

2006年3月16日
独立行政法人 理化学研究所

ゲンジボタルの発光現象の仕組みをとらえる

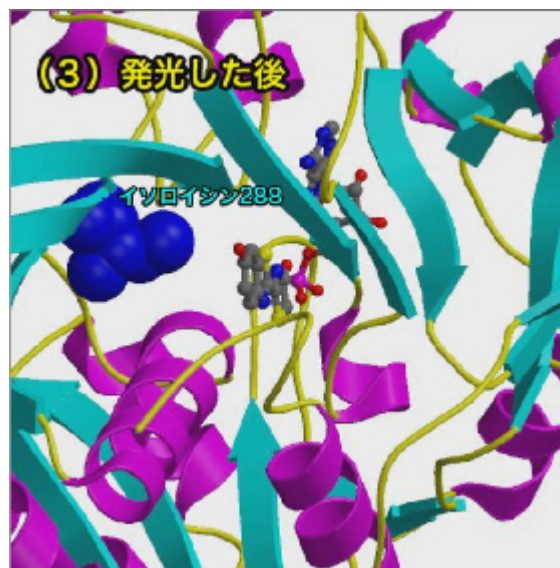
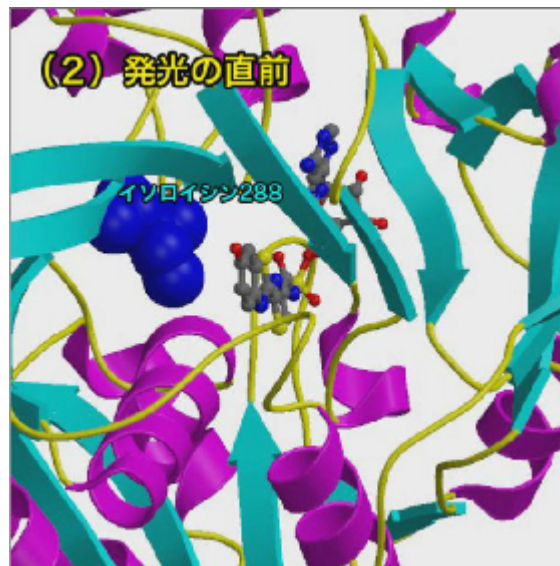
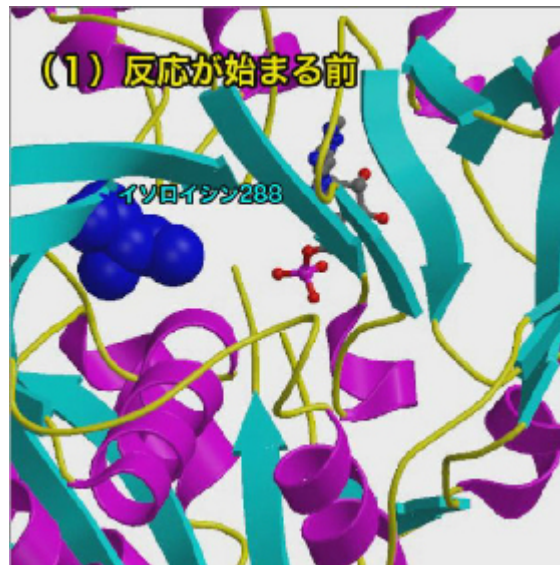
- 世界最大の放射光施設 SPring-8 の光が解き明かす小さな光の謎 -

夏の終わり、野山で小さくも幻想的な光りを放ち、人々の心を魅了してやまない生物、ホタル。その美しさの謎が、世界最大級の放射光施設を使って、明らかにされました。

ゲンジボタルで黄緑色に光るのは、「ルシフェラーゼ」という名前の発光酵素の働きであることはわかっていました。理研播磨研究所メンブレンダイナミクス研究グループは、この「ルシフェラーゼ」が独特の立体構造を持ち、その構造から、発光するメカニズムを明らかにしました。

さらに、天然の状態での黄緑色とは異なり、赤く発色する「ルシフェラーゼ」を人工的に合成。その構造を天然型の酵素と比較し、色が調節される仕組みを解明することにも成功しました。

ホタル発光は、「この世に存在する、もっとも効率の高いエネルギー変換装置」といわれています。90%という高い効率で、化学エネルギーを光エネルギーに変換できるからです。そのため、今回の発見は、単にホタルの神秘が科学的に解明されたということにとどまらず、より効率的なエネルギー変換装置の設計という技術開発に貢献できる点でも、有意義なものと評価できるでしょう。



(図) ゲンジボタルのルシフェラーゼの立体構造の比較

2006年3月16日
独立行政法人 理化学研究所

ゲンジボタルの発光現象の仕組みをとらえる

- 世界最大の放射光施設 SPring-8 の光が解き明かす小さな光の謎 -

◇ポイント◇

- ・発光酵素「ルシフェラーゼ」の反応過程の立体構造を世界で初めて決定
- ・発光色を決定しているメカニズムも解明
- ・高い発光効率の工業化も可能に

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、国立大学法人京都大学と共同で、ホタルが黄緑色に光るメカニズムを世界で初めて原子レベルで解明することに成功しました。ホタルの発光に関わる酵素（タンパク質）「ルシフェラーゼ」*1をはじめとする生物発光に関与する物質はすでに知られていましたが、今回、大型放射光施設（SPring-8）の理研構造生物学ビームラインI（BL45XU）と理研構造生物学ビームラインII（BL44B2）を用いて、ルシフェラーゼの立体構造を解明し、さらに発光色を決定しているメカニズムを明らかにしました。この研究成果は、理研播磨研究所メンブレンダイナミクス研究グループの中津亨連携研究員（京都大学大学院薬学研究科助教授）、市山進連携研究員（学習院大学助手）、小橋信行連携研究員（現在は中央研究所吉田化学遺伝学研究室）、加藤博章チームリーダー（京都大学大学院薬学研究科教授）、京都大学化学研究所平竹潤助教授らの研究グループによるものです。

これまで、ホタルによる黄緑色の発光はタンパク質であるルシフェラーゼと発光基質*2であるルシフェリン*3との反応により生じること、さらにはルシフェラーゼの種類や反応条件の違いで発光色が黄緑から橙色や赤色に変化することが知られていました。しかしこうした現象が生じるメカニズムの多くは、大きな謎となっていました。

研究グループは、日本の代表的なホタルであり、アメリカ産ホタルの近縁種でもあるゲンジボタルを材料に使い、この幻想的な光を放つゲンジボタルのルシフェラーゼの立体構造が反応の経過にともなって変化していくさまを精密に捕らえ、この謎を解き明かしました。すなわちルシフェラーゼは、発光の際に、ルシフェリンから生じた発光体「オキシルシフェリン」を強く握りしめるような構造をとり、オキシルシフェリン分子が強く固定されることで化学エネルギーが無駄なく使われ黄緑色になり、握りが緩いとエネルギーが失われて赤色になることを突き止めました。

今回の成果は、精巧な分子装置である生物発光がどのようにして行われているのかを解明しただけでなく、全く新しい発光システム構築などへの応用を可能にするものです。本研究成果は、英国の科学雑誌『*nature*』（3月16日号）に掲載されます。

1. 背景

初夏になると、ホタルは互いのコミュニケーションのために黄緑色の光を放ち明滅します。このホタルの発光は、タンパク質であるルシフェラーゼ（酵素）と発光のもととなる物質ルシフェリン（発光基質）が反応することにより生じます。最初

にルシフェリンがルシフェラーゼの中でATP^{*4}と反応し、発光する直前の中間体化合物を生成します。次にこの化合物が酸化されることで、エネルギーを持った「オキシルシフェリン」という発光体が生成され、そのエネルギーを放出する際に発光します(図1)。ホタルのルシフェラーゼの立体構造は、アメリカ産ホタルのルシフェラーゼでは1996年にすでに明らかになっていました。しかし、この時点で明らかにされた立体構造は、反応に関わるルシフェリンなどの物質が含まれていない、ルシフェラーゼのみの構造であったことから、発光メカニズムに関してはほとんど何もわかっていませんでした。

また、この黄緑色の発光を橙色や赤色に変えられることも、非常に興味深い現象として昔から知られていました。たとえば、ルシフェリンとルシフェラーゼを用いて発光反応を行う時に溶液を酸性にしたり、発光の手助けをするルシフェラーゼのアミノ酸残基^{*5}を1つ変えたりすることにより、発光色が赤色に、劇的に変化します。しかしこの理由については、約40年間様々な研究が行われ、たくさんの理論が考えられてきましたが、はっきりしたことはわかっていませんでした。

2. 研究手法

研究グループは、日本の代表的なホタルであるゲンジボタルのルシフェラーゼを用い、酵素の立体構造が発光反応の経過にもなって変化していくさまを連続写真のように順番に捕らえ、発光メカニズムを解明していく手法を考えました。すなわち、X線結晶構造解析の手法を用いて、原子レベルで酵素の連続写真を撮っていくというものです。

X線結晶構造解析を行うには、まずルシフェラーゼを高純度に精製し、品質の良い結晶を作る必要がありました。そこで、ゲンジボタルのルシフェラーゼの遺伝子を大腸菌に組み込み、大量に作らせるという遺伝子工学の手法を使いました。大腸菌に作らせたルシフェラーゼを高純度に精製したところ、非常に良好な結晶が得られました。また、反応の経過にもなって変化する酵素の構造を段階的に捕らえるために、(1) 反応が始まる前、(2) 発光の直前、(3) 発光した後の3種類の状態を結晶中で作成し、その立体構造を決定しました。特に、今回の研究のポイントとなる(2)の発光反応直前の状態については、この構造に似た化合物(中間体アナログ)デヒドロルシフェリルスルファモイルアデノシン(DLSA、図1)を合成して用いたことで、この状態の結晶を初めて作成することに成功しました。さらに、大型放射光施設SPring-8によるきわめて高質なX線を用いることで、1.3 Å(オンゲストローム=10⁻¹⁰m)分解能というきわめて高い分解能での構造解析(図2)が実現し、発光機構解明のカギとなりました。

3. 研究成果

反応が始まる前、発光の直前、発光した後、の3つの反応段階のルシフェラーゼの立体構造について比較したところ、発光直前の構造では、ルシフェラーゼを構成しているアミノ酸残基のうち288番目のイソロイシン残基が発光体であるオキシルシフェリンのほうに大きく張り出すという特徴的な構造変化を起こしていることがわかりました(図3)。しかしこの構造変化は、発光を行うために必要なことなのか?黄緑色に光らせることに必要なことなのか?のどちらなのかはこの構造情報

からだけではわかりませんでした。

これまでの研究から 286 番目のセリン残基をアスパラギン残基に変えると発光色が黄緑色から赤色に変化することが知られています (図 4)。そこで、この変異型ルシフェラーゼを使い、本来のルシフェラーゼ (野生型) と同じく、(2) の発光反応直前の立体構造を決定しました。すると、288 番目のイソロイシン残基に特徴的な構造変化は観測されませんでした。このことから 288 番目のイソロイシンの動きは、赤色ではなく黄緑色に光らせるために必要な動きであることが示されました。

野生型のルシフェラーゼである黄緑色型、赤色に光らせる赤色型の 2 つの構造について、発光体であるオキシルシフェリンのまわりの環境 (立体構造) を比較してみたところ、赤色型に比べて黄緑色型のほうが、オキシルシフェリンを非常に密に取り囲んでいる (しっかりと握っている) ことがわかりました (図 5)。すなわち、黄緑色に光るためには、赤色に光るよりもより多くのエネルギーが必要であるため、288 番目のイソロイシン残基は、オキシルシフェリンのもつ化学エネルギーを熱 (振動) として無駄に逃がさないようにしっかりと捕まえておくための「装置」として働いていることが予想されました。

そこで、オキシルシフェリンを取り囲んでいる状態をわざと変化させるために、288 番目のイソロイシンを、より小さなアミノ酸残基であるバリンやアラニンに変異させたルシフェラーゼを作成しました。その発光色を観察したところ、予想どおり、それぞれ橙色、赤色に発光し、よりエネルギーの低い色に変化していきました (図 6)。すなわち、288 番目のイソロイシン残基がオキシルシフェリンをしっかりとつかまえておく「装置」として働いていることを、実験的に確かめることに成功したことになります。これは、288 番目のイソロイシンというこれまで全く予期されていなかったアミノ酸残基を変化させることによって発光色の違う一連のルシフェラーゼを作成することによって、発光色の制御メカニズムを実験的に証明したことになります。

4. 今後の期待

約 100 年前の 1900 年初頭には、「ホタルによる発光は発熱を伴わないため冷光である」との記載があり、1960 年には、精密測定により、化学反応によって得られたエネルギーが発光のエネルギーに使われる変換効率 (量子収率) は約 9 割であることが明らかにされました。この効率は、現在知られている発光システムの中でも最高の効率といえます。

今回明らかになった立体構造情報から、「なぜホタルの発光反応がこのように変換効率が良いのか?」ということがさらに明らかになれば、この一連の研究から省エネ型バイオナノマシン^{※6}の開発などへの応用が期待できます。また、発光によるイメージング技術は、バイオ産業や医療など様々な分野での応用が進められており、今回の成果はさらなる波及効果をもたらすでしょう。さらに研究が進み、青色発光するルシフェラーゼを作ることができれば、光の 3 原色である赤、緑、青がそろうことになり、青色発光ダイオードが産業界に革命をもたらしたように、生物発光を利用したバイオイメージング等の分野でさらに応用が広がるのが期待できます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所播磨研究所
放射光科学総合研究センター
メンブレンダイナミクス研究グループ
速度論的結晶学研究チーム

チームリーダー 加藤 博章

Tel : 0791-58-1825 / Fax : 0791-58-1826

研究推進部

猿木 重文

Tel : 0791-58-0900 / Fax : 0791-58-0800

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ルシフェラーゼ

発光バクテリアやホタルなどの生物発光において、発光物質が光を放つ化学反応を触媒する作用を持つ酵素の総称。発光酵素とも呼ばれる。

※2 基質

酵素の触媒作用によって、化学反応が起こる物質。

※3 ルシフェリン

ルシフェラーゼによって酸化されて発光する様々な基質の総称。

※4 ATP

アデノシン 3 リン酸。生体内でエネルギー生産を行う過程で必ず使用される、非常に重要な物質。

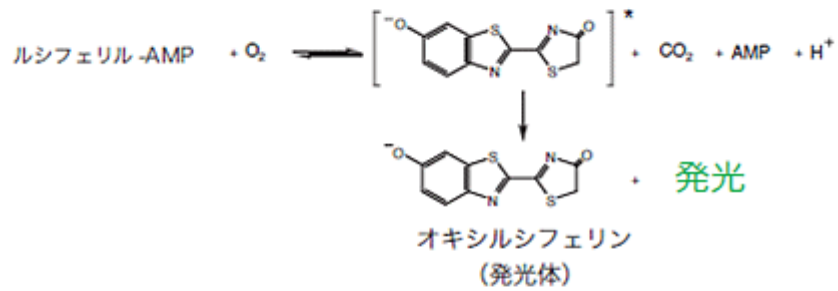
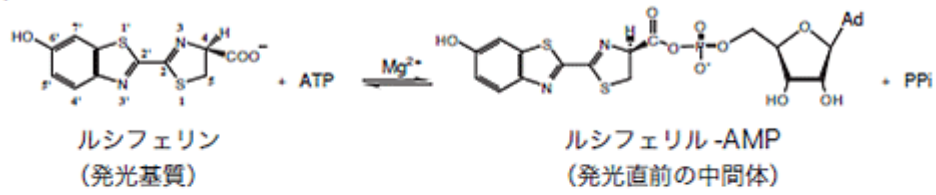
※5 アミノ酸残基

タンパク質はアミノ酸が直鎖状に繋がってできおり、この直鎖にはもともとのアミノ酸の構造を示す小さな枝状の部分が存在する。この部分をアミノ酸残基という。

※6 バイオナノマシン

ナノマシンとは、ナノメートル(10^{-9}m)単位の機械装置を言い、生体物質がナノマシンのように振る舞うものをバイオナノマシンと呼ぶ。例えば、べん毛を形作るタンパク質は、タンパク質の集合がモーターのように働くことから、バイオナノマシンと言える。

(1)



(2)

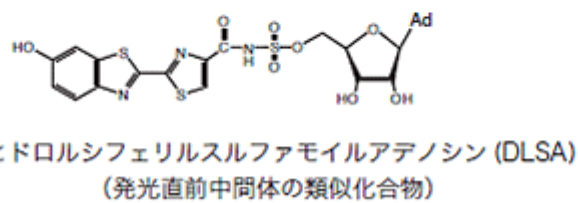


図1 (1) ルシフェラーゼによる発光反応メカニズムと (2) 発光直前中間体の類似化合物 DLSA



図2 ゲンジボタルルシフェラーゼの発光直前の立体構造

青色の大きなドメインと小さなドメインから構成されている。ルシフェリンの結合場所は両ドメインの間にある。緑色は発光直前の構造を模した反応中間体アナログ DLSA の構造。1.3 Å分解能で構造解析された。

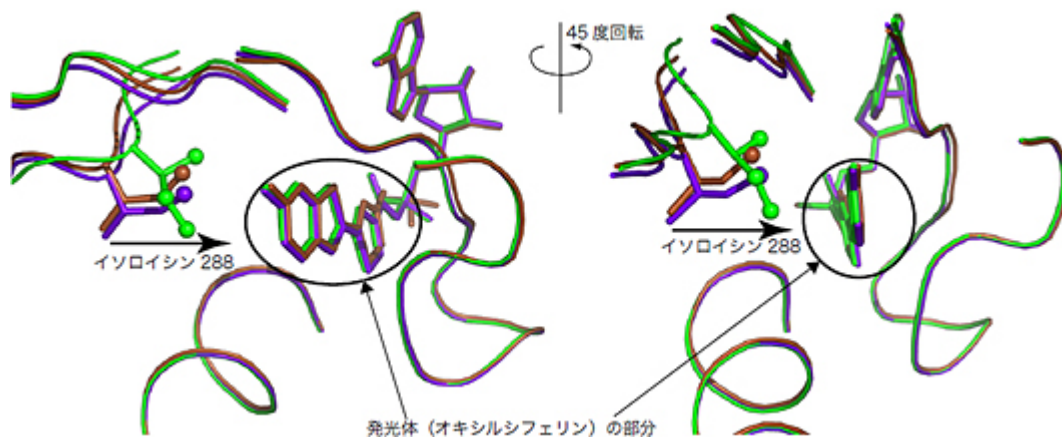
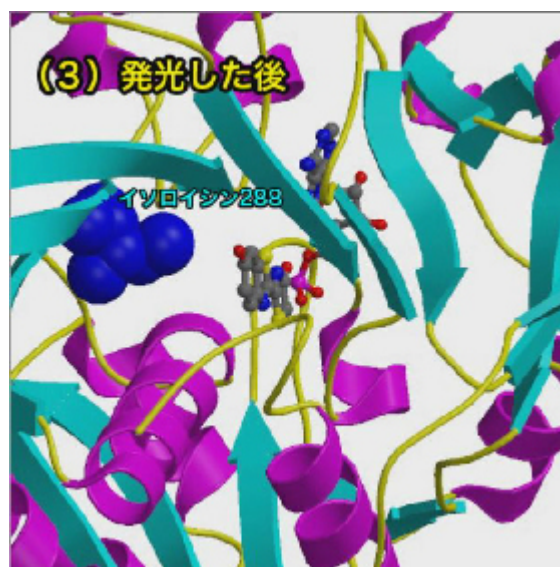
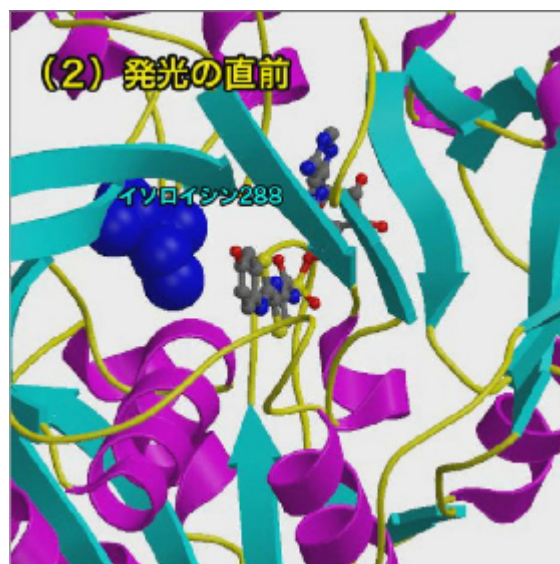
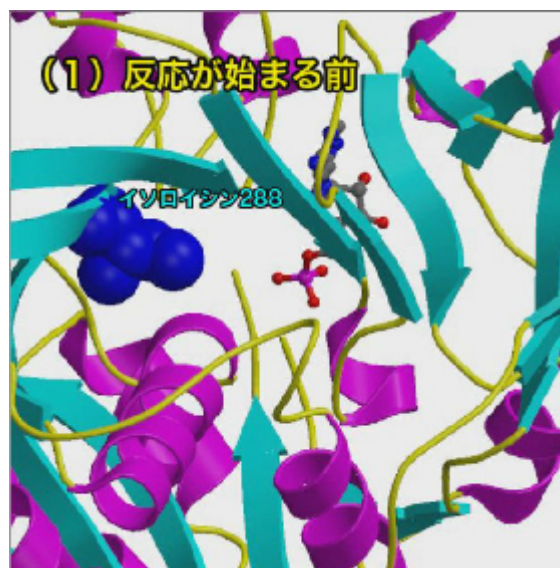


図3 3つの反応段階のルシフェラーゼの立体構造の重ね合わせ図

左図の向きを45度方向変えると右図になる。

(1) 反応が始まる前 (茶色)、(2) 発光の直前 (黄緑色)、(3) 発光した後 (紫色) を比較すると、288番目のイソロイシン残基が発光体であるオキシルシフェリンの方に大きく張り出している。



反応に伴う 288 番目のイソロイシンの動き



図4 ルシフェラーゼの発光の変化

ルシフェラーゼを構成するアミノ酸のうち、286番目のセリン残基をアスパラギン残基に変えると発光色が黄緑色から赤色に変化。

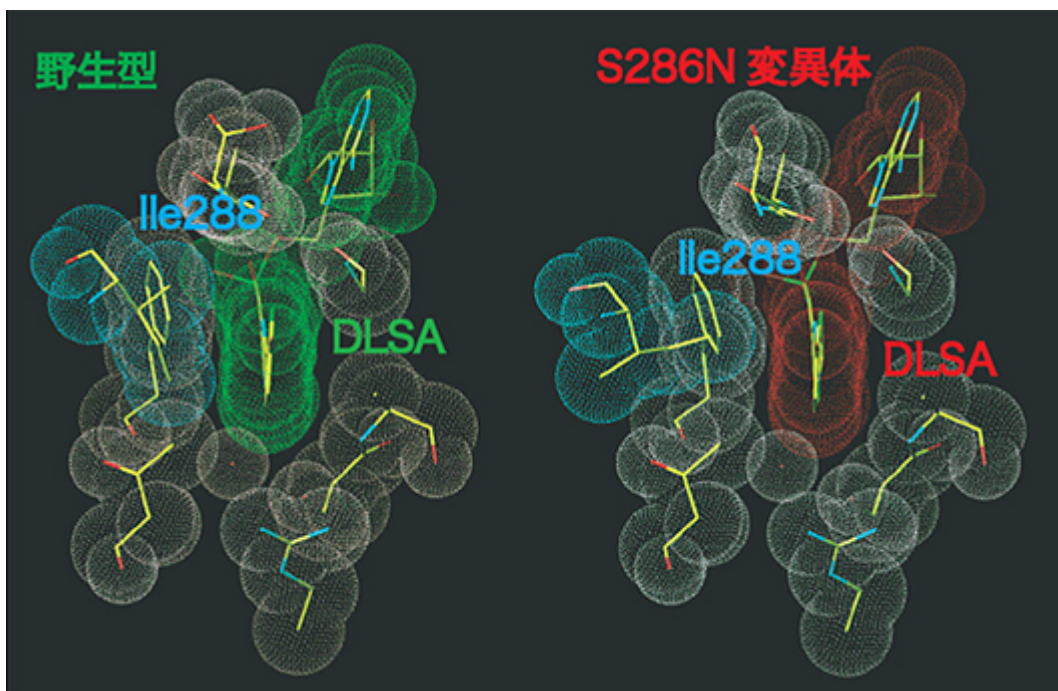


図5 発光体オキシルシフェリンのまわりの環境（立体構造）比較

黄緑色型（野生型）と赤色型（286番目のセリン残基をアスパラギン残基にした変異体）のルシフェラーゼの発光直前状態。黄緑色型のほうがオキシルシフェリンをしっかり握るように近寄っていることがわかる。

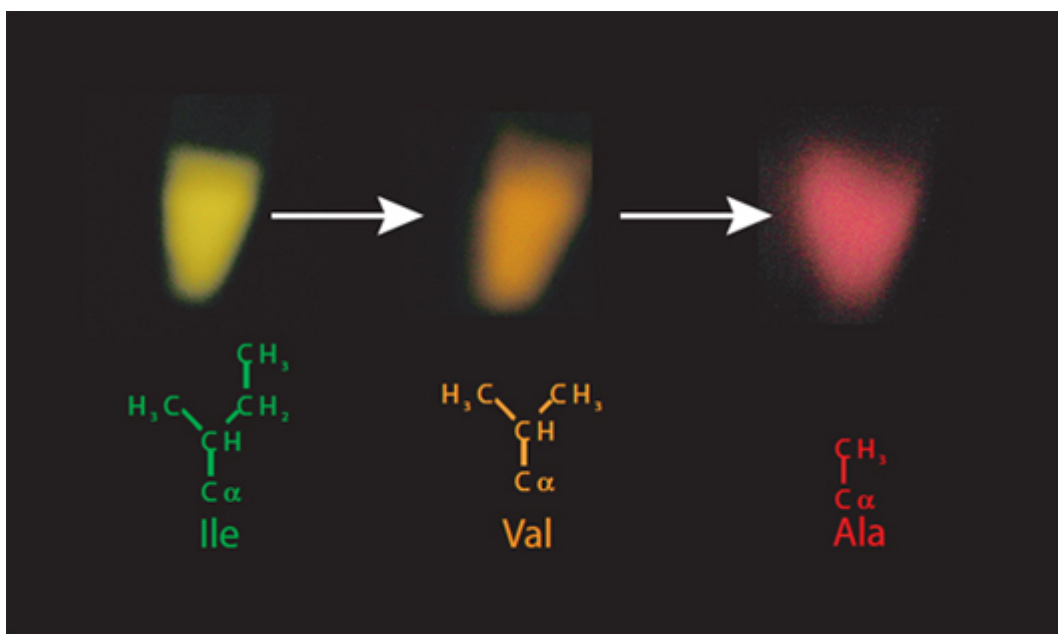


図6 288番目のイソロイシン残基の大きさの変化による発光色の変化

残基の大きさが小さくなるにつれ、黄緑色、橙色、赤色に変化した。