

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19370039

研究課題名（和文） ホタルルシフェラーゼは発光反応をどのように制御しているか

研究課題名（英文） How does firefly luciferase control the bioluminescence reaction?

研究代表者

中津 亨 (NAKATSU TORU)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50293949

研究成果の概要（和文）：ホタルの黄緑色の発光を触媒するルシフェラーゼの、赤色発光色変異体であり活性部位から遠い位置の変異である G326S および発光量が低下する Y257A 変異体の活性測定および立体構造決定を行った。その結果、変異により生じる変化の要因は発光体の取り囲み方が弱いためエネルギーを損失することによることが示唆された。さらにホタルの発光制御に関わる別の酵素であるルシフェリン再生酵素の立体構造を決定した。

研究成果の概要（英文）：We measure the bioluminescent activities and determine the crystal structures of G326S and Y257A firefly luciferase mutants which emit red light. In the result, it is supposed that the emission color change from yellow-green to red and the decrease of the emission are caused by the energy loss of the excited oxyluciferin. In addition we determine the crystal structure of luciferin regenerating enzyme, which controls the emission reaction in firefly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：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：構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

ほたるによる黄緑色の発光反応は発光基質ルシフェリンと、ATP、分子状酸素、そして発光反応を触媒するタンパク質であるルシフェラーゼによる酵素反応であり、生成してきた励起状態のオキシルシフェリンが基底状態に落ちる際、励起エネルギーが光として

放出され発光することはよく知られている。しかしながら、この発光反応に関して古くから非常に興味深い謎が存在した。それは酵素であるルシフェラーゼのアミノ酸をわずかに1アミノ酸置換するだけでも発光色が黄緑色から赤色に劇的に変化するということである。そこでこの仕組みがどのようになっている

るのかを我々はX線結晶構造解析を用いて明らかにした。その結果、黄緑色に発光するためには励起状態のオキシルシフェリンが得たエネルギーを無駄に放出しないようにアミノ酸でしっかりと取り囲む必要があるということが明らかとなった。そして赤色に発光するときはその取り囲み方が弱く、エネルギーを無駄に放出してしまうため生じるのであることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

ホタルのルシフェラーゼはわずかに1アミノ酸残基の置換により発光色が変化し、そのアミノ酸の場所により変化量は数nmから50nmと非常に幅が広い。しかも発光体付近のアミノ酸の変化だけでなく、離れた場所のアミノ酸の変異によっても発光色が変化する。S286N赤色発光変異体を用い、これまでに明らかにした発光色変化の機構(Ile288の側鎖の動き、励起状態オキシルシフェリンの固定)は、ルシフェラーゼにおける発光色制御の基本的な仕組みである。そこで活性部位から遠く離れたアミノ酸置換によっても発光色が赤色に変化するものがすでに知られているが、これも同じメカニズムで説明できるのか、他のメカニズムがあるのかどうかを明らかにしていく必要がある。また発光量が低下する変異体の場合どこにその原因があるのかを知ることとは、効率良く反応を行っているルシフェラーゼの要因を探る上で重要である。このように変異型のルシフェラーゼの性質を調べることにより、野生型のルシフェラーゼがいかに効率良く反応を制御しているのかを明らかにしていくことを目的としている。

発光自体を制御しているのはルシフェラーゼであるが、発光反応に伴いルシフェリンが減ってしまうため、長時間の発光を行うことができない。しかしながらホタル体内では明滅を繰り返しながら非常に長い時間発光を行っている。したがって反応によって得られたオキシルシフェリンをルシフェリンに戻す必要がある。これを行っているのがルシフェリン再生酵素であり、ホタル自身の発光の制御の仕組みを考える場合、ルシフェラーゼのみならずルシフェリン再生酵素についてもその詳細をする必要がある。そこで、ルシフェリン再生酵素がどのようなメカニズムでルシフェリンを再生しているのかを明らかにすることも目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) ゲンジボタル・ルシフェラーゼの精製および結晶化：従来のX線結晶構造解析の精製方法として陽イオン交換クロマトグラフィ

ーとハイドロキシアパタイトカラムの2段階により行ってきた。しかしこの方法ではどうしても除去できない不純物が残ることが多く、結晶化の際の弊害となってきた。そこで、ヒスチジンタグを利用し精製する方法に変更した。ヒスチジンタグとルシフェラーゼの間にはTEVによる切断サイトを導入した。Talon-Super flowカラムを用いたヒスチジンタグによる精製を行い、その後TEVによりタグを除去した。その後、ハイドロキシアパタイトカラムを利用し、2段階の精製により純度の高いサンプルが得られるようになった。この精製サンプルを利用し、PEG4000を沈殿剤として用いることにより結晶化を行った。

(2) ゲンジボタル・ルシフェラーゼの活性測定：精製ルシフェラーゼの活性測定は発光量を測定するために20秒間の発光量の積算をルミノメーターにより測定した。発光測定は反応が2段階進行したときの活性を示しており、反応の第1段階目において反応がどの程度進行しているのかを明らかにするために、反応段階で生じてくるピロリン酸の定量することにより、活性測定を行った。

(3) ゲンジボタル・ルシフェラーゼのX線回折実験：野生型、Y257A変異体、G326S変異体それぞれの結晶についてSPRING-8のビームラインBL41XUにおいてX線回折実験を行った。

(4) ルシフェリン再生酵素の大量発現、精製、結晶化：ルシフェリン再生酵素(LRE)のN末端にヒスチジンタグとスロンピン切断サイトが導入されるようにLRE遺伝子を発現ベクターに組み込んだ。大量発現は温度を18度、約20時間培養することにより行った。精製はNi-NTAクロマトグラフィーを用いて行い、スロンピンを用いてヒスチジンタグを除去した。得られた精製サンプルを用いて結晶化条件の探索を行ったところ、PEGを用いたときに結晶が得られた。さらに塩としてMg、もしくはCaを加えたときに良好な結晶が得られた。

(5) ルシフェリン再生酵素のX線回折実験および立体構造決定：LREの野生型および重原子置換体結晶の測定は実験室系のX線発生装置であるFR-Eを用い、高分解能の野生型結晶の測定はSPRING-8のビームラインBL41XUにおいて行った。位相決定は得られたX線回折強度データを用い、異常分散効果を利用した単一重原子同型置換(SIRAS)法により行った。その際、プログラムPHENIXを利用した。得られた位相情報をもとにプログラムARP/wARPによりタンパク質分子モデルを自動構築した。その後、プログラムCOOTを

用いて分子モデルの修正とプログラム REFMAC5 による精密化を繰り返した。

#### 4. 研究成果

(1) G326S, Y257A 変異体の活性測定：G326S 変異体は直接的もしくは間接的にも反応に関わっていないアミノ酸が変異したルシフェラーゼ赤色発光色変異体である。この変異体について発光活性測定を行ったところ、発光最大波長は 605nm であり、発光強度は野生型の約 55%であった。また反応の第 1 段階目のアデニル化反応では野生型の約 85%であった。

次に Y257A 変異体の活性測定を行った。ルシフェラーゼが黄緑色の発光を生じさせるためには第 1 段階目の反応によってルシフェリル AMP 中間体がルシフェラーゼ中で生成した後、Ile288 が発光体の方へ移動すると考えられている。その際、Ser286 が水を介して Tyr257 と水素結合を作ることにより構造変化が生じる。Tyr257 はこのスイッチングに関わっていると考えられているアミノ酸残基である。Y257A 変異体は赤色に発光し、発光最大波長は 615nm であり、発光強度は野生型のわずか 5%程度であった。一方アデニル化反応では約 70%の活性が保持されていた。

また両変異体のルシフェリンに対する Km を測定したところ 5 - 30  $\mu$ M であり、大きな違いは観測されなかった。このことから Y257A 変異体の酵素反応自体は進行しているものの、発光が減少している変異体であることが示唆された。(図 1)

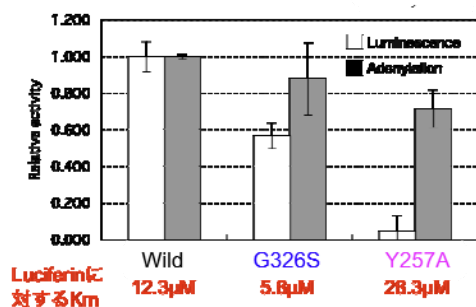


図 1、野生型と赤色発光変異体の活性

(2) G326S, Y257A 変異体の X 線結晶構造解析：G326S および Y257A について反応中間体アナログである DLASA との複合体の X 線結晶構造解析を行った。DLASA は反応中間体のルシフェリル AMP 中間体のルシフェリン部分をデヒドロルシフェリンに変更し、P-O 結合を S-N 結合に変化させた化合物である。従来は DLSA を利用して構造解析を行っていたが、このままでは条件によっては環化反応が生じ構造を保てない可能性が考えられた。そこで構造解析に適したより安定な物質として

DLASA を合成し、構造解析に使用した。(図 2)

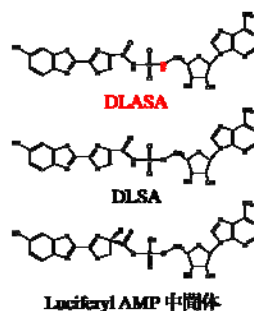


図 2、ルシフェリル AMP 中間体とそのアナログ

その結果、野生型:DLASA 複合体では Ile288 が発光体の方に移動していることが確認できたが、G326S, Y257A 変異体ではそのような移動は観測できなかった。さらに Ile288 の側鎖を観察したところ G326S では側鎖の一部が発光体に近づいているものの、Y257A では完全に離れていた。すなわち Tyr257 が Ala に変異すると Ile288 の向きが変わり、発光体からはさらに遠いところに位置するというのである。したがって Tyr257 は Ile288 を発光反応に適した向きに向かせるための働きがあるということが考えられた。また黄緑色の発光の時に生じた構造変化が見られなかったことから、スイッチングに重要なアミノ酸であることが示唆された。また発光量が非常に低下していることは、発光体を取り巻く空間が非常に大きいため、得られた発光のためのエネルギーを無駄に消費してしまったためと考えることができる。(図 3)

G326S 変異体が赤色発光であり、反応中間体状態で Ile288 が発光体のほうへ移動していないということは、これまでの研究で得られた S286N 赤色発光色変異体での結果と同じである。G326S 変異体は活性部位とは異なる領域でフレキシブルになっている領域が存在した。このように活性部位とは異なるところの変異であっても全体の立体構造の状態が変化することで、本来見られるはずのスイッチングが生じなくなり、赤色発光するのではと考えられた。(図 3)

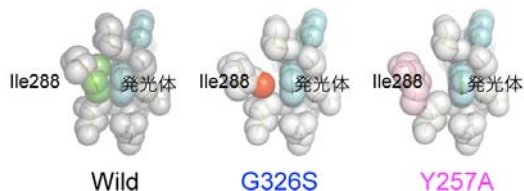


図 3、野生型、赤色発光変異体における活性部位の構造

(3) ルシフェリン再生酵素の立体構造：ホタルの発光は明滅を繰り返しながら長時間繰り返される。このことから発光反応によって生じたオキシルシフェリンがホタル体内でルシフェリンに変換されると考えられている。この反応を行っているのがルシフェリン再生酵素であり、ホタルによる発光の制御メカニズムの詳細を明らかにしていくためには本酵素の詳細を明らかにしていく必要がある。そこでアメリカホタル由来 LRE (pLRE) の立体構造を SIRAS 法により 1.4 Å 分解能で決定した。明らかになった立体構造は図 4 に示した通り 4 つの  $\beta$  ストランドを 1 つの羽として合計 6 枚の羽を持つ、6-bladed  $\beta$ -propeller 構造であった。本構造では中心部分に活性部位と考えられる溝があり、結晶化の際使用した MPD と活性に必須である  $Mg^{2+}$  イオンが配位していた。Mg は E18、N160、D212 および 3 つの水分子により 6 配位で結合しており、各原子との距離は約 2.0 Å であった。MPD が結合していた部分は疎水性残基で囲まれた領域であり、I158、F227 が挟み込むように存在していた。基質であるオキシルシフェリンは疎水性が高くオキシルシフェリンの結合サイトであることが示唆された。

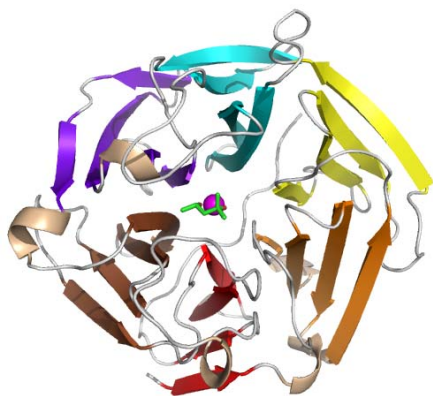


図 4、ルシフェリン再生酵素の立体構造

さらにヘイケボタル由来の LRE (HLRE) についても立体構造を決定した。そこで pLRE と HLRE の活性部位付近のアミノ酸の比較を行った。その結果、 $Mg^{2+}$  を認識している E18、N160、D212 の 3 つのアミノ酸残基は保存されていた。MPD の 10 Å 以内に存在する 7 つの疎水性アミノ酸残基については、疎水性は保たれているものの保存されているアミノ酸残基は 2 つであった。

LRE の立体構造は  $Ca^{2+}$  依存的に有機リン化合物の加水分解を触媒する酵素である DFPase と非常によく似ていた。そこで DFPase とその基質アナログである DcPPA との複合体の立体構造との比較を行った。その結果、Mg イオンと同じ位置に Ca イオンが結合しており、金属イオンの認識に関わる Glu、Asn、Asp

は保存されていた。そして DFPase の Ca イオンに対し DcPPA のホスホニル酸素が結合していることから、この金属の配位は、基質を結合させるために重要な役割であることが推察できた。この位置には pLRE では MPD が水を解して結合していた。以上のことから LRE における Mg イオンの配位は基質であるオキシルシフェリンの認識に非常に重要であることが示唆された。

そこで Mg の認識に関わっているアミノ酸残基について E18A、N160A、D212A、D212N の 4 種類の変異体を作成し、活性測定を行ったところ活性は消失した。このことからオキシルシフェリンの認識には Mg イオンを介した結合が重要であることが確認できた。また LRE の活性測定の際、Mg もしくは Ca を用いて活性測定を行ったところ、Mg イオンを用いたときにより高い活性を示し、LRE では Mg イオンが重要であることが判明した。

## 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 8 件)

(1) 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, Vol. 66, 2010, p319-323、査読有

(2) 中津亨、高機能化ホタル・ルシフェラーゼ創製に向けて、日本結晶学会誌、Vol. 52、No. 1、2010、p81-88、査読無

(3) Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, Ohno H, Nakano H, Nakatsu T, Kato H, Izumi K, Kodama E, Matsuoka M, Kitaura K, Oishi S, Fujii N. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. J Mol Biol. Vol. 392, 2009, p657-665、査読有

(4) Sato T, Kodan A, Kimura Y, Ueda K, Nakatsu T, Kato H. Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein. FEBS J. Vol. 276, 2009, p3504-3516、査読有

(5) 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, Vol. 456, 2008, p520-523、査読有

(6) 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. Vol.130, 2008, p12880-12881、査読有

(7) Nakahata Y, Yoshida M, Takano A, Soma H, Yamamoto T, Yasuda A, Nakatsu T, Takumi T. A direct repeat of E-box-like elements is required for cell-autonomous circadian rhythm of clock genes, BMC Mol Biol. 2008, 1, 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

(1) 寺角香菜子、中津亨、ホタル・ルシフェラーゼによる  $\pi$  空間制御機構、日本生物物理学会、2009 年 10 月 30 日、アスティ徳島

(2) 加藤 太一郎、宮永 佳奈、番匠 亜沙美、中津 亨、武尾 正弘、根来 誠司、ホタルルシフェラーゼは基質の不斉をどのように見分けているのか? 日本生物工学会、2009 年 9 月 24 日、名古屋大学

(3) 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 2009 年度大会、2009 年 3 月 28 日、福岡国際会議場

(4) 奥田智彦、五味恵子、梶山直樹、加藤博章、中津亨、ルシフェリン再生酵素の X 線結晶構造解析、日本薬学会、2009 年 3 月 26 日、国立京都国際会館

(5) 中津亨、ゲンジボタル・ルシフェラーゼの発光反応および発光色制御機構の構造基盤、酵素工学会、2008 年 4 月 25 日、京都テルサ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中津 亨 (NAKATSU TORU)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：50293949

### (2) 研究分担者

平竹 潤 (HIRATAKE JUN)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：80199075

加藤 太一郎 (KATO TAIICHIROU)

兵庫県立大学・工学研究科・助教

研究者番号：60423901

木村 泰久 (KIMURA YASUHISA)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10415143

(H20→H21：連携研究者)