

10. 海ホタルルシフェリンの構造

名 大 理 ○ 平 田 義 正 ・ 江 口 昇 次
長 崎 大 薬 下 村 脩

海ホタル *Cypridina hilgendorffii* は古くから知られている発光生物であつてルシフェリン — ルシフェラーゼ系では最も簡単な発光系を有している。即ち、その発光にはルシフェリン、ルシフェラーゼのほか酸素のみが必要である。¹⁾ このため生物発光機構の解明には *Cypridina hilgendorffii* は最も適当なものの一つで、Harvey を始め多くの研究者がその発光について報告している。²⁾ けれどもその発光物質 *Cypridina luciferin* は1957年に著者らが始めて結晶化に成功するまで純粋には得られなかつた。³⁾

Cypridina luciferin の化学構造に関しては多くの推定がなされて、プロテオーゼ (Harvey) リン脂質 (Kanda), オキシベンゼン誘導体 (Anderson), 色素ペプチド (Mason) などといわれていたがいずれも不純な *Luciferin* を使用したための誤りであることが明らかとなつた。⁴⁾ 我々の得た結晶についての研究結果 *Cypridina luciferin* は一種のインドール誘導体であることが判明した。以下 *Cypridina luciferin* の抽出結晶化から推定構造式の提出までの経過を述べる。

D) *Cypridina luciferin* の抽出及び結晶化

Luciferin は極めて酸化を受けやすいため、空気中での取扱いはできない。結晶化が長い間成功しなかつたのはこのためと思われる。

著者らは次のようにまず Anderson のベンゾイル化法⁵⁾ を改良して用いて粗精製 *luciferin* を得これを更に粉末濾紙での分配クロマトグラフィを行つて得られた精製ルシフェリンを塩酸を用いて結晶化した。

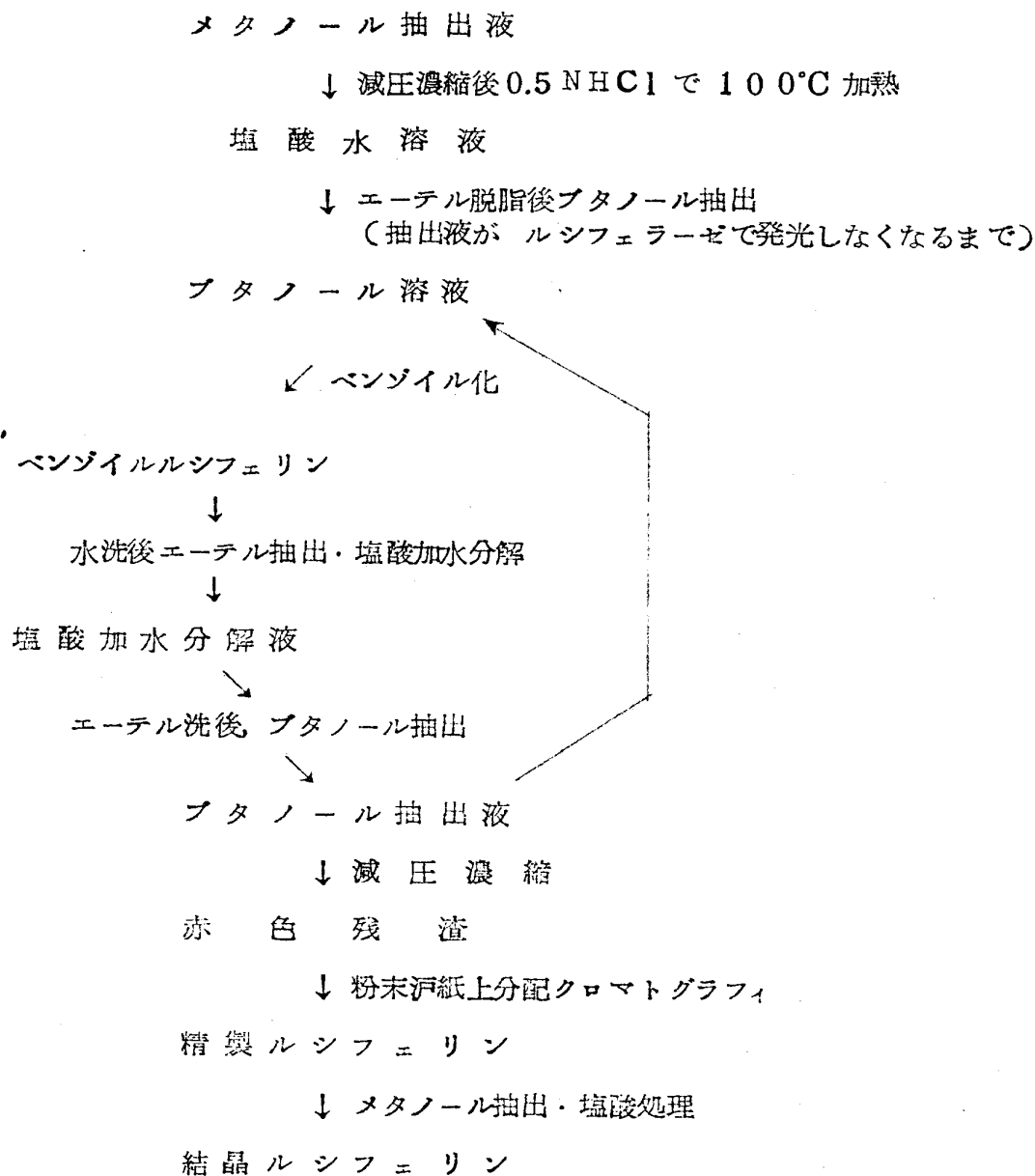
海ホタル乾燥粉末

↓ 乾燥ベンゼンで48時間脱脂

脱脂粉末

↓ H₂ 気流中メタノール抽出(48時間)

以下ずつと H₂ 気流中



抽出装置はすでに報告したが³⁾ その後改良してステンレス鋼製のものに変え一度に2Kgの海ホタルを処理できるようになった。

2) 結晶Luciferinの性質

結晶Luciferinは橙赤色針状結晶でmp.182~195°。メタノール、エタノールによく溶け、水・アセトンには難溶性、エーテル・ベンゼンには溶けない。結晶の発光力は原料の約37000倍である。分子量はRast法が適用できないためBarger法、フェリシアン化カリウムを用いての酸化滴定などを行って470と定め、分析の結果分子式は、 $C_{21}H_{30}O_2N_8Cl_2$ であることがわかった。

赤外線吸収スペクトルは、はつきりしたバンドを示さないが1648, 1666 (モノ置換グアニジニウム), 3250 (broad) cm^{-1} { KBr 法 } に吸収がある。

U.V. は λ_{max} 435 $m\mu$ (log ϵ 3.8 メタノール中) でこの吸収は空气中に放置すると一旦465 $m\mu$ まで移動するが時間がたつにつれ再び短波長に移つてついには消失する。また液性によつては強酸性で470 $m\mu$ 附近まで、アルカリ性では逆に375 $m\mu$ 附近まで可逆的に移動する。6)

呈性反応はニンヒドリン, エールリツヒ, 塩化鉄反応いずれも陰性で, ビウレット, 坂口反応が陽性である。従つてモノ置換グアニシル誘導体であると思われる。

3) Cypridina luciferin の酸化還元生成物

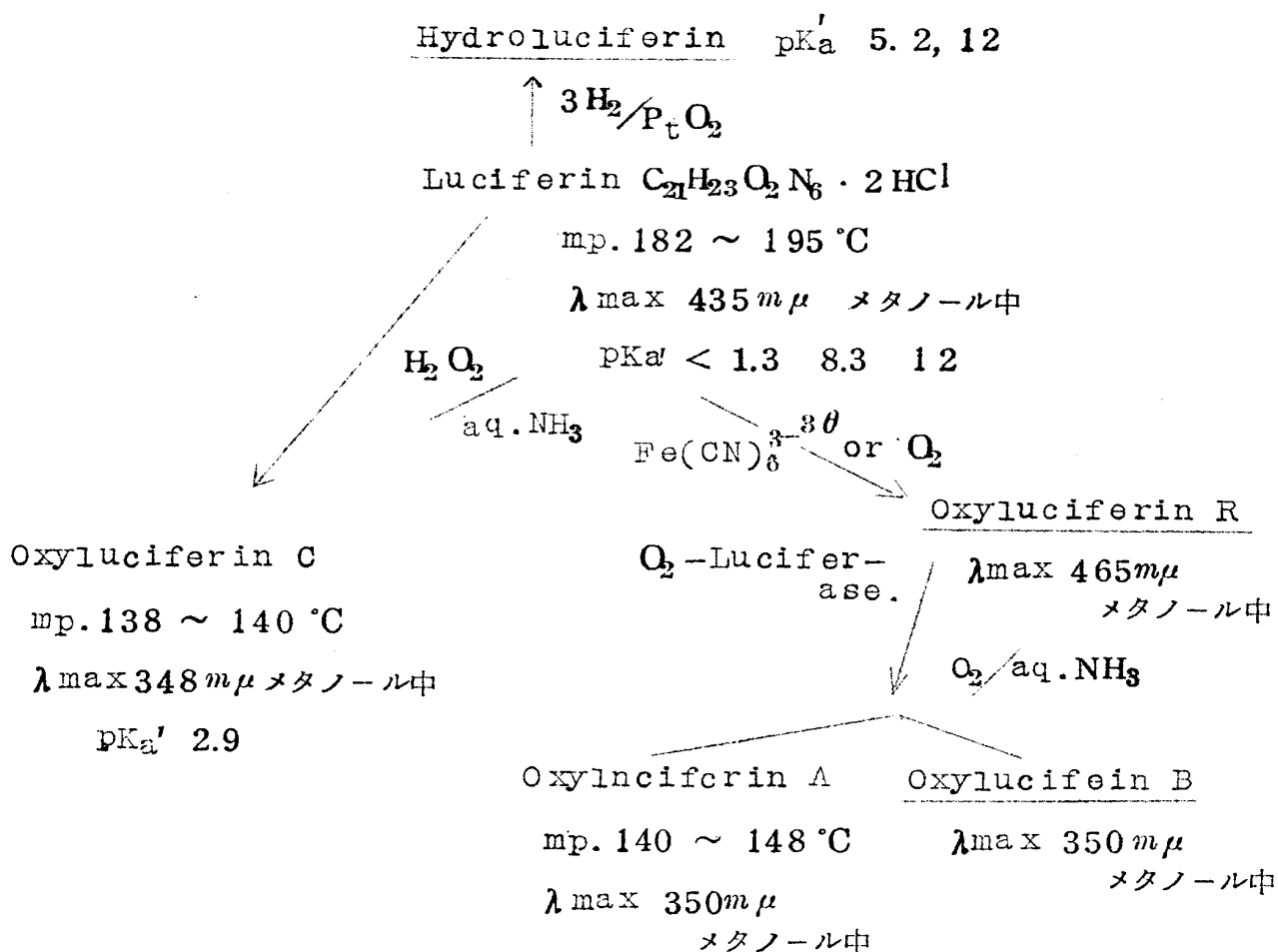
Luciferin 溶液を空气中に放置すると黄色から赤色に変わるが更に時間が過ぎると脱色する。二日間放置した溶液をペーパークロマトグラフィで調べると赤色の物質と青色蛍光を有する二つの物質が存在している。赤色物質は, Oxyluciferin R, 他の二つは Oxyluciferin A, B と呼ぶことにする。

Oxyluciferin A はメタノール・水・塩酸から黄色針状結晶 mp 140~148° (135° で着色) として得られたが, Oxyluciferin B は結晶化できなかつた。Oxyluciferin R はまたフェリシアン化カリウム酸化でも収量よく得られるが結晶としては得ていない。Oxyluciferin A, B はアンモニアの存在で酸化すると収量よく得られるが, A はまたルシフェラーゼで発光させた時にも生ずる。

Luciferin をアンモニアの存在で過酸化水素酸化すると Oxyluciferin C と呼んでいる物質を生ずるが, これは硝酸塩として黄色針状結晶として得られる。mp. 138~140°

以上の四つの酸化物はいずれも発行能を有していない。

Luciferin を酸化白金触媒で接触還元すると3モルの水素を吸収してHydro-luciferin と呼ぶ物質を生ずるがこのU V はトリプタミンのそれとほとんど一致する。以上の物質の相互関係は次のようにまとめられる。



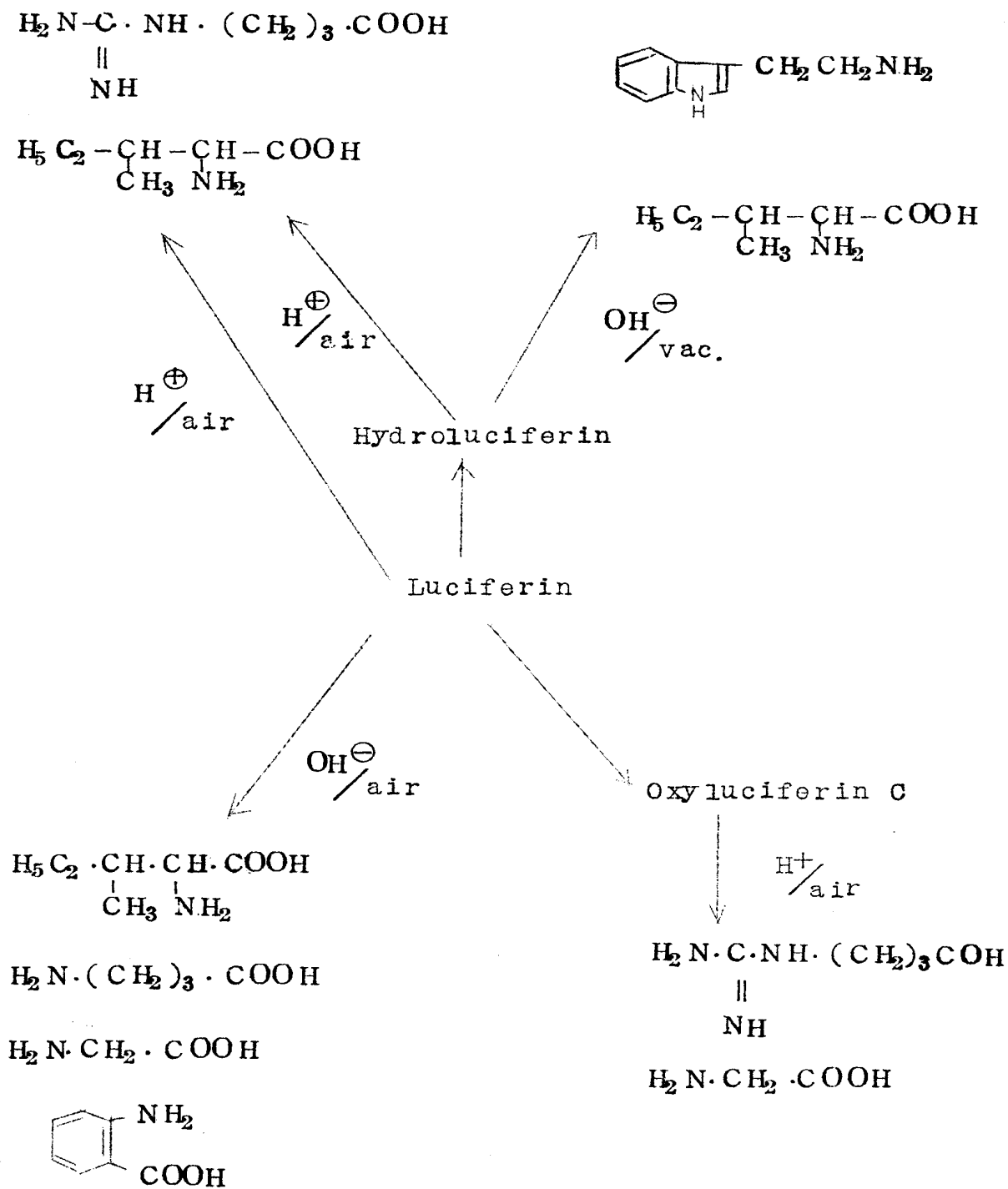
Oxyluciferin A, B の赤外線吸収スペクトルは, Luciferin と似て, はつきりしたバンドはないがほとんど同じで, 1430, 1680, 3200 (broad) cm^{-1} に吸収をもっている。これら酸化物の構造については未だ研究していない。Oxyluciferin C の赤外線吸収スペクトルは, 750, 1125, 1385, 1547, 1650, 3250 (broad) cm^{-1} に強い吸収がある。

4) 加水分解生成物について

酸加水分解ではたゞグリシン(極少量), イソロイシン, γ -グアニジル酪酸を生ずる。この結果はアルギニン, ロイシン, イソロイシン, グルタミン酸, アラニン, ヴァリン, メチオニンなど非常に多くのアミノ酸を生ずると報告している Mason⁷⁾ や Tsuji²⁾ の結果と全くことなっているが, 彼等の精製ルシフェリンがいかにか不純であつたかどうかわれる。


アルカリ加水分解ではグリシン, イソロイシン, γ -アミノ酪酸, アントラニル酸が得られる。HydroLuciferin, Oxyluciferin A, B, R, C, についても種々の条件で加水分解を行つたが, A, B, R については Luciferin と, ほとんど同じ結果になる。Hydro-

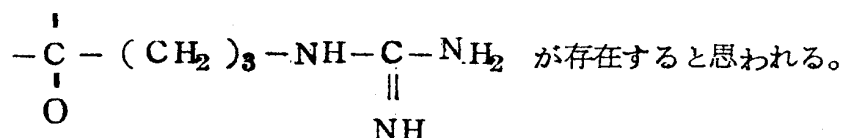
luciferin ではトリプタミンがとれること, Cではイソロイシンがとれないことがことな
つている。加水分解の結果を要約すれば次のようになる。



5) Hydroluciferin の構造

Hydroluciferin は未だ結晶としては得られなかつたが、ペーパークロマトグラフィでは単一物質である。吸収したモルの H_2 のうち1モルは $N-OH$ を NH にするのに消費される(これについては後に又のべる)。Hydroluciferin の U.V. がトリプタミンの

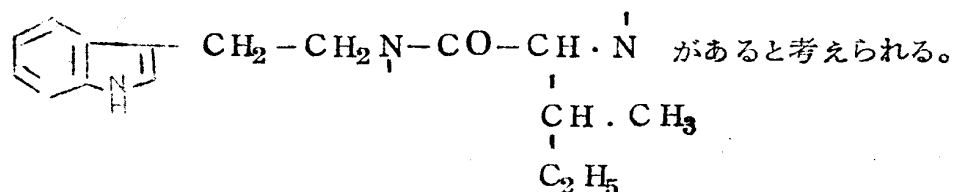
それと一致するから  CH_2CH_2N- グループがある。坂口反応陽性であり、空気存在中での酸加水分解で、 γ -グアニジル酸がとれるから



しかしこれは真空中で加水分解した時には生じないから Hydroluciferin においてペプチド結合で存在するのでなく、もつと還元された状態に結合していなければならない。当然のことながらグアニジル基はアルカリ分解ではアミノ基に変化する。この他イソロイシンがとれ、これで炭素21ヶ、窒素6ヶとなるから Hydroluciferin の構成々分はトリプタミン、イソロイシン、 γ -グアニジル酪酸グループの3ヶである。グリシンは、しばしば分解産物として認められるが、この場合にも構成々分とは考えられない。

加水分解をや、温和な条件で水酸化バリウムを使用して行くと、ニンヒドリン及びエールリツヒ陽性の部分が新たに得られるがこれを抽出して更に加水分解すると前記試薬で検出できる物質としてはトリプタミンとイソロイシンのみを生ずる。

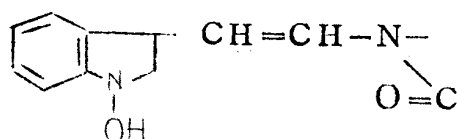
従つて Hydroluciferin には



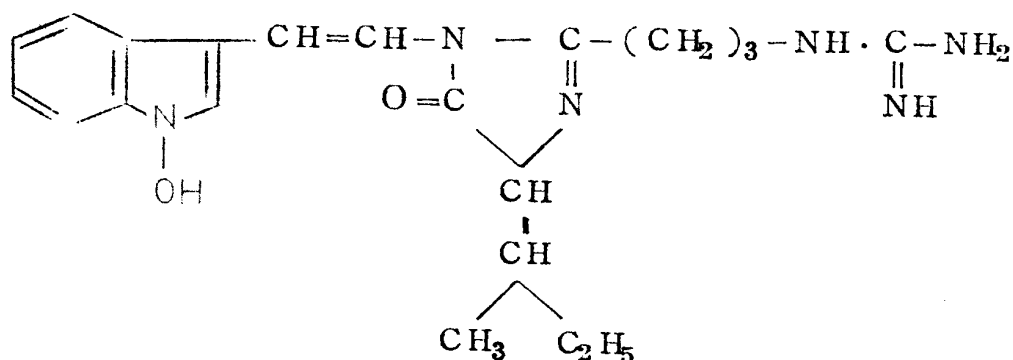
Hydroluciferin は、ニンヒドリン陽性であるがイソロイシンのNは一級のアミノ基として存在していない。即ち 2.4 DNFb で処理後加水分解しても、DNP イソロイシンはとれないし亜硝酸と反応させて加水分解してもイソロイシンがとれてくる。従つて γ -グアニジル酪酸はイソロイシンのNに必ず結合していなければならない。以上の結果 Hydroluciferin

a) Luciferin を $\text{Ba}(\text{OH})_2$ で温和な条件で加水分解しても芳香族アミンを生じない。一般に $\alpha\text{-OH}$ インドール核はこの条件で簡単に分解して芳香族アミンを生ずるから Luciferin には $\alpha\text{-OH}$ はないものと考えられる。

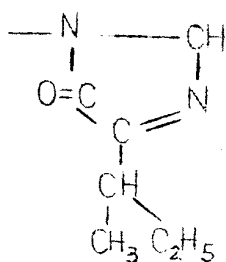
b) N-OH インドール誘導体はフェリシアン化カリウムで酸化されて不安定な赤色物質を生ずるが Luciferin の場合も同じ状態を呈する。Luciferin の λ_{max} が $435\text{ m}\mu$ にあることからインドール核と共役できるグループがなければならない。従つて HydroLuciferin の骨核から Luciferin には次の部分構造が与えられる。



ところで過酸化水素酸化で得られた OxyLuciferin C は加水分解してもイソロイシンを生じないが、C を還元後加水分解するとイソロイシンが得られるようになる。このことは C のイソロイシン N が酸化されてオキサイドのようなものになっていることを意味するが、一般に、一級、二級アミンはこの条件でオキサイドを与えないから Luciferin 中でイソロイシンの N は、 $-\text{N}=\text{C}<$ として存在するものと考えなければならない。これで水素吸収量も都合よく説明される。従つて、Luciferin は



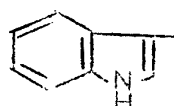
なる推定式をもつものと考えられる。

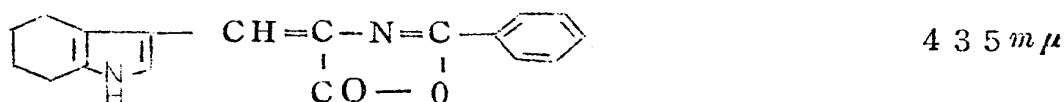
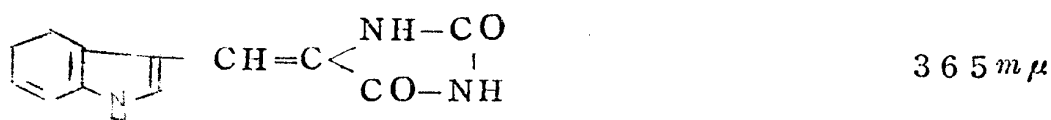
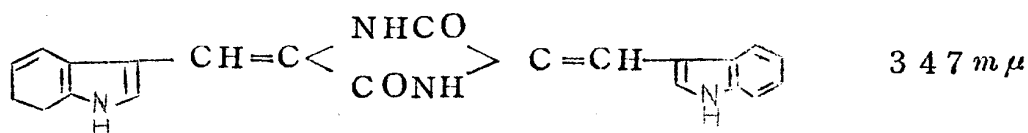
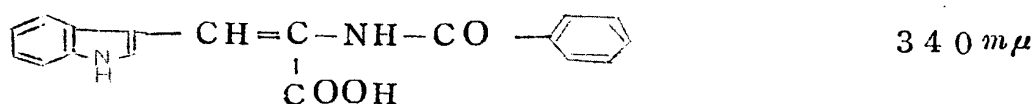


4 (or 5) -イミダゾロン核の二重結合の位置はの可能性もあるが加水分解でイソロイシンが収量よくとれることや他の分解によつて生ずる物質が検出されないことから一応上のように考えた。

この構造で, Luciferin の pK_a 12 (グアニジニウム), 8.3 (イントールN-OH) < 1.3 (イミダゾロン核) は説明できる。

可組部吸収 $435 m\mu$ を説明することは未だ適当なモデル化合物が合成できないため不充分であるが一応次のように考えている。

 $CH=CH-N-$ なる系をもつ化合物を合成して吸収を調べた結果

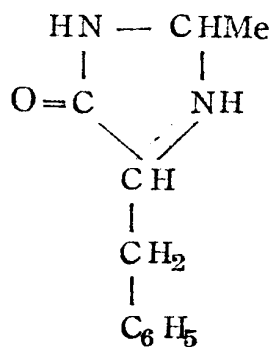


(いずれも メタノール中)

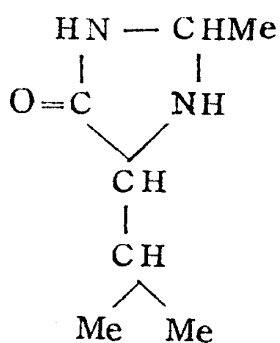
であつて, N-OHの効果は不明であるにしてもイミダゾロン核との共役系を考えなければならぬ。ところがアミドのエノール化は不可能であるからイソロイシンの $N=C$ が関与していると考えられる。そうすれば酸性でプロトン付加によつて一種のアミジニウムカチオンになることにより吸収は長波長に移動する。アルカリ性ではインドール核のN-OH が解離して $N-O^-$ となるから >N^+-O^- のインドレニン型構造の寄与のため共役系は切れて吸収が短波長に移動する。モデルとしてのインドレニウム塩の吸収が大体 $380 m\mu$ でアルカリ性での Luciferin の λ_{max} と大体一致している。

いずれにしてもアミド窒素のロンペア-電子を介しての共役効果がどの程度のものか疑問であるので更にモデル化合物を合成して検討を要するところである。

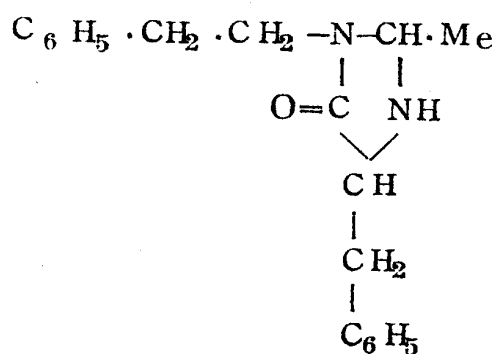
最後に, Hydroluciferin の pK_a' 5.2 についてモデル化合物 pK_a' から検討した結果をのべる。合成した5-イミダゾリドン誘導体のおもなものとその pK_a' 値をみると次のようである。



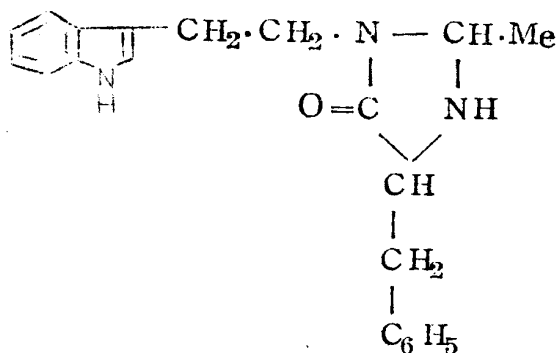
4.3



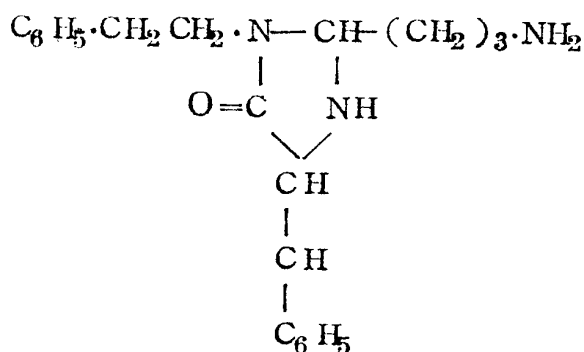
4.7



3.8



3.8



4.6

(いずれも 33%メタノール中)

このほかいずれの場合も $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$ 基は $-\text{CH} \begin{array}{l} \text{Me} \\ \text{Me} \end{array}$ 基に比べて pK_a' を小さくするように働いている。最後のものこの点を考えると Hydroluciferin の pK_a' 5.2 に極めて近い値を示す。但し γ -グアニル基の効果を考慮におく必要があるからまだ最終的に結論は下せない。

今までの結果上のべた Hydroluciferin の構造, Luciferin の構造ともに推定構造式であるが、更にモデル化合物からの検討, 酸化物の構造研究などを進めれば, Luciferin の精進についても手掛りが得られるものと信ずる。

あ と が き

海ホタルの採集に御協力を頂いた宮本左門氏, 並びに研究費を援助して頂いたロックフェラ
-財団に感謝致します。

文 献

- 1) Harvey : Science 44 152 (1916)
- 2) F.H. Johnson : The Luminescence of Biological Systems" A.A.A.S. (1955)
- 3) O. Shimomura. T.goto and Y.Hirata. Bull. chem. Soc. Japan 30 927 (1957)
- 4) Y.Hirata. O. Shimomura. S. Eguchi. Tetra Hedron Letters No. 5 (1959)
- 5) R.S. Henderson. J. gen. Physiol., 19 301 (1935)
- 6) 木村, 江口, 平田, 日化会第 12 年会(京都)発表(1959)
- 7) H.S.Mason. J. Am. Chem. Soc., 74 4727 (1952)