

## 生物発光とルシフェラーゼの科学

丹羽 一樹

ルシフェラーゼはホタルの発光反応を触媒する酵素として広く知られている。ホタル以外にも光る甲虫は世界中に分布し、中にはブラジルの鉄道虫のように赤と緑の2色で光るものもある。さらには甲虫以外にも多くの発光生物が知られており、多くのルシフェラーゼが研究されてきている。また生物発光現象と関連して緑色蛍光タンパク質 (GFP) も広く知られているが、ルシフェラーゼの生物発光反応と混同されることもしばしばである。本稿では生物の発光現象としての生物発光を改めて整理し、この現象を支える化学、生化学について、蛍光と発光の違いも含めて解説する。

### 生物による発光現象

蛍狩りはわが国の初夏の風物詩の一つであり、ホタルが我々にとってもっとも身近な発光生物であると言っても過言ではないだろう。海外では日本と異なり優美な印象ばかりではないようだが、古代文献にも記載される身近な発光生物である。近年では都市化の進展に伴いホタルを身近に感じる機会は減ってしまっているが、今でも野生のホタルを観察することは可能である。環境保全の観点から積極的な情報発信が行われていない例も多いが、都市周辺でも意外と身近なところに生息している。

ホタルの他にも発光生物は数多く知られている。ウミホタルなどは今や光る生物としてよりもサービスエリアとして身近になってしまっているが、正真正銘の発光生物である。他にもホタルイカをはじめ多くの発光生物が知られている。ただしヒカリゴケやクシクラゲのように、美しく輝いて見えるが反射しているだけで、自ら光っていない生物もいる。

### 生物発光の化学反応機構

これまでに多くの発光生物が研究され、化学的な発光機構が明らかになってきた。基本的には酸化反応であり、この反応を触媒する酵素がルシフェラーゼ、反応基質がルシフェリンと呼ばれている。ルシフェリンはすべての発光生物で共通ではなく、生物グループごとに構造はまったく異なっている。図1にこれまでに決定されたルシフェリンの構造を示す。

ルシフェラーゼも多くの発光生物でクローニングされている。ルシフェラーゼによるルシフェリンの基質認識は厳密であり、本来の基質ではないルシフェリンを反応させること(クロスリアクション)はできない。海洋性の発光生物は分類学的に広い範囲でセレンテラジンを発光基質とするものが多いため、この性質を利用することで基質を推定することができる。

発光生物の中には、ルシフェリンの構造は決まってもルシフェラーゼがまだクローニングされていないものがある。ラチア(ニュージーランドの発光巻貝)や発光ミズなどがこれにあたる。また発光キノコのように基質の構造も明らかにされていないような例も少なくない。詳しくは優れた成書<sup>1,2)</sup>を参照されたいが、魅力的な研究対象はまだ多く残されている。

図1のように発光基質は生物種によって異なるが、発光反応メカニズムには共通点が多い。基本は酸素分子による酸化であり、二酸化炭素が生成する酸化脱炭酸反応である。この反応はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L反応)とも言われている。しかし光子が放出されるまでのメカニズムは、生物ごとに少しずつ異なる。生物発光の化学的メカニズムを図2にまとめた。

ホタル、ウミホタルなどではL-L反応のみで光子が発生する(図2bの経路)。すなわち、反応生成物であるオキシルシフェリンが蛍光性のクロモフォアを有しているため、L-L反応のみで蛍光放射すなわち光子の放出まで完了する。しかしL-L反応のみで発光が完結しない生物も少なくない。その代表例がオワンクラゲである。オワンクラゲの生物発光反応では、酸化生成物は青色の発光色を持つ。しかし生きたオワンクラゲの発光色は緑色であり、発光色が異なる。これは酸化反応生成物が直接的に蛍光放射を行うのではなく、緑色の蛍光クロモフォアを持つGFPに励起エネルギーを移動させ、このものの蛍光放射により生物発光を行っているためである(図2cの経路)。このオワンクラゲの発光機構はGFPの発見で著名な下村博士が解明したことである。ただし、下村博士が天然のオワンクラゲから抽出、精製したのはセレンテラジンと酸素分子、そしてタンパク質アポエクオリンが複合体を形成したエクオリンという発光タンパク質で

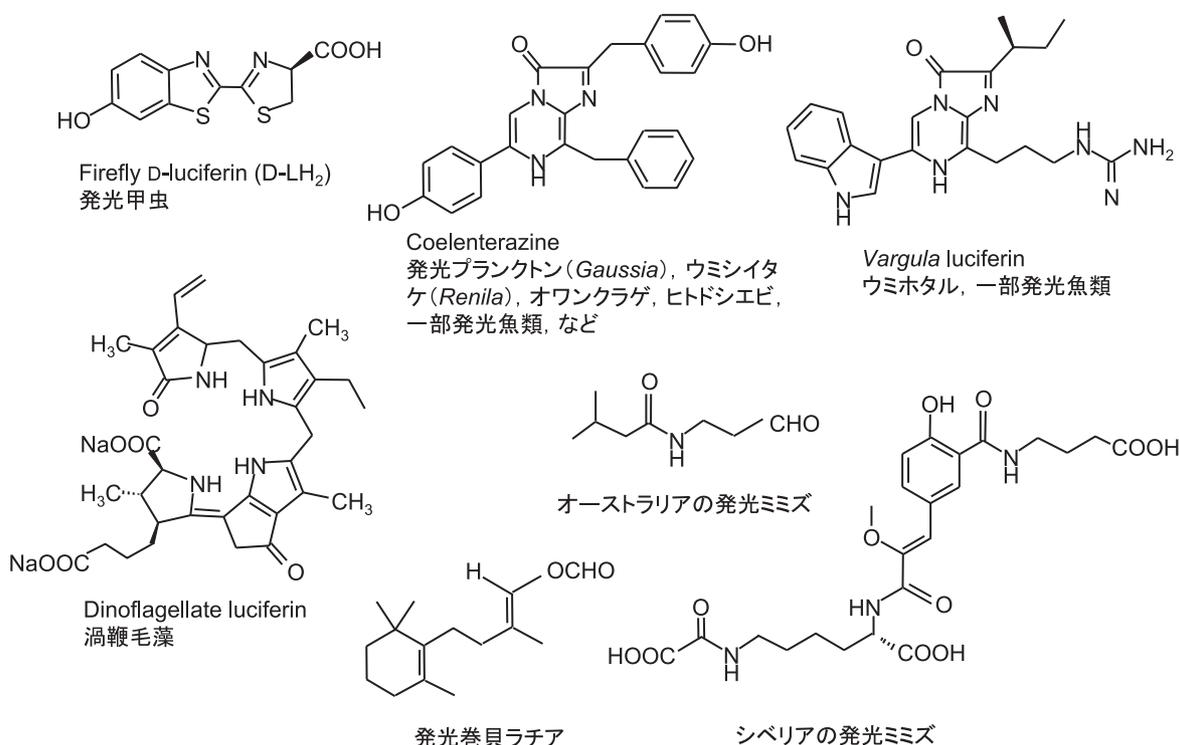


図1. 発光基質ルシフェリンの構造とそれらを使う発光生物. ラチアルシフェリンのように蛍光性の発色団を持たない基質もある. このほか, ホタルイカのルシフェリンは coelenterazine の硫酸化物であり, 発光バクテリアのルシフェリンは直鎖脂肪酸アルデヒドである.

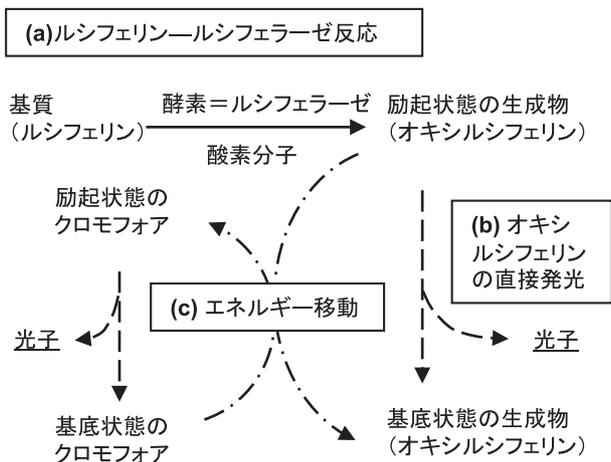


図2. 生物発光反応メカニズム. L-L 反応 (a) によって生成するオキシルシフェリン (励起状態) が直接発光 (b) する生物だけではなく, 発光クロモフォアにエネルギー移動 (c) の後, クロモフォアが発光する生物がある. GFP はクロモフォアの代表.

ある. 天然物質としてオワンクラゲから発見されたのは厳密にはルシフェリンでもルシフェラーゼでもない.

オワンクラゲの場合は, 酸化反応生成物が蛍光能を持つにも関わらず GFP の蛍光により生物発光を行う. これと対照的に発光巻貝ラチア, 発光ミミズなどの場合は

L-L 反応生成物が蛍光性のクロモフォアを持たない. このままでは生成物の励起エネルギーは分子振動という形で熱に変換されるだけである. そのため, このような発光生物は何らかの蛍光性クロモフォアを有しており, その蛍光により生物発光を行うと考えられている.

分子間の励起エネルギーの移動に関しては, 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) がよく知られており, この場合はドナー分子の蛍光スペクトルとアクセプター分子の吸収スペクトルが一致していることがエネルギー移動効率を決める要因とされている. 一方, 上のラチアの例ではドナー分子 (励起生成物) 側がそもそも蛍光しないことから, FRET とは異なるエネルギー移動を行っていると考えられている.

### 蛍光と発光

ところで, ホタルの研究をしているとしばしば「蛍光のことですか?」と言われることがある. 紛らわしい話ではあるが, 「蛍光は読んで字のごとくホタルの光です」と答えることはできない. 蛍光を意味する fluorescence という言葉の語源は fluorite という鉱物であり, 蛍石のことである. 蛍石は紫外線を照射することで発光する (フォトルミネッセンス). 蛍光 (floreescence) は蛍石の

表1. 代表的なルシフェラーゼ遺伝子

生物種	代表的な製品	その他
ホタルルシフェリンを基質とするもの		
<i>Photinus pyralis</i> (北米産ホタル)	Luciferase Assay System (Promega) 天然精製酵素 (Sigma-Aldrich)	pH感受性, 極大波長 560 nm ~
<i>Pyrearinus termitilluminans</i> (ブラジル産ヒカリコメツキ)	E-Luc (TOYOBO)	pH非感受性, 極大波長 539 nm, 量子収率がもっとも高い (0.61)
<i>Rhagophthalmus ohbai</i> (イリオモテボタル)	SLG, MultiReporter Assay System- Tripluc (TOYOBO) SLO, MultiReporter Assay System- Tripluc (TOYOBO)	pH非感受性, 極大波長 556 nm pH非感受性, 極大波長 586 nm SLGの変異体
<i>Phrixothrix hirtus</i> (鉄道虫)	SLR, MultiReporter Assay System- Tripluc (TOYOBO)	pH非感受性, 極大波長 625 nm 天然で赤色発光
<i>Luciola cruciate</i> (ゲンジボタル)	リコンビナント酵素 (Wako)	pH感受性, 極大波長 560 nm ~
<i>Luciola mingrellica</i> (欧州産ホタル)	リコンビナント酵素 (Sigma-Aldrich)	pH感受性, 極大波長 560 nm ~
セレンテラジンを基質とするもの		
<i>Renilla reniformis</i> (ウミシイタケ)	Dual-Luciferase Assay System (Promega)	極大波長 480 nm
<i>Gaussia princeps</i>	BioLux <i>Gaussia</i> Luciferase Assay Kit (NEB)	分泌型
ウミホタルルシフェリンを基質とするもの		
<i>Cypridina noctiluca</i>	BioLux <i>Cypridina</i> Luciferase Assay Kit (NEB)	分泌型

発光のような photoluminescence とほぼ同義で使われることがほとんどである (専門分野によってはさらに厳密な定義付けがされている). 我々が生物発光 (反応) と呼ぶホタルの光は, ルシフェリンとルシフェラーゼの L-L 反応であり, 化学反応の結果として発光する化学発光 (chemiluminescence) の一種である. このようにホタルなどの生物発光 (反応) は蛍光物質とは別のものとして位置付けられていることがほとんどである.

バイオ分野では GFP をはじめとする蛍光タンパク質が広く応用されている. これらは励起光の照射によって発光するフォトルミネッセンスであり, L-L 反応のような化学反応ではなく, 基質を必要としない. そのため蛍光タンパク質の遺伝子を細胞内で発現させるだけで発光させる簡便さが広く受け入れられている. これに対し L-L 反応は基質の添加が必要である一方, 励起光を必要としない. 励起光源に起因するノイズの懸念がないことから, L-L 反応の発光計測はバックグラウンドが低く, 定量的な遺伝子発現解析に有利である.

蛍光物質と生物発光反応は別と書いたが, 先ほど紹介したとおり, GFP は現象としての生物発光には深く関わっているから紛らわしい. GFP はオワンクラゲの蛍光クロモフォアであり, オワンクラゲの光の色は GFP の色である. 「生物発光」とはもともと生物が光る現象

そのものを意味しているはずであり, オワンクラゲの生物発光で重要な役割を担う「蛍光」タンパク質も, 生物発光のためのタンパク質の一つと言える. しかしサンゴなどの発光生物ではない腔腸動物からも蛍光タンパク質が単離されており, このことを考えると蛍光タンパク質のいくつかは確かに生物発光とは無関係である. この点では生物発光反応 (L-L 反応) が天然の生物発光に不可欠な酵素反応であるのとは対照的である.

### ルシフェラーゼの応用

これまでに多くの発光生物のルシフェラーゼ遺伝子がクローニングされ, リコンビナントに発現させた酵素の発光活性が確認されている. このようなルシフェラーゼ遺伝子は遺伝子発現マーカーなどとして, 主にライフサイエンスの研究現場で応用されている. 表1にこれまでクローニングされ応用研究が進んでいる代表的な発光酵素ルシフェラーゼに関する情報をまとめた.

ホタルなど発光甲虫のルシフェラーゼは, 発光色の多様性という意味で非常に興味深い性質がある. すなわち, 発光基質が共通であるにもかかわらず酵素の種類や溶媒環境によって発光色が変わることが知られており, そのメカニズムは未だに解明されていない. 発光甲虫ルシフェラーゼの結晶構造解析, 理論化学計算, 発光基質の

構造活性相関などの最先端の科学技術で世界中の研究者が取り組んでおり、多くの実験結果に基づく説明が報告されているが、発光色が変化する多くの現象のすべてを説明できる理論構築には至っていない。

発光色変化に関係する発光甲虫ルシフェラーゼの生化学的な性質として、溶媒pHに対する感受性が重要である<sup>3)</sup>。ホタルの生物発光反応研究を牽引してきた北米産ホタルのルシフェラーゼはpH感受性であり、溶媒のpHが変化すると発光色が赤色に変化する(図3左)。これに対しpH非感受性のE-LucあるいはMultiReporter Assay System用ルシフェラーゼ(SLG, SLO, SLR)のスペクトルは、溶媒のpHが変化しても一定のままであり(図3右)、複数遺伝子の発現解析に向いている。

ホタルの発光系のもう一つの特徴として、ATPが補因子として発光に必要というものがある。このため、ホタルの生物発光反応をATPの検出試薬として応用することができる。ATPはすべての生細胞に存在する物質であることから、微生物や食品残渣を検出する衛生検査キットとして普及している。

その他、細胞外に分泌されるタイプのルシフェラーゼがある。ウミホタルの発光反応系は酵素ルシフェラーゼが細胞外に分泌されるため、細胞そのものは光らない。

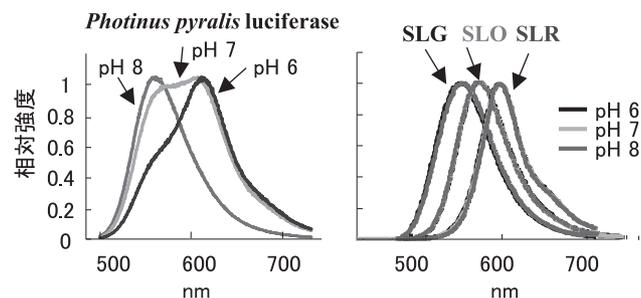


図3. ホタルなどの発光甲虫ルシフェラーゼのスペクトル。pH感受性の北米産ホタルルシフェラーゼ(左)とpH非感受性のMultiReporter Assay System用3色のルシフェラーゼ(右)のスペクトル。

バイオイメージングなどの用途では細胞内に留まって発光することが重要であり、分泌型ルシフェラーゼは役に立たないように思われるかもしれない。しかし分泌型ルシフェラーゼの特性を活用したアプリケーションも開発されている。海水中に放出されて発光するウミホタルのルシフェラーゼは細胞外でも強い活性を維持できる。そのため培養細胞にウミホタルルシフェラーゼを発現させた場合、培養液を分取することで細胞から分泌されたルシフェラーゼ量を発光により定量することができる。この方法では細胞内にトランスジーンが発現産物が蓄積されないため、培養される細胞の負担は最小限に抑えられ、長期間の観察が可能になるなどのメリットがある<sup>4)</sup>。

このように生物発光反応にはそれぞれ特徴があり、その特徴を活かした応用技術の開発が行われている。今後、研究の進展により新しい生物発光反応系が発見され、新しい応用技術が開発されていく可能性は非常に高い。

## 結 語

生物発光は魅力的な生命現象であり、多くの研究成果が積み上がっている。それにもかかわらず、発光色の決定機構など未だに世界中の研究者の興味を引いて止まない研究テーマが残されている他、応用技術開発も重要な研究テーマとして期待されている。また、生物発光の研究では日本人の多くの偉大な研究者が大きな役割を果たしてきた歴史がある。少しでも多くの方に生物発光とその科学に興味を持っていただければ幸いである。

## 文 献

- 1) 今井一洋：生物発光と化学発光—基礎と実験，廣川書店(1989)。
- 2) 今井一洋，近江谷克裕：バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック，丸善(2006)。
- 3) Viviani, V. R. and Ohmiya, Y.: *Photoprot. Bioanal.*, p. 49 (2006)。
- 4) Yamada, Y. et al.: *Anal. Biochem.*, **439**, 80 (2013)。