

ホタルルシフェリン酸化反応経路の理論的研究

(東大物性研¹、名大院・情報科学²) ○樋山みやび¹、秋山英文¹、古賀伸明²

Theoretical study for oxidation reaction of firefly luciferin

(1ISSP, Univ. Tokyo, 2Nagoya Univ.) ○Miyabi Hiyama¹, Hidefumi Akiyama¹, Nobuaki Koga²

【序論】ホタル生物発光は、ホタルルシフェラーゼタンパク質中でルシフェリン酸化反応によりおきる化学発光である[1]。この反応はルシフェリンールシフェラーゼ反応と呼ばれている。図1にホタルルシフェリン酸化反応を示す。この反応ではホタルルシフェラーゼタンパク質中でルシフェリンアニオン(LH⁻)がアデノシン三リン酸(ATP)と Mg²⁺の存在下で、ルシフェリルアデノシンリン酸(LH-AMP)中間体を形成し、ジオキセタノンを経由してオキシルシフェリンアニオン(OL⁻)の励起状態が生成する。

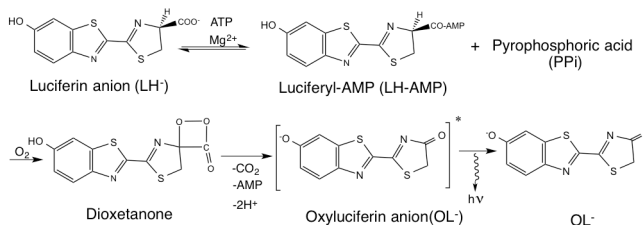


図1：ホタルルシフェリン酸化反応

反応の理解には、初期状態・遷移状態・終状態に関与する化学種の構造変化が重要となる。

ジオキセタノンからケト型オキシルシフェリンアニオン(keto-OL⁻)の励起状態が生成される経路に着目した気相中・タンパク質中のモデル計算が報告されている[2, 3]。これまで発光体の電子励起状態に着目した水溶液中のルシフェリン吸収とオキシルシフェリン光ルミネッセンスの研究[4, 5]から、pH 7付近ではプロトン脱離した共役塩基の存在が報告された。このため、中間体や発光体については複数の候補があり、pHに応じて反応経路が異なる可能性がある。そこで本研究では、LH-AMP・ジオキセタノン・keto-OL⁻およびそれらの共役塩基を考慮することにより、タンパク質内の環境に相当するpH領域での反応経路を明らかにすることを目的とする。

【計算方法】本研究では、タンパク質の環境として考えられるpH 7-9を仮定した。図2にketo-OL⁻の生成経路に関与する化学種を示す。LH⁻・LH-AMP・ジオキセタノンのフェノール基からプロトン脱離した共役塩基も考慮した。経路(a)-(d)それぞれの化学種について、密度汎関数(DFT)法および時間依存DFT(TDDFT)法とB3LYP-D3/6-31+G(d,p)を用いて基底(S₀)状態およびOL⁻の第一励起(S₁)状態の安定構造を求めた。-1価のジオキセタン中間体の初期構造はChungらの構造を参考にした。振動解析からpK_aを求めることにより、共役塩基の相対自由エネルギーを求めた。溶媒効果は連続誘電体モデル(PCM)により取り入れた。電子状態計算にはGaussian09を用いた。酸素は一重項と三重項があり得るので、LH⁻と一重項酸素(三重項酸素)を含む反応系をR_a^S(R_a^T)、と呼ぶことにする。また、LH-AMPと一重項酸素(三重

項酸素) を含む系を I_{1a}^S (I_{1a}^T)、LH-AMP の共役塩基と一重項酸素 (三重項酸素) を含む系を I_{1b}^S (I_{1b}^T) と呼ぶ。ジオキセタンオン中間体の系は I_{2a} 、その共役塩基の系は I_{2b} と呼ぶ。生成系は keto-OL⁻ の系を P_a 、その互変異性のエノール型 OL⁻ の系を P_b 、エノレート型 OL⁻ を含む系を P_c と呼ぶ。

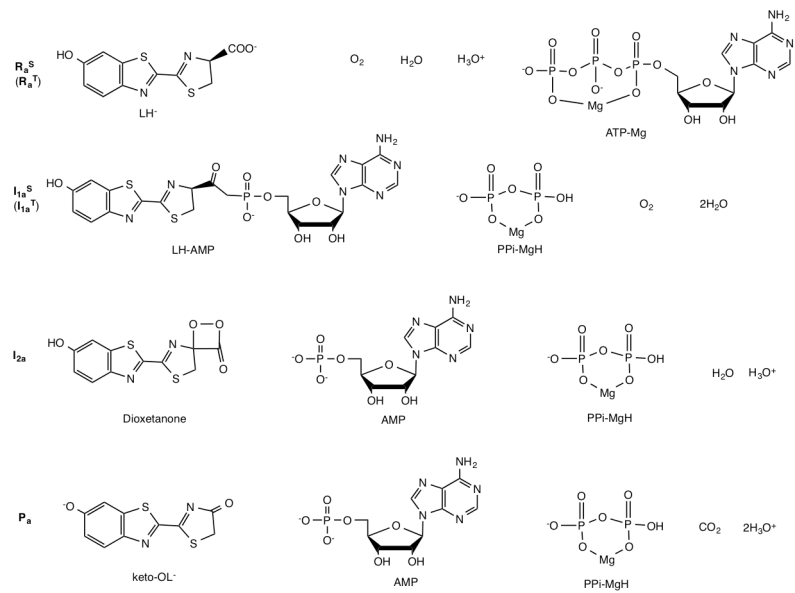


図 2 : keto-OL⁻生成経路に関する化学種

【結果】分散力補正により全エネルギーが低くなるのは、ルシフェリン、ATP-Mg、PPI-MgH、Oxy、AMP、LH-AMP であることがわかった。特に、ATP-Mg (-0.058au) と LH-AMP (-0.09au) は、それぞれ 1.6eV と 2.4eV ほど安定化するため、分散力補正の影響は大きいと言える。LH-AMP 中間体は収束が遅く、分散力補正を入れない計算では、ベンゾチアゾール環とアデニル環がずれた構造になる。分散力補正により、ベンゾチアゾール環とアデニル環が向かい合わせの構造が得られる。

図 3 に化学種の全エネルギーに対する反応経路のエネルギープロフィールを示す。図 3 より、 I_{1a} はとても安定であることがわかった。タンパク質など外的環境が無ければオキシルルシフェリン生成反応はおきにくいということになる。これは、実験的に「ルシフェリン化学ルミネッセンスおきにくい」という結果[6]と一致した。

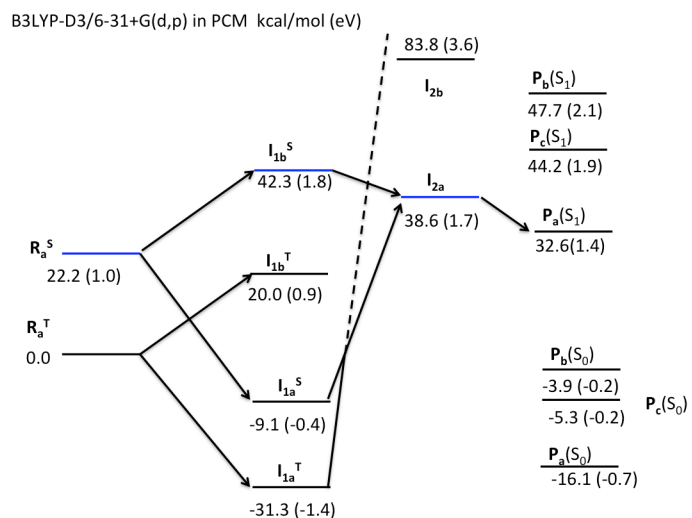


図 3 : 反応経路のエネルギープロフィール

参考文献

- [1] O. Shimomura, Bioluminescence: Chemical Principles and Methods 1-29 (World Scientific, New Jersey, 2006). [2] L. W. Chung et al. (2008) JACS 130, 12880. [3] I. Naviez et al. (2011) Chem Phys Chem 12, 3064. [4] M. Hiyama et al. (2013) Photochem. Photobiol. 89, 571. [5] M. Hiyama et al. (2015) Photochem. Photobiol. 91, 74. [6] H. H. Seliger et al. (1962) Science. 238, 683 - 685.