

ホタルの発光色と酵素—基質間相互作用との立体構造に基づいた関係

飯尾 一輝¹, 山口 知宏², 村井 智洋², 宇都宮 裕人², 大西 弘晃², 盧 卡², 中津 亨², 加藤 博章^{2*}

¹大阪府立豊中高等学校, ²京都大学大学院薬学研究科

要旨

ホタルは、発光基質であるルシフェリンと酵素が ATP, Mg イオンの存在下に酵素ルシフェラーゼの触媒作用により反応することによって黄緑色に発光することが知られている。近年、岩野らによって合成されたアカルミネというルシフェリン類似物は、ルシフェリンの代わりにルシフェラーゼ反応に供与すると赤色に発光する。この発光色の違いが、発光基質とルシフェラーゼとの相互作用の違いによるものなのか、あるいは、発光基質の化学的な性質の違いによるものかは不明である。そこで我々は、アカルミネとルシフェラーゼの反応後の複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、ルシフェリンの場合と比較することでこの問題への解答を行った。その結果、反応に関わる両基質と酵素の官能基の原子間の立体的な位置関係は、ほとんど同じであった。このことから、基質-酵素間の相互作用はほぼ同じと考えられ、発色の違いは、アカルミネとルシフェリン、それぞれの化学的性質の違いによることが示唆された。

重要語句: 生物発光, ルシフェラーゼ, アカルミネ, ルシフェリン, X 線結晶構造解析

序論

ホタルの黄緑色の発光はルシフェラーゼという酵素によって触媒される化学反応によって生じる⁽¹⁻³⁾。この化学反応では、発光基質であるルシフェリンと ATP が酵素と反応し、反応生成物であるオキシルシフェリン, AMP, ピロリン酸, および二酸化炭素が生じるとともに光が発生する (図 1A)。ルシフェラーゼにオキシルシフェリンと AMP が結合した複合体 (オキシルシフェリン複合体) の立体構造は Nakatsu らによって明らかにされた⁽⁴⁾。また、ルシフェラーゼのアミノ酸配列に変異を導入すると発光色が変化することが知られており、この場合に発光色を制御しているのは、反応途中におけるルシフェラーゼ

とルシフェリンからオキシルシフェリンへと化学変換される分子との相互作用であることも、結晶構造解析によって明らかにされている⁽⁴⁾。近年、この発光反応を利用した分子イメージングは細胞生物学の基礎研究や医療検査に広く利用されており、発光色のしくみが明らかにできれば、さらに応用への付加価値が高まると期待されている⁽⁵⁾。

最近、生体深部イメージングに用いるために新たな発光基質アカルミネが作られた⁽⁶⁾ (図 1B)。アカルミネはルシフェリンの化学構造の改変によって長い波長、つまり赤色の光を生じる発光基質であり、これを用いることによって生体の深部での発光が検出できると期待されている⁽⁷⁾。しかし、アカルミネとルシフェラーゼの反応過程が捉えられていないうえに、その反応生成物の分子構造は未解明である。そのため赤色に発光する原因が、ルシフェラーゼによる反応の仕方、すなわち酵素反応メカニズムや分子間の相互作用がルシフェリンの場合とは違うことによるものなのか、または、これら 2 つの発光基質分子そのものの化学的な性質の違いによるものなのかはわかっていない。そこで本研究では、ルシフェラーゼと反応したアカルミネの生成物の分子構造をルシフェラーゼとの複合体で捉えることにより、発光色の違いの原因を解明しようと試みた。そして、ルシフェリンとルシフェラーゼの反応生成物複合体の分子構造とアカルミネの場合とを比較することによって、発光色の違いの原因を分子構造を基に調べた。

試料と方法

材料

ゲンジボタル・ルシフェラーゼの精製は Nakatsu らの方法に従った⁽⁴⁾。アカルミネは和光純薬から購入した。その他の試薬は、高純度の市販品を用いた。

ルシフェリンルシフェラーゼ反応に対するアカルミネによる阻害の測定

ルシフェリンとルシフェラーゼの酵素反応に対するアカルミ

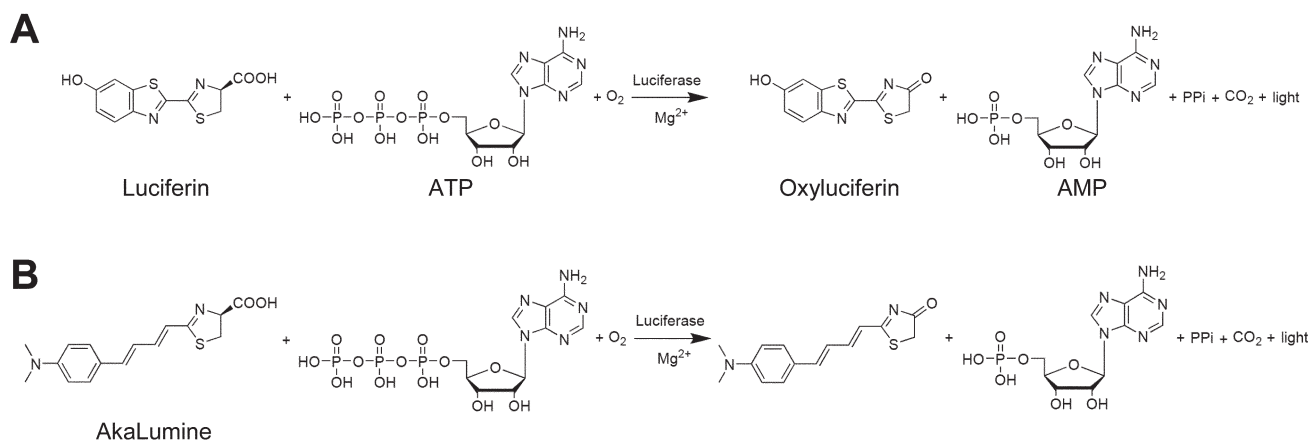


図 1. ルシフェラーゼによって触媒される生物発光反応メカニズム (A) と予測されるアカルミネの発光反応メカニズム (B)。PPi はピロリン酸を示す。

* 内容に関する連絡先: katohiro@pharm.kyoto-u.ac.jp

ネの濃度依存的な影響を以下の方法で調べた。すなわち、0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, または 1000 μM アカルミネを含むルシフェラーゼ-ルシフェリン混合溶液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ルシフェラーゼ, 20 μM ルシフェリン, 50 mM HEPES(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH7.5), 5% (v/v) グリセロール, 1% (w/v) ウシ血清アルブミン) を 100 μL ずつ 96 ウェルマイクロプレートに分注し, 温度を 30 $^{\circ}\text{C}$ に設定したマイクロプレート読取機 LB941 (ベルトールド社製) に挿入した。これに, 100 μL の ATP 溶液 (2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 50 mM HEPES 緩衝液 (pH7.5)) を専用インジェクターを用いて添加混合し, 添加直後から 20 秒間, 0.1 秒ごとに発光強度を測定した。今回測定に用いた装置の測定波長範囲は 340 nm~700 nm であるのに対して, ルシフェリン, アカルミネのピーク波長はそれぞれ 575 nm, 675 nm であるため, ルシフェリンの発光はほぼすべて検出されるが, アカルミネの長波長側の発光の一部は検出されない。さらに, アカルミネの発光強度はルシフェリンの 5% であることが Iwano らによって明らかにされている⁽⁶⁾。そこで, 発光強度の測定値をすべてルシフェリン由来とみなして解析を行った。20 秒間の発光強度の積算値を縦軸に, アカルミネの濃度を横軸にしてグラフを作成し, ルシフェリンの発光強度が 50% に低下するときのアカルミネ濃度を IC_{50} (μM) として算出した。

ルシフェラーゼ反応生成物複合体の結晶化

ルシフェラーゼにアカルミネと ATP および Mg^{2+} イオンを加えて発光させた後の溶液を結晶化に用いた。このときの反応溶液は, 18 mg/mL ルシフェラーゼ, 3 mM アカルミネ, 5 mM ATP, 16 mM MgCl_2 , 5 mM ジチオスレイトール (DTT) となるように 50 μL 調製し, 20 $^{\circ}\text{C}$ の恒温器で 2 時間静置した。その後, 微量遠心機で, 10 分間遠心 (18000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$) した。その遠心後の上清 1 μL と, 沈殿剤を含むリザーバー溶液 (100 mM Tris-HCl (pH8.0), 200 mM MgCl_2 , 21~28% (w/v) ポリエチレングリコール (PEG) 4000, 1 mM DTT) 1 μL を 24 ウェル結晶化プレートの所定の結晶化場所まで混合し, 別の区画に入れた 0.3 mL のリザーバー溶液とともに密閉後, 2 週間 20 $^{\circ}\text{C}$ に恒温して静置することにより結晶化を行った。

X 線回折実験と結晶構造解析

結晶の X 線回折実験は液体窒素温度下で行った。まず, 得られた結晶を, 氷形成を防ぐクライオプロテクタント溶液 (100 mM Tris-HCl (pH8.0), 200 mM MgCl_2 , 28% (w/v) PEG4000, 1

mM DTT, 20% (v/v) イソプロパノール, 10% (v/v) グリセロール, 20 mM HEPES (pH 7.5)) に浸漬させたのち, 水がガラス状に固化するように液体窒素で急速冷却した。その後, この結晶を用いて X 線回折強度測定を行った。このとき, リガク社製の X 線発生装置: FR-E, X 線検出器: Pilatus3 R 200K-A を用い, 測定温度: -180 $^{\circ}\text{C}$, カメラ長 (結晶と検出器の距離): 175 mm, 露光時間: 60 秒, 振動角: 0.5 $^{\circ}$, X 線検出器の 2 θ 角: 0 $^{\circ}$ または 15 $^{\circ}$, の条件で測定した。

作成した結晶の X 線回折像から立体構造を求めるために以下のプログラムを用いて解析を行った。すなわち, 得られた X 線回折像から X 線回折強度への計算にはソフトウェア CrystalClear⁽⁸⁾ を用いた。位相決定はプログラム Phaser MR⁽⁹⁾ を用い, 分子置換法により行った。このときの初期分子モデルには, オキシルシフェリン複合体⁽⁴⁾ (構造座標 PDBid:2D1R) のタンパク質部分を用いた。分子モデルの精密化にはプログラム Refmac5⁽¹⁰⁾, 分子モデルの修正にはソフトウェア Coot⁽¹¹⁾, 立体構造の画像の作成にはソフトウェア PyMOL⁽¹²⁾ を用いた。

立体構造の重ね合わせ

今回構造決定を行った立体構造とオキシルシフェリン複合体 (2D1R) の立体構造の重ね合わせには PyMOL の Align コマンドを用いた。

結果

ルシフェラーゼとアカルミネなどの反応生成物複合体の結晶を作成するために, ルシフェリンを基質とする発光反応に対するアカルミネの影響を指標にして, ルシフェラーゼとアカルミネの結合の強さを調べた。その結果, 加えたアカルミネの濃度増加に伴い, ルシフェリンとルシフェラーゼの酵素反応に伴う発光が阻害された (図 2)。反応が 50% 阻害されたときのアカルミネ濃度, すなわち IC_{50} を算出したところ, $2.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ となった。このことから, 結晶中の全ルシフェラーゼ分子がアカルミネと結合するように, 結晶化溶液に添加するアカルミネの濃度を IC_{50} 値の 1000 倍以上を指標として 3 mM とした。

ルシフェラーゼとアカルミネなどの基質を十分に反応させた後に結晶化したところ, 沈殿剤として 24% (w/v) PEG4000 を用いた場合に図 3 に示した良質の結晶が得られた。この結晶を

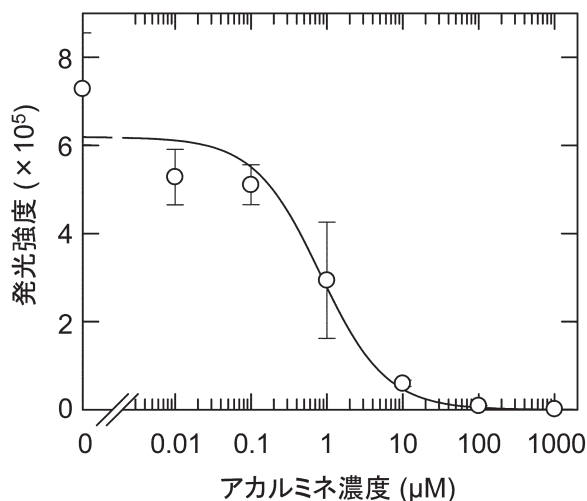


図 2. ルシフェリンを基質としたときのルシフェラーゼの触媒活性に対するアカルミネの濃度依存的な影響。

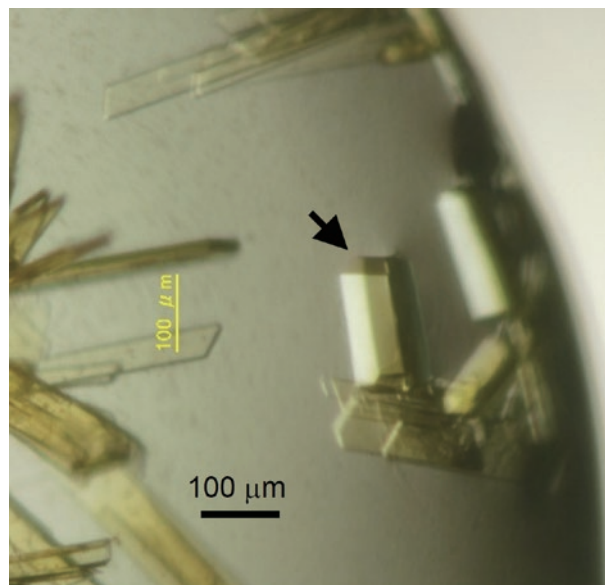


図 3. ルシフェラーゼとアカルミネ, ATP の発光反応後の試料を用いて得られた結晶。矢印で示した結晶を X 線回折実験に用いた。

用いて X 線回折実験を行ったところ、空間群は $P2_1$ 、格子定数は $a = 57.51 \text{ \AA}$, $b = 52.36 \text{ \AA}$, $c = 99.86 \text{ \AA}$, $\beta = 98.22^\circ$ であった。X 線回折強度データの処理を行った結果、 $2.50 \text{ \AA}$ 分解能までのデータの処理が可能であった。測定結果の統計値を表 1 に示した。得られた結晶の分解能からはタンパク質の側鎖の構造を明らかにすることが可能であり、分子の立体構造に基づいて反応メカニズムを調べる目的には十分な解析結果であると考えられた。

表 1. 回折強度データの統計値。

Space group	$P2_1$
Cell dimensions	
$a, b, c \text{ (\AA)}$	57.51, 52.36, 99.68
$\alpha, \beta, \gamma \text{ (}^\circ\text{)}$	90.00, 98.22, 90.00
Wavelength ($\text{\AA}$)	1.5418
Resolution ($\text{\AA}$)	49.33–2.50 (2.59–2.50)
R_{merge}	0.149 (0.418)
No. total reflections	61521
No. unique reflections	16230
$I/\sigma I$	37.9 (6.5)
Completeness (%)	78.8 (64.5)
Redundancy	3.79 (1.88)

The highest resolution shell is shown in parentheses.

次に、得られた回折強度データを用いて立体構造決定を行った。立体構造を決定するには X 線回折強度データと位相が必要であるが、回折像からは位相のデータを得ることはできない。そこで当研究室が明らかにしたオキシルシフェリン複合体の立体構造⁽⁴⁾のうち、ルシフェラーゼ部分の原子座標を初期モデルとして分子置換法により位相決定を行った。回転と並進に関する得られた解を基に精密化と分子モデルの修正を行うことにより、ルシフェラーゼ領域に関する良好な電子密度を得ることに成功した (図 4)。

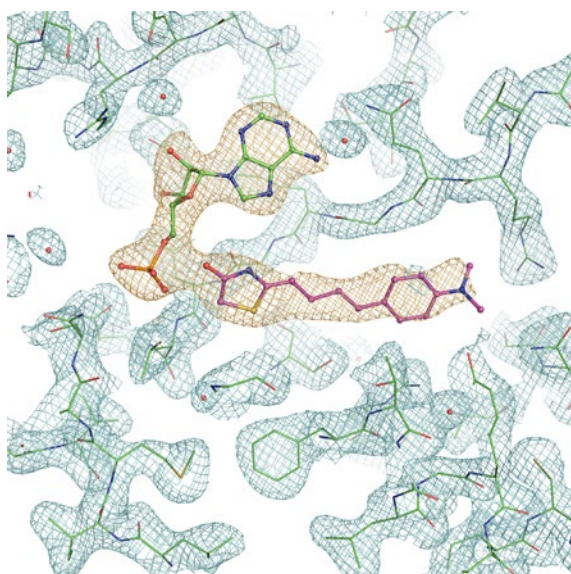


図 4. オキシカルミネ複合体の $2F_o - F_c$ 電子密度図 (閾値は 1.2σ) および当てはめた分子モデル。

ルシフェラーゼ領域の電子密度をシアン色、オキシカルミネ、AMP の電子密度をオレンジ色で示した。分子モデルは、オキシカルミネ、AMP 部分をボール & スティックモデル、ルシフェラーゼ部分をスティックモデルで表示した。分子モデルの配色は、炭素: 緑 (ルシフェラーゼ, AMP), マゼンダ (オキシカルミネ), 酸素: 赤, 窒素: 青, 硫黄: 茶色で示した。水分子の酸素は赤色の球で表示した。

さらに調べたところ、ルシフェラーゼ分子には該当しない領域に図 4 のオレンジ色で示した比較的大きな電子密度の塊を見つけることができた。この電子密度は、形状を考えるとアカルミネの反応生成物 (オキシカルミネと命名) と AMP であると考えられた。オキシカルミネは、オキシルシフェリンと同様、チアゾール環にある反応基のカルボキシル基が酸素に置換された化学構造であると予測されるため (図 1), その向きにオキシカルミネを上記の電子密度に当てはめた。なお、残りの電子密度領域には AMP を当てはめることができた。精密化を行った後にそれぞれの分子間の相互作用の様子を観測すると、反応部位であるオキシカルミネのチアゾール環のカルボニル酸素と AMP のリン酸の酸素が互いに近接し、それぞれの官能基の形状、大きさが電子密度に適切に合致していた (図 4)。さらに原子座標の精密化を行った結果、反応生成物複合体 (オキシカルミネ複合体) 結晶構造の R 値 (結晶構造分子モデルから予測される回折強度と測定した回折強度の一致度) は、22.4% という比較的良好な値へ改良することができた。

本解析によって得られたオキシカルミネ複合体の立体構造は図 5、解析結果の統計値は表 2 に示した。

考察

今回決定したオキシカルミネ複合体の立体構造と、オキシルシフェリン複合体の立体構造⁽⁴⁾とを比較した。まず、二つの複合体の立体構造を重ね合わせたところ、ルシフェラーゼ分子はよく重なっており、さらにオキシカルミネとオキシルシフェリンの対応する各官能基の立体的な位置関係もほとんど同じであった (図 6)。次に、酵素反応に関わる官能基間の距離を調べたところ、チアゾール環のカルボニル基の酸素と AMP のリン酸基の酸素の距離は、オキシカルミネでは $2.9 \text{ \AA}$ 、オキシルシフェリンでは $2.7 \text{ \AA}$ とほぼ同様の値であった。そして、両生成物のチアゾール環部位と AMP および周囲のルシフェラーゼ部位との位置関係は、ほぼ一致していた。以上のことから、ルシフェラーゼとの反応メカニズムは、アカルミネとルシフェリンとでは、ほとんど同じであると考えられた。したがって、これら 2 つの発光基質の発光色の違いは、ルシフェリンとアカルミネの化学的な性質の差異によるものと考えられた。ルシフェラーゼによる発光反応はわずか 1 ケ所のアミノ酸変異によって発光色が赤色に変化することがすでに知られている⁽¹³⁾。この変化の仕組みはルシフェラーゼと発光体であるオキシルシフェリンの相互作用において、立体構造上の違いが生じるため

表 2. 構造解析の統計値。

Resolution ($\text{\AA}$)	30.00–2.50
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.224 / 0.305
No. atoms	
Protein	4111
Ligand	42
Water	159
B-factors ($\text{\AA}^2$)	
Protein	31.9
Ligand	40.6
Water	22.4
R.m.s deviations	
Bond lengths ($\text{\AA}$)	0.012
Bond angles ($^\circ$)	1.60

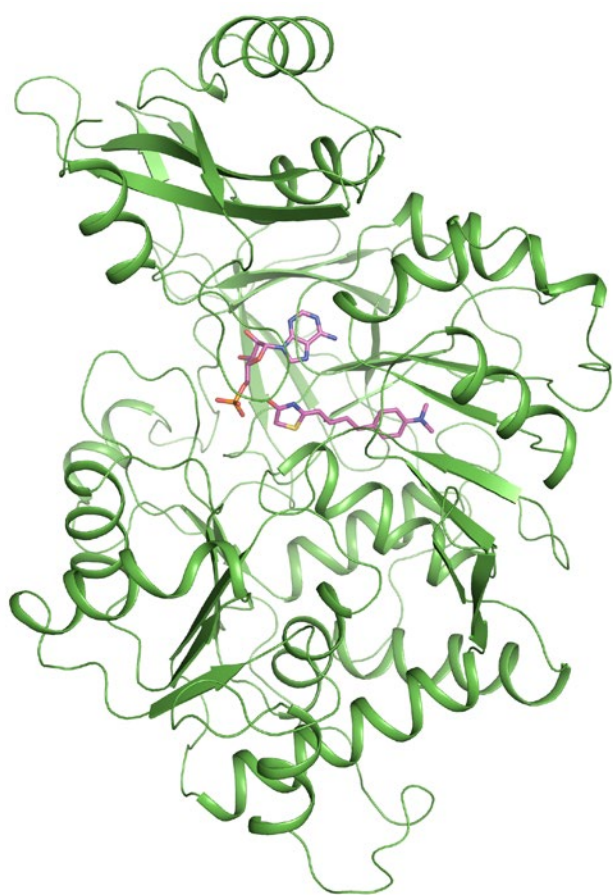


図 5. オキシカルミネ複合体の立体構造モデル図。
ルシフェラーゼは緑色のリボン図、オキシカルミネと AMP はスティックモデル { 炭素: 緑 (AMP), マゼンダ (オキシカルミネ), 酸素: 赤, 窒素: 青 } で示した。

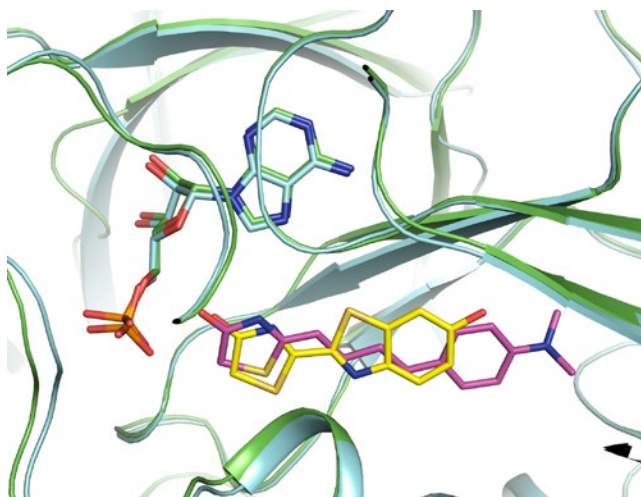


図 6. オキシカルミネ複合体とオキシルシフェリン複合体の基質結合部位付近の立体構造比較。
オキシカルミネ複合体ではルシフェラーゼは緑のリボン図、スティックモデルで描いたオキシカルミネと AMP は炭素: 緑 (AMP), マゼンダ (オキシカルミネ), 酸素: 赤, 窒素: 青で示した。オキシルシフェリン複合体の立体構造では、ルシフェラーゼはシアン, オキシルシフェリンと AMP は炭素: シアン (AMP), 黄色 (オキシルシフェリン), 酸素: 赤, 窒素: 青, 硫黄: 茶で示した。

であると考えられている⁽⁴⁾。その場合とは異なり、今回の結果はルシフェラーゼ反応による両酸化生成物の分子軌道の性質の違いによるものであることが強く示唆された。

結語

本研究によって、アカルミネの反応生成物であるオキシアカルミネとルシフェラーゼとの複合体の 2.5 Å 分解能における結晶構造を明らかにすることができた。さらに、オキシルシフェリン複合体の立体構造との比較から、アカルミネを基質とするルシフェラーゼの酵素反応が赤色の発光を生じる原因は、アカルミネの化学的性質によることが示唆された。しかし、今回解析したオキシアカルミネの電子密度は、ルシフェラーゼとの水素結合など詳細な相互作用を明らかにするには不明瞭であった。したがって、アカルミネの競合阻害実験の結果から IC_{50} 値が $2.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$ と決定できたものの、オキシアカルミネの正確な原子座標位置を決定するまでには至っておらず、発光色や反応機構に関して十分に議論することができなかった。今後、複合体形成条件および結晶化条件を最適化し、より正確なオキシアカルミネの電子密度を計測することによって、もっと詳細なコンフォーメーション決定からルシフェラーゼとの相互作用を明らかにする。さらには酵素反応実験、発光体の吸収スペクトル測定の結果を合わせて解析することにより、発光色や発光反応機構を明らかにしていくことができるものと期待している。

参考文献

- White, E. H., McCapra, F., Field, G. F. & W. D. McElroy. THE STRUCTURE AND SYNTHESIS OF FIREFLY LUCIFERIN. J. Am. Chem. Soc. 83: 2402–2403. (1961).
- Seliger, H. H., Mc, E. W., White, E. H. & G. F. Field. Stereo-specificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 47: 1129–1134. (1961).
- Suzuki, N. & T. Goto. Studies on Firefly Bioluminescence .2. Identification of Oxyluciferin as a Product in Bioluminescence of Firefly Lanterns and in Chemiluminescence of Firefly Luciferin. Tetrahedron 28: 4075–4082. (1972).
- Nakatsu, T. *et al.* Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. Nature 440: 372–376. (2006).
- Prescher, J. A. & Contag, C. H. Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. Curr. Opin. Chem. Biol. 14: 80–89. (2010).
- Iwano, S. *et al.* Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light. Tetrahedron 69: 3847–3856. (2013).
- Kuchimaru, T. *et al.* A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging. Nat. Commun. 7: 11856 (2016).
- Pflugrath, J. W. The finer things in X-ray diffraction data collection. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 55: 1718–1725. (1999).
- McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. J. Appl. Crystallogr. 40: 658–674. (2007).
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & E. J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53: 240–255. (1997).
- Emsley, P. & K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 60: 2126–2132. (2004).
- Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger, LLC. (2010).

13. Kajiyama, N. & E. Nakano. Isolation and characterization of mutants of firefly luciferase which produce different colors of light. *Protein Engineering* 4: 691–693. (1991).

Structure-based Relationship between the Color of Firefly Luminescence and the Enzyme-substrate Interaction

KAZUKI IO¹, TOMOHIRO YAMAGUCHI², TOMOHIRO MURAI², YUTO UTSUNOMIYA², HIROAKI ONISHI², KA LU², TORU NAKATSU² & HIROAKI KATO^{2*}

¹ Toyonaka Senior High School, ² Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Abstract

Fireflies generate a yellow-green light from the oxygenation of the luminescent substrate, D-luciferin, using molecular oxygen. This reaction is catalyzed by the enzyme luciferase in the presence of ATP and Mg²⁺ ions. A luciferin analog called AkaLumine emits a red light when subject to the same luciferase-catalyzed reaction. Whether the difference in emitted color is due to a difference in reaction mechanisms or to the different chemical properties of these two substrates remains unclear. To address the question, we determined the X-ray crystal structure of the complex formed between luciferase and the reaction products derived from AkaLumine at 2.5 Å resolution. Comparing the crystal structures obtained from the AkaLumine-derived complex with that previously obtained from D-luciferin revealed a common three-dimensional arrangement of the functional groups participating in the reaction in luciferase as well as in both substrates. Our results indicate that the reaction mechanism of AkaLumine is almost identical to that of D-luciferin. Therefore, we propose that the red light emitted from AkaLumine is due to a difference in its chemical properties compared with D-luciferin.

Key words: Bioluminescence, Luciferase, AkaLumine, Luciferin, X-ray crystal structure analysis

*Correspondence Researcher: katohiro@pharm.kyoto-u.ac.jp