

## 夜光虫(渦鞭毛藻)の生物発光

(ハーバード大化学)

○ 中村英士, B. Musicki  
岸 義人

(ハーバード大生物)

D. Morse, J. W. Hastings

(ラッズホール海洋生物研) 下村 脩

海産微小藻は、近年赤潮や魚貝類の毒化原因として注目されてい  
る。一方、俗称夜光虫で代表されるごとく、これらの微小藻には顕  
著な生物発光現象を示す渦鞭毛藻類のいることが旧くより知られて  
いる。渦鞭毛藻の生物発光は、ルシフェリン(基質)のルシフェラーゼ(酵  
素)による触媒的空気酸化に基づくものと説明されている。<sup>1)</sup>しかし、  
発光に関与する物質が極めて不安定であるため、この生物発光現象  
の化学的詳細はいまだ明らかにされていない。渦鞭毛藻の生物発光  
は光によって抑制されるため、夜光虫の名が示すごとく一般に夜間  
にのみ発光するが、*Gonyaulax polyedra* 等では藻自身の体内時計  
によっても制御され、約23時間の周期性を示す。<sup>2)</sup>最近、この周期  
がクレアチン等の低分子化合物によって短縮されるのが明らかにさ  
れている。<sup>3)</sup>発光現象を化学的に解明することは、発光現象と密接に  
関連する体内時計、光受容等の生理過程を明らかにする上にも重要  
である。

渦鞭毛藻のルシフェリンは390nmに吸収極大を持つ蛍光性物質( $\lambda_{max} \sim 470\text{nm}$ )で、特に酸及び酸素に対して反応性が高く、極めて  
不安定な化合物である。また渦鞭毛藻の種が異なるとルシフェリン  
の化学構造は同一であると考えられている。一方、生物分類上異な  
るオキアミの生物発光系にも、化学的性状が渦鞭毛藻ルシフェリンに  
類似した化合物が関与していることが知られている。<sup>4)</sup>この化合物(  
蛍光性物質F)はルシフェリンとは異なり、ある種のタンパク質を触  
媒的に空気酸化し、さらに発光体としても機能している。興味ある  
ことに、渦鞭毛藻の発光系とオキアミの発光系の間に弱いながら交  
叉反応が認められている。<sup>5)</sup>我々は、オキアミが研究材料としてより  
入手しやすい点に着目して、まずFの構造研究より着手することに  
した。

**Frozen Krill (*Euphausia pacifica*) 500g**

Extraction with 60% EtOH

Desal with EtOH

**Crude Extract**

Extraction with n-BuOH

Alumina column chromatography (0.6% NH<sub>4</sub>OH in 50% EtOH)

DEAE cellulose column chromatography (0.1M NaCl, 0.01M Tris pH 7.5 in 50% EtOH)

HPLC on TSK DEAE-5PW (85mM NaCl, 3mM NaHCO<sub>3</sub> in 40% CH<sub>3</sub>CN)**Fluorescent substance F (2-3mg)**O<sub>2</sub> in MeOH at -20°C for 2-3 weeksHPLC on TSK DEAE-5PW (85mM NaCl, 3mM NaHCO<sub>3</sub> in 35% CH<sub>3</sub>CN)**Oxy-F**

Scheme 1

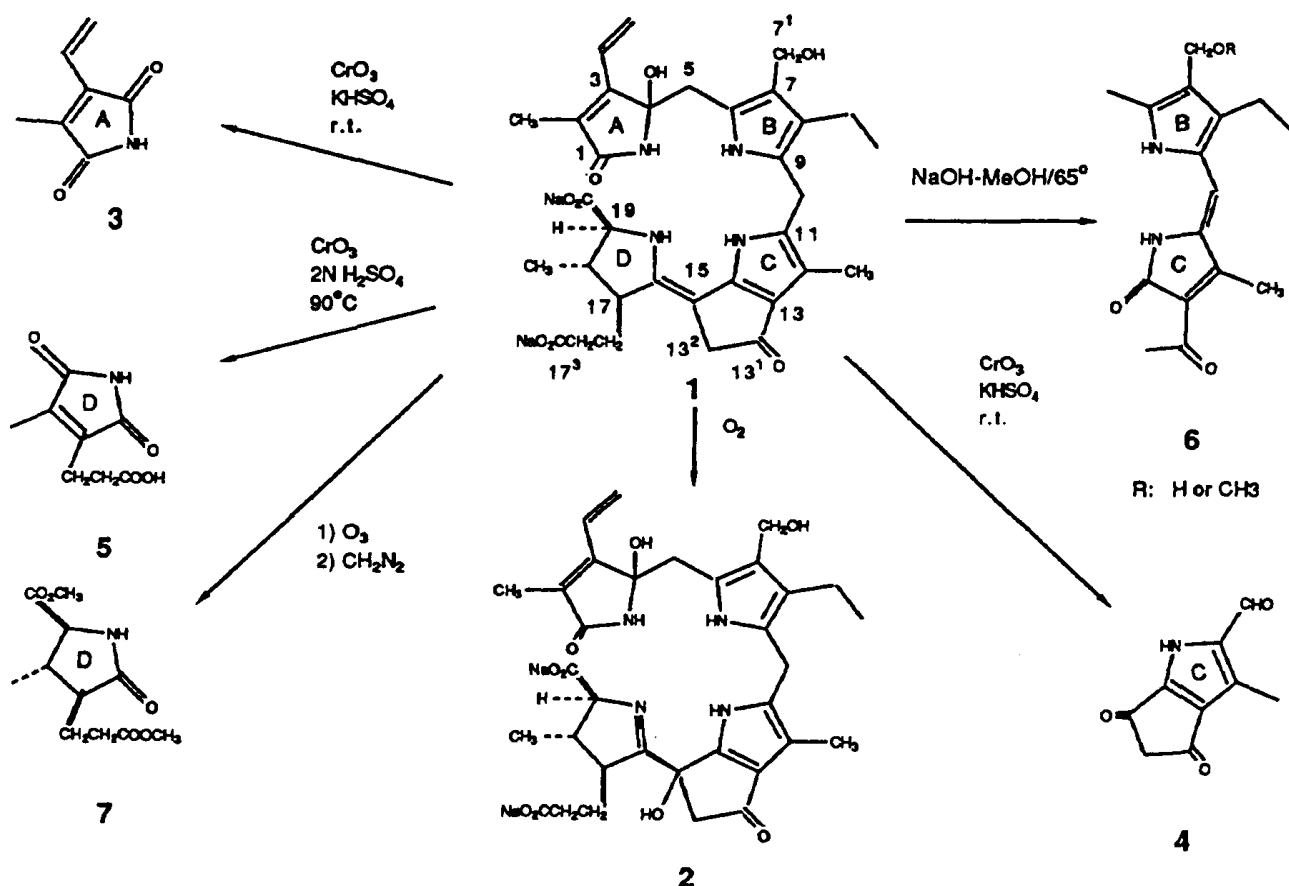


Fig 1

Table 1. 500 MHz  $^1\text{H}$  and 125 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR data for krill P (1) and oxy-P (2), and dinoflagellate luciferin (8), oxidized luciferin (9) and blue compound (10) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $-5^\circ\text{C}$ .

	1	2	8	9	10
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
	$\delta_{\text{Cbc}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{Cbc}}$	$\delta_{\text{Cbc}}$	$\delta_{\text{Cbc}}$
1	174.2s		174.3s	176.0s	176.1s
2	130.7s		130.8sd	130.8s	130.9s
21	8.4q	1.72 (t)	8.5q	8.6q	8.6q
3	152.1se		152.2se	152.8se	152.8se
31	6.58 (dd, $J=11, 17$ Hz)	6.61 (dd, $J=18, 11$ Hz)	128.1d	128.9d	129.1d
32	5.59 (d, $J=11$ Hz)	5.56 (dd, $J=11, 1$ Hz)	122.7t	121.0t	120.8t
	5.98 (d, $J=17$ Hz)	5.96 (dd, $J=18, 1$ Hz)		59.1d	58.9d
4			90.1s	59.1d	4.76 (br)
5	3.18 (d, $J=15$ Hz)	3.17 (d, $J=15$ Hz)	35.8t	31.5t	3.53 (dd, $J=14, 4$ Hz)
	3.28 (d, $J=15$ Hz)	3.21 (d, $J=15$ Hz)		121.9sf	3.56 (dd, $J=14, 6$ Hz)
6			125.7sf	121.9sf	122.0sf
7			119.3s	114.7s	115.0s
71	4.21 (d, $J=11$ Hz)	4.20 (d, $J=12$ Hz)	55.8t	9.7q	9.9q
	4.40 (d, $J=11$ Hz)	4.39 (d, $J=12$ Hz)		1.76 (s)	1.85 (s)
8			120.4sf	120.1sf	120.3sf
81	2.47	2.48 (q, $J=7.5$ Hz)	18.5t	18.7t	18.8t
82	1.02 (t, $J=7$ Hz)	1.04 (t, $J=7.5$ Hz)	17.5q	16.6q	16.7q
9			123.5sf	124.9sf	124.2sf
10	3.64 (d, $J=16$ Hz)	3.75 (d, $J=16$ Hz)	22.2t	22.9t	22.5t
	3.76 (d, $J=16$ Hz)	3.85 (d, $J=16$ Hz)		3.78 (d, $J=16$ Hz)	6.88 (s)
11			137.3s	137.5s	
12			123.4s	123.5s	
121	2.12 (t)	2.14 (t)	9.7q	9.4q	
13			108.5s	108.5s	
131			193.4s	194.4s	
132	3.11 (d, $J=19$ Hz)	2.83 (d, $J=18$ Hz)	45.3t	45.4t	
	3.28 (d, $J=19$ Hz)	3.79 (d, $J=18$ Hz)		57.4t	3.37 (d, $J=20$ Hz)
14			149.7se	149.7se	3.56 (d, $J=20$ Hz)
15			88.1s	88.2s	
16			160.8s	160.7s	
17	2.49	2.73 (dd, $J=13, 3$ Hz)	58.1d	50.0d	
171	1.56 (br t, $J=14$ Hz)	1.48 (br t, $J=13, 3$ Hz)	30.9t	30.2t	
	2.49	2.81 (br t, $J=13$ Hz)		2.38	
172	2.08 (m)	2.32 (ddd, $J=16, 13, 3$ Hz)	35.4t	34.6t	
	2.39 (br t, $J=14$ Hz)	2.50 (m)		2.03	
173			182.0sf	181.6sf	
18	2.49	2.21 (m)	42.2d	42.3d	
181	1.18 (d, $J=7$ Hz)	1.14 (d, $J=7$ Hz)	23.5q	23.4q	
19	3.59 (d, $J=1$ Hz)	4.10 (d, $J=4$ Hz)	69.6d	69.6d	
20			182.5sf	182.4sf	
NH	11.1 (s), 11.9 (s)	10.7 (s), 11.9 (s)			

a)  $\delta$  in ppm.

b) Multiplicity of carbon signals was determined by DEPT.

c) Protonated carbon signals were assigned by proton selective decoupling experiment.

d-g) Each signal was interchangeable in a column.

## 1. オキアミ (*Euphausia pacifica*) の蛍光性物質 F の構造

F はルシフェリン同様不安定であるが, Victoria (British Columbia, Canada) にて採集したオキアミ *Euphausia pacifica* より無酸素条件下, アルミナ及びイオン交換クロマトを駆使することにより, F を紙層に分離することに成功した (Scheme 1)。しかし, 脱塩操作中の分解が完全に防げないため, 実際に単離した F の紙層は NMR 等の機器分析では 60~70% であった。しかし, F を低温下低濃度の酸素で酸化すると比較的安定な化合物 oxy-F (2) が紙層に得られ, その機器分析による構造解析が可能となった。

この構造決定の手順についてはすでに報告してあるので<sup>6)</sup>, その詳細は省略するが, F の分解物の構造 (Fig. 1) 及び機器データ (Table 1) に基づいて, F 及び oxy-F の構造を 1 及び 2 とそれぞれ決定した。F の分解生成物 3 と 4 は標品との比較, また 5 と 6 は合成により決定した。<sup>7)</sup> C-15, C-16 のエナミン構造ならびに D 環上の置換基の相対配置については, F をオゾン分解後, メチルエステル化することによって得られるエステル 7 を合成することにより証明した。C-15, C-16 二重結合の配位については不明であるが, F がクロロフィル由来と考えると図に示した様に推定される。これらの知見をもとに渦鞭毛藻ルシフェリンの構造研究を開始した。

## 2. 渦鞭毛藻 (*Pyrocystis lunula*) ルシフェリンの構造

ルシフェリンの抽出には, ルシフェリン含量の高い *Pyrocystis lunula* を用いた。藻を 1 日 12 時間の照明条件下約 6 週間培養を行ない, F の分離方法に基づいてルシフェリンを単離した (Scheme 2)。ルシフェリンは分離過程において一部空気酸化され, 比較的安定な青色化合物を与える。またルシフェリンはオキアミの F と同様, 低温下低濃度の酸素によって酸化され, oxy-F に類似した酸化物を与える。

ルシフェリンはクロム酸酸化において化合物 8~11 を与えることから, F とは異なり B 環上にはメチル基が存在することが示唆された。また, A 環上の C-4 炭素は F と異なり酸化されないことが以下の実験事実から推定された。1) クロム酸酸化において化合物 8 に一原子の <sup>18</sup>O が取り込まれる。2) 酸性条件において化合物 8 を遊離しない。

**Pyrocystis lunula (131 g wet cells from 1.5 L x 92 culture flasks)**

Extraction with 5 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM phosphate buffer pH 8.0  
 DEAE cellulose column (5 mM 2-mercaptoethanol, 2-300 mM phosphate buffer pH 8.0)

**Crude Extract**

Extraction with n-BuOH  
 Aluminum column chromatography (0.6% NH<sub>4</sub>OH in 50% EtOH)  
 HPLC on TSK DEAE-5PW (85 mM NaCl, 3 mM NaHCO<sub>3</sub> in 40% CH<sub>3</sub>CN)

**Luciferin (3-5 mg)**

O<sub>2</sub> in MeOH at -20°C for 3 days  
 HPLC on TSK DEAE-5PW (85 mM NaCl, 3 mM NaHCO<sub>3</sub> in 35% CH<sub>3</sub>CN)

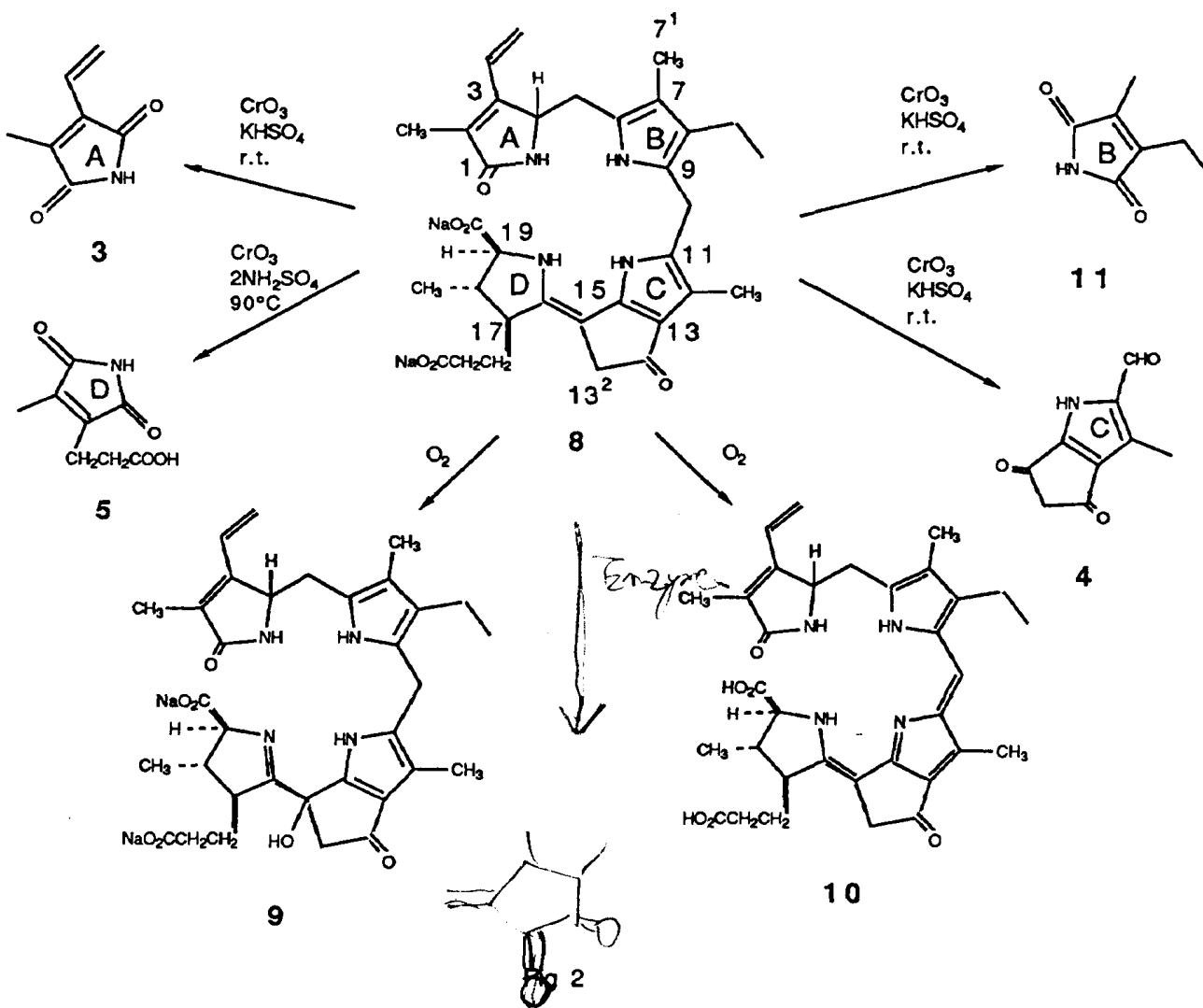
**Oxidized Luciferin**

**Crude blue compound**

HPLC on Hamilton PRP-1 (0.1% AcONH<sub>4</sub> in 80% MeOH)

**Blue compound**

Scheme 2



*Oxidation products of luciferin*

酸化生成物 9 は UV スペクトル等その性状がオキアミの oxy-F とよく似ており、高分解能 FAB マスにより分子式  $C_{33}H_{38}O_7N_4Na_2$  [ $m/z$  671.2484 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>  $\Delta$ 5.1 mmu, 649.2670 ( $M+H$ )<sup>+</sup>,  $\Delta$ 0.6 mmu] が得られた。<sup>1</sup>H NMR および <sup>13</sup>C NMR をオキアミの oxy-F と比較すると, C-5' x4 レンプロトンが C-2' x4 アルプロトンと遠隔カップリングした C-4' x4 チンプロトンとカップリングしている。また, C-4' x4 チン炭素が  $\delta$ 58.9 に観測されることから, 先に推定した様に C-4' 位は酸化されていることが明らかとなった。oxy-F における B 環上のヒドロキシメチル基に由来するシグナルはこの酸化物では見られず, それにかわ, 2 メチル基のシグナル ( $\delta_H$  1.76s,  $\delta_C$  9.9g) が観測される。従って, ルシフェリン酸化物の構造は 9 となる。

ルシフェリンの構造は酸化物 9 の構造から 8 の様に推定され, 事実, FAB マスにおいて 9 より酸素 1 原子分小さいイオンピークが顕著に認められた [ $m/z$  655 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>, 633 ( $M+H$ )<sup>+</sup>]。ルシフェリンの精製方法についても種々検討した結果, 最後の脱塩操作において, 適度な塩を残すかあるいは 2-メチルカプトエタノールを添加することにより, 極めて純度の高い (~90%) ルシフェリンを得ることが可能となった。一方, 低温においては, NH プロトン 特には B 環上のプロトンと重水素との交換速度が遅く, <sup>1</sup>H NMR において NH プロトンが観測される (Table 1)。F についても同様であることが後に判明した。<sup>1</sup>H 及び <sup>13</sup>C NMR を F と詳細に比較検討し, ルシフェリンの構造を 8 と決定した。

青色化合物は 633 nm に極大吸収を示し, 高分解能 FAB マスによって分子式  $C_{33}H_{38}O_6N_4$  [ $m/z$  631.2524 ( $M+2Na-H$ )<sup>+</sup>  $\Delta$ 1.5 mmu, 609.2672 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>  $\Delta$ 0.9 mmu] が得られた。<sup>1</sup>H NMR では C-10' x4 レンに由来するシグナルが認められず, それにかわ,  $\delta$ 6.88 にシングレットのオレフィンプロトンのシグナルが観測されることから, この青色化合物の構造は, B 環と C 環が共役した構造 10 と考えられる。

渦鞭毛藻ルシフェリンならびにオキアミの蛍光性物質 F は, クロコフィルあるいはその生合成前駆体に由来する bile pigment の一種と考えられる。しかし, クロコフィルに由来した bile pigment が天然より単離されたのは今回が初めてである。今後, クロコフィル類の代謝な

らびに bile pigment の生合成にも重要な知見をもたらすものと期待される。渦鞭毛藻の生物発光機構の詳細については、現在検討中であり、あわせて報告する。

<謝辞> オキアミの採取にご協力いただいた Dr. Heath (Biocean Surveys, Ltd., Victoria, British Columbia, Canada) ならびに FAB マスを測定していただいた Mr. Higuchi (Mass Spectrometer Application Lab., JEOL USA, Inc.) に感謝致します。また、本研究は NSF の援助によるものであり、ここに謝意を表します。

### References

- 1 (a) J. C. Dunlap, J. W. Hastings, *Biochemistry*, **20**, 983 (1981).  
(b) J. C. Dunlap, J. W. Hastings, O. Shimomura, *FEBS Lett.* **135**, 273 (1981).
2. C. H. Johnson, J. W. Hastings, *Am. Scient.* **74**, 29 (1986).
3. T. Roenneberg, H. Nakamura, J. W. Hastings, *Nature*, **334**, 432 (1988).
4. (a) O. Shimomura, F. H. Johnson, *Biochemistry*, **6**, 2293 (1967).  
(b) O. Shimomura, F. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**, 475 (1968).  
(c) O. Shimomura, *FEBS Lett.* **116**, 203 (1980).
5. J. C. Dunlap, J. W. Hastings, O. Shimomura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1394 (1980).
6. H. Nakamura, B. Musicki, Y. Kishi, O. Shimomura, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, (1988).
7. The dissertation of B. Musicki, Harvard University (1987).

## BIOLUMINESCENCE OF DINOFLAGELLATES AND KRILLS

H. Nakamura, B. Musicki and Y. Kishi

(Department of Chemistry, Harvard University)

D. Morse and J. W. Hastings

(Department of Cellular and Developmental Biology, Harvard University)

O. Shimomura

(Woods Hole Marine Biological Laboratory)

The bioluminescence of dinoflagellates involves air-oxidation of luciferin (enzyme substrate) by luciferase (enzyme). On the other hand, *Euphausia* krills utilize highly fluorescent substance F not only as the catalyst for air-oxidation of a protein but also as the light-emitter. Fluorescent substance F exhibits chemical properties similar to those of dinoflagellate luciferin.

Using alumina and ion exchange chromatography at low temperature under inert atmosphere (Scheme 1), the substance F (1) was successfully isolated from *Euphausia pacifica*. The structure of F was elucidated on the basis of degradation reaction summarized in Fig. 1 as well as the spectroscopic data of F (1) and oxy-F (2). The ring D part of the proposed structure, including relative stereochemistry, was unambiguously established by chemical means; ozonolysis of F, followed by CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> treatment, yielded the expected product 7, the structure of which was determined by chemical synthesis.

Dinoflagellate luciferin could be isolated from the dinoflagellate *Pyrocystis lunula* (Scheme 2). The structures of luciferin 8, oxidized luciferin 9 and blue compound 10 were elucidated by comparing their spectroscopic data with those of fluorescent substance F and oxy-F.

Dinoflagellate luciferin and krill fluorescent substance F are apparently a member of the bile pigments. To the best of our knowledge, however, these are the first naturally occurring bile pigments, which structurally relate to chlorophylls rather than to haems. Studies on the mechanism of dinoflagellate bioluminescence is in progress.