

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26800164

研究課題名(和文) オキシルシフェリン誘導体を用いたホタル生物発光の色変化機構の解明

研究課題名(英文) Studies on color change of firefly bioluminescence using the Oxyluciferin derivatives

研究代表者

望月 敏光 (Toshimitsu, Mochizuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・再生可能エネルギー研究センター・研究員

研究者番号：30549572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：5-5ジメチルオキシルシフェリン水溶液の吸収スペクトルのpH依存性から、 $pK_a=8$ の中性分子と陰イオンの2状態の吸収ピークをそれぞれ観測し、発光励起スペクトルからどちらの状態も陰イオンに対応する636nmの単一のピークで発光することを示した。発光タンパクに取り込ませた状態ではpH依存性は小さくなり、生物発光により近い592nmで光った。これはルシフェラーゼが作る環境が水中と異なるためであるものと考えられ、発光および吸収をプローブとして発光タンパク質が作る環境を調べる道筋が立った。

研究成果の概要(英文)：We measured pH dependence of absorption spectrum of 5-5 dimethyl oxyluciferin aqueous solution and found 2 absorption peaks related to neutral molecules and anions, with $pK_a = 8$ of neutral molecule. We also performed photo-luminescence excitation measurement and found that both absorption peaks related to photo-luminescence at 636 nm of anions. We also performed the similar measurements on 5-5 dimethyl oxyluciferin incorporated in American Firefly Luciferase and the observed absorption showed much smaller pH dependence on pH and photo-luminescence peaked at 592 nm, which is closer to the bioluminescence compared to the aqueous solution. We established the path to study environment which Luciferase offers using absorption and luminescence as probes.

研究分野：光物性

キーワード：ホタル生物発光 発光励起スペクトル 吸収測定

1. 研究開始当初の背景

生物発光反応は酵素タンパク質が発光ナノデバイスとして振る舞うもので、光物性物理の研究対象として特に興味深い。ホタル生物発光反応は、数ある生物発光反応の中でも最も有名で、88%もの高い量子収率でも知られる、その反応の活性は生物種や pH、温度などに強く依存することが知られている。この理由・微視的機構は Seliger らの先駆的報告から 50 年以上経た今でも不明であり、光物性物理で扱っている興味深い謎である。

生物発光の機構が不明であった主な理由として、反応時の発光基質の状態が不明な点が挙げられる。先に挙げた 88% という量子収率には多くの疑いが持たれてきたが、より精度の良い追試は長年無かった。その中で近年の光学計測・分光技術の目覚ましい発展を背景に 2008 年に安東らが標準に即した絶対波長感度校正をスムーズに行える測定系と校正手法を開発した。安東らはホタル生物発光の効率が過去の報告と異なり $41 \pm 7\%$ であることを示し、更に王らが 2012 年に発光の金属イオン添加効果や、ルシフェラーゼに変異体を使った場合の発光を、2013 年に申請者らが温度依存性をそれぞれ定量評価し、全ての結果で緑色の発光成分のみが環境に敏感であることを明らかにした。王らは反応生成物に残存する酸化ルシフェリンの吸収および発光をその場で分光する手段を開発し、結果を理論計算と比較することで、各発光成分の同定に端緒をつかんだ。

2. 研究の目的

ホタル生物発光の色変化機構の解明は定量測定を通じて急速に進みつつあるが、未だ課題は多く残っており、同定も完了していない。環境に敏感な緑発光成分の起源については、エノール型の酸化ルシフェリン陰イオン、キャリアが移動したケト型の酸化ルシフェリン陰イオンの二つの説が Branchini らにより提唱されており、どちらが正しいかの検証が待たれている[4]。そこでケト型しか取れない 5-5 ジメチル誘導体の基質をルシフェラーゼに取り込ませ、吸収、蛍光および生物発光スペクトルを評価することで、緑発光成分がケト型のみで発生するかを明らかにする。生物発光に寄与している構造が明らかになれば、量子化学計算により基底状態における吸収および存在比が計算できるだけでなく、発光および生物発光がどのような励起状態に起因しているのかもより精度良く計算する事が出来る。これらの計算結果と生物発光のスペクトルを突き合わせることで、生物発光反応のエネルギー図を書くと共に、ルシフェラーゼがこの反応をどのように触媒しているかを明らかにすることが出来る。こうして長年不明であったホタル生物発光

の色変化機構の解明の決着をつけることを目的とした。

3. 研究の方法

5-5 ジメチルオキシルシフェリンをホタルルシフェラーゼに取り込ませた、in-situ の状態における吸収および蛍光スペクトルの測定を行う。得られた結果を通常型ルシフェリンの in-situ 状態の吸収および発光スペクトルと定量比較した。5-5 ジメチルオキシルシフェリンは塩基性の水溶液中で加水分解が進むとされている。濃度 0.15M の GTA 緩衝溶液中に 7.1×10^{-6} M の 5-5 ジメチルオキシルシフェリンを溶かした溶液の吸収スペクトルの時間変化を見ると、pH 8 にて時定数 590 ± 40 分、pH 9 にて時定数 311 ± 10 分で指数関数的に減衰するガウス成分を観測した。このため本研究においては溶液の作成から測定終了までの時間は 1 時間以内とした。GAUSSIAN09 による計算結果を参考に、各吸収ピークと発光ピークの解釈を行った。

4. 研究成果

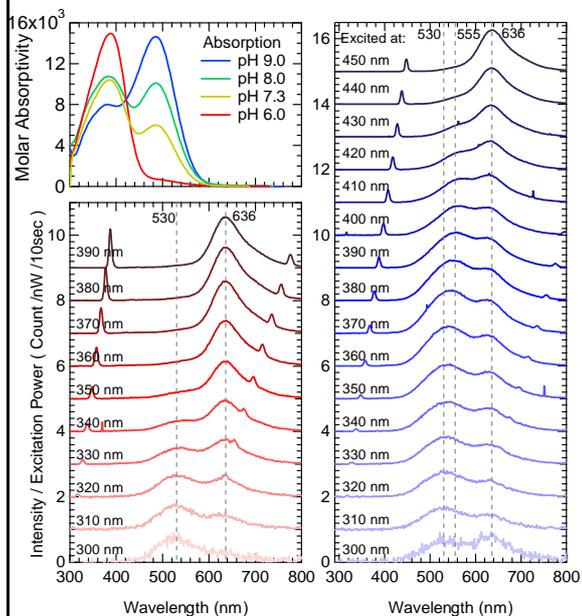
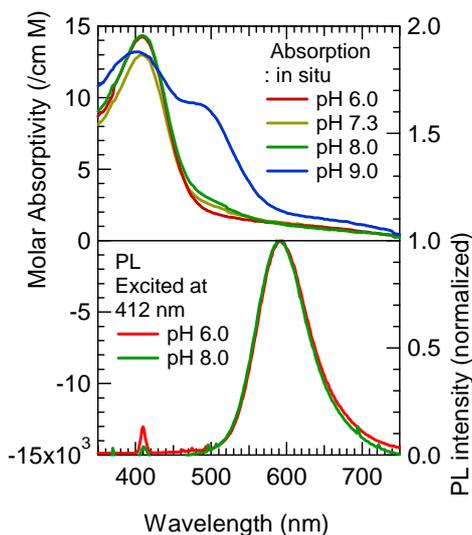


図1: 水溶液中の 5-5 ジメチルオキシルシフェリンの吸収スペクトルおよび発光励起スペクトル

図1に示す通り、 7.1×10^{-6} M の 5-5 ジメチルオキシルシフェリン水溶液は 388 nm と 484 nm の吸収ピークを持ち、pH8 以下では前者が、8 以上では後者が優勢であった。共鳴励起条件ではどちらの吸収ピークも 636 nm で発光した。これは水溶液中で中性分子の状態が $pK_a=8$ であり、また中性の状態の分子も光励起されると脱プロトンして陰イオンの状態で光るものと解釈できる。

図2に示すように、 1.2×10^{-6} M の 5-5 ジメチルオキシルシフェリン水溶液に 5×10^{-6} M のホタルルシフェラーゼおよび過剰量の AMP と Mg イオンを加えると、吸収及び発光スペクトルが顕著にシフトする。吸収は pH<9

で pH にほとんど依存せず 412 nm に吸収ピークを持ち、592 nm で発光した。pH9 では水溶液中に類似の吸収および発光スペクトルが観測され、タンパク質への発光体の取り込みが十分でない様子が観測された。pH8 以下の発光および吸収のシフトおよび吸収スペクトルの pH に対する安定性は、5-5 ジメチルオキシルシフェリンが中性分子の状態でルシフェラーゼに取り込まれ、ルシフェラーゼが作る環境中にあり、光励起された際には脱プロトンして陰イオンの状態で発光していると解釈できる。また発光ピークは水溶液中よりも生物発光のピークである 533 nm に近か



った。

図2 ルシフェラーゼを加えた 5-5 ジメチルオキシルシフェリン溶液の吸収及び発光スペクトル

本研究では 5-5 ジメチルオキシルシフェリンの発光特性をルシフェラーゼがつくる環境中で観測することに成功し、発光および吸収をプローブとして発光タンパク質が作る環境を調べる道筋を立てた。

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 1 件)

Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, "Analysis of Oxyluciferin Photoluminescence Pathways in Aqueous Solutions", Photochemistry and Photobiology **91**, 74-83 (2015) 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

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 (東工大 2015/9/16-19) 3P023

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 (金沢 2015/9/13-15) 1Pos173

Hidefumi Akiyama, Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Yu Wang, Yoriko Ando, Yuji Hazama, "Quantitative bioluminescence measurements and oxyluciferin keto-enol problems", International Workshop on Bioluminescence in Beijing, China, Sept. 12-13, 2015. (Invited)

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(早稲田大学 早稲田キャンパス 2015/3/21-24) 22pAQ-6

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 (invited)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 敏光 (MOCHIZUKI, Toshimitsu)
産業技術総合研究所・再生可能エネルギー
研究センター・研究員
研究者番号：30549572

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

()