫のルシフェラーゼ(黄色)とは異なる発光色(緑色)を持つことがわかった (Oba et al., 2010)。このことは、ルシフェラーゼ遺伝子の多様性と反応システムの共通原理を理解する上で重要な発見であると思われる。実際、LcLuc2 はこれまでに知られているホタル科のルシフェラーゼと比べて59%のアミノ酸ホモロジーしかないにもかかわらず、基質結合部位と考えられているアミノ酸サイト(7カ所)が極めて高く保存されていた。このことは、ルシフェラーゼの高い発光効率には基質結合部位が厳密に規定されている必要があることを裏付ける。また、LcLuc2 は既知のホタルルシフェラーゼと異なり、発光色が pH に依存しない特殊な性質を持っていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：

Site-directed mutagenesis of AbLL, a fatty acyl-CoA synthetase in non-luminous click beetle *Agrypnus binodulus*, showed that only one - three amino acid substitutions are sufficient to generate the luciferase activity. The activity was weak but the further amino acid changes gave stronger activity, more than 40 times. We also isolated an isotype luciferase, LcLuc2, from the Japanese firefly *Luciola cruciata* (Oba et al., 2010), suggesting that fireflies possess at least two luciferase genes and that luciferin-binding sites (7 amino acids) in luciferases are highly conserved. Interestingly, the luminescent color by LcLuc2 is pH insensitive, unlike other firefly luciferases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：発光生物学、進化生物学、生化学

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：人工進化、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、ホタル

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫のルシフェラーゼは、もともと脂肪酸 CoA 合成酵素であることが本研究代表者のこれまでの研究によって明らかになっていた。しかし、いかにして脂肪酸 CoA 合成酵素がルシフェラーゼへと進化したのかについては不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ルシフェラーゼがいかにして脂肪酸 CoA 合成酵素から進化したのかを明らかにするために、非発光性昆虫からルシフェラーゼ・ホモログ遺伝子を探索する。その結果、この遺伝子は脂肪酸 CoA 合成酵素であることが分かったので、次のステップとして脂肪酸 CoA 合成酵素に **Site-directed mutagenesis** を施すことにより人工進化を試み、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の機構を進化的な視点から解明することを目的とした。また、進化的な視点から、全く新しいタイプのルシフェラーゼのクローニングを試みる。これらの研究結果を総合し、ルシフェラーゼという発光を触媒する特殊な酵素がどのようにして進化し得たのかを考察するとともに、将来的には新しい触媒活性を持つ人工酵素を設計する際のヒントを得ることが大きな目的である。

## 3. 研究の方法

材料には非発光性甲虫サビキコリ (*Agrypnus binodulus*) からクローニングした脂肪酸 CoA 合成酵素 (AbLL) 遺伝子を用いる。サビキコリはコメツキムシ科サビキコリ亜科 (*Agrypninae*) に属し日本全土にごく普通に見られる種である。同じサビキコリ亜科には、中南米にヒカリコメツキがある。クローニングしたこの遺伝子タンパク質は脂肪酸 CoA 合成酵素活性を有しているが有意な発光活性は観測されない。これに対して、すでにゲンジボタルルシフェラーゼで明らかになっている X 線結晶構造解析のデータ (とくに、基質結合部位とその周辺のアミノ酸の位置) を参照しながらポイントミューテーションを加える。大腸菌でタンパク質を発現しニッケルキレートカラムにて精製後にルシフェリンに対する発光活性と脂肪酸 CoA 合成酵素活性を測定する。新規ルシフェラーゼのクローニングについては、ゲンジボタルなどすでにルシフェラーゼが知られている生物を用いてそのアイソタイプがないかどうかを degenerate PCR により探索する。さらに、タンパク質の特性 (酵素触媒活性やその pH 依存性など) を生化学的手法により調べるとともに、遺伝子発現様式を PCR などで解析する。

## 4. 研究成果

まず、非発光性甲虫サビキコリ (コメツキ

ムシ科) からルシフェラーゼホモログ AbLL (*Agrypnus binodulus* luciferase-like gene の略) をクローニングした。この遺伝子産物を解析した結果、これが発光活性を殆ど有さない脂肪酸 CoA 合成酵素であることが分かった。次にこの AbLL に対して、1カ所のアミノ酸変異を加えると発光活性が有意に出現するミュータント (Mt14) を1つ発見した。これは、345番目のロイシンをセリンに変換したミュータントであり、ゲンジボタルルシフェラーゼのエックス線結晶解析からルシフェリンのベンゾチアゾール基に水1分子を介してインタラクションするアミノ酸残基であった。このことから、ここで発見した Mt14 はルシフェラーゼが進化する上で鍵となるアミノ酸変異であると考えた。次に、この Mt14 の 345番アミノ酸に隣接するアミノ酸2つ (343, 344番目) にミューテーションを加えたところ (Mt11)、さらに劇的な発光活性の上昇が認められた (約15倍)。これは、セリン345の側鎖を343番目と344番目のアミノ酸との水素結合ネットワークにより正しい方向に向けることが可能になったためであると説明された (Oba et al., 2010. FEBS Letters)。さらに、発光活性の上昇を目指してポイントミューテーションを検討した結果、最終的に AbLL に対し5カ所のアミノ酸を変更するだけでゲンジボタルルシフェラーゼの1%近い発光活性を達成することに成功した (Mt11 の約40倍の活性)。この新しいミュータントは、オレンジ色に発光する。現在は、このミュータントのルシフェリン結合様式をホモロジーモデリングにより詳細に検討中である。

ルシフェラーゼのアイソタイプのクローニングにも成功した。材料に使ったのはゲンジボタル。これまでに知られていたルシフェラーゼとは全く異なるルシフェラーゼ遺伝子を見つけることができた。この遺伝子は、もともと知られていたルシフェラーゼと区別するために LcLuc2 と命名した。ホタル科のルシフェラーゼは、これまでの生化学的な知見や断片的な分子生物学的知見からアイソタイプの存在が推定されていたが、ながらくその実体が捕らえられることはなかったが、今回それが初めてきちんと証明できたことになる。LcLuc2 を含むこれまでに知られている甲虫目ルシフェラーゼの分子系統樹 (アミノ酸/ベイズ法/Posterior probability 0.9 以上のみを示す) を図1に示す。この系統樹から、ホタル科におけるルシフェラーゼ遺伝子は、すでにホタル科が多様化する以前から2つのアイソタイプを保有していたことが分かる。したがって、ゲンジボタル以外のホタルからもこの LcLuc2 タイプのルシフェラーゼ・アイソタイプが今後発見される可能性が高い (偽遺伝子化が生じていなければ

ば)。これらの情報が集まれば、よりルシフェラーゼの進化に関する詳細な知見が得られるものと考えられるため、現在、他のホタルからそのクローニングとタンパク質特性の研究を進めている。

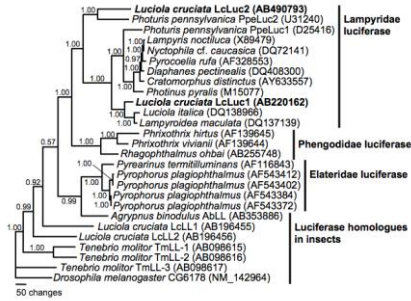


図1: LcLuc2とそのほかのルシフェラーゼの系統樹

もともと知られていたゲンジボタルルシフェラーゼ LcLuc1 が卵から成虫を通じて発現していたのに対し、新たに見つかった LcLuc2 は卵のみで発現していた。さらに、その発光色は LcLuc1 が黄色 ( $\lambda_{max} = 554 \text{ nm}$ , at pH 7.8) であるのに対して LcLuc2 は緑色 ( $\lambda_{max} = 543 \text{ nm}$ , at pH 7.8) であった。このことから、LcLuc2 は卵が緑色に発光することに関与する遺伝子であることが分かった。さらに、この LcLuc2 の発光反応の色は pH に依存しないことが分かった。ホタルのルシフェラーゼはこれまでに 20 種以上からクローニングされているが、どれも pH に依存して発光色が変化する「pH sensitive」な酵素であったことと比較して、この LcLuc2 はルシフェラーゼの特性を理解する上でも応用的利用法を考える上でも重要な発見であると思われる (図2)。

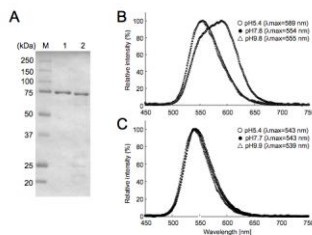


図2: (A)精製したタンパク質のSDS-PAGE、(B,C) LcLuc1 (A)とLcLuc2 (B)の発光スペクトル

LcLuc2 とこれまでに知られているルシフェラーゼのアミノ酸を比較したところ、全体でアミノ酸のホモロジーが 50%程度であるにもかかわらずルシフェリン結合に関与するアミノ酸 (7つ) が高度に保存されていることが分かった。このことは、ルシフェラーゼへのルシフェリン結合様式は厳密に規定されていることを示唆する。しかし、わずか数個

のアミノ酸変位によって脂肪酸 CoA 合成酵素をルシフェラーゼへと人工進化することに成功したことから、こうした進化プロセスは比較的容易に生じうると思われる。

以上の研究成果により、「新しい酵素触媒がいかにして進化しうるのか」という一般的で重要な問題に対しひとつの解答を与えることが出来たものと考えている。すなわち、新しい遺伝子が生じる際 (前段階) として遺伝子重複 (Gene duplication) が重要であるという考え方 (1970 年の大野乾を嚆矢とする考え方) がルシフェラーゼのような特殊な酵素にも当てはまるということ。また、ホタルルシフェラーゼが脂肪酸 CoA 合成酵素活性という「オリジナルな活性」を保持しているということから、新たな触媒活性の進化様式の一つとして「遺伝子共有」 (Gene sharing, Moon lighting, Gene recruitment) が使われていること。さらに、一見まったく異なるような触媒活性様式 (この場合、脂肪酸 CoA 合成酵素活性と発光活性) がわずかに数アミノ酸の変位によって達成しうるということがわかったことは重要である。このことは、おそらく基質 (この場合はルシフェリン) の化学的特質と関係があると考えられる。すなわち、ホタルルシフェリンは強塩基下で弱く化学発光 (酵素とは無関係に発光反応が生じること) することが知られていることから、もともと酸化されて発光しやすい化学構造であると考えられる。そのため、酵素の基質結合ドメインに取り込まれるとそこで基質が生じやすい有機化学反応が起こると考えられる。これまでは、酵素のドメイン構造や 3 次元構造の変化と活性が関連付けられることが多かったが、今回の我々の結果が示すことは、むしろケミカルバイオロジー的な視点で基質の有機化学的特性により注目すべきであるということである。このような観点をを用いて、今後まったく新しい機能性人工酵素を構築することが可能になるかも知れない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Oba Yuichi, Mori Nanae, Yoshida Mayumi, Inouye Satoshi (2010) Identification and characterization of a luciferase isotype in the Japanese firefly, *Luciola cruciata*, involving in the dim glow of firefly egg. *Biochemistry* 49, 10788-10795. (査読あり)

2) Oba Yuichi, Iida Koichiro, Inouye Satoshi (2009) Functional conversion of fatty acyl-CoA synthetase to firefly luciferase by site-directed mutagenesis: A key substitution responsible for luminescence

activity. FEBS Letters 583, 2004-2008. (査読あり)

3) Oba Yuichi, Shintani Takeru, Nakamura Takanori, Ojika Makoto, Inouye Satoshi (2008) Determination of the luciferin contents in luminous and non-luminous beetles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (5) 1384-1387. (査読あり)

4) Oba Yuichi, Iida Koichiro, Ojika Makoto, Inouye Satoshi (2008) Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle, *Agrypnus binodulus* (Elateridae), encodes a fatty acyl-CoA synthetase. *Gene* 407, 169-175. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1) 大場裕一、飯田幸一郎、井上敏 (2009) 脂肪酸 CoA 合成酵素からルシフェラーゼへの人工進化. 日本動物学会第 80 回大会 (グランシップ静岡). 2009.9.19.

2) 熊崎瑞保、大場裕一 (2009) ヒカリコメツキルシフェラーゼの酵素特性とその進化. 日本動物学会第 80 回大会 (グランシップ静岡). 2009.9.17.

3) Iida Koichiro, Oba Yuichi (2008) Orthologous gene of beetle luciferase in non-luminous click beetle. *Evolution* 2008 (University of Minnesota). 2008.6.23.

4) Oba Yuichi, Inouye Satoshi (2008) Evolutionary origin of beetle luciferase. *Evolution* 2008 (University of Minnesota). 2008.6.22.

[図書] (計 2 件)

1) 大場裕一 (2011) ホタル. 地球からのおくりもの. 風媒社. p. 71-77.

2) Oba Yuichi (2009) On the Origin of Beetle luminescence. In "Bioluminescence in Focus- A Collection of Illuminating Essays". Research Signpost, p. 277-290.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

中日新聞「ホタル卵の発光酵素発見-成虫とは別、確認/名古屋大院助教ら」2011年1月6日夕刊

ホタル~蛍狩りの文化から最先端バイオテクノロジーまで~. 第48回名市大サイエンスカフェ (生物多様性シリーズ). 名古屋ナディアパーク. 2010.9.17.

光る生き物のふしぎ. 安城市立今池小学校 (5年生). 2010.9.14.

生物発光のしくみ. SSH事業アドバンストサイエンスリテラシープロジェクト (ASP) 学びの杜. 名古屋大学附属高等学校. 2010.8.30.

生物発光の科学: ダーウィンから下村先生まで. 第94回名大サロン. 名古屋大学. 2010.6.7.

平成21年度名古屋大学農学部実験講習会「ウミホタルを使って生物の光るしくみを学ぶ」(講演+実験教室) 愛知県高等学校文化連盟自然科学専門部. 2009.11.7.

発光生物の謎を解く. 平成21年度山口県高等学校教育研究会生物教育研究大会 (講演+実験教室). 山口県立新南陽高等学校. 2009.10.16.

生物発光のしくみ. スーパーサイエンスハイスクール事業アドバンストサイエンスリテラシープロジェクト (ASP) 学びの杜. 名古屋大学附属高等学校. 2009.8.3.

発光生物の不思議. 日本科学未来館リアル・ラボ@八丈島「光る! 生き物」の実験室 (講演+実験教室). 2009.6.27.

光る生き物の不思議 (講演+実験教室). 都立八丈高校 (定時制). 2009.6.25.

ひかるいきものふしぎ. 八丈町立大賀郷小学校 (東京都). 2009.6.25.

光る生き物の不思議. 都立八丈高校(全日制).  
2009.6.25.

基調講演「ホタルの進化」. 第8回ヒメボタル  
サミット in 愛知. 2009.8.8.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大場裕一 (OBA Yuichi)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号: 40332704

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号: