

自己評価報告書

平成23年 5月 9日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20108016

研究課題名（和文） ホタルルシフェラーゼによる π 空間制御機構の解明研究課題名（英文） π space control of firefly luciferase

研究代表者

中津 亨 (NAKATSU TORU)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：50293949

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：ルシフェラーゼ、生物発光、X線結晶構造解析、ルシフェリン

1. 研究計画の概要

ホタルルシフェラーゼによる発光反応には古くから2つの謎が知られている。それは

(1) 量子収率が高いこと、(2) ルシフェラーゼの1アミノ酸置換により発光色が黄緑色から赤色に劇的に変化することである。我々は黄緑色発光の野生型と赤色発光のS286N変異体ルシフェラーゼのX線結晶構造解析から、発光時における構造上の違いを見いだした。この結果、ルシフェラーゼによる発光体オキシルシフェリンの取り囲み方の違いが、得られる励起状態のエネルギーの違いを導き、発光色変化が生じることを明らかにした。そこで本研究ではルシフェラーゼの立体構造、発光スペクトル、量子収率、オキシルシフェリンの構造を相互的に解析し、未だ未解明のさらなる発光色制御機構を明らかにすることとした。

本領域研究では新規高次 π 空間分子の創製が1つの方向性である。すでに生体空間では様々な高次 π 空間を使った分子が存在するが、未解明の部分が多い。そこでその詳細を理解することは、新規 π 空間物質の分子設計には非常に有用である。ホタルのルシフェリンルシフェラーゼ反応は π 空間を巧みに利用しており、発光色の制御は励起状態のオキシルシフェリンの π 電子空間における構造状態の違いによると考えられている。そこで申請者はルシフェリンルシフェラーゼ空間の精密構造解析によって、詳細な π 空間制御機構の解明を行い、新規 π 空間分子の創製に役立たせようというものである。

2. 研究の進捗状況

ホタルルシフェラーゼの発光色制御機構の詳細を明らかにするためにはさまざまな

発光色変異体の状態を明らかにする必要がある。そこで1アミノ酸置換により20種類の変異体を作成し、基質結合部位に近くにあるTyr257, Asn231, Arg220変異体、また基質結合部位から遠くにあるGly326, His433変異体をそのターゲットとすることとした。黄緑色の発光を行うためには、発光の際基質結合部位の構造変化を起こす必要がある。この構造変化にはTyr257またはAsn231がSer286と水を介した水素結合を形成する必要があることがこれまでの構造解析から推察された。そこでY257F, N231A変異体の構造解析から、構造変化にはY257が関わっていることが明らかとなった。またN231A変異体の構造解析では構造変化が観測されたものの赤色に変化するという新たな現象が確認できた。野生型の構造と比較するとオキシルシフェリンに対する水素結合ネットワークが異なっていたことから、このネットワークの発光色変化への関与をより詳細にするためにN231D, R220A変異体を作成した。さらにY257R変異体は黄緑色と赤色の中間に位置する橙色の発光を示し、さらにはpH変化により発光色変化が生じない変異体であった。得られた変異体はこれまでにない新たな性質を有しており、 π 空間制御ならびに水素結合ネットワークと発光色変化との関係を明らかにする上で重要な変異体である。また赤色発光G326S変異体の立体構造では構造変化は観測されなかったため、このことが赤色発光した原因であることが推定できた。

3. 現在までの達成度

(2) おおむね順調に進んでいる。

本研究を進めていく上でまず成し遂げるべ

きポイントが2点あった。それは適した発光色変異体を見つけ出すこと、そしてその変異体をより簡便に取得し、高分解能で立体構造を決定できるような結晶化法の確立である。いずれも目的が達成され、いくつかの変異体については構造解析や分光学的な結果が得られ、ほぼ当初の予定通りに順次結果が得られているためである。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 活性部位近傍発光色変異体の詳細なX線結晶構造解析：N231D, R220A 変異体を中心に構造解析を行い、水素結合ネットワークの発光色との関係を明らかにする。

(2) 活性部位から10Å以上離れた発光色変異体のX線結晶構造解析：H433Y 変異体のX線結晶構造解析：H433Y 変異体について構造解析を行い発光色変化している原因を明らかにする。

(3) ルシフェラーゼの酵素学的パラメータ、発光特性、分光学的データの測定：発光色変異体について、発光スペクトルの測定や量子収率の測定、さらには赤外スペクトルの測定を行い、立体構造との関係を明らかにし、ルシフェラーゼとオキシルシフェリンとの構造的な基盤の解明を行う。

5. 代表的な研究成果

(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5件)

(1) Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, Nakano H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H. Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J.* 29 4083-4093 (2010) 査読有

(2) Terakado K, Kodan A, Nakano H, Kimura Y, Ueda K, Nakatsu T, Kato H. Deleting two C-terminal alpha-helices is effective to crystallize the bacterial ABC transporter Escherichia coli MsbA complexed with AMP-PNP. *Acta Crystallogr D* 66 319-323 (2010) 査読有

(3) Sato T, Kodan A, Kimura Y, Ueda K, Nakatsu T, Kato H. Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein. *FEBS Journal.* 276 3504-3516 (2009) 査読有

(4) Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M. Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456 520-523 (2008) 査読有

(5) Chung LW, Hayashi S, Lundberg M, Nakatsu T, Kato H, Morokuma K. Mechanism of efficient firefly bioluminescence via adiabatic transition state and seam of sloped conical intersection. *J Am Chem Soc.* 130 12880-12881 (2008) 査読有

[学会発表] (計5件)

(1) 寺角 香菜子、吉宗 良祐、五味 恵子、梶山 直樹、池内 秀幸、平竹 潤、加藤 博章、中津 亨 ゲンジボタルルシフェラーゼの発光色決定メカニズムの解明日本農芸化学会 2011 年度年会 2011/3/25-28 京都女子大学 (京都市)

(2) 吉宗良祐、寺角香菜子、加藤博章、中津亨 ホタルルシフェラーゼの発光色決定メカニズムの解明日本結晶学会平成 22 年度年会 2010/12/3-12/5 大阪大学コンベンションセンター (大阪府)

(3) 寺角香菜子、吉宗良祐、五味恵子、梶山直樹、池内秀幸、平竹潤、加藤博章、中津亨 第10回日本蛋白質科学会年会 2010/6/16-18 札幌コンベンションセンター (札幌市)

(4) 寺角香菜子、中津亨 ホタル・ルシフェラーゼによる π 空間制御機構日本生物物理学会 2009/10/30 アスティ徳島 (徳島)

(5) 中津亨 ホタルにおける発光制御メカニズム日本農芸化学会 2008 年度大会 2009/3/27-29 福岡国際会議場 (福岡市)