

論文の内容の要旨

論文題目	長波長発光を示す生物発光基質の開発およびその性質
学位申請者	木山 正啓

非侵襲的 *in vivo* 生物発光イメージングは現在、小動物の分子および細胞で起こるイベントを、高感度で、迅速かつ安価簡便な方法としてモニタリングするために広く使用されている。生物発光反応は化学反応に基づいており、蛍光アッセイのような励起光源を必要としない。そのためBLIは、蛍光イメージングよりもノイズが低減された精密なイメージングが可能である。

生物発光イメージング (BLI) で最も広く使用されている発光系は、ホタルおよび海洋生物系のルシフェリンルシフェラーゼ (L-L) 反応である。ホタルルシフェリン (D-LH₂) および海洋生物ルシフェリン (セレンテラジン, CTZ) はそれぞれ黄緑色光 (ca. 560 nm) および青色 (ca. 480 nm) の波長で発光する。これらの波長の光はヘモグロビンとオキシヘモグロビンを含む哺乳動物組織に容易に吸収され、このためBLIアッセイでは透過光は弱くなる。BLIにおける光組織浸透性を改善するためには、L-L反応により、“生体の窓 (optical window)” 領域の赤色～近赤外 (NIR) 光 ($\lambda = 650\text{--}900\text{nm}$) で発光すれば効果的である。

近年当研究グループ赤色発光を示すアカルミネを開発した。深部観察において既存のホタルルシフェリンよりも高輝度な発光を示した。しかしまだ十分な輝度を得ているとは言い難い。本研究第1章ではその高輝度化へ向けた取り組みを行った。

一方海洋生物ルシフェリンのセレンテラジンは未だにそれ単体で600 nm以上

の生物発光波長を示すルシフェリンが開発されていない。本研究第2章では、セレンテラジンの長波長化への取り組みを行った。

第1章 アカルミネ類似体の合成と発光活性評価

環状アミノ基（1-ピロリジニル，1-ピペリジノ，1-アゼパニルおよびモルフォリノ基）を有するアカルミネ類似体を新規に合成し，それらの生物発光および生物発光イメージング特性を調べた。すべての類似体は約670 nmに赤色領域に極大発光波長を示し，また1-ピロリジニル，1-アゼパニルおよびモルフォリノ基を有する類縁体は約560 nmの黄緑色領域にも発光を示した。発光量子収率，ミカエリス定数，発光反応速度および酵素反応速度は，置換基の構造に依存して特徴的な変化を示した。特に，1-ピロリジニル類似体は最も高い発光量子収率を示し，1-アゼパニル類似体は最も高い酵素反応速度を示した環状アミノ基の分子サイズ，疎水性および柔軟性は，ルシフェラーゼ活性部位との相互作用を調節し，発光波長，酵素反応速度およびBL量子収率を含むBL特性を微調整するのに役立つことが見出された。極大発光波長は，それらの蛍光特性との比較，およびDFTおよびTD-DFT計算によってオキシルシフェリン構造の π 電子特性と相関した。類縁体のBLIの結果は，高い発光量子収率を有する1-ピロリジニル類似体が最も明るく，BL特性の改善がBLI特性の改善に直接的に寄与することを示した。またルシフェリン類縁体の体内動態を分配係数log P値から予測できることを示した。1-ピロリジニル類似体は高輝度で体内分布性が高いため，有力な材料であると考えられる。

第2章 長波長セレンテラジン類縁体の合成およびその発光評価

イミダゾピラジノ骨格C-6位に複数のオレフィンをもつセレンテラジン誘導体を新規に合成し，それらの生物発光特性および化学発光特性を調べた。オレフィンの数を増大させることにより発光極大波長が長波長化し，オレフィンを3つ有するCTZ類縁体およびウミシイタケルシフェリン変異体Rluc8.6_547の組み合わせにより発光極大波長664 nmを示した。生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）を利用しないCTZ類縁体で世界最長波長の発光波長を示した。DMSO-TMG系による発光反応後溶液のFL特性を調べることで，BL反応は中性アミド状態で発光し，CL反応ではアミドアニオン状態で発光していることが示唆された。また，速度論解析よりオレフィンが増加するごとにミカエリス定数が低下し親和性が増大した。一方，オレフィンが増加し分子の高さが増すに従い発光反応速度が低下し，これは酵素反応速度 k_{cat} が低下するためと考えられる。

論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名 木山 正啓

審査委員主査 牧 昌次郎

委員 平野 誉

委員 三瓶 厳一

委員 瀧 真清

委員 丹羽 治樹

委員

委員

本論文では、ホタル生物発光系とウミシイタケを含む海洋生物発光系の有機化学的な人工基質変換により、生物発光を650nm程度以上に変換した研究についてまとめられている。ホタル生物発光系ではホタル発光基質を改変することで、天然発光酵素に対して670nm程度にまで波長を伸長した。長波長化した材料で、マウスのイメージングを行い天然発光基質よりも深部可視化に適していることを証明した。ウミシイタケまたは海洋生物発光系でも同様に発光基質セレンテラジンを有機化学的に人工基質変換することで660nm程度にまで発光波長を伸長した。これらの研究水準は非常に高く、国内外から高く評価されている。

第1章「序論」では、生物発光の基礎から応用技術である*in vivo*イメージング技術について概説し、本研究の目的を簡潔に述べている。

第2章「アカルミネ類縁体の合成と発光活性評価」では、環状アミノ基（1-ピロリジニル，1-ピペリジノ，1-アゼパニルおよびモルフォリノ基）を有するアカルミネ類似体を新規に合成した。またそれらの生物発光および生物発光イメージング特性を調べたところ、すべての類似体は約670 nmに赤色領域に極大発光波長を示した。また1-ピロリジニル，1-ピペリジノ，1-アゼパニルおよびモルフォリノ基を有する類縁体は約560 nmの黄緑色領域にも発光を示した。

第3章「長波長セレンテラジン類縁体の合成およびその発光評価」では、イミダゾピラジノ骨格C-6位に複数のオレフィンをもつセレンテラジン誘導体を新規に合成し、それらの生物発光特性および化学発光特性を調べた。オレフィンを3つもつセレンテラジン類縁体およびウミシイタケルシフェラーゼ変異体 Rluc8.6_547の組み合わせにより発光極大波長664 nmを示した。この長波長は報告のある同類縁体で世界最長波長と考えられる。この材料も動物実験の詳細な検討を行うことで、世界的な実用化が期待できると考えられる。

第4章「結語」では、結論として各論の研究内容を総括し、本研究における将来的な展望について述べている。

結論として、ホタル生物発光系とウミシイタケを含む海洋生物発光系の有機化学的な人工基質変換により、それぞれ天然物では得られない長波長化に成功している。特にセレンテラジン類縁体で660nm程度にまで生物発光波長を伸長した例はなく、本論文は生物有機化学ならびに生命科学分野において、新たな知見を与えるものとして、博士（理学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと認める。