

# 生物発光を基にしたスーパーオキシドアニオン検出用 化学発光プローブ

寺西克倫

三重大学大学院生物資源学研究科

## The Chemiluminescence Probes for Detecting Superoxide Anions Based on Bioluminescence

Katsunori TERANISHI

Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie, 514-8507, Japan

### Abstract

In this review, I describe the chemical principles of bioluminescence and chemiluminescence in the imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one compounds, including *Cypridina* luciferin, coelenterazine, and their analogues, and the development of chemiluminescence probes for detecting superoxide anions on the basis of bioluminescence. Bioluminescence is observed in many marine organisms; it is particularly common among deep-sea organisms. The substance imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one, which has been recognized to be a common structure of marine bioluminescence substance. There are two type reactions in bioluminescence: one is a reaction between the energy-source substance “luciferin” and the enzyme “luciferase”, called the luciferin-luciferase reaction, as *Cypridina* bioluminescence, and another one is the photoprotein system, has been found in such organisms as the jellyfish *Aequorea aequorea*.

The imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one luciferins react with active oxygen species without luciferase and show chemiluminescence in lower quantum yields than in bioluminescence. Some researchers studied to use the imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one luciferins as chemiluminescence probes for detecting the active oxygen species, especially superoxide anions. Then, some chemiluminescence probes, for instance, CLA, MCLA, FCLA, EMPEC, Green Chemiluminescent CD, and Red-CLA, have been developed and are now widely used.

**Key Words:** bioluminescence, chemiluminescence, superoxide anions,  
imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one

## 1. 生物発光

### 1.1. 生物発光とは

蛍に代表される発光を行う生物は地球上に多く生息する。特に海洋生物に多くみられ、甲殻類のウミホタル (図1)、軟体動物のホタルイカ (図1)、こう腸類のクラゲ (図1)、魚類のマツカサウオ等の生物発光などがあげられる。これらの生物は、

生体内調節機能あるいは求愛シグナルや威嚇シグナルなどの個体間情報伝達機能として発光を行い、生命活動を維持している。これらの生物発光の分子反応機構は、発光基質であるルシフェリン、分子状酸素及び酵素 (ルシフェラーゼ) による発光反応 (ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応) とクラゲのように発光基質をタンパク質内に含有しこの発光タンパク質への化学的な刺激による発光反

応との二種類に大別される。いずれの発光反応においても、これらの酸化反応により生成する化学エネルギーが一重項励起分子種を形成し、その励起分子種の基底状態への緩和の際にエネルギーを光に変換する。

## 1. 2. ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応

ウミホタルの発光は単純なルシフェリン-ルシフェラーゼ反応であり、その発光基質ウミホタルルシフェリン (*Cypridina luciferin*) は、3,7-ジヒドロイミダゾ[1,2-*a*]ピラジン-3-オン環構造を有している (図2)<sup>1, 2)</sup>。ウミホタルは魚などに襲わ



図1. ウミホタル (左), ホタルイカ (中央) と発光クラゲ (*Aequorea*) (右)

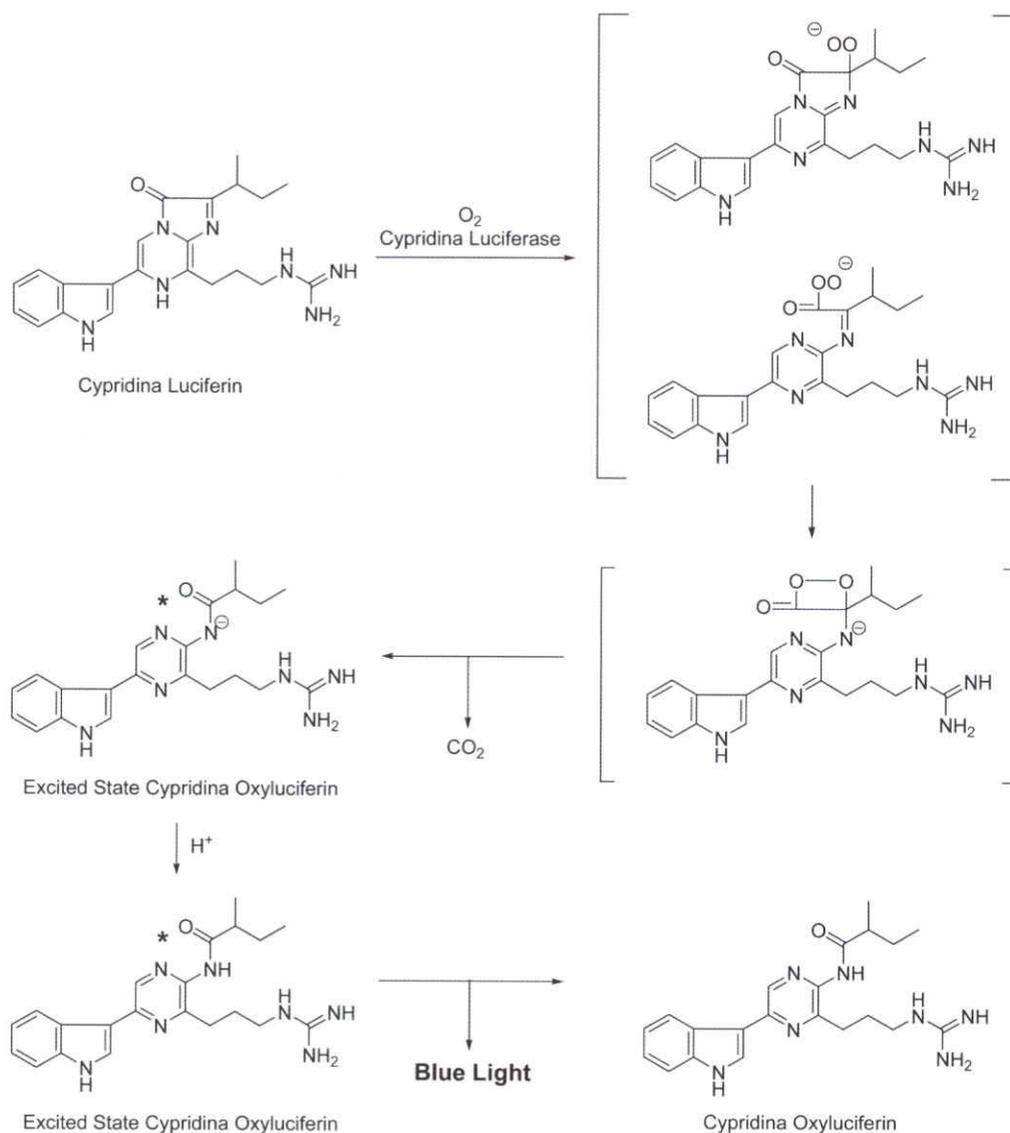


図2. ウミホタルの生物発光反応の分子機構

れた際に、ルシフェリンとルシフェラーゼをそれぞれ異なる器官から海中に放出する。海中でこれらの成分および酸素が混ざりあってルシフェリン-ルシフェラーゼ反応が起こり、青色の光が放たれる。発光反応は図2に示す過程で進行するものと考えられている。ルシフェリンのピラジン環のプロトンが解離し、酸素分子と結合しペルオキシドを形成する。ペルオキシドはジオキサノンを経て二酸化炭素及びアニオン型のオキシルシフェリン一重項励起分子を形成後、水素化が生じ中性型オキシルシフェリンに変化し、光を放出して基底状態のオキシルシフェリンとなる。この発光反応の発光量子効率率は高く約0.3である<sup>3, 4)</sup>。

この発光反応の機構に関しては、一分子の二酸化炭素の生成、オキシルシフェリンの生成及び<sup>18</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub><sup>18</sup>Oの取込み実験の結果から<sup>5, 6)</sup>、図2に示したジオキサノン中間体を經由する機構が支持されている。しかし、ジオキサノン中間体は、極めて

不安定であるため中間体の確認には成功していない。ペルオキシド体に関して、McCapra<sup>7)</sup>は2-ペルオキシド体を提唱し、Goto<sup>8)</sup>は3-ペルオキシド体を提唱した。また、中性型オキシルシフェリンを形成する際の水素化は励起後と考えられているが、励起前に中性分子に変化すると考えることも可能である。これまで水素化のタイミングに関しては、全く議論されてこなかったが、効率的な一重項励起分子の形成要因を論ずる上で重要である。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応で発光する発光ウミシイタケやヒオドシエビの発光基質は*Cypridina* luciferinと同じイミダゾピラジノン環を有する化合物（各々*Renilla* luciferin<sup>9)</sup>, *Oplophorous* luciferin<sup>10)</sup>と命名されている）であり、さらに、この基質は次項で記載する発光クラゲが持つ発光タンパク質aequorin（図3）の発光基質coelenterazineでもある<sup>11)</sup>。また、ホタルイカルシフェリン（*Watasenia* luciferin）（図4）は

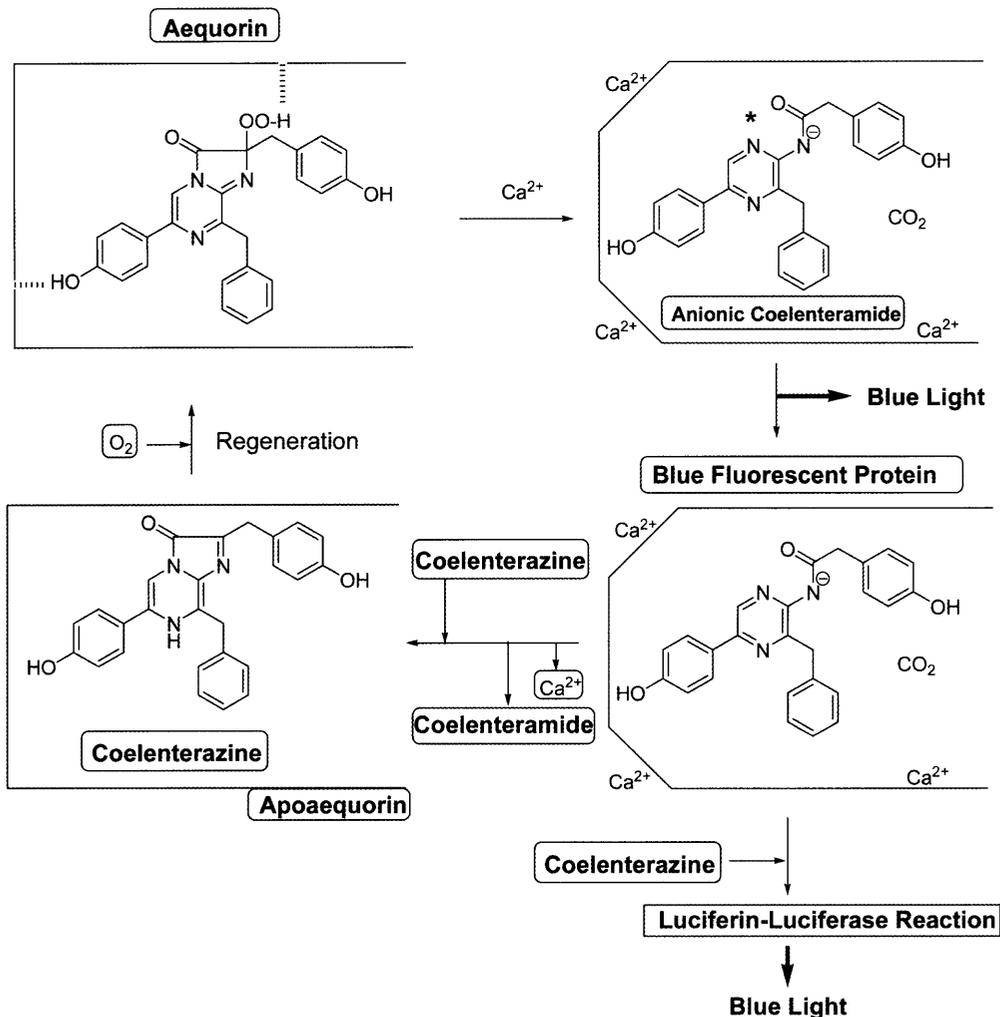


図3. 発光タンパク質 aequorin の生物発光反応の分子機構

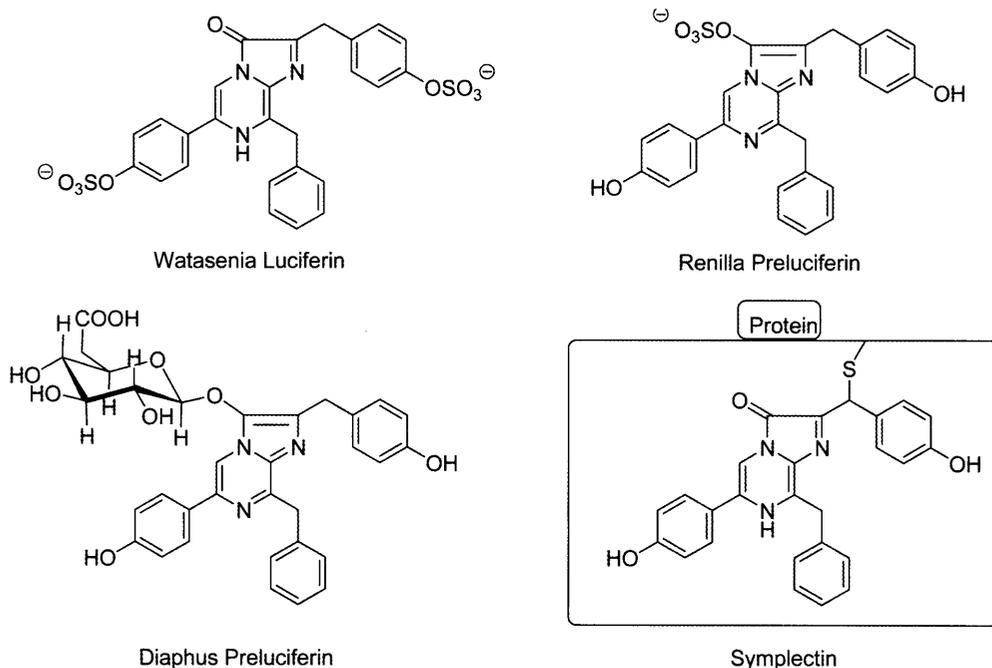


図4. イミダゾピラジノン化合物を有する生物発光化合物

coelenterazine の硫酸エステルであり<sup>12, 13)</sup>, ホタルイカの肝臓中には coelenterazine が検出されている<sup>14)</sup>。トビイカ (*Symplectoteuthis oualaniensis*) のナトリウムイオンが引金となる発光基質にも coelenterazine 骨格が存在している (図4)<sup>15, 16)</sup>。トビイカの場合, dehydrocoelenterazine にタンパク質中の求核官能基が付加し, 3, 7-ジヒドロイミダゾ[1, 2-*a*]ピラジン-3-オン環が形成され, これが酸素酸化され発光を示すものと考えられている。このようにイミダゾピラジノンは海洋生物発光を代表する発光基質と考えることができる。

### 1. 3. 発光タンパク質

発光タンパク質 aequorin は, 1962 年に Shimomura らにより発光オワンクラゲ (*Aequorea*) より単離されたカルシウム受容型発光タンパク質である<sup>17)</sup>。Aequorin はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光ではなく, タンパク質内に発光基質 coelenterazine と分子状酸素が取り込まれペルオキシド体が形成され, その状態で保持されているタンパク質である。Aequorin はカルシウムイオンの添加により発光量子効率 0.2 以上の高効率発光を示す (図3)。Aequorin は 189 個のアミノ酸よりなるタンパク質で 3 つのカルシウムイオン結合部位を持つ<sup>18)</sup>。Aequorin は最低 2 個のカルシウムイオンの結合により<sup>19)</sup>, そのタンパク質

の三次元構造に変化が生じ, ペルオキシド体の反応性が増加し次への反応が起こる。その結果, 二酸化炭素とアミドアニオン型 coelenteramide の一重項励起分子種を形成し<sup>20)</sup>, その分子種の基底状態への緩和により青色の発光を示す。ウミホタルの生物発光との違いは, 基質である coelenterazine がタンパク質の中央部に取込まれ, coelenterazine 近傍のアミノ酸残基の作用によりペルオキシドの状態に保持されている点である (図5, 6)<sup>21)</sup>。化学合成で合成したペルオキシド体は, 約 $-50^{\circ}\text{C}$ より高い温度において次への分子内反応が進行し発光を示すが<sup>22)</sup>, aequorin においては室温においても安定に保持されている。発光後は coelenterazine の酸化分解体である coelenteramide を取り込んだ青色蛍光タンパク質 (BFP) を形成する。Coelenteramide は BFP のゲルろ過によりアポタンパク質と分離され, ここで得られたアポタンパク質を, 化学合成された coelenterazine 及び分子状酸素と反応させることにより, 人工的に半合成 aequorin を合成することができる<sup>23)</sup>。

発光クラゲが有している発光タンパク質 aequorin は, すでに述べたように青色の光 (極大発光波長約 475 nm) を放つ。しかし, 発光クラゲは緑色 (極大発光波長約 510 nm) の光を放つ。この光の色の違いは以下の理由による。発光

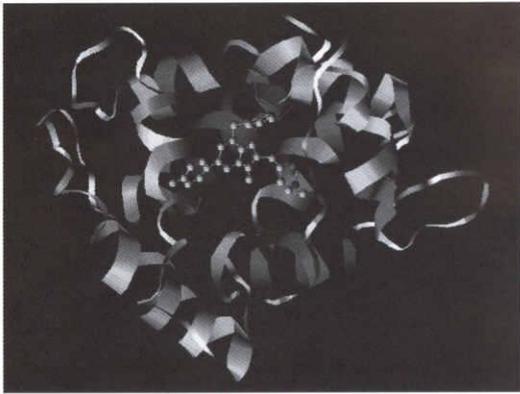


図5. AequorinのX線結晶構造解析より得られた3次元構造

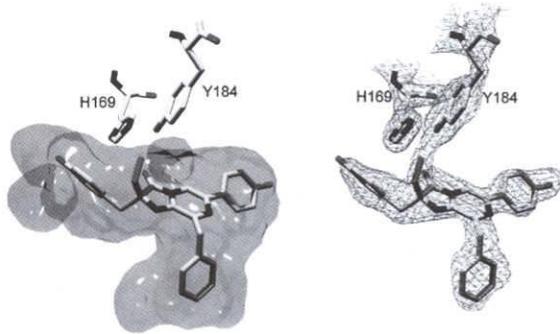


図6. Aequorin内のcoelenterazineperoxideの近傍アミノ酸残基による安定化機構

クラゲは、aequorinと緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP)<sup>24-26)</sup>を持ち、aequorinで生じた励起エネルギーがGFPにエネルギー移動しGFPから緑色の蛍光が放たれるのである。

## 2. 活性酸素

酸素 $^3\text{O}_2$ は三重項基底状態であり反応性は低く、生物は酵素等によって活性の高い酸素種に変換し、それを生体内で利用している。活性の高い酸素には、スーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、ヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) などがあり、これらは活性酸素と呼ばれ、生体において能動的には酵素反応、受動的には自動酸化反応、光による反応など様々な化学反応によりつくり出されている。活性酸素は、生物の特定器官や細胞器官において能動的に生産され生体防御などの生体制御に使われるが、生体自身への攻撃による酸素障害も引き起こされる。

生体内の過剰な活性酸素は生体の酸化ストレスを引き起こし、呼吸器系疾患、腎不全や尿毒症などの腎臓疾患、虚血性不整脈や心筋梗塞などの循環器系疾患および発がんなどさまざまな疾患に関わっているとされている。健全な生体維持のために生物は、生体制御および酸素障害という活性酸素の機能を制御するために活性酸素濃度を調節している。このような活性酸素の機能を理解するためには、活性酸素の測定が必要となり、測定には活性酸素の種類に適した方法、例えば吸光度法、ESR法、発光法などが用いられている。特に近年、ヒト、家畜、ペット動物における生体内活性酸素に関する生理的・臨床的な研究は、疾患や老化との関連から予防医学、臨床医学、スポーツ医学、畜産医学、獣医学などさまざまな分野において注目されており、活性酸素の簡便なリアルタイム検出が望まれている。

## 3. スーパーオキシドアニオン分析用発光プローブの開発

### 3.1. 発光によるスーパーオキシドアニオン分析の原理

発光による分析は、「発光プローブとよばれる発光化合物がスーパーオキシドアニオンと化学反応を起こし、その結果生じる酸化化合物が一重項励起し、その後のエネルギー緩和の際にフォトン形成する」という原理を用いている。この分析法は、1) サンプルを破壊しない、2) 高感度である、3) 有害でない、4) 測定装置は安価である、5) 吸光度法、蛍光法のように光源を必要としないため測定装置が小型である、などの利点がある。スーパーオキシドアニオンの発光法による測定では、古くはルミノールやルシゲニンなどの発光プローブが用いられてきている。

### 3.2. イミダゾピラジノン系発光プローブ

*Cypridina* luciferinは酵素が存在しない水溶液中において三重項酸素と反応し発光する<sup>27, 28)</sup>。その発光機構は明確になっていないが、発光体は生物発光と同じアミド体 (発光条件により中性型とアニオン型を形成する) を発光種としている (図7)。しかし、水溶液中では、極めて弱い発光しか示さない。これは、酸化反応によって生成する励起体

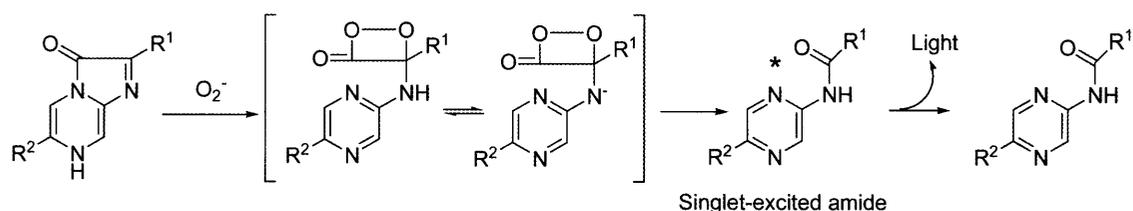


図7. イミダゾピラジノン化合物の酸化発光反応の分子機構

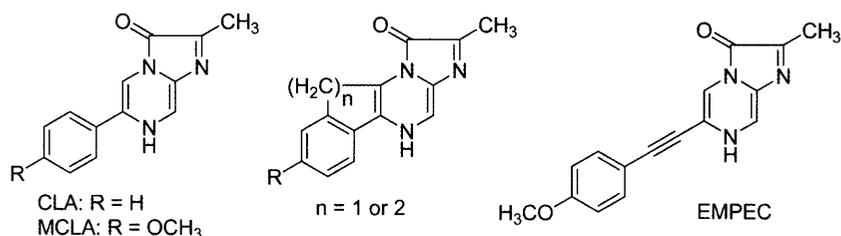


図8. スーパーオキシドアニオン分析用発光プローブ

の蛍光収率および一重項励起収率が低いためである。この酸化反応において生成するアミド体の蛍光収率を向上させた CLA (図8) が Goto らにより合成され、三重項酸素との反応による発光強度は高くなり、その後、CLA はスーパーオキシドアニオンとも反応し発光することが報告された<sup>29)</sup>。Nakano らは、CLA が生体内のスーパーオキシドアニオン検出試薬として有用であることを示した<sup>30)</sup>。さらに CLA (極大発光波長が約 390 nm) よりも約 4 倍の発光強度を持ち極大発光波長が約 460 nm である MCLA (図8) が開発され<sup>31)</sup>、ルミノールやルシゲニンとともに使用されるようになった。しかし、CLA や MCLA はスーパーオキシドアニオンと一重項酸素とほぼ同じ速度で反応して発光するため<sup>32, 33)</sup>、これらの活性酸素種を区別できなく、さらに、緩衝液中では三重項酸素との反応により生ずる非特異的発光があるのが欠点である。現在、スーパーオキシドアニオンと一重項酸素との区別は、反応系に superoxide dismutase (SOD) の添加を行うことにより解決されている。

MCLA の出現以降、スーパーオキシドアニオン依存発光の発光強度の向上やスーパーオキシドアニオンに対する選択性の向上を目的とした発光プローブの開発が試みられた。Toya らは MCLA よりも発光強度の高いイミダゾピラジノン化合物の探索のためにイミダゾピラジノン骨格 6 位の置換基を変えた類縁体の合成を行ったが、その目的

は達せられなかった<sup>34)</sup>。Teranishi らは、イミダゾピラジノン環の 5 位と 6 位フェニル環とを架橋した化合物 (図8) を合成し、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系でのスーパーオキシドアニオン依存発光を MCLA の 10 倍高められることを示したが、三重項酸素による非特異的発光も増加し、実用化まではいたらなかった<sup>35)</sup>。Nakamura らはパラジウム触媒を用いた反応により、2-アミノ-5-プロモピラジン或は 2-アミノ-3, 5-ジプロモピラジンから  $\pi$  電子共役型イミダゾピラジノン化合物を合成し<sup>36, 37)</sup>、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系及び *Listeria monocytogenes* によるスーパーオキシドアニオン依存発光を報告している<sup>38)</sup>。その中で EMPEC (図8) は MCLA に比べ約 0.5 倍のスーパーオキシドアニオン依存発光強度であるが、三重項酸素による非特異的発光は約 0.03 倍と低く、スーパーオキシドアニオン依存発光の選択性が高められている。

### 3. 3. シクロデキストリン結合型 MCLA 発光プローブ

シクロデキストリンは、グルコースの  $\alpha$ -1, 4 結合からなる環状糖であり、その分子形状は底の抜けたバケツの形である。分子内部には疎水的な空洞が存在し分子外部は親水的となっている。グルコース数が多くなると分子内部の空洞は大きくなり、空洞の大きさに適した分子形状の疎水的分子をゲスト分子として取り込む (包接という) こ

とができる。量的に実用できるシクロデキストリンには、グルコース数が6 ( $\alpha$ -CD と呼ぶ), 7 ( $\beta$ -CD), および8個 ( $\gamma$ -CD) のものがある。

Teranishi らは、各種シクロデキストリンの空洞口の広い二級水酸基面に位置する二位水酸基の簡便な選択的スルホニル化を見出し<sup>39-41)</sup>, この化学反応を用いることにより二級水酸基面に発光分子となる MCLA を結合させた。また、空洞口の狭い一級水酸基面にも MCLA を結合させ、シクロデキストリンの種類 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -CD), 空洞口の種類 (一級水酸基面, 二級水酸基面) およびシクロデキストリンと MCLA を結合させる鎖の鎖長などの分子構造と水溶液中での三重項酸素との反応における発光の発光効率との相関を検討した (図9)<sup>42)</sup>。その結果,  $\gamma$ -シクロデキストリンの二級水酸基面に結合した場合 (図9中の化合物3) に MCLA の40倍以上の発光効率の向上を見出した。 $\alpha$ -シクロデキストリンに結合した場合には、ほとんど発光効率の向上はみられなく、 $\beta$ -シクロデキストリンあるいは $\delta$ -シクロデキストリンに結合した場合は約10倍の向上となっ

た<sup>43)</sup>。また、化合物9 (図9) では、約171倍の発光効率の向上を見出した<sup>44)</sup>。化合物9の発光効率が高いのは、化合物3の発光効率に及ぼす発光種の一重項励起効率に加え発光種の蛍光効率の向上が影響している<sup>45)</sup>。

このようにシクロデキストリンの種類、空洞口の種類およびシクロデキストリンと MCLA を結合させる鎖の鎖長などの発光効率に及ぼす効果は以下の機構であると報告されている<sup>42)</sup>。いずれのシクロデキストリン結合型 MCLA 分子でも、MCLA 部分は疎水的な性質でないため酸素との反応時はシクロデキストリンの空洞より離れて存在する。酸素と反応しペルオキシド分子およびそれが分裂して形成される励起アミド分子は疎水的性質を持つためシクロデキストリン空洞に近づき包接される。この包接は、ゲスト部分の大きさとシクロデキストリンの空洞径がフィットする $\gamma$ -シクロデキストリンの二級水酸基側が良好となる。MCLA の化学発光においては、その発光場が疎水的である方が一重項励起効率が高まることが示されており、シクロデキストリン空洞への包接は、

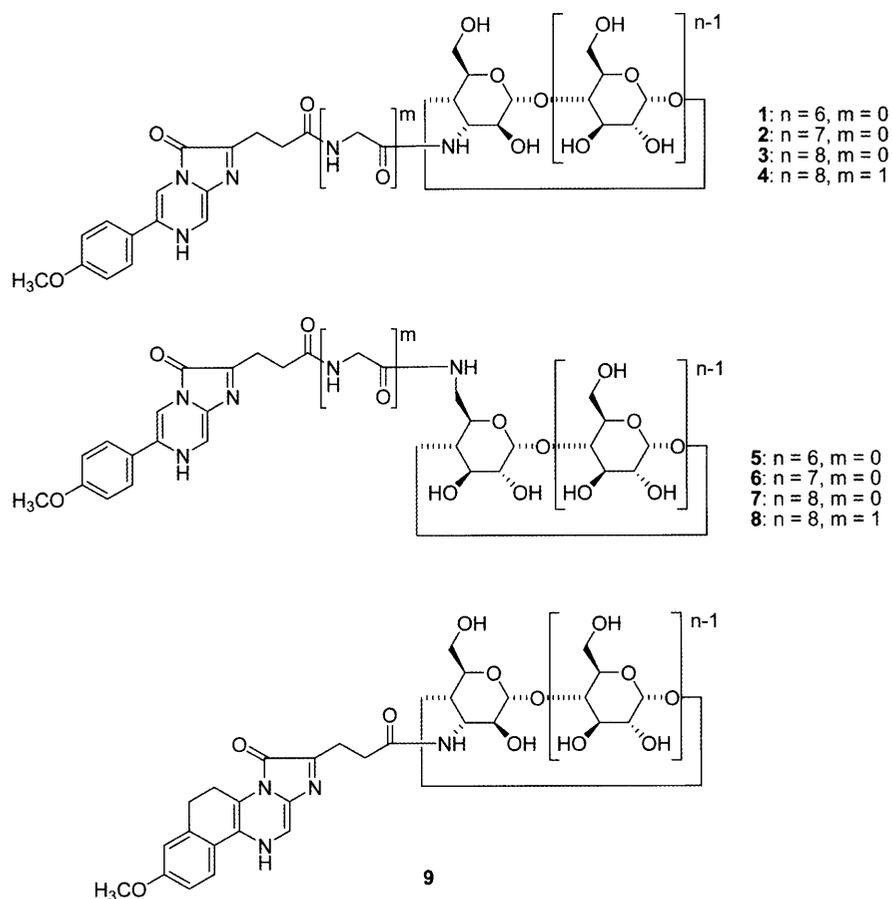


図9. シクロデキストリン結合型 MCLA 化合物

一重項励起効率の向上に寄与したものと考えられる。また、MCLA の化学発光においては、その発光場の疎水性は励起体の蛍光効率にあまり影響を及ぼさないことが示されている。

Teranishi は、上記の三重項酸素との反応をスーパーオキシドアニオン依存発光に発展させている<sup>46)</sup>。化合物 1-9 (図 9) のスーパーオキシドアニオン依存発光において、化合物 3 および 9 はそれぞれ MCLA の約 15 倍および 52 倍の発光強度を示すことが報告された (表 1)。これらの化合物では、化学発光強度の増強剤として使われる hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) あるいは化学発光の発光強度に増減影響を与える bovine serum albumin (BSA) を添加しても発光強度に大きな影響がなく、MCLA あるいはアミド励起種は、シクロデキストリンによって外部環境から隔離されていることが示された。化合物 9 のこれらの特徴は有用ではあるが、非スーパーオキシドアニオン依存発光 (バックグラウンド発光) が高く実用的ではない。これに対し化合物 3 は、スーパーオキシドアニオン依存発光/非スーパーオキシドアニオン依存発光比 (S/B) は MCLA と同じであり有用と判断される。

### 3. 4. エネルギー移動を用いた発光色の調節

CLA および MCLA の極大発光波長はそれぞれ約 390 nm, 460 nm であり、光の透過性を向上させるための長波長発光が報告されている<sup>47)</sup>。この報告では、 $\gamma$ -シクロデキストリンの二級水酸基面に MCLA を、さらに一級水酸基面あるいは二級水酸基面に緑色蛍光分子であるフルオレセインを共有結合させ (図 10. 化合物 1-3), MCLA の酸化反応から生ずるエネルギーをフルオレセインにエネルギー移動させる方法 (Chemiluminescence Resonance Energy Transfer: CRET) を使用している。これらの化学合成した化合物の水溶液中 ( $1 \times 10^{-6}$  mol/L) でのキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系において発生するスーパーオキシドアニオンに対する化学発光の発光強度は、一級水酸基面にフルオレセインを結合させた Green Chemiluminescent CD (1) では、二級水酸基面にフルオレセインを結合させた化合物 2 あるいは 3 よりも約 8 倍発光効率が高く、Goto らにより開発された緑色発光を示す FCLA (図 11)<sup>33)</sup> よりも約 26 倍発光効率が高いことが見出された。Green Chemiluminescent CD (1) の発光は、発光極大波長が約 520 nm (図 12) であ

表 1. シクロデキストリン結合型 MCLA のスーパーオキシドアニオン依存発光

化合物	発光強度 (カウント / 分)				
	標準測定 <sup>a</sup>	S/B <sup>b</sup>	+SOD <sup>c</sup>	+CTAB <sup>d</sup>	+BSA <sup>e</sup>
MCLA	120 [2.7]	44	2.0	390 [14]	75 [2.5]
1	100 [1.5]	67	0.9	310 [5.7]	64 [1.1]
2	240 [6.9]	35	8.5	260 [6.4]	220 [6.2]
3	1770 [37]	48	33	1520 [32]	1610 [44]
4	550 [20]	28	17	670 [17]	540 [20]
5	130 [2.7]	48	2.7	530 [19]	130 [1.9]
6	620 [67]	9.3	60	620 [25]	620 [49]
7	900 [32]	28	26	780 [20]	660 [28]
8	1020 [51]	20	37	580 [25]	1230 [45]
9	6180 [520]	12	224	6110 [430]	6160 [520]

<sup>a</sup> 20 mM Mops/0.2 M KCl (pH 7.2) 緩衝液 (0.5 mL), 0.3 mM ヒポキサンチン水溶液 (0.5 mL), 50  $\mu$ M シクロデキストリン結合型 MCLA 化合物水溶液 (20  $\mu$ L), キサンチンオキシダーゼ (20  $\mu$ L, 1.33 units/mL) の混合液における発光強度。[ ]内の数値は、キサンチンオキシダーゼを添加しない時の発光強度 (バックグラウンド発光)。

<sup>b</sup> S/B 値は、スーパーオキシドアニオン依存発光値/バックグラウンド発光値。

<sup>c</sup> superoxide dismutase (SOD; from bovine erythrocytes) (150 units) を標準測定液に添加した際の発光強度。

<sup>d</sup> 0.5% CTAB 水溶液 (50  $\mu$ L) を標準測定液に添加した際の発光強度。[ ]内の数値は、キサンチンオキシダーゼを添加しない時の発光強度 (バックグラウンド発光)。

<sup>e</sup> BSA (0.1%) が Mops buffer に含まれた時のスーパーオキシドアニオン依存発光強度。[ ]内の数値は、キサンチンオキシダーゼを添加しない時の発光強度 (バックグラウンド発光)。

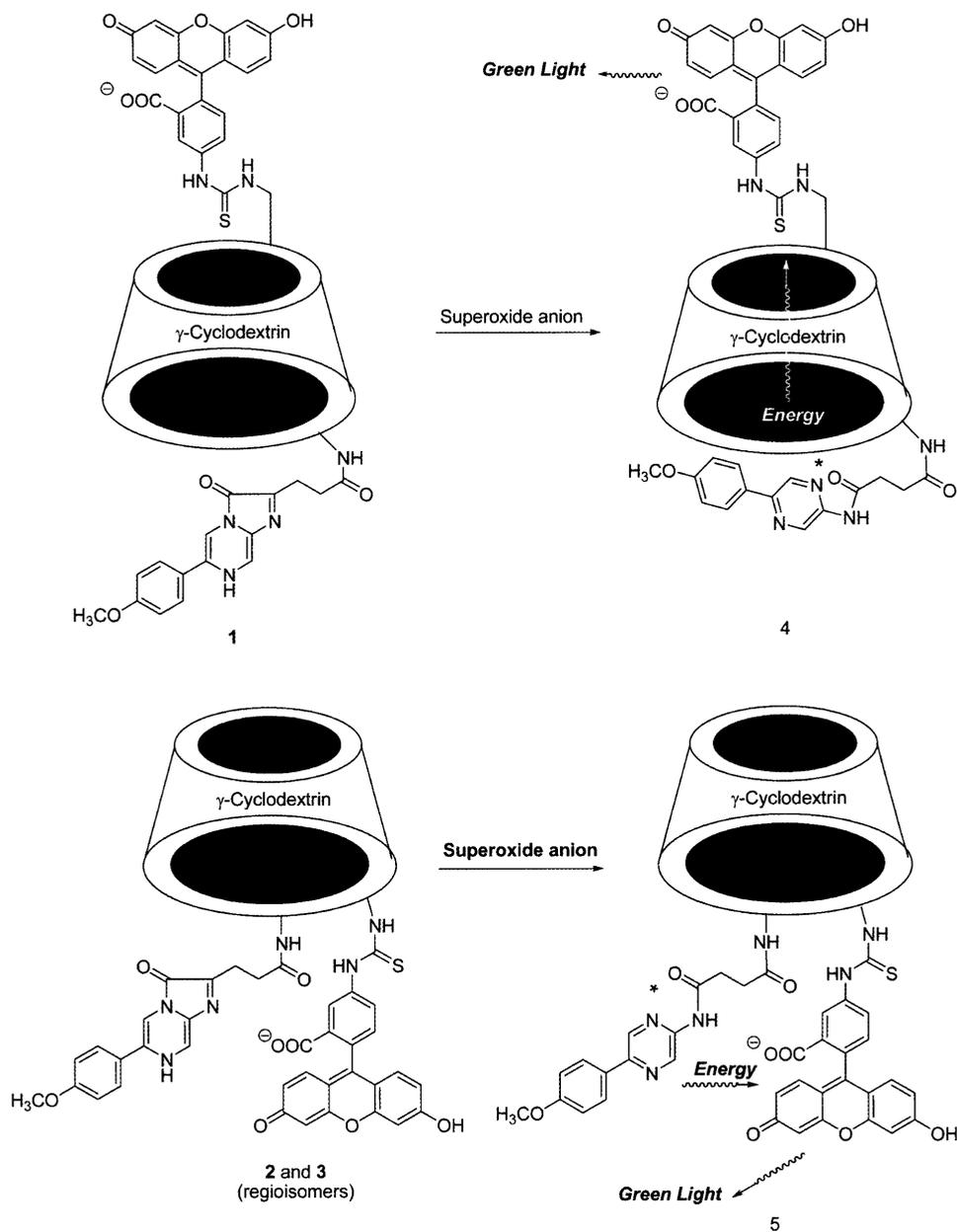


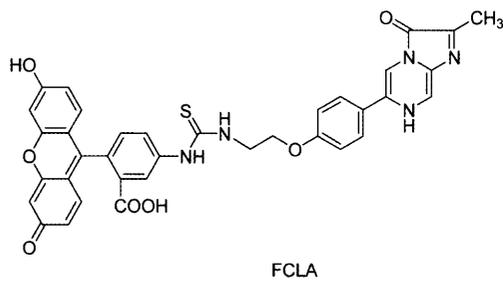
図10. Green Chemiluminescent CD の発光反応の分子機構

り、 $\gamma$ -シクロデキストリンを介しても良好に CRET が生ずることが示された。

化合物 2 および 3 に示すように二級水酸基面にフルオレセインを結合させた場合には、MCLA から生成する励起体とフルオレセインとの距離は近くエネルギー移動効率は良好であるが、励起体のシクロデキストリン空洞への包接がフルオレセインに妨害されるため、MCLA から生成する励起体の励起効率が低下するため発光効率が低いと推測された。それに対し、一級水酸基面にフルオレセインを結合させた Green Chemiluminescent CD (1) では、図 10 の化合物 4 に示すように、

MCLA から生成する励起体のシクロデキストリン空洞への包接が良好に起こるため励起効率が高く、さらに、シクロデキストリンを介してのフルオレセインへのエネルギー移動も良好に行なわれるものと推測された。

$\alpha$ -シクロデキストリンを結合させた化合物 1 (図 13) においては、発光は MCLA から生成する励起体からの青色発光が主でフルオレセインからの緑色発光は僅かであった。この現象は、 $\alpha$ -シクロデキストリンの空洞は狭いため MCLA から生じる励起体は、シクロデキストリンの空洞に包接されずフルオレセイン部位から離れてしまう



FCLA

図11. FCLA の化学構造式

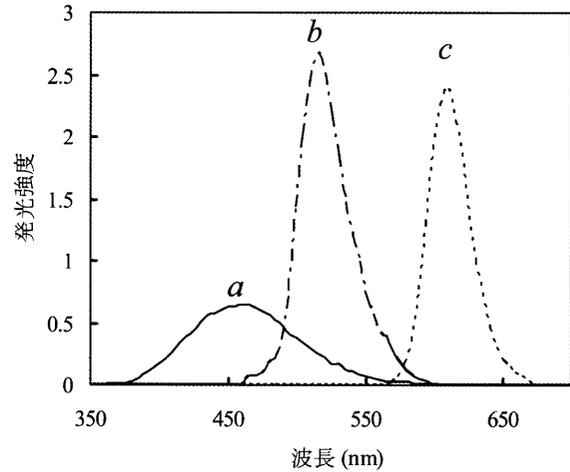
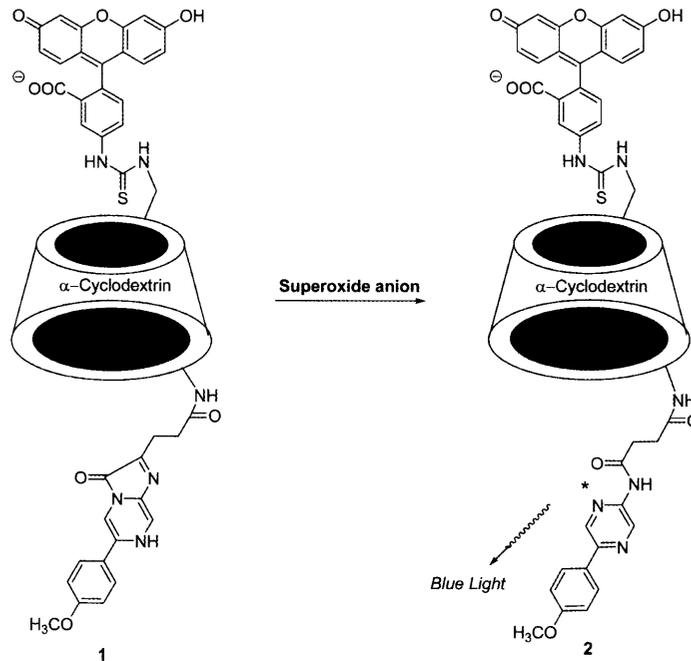


図12. MCLA (a), Green Chemiluminescent CD (b), および Red-CLA (c) のスーパーオキシドアニオン依存発光の発光スペクトル

図13. フルオレセイン- $\alpha$ -シクロデキストリン-MCLA 結合化合物の発光反応の分子機構

ためエネルギー移動が起こりにくいものと推測された。興味深いことに、発光後の化合物 2 (図 13) を別途化学合成し、スーパーオキシドアニオンによる発光反応と同じ条件下で 330 nm の励起光を照射し蛍光を観測すると、MCLA から励起体として生成するアミド部分からの青色の蛍光は観測されず、フルオレセイン部分からの緑色蛍光のみが観測された。この現象は Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)<sup>48)</sup> であり、スーパーオキシドアニオンによる発光後には、アミド部分は、 $\alpha$ -シクロデキストリンの空洞に包

接されフルオレセイン部位に接近したことを示し、スーパーオキシドアニオンと MCLA との反応における発光に到達するまでの時間は、包接現象に必要な時間よりも短いと推測された。

Teranishi は、CRET を適用した紅色の光を放つイミダゾピラジノン系のスーパーオキシドアニオン検出用発光プローブを報告している<sup>49)</sup>。図 14 に示したローダミン部位と MCLA 部位からなる発光プローブが合成され、化合物 1 (Red-CLA) と 3 のスーパーオキシドアニオン依存発光が MCLA のそれよりも高く、紅色 (極大発光波長

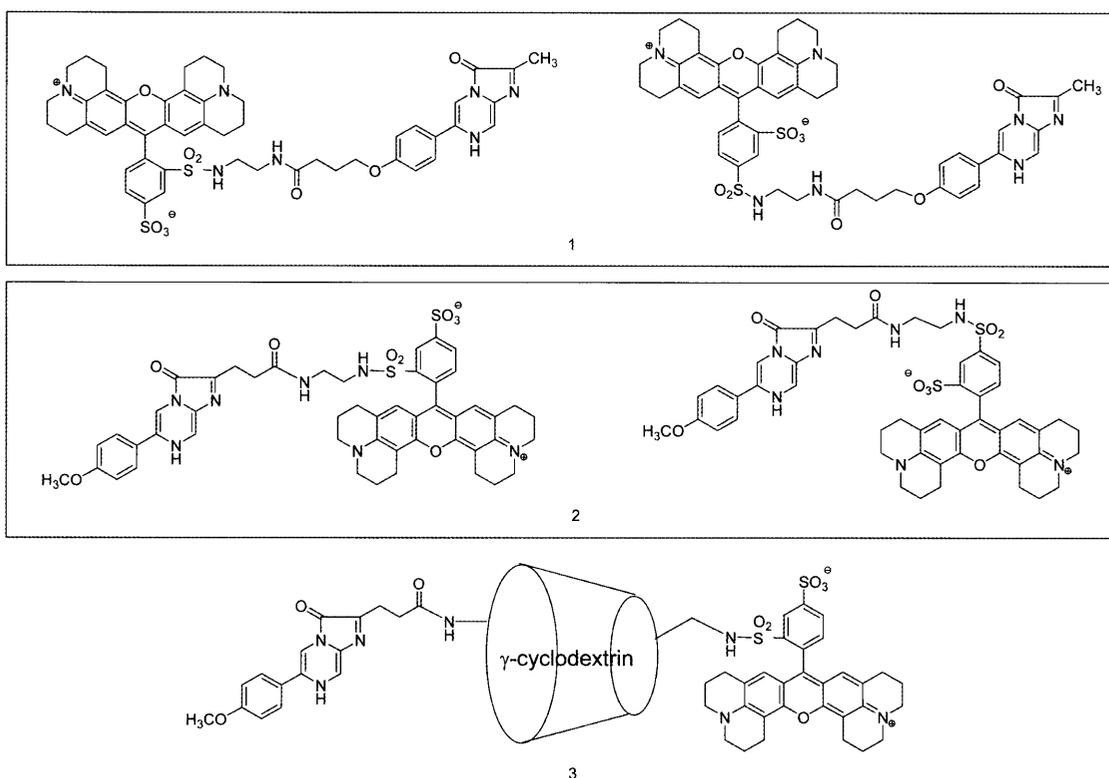


図14. ローダミン-MCLA 結合型発光プローブ

約 610 nm) (図 12) の発光をすることが示された。これらの化合物においても CRET が効率よく行われていることがわかる。ただし、先に述べた Green Chemiluminescent CD の場合とは異なり、 $\gamma$ -シクロデキストリンの一級水酸基面にローダミン基、二級水酸基面に MCLA を配置させた化合物 3 においてシクロデキストリンによる発光強度の増強効果は認められなかった。

#### 4. おわりに

本総説では、イミダゾピラジノン化合物の生物発光をもとにしたスーパーオキシドアニオンの検出用化学発光プローブに関して簡単にまとめた。化学発光のスーパーオキシドアニオン分析においては、発光プローブのスーパーオキシドアニオンに対する発光選択性の向上、すなわち三重項酸素による非特異的発光の低減化、スーパーオキシドアニオンに対する発光感度の増強、発光プローブの水溶性の向上、使用しやすい保存溶液中における発光プローブの安定性の向上などがさらに望まれている。これらすべてを満たしている化合物は未だ開発されておらず、ユーザーに使い勝手がよ

く信頼できる分析情報をもたらす発光プローブの開発が望まれる。

#### 謝 辞

本稿寄稿に際し機会を与えていただきました田口寛先生に御礼申し上げます。

#### 和 文 要 約

この総説は、*Cypridina luciferin* や *coelenterazine* などのイミダゾ[1, 2-*a*]ピラジジン-3(7*H*)-オン化合物の生物発光および化学発光に関する化学的原理とスーパーオキシドアニオン検出用化学発光プローブの開発に関し書かれている。生物発光は多くの海洋生物において観測され、その多くは深海生物に見出されている。生物発光は、発光基質であるルシフェリンと酵素(ルシフェラーゼ)による発光反応とクラゲのような発光タンパク質による発光反応との二種類に大別される。イミダゾ[1, 2-*a*]ピラジジン-3(7*H*)-オン化合物は、生物発光を行う多くの海洋生物において見出されており、海洋の生物発光の基質の共通化合物とみなすこと

ができる。

イミダゾ[1,2-*a*]ピラジン-3(7*H*)-オンルシフェリンはルシフェラーゼの非存在下においても活性酸素種との反応によって発光する。しかし、その量子収率は極めて低い。多くの研究者は、この化学発光を活性酸素種、特にスーパーオキシドアニオンの検出に利用できるように研究を行い、これまでに有用な発光プローブ、例えば CLA, MCLA, FCLA, EMPEC, Green Chemiluminescent CD, Red-CLA が開発され使用されるにいたっている。

### 参考文献

- 1) KISHI, Y., GOTO, T., HIRATA, Y., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. (1966) *Cypridina* bioluminescence I. Structure of *Cypridina* luciferin. *Tetrahedron Lett.* **7**: 3427-3436.
- 2) KISHI, Y., GOTO, T., EGUCHI, S., HIRATA, Y., WATANABE, E., AOYAMA, T. (1966) *Cypridina* bioluminescence II structural studies of *Cypridina* luciferin by means of a high resolution mass spectrometer and an amino acid analyzer. *Tetrahedron Lett.* **7**: 3437-3444.
- 3) JOHNSON, F. H., SHIMOMURA, O., SAIGA, Y., GERSHMAN, L. C., REYNOLD, G. T., WATERS, J. R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **60**: 85-103.
- 4) SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. (1970) Mechanisms in the quantum yield of *Cypridina* bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* **12**: 291-295.
- 5) STONE, H. (1968) The enzyme catalyzed oxidation of *Cypridina* luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **31**: 386-391.
- 6) SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. (1971) Mechanism of the luminescent oxidation of *Cypridina* luciferin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **44**: 340-346.
- 7) MACPRA, F., CHANG, Y. C. (1967) The chemiluminescence of *Cypridina* luciferin analogue. *J. C. S. Chem. Commun.* 1011-1012.
- 8) GOTO, T., INOUE, S., SUGIURA, S. (1968) *Cypridina* bioluminescence IV. Synthesis and chemiluminescence of 3, 7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one and its 2-methyl derivative. *Tetrahedron Lett.* **9**: 3873-3876.
- 9) HORI, K., NAKANO, Y., CORMIRE, M. J. (1972) Studies on the bioluminescence of *Renilla reniformis*. XI. Location of the sulfate group in luciferyl sulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, **256**: 638-644.
- 10) SHIMOMURA, O., MASUGI, T., JOHNSON, F. H., HANED, Y. (1978) Properties and reaction mechanism of the bioluminescence system of the deep-sea shrimp *Oplophorous gracilorostris*. *Biochemistry*, **17**: 994-998.
- 11) SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., MORISE, H. (1974) Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry*, **13**: 3278-3286.
- 12) INOUE, S., KAKOI, H., GOTO, T. (1976) Squid bioluminescence III. Isolation and structure of *Watasenia* luciferin. *Tetrahedron Lett.* **17**: 2971-2974.
- 13) INOUE, S., KAKOI, H., OKADA, K., TANINO, H., GOTO, T. (1983) Trace characterization of the *Watasenia* luciferin in eye and skin photophores and in liver of *Watasenia scintillans*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 635-636.
- 14) INOUE, S., SUGIURA, S., KAKOI, H., HASIZUME, K., GOTO, T., IIO, H. (1975) Squid bioluminescence II. Isolation from *Watasenia scintillans* and synthesis of 2-(*p*-hydroxybenzyl)-6-(*p*-hydroxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one. *Chem. Lett.* 141-144.
- 15) TAKAHASHI, H., ISOBE, M. (1993) *Symplectoteuthis* bioluminescence (1) structure and binding form of chromophore in photoprotein of a luminous squid. *Biomed. Chem. Lett.* **3**: 2647-2652.
- 16) TAKAHASHI, H., ISOBE, M. (1994) Photoprotein of luminous squid, *Symplectoteuthis oualaniensis* and reconstruction of the luminous system. *Chem. Lett.* 843-846.
- 17) SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., SAIGA, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-240.
- 18) INOUE, S., NOGUCHI, M., SAKAKI, Y., TAKAGI, Y., MIYATA, T., IWANAGA, S., MIYATA, T., TSUJI, F. I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **82**: 3154-3158.
- 19) SHIMOMURA, O. (1995) Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**: 359-363.
- 20) SHIMOMURA, O., TERANISHI, K. (2000) Light-

- emitters involved in the luminescence of coelenterazine. *Luminescence* **15**: 51-58.
- 21) HEAD, J. F., INOUE, S., TERANISHI, K., SHIMOMURA, O. (2000) The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution. *Nature* **405**: 372-376.
  - 22) TERANISHI, K., UEDA, K., NAKAO, H., HISAMATSU, M., YAMADA, T. (1994) Synthesis of hydroperoxide via photooxygenation for a model aequorin bioluminescence. *Tetrahedron Lett.* **35**: 8181-8184.
  - 23) SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. (1975) Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature* **256**: 236-238.
  - 24) MORIN, J. G., HASTINGS, J. W. (1971) Energy transfer in a bioluminescent system. *J. Cell. Physiol.* **77**: 313-318.
  - 25) MORISE, H., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., WINANT, J. (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, **13**: 2656-2662.
  - 26) SHIMOMURA, O. (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**: 220-222.
  - 27) GOTO, T., FUKATSU, H. (1969) *Cypridina* bioluminescence VII. Chemiluminescence in micelle solutions. A model system for *Cypridina* bioluminescence. *Tetrahedron. Lett.* **10**: 4299-4302.
  - 28) GOTO, T., (1968) Chemistry of bioluminescence. *Pure Appl.* **17**: 421-441.
  - 29) GOTO, T., TAKAGI, T. (1980) Chemiluminescence of a *Cypridina* luciferin analogue, 2-methyl-6-phenyl-3, 7-dihydroimidazo [1, 2-*a*] pyrazin-3-one, in the presence of the xanthine-xanthine oxidase system. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**: 833-834.
  - 30) NAKANO, M., SUGIOKA, K., USHIJIMA, Y., GOTO, T. (1986) Chemiluminescence probe with *Cypridina* luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-*a*]pyrazin-3-one, for estimating the ability of human granulocytes to generate  $O_2^-$ . *Anal. Biochem.* **159**: 363-369.
  - 31) NISHIDA, A., KIMURA, H., NAKANO, M., GOTO, T. (1989) A sensitive and specific chemiluminescence method for estimating the ability of human granulocytes and monocytes to generate  $O_2^-$ . *Clin. Chim. Acta*, **179**: 177-182.
  - 32) SUZUKI, N., MIZUMOTO, I., TOYA, Y., NOMOTO, T., MASHIKO, S., INABA, H. (1990) Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: a stern-volmer quenching experiment with luminol, superoxide dismutase, and cypridina luciferin analogues. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2783.
  - 33) SUZUKI, N., SUETSUNA, K., MASHIKO, S., NOMOTO, T., TOYA, Y., YODA, B., INABA, H., GOTO, T. (1991) Reaction rates for the chemiluminescence of *Cypridina* luciferin analogues with superoxide: A quenching experiment with superoxide dismutase. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 157-160.
  - 34) TOYA, Y., KAYANO, T., SATO, K., GOTO, T. (1992) Synthesis and chemiluminescence properties of 6-(4-methoxyphenyl)-2-methylimidazo [1,2-*a*] pyrazin-3(7*H*)-one and 2-methyl-6-(2-naphthyl)-imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65**: 2475-2479.
  - 35) TERANISHI, K., SHIMOMURA, O. (1997) Coelenterazine analogues as chemiluminescent probe for superoxide anion. *Anal. Biochem.* **249**: 37-43.
  - 36) NAKAMURA, H., TAKEUCHI, D., MURAI, A. (1995) Synthesis of 5- and 3,5-substituted 2-aminopyrazines by Pd mediated Still coupling. *Synlett.* 1227-1228.
  - 37) NAKAMURA, H., WU, C., TAKEUCHI, D., MURAI, A. (1998) Bimodal chemiluminescence of 8-chlorostyryl-6-phenylethynylimidazopyrazinon: large bathochromic shift caused by a styryl group at 8-position. *Tetrahedron Lett.* **39**: 301-304.
  - 38) SHIMOMURA, O., WU, C., MURAI, A., NAKAMURA, H. (1998) Evaluation of five imidazopyrazinone-type chemiluminescent superoxide probes and their application to the measurement of superoxide anion generated by *Listeria monocytogenes*. *Anal. Biochem.* **258**: 230-235.
  - 39) TERANISHI, K., WATANABE, K., HISAMATSU, M., YAMADA, T. (1998) Efficient regioselective synthesis of mono-2-*O*-sulfonyl-cyclodextrins by the combination of sulfonyl imidazole and molecular sieves. *J. Carbohydr. Chem.* **17**: 489-494.
  - 40) TERANISHI, K., TANABE, S., HISAMATSU, M., YAMADA, T. (1998) Conveniently regioselective mono-2-*O*-sulfonation of cyclomaltooctaose. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**: 1249-1252.
  - 41) TERANISHI, K., NISHIGUCHI, T., UEDA, H. (2002) Regioselective functionalization of the secondary side of cyclomaltonaose ( $\delta$ -cyclodextrin). *ITE Lett.* **3**: 26-29.
  - 42) TERANISHI, K., TANABE, S., HISAMATSU, M., YAMADA, T. (1999) Investigation of cyclomaltooligosaccharide-bound 6-(4-methoxyphenyl)imidazole[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-

- one for enhanced chemiluminescence. *Luminescence* **14**: 303-314.
- 43) TERANISHI, K., NISHIGUCHI, T., UEDA, H. (2003) Enhanced chemiluminescence of 6-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one by attachment of cyclomaltooligosaccharide (cyclodextrin). Attachment of cyclomaltonaose ( $\delta$ -cyclodextrin). *Carbohydr. Res.* **228**: 987-993.
- 44) TERANISHI, K., (2001) Synthesis and chemiluminescence properties in an aqueous solution of cyclodextrin-bound 6-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one. *ITE Lett.* **2**: 530-536.
- 45) TERANISHI, K. (2001) Effect of conformation on the chemiluminescence efficiency of light-producing 2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones. *Luminescence* **16**: 367-374.
- 46) TERANISHI, K. (2003) Cyclodextrin-bound 6-(4-methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-one as chemiluminescent probe for superoxide anions. *ITE Lett.* **4**: 201-205.
- 47) TERANISHI, K., NISHIGUCHI, T. (2004) Cyclodextrin-bound 6-(4-Methoxyphenyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazin-3(7*H*)-ones with fluorescein as green-chemiluminescent probes for superoxide anions. *Anal. Biochem.* **325**: 185-195.
- 48) FORESTER, T. (1948) Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Physik.* **2**: 55-75.
- 49) TERANISHI, K. (2007) Development of imidazopyrazinone red-chemiluminescent probes for detecting superoxide. *Luminescence* **22**: 147-156.