

原子衝突学会誌「しょうとつ」
2019年9月17日発行
第16巻第5号

原 子 衝 突 学 会 誌

しょうとつ

Journal of Atomic Collision Research

Vol.16 Issue5

2019

解説

ホタル生物発光関連分子の電子状態に関する理論研究

樋山みやび

原子衝突学会賛助会員（五十音順）

アイオーピー・パブリッシング・リミテッド（IOP 英国物理学会出版局）

Institute *of* **Physics**

<http://journals.iop.org/>

アドキャップバキュームテクノロジー株式会社



<http://www.adcap-vacuum.com>

有限会社イーオーアール



Electronics Optics Research Ltd.

<http://www.eor.jp/>

イノベーションサイエンス株式会社



<http://www.innovation-science.co.jp/>

株式会社オプティマ

Optima Corp.

<http://www.optimacorp.co.jp/>

クリムゾン インタラクティブ プライベート リミテッド

enago™

<http://www.enago.jp/>

<http://ulatus.jp/>

<http://www.voxtab.jp/>

コスモ・テック株式会社



<https://www.cosmotec-co.jp/>

株式会社サイエンス ラボラトリーズ



株式会社サイエンス ラボラトリーズ

<http://www.scilab.co.jp/>

真空光学株式会社

真空光学株式会社 - Vacuum & Optical Instruments -

<http://www.shinku-kogaku.co.jp/>

スウェージロック・ジャパン

Swagelok

<http://www.swagelok.co.jp>

スペクトラ・フィジックス株式会社



<http://www.spectra-physics.jp/>

ソーラボジャパン株式会社



<http://www.thorlabs.jp/>

ツジ電子株式会社



<http://www.tsujicon.jp/>

ツジ電子株式会社

株式会社東京インスツルメンツ



<http://www.tokyoinst.co.jp/>

株式会社ナバテック

真空機器の未来と歩む



<http://www.navatec.co.jp/>

仁木工芸株式会社



<http://www.nikiglass.co.jp/>

伯東株式会社



<http://www.g5-hakuto.jp/>

株式会社ラボラトリ・イクイップメント・コーポレーション



<http://www.labo-eq.co.jp/>

原 子 衝 突 学 会 誌

しょうとつ

第 16 卷 第 5 号



THE ATOMIC COLLISION
SOCIETY OF JAPAN

目 次

解説		
ホタル生物発光関連分子の電子状態に関する理論研究	樋山みやび	... 75
原子衝突若手の会第 40 回秋の学校開催のお知らせ	第 40 回秋の学校 開催事務局	... 87
2019 年度国際会議発表奨励賞について	顕彰委員会委員長	... 87
「しょうとつ」原稿募集	編集委員会事務局	... 87
ユーザー名とパスワード		... 88

ホタル生物発光関連分子の電子状態に関する理論的研究

樋山みやび

群馬大学大学院環境創生部門 〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1

miyabi@gunma-u.ac.jp

令和元年 8 月 29 日原稿受付

初夏になると日本のあちこちでホタルを見ることができる。ホタルの発光は、タンパク質酵素内での化学反応により起こる現象であることが知られているが、発光機構については未だ謎の部分も多い。この発光反応の解明のためには、基質や発光体など、発光反応に重要な役割を果たす分子そのものの情報を得ることが必須である。私たちはこれまで、ホタル生物発光の基質であるルシフェリンと発光体であるオキシルシフェリンの分光的な性質を理論的に調べてきた。本解説では、これまで行ってきた理論研究により実験スペクトルがどこまで解釈できるようになったかについて紹介する。

1. 序論

生物発光は生物内で起こる化学反応により発光する現象であり、バクテリア、藻、キノコ、魚、イカ、エビ、昆虫等で観測されている。その多くは基質であるルシフェリンがタンパク質酵素中で化学反応を起こすことにより発光する。図1に示すように、生物によって異なるルシフェリンが生物発光に使われている。このため、反応過程も生物の種類に依存する [1]。

中でもホタル生物発光は、pH やタンパク質の変異体など環境条件の違いで異なる発光色になることや、反応に関与する物質は生体にとって害が少ないことから、環境、医療、バイオテクノロジー分野で広く利用されている。ホタル生物発光の反応過程では、基質であるホタルルシフェリン（以下、単にルシフェリンと呼ぶ）がルシフェラー

ゼタンパク質中で酸化反応を起こし発光が起きる。この反応は「ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応」と呼ばれている [2]。

図2に、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の詳細を示す。この反応は二段階で進むことが知られている。まず、ルシフェリンはアデノシン三リン酸(ATP)と結合し、Luciferyl-AMP 中間体を生成する。次に、この中間体が酸素と結合し、二つ目の中間体(Dioxsetanone 中間体)を経由してCO₂、アデノシン一リン酸(AMP)および励起状態のオキシルシフェリンになる。ルシフェラーゼそのものは反応の前後で変化せず、反応の触媒として働く。ホタル生物発光ではルシフェラーゼが化学エネルギーを光エネルギーに変換している、とも言える。

この反応はルシフェラーゼや ATP を使うことから、生体内のルシフェラーゼを検出することにより、ルシフェラーゼをつけた薬剤やルシフェラーゼを含む細胞の動態を画像で調べることのできる *in vivo* 分子イメージングに用いられる。また、ルシフェリン1分子と ATP 1分子から中間体を経由してオキシルシフェリンが生成するため、ATP も検出することができる。このため、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応はRNAの生物発光解析による遺伝子解析に用いられている。他にも、培養を行う検査法に比べて、迅速に測定できる利点を

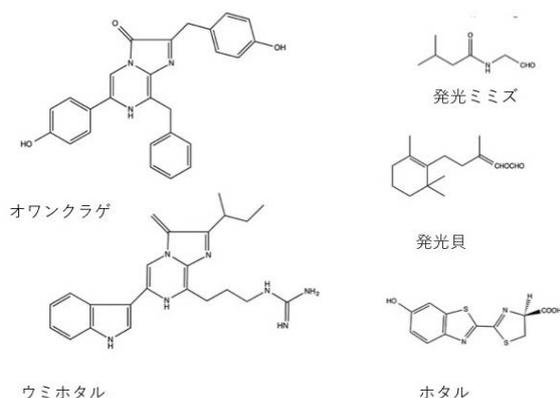


図1: 代表的な発光生物のルシフェリン。

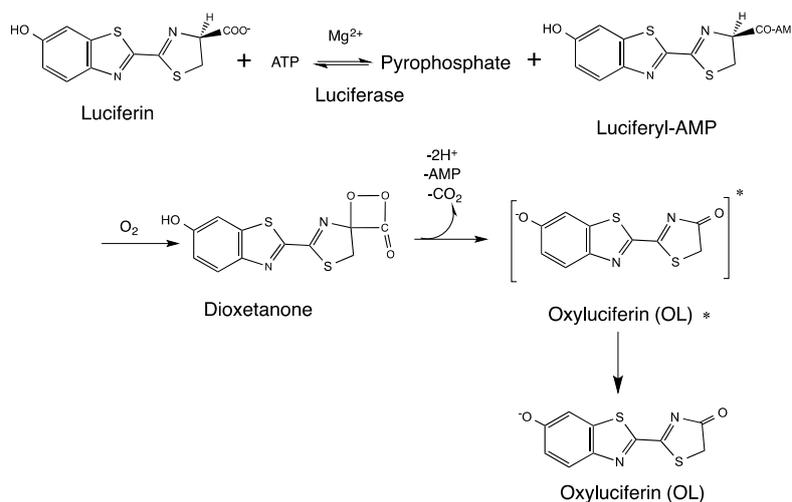


図 2: ホタル生物発光におけるルシフェリン-ルシフェラーゼ反応.

生かし、食品工場での微生物検査や食品製造ラインなどの汚染微生物の検出など食品分野に用いられている。現在では手軽に汚染状況を検査できるキットも実用化されている [1].

ホタル生物発光は、発光現象の不思議、という観点だけでなく、上記のような遺伝子解析や微生物検査などの応用研究の重要性から、発光機構解明の基礎研究が多く行われている。1917年に、Harveyにより北米産ホタルの発光がルシフェリン-ルシフェラーゼ反応であることが初めて確認された [3]. その後、Contiら [4] や Nakatsuら [5] の X 線構造解析から、北米産ホタルルシフェラーゼやゲンジボタルルシフェラーゼの構造やアミノ酸残基の違いの発光色に対する効果が明らかになった。2008 年には Ando らの絶対発光量測定により、北米産ホタルの発光量子収率が 41% であると決定され [6], それまで 80% [7] と言われていた値が約 50 年ぶりに修正された。また、溶媒や金属イオンに対する発光色変化も調べられている [7-20]. これらの実験研究によりタンパク質、基質、発光体の構造が明らかになったため、それに歩調を合わせて理論研究が進展してきた [21-26].

反応機構を理論的に明らかにするためには、反応物と生成物それぞれの励起状態を含む電子状態についての詳細な情報が必要になる。ホタル生物発光のように、タンパク質が関与する反応の場合は、実験スペクトルにタンパク質の影響が含まれているため、スペクトルの解析に考慮すべき要素が多い。そこで、私たちは水溶液中の

吸収・蛍光スペクトルを解析することで、ルシフェリンとオキシルシフェリンそれぞれの電子状態を明らかにすることを目指した。

ルシフェリンの分子構造はオキシルシフェリンの分子構造と良く似ている。図 2 に示すように、どちらも 7 個の C, N, S 原子からなるベンゾチアゾール環と 3 個の C, N, S 原子からなるチアゾリン環をもつ。さらに、両者のベンゾチアゾール環には水酸基 (OH 基) が付いている。オキシルシフェリンとは異なり、ルシフェリンのチアゾリン環にはカルボキシ基 (COOH 基) が付いている。オキシルシフェリンはベンゾチアゾール環とチアゾリン環が平面にある構造が安定であるが、カルボキシ基の影響でルシフェリンの安定構造は平面からずれた構造になる。

私たちの理論研究の開始当初は、ルシフェリンとオキシルシフェリンともに、pH に依存して変化する水溶液中の吸収・蛍光スペクトルは報告されていた [27-30] が、水溶液中に存在する異なる個々の化学種を識別したスペクトルの報告例は無かった。そこで、私たちは、水溶液中に存在する可能性があるルシフェリンとオキシルシフェリンおよびそれぞれの共役酸・塩基に着目した。これらの化学種を考慮し、ルシフェリンとオキシルシフェリンそれぞれの分光的性質の解明を目的とした理論研究を行った。本解説では量子化学計算と分子動力学計算を使った理論化学的な視点から行ったこれらの研究成果 [31-39] について紹介する。

2. ルシフェリン研究

ホタル生物発光における発光エネルギーはオキシルシフェリンの励起状態から基底状態への遷移エネルギーであるため、オキシルシフェリンの励起状態を明らかにすることが重要である。しかし、オキシルシフェリンは水溶液中で不安定な化合物であることから、私たちが研究を開始した当初は気相中や水溶液中の実験データが非常に少なかった [40–42]。

これに対してルシフェリンは扱いやすい上に、その分子構造がオキシルシフェリンの分子構造に似ているため、ルシフェリンの励起状態についての研究は、ホタル生物発光の発光経路解明の手がかりになると期待されていた。実際に、ルシフェリンの蛍光エネルギーは 550 nm ほどであり [28]、北米産ホタル生物発光の発光エネルギー (560 nm) [6] とほぼ同じである。

ルシフェリンはホタル生物発光の基質としてだけでなく、タンパク質がなくても起こる化学発光の反応物としても興味もたれ、1950 年代からその分光的性質を明らかにする研究が行われてきた [7–11, 14, 21, 28]。さらに、蛍光過程に重要なプロトン付加・脱離の情報について、基底状態だけでなく励起状態についても詳しく研究がなされるようになった [29, 30]。

近年では、放射光を用いた測定技術が発展し、気相中のルシフェリン吸収スペクトルの測定にも成功している [43]。一方で、ルシフェリンについての理論研究は、1973 年に X 線構造解析によりルシフェリンの分子構造 [12] が解明されてから発展した [21]。1980 年代は、ルシフェリン分子のチアゾール環を省略したモデル系に対する振動子強度の計算から、ルシフェリン吸収スペクトルの解析がなされた [22, 23]。これらの状況をふまえて、私たちはまずルシフェリンの気相および水溶液中における電子励起状態を解明することにした。

ルシフェリン単分子の光吸収

静電型イオン蓄積リング ELISA を使って測定された気相中のルシフェリン吸収スペクトルは Stochkel らにより報告されている [43]。彼らは真空中に噴射したルシフェリンを一度クールダウン

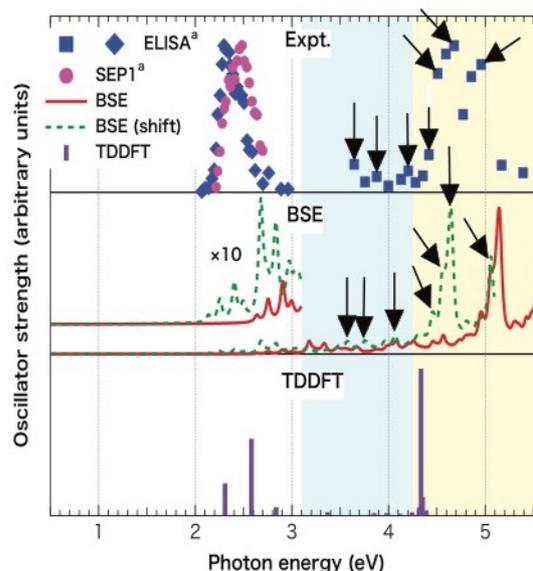


図 3: 気相中ルシフェリンの実験吸収スペクトル (Expt.), GW + Bethe-Salpeter 法 (BSE) および TDDFT 法 (TDDFT) による理論吸収スペクトル. Reproduced from Ref. 36, with the permission of AIP Publishing.

することにより、ルシフェリンアニオンの基底状態からの吸収スペクトルの測定に成功した。

私たちは、気相中のルシフェリン吸収スペクトルについて、独自に開発した第一原理計算に基づく GW + Bethe-Salpeter 法 [44] を用いて、気相中のルシフェリン吸収スペクトルについてより高精度な解析を行った [36]。その結果、図 3 に示すように、時間依存密度汎関数 (TDDFT) 計算を用いた理論吸収スペクトルは最も低いピークと 4.7 eV 付近のピークのみ再現されることがわかった。これに比べて、GW + Bethe-Salpeter 法の理論吸収スペクトルには、4 eV 付近の小さなピークや 5 eV 付近のピークも記述できている。4 eV 付近の小さなピークは Rydberg 状態に起因することが明らかになった。

水溶液中ルシフェリン吸収・蛍光スペクトル

pH に依存して変化するルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルの詳細は、2010 年に報告された [28]。図 4 に Ando らにより報告されたルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルを示す。ルシフェリンの吸収スペクトルは、塩基性条件では 390 nm にピークをもち、pH 8 よりも酸性条件では 310 nm にピークをもち、一方で、ルシフェリンを 350 nm で

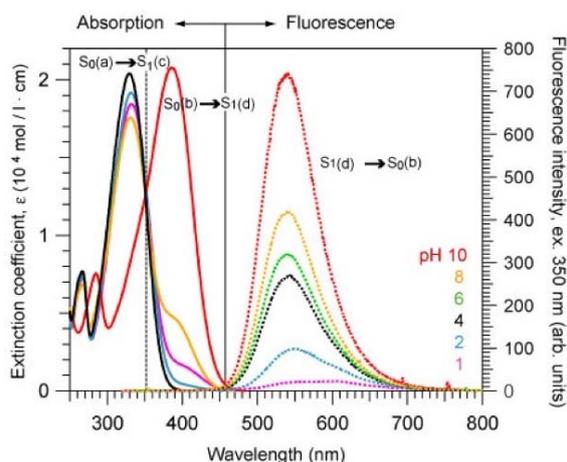


図 4: ルシフェリン吸収・蛍光スペクトルの pH 依存性 [28]. Copyright (2010) The Japan Society of Applied Physics.

励起すると、pH に依らず 550 nm 付近に蛍光が現れることが示された。

pH 7 付近では、ルシフェリンのカルボキシ基はプロトンが外れて COO^- になり、全電荷が -1 のアニオンになっている。ルシフェリンのベンゾチアゾール環についている OH 基の pK_a は 8.7 である [10] ため、pH 9 よりも塩基性の水溶液ではルシフェリンアニオンの OH 基からプロトンが外れ、ジアニオンになる。図 3 の吸収スペクトルでは 390 nm のピークがジアニオン由来、330 nm のピークがアニオン由来と考えられた。さらに蛍光スペクトルについては、励起状態では $\text{pK}_a < 0$ であるため、励起状態ではアニオンからジアニオンになり 550 nm の発光が起こると考えられた。

しかし、この考え方では説明がつかない部分がある。まず、図 4 の 330 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値が pH に応じてわずかにずれており、誤差と考えるのは正しいのか疑問がある。また pH の小さいところではジアニオンのピークはほとんどなくなるはずであるが、pH 1 と 2 では、390 nm 付近にピークが存在するように見える。さらに蛍光スペクトルは pH の小さいところで 610 nm 付近に発光があるように見える。

水溶液中ルシフェリン吸収・蛍光過程の解明

ルシフェリンとその共役酸・塩基および本解説で用いる名称を表 1 に示す。Ando らの解析では、ジアニオン ($6'\text{O}^-$, 4COO^-) とフェノール型のアニ

表 1: ルシフェリンとその共役酸および共役塩基 [35].

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(6'OH, 4COOH)	OH	—	—	COOH
(6'O ⁻ , 4COOH)	O ⁻	—	—	COOH
(6'OH, 4COO ⁻)	OH	—	—	COO ⁻
(6'O ⁻ , 4COO ⁻)	O ⁻	—	—	COO ⁻
(6'OH, 3H ⁺ , 4COOH)	OH	—	H ⁺	COOH
(6'O ⁻ , 3H ⁺ , 4COOH)	O ⁻	—	H ⁺	COOH
(6'OH, 3H ⁺ , 4COO ⁻)	OH	—	H ⁺	COO ⁻
(6'O ⁻ , 3H ⁺ , 4COO ⁻)	O ⁻	—	H ⁺	COO ⁻
(3'H ⁺ , 6'OH, 4COOH)	OH	H ⁺	—	COOH
(3'H ⁺ , 6'O ⁻ , 4COOH)	O ⁻	H ⁺	—	COOH
(3'H ⁺ , 6'OH, 4COO ⁻)	OH	H ⁺	—	COO ⁻
(3'H ⁺ , 6'O ⁻ , 4COO ⁻)	O ⁻	H ⁺	—	COO ⁻

オン ($6'\text{OH}$, 4COO^-) 由来のピークがスペクトルに現れると考えられていた。私たちはルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルの過程を明らかにするため、水溶液中に存在すると考えられる表 1 の ($6'\text{OH}$, 4COOH), ($6'\text{OH}$, 4COO^-), ($6'\text{O}^-$, 4COOH), ($6'\text{O}^-$, 4COO^-), ($6'\text{OH}$, 3H^+ , 4COOH), ($3'\text{H}^+$, $6'\text{OH}$, 4COOH) について、量子化学計算によりスペクトル解析を行った [31].

これらの化学種に対して、DFT および TDDFT 計算 (B3LYP/aug-cc-pVTZ) により基底状態 (S_0) および第一励起状態 (S_1) の構造最適化をそれぞれ行い、励起エネルギーおよび振動子強度を求めた。溶媒は、連続誘電体モデル (PCM) で近似した。

図 5 に計算から得られた Kohn-Sham 軌道の最高被占軌道 (HOMO) と最低空軌道 (LUMO) を示す。HOMO および LUMO 共に非局在型の π 軌道になっている。吸収・蛍光スペクトルに現れる S_1 は、HOMO \rightarrow LUMO への $\pi \rightarrow \pi^*$ 励起が主成分となっている。

また、pH の小さいところでの 390 nm 付近の吸収は ($6'\text{OH}$, 3H^+ , 4COOH)、蛍光スペクトルにおける 610 nm の発光は ($6'\text{OH}$, 4COO^-) の S_1 に起因する可能性があることが明らかになった。しかし、ここで用いている従来の計算方法では、個々の化学種に対する振動子強度を得ることはできなかったが、水溶液中に共存する化学種の相対的な強度比はわからない。

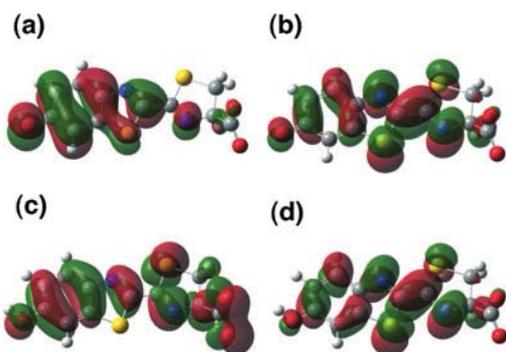


図 5: ルシフェリンの Kohn-Sham 軌道 [31].
(a) (6'OH, 4COO⁻) の HOMO, (b) (6'OH, 4COO⁻) の LUMO, (c) (6'O⁻, 4COO⁻) の HOMO, (d) (6'O⁻, 4COO⁻) の LUMO.

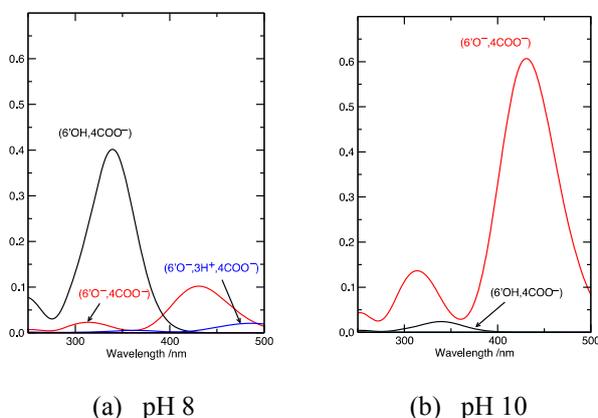


図 6: (a) pH 8 と (b) pH 10 の理論吸収スペクトル [32].

そこで、水溶液中に存在する可能性のあるルシフェリンおよびその共役酸・塩基 12 種類(表 1 参照)に対し、それぞれの基底状態における pK_a を求め、水溶液中における相対濃度を pH ごとに得た [32]。この相対濃度から、pH ごとに異なる吸収スペクトル形状を得ることができた。

図 6 に pH 8 と 10 の場合の吸収スペクトルを示す。図 6 (a) に示すように、pH 8 では (6'OH, 4COO⁻) 由来の吸収ピークが最も大きく、長波長側に (6'O⁻, 4COO⁻) の低い吸収ピークがある。これに対して、pH 10 では (6'O⁻, 4COO⁻) の吸収ピークが最も大きい。

これらの結果から、pH と励起波長ごとにどの化学種が最も励起されるか明らかになったため、pH と励起波長ごとに励起される化学種を知ることができる。図 7 に、350 nm の励起光を用いた場合の蛍光経路を示す。

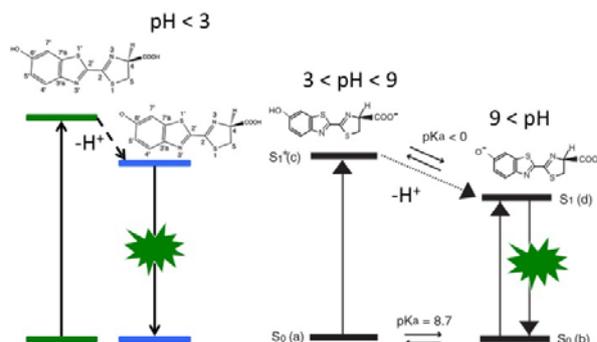


図 7: 350 nm 光励起の場合のルシフェリン蛍光経路。

pH が 9 より大きい場合は、(6'O⁻, 4COO⁻) が主化合物であるため、この化合物の励起 → 発光が蛍光スペクトルに現れる。それよりも酸性の場合 ($3 < \text{pH} < 9$) は、(6'OH, 4COO⁻) の励起 → (6'O⁻, 4COO⁻) からの発光がこれに加わる。一方、 $\text{pH} < 3$ では中性のルシフェリン (6'OH, 4COOH) が励起され、その後プロトン脱離を起こしてアニオン (6'O⁻, 4COO⁻) になった後、発光していることがわかった [34, 35]。

Gibbs の自由エネルギー計算

ルシフェリン吸収・蛍光スペクトルの解析が合理的に解釈できた理由は、表 1 の化学種の pK_a を得ることができたことにある。物理化学の教科書にあるように、 pK_a は自由エネルギー ΔG (Jmol^{-1}) と

$$pK_a = \Delta G / 2.303RT \quad (1)$$

の関係にある。ここで R と T はそれぞれ気体定数 ($\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$) と温度 (K) である。そこで、ルシフェリンの pK_a を求めるために、化学種 AH のプロトン脱離過程を



により近似し、右辺と左辺の自由エネルギー差を AH のプロトン脱離の ΔG とした。量子化学計算から得られる ΔG を使って pK_a を見積もった。

どの原子に結合しているプロトンが外れるかにより pK_a は異なる。表 2 に、水溶液中に多く存在するルシフェリン化学種に対するプロトン解離前後の化学種とその pK_a について、 ΔG から得られる値(計算値)と補正した値を示す。 ΔG から得られる pK_a は 30 を超える値となった。

(6'OH, 4COO⁻) の OH 基からプロトンが外れる場合の pK_a は 8.7 であることが知られている [10]。

表 2: ルシフェリンの pK_a の計算値と補正值 (データは文献 [32] の値).

プロトン解離前	プロトン解離後	計算 pK_a	補正 pK_a
(6'OH, 4COOH)	(6'O ⁻ , 4COOH)	38.7	7.7
(6'OH, 4COOH)	(6'OH, 4COO ⁻)	33.6	2.8
(6'O ⁻ , 4COOH)	(6'O ⁻ , 4COO ⁻)	34.5	3.8
(6'OH, 4COO ⁻)	(6'O ⁻ , 4COO ⁻)	39.7	8.7 [†]
CH ₃ COOH	CH ₃ COO ⁻	-	4.8 [‡]

[†]実験値[10]

[‡]実験値[45]

そこで、計算値の相対的な値は実験値を再現していると仮定し、 pK_a 値 8.7 で他の化学種の pK_a 値を補正することにより、他の化学種の pK_a 値を補正した (表 2 の補正值). その結果、(6'OH, 4COOH) の OH 基からプロトンが外れる場合の補正 pK_a は 7.7 となり、(6'OH, 4COO⁻) の OH 基の pK_a と似たような値が得られた. また、(6'O⁻, 4COOH) のカルボキシ基の補正 pK_a は 2.8 となり、参考のために載せた酢酸のカルボキシ基の pK_a 実験値と似たような値になった. 同じ置換基の pK_a は似たような値になる傾向がある [45] ことから、表 2 の補正した pK_a 値は妥当な値であると考えられる.

pH ごとの相対濃度は

$$\frac{[A^-]}{[AH]} = 10^{-pK_a + pH} \quad (3)$$

から得ることができる.

ルシフェリンについては、気相中、水溶液中ともに吸収あるいは蛍光スペクトルを解析することにより、その電子状態が明らかになった、といえる. 水溶液中には複数の共役酸・塩基が存在するため、吸収・蛍光スペクトルを解析するためには、共役酸・塩基を考慮し、水和の影響を高精度に見積もる必要があることも示された.

3. オキシルシフェリン研究

実験値を参考にして pK_a を得る方法は、ルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルの解析において有効であることがわかった. ホタル生物発光における発光体であるオキシルシフェリンの分子構造はルシフェリンと似ているため、このルシフェリン

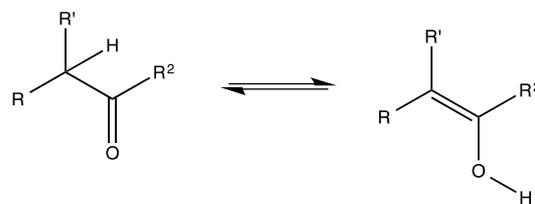


図 8: ケト-エノール互変異性.

のスペクトル解析に有効な方法が、オキシルシフェリンの吸収スペクトル解析にも使えると期待できる.

オキシルシフェリンはとても不安定な物質であり、1969 年になって初めて Suzuki らにより合成された [46]. 溶媒の違いによる蛍光の特徴が明らかになり、オキシルシフェリンの吸収スペクトルは、生物発光後のルシフェラーゼ存在下でのオキシルシフェリンの吸収スペクトルとよく似ていることが明らかになった. 1990 年代に入ると、ルシフェリンとともにオキシルシフェリンについても吸収・蛍光スペクトルの pH 依存性の詳細が明らかになった [40–42].

ケト-エノール互変異性

ルシフェリンの場合と異なり、オキシルシフェリンにはケト型とエノール型が存在する. ケト型とエノール型は水溶液中で平衡状態にあり、有機化学の分野で「ケト-エノール互変異性」として知られている. 図 8 に一般的なケト-エノール互変異性を示す. ケト型とエノール型のどちらの構造が水溶液中で安定か、については一概に言うことはできない. 分子の構造によっては、分子内でプロトン移動が起こることにより、エノール型からケト型、あるいはその逆に構造が変わる. また、周囲の水分子を介在して、エノール型からケト型、あるいはその逆に構造が変わることもある. 安定な構造は、その分子の構造と水和の状況から決まる.

表 3 にオキシルシフェリンとその共役酸・塩基の構造および本解説で用いる名称を示す. オキシルシフェリンの構造のうち、4C (4 番の炭素原子)-5C (5 番の炭素原子)間の結合が単結合になっている構造がケト型、二重結合になっている構造がエノール型である.

表 3: オキシルシフェリンとその共役酸・塩基 [33].

R ₁	R ₂			
OH	OH	(6'OH, 4OH)	(6'OH, 3H ⁺ , 4OH)	(3'H ⁺ , 6'OH, 4OH)
OH	O ⁻	(6'OH, 4O ⁻)	(6'OH, 3H ⁺ , 4O ⁻)	(3'H ⁺ , 6'OH, 4O ⁻)
O ⁻	OH	(6'O ⁻ , 4OH)	(6'O ⁻ , 3H ⁺ , 4OH)	(3'H ⁺ , 6'O ⁻ , 4OH)
O ⁻	O ⁻	(6'O ⁻ , 4O ⁻)	(6'O ⁻ , 3H ⁺ , 4O ⁻)	(3'H ⁺ , 6'O ⁻ , 4O ⁻)

R			
OH	(6'OH, 4O)	(6'OH, 3H ⁺ , 4O)	(3'H ⁺ , 6'OH, 4O)
O ⁻	(6'O ⁻ , 4O)	(6'O ⁻ , 3H ⁺ , 4O)	(3'H ⁺ , 6'O ⁻ , 4O)

ホタル生物発光における発光色は、黄緑色である。この発光はケト型由来か、エノール型由来か、について未だに決着していない。気相におけるオキシルシフェリンの電子状態計算を行うと、ケト型がもっとも安定になる [33]。その理由は、ケト型が共鳴構造を持つからである。溶媒を PCM で近似した場合も、同様の結果になる。また、互変異性が生じないようにルシフェリンの 5C に結合している二つの水素原子をメチル基 (CH₃ 基) で置換した類似体を用いた生物発光でも黄緑色の発光が検出されたため、ケト型説が有力である [16]。そのため、ホタル生物発光の反応機構を示した図のほとんどには、図 2 のようにケト型のオキシルシフェリンが描かれている [例えば 1, 2]。一方で、水溶液中の実験が報告されるようになり、黄緑色の発光はエノール型由来である可能性も出てきた [42]。

オキシルシフェリンの場合は、ケト型からエノール型へ変わる場合、5C に結合しているプロトンが外れ、4C に結合している O がプロトンを受け取って、OH になる必要がある。構造から直接このプロトン移動が起こるとは考えにくいので、周囲の水分子が関与する可能性が高い。すなわち、理論的な解析を行う上で、水和の問題を高精度に扱う必要がある。

オキシルシフェリン吸収・蛍光スペクトル

オキシルシフェリンの吸収スペクトルは Esteved da Silva らにより報告されている [27]。オキシルシフェリンの吸収スペクトルもルシフェリンの吸収ス

表 4: オキシルシフェリンの pK_a の計算値と補正值。

プロトン解離前	プロトン解離後	計算 pK _a	補正 pK _a
(6'OH, 4O ⁻)	(6'O ⁻ , 4O ⁻)	41.5 [†]	8.7 [†]
(6'OH, 4O)	(6'O ⁻ , 4O)	37.1	4.4 [†]
(6'OH, 4OH)	(6'O ⁻ , 4OH)	39.9	7.2 [†]
(6'OH, 4OH)	(6'OH, 4O ⁻)	38.8	6.1 [†]
(6'O ⁻ , 4OH)	(6'O ⁻ , 4O ⁻)	40.4 [†]	7.6 [†]
(6'O ⁻ , 4O)	(6'O ⁻ , 4O ⁻)	45.8 [†]	8.1 [†]

[†] [33]

ペクトルと同様に、pH が塩基性から酸性へ変化すると 414 nm と 371 nm の二つのピーク強度が入れ替わる。ただしオキシルシフェリンのこの変化は、ルシフェリンの場合よりもずっと酸性条件である pH 5–6 で起こっている。ルシフェリン吸収スペクトルの解析から考えると、この変化にはオキシルシフェリンとその共役酸・塩基の pK_a が関係していると予想できる。

私たちは、水溶液中に存在する可能性のあるオキシルシフェリンとその共役酸・塩基 18 種類 (表 3 参照) に対し、ルシフェリンの場合と同じ計算方法により、それぞれの基底状態における pK_a 値を得た。表 4 に水溶液中に多く存在するオキシルシフェリン化学種の pK_a を示す。ΔG から得られる pK_a は、37–46 くらいの値になった。オキシルシフェリンアニオン (6'OH, 4O⁻) の OH 基とルシフェリンアニオン (6'OH, 4COO⁻) の OH 基は同じベンズチアゾール環に結合している。前章で述べたルシフェリンの結果から、(6'OH, 4O⁻) の OH 基からプロトン脱離する pK_a 値は、ルシフェリンアニオン (6'OH, 4COO⁻) の pK_a 値に近い値になると考え、(6'OH, 4O⁻) の補正 pK_a 値を 8.7 とした。また、この値を用いて他の補正 pK_a 値を見積もった。

表 3 の補正 pK_a 値を用いて pH ごとの吸収スペクトルの相対的な強度比を見積もることで、化学種ごとの理論吸収スペクトルを得た。図 9(a) と (b) に、pH 5 と 6 の場合の理論吸収スペクトルを示す。pH 5 では (6'OH, 4OH) に起因する吸収が最も大きく、他の化学種に起因する吸収はほとんど無い。pH 6 では、(6'OH, 4OH) に起因する

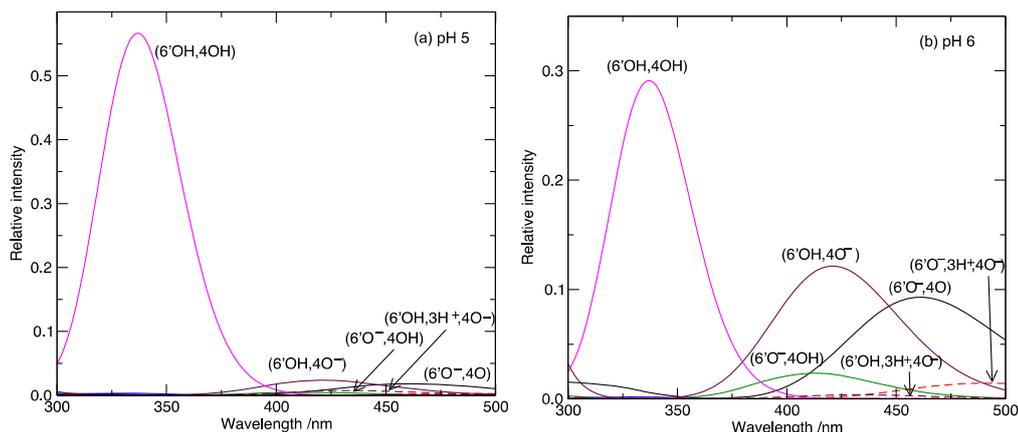


図 9: オキシルシフェリン理論吸収スペクトル; (a) pH 5, (b) pH 6 [33].

吸収が最も大きいのが、 $(6'OH, 4O^-)$ や $(6'O^-, 4O^-)$ に起因する吸収も $(6'OH, 4OH)$ に起因する吸収強度の 1/3 程度の強度になることがわかった。

分子振動解析

私たちの上記の研究が投稿論文として受理されたのと同時期に、水溶液中のオキシルシフェリンとその共役酸・塩基に対する詳細な実験吸収スペクトルが Reberz らと Ghose らの同じグループにより報告された [47, 48]. これらの実験スペクトルと理論スペクトルを比べることで、オキシルシフェリン電子状態に対する水和の影響が明らかになると考えられる。

そこで、私たちは水溶液におけるオキシルシフェリンの振電相互作用を調べた。スペクトルの強度を与える遷移双極子モーメントは、近似的に始状態と終状態間のフランク・コンドン因子 (FCF) に比例する。pH 7 の場合に水溶液中に主に存在する化学種は、オキシルシフェリン吸収および蛍光スペクトルの解析 [33] から、ケト型の $(6'OH, 4O^-)$ 、 $(6'O^-, 4O^-)$ およびエノール型 $(6'OH, 4OH)$ 、 $(6'O^-, 4OH)$ 、エノレート型 $(6'OH, 4O^-)$ 、 $(6'O^-, 4O^-)$ の 6 種類であることがわかっている。そこで、これら 6 種類のオキシルシフェリンとその共役塩基の S_0 と S_1 状態それぞれの安定構造を TDDFT 計算 (cam-B3LYP/aug-cc-pVTZ) により求めた。溶媒効果は PCM により取り入れた。 S_0 の安定構造における振動準位 $v=0$ と S_1 の振動準位 v' の FCF を求め、振動によるスペクトル幅を考慮した理論吸収スペクトルを得た。また、 S_1 の

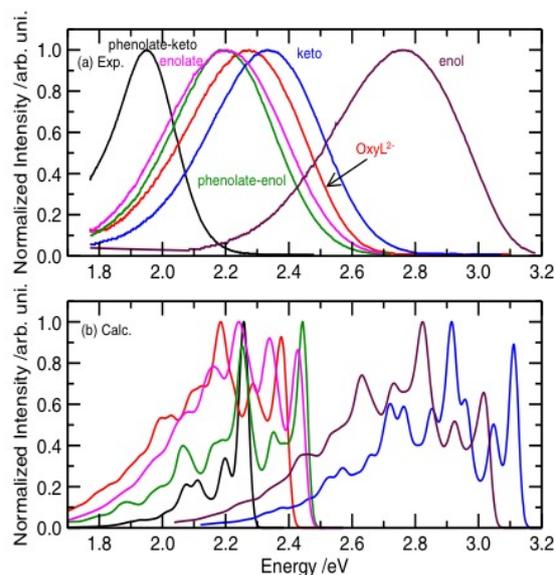


図 10: enol: $(6'OH, 4OH)$, keto: $(6'OH, 4O^-)$, phenolate-keto: $(6'O^-, 4O^-)$, phenolate-enol: $(6'O^-, 4OH)$, enolate: $(6'OH, 4O^-)$, $OxyL^{2-}$: $(6'O^-, 4O^-)$ の蛍光スペクトル (a) 実験 [48], (b) 理論 [37].

振動準位 $v'=0$ と S_0 の振動準位 v の FCF を求め、振動によるスペクトル幅を考慮した理論蛍光スペクトルを得た [37].

図 10 に 6 種類のオキシルシフェリンとその共役塩基について、Ghose らによる実験蛍光スペクトル [48] と本研究の理論蛍光スペクトルを示す。実験の蛍光スペクトルではケト型アニオン $(6'O^-, 4O^-)$ のみスペクトル幅が小さくなるという特徴が現れている。この特徴は、理論蛍光スペクトルにも見られる。 $(6'O^-, 4O^-)$ は基底状態の $v=0$ と励起状態の $v'=0$ の間の遷移 (0-0'バンド) が強い

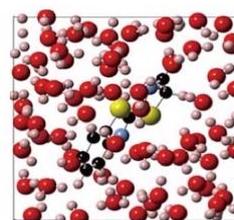
め、鋭いスペクトル形状になることがわかった。(6'O, 4O) 以外の化学種の場合は、0-0'バンド以外の遷移も強度をもつため、ブロードなスペクトル形状となる。

この研究から、水溶液中におけるケト型とエノール型のオキシシフェリンとその共役塩基の吸収および蛍光スペクトルにおけるスペクトルの形状とスペクトル幅、さらにそれらの起源を解明することができた。ただし、ここで用いた計算方法ではケト型については実験結果をあまりよく再現できていない。蛍光エネルギーに着目してみると、(6'O, 4O) と (6'OH, 4O) のケト型はどちらも実験値よりも 0.3–0.6 eV 程度高くなる。すなわち、ケト型の蛍光エネルギーは他の化学種のエネルギーに比べて過大評価されたことになる。

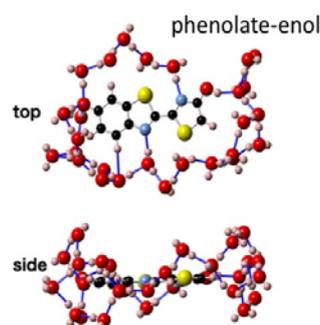
Full QM/MD 計算

PCM を用いた場合にはケト型のみ計算結果が実験結果と異なったことから、私たちは PCM では水和の記述に限界があると考えた。この水和の問題に対応するため、さらに高精度な計算方法を検討した。上記の原因は、ケト型アニオンの場合は他の化学種に比べて特異な溶媒効果があり、溶媒環境の記述が従来の連続誘電体モデルでは不十分であるためと考えられる。そこで、水素結合相互作用をより高精度に理論計算に取り入れる方法として、水分子をあらわに扱う分子動力学(MD)計算である第一原理分子動力学 (First principle molecular dynamics: FPMD) 計算に着目した。FPMD 計算では、オキシシフェリンアニオンと 64 個の水分子を取り入れ、水溶液中オキシシフェリンのモデル系とした。この系に対して 1 ns (計算時間は 200 日) を超える FPMD 計算を実行した [38]。

図 11 に、FPMD 計算に用いた系のスナップショットと、この計算から得られる (6'O, 4OH) とその周囲に生成した水分子鎖のスナップショットを示す。オキシシフェリンアニオンのエノール型やエノレート型は、周囲の水分子によりベンズチアゾール環とチアゾリン環からなる面の左右に水分子鎖が生成する。この水分子鎖の影響により、エノール型やエノレート型は水溶液中で特にエネルギー的に安定化されることが示された。こ



(a) 系全体



(b) (6'O, 4OH) とその水分子鎖

図 11: FPMD 計算に用いた系のスナップショット. Reprinted (adapted) with permission from Reference 38 Copyright (2019) American Chemical Society.

の結果は「理論計算では水溶液中ではケト型が最も安定」というケト型説の根拠の一つを覆し、エノール型からの発光の可能性もあることを理論的に示した結果として、ホタル生物発光研究において重要な意味をもつ。

水和構造は FPMD 計算により得られるスナップショットに現れるため、スナップショットごとのオキシシフェリンアニオンの励起状態を計算することで、水和構造をより正確に取り入れた吸収スペクトルを得ることができると考えられる。そこで、FPMD 計算の結果から 1000 個のスナップショットを取り出し、スナップショットごとの水分子に対して、量子化学計算 (QM 計算) と分子力学計算 (MM 計算) を組み合わせた QM/MM 計算を行った [39]。

ここでは、QM 領域はオキシシフェリンのみとし、溶媒である水分子は MM 領域とした。QM 領域には、時間依存 (TD) DFT 法 (cam-B3LYP/ aug-cc-pVTZ) を用いた。MM 領域である水分子は点電荷で近似されるため、分子を構成する酸素原子と水素原子の座標以外に、それぞれの原子に対する電荷の情報が必要になる。そこで、よ

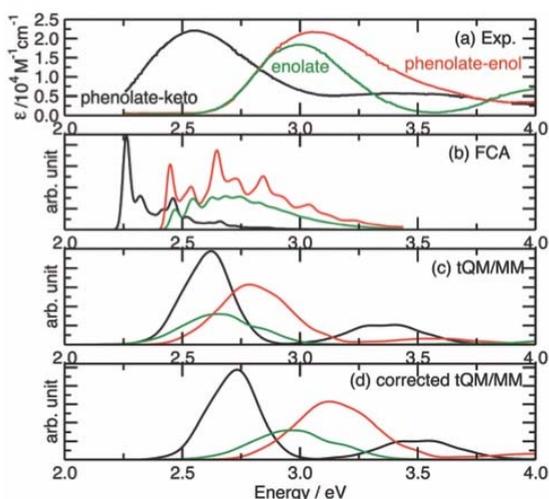


図 12: オキシルシフェリンアニオン ($6'O^-, 4O$) (phenolate-keto), ($6'O^-, 4OH$) (phenolate-enol), ($6'OH, 4O^-$) (enolate) の吸収スペクトル。Reproduced from Ref. 39 with permission from the PCCP Owner Societies. (a) 実験値 [47], (b) フランク・コンドン近似 [37], (c) QM/MM, (d) 補正 QM/MM.

り高精度な電荷を得るために、各スナップショットの構造に対して Natural Population Analysis 計算を行った。この計算から得られた水分子の電荷を MM 領域の電荷とし、オキシルシフェリンアニオンの励起エネルギーおよび振動子強度を、QM/MM 計算により求めた。振幅に影響を与えない程度に、振動子強度のラインに適当な不均一幅をつけて、積算することにより、理論吸収スペクトルを得た。

図 12 に、水溶液における ($6'O^-, 4O$), ($6'O^-, 4OH$), ($6'OH, 4O^-$) の 3 種類のオキシルシフェリンアニオンの理論吸収スペクトルを Reverz らの実験スペクトル [47] と比較して示す。図 12 では、($6'O^-, 4O$) は phenolate-keto, ($6'O^-, 4OH$) は phenolate-enol, ($6'OH, 4O^-$) は enolate としている。また、比較のためフランク・コンドン近似を用いた分子振動解析から得られた理論吸収スペクトルも図 12 (b) に載せた。この分子振動解析から得られたスペクトルでは、($6'O^-, 4O$) のケト型のスペクトル幅は他のスペクトル幅に比べて狭くなっている。一方、図 12 (c) に示すように、QM/MM (cam-B3LYP/aug-cc-pVTZ) 計算から得られたケト型のスペクトル幅は他のスペクトル幅と同程度になり、実験結果とも一致する。すなわち、

FPMD 計算により PCM を用いた場合よりも、特にケト型オキシルシフェリンの水和構造が改良されたと言える。

相対的な吸収エネルギーは QM 部分の計算レベルに依存することから、cam-B3LYP/aug-cc-pVTZ よりも高精度な EOM-CCSD/6-31G* を用いて QM/MM のスペクトルを補正した(図 12(d))。補正 QM/MM のスペクトルは、相対的な吸収エネルギーも実験値に近い値となった。

4. まとめと今後の展望

本解説ではホタル生物発光の基質であるルシフェリンと発光体であるオキシルシフェリンの水溶液における電子状態について、量子化学計算と分子動力学計算を使った理論化学的な視点から行った研究成果について紹介した。ホタル生物発光の基質と発光体としてのルシフェリンとオキシルシフェリンの水溶液における吸収・蛍光スペクトルの解析を通じて、① pH を変えた吸収・蛍光スペクトルには、共役酸・塩基の影響が入る、②これらの化学種の pK_a は量子化学計算と実験値を利用した補正により得ることができる、③分子動力学計算 + 量子化学計算により高精度に水和を扱うことができる、ということがわかった。オキシルシフェリンやルシフェリンは、カルボキシ基やフェノール基といった有機化合物の特徴を備えているので、他の有機化合物に対しても②の補正や③の計算方法による解析が有効であろう。

FPMD 計算は計算コストがかかるため、タンパク質も扱う場合には現状では古典 MD 計算の方が実用的である。古典 MD 計算と量子化学計算を組み合わせる方法は他のグループでも試みられており、FPMD 計算の代わりに古典 MD 計算を使った結果について報告されている [49]。ここで紹介した FPMD 計算を用いた研究により、オキシルシフェリンの水和の様子が明らかになっただけでなく、古典 MD 計算を使った結果の評価が可能になったと言える。今後、励起状態の FPMD 計算が可能になれば、オキシルシフェリン励起状態の詳細なデータが得られるであろう。

ホタル生物発光の発光機構解明という視点からみれば、ホタル生物発光における反応物と生

成物の励起状態を含む電子状態については、ほぼ明らかになったと言える。反応途中の中間体を経由する発光機構について、理論計算による予測やルシフェラーゼ変異体とルシフェリンあるいは中間体の類似体を用いた実験により検証されている [50, 51]。しかし、発光色が pH や温度により変化する理由を明確に説明できるほどの成果はまだ出ていない。タンパク質変異体を作製することのできる生物学、生体内での観測ができる医学・薬学、中間体など類似体を合成できる有機化学、反応経路予測のできる量子化学等を駆使した、タンパク質中の反応過程を追跡する手法のブレークスルーが待たれる。

謝辞

ホタル生物発光関連分子の理論研究は、2010 年ごろから名古屋大学の古賀伸明教授と東京大学物性研究所の秋山英文教授との共同研究として始まりました。現在は群馬大学板橋研究室にて板橋英之教授のご協力のもと、学生たちとホタル生物発光の研究を続けています。

この理論研究に協力してくださった、古賀教授、秋山教授、静岡大学野口良史准教授、東京大学物性研究所杉野修教授、原田慈久教授、原研の志賀基之博士、中外製薬山田健太博士、産総研望月敏光博士および秋山研のみなさん、そして板橋教授と板橋・樋山研のみなさんに感謝します。

ここで紹介した計算は、名古屋大学情報基盤センター、物性研究所、九州大学のスパコンを使って行われました。また、特定非営利活動法人量子化学探索研究所平成 26 年度助成金と科研費 26610081, 15K05379, 17KT0094 の支援により研究が行われました。

参考文献

- [1] 今井一洋, 近江谷克裕, バイオルミネッセンスハンドブック(丸善, 2006)
- [2] O. Shimomura, *Bioluminescence-Chemical Principles and Methods* (World Scientific, 2012).
- [3] E. N. Harvey, *Science*, **46**, 241 (1917).
- [4] E. Conti *et al.*, *Structure* **4**, 287 (1996).
- [5] T. Nakatsu *et al.*, *Nature* **440**, 372 (2006).
- [6] Y. Ando *et al.*, *Nature Photonics* **2**, 44 (2008).
- [7] H. H. Seliger *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 21 (1959).
- [8] H. H. Seliger *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136 (1960).
- [9] H. H. Seliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **52**, 75 (1964).
- [10] R. A. Morton *et al.*, *Biochem.* **8**, 1598 (1969).
- [11] E. H. White *et al.*, *Bioorg. Chem.* **1**, 92 (1971).
- [12] D. Dennis *et al.*, *Acta Cryst. B* **29**, 1053 (1973).
- [13] N. Kajiyama *et al.*, *Protein Eng.* **4**, 691 (1991).
- [14] O. A. Gandelman *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **19**, 187 (1993).
- [15] V. A. Viviani *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1286 (2001).
- [16] B. R. Branchini *et al.*, *Biochemistry* **43**, 7255 (2004).
- [17] T. Hirano *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 2385 (2009).
- [18] Y. Wang *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **87**, 846 (2011).
- [19] Y. Wang *et al.*, *Scientific Reports* **3**, 2490 (2013).
- [20] T. Mochizuki *et al.*, *Appl. Phys. Lett.* **104**, 213704 (2014).
- [21] J. Jung *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3949 (1976).
- [22] N. Wada *et al.*, *J. Phys. Soc. Jap.* **49**, 1519 (1980).
- [23] N. Wada *et al.*, *J. Phys. Soc. Jap.* **54**, 4851 (1985).
- [24] L. W. Chung *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12880 (2008).
- [25] N. Nakatani *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **469**,

- 191 (2009).
- [26] I. Navizet *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 706 (2010).
- [27] J. C. G. Esteves da Silva *et al.*, *Tetrahedron Letters* **42**, 8173 (2001).
- [28] Y. Ando *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 117002 (2010).
- [29] I. Presiado *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **115**, 7591 (2011).
- [30] Y. Erez *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **116**, 7452 (2012).
- [31] M. Hiyama *et al.*, *Photochem. Photobio.* **88**, 889 (2012).
- [32] M. Hiyama *et al.*, *Photochem. Photobio.* **89**, 571 (2013).
- [33] M. Hiyama *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **577**, 121 (2013).
- [34] M. Hiyama *et al.*, *Photochem. Photobio.* **90**, 35 (2014).
- [35] M. Hiyama *et al.*, *Photochem. Photobio.* **90**, 820 (2014).
- [36] Y. Noguchi *et al.*, *J. Chem. Phys.* **141**, 044309 (2014).
- [37] M. Hiyama *et al.*, *Photochem. Photobiol.* **91**, 74 (2015).
- [38] Y. Noguchi *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **120**, 8776 (2016).
- [39] M. Hiyama *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19**, 10028 (2017).
- [40] O. A. Gandelman *et al.*, *J. Photochem. Photobiol B*: **19**, 187 (1993).
- [41] J. C. G. Esteves da Silva *et al.*, *Tetrahedron Letters* **42**, 8173 (2001).
- [42] P. Naumov *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11590 (2009).
- [43] K. Stochkel *et al.*, *J. Phys. Chem. A* **115**, 2155 (2011).
- [44] Y. Noguchi *et al.*, *Phys. Rev. A* **81**, 045201 (2016).
- [45] A. Streitwieser *et al.*, *Introduction to Organic Chemistry* (Macmillan Publishing Company, New York, USA. 1985).
- [46] N. Suzuki *et al.*, *Tetrahedron letter* **10**, 4683 (1969).
- [47] M. Rebarz *et al.*, *Chemical Science* **4**, 3803 (2013).
- [48] A. Ghose *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **119**, 2639 (2015).
- [49] C. García-Iriepa *et al.*, *J. Chem. Theo. Comp.* **14**, 2117 (2018).
- [50] B. R. Branchini *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 11088 (2011).
- [51] B. R. Branchini *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7592 (2015).

2019 年度 役員・委員会

会長

城丸春夫（首都大学東京）

幹事

平山孝人（立教大学）〔副会長〕

土田秀次（京都大学）

彦坂泰正（富山大学）

松本淳（首都大学東京）

吉井裕（量子科学技術研究開発機構）

運営委員

東俊行（理化学研究所）

鵜飼正敏（東京農工大学）

加藤大治（核融合科学研究所）

田沼肇（首都大学東京）

土田秀次（京都大学）

彦坂泰正（富山大学）

平山孝人（立教大学）

間嶋拓也（京都大学）

松本淳（首都大学東京）

吉井裕（量子科学技術研究開発機構）

石井邦和（奈良女子大学）

大橋隼人（富山大学）

金安達夫（九州シンクロトロン光研）

歸家令果（東京大学）

木野康志（東北大学）

中井陽一（理化学研究所）

常置委員会

編集委員会 委員長：彦坂泰正（富山大学）

行事委員会 委員長：土田秀次（京都大学）

広報渉外委員会 委員長：吉井裕（量子科学技術研究開発機構）

顕彰委員会 委員長：平山孝人（立教大学）

庶務委員会 委員長：松本淳（首都大学東京）

編集委員 大橋隼人, 岡田邦宏, 金安達夫, 北島昌史,
中井陽一, 彦坂泰正, 松田晃孝, 森下亨



しょうとつ 第16巻 第5号 (通巻90号)

Journal of Atomic Collision Research

©原子衝突学会 2019

<http://www.atomiccollision.jp/>

発行: 2019年9月17日

配信: 原子衝突学会事務局 <acr-post@bunken.co.jp>