

ホタルルシフェリンの励起状態に関する理論的研究

(京大院工¹、京大福井セ²) 中谷 直輝¹、長谷川 淳也¹、中辻 博^{1,2}

【緒言】

ホタルの生物発光に関しては古くから数多くの実験的な研究がなされており、また色素であるルシフェリンは化学発光することも知られているため、化学発光に関する研究も数多く行われてきた。化学発光に関しては発光体であるオキシルシフェリン (OxyLH₂) が酸塩基環境の違いにより keto-enol 互変異性を起こし keto 型から赤色の光が、enol 型から緑色の光が放出されることが知られている。しかしながら生物発光については発光反応の酵素であるルシフェラーゼの立体構造についての知見が無かったため、理論的な研究はほとんど行われてこなかった。しかし 1996 年にアメリカホタル (*Photinus pyralis*) のルシフェラーゼの X 線構造が初めて解明された。また、生物発光において、keto 型から緑色の光が出たという実験も報告されている。本研究ではこのアメリカホタルに着目し、量子化学的な手法を用いて、理論的な立場から発光色の再現と emitting state の決定を行った。また、ルシフェラーゼ中にある色素が受ける影響について解析し、ホタルの発光色に与える影響について考察を行った。

【計算内容】

まず化学発光について keto-enol、cis-trans 異性体など OxyLH₂ の幾つかの構造を考え、それぞれ CIS 法により励起状態の構造最適化を行った。得られた構造を用いて、気相中および液相中 (DMSO 中) における発光エネルギーを SAC-CI 法により計算した。溶媒効果については連続誘電体モデル (PCM) を用いて取り込んだ。

次に、emitting state の構造と性質を特定するため、OxyLH₂ keto 型の分子面の回転に対するポテンシャルエネルギー曲線を CIS 法により生成し考察を行った。

さらに生物発光の発光エネルギーに対するルシフェラーゼの影響を考えるため、X 線構造と実験的な研究から予測されている活性部位の位置から OxyLH₂ および反応副生成物である AMP を含んだモデル構造を作成し、分子動力学シミュレーションにより構造を緩和させて安定構造を推定した。さらに、OxyLH₂ に関しては CIS を用いてルシフェラーゼ中での構造最適化を行い、SAC-CI 法により生物発光の発光エネルギーを計算した。

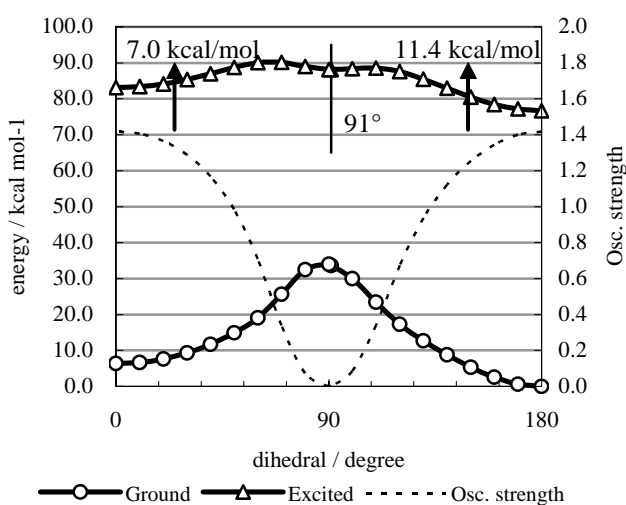
【結果と考察】

まず化学発光に関する発光エネルギーの計算値を以下の表・1 にまとめた。表・1 から気相中の発光エネルギーは中性の構造を除いて全体的に実験値より低い値となっており、実験の傾向も再現できていない。しかしながら、溶媒効果を加えることにより keto 型では 0.14 eV、enol 型では 0.18~0.68 eV の青方シフトが見られ特に 1 価のアニオン構造において実験を高い精度で再現することができた。これらの青方シフトは OxyLH₂ と溶媒分子との双極子-双極子相互作用により OxyLH₂ の基底状態が特異的に安定化されたものと考えことができ、基底状態の双極子モーメントが大きい enol 型におい

表・1: SAC-CI法による化学発光の発光エネルギーの計算値

Structure	Emission energy / eV			
	Gas phase	in DMSO		
	E_{emit}	E_{emit}	Shift	Exptl.
keto-s-trans	3.15	2.95	-0.20	
keto-s-trans(-1)	1.84	2.08	+0.14	1.97
keto-s-cis(-1)	1.84	2.08	+0.14	
enol-s-trans	2.88	2.83	-0.05	
enol-s-trans(-1)	1.92	2.25	+0.33	
enol-s-cis(-1)	1.93	2.30	+0.37	2.20
enol-s-trans(-1)'	1.46	2.14	+0.68	
enol-s-trans(-2)	1.89	2.07	+0.18	

()内の数字は電荷、"Shift"は気相中からの発光エネルギーシフト



図・1: OxyLH2の分子面の回転に対するポテンシャル曲線

表・2: SAC-CI法による生物発光の発光エネルギーの計算値

Gas phase	AMP position	QM region	Emission energy / eV	
			SAC-CI	Exptl.
Gas phase	-	Gas phase	1.84 (Ref.)	
In-Protein not QM optimized	×		1.89 (0.04)	
	a	OxyLH ₂ only	2.10 (0.26)	
	b		2.17 (0.33)	
	a	OxyLH ₂ only	2.02 (0.18)	2.23
	b		1.82 (-0.02)	
In-Protein Optimized Structure	a	OxyLH ₂ +	2.07 (0.23)	
	b	ARG218	1.90 (0.06)	
	a	OxyLH ₂ + ARG218	2.33 (0.49)	
	b	+ HIS245 + Phosphate	2.13 (0.29)	

()内の数字は気相中からのシフト

HIS245 への電荷移動により HIS245 の正電荷による OxyLH₂ の LUMO への安定化の寄与が弱くなり、大きな青方シフトを与えている可能性がある。

以上の計算結果と実験事実などを踏まえると、アメリカホタルの生物発光では本来赤色の光を放出する keto 型の OxyLH₂ が AMP のリン酸部分の負電荷や HIS245 上の正電荷の減少により発光色が大きく青方シフトしていることが示唆された。

てその効果が顕著に現れたと考えられる。

次に、OxyLH₂ の分子面の回転に対するポテンシャルエネルギー曲線を以下の図・1に示した。図・1から keto 励起状態においては trans 型の平面構造が最も安定であり、ねじれ構造では発光強度も著しく低下することから化学発光においても生物発光においても emitting state は平面性を保っている可能性が高いと考えられる。しかしながら、分子面の2面角が91°になるところで局所安定点が存在し、ねじれ構造が準安定な状態として存在する可能性は否定できないと考えられる。

また、OxyLH₂ keto-s-trans(-1)の構造を用いて計算したルシフェラーゼ中での発光エネルギーを以下の表・2にまとめた。表・2からAMPを含まないモデルでは発光エネルギーが1.89 eVと気相中に比べ、0.04 eVしか変わらないのに対し、AMPを含むモデルでは0.2~0.3 eV程度の青方シフトが見られることからAMPのリン酸部分の負電荷が発光エネルギーに大きな影響を与えていることが分かった。また、ルシフェラーゼ中でCISによりOxyLH₂の構造最適化を行うと立体障害などの影響を受け、分子面がわずかにねじれ、赤方シフトすることが分かる。さらに発光エネルギー計算の際に、QM regionに周辺残基であるARG218やHIS245、AMPのリン酸部分を加えた計算では、OxyLH₂とARG218との水素結合の影響はほとんど現れなかったが、AMPのリン酸部分から