

## [研究成果]

## ホタルルシフェリンの化学発光反応に関与する 中間生成物の吸収スペクトルの理論解析

酒井博則、梅澤聡、和田直久  
東洋大学生命科学部生命科学科

ホタルの生物発光は酵素反応であり、それに関与する基質分子は、酵素非存在下でも発光することが知られている。化学発光反応では 440nm と 420nm にそれぞれ吸収ピークをもつ 2 つの中間生成物(M440、M420)を経由し、それらの構造は H-NMR により推定されているが、同定には至っていない。本報告では推定された中間生成物に対して第一原理計算により吸収スペクトルの予測を行い、M440、M420 のイオン化状態を理論的に推測した。

### 1.序

ホタルの生物発光は一般にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応と呼ばれる酵素反応である[1]。ルシフェラーゼ(Luc)、Mg<sup>2+</sup>の存在下でルシフェリン(Ln)がアデノシン三リン酸(ATP)と反応してルシフェリルアデニレイトとなり、これが酸化されることによってオキシルシフェリンの励起状態(Oxyln\*)となる。これが基底状態に遷移するときに可視光を放出する[2]が、このとき溶液の pH 条件により、pH7.6 では黄緑色の、pH5.6 では赤色の発光が観測される[3]。しかし Luc、Mg<sup>2+</sup>、ATP がなくても発光することが報告された[4]。それが化学発光である。

化学発光は Ln を DMSO 溶液に溶かし、*t*-BuOK のような強塩基を加えることで起きる。化学発光反応における中間生成物の構造を見出すために、脱気条件下で吸収波長を測定すると、*t*-BuOK の濃度が 3.6mM であると 440nm にピークを持つ中間生成物 M440 が生成されて反応が止まり、5mM であると 420nm にピークを持つ安定な中間生成物 M420 が形成され、そこに酸素を加えると発光することが知られている(図 1、図 2)[5]。その反応機構は、Ln から M440→M420 の順に反応が進み、M420 と酸素が反応することで、ヒドロキシオキシドアニオンが生成された後、ジオキセタンという分子が形成され、その後 Oxyln\* が生成されて可視光を放出すると考えられている。M440、M420 は H-NMR によりその構造が推定されており(図 2)[6]、M440 はフェノール基とカルボキシル基が脱プロトン化した構造、M420 はさらに C<sub>4</sub> 位に結合している水素が脱プロトン化したものと考えられている。

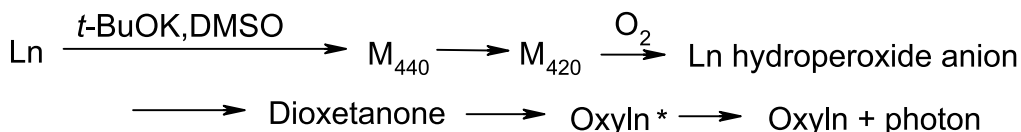


図 1 Ln の化学発光における反応機構。

化学発光も生物発光と同様に、発光色は pH の影響を受ける。このように 1 つの分子から多彩な発光色を呈するマルチカラー発光性試薬を合成できれば、正常細胞とガ

ン細胞などの異常細胞をカラー化してイメージングし、その罹患初期の段階でも検出することもできる。近年変異体 Luc を用いることで発光色を制御しようという試みは盛んに行われており、最近では野生体の発光波長(560nm)をブルーシフトさせることで、遺伝子レポーターとしての性能を向上させる可能性のある変異体 Luc の作成に成功している[7]。このように、生物発光に対する研究は変異体 Luc の作成を中心として盛んであるが、化学発光に対しては M440、M420 といった化学発光反応における重要な中間生成物の構造が不明であり、反応機構が明確に分かっているとは言いがたい状況である。そこで、マルチカラー発光性有機分子の合成を実現させるために、M440 と M420 のイオン化状態を電子レベルで詳細に考察することは、化学発光反応機構を明らかにしていくための第一歩として意義のあることである。さらにホタルの生物発光反応は一般に発光量子収率が 88%と評価されており、反応機構が生物発光と同一であると考えられている化学発光機構を解明し、生物発光反応におけるルシフェラーゼの活性部位の触媒作用と比較すれば、生物発光における高い発光量子収率の起源を明らかにすることも可能になる。

本研究の目的は吸収スペクトル計算から発光に関与する中間生成物、M440 と M420 の詳細な構造とその電子状態を第一原理計算により明らかにし、それぞれの中間生成物のイオン化状態を推定することである。

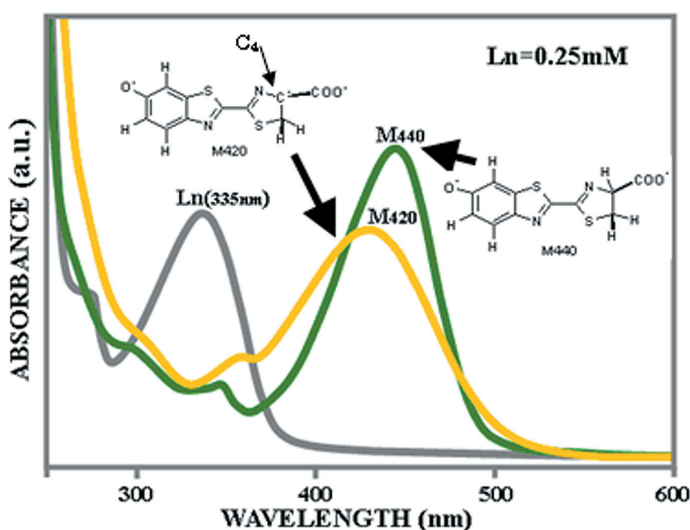


図 2 H-NMR によって推定された M440 と M420 のイオン化状態、およびそれらと Ln の吸収スペクトル[6]。

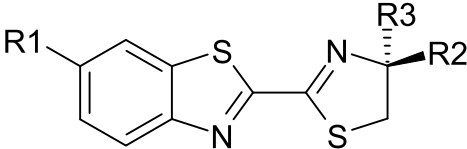
## 2. 計算方法

まず Ln の取りうる 5 種のイオン化状態(neutral、anion-O、-COO、-2、-3)の計算モデルを作成した。anion-2 と anion-3 はそれぞれ H-NMR により M440、M420 と推定されているものである。Ln はシス体とトランス体を取りうるが、今回はトランス体のみを取り上げた。これはシス体であると、Ln のベンゾチアゾール環とチアゾリン環のファンデルワールス半径の大きい硫黄原子同士が、トランス体に比べると近づきすぎるため、環同士が平面にならず π電子の非局在化が起こりにくくなると考え

たからである。

次に、作成した Ln および 5 種のイオン化状態に対して構造最適化を行った。計算には分子軌道法計算ソフトウェア Gaussian03[8]を用い、計算条件は密度汎関数法の B3LYP で、基底関数は 6-31+G(d,p)である。また、化学発光反応では *t*-BuOK が必須であることから、イオン化した部位に K<sup>+</sup>が結合している可能性を考慮し、K<sup>+</sup>を加えた構造も作成した。計算に用いた分子構造は表 1 に示した。計算は気相中と DMSO 溶媒(誘電率=46.7)中の 2 通りで行い、溶媒効果は分極連続体モデル(PCM)を用いて計算に考慮した。

表 1 構造最適化計算のための Ln の状態モデル。



Ln の状態	R1	R2	R3
neutral	-OH	-COOH	-H
anion-O	-O	-COOH	-H
anion-O+K <sup>+</sup>	-OK	-COOH	-H
anion-COO	-OH	-COO <sup>·</sup>	-H
anion-COO+K <sup>+</sup>	-OH	-COOK	-H
anion-2	-O	-COO <sup>·</sup>	-H
anion-2+2K <sup>+</sup>	-OK	-COOK	-H
anion-3	-O	-COO <sup>·</sup>	/
anion-3+3K <sup>+</sup>	-OK	-COOK	-K

そして吸収スペクトルの計算は、時間依存性密度汎関数法の TD-B3LYP を用いた。基底関数は構造最適化と同様に 6-31+G(d,p)である。気相中で構造最適化したものについては気相中、DMSO 溶媒中の 2 通りで吸収スペクトルの計算を行い、DMSO 溶媒中で構造最適化したものは DMSO 溶媒中の吸収スペクトル計算のみ行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. 構造最適化について

構造最適化したすべての Ln の状態について、気相中と DMSO 溶媒中でのそれぞれのエネルギー差( $\Delta G$ )を表 2 に示す。

anion-2、-3 は DMSO 溶媒の効果を考慮すると、溶媒和が極めて大きくはたらくことが分かる。K<sup>+</sup>が結合している Ln の状態では、K<sup>+</sup>の数が多いほどより強く溶媒和が効いてくることが分かる。

最適化構造は気相中と DMSO 溶媒中でそれほど大きな差は見られなかったが、K<sup>+</sup>を加えた構造の anion-COO+K<sup>+</sup>、anion-3+3K<sup>+</sup>の構造では、気相中か DMSO 溶媒中かによって、構造に大きな変化が見られた。図 3 に K<sup>+</sup>を含んだ Ln の状態の最適化構造を示す。

表 2 Ln の各状態における気相中と溶媒中のエネルギー差( $\Delta G$ )。

Ln の状態	$\Delta G$ (kcal/mol)
neutral	-9.92
anion-O	-47.08
anion-O+K <sup>+</sup>	-25.04
anion-COO	-57.19
anion-COO+K <sup>+</sup>	-21.17
anion-2	-141.74
anion-2+2K <sup>+</sup>	-38.24
anion-3	-301.89
anion-3+3K <sup>+</sup>	-56.4

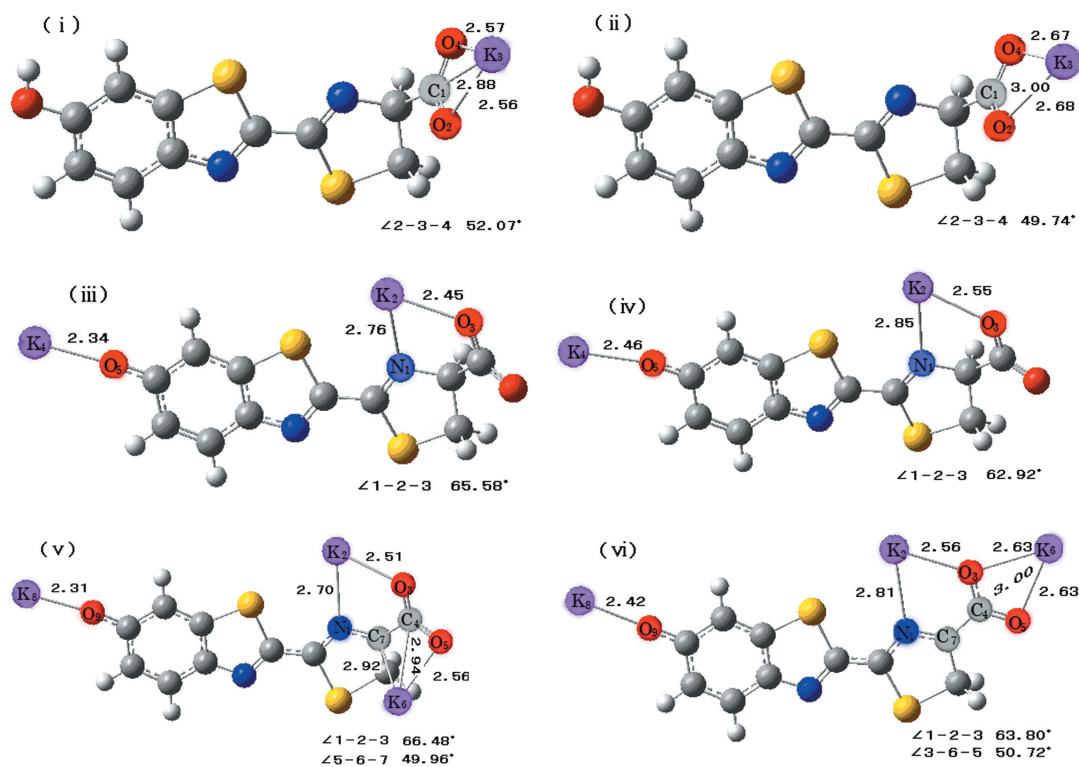


図 3 計算によって得られた最適化構造 : anion-COO+K<sup>+</sup>の気相中 (i)、DMSO 溶媒中 (ii) ; anion-2+2K<sup>+</sup>の気相中 (iii)、DMSO 溶媒中 (iv) ; anion-3+3K<sup>+</sup>の気相中 (v)、DMSO 溶媒中 (vi) : ただし、図中の数値は結合距離(Å)と結合角度(°)を表す。

anion-COO+K<sup>+</sup>では K<sub>3</sub>が DMSO 溶媒中では C<sub>1</sub> から遠ざかることによって、K<sub>3</sub>-C<sub>1</sub> 間の結合が弱まり、同時に結合角( $\angle O_2-K_3-O_1$ )も気相中のものと比べると小さくなる

ている。anion-3+3K<sup>+</sup>については、(v)、(vi)中 K<sub>6</sub>と示した K 原子が気相中か DMSO 溶媒中かでその位置が大きく異なった。anion-2+2K<sup>+</sup>も同様に、DMSO 溶媒中で K<sub>4</sub>は O<sub>5</sub>、K<sub>2</sub>は N<sub>1</sub>と O<sub>3</sub>から遠ざかっており、結合角(∠N<sub>1</sub>-K<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>)も気相中のもより小さくなっている。K<sup>+</sup>を含んだこれらの最適化構造に共通していることは、DMSO 溶媒中であると K<sup>+</sup>と酸素原子との距離が離れ、結合が弱まる傾向を示していることである。これらの傾向は DMSO 溶媒の効果が特に K<sup>+</sup>の結合様式に対して大きく寄与していることを表している。

### 3.2. 吸収スペクトルについて

TD-B3LYP により予測された最大吸収ピークとその振動子強度を表 3 にまとめた。

表 3 Ln の各状態の最大吸収ピーク(nm)とその振動子強度。

Ln の状態	最大吸収ピーク ( f * )			実験値(nm)
	真空	真空 <sup>1)</sup>	真空 溶媒 <sup>2)</sup>	
neutral	323 (0.38)	338 (0.49)	339 (0.49)	335(Ln)
anion-O	475 (0.36)	453 (0.73)	451 (0.68)	
anion-O+K <sup>+</sup>	403 (0.53)	430 (0.63)	434 (0.65)	
anion-COO	492 (0.16)	380 (0.25)	319 (0.22)	
anion-COO+K <sup>+</sup>	313 (0.28)	329 (0.54)	331 (0.55)	
anion-2	423 (0.58)	434 (0.69)	434 (0.68)	440(M440)
anion-2+2K <sup>+</sup>	404 (0.49)	425 (0.68)	429 (0.70)	
anion-3	457 (0.62)	482 (0.99)	486 (0.86)	420(M420)
anion-3+3K <sup>+</sup>	498 (0.33)	513 (0.51)	500 (0.91)	

- 1) 構造最適化と吸収ピークの予測を気相計算で行った。
  - 2) 構造最適化を気相、吸収ピークの予測を DMSO 溶媒中で行った。
  - 3) 構造最適化と吸収ピークの予測を DMSO 溶媒中で行った。
- \* 振動子強度

neutral の 3 つの吸収ピークがそれぞれ 323、338、339 であり、これらは実験値の 335nm に近い値を示した。吸収スペクトルの予測を DMSO 溶媒中で計算すると、気相中のものに比べるとレッドシフトすることが分かる。実験値は 335nm であることから、溶媒効果を考慮したほうが実験値との一致が良い。よって、DMSO 溶媒の効果は、吸収スペクトルの予測に必須の因子であるといえる。

DMSO は、プロトンアクセプターとはなりえない溶媒であるため、DMSO 溶媒中の Ln は *t*-BuOK を加えない限り脱プロトン化しない。従って、化学発光反応において観測される M440 と M420 は、Ln のどこかのプロトンがはずれた構造を取っているはずである。まず M440 について考えてみると、その候補は H-NMR によって推測された anion-2 が最も確からしい構造であるといえる。TD-B3LYP によって予測された吸収ピークは anion-2 がそれぞれ 423、434、434 と計算されており、440nm に近い値である。しかしながら anion-O は K<sup>+</sup>を取り込むと短波長になり、K<sup>+</sup>を考慮することで 440nm に近い値が算出されていることは無視できない。また anion-2+2K<sup>+</sup>も、吸収ピークの計算に DMSO 溶媒の効果を考えると 440nm に近くなっている。これら anion-2、anion-2+2K<sup>+</sup>、anion-O+K<sup>+</sup>は溶媒効果を考慮することで 440nm に近く

なるという点で共通しており、また振動子強度も充分大きな値であり、かつ3つのピーク共に  $S_0 \rightarrow S_1$  遷移である。従って、M440の構造としては、H-NMRによって推測されている anion-2 以外にも、anion-2+2K<sup>+</sup>、anion-O+K<sup>+</sup>であるという可能性もある。

anion-3はH-NMRによりM420の構造であると推測されている。しかしながら計算結果から分かるように、吸収スペクトルがすべて420nmよりも長波長側に算出されている。ここから推測されることは、M420が存在するためには、DMSO分子がK<sup>+</sup>とanion-3を介在して存在するなど、anion-3とDMSO分子とが直接相互作用することにより、M420が形成されるということである。

そこでDMSO分子をanion-3の周りに配置させたモデルを作成し、構造最適化と吸収ピークの予測を試みた。(vii)はanion-3のイオン化したフェノール基近傍にDMSO分子を配置させたものであり、(viii)は(vii)にK<sup>+</sup>を置いたものである(図4)。

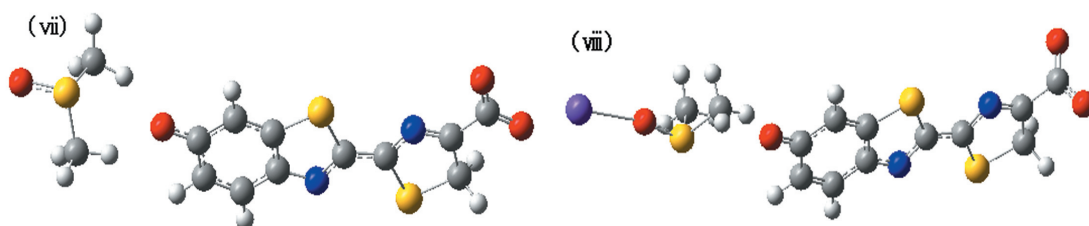


図4 計算によって得られた気相中での最適化構造：anion-3+DMSO(vii)；anion-3+DMSO+K<sup>+</sup>(viii)。

計算によって得られた最適化構造に対して吸収ピークの予測を行った。その結果を表4に示す。

表4 Ln(anion-3)の各状態の最大吸収ピーク(nm)とその振動子強度。

	最大吸収ピーク (f*)	
	真空	真空 <sup>1)</sup>
vii	447	(0.85)
viii	417	(0.41)

1) 構造最適化と吸収ピークの予測を気相中で行った。

\* 振動子強度

気相中での計算であるが、DMSO分子を直接計算に考慮することで、特にK<sup>+</sup>を含む構造で吸収ピークが大きくブルーシフト(457nm→417nm)し、M420の吸収ピークである420nmに近くなっていることが分かる。よって化学発光反応中においては*t*-BuOKがプロトン脱離剤としてのみではなく、そのK<sup>+</sup>と溶媒であるDMSOとがanion-3に直接相互作用することによりM420が形成されると推測された。

#### 4.まとめ

Lnのneutral及びanion-2では、それぞれの実験値335nm、440nmに近い計算値を示したことからLnおよびM440のイオン化状態を同定できたと思われる。しか

し、M440 のイオン化状態として、anion-2 のほかに anion-2+2K<sup>+</sup>(429nm)、anion-O+K<sup>+</sup>(434nm)であるという可能性も考えられる。また M420 に関しては、H-NMR による実験から考えると、anion-3 が実験値に近い値を示すと想定していたが、計算値は 420nm よりも長波長を示した。化学発光反応には *t*-BuOK が必須であることから、本研究でもそれを考慮して anion-3 のイオン化した部位に K<sup>+</sup>を加え計算を行ったが、やはり実験値とは異なる結果となった。しかしながら anion-3 と K<sup>+</sup>の間に DMSO 分子を置くと吸収ピークが大きくブルーシフトしたことから、H-NMR によって推定された anion-3 のイオン化状態にさらに DMSO 分子と K<sup>+</sup>が直接相互作用することで M420 が形成されると推測された。すなわち M420 のイオン化状態は anion-3 単体ではなく、DMSO 分子と *t*-BuOK 由来の K<sup>+</sup>の存在によって形成されているということである。また anion-COO に関しては、計算された吸収ピークが M440、M420 とは大きく異なるため、化学発光反応中においては anion-COO のイオン化状態を取らずに反応が進むと推測された。よって本研究によって明らかになった点としては、化学発光反応中においては恐らく Ln→anion-O→M440→M420 の順に脱プロトン化していくという点である。

今後は anion-3 に DMSO 分子を加えたものについて、DMSO 溶媒の効果を PCM で考慮し構造最適化、吸収ピークの予測を行い、さらに第一原理計算による IR スペクトル、NMR スペクトルの予測から、より詳細に M440、M420 のイオン化状態を同定し、さらに励起状態生成機構を理論的に研究していくことを計画している。そして生物発光反応におけるルシフェラーゼ - 基質間の特異的相互作用を明らかにすることで、ホタル生物発光反応の励起状態生成機構の解明につなげていくことを考えている。

## 5.謝辞

本研究の一部の計算は、東北大学情報シナジーセンターの大型計算機システムの Gaussian03 を利用して得られたものであり、ここに深く感謝します。

## 参考文献

- [1][a]F. McCapra, Y. C. Chang, V. P. Francois: *Chem. Commun.*, 1968, 22-23  
[b]F. McCapra: *Chem. Commun(London)*, 1968, 155-156  
[c]W. D. McElroy, H. H. Seliger, E. H. White: *Photochem. Photobio.*, 1969, 10, 153-170
- [2][a]N. Suzuki, M. Sato, K. Okada, T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 1969, 4683-4684  
[b]N. Suzuki, T. Goto: *Tetrahedron Lett.*, 1971, 2021-2024
- [3][a]E. H. White, E. Rapaport, H. H. Seliger, W. D. McElroy: *Bioorg. Chem.*, 1971, 1, 92-122  
[b]E. H. White, M. G. Steinmetz, J. D. Miano, P. D. Wildes, R. Morland: *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 3199-3208
- [4]E. H. White, E. Rapaport, T. A. Hopkins, H. H. Seliger: *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, 91(8), 2178-2180
- [5]N. Wada, R. Shibata: *J. Phys. Soc. Jpn.*, 1997, 66, 3312
- [6]R. Shibata, Y. Yoshida, N. Wada: *J. Photoscience.*, 2002, 9(2), 290-292
- [7]B. R. Branchini, D. M. Ablamsky, J. M. Rosenman, L. Uzasci, T. L. Southworth, M. Zimmer: *Biochemistry*, 2007, 46, 13847-13855

## [8]Gaussian 03, Revision D.01,

M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.