



酵素ルシフェラーゼの性質について

本研究は日本農芸化学会 2013 年度大会 (開催地: 東北大学) での「ジュニア農芸化学会」において発表された。ルシフェラーゼとルシフェリンの酵素反応について温度と pH の変化との関係を調べ、ルシフェラーゼの熱安定性を明らかにしたほか、発光色の変化について、文献をあたって詳細な考察を行っている。



本研究の目的, 方法および結果

【目的】 ホタルのルシフェラーゼとルシフェリンによる発光反応は、酵素反応の例として広く用いられている。高校の夏休みの理科講座でホタルルシフェラーゼを用いた実験を行った際、発光色などが反応条件によって変化することを知り、それらがなぜ起こるのかなどいくつか疑問点が生じた。そこでさまざまな反応条件を整えて詳しく調べてみることにした。

【方法】 ホタルルシフェリンとルシフェラーゼとして、ホタライト (キッコーマンバイオケミファ) を用いた。A 液がルシフェラーゼ, B 液がルシフェリンと ATP を含んでいる。

実験 1: 温度による発光の変化。A 液と B 液を 1 mL ずつ混合し、10 ~ 60℃ まで 10℃ 間隔で 5 分間保温し発光の有無・程度を確認した。その後各試験管に A 液を追加し、常温で発光を再度確認した。酵素と基質それぞれの温度に対する変化を観察するときは、混合前に上記と同様に保温した後に常温に戻し、もう一方の液を加え、発光を観察した。

実験 2: pH による発光の変化。A 液と B 液を 1 mL ずつ混合し、40℃ に保温して、発光を確認した後、HCl または NaOH 水溶液 (0.1 mol/L) で pH を 3 ~ 12 に調整し、発光の有無・程度を観察した。酵素と基質の pH による

変化を別々に調べる場合は、どちらかの液を 0.5 mL ずつ採り、HCl 水溶液 (0.1 mol/L) を 25 ~ 75 μ L, NaOH 水溶液 (0.1 mol/L) を 25 ~ 75 μ L まで 25 μ L の幅で加えた後、0.5 mL のもう一方の液を加えた。各試験管の発光の有無・程度を確認した後、各試験管に入れた薬品を中和させるため等量の HCl または NaOH 水溶液を加え、各試験管の発光の有無・程度を確認した。

【結果と考察】

実験 1: A 液と B 液を 1 mL ずつ混合し、10 ~ 60℃ まで 10℃ 間隔で 5 分間保温し、発光の有無・程度を確認した。その結果、40℃ で最も強い発光が観察された。また、高温で保温すると発光色が暖色系になり、60℃ では発光は観察されなかった (図 1A)。その後各試験管に A 液を加えたところ、発光が弱かった 50℃, 60℃ のサンプルにおいて再び発光が観察された (図 1B)。これは、高温下でルシフェラーゼが失活し、残存していたルシフェリンと新たに加えたルシフェラーゼが反応したためと考えられた。これを確認するため、A 液を各温度で 5 分間保温後、常温にして B 液を加えた。その結果、60℃, 5 分でルシフェラーゼが失活することが確認された (図 2A)。またこのとき 50℃ で保温後の発光色の変化が見られなかったことから、ルシフェラーゼは 50℃ では不可逆的に変化せず、常温に戻すことで元どおりに反応することが示唆された。一方、B 液を各温度で 5 分間保温後、常温にして A 液を加えたところ発光の変化は見られなかったことから、ルシフェリンは 60℃ では不活化しないことが示された (図 2B)。以上のことから、50℃ ではタンパク質分子の構造が可逆的に変化していると考えられた。

実験 2: 反応の至適 pH を調べるため、A 液と B 液を混合した後に pH を調整して発光を観察した。その結果、

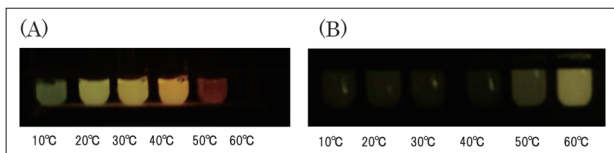


図1 ■ 温度変化による発光反応の変化

(A) 異なる温度下での発光, (B) (A) の後に酵素を添加したときの反応。

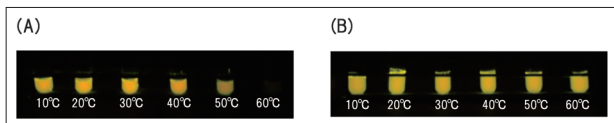


図2 ■ 温度による反応の変化

(A) A液 (ルシフェラーゼ) を各温度で保温後, B液 (ルシフェリン) と混合した際の反応の様子. (B) B液 (ルシフェリン) を各温度で保温後, A液 (ルシフェラーゼ) と混合した際の反応の様子。

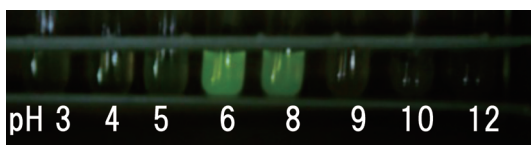


図3 ■ pHの変化による発光の様子

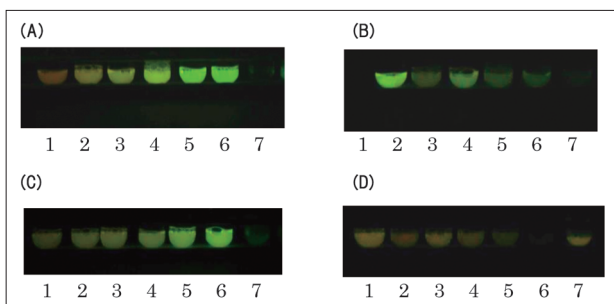


図4 ■ A液 (ルシフェラーゼ) およびB液 (ルシフェリン) の pHの変化による発光の様子

(A) A液のpHを変化させた後, B液と混合した. それぞれのサンプルで最初に加えた試薬と量, pHの測定値は以下のとおり. 1; 0.1 M HCl 75 μ L (pH 6.5), 2; 0.1 M HCl 50 μ L (pH 7.0), 3; 0.1 M HCl 25 μ L (pH 7.1), 4; 添加なし (pH 7.8), 5; 0.1 M NaOH 25 μ L (pH 7.8), 6; 0.1 M NaOH 50 μ L (pH 8.2), 7; 0.1 M NaOH 75 μ L (pH 9.8). (B) (A) の反応液を中和させた後の発光. (C) B液のpHを変化させた後, A液と混合した. それぞれのサンプルで最初に加えた試薬と量, pHの測定値は以下のとおり. 1; 0.1 M HCl 75 μ L (pH 7.1), 2; 0.1 M HCl 50 μ L (pH 7.0), 3; 0.1 M HCl 25 μ L (pH 7.1), 4; 何も加えず (pH 7.8), 5; 0.1 M NaOH 25 μ L (pH 8.1), 6; 0.1 M NaOH 50 μ L (pH 8.4), 7; 0.1 M NaOH 75 μ L (pH 9.0). (D) (C) の反応液を中和させた後の発光。

発光反応の至適pHが8付近であることが明らかとなった (図3). 酵素と基質それぞれの至適pHを調べるため, A液またはB液のpHを変化させた後にもう一方の液と混合し, 発光を観察した, その結果, 酵素はpH 8.2と9.8の間で失活することが明らかとなった (図4).

ホタルのルシフェリンの発光は以下の二段階から成り立っている^(1,2).

①ルシフェリル AMP 中間体が生成され, その酸化により励起状態のオキシルシフェリンが生成される。

②励起状態のオキシルシフェリンが, 基底状態に戻るときに光エネルギーを放出し, 発光する。

オキシルシフェリンの蛍光は赤色であるが, ルシフェラーゼが②の段階においてオキシルシフェリンと結合することで波長の短い黄緑色の光が放出される^(1,2). ②の段階においてルシフェラーゼのイソロイシン 288がオキシルシフェリンのほうに動き, オキシルシフェリンとルシフェラーゼとの間に疎水的な構造をとる. これによってオキシルシフェリンのもつ化学エネルギーが保持され, 光エネルギーへの変換の際に振動(熱)として放出されにくくなり, エネルギーの高い(波長の短い)黄緑色の光が放出される. このイソロイシン 288を分子量の小さいアミノ酸に置換すると, エネルギーの保持力が弱くなりエネルギーの低い(波長の長い)暖色系の光が放出される⁽¹⁾. つまり, ルシフェラーゼのルシフェリン結合部位の微細な構造の変化によって発光色が決定される. 図2Bにおいて発光色の変化がなかったことから, ルシフェリン自体は60°C程度の熱では変性しないものと考えられる. 本実験で見られた発光色の変化は熱の変化(図1, 2)やpHの変化(図3, 4)によってルシフェラーゼの全体的な立体構造が変性しない程度にわずかに変化した化学エネルギーの変換効率が悪くなることで, 波長の長い光が放出されるようになるためだと考えられる. また, オキシルシフェリン自体の発光色が赤色であることから, 発光色の変化は酵素を構成するタンパク質が変性したことによって, オキシルシフェリンとの関係が弱くなり, より本来の発光色に近づいた可能性も考えられる。



本研究の意義と展望

ホタルルシフェリンとルシフェラーゼを用いた発光の観察実験を端緒とし, 酵素の至適温度, 至適pHといった酵素反応の基礎的なデータについて, 実験系を丁寧に設計し, 調べている. 設備の関係もあり, 発光色の発光スペクトル変化については詳細に調べることは困難であるが, インターネットを用いて文献などの情報を探し出して調べ考察するなど, 興味をもった題材に対して真剣に向き合っている姿勢に感銘を受けた発表であった。

文献

- 1) SPring-8が明かすホタルが発光するしくみ, http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/research_highlights/no_26/
- 2) 加藤博章, 中津 亨, 京都大学低温物質科学研究センター誌, 11, 44 (2007).

(文責「化学と生物」編集委員)