

ホタル生物発光における内殻吸収計測技術

工藤優斗¹, 熊木文俊², 長坂将成³, 足立純一², 野口良史⁴, 古賀伸明⁵, 板橋英之¹, 樋山みやび¹

¹群馬大学 大学院理工学府環境創生理工学科, ²高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所,

³自然科学研究機構 分子科学研究所, ⁴静岡大学 大学院総合科学技術研究科, ⁵名古屋大学 大学院情報学研究科

Inner-Shell Absorption Measurement Technology for Firefly Bioluminescence Research

Yuto KUDO¹, Fumitoshi KUMAKI², Masanari NAGASAKA³, Jun-ichi ADACHI², Yoshifumi NOGUUCHI⁴,
Nobuaki KOGA⁵, Hideyuki ITABASHI¹, Miyabi HIYAMA¹

¹ Graduate School of Science and Technology, Gunma University,

² IMSS, High Energy Accelerator Research Organization,

³ Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences,

⁴ Graduate School of Engineering, Shizuoka University,

⁵ Graduate School of Informatics, Nagoya University

Abstract

夏の風物詩であるホタルの光は我々に馴染みのある風景である。このホタル生物発光はタンパク質酵素内で化学反応により発光する現象であり、発光反応メカニズム解明のため数多くの研究がなされている。本稿では、内殻吸収計測を用いたホタル生物発光の研究について紹介する。

1. はじめに

1-1. ホタル生物発光における課題

ホタル生物発光は、励起光を必要としない・発光波長の範囲が広い・発光量が高いという特徴を生かし、腫瘍増殖や病原菌感染を観測する生体内分子イメージングから食品衛生検査・土壌検査まで幅広く使われている [1]。この発光は、タンパク質酵素であるホタルルシフェラーゼ（以下「ルシフェラーゼ」）中で基質であるホタルルシフェリン（以下「ルシフェリン」）とアデノシン三リン酸（ATP）とが中間体を形成し、酸化反応により生成される発光体（オキシルシフェリン）の励起状態から基底状態へ遷移する際におこる（Fig. 1(a)）。この反応は、基質と酵素の名称からルシフェリン-ルシフェラーゼ反応（LL 反応）と呼ばれ、その発光色は温度・溶媒の pH・タンパク質の構造の違い（変異体）などにより黄緑色から赤色に変化する [2-10]。Fig. 1(a) の発光反応経路は広く受け入れられているが、この経路の情報だけでは環境による色変化機構の説明はつかない。2008 年に、pH 6.4 ~ 8.5 のホタル生物発光の発光スペクトルが絶対値で測定され、pH 8.5 の発光量子収率は 41.0±7.4% と報告された [7]。またこの研究から、pH が小さくなるほど緑色の成分が少なくなるため、赤色発光になることが明らかになった。この定量計測の結果と水溶液中のオキシルシフェリンに対する吸収・蛍光計測・理論計算から [11-17]、現在では、発光にはケト-エノール互変異性を含む複数の異性体が関与すると考えられている（Fig. 1(b)） [18]。また、Fig. 1(a) の経路では生成物の

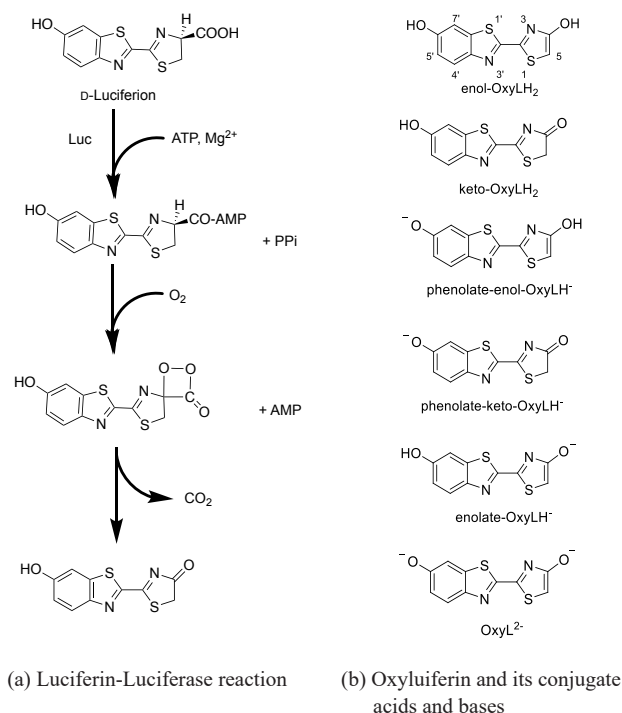
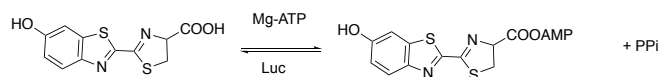
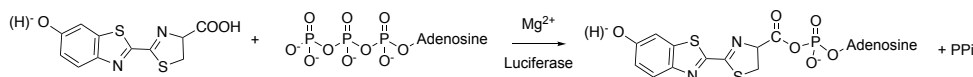


Figure 1 Luciferin-Luciferase reaction (a) and possible compounds for the emitter (b).

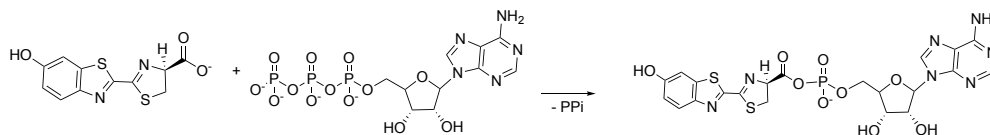
オキシルシフェリンに至るまでプロトンが2個外れるが、どの時点で外れるのか不明である。そのため、いまだに生物発光の発光経路におけるルシフェリンの分子構造は、



(a) Total charge of D-luciferin is 0 [19]



(b) Total charge of D-luciferin is unclear [20]



(c) Total charge of D-luciferin is -1 [18]

Figure 2 Three cases for the structure of D-luciferin in firefly bioluminescence reaction.

文献により異なる (Fig. 2) [18-20]。これらの点も含めて、色変化機構の理解にはホタル生物発光の反応過程を詳細に調べることが求められている。

化学反応過程を追跡する有効な実験方法として、はじめに照射するポンプ光により反応を開始し、時間差を置いて照射するプローブ光により反応途中の分子のスペクトル測定を行う超高速時間分解測定が有効である [21]。現在ではこの超高速時間分解測定法のタンパク質反応への応用が進んでいる。しかし、ホタル生物発光のようにタンパク質酵素中でおこる化学反応は、基質・補因子・タンパク質を混ぜると反応がはじまるため、反応開始時刻を正確に決定できないという課題がある。この課題に対し、Kurataらは光照射により外れる保護基（ケージド基）の利用を考え、(7-diethylaminocoumarin-4-yl)methyl-caged D-luciferin (DEACM-ケージドルシフェリン)を開発した [22]。さらに、KumagaiらはDEACM-ケージドルシフェリンの光安定性を照射光の波長ごとの光開裂量子収率として定量評価した [23]。これにより、光安定性が既知のケージドルシフェリンを得ることができたので、ホタル生物発光の反応機構追跡が一步進んだと言える。

1-2. K-edge スペクトルの利用

我々は、ケージドルシフェリンの研究開始当初、検出用の光源として紫外光の利用を想定していた。しかし、近年軟X線時間分解分光法（Time-resolved soft X-ray absorption spectroscopy）の開発が進んだため [24,25]、X線も利用できる可能性が出てきた。実際、Kumakiらにより、フェナントロリン鉄錯体の軟X線時間分解スペクトルが報告された [25]。軟X線時間分解スペクトルで反応を追跡するためには、プローブ光による結合状態観測について検証する必要がある。それに向けた研究はすでに開始され [26-28]、原子数が少ない系について成果が出ている。また、

AkazawaらがセルピオースのX線吸収スペクトル（XAS）を測定しており [29]、他の有機化合物に対してもX線吸収計測による議論ができそうである。

軟X線を用いた吸収計測では、分子の結合状態を反映したスペクトルを得ることができるため、軟X線時間分解分光法の利用によるプロトン脱離も含めたLL反応の詳細説明が期待できる。しかし、気相中の孤立分子や、比較的構成原子数の少ない有機分子とは異なり、緩衝液中のケージドルシフェリンのような環境中の有機分子のXASは、かなり複雑になると予想される。そのため、結合の開裂や脱プロトン化などの結合の違いをXASによって区別することができるかどうかは自明ではない。

上記のようにLL反応においてプロトンが反応経路のどの時点で外れるのかは明確ではない。ホタル生物発光の反応過程を追跡するためには、プロトン脱離による構造変化の検出が必要である。そこで、まずX線吸収計測により、ルシフェリンの脱プロトン化による構造の違いについて区別できるか検証した [30]。本稿では、これについて以下に述べる。

2. 方法

2-1. K-edge スペクトル

ルシフェリンは、pHに依存してアニオンやプロトン脱離したジアニオンの構造をとることが知られているため、pHにより分子構造を制御することができる系となっている。Fig. 3に、ベンゾチアゾール環にC-OH結合を持つルシフェリンアニオン(a)およびC-O⁻結合を持つルシフェリンジアニオン(b)の分子構造を示す。Fig. 3に示すように、本稿では、ベンゾチアゾール環とチアゾリン環を構成する元素は番号で区別する。例えばヒドロキシ基がついているC原子は6C、カルボキシ基がついているC原子は4Cである。

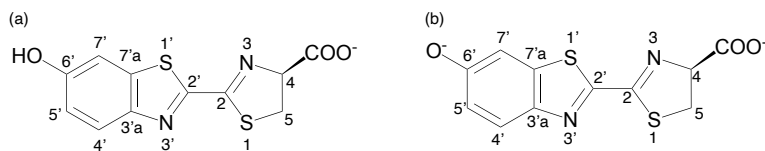


Figure 3 Structure of D-luciferin anion (a) and dianion (b).

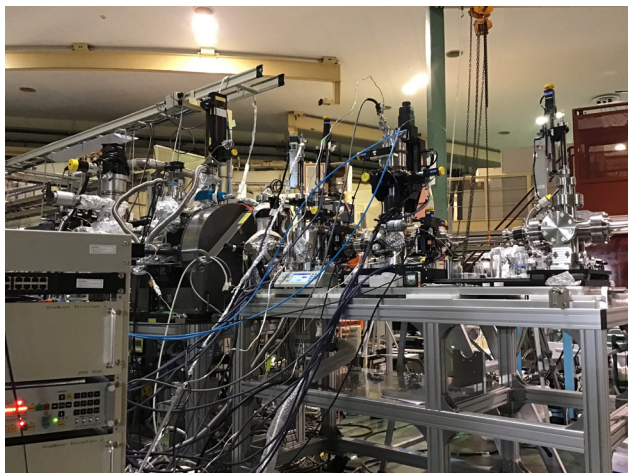


Figure 4 Exterior of experimental setup.

ルシフェリンの pK_a は 8.7[31] であることから、pH 7 でアニオン、pH 10 でジアニオンの構造をとることが知られている [32,33]。そこで、フォトンファクトリーの軟X線ビームライン BL-7A に我々が開発した溶液の XAS 測定装置 [27,28] を設置することで、pH 5, 7, 10 のルシフェリン C K-edge XAS スペクトルを測定した (Fig. 4)。XAS 測定は、溶液試料を 2 枚の Si_3N_4 膜 (100 nm 厚) で挟むことで構成する液体セルを用いて行った。シリンジポンプを用いて、液体セルの位置を変えことなく溶液試料の入れ替えができる。溶液温度は 25°C に設定した。液体セルは常圧のヘリウム環境下にあり、ヘリウムの圧力を制御することで、液体層の厚さを 20 nm ~ 40 μm の範囲で精密に制御できる。XAS 測定は液体セルを透過する軟X線強度をフォトダイオードで測定することで行うが、液体層の精密厚さ制御により軟X線の吸収量を最適化できる。

2-2. 解析方法

ルシフェリン分子には C 原子が 11 個あるために実験事実のみから C K-edge XAS スペクトルを帰属することは難しい。そこでルシフェリンアニオンとジアニオンに対する密度汎関数理論 (DFT) 計算を行い、時間依存 (TD)-DFT 計算から得られる理論スペクトルとの比較から実験スペクトルの帰属を行った。ルシフェリンには、S 原子が 2 個、O 原子が 3 個、N 原子が 2 個、C 原子が 11 個含まれるが、1-2 番目の分子軌道 (MO) は S 原子、3-5 番目の MO は O 原子、6-7 番目の MO は N 原子、8-18 番目の MO は C 原子の 1s 軌道に相当する。ルシフェリンアニオンの内殻励起スペクトルは、8-18 番目の MO から lowest unoccupied

molecular orbital (LUMO) への励起が主な成分である。これらの情報に基づき、理論スペクトルから C K-edge XAS スペクトルに現れるピークの帰属を行った。なお、着目している C-OH 結合 (アニオン) と C-O⁻ 結合 (ジアニオン) の違いは、6'C1s 軌道から LUMO への励起に相当する C K-edge XAS スペクトルピークに現れる。そこで、アニオンとジアニオンの場合、6'C1s 軌道の MO を確認し、6'C1s から LUMO への励起が含まれる実験スペクトルのピークを調べた。

3. 結果と考察

3-1. K-edge スペクトル

Fig. 5 にルシフェリンの C K-edge XAS スペクトルを示す。どの pH の場合でも、特徴的なスペクトルピークは 4 つ現れた。pH 5 と 7 のスペクトルにおいて、ピーク強度は異なるが、吸収エネルギーはほぼ同じという結果となった。吸収エネルギーが似ているのは、pH 5 も 7 も、溶媒中の主な化学種はアニオンであるためと考えられる。また、濃度・光路長・溶媒の影響が含まれているため pH 5 と 7 のピーク強度に違いが現れた、と考えられる。pH 10 の最も大きなピーク (285.1 eV) と 2 番目に大きなピークのエネルギー (288.7 eV) は、pH 7 のピークエネルギー (それぞれ 284.9 eV と 288.6 eV) と似たような値であった。

3-2. スペクトルの帰属

アニオンとジアニオンともに、6'C1s 軌道は 11 番目の MO(MO11) であった。8 番目の MO(MO8) はカルボキシ基

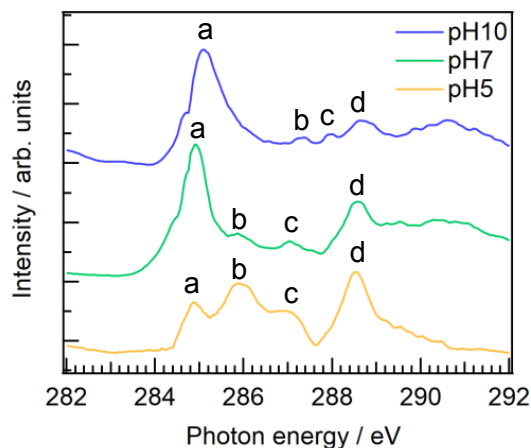


Figure 5 C K-edge spectra for luciferin [30].

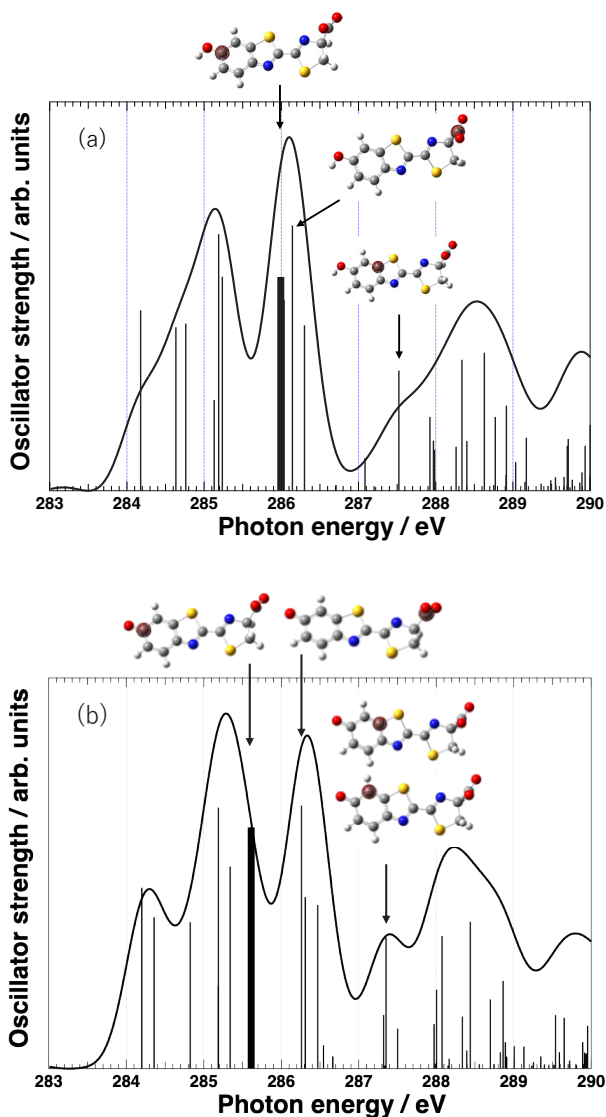


Figure 6 Theoretical absorption spectra for luciferin. Black bold line: transition from C-OH(6'C 1s) to LUMO [30].

の C1s 軌道で、11 個の C1s 軌道のうちで最も低い軌道エネルギーを持つ。Fig. 6 にアニオンとジアニオンの理論吸収スペクトルを示す。6'C1s (MO11) から LUMO への振動子強度を太線で示した。MO11 から LUMO への励起は、アニオンとジアニオンのスペクトルで異なるピークに含まれることがわかった。

アニオンのスペクトルでは、285 eV 付近のピークは 284 eV 付近にシヨルダ構造を持ち、シヨルダ構造は 4'C1s から LUMO および LUMO よりも高い空軌道への励起、285 eV 付近のピークにはベンゾチアゾール環とチアゾリン環の結合部位 2'a と 2a に分布する MO10 から LUMO への励起および 7'aC, 5'C1s から LUMO よりも高い空軌道への励起が含まれる。着目している MO11 から LUMO への励起は、カルボキシ基の C1s 軌道の MO8 からの励起ピークとともに 286 eV 付近にピークを形成する。一方、ジアニオンのスペクトルでは、284 eV 付近のピークはアニオンのシヨルダ構造と同様に主に 4'C1s から

LUMO への励起に相当する。285 eV 付近のピークは、ベンゾチアゾール環とチアゾリン環の結合部位 2'aC と 2aC に分布する MO10 から LUMO よりも高い空軌道への励起に加えて、着目している MO11 から LUMO への励起が含まれる。すなわち、ジアニオンの場合は、C1s MO8 からの励起で構成されるピークよりも低エネルギー側に、MO11 からの励起に相当するピークが現れることがわかった。287.5 eV 付近のピークおよび 288.5 eV 付近のピークは、アニオンの場合もジアニオンの場合も似たような励起が含まれていた。287.5 eV 付近のピークには 7'C1s(MO18) や 7'aC1s(MO12) から LUMO よりも高い空軌道への励起、288.5 eV 付近のピークには C1s から LUMO よりも高い空軌道への 1 電子励起が複数混ざっていた。

これらの結果に基づき、実験スペクトルである Fig. 5 の pH 7 と pH 10 に現れたピークを帰属した。pH 7 はアニオンのスペクトルなので、Fig. 6(a) と比較する。実験スペクトル (Fig. 5) における pH 7 のピーク a は、理論スペクトル (Fig. 6(a)) の 285 eV 付近のピークと 284 eV 付近のシヨルダ構造に相当する。pH 7 のピーク b は、C-OH(6'C 1s) から LUMO への励起と、カルボキシ基の C1s 軌道から LUMO への励起を含んでいる。pH 7 のピーク c は、7'aC1s(MO12) から LUMO への励起、ピーク d は C1s から LUMO よりも高い空軌道への複数の 1 電子励起に相当する。pH 10 はジアニオンのスペクトルなので、Fig. 6(b) と比較する。実験スペクトル (Fig. 5) における pH 10 のピーク a は、pH 7 の場合と同様に Fig. 6(b) の 286 eV より低エネルギー側のピークに相当すると考えられる。このピークには C-O(6'C 1s) から LUMO への励起が含まれる。この励起が pH 7 のピーク b から pH 10 のピーク a へと移動したために、pH 10 の場合、カルボキシ基の C1s 軌道からの励起で構成されるピーク b は、結果として pH 7 の場合に比べて高エネルギー側へシフトし、ピーク a とのエネルギー差が大きくなったと考えられる。なお、pH 10 の場合も、ピーク d は C1s から LUMO よりも高い空軌道への複数の 1 電子励起に相当する。

4. まとめ

本研究では、緩衝液中のルシフェリンにおいて、結合 (OH と O⁻) の違いを内殻励起スペクトルで区別できるか調べた。実験により pH 5, 7, 10 の溶液におけるルシフェリンの C K-edge XAS スペクトルを測定し、量子化学計算による解析を行なった。その結果、C K-edge XAS スペクトルには特徴的なピークが 4 つ現れることがわかった。理論スペクトルとの比較から、それぞれ、ベンゾチアゾール環を構成する C1s から LUMO への励起・C-OH の C1s から LUMO への励起・カルボキシ基の C1s から LUMO への励起・複数の一電子励起、と帰属できた。ルシフェリンのヒドロキシ基からプロトン脱離する影響は、アニオンとジアニオンの 6'C から LUMO への励起エネルギーの違いからピーク a とピーク b のエネルギー差に反映されることがわかった。その差は 2.3 eV となることから、C K-edge

XAS スペクトル測定により, C-OH 結合 (アニオン) から C-O⁻ 結合 (ジアニオン) への変化を調べることができる, と言える。

ルシフェリンの C K-edge XAS スペクトルにおける C-OH 結合と C-O⁻ 結合の違いはベンゾチアゾール環の一部である 6C から LUMO への励起に現れたが, ルシフェリンのベンゾチアゾール環は共鳴構造をとり, 負電荷は非局在化していることから, C-OH 結合と C-O⁻ 結合の違いはわずかであったと考えられる。ケージドルシフェリンからルシフェリンが生成する反応のように, C-O 結合が直接開裂する場合は C K-edge XAS スペクトルにもっと大きな変化が現れる, と予想される。今後, ケージドルシフェリンを用いた軟X線時間分解分光計測が可能になれば, ホタル生物発光の反応経路解明への道が拓けると期待できる。

謝辞

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所「PF 課題 (課題番号 2021PF-G012)」

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所「PAC 課題 (課題番号 2021G047)」

科学研究費補助金 19H02680, 20K03784, 21K04989

引用文献

- [1] O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*; World Scientific: NJ, 1 (2006).
- [2] H. H. Seliger and W. D. McElroy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 21 (1959).
- [3] H. H. Seliger and W. D. McElroy, *W. D. Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136 (1960).
- [4] H. H. Seliger, W. D. McElroy, E. H. White, and G. F. Field, *G. F. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 1129 (1961).
- [5] T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobashi, K. Sakata, and H. Kato, *Nature* **440**, 372 (2006).
- [6] G. Oliveira and V. R. Viviani, *Photochem. Photobiol. Sci.* **18**, 2682 (2019).
- [7] Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya, and H. Akiyama, *Nat. Photonics* **2**, 44 (2008).
- [8] Y. Wang, H. Kubota, N. Yamada, T. Irie, and H. Akiyama, *Photochem. Photobiol.* **87**, 846 (2011).
- [9] T. Mochizuki, Y. Wang, M. Hiyama, and H. Akiyama, *Appl. Phys. Lett.* **104**, 213704 (2014).
- [10] N.N. Ugarova, L. G. Maloshenok, I. V. Uporov, and M. I. Koksharov, *Biochemistry (Moscow)* **70**, 1262 (2005).
- [11] P. Naumov, Y. Ozawa, K. Ohkubo, and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11590 (2009).
- [12] M. Rebarz, B.-M. Kukovec, O. V. Maltsev, C. Ruckebusch, L. Hintermann, P. Naumov, and M. Sliwa, *Chem. Sci.* **4**, 3803 (2013).
- [13] A. Ghose, M. Rebarz, O. V. Maltsev, L. Hintermann, C. Ruckebusch, E. Fron, J. Hofkens, Y. Mély, P. Naumov, M. Sliwa, and P. Didier, *J. Phys. Chem. B* **119**, 2638 (2015).
- [14] M. Hiyama, H. Akiyama, Y. Wang, and N. Koga, *Chem. Phys. Lett.* **577**, 121 (2013).
- [15] Y. Noguchi, M. Hiyama, M. Shiga, O. Sugino, and H. Akiyama, *J. Phys. Chem. B* **120**, 8776 (2016).
- [16] Y. Noguchi, M. Hiyama, M. Shiga, H. Akiyama, and O. Sugino, *J. Chem. Theo. Computa.* **15**, 5474 (2019).
- [17] Y. Noguchi, M. Hiyama, M. Shiga, H. Akiyama, and O. Sugino, *J. Chem. Phys.* **153**, 201103 (2020).
- [18] M. B. Al-Handawi, S. Polavaram, A. Kurlevskaya, P. Commins, S. Schramm, C. Carrasco-López, N. M. Lui, K. M. Solntsev, S. P. Laptinok, I. Navizet, and P. Naumov, *Chem. Rev.* **122**, 13207 (2022).
- [19] B. R. Branchini, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7592 (2015).
- [20] Y. Liu, *J. Photochem. Photobiol. C* **52**, 100537 (2022).
- [21] D. Kosumi, T. Kusumoto, R. Fujii, M. Sugisaki, Y. Inuma, N. Oka, Y. Takaesu, T. Taira, M. Iha, H. A. Frank, and H. Hashimoto, *Chem. Phys. Lett.* **483**, 95 (2009).
- [22] M. Kurata, M. Hiyama, T. Narimatsu, Y. Hazama, T. Ito, Y. Hayamizu, X. Qiu, F. M. Winnik and H. Akiyama, *J. Photochem. Photobiol. B* **189**, 81 (2018).
- [23] R. Kumagai, R. Ono, S. Sakimoto, C. Suzuki, K. Kanno, J. Usukura, H. Itabashi, H. Akiyama, and M. Hiyama, *J. Photochem. Photobiol. A* **434**, 114230 (2023).
- [24] N. Huse, T. K. Kim, L. Jamula, J. K. McCusker, F. M. F. de Groot, and R. W. Schoenlein, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6809 (2010).
- [25] F. Kumaki, M. Nagasaka, R. Fukaya, Y. Okano, S. Yamashita, S. Nozawa, S. Adachi, J. Adachi, *J. Chem. Phys.* **158**, 104201 (2023).
- [26] Y. Horikawa, T. Tokushima, Y. Harada, O. Takahashi, A. Chainani, Y. Senba, H. Ohashi, A. Hiraya, and S. Shin, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 8676 (2009).
- [27] M. Nagasaka, H. Yuzawa, and N. Kosugi, *Anal. Sci.* **36**, 95 (2020).
- [28] M. Nagasaka and N. Kosugi, *Chem. Lett.* **50**, 956 (2021).
- [29] D. Akazawa, T. Sasaki, M. Nagasaka, and M. Shiga, *J. Chem. Phys.* **156**, 044202 (2022).
- [30] Y. Kudo, F. Kumaki, M. Nagasaka, J. Adachi, Y. Noguchi, N. Koga, H. Itabashi, and M. Hiyama, *J. Phys. Chem. A* **128**, 611 (2024).
- [31] R. A. Morton, T. A. Hopkins, and H. H. Seliger, *Biochemistry* **8**, 1598 (1969).
- [32] Y. Ando, and H. Akiyama, *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 117002 (2010).
- [33] M. Hiyama, H. Akiyama, K. Yamada, and N. Koga, *Photochem. Photobiol.* **89**, 571 (2013).

(原稿受付日: 2024年11月15日)

著者紹介

工藤優斗 Yuto KUDO

群馬大学 大学院理工学府

〒376-8515 群馬県桐生市天神町

e-mail: t211c013@gunma-u.ac.jp

略歴：2022年群馬大学大学院理工学府博士前期課程終了。

熊木文俊 Fumitoshi KUMAKI



物質構造科学研究所 博士研究員

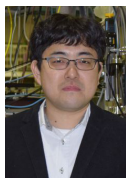
〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: kumakif@post.kek.jp

略歴：2023年より物質構造科学研究所博士研究員。理学博士。

最近の研究：軟X線とレーザーの組み合わせによる時間分解軟X線吸収分光法の開発。

長坂将成 Masanari NAGASAKA



分子科学研究所 助教

〒444-8585

愛知県岡崎市明大寺町字西郷中 38

e-mail: nagasaka@ims.ac.jp

略歴：2007年分子科学研究所助教。博士（理学）。

最近の研究：溶液の軟X線吸収分光計測。

足立純一 Jun-ichi ADACHI



物質構造科学研究所 講師

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

e-mail: jun-ichi.adachi@kek.jp

略歴：1999年より KEK 物質構造科学研究所，現在講師。博士（理学）。

最近の研究：パルス軟X線を活用した計測法の開発と利用。放射光原子分子科学。

野口良史 Yoshifumi NOGUCHI



静岡大学 准教授

〒432-8561 静岡県浜松市中央区城北 3-5-1

e-mail: noguchi.yoshifumi@shizuoka.ac.jp

略歴：2018年静岡大学准教授。博士（工学）

最近の研究：第一原理グリーン関数法の開発。

古賀伸明 Nobuaki KOGA

名古屋大学 名誉教授

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

e-mail: koga@nagoya-u.ac.jp

略歴：2023年名古屋大学名誉教授。工学博士。

板橋英之 Hideyuki ITABASHI

群馬大学 教授

〒376-8515 群馬県桐生市天神町

e-mail: itabashi@gunma-u.ac.jp

略歴：2004年群馬大学教授。工学博士。

最近の研究：土壌改良剤と化粧品の研究。

樋山みやび Miyabi HIYAMA



群馬大学 准教授

〒376-8515 群馬県桐生市天神町

e-mail: miyabi@gunma-u.ac.jp

略歴：2017年群馬大学准教授。博士（理学）。

最近の研究：量子化学計算と定量計測を用いたホタル生物発光の研究。