

ホタルルシフェリンの吸収・発光スペクトルの理論的研究

(名大院・情報科学¹、東大・物性研²)樋山みやび¹、秋山英文²、古賀伸明¹

【序論】ホタルルシフェリン(図1. 以下、ルシフェリン)は、ホタル生物発光の基質であり、かつ、その発光起源であるオキシルシフェリンの関連物質である。ホタル生物発光の理解のため、ルシフェリンの分光的性質にも古くから興味を持たれ研究がなされてきた[1-4]。例えば、吸収・発光ピークの pH 依存性が詳細に調べられている。しかし、そこでは未だに帰属不明なピークも存在する。pH を変化させた水溶液中では、pH=10 のとき 390nm に、pH=1-8 のとき 330 nm に主要吸収ピークが観測され、それぞれ一価のアニオン($6'OH, 4COO^-$)と二価のアニオン($6O^-, 4COO^-$)と一価のアニオン($6'OH, 4COO^-$)とに帰属されているが、pH=1 では 410nm に帰属不明の小さな吸収ピークが存在する。一方、主要発光ピークは、pH=1-10 で常に 540nm に位置し、二価のアニオン($6'O^-, 4COO^-$)の励起状態からの発光と帰属されているが、pH=1-2 で見られる 620nm のピークの起源が明らかではない。

本研究では、ルシフェリンの吸収発光の機構解明を目的とし、溶液中に存在する可能性のある ($6'OH, 4COO^-$)と($6'O^-, 4COO^-$)だけでなく、図1に示すような中性ルシフェリン($6'OH, 4COOH$)と、もう一つの一価のアニオン ($6'O^-, 4COOH$)、さらに強酸性条件下で存在すると考えられる中性ルシフェリンの窒素原子にプロトンが付加した ($6'OH, 3H^+, 4COOH$)と($3'H^+, 6'OH, 4COOH$)に対しても電子状態計算を行い、吸収・発光スペクトルの解析を行った。

【計算方法】基底状態と第一励起状態の安定構造を、それぞれ B3LYP/ AUG-cc-pVTZ 法と TDDFT B3LYP/AUG-cc-pVTZ 法を用いて決定するとともに、TDDFT 法でそれぞれの構造での第一励起エネルギーを計算した。溶媒効果をとるこむために連続誘電体モデル (PCM、水溶液) を用いた。

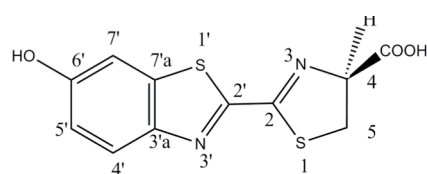


図1：中性ルシフェリン

【結果】図2に理論吸収スペクトルを示す。400nm-500nm の間のエネルギー領域では、($6'O^-, 4COOH$)、($6'O^-, 4COO^-$)、($6'OH, 3H^+, 4COOH$)の第一励起状態への吸収が起こり、これよりも短波長側にそれ以外の分子の第一励起状態への吸収が起きる。また、図3に理論発光スペクトルを示す。($6'O^-, 4COO^-$)の発光スペクトルの近辺には、($6'O^-, 4COOH$)、($6'OH, 3H^+, 4COOH$)、($3'H^+, 6'OH, 4COOH$)の発光スペクトルも存在し、長波長側には($6'OH, 4COO^-$)からの発光がある。これらの計算結果は、実験スペ

クトルと比べて、吸収スペクトルは長波長側へシフトし、発光スペクトルは短波長側へシフトしているものの、その形状や pH 依存性[4]をうまく再現する。

水溶液中におけるルシフェリンは、pH=10 の場合はほとんど二価のアニオン($6'O^-, 4COO^-$)として存在すると考えられる。一方、COOH と OH の pKa はそれぞれおよそ 4 と 8 であることから、pH=6~8 では COOH の H^+ が解離した($6'OH, 4COO^-$) が主に存在し、pH=4 では($6'OH, 4COO^-$) が存在し、($6'O^-, 4COOH$)も可能性はある。また、pH=1~2 ではこれらの分子に加えて、中性の($6'OH, 4COOH$)、さらにはプロトンが付加した($6'OH, 3H^+, 4COOH$)の分子が存在すると考えられる。

理論吸収スペクトルと実験スペクトルを比較すると、実験の pH=10 での 390nm の主要吸収ピークが ($6'O^-, 4COO^-$)に帰属されることは確かであるが、pH=1-8 の 330nm の吸収ピークには、($6'OH, 4COO^-$)だけでなく ($6'OH, 4COOH$)、($6'O^-, 4COOH$)、($6'OH, 3H^+, 4COOH$)、および($3'H^+, 6'OH, 4COOH$)が寄与している可能性があると言える。また、これまで帰属が不明であった pH=1 の 410nm 付近のピークは、強酸条件であることから($6'OH, 3H^+, 4COOH$)の第一励起状態への吸収と帰属できる。

理論発光スペクトルと実験スペクトルを比較すると、pH=6-10 で 540nm に現れる主要ピークは確かに ($6'O^-, 4COO^-$)に帰属されるが、pH=1-4 の場合は ($6'O^-, 4COOH$) が寄与している可能性がある。また、これまで帰属が不明であった強い酸性条件で現れる 620nm のピークは、($6'OH, 4COO^-$)からの発光であると考えられる。計算の詳細については当日発表する。

参考文献

- [1] R. A. Morton et al., Biochemistry **8** (1969) 1598
- [2] J. Jung et al., J. Am. Chem. Soc. **98** (1976) 3949
- [3] O. A. Gandelman et al., J. Photochem. Photobiol. B**19** (1993) 187
- [4] Y. Ando and H. Akiyama, Jpn. J. Appl. Phys. **49** (2010) 117002

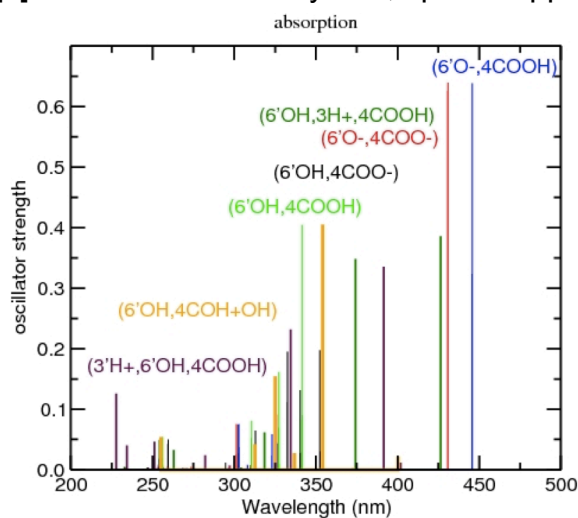


図 2 : 理論吸収スペクトル

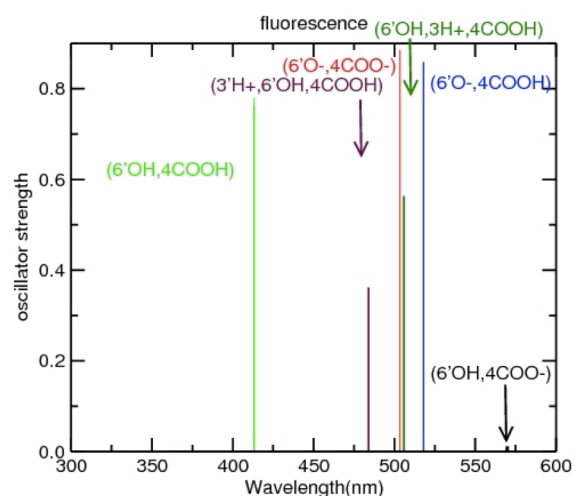


図 3 : 理論発光スペクトル