

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659021

研究課題名（和文） 眠らないルシフェラーゼを創る

研究課題名（英文） Creation of a high efficient 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

研究成果の概要（和文）：ホタルのルシフェラーゼによる黄緑色の発光は様々なアプリケーションに利用されている。しかしながら生成物阻害のために反応が長時間続かない。そこで生成物阻害を引き起こしている原因を探るために生成物阻害が弱まった H247A 変異体を作成した。この変異体の構造解析を行ったところ、N 末ドメインと C 末ドメインの相互作用が弱まっており、活性部位が広がりやすくなり、これが生成物阻害の減少につながったと推察できた。

研究成果の概要（英文）：The emission reaction is inhibited by the emission reaction by the product inhibition caused by the production of oxyluciferin in firefly luciferase. In order to understand the mechanism of the product inhibition, I determine the crystal structure of H247A mutant which decreases the degree of the product inhibition. The crystal structure shows that the interaction of between N- and C- terminal domain is weakened by the structural change. Because the active site might open easily, it is difficult to occur the product inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学・構造生物学

キーワード：生物発光

1. 研究開始当初の背景

ホタルによる黄緑色の発光反応は、ルシフェラーゼを酵素触媒として利用し2段階の過程で進行する。しかしながら、生成物として生じたオキシルシフェリンにより発光が阻害され、発光反応が持続しないという現象が知られている。このルシフェラーゼによる発光反応はがんの転移過程を追跡する分子イメージング、食物に微量に含まれる微生物が持っている ATP 量を測定することによる微生物検査など、幅広く用いられている。ルシフェラーゼによる発光は量子収率が高いため、非常に感度良く測定できる反面、生成物阻害により、発光が短

時間で終了してしまう欠点を有している。このような観点から発光を持続させることができる GFP を用いた蛍光測定が幅広く用いられてきた。しかしながら GFP の蛍光法では、試料にはよりエネルギーが高い異なる色の光を当て続けなければならない。そのため浴びせられた光によって試料がダメージをうける、試料に含まれている目的物以外のものによる蛍光も観測される、といった問題点が明らかとなっている。このような観点からルシフェラーゼの発光反応が今一度見直されている。そこでルシフェラーゼがもつ生成物阻害が生じないルシフェラーゼが求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は生化学、分子生物学の研究や検査のツールとして利用されているホタル由来のルシフェラーゼによる発光反応をより高機能化することを目的としている。

ルシフェラーゼによる発光は短時間で急激に減衰してしまうという欠点を有している。これは反応により得られたオキシルシフェリンが生成物阻害を引き起こすために生じると考えられている。そこで様々なアミノ酸変異体を作成することで、発光が持続するようなルシフェラーゼを作成し、その生成物阻害解除を引き起こしたルシフェラーゼと類似の立体構造をしているアセチル CoA 合成酵素と構造比較することなどから、生成物阻害の原因を追及し、発光持続可能なルシフェラーゼを新しく創成しようというものである。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸変異体ルシフェラーゼの発現

精製：ルシフェラーゼの活性部位近傍におけるアミノ酸に着目し、1アミノ酸変異体を作成し、生成物阻害を解除するルシフェラーゼの検索を行った。そこで野生型としてはゲンジボタルルシフェラーゼの耐熱性変異体 (T217I) の N 末端 6 残基を除去したものを使用した。まず野生型を pColdI ベクターの Factor Xa 切断サイトを TEV protease 切断サイトに変更したものに対して組み込んだ。変異体の作成は部位特異的変異導入により行った。各種変異体の作成は野生型ベクターに対する部位特異的変異導入により行った。発現は発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し発現させた。培養は 37 度、180rpm の条件で行った。OD600 が 0.8 を示した際、培養温度を 18 度に下げ、IPTG を加えた後、20 時間培養した。得られた菌体を超音波破碎し、可溶性画分を回収した。このように得られた各変異体の活性評価を行った。評価の方法としては野生型に比べ比活性の著しい低下が見られず、初期の発光強度が抑えられているものを候補として選んだ。

(2) 発光スペクトル測定：分光蛍光光度計 RF-5300PC (島津製作所) により発光スペクトルを測定した。WT および H247A の結晶化用サンプルを用いたタンパク溶液 (1 mg/mL luciferase, 20 mM HEPES pH 7.5, 5% glycerol, 1 mM DTT) 40 μ L と基質溶液 (2.5 mM D-luciferin, 2 mM ATP, 16 mM MgCl₂) 60 μ L を混合し、励起光を照射せずに、20°C 下で測定した。

(3) ルミノメーター LB941 (BERTHOLD) により活性測定を行った。光子数の時間推移は、タ

ンパク溶液 ((WT : 100 ng/mL, H247A : 460 ng/mL) luciferase, 50 mM HEPES pH 7.5, 5% glycerol, 1% BSA, 2mM DTT, 400 μ M D-luciferin) 100 μ L と基質溶液 (50 mM HEPES pH 7.5, 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂) 100 μ L を混合し、測定した。相対的に評価するために H247A の値を 1/4.6 にして比較した。ルシフェリンの Km は、上記のタンパク溶液中で (0-800 μ M D-luciferin) と濃度を 12 点振り、ATP の Km は、上記のタンパク溶液中でルシフェリンの代わりに (0-2000 μ M ATP) と濃度を 12 点振り、さらに基質溶液の ATP を (1 mM D-luciferin) に代えて、それぞれ 3 回独立に測定した。

(4) X線結晶構造解析：ルシフェリン AMP 中間体のアナログである DLASA と H247A の共結晶化を行った。タンパク質溶液 (15 mg/mL luciferase, 1 mM DLASA, 16 mM MgCl₂, 5mM DTT) と、リザーバー溶液 (0.1 M Tris-Cl pH 7.5, 0.2 M LiCl, 18-23% PEG4000) を調製し、Sitting-drop 蒸気拡散法により 20°C の条件下で結晶化を行った。ドロップ作成 1 時間後、予め取得したルシフェラーゼ結晶をホモジナイズして 25% PEG4000 のリザーバー溶液で 1 万倍に希釈し、ドロップに 2 μ L 添加し、seeding を行った。X 線回折実験は SPring-8 BL38B1 にて行った。測定条件は、測定波長 1 \AA 、検出器 Q315 (ADSC)、カメラ長 213 mm、露光時間 5 秒、振動角 0.2 ° にておこなった。スクーリングには CrystalClear (Rigaku) を用いて行った。ルシフェラーゼの野生型構造を用いて分子置換を行い、得られた位相情報をもとに ARP/wARP による自動モデル構築を行った。その後、COOT によるモデル修正と Refmac5 による精密化を繰り返し行った。

CoA 複合体結晶の X線結晶構造解析を行うために次の 6 種類の複合体 (CoA 複合体、CoA-DLASA 複合体、CoA-オキシルシフェリン-AMP 複合体、CoA-ATP 複合体、CoA-AMP 複合体、CoA-デヒドロルシフェリン-ATP 複合体) について結晶化を行い、構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 63 種類のルシフェラーゼの変異体を作成した。大腸菌により発現させた菌体の可溶性画分を調製し発光強度の測定を行った。活性測定の結果から比活性とピーク強度/20 秒後の強度を計算し、野生型と比較した。比活性が著しく低下しておらず発光強度の減衰が抑制された傾向がある 12 種類の変異体 (S200A, S201A, S203A, T204A, L206A, H247A, Q450A, Q450N, Q450R, V451A, E455A, V508A) を見いだした。以上の変異体について精製し酵素活性を野生型に対して比較したところ、発光ピーク強度が弱い場合、初期の発光が抑

制された変異体であることがわかった。ここで見つかったアミノ酸の位置はN末端ドメインとC末端ドメインが会合するあたりに位置していた。しかしいずれも強い結合を作っているところではなかった。反応によって得られたオキシルシフェリンが酵素中から抜けていくためには反応を起こしている時から構造変化を起こさなくてはならない。したがってこれらの変異体の結果は構造変化が生じやすくN末端ドメイン、C末端ドメイン間の結合に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

(2)そこで H247A 変異体に着目した。活性測定を行ったところ Fig. 1 のような発光スペクトルが得られ、野生型に比べ初期の発光強度が抑えられている変異体であった。ピーク値は野生型の約 20%であった。野生型と H247A 変異体の V_{max}/K_m を比較したところ、ルシフェリンにおいては H247A は野生型の 0.7 倍、ATP については同じであった。また H247A の発光スペクトルを測定したところ、最大発光波長は 606nm であり、赤色発光であることがわかった。

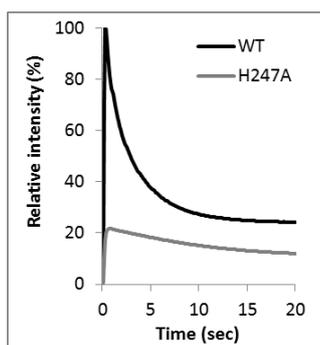


Fig1. 野生型および H247 変異体の時間依存的な発光スペクトル

H247A 変異体と Luciferyl-AMP 中間体のアナログである DLASA との結晶は沈殿剤として PEG4000 を用いることにより得られた。得られた結晶を SPring-8 の BL38B1 にて X線回折実験を行い、1.6 Å 分解能までの X線回折強度データを収集した。構造決定は野生型のルシフェラーゼの構造に基づく分子置換法により決定した。Refmac5 により精密化を行ったところ、 R_{work} および R_{free} 値はそれぞれ 0.222、0.250 となった。決定した立体構造を野生型と比較したところ、N、C 末端ドメインの関係が少し異なっていた。野生型では His247 は N 末端ドメインの Ser201 と水素結合可能な位置に存在し、この Ser201 は C 末端ドメインの Lys531 と水素結合していると考えられた。一方 H247A 変異体ではこの Ser201 との結合がなくなり、Ser201 と Lys531 と結合も観測されなかった。すなわち His247 は Ser201 の位

置を決めるために重要な残基であることから、N 末端ドメインと C 末端ドメインの相互作用に重要な残基であることが考えられた。Ser201 が位置するループ部分は H247 変異体では β シートを形成していた。このループ部分は複合体の種類によっては電子密度が観測されない。このときであっても N 末端ドメインと C 末端ドメインの位置関係は大きくは変化しない。このことから His247 は C 末端ドメインの位置を決定するためにも重要であることが推定される。H247A 変異体では Lys531 が位置するループ部分が N 末端ドメインの方に入りこんだ構造になっている。これは His247 が Ala に変わっていることと、Ser201 のループ部分が β シート構造をとったことにより、この部分の空間が大きくあいたためである。したがって His247 は N、C 末端ドメインの間の相互作用に重要な残基であることが示唆された。そして生成物阻害が減少した原因は N、C 末端ドメインの相互作用が弱まったことが原因であると推察された。

H247A 変異体の活性は野生型とそれほど変わらない値であった。しかしながら発光色は赤色に変化していた。発光色変化において Ile288 の動きが重要であると考えている。これまでの解析から黄緑色に発光するルシフェラーゼは Ile288 が発光体であるオキシルシフェリンの方に動いているが、赤色に発光するルシフェラーゼ変異体では動かないという知見を得ている。H247A 変異体では構造解析の結果からこの Ile288 は動いておらず、これまでの結果と一致するところであった。

(3) ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応において CoA の添加により発光を持続させることができることが知られている。しかしながら CoA がどのように働いてこのような現象が生じるかは明らかではない。そこで CoA とルシフェラーゼの複合体結晶構造解析から、CoA の作用機序を明らかにしようと、CoA と様々なリガンドの組み合わせで結晶化を行った。リガンドとして CoA のみを添加したときは良好な結晶は得られなかった。リガンドとして、CoA と ATP およびルシフェリンのアナログであるデヒドロルシフェリンを使用したものについては、沈殿剤に PEG3350, MgFormate を使用したときに、格子定数、空間群が野生型と比べて変化した結晶が得られた。構造解析を行い、電子密度を確認したものの、活性部位にデヒドロルシフェリンが結合している電子密度しか示さず、CoA を示す電子密度は得られなかった。残りの 4 種類のリガンドの組合せについては野生型と同型の結晶が得られた。構造解析をおこなったものの、CoA に相当する電子密度は観測できなかった。

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 2 件)

(1) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of two eukaryotic fructosyl peptide oxidases. Ichiyanagi A, Hirokawa K, Gomi K, Nakatsu T, Kato H, Kajiyama N. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. (2013) 69(Pt 2):130-3. 査読有 doi: 10.1107/S1744309112051445.

(2) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Pz peptidase B from Geobacillus collagenovorans MO-1.

Nakano H, Hosokawa A, Tagawa R, Inaka K, Ohta K, Nakatsu T, Kato H, Watanabe K.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. (2012) 68(Pt 7):757-9. 査読有 doi: 10.1107/S1744309112018969.

〔学会発表〕(計 10 件)

(1) Kanako Terakado, Panče Naumov, Keiko Gomi, Naoki Kajiyama, Hideyuki Ikeuchi, Jun Hiratake, Hiroaki Kato and Toru Nakatsu The role of hydrogen bonding network around oxyluciferin binding region in firefly luciferase bioluminescence. Nagoya symposium - Frontiers in Structural Physiology 2013/1/22-24 Nagoya University, Nagoya, Japan

(2) 寺角 香菜子, Naumov Panche, 五味 恵子, 梶山 直樹, 加藤 博章, 中津 亨 ホタル由来ルシフェラーゼのオキシルシフェリンアナログ複合体の高分解能 X 線結晶構造解析 日本生化学会 2012 年度年会 2012/12/14-16 マリンメッセ福岡 (福岡県)

(3) 中津 亨 多剤排出型 ABC トランスポーターの立体構造と薬物排出メカニズム 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2012/11/15-16 京都大学 (京都市)

(4) Kanako Terakado, Ryosuke Yoshimune, Keiko Gomi, Naoki Kajiyama, Hideyuki Ikeuchi, Jun Hiratake, Hiroaki Kato and Toru Nakatsu. Structural basis for color modulation mechanism of firefly luciferase bioluminescence 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2012/5/28-6/2 Guelph Ontario, Canada

(5) 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 ケンシホタルルシフェラーゼの発光色制御メカニズムの解明 日本結晶学会 2011 年度年会 2011/11/24-25 北海道大学 (札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

(1) 寺角 香菜子、中津 亨 シーエムシー出版、生体 π 空間の制御機構の解明と新機能開発 - ホタルルシフェラーゼによる π 空間制御機構 - 2013 年 223-228

6. 研究組織

(1) 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