

電子科学研究科:

GD

K

0006506075

R

450

静岡大学附属図書館

静岡大学 博士論文

ホタル生物発光の分子機構研究



大学院電子科学研究科
電子応用工学専攻

丹羽 一樹

目 次

第1章 序論	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 生物発光研究の現状	1
1.1.2 ホタル生物発光の化学メカニズムについて	4
1.1.3 ホタル生物発光系の応用	10
1.2 研究目的	14
第2章 ホタルルシフェリンの生合成	15
2.1 研究背景	15
2.1.1 過去のルシフェリン生合成研究	15
2.1.2 ホタルの生態とルシフェリン生合成の関係	20
2.2 実験方法	26
2.2.1 ホタルの飼育	26
2.2.2 基質ルシフェリンの調製	26
2.2.3 ルシフェリンキラル分析	27
2.2.4 システインキラル分析	29
2.2.5 ホタル粗蛋白質によるキラル異性化反応	31
2.3 結果及び考察	32
2.3.1 ルシフェリンのキラル分析方法	32
2.3.2 ヘイケボタルの生活環とルシフェリンの分析	34
2.3.3 システインのキラル分析方法	40
2.3.4 ヘイケボタル体内のシステインの光学純度	41
2.3.5 抽出蛋白質によるルシフェリンの合成	43
2.3.6 ホタルルシフェリンの生合成経路	48
第3章 ホタルルシフェラーゼの基質立体認識	51
3.1 研究背景	51
3.2 実験方法	54
3.2.1 系統解析	54
3.2.2 ルシフェラーゼ酵素反応解析	56
3.3 結果及び考察	58
3.3.1 ルシフェラーゼの進化的背景	58
3.3.2 D体およびL体ルシフェリンの反応特性	61
第4章 ホタルルシフェリンの酵素的立体異性化反応	67
4.1 研究背景	67
4.2 実験方法	69

4.2.1	ルシフェリン生合成反応解析	69
4.3	結果及び考察	70
4.3.1	生合成経路におけるルシフェラーゼの役割	70
4.3.2	生合成経路を利用した発光反応溶液システム	71
4.3.3	2-アールピロピロ酸系抗炎症薬のキラル異性化	73
第5章	ホタルルシフェラーゼ酵素活性に対する生体物質の作用	75
5.1	研究背景	75
5.2	実験方法	78
5.2.1	試薬	78
5.2.2	発光反応測定実験	78
5.2.3	酵素カイネティクス解析	78
5.3	結果及び考察	80
5.3.1	構造活性相関	80
5.3.2	リボ酸の阻害作用	83
5.3.3	一酸化窒素および補酵素 A の作用	84
5.3.4	リボ酸によるルシフェリン異性化阻害	86
第6章	結語	88
引用文献		93
本研究に関する業績一覧		103
謝辞		105

— 図表目次 —

図 1-1、発光生物とそのルシフェリンの構造の例	2
図 1-2、生物発光反応の化学的メカニズムの概略	2
表 1-1、ホタル研究の主な動き	5
図 1-3、ホタル発光反応機構	5
図 1-4、ホタル生物発光研究の広がり	9
図 1-5、ホタルルシフェラーゼの応用	11
図 2-1、ホタルルシフェリンの生合成経路の予測	15
表 2-1、ホタルルシフェリン取り込み実験	16
図 2-2、ホタルルシフェリンの生合成に関する有機反応	16
図 2-3、ホタルルシフェリンの再生経路	17
図 2-4、ホタルルシフェリンの生合成に 関するこれまでの知見	18
図 2-5、ヘイケボタルの生活環	22
図 2-6、ヘイケボタルの飼育	23
図 2-7、システインの蛍光標識試薬	25
図 2-8、L-ルシフェリンの合成	27
図 2-9、ホタルルシフェリンのキラル分析方法	28
図 2-10、システインのキラル分析方法	30
図 2-11、ホタルルシフェリンの定量分析	32
図 2-12、D-ルシフェリンの異性化 (ラセミ化)	33
図 2-13、ヘイケボタル成虫抽出物の キラルカラム分析のクロマトグラム	34
図 2-14、L-ルシフェリンの酵素反応による同定	35
表 2-2、ヘイケボタルルシフェリンのキラル定量分析結果 1	36
図 2-15、ヘイケボタルのライフサイクルと ルシフェリン内在量および光学純度	37
表 2-3、ヘイケボタルルシフェリンのキラル定量分析結果 2	38
表 2-4、ヘイケボタル成虫の発光物質と酵素活性の局在	39
図 2-16、ヘイケボタルシステインのキラル分析結果	42
図 2-17、ヘイケボタル抽出蛋白質による L-ルシフェリンのキラル変換反応	44
図 2-18、L-ルシフェリンのキラル異性化反応の特性	46

図 2-19、D-ルシフェリンの生合成経路	48
図 2-20、天然物の光学異性体	49
図 3-1、発光甲虫ルシフェラーゼと 相同性のある酵素蛋白質の反応	51
図 3-2、ルシフェラーゼにより CoA 化される化合物	52
表 3-1、ホタルルシフェラーゼの相同性蛋白質	54
図 3-3、発光甲虫ルシフェラーゼと その相同性蛋白質の系統解析	57
図 3-4、ルシフェラーゼと NRPS の解析	58
図 3-5、ルシフェラーゼの活性中心の模式図	60
図 3-6、L-ルシフェリンの CoA 化反応	62
図 3-7、CoA 化反応におけるルシフェリン量の変化	63
表 3-2、D-およびL-ルシフェリンの反応速度の違い	64
図 3-8、ルシフェラーゼの基質特性	65
図 4-1、想定される L-ルシフェリンの生合成経路	68
図 4-2、エステラーゼによるルシフェリル-CoA 加水分解	69
図 4-3、ルシフェラーゼとエステラーゼによる L-ルシフェリン発光活性	71
図 4-4、D-ルシフェリン生合成を模したシステイン 検出試薬	72
図 4-5、2-アリールプロピオン酸系抗炎症薬イブプロ フェンの立体異性化代謝経路	73
図 5-1、ホタル発光反応に影響を及ぼす化合物	75
図 5-2、構造活性相関	79
図 5-3、L-L 反応に対する作用濃度	82
図 5-4、Lineweaver-Burk Prot	83
図 5-5、CoA による発光反応阻害の解除	84
図 5-6、NO と DTT の効果	85
図 5-7、リポ酸による CoA リガーゼ活性の阻害	86
図 6-1、ホタル発光反応の応用例の現状と将来性	90
図 6-2、生合成酵素の共発現系の応用例	91

— 略語 —

AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
CHBT	2-cyano-6-hydroxybinzothiazole
CoA	Coenzyme A
Cys	Cysteine
D-Cys	D-Cysteine
L-Cys	L-Cysteine
DTT	Dithiothreitol
GSH	Glutathione (reduced)
LH ₂	Firefly luciferin
D-LH ₂	D-luciferin
L-LH ₂	L-luciferin
L-L 反応	ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応
LRE	Luciferin regeneration enzyme
LUC	Firefly luciferase
NO	Nitric oxide
OxyL	Oxyluciferin
TBP	tri- <i>n</i> -butylphosphine
TFA	trifluoroacetic acid

第1章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 生物発光研究の現状 (今井 1989)

ホタルに代表される生物発光は古くから人々の興味を惹く魅力的な生命現象であった。ホタルやホタルイカは我々日本人の日常生活にも身近であるが、その他にも発光バクテリア、発光キノコ、オワンクラゲ、ヒオドシエビ、そしてウミホタルや夜光虫のようなプランクトンなど多くの発光生物が知られている(羽根田 1985)。

古くは紀元前4世紀にアリストテレスがホタルや食品の発光を記述している(神田 1981)。わが国でもホタルが万葉集で詠まれており、恐らく有史以前から我々人類にとって興味深い身近な生命現象として認識されてきた。

発光現象に関する研究が文献に残る形で始まったのは16世紀の大航海時代である。植民地経営によって世界中の文物が集まったヨーロッパで博物学が盛んになり、その流れの中で食品などの発光現象が詳しく観察され、記載された。17世紀には肉や死魚などの発光に空気(酸素)が必要であることが発見され、18世紀にはその原因がバクテリアであることが明らかにされた。その後エビや魚などの発光器官に発光バクテリアが共生していることが見出された(羽根田 1985)。一方、発光バクテリアによらない生物発光も数多く観察、記載されていた。

分子的な発光機構解明の端緒と言えるのは、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L反応)の発見(Dubois 1885)である。Duboisは発光昆虫ヒカリコメツキの発光組織を水中ですりつぶし、得られた発光液を光らなくなるまで放置した液と、熱水抽出した溶液とを混合すると再び発光することから、前者には酵素ルシフェラーゼが、後者には基質ルシフェリンが存在すると考え、酵素反応としてのL-L反応を提唱した。その後、多くの発光生物でL-L反応が確認され、それぞれが異なるルシフェリンを持つことがわかった。ルシフェリンという言葉は特定の分子を指すもので

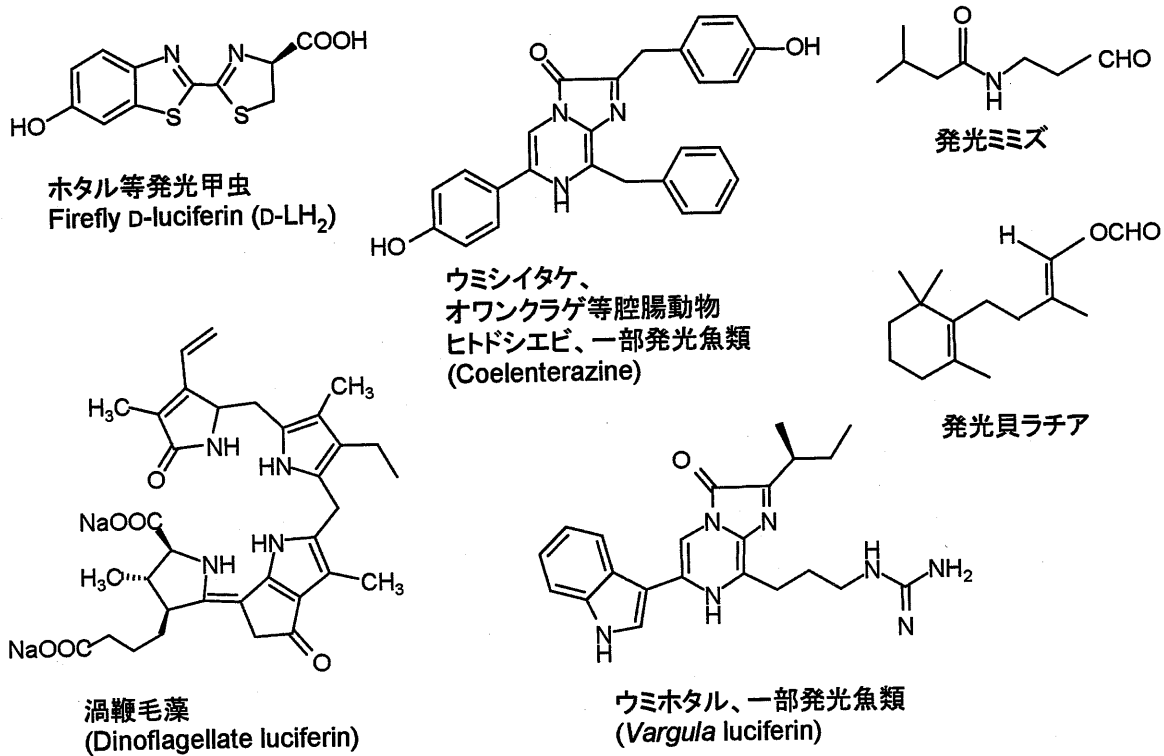


図1-1、発光生物とそのルシフェリンの構造の例

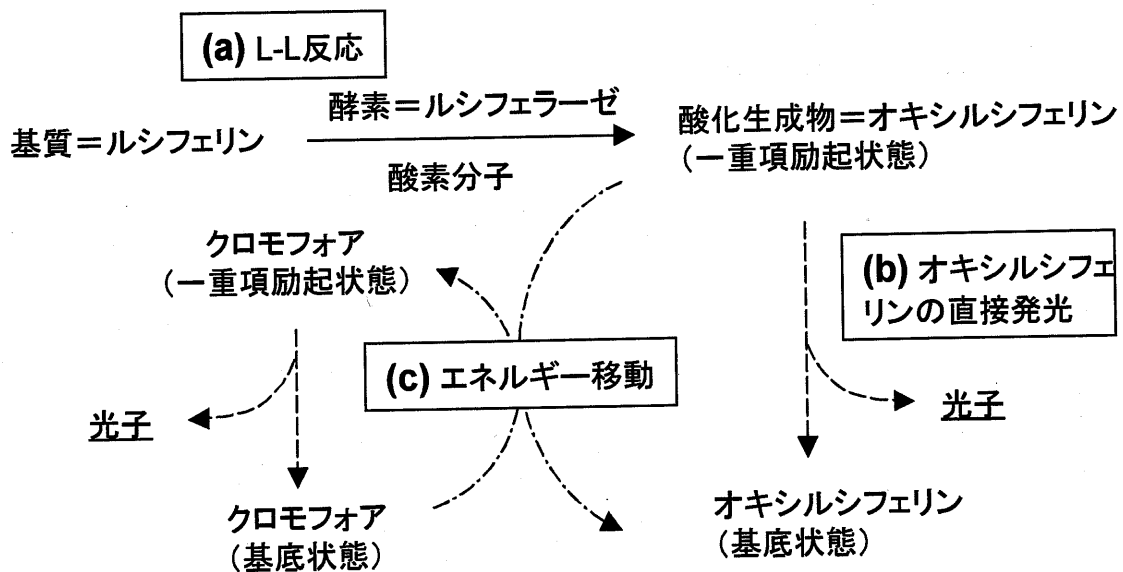


図1-2、生物発光反応の化学的メカニズムの概略

L-L反応(a)とそれに続く発光過程(b)と(c)。オキシルシフェリンが光子を放出して直接発光する(b)はホタルやウミホタルの場合。(c)エネルギー移動の代表例は腔腸動物で、クロモフォアであるGFPが光子を放出して発光する。発光バクテリアやラチアなどもエネルギー移動によって励起されたクロモフォアが発光する。

はないため、ホタルルシフェリン、ウミホタルルシフェリンというように、発光生物種を付して呼ぶことが多い。

それから 80 年を経てようやくホタルルシフェリンの構造が決定され、それと同時に化学合成も行われた (White 1961, White 1963)。これに続いてウミホタルルシフェリンの構造が 1966 年に岸、後藤、平田らによって決定され (Kishi 1966a, Kishi 1966b)、化学的に合成された (Kishi 1966c)。その後ラチアルシフェリン (Shimomura 1968)、発光ミミズルシフェリン (Ohtsuka 1976)、ウミシイタケルシフェリン (セレンテラジン) (Inoue 1977, Hori 1977)、ヒオドシエビルシフェリン (セレンテラジン) (Shimomura 1978)、渦鞭毛藻ルシフェリン (Nakamura 1989) などの構造が決定された。図 1-1 にこれらルシフェリンの構造を示す。この中でセレンテラジンは腔腸動物 (Coelenterata) や発光魚など多くの生物の発光基質として共通の化合物である。

ルシフェラーゼもいろいろな発光生物で精製され、生化学的な研究が盛んに行われた。1980 年代に分子生物学が盛んになり、次々と cDNA 塩基配列が報告され、それによりアミノ酸配列が明らかになった。まずオワンクラゲから発光蛋白質イクオリンのアミノ酸配列が明らかになった (Inouye 1985)。更にホタルルシフェラーゼ (de Wet 1987)、ウミホタル (Thompson 1989)、ウミシイタケ (Lorenz 1991)、渦鞭毛藻 (Hastings 1994) などのルシフェラーゼのアミノ酸配列が明らかにされている。分類学的に遠い生物種のルシフェラーゼは互いに相同性が低い。このことから発光生物が進化の過程で個別に発光メカニズムを獲得したと考えられている。

発光反応の詳細なメカニズムも発光生物によって異なっている。基本としては L-L 反応であり、基質 (ルシフェリン) が酵素 (ルシフェラーゼ) の触媒作用により、酸素分子で酸化される反応である (図 1-2、(a))。ウミホタルやウミシイタケはこのような単純な反応様式で発光するが、ホタルの場合は補因子として ATP と Mg^{2+} が必要である。オワンクラゲの場合は、基質セレンテラジンが蛋白質アポイクオリ

ンと酸素分子を介して共有結合した発光蛋白質イクオリンが、 Ca^{2+} の作用によって発光する。これは見方を変えると、セレンテラジンを発光基質ルシフェリン、アポイクオリンを酵素ルシフェラーゼと位置づけることができる。そのためイクオリン発光系を precharged system と呼ぶ。

ホタルやウミホタルの場合は酸化反応によって生成した励起一重項分子が蛍光能を持ち、それがそのまま発光分子種になるが(図1-2、(b))、このような例は必ずしも多くはない。オワンクラゲやウミシイタケなどの腔腸動物の発光系(Shimomura 2005)では、反応生成物の励起エネルギーが緑色蛍光蛋白質 GFP (Green Fluorescence Protein) などの蛍光蛋白質に移動してから発光する(図1-2、(c))。また、発光バクテリアや発光貝ラチアの場合は反応生成物に蛍光能が無い場合直接発光はできない。そのため蛍光能を持つ何らかのクロモフォアに励起エネルギーが移動して光ると考えられている(Ohmiya 2005)。

以上のように生物発光は生物種ごとに異なる発光反応機構を有している。

1.1.2 ホタル生物発光の化学メカニズムについて

ホタルは最も身近な発光生物のひとつであり、わが国では特にゲンジボタル (*Luciola cruciata*) が古くから親しまれている。蛍狩りは初夏の風物詩として現代でもわれわれの興味を惹き、雑誌などでホタルの名所が毎年特集されている。

ゲンジボタルに近縁の発光甲虫類は、陸上で生活する我々人類にとって最も目に付きやすい発光生物であると言える。そのため、研究の歴史も古い。前節で述べた生物発光研究の全般を見渡してみても、L-L 反応、ルシフェリンの化学構造の決定と有機合成など、多くの重要な発見はホタルで最初に成された。これはホタルの研究が常にその時代で最先端の科学の対象となってきたことの現れと言える(表1-1)。

表1-1、ホタル研究の主な動き

1885,	酵素反応としてのL-L反応 (Luciferin, Luciferase)	生化学
1957,	ルシフェリンの単離	有機化学
1959,	発光反応量子収率88%	↓
1961,	ルシフェリンの構造決定と有機合成	
(1950~),	ジオキセタン中間体、反応生成物オキシルシフェリンなど 発光反応機構の解明	
1985,	ルシフェラーゼ遺伝子のクローニング	分子生物学
1996,	ルシフェラーゼ蛋白質のX線結晶構造解析	構造生物学

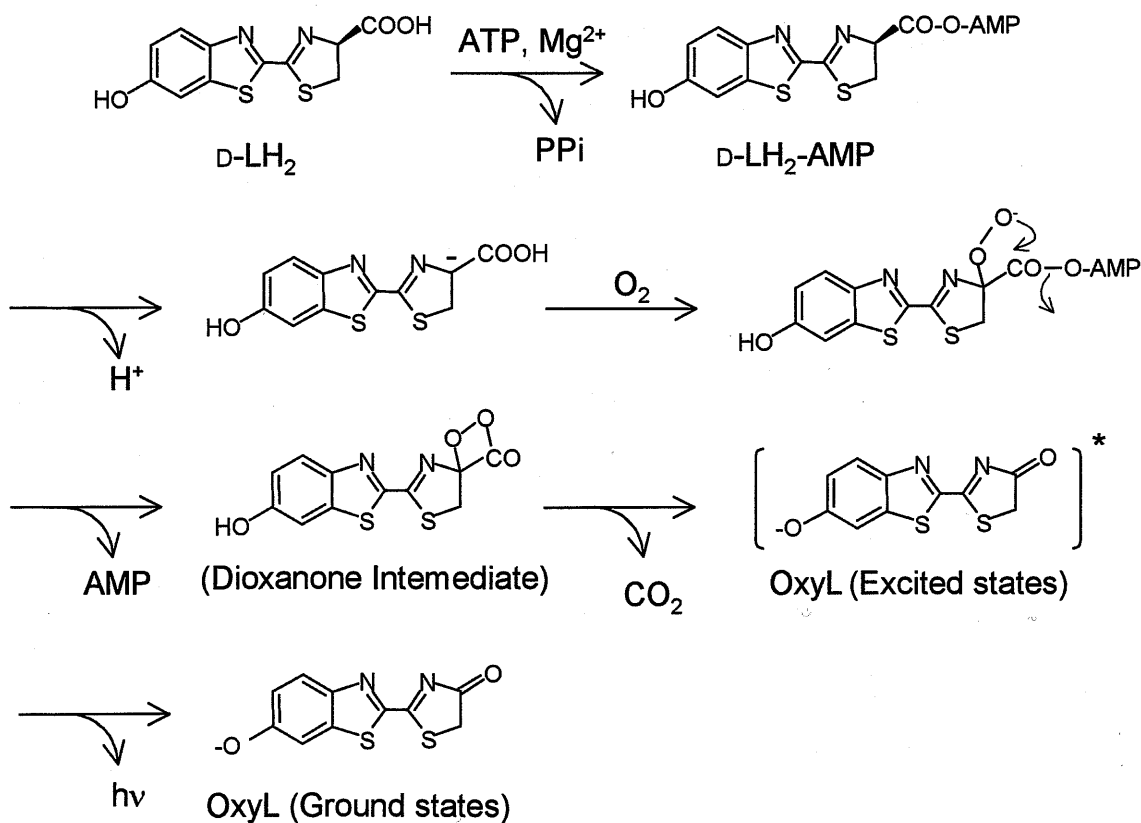


図1-3、ホタル発光反応機構

励起状態のオキシルシフェリンの極限構造式は明らかになっていない。

ここで興味深いのは、ルシフェリンの化学構造が解明される以前に発光反応の量子収率(88%)が測定されている(Seliger 1959, Seliger 1960)ことである。これは構造決定に先駆けてルシフェリンが単離され、その化学的性質が詳しく調べられていた(Bitler 1957)ためである。しかしホタルの発光反応量子収率は他の発光生物の量子収率、例えばウミホタルの28% (Johnson 1962)、オワンクラゲの17%(Shimomura 1986)に比べて極端に高いにもかかわらず、再実験の報告は一度も無く、再検討が必要と言われている(Seliger 1961)。

ホタル生物発光の化学反応機構(図1-3)が詳細に研究されたのは1950年代から1970年代にかけてである(DeLuca 1976)。この中で初期の重要な発見は1956年のATPと Mg^{2+} の関与である。すなわちルシフェリン(D-LH₂)が発光するときまず、ATPが反応してルシフェリル-AMP(D-LH₂-AMP)が生成し、これが反応中間体となる(Green 1956, Rhodes 1958)。このときATPのリン酸基に対して Mg^{2+} がキレートする必要がある。 Co^{2+} と Mn^{2+} が Mg^{2+} の代わりになることが知られている(DeLuca 1976)。D-LH₂のカルボキシル基がアデニル化されることで4'位の炭素の酸性度が上がりアニオン化しやすくなる。その結果酸化され、ジオキセタン中間体ができる。そして二酸化炭素が脱離して一重項励起状態のオキシルシフェリン(OxyL)が生成する。ジオキセタン中間体(McCapra 1964a)を経る反応機構は過シュウ酸エステル系の化学発光(Rauhut 1965)やホタルルシフェリンの化学発光(Hopkins 1967, McCapra 1968a)の反応機構として既に提唱されていたものであるが、McCapraによりこれがホタルの生物発光反応機構と同一のものであることが提唱された(McCapra 1968b)。その後実際にジオキセタン中間体の存在が証明された(DeLuca 1970, White 1980)。OxyLが生成物であることはこれより少し早く後藤らにより証明された(Suzuki 1971a, Suzuki 1971b)。

近年では遺伝子工学や分子生物学が急速に発展しているが、ホタルの発光酵素ル

ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングが Wood らによって行われたのは極めて早い時期であったと言える。当時の技術レベルは現在と大きく異なるため、方法論も異なっている。1984年に彼らはまず、無細胞発現系（ウサギ赤血球抽出物）で北米産ホタル（*Photinus pyralis*）の mRNA からルシフェラーゼを発現させたことを報告した（Wood 1984）。このとき既に抗ルシフェラーゼ抗体が作られており、発現させたルシフェラーゼを免疫沈降により精製している。翌 1985 年、mRNA から合成した cDNA を大腸菌に導入した発現ライブラリーを作成し、抗体を用いてルシフェラーゼをコードする cDNA のクローニングに成功した（de Wet 1985）。ルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列が決定されアミノ酸配列が発表されたのはこの 2 年後であった（de Wet 1987）。ポストゲノム時代と言われる現代とは異なり、この報告がされた頃はまだ塩基配列やアミノ酸配列に関する知見は少なかったため、ルシフェラーゼのホモログ（アミノ酸配列に相同性のある蛋白質）は見つかっていなかった。ホモログが見つかったのは更に 2 年後であった（Schröder 1989）。

ホタル生物発光に関する生理学的な解析も行われている。まず、ルシフェラーゼが細胞内小器官ペルオキシソームに局在することが確かめられた（Keller 1987）。続いてこの局在化に N 末端のアミノ酸配列[セリンーリジンーロイシンーN']が必要であることが見出された（Gould 1989）。このアミノ配列は S K L 配列と呼ばれ、ペルオキシソーム局在化シグナルとしてホタル以外の生物においても普遍的に見られるものである。

ホタルの光は明滅するが、これはホタルが発光反応を高度に制御していることを意味している。具体的にはペルオキシソームに対する酸素供給の制御によって行われるという機構が提唱されている（Timmins 2001a）。更にこの酸素供給制御に神経伝達物質である一酸化窒素（NO）が関与していることが示されている（Trimmer 2001）。昆虫には肺はなく、組織に必要な酸素は体中に張り巡らされた気道で供給される。ホタルは発光に必要な酸素を供給する気道を開閉することで、明滅を制御している

と考えられている。

ホタル発光系で興味深い現象のひとつに、発光色の決定機構がある(近江谷 2004)。日本のゲンジボタル、ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)、あるいは北米産ホタル *Photinus pyralis* は黄緑色の発光を示すが、これらのホタルの発光酵素ルシフェラーゼは *in vitro* では反応溶液の pH に依存して発光色が変化する (pH 感受性)。すなわち細胞内でルシフェラーゼが局在するペルオキシソームと同じアルカリ領域 (pH 7.5~8.5) では発光色は生きたホタルと同じ黄緑色であるが、溶液を酸性にすると赤色にシフトする。これに対し、イリオモテボタル(近江谷 2004)、ヒカリコマツキ(McCapra 1964b, Stolz 2003)、南米産鉄道虫(Viviani 2002)のルシフェラーゼはそれぞれ固有の発光色を持つが、pH 6.0~8.5 において発光色は変化しない (pH 非感受性)。鉄道虫は頭部が赤、胴体の発光器が緑色に光るが、これはそれぞれの器官に赤色のルシフェラーゼと緑色のルシフェラーゼが存在するためである。これらのルシフェラーゼは *in vitro* において pH に関係無く生体ホタルの発光色と同じ色で発光する。このような発光色を決めるメカニズムは古くから盛んに議論されているにもかかわらず未だ統一的な決着は得られていないため非常に興味深い。

1996 年、ホタルルシフェラーゼの X 線結晶構造が他の発光生物に先駆けて報告された(Conti 1996a)。これを元に活性中心の基質認識様式などが推定され、発光色の決定機構の議論(Branchini 2004)が加速した。

以上のようにホタル発光系の化学反応機構は化学的、生化学的に詳しく調べられてきた(DeLuca 1976)。近年では特に発光反応以外の触媒能が興味をもたれている。すなわちルシフェラーゼが、CoA リガーゼとしての活性(Airth 1958, Oba 2003, Fraga 2004)や、ATP と AMP から ADP 2 分子を生成する活性(Min 2001)、アデノシンとリン酸の多重合体 (AppppA など) を生成する活性(Fontes 1997, Fraga 2003, Fraga 2005)などを有することが報告されている。このようなホタルルシフェラーゼの多機能性は、ホタル生物発光の進化的起源に関連すると考えられ、興味を持たれている。

ルシフェラーゼの多機能性と関連することとして、L-L 反応がいろいろな生体関連物質の影響を受けるということが知られている (DeLuca 1976)。例えば長鎖脂肪酸によって発光反応が強力に阻害され (Ueda 1998)、逆に補酵素 A (CoA) によって促進される (Sillero 2000)。また人工的なルシフェリンのアナログ分子によって阻害される (Denburg 1969) ことや、Dithiothreitol (DTT) などの人工的な還元剤によって促進される (Ryufuku 2002) ことも知られている。しかし CoA や DTT がルシフェラーゼにどのような影響を及ぼして発光を促進しているのかは明らかにされていない。

ルシフェリンに関しては生合成経路が古くから興味を持たれている。同位体で標識した化合物の取り込み実験 (Okada 1974、Okada 1976、McCapra 1976、Colepicolo 1988) が報告されているが未だに解明されていない (Day 2005)。他の発光生物も含めて発光基質ルシフェリンの生合成酵素はこれまで一つも単離されていない。生合成の経路そのものに関しては取り込み実験がウミホタル (Oba 2002) および渦鞭毛藻 (Wu 2003) に関して報告されている。

「どうしてホタルは光る？」

何の目的で光るのか? (行動生物学、生態学)

体内で何が起きているのか? (生化学、有機化学、酵素学)

どんな原理で光るのか? (量子化学、量子力学、分光学)

なぜホタルだけが光るのか? (進化学、生理学、化学)

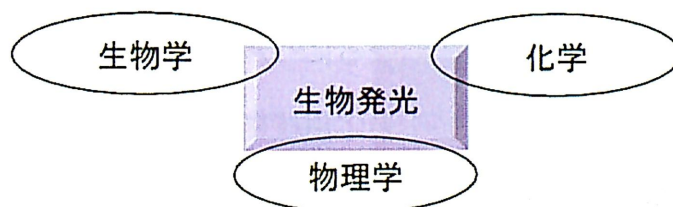


図1-4、ホタル生物発光研究の広がり

生物発光という現象は広い分野の興味を惹きつけてきた。「どうしてホタルは光る？」という命題も、それぞれの分野ならではの命題になる。

ルシフェリンの生合成経路の解明は、生物発光の進化的起源を探る上でも重要な知見になる。発光の意義に関しては化学的、生理学的な知見から活性酸素の解毒であるという説がある (Timmins 2001b)。しかしながら発光生物が進化の過程でどのようにしてルシフェリンとルシフェラーゼという 2 つの必須な因子を獲得したかは明らかではない。系統的に遠く離れた生物は異なる発光系を有しており、それぞれの発光系が進化の過程で個別に獲得されたと考えるのが一般的である。ルシフェラーゼに関してはアミノ酸配列を非発光生物のホモログ蛋白質と比較することで起源蛋白質が予想できる (Viviani 2002、Oba 2005)。これに対し低分子であるルシフェリンの進化的起源の探索には生合成経路の解明が必要である。

以上のようにホタルは発光生物の中で最も身近であり、また生物学、化学、物理学という幅広い好奇心を掻きたてる魅力的な研究テーマであるために (図 1-4) 盛んに研究され、生物発光研究の中でも重要な地位を占めている。しかしながら、量子収率が高い理由、発光色決定機構、ルシフェラーゼの多機能性、ルシフェリンの生合成経路など、未解明の問題も数多く残されている。

1.1.3 ホタル生物発光系の応用

以上のように生物発光は古くから盛んに研究されてきた。しかしながら近年、生物発光の化学的メカニズムが明らかになるにつれて、応用技術が次々と開発されて注目されるようになった。実際に多くの応用技術が生命工学研究、あるいは創薬などに貢献するようになっている。

オワンクラゲ GFP のような蛍光蛋白質は細胞のイメージングなどのためのマーカー遺伝子として応用されている (Chalfie 1994, Chalfie 1995, Prasher 1992, Prasher 1995)。蛍光蛋白質は発光しないサンゴなどでも見つかっており (Matz 1999)、その発光色や発光特性の豊富さから応用範囲は広がっている (Tsien 1998, Miyawaki

2005)。蛍光蛋白質はその遺伝子を細胞に導入して発現させるだけで翻訳された蛋白質が自動的にフォールディングして蛍光能のあるアクティブフォームになる。基質やクロモフォアなどの供給が必要なく、その簡便さのために広く応用されている。しかし発光させるために細胞毒性のある紫外線を照射して蛍光蛋白質を励起させる必要があり、長時間の観測ができないという問題がある。また励起光が原因となる高いバックグラウンドという問題もあり、定量性が乏しい。

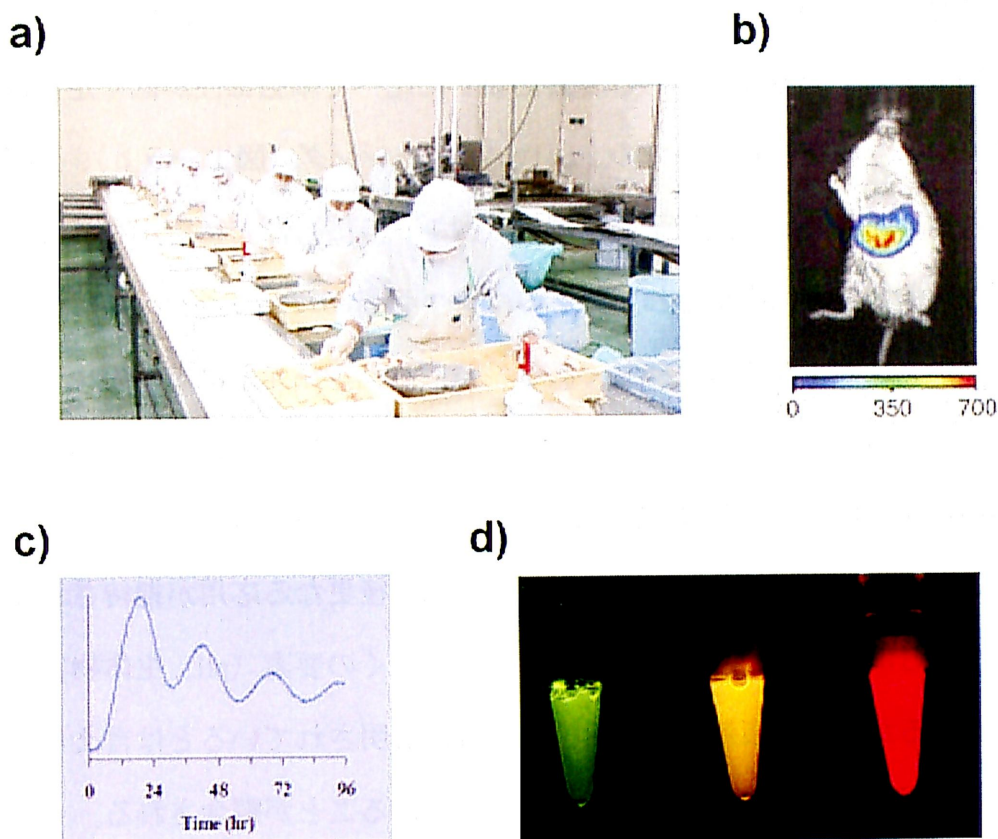


図1-5、ホタルルシフェラーゼの応用

(a) 微生物検出(ATPセンサー)試薬として食品工場などで衛生検査に応用されている。(b) in vivo イメージング。*Nature Methods* **2**, (2005) 607出典。(c) 培養細胞での時計遺伝子の発現解析。中島芳浩博士提供(d) 3種の異なる発光色のルシフェラーゼの発光。基質、反応条件は全て同じである。小江克典博士提供。

一方、ルシフェラーゼもいろいろな発光生物のものが幅広く応用されている。特にホタルの L-L 反応の応用範囲は広い (図 1-5)。図 1-3 に示したようにホタル L-L 反応には ATP が補因子として必要であるため、ATP を検出する試薬として微生物の検出に応用されている (図 1-5 a)。具体的には食品工場などにおける衛生試験や、特殊な例では火星探査機で生命体の探索に用いられている。

ルシフェラーゼは遺伝子発現解析のマーカー遺伝子として生命科学研究においても応用されている (Greer III 2002, Bhaumik 2004, Alvarado 2004)。これは GFP の応用例と目的が似ているが、ルシフェラーゼならではの特徴がある。まず励起光を照射する必要が無いためにバックグラウンドが低く抑えられ、高い感度で遺伝子発現を検出できるという利点がある。また GFP に比べて細胞毒性が低く定量性に優れている。そのため組織レベルでの *in vivo* イメージング (図 1-5 b)、あるいは培養細胞を用いた長時間の遺伝子発現解析 (図 1-5 c) などに応用されている。このような目的で実際に応用されているのはレニラ (*Renilla reniformis*) のルシフェラーゼとホタルのルシフェラーゼである。特にホタル発光系は 1 つのルシフェリンから異なる色のルシフェラーゼを同時に用いることができるため (Nakajima 2004, Branchini 2005) 応用範囲が広くなりつつある (図 1-5 d)。

以上のようにホタルルシフェラーゼ発光系は今後更なる応用が期待されている。しかしながらホタル発光系は反応機構が複雑で多くの要素 (pH、生体物質など) の影響を受けるが、その複雑な反応機構は十分に解明されているとは言えない。そのため、細胞内の環境状態から何らかの影響を受けることが懸念される。

更に基質ルシフェリンの供給が必要という欠点がある。ルシフェラーゼは GFP のように紫外線の照射は必要ではないが、基質分子を細胞外から供給しなくては発光できないからである。

もし、ルシフェリン生合成酵素の遺伝子をルシフェラーゼ遺伝子と共に細胞内で発現させれば、細胞内でルシフェリンを合成させることができ、外からルシフェリ

ンを供給する必要がなくなる。しかしながらルシフェリン生合成を触媒する酵素は
いずれの発光生物でもクローニングされていない。

以上のようにルシフェラーゼの酵素反応機構、そしてルシフェリンの生合成経路
の解析は科学的に興味を持たれるだけでなく、応用面においても活用が期待できる
課題である。

1.2 研究目的

ホタル生物発光系は学術的に興味深いだけでなく多方面で応用されており、産業上重要な生命現象であると言える。しかしながら現在でもホタル生物発光に関して多くの未解明の問題が残されている。本学位論文では特にルシフェリンの生合成とルシフェラーゼの反応特性に関して研究を行うこととした。

まずルシフェリンの生合成に関しては、ルシフェラーゼアッセイにおける基質供給の問題改善という効果が見込まれる。これは生合成酵素によるルシフェリンの細胞内合成が可能になるからである。この他にも、生合成原料物質を定量分析する試薬の開発も可能になる。生合成原料物質の量がルシフェリンの量と相関し、最終的な発光量で測定することが可能となるからである。

またルシフェラーゼの複雑な反応特性、特に発光反応に対する生体物質の作用機序を解明することは、ルシフェラーゼアッセイにおける発光量を正確に評価するための基礎的な知見になる。

以上のように本学位論文では、ホタル生物発光の応用技術を視野に入れながら、その未解明の問題を解決することを目的とする。

第2章 ホタルルシフェリンの生合成

2.1 研究背景

2.1.1 過去のルシフェリン生合成研究

ホタルルシフェリン (D-LH₂) の分子量は他の発光生物のルシフェリンに比べて小さく、化学構造も比較的単純である。White らが 1961 年に D-LH₂ の化学構造を報告したときに、構造確認の一環として有機化学合成を報告している。D-LH₂ の構造が単純で有機合成も比較的容易であったため生合成経路も早い時期に推定されていた。

図 2-1 に逆合成的に考察された D-LH₂ の生合成経路を示す。この中で生合成中間体と考えられたのは 2-cyano-6-hydroxybenzothiazole (CHBT) であり、生合成原料と考えられたのはシステイン (Cys) 2 分子と *p*-benzoquinone 1 分子である。Cys は蛋白質を構成する 20 種類の α アミノ酸の 1 つである。キノンは生物で一般的な化合物であるが、特に甲虫類に

多く含まれている。生合成原料あるいは生合成中間体を

特定する方法として一般的なものは、放射性あるいは安定同位体で標識した化合物の取り込み実験である (表 2-1)。

ホタルにおいては *p*-benzoquinone (Okada 1976) および CHBT (Okada 1974) がホタル体内の D-LH₂ に取り込まれることが確認

された。また DL-cystine (Cys

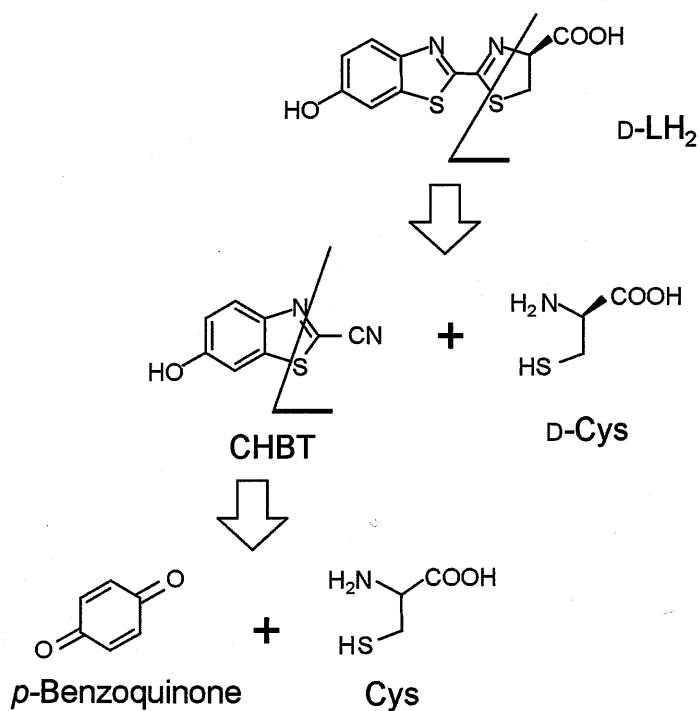
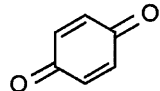
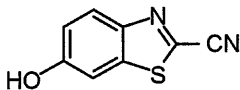
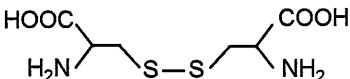


図2-1、ホタルルシフェリンの生合成経路の予測

が酸化したジスルフィド二量体) も同様に取りこまれることが確認された (McCapra 1976, Colepicolo 1988)。

表2-1、ホタルルシフェリン取り込み実験

システインの代わりにラセミ体のシスチンを用いている。

 p -Benzoinone	K. Okada, et al. (1976)
 CHBT	K. Okada, et al. (1974)
 DL-Cystine	F. McCapra, Z. Razavi (1976) P. Colepicolo, et al. (1988)

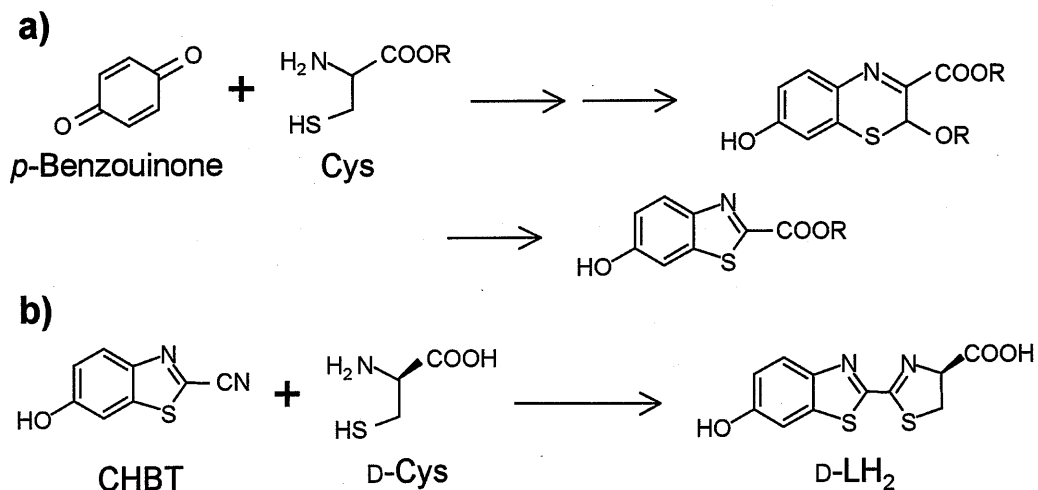


図2-2、ホタルルシフェリンの生合成に関する有機反応

(a)キノンとシステインのカップリング反応と酸化によりベンゾチアゾール環ができる。カップリング反応は非酵素的に進行するが、環化と縮環には $K_3Fe(CN)_6$ などの酸化剤が必要である。(b) CHBTとシステインがカップリングしてルシフェリンができる。この反応はpH8のバッファー中で非酵素的に進行する。

次に D-LH₂ 生合成に関与すると考えられる有機化学反応を図 2-2 に示す。
p-benzoquinone は Cys と縮合してベンゾチアジン環化合物となり、これが縮環することでベンゾチアゾール環となる (Löwik 2001) (図 2-2 a)。キノンとチオールは相互の反応性が高いため、このカップリング反応は非酵素的に水溶液中で進行する。これに続く閉環と縮環は K₃Fe(CN)₆ のような酸化剤が必要であるが、有機化学的には十分に起こり得る。しかしながらこれらの反応が D-LH₂ の生合成経路であるかどうかは証明されていない。

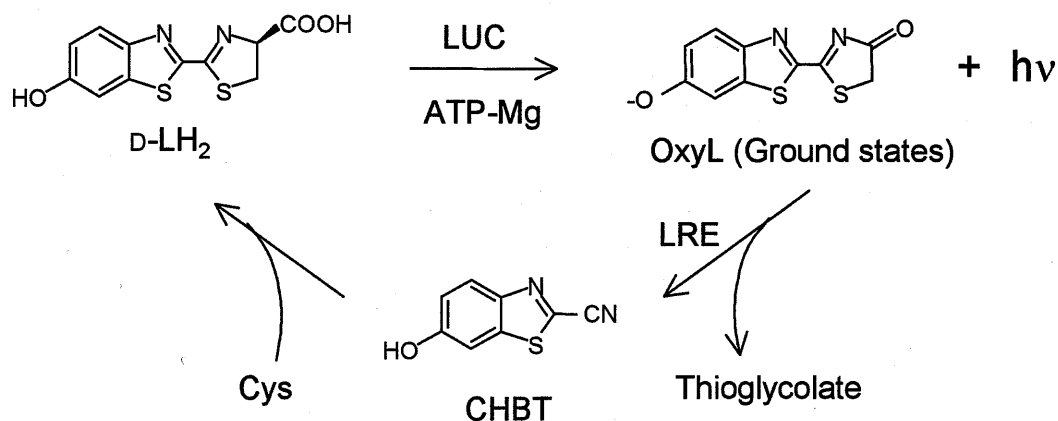


図2-3、ホタルルシフェリンの再生経路
 CHBTはシステインと反応してルシフェリンを再生する。

一方、CHBT と D-Cys は非酵素的に反応して D-LH₂ となる (図 2-2 b)。CHBT は当初、LH₂ の有機合成材料と考えられていたが、岡田らは取り込み実験の詳細な解析からルシフェリン再生経路 (図 2-3) の中間体であることを提唱した (Okada 1974)。更に 2001 年、五味らは発光反応生成物であるオキシルシフェリン (OxyL) を CHBT に分解する酵素 (LRE, luciferin regeneration enzyme) を単離、クローニングした (Gomi 2001)。これにより CHBT がホタル体内に存在する天然物質であることが示されたと言える。しかしながらルシフェリン再生の必要性、あるいは LRE の酵素としての機能に関しては疑問が持たれている (Day 2004)。更に Day らは LRE の基質が OxyL のみではなく他のヒドロキシベンゾチアゾール誘導体であって、これが CHBT

を合成するための基質となり、ルシフェリンの生合成につながるのではないかという考察をしている。図2-2 bに示したように、D-LH₂の不斉炭素はD-Cysのそれに対応している。この反応は非酵素的に進行する (White 1961) ので、D-Cysの代わりにL-Cysと反応させると光学異性体のL-LH₂が合成される。

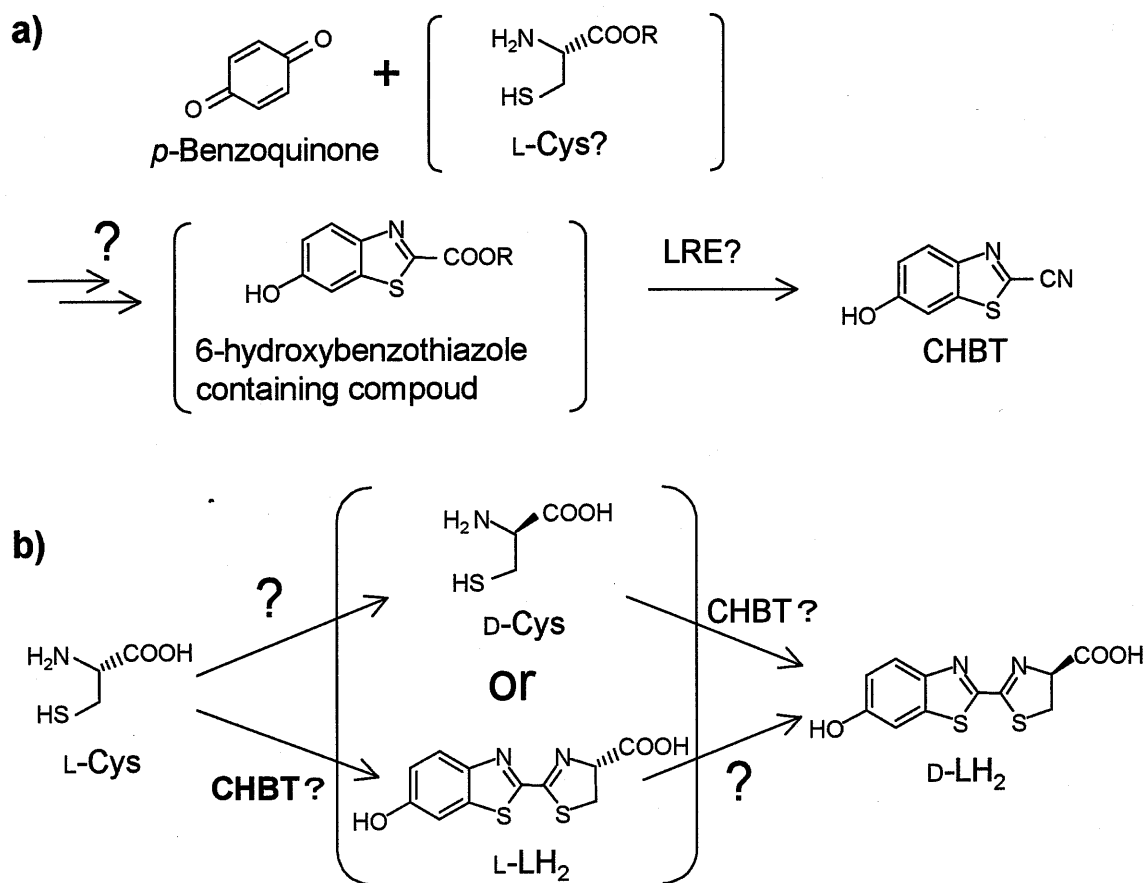


図2-4、ホタルルシフェリンの生合成に関するこれまでの知見
 (a) キノンからベンゾチアゾール環の生合成。キノンとシステイン(あるいはその誘導体)からヒドロキシベンゾチアゾール化合物を経てCHBTができる。このとき、LREが関与しているかもしれない。(b) チアゾリン環の生合成で想定されるL-Cysからの2つのルート。ひとつは、L-Cysのキラリティが変換されてからD-LH₂が生成する径路。もうひとつは、L-CysがまずL-LH₂となり、その後キラリティが変換されてD-LH₂が生成する径路。

ホタルルシフェリンはキラルな化合物である。生物発光は D-LH₂ のみに活性があり、その光学異性体である L-LH₂ は活性が無い (Seliger 1961)。さらに L-LH₂ は発光反応を阻害する (McElroy 1962, Lember 1996)。ここで問題となるのは生合成原料と考えられている Cys の立体である。Cys を含めて蛋白質を構成するアミノ酸は全て L 体である。そのため生合成の最初の原料となるのは L-Cys である。しかし L-Cys が CHBT とカップリングして生成するのは光学異性体の L-LH₂ である。このように D-LH₂ の立体は生物的に特異なものであると言える。そのため Cys の立体を考慮した取り込み実験が必要である。しかし現在のところ、単独の L-Cys あるいは D-Cys を用いた取り込み実験の報告はない。そのため D-LH₂ の特異なキラリティをホタルがどのように作り出しているのかは全く明らかになっていない。

以上これまでに報告された D-LH₂ 生合成に関する知見をまとめたものを図 2-4 に示す。CHBT は、*p*-benzoquinone と L 体の Cys あるいはその誘導体から合成できる (Löwik 2001) (図 2-4 a)。しかし生合成経路としての詳細は明らかにはなっていない。この中で最終段階は D-LH₂ 再生経路の酵素として見つかった LRE が触媒しているかもしれない (Day 2004)。

次に、D-LH₂ は CHBT と Cys のカップリングによって生成する (図 2-4 b)。LH₂ の立体は Cys の不斉炭素に起因し、また生合成原料は天然型 L-Cys と考えられるので、D-LH₂ を合成するためには途中でそのキラリティは変換されなくてはならない。また CHBT と Cys のカップリング反応は非酵素的に速やかに進行する。そこで、次の 2 つの経路が考えられる。すなわち①、L-Cys が D-Cys に異性化されて CHBT とカップリングして D-LH₂ が生成する経路。あるいは②、まず L-LH₂ が生成してその後キラリティが変換されて D-LH₂ が生成する経路。このとき想定される中間体 (D-Cys あるいは L-LH₂) はいずれも天然物の光学異性体であり、一般的には生体内に存在しないと考えられている化合物である。そのため生合成経路は①か②のどちらか一方にしておくことが生物としてのホタルにとってコスト的に無駄がないと考えられる。

以上のようにホタルがいかにして D-LH₂ の特異な立体を生合成的に得ているのかを考えると、中間体として D-Cys あるいは L-LH₂ が想定される。

近年、 α -アミノ酸の一つである D-セリンがシナプスでの神経シグナル伝達物質としてセリンラセマーゼによって合成され、神経細胞の NMDA レセプターのグリシン結合部位に結合することが明らかにされた(Boehning 2003, Stevens 2003)。また昆虫を含めて多くの生物に D-アミノ酸が含まれていることが報告されている(Friedman 1999, Fujii 2002, Hamase 2002)。更に、カイコがセリンラセマーゼを持っており、しかも成熟するに従って D-セリンが増加することが報告されている(Yoshimura 2004)。これらの報告はホタルがシステインラセマーゼを持っている可能性を示唆している。しかしながら D-Cys が生体に悪影響を与える物質であり(Friedman 1984)、酵素によって積極的に分解されているという証拠も報告されている(Soutourina 2001, Riemenschneider 2005)。

一方 1996 年、Lembert はルシフェラーゼによる L-LH₂ からの発光を報告している。これは L-LH₂ が生合成中間体である可能性を示唆している。

以上のように、L-LH₂ と D-Cys のどちらも生合成中間体である可能性を示唆する報告があると言える。そこで本章では、LH₂ および Cys の光学純度を測定し、ホタル自身がこれらの化合物のキラル異性化を行えるか否かを調べることにした。

2.1.2 ホタルの生態とルシフェリン生合成の関係

ホタルルシフェリン (D-LH₂) と類似構造を持つ天然物質としては、細菌類が防御物質として生産するペプチド誘導体が知られている(Schwarzer 2003)。ホタルをはじめ昆虫は一般的に共生細菌が腸内などに多く存在するため、Day らは D-LH₂ もホタルに共生している微生物が生合成しているのではないかと提唱している。しかしながらこれを証明する実験結果は得られていない。

近年、オワンクラゲのセレンテラジンが食物連鎖で生物濃縮されていることがクラゲの給餌実験によって確かめられた (Haddock 2001)。このことは発光生物自身がルシフェリンを合成していない場合があるということを意味している。そのため、生合成の研究を行うためには共生細菌や食物連鎖を念頭に置き、化学物質の循環を生態学的に解析する必要がある。これによってルシフェリンがいつどこで何が生合成しているのかが明らかになり、そこではじめて生合成経路の解明、生合成酵素の単離が可能になる。

ホタルルシフェリン (D-LH₂) の生合成においても同様に生態学的な解析が重要である。そのためにはホタルの生活環あるいは食性を考慮することが重要である。しかしながらこれまで、生合成を生態学的に捉えた研究は報告されていない。

ホタルの生態という観点で考察すると、わが国のゲンジボタル (*Luciola cruciata*) あるいはヘイケボタル (*Luciola lateralis*) は非常に興味深い。これらのホタルは我々にとって非常に身近であり、既にその生態が詳しく調べられている (Ohba 2001, Ohba 2004)。ルシフェリン生合成において特に重要な点は、これらのホタルがそのライフサイクルの中で最も発光する時期と餌を摂る時期がずれているということである (図 2-5)。これらのホタルは卵から成虫まで、全てのライフステージで発光することが知られている。特に成虫は発光を個体間のコミュニケーションに利用しており、交尾相手を探す (mate attraction) ために明滅することは広く知られている。これに対し幼虫の発光は目的がはっきりせず、成虫のように高度に制御された明滅は行わない。また発光の頻度も少ない。蛹、あるいは卵の期間は仄かに発光しているが、成虫期ほどの明るさではなく、これも制御された発光ではない。このようにこれらのホタルが最も光るのは成虫期であると言えるが、面白いことに成虫は何も食べない。時折水を飲む程度である。また当然のことながら、蛹、卵も何も食べない。餌 (主に水棲巻貝) を摂るのは水中で生活をする幼虫だけである。

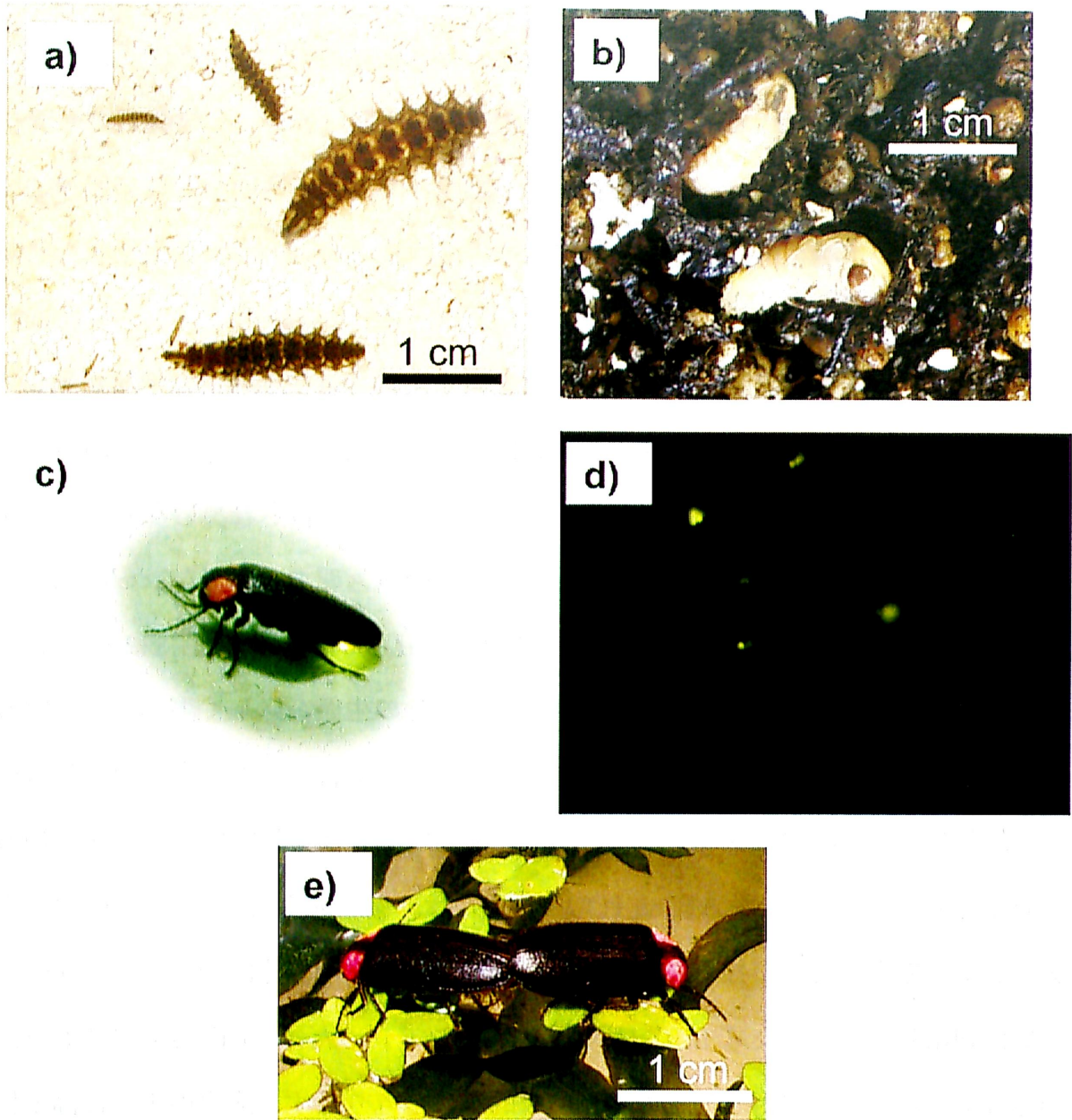


図2-5、ヘイケボタルの生活環

(a) 幼虫。餌(タニシ、サカマキガイなど)を食べるのは一生のうちこの時期だけである。脱皮を繰り返し1齢から5齢幼虫まで成長する。ごく稀にしか発光しない。(b) 蛹。上陸後、土繭を作ってその中で蛹を経て羽化する。刺激に反応して光ることがある。(c) 成虫。尾部の発光器を光らせて他の個体とコミュニケーションする。餌は摂らない。(d) 暗闇で光によって通信するヘイケボタル成虫。この時期の発光は非常に明るく、明滅は高度に制御されている。この時期にルシフェリンを最も必要とすると考えられる。(e) 交尾。その後水辺の苔などに産卵する。



図2-6、ヘイケボタルの飼育

(a) 飼育ケース。この中で数100匹の幼虫を飼育できる。(b) 作業はケースの蓋をはずして行う。水槽の中央には体積の1/3を占める炭素フィルターがある。(c) 小規模な生態系を維持するためにメダカ、水草を共存させている。メダカは羽虫などの発生を抑える。ボタルの幼虫には毒があるためメダカに食べられることはない。(d) 餌は主にタニシで、生きたまま与えたり剥き身にして与える。タニシは水槽の藻を食べて掃除もしてくれる。(e) 中央の炭素フィルターの上に成虫になるための繭床を乗せてある。上陸した終齢幼虫は土繭を作り変態し、成虫になる。

以上のことからホタル自身が D-LH₂ を合成しているか否かは、生活環を追ってホタル体内の D-LH₂ の量を測定すれば明らかになると思われる。

各生育段階のホタルをサンプリングするためには、実験室内で飼育することが望ましい (図 2-6)。ゲンジボタルあるいはヘイケボタルは世界中の他のホタルとは異なり幼虫期を水中で過ごすという特徴がある。自然に生育している水中の幼虫を採集することは極めて困難である。またホタルは各地で保護、育成されているために、これを採集することは社会的に問題がある。一方、これらのホタルの飼育は一般でも行われるようになっており、特にヘイケボタルであれば飼育キットも購入することができる (図 2-6 a)。

ヘイケボタルはゲンジボタルに比べて飼育が容易である。餌の許容範囲が広く、水棲巻貝であれば何でも食べる。また水質汚濁に強い。更に生態的特徴として、体が小さく最短なら 2~3 ヶ月ほどで生活環が一周する。そのため飼育コストがかからない。また生育速度に個体間のばらつきが大きく、一年中、いろいろな生育段階の個体が同時にサンプリングできる (図 2-6 e)。生育速度のばらつきは、ヘイケボタルの生存戦略として、成熟する時期をばらつかせて常に一定数の成虫が交配相手と出会い、短期的な環境悪化のリスクを回避するためのものと考えられている。これに対しゲンジボタルは全ての個体が短期間 (約 2 週間) に成虫になり、交配の機会を最大限に増やし、一度に大量に産卵する。これにより個体数の損耗によるダメージを減らすと考えられている。餌が充分でなく成長が遅れて成虫になれなかったゲンジボタルの幼虫は、もう一年越冬して次のシーズンを待つ (大場 1993)。

そこで本章では、ヘイケボタルを実験室内で飼育、サンプリングし、分析を行うこととした。前節で述べたように、D-LH₂ の生合成中間体として予想されるのは、D-Cys か L-LH₂ のどちらかである。そこで本章では、幼虫から蛹、成虫にかけてのホタルをサンプリングし、これらの物質を分析することとした。特に光学純度を詳細に解析することとした。

このうち、Cys は蛋白質を構成するアミノ酸の1つである。アミノ酸の光学純度に関しては、これまでに多くの報告 (Fujii 2002, Hamase 2002, Boehning 2003) がされており、同時に複数の α アミノ酸の光学純度を分析する方法も報告されている (Brückner 2003, Yokoyama 2003)。しかしながらいずれの報告においても Cys は除外されている。すなわち、これまでに Cys の光学純度を分析した報告はほとんど無い。その最大の理由はキラル分析を行うために、Cys とのジアステレオマーを形成させる方法が用いられるためである。また Cys は酸化されて2量体のシスチンに変化しやすいことや、紫外吸収がほとんど無いために HPLC での分析が困難であることなども、Cys の生体キラル分析が行われていない理由である。

Cys 及びシスチンの定量分析に関しては、チオール基に特異的な蛍光標識試薬を用いた方法 (図2-7) が報告されている (Toyo'oka 1988)。しかし、Cys の光学純度の分析は行われていない。そこで本章では、Cys の光学純度分析方法についても詳述する。

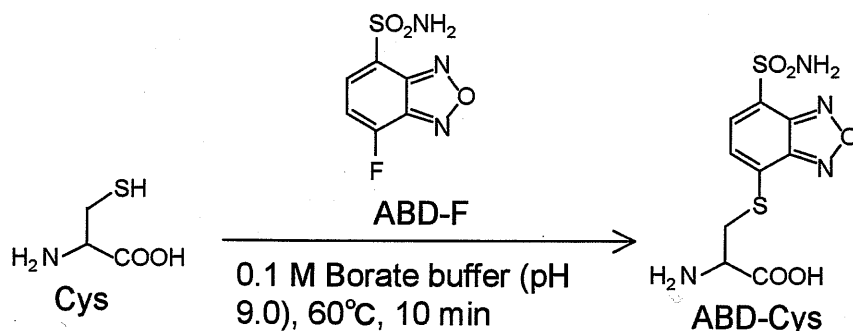


図2-7、システインの蛍光標識試薬

ABD-FはpH9、60°Cでチオール基特異的に結合する。ABDはチオールと結合すると特異的な蛍光 (λ ex 375 nm, λ em 500 nm) を持つのでHPLCで高感度に検出できる。

2.2 実験方法

2.2.1 ホタルの飼育

ヘイケボタル及び飼育装置は、株式会社環境技術研究所(前橋市)より購入した(図2-6 a)。300~400匹の個体をこの飼育装置で飼育した。

水槽内で全ステージの個体を飼育することができる。水槽の中央を仕切る形で体積の1/3を占める炭素フィルターが据えられている(図2-6 b)。これに付着繁殖している好気性細菌により水質浄化を行う。エアーリフトポンプで水を循環させてフィルターに通水する。水槽は空調のある実験室内に設置し、水温調節は特に行わなかった。

幼虫は水中に生息する(図2-6 c)。小規模な生態系を維持するためにメダカ、水草を共存させている。メダカは羽虫などの発生を抑える。ホタルの幼虫には毒があるためメダカに食べられることはない。

餌は主にタニシで、生きたまま、あるいは剥き身にして与える(図2-6 d)。生きたタニシは藻を食べて水槽の掃除もしてくれる。幼虫は夜行性なので、食べ残しが発生しないよう剥き身の餌は夕方を与える。200匹位の幼虫であれば、殻長2~3cmのタニシを2日に1度ずつ与える。タニシは箕面市内の溜め池から採取した。

中央の炭素フィルターの上に蛹になるための繭床となる園芸用土を乗せてある(図2-6 e)。上陸した終齢幼虫は土繭を作り、蛹を経て羽化し、成虫になる。成虫は十分な個体数があれば交尾して産卵する。卵は炭素フィルターなどに産みつけられる。

2.2.2 基質ルシフェリンの調製

D-LH₂は和光純薬のD-luciferin sodium saltを用いた。L-LH₂は常法(Toya 1992)に従い合成した(図2-8)。CHBTは6-methoxy-2-cyanobenzothiazole (Sigma)から常法に従い合成した。

26.4 mg の 6-methoxy-2-cyanobenzothiazole と 4.3 g のピリジン塩酸塩を耐熱試験管に入れ、窒素雰囲気下密閉して 200°C、2 時間反応させた。10%炭酸カリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、生成物をエーテルで抽出した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、12.8 mg の CHBT を得た。次に 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] バッファー中、1 mM CHBT と 1 mM L-Cys を混合し、室温で 30 分間反応させて L-LH₂ を合成した。これを 1 mM L-LH₂ 溶液とした。

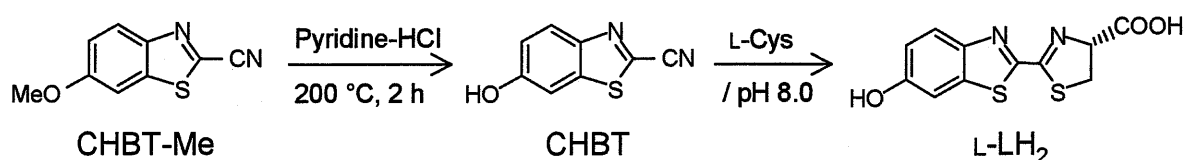


図2-8、L-ルシフェリンの合成

2.2.3 ルシフェリンキラル分析

装置等：LH₂ の定量分析および光学純度分析は、高速液体カラムクロマトグラフィー (HPLC) によって行った。分離装置は Waters 社製 Alliance (ポンプシステム 2695、フォトダイオードアレイディテクター 2996、蛍光ディテクター 2475) を用いた。

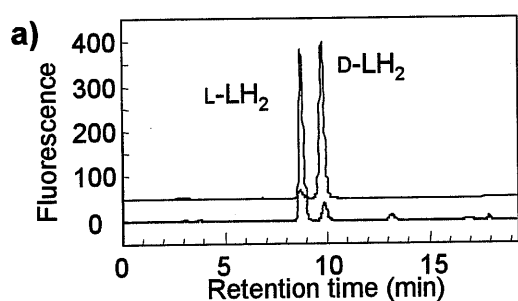
LH₂ キラル分析条件 (in vitro LH₂)：流速、1.0 ml/min。移動相、27%アセトニトリル (0.1% TFA) 水溶液。蛍光検出器、励起波長 330 nm、蛍光波長 530 nm。図 2-9 a に標品の D-及び L-LH₂ のクロマトグラムを示す。

ホタル LH₂ 抽出：1.5 ml エッペンチューブにホタル 1 匹を入れ、200 μl EtOH - 0.5% tri-*n*-butylphosphine を加え、チューブ用ホモジェナイザーでホタルを破碎した。これを 70°C で 5 分間加熱し、遠心分離 (15,000 rpm, 5 min, 4°C) して細胞残渣を除去した。20 ml の上清に 100 μl の 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] を加え、スピンフィルター (0.4 μm) で不溶物を除去し、次の HPLC 分析に供した。図 2-9 b に生体ホタル中のルシフェリン抽出方法を示す。

LH₂キラル分析条件 (ホタル生体 LH₂) : 100 μl のホタル抽出ルシフェリンを、キラルカラムを用いた HPLC により分析した。HPLC 分離条件 : カラム、CHIRALCEL OD-RH (φ 4.6 mm, 150 mm, ダイセル化学)。流速、1.0 ml/min。移動相、グラジエント (15-40%, 20 min) アセトニトリル (0.1% TFA) 水溶液。蛍光検出器、励起波長 330 nm、蛍光波長 530 nm。

D-LH₂ および L-LH₂ のピークは分取して酵素反応により同定した。この解析ではシグマ社の北米産ホタル (*Photinus pyralis*) 天然抽出、HPLC 精製、再結晶グレードルシフェラーゼ (LUC) を用いた。その他の試薬 (ATP、MgSO₄、CoA、Tris、HCl) は和光純薬製のものを用いた。LUC は glycerol を 10% 含む 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] に溶かして 1 mg/ml として -30°C で保存した。ATP と MgSO₄ はそれぞれ 3 mM、8 mM となるように 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] に溶かして ATP-Mg 溶液とし、-30°C で保存した。CoA は蒸留水に溶解して 100 mM として、-30°C で保存した。

D-LH₂ のフラクションは、乾燥して 120 μl の ATP-Mg 溶液と 1 μl の LUC 溶液を加えて発光活性を確認した。また L-LH₂ は同様に 120 μl の ATP-Mg 溶液と 1 μl の LUC 溶液、1 μl の CoA 溶液を加え、LH₂-CoA に変換されることにより確認した。



50 pmol LH₂
CHIRALCEL OD-RH column, 1.0 ml/min,
27% AN aq. with 0.1% TFA
Fluorescence detector,
(λ_{ex} = 330 nm, λ_{em} = 530 nm)

b)
Single firefly body
↓ 200 μl 0.5% TBP/EtOH
Homogenization
↓ 80 °C, 5 min
Centrifugation
↓ 15,000 rpm, 5 min
20 μl Supernatant
↓ 100 μl 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)
Spin filtration (0.4 μm)
↓ 8,000 rpm
HPLC chiral analysis

図2-9、ホタルルシフェリンのキラル分析方法
(a) D-およびL-LH₂ (標品) のキラルカラムによる分離のクロマトグラム。(b) 生体ホタルからのLH₂抽出方法。

2.2.4 システインキラル分析

装置等：Cysの光学純度分析は、HPLCによって行った。分離装置は2.2.3と同じである。D-CysとL-Cysの標品としてD-cysteine hydrochloride; mono hydrate (Sigma)及びL-cysteine hydrochloride; mono hydrate (Sigma)を用いた。Cysの標識試薬はABD-F (同仁化学)を用いた (図2-7)。ABD-Fは0.1 Mホウ酸バッファ- [pH 8.0]に溶解した。

ホタル生体Cys抽出：1.5 ml エッペンチューブにホタル4匹を入れ、400 μ l 1 N HCl と10 μ l の10% tri-*n*-butylphosphineを加え、チューブ用ホモジェナイザーでホタルを破碎した。これを100°Cで5分間加熱し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 4°C) して細胞残渣を除去した。スピンフィルター (0.4 μ m) で不要物を除去し、次の分析前簡易精製に供した。図2-10 aにホタル生体Cys抽出方法を示す。

ODSカラム精製：100 μ l のホタル抽出液をODSカラムを用いてHPLCで精製した。Cysを含むフラクションを分取し、遠心エバポレーターにより乾燥した。

HPLC分離条件：カラム、Deverosil ODS-SR-5 (ϕ 4.6 mm, 250 mm, 野村化学)。流速、0.7 ml/min。移動相、25% アセトニトリル水溶液 (0.1% TFA)。フラクション、3.5~4.3分。図2-10 bにホタルCysのODSカラム精製方法を示す。

Cys蛍光標識：ODSカラムで精製したホタル抽出Cysフラクション (乾燥済み) を25 μ l の0.1 Mホウ酸バッファ- [pH 8]に溶解した。標品Cysは、それぞれ0.4 mMのD-Cys、L-Cys溶液を同じバッファ-で調整した。25 μ l Cysフラクションあるいは標品に80 μ l の0.1 Mホウ酸バッファ- [pH 8]、50 μ l の1 mM ABD-F、5 μ l の10% TBP/アセトニトリルを加え、50 °Cで5分間反応させた。その後、氷上に移し60 μ l の0.1 N HClを加え、反応を停止させた。図2-10 cにCysの蛍光標識方法を示す。

Cys キラル分析条件：40 μl の標識済みホタル抽出 Cys フラクシオンを、キラルカラムを用いた HPLC により分析した。HPLC 分離条件：カラム、CROWNPAK CR(+) (ϕ 4.6 mm, 150 mm, ダイセル化学)。流速、1.2 ml/min。移動相、0.1% TFA 水溶液。蛍光検出器、励起波長 380 nm、蛍光波長 510 nm。図 2-10 d に標品の D-及び L-Cys のクロマトグラムを示す。

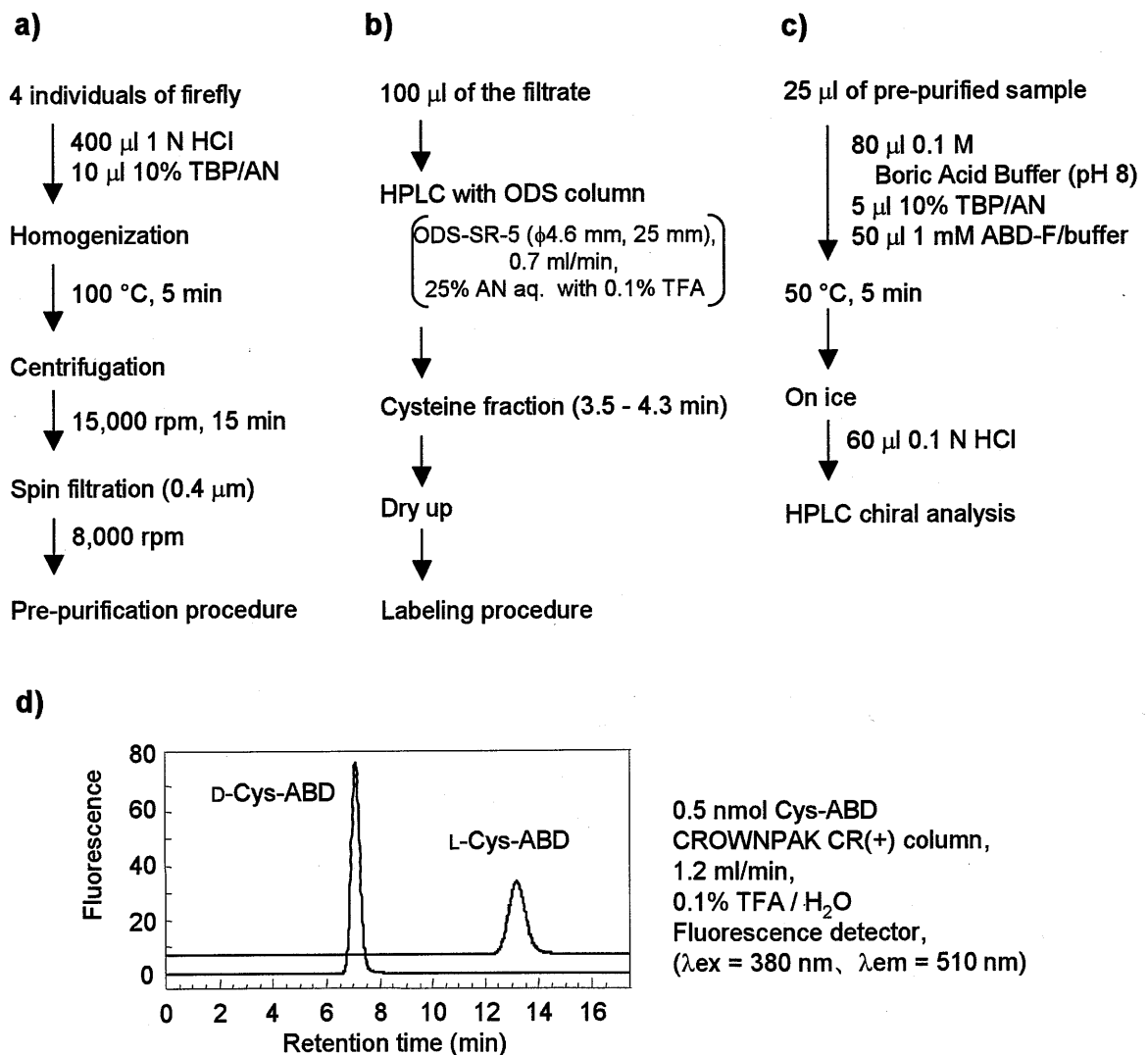


図2-10、システインのキラル分析方法

(a) 生体ホタルからのCys抽出方法。(b)抽出CysのODSカラム精製方法。(c) ODSカラム精製CysのABD標識方法。(d) ABD標識した D-およびL-Cys (標品)のキラルカラムによる分離のクロマトグラム。

2.2.5 ホタル粗蛋白質によるキラル異性化反応

ヘイケボタル成虫は2.2.1のとおり実験室で飼育したもの、ゲンジボタル成虫は隠岐において採取したもの、*Photinus pyralis*成虫はシグマより購入したものをそれぞれ用いた。また対照実験に用いるためのLUCとしてLuciferase, Recombinant, *Luciola cruciata* (和光純薬) を使用した。ATP、MgSO₄、CoA、L-Cys、D-Cys、その他必要な試薬は和光純薬のものを使用した。

酵素は glycerol を10%含む0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] に溶かしてその日のうちに使用した。ATP-Mg 溶液は、それぞれ3 mM、8 mM となるように0.1 M Tris-HCl [pH 8.0] に溶かして調整した。

ホタル成虫をドライアイス上で凍結し、発光器を切り出した。これを1.5 ml エッペンチューブに入れ、200 μ l のバッファー (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]) を加え、チューブ用ホモジェナイザーで発光器を破碎した。これをバッファーで透析し (50 ml、30分 \times 4回)、粗蛋白質溶液とした。

この粗蛋白質溶液を用いて、各種条件での酵素活性を調べた。

2.3 結果及び考察

2.3.1 ルシフェリンのキラル分析方法

ホタル LH_2 は特異的な蛍光（励起波長 330 nm、蛍光波長 530 nm）を有しており、蛍光検出器により HPLC で高い特異性で検出が可能である。

まず光学分割を行うためにダイセル化学工業社から市販されている逆相系キラルカラム、CHIRALCEL OD-RH、CHIRALCEL OJ-RH、CHIRALPAK AD-RH、CHIRALPAK AS-RH を比較したところ、CHIRALCEL OD-RH で最も良好な分離が得られた（図 2-9 a）。移動相はアセトニトリル-TFA 系が良好であった。保持時間は D- LH_2 が 7.0 ± 0.1 min、L- LH_2 が 8.5 ± 0.1 min であった。

定量分析を行うために、標品の D- LH_2 を用いて検量線を作成した（図 2-11 a）。HPLC のピーク面積（蛍光検出）とルシフェリン量には良い相関が見られた（ $R^2 = 0.9992$ ）。検出限界はおよそ 10^{-13} mol であった。

次に LH_2 をホタルから抽出する方法の検討を行った。溶出には LH_2 の溶解度が高いアルコールを用いた。 LH_2 は酸化してデヒドロルシフェリンになるなどが予想されるため、還元剤として 0.5% tri-*n*-butylphosphine を加えた。抽出効率を良くし、またホタル体内の酵素による影響を除くために 70°C で 5 分間加熱することとした（図 2-9 b）。

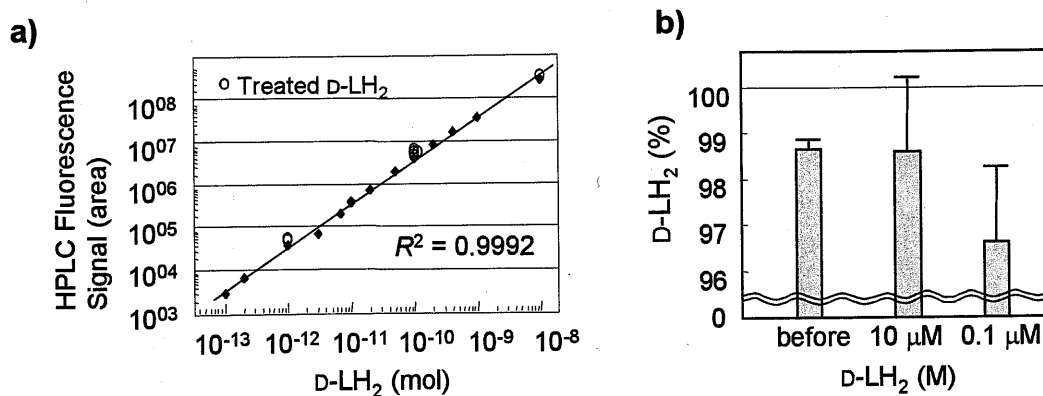


図2-11、ホタルルシフェリンの定量分析

(a) LH_2 の検量線（実線）および、抽出操作を行った濃度既知標品 D- LH_2 （○印）の定量分析結果。(b) 濃度既知標品 D- LH_2 の光学純度。抽出操作を行う前（10 μM ）の D- LH_2 と抽出操作を行った D- LH_2 をキラルカラムで分析した。（平均値 \pm 標準偏差）

この抽出操作が LH₂ に及ぼす影響を調べるために、濃度既知の標品を用いて同様の抽出操作を行った。すなわち D-LH₂ を 0.5% tri-*n*-butylphosphine/MeOH に溶かし、1 mM、10 μM、0.1 μM とし、これを 5 分間煮沸してキラルカラムにより定量した。その結果、図 2-11 a に示したとおりいずれの濃度においても D-LH₂ 量の低下は認められなかった。

更に、抽出操作によって LH₂ がラセミ化はしないということも確かめられた (図 2-11 b)。以上により、LH₂ のキラル分析が本法によって可能であることが確認された。

図 2-11 b から明らかなように、標品として用いた市販の D-LH₂ の光学純度が既に 100% ではなかった。そこで D-LH₂ の安定性を評価するために、室温暗所での D-LH₂ 溶液 (200 μM) の時間変化を調べた (図 2-12)。その結果、中性のバッファー溶液の場合、1 日で約 3% という僅かな量ではあるが、LH₂ が異性化することが明らかとなった。これに対し純水溶液の場合、10 日を過ぎても顕著な異性化は認められなかった。LH₂ の絶対総量は本実験では変化は認められなかった。

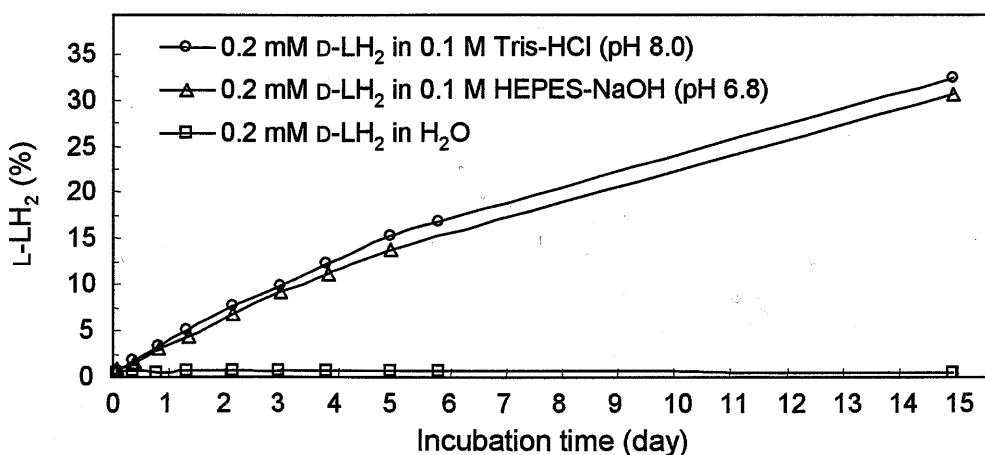


図 2-12、D-ルシフェリンの異性化 (ラセミ化)

0.2 mM の D-LH₂ のバッファーおよび純水の溶液とし、室温暗所で保存し、キラルカラムで光学純度を分析した。バッファー中で少しずつではあるが、ラセミ化している様子がわかる。

以上の結果から、ホタル生体分析は安全を期して抽出してから1日以内に行うこととした。また生体分析では、HPLCでのより良い分離と効率的なカラム洗浄を行うために移動相条件を更に改良し、アセトニトリルのグラジエント(15-40%, 20 min)展開を行った。このとき、保持時間はL-LH₂が10.8±0.1 min、D-LH₂が11.9±0.1 minで、不純物として予想されるデヒドロルシフェリンの保持時間はおよそ13 min、CHBTは14 minであった。

2.3.2 ヘイケボタルの生活環とルシフェリンの分析

図2-13にヘイケボタル成虫LH₂のキラル分析クロマトグラムを示す。予想されるリテンションタイムにL-LH₂及びD-LH₂のピークが確認できた。フォトダイオードアレイディテクターにより、両方のピークでLH₂に特異的な330 nmの吸収を確認した。更にそれぞれのピークを分取して酵素に対する反応活性を調べた。即ち、D-LH₂のフラクションは発光反応の基質となることが確認できた。またL-LH₂はLH₂-CoA合成酵素反応(第3章参照)の基質となることが確認できた(図2-14)。

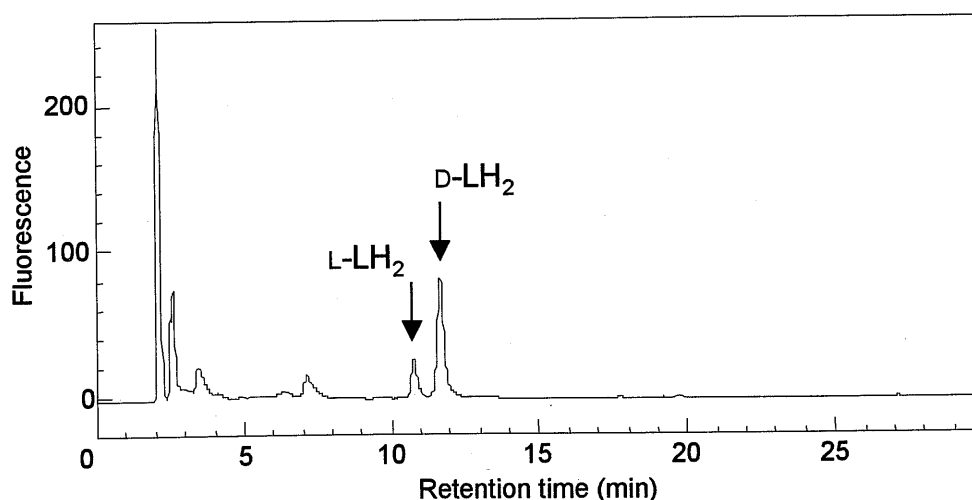
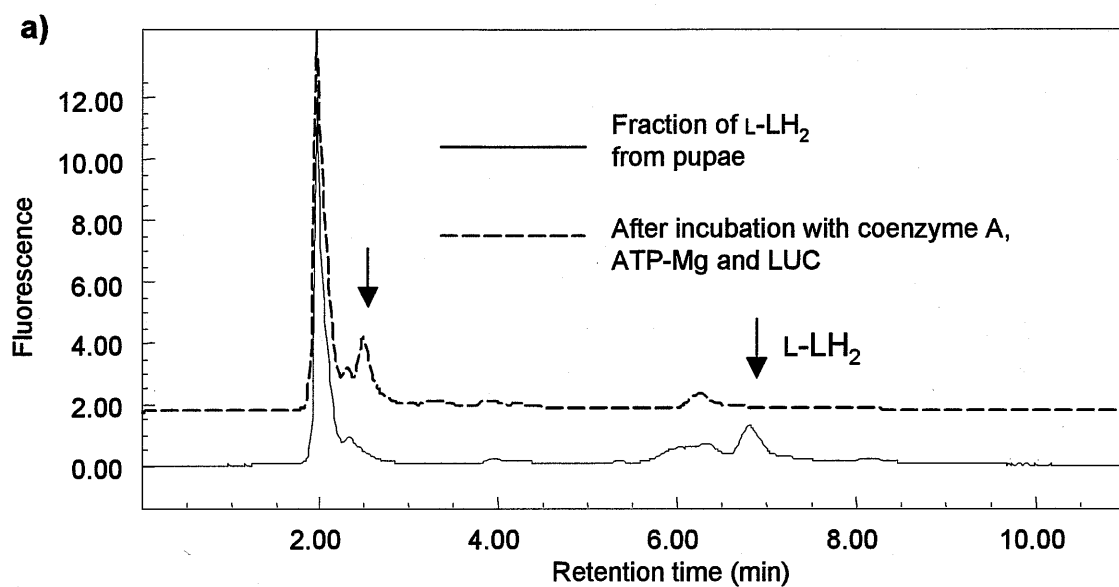


図2-13、ヘイケボタル成虫抽出物のキラルカラム分析のクロマトグラム
デヒドロルシフェリン、CHBTのピークは見られない。L-LH₂とD-LH₂の量をピーク面積から求めると、それぞれ6.45 pmol、23.0 pmolとなる。これはホタル1個体あたりに換算するとそれぞれ139 pmol、460 pmolとなり、全LH₂量に占めるL-LH₂の比率は23.2%になる。

不純物として予想されたデヒドロルシフェリン（保持時間 13 min）および CHBT（保持時間 14 min）はクロマトグラム上では検出されなかった（図 2-13）。

この分析方法を用いて、実験室で飼育したヘイケボタルの分析を行った。表 2-2、表 2-3 にその結果をまとめる。この結果を元に、ホタルの生活環（図 2-15 a）と、1 固体あたりの総 LH₂ 量（図 2-15 b）、L-LH₂ の比率（L-LH₂/DL-LH₂）（図 2-15 c）、湿重量（図 2-15 d）の関係についてまとめた。



b)

L-LH ₂ fraction	40 μ l
Coenzyme A (100 mM)	1 μ l
ATP-Mg (3 mM / 8 mM) in 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]	120 μ l
<i>Photinus pyralis</i> Luciferase (1 mg/ml)	1 μ l

(at room temperature)

図2-14、L-ルシフェリンの酵素反応による同定

(a)ヘイケボタルのさなぎから分離したL-LH₂が、標品のL-LH₂と同様の酵素反応性(第3章参照)を示したことから、L-LH₂と同定した。(b)反応条件。

表2-2、ヘイケボタルルシフェリンキラル定量分析結果1

Stage	Sample name	wet weight (mg)	L-LH ₂ (pmol/body)	D-LH ₂ (pmol/body)	DL-LH ₂ (pmol/body)	optical purity (% ee)	L-LH ₂ / DL-LH ₂ (%)
L	2003-1	47.9	40.2	182.0	222	63.8	18.1
L	2003-2	74	6.2	51.1	57	78.3	10.9
L	2003-3	36	9.4	64.8	74	74.8	12.6
L	2003-4	43.6	17.9	95.9	114	68.6	15.7
L	2003-5	44.4	48.8	133.2	182	46.3	26.8
L	2003-6	33.4	23.4	63.5	87	46.2	26.9
L	2003-7	40.8	5.7	24.5	30	62.2	18.9
L	2003-8	66.8	44.1	200.4	244	63.9	18.0
L	2003-9	40.4	21.8	21.8	44	0.0	50.0
L	2003-11	113.7	145.5	136.4	282	-3.2	51.6
L	2003-12	64.3	147.9	117.0	265	-11.7	55.8
L	2003-13	40.5	20.8	108.1	129	67.7	16.1
L	Y1	28.3	9.3	11.0	20	8.3	45.8
L	Y2	78	28.1	17.9	46	-22.0	61.0
LC	M1-1	43.8	24.1	52.6	77	37.1	31.4
LC	M1-2	25.7	33.4	48.8	82	18.8	40.6
LC	M5-4	33.3	74.6	120.2	195	23.4	38.3
LC	M5-5	46.8	134.8	210.1	345	21.8	39.1
LC	M5-6	38.1	70.9	85.0	156	9.0	45.5
P	S1	42	147.0	134.4	281	-4.5	52.2
P	S2	38.5	100.1	48.5	149	-34.7	67.4
P	S4	30.4	45.6	98.8	144	36.8	31.6
P	S5	24.4	105.9	160.1	266	20.4	39.8
P	S8	32.2	111.1	421.8	533	58.3	20.8
P	S9	33.2	139.1	474.8	614	54.7	22.7
P	S10	29.8	41.7	68.5	110	24.3	37.8
P	S11	37.6	120.3	300.8	421	42.9	28.6
P	S12	36	219.6	648.0	868	49.4	25.3
P	S13	34.2	280.4	718.2	999	43.8	28.1
P	M7-1	24.5	210.7	269.5	480	12.2	43.9
P	M7-2	27.5	209.0	200.8	410	-2.0	51.0
P	M9-3	38.1	69.3	270.1	339	59.1	20.4
P	M9-2	26.2	83.8	226.1	310	45.9	27.0
AC	male2	16.1	107.1	508.8	616	65.2	17.4
AC	M12-2	18.5	149.9	721.5	871	65.6	17.2
AC	fem1	32.1	128.4	609.9	738	65.2	17.4
AC	fem3	18.9	130.4	434.7	565	53.8	23.1
AC	S22	24.2	24.2	140.4	165	70.6	14.7
AC	S15	16.5	165.0	643.5	809	59.2	20.4
AC	S17	22.9	139.7	709.9	850	67.1	16.4
A	Sei1*	17.3	138.9	460.2	599	53.6	23.2
A	S16	13	45.0	309.4	354	74.6	12.7
A	S18	15	112.2	588.0	700	68.0	16.0
A	die13	21.4	143.4	963.0	1,106	74.1	13.0
A	S23	33.2	73.0	149.4	222	34.3	32.8
A	S20	16.1	130.4	1094.8	1,225	78.7	10.6
A	S21	12.6	65.5	554.4	620	78.9	10.6
A	fem2	22.8	250.8	1003.2	1,254	60.0	20.0
A	die11	19.1	126.1	977.9	1,104	77.2	11.4
A	die12	17	114.1	732.7	847	73.1	13.5
A	die3	16	176.0	1760.0	1,936	81.8	9.1

* 図2-13にクロマトグラムを掲載

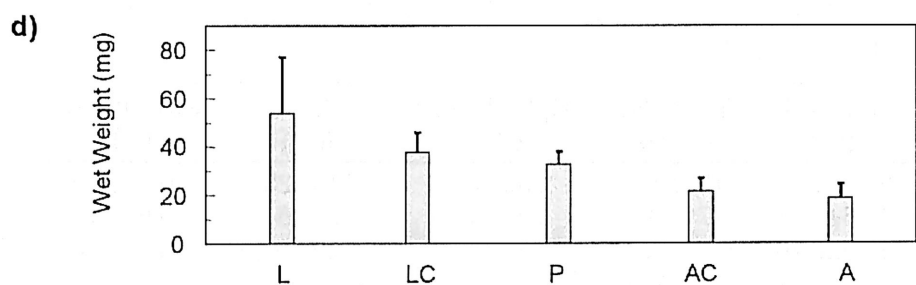
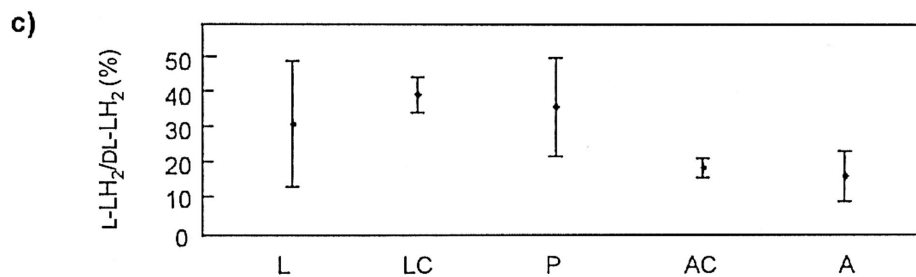
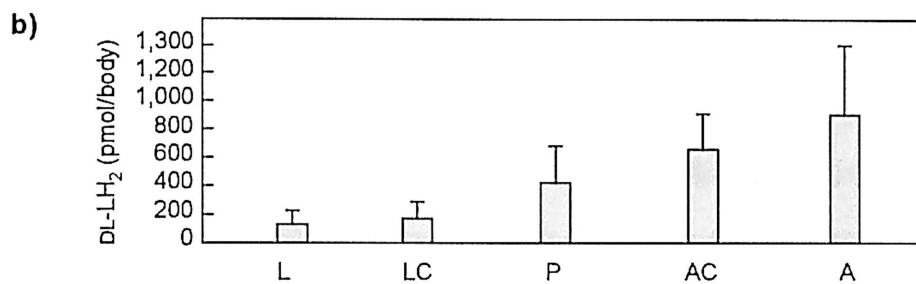
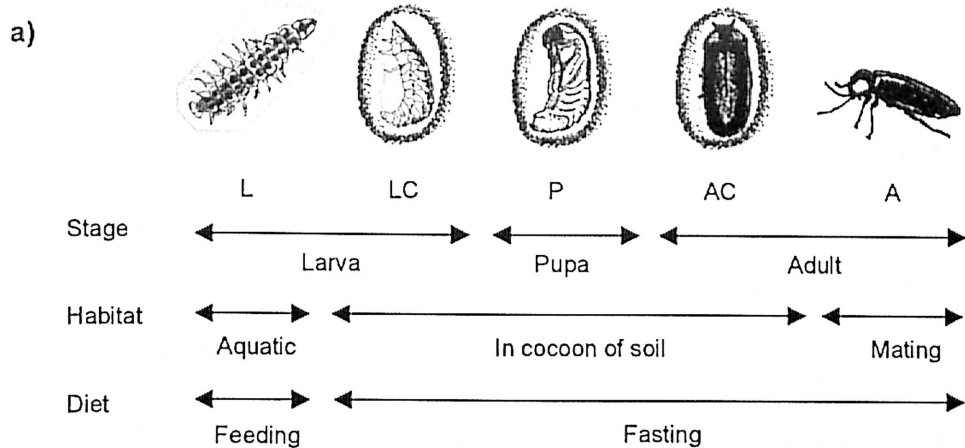


図2-15、ヘイケボタルのライフサイクルとルシフェリン内在量および光学純度
 (a) 幼虫から成虫にかけての成長と生態。菌の中で幼虫から成虫になる (LC→P→AC)。幼虫以外の時期は何も食べない。最も光るのは成虫であるが、この時期は何も食べない。(b) 1個体あたりの総LH₂量。(c) 総LH₂に対するL-LH₂の比率。(d) ヘイケボタルの湿重量。(平均値±標準偏差)

ヘイケボタルが最も D-LH₂ を必要とするのは、光を利用してコミュニケーションを行う成虫の時期である。図 2-15 b からボタルが成虫になって羽化するまで LH₂ を体内に蓄積し続けていることがわかる。ボタルが餌を摂るのは幼虫期だけなので、この結果は LH₂ がヘイケボタルの体内で合成されていることを意味している。体内に寄生している微生物が関与している可能性を否定することはできないが、ヘイケボタルの LH₂ が餌由来ではないことは間違いないと言える。

光学異性体の L-LH₂ はいずれの個体からも検出感度の範囲内で検出された (表 2-2)。更に図 2-15 c から、光学純度も成虫の時期に高いことがわかる。これらの結果は生物学的に興味深い知見である。即ち、ヘイケボタルは成虫期に最も光り、そのためこの時期に発光基質を最も必要とし、実際に内在量も光学純度も最大に達するということが分析により確かめられたことになる。

ヘイケボタルの湿重量は逆に成長と共に減少している (図 2-15 d)。これは、幼虫を過ぎてから次世代を残して死ぬまで何も食べずに、エネルギーとして消費し続けた結果と考えることができる。

表 2-3、ヘイケボタルルシフェリンのキラル定量分析結果 2
(平均値 ± 標準偏差)

Stage	Total LH ₂ (μ M)	Total LH ₂ (pmol)	Optical purity (%ee)	Weight (mg)	L-LH ₂ / DL-LH ₂ (%)
R	2.38±1.43	128±93	38.8±36.1	53.7±23.2	30.6±18.0
RC	4.45±2.21	171±109	22.0±10.1	37.5±8.4	39.0±5.1
P	13.2±7.70	423±263	29.0±27.9	32.5±5.6	35.5±14.0
AC	33.0±14.7	659±247	63.8± 5.5	21.3±5.6	18.1±2.8
A	52.3±29.0	906±486	68.6±14.2	18.5±5.8	15.7±7.1
				R, RC, P	33.9±15.0
				A, AC	16.6±5.8

また、分析データの多くに大きなばらつきが見られた（表2-3）。特にL-LH₂の比率は幼虫と蛹で大きなばらつきが見られた。これらのステージは、多様な生育段階の個体が含まれているため、サンプル間のばらつきが大きくなったと考えられる。また、総LH₂量はいずれのステージでも大きなばらつきが見られた。ヘイケボタルは、種の特徴として、個体差が大きい。実際に湿重量でも比較的大きなばらつきが見られ、成虫での湿重量は最大で約3倍の違いが認められた（11.2 mgと33.2 mg）。実験データの大きなばらつきは、個体差が大きいというヘイケボタルの特徴(Oba 2004)なのかもしれない。

1個体あたりのLH₂量は成虫で906±485 pmolであり、これをホタルの湿重量から濃度に換算すると52.4±29.0 μMである。成虫のLH₂は尾部の発光器に集中しているため（表2-4）、発光器内でのLH₂濃度はこの数倍になると考えられる。市販の発光試薬キット（ピッカジーン、和光純薬）におけるD-LH₂の濃度は200 μMであり、これに近い濃度であることは興味深い。発光器以外の部分から約4%のLH₂が検出されたが、その意義は現段階でははっきりしない。しかしLREが発光器官だけでなく体全体で発現しているという報告（Day 2003）もあるので、LH₂が発光器官の外で合成されている可能性を示唆しているのかもしれない。LH₂は細胞膜透過性が比較的良好と考えられているため、LH₂のホタル体内での局在メカニズムは生合成経路にも関わる問題であり、今後に残された興味深い課題である。

表2-4、ヘイケボタル成虫の発光物質と酵素活性の局在
成虫(11.2 mg)を発光器とその他の部分に分けて行ったLH₂のキラル分析結果と、別の成虫(12.6 mg)を同様に分けて行った酵素活性試験の結果。

Part	L-LH ₂ (pmol)	D-LH ₂ (pmol)	L/DL (%)	Luciferase activity* (count)	Chiral conversion activity
Lantern	2.50	45.3	5.22	2.0 x 10 ⁸	+
Body	0.153	1.76	8.00	1.0 x 10 ⁵	-

* ATTO社製Luminescencer-PSN AB2200にて10秒間積算

卵に関しては、1個が非常に小さく微量であるため分析が困難であった。そこで今回は予備的な分析として、数百個の卵をまとめて分析してL-LH₂とD-LH₂の濃度を測定した。その結果、L-LH₂は3.8 μM、D-LH₂は3.9 μMであった。これは成虫の約1/10量であるが、光学純度は非常に低かった。卵は常に仄かに発光しているが、卵の中のルシフェリンが卵の中で生合成されているのか、親の体内で生合成されたものが卵に受け継がれたものなのかは明らかではない。

以上のように全てのステージで、天然物の光学異性体であるL-LH₂が含まれているということが明らかになった。このことは、L-LH₂が生合成中間体であり、Cysのキラル異性化ではなく、LH₂のキラル異性化が生合成経路であることを強く示唆している。

2.3.3 システインのキラル分析方法

もしホタル体内でD-LH₂のみがCysから直接合成されているとすると、天然型の逆の立体であるD-Cysが大過剰でなくてはならない。そこで、ホタル体内のCysの光学純度を調べることにした。

CysはHPLCの吸収検出器あるいは蛍光検出器では検出が難しい。そこで、チオール基特異的な蛍光標識試薬(図2-7)を用いることとし、ホタルからのCys抽出方法とHPLC分析方法を検討した。

Cysに含まれるチオール基は酸化してジスルフィド結合を形成する。Cysが酸化したジスルフィド二量体はシスチンであるが、このものは水溶性が低いために沈殿しやすく、シスチン尿症の原因となる(Parvex 2003)ことで知られている。シスチンは細胞内でのCysの貯蔵型物質であるため、本研究の目的であるホタル体内のCysの光学純度分析には、貯蔵型であるシスチンもあわせて測定すべきである。

そこでシスチンをよく溶かす1N塩酸で溶出し、更にシスチンをCysに還元する

ために tri-*n*-butylphosphine を加え 100 °C に加熱した。加熱は酵素類を失活させる効果もある (図 2-10 a)。

次に、Cys を ODS カラムを用いて予備的に精製した (図 2-10 b)。これはキラルカラムでの分析時に、ピークをより明瞭にするためである。あらかじめ標品を用いて Cys の溶出時間を測定しておき、それを目安にホタルから抽出した Cys をフラクショニングした。この ODS カラム精製 Cys を、豊岡らの方法 (Toyooka 1988) に従い蛍光標識した (図 2-10 c)。

光学分割を行うためのキラルカラムは、ダイセル化学工業社から市販されている逆相系キラルカラム CHIRALCEL OD-RH、CHIRALCEL OJ-RH、CHIRALPAK AD-RH、CHIRALPAK AS-RH、およびクラウンエーテルカラム CROWNPAK CR(+) を試した。その結果逆相系のカラムではキラルを分離することはできなかった。一方 CROWNPAK CR(+) では良好な分離結果が得られた (図 2-10 d)。

以上の分析方法は操作が煩雑であり、またクラウンエーテルカラムが非常にデリケートであるなどの理由があり、Cys の絶対定量を正確に行うのは困難であった。キラルカラムを用いずに別に行った Cys の定量分析の結果では、ホタル体内の Cys は 1 匹あたり 50~100 nmol であった。これは、最終的なキラルカラムでの検出限界 (約 10 pmol) で十分に測定できる量である。

2.3.4 ヘイケボタル体内のシステインの光学純度

LH₂ を分析した結果から、成虫とサナギが LH₂ を盛んに合成していることがわかった。そこで、成虫とサナギの Cys を分析することにした。予備実験では L-Cys のみが検出され、D-Cys が検出できなかったため、より検出感度を上げるために 4 個体からまとめて Cys を抽出し、分析を行った。その結果のクロマトグラムを図 2-16 に示す。

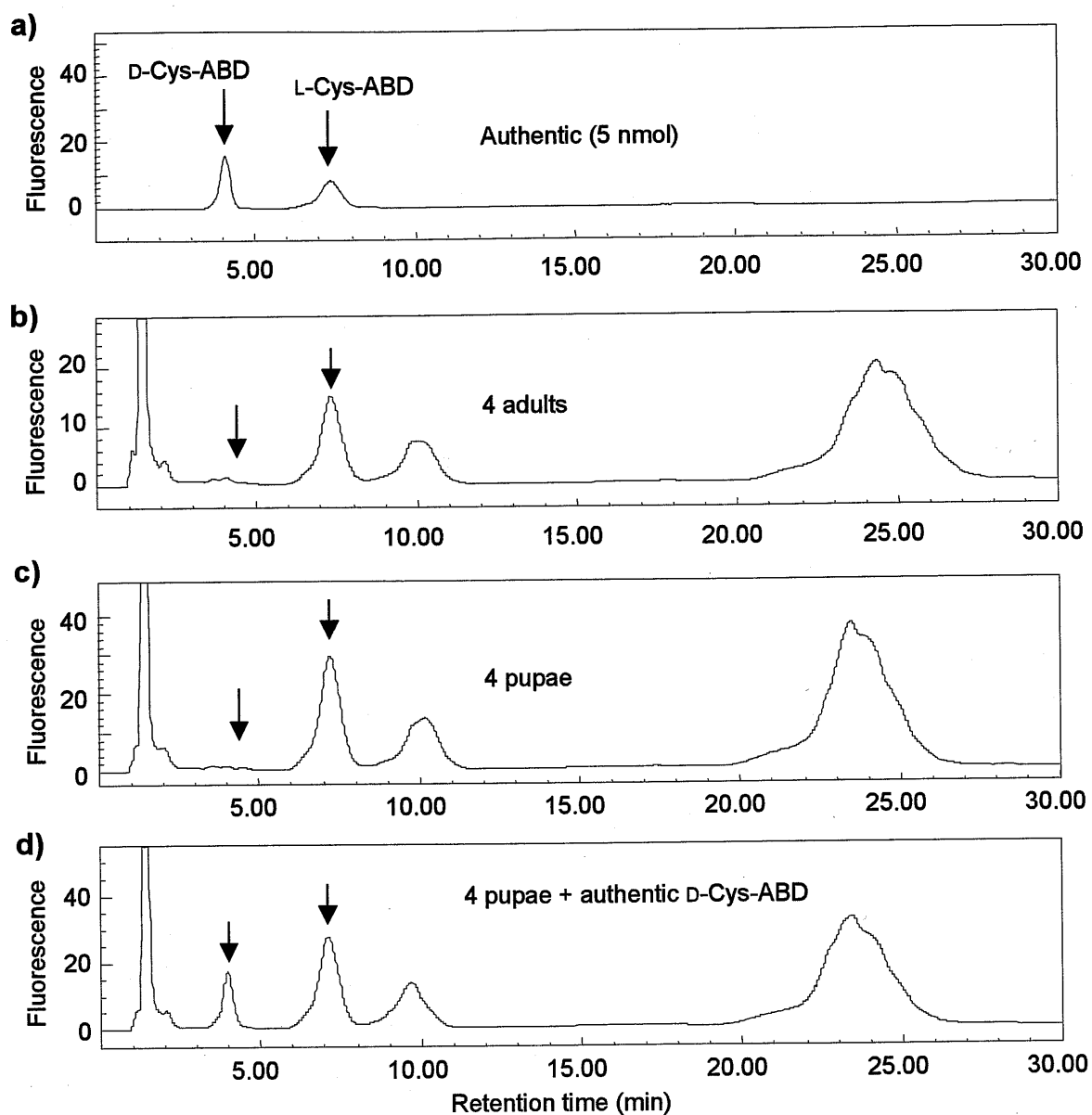


図2-16、ヘイケボタルシステインのキラル分析結果

(a)標品(DL-Cys-ABD)のクロマトグラム。(b)成虫4匹分のCysのクロマトグラム。D-Cys-ABDは痕跡量しか見られない。(c)さなぎ4匹分のCysのクロマトグラム。D-Cys-ABDは痕跡量しか見られない。(d)さなぎ4匹分のCysと標品(D-Cys-ABD)の混合物のクロマトグラム。

成虫 (図 2-16 b) およびサナギ (図 2-16 c) は共に良く似た分析結果であった。どちらも L-Cys-ABD は他のピークから独立して検出され、その量はさなぎが 7.0 nmol、成虫が 13 nmol であった。しかしこれは予想される Cys 量の 1/10 であった。抽出精製及び蛍光標識操作による減少が原因と考えられる。正確な定量分析を行うためにはより高性能のキラルカラム、あるいは LC/MS などを用いた非標識分析法の確立が必要である。

D-Cys-ABD のピークは成虫 (図 2-16 b) およびサナギ (図 2-16 c) のどちらからも、判別することは困難であった。D-Cys-ABD のピークが現れる位置は標品を用いて確認した (図 2-16 d)。その位置にはノイズと区別することが困難なシグナルが認められるが、そのピーク面積は L-Cys-ABD の 1% 未満であった。

以上のように、ホタルの中の Cys は、天然型の L 体が非天然型の D 体に対して少なくとも 99% 以上含まれていることが明らかになった。この結果は、L-LH₂ を中間体とする D-LH₂ 生合成経路を支持するものである。

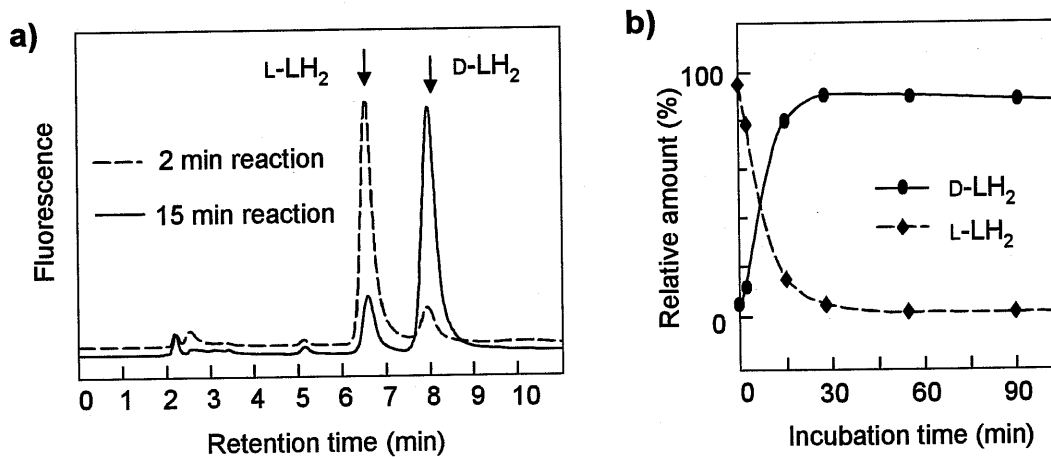
L-Cys は蛋白質を構成するアミノ酸のひとつであり、その光学異性体は生体にとって悪影響があると言われている (Friedman 1984)。実際に D-Cys を分解するシステムを生物は備えている (Soutourina 2001, Riemenschneider 2005)。ホタルが D-LH₂ を体内で合成するために D-Cys を、仮に局所的とはいえ高い比率で用意することはリスクが高いと考えられる。むしろ L-Cys からまず先に L-LH₂ を合成して、これを異性化して D-LH₂ にする方がホタルにとってリスクが低いと言える。

2.3.5 抽出蛋白質によるルシフェリンの合成

前節まででホタル体内に L-LH₂ が存在し、D-Cys がほとんど存在していないことを明らかにした。この結果は D-LH₂ の生合成において L-LH₂ が中間体であるという可能性を示唆している。

本当にL-LH₂が中間体であるならば、ホタル自身が体内でL-LH₂からD-LH₂を合成しているはずである。すなわち、ホタルがL-LH₂のキラリティを変換する異性化酵素(群)を持っているはずである。これを確認するためにホタルから蛋白質を抽出し、L-LH₂キラル異性化活性を確かめる実験を行った。

成虫のLH₂は発光器に局在しており、ここでの光学純度はD体に大きく偏っている(表2-4)。そこで発光器から抽出した蛋白質でL-LH₂キラル異性化活性実験を行った。抽出した蛋白質は透析により低分子を除去し、200 μlのバッファー溶液とした。この粗蛋白質溶液には僅かではあるがD-LH₂が残留していた(20 μlあたり約10 × 10⁻¹⁴ mol)が、大量の標品のL-LH₂を用いる以下の実験に対して影響はなかった。



c)

L-LH ₂ (10 mM)	2 μl
Coenzyme A (100 mM)	2 μl
ATP-Mg (3 mM / 8 mM) in 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]	196 μl
Protein extract form <i>Luciola lateralis</i>	40 μl

(at room temperature)

図2-17、ヘイケボタル抽出蛋白質によるルシフェリンのキラル変換反応
 (a) キラル変換反応開始2分後と15分後のクロマトグラム。L-LH₂がD-LH₂に効率よく変換されている。(b)キラル変換反応におけるLH₂量の経時変化。
 (c) 反応条件。

L-LH₂キラル異性化活性を確認するにあたり、補因子としてATP、Mg、coenzyme A (CoA)を加えた。発光酵素ルシフェラーゼがD-LH₂の発光活性以外にL-LH₂を特異的にCoA化する活性を有していることから(第3章、第4章で詳しく述べる)、この反応に必須のATP、Mg、CoAを加えた。

L-LH₂ (0.1 mM, 2 μl)を出発物質溶液としてCoA (100 mM, 2 μl)とATP-Mg (3 mM/8 mM, 200 μl)の存在下、粗蛋白質溶液 (40 μl)と混合し、室温にて反応させた。反応開始2分後と15分後の溶液をキラルカラムによって比較したところ、L-LH₂がD-LH₂に効率良く異性化されていた(図2-17a)。

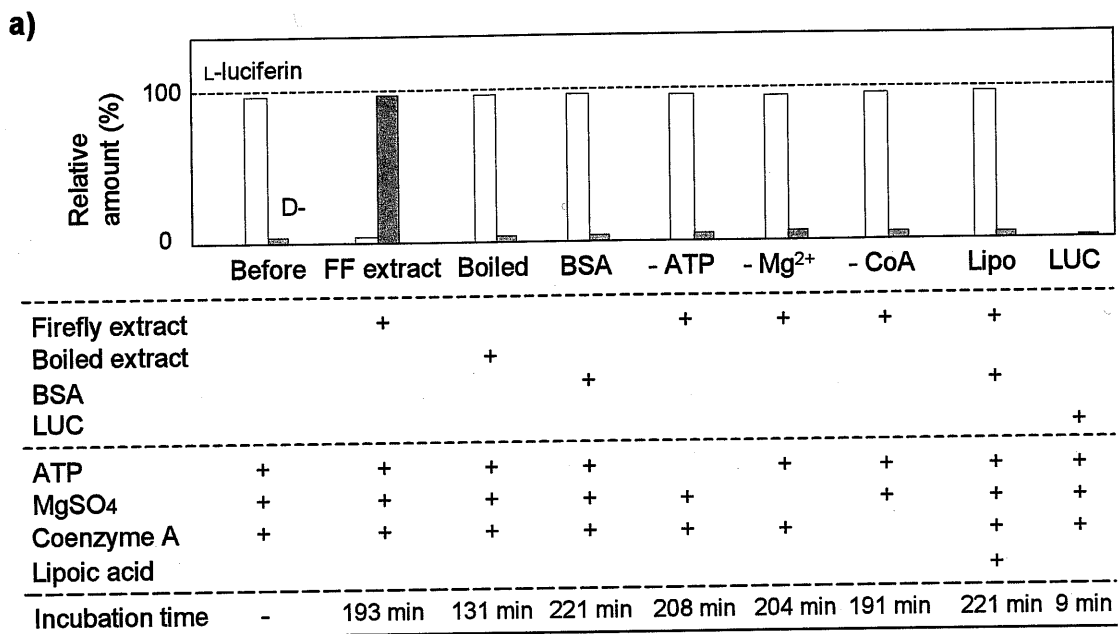
経時変化を調べると反応は30分でほぼ完了していた(図2-17b)。図2-12に示したように、LH₂は溶液中でゆっくりではあるがラセミ化する。しかしこれとは明らかに反応速度が異なる。またL-LH₂キラル異性化反応は光学純度を完全に逆転させるため、ラセミ化とは明らかに異なる。ラセミ化であれば反応生成物はL-LH₂とD-LH₂の等量混合物でなくてはならない。このことは、ホタルが体内でLH₂の立体を能動的にD体に偏らせていることを意味している。

ホタルがL-LH₂キラル異性化活性を有しているということは、L-Cysのキラリティをあえて変換する必要がないということの意味している。このことはホタル体内のCysがほとんどL体であるという結果(2.2.3)と合致する。

次にL-LH₂キラル異性化反応が酵素反応であること、そして補因子としてATP、Mg、CoAを必要とすることを確かめる実験を行った(図2-18)。この実験で基質として用いたL-LH₂溶液(1.0 mM)にははじめから約3%のD-LH₂が含まれていた。

図2-17の実験と同様にヘイケボタルの粗蛋白質抽出物を用いた反応条件(FE extract)では効率の良いL-LH₂のキラル異性化反応が確認できた。これに対し煮沸した抽出物(Boiled)、あるいは抽出物の代わりに牛血清アルブミン(BSA)を用いた反応系ではL-LH₂のキラル異性化は全く起こらなかった。この結果は、L-LH₂キラル異性化反応がホタル内に存在する酵素蛋白質による特異的な反応であることを意

味している。



b)

L-LH ₂ (1.0 mM)	2 μl
Coenzyme A (100 mM)	2 μl
ATP-Mg (3 mM / 8 mM) in 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]	190 μl
Protein extract from <i>Luciola lateralis</i>	40 μl
BSA (1 mg/ml)	2 μl
Recombinant luciferase (<i>Luciola cruciata</i>)	2 μl
Lipoic acid (500 mM)	1 μl

(at room temperature)

図2-18、L-ルシフェリンのキラル異性化反応の特性

(a) 各種条件でのキラル変換活性。グラフは総LH₂量に対するL-LH₂およびD-LH₂の比率(%)を示す。ただしLUCを用いた実験では、大部分のL-LH₂およびD-LH₂が消失するため反応前の総LH₂量に対する比率を示した。(b)反応条件。

次に補因子として加えた ATP、Mg、CoA に関して、それぞれを除いた反応系 (-ATP、-Mg、-CoA) を試したところ、これら 3 つの因子が L-LH₂ キラル異性化反応における必要十分条件であることが確認できた。ここで ATP、Mg²⁺ が必須であるという結果はこの反応に対する LUC の関与を示唆するものである。更に CoA が必須であるという結果は LUC の CoA リガーゼ活性 (第 3 章参照) が関与していることが示唆される。実際に CoA リガーゼとしての LUC の阻害剤であるリポ酸を加えたところ (リポ酸については第 5 章で詳述する)、L-LH₂ キラル異性化が阻害された。以上のことから L-LH₂ キラル異性化反応には発光酵素である LUC が関与しており、中間体として LH₂-CoA を経ていることが示唆された。

LUC はキラル異性化に関与していると考えられるが、これが単独で機能しているのか調べるために、同抽出物の代わりにリコンビナントのゲンジボタルルシフェラーゼ (LUC) を用いたところ、わずか 9 分間で L-LH₂ が完全に消失したが D-LH₂ の増加は全く確認できなかった。この結果は、L-LH₂ キラル異性化活性が LUC のみに依存するものではなく、何らかの酵素による LH₂-CoA のチオエステル加水分解が必要であることを示唆している。

以上の実験はヘイケボタル (*Luciola lateralis*, Lampyridae) を用いたものであるが、ゲンジボタル (*Luciola cruciata*, Lampyridae) および北米産ホタル (*Photinus pyralis*, Lampyridae) に関しても同様に蛋白質抽出物を調製し、L-LH₂ キラル異性化活性を測定した。その結果いずれのホタルからも強い活性が確認できた。これにより L-LH₂ キラル異性化活性がヘイケボタル以外にも存在していることが示された。特に北米産ホタルはゲンジ、ヘイケボタルとは属が異なるため、少なくともホタル科昆虫 (Lampyridae) において普遍的な反応であると考えられる。D-LH₂ を発光基質とする発光甲虫としてはホタル科以外にヒカリコメツキ科 (Elateridae) および鉄道虫科 (Phengodidae) が知られている。これらの科においても L-LH₂ キラル異性化活性が存在するか興味を持たれる。

2.3.6 ルシフェリンの生合成経路

以上の実験結果から、図2-19に示す生合成経路が新たに明らかになった。天然型 L-Cys からまず L-LH₂ ができる。次に、キラル異性化により D-LH₂ が生成する。このとき、CoA および ATP-Mg が必須で、恐らく CoA 化された中間体 L-LH₂-CoA を経て異性化しているものと考えられる。このとき、ルシフェラーゼが CoA 化を触媒していると考えられる（反応機構に関しては第3章で詳述する）。

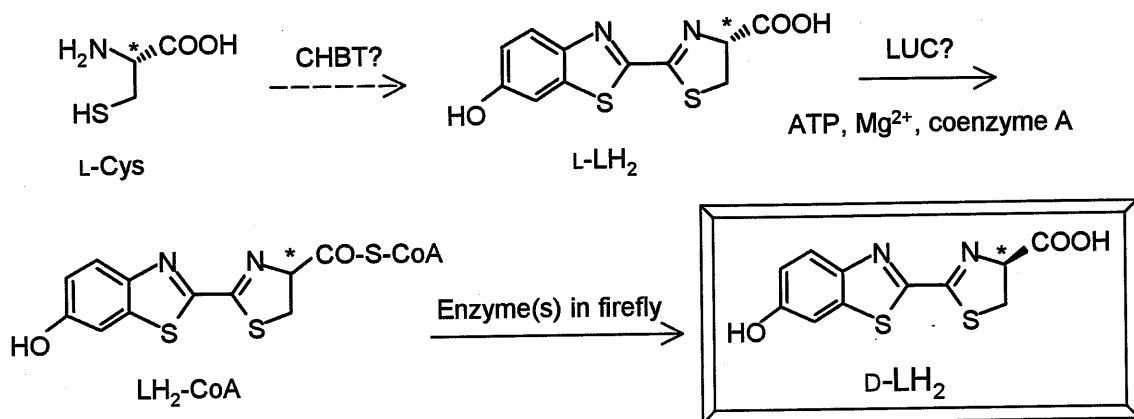


図2-19、想定されるD-ルシフェリンの生合成経路

天然型 L-Cys からまず L-LH₂ ができる。次に、キラル異性化により D-LH₂ が生成する。このとき、CoA および ATP-Mg が必須で、恐らく CoA 化された中間体を経て異性化しているものと考えられる。

この生合成経路で最も重要な点は、その中間体が発光基質 D-LH₂ の光学異性体 L-LH₂ であることである。一般的に天然の生理活性物質はホモキラル（片方の光学異性体だけの状態）である。そのため天然の生理活性物質の光学異性体は、活性が無いか別の活性（多くは生体にとって良くない活性）がある場合がほとんどである（図2-20）。これは生物が多く、非対称な分子で構成されているからである。例えば DNA 二重螺旋は右巻きで、蛋白質は L アミノ酸が重合してできている。

ホタル発光反応においても、同じような立体選択性がある。すなわち、生物発光反応に寄与するのは D-LH₂ のみであり、その光学異性体である L-LH₂ は発光基質とならない。更に、L-LH₂ は発光反応を阻害する。これらについては McElroy、White、

Seliger、McCrapra らのグループがホタル発光基質の化学構造を決定する過程で詳しく研究した (White 1961, Seliger 1961, White 1963)。彼らは、生物発光反応における基質の立体特異性からから、D-LH₂が天然物であると結論付けた。これは天然物が一般にホモキラルであるという常識から来るものであり、当時の学会でも問題無く受け入れられた (後藤 1975)。しかしながら興味深いことに、天然のホタル (*Photinus pyralis*) から抽出、精製した LH₂ (Bitler 1957) の旋光度 ($[\alpha]_D -0.6^\circ$) が、有機合成した D-LH₂ の旋光度 ($[\alpha]_D -29^\circ$) と大きく異なる値であったことを彼ら自身が記載している (White 1963)。彼らはその理由として、天然品が精製の過程でラセミ化した可能性を指摘している。しかしながら、精製過程でどのようなラセミ化促進要因があったのかは議論していない。かれらの研究の後、ホタル体内の LH₂ の光学純度を確かめる研究は報告されていない。

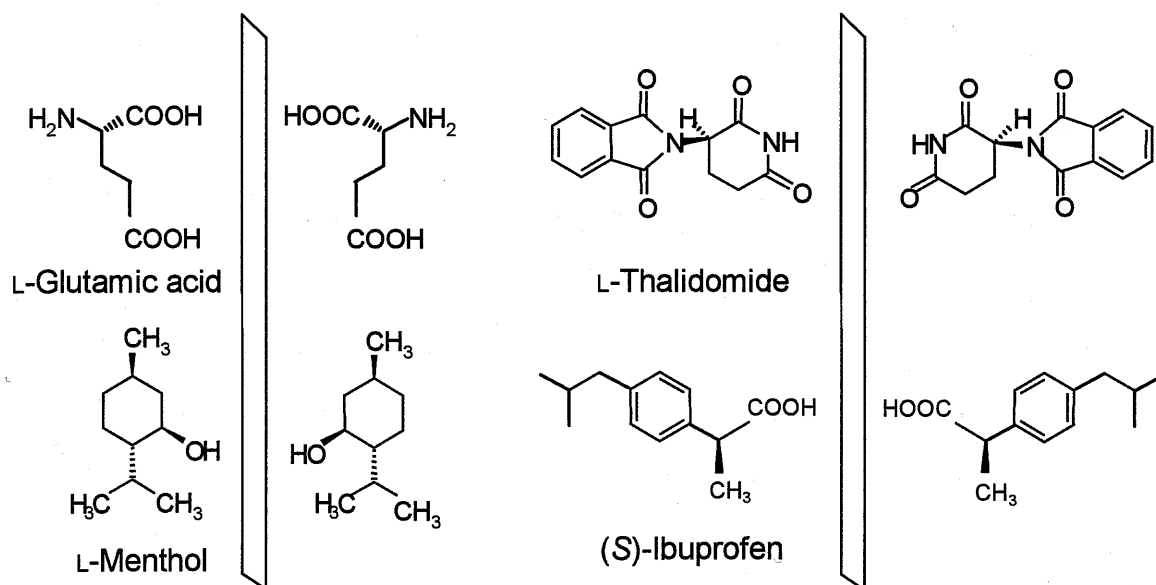


図2-20、天然物の光学異性体

生物は一般に片方の鏡像体分子で構成されている。光学異性体分子は活性が無い、異なる活性を有する。L-アミノ酸の一つであり、旨み成分でもあるL-アスパラギン酸の光学異性体は無味であり、ミントの香気成分であるL-メントールの光学異性体は粉塵臭がする。また人工的な薬物も、立体特異性がある。睡眠薬サリドマイドは、光学異性体による催奇形性が社会問題となった。非ステロイド系抗炎症薬イブプロフェンの薬理作用はCOX阻害であるが、光学異性体はその活性は無い。

本学位論文において、日本のヘイケボタルに L-LH₂ が含まれていることが初めて確かめられた。このことは L-LH₂ が、発光基質の光学異性体であるにもかかわらず、天然物であることを示唆している。しかしながら LH₂ はゆっくりであるがバッファー中でラセミ化する。そのためこれだけでは、L-LH₂ が単なるラセミ化の産物である可能性は否定できず、機能のある天然物であるかどうかは断定しにくい。

しかし今回、ホタルが L-LH₂ を能動的に D-LH₂ に異性化できることが示されたことから、L-LH₂ が D-LH₂ の生合成中間体であり、機能を持った天然物であるという可能性が非常に高くなった。また生合成の出発物質と考えられる Cys の立体が天然型の L 体だけであったことは、これを強く支持している。

このように本章の実験からは、L-LH₂ を中間体とする生合成経路を支持する結果が得られた。しかし、L-LH₂ を通らずに D-LH₂ を直接生合成する可能性を完全に否定することはできない。すなわち Day ら (2004) が提唱するように、酵素に共有結合したままの形で Cys から D 体のチアゾリン環を形成し、最後に D-LH₂ を切り離すという経路を完全に否定することはできない。

しかしながら L-LH₂ をホタルは積極的に異性化して D-LH₂ を効率良く合成できることは生化学的な事実であると言える。しかも L-LH₂ は L-Cys と CHBT から非酵素的に合成できる。そのためホタルが L-LH₂ 以外の経路をあえて保持していることは効率的ではなく、考えにくい。以上のことから、L-LH₂ を中間体とする生合成経路が最も可能性が高いと考えられる。

第3章 ホタルルシフェラーゼの基質立体認識

3.1 研究背景

第2章において、ホタルD-LH₂がL-Cysより生合成されることを示した。この中で、L-LH₂はCoA化されLH₂-CoAとなり、これが生合成中間体になることが示唆された。この中間体が生成する反応メカニズムは、ホタルルシフェラーゼ(LUC)の複雑な機能性に大きく関与していることが考えられる。そこで本章では、LUCの機能について詳述する。

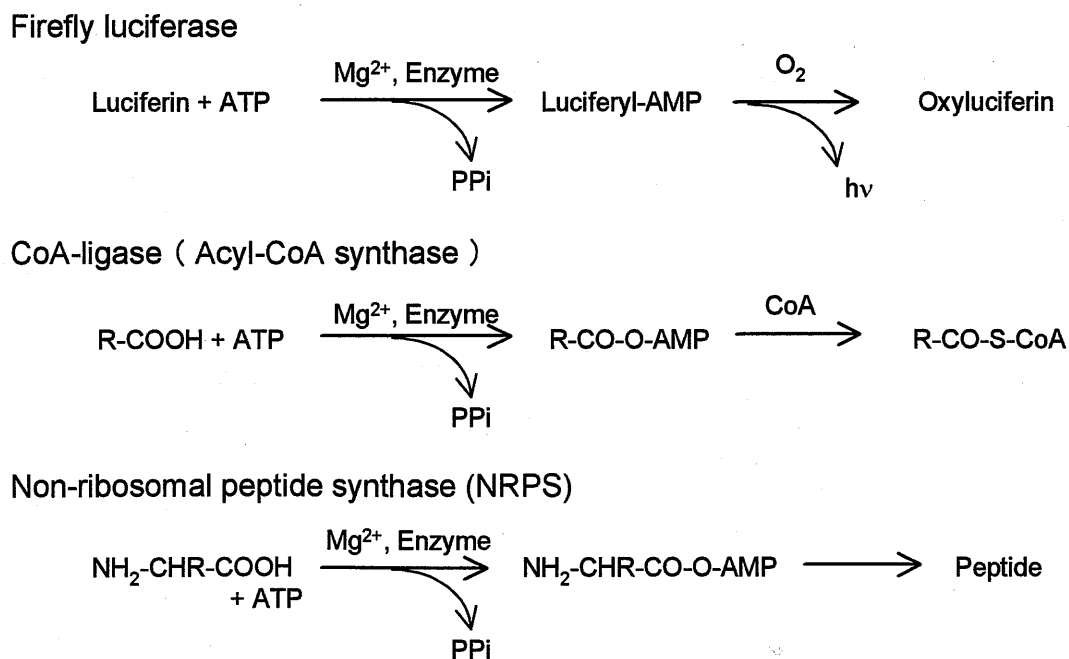


図3-1、発光甲虫ルシフェラーゼと相同性のある酵素蛋白質の反応

表3-1に示した蛋白質の酵素反応性をまとめた。全てMg²⁺を補因子としてATPとカルボキシル基が反応してアデニル化されるという共通の反応機構を有している。アデニル化の後には、それぞれ異なる反応を示すが、上に挙げた3種類に大別できる。

LUCは1985年にcDNAがクローニングされ (de Wet 1985)、1987年にその塩基配列が読まれた (de Wet 1987)。これによりアミノ酸配列が確定したが、この当時はまだ遺伝子情報が十分に蓄積されておらず、LUCはユニークな新規遺伝子であった。2年後にLUCと相同性のある酵素(植物の4-クマル酸-CoA合成酵素)が初めてクローニングされた (Schroder 1989) が、その後LUCに相同性のある酵素遺伝子はしばしば firefly luciferase superfamily gene と呼ばれている (Staswick 2002)。

L-L反応にはATPと Mg^{2+} が補因子として必要である(図1-3)。これは脂肪酸CoAなどのカルボニル-CoA合成酵素 (CoAリガーゼ) やアミノアシルtRNA合成酵素と共通の要素であるため、これらの酵素との関係が古くから指摘されていた (McElroy 1967)。これらの酵素の反応中間体は全てカルボン酸のアデニル体である(図3-1)。そのためLUCをはじめこれらの酵素はアデニル化酵素と呼ばれる。この中でCoAリガーゼはLUCと相同性がある (Schroder 1989)。また同様に、バクテリアが生産する生理活性ペプチドの生合成酵素複合体 (NRPS) 中のアミノ酸活性化ドメインがアデニル化酵素であり、更にLUCと相同性があることが知られている (Schwarzer 2003)。

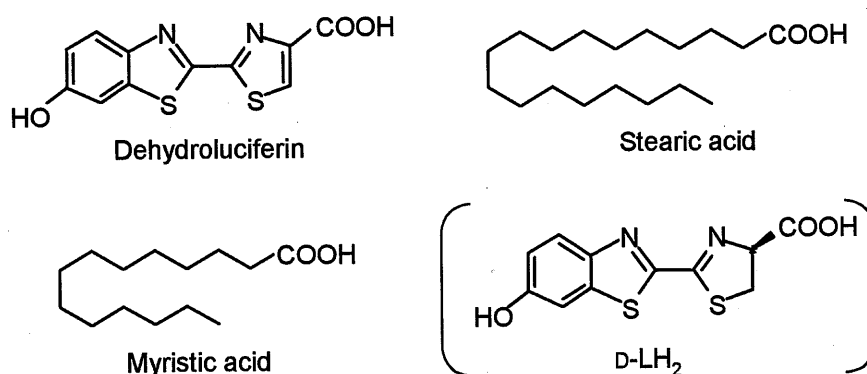


図3-2、ルシフェラーゼによりCoA化される化合物

ATP、 Mg^{2+} 、CoAの存在LUCによりこれらの化合物はカルボキシル基がCoAチオエステルを形成する。他にも長鎖脂肪酸は飽和、不飽和を問わずCoA化される。D-LH₂は反応液を無酸素状態にすることでCoA化されることが報告されている。

LUC はただ単に CoA リガーゼと相同性があるだけではなく、実際に CoA リガーゼ活性がある (図 3-2)。1958 年に LUC がデヒドロルシフェリル-CoA 合成活性を持つことが報告されている (Airth 1958)。近年では、LUC が長鎖脂肪酸 CoA 合成活性を持つことが報告されている (Oba 2003)。さらに通常の L-L 反応条件に CoA を添加し、無酸素条件下で D-LH₂ が D-LH₂-CoA に変換されることが報告された (Fraga 2004)。

CoA に関しては、古くから L-L 反応を増強する作用があることが知られている (DeLuca 1976)。そのメカニズムは、発光反応生成物 (OxyL) による阻害を CoA が解除するからと考えられてきた (後藤 1975)。また近年、LUC の活性部位を塞ぐ拮抗阻害物質 (脂肪酸、デヒドロルシフェリンなど) が CoA リガーゼ活性の基質となり、CoA 化されてはずれるからであるという説明がされている (Sillero 2000)。

以上のことから LUC をアデニル化酵素の一つと考えると、図 3-2 に示した化合物は全て LUC の基質であると言える。同じように D-LH₂ が発光する L-L 反応においても中間体はやはりアデニル化物であるため、D-LH₂ は基質であると言える。興味深いことに光学異性体である L-LH₂ もアデニル化される事が知られている。すなわち L-LH₂ は発光反応の基質にならないため、ATP、Mg²⁺ および LUC の存在下においてもオキシルシフェリンは生成せず発光しないが、ルシフェリル-AMP は生成しており、更にそれを示す証拠としてピロリン酸が生成することが実験的に確かめられている (Seliger 1961)。

以上のことは L-LH₂ もデヒドロルシフェリンのようにアデニル化酵素としての LUC の基質になる可能性を示唆している。しかしながら最終的な反応生成物についての情報は得られていない。

本章ではまず、アミノ酸配列によるホモロジー解析を行い、LUC とその近縁酵素との相関から LUC の進化的背景や CoA リガーゼとしての機能性について考察した。

更に、CoA 存在下における L-LH₂ の LUC による酵素反応特性を解析し、これが D-LH₂ 生合成に関与する仕組みを解析した。

3.2 実験方法

3.2.1 系統解析

NCBI の遺伝子データベース (GenBank) より、LUC と相同性のある蛋白質のアミノ酸配列情報を BLAST 検索により蒐集した (表 3-1)。これを ClustalW によりデフォルトのパラメーター設定でアライメントした。続いて系統解析ソフト MEGA2 を用いて近隣接合法により系統樹を作成した。この時ディスタンスマトリクスは Tamura-Nei モデルを用い、ギャップ配列は排除した。ブートストラップ値は 1000 回繰り返しにより計算した。

表3-1、ホタルルシフェラーゼの相同性蛋白質

NCBIに登録されている発光甲虫ルシフェラーゼとその相同性蛋白質のアミノ酸配列。代表的なものをNCBIのGenBankからくまなく蒐集した(2003年9月)。

#	SOURCE ORGANISM	DESCRIPTION	ACCESSION	PubMed
0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PlantHormoneAdenylationEnz.	NP_850453	
1	<i>Brevibacillus brevis</i>	Gramicidin S syn. 1	BAA06146	7822255
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lichenysin syn. B	AAD04758	9864322
3	<i>Brevibacillus brevis</i>	Gramicidin S syn. 2	1AMUB	7534306
4	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacitracin syn. 1	AAC06346	
5	<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactin syn.	BAA02522	8441623
6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	polyketide or peptide syn. Hypothetical	AAK18894	9851916
7	<i>Mus musculus</i>	dehydrogenase homolog	BAE43303	10349636
8	<i>Drosophila melanogaster</i>	ebony gene	CAA11962	
9	<i>Homo sapiens</i>	ACS isoform	NP_644803	12477932
10	<i>Mus musculus</i>	ACS	AAF24510	
11	<i>Drosophila melanogaster</i>	ACS	CAA86733	
12	<i>Brucella melitensis</i>	ACS	AAL51420	11756688
13	<i>Solanum tuberosum (potato)</i>	ACS	CAA67130	
14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACS	AAB92552	
15	<i>Leptospira interrogans</i>	ACS	NP_714434	12712204
16	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	ACS	NP_442428	8905231
17	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	ACS	AAO78860	12663928
18	<i>Homo sapiens</i>	BtCS	NP_443188	15361761
19	<i>Bos taurus (cow)</i>	BtCS	NP_777107	11382754
20	<i>Mus musculus</i>	BtCS	NP_473435	16141073
21	<i>Escherichia coli</i>	entE gene	1610172A	
22	<i>Brucella melitensis</i>	2,3-DIHYDROXYBENZOATE-AMP LIGASE	AAL53319	11756688
23	<i>Bacillus subtilis</i>	DhbE, aryl acid activation	1MDFA	12221282
24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyochelin syn.	AAG07616	10984043
25	<i>Mycobacterium bovis</i>	Salicyl-AMP Ligase	NP_856054	12788972
26	<i>Vibrio vulnificus</i>	Peptide arylation enz.	NP_762773	14500463
27	<i>Streptomyces ansochromogenes</i>	adenylate-forming enz.	AAL85694	
28	<i>Escherichia coli</i>	EntA protein	BAA20915	
29	<i>Bacillus halodurans</i>	FACS	BAB05725	
30	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	FASS	NP_693138	12235376

(表3-1、つづき)

31	<i>Bacillus halodurans</i>	FACS	BAB04850	10086841
32	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	FACS	AAB85162	9371463
33	<i>Drosophila melanogaster</i>	Hypothetical gene chromosome 2L	AAF52246	
34	<i>Mesorhizobium loti</i>	FACS	NP_107337	11214968
35	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Hypothetical FACS	AAD14712	
36	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Hypothetical gene chromosome V	NP_503845	
37	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	FACS	NP_767149	12597275
38	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FACS	BAB02683	10819329
39	<i>Homo sapiens</i>	FACS	NP_001986	15292367
40	<i>Cavia porcellus (domestic guinea pig)</i>	FACS	AAF91295	
41	<i>Mus musculus</i>	FACS	P41216	16141072
42	<i>Rattus norvegicus</i>	FACS	NP_036952	15051725
43	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FACS	ZP_00136654	
44	<i>Vanilla planifolia (vanilla)</i>	4CCL	O24540	
45	<i>Solanum tuberosum (potato)</i>	4CCL2	B39827	2022667
46	<i>Solanum tuberosum (potato)</i>	4CCL1	P31684	2022667
47	<i>Nicotiana tabacum</i>	4CCL1	O24145	8819324
48	<i>Nicotiana tabacum</i>	4CCL2	O24146	8819324
49	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4CCL2	Q9S725	10417722
50	<i>Pinus taeda (loblolly pine)</i>	4CCL	AAB42383	9008388
51	<i>Glycine max (soybean)</i>	4CCL isoform 4	CAC36095	
52	<i>Oryza sativa</i>	4CCL isoform 2	AAA69580	
53	<i>Oryza sativa (japonica cultivar-group)</i>	4CCL	CAA36850	2235510
54	<i>Arabidopsis thaliana</i>	putative 4CCL	BAC42032	
55	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4CCL	NP_173473	
56	<i>Anopheles gambiae str. PEST</i>	Hypothetical gene chromosome 2R	EAA11995	
57	<i>Drosophila melanogaster</i>	Hypothetical FACS chromosome 3R	AAF56245	
58	<i>Phrixothrix vivianii</i>	Luciferase	AAD34542	10387072
59	<i>Phrixothrix hirtus</i>	Luciferase	AAD34543	10387072
60	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	Luciferase	AAQ11734	14623957
61	<i>Photuris pennsylvanica</i>	Luciferase	Q27757	9165098
62	<i>Hotaria tsushimana</i>	Luciferase	AAN40979	
63	<i>Hotaria papariensis</i>	Luciferase	AAN40978	
64	<i>Hotaria parvula</i>	Luciferase	AAC37253	
65	<i>Luciola lateralis</i>	Luciferase	CAA93444	
66	<i>Luciola cruciata</i>	Luciferase	P13129	
67	<i>Photuris pennsylvanica</i>	Luciferase	BAA05006	
68	<i>Photuris pennsylvanica</i>	Luciferase	BAA05005	
69	<i>Photinus pyralis</i>	Luciferase	CAA59281	
70	<i>Pyrocoelia noctiluca</i>	Luciferase	CAA61668	
71	<i>Pyrocoelia miyako</i>	Luciferase	AAC37254	7480137
72	<i>Pyrocoelia lufa</i>	Luciferase	AAG45439	11604168

3.2.2 ルシフェラーゼ酵素反応解析

D-LH₂、L-LH₂の調製方法、分析方法は第2章(2.2.2及び2.2.3)に従った。

反応に使用する酵素はシグマ社の北米産ホタル(*Photinus pyralis*)天然抽出、HPLC精製、再結晶グレードルシフェラーゼを用いた。ATPは東京化成、その他の試薬(MgSO₄、CoA、Tris、HCl、KCl、HEPES、KOH)は和光純薬製のものを用いた。ATP、Mg、およびCoAはHEPESバッファー(50 mM HEPES-KOH[pH 7.6] / 20 mM KCl)に溶かして使用した。酵素は10%グリセロール含有HEPESバッファーに溶かして1 mg/mlとして-30°C保存したものを、用時希釈して使用した。反応は全て室温で行った。

酵素反応生成物のマススペクトルはVayager Elite MALDI-TOF-MS(PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, US)にて337 nm pulsed nitrogen laserにて測定した。マトリクスは10 mg/mlの α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(Aldrich Chemical, Milwaukee, WI)を50% acetonitrile, 0.1% TFAに溶かして使用した。

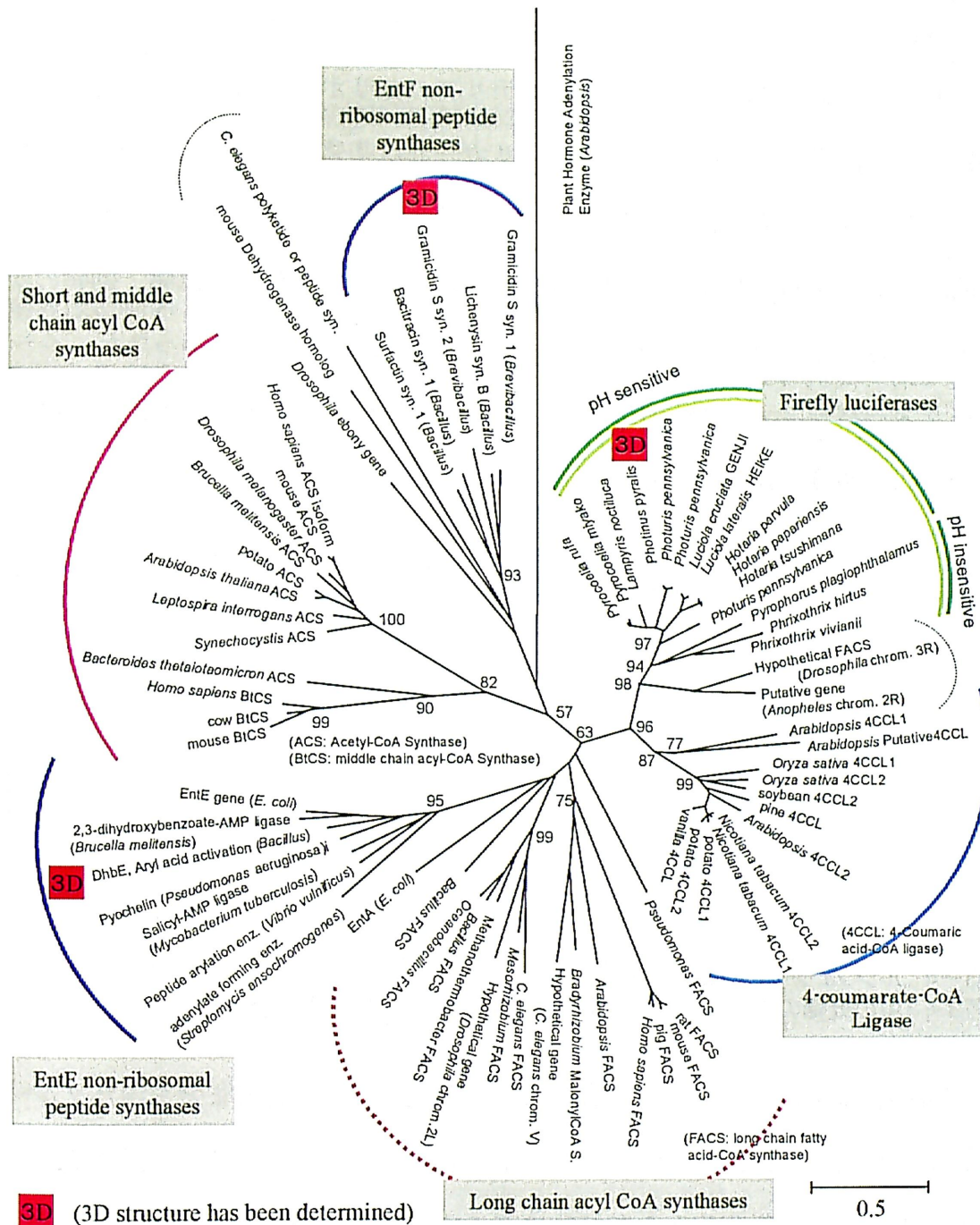


図3-3、発光甲虫ルシフェラーゼとその同源性蛋白質の系統解析
 表3-1に示した蛋白質のアミノ酸配列をもとに、Tamura-Neiモデルによる距離行列から近隣接合法により系統樹を作成した。ブートストラップ値は1000回繰り返し計算により50%以上のものを各分岐に示した。機能的に近い酵素群が種を超えて、それぞれまとまった系群を形成している。

3.3 結果及び考察

3.3.1 ルシフェラーゼの進化的背景

図3-3に各種ホタルのLUCを含む種々のアデニル化酵素の系統樹を示す。相同蛋白質としてはアシル-CoA リガーゼとバクテリアの非リボゾームペプチド合成酵素 (NRPS) などの情報を集めた。アシル-CoA リガーゼは基質となる脂肪酸の分子量によって、アセチル-CoA 合成酵素 (ACS)、中鎖脂肪酸アシル-CoA 合成酵素 (BtCS)、長鎖脂肪酸アシル-CoA 合成酵素が知られており、これらを微生物、植物、動物の代表的な生物から広く集めた。その他、ブラスト検索では検出できなかったが、ルシフェラーゼスーパーファミリー遺伝子として報告された植物ホルモンアデニル化酵素 (Staswick 2002) も解析に加えた。

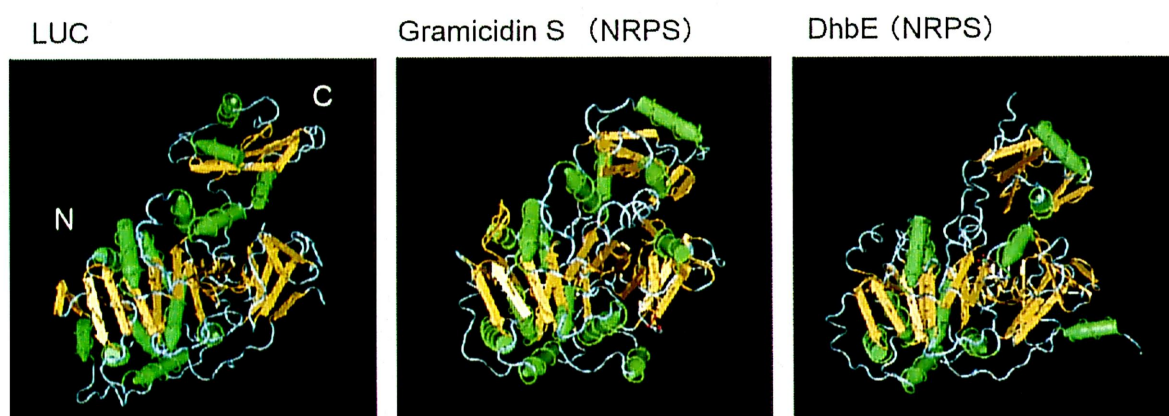


図3-4、ルシフェラーゼとNRPSの解析

図3-3中の既報のX線結晶構造解析結果。互いに似ていることがわかる。

系統解析の結果では、同じ機能を有する酵素が生物種を超えてまとまったグループを形成していた。例えば、アセチル-CoA 合成酵素は他の酵素群から独立したグループを形成しており、微生物から動植物に至るまで広い生物種のアセチル-CoA 合成酵素から成っていた。これは機能遺伝子が独自の変異を受けにくいという分子進化の中立説に沿った結果と言える。

図3-4にこれまでに報告されたアデニル化酵素の立体構造を示す (Conti 1996a, Conti 1996b, May 2002)。いずれの酵素も大きなN末端側ドメインと小さなC末端

側ドメインから成り、良く似た立体構造を取ることが分かる。これらの蛋白質のアミノ酸レベルでの相同性は、例えば LUC と EntE の間で 23.3%であり、一般的に機能が保存されるために必要と言われる 30%よりも低い。このことからアデニル化酵素群が互いのアミノ酸配列の相同性以上に、その機能が保存されていることが示唆される。

各種ホタルの LUC も一つのまとまったグループを形成している。これに最も近い酵素は植物の 4-クマル酸-CoA リガーゼ (4 CCL) である。D-LH₂ もクマル酸も芳香環を有しており、これらを基質とする酵素が近い関係にあることは興味深い。また、機能未知ではあるがルシフェラーゼと相同性のある蛋白質がホタルと同じ昆虫であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) やハマダラカ (*Anopheles gambiae*) から見ついている。これらは他の生物のどの酵素よりもホタル LUC の近くに位置している。近年、ショウジョウバエのこの遺伝子産物に関して機能解析が行われ、発光活性が無いかわりに長鎖脂肪酸 CoA-リガーゼ活性があることが報告された (Oba 2005)。この遺伝子は発光甲虫ルシフェラーゼの進化的起源を知る上で重要な手掛かりになることが期待されている。

図 3-3 の系統樹の中で、LUC によって形成される枝には他の生物に由来する蛋白質遺伝子は含まれていない。同様に 4-クマル酸-CoA リガーゼの枝は植物以外の生物は含まれていない。実際に GenBank データベース内で、図 3-3 の LUC あるいは 4-クマル酸-CoA リガーゼの枝に入る酵素は昆虫、植物以外からは見つからなかった。このことはこの二つの酵素群がそれぞれ昆虫、植物だけで進化した特異的な酵素であることを意味している。

アデニル化酵素の中で、各種アシル-CoA リガーゼが系統樹の中心近くから広がっている事がわかる。これに対し NRPS あるいは LUC は比較的まとまったグループを形成している。この結果からアデニル化酵素の起源酵素がアシル-CoA リガーゼであったと解釈できる。

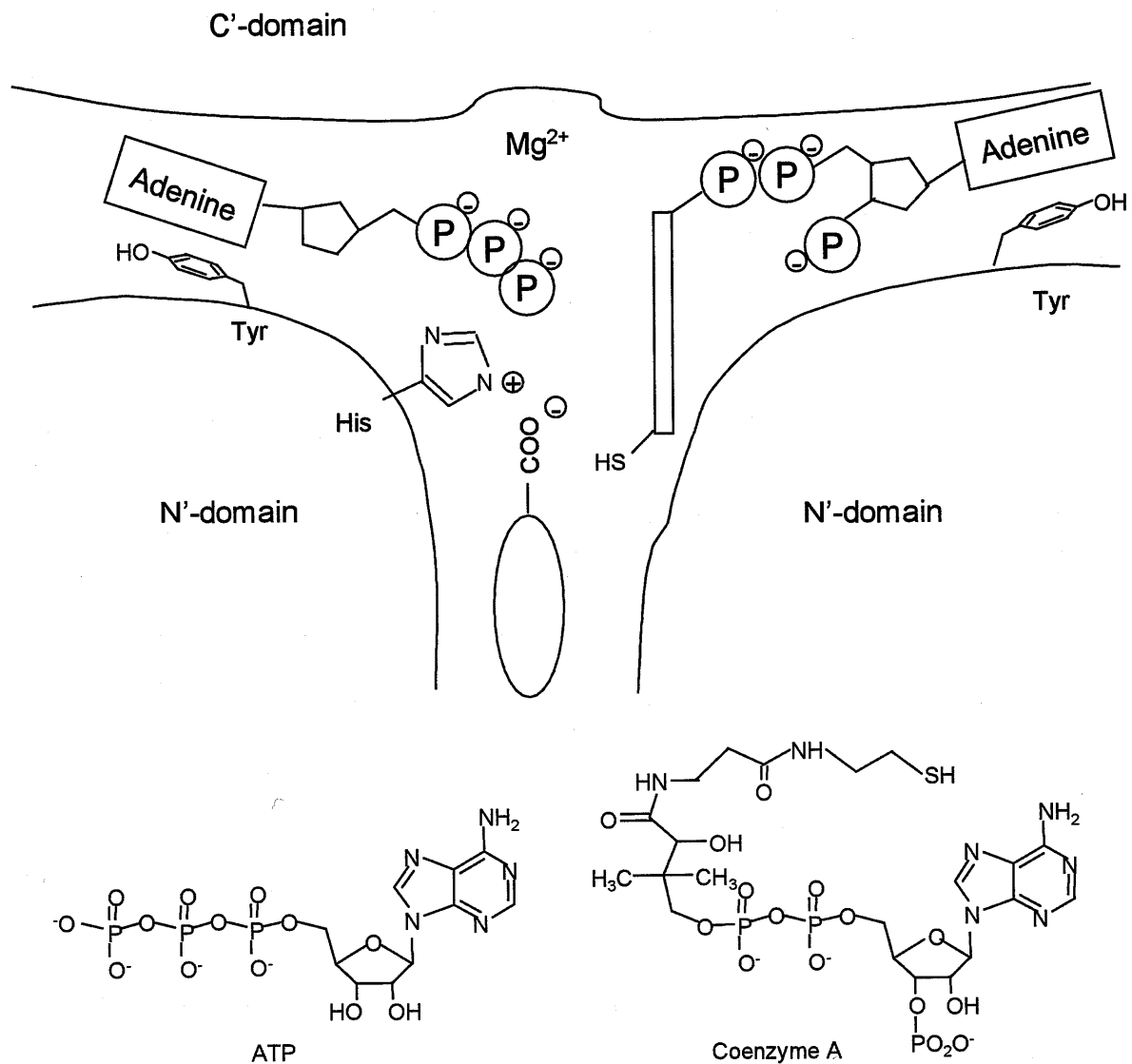


図3-5、ルシフェラーゼの活性中心の模式図

N'ドメイン中央部の疎水的な穴に LH_2 や脂肪酸が収まり、His残基の正電荷によりカルボキシル基がC'ドメイン側に向けて固定される。両ドメインの間隙部分にチロシン残基があり、これらがATPあるいはCoAのアデニン部分を認識していると考えられている。固定されたATPのリン酸基、そしてCoAのチオール基が、N'ドメインに固定されたカルボキシル基近くに集まるような配置を取ると考えられている。

図3-5にCoAリガーゼの活性中心の模式図を示す。N'ドメインの疎水的な穴に脂肪酸あるいはLH₂が収まる。N'ドメインのヒスチジン残基の正電荷の作用でカルボキシル基はC'ドメイン側を向いて固定される。更にATPとCoAがN'ドメインとC'ドメインの間隙に固定される。このときATPとCoAのアデニン部分をチロシン残基が認識していると考えられている(Steghens 1998, Branchini 1998)。反応するATPのリン酸基およびCoAのチオール基が中央に向けて互いに近づき、反応が起こると考えられる。ATPとCoAは互いにアデノシン構造を有している。SilleroらはLUCによってAPTとAMPがリン酸結合を介して二量化した化合物(AppppA)が合成されることを報告しているが(Sillero 2000)、これはCoAが結合する場所にATPあるいはAMPが結合することで起こる副反応であると考えられる。

アシル-CoAリガーゼは脂質代謝に関与する酵素であり、細胞のエネルギー代謝に重要な役割を担っている。実際に微生物も動植物もこの酵素群を持っている。これに対しNRPSは微生物の生理活性ペプチドという二次代謝産物の生合成酵素であり、全ての生物の生命活動の根源に関わる酵素とは言えない。同様にLUCや4-クマル酸-CoAリガーゼも全ての生物に必須の酵素ではない。またLUCにCoAリガーゼ活性があることは3.1でも述べたとおりである。

以上のことから、LUCを含むアデニル化酵素の共通の進化的起源は何らかのCoAリガーゼであったと考えられる。

3.3.2 D体およびL体ルシフェリンの反応特性

L-LH₂がATPとMg²⁺、およびCoAの存在下、どのような反応生成物が生じるかをMALDI-TOF-MSで解析した(図3-6)。L-LH₂を基質した場合(図3-6a)、未反応のCoA([M-H]⁻=766.12)とL-LH₂-CoA([M-H]⁻=1028.10)に由来すると思われる強いシグナルが認められた。このことから、L-LH₂はCoAリガーゼとしてのLUCの基質

になることが示された。

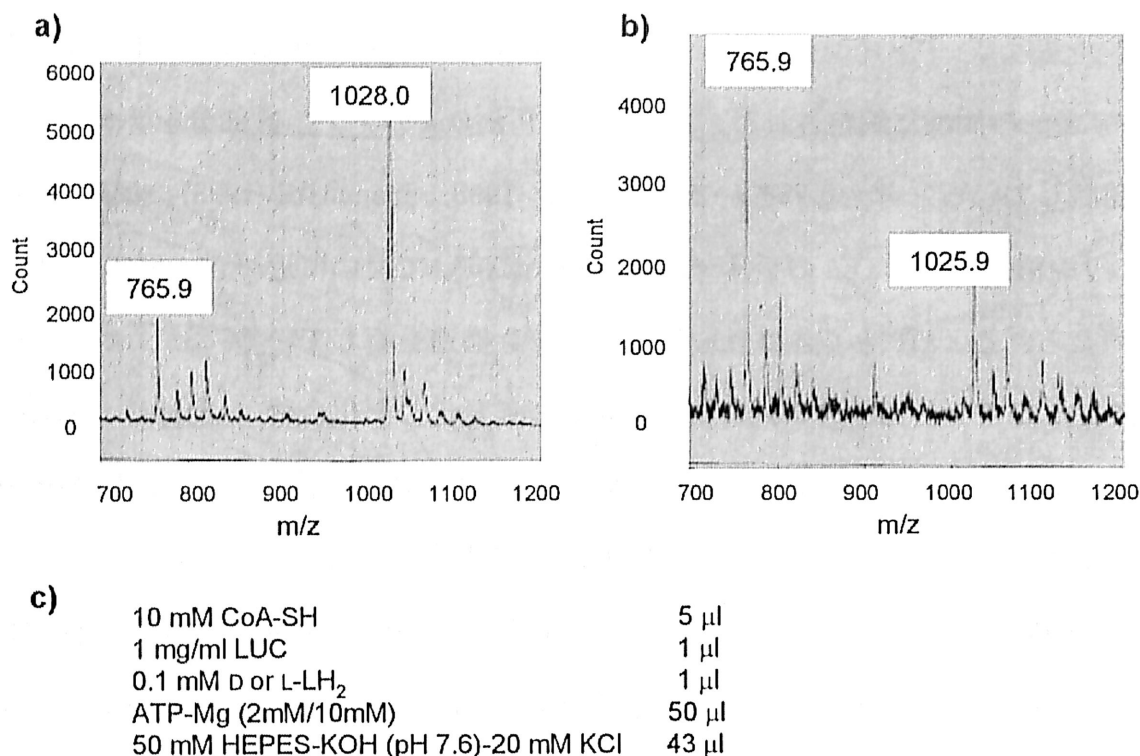


図3-6、L-ルシフェリンのCoA化反応

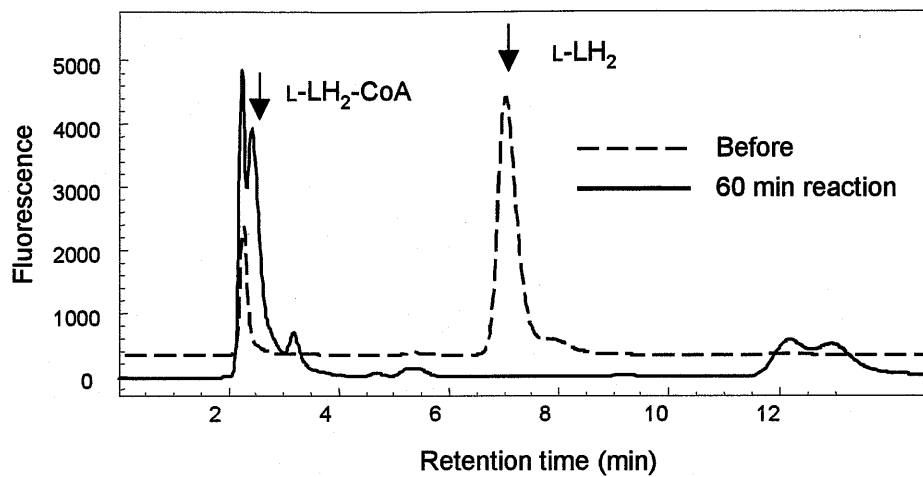
(a) L-LH₂をLUCの存在下、ATP、Mg²⁺、CoAと反応させ、MALDI-TOF-MSで解析した。未反応のCoA ([M-H]⁻=766.12)とL-LH₂-CoA ([M-H]⁻=1028.10)のピークが認められる。(b) 同様にD-LH₂を反応させ、MALDI-TOF-MSで解析した。未反応のCoA ([M-H]⁻=766.12)とDehydroluciferyl-CoA ([M-H]⁻=1026.09)のピークが認められる。しかしシグナルは弱い。(c) 反応条件。

これに対してD-LH₂を基質とした場合(図3-6 b)、未反応のCoA ([M-H]⁻=766.12)とデヒドロルシフェリル-CoA ([M-H]⁻=1026.09)のピークが認められた。デヒドロルシフェリル-CoAのピークは極めて弱く、主生成物とは言いにくい。このものが生成した反応機構は明らかではないが、デヒドロルシフェリンが発光反応の副生成物であることが知られていることから、発光反応の副生成物として生じたデヒドロルシフェリンがCoA化の基質になって生じた可能性が考えられる。

図3-7はCoA化の反応条件におけるD-LH₂及びL-LH₂の量をHPLCで追跡したもの

である。L-LH₂が2分で初濃度の半分にまで減っているのに対し、D-LH₂の量はほとんど変化しない。このことから、L-LH₂がCoA化する反応速度が非常に速く、D-LH₂が発光する反応速度が非常に遅いと言える。また図3-6bで検出されたデヒドロCoAは主生成物ではなく、微量な副生成物であると考えられる。

a)



b)

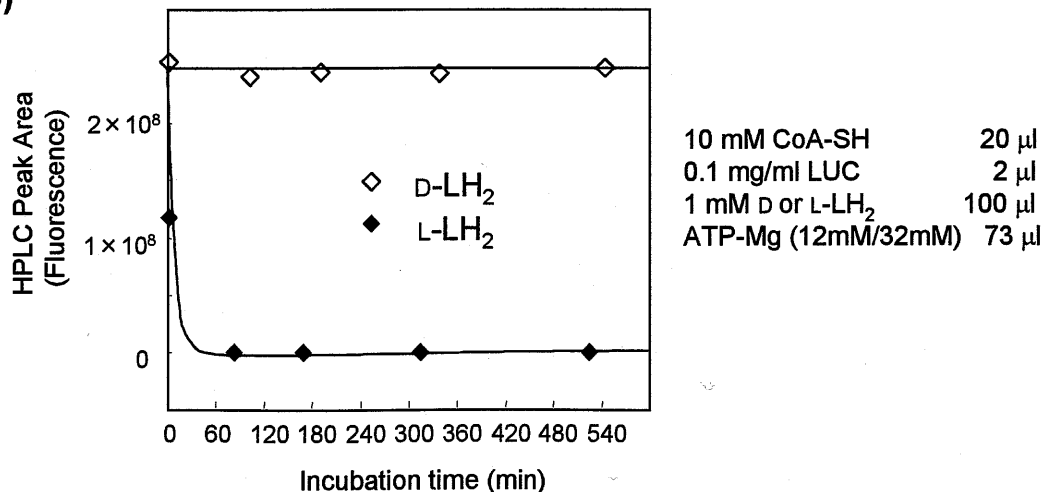


図3-7、CoA化反応におけるルシフェリン量の変化

a) L-LH₂のCoA化反応前後のクロマトグラム。0.1 mMの基質をLUC存在下、ATP、Mg²⁺、CoAと反応させたときの基質量変化をHPLCで分析した。b) D-LH₂とL-LH₂量の経時変化。L-LH₂は急速に減っているのに対し、D-LH₂はほとんど変化が無いことがわかる。L-LH₂のCoA化の反応速度が極めて速いことを意味している。

表3-2に基質量の半減期が約2分になるときの反応液組成を示す。両者は反応に関与する基質数や反応機構が異なるため、反応速度の直接的な比較はできないが、同じ半減期となる反応条件にするためには、D-LH₂の初濃度をL-LH₂より10⁵倍希釈し、酵素濃度もL-LH₂の場合の25倍濃い条件にする必要がある。トータルで約2.5×10⁶倍、L-LH₂のCoA化反応の方がD-LH₂の発光反応より速い。

図3-8にD-LH₂とL-LH₂の反応特性の違いをまとめる。極めて構造が良く似たデヒドロルシフェリンの反応特性についても参考のために示した。D-LH₂はCoAと反応せず、その代わり4'位のプロトンが脱離してアニオン化し、酸素分子と反応して発光する(図1-3参照)。これに対しL-LH₂は発光反応の基質にはならずCoA化される。D-LH₂の発光反応では4'位がアニオン化するときに不斉は消失する。このことはL-LH₂の4'位のプロトンが脱離していないことを示唆している。デヒドロルシフェリンは4'位にプロトンを持たないためCoA化しかありえないが、L-LH₂が脱プロトン化しないことは興味深い。恐らくLUCがそれぞれの光学異性体を厳密に認識して脱プロトン化とCoA化に反応を振り分けているのであろう。

表3-2、D-およびL-ルシフェリンの反応速度の違い

D-LH₂の発光反応とL-LH₂のCoA化反応における基質の半減期(τ)、基質の初濃度、LUC濃度を示す。(0.1 M Tris-HCl pH8.0, 8 mM MgSO₄, 3 mM ATP)

	D-LH ₂	L-LH ₂	Ratio
τ (min)	2	2	1
LH ₂ (M)	5 × 10 ⁻⁹	5 × 10 ⁻⁴	10 ⁵
LUC (mg/ml)	5 × 10 ⁻²	2 × 10 ⁻³	25
		Total	2.5 × 10 ⁶

これまでに、D-LH₂が無酸素状態でCoA化されてD-LH₂-CoAが生成すること (Fraga 2004)、またL-LH₂がCoAの無い条件下で発光すること (Lembert 1996) が報告されている。しかしこれらの報告での反応速度は非常に遅いため、酵素反応による生成物ではなく、ラセミ化の結果として生じた分子が反応している可能性がある。実際、in vitroでの発光反応溶液のpHは7.6~8.0であり、この条件では僅かではあるがラセミ化が進行する (図2-12)。

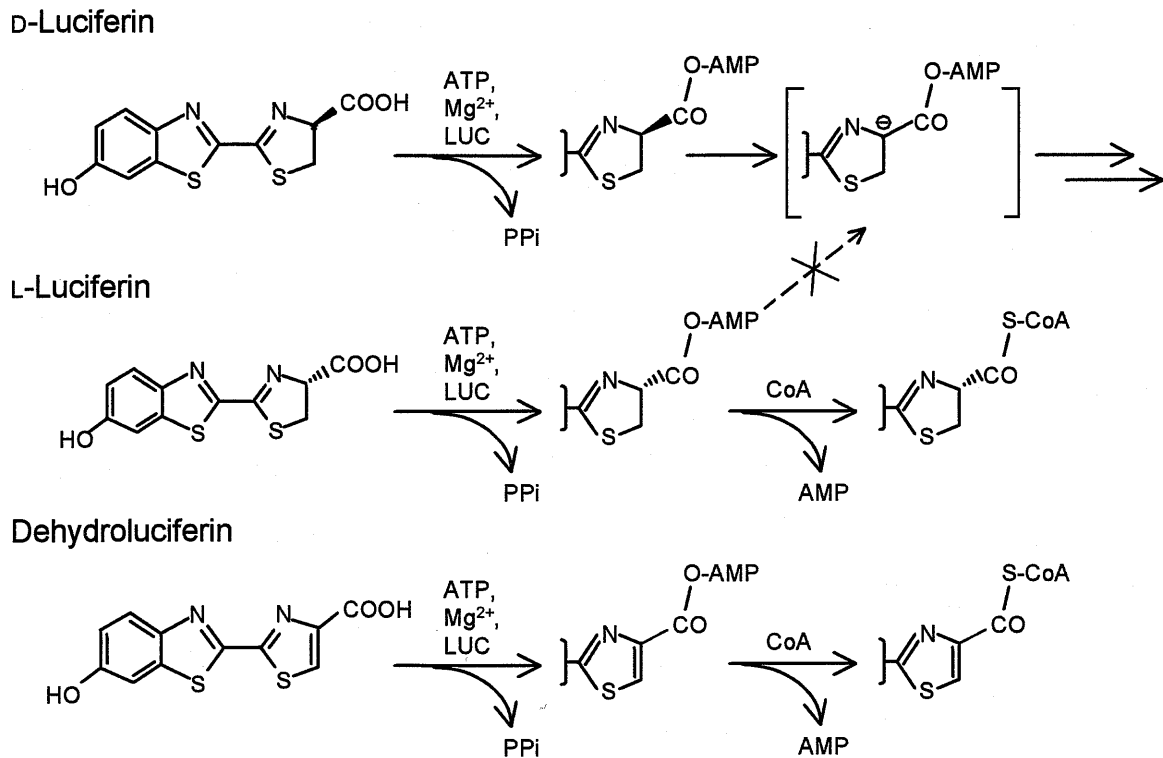


図3-8、ルシフェラーゼの基質特性

D-LH₂、L-LH₂、Dehydroluciferinの反応性の比較。ATP、Mg²⁺、CoAの存在下ルシフェラーゼにより、いずれの化合物もアデニル化される。その後D-LH₂以外はCoA化される。これに対しD-LH₂はCoA化されずに酸化してジオキセタン中間体を経てオキシルシフェリンとなる。

天然の酵素が基質分子の光学異性体を識別することは一般的なことである。しかし、酵素が2種類以上の異なる化学反応を触媒することができて、更にその異なる反応の基質が光学異性体同士であるということは珍しい現象であり、非常に興味深い。二つの光学異性体の両方を認識する酵素としては、アミノ酸のラセマーゼなどが知られている (Fujii 2002)。しかしながらラセマーゼの場合は光学異性体の両方を同じ反応機構で異性化する。これに対しホタル LUC の場合は、アデニル化までは同じであるが、その後は全く異なる反応にそれぞれの光学異性体を供する。

3.3.1 で述べたように、LUC の起源は CoA リガーゼと考えられる。また、L-LH₂-CoA リガーゼ活性の反応速度が発光反応速度よりも明らかに速い。これらのことから、本章で明らかにした LUC の L-LH₂-CoA リガーゼ活性はむしろ LUC の持つ本来の機能である可能性が考えられる。また LUC は脂肪酸アシル-CoA リガーゼ活性を持つことも知られている (Oba 2003)。D-LH₂ は CoA 化の基質とならないため、酵素のアクティブサイトを塞いで L-LH₂-CoA リガーゼ反応を阻害した (IC₅₀=135 μM)。このことから、本来であれば D-LH₂ は除去されるべき不要物ではないかと想像される。ホタル発光反応の起源は、まだ CoA リガーゼであった LUC が D-LH₂ に CoA リガーゼ活性を阻害され、これを除去するために行った酸化反応なのかも知れない。これは今後の研究課題である。

第4章 ホタルルシフェリンの酵素的立体異性化反応

4.1 研究背景

第2章においての D-LH₂ の生合成経路として L-LH₂ が D-LH₂ に異性化されることを示し、また CoA が必須要素であることを示した。更に第3章において LUC が L-LH₂ を効率的に CoA 化し、LH₂-CoA に変換することを示した。以上のことから考えら得る D-LH₂ 生合成経路を図4-1に示す。ここで L-LH₂ の CoA 化は第3章の結果から LUC が担っていると考えられる。

LUC による CoA-リガーゼ反応で生じた L-LH₂-CoA は自動的にラセミ化し、D-LH₂-CoA との混合物になる。ここで D-LH₂-CoA のチオエステルを加水分解することで最終目的物である D-LH₂ が得られる。

生物は一般的に脂質の代謝・生合成に必要な酵素として Acetyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.1)、Succinyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.3)、Acyl-CoA hydrolase (EC 3.1.2.20) など多くの CoA チオエステル加水分解酵素 (EC 3.1.2) を有している。ホタル体内においてもこれらの酵素に関係する何らかの酵素が D-LH₂ 生合成に関与しているものと思われる。

そこで本章では、基質選択性が低いエステル加水分解酵素として有機合成化学において広く用いられている豚肝臓エステラーゼ (PLE) を用いて D-LH₂ 合成を再現できるか検証した。L-LH₂ を D-LH₂ に異性化する生合成反応について検証した。またその応用の可能性を確かめた。

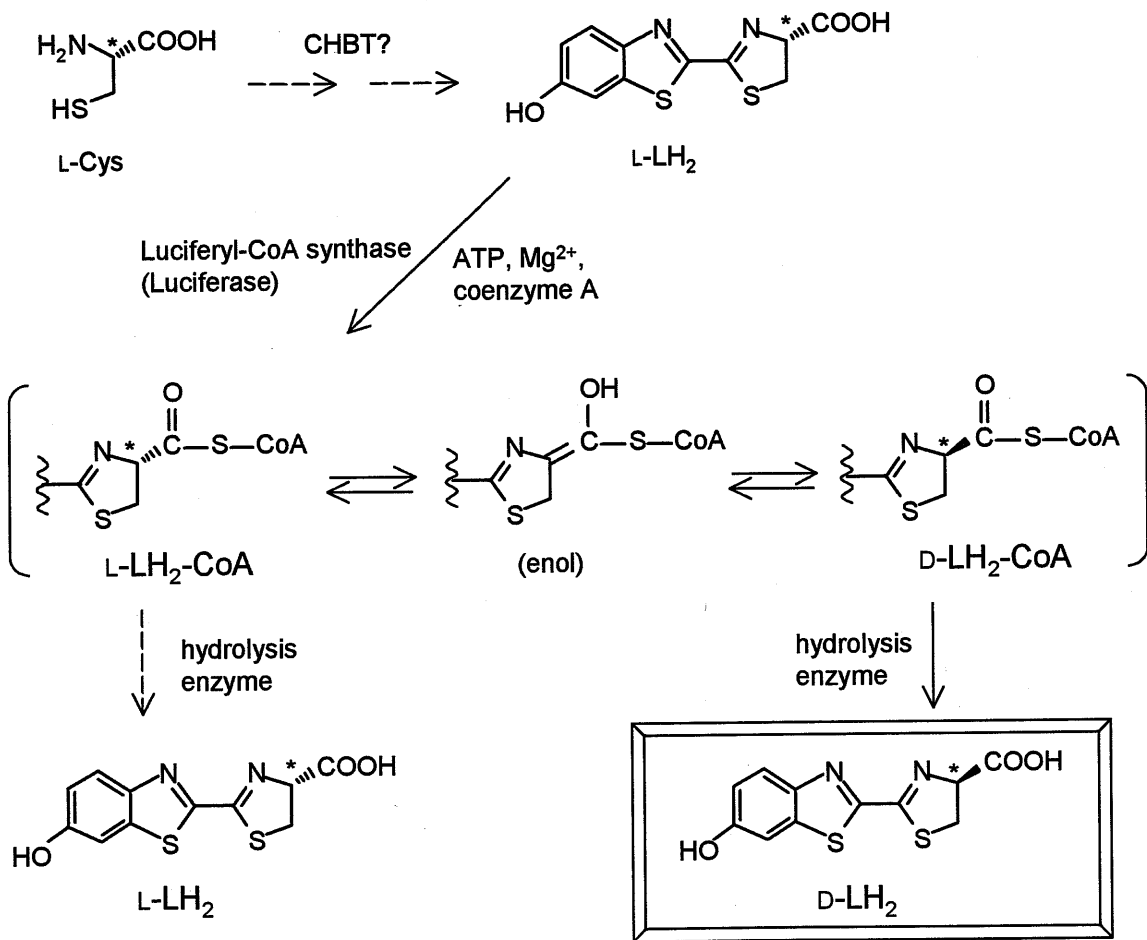


図4-1、想定されるD-ルシフェリンの生合成経路

天然型L-Cysからまず最初にL-LH₂ができる。次にCoAおよびATP-Mg存在下、恐らくルシフェラーゼによりCoA化されてL-LH₂-CoAとなる。CoA化されたLH₂は容易にエノール化するため、平衡が移動してD-LH₂-CoAができる。チオエステル結合を何らかの酵素が加水分解することによりD-LH₂が生成する。

4.2 実験方法

4.2.1 ルシフェリン生合成反応解析

D-LH₂、L-LH₂およびCHBTの調製方法は第2章(2.2.2)に従った。反応に使用する酵素、試薬は3.2.2と同様のものを使用した。豚肝臓エステラーゼはシグマ社のものを使用した。LUCと豚肝臓エステラーゼはGlycerolを10%含む0.1M Tris-HCl [pH 8.0]に溶かして1mg/mlとし、-30°Cで保存した。ATPとMgSO₄は0.1M Tris-HCl [pH 8.0]に溶かしてATP-Mg溶液とした。CoAは蒸留水に溶解した。反応は全てATP-Mg溶液を添加することで開始させ、室温で行った。

反応生成物の分析はHPLCによって行った。分析方法は第2章(2.2.3)に従った。

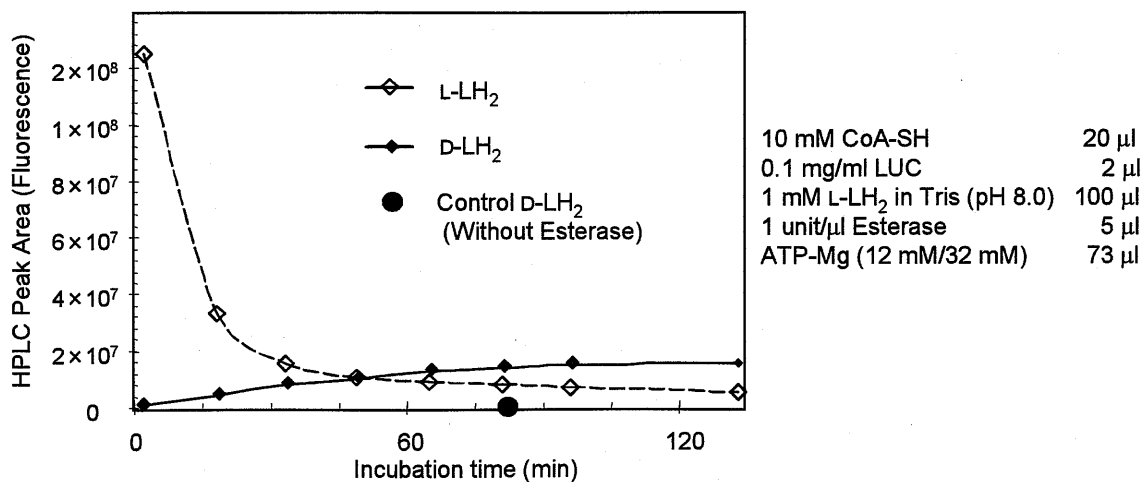


図4-2、エステラーゼによるルシフェリル-CoA加水分解

L-LH₂をATP、Mg²⁺、CoA及び豚肝臓エステラーゼの存在下反応させた。L-LH₂はCoA化により減少し、LH₂-CoAの加水分解によりD-LH₂が生じた。エステラーゼが無いとD-LH₂は生じなかった。

4.3 結果および考察

4.3.1 生合成経路におけるルシフェラーゼの役割

酵素的にチオエステルを加水分解することで、LUC、ATP、 Mg^{2+} 、CoA の存在下、L-LH₂ を D-LH₂ に異性化できるか実験を行った。酵素としては、基質選択性が低い豚肝臓エステラーゼを用いた。その結果このエステラーゼの作用により D-LH₂ が生成することが確かめられた (図 4-2)。反応後の D-LH₂ の比率は全 LH₂ の約 75%であった。この結果から、少なくとも *in vitro* において L-LH₂ は LUC とエステラーゼの働きにより異性化されて D-LH₂ に変換できると考えられる。

しかしながら豚肝臓エステラーゼを用いた実験では D-LH₂ 生成量は少なく、反応収率は 15%であった。これに対し、天然のホタル抽出蛋白質を用いた場合、ほぼ定量的に異性化が起きた (図 2-17)。このことからホタルは LH₂-CoA を効率良く加水分解する酵素を保持していると考えられる。

ラセミ化しやすい LH₂-CoA から選択的に D-LH₂ を得るためには、D-LH₂-CoA を選択的に加水分解する必要がある。しかしながらホタル体内で LH₂-CoA の加水分解を行う酵素の立体選択性については明らかではない。今後、ホタルから LH₂-CoA 加水分解酵素を精製し、その酵素活性を解析する必要がある。

豚肝臓エステラーゼは基質選択性が低いので、D-LH₂-CoA だけではなく L-LH₂-CoA も加水分解されていると考えられる。しかしこのようにして L-LH₂ が生成したとしても、このものは再び CoA 化反応の基質となる。これに対し D-LH₂ は CoA 化の基質にはならない (図 3-7b)。また LUC によって発光する反応速度は L-LH₂ の CoA 化の 10⁶ 倍遅い (表 3-2)。そのため L-LH₂ のみが消費され、結果的に D-LH₂ が蓄積される。このことから D-LH₂ 生合成には必ずしも D-LH₂-CoA 選択的な加水分解酵素は必要ではない。

以上のように D-LH₂ が LUC とエステラーゼによって合成できることから、*in vivo* での D-LH₂ 生合成においても、LUC と何らかのエステラーゼ (おそらく何らかの CoA

チオエステラーゼ) がその役割を担っているものと考えられる。

4.3.2 生合成経路を利用した発光反応溶液システム

4.3.1において、LUC、ATP、 Mg^{2+} 、CoA、豚肝臓エステラーゼの存在下、L-LH₂がD-LH₂に異性化されることを示した。D-LH₂はLUC、ATP、 Mg^{2+} により発光するので、この反応溶液はそのままで発光する。その発光量はLUC量に比例した(図4-3)。これはD-LH₂を直接使用しない新しいLUC定量用の発光反応溶液システムと言える。

本研究で見出した生合成経路は、L-Cysの定量試薬としての応用も期待できる。すなわち、L-LH₂はCHBTとL-Cysから非酵素的にバッファー中で生成するのでL-LH₂をCHBTとL-Cysに置き換えることで同様の発光系を構築できる(図4-4a)。

図4-4bにL-Cysの濃度と発光量の相関を実験した結果を示す。L-Cys濃度が0.01 mMまでにおいて、L-Cys濃度と発光量に良い相関が見られたがデータのばらつきが大きかった。また、L-Cys濃度0.1 Mにおいて急激な発光の減少が見られた。これは高濃度L-CysによるL-L反応の阻害によるものと思われる(第5章参照)。

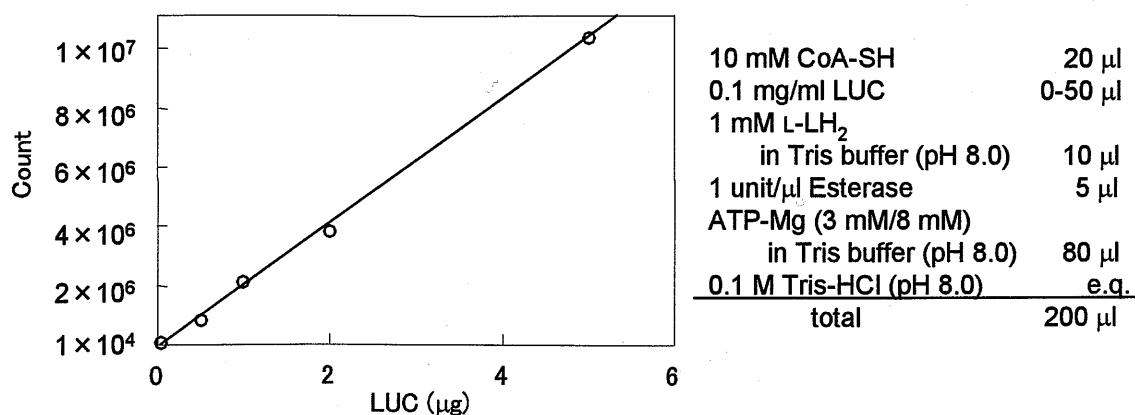


図4-3、ルシフェラーゼとエステラーゼによるL-ルシフェリン発光活性

L-LH₂を出発物質としてATP、 Mg^{2+} 、CoA及び豚肝臓エステラーゼの存在下、発光活性を測定した。ATP-Mg添加により反応を開始し、50秒間の発光量を測定した。LUCの量と発光量に良い相関が見られた($R^2=0.9985$)。

定量試薬としての反応系としては今後の最適化が必要であると思われる。特にここで用いた加水分解酵素は豚肝臓エステラーゼであるが、ホタルに存在すると考えられる LH₂-CoA に特異性の高い加水分解酵素を使用すればダイナミックレンジを改善できると思われる。

本節で検討した Cys の検出試薬は生体内物質である Cys の内在量測定に応用がみこまれるので、特許申請を行った。

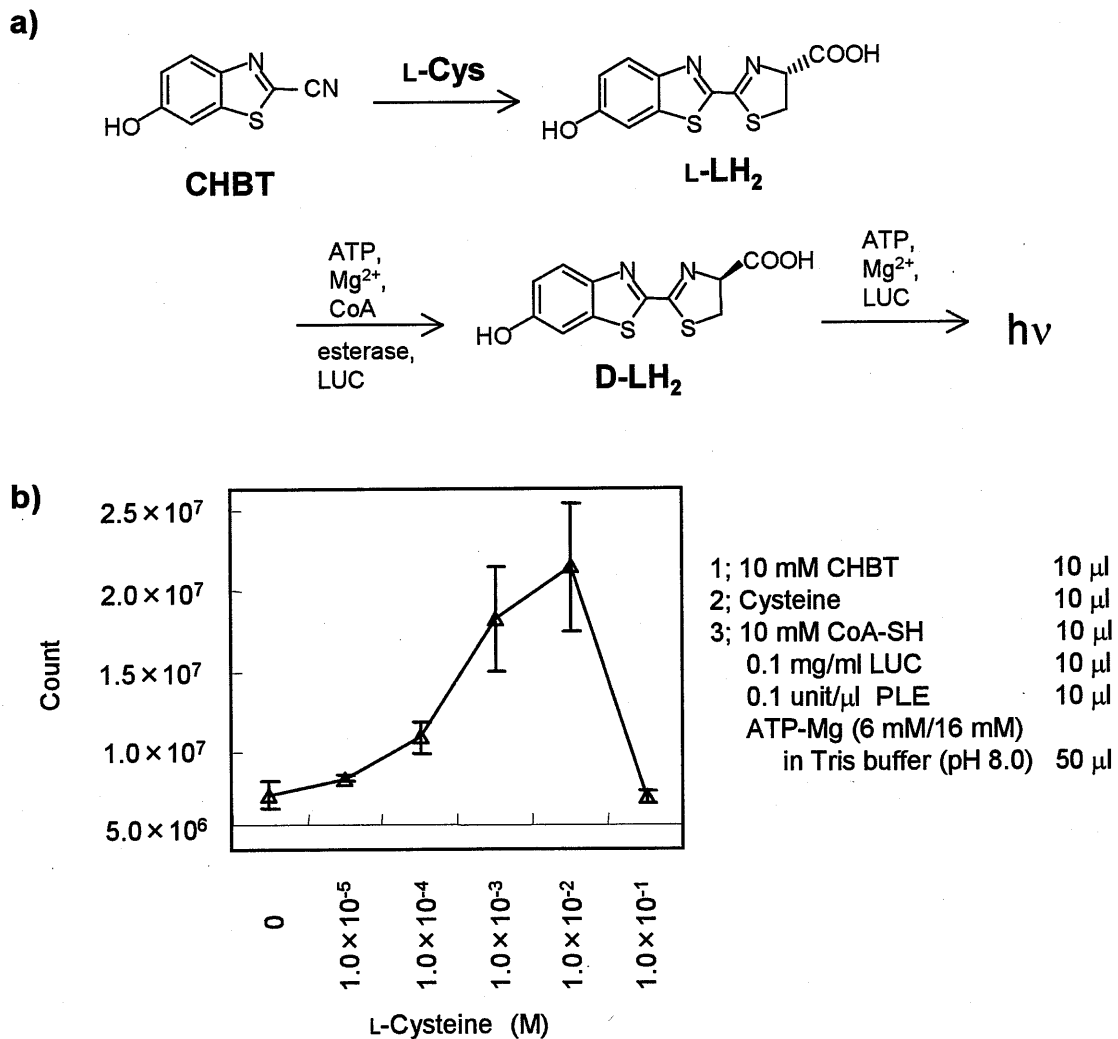


図4-4、D-ルシフェリン生合成を模したシステイン検出試薬

(a) CHBTを出発物質とした発光反応系。CHBTはL-CysによりL-LH₂となり、ATP、Mg²⁺、CoA及び豚肝臓エステラーゼの存在下、発光する。(b) L-Cysの量と発光量の相関。(平均値±標準偏差)

4.3.3 2-アリアルプロピオン酸系抗炎症薬のキラル異性化

図4-1に示したようなCoA化によるキラル異性化と同様の反応が、2-アリアルプロピオン酸系抗炎症薬イブプロフェンの薬理代謝でも知られている(Reichel 1997)。イブプロフェンは大衆薬(エスエス製薬「エスタックイブ」「EVE A錠」、大正製薬「ナロンエース」など)として市販されており、われわれに身近な頭痛薬、解熱剤である。その抗炎症薬としての薬理作用はCOX(プロスタグランジン生合成のシクロキシゲナーゼ)阻害であるが、この阻害活性を持つのは片方の光学異性体(*S*)-イブプロフェンのみである。これに対して光学異性体の(*R*)-イブプロフェンには阻害活性は無い。

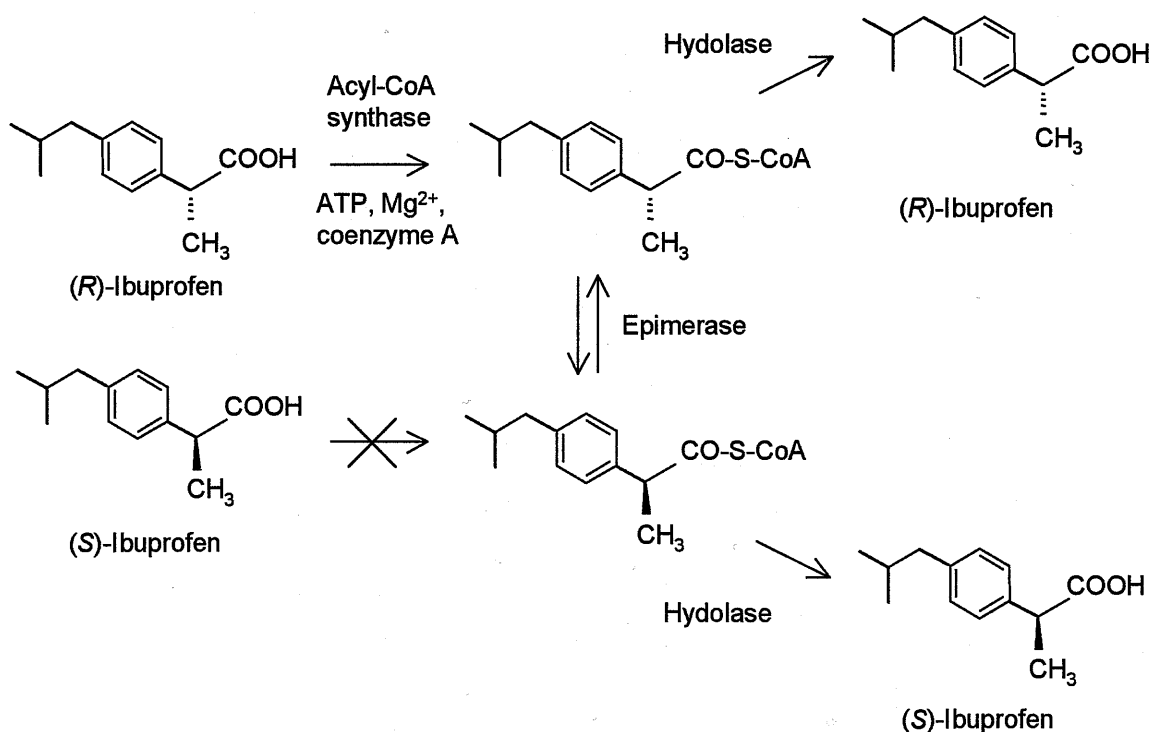


図4-5、2-アリアルプロピオン酸系抗炎症薬イブプロフェンの立体異性化代謝経路
加水分解反応には基質の立体選択性がないため、*S*体と*R*体のイブプロフェンが生成する。しかしCoA化は*R*体特異的なので、*S*体が結果的に蓄積される。

しかし(*R*)-イブプロフェンはアシル CoA リガーゼにより選択的に CoA 化される(図 4-5)。エピメラーゼの作用により CoA 化されたイブプロフェンはラセミ化する。ここでチオエステル加水分解酵素が働くことでラセミ体のイブプロフェンが生成する。*R*体は再び同じ反応によってラセミ化する。しかし CoA 化酵素の基質立体選択性が高いために *S*体は CoA 化されない。そのため結果的に薬理活性のある *S*体が蓄積される。

このように、(*R*)-イブプロフェンは細胞内で代謝されて COX 阻害活性のある (*S*)-イブプロフェンに変換されるので、*S*体のみには活性があるにも関わらずラセミ体のまま大衆薬として市販されている。

図 3-8 および図 4-5 で示したように、CoA 化反応の基質立体選択性が高いという点では、ホタルの LH₂ とイブプロフェンは同じと言える。

CoA 化の後、イブプロフェンの場合はラセミ化にエピメラーゼが必要である。これに対しホタルの場合は α 位の炭素 (4' 位) がチアゾリン環に位置しているために酸性度が高くエノール化しやすい。そのためエピメラーゼが無くても自動的にラセミ化する。

ラセミ化に続くチオエステル加水分解酵素は、イブプロフェンの場合は基質の立体選択性が無い。そのため、活性型の (*S*)-イブプロフェンのみが生成するわけではないが、最終的には *S*体のみが蓄積される。ホタルの生合成においては現在のところ酵素が同定されておらず反応特性が解明されていないので、チオエステル加水分解反応の基質特異性は明らかではない。しかし仮に特異性が無かったとしても、イブプロフェンの場合と同様の機構で最終的には D-LH₂ が蓄積されると考えられる。

第5章 ホタルルシフェラーゼ酵素活性に対する生体物質の作用

5.1 研究背景

第2章において、ホタルD-LH₂がL-Cysより生合成されることを示した。また第3章において、LUCの多機能性について議論し、第4章においてLUCがD-LH₂生合成に関与していることが示唆される結果が得られた。

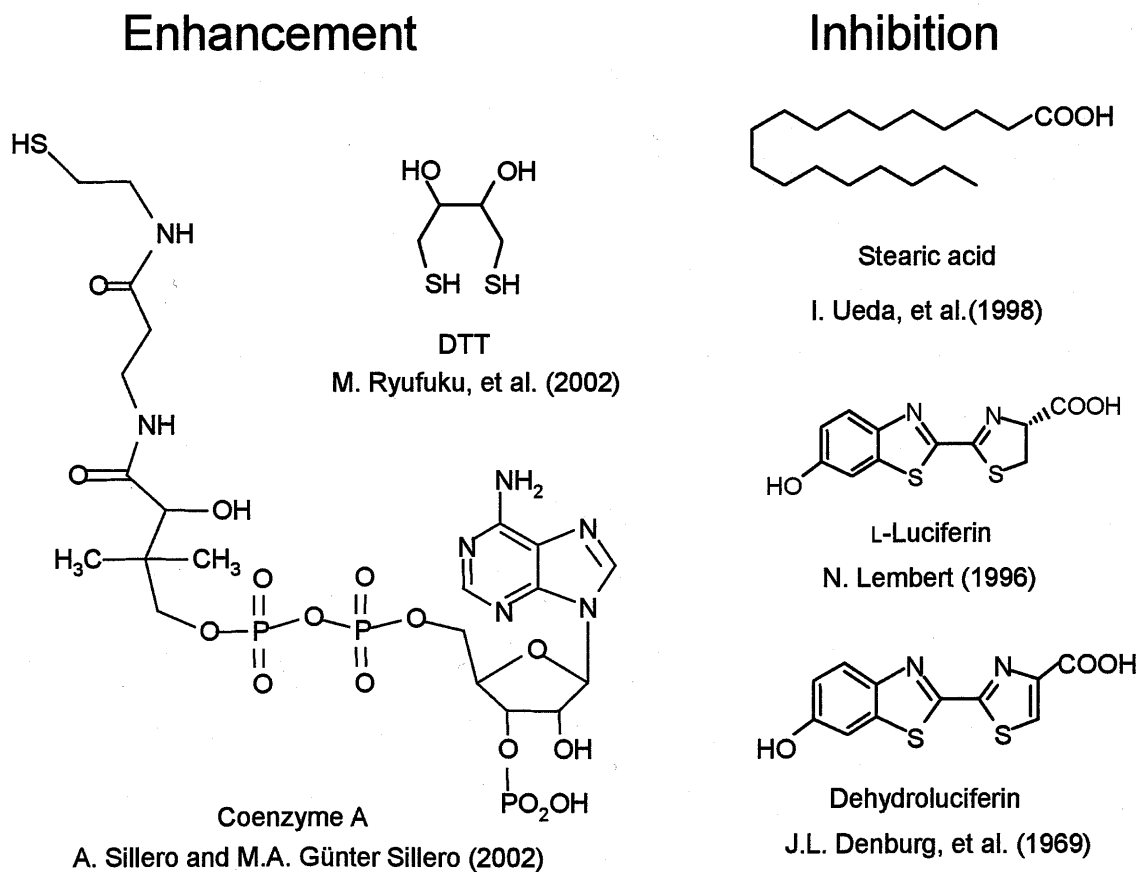


図5-1、ホタル発光反応に影響を及ぼす化合物
発光反応促進作用を示すDTTとCoA、および阻害作用を示すステアリン酸、L-LH₂とデヒドロルシフェリン

LUCは古くから反応性が複雑で、種々の化合物(図5-1)の影響を受けることが知られている(DeLuca 1976)。これはLUCの複雑な反応機構(図3-8)と深く関わっているが、実験データとしては未だ充分とは言えない。

LUCの酵素学的な反応特性を詳しく調べることは、D-LH₂生合成に対するLUCの関与についての情報を与えるだけでなく、その複雑な反応機構をより深く理解する助けになる。そこで本章ではLUCの酵素反応メカニズム、特に生体内還元性化合物の酵素活性に対する影響を調べることにした。

L-L反応は各種脂肪酸(Ueda 1998)あるいはルシフェリンアナログ(Denburg 1969)によって阻害される(図5-1)。これらの阻害作用は競争的であり、界面活性剤などによるアロステリックな活性消失ではない。これらの物質は細胞内に存在するものであり、ホタルの発光細胞内で何らかの影響があると考えられる。ルシフェリンアナログとしては、第2章で示したようにD-LH₂がラセミ化して生じるL-LH₂

(Lembert 1996)、あるいは溶液中で酸化して生じるデヒドロルシフェリン(Denburg 1969)が強い阻害作用を持つ。このことは発光反応に必須のD-LH₂は常に強い阻害剤に少しずつ変化してしまうということを意味している。

これらの阻害物質はいずれもCoAリガーゼとしてのLUCの基質となるため、CoAの非存在下では反応が進行せずにLUCのアクティブサイトを塞いで発光反応を阻害するが、CoA存在下ではCoAと反応することにより酵素から離れ、発光基質であるD-LH₂がアクティブサイトに入れるようになる。このためin vitroでの反応系に加える試薬としてのD-LH₂には必ず混入するこれらの阻害物質による発光反応阻害は、CoAによって解除される。このことから、CoAは発光促進作用がある物質として知られてきた(Sillero 2000)。

この他にもdithiothreitol(DTT)に発光促進作用があることが知られている。DTTによる発光促進作用はその還元能にあるとされ、ジエチルジチオカルバミン酸などの還元剤にも同様に促進作用が報告されている(Ryufuku 2002)。しかしながらその

発光促進メカニズムは明らかにされていない。また、DTT は人工的な化学合成物質であり、生体内でどのような還元剤が発光促進に寄与しているのか（あるいは寄与している化合物が存在しないのか）明らかにはなっていない。

DTT の還元能はチオール基に起因する。生体物質でチオール基を持つ分子としてはシステイン、システアミン、ホモシステイン、グルタチオン (GSH) などがある。また生体内で最も強い還元剤としてはジヒドロリポ酸 (図 5-2) が知られている。ジヒドロリポ酸の酸化型化合物であるリポ酸は強力なフリーラジカルスカベンジャー (Moini 2002) であり、いくつかの酸化還元酵素の反応中心因子として知られている (Fujiwara 2001)。更に、ジヒドロリポ酸が DTT の membrane-associated prostaglandin E synthase-2 活性促進作用を代替することが知られている (Watanabe 2003)。

以上のことからチオール基を有する生体物質をはじめこれと構造的に相関のある物質を中心に、L-L 反応に対する作用を解析することとした。

更に研究を進める中で興味深いことに、リポ酸 (図 5-2) が LUC による発光反応のみならず、L-LH₂-CoA チオエステラーゼ活性を阻害することを見出した。そこでリポ酸を用いて D-LH₂ 生合成における LUC の L-LH₂-CoA チオエステラーゼ活性の関与を評価した。

5.2 実験方法

5.2.1 試薬

LUCはシグマ社の北米産ホタル (*Photinus pyralis*) HPLC精製、再結晶グレードを用いた。D-LH₂、DTT、アスコルビン酸、システアミン、デオキシコール酸、ピフィスリン α 、リポ酸、ジヒドロリポ酸、ミリスチン酸、ステアリン酸はシグマ社、ATP、CoA、L-システイン、その他必要な試薬は和光純薬あるいはナカライテスクのものを使用した。一酸化窒素 (NO) 発生剤は同仁化学のNOR1 (Kato 1996)を使用した。

LUCは10%グリセロール含有0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]に溶解し、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の保存溶液として -30°C で保存した。NOR1はDMSOに溶解し、10 mMの凍結保存溶液とした。その他の化合物は蒸留水に溶解し凍結保存した。

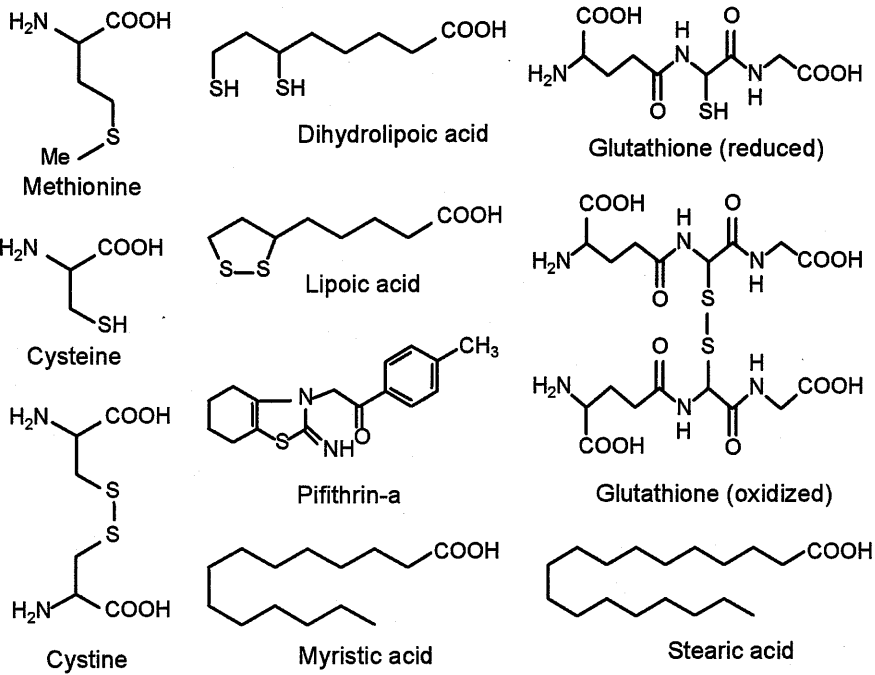
5.2.2 発光反応測定実験

発光量はアトー社製ルミノメーターAB-2200を用いて20秒間の積算値を測定した。50 μl の反応溶液 (40 μM D-LH₂、0.1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ LUC、0.1 M Tris-HCl [pH 8.0])を装置内部の反応チューブに入れ、自動注入装置により50 μl の反応開始剤 (4 mM ATP、8 mM MgSO₄、0.1 M Tris-HCl [pH 8.0])を加えて発光量を測定した。測定はそれぞれ2回ずつ行った。

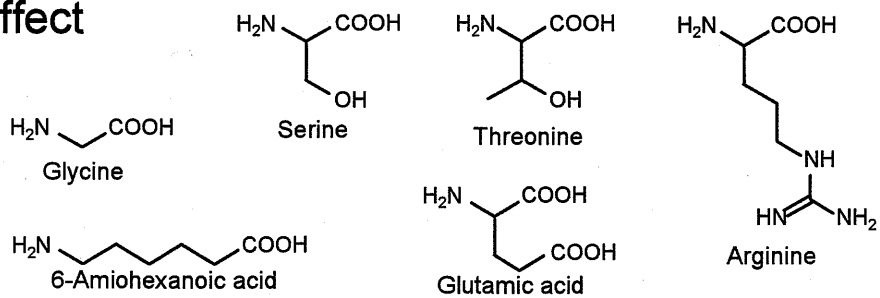
5.2.3 酵素カインेटィクス解析

2-20 μM D-LH₂、リポ酸 (0-0.01 μM)、LUC (0.1 $\text{ng}/\mu\text{l}$)、0.1 M Tris-HCl [pH 8.0]から成る50 μl の反応液を3.2.2と同様に反応させて発光量を測定した。 K_i 値は通常のLineweaver-Burkプロットから計算した。ここで V_0 値は測定した発光量とした。3回の測定の平均値をプロットし、最小二乗法による近似直線を作成した。

Inhibition



No Effect



Enhancement

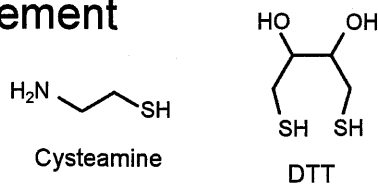


図5-2、構造活性相関

発光反応促進作用を示す化合物、促進作用を示す化合物、および(50 mM にて)効果を示さない化合物。(40 μ M D-LH₂、0.1 ng/ μ l LUC、0.1 M Tris-HCl [pH 8.0])

5.3 結果及び考察

5.3.1 構造活性相関

DTTによる membrane-associated prostaglandin E synthase-2 の活性促進作用をジヒドロリポ酸が低濃度で代替したことから (Watanabe 2003)、当初はジヒドロリポ酸が L-L 反応を DTT よりも強力に促進するものと予想した。しかし実際は強い阻害作用を示した。

DTTによるホタル発光反応の促進がチオール基による還元能であると考えられることから、Cys あるいは GSH などのチオール分子の作用を調べた。更にその構造活性相関を調べるために、セリン、メチオニン、システアミンなどの類延体の作用も調べた。図 5-2 は種々の化合物の L-L 反応に対する影響をまとめたものである。

当初の予想に反し、還元能を有するチオール基が必ずしも反応促進的に働かないことが明らかになった。むしろ、チオール基をはじめとして硫黄原子を有する多くの化合物が L-L 反応を阻害した。また、阻害剤として働いたチオール化合物のジスルフィド二量体が同じように阻害活性を示した。

全般的な特徴は、硫黄原子とカルボキシル基の両方を持つ分子が阻害能を持つということである。カルボキシル基を持たないチオールであるシステアミンは DTT とほぼ同じ濃度での促進作用を示した。これに対しチオールを持たない化合物のほとんどが促進も阻害もしなかった。これらの化合物は最終濃度が 50 mM でも発光反応を促進も阻害もしなかった。

発光基質である D-LH₂ は、阻害的に働いた化合物と同じように硫黄原子とカルボキシル基を持つ。このことは、これらの化合物が拮抗的に阻害していることを示唆している。実際にアナログ分子の多くが発光反応を阻害する。例えばデヒドロルシフェリンは強い阻害剤 ($K_i=0.1 \mu\text{M}$) である (Denburg 1969)。

しかしながら硫黄原子とカルボキシル基が絶対条件ではない。例えば長鎖脂肪酸には硫黄原子は無く、ピプイスリン α にはカルボキシル基は無い。ピプイスリン α

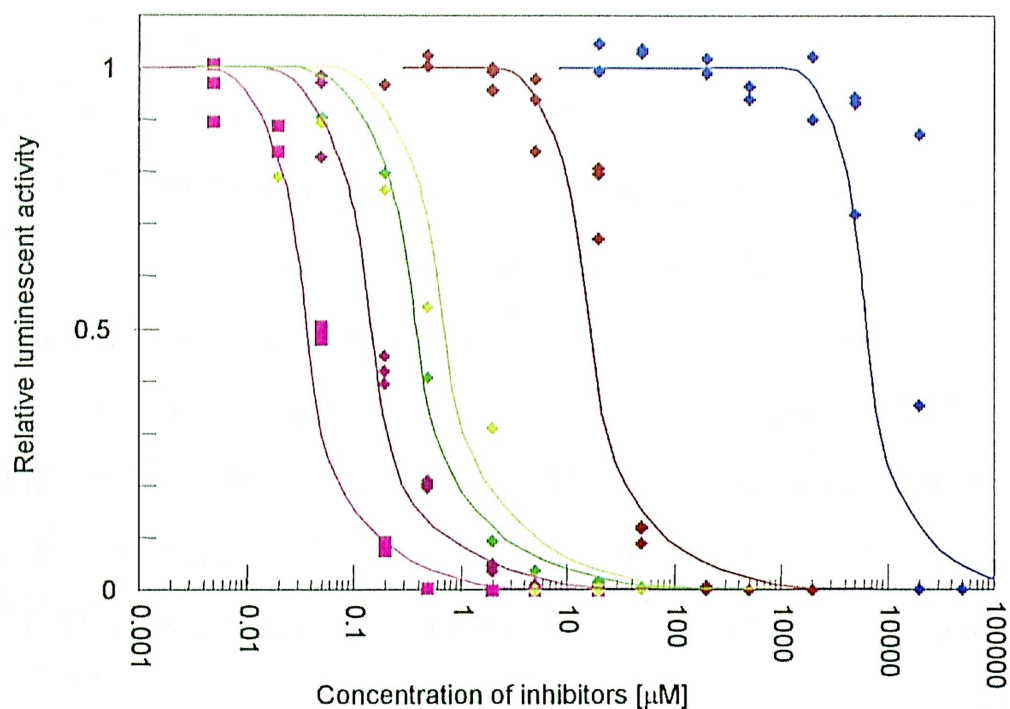
は p53 の特異的阻害剤として知られる薬剤である。長鎖脂肪酸 (Ueda 1998) もピプ
イスリン α (Rocha 2003) もホタル発光反応を強力に阻害する。このことから発光反
応に対する阻害には何らかの構造的特徴が重要であると考えられる。

次にいくつかの化合物に関してその濃度活性相関を調べた (図 5-3)。その結果、
どの化合物よりもリポ酸の阻害能が強かった。その IC_{50} は $0.04 \mu\text{M}$ であり、これは
これまで報告されたどの化合物よりも強い阻害活性である。

リポ酸にはラジカル消去能があり、両親媒性で界面活性能がある。阻害活性はこ
れらの性質に起因する可能性が考えられたが、ラジカル消去能を持つアスコルビン
酸 ($IC_{50}=20 \mu\text{M}$)、あるいはこれまで報告された中で最も強い L-L 反応阻害作用を持
つ界面活性剤デオキシコール酸 ($IC_{50}=20 \text{mM}$) に比べても、リポ酸ははるかに強い阻
害活性を示した (図 5-3)。このことからリポ酸の阻害能には高い特異性があると
考えられる。

また、リポ酸の還元型物質であるジヒドロリポ酸の阻害能はリポ酸の約 100 分の
1 であった。ジヒドロリポ酸は酸化されてリポ酸に変換されやすい (Moini 2002)
ため、ジヒドロリポ酸の単独での阻害作用をリポ酸の強い阻害作用と区別すること
は困難であった。

a)



b)

Substances	IC ₅₀
■ Lipoic acid	0.04 μM
◆ Pifithrin-α	0.2 μM
◆ Myristic acid	0.4 μM
◆ Stearic acid	0.7 μM
◆ Deoxycholic acid	200 μM
L-Cystine	5 mM
◆ Ascorbic acid	6 mM
L-Cysteine	10 mM
Glutathione (oxidized)	10 mM
L-Methionine	20 mM

c)

Substances	
Cysteamine	10 mM
DTT	30 mM

図5-3、L-L反応に対する作用濃度
 (a) 阻害剤の濃度活性相関曲線。(b)阻害剤のIC₅₀値。(c)促進剤の作用濃度。発光量を2倍以上に促進する濃度。

5.3.2 リポ酸の阻害作用

リポ酸の阻害作用を酵素反応速度論的に解析するために Lineweaver-Burk プロットを作成した (図 5-4)。その結果グラフが縦軸付近で交差したことからリポ酸による阻害作用が拮抗的であることが示された。また K_i 値は $0.0285 \mu\text{M}$ であった。これは図 5-3 における IC_{50} 値 ($0.04 \mu\text{M}$) に近く、矛盾のない結果である。またこれまでに K_i 値が報告されているミリスチン酸 ($K_i=0.68 \mu\text{M}$) あるいはデヒドロルシフェリン ($K_i=0.1 \mu\text{M}$) よりも強い阻害剤であることが酵素反応速度論的に確かめられたと言える。更にこのときの D-LH₂ の K_m 値 ($4.55 \mu\text{M}$) よりもリポ酸の K_i 値は小さく、リポ酸が LUC に対して強い親和性を有していると言える。

このようにリポ酸は LUC の活性中心に強い親和性を有する発光反応阻害剤であることが明らかになった。リポ酸は生命にとって重要な生体物質であり、ホタルの発光細胞内にも存在することが予想される。このことからリポ酸がホタル発光反応に対して何らかの機能を有していることが予想される。

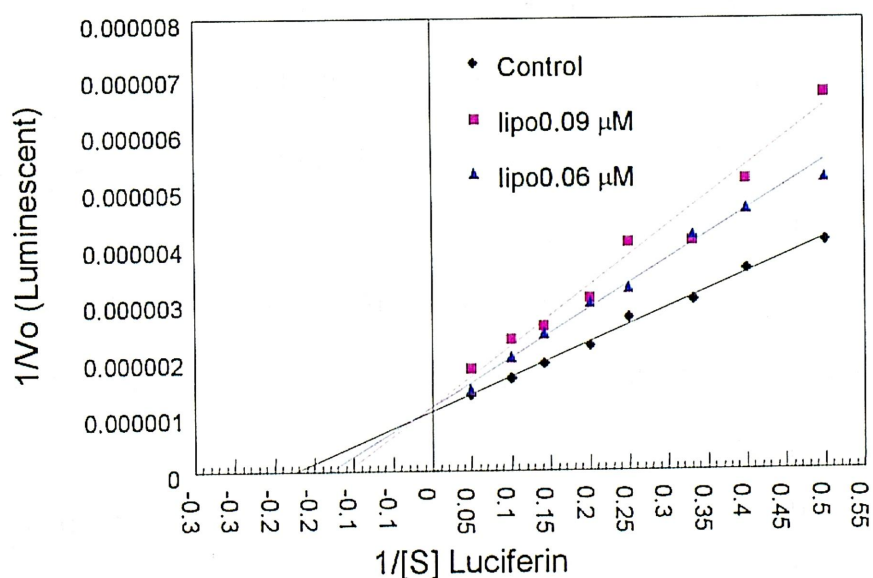


図5-4、Lineweaver-Burk Prot

縦軸近くで交わっているので、リポ酸による阻害は拮抗的であると言える。このグラフより K_m (luciferin) = $4.55 (\mu\text{M})$ 、 $K_i = 0.0285 (\mu\text{M})$ であった。

5.3.3 一酸化窒素および補酵素 A の作用

リポ酸は lipoate-activating enzymes (LAE) の基質となってアデニル化されることが知られている (Fujiwara 2001)。また LAE は LUC と相同性がある。またリポ酸はカルボキシル基があり、疎水部分を持つ両親媒性分子である。このことはリポ酸が、脂肪酸やデヒドロルシフェリンあるいは L-LH₂ と同様に LUC によって CoA 化される可能性を示唆している。

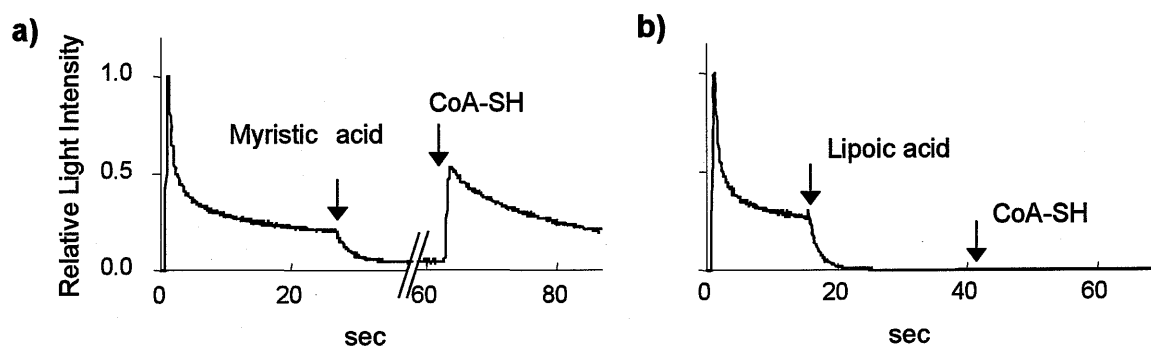


図5-5、CoAによる発光反応阻害の解除

阻害剤、促進剤の添加による効果を、発光量の変化により記録した。(a) ミリスチン酸添加による発光阻害がCoAにより解除された。(b) リポ酸添加による発光阻害はCoAで解除されなかった。阻害剤であるリポ酸とミリスチン酸の終濃度はそれぞれ2.5 μ Mと5 μ M。CoAの終濃度は0.5 mM。

リポ酸が CoA リガーゼとしての LUC の基質になるのであれば、CoA によって発光阻害が解除されるはずである。例えばミリスチン酸による阻害は CoA によって解除される (図 5-5 a)。これに対しリポ酸による阻害は CoA を添加しても解除されなかった (図 5-5 b)。

この結果は他の阻害剤を抑制する CoA の存在下においてもリポ酸が効率良く LUC の活性を阻害できることを意味している。これはホタルの発光制御にリポ酸が関与している可能性を示唆する結果である。

ホタルの発光反応制御はこれまでに NO の関与が指摘されてきた。NO ガスの作用によりホタルが強く発光することが確かめられている (Trimmer 2001)。これは NO が神経伝達物質として働くからであると説明されている。しかしながら NO が L-L 反応に対して直接的にどのような作用を持つかは明らかではない。そこで NO 発生剤とし

て NOR1 を図 5-5 と同様に添加してその作用特性を調べた (図 5-6)。CoA の非存在下では、NO によって発光が促進されるが、リポ酸により発光が阻害された (図 5-6 a)。CoA が存在する場合は、リポ酸による発光阻害を NO が更に強める結果となった (図 5-6 b)。NO の効果が CoA およびリポ酸が存在する場合とは全く逆である。興味深いことに NO と同様のレスポンスが DTT にも見られた。しかしながら DTT の終濃度 (15 mM) に対して NOR1 の終濃度は 0.5 mM であった。NOR1 が NO を放出する半減期は 2.6 分であるので (Kato 1996, Ke 2001)、実際の NO の濃度はさらに小さい。このことから NO の効果は DTT よりも明らかに強いと言える。

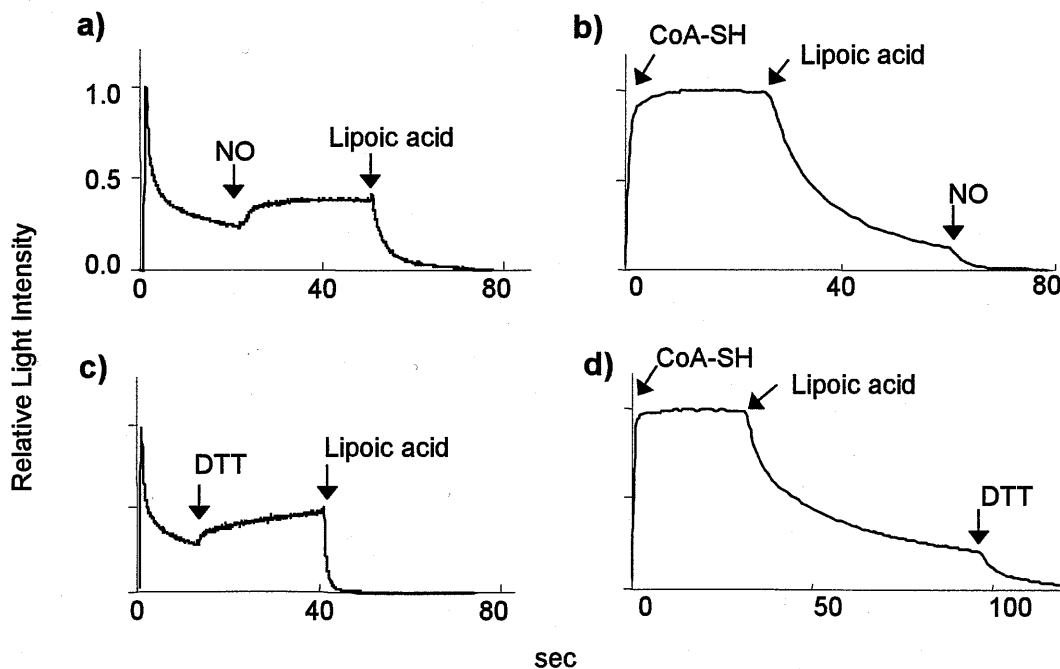


図5-6、NOとDTTの効果

阻害剤、促進剤の添加による効果を、発光量の変化により記録した。(a) CoAの非存在下、NOの添加により促進された発光はリポ酸の添加により抑制された。(b) CoAが存在する場合リポ酸により発光が阻害されるが、NOを加えると更に阻害が強くなった。NOの効果はCoA、リポ酸が無い場合とは逆である。(c) (d) NOを加えた時と同様のレスポンスがDTTにより見られた。リポ酸の終濃度は2.5 μ M、CoAの終濃度は0.5 mM、NOは発生試薬NOR1を0.5 mM、DTTは終濃度15 mM加えた。

人工的な化合物である DTT と NO が同様の作用を示すことは興味深い。しかしながら NO の作用メカニズムは明らかではなく、今後の課題である。

5.3.4 リポ酸によるルシフェリンキラル異性化阻害

以上に示したようにリポ酸は LUC の D-LH₂ に対する拮抗阻害剤であり、またリポ酸による発光阻害が CoA によって解除されないということが明らかになった。このことはリポ酸が LUC の活性中心に対して非常に強い親和性を示し、CoA リガーゼ活性をも阻害する可能性を示唆している。そこでリポ酸による CoA リガーゼ活性阻害能を確かめた (図 5-7)。

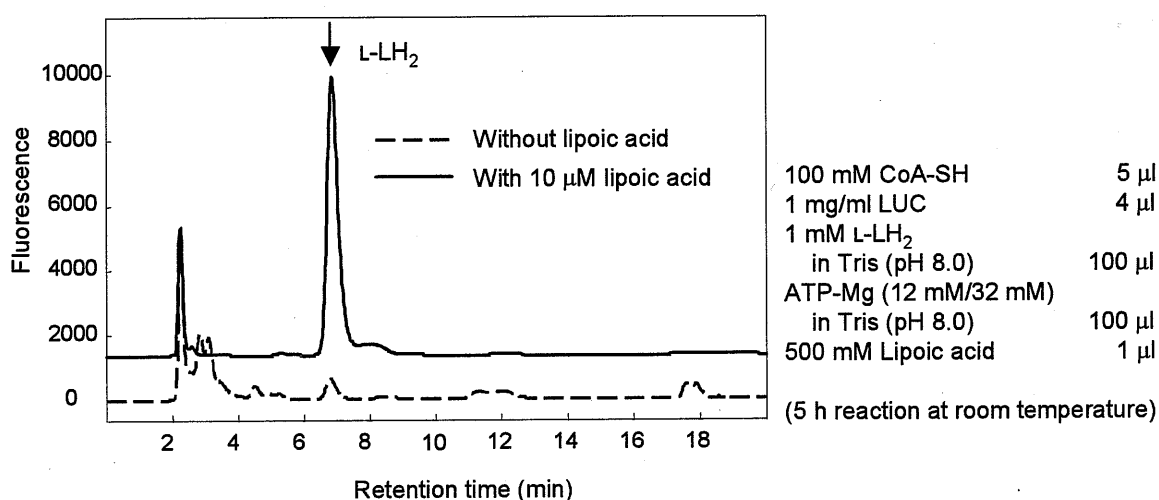


図5-7、リポ酸によるCoAリガーゼ活性の阻害

リポ酸が無い場合はCoA化によってL-LH₂が消失するが、リポ酸が存在すると反応が阻害されてL-LH₂は消失しない。

第2章において L-LH₂ がホタル抽出蛋白質により D-LH₂ にキラル異性化されることを示したが、このキラル異性化反応に LUC が (L-LH₂-CoA リガーゼとして) 関与しているのであれば、キラル異性化反応はリポ酸で阻害されると考えられる。実際に試してみたところ、リポ酸が約 2 mM でキラル異性化反応を阻害していることが確かめられた (図 2-14)。

以上の結果は、図4-1に示したLH₂キラル異性化反応においてL-LH₂をCoA化しているのはLUCであるという可能性の高さを示唆している。

第6章 結語

ホタル生物発光系は学術的に興味深いだけでなく、多方面で応用されており、産業上有用な生命現象である。しかしながら未だに科学的に解明されていない問題が残されている。本学位論文では特に発光基質ルシフェリン (D-LH₂) の生合成経路と発光酵素ルシフェラーゼの反応特性に関して研究を行った。

第2章においては D-LH₂ の生合成経路を解明すべく、ホタルのライフステージごとに D-LH₂ とその光学異性体 L-LH₂ を定量的に分析した。更に生合成前駆体と考えられるシステインの光学純度を分析した。そしてホタル抽出蛋白質が光学異性体 L-LH₂ を効率良く発光基質 D-LH₂ に異性化することを見出した。これにより、L-Cys を出発原料とし、L-LH₂ を中間体とする新しい D-LH₂ 生合成経路を提唱した。

第3章ではルシフェラーゼの反応特性を解明するためにルシフェラーゼの CoA-リガーゼとしての活性に注目し、D-LH₂ と L-LH₂ に対する反応生成物解析を行った。その結果、光学異性体 L-LH₂ をルシフェラーゼが効率良く CoA 化し、ルシフェリル-CoA とすることを見出した。この結果は、第2章で提唱した D-LH₂ 生合成経路に関して、L-LH₂ のキラル異性化反応にルシフェラーゼの L-LH₂ 特異的 CoA 化活性が関与していることを示唆するものであった。

この結果をふまえ第4章では、*in vitro* の反応系で精製品のルシフェラーゼと加水分解酵素（具体的には豚肝臓エステラーゼ）によって L-LH₂ が異性化し D-LH₂ が生成することを確認した。

また第5章においては、生体物質がホタル発光反応に対して及ぼす影響を評価するために、還元性のチオール基を有する化合物の作用を調べた。還元性のチオール基を有する DTT は発光反応の促進作用を示すが、細胞内で還元剤として機能するリポ酸—ジヒドロリポ酸が発光反応を強く阻害することが実験的に確認された。更にリポ酸が、ルシフェラーゼの L-LH₂ 特異的 CoA 化活性も阻害することを見出した。この活性は D-LH₂ 生合成に関与することが第3章、第4章で示唆されたが、実際にリポ

酸がホタル抽出蛋白質の L-LH₂ キラル異性化活性を阻害することが確認できた。これは、発光酵素ルシフェラーゼが発光基質 D-LH₂ の生合成にも関与していることを支持する結果である。

以上の結果は、ホタル生物発光における未解決の問題に関して新しい知見を与えるものである。要約すれば、1)、生合成経路に関しては、ホタルを含む全ての発光生物においてルシフェリン生合成のメカニズムを実験的に示すことができた。2)、ルシフェリンの生合成中間体として、通常は非天然物質と考えられる光学異性体が機能しているという興味深い結果が得られた。更に酵素ルシフェラーゼの多機能性がルシフェリンの生合成に関与することを示唆する結果も得られた。これは生物発光現象の枠を超えて、天然物化学的に興味深い結果である。3)、ルシフェリン生合成経路を解明するために、本研究では主に生体物質の化学分析実験と酵素活性解析実験を中心に行った。そしてホタルがライフステージごとにダイナミックに発光基質の生合成をコントロールしていることが明らかになり、生態学的な理解を深めることもできた。生体物質を丹念に分析することは生合成研究のみならず生命現象全般に渡って多くの面で理解を深めることに役立つと言える。

今日のバイオサイエンスでは、ポストゲノム時代の技術と言われるプロテオーム、トランスクリプトームから、更に生体低分子を網羅的に分析するメタボロームが盛んになりつつある。今後は、ゲノム解析では解明しきれない生命のメカニズムを化学物質の動きとして捉える必要が出てくるであろう。本学位論文で行ったような生体物質の分析実験は今後ますます重要になると考えられる。

本学位論文で得られた研究成果は学術的に意義があるのみではなく、ホタル発光反応の産業利用に関して、将来的な応用が見こめるものである。現在ホタル発光反応は既に食品衛生のための微生物検出キットとして市販されており、またバイオ研究や医薬品開発において遺伝子の発現解析ツールとして応用されている。しかし現

状にはいくつか問題があり、その解決は応用範囲の更なる拡大につながる（図6-1）。本博士論文研究ではホタル発光反応に関する未解明の問題について取り組んだが、応用範囲拡大のための問題点解決に直結する課題であったと言える。

例えば第3章、第5章で行ったルシフェラーゼの酵素活性の生化学的な解析は、発光反応機構の詳細な理解を深めるものであり、将来的には微生物検出キットなどにおける定量性の確保につながる。ホタル発光系を用いた検査方法は簡便であるが、更にその信頼性が高められ、効率的な安全衛生の維持管理を可能にすると考えられる。

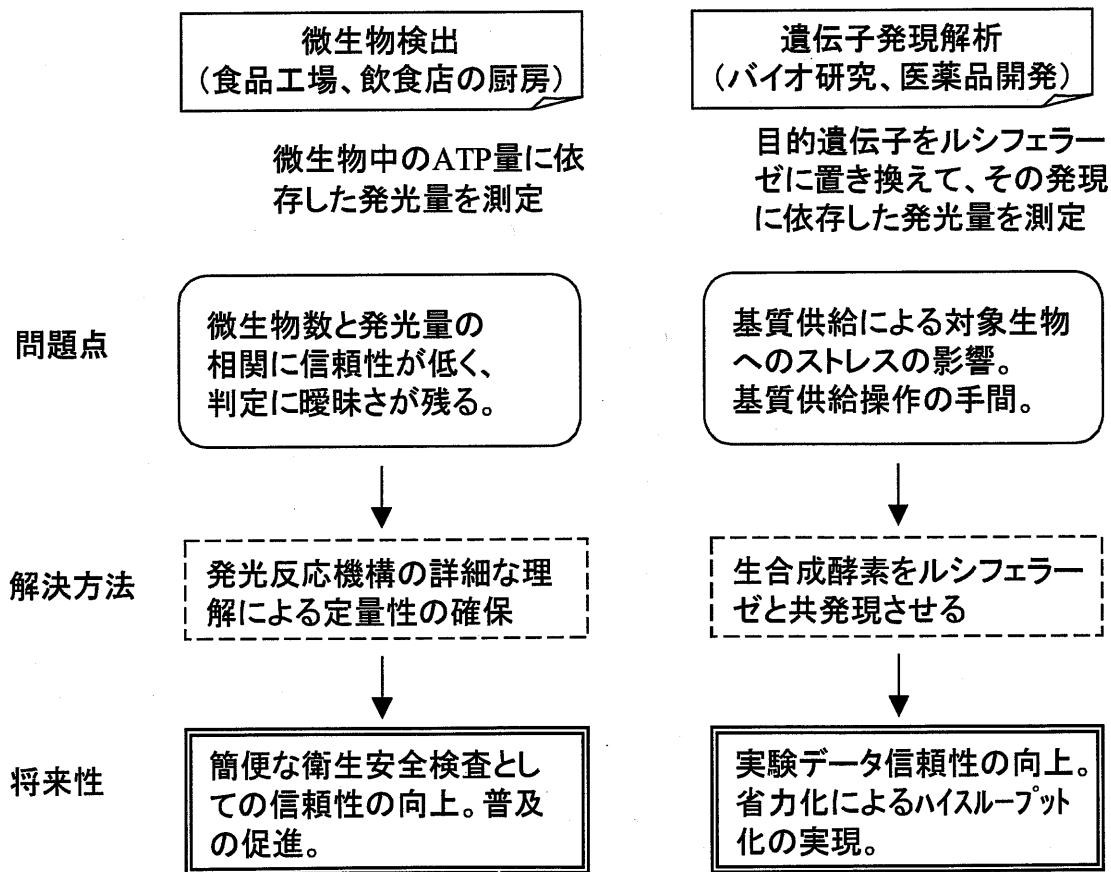


図6-1、ホタル発光反応の応用例の現状と将来性

現在、実際にホタル発光反応が応用されている微生物検出および遺伝子発現解析に関して、その基本原理、現状の問題点、その解決方法、将来性について。

また第2章、第4章で明らかにしたルシフェリンの生合成経路に関する知見は、生合成酵素を探索するための基礎的情報となる。将来的に生合成酵素が単離され、その遺伝子を細胞内でルシフェラーゼ遺伝子と共に発現させることができれば、基質ルシフェリンを外部から供給する必要がなくなる。また、酵素が発現している細胞でのみ基質を生産できる。

例えば生きたマウスを用いてルシフェラーゼアッセイによる遺伝子発現の観察を行う場合、現在では基質ルシフェリンを注射器で生体内に注入（主に腹腔注射）する必要がある（図6-2）。このような操作はそれ自体が、対象生物に対する負荷となりうるため、可能であれば避けるべきである。またルシフェラーゼを発現している細胞を探索するのが目的なので必然的に全ての細胞に基質が供給されなくてはならない。発光反応に必要な量をはるかに超える基質ルシフェリンを対象生物体に供給することの影響が心配される。逆に全ての細胞に均一に基質ルシフェリンが供給されることは期待できないと言った問題もある。更にコスト的にも無駄が多い。

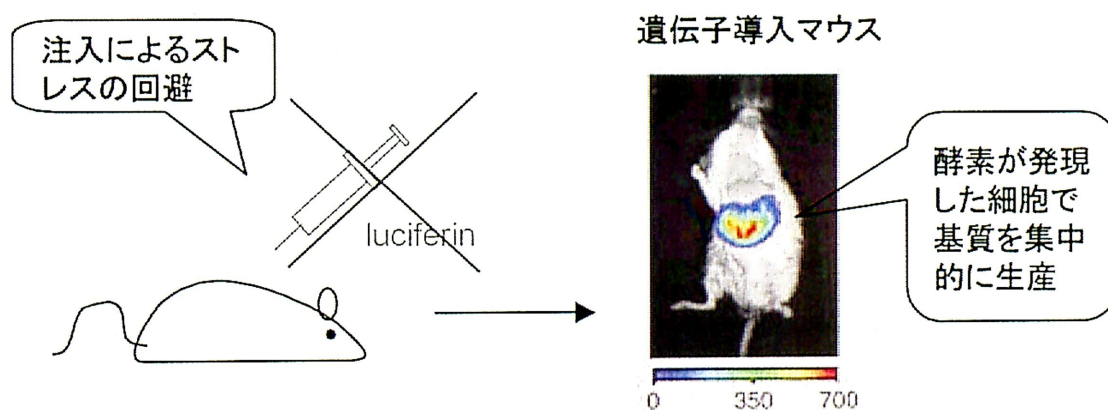


図6-2、生合成酵素の共発現系の応用例

生きたマウスでルシフェラーゼアッセイを行う場合、現在は主に腹腔注射により基質ルシフェリンを注入している。発光酵素ルシフェラーゼと共にルシフェリン生合成酵素を発現させることができると、基質注入の手間が省けるだけでなく、マウスに対するストレスが大幅に軽減される。また、酵素が発現している細胞でのみ基質を生産できるので、基質の過剰投与の影響を抑えることができる。

発光酵素ルシフェラーゼと基質生合成酵素の共発現系が実現できれば、これらの問題が大幅に改善されるであろう。操作が簡略化され、ハイスループットスクリーニングなどの大規模応用も簡便になると考えられる。

ルシフェラーゼの応用技術以外における活用も考えられる。第4章で述べたように、本学位論文で明らかになった D-LH₂ の生合成反応は、生合成材料であるシステインを定量分析する試薬としての応用も可能である。これに関しては実際に特許出願を行った。

その他、ルシフェラーゼを用いた遺伝子発現実験において定量的解析を可能にするためには、細胞内における発光反応の効率などを評価する必要がある。第5章に示したような反応機構の詳細な解析はその基礎的知見になると考えられる。

以上のように本学位論文で明らかになった実験結果、特に基質ルシフェリン生合成経路は、ホタル発光反応の応用において、基質供給の問題を改善するなど、多くの利用の可能性を提示するものである。

今井一洋 (1989) 生物発光と化学発光・基礎と実験、廣川書店

大場信義 (1993) ホタルの飼い方と観察、ハート出版

近江谷克裕 (2004) 生化学, **76**, 5-15.

神田左京 (復刻版 1981) ホタル、サイエンティスト社

後藤俊夫 (1975) 生物発光

羽根田弥太 (1985) 発光生物、恒星社厚生閣

R.L. Airth, W.C. Rhodes, W.D. McElroy (1958) **The function of coenzyme A in luminescence.** *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 519-532.

M.C. Alvarado, L.M. Zsigmond, I. Kovacs, A. Cseplo, C. Koncz, L.M. Szabados (2004) **Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes.** *Plant Physiol.*, **134**, 18-27.

Y.M. Bae, J.W. Hastings (1994) **Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*.** *Biochem. Biophys. Acta*, **1219**, 449-456.

S. Bhaumik, X.Z. Lewis, S.S. Gambhir (2004) **Optical imaging of *Renilla* luciferase, synthetic *Renilla* luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice.** *Journal of Biomedical Optics.*, **9**, 578-586.

B. Bitler, W.D. McElroy (1957) **The preparation and properties of crystalline firefly luciferin.** *Archs. Biochem. Biophys.*, **72**, 358-368.

D. Boehning, S.H. Snyder (2003) **Novel neural modulators.** *Annu Rev Neurosci.*, **26**, 105-131.

B.R. Branchini, R.A. Magyar, M.H. Murtiashaw, S.M. Anderson, M. Zimmer (1998) **Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site.** *Biochemistry*, **37**, 15311-15319.

B.R. Branchini, T.L. Southworth, M.H. Murtiashaw, R.A. Magyar, S.A. Gonzalez, M.C. Ruggiero, J.G. Stroh (2004) **An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase.** *Biochemistry*, **43**, 7255-7262.

B.R. Branchini, T.L. Southworth, N.F. Khattak, E. Michelini, A. Roda (2005) **Red- and green-emitting firefly luciferase mutants for bioluminescent reporter applications.** *Anal. Biochem.*, **345**, 140-148.

- H. Brückner, J. Justus, J. Kirschbaum (2003) **Saccharide induced racemization of amino acids in the course of the Maillard reaction.** *Amino Acids*, **24**, 43-55.
- M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, D.C. Prasher (1994) **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* **263**, 802-805.
- M. Chalfie (1995) **Green fluorescent protein.** *Photochem. Photobiol.* **62**, 651-656.
- P. Colepiccolo, D. Pagni, E.J.H. Bechara (1988) **Luciferin biosynthesis in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae).** *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**, 143-147.
- E. Conti, N.P. Franks, P. Brick (1996a) **Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes.** *Structure*, **4**, 287-298.
- E. Conti, T. Stachelhaus, M.A. Marahiel, P. Brick (1996b) **Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S.** *The EMBO Journal*, **16**, 4174-4183.
- J.C. Day, M.J. Bailey (2003) **Structure and evolution of the luciferin-regenerating enzyme (LRE) gene from the firefly *Photinus pyralis*.** *Insect Molecular Biology*, **12**, 365-372.
- J.C. Day, L.C. Tisi, M.J. Bailey (2004) **Evolution of beetle bioluminescence: the origin of beetle luciferin.** *Luminescence*, **19**, 8-20.
- M. DeLuca, M.E. Dempsey (1970) **Mechanism of oxidation in firefly luminescence.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 117-122.
- M. DeLuca (1976) **Firefly luciferase.** *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, **44**, 37-68.
- J.L. Denburg, R.T. Lee, W.D. McElroy (1969) **Substrate-binding properties of firefly luciferase.** *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 381-394.
- J.R. de Wet, K.V. Wood, D.R. Helinski, M. DeLuca (1985) **Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7870-7873.
- J.R. de Wet, K.V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helinski, S. Subramani (1987) **Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells.** *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 725-737.
- R. Dubois (1885) **Note sur las physiologie des pyrophores.** *C. R. Soc. Biol.* **2**, 559-562.
- R. Fontes, A. Dukhovich, A. Sillero, M.A.G. Sillero (1997) **Synthesis of**

- dehydroluciferin by firefly luciferase: effect of dehydroluciferin, coenzyme A and nucleoside triphosphates on the luminescent reaction.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **137**, 445-450.
- H. Fraga, J.C. Esteves da Silva, R. Fontes (2003) **pH opposite effects on synthesis of dinucleoside polyphosphates and on oxidation reactions catalyzed by firefly luciferase.** *FEBS Lett.* **543**, 37-41.
- H. Fraga, J.C. Esteves da Silva, R. Fontes (2004) **Identification of luciferyl adenylate and luciferyl coenzyme A synthesized by firefly luciferase.** *Chembiochem*, **5**, 110-115.
- H. Fraga, D. Fernandes, R. Fontes, J.C. Esteves da Silva (2005) **Coenzyme A affects firefly luciferase luminescence because it acts as a substrate and not as an allosteric effector.** *FEBS J.* **272**, 5206-5216.
- M. Friedman, M.R. Gumbmann (1984) **The utilization and safety of isomeric sulfur-containing amino acids in mice.** *J. Nutr.*, **114**, 2301-2310.
- M. Friedman (1999) **Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids.** *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3457-3479.
- N. Fujii (2002) **D-Amino acids in living higher organisms.** *Orig. Life Evol. Biosph.*, **32**, 103-127.
- K. Fujiwara, S. Takeuchi, K. Okamura-Ikeda, Y. Motokawa (2001) **Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver.** *J. Biol. Chem.*, **276**, 28819-28823.
- K. Gomi, N. Kajiyama (2001) **Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin.** *J. Biol. Chem.*, **276**, 36508-36513.
- S.J. Gould, G.-A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, S. Subramani (1989) **Conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes.** *J. Cell Biol.*, **108**, 1657-1664.
- A. Green, W.D. McElroy (1956) **Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin.** *Archs. Biochem. Biophys.*, **64**, 257-271.
- L.F. Greer III, A.A. Szalay (2002) **Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review.** *Luminescence*, **17**, 43-74.
- S.H. Haddock, T.J. Rivers, B.H. Robison (2001) **Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian**

- bioluminescence.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **98**, 11148-11151.
- K. Hamase, A. Morikawa, K. Zaitso (2002) **D-Amino acids in mammals and their diagnostic value.** *Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **781**, 73-91.
- T.A. Hopkins, H.H. Seliger, E.H. White, M.W. Cass (1967) **The chemiluminescence of firefly luciferin. A model for the bioluminescent reaction and identification of the product excited state.** *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 7148-7150.
- K. Hori, H. Charbounneau, R.C. Hart, M.J. Cormier (1977) **Structure of native *Renilla reniformis* luciferin.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 4285-4287.
- S. Inoue, H. Kakoi, M. Murata, T. Goto (1977) **Complete structure of *Renilla* luciferin and luciferyl sulfate.** *Tetrahedron Lett.*, **18**, 2685-2688.
- S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F.I. Tsuji (1985) **Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **82**, 3154-3158.
- F.H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L.C. Gershman, G.T. Reynolds, J.R. Waters (1962) **Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*.** *J. Cell. Comp. Physiol.*, **60**, 85-103.
- M. Kato, S. Nishino, M. Ohno, S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, I. Nakanishi, H. Takasugi, K. Sakane (1996) **New reagents for controlled release of nitric oxide. Structure-stability relationships.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 33-38.
- X.-C. Ke, M. Terashima, Y. Nariai, Y. Nakashima, T. Nabika, Y. Tanigawa (2001) **Nitric oxide regulates actin reorganization through cGMP and Ca²⁺/calmodulin in RAW 264.7 cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, **1539**, 101-1513.
- G.-A. Keller, S. Gould, M. DeLuca, S. Subramani (1987) **Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **84**, 3264-3268.
- Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura, F.H. Johnson (1966a) ***Cypridina* bioluminescence I structure of *Cypridina* luciferin.** *Tetrahedron Lett.*, **7**, 3427-3436.
- Y. Kishi, T. Goto, S. Eguchi, Y. Hirata, E. Watanabe, T. Aoyama (1966b) ***Cypridina* bioluminescence II structural studies of *Cypridina* luciferin means of a high resolution mass spectrometer and an amino acid analyzer.**

- Tetrahedron Lett.*, **7**, 3437-3444.
- Y. Kishi, T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura, H. Kishimoto (1966c) **Cypridina bioluminescence III total synthesis of *Cypridina* luciferin.** *Tetrahedron Lett.*, **7**, 3445-3450.
- N. Lemberg (1996) **Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light.** *Biochem. J.*, **317**, 273-277.
- W.W. Lorenz, R.O. McCann, M. Longiaru, M.J. Cormier (1991) **Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4438-4442.
- D.W.P.M. Löwik, L.C. Tisi, J.A.H. Murray, C.R. Lowe (2001) **Synthesis of 6-hydroxybenzothiazole-2-carboxylic acid.** *Synthesis*, **12**, 1780-1783.
- M.V. Matz, A.F. Fradkov, Y.A. Labas, A.P. Savitsky, A.G. Zaraisky, M.L. Markelov, S.A. Lukyanov (1999) **Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.** *Nat. Biotechnol.*, **17**, 969-973.
- J.J. May, N. Kessler, M.A. Marahiel, M.T. Stubbs (2002) **Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 12120-12125.
- F. McCapra, D.G. Richardson (1964a) **The mechanism of chemiluminescence: a new chemiluminescent reaction.** *Tetrahedron Lett.*, **5**, 3167-3172.
- F. McCapra, D.G. Richardson (1964b) **The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **52**, 75-81.
- F. McCapra, Y.C. Chang, V.P. Francois (1968a) **The chemiluminescence of a firefly luciferin analogue.** *J. C. S. Chem. Commun.*, 22-23.
- F. McCapra (1968b) **An application of the theory of electrocyclic reactions to bioluminescence.** *J. C. S. Chem. Commun.*, 155-156.
- F. McCapra, Z. Razavi (1976) **Biosynthesis of luciferin in *Pyrophorus pellucens*.** *J. C. S. Chem. Commun.*, 153-154.
- W.D. McElroy, H.H. Seliger (1962) **Mechanism of action of firefly luciferase.** *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **21**, 1006-1012.
- W.D. McElroy, M. DeLuca, J. Travis (1967) **Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared.** *Science*, **157**, 150-160.

- K. Min, J. Steghens (2001) **ADP is produced by firefly luciferase but its synthesis is independent of the light emitting properties.** *Biochimie*, **83**, 523-528.
- A. Miyawaki, T. Nagai, H. Mizuno (2005) **Engineering fluorescence proteins.** *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **95**, 1-15.
- H. Moini, L. Packer, N.-E.L. Saris (2002) **Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **182**, 84-90.
- Y. Nakajima, T. Kimura, C. Suzuki, Y. Ohmiya (2004) **Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of *Phrixothrix* railroad worms in mammalian cells.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 948-951.
- H. Nakamura, Y. Kishi, O. Shimomura, D. Morse, J.W. Hastings (1989) **Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products.** *J. Amer. Chem. Soc.*, **111**, 7607-7611.
- Y. Oba, S. Kato, M. Ojika, S. Inouye (2002) **Biosynthesis of luciferin in the sea firefly, *Cypridina hilgendorffii*: L-tryptophan is a component in *Cypridina* luciferin.** *Tetrahedron Lett.*, **43**, 2389-2392.
- Y. Oba, M. Ojika, S. Inouye (2003) **Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase.** *FEBS Lett.*, **540**, 251-254.
- Y. Oba, M. Sato, M. Ojika, S. Inouye (2005) **Enzymatic and genetic characterization of firefly luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl-CoA synthetase.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 819-828.
- N. Ohba, S.E. Kim, J.G. Kim (2001) **Flash patterns and morphology of the firefly, *Luciola lateralis* in Japan and Korea.** *Sci. Rept. Yokosuka City Mus.*, **48**, 91-116.
- N. Ohba (2004) **Flash communication systems of Japanese fireflies.** *Integr. Comp. Biol.*, **44**, 225-233.
- Y. Ohmiya (2005) **Basic and Applied Aspects of Color Tuning of Bioluminescence Systems.** *Japanese Journal of Applied Physics*, **44**, 6368-6379.
- H. Ohtsuka, N.G. Rudie, J.E. Wampler (1976) **Structural identification and synthesis of luciferin from the bioluminescent earthworm, *Diplocardia longa*.** *Biochemistry*, **15**, 1001-1004.
- K. Okada, H. Ito, I. Kubuta, T. Goto (1974) **Firefly bioluminescence III. Conversion of**

- oxyluciferin to luciferin in firefly. *Tetrahedron Lett.*, 15, 2771-2774.**
- K. Okada, H. Ito, T. Goto (1976) **Biosynthesis of firefly luciferin. Probable formation of benzothiazole from *p*-benzoquinone and cysteine. *J. C. S. Chem. Commun.*, 32.**
- P. Parvex, R. Rozen, A. Dziarmaga, P. Goodyer (2003) **Studies of urinary cystine precipitation in vitro: ontogeny of cystine nephrolithiasis and identification of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid as a potential therapy for cystinuria. *Mol. Genet. Metab.*, 80, 419-425.**
- D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, M.J. Courmier (1994) **Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-233.**
- D.C. Prasher (1995) **Using GFP to see the light. *Trends Genet.*, 11, 320-323.**
- M.M. Rauhut, D. Sheehan, R.A. Clark, A.M. Semsel (1965) *Photochem. Photobiol.*, 4, 1097.
- C. Reichel, R. Brugger, H. Bang, G. Geisslinger, K. Brune (1997) **Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen. *Mol. Pharmacol.*, 51, 576-582.**
- W.C. Rhodes, W.D. McElroy (1958) **The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferin-adenylate. *J. Biological Chemistry*, 233, 1528-1537.**
- A. Riemenschneider, R. Wegele, A. Schmidt, J. Papenbrock (2005) **Isolation and characterization of a D-cysteine desulfhydrase protein from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.*, 272, 1291-1304.**
- S. Rocha, K.J. Campbell, K.C. Roche, N.D. Perkins (2003) **The p53-inhibitor pifithrin- α inhibits firefly luciferase activity *in vivo* and *in vitro*. *BMC Mol. Biol.*, 4, 9-16.**
- M. Ryufuku, M. Fujimoto, H. Tanaka, Y. Ohmiya (2002) **Low amount of diethyldithiocarbamate enhances the light activity in beetle bioluminescence system in vitro. *ITE Lett.*, 3, 48-54.**
- J. Schröder (1989) **Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acid Research*, 17, 460.**
- D. Schwarzer, R. Finking, M.A. Marahiel (2003) **Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 275-287.**

- H.H. Seliger, W.D. McElroy (1959) **Quantum yield in the oxidation of firefly luciferin.** *Biochem. J. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 21-24.
- H.H. Seliger, W.D. McElroy (1960) **Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence.** *Archs. Biochem. Biophys.*, **88**, 136-141.
- H.H. Seliger, W.D. McElroy, E.H. White, G.F. Field (1961) **Stereospecificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **47**, 1192-1134.
- O. Shimomura, F.H. Johnson (1968) **Purification and properties of the luciferase and of a protein cofactor in the bioluminescence system of *Latia neritoides*.** *Biochemistry*, **7**, 2574-998.
- O. Shimomura, T. Masugi, F.H. Johnson, Y. Haneda (1978) **Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorus gracilorostris*.** *Biochemistry*, **17**, 994-998.
- O. Shimomura (1986) **Isolation and properties of various molecular forms of aequorin.** *Biochem. J.*, **234**, 85.
- O. Shimomura (2005) **The discovery of aequorin and green fluorescent protein.** *J. Microsc.*, **217**, 1-15.
- A. Sillero, M.A. Günter Sillero (2000) **Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases.** *Pharmacol. Ther.* **87**, 91-102.
- J. Soutourina, S. Blanquet, P. Plateau (2001) **Role of D-cysteine desulphydrase in the adaptation of *Escherichia coli* to D-cysteine.** *Biol. Chem.*, **276**, 40864-40872.
- P.E. Staswick, I. Tiryaki, M.L. Rowe. (2002) **Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation.** *Plant Cell*, **14**, 1405-1415.
- J.P. Steghens, K.L. Min, J.C. Bernengo (1998) **Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and CoA on the light-emission spectra.** *Biochem. J.*, **336**, 109-113.
- E.R. Stevens, M. Esguerra, P.M. Kim, E.A. Newman, S.H. Snyder, K.R. Zahs, R.F. Miller (2003) **D-Serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors.** *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 6789-6794.
- U. Stolz, S. Velez, K.V. Wood, M. Wood, J.L. Feder (2003) **Darwinian natural selection for orange bioluminescent color in a Jamaican click beetle.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 12120-12125.
- N. Suzuki, T. Goto (1971a) **Firefly bioluminescence II. Identification of 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2'-yl)-4-hydroxythiazole as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and as a product in the chemiluminescence of firefly luciferin in DMSO.** *Tetrahedron Lett.*, **12**, 2021-2024.
- N. Suzuki, T. Goto (1971b) **Studies on firefly bioluminescence—II: Identification of oxyluciferin as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and in the chemiluminescence of firefly luciferin.** *Tetrahedron*, **28**, 4065-4074.
- E.M. Thompson, S. Nagata, F.I. Tsuji (1989) **Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **86**, 6567-6571.
- G.S. Timmins, F.J. Robb, C.M. Wilmot, S.K. Jackson, H.M. Swartz (2001a) **Firefly flashing is controlled by gating oxygen to light-emitting cells.** *J. Exp. Biol.*, **204**, 2795-2801.
- G.S. Timmins, S.K. Jackson, H.M. Swartz (2001b) **The evolution of bioluminescent oxygen consumption as an ancient oxygen detoxification mechanism.** *J. Mol. Evol.*, **52**, 321-332.
- Y. Toya, M. Takagi, H. Nakata, N. Suzuki, M. Isobe, T. Goto (1992) **A convenient synthetic method of 2-cyano-6-methoxybenzothiazole, -a key intermediate for the synthesis of firefly luciferin.** *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 392-395.
- T. Toyooka, S. Uchida, Y. Saito, K. Imai (1988) **Simultaneous determination of thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Anal. Chimica. Acta*, **205**, 29-41.
- B.A. Trimmer, J.R. Aprille, D.M. Dudzinski, C.J. Lagace, S.M. Lewis, T. Michel, S. Qazi, R.M. Zayas (2001) **Nitric oxide and the control of firefly flashing.** *Science*, **292**, 2486-2488.
- R.Y. Tsien (1998) **The green fluorescent protein.** *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544.
- I. Ueda, A. Suzuki (1998) **Is there a specific receptor for anesthetics? Contrary effects**

- of alcohols and fatty acids on phase transition and bioluminescence of firefly luciferase. *Biophys. J.*, 75, 1052–1057.**
- V.R. Viviani (2002) **The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 59, 1833-1850.**
- K. Watanabe, H. Ohkubo, H. Niwa, N. Tanikawa, N. Koda, S. Ito, Y. Ohmiya (2003) **Essential ¹¹⁰Cys in active site of membrane-associated prostaglandin E synthase-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 577–581.**
- E.H. White, F. McCapra, G.F. Field, W.D. McElroy (1961) **The structure and synthesis of firefly luciferin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 2402-2403.**
- E.H. White, F. McCapra, G.F. Field (1963) **The structure and synthesis of firefly luciferin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 337-343.**
- E.H. White, M.G. Steinmetz, J.D. Miano, P.D. Wildes, R. Morland (1980) **Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J. Amer. Chem. Soc.*, 102, 3199-3208.**
- K.V. Wood, J.R. de Wet, N. Dewji, M. DeLuca (1984) **Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 124, 592-596.**
- C. Wu, H. Akimoto, Y. Ohmiya (2003) **Tracer studies on dinoflagellate luciferin with [¹⁵N]-glycine and [¹⁵N]-L-glutamic acid in the dinoflagellate *Phrocystis lunula*. *Tetrahedron Lett.*, 44, 1263-1266.**
- T. Yokoyama, N. Kan-no, T. Ogata, Y. Kotaki, M. Sato, E. Nagahisa (2003) **Presence of free D-amino acids in microalgae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 388-392.**
- T. Yoshimura (2004) **Function and metabolism of D-amino acids in eukaryotes. *Seikagaku*, 76, 378-381.**

本研究に関する業績一覧

<論文>

- (1) “Biosynthetic chirality conversion of firefly bioluminescence substrate” , 丹羽一樹, 中村光裕, 近江谷克裕, *投稿準備中* (関連する章 第2章)
- (2) “Construction of a new firefly bioluminescence system using L-luciferin as substrate” , 中村光裕, 丹羽一樹, 牧昌次郎, 平野誉, 近江谷克裕, 丹羽治樹, *Tetrahedron Lett.*, (2006) vol.47, pp.1197-1200. (関連する章 第4章)
- (3) “Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality” , 中村光裕, 牧昌次郎, 天野良治, 大来裕, 丹羽一樹, 平野誉, 近江谷克裕, 丹羽治樹, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2005) vol.331, pp.471-475. (関連する章 第3章)
- (4) “Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence” 丹羽一樹, 近江谷克裕, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2004) vol.323, pp.625-629. (関連する章 第5章)
- (5) “Preliminary aspects of firefly luciferin biosynthetic pathway based on its chiral analysis” , 丹羽一樹, 近江谷克裕, *Reports of Graduate School of Electronic Science and Technology Shizuoka Univ.*, (2004) vol.26, pp.63-66. (関連する章 第2章)

<口頭発表など>

- (1) [国際学会 招待講演] “Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence” 丹羽一樹, 近江谷克裕, *XXXIV Annual Meeting of SBBq, Sao Paulo, (Brazil)*, (2005.7) (関連する章 第5章)
- (2) [国内学会 ポスター発表] “Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence” , 丹羽一樹, 近江谷克裕, *第77回日本生化学会大会*, 横

浜, (2004. 10) (関連する章 第5章)

(3) [国内特許 出願] “天然型L-システインまたはその誘導体を用いたホタル発光基質の生合成システム及び本システムを含んだ発光基質溶液”, 近江谷克裕, 丹羽一樹, 丹羽治樹, 中村光裕, 龍福正行, 特願2004-379971, 2004. 12. 28 (関連する章 第4章)

(3) [国際特許 出願] “天然型L-システインまたはその誘導体を用いたホタル発光基質の生合成システム及び本システムを含んだ発光基質溶液”, 近江谷克裕, 丹羽一樹, 丹羽治樹, 中村光裕, 龍福正行, PCT/JP2005/ 23847, 2005. 12. 27 (関連する章 第4章)

謝辞

はじめに、静岡大学大学院電子科学研究科生体制御講座助教授（兼任：独立行政法人産業技術総合研究所関西センターセルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループグループリーダー）の近江谷克裕先生には、ホタルの生物発光という魅力的なテーマで研究する機会を与えて頂き、また細部にわたって適切な御指導を賜ったことに厚く御礼申し上げます。

大阪での研究を許可及び、御指導賜りました浜松医科大学医学部教授の福田敦夫先生に厚く御礼申し上げます。

ホタルルシフェリンの調製、HPLC分析、MSスペクトル解析などご指導ご協力を頂きました電気通信大学の中村光裕博士（現理化学研究所播磨研究所）に厚く御礼申し上げます。

ホタルの生態、飼育について貴重なアドバイスを頂きました横須賀市自然博物館学芸員大場信義博士に深く感謝いたします。

実験方法などで適切な助言を頂き、多くの指導を賜りました武蔵野大学の今井一洋教授、独立行政法人産業技術総合研究所関西センターの中島芳浩博士、呉純博士、小江克典博士、電気通信大学の牧昌二郎氏に厚く御礼申し上げます。

公私にわたり助言、援助を頂きました父、電気通信大学丹羽治樹教授に深く感謝いたします。

日々の研究に際し、手厚い御配慮並びにご協力を賜りました静岡大学大学院電子科学研究科大学院系の皆様、独立行政法人産業技術総合研究所セルダイナミクス研究グループの皆様、同研究所関係者の皆様、他関係各所の皆様に御礼申し上げます。

最後に、経済的、精神的に私を支えてくれた両親に深く感謝いたします。



Inhibitory effect of lipoic acid on firefly luciferase bioluminescence[☆]

Kazuki Niwa, Yoshihiro Ohmiya*

Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan

Graduate School of Electronic Science and Technology, Shizuoka University, Jyohoku, Hamamatsu, Shizuoka 432-8011, Japan

Received 10 August 2004

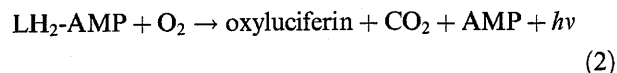
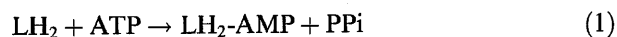
Abstract

Lipoic acid was found to inhibit the firefly luciferin–luciferase reaction. The inhibition is competitive and is the strongest known ($K_i = 0.026 \pm 0.013 \mu\text{M}$) compared with other reported inhibitors. Considering the structure–activity correlations, the mechanism of inhibition may originate from the sulfur atom and carboxyl moiety of lipoic acid giving it structural specificity. Subsequent addition of lipoic acid and nitric oxide accelerated the inhibition *in vitro*, suggesting that lipoic acid may have a functional role in regulating firefly bioluminescence.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

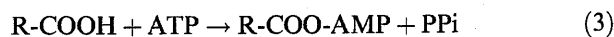
Keywords: Antioxidant; Bioluminescence; Firefly luciferase; Lipoic acid

Fireflies emit light via a bioluminescence reaction, which consists of two successive reaction steps: (I) the luciferin (LH_2) substrate is first converted to luciferyl adenylate ($\text{LH}_2\text{-AMP}$) in the presence of ATP, Mg^{2+} , and firefly luciferase (FFL, EC 1.13.12.7) (reaction 1); and (II) luciferyl adenylate is then oxidized with molecular oxygen to yield light emitting oxyluciferin, CO_2 , adenylate monophosphate (AMP), and FFL (reaction 2) [1,2]:

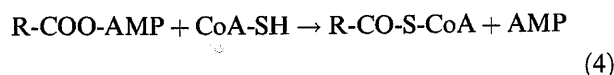


This luciferin–luciferase reaction is affected by many non-substrate cofactors. For example, coenzyme A

(CoA-SH) and dithiothreitol (DTT) activate the reaction, whereas many compounds such as fatty acids [3], pifithrin- α [4], and some luciferin analogues [5] inhibit it. The cofactor-dependent mechanisms of FFL are related to the fact that FFL is homologous to acyl-CoA synthetases [2,6]. The first step (reaction 3) of acyl-CoA synthetase is identical to the adenylation step of FFL (reaction 1)



The second step of acyl-CoA synthetase is CoA-ligation yielding an acyl-CoA thioester (reaction 4)



Here, the CoA-ligation (reaction 4) can be considered to substitute for the second step in the bioluminescence reaction (reaction 2). However, FFL also has CoA-ligase activity [1,7–9]. FFL produces fatty acid-CoA and dehydroluciferyl-CoA from corresponding fatty acids and dehydroluciferin that strongly inhibit the luciferin–luciferase reaction [3,5]. This bifunctional feature

[☆] Abbreviations: CoA-SH, coenzyme A; FFL, firefly luciferase; K_i , inhibition constant; L, dehydroluciferin; LH_2 , D-luciferin; LAE, lipoate-activating enzyme; lipoic acid, 6,8-thioctic acid; NO, nitric oxide.

* Corresponding author. Fax: +81 72 751 9628.

E-mail address: y-ohmiya@aist.go.jp (Y. Ohmiya).

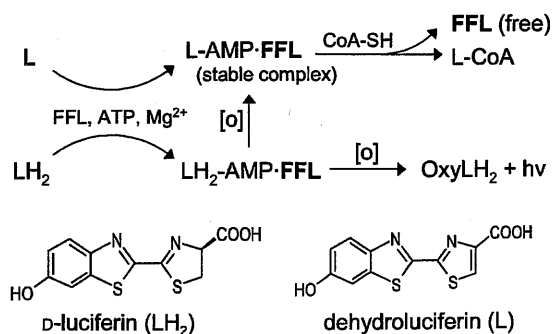


Fig. 1. Dehydroluciferyl-CoA synthesis catalyzed by firefly luciferase (FFL) helps regenerate free FFL. The intermediate complex L-AMP-FFL is inactive and accumulates in the absence of CoA-SH, resulting in the suppression of luminescence.

of FFL is important in explaining the mechanism by which CoA-SH enhances the bioluminescence reaction (Fig. 1) [6]. CoA-SH regenerates FFL by removing inhibitors such as dehydroluciferin (L) by forming dehydroluciferyl-CoA (L-CoA) from the inactive L-AMP · FFL complex [1,6].

Many reductant chemicals such as DTT enhance the bioluminescence reaction *in vitro* because of their reductant activity at the sulfhydryl group [10], although the activation mechanism is not clear. These reductants are artificial and do not exist in living cells. It is reported that dihydrolipoic acid is one of the strongest endogenous reductants, and lipoic acid is the oxidized form of this acid [11]. Lipoic acid is a free radical scavenger and a core prosthetic element of some oxidoreductases [11,12]. We have previously reported that dihydrolipoic acid substitutes for DTT in enhancing the enzymatic activity of membrane-associated prostaglandin E synthase-2 [13]. Therefore, we predicted that dihydrolipoic acid should also function as a reductant to enhance firefly bioluminescence, but it did not. Furthermore, to our surprise, lipoic acid acted as an inhibitor of this reaction even at low concentrations. Because lipoic acid is used as a substrate by some FFL-homologous adenylyating enzymes, such as lipoate-activating enzymes (LAE) [12], it may act as a substrate or competitive inhibitor of FFL, as do long-chain fatty acids [3]. Here, we report the effects of lipoic acid upon the *in vitro* bioluminescence reaction.

Materials and methods

Materials. Crystallized chromatographic-grade firefly (*Photinus pyralis*) luciferase used in this research was from Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals were obtained from commercial sources: DTT, ascorbic acid, cysteamine, deoxycholic acid, pifithrin- α , lipoic acid, dihydrolipoic acid, and myristic acid from Sigma; ATP, CoA-SH, glycerol, methanol, disodium phosphate, sodium dihydrogen phos-

phate, dimethyl sulfoxide (DMSO), HCl, NaOH, Tris, L-cysteine, L-cystine, glutathione, L-glutamic acid, L-threonine, and 6-aminohexanoic acid from Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan; L-arginine, L-methionine, L-serine, and glycine from Nacalai Tesque, Kyoto, Japan; and luciferin potassium salt and (\pm)-(*E*)-4-methyl-2-[(*E*)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR1) [14,15] from Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan.

Preparation of solutions. Stock solutions were prepared as follows: luciferin solution (4 mM) in 10 mM phosphate-buffered saline (pH 7.0); NOR1 solution (10 mM) in DMSO; lipoic acid solution (0.4 M) in 0.4 N NaOH; myristic acid solutions (0.1 M) in methanol; and other solutions in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The solutions were diluted to appropriate concentrations using 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Luciferase stock solution (1.0 μ g/ml) was dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 10% glycerol.

Dose-response and structure-activity correlation analysis of the bioluminescence reaction. Luminescence activity was measured using an AB-2200 luminometer (ATTO, Tokyo, Japan). An aliquot (50 μ l) of the reaction mixtures (40 μ M luciferin, 0.1 ng/ μ l luciferase, and appropriate additives in 0.1 M Tris-HCl buffer [pH 8.0]) was placed in the luminometer, and the reaction was started automatically with an injection of 50 μ l ATP-Mg²⁺ solution (4 mM ATP, 8 mM MgSO₄ in 0.1 M Tris-HCl buffer [pH 8.0]). Relative light intensity was integrated for 20 s and the measurement was duplicated for each set of conditions.

Kinetic analysis. Reaction mixtures (50 μ l) contained luciferin (2–20 μ M), lipoic acid (0–0.01 μ M), and luciferase (0.1 ng/ μ l) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) buffer. The reactions and measurements were performed as described. The value of the inhibition constant (K_i) was calculated from Lineweaver-Burk plots constructed by the standard method, where the V_0 value of the reaction was defined as the relative light intensity integrated for 20 s. The plots were fitted to a line approximated by the least squares method. All analyses were performed in triplicate.

Effects of cofactors added during the bioluminescence reaction. An aliquot (100 μ l) of the reaction mixture (0.4 mM luciferin and 0.1 ng/ μ l luciferase in 0.1 M Tris-HCl buffer [pH 8.0]) with or without 0.6 mM CoA-SH was mixed to start the reaction in the luminometer by automatic injection of 100 μ l ATP-Mg²⁺ solution (as in Dose-response and structure-activity correlation analysis of the bioluminescence reaction). Aliquots (10 μ l) of lipoic acid (50 μ M), myristic acid (100 μ M), CoA-SH (10 mM), DTT (0.3 M), and/or NOR1 (10 mM) were manually injected into the reaction tube inside the luminometer.

Results and discussion

Bioluminescence is enhanced by DTT and diethylthiocarbamic acid [10], whereas it is inhibited by pifithrin- α [4], deoxycholic acid [16], and long-chain fatty acids [3] (Fig. 2). The bifunctional feature of FFL, combining acyl-CoA synthesis and bioluminescence activities, can explain the effects of some reagents, but not those of DTT. We studied the effect of an endogenous reductant, dihydrolipoic acid, and its oxidized form, lipoic acid, on FFL bioluminescence to answer two questions. First, because dihydrolipoic acid is a reducing reagent, can it enhance the bioluminescence reaction in the same way as DTT? Second, because LAE is homologous to FFL, can lipoic acid (a substrate of LAE) substitute for luciferin (a substrate of FFL) in the bioluminescence reaction? We found that lipoic acid

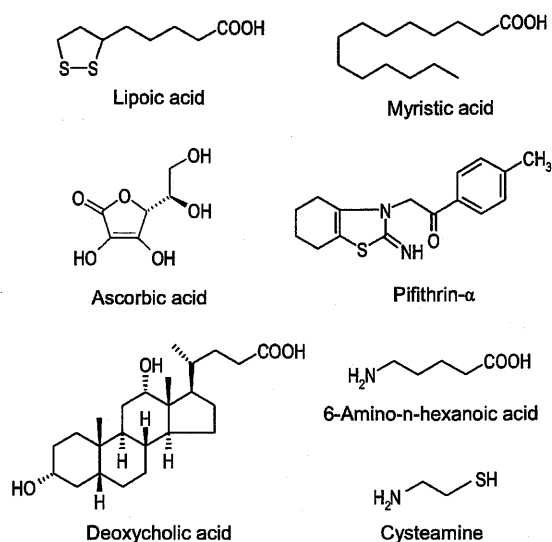


Fig. 2. Chemical structures of lipoic acid and other additives used in this report.

exhibited a strong inhibitory effect even at low concentrations and dihydrolipoic acid showed less inhibitory effect, contrary to our first assumption that dihydrolipoic acid may act as a reductant to enhance the bioluminescence reaction.

The IC_{50} value (an index of inhibition) for myristic acid has been reported as $0.53 \mu\text{M}$ [3]. Pfifithrin- α and deoxycholic acid have been reported to inhibit the bioluminescence reaction completely at $20 \mu\text{M}$ [4] and 1mM [16], respectively. Fig. 3 shows the dose–response curves of inhibitory compounds on the bioluminescence reaction. Lipoic acid was a stronger inhibitor ($IC_{50} = 0.05 \mu\text{M}$) than all other reported inhibitors. The apparent IC_{50} of dihydrolipoic acid (10^{-5}M) was approximately one hundred times greater than that of lipoic acid, but

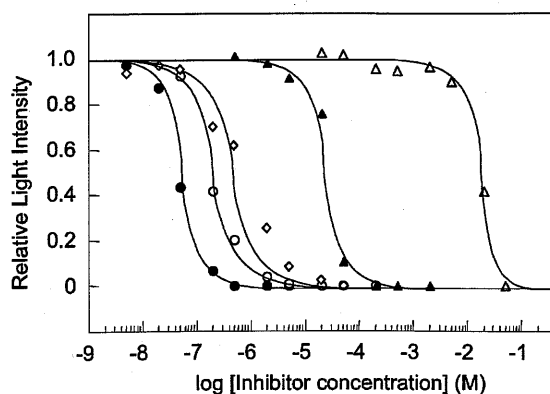


Fig. 3. Dose–response analysis of inhibitors of the firefly bioluminescence reaction. Closed circle, lipoic acid; open circle, pfifithrin- α ; open square, myristic acid; closed triangle, deoxycholic acid; and open triangle, ascorbic acid. Relative light intensity was measured relative to the control reaction with no inhibitor.

the exact value could not be determined. Lipoic acid and dihydrolipoic acid are equilibrated with one another as a reductant couple with a low redox potential (-0.32V) [11], so dihydrolipoic acid is easily oxidized and produces lipoic acid under standard biological conditions. This contaminating lipoic acid in dihydrolipoic acid solutions could be partly responsible for the observed inhibition.

Lipoic acid is an amphiphilic and antioxidative substance [11]. Amphiphilic deoxycholic acid [16] and antioxidative ascorbic acid slightly inhibit the bioluminescence reaction. Lipoic acid inhibited far more strongly than these compounds (Fig. 3), suggesting that the inhibitory mechanism is not due to amphiphilicity or antioxidation. Summaries of structure–activity correlation analysis are as follows: (1) Glutathione, methionine, cysteine, and cystine inhibited slightly ($IC_{50} = 5\text{--}25 \text{mM}$) (Table 1). (2) 6-Aminohexanoic acid, serine, threonine, arginine, glycine, and glutamic acid have no effects even at high concentrations, such as 50mM . (3) Cysteamine enhanced the bioluminescence reaction at a concentration of 10mM (Table 1). (4) Fatty acids smaller than C_{10} have been reported to inhibit less strongly than long-chain fatty acids [3]. Considering the effective concentration of these additives, the inhibitory activity of lipoic acid could originate not only from its sulfur atom and carboxyl moiety but also from its structural specificity.

Examining the inhibitory kinetics in more detail, the Lineweaver–Burk plot shows that lipoic acid competitively inhibits LH_2 (the K_i of lipoic acid is $0.026 \pm 0.013 \mu\text{M}$) (Fig. 4). The inhibition of lipoic acid is approximately 10-fold stronger than myristic acid ($K_i = 0.68 \mu\text{M}$) [3] or luciferin analogues ($K_i = 0.1\text{--}58 \mu\text{M}$) [5]. These analogues are artificial chemicals and the strongest competitive inhibitors ever reported. Nevertheless, lipoic acid is an endogenous compound, has only a few structural similarities to LH_2 , and is the strongest known inhibitor.

Table 1
Effects of substances added to the bioluminescence reaction mixture

Additives	Concentration
<i>Inhibitor</i>	
Lipoic acid	$0.05 \mu\text{M}$
L-Cystine	5mM
L-Cysteine	10mM
L-Methionine	20mM
Glutathione	10mM
<i>Enhancer</i>	
Cysteamine	10mM
DTT	30mM

Concentrations given for inhibitors indicate IC_{50} values. For enhancers, the concentrations are listed that raise the bioluminescence reaction more than twice the light intensity obtained without any additives.

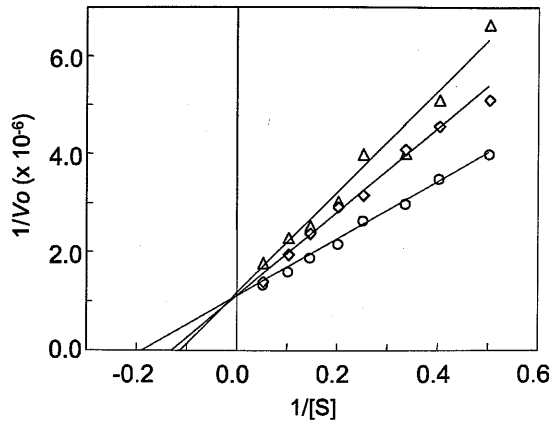


Fig. 4. A Lineweaver–Burk plot showing competitive inhibition by lipoic acid. V_0 is defined as the light intensity over the initial 20 s and $[S]$ is the substrate luciferin concentration (micromolar). The concentrations of lipoic acid used here were 0.09 μM (triangle) and 0.06 μM (square). Open circle indicates negative controls with no lipoic acid.

Dehydroluciferin, which is one of the luciferin analogues and a strong competitive inhibitor of the bioluminescence reaction ($K_i = 0.1 \mu\text{M}$) [5], can react with CoA-SH, resulting in the regeneration of active FFL (Fig. 1) [6–8]. Myristic acid is also a competitive inhibitor of LH₂ on FFL [3] and is converted to myristyl-CoA by FFL [9]. We therefore analyzed the effects of CoA-SH in the presence of lipoic acid or myristic acid (Fig. 5). CoA-SH did not reverse the inhibitory effects of lipoic acid (Fig. 5B), although it did reverse the effects of myristic acid (Fig. 5A). If lipoic acid were to be adenylated and turned into the inactive complex, which inhibits the bioluminescence reaction, CoA-SH should enhance the bioluminescence reaction through the reactivation of FFL. These results indicate that lipoic acid is not transferred to lipoyl-CoA. However, mammalian cell lysate released the lipoic acid inhibition of L–L reaction, meaning that the lysate contains something to release the inhibition.

Recently, firefly bioluminescence has gained remarkable attention due to its application in highly sensitive cell-based gene expression analyses [2]. Luciferase activ-

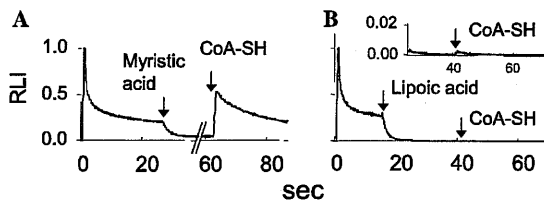


Fig. 5. Effect of CoA-SH on the bioluminescence reaction. Injection of CoA-SH enhanced the luminescence when the reaction was inhibited by myristic acid (A), but did not when inhibited by lipoic acid (B), except for the basal shock attributable to contaminated dehydroluciferin inhibition. Relative light intensity (RLI) luminescence was measured during the reaction.

ity of mammalian cell lysates expressing recombinant FFL was not inhibited by up to 5.0- μM lipoic acid (data not shown), whereas purified FFL was inhibited. The lipoic acid level was not enough to inhibit the bioluminescence reaction in these situations.

These results indicate that lipoic acid regulates the firefly luciferase activity, even in the presence of CoA-SH that release the inhibition by long-chain fatty acids. Trimmer et al. reported that nitric oxide activates the bioluminescence of living fireflies and acts as a neurotransmitter to control the flashing of the light [17]. However, the role of nitric oxide in the bioluminescence reaction is not clear. In addition, the role of antioxidant DTT is not yet clarified. Here, we explored the effects of lipoic acid on the *in vitro* bioluminescence reaction in the presence or absence of nitric oxide, and with the addition of some additives such as CoA-SH or DTT. Because it is difficult to add nitric oxide gas to the reaction mixture inside the luminometer, the nitric oxide generator, NOR1, was injected. NOR1 releases nitric oxide with its short half-life of 2.6 min [14,15]. Nitric oxide enhanced the bioluminescence reaction *in vitro* and lipoic acid inhibited it, even after the addition of nitric oxide (Fig. 6C). In the presence of CoA-SH, nitric oxide further accelerated the inhibition by lipoic acid (Fig. 6A). Similar results were observed for DTT (Figs. 6B and D). Final concentrations of DTT and NOR1 in the reaction mixture were 15 and 0.5 mM, respectively, indicating that nitric oxide acts more effectively than DTT. Lipoic acid could inhibit the bioluminescence reaction even in the presence of CoA-SH, suggesting that lipoic acid with nitric oxide might have some functional role in the *in vivo* bioluminescence reaction to regulate firefly lighting.

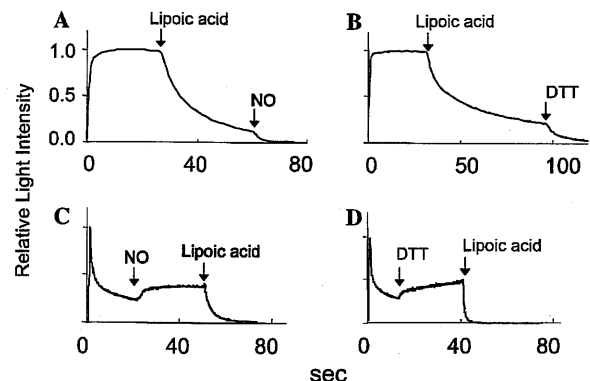


Fig. 6. Effects of the addition of lipoic acid, DTT, and/or NO during the bioluminescence reaction. After lipoic acid inhibition, NO (A) or DTT (B) was injected into the reaction mixture in the presence of 0.3 mM CoA-SH. In the absence of CoA-SH, both NO (C) and DTT (D) enhanced the luminescence; subsequent injection of lipoic acid inhibited the reaction. NO was introduced by injecting the NO generator, NOR1.

Luciferase inside the lantern cells of the firefly is localized around peroxisomes because of the peroxisomal targeting tripeptide sequence, SKL, at its C-terminus [18], whereas it remains unclear how lipoic acid is localized and functions during the bioluminescence reaction in firefly lantern cells. Further studies are in progress to understand this aspect.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. M. Nakamura for technical advice and discussion, and Dr. B. Venkatesh and Dr. V. Viviani for discussion and assistance in correcting the manuscript. This study was supported in part by a NEDO grant (Dynamic Biology Project) from the Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan.

References

- [1] M. DeLuca, Firefly luciferase, *Adv. Enzymol.* 44 (1976) 37–68.
- [2] K.V. Wood, The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 662–673.
- [3] I. Ueda, A. Suzuki, Is there a specific receptor for anesthetics? Contrary effects of alcohols and fatty acids on phase transition and bioluminescence of firefly luciferase, *Biophys. J.* 75 (1998) 1052–1057.
- [4] S. Rocha, K.J. Campbell, K.C. Roche, N.D. Perkins, The p53-inhibitor pifithrin- α inhibits firefly luciferase activity in vivo and in vitro, *BMC Mol. Biol.* 4 (2003) 9–16.
- [5] J.L. Denburg, R.T. Lee, W.D. McElroy, Substrate-binding properties of firefly luciferase, *Arch. Biochem. Biophys.* 134 (1969) 381–394.
- [6] A. Sillero, M.A. Günther Sillero, Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 91–102.
- [7] R.L. Airth, W.C. Rhodes, W.D. McElroy, The function of coenzyme A in luminescence, *Biochim. Biophys. Acta* 27 (1958) 519–532.
- [8] R. Fontes, B. Ortiz, A. de Diego, A. Sillero, M.A. Günther Sillero, Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap₄A catalyzed by firefly luciferase, *FEBS Lett.* 438 (1998) 190–194.
- [9] Y. Oba, M. Ojika, S. Inouye, Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase, *FEBS Lett.* 540 (2003) 251–254.
- [10] M. Ryufuku, M. Fujimoto, H. Tanaka, Y. Ohmiya, Low amount of diethyldithiocarbamate enhances the light activity in beetle bioluminescence system in vitro, *ITE Lett.* 3 (2002) 48–54.
- [11] H. Moini, L. Packer, N.-E.L. Saris, Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182 (2002) 84–90.
- [12] K. Fujiwara, S. Takeuchi, K. Okamura-Ikeda, Y. Motokawa, Purification, characterization, and cDNA cloning of lipoate-activating enzyme from bovine liver, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28819–28823.
- [13] K. Watanabe, H. Ohkubo, H. Niwa, N. Tanikawa, N. Koda, S. Ito, Y. Ohmiya, Essential ¹¹⁰Cys in active site of membrane-associated prostaglandin E synthase-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306 (2003) 577–581.
- [14] M. Kato, S. Nishino, M. Ohno, S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, I. Nakanishi, H. Takasugi, K. Sakane, New reagents for controlled release of nitric oxide. Structure–stability relationships, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6 (1996) 33–38.
- [15] X.-C. Ke, M. Terashima, Y. Nariai, Y. Nakashima, T. Nabika, Y. Tanigawa, Nitric oxide regulates actin reorganization through cGMP and Ca²⁺/calmodulin in RAW 264.7 cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1539 (2001) 101–113.
- [16] L.J. Kricka, M. DeLuca, Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase, *Arch. Biochem. Biophys.* 217 (1982) 674–681.
- [17] B.A. Trimmer, J.R. Aprille, D.M. Dudzinski, C.J. Lagace, S.M. Lewis, T. Michel, S. Qazi, R.M. Zayas, Nitric oxide and the control of firefly flashing, *Science* 292 (2001) 2486–2488.
- [18] S.J. Gould, G.A. Keller, N. Hosken, J. Wilkinson, S. Subramani, A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes, *J. Cell Biol.* 108 (1989) 1657–1664.



Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality [☆]

Mitsuhiro Nakamura ^{a,b,1}, Shojiro Maki ^a, Yoshiharu Amano ^a, Yutaka Ohkita ^a, Kazuki Niwa ^b, Takashi Hirano ^a, Yoshihiro Ohmiya ^b, Haruki Niwa ^{a,*}

^a Department of Applied Physics and Chemistry, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan

^b Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka 563-8577, Japan

Received 25 March 2005

Available online 6 April 2005

Abstract

Firefly luciferase is able to convert L-luciferin into luciferyl-CoA even under ordinary aerobic luciferin–luciferase reaction conditions. The luciferase is able to recognize strictly the chirality of the luciferin structure, serving as the acyl-CoA synthetase for L-luciferin, whereas D-luciferin is used for the bioluminescence reaction. D-Luciferin inhibits the luciferyl-CoA synthetase activity of L-luciferin, whereas L-luciferin retards the bioluminescence reaction of D-luciferin, meaning that both enzyme activities are prevented by the enantiomer of its own substrate.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chiral recognition; CoA-ligase; Enantioselective; Firefly luciferase; L-Luciferin; D-Luciferin

The firefly is quite famous for its brilliant bioluminescence, whose biochemical mechanism is explained by the so-called luciferin–luciferase reaction [1,2]. Firefly D-luciferin is first converted to luciferyl adenylate in the presence of ATP, Mg²⁺, and firefly luciferase (EC 1.13.12.7). The luciferyl adenylate is then oxidized by firefly luciferase using molecular oxygen, yielding yellow-green light ($\lambda_{\text{max}} = 550\text{--}570$ nm) with the formation of oxyluciferin, CO₂, and AMP (Fig. 1).

Firefly D-luciferin is the specific substrate for the luciferin–luciferase reaction. L-Luciferin, the enantiomer of D-luciferin, is not used for the light-producing reac-

tion [3–7], but behaves as a competitive inhibitor for the bioluminescence reaction of D-luciferin [5,8]. However, Lembert [9] reported light production from L-luciferin in the presence of luciferase.

On the other hand, firefly luciferase catalyses the adenylation of dehydroluciferin in vitro, and dehydroluciferyl adenylate is converted into dehydroluciferyl-coenzyme A (CoA) by luciferase (Fig. 1, below) [10–12]. Long-chain fatty acids are also converted into fatty acyl-CoA by the firefly luciferase [13].

Based on these previous reports, the question occurs as to how CoA-SH affects the L-luciferin under ordinary luciferin–luciferase reaction conditions. We now report that the firefly luciferase has two distinct activities for each luciferin enantiomer: (i) CoA-SH ligase activity for L-luciferin and (ii) bioluminescence activity for D-luciferin.

Materials and methods

Materials. CoA-SH and firefly luciferase (from *Photinus pyralis*) were purchased from Sigma. ATP was purchased from Tokyo Kasei

[☆] **Abbreviations:** ATP, adenosine triphosphate; AMP, adenosine monophosphate; CoA-SH, coenzyme A; HPLC, high-performance liquid chromatography; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; RP, reverse phase; ODS, octadecyl silyl.

* Corresponding author. Fax: +81 424 86 1966.

E-mail address: niwa@pc.uec.ac.jp (H. Niwa).

¹ Present address: RIKEN Harima Institute/SPring-8, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan.

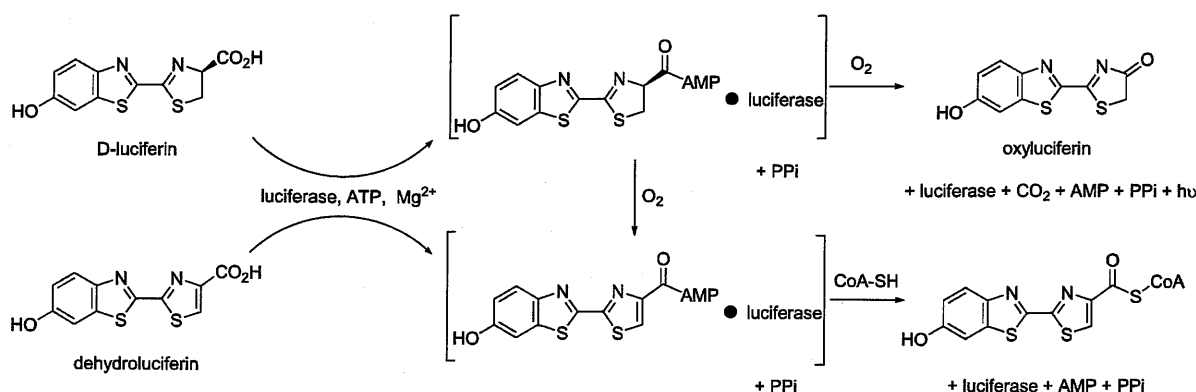


Fig. 1. Scheme for firefly bioluminescence (above) and dehydroluciferyl-CoA synthesis (below) by firefly luciferase.

(Tokyo, Japan). Firefly D- and L-luciferins were prepared from 2-cyano-6-methoxybenzothiazole as previously described [14]. The reagent buffer, consisting of 50 mM Hepes containing 20 mM KCl, was adjusted to pH 7.6 with KOH.

HPLC analysis. Analytical RP-HPLC was conducted on a JASCO 1500 system (JASCO, Tokyo, Japan) with a chiral ODS column Chiralcel OD-RH (4.6 × 150 mm, Daicel Chemical Industries, Osaka, Japan). The compounds were eluted with a linear gradient of 2% acetonitrile containing 0.1% TFA increase/min (from 10% to 70%) at a flow rate of 0.8 ml/min and detected by measuring absorbance ($\lambda = 254$ nm) and fluorescence (excitation $\lambda = 400$ nm, emission $\lambda = 500$ nm). Elution times of luciferyl-CoA, D-luciferin, and L-luciferin were 13.0, 18.1, and 19.0 min, respectively.

MALDI-TOF-MS measurements. The mass spectra were acquired using a Voyager Elite MALDI-TOF-MS (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with a delayed extraction source and 337 nm pulsed nitrogen laser. The accelerating voltage in the ion source was set to 20 kV. For the matrix, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) was dissolved in a 50% acetonitrile solution containing 0.1% TFA at 10 mg/ml. The mixture (50 μ l) of ATP (2 mM) and MgSO₄ (10 mM) in 50 mM Hepes buffer was added to the mixture (50 μ l) containing D-luciferin (2 μ M) or L-luciferin (2 μ M), CoA-SH (1 mM), and luciferase (20 μ g/ml) in 50 mM Hepes buffer. After 15 min, 0.5 μ l of the reaction mixture was picked up, mixed with 1 μ l of the matrix solution on the sample plate, and then air-dried.

Kinetic analysis. The reaction mixture (100 μ l) contained L-luciferin (0.1–100 μ M), ATP (1 mM), CoA-SH (500 μ M), MgSO₄ (5 mM), and luciferase (10 μ g/ml) in 50 mM Hepes buffer. The reaction was started by adding ATP and MgSO₄, and then incubated at 25 °C for 15 min. The products were measured by RP-HPLC as described in the HPLC analysis section. The K_m and V_{max} values for L-luciferin were determined at concentrations from 10 to 100 μ M of L-luciferin by the standard method for Lineweaver–Burk plots.

Luminescence assay. The reaction mixture (100 μ l) contained D-luciferin (1 μ M), L-luciferin (1 μ M), ATP (1 mM), CoA-SH (various concentrations), MgSO₄ (5 mM), and luciferase (10 μ g/ml) in 50 mM Hepes buffer. The reaction was started by adding ATP and MgSO₄, and incubated at 25 °C. The photons were counted by a Luminescence-JNR II AB-2300 luminometer (Atto, Tokyo, Japan).

Results and discussion

Firefly L- and D-luciferins were synthesized as described in a previous paper [14]. Their structures and

purities were confirmed by NMR spectroscopy and RP-HPLC using a chiral column.

Even under ordinary bioluminescence reaction conditions in the presence of CoA-SH, L-luciferin was ligated with CoA-SH by the firefly luciferase to yield luciferyl-CoA, which was identified by MALDI-TOF-MS (Fig. 2). On the other hand, when D-luciferin was used for the bioluminescence reaction instead of L-luciferin, the formation of dehydroluciferyl-CoA was observed without any formation of luciferyl-CoA (Fig. 2). This result does not conflict with those of the previous studies, in which dehydroluciferin was found as a by-product of the luciferin–luciferase reaction [10,15]. The presence of CoA-SH in the bioluminescence reaction mixtures resulted in the rapid removal of dehydroluciferyl-AMP as the competitive inhibitor of the light-producing reaction by conversion into dehydroluciferyl-CoA with the luciferase (Fig. 1, below) [1,2,11,12,16,17].

The formation of luciferyl-CoA from L-luciferin by the firefly luciferase could be observed on RP-HPLC using a chiral column (Fig. 3). With time, L-luciferin

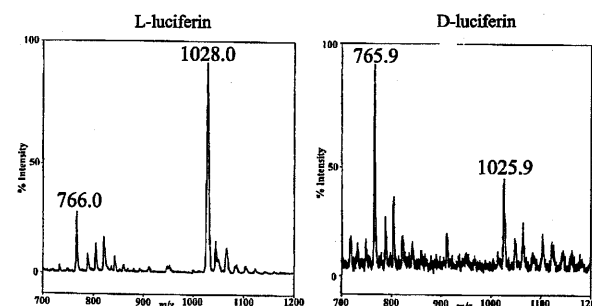


Fig. 2. MALDI-TOF-MS spectra of the reaction mixture of CoA ligation in the negative mode. The reaction mixture (100 μ l) contained L-luciferin (1 μ M) or D-luciferin (1 μ M), ATP (1 mM), CoA-SH (500 μ M), MgSO₄ (5 mM), and luciferase (10 μ g/ml) in 50 mM Hepes buffer. The reaction was started by adding ATP and MgSO₄, and then incubated at 25 °C for 15 min. Calculated $[M-H]^-$ of CoA-SH, dehydroluciferyl-CoA, and luciferyl-CoA were 766.12, 1026.09, and 1028.1, respectively.

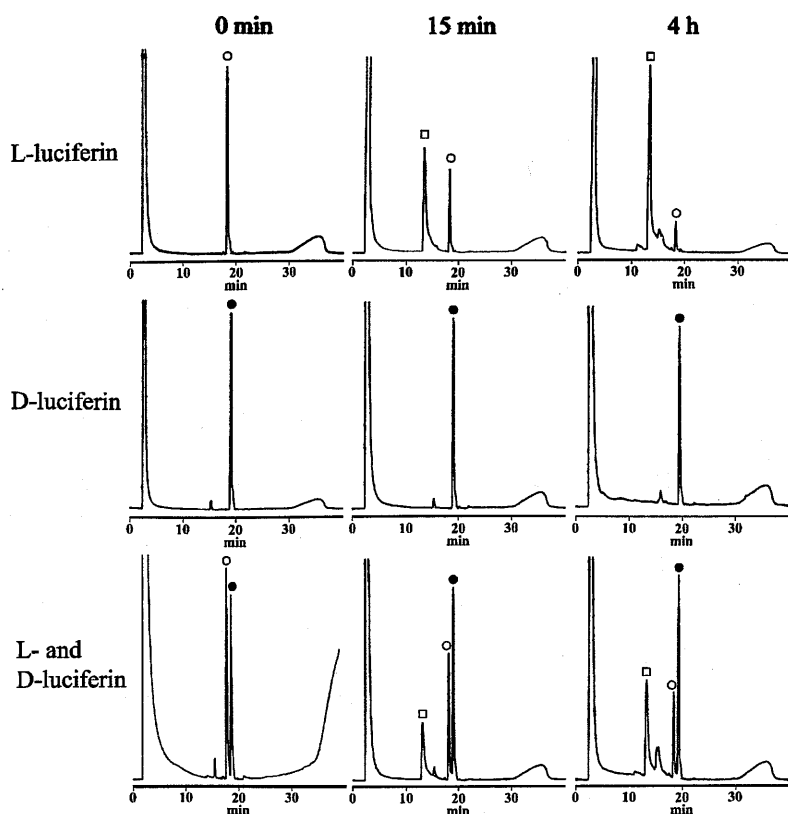


Fig. 3. RP-HPLC analysis of the reaction mixture of CoA ligation. The reaction mixture (100 μ l) contained L-luciferin (100 μ M), ATP (1 mM), CoA-SH (500 μ M), MgSO₄ (5 mM), and luciferase (10 μ g/ml) in 50 mM Hepes buffer. The reaction was started by adding ATP and MgSO₄, and then incubated at 25 $^{\circ}$ C for 15 min. The reaction mixtures were eluted with a linear gradient of 2% acetonitrile containing 0.1% TFA increase/min (from 10% to 70%) and detected by measuring absorbance ($\lambda = 254$ nm). L-Luciferin, D-luciferin, and luciferyl-CoA are indicated by the open circles, closed circles, and open squares, respectively.

decreased, but luciferyl-CoA increased. The peaks were then fractionated and analysed for identification by MALDI-TOF-MS. However, the chiroptical property of the yielded luciferyl-CoA from L-luciferin was unclear. It was thought to be racemized, because luciferin methyl ester in 50 mM Hepes buffer at pH 7.6 was easily racemized (data not shown). In contrast, the formation of luciferyl-CoA or dehydroluciferyl-CoA from D-luciferin could not be observed on RP-HPLC. In Fig. 2, trace of dehydroluciferyl-CoA from D-luciferin could be detected with sensitive MALDI-TOF-MS. It indicates the possible presence of dehydroluciferin in the reaction mixture. Dehydroluciferin can be readily converted into dehydroluciferyl-CoA in this condition (Fig. 1).

Luciferyl-CoA and dehydroluciferyl-CoA formation from D-luciferin by luciferase could not be observed on RP-HPLC using a chiral column. The MALDI-TOF-MS and RP-HPLC results indicate that a trace of dehydroluciferyl-CoA was produced from D-luciferin under these reaction conditions.

The kinetics of the luciferyl-CoA synthetase activity on luciferase was explored for a more detailed under-

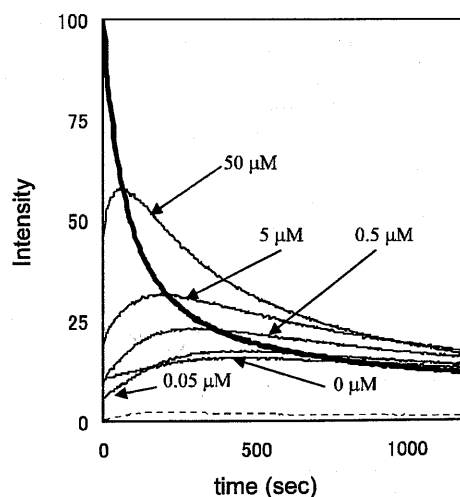


Fig. 4. The solid lines indicate the effect of coenzyme A, when L-luciferin (1 μ M) is inhibiting the bioluminescence reaction. Concentrations indicated with arrows are those of coenzyme A. The bold line shows the standard bioluminescence reaction (no L-luciferin inhibition). The dashed line shows the control condition (no substrate D-luciferin).

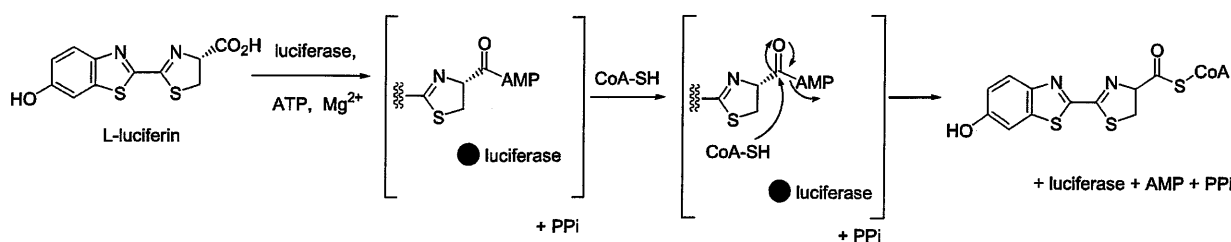


Fig. 5. Scheme for L-luciferyl-CoA synthesis by firefly luciferase.

standing. According to the Lineweaver–Burk plot, the K_m and V_{max} values for L-luciferin were calculated as 98.2 μM and 0.136 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein. The K_m value of the CoA-SH ligase activity was approximately 10 times higher than those of the fatty acids (e.g., linoleic acid: 13.6 μM) [13], meaning L-luciferin has 10 times less affinity for firefly luciferase than the fatty acids.

The quantity of D-luciferin was almost constant during the observation (Fig. 3), because the D-luciferin was in excess and the reaction rate of bioluminescence was significantly slower than for the CoA-ligation. The K_m value for D-luciferin of luciferase in bioluminescence reaction was calculated as 4.54 μM (data not shown).

D-Luciferin inhibited the CoA-ligase activity of luciferase (IC_{50} value was 135 μM against 100 μM for L-luciferin). L-Luciferin inhibited the bioluminescence activity of luciferase (IC_{50} value was 115 μM against 100 μM for D-luciferin). These results imply that the luciferins inhibit the luciferase activity that is caused by their own enantiomeric luciferin.

The CoA-ligase activity of luciferase is helpful for interpreting the function of CoA-SH, which enhances the luciferin–luciferase reaction *in vitro* [12]. CoA-SH releases the inhibitors, such as dehydroluciferin [1,2,11,16] or fatty acids [18], from the enzyme by producing the corresponding CoA thioesters. Firefly L-luciferin is a competitive inhibitor of the luciferin–luciferase reaction [9]. The inhibition of L-luciferin was removed by the CoA-ligase activity of luciferase, which is similar to the case of dehydroluciferin (Fig. 4). Although L-luciferin could contribute to produce light [9], the luminescence intensity from D-luciferin was extremely stronger than that from L-luciferin.

The reaction of L-luciferin by firefly luciferase was shown to be quite similar to that of dehydroluciferin. L-Luciferin is converted to luciferyl adenylate in the presence of ATP and firefly luciferase, and the adenylated group of luciferyl adenylate is then substituted to CoA-SH to give luciferyl-CoA (Fig. 5). The adenylated compound of D-luciferin is an intermediate of the bioluminescence (Fig. 1). Even in the presence of CoA-SH, D-luciferin was used for the light production reaction, but was not converted into luciferyl-CoA. This means that the firefly luciferases strictly recognize the stereogenic centre at C4 of the luciferin, and exhibit a CoA-ligase

activity for L-luciferin and dehydroluciferin, or bioluminescence reaction for D-luciferin.

Under a low-oxygen atmosphere, firefly luciferase can catalyze the synthesis of luciferyl-CoA from D-luciferin, ATP, and CoA-SH [15], although, in air, dehydroluciferyl-CoA was produced. Light production from L-luciferin had a slower reaction rate than that of D-luciferin [9]. Consequently, these reports and our results infer that, in the firefly luciferase, the CoA-SH ligase activity for L-luciferin is faster than the bioluminescence reaction of L-luciferin, whereas the bioluminescence reaction of D-luciferin is faster than the CoA-SH ligation.

The first report of the CoA-ligase activity of luciferase concerned dehydroluciferin in 1958 [10]. A similarity regarding the ATP-dependent reaction mechanism has suggested a strong correlation between luciferase and other adenylation enzymes, including the CoA-ligases. An amino acid sequence homology between luciferase and CoA-ligases was then found [2]. Recently, Oba et al. [13] reported the long-chain fatty acid CoA-ligase activity on luciferase. These facts suggest the ambiguous substrate recognizing ability of the CoA-ligase activity by luciferase, which shows why L-luciferin can be a substrate for the CoA-ligase activity of luciferase.

Acknowledgments

This study was supported in part by a NEDO grant (Dynamic Biology Project) from the Ministry of Economy, Trade and Industry of Japan, and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

References

- [1] M. DeLuca, Firefly luciferase, *Adv. Enzymol.* 44 (1976) 37–68.
- [2] K.V. Wood, The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 662–673.
- [3] H.-H. Seliger, W.D. McElroy, E.H. White, G.F. Field, Stereospecificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47 (1961) 1129–1134.

- [4] E.H. White, F. McCapra, G.F. Field, W.D. McElroy, The structure and synthesis of firefly luciferin, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 2402–2403.
- [5] W.D. McElroy, H.H. Seliger, Mechanism of action of firefly luciferase, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21 (1962) 1006–1012.
- [6] E.H. White, F. McCapra, G.F. Field, The structure and synthesis of firefly luciferin, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 337–343.
- [7] B.R. Branchini, M.M. Hayard, S. Bamford, P.M. Brennan, E.J. Lajiness, Naphthyl- and quinolyl-luciferin: green and red light emitting firefly luciferin analogues, *Photochem. Photobiol.* 49 (1989) 689–695.
- [8] A. Lundin, Perspectives in endocrinology and clinical chemistry, in: M. Serio, M. Pazzagli (Eds.), *Luminescent Assays*, Raven Press, New York, 1982, pp. 29–45.
- [9] N. Lambert, Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light, *Biochem. J.* 317 (1996) 273–277.
- [10] R.L. Airth, W.C. Rhodes, W.D. McElroy, The function of coenzyme A in luminescence, *Biochem. Biophys. Acta* 27 (1958) 519–532.
- [11] R. Fontes, B. Ortiz, A. Diego, A. Sillero, M.A.G. Sillero, Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap₄A catalyzed by firefly luciferase, *FEBS Lett.* 438 (1998) 190–194.
- [12] A. Sillero, M.A.G. Sillero, Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase and several ligases, *Pharmacol. Ther.* 87 (2000) 91–102.
- [13] Y. Oba, M. Ojika, S. Inouye, Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase, *FEBS Lett.* 540 (2003) 251–254.
- [14] Y. Toya, M. Takagi, H. Nakata, N. Suzuki, M. Isobe, T. Goto, A convenient synthetic method of 2-cyano-6-methoxybenzothiazole, a key intermediate for the synthesis of firefly luciferin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65 (1992) 392–395.
- [15] H. Fraga, J.C.G. Esteves da Silva, R. Fontes, Identification of luciferyl adenylate and luciferyl coenzyme A synthesized by firefly luciferase, *ChemBioChem* 5 (2004) 110–115.
- [16] J.L. Denburg, R.T. Lee, W.D. McElroy, Substrate-binding properties of firefly luciferase. I. Luciferin-binding site, *Arch. Biochem. Biophys.* 134 (1969) 381–394.
- [17] H. Fraga, J.C.G. Esteves da Silva, R. Fontes, Chemical synthesis and firefly luciferase produced dehydroluciferyl-coenzyme A, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 2117–2120.
- [18] I. Ueda, A. Suzuki, Is there a specific receptor for anesthetics? Contrary effects of alcohols and fatty acids on phase transition and bioluminescence of firefly luciferase, *Biophys. J.* 75 (1998) 1052–1057.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Tetrahedron
Letters

Tetrahedron Letters 47 (2006) 1197–1200

Construction of a new firefly bioluminescence system using L-luciferin as substrate

Mitsuhiro Nakamura,^{a,b,*} Kazuki Niwa,^b Shojiro Maki,^a Takashi Hirano,^a
Yoshihiro Ohmiya^b and Haruki Niwa^{a,*}

^aDepartment of Applied Physics and Chemistry, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan

^bResearch Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka 563-8577, Japan

Received 7 November 2005; revised 1 December 2005; accepted 2 December 2005

Available online 27 December 2005

Abstract—L-Luciferin can be converted into D-luciferin with an enzyme/co-factor system consisting of firefly luciferase, an esterase, ATP, Mg²⁺, and coenzyme A. By this means, a new firefly bioluminescence system can be constructed that uses L-luciferin as the substrate.

© 2005 Published by Elsevier Ltd.

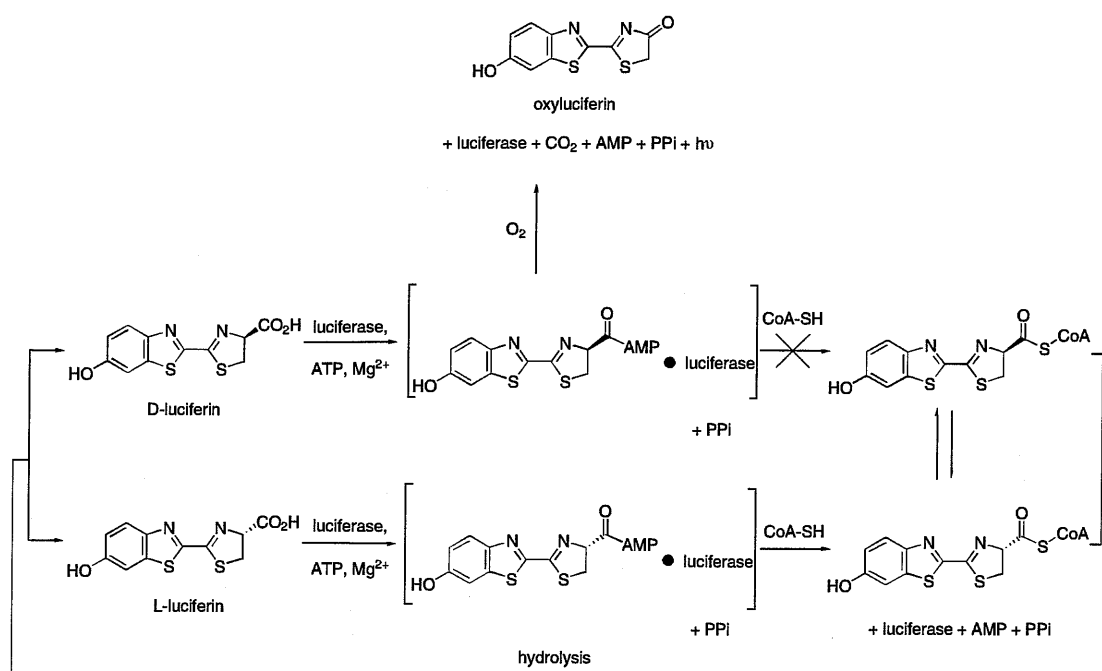
Bioluminescence systems are widely used in various biological, medical, and health science fields because highly sensitive devices are available to detect the light emitted. Of these, the firefly bioluminescence system that requires ATP as a co-factor is particularly useful for the detection of various biological events involving ATP and the detection of bacterial contamination of food, water, air, and various environments.^{1,2} The firefly bioluminescence system is also useful for monitoring gene expression in promoter assays and for protein localization, with measurement of the emitted light.^{2–7} In the bioluminescence reaction, firefly D-luciferin is first converted to luciferyl adenylate by firefly luciferase (EC 1.13.12.7) in the presence of ATP and Mg²⁺. The luciferyl adenylate is then oxidized by luciferase with molecular oxygen, yielding a yellow–green light ($\lambda_{\text{max}} = 550\text{--}570\text{ nm}$) with the formation of oxyluciferin, CO₂, and AMP.^{8–11} D-Luciferin, the specific substrate for the bioluminescence reaction, has the same chirality, with a stereogenic centre, as unnatural D-cysteine. The enantiomer L-luciferin has the same chirality as natural L-cysteine, and behaves as a competitive luciferase

inhibitor, as do dehydroluciferin, fatty acids, and lipoic acid.^{12–15} Whereas several research groups have reported that no light was produced from L-luciferin,^{16–19} Lemberg noted that L-luciferin produced weak light very slowly under the usual bioluminescence conditions (firefly luciferase, L-luciferin, ATP, and Mg²⁺).²⁰ More recently, light production from luciferyl-CoA and AMP in the presence of firefly luciferase has been reported.²¹ Firefly luciferase is known to have coenzyme A (CoA-SH) ligase activity for dehydroluciferin and fatty acids.^{13,22,23} We have recently demonstrated that firefly luciferase exhibits a bimodal action depending on luciferin chirality under normal aerobic conditions: D-luciferin-specific bioluminescence activity and L-luciferin-specific acyl-CoA synthetase activity.¹³ The inhibition of D-luciferin bioluminescence by L-luciferin, dehydroluciferin, or fatty acids is known to be abolished by the addition of CoA-SH to the reaction mixture.^{10–12}

Based on previous reports^{1–23} including our recent finding,¹³ we anticipated that the epimerization followed by hydrolysis of luciferyl-CoA derived from L-luciferin by the action of firefly luciferase may yield bioluminescent-active D-luciferin, which would allow us to produce continuous light using L-luciferin (Scheme 1). We found that luciferin methyl ester was easily racemized in 50 mM Hepes buffer at pH 7.6.¹³ As mentioned above, firefly luciferase exhibits L-luciferin-specific, CoA synthetase activity.¹³ Therefore, a thioester-directed hydrolytic enzyme could hydrolyze epimerized luciferyl-CoA

Keywords: Firefly; Bioluminescence; Luciferase; CoA ligase; L-Luciferin; D-Luciferin.

* Corresponding authors. Present address: RIKEN Harima Institute/SPRING-8, Sayo, Hyogo 679-5148, Japan. Tel.: +81 791 58 2817; fax: +81 791 58 2522 (M.N.); tel.: +81 424 43 5484; fax: +81 424 86 1966 (H.N.); e-mail addresses: naka_mit@spring8.or.jp; niwa@pc.uec.ac.jp



Scheme 1. Proposed mechanism for the production of D-luciferin from L-luciferin via luciferyl-CoA.

to yield D- and L-luciferin. Whereas the regenerated L-luciferin would be rapidly reconverted to luciferyl-CoA, D-luciferin could be used for the light-producing reaction. We report here the development of a new firefly bioluminescence system using L-luciferin, the antipode of D-luciferin.

An esterase from porcine liver (from Sigma–Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) was used to hydrolyze the luciferyl-CoA thioester, because the enzyme is flexible in its recognition of substrates. The esterase hydrolyzed luciferyl-CoA (data not shown). The reaction mixture (400 μ L) contained L-luciferin (50 μ M), CoA-SH (500 μ M), ATP (1.5 mM), MgSO₄ (4 mM), luciferase (10 μ g/mL), and esterase (0.2 mg/mL) in 0.1 M Tris buffer at pH 8.0. The reaction was initiated by the addition of a solution of ATP and MgSO₄. The reaction was monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of D- and L-luciferin using a chiral column (Chiralcel OD-RH, 4.6 \times 150 mm; Daicel Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) eluted with 27% acetonitrile containing 0.1% TFA, by measuring fluorescence (excitation 330 nm, emission 530 nm) (Fig. 1).

As shown in Figure 1, the quantity of L-luciferin rapidly decreased (Fig. 1, A and B) and luciferyl-CoA appeared instantaneously, as reported previously.¹³ After an induction period, the amount of D-luciferin gradually increased. This indicates that D-luciferin was generated from L-luciferin in the presence of firefly luciferase, esterase, CoA-SH, ATP, and Mg²⁺. In the absence of CoA-SH in this reaction, L-luciferin was essentially not consumed and its concentration remained almost constant during the observation period, indicating that CoA-SH is the essential component in the production

of D-luciferin (Fig. 1, C). On the other hand, luciferyl-CoA was not produced from D-luciferin by firefly luciferase.¹³ Therefore, L-luciferin was not produced directly from D-luciferin by the action of firefly luciferase and esterase. This means that this conversion reaction is enantio-specific, and this enantio-specificity is due to the strict chiral recognition capacity of firefly luciferase. These results indicate that L-luciferin was first converted into L-luciferyl-CoA by the action of the luciferase serving as L-luciferin-selective CoA ligase, in the presence of ATP, Mg²⁺, and CoA-SH (Scheme 1).¹³ The epimerization of the derived L-luciferyl-CoA and the subsequent hydrolysis of the epimerized luciferyl-CoA with the esterase furnished D-luciferin along with L-luciferin.

Since D-luciferin was found to be always present in the reaction mixture at a certain concentration over several hours as shown in Figure 1, the continuous light production was observed through several hours (data not shown). Most of the luciferin used was present as luciferyl-CoA (luciferyl-CoA:L-luciferin:D-luciferin = 96.5:0.8:2.7, 10 min), because the reaction rate of the luciferyl-CoA hydrolysis with the porcine liver esterase was slower than CoA ligase reaction with the firefly luciferase. Therefore, the amount of light emission should be controlled with the hydrolysis activity of esterase co-present in the reaction mixture.

L-Luciferin is known to inhibit the bioluminescence activity of D-luciferin, and the binding ability of L-luciferin to firefly luciferase was found to be three times stronger than that of D-luciferin.²⁰ The inhibition of D-luciferin bioluminescence by L-luciferin is known to be abolished by the addition of CoA-SH to the reaction mixture.^{10–13} Thus, L-luciferin regenerated from the

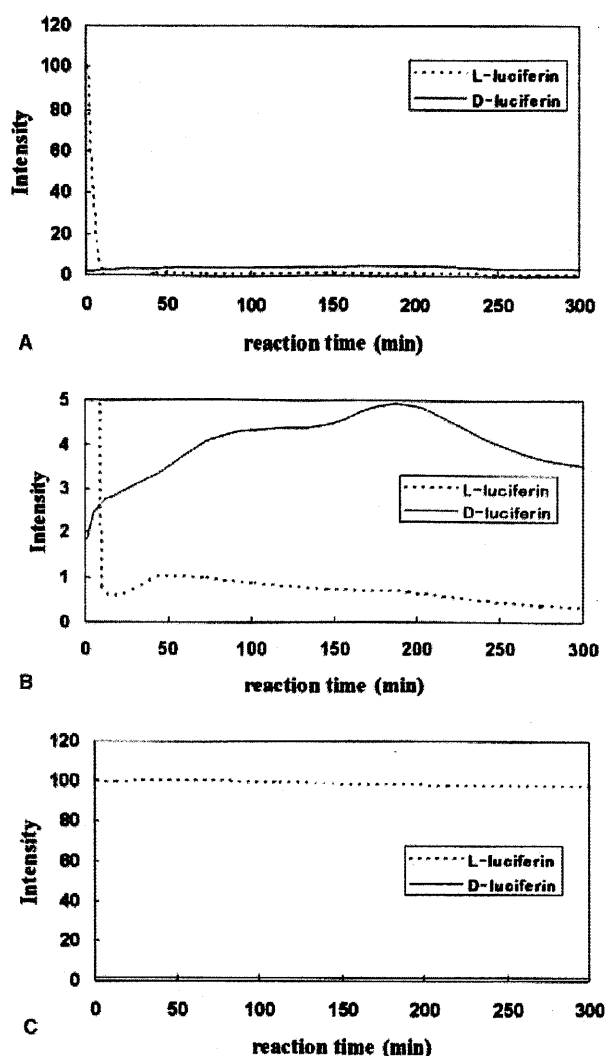


Figure 1. The time course of the change in fluorescence intensity of L- and D-luciferin in the reaction of L-luciferin with ATP, MgSO₄, luciferase, and esterase in the presence of CoA-SH (A and B) and in the absence of CoA-SH (C). B is a magnification of the figure in A. The reaction conditions were as follows: (A) L-luciferin (50 μM), CoA-SH (500 μM), ATP (1.5 mM), MgSO₄ (4 mM), luciferase (10 μg/mL), and esterase (0.2 mg/mL) in 0.1 M Tris buffer at pH 8.0. (B) The reaction conditions in the absence of CoA-SH. The reaction was monitored by HPLC analysis of D- and L-luciferin using a chiral column (Chiralcel OD-RH, 4.6 × 150 mm; Daicel Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) eluted with 27% acetonitrile containing 0.1% TFA, by measuring fluorescence (excitation 330 nm, emission 530 nm). L-Luciferin and D-luciferin were eluted at 7.1 and 8.4 min, respectively.

hydrolysis of the epimerized luciferyl-CoA does not inhibit the bioluminescence activity of D-luciferin, because the regenerated L-luciferin was immediately reconverted into luciferyl-CoA with firefly luciferase and the resulting luciferyl-CoA is removed from the active site.

The bioluminescence activity of the present reaction system using L-luciferin at various luciferase concentrations exhibited linearity ($R^2 > 0.99$) with the luciferase concentration used (Fig. 2), indicating that the present method should be useful as a promoter assay in which

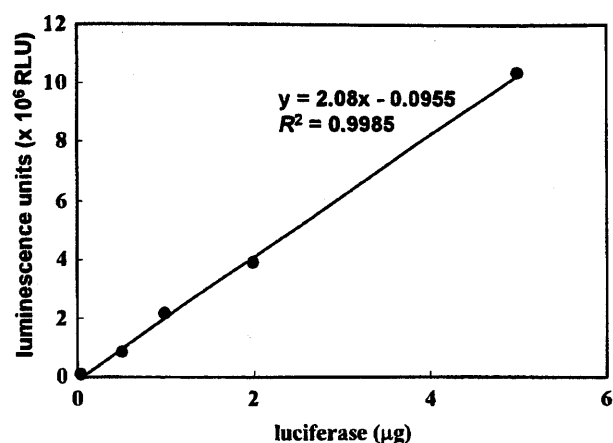


Figure 2. Assay of firefly luciferase using L-luciferin as the substrate. The reaction conditions were as follows: L-luciferin (50 μM), CoA-SH (500 μM), ATP (1.5 mM), MgSO₄ (4 mM), luciferase (see figure), and esterase (0.2 mg/mL) in 0.1 M Tris buffer at pH 8.0. The vertical axis indicates the integration of luminescence from 1 to 50 s.

luciferase concentration is monitored as a reporter enzyme.

In conclusion, we have identified a novel route of D-luciferin formation from L-luciferin *in vitro* that allows the construction of a new firefly bioluminescence system using L-luciferin, which is available cheaply from natural L-cysteine. In living cells, CoA-SH, ATP, Mg²⁺, and some kind of esterase or thioesterase are present as ubiquitous cell components. Therefore, L-luciferin may be used to quantitatively monitor luciferase concentration as a reporter enzyme for gene expression in living cells.

Acknowledgments

This study was supported in part by a NEDO grant (Dynamic Biology Project) from the Ministry of Economy, Trade, and Industry of Japan and by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture of Japan.

References and notes

- Petty, R. D.; Sutherland, L. A.; Hunter, E. M.; Cree, I. A. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1995**, *10*, 29–34.
- Fukuda, J.; Fujita, Y.; Ohsawa, K. *J. Neurosci. Methods* **1983**, *8*, 295–302.
- Keller, G. A.; Gould, S.; DeLuca, M.; Subramani, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 3264–3268.
- Pazzagli, M.; Devine, J. H.; Peterson, D. O.; Baldwin, T. O. *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 315–323.
- Badia, E.; Duchesne, M. J.; Pons, M.; Nicolas, J. C. *Anal. Biochem.* **1994**, *217*, 333–335.
- Aflalo, C. *Int. Rev. Cytol.* **1991**, *130*, 269–323.
- Wood, K. V. *J. Biolumin. Chemilumin.* **1990**, *5*, 107–114.
- McElroy, W. D.; Seliger, H. H.; White, E. H. *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10*, 153–170.
- White, E. H.; Rapaport, E.; Seliger, H. H.; Hopkins, T. A. *Bioorg. Chem.* **1971**, *1*, 92–122.

10. DeLuca, M. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1976**, *44*, 37–68.
11. Wood, K. V. *Photochem. Photobiol.* **1995**, *62*, 662–673.
12. Sillero, A.; Günther Sillero, M. A. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 91–102.
13. Nakamura, M.; Maki, S.; Amano, Y.; Ohkita, Y.; Niwa, K.; Hirano, T.; Ohmiya, Y.; Niwa, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 471–475.
14. Ueda, I.; Suzuki, A. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1052–1057.
15. Niwa, K.; Ohmiya, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 625–629.
16. White, E. H.; McCapra, F.; Field, G. F.; McElroy, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2402–2403.
17. McElroy, W. D.; Seliger, H. H. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1962**, *21*, 1006–1012.
18. White, E. H.; McCapra, F.; Field, G. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 337–343.
19. Branchini, B. R.; Hayward, M. M.; Bamford, S.; Brennan, P. M.; Lajiness, E. J. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 689–695.
20. Lambert, N. *Biochem. J.* **1996**, *317*, 273–277.
21. Fraga, H.; Fontes, R.; Esteves da Silva, J. C. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3427–3429.
22. Airth, R. L.; Rhodes, W. C.; McElroy, W. D. *Biochem. Biophys. Acta* **1958**, *27*, 519–532.
23. Oba, Y.; Ojika, M.; Inouye, S. *FEBS Lett.* **2003**, *540*, 251–254.