

3P023

生物発光の光制御に向けたケージド・ルシフェリンの分光評価

(東大物性研*, 産総研**)

○倉田麻貴*, 樋山みやび*, 挟間優治*, 東暉舜*, 吉田正裕*, 望月敏光**

秋山英文*

Spectroscopic evaluation of caged-luciferin toward light control of bioluminescence

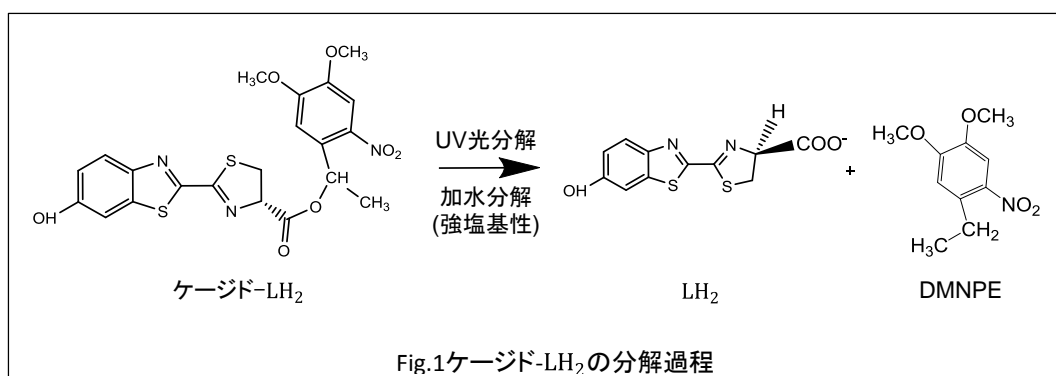
(ISSP, Univ. Tokyo*, AIST**)

○Kurata Maki*, Hiyama Miyabi*, Hazama Yuji*, Azuma Terumitsu*,

Yoshita Masahiro*, Mochizuki Toshimitsu**, Akiyama Hidefumi*

【序論】ホタル生物発光は、ルシフェリン(LH₂)分子がタンパク質ルシフェラーゼの中で酸化反応によりオキシルシフェリンに変わり、その反応エネルギーの一部が光として放出されることで発光する。その反応過程を明らかにするためには、光刺激で反応をトリガーし、時間分解分光計測を行うことが有効である。そこで我々はケージド・ルシフェリンに注目した。ケージド化合物とは、UV 光照射により光分解する化合物のことを言う[1]。ケージド・ルシフェリンは、ホタル生物発光の基質であるLH₂のケージド化合物であり、ホタル生物発光をはじめ触媒反応の分光学的研究を行うための強力なツールとなることが期待される。本研究では、Fig. 1のような1-(4,5-ジメチルオキシ-2-ニトロフェニル)エチル エステル D-ルシフェリン(以下、ケージド-LH₂とする)の基礎的性質の理解を目指した。特に、UV 光分解や強塩基性条件下での加水分解によるケージド-LH₂からLH₂の生成や分解を分光手法により定量することが目的である。

まずケージド-LH₂の加水分解後の吸収スペクトルを測定し、LH₂の生成量の確認を目指した。Fig. 1に示すように、1分子のケージド-LH₂はUV 光分解または加水分解により、1分子のLH₂と1分子の生成物DMNPEに分解されることはすでに知られている。しかし分解後の吸収スペクトルには、ケージド-LH₂、LH₂、DMNPEをそれぞれ区別できる特徴的なピークが見られない、これらの化学種の濃度が不明で強度比もわからないという問題があり、これらの物質のそれぞれの吸収スペクトルの特定が必要である。そこで本研究では、既に得られているケージド-LH₂とLH₂の吸収スペクトルを用いて、DMNPEの吸収スペクトルの形状を調べた。



【実験方法】吸収スペクトルは汎用紫外～近赤外分光測定装置を使って測定した。また、D-LH₂の濃度を推測するため、生物発光ではMgイオン、アデノシン三リン酸(ATP)、ルシフェラーゼが過剰に存在する条件下で行い、当研究室で開発した発光量絶対値測定法[2]を用いて発光量子収率を算出した。

ここでケージド-LH₂の加水分解では、ケージド-LH₂、LH₂、DMNPE以外の物質が生成されないことを

仮定した。また生成されるLH₂のD体とL体の比率を仮定して、DMNPEの吸収スペクトルを予想した。同時にDMNPEの予想スペクトルと比較するため、B3LYP/6-31+G(d,p)を用いてDMNPEの構造最適化を行い、TDDFT計算により理論吸収スペクトルを求めた。

【結果・考察】Fig. 2は加水分解前(黒実線)と後(赤実線)の吸収スペクトルを示す。加水分解前の吸収スペクトル(黒実線)は、ケージド-LH₂の吸収スペクトルである。

生物発光測定では加水分解前 7.03×10^{-5} (M)のケージド-LH₂から、加水分解後 1.35×10^{-5} (M)のD-LH₂が生成されることがわかった。この濃度を用いて加水分解後の吸収スペクトルを予想した。Fig. 3にその結果を示す。

Fig. 3(a)は、加水分解後に生成されたLH₂のD体とL体の比率が1:0でラセミ化していないと仮定したときの吸収スペクトルを示す。Fig. 3(a)の赤実線は生物発光測定から決定した濃度でのLH₂の吸収スペクトルである。またFig. 3(a)の青実線に加水分解せずに残ったケージド-LH₂の吸収スペクトルを示した。そしてFig. 2の加水分解後の吸収スペクトルからFig. 3(a)のケージド-LH₂とLH₂の吸収スペクトルを引くことにより、DMNPE(緑点線)の吸収スペクトルが得られた。

Fig. 3(b)は、D体とL体の比率が1:1でラセミ化しているときを仮定した吸収スペクトルを示す。Fig. 3(b)の赤実線はLH₂の吸収スペクトルで、青実線はケージド-LH₂の吸収スペクトルである。そしてDMNPE(緑点線)の吸収スペクトルが得られた。

DMNPEの理論吸収スペクトル計算と比較すると、Fig. 3(b)に近いスペクトル形状であった。そのため生成されたLH₂は、ラセミ化している可能性がある。

今後の課題はラセミ化の有無、LH₂の生成量を確認し、その後ケージド-LH₂をレーザーでUV光分解させたときのLH₂の生成量を定量的に測定することである。

【参考文献】

- [1]G. C. R. Ellis-Davies Nature Method (2007)
- [2]Y. Ando et al. Nature Photonics 2, 44 - 47 (2008)

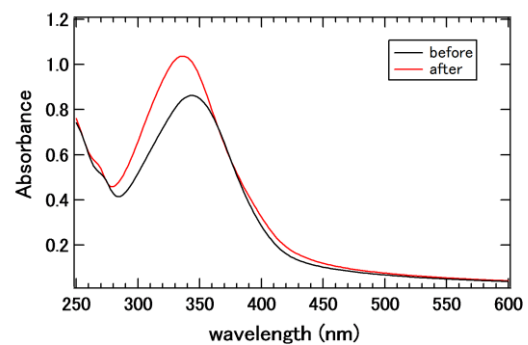


Fig.2 加水分解による吸収スペクトルの変化

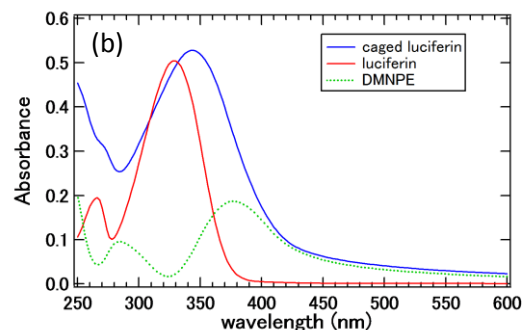
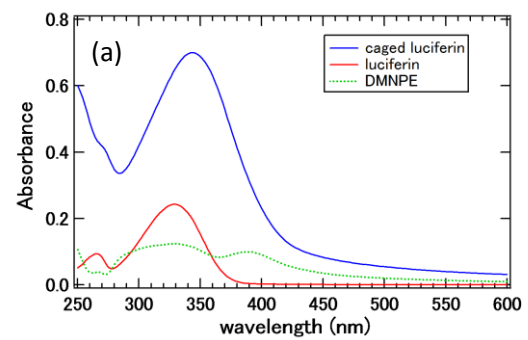


Fig.3 加水分解後に生成されたLH₂がD体とL体の比率が1:0でラセミ化していないとき(a)と1:1でラセミ化しているとき(b)の吸収スペクトル