

長波長発光を示す生物発光基質の開発およびその性質

木山 正啓

電気通信大学大学院情報理工学研究科

博士(理学)学位申請論文

2018年3月

長波長発光を示す生物発光基質の開発およびその性質

博士論文審査委員会

主査 牧 昌次郎 助教

平野 誉 教授

三瓶 巖一 准教授

瀧 真清 准教授

丹羽 治樹 特任教授

著作権所有者

木山 正啓

2018 年

Development and Properties of Red-shifted Bioluminescent Substrate

Masahiro Kiyama

Abstract

Bioluminescence reactions of fireflies and marine organisms are widely used for bioanalysis including *in vivo* bioluminescence imaging. *In vivo* bioluminescence imaging, wavelengths in the red to near-infrared region are highly advantageous for tissue permeability. However, many bioluminescent substances emit at shorter wavelengths ($\lambda \leq 600$ nm). Recently, we developed a red firefly bioluminescent substrate (AkaLumine, $\lambda_{\text{max}} = \text{ca. } 670$ nm), getting good results with *in vivo* bioluminescence imaging. However, the emission intensity is not sufficient. In this paper, we synthesized AkaLumine analogues introducing a cyclic amino group, generating high brightness while maintaining red-light-emission. On the other hand, red-light-emission ($\lambda > 600$ nm) of the marine bioluminescent substance "coelenterazine (CTZ)" without energy transfer has not been achieved. We found that CTZ analogues with multi-olefines at the C-6 position of imidazopyrazinone produced red-light emission ($\lambda_{\text{max}} = 664$ nm), and clarified their bioluminescence properties.

長波長発光を示す生物発光基質の開発およびその性質

木山 正啓

和文概要

赤色ホタル生物発光基質 AkaLumine($\lambda_{\max} = \text{ca. } 670 \text{ nm}$)にいくつかの環状アミノ基を導入することで、長波長発光を維持しつつ高輝度化を達成した。マウスを用いた *in vivo* 発光測定により、長波長発光および高輝度化した発光基質の有効性を確かめた。また、海洋生物発光基質セレンテラジンのイミダゾピラジノン骨格 C'6 位をオレフィン化し、オレフィン数による発光波長の制御が可能であることを見出した。これらの基質の 1 つで、セレンテラジン系発光基質としては世界最長波長を達成した($\lambda_{\max} = 664 \text{ nm}$)。

目次

1. 序論	1
1.1. 発光生物	1
1.2. 生物発光の化学.....	2
1.3. 生物発光の発光機構.....	9
1.4. 生物発光の解析法.....	11
1.5. 生物発光の <i>in vivo</i> イメージングへの応用	16
1.6. 本研究の目的.....	22
2. 新規長波長ホタル生物発光基質の合成および発光活性評価.....	23
2.1. はじめに	23
2.2. 環状アミノ基を有する AkaLumine 類縁体の合成.....	28
2.3. AkaLumine および新規類縁体の生物発光特性.....	30
2.4. Akaumine とその新規類縁体および対応するオキシルシフェリンの DFT 計算.....	36
2.5. AkaLumine とその新規類縁体およびホタルルシフェリンの生物発光イメージング 特性	39
2.6. まとめ	46
3. 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.....	47
3.1. はじめに	47
3.2. 新規セレンテラジン類縁体の合成.....	51
3.3. セレンテラジンおよび新規セレンテラジン類縁体の UV/Vis 吸収スペクトルおよび 生物発光、化学発光スペクトル.....	55
3.4. セレンテラジンおよび新規セレンテラジン類縁体の生物発光反応評価.....	65
3.5. セレンテラミド類縁体の DFT 計算	70
3.6. まとめ	72
4. 結語	73
5. 実験の部	75
5.1. 合成の部	75
5.2. 測定の部	95
6. 参考文献	100
7. 謝辞	106

1. 序論

1.1. 発光生物

発光生物は細菌や昆虫、海洋生物など広範囲な生物種で確認されており、種によって光の色や光り方は様々である。例えばホタルや発光キノコ、オワンクラゲなどは体内で光るが、ウミホタルは発光液を体外に放出して発光する¹。

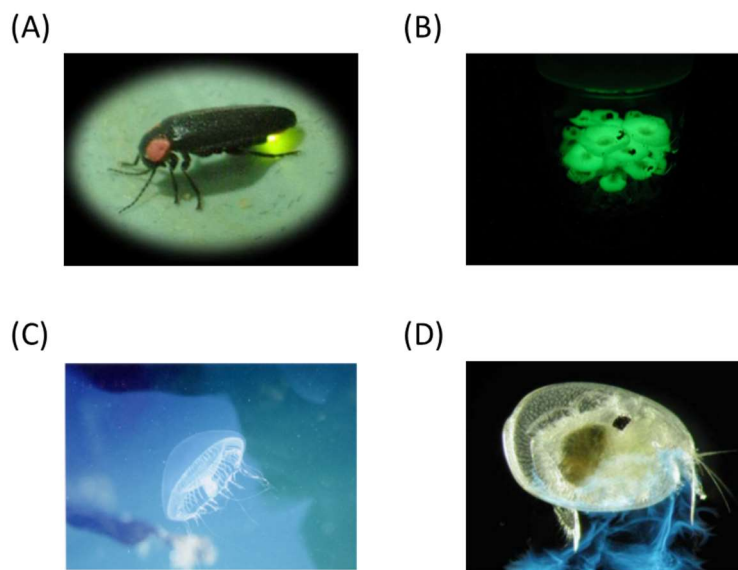


図 1-1 発光生物 (A)ホタル、(B)ヤコウタケ、(C)オワンクラゲ、(D)ウミホタル

生物が進化の過程でいかに発光の手段を獲得したかは定かではないが、一説には生命発生初期の嫌気的な地球において、有害な酸素を生体内で効率的に廃棄するためとも言われており（酸素スカベンジャー説）、その後の進化の過程で発光に様々な意味合い(雌雄間の合図、威嚇・逃亡、餌の獲得など)が込められたと考えられている²。

1.2. 生物発光の化学

1885年 Dubois は、ヒカリコメツキ(*Pyrophorus*)の発光器の冷水抽出液を発光が認められなくなるまで放置したものと、発光器を熱湯抽出して得たものとを常温で混合するとその溶液が強く発光することを確認し、前者には酵素、後者には発光物質が存在すると考えた(図 1-2)。この酵素をルシフェラーゼ、発光物質をルシフェリン、そしてこの様式で発光する反応をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L 反応)と名付けた²。

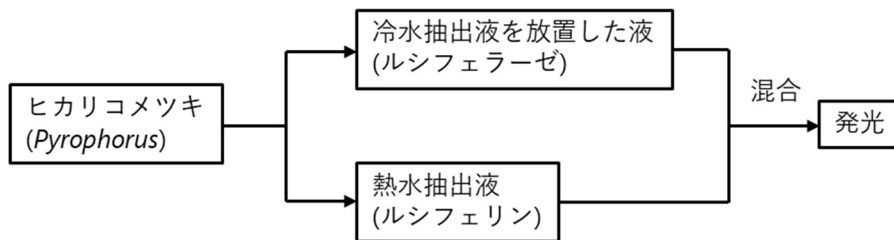


図 1-2 Dubois の実験

生物発光は多種多様な発光色を示す。これらは基質ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼとの相互作用によって引き起こされる化学反応によるものである。ルシフェラーゼはルシフェリンの酸化を触媒し、励起状態のオキシルシフェリンを生成し、これらが基底状態に戻る際に各オキシルシフェリンが対応する蛍光を発する。(図 1-3)

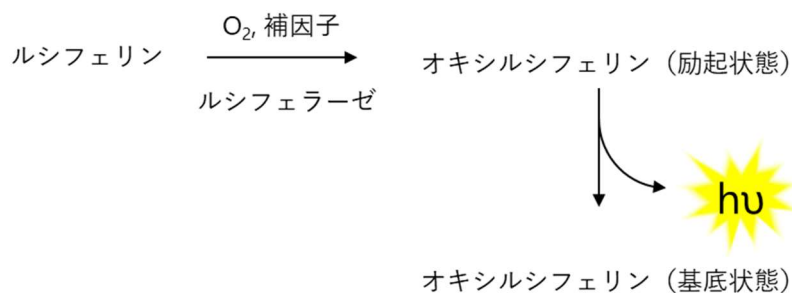


図 1-3 ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応

現在、約 30 種類の異なる生物発光系が存在するが、そのうち基質の同定および反応機構解析研究が行われているものは 9 種類ほどである(図 1-4)。以下簡単にそれら生物発光の基質ルシフェリン・酵素ルシフェラーゼについて紹介する。

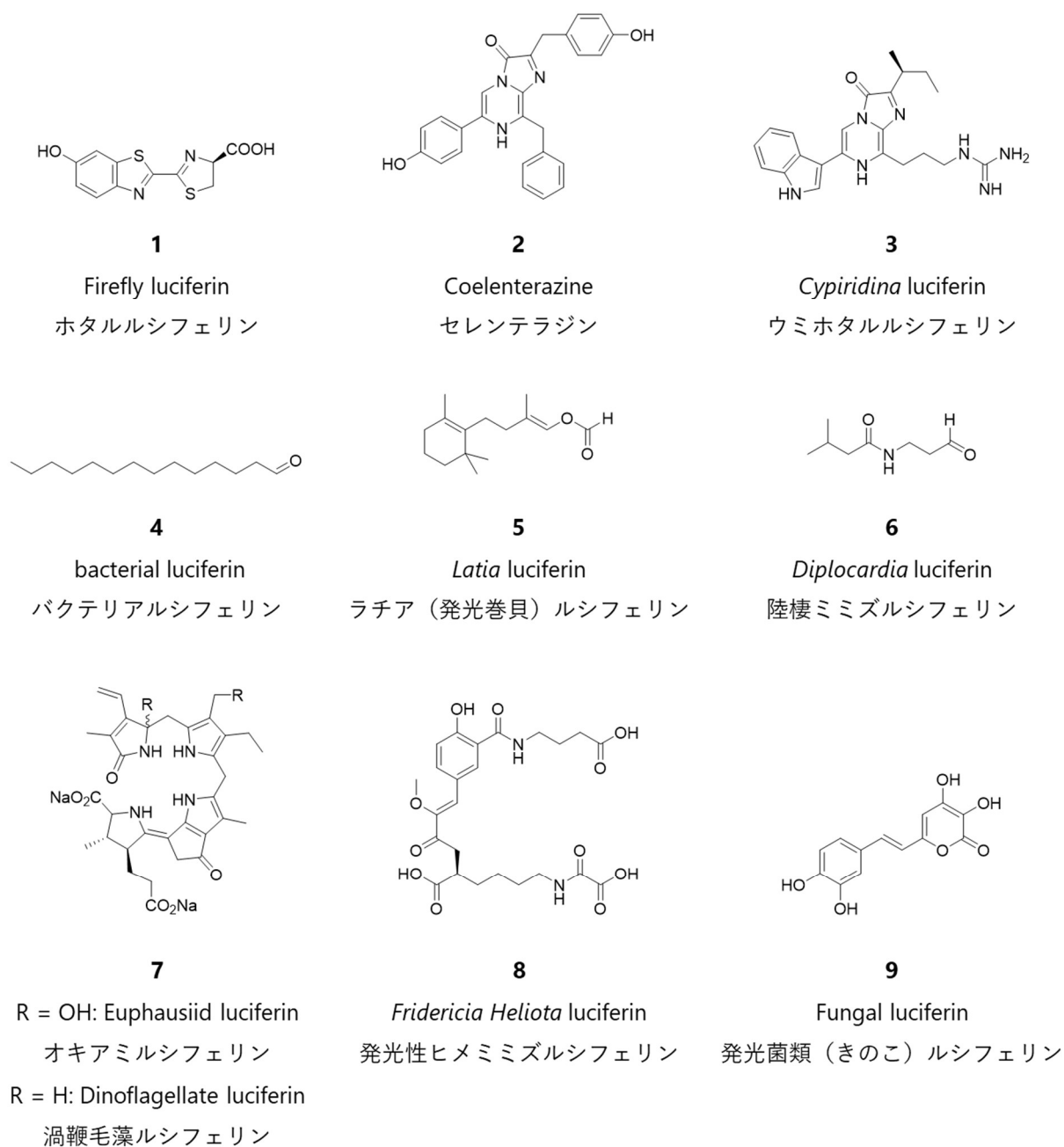


図 1-4 構造が判明しているルシフェリン

1.2.1. ホタルルシフェリンとルシフェラーゼ

1916年、Harveyらはホタルの発光がルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を示す事を発見し、その後1957年にMcElroyらにより北アメリカ産ホタル(*Photinus pyralis*, *Ppy*)からホタルルシフェリン(1)が単離された³。1961年にはWhiteらによってホタルルシフェリン(1)が合成され、構造決定がなされている⁴。

ルシフェラーゼについては、1985年にde Wetらによって北米産ホタルによりルシフェラーゼがクローニングされた。分子量は61 kDaで、560 nmを発光極大波長とする黄緑色の光を放出する。その後、多くの研究グループから種々ルシフェラーゼの単離が行われた。鉄道虫のように赤色および黄緑色発光を示す2種類のルシフェラーゼを持つユニークな生物も存在する。代表的なルシフェラーゼを表1-1にまとめた。

表 1-1 ホタルルシフェリン(1)を基質とする代表的なルシフェラーゼ

ルシフェラーゼ	略称	発光極大波長 / nm
北米産ホタル(<i>Photinus pyralis</i>)	Fluc, <i>Ppy</i>	560
ヒカリコメツキ(<i>Pyrophorus termitilluminans</i>)	Eluc	537
ヒカリコメツキ(<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>)	CBG	540
	CBR	615
イリオモテボタル(<i>Rhagophthalmus ohbai</i>)	SLG	550
イリオモテボタル変異体	SLO	580
鉄道虫(railroad worm)	SLR	630

1996年にContiらにより、*Ppy*ルシフェラーゼの3次元構造が報告された(図1-5)⁵。2006年には、ゲンジボタルルシフェラーゼに不活性反応中間体やオキシルシフェリンを内包させ状態でのX線構造も報告されるなど⁶、反応解析を含め最も研究がすすんでいる生物発光系の1つである。

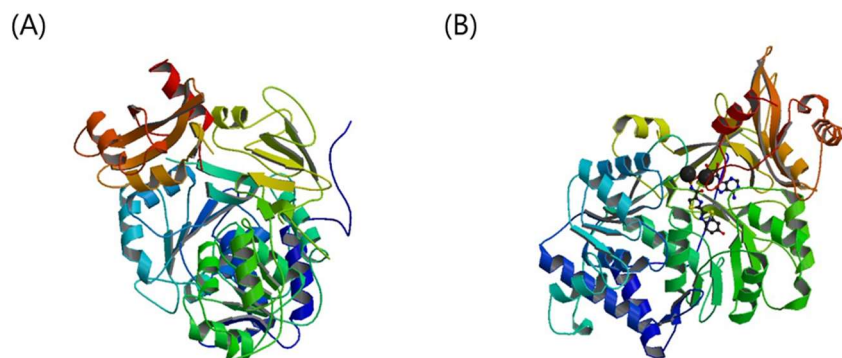
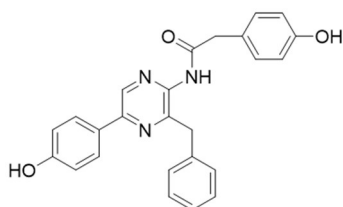


図 1-5 (A)北米産ホタル(*Ppy*)ルシフェラーゼおよび(B)ゲンジボタルルシフェラーゼと不活性反応中間体との共結晶の構造

((A) Conti, E.; Franks, N. P.; Brick, P. *Structure* **1996**, *4* (3), 287–298, PDB ID: 1LCI, (B) Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. *Nature* **2006**, *440* (7082), 372–376, PDB ID: 2D1S より抜粋)

1.2.2. セレテンラジンとルシフェラーゼ

セレテンラジンは、1962 年下村らによって腔腸動物オワンクラゲの発光器から発光タンパク質イクオリン(Aequorin)を単離・精製したことに端を発する。1973 年に生物発光の反応後に得られる蛍光タンパク質の発色団がセレテラミド **10** であることを発見し、1975 年に発光基質の単離・精製およびイクオリンとの再発光反応によりセレテンラジン **2** の構造決定に至った。Cormier らも 1977 年とほぼ同時期に、セレテンラジンの単離精製を行っている。



10

Coelenteramide

セレテラミド

図 1-6 セレテラミド **10** の構造

また、セレンテラジン(2)をルシフェリンとして用いるルシフェラーゼは 1978 年に下村らによって発光エビ(*Oplophorus gracilirostris*)から最初に単離された⁷。*Oplophorus* ルシフェラーゼは分子量が 106 kDa であり、その構造は 2 つの同一サブユニット (19 kDa および 35kDa が 2 つずつ) を含む。19 kDa のサブユニットの変異体 nanoluc およびセレンテラジン類縁体 furimazine**11a** の組み合わせにより、非常に高輝度な人工発光システムを構築している(図 1-7)⁸。ウミシイタケ(*Renilla*)ルシフェラーゼは Cormier らによってクローン化された⁹。分子量 36 kDa で 480 nm の生物発光極大波長を有するタンパク質である。このルシフェラーゼは、ほとんどすべての細胞型で発現することが可能なため、バイオイメージングおよび他の生物発光研究で広く利用されている。海洋性カイアシ(*Gaussia princeps*)由来のルシフェラーゼは、2002 年にクローン化された¹⁰。これは、分子量 19.9 kDa の質量を有する最小のルシフェラーゼの 1 つである。分泌型のルシフェラーゼとして広く利用されている。

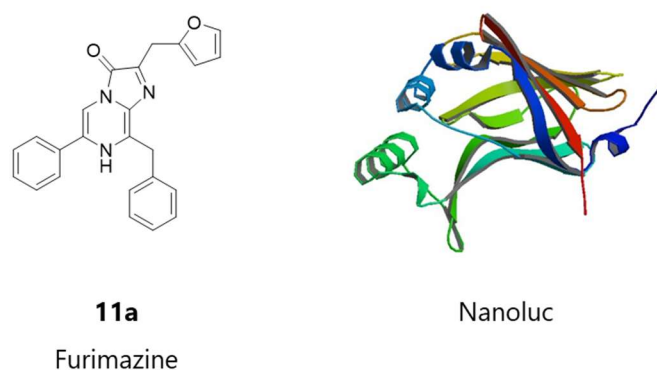


図 1-7 Furimazine(**11a**)と Nanoluc(PDB ID; 5IBO)の構造

表 1-2 海洋性セレンテラジン **2** を用いる代表的なルシフェラーゼ

ルシフェラーゼ	略称	発光極大波長 / nm
ウミシイタケ(<i>Renilla reniformis</i>)	Rluc	480
海洋性カイアシ(<i>Gaussia princeps</i>)	Gluc	470
発光エビ(<i>Oplophorus gracilirostris</i>)	Oluc	460
Nanoluc (発光エビ由来)	Nluc	460

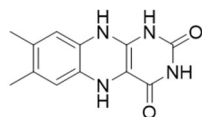
1.2.3. ウミホタルルシフェリンとルシフェラーゼ

ウミホタル(*Vargula*)ルシフェリン **3** は、トリプトファン、アルギニン、イソロイシンの3つのアミノ酸から生合成される。1966年に岸らによって全合成され、その構造が決定された²。

ウミホタルルシフェラーゼは、最も安定なルシフェラーゼの1つであり、室温で乾燥した形で何年も保存することができる。このルシフェラーゼを単離するための最初の試みは1950年代に行われ²、1989年にウミホタル(*Vargula hilgendorffii*)ルシフェラーゼのcDNAクローンが最初に構築された¹¹。Cypridina *noctiluca* ルシフェラーゼもまたクローン化された²。

1.2.4. バクテリアルシフェリン

バクテリアルシフェリン **4** はその分子自体の酸化生成物が発光体ではなく、フラビンモノヌクレオチド(FMN)が真の発光体である²(図 1-8)。1953年に Strehler らにより L-L 反応であることが突き止められ、1954年に Cormier らによって還元型のフラビンモノヌクレオチド(FMNH₂, **12**)とバクテリアルシフェリン(**4**)が発光反応($\lambda = 490 \text{ nm}$)を示すことが確かめられた。



12

図 1-8 フラビンモノヌクレオチド(FMNH₂)の構造

1.2.5. ラチア(発光巻貝)ルシフェリン

発光性ラチア(*Latia*)はニュージーランドの溪流に棲息し、緑色($\lambda = 535 \text{ nm}$)の発光を示す。ラチアルシフェリン **5** もその分子自体の酸化生成物は発光性を示さない。1950年に Bowden によって L-L 反応であることを確かめられ、下村らによってその構造が決定された。発光体はフラビン類であると予想されているが、まだ詳細はわかっていない¹²。

1.2.6. 陸棲ミミズルシフェリン

陸棲ミミズ(*Diplocardia longa*)ルシフェリン **6** は 1976 年に Wampler らによってその構造が明らかになった¹³。反応には過酸化水素を必要とし、 $\lambda = 500 \text{ nm}$ の緑色発光を示す¹⁴。ルシフェラーゼはまだクローニングされていない。

1.2.7. 渦鞭毛藻ルシフェリン

Pyrocystis lunula 由来の渦鞭毛藻ルシフェリンの構造は、1989 年に中村らによって解明された¹⁵。*Lingulodinium polyedrum* 由来のルシフェラーゼは、3つの相同ドメインからなる分子量 130 kDa のタンパク質である^{16,17}。他の天然渦鞭毛藻ルシフェラーゼもクローニングされている。オキアミ(Euphausiid)についても、渦鞭毛藻ルシフェリンと類似した構造を持つことが判明している。

1.2.8. 発光性ヒメミミズルシフェリン

発光性ヒメミミズ(*Fridericia*)ルシフェリンは、2014 年に Petushkov らによって分離され、構造が明らかとなった¹⁸。*Fridericia* ルシフェリンは、 γ -アミノ酪酸、改変チロシン残基、リジンおよびシュウ酸基からなるペプチドである。ヒメミミズの発光極大波長は 478 nm を示す。ホタル生物発光同様、ATP を利用した L-L 反応様式で発光する。

1.2.9. 発光菌類ルシフェリン

発光菌類(キノコ)は発光極大波長が 530 nm の緑色を示す。発光キノコルシフェリンの構造は 2015 年に Yampolsky らによって明らかにされ¹⁹、その発光機構の解明も進んでいる²⁰。しかし、未だルシフェラーゼは単離されていない。

1.3. 生物発光の発光機構

ホタル生物発光および海洋生物系生物発光はルシフェリン、ルシフェラーゼの単離および発光メカニズム解明が進んでいる。本節においては、本研究で扱うホタル生物発光および海洋性セレテンラジンの生物発光反応機構を紹介する。

1.3.1. ホタル生物発光機構

ホタルの生物発光の反応メカニズムを図 1-9 に示した^{21,22}。ホタルルシフェラーゼは、ATP、 Mg^{2+} 、および酸素(O_2)の存在下で、ホタルルシフェリン(**1**)の AMP 化および酸素化を触媒する。ルシフェラーゼはまず、**1** の AMP 化を触媒して、活性化された中間体 **13** を得る。さらに同ルシフェラーゼ内で **13** を酸素化し、生成した不安定なジオキセタノン **15** が脱炭酸する際に、励起状態オキシルシフェリン **16*** の生成をもたらす。励起状態オキシルシフェリン **16*** が基底状態の化合物 **16** に遷移する際に、可視光の光子を放出する。

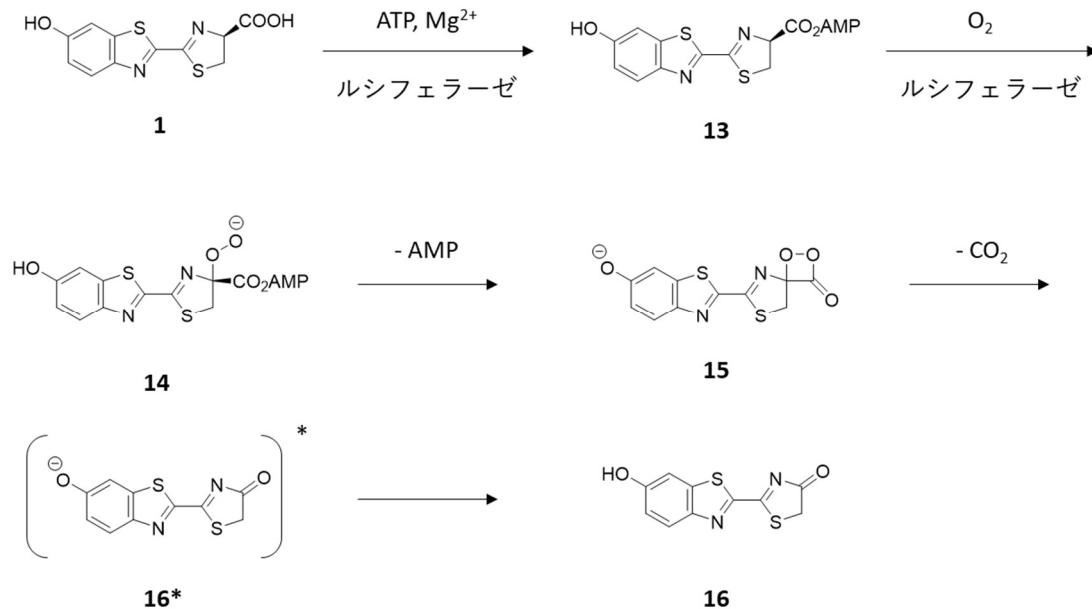


図 1-9 ホタルの L-L 反応様式

1.3.2. 海洋生物発光物質セレンテラジンの発光機構

海洋生物発光物質セレンテラジンの反応メカニズムを図 1-10 に示した。同じイミダゾピラジノン環を持つウミホタルルシフェリンも同様の反応で進行する。まずイミダゾピラジノンは塩基によって C7 位の NH が脱プロトン化されアニオン状態となる。続いて、三重項酸素へ電子移動し、ラジカルカップリングにより過酸化物質アニオン **17** を生成する。この過酸化物質アニオン **17** が環化してジオキセタノン中間体 **18** を生成し、この分解による脱炭酸により一重項励起状態のアミドピラジン **20*** が生成し、これが基底状態に遷移して発光する。ルシフェラーゼの環境によっては、ジオキセタノンアニオンのプロトン化が起き、中性のジオキセタノン **19** からアミドピラジンの中性種の励起分子 **21*** が生成して発光する経路もある。ホタルイカ (*Watasenia scintillans*) ルシフェリンの発光基質セレンテラジンジサルファイトはアミドアニオン種 **20** が発光体であると報告されている。

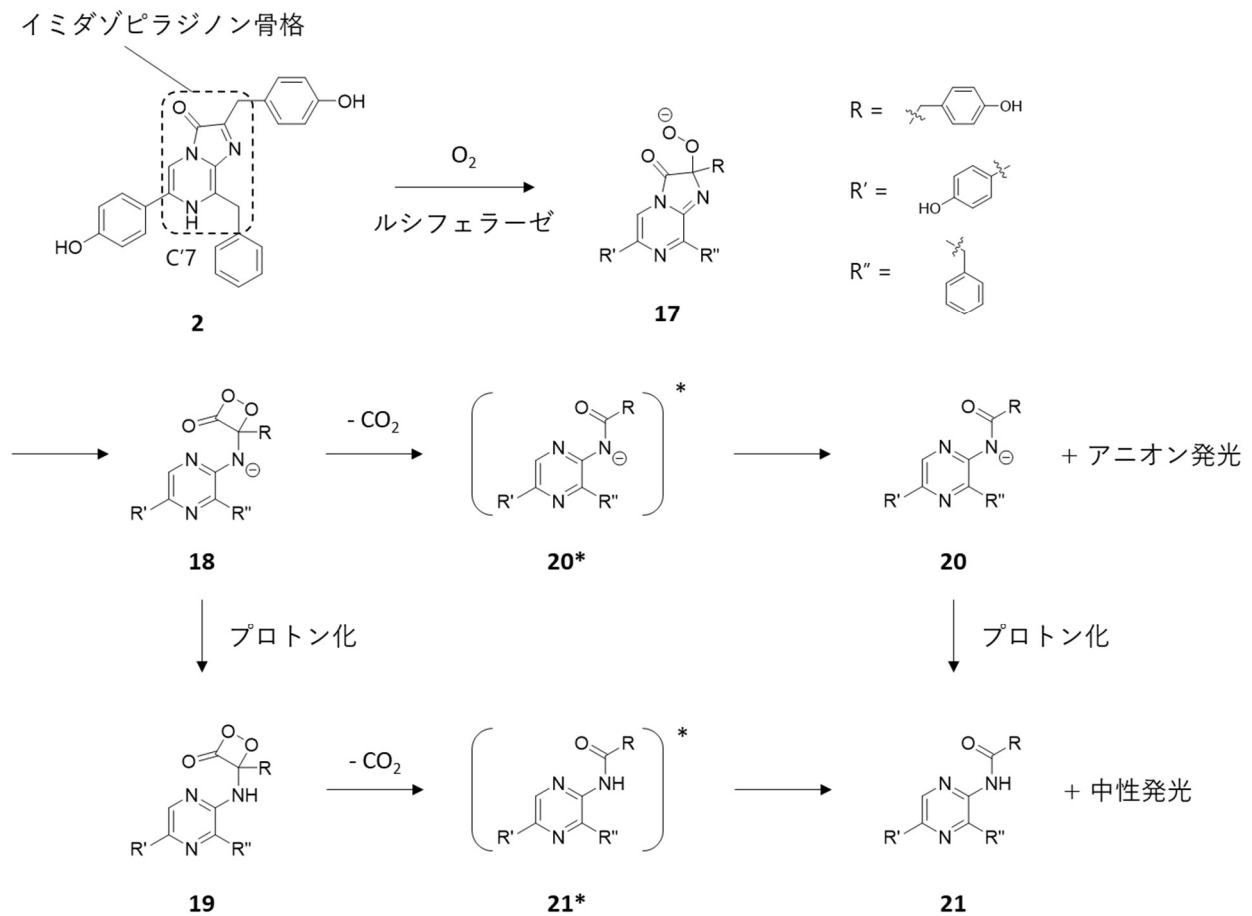


図 1-10 海洋生物発光物質セレンテラジンの発光様式

1.4. 生物発光の解析法

1.4.1. 酵素反応速度論解析

生物発光のルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の酵素反応特性の解析において、酵素反応速度論解析が行われる(ホタル生物発光^{23, 24}、海洋性生物発光^{8, 20, 25, 26})。L-L 反応は、基質ルシフェリン S と酵素ルシフェラーゼ E に加え酸素も加わり複合体 ES を形成し、複合体 ES 内で S が化学反応を起こすことで励起状態のオキシルシフェリン P*が生成し、これが光子 hu を放出する。反応系中における溶存酸素は一定であると考えられるため、単一基質反応の酵素反応様式に当てはめることができる(図 1-11)。光子の量は生成した P*の量に比例するため、光子 hu を光検出器で測定することで、図 1-12 のような基質濃度[S]と発光反応速度 V のグラフが描くことができる。

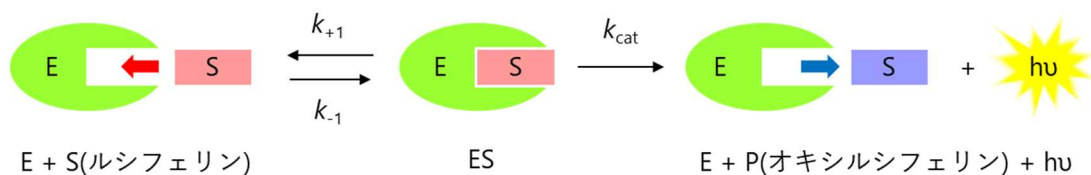


図 1-11 酵素反応

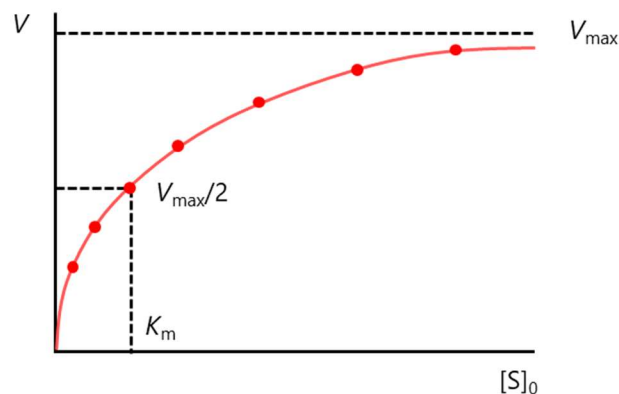


図 1-12 基質濃度[S]と発光反応速度 V の関係

初期発光反応速度 V_0 、最大基質濃度 V_{max} 、最大発光反応速度 V_{max} 、ミカエリス定数 K_m とした時、以下のミカエリス-メンテンの速度式(式 1-1)が与えられる。

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (\text{式 1-1})$$

この式の両辺を逆数にとると、Lineweaver-Burk 式(式 1-2)が得られる。

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]_0} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (\text{式 1-2})$$

横軸 $1/[S]_0$ に対して縦軸 $1/V_0$ をプロットすると測定値は直線に並び、縦軸切片 = $1/V_{\max}$ 、横軸切片 = $-1/K_m$ となり、 V_{\max} と K_m が求められる(図 1-10)。なお、 V_{\max} は k_{cat} 、酵素量、次に示す発光量子収率 Φ_{bl} および測定装置の装置定数に比例する。

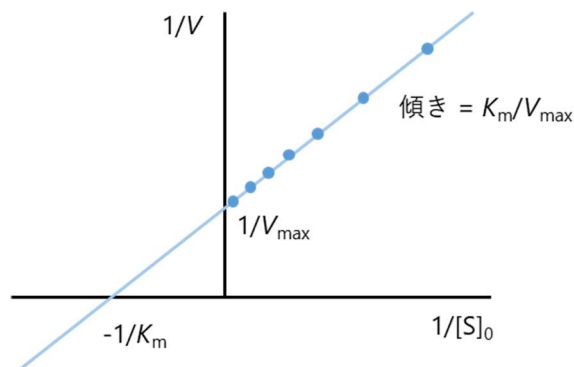


図 1-13 Lineweaver-Burk プロット

本研究では、 V_{\max} 値を発光強度として比較した。また、ホタル生物発光は AMP 化およびその酸素化の 2 段階反応で発光するものの、酸素化過程が AMP 化過程に比して早く、AMP 化反応が律速過程であるため^{27,28}、擬一次反応として解析した。

1.4.2. 発光量子収率および酵素反応速度定数

一般に生物発光は化学発光に比べ光子生成効率が良く、反応による熱損失がほとんどないため、「冷光」(luminescence)と呼ばれている。これは、1つのルシフェリンから1つの光子を生成する効率、発光量子収率 Φ_{bl} が高いためである。表 1-3 に各生物発光および化学発光の発光量子収率 Φ_{cl} および Φ_{bl} をまとめた。

表 1-3 発光量子収率

		発光量子収率
生物発光	バクテリア	0.12-0.17
	ウミホタル (<i>Vargula</i>)	0.28
	ウミシイタケ (<i>Renilla</i>)	0.05
	北米産ホタル (<i>Fluc, Ppy</i>)	0.48
	ヒカリコメツキ (<i>Eluc</i>)	0.61
	オワンクラゲ	0.23
化学発光	ルミノール	0.012

現在絶対発光量子収率は、秋山らが開発した測定装置を用いることで最も精度良く測定される(図 1-14)。検出器に CCD を使用し、回折格子による分光によって得られたスペクトルを、基準光源としてレーザーおよび白色光源を用いる校正することにより、 Φ_{bl} 値を求める。これにより、長年 88%とされてきた北米産ホタルルシフェラーゼとホタルルシフェリン(1)の発光量子収率が 47.6% \pm 2.2%に訂正された^{29, 30}。

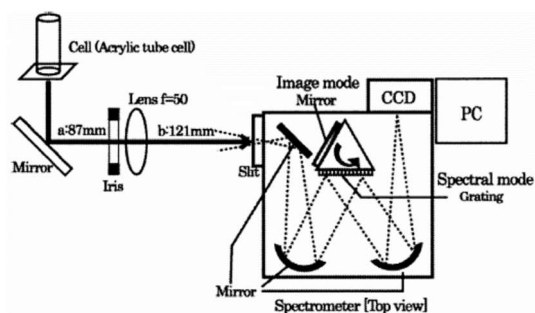


図 1-14 絶対発光量測定装置の概略

(丹羽一樹、生物発光,化学発光を用いたバイオ計測技術に関する調査研究、2007.3、産総研計量標準報告より抜粋)

本研究の絶対量子収率測定は、秋山らが開発した絶対量子収率測定と同様の分光器、冷却 CCD を備えたスペクトルメータ(AB-1850、ATTO)を使用した。また使用したセルが秋山らとは異なるが、絶対量子収率測定により得られた測定値から、相対的に絶対発光量子収率を測定した。すなわち、基準となる *Ppy* ルシフェラーゼおよび天然ルシフェリン(**1**)の発光量子収率の報告値から、基準ルシフェリンおよび測定対象の発光スペクトル面積比を用いて計算することで、測定対象ルシフェリンの発光量子収率を相対的に求めることができる。

また Φ_{bl} 値は、反応生成収率(Φ_r)、一重項励起生成効率(Φ_s)および蛍光量子収率(Φ_{fl})の積で求まる(式 1-4)。ヒカリコメツキムシルシフェラーゼ(Eluc)と天然ルシフェリン(**1**)の Φ_{bl} 値(0.61)は、 Φ_r 、 Φ_s 、 Φ_{fl} 値が平均して 0.8 以上の高い値を示す必要があることから、非常に高効率な発光システムであると言える。

$$\Phi_{bl} = \Phi_r \times \Phi_s \times \Phi_{fl} \quad (\text{式 1-4})$$

また、得られた発光反応速度 V_{max} 、発光量子収率 Φ_{bl} および酵素濃度[E]から酵素反応速度定数(k_{cat})は以下の式により計算される(式 1-3)³¹。

$$V_{max} = \Phi_{bl} \times k_{cat} \times [E] \quad (\text{式 1-3})$$

Ppy ルシフェラーゼとホタルルシフェリン(1)の K_{cat} 値は $4.3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ 程度を示すことが報告されている

31。

1.5. 生物発光の *in vivo* イメージングへの応用

生物発光系は、その発光効率の高さから研究・試験分野で高感度分子プローブとして利用されている。既存の生物発光は、イノムアッセイ、遺伝子発現アッセイ、薬物スクリーニング、*in vivo* 生物発光イメージング、癌研究、感染症研究、環境モニタリングおよび微生物検査等に応用されている(図 1-15)。

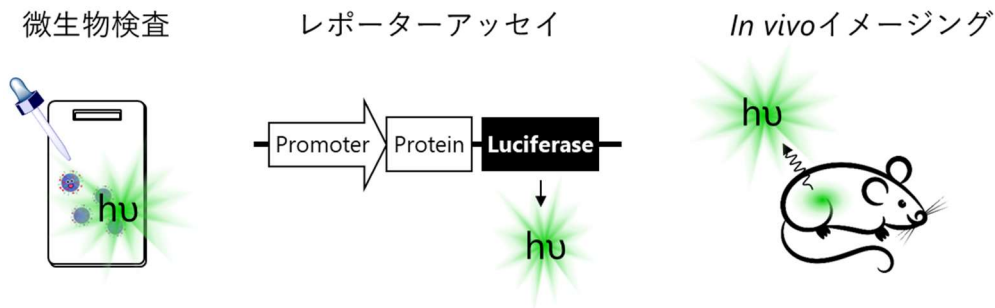


図 1-15 生物発光の応用例

1.5.1. *In vivo* イメージング

分子イメージング技術の発展により、生体内における遺伝子やタンパク質などの量や働きを生物が生きたままの状態画像化することができるようになり、疾患に関係する分子を可視化・指標化することで様々な疾患の高度な診断が可能になってきている。また新薬候補物質の効果を視覚的・定量的に理解できることで新薬開発の迅速化やコストの削減も可能にしつつある。*In vivo* イメージングにおける必要要件は、1)安全性(無毒性)、2)高空間および時間分解能、3)高感度、4)高標的特異性、5)長期追跡、6)無遺伝子改変、7)プローブ利用および 8)低コストである。現在利用可能な技術は、いずれもこれらの要件をすべて満たしていない。*In vivo* イメージングにおける代表的な分子イメージング法としては X 線コンピュータ断層撮影法(CT)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、光学イメージング法(蛍光および生物発光)が挙げられ、それぞれに長所と短所がある^{32,33} (表 1-4)。

表 1-4 PET、SPECT、MRI、傾向の比較

	電磁波	空間分解能	深度	感度	時間分解能	相対コスト
CT	X線	50–200 μm	限界なし	mM	分	0.2–0.4
PET	高エネルギーγ線	1–2 mm	限界なし	pM	分	0.8–1.0
SPECT	低エネルギーγ線	1–2 mm	限界なし	pM	分	0.4–0.6
MRI	ラジオ波	25–100 μm	限界なし	μM から mM	分から時	1.2–1.5
蛍光	可視光、近赤外光	2–3 mm	< 1 cm	pM から nM	秒から分	0.1–0.4
生物発光	可視光	3–5 mm	1–2 cm		秒から分	

CTは、X線源を使用し組織の偏光および吸収の違いによりイメージングを行う。一般に、CTイメージングは、分子プローブを使用せず、その透過性の高さから高空間分解能である。しかし、放射線の安全性や、標的細胞に対する特異性はない。PET・SPECTは、陽電子もしくは単一光子線を放出するアイソトープで標識された薬剤の核種崩壊からのγ線放射を検出することにより、イメージングを行う。アイソトープ標識化合物と生体機能分子との相互作用を非侵襲的にリアルタイムで測定できる点で優れているが、CT同様被曝の危険性や空間分解能が低い等の問題点を有している。MRIは、磁場の存在下で電波を使用して、組織内の水分子の水素核を検出する。MRIは放射線を使用せず、高解像度のイメージングが可能であるが、測定時間が比較的長くなり、かつコストが高い。

光学イメージングは放射線を使用せずに、高感度かつ低コストで細胞や分子のイメージングが可能である。蛍光イメージングでは、GFP等の蛍光タンパク質や蛍光プローブに励起光を照射し、得られた蛍光をCCD(charge coupled device)カメラで検出する。空間・時間分解能が著しく高い点や、安全で操作的にも簡便な点で非常に有用である。しかしながら汎用されている可視光領域の蛍光は生体透過性が悪く、その使用を組織表面など励起光により励起される範囲に限定せざるを得ない問題点を持つ。

一方で、近年上記問題を解決する手法として生物発光法が注目されている。生物発光法は、PETやSPECTのように光子を内部から発生させるため、MRIや蛍光分析法のように外的刺激を必要としない³⁴。さらに、励起光を必要としないことから、蛍光分析法と比較してS/N比も高く、測定に特殊な装置を必要としない点で有利であり、*in vivo* イメージングで広く利用されている。しかしながら、発光酵素の遺伝子導入

の倫理的問題などがあるため臨床応用は難しい。生物発光法は利点も難点も持ち合わせているが、既存の方法と相補的な特徴を持つことから様々な可視化ニーズに対応することが期待される。

1.5.2. 長波長発光の利点

ホタルや海洋性生物の L-L 反応による発光波長は、可視領域(400~640 nm)である。この領域の光を *in vivo* イメージングに用いると、哺乳類の体内ではヘモグロビン(Hb)、オキシヘモグロビン(HbO₂)などの生体成分による光吸収を受けて検出感が低下する(図 1-16)。そのため、イメージングにおいては“生体の光学窓(biological optical window)”と呼ばれる赤から近赤外領域の波長($\lambda = 650\text{--}900\text{nm}$)が、光透過性が高く生体内深部を可視化できるため有利である³⁵。また、この領域の波長は散乱も低減され、鮮明な画像が得られる利点もある(図 1-17)³⁶。そのため、近年ではこの赤から近赤外領域の波長を用いたイメージングが焦点になっており、この領域で発光する生物発光が実現できれば、検出感が向上することが期待でき、バイオイメージング分野のさらなる発展につながるものと考えられる。

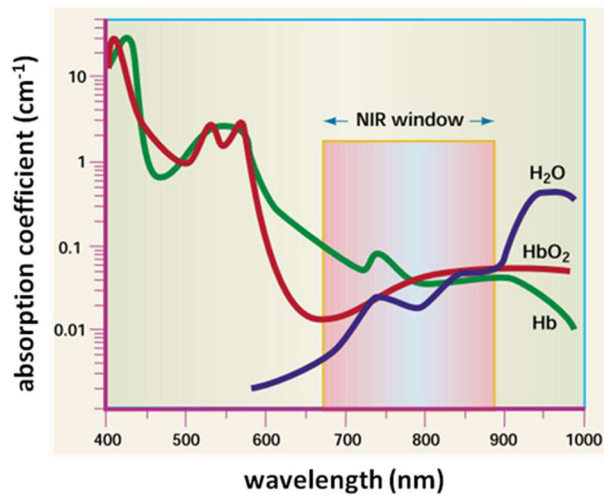


図 1-16 ヘモグロビン(Hb)、オキシヘモグロビン(HbO₂)および水における波長と吸光度の関係

(Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19, 316–317 より抜粋)

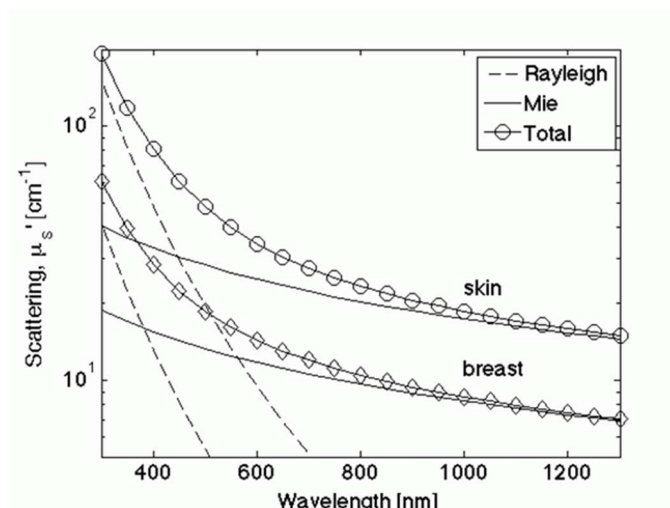


図 1-17 皮膚および胸部の波長と散乱の関係

(Jacques, S. L. *Phys. Med. Biol.* **2013**, 58 (14), 5007–5008.より抜粋)

1.5.3. 長波長ホタル生物発光基質”AkaLumine”

ホタルルシフェリン(**1**)と *Ppy* ルシフェラーゼの組み合わせによる *in vivo* 生物発光イメージング法は、分子イメージング手法として最も一般的である。しかし、L-L 発光により生成される光は約 560 nm に発光極大波長を持つため、*in vivo* 生物発光イメージングに最適とは言えない。私の研究室で開発されたホタルルシフェリン類縁体である AkaLumine **22a** は赤色発光を示す($\lambda_{bl} = 675$ nm、図 1-18)³⁷。組織の光透過性の違いにより深部観察が可能である(図 1-19)³⁸。実際の *in vivo* イメージングにおいても既存のホタルルシフェリン(**1**)よりも有利である(図 1-20)。

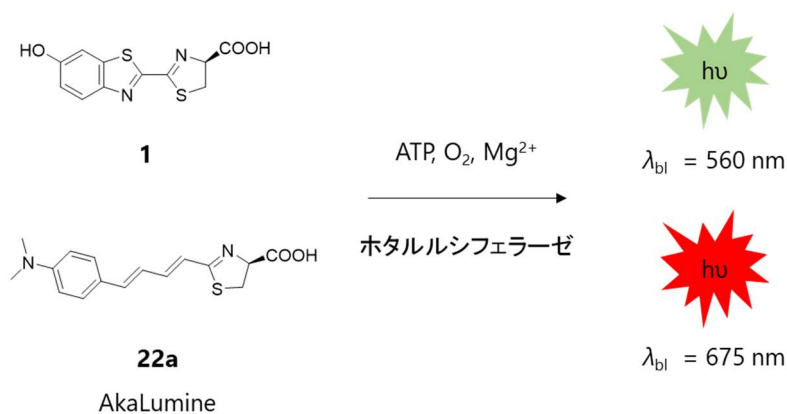


図 1-18 ホタルルシフェリン **1** および AkaLumine**22a** の発光

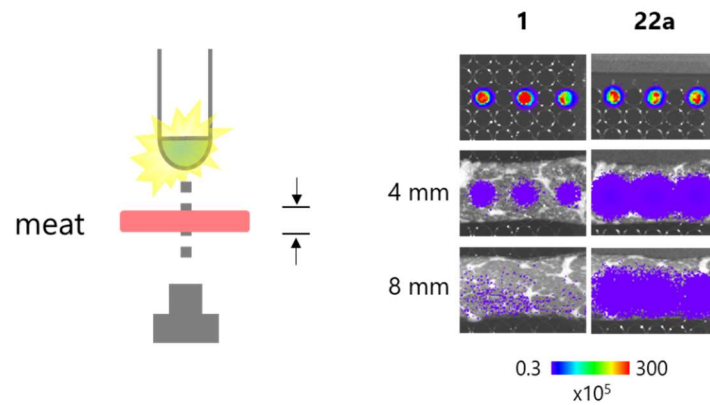


図 1-19 ホタルルシフェリン **1** と AkaLuciferase **22a** の発光波長の違いによる牛肉スライスを用いた透過度の違い

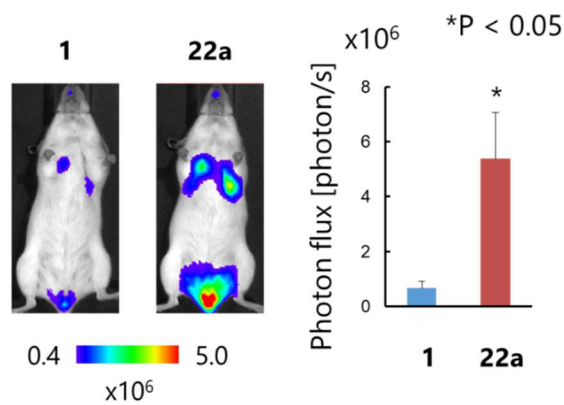
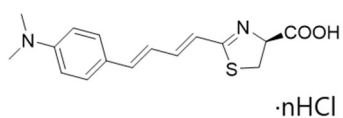


図 1-20 ホタルルシフェリン **1** と AkaLuciferase **22a** の肺がんモデルマウスを用いた *in vivo* 生物発光イメージング

また、AkaLuciferase **22a** は難水溶性であり高濃度で投与することが難しかった。AkaLuciferase を塩酸塩化した Tokeoni **23** は易水溶性であり、高濃度で投与できるため濃度の調整および高輝度化が可能である。



23

Tokeoni

図 1-21 Tokeoni (AkaLumine · HCl)の構造

1.5.4. 海洋性生物発光

海洋性生物発光も *in vivo* 生物発光イメージングに広く利用されている。しかし、実用化されているルシフェリン-ルシフェラーゼの組み合わせでも、その波長領域は 400–480 nm であり、*in vivo* イメージングに最適な波長領域(650–900 nm)から大きく離れているため、生体組織による強い吸収を避けることができない(表 1-2)。一方で、Nanoluc と Furimazine の組み合わせなど、ホタル発光系に比較して高輝度、高酵素活性を有する発光システムが使用可能である。そのため長波長発光波長を実現することができれば、潜在的にホタル生物発光法に並ぶ *in vivo* 生物発光イメージング手法となり得る。

1.6. 本研究の目的

現在は、研究における *in vivo* イメージングはマウスやラットなど小さな個体を中心である(図 1-22)。将来的に癌研究や再生医療研究などにおいて、マーモセットやミニブタなど大きな個体へイメージング対象が拡大するものと考えられる。そのため、さらなる深部の観察が必要であることから、発光材料の長波長化と高輝度化を達成する必要がある。



図 1-22 *in vivo* イメージングは小さな個体から大きな個体へと移行する

本研究では生物発光を対象に、発光材料の長波長化と高輝度化への取り組みを行った。第2章では、長波長発光材料 AkaLumine の波長を維持しつつ、アミノ基を調子することで高輝度化を行った。第3章では、高輝度生物発光材料であるセレンテラジンの波長を調整し、長波長化へ手法の確立を目指した。

2. 新規長波長ホタル生物発光基質の合成および発光活性評価

2.1. はじめに

非侵襲的 *in vivo* 生物発光イメージングは現在、小動物の分子や細胞の挙動を、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³⁹。北米ホタル *Photinus pyralis* (*Ppy*) のルシフェラーゼおよびその天然型発光基質ホタル D-ルシフェリン(**1**)は、生物発光イメージング測定に最も一般的に用いられる。ホタル生物発光は、基質ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼによるルシフェリン-ルシフェラーゼ(L-L)反応に基づいている^{40, 41}。ルシフェラーゼは、 Mg^{2+} の存在下で **1** と ATP および酸素との反応を触媒し、励起された一重項状態の発光体オキシルシフェリン(**16**)を与える(図 2-1)。**1** と *Ppy* ルシフェラーゼとの L-L 反応は、黄緑色光(生物発光極大波長 $[\lambda_{bl}] = ca. 560 \text{ nm}$)を生成し、pH 8.0 GTA 緩衝液(0.05 M 3,3-ジメチルグルタル酸、0.05 M 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールおよび 0.05 M、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールおよび NaOH の混合水溶液)中で高い発光量子収率($\Phi_{bl} = 0.48$)を示すことが報告されている^{29, 30}。生物発光は化学反応に基づいており、蛍光アッセイのように励起光源を必要としない。そのため生物発光イメージングは、蛍光イメージングよりもノイズが低減された高感度なイメージングが可能である。

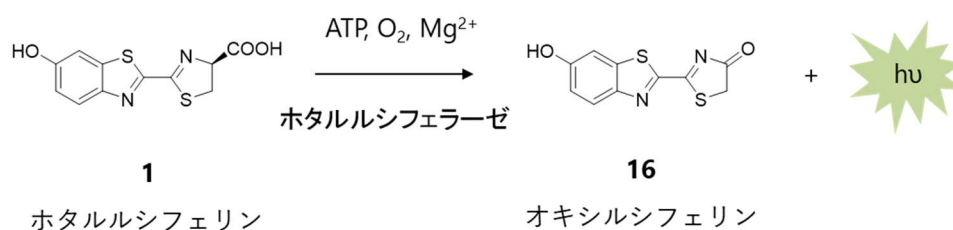


図 2-1 ホタル生物発光の発光機構²

1 と *Ppy* ルシフェラーゼとの L-L 反応によって生成された黄緑色光(ca. 560 nm)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、このため生物発光イメージングアッセイでは透過光は弱くなる³⁵。生物発光イメージングにおける光組織透過性を改善するためには、L-L 反応により、“生体の光学窓(biological optical window)”と呼ばれる領域の赤色～近赤外(NIR)光($\lambda = 650\text{--}900\text{nm}$)で発光

する必要がある(図 1-16)。この目的のために我々および他の研究グループは、赤色から NIR 領域で発光するルシフェリン類縁体の開発を行っている^{28,42}。

多くの研究グループはルシフェラーゼの選択的基質特異性が高い **1** の構造に基づき、ルシフェリン類縁体を設計している。先駆的研究として、ベンゾチアゾール構造の C6'位ヒドロキシ基の代わりにアミノ基を有するアミノルシフェリンは、極大波長約 600 nm で効率的な生物発光を示すことが見出された(図 2-2; **24**)⁴³。アミノルシフェリン構造のアミノ基に蛍光色素 BODIPY と Cy 7 を結合させた類縁体は、分子内 Förster 共鳴エネルギー移動によってそれぞれ 679 と 772 nm に λ_{bl} 値を示すことが報告された(図 2-2; **25, 26**)^{44, 45}。他の手法として、アミノルシフェリンの C6'位アミノ基と C'5 位を縮環し、アザシクロに変換した類縁体(Cycluc シリーズ)は長波長発光を示す($\lambda_{bl} \leq 648$ nm)^{46, 47}。その内縮合ピロリジンを持つ Cycluc1 は、生物発光イメージングにおいて高い生物発光活性を示す(図 2-2; **27**)^{48, 49}。セレノチアゾリン環を持つセレンウムアミノルシフェリンも 600 nm で発光する(図 2-2; **28**)⁵⁰。

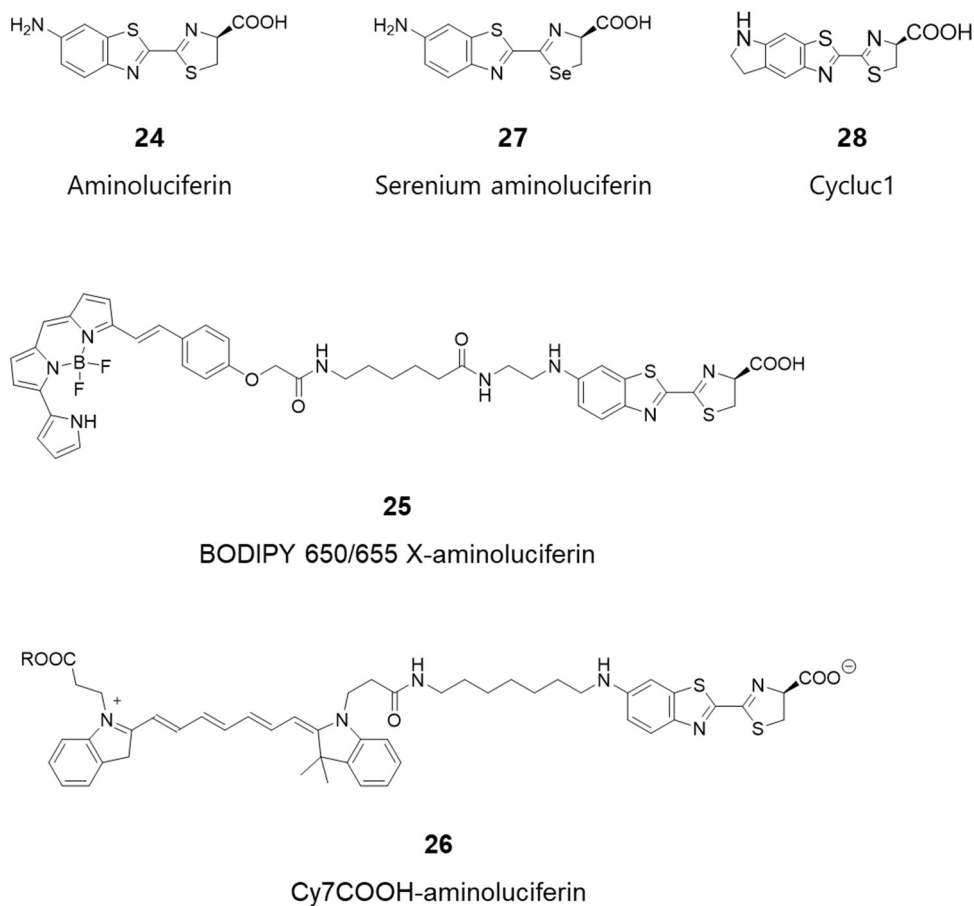


図 2-2 ホタル D-ルシフェリン(**1**)の類縁体

これらの方法論とは対照的に、私の研究室ではベンゾチアゾール部分の代わりに 2-フェニルエチニルと 4-フェニルブタジエニル構造により π 電子構造を改変したルシフェリン類縁体を設計した^{37,51}。**1** のヒドロキシル基とアミノルシフェリンのアミノ基はそれぞれ電子供与置換基であり、生物発光活性を増加させる。そのため我々の合成したルシフェリン類縁体では、フェニル基にヒドロキシル基あるいはジメチルアミノ基を導入している。 π 電子構造を改変したルシフェリン類縁体の中で、4-(4-ジメチル-アミノフェニル)ブタジエニル類似体 **22a**((4S)-2-[(1E,3E)-4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-1,3-ブタジエン-1-イル]-4,5-ジヒドロ-4-チアゾールカルボン酸; 図 2-3)は、天然型 *Ppy* ルシフェラーゼにおいて最も波長の長い λ_{bl} 値(675 nm)を持ち、中程度の生物発光活性を示した。この類縁体およびその HCl 塩は、それぞれ AkaLumine(和光純薬工業株式会社、大阪、日本)および Tokeoni(**23**、シグマアルドリッチ、セントルイス、ミズーリ州、アメリカ合衆国)の名称でそれぞれ商品化されている。赤色シフトした **22a** の

発光波長により、Tokeoni を用いた哺乳動物の生物発光イメージングの発光強度が、**1** および Cycluc1 よりも有意に強いことが見出された^{38, 52}。C=C 二重結合による π 電子構造の修飾と同様の方法で、モノエンおよびジエン構造を **1** のベンゾチアゾール部分とチアゾリン部分の間に挿入されたルシフェリン類縁体も合成されている^{53, 54}。モノエンを挿入した類縁体は、*Ppy* ルシフェラーゼ変異体を用いると 706 nm の λ_{bl} 値を示した(野生型 *Ppy* については 670 nm; 図 2-3; **29**)。

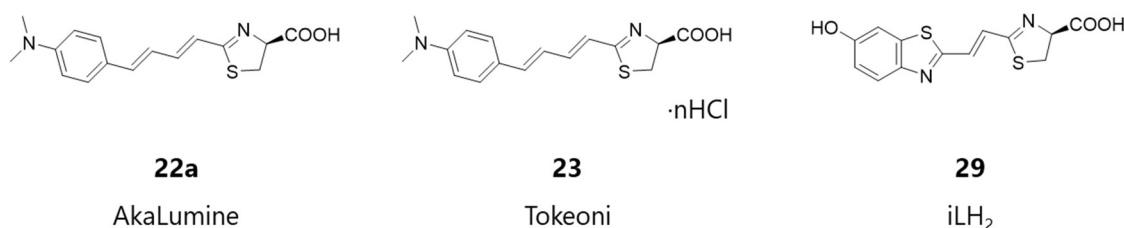


図 2-3 オレフィンによる π 電子改変ルシフェリン類縁体

AkaLumine(**22a**)は新しいルシフェリン類縁体を設計する上で魅力的な化合物である。**22a** の分子形状は線状であり、ブタジエニル部分は分子空間に適合するのに十分なほど柔軟性を持ち、そのため望ましい生物発光活性を得ることが可能であると考えられる。**22a** の生物発光特性を改善するために、我々は骨格構造を維持しながら **22a** の分子構造を微調整することとした。ルシフェリン構造を微調整する方法として我々は最近、**1** のベンゾチアゾールの C6'位に環状アミノ基を有するアミノルシフェリン類縁体の生物発光特性を報告した(図 2-4, **30a-e**)⁵⁵。環状アミノ基は、ジメチルアミノ基と同様の電子供与性を有し、分子環状アミノ基のサイズおよび疎水性はジメチルアミノ基のそれらよりも大きい。したがって、ルシフェリンアナログの分子サイズおよび疎水性は、環状アミノ基の環の大きさを変えることによって適切に調整される。実際に cyclic アミノルシフェリンは、約 625 nm の λ_{bl} 値を示し、ジメチルアミノルシフェリンよりも高い生物発光量子収率(Φ_{bl})を示した。本研究では、AkaLumine にこの手法を適用した環状アミノ基を有する AkaLumine 類縁体 **22b-e**(図 2-5)を合成し、それらの生物発光特性を調べた。さらに *in vivo* 生物発光イメージングも行い、基本的生物発光特性と比較して評価した。

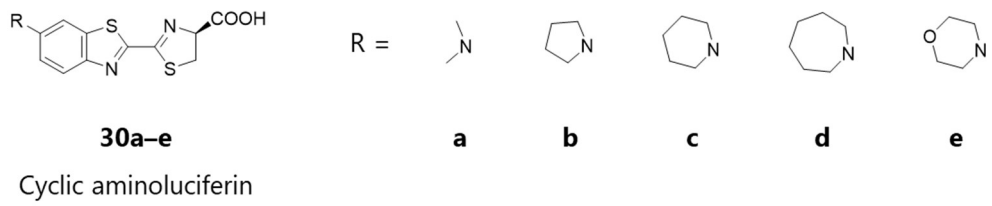


図 2-4 ジメチルアミノルシフェリン(**24a**)および環状アミノルシフェリン(**24b-e**)

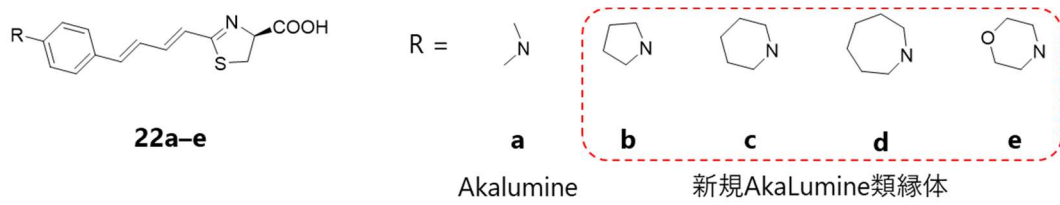


図 2-5 AkaLumine(**22a**)と新規 AkaLumine 類縁体(**22b-e**)

2.2. 環状アミノ基を有する AkaLumine 類縁体の合成

図 2-7 に示す手順で、1-ピロリジニル、1-ピペリジノ、1-アゼパニル、およびモルホリノ基を有する AkaLumine 類縁体(**22b-e**)を合成した³⁷。4-(1-アゼパニル)ベンズアルデヒド **32d** は、4-フルオロベンズアルデヒド **31** をヘキサメチレンイミンで ipso 置換することによって調製した(図 2-6)。

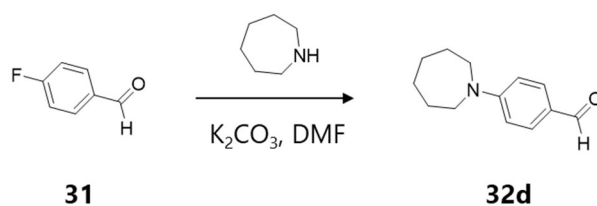


図 2-6 4-アゼパニルベンズアルデヒドの合成

得られたベンズアルデヒド **32d** および市販の **32b**、**32c**、**32e** を 4-ホスホノクロトン酸トリエチルを用いたホーナー・ワズワース・エモンズ反応によりジエンエチルエステル **33b-e** に変換した。エステル **33b-e** を加水分解し、続いて S-トリチル-D-システインメチルエステル(D-Cys(Trt)-OMe)と縮合させ、アミド **34b-e** を得た。**35b-e** のチアゾリン環は、アミド **34b-e** のアミド部分をトリフルオロメタンスルホン酸無水物(Tf_2O)で環化することによって構築した⁵⁶。最後に、**35b-e** を酸加水分解し新規 AkaLumine 類縁体 **22b-e** を合成した。

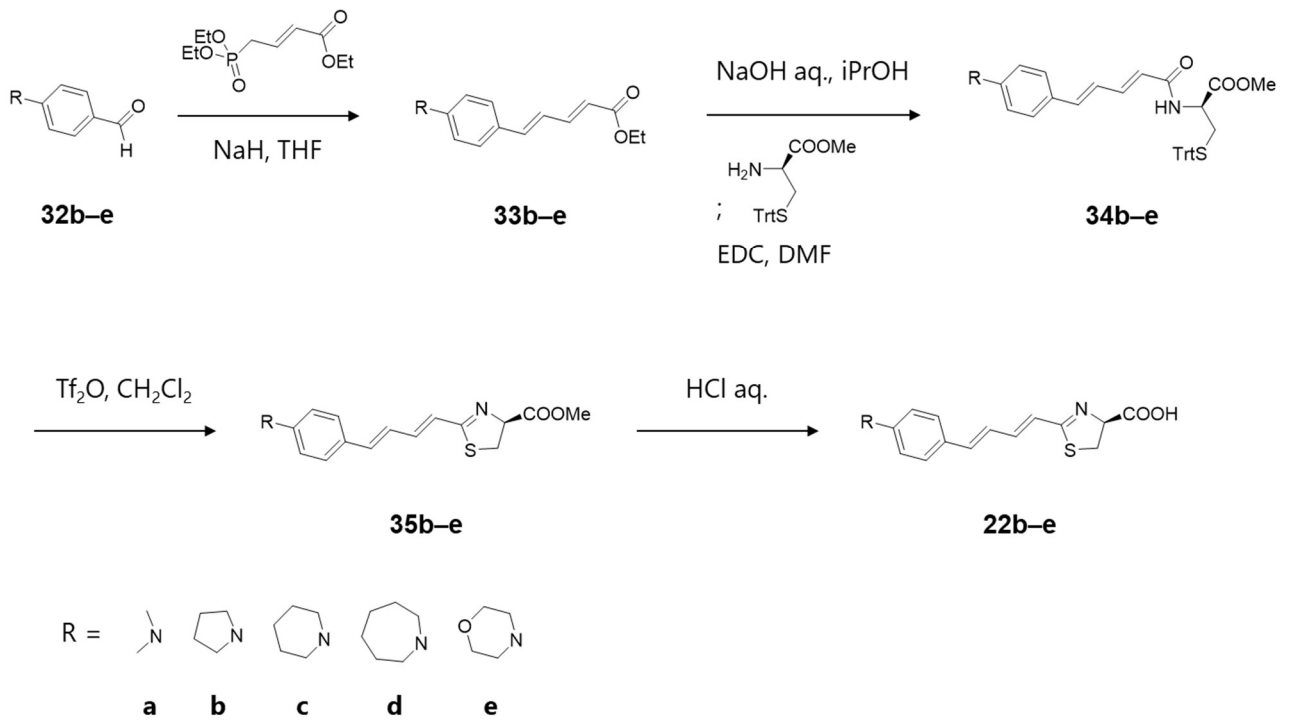
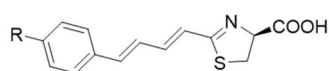
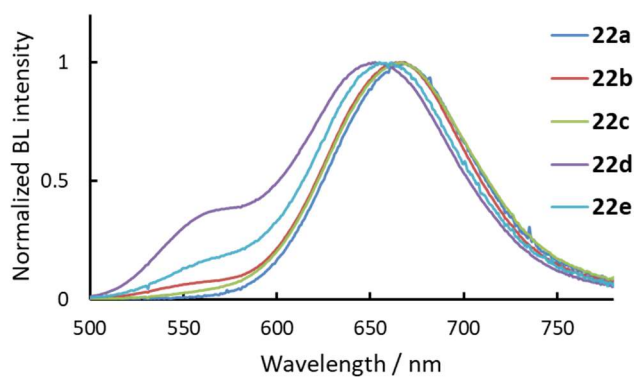


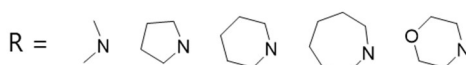
図 2-7 新規 AkaLumine 類縁体 **22b-e** の合成

2.3. AkaLumine および新規類縁体の生物発光特性

pH 8.0 GTA 緩衝液中で北米産ホタル(*Ppy*)ルシフェラーゼを用いて **22a-e** の L-L 反応を調べた(図 2-8 および表 2-1)。1-ピペリジノ類縁体 **22c** は **22a** と同様の単一バンドスペクトルを示し、**22a** および **22c** の λ_{bl} 値は 668 nm および 667 nm を示し、互いに類似していた。**22b**、**22d** および **22e** の生物発光スペクトルは、約 660 nm の主発光バンドと、560 nm 付近の小さな発光バンドを示した。**22b**、**22d** および **22e** の主発光バンドの λ_{bl} 値はそれぞれ 667、665 および 665 nm で観測された。興味深いことに、**22d** の主発光バンドは、**22a** のそれに比べて青色に 12 nm シフトした。**22b**、**22d**、**22e** のマイナー発光バンドは、**1** と同様の波長域で観測された。特に **22d** はマイナーな発光バンドを有意に示した。



22a-e








a b c d e

AkaLumine

図 2-8. AkaLumine(**22a**)と新規 AkaLumine 類縁体(**22b-e**)の生物発光スペクトル

表 2-1 **22a-e** および *Ppy* ルシフェラーゼの生物発光極大波長およびメタノール中の蛍光極大波長

Compound	λ_{bl}^a / nm	λ_{fl}^b / nm (Φ_f)	
		methanol	pH 8.0 GTA 緩衝液
22a 	668	537 (0.016)	571 (0.025)
22b 	(565), 667	545 (0.017)	583 (0.025)
22c 	667	539 (0.019)	600 (0.029)
22d 	567, 656	549 (0.020)	582 (0.032)
22e 	(565), 665	534 (0.016)	575 (0.030)

^a 生物発光極大波長(マイナー発光極大波長) ^b 蛍光極大波長(蛍光量子収率)

22a-e の λ_{bl} 値を評価するために、メタノールおよび pH 8.0 GTA 緩衝液中の **22a-e** の蛍光特性を調べた。蛍光および UV/vis 吸収データを表 2-1、2-2 および図 2-9 に示した。メタノール中の **22a-e** の蛍光発光の最大波長(λ_{fl})は、それぞれ 537, 545, 539, 549 および 534 nm で観察された(表 2-1)。 λ_{bl} 値は本来オキシルシフェリンの蛍光に由来するが、ルシフェリンアナログと対応するオキシルシフェリン類縁体の λ_{fl} 値が互いに相関することがわかっているため(図 2-10)⁵⁷、オキシルシフェリンの代わりに **22a-e** の λ_{fl} 値を用い、発光体であるオキシルシフェリン類縁体 **36a-e** の λ_{bl} 値を予測するのに用いた。すなわち、**22a-e** の λ_{fl} 値は λ_{bl} 値と強く相関すると考えられる。**22a-e** の λ_{fl} 値は、1-ピロリジニルおよび 1-アゼパニル基が、ジメチルアミノ基よりもわずかに長波長化しており、置換基として少しだけ強い電子供与特性を有している。1-ピペリジノ基は、ジメチルアミノ基と同様の電子供与性を有する。モルホリノ基の電子供与性はジメチルアミノ基のそれよりもわずかに弱く、 λ_{fl} 値の青色シフトが小さい。この、**22a-e** の λ_{fl} 値の置換基依存性の変化は、環状アミノルシフェリン類縁体のそれと類似している⁵⁵。この知見を基に λ_{bl} 値を評価すると、**22b**、**22c** および **22e** の主発光バンドの λ_{bl} 値は **22a** のものと類似していた。この主発光バンドの λ_{bl} 値が小さな青色シフトを示さないことは、L-L 反応によって生成された **30a-e** の励起一重項状態が均一溶液中の蛍光特性を反映しないことを示している。すなわち、**22a-e** の λ_{bl} 値は、環状アミノ基の立体特異性および疎水性が *Ppy* ルシフェラーゼの活性部位を調節し、**30a-e** の励起一重項状態の発光特性に影響を与えることを示している。

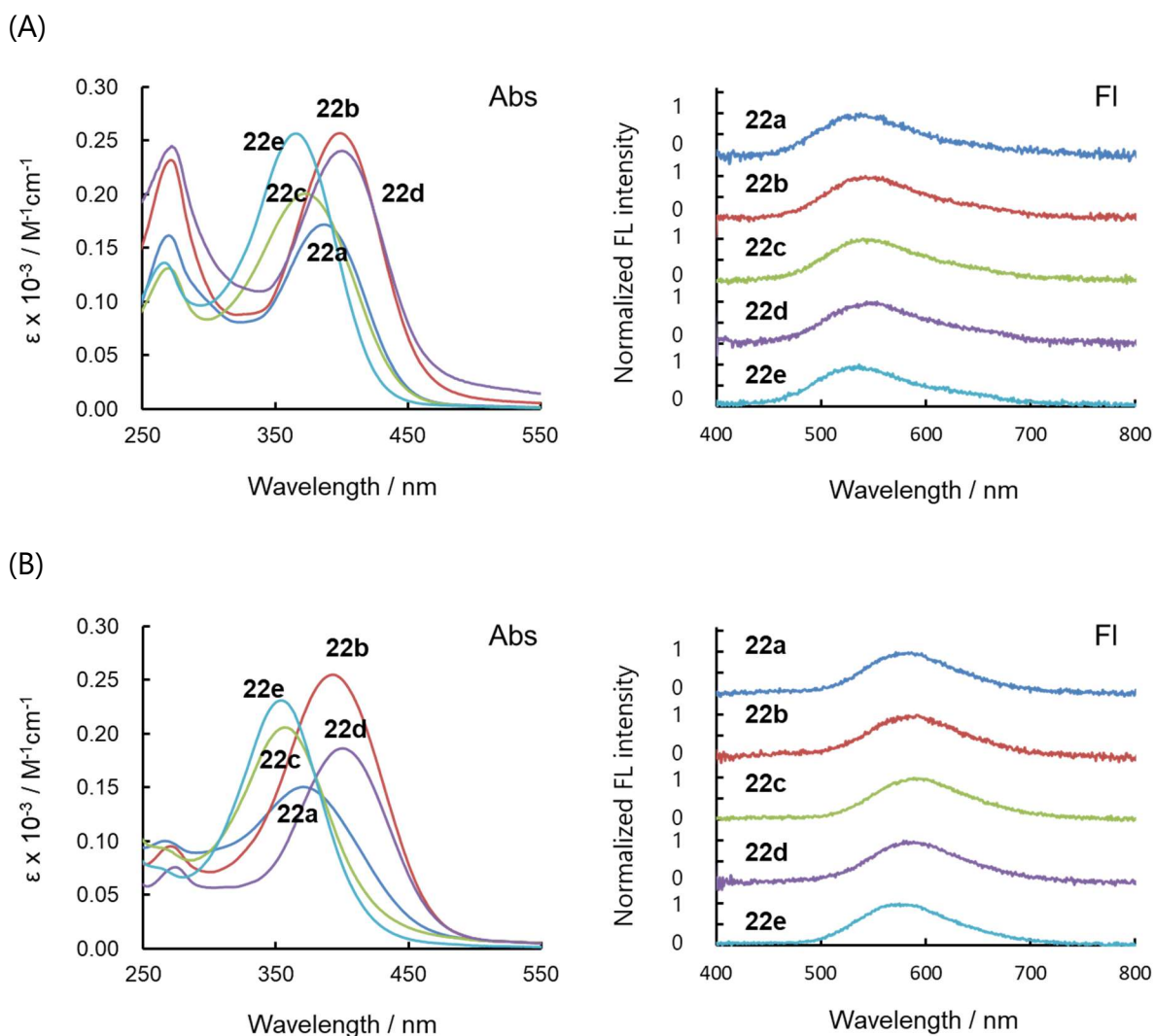







図 2-9 (A)メタノール中および(B) pH 8.0 GTA 緩衝溶液中における **22a–e** の UV/vis 吸収スペクトル(Abs) および蛍光スペクトル(FI)

表 2-2 メタノール中および pH 8.0 GTA 緩衝溶液中における AkaLumine 類縁体 **22a–e** の UV/vis 吸収スペクトル

Solvent	$\lambda_{ab}^a / \text{nm}$				
	22a 	22b 	22c 	22d 	22e 
methanol	387	399	372	401	365
pH 8.0 GTA buffer	363	389	359	402	352

^a 極大吸収波長

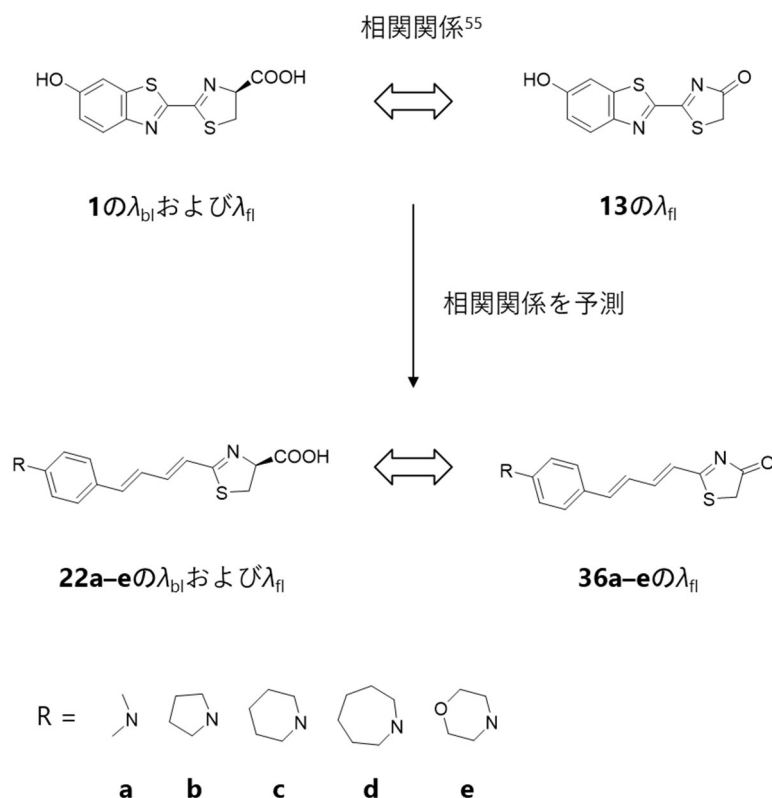


図 2-10 ルシフェリンの発光極大波長と蛍光極大波長およびオキシルシフェリンの蛍光極大波長の相関関係






22a-e の *in vitro* における発光強度および酵素反応特性を調べるために、ミカエリス定数(K_m)および発光反応速度(V_{max})を調べた。 K_m および V_{max} は、GTA 緩衝液中における **22a-e**、Ppy ルシフェラーゼ、 $MgSO_4$ 、および Na_2-ATP との L-L 反応の発光を、ルミノメーターで 30 秒間モニターしその積分値を初速度として測定し、Lineweaver-Burk プロットを用いて計算した(表 2-3)^{23, 24}。**22b-e** の K_m 値(0.22–2.3 μM)は **22a**(0.14 μM)よりも大きく、環状アミノ基の高高さによって、ルシフェラーゼ活性部位と類縁体の結合性の低下が予想される。特に、モルホリノ類縁体 **22e** は、それらの中で最大の K_m 値を示し、モルホリノ基の弱い疎水性特性が **22e** のルシフェラーゼ活性部位に対する親和性を減少させることを示している。**22b-e** の rel. V_{max} 値は **22a** の rel. V_{max} 値より大きく、特に **22b** および **22d** は、それぞれ **22a** よりも 2.2 倍および 3.5 倍の値を示した。

続いて AkaLumine 類縁体 **22a-e** の発光効率を調べるために、Ppy ルシフェラーゼと **1** の報告値を用

いて、**22a-e** の生物発光量子収率(Φ_{bl})を相対的に決定した^{29,30}。 Φ_{bl} は GTA 緩衝液中における **22a-e** の L-L 反応の発光スペクトルを、AB-1850 分光光度計を用いて反応が完了するまで測定し、分子数当たりの発光スペクトルの面積比から **1** の報告値($\Phi_{bl} = 0.476$)を基に相対的に算出した(表 2-3)。**22a-e** の Φ_{bl} 値はそれぞれ 0.0050, 0.020, 0.0064, 0.0062, 0.0043 と決定した。**22c-e** の Φ_{bl} 値は **22a** と近似しており、1-ピロリジニル類縁体 **22b** はその中で最も大きな値を示した。メタノール中の **22a-e** の蛍光量子収率(Φ_{fl})はほぼ同一であった(約 0.02)が、**22b** が高い Φ_{bl} 値を示した原因はおそらく、ルシフェラーゼ活性部位における oxy-**22b** の Φ_{fl} 値の改善によって引き起こされた可能性がある。また別の要因として、**22b** の L-L 反応の化学励起効率(Φ_s)が上昇した可能性もある。**22b** 中の 1-ピロリジニル基の分子サイズおよび疎水性は、**22a** 中のジメチルアミノ基の構造と比較し、ルシフェラーゼ活性部位へより適切な結合を構築するため、 Φ_{bl} 値を増加させるものと考えられる。

さらに、AkaLumine 類縁体 **22a-e** の酵素反応性を調べるために、相対反応速度定数(rel. k_{cat})を求めた。 k_{cat} 値は V_{max} 値を Φ_{bl} 値で除して算出される³¹。Rel. k_{cat} 値を、**22a** の値を基準として比較した(表 2-3)。興味深いことに、Rel. V_{max} 値が大きな値を示した **22b** および **22d** のうち、1-アゼパニル類縁体 **22d** のみがより大きな rel k_{cat} 値を示した。 k_{cat} 値が **22a** よりも大きいことから、**22d** の 1-アゼパニル環の柔軟性によりルシフェラーゼ反応活性部位との反応を容易にし、酵素反応が促進されることが示唆された。これは以前の研究の 6'-(1-アゼパニル)アミノルシフェリンも同様な傾向が見られた⁵⁵。また、**22b** の Rel. k_{cat} 値は、**22a** のほぼ半分であり、 Φ_{bl} 値の向上による効果により V_{max} 値が向上していることが判明した。

表 2-3 **22a-e** の *Ppy* ルシフェラーゼによる生物発光特性およびメタノール中における蛍光特性

Compound	Φ_{bl}^a	$K_m^b / \mu\text{M}$	rel. V_{max}^c	rel. $k_{cat}^{c,d}$
22a 	0.0050	0.14	1.0	1.0
22b 	0.020	0.22	2.2	0.54
22c 	0.0064	0.53	0.47	0.37
22d 	0.0062	0.71	3.5	2.8
22e 	0.0043	2.3	0.81	0.96

^a 発光量子収率(Φ_{bl})は **1** および *Ppy* の報告値(Ref.28)から求めた. 誤差 10%以内. ^b 誤差 10%以内. ^c 相対発光反応速度(Rel. V_{max})、相対酵素反応速度定数(rel. k_{cat})は **22a** の値を 1.0 とした際の相対比で表した. 誤差 8%以内. ^d rel. k_{cat} 値は Rel. V_{max} 値を Φ_{bl} 値で除して求めた

2.4. Akaumine とその新規類縁体および対応するオキシルシフェリンの DFT 計算

電子特性に基づいて AkaLumine 類縁体 **22a-e** の生物発光波長を評価するために、基底関数 B3LYP/6-31+G(d)を用いて **22a-e** および対応するオキシルシフェリン **36a-e** の DFT および TD-DFT 計算を行った。結果を表 2-4 にまとめた。形成熱が最も低い **22a-e** の最適化構造は、図 2-11 に示すようなチアゾリン環とジエン部分との間の単結合の立体配座を有する。この結果は、*Luciola cruciate* ルシフェラーゼと **30a** の共結晶構造と適合した⁵⁸。**22a-e** の構造を維持しながら **36a-e** の構造を最適化した。

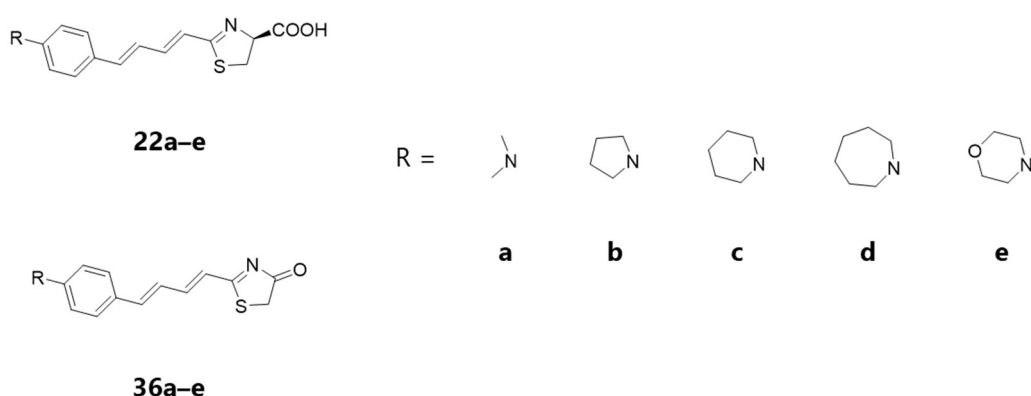












図 2-11 AkaLumine 類縁体 **22a-e** と対応する AkaLumine 類縁体のオキシルシフェリン **36a-e** の構造

すべての化合物の $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移は、 $\pi-\pi^*$ 特性を有する HOMO-LUMO 遷移からなる。**22a-e** の HOMO と LUMO との間のエネルギーギャップ(ΔE_{H-L})および遷移エネルギーから推定される遷移波長(λ_{tr})は、メタノール中の **22a-e** の λ_{fl} 値と同様の変化を示す(表 2-1)。すなわち、**22b** および **22d** の λ_{tr} 値は **22a** の λ_{tr} 値よりもわずかに長く、**22a** および **22c** の λ_{tr} 値は互いに類似している。モルホリノ類縁体 **22e** は、短波長シフトした λ_{tr} 値を示した。**36a-e** の λ_{tr} 値の変化は、**22a-e** のものと同様の傾向を示したが、**30a-e** の λ_{tr} 値は **22a-e** のものよりも長い。すべての化合物の $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の振動子強度(f)は約 1.4 であり、励起された **36a-e** の一重項状態から S_0 への遷移が起こりやすいことを示している。この蛍光発光は、遷移エネルギーが小さいために Fermi の golden 則に従って効率的な競合内部変換と競合はしながらかも、発光過程が進むと予測できる。そのため **22a-e** は良好な発光体であると予測される。

表 2-4 **22a-e** および **36a-e** の B3LYP/6-31+G(d)を用いた DFT および TD-DFT 計算

Compound	HOMO /eV	LUMO /eV	ΔE_{H-L}^a /eV	Transitions ^b	λ_{tr}^c / nm (f^d)	Configuration ^{e, f}
22a 	-5.25	-2.01	3.24	$S_0 \rightarrow S_1$	395 (1.40)	H \rightarrow L (0.70)
22b 	-5.15	-1.96	3.19	$S_0 \rightarrow S_1$	401 (1.48)	H \rightarrow L (0.70)
22c 	-5.37	-2.10	3.27	$S_0 \rightarrow S_1$	394 (1.43)	H \rightarrow L (0.70)
22d 	-5.18	-1.98	3.20	$S_0 \rightarrow S_1$	402 (1.48)	H \rightarrow L (0.70)
22e 	-5.50	-2.18	3.32	$S_0 \rightarrow S_1$	387 (1.44)	H \rightarrow L (0.70)
36a 	-5.54	-2.65	2.89	$S_0 \rightarrow S_1$	439 (1.38)	H \rightarrow L (0.70)
36b 	-5.46	-2.61	2.85	$S_0 \rightarrow S_1$	445 (1.46)	H \rightarrow L (0.70)
36c 	-5.64	-2.73	2.91	$S_0 \rightarrow S_1$	440 (1.38)	H \rightarrow L (0.70)
36d 	-5.47	-2.63	2.84	$S_0 \rightarrow S_1$	447 (1.46)	H \rightarrow L (0.70)
36e 	-5.78	-2.80	2.98	$S_0 \rightarrow S_1$	432 (1.39)	H \rightarrow L (0.70)

^a HOMO-LUMO エネルギーギャップ ^b 最低励起エネルギーを示す遷移 ^c 遷移エネルギーから見積もられた波長 ^d 振動子強度 ^e 配置間相互作用 ^f H および L は HOMO、LUMO を表す

22b、**22d** および **22e** の生物発光スペクトルでは、約 560 nm でマイナー発光バンドが観察された。青色シフトした原因として、励起されたオキシルシフェリンの構造の π 電子共役系が弱くなった可能性が上げられる。**36a** 構造の中の単結合部分の回転を考慮すると、ジメチルアミノ基とフェニル環との間 ($C_6H_4-NMe_2$) の単結合の回転によるねじれが π 電子特性に効果的に影響し、HOMO および LUMO のエネルギーレベルを最も大きく変化させることを DFT 計算により見出した(表 2-5 および図 2-12)。 ΔE_{H-L} 値は、ジメチルアミノ基の電子供与効果の低下により、 $C_6H_4-NMe_2$ 結合のねじれ角が大きくなると大きく増加した。従って、青色にシフトした **22b**、**22d** および **22e** のマイナー発光バンドは、ルシフェラーゼ活性部位の環式アミノ基の捻れに由来するのではないかと予想している。

表 2-5 AkaLumine オキシルシフェリン **36a** のジメチルアミノ基およびフェニル間のねじれ(0°-90°)構造

の B3LYP/6-31+G(d)を用いた DFT および TD-DFT 計算

Compound	Dipole moment /D	HOMO /eV	LUMO /eV	ΔE_{H-L} ^a /eV	Transitions ^b	λ_{tr} ^c / nm (f^d)	Configuration ^{e, f}
C-NMe2_0°	12.9	-5.54	-2.65	2.89	S ₀ → S ₁	439 (1.38)	H → L (0.70)
C-NMe2_30°	11.6	-5.64	-2.71	2.92	S ₀ → S ₁	435 (1.36)	H → L (0.70)
C-NMe2_60°	10.3	-5.79	-2.80	2.98	S ₀ → S ₁	431 (1.24)	H → L (0.70)
C-NMe2_90°	8.85	-6.08	-2.92	3.15	S ₀ → S ₁	423 (0.82)	H → L (0.70), H-1 → L (0.18)

^aHOMO-LUMO エネルギーギャップ ^b最低励起エネルギーを示す遷移 ^c遷移エネルギーから見積もられた波長 ^d振動子強度 ^e配置間相互作用 ^fH, H-1 および L は HOMO, HOMO-1, LUMO を表す

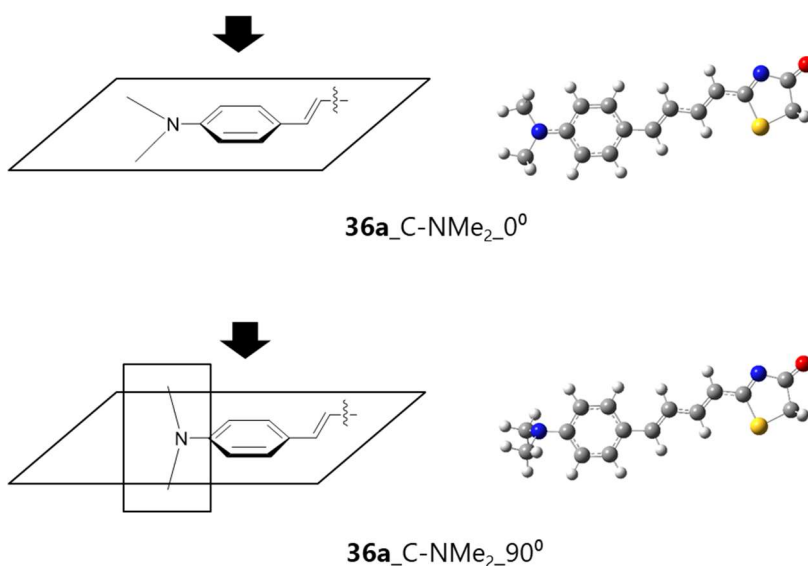


図 2-12 DFT 計算[B3LYP/6-31+G(d)]により最適化された AkaLumine オキシルシフェリン **36a** のジメチルアミノ基およびフェニル間のねじれ(0°および 90°)構造

2.5. AkaLumine とその新規類縁体およびホタルルシフェリンの生物発光イメージング特性

AkaLumine **22a** およびその類縁体 **22b-e** と天然型ホタルルシフェリン **1** を用いて、*in vivo* 生物発光イメージングを行った。生物発光イメージングは、3つの独立した Ppy ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 Venus 発現マウス⁵⁹ を用いて行った。イメージング像は、1 mM **22a-e** および **1** の 20%メタノール含有リン酸緩衝化生理食塩水を腹腔投与し、生物発光イメージング装置を用いて 5 秒間露光で 5,400 秒間モニターすることによって得た。*In vivo* 生物発光イメージングを図 2-13 および 2-14 に示す。**22b** を用いたマウス全身生物発光イメージング総発光強度は、**22a** の発光強度よりも約 2 倍大きかったが、**22c-e** の発光強度は小さかった(図 2-13)。**22b-e** を用いた生物発光イメージング強度の時間経過は、**22a** と同様の立ち上がりおよび減衰傾向を示す(図 2-14)。**22b** の強い発光強度は、**22b** との L-L 反応が **22a** よりも高い Φ_{bl} 値を示すという知見に対応する。**22b** および **22c** で得られた生物発光イメージング画像では、IP 投与腹部以外の部分も強い発光を示したが、**1** を用いた生物発光イメージングは、IP 投与腹部周囲にのみ強い発光を示した。これは、**22b** および **22c** が **1** よりも高い血液移動性を有し、**22b** および **22c** の分布性が高いことを示している(図 2-15、2-16 および表 2-6)。一般に、薬物の透過性および分布は、化合物の親水性特性のオクタノール/水 分配比率 LogP と相関する^{60, 61}。ChemDraw により計算した LogP および ClogP と腹腔部分(abdomen)とそれ以外(other)の比率は相関を示し、分配率がルシフェリンの体内動態を評価する指標になることを示した。

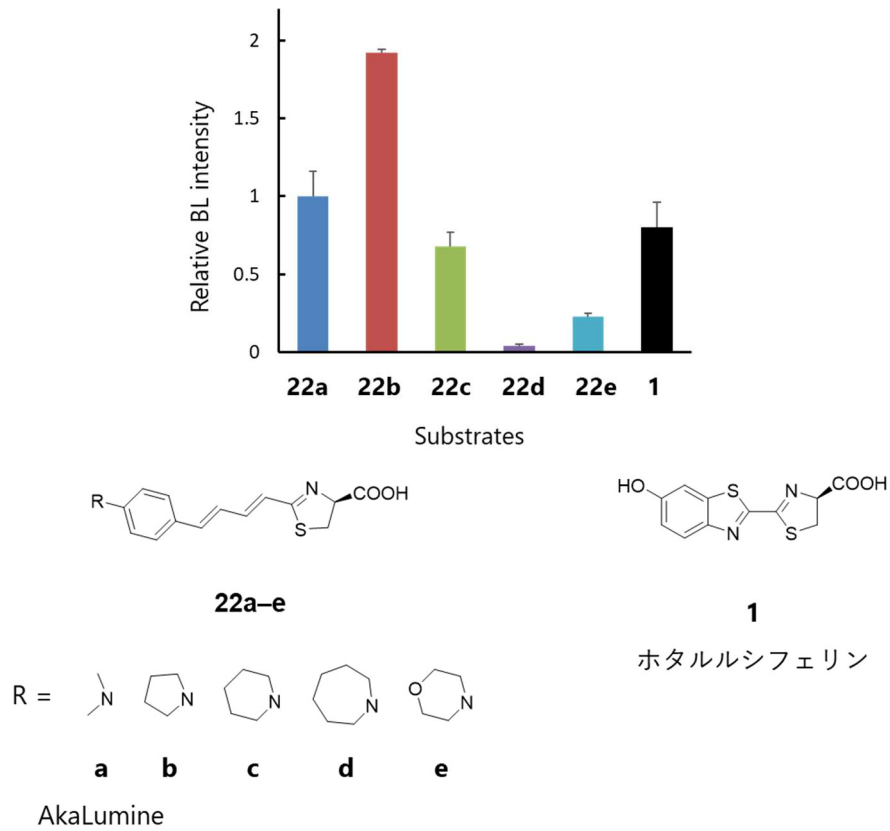


図 2-13 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** と **1** の *in vivo* 生物発光イメージングにおける相対発光強度

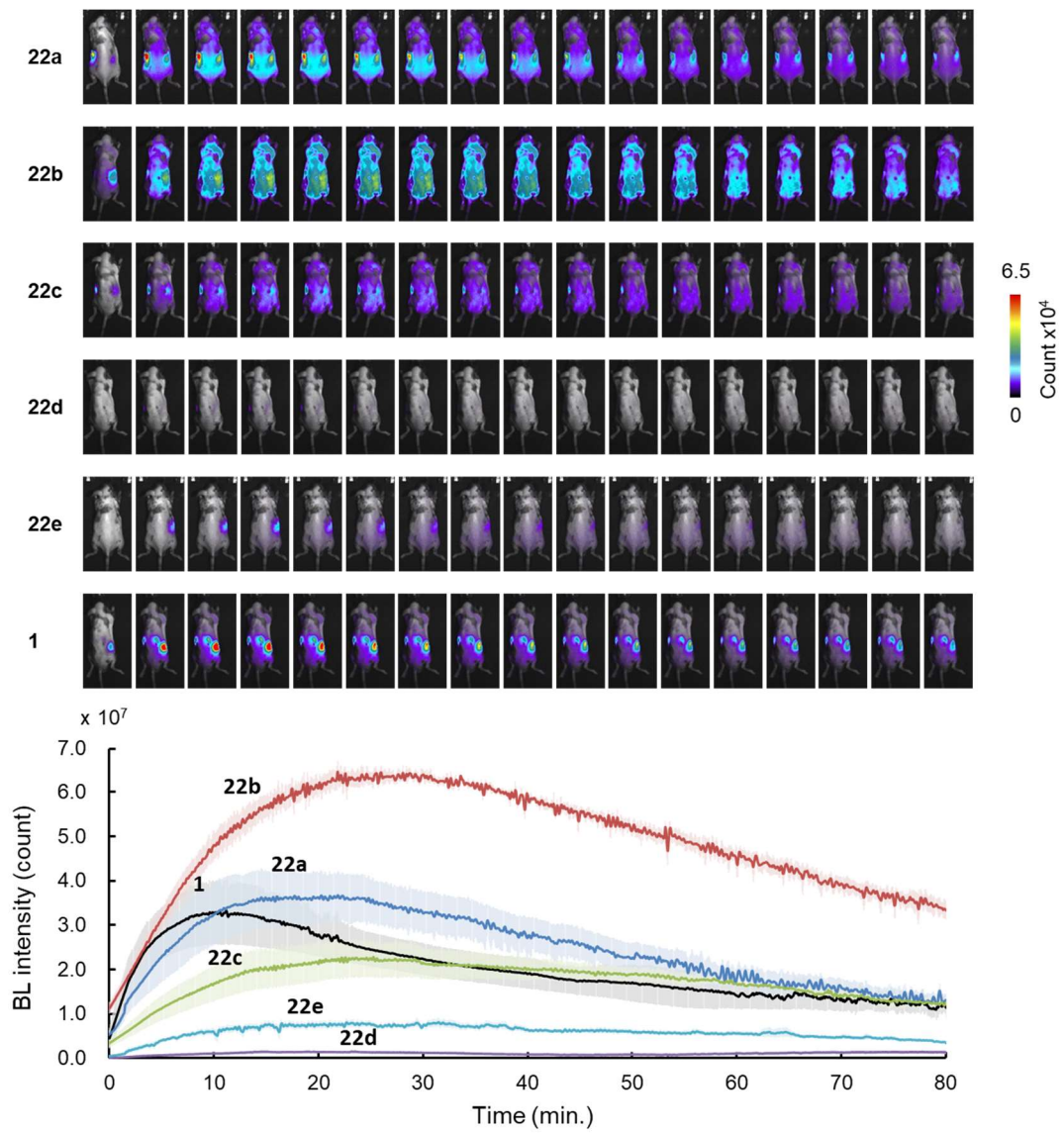


図 2-14 AkaLumine22a およびその類縁体 22b-e と 1 の *in vivo* 生物発光イメージング画像および生物発光強度の経時変化

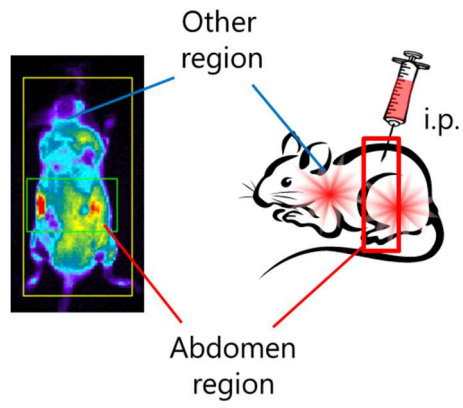


図 2-15 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** とホタルルシフェリン **1** の *in vivo* 生物発光イメージング画像における腹腔部分(abdomen)とそれ以外(other)の発光の範囲

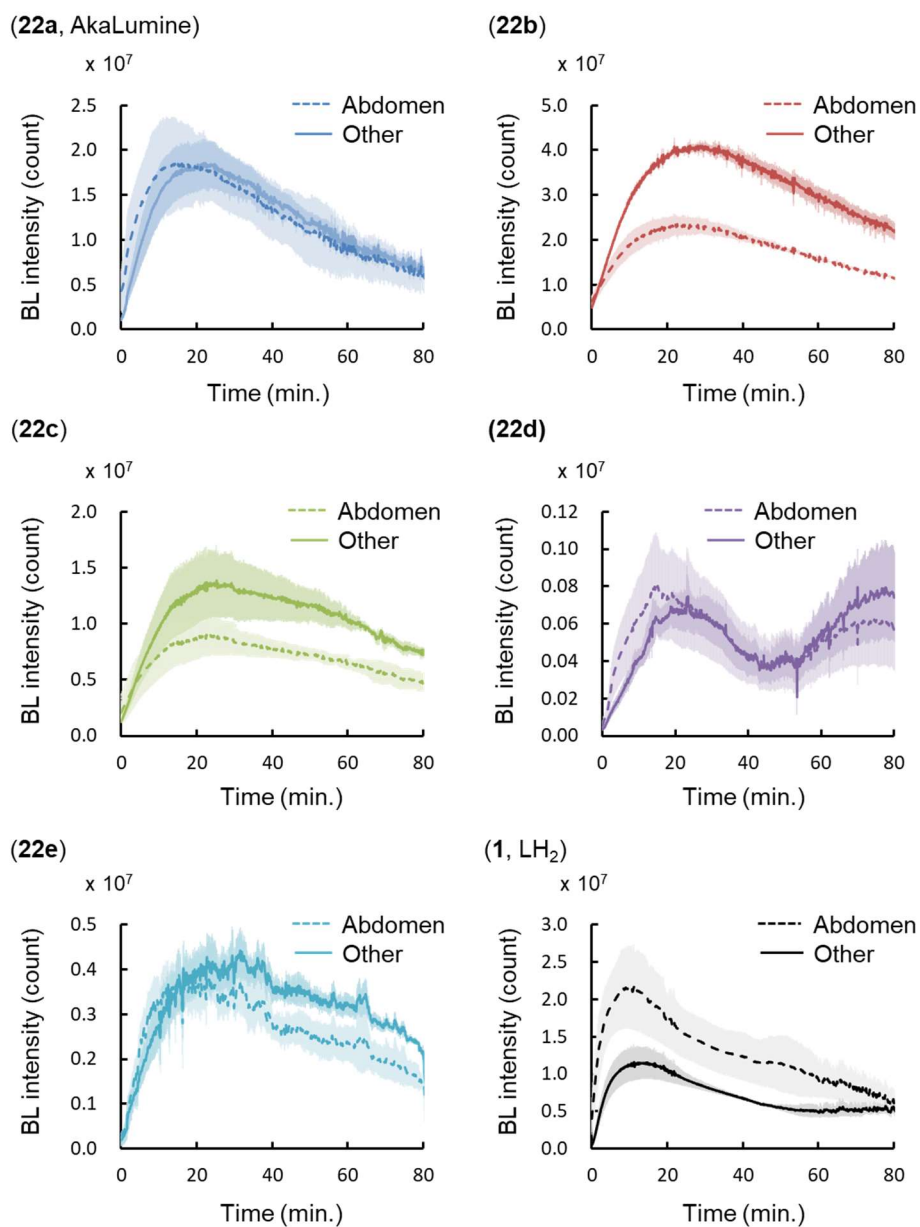


図 2-16 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** とホタルルシフェリン **1** の *in vivo* 生物発光イメージングにおける腹腔部分(abdomen)とそれ以外(other)の発光経時変化

表 2-6 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** とホタルルシフェリン **1** の *in vivo* 生物発光イメージングにおける腹腔部分(abdomen)とそれ以外(other)の発光強度の比率と LogP の関係

Compound	Rel. Other/abdomen ^a	Log P ^a	ClogP ^a
1	0.57	2.53	1.87
22a	1.0	3.20	3.15
22b	1.7	3.51	3.27
22c	1.4	3.93	3.83
22d	1.1	4.35	4.39
22e	1.1	2.80	2.45

^a 腹腔付近(abdomen)とそれ以外(Othe)の発光強度の比率を、**22a** を 1.0 としたときの相対比で表した。

^b LogP および ClogP は Chemdraw professional (version 13.0)を用いて計算した。

しかし興味深いことに、**22a** と同等の ϕ_{bl} 値を示した **22d** は生物発光イメージング強度が最も弱かった(4%)。**22d** の Venus-Ppy ルシフェラーゼ発現 HeLa 細胞を用いた細胞ベースのアッセイでは、図 2-8 に示す生物発光スペクトルとは異なる 567 nm に λ_{bl} 値を有する生物発光スペクトルが得られた(図 2-17 および表 2-7)。*in vivo* 条件下の **22d** の L-L 反応では、活性中心と基質が結合する際に 1-アゼパニル基がねじれて酵素に取り込まれたため、組織に吸収されやすい短波長シフトした発光波長を主に示したと推測される。これにより、生物発光イメージング強度が低いものと考えられる。

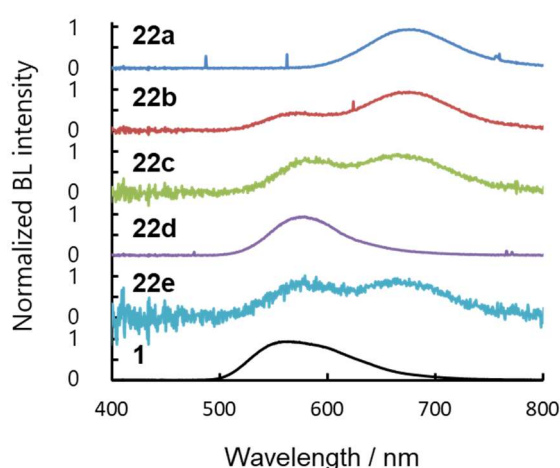


図 2-17 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** とホタルルシフェリン **1** の Venus-Ppy 発現 HeLa 細胞を用いたときの生物発光スペクトル。

表 2-7 AkaLumine**22a** およびその類縁体 **22b-e** とホタルルシフェリン **1** の *in vitro* および細胞中における生物発光極大波長

Compound	<i>in vitro</i> λ_{bl} / nm	<i>in cell</i> λ_{bl} / nm
1	570 ^a	563, 601
22a	668	664
22b	(565), 667	564, 668
22c	667	575, 660
22d	567, 656	572
22e	(565), 665	571, 656

^a Ref. 27

2.6. まとめ

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ホリノ基)を有する新規 AkaLumine 類縁体 **22b-e** を合成し、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。すべての類縁体の主な生物発光極大波長 λ_{bl} 値は、AkaLumine(**22a**)と類似して約 670 nm の赤色領域に存在し、また **22b**、**22d** および **22c** は約 560 nm の青色シフトしたマイナー発光バンドを示した。これらのマイナー発光バンドは DFT 計算による予測により、 $C_6H_4-NMe_2$ 結合のねじれの影響であると推測された。活性中心と基質が結合する際に、類縁体の一部がねじれて取り込まれたためと考えられる。発光量子収率 Φ_{bl} 値および速度論による Kinetics 定数(K_m 、rel. V_{max} および k_{cat})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-ピロリジニル類縁体 **22b** が最も高い Φ_{bl} 値を示し、1-アゼパニル類縁体 **22d** が最も高い k_{cat} 値を示した。**22b-e** の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、酵素反応速度定数および生物発光量子収率を含む生物発光特性を微調整するのに役立つことが見出された。**22b-e** の λ_{bl} 値は、それらの蛍光特性 λ_{fl} 値の比較、および DFT および TD-DFT 計算によって得られた対応するオキシルシフェリン構造の **oxy-22b-e** の π 電子特性と相関されることを明らかにした。**22a-e** を有する生物発光イメージングの結果は、高い Φ_{bl} 値を有する 1-ピロリジニル類縁体 **22b** が最も明るい画像を与え、生物発光特性の改善が生物発光イメージング特性の改善に直接的に寄与することを示している。ルシフェリン類縁体の分子構造の微調整に加えて、より望ましい生物発光特性のためにルシフェラーゼ変異体で最適化する必要がある。

3. 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

3.1. はじめに

生物発光反応は低侵襲的かつ高感度な測定法として、個体の一分子イメージングや細菌検査等に利用されている³⁹。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。そのため生物発光イメージングは、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で最も広く使用されている発光系は、ホタルルシフェリンとホタルルシフェラーゼによる L-L 反応である。天然ホタルルシフェリン(**1**)は比較的波長が長い(生物発光極大波長、 $\lambda_{bl} = 560$ nm)光を生成する。“生体の光学窓(optical window)”領域($\lambda = 650\text{--}900\text{nm}$)波長は、組織光透過性が高く(図 1-16)³⁵、また散乱も比較的小さいことが知られており(図 1-17)³⁶、生物発光イメージングにおいて最適な波長域である。近年、Cycluc1(**27**)⁴⁶や AkaLumine(**22a**)³⁷など長波長発光(それぞれ $\lambda_{bl} = 599$ 、675 nm)を示すホタルルシフェリン類縁体が合成され、高い生物発光イメージング活性を示した^{48,38}。しかし、ホタルルシフェリンの L-L 反応は、ATP や Mg^{2+} 等の補因子を必要とし、さらに酵素反応速度定数(K_{cat})が小さく生物発光活性が低い。

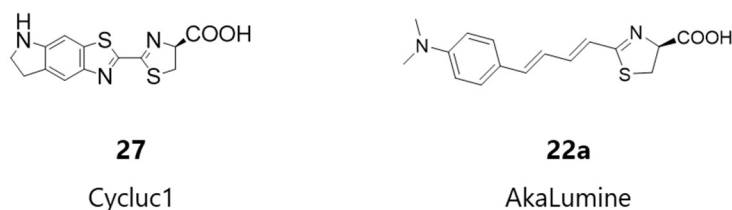


図 3-2 Cycluc1(**27**)および AkaLumine(**22a**)

一方、セレンテラジン(**2**)およびセレンテラジン類縁体も広く生物発光アッセイに利用されている。セレンテラジンによる L-L 反応は酵素反応速度定数が大きく、生物発光活性が高いため高輝度で発光する⁶²。近年は、発光エビ(Oplophorus 属)由来のルシフェラーゼ変異体 nanoluc®およびその特異的基質 furimazine **11a**による組み合わせにより、高輝度な発光システムを構築可能である(図 3-3)⁸。しかし、

比較的短波長領域で発光するセレンテラジン類縁体($\lambda_{bl} \leq 550$ nm)が多く、生物発光イメージングではやや不利とされてきた。

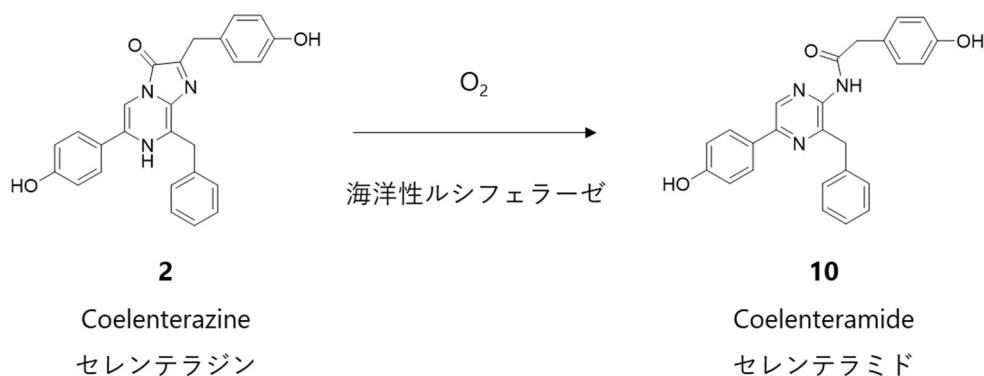


図 3-1 セレンテラジンおよびセレンテラミドの構造およびその発光

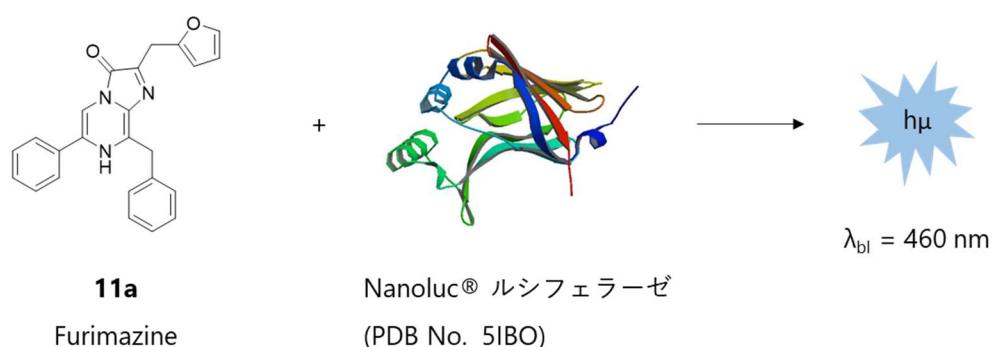


図 3-3 Furimazine および nanoluc ルシフェラーゼ

セレンテラジンの生物発光波長制御は、イミダゾピラジノン構造の C'5、C'6 および C'8 位における修飾によって決定される⁶³。Wu らは、C'6 位、C'8 位に芳香環を導入したセレンテラジン類縁体 **37** を合成し、カイアシ(Gaussia 属)ルシフェラーゼとの L-L 反応により長波長発光を示すことを見出した⁶⁴。井上らは、C-5 位と C-6 位 p ヒドロキシフェニル置換基との間に炭素架橋を形成したセレンテラジン類縁体 **38** を合成し、長波長シフトすることを示した⁶⁵。また井上らは、C'8 位に電子供与性芳香環を導入したセレンテラジン類縁体 **39** を合成し、その赤色シフトを確認した⁶⁶。Giuliani らは、C'8 位に S 原子を導

入したセレンテラジン類縁体 **40** を合成し、その赤色シフトを確認した⁶⁷。Anton らは、Furimazine (**32a**) の構造を基に C'6 位に電子供与性芳香環を導入しかつ、C'8 位に電子吸引性芳香環を導入した Furimazine 類縁体 **11b** は、nanoluc®ルシフェラーゼを用いて長波長発光($\lambda_{bl} = 592 \text{ nm}$)を示した⁶⁸。

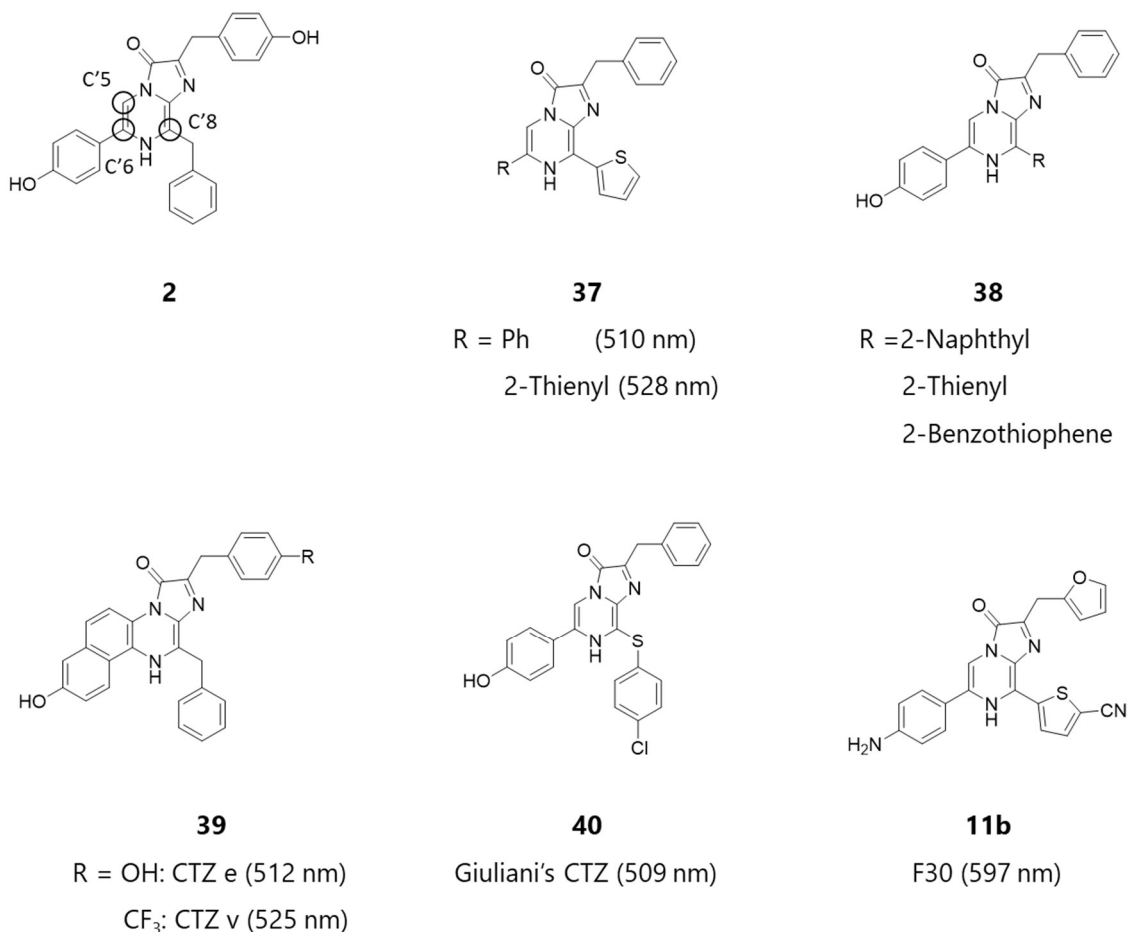
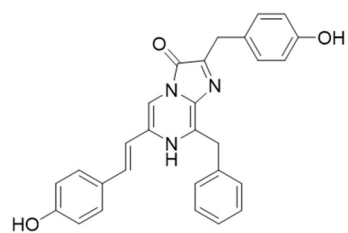


図 3-4 セレンテラジン **2** と長波長発光を示すセレンテラジン類縁体

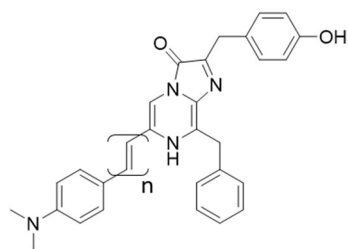
近年、西原らは C'6 位にスチリル基を持ったセレンテラジン類縁体 **41** (6-pi-OH-CTZ および 6-pi-H-CTZ)を合成し、オレフィンの共役系が生物発光波長の赤色シフトを促す効果を確認した(図 3-5)⁶⁹。オレフィン構造は直線的であり、赤色ホタルルシフェリン類縁体 AkaLumine(**22a**)に見られる通り、共役系を拡張しつつ、酵素活性を阻害することなく生物発光活性を維持できるものと推測される。6-pi-OH-CTZ の C'6 位にオレフィンを導入することで長波長化が可能であるという知見を基に、オレフィンのさらなる伸張を行うことによる波長制御およびそれに伴う長波長化を達成できると考えた。



41

R = H: 6-pi-OH-CTZ

= OH: 6-pi-H-CTZ



42a: n = 0

42b: n = 1

42c: n = 2

42d: n = 3

図 3-5 C'6 位オレフィン導入セレンテラジン類縁体 **41** および新規セレンテラジン類縁体 **42a-d**

3.2. 新規セレンテラジン類縁体の合成

次に示す手順で、セレンテラジン類縁体 **42a-d** の合成を行った。

4-(ベンジルオキシ)ベンジルクロリド(**43**)とマグネシウムを用いてグリニャール試薬を調整し、ジエトキシ酢酸エチル((EtO)₂AcOEt)と反応させ、続くパラジウム/炭素および水素による水素添加反応によりベンジルを脱保護し、ケトアセタール **44** を合成した (図 3-6)。

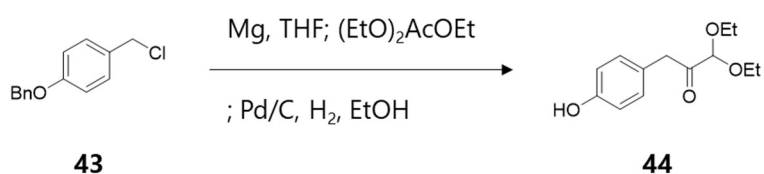


図 3-6 ケトアセタール **44** の合成

2-アミノ-3, 5-ジブromoアミノピラジン **45** とベンジルマグネシウムクロリドおよびビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II)ジクロリド(Pd(PPh₃)₂Cl₂)を用いたカップリング反応により、2-アミノ-3-ベンジル-5-ブromoアミノピラジン **46** を合成した。続いて、得られた **46** と 4-(ジメチルアミノ)フェニル硼酸を用いて鈴木・宮浦カップリングを行い、アミノピラジン誘導体 **48a** を合成した。最後に、得られたアミノピラジン誘導体(**48a**)とケトアセタール体(**44**)を塩酸条件下で縮合環化させ、対応する新規直結型セレンテラジン類縁体(**42a**)を合成した (図 3-7)。

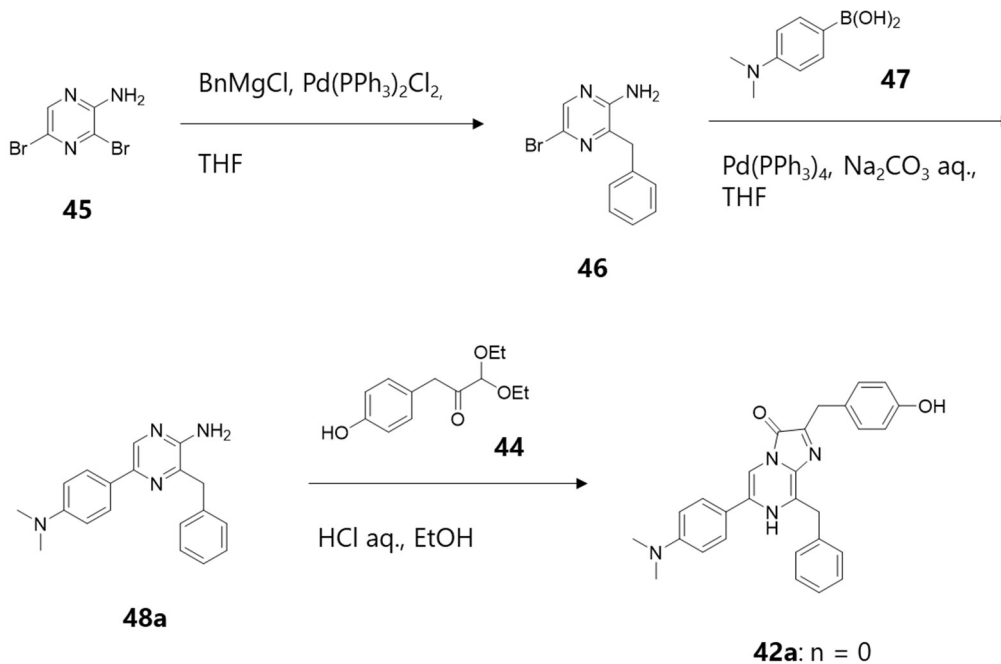


図 3-7 新規直結型セレンテラジン類縁体(42a)の合成

また、モノおよびジエンセレンテラジン類縁体(42b, 42c)は以下の通り合成した(図 3-8)。市販の 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド(49)および 4-ジメチルアミノシナムアルデヒド(50)から、ビス[(ピナコラト)ボリル]メタンを用いたボロン-ウィッティヒ反応⁷⁰を用いて、ジメチルアミノフェニル基を有するモノ、ジエン-ピナコールボランエステル 52b および 52c を合成した。続いて 42a の合成と同様に、得られた 52b、52c および 46 から鈴木・宮浦カップリング反応を行いそれぞれモノ、ジエンアミノピラジン誘導体 48b および 48c を合成した。最後に得られた 48b、48c を 44 との縮合環化反応を行い、対応する新規モノおよびジエンセレンテラジン類縁体 42b および 42c を合成した。

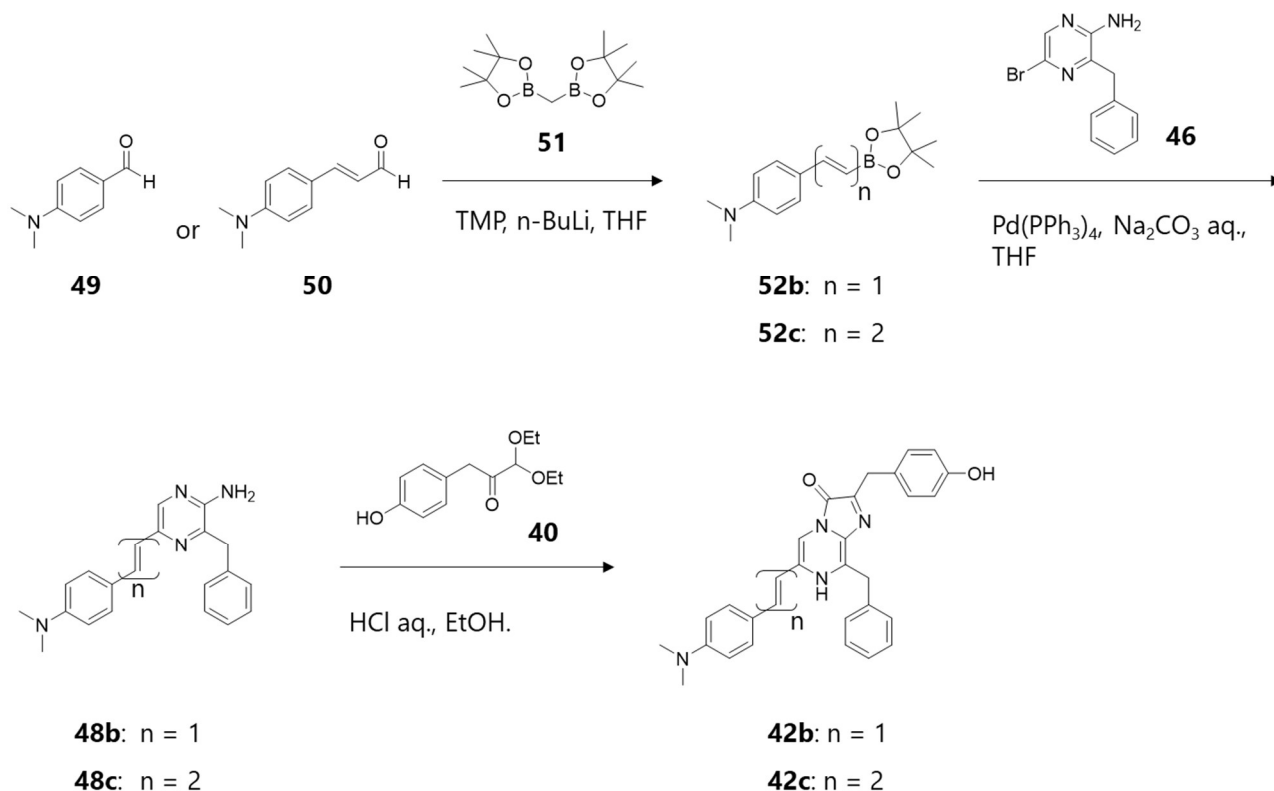


図 3-8 新規モノおよびジエンセレンテラジン類縁体(**42b**, **42c**)の合成

4-ジメチルアミノシナムアルデヒド(**50**)から2-(1,3-ジオキソラン-2-イル)エチルトリフェニルホスホニウムブロミドを用いたウィッティヒ反応および続く酸加水分解を経て、ジエンアルデヒド **53** を合成した (図 3-9)。

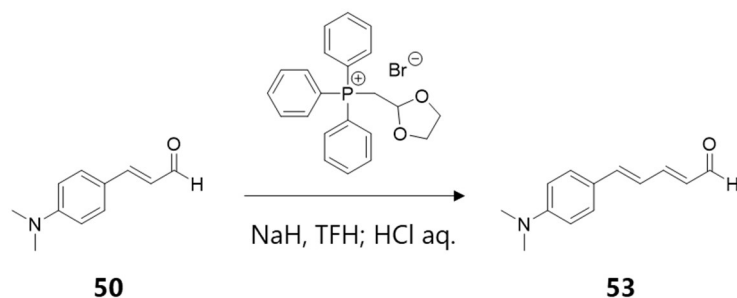


図 3-9 ジエンアルデヒド **53** の合成

続いて **42b** および **42c** の合成と同様に合成を行った(図 3-10)。得られたジエンアルデヒド **53** とビス

[(ピナコラト)ボリル]メタンを用いたボロン-ウィッティヒ反応によりトリエン-ピナコールボランエステル **52d** を得た。続いて、得られたボランエステル **52d** と **42** を鈴木・宮浦カップリング反応によりトリエンエンアミノピラジン誘導体 **48d** を合成し、続く **44** との縮合環化反応を経て、対応する新規トリエンセレンテラジン類縁体 **42d** を合成した。

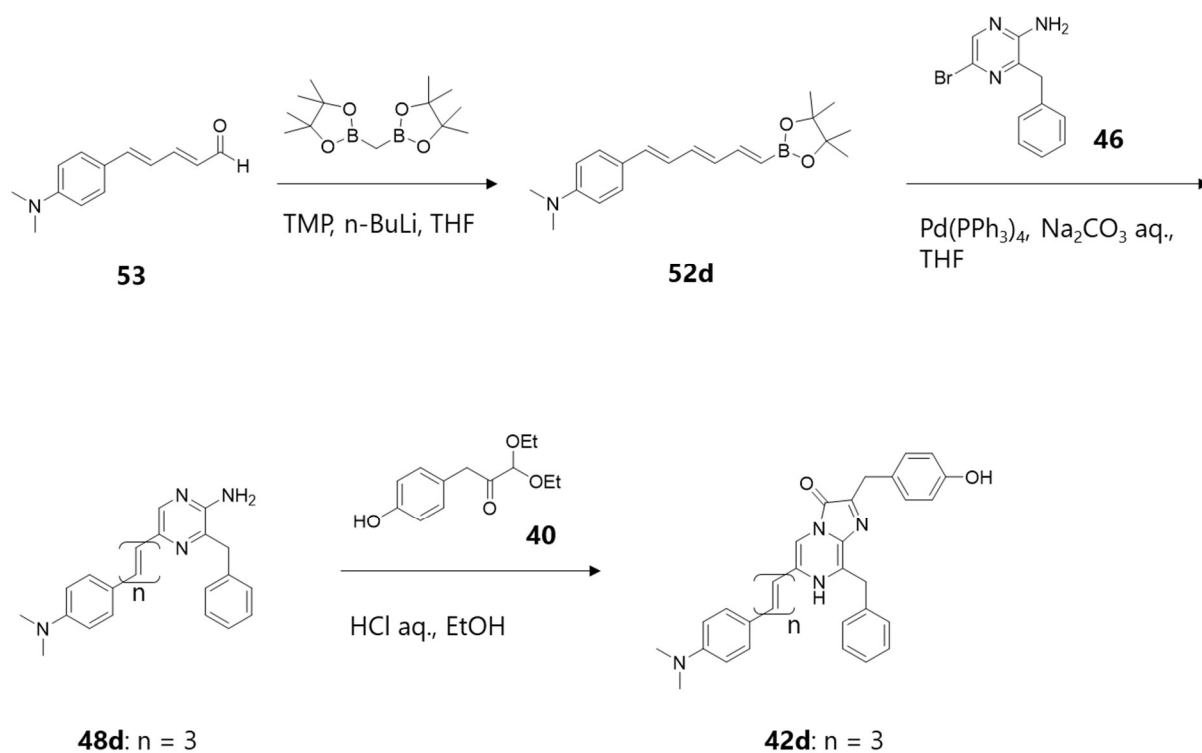


図 3-10 新規トリエンセレンテラジン類縁体(**42d**)の合成

3.3. セレンテラジンおよび新規セレンテラジン類縁体の UV/Vis 吸収スペクトルおよび生物発光、化学発光スペクトル

メタノール溶液中におけるセレンテラジン **2** およびセレンテラジン類縁体 **42a-d** の UV/Vis 吸収スペクトルを図 3-9 および表 3-1 に示した。**42a-d** の UV/vis 吸収極大波長はそれぞれ、300、360、392、415 nm であり、共役が増大するごとに約 20–60 nm 赤色シフトを示した。

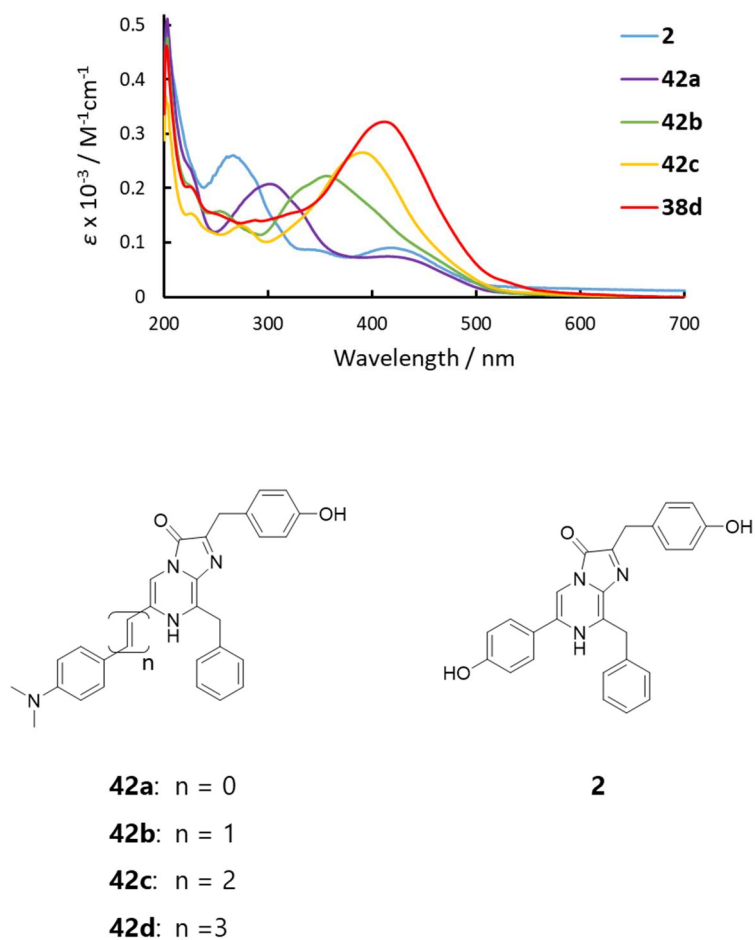


図 3-11 メタノール中における **42a-d** および **2** の UV/vis 吸収スペクトル

表 3-1 メタノール中における **42a-d** および **2** の UV/vis 吸収極大波長

Solvent	$\lambda_{ab}^a / \text{nm}$				
	42a	42b	42c	42d	2
methanol	300, (427)	360	392	415	266, (417)

^a UV/vis 吸収極大波長.

続いて生物発光活性を調べるために、ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ (Rluc) およびその変異体 (Rluc8、Rluc8.6_535、Rluc8.6_547) を用いて L-L 反応を測定した。Rluc ルシフェラーゼは、腔腸動物の花虫綱に属する *Renilla reniformis* (ウミシイタケ) から、Cormier らによってクローニングされたルシフェラーゼである⁹。311 アミノ酸からなるタンパク質で、分子量は約 36 kda である。また、Rluc8 ルシフェラーゼは哺乳動物細胞での安定性向上および酵素活性向上を目的に開発された Rluc ルシフェラーゼ変異体である⁷¹。セレンテラミド **10** との共結晶が報告されている (図 3-12, PDB No.)⁷²。Rluc8.6_535 および Rluc8.6_547 ルシフェラーゼは、Rluc8 ルシフェラーゼの安定性および酵素活性を維持しつつ、セレンテラジン **2** の長波長発光化を達成した変異体酵素である⁷³。

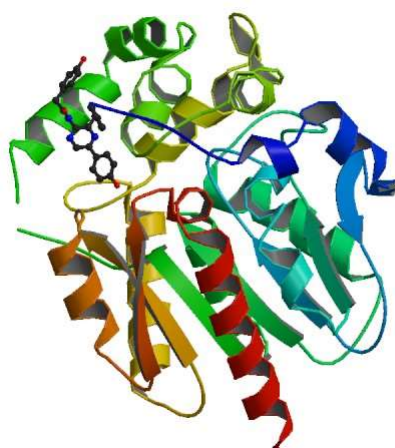
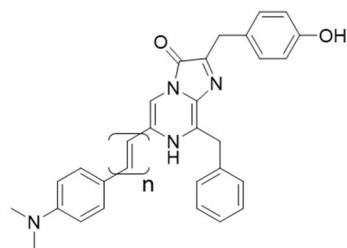
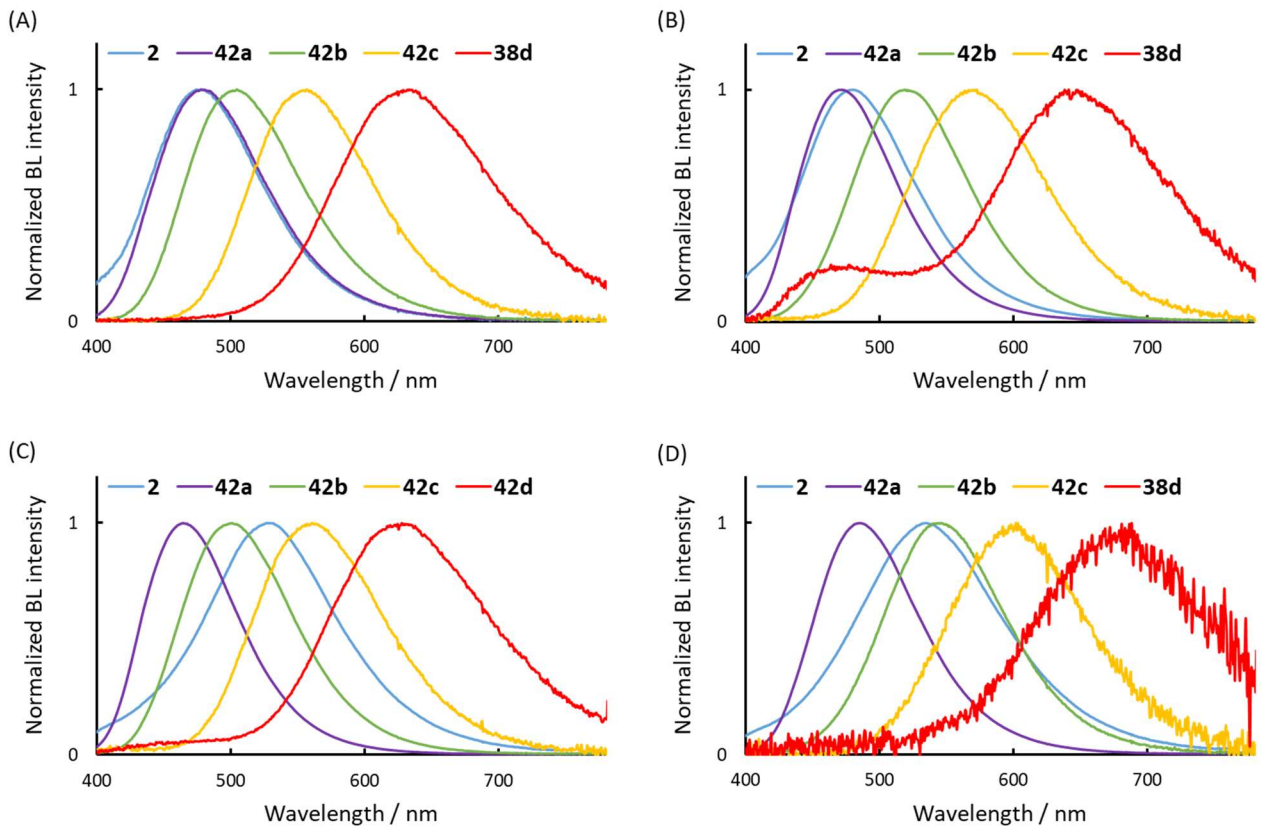


図 3-12 Rluc8 ルシフェラーゼとセレンテラミド (**10**) の共結晶 (PDB no. 2PSJ)⁷²

Rluc、Rluc8、Rluc8.6_535 および Rluc8.6_547 ルシフェラーゼとセレンテラジン **2** とセレンテラジン類縁体 **42a-d** の pH 7.2 HEPES 緩衝液中における生物発光スペクトルを図 3-13 に示し、発光極大波長を表

3-2 にまとめた。**42a**、**42b**、**42c**、**42d** の生物発光極大波長は、それぞれ約 465–485 nm、約 500–545 nm、約 555–600 nm、約 620–642 nm を示し、オレフィンが 1 つ伸張するに依り約 40–70 nm 赤色シフトした。**42d** と Rluc8 および Rluc8.6_535 の生物発光スペクトルは、約 500 nm 付近にマイナー発光バンドを示した。

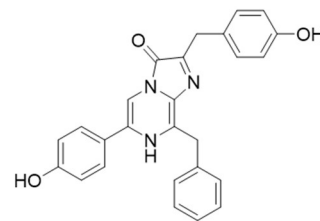


42a: n = 0

42b: n = 1

42c: n = 2

42d: n = 3



2

図 3-13 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の生物発光スペクトル: (A) Rluc, (B) Rluc8, (C) Rluc8.6_535 and (D) Rluc 8.6_547.

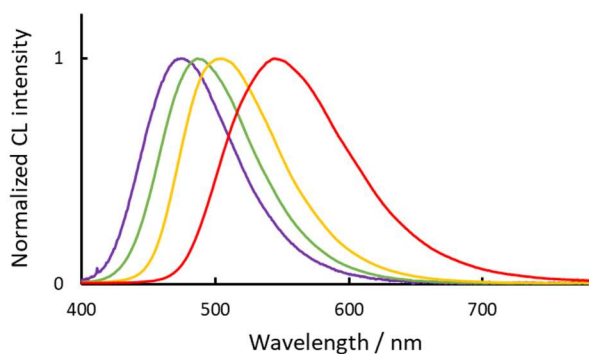
表 3-2 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の生物発光極大波長

Compound	λ_{bl}^a / nm			
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547
42a (n = 0)	478	469	464	484
42b (n = 1)	504	518	500	543
42c (n = 2)	555	567	560	599
42d (n = 3)	623	642, (451)	617	664
2	476	477	525	533

^a 生物発光極大波長

セレンテラジン類縁体 **42a-d** の λ_{bl} 値を評価するために、化学発光特性を調べた。化学発光特性は 1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(TMG)の DMSO 溶液(0.1 M)、pH 5.6 酢酸水溶液を加えたジエチレングリコールジメチルエーテル(DGM)溶液 (0.66 %) を用いて行った。その結果を、図 3-14、表 3-3 にまとめた。TMG-DMSO 化学発光条件はセレンテラミドがアミドアニオン状態で発光し⁷⁴、pH 5.6 酢酸水溶液-DGM の化学発光条件は中性アミド状態で発光することが報告されている^{75, 76, 77}(図 3-16)。TMG-DMSO 化学発光条件における **42a-d** の λ_{cl} 値は 474、495、503、545 nm を示し、pH 5.6 酢酸水溶液-DGM の化学発光条件における **42a-d** の λ_{cl} 値は 486、490、495、536 nm を示した。それぞれの類縁体の λ_{cl} 値は近い値を示しており、また λ_{bl} 値とも異なる値を示したため、生物発光反応がアミドアニオンもしくは中性アミド状態で発光しているかどうかは判別できなかった。一方、水溶液中でウシ血清アルブミン(BSA)と共存しても化学発光を示すことが知られており、この発光条件でも化学発光測定を行った。その結果を、図 3-15、表 3-3 にまとめた。PBS 緩衝溶液(2% w/v)を用いた化学発光条件における **42a-d** の λ_{cl} 値は 483、500、565、626 nm を示し、 λ_{bl} 値と近い値を示した。

(A) TMG+DMSO



(B) 酢酸水溶液+DGM

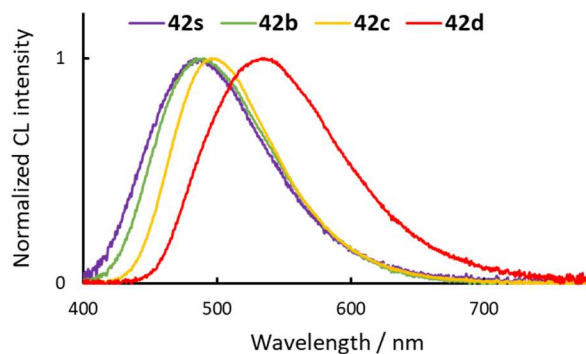


図 3-14 0.1 M TMG-DMSO 溶液および pH5.6 酢酸水溶液含有 DGM 溶液における化学発光スペクトル

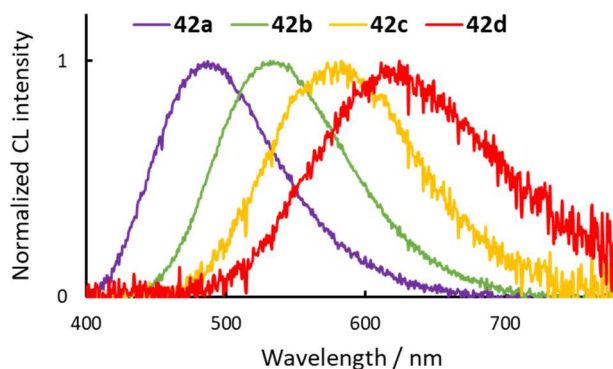


図 3-15 2% v/w BSA 含有 PBS 緩衝液における **42a-d** の化学発光スペクトル

表 3-3 **42a-d** および **2** の TMD-DMSO、酢酸水溶液-DGM および BSA を用いた化学発光極大波長

Compound	λ_{cl} / nm		
	TMG-DMSO	酢酸水溶液-DGM	BSA-PBS 緩衝液
42a	474	486	483
42b	495	490	500
42c	503	495	565
42d	545	536	626

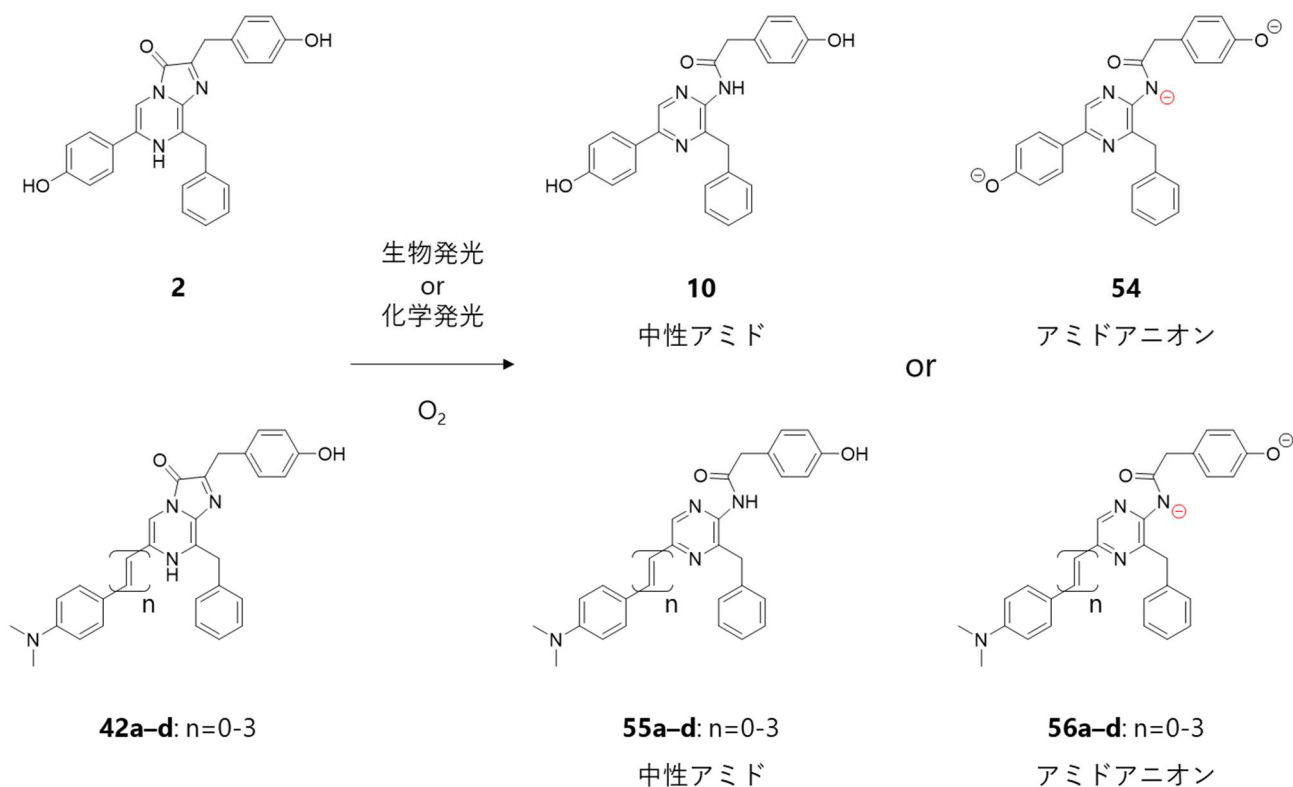
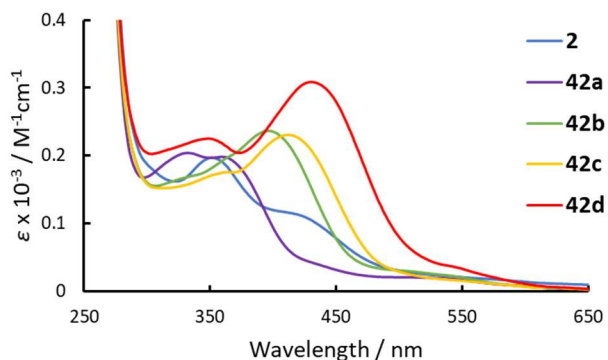


図 3-16 中性アミドおよびアミドアニオンの構造

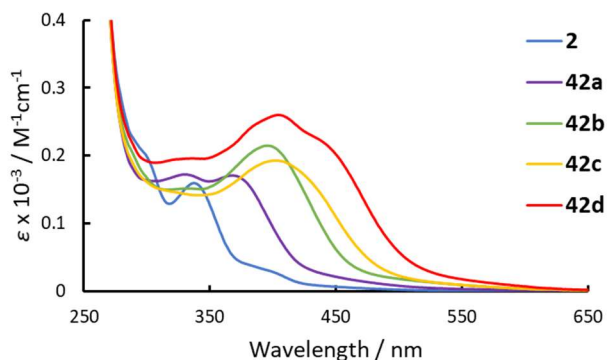
続いて、セレンテラジン **2** およびセレンテラジン類縁体 **42a-d** の生物発光および化学発光反応後の生成物である対応するセレンテラミド **10** および **55a-d** の蛍光特性を調べた。TMG-DMSO 系の化学発光反応は反応生成収率($\Phi_r = 0.7-0.9$)が高く⁷⁸、反応後の生成物はほぼセレンテラミドのみが得られる。そのため、反応後の溶液の蛍光を測定すればセレンテラミドの蛍光特性を調べることが可能である。TMG-DMSO による化学発光反応後溶液に当量のメタンサルホン酸 (MsOH)を加えて中和した溶液と、強い塩基としてテトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBAOH、37%メタノール溶液)を0.1当量加えた溶液の蛍光特性を調べた。UV/vis 吸収スペクトルを図 3-17 および表 3-4 にまとめた。また蛍光スペクトルを図 3-18 および表 3-5 にまとめた。**42a-d** の TMG-DMSO 化学発光後溶液の蛍光極大波長(λ_{fl})は 513、559、577、658 nm を示し、MsOH 添加溶液の λ_{fl} 値は 516、559、602、663 nm を示し、TMG-DMSO 化学発光後溶液とそれに MsOH を添加した溶液の λ_{fl} 値は近い値を示した。一方、TBAOH 添加溶液の λ_{fl} 値は 451、473、515、554 nm を示した。セレンテラミドは MsOH 添加溶液で中性アミド状態 **55a-d**、TBAOH 添加溶液でアミドアニオン状態 **56a-d** と推測できるため、中性アミド状態の λ_{fl} 値はア

ミドアニオン状態の λ_{fl} 値よりも長波長の λ_{fl} 値を示すことが判明した。C'6 位にジメチルアミノフェニルを有するセレンテラミドは中性アミドの構造ではその励起一重項状態の分極構造から大きなソルバトクロミズム性を示す。一方、アミドアニオン状態では分極が小さくほぼソルバトクロミズム性を示さない⁷⁹。生物発光で観測された λ_{bl} 値は、アミドアニオン状態 **56a-d** の λ_{fl} 値よりも長波長で、中性アミド状態 **55a-d** の λ_{fl} 値よりも短波長であった。従って、セレンテラジン類縁体 **42a-d** から生成したセレンテラミド類縁体の励起一重項状態は中性アミド状態で発光していることが推測された。さらに DMSO 溶媒の λ_{fl} 値よりも、いずれのルシフェラーゼの λ_{bl} 値は同等か短波長化していたことから、酵素活性中心は DMSO よりも同等か低極性であることが示唆された。また、TMG-DMSO および酢酸水溶液-DGM 化学発光条件による λ_{cl} 値は、これらの化学発光反応がいずれもアミドアニオン状態で発光していることを示唆した。一方、BSA 化学発光条件による λ_{cl} 値は、BSA による化学発光反応が中性アミド状態で発光していることを示唆した。

(A) TMG+DMSO化学発光後溶液



(B) TMG+DMSO化学発光後溶液にMsOHを添加



(C) TMG+DMSO化学発光後溶液にTBAOHを添加

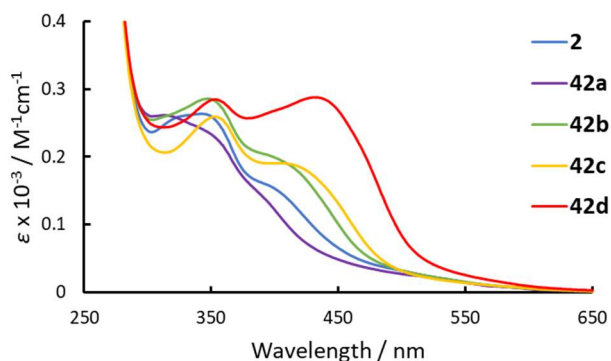


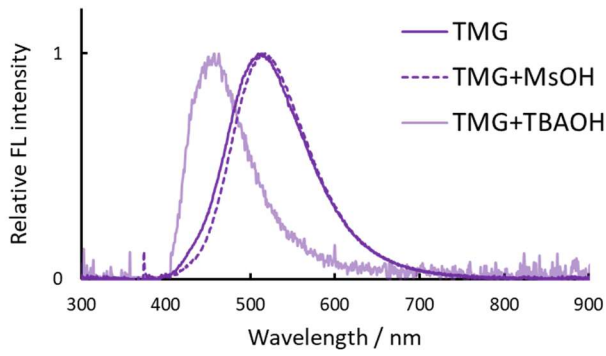
図 3-17 (A) **42a-d** および **2** の TMG-DMSO 化学発光後の UV/vis 吸収スペクトル、(B) MsOH を加えた UV/vis 吸収スペクトル、(c) TBAOH を加えた UV/vis 吸収スペクトル

表 3-4 **42a-d** および **2** の TMG-DMSO 化学発光後に TBAOH あるいは MsOH を加えた溶液の UV/vis 吸収極大波長

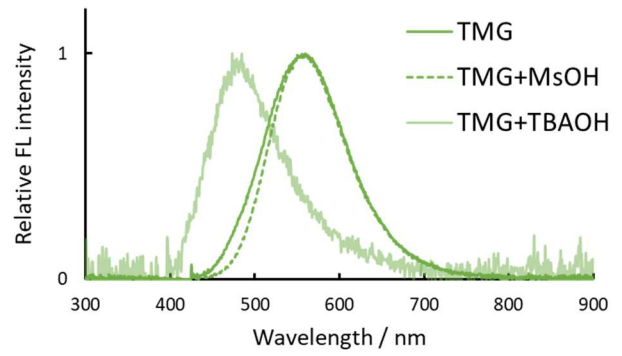
Compound	$\lambda_{ab}^a / \text{nm}$		
	TMG	TMG + MsOH	TMG + TBAOH
42a	332, 359	331, 368	328, (400)
42b	396	396	325, (527)
42c	(358), 411	403	329, 400
42d	349, 430	404, (440)	360, 425
2	351, (418)	(300), 337, (400)	349, 440

^a UV/vis 吸収極大波長

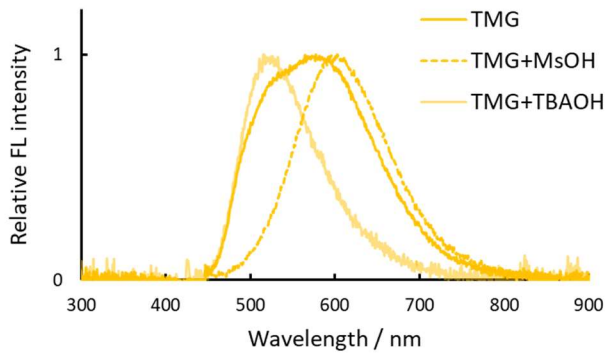
(A) 42a



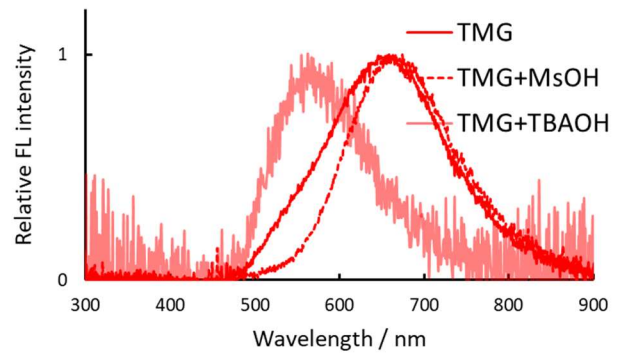
(B) 42b



(C) 42c



(D) 42c



(E) 2

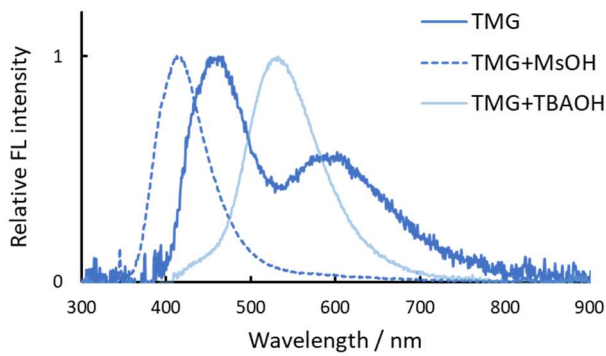


図 3-18 42a-d および 2 の TMG-DMSO 化学発光後に TBAOH あるいは MsOH を加えた溶液の蛍光スペクトル

表 3-5 **42a-d** および **2** の TMG-DMSO 化学発光後に TBAOH あるいは MsOH を加えた溶液の蛍光極大波長

Compound	$\lambda_{fl} / \text{nm} (\lambda_{ex}^a / \text{nm}, \Phi_{fl}^b)$		
	TMG	TMG + MsOH	TMG + TBAOH
42a	513 (380, 0.34)	516 (370, 0.34)	451 (380, 0.025)
42b	559 (420, 0.34)	559 (430, 0.39)	473 (390, 0.022)
42c	(525), 577 (440, 0.27)	602 (440, 0.25)	515 (420, 0.052)
42d	658 (460, 0.15)	663 (450, 0.16)	554 (440, 0.013)
2	411 (380, 0.076)	413 (340, 0.18)	532 (400, 0.22)

^a 励起波長、^b 蛍光量子収率

3.4. セレンテラジンおよび新規セレンテラジン類縁体の生物発光反応評価

セレンテラジン類縁体 **42a-d** およびセレンテラジン **2** の *in vitro* における発光強度および酵素反応特性として、ミカエリス定数(K_m)および発光反応速度(V_{max})を測定した(表 3-6、3-7 および図 3-19)。 K_m および V_{max} は、HEPES 緩衝液中の **42a-d** および **2**、Rluc ルシフェラーゼの L-L 反応の発光を、ルミノメーターで 5 秒間モニターしその積分値を初速度として測定し、Lineweaver-Burk プロットを用いて計算した(表 3-6、3-7 および図 3-19)。**42a-d** の K_m 値は順に、0.49–3.6、0.20–1.2、0.14–0.33、0.030–0.16 と、ルシフェラーゼ毎に異なる値を示したが、オレフィンの数を増やすごとに低下する傾向であった。 K_m 値が低い値を示すほど酵素と基質の親和性は向上しているため、オレフィンの数を増やすほどルシフェラーゼ活性部位とセレンテラジン類縁体の親和性が向上していることが推測された。また、**42a-d** の相対発光反応速度(*rel. V_{max}*)はオレフィンの数を増やすごとに低下する傾向を示した。

表 3-6 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の K_m

Compound	$K_m / \mu\text{M} (\text{SE}^a / \mu\text{M})$			
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547
42a	0.49 (0.045)	1.4 (0.23)	1.9 (0.21)	3.6 (0.28)
42b	0.20 (0.041)	0.46 (0.090)	0.71 (0.058)	1.2 (0.058)
42c	0.16 (0.047)	0.14 (0.023)	0.18 (0.013)	0.33 (0.020)
42d	0.030 (0.0072))	0.068 (0.014)	0.076 (0.019)	0.16 (0.017)
2	1.45 (0.10)	2.3 (0.13)	1.8 (0.14)	4.0 (0.32)

^a 標準誤差

表 3-7 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対発光反応速度 (*rel. V_{max}*)

Compound	<i>rel. V_{max}</i> ^a (%SE ^b)			
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547
42a	0.15 (3%)	0.55 (7%)	1.6 (5%)	0.045 (3%)
42b	0.39 (6%)	0.38 (6%)	2.9 (3%)	0.026 (2%)
42c	0.11 (12%)	0.057 (5%)	0.35 (5%)	0.0029 (2%)
42d	0.0080 (6%)	0.015 (6%)	0.074 (9%)	0.0028 (3%)
2	1.0 (2%)	0.61 (2%)	3.7 (3%)	0.48 (4%)

^a **2** および Rluc の値を 1.0 とした際の相対発光反応速度(*rel. V_{max}* 値) ^b 標準誤差パーセンテージ

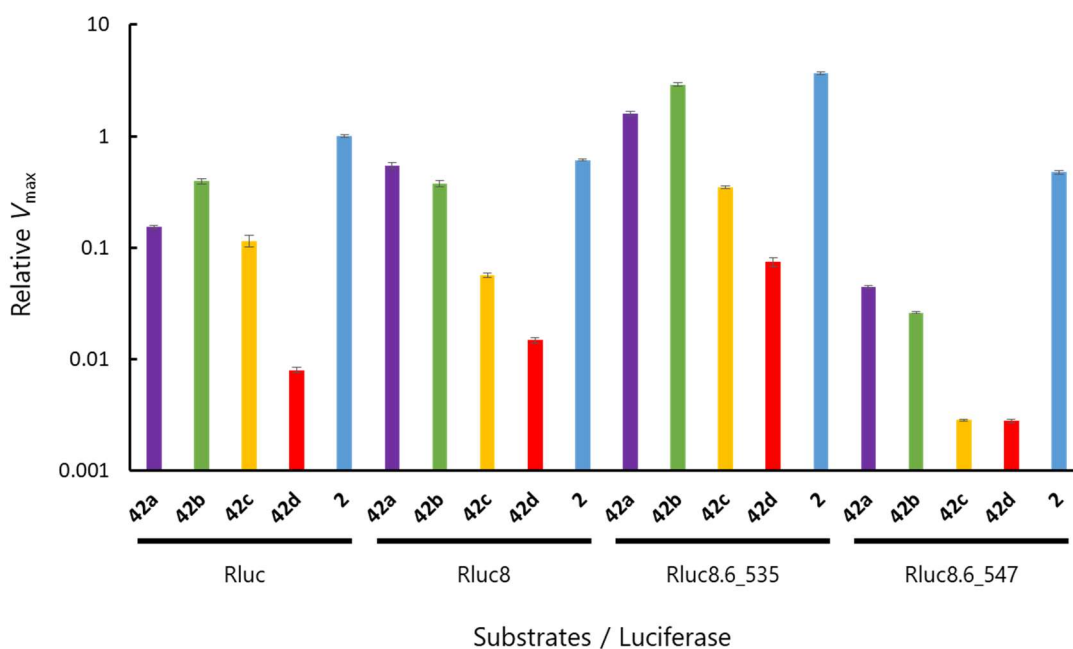


図 3-19 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対発光反応速度 (rel. V_{max})

続いて **42a-d** および **2** の発光効率を調べるために、相対発光量子収率(Φ_{bl})を測定した(表 3-8 および図 3-20)。 Φ_{bl} 値は HEPES 緩衝液中における **42a-d** および **2** の L-L 反応の発光スペクトルを、AB-1850 分光光度計を用いて反応が完了するまで測定し、分子数当たりの発光スペクトルの面積比から **42a** および Rluc の値を 1.0 とした際の相対比で表した。セレンテラジン類縁体 **42a-d** の Φ_{bl} 値は、異なるルシフェラーゼであっても **42b**、**42a**、**42c**、**42d** の順に高い傾向にあった。さらに、ルシフェラーゼ間では異なる Φ_{bl} 値を示し、Rluc8.6_535 > Rluc8 \approx Rluc8.6_535 > Rluc の順に高い傾向を示した。Rluc 変異体は Rluc の活性中心付近に変異を導入している、活性中心の極性等の分子環境が変化し発光量子収率に影響を与えたものと考えられる。また、セレンテラジン類縁体 **42a-d** の Φ_{bl} 値は対応する中性セレンテラミド **55a-d** の DMSO 中における蛍光量子収率(Φ_{fl})と相関があることを示し、その大きさによって増減する傾向を示した。 Φ_{bl} 値は、反応生成収率(Φ_r)、一重項励起生成効率(Φ_s)および蛍光量子収率(Φ_{fl})の積で求まる。酵素反応中における蛍光性が DMSO 中の中性セレンテラミド **55a-d** の Φ_{fl} 値と同等であると仮定した場合、 Φ_r 値と Φ_s 値の積を、 Φ_{bl} 値を Φ_{fl} 値で除して計算した(表 3-9)。セレンテラジン類縁体 **42a-d** の Φ_r 値と Φ_s 値の積は、ルシフェラーゼの種類に関わらず、**42b**、**42c**、**42a**、**42d** の順に高い傾向を示した。これはセレンテラジン類縁体 **42b** の反応生成収率(Φ_r)と一重項励起生成効率(Φ_s)の一方または両方が高いことを意

味しており、酵素内で最も **42b** が酵素反応性あるいは励起状態での一重項励起状態への移行性が高いものと推測される。

表 3-8 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対発光量子収率(rel. Φ_{bl})および中性セレンテラミド **55a-d** の蛍光量子収率(Φ_{fl})

Compound	rel. Φ_{bl} ^a (%SE ^b)				Φ_{fl} ^c
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547	
42a	0.20 (7%)	0.39 (10%)	1.3 (14%)	0.89 (11%)	0.34
42b	0.34 (14%)	0.80 (13%)	1.8 (5%)	0.75 (18%)	0.39
42c	0.15 (34%)	0.38 (29%)	0.95 (8%)	0.27 (17%)	0.25
42d	0.10 (2%)	0.19 (10%)	0.48 (8%)	0.070 (8%)	0.16
2	1.0 (14%)	1.1 (8%)	0.34 (5%)	0.37 (4%)	0.18

^a **2** および Rluc の値を 1.0 とした際の相対発光量子収率(rel. Φ_{bl} 値) ^b 標準誤差パーセンテージ ^c 対応する中性セレンテラミド **55a-d** の DMSO 中における蛍光量子収率

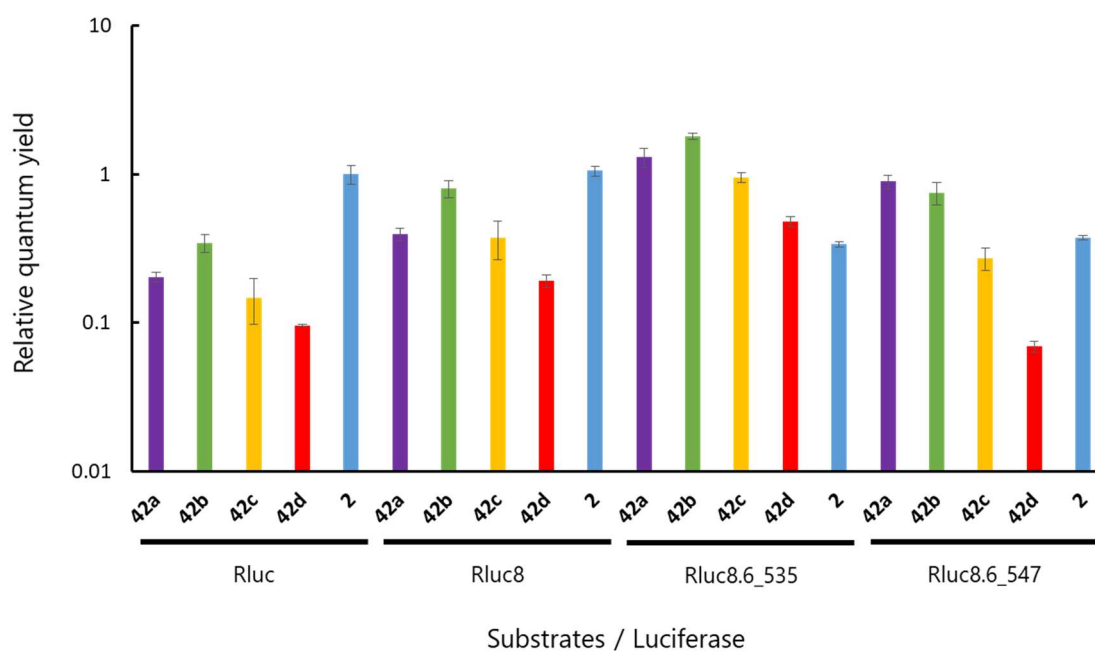


図 3-20 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対発光量子収率 (rel. Φ_{bl})

表 3-9 DMSO 中の蛍光量子収率(Φ_{fl})から求めた Rluc および Rluc 変異体と **42a-d** の反応生成収率(Φ_r)と一重項励起生成効率(Φ_s)の積および中性セレンテラミド **55a-d** の蛍光量子収率(Φ_{fl})

Compound	rel. $\Phi_r \times \Phi_s^a$ (%SE ^b)				Φ_{fl}^c
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547	
42a	1.0 (7%)	1.9 (10%)	6.4 (14%)	4.4 (11%)	0.34
42b	2.6 (14%)	6.1 (13%)	14 (5%)	5.8 (18%)	0.39
42c	1.8 (34%)	4.5 (29%)	11 (8%)	3.3 (17%)	0.25
42d	1.0 (2%)	2.0 (10%)	5.1 (8%)	0.74 (8%)	0.16

^a **42a** および Rluc の値を 1.0 とした際の反応生成収率(Φ_r)と一重項励起生成効率(Φ_s)の積($\Phi_r \times \Phi_s$) ^b標準誤差パーセンテージ ^c 対応する中性セレンテラミド **55a-d** の DMSO 中における蛍光量子収率

さらに、セレンテラジン類縁体 **42a-d** およびセレンテラジン **2** の相対酵素反応速度定数(rel. k_{cat})を求めた(表 3-10 および図 3-20)。Rel. k_{cat} 値は rel. V_{max} 値を rel. Φ_{bl} 値で除して算出し、**42a** および Rluc の値を 1.0 とした際の相対比で表した。Rluc とセレンテラジン類縁体 **42a-c** の組み合わせにおける Rel. k_{cat} 値は、セレンテラジン **2** の Rel. k_{cat} 値と同等の値を示した。これは、天然型の Rluc ルシフェラーゼは酵素認識の自由度が高く、多少の分子サイズの異なるセレンテラジン類縁体においても酵素認識できるものと推察される。Rluc8 とセレンテラジン類縁体 **42a**、**42b** とセレンテラジン **2** の組み合わせにおける rel. k_{cat} 値は、Rluc とセレンテラジン **2** の組み合わせの値と同等であり、**42c**、**42d** については分子サイズが大きくなるにつれて k_{cat} 値が低下した。Rluc8 ルシフェラーゼの変異によりセレンテラジン類縁体の酵素認識が低下したためと考えられる。さらに、Rluc8.6_535 および Rluc8.6_547 とセレンテラジン類縁体 **42a-d** の k_{cat} 値はセレンテラジン **2** の組み合わせより大きく低下した。これは、Rluc8 ルシフェラーゼ変異体である Rluc8.6_535 および Rluc8.6_547 がセレンテラジン **2** に対して最適化されており、Rluc8 よりもさらにセレンテラジン類縁体への酵素認識が低下したためと考えられる。また、Rluc8.6_535 およびセレンテラジン類縁体との組み合わせは、他の Rluc ルシフェラーゼ変異体との組み合わせと同程度高い k_{cat} 値を示す。Rluc8.6_535 およびセレンテラジン **2** の k_{cat} 値は 1 桁高く、Rluc8.6_535 が高い酵素反応速度を持つルシフェラーゼ変異体であると推測できる。そのため、Rluc8.6_535 とセレンテラジン類縁体 **42a-d** はセレンテラジン **2** の k_{cat} 値よりも低下するものの、他のルシフェラーゼと同等の高い k_{cat} 値を示したと考えられる。

表 3-10 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対酵素反応速度定数 (rel. K_{cat})

Compound	rel. k_{cat} ^a (%SE ^b)			
	Rluc	Rluc8	Rluc8.6_535	Rluc8.6_547
42a	0.75 (8%)	1.4 (12%)	1.2 (15%)	0.050 (11%)
42b	1.1 (15%)	0.47 (15%)	1.6 (6%)	0.035 (18%)
42c	0.78 (36%)	0.15 (30%)	0.37 (8%)	0.011 (17%)
42d	0.083 (6%)	0.077 (12%)	0.15 (12%)	0.040 (9%)
2	1.0 (14%)	0.58 (8%)	11 (5%)	1.3 (5%)

^a **42a** および Rluc の値を 1.0 とした際の相対酵素反応速度定数(rel. K_{cat} 値) ^b 標準誤差パーセンテージ

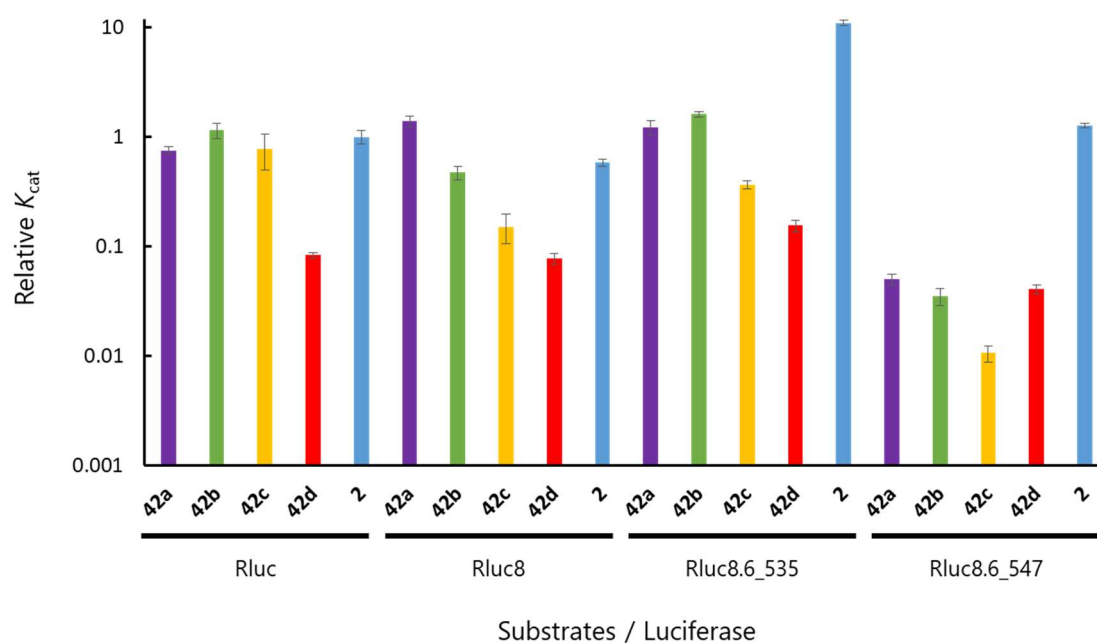


図 3-21 Rluc および Rluc 変異体を用いた **42a-d** および **2** の相対酵素反応速度定数(rel. K_{cat})

3.5. セレンテラミド類縁体の DFT 計算

セレンテラジン類縁体 **42a-d** の生物発光波長を評価するために、基底関数 B3LYP/6-31+G(d)を用いて対応するセレンテラミドの中性状態 **55a-d** およびアニオン状態 **56a-d** の DFT および TD-DFT 計算を行った。計算結果を表 3-11 および表 3-12 にまとめた。

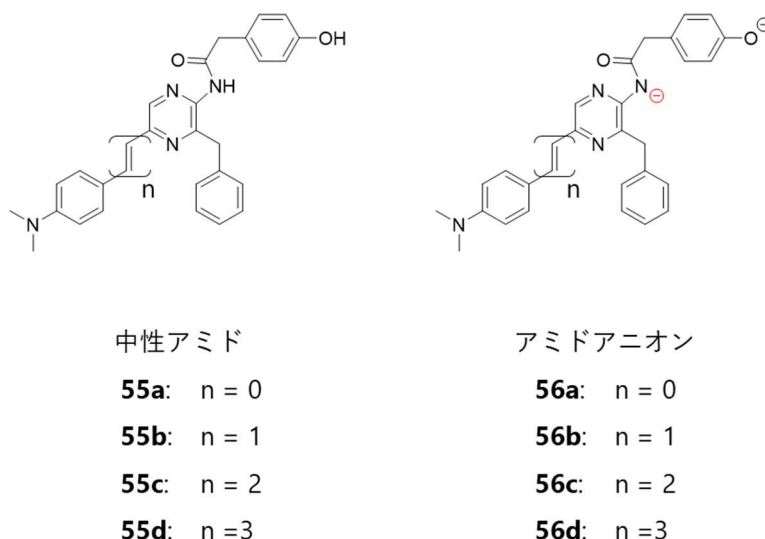


図 3-22 セレンテラミドの中性状態 **55a-d** およびアニオン状態 **56a-d** の構造

セレンテラミドの中性状態 **55a-d** およびアニオン状態 **56a-d** HOMO と LUMO との間のエネルギーギャップ(ΔE_{H-L})および **22a-e** の遷移エネルギーから推定される遷移波長(λ_{tr})は、オレフィンの数が増えるに従い大きくなっている。これは π 共役の拡張が効果的に働いていることを示し、生物発光極大波長(λ_{bl}) (表 3-2)、化学発光極大波長(λ_{cl}) (表 3-3)、セレンテラミドの吸収極大波長(λ_{ab}) (表 3-4)、蛍光極大波長(λ_{fl}) (表 3-5)と同じ傾向を示した。またセレンテラミドの中性状態 **55a-d** の λ_{tr} 値(363–467 nm)は、アミド状態 **56a-d** の λ_{tr} 値(450–542 nm)よりも短波長を示した。これは真空中で DFT 計算を行っていることが原因であり、セレンテラミドの中性状態 **55a-d** は極性溶媒により強いソルバトクロミズム性を持つためである。一方、アミドアニオン **56a-d** はソルバトクロミズム性をほぼ持たないため、実際に測定される吸収極大波長(λ_{ab}) (表 3-4)、蛍光極大波長(λ_{fl})は逆転すると推測される。

表 3-11 セレンテラミドの中性状態 **55a-d** の B3LYP/6-31+G(d)を用いた DFT および TD-DFT 計算

Compound	HOMO /eV	LUMO /eV	ΔE_{H-L}^a /eV	Transitions ^b	λ_{tr}^c / nm (f^d)	Configuration ^{e, f}
55a	-5.31	-1.48	3.83	$S_0 \rightarrow S_1$	363 (0.38)	H → L (0.67) H-L+1 (0.20)
55b	-5.13	-1.81	3.32	$S_0 \rightarrow S_1$	407 (0.91)	H → L (0.69) H-L+1 (0.12)
55c	-5.01	-1.98	3.03	$S_0 \rightarrow S_1$	435 (1.39)	H → L (0.70) H-L+1 (0.11)
55d	-4.91	-2.14	2.77	$S_0 \rightarrow S_1$	467 (1.84)	H → L (0.70)

^a HOMO-LUMO エネルギーギャップ ^b 最低励起エネルギーを示す遷移 ^c 遷移エネルギーから見積もられた波長 ^d 振動子強度 ^e 配置間相互作用 ^f H および L は HOMO、LUMO を表す

表 3-12 セレンテラミドのアニオン状態 **56a-d** の B3LYP/6-31+G(d)を用いた DFT および TD-DFT 計算

Compound	HOMO /eV	LUMO /eV	ΔE_{H-L}^a /eV	Transitions ^b	λ_{tr}^c / nm (f^d)	Configuration ^{e, f}
56a	-1.47	1.63	3.10	$S_0 \rightarrow S_1$	450 (0.041)	H → L (0.70)
56b	-1.54	1.34	2.87	$S_0 \rightarrow S_1$	472 (0.27)	H → L (0.62) H-L+1 (0.33)
56c	-1.63	0.93	2.56	$S_0 \rightarrow S_1$	498 (1.23)	H → L (0.67) H-L+1 (0.19)
56d	-1.73	0.55	2.23	$S_0 \rightarrow S_1$	542 (1.92)	H → L (0.70) H-L+1 (0.10)

^a HOMO-LUMO エネルギーギャップ ^b 最低励起エネルギーを示す遷移 ^c 遷移エネルギーから見積もられた波長 ^d 振動子強度 ^e 配置間相互作用 ^f H および L は HOMO、LUMO を表す

3.6. まとめ

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類縁体 **42a-d** を新規に合成し、それらの生物発光および化学発光特性を調べた。C'6 位にオレフィンの数を増大させることにより発光極大波長 λ_{bl} 値が長波長シフトを示し、トリエンをもつセレンテラジン類縁体 **42d** および Rluc8.6_547 の組み合わせにより 664 nm の λ_{bl} 値を示した。生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)を利用しないセレンテラジン類縁体としては世界で最も長い発光波長を示した。TMG-DMSO 系による発光反応後溶液の蛍光特性を調べることで、生物発光反応は中性アミド状態で発光し、化学発光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。**42d** および Rluc8.6_547 の L-L 反応が長波長発光を示した要因として、C'6 位に導入されたトリエンの共役効果と共に、Ruc8.6_547 ルシフェラーゼの活性中心が DMSO に近い高極性環境を有し、そのため中性セレンテラミドの蛍光波長が長波長シフトしたためであると推測される。

セレンテラジン類縁体 **42a-d** および **2** の酵素反応速度論解析を行った。**42a-d** のミカエリス定数 K_m は分子サイズが増大するに従い低下し、ルシフェラーゼと基質との親和性が増大した。一方、相対発光反応速度($rel. V_{max}$)は **42a-d** の順にオレフィン数が多くなるにつれ低下した。また、相対発光量子収率 $rel. \Phi_{bl}$ を求め、これと $rel. V_{max}$ 値から酵素反応速度定数($rel. K_{cat}$)を求めた。 $rel. \Phi_{bl}$ 値は、中性セレンテラミド **55a-d** の蛍光量子収率(Φ_{fl})と相関を示した。酵素反応速度定数(K_{cat})は類縁体の分子サイズが大きくなるにつれ低下する傾向を示した。

また、長波長シフトを示したセレンテラジン類縁体 **42c**、**42d** は、セレンテラジン **2** の発光強度よりも 1/10 以下であり実用的であるとは言い難く、さらなる発光強度の向上が望まれる。イミダゾピラジノン C'2 位の置換基を変換しかつ nanoluc 等の高活性なルシフェラーゼを用いることで、発光強度が 10 倍以上に向上することが報告されており^{80, 81}、本研究のセレンテラジン類縁体においても適用できる可能性がある。

4. 結語

本研究では生物発光を対象に、発光材料の長波長化と高輝度化への取り組みを行った。

第2章、新規長波長ホタル生物発光基質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-ペペリジノ、1-アゼパニルおよびモルホリノ基)を有する新規 AkaLumine 類縁体を合成し、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。すべての類縁体は AkaLumine と同様に生物発光極大波長は約 670 nm を示した。1-ピロリジニル基および 1-アゼパニル基を有する AkaLumine 類縁体は発光強度が 2.2 倍および 3.5 倍大きくなり、それぞれ発光量子収率および酵素反応速度定数が向上した結果であった。アミノ基の置換により基質-酵素間の相互作用を調整し、生物発光性能の改善につながることを見出した。続いて、全身 Ppy ルシフェラーゼ発現マウスを用いた *in vivo* アッセイの結果、1-ピロリジニル基を持つ AkaLumine 類縁体は AkaLumine と比較し約 2 倍発光強度が向上した。また、ルシフェリンの分配係数(LogP)から、血中移行性および体内分布性と相関が見られた。1-ピロリジニル基 AkaLumine 類縁体は発光強度が高く、生体内での分布濃度差が小さいと考えられるため、定量性の高い発光材料として有力な発光材料であると考えられる。

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の C'6 位に複数のオレフィンを導入することで波長の制御が可能であることを明らかにした。中でもトリエンを有する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、発光極大波長が 664 nm を示した。これは、生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)を利用しないセレンテラジン類縁体としては最長波長の発光波長である。また、化学発光後生成物の蛍光測定により、中性アミド状態で発光していることを明らかにし、一部のルシフェラーゼの酵素活性中心も DMSO に近い高極性環境下であることが判明した。さらに、酵素反応速度論解析および発光量子収率測定により、基質の分子サイズにより酵素反応速度(k_{cat} 値)が低下することを明らかにした。また、発光量子収率の低下はセレンテラジン類縁体に対応するセレンテラミドの蛍光量子収率と相関関係を持ち、それぞれの量子収率は比較的高い値を示した。高輝度な長波長セレンテラジン類縁体を開発するためには、蛍光量子収率の改

善よりも、基質および酵素の最適化による酵素反応速度の向上に注目すべきと考える。

本研究において合成した生物発光基質から、それらが有用な生物発光基質であることを示し、各基質の高輝度化および長波長化への知見を得ることができた。しかしながら、既存の *in vivo* イメージングに使用される生物発光基質の代替材料とはなっていない。*in vivo* イメージング技術の向上のために、さらなる発光材料の長波長化、高輝度化への取り組みが望まれる。

5. 実験の部

5.1. 合成の部

5.1.1. 試薬、測定機器

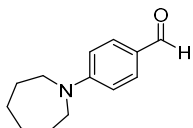
購入した試薬および溶媒は、さらに精製することなく使用した。*In vitro* 生物発光測定では、組換え *Ppy* ルシフェラーゼ(Quantilum recombinant luciferase, Promega corp., USA)および天然ホタルから精製した *Ppy* ルシフェラーゼ(Sigma-Aldrich Co. LLC.)を使用した。0.05 M 3,3-ジメチルグルタル酸、0.05 M 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールおよび 0.05 M および 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールによる混合水溶液に NaOH 水溶液を加え、pH 8.0 GTA 緩衝液を調整した。分析薄層クロマトグラフィー(TLC)は、Wako Silica gel 70 F254 TLC プレートを使用した。カラムクロマトグラフィーには関東化学シリカゲル 60N(球状、中性)および Waters Sep-Pak C18(ODS, 6 cc Vac Cartridge, 1 g sorbent per cartridge, 55–105 μm particle size)を使用した。

融点は Yamato MP-21 装置で測定した。IR スペクトルは、全反射測定法(Attenuated Total Reflection, ATR)を用いて Nicolet 6700 分光計で測定した。 ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルは、JEOL ECA-500(^1H : 500 MHz、 ^{13}C : 125 MHz)で測定した。JEOL JMS-T100LC 質量分析計を用いて、高分解能エレクトロスプレーイオン化(ESI)質量スペクトルを得た。AkaLumine 類縁体の光学純度は、Thermo Fisher Scientific LCQ Fleet LC-MS を使用し、キラルカラム(Daicel Chemical Industries、OZ-RH、5 μm 、4.6-150 mm)を用いて、10%~90% アセトニトリル(流速 0.3 mL /分)による勾配溶出で、330nm の UV 検出器で検出した。UV 可視吸収スペクトルは、Varian Cary 60 分光光度計(走査速度 600 nm /分; データ間隔 1 nm)を用いて測定した。蛍光スペクトルおよび蛍光量子収率は、Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY 絶対 PL 量子収率測定システムを用いて測定した。生物発光強度は ATTO AB-2200 ルミノメーターを用いてモニターし、生物発光スペクトルは ATTO AB-1850 分光光度計(データ間隔、1 nm)を用いて測定した。LogP と ClogP は ChemDraw 13.0 を用いて計算した。密度汎関数理論 DFT および TD-DFT 計算は、Gaussian 09 プログラム(Rev. D.01)を用いて行い⁸²、基底関数は B3LYP/6-31+G (d)を用いた^{83, 84, 85}。分子グラフィックスは、GaussView(Version 5)を用いた⁸⁶。生物発光イメージングは、多機能インビボイメージングシステム(MIIS、Molecular device、

LLC)を用いて測定した。

5.1.2. AkaLumine 類縁体 **22b–e** の合成

5.1.2.1. ベンズアルデヒド **32d** の合成



4-(azepan-1-yl)benzaldehyde (**32d**)

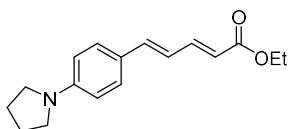
4-Fluorobenzaldehyde **31** (105 μ L、1.0 mmol)の DFT 溶液(0.5 mL)に Hexamethyleneimine(224 μ L、2.0 mmol)および炭酸カリウム(415 mg、3.0 mmol)を加え、Ar 下で 16 時間、80°Cで攪拌した。反応混合物に水(50 mL)を加え、酢酸エチルおよびヘキサン(1 : 4)の混合物(2 \times 50 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [4 : 1])により精製し、**32d**(134 mg、0.66 mmol、66%)をオレンジ色の油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM- D_3) δ 9.69 (s, 1 H), 7.70 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 6.70 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 3.52 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 1.79 (br. s, 4 H), 1.55–1.54 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM- D_3) δ 190.0, 153.4, 132.3, 124.7, 110.6, 49.6, 27.2, 26.7; HR-ESI-MS: m/z :

[$\text{M}+\text{H}$] $^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$, 204.1388; found, 204.1408.

5.1.2.2. ジエンエステル **33b–e** の合成



Ethyl (2E,4E)-5-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoate (**33b**).

32b(1.75 g、10 mmol)および Triethyl 4-phosphonocrotonate(3.3 mL、15 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(40 mL)を 0 °C、Ar 雰囲気下で、水素化ナトリウム(40%鉱油、800 mg、20 mmol)をゆっくり加えた。反応混合物を室温で 3 時間攪拌した後、エタノール(1 mL)および水(20mL)を加えて反応を停止させ、生成

物を酢酸エチル(3×20mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/ 酢酸エチル [4 : 1])で精製し、**33b**(1.9 g、7.0 mmol、70%)を黄色結晶として得た

mp 138–141 °C

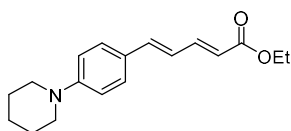
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1698, 1588, 1234, 1001

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.44 (dd, $J = 11.2, 15.4$ Hz, 1 H), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.82 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.66 (dd, $J = 11.2, 15.2$ Hz, 1 H), 6.51 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 5.85 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.21 (q, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 3.31 (m, 4 H), 2.00 (m, 4 H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 167.6, 148.4, 146.0, 141.5, 128.8, 123.3, 121.0, 117.6, 111.6, 60.0, 47.5, 25.4, 14.4

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{Na}$, 294.1470; found, 294.1483.

以下、**33b** と同等の手順で、ベンズアルデヒド **32c–e** からジエンエステル **33c–e** を合成した。



Ethyl (2E,4E)-5-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoate (33c) (yield 85%), yellow crystals:

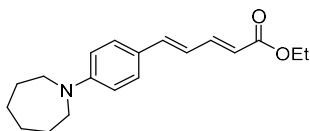
mp 108–109 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1698, 1593, 1117, 1000

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.43 (dd, $J = 11.4, 15.4$ Hz, 1 H), 7.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.70 (dd, $J = 10.8, 15.4$ Hz, 1 H), 5.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.21 (q, $J = 6.9$ Hz, 2 H), 3.23 (m, 4 H), 1.68 (m, 4 H), 1.60 (m, 2 H), 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 167.5, 152.4, 145.6, 140.9, 128.6, 126.2, 122.8, 118.9, 115.4, 60.2, 49.6, 25.6, 24.4, 14.5

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_2$, 286.1807, found 286.1806.



Ethyl (2E,4E)-5-(4-(azepan-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoate (**33d**) (yield 72%), yellow crystals:

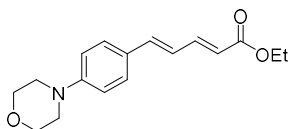
mp 83–85 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1699, 1585, 1518, 1233, 1117, 998

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.44 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 7.34 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.82 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.67 (m, 3 H), 5.86 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.49 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 1.80 (s, 4 H), 1.54 (s, 4 H), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 167.7, 149.7, 146.1, 141.5, 129.1, 123.3, 121.2, 117.8, 111.3, 60.1, 49.4, 27.6, 27.0, 14.5

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{NO}_2$, 300.1964; found, 300.1976.



Ethyl (2E,4E)-5-(4-モルホリノ phenyl)penta-2,4-dienoate (**33e**) (yield 76%), yellow crystals:

mp 128–130 °C

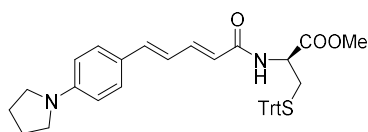
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1700, 1596, 1243, 1116, 1008

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.42 (dd, $J = 10.9, 15.5$ Hz, 1 H), 7.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 6.71 (dd, $J = 10.9, 15.5$ Hz, 1 H), 5.90 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.20 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.83 (m, 4 H), 3.19 (m, 4 H), 1.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 3 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 167.4, 151.7, 145.4, 140.5, 128.6, 127.5, 123.5, 119.5, 115.1, 66.8, 60.3, 48.5, 14.5

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_3$, 288.1600; found, 288.1589.

5.1.2.3. アミド体 **34b-e** の合成



Methyl N-((2E,4E)-5-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoyl)-S-trityl-D-cysteinate (34b).

33b(1.35g, 5mmol)の 2-プロパノール溶液(20mL)に、5 M NaOH 水溶液中(5mL)および水(20mL)を加え、3 時間加熱還流を行った。反応後、5 M HCl 水溶液(5mL)を加えて反応混合物を中和した。生じた沈殿物を吸引濾過によって集め、水で洗浄し、真空中で乾燥して、(2E,4E)-5-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoic acid を得た。得られたジエン酸の DMF 溶液(20 mL)に、D-Cys(S-Trt)-OMe(1.9 g、5 mmol)および 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC · HCl、1.45 g、7.5 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、30°Cで 24 時間攪拌した。反応混合物に水(20 mL)を加えた後、酢酸エチル(200 mL×2)で抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウム乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [2 : 1])で精製し、**34b**(1.6 g、2.6 mmol、52%)を黄色結晶として得た。

mp 94–102 °C

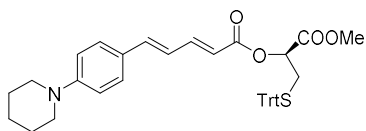
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1645, 1583, 1483, 1139

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.39–7.18 (comp., 18 H), 6.80 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 6.65 (dd, $J = 10.9$ Hz, 1 H), 6.50 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 5.81 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.74 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H), 3.30 (m, 4 H), 2.70 (m, 2 H), 2.00 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 172.3, 166.1, 148.4, 144.4, 143.2, 141.0, 129.6, 128.8, 128.1, 127.0, 123.7, 121.2, 119.8, 111.8, 67.0, 52.7, 51.2, 47.7, 34.2, 25.6

; ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 625.20.

以下、**34b** と同等の手順で、ジエンエステル **33c-e** からアミド体 **34c-e** を合成した。



(*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-(tritylthio)propan-2-yl (2*E*,4*E*)-5-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoate (**34c**)

(yield 60%), yellow crystals:

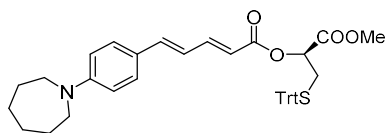
mp 86–89

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1650, 1589, 1510, 1487

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 7.39–7.19 (comp., 18 H), 6.86 (d, J = 8.6 Hz, 2 H), 6.79 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 6.69 (dd, J = 10.9 15.5 Hz, 1 H), 6.05 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 5.84 (d, J = 14.9 Hz, 1 H), 4.74 (m, 1 H), 3.70 (s, 3 H), 3.23 (m, 4 H), 2.70 (m, 2 H), 1.68 (m, 4 H), 1.60 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 171.2, 165.9, 152.3, 144.4, 142.8, 140.2, 129.6, 128.4, 128.1, 127.0, 126.5, 122.8, 120.9, 115.5, 67.0, 52.8, 51.2, 49.7, 34.2, 25.6, 24.4

; ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ 617.27, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 639.25.



Methyl *N*-((2*E*,4*E*)-5-(4-(azepan-1-yl)phenyl)penta-2,4-dienoyl)-*S*-trityl-*D*-cysteinate (**34d**) (yield 45%),

yellow crystals:

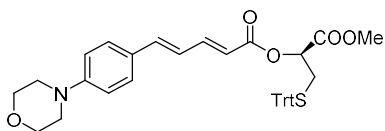
mp 86–89

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1651, 1584, 1515, 1487, 1182, 1141

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 7.44–7.35 (m, 6 H), 7.36–7.30 (m, 3 H), 7.30–7.24 (m, 6 H), 7.21 (t, J = 7.2 Hz, 3 H), 6.79 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 6.69–6.59 (m, 3 H), 5.98 (d, J = 7.4 Hz, 1 H), 5.81 (d, J = 14.9 Hz, 1 H), 4.83–4.65 (m, 1 H), 3.71 (s, 3 H), 3.48 (t, J = 6.0 Hz, 4 H), 2.70 (m, 2 H), 1.79 (m, 4 H), 1.55 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 171.3, 166.1, 149.6, 144.5, 143.3, 140.8, 129.7, 129.0, 128.2, 127.0, 123.6, 121.2, 119.8, 111.3, 67.0, 52.8, 51.2, 49.4, 34.3, 27.7, 27.1

; ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 653.22.



(*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-(tritylthio)propan-2-yl (2*E*,4*E*)-5-(4-モルホリノ phenyl)penta-2,4-dienoate (**34e**)

(yield 62%), yellow crystals:

mp 85–87

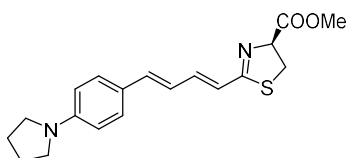
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1732, 1650, 1591, 1511, 1236, 1191

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 7.39–7.19 (comp., 18 H), 6.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.80 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.72 (dd, $J = 10.9$ 15.5 Hz, 1 H), 6.09 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 5.87 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.74 (m, 1 H), 3.85 (m, 4 H), 3.71 (s, 3 H), 3.20 (m, 4 H), 2.70 (m, 2 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-*D*) δ 171.2, 165.8, 151.6, 144.4, 142.6, 139.8, 129.6, 128.4, 128.1, 127.7, 127.0, 123.5, 121.4, 115.2, 67.0, 66.8, 52.8, 51.2, 48.6, 34.2

; ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 641.24.

5.1.2.4. チアゾリン体 **35b–e** の合成



Methyl (*S*)-2-(((1*E*,3*E*)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate (**35b**).

トリフルオロメタンスルホン酸無水物(Tf_2O)(347 μL , 2.1 mmol)の乾燥ジクロロメタン溶液中(5 mL)に、**34b**(640 mg, 1.06 mmol)のジクロロメタン溶液(10 mL)をアルゴン雰囲気下、0 $^\circ\text{C}$ でゆっくり滴下し、30分間攪拌した。飽和 NaHCO_3 水溶液(20 mL)を加えた後、 CHCl_3 (3 \times 20 mL)で抽出した。有機層を合わせ飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [2 : 1])で精製して **35b**(72.6 mg, 0.21 mmol, 21%)をオレンジ色の結晶として得た。

mp 147–149

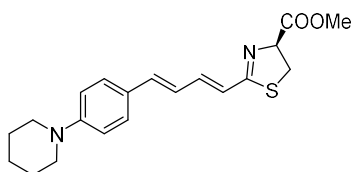
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1713, 1592, 1519, 1153, 984

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM- D) δ 7.33 (d, $J = 8.6$, 2 H), 6.93 (dd, $J = 10.9, 14.9$ Hz, 1 H), 6.75 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.68 (dd, $J = 10.9, 15.5$ Hz, 1 H), 6.51 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 6.49 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 5.15 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 3.82 (s, 3 H), 3.59–3.49 (comp., 2 H), 3.30 (m, 4 H), 1.99 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM- D) δ 171.6, 170.3, 148.4, 144.1, 140.0, 128.8, 123.6, 122.2, 121.9, 111.8, 77.9, 52.9, 47.6, 34.6, 25.6

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 343.1480; found, 343.1509.

以下、**35b** と同等の手順で、アミド体 **34c-e** からチアゾリン体 **35c-e** を合成した。



Methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate (**35c**) (yield 42%), orange crystals:

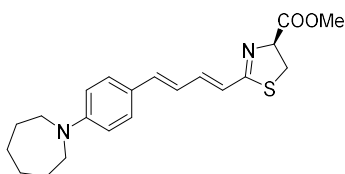
mp 118–119 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1737, 1593, 1512, 1202, 985

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM- D) δ 7.33 (d, $J = 8.6$, 2 H), 6.93 (m, 1 H), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.76–6.71 (comp., 2 H), 6.54 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.15 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 3.81 (s, 3 H), 3.59–3.49 (comp., 2 H), 3.22 (m, 4 H), 1.67 (m, 4 H), 1.59 (m, 2 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM- D) δ 171.5, 170.2, 152.2, 143.6, 139.3, 128.5, 126.4, 123.5, 123.2, 115.5, 78.0, 52.9, 49.6, 34.6, 25.6, 24.4

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 357.1637; found, 357.1675.



Methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(4-(azepan-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate (35d)

(yield 49%), yellow crystals:

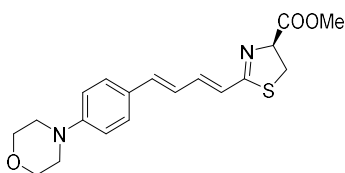
mp 99–101 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1737, 1589, 1150, 982

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.32 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.94 (dd, $J = 15.5, 10.3$ Hz, 1 H), 6.79–6.62 (m, 4 H), 6.51 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.16 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 3.82 (s, 3 H), 3.62–3.51 (m, 2 H), 3.48 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 1.79 (s, 4 H), 1.60–1.51 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 171.5, 170.3, 149.4, 144.0, 139.7, 128.8, 123.4, 122.1, 121.9, 111.2, 77.8, 52.8, 49.3, 34.5, 27.5, 27.0

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 371.1793; found, 371.1800.



Methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(4-モルホリノ phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate (35e)

(yield 62%), yellow crystals:

mp 158–162 °C

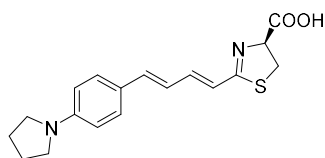
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1734, 1596, 1512, 1121, 985

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.36 (d, $J = 8.6$, 2 H), 6.92 (m, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.76–6.73 (comp., 2 H), 6.55 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.15 (t, $J = 9.1$ Hz, 1 H), 3.82 (m, 4 H), 3.81 (s, 3 H), 3.60–3.49 (comp., 2 H), 3.18 (m, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 171.4, 170.0, 151.6, 143.3, 138.8, 128.4, 127.6, 124.2, 123.7, 115.1, 78.0, 66.8, 52.9, 48.5, 34.6

; HR-ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{19}H_{23}N_2O_3S$, 359.1429; found, 359.1441.

5.1.2.5. AkaLumine 類縁体 **22b–e** の合成



(*S*)-2-((1*E*,3*E*)-4-(4-(pyrrolidin-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**22b**).

チアゾリンエステル **35b**(68 mg、0.2 mmol)に 4 M HCl 水溶液(1 mL)を加え、室温で 24 時間攪拌した。反応混合物を 0 °Cに冷却し、2 M NaOH 水溶液(2 mL)を加え中和し、減圧濃縮した。残渣を ODS クロマトグラフィー(H₂O/アセトニトリル [0/1~1/1])で精製し、**22b**(59 mg、0.18 mmol、90%)を赤色結晶として得た。

mp 190-195 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1714, 1519, 1372, 1149

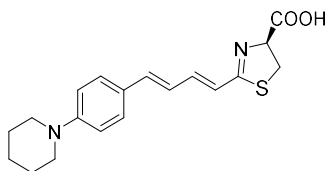
; ¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-D₃) δ 7.35 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 6.95 (ddd, J = 15.5, 8.0, 1.7 Hz, 1 H), 6.77–6.75 (comp., 2 H), 6.54 (d, J = 8.6 Hz, 2 H), 6.48 (d, J = 15.5 Hz, 1 H), 4.94 (t, J = 9.2 Hz, 1 H), 3.59–3.46 (comp., 2 H), 3.30 (m, 4 H), 2.02 (m, 4 H)

; ¹³C-NMR (125 MHz, METHANOL-D₃) δ 175.4, 174.8, 150.4, 148.0, 143.8, 130.3, 124.9, 122.5, 120.3, 112.9, 77.6, 48.6, 35.9, 26.4

; HR-ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{18}H_{21}N_2O_2S$, 329.1322; found, 329.1329

; 77%*e.e.* from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 23.4 min, D-isomer: 25.0 min).

以下、**22b** と同等の手順で、チアゾリン体 **35c–e** から AkaLumine 類縁体 **22c–e** を合成した。



(*S*)-2-(((1*E*,3*E*)-4-(4-(piperidin-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**22c**)

(yield 85%), orange crystals:

mp 210–217 °C

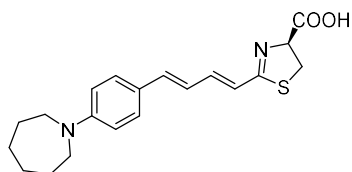
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1722, 1557, 1513, 1151

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- D_3) δ 7.39 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 7.03 (m, 1 H), 6.92 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 6.83–6.85 (m, 2 H), 6.54 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.02 (t, $J = 8.9$ Hz, 1 H), 3.53–3.63 (comp., 2 H), 3.23–3.25 (m, 4 H), 1.59–1.71 (m, 6 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, METHANOL- D_3) δ 176.3, 172.8, 153.8, 145.7, 141.3, 129.6, 128.1, 124.6, 123.0, 116.8, 79.7, 50.9, 36.2, 26.7, 25.4

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ 343.1480, found 343.1487

; 75%*e.e.* from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 22.4 min, D-isomer: 24.4 min).



(*S*)-2-(((1*E*,3*E*)-4-(4-(azepan-1-yl)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**22d**)

(yield 79%), orange crystals:

mp 189–195 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1715, 1515, 1145

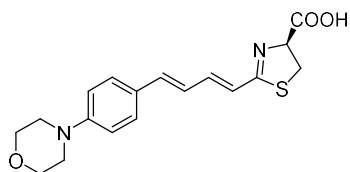
; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- D_3) δ 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.20 (dd, $J = 15.2, 10.6$ Hz, 1 H), 6.92 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 6.80 (dd, $J = 15.2, 10.6$ Hz, 1 H), 6.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.50 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 5.07 (t, $J = 8.3$ Hz, 1 H), 3.83–3.57 (m, 2 H), 3.52 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H), 1.79 (s, 4 H), 1.53 (s, 4 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, METHANOL- D_3) δ 178.3, 171.0, 150.8, 144.7, 140.7, 129.9, 125.0, 123.1, 123.0, 112.3,

82.0, 50.3, 36.7, 28.6, 27.9

; HR-ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{20}H_{25}N_2O_2S$, 357.1637; found, 357.1666

; 77%e.e. from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 31.6 min, D-isomer: 34.2 min).



(*S*)-2-((1*E*,3*E*)-4-(4-モルホリノphenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**22e**) (yield 67%), red crystals:

mp 215-219 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1719, 1511, 1112

; 1H -NMR (500 MHz, METHANOL- D_3) δ 7.41 (d, $J = 8.0$, 2 H), 7.01 (dd, $J = 9.2, 15.5$ Hz, 1 H), 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.89–6.80 (comp., 2 H), 6.55 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.01 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 3.81 (m, 4 H), 3.62–3.51 (comp., 2 H), 3.19 (m, 4H)

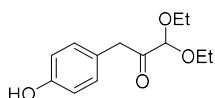
; ^{13}C -NMR (125 MHz, METHANOL- D_3) δ 177.0, 172.1, 153.2, 145.0, 140.7, 129.5, 129.0, 125.1, 123.8, 116.3, 80.5, 67.8, 49.7, 36.4

; HR-ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{18}H_{21}N_2O_3S$, 345.1273; found, 345.1308

; 62%e.e. from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 22.4 min, D-isomer: 26.1 min).

5.1.3. セレンテラジン類縁体 **42a-d** の合成

5.1.3.1. ケトアセタール **44** の合成

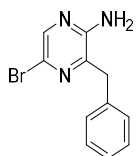


1,1-diethoxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-one (**44**)

4-(ベンジルオキシ)ベンジルクロリド(**43**, 1.16 g, 5.0 mmol)および削り屑状マグネシウム(364 mg, 15 mmol)を入れたアルゴン雰囲気下の枝付きフラスコに、乾燥テトラヒドロフラン(50 mL)を加えた。反応混合物に 1,2-ジブロモエタン(0.1 mL, 0.24 mmol)を加えた後、70 °Cで1時間攪拌した。その後反応混合物を 80 °Cに冷却し、ジエトキシ酢酸エチル(1.3 mL, 7.5 mmol)の乾燥テトラヒドロフラン溶液(20 mL)をゆっくり滴下し、3時間攪拌した。反応混合物に水(50 mL)を加え反応を停止させ室温まで昇温させた後、酢酸エチル(3 × 100 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮して透明油状混合物を得た。得られた混合物にエタノール(20 mL)および 10%パラジウム/炭素(150 mg)を加え、水素雰囲気下室温で2時間攪拌した。反応後、セライト濾過によりパラジウム/炭素を除去し、得られた濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [4 : 1])で精製し、ケトアセタール **44** (350 mg、1.5 mmol、30%)を無色油状として得た。

; ¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.24 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.67-3.73 (m, 2H), 3.52-3.58 (m, 2H), 1.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H)

5.1.3.2. 2-アミノ-3-ベンジル-5-ブロモアミノピラジン **46** の合成



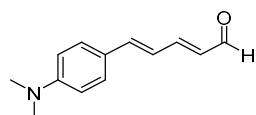
3-benzyl-5-bromopyrazin-2-amine (**46**)

1 M ベンジルマグネシウムクロリド-テトラヒドロフラン溶液(22 mL, 22 mol)と 1 M 塩化亜鉛-テトラヒドロフラン溶液(22 mL, 22 mmol)をアルゴン雰囲気下で混合し、室温で1時間攪拌した。この反応混合物に、2-アミノ-3,5-ジブromoアミノピラジン(**45**, 2.5 g, 10 mmol)とビス(トリフェニルホスフィン)パラジ

ウム(II)ジクロリド(351 mg, 0.5 mmol)のテトラヒドロフラン溶液(20 mL)を加え、4日間室温で攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチル(3×200 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [4:1])で精製し、2-アミノ-3-ベンジル-5-ブロモアミノピラジン **46** (1.3 g, 5.1 mmol, 51%)を茶色油状として得た。

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.03 (s, 1H), 7.21-7.38 (comp., 5H), 4.38 (s, 2H), 4.08 (s, 2H)

5.1.3.3. ジエンアルデヒド **53** の合成



(2E,4E)-5-(4-(dimethylamino)phenyl)penta-2,4-dienal (**53**)

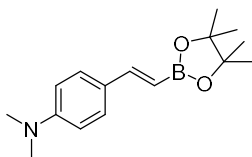
4-ジメチルアミノシナナムアルデヒド(**50**, 876 mg, 5 mmol)、(1,3-ジオキソラン-2-イル)メチルトリフェニルホスホニウムブロミド(4.3 g, 10 mmol)を乾燥テトラヒドロフラン(20 mL)に溶解し、アルゴン雰囲気下 0 °Cで水素化ナトリウム(40%鉱油、1 g, 25 mmol)をゆっくり加えた。反応混合物を室温で3時間攪拌した後、エタノール(1 mL)および水(100 mL)を加えて反応を停止させ、酢酸エチル(3×100 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル [4:1])で精製し、ジエンアルデヒド **53** (900 mg, 4.5 mmol, 90%)を黄色結晶として得た。

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1661, 1584, 1520, 1114, 1064, 1014, 986

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 9.56 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.23–7.30 (m, 1 H), 6.95 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.82 (dd, $J = 15.5, 10.9$ Hz, 1 H), 6.68 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 6.18 (q, $J = 7.6$ Hz, 1 H), 3.03 (s, 6 H)

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NONa}$, 224.1051; found, 224.1064.

5.1.3.4. ピナコールボランエステル **52b-d** の合成



(E)-*N,N*-dimethyl-4-(2-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)vinyl)aniline (**52b**)

2,2,6,6-テトラメチルピペリジン(3.0 mmol)のテトラヒドロフラン(1 mL)溶液にアルゴン雰囲気下 0 °C で 1.6 M *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液(3.0 mmol)を加え、5分攪拌した。この反応混合溶液にビス([ピナコラト]ボリル)メタン(3.0 mmol)テトラヒドロフラン溶液(1 mL)を加え、5分攪拌した。続いて、この反応混合物を-78 °Cに冷却し、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド **49** (2.0 mmol)テトラヒドロフラン溶液(1 mL)をゆっくり加え、4時間攪拌した。その後室温に昇温し、トルエンを加えて減圧濃縮した。得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 4 /1)にて分取し、**52b** (268 mg, 0.98 mmol, 49%)を黄色結晶として得た。

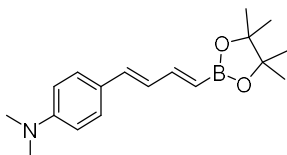
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1600, 1351, 1319, 1136, 1001

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.36 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 7.34 (d, J = 17.8 Hz, 1 H), 6.61 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 5.91 (d, J = 18.3 Hz, 1 H), 2.91 (s, 6 H), 1.28 (s, 12 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 150.65, 149.60, 128.10, 125.55, 111.64, 82.67, 39.94, 24.57

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{BNO}_2$, 274.1978; found, 274.1991.

以下、**52b** と同等の手順で、ジ、トリエン-ピナコールボランエステル **52c**, **52d** を合成した。



N,N-dimethyl-4-((1*E*,3*E*)-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)buta-1,3-dien-1-yl)aniline (**52c**)

(yield 37%), yellow crystals:

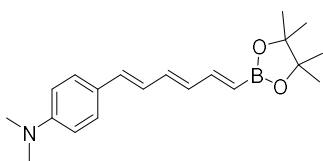
; mp. 98–102 °C

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1594, 1299, 1134, 1012

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHCl_3 - d) δ 7.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.16 (dd, $J = 9.0$ Hz, 1 H), 6.60–6.67 (comp., 4 H), 5.54 (d, $J = 17.8$ Hz, 1 H), 5.25 (s, 1 H), 2.94 (s, 6 H), 1.27 (s, 12 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHCl_3 - d) δ 150.74, 150.34, 136.68, 128.00, 126.29, 124.87, 112.09, 82.90, 40.21, 24.69

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{BNO}$, 300.2135; found, 300.2139.



N,N-dimethyl-4-((1*E*,3*E*,5*E*)-6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)hexa-1,3,5-trien-1-yl)aniline (**52d**) (yield 21%), yellow crystals:

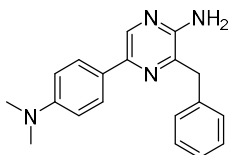
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1590, 1574, 1362, 1332, 1294, 1261, 1147, 1129, 1102, 1015, 972

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHCl_3 - d) δ 7.31 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 7.09 (dd, $J = 17.5, 10.6$ Hz, 1 H), 6.74–6.44 (comp., 5 H), 6.34 (dd, $J = 14.9, 10.9$ Hz, 1 H), 5.53 (d, $J = 17.2$ Hz, 1 H), 2.98 (s, 6 H), 1.28 (s, 12 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHCl_3 - d) δ 150.03, 150.01, 137.61, 135.16, 132.14, 127.64, 125.12, 124.16, 112.06, 82.88, 40.14, 24.63

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{BNO}_2$, 326.2291; found, 326.2297.

5.1.3.5. アミノピラジン誘導体 **47a–d** の合成



3-benzyl-5-(4-(dimethylamino)phenyl)pyrazin-2-amine (**47a**)

2-アミノ-3-ベンジル-5-ブromoピラジン **46** (0.3 mmol)、4-(ジメチルアミノ)フェニルボロン酸(0.45 mmol)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) (0.0015 mmol)を1,4-ジオキサン(1 mL)に溶

解し、アルゴン雰囲気下 1M 炭酸ナトリウム水溶液(1 mL)加えて 90 °Cで 3 時間攪拌した。反応終了後、反応混合物を酢酸エチル(30 mL x 2)で抽出し、飽和食塩水で洗浄した。有機層を合わせ硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮を行った。得られた残渣をフラッシュクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル = 1 / 1)にて分取し、2-アミノ-3-ベンジル-5-ジメチルアミノフェニルピラジン **47a** (73 mg, 0.24 mmol, 80%) を黄色結晶として得た。

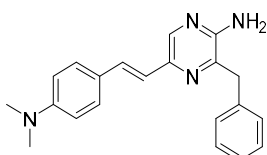
; mp. 159–160 °C; IR (neat, ν , cm^{-1})

: 1607, 1463, 1439, 1424, 1222, 1122, 1062

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.31 (s, 1 H), 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.37–7.19 (comp., 5 H), 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 2 H), 4.30 (s, 2 H), 4.16 (s, 2 H), 3.00 (s, 6 H)

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4$, 305.1766; found, 305.1770.

以下、**47a** と同等の手順で、ピナコールボランエステル **52c-d** からアミノピラジン誘導体 **47c-d** を合成した。

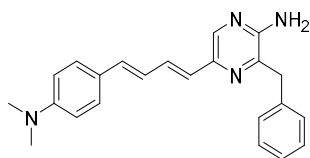


(*E*)-3-benzyl-5-(4-(dimethylamino)styryl)pyrazin-2-amine (**47b**) (yield 84%), yellow crystals:

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1605, 1522, 1452, 1396, 1360, 1184, 1131, 959

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.00 (s, 1 H), 7.47–7.41 (comp., 3 H), 7.34–7.24 (comp., 5 H), 6.92 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 4.30 (s, 2 H), 4.16 (s, 2 H), 3.00 (s, 6 H)

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_4$, 331.1923; found, 331.1927.



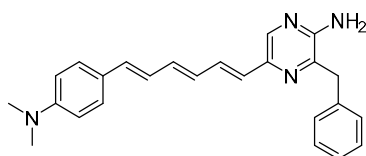
3-benzyl-5-((1E,3E)-4-(4-(dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)pyrazin-2-amine (**47c**) (yield 85%), yellow crystals:

; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1594, 1517, 1451, 1402, 1349, 1156, 990

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.90 (s, 1 H), 7.35–7.23 (comp., 8 H), 6.80 (dd, $J = 15.3, 11.0$ Hz, 1 H), 6.69–6.65 (comp., 3 H), 6.55 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.40 (s, 2 H), 4.11 (s, 2 H), 2.96 (s, 6 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 151.07, 150.07, 141.88, 140.89, 138.88, 136.68, 134.20, 131.14, 128.93, 128.48, 127.58, 126.97, 126.21, 125.72, 124.75, 112.33, 41.26, 40.35

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_4$, 357.2079; found, 357.2073.



3-benzyl-5-((1E,3E,5E)-6-(4-(dimethylamino)phenyl)hexa-1,3,5-trien-1-yl)pyrazin-2-amine (**47d**) (yield 89%), yellow crystals:

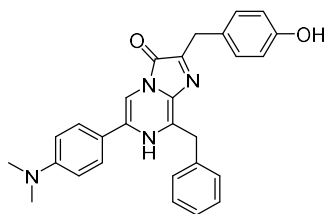
; IR (neat, ν , cm^{-1}): 1582, 1516, 1451, 1402, 1347, 995

; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CHLOROFORM-D) δ 7.90 (s, 1 H), 7.33–7.22 (comp., 8 H), 6.73 (dd, 15.5, 10.9 Hz, 1 H), 6.67 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 6.61–6.41 (m, 4 H), 4.48–4.35 (2 H), 4.17–4.06 (2 H), 2.96 (s, 6 H)

; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CHLOROFORM-D) δ 151.30, 150.15, 141.83, 141.11, 139.29, 136.76, 135.62, 133.60, 130.97, 130.75, 129.12, 128.64, 127.70, 127.24, 127.17, 125.86, 125.19, 112.46, 41.45, 40.52

; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4$, 383.2236; found, 383.2229.

5.1.3.6. セレンテラジン類縁体 **42a-d** の合成



8-benzyl-6-(4-(dimethylamino)phenyl)-2-(4-hydroxybenzyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one (42a)

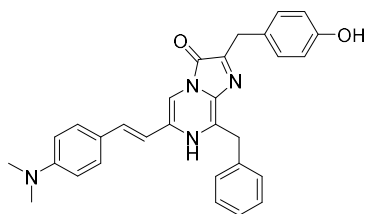
アミノピラジン誘導体 **47a** (30 mg, 0.1 mmol)、ケトアセタール **44** (36 mg, 0.15 mmol)をエタノール (1.0 mL)に溶解し、12 M 塩酸(100 μ L)を加え、60 °Cで12時間攪拌した。反応終了後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ / MeOH = 10 / 1 to 5 / 1)で分取し、セレンテラジン類縁体 **42a** (20 mg, 0.080 mmol, 80%)を茶色固体として得た。

; ¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-D₃) δ 7.91 (s, 1 H), 7.44 (d, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 7.38 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 7.28–7.31 (m, 2 H), 7.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 7.16 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 6.79 (d, *J* = 9.2 Hz, 2 H), 6.69 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 2 H), 4.40 (s, 2H), 4.06 (s, 2 H), 2.97 (d, *J* = 12.0 Hz, 6 H)

; ¹³C-NMR (125 MHz, METHANOL-D₃) δ 155.66, 151.51, 136.76, 129.47, 129.28, 128.45, 128.39, 127.26, 126.86, 114.85, 112.05, 105.63, 72.19, 60.92, 39.07

; HR-ESI-MS: *m/z*: [M+H]⁺ calcd for C₂₈H₂₇N₄O₂, 451.2134; found, 451.2130, [M+Na]⁺ calcd for C₂₈H₂₆N₄O₂Na, 473.1947; found, 473.1953.

以下、**42a** と同等の手順で、セレンテラジン類縁体 **42b-d** を合成した。

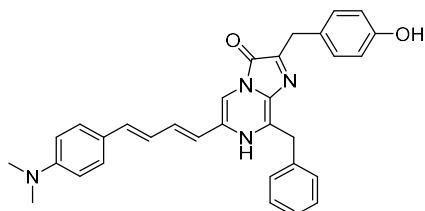


(E)-8-benzyl-6-(4-(dimethylamino)styryl)-2-(4-hydroxybenzyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one (**42b**) (yield 78%), brown crystals:

; ¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-D₃) δ 7.51 (s, 1 H), 7.37 (t, *J* = 7.7 Hz, 4 H), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 7.23

(t, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 7.14 (t, $J = 8.3$ Hz, 3 H), 6.68–6.73 (m, 5 H), 4.40 (s, 2 H), 4.04 (s, 2 H), 2.97 (s, 6 H)

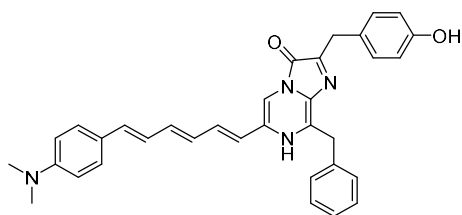
; HR-ESI-MS: m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{30}H_{29}N_4O_2$, 477.2291; found, 477.2287, $[M+Na]^+$ calcd for $C_{30}H_{28}N_4O_2Na$, 499.2104; found, 499.2094.



8-benzyl-6-((1E,3E)-4-(4-(dimethylamino)phenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-2-(4-hydroxybenzyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one (**42c**) (yield 40%), brown crystals:

; 1H -NMR (500 MHz, METHANOL- D_3) δ 7.47 (s, 1 H), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H), 7.27–7.33 (m, 4 H), 7.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.02–7.09 (m, 1 H), 6.77 (dd, $J = 15.2, 10.6$ Hz, 1 H), 6.62–6.71 (m, 5 H), 6.33 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.38 (s, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 3.87 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 2.95 (s, 6 H)

; HR-ESI-MS: m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{32}H_{31}N_4O_2$, 503.2447; found, 503.2463, $[M+Na]^+$ calcd for $C_{32}H_{30}N_4O_2Na$, 525.2266; found, 525.2263.



8-benzyl-6-((1E,3E,5E)-6-(4-(dimethylamino)phenyl)hexa-1,3,5-trien-1-yl)-2-(4-hydroxybenzyl)imidazo[1,2-a]pyrazin-3(7H)-one (**42d**) (yield 28%), brown crystals:

; 1H -NMR (500 MHz, METHANOL- D_3) δ 7.47 (s, 1H), 7.27–7.37 (comp., 7 H), 7.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.02–7.09 (m, 2 H), 6.77 (dd, $J = 15.2, 10.6$ Hz, 1 H), 6.62–6.71 (m, 6 H), 6.33 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.38 (s, 2 H), 4.03 (s, 2 H), 2.95 (s, 6 H)

; HR-ESI-MS: m/z : $[M+H]^+$ calcd for $C_{34}H_{33}N_4O_2$, 529.2604; found, 529.2637, $[M+Na]^+$ calcd for $C_{34}H_{32}N_4O_2Na$, 551.2423; found, 551.2409, $[M+K]^+$ calcd for $C_{34}H_{32}N_4O_2K$, 567.2162; found, 567.2144.

5.2. 測定の部

5.2.1. Akalumine 類縁体 **22a-e** および **1** の発光測定

5.2.1.1. *In vitro* 生物発光測定

5.2.1.1.1. 生物発光スペクトル測定

室温(20~25 °C)で GTA 緩衝液(0.15 M、pH 8.0)中、**22a-e** と *Ppy* ルシフェラーゼ(promega)との L-L 反応を行った。**22a-e**(100 μM)の GTA 緩衝液(5 μL)、*Ppy* ルシフェラーゼ(1.0 mg/mL)の 10%グリセロールを含む GTA 緩衝液(5 μL)、0.10 M MgSO₄ の GTA 緩衝液(5 μL)および GTA 緩衝液(35 μL)をポリスチレンチューブに入れた。この溶液に、ATP ATP 二ナトリウム塩(Na₂-ATP、1.0 mM)の GTA 緩衝液(50 μL)をガスタイトシリンジで注入して L-L 反応を開始させた。発光スペクトルを AB-1850 分光光度計(スリット幅:0.25 mm、露光時間:60 秒)で測定した。最終濃度は、**22a-e**: 5.0 μM、*Ppy* ルシフェラーゼ: 50 μg/ mL、MgSO₄: 5.0 mM および Na₂-ATP: 0.50 mM であった。

5.2.1.1.2. 酵素反応速度論解析

室温(20~25 °C)で、**22a-e**、*Ppy* ルシフェラーゼ、MgSO₄、および Na₂-ATP との L-L 反応の発光を、AB-2270 ルミノメーターで測定した。発光強度を 30 秒間モニターし、初期速度を 30 秒間の発光強度の積分値として推定した。アッセイは、**22a-e**(種々の濃度)の GTA 緩衝液(5 μL)、*Ppy* ルシフェラーゼ(0.5 μg/mL)の 10%グリセロールを含む GTA 緩衝液(5 μL)、0.10 M MgSO₄ の GTA 緩衝液(5 μL)および GTA 緩衝液(35 μL)をポリスチレンチューブに入れた。この溶液に、ATP ATP 二ナトリウム塩(Na₂-ATP、1.0 mM)の GTA 緩衝液(50 μL)をガスタイトシリンジで注入して L-L 反応を開始させた。最終濃度は、**22a** および **22b**: 0.01–5.0 μM、**22c** および **22d**: 0.1–5.0 μM、**22e**: 0.25–10 μM、*Ppy* ルシフェラーゼ: 25 ng/mL、MgSO₄: 5.0 mM および Na₂-ATP: 0.50 mM である。すべてのアッセイは 3 回測定した。 K_m と $rel. V_{max}$ 値は、Lineweaver-Burk プロットを用いて計算した²³²⁴。 $rel. V_{max}$ 値は、Akalumine **22a** の V_{max} 値を 1.0 とした際の相対比で表した。

5.2.1.1.3. 生物発光量子収率測定

室温(20~25 °C)、GTA 緩衝液中における **22a-e** と *Ppy* ルシフェラーゼの L-L 反応の生物発光量子収率(Φ_{bl})を、24 °C、GTA 緩衝液中における **1** と天然ホタルから精製した *Ppy* ルシフェラーゼ(Sigma-Aldrich Co. LLC.)との L-L 反応(**1**: 0.10 μ M, 5.0 μ L、*Ppy* ルシフェラーゼ: 1.0 mg/mL, 5.0 μ L、0.10 M $MgSO_4$: 5.0 μ L、GTA 緩衝液: 35 μ L)により測定された報告値(Φ_{bl} = 0.476)から相対的に決定した。AB-1850 分光光度計(スリット幅: 0.25mm)を用いて、L-L 反応の発光スペクトルを反応が完了するまで露光させた。アッセイは、**22a-e** の GTA 緩衝液(5.0 μ M, 5.0 μ L)、*Ppy* ルシフェラーゼの 10%グリセロールを含む GTA 緩衝液(1.0 mg/mL, 5.0 μ L)、0.10 M $MgSO_4$ の GTA 緩衝液(5.0 μ L)および GTA 緩衝液(35 μ L)をポリスチレンチューブに入れた。この溶液に、ATP ニナトリウム塩(Na_2 -ATP、1.0 mM)の GTA 緩衝液(50 μ L)をガスタイトシリンジで注入して L-L 反応を開始させた。同様に、GTA 緩衝液中の組換え *Ppy* ルシフェラーゼを用いた **22a-e** の L-L 反応の発光スペクトルを同じ測定条件下で測定した。アッセイのために、GTA 緩衝液中の **22a-e** の 1.2 μ M 溶液を使用した。すべてのアッセイを 3 回測定した。**22a-e** の分子数当たりの発光スペクトルの面積を計算し、**22a-e** と **1** の面積比により **1** の報告値(Φ_{bl} = 0.476)から相対的に Φ_{bl} 値を計算した。

5.2.1.2. *In vivo* 生物発光イメージング測定

5.2.1.2.1. *In vivo* 生物発光イメージング測定

生物発光イメージング測定のために、CAG-ffLuc-cp156 トランスジェニックマウス⁵⁹(C57BL / 6, 6 ヶ月齢)を脱毛クリームによる除毛後に使用した。マウスを 2%イソフルランで麻酔し、**22a-e** および **1**(20% MeOH 含有リン酸緩衝化生理食塩水[PBS]中 1 mM、100 μ L)を腹腔内注射した。注入後直ちに、多機能インビボイメージングシステムを用いて測定を実施した。5 秒の露光時間で発光を 5,400 秒間モニターした。動物の実験手順および飼育条件は、理化学研究所の動物実験委員会によって承認され、すべての動物は動物実験のための施設ガイドラインに従って処理された。

5.2.1.2.2. Venus-*Ppy* 発現 HeLa 細胞による生物発光スペクトル測定

HeLa 細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および1% penicillin-streptomycin 溶液を含有するダルベッコ変法イーグル培地中の 60 mm ディッシュ上で増殖させた。cDNA トランスフェクションをコードする Venus-*Ppy*(luc2、Promega corp.)は、polyethlenimine(PEI, linear, MW 25,000)を用いて行った。トランスフェクションの 24 時間後にトリプシン処理し、PBS で懸濁した Venus-*Ppy* 発現 HeLa 細胞を使用した。**22a-e** および **1**(1 mM)の 10%MeOH 含有 PBS 緩衝液(80 μ L)を Venus-*Ppy* 発現 HeLa 細胞(600 cell/ μ L、20 μ L)に注入することによって L-L 反応を開始した。AB-1850-iV 分光光度計(露光時間：60 秒)を用いて発光スペクトルを測定した。

5.2.2. セレンテラジン類縁体および **2** の発光測定

5.2.2.1. *In vitro* 生物発光測定

5.2.2.1.1. ルシフェラーゼの発現および精製

Rluc および Rluc8、Rluc8.6_535、Rluc8.6_547 をコードするルシフェラーゼレポーター遺伝子を、製造者の指示書(Promega、Madison、WI、USA および MMIL, Stanford, CA, USA)に従って合成した。ルシフェラーゼ遺伝子を、5'-BamHI および 3'-EcoRI 部位を含むプライマーを用いて増幅し、制限された産物を pRSETB(Thermo Fisher Scientific Inc.)の BamHI / EcoRI 部位にインフレームでクローニングして、pRSETB/Rluc、pRSETB/Rluc8、pRSETB/Rluc8.6_535 および pRSETB/Rluc8.6_547 と命名した。

N 末端にポリヒスチジンタグを有する組換えルシフェラーゼを大腸菌[JM109(DE3)]で発現させた。形質転換した大腸菌を、LB/ampicillin 培地中、室温で穏やかに振盪しながら数日間培養した。ルシフェラーゼを、PBS 緩衝液中の 100mM イミダゾールを用いてニッケルキレートカラム(Qiagen)上で透明溶解物から精製して、タンパク質を溶出させた。溶出サンプルから MonoQ FPLC(GE healthcare Life Sciences)によりさらに精製した。標準としてウシ血清アルブミンを用いた、ビスンコニン酸(BCA)法(BCA Protein Assay Kit、Pierce)によりタンパク質濃度を推定した。

5.2.2.1.2. 生物発光スペクトル測定

室温(20~25°C)で HEPES 緩衝液(50 mM、pH 6.5)中、セレンテラジン **2** およびセレンテラジン類縁体 **42a-d** と Rluc ルシフェラーゼおよびその変異体(Rluc8、Rluc8.6_535、Rluc8.6_547)との L-L 反応を行った。ルシフェラーゼの HEPES 緩衝液(0.1 mg/mL、10 μ L)をポリスチレンチューブに入れ、この溶液に **2** および **42a-d** の HEPES 緩衝液(10 μ M、90 μ L)をプラスチック製注射器で注入して L-L 反応を開始させた。発光スペクトルを AB-1850 分光光度計(スリット幅：0.25 mm、露光時間：60 秒)で測定した。最終濃度は、**2** および **42a-d**：5.0 μ M、ルシフェラーゼ：50 μ g/mL、MgSO₄：5.0 mM および Na₂-ATP：0.50 mM であった。

5.2.2.1.3. 酵素反応速度論解析

室温(20~25°C)で HEPES 緩衝液(50 mM、pH 6.5)中、セレンテラジン **2** およびセレンテラジン類縁体 **42a-d** と Rluc ルシフェラーゼおよびその変異体(Rluc8、Rluc8.6_535、Rluc8.6_547)との L-L 反応を、AB-2270 ルミノメーターで測定した。発光強度を 5 秒間モニターし、初期速度を 5 秒間の発光強度の積分値として推定した。ルシフェラーゼの pH7.2 50 mM HEPES 緩衝液(50 nM、10 μ L)をポリスチレンチューブに入れ、この溶液に **2** および **42a-d** の HEPES 緩衝液(90 μ L)をプラスチック製注射器で注入し L-L 反応を開始させた。最終濃度は、**2** および **42a**：0.047–9.0 μ M、**42b**：0.047–1.5 μ M、**42c**：0.016–0.5 μ M、**42d**：0.016–0.5 μ M、ルシフェラーゼ：5 nM である。すべてのアッセイを 5 回測定した。K_m と rel. V_{max} 値は、Lineweaver-Burk プロットを用いて計算した。Rel. V_{max} 値は、**42a** および Rluc ルシフェラーゼの V_{max} 値を 1.0 とした際の相対比で表した。

5.2.2.1.4. 生物発光量子収率測定

室温(20~25°C)で HEPES 緩衝液(50 mM、pH 6.5)中、セレンテラジン **2** およびセレンテラジン類縁体 **42a-d** と Rluc ルシフェラーゼおよびその変異体(Rluc8、Rluc8.6_535、Rluc8.6_547)との L-L 反応の相対生物発光量子収率(rel. ϕ_b)を測定した。**2** および **42a-d** の HEPES 緩衝液(1.0 μ M、10 μ L)をポリスチレンチューブに入れ、ルシフェラーゼの HEPES 緩衝液(10 nM、90 μ L)プラスチック製注射器で注入して L-L 反

応を開始させた。AB-1850 分光光度計(スリット幅：0.25 mm)を用いて、L-L 反応の発光スペクトルを反応が完了するまで露光させた。**42a-d** の分子数当たりの発光スペクトルの面積を計算し、**42a** および Rluc ルシフェラーゼの V_{\max} 値を 1.0 とした際の相対比で表した。

5.2.2.2. 化学発光測定

5.2.2.2.1. 化学発光スペクトル測定

室温(20~25°C)で **2** および **42a-d** のメタノール溶液(1.0 mM, 10 μ L)をポリスチレンチューブに入れ、TMG-DMSO 溶液(0.1 M)、pH5.6 acetate 溶液液含有(0.66% v/v)DGM 溶液および牛血清アルブミン(BSA)含有(2% w/v) PBS 緩衝液をそれぞれ 990 μ L プラスチック製注射器で注入して化学発光反応を開始させた。発光スペクトルを AB-1850 分光光度計(スリット幅：0.25 mm、露光時間：TMG-DMSO：3 分、DGM-pH5.6 acetate 水溶液：1.5 時間、PBS 緩衝液-BSA：10 分)で測定した。最終濃度は、**42a-d**：10 μ M であった。

5.2.2.2.2. 蛍光測定

室温(20~25°C)で **2** および **42a-d** のメタノール溶液(1.0 mM, 200 μ L)をガラスバイアルに入れ、TMG-DMSO 溶液(0.1 M, 1.8 mL)を加えて化学発光反応を開始させた。10 分以上経過した後、溶液を 5 mL を抜き出しそこに MsOH(0.5 mmol, 32 μ L)、TBAOH メタノール溶液(37% w/w, 0.05 mmol, 446 μ L)をそれぞれ加えた。これらの溶液の蛍光スペクトルおよび蛍光量子収率を絶対 PL 量子収率測定システムを用いて励起スキャン(300-520 nm, 10 nm 毎)により測定した。

6. 参考文献

- (1) 羽根田弥太. 発光生物; 恒星社厚生閣, 1985.
- (2) Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, rev. Ed.; World Scientific: Singapore, 2012.
- (3) Bitler, B.; McElroy, W. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *72* (2), 358–368.
- (4) Seliger, H. H.; McElroy, W. D.; White, E. H.; Field, G. F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, *47* (8), 1129–1134.
- (5) Conti, E.; Franks, N. P.; Brick, P. *Structure* **1996**, *4* (3), 287–298.
- (6) Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. *Nature* **2006**, *440* (7082), 372–376.
- (7) Shimomura, O.; Masugi, T.; Johnson, F. H.; Haneda, Y. *Biochemistry* **1978**, *17* (6), 994–998.
- (8) Hall, M. P.; Unch, J.; Binkowski, B. F.; Valley, M. P.; Butler, B. L.; Wood, M. G.; Otto, P.; Zimmerman, K.; Vidugiris, G.; MacHleidt, T.; Robers, M. B.; Benink, H. A.; Eggers, C. T.; Slater, M. R.; Meisenheimer, P. L.; Klaubert, D. H.; Fan, F.; Encell, L. P.; Wood, K. V. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (11), 1848–1857.
- (9) Lorenz, W. W.; McCann, R. O.; Longiaru, M.; Cormier, M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (10), 4438–4442.
- (10) Verhaegent, M.; Christopoulos, T. K. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (17), 4378–4385.
- (11) Thompson, E. M.; Nagata, S.; Tsuji, F. I. *Biochemistry* **1989**, *86* (September), 6567–6571.
- (12) Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Kohama, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69* (August), 2086–2089.
- (13) Ohtsuka, H.; Rudie, N. G.; Wampler, J. E. *Biochemistry* **1976**, *15* (5), 1001–1004.
- (14) Rudie, N. G.; Michael, J.; Mulkerrin, G.; Wampler, J. E. *Biochemistry* **1981**, *20* (2), 344–350.
- (15) Nakamura, H.; Kishi, Y.; Shimomura, O.; Morse, D.; Hastings, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (19), 7607–7611.
- (16) Schultz, L. W.; Liu, L.; Cegielski, M.; Hastings, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (5), 1378–1383.
- (17) Li, L.; Hong, R.; Hastings, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (17), 8954–8958.
- (18) Petushkov, V. N.; Rodionova, N. S. *Dokl. Biochem. Biophys.* **2005**, *401* (1–6), 115–118.

- (19) Purto, K. V.; Petushkov, V. N.; Baranov, M. S.; Mineev, K. S.; Rodionova, N. S.; Kaskova, Z. M.; Tsarkova, A. S.; Petunin, A. I.; Bondar, V. S.; Rodicheva, E. K.; Medvedeva, S. E.; Oba, Y.; Oba, Y.; Arseniev, A. S.; Lukyanov, S.; Gitelson, J. I.; Yampolsky, I. V. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (28), 8124–8128.
- (20) Jiang, T.; Yang, X.; Zhou, Y.; Yampolsky, I.; Du, L.; Li, M. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 7008–7018.
- (21) Viviani, V. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59* (11), 1833–1850.
- (22) Fraga, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7* (2), 146.
- (23) Thompson, J. F.; Geoghegan, K. F.; Lloyd, D. B.; Lanzetti, A. J.; Magyar, R. A.; Anderson, S. M.; Branchini, B. R. *FASEB J.* **1997**, *11* (9), 18766–18771.
- (24) Branchini, B. R.; Magyar, R. a; Murtiashaw, M. H.; Anderson, S. M.; Zimmer, M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 15311–15319.
- (25) Takai, A.; Nakano, M.; Saito, K.; Haruno, R.; Watanabe, T. M.; Ohyanagi, T. **2015**.
- (26) Jiang, T.; Yang, X.; Yang, X.; Yuan, M.; Zhang, T.; Zhang, H.; Li, M. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (23), 5272–5281.
- (27) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Carmody, J. N.; Mygatt, E. E.; Southworth, T. L. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (17), 3860–3864.
- (28) Kiyama, M.; Saito, R.; Iwano, S.; Obata, R.; Niwa, H.; Maki, S. A. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16* (24), 2648–2655.
- (29) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. *Nat. Photonics* **2008**, *2* (January), 44–47.
- (30) Wang, Y.; Kubota, H.; Yamada, N.; Irie, T.; Akiyama, H. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87* (9), 846–852.
- (31) Niwa, K.; Ichino, Y.; Kumata, S.; Nakajima, Y.; Hiraishi, Y.; Kato, D. I.; Viviani, V. R.; Ohmiya, Y. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86* (5), 1046–1049.
- (32) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. *Genes Dev.* **2003**, *17* (5), 545–580.
- (33) Nienhaus, G. U. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (47), 8992–8994.
- (34) 今井一洋; 近江谷克裕. バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック; 丸善株式会社, 2006.

- (35) Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- (36) Jacques, S. L. *Phys. Med. Biol.* **2013**, *58* (14), 5007–5008.
- (37) Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C.; Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H. *Tetrahedron* **2013**, *69* (19), 3847–3856.
- (38) Kuchimaru, T.; Iwano, S.; Kiyama, M.; Mitsumata, S.; Kadonosono, T. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (May), 1–8.
- (39) Mezzanotte, L.; Root, M. van 't; Karatas, H.; Goun, E. A.; Löwik, C. W. G. M. G. M. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35* (7), 640–652.
- (40) McElroy, W. D.; DeLuca, M. In *Chemistry of firefly luminescence. Bioluminescence in Action*; Academic Press: London, 1978; p 109–127.
- (41) Shimomura, O. In *The fireflies and luminous insects. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods, rev. Ed.*; World Scientific: Singapore, 2012; p 1–30.
- (42) Hirano, T. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 2638–2647.
- (43) White, E.; Wörther, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (9), 2015–2019.
- (44) Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1800–1810.
- (45) Kojima, R.; Takakura, H.; Ozawa, T.; Tada, Y.; Nagano, T.; Urano, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1175–1179.
- (46) Reddy, G. R.; Thompson, W. C.; Miller, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (39), 13586–13587.
- (47) Mofford, D. M.; Reddy, G. R.; Miller, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (38), 13277–13282.
- (48) Evans, M. S.; Chaurette, J. P.; Adams, S. T.; Reddy, G. R.; Paley, M.; Aronin, N.; Prescher, J.; Miller, S. C. *Nat. Methods* **2014**, *11* (4), 393–395.
- (49) Adams, S. T.; Mofford, D. M.; Reddy, G. S. K. K.; Miller, S. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (16), 4943–4946.
- (50) Conley, N. R.; Dragulescu-andrasi, A.; Rao, J.; Moerner, W. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3350–3353.
- (51) Miura, C.; Kiyama, M.; Iwano, S.; Ito, K.; Obata, R.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9726–9734.

- (52) Fukuchi, M.; Izumi, H.; Mori, H.; Kiyama, M.; Otsuka, S.; Maki, S.; Maehata, Y.; Tabuchi, A.; Tsuda, M. *Sci Rep.* **2017**, *7* (1), 4949.
- (53) Jathoul, A. P.; Grounds, H.; Anderson, J. C.; Pule, M. A. *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1–6.
- (54) Anderson, J. C.; Grounds, H.; Jathoul, A. P.; Murray, J. A. H.; Pacman, S. J.; Tisi, L. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 3975–3982.
- (55) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Kiyama, M.; Goto, F.; Matsushashi, T.; Yamaji, M.; Maki, S.; Hirano, T. *Chem. Lett.* **2017**, *46* (8), 1090–1092.
- (56) You, S.; Razavi, H.; Kelly, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 83–85.
- (57) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (2), 486–494.
- (58) Ito, K.; Yamaguchi, T.; Murai, T.; Utsunomiya, Y.; Onishi, H.; Lu, K.; Nakatsu, T.; Kato, H. *ELCAS J.* **2017**, *2*, 53–57.
- (59) Hara-Miyauchi, C.; Tsuji, O.; Hanyu, A.; Okada, S.; Yasuda, A.; Fukano, T.; Akazawa, C.; Nakamura, M.; Imamura, T.; Matsuzaki, Y.; Okano, H. J.; Miyawaki, A.; Okano, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *419* (2), 188–193.
- (60) Waring, M. J. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (10), 2844–2851.
- (61) Waring, M. J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5* (3), 235–248.
- (62) Yeh, H. W.; Karmach, O.; Ji, A.; Carter, D.; Martins-Green, M. M.; Ai, H. W. *Nat. Methods* **2017**, *14* (10), 971–974.
- (63) Jiang, T.; Du, L.; Li, M. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15* (4), 466–480.
- (64) Wu, C.; Nakamura, H.; Murai, A.; Shimomura, O. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (16), 2997–3000.
- (65) Inouye, S.; Miura, Y.; Yoshida, S.; Hosoya, T. PROCESS FOR PRODUCING v-COELENTERAZINE COMPOUNDS. US 20120232272 A1.
- (66) Inouye, S.; Sahara, Y.; Hosoya, T. Coelenterazine analogues and coelenteramide analogues. US 20110244481 A1.

- (67) Giuliani, G.; Molinari, P.; Ferretti, G.; Cappelli, A.; Anzini, M.; Vomero, S.; Costa, T. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53 (38), 5114–5118.
- (68) Shakhmin, A.; Hall, M. P.; Machleidt, T.; Walker, J. R.; Wood, K. V.; Kirkland, T. A. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 8559–8567.
- (69) Nishihara, R.; Suzuki, H.; Hoshino, E.; Suganuma, S.; Sato, M.; Saitoh, T.; Nishiyama, S.; Iwasawa, N.; Citterio, D.; Suzuki, K. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (2), 391–394.
- (70) Coombs, J. R.; Zhang, L.; Morken, J. P. *Org. Lett.* **2015**, 17 (7), 1708–1711.
- (71) So, M.-K.; Loening, A. M.; Gambhir, S. S.; Rao, J. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1160–1164.
- (72) Loening, A. M.; Fenn, T. D.; Gambhir, S. S. *J. Mol. Biol.* **2007**, 374 (4), 1017–1028.
- (73) Loening, A. M.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S. *Nat. Methods* **2007**, 4 (8), 641–643.
- (74) Takahashi, Y.; Kondo, H.; Maki, S.; Niwa, H.; Ikeda, H.; Hirano, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (34), 6057–6061.
- (75) Goto, T.; Inoue, S.; Sugiura, S. *Tetrahedron Lett.* **1968**, No. 36, 3873–3876.
- (76) Goto, T. *Pure Appl. Chem.* **1968**, 17, 421–442.
- (77) Goto, T.; Fukatsu, H. *Tetrahedron Lett.* **1969**, No. 49, 4299–4302.
- (78) Hirano, T.; Takahashi, Y.; Kondo, H.; Maki, S.; Kojima, S.; Ikeda, H.; Niwa, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7 (2), 197–207.
- (79) Mori, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Ikeda, H.; Hirano, T. *Tetrahedron* **2006**, 62 (26), 6272–6288.
- (80) Inouye, S.; Sato, J.; Miura, Y. Coelenterazine analogs. US 20140302539 A1, 2014.
- (81) Inouye, S.; Sato, J. -i.; Sahara-Miura, Y.; Yoshida, S.; Kurakata, H.; Hosoya, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, 437 (1), 23–28.
- (82) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Jr., J. E. P.; Ogliaro,

F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc.: Wallingford CT 2009.

- (83) Becke, A. *J. Chem. Phys* **1993**, *98*, 5648.
- (84) Lee, C.; Yang, W.; G, R. *Parr. Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- (85) Stephens, P.; Devlin, F.; Chabalowski, C.; Frisch, M. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.
- (86) Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. Semichem Inc.: Shawnee Mission KS 2009.

7. 謝辞

本研究は、電気通信大学大学院情報理工学研究科先進理工学専攻において、牧昌次郎助教、平野誉教授のご指導のもとで行ったものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、ご助言をいただきました本学脳科学ライフサポートセンター 丹羽治樹特任教授、慶應義塾大学文学部化学教室 小島りか助教に感謝いたします。事務関連の数々の手続きを行っていただいた牧研究室秘書 宮川朋子様にも感謝致します。

また本学研究企画室(URA)の小島様、関口様、亀上様には、産学連携、特許に関するアドバイスを頂き、感謝いたします。また、電気通信大学 TLO キャンパスクリエイト(株)の坂田様、角田様、塚様、米内様には、展示会・企業連携においてご協力、ご配慮いただき感謝申し上げます。

黒金化成株式会社 加藤様、高鳥様には AkaLumine および Tokeoni のサンプル提供をいただき、感謝致します。

また、留学先であるカリフォルニア大学バークレー校において受け入れていただきました Gerard Marriott 教授に感謝いたします。

動物実験のデータおよび酵素 Rluc ルシフェラーゼの作製は、理化学研究所 脳科学総合研究センター(理研 BSI)・細胞機能探索技術開発チーム 宮脇敦史チームリーダー、岩野智基礎科学特別研究員に行って頂きました。厚く感謝申し上げます。

牧研究室の博士課程 北田昇雄氏、齊藤亮平氏には公私共々大変お世話になりました。

N7 員環 AkaLumine の合成を最初にしていただきました大塚氏、セレンテラジンの化学発光を教えてくださいました金井氏、セレンテラジンの特許に関わる合成を行っていただいた盛満氏、玉城氏を始め、平野・牧研究室の方々に深く感謝いたします。

海外の国際学会への参加や留学の際に助成を下さった本学創立 80 周年記念学術交流基金、学長裁学長裁量経費海外派遣助成、および丸文財団殿、吉田科学技術財団殿に感謝申し上げます。

末筆ながら、博士課程取得に理解をいただき、経済的、精神的に支えていただいた両親に深く感謝申し上げます。

木山 正啓

関連論文の印刷公表の方法および時期

(1)

全著者名 : Masahiro Kiyama, Satoshi Iwano, Satoshi Otsuka, Shijia W. Lu, Rika Obata, Atsushi Miyawaki,

Takashi Hirano, Shojiro A. Maki

論文題目 : Quantum Yield Improvement of Red-light-emitting Firefly Luciferin Analogues for in vivo

Bioluminescence Imaging

平成30年2月 *Tetrahedron*, **74**, 652–660

参考論文の印刷公表の方法および時期

(1)

全著者名 : Satoshi Iwano, Rika Obata, Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Kazutoshi Hama, Mitsuhiko

Nakamura, Yoshiharu Amano, Satoshi. Kojima, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa

論文題目 : Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light

平成 25 年 5 月 *Tetrahedron*, **69**, 3847–3856

(2)

全著者名 : Chiro Miura, Masahiro Kiyama, Satoshi Iwano, Kazuto Ito, Rika Obata, Takashi Hirano, Shojiro

Maki, Haruki. Niwa

論文題目 : Synthesis and Luminescence Properties of Biphenyl-Type Firefly Luciferin Analogs with a New, near-Infrared Light-Emitting Bioluminophore

平成 25 年 9 月 *Tetrahedron*, **69**, 9726–9734

(3)

全著者名 : Takahiro Kuchimaru, Satoshi Iwano, Masahiro Kiyama, Shun Mitsumata,, Tetsuya Kadonosono,

Haruki Niwa, Shojiro Maki, Shinae Kizaka-Kondoh

論文題目 : A luciferin analogue generating near-infrared bioluminescence achieves highly sensitive deep-tissue imaging

平成 28 年 6 月 *Nature Communications*, **7**, 1–8

(4)

全著者名 : Masahiro Kiyama, Ryohei Saito, Satoshi Iwano, Rika Obata, Haruki Niwa, Shojiro A. Maki

論文題目 : Multicolor bioluminescence obtained using firefly luciferin

平成 28 年 10 月 *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **16**, 2648–2655

(5)

全著者名：Michio Kakiuchi, Soichiro Ito, Masahiro Kiyama, Fumiya Goto, Takuto Matsuhashi, Minoru Yamaji, Shojiro Maki, Takashi Hirano

論文題目：Electronic and Steric Effects of Cyclic Amino Substituents of Luciferin Analogues on a Firefly Luciferin–Luciferase Reaction

平成 29 年 5 月 *Chemistry Letters*, **46**, 1090–1092

(6)

全著者名：Mamoru Fukuchi, Hironori Izumi, Hisashi Mori, Masahiro Kiyama, Satoshi Otsuka, Shojiro Maki, Yosuke Maehata, Akiko Tabuchi, Masaaki Tsuda

論文題目：Visualizing changes in brain- derived neurotrophic factor (BDNF) expression using bioluminescence imaging in living mice

平成 29 年 7 月 *Scientific Reports*, **7**, 4949, 1-10

(7)

全著者名：Satoshi Iwano, Mayu Sugiyama, Hiroshi Hama, Akiya Watakabe, Naomi Hasegawa, Takahiro Kuchimaru, Kazumasa Z. Tanaka, Megumu Takahashi, Yoko Ishida, Junichi Hata, Satoshi Shimozone, Kana Namiki, Takashi Fukano, Masahiro Kiyama, Hideyuki Okano, Shinae Kizaka-Kondoh, Thomas J. McHugh, Tetsuo Yamamori, Hiroyuki Hioki, Shojiro Maki, Atsushi Miyawaki

論文題目：Single cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals

平成 30 年 2 月 *Science*, **359**, 935–939