

3253

主
題
文

海ホタルルシフェリンの構造

下村 脩

名古屋大学図書
和 1080805

海ホタルルシフェリンの構造

(昭和34年8月18日受理)

下村 脩†

I. 海ホタルルシフェリンの性質および分子式について

約 5kg の良質な乾燥海ホタルから海ホタルルシフェリンの結晶約 70 mg をうる事ができたので、これを用いて吸収スペクトル、酸化および還元による変化、呈色反応などについて調べ、加水分解によって構成成分を知り、また分子量測定および元素分析により分子式を求めた。その結果、海ホタルルシフェリンの構造中にはイソロイシン、 γ -グアニジノ酪酸およびトリプタミンの骨格を含み、分子式 $C_{21}H_{28}O_2N_6 \cdot 2HCl$ を有することを知った。

1 緒 言

生発光物質の一つである海ホタルルシフェリン(以下ルシフェリンと省略)については数十年前から多数の研究者によって研究されてきたが、これを結晶状にうることができなかったためにもっぱら含量の低い粗エキスについて実験が行われてきた。

前報¹⁾で報告したように著者らは完全に酸素との接触をさせた条件下でルシフェリンを抽出し、さらにベンゾイル化法およびクロマトグラフィーによって精製し、純ルシフェリンを塩酸塩として結晶化することに成功したので、その化学構造決定の可能性が生じた。

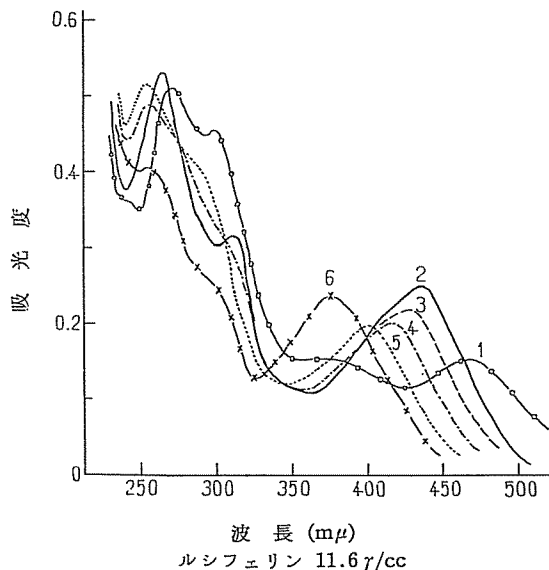
著者は約 5kg の良質の乾燥海ホタルを数回にわけて抽出し、総量約 70 mg の結晶ルシフェリンを得たので、これを用いて吸収スペクトルや酸化還元生成物について調べ、一方加水分解によってその構成成分を知り、また元素分析およびいろいろの方法による分子量測定結果から分子式を決定した。

ルシフェリンの性質の一部についてはすでに前報で報告した。

2 ルシフェリンの二、三の物理的性質

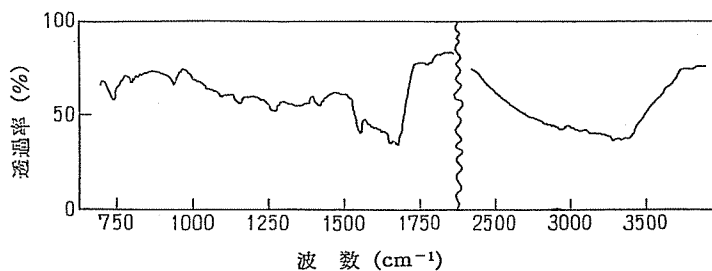
ルシフェリンの中性メタノール溶液における紫外部および可視部吸収についてはさきに報告した。しかし溶液の液性をいろいろに変えて測定すると図1のように複雑な変化を示すが、まだ現在この変化を十分説明できる段階にはいたっていない。

赤外線吸収スペクトルを図2に示したが1648と1666 cm^{-1} の強い吸収と3250 cm^{-1} 付近の幅広い吸収はモノ置換グアニジノ基によるものと考えられる。しかし他の弱い吸収帯についてはまだ不明である。



ルシフェリン 11.6 γ/cc
1: 6.7% 硫酸, 2: pH 5.00, 3: pH 7.75, 4: pH 8.23, 5: pH 9.90, 6: 1.3N 水酸化カリウム

図1 紫外部および可視部吸収スペクトルの液性による変化



ルシフェリン 1 mg/200 mg KBr

図2 赤外線吸収スペクトル

解離曲線²⁾を図3に示した。この図からルシフェリンが3個の

30, 929 (1957).

2) T. V. Parke, W. W. Davis, *Anal. Chem.* 26, 642 (1954).

† 名古屋大学理学部化学教室, 名古屋市千種区不老町, 現在長崎大学薬学部, 長崎市昭和町

1) O. Shimomura, T. Goto, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Japan*

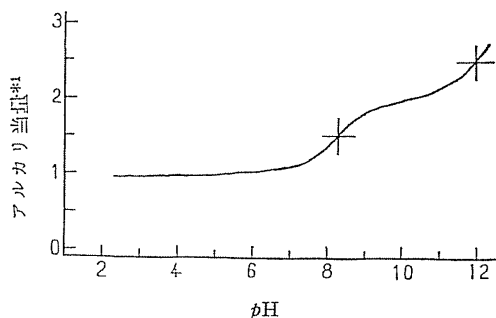


図3 ルシフェリン (塩酸塩) の解離曲線

pK_a' 値 (1.3 以下, 8.3, 12.0) をもち, かつこれらはすべてプロトン放出基の pK_a' であることを知った。ルシフェリン結晶が強塩酸性下で得られたこと, およびルシフェリン1分子中に2原子の塩素が含まれかつグアニジノ基の存在が確かであること (後述) をあわせ考えると pK_a' 12.0 はグアニジノ基の塩酸塩によるものと考えられ, また pK_a' 1.3 以下の強酸性基が存在するとは考えられないので, この pK_a' も弱塩基の塩酸塩によるものと考えられる。したがって pK_a' 8.3 は酸性解離基の pK_a' でなければならないことになる。また図からわかるように1段目のプロトン脱離量は2段目のよりも少し大きい, これは結晶に吸着されていて除去が困難な遊離塩酸分によると考えられる。

3 酸化および還元

ルシフェリン溶液を空气中に放置した場合にできるオキシルシフェリンAおよびBについては前報でのべた。

ルシフェリンのメタノール性水溶液をアンモニアアルカリ性にして過酸化水素で酸化後硝酸酸性にして放置したところ黄色の針状結晶が得られた。以後この物質をオキシルシフェリンCと称す

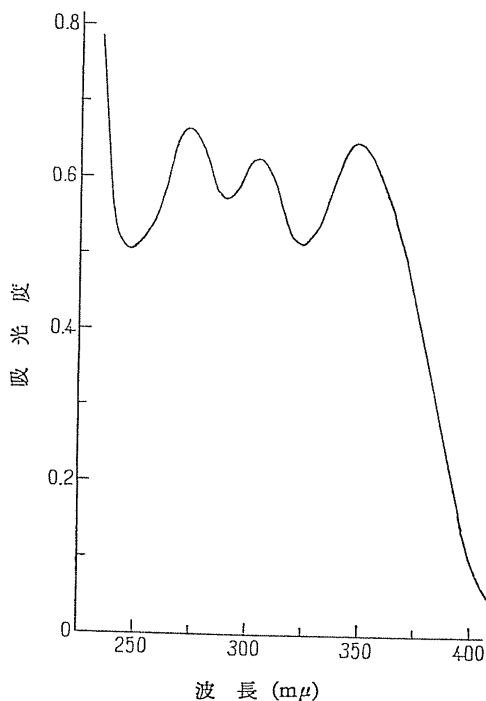


図4 オキシルシフェリンCの紫外外部吸収スペクトル

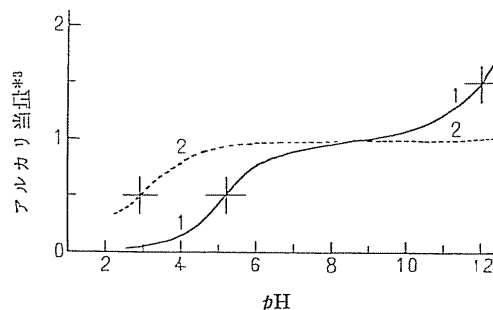
*1 ルシフェリンの分子量を約 470 程度とした。

る。この物質は mp 141°~147°C で紫外外部吸収スペクトル (図4) はオキシルシフェリンAによく似ており, 坂口反応はきわめて弱く, また pK_a' (図5) は 2.9 1個のみしか示さなかった。

ルシフェリン溶液を水酸化ナトリウムでアルカリ性にして1昼夜空气中に放置したものをペーパークロマトグラフィーで調べると, オキシルシフェリンA, Bのほかにも著明な黄色スポット (R_f 0.45^{*2} 蛍光は黄緑色) を生じたがこの物質の詳細については不明である。

ルシフェリンをメタノールにとかし Adams の酸化白金を触媒として接触還元したところ, ちょうど 3 mol の水素を吸収させたときその紫外外部吸収スペクトルはトリプタミンとほとんど一致した。この還元生成物 (ヒドロルシフェリン) はペーパークロマトグラフィーで調べたところではかなり純粋であるようにみられたが, 結晶化の試みは成功しなかった。このヒドロルシフェリンについて pK_a' を測定したところ (図5) 5.2 と 12.0 の二つの値を示した。 pK_a' 12.0 はグアニジノ基によるものと考えられるが, 5.2 の方は不明である。

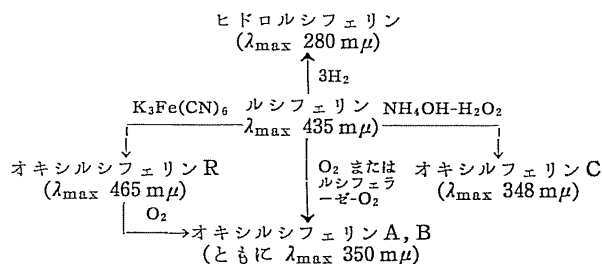
またルシフェリンに水素化ホウ素ナトリウムを作用させても変化せず, したがって発光力を失わないが, 亜鉛と塩酸で還元した場合は脱色されて発光力を失った。



1: ヒドロルシフェリン (塩酸塩)
2: オキシルシフェリンC (硝酸塩)

図5 解離曲線

ルシフェリンとその酸化還元生成物との関係をまとめるとつぎのようになる^{*4}。



4 ルシフェリンおよびその誘導体に対する定性反応

ルシフェリンおよびその誘導体は, それらが微量しか得られないために普通の化学反応をおこなうことが困難なので, 微量でできるいろいろの定性反応をおこなった。そのおもなものを表1に示した。

*2 ブタノール・酢酸・水 (4:1:1)。

*3 ヒドロルシフェリンおよびオキシルシフェリンCの分子量をルシフェリンと同程度とした。

*4 λ_{max} はすべてメタノール中における値。

表1 定性反応

反応名	ヒドロルシフェリン	ルシフェリン	オキシルシフェリンA	オキシルシフェリンC
ビュレット	-	+	-	-
ニンヒドリン	+	-	-	-
Ehrlich	+	-	-	-
Dragendorff	+	+	-	-
坂口	+	+	+	よわい

ビュレット反応でオキシルシフェリン A および C は緑色, Jaffé 反応でオキシルシフェリン C は陽性 (橙色), ジアゾ化反応でヒドロルシフェリンは黄色 (多分 β-置換インドール核による), 塩化鉄 (II) 溶液によってルシフェリンは赤色 (多分酸化によるオキシルシフェリン R の生成) を呈した。またルシフェリンは硝酸銀溶液によって暗赤色を呈し, すみやかにコロイド状銀を遊離した。ヒドロキサム酸生成反応は陰性で, 遊離カルボン酸およびエステルが存在しないことを知った。

5 加水分解

塩酸および水酸化バリウムによる加水分解については前報で簡単に述べたが, 本報ではさらに詳細に検討した。加水分解物についてペーパークロマトグラフィーで調べた結果を表2に示した。水酸化バリウム分解において前報で報告した未知のニンヒドリン反応強陽性物質は γ-アミノ酪酸であったことが判明した*5。

表2 加水分解生成物

生成物		条件	ヒドロルシフェリン	ルシフェリン	オキシルシフェリンA	オキシルシフェリンC
塩酸分解						
イソロイシン	{	A	卅	卅	卅	-
		V	卅	卅	卅	-
γ-グアニジノ酪酸	{	A	卅	卅	卅	卅
		V	-	卅	卅	卅
グリシン	{	A	+	卅	卅	卅
		V	+	卅	卅	卅
水酸化バリウム分解						
イソロイシン	{	A	卅	卅	卅	-
		V	卅	卅	卅	-
γ-アミノ酪酸	{	A	卅	卅	卅	卅
		V	-	-	-	-
トリプタミン	{	A	+	-	-	-
		V	卅	-	-	-
アントラニル酸	{	A	+	卅	卅	卅
		V	-	-	-	-
グリシン	{	A	+	+	+	+
		V	+	+	+	+

注 A: 空気存在 卅: 約 0.7~1.0 mol, +: 約 0.1~0.2 mol
V: 真空 卅: 約 0.3~0.6 mol - : なし

塩酸分解では γ-グアニジノ酪酸のみで γ-アミノ酪酸をまったく生じないことから, 後者は前者の分解産物であると解釈される。真空中の水酸化バリウム分解で γ-アミノ酪酸がまったく生ぜず, 同じく塩酸分解でも γ-グアニジノ酪酸が少ないこと, およびオキシルシフェリン C からイソロイシンが得られないことは興味深いことである。また水酸化バリウム分解物は一般にインドール臭を有するが, オキシルシフェリン C の場合のみは無臭であ

った。トリプタミンは塩酸分解時には変化してしまっていて検出できない。アントラニル酸はトリプタミン骨格の酸化分解産物であり, またグリシンもつねに少量であってこれも分解産物と考えられる。

以上のことからルシフェリンはイソロイシン, γ-グアニジノ酪酸およびトリプタミン骨格の3種の構成成分からなると考えた。

6 分子式の決定

Rast 法によりショウノウおよびボルネオールを用いて分子量を測定しようとしたが, ルシフェリンがこれらに溶解せず測定不能であったのでつぎの諸法によった。

a) ルシフェリンを接触還元して 3 mol の水素を吸収させると, 紫外吸収スペクトルがトリプタミンとよく一致するヒドロルシフェリンが得られる。ヒドロルシフェリンとトリプタミンが同じ発色団をもつ (分子吸光係数が等しい) と仮定して 280 mμ でヒドロルシフェリンの分子量を計算した。測定結果 479。

b) ルシフェリンをフェリシアン化カリウムで酸化すると赤色のオキシルシフェリン R になり発光力を失なう。この反応を利用して, ルシフェラーゼ溶液を外部指示薬としてルシフェリンをフェリシアン化カリウムで滴定した。

測定結果 (1 当量の酸化反応として) 476。

c) 等温蒸留法³⁾によりメタノールを溶媒とし, アゾベンゼンを対照物質として測定した。測定結果 350。

d) 窒素ならびに塩素の分析値 (後記) より

1 分子中に 6 原子の窒素を含むとして 446。

1 分子中に 2 原子の塩素を含むとして 438。

以上の測定結果中 a, b および d 法には倍数の可能性が含まれているが, c 法は絶対的な分子量を示すと考えられるので倍数の可能性は否定され, ルシフェリンの分子量は約 460 と考えられる。c 法の結果がやや小さすぎるのは塩酸塩の解離によるものと解釈される。

ルシフェリンはその微量性および空気中における不安定性のために精製がむずかしく, 元素分析に十分な純度をうることは非常に困難である。2 回再結晶したルシフェリンについてつぎのような分析値を得た。

表 3

	C	H	O	N	Cl	灰分	合計
分析値 (%)	53.2	6.4	6.7	18.9	16.2	0	101.4
C ₂₁ H ₃₀ O ₂ N ₆ Cl ₂ としての計算値 (%)	53.7	6.4	6.8	17.9	15.1	0	100

分子量, 分析値ならびにさきに pKa' について述べたことから, ルシフェリンの分子式は C₂₁H₂₈O₂N₆·2HCl (分子量 469.4) となる。

なお前記の分析値は, 炭素, 水素および塩素については 2 回の平均値で, 酸素および窒素は 1 回の測定値である。塩素の値が理論値より少し大きいのは, さきに述べたように結晶に吸着された塩酸によるものとみられるが, 窒素についてはもう 1 度分析する必要があると考えられる。

7 実験の部

結晶ルシフェリンは水素で置換後真空にしたデシケーター中に

3) 秋谷, 薬誌 57, 967 (1937)。

*5 対照用サンプルを金沢大学医学部岩間吉也氏からいただいたので感謝する。

保存し、なるべく新鮮なうちに使用した。またルシフェリンは酸素に対して極端に不安定であるので、その結晶または溶液をやむをえず空気中で取りあつかうときには、たえずアルゴン気流でおおって酸化を防いだ。

7.1 紫外部および可視部吸収スペクトル

Beckman DK-2 型自記分光光度計を用いた。図1の測定における試料溶液は、ルシフェリンのメタノール溶液 (0.347 mg/10 cc) 1 cc に対して、曲線1では 10% 硫酸、曲線2と3ではホウ酸緩衝液 (イオン強度 0.1)、曲線4と5ではリン酸緩衝液 (イオン強度 0.1)、曲線6では 2N 水酸化カリウムをそれぞれ 2 cc ずつ加えてつくり、調製後3分間以内に吸収スペクトルの測定をすませ、ついで pH を測定した。

7.2 赤外線吸収スペクトル

Hilger H-800 型赤外分光光度計を用い、KBr 錠剤法によって測定した。

7.3 解離曲線

ルシフェリン 6.432 mg をメタノール 1 cc にとかし 0.01N HCl 2 cc を加え、1N 水酸化ナトリウムで滴定して pH-水酸化ナトリウム消費量曲線を求め、この曲線から空試曲線を差し引いて解離曲線を得た。ヒドロルシフェリンおよびオキシルシフェリン C についてもこれに準じて測定した。

pH メーター Beckman G 型 pH メーター

ビュレット 三田村製ウルトラマイクロビュレット (最小目盛 約 0.0001 cc)。

7.4 過酸化水素酸化

ルシフェリン約 4 mg をメタノール 1 cc にとかし、28% アンモニア水 1 滴および 30% 過酸化水素 1 滴を加え、わずかに加温 (40°C 以下) して脱色させ^{*6}、これを冷却しながら 10% 硝酸で酸性にして放置すると黄色針状のオキシルシフェリン C を析出する。オキシルシフェリン C は遠心によって結晶を分取し、メタノールにとかし 10% 硝酸を加える方法によって 3 回再結晶し、最後に結晶を口取して真空乾燥した。

*6 2, 3 分間で脱色。

7.5 接触還元

約 2 mg の Adams の酸化白金を 3 cc のメタノールとともにあらかじめ還元しておき、これにルシフェリン 7.146 mg を加えて還元したところ、始め黄色であったのが約 12 時間後にほとんど無色になった。ふりまぜを止めてそのまま 8 時間放置し、触媒を遠心で除去し、微量の塩酸を加えて弱酸性とし、真空蒸発乾固してヒドロルシフェリンを得た。

7.6 加水分解および分解物のペーパークロマトグラフィー

加水分解剤として 18% 塩酸および 14% 水酸化バリウム溶液を用いた。試料約 1 mg に加水分解剤 0.4 cc を加え、封管中で 115°C に 16 時間加熱した。この場合、空気存在下で分解するときには、封管内に液体部分容積の約 5 倍の空気部を残し、また真空で分解するときには、封管を融封する際に封管をアスピレーターで減圧にして、内容を沸騰させながら融封した。分解終了後に、塩酸の場合にはそのまま真空蒸発乾固し、水酸化バリウムの場合は硫酸でバリウムを除去してから濃縮し、ペーパークロマトグラフィーをおこなった。この場合、既知濃度の純物質を対照物質として用いて、スポットの大きさによって半定量的測定を行なった。

東洋濾紙 No.51, 上昇法。

展開溶媒 {
ブタノール-酢酸-水 (4:1:1)。
イソプロピルアルコール-アンモニア水-水 (10:1:1)。
2,6-ルチジン-水 (3:2)。

顕色試薬 ニンヒドリン, エールリッヒ試薬および坂口反応試薬。

7.7 フェリシアン化カリウムによる滴定

ルシフェリン 1.532 mg をメタノール 1 cc にとかし、緩衝液 10 cc を加え、ルシフェラーゼ溶液を外部指示薬として用い、0.002 mol/l フェリシアン化カリウムで滴定したところ 1.52 cc 消費したところでほとんど光らなくなった。

緩衝液 pH 6.0 (0.2 mol/l KH_2PO_4 50 cc
+ 0.2 mol/l NaOH 5.64 cc)。

ビュレット 2 cc マイクロビュレット。

II. 海ホタルルシフェリンおよびヒドロルシフェリンの推定構造

海ホタルルシフェリンおよびその誘導体について前報までに得られた知見をもとにし、あらたにいくつかの実験を行ない、これらに考察を加えて、ヒドロルシフェリンの構造を III, 海ホタルルシフェリンの構造を IV と推定した。

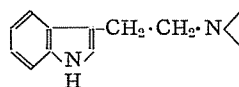
1 緒言

海ホタルルシフェリンの性質、構成成分および分子式などについて第2報で報告したが、これらのデータに総合的考察を加え、さらに新しくいくつかの実験を行なってヒドロルシフェリンおよびルシフェリンの構造を推定し、その推定構造にたいして二、三の点でモデル化合物との比較検討を試みた。

2 ヒドロルシフェリンの構造

ヒドロルシフェリンはルシフェリンの接触還元によって得られるが、その紫外部吸収スペクトルはトリプタミンとよく一致し、Ehrlich 試薬, Adamkiewicz 試薬などのインドール試薬にた

いして陽性であり、さらにその水酸化バリウム加水分解物からペーパークロマトグラフィーによりトリプタミンを確認できることから、ヒドロルシフェリンの構造中に



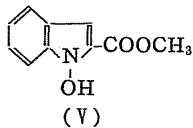
の存在が確実である。

ヒドロルシフェリンの加水分解結果から、その構成成分としてトリプタミン以外にイソロイシンと γ -グアニジノ酪酸が考えられるが、ヒドロルシフェリンはルシフェリンと類似の骨格をもち、かつ分子量も同程度とみられるから、ヒドロルシフェリンは前記3成分の各 1 mol ずつからなると考えられる。

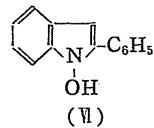
置に水酸基が置換していると考えると好都合である。

2-ヒドロキシインドール類は水酸化バリウムと加熱するとき極めて容易にオルト置換アニリン類を与えるが、ルシフェリンはこのような性質を有しない。

一方、1-オキシインドール類はいままでにわずかに数種類が知られているにすぎないめづらしい化合物であるが、そのうち 1-オキシインドール-2-カルボン酸メチルエステル(V)¹⁾および 1-オキシ-2-フェニルインドール(Ⅵ)²⁾を合成してその性質を調べたところ、ルシフェリンの性質とみずかずの一致を示した。たとえば、これらの化合物は酸化に対して不安定で、とくにフェリシアニ化カリウムで酸化したときの状態はルシフェリンの場合と酷似しており、またその水酸基は接触還元によって除去することができた。さらに、ⅤおよびⅥは酸としての性質を示し、

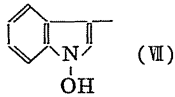


$pK_a' 8.7$
(33% メタノール中)

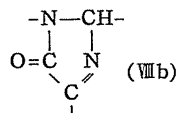
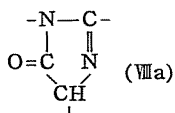


$pK_a' 10.3$
(65% メタノール中)

それらの pK_a' はルシフェリンの酸性解離基の $pK_a' 8.3$ に近い値を示した。これらのことからルシフェリンの構造中に 1-オキシインドリル基(Ⅶ)が存在すると考えた。



オキシルシフェリンCは加水分解してもイソロイシンを与えないが、それを接触還元または硫酸第一鉄で還元したのち加水分解するとふたたびイソロイシンを与えるようになる。このことからオキシルシフェリンCではイソロイシンの窒素がN-オキシドの状態にあるものと想像され、オキシルシフェリンCがルシフェリンからきわめて容易に生成することを考え合せると、もとのルシフェリンではイソロイシンの窒素は第3級の状態にあり、(Ⅲ)式の5-イミダゾリドン環の2-3または3-4間が二重結合で結ばれた5-イミダゾロン(Ⅷa)または5-イソイミダゾロン(Ⅷb)の状態にあるものと推定される。



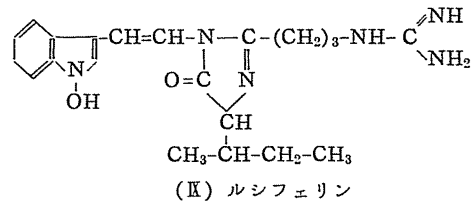
この2式のうちどちらが正しいか決定できるようなデータをまだ得ていないが、加水分解の結果の説明には(Ⅷa)式の方が幾分好都合のように思われる。なお、ルシフェリンの $pK_a' 1.3$ 以下はこのイミダゾロン環によるものと考えられる。

ルシフェリンの坂口反応は陽性であるから、ヒドロルシフェリンと同様にグアニジノ基は置換されていない。

また発色団の面から考えると、ルシフェリンの可視部吸収極大波長 $435 m\mu$ (メタノール中) を説明するためには、どうしても1-オキシインドールに共役する二重結合が必要である。なおこの二重結合は接触還元時の水素吸収量を説明するためにも必要であ

る。

以上の結果をまとめ、ルシフェリンの構造式をつぎのように推定した。



(Ⅸ) 式においてイミダゾロン環の二重結合の位置はさきに述べたようにまだ確実でなく、また発色団の証明についても不十分であるので、これらの点についてさらに検討するつもりである。

4 実験の部

4.1 ヒドロルシフェリンの亜硝酸分解

ヒドロルシフェリン約 2 mg を 0.5 cc のメタノールにとかし、亜硝酸銀約 50 mg および濃塩酸 1 滴を加えて常温で 3 時間反応させ、遠心によって沈殿を分離し、沈殿はさらに水およびメタノールで抽出し、液体部分を合わせて減圧で蒸発乾固した残分についてペーパークロマトグラフィーを行なった。

4.2 ヒドロルシフェリンのDNP化

ヒドロルシフェリン約 3 mg を 5 cc のメタノールにとかし、0.4% 水素炭酸ナトリウム水溶液 5 cc を加えたのち、2% 2,4-ジニトロフルオルベンゼン-アルコール溶液 5 cc を加えて常温で 1 夜放置し、減圧濃縮して約 2 cc にしてからエーテル抽出し、抽出残液をさらに濃縮後 5N 塩酸 3 cc を加えて 100°C で 5 時間加水分解し、分解物についてペーパークロマトグラフィーを行なった。

4.3 ヒドロルシフェリンの水酸化バリウムによる部分加水分解

ヒドロルシフェリン約 2 mg に 10% 水酸化バリウム 0.5 cc を加え、減圧下で封管に密封し、90°C で 10 時間加水分解した。分解後常法によってバリウムを除去した。

4.4 オキシルシフェリンCの還元

1 接触還元—オキシルシフェリンC 0.3 mg を同量の Adams の酸化白金を用いて 12 時間還元した*4。

2 硫酸第一鉄—オキシルシフェリンC 0.3 mg を 35% メタノール 0.5 cc にとかし、硫酸第一鉄 10 mg およびアンモニア水 1 滴を加えて 1 夜放置して反応させ、ついで水酸化バリウムによって鉄分および硫酸分を除去した。還元後はどちらの場合も水酸化バリウムによって加水分解した。

終りにのぞみ、終始御懇篤な御指導を賜った平田義正教授、しばしば御激励下さった故安永峻五教授、本研究に御協力下さった後藤俊夫氏ならびに江口昇次氏に厚く感謝する。また、原料海ホタルを採集して下さった横須賀博物館長羽根田弥太博士ならびに広島県瀬戸田中学校宮本左門氏、窒素元素分析を行なって下さった中田尚男氏に厚く御礼申しあげる。

なお、本研究の費用の一部は昭和 33 年度科学研究費によった。(1958 年 4 月、日本化学会第 11 年会講演)

1) A. Reissert, Ber. 24, 639 (1896).

2) E. Fischer, H. Hütz, ibid. 28, 585 (1895).

*4 還元中にインドール系の紫外吸収を示す物質は得られなかった。