

ホタル生物発光反応を基盤とした
近赤外発光イメージング材料の開発と実用化

齊藤 亮平

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

2019年3月

博士論文審査員

主査 牧昌次郎 准教授

狩野豊 教授

平野誉 教授

三瓶巖一 准教授

瀧真清 准教授

著作権所有者

齊藤 亮平

2019 年

Application and Innovation of Near-infrared Analogue for *in vivo* Optical Imaging based on Firefly Bioluminescence

Ryohei Saito

Abstract

Optical imaging is one of the most popular techniques in the biological field for observation of biological tissues. Optical imaging has two types: fluorescence and bioluminescence imaging. My research focus is on the firefly luminescence reaction, which can be utilized in bioluminescence imaging. Firefly bioluminescence is a reaction of firefly luciferin (substrate) and firefly luciferase (enzyme), which produces green-yellow light ($\lambda_{\max} = \text{ca. } 560 \text{ nm}$). This wavelength of light is scattered and absorbed in biological tissues. However, the near-infrared wavelength (650–900 nm) has little scatter and absorption with respect to green-yellow light. In addition, existing bioluminescence agents with near-infrared emission wavelengths have poor water solubilities. In general, a high water solubility compound is preferred for biological experiments, as it is easier and more useful for tuning the concentration in buffer solution.

In this study, I synthesized new luciferin analogues with an aim of producing near-infrared light while having a high solubility in buffer solutions.

Chapter 2, I modified the benzothiazole of firefly luciferin structure to the adenine skeleton for improved water solubility. The water solubility of adenine analogue is as same as that of firefly luciferin, however, adenine analogue did not produce light. I investigated the reason adenine analogue did not produce light. The reason is that the part of functional group in adenine analogue inhibited to induce the active site of luciferase.

Chapter 3, I modified the benzene of AkaLumine structure to the pyridine or pyrazine, because AkaLumine was previously reported and produced near-infrared light ($\lambda_{\max} = \text{ca. } 675 \text{ nm}$) with low water solubility. “seMpai”, one of the new luciferin analogues, achieved

these purposes: the new analogue produced near infrared light ($\lambda_{\text{max}} = \text{ca. } 675 \text{ nm}$) and had a higher solubility in buffer solution compared with AkaLumine. In addition, the *in vivo* imaging of seMpai is more beneficial and useful compared with that of AkaLumine and TokeOni (AkaLumine-HCl).

Chapter 4, I have made the analogue available as a commercial product, which is being utilized in the field of *in vivo* optical imaging. I optimized the synthesis route of seMpai for industrial production. Due to that, seMpai was commercialized by Merck group.

ホタル生物発光反応を基盤とした 近赤外発光イメージング材料の開発と実用化

齊藤 亮平

和文概要

近年、医学研究におけるイメージング技術が大変注目されている。基礎や臨床を問わず生きたままの生命現象を精密に観察することが重要視されている。中でも、基礎研究においては、安価・安全・簡便な光イメージングが必要不可欠になっており、筆者はホタル生物発光を用いた光イメージング技術の開発に取り組んだ。

生物発光イメージング技術における課題は、長波長・高水溶性・高輝度の3つである。長波長・高輝度は光イメージングの計測感度向上に必須であるが、高水溶性は動物実験を実施する上で重要視すべき点であり、難水溶性の化合物では実用性に劣り、このような材料特性は有用とは言い難い。そこで、筆者は3つの課題のうち、長波長・高水溶性を克服することを念頭に、発光基質ホタルルシフェリンの構造改変により、イメージング技術の開発を行った。

第2章では、ホタルルシフェリンのベンゾチアゾール部位をアデニン骨格に置換することで、高水溶性アデニンアナログを合成した。アデニンアナログはホタルルシフェリンと同程度の溶解性であったが、発光しなかった。この理由を検討したところ、アデニンアナログの官能基の一部がルシフェラーゼの活性中心への誘導を阻害していることがわかった。

第3章では、先行研究において近赤外発光基質として報告されている **AkaLumine** の構造を基に、ピリジンもしくはピラジンに置換した新規アナログを合成した。これらアナログのう

ちの1つは、近赤外発光且つ高溶解性であり、当初の目的を達成し、これを **seMpai** と名付けた。**seMpai** は動物実験でも高感度にイメージングでき、新たな材料として既存の材料よりも有用な結果を得た。

第4章では、**seMpai** をライフサイエンス研究に幅広く利用するために市販化することにした。**seMpai** の合成方法を工業合成に最適化するために、種々の検討を行った。その結果、**seMpai** はメルク株式会社から上市された。

略語

AMP	アデノシン一リン酸
ATP	アデノシン三リン酸
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)
DCC	<i>N, N</i> -ジシクロヘキシルカルボジイミド
DFT	Density functional theory (密度汎関数理論)
DIBAL	水素化ジイソブチルアルミニウム
DLSA	5' -O-[<i>N</i> -(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine
DMAP	<i>N, N</i> -ジメチル-4-アミノピリジン
DMF	<i>N, N</i> -ジメチルホルムアミド
EDC	1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩
KPB	リン酸カリウム緩衝液
NaH	水素化ナトリウム
NEt ₃	トリエチルアミン
<i>n</i> -BuLi	ノルマルブチルリチウム
LLC	Lewis Lung Carcinoma (マウスレイス肺がん細胞)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
TD-DFT	Time-dependent density functional theory (時間依存密度汎関数理論)
Tf ₂ O	トリフルオロメタンスルホン酸無水物

目次

1 序論.....	- 11 -
1.1. 現在のイメージング技術.....	- 11 -
1.2. 発光イメージング法に応用される生物発光.....	- 13 -
1.3. ホタル・発光エビの実用例.....	- 14 -
1.3.1. ホタルルシフェリン誘導体の実用化例.....	- 15 -
1.3.2. 発光エビの実用例 Nano Luc®.....	- 15 -
1.3.3. 人工基質と人工酵素による近赤外発光の例.....	- 16 -
1.4. 当研究室が開発してきたホタル生物発光イメージング技術.....	- 16 -
1.4.1. 近赤外発光人工基質の開発.....	- 17 -
1.4.2. TokeOni (8) の <i>in vivo</i> イメージング実験.....	- 19 -
1.4.3. TokeOni (8) と特化酵素”AkaLuc” によるイメージング.....	- 20 -
1.5. AkaLumine (7) 及び TokeOni (8) の課題.....	- 21 -
1.6. AkaLumine (7) 及び TokeOni (8) はマウス肝臓において自家発光する.....	- 22 -
1.7. 本研究の目的.....	- 23 -
2 N 原子導入型アデニンアナログの合成と性質.....	- 25 -
2.1. 分子設計.....	- 25 -
2.3. アデニンアナログ 17 の溶解度測定.....	- 26 -
2.4. アデニンアナログ 17 の生物発光活性評価.....	- 26 -
2.5. AMP 中間体を用いた発光活性評価.....	- 28 -
2.6. Auto Dock Vina による酵素との結合予測結果.....	- 30 -
2.7. まとめ.....	- 33 -
3 AkaLumine アナログの合成と応用.....	- 34 -
3.1. AkaLumine アナログのデザインと合成経路.....	- 34 -
3.2. 溶解度の評価.....	- 36 -
3.3. 発光活性の評価.....	- 38 -
3.4. 計算化学による評価.....	- 43 -
3.5. <i>in vitro</i> (培養細胞) における発光活性評価.....	- 46 -
3.6. <i>in vivo</i> (マウス個体) における発光活性評価.....	- 49 -
3.7. 肝臓での自家発光の評価及び微小環境イメージング.....	- 51 -
3.8. まとめ.....	- 53 -

4	AkaLumine アナログ 26 の実用化	- 55 -
4.1.	合成方法の検討	- 55 -
4.1.1.	アルデヒド 35 の合成成績を向上させる	- 56 -
4.1.2.	AkaLumine アナログ 26 の合成検討	- 60 -
4.2.	AkaLumine アナログ 26 の溶解性	- 64 -
4.3.	NMR による構造決定	- 65 -
4.4.	工業ロットにおける不純物ピークの評価	- 66 -
4.4.1.	ターゲットの H は交換可能なものかを検討	- 67 -
4.4.2.	ターゲットの H は 26 の多量体のプロトンではないか	- 68 -
4.4.3.	ターゲットの H は 26 の C-H 直接結合の H か	- 70 -
4.4.4.	ターゲットの H の温度依存の検討	- 70 -
4.5.	工業ロット間による不純物ピークの評価	- 72 -
4.5.1.	ロット間の比較	- 72 -
4.5.2.	No. 0018 と No. 0018-Na の比較	- 76 -
4.5.3.	No. 0018 を中圧自動分取カラムで精製	- 77 -
4.5.4.	26 の前駆体チアゾリジンメチルエステル体 47 の評価	- 79 -
4.6.	工業合成ロットの発光測定結果	- 80 -
4.7.	まとめ	- 81 -
5	結語	- 82 -
6	実験の部	- 83 -
6.1.	合成の部-基本操作	- 83 -
6.2.	合成の部-合成方法	- 87 -
6.3.	測定の部-基本操作	- 112 -
6.4.	測定の部-測定方法	- 114 -
	参考文献	- 118 -
	謝辞	- 124 -

1 序論

1.1. 現在のイメージング技術

現在、ライフサイエンス研究において生体内を観察する技術として、ポジトロン断層法 (PET)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、コンピュータ断層撮影法 (CT)、光 (生物発光イメージング; BLI, 蛍光イメージング; FI) などが用いられており、これら生体イメージング技術の発展はライフサイエンス研究に必要な要素になっている。研究者たちは、これら各種イメージング法の特徴¹を考慮して、各々の研究に最適なイメージング方法で研究している。Table 1-1 に代表的なイメージング方法の特徴をまとめた。

Table 1-1. 各種イメージング法の特徴のまとめ¹

	BLI	FI	PET	MRI	CT
電磁波の種類	可視光	可視光・近赤外	γ 線	ラジオ波	X 線
空間分解能 ^a	3–5 mm ^c	2–3 mm ^d	1–2 mm	25–100 mm	50–200 mm
時間分解能 ^b	秒–分	秒–分	10 秒–分	分–時	分
深さ	1–2 cm	< 1 cm ^e	無制限	無制限	無制限
ヒトへの臨床応用	×	△	○	○	○
主な使用	遺伝子 細胞追跡	遺伝子 細胞追跡	代謝	形態学 遺伝子	形態学
コスト ^f	¥¥	¥ – ¥¥	¥¥¥¥	¥¥¥¥	¥¥

^a空間分解能は、ミリメートルで表された画像におけるグラフィック表示の精度または詳細の尺度。別々に区別できる 2 つの独立に測定できる物質間の最小距離。

^b時間分解能は、画像処理プロセスが開始されると、最終的に解釈可能な画像のバージョンが被写体から記録/取得される頻度。これは、画像を形成するのに十分な事象を収集するの

に必要な時間、およびオペレータまたは生物学的なイベントによって引き起こされる変化の割合に対する画像システムの応答性に関連する。

°生物発光および得られる蛍光の空間分解能は深度に依存する。生物発光の場合、分解能は対象物の深さと等しくなる。もしくは僅かに悪くなる。すなわち、深さ **3–5 mm** の対象物を検出できることは、約 **3–5 mm** の空間分解能を有する。

°蛍光トモグラフィの使用より、より良い空間分解能をもたらす可能性がある。

°この深さは得られる蛍光のときのもの。蛍光トモグラフィでは、より深いところ (**2–6 cm**) で物体を撮像できる可能性がある。

°設備費と研究費を含む。

PET, MRI, CT といった臨床で使われている方法は、管理区域での厳密な設備や大型の装置が必要であり、研究コストが高くなる。また、 γ 線や X 線などは患者だけでなく、医療従事者や研究者自身への被爆による健康リスクも考慮すべきことである。BLI や FI といった光イメージングは上記のような課題はなく、研究コストは安い、遺伝子改変技術が必要な場合が多く、臨床応用は難しい。そのため、基礎研究においては、安全・簡便・安いというメリットを考慮され、光イメージングが広く使われている²。

BLI と FI で大きく異なる点は、発光体の励起方法である。BLI は化学反応により励起された発光体を生成するのに対し、FI では励起光を照射して励起状態を生成させる。これにより、BLI では発光体以外による自家発光は無いが、FI では発光体以外による自家蛍光が生じることがある。そのため、BLI の場合はシグナルノイズ (S/N) 比が高く、FI の場合は S/N 比が低くなる。

筆者は、これらの項目を総合的に考慮し、安全・簡便・安価・高 S/N 比である生物発光イメージング技術が基礎研究には必要であると考えた。この技術を生物学の研究者たちが実際に利用できるものにしたと考え、実際に開発したものを実用化することを念頭に置いた。

1.2. 発光イメージング法に応用される生物発光

ホタルやウミホタルなど、多くの発光生物が知られている³。これら発光生物の発光反応のメカニズムは解明されているものから、いまだ解明されていないものまで、様々である。最近、報告された発光生物の発光反応では、ヤコウタケ(学術名; *Mycena chlorophos*, マイセナクロフォス)^{4,5} や発光ゴカイ(学術名; *Odontsyllis*, オドントシリス)⁶ などが挙げられる。代表的な発光生物が用いる発光基質と発光酵素、その際に必要な補因子を Table 1-2 にまとめた。

Table 1-2. 発光生物の発光反応の一覧

生物種	基質	酵素	補因子	発光波長
ホタル	ホタル ルシフェリン	ホタルルシフェラーゼ (FLuc)	ATP, Mg ²⁺ , O ₂	560 nm
ウミホタル	ウミホタル ルシフェリン	ウミホタルルシフェラ ーゼ (CLuc)	Ca ²⁺ , O ₂	460 nm
ウミシイタケ	セレンテラジン	ウミシイタケルシフェ ラーゼ (RLuc)	Ca ²⁺ , O ₂	480 nm
発光エビ (トゲオキヒオドシ エビ)	セレンテラジン	トゲオキヒオドシエビ ルシフェラーゼ (OLuc)	O ₂	454 nm ⁷
発光キノコ (マイセナクロロフ オーラス)	3-ヒドロキシ ヒスピジン	- ^a	O ₂	510 nm ⁵
発光ゴカイ (オドントシリス)	- ^a	オドントシリスルシフ ェラーゼ (GoLuc)	- ^a	510 nm ⁶

^a 未だに解明されていない

現在報告されている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酸化反応である(Figure 1-1)。種々の生物によって発光反応に必要な補因子が異なるが、共通しているものは Figure 1-1 のような酸化反応である。

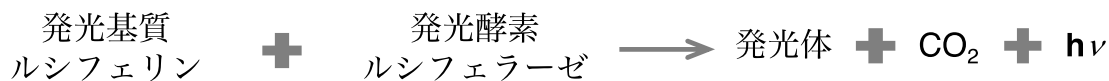


Figure 1-1. 生物発光反応の略式図

これら発光生物の中でも、ライフサイエンスの研究分野で多くの報告例があるのが、ホタルと発光エビの生物発光反応を応用したものである⁸。

ホタルの発光反応は、Figure 1-2-A のように基質ホタルルシフェリン(1, D-LH₂) が、ATP, Mg²⁺, O₂ 存在下、酵素ホタルルシフェラーゼ(FLuc) の触媒作用により励起状態のオキシルシフェリン(2) が生成され、2 が基底状態に失活する際に黄緑色(λ_{max}= ca. 560 nm)^{9, 10, 11} に発光する。一方、発光エビの発光反応は、Figure 1-2-B のように基質セレンテラジン(3) が酵素ルシフェラーゼ(OLuc) の触媒作用により励起状態のセレンテラミド(4) が生成され、励起状態 4 が基底状態に失活する際に青色(λ_{max}= ca. 454 nm)⁷ に発光する。

これらの発光反応は、基質と酵素ともに、それぞれ誘導体と変異体が報告されており、実用化されているものが多い。

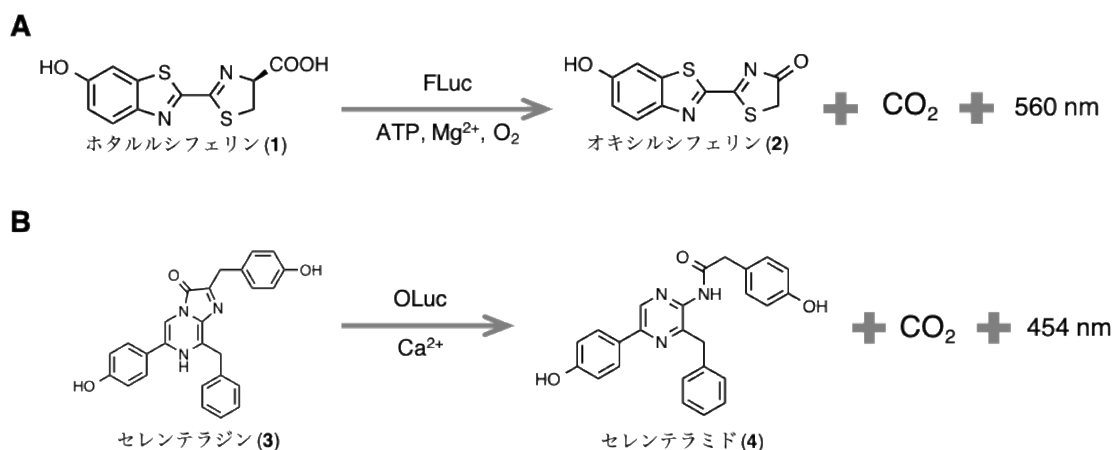


Figure 1-2. ホタルと発光エビの発光反応

1.3. ホタル・発光エビの実用例

天然型の発光反応に比べて、発光色を変えたり、発光輝度をさらに向上させたり、有用な技術が実用化されている。

1.3.1. ホタルルシフェリン誘導体の実用化例

ホタルルシフェリンの誘導体はこれまでに多数報告¹²されており、その中でも実用化に至っているものは、Miller らが開発した CycLuc1(**5**)¹³ と Li らが開発した CybLuc(**6**)¹⁴、当研究室が開発した AkaLumine(**7**)¹⁵ 及び TokeOni(**8**)¹⁶ である(Figure 1-3)。

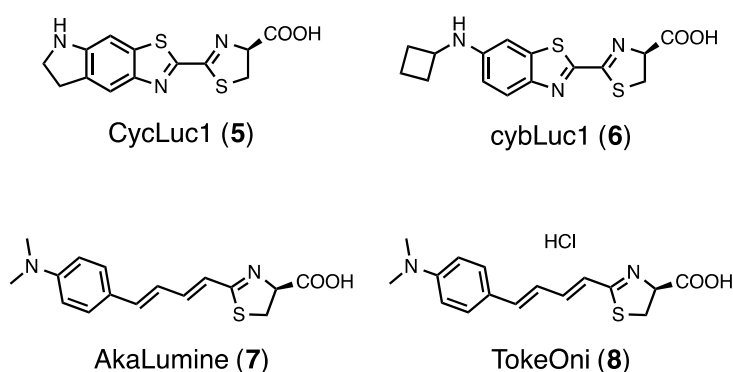


Figure 1-3. ホタルルシフェリン誘導体の実用化例

これらの基質は酵素 FLuc と反応し、**5** は λ_{\max} = ca. 610 nm, **6** は λ_{\max} = ca. 603 nm, **7** 及び **8** は λ_{\max} = ca. 675 nm でそれぞれ発光し、いずれも **1** よりも長波長で発光する。**5-8** はそれぞれマウスを用いたイメージング実験において **1** よりも高感度な検出することができおり^{13,14,16,17}、実用化に至っている。

1.3.2. 発光エビの実用例 Nano Luc[®]

発光エビの発光反応を実用化したのは、米国プロメガ社である。彼らは基質 **3** を Furimazine (**9**) に構造変換し、さらに酵素 OLuc のアミノ酸残基のうち 16 残基を改変することで、酵素変異体 NanoLuc[®] を開発した(Figure 1-4)¹⁸。

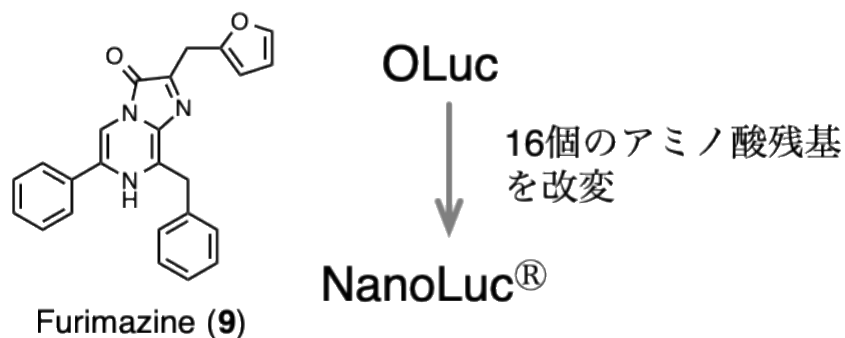


Figure 1-4. Furimazine (9) の構造と特化酵素 NanoLuc®

この発光反応は λ_{\max} = ca.460 nm で発光し、ホタル発光反応の輝度に比べ、約 150 倍も明るい¹⁸ことが特徴である。

1.3.3. 人工基質と人工酵素による近赤外発光の例

さらに、米国プロメガ社は基質も酵素も人工化を行い、728 nm という近赤外発光を実現し、2018 年に報告している¹⁹。この研究ではホタルルシフェリン(1)を構造改変した NH₂-NpLH₂ (10) と、click beetle red luciferase (CBR) のアミノ酸残基のうち 2 個を変異させた CBR2 と発光させることで 700 nm 以上の近赤外発光を達成している(Figure 1-5)。

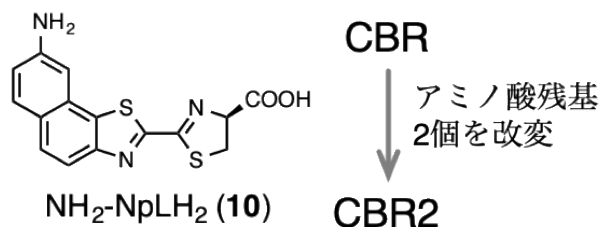


Figure 1-5. NH₂-NpLH₂ (10) の構造と特化酵素 CBR2

1.4. 当研究室が開発してきたホタル生物発光イメージング技術

前述のように、当研究室の先行研究でホタル生物発光イメージング用の近赤外発光人工基質として 7 や 8 を実用化してきた。

1.4.1. 近赤外発光人工基質の開発

Figure 1-2-A のように、ホタル生物発光は **1** の酸化反応により発光する。そこで、**1** の構造を改変することで、発光色を制御できると考え、構造活性相関²⁰の取得に取り組んできた。**1** の化学構造を 1 原子レベルで改変した誘導体を数多く合成し、発光能を調べた。その結果、ルシフェリン構造の右側のチアゾリン環は発光能に必要な構造であるが、左側のベンゾチアゾール環は改変可能な構造だとわかった(Figure 1-6)。

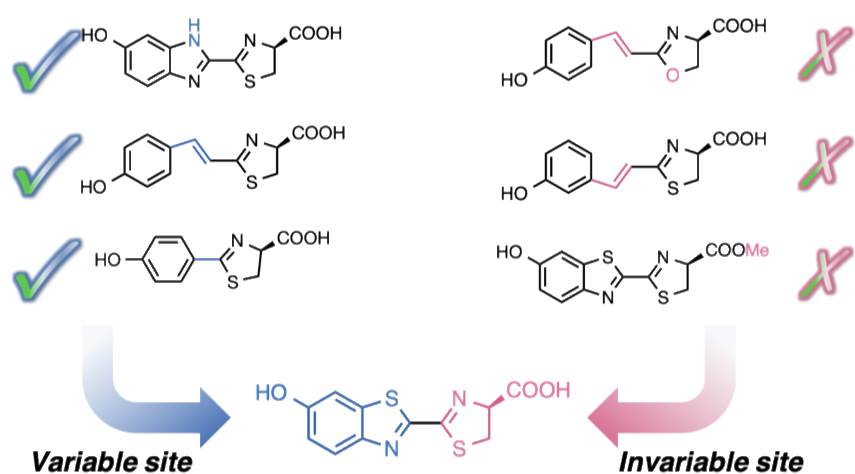


Figure 1-6. ホタルルシフェリン(**1**) と酵素 *Ppy* の発光反応に関する構造活性相関²⁰

この構造活性相関をもとに、発光色を制御するような発光基質をデザインし合成した。

Figure 1-7 のように、可視領域をほぼ網羅するような発光色の多色化を実現している^{15, 20, 21}。

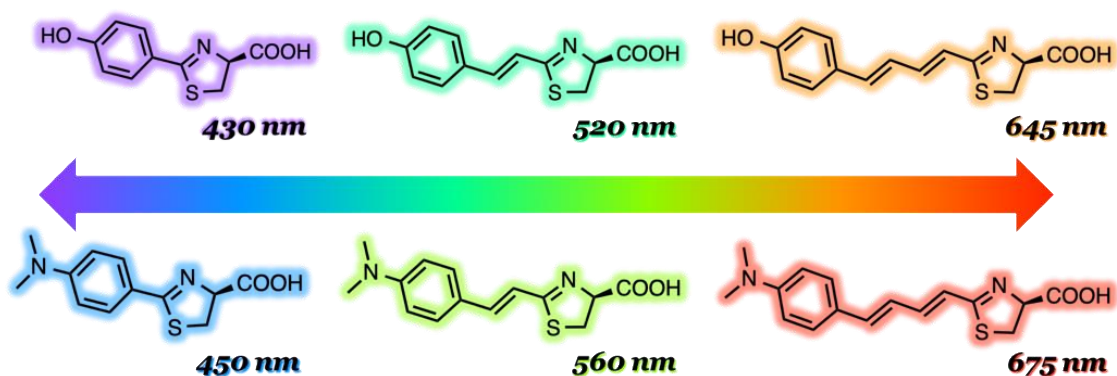


Figure 1-7. 多色化アナログの構造

たとえば、オレフィン構造を伸長することで発光波長は約 100 nm 長波長化し、ヒドロキシ基をジメチルアミノ基に置換することで 20–40 nm ほど長波長化する。また、赤色–近赤外領域の波長変換に着目すると、Figure 1-8 のようになる。7 のジメチルアミノ基をヒドロキシ基に変化した 11 は 645 nm で発光する。11 のベンゼン環をナフタレン環に置換した 12 は 11 よりも 10 nm ほど長波長化する²²。また、7 の 3 位にアリル基を導入した 13 は 7 よりも 10 nm ほど長波長化した²²。これらの結果を踏まえて、11 の 5 位にアリル基を置換した 14 は 690 nm まで長波長化することに成功している²²。これは共役系の伸長とは異なる、新たな長波長化技術である。さらに、7 と同様に共役系を伸長したビフェニル構造の 15 は 7 とほぼ同じ 675 nm であった²³。

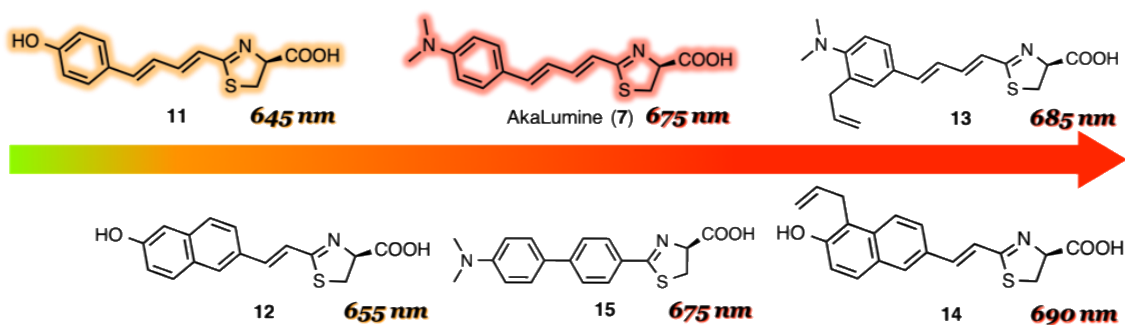


Figure 1-8. 赤色～近赤外発光を示すルシフェリンアナログ

波長だけでなく、発光量子収率 Φ_{bl} についても構造活性相関を得ている。7 の Φ_{bl} は 0.0050 であるのに対し、7 のジメチルアミノ基を 1-ピロリジンに置換したシクロアナログ 16 の Φ_{bl} は 0.020 であった(Figure 1-9)²⁴。

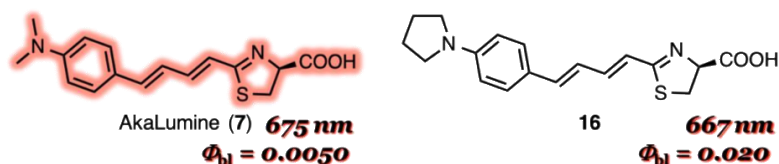


Figure 1-9. 高い発光量子収率 Φ_{bl} の赤色ルシフェリンアナログ

光イメージングにおいて、発光体の放出する光が生体組織を透過し、体外からその光を検出できなければ、高感度のイメージングは難しい²⁵。Figure 1-10 のように、黄緑色(λ_{max} = ca.

560 nm) の波長域はヘモグロビンや酸化ヘモグロビンに吸収されてしまい、900 nm 以上の波長域は水に吸収されてしまう²⁵。しかしながら、近赤外領域 (650–900 nm) はこれら生体内分子による吸収が少なく、生体透過性が高い²⁵といえる。

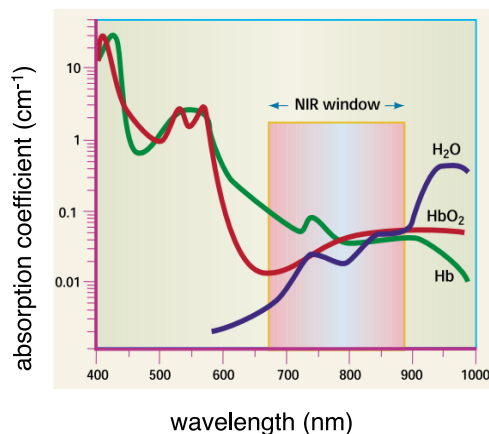


Figure 1-10. 生体内分子による光の吸収の強さ²⁵

Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317. より転載。

AkaLumine (7) の発光波長は $\lambda_{\max} = \text{ca. } 675 \text{ nm}$ であり近赤外領域の発光を示す¹⁵。つまり、7 は生体組織に対する透過性が高く深部組織 (脳や肺) の高感度イメージングが可能と想定されるが、7 は難水溶性 (<2 mM) であり¹⁶、生体に使う *in vivo* イメージングには適していなかった。そこで、7 を塩酸塩化させることで水に対する溶解度を向上させた TokeOni (8) が開発された¹⁶。8 は超純水に対して 30–100 mM の溶解度を実現した^{16, 17}。

1.4.2. TokeOni (8) の *in vivo* イメージング実験

近赤外領域 (8 の発光色) の光は黄緑色 (1 の発光色) の光に比べ、生体内深部組織のイメージングに適しているのか、TokeOni (8) を用いたイメージング結果をホタルルシフェリン (1) と比較し 8 の有用性を評価してきた。

東京工業大学 (現自治医科大学) 口丸らとはマウスの深部組織である肺のイメージングに成功している¹⁶。肺腫瘍転移モデル (LLC/Luc) を用いて、8 の深部組織における有用性を、1 と比較検討した。このモデルマウスは、腫瘍細胞に酵素ルシフェラーゼを遺伝子導入し、この腫瘍細胞をマウスの大腿部に移植し、2 週間後に肺に転移するものである。まず、33 mM の 1 をマウスに投与して撮影した後、4 時間に同一個体のマウスに 33 mM の 8 を投

与し撮影した。Figure 1-11-A のようなイメージ結果が得られ、TokeOni (8) の方がホタルルシフェリン (1) よりも約 8.1 倍高感度なイメージングに成功した¹⁶。

また、富山大学 (現高崎健康福祉大学) 福地らとはマウスの脳のイメージングに成功している²⁶。脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) に酵素ルシフェラーゼを発現させた BDNF-Luc トランスジェニックマウスを用いてイメージングを行った。従来の 1 の発光色では、光が散乱しており、解像度が低くなっている。一方、8 の発光色を用いると、光が散乱せずに、解像度の高いイメージング結果を得られた (Figure 1-11-B)²⁶。このときの投与量は、150 mg/kg weight である。

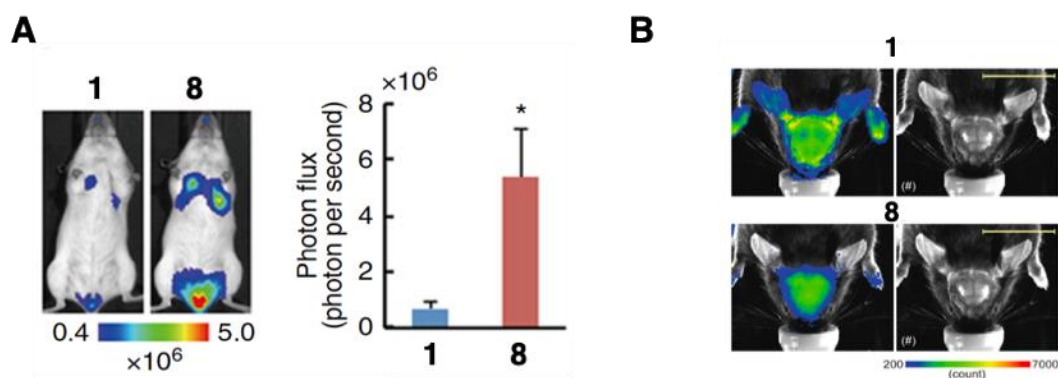


Figure 1-11. ホタルルシフェリン (1) と TokeOni (8) のイメージング比較

A) 肺転移モデルマウスでのイメージング結果。左が 1 と 8 のイメージング画像であり、右は最も強い発光輝度が得られたときの値。; B) 上が 1 を投与したときのイメージ、下が 8 を投与したときのイメージ。# は疑似カラーのイメージ。

1.4.3. TokeOni (8) と特化酵素 "AkaLuc" によるイメージング

人工の発光基質である 8 には人工の発酵酵素を作製することで、より高い発光強度を得られると考えた理化学研究所 岩野らは、TokeOni (8) の特化酵素 "AkaLuc" を開発した¹⁷。酵素変異体 AkaLuc は天然型酵素 Fluc のアミノ酸残基 28 個に変異させたものであり、この変異酵素と 8 を発光させると天然型の組み合わせに比べ、約 7 倍高輝度化に成功した。この AkaLuc と TokeOni (8) との組み合わせを Aka-BLI (Aka-BioLuminescence Imaging) と名付け、マウスやマーモセット (小型霊長類) を用いてイメージングシステムとしての性能を、Green-BLI (Green-BioLuminescence Imaging, 酵素 FLuc とホタルルシフェリン (1) による発光) と比較し、評価している¹⁷。Figure 1-12-A と B では、それぞれ Green-BLI と

Aka-BLI を用いたときのマウスの脳をイメージングした結果である。Green-BLI では脳の発光を検出できなかったが、Aka-BLI では脳でのイメージングに成功しており、Green-BLI と比較すると、1400 倍ほど高感度化している。また、このイメージング方法を用いると、自由行動下でのマウスの行動追跡も動画で撮影できている (Figure 1-12-A もしくは B の右の写真)。さらに、Aka-BLI では、Figure 1-12-C のように、マーモセットの脳のイメージングにも成功しており、こちらもマウス同様に自由行動の動画撮影に成功している¹⁷。

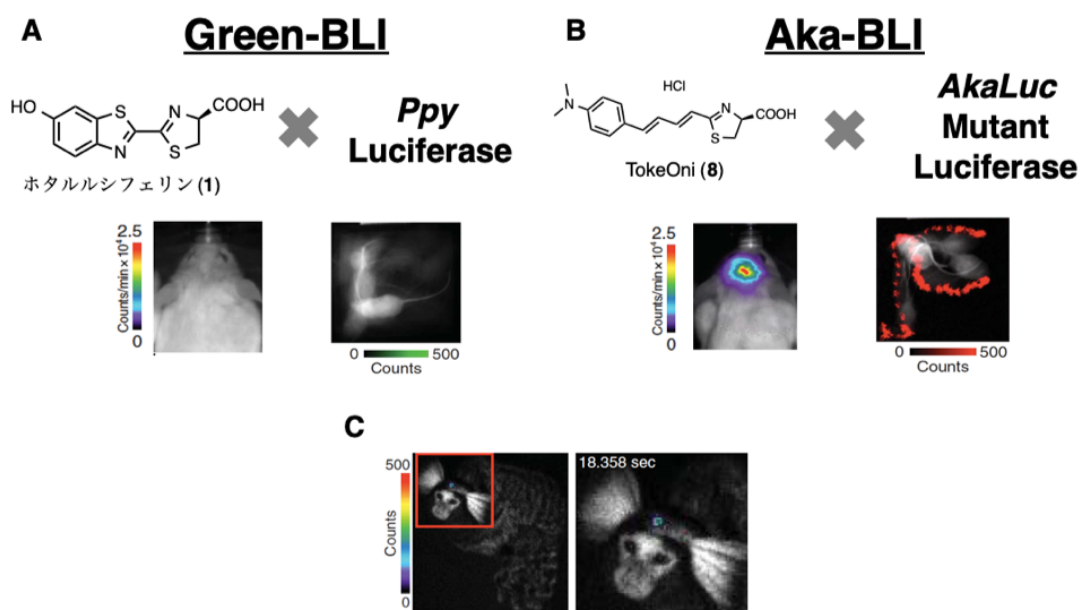


Figure 1-12. マウス及びマーモセットの脳の発光イメージング結果¹⁷

A) ホタルルシフェリン(1) と天然型酵素 FLuc によるイメージング結果。; **B)** TokeOni (8) と変異酵素 *AkaLuc* によるイメージング結果。; **C)** Aka-BLI によるマーモセットの脳の発光イメージング結果

1.5. AkaLumine (7) 及び TokeOni (8) の課題

このように、*in vivo* 光イメージング材料として、非常に有用な結果を得ている 7 と 8 であるが、両基質ともに緩衝液に溶けにくいという性質がある。これは、細胞や動物実験の際の実施上の課題である。一般に、*in vivo* 光イメージング実験では、試薬を緩衝液に溶解させた後に動物に投与する。投与方法は主に、静脈投与 (IntraVenous administration; IV) や腹腔内投与 (IntraPeritoneal administration; IP) を行っている。これらの方法では、動物 1 個体

あたりに投与する液量は少ないことが望ましい。特に、マウスの場合は動物 1 個体当たりの全血液量が約 2 mL と少ないため、投与量を大きくできない。

緩衝液 (PBS; phosphate-buffered saline) に対してホタルルシフェリン(1) は 33–100 mM で溶解する^{27,28} のに対し、AkaLumine (7) は 2 mM 程度¹⁶ である。

一方、TokeOni (8) は 7 を塩化水素で造塩させたものであり、超純水に 33–100 mM ほど溶解させる^{16, 17, 29} ことが可能となった。アンモニアによる造塩でも 2.5 倍ほど溶解性は向上したが、塩化水素ほどの大きな向上ではなかった²⁹。しかしながら、8 は、pH が中性付近の緩衝液に溶解すると、7 が析出する。また、8 を超純水に溶解すると pH が約 2 の酸性水溶液となり、実験動物の生体内へ投与することは、血液の pH が大きく下がり生体機能観察や動物愛護の観点から、実験動物への投与は好ましくない実験系があることが想定される。

1.6. AkaLumine (7) 及び TokeOni (8) はマウス肝臓において自家発光する

AkaLumine (7) 及び TokeOni (8) には、溶解性以外にもホタルルシフェリン (1) とは異なる発光特性がわかっている。酵素ルシフェラーゼを発現していない野生型マウスに 1, 7, 8 をそれぞれ腹腔内投与したとき、Figure 1-13 に示すように、7 と 8 のみで野生型マウスにおいて肝臓発光が確認された。この発光現象は 1 を投与したときには、観測されていない³⁰。これは、肝臓内に 7 や 8 を特異的に発光させる物質が存在することを示唆しているが、発光の原因はわかっていない。

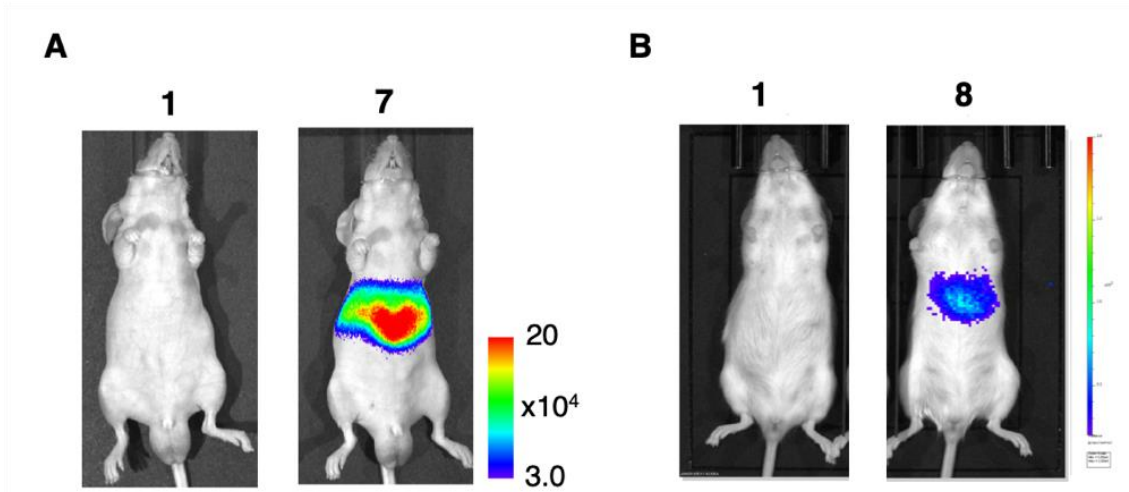


Figure 1-13. 野生型マウスに投与したときの発光イメージング結果

A) **1** と **7** を 5 mM 300 μ L 6% DMSO in PBS でそれぞれ腹腔内投与し 15 分後に撮影した。**B)** **1** (10 mM 100 μ L PBS) と **8** (10 mM 100 μ L H₂O) をそれぞれ腹腔内投与し 10 分後に撮影した。

Figure 1-11-A (1.4.2. 参照)のように、ルシフェラーゼ発現マウスを用いたイメージング結果では肝臓発光は確認できていない。これらの結果は、肝臓での発光シグナルそのものは、ルシフェラーゼとの発光シグナルに比べると非常に微弱なシグナルであることを示唆している。

しかしながら、ルシフェラーゼ発現マウスを用いての微小環境イメージングを行いたい場合、この肝臓発光のシグナルの影響でバックグラウンドが高くなり、測定感度の低下を招く。肝臓発光のシグナルが低い試薬を開発できれば、近赤外発光による微小環境イメージングが可能となる。

1.7. 本研究の目的

このように、**7** や **8** は、*in vivo* 光イメージング試薬として、有用な材料であるが、その一方で、難水溶性や低 pH という実用上の課題が残るものであった。また、肝臓での自家発光が確認されており、この発光シグナルは微小環境イメージングの妨げになっている。そこで、本研究では、実用化を念頭に **7** や **8** の発光能は維持したまま、溶解性及び肝臓の自家

発光を改良した後継材料の開発を目指した。第 2 章では **8** のような造塩以外での溶解性を向上させる方法を創製し、第 3 章では、**AkaLumine (7)** と同程度の発光活性を維持しつつ緩衝液に対する溶解性を向上させ、第 4 章では、企業と共同で行った製品化に向けた工業合成法の確立を行った。

2 N 原子導入型アデニンアナログの合成と性質

2.1. 分子設計

一般に、N 原子を導入することで水溶性が向上されることが知られている³¹。そこで、N 原子を多く含むアデニンアナログ **17** を設計し、合成することにした。生体内分子の 1 つである核酸塩基であるアデニン(**18**) の母骨格であるプリン構造がホタルルシフェリンのベンゾチアゾリン骨格と類似していることから、**17** を設計した (Figure 2-1)。アデニンアナログ **17** はホタルルシフェリンと母骨格構造が類似しているため、酵素ホタルルシフェラーゼ (*Ppy*) との親和性が高いと考えた。酵素との親和性が高くなることで、発光能を有する可能性も高くなる。そこで、アデニンアナログ **17** の合成を行い、生物発光活性を測定した。

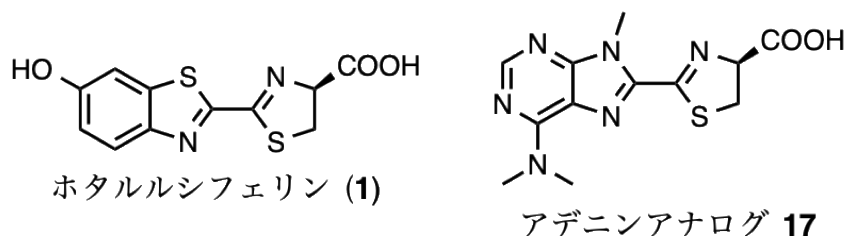


Figure 2-1. ホタルルシフェリン (**1**) とアデニンアナログ **17** の構造

2.2. アデニンアナログ **17** の合成方法

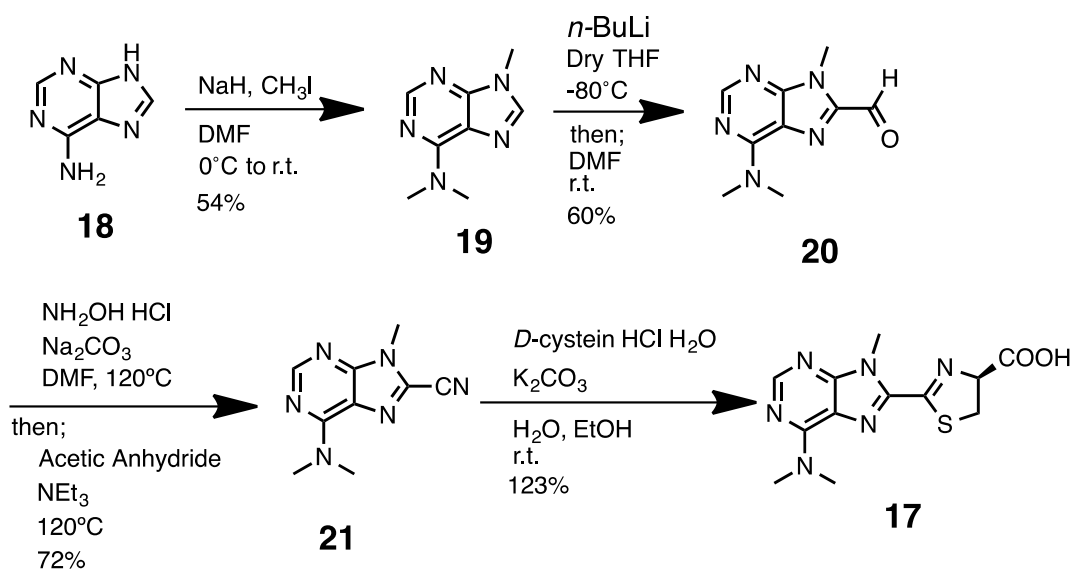


Figure 2-2. アデニンアナログ **17** の合成経路

Figure 2-2 のように、市販のアデニン(18) をヨードメタンと NaH を用いて *N,N*,9-トリメチル-9*H*-プリン-6-アミン(19) を得た。続いて *N,N*,9-トリメチル-9*H*-プリン-6-アミン(19) に *n*-BuLi を加えた後、DMF を加えホルミル体 20 を得た。得られたホルミル体 20 に、まず NH₂OH · HCl と Na₂CO₃ を加え攪拌した。その後、無水酢酸と NEt₃ を加え、ニトリル体 21 を得た。最後に、ニトリル体 21 に *D*-Cystein · HCl · H₂O と炭酸カリウムを加えて、チアゾリン環化を行い、アデニンアナログ 17 を合成した。

17 を合成した際、収率が 100% 以上になったが、これは精製過程で脱塩が不十分であったと想定される。高溶解性の発光基質を合成することが目的であるため、このような特性の基質と塩を分離するのは非常に難しい。

2.3. アデニンアナログ 17 の溶解度測定

pH 7.4 PBS Buffer に対する溶解度を測定した。合成したアデニンアナログ 17 を 1.3 mg 量り取り、Buffer を 50 μL 加え、遠心分離させ沈殿の有無を目視で確認した。これを沈殿がなくなるまで行った。そのときのアデニンアナログ 17 の濃度は 42 mM であり、これを 17 の溶解度とした。ホタルルシフェリン(1) の溶解度は 33–100 mM (1.5. 参照) であり、17 の溶解性は 1 に比べると低いイメージングの実用性には問題ないと言える。

2.4. アデニンアナログ 17 の生物発光活性評価

合成したアデニンアナログ 17 を緩衝液中 (500 mM, pH8, KPB buffer)、Mg-ATP 存在下で、天然型ホタルルシフェラーゼ (*Ppy*) と反応させることで、生物発光活性を確認した。

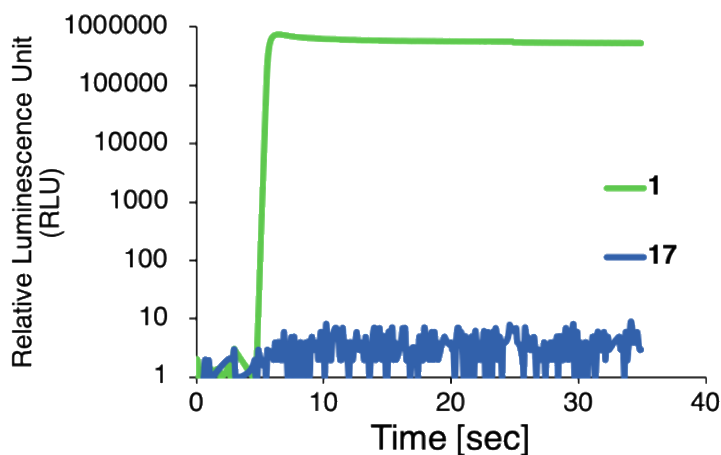


Figure 2-3. アデニンアナログ **17** の発光経時変化

Figure 2-3 に示した通り、アデニンアナログ **17** は酵素 *Ppy* との反応では生物発光能を有さないことがわかった³²。

ホタル生物発光反応は Figure 2-4 のように、**1** をアデニル化し、反応中間体である **22** が生成され、**22** が酸化されることで発光する 2 段階の反応であることが知られている⁹。それぞれの反応で酵素ホタルルシフェラーゼが触媒している。

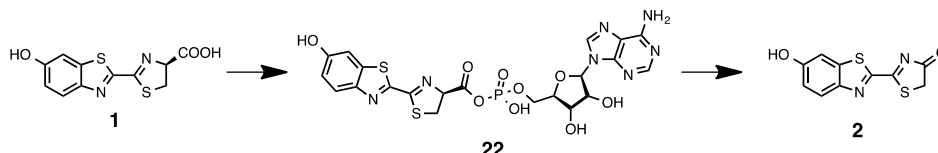


Figure 2-4. **1** の詳細な発光反応機構

17 も **1** と同様の 2 段階の反応が進行し発光すると仮定すると、発光能を有さない理由として以下の 2 つが考えられる。

- ① アデニンアナログ **17** が酵素に取り込まれていない。
- ② アデニンアナログ **17** は酵素に取り込まれているが、何らかの理由でアデニル化反応もしくは酸化反応が進んでいない。

そこで、この理由を検証するために、**1** の発光に対するアデニンアナログ **17** による発光阻

害を測定した。

さきほどと同様の条件の緩衝液 (500 mM, pH8, KPB buffer) 中で、**1** と天然型ホタルルシフェラーゼ (*Ppy*)、Mg-ATP、さらに、アデニンアナログ **17** を加えて発光測定を行った。

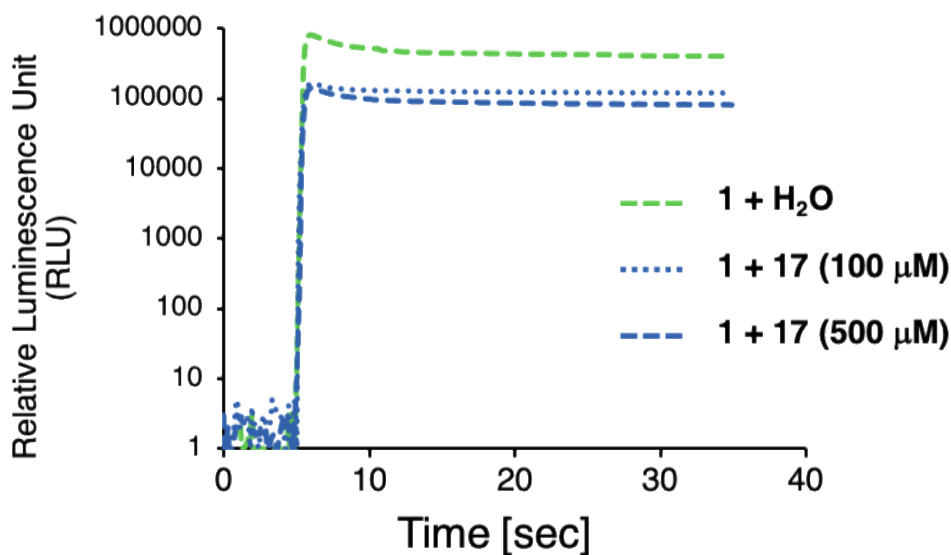


Figure 2-5. アデニンアナログ **17** による **1** の発光阻害の経時変化

1 と **17** を競合的に反応させるときに、最終濃度を揃えるために、**1** のみの発光には純水を加えた。

通常の **1** の発光条件 (**1**, *Ppy*, KPB, Mg-ATP, H₂O) に比べ、100 μM のアデニンアナログ **17** を加えた発光条件 (**17**, **1**, *Ppy*, KPB, Mg-ATP, H₂O) では、発光輝度が 1/10 程度に低下した。さらに、アデニンアナログ **17** の濃度を 5 倍にすると、わずかながら発光輝度がさらに低下した (Figure 2-5)。アデニンアナログ **17** は、**1** の発光阻害をしていることがわかった。

このことから、アデニンアナログ **17** は酵素の活性部位に取り込まれているが、発光反応は進行していないと示唆される。

2.5. AMP 中間体を用いた発光活性評価

前節でアデニンアナログ **17** は発光能を有していないが、酵素に取り込まれている可能性が

高いとわかった。**1**と同様に AMP 中間体である **23** が生成されて発光すると仮定したとき、酵素 *Ppy* により **17** から **23** が生成されていないと考えた。そこで、中間体 **23** を有機合成し、発光能を確認することにした。

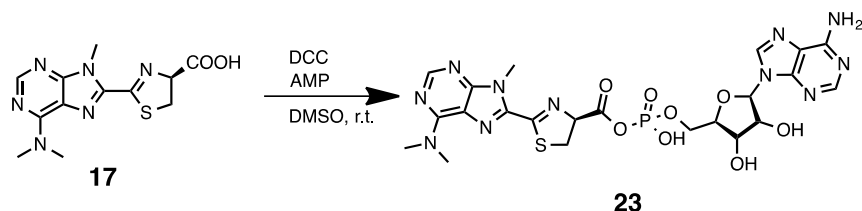


Figure 2-6. アデニンアナログ **17** から **23** への合成経路

縮合剤 DCC を用いてアデニンアナログ **17** と AMP を縮合させて、**23** を合成した。精製はフィルターによる濾過のみで、粗精製物として **23** を得た。

合成した **23** を緩衝液中 (500 mM, pH8, KPB buffer) で、酵素 *Ppy* と反応させることで、生物発光活性を確認した。

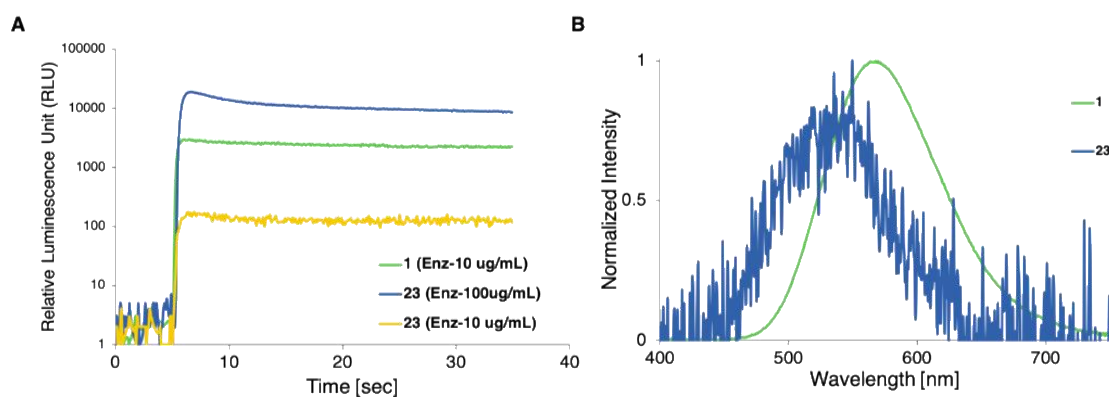


Figure 2-7. **22** の発光経時変化 (A) と発光波長 (B)

Figure 2-7-A より、酵素濃度を 10 $\mu\text{g/mL}$ と 100 $\mu\text{g/mL}$ の両方で比較すると、高濃度条件のとき、低濃度条件よりも発光強度が約 100 倍向上することがわかった。高濃度条件 (酵素濃度 100 $\mu\text{g/mL}$) のときは **1** の発光強度 (酵素濃度 10 $\mu\text{g/mL}$) よりも高い値を示した。また、Figure 2-7-B より、**23** の発光極大波長は約 535 nm であった。**1** の発光極大波長である約 560 nm よりも短波長化した。

これらの結果より、**23** は発光能を有していることがわかり、同時に、**17** が発光能を有し

なかったのは、酵素 *Ppy* によるアデニル化反応が進行しなかったからだと強く示唆された。

2.6. Auto Dock Vina による酵素との結合予測結果

アデニル化が起こらない原因を推測するために、アデニンアナログ **17** と **23** が酵素内でどのように取り込まれているか、計算ソフト (Auto Dock Vina)³³を用いて酵素内 Fitting 予測を行った。今回用いた計算ソフトは、2006 年に報告された X 線結晶構造解析の結果³⁴がもとになっている。中津らが報告した酵素 *Ppy* の X 線結晶構造内には、**22** を模倣した DLSA (5'-O-[N-(dehydroluciferyl)-sulfamoyl]adenosine) 体 **24** (Figure 2-8) を内包したときの酵素との複合体を結晶化している。

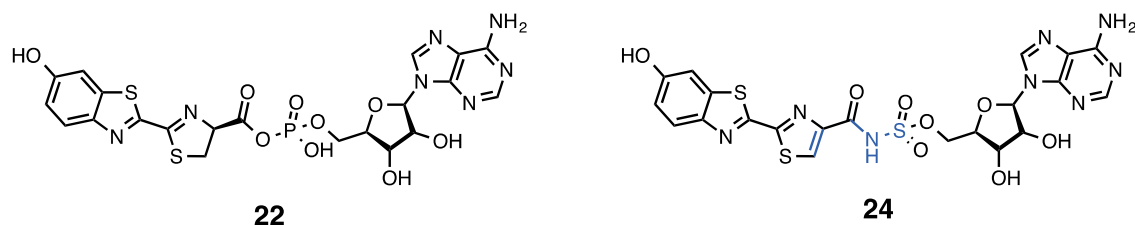


Figure 2-8. 1 の AMP 体 **22** とその類縁体 DLSA 体 **24**

24 は **22** のリン酸エステル構造をチオアミド構造に変更し、さらに **22** のチアゾリン環 4 位及び 5 位をデヒドロ化した構造である。これにより、**24** が酵素 *Ppy* の活性部位に取り込まれても、酸化反応が進行せずに発光しないで、基質と酵素の複合体を形成した状態になる。この複合体を用いて結晶構造の解析が行われた³⁴。

この複合体の構造情報をもとに、**1**, **17**, **22**, **23** が酵素の活性部位にどのように内包されるか確認した。

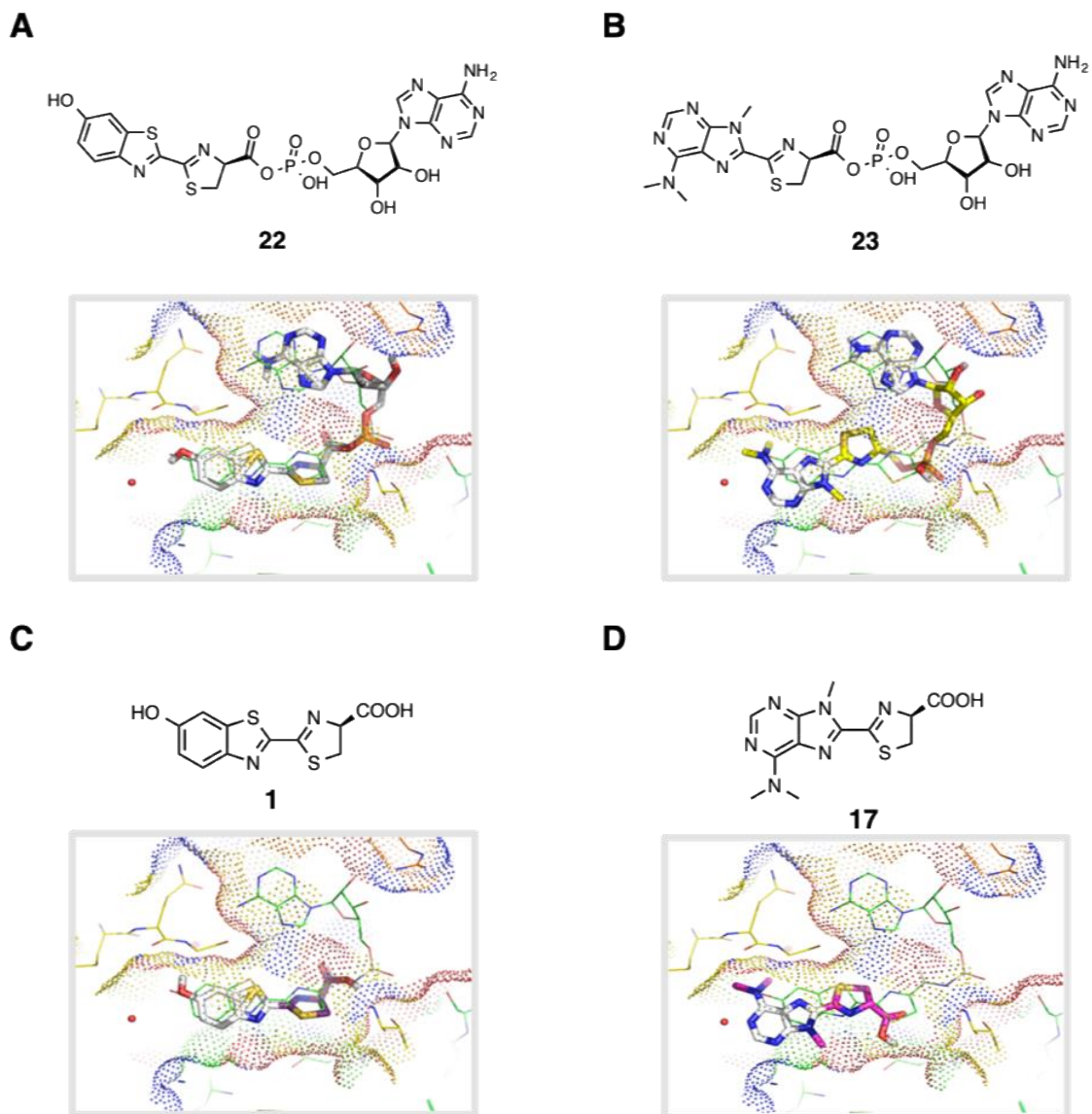


Figure 2-9. 1, 16, 21, 22 の構造及び、それぞれの Fitting 計算の結果

A) 22, B) 23, C) 1, D) 17 のそれぞれの構造式と酵素とのドッキングシミュレーションの結果。

Figure 2-9-A, C から、**1** と **22** の酵素 Fitting が DLSA 体 **24** とほぼ同じ箇所に位置しているため、今回の計算結果は信憑性が高いと考えられる。これを踏まえ、**17** と **23** の結果を比較検討する。

1 及び **17** のチアゾリン環 4 位のカルボニル基の向きが大きく異なることがわかる。さらに、**1, 17** のそれぞれの Fitting の位置を DLSA 体 **24** のチアゾリン環部位の位置と比較す

ると、**1** は **24** の Fitting 位置と一致しているのに対し、**17** のチアゾリン環は左側に位置している (Figure 2-10)。

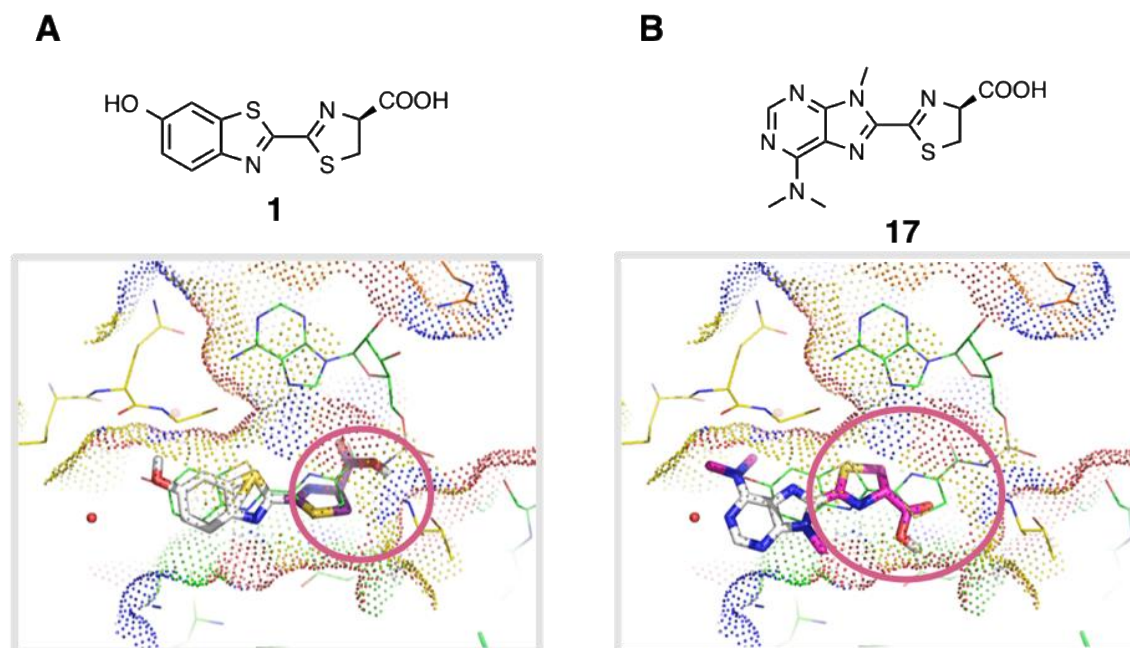


Figure 2-10. **1** (A) と **17** (B) の構造及びそれぞれの計算結果

上段に **1** と **17** の構造を示し、下段に各基質と酵素のドッキングシミュレーションの結果を示した。注目すべきところを赤線で囲んだ。

この結果から、Figure 2-11 の概略図で示すように、**1** の母骨格に比べると、**17** の NMe₂ 基や Me 基の立体障害が酵素の活性部位への取り込みを大きく阻害していると推測される。

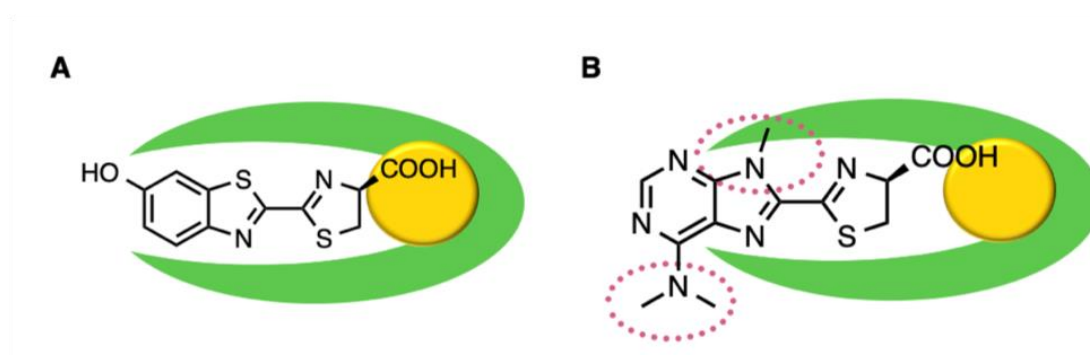


Figure 2-11. 酵素内活性部位と **1** (A) または **17** (B) の位置を表した模式図
酵素全体を緑、酵素活性中心部位を黄色で、**17** の立体障害部位を赤の点線で囲んだ。

2.7. まとめ

水溶性を向上させるために、N 原子を含むアデニン骨格を有するアデニンアナログ **17** をデザインし合成した。アデニンアナログ **17** の溶解度は 42 mM であり、イメージング材料としては十分な溶解性であるが、酵素 *Ppy* との酵素反応が進行しにくく、発光しなかった。*Ppy* との反応性が低い理由を調べるために、計算化学による酵素とのドッキングシミュレーションを行った。この結果から、アデニン骨格の一部の官能基が、酵素活性中心内への取り込みを阻害していることが示唆された。**17** はイメージング材料としては不十分であるものの、水溶性向上には N 原子導入が非常に有効な方法であることを見出した。

3 AkaLumine アナログの合成と応用

3.1. AkaLumine アナログのデザインと合成経路

前章では N 原子導入による水溶性の向上を示した。本章では前述の実用化技術”AkaLumine (7)” 及び”TokeOni (8)” の構造をもとにして、新規水溶性 AkaLumine アナログ(25–27) (Figure 3-1) の合成を目指した。

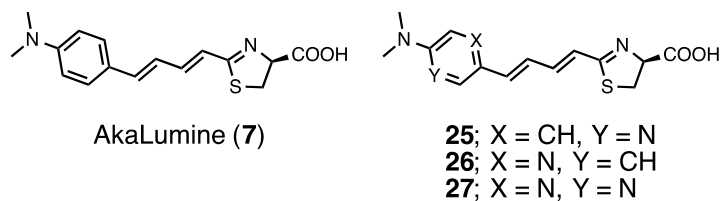


Figure 3-1. AkaLumine (7) と新規水溶性 AkaLumine アナログ(25–27) の構造

AkaLumine (7) のベンゼン環部位をピリジン環もしくはピラジン環に置換した新規水溶性 AkaLumine アナログ(25–27) を Figure 3-2 の合成経路のように合成した。

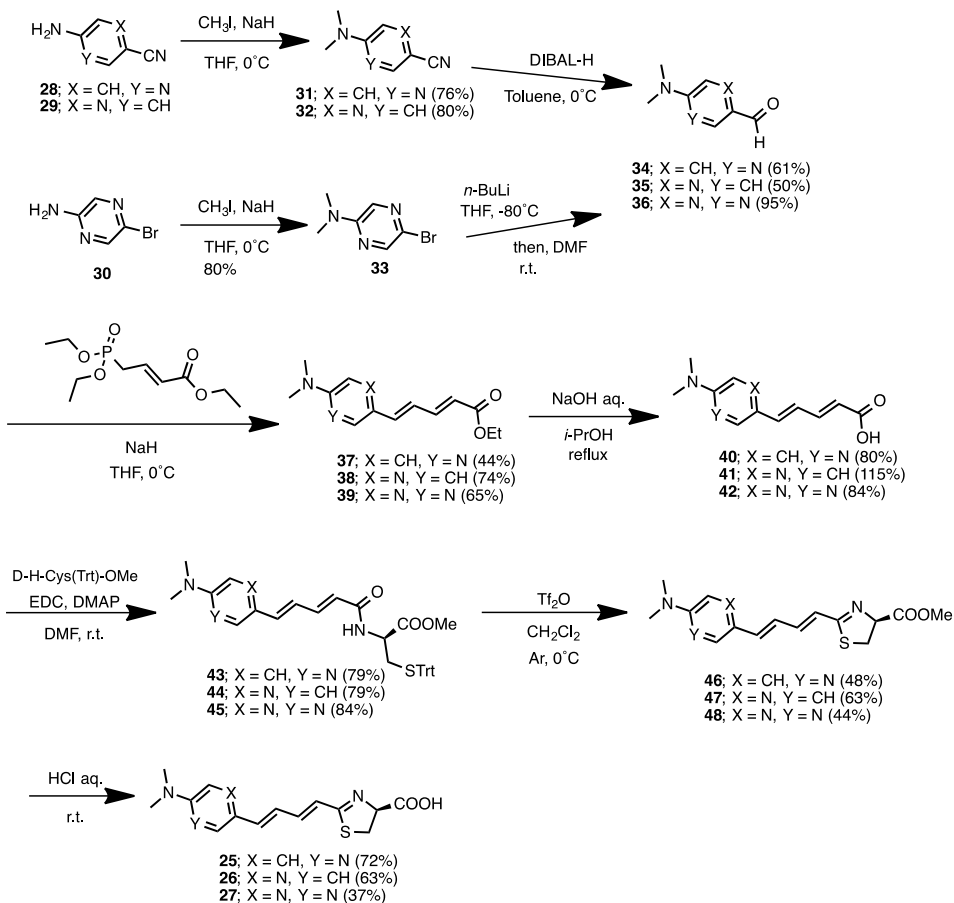


Figure 3-2. AkaLumine アナログ(25–27) の合成経路; 括弧内には収率を表記した

市販のアミノピリジン体 (**28–30**) をそれぞれヨードメタンと NaH により、ジメチルアミノ体 (**31–33**) を得た。**31, 32** はそれぞれ DIBAL を用いた還元反応でアルデヒド **34** 及び **35** を、**33** は *n*-BuLi によるリチオ化を経て DMF によりホルミル化し、アルデヒド **36** を得た。アルデヒド **34–36** は、Triethyl 4-phosphonocrotonate を用いた増炭反応によりエチルエステル **37–39** を得たのち、5 M NaOH aq. による加水分解を行いカルボン酸 **40–42** を合成した。予め合成した *D*-H-Cys(Trt)-OMe と **40–42** を EDC, DMAP で縮合し、アミド **43–45** を得た。得られた **43–45** を Tf₂O によるチアゾリン環化反応を行い、チアゾリンメチルエステル体 **46–48** を得た。最後に、6 M HCl aq. による酸加水分解で目的物である AkaLumine アナログ **25–27** を合成した。

ほとんどの反応成績が収率 60% 以上であったが、アルデヒド **35** の反応成績は最も高い収率で 50% であった。これに対して、同様の合成方法で得られたアルデヒド **34** は安定して 60% 以上の収率であった。**34** 及び **35** はピリジンの位置異性体であり、これらは反応成績が大きく異なっていた。このことは、**31** 及び **32** の反応点であるシアノ基が DIBAL 試薬と反応するとき、ピリジンの N 原子の孤立電子対と DIBAL の Al 原子が有する空軌道が反応するか否かが影響していると推測できる。シアノ基と N 原子の距離が近い **32** では、本来シアノ基の N 原子と DIBAL の Al が反応するが、ピリジンの N 原子と DIBAL の Al が競合的に反応したことで、収率が低下したと考えた。このアルデヒド **35** の合成方法はいくつかの条件検討を行った(第 4 章 4.1.1. 参照)。

また、各官能基の類縁体の反応成績に着目すると、各類縁体の反応点と N 原子の距離は十分離れていると想定されるにもかかわらず、複素環の N 原子の位置や数で反応成績が異なっている。これは、各化合物の溶媒への溶解性にわずかな差が生じ、それが反応速度に影響したと推測できる。またあるいは、複素環の N 原子が溶媒和することで、化合物の立体配座がわずかに異なり、それが反応性に影響を及ぼしたと考えられる。

これら反応成績について、明確な理由はわからないが、この結果から、『有機合成において、着目すべきは反応点だけでなく、分子全体を俯瞰して捉えること』が重要だと言える。

3.2. 溶解度の評価

合成した AkaLumine (7) 及び AkaLumine アナログ 25-27 の PBS 緩衝液に対する溶解度 c_{\max} を測定するために、UV 吸収スペクトルを用い、溶解度を算出した。まず、任意の濃度で UV 吸収スペクトルの吸光度を測定し、そのときのモル吸光係数 ϵ を求めた (Figure 3-3.)。次に、各基質で飽和状態を作製し、適当な濃度に希釈した後、UV 吸収スペクトルの吸光度を測定した。この吸光度と求めたモル吸光係数 ϵ を式 $c_{\max} = \text{Absorption} / \epsilon$ に代入し、溶解度 c_{\max} を求めた (Table 3-1)。

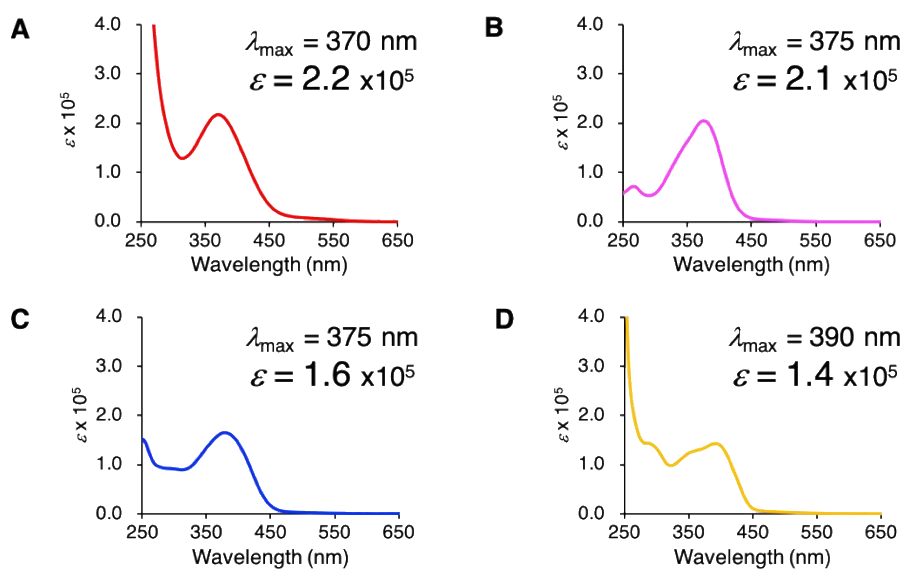


Figure 3-3. 7 と 25-27 の UV 吸収スペクトル

A-D には AkaLumine (7) と 25-27 のそれぞれの UV 吸収スペクトルを示し、その縦軸にはモル吸光係数 ϵ を表示した。吸収極大波長とその時の ϵ も併記した。

Table 3-1. PBS 緩衝液における **25–27** の UV 吸収特性と溶解度 c_{\max} (25 °C)

化合物	λ_{\max} /nm ($\epsilon/10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	c_{\max} ^b /mM
7	370 (2.2)	2.2
25	375 (2.1)	28
26	375 (1.6)	69
27	390 (1.4)	480

^aUV 吸収の極大波長。括弧内はモル吸光係数

^b溶解度 c_{\max} は 25 °C のとき、PBS (pH 7.4) 緩衝液中での飽和濃度。

アナログ **25–27** の PBS における溶解度はそれぞれ 28, 69, 480 mM であった。すべてのアナログで AkaLumie (**7**) よりも溶解度は向上した。これは、**7** の芳香環をピリジンもしくはピラジンに置換したことが溶解度向上に効果をもたらしたといえる。AkaLumine アナログ **25–27** の中では **27** がもっとも溶解度が向上した。興味深い点は、**25** と **26** である。この 2 つはそれぞれ N 原子の位置が異なるだけなのにもかかわらず、溶解性が **25** の 28 mM と **26** の 69 mM のように大きく異なる。

アナログ **25** と **26** の構造は位置異性体であり、複素環内の N 原子の位置が異なる。そもそも化合物が溶解することは、それらの化合物同士の親和性を意味している。つまり、**25** 及び **26** は水分子との親和度が異なると言える。それは、Figure 3-4 に示すように、**25** は **26** に比べると、水分子が水素結合するであろう N 原子の距離が近くにあるため、水分子同士の競合が起こると想定される。それ比べ、**26** は N 原子同士の距離が離れており、水分子同士の競合は起きづらい。つまり、化合物の水溶性には、水分子が水素結合しやすいような極性基と立体配座が重要であることが示唆される。

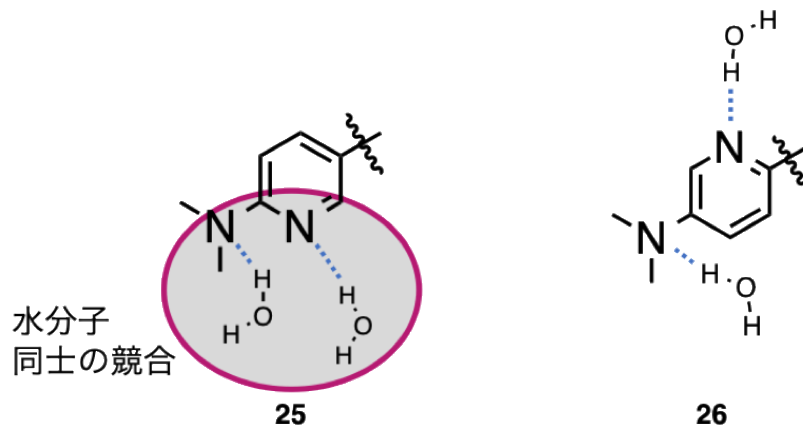


Figure 3-4. 25 と 26 の溶解性の差異に関する模式図

25 と 26 のそれぞれの構造は複素環部位のみ表示した。想定される水分子との水素結合の様子を模式的に示した。

3.3. 発光活性の評価

まず、生物発光特性を測定した。今回測定に用いた酵素は北米産ホタルルシフェラーゼ (*Photinus Pyralis* Luciferase, *Ppy*) である。リン酸カリウム緩衝液(KPB, pH8.0, 500 mM) 中 ATP, Mg²⁺ 存在下、1 と 7, 25–27 をそれぞれ *Ppy* ルシフェラーゼと反応させ、種々の発光特性を測定した。

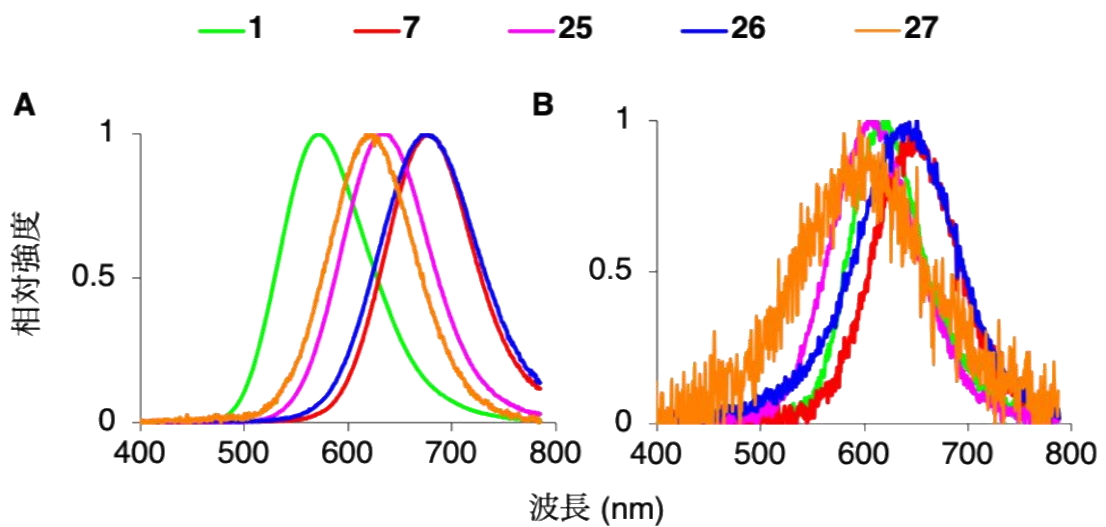


Figure 3-5. 1 と 7, 25–27 の生物発光スペクトル(A) と化学発光スペクトル(B)

Table 3-2. 1 と 7, 25–27 の生物発光と化学発光特性

化合物	Rel. Int _{BL} ^a	λ_{BL} ^b /nm	Rel. Int _{CL} ^a	λ_{CL} ^c /nm	K_m / μ M	Rel. V_{max} ^d
1	100%	560	100%	620	107 \pm 15 ^e	–
7	36%	675	54%	645	1.3 \pm 0.3	100%
25	135%	640	104%	600	29 \pm 5	240%
26	10%	675	84%	635	6.2 \pm 1.2	180%
27	4%	625	19%	595	57 \pm 9	6.5%

^a **7, 25–27** の発光輝度を **1** との相対的な値で比較。180 秒露光時の発光極大波長の輝度で比較した。

^b 生物発光の極大波長。

^c 化学発光の極大波長。

^d **25–27** の V_{max} を **7** との相対的な値で比較。30 秒露光時の積算した輝度で比較した。

^e Ref. 16.

7 及び **25–27** の生物発光強度を **1** との相対強度で比較する(Rel. Int_{BL})と、それぞれ 36%, 135%, 10%, 4% であった(Table 3-2)。アナログ **25–27** の生物発光極大波長(λ_{BL}) は、それぞれ 640, 675, 625 nm であった(Figure 3-5-A, Table 3-2)。アナログ **25–27** の λ_{BL} 値は **1** に比べて、長波長シフトした。**7** と比較すると、**25** と **27** はそれぞれ 35 と 50 nm ずつ短波長シフトし、**26** は **7** とほぼ同じ λ_{BL} 値であった(Figure 3-5-A, Table 3-2)。次に、化学発光特性を調べるため、それぞれの基質を DMF 中でプロピルホスホン酸無水物(T3P) とトリエチルアミン(NEt₃) と反応³⁵させ、測定した。**7** 及び **25–27** の生物発光強度を **1** との相対強度で比較する(Rel. Int_{CL})と、それぞれ 54%, 104%, 84%, 19% であった(Table 3-2)。**7** 及び **25–27** の化学発光極大波長(λ_{CL}) はそれぞれ 645, 600, 635, 595 nm であった(Figure 3-5-B, Table 3-2)。このアナログと波長の関係性は生物発光波長の場合とほとんど同じような結果になり、**7** と比較すると、**25** と **27** はそれぞれ 45, 50 nm ずつ短波長シフトし、**26** は僅かに短波長シフトした(Figure 3-5-B, Table 3-2)。

生物発光と化学発光共に、発光強度が各基質で大きく異なっていた。発光反応には、そもそもの化学反応の反応性が関与しており、この反応効率と発光体の量子収率の掛け合わせとなっている。AkaLumine アナログ **25-27** に着目すると、2つの発光反応の発光強度は概ね相関していた。生物発光極大波長(λ_{BL}) と化学発光極大波長(λ_{CL}) では、波長が異なる値になった。生物発光と化学発光の波長は、基質の π -共役の長さとその発光反応中の極性環境に依存している。2つの発光反応において、基質の π -共役の長さは変わらないため、反応中の極性環境が大きく影響したことで、両者の発光波長が異なるものになったと考えられる。

次に、**7** 及び **25-27** のミカエリス定数 K_m 及び最大相対酵素反応速度 $Rel. V_{max}$ を調べた。具体的な評価に入る前に、ホタル生物発光反応を一般的な酵素反応に近似できることを **Figure 3-6** を用いて概説する。

基質 **S** が酵素 **E** に取り込まれるとき、 k_1 及び k_{-1} の速度定数で反応は可逆的に進行し、基質-酵素複合体 **S-E** となり、これが酵素反応触媒定数 k_{cat} で生成物 **P** と酵素 **E** に解離する。ここで、**S** が **E** に取り込まれる過程は平衡反応であるため、解離定数 K_s が式①で成り立つ。これが後に説明するように、特定の条件下でミカエリス定数 K_m となる。

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \dots \textcircled{1}$$

酵素の初期濃度 $[E]_0$ を用いて①を変形すると、式①' になる。

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_s + [S]} \dots \textcircled{1}'$$

また、反応速度 v は式①' を代入することで、式②で表せる。

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES] = \frac{k_{cat} \times [E]_0[S]}{K_s + [S]} \dots \textcircled{2}$$

基質 **S** が酵素 **E** に取り込まれる段階で平衡反応が成り立ち、基質が過剰に存在すれば、その反応速度は最大になる。最大反応速度 V_{max} は基質濃度には依存せず、酵素の初期濃度 $[E]_0$ に依存し、式③で表せる。

$$V_{max} = k_{cat} \times [E]_0 \dots \textcircled{3}$$

ここで、 $[S] = K_s$ のとき、式③によると、最大速度 V_{max} の $1/2$ になるときの解離定数が

K_m となる。

$$v = \frac{V_{\max}K_m}{K_m + K_m} = \frac{V_{\max}}{2} \dots \textcircled{4}$$

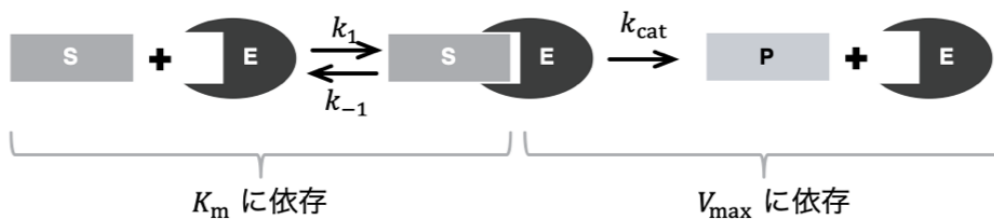
この K_m は解離定数 K_s と同義であるため、 K_m 値が小さいほど酵素に取り込まれやすく、 K_m 値が大きいほど酵素に取り込まれにくいことを示している。

一方、ホタル生物発光反応はホタルルシフェリン(1, LH₂) と ATP の 2 つの基質が酵素ルシフェラーゼ (Luc) に取り込まれ、AMP 中間体(LH₂-AMP) が生成される。この中間体は酵素内にそのままとどまり、酵素の触媒作用で酸化され、励起状態のオキシルシフェリン(2, Oxy-LH₂) が生成される。最後に、励起状態の Oxy-LH₂ が基底状態になる際に光子($h\nu$) が放出される。このことを踏まえると、酵素ルシフェラーゼは 2 つの反応を触媒しており、生成物は Oxy-LH₂ と光子である。したがって、先に説明した一般的な酵素反応とは異なる点がある。

しかしながら、このホタル生物発光反応は 1 段階目のアデニル化反応が律速段階であり、2 段階目の酸化反応が急速に進行する^{15,36}。つまり、 $k_{O_2} \gg k_{AMP}$ となり、ホタル生物発光反応は 1 段階目のアデニル化反応のみの酵素反応と近似できる。さらに、今回の反応の場合、生成物は光子であるため、最大速度 V_{\max} は式③にさらに生物発光量子収率 Φ_{BL} を掛け合わせた式⑤になる。

$$V_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E]_0 \times \Phi_{BL} \dots \textcircled{5}$$

A 酵素反応



B ホタル生物発光 (λ_{BL})

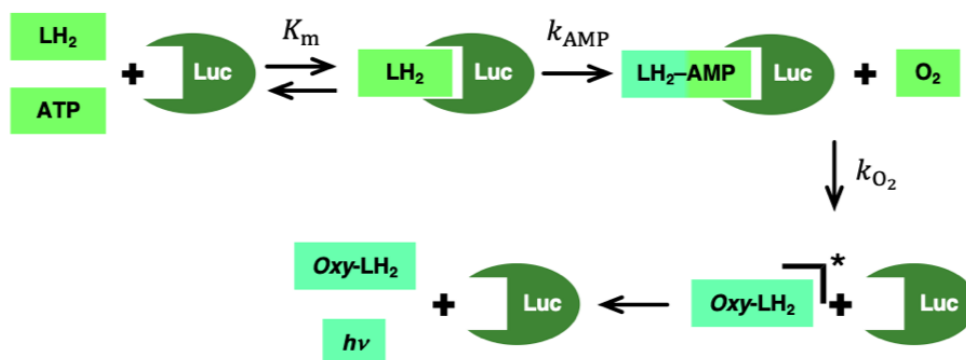


Figure 3-6. ミカエリス・メンテンによる酵素反応(A) とホタル生物発光反応(B) の模式図

A) 一般的な一次の酵素反応速度論、B) ホタル生物発光反応の速度論をそれぞれ模式的に表した。各記号は以下を表している。S: 基質、E: 酵素、SE: 基質酵素複合体、P: 生成物、LH₂: ホタルルシフェリン、Luc: ホタルルシフェラーゼ、LH₂-AMP: AMP 中間体、Oxy-LH₂: オキシルシフェリン、*hν*: 光子

具体的な評価を以下に記した。7 及び 25–27 の K_m 値はそれぞれ 1.3, 29, 6.2, 57 μM であった(Table 3-2)。25–27 の K_m 値はすべて 7 よりも大きくなっている。これは 25–27 の溶解度が高くなっていることが原因だと思われる。実際、溶解度が最大だった 27 は K_m 値も最大である。一般に、酵素の活性部位は疎水性なので、親水性である 27 は酵素活性部位との親和性を低下させたと考えられる。

興味深いことに、25 の K_m 値は 26 に比べると約 5 倍高い。これは、25 と 26 の N 原子の位置が酵素活性部位との親和性に大きく影響していることを示唆している。N 原子の孤

立電子対と酵素活性中心に存在するアミノ酸残基との水素結合が主な原因と推測できる。しかしながら、**7** や **25-27** と酵素 *Ppy* の複合体の X 線結晶構造解析もなされていないため、具体的にどのアミノ酸残基が酵素活性に影響を与えているのか、現時点では判断できない。

25 と **26** の Rel. V_{\max} は、**7** よりも大きく、ピラジン含有アナログ **27** の Rel. V_{\max} は、**7** よりも小さかった。Rel. V_{\max} は、生物発光量子収率(Φ_{BL}) と酵素反応触媒定数(k_{cat}) の掛け算であるため(上述式⑤)、本酵素反応速度は各基質と酵素の親和性だけでなく、 Φ_{BL} と k_{cat} に大きく依存していることを示している。

前章で用いた酵素ドッキングシミュレーション (2.6. 参照) は、ホタルルシフェリン(**1**) と酵素 *Ppy* の複合体を基準になっている。そのため、**1** とは構造の基本骨格が異なる **7** 及び **25-27** でこのシミュレーションソフトを用いても、得られた結果がどれだけ正確なのか疑問が残る。このような考えのもと、本項ではドッキングシミュレーションによる解析は行わず、次項で各基質の電子状態を計算化学で求めることで議論することにした。

3.4. 計算化学による評価

これら生物発光活性の結果をさらに考察するために、計算化学により評価した。序論で述べたとおり、L-L 反応により **1** から生成される発光体はオキシルシフェリン(**2**) である。したがって、**7** 及び **25-27** の L-L 反応により生成される発光体もケト型のオキシ体である **49-52** と想定される(Figure 3-7-A)。そこで、DFT (density functional theory) 及び TD-DFT (time-dependent DFT) 法により **25-27** のオキシ体である **50-52** の電子状態を調べた。**50-52** の最安定化構造は **49** の最安定化構造²⁴ と同一であり(Figure 3-7-A)、HOMO と LUMO のエネルギー準位とそのときのエネルギー準位差($\Delta E_{\text{H-L}}$)、波長(λ_{tr})、振動子強度(f)、 $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移を Table 3-4 にまとめた。

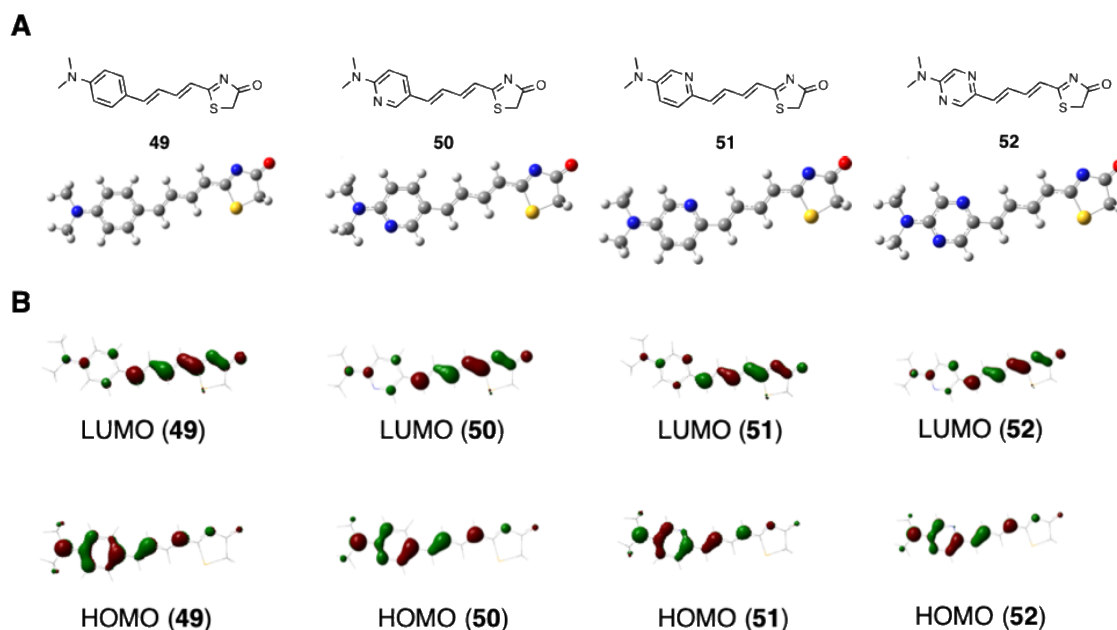


Figure 3-7. 49–52 の最安定化構造(A) とその時の HOMO と LUMO (B) の電子状態

Table 3-4. 49–52 の DFT と TD-DFT 計算結果

化合物	HOMO /eV	LUMO /eV	ΔE_{H-L}^a /eV	λ_{tr}/nm (f) ^b	Configuration ^c
49 ^d	-5.54	-2.65	2.89	439 (1.38)	H → L (0.70)
50	-5.76	-2.77	2.99	426 (1.43)	H → L (0.70)
51	-5.70	-2.74	2.96	432 (1.29)	H → L (0.70)
52	-5.91	-2.87	3.03	421 (1.37)	H → L (0.70)

^aHOMO と LUMO のエネルギー準位差

^b $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移のエネルギー差を波長表記したものの。括弧は振動子強度(f)。

^c励起状態の Configuration。そのときの係数を括弧に記した。HOMO と LUMO をそれぞれ H と L と定義した。

^dRef. 24

50–52 の HOMO と LUMO の電子状態は 49 と類似していた。50–52 の HOMO と LUMO のエネルギー準位は 49 よりもわずかに低くなっていた。これは、50–52 が 49 の芳香環の代わりに N 原子含有複素環を有しているからであり、N 原子を導入したことで非結合性軌

道(n 軌道)が増え、HOMO と LUMO のエネルギー準位が低下した。 ΔE_{H-L} 値の順番(49 < 51 < 50 < 52) は、 λ_{BL} 値(49 \approx 51 > 50 > 52) と λ_{CL} 値(49 > 51 > 50 > 52) の順番とおおまかに一致している (Table 3-4 と Table 3-2 を参照)。このことから、アナログ 7 及び 25-27 における生物発光と化学発光の極大波長の関係性はほとんど 49-52 の電子状態によって決まることを示唆している。しかしながら、興味深いことに、7 と 26 の生物発光波長 λ_{BL} 値は一致している。これは L-L 反応により生成される 49-52 の一重項励起状態(S_1) の発光がルシフェラーゼの活性部位との相互作用によることを示唆するものである。

オキシ 49-52 の HOMO の電子分布は(4-ジメチルアミノフェニル)-エテニル部位に多く存在し、LUMO の電子分布は 2-ブタジエニル- 1,3-チアゾール部位に多く存在する(Figure 3-7-B と Figure 3-8)。つまり、HOMO-LUMO 遷移による 49-52 の電子励起は一重項励起状態に極性を生じる電子移動特性を有している。49-52 の HOMO-LUMO 電子特性は、基底状態(S_0) から励起状態(S_1) への遷移が大きい f 値(1.2 以上) に起因している(Table 3-4)。蛍光発光過程は $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の逆過程なので、蛍光発光の速度定数は $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移の f 値から予測される³⁷。つまり、49-52 の f 値は、これらの化合物が発光体として優れていることを示唆する。

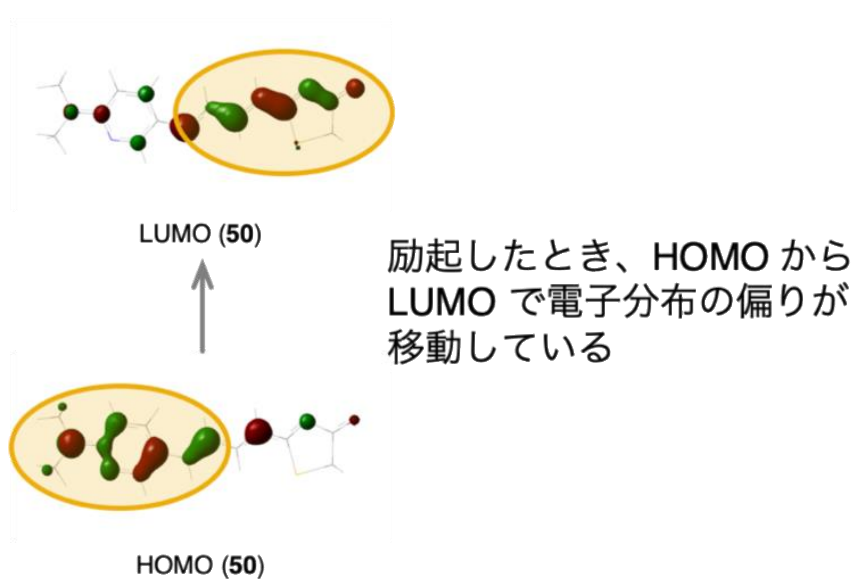


Figure 3-8. オキシ体 50 を例に電子移動特性の説明。

本項の計算結果を踏まえ、前項で生物発光波長と化学発光波長が大きく異なっており、生物発光で長波長化したことを考察する。

垣内らの報告³⁸によると、ジメチルアミノオキシルシフェリンは、非極性条件では短波長化し、極性条件では長波長化する。ホタル生物発光反応における発光波長は、発光体であるオキシ体の励起状態の置かれている極性環境に依存する³⁸。つまり、**AkaLumine アナログ 25–27** の生物発光波長と化学発光波長の差は、オキシ **49–52** の励起状態が置かれている極性環境の差であるといえる。生物発光は緩衝液(KPB) 中で、化学発光は DMF 中でそれぞれ測定しているので、これら測定溶媒の極性の違いが発光波長に影響している。ここにさらに、生物発光の場合、酵素活性部位の極性環境も寄与している。よって、生物発光波長は酵素内の極性環境が重要な要素であり、この極性も考慮した基質デザインを行うことで、発光波長をより正確に制御できる可能性もある。

3.5. *in vitro* (培養細胞) における発光活性評価

AkaLumine アナログ 26 は **AkaLumine (7)** 及び **TokeOni (8)** と同じ発光波長($\lambda_{BL} = 675 \text{ nm}$) であり、且つ高い溶解性($C_{max} = 69 \text{ mM}$) を有していた。一方、**AkaLumine アナログ 25** は **26** よりも短波長($\lambda_{BL} = 640 \text{ nm}$) であるが、ホタルルシフェリン(**1**) や **7** よりも強い発光強度であった。そこで、**25** と **26** がイメージング材料として実用的か調べることにした。

まずは細胞内での発光特性を評価することにした。今回は **1, 8, 25, 26** の 4 種で比較した。

培養細胞内での発光特性を調べるため、ホタルルシフェラーゼを恒常的に発現しているマウスルイス肺がん細胞(LLC; Lewis Lung Carcinoma)/luc にそれぞれの基質を最終濃度 0.25, 2.5, 25, 250 μM で添加したときの発光強度を評価した(Figure 3-9)。

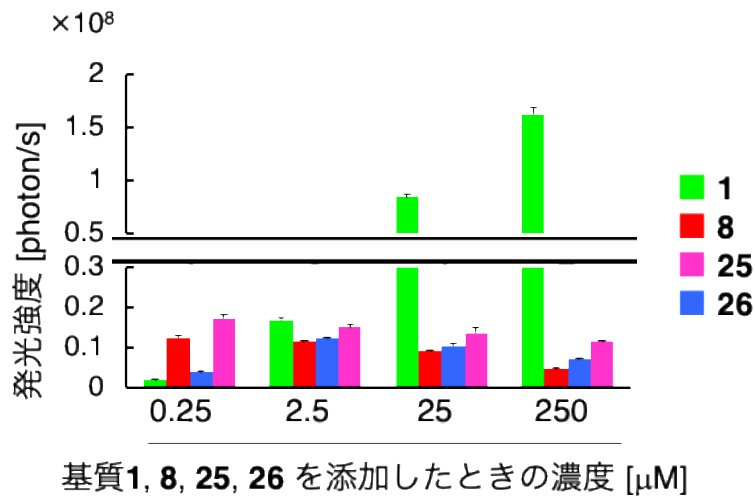


Figure 3-9. 細胞の発光特性評価 LLC/luc 細胞に表記濃度の基質 **1, 8, 25, 26** を添加し、そのときの発光強度を測定した。n=3, *P<0.05. 誤差棒は標準誤差を示している。

1 は濃度に比例して発光強度が増大していき、**8** の発光強度は濃度に依存せず低濃度(0.25 μM) で飽和していた。

26 を投与した細胞の発光強度は、**8** を投与したときの細胞の発光強度と同じような発光強度を示した。低濃度条件下では **26** は濃度依存的に発光強度が増大した。このときの発光強度は **1** よりも強かった。

25 は **8** と同様に、発光強度は濃度依存的に増大せず、低濃度条件下ですでに発光強度は飽和していた。

動物のイメージングでは基質を大量に何度も投与する必要があり、**25** や **26** のように低濃度で十分な発光活性が得られることは、動物への健康を考慮すると非常に有用な性質である。

続いて、各基質の細胞毒性を、様々な濃度の基質を添加した時の培養細胞の生存率から評価することにした。

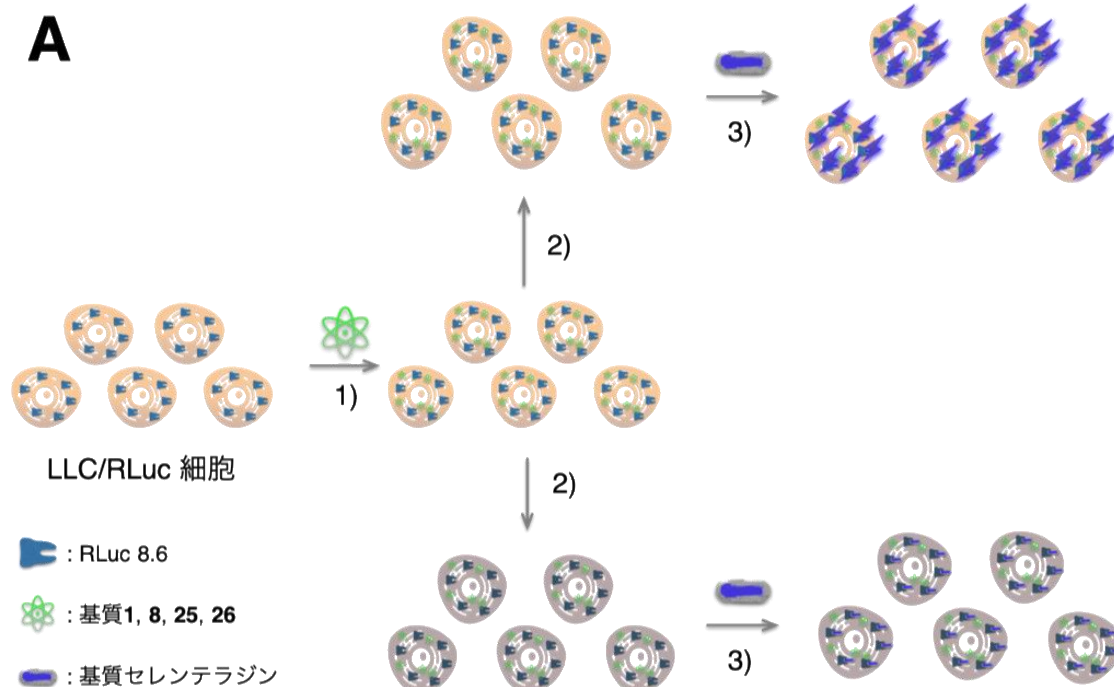
Figure 3-10-A に示すように、まず LLC の培養細胞にウミホタルルシフェラーゼ(RLuc 8.6) を恒常的に発現する LLC/RLuc 細胞に各基質 **1, 8, 25, 26** を 2.5–1000 μM の濃度で添加し、さらに 24 時間培養した。その後、各細胞を破碎・回収し、ここに RLuc の発光基質である

セレンテラジン(3) を添加し、発光量を測定した。Rluc の発光量は生細胞数に比例するため、この発光量を比較することで培養細胞の生存率を評価した。

Yeh らが以前に報告³⁹していたように、8 は高濃度(> 500 μ M) 条件下では細胞の生存数が減少したことから細胞に毒性が確認された。25 も 8 と同じように高濃度条件下で毒性が観察された。一方、26 は高濃度条件下においても、細胞の生存数には影響がなく、毒性が確認されなかった (Figure 3-10-B)。

これらの結果は、各基質の疎水性及び親水性が関与していると想定される。疎水性化合物は細胞膜を透過しやすく、親水性化合物は細胞膜を透過しにくい。つまり、8 と 25 が細胞膜の透過性が高く、細胞内に過剰に取り込まれたことで細胞生存率の低下を招いたと考えられる。

この細胞毒性評価実験の結果から、25 よりも 26 の方が細胞への毒性がなく、イメージング材料として大きなメリットであるため、動物実験で 26 の更なる評価を実施した。



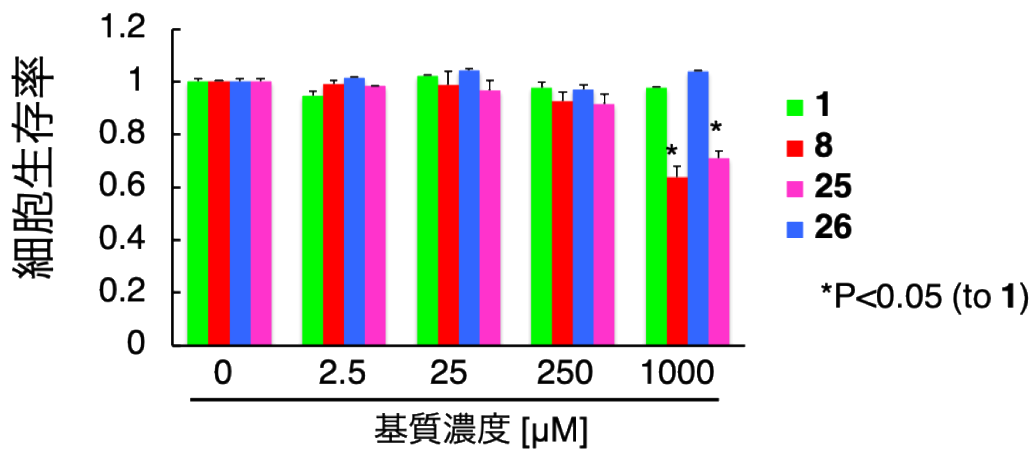
B

Figure 3-10. 培養細胞の生存率を用いた各基質の細胞毒性の評価 (A) 細胞毒性の評価の実験方法の概略図。1) 各発光基質 **1**, **8**, **25**, **26** の添加、2) 24 時間培養、3) セレンテラジンの添加による生細胞からの発光活性測定。(B) それぞれの異なる濃度で基質を投与したときの LLC/luc 細胞の生存数を評価した。n=3, *P<0.05. 誤差棒は標準誤差を示している。

3.6. *in vivo* (マウス個体) における発光活性評価

マウス腫瘍モデルを用いて、**26** もしくは、**1**, **8** を投与した時に腫瘍から得られる発光強度を比較することで、**26** の *in vivo* イメージング材料としての性能を評価した。

まず、マウス体表面に近い皮下腫瘍モデルに、同量の **1** と **26** をそれぞれ投与し、発光強度を比較した。**1** を投与したマウスに比べ、**26** を投与したマウスの方が僅かに強い発光強度が得られた(Figure 3-11-A)。解析した個体のイメージを Figure 3-11-B に示す。これらのイメージからわかるように発光強度の差は僅かであり、統計解析においても有意な差は認められなかった。つまり、体表面に近い皮下腫瘍モデルのイメージングには、**26** の有用性はわずかしかない。

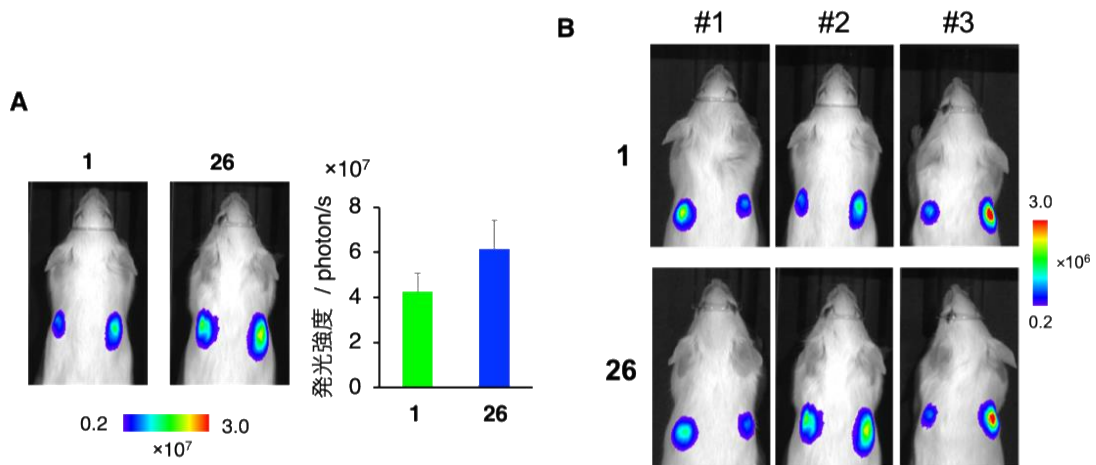


Figure 3-11. 皮下腫瘍モデルマウスでのイメージング結果 (A) 33 mM の **1** 及び **26** を投与したのち、イメージング撮影を行い、発光強度を測定した。n = 6. 誤差棒は標準誤差を示している。(B) 個々のマウス (#1-3) でのイメージング図。30 分間 3 分毎に撮影したとき、最も発光強度が高いイメージを示した。

しかしながら、体内の深部に位置する肺転移モデルマウスで比較すると、近赤外発光する **26** は **1** に比べ約 6 倍検出感度が向上した(Figure 3-12-A)。解析した個体のイメージを Figure 3-12-B に示す。 **1** と **26** を投与したときのイメージ図を比較すると、 **1** では発光信号を確認できない部位も、 **26** では発光信号を確認できた。これらの結果から、深部組織のイメージングには、長波長化は非常に効果的であるといえる。

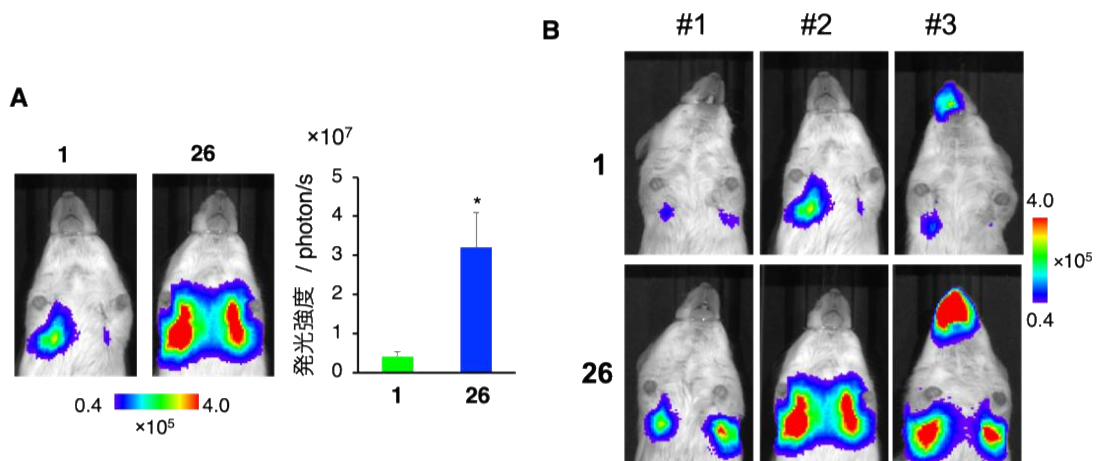


Figure 3-12. 肺転移モデルマウスでの **1** と **26** を投与したときのイメージング結果 (A) 33 mM の **1** 及び **26** を投与したのち、イメージング撮影を行い、発光強度を測定した。n = 6, *P<0.05. 誤差棒は標準誤差を示している。(B) 個々のマウス (#1-3) でのイメージング図。30 分間 3 分毎に撮影したとき、最も発光強度が高いイメージを示した。

さらに、肺転移モデルマウスのイメージングにおいて、**26** は **8** とほぼ同程度の検出感度であった(Figure 3-13-A)。解析した個体の発光イメージを Figure 3-13-B に示す。これからわかるように、イメージでは大きな差は認められず、統計解析においても有意な差は確認できなかった。しかしながら、前節で示したように、**26** が **8** よりも細胞毒性が小さいことを考慮すると、**26** は **8** よりも *in vivo* イメージングに適した材料と言える。

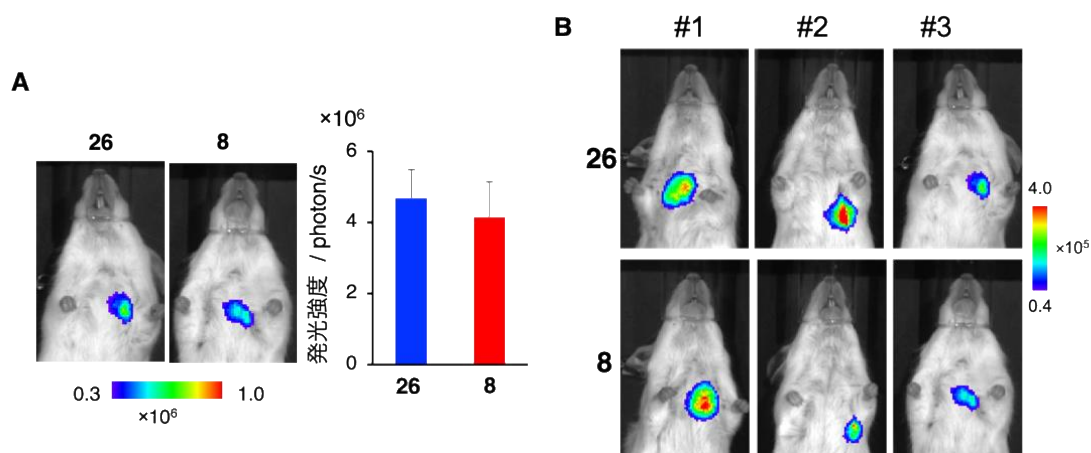


Figure 3-13. 肺転移モデルマウスでの **26** と **8** を投与したときのイメージング結果 (A) 33 mM の **26** 及び **8** を投与したのち、イメージング撮影を行い、発光強度を測定した。n = 3. 誤差棒は標準誤差を示している。(B) 個々のマウス (#1-3) でのイメージング図。30 分間 3 分毎に撮影したとき、最も発光強度が高いときのイメージ。

3.7. 肝臓での自家発光の評価及び微小環境イメージング
in vivo イメージングにおいて有用な結果を得られた AkaLumine アナログ **26** の肝臓からの発光強度を評価した。

酵素ルシフェラーゼが発現していない野生型マウス(*Rag 2* 遺伝子をノックアウトした免疫不全マウス) に **1** や **8**, **26** を投与したときに、肝臓からの発光強度を比較した(Figure 3-14)。 **8** でのみ肝臓での発光シグナルが観測され、 **1** と **26** では肝臓から発光シグナルは検出されなかった。

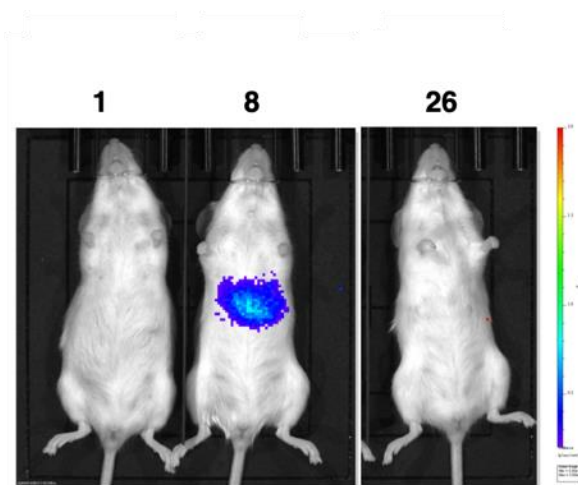


Figure 3-14. ルシフェラーゼを発現していない免疫不全マウスに **1** と **8, 26** を投与したときのイメージング結果

1, 8, 26 をそれぞれ 10 mM 100 μ L 腹腔内投与し 10 分後に撮影した。

8 と **26** の化学構造はほぼ同じであり、ルシフェラーゼとの発光特性も大して変わらないにもかかわらず、肝臓発光のシグナルの結果は大きく異なっていた。この結果は、肝臓内には、**8** のみを特異的に発光させる物質が存在することを示唆している。

また、**8** は体内に投与すると **7** に変換されると推測されることと、**7** の脂溶性は **26** よりも高い(3.2. 参照) ことを踏まえると、**7** は **26** よりも肝臓へ集積する可能性も高い。**7** が肝臓への集積しやすいことで、**26** に比べて肝臓での反応が起こりやすく、発光強度が強くなったと考えることもできる。

肝臓での自家発光の原因は不明であるが、この結果は非常に興味深いものであり、本現象を解明していく上で非常に重要な知見だといえる。

このように、**26** は肝臓で自家発光せず、且つ酵素ルシフェラーゼとの反応では近赤外発光を示すため、微小環境の発光イメージングの性能を評価した。モデルマウスと実験内容は、以下のものである。

まず、正常な乳腺上皮細胞 (NMuMG 細胞) にレトロウイルスベクターを用いて、活性型 ERBB2 を発現させることで人工的に癌化させた。ここにさらに、ルシフェラーゼおよびがん転移促進遺伝子 A も同時に過剰発現させた。この細胞株を免疫不全マウス(Rag 2 欠損)の第 4 乳腺組織 (fatpad) に移植し、乳がん原発巣を作製した。次に、樹立した原発巣を摘出し、1 週間後に残存する乳がん原発巣及び肺に転移した腫瘍の発光強度を撮影した (Figure 3-15)。

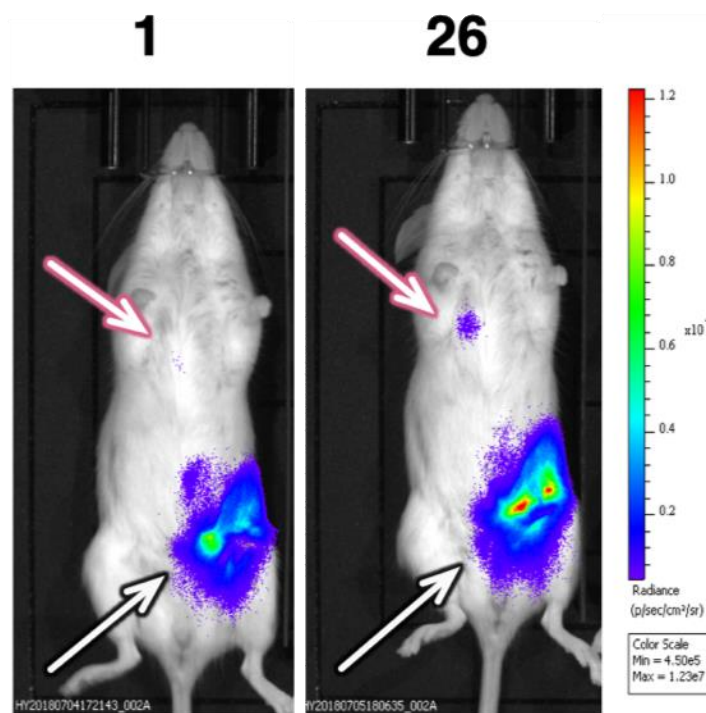


Figure 3-15. 乳がんモデルマウスに **1** と **26** を投与したときのイメージング結果 **1** (47.1 mM, 127 μ L in PBS) と **26** (60 mM, 100 μ L in PBS) を腹腔内投与し 5 分後に撮影した。黒矢印で示した部分が摘出した後の乳がん原発巣、赤矢印で示した部分が転移した細胞。Rag 2^{-/-} マウス♀, 週齢; 10 週。

乳がん原発巣部位 (Figure 3-15. 黒矢印) で比較すると、**26** の方が **1** よりもわずかに強い発光強度であった。また、肺に転移した部位 (Figure 3-15. 赤矢印) で比較すると、**26** でのみ発光シグナルを観測でき、**1** では発光シグナルは観測されなかった。**1** では検出できないような細胞数でも **26** では検出できたといえる。これは、**26** が **1** よりも長波長化したことでイメージング感度が向上したことを示すものである。また、このような微小環境のイメージングは、肝臓発光する **8** にもできないものである。よって、**26** はイメージング材料として、**1** や **8** よりも優れた性能を有しているといえる。

3.8. まとめ

AkaLumine (**7**) の芳香環をピリジンもしくはピラジンに置換した AkaLumine アナログ

25-27 を合成した。**25-27** の溶解度はそれぞれ 28, 69, 480 mM であり、AkaLumine (**7**) の 2.2 mM よりも大きく改善することに成功した。これら **25-27** の酵素 *Ppy* と発光反応させたところ、生物発光波長はそれぞれ 640, 675, 625 nm であった。AkaLumine (**7**) は 675 nm であるので、**25, 27** は AkaLumine (**7**) よりも短波長化し、**26** は AkaLumine (**7**) とほぼ同じ発光波長であった。N 原子導入による波長変化の結果の考察を深めるため、化学発光、酵素反応における K_m 及び Rel. V_{max} 、DFT 及び TD-DFT による計算化学の実験を行った。**25-27** は N 原子 1 つもしくは 2 つが置換されるだけで、基底状態と励起状態のエネルギー差が変化することがわかった。この特性により生物発光波長に変化が生じた。化合物のそのもののエネルギー状態だけでなく、酵素との相互作用が大きく発光活性に影響を与えたため、大きな波長変化を生み出せたことがわかった。

また、これら AkaLumine アナログ **25-27** のうち、**26** が長波長で発光し、高い溶解度を得られたので、細胞及び動物による実験を行った。これらの実験はホタルルシフェリン (**1**) と TokeOni (**8**)、AkaLumine アナログ (**26**) の 3 種で比較検討した。LLC/Luc 細胞を用いた *in vitro* イメージングでは、低濃度条件下で **1** よりも **26** のほうが強い発光強度を示し、**8** と **26** ではほぼ同じような発光強度であった。皮下腫瘍モデルマウス及び肺転移モデルマウスを用いた *in vivo* イメージングでは、33 mM の同一濃度条件で測定した。皮下腫瘍モデルマウスでは、**1** と **26** ではほぼ同じような発光強度であったが、肺転移モデルマウスでは、**26** の方が **1** よりも 6 倍ほど強い発光強度を得られた。また、この肺転移モデルマウスで、**8** と **26** を比較すると、ほぼ同じような結果となった。さらに、**26** は肝臓での自家発光が観測されなかった。これにより、微小環境のイメージングが可能となった。つまり、**26** は先行研究で得られていた **1** や **8** よりも優れたイメージング材料であるといえる。

4 AkaLumine アナログ **26** の実用化

前章で AkaLumine アナログ **26** はすでに市販化されている AkaLumine (**7**) 及び TokeOni (**8**) と同等の発光活性を有し、**7** や **8** では困難だった PBS への高溶解性も有している。そこで、**26** は工業合成に取り組み、市販化することを目指した。本章は黒金化成株式会社による工業合成及び市販化を目指したものであり、黒金化成株式会社との共同研究による成果である。

4.1. 合成方法の検討

26 は前章で示したように Figure 4-1 の経路で合成している。アルデヒド **35** の合成収率が極めて低く、**47** から **26** を合成する最終段階では精製過程で中圧自動分取カラムクロマトグラフィー装置(EPCLC) を用いている。そこで、**35** の合成収率を向上させる別法の探索を行い、また **26** の精製過程で EPCLC を用いない精製方法の開発を行った。

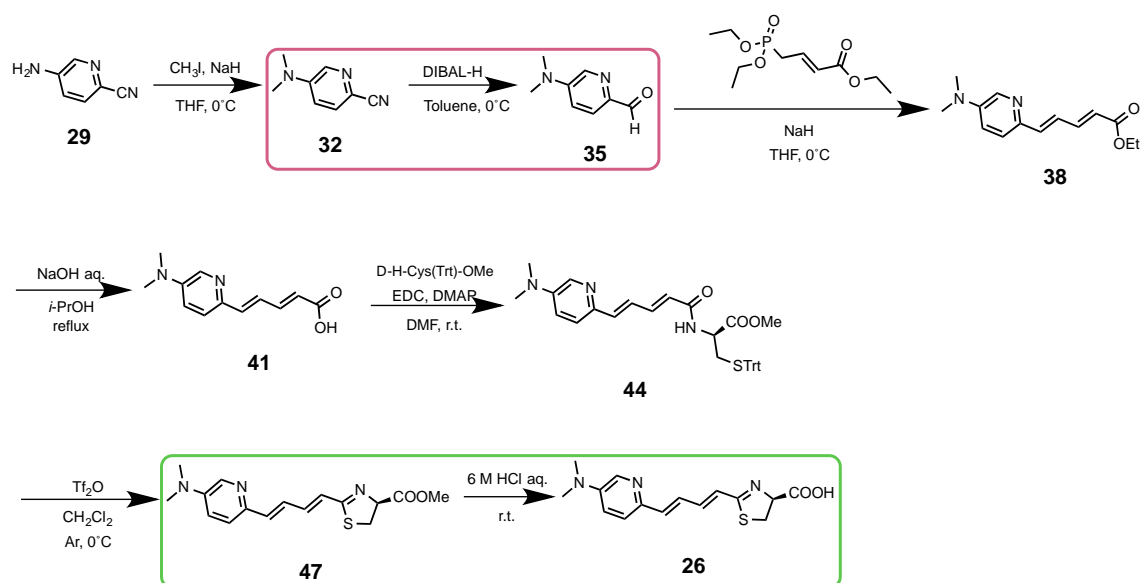


Figure 4-1. **26** の合成経路

32 から **35** の合成経路を赤枠、**47** から **26** の合成経路を緑枠でそれぞれ囲んだ。

4.1.1. アルデヒド **35** の合成成績を向上させる

①DIBAL 還元反応の条件検討

アルデヒド **35** はジメチルアミノ体 **32** から DIBAL による還元反応で得てきた(Figure 4-2)。この反応は最高収率 50% であり、工業合成に展開するには非常に難しいものがあった。

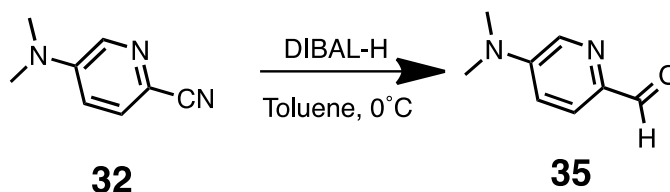


Figure 4-2. **32** から **35** を合成する還元反応

Table 4-1. DIBAL による還元反応の条件検討の結果

Entry	基質	DIBAL	toluene	基質/ 溶媒 (DIBAL 含)	処理	精製	収量
1	33 mg 0.23 mmolL	1.5eq. 0.33 mL	10 mL	0.022 M	acetone ロッシェル塩	PTLC C/M=10/1	4.3 mg 0.029 mmolL 9%
2	1.4 g 9.2 mmolL	1.5eq. 14 mL	25 mL	0.24 M	acetone ロッシェル塩	φ=4.0 cm w = 56 g H/E = 1/2	250 mg 1.6 mmolL 18%
3	860 mg 5.9 mmolL	1.5eq. 8.8 mL	25 mL	0.17 M	acetone ロッシェル塩	φ=4.0 cm w = 60 g H/E = 1/2	170 mg 1.1 mmolL 19%
4	720 mg 4.9 mmolL	1.5eq. 7.5 mL	20 mL	0.18 M	acetone ロッシェル塩	φ=4.0 cm w = 57 g C/M = 10/1	370 mg 2.5 mmolL 50%
5	350 mg 2.3 mmolL	1.2eq. 2.8 mL	10 mL	0.18 M	acetone ロッシェル塩	φ=4.0 cm w = 55 g C/M = 10/1	130 mg 0.85 mmolL 36%
6	1.3 g 8.8 mmolL	2.0eq. 16 mL	30 mL	0.19 M	acetone ロッシェル塩	φ=4.0 cm w = 56 g C/M = 10/1	130 mg 0.88 mmolL 10%

7	140 mg 0.92 mmolL	2.0eq. 2.0 mL	8.0 mL	0.10 M	6M HCl 5M NaOH	PTLC C/M=10/1	3.4 mg 0.023 mmolL 2.5%
---	----------------------	------------------	--------	--------	-------------------	------------------	-------------------------------

そこで、反応溶媒量や後処理試薬の変更などの条件検討を行った(Table 4-1)。基質(32) 量/(反応溶媒+DIBAL の体積量) を反応濃度とし、この濃度に着目し Entry 1-7 まで検討した。Entry 1 は収率 9% であった。これは反応濃度が非常に薄かったことが原因と推測し、Entry 2 では反応濃度を Entry 1 の約 10 倍にして検討し、収率 18% であった。Entry 1 の収率に比べ 2 倍ほど向上した。Entry 3 では反応濃度を Entry 2 よりもわずかに薄くしたところ、この両者の収率には大した差はなかった。そこで、Entry 4 では、反応濃度では Entry 3 と同量にし、カラムクロマトグラフィーの精製時の展開溶媒を変更した。Entry 2, 3 ではヘキサン-酢酸エチル混合溶媒系を用いていたが、Entry 4 ではクロロホルム-メタノール混合溶媒系を用いた。その結果、収率は 50% まで向上した。これを踏まえて、Entry 5 では DIBAL 試薬の量がわずかに少なくしたが Entry 4 とほぼ同条件で検討したところ、収率は 36% であった。Entry 4 の再現性は得られなかった。そこで、Entry 6 では、基質 32 に対する DIBAL 試薬の当量をこれまでの約 1.5eq. から 2.0eq. で試みた。このときの収率は大きく低下し、10% であった。Entry 7 では、ロッシェル塩による後処理を変更することにした。本還元反応はシアノ基が DIBAL に還元されイミン中間体が生成し、これが加水分解されアルデヒドが生成される。そこで、このイミン中間体からアルデヒドへの加水分解反応が進行していないと仮定し、ロッシェル塩から 6M HCl aq. に変更した。HCl aq. で十分加水分解したのち、5M NaOH aq. で中性付近まで pH を調整した。この結果は収率 2.5% であった。つまり、本反応においてはロッシェル塩によるイミン加水分解は十分に進行していたと示唆される。

今回行った条件検討では、大幅な収率向上はできず、Entry 4 の収率 50% が最も反応成績がよく、本条件が適当と示唆される。

②ハロゲンとアミンの交換反応

DIBAL 還元では反応条件を検討したものの、収率向上は達成できなかった。そこで、アル

デヒド **35** をクロロホルミル体 **53** 及びブロモホルミル体 **54** から合成した(Figure 4-3)。

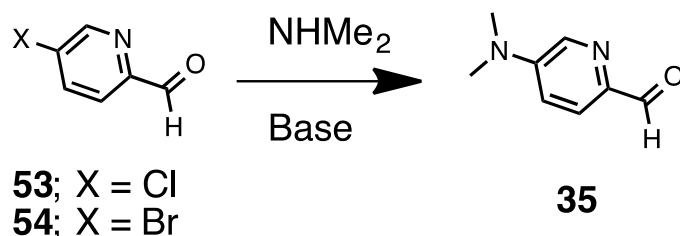


Figure 4-3. **53** 及び **54** から **35** を合成する反応

Table 4-2. ジメチルアミノ化の条件検討の結果

Entry	基質	ジメチルアミン	塩基	溶媒	条件	収量
8	140 mg	12eq.	ヨウ化	THF	60 °C	× 反応は進行せず
	1.0 mmol	12 mL	カリウム 触媒量	10 mL	封管 6 days	
9	190 mg	12eq.	ヨウ化	THF	60 °C	× 反応は進行してい たがごくわずか
	1.0 mmol	12 mL	カリウム 触媒量	10 mL	封管 6 days	
10	220 mg	12eq.	K ₂ CO ₃	DMF	80 °C	原料消失
	1.2 mmol	12 mL	720 mg 4 eq		Ar 1 week	

Table 4-2 のように、Entry 8, 9 の結果を比較すると、クロロ体 **53** では反応がほとんど進行しておらず、ブロモ体 **54** はわずかに反応が進行していることがわかった。そこで、Entry 10 ではブロモ体 **54** で溶媒と塩基を変更し反応を検討した。Entry 8, 9 では原料がほとんど消失しなかったが、Entry 10 では原料がほぼ消失し、84 mg の生成物が得られた。この生成物を NMR で解析したところ、目的物の **35** とは異なる化合物であり、この化合物の特定には至らなかった。Figure4-3 の合成ルートでは **35** は得られないと結論付けた。

③ *n*-BuLi によるホルミル化反応

本合成経路では、出発原料である 5-アミノ-2-ブロモピリジン(**55**) を還元的アミノ化し、2-ブロモ-5-ジメチルアミノピリジン(**56**) を得た。これを *n*-BuLi でリチオ化した後、DMF を加え、アルデヒド **35** を得た(Figure 4-4)。

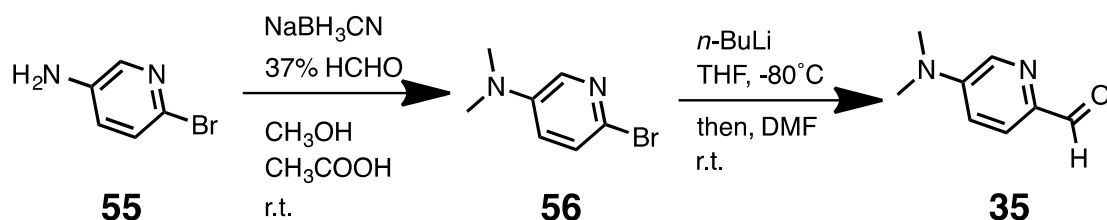


Figure 4-4. **55** から **56** を経て **35** を合成する反応

Table 4-3. **55** から **56** を得る還元的アミノ化反応の成績

Entry	基質	NaBH ₃ CN	HCHO	CH ₃ OH	CH ₃ COOH	収量
11	170 mg	270 mg	1.2 mL	15 mL	3 mL	190 mg
	0.96 mmol	4.2 mmol				0.94 mmol
12	1.3 g	1.9 g	4 mL	100 mL	4 mL	1.5 g
	7.3 mmol	29 mmol				7.2 mmol
13	1.3 g	1.9 g	4 mL	100 mL	4 mL	1.2 g
	7.3 mmol	30 mmol				6.2 mmol
14	3.1 g	3.9 g	12 mL	300 mL	12 mL	3.7 g
	18 mmol	62 mmol				19 mmol

Entry 11–14 のように **55** から **56** への反応成績は非常に高く、そのほとんどで安定して収率よく得られてきた。

続いて、**56** から **35** のホルミル化の反応成績を評価した。

Table 4-4. 56 から 35 の反応成績

Entry	基質	<i>n</i> -BuLi	THF	DMF	収量
15	190 mg	1.2 mL	10 mL	240 μ L	60 mg
	0.94 mmolL	2.1 mmolL			0.40 mmolL
16	910 mg	6 mL	100 mL	1.1 mL	160 mg
	4.5 mmolL	9.6 mmolL			1.1 mmolL
17	910 mg	6 mL	100 mL	3 mL	380 mg
	4.5 mmolL	9.6 mmolL			2.5 mmolL
18	3.6 g	23 mL	200 mL	10 mL	1.8 g
	18 mmolL	37 mmolL			12 mmolL

この反応成績は、反応量が多くなると反応収率は向上した。また、上述の①や②の合成ルートに比べ、収率よく **35** を得られた。

55 から **56** を経て **35** を得る合成ルートは、従来の **29** から **32** を経て **35** を得る合成ルートよりも収率よく **35** を得られた。

しかしながら、 NaBH_3CN の試薬単価が高いこと、また、 -80°C のような低温条件の本合成ルートは工業合成には不向きであると判断され、実際の工業合成には、①の DIBAL 還元方法が行われている。

4.1.2. AkaLumine アナログ **26** の合成検討

AkaLumine アナログ **26** はチアゾリンメチルエステル体 **47** を 6M HCl aq. で加水分解したのち重曹で中和し、濃縮乾固する。この個体を中圧自動分取カラムクロマトグラフィー装

置(EPCLC) により逆相カラム(C18) で分離精製している。しかしながら、この EPCLC が工業合成には適していないため、この方法以外による **26** の合成に着手した。

①加水分解酵素を用いた反応

本反応の難点は中和したときに得られる塩を生成物と分離精製することである。そこで、HCl のような無機酸や無機塩基での加水分解ではなく、加水分解酵素を用いた反応を検討した。

Figure 4-5 で示すように、フラスコスケールで反応させる前に、1 mg スケールのごく少量の基質量で酵素と反応させ、原料が消失するかどうかを LC-MS で検証した(Table 4-4)。Entry 20 で原料消失を確認した。

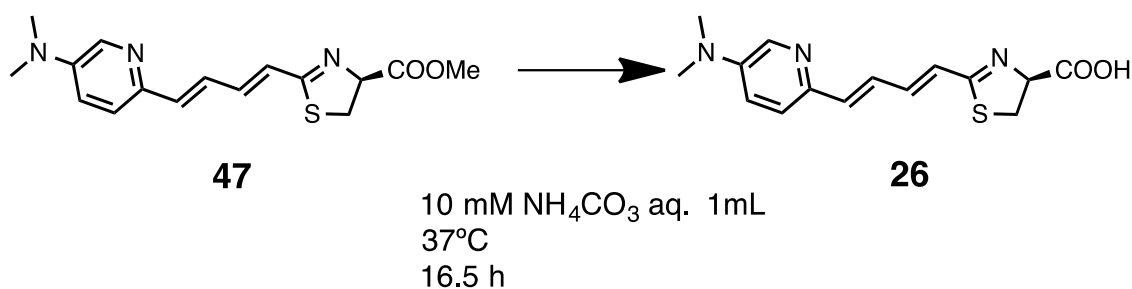


Figure 4-5. **47** から **26** を合成する反応と条件

Table 4-5. 加水分解酵素の反応条件検討

Entry	酵素	結果
19	PLE* ¹	×
20	PPL* ²	○ (基質消失)
21	Amano リパーゼ* ³	△ (基質残り)

*1: Esterase, From Porcine Liver, Crude エステラーゼ ブタ肝臓由来; *2: Lipase from porcine pancreas リパーゼ ブタ膵臓由来; *3: Lipase PS Amano SD

そこで、基質原料が消失した酵素 PPL を用いて、フラスコスケールで反応を行った。

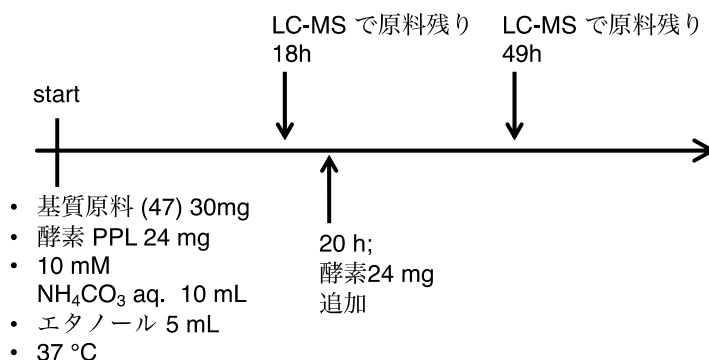


Figure 4-6. 反応追跡の概略図

Figure 4-6 のように、基質と酵素の量はほぼ同量でスタートしたが、18 時間ほど攪拌したが、原料が消失しなかったため、そこから酵素を追加した。その後さらに 20 時間ほど攪拌したが、原料は消失しなかった。TLC 上で生成物を確認したので、桐山ろ過でろ別し、黄色固体を得てきた。得られた固体を NMR 測定したところ、**26** は確認できなかった。

②イオン交換樹脂による中和精製

塩酸による加水分解反応において、チアゾリンメチルエステル **47** はきれいに消失するため、中和処理の検討を行うことにした。中和反応には、イオン交換樹脂で行う方法がある。今回は市販されており比較的容易に入手できるオルガノ社製イオン交換樹脂アンバーライト® シリーズ IRA67, IRA96SB, IRA478RF CI の 3 種で検討した。

47 (140 mg, 0.45 mmol) を 6 M HCl aq. 7 mL と H₂O 2 mL に溶解し、室温で 18 時間攪拌した。3 種の樹脂をそれぞれ水-メタノールの混合溶媒で洗浄したのち、反応混合物を 3 等分し、それぞれの樹脂で水-メタノール混合溶媒を用いながら、中和精製した(Table 4-5)。

Entry 24 の樹脂(IRA478RF CI) を用いた場合、**26** を最も多く得ることができた。

Table 4-6. 加水分解後の中和精製の条件検討

Entry	樹脂	結果
22	IRA67	9.2 mg
23	IRA96SB	7.4 mg
24	IRA478RF CI	19.6 mg

そこで、IRA478RF CI を用いて中和精製を行うことにした。**47** (120 mg, 0.39 mmol) を上記同様、6M HCl aq. 7 mL と H₂O 2 mL に溶解し、室温で 22 時間攪拌した。LC-MS で原料消失を確認した後、水-メタノール混合溶媒を用いながら IRA478RF CI で中和精製を行った。得られた生成物は目的物である **26** と原料である **47**, 帰属できない化合物が混合した物 140 mg が得られた。中和精製前に、LC-MS により原料消失を確認していたことを考慮すると、精製時に用いた水-メタノール混合溶媒と生成された **26** によるエステル化が樹脂での中和過程で進行し、出発原料である **47** が得られたと考えられる。

この結果を踏まえ、**47** (120 mg, 0.38 mmol) を上記同様、6M HCl aq. 7 mL と H₂O 2 mL に溶解し、室温で 18 時間攪拌した。LC-MS で原料消失を確認した後、水-アセトニトリル混合溶媒を用いながら IRA478RF CI で中和精製を行った。イオン交換樹脂の前処理も水-アセトニトリル混合溶媒でおこなった。その結果、**26** を 35 mg, 収率 29% で得られた。収率が低かった原因の 1 つは、化合物が樹脂に吸着された後、溶出されなかったためだと考えられる。吸着させた樹脂から水-アセトニトリル混合溶媒で溶出したときに、樹脂が反応溶液と同様の黄色に染まっていたことから、生成物を樹脂から溶出しきれなかったと考えられる。

これら①及び②の結果を踏まえ、工業合成では塩酸加水分解後に樹脂による中和精製が行われている。当初の課題であった **26** の工業合成に適した精製方法の確立に成功した。

4.2. AkaLumine アナログ 26 の溶解性

ラボスケールで AkaLumine アナログ 26 を 4 ロット合成したところ、Table 4-7 のように、PBS に対する溶解度にはばらつきがあった。

Table 4-7. 各ロットの溶解度まとめ

Entry	λ_{\max}/nm ($\epsilon/10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	c_{\max}^b /mM
25	379 (1.6)	120
26	379 (1.2)	79
27	379 (1.6)	69
28	380 (1.9)	860

^aUV 吸収の極大波長。括弧内はモル吸光係数

^b溶解度 c_{\max} は 25 °C のとき、PBS (pH 7.4) 緩衝液中での飽和濃度。

Entry 25–28 の PBS に対する溶解度は、それぞれ 120, 79, 69, 860 mM であった。それぞれ合成及び精製方法は同じであるにもかかわらず、ロット間で溶解度に大きな差があった。

一方、黒金化成株式会社が合成した試作品 Entry 29, 30 の溶解度はそれぞれ 26, 10 mM であった(Table 4-8)。

Table 4-8. 工業合成ロットの溶解度まとめ

Entry	λ_{\max}/nm ($\epsilon/10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^a	c_{\max}^b /mM
29	379 (2.1)	26
30	381 (2.2)	10
31	377 (1.6)	1100

^aUV 吸収の極大波長。括弧内はモル吸光係数

^b溶解度 c_{\max} は 25 °C のとき、PBS (pH 7.4) 緩衝液中での飽和濃度。

Entry 29, 30 はこれまでの Entry 25–28 に比べると、溶解度が大きく低下していた。Entry 29, 30 は NMR, MS, 生物発光活性には Entry 25–28 と同じにもかかわらず、溶解度にのみ大きな差が生じた。

この原因は、Entry 25–28 が **26** の Na 塩であり、Entry 29, 30 が複塩ではない **26** であると仮定した。以下、**26** の Na 塩を **57** と定義した(Figure 4-7)。

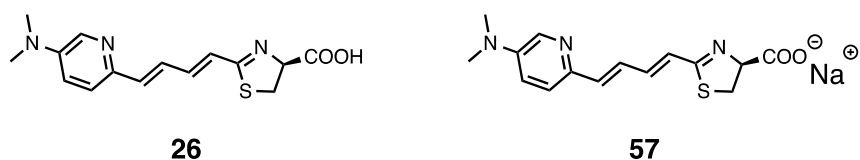


Figure 4-7. **26** と **57** の化学構造

工業合成ロットとして Na 塩を合成する必要があるため、黒金化成株式会社に **57** の合成していただいた。詳細な合成方法は企業秘密なため公開できない。合成された **57** の PBS に対する溶解度を測定したところ、1100 mM であった(Table 4-8 内 Entry 31)。

これまでの工業合成ロットである Entry 29, 30 よりも大幅に溶解度が改善された。**26** を Na で造塩した **57** が高い溶解性を有することがわかった。また、この結果を踏まえると、Entry 25–27 で合成したものは、**26** と **57** の混合物であることが示唆される。

4.3. NMR による構造決定

AkaLumine アナログ **26** の構造決定を行った結果を記す。今回は、¹H 及び ¹³C, DEPT, COSY, HMQC, HMBC による測定方法を用いて、構造決定を行った。測定溶媒は DMSO-*d*₆ で行い、¹H-NMR で得られた各ピークをアサインした(Figure 4-8)。

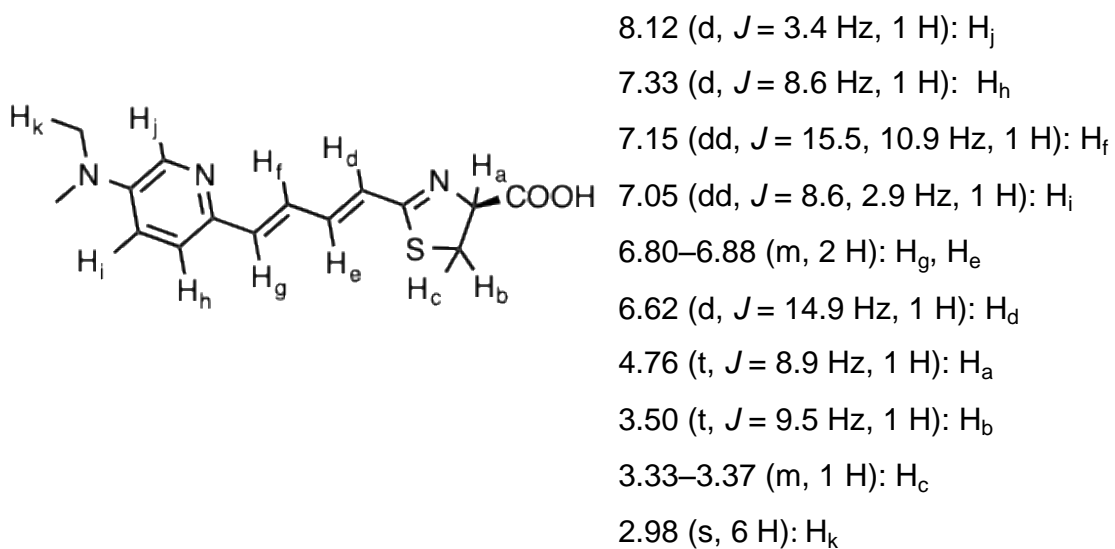


Figure 4-8. $^1\text{H-NMR}$ スペクトルと構造の帰属

4.4. 工業ロットにおける不純物ピークの評価

NMR の結果において、工業合成された **26** の Lot. No.0018 は帰属できないブロードのピークが確認された。このピークは研究室で合成されたロットでは確認されていないものであり、DMSO- d_6 中、 $\delta 2.88$ ppm (br, 1 H) に確認され、D $_2$ O 中では確認されなかった(Figure 4-9)。Figure 4-9 は該当付近のピークのみ記した。

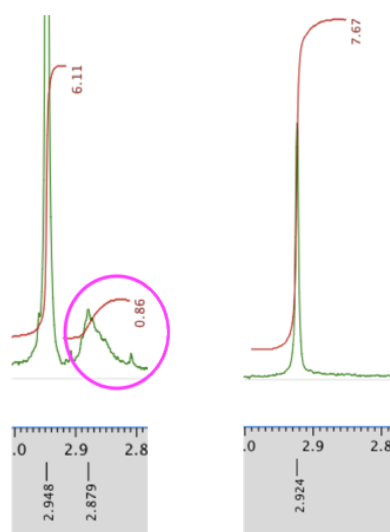


Figure 4-9. DMSO- d_6 (左) では帰属できないピーク($\delta 2.88$ ppm, br, 1 H)、及び D $_2$ O (右) 中のピーク

本項では、このピークを帰属するために、NMR を用いた種々の検討を行った。以下、この帰属できないピークを”ターゲットの H” と定義し議論を展開する。

4.4.1. ターゲットの H は交換可能なものかを検討

ターゲットの H は、D₂O 中で観測されないことから活性プロトンのような交換可能な H であることを想定し、種々のプロトン性と非プロトン性の重溶媒で NMR スペクトルを測定した(Figure 4-10)。

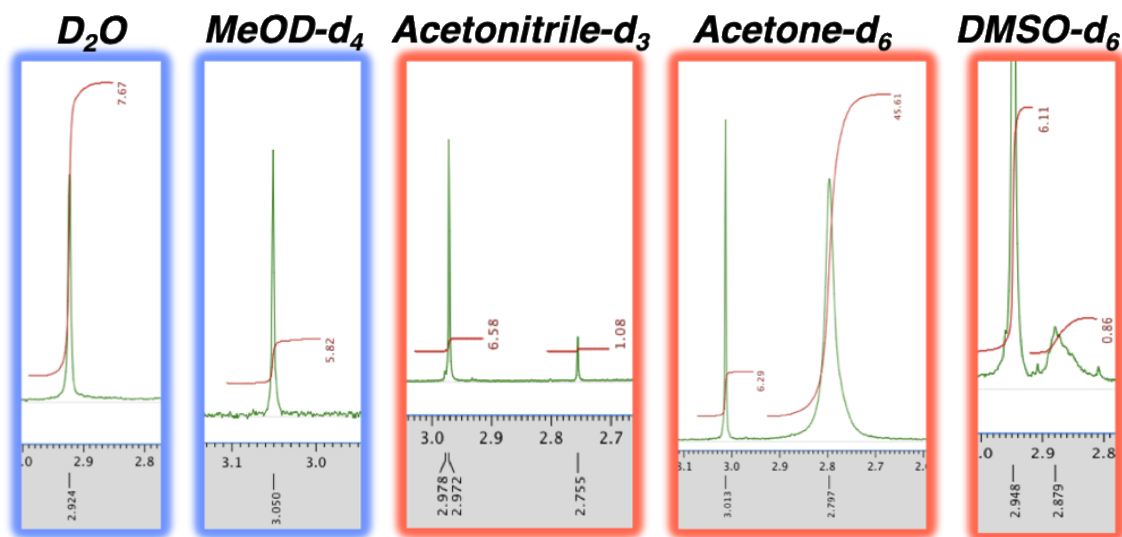


Figure 4-10. 各重溶媒中でのターゲットピークの様子

左から、D₂O, MeOD-*d*₄, Acetonitrile-*d*₃, Acetone-*d*₆, DMSO-*d*₆ の結果。青枠がプロトン性溶媒、赤枠が非プロトン性溶媒。

ターゲットの H はプロトン性溶媒では観測されず、非プロトン性溶媒で観測された。Acetonitrile-*d*₃ での δ 2.76 ppm のピークは DMSO-*d*₆ 中でターゲットの H に比べ、シャープなものであり、これがターゲットの H と同一かは不明である。Acetone-*d*₆ での δ 2.80 ppm (br) は H₂O とのピークと重なっている可能性がある。これらの非プロトン性溶媒で観測されたピークは、DMSO-*d*₆ 中で観測されたようなブロードのピークとは波形が異なるため、同一ピークと結論付けることは難しく、この結果からは、ターゲットの H は交換可能なプロトンとは考えられない。

そこで、DMSO- d_6 中に少量の D_2O を加えることでターゲットの **H** が消失するか検証した。

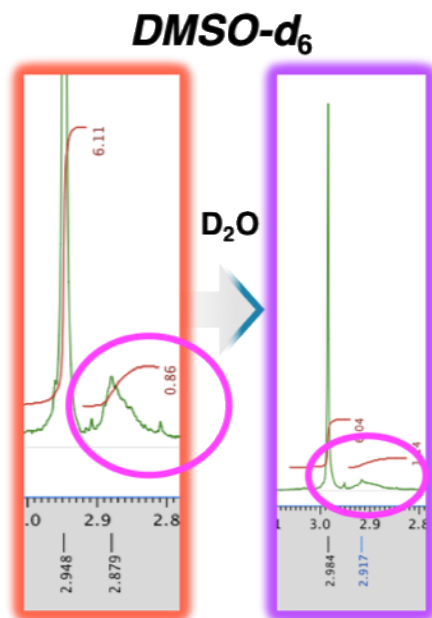


Figure 4-11. DMSO- d_6 中に D_2O を加えたときのターゲットの **H** の変化

Figure 4-11 の通り、ターゲットの **H** は D_2O 添加の場合でも完全に消失しなかった。

これらの結果から、ターゲットの **H** は交換不可能なプロトンであることが示唆され、活性プロトンではない可能性が高いとわかった。

4.4.2. ターゲットの **H** は **26** の多量体のプロトンではないか

ターゲットの **H** は前項で活性プロトンではないことがわかった。そこで、このターゲットの **H** は、**26** の多量体のプロトンである可能性を検討した。DMSO 中で、例えば、**26** が二量体のようなもの(Figure 4-12) を形成しており、対になる **26** が観測されていると想定した。

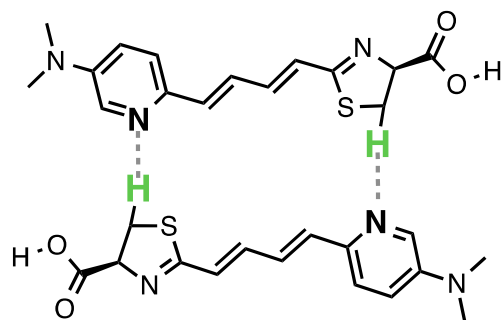


Figure 4-12. DMSO- d_6 中における **26** の状態。例えば想定される構造状態

そこで、差 NOE 測定を用いて、ターゲットの **H** の近傍の様子を観察した。

ターゲットの **H** ($\delta 2.86$ ppm) にパルスを照射し、空間的に近い **H** を探索した。ターゲットの **H** と呼応したプロトンは 4 種類だった。呼応したそれぞれのピークは Figure 4-13 内にて青で記した。

δ 2.86 ppm (ターゲットピーク)



2.93 (NMe₂)

3.53 (チアゾリン環)

6.95 (オレフィン)

7.96 (不明ピーク)

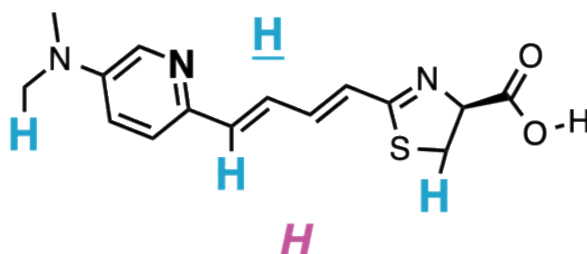


Figure 4-13. ターゲットピークに呼応した **26** のプロトン

便宜上、ターゲットの **H** をピンクで記し、それに呼応したプロトンを青で記した。

4 つの **H** のうち 3 つは **26** の構造内の **H** とわかったが、 $\delta 7.96$ ppm のプロトンは **26** の構造とは関係ない帰属できないピークであった。

これらの結果から、ターゲットの **H** は Figure 4-12 のように、**26** が多量体を形成しており、その一部である可能性も示唆される。

4.4.3. ターゲットの H は 26 の C-H 直接結合の H か

ターゲットの H が 26 の C と H で直接結合しているものなのかを調べるため、DMSO- d_6 中での HMQC の測定を行った。

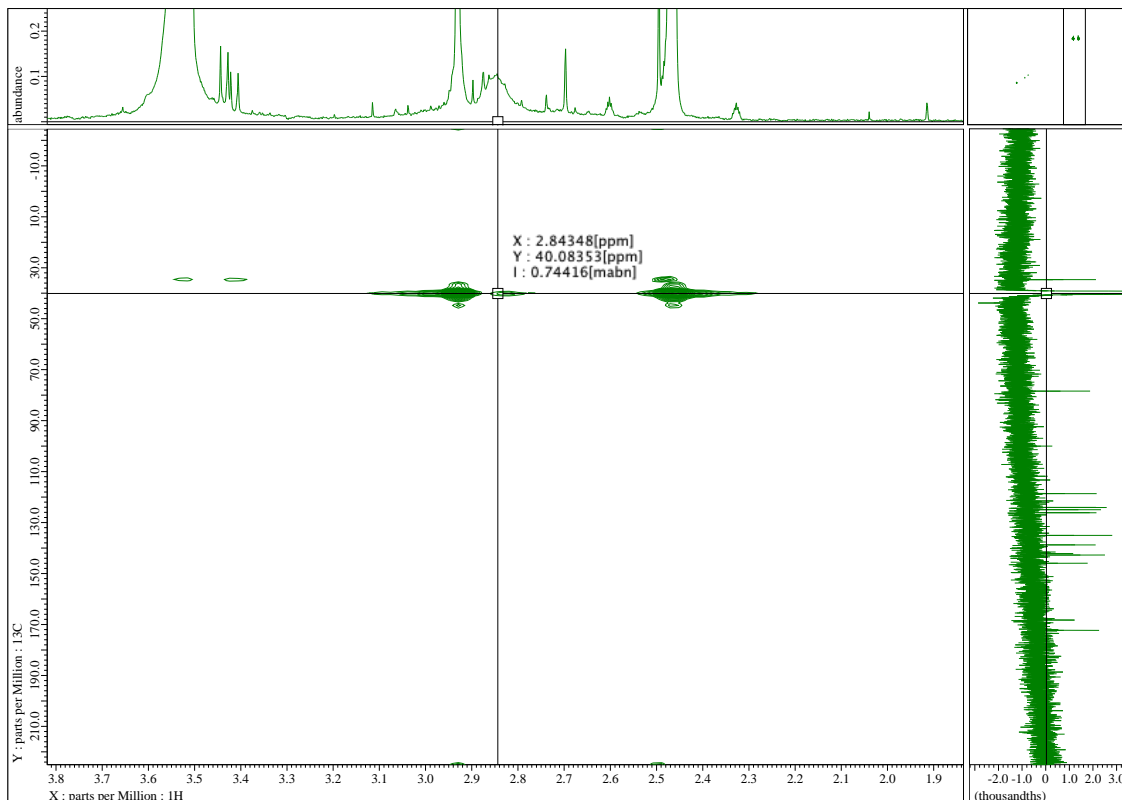


Figure 4-13. HMQC の該当箇所拡大図

ターゲットの H とのクロスピークは観測された。しかしながら、この部分のピークは溶媒の DMSO- d_6 と重なっており、肝心のクロスピークがそれだと断定はできない。また、そもそも溶媒ピーク内には 26 の NMe_2 基の C のピーク (δ 40.1) が含まれており、この C とターゲットの H が結合している可能性も否定はできない。HMQC のスペクトルでは C-H 結合の有無からターゲットの H の情報を得ることは非常に困難であった。また、測定溶媒を変えた場合、ターゲットの H がそもそも観測されづらい(前述 4.4.1) ため、C-H 直接結合を観測するのは困難であると判断した。

4.4.4. ターゲットの H の温度依存の検討

NMR でのピークがブロードで観測される理由の 1 つは、対象となる H の平衡反応が遅い

ことである。例えば、Figure 4-14 のような平衡反応が均衡していると、その **H** のピークはブロードに観測され、この平衡反応がどちらかに偏るとシャープなピークが観測される。

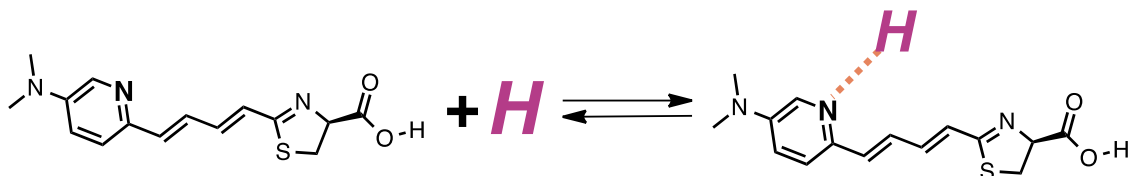


Figure 4-14. ターゲットの **H** の平衡反応

そこで、測定温度条件を変更することで、この平衡反応をどちらかに偏らせ、シャープな **H** のピークが観測されれば、このターゲットの **H** は **26** と平衡状態を形成しているといえる。今回の実験では、25 °C と 80 °C で実験し、Figure 4-15 には該当箇所を拡大したスペクトル図を記した。

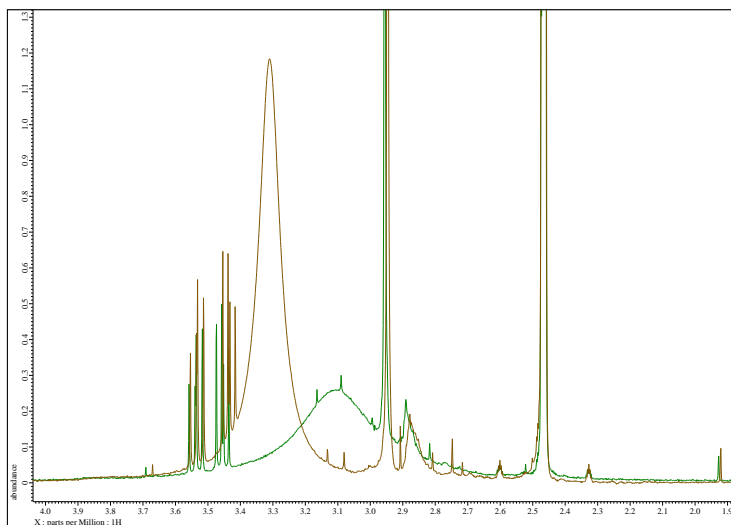


Figure 4-15. 25 °C と 80 °C のときの NMR スペクトルの重ね合わせ
茶色が 25 °C のとき、緑が 80 °C のときのスペクトル

25 °C と 80 °C でピークが大きくシフトしているものは H_2O であり、その他のピークはさほどシフトしていなかった。ターゲットの **H** のピークは形に変化はなく、化学シフトも変化していなかった。

この結果から、ターゲットの **H** は **26** との平衡状態の可能性は非常に低いといえる。

4.5. 工業ロット間による不純物ピークの評価

黒金化成株式会社により工業合成された **26** (Lot. No.0018) の NMR データにおいて、化学構造として帰属できないブロードのピークが観測された。工業合成では、Figure 4-7 のように、**26** と **26** の Na 塩である **57** の二種類を工業合成している。本章では、このピークが他のロットにも確認されるか、あるいは Lot. No.0018 のみで見られるピークなのか、ロット間の比較、検証を行った。

今回比較したロットは Table 4-9 にまとめた。

Table 4-9. 今回比較するロットのまとめ

基質		18				57	
Lot	No. 0018	KH2-74	KH3-15	KH3-78	KH3-75	HRun10	HRun09
色	赤茶	赤	赤	黄	黄	黄	赤茶

4.5.1. ロット間の比較

今回測定する **26** と **57** の NMR スペクトルは、それぞれ D_2O 及び $DMSO-d_6$ で行い、前述(4.4.) のターゲットの **H** が観測されるか確認した。

まず、 D_2O 中での NMR ピークを Figure 4-16 に記す。



Figure 4-16. ターゲットの H 付近の NMR チャート in D₂O

上段の 3 つ (0018, KH2-74, KH3-15) が **26**、下段の 4 つが **57** (KH3-78, KH3-75, HRun10, HRun09)。ターゲットの H と思われる箇所はピンク及び黄色で囲み、混合物と思われる箇所は青で囲んだ。

ターゲットの H は、はっきりとは観測されないが、**26** では僅かに観測され (Figure 4-16 内のピンク)、**57** では観測されないと判断した。**26** の KH3-15 の δ 2.94 付近 (Figure 4-16 内の黄色) はターゲットの H のピークだと思われる。**26** と **57** のいくつかのロットでは、 δ 2.8 付近に小さなピークが確認できる (Figure 4-16 内の青)。このピークは、ターゲットの H に比べると極めてシャープな波形であるため、これとは別の混合物だと想定される。

また、NMe₂ (s, 6 H) のピークの根元部分を比較すると、**26** の場合のみ、根元の波形が僅

かに盛り上がっているように見える(Figure 4-17)。

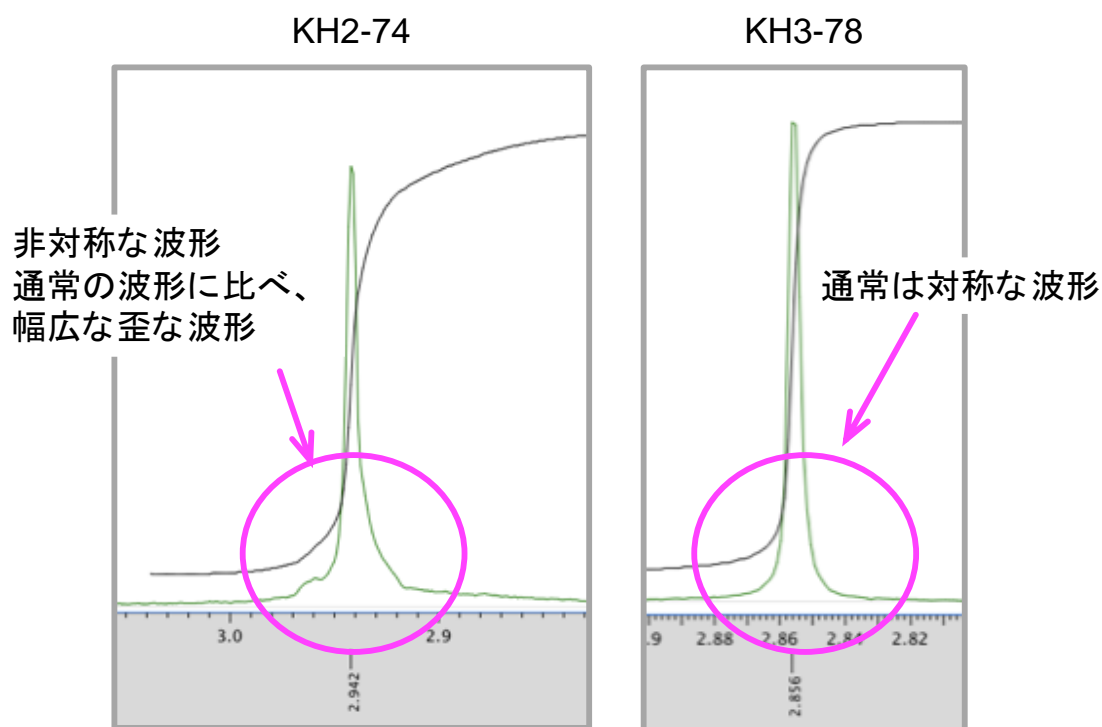


Figure 4-17. NMe₂ のピークの根元付近の拡大図

KH2-74 は 26, KH3-78 は 57。

通常の NMR の結果において、不純物を含まない単一のピークの根元付近は、KH3-78 のように対称性の波形をしている(Figure 4-17)。これに対して、KH2-74 の根元付近に着目すると、非対称な波形になっていることが確認できる。このピーク波形からだけでは断定はできないが、両者が少し異なるものであることを示唆している。

次に、DMSO-d₆ 中での NMR ピークを Figure 4-18 に記す。

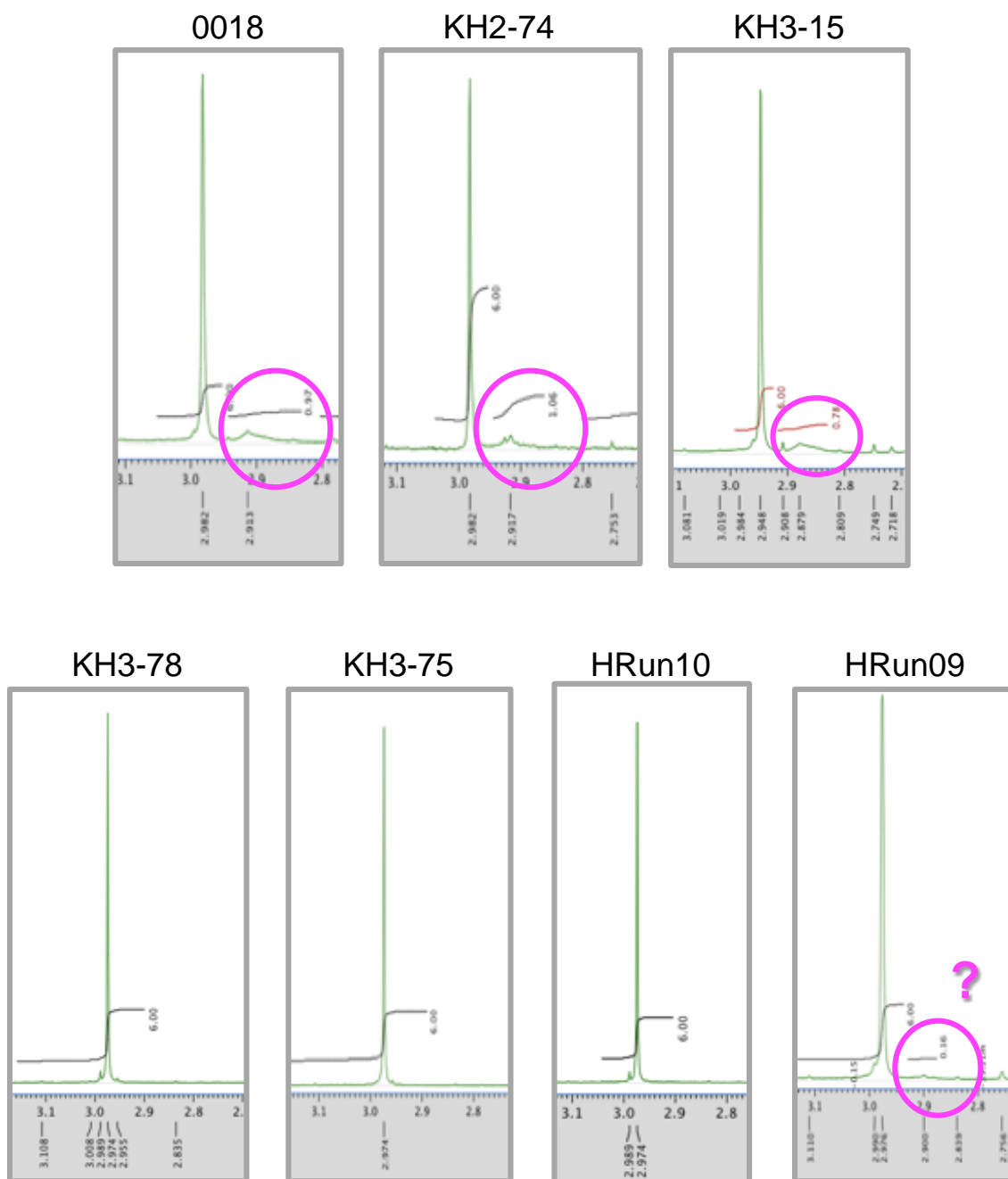


Figure 4-18. ターゲットの H 付近の NMR チャート in DMSO- d_6

上段の 3 つ (0018, KH2-74, KH3-15) が **26**、下段の 4 つが **57** (KH3-78, KH3-75, HRun10, HRun09)。ターゲットの H と思われる箇所はピンクで囲んだ。

DMSO- d_6 の場合、**26** ではターゲットの H (1H, br) が確認できた。**57** では、 $\delta 2.9$ 付近にピークは確認できなかったが、HRun09 では、ターゲットの H のようなピークがわずかに観測された。

ここまですを Table 4-10 にまとめる。

Table 4-10. 各ロットの NMR 結果のまとめ

基質	18				57		
Lot	No. 0018	KH2-74	KH3-15	KH3-78	KH3-75	HRun10	HRun09
色	赤茶	赤	赤	黄	黄	黄	赤茶
NMR (D ₂ O)	△	△	△	×	×	×	×
NMR (DMSO-d ₆)	○	○	○	△	△	△	△

NMR で測定した結果では、ターゲットの **H** が観測されたものは○、観測されなかったものは×、曖昧なものは△で表記した。

ターゲットの **H** がはっきりと確認されるのは、**26** のみであり、**57** では観測されないといえる。ただし、ターゲットの **H** の関連物質が、H₂O には溶解せず、DMSO にのみ溶解するという性質も考慮しておかねばならない。

4.5.2. No. 0018 と No. 0018-Na の比較

次に、No.0018 とその Na 体の NMR を測定した。No.0018-Na は一度合成してきた No.0018 から Na 塩を合成したものである。

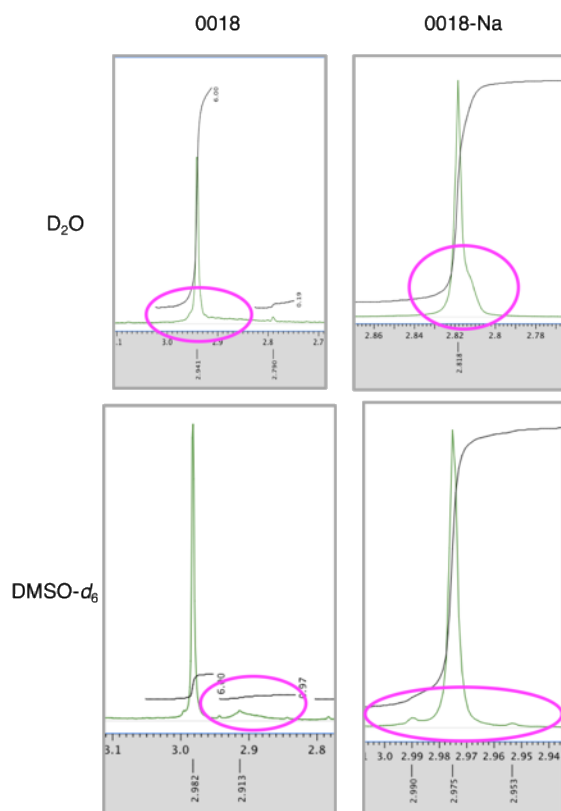


Figure 4-19. ターゲットピーク付近を拡大した NMR チャート

Figure 4-19 で示すように、No. 0018-Na において、DMSO- d_6 中では極僅かにターゲットの **H** と思われるピークが観測される。一方、D₂O 中では、NMe₂ の根元付近に Figure 4-17 で示したような波形が見られる。このいびつな波形は、Figure 4-16 に示したように、他の **57** (KH3-78, KH3-75, HRun10, HRun09) では観測されていない。

4.5.3. No. 0018 を中圧自動分取カラムで精製

No. 0018 を中圧自動分取カラムで精製し、**26** とターゲットの **H** の混合物を分離できないか検証した。使用したカラムと条件は、Smart Flash EPCLC AI-580S, ULTRAPACK COLUMNS C₁₈, H₂O/ MeOH = 9/1 to 1/9 である。

以下のようなクロマトグラム (Figure 4-20) が得られ、フラクション No. 2-5 を Lot. 5-143-1, No. 6-8 を Lot. 5-143-2 として、それぞれ減圧濃縮し、NMR を測定した。

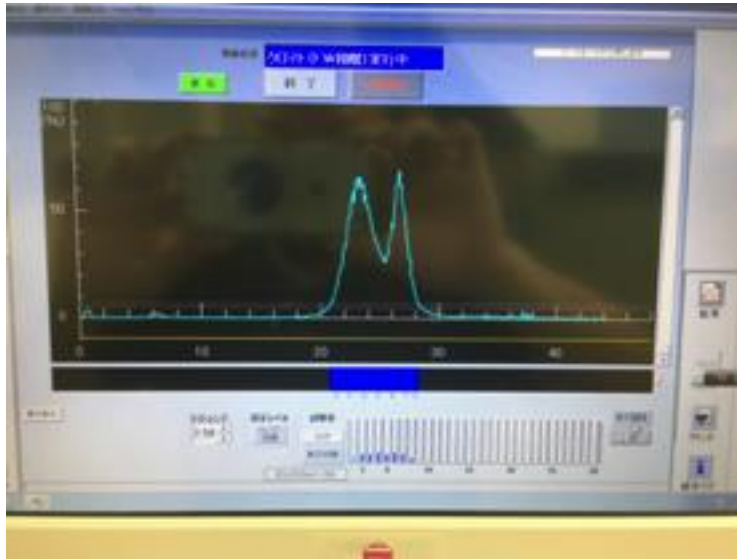


Figure 4-20. 中圧精製時のクロマトグラム

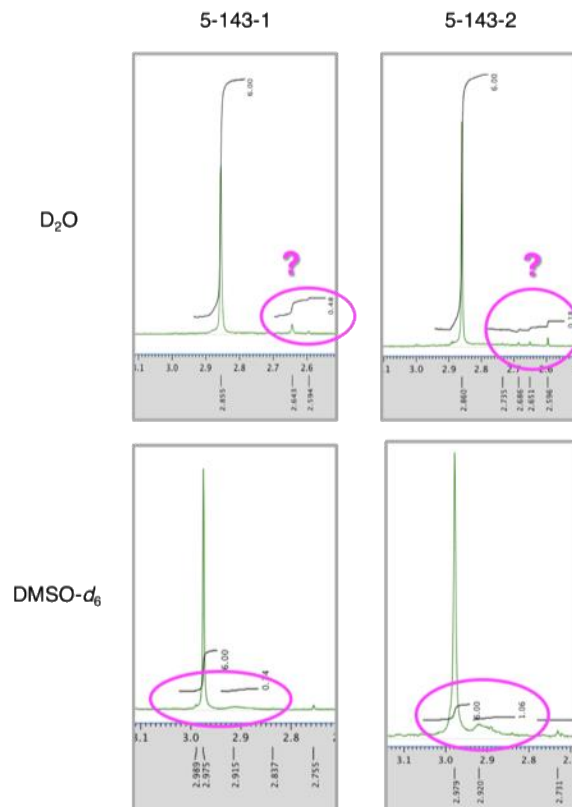


Figure 4-21. Lot. 5-143-1, 5-143-2 のターゲットの H 付近の NMR チャート

D₂O では両ロットともに、ターゲットの H は検出されなかったが、細かいピークは観測さ

れた(Figure 4-21)。一方、DMSO- d_6 中では、両ロットともにターゲットの **H** が検出された。Lot. 5-143-1 では、ターゲットの **H** の積分値は小さくなったものの、依然としてこのピークは観測された。また、Lot. 5-143-2 については、精製前と変わらない結果となった。この結果から、ターゲットの **H** 関連の混合物は、逆相カラムを用いた精製でも取り除けないものであるとわかった。

4.5.4. 26 の前駆体チアゾリジンメチルエステル体 47 の評価

NMR で観測されたターゲットの **H** は 26 の前駆体であるチアゾリジンメチルエステル体 47 (Lot. HRun14) でも検出されるのか検証した。NMR 測定において、チアゾリジンメチルエステル体 47 は D_2O には溶解しないため、同じプロトン性溶媒である MeOD- d_4 を用いた。また DMSO- d_6 でも測定を行い、2 種の溶媒中での NMR の測定をおこなった。

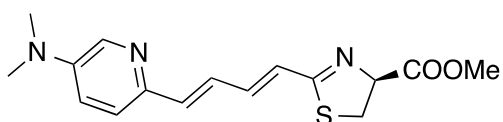


Figure 4-22. チアゾリジンメチルエステル体 47 の構造

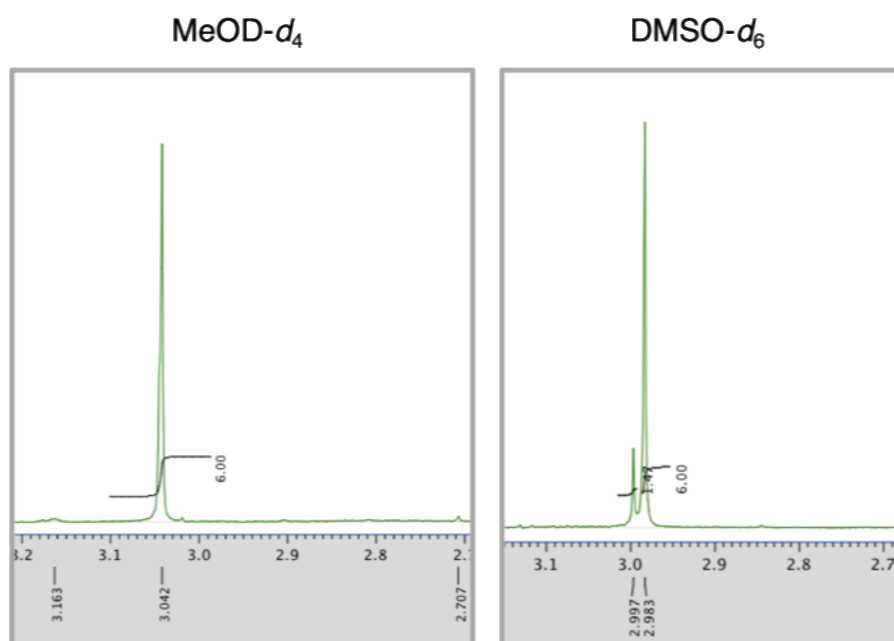


Figure 4-23. 47 の NMR データのターゲットピーク付近の拡大図

この化合物にも 47 とは関係ないピークが観測されていたが、化学シフトが異なる点、ピー

クがブロードではない点を考慮すると、本化合物にはターゲットの **H** に関連する化合物は含まれていないと考えられる。

この結果から、ターゲットの **H** は **47** までを合成する過程では含まれておらず、**47** から **26** もしくは **57** を合成する過程で生成され、含有されたと考えられる。

4.6. 工業合成ロットの発光測定結果

工業合成ロットの発光活性を調べ、品質の検証を行った。ホタルルシフェリン(**1**) と AkaLumine (**7**)、AkaLumine アナログ **26** (No. 0018), AkaLumine アナログ Na 体 **57** (KH3-75, KH3-78) を用いて、酵素 *Ppy* との発光活性評価を行った。Figure 4-24 に示すように、工業合成ロットである No. 0018, KH3-75, KH3-78 の3種ともに生物発光波長 λ_{\max} は 675 nm であり、ラボスケールで合成した **26** と同じ結果であった。

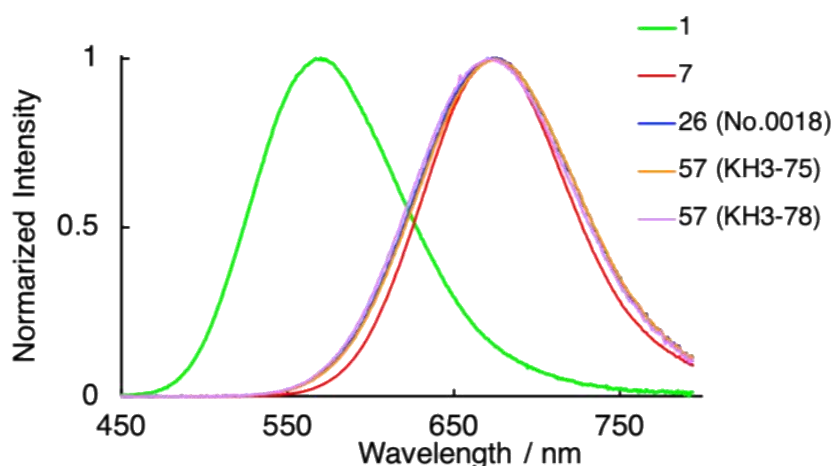


Figure 4-24. 工業合成ロットの生物発光波長

また、工業合成ロットである **57** (HRun09) を用いて、皮下腫瘍モデルマウスを用いて、*in vivo* での活性評価を行った。第 3 章で用いたマウスルイス肺がん細胞(LLC/Luc) を皮下に移植したモデルマウスで実験を行った(Figure 4-25)。

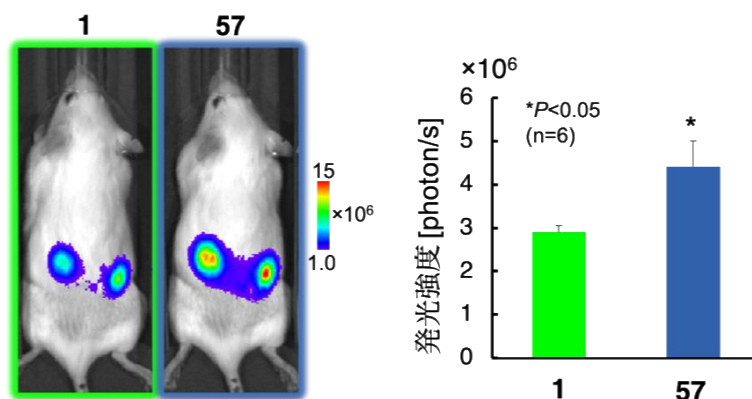


Figure 4-25. 工業合成ロット(HRun 09) の発光イメージング結果

1 と **57** はそれぞれ PBS に 33 mM で溶解し 100 μ L を腹腔内投与し、15 分後に撮影した。n = 6, *P < 0.05.

57 は本実験系において **1** よりも 1.5 倍ほど高い発光強度を示し、既述の Figure 3-11 とほぼ同じような結果を得られた。これらの結果から、工業合成品の品質は生物発光活性及び動物実験において問題なく利用できることがわかった。

4.7. まとめ

AkaLumine アナログ(**26**) の実用化に向けて、工業合成への展開及びその品質の検討を行った。ラボスケールで合成していた AkaLumine アナログ (**26**) を工業合成用に展開するために、収率向上を目指した合成方法及び精製方法の検討を行った。これらの方法を用いた結果、工業合成に成功した。その一方、工業合成ロットは NMR 測定において帰属できないピークが確認されたため、工業合成ロットの品質保証のための測定をおこなった。溶媒検討、差 NOE 測定、測定温度の検討など、種々の測定法を用いたが、帰属できないピークの由来を決定することはできなかった。しかしながら、工業ロットの生物発光活性及びモデル動物によるイメージングでは、問題なく発光していた。よって、工業ロットには帰属できない混合物があるものの、本来の目的である動物実験のイメージング結果には大きな影響を与えていないことから、この工業ロットの品質には問題ないと結論づけた。

5 結語

本研究では、光イメージング技術への実用化を念頭に置いたホタル生物発光基質の開発を行った。既存のホタルルシフェリン(1) や AkaLumine (7), TokeOni (8) よりも優良な材料を開発するために、近赤外発光且つ中性条件での高溶解性を達成する新規発光基質を合成した。

第2章では、ホタルルシフェリン(1) の基本骨格をアデニンに置換し、アデニンアナログ 17 を合成した。17 は高い溶解度であったが、ルシフェラーゼとは発光しなかった。これは、17 の官能基の一部が、ルシフェラーゼの活性中心への誘導を阻害していることが強く示唆された。

第3章では、AkaLumine (7) や TokeOni (8) の芳香環をピリジンもしくはピラジジンに置換した AkaLumine アナログ 25-27 を合成した。これらのうち、26 は近赤外発光且つ高溶解性を有しており、その発光を動物実験で比較すると、1 や 7, 8 よりも高感度にイメージングできた。

第4章では、AkaLumine アナログ 26 は光イメージングにとって有用な新規材料であると考え、実用化に向けて、合成方法の検討を行った。工業合成を行うにあたり、高収率及び安価な合成方法を検討した。この合成方法を基に生産された工業合成ロット品の品質検査を行い、発光特性及び動物実験において、その品質には問題なく使用できた。

このように、課題であった難水溶性を改善した新規生物発光イメージング基質の開発に取り組み、イメージング材料として有用なデータを得てきた。これを実用化させるべく、工業合成へ展開し、その結果、AkaLumine アナログ 26 は米国 Merck 社より上市するに至った。

6 実験の部

6.1. 合成の部-基本操作

6.1.1. 機器分析、測定装置

➤ 融点測定 (m.p.)

Yanaco 社製 MP-500P を用いて測定した。測定値は未補正である。

➤ 赤外吸収スペクトル (IR)

Thermo Fisher Science 社製 Nicolet 6700 spectrometer フーリエ変換赤外分光光度計を用い、全反射法 (ATR) により測定を行なった。測定値は波数 (cm^{-1}) で記載した。

➤ ^1H 核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)

日本電子社製 ECA 500 (500 MHz) を用いて測定し、“ $^1\text{H-NMR}$ (測定周波数、測定溶媒) ケミカルシフト値 (水素の数、多重度、スピン結合定数)”と記載した。ケミカルシフト値 (δ) はテトラメチルシラン (TMS) もしくはトリメチルシリルプロパン酸ナトリウム (TMSP- d_4 Na salt) ($\delta=0$) を内部基準とし、ppm で表記した。多重度は、s (単一線)、d (二重線)、t (三重線)、q (四重線)、m (多重線あるいは複雑に重なったシグナル) で表示し、幅広いシグナルについては br と付記した。スピン結合定数 (J) は Hz で記載した。

➤ ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル ($^{13}\text{C-NMR}$)

日本電子社製 ECA 500 (125 MHz) を用いて測定し、“ $^{13}\text{C-NMR}$ (測定周波数、測定溶媒) ケミカルシフト値”と記載した。ケミカルシフト値 (δ) はテトラメチルシラン (TMS) もしくはトリメチルシリルプロパン酸ナトリウム (TMSP- d_4 Na salt) ($\delta=0$) を内部基準とし、ppm で表記した。

➤ 質量スペクトル (MS)

エレクトロスプレーイオン法 (ESI)

日本電子社製 JMS-T100LC 型 TOF 質量分析計 AccuTOF を用い、エレクトロスプレ

レイイオン化法 (ESI) により測定した。なお、装置の設定は脱溶媒ガス 250 °C、オリフィス 1 電圧 80 °C、ニードル電圧 2000 V、リングレンズ電圧 10 V、オリフィス 1 電圧 85 V、オリフィス 2 電圧 5 V とした。サンプル送液はインフュージョン法で行ない、流速 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。“MS (ESI) m/z 質量数 (M + 付加イオン)” と記載した。

6.1.2. クロマトグラフィー

➤ 分析用薄層クロマトグラフィー (TLC)

E. Merck 社製の TLC プレート、シリカゲル 60F254 (Art. 5715) 厚さ 0.25 mm を用いた。TLC 上の化合物の検出は UV 照射 (254 nm あるいは 365 nm) および発色剤に浸した後に加熱して発色させることによって行なった。

➤ 分取用薄層クロマトグラフィー (PTLC)

ANALTECH 社製の UNIPLATE™、厚さ 0.5 mm もしくは厚さ 2.0 mm を使い、[使用したガラスプレートの縦の長さ×横の長さ×厚さ×枚数；展開溶媒]” と記載した。

➤ 高速液体クロマトグラフィー(LC-MS)

Thermo Fisher Scientific 社製 LCQ Fleet LC-MS を用いて測定した。

➤ シリカゲルカラムクロマトグラフィー

関東化学株式会社製のシリカゲル 60N (球状、中性、63–210 μm) を用いて行ない、“展開溶媒” と記載した。

6.1.3. 基本操作

➤ 反応後の抽出溶液の乾燥は無水硫酸ナトリウムを加えることで行なった。

➤ 反応後の中和を樹脂で行なったものについては、オルガノ株式会社製陽イオン交換樹脂アンバーライト IR120B NA、あるいは陰イオン交換樹脂アンバーライト IRAOH AG を用いた。

- 溶液の減圧濃縮はアスピレーターの減圧下 (20-30 mmHg)、ロータリーエバポレーターを用いて行なった。痕跡量の溶媒の除去は、液体窒素浴で冷却したトラップを装着させた真空ポンプ (約 1 mmHg) を用いて行なった。
- 溶媒の混合比はすべて体積比で表した。

6.1.4. 溶媒

- 蒸留水

アドバンテック東洋株式会社製 **GS-200** 型蒸留水製造装置を用いて蒸留、及びイオン交換処理したものを使用した。

- トルエン、クロロホルム、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル
関東化学株式会社製及び和光純薬工業株式会社製の有機合成用超脱水溶媒、あるいは特級溶媒をモレキュラーシーブス(4A) で乾燥させて使用した。

- NMR 測定用溶媒

以下に示すものをそのまま用いた。

CDCl_3 - d_1 : 関東化学社製 99.8 %D、0.03% TMS 含有、銀箔入

CD_3OD - d_4 : 関東化学社製 99.8 %D、0.03% TMS 含有

DMSO - d_6 : 関東化学社製 99.9 %D、0.03% TMS 含有

D_2O : SIGMA-ALDRICH 社製 99.9 %D、0.05 wt.% TMSP- d_4 Na salt 含有

6.1.5. 計算化学

- 酵素ドッキングシミュレーション (2.6. Auto Dock Vina による酵素との結合予測結果)
AutoDock VINA: MGL Tools: Pymol: Windows: on Mac OSX Yosemite 10.10.5 Bootcamp
を用いて、以下のような条件で行った。酵素: PDB ID 4G36 [*P. Pyralis* ルシフェラ

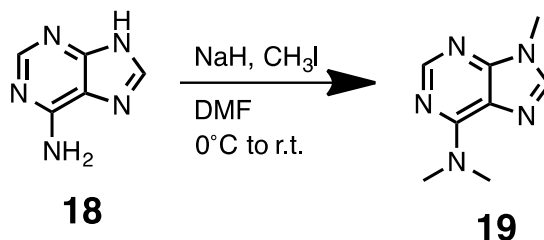
ーゼと **24** (DLISA 体) の複合体結晶] の B サブユニット。中心座標 : $x = -54$, $y = 29.5$, $z = -50$; 範囲 (Å) : $x = 10$, $y = 14$, $z = 28$ 。

➤ DFT 及び TD-DFT 計算 (3.4. 計算化学による評価)

DFT 及び TD-DFT 計算には Gaussian 09 プログラム (Rev. D.01)⁴⁰ を用いた。DFT は B3LYP と 6-31+G(d) を考慮している^{41, 42, 43}。最安定構造の表示は GaussView, Version 5⁴⁴ を用いた。

6.2. 合成の部-合成方法

6.2.1. メチルアデニン **19**: *N,N*,9-trimethyl-9*H*-purin-6-amine



アデニン (**18**) (141 mg, 1.04 mmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (20 mL) に溶解し、ヨウ化メチル (260 μ L, 4.17 mmol) と水素化ナトリウム (60% in oil, 190 mg, 4.7 mmol) を加え、氷浴内で 24 時間攪拌した。反応溶液にメタノール (2 mL) を加え反応を終了した。その後、混合溶液に水と酢酸エチル (3 x 30 mL) を加えて抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、綿栓濾過の後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 5 / 1) を用いて展開分取し、メチルアデニン **19** (99.6 mg, 0.563 mmol, 54%) を得た。

mp 62–65 °C;

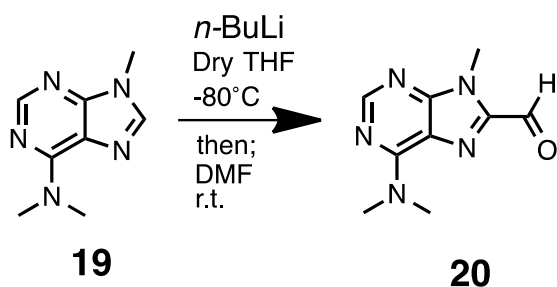
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2923, 2359, 1588, 643;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 8.22 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.49 (br, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 156.2, 153.0, 151.7, 141.6, 120.9, 39.1, 30.2;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5$, 178.10927; found, 178.10626.

6.2.2. ホルミルアデニン **20**: 6-(dimethylamino)-9-methyl-9*H*-purine-8-carbaldehyde



メチルアデニン **19** (55.5 mg, 0.314 mmol) を脱水 THF (8 mL) に溶解し、1.6 M ノルマルブチルリチウムヘキサン溶液 (300 μ L, 0.48 mmol) をアルゴン雰囲気下、-80 $^{\circ}$ C において約 1 分間で滴下し、30 分撹拌した。この反応溶液に DMF (70 μ L) を加えた後、室温まで昇温しさらに 30 分撹拌した。水を加えて過剰な試薬を分解した後、酢酸エチル (3 x 30 mL) で抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、綿栓濾過の後、減圧濃縮した。得られた残渣を薄層クロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 3) で精製し、ホルミルアデニン **20** (38.8 mg, 0.189 mmol, 60%) を得た。

mp 160 $^{\circ}$ C;

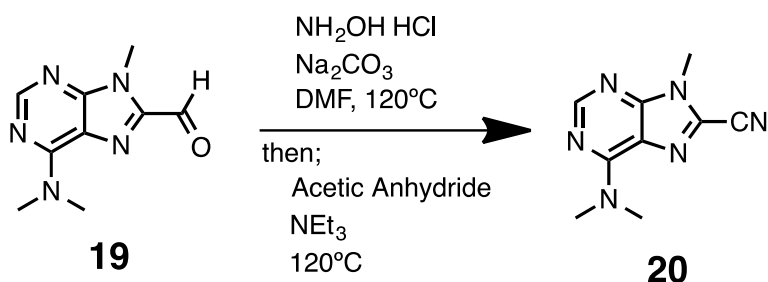
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2922, 2359, 1682, 827;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 9.94 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.36–3.85 (br, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 183.8, 156.0, 155.3, 152.4, 142.7, 121.6, 39.7, 38.0, 30.4;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}$, 206.10418; found, 206.10174.

6.2.3. ニトリルアデニン **21**: 6-(dimethylamino)-9-methyl-9*H*-purine-8-carbonitrile



ホルミルアデニン **20** (36.3 mg, 0.177 mmol) を DMF (15 mL) に溶解し、塩化ヒドロキシルアンモニウム (40.0 mg, 0.620 mmol) と炭酸ナトリウム (59.0 mg, 0.557 mmol) を加え 120°C で 1 時間攪拌した。その後、無水酢酸 (275 μL , 2.91 mmol) とトリエチルアミン (150 μL , 1.08 mmol) を加え、 120°C で 24 時間攪拌した。原料が消失したことを確認した後、酢酸エチル (3 x 30mL) で抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、綿栓濾過の後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、ニトリルアデニン **21** (25.7 mg, 0.127 mmol, 72%) を得た。

mp 128°C ;

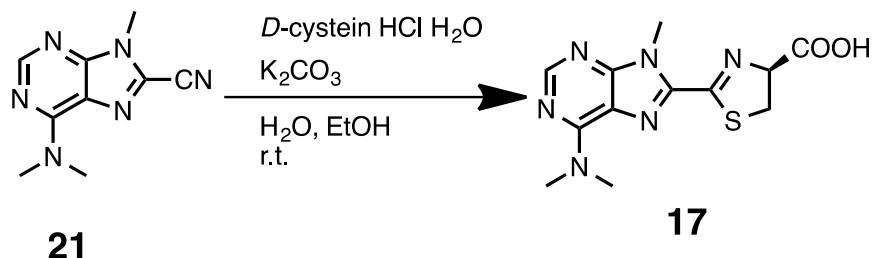
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2930, 2359, 2232, 1590;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.41 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.76–3.33 (br, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 155.2, 155.1, 150.7, 122.4, 120.8, 111.0, 39.7, 37.9, 30.0;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_6$, 203.10452; found, 203.10352.

6.2.4. アデニンアナログ **17**: (S)-2-(6-(dimethylamino)-9-methyl-9H-purin-8-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid



ニトリルアデニン **21** (34.9 mg, 0.173 mmol) をエタノール (6 mL) と水 (2 mL) の混合溶媒に溶解し、*D*-Cystein · HCl · H₂O (60.0 mg, 0.34 mmol) と炭酸カリウム (47.3 mg, 0.34 mmol) を加え、室温で 6 時間攪拌した。この反応溶液を 1 M HCl aq. で pH7 に調整し、減圧濃縮した。得られた残渣を水 (3 x 15 mL) で洗浄し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣を逆相カラムクロマトグラフィー (Supelclean™ LC-18 SPE 1g) に吸着させ、水 (3 x 2 mL) で塩を流し、メタノール (5 x 2 mL) で溶出した。得られたメタノール溶液を減圧濃縮し、アデニンアナログ **17** (63.3 mg, 0.207 mmol, 123%) を定量的に得た。

mp 147 °C;

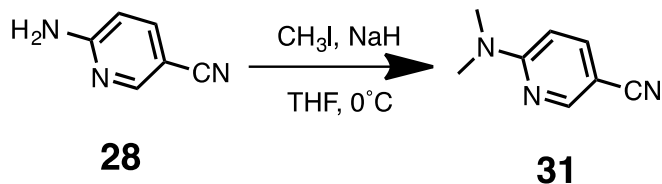
IR (neat, ν , cm⁻¹): 3217, 1586;

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ 8.07 (s, 1H), 5.37 (dd, $J = 9.7, 8.6$ Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.73 (dd, $J = 11.5, 9.7$ Hz, 1H), 3.55 (dd, $J = 11.2, 8.3$ Hz, 1H), 3.39 (s, 6H);

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O) δ 180.8, 164.7, 157.0, 155.6, 153.7, 143.7, 121.9, 84.9, 41.7, 37.9, 34.1;

HR-ESI-MS: m/z : [M+H]⁺ calculated for C₁₂H₁₅N₆O₂S, 307.09772; found, 307.09634.

6.2.5. ジメチルアミノ体 **31**: 6-(dimethylamino)nicotinonitrile



2-アミノ-5-シアノピリジン(**28**) (1.19 g, 10.0 mmol)、ヨードメタン(2.83 mL, 45.5 mmol)をテトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (100 mL) に溶解させた。この溶液を氷浴内で、水素化ナトリウム (60% in oil, 1.4 g, 36 mmol) を加え、混合物を 30 分間攪拌した。反応混合物を室温に昇温し、12 時間攪拌した。この反応溶液にメタノール (10 mL) を加え反応を終了した。続いて水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 200 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、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 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) にて精製すると、2-ジメチルアミノ-5-シアノピリジン(**31**) (1120 mg, 7.62 mmol, 76%) が得られた。

mp 64 °C;

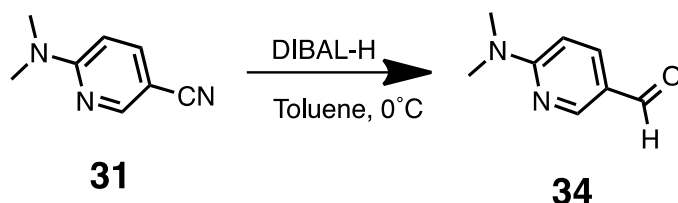
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2213, 1324, 809;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.41 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.16 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 159.7, 152.7, 139.3, 119.1, 105.1, 95.3, 38.0;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_3$, 148.0875; found, 148.0873.

6.2.6. アルデヒド **34**: 6-(dimethylamino)nicotinaldehyde



5-シアノ-2-ジメチルアミノピリジン(**31**) (1120 mg, 7.62 mmol) を脱水トルエン (20 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下とした。この溶液を氷浴し、1.0 M 水素化ジイソブチルアルミニウム-トルエン溶液 (12 mL) を約 1 分間で滴下し、そのまま 30 分間攪拌した。続いてこの混合溶液を室温に昇温させ、1 時間攪拌した。その後この反応混合物に十分量のアセトン、水を加え過剰の還元剤を分解した。さらにこの混合溶液に飽和酒石酸カリウムナトリウム水溶液 (50 mL)、酢酸エチル (10 mL) を加え、一晩攪拌した。その後、酢酸エチル (3 x 100 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られ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 = 1 / 1 → 0 / 1)にて精製すると、5-アルデヒド-2-ジメチルアミノピリジン(**34**) (700 mg, 4.67 mmol, 61%) が得られた。

mp 54 °C;

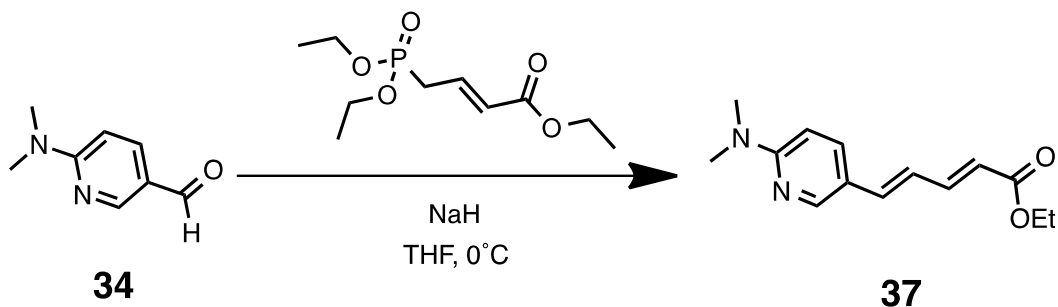
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2709, 1679, 1386, 815;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 9.77 (s, 1H), 8.56 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.21 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 189.2, 161.4, 154.6, 136.0, 121.7, 105.7, 38.2;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$, 151.0871; found, 151.0873.

6.2.7. エチルエステル **37**: ethyl (2*E*,4*E*)-5-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)penta-2,4-dienoate



5-アルデヒド-2-ジメチルアミノピリジン(**34**) (600 mg, 4.00 mmol)、4-ホスホノクロトン酸トリエチル (1.5 mL, 12 mmol) を、テトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (30 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下とした。この溶液を氷浴内で、水素化ナトリウム(60% in oil, 340 mg, 14 mmol) を加え、30 分間攪拌した。反応溶液にメタノール (10 mL) を加え反応を終了し、この溶液を室温に昇温させた。続いて、酢酸エチル (3 x 50 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られ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) にて精製すると、エチルエステル体 **37** (433 mg, 1.76 mmol, 44%) が得られた。

mp 95 °C;

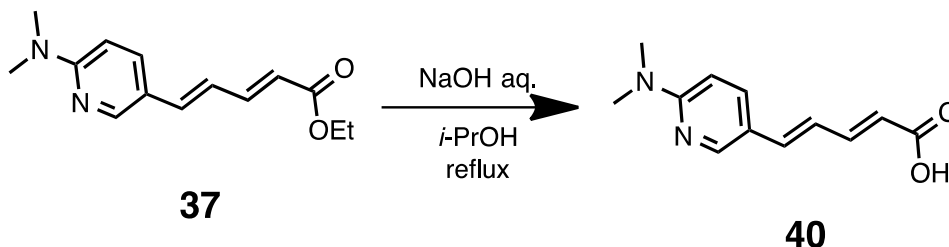
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2903, 1704, 1386, 988, 805;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.19 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 7.62 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1 H), 7.43 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 6.79 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.66 (dd, $J = 15.5, 10.9$ Hz, 1 H), 6.51 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 5.89 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.13 (s, 6 H), 1.31 (t, $J = 6.9$ Hz, 3 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 167.3, 145.5, 144.8, 142.2, 139.7, 134.9, 125.3, 123.7, 120.6, 117.9, 60.2, 39.9, 14.3;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$, 247.1447; found, 247.1447.

6.2.8. カルボン酸 **40**: (2*E*,4*E*)-5-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)penta-2,4-dienoic acid



エチルエステル体 **37** (340 mg, 1.38 mmol) をイソプロパノール (10 mL) に溶解し、5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (560 μ L) を加え、90 $^{\circ}$ C でその溶液をその溶液を 5 時間加熱還流した。反応混合物を冷やした後、反応混合物に 5 M HCl (560 μ L) を加え中和し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 5 / 1) にて精製すると、カルボキシル体 **40** (240 mg, 1.10 mmol, 80%) が得られた。

mp 215–218 $^{\circ}$ C;

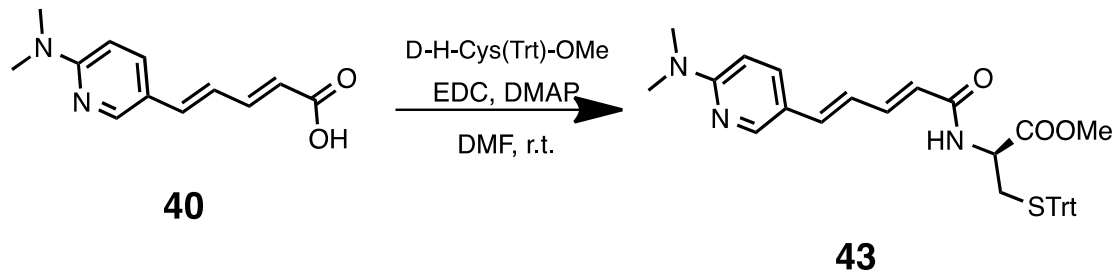
IR (neat, ν , cm^{-1}): 1674, 995, 802;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 8.11 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 7.80 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1 H), 7.42 (dd, $J = 15.2, 10.0$ Hz, 1 H), 6.80–6.89 (m, 2 H), 6.70 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 5.90 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 3.12 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 171.2, 160.1, 149.1, 147.1, 138.8, 135.9, 124.0, 121.7, 120.4, 107.8, 38.5;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$, 219.1134; found, 219.1122.

6.2.9. アミド **43**: methyl *N*-((2*E*,4*E*)-5-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)penta-2,4-dienoyl)-*S*-trityl-*D*-cysteinate



カルボキシル体 **40** (126 mg, 0.578 mmol) と *S*-トリチル-*D*-システインメチルエステル (261 mg, 0.692 mmol) に *N,N*-ジメチルホルムアミド (モレキュラーシーブス **4A** で簡易脱水) (50 mL) に溶解した。この溶液に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (278 mg, 1.45 mmol)、*N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン(DMAP) (141 mg, 1.15 mmol) を加え、この反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に水 (50 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 50 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られ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 = 1 / 1) にて精製すると、アミド体 **43** (264 mg, 0.457 mmol, 79%) が得られた。mp 85 °C;

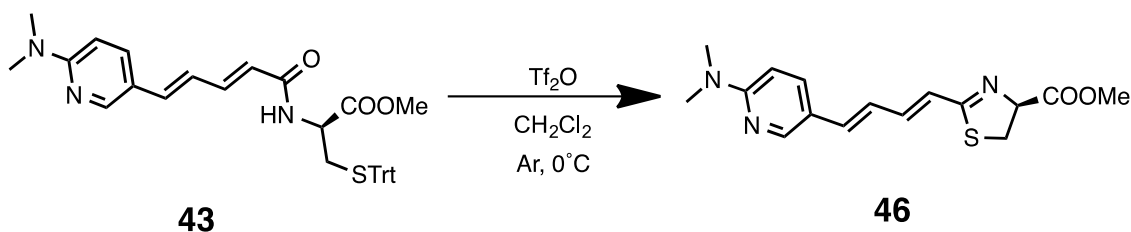
IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1651, 1586, 741, 697;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.20 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 7.62 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1 H), 7.20–7.39 (m, 17 H), 6.77 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.65 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 6.51 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 5.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 5.84 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.74 (dd, $J = 12.6, 5.2$ Hz, 1 H), 3.72 (s, 3 H), 3.13 (s, 6 H), 2.70 (t, $J = 4.6$ Hz, 2 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.1, 165.9, 158.8, 148.4, 144.3, 142.3, 137.0, 134.2, 129.4, 127.9, 126.79, 122.4, 121.0, 120.1, 105.8, 66.8, 52.5, 51.3, 38.0, 33.9;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, 578.2477; found, 578.2491.

6.2.10. チアゾリンメチルエステル体 **46**: methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate



アミド体 **43** (191 mg, 0.331 mmol) をアルゴン雰囲気下にし、脱水ジクロロメタン (10 mL) を加えた。この溶液を氷浴内で、トリフルオロ酢酸無水物 (170 μL , 1.00 mmol) を約 1 分間で滴下し、10 分間攪拌した。原料が消失したのを確認した後、陰イオン交換樹脂 IRA400 OHAG を用いて中和した。樹脂を洗浄して濾別し、得られた洗液を減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 2 / 1) で精製すると、チアゾリンメチルエステル体 **46** (51.6 mg, 0.163 mmol, 48%) が得られた。

mp 134 $^\circ\text{C}$;

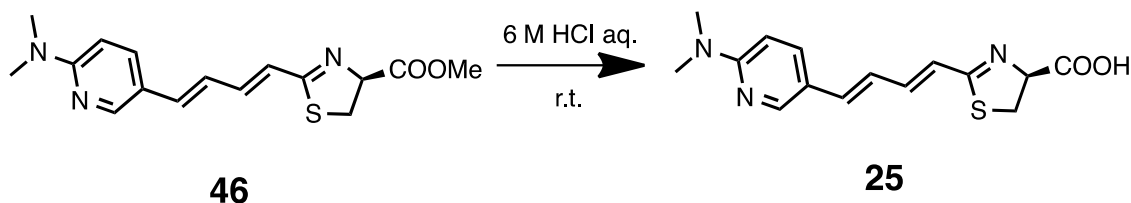
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2914, 1746, 1588, 1201, 994, 799;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.17 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H), 7.64 (dd, $J = 9.2, 2.3$ Hz, 1 H), 6.93 (dd, $J = 15.5, 9.7$ Hz, 1 H), 6.68–6.75 (m, 2 H), 6.50–6.56 (m, 2 H), 5.17 (t, $J = 8.9$ Hz, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 3.59 (dd, $J = 11.5, 9.2$ Hz, 1 H), 3.53 (dd, $J = 10.9, 9.2$ Hz, 1 H), 3.13 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.4, 170.2, 159.0, 148.8, 143.3, 136.3, 134.1, 123.3, 123.1, 120.2, 105.9, 77.9, 52.8, 38.1, 34.6;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, 318.1276; found, 318.1271.

6.2.11. AkaLumine アナログ **25**: (S)-2-((1E,3E)-4-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid



チアゾリンメチルエステル体 **46** (147 mg, 0.463 mmol) を 6 M HCl (30 mL) を加え、その溶液を 18 時間室温で攪拌した。反応混合物に重曹を加え中和した後、減圧濃縮した。得られた残渣を自動分取中圧カラムクロマトグラフィー (Smart Flash EPCLC AI-580S, ULTRAPACK COLUMNS C₁₈, H₂O / methanol = 9 / 1 to 1 / 9) で精製し、AkaLumine アナログ **25** (101 mg, 0.332 mmol, 72%) を得た。

mp 258–261 °C;

IR (neat, ν , cm⁻¹): 3360, 1589, 983;

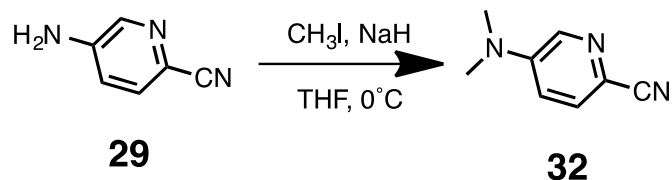
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.17 (d, J = 2.3 Hz, 1 H), 7.78 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1 H), 6.74–6.92 (m, 3 H), 6.67 (d, J = 9.2 Hz, 1 H), 6.52 (d, J = 14.9 Hz, 1 H), 4.71 (t, J = 8.9 Hz, 1 H), 3.49 (dd, J = 10.3, 9.2 Hz, 1 H), 3.30–3.41 (m, 1 H), 3.06 (s, 6 H);

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.0, 163.1, 158.6, 148.1, 140.7, 134.8, 134.2, 124.5, 123.5, 120.2, 106.0, 83.2, 37.7, 35.4;

HR-ESI-MS: m/z : [M+H]⁺ calculated for C₁₅H₁₈N₃O₂S, 304.1120; found, 304.1100;

90%e.e. from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 8.60 min, D-isomer: 20.2 min, Formic acid buffer at pH 2.0 / methanol = 10 / 90, detection of UV: 360 nm).

6.2.12. ジメチルアミノ体 **32**: 5-(dimethylamino)picolinonitrile



5-アミノ-2-シアノピリジン(**29**) (1.31 g, 11.0 mmol)、ヨードメタン (2.0 mL, 32.1 mmol)をテトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (100 mL) に溶解させた。この溶液を 0°C にし、水素化ナトリウム(60% in oil, 1.3 g, 32.7 mmol) を加え、混合物を 50 時間攪拌した。反応溶液にメタノール (10 mL) を加え反応を終了した。続いて水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 200 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、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 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 2) にて精製すると、2-シアノ-5-ジメチルアミノピリジン(**32**) (1.30 g, 8.86 mmol, 80%) が得られた。

mp 65°C ;

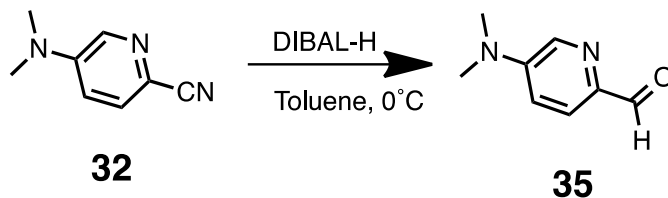
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2215, 1368, 822;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.11 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.88 (dd, $J = 8.9, 3.2$ Hz, 1H), 3.09 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 147.1, 135.4, 129.0, 119.0, 118.9, 116.4, 39.7;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_3$, 148.0875; found, 148.0880.

6.2.13. アルデヒド **35**: 5-(dimethylamino)picolinaldehyde



2-シアノ-5-ジメチルアミノピリジン(**32**) (723 mg, 4.92 mmol) を脱水テトラヒドロフラン (20 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下とした。この溶液を氷浴内で、1.0 M 水素化ジイソブチルアルミニウム-トルエン溶液 (7.5 mL) を約 1 分間で滴下し、そのまま 15 分間攪拌した。続いてこの混合溶液を室温に昇温させ、1 時間攪拌した。その後この反応混合物に十分量のアセトン、水を加え過剰の還元剤を分解させた。さらにこの混合溶液に飽和酒石酸カリウムナトリウム水溶液 (50 mL)、酢酸エチル (10 mL) を加え、一晩攪拌した。その後、酢酸エチル (2 x 50 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 10 / 1) にて精製すると、2-アルデヒド-5-ジメチルアミノピリジン(**35**) (369 mg, 2.46 mmol, 50%) が得られた。

mp 69 °C;

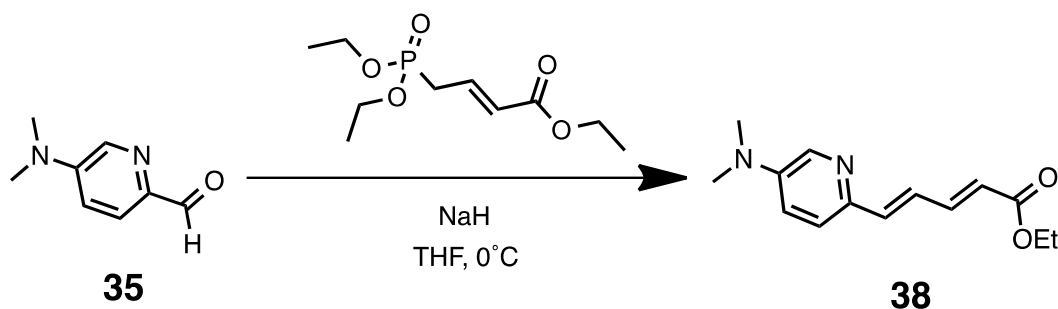
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2787, 1656, 1364, 825;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 9.86 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.10 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 191.3, 147.9, 141.2, 133.6, 123.1, 116.2, 39.4;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$, 151.0871; found, 151.0848.

6.2.14. エチルエステル **38**: ethyl (2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyridin-2-yl)penta-2,4-dienoate



2-アルデヒド-5-ジメチルアミノピリジン(**35**) (31.4 mg, 0.21 mmol)、4-ホスホクロトン酸トリエチル (80 μ L, 0.36 mmol) を、テトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス **4A** で簡易脱水) (10 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下とした。この溶液に氷浴内で、水素化ナトリウム (60% in oil, 21.6 mg, 0.54 mmol) を加え、そのまま 30 分間攪拌した。この反応混合物に水 (10 mL) を加えて反応を終了し、この溶液を室温に昇温させた。続いて、酢酸エチル (3 x 30 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) にて精製すると、エチルエステル体 **38** (38.7 mg, 0.157 mmol, 74%) が得られた。

mp 105 °C;

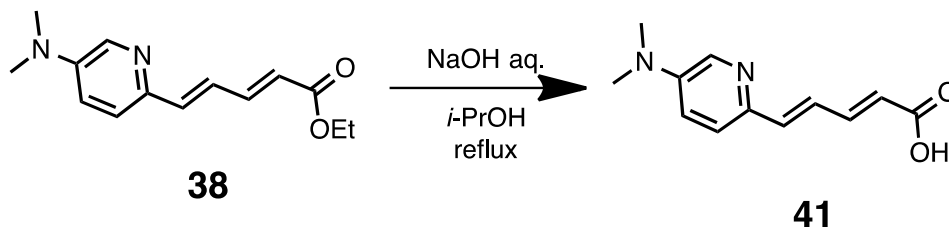
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2898, 1699, 1366, 1004, 815;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.14 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H), 7.47 (dd, $J = 15.5, 11.5$ Hz, 1 H), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.12 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 6.86–6.92 (m, 2 H), 5.99 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.03 (s, 6 H), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 167.3, 145.5, 144.8, 142.2, 139.7, 134.9, 125.3, 123.7, 120.6, 117.9, 60.2, 39.9, 14.3;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$, 247.1447; found, 247.1454.

6.2.15. カルボン酸 **41**: (2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyridin-2-yl)penta-2,4-dienoic acid



エチルエステル体 **38** (54.0 mg, 0.22 mmol) をイソプロパノール (10 mL) に溶解し、5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (130 μ L) を加え、90 $^{\circ}$ C でその溶液をその溶液を 26 時間加熱還流した。反応混合物に 4 M 塩酸 を加え中和した後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 5 / 1) にて精製すると、カルボキシル体 **41** (50.0 mg, 0.23 mmol, 115%) を定量的に得られた。

mp 230 $^{\circ}$ C;

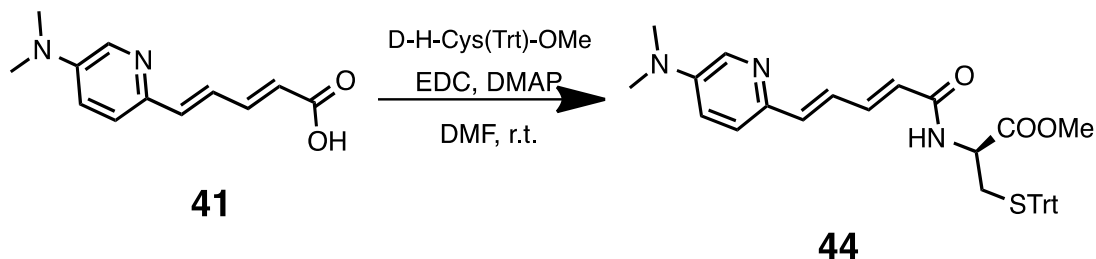
IR (neat, ν , cm^{-1}): 3428, 1709, 986, 807;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.12 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H), 7.50 (br, 1 H), 7.35 (dd, $J = 14.9$, 11.5 Hz, 1 H), 7.17–7.22 (m, 2 H), 6.99 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 6.00 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 3.01 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 147.4, 143.4, 139.2, 134.6, 127.5, 124.4, 120.4, 40.0;

HR-ESI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$, 219.1134; found, 219.1128.

6.2.16. アミド **44**: methyl *N*-((2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyridin-2-yl)penta-2,4-dienoyl)-*S*-trityl-*D*-cysteinate



カルボキシル体 **41** (105 mg, 0.482 mmol) と *s*-トリチル-*D*-システインメチルエステル (387 mg, 1.06 mmol) に *N,N*-ジメチルホルムアミド (モレキュラーシーブス **4A** で簡易脱水) (50 mL) に溶解した。この溶液に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (301 mg, 1.57 mmol)、*N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン(DMAP) (295 mg, 2.41 mmol) を加え、この反応混合物を室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に水 (50 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 50 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 10 / 1) にて精製したのち、さらに、分取薄層クロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 10 / 1) にて精製すると、アミド体 **44** (264 mg, 0.46 mmol, 79%) が得られた。

mp 86 °C;

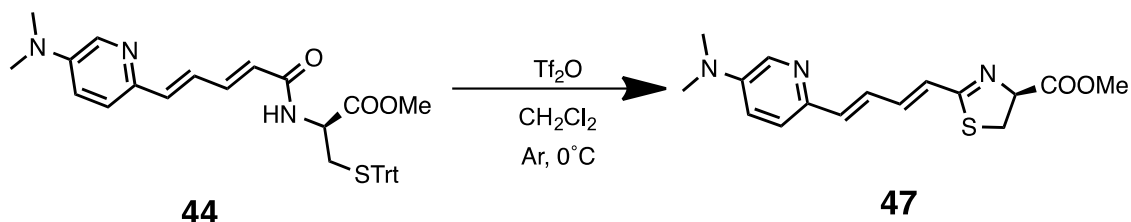
IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1651, 1575, 741, 697;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.15 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H), 7.21–7.39 (m, 16 H), 7.13 (dd, $J = 14.9, 11.5$ Hz, 1 H), 6.92 (dd, $J = 8.9, 3.2$ Hz, 1 H), 6.85 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.90–5.94 (m, 2 H), 4.74 (dd, $J = 12.9, 5.4$ Hz, 1 H), 3.73 (s, 3 H), 3.03 (s, 6 H), 2.74 (q, $J = 6.1$ Hz, 1 H), 2.68 (dd, $J = 12.3, 4.9$ Hz, 1 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.0, 165.6, 145.4, 144.3, 142.5, 142.1, 139.0, 134.9, 129.5, 128.0, 126.9, 125.4, 123.7, 122.5, 118.0, 67.0, 52.7, 51.1, 40.0, 34.0;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, 578.2477; found, 578.2478.

6.2.17. チアゾリンメチルエステル体 **47**: methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(5-(dimethylamino)pyridin-2-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate



アミド体 **44** (5.08 g, 8.81 mmol) をアルゴン雰囲気下にし、脱水ジクロロメタン (150 mL) を加えた。この溶液に氷浴内で、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (2.30 mL, 13.6 mmol) を約 20 分間滴下し、40 分間攪拌した。原料が消失したのを確認した後、陰イオン交換樹脂 IRA400 OH AG を用いて中和した。樹脂を洗浄して濾別し、得られた洗液を減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製すると、チアゾリンメチルエステル体 **47** (1.77 g, 5.57 mmol, 63%) が得られた。

mp 117 °C;

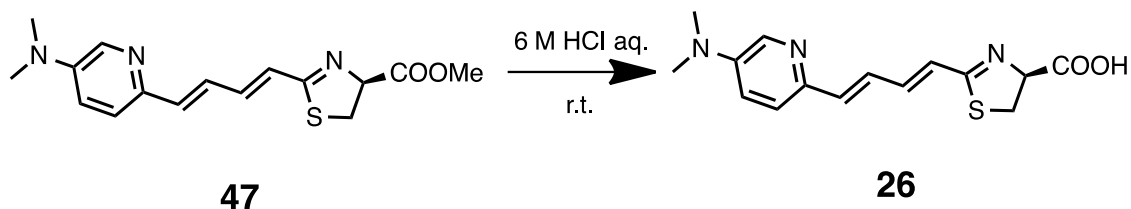
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2949, 1725, 1576, 1206, 987;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.14 (d, $J = 3.4$ Hz, 1 H), 7.22 (d, $J = 8.6$ Hz, 1 H), 7.15 (dd, $J = 14.9, 10.9$ Hz, 1 H), 6.90–6.99 (m, 2 H), 6.81 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.65 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.17 (t, $J = 9.2$ Hz, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 3.61 (t, $J = 10.0$ Hz, 1 H), 3.54 (t, $J = 10.0$ Hz, 1 H), 3.03 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.4, 170.1, 145.4, 142.8, 142.5, 138.0, 134.9, 126.2, 125.0, 123.6, 118.0, 77.9, 52.8, 40.0, 34.5;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$, 318.1276; found, 318.1271.

6.2.18. AkaLumine アナログ **26**: (S)-2-((1E,3E)-4-(5-(dimethylamino)pyridin-2-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid



チアゾリンメチルエステル体 **47** (85.9 mg, 0.271 mmol) を H₂O (1 mL) に溶解し、6 M 塩酸 (2 mL) を加え、その溶液を 27 時間室温で攪拌した。反応混合物に重曹を加え中和した後、減圧濃縮した。得られた残渣を自動分取中圧カラムクロマトグラフィー (Smart Flash EPCLC AI-580S, ULTRAPACK COLUMNS C₁₈, H₂O / methanol = 9 / 1 to 1 / 9) で精製し、AkaLumine アナログ **26** (35.9 mg, 0.118 mmol, 63%) が得られた。

mp 207 °C;

IR (neat, ν , cm⁻¹): 3207, 1575, 984;

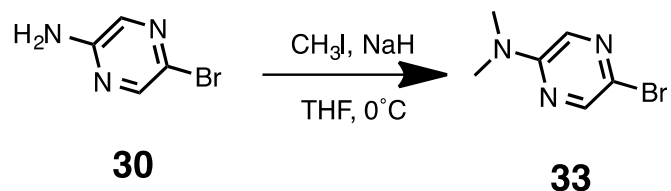
¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.12 (d, *J* = 3.4 Hz, 1 H), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H), 7.15 (dd, *J* = 15.5, 10.9 Hz, 1 H), 7.05 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 1 H), 6.80–6.88 (m, 2 H), 6.62 (d, *J* = 14.9 Hz, 1 H), 4.76 (t, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 3.50 (t, *J* = 9.5 Hz, 1 H), 3.33–3.37 (m, 1 H), 2.98 (s, 6 H);

¹³C-NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.7, 163.3, 145.3, 142.1, 140.2, 137.0, 134.7, 126.0, 125.9, 123.2, 118.1, 82.9, 39.2, 35.4;

HR-ESI-MS: *m/z*: [M+H]⁺ calculated for C₁₅H₁₈N₃O₂S, 304.1120; found, 304.1107;

90%e.e. from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 12.1 min, D-isomer: 15.5 min, Formic acid buffer at pH 2.0/methanol = 10/90, detection of UV: 400 nm).

6.2.19. ジメチルアミノ体 **33**: 5-bromo-*N,N*-dimethylpyrazin-2-amine



2-アミノ-5-ブロモ-ピラジン(**30**) (1.17 g, 6.72 mmol)、ヨードメタン(1.2 mL, 19.5 mmol)をテトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (100 mL) に溶解させた。この溶液に氷浴内で、水素化ナトリウム (60% in oil, 1.5 g, 37.5 mmol) を加え、混合物を 30 時間攪拌した。反応混合物にメタノール (10 mL) を加え反応を終了し、続いて水 (10 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 200 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、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 (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) にて精製すると、2-ジメチルアミノ-5-ブロモ-ピラジン(**33**) (1.10 g, 5.50 mmol, 80%) が得られた。

mp 69 °C;

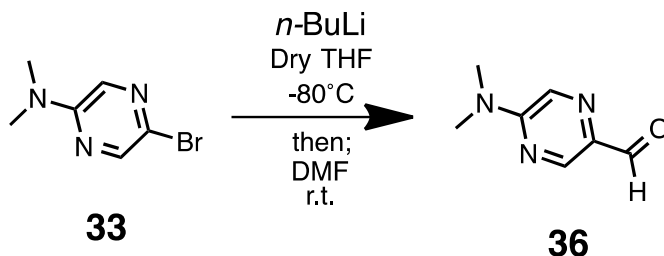
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2852, 1378, 998;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.11 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 3.10 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 153.9, 143.7, 129.1, 124.6, 37.8;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{Br}$, 201.9980; found, 201.9990.

6.2.20. アルデヒド **36**: 5-(dimethylamino)pyrazine-2-carbaldehyde



2-ジメチルアミノ-5-ブロモ-ピラジン(**33**) (1.37 g, 6.85 mmol) を脱水テトラヒドロフラン (50 mL) に溶解し、アルゴン雰囲気下とした。この溶液を、アセトンバスを用いて -80°C まで冷却し、1.57 M ノルマルブチルリチウム-ヘキサン溶液 (10.8 mL) を約 1 分間で滴下し、1 時間攪拌した。続いてこの混合溶液に脱水 N,N -ジメチルホルムアミド (2.0 mL, 26 mmol) を約 1 分間で加えた後、室温に昇温させ 1 時間攪拌した。その後この反応混合物に水を加え 15 分間攪拌し、酢酸エチル (2 x 200 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られ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 = 1 / 1) にて精製すると、5-アルデヒド-2-ジメチルアミノ-ピラジン (**36**) (975 mg, 6.46 mmol, 95%) が得られた。

mp 112°C ;

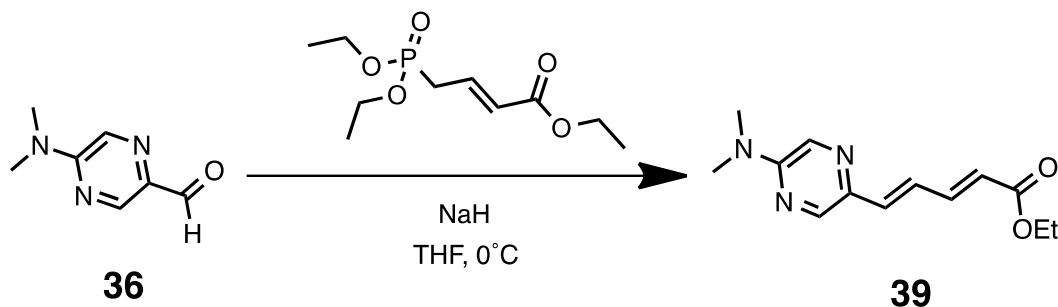
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2783, 1681, 1373, 1008;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) δ 9.91 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 3.26 (s, 6H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$) δ 190.7, 155.5, 144.3, 136.8, 129.4, 37.9;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}$, 152.0824; found, 152.0814.

6.2.21. エチルエステル **39**: ethyl (2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyrazin-2-yl)penta-2,4-dienoate



5-アルデヒド-2-ジメチルアミノピラジン(**36**) (44.5 mg, 0.295 mmol)、4-ホスホクロトン酸トリエチル (150 μ L, 0.58 mmol) を、テトラヒドロフラン (モレキュラーシーブス 4A で簡易脱水) (20 mL) に溶解した。この溶液に氷浴内で、水素化ナトリウム (60% in oil, 27.4 mg, 0.69 mmol) を加え、15 分間攪拌した。この反応混合物に EtOH (5 mL) を加えて反応を終了し、この溶液を室温に昇温させた。続いて、酢酸エチル (3 x 30 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 1 / 1) にて精製すると、エチルエステル体 **39** (47.6 mg, 0.193 mmol, 65%) が得られた。

mp 115–118 °C;

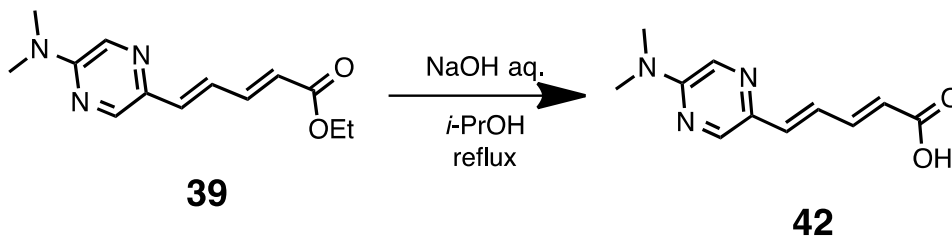
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2942, 1699, 1398, 1006, 876;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.05 (m, 2H), 7.46 (dd, $J = 15.2, 11.7$ Hz, 1 H), 7.14 (dd, $J = 14.9, 11.5$ Hz, 1 H), 6.84 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.99 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 3.17 (s, 6 H), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 167.3, 153.8, 144.5, 142.3, 136.2, 129.9, 125.6, 121.1, 120.6, 60.3, 37.8, 14.4;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 270.1219; found, 270.1213.

6.2.22. カルボン酸 **42**: (2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyrazin-2-yl)penta-2,4-dienoic acid



エチルエステル体 **39** (47.6 mg, 0.193 mmol) をイソプロパノール (10 mL) に溶解し、5 M 水酸化ナトリウム水溶液 (120 μ L) を加え、90 $^{\circ}$ C でその溶液を 45 分間加熱還流した。反応混合物に 4 M 塩酸 を加え中和した後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム / メタノール = 5 / 1) にて精製すると、カルボキシル体 **42** (36.8 mg, 0.168 mmol, 84%) が得られた。

mp 232 $^{\circ}$ C;

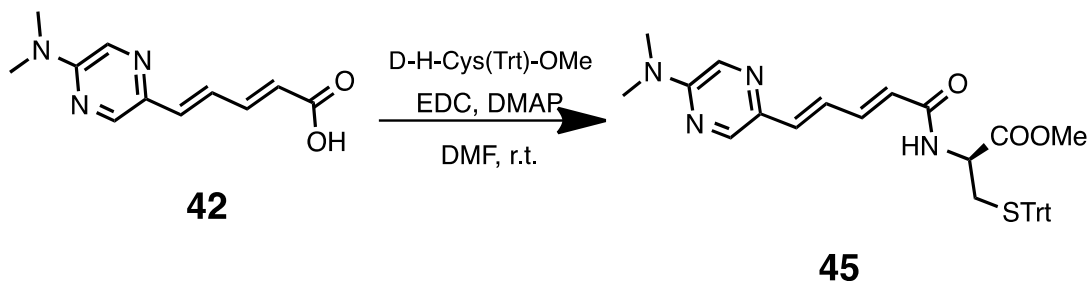
IR (neat, ν , cm^{-1}): 1674, 1261, 995;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 8.11 (s, 1 H), 8.07 (s, 1 H), 7.28 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 7.12 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1 H), 6.81 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 6.01 (t, $J = 15.2$ Hz, 1 H), 3.16 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$) δ 174.1, 155.2, 142.9, 138.7, 135.1, 131.0, 127.9, 38.0, 30.8;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{NaO}_2$, 242.0906; found, 242.0908.

6.2.23. アミド **45**: methyl *N*-((2*E*,4*E*)-5-(5-(dimethylamino)pyrazin-2-yl)penta-2,4-dienoyl)-*S*-trityl-*D*-cysteinate



カルボキシル体 **42** (720 mg, 3.29 mmol) と *S*-トリチル-*D*-システインメチルエステル (3.60 g, 9.55 mmol) に *N,N*-ジメチルホルムアミド (モレキュラーシーブス **4A** で簡易脱水) (50 mL) に溶解した。この溶液に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (2.04 g, 10.6 mmol)、*N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (1.27 g, 10.4 mmol) を加え、この反応混合物を室温で 17 時間攪拌した。反応混合物に水 (50 mL) を加え、酢酸エチル (3 x 100 mL) で抽出した。有機層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られ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 = 1 / 2) にて精製すると、アミド体 **45** (1.63 g, 2.81 mmol, 84%) が得られた。

mp 70 °C;

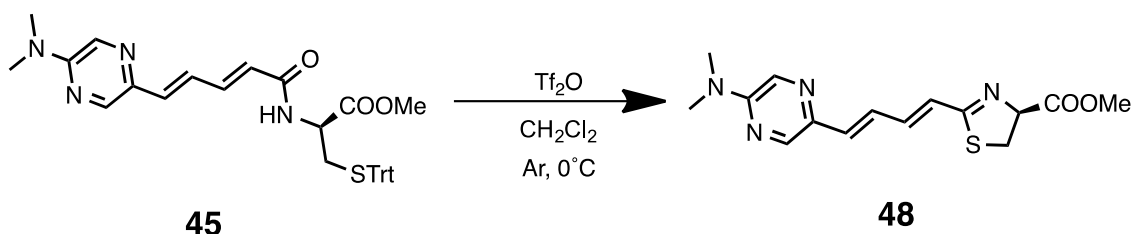
IR (neat, ν , cm^{-1}): 1738, 1651, 1569, 741, 697;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.05 (s, 2 H), 7.20–7.44 (m, 15 H), 7.13 (dd, $J = 14.9, 11.5$ Hz, 1 H), 6.82 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 5.93 (m, 2 H), 4.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H), 3.73 (s, 3 H), 3.18 (s, 6 H), 2.67–2.73 (m, 2 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.0, 165.6, 153.8, 144.3, 142.2, 141.8, 137.3, 135.6, 129.8, 129.6, 129.5, 128.0, 128.0, 126.9, 126.8, 125.6, 122.9, 67.0, 52.7, 51.2, 37.8, 34.0;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_3\text{S}$, 601.2249; found, 601.2243.

6.2.24. チアゾリンメチルエステル体 **48**: methyl (S)-2-((1E,3E)-4-(5-(dimethylamino)pyrazin-2-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate



アミド体 **45** (114 mg, 0.197 mmol) をアルゴン雰囲気下にし、脱水ジクロロメタン (10.0 mL) を加えた。この溶液に氷浴内で、トリフルオロメタンスルホン酸無水物 (100 μL , 0.6 mmol) を約 1 分間で滴下し、35 分間攪拌した。原料が消失したのを確認した後、陰イオン交換樹脂 IRA400 OH AG を用いて中和した。樹脂を洗浄して濾別し、得られた洗液を減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層クロマトグラフィー (ヘキサン / 酢酸エチル = 1/2) で精製すると、チアゾリンメチルエステル体 **48** (28.2 mg, 0.0886 mmol, 44%) が得られた。

mp 142°C ;

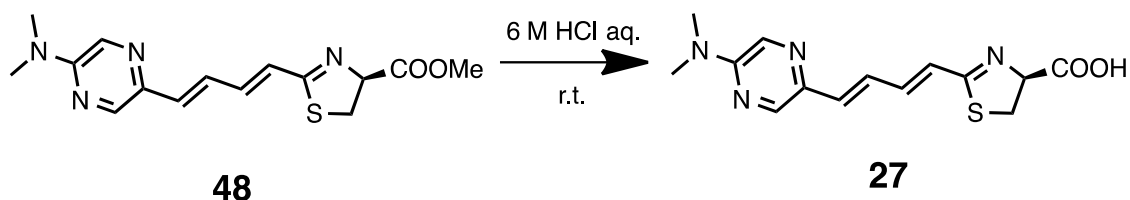
IR (neat, ν , cm^{-1}): 2940, 1745, 1574, 1197, 982;

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3-d_1) δ 8.04 (s, 2 H), 7.14–7.20 (m, 1 H), 6.94–6.99 (m, 1 H), 6.77 (d, $J = 14.9$ Hz, 1 H), 6.65 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H), 5.17 (t, $J = 8.9$ Hz, 1 H), 3.83 (s, 3 H), 3.54–3.63 (m, 2 H), 3.17 (s, 6 H);

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3-d_1) δ 171.3, 170.0, 153.7, 142.5, 142.2, 137.3, 134.5, 129.9, 126.4, 125.3, 78.0, 52.8, 37.8, 34.6;

HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$, 319.1229; found, 319.1230.

6.2.25. AkaLumine アナログ **27**: (S)-2-((1E,3E)-4-(5-(dimethylamino)pyrazin-2-yl)buta-1,3-dien-1-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid



チアゾリンメチルエステル体 **48** (11.2 mg, 0.035 mmol) を H₂O (2 mL) に溶解し、4 M 塩酸 (1.5 mL) を加え、その溶液を 19 時間室温で攪拌した。反応混合物にアンモニア水を加え中和した後、減圧濃縮した。得られた残渣を自動分取中圧カラムクロマトグラフィー (Smart Flash EPCLC AI-580S, ULTRAPACK COLUMNS C₁₈, H₂O / methanol = 9 / 1 to 1 / 9) で精製し、AkaLumine アナログ **27** (4.1 mg, 0.013 mmol, 37 %) が得られた。

mp 204–207 °C;

IR (neat, ν , cm⁻¹): 3234, 1568, 1386, 982;

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 8.13 (s, 1 H), 8.09 (s, 1 H), 7.18 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1 H), 7.04 (dd, *J* = 15.5, 10.9 Hz, 1 H), 6.86 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H), 6.61 (d, *J* = 14.9 Hz, 1 H), 5.06 (t, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 3.59 (m, 2 H), 3.17 (s, 6 H);

¹³C-NMR (126 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ 176.2, 171.9, 155.4, 144.1, 143.4, 138.5, 136.2, 131.3, 127.7, 125.7, 80.3, 38.1, 36.4;

HR-ESI-MS: *m/z*: [M+H]⁺ calculated for C₁₄H₁₇N₄O₂S, 305.1072; found, 305.1077;

87%e.e. from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 19.6 min, D-isomer: 26.5 min, 0.1 M Potassium hexafluorophosphate buffer at pH 2.0/ acetonitrile = 65/35, detection of UV: 450 nm).

6.3. 測定の一部-基本操作

6.3.1. 測定装置

➤ pH 測定

堀場製作所製 F-23 型ガラス電極式水素イオン濃度指示計を用いて行なった。

➤ 発光光子量子測定

ATTO 株式会社製ルミノメーター AB-2200 を用いて測定した(data interval 0.1 s)。

➤ 発光スペクトル測定

ATTO 株式会社製微弱発光蛍光スペクトル装置 AB-1850 を用いて測定した。測定したスペクトルは全て検出器の特性を補正したスペクトルである(data interval 1 nm, 測定範囲 400–750 nm)。

➤ 紫外吸収スペクトル測定

Agilent Technologies 社製 Cary 60 spectrophotometer を用いて測定した(scan speed 600 nm/min; data interval 1 nm)。

➤ 細胞でのイメージング測定

Microtec Co. 製 GL-201A luminometer を用いて測定した。

➤ 動物でのイメージング測定

Multifunctional *in vivo* imaging system (IVIS Spectrum, PerkinElmer) を用いて測定した。

6.3.2. 試薬

➤ 超純水

MILLIPORE 製 Milli-RX12 α から採水したものを使用した。

➤ *Ppy* ルシフェラーゼ (北米産ホタル *Photinus pyralis* 由来)

Promega 社製の組み換え型 (QuantiLum[®], カタログ番号 E1701) を用いた。

➤ ATP-Mg

Sigma 社製 (カタログ番号 00386-41) を用いた。

➤ リン酸カリウム緩衝液 (KPB 溶液)

和光純薬工業株式会社製のリン酸水素二カリウム・12 水和物(特級) とリン酸二水素カリウム・2 水和物(特級) を超純水に溶かし、pH を調整して用いた。

➤ PBS 緩衝液

Thermo Fisher Scientific 社製 Gibco®, pH7.4, 1× をそのまま希釈せずに用いた。

6.3.3. 試料調製

➤ 基質溶液

基質を電子天秤で秤量し希釈した。溶媒として、KPB 緩衝液(50 mM, pH 6.0) を用いた。

➤ 酵素溶液

Ppy ルシフェラーゼを 1 mg/mL になるように Tris-HCl 緩衝液(50 mM, pH 8.0, 10% グリセロール含有) で希釈し小分けした。これをストック溶液とし、必要量をその都度希釈して用いた。

➤ ATP-Mg 溶液

ATP-Mg を超純水で希釈した。

6.4. 測定の一部-測定方法

➤ 溶解度測定 (3.2.)

化合物を PBS 緩衝液に任意の濃度で溶解し、25 °C にて UV / vis スペクトルを測定し、そのときの濃度と吸光度からモル吸光係数 ϵ を求めた。他方、PBS 緩衝液で飽和濃度を作製し、このときの UV / vis スペクトルを測定し、吸光度を求めた。最後に、飽和濃度での吸光度と求めた ϵ から溶解度 c_{\max} を求めた。

➤ 生物発光強度の測定 (2.4.)

室温下にて、KPB 溶液 (pH8.0, 500 mM) を 20 μ L、基質溶液を 20 μ L、0.1 mg/mL の *Ppy* 溶液を 20 μ L、200 μ M の Mg-ATP 溶液を 40 μ L を混合し、ルミノメーター (AB-1850) で 30 秒間測定した。

➤ 生物発光波長の測定 (2.5.)

室温下にて、KPB 溶液 (pH8.0, 500 mM) を 5 μ L、ホタルルシフェリン(1) の溶液(100 μ M) を 5 μ L、1 mg/mL の *Ppy* 溶液を 5 μ L、200 μ M の Mg-ATP 溶液を 10 μ L を混合し、発光スペクトルの測定装置 (AB-1850) で 180 秒間発光スペクトルを測定した。また、KPB 溶液 (pH8.0, 500 mM) を 5 μ L、アデニンアナログ **23** の溶液を 5 μ L、1 mg/mL の *Ppy* 溶液を 10 μ L、超純水を 5 μ L を混合し、180 秒間発光スペクトルを測定した。

➤ 生物発光波長の測定 (3.3.)

室温下にて、KPB 溶液 (pH8.0, 500 mM) を 5 μ L、基質溶液 (100 μ M)を 5 μ L、1 mg/mL の *Ppy* 溶液を 5 μ L、200 μ M の Mg-ATP 溶液を 10 μ L を混合し、発光スペクトルの測定装置 (AB-1850) で 180 秒間発光スペクトルを測定した。

➤ 化学発光波長の測定 (3.3.)

室温下にて、150 μ L の T3P 溶液 (150 mM in DMF) と 40 μ L の基質溶液 (20 mM in DMF)、40 μ L の NEt₃ 溶液 (500 mM in DMF) を混合し、発光スペクトルの測定装置 (AB-1850) で 180 秒間発光スペクトルを測定した。

➤ K_m 及び V_{max} の測定 (3.3.)

室温下にて、KPB 溶液 (pH8.0, 500 mM) を 20 μ L、基質溶液を 20 μ L、0.1 mg/mL の *Ppy* 溶液を 20 μ L、200 μ M の Mg-ATP 溶液を 40 μ L を混合し、ルミノメーター(AB-2270) で 30 秒間測定した。基質の濃度は、最終濃度が 0.02–100 μ M の範囲になるようにした。積算された発光強度を用いて、酵素反応速度を求める Lineweaver-Burk の式に代入し、 K_m 及び V_{max} を計算し求めた。このとき、ソフトウェア SigmaPlot 13.0 (Systat Software 社製) を用いた。

➤ 細胞培養 (3.5.)

マウスのルイス肺がん由来細胞 (LLC) は ATCC (Rockville, MD, USA) から購入した。LLC に luc+ 遺伝子を安定導入することで、LLC/luc 細胞を樹立した¹⁶。また、LLC/mKO2-Rluc8.6 細胞も同様に、mKO2-Rluc8.6 遺伝子の安定導入によって樹立した^{16,45}。これらの細胞は、5% ウシ胎児血清とペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/mL) を添加し、37 °C 下、ダルベッコ変法培地(Nacalai Tesque) で培養した。このとき、マイコプラズマチェックキット(Lonza) でマイコプラズマ含量を定期的にチェックした。

➤ 細胞のイメージング (3.5.)

黒の 96 ウェルプレート上で、LLC/luc (2 × 10⁵ cells/well) に基質を添加した。基質を添加 1 分後に発光イメージャー(IVIS, PerkinElmer) にて生物発光イメージを撮像した。撮影条件は以下の通りである。オープンフィルター (全波長域)、露光時間 = 10 s、binning = medium: 8, 撮影領域 = 12.9 × 12.9 cm、f/stop = 1。Living Image 4.3 software (PerkinElmer) specialized for IVIS を用いて解析した。

➤ 細胞生存率のアッセイ (3.5.)

24 ウェルプレートに LLC/mKO2-Rluc8.6 細胞 (2 × 10⁴ cells/well) を蒔種した。24 時間培養した後、それぞれの濃度の基質を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、各ウェルの細胞を破砕・回収し、ルミノメーター (GL-201A、マイクロテック・ニチオ

ン)を用いて、Rluc とセレンテラジンによる生物発光強度を測定した。

➤ マウス (3.6.)

C57B/6 アルビノマウス (オス、メス、6 週齢) を日本チャールスリバー株式会社 (横浜) から購入した。マウスを使用したすべての実験は東京工業大学動物実験委員会 (承認番号 2014005) に以前から承認されており、関連する国内及び国外のガイドラインに従って動物を扱った。

➤ 腫瘍モデルマウス (3.6.)

皮下腫瘍マウスでは、LLC/luc (3×10^5 cells/10 μ L) を PBS に懸濁し、同量の Geltrex® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) と混ぜ合わせ、C57B/6 アルビノマウス (メス) の皮下に注射した。注射 4 日後にイメージング実験を行った。肺転移モデルでは、LLC/luc (5×10^5 cells/100 μ L) を PBS に懸濁し、C57B/6 アルビノマウス (オス) の尾静脈に注射した。尾静脈注射後、10–20 日後にイメージング実験を行った。

➤ 動物のイメージング (3.6.)

皮下腫瘍及び肺転移モデルの生物発光イメージングは、基質(33 mM, 100 μ L) を腹腔内投与後、30 分間、3 分毎に連続的に IVIS で発光画像を取得した。得られた画像のうち、最も強度の高い画像を解析に用いた。同一個体のマウスに異なる基質を投与し生物発光イメージングを比較するため、ホタルルシフェリン(LH₂, 1) の影響が完全に消失していると考えられる投与後 4 時間¹⁶ で、26 のイメージングを行った。イメージング撮影は以下の通りである。オープンフィルター、露光時間 = 60 s、binning = medium: 8、撮影領域 = 12.9 × 12.9 cm、f/stop = 1。Living Image 4.3 software (PerkinElmer) specialized for IVIS を用いて解析した。

➤ マウス (3.7.)

FVB または Balb/c と掛け合わせることでアルビノ化を行った C57B/6 rag2^{-/-} マウス (♀, 6–8 週齢) を用いて移植を行った。rag2^{-/-} 免疫不全マウスは国立国際医療センター 高木先生から提供を受けた。本研究における組換え DNA 実験ならびに動物実験は

それぞれ早稲田大学内に設置された組換え DNA 実験委員会と動物実験委員会の承認を得た(遺伝子組換え実験 WD18-119、動物実験 2018-A058)。

➤ 腫瘍移植モデル (3.7.)

正常乳腺上皮細胞株である NMuMG 細胞 (山梨医科大学 宮澤恵二博士から提供を受けた) に、レトロウイルスベクターを用いて活性型変異体 ERBB2V659E、firefly luciferase およびがん転移促進遺伝子 A を過剰発現させた細胞を用いた。

乳がんをモデルとした同所性移植による転移アッセイを行うため、 1.0×10^6 cells/ 10 μ L に調整した細胞を、Rag2 欠損マウスの第 4 乳腺組織 (fatpad) に移植した。移植後、原発腫瘍の大きさをノギスによって測定し、300 mm³ の大きさになった時点で切除した。切除後さらに経時的な観察を行うことで、転移巣の測定を行った。

➤ 動物の *in vivo* イメージング (3.7.)

同所性転移モデルおよび肝臓非特異的発光の測定において、IVIS-XR (PerkinElmer) を用いて、非侵襲的な生物発光イメージングを行った。同所性転移モデルにおいて、2.5% イソフルラン(Fujifilm Wako) にてマウスに麻酔をかけた状態で測定を行った。1 (47.1 mM, 127 μ L in PBS) と 26 (60 mM, 100 μ L in PBS) をそれぞれ腹腔内投与し、25 分間の測定を行った。5 分ごとに 30 秒間の露光を行い、イメージング画像を取得した(オープンフィルター、露光時間 : 30 秒、Binning Factor : Medium、F/stop Number : 1)。取得した画像の解析は、Living Image 4.3 software (PerkinElmer) specialized for IVIS を用いて解析した。

肝臓の非特異的発光測定においても、同所性転移モデルと同様の手法で測定を行った。この際、Binning Factor : Large の条件にて測定を行った。

参考文献

- (1) Massoud, T. F.; Gambhir, S. S. Molecular Imaging in Living Subjects: Seeing Fundamental Biological Processes in a New Light. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 545–580.
- (2) Close, D. M.; Xu, T.; Sayler, G. S.; Ripp, S. In Vivo Bioluminescent Imaging (BLI): Noninvasive Visualization and Interrogation of Biological Processes in Living Animals. *Sensors* **2011**, *11* (1), 180–206.
- (3) Shimomura, O. *Bioluminescence*, Revised Ed.; World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012.
- (4) Kaskova, Z. M.; Dörr, F. A.; Petushkov, V. N.; Purtov, K. V.; Tsarkova, A. S.; Rodionova, N. S.; Mineev, K. S.; Guglya, E. B.; Kotlobay, A.; Baleeva, N. S.; et al. Mechanism and Color Modulation of Fungal Bioluminescence. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1602847.
- (5) Purtov, 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.; et al. The Chemical Basis of Fungal Bioluminescence **. *Angew.Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8124–8128.
- (6) Mitani, Y.; Yasuno, R.; Isaka, M.; Mitsuda, N.; Futahashi, R.; Kamagata, Y.; Ohmiya, Y. Novel Gene Encoding a Unique Luciferase from the Fireworm *Odontosyllis Undecimdongata*. *Sci. Rep.* **2018**, No. 8, 12789.
- (7) Inouye, S.; Watanabe, K.; Nakamura, H.; Shimomura, O. Secretional Luciferase of the Luminous Shrimp *Oplophorus Gracilirostris*: CDNA Cloning of a Novel Imidazopyrazinone Luciferase. *FEBS Lett.* **2000**, *481* (1), 19–25.
- (8) Mezzanotte, L.; van 't Root, M.; Karatas, H.; Goun, E. A.; Löwik, C. W. G. M. In Vivo Molecular Bioluminescence Imaging: New Tools and Applications. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35* (7), 640–652.

- (9) Branchini, B. R.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Gulick, A. M.; Vinyard, D. J.; Brudvig, G. W. Experimental Support for a Single Electron-Transfer Oxidation Mechanism in Firefly Bioluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (24), 7592–7595.
- (10) Shimomura, O.; Goto, T.; Johnson, F. H. Source of Oxygen in the CO₂ Produced in the Bioluminescent Oxidation of Firefly Luciferin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1977**, *74* (7), 2799–2802.
- (11) Isobe, H.; Takano, Y.; Okumura, M.; Kuramitsu, S.; Yamaguchi, K. Mechanistic Insights in Charge-Transfer-Induced Luminescence of 1,2-Dioxetanones with a Substituent of Low Oxidation Potential. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (24), 8667–8679.
- (12) Miller, S. C.; Mofford, D. M.; Adams, S. T. Lessons Learned from Luminous Luciferins and Latent Luciferases. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (7), 1734–1740.
- (13) Evans, M. S.; Chaurette, J. P.; Adams, S. T.; Reddy, G. R.; Paley, M. a; Aronin, N.; Prescher, J. a; Miller, S. C. A Synthetic Luciferin Improves Bioluminescence Imaging in Live Mice. *Nat. Methods* **2014**, *11* (4), 393–395.
- (14) Wu, W.; Su, J.; Tang, C.; Bai, H.; Ma, Z.; Zhang, T.; Yuan, Z.; Li, Z.; Zhou, W.; Zhang, H.; et al. CybLuc: An Effective Aminoluciferin Derivative for Deep Bioluminescence Imaging. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (9), 4808–4816.
- (15) Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C.; Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T.; Maki, S.; et al. Development of Simple Firefly Luciferin Analogs Emitting Blue, Green, Red, and near-Infrared Biological Window Light. *Tetrahedron* **2013**, *69* (19), 3847–3856.
- (16) Kuchimaru, T.; Iwano, S.; Kiyama, M.; Mitsumata, S.; Kadonosono, T.; Niwa, H.; Maki, S.; Kizaka-Kondoh, S. A Luciferin Analogue Generating Near-Infrared Bioluminescence Achieves Highly Sensitive Deep-Tissue Imaging. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11856.

- (17) Iwano, S.; Sugiyama, M.; Hama, H.; Watakabe, A.; Hasegawa, N.; Kuchimaru, T.; Tanaka, K. Z.; Takahashi, M.; Ishida, Y.; Hata, J.; et al. Single-Cell Bioluminescence Imaging of Deep Tissue in Freely Moving Animals. *Science (80-.)*. **2018**, *359* (6378), 935–939.
- (18) Dixon, A. S.; Schwinn, M. K.; Hall, M. P.; Zimmerman, K.; Otto, P.; Lubben, T. H.; Butler, B. L.; Binkowski, B. F.; MacHleidt, T.; Kirkland, T. A.; et al. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (2), 400–408.
- (19) Hall, M. P.; Woodroffe, C. C.; Wood, M. G.; Que, I.; Van'T Root, M.; Ridwan, Y.; Shi, C.; Kirkland, T. A.; Encell, L. P.; Wood, K. V.; et al. Click Beetle Luciferase Mutant and near Infrared Naphthyl-Luciferins for Improved Bioluminescence Imaging. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 132.
- (20) 牧昌次郎; 小島哲; 丹羽治樹. 波長が制御されたルシフェラーゼの発光基質および製造方法. 特許第5550035号, 2014.
- (21) Kiyama, M.; Saito, R.; Iwano, S.; Obata, R.; Niwa, H.; Maki, S. A. Multicolor Bioluminescence Obtained Using Firefly Luciferin. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16* (24), 2648–2655.
- (22) Kitada, N.; Saitoh, T.; Ikeda, Y.; Iwano, S.; Obata, R.; Niwa, H.; Hirano, T.; Miyawaki, A.; Suzuki, K.; Nishiyama, S.; et al. Toward Bioluminescence in the Near-Infrared Region: Tuning the Emission Wavelength of Firefly Luciferin Analogues by Allyl Substitution. *Tetrahedron Lett.* **2018**, *59* (12), 1087–1090.
- (23) Miura, C.; Kiyama, M.; Iwano, S.; Ito, K.; Obata, R.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H. Synthesis and Luminescence Properties of Biphenyl-Type Firefly Luciferin Analogs with a New, near-Infrared Light-Emitting Bioluminophore. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9726–9734.
- (24) Kiyama, M.; Iwano, S.; Otsuka, S.; Lu, S. W.; Obata, R.; Miyawaki, A.; Hirano, T.; Maki,

- S. A. Quantum Yield Improvement of Red-Light-Emitting Firefly Luciferin Analogues for in Vivo Bioluminescence Imaging. *Tetrahedron* **2017**, *74* (6), 652–660.
- (25) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging Progress Continues in the Development of Smaller , More Penetrable Probes for Biological Imaging . Toward the Phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317.
- (26) Fukuchi, M.; Izumi, H.; Mori, H.; Kiyama, M.; Otsuka, S.; Maki, S.; Maehata, Y.; Tabuchi, A.; Tsuda, M. Visualizing Changes in Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression Using Bioluminescence Imaging in Living Mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–5.
- (27) De Niz, M.; Helm, S.; Horstmann, S.; Annoura, T.; Del Portillo, H. A.; Khan, S. M.; Heussler, V. T. In Vivo and in Vitro Characterization of a Plasmodium Liver Stage-Specific Promoter. *PLoS One* **2015**, *10* (4), 1–17.
- (28) Henriques, C.; Henriques-pons, A.; Meuser-batista, M.; Ribeiro, A. S. In Vivo Imaging of Mice Infected with Bioluminescent Trypanosoma Cruzi Unveils Novel Sites of Infection. **2014**, 1–15.
- (29) 牧昌次郎; 丹羽治樹. 新規ハロゲン化水素塩. 特許第6011974号, 2016.
- (30) 仲村厚志; 林唯奈; 齊藤亮平; 牧昌次郎; 吉川朋子. ホタルルシフェリン誘導体によるマウス肝臓の発光. In 日本分子生物学会; 2018; p 2LBA–132.
- (31) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591.
- (32) 齊藤亮平; 木山正啓; 北田昇雄; 岩野智; 小畠りか; 丹羽治樹; 平野蒼; 牧昌次郎. ホタル生物発光基質の構造と活性. In 生物発光化学発光研究会; 2015; p P20.
- (33) Trott, O.; Olson, A. J. Software News and Update AutoDock Vina : Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function , Efficient Optimization , and Multithreading. *J Comput Chem* **2010**, *31*, 455–461.

- (34) Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. Structural Basis for the Spectral Difference in Luciferase Bioluminescence. **2006**, *440* (March), 1–5.
- (35) Kato, D.; Shirakawa, D.; Polz, R.; Maenaka, M.; Takeo, M.; Negoro, S.; Niwa, K. A Firefly Inspired One-Pot Chemiluminescence System Using n-Propylphosphonic Anhydride (T3P). *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (12), 1640–1645.
- (36) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Portier, N. C.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. Yellow-Green and Red Firefly Bioluminescence from 5,5-Dimethyloxyluciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (10), 2112–2113.
- (37) Strickler, S. J.; Berg, R. A. Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37* (4), 814–822.
- (38) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T. Spectroscopic Properties of Amine-Substituted Analogues of Fire FI Y. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 486–494.
- (39) Yeh, H. W.; Karmach, O.; Ji, A.; Carter, D.; Martins-Green, M. M.; Ai, H. W. Red-Shifted Luciferase-Luciferin Pairs for Enhanced Bioluminescence Imaging. *Nat. Methods* **2017**, *14* (10), 971–974.
- (40) 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.; et al. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc.: Wallingford, CT 2004, p Gaussian 09, Revision D.01.
- (41) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648–5652.
- (42) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.

- (43) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (45), 11623–11627.
- (44) Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. GaussView, Version 5. *Semichem Inc.*, Shawnee Mission, KS. 2009, p Semichem Inc.
- (45) Tsubaki, T.; Kadonosono, T.; Sakurai, S.; Shiozawa, T.; Goto, T.; Sakai, S.; Kuchimaru, T.; Sakamoto, T.; Kondoh, G.; Kizaka-kondoh, S. Novel Adherent CD11b Gr-1 Tumor-Infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget* **2018**, *9* (13), 11209–11226.

謝辞

本研究は、電気通信大学大学院情報理工学研究科基盤理工学専攻において、牧昌次郎准教授、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、多くのご指導・ご助言をいただきました慶應義塾大学文学部化学教室 小畠りか助教、牧研究室 研究員(現 東邦大学) 東翔子博士に感謝いたします。また、伊藤喜之研究員には、卒業生でもあり、企業からの客員研究員ということで、実験技術だけではなく多くのご指導をいただき感謝しております。さらに、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 宮川朋子様感謝致します。

また本学研究企画室(URA) の関口様には、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。電気通信大学TLO キャンパスクリエイト(株)の堺様、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、河合様、長谷川様にはseMpai (DP3及びDP3-Na) の工業合成化をおこなっていただき、感謝致します。また、AkaLumineおよびTokeoniのサンプル提供をいただき、感謝致します。

動物及び細胞実験のデータは、東京工業大学 生命理工学院 近藤科江教授、口丸高弘助教(現、自治医科大学 講師)及び早稲田大学 理工学院 仙波憲太郎教授、中山淳助手に取得していただきました。また、専門外の分野であることをご理解いただき、多くのアドバイスご指導いただきました。感謝致します。

動物実験や細胞実験に関しまして、国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター・細胞機能探索技術研究チーム 宮脇敦史チームリーダー、岩野智研究員には多くのサポートをしていただきました。

牧研究室に配属した当初より指導してくださいました、岩野智博士、木山正啓博士、小林義尚氏、北田昇雄博士には公私共々大変お世話になりました。先輩方には、実験だけでなく人生の楽しみ方もご教示いただきました。盛満玲氏、鉢呂佳史氏をはじめとする牧研究室の後輩の方々とは、研究室生活を有意義に過ごすことができましたこと深く感謝いたします。また、平野研究室の先輩・後輩の皆様とも日々の研究室生活を楽しく過ごさせていただき、お陰様でとても有意義な研究室生活となりました。

シドニー大学医学部 **Shijia Winson Lu** 氏とは研究室生活を通じて、必然であるかのように出会い、研究だけでなく私生活でも楽しく過ごすことができました。また、留学の際は英語力に不安がある筆者に準備の段階から渡米先での生活まで大変多くのサポートをしてくださいました。非常に感謝しております。

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。

海外への国際学会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、学長裁量経費海外派遣助成、および吉田科学技術財団殿、公益財団法人中谷医工計測技術振興財団殿に感謝申し上げます。

また、研究費の助成をいただきました、がん若手共同研究研究支援・がん若手事務局殿、公益財団法人 日本科学協会 笹川研究助成殿に大変感謝致します。

末筆ながら、博士号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。

齊藤 亮平