

2A13

ホタルの光を制御するルシフェラーゼ酵素の機能

(京大院・工) ○中谷 直輝、長谷川 淳也、中辻 博

【緒言】

ホタルはその種類によって緑色(530 nm)から赤色(620 nm)の光を放出することが知られている。しかしながら、発光を担う色素であるホタルルシフェリンは全てのホタルで共通しており、この発光色の変化は酵素であるルシフェラーゼの構造が重要な役割を担っていると考えられている。また、近年ではホタルの生物発光は遺伝子発現のレポーター試薬として用いられており、ホタルの発光色制御メカニズムはバイオイメージングの観点からも非常に興味深い課題である。

ホタルの発光色制御メカニズムに関しては古くから研究が行われており、生物発光とルシフェリンの化学発光との類似性から、発光体となるオキシルシフェリン(OxyLH₂)の keto-enol 互変異性に基づくメカニズムが実験から提案され(1)、近年までこの説が有力視されてきた。ところが 2001 年になって、keto 型のみでの発光色制御メカニズムが存在する可能性を示唆する報告が Branchini ら(2)によって行われ、再び発光色制御メカニズムに関する議論がなされてきている。

本研究では、化学発光・生物発光における OxyLH₂ の発光エネルギーを SAC-CI 法を用いた量子化学計算により算出し、実験スペクトルとの比較から発光色メカニズムの解明を試みるとともに、ルシフェラーゼ酵素が担う役割について考察を行った。

【計算内容】

化学発光に関しては、keto 型・enol 型それぞれについてプロトネーション状態の違いなどによる 8 つのモデルを考え、それぞれ CIS 法による励起状態の構造最適化を行った。得られた構造について気相中および実験条件を再現するために液相中(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)を用いた。

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。

生物発光に関しては、古くから実験が多く行われてきている北アメリカホタル(*Photinus pyralis*)に着目し、その黄緑色の発光(556 nm: 2.23 eV)の起源を解明することを目的として研究を行った。生物発光を議論するためには OxyLH₂ とルシフェラーゼ酵素との複合体の構造が不可欠であるが、現在解かれている北アメリカホタルのルシフェラーゼの X 線結晶構造には基質であるルシフェリンや ATP もしくは、生成物である OxyLH₂ が含まれていない。そこで本研究では、まずミュータント実験などから提唱されているルシフェリン-ルシフェラーゼ複合体の構造予測をもとにモデリングを行い、分子動力学シミュレーションを用いて複合体の安定構造の予測を行った。次に、得られた複合体の構造に関して OxyLH₂ とその周辺アミノ酸残基を QM 領域として取り込み、CIS 法を用いて励起状態の構造最適化を行った。さらに、得られた最適化構造を用いて SAC-CI 法により生物発光の発光エネルギーを計算した。また発光エネルギー計算の際、QM 領域の取り方を変えることにより、ルシフェラーゼ酵素の量子効果についても詳細な解析を行い、考察を行った。

【結果と考察】

SAC-CI 法による化学発光・生物発光の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においては keto 型・enol 型で有意の違いは見られず、実験スペクトルの傾向を再現できなかった。しかしながら DMSO の溶媒効果を加えることにより、特に enol 型において大きな青方シフトが見られ、実験スペクトルをよく再現する結果となった。これらの青方シフトは

表 1: SAC-CI法による化学発光の発光エネルギーの計算値

Phase	Structure	QM model	Emission energy / eV	
			E _{emit}	Exptl.
in Vacuo	keto-form	OxyLH ₂	1.96	-
	enol-form		2.02	
in DMSO (化学発光)	keto-form	OxyLH ₂	2.08	1.97¹⁾
	enol-form		2.25	2.20¹⁾
in Protein (生物発光)		OxyLH ₂	2.02	
	keto-form	OxyLH ₂ +Arg +His+Phosphate	2.33	2.23²⁾

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ることができ、基底状態の双極子モーメントが大きい enol 型においてその効果が顕著に現れたと考えた。

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た。

また、オキシルシフェリン(keto-form)-ルシフェラーゼ複合体の構造を用いて計算した生物発光の発光エネルギーでは、QM 領域として OxyLH₂ のみを含めた場合、気相中や液相中の結果と大きな変化は見られなかった。しかしながら周囲の荷電アミノ酸と副生成物として OxyLH₂ 付近に存在すると考えられる

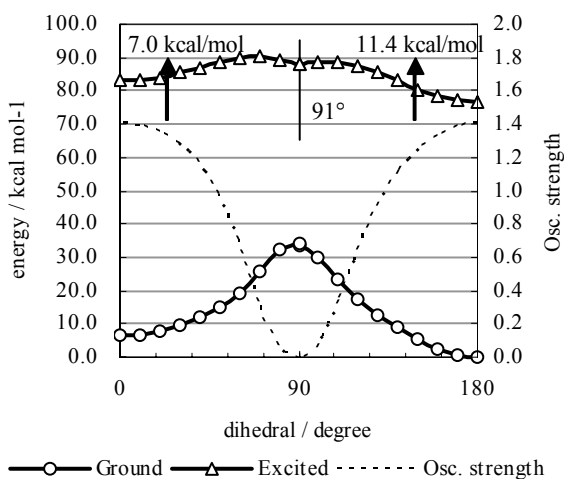


図 1: OxyLH₂ の分子面の回転に対するポテンシャル曲線

る AMP のリン酸部分を QM 領域に含めることによって、大きな青方シフトが見られ、実験の発光エネルギーとよい一致を示した。このことから、北アメリカホタルにおける黄緑色の発光は、keto 型の OxyLH₂ が担っている可能性が高いことが示唆され、Branchini らの結果が支持された。

さらに、発光エネルギーに影響を及ぼす因子について詳細な解析を行った結果、OxyLH₂ のルシフェラーゼ中での構造緩和と HIS245 の静電場の影響は発光エネルギーを赤方シフトさせる方向にはたらき、ARG218 や AMP のリン酸部分の静電場の影響は逆に発光エネルギーを青色シフトさせる方向にはたらくことが分かった。また stacking や CT の影響が動的な電子相関を通して発光エネルギーをさらに青色シフトさせる方向にはたらいていることが分かった。

以上の計算結果と実験事実などを踏まえると、ホタルの発光色は keto 型の OxyLH₂ の発光エネルギーをルシフェラーゼ酵素の活性部位における静電的な環境の違いによって制御している可能性が高いと結論づけられた。

[1] White, E. H., Rapaport, E., Seliger, H. H., Hopkins, T. A. *Bioorg. Chem.* **1971**, *1*, 92

[2] Branchini, B. R., Murtiashaw, M. H., Magyar, R. A., Portier, N. C., Ruggiero, M. C., Stroh, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2112