

2P083

ホタルルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルにおける pH 依存性の理論的研究 — 密度汎関数計算から評価した共役酸・塩基の濃度比による解析

(名大院・情報科学¹、東大物性研²、横浜市大院・生命ナノ³)

樋山みやび¹、秋山英文²、山田健太³、古賀伸明¹

Theoretical Study for pH Dependence of Absorption and Fluorescence Spectra of Firefly Luciferin: Analysis using Concentration Ratio of Conjugate Acids and Bases Estimated with DFT Calculations

(¹Nagoya Univ., ²ISSP, Univ. of Tokyo, ³Yokohama City Univ.)

Miyabi Hiyama¹, Hidefumi Akiyama², Kenta Yamada³, Nobuaki Koga¹

【序論】ホタルルシフェリン（以下、ルシフェリンと呼ぶ）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されてきた[1-8]。水溶液中におけるルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルに現れるピークは電子状態計算から得られるエネルギー準位から帰属されている[8]。

ルシフェリンは、酸性を示すカルボキシ基やフェノール性ヒドロキシ基とともに、塩基性を示す窒素原子を持つ。したがって、水溶液中での吸収・発光過程の理解のためには、それぞれの実験条件で存在する化学種を知ることが必要であり、そのために有用な情報の一つに、 pK_a が挙げられる。ルシフェリンとその共役酸・共役塩基の場合、カルボキシ基の pK_a は 8.7 であるということが実験的にわかっている[3]。その他の化学種についても pK_a を知ることができれば、図 1 に示すような pH に依存するルシフェリンの水溶液中における吸収・蛍光スペクトルの解析を、励起エネルギーだけから考える場合よりも、より精度よく行うことができると考えられる。

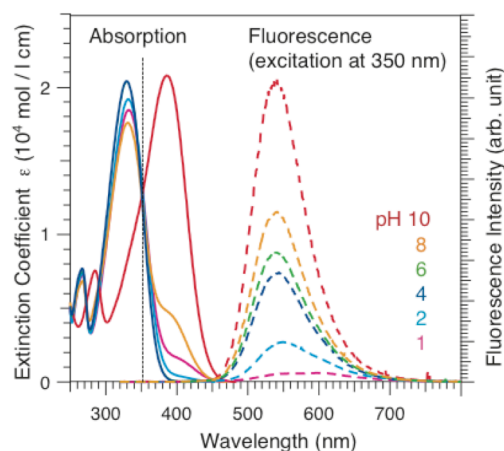


図 1 : ルシフェリン吸収・
蛍光スペクトル [7]

そこで本研究では、ルシフェリンとその共

役酸・塩基の pK_a を見積もり、pH ごとのスペクトル解析を行うことを目的とする。

【方法】基底状態と第一励起状態の pK_a を得るため、ルシフェリンとその共役酸・塩基について密度汎関数法を用いて得られた基底状態と励起状態それぞれの安定構造における振動解析を行った。振動解析の計算から得られる Gibbs の自由エネルギーを用いて、それぞれの化学種の基底状態と励起状態における pK_a を見積った。さらに、実験値を利用することにより pK_a の補正を行い、溶媒の pH ごとにそれぞれの化学種の濃度を見積もった。励起エネルギー、振動子強度、および pH ごとの濃度を考慮することにより、理論吸収スペクトルを得た。

【結果】pH 10 の理論吸収スペクトルを図 2 に示す。実験スペクトルと比べて長波長側へシフトしているものの、図 1 に示す pH 10 の場合の実験吸収スペクトルとこの理論吸収スペクトルの形状はよく一致している。実験吸収スペクトルに見られる 400 nm 付近のピークは $(6'O^-, 4COO^-)$ の吸収からなり、高エネルギー側にわずかに $(6'OH, 4COO^-)$ のピークが含まれている状況を明確に示すことができた。

さらに、pH 1-2 で 400nm 付近に現れる吸収スペクトルのピークは中性のルシフェリンの窒素にプロトン付加した分子の吸収ではなく [8]、アニオンの窒素にプロトン付加した化学種の吸収であることがわかった。振動子強度の計算により吸収スペクトルの解析は容易になってきたが、酸性や塩基性の官能基をもつ分子の水溶液中の吸収スペクトルの解析には濃度の計算が必要であることがわかった。

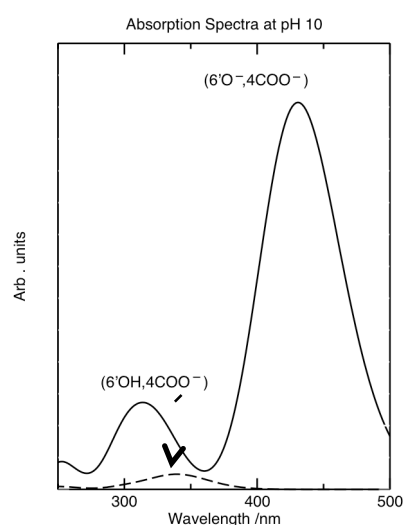


図 2 : pH 10 の時の理論吸収スペクトル
実線 : $(6'O^-, 4COO^-)$
破線 : $(6'OH, 4COO^-)$

参考文献

- [1] Seliger et al. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136.
- [2] Seliger et al. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **47**, 1129.
- [3] Morton et al. (1969) *Biochem.* **8**, 1598.
- [4] White et al. (1971) *Bioorg. Chem.* **1**, 92.
- [5] Jung et al. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3949.
- [6] Gandelman et al. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **19**, 187.
- [7] Ando et al. (2010) *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 117002.
- [8] Hiyama et al. (2012) *Photochem. Photobiol.* **88**, 898.