

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）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：新学術領域研究（研究領域提案型）

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は 1 アミノ酸置換により発光色に変化する。Tyr257, Asn231, Arg220 変異体を作成し、構造解析を行い、野生型と比較した。その結果、Tyr257 変異体では発光体の疎水性相互作用が弱くなっていた。また Asn231 変異体、Arg220 変異体ではオキシルシフェリンの水素結合ネットワークが乱れていた。以上のことからいずれの構造においても励起状態のオキシルシフェリンに対し、エネルギーロスを引き起こし、その結果として赤色発光すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Firefly luciferase catalyzes the emission of yellow-green light and the emission color changes to red by the substitution of an amino acid. We determine the Tyr257, Asn231 and Arg220 mutants. Tyr257 mutants decreased the hydrophobic interaction in the active site. Asn231 and Arg220 mutants broak the hydrogen-bonding network of oxyluciferin binding region. In the result, it is supposed that the change of the emission color is caused by the energy loss of the excited oxyluciferin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	24,200,000	7,260,000	31,460,000

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：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、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、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2つのなぞがある。それは(1)発光の量子収率が約40%と、非常に発光効率が良い。(2)酵素ルシフェラーゼがわずかに1アミノ酸置換しただけでも、発光色が黄緑色から赤色方向に劇的に変化する。という事実である。特に、基質ルシフェリンは共通でも、酵素の変異により発光色が劇的に変化する事実は、発光色が酵素によって一義的に制御されていることを示している。発

光色変化に関しては、発光基質（ルシフェリン）や発光体（オキシルシフェリン）の誘導体の合成化学的なアプローチ（White, E.H. J. *Am. Chem. Soc.*, 91, 2178, 1969）や量子化学計算（McCapra, F. in *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 387, 1994）、ルシフェラーゼのアミノ酸変異によるスペクトル解析（Branchini, B.R. *Biochemistry*, 43, 7255, 2004）が行われてきたが、いずれも発光体であるオキシルシフェリンの状態変化のみを考慮したものであった。

そこで黄緑色に発光する野生型と赤色に発光する S286N 変異体の 2 種類のゲンジボタルのルシフェラーゼを使い、その中間体アナログ阻害剤（DLASA）との複合体結晶および発光終了後のオキシルシフェリンとの複合体の X 線結晶構造解析を行うことにより、ルシフェラーゼがどのようにして発光色を制御しているのかを、明らかにした。発光体付近にある 288 番目の Ile 残基が野生型では発光体の方に大きく動き、オキシルシフェリンを非常に疎水的な環境に密に取り囲む構造をつくり、S286N 赤色発光変異体ではその動きは観測されず、取り囲み方が緩くなっていた。すなわち、よりエネルギーの高い黄緑色の発光を行う野生型酵素では、励起状態のオキシルシフェリンを Ile288 の側鎖がしっかりと固定し、熱振動によるエネルギー損失を防いでいるのに対し、赤色発光の変異体では捕まえ方が緩いため励起エネルギーの損失を招いていることが、発光色変化の原因であることが明らかとなった。しかしながらこの観点だけで発光色変化を説明することは不可能であり、他にも発光色を制御する機構は存在するものと考えられる。

2. 研究の目的

ホタルのルシフェラーゼによって生じる発光の発光色変化は、ルシフェラーゼと発光体のオキシルシフェリンの π 空間内でのわずかな構造的なゆがみの違いがその原因であると考えられる。また発光の量子収率が非常に高い原因もルシフェラーゼとルシフェリンの π 空間内での非常に密に結合したその結合状態にあると考えられる。そこでゲンジボタルの各種発光色変異体を作成し、発光スペクトルを測定し発光特性を調べる。そして発光色変異体に対して発光直前を模したアナログとの複合体の立体構造を原子分解能で決定する。得られた立体構造を構造比較することによりそれぞれの変異体で発光色を決定している要因を探る。

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

ーとヒ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、ヒ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ルミノメーター：TriStar LB941 を使い 20 秒間の発光量の積算を測定した。測定は 50 ng/mL luciferase (in 20 mM HEPES pH 7.5, 5% (v/v) glycerol and 10% BSA) 0.25mM D-luciferin, 5mM ATP, 10mM MgCl₂ の条件で行った。発光スペクトルの測定はスペクトロメーター：MCPD-7000 を用いた。測定は 1-5mg/mL, 5mM luciferin, 2mM ATP, 10mM MgCl₂, 50mM Tris-HCl (pH7.5) の条件で行った。

(3) ゲンジボタル・ルシフェラーゼの X 線回折実験：野生型、Tyr257 変異体、Asn231 変異体、Arg220 変異体のそれぞれの結晶について SPring-8 のビームライン BL41XU、BL38B1 において X 線回折実験を行った。

4. 研究成果

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野生型における詳細な立体構造と発光色が異なる発光色変異体の構造の違いから発光色制御を行っている構造的な基盤を明らかにしていく必要がある。そこでこれまでに構造解析を行った野生型と発光中間体アナログおよび発光反応終了後の構造解析では、発光体付近の水分子を示す電子密度が十分ではなかった。そこでこれまでに使用した中間体アナログをより安定化した DLASA 中間体に変更し、野生型と中間体アナログとの構造決定を行った。その結果、ベンゾチアゾール基の 5 位の酸素に結合している水分子を含め、5 つの水分子と Asn231、Tyr257、Arg339 により水素結合ネットワークが形成されていることが判明した。また発光前後の立体構造と比較すると Ile288 が発光体の方向へ移動していることが観測できた。そこで Asn231、Tyr257、Arg339 について 1 アミノ酸置換を行い、発光色と立体構造の違いを検討した。

Tyr257 の変異体は Y257F、Y257A、Y257R、Y257D 変異体を作成し、DLASA 複合体の立

体構造を決定した。Tyr257の変異体ではいずれにおいても野生型で観測された Ile288 の発光体方向への移動は観測されなかった。野生型において Tyr257 の OH 基は水分子を介して Ser286 と結合している。したがって、Phe, Ala ではこの水素結合が形成できず、また Arg, Glu においては違った位置で水素結合が生じており、同じような構造にはならなかった。したがって、野生型における Tyr257 は Ile288, Ser286 が形成している β ストランドの動きを調節していることが推測された。また Y257F 変異体では発光のピーク波長が 560nm から 570nm に移動していた。すなわち変異により構造変化が起こりにくくなり、発光色に変化したと考えられた。また Y257A 変異体では発光のピーク波長は 610nm とさらに赤色側へ変化していた。Ile288 や水分子を含めた水素結合ネットワークは Y257F 変異体と同じであった。Tyr257 は発光体の部分から約 8Å 離れており、直接発光体との結合は観測できない。したがって、蛋白質分子内部でのフェニル基の消失は活性部位を構成するアミノ酸の flexibility を増大に影響すると考えられた。このことから、発光体の rigidity に影響し、励起状態のオキシルシフェリンのエネルギーロスを生じさせ、発光色が赤色へ変化する可能性が考えられた。

Y257R, Y257E の発光波長は 585nm, 610nm であった。また通常野生型では測定 pH が酸性側に変化させると赤色発光に変化するが、Y257R では測定 pH を酸性側にしても発光色に変化は見られなかった。オキシルシフェリンのフェニル基の酸素と水、そして Arg257 が水素結合により結合していた。野生型ではオキシルシフェリンと結合している水はさらにもう 1 つ水を介して、Arg220 と水素結合している。すなわち、Arg257 にすることによりオキシルシフェリンと結合する水の位置が変わり、また距離も水素結合 1 つ分短くなり、より強い結合ができていると考えられた。このことから、pH による環境の変化に対しオキシルシフェリンの状態が変わりにくく、pH に対する耐性が出てきたと考えられた。一方 Glu257 では Arg220 と結合している水に対し Glu257 が結合しており、オキシルシフェリンに対するプロトン供与性が弱まっている。したがって、オキシルシフェリンのフェニル基におけるイオン化の蛍光が弱くなっていると考えられ、そのため発光色が赤色へ変化しているものと考えられた。

次に N231A, N231D を作成し、発光スペクトルを測定したところ、驚いたことに何れも約 590nm に発光最大波長が存在した。アミノ酸の性質が全く異なる 2 つの変異体がほぼ同じ最大発光波長を示したことは、アミノ酸の性質が発光色に影響を与えるというより

はむしろ蛋白質内部に生じている構造的な特徴が発光色に関与していると考えられた。野生型の DLASA 複合体と Asn231 変異体の DLASA 複合体の立体構造構造を比較してみたところ、Ile288 の活性部位付近への動きはいずれも同じように観測された。すなわち Asn231 変異体は赤色発光する変異体の中ではじめて Ile288 の動きが観測されたものである。Asn231 変異体が野生型の構造と最も違っているのは、野生型で観測された水を含んだオキシルシフェリンまわりの水素結合ネットワークがおかしくなっていたことである。N231A では Ala に変異したことで水との水素結合ができなくなり Asn231 と結合していた水は観測されなかった。また N231D においても水を介した水素結合ネットワークが崩れていた。しかし Arg220 とオキシルシフェリンの間の 2 つの水分子は同じ位置で水素結合に関与していた。このことから、水素結合ネットワークも発光色に関与していると推測できた。したがってこの位置の発光色変化は電荷の違いというよりもむしろ発光する際の構造的な違いにより発光色が決定されると考えられた。この水素結合により野生型では発光体の rigidity の増大が図られ、黄緑色発光できる状態を作っていると考えられた。

R220A 変異体の発光スペクトルは Asn231 変異体とほぼ同様であった。R220A では Arg220 と結合していた 2 つの水分子は少し位置は変更しているものの、保存されていた。しかしながらこの水の位置が変化したことにより、Asn231 と水の水素結合ネットワークができなくなっていた。Ile288 は動いていたことから発光色に影響を及ぼしているのは水素結合ネットワークと考えられた。R220A 変異体はルシフェリンに対する K_m が約 40 倍になり、 V_{max} も 1/50 程度にまで低下していた。これは Arg220 がルシフェリンのベンゾチアゾール基の認識に非常に重要であることを意味している。一方 Asn231 変異体では活性に大きな影響はなく発光色にのみ影響する変異であった。

Tyr257 変異体では励起状態のオキシルシフェリンの取り囲み方が弱いためエネルギー損失が生じると考えられた。また Asn231, Arg220 変異体では励起状態のオキシルシフェリンの水素結合ネットワークが乱れていることから、エネルギー損失が生じると示唆された。いずれの変異体において、発光色が赤色のほうへシフトするのは、励起状態のオキシルシフェリンのエネルギー損失により生じると考えられた。

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 10 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.

(3) 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 doi: 10.1038/emboj.2010.293.

(4) 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 doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07072.x.

(5) 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

(6) 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 doi: 10.1038/nature07546.

(7) 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 doi: 10.1021/ja8052464.

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 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)

(2) 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

(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 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)

(4) 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)

(5) 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)

(6) 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)

(7) 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)

(8) 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)

〔図書〕(計 2 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

(2) 中津 亨 日本結晶学会 高機能化ホタル・ルシフェラーゼ創製に向けて 2010 年 81 -- 88

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