ゲンジボタル・ルシフェラーゼにおける 発光色制御機構の構造生物学的研究

京都大学大学院薬学研究科 中津 亨

Toru NAKATSU: Structural Studies for the Bioluminescent Color Control in Genji-botaru Luciferase

Firefly emits visible yellow-green light. The bioluminescence reaction is carried out by the enzyme luciferase. The bioluminescence color change by a single amino acid substitution in luciferase is most attractive interest, however the molecular mechanism has been unclear. In fact S286N mutant of Genji-botaru luciferase emits red light. We have determined wild-type and S286N crystal structures of Genji-botaru luciferase and uncovered a structural explanation for the color control mechanism in firefly luciferase. The degree of molecular rigidity of the excited oxyluciferin is involved in the color of bioluminescence during emission reaction.

1. はじめに

1.1 螢

日本には現在約 50 種類のホタルが生息していると言われている。そして“螢”という言葉が初めて書に登場したのは日本書紀(西暦 720 年)で

彼地多有螢日之光神(彼地には螢火光る神多く有り)と記されている。その後も俳句や和歌などにもたくさん詠まれており、その幽玄な光が古くから日本人に親しまれてきたことがよくわかる。そして日本で最も有名なホタルといえばゲンジボタルであり、ほぼ日本全域に分布し、その生態はよく知られている。ゲンジボタルは前胸部のところに十字の型 (cruciata) があることから学名を *Luciola cruciata* と言うが、ゲンジボタルという名前の語源について諸説あるものの定かではない。古くから人々を魅了してきた発光に関し、1885 年にフランスの生理学者 Raphaël Dubois がホタルに似たヒカリコメツキムシを使い、現在の発光反応機構の基になるルシフェリニールシフェラーゼ反応を初めて唱えた。そして 1910 年代頃からアメリカの Edmunt Newton Harvey, 日本の神田左京によりホタルを用いた発光反応研究がさらに進められ、現在の反応メカニズムの礎ができた。

1.2 ホタルによる発光反応

ホタルにより行われている生物発光現象はルシフェリンという発光の基になる物質(発光基質)とルシフェラーゼと呼ばれる発光反応を触媒する酵素タンパク質(発光酵素)によって生じ、ルシフェリニールシフェラーゼ反応と呼ばれている。ホタルのルシフェラーゼによる発光反応機構は図 1a に示したように 2 段階で進行する。¹⁾ まずルシ

フェリンのカルボキシル基が ATP の α 位のリン酸部位を攻撃し、ルシフェリル AMP 中間体を酵素中でいったん生成する。その後、中間体のルシフェリンの 4 位に相当する水素が引き抜かれた後、酸素がその空いたところを攻撃に行くことによって、励起状態のオキシルシフェリンが生成する。これが基底状態のオキシルシフェリンに変わる際、黄緑色の光が放出され発光が生じる。このような発光反応機構に関する研究は 1960 年から 70 年代にかけて精力的に行われ、図 1a に示すような 2 段階の反応機構がほぼ明らかとなった。このホタルによるルシフェリニールシフェラーゼ反応はほとんど熱を出さないため冷光と呼ばれている。そして発光の量子収率は約 90 % と非常に高く、世界最高の値である。²⁾

1.3 ホタルの発光色に関する謎

通常われわれが目にするホタルの発光色は黄緑色である。しかしながら、この発光色を案外簡単に赤色に変えることができる。発光反応は通常中性付近で行うが、これを pH6 付近にわずかに酸性にすることで、発光色が赤色に変化する。この現象は約 40 年前から知られており、この原因は励起状態のオキシルシフェリンの構造にあると考えられ、図 1b (1) に示すようなケト-エノール互変異性によるという説が唱えられた。³⁾ また McCapra は量子化学計算により励起状態のオキシルシフェリンの構造は C2-C2' 間においてお互いの官同士が平面であるかそうでないかということが、発光色の違いであることを提唱した(図 1b (2)).⁴⁾ さらに Branchini はルシフェリル AMP 中間体の 5 位に 2 つメチル基が付いた中間体アナログを合成し、この化合物をルシフェラーゼの反応基質としたところ赤色の発光が得られたことから、図 1b (3) に示したような共鳴に基づく

図1 ホタル・ルシフェラーゼによる発光反応機構. (Reaction mechanism of firefly luciferase.) (a) ルシフェラーゼによる2段階の発光反応機構. (b) 励起状態オキシルシフェリンの構造の違いによる発光色の違い. (c) 中間体アナログ阻害剤 (DLSA).

電荷の偏りという説を提唱した.⁵⁾

しかしこれだけでは発光酵素であるルシフェラーゼの存在を無視していることになる. ホタルに似ておりルシフェリンや発光のメカニズムが同じであるヒカリコメツキムシに関して, Woodらによって背中と腹から4種類のルシフェラーゼ遺伝子がクローニングされた. それぞれのアミノ酸配列の相同性は約95~99%でほとんど同じであるが, 発光色は黄緑から橙までそれぞれ違っていた.⁶⁾ さらにキッコーマンの梶山らはゲンジボタルのルシフェラーゼに対してランダム変異を導入することにより, わずかに1アミノ酸残基が異なるだけで発光色が異なる変異体の作製に成功した. その中でも286番目のアミノ酸であるSerをAsnに変えた変異体(S286N変異体)は約45 nm赤色のほうにシフトしていた.⁷⁾ このようにルシフェラーゼの違いによっても発光色が変化するのである.

確かに発光する色が異なるのは励起状態のオキシルシフェリンの構造の違いによるものと考えられることができる. しかし, その発光色を制御できるのはルシフェラーゼである. そこで筆者らはルシフェラーゼの発光反応メカニズムの詳細を立体構造から明らかにし, どのようにしてルシフェラーゼが発光色を制御しているのかを明らかにすることを目標に, ゲンジボタル・ルシフェラーゼのX線結晶構造解析を開始した.

2. 発光反応過程を捉えるために

ホタルルシフェラーゼの立体構造は1996年にイギリスのグループによりアメリカ産のホタルの立体構造が明らかとなった.⁸⁾ しかしこの立体構造はリガンドが結合していない立体構造であった. さらに1998年にはプロモホルムとの複合体の構造解析が行われ, ルシフェリンの結合サ

イトが推定されたものの, 活性中心の詳細な構造は不明のままであった.⁹⁾ したがって, ルシフェラーゼによる発光反応がどのようにして進行していくのか, その詳細はほとんど未解明であった. そこで実際に発光しているときの立体構造を明らかにしたいと考えたわけであるが, この状態は励起状態であるためX線結晶構造解析で捉えることは不可能である. そこでルシフェラーゼの発光反応に伴う一連の立体構造変化を捉えることにより, 反応がどのように進行しているのか, ということを詳細に明らかにすることを目的とし, (1) 反応が起こる前, (2) 発光する直前, (3) 発光が終了した後, の3段階の立体構造を捉えることとした.

発光する直前の構造を捉えるにあたって立てた戦略としては, いかにして発光しているときの状態に近い構造を作り上げるかということである. そこでルシフェリルAMP中間体に注目した. もしも完全な嫌気条件で, ルシフェラーゼとルシフェリン, MgATPの複合体の結晶化を行うことができればルシフェリルAMP中間体を酵素中で捉えることができる. しかしながら完全に嫌気条件を作ることは困難であり, 結晶は作製できなかった. そこで, ルシフェリルAMP中間体の構造を基にし, 図1cに示した中間体アナログ5'-O-[N-(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine (DLSA)を合成し, 構造解析に用いることとした. この化合物はルシフェリルAMP中間体ではP-O結合であるところをS-N結合にし, またルシフェリン骨格の4,5位の炭素間を二重結合にして4位の水素を初めからなくした状態(デヒドロルシフェリン骨格)に変更した. この変更により非常に構造的に安定な化合物にすることができた. そしてDLSAは酸素による攻撃を受けない構造になっているため, ルシフェラーゼが間違えてこの化合物を取り込んで

しまうと酸化反応が進行しないため、酸化される直前すなわち発光を始める直前の構造で捕捉されることになる。

次に反応終了後の立体構造であるが、酵素はその反応が終了するとすぐに生成物を放出してしまうため、通常ではこの状態をX線結晶構造解析で捉えることは困難である。しかし、ルシフェラーゼは反応生成物との結合が強く、生成物による障害が非常に大きいことが古くから知られている。¹⁰⁾ そこでこの性質を利用し、ルシフェラーゼに対しすべての基質をあらかじめ加えて発光反応を進行させ、その後結晶化を行うということで、反応終了後の状態すなわち、オキシルシフェリンとAMPとの複合体を作り上げることに成功した。また発光反応前はルシフェラーゼとATPとの複合体の状態を作ることによって実現させた。以上のようにルシフェラーゼによる酵素反応の性質をうまく利用し、(1) 反応が起こる前(ATP複合体)、(2) 発光する直前(DLSA複合体)、(3) 発光が終了した後(AMP-オキシルシフェリン複合体)の各段階の結晶を作製し構造解析を行った。

3. X線結晶構造解析

まず結晶化を有利に進めていくために、すでに梶山らにより得られていた耐熱化したThr217Ile変異型ゲンジボタル・ルシフェラーゼ¹¹⁾を結晶化に使用することとした。そして結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により、おおむね22% PEG4000, 0.2M LiCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol, 0.1 M HEPES-Na (pH7.8)の条件で行った。しかし、この条件で結晶は得られるものの、なかなか良好な単結晶は得られなかった。そこでいったん得られた結晶を種結晶として使用することにより、良好な結晶をコンスタントに得る

ことができるようになった。また今回の構造解析はすべて複合体であるので、いずれもルシフェラーゼ溶液に必要なリガンドを加え、16時間インキュベートしたのち、結晶化に用いた。

構造解析はすでに明らかになっているアメリカ産ホタルルシフェラーゼの立体構造を用い、分子置換法により行った。ルシフェラーゼの立体構造は約450アミノ酸からなるN末端ラージドメインと約100残基からなるC末端スモールドメインから構成されているが、分子置換により解が得られた際、N末端ドメインの電子密度はしっかり観測されたにもかかわらずC末端ドメインの電子密度はほとんど観測されなかった。そこでN末端ドメインのみ精密化をすすめたところC末端ドメインの電子密度が現れ、すべての分子モデルを構築することができた。

図2a左には構造解析したゲンジボタル・ルシフェラーゼ-DLSA複合体の全体構造を示した。¹²⁾ DLSAは両ドメインの間に存在し、N末端ドメインのより奥まった部分の α ヘリックスと β シートによって囲まれた疎水的な部分がルシフェリンの結合位置であった。一方、リガンドが結合していないアメリカ産ホタル・ルシフェラーゼでは各ドメインの構造はほぼ同じであったものの、両ドメイン間の配置は異なっていた(図2a右)。すなわち、リガンドが結合していないときはリガンドが入っていくことができるように活性部位が空いた状態になっており、リガンドが結合するとドメインが77度の回転と7Åの移動を伴って、閉まった状態になることがわかった。

図2bに今回明らかになったDLSA分子とその電子密度を示した。1.3Å分解能という非常に高い分解能のおかげ

図2 ホタル・ルシフェラーゼの立体構造。(Crystal structure of firefly luciferase.) (a) 左：ゲンジボタル・ルシフェラーゼ-DLSA 複合体, 右：アメリカ産ホタル・ルシフェラーゼ。このC末端ドメインを77度回転させ、N末端ドメインのほうに7Å近づけると左の配置になる。(b) 中間体アナログDLSAの電子密度。(c) 活性部位の結合の様子。

図3 ルシフェリン結合部位におけるゲンジボタルルシフェラーゼの構造比較. (Comparison of the luciferin binding site of Genji-botaru luciferase.) 野生型 AMP-オキシルシフェリン複合体 (薄い灰色) に対して (a) 野生型 ATP 複合体 (濃い灰色), (b) 野生型 DLSA 複合体 (濃い灰色), (c) S286N 変異体 DLSA 複合体 (濃い灰色) との構造比較.

で原子の位置を明確に決定できた. その結果, 発光体の部分に相当するデヒドロルシフェリン部分はトランス型をしており C2-C2'結合に対して約7度傾いた状態であることがわかった. そして図 2c のように Phe249, Thr253, Ile288, Ala350 との疎水性相互作用によって結合していることが判明した.

反応前の ATP 複合体は 2.3 Å 分解能で決定した. この構造では ATP 部分のうち AMP 部分が観測できた. そして発光反応終了後, すなわち AMP : オキシルシフェリン複合体の立体構造についても 1.6 Å 分解能で決定した. 今回解析した3種類の複合体構造のN末端ドメインとC末端ドメインの関係はすべて同じで閉まった状態になっていた.

4. 野生型ルシフェラーゼの発光反応機構

次に (1) ATP 複合体, (2) DLSA 複合体, (3) AMP-オキシルシフェリン複合体の3種類の活性部位の構造について, より詳細に比較検討を行った. まず反応前の ATP 複合体と発光反応後の AMP-オキシルシフェリン複合体の構造を比較したところ, 図 3a のようにルシフェラーゼの立体構造に大きな違いは見られなかった. また AMP の結合状態もほぼ同じであった. しかしながら発光直前の DLSA 複合体と AMP-オキシルシフェリン複合体の立体構造を比較したところ, 図 3b を見るとわかるように Ile288 付近に構造変化が観測された. すなわち, DLSA 複合体では Ile288 はルシフェリン結合部位のほうに, 側鎖を回転させながら C α の位置で 1.5 Å 移動していた. また Phe249 についても DLSA 複合体ではルシフェリン結合部位の方向に6度傾いていた. 反応前後の ATP 複合体や AMP-オキシルシフェリン複合体では Ser286 の側鎖と Glu313 の側鎖が水素結合を形成していた (図 3a). しかしながら, DLSA 複合体ではこの水素結合は形成されておらず, Ser286 は水 (Wat2) を介して Asn231, Tyr257 の側鎖と水素結合していた (図 3b). DLSA のベンゾチアゾール環を取り巻いている環境は非常に疎水性が高いことから, Ile288 が発

光直前に動くことで最終的に発光するときの疎水的な環境を完成すると考えられた. すなわち, ルシフェラーゼはその酵素反応に伴って構造変化を引き起こし, 励起状態のオキシルシフェリンを非常に高い疎水的な環境下にすることによって発光を行うと考えられたのである. しかし Ile288 がルシフェリンのほうに近づいた状態では活性部位が狭くルシフェリンが自由に入出入りが困難である. したがってこの Ile288 の動きは発光を行うために必要なことなのか, それとも黄緑色に発光するために必要な動きであるのかは, 以上の3つの立体構造から明らかにすることはできなかった.

5. S286N 赤色発光変異体の立体構造

赤色に発光することがわかっている S286N 変異体について DLSA 複合体と AMP-オキシルシフェリン複合体 (未発表データ) の構造解析を行った. そして両構造の比較を行ったところ, 野生型で観測された反応に伴う Ile288 付近の構造変化は観測されなかった. そこで S286N 変異体の DLSA 複合体を野生型の AMP-オキシルシフェリン複合体と比較したところ, 図 4c のように両構造は同じ配置をしていた. 赤色発光変異体では野生型における Ser286 が Asn に変異したことで, Glu313 との水素結合だけではなく, 水との水素結合が増え, この水を介した水素結合ネットワークが形成されていた. この結合により, Ile288 付近の動きが妨げられ, 構造変化が生じなかったと考えられた. すなわち Ile288 の動きは黄緑色に発光するために必要であり, S286N 変異体は黄緑色に光らせるためのスイッチが壊れた状態にあることが明らかとなった.

さらに野生型と S286N 変異体の DLSA 複合体について図 4 のように van der Waals interaction の比較を行った. DLSA のベンゾチアゾール環を取り巻くアミノ酸残基の構造については Ile288 以外はほぼ同じであった. 野生型では Ile288 の側鎖の3つの炭素原子を使ってしっかりと接触し, 活性部位が閉まった構造 (closed form) になっていた. 一方 S286N 変異体では Ile288 の動きがないため, 1つ

図4 野生型(左)とS286N変異体(右)におけるDLSA(濃い灰色)とIle288(薄い灰色)のファン・デル・ワールス相互作用の様子。(The van der Waals contact of DLSA and Ile288 of Wild type and S286N mutant.) その他のアミノ酸残基は白色。

の炭素原子が接触しているだけであり、活性部位が空いた構造(open form)となっていた。そしてDLSAの構造については双方の構造においてほぼ同じであった。したがって両方の構造における違いはIle288の接触の仕方のみであることから、発光するときのオキシルシフェリンの結合部位に関する疎水性の程度の違いが発光色に大きく関係していると考えられた。

6. 発光色制御機構

以上の構造解析の結果を総合すると次のように考えられる。黄緑色に発光する野生型のルシフェラーゼでは発光体のオキシルシフェリンをしっかり握りしめ、発光に必要な励起状態から基底状態への変化に伴うエネルギーをしっかり保っている。しかしながら赤色に発光する変異体では発光のときの握りしめ方が弱いため、このエネルギーを振動(熱)として一部無駄に放出してしまい、エネルギーの低い(すなわち、波長が長い)赤色の発光になると考えられた。

そこで、この発光色を制御している仕組みを確認するため、野生型のルシフェラーゼを用いてI288V, I288Aという変異体を作製し、その発光色を調べた。この変異体であればたとえ288番目の残基が動いたとしても、オキシルシフェリンを取り囲む疎水的で相補的な環境は不完全となり、Ile288が動かなかったときと同様に発光色が変化するはずだと考えたからである。図5に示したように野生型では黄緑色の発光を示す最大発光波長560 nmのスペクトルが得られる。そしてI288A変異体では赤色の発光を示す最大発光波長613 nmのスペクトルが得られた。またI288Vは橙色の発光を示し、最大発光波長が560 nmと613 nmの2カ所にあるスペクトルが得られた。このように発光スペクトル(発光色)を測定した結果、その側鎖の大きさがIle→Val→Alaと小さくなっていくのに合わせて、黄緑色から

図5 野生型, I288V, I288A 変異体ルシフェラーゼの発光スペクトル。(Emission spectra of wild-type, I288V and I288A Genji-botaru luciferases.)

発光色がよりエネルギーの低い(波長が長い)橙色、赤色へと順番に変化していった。すなわち予想したとおり疎水性の程度が発光色と直接関係があることが証明できた。ルシフェラーゼは化学反応により得たエネルギーを発光に用いるために、そのエネルギーを励起状態のオキシルシフェリンとして蓄えている。そしてオキシルシフェリンの周りの疎水性を高めることにより、オキシルシフェリンの無駄な動き、すなわち熱振動が起こりにくくなるようにし、無駄なエネルギーロスを起こさないように構造変化を行っている。このおかげで野生型のルシフェラーゼは黄緑色に光らせることができるようになっているのである。

冒頭でも述べたように、ホタルに似たヒカリコメツキムシは非常によく似た4種類のルシフェラーゼを体内に備えており、それぞれ発光色が異なる。その発光色は緑っぽく光るもの(PplGR, PplYG)と橙色っぽく光るもの(PplOR, PplYE)に分けられる。これらについて288番目に相当するアミノ酸残基を調べてみる(図6)と、橙色に光るものはValになっており、緑に光るものはIleになっていた。そしてほかのホタルについてアミノ酸残基を調べてみるとIleもしくはLeuとなっており、形は異なるものの側鎖の大きさは同じである。また黄緑色の発光のスイッチングにかかわっているPhe249, Tyr257, Ser286, Glu313はホタル、ヒカリコメツキムシともにきちんと保存されていた。すなわち黄緑色に光らせるためには288番目の部分はIleもしくはLeuの大きさが必要であり、この大きさが小さくなれば発光のエネルギーが低くなるという今回われわれが明らかにした発光色を制御する方法をすでに天然においても使っていたのである。

図6 ホタルとヒカリコメツキムシの活性部位におけるアミノ酸比較。(Sequence alignment of firefly luciferase and click beetle luciferases.) ホタル・ルシフェラーゼ: Lcr, *Luciola cruciata* (ゲンジボタル); Lla, *Luciola lateralis*; Lmi, *Luciola mingrelica*; Hpa, *Hotaria parvula*; Pmi, *Pyrocoelia miyako*; Pru, *Pyrocoelia rufa*; Lno, *Lampyrus noctiluca*; Ppy, *Photinus pyralis* (アメリカ産ホタル); Ppe, *Photuris pennsylvanica*. Click beetle luciferases: Ppl, *Pyrophorus plagiophthalmus*; Pyt, *Pyrearinus termitilluminans*. 4つのPplルシフェラーゼはそれぞれ異なる発光色を示す. PplYE (黄色), PplOR (橙色), PplYG (黄緑色), and PplGR (緑色).

7. 最後に

今回はホタル・ルシフェラーゼがどのようにして黄緑色や赤色に発光色を変化させることができるのか、ということ明らかにした。しかしながら実際にその色の発光を行っているときのオキシルシフェリンが、どのような構造をしているのかはいまだ謎のままである。これは励起状態であるため、X線結晶構造解析では明らかにできないが、今回解析した高分解能の立体構造を基に今一度ルシフェラーゼを含めた量子計算が行われることにより、励起状態のオキシルシフェリンの全貌が明らかになることを期待している。これまで発光のエネルギーがより低くなる赤色発光のルシフェラーゼ変異体はたくさん作られてきたが、エネルギーがより高くなり青色に発光するルシフェラーゼはいまだ作製できていない。青色を発光するルシフェラーゼは作製が可能なのか、もし可能であるのならどうすればよいのか、さらには赤色に発光するほかのルシフェラーゼ変異体について、今回と同じ発光色制御機構で赤色になっているのか、ほかに色を変化させる仕組みはないのか、このように発光色を制御している仕組みの解明についてまだまだ興味深い内容は山積している。またホタルがもう1つの謎である量子収率が高い理由について、活性部位の疎水性の高さがその原因の1つであると考えられることはできるが、どのような仕組みで90%という高効率を実現できるのかは不明である。この仕組みについても是非これから明らかにしていきたい。

文 献

- 1) M. Deluca: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **44**, 37 (1976).
- 2) H. H. Seliger and W. D. McElroy: *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136 (1960).

- 3) E. H. White, E. Rapaport, T. A. Hopkins and H. H. Seliger: *J. Am. Chem. Soc.* **91** (8), 2178 (1969).
- 4) F. McCapra, D. J. Gilfoyle, D. W. Young, N. J. Church and P. Spencer: The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence. In: A. K. Campbell, L. J. Krick and P. E. Stanley (eds). *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*, John Wiley and Sons, Chichester (1994).
- 5) B. R. Branchini, T. L. Southworth, M. H. Murtiashaw, R. A. Magyar, S. A. Gonzalez, M. C. Ruggiero and J. G. Stroh: *Biochemistry* **43** (23), 7255 (2004).
- 6) K. V. Wood, Y. A. Lam, H. H. Seliger and W. D. McElroy: *Science* **244** (4905), 700 (1989).
- 7) N. Kajiyama and E. Nakano: *Protein Eng.* **4** (6), 691 (1991).
- 8) E. Conti, N. P. Franks and P. Brick: *Structure* **4** (3), 287 (1996).
- 9) N. P. Franks, A. Jenkins, E. Conti, W. R. Lieb and P. Brick: *Biophys. J.* **75** (5), 2205 (1998).
- 10) J. L. Denburg, R. T. Lee and W. D. McElroy: *Arch. Biochem. Biophys.* **134** (2), 381 (1969).
- 11) N. Kajiyama and E. Nakano: *Biochemistry* **32** (50), 13795 (1993).
- 12) T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata and H. Kato: *Nature* **440** (7082), 372 (2006).

プロフィール

中津 亨 Toru NAKATSU
京都大学大学院薬学研究科
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University
〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan
e-mail: nakatsu@pharm.kyoto-u.ac.jp
最終学歴: 京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了
専門分野: 構造生物学
現在のテーマ: 発光関連タンパク質の構造生物学