

Luciferine, biolumineszierende Substanzen

VON T. GOTO UND Y. KISHI[*]

Die Biolumineszenz des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus* beruht auf der Reaktion von 2-(6-Hydroxybenzthiazol-2-yl)- Δ^2 -1,3-thiazolin-4-carbonsäure („*Photinus-Luciferin*“) mit dem Enzym Luciferase in Gegenwart von ATP und Magnesium-Ionen. Im Muschelkrebs *Cypridina* wird die Biolumineszenz dagegen durch die Reaktion einer Luciferase mit 8-(3-Guanidino-propyl)-6-indol-3-yl-2-(1-methyl-propyl)-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]-pyrazin-3-on („*Cypridina-Luciferin*“) hervorgerufen. *Latia-Luciferin* ist 1,3,3-Trimethyl-2-(4-formyloxy-3-methyl-3-butenyl)-1-cyclohexen. Das Luciferin der Federkoralle *Renilla* ist ein noch nicht genau identifiziertes Tryptaminderivat; die Luciferine anderer leuchtender Organismen sind noch unbekannt. – Vorstellungen über den Ablauf der Luciferin-Luciferase-Reaktion und zahlreiche Spektren runden diese Übersicht ab.

1. Die Luciferin-Luciferase-Reaktion[1]

Vor etwa achtzig Jahren fand *Dubois*, daß die Biolumineszenz des leuchtenden Schnellkäfers *Pyrophorus* auf der Luciferin-Luciferase-Reaktion beruht. Eine Biolumineszenz trat auf, wenn ein heißer wäßriger Extrakt des Insektes („Luciferin“) mit einem kalten wäßrigen Extrakt („Luciferase“) vermischt wurde, nachdem die anfängliche Lumineszenz abgeklungen war. Dieses Ergebnis gab Anlaß für umfangreiche Untersuchungen der Luciferin-Luciferase-Reaktion bei zahlreichen biolumineszierenden Organismen (siehe Tabelle 1). Heute weiß man, daß mit heißem Wasser Luciferin extrahiert und Luciferase zerstört wird; der Extrakt mit kaltem Wasser enthält Luciferase und zunächst auch Luciferin, das sich aber beim Stehen an der Luft in ein unwirksames Oxidationsprodukt umwandelt.

Unter der Luciferin-Luciferase-Reaktion versteht man die Lichtemission durch Biolumineszenz als Resultat einer durch ein Enzym (eine Luciferase) katalysierten Oxidation (gewöhnlich mit Sauerstoff) eines

Tabelle 1. Leuchtende Organismen; Jahr der Entdeckung und Entdecker der Luciferin-Luciferase-Reaktion in diesen Organismen.

<i>Pyrophorus</i> (Schnellkäfer)	1885	<i>Dubois</i>
<i>Pholas dactylus</i> (Bohrmuschel)	1887	<i>Dubois</i>
<i>Photinus</i> (amerikanischer Leuchtkäfer)	1916	<i>Harvey</i>
<i>Luciola</i> (japanischer Leuchtkäfer)	1917	<i>Harvey</i>
<i>Cypridina</i> (Muschelkrebs)	1917	<i>Harvey</i>
<i>Pyrocypis</i> (Muschelkrebs)	1921	<i>Harvey</i>
<i>Odontosyllis</i> (Polychaeten-Gliederwurm)	1931	<i>Harvey</i>
<i>Systellaspis</i> (Garnele)	1931	<i>Harvey</i>
<i>Latia</i> (Süßwasserschnecke)	1950	<i>Bowden</i>
<i>Achromobacter</i> (Leuchtbakterium)	1953	<i>Strehler</i>
<i>Photobacterium</i> (Leuchtbakterium)	1953	<i>McElroy</i>
<i>Heterocarpus</i> (Garnele)	1955	<i>Haneda</i>
<i>Gonyaulax</i> (Dinoflagellat)	1957	<i>Hastings und Sweeny</i>
<i>Apogon</i> und <i>Parapriacanthus</i> (Knochenfische)	1958	<i>Haneda und Johnson</i>
<i>Renilla</i> (Federkoralle)	1959	<i>Cormier</i>
<i>Collybia</i> , <i>Armillaria</i> und <i>Omphalia</i> (Pilze)	1959	<i>Airth und McElroy</i>
<i>Balanoglossus</i> (Eichelwurm)	1963	<i>Dure und Cormier</i> [2]
<i>Octochaetus multiporus</i> (Oligochaeten-Gliederwurm)	1966	<i>Johnson, Shimomura und Haneda</i> [3]
<i>Hoplophorus</i> (Garnele)	1966	<i>Johnson, Stachel, Shimomura und Haneda</i> [4]

[*] Prof. Dr. T. Goto und Dr. Y. Kishi
Department of Agricultural Chemistry and
Chemical Institute
Nagoya University, Nagoya (Japan)

[1] F. H. Johnson u. E. H.-C. Sie in W. D. McElroy u. B. Glass: A symposium on light and life. Johns Hopkins Press, Baltimore 1961, S. 206.

[2] L. S. Dure u. M. J. Cormier, J. biol. Chemistry 238, 790 (1963).

[3] F. H. Johnson, O. Shimomura u. Y. Haneda in F. H. Johnson u. Y. Haneda: Bioluminescence in progress. Princeton Univ. Press, New Jersey 1966, S. 385.

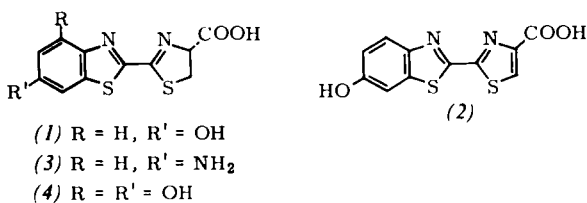
[4] F. H. Johnson, H.-D. Stachel, O. Shimomura u. Y. Haneda in [3], S. 523.

Substrats (eines Luciferins). „Luciferin“ bezeichnet also Stoffe mit besonderen Eigenschaften und ist nicht der Name einer Verbindung oder einer Verbindungs-klasse. Beispielsweise sind Luciferin aus dem amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus* und aus dem Muschelkrebs *Cypridina* völlig verschiedene Substanzen. Auch die Luciferase dieser Organismen ist verschieden.

2. Isolierung und Struktur des *Photinus*-Luciferins

Harvey^[5] entdeckte 1916 die Luciferin-Luciferase-Reaktion beim amerikanischen Leuchtkäfer *Photinus*. Der Autor stellte zunächst „Luciferin“- und „Luciferase“-Lösungen aus den Leuchtorganen leuchtender und nichtleuchtender Individuen her. Luciferin und Luciferase aus leuchtenden Käfern emittierten beim Vermischen Licht, ebenso Luciferin aus nichtleuchtenden Käfern beim Zusammenbringen mit Luciferase aus leuchtenden Käfern. Luciferin und Luciferase aus nichtleuchtenden Käfern sowie Luciferin aus leuchtenden und Luciferase aus nichtleuchtenden Käfern zeigten beim Vermischen keine Lumineszenz. Die Lichtemission hing also offenbar von der Herkunft der Luciferase ab.

McElroy wies 1947 nach, daß Harvey kein Luciferin, sondern Adenosintriphosphat (ATP) in der Hand hatte^[5]; das echte Leuchtkäfer-Luciferin wurde erst 1957 aus *Photinus pyralis* isoliert^[6]. Es ist in sauerstofffreiem, alkalischem Medium stabil, wird aber leicht von Sauerstoff zu Dehydroluciferin oxidiert. Auch diese Substanz konnte aus dem Leuchtkäfer isoliert werden. Das UV-Spektrum des Luciferins zeigt einen Benzthiazol-Chromophor an; bei der sauren Hydrolyse wurden 6-Hydroxy-benzthiazol und Cystein nachgewiesen. Dies führte zur Struktur (1) für das Luciferin^[7] und zur Struktur (2) für das Dehydroluciferin.



Die Strukturen der Verbindungen wurden durch Totalsynthese aus *N*-(*p*-Methoxyphenyl)oxamidsäure-äthylester gesichert. Nur D-(-)-Luciferin erzeugte Licht und war somit mit der natürlichen Verbindung identisch; L-(+)-Luciferin blieb unwirksam. UV-, Fluoreszenz- und Emissionsspektren des Luciferins (1) und Dehydroluciferins (2) sind in den Abbildungen 1 und 2 wiedergegeben^[8].

[5] E. N. Harvey: Bioluminescence. Academic Press, New York 1952.

[6] B. Bitler u. M. D. McElroy, Arch. Biochem. Biophysics 72, 358 (1957).

[7] E. H. White, F. McCapra u. G. F. Field, J. Amer. chem. Soc. 83, 2402 (1961); 85, 337 (1963).

[8] M. D. McElroy u. H. H. Seliger, Advances in Enzymology 25, 119 (1963).

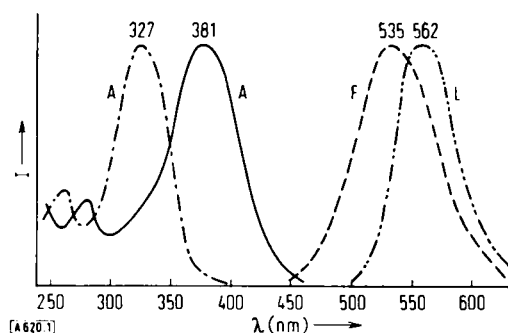


Abb. 1. Spektrum vom Luciferin (1) des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus*. (---) Säure, (—) Base, (---) Base. A Absorption, F Fluoreszenz, L Lumineszenz.

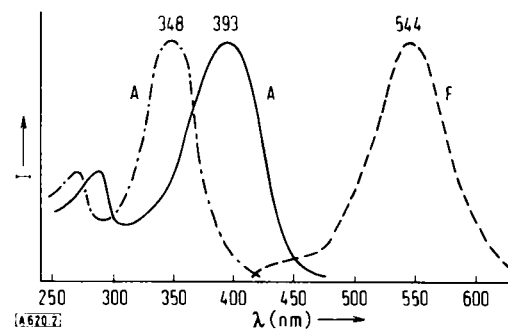
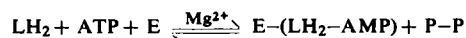


Abb. 2. Spektrum vom Dehydroluciferin (2) des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus*. (---) Säure, (---) Base, (---) Base. A Absorption, F Fluoreszenz.

Von mehreren synthetisch dargestellten analogen Verbindungen des Luciferins^[9], die auf Biolumineszenz geprüft worden waren, zeigten nur „Amino-luciferin“ (3) und „4'-Hydroxyluciferin“ (4) eine positive Reaktion. Amino-luciferin beispielsweise luminesciert rot. Obwohl verschiedene Spezies des Leuchtkäfers verschiedenfarbiges Licht (von grün bis gelb) emittieren, enthielten alle geprüften Spezies das Luciferin (1), beispielsweise *Photinus*, *Photuris*, *Pyrophorus*, *Diphotus* und *Lecontea*^[10]. Auch das Luciferin von *Luciola cruciata* stimmte mit dem von *Photinus* überein^[11].

3. Die Lumineszenz von *Photinus*^[12]

Für die Lumineszenz des Leuchtkäfers *Photinus* werden Luciferin (LH₂), Luciferase (E), Magnesium-Ionen, ATP und Sauerstoff benötigt. Im ersten Schritt, einer Dunkelreaktion, wird ein an das Enzym gebundenes Luciferyladenylat gebildet^[13].



[9] E. H. White, H. Wörther, G. F. Field u. W. D. McElroy, J. org. Chemistry 30, 2344 (1965); E. H. White u. H. Wörther, ibid. 31, 1484 (1966); E. H. White, H. Wörther, H. H. Seliger u. W. D. McElroy, J. Amer. chem. Soc. 88, 2015 (1966).

[10] H. H. Seliger u. W. D. McElroy, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 75 (1964).

[11] Y. Kishi, T. Goto, S. Inoue, O. Shimomura u. Y. Hirata, vorgetragen beim XI. Pacific Science Congress, Tokyo 1966.

[12] W. D. McElroy u. H. H. Seliger in [3], S. 427.

[13] W. D. McElroy u. A. Green, Arch. Biochem. Biophysics 64, 257 (1956); W. E. Rhodes u. W. D. McElroy, Science (Washington) 128, 253 (1958); J. biol. Chemistry 233, 1528 (1958).

Diese Reaktion hängt, wie aus Abbildung 3a hervorgeht, von der Konzentration des Luciferins und des ATPs ab. Im nächsten Schritt reagiert der Enzymkomplex E-(LH₂-AMP) unter Lichtemission mit Sauerstoff; das Reaktionsprodukt bleibt danach weiter an das Enzym gebunden. Aus dieser Produkthemmung ergibt sich für die lichtemittierende Reaktion auch noch eine Abhängigkeit von der Menge der Luciferase (vgl. Abb. 3b).

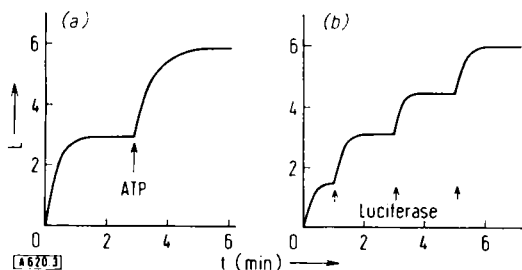
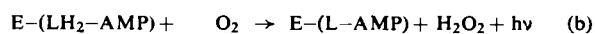
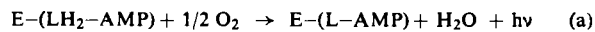


Abb. 3. Lumineszenz des amerikanischen Leuchtkäfers *Photinus* (a) bei Zugabe von ATP und (b) bei successiver Zugabe von Luciferase. L = integrierte Lichteinheiten.

Früher wurde Dehydroluciferin (L) als direktes Folgeprodukt der Lichtemission angesehen. Nach neueren Ergebnissen entspricht jedoch das Dehydroluciferin nicht dem Grundzustand des angeregten Zwischenproduktes, sondern ist eher ein Alternativprodukt der Oxidation, das weder an der Lichtemission beteiligt ist noch als Folgeprodukt der angeregten Zwischenverbindung betrachtet werden kann.

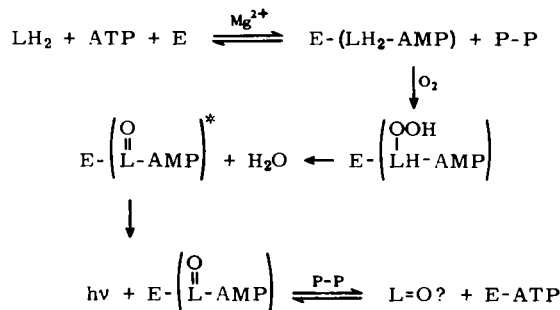
Da ein mol Luciferin ein mol Sauerstoff verbraucht [8], kann die Gleichung (a) nicht den Tatsachen entsprechen. Auch die Alternativgleichung (b) kann nicht zutreffen, weil sie nicht die erforderliche Energie von



mehr als 60 kcal/mol erbringen würde; außerdem ließ sich in der Reaktionsmischung bisher kein H₂O₂ nachweisen. Die Fluoreszenzspektren des Dehydroluciferins und seiner Derivate stimmen ebenfalls nicht mit

cenzausbeute des Zwischenproduktes bei nahezu 100% liegen.

Synthetisches L-Luciferin zeigt keine Biolumineszenz, verbraucht keinen Sauerstoff, reagiert aber wie D-Luciferin mit ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat (P-P), wenn es mit ATP, Luciferase und Magnesium-Ionen behandelt wird [12]. Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse kann Schema 1 aufgestellt werden.

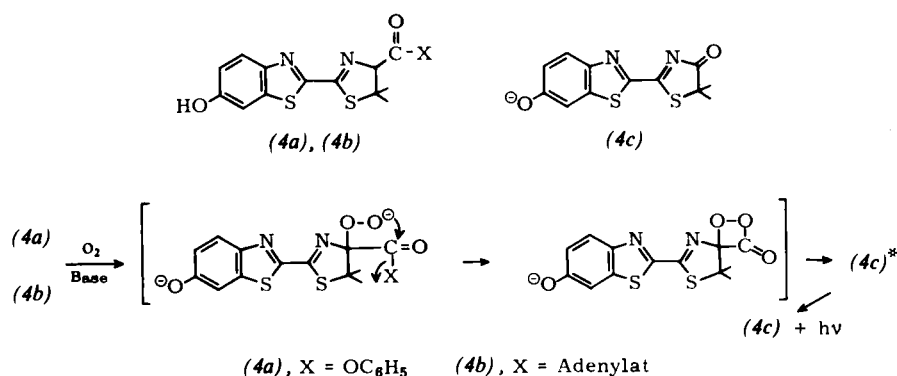


Schema 1. Vorstellungen über die Luciferin(LH₂)-Luciferase(E)-Reaktion.

Die Reaktion würde mehr als 100 kcal/mol erbringen; das Reaktionsprodukt L=O konnte noch nicht nachgewiesen werden. L und möglicherweise L=O inhibieren die Lichterzeugung; sie können durch Zusatz von Pyrophosphat oder Coenzym A vom Enzym getrennt werden.

Als aktives Zentrum der *Photinus*-Luciferase wurden zwei Thiolgruppen angenommen. Aber entgegen der Erwartung, daß die energiereiche Phosphatbindung die Energiequelle der Biolumineszenz sei, gibt es keine Anzeichen für eine Lösung der Anhydridbindung des Luciferyl-adenylats und für die Bildung einer LH₂-S-E-Bindung während der Biolumineszenz [12].

Eine Chemolumineszenz ohne Anwesenheit des Enzyms kann bei synthetischem *Photinus*-Luciferyl-adenylat beobachtet werden, wenn es in Dimethylsulfoxid mit KOH oder Kalium-tert.-butanolat behandelt wird [16].



den Biolumineszenzspektren überein. UV-spektroskopische Untersuchungen weisen auf ein mögliches Zwischenprodukt hin, das ein Absorptionsmaximum bei 400–410 nm [14] hat. Da die Quantenausbeute der Biolumineszenz fast eins [15] beträgt, muß die Fluores-

[14] H. H. Seliger u. W. D. McElroy in [3], S. 405.

[15] H. H. Seliger u. W. D. McElroy, Arch. Biochem. Biophysics 88, 136 (1960).

Kürzlich berichteten McCapra et al. [16a] und Seliger et al. [16b] über die Chemolumineszenz des 5,5-Dimethyl-luciferin-phenylesters (4a) bzw. des Adenylats

[16] H. H. Seliger u. W. D. McElroy, Science (Washington) 138, 683 (1962).

[16a] F. McCapra, Y. C. Chang u. V. P. Francois, Chem. Commun. 1968, 22.

[16b] T. A. Hopkins, H. H. Seliger, E. H. White u. M. W. Cass, J. Amer. chem. Soc. 89, 7148 (1967).

(4b). Als Reaktionsprodukt identifizierten sie das Anion (4c), dessen Fluoreszenzspektrum mit seinem Chemolumineszenzspektrum übereinstimmt. Die Reaktion soll über ein Peroxid mit viergliedrigem Ring verlaufen; ähnliche Zwischenprodukte treten bei der Chemolumineszenz von Lophinderivaten und Derivaten der Acridin-carbonsäuren auf.

Die Chemolumineszenz des Luciferyl-adenylats in Dimethylsulfoxid und die Fluoreszenz erschöpfter Chemolumineszenz-Ansätze stimmen mit der Fluoreszenz des Anions (4c) überein. Das Chemolumineszenzprodukt war allerdings zu zersetzlich, um isoliert werden zu können. Die Luciferin-Biolumineszenz ist in vitro bei pH = 7,5 gelbgrün (565 nm), bei pH = 6,0 dagegen rot (620 nm). Die Chemolumineszenz des Luciferyl-adenylats (rote Emission) entspricht der Biolumineszenz; über die gelbgrüne biolumineszierende Spezies ist noch fast nichts bekannt. Seliger et al. vermuten, daß es sich dabei um das Dianion von (4c) handeln könnte.

4. Isolierung und Struktur des Cypridina-Luciferins

Der Muschelkrebs *Cypridina hilgendorffii* kommt reichlich an der japanischen Küste vor. Der ca. 3 mm lange Organismus erzeugt ein stark leuchtendes Sekret, das in das Meerwasser abgegeben wird. Die Luciferin-Luciferase-Reaktion wurde bei *Cypridina* 1917 von Harvey gefunden^[5]. Vollständig getrocknete *Cypridina* bewahrt die Lumineszenzaktivität nahezu unbegrenzt; die Lumineszenz wird durch Feuchtigkeit wiederhergestellt. Versuche, das Luciferin aus getrockneter *Cypridina* zu isolieren, führten zunächst nur zu einem „gereinigten“, nicht aber zu kristallinem Luciferin^[17].

Extraktion und Reinigung des Luciferins waren deshalb so schwierig, weil die Substanz in getrockneter *Cypridina* nur in minimalen Mengen vorkommt und extrem instabil gegen Sauerstoff und Wasser ist. Unter den entwickelten Methoden war die von Anderson beschriebene Benzoylierung am erfolgreichsten^[18]. Ein Butanolextrakt des Luciferins wird dabei mit einem großen Überschuß an Benzoylchlorid ohne basischen Katalysator benzoyliert.

Kristallines Luciferin ließ sich 1957^[19] aus Andersons Benzoyl-luciferin erhalten, das zuerst an Cellulosepulver chromatographisch gereinigt wurde. Aus einer wäßrig-methanolischen Lösung kristallisierte das Luciferin nach dem Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure als Hydrochlorid aus.

Seit 1917 haben mehrere Forscher, ausgehend von „gereinigtem“ Luciferin, Partialstrukturen für diese Substanz aufgestellt. So sollte Luciferin beispielsweise ein Pepton, ein Phospholipid, ein Polyhydroxybenzolderivat, eine hydrochinon-ähnliche Verbindung mit einer Keto-hydroxy-Seitenkette, ein Flavoprotein, ein Pyridinnucleotid oder ein Chromopolypeptid sein^[20].

[17] F. I. Tsuji, A. M. Chase u. E. N. Harvey in F. H. Johnson: The Luminescence of Biological Systems. Amer. Assoc. for the Advancement of Sci., Washington 1955, S. 127.

[18] R. S. Anderson, J. gen. Physiol. 19, 301 (1935).

[19] O. Shimomura, T. Goto u. Y. Hirata, Bull. chem. Soc. Japan 30, 929 (1957).

[20] Vgl. S. 130 in [17].

Obwohl nach Aussage der UV-Spektren „gereinigtes“ Luciferin dem kristallinen nahezu entspricht, enthält das Säurehydrolysat des „gereinigten“ Luciferins etwa 20 Aminosäuren^[20], das des kristallinen dagegen nur wenige^[19]. Bei der katalytischen Hydrierung wurde eine Verbindung (Hydroluciferin) mit einem für Indole typischen UV-Spektrum erhalten^[19]. Ungenügende Mengen an Untersuchungsmaterial erschwerten die Strukturanalyse, und eine zunächst plausibel erscheinende Struktur^[21] erwies sich später als falsch. Die quantitative Analyse der Aminosäurezusammensetzung des Luciferins und des Hydroluciferins mit dem Aminosäureanalysator^[22, 24] hatte das in Tabelle 2 wiedergegebene Ergebnis.

Tabelle 2. Durch saure Hydrolyse im Vakuum oder unter Sauerstoff aus Cypridina-Luciferin und -Hydroluciferin erhaltene Aminosäuren.

		aus Luciferin (11)		aus Hydroluciferin	
		Vakuum	O ₂	Vakuum	O ₂
Glycin	(mol)	0,96	0,93	0,03	0,12
Arginin [a]	(mol)	0,62	0,38	0,03	0,41
Isoleucin [b]	(mol)	0,16	0,16	0,98	0,96
NH ₃	(mol)	0,27	0,33	0,40	0,41

[a] Zusammengefaßte Anteile an Arginin, γ -Guanidino-buttersäure und Prolin.

[b] Zusammengefaßte Anteile an Isoleucin und Alloisoleucin; beide Säuren wurden in nahezu gleichen Mengen erhalten.

1961 gelang es Johnson et al.^[23], Luciferin direkt aus lebender *Cypridina* zu extrahieren. Neben einer großen Zeitersparnis wird mit dieser Methode die Ausbeute auf mehr als das zehnfache (ca. 20 mg kristallines Luciferin pro kg feuchter *Cypridina*) erhöht.

1966 wurde die vollständige Struktur des Cypridina-Luciferins (11) chemisch ermittelt^[24]. Bei der Oxidation von (11) mit Luft, enzymatisch (Lumineszenz) oder nichtenzymatisch, entstehen zwei fluoreszierende Substanzen: Oxyluciferin (9) und Ätioluciferin (5); (9) läßt sich durch Säurehydrolyse in (5) umwandeln. Die Struktur des Ätioluciferins (5) wurde folgendermaßen bestimmt: Hydrolyse von (5) mit Ba(OH)₂ unter Sauerstoffausschluß gab Ätioluciferamin, dessen Zusammensetzung sich mit Hilfe eines hochauflösenden Massenspektrometers zu C₁₅H₁₇N₅ ergab. (5a) trägt statt einer Amino- eine Guanidinogruppe und hat die Zusammensetzung C₁₆H₁₉N₇.

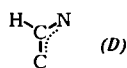
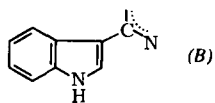
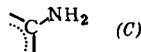
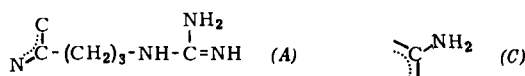
Bei der katalytischen Hydrierung von (5) wurde eine Verbindung (Hydroätioluciferin) mit einem für einen Indol-Kern typischen UV-Spektrum erhalten. Die pH-Abhängigkeit des UV-Spektrums ließ auf eine β -Aminomethylindol-Struktur (B) schließen. Aus dem NMR-Spektrum kombiniert mit der Aminosäurezusammensetzung ergaben sich die Teilstrukturen (A) und (D); die Teilstruktur (C) wurde aus den pK-Werten und der Diazo-Kupplungsreaktion von (5) abgeleitet.

[21] Y. Hirata, O. Shimomura u. S. Eguchi, Tetrahedron Letters Nr. 5, S. 4 (1959); O. Shimomura, J. chem. Soc. Japan 81, 179 (1960).

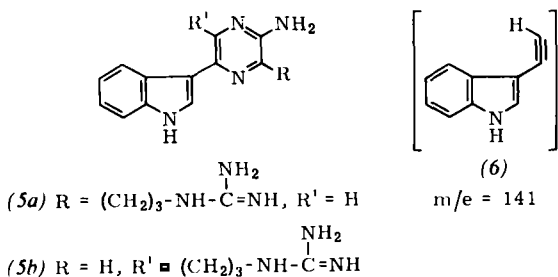
[22] S. Eguchi, J. chem. Soc. Japan 84, 86 (1963).

[23] Y. Haneda, F. H. Johnson, Y. Masuda, Y. Saiga, O. Shimomura, H.-C. Sie, N. Sugiyama u. I. Takatsuki, J. cellular comparat. Physiol. 57, 55 (1961).

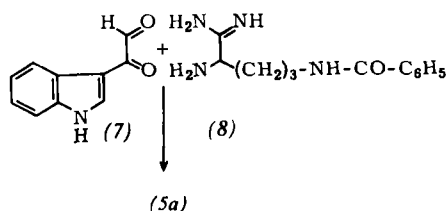
[24] Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura u. F. H. Johnson, Tetrahedron Letters 1966, 3427; in [3], S. 89.



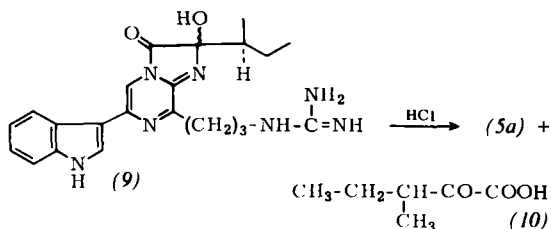
Diese vier Teilstrukturen können nur zu den beiden Gesamtformeln (5a) und (5b) kombiniert werden. (5b) wird durch das Massenspektrum von Ätioluciferamin ausgeschlossen; das darin enthaltene Signal bei $m/e = 141$ muß dem Radikal-Ion (6) zugeordnet werden.



Die Struktur (5a) konnte schließlich durch die Total-synthese aus (7) und (8) bestätigt werden^[25], die nacheinander mit Natronlauge, methanolischem KOH und $\text{H}_2\text{N} \text{---} \text{C}(\text{=NH}) \text{---} \text{SCH}_3$ umgesetzt wurden. Die Annahmen über die relativen Stellungen der Amino- und Indolgruppen am Pyrazin-Kern wurden durch UV- und NMR-Spektren gesichert^[26].



Oxyluciferin (9) ergibt bei der Behandlung mit Salzsäure neben (5a) α -Oxo- β -methylvaleriansäure (10). Das NMR-Spektrum von (9) enthält ein scharfes OH-Singulett-Signal. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß das Stickstoffatom, welches als Isoleucin erscheint, nicht auch Arginin oder Glycin bildet. Da die Ketosäure (10) aus dem Isoleucin-Anteil stammen muß, war also C-2 von (10) mit der primären Aminogruppe von (5a)

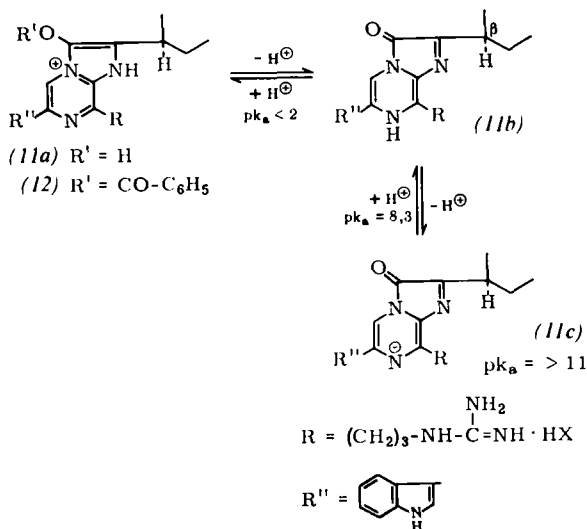


[25] Y. Kishi, T. Goto, S. Inoue, S. Sugiura u. H. Kishimoto, Tetrahedron Letters 1966, 3445.

[26] T. Goto, unveröffentlichte Ergebnisse.

verbunden gewesen. Somit ergibt sich die für das Oxyluciferin vorgeschlagene Struktur (9).

Das NMR-Spektrum des Cypridina-Luciferins enthält kein OH-Signal. Die orange-rote Lösung des Luciferinhydrobromids in Methanol wird beim Einleiten von wasserfreiem HBr entfärbt; das UV-Spektrum der Lösung ist danach dem von (5a) sehr ähnlich. Luciferin hat drei pK_a -Werte: <2 , 8,3 und >11 ; in basischem Medium ist es gelb. Die drei Formen des Luciferins werden am besten als (11a), (11b) und (11c) formuliert.



UV-, Fluoreszenz- und Emissionsspektrum des Cypridina-Luciferins und -Oxyluciferins sind in den Abbildungen 4 bzw. 5 wiedergegeben.

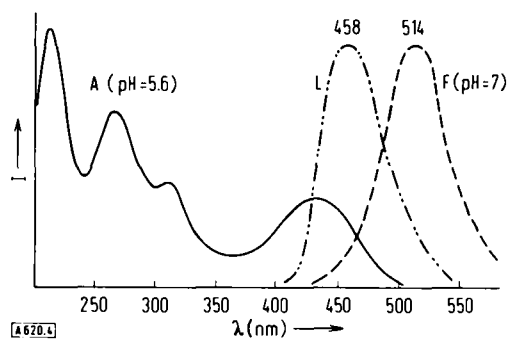


Abb. 4. Spektrum vom Luciferin (11) des Muschelkrebses Cypridina. (—) Säure, (---) Base. A Absorption, F Fluoreszenz, L Lumineszenz.

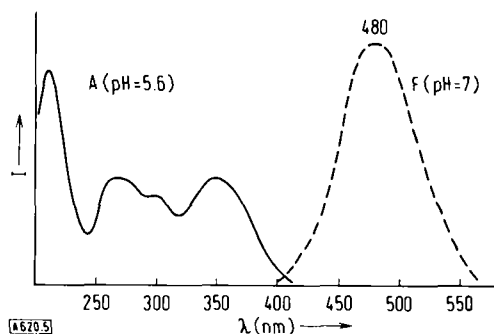


Abb. 5. Spektrum vom Oxyluciferin (9) des Muschelkrebses Cypridina. (—) Säure, (---) Base. A Absorption, F Fluoreszenz.

Das nach *Anderson* erhaltene benzoyleierte Cypridina-Luciferin hat ein den Verbindungen (5a) oder (11a) ähnliches UV-Spektrum und vermutlich die Struktur (12).

Die absolute Konfiguration am β -Kohlenstoffatom des Isoleucin-Anteils wurde enzymatisch folgendermaßen bestimmt: Die Hydrolyse des Hydroluciferins ergab ein Gemisch aus Isoleucin und Alloisoleucin; diese Mischung wurde mit L- und D-Aminosäureoxidase behandelt und die Produkte mit dem Aminosäureanalysator untersucht. Cypridina-Luciferin ist danach aus Tryptamin-, Arginin- und L-Isoleucin-Anteilen zusammengesetzt, und aus dieser Struktur kann nun auch das seltsame Resultat der Aminosäureanalyse (Tabelle 2) verstanden werden [27].

Die Totalsynthese des Cypridina-Luciferins gelang aus (10) und (5a) durch Umsetzung mit PtO_2 oder Al/Hg und anschließende Reaktion mit Dicyclohexylcarbodiimid.

Auch die Luciferine der Leuchtische *Apogon* und *Parapriacanthus* sind mit dem Cypridina-Luciferin identisch [28].

5. Die Lumineszenz von Cypridina

Bereits 1919 beobachtete *Harvey*, daß die in-vitro-Lumineszenz bei *Cypridina* eine Reaktion erster Ordnung ist (Abb. 6) [5]. Weitere kinetische Untersuchungen von *Chase* und *Lorenz* ergaben, daß zwei Reaktionen erster Ordnung ablaufen: eine lichterzeugende und eine Dunkelreaktion [29]. Nach Messungen von *Johnson et al.* [30] verbraucht ein Molekül Luciferin bei der Lumineszenz ein Sauerstoffatom; die Quantenausbeute beträgt mindestens 0,28. Da lichterzeugende und Dunkelreaktion dieselben Produkte, Oxyluciferin (9) und Ätioluciferin (5a), ergeben, kann die Lumineszenzreaktion mit der Gleichung

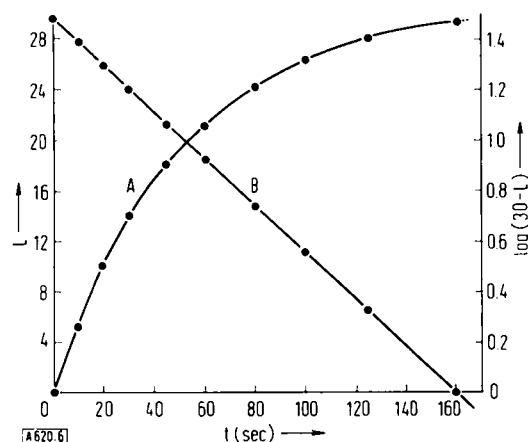


Abb. 6. Biolumineszenz im System Cypridina-Luciferin/Luciferase. Kurve A bezieht sich auf die linke Ordinate (L = integrierte Lichtintensitäten), Kurve B auf die rechte Ordinate.

[27] Y. Kishi, T. Goto, S. Eguchi, Y. Hirata, E. Watanabe u. T. Aoyama, *Tetrahedron Letters* 1966, 3437.

[28] F. H. Johnson, N. Sugiyama, O. Shimomura, Y. Saiga u. Y. Haneda, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 486 (1961); Y. Haneda, F. H. Johnson u. O. Shimomura in [3], S. 533.

[29] A. M. Chase u. P. B. Lorenz, *J. cellular comparat. Physiol.* 25, 53 (1945).

[30] F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds u. J. R. Waters, *J. cellular comparat. Physiol.* 60, 85 (1962).

wiedergegeben werden. Beim Stehenlassen wird eine wäßrige, orange-gelbe Luciferinlösung an Luft infolge Autoxidation nach und nach rot und schließlich farblos (Abb. 7) [19].

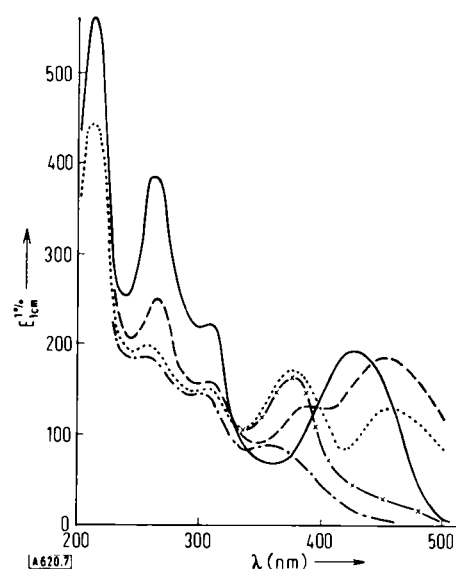


Abb. 7. Nichtenzymatische Oxidation von Cypridina-Luciferin mit Luft in phosphatgepufferter wäßriger Lösung bei pH = 5,6. (—) Frisch hergestellte Lösung, (---) nach 1 Tag, (---) nach 3 Tagen, (× ---) nach 7 Tagen, (---) nach 52 Tagen.

Eine ähnliche Änderung wird im Spektrum bei der Biolumineszenz in Gegenwart des Enzyms beobachtet [31]; die enzymkatalysierte Reaktion ist jedoch extrem schnell. Die anfängliche Rotverschiebung im Spektrum weist auf die Bildung einer roten Substanz hin, die auch aus der Reaktionsmischung isoliert werden kann. In Anwesenheit des Enzyms emittiert diese rote Substanz sehr wenig Licht. Durch chemische Reduktion kann die Lichtemissionsaktivität aber wiederhergestellt werden; der Zusatz eines reduzierenden Agens wie Ascorbinsäure zur Reaktionsmischung verhindert die Bildung der roten Substanz [32]. Bereits *Harvey*, *Anderson* und andere fanden dieses Phänomen und diskutierten es als reversible Oxidation des Luciferins [5]. Die Struktur dieser Substanz und ihre Rolle in der lichtemittierenden Reaktion harren jedoch noch der Aufklärung.

Cypridina-Luciferin zeigt spontane Chemolumineszenz [33], wenn es in Gegenwart von Sauerstoff in Dimethylsulfoxid – mit oder ohne Basen – gelöst wird; allerdings ist die Quantenausbeute dieser Chemolumineszenz niedrig (ca. 0,15% der Quantenausbeute der Biolumineszenz). In acetat-gepuffertem Diglyme wird die Quantenausbeute auf mehr als 10% der Quantenausbeute bei der Biolumineszenz erhöht und beträgt dann etwa das Doppelte der Quantenausbeute bei der Chemolumineszenz von Luminol in Dimethylsulfoxid mit Kalium-tert.-butanolat [33a]. Das einfachste Luci-

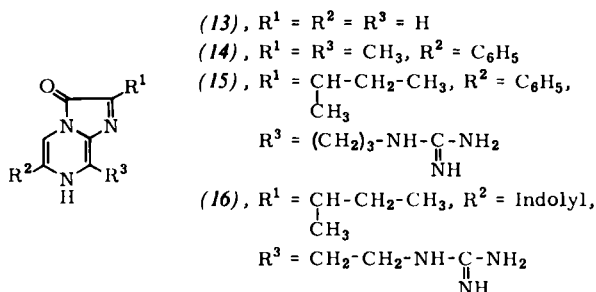
[31] A. M. Chase u. E. H. Brigham, *J. biol. Chemistry* 190, 529 (1951).

[32] A. M. Chase, J. H. Ball, C. E. Cornelius u. R. J. Lederman in [1], S. 258.

[33] F. H. Johnson, H.-D. Stachel, E. C. Taylor u. O. Shimomura in [3], S. 67.

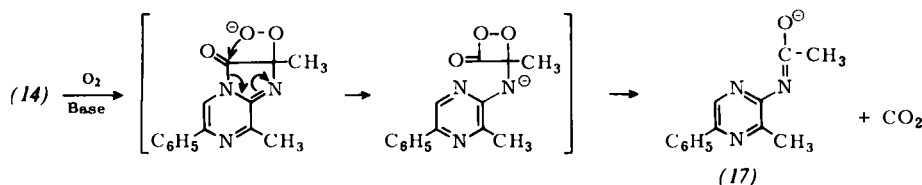
[33a] T. Goto, S. Inoue u. S. Sugiura, unveröffentlicht.

ferin-Analoge (13) chemoluminesciert ebenfalls in acetat-gepuffertem Dimethylsulfoxid; es verbraucht dabei 1 mol O₂ [33a]. *McCapra* und *Chang* [33b] studierten die Chemolumineszenz des 2,8-Dimethyl-6-phenyl-Derivats (14) in Dimethylsulfoxid in Gegenwart von Kalium-tert.-butanolat. Sie isolierten als Reaktionsprodukt 2-Acetamino-3-methyl-5-phenylpyrazin-3-on (als Anion (17) gezeichnet), dessen Fluoreszenzspektrum im Alkalischen dem Chemolumineszenzspektrum entspricht, und schlugen einen



Reaktionsablauf über ein peroxidisches Zwischenprodukt mit Vierring vor (siehe Abschnitt 3). – Kinetische Messungen zeigen die Teilnahme von Radikalen [33a].

Die Biolumineszenz von *Cypridina* hängt stärker von der Struktur des Substrates ab als die oben besprochene Chemolumineszenz. Phenyl-desindolyl-luciferin (15) bioluminesciert nur sehr schwach; die Biolumineszenzaktivität von Norluciferin (16) ist dagegen mit der des Luciferins vergleichbar [33c]. Ersatz der Alkylseitenkette (R¹) des Luciferins durch andere Alkylreste verringert die Biolumineszenzaktivität mäßig, während die Aktivität nach hydrolytischer Umwandlung der Guanidino- in eine Aminogruppe stark abnimmt [25, 33d].



6. Bakteriellcs Luciferin

Bei der Bakterien-Lumineszenz sind reduziertes Flavinmononucleotid, ein Enzym, Sauerstoff und ein langkettiger aliphatischer Aldehyd essentielle Faktoren für die Lichterzeugung. Die Quantenausbeute ist sehr gering, die zugehörigen Reaktionen sind kompliziert. Anfänglich wurde der Aldehyd als das bakterielle Luciferin angesehen [34]; seine Rolle bei der Reaktion konnte aber noch nicht eindeutig ermittelt wer-

den [8, 35]. Trotz umfangreicher Bemühungen, den Ablauf der Lumineszenz zu klären, ist ungewiß, welche Substanz als das bakterielle Luciferin angesehen werden soll.

7. Renilla-Luciferin

Renilla-Luciferin wurde in gereinigter Form aus der Federkoralle *Renilla reniformis* von *Cormier* et al. [36] isoliert. Es ist in neutraler und basischer Lösung stabil, in saurem Medium wird es in ein „aktiviertes Luciferin“ umgewandelt, das mit Luciferase oder durch Autoxidation (ohne Enzym) Licht (λ_{max} = 485 nm) emittiert und dabei in ein oxidiertes Luciferin übergeht. Aktiviertes Luciferin entsteht auch nach Inkubation des Luciferins mit Luciferase, Calcium-Ionen und Adenosin-3',5'-diphosphat unter anaeroben Bedingungen.

Das Renilla-Luciferin ist ein Tryptamin-Derivat mit einer anionischen Gruppe. Die alkalische Hydrolyse

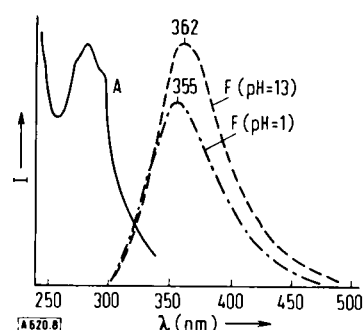


Abb. 8. Spektrum vom Luciferin der Federkoralle *Renilla*. (—) Neutral, (---) Base, (---) Säure. A Absorption, F Fluoreszenz.

des Dehydroluciferins ergibt Tryptamin; während der Aktivierung wird die anionische Gruppe – vielleicht Sulfat – vom Luciferin abgetrennt.

Somit verläuft auch hier die zur Lichtemission führende Reaktion in mindestens zwei Schritten. Im ersten Schritt, einer Dunkelreaktion, wird wahrscheinlich Sulfat vom Luciferin zum Adenosin-3',5'-diphosphat transferiert und aktives Luciferin gebildet; dieses wird im zweiten Reaktionsschritt enzymatisch mit Sauerstoff oxidiert, wobei Licht emittiert wird. Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Renilla-Luciferins sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

[33b] F. *McCapra* u. Y. C. *Chang*, Chem. Commun. 1967, 1011.

[33c] D. A. *Coviello*, S. *Inoue* u. T. *Goto*, Vortrag vor der Chemical Society of Japan in Nagoya (17. Okt. 1967).

[33d] Y. *Kishi*, Dissertation, Nagoya University, 1966.

[34] W. D. *McElroy*, J. W. *Hastings*, V. *Sonnenfeld* u. J. *Coulombre*, J. Bacteriol. 67, 402 (1954).

[35] J. W. *Hastings*, Q. H. *Gibson*, J. *Friedland* u. J. *Spudich* in [3], S. 151, dort weitere Literatur.

[36] K. *Hori* u. M. J. *Cormier*, Biochim. biophysica Acta 102, 386 (1965); M. J. *Cormier*, K. *Hori* u. P. *Kreiss* in [3], S. 349.

8. Odontosyllis-Luciferin

An der Lumineszenz des Polychaeten-Gliederwurms *Odontosyllis* sind ein Luciferin, Luciferase und Sauerstoff beteiligt. McElroy^[8] hat bei teilweise gereinigtem Luciferin ein Fluoreszenzemissionsmaximum um 510 nm gefunden, das mit dem während der Lumineszenz beobachteten übereinstimmt. Autoxydiertes Luciferin kann zur aktiven Form reduziert werden.

Kürzlich erhielten Shimomura et al.^[37] ein gereinigtes Luciferin aus *Odontosyllis enopla* als farblose, nicht-fluoreszierende Substanz. Nach der Lichtemission ($\lambda_{\max} = 507$ nm) wurde ein fluoreszierendes Produkt mit einem Fluoreszenzmaximum bei ebenfalls 507 nm erhalten. Versuche, dieses Produkt mit reduzierenden Agentien zu einem aktiven Luciferin zu reduzieren, blieben erfolglos. Absorptions- und Lumineszenzspektrum des Odontosyllis-Luciferins und des licht-emittierenden Produktes sind in Abbildung 9 wiedergegeben.

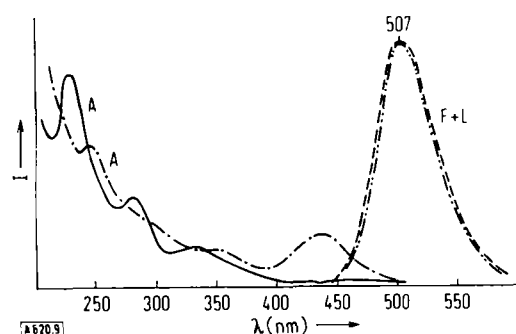


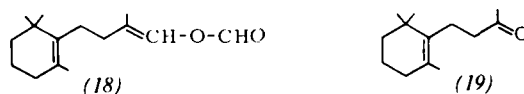
Abb. 9. Spektrum vom Luciferin des Polychaeten-Gliederwurms *Odontosyllis* (neutral) (---) und der (des) lumineszierenden Reaktionsprodukte(s) (neutral) (---), (neutral) (---), (---) (neutral). A Absorption, F Fluoreszenz, L Lumineszenz.

Das Odontosyllis-Luciferin läßt sich ohne Enzym leicht zu einer rosa Substanz mit Absorptionsmaxima bei 260, 330 und 520 nm oxidieren. Diese Umwandlung wird durch Zusatz von Jod vervollständigt. Die rosa Substanz bleibt in Gegenwart von Sauerstoff und Luciferase unverändert.

9. Latia-Luciferin

Das Luciferin der Süßwasserschnecke *Latia* wurde in fast reiner Form isoliert^[38]. Die Substanz zeigt ein Absorptionsmaximum bei 212 nm und zwei IR-Ban-

den bei 1745 cm^{-1} (stark) und 1685 cm^{-1} (schwach). Latia-Luciferin ist mäßig flüchtig und hat ein Molekulargewicht von 236 (massenspektrometrisch ermittelt). Beim Mischen des Luciferins mit Luciferase-Lösung kann in Gegenwart von Sauerstoff eine Lumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 520 nm beobachtet werden.



Shimomura und Johnson leiteten kürzlich die Strukturen des Latia-Luciferins (18) und seines Chemo-lumineszenzproduktes (19) ab^[38a]. (19), Dihydro- β -jonon, dürfte aber bei der Biolumineszenz nicht auftreten.

10. Luciferin aus Pilzen

Kuwabara und Wassink^[39] isolierten Pilz-Luciferin aus dem leuchtenden Pilz *Omphalia flavida*. In Gegenwart von Luciferase oder NaOH und H_2O_2 emittiert es Licht; Absorptions-, Fluoreszenz- und Emissionsspektrum sind in Abbildung 10 wiedergegeben.

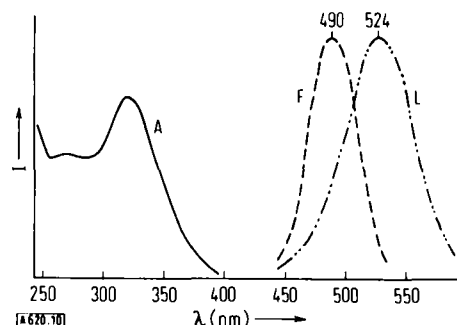


Abb. 10. Spektrum vom Luciferin des Pilzes *Omphalia flavida* bei pH = 6,5. A Absorption, F Fluoreszenz, L Lumineszenz.

Die Autoren danken Professor Y. Hirata für sein Interesse an dieser Arbeit.

Eingegangen am 6. Juli 1967, ergänzt am 19. Februar 1968 [A 620]
Übersetzt von Dr. D. Kuschmütz, Heidelberg

[37] O. Shimomura, F. H. Johnson u. Y. Saiga, J. cellular comparat. Physiol. 61, 275 (1963).

[38] O. Shimomura, F. H. Johnson u. Y. Haneda in [3], S. 391.

[38a] O. Shimomura u. F. H. Johnson, Biochemistry, im Druck.

[39] S. Kuwabara u. E. C. Wassink in [3], S. 233.