

- H., Tempst, P., Wong, J., & Zhang, Y. (2006) *Cell*, 125, 483–495.
- 15) Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., & Zhang, Y. (2006) *Nature*, 442, 312–316.
- 16) Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolnikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., & Shi, Y. (2006) *Cell*, 125, 467–481.
- 17) Cloos, P.A.C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., & Helin, K. (2006) *Nature*, 442, 307–311.
- 18) Fodor, B.D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan, R.J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G., & Jenuwein, T. (2006) *Genes Dev.*, 20, 1557–1562.
- 19) Shi, Y. & Whetstine, J.R. (2007) *Mol. Cell*, 25, 1–14.

東田 裕一

(国立大学法人九州大学生体防御医学研究所
細胞機能制御学部門分子発現制御学分野)

Histone methylation and demethylation—Focusing on demethylation—

Yuichi Tsukada (Department of Molecular and Cellular Biology, Division of Cell Biology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Fukuoka 812-8582, Japan)

ホタル発光のなぞ

はじめに

ホタルのルシフェラーゼの発光反応は、分子生物学や細胞生物学研究は無論のこと、*in vivo*の分子イメージングなどの基礎医学研究でも広く用いられている。この発光反応の最大のなぞの一つは、発光色制御のメカニズムである。長らく謎だったこの仕組みが、発光色の異なるルシフェラーゼの反応過程の各段階の結晶構造を精密に解析することによりようやく明らかになった¹⁾。本稿では、ホタルの発光反応色の制御メカニズムの研究動向について紹介する。

1. ホタル・ルシフェラーゼの発光反応と発光色の制御メカニズム

ホタルの発光反応は、発光酵素ルシフェラーゼ (EC 1.13.12.7) によって発光基質の化学エネルギーが光へと変換されるものである^{2,3)}。発光反応は図 1a に示すように

2段階で進行する。まず発光基質ルシフェリンのカルボキシ基がATPの α 位のリン酸基を攻撃し、ルシフェリルAMP中間体を酵素中で一旦生成し、ピロリン酸 (PPi) が放出される。次いで、酸素がこの中間体と反応して、AMP、CO₂とともに、励起状態のオキシルシフェリンが生成し、これが基底状態へと移動する際、エネルギーを可視光として放出する。このエネルギー変換の量子収率は極めて高く、ほぼ90%に達する⁴⁾。

この発光反応の最大のなぞの一つは、発光色制御のメカニズムである。ホタルの発光はふつう黄緑色を示す。しかし、酸性pH条件下でルシフェラーゼ反応を行うと発光色が赤色に変化する。また、ルシフェリン誘導体を酵素非存在下で反応させた場合も発光は赤色になってしまう。この発光色の変化は、発光するときのオキシルシフェリンがケト-エノール互変異性により変化し、エノール型が黄緑色に発光し、ケト型が赤色に発光するという説が唱えられてきた⁵⁾ (図 1a ではケト型のみ記載)。ところが、ジャマイカ産のヒカリコメツキ (*Pyrophorus plagiophthalmus*) というホタルの仲間では、多種類のルシフェラーゼ遺伝子を体内に持っており、例えば、背は緑色に腹が黄色に発光する⁶⁾。さらに、梶山らは、ゲンジボタルのルシフェラーゼ遺伝子にランダム変異を導入することにより赤色に発光するルシフェラーゼを作り出した⁷⁾。配列解析の結果、Ser 286 が Asn に変換されている (S286N) ことが判明した (図 1c)。ヒカリコメツキや S286N の場合、基質や反応条件はまったく同じであるわけであるから、発色の違いをケト-エノールの違いで説明するには無理がある。これらアミノ酸配列の違いと発光色の関わりが報告されると、McCapra は、オキシルシフェリン分子の簡単な量子化学計算などを基に、オキシルシフェリンの構造はケト型であり、発光色の違いは、励起状態におけるオキシルシフェリンの二つの環構造の相対角度 (C2-C2'結合の回転角度) の違いに由来するという説を提出した⁸⁾。この角度の制御にルシフェラーゼの立体構造の違いが関与していると考えれば矛盾しないだろう。

2. 北アメリカホタル・ルシフェラーゼの結晶構造決定と変異体解析

北アメリカホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼの結晶構造が1996年にContiらによって決定された (図 2 a)⁹⁾。ルシフェラーゼは、N末端側の大ドメインとC末端側の小ドメインの二つから構成されていることが判明した。ただし、基質や生成物などATPやルシフェリン関連

化合物を含まない状態だったため、その構造から活性中心は同定されず、発光色の違いを説明することはできなかった。しかし、彼らは翌年さらにグラミシジン S 合成酵素 I (フェニルアラニンラセマーゼ, EC 5.1.1.11) という、反応機構およびアミノ酸配列がルシフェラーゼと良く似た酵素の X 線結晶解析を行い、立体構造も良く似ていることを見いだした¹⁰⁾。解析されたのは、生成物である AMP と D-Phe との複合体だった。その結果、ルシフェラーゼの活性中心も大ドメインと小ドメインの境界の大ドメイン側にあること、小ドメインは、基質の結合に伴い回転するだろうと予想された。図 2b に、ルシフェリル AMP 中間体とゲンジボタル・ルシフェラーゼとの複合体の構造¹⁾を示したが、少なくとも、この予想は見事に的中していた。また、グラミシジン S 合成酵素 I とルシフェラーゼに共通する AMP の結合部位周囲のアミノ酸残基も良く一致している。

ルシフェリンの結合部位は不明のままであるが、グラミ

シジン S 合成酵素 I における D-Phe 結合部位からの予想を基に、周辺アミノ酸残基への変異導入が行われ、ルシフェラーゼ活性や発光色制御に関わるアミノ酸残基が予測された。そして、変異導入実験の結果と、5 位にメチル基二つの付いたルシフェリン誘導体でもアデニル化すると黄緑色に発色する反応が検出できたという有機化学的な知見を基に、発光色制御のケト-エノール互変異性説が改良された。すなわち、ケト型の共鳴に基づいた電荷の偏りの違いによって (共鳴に基づく電荷の偏り説) 発色が制御されるという説である¹¹⁾。

3. 各反応過程段階の酵素-基質複合体の X 線結晶構造解析

我々は、黄緑色に発光するゲンジボタル (*Luciola cruciata*) ルシフェラーゼの野生型酵素と赤色に発光する S286 N 変異型酵素に着目し、それぞれについて反応過程における各段階の酵素-基質複合体の結晶化を行い、その構造を

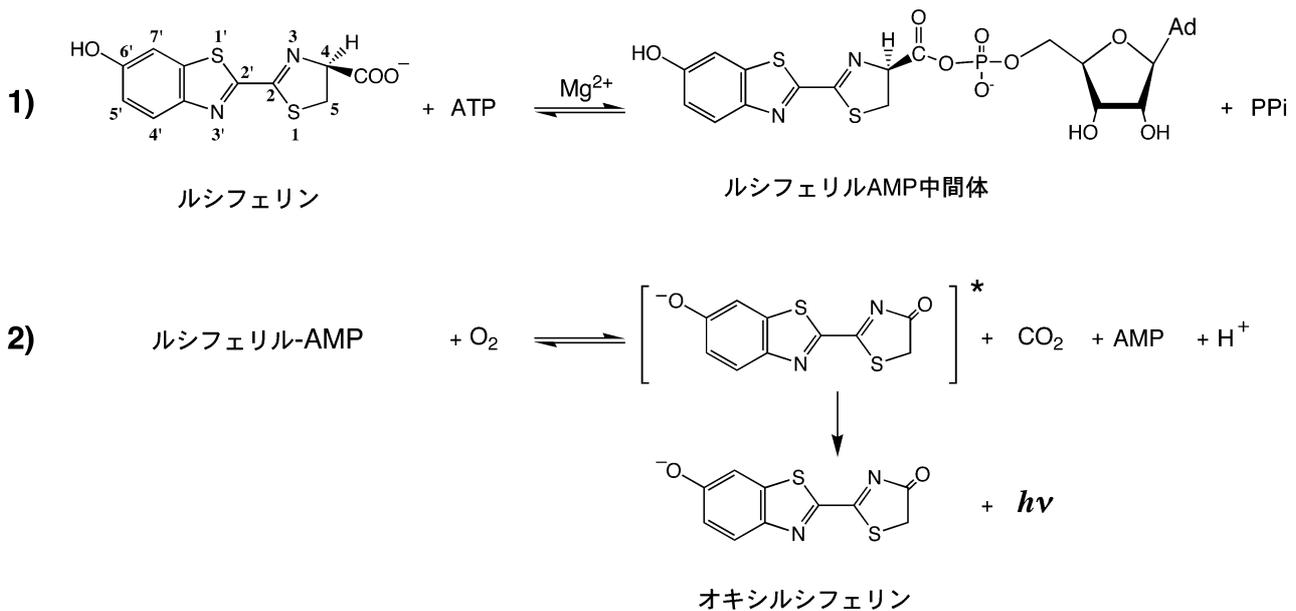
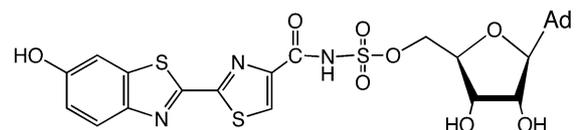


図 1a



5'-O-[N-(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine (DLSA)

図 1b

図 1 ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応機構

a, ルシフェリル AMP 中間体を経由する 2 段階反応機構. b, ルシフェリル AMP 中間体アナログ, DLSA の構造. c, 野生型および S286N 変異型ゲンジボタル・ルシフェラーゼの発光色.

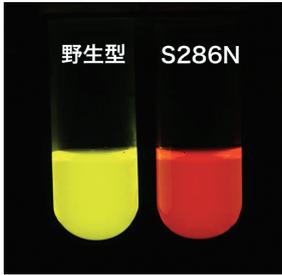


図 1c

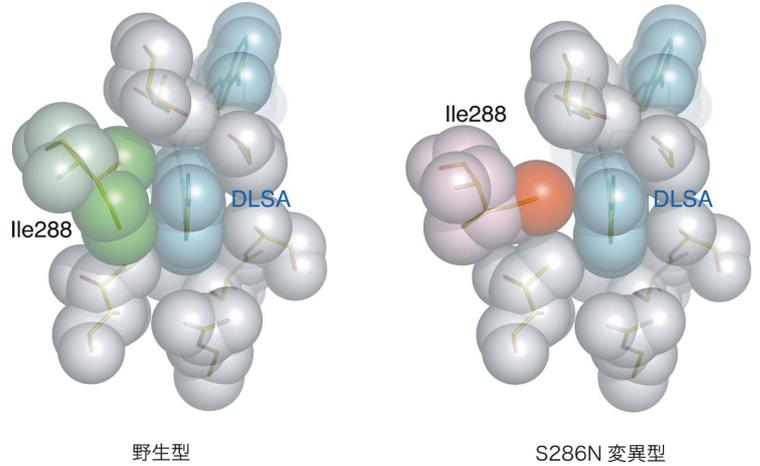
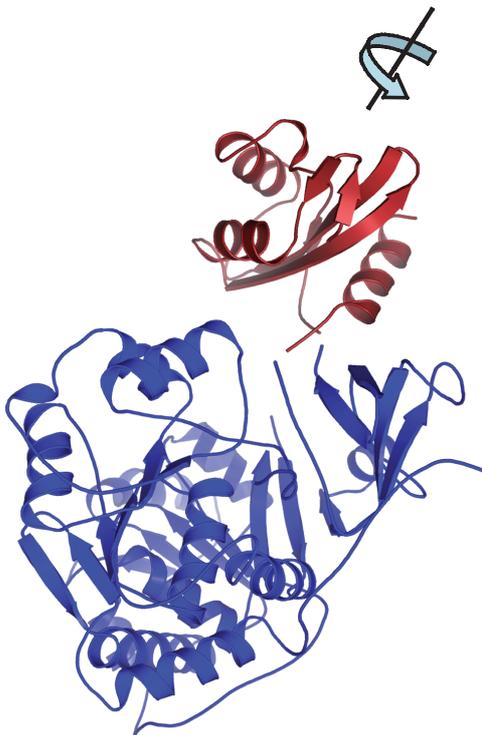


図 3 野生型 (左) と S286N 変異型 (右) ルシフェラーゼ-DLSA 複合体の Ile288 周辺のファンデルワールス相互作用の比較
DLSA (水色), 野生型酵素の Ile288 (緑色), S286N 変異型酵素の Ile288 (桃色) など各原子をファンデルワールス半径の球として表示した。

a



b

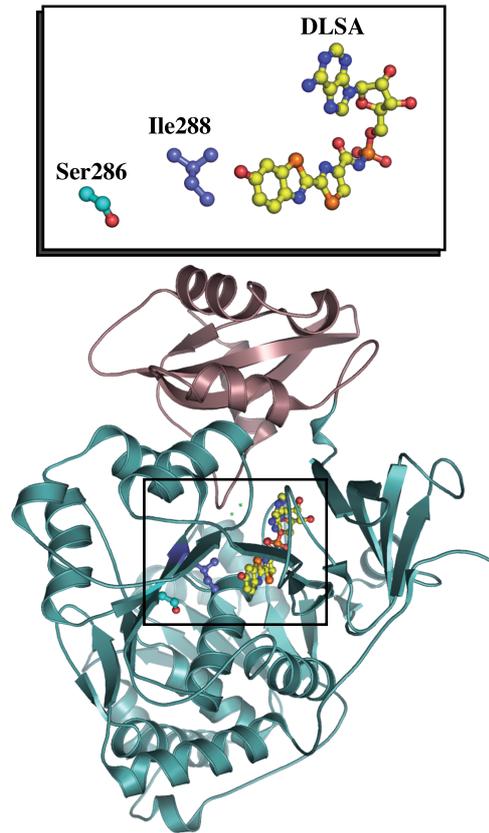


図 2 ルシフェラーゼ全体構造の模式図

a, 北アメリカホタル・ルシフェラーゼ (PDB code: 1LC1). 大ドメインを青色, 小ドメインを赤色で表示した. b, ゲンジボタル・ルシフェラーゼ-DLSA 複合体 (PDB code: 2D1S). 大ドメインを空色, 小ドメインを桃色で表示した. DLSA 分子と, Ser286 および Ile288 側鎖をボール&スティックモデルで表示した (上部は四角で囲んだ部分の拡大図). 二つのドメインをそれぞれ水色と紫色で表示した. ドメインの境界部位に活性中心があることがわかる. 大ドメインの向きは, a, b 同じなので, a の小ドメインを a の右上の軸を中心に約 80 度回転させると b の構造と一致する.

比較することにより発光色制御の仕組みを解き明かした¹⁾。Ser286の位置は、ルシフェリンと接することができないほど離れており、この1残基の変異が発色を変えてしまう不思議さに興味をそそられた。しかし、単純に、野生型とS286Nそれぞれの立体構造を比較しただけでは解は得られなかった。

1) 反応中間体アナログによる Chemical Trapping で反応過程の立体構造を見る

実際に発光が起きている状態を含む構造の変遷を見るにはどうしたらよいか。推定化学反応機構(図1a)を基に結晶解析の標的とすべき状態(複合体)を絞った。そして、(1)反応前の状態としてATP-酵素複合体、(2)発光直前のルシフェリルAMP中間体-酵素複合体、(3)発光終了後のAMP-オキシルシフェリン-酵素複合体の3状態の構造についてX線結晶構造解析を行った。

なかでもルシフェリルAMP中間体の捕捉に工夫を凝らした。すなわち、ルシフェリルAMP中間体の構造を基に、5'-O-[N-(dehydroLuciferyl)sulfamoyl]adenosine (DLSA)というアナログを設計合成した(図1b)。この化合物は構造を安定化するために、ルシフェリルAMP中間体ではP-O結合であるところをS-N結合にし、またルシフェリンの4,5位の炭素間を二重結合にして4位の水素を初めから除去した状態に設計した。この改変のおかげで、酵素による攻撃を受けない構造になっており、酵素は、この化合物を間違えて取り込んでしまうと罠にかかって捕捉されてしまう(chemical trappingという)。この種の化合物による反応中間体の捕捉は、ATPを基質の活性化に用いる酵素のメカニズム研究においてすでに成功を収めている^{12~14)}。

2) 各反応過程におけるルシフェラーゼの立体構造比較

野生型ゲンジボタル・ルシフェラーゼのリガンドが結合した3種類の構造を比較すると、反応前のATP複合体と発光反応後のAMP-オキシルシフェリン複合体の構造では大きな違いはなかった。しかしながら、発光直前のDLSA複合体ではIle288付近にだけ顕著な動きが観測された。すなわち、Ile288のC α 位置で1.5Åのずれがあり、側鎖を回転させながらルシフェリン結合部位の方へ移動していたのである。

一方、赤色に発光するS286N変異体のDLSA複合体ではIle288の動きは観測されなかった。すなわち、S286N-DLSA複合体の結晶構造は、野生型の反応終了後の構造とまったく同じだった。これはSer286がAsnに変異したこ

とで側鎖が二股になりその両端が水素結合できるようになったため、Glu313との水素結合に加えて、水との水素結合も増え、水素結合ネットワークの形成がIle288の動きを妨げたのだと考えられた。S286N変異型とは、黄緑色にするためのスイッチが壊れた発光装置だと言えることができるだろう。

Ile288の動きに伴う活性中心の構造、すなわち、活性中心に結合したオキシルシフェリンと周辺のアミノ酸残基の相互作用の様子について詳しく見てみる。図3では、野生型とS286N変異体のDLSA複合体の活性中心付近について各原子をファンデルワールス半径の球として表示した。野生型(左側)では、基質(反応中間体)と酵素の立体構造的な相補性が完璧である。DLSAのベンゾチアゾール環はIle288の側鎖の三つの炭素原子と広範囲に接触している。一方、S286N変異体では、Ile288の動きがないため一つの炭素原子がわずかに接触しているだけである。ただし、Ile288以外のベンゾチアゾール環の周囲のアミノ酸残基やDLSAの構造自体は、ほとんど変化がない。ルシフェリンのC2-C2'結合の回転角にも違いは見られなかった。したがって、両者の構造における違いはIle288のベンゾチアゾール環に対する接触の仕方のみであり、発光するときのオキシルシフェリンの結合部位に関する疎水性の程度の違い、そして、酵素と基質の立体構造の相補性の良さが発光色に大きく関係していると考えられた。

3) どうして発光色が変わるのか?

これら結果を総合すると次のように考えられる。すなわち、黄緑色に発光する野生型のルシフェラーゼでは発光体のオキシルシフェリンをしっかり握りしめ、励起状態から基底状態への変移に伴うエネルギーをしっかり保っている。しかしながら赤色に発光する変異体では発光のときの握りしめ方が弱いため、このエネルギーを振動(熱)として一部無駄に放出してしまい、エネルギーの低い(すなわち、波長の長い)赤色の発光になるのである。

さらにこの考え方を裏付けるため、野生型のルシフェラーゼを用いてI288V, I288Aという変異体を作成した。この変異体であればたとえ288番目の残基が動いたとしても、オキシルシフェリンを取り囲む疎水的で相補的な環境は不完全となり、Ile288が動かなかったときと同様に発光色が変化すると考えられる。I288V, I288A変異体の発光色を測定した結果、その側鎖の大きさに合わせて発光色がよりエネルギーの低い(波長が長い)橙色、そして、赤色へと順番に変化していった。これで、酵素とリガンドとの

空間的な相補性が完璧であることが発光色制御の原理であると言っても良いだろう。

おわりに

これまでの議論から明らかなように、ルシフェラーゼの活性中心の構成は絶妙であり、反応に伴い構造を変化させることによってオキシルシフェリンのような不安定な反応分子種のエネルギー状態を制御しているのである。したがって、結合した基質に直接接しているアミノ酸残基を不用意に置換すると、たいがい発光色の変化を引き起こすのも無理はない。何れにせよ、ホタル・ルシフェラーゼの活性中心の精密な立体構造が明らかになった。これで、活性中心を構成する各アミノ酸残基の役割が原子構造に基づいて議論できるようになる。1971年に後藤俊夫らによってオキシルシフェリンが反応生成物であると同定されてから、実に35年が経過している¹⁵⁾。

- 1) Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., & Kato, H. (2006) *Nature*, 440, 372–376.
- 2) 後藤俊夫 (1975) 生物発光, 共立出版, 東京.
- 3) 今井一洋, 近江谷克裕 (2006) バイオ・ケミルミネセンスハンドブック, 丸善, 東京.
- 4) Seliger, H.H. & McElroy, W.D. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 136–141.
- 5) White, E.H., Rapaport, E., Hopkins, T.A., & Seliger, H.H. (1969) *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 2178–2180.
- 6) Wood, K.V., Lam, Y.A., Seliger, H.H., & McElroy, W.D.

- (1989) *Science*, 244, 700–702.
- 7) Kajiyama, N. & Nakano, E. (1991) *Protein Eng.*, 4, 691–693.
- 8) McCapra, F., Gilfoyle, D.J., Young, D.W., Church, N.J., & Spencer, P. (1994) in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamentals and Applied Aspects* (Campbell, A.K., Kricka, L.J., & Stanley, P.E., eds.), pp. 387–391, John Wiley and Sons, Chichester.
- 9) Conti, E., Franks, N.P., & Brick, P. (1996) *Structure*, 4, 287–298.
- 10) Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., & Brick, P. (1997) *EMBO J.*, 16, 4174–4183.
- 11) Branchini, B.R., Southworth, T.L., Murtiashaw, M.H., Magyar, R.A., Gonzalez, S.A., Ruggiero, M.C., & Stroh, J.G. (2004) *Biochemistry*, 43, 7255–7262.
- 12) Hiratake, J., Kato, H., & Oda, J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 12059–12060.
- 13) Koizumi, M., Hiratake, J., Nakatsu, T., Kato, H., & Oda, J. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 5799–5800.
- 14) Hibi, T., Nii, H., Nakatsu, T., Kimura, A., Kato, H., Hiratake, J., & Oda, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15052–15057.
- 15) Suzuki, N. & Goto, T. (1971) *Tetrahedron Lett.*, 2021–2024.

加藤 博章, 中津 亨

(京都大学大学院薬学研究科構造生物薬学分野)

Enigma of firefly glowing
Hiroaki Kato and Toru Nakatsu (Department of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46–29 Yoshida-Shimoadachi, Sakyo, Kyoto 606–8501, Japan)