

■報告書■ 2006年度神奈川大学総合理学研究所助成共同研究

ホタルの生物発光とそれらに関連する化学発光の機構解明

松本正勝^{1,3} 渡辺信子¹ 大橋 守¹ 藤森 憲²

Mechanistic Study on Bioluminescence of Fireflies and Related Chemiluminescence

Masakatsu Matsumoto^{1,3}, Nobuko Watanabe¹, Mamoru Ohashi¹,
and Ken Fujimori²

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka-City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Chemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8571, Japan

³ To whom correspondence should be addressed. E-mail: matsumo-chem@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A dioxetane bearing a phenoxide anion decomposes with the accompanying emission of light, effectively by the intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence (CTICL) mechanism, by which the bioluminescence of fireflies has been believed to take place through an intermediary dioxetanone. In the course of our investigation of highly effective dioxetane-based chemiluminescent substrates, bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxyphenyl moiety substituted with a 5-aryl, such as naphthalen-1-yl, carbazol-9-yl, indol-1-yl, and benzotriazol-1-yl, were synthesized. Base-induced decomposition of these dioxetanes displayed intense light, the maximum wavelength of which changed depending on the crown ether complex used as a base. As a further development, we realized four optically isomeric bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-4-yl moiety. These isomeric dioxetanes were decomposed with the accompanying emission of light on treatment with three base systems. The chemiluminescence efficiencies of all isomers were practically the same for tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in the DMSO system, whereas they split into two diastereomer-groups for 18-crown-6 ether complex of t-BuOK in the benzene-THF system. For the base system using t-BuOK complex of optically active crown ether, the chemiluminescence efficiencies split further into four. The shape of the chemiluminescence spectrum, maximum wavelength, and rate of decomposition were also different between each of the four stereoisomers.

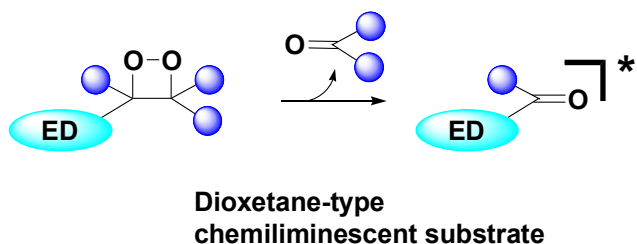
Keywords: chemiluminescence, bioluminescence, dioxetane

序論

ホタルやヒカリコメツキなど発光昆虫は同一のルシフェリンを基質とするにもかかわらず、緑色から赤色にわたる光を放つ。このような生物発光における色調変調はその分子機構に対する興味だけでなく医療や生化学分析への応用という視点から最近多大の関心を集めている。

これら昆虫の生物発光の機構は、酵素ルシフェラーゼの触媒作用によるルシフェリンの酸素化、それにより生成する高エネルギー中間体の一重項励起

オキシルシフェリンへの分解、が鍵となっている。一方、われわれは生物発光における高エネルギー中間体の基本骨格である4員環ペルオキシド、すなわちジオキセタン、を化学発光化合物として人工的に創り出し、その化学励起機構についても明らかにする研究を行ってきた。その結果多くの生物発光に匹敵する発光効率を有する基質の創出に成功しているが、ここでは、もう一つの大きな研究課題である色調変調を起こす化学発光基質の創出について報



告するとともに、その研究を通じて得た知見を基礎にした生物発光における色調変調機構についてもふれる。

結果と考察

1. 4-アリール-3-ヒドロキシフェニル基を有するジオキセタンの発光

4-(アントラセン-9-イル)-3-ヒドロキシフェニル基を有するジオキセタン **1** がクラウンエーテルなどの配位場系において黄色から真紅までの発光色調の変調を起こすことはすでに報告している。このような研究の一環として、3-ヒドロキシ-4-(ナフタレン-2-イル)-フェニル **2, 3**、4-(カルバゾール-9-イル)-3-ヒドロキシフェニル **4**、4-(インドール-1-イル)-3-ヒド

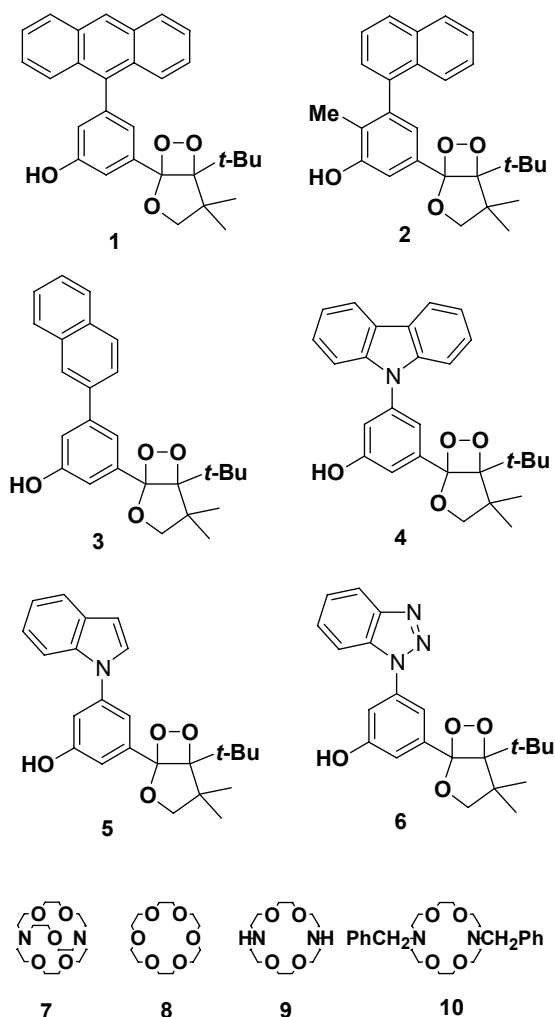


図1. アリールフェニル置換ジオキセタン。

ロキシフェニル **5**、4-(ベンゾトリアゾール-1-イル)-3-ヒドロキシフェニル **6** などを有するジオキセタンを設計・合成し、それらの完全な均一系、そして配位場系における発光について調べた(図1)。

その結果、クラウンエーテル **7~10** との配位場系においては、クラウンエーテルの嵩高さのアリールフェノール基中のアリールの嵩高さに応じて色調変調の起こることを見出した。また、通常の均一系での発光においては、発光スペクトルと標品となるエミッターの蛍光は一致するが、これらアリールフェノール置換ジオキセタンの配位場系における発光では、発光と蛍光のスペクトルは一致しないことが分かった。このような現象は、発光がジオキセタンの分解から励起カルボニルを生成するまでの化学反応における過渡的な姿を反映していることを示唆するものである(図2)。

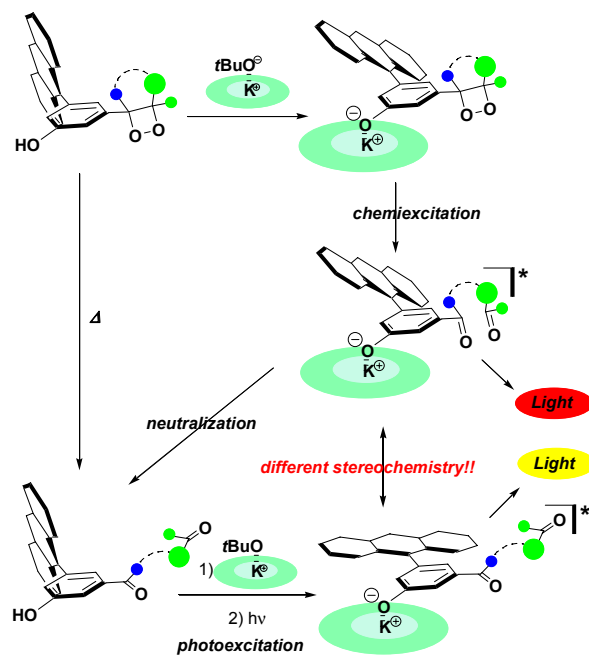


図2. ビアリール置換ジオキセタンの発光色調の変調機構。

アノトロピックな微視的環境に応答する色調変調型ジオキセタンの創出

先述のアリール置換フェノール基を有するジオキセタンの色調変調の仕組みとビナフチル骨格が軸性不斉を発現することを基礎にして、2-ヒドロキシ-1,1'-ナフチル-4-イル基を有する双環性ジオキセタン **11** の光学異性体4種すべて、すなわち (*Ra,1R,5R*)体、(*Ra,1S,5S*)体、(*Sa,1S,5S*)体、(*Sa,1R,5R*)体を合成した。完全な均一系 (TBAF / DMSO) および光学活性でない配位場系 (18-crown-6 エーテルの *t*BuOK 錯体、[Kc(18C6)]+*t*-BuO-) においては、これらの異性体は異性体間で相違のない発光スペクトル

ルを示した。一方、光学活性な配位場系（ビスピナフトクラウン・エーテルの *t*-BuOK 錯体、 $[Kc(12)]+t\text{-BuO}^-$ ）においては、4種の異性体はそれぞれ異なる形の発光スペクトルを与えた(図3)。また、光学活性な配位場系を構築するために用いている光学活性クラウンエーテルをそのエナンチオマーに変えた配位場系においては、4種の発光スペクトルの形は反転的に入れ替わった。これらの結果は、光学活性ジオキセタン **11** が光学活性クラウンエーテルという分子を認識しながら分解発光することを示している。しかし発光スペクトルの違いの程度は光学活性ジオキセタン **13** の発光の場合ほど顕著ではなかった(図4)。特筆すべき特徴は発光スペクトル

ルではなく、発光の効率に見られた。すなわち、完全な均一系においては、4種の異性体間で差異が認められないのに対し、光学活性でない配位場系においてはジアステレオマー間で発光効率が異なった。さらに光学活性な配位場系においては、発光効率は光学異性体に応じて4つに分裂した。また、発光スペクトルとエミッターの蛍光スペクトルの乖離は、光学活性であろうとなかろうと配位場系において認められた。

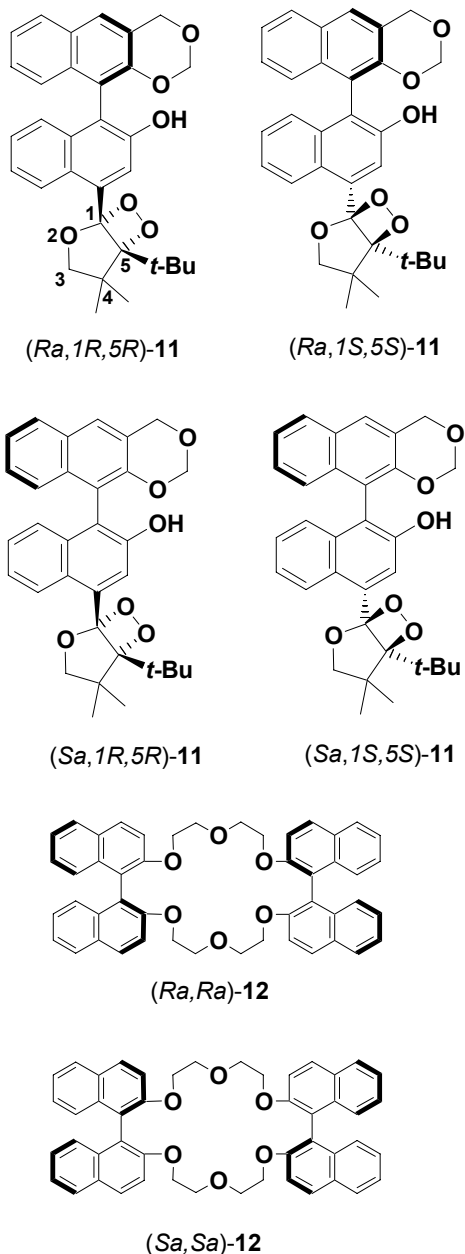


図3. 光学活性なピナフチル置換ジオキセタン。

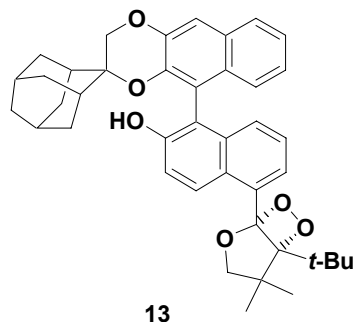


図4. 光学活性ジオキセタン。

昆虫の生物発光の色調変調機構について

ホタルなどの生物発光は序論でも少しふれたが、図5のようなメカニズムで起こるとされている。

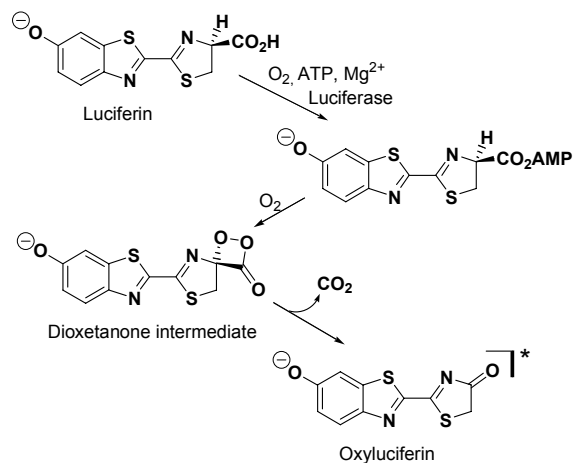


図5. ホタルの生物発光機構。

発光昆虫における色調変調のメカニズムとしては、

- ① オキシルシフェリンのケト-エノール互変異性による。
- ② オキシルシフェリンのモノアニオンとジアニオンの違いによる。
- ③ オキシルシフェリンの取り込まれているルシフェラーゼポケットの極性による。
- ④ 励起オキシルシフェリン分子の振れで TICT (twisted intramolecular charge-transfer) 励起状態ができる。

といった説がある(図 6)。これらのうち、本報告で述べた色調変調型ジオキセタンは④のモデルといえる。また、ベンゾチアゾリルレゾルシノール置換ジオキセタン **14** の熱分解では ES IPT (excited state

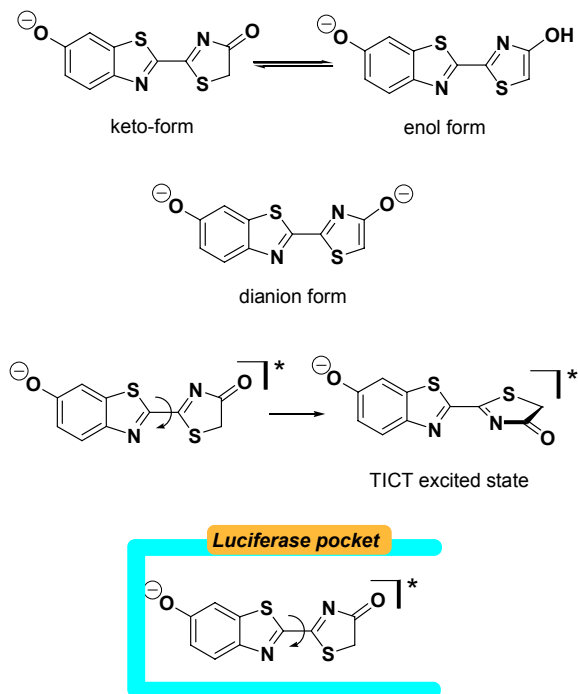


図 6. ホタルの発光における色調変調.

intramolecular proton transfer) 型発光を起こすことから①のモデルと考える。弱塩基誘発分解ではモノアニオン由来の発光をし、強塩基誘発分解ではジアニオン由来の発光をすることが分かっており、これは②のモデルと言える(図 7)。

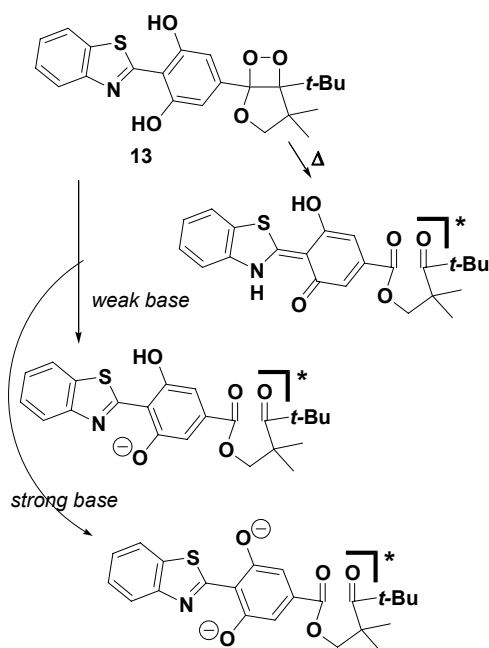


図 7. ジヒドロキシフェニル置換ジオキセタンの発光色調変調.

しかし、より重要なことは、色調変調型ジオキセタンのアニソトロピックな微視的環境下での発光が生成するエミッターの蛍光ともはや一致しないという現象にある。この現象から、われわれは“発光は前駆体であるジオキセタンの分解反応における構造変化の過渡的な姿を反映する”とした。ホタルの生物発光においてもジオキセタンファミリーの一員であるジオキセタノンの分解により発光種が生じる。このようなことを考え合わせると、ホタルなど昆虫の生物発光における色調変調もジオキセタノンの立体構造変化に大きく影響されるはずであり、メカニズムに関する研究においてこの視点はずしてはならないと考える。

文献

- 1) Matsumoto M, Watanabe N (2005) Structural aspects of 1,2-dioxetanes active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Bull. Chem. Soc. Jpn, Accounts*, **78**: 1899-1920.
- 2) Matsumoto M, Yamada K, Ishikawa H, Hoshiya N, Watanabe N and Ijuin HK (2006) Color modulation for charge-transfer-induced chemiluminescence of bicyclic dioxetanes bearing a 3-hydroxy-5-naphthylphenyl moiety in the coordination sphere. *Tetrahedron Lett.* **47**: 8407-8411.
- 3) Matsumoto M, Yamada K, Watanabe N and Ijuin H K (2007) Chemiluminescence of bicyclic dioxetanes bearing a hydroxyphenyl moiety substituted with carbazolyl indolyl or benzotriazolyl group in the coordination sphere. *Luminescence*, in press.
- 4) Hoshiya N, Watanabe N, Ijuin HK and Matsumoto M (2006) Synthesis of bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-5-yl moiety active toward intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescent decomposition. *Tetrahedron* **62**: 12424-12437.
- 5) Matsumoto M, Maeda H, Hoshiya N, Watanabe N and Ijuin HK (2007) Chemiluminescence in anisotropic microenvironment: splitting of chemiluminescence efficiency for charge-transfer-induced decomposition of optically active bicyclic dioxetanes bearing a 2-hydroxy-1,1'-binaphthyl-4-yl moiety under chiral recognition *Tetrahedron Lett.* **48**: 491-496.
- 6) Hoshiya N, Watanabe N, Ijuin HK and Matsumoto M (2007) Effect of intramolecular hydrogen bonding on thermolysis of dioxetanes: unusual instability of bicyclic dioxetanes bearing a hydroxynaphthyl group with vicinal substitution pattern. *Chemistry Lett.* **36**: in press.
- 7) Matsumoto M, Watanabe N, Hoshiya N and Ijuin HK (2007) Color modulation for intramolecular charge-transfer-induced chemiluminescence of 1,2-dioxetanes. *Chemical Records*, in press.