



Title	STUDIES ON LUCIFERASE FROM PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM
Author(s)	Yoshida, Kenzaburo
Citation	大阪大学, 1974, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2529">https://hdl.handle.net/11094/2529</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

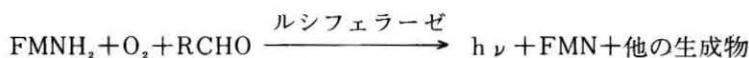
The University of Osaka

## 【21】

氏名・(本籍)	よし だ けん さぶろう 吉 田 賢 三 郎
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	第 3053 号
学位授与の日付	昭和49年3月25日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	発光細菌ルシフェラーゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 殿村 雄治 (副査) 教授 浜口 浩三 教授 佐藤 了 助教授 中村 隆雄

## 論文内容の要旨

生物発光はルシフェラーゼとよばれる特異的な働きをもった酵素の触媒作用によるものであり、その酵素反応における効率のよい化学エネルギーから光エネルギーへの変換機構に興味がもたれている。代表的な発光生物の一つである発光細菌のルシフェラーゼは次の反応を触媒して発光することが知られている。



ここで、RCHOは長鎖脂肪族アルデヒドを示す。

以前、Hastings と Gibson は Ph. fischeri より得た crude なルシフェラーゼ標品を用いて、この反応途中に寿命の長い中間体（“long lived-intermediate”）を含む少くとも 3 つの中間体の存在することを予想した。しかしながら、これら中間体の性質や速度論的な解析等についてはあまり知られていない。そこで、これらの点を明らかにするため本研究においてまず発光細菌 Ph. phosphoreum よりルシフェラーゼを抽出精製し、次いでこのルシフェラーゼを用いた発光反応中間体の解析を行い以下の結果を得た。

(1) 細菌ルシフェラーゼの精製と性質

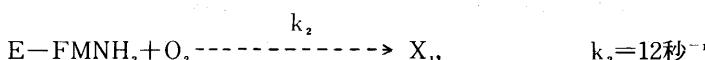
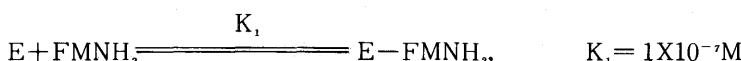
通気培養を行い大量に得た菌体から浸透圧ショックでルシフェラーゼ活性液を抽出した後、カルシウムゲル吸着、硫安分画（40–75% 飽和）及び DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーを用いてルシフェラーゼを精製した。得られた標品はセファデックス (G-100) によるゲル沪過、超遠心 ( $S_{20,w} = 5.5 S$ ) 及び電気泳動よりみて均一であった。浸透圧測定より求めた分子量は 82,000 で、SDS ポリアクリルアミド電気泳動では分子量が 42,000 と 38,000 の 2 本のバンドのみが観察された。ところで、こ

の方法で精製したルシフェラーゼには一部、可視部に蛍光及び吸収を持つ構造未知の新フラビン誘導体が結合していることがわかったが、これは塩酸グアニジンを用いた可逆的変性で除去できる。この処理で得た無色無蛍光のルシフェラーゼをとくに stripped ルシフェラーゼとよぶ。この調製によってルシフェラーゼに結合した  $FMNH_2$  と  $O_2$  との反応を分光学的に測定することがはじめて可能となつた。

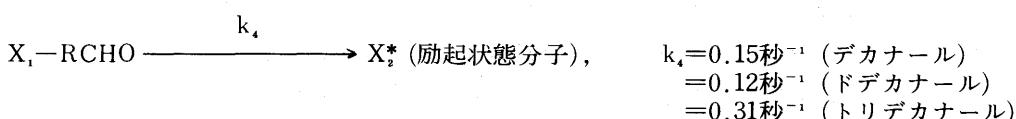
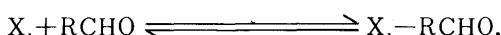
## (2) 発光反応の機構

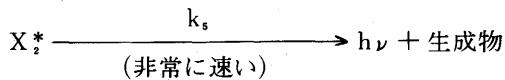
細菌ルシフェラーゼの反応において、最初に形成される中間体はルシフェラーゼ-FMNH<sub>2</sub>複合体と考えられている。そして、これとO<sub>2</sub>との反応生成物、FMNは特に重要な役割(エミッター形成及びFMNH<sub>2</sub>からの再酸化に伴うエネルギーの供給)を果していると思われる。そこでまず、ルシフェラーゼに結合したFMNH<sub>2</sub>とO<sub>2</sub>との反応を検討した。

嫌気的条件下でルシフェラーゼ (E) と  $\text{FMNH}_2$  から  $\text{E}-\text{FMNH}_2$  複合体を形成せしめた後、 $\text{RCHO}$  が無い条件下でフロー装置を用いて  $\text{O}_2$  と反応させ可視部吸収スペクトルを測定した。その結果、反応直後 (生成速度、12秒 $^{-1}$ ) に遊離の FMN のそれとは異なる、435nm 附近に幅広い吸収を持った分子種 ( $\text{X}_1$ ) が一過的に現われること、および、これは 0.25 秒 $^{-1}$  の速度で崩壊して FMN と同一の吸収スペクトルを与えることを見い出した。FMN は殆ど E に結合しないからこの  $\text{X}_1$  の崩壊は E からの離脱に相当するものと考えられる。さらに、 $\text{E}-\text{FMNH}_2$  と  $\text{O}_2$  との反応後の任意の時間に  $\text{RCHO}$  を添加すると急激な発光がみられ、続いて  $\text{RCHO}$  の炭素数に依存した速度で指数関数的に減衰するが、添加の時間を変えた時、得られる各々の発光ピークの高さはその時存在した  $\text{RCHO}$  と反応しうる中間体の量に相当するものと考えられる。従って、このピークの高さの減衰から発光反応に必須な中間体の崩壊速度が求められる。3種類の  $\text{RCHO}$  の炭素数 (10, 12 及び 13) にかかわりなくほぼ一定の値 (0.25, 0.24 及び 0.23 秒 $^{-1}$ ) を示し、しかも分光測定から求めた  $\text{X}_1$  の崩壊速度 (0.25 秒 $^{-1}$ ) によく一致した。これらの結果等からルシフェラーゼ反応の機構 (pH70, 20°C) として以下のようなスキームが考えられる。すなわち、 $\text{E}-\text{FMNH}_2$  複合体と  $\text{O}_2$  の反応後まず  $\text{X}_1$  が形成されるがこの  $\text{X}_1$  は、 $\text{RCHO}$  が存在しないときは崩壊して E と FMN となる。一方、 $\text{RCHO}$  が存在すると  $\text{X}_1$  は反応して別の中間体 ( $\text{X}_1-\text{RCHO}$ ) を形成した後、励起状態分子となって発光する。この  $\text{X}_1-\text{RCHO}$  から励起状態分子へ進むステップが発光反応の律速段階でその速度が  $\text{RCHO}$  の炭素数により異なっている。

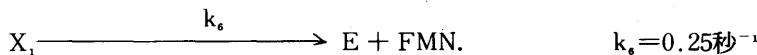


(a)  $\text{RCHO}$  が存在するとき





(b) RCHOが存在しないとき



### 論文の審査結果の要旨

生物発光は酵素ルシフェラーゼの作用による化学エネルギーの光エネルギーへの変換によっておこる。細菌ルシフェラーゼの反応は

$FMNH_2 + O_2 + RCHO$  (アルデヒド)  $\rightarrow h\nu + FMN + RCOOH$  であらわされる。この反応の機構を明かにするためには、 $FMNH_2$ の酸化およびエミッターとしての働きを分光学的に研究することが重要である。しかしこまでの酵素標品はそれ自体作用不明の蛍光作質をふくみ、くわしい解析が不可能であった。

そこで吉田君は酵素標品におけるこの難点を解決し迅速反応測定法により発光反応に必須の中間体を発見し、そのいくつかの性質を明かにした。論文は次の三つから成る。

(1) ルシフェラーゼの調製：大量培養した菌体からルシフェラーゼを単一成分として精製した。次にグアニジンによる可逆的変性を用い酵素蛋白質に結合したフラビン誘導体を除去し、可視部に吸収、蛍光がなく活性不变のストリップ・ルシフェラーゼを調製することに成功した。

(2) 反応機構：ルシフェラーゼ- $FMNH_2$ 複合体にフロー法を用いて $O_2$ を反応させたところ435nm附近に吸収極大をもつ新しい分子種 $X_1$ が一過的に生成されることを見出した。 $X_1$ はRCHO添加により発光するが、発光極大強度は添加時間の遅れと共に減衰する。その経過はRCHOなしでの $X_1 \rightarrow FMN$ の時間経過と一致したので、 $X_1$ が発光反応の必須中間体であることが示された。また $X_1$ の蛍光スペクトル、発光反応に対する酸化剤、 $RCOOH$ の影響をしらべ、 $X_1$ におけるエミッターとしてのFMNの存在状態について推論した。

(3) グアニジン処理により分離される新種フラビンの物理化学的性質を明かにした。

以上のように吉田君のこの研究は、ルシフェラーゼの精製に成功し、その発光機構、特に必須中間体の存在と性質を明かにしたものであり、生物発光反応の機構を解明するための最も基本的で重要な貢献であると考えられる。従ってこの論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。