

ホタルの発光色を制御する仕組み
– 発光酵素ルシフェラーゼの結晶構造とメカニズム –
Color control mechanism of Firefly glowing
Crystal structure and mechanism of luminescent enzyme luciferase

加藤博章, 中津 亨
京都大学大学院薬学研究科
Hiroaki Kato, Toru Nakatsu
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Fireflies are glowing by a bioluminescent reaction carried out by the enzyme luciferase. The change in bioluminescence color caused by subtle structural differences in luciferase has attracted much research interest. We solved the crystal structures of wild-type and red mutant (S286N) luciferases from the Japanese Genji-botaru (*Luciola cruciata*) in complex with a high-energy intermediate analogue. Comparing these structures to those of the wild-type luciferase complexed with a substrate and with products revealed a significant conformational change that was observed in the high-energy state of the wild-type enzyme, but not in the red mutant. A series of the structures indicates that the extent of molecular rigidity of the excited state of a product, oxyluciferin, which is controlled by a transient movement of Ile288, determines the color of the bioluminescence during the emission reaction.

1. はじめに

幻想的な光を放つホタルは、なつかしさと癒しを感じさせてくれる初夏の風物詩である。また、東晋の時代に、車胤はホタルを灯火の代りとして深夜まで勉学に励んだとの故事から「蛍の光」は学問励勉の象徴でもある。そして、化学者は、ホタルがどのようにして黄緑色に発光するのか、この発光色の制御の仕組みの謎に甚だ好奇心をそそられる。ホタルの発光は、ルシフェラーゼと呼ばれる酵素によって触媒される化学反応で発生する、いわゆる生物発光という現象である。我々は、黄緑色に発光するゲンジボタル (*Luciola cruciata*) 由来の天然のルシフェラーゼ (野生型酵素) と、その遺伝子変異によって偶然に作成された赤色に発光する S286N (286 番目の Ser 残基が Asn 残基に換っている) 変異型酵素に着目し、それぞれについて反応過程における各段階の「酵素-基質複合体」の結晶化を行い、その立体構造を原子レベルで比較することにより発光色制御の仕組みを解き明かした [1]。本稿では、その研究を紹介する。

2. ルシフェラーゼ発光反応の化学

ホタルの発光反応は、発光酵素ルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7) によって発光基質の化学エネルギーが光へと変換されるものである [2, 3]。発光反応は図 1a に示すように 2 段階で進行する。まず発光基質ルシフェリンのカルボキシ基が ATP の α 位のリン酸基を攻撃し、ルシフェリル AMP 中間体を酵素中でいったん生成したのち、ピロリン酸 (PPi) が放出される。次いで、酸素がこの中間体と反応して、

図 1a

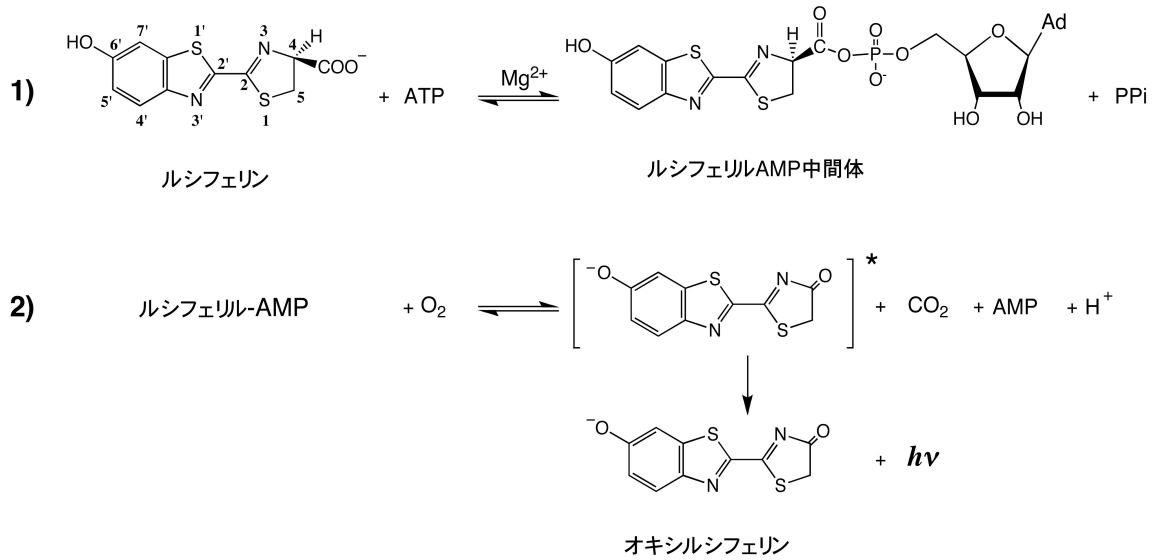


図 1b



図 1c

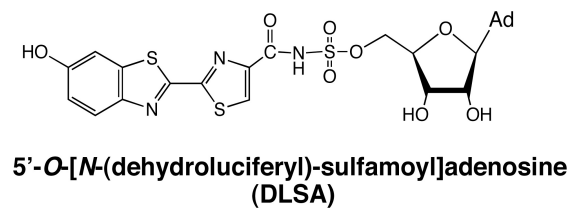


図1 ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応機構. a, ルシフェリル AMP 中間体を経由する 2 段階反応機構. b, 野生型および S286N 変異型ゲンジボタル・ルシフェラーゼの発光色. c, ルシフェリル AMP 中間体アナログ, DLSA の構造.

AMP, CO₂ とともに, 励起状態のオキシルシフェリンを生成し, これが基底状態へと移動する. この際, 差分のエネルギーが黄緑色の可視光として放出される. このエネルギー変換の量子収率は極めて高く, ほぼ 90 % に達するらしい [4].

この発光反応の最大のなぞの一つは, 発光色制御のメカニズムである. ホタルの発光はふつう黄緑色 (最大発光波長 562 nm) を示す (図 1b). しかし, ルシフェラーゼの反応を酸性 pH 条件下で行なうと発光色が赤色に変化する. また, ルシフェリル AMP 中間体を酵素非存在下 DMSO 中で反応させた場合, 発光は赤色になってしまい, 黄緑色に発光させるには塩基を加えなければならない. このことから, 発光色の変化は, 発光するときのオキシルシフェリンがケト-エノール互変異性により変化し, その状態が違うことで発光色が異なるという説が唱えられてきた [5]. その後, 5 位にメチル基が 2 つ付いたルシフェリン誘導体でもアデニル化すると黄緑色に発色する反応が検出できたことから, ケト-エノール互変異性ではなく, ケト型の共鳴にもとづいた電荷の偏りの違いによって (共鳴にもとづく電荷の偏り説) 発色が制御されるという説も提出されている [6].

3. アミノ酸配列の違いが発光色を変化させる

一方、遺伝子の違いでも発光色が異なることが判明した。ジャマイカ産のヒカリコメツキ (*Pyrophorus plagiophalamus*) というホタルの仲間では、多種類のルシフェラーゼ遺伝子を体内に持っており、その遺伝子の違いにより、例えば背は緑色に腹が黄色にと異なる発光色を示す [7]。化学的な反応条件は同じであるから、触媒であるルシフェラーゼが何らかの仕組みを用いて発光色を制御していると考えべきである。

さらに、キッコーマンの梶山らは、ゲンジボタルの遺伝子にランダム変異を導入することにより赤色 (607 nm) に発光するルシフェラーゼを作り出した [8]。DNA 配列解析の結果、Ser286 が Asn に変換されている、すなわち、S286N 変異型であることが判明した (図 1b)。発色の変化は、このたった1つのアミノ酸を変換したことに起因することは明白である。すなわち、基質のルシフェリンや反応の pH は共通なのであるから発色の違いをケト-エノールの違いで説明するには無理がある。これら酵素のアミノ酸配列と発光色の関わりが報告されると、McCapra は、オキシルシフェリン分子の簡単な量子化学計算などを基に励起状態におけるオキシルシフェリンの2つの環構造の相対角度の違いにより発光色が変わるという説 (C2-C2' 結合回転説) を提出した [9]。

この S286N 変異型の話聞いた我々は、ルシフェラーゼの立体構造に発光色制御の仕組みが隠されていると考え、野生型と赤色発光変異型、それぞれのルシフェラーゼの立体構造を比較すれば、その仕組みが明らかにできるに違いないと考えた。残念なことに、1996年イギリスのインペリアルカレッジの Conti らが北アメリカホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼの結晶構造を決定して報告してしまった [10]。しかし、彼らの結晶構造は、基質や生成物など ATP やルシフェリン関連化合物を含まない状態だったため、その構造からは、発光色制御はおろか反応メカニズムの解明にも至らなかった。メカニズムの解明には、相応しい反応状態構造の捕捉が必要なのである。

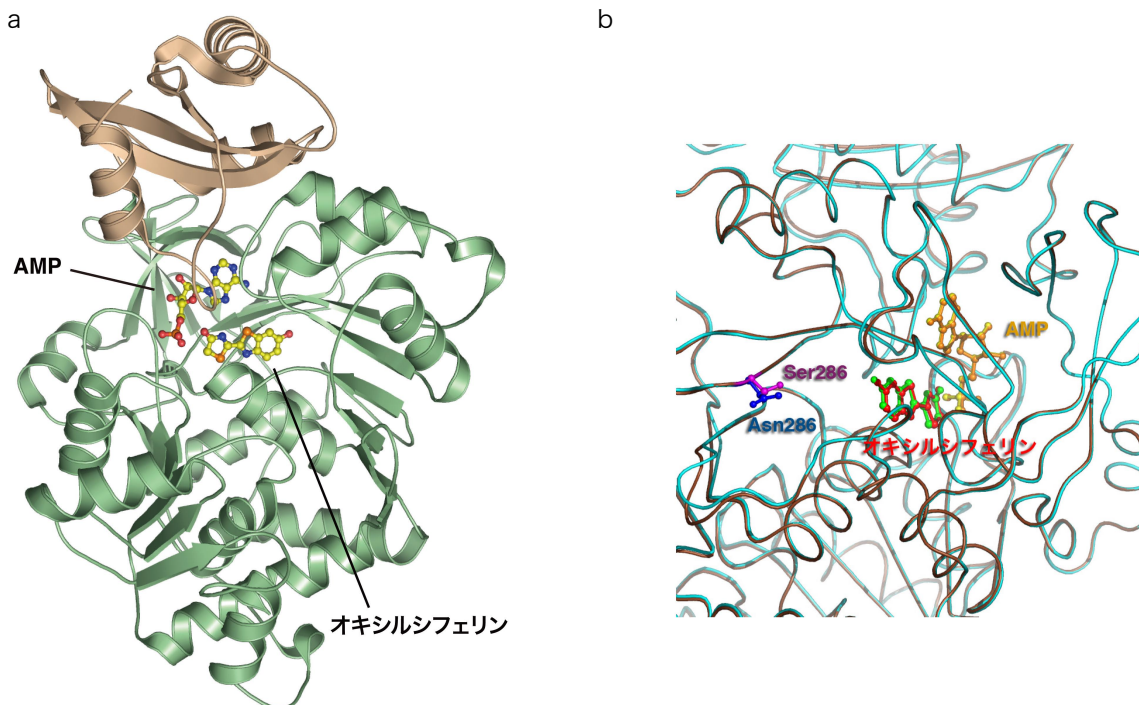


図2 オキシルシフェリン-AMP-ルシフェラーゼ複合体の結晶構造模式図。a, 野生型ルシフェラーゼ。b, 野生型 (褐色) と S286N 変異型 (水色) ルシフェラーゼの重ね合わせ図。野生型の Ser286, S286N の Asn286 それぞれの側鎖と、オキシルシフェリン, AMP は、ボールアンドスティックモデルで表示した。図 b は、a の右背面から見ている。

4. オキシルシフェリン-AMP-酵素複合体の立体構造

当初我々は、生成物であるオキシルシフェリンと酵素との複合体を結晶化すれば黄緑色発光と赤色発光の違いをそれぞれの複合体構造の違いから見つけ出せると考えた。実は、オキシルシフェリン-ルシフェラーゼ複合体は発光した後の状態であり(図1a), 発光中の(励起状態のオキシルシフェリン)複合体ではない。もっとも、オキシルシフェリンの励起状態は短寿命であり、通常のX線結晶解析では捕捉不可能である。しかし、反応終了後でもオキシルシフェリンそのものの立体構造であることは確かであり、目的とする状態の構造に最も似ていると考えたのである。また、ルシフェラーゼに結合したオキシルシフェリンの構造は誰も見たことがなかった。問題は、不安定なオキシルシフェリンを結晶化のためにどうやって用意するかであった。

オキシルシフェリン複合体は、予めルシフェラーゼに対し基質すべてを与えて発光反応を進行させ、その終了後に結晶化を行うという方法で調製することができた。これは、ルシフェラーゼが生成物阻害を起こしやすいことから、反応終了後の生成物が解離し難いだろうとの予測に基づいて立てた策だった。我々は、野生型(図2a)および赤色発光変異型S286Nそれぞれについて立体構造を決定した(S286N-オキシルシフェリン複合体の構造は未発表)。初めて、オキシルシフェリンとAMPの結合した構造を見ることに成功した。何はともあれ、ルシフェラーゼの活性中心が判明したのである。

しかしながら、変異により発光色を変化させる286番目のアミノ酸の場所は、活性中心から遠く離れていた。しかも、野生型酵素とS286Nの立体構造は、286番目のSerとAsn以外、寸分たがわず同じだった(図2b)。残念ながら、オキシルシフェリン-AMP-酵素複合体の構造からは、発光色とSer286との関係を示すことはできなかったのだ。

5. 速度論的結晶学で反応途中の構造を捕捉する

酵素反応の神髄は、触媒作用、すなわち化学反応を加速する際に、立体構造(コンフォーメーション)を変化させることである。したがって、反応メカニズムの解明には、反応に伴う立体構造の変化を追跡することが必要である。つまり、「反応前」、「反応途中」、「反応後」とそれぞれの状態を結晶化して立体構造を決定しなければならないのである。このように、時間を追って結晶構造を決定し、アニメーションを作るための結晶学を速度論的結晶学という。ルシフェラーゼの場合も、発光反応終了後ではなく、発光直前の「反応中間体-酵素複合体」を捉え、反応前と反応後との立体構造変化を見なければならぬと考えた。反応前の構造は、ATP-酵素複合体を結晶化して見る事ができた。その構造は、反応終了後とほとんど変わらなかった。それでは、発光直前のルシフェリルAMP中間体-酵素複合体(図1a)をどうやって捕捉したらよいのか。と言うのも、結晶化に必要な時間を考えると、酵素反応の途中構造を捕捉静止させることが不可能であることは、誰の目にも明らかであるからだ。速度論的結晶学では、ラウエ法というX線回折像のナノ秒レベルの迅速測定法が有名であるが、この方法は、結晶性についての厳しい制限や、得られる構造の分解能が低くなりやすいという欠点がある[11, 12]。今回の場合、詳細な立体構造の違いを明らかにすることが求められることから、ラウエ法を用いることは得策とは言えなかった。

共同研究者の平竹は、ルシフェリルAMP中間体の構造を基に、5'-O-[N-(dehydrolyciferly)sulfamoyl]-adenosine (DLSA) というアナログを設計合成した(図1c)。この化合物は、構造を安定化するためにルシフェリル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、ルシフェリンの4,5位の炭素間を二重結合にして4位の水素が初めから除去された状態になるように設計した。すなわち

DLSA は、酸素による攻撃を受けない構造になっており、酵素は、この化合物を間違えて取り込んでしまうと罠にかかって捕獲されてしまう。このように、化学的手法を用いて短寿命の途中状態を捕捉する手法を Chemical Trapping と言い、速度論的結晶学における重要な手法の1つとなっている。我々は、同様の手法を用いて、グルタチオン合成酵素、アスパラギン合成酵素、そして、 γ -グルタミルシステイン合成酵素と、いずれも ATP で基質を活性化する酵素反応の反応中間体を捕捉してきた [13-15]。ルシフェラーゼでも DLSA が期待通り酵素反応中間体を捕捉してくれた。

DLSA -ルシフェラーゼ複合体は、野生型、S286N とも最高 1.3 Å という高分解能で結晶解析することができた [1]。構造全体の姿は、すでに解析した生成物複合体とほぼ変わらない。しかし、活性中心付近では、野生型の DLSA 複合体と生成物複合体の間にわずかな構造変化を観測できたのである。

6. 野生型では、Ile288 が動く

野生型ゲンジボタル・ルシフェラーゼの生成物複合体と発光直前の DLSA 複合体では、図 3a に示すように Ile288 付近にだけ顕著な動きが観測された。すなわち、Ile288 は、C α 位置で 1.5 Å のズレがあり、側鎖を回転させながらルシフェリン結合部位の方へ移動していたのである。この移動に伴い、Ser286 の水素結合相手の交換が起きていた。つまり、反応終了後の AMP- オキシルシフェリン複合体では Ser286 と Glu313 が水素結合していたが、DLSA 複合体では Ser286 が水を介して Asn231 および Tyr257 と水素結合していたのだ。そして、Ile288 が動いて「閉鎖型構造 (closed form)」ができること、DLSA のベンゾチアゾール環の周囲には、非常に疎水的な環境が完成することになる。

ところが、赤色に発光する S286N 変異体の DLSA 複合体の構造は野生型の反応終了後の構造と同じであり、Ile288 の動きは観測されなかった (図 3b)。これは Ser286 が Asn に変異したことで側鎖の先が二股になりその両端が水素結合できるようになったため、Glu313 との水素結合だけではなく、水との水素結合も増えたことで、形成された水素結合ネットワークが Ile288 の動きを妨げたのだと考えられた。したがって、286 番目のアミノ酸残基が基質と直接相互作用して発光色が変化しているのではなく、Ile288 の動きが黄緑色に発光するために重要であることが判明した。すなわち、S286N 変異型とは、黄緑色にするためのスイッチが壊れた発光触媒装置だと言えるだろう。

Ile288 の動きに伴う活性中心の様子についてもう少し詳しく見てみる。図 4 では、野生型と S286N 変異型それぞれの DLSA 複合体の活性中心付近について各原子をファンデルワールス半径の球として表示した。野生型 (左側) では、基質 (反応中間体) と酵素の立体構造的な相補性が完璧である。ま

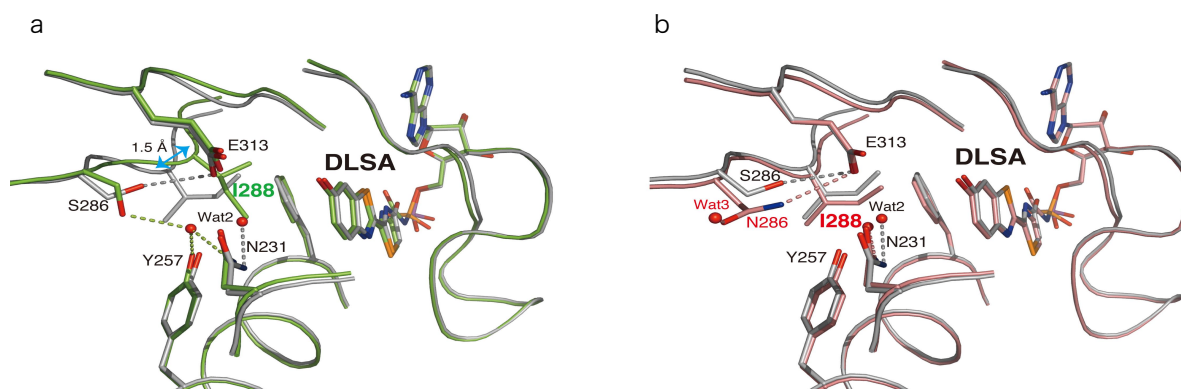


図3 活性中心付近の構造比較. a, 野生型酵素における DLSA 複合体とオキシルシフェリン-AMP 複合体との活性部位周辺の重ね合わせ図. b, S286N 変異型ルシフェラーゼの DLSA 複合体と野生型酵素のオキシルシフェリン-AMP 複合体との活性部位周辺の重ね合わせ図. 文献 1 より転載.

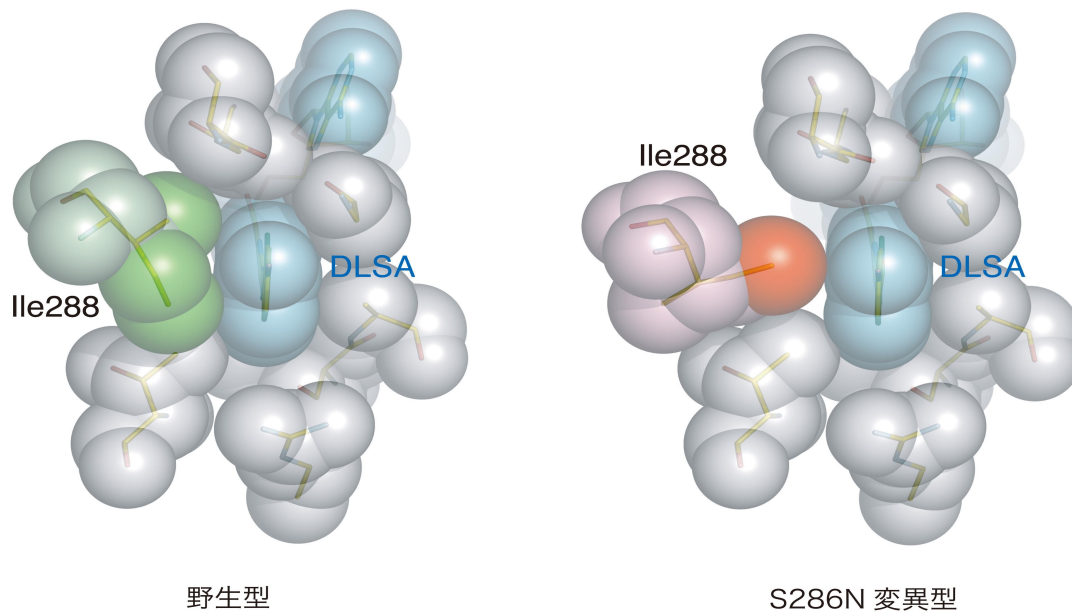


図4 野生型（左）と S286N 変異型（右）ルシフェラーゼ-DLSA 複合体の Ile288 周辺のファンデルワールス相互作用の比較. DLSA（水色）、野生型酵素の Ile288（緑色）、S286N 変異型酵素の Ile288（桃色）など各原子をファンデルワールス半径の球として表示した. 文献 1 より転載.

さに鍵と鍵穴の関係である. Ile288 の側鎖は、3つの炭素原子で DLSA のベンゾチアゾール環と広範囲に接触していた. ところが、S286N 変異型では Ile288 の1つの炭素原子がわずかに接触しているだけであった. ただし、ベンゾチアゾール環の周囲にある Ile288 以外のアミノ酸残基は、野生型と S286N いずれの構造でもほぼ同じ位置にあった. また、DLSA の構造自体は変わっていない. すなわち、赤色発光型 S286N において、ルシフェリンの C2-C2' 結合の回転角に違いは見られなかったことになる. したがって、両者の構造における違いは Ile288 のベンゾチアゾール環に対する接触状態の違いのみであり、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、そして、酵素と基質の立体構造の相補性の良さが発光色に大きく関係していると考えられた.

7. 発光色制御の仕組みとは

これら立体構造解析の結果を総合すると次のように考えられる. すなわち、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と握りしめ、励起状態から基底状態への変移に伴うエネルギーをしっかりと保っている. 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、波長の長い）赤色の発光になるというものである.

この考え方を裏付けるため、野生型のルシフェラーゼを用いて I288V, I288A という変異体を作成した. 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隙間が生じ、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. I288V, I288A 変異体の発光色を測定した結果、その側鎖の大きさに合わせて発光色がよりエネルギーの低い（波長が長い）橙色、そして、赤色へと順番に変化していった. 確かに、酵素トリガンドとの空間的な相補性のわずかな違いが発光色を決定しているといえるだろう.

8. 今後の展望

北アメリカホタルのルシフェラーゼについては、Branchini らにより沢山の部位特異的変異体が作られ、反応や発色制御のメカニズムが論じられてきた [6][16]。無理もないことだが、彼らが議論に用いたモデリングによる立体構造は化学を論じる精度には達していなかった。おそらく、精密な立体構造の決定を心待ちにしていたことであろう。今回の精密な立体構造の決定は、化学反応機構の詳しい解析の基盤として今後大いに活躍するものと期待される。また、精密な原子座標に従い、量子化学計算によって酵素に結合した状態のオキシルシフェリンの励起状態構造にもアプローチができるようになった。McCapra の予想の是非は、ルシフェラーゼの原子構造に基づいた精密な量子化学計算が明らかにしてくれるであろう。

一方、ホタルのルシフェラーゼは、*in vivo* の分子イメージングの素として、癌の転移経路の解明や薬物の体内動態を調べることなどに貢献している [17] [18]。活性中心の構造が判明したことで、発光持続時間を長くしたり、酵素の安定性や基質特異性を改変したりするためのルシフェラーゼの改良も加速されるだろう。

参考文献

- [1] T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata & H. Kato. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*, **440**, 372 (2006)
- [2] 今井一洋 & 近江谷克裕 " バイオ・ケミルミネセンスハンドブック " 丸善, p. 233, (2006)
- [3] 後藤俊夫 " 生物発光 " 共立出版, p. 93, (1975)
- [4] H. H. Seliger & W. D. McElroy. Spectral Emission and Quantum Yield of Firefly Bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 136 (1960)
- [5] E. H. White, E. Rapaport, T. A. Hopkins & H. H. Seliger. Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2178 (1969)
- [6] B. R. Branchini, T. L. Southworth, M. H. Murtiashaw, R. A. Magyar, S. A. Gonzalez, M. C. Ruggiero & J. G. Stroh. An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase. *Biochemistry*, **43**, 7255 (2004)
- [7] K. V. Wood, Y. A. Lam, H. H. Seliger & W. D. McElroy. Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science*, **244**, 700 (1989)
- [8] N. Kajiyama & E. Nakano. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. *Protein Eng.*, **4**, 691 (1991)
- [9] F. McCapra, D. J. Gilfoyle, D. W. Young, N. J. Church & P. Spencer The Chemical Origin of Colour Differences in Beetle Bioluminescence. A. K. Campbell, L. J. Kricka & P. E. Stanley ed., "Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects" John Wiley and Sons, 1994, p. 387.
- [10] E. Conti, N. P. Franks & P. Brick. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, **4**, 287 (1996)
- [11] 加藤博章. ラウエ法を用いた時分割 X 線結晶構造解析. 蛋白質核酸酵素, **46**, 1446 (2001)
- [12] 加藤博章 第 9 章触媒機能 4 構造学的解析に基づく反応機構—動的構造解析, 遷移状態アナログ—. 後藤祐児, 桑島邦博 & 谷澤克行 編, "タンパク質科学" 化学同人, p. 419, (2005)
- [13] J. Hiratake, H. Kato & J. Oda. Mechanism-Based Inactivation of Glutathione Synthetase by Phosphinic Acid Transition-State Analog. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 12059 (1994)
- [14] M. Koizumi, J. Hiratake, T. Nakatsu, H. Kato & J. Oda. A potent transition-state analogue inhibitor of *Escherichia coli* asparagine synthetase A. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5799 (1999)

- [15] T. Hibi, H. Nii, T. Nakatsu, A. Kimura, H. Kato, J. Hiratake & J. Oda. Crystal structure of γ -glutamylcysteine synthetase: insights into the mechanism of catalysis by a key enzyme for glutathione homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15052 (2004)
- [16] B. R. Branchini, T. L. Southworth, M. H. Murtiashaw, H. Boije & S. E. Fleet. A mutagenesis study of the putative luciferin binding site residues of firefly luciferase. *Biochemistry*, **42**, 10429 (2003)
- [17] C. H. Contag, S. D. Spilman, P. R. Contag, M. Oshiro, B. Eames, P. Dennery, D. K. Stevenson & D. A. Benaron. Visualizing expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 523 (1997)
- [18] M. Nogawa, T. Yuasa, S. Kimura, J. Kuroda, K. Sato, H. Segawa, A. Yokota & T. Maekawa. Monitoring luciferaselabeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett.*, **217**, 243 (2005)

著者略歴



氏名：加藤博章

現職：京都大学大学院薬学研究科構造生物薬学分野 教授

学位：京都大学農学博士

生年月日（西暦）：1961年2月17日

出生地：青森県八戸市

最終学歴：1988年 京都大学大学院農学研究科農芸科学専攻博士後期課程修了
農学博士 取得

1988-1989年 京都大学化学研究所教務職員

1989-1999年 同助手

1992-1993年 米国 Brandeis 大学 (G.A. Petsko 研) にて在外研究員

1999-2006年 理化学研究所播磨研究所速度論的結晶学研究チームチームリーダー

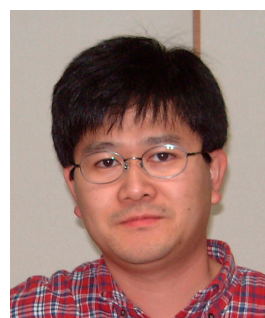
2002年より 現職.

2006年より, 理化学研究所客員主管研究員を兼務.

研究テーマと抱負：速度論的結晶学による酵素やトランスポーターなどのメカニズムの解明.

ホームページ：<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/structbl/>

趣味：うつわ観賞



氏名：中津亨

現職：京都大学大学院薬学研究科構造生物薬学分野 准教授

学位：京都大学博士（農学）

生年月日（西暦）：1968年1月23日

出生地：大阪府八尾市

最終学歴：1997年 京都大学農学研究科農芸科学専攻博士後期課程修了
博士（農学）取得

1997-2000年 京都大学化学研究所 教務職員

2000-2003年 理化学研究所播磨研究所 連携研究員

2003年より, 京都大学大学院薬学研究科構造生物薬学分野 助教授

2007年より, 現職

研究テーマと抱負：生物時計の分子メカニズムの解明. 1つでもたくさんのタンパク質の姿を明らかにしたい.

ホームページ：<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/structbl/>

趣味：演劇鑑賞