

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26610081

研究課題名(和文) 遺伝子生物学に基づくホタル生物発光の設計制御と定量計測

研究課題名(英文) Quantitative measurements and controlled designs of firefly bioluminescence with genetic bio-technology

研究代表者

秋山 英文 (AKIYAMA, HIDEFUMI)

東京大学・物性研究所・准教授

研究者番号：40251491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質酵素ルシフェラーゼ内の発光分子オキシルシフェリン近傍のアミノ酸残基を置換し、オキシルシフェリン近傍の電荷・極性・親/疎水性を変えた複数の試料について、生物発光の効率及びスペクトルの温度依存性・溶媒依存性などを定量的に測定した。実験系を青色領域にまで拡張し、遺伝子工学的手法を用いて生合成されたオワンクラゲの発光系であるイクオリンについて、量子収率を測定した。理論的に、時間依存密度汎関数計算、第一原理計算、タンパク質酵素の分子動力学計算など複数の理論的アプローチを進めた。

研究成果の概要(英文)：We studied quantum yields, spectra, and their dependences on temperatures and solvents, on luciferin-luciferase reactions in firefly bioluminescence, by using biosynthetic mutant luciferase enzyme, where charges, polarity, and hydrophobicity/ hydrophilicity of amino acid residues surrounding oxyluciferin are modified. We also measured quantum yields of biosynthetic mutant photo-protein (aequorin) in jellyfish bioluminescence, by revising our quantitative spectrometer to cover 400 nm blue region. Theoretical analyses via time-dependent density-functional calculations, first-principle calculations, and molecular dynamics calculations including water and protein molecules were made.

研究分野：数物系科学

キーワード：生物発光 酵素 ルシフェラーゼ ルシフェリン 分光

### 1. 研究開始当初の背景

ホタル生物発光は、自然科学の中でも最も広く興味をもたれる現象の一つであり、高効率に進む生体内の酵素反応の典型として重要な意義を持つ。このシステムは微視的に見ると非常に複雑であり、従来、自然を根源的・統一的立場から演繹的に記述しようとする物理学からは遠い存在でしかなかった。

### 2. 研究の目的

本研究は、発展の著しい遺伝子工学・生物工学の手法を取り入れることにより、天然のホタル生物発光システムと変異体生物発光システムを光物性物理学の研究の題材として扱い、物理的記述に基づいた理解を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

タンパク質酵素ルシフェラーゼ内の発光分子オキシルシフェリン近傍のアミノ酸残基を置換し、オキシルシフェリン近傍の電荷・極性・親/疎水性を変えた複数の試料について、これまでに得た生物発光の効率及びスペクトルの温度依存性・溶媒依存性などを定量的に整理した。

時間依存密度汎関数計算(Gaussian09)や、第一原理計算を行った。タンパク質内のアミノ酸残基置換効果を環境電荷分布として気相を仮定した計算は直ちに可能だが、水和効果すなわち水分子の配置と水素結合の効果を取り入れることが、重要かつ最難関であることが解り、複数のアプローチの計算を試みた。

多くの遺伝子工学・生物工学試料に対して実験を進めるため、ウミホタル系試料、オワンクラゲ系試料開発の国内グループ、ホタル系試料開発の国内およびブラジル・ドバイなど国外のグループと共同研究打合せを行い実験準備を開始した。これまでの定量分光測定は、緑 赤色領域が中心であったが、様々な試料に対応するため青色領域に拡張した。標準的なルミノール化学発光試料を用いてその試用を行った。毎度の校正作業に甚大な労力がかかりすぎるので、絶対値較正を容易にする微弱発光標準ツールの開発と利用の実験を進めた。

生物発光反応中のオキシルシフェリンの透過吸収、蛍光、時間分解蛍光などのその場分光計測を行うため、ケージドルシフェリンやケージドATPという人工合成された分子群が有効と考え、その基礎分光に取り組んだ。

### 4. 研究成果

理論計算に関して、量子化学計算と分子動力学計算を組み合わせた計算により水和効果を調べた研究や、束縛非束縛全基底ペーテサルピータ方程式を初めて内核遷移に適用した第一原理計算研究など、理論家との共同研究が進んだ。

ホタル生物発光のルシフェラーゼやオワ

ンクラゲ生物発光のイクオリンなどのタンパク質酵素の動的な構造を、分子動力学計算によりシミュレートした。また、一方で、反応基質であるルシフェリンやセレンテラジンの反応中間体や反応生成物に対する量子化学計算を水溶液中の場合について行った。水和効果すなわち水分子の配置と水素結合の効果もpH依存性も含めて取り入れるため、分極連続体媒質モデルを用いて行う量子化学計算結果に対して、モデル分子の実験結果として得られるpKaの値を用いて補正を行うアプローチを試み、無矛盾の結果を得た。理論的妥当性の検証や、タンパク質背景を含めた計算を進めてゆく前段階の試行研究として有意義であった。

青色領域に拡張した定量実験系を用いて、遺伝子工学的手法を用いて生合成された、オワンクラゲの発光系であるイクオリンについて、定量計測を行った。遺伝子工学的に作られたイクオリンは、アミノ酸残基配列が正確にわかるので、1分子あたりの各種のアミノ酸残基含有量がわかる。アミノ酸分析を行うことで、測定に用いた試料溶液のイクオリン濃度を正確に定量した。これらの実験から、イクオリン生物発光の量子収率を決定することが出来た。下村らの測定結果との比較・検証を行い、良い一致を得た。

ケージドATPは、紫外光照射によりATPが切り離されて発生するものであるが、入手が容易なNPEケージドATPの場合のATP発生は、光吸収に伴う超高速一次明反応と比較的遅い二次暗反応によりおこるため、生物発光反応の光トリガとしては時間分解能が悪いことが解った。人工的に準備した系統的な一連の生物系試料群に対して、光物性物理学・先端的分光学流の学理や定量的計測手法を適用し、ホタル生物発光の高効率性と発光制御の物理機構の解明に踏み出すことが出来た。

### 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14件)

1. Masahiro Yoshita, Lin Zhu, Changsu Kim, Toshimitsu Mochizuki, Tetsuya Nakamura, Mitsuru Imaizumi, Shaoqiang Chen, Hidehiro Kubota, Yoshihiko Kanemitsu, and Hidefumi Akiyama, "Calibration standards and measurement accuracy of absolute electroluminescence and internal properties in multi-junction and arrayed solar cells," in Proc. of SPIE Photonics West, 査読なし vol. 9743, 97430D1-6(2016).<http://dx.doi.org/10.1117/12.2211726>
2. Masahiro Yoshita, Lin Zhu, Changsu

- Kim, Hidefumi Akiyama, Shaoqiang Chen, Toshimitsu Mochizuki, Hidehiro Kubota, Tetsuya Nakamura, Mitsuru Imaizumi, Yoshihiko Kanemitsu, "Absolute Electroluminescence Imaging of Multi-Junction Solar Cells and Calibration Standards", The 42nd IEEE Photovoltaic Specialists Conference Proceedings, 査読なし 7356199-1-4 (2015).<http://dx.doi.org/10.1109/PVSC.2015.7356199>
3. Weihang Zhou, Daisuke Nakamura, Yu Wang, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Shojiro Takeyama, "Effect of very High magnetic field on the optical properties of firefly light emitter oxyluciferin", Journal of Luminescence 査読あり 165, 15-18 (2015)<http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.04.009>
  4. W. J. Liu, X. L. Hu, L. Y. Ying, S. Q. Chen, J. Y. Zhang, H. Akiyama, Z. P. Cai, B. P. Zhang, "On the importance of cavity-length and heat dissipation in GaN-based vertical-cavity surface-emitting lasers", Scientific Reports 査読あり 5,9600(2015).<http://dx.doi.org/10.1038/srep09600>
  5. Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Hidefumi Akiyama, Kenta Yamada, Nobuaki Koga, "Vibronic structures in absorption and fluorescence spectra of firefly oxyluciferin in aqueous solutions", Photochem. Photobiol. 査読あり 91, 819-827,(2015)<http://dx.doi.org/10.1111/php.12463>
  6. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Yoshihisa Harada, Nobuaki Koga, "First-Principles Investigation of Strong Excitonic Effects in Oxygen 1s X-Ray Absorption Spectra", J. Chem. Theory Comput. 査読あり 11, 1668-1673 (2015). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00082>
  7. Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "Analysis of Oxyluciferin Photoluminescence Pathways in Aqueous Solutions", Photochemistry and Photobiology 査読あり 91, 74-83(2015). <http://dx.doi.org/10.1111/php.12370>
  8. 秋山英文, 望月敏光, 樋山みやび, 「ホタル生物発光と物理」, 日本物理学会誌 査読あり 69, 218 (2014).
  9. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "First-Principles Investigation on Rydberg excitations of Firefly Luciferin Anion in Vacuum", J. Chem. Phys. 査読あり 141, 044309 (2014). <http://dx.doi.org/10.1063/1.4890730>
  10. Hidefumi Akiyama, Yu Wang, Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Kanako Terakado, Toru Nakatsu, "How can quantitative bioluminescence and in-situ fluorescence of firefly oxyluciferin in luciferase be compared with theoretical calculations ?" Luminescence 査読あり 29, 7-8 (2014)
  11. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "First-Principles Investigation on Optical Properties of Firefly Luciferin Anion", Luminescence 査読あり 29, 86-87 (2014)
  12. Miyabi Hiyama, Kenta Yamada, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "Theoretical study of pH dependence on photoluminescence of firefly luciferin", Luminescence 査読あり 29, 70 (2014)
  13. Toshimitsu Mochizuki, Yu Wang, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, "Robust red-emission spectra and yields in firefly bioluminescence against temperature changes", Appl. Phys. Lett. 査読あり 104, 213704 (2014). doi: 10.1063/1.4880578
  14. Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Toshimitsu Mochizuki, Kenta Yamada, and Nobuaki Koga, "Analysis of Photoexcitation Energy Dependence in the Photo Luminescence of Firefly Luciferin" Photochem. Photobiol. 査読あり 90, 820-828 (2014)
- [学会発表](計 29 件)
1. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, "Stability of keto-, enol-, enolate-type oxyluciferin anions in aqueous solutions" 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2016, 29 May-2 June, Tsukuba, Japan
  2. 秋山 英文, "太陽電池の絶対エレクトロルミネッセンス画像計測法と応用", 第 63 回応用物理学会春季学術講演会 2016 年 3 月 19-22 日 東工大 大岡山キャンパ

- ス(東京都目黒区)
3. 吉田 正裕, 朱 琳, 金 昌秀, 久保田 英博, 中村 徹哉, 今泉 充, 金光 義彦, 秋山 英文, "多接合太陽電池エレクトロルミネッセンス定量計測の測定精度評価", 第 63 回応用物理学会春季学術講演会 2016 年 3 月 19-22 日 東工大 大岡山キャンパス(東京都目黒区)
  4. Masahiro Yoshita, Lin Zhu, Changsu Kim, Toshimitsu Mochizuki, Tetsuya Nakamura, Mitsuru Imaizumi, Shaoqiang Chen, Hidehiro Kubota, Yoshihiko Kanemitsu, and Hidefumi Akiyama, "Calibration standards and measurement accuracy of absolute electroluminescence and internal properties in multi-junction and arrayed solar cells," SPIE Photonics West 2016/2/13-18 San Francisco, USA, (oral).
  5. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Yoshihisa Harada, Nobuaki Koga, "11-electron first-principles X-ray adsorption spectra calculations for acetone and acetic acid" Recent Progress in Molecular Theory for Excited state Electronic Structure and Dynamics (#142), THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015/12/17 Honolulu, Hawaii, USA.
  6. Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Toshimitsu Mochizuki, Kenta Yamada, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "Theoretical study for photoluminescence of firefly-bioluminescence-related molecules" (Invited paper) Luciferin/Luciferase Engineering (#410), THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015/12/16 Honolulu, Hawaii, USA.
  7. 樋山みやび, "ホタル生物発光の量子化学計算と反応機構" 量子化学探索研究所講演会 2015(2015/11/29), 東京大学本郷キャンパス 山上会館(東京都文京区) 招待講演
  8. 樋山みやび, "生物発光における量子化学計算" 第 3 回津田沼 RBK フォーラム(2015/11/28) 千葉工業大学 千葉県習志野市 招待講演
  9. 樋山みやび, "量子化学計算によるホタル生物発光関連分子の理論的研究" 談話会 (2015/11/05) 日本大学理工学部(東京都千代田区)
  10. 樋山みやび, "生物発光における分子科学" 原子衝突学会第 40 回年会(2015/09/28-30) 首都大学東京南大沢キャンパス国際交流会館(東京都八王子市)
  11. 挟間優治, 東暉舜, 倉田麻貴, 樋山みやび, 吉田正裕, 久保田英博, 井上敏, 秋山英文, "イクオリン生物発光の量子収率測定" 日本物理学会 2015 年秋季大会 2015/09/16-19 関西大学 千里山キャンパス(大阪府吹田市)
  12. 挟間優治, 東暉舜, 倉田麻貴, 樋山みやび, 吉田正裕, 久保田英博, 井上敏, 秋山英文, "イクオリン生物発光の量子収率測定" 日本物理学会 2015 年秋季大会 2015/09/16-19 関西大学 千里山キャンパス(大阪府吹田市)
  13. 倉田麻貴, 樋山みやび, 挟間優治, 東暉舜, 吉田正裕, 望月敏光, 秋山英文, "生物発光の光制御に向けたケージド・ルシフェリンの分光評価" 第 9 回分子科学討論会 2015/09/16-19 東京工業大学(東京都目黒区)
  14. 樋山みやび, 野口良史, 秋山英文, 山田健太, 古賀伸明, "水溶液中オキシルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルにおける振電構造の解析" 第 9 回分子科学討論会 2015/09/16-19 東京工業大学(東京都目黒区)
  15. Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga "Analysis of Photoluminescence Pathways of Firefly Oxyluciferin in Aqueous Solution" 日本生物物理学会第 53 回年会 2015/9/13-15 金沢大学(石川県金沢市)
  16. 樋山みやび, 野口良史, 望月敏光, 秋山英文, 古賀伸明"オキシルシフェリン光ルミネッセンスにおける発光反応経路と振動構造" 物性研究所短期研究会 機能物性融合科学研究会シリーズ(3)「反応と輸送」2015/06/24-26 東京大学物性研究所(千葉県柏市)
  17. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Yoshihisa Harada, Nobuaki Koga (ISSP, Nagoya Univ) "All-electron first-principles calculations for XAS of acetone and acetic acid" 30th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics, 2014/ June 4-6 Hyogo University Hyogo, Japan,
  18. Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga "Theoretical study for excited states of firefly-bioluminescence-related molecules" 30th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics, 2014/ June 4-6 Hyogo University Hyogo, Japan,
  19. Hidefumi Akiyama, Yu Wang, Miyabi Hiyama, Toshimitsu

- Mochizuki, Kanako Terakado, Toru Nakatsu, "How can quantitative bioluminescence and in-situ fluorescence of firefly oxyluciferin in luciferase be compared with theoretical calculations ?", 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2014, 23-28 June, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden
20. Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "First-Principles Investigation on Optical Properties of Firefly Luciferin Anion", 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2014, 23-28 June, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden
21. Miyabi Hiyama, Kenta Yamada, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "Theoretical study of pH dependence on photoluminescence of firefly luciferin", 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2014, 23-28 June, Uppsala Universitet, Uppsala, Sweden
22. 村岡洋祐, 望月敏光, 樋山みやび, 吉田正裕, 秋山英文 "ルミノール化学発光の量子収率測定と触媒依存性" 日本物理学会第70回年次大会 2015/3/21-24 早稲田大学 早稲田キャンパス (東京都新宿区)
23. 樋山みやび, 野口良史, 望月敏光, 山田健太, 秋山英文, 古賀伸明 "ホタル生物発光関連分子における分光的性質についての理論研究" 物性研究所短期研究会 機能物性融合科学研究会シリーズ (1)「光機能」2014/12/04-05 東京大学物性研究所 (千葉県柏市)
24. 倉田麻貴, 望月敏光, 樋山みやび, 秋山英文 "ケージド・ルシフェリンの吸収・生物発光と溶媒依存性" 物性研究所短期研究会 機能物性融合科学研究会シリーズ (1)「光機能」2014/12/04-05 東京大学物性研究所 (千葉県柏市)
25. 樋山みやび "生物発光と原子分子" 京都大学量子理工学教育研究センター 第15回公開シンポジウム 2014/10/24 京都大学宇治キャンパス (京都府京都市)
26. 樋山みやび, 秋山英文, 古賀伸明, "ホタル生物発光関連分子の光ルミネッセンスの理論的研究" 第8回分子科学討論会 2014/9/21-24 広島大学 (広島県東広島市)
27. Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama,

- Nobuaki Koga, "Theoretical Analysis of Absorption Spectra of Oxyluciferin in Aqueous Solutions" 日本生物物理学会第52回年会 2014/9/25-27 札幌コンベンションセンター 北海道札幌市
28. 野口良史, 樋山みやび, 秋山英文, 原田慈久, 古賀伸明 "アセトンと酢酸のX線吸収スペクトルの第一原理計算" 第17回理論化学討論会 2014/5/22-24 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
29. 樋山みやび, 秋山英文, 古賀伸明, "励起状態のpKaを利用した酸性条件下でのホタルルシフェリン蛍光スペクトルの解析" 第17回理論化学討論会 2014/5/22-24 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 英文 (AKIYAMA Hidefumi)  
東京大学・物性研究所・准教授  
研究者番号: 40251491

### (2) 研究分担者

樋山 みやび (HIYAMA Miyabi)  
東京大学・物性研究所・研究員  
研究者番号: 90399311