

ホタル生物発光における発光制御機構の
化学生物学的研究

岩野 智

電気通信大学
2014年3月

ホタル生物発光における発光制御機構の化学生物学的研究

岩野

智

二〇一四年

ホタル生物発光における発光制御機構の
化学生物学的研究

岩野 智

電気通信大学大学院情報理工学研究科
博士（理学）の学位申請論文

2014 年 3 月

ホタル生物発光における発光制御機構の
化学生物学的研究

博士論文審査委員会

主査	牧 昌次郎	助教
	丹羽 治樹	特任教授
	平野 誉	教授
	中村 整	教授
	白川 英樹	准教授

著作権所有者

岩野 智

2014 年

Chemical biology study of firefly bioluminescence

Satoshi Iwano

Abstract

Firefly bioluminescence is an enzymatic reaction, which requires Mg²⁺, ATP, and O₂. The mechanism of this bioluminescence is as follows; first, the luciferase catalyzes the adenylation of the luciferin and then the oxygenation of the adenylylated luciferin, which makes an excited state oxyluciferin is generated and yellow-green (560 nm) light is emitted. This high efficiency luminescent system is widely used in the field of life science.

At first, I have synthesized firefly luciferin analogs and evaluated bioluminescent property of 7- substituted and π -extended analogs. The π -extended type firefly luciferin analogs emitting blue, green, and red lights were developed. The longest emission maximum was observed at 675 nm (Near infra red, NIR), which belongs to the NIR biological window (650-900 nm), useful for deep site bioimaging of living animals.

Next, I and the collaborator have applied NIR luciferin analog to *in vivo* cancer imaging. The light intensity of NIR emission luciferin analog ($\lambda_{\text{max}} = 675 \text{ nm}$) at the living mice imaging experiment had 10 times stronger than natural luciferin. The results indicate that the NIR emission luciferin analog has great potential to detect tumors in deeper sites.

But firefly bioluminescence has a problem. The stronger light is required for realization of *in vivo* supersensitive deep site imaging. And another multi color luciferin analog has only very low light intensity. I have to solve this problem. The solution is that the light emission of the adenylylated analogs was strongly enhanced compared with those of analogs themselves. But luciferin adenylate has low stability, so luciferin adenylate was not used imaging experiment as practical use tool. we aspire to create a high intensity and high stability luminescence system: a stable luciferyl- AMP. One has luciferyl-AMP's structure

activity correlation.

Many kind of luciferin nucleotide was synthesized and evaluated those light intensity. One of luciferin nucleotide analog that was translated nucleotide structure at the phosphoester bond site has high stability. High stability luciferin nucleotide analog was developed and this technology can be applied to blue and red luciferin analogs. These technology will become a new powerful luminescent tool for life science field.

ホタル生物発光における発光制御機構の化学生物学的研究

岩野 智

和文概要

生物発光はライフサイエンス分野で様々な用途で用いられており、ライフサイエンス分野において欠くことのできない重要な技術となっている。

本論文では、近年急速に発展を遂げている生体内イメージング用途における生物発光反応を用いた発光材料の多様性の向上と実用に資する革新的 *in vivo* イメージング材料の開発を目指し研究を行った。

ホタルの生物発光反応は発光基質ルシフェリンが酵素ルシフェラーゼの作用により反応が進行し、黄緑色に発光する。本研究では、有機化学的なアプローチによる発光基質ルシフェリン類縁体合成と発光活性評価と発光反応の詳細な解析、また創製した近赤外発光ルシフェリンの *in vivo* イメージングへの応用を行った。

その結果、近赤外発光ルシフェリンが *in vivo* イメージングにおいて非常に有用なツールであることを明らかにした。また、ホタル生物発光をモデルとした安定な一段階発光反応の開発にも成功した。

目次

第1章 序論

1-1. 生物発光	1
1-2. 生物発光の化学	
1-2-1. 発光様式	2
1-2-2. 発光量子収率	5
1-3. ホタルの生物発光	5
1-4. ホタル生物発光系の応用	
1-4-1. 天然・変異発光系を使ったイメージング	7
1-4-2. ルシフェラーゼを修飾した分子プローブを用いるイメージング	8
1-4-3. ルシフェリン誘導体を用いたイメージング	8
1-4-4. 動物個体を使った生物発光 <i>in vivo</i> イメージング	10
1-5. 本研究の目的	11

第2章 ホタルルシフェリン類縁体の合成と発光活性評価

2-1. 7位置換型ルシフェリンアナログの分子設計	12
2-2. ホタルルシフェリンの合成	13
2-3. 7位置換型ルシフェリンアナログの合成	14
2-4. 7位置換型ルシフェリンアナログの発光測定	
2-4-1. 生物発光強度の測定	15
2-4-2. ミカエリス定数	16
2-4-3. 生物発光波長の測定	17
2-5. ホタルルシフェリンに対する7位置換基導入の効果	18
2-6. π 共役伸長型ルシフェリンアナログの分子設計	19
2-7. π 共役伸長型ルシフェリンアナログの生物発光活性評価	19
2-7-1. フェノール型アナログの生物発光スペクトル	20
2-7-2. ジメチルアミノ型アナログの生物発光スペクトル	21
2-7-3. ナフトール型アナログの生物発光強度	22
2-7-4. π 共役伸長型ルシフェリンアナログの生物発光活性まとめ	23

第3章 生物発光波長と化学発光波長の相違 (酵素シフト)

3-1. 化学発光基質の合成 (ルシフェリンアナログのメチルエステル化)	25
3-2. ホタルルシフェリン及びホタルルシフェリンアナログの化学発光波長測定	
3-2-1. 7位置換型ルシフェリンアナログの化学発光スペクトル	26
3-2-2. ジメチルアミノ型アナログの化学発光スペクトル	27
3-2-3. ナフトール型アナログ化学発光スペクトル	28

3-3.	化学発光スペクトルまとめ	29
3-4.	酵素シフトについての考察	30
3-5.	考察	35
第4章	<i>in vivo</i> イメージングへの応用	36
4-1.	近赤外発光材料を用いた <i>in vivo</i> イメージング実験	
4-1-1.	<i>in vitro</i> での擬似生体実験の概要	38
4-1-2.	<i>in vitro</i> での生体モデルフィルターからの透過光の発光スペクトルの測定	39
4-1-3.	<i>in vitro</i> での生体モデルフィルターを用いた擬似生体透過性の評価	40
4-1-4.	<i>in vitro</i> での生体モデルフィルターからの透過光の強度	41
4-2.	腫瘍モデルマウスを用いた <i>in vivo</i> イメージング実験	42
4-2-1.	皮下腫瘍モデルマウスを用いた <i>in vivo</i> イメージング実験	43
4-2-2.	骨転移モデルマウスを用いたイメージング実験	44
4-3.	マウス体内での基質の動態評価	45
4-4.	近赤外発光アナログの実用性	46
第5章	ホタルルシフェリンヌクレオチドの合成と発光活性評価	
5-1.	分子設計	48
5-2.	各種 NTP を用いた場合の相対発光活性評価 (二段階)	50
5-3.	各種 NTP を用いた場合の発光スペクトル (二段階)	51
5-4.	各種ルシフェリンヌクレオチドの合成	52
5-5.	各種ルシフェリンヌクレオチドを用いた場合の相対発光活性評価	53
5-6.	二段階反応と一段階反応の発光活性の比較	54
5-7.	各種ルシフェリンヌクレオチドを用いた場合の発光スペクトル	55
5-8.	塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチドを用いた場合の 相対発光活性評価	56
5-9.	塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチドを用いた場合の 発光スペクトル	57
5-10.	リン酸結合部位を構造改変したルシフェリンヌクレオチド の発光スペクトル	58
5-11.	安定化ルシフェリンヌクレオチドの安定性評価	59
5-12.	ルシフェリンヌクレオチドのヌクレオチド部分の構造活性相関まとめ	60
第6章	結語	62
第7章	実験の部	
7-1.	合成の部	65
7-2.	測定の部	89
	文献	98
	謝辞	99

第1章 序論

1-1. 生物発光

世界に存在する数多の生物は、ヒトを含め、太古からの進化を経て現在に至る。進化の過程では、種の存続や環境の変化に対応するため、様々な能力を身につける。生物が持つ「能力」は実に多様であり、時にわれわれ人間の目を楽しませてくれる事もある。そんな能力の一つが「生物発光」である。

生物発光は細菌や昆虫、海洋生物など広範囲な生物種で見出されている。種によって光り方も異なり、たとえばホタル (Fig. 1-1)や発光キノコ (Fig. 1-2)、オワンクラゲ (Fig. 1-3)などは体内で光るが、ウミホタル (Fig. 1-4)は発光液を体外に放出して発光する¹⁾。



Fig. 1-1 ホタル

(写真提供:産業技術総合研究所 近江谷克裕博士)



Fig. 1-2 発光キノコ



Fig. 1-3 オワンクラゲ



Fig. 1-4 ウミホタル

(写真提供:産業技術総合研究所 近江谷克裕博士
オリンパス株式会社 小江克典博士)

発光生物は何のために光っているのでしょうか。一説には地球がまだ嫌気性条件下にあったころ、有害な酸素を生体内で効率的に除去するためであったといわれている。その後、進化の過程で雄雌間の合図(ホタル)や、敵への威嚇・逃亡 (ウミホタル)、餌の獲得 (チョウチンアンコウ)など様々な目的に利用するようになったと考えられるが、まだ明らかにされていない²⁾。

1-2. 生物発光の化学

1-2-1. 発光様式

歴史上、「生物発光」という現象を初めて化学的に扱ったのはフランスの Dubois だった。Dubois は 1885 年にヒカリコメツキムシ(*Pyrophorus*)の発光器を冷水抽出してから発光が認められなくなるまで放置したものと、発光器を熱湯抽出して得た液とを常温で混合すると液が強く発光することを確認し、前者には酵素、後者には発光物質が存在すると考えた (Fig. 1-5)。この酵素をルシフェラーゼ、発光物質をルシフェリン、そしてこのような反応をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応(L-L 反応)と名付けた³⁾。

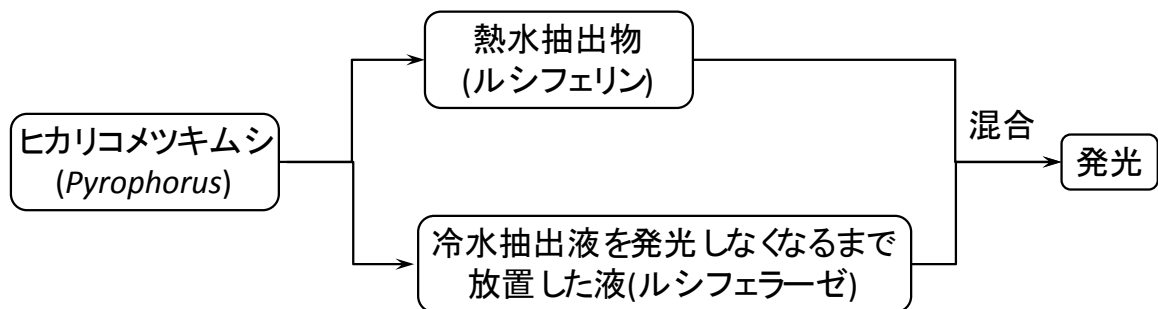


Fig. 1-5 Dubois の実験

L-L 反応では、まずルシフェリン (基質)がルシフェラーゼ (酵素)によって触媒的に酸化され、不安定中間体を生成する。その中間体が分解した後、励起状態のオキシルシフェリンを生成し、基底状態に至る過程で発光する²⁾ (Fig. 1-6)。L-L 反応で発光することが知られている代表的な発光生物はホタルやウミホタルなどであり、それぞれの生物種に対応するルシフェリン (1, 2)とルシフェラーゼが存在する。

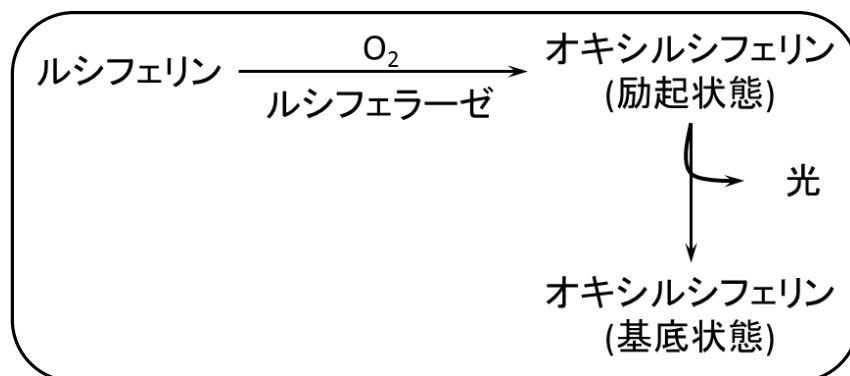
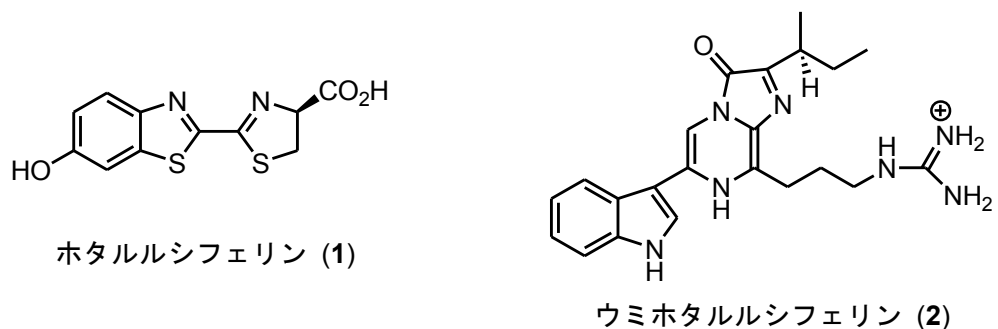


Fig. 1-6 ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応



一方、L-L 反応と異なる生物発光様式をもつ生物も数多く存在する。たとえば、オワンクラゲは発光基質としてセレンテラジン (3) を持ち、アポタンパク質、酸素が結合することにより発光タンパク質エクオリンが形成される。エクオリンはカルシウムイオンが付加することで、励起状態の青色蛍光タンパク質(Blue Fluorescent Protein : BFP)へと変化し、青色光 ($\lambda_{\max} = 465 \text{ nm}$) を発する (Fig. 1-7)。L-L 反応と最も異なる点は、酵素を使わずタンパク質が基質と直接反応する点である。

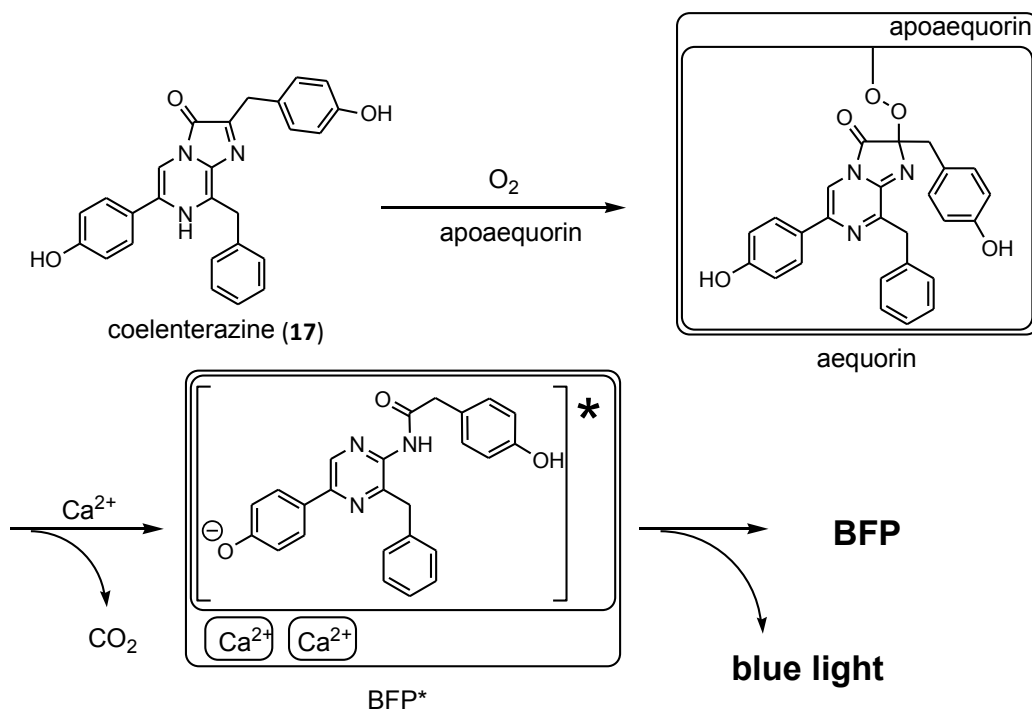


Fig. 1-7 オワンクラゲの生物発光反応 (1)

オワンクラゲの発光は緑色 ($\lambda_{\max} = 510 \text{ nm}$) だが、これは BFP から緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein : GFP) へエネルギー移動が起きることによって生じる²⁾ (Fig. 1-8)。

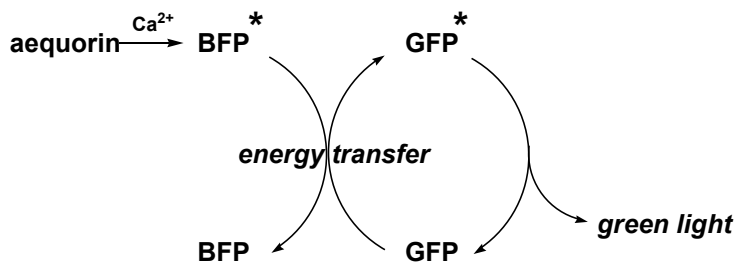


Fig. 1-8 オワンクラゲの生物発光反応 (2)

上述の L-L 反応や発光タンパク質による発光は、ほかの発光生物にも多くあてはまる (Table 1-1)。この他にバクテリアとの共生により発光するものや、未だその機構が明らかになっていない発光生物も存在する。

Table 1-1 発光生物^{3),4)}

門・綱・目	例	発光系
細菌植物門	発光菌 <i>Photobacterium</i>	L-L
真菌植物門	ツキヨタケ <i>Lampteromyces</i>	—
原生動物門		
無穀類	夜光虫 <i>Noctiluca scintillance</i>	L-L
渦鞭毛虫類	ゴニオラックス <i>Gonyaulax</i>	L-L
腔腸動物門		
ヒドロ虫類	オワンクラゲ <i>Aequorea</i>	Photoprotein
	オベリアクラゲ <i>Obelia</i>	Photoprotein
鉢虫類	オキクラゲ <i>Pelagina</i>	Photoprotein
花虫類	ウミシイタケ <i>Renilla</i>	L-L
	ウミサボテン <i>Cavenularia</i>	L-L
有櫛動物類	ウリクラゲ <i>Berœe ovata</i>	Photoprotein
環形動物門		
多毛類	ツバサゴカイ <i>Chaetopterus</i>	L-L
	オドントシリリス <i>Odontosyllis</i>	L-L
貧毛類	発光ミミズ <i>Diplocardia</i>	L-L
軟体動物門		
斧足類	カモメガイ <i>Pholas</i>	Photoprotein
腹足類	ヒカリウミウシ <i>Placamopherus</i>	—
	発光カタツムリ <i>Quantula</i>	—
	ラチア <i>Latia</i>	L-L
頭足類	ホタルイカ <i>Watasenia</i>	—
節足動物門		
甲殻類		
介形	ウミホタル <i>Vargula (Cypridina)</i>	L-L
オキアミ	メガニクチファネス <i>Meganyctiphanes</i>	Photoprotein
十脚	オプロホーラス <i>Orphanaeus</i>	—
昆虫類	北アメリカ産ホタル <i>Photinus pyralis</i>	L-L
	ゲンジボタル <i>Luciola cruciata</i>	L-L
	ヘイケボタル <i>Luciola lateralis</i>	L-L
二翅類	アラキノカンパ <i>Arachnocampa</i>	L-L
原策動物門	ギボシムシ <i>Balanoglossus</i>	L-L
脊椎動物門		
硬骨魚類		
ハダカイワシ	サンゴイワシ <i>Neoscopelus</i>	L-L
バトラコイデス	ミッドシップマン <i>Porichthys</i>	L-L
スズキ	ツマグロイシモチ <i>Apogon</i>	L-L
	マツカサウオ <i>Monacentris</i>	バクテリアの共生
チョウチンアンコウ	チョウチンアンコウ <i>Himantolophius</i>	バクテリアの共生

1-2-2. 発光量子収率

一般に生物発光は化学発光に比べ効率がよく、反応による熱損失がほとんどないため、「冷光」(luminescence)とも呼ばれている (Table 1-2)。発光効率を決める生物発光量子収率 Φ_{BL} は下式により表される。

$$\Phi_{BL} = \Phi_R \times \Phi_S \times \Phi_F$$

この式の Φ_R は化学反応による収率、 Φ_S は一重項励起状態の生成効率、 Φ_F は蛍光量子収率を示す。したがって Φ_{BL} が 0.41 であるホタルの場合は、 Φ_R 、 Φ_S 、 Φ_F がいずれも高い値になる。

Table 1-2 量子収率³⁾

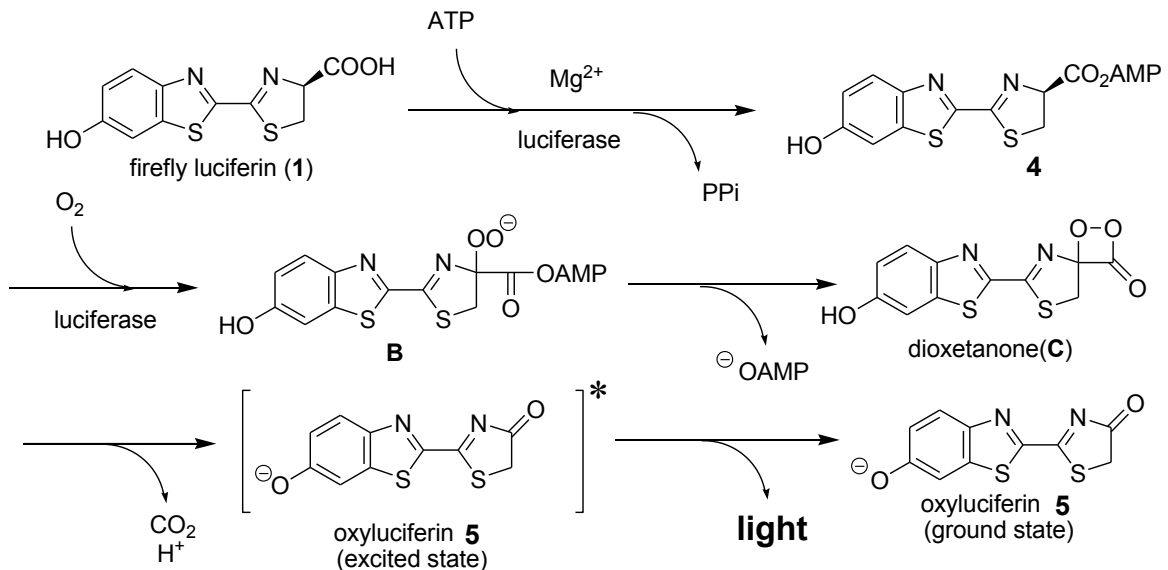
		量子収率
生物発光	Bacteria	0.12~0.17
	<i>Cypridina(Vargula)</i>	0.28
	<i>Renilla</i>	0.05
	Firefly	0.41
	<i>Aequorea</i>	0.23
化学発光	Luminol	0.036

1-3. ホタルの生物発光

「生物発光」と聞いた人の多くは第一に昆虫のホタル (Fig. 1-1)を想像するだろう。ホタルはコウチュウ目・ホタル上科・ホタル科 (Lampyridae)に分類される昆虫の総称で、世界におよそ 2000 種が生息しているとされる。ただし、そのすべてが発光するわけではない。卵、幼虫、蛹ではほとんどの種が発光するものの、成虫で発光するものは限られている。

1916 年、Harvey らはホタルの発光がルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を示すことを発見した。その後、1957 年に McElroy らにより北アメリカ産ホタル (*Photinus pyralis*)からホタルルシフェリン (1)が単離され⁵⁾、1961 年に White らによってホタルルシフェリン(1)の合成、構造決定がなされている⁶⁾。また、ルシフェラーゼについては 1996 年に Conti らにより、北アメリカ産ホタルルシフェラーゼの三次元構造が報告され⁷⁾、2006 年には、ダミー基質を用いた反応中間体の X 線構造も報告されている⁸⁾。

ホタル生物発光の分子機構として、次の発光機構が提唱されている。まず、ルシフェラーゼの作用によりホタルルシフェリン (1)がマグネシウムイオン存在下、アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate : ATP)と反応しアデニル体 4 となり、続く酸化反応により生成する中間体 B を経て不安定なジオキサノン中間体 C が形成される。これが脱炭酸を伴って分解する過程で、励起状態のオキシルシフェリン 5 を生成する。このオキシルシフェリン 5 が基底状態に遷移する際に、効率よく発光が起こる²⁾ (Scheme 1-1)。



Scheme 1-1 ホタルの生物発光反応

北アメリカ産ホタル (*Photinus pyralis*)から単離されたホタルルシフェリン (1)は、他の発光甲虫のルシフェラーゼとも交叉反応することが知られている²⁾。

ホタルの仲間の発光甲虫は共通のルシフェリン (1)から Scheme 1-1 ようにして発光するが種類により様々な色の発光を示す。たとえばヘイケボタル (*Luciola lateralis*)は黄緑色の発光を示すが、ヒカリコメツクムシ (*Pyrophorus*)は個体によって黄緑色からオレンジ色の発光を示す。鉄道虫 (*Phrixothrix*)では、1つの個体で頭部がオレンジ色、腹側部が黄緑色と場所によって色をかえる。発光色が変化する原因は、それぞれの発光甲虫により異なるルシフェラーゼがそれぞれ異なる環境場を作ることによってオキシルシフェリンの励起状態の構造や性質に影響を与えているためである。

しかしながら、これらの詳細なメカニズムはいまだ明らかになっていない。

1-4. ホタル生物発光の応用

ホタル生物発光系は、その発光効率の高さから研究・試験分野で高感度プローブとして利用されている。既存のホタル生物発光を用いたイメージングは大きく分けて4通りの方法で応用されている。

1-4-1. 天然・変異発光系を使ったイメージング

ホタル生物発光は Scheme 1-1 に示すように ATP が必須であり、ATP の量を発光で定量することができる。キッコーマン株式会社ではこの特性を利用し、微生物や細菌の増殖の検出(衛生検査)などに応用している (Fig. 1-9)。また、ホタル生物発光系が高効率で定量性が高いことから、任意のプロモーター遺伝子の下流にルシフェラーゼ発現領域を導入したプラスミドを用いた、遺伝子のレポーターアッセイにも応用されている (Fig. 1-10)。近年ではマルチカラーのルシフェラーゼを用いた、in vivo での複数の遺伝子の同時モニタリングも可能となっている。



Fig. 1-9 衛生検査キット
ルミテスターPD10N &
ルシパックワイド
(キッコーマン株式会社)



Fig. 1-10 レポーターアッセイキット
ピッカジーン
(東洋ビーネット株式会社)

1-4-2. ルシフェラーゼを修飾した分子プローブを用いるイメージング

ルシフェラーゼはNドメインとCドメインをスプリットしても、それらが相互作用可能な距離に近づくと本来のルシフェラーゼとしての機能を発現できることが明らかになっている。梅澤らは、この原理に基づいてルシフェラーゼをスプリットしスプライシング蛋白質のN末及びC末に各々結合した人工蛋白質スプリットルシフェラーゼを開発した⁹⁾。この技術により、相互作用を示すタンパク質を、リンカーを介してこのスプリットプローブのN末及びC末に結合させることで蛋白質間相互作用を評価することができる。例えば、モデルとしてインスリンにより誘起されるリン酸化されたIRS-1と、PI3KのSH2ドメインとの相互作用を用いた際には、スプリットプローブ分子に結合したIRS-1とSH2ドメインを、インスリン受容体を過剰発現させた細胞に発現させると、細胞にインスリンを添加することで、インスリン濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇し、発光する¹⁰⁾ (Fig. 1-11)。このようにスプリットルシフェラーゼシステムは、真核細胞内蛋白質間相互作用を定量評価する一般性のある方法として提唱されている。

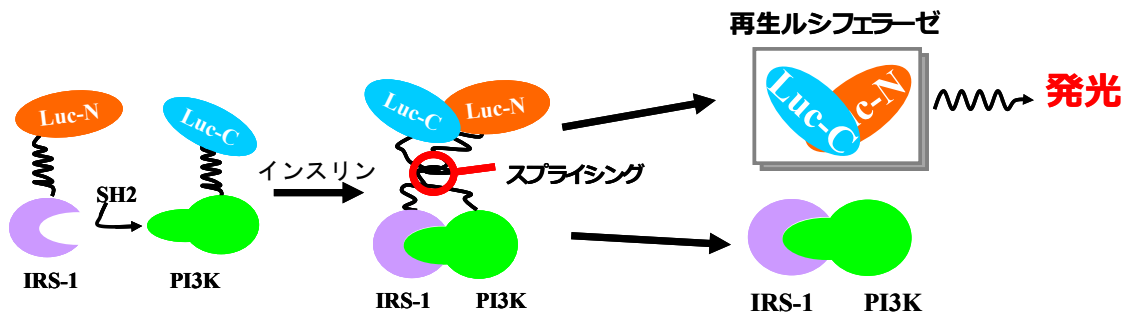


Fig. 1-11 スプリットルシフェラーゼの概念図

1-4-3. ルシフェリン誘導体を用いたイメージング

ルシフェリン誘導体を用いたイメージングは、1987年のMiskaらの報告にまで遡る¹¹⁾。Miskaらはルシフェリン前駆体として、第一酵素(プロテアーゼ)の認識部位を有しているルシフェリン誘導体を、適切な第一酵素と特定期間インキュベートすることで遊離したルシフェリンが産生し、第二酵素(ルシフェラーゼ)を加えることで発光すると報告した (Fig. 1-12)。

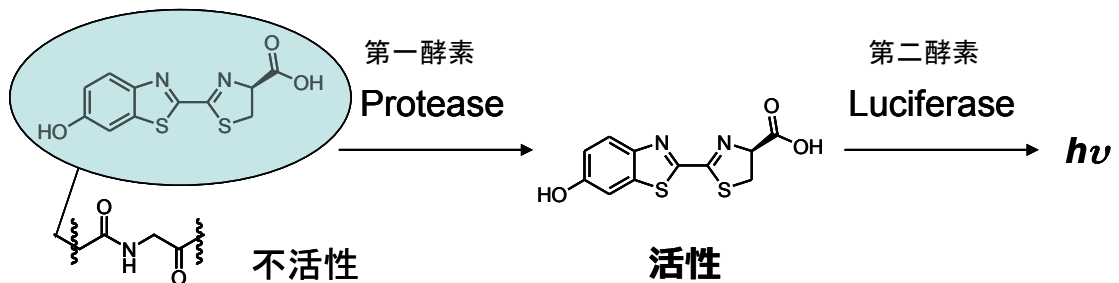


Fig. 1-12 Miska らの実験の模式図

また、2000年には西村らが、第一酵素としてガラクトシダーゼを標的とした修飾ルシフェリン (LuGal)を合成し、in vivo でガラクトシダーゼの光検出を報告した¹²⁾(Fig. 1-13)。

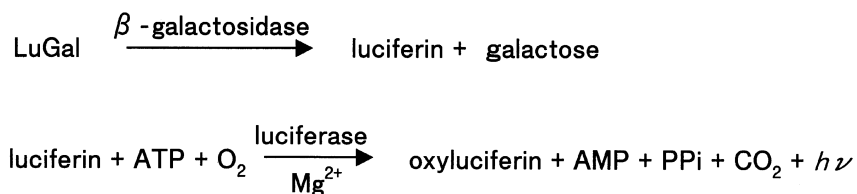


Fig. 1-13 西村らの実験の模式図

これらのルシフェリン誘導体は、第一酵素の活性に関する反応基を有しており、第一酵素の作用に応じてルシフェリンを直接生成物として生産するというものである。この方法論を受けてプロメガ社は、2005年に任意に修飾したルシフェリン前駆体を発表し、多くの第一酵素の可視化を可能にした¹³⁾。代表的なものを Fig. 1-14 に示す。

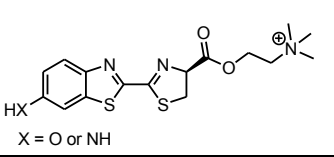
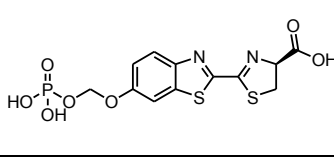
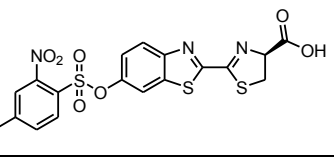
		
アセチルコリンエステラーゼ	フォスファターゼ	S-グルタチオントランスフェラーゼ

Fig. 1-14 プロメガ社のルシフェリンプローブ

一方で、長野らはアミノルシフェリンおよびN,N-ジメチルアミノルシフェリンに良好な発光が確認されることに注目し、アミン部位にN-アルキルを導入した分子を設計・合成し、そのいくつかにおいて発光を維持することを見出している¹⁴⁾。特に、アルキル基としてアミノフェネチル基を導入した分子は、ルシフェラーゼの基質になるがアミノ基が置換した電子密度の高いベンゼン環部位から発光部位のアミノルシフェリン部位への電子供与が起こり、ルシフェラーゼとの反応の結果としての発光過程が消光するという特性があり、この特性を利用してアシルトランスフェラーゼの有無を可視化することができる新規プローブを開発している (Fig. 1-15)。

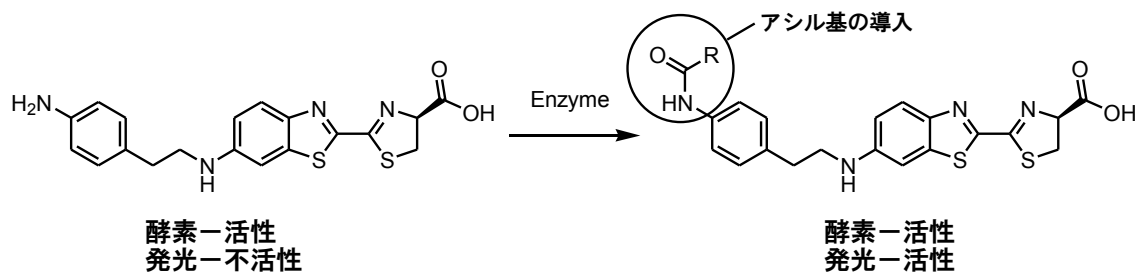


Fig. 1-15 アシルトランスフェラーゼ検出プローブ

1-4-4. 動物個体を使った生物発光 *in vivo* イメージング

in vivo イメージングは主にマウスやラット等の動物個体での細胞、遺伝子発現やタンパク質の挙動を生きのままに体外から観察する技術である¹⁵⁾。特に *in vivo* 光イメージングは特別な設備や大型機器を必要としない事と検出機器の発展により、近年急速に普及してきている。

in vivo 光イメージングには大きく分けて二通りの方法がある。

一つは、蛍光色素や蛍光タンパク質を用いた蛍光イメージング法である。蛍光イメージング技術は哺乳細胞等を用いた細胞イメージングで極めて汎用的に用いられており、蛍光顕微鏡や材料開発、イメージング技術開発が盛んに行われている。しかしながら、個体レベルのイメージングの際には、蛍光イメージング法は励起光を必要とするため励起光の届く範囲でのイメージングに限られてしまう。二光子励起を用いたイメージング方法の開発が盛んに行われているが、現在の技術では最深部でも 1 mm 程度が限度だと言われている。

もう一つが生物発光を用いたイメージング法である¹⁷⁾。生物発光を用いたイメージング法の特徴はその発光に励起光を必要としない事があげられる。このため、個体レベルの *in vivo* イメージングにおいては、生物発光イメージングがよく行われている。

この2つの光イメージング法の比較は Fig. 1-16 に示す。

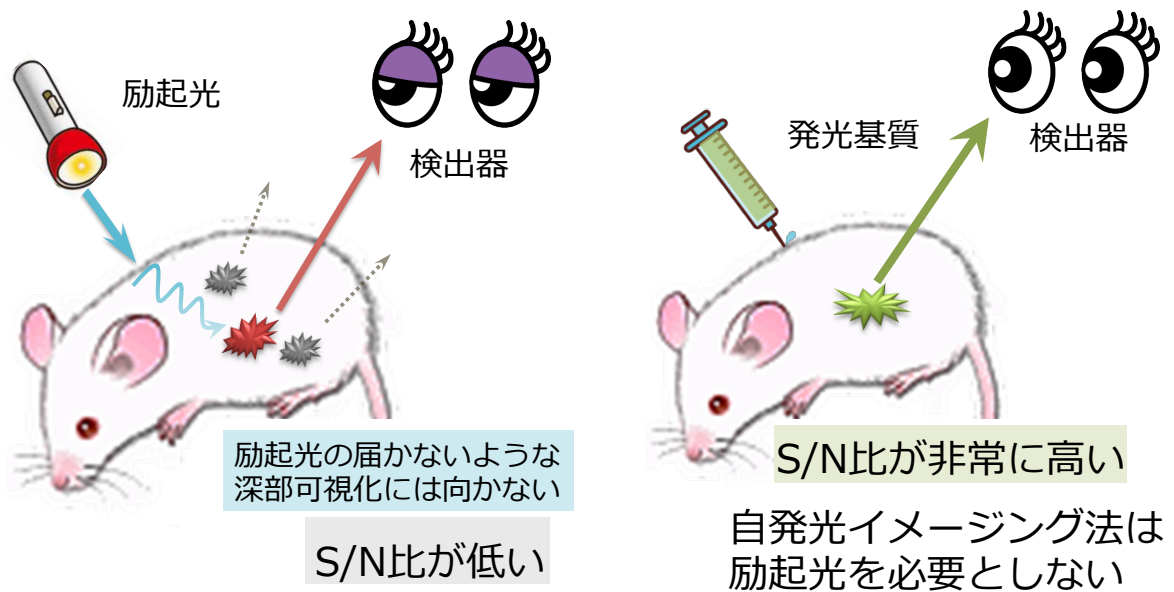


Fig. 1-16 *in vivo* 蛍光イメージングと発光イメージングの比較

個体レベルのイメージングにおいて、発光イメージング法の有用性は上に述べたとおりであるが、一方で、生物発光イメージング材料は蛍光イメージング材料と比較して、バリエーションは無いと言っても過言ではなく、多彩な発光イメージング材料の開発が望まれている。

1-5 本研究の目的

で述べたように、ホタル生物発光系はバイオイメージング分野で活躍しており、今後更なる用途への応用が期待されている。

しかし、イメージング材料としての生物発光は生物学者の多様なニーズに応えるには至っておらず、革新的な新規材料群の開発が求められている。

本研究ではホタル生物発光系の応用を大きな主題として、有機化学的なアプローチからの材料合成、性能評価、そしてバイオイメージングへの応用を行った。

本論文ではルシフェリンアナログの分子設計と合成、*in vitro*での性能評価、発光反応の解析、*in vivo* (細胞、マウスレベル)での性能評価と大きく3つのセクションに分けて記述する。

また、本研究では、実際にバイオイメージング用途で使える材料創製のため、以下に示すような生物学者との共同研究により、バイオイメージングを革新するような材料開発を目的とした (Fig. 1-17)。

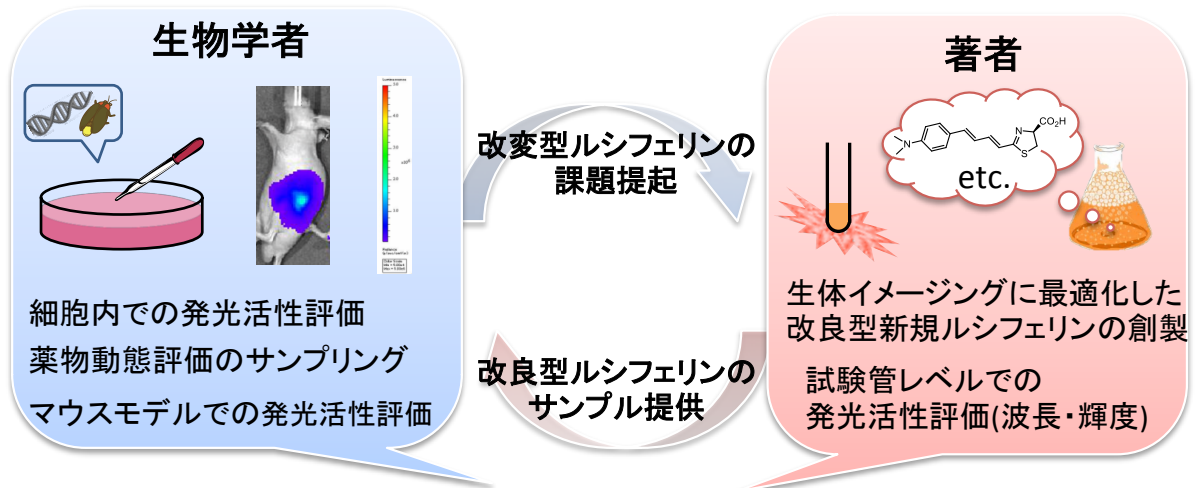
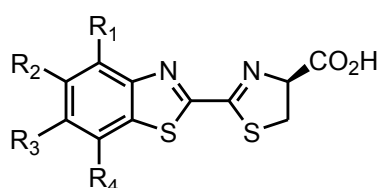


Fig. 1-17 本研究のイメージ図

第2章 ホタルルシフェリン類縁体の合成と発光活性評価

2-1. 7位置換型ルシフェリンアナログの分子設計

ベンゾチアゾール環におけるヒドロキシル基の位置を変更したアナログ **6**, **7**, **8**, **9** には発光活性がないことが報告されている。したがってヒドロキシル基の位置が発光活性に大きく影響を与えていると考えられる¹⁸⁾。



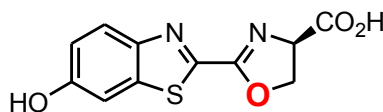
6 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = H

7 : R₂ = R₃ = R₄ = H, R₁ = OH

8 : R₁ = R₃ = R₄ = H, R₂ = OH

9 : R₁ = R₂ = R₃ = H, R₄ = OH

骨格であるチアゾリン環をオキサゾリン環に改変したアナログ **10** の発光極大波長はホタルルシフェリン **1** (λ_{\max} = 565 nm) に比べ長波長シフトした (λ_{\max} = 580 nm, **10**) が、一つの原子の違いで発光強度は大きく低下した¹⁸⁾。このことから、チアゾリン環の硫黄原子は発光活性に大きく影響を与えていると予想される。

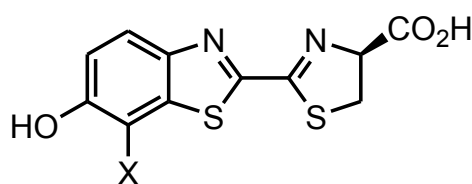


10

さらにチアゾリン環の一部を、発光活性を保ったまま改変するのは合成的に困難なため、これまでの研究ではベンゾチアゾール環の改変に焦点を絞り様々なルシフェリンアナログの合成を行ってきた²⁰⁾。

本項ではこれまで行われていなかったベンゾチアゾール環上 (7 位) に対する置換基導入が発光活性に与える影響を調べるために合成したアナログについて記述する。

置換基としては、原子半径にバリエーションがあり、電子吸引性置換基としても電子供与性置換基としても働く可能性のあるハロゲン (フッ素、塩素、臭素、ヨウ素) を導入した類縁体 **11**~**14** を合成する事とした。また、共同研究者により合成された7位にアリル基を導入した類縁体 **15** も用いた。加えて類縁体の発光活性の比較としてホタルルシフェリン (**1**) の合成も行った。



1: X = H

11: X = F

12: X = Cl

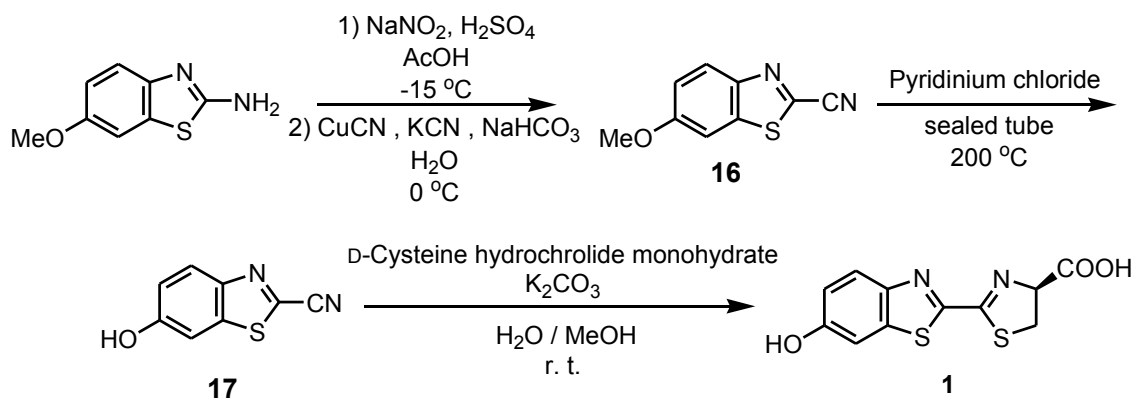
13: X = Br

14: X = I

15: X = Allyl

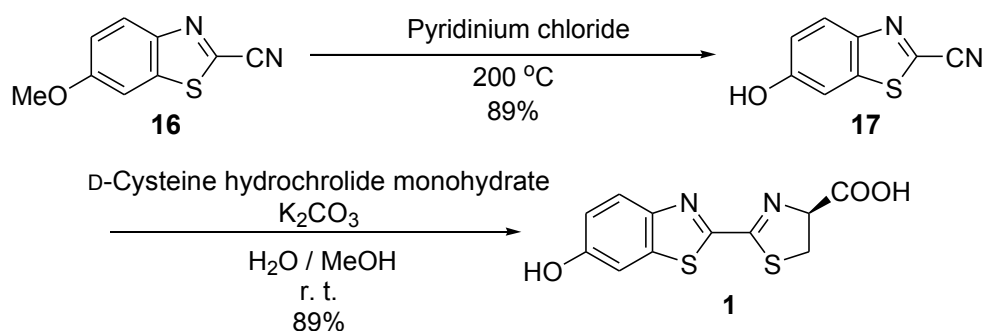
2-2. ホタルルシフェリン (1) の合成

ホタルルシフェリン (1) の合成は 1961 年に White らにより初めて報告²⁰⁾ され、その後、合成経路の改善が報告されている。最近では、1992 年に戸谷らにより簡便な合成経路が報告²¹⁾ されており (Scheme 2-1)、本研究ではこの合成法に従った。



Scheme 2-1 戸谷らのホタルルシフェリン (1) の合成

まず、合成中間体である市販の 2-シアノ-6-メトキシベンゾチアゾール (16) のメトキシ基を、ピリジン塩酸塩を用いてヒドロキシル基とし、フェノール体 17 を調製する事とした。フェノール体 17 は市販されているが、高価であるため、前駆体である 16 からの合成を行った。戸谷らは反応に封管を利用しているが、封管の使用には危険が伴うため、常圧条件下でのピリジン塩酸塩溶融反応による脱保護を検討した。しかし、長時間の反応では分解物が生成された。そこで反応時間を短縮し、未反応の原料を回収する事とした。結果として、収率は若干低下するが変換収率では遜色なかった。得られたフェノール体 17 に炭酸カリウムを用いて D-システイン塩酸塩一水和物を環化付加させ、高収率でホタルルシフェリン (1) を得た (Scheme 2-2)。

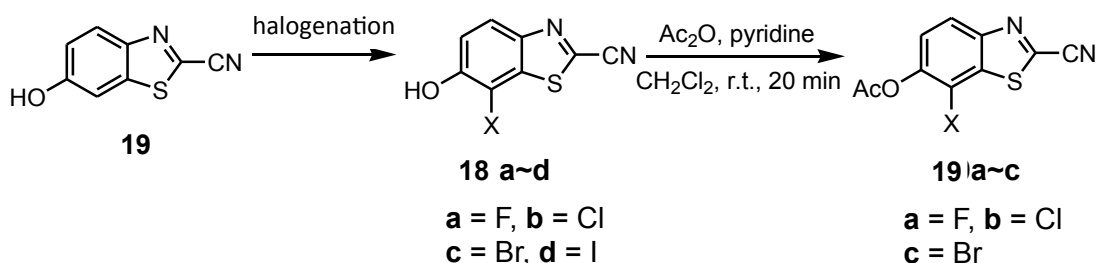


Scheme 2-2 本研究で用いたホタルルシフェリン (1) の合成

2-3. 7位置換型ルシフェリンアナログ 11~14 の合成

化合物 11~14 についても、2-2. で用いたチアゾリン環形成法を用いることで合成する事とした。

化合物 12~14 の合成は市販のフェノール体 17 を出発原料 (17 は非常に高価なため、実際は 16 から合成した) とし、N-X-スクシイミド (X = Cl, Br, I) を用いて 7 位をハロゲン化し化合物 18b~d 得た。しかしながら、この得られた化合物のうちクロロ体 18b、ブromo 18c は原料との分離がカラム上では困難であったため、フェノール性水酸基をアセチル基で保護する事で単一の生成物 19b、19c として分取した。化合物 11 に関しては、1-フルオロピリジニウムトリフルオロメタンスルホネート (NFPY-OTf) を用いてフッ素化を行いフルオロ体 18a 得た。続いて、フェノール性水酸基をアセチル基で保護する事で単一の生成物 19a を得た (Scheme 2-3, Table 2-1)。

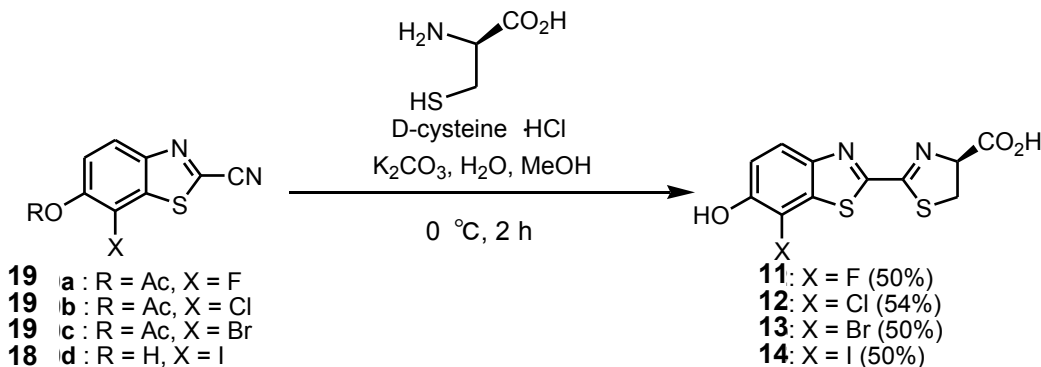


Scheme 2-3 7位置換ルシフェリン中間体 18d, 19a~c

Table 2-1 中間体 18d, 19a~c の合成収率

X	ハロゲン化剤 (当量)	溶媒	温度	反応時間	収率
F	NFPY-OTf (3)	C ₂ H ₄ Cl ₂	95 °C	72 h	23% (19a)
Cl	NCS (1)	MeCN	r. t.	1 h	80% (19b)
Br	NBS (1)	MeCN	r. t.	1 h	76% (19c)
I	NIS (1)	MeCN	r. t.	3 h	99% (18d)

得られたハロゲン化体 18d, 19a~c を塩基として炭酸カリウムを用いて D-システイン塩酸塩との縮合環化により、目的の生成物であるハロゲン化ホタルルシフェリン 11~14 を得た。



Scheme 2-4 7-ハロゲン化ホタルルシフェリン 11~14 の合成

2-4. 7 位置換型ルシフェリンアナログの発光測定

2-4-1. 生物発光強度の測定

合成したホタルルシフェリン **1** とホタルルシフェリン類縁体 **11~15** の発光測定を行った。基質、酵素ルシフェラーゼとして北米産ホタル (*Photinus pyralis*, Ppy) 由来のルシフェラーゼ Ppy を用い ATP, Mg⁺存在下で 30 秒間発光測定を行った。基質 **1**, **11~15** の発光強度の推移を以下に示した (Fig. 2-1)。

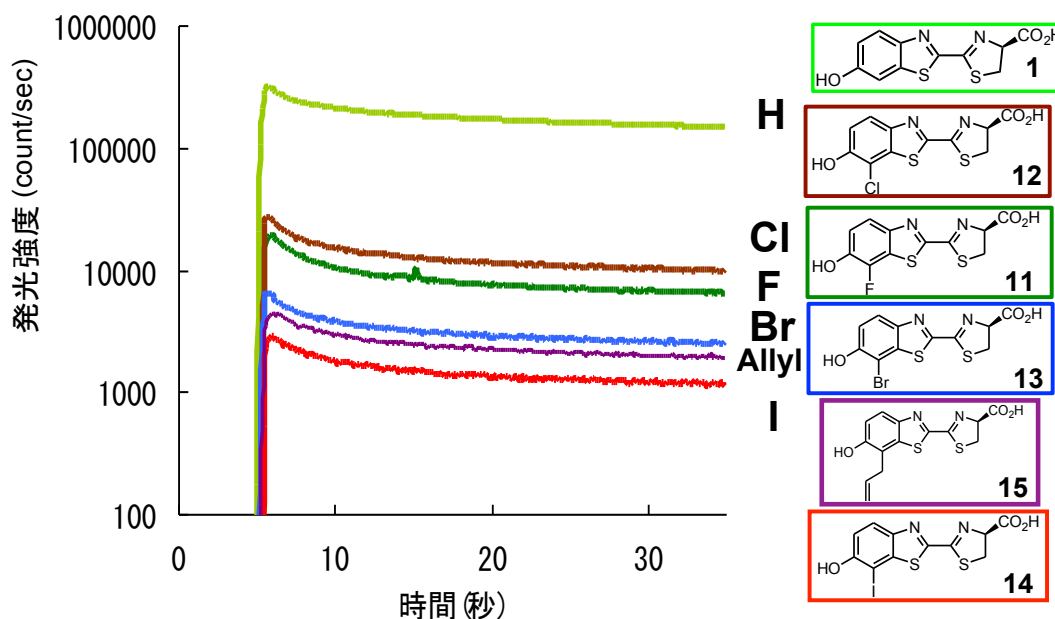


Fig. 2-1 ホタルルシフェリン **1** と 7 位置換型アナログ **11~15** の 30 秒間の発光経時変化を示した (基質濃度はいずれも 20 μ M)

酵素として Ppy を用いた時のホタルルシフェリン **1** の 30 秒の発光積算値を 1 として類縁体 **11~15** の発光強度と比較した (Table 2-2)。

Table 2-2 ホタルルシフェリン **1** の 30 秒間の発光積算値を 1 とした場合の 7 位置換型アナログ **11~15** の発光比活性を示した

基質	1 (X = H)	11 (X = F)	12 (X = Cl)	13 (X = Br)	14 (X = I)	15 (X = Allyl)
発光活性	1	1/20	1/15	1/50	1/100	1/70

類縁体 **11~15** の発光強度はホタルルシフェリン **1** の発光強度と比較して 1/20~1/100 程度の発光強度であった。

この結果より、7 位に置換基を導入した類縁体 **11~15** は発光活性を有する事がわかった。また、置換基の原子、または分子の半径が大きくなるに従って、発光活性が減少していく傾向が見られた。

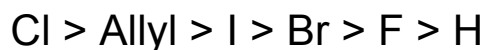
2-4-2 ミカエリス定数の測定

基質とルシフェラーゼとの親和性を検証するため、ミカエリス定数 (K_m) を測定した。総発光量を反応の初速度 (v_0) とし、基質濃度に対する v_0 を Lineweaver-Burk プロットし、 K_m と V_{max} の値を決定した。まず、酵素 Ppy と基質 **1**, **11~15** との K_m と V_{max} の値を Table 2-3 に示した。

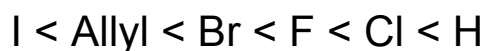
Table 2-3 酵素 Ppy と基質 **1**, **11~15** とのミカエリス定数 (K_m) と V_{max} を示した

	基質濃度 (μM)	酵素濃度 (mg/ml)	K_m (μM)	V_{max} (count/30sec)
H (1)	0.8~12	0.00002	22.0 ± 2.1	2.9×10^7
F (11)	1.25~100	0.002	37.8 ± 3.4	1.8×10^6
Cl (12)	5~100	0.002	120.7 ± 17	6.6×10^6
Br (13)	2~20	0.002	44.8 ± 4.8	7.4×10^6
I (14)	2~100	0.002	66.7 ± 15.6	6.7×10^6
Allyl (15)	0.8~80	0.002	86.0 ± 9.0	1.3×10^6

得られた K_m 値の順に並べると以下のようになった。



発光活性は



このように、発光活性と K_m は Cl 置換体を除いて相関を示した。Cl 置換体は最も発光活性が高かったが、ルシフェラーゼとの親和性は低い事が示唆された。

発光活性の低かった Br 置換体 (**13**) や I 置換体 (**14**) においては重原子効果による蛍光量子収率の低下を加味する必要がある。このため、これら2つのアナログは化合物そのものの Φ_{FL} の低下のために発光活性が低くなってしまっていると考えられる。

一方で Cl 置換体 (**12**) の発光活性の高さの理由はわからないが、 K_m 値が飛び抜けて大きいなどイレギュラーな化合物であると考えられる。

2-4-3. 生物発光波長の測定

合成したホタルルシフェリン **1** とホタルルシフェリン類縁体 **11~15** の発光波長の測定を行った。第4節第1項の測定と同様に、基質、酵素ルシフェラーゼとして Ppy を用い ATP, Mg⁺ 存在下で測定を行った。基質 **11~15** の生物発光スペクトルの推移を以下に示した (Fig. 2-2)。

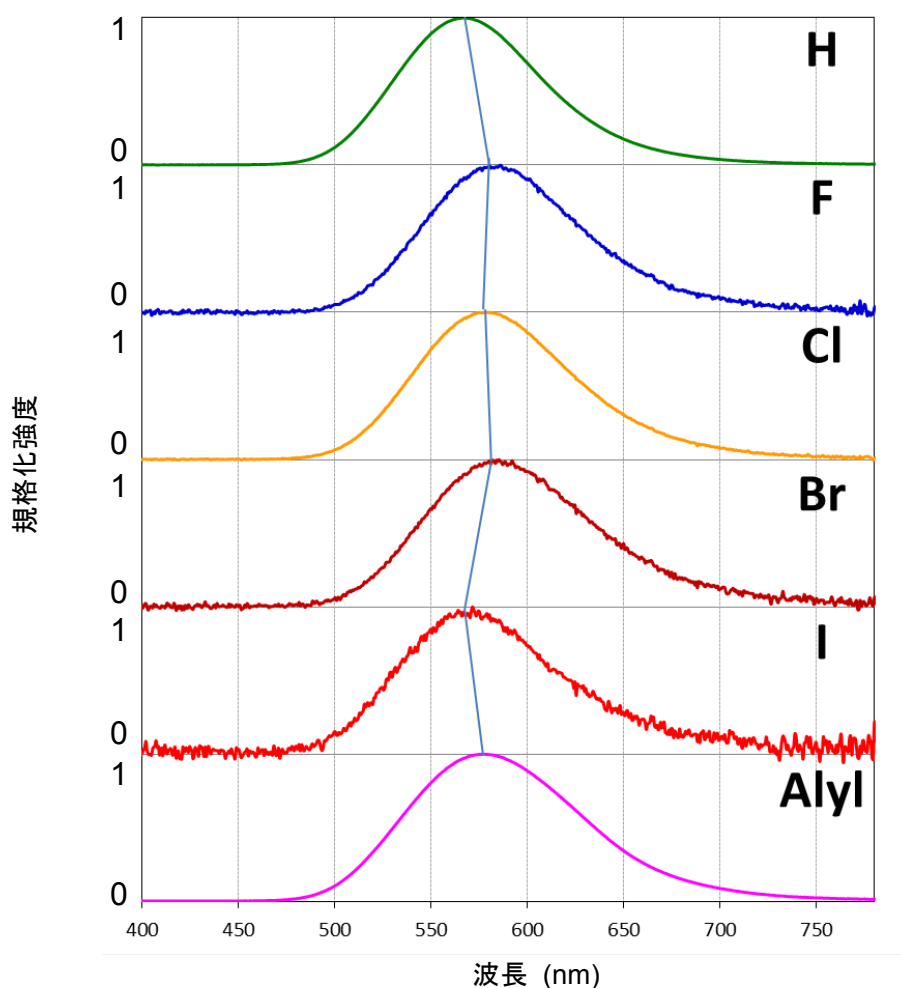


Fig. 2-2 基質 **1**, **11~15** の生物発光スペクトル (酵素 Ppy, 発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 2-4 基質 **1**, **11~15** の生物発光極大波長

	λ_{\max}		λ_{\max}
H (1)	565 nm	Br (13)	585 nm
F (11)	585 nm	I (14)	570 nm
Cl (12)	580 nm	Allyl (15)	580 nm

酵素として Ppy を用いた場合のホタルルシフェリン (**1**) の生物発光波長は 565 nm であるのに対し、7 位置換型アナログ **11~15** の生物発光波長は概ね 570~585 nm と波長の変化は 20 nm 程度であった (Table 2-4)。

2-5. ホタルルシフェリンに対する 7 位置換基導入の効果

ホタルルシフェリンと発光との構造活性相関を明らかにすべく、ホタルルシフェリン (1) のベンゾチアゾール環上 7 位に各種置換基を導入したルシフェリンアナログ 11~15 (Fig. 2-3) の合成を行い、以下の新たな知見が得られた。

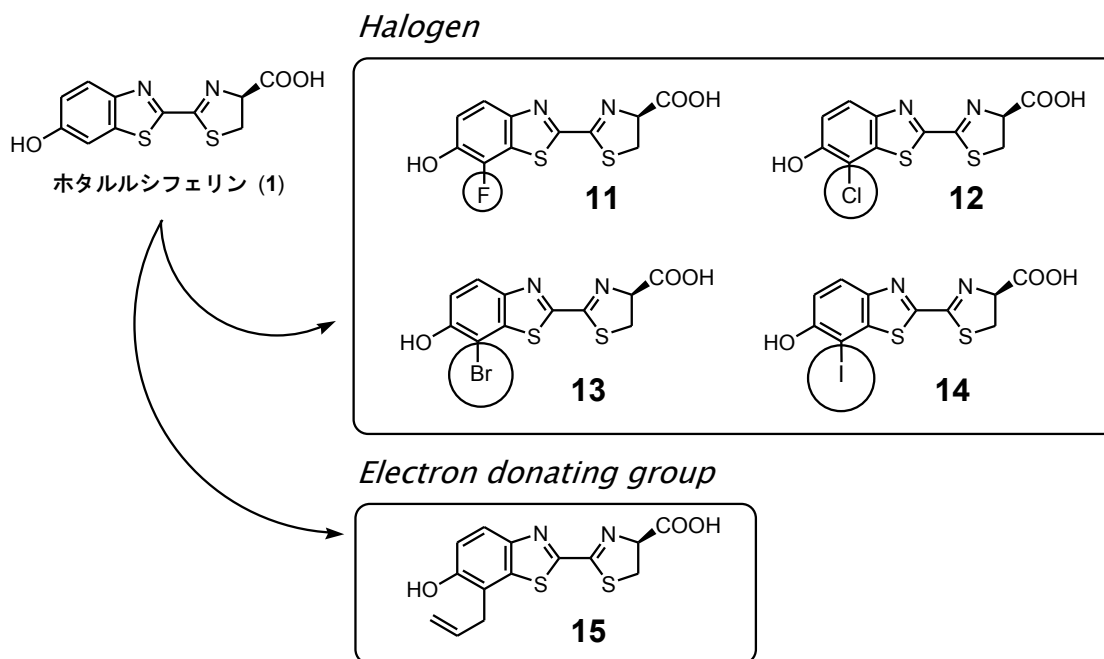


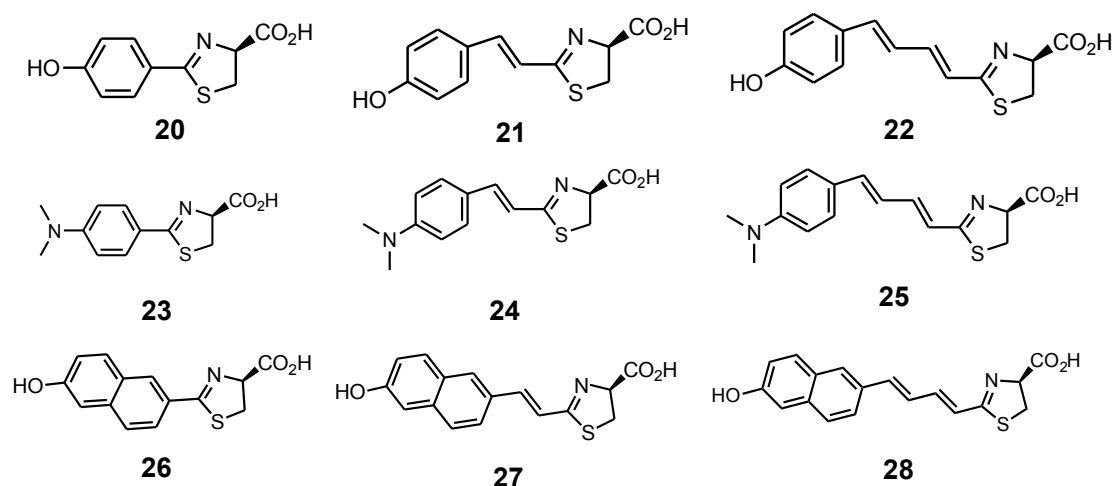
Fig. 2-3 7 位置換型ルシフェリンアナログ

ベンゾチアゾール環上 7 位を、電子的もしくは立体的に置換しても Ppy に対して発光活性を保持することを見出した。また、生物発光量と立体因子の間には何らかの相関が認められることから、7 位近傍の酵素内環境には比較的余裕のある空間が存在し、7 位が置換されていても柔軟に受け入れていると考えられる。それを裏付けるようにミカエリス定数 (基質ルシフェラーゼ間の親和性) と、生物発光量にも良い相関が確認され、Ppy は 7 位置換基を何らかの形で認識している可能性がある。しかしながら、厳密にはルシフェラーゼ内では発光に至るまで複数の反応があり、その中間体である各基質の AMP 体やオキシルシフェリン (5) の、ルシフェラーゼに対する親和性や、オキシルシフェリンの Φ_s や Φ_F など加味する必要があるため、ミカエリス定数はあくまでも指標の 1 つであることを言及しておく。

2-6. π 共役伸長型ルシフェリンアナログの分子設計

2-1.でも述べたように、チアゾリン環をオキサゾリンに変換したアナログ **10** の生物発光極大はホタルルシフェリン (**1**) に比べ長波長シフトしたものの、発光強度が著しく低下した。このことからチアゾリン環の硫黄原子は発光活性に大きく関わっていると予想される。このため、ベンゾチアゾール環の改変に焦点を絞り分子設計を行なった。発光種であるオキシルルシフェリンの π 共役系を調節することで発光極大の制御を目指した。

本研究では、 π 共役伸長型アナログとして以下の化合物の発光活性を測定することとした。アナログ **20~22** はそれぞれホタルルシフェリン (**1**) の左側環部、ベンゾチアゾール環について、アナログ **20** は窒素原子と硫黄原子、アナログ **21** は硫黄原子のみを省き、 π 共役系の短縮を試みている。アナログ **22** については π 共役系の伸長を試みた。置換基として OH 基 (アナログ **20~22**)、NMe 基 (アナログ **23~25**) の二種類を用いた。またナフタレン構造を有する以下の様なアナログ (アナログ **26~28**) も用いて、 π 共役系の伸長による発光波長の制御を目指した。



2-7. π 共役伸長型アナログの生物発光活性評価

2-7-1. フェノール型アナログ **20**, **21**, **22** の生物発光スペクトル

共同研究者により合成¹⁹⁾されたアナログ **20**, **21**, **22** についての発光波長を測定した。基質、酵素 Ppy、ATP、マグネシウムイオン存在下で 180 秒間測光した。各基質の発光スペクトルを以下に示す (Fig. 2-4)。

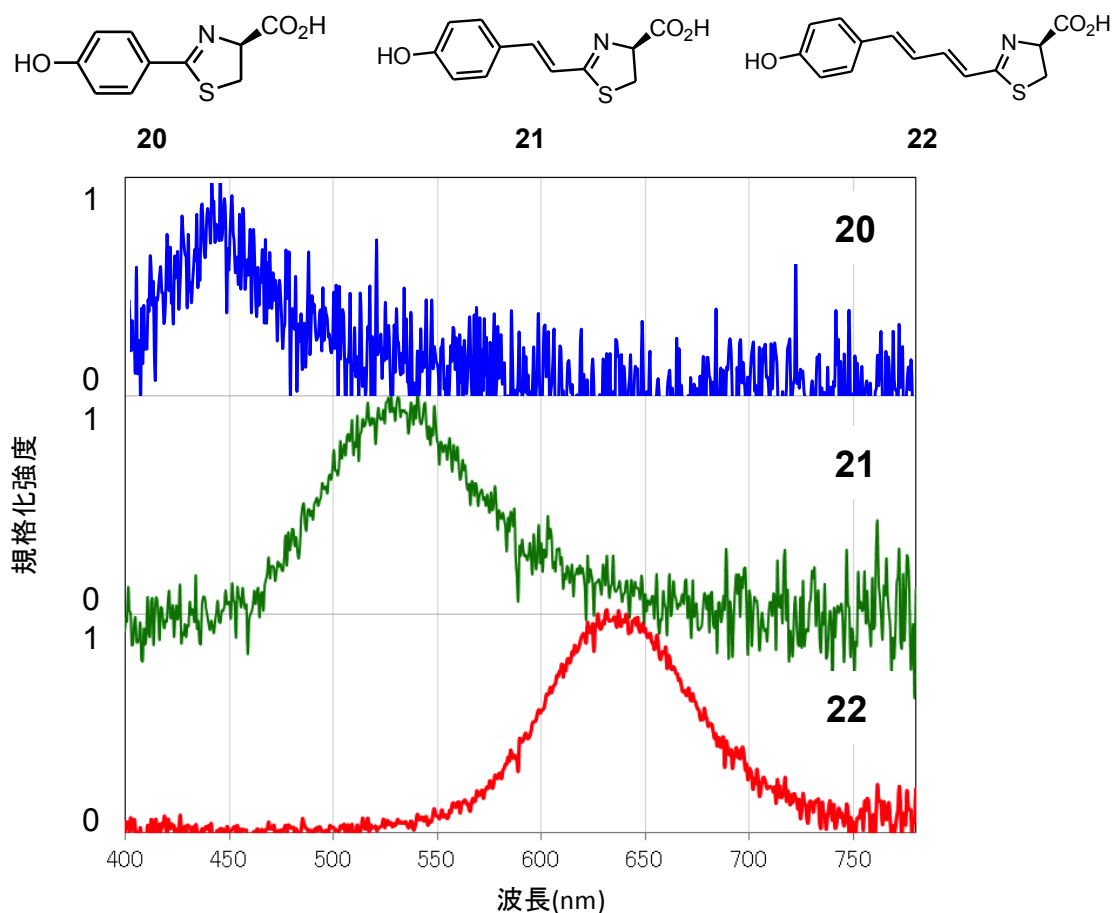


Fig. 2-4 フェノール型アナログ **20**, **21**, **22** の生物発光スペクトル (酵素 Ppy を用いた場合の発光スペクトルで、スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 2-5 フェノール型アナログ **20**, **21**, **22** の生物発光極大波長

	λ_{\max}
20	440 nm
21	530 nm
22	640 nm

アナログ **20**, **21**, **22** の発光極大は **20** が 440 nm、**21** が 530 nm、**22** が 640 nm であった (Table 2-5)。フェノールとチアゾリン環との間に一つ二重結合を導入するごとにおよそ生物発光波長の 100 nm の長波長シフトが観測された。

2-7-2 ジメチルアミノ型アナログ **23**, **24**, **25** の生物発光スペクトル

共同研究者により合成¹⁹⁾されたホタルルシフェリンと各アナログ **23**, **24**, **25** についての発光波長を測定した。

基質、酵素 Ppy、ATP、マグネシウムイオン存在下で 180 秒間測光した。各基質の発光スペクトルを以下に示す (Fig. 2-5)。

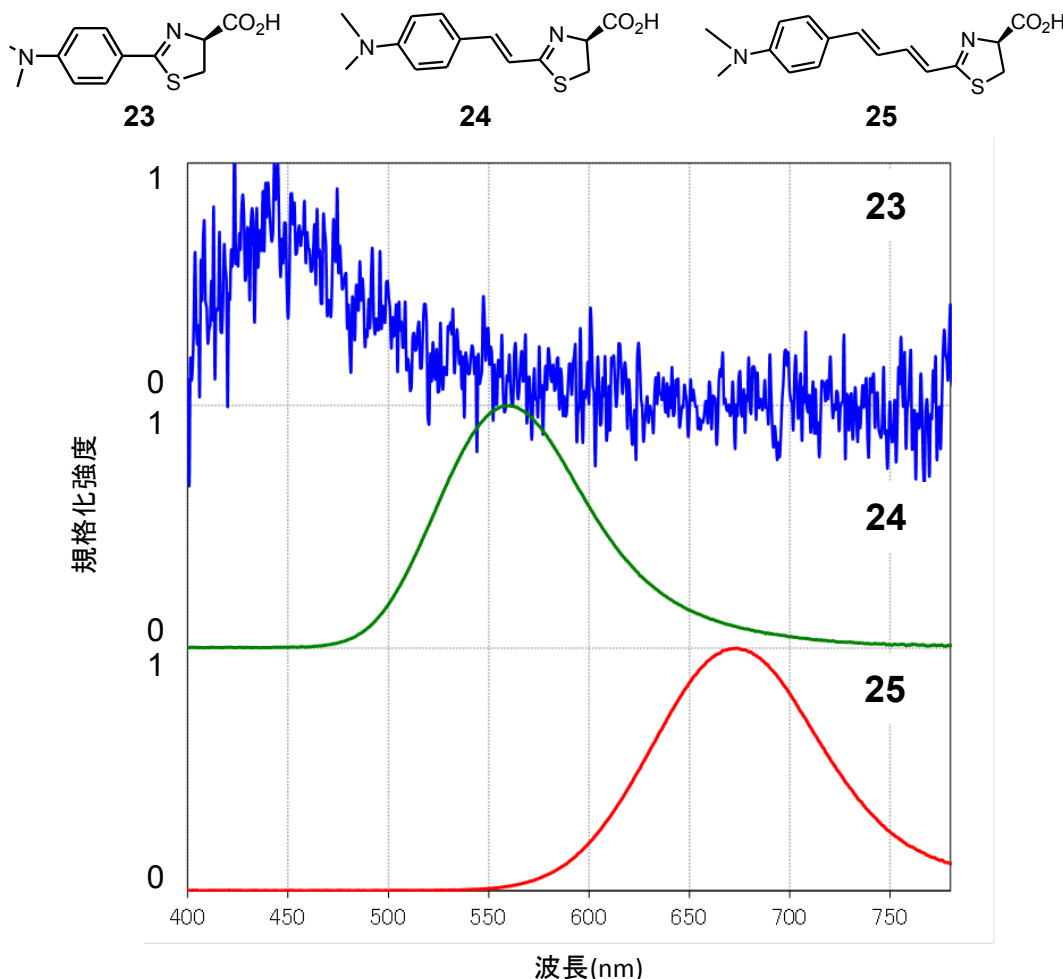


Fig. 2-5 ジメチルアミノ型アナログ **23**, **24**, **25** の生物発光スペクトル (酵素 Ppy を用いた場合の発光スペクトルで、スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 2-6 ジメチルアミノ型アナログ **23**, **24**, **25** の生物発光極大波長

	λ_{\max}
23	445 nm
24	560 nm
25	675 nm

アナログ **23**, **24**, **25** の発光極大は **23** が 445 nm、**24** が 560 nm、**25** が 675 nm であった (Table 2-6)。フェノール型のアナログと同様に二重結合が一つ増えるごとにおよそ 100 nm ずつの長波長シフトが観測された。

2-7-3. ナフトール型アナログ **26**, **27**, **28** の生物発光強度

共同研究者により合成された¹⁹⁾ アナログ **26**, **27**, **28** についての発光波長を測定した。基質、酵素 Ppy、ATP、マグネシウムイオン存在下で 180 秒間測光した。各基質の発光スペクトルを以下に示す (Fig. 2-6)。

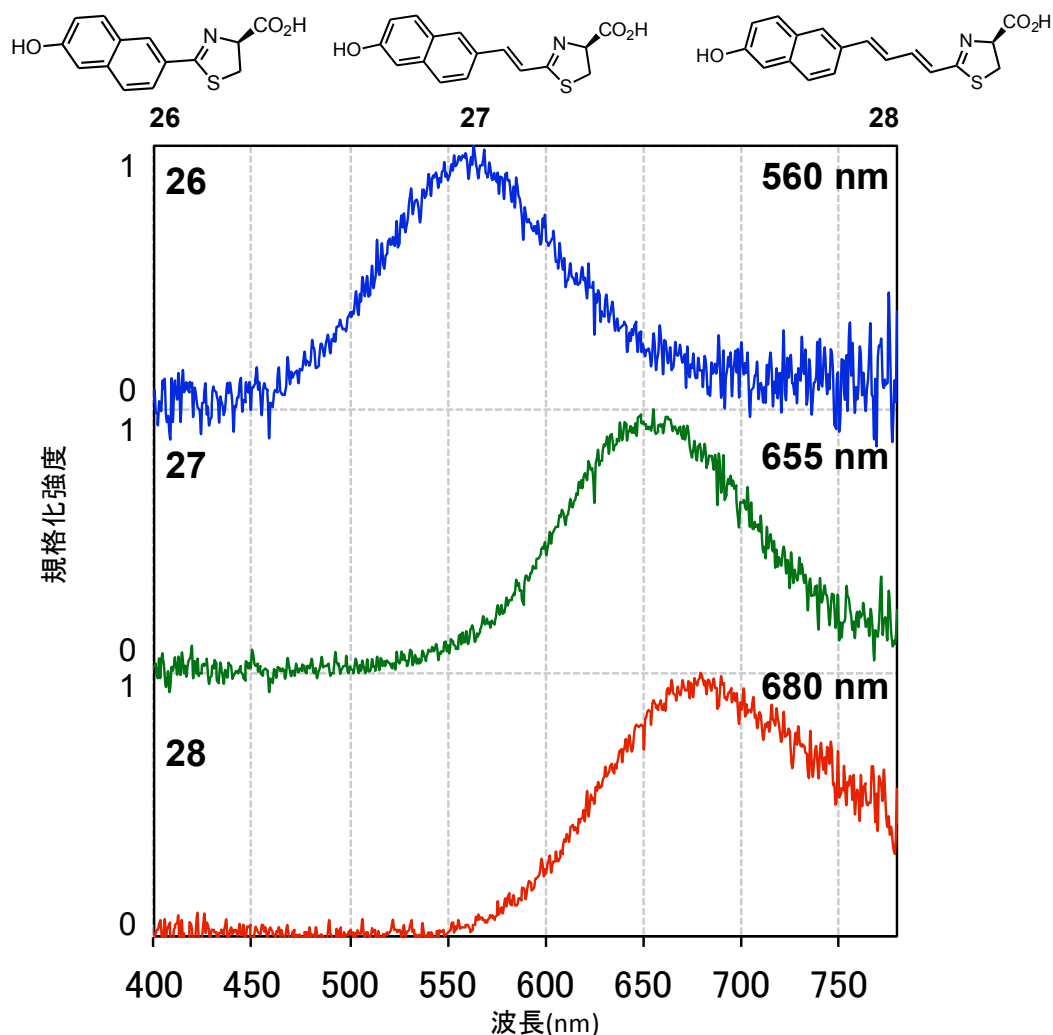


Fig. 2-6 ナフトール型アナログ **26**, **27**, **28** の生物発光スペクトル (酵素 Ppy を用いた場合の発光スペクトルで、スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

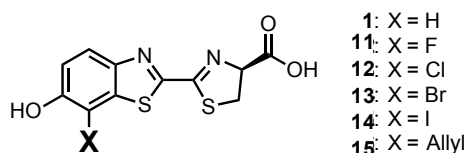
Table 2-7 ナフトール型アナログの生物発光極大波長

	λ_{\max}
26	560 nm
27	655 nm
28	680 nm

アナログ **26**, **27**, **28** の発光極大は **26** が 560 nm、**27** が 655 nm、**28** が 680 nm であった (Table 2-7)。ナフトールとチアゾリン環の間の二重結合を一つ導入した場合には 95 nm 長波長シフトしていた。ナフトールとチアゾリン環の間の二重結合を二つ導入した場合には 120 nm 長波長シフトしていた。アナログ **28** においては、二重結合を二つ導入したにもかかわらず、120 nm の長波長シフトとこれまでの知見と異なる結果が得られた。

2-7-4. 7位置換ルシフェリンアナログとπ共役伸長型ルシフェリンアナログの生物発光波長まとめ

7位にハロゲンとアリル基を導入したアナログ2~6では565 nmから585 nmと最も波長がシフトしたのもでも20 nm程度の長波長シフトであった。このことからホタルルシフェリンの7位に置換基を導入することでは生物発光波長にはそれほど影響がないということが分かった。



次に、ホタルルシフェリンと大きく化学構造の異なるπ共役伸長型アナログの生物発光波長は以下に示すようになった (Fig. 2-7)。

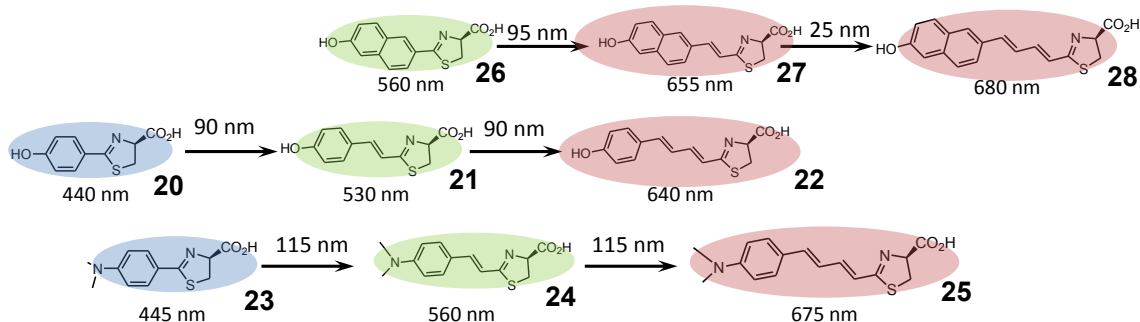


Fig. 2-7 アナログの生物発光極大波長 (Ppy) とその相関

Fig. 2-7に示すように二重結合を一つ導入することによおよそ100 nmの長波長シフトが観測された¹⁹⁾。一方でナフトールジエンアナログ28においてはナフトールモノエンアナログ27と比べ、波長のシフトは30 nmの長波長シフトにとどまっていた。

一般的には二重結合を一つ導入することによる波長のシフトは30 nmの長波長シフト程度と言われており、上記のπ共役伸長型アナログで観測された二重結合一つにつき100 nmもの長波長シフトは酵素ルシフェラーゼの作用が関わっていると考えられる。

第三章では、酵素ルシフェラーゼを使った生物発光波長と塩基を使って発光させる化学発光波長を比較し、酵素ルシフェラーゼが発光波長に与える影響についての研究を行った。

第3章 生物発光波長と化学発光波長の相違 (酵素シフト)

ホタル生物発光のメカニズムについてはいまだ解明されていないことが多くあり学術的な興味でも多くの研究者たちをひきつけている。なかでも様々な発光甲虫が緑色からオレンジ色に至る様々な色の発光を示すメカニズムについてはいろいろな仮説が提唱されているが、どれも明解な結論にはいたっておらず未解明のままである。またホタルルシフェリンメチルエステル化体 (27) は化学発光する事がよく知られているが、その化学発光波長は 625 nm と発光種が同一であるにもかかわらず、生物発光波長とは大きく異なることがわかっている (Fig. 3-1)。

本項では、この化学発光波長をルシフェリンそのものが持つ潜在的な発光波長と定義し、生物発光波長と化学発光波長との差を酵素ルシフェラーゼにより変化する波長シフトと考えた。これを「酵素シフト」と定義し、当研究室の有する基質アナログにおける酵素シフトを調べることで、ホタル生物発光色制御機構、つまりホタル生物発光系の発光色に与える酵素の影響についての研究を行った。

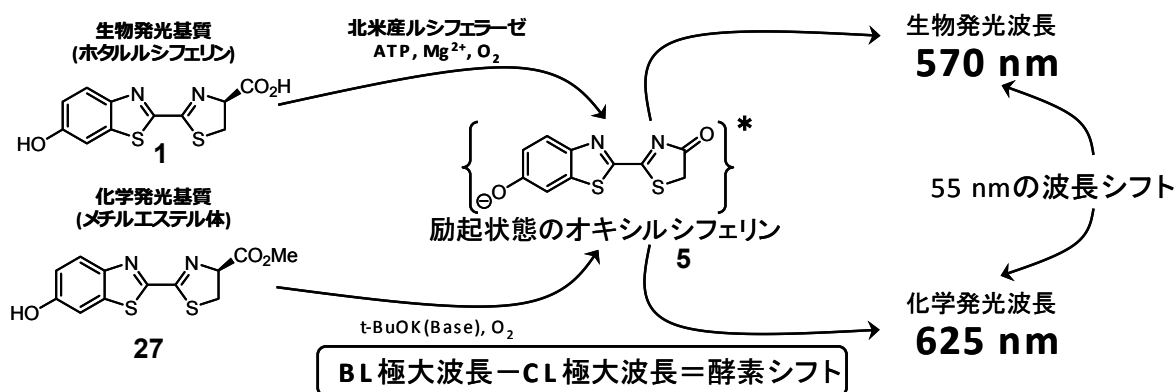
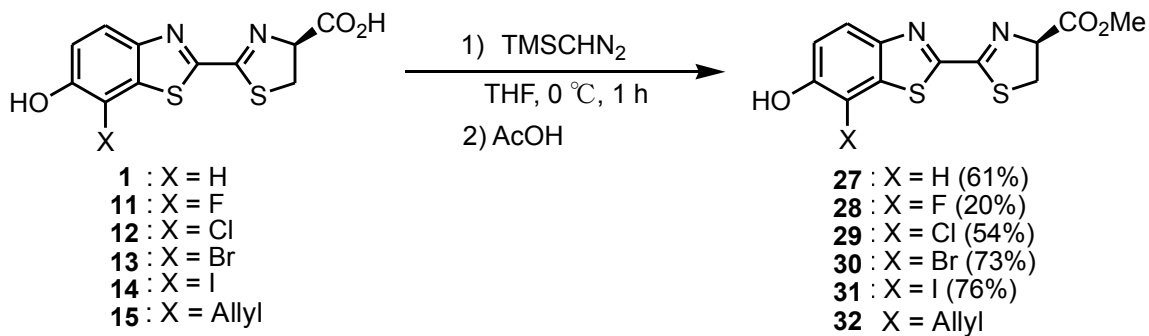


Fig.3-1 酵素がホタル生物発光色に与える影響 (酵素シフト)

第二項で筆者が合成した 7 位置換型ルシフェリンアナログに加えて、さらに当研究室で有している様々なルシフェリンアナログを用いて置換基の影響やルシフェリンの構造の変化が酵素シフトにどのような影響を与えるかを系統的に理解することを目的とした。酵素シフトの指標を得る事ができれば、量子化学計算等により比較的簡単に予測できる化学発光波長と組み合わせることで、これまでブラックボックスであった生物発光波長の予測が可能になると考え、研究を進めた。

3-1. 化学発光基質の合成 (ルシフェリンアナログのメチルエステル化)

化学発光の測定を行う際に用いるメチルエステル体の合成を行った。
メチルエステル体 **27~32** の合成は化合物 **1~5** それぞれとトリメチルシリルジアゾメタンを
反応させ合成した (Scheme 3-1)。



Scheme 3-1 ルシフェリンアナログのメチルエステル化体の合成

3-2. ホタルルシフェリンおよびルシフェリンアナログの化学発光波長測定

3-2-1. 7位置換型アナログの化学発光スペクトル

7位に置換基を導入したアナログ **11**~**15** ではCL 極大波長に置換基導入の効果による大きな波長のシフトは観測されなかった (Fig. 3-2, Table 3-1)。ホタルルシフェリン (**1**) 骨格のベンゼン環上への置換基導入は発光波長への影響は少ない事がわかった。

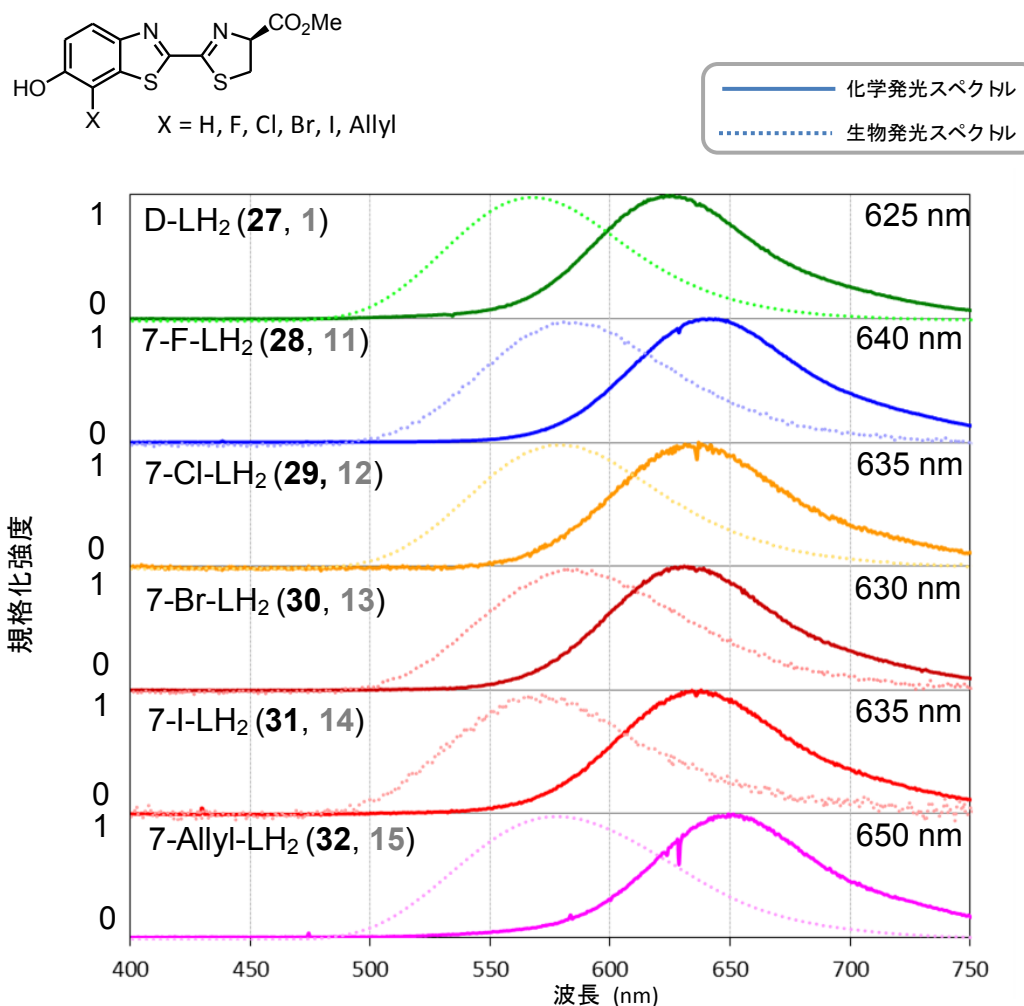


Fig. 3-2 7位置換型アナログの化学発光スペクトルを実線で、生物発光スペクトルを破線で示した (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 3-1 基質 **1**, **11**~**15** の発光スペクトルと酵素シフト

	CL 極大波長	酵素シフト	BL 極大波長
D-LH ₂ (27 , 1)	625 nm	60	565 nm
7-F-LH ₂ (28 , 11)	640 nm	55	585 nm
7-Cl-LH ₂ (29 , 12)	635 nm	55	580 nm
7-Br-LH ₂ (30 , 13)	630 nm	45	585 nm
7-I-LH ₂ (31 , 14)	635 nm	65	570 nm
7-Allyl-LH ₂ (32 , 15)	650 nm	70	580 nm

3-2-2. ジメチルアミノ型アナログの化学発光スペクトル

アナログ **33**, **23** では CL 極大波長が 540 nm であったのに対し、BL 極大波長は酵素の影響 (酵素シフト) により 95 nm 短波長シフトした 445 nm であった。アナログ **34**, **24** では CL 極大波長と BL 極大波長に大きな差はなかった、すなわち、酵素による影響 (酵素シフト) をほとんど受けていなかった。アナログ **35**, **25** は CL 極大波長がアナログ **34**, **24** に比べ 30 nm 長波長シフトし、BL 極大波長はさらに酵素の影響 (酵素シフト) により 60 nm 長波長シフトした 675 nm であった (Fig. 3-3, Table 3-2)。

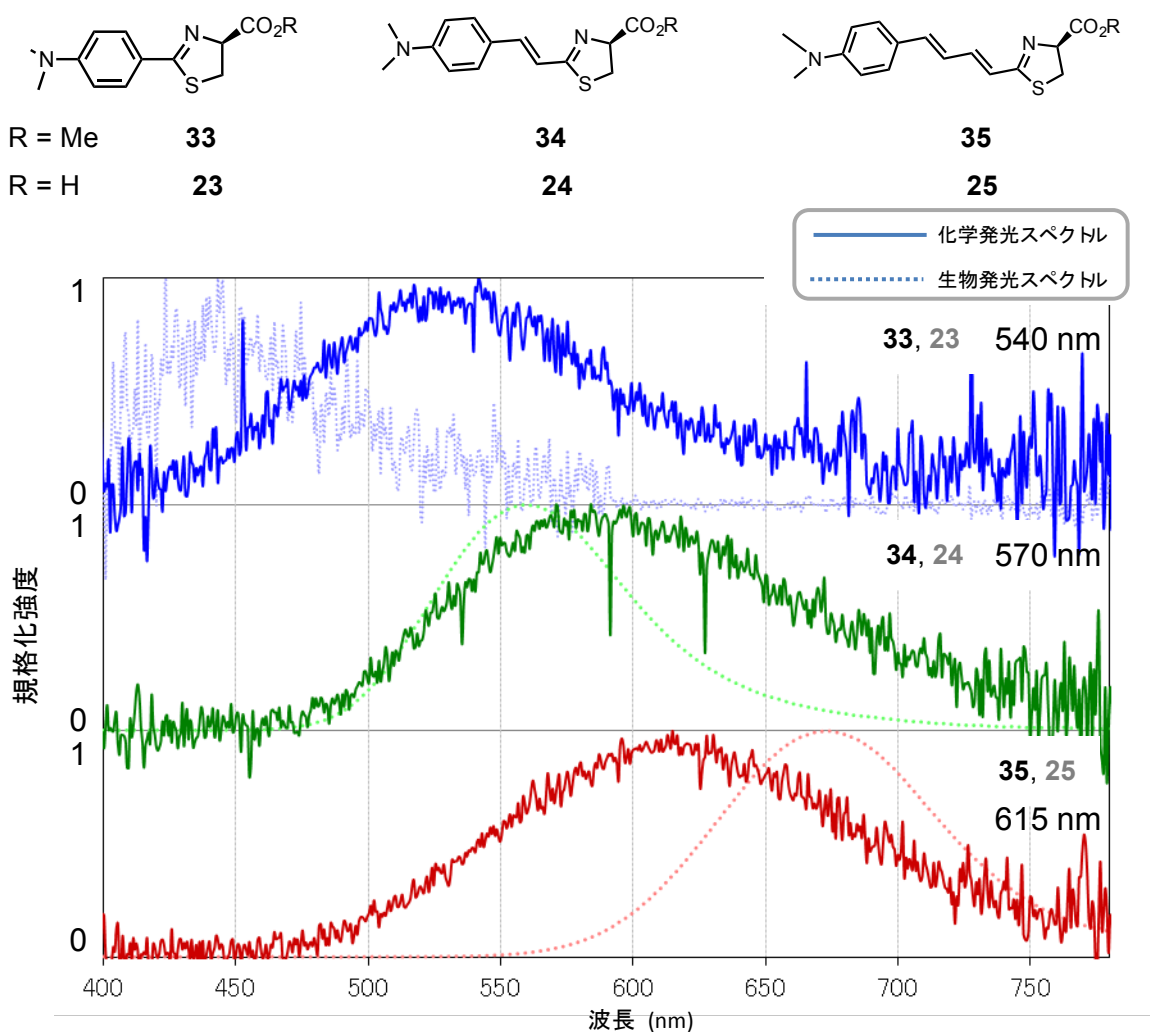


Fig. 3-3 ジメチルアミノ型アナログの化学発光スペクトルを実線で、生物発光スペクトルを破線で示した (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 3-2 ジメチルアミノ型アナログの発光スペクトルと酵素シフト

	CL 極大波長	酵素シフト	BL 極大波長
33, 23 (n = 0)	540 nm	95 nm	445 nm
34, 24 (n = 1)	570 nm	10 nm	560 nm
35, 25 (n = 2)	615 nm	60 nm	675 nm

3-2-3. ナフトール型アナログの化学発光スペクトル

化学発光波長はナフタレン環とチアゾリン環との間に二重結合を一つ導入することで約 30 nm のレッドシフトが観測された。アナログ **36**, **26** では酵素シフトはほとんど観測されなかった。アナログ **37**, **27** では一つ二重結合を導入したことによる 30 nm の長波長シフトに加え、酵素による影響 (酵素シフト) でさらに 60 nm の長波長シフトが観測された。一方で分子長が最長のアナログ **38**, **28** ではアナログ **37**, **27** と比較し酵素シフトの値には変化がなく、共役伸長の効果で 30 nm 長波長シフトしている事が示唆された (Fig. 3-4, Table 3-3)。

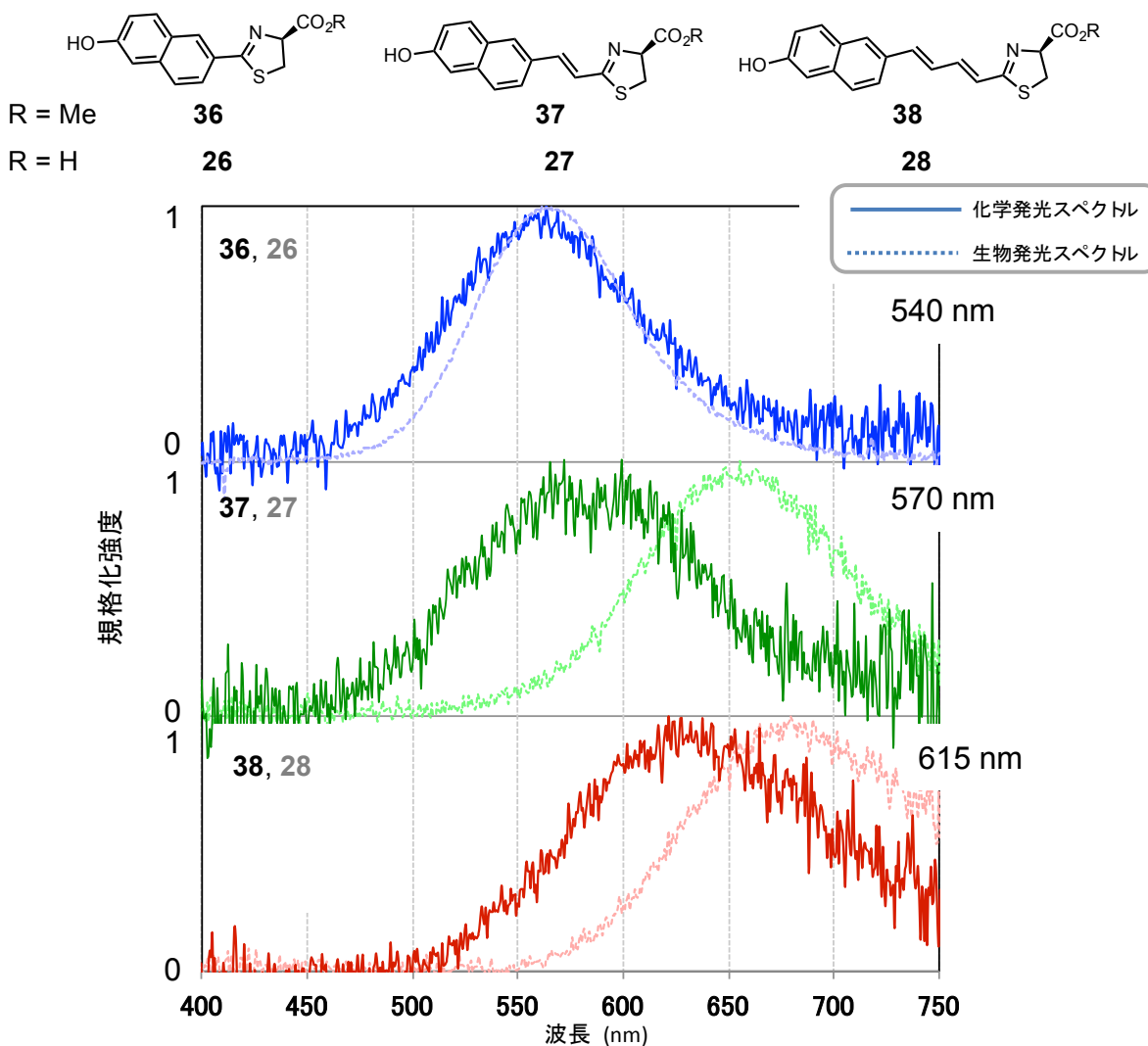


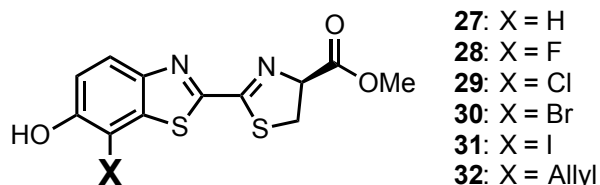
Fig. 3-4 ナフトール型アナログの化学発光スペクトルを実線で、生物発光スペクトルを破線で示した (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

Table 3-3 ナフトール型アナログの発光スペクトルと酵素シフト

	CL 極大波長	酵素シフト	BL 極大波長
36, 26 (n = 0)	560 nm	5 nm	565 nm
37, 27 (n = 1)	590 nm	65 nm	655 nm
38, 28 (n = 2)	620 nm	60 nm	680 nm

3-3. 化学発光波長まとめ

7 位にハロゲンを導入したアナログでは生物発光スペクトルと同様に化学発光スペクトルでも大きな波長のシフトは観測されなかった。ホタルルシフェリン (1) 骨格のベンゼン環上への置換基導入は発光波長への影響は少ない事が明らかになった。



ホタルルシフェリン (1) と大きく構造の異なるアナログではいずれのアナログにおいても、二重結合の数が一つ増えるごとに CL 極大波長が 30 ~ 40 nm 程度長波長シフトしていた。これは π 共役伸長による影響だと考えられる (Fig. 3-5)。次に化学発光波長と生物発光波長を併せて考察した。

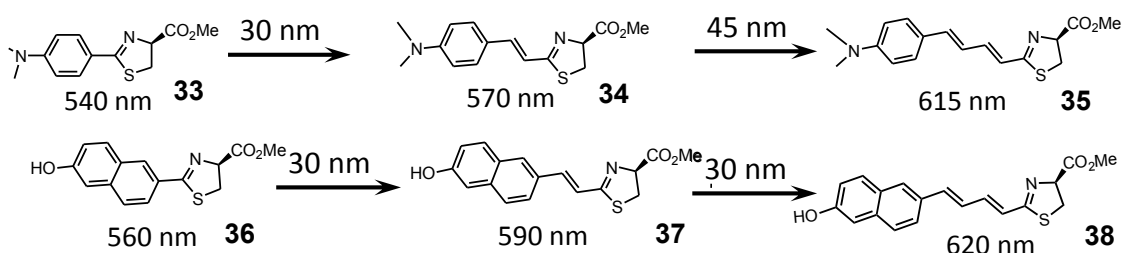


Fig. 3-5 π 共役型アナログの化学発光極大波長とその相関関係

3-4. 酵素シフトについての考察

これまでの結果からまず7位置換型のアナログについての考察を行った。

分子の嵩高さという視点から、ホタルルシフェリン (1) の7位に置換基を導入したアナログ 4~8 の酵素シフトについて評価する。

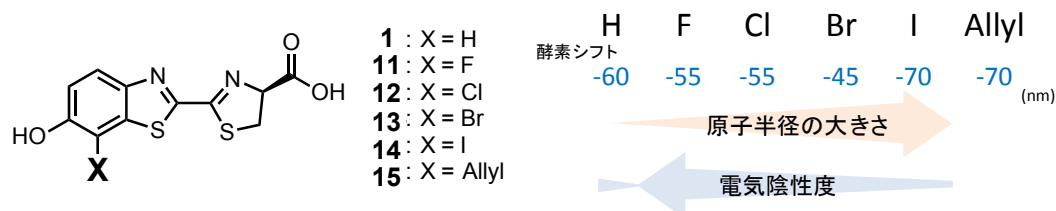


Fig. 3-6 ホタルルシフェリン (1) と7位置換型アナログ 2~6 の酵素シフトの値

7位にハロゲン、アリル基を導入したアナログにおいてもホタルルシフェリン(1) と比べ酵素シフトに大きな変化は観測されなかった (Fig. 3-6, 3-2-1.)。このことから、7位置換は発光波長に影響を与えないという事がわかった。

次に、 π 共役伸長型アナログ 23, 24, 25 についての考察を行った。これまでの結果から、アナログ 23, 24, 25 についての BL 極大波長と CL 極大波長との相関関係を以下にまとめた (Fig. 3-7, 3-2-2.)。

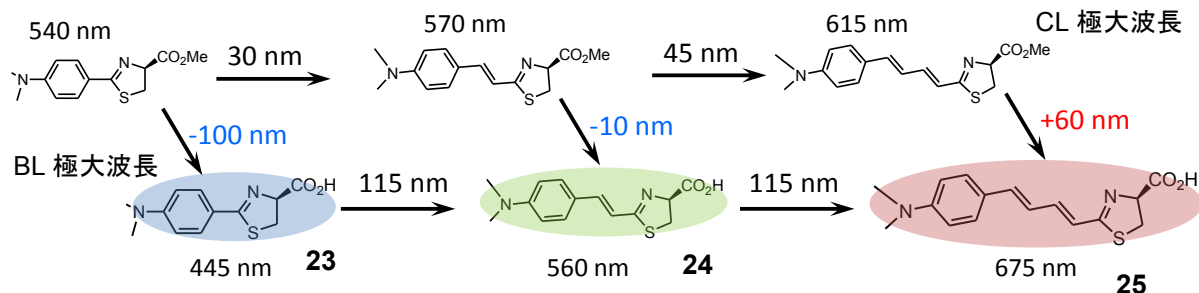


Fig. 3-7 アナログ 23, 24, 25 の発光極大波長と酵素シフトとの関係

以上の結果から、 π 共役伸長型アナログでは π 共役伸長が生物発光波長に与える影響は2つに分けて考えることができた。 π 共役伸長により二重結合を一つ導入することで、化合物が持つ潜在的な波長の長波長シフト (30~40 nm)、加えて構造が変化したことにより酵素シフトが影響を受け、70 nm 程度の長波長シフト、これら2つの効果があわさって、二重結合を一つ入れるごとに生物発光波長が 100 nm 程度の長波長シフトが起こり、幅広い発光波長を実現していた。

アナログ **23**, **24**, **25** はホタルルシフェリン(**1**) と構造が大きく異なっているため、酵素ルシフェラーゼ内でホタルルシフェリンとは違った分子環境にいることが予測される (Fig. 3-8)。

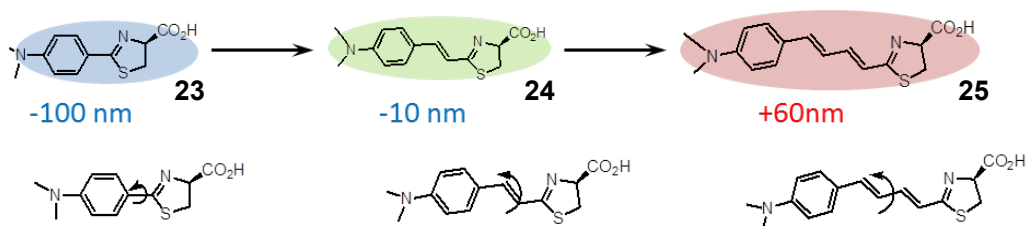


Fig. 3-8 アナログ **23**, **24**, **25** の酵素シフトの値

アナログ **23** では酵素内で大きくねじれることにより、生物発光波長が化学発光波長よりも-100 nm ブルーシフトしたと考えられる。アナログ **25** においては化学発光の溶媒中では自由に回転し、 π 共役伸長による効果が完全に生かされることなく化学発光しており、酵素内では平面構造をとり π 共役伸長による効果が最大限生かされる形で固定されて生物発光しているため、化学発光波長に比べ+60 nm レッドシフトしたと考えられる。

続けて、アナログ **26**, **27**, **28** についての BL 極大波長と CL 極大波長との相関関係を以下にまとめた (Fig. 3-9, 3-2-3.)。

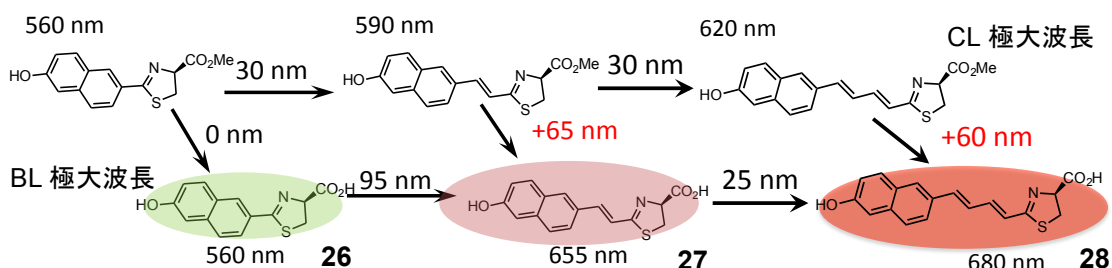


Fig. 3-9 アナログ **26**, **27**, **28** の発光極大波長と酵素シフトとの関係

ナフトール型のアナログ **26**, **27**, **28** についてもジメチルアミノ型のアナログ **23**, **24**, **25** とほとんど同様であり、 π 共役伸長により二重結合を 1 つ導入するごとに化合物の潜在的な波長の長波長シフト (30 nm)、加えて酵素シフトによる影響を受け 65 nm の長波長シフト、これら 2 つの効果があわさって、二重結合を一つ入れるごとに生物発光波長が 100 nm 程度の長波長シフトが起こっていた。一方で二重結合を 2 つ導入したアナログ **28** においては、酵素シフトの値はアナログ **27** と殆ど同程度の+60 nm であった。このためアナログ **28** の生物発光波長は 680 nm とアナログ **27** と比較し 25 nm 程度の長波長シフトしか観測されなかった。

ナフトール型のアナログにおいてはアナログ **28** においてはアナログ **27** と酵素シフトの値は殆ど変わらず、発光波長も BL 極大波長、CL 極大波長ともに 25 ~ 30 nm 程度の長波長シフトしか観測されなかった。この結果から、分子長をある一定以上の大きさにすると酵素シフトには変化が無いことがわかった。

次に酵素内の活性部位近傍での極性と発光波長の関係という視点からも考察を行った。

考察に入る前にホタル生物発光色制御のメカニズムに関しての電通大・平野らの研究²⁵⁾について紹介する (Fig. 3-10)。この研究ではホタル発光系の発光種であるオキシルシフェリンの誘導体の蛍光特性を様々な溶媒、塩基を用いて調べ、オキシルシフェリン誘導体の蛍光色を溶媒極性変化とイオン対構造変化により、ルシフェラーゼの活性中心の環境場のモデル化ができることを報告している。このルシフェラーゼの活性中心の環境場のモデルに従い、考察を行った。

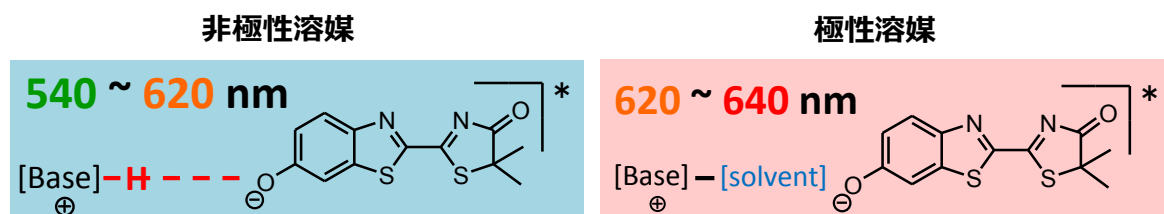


Fig. 3-10 平野らの研究 (様々な溶媒中でのオキシルシフェリンアナログの蛍光特性を調査し、溶媒極性やイオン対構造変化により、ルシフェラーゼの活性中心の環境場のモデル化が出来る事を報告した)

本研究で用いた北米産ホタルルシフェラーゼでホタルルシフェリン(1) を発光させたときに発光極大波長が 565 nm であったことから酵素の活性部位での極性は非極性環境場である可能性が示唆された。化学発光で溶媒として用いた t-BuOH は高極性な溶媒である。このことを踏まえて、今回測定したアナログの酵素シフトについて考察していく。

まず 7 位置換型アナログ **11~15** に関しては分子サイズがホタルルシフェリン(1) と大きく変わらないため非極性環境場での発光であることにより、生物発光波長が化学発光波長に比べ、いずれの 7 位置換型アナログに関しても -60 nm 程度の酵素シフトを示していたと考えられる (Fig. 3-11)。

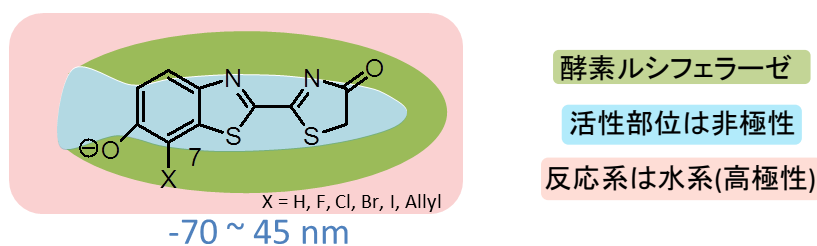


Fig. 3-11 7 位置換型アナログでの活性部位イメージ図

このことから 7 位置換型アナログ **11~15** はやはりホタルルシフェリン(1) と同様な分子環境で発光していると示唆された。

共役伸長型アナログ **23**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28** についても同様に考察を行った。
 ホタルルシフェリン (1) の分子サイズに比べ **23** に関しては小さく、**24**, **26** ではほとんど
 同様であり、**25**, **27**, **28** ではホタルルシフェリン (1) よりも大きくなっている (Fig. 3-12)。

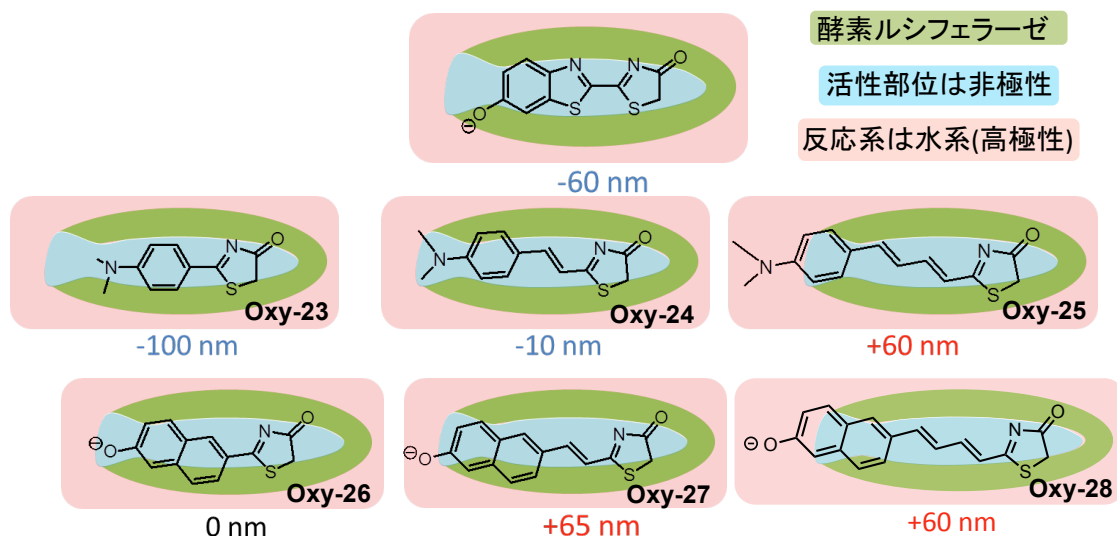


Fig. 3-12 Oxy- π 共役伸長アナログでの活性部位イメージ図

分子サイズが最も小さいアナログ **23** では完全に酵素の活性部位に包み込まれてしまい、非極性環境場での発光であることが考えられる。アナログ **24**, **26** においては化学発光の条件に近い環境場で発光していることが示唆された。アナログ **25**, **27** では分子サイズが大きく、D-ルシフェリンとは違う高極性な環境場で発光している事が示唆された。また最も分子サイズの大きなアナログ **28** においても殆ど同様の酵素シフトの値を示している事からアナログ **25**, **26** と同様な環境場で発光している事が示唆された。

この考察に関して、2006年に京都大学 中津らにより報告されたルシフェラーゼとルシフェリン類似体との複合体の X 線結晶構造解析結果⁽⁸⁾ をプロテインデータバンク (PDB) からダウンロードし DeLano Scientific 社の分子グラフィックスツールである PyMOL を用いて、ルシフェラーゼの活性中心部分のタンパク構造のモデル (水色) とオキシルルシフェリン (**5**, 黄色) とアナログ **Oxy-25** (桃色) の重ね合わせを行った (Fig. 3-13)。重ね合わせはオキシルルシフェリン (**5**) のチアゾロン環と **Oxy-25** のチアゾロン環が重なるように手動で合わせた。

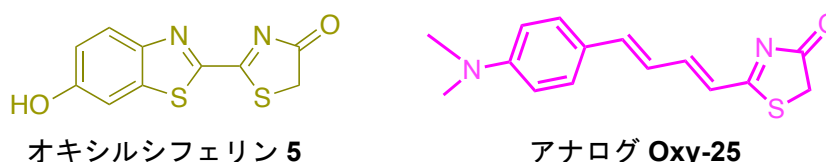


Fig. 3-13 の赤色のメッシュで示されている部分はネガティブチャージを持つ部分、青色のメッシュ部分がポジティブチャージを示している。また小さな赤い球は水分子を示している、Wat725 と表記した水分子のみ緑色の球で表記した。Wat725 はオキシルシフェリン 5 (黄色) とは近接していないが、重ねあわせた **Oxy-25** (桃色) においてはアナログの分子長が伸びたことにより、水分子と近接している事が分かり、P32, P33 で述べた考察をサポートする結果となっている。

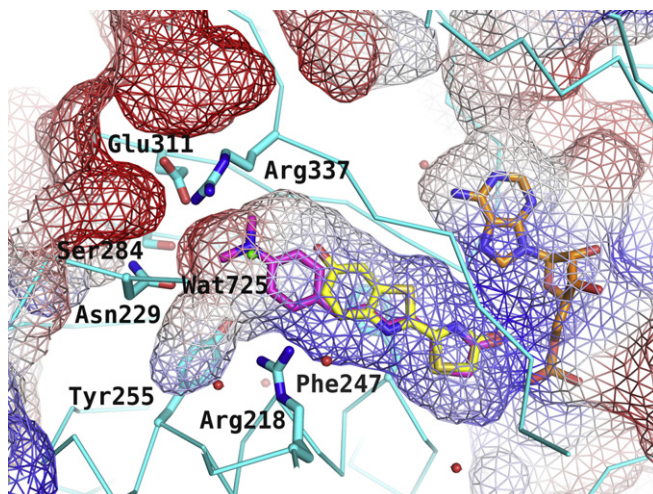


Fig. 3-13 ルシフェラーゼ (水色) の活性中心とオキシルシフェリン (5, 黄色) とアナログ **Oxy-25** (桃色) と AMP (オレンジ) の重ね合わせ図

(青色メッシュで示された部分がポジティブチャージを持つ部分、赤色メッシュで示された部分がネガティブチャージを持つ、また赤い球が水分子を示しており(Wat725 と示した水分子のみ緑色の球で示した)、Arg218, Asn229, Phe247, Tyr255, Ser284, Glu311, Arg337 のアミノ酸残基は棒型で示した)

これに加えて、オキシルシフェリン 5、またいずれのオキシルシフェリンアナログにおいても、エレクトロンドナー・アクセプター構造を有している。励起状態ではその極性は更に強いものとなっている事が予想される。Fig. 3-13 を見てみるとオキシルシフェリン 5 (黄色) はその構造部分の殆どが青色のメッシュ部分に包まれている事が分かる。つまり極性構造を持つオキシルシフェリンが青色メッシュ部分だけに包まれることで、励起状態が不安定化し、基底状態とのエネルギーギャップが大きくなり、酵素シフトが-60 nm という値を示したと考えられる。

一方でアナログ **Oxy-25** においては分子長がオキシルシフェリン 5 (黄色) よりも長い事により、構造の一部部分が赤色のメッシュ部分に包まれている事が分かる。この包まれているジメチルアミノ基の部分はポジティブチャージを持つ部分であり、赤色メッシュのネガティブチャージに包まれることで励起状態が安定化し基底状態とのエネルギーギャップが小さくなる事で酵素シフトが+60 nm という値を示したと考えられる。

3-5. 考察

天然基質およびそのアナログを用いてホタル生物発光系に与える酵素の影響を検証した。本研究では化学発光波長を測定し生物発光波長（北米産ホタルルシフェラーゼ）との比較を行った。天然基質では酵素による影響（酵素シフト）で化学発光波長よりも 60 nm 短波長シフトしていた (Fig. 3-14, 3-2-1.)。

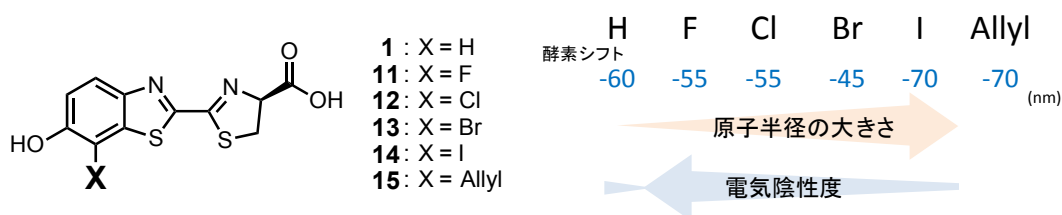


Fig. 3-14 7 位置換型アナログの酵素シフト

天然基質の 7 位に種々の置換基を導入したアナログ 11~15 では酵素シフトに大きな影響は与えなかった。

天然基質と大きく構造の異なる π 共役伸張型のアナログでも酵素による影響を大きく受けていた。分子サイズと酵素シフトとの間にある程度の相関関係があることが分かった (Fig. 3-15, 3-2-2., 3-2-3.)。

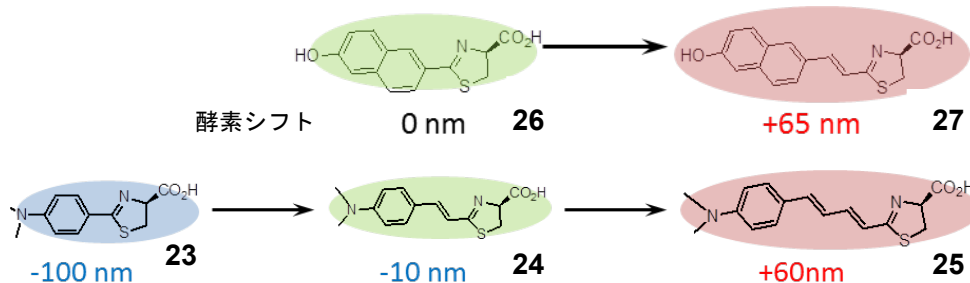


Fig. 3-15 アナログの分子サイズと酵素シフトの関係

π 共役伸長型アナログでは π 共役伸長が生物発光波長に与える影響は 2 つに分けて考えることができた。 π 共役伸長により化合物が持つ潜在的な波長の長波長シフト (30~40 nm)、加えて構造が変化したことにより酵素シフトが影響を受け、更に 70 nm 程度の長波長シフト、これら二つの効果により幅広い生物発光波長を実現していた。

以上のような結果は得られたが、ルシフェリンの変化が酵素シフトにどのような影響を与えるかを系統的に理解するために今後、当研究室が有している様々なアナログの酵素シフトに関するデータを測定し精査する必要がある。

第 4 章 *in vivo* イメージングへの応用

第一章で述べたように、ホタル生物発光反応はライフサイエンス分野で欠くことのできない基盤技術となっている。本研究では一貫して有機化学的アプローチからホタル生物発光系の機能性材料化を進めてきた。

本項では、近赤外領域に発光極大波長を有するルシフェリンアナログ **25** の *in vivo* イメージングへの応用を行った。*in vivo* イメージングに実際に使う場合に近赤外発光アナログ **25** の有効性を示すとともに、実際の動物実験の結果について記述する。

現在、個体レベルの *in vivo* イメージングで大きなトピックとなっているのは、生体深部観測である。これは現行のイメージング技術では困難であるとされている。特に現在主流である蛍光イメージング法では、励起光の届かないような深部観測は困難であり、深度方向には数 μm 程度が限度であるとされている。多光子励起を応用したイメージング技術も盛んに研究がなされているが、こちらを用いても 1 mm 程度が最大深度とされている。

一方で生物発光を用いたイメージングでは、励起光を必要としないことから原理的に深度方向に強みを持つが、青 (480 nm) や黄緑 (560 nm) といった可視光領域の光しか無いことが問題であった。

生体深部からの光を効率よく検出するには、生体組織による吸収の影響を避ける生体透過性の高い近赤外の光が必要である。以下の図に示されるように、血液中のヘモグロビンは可視光領域の光を、水は赤外領域の光を強く吸収する。この血液による光の吸収を受けにくい 650 ~ 900 nm の近赤外領域の光はその生体透過性の高さから生体の窓と呼ばれ、近年大きな注目を集めている (Fig. 4-1)²³⁾。

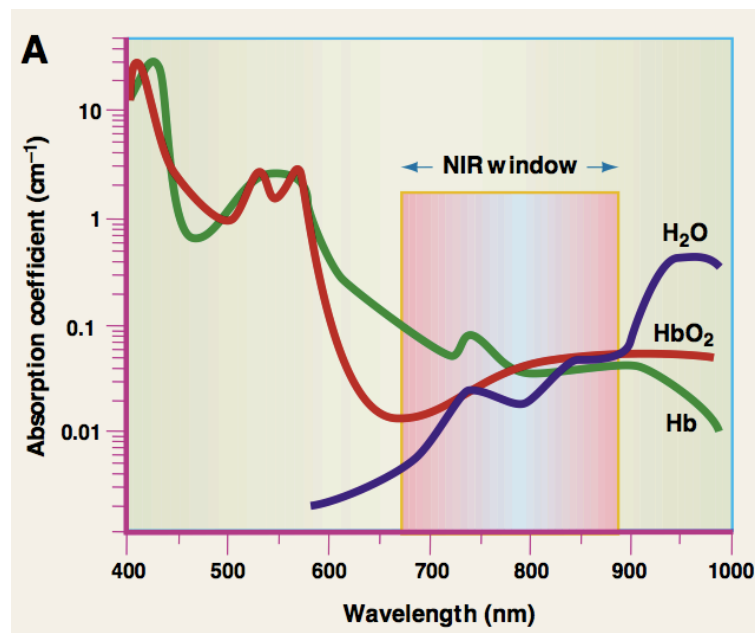


Fig. 4-1 光学的な生体の窓 (血液主成分であるヘモグロビン、酸化ヘモグロビン、水の光吸収スペクトル)

第2章で示したように、近赤外発光アナログアナログ (**25**, $\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) の創製に成功している。本項ではこの近赤外発光アナログを使って、*in vitro* での擬似生体実験、またマウスの腫瘍モデルを用いた *in vivo* での発光イメージングの結果、近赤外発光アナログのマウス体内での動態の評価を行い、ホタルルシフェリンと比較した場合の本アナログの実用性を示した。実際にはホタルルシフェリン (**1**, $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$)、アミノルシフェリン (**40**, $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$)、近赤外発光アナログ (**25**, $\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) の三種類の基質を用いて実験を行った。

4-1. 近赤外発光材料を用いた *in vivo* イメージング実験

4-1-1. *in vitro* での擬似生体実験の概要

馬血液と鶏胸肉ペーストを混合させ、生体モデルフィルターとして使用し、その透過光を評価した。*in vitro* の実験で生体モデルフィルターの透過光の発光スペクトル、発光強度、発光の生体透過率の測定を行った。実際には、Fig. 4-2 に示すような実験を行った。

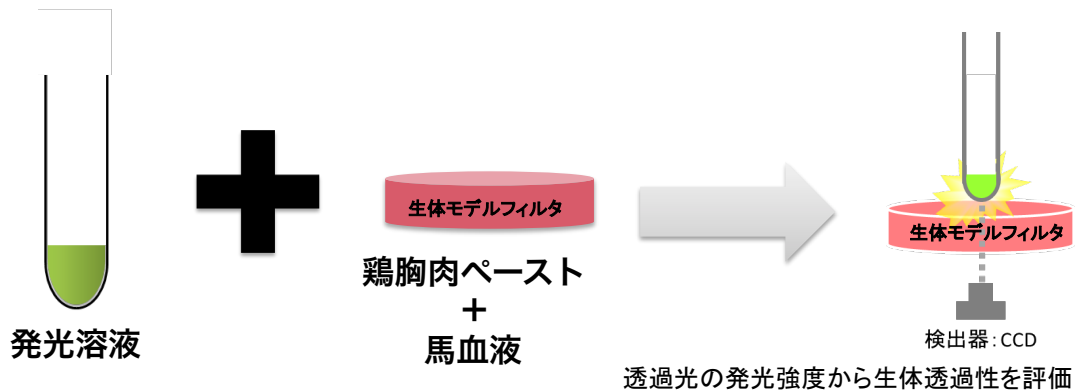


Fig. 4-2 擬似生体実験 (発光を鶏胸肉のペーストとウマ血液を混合し作成した生体モデルフィルターからの透過光を観測し、生体透過性を評価した)

4-1-2. *in vitro* での生体モデルフィルターからの透過光のスペクトル測定

ホタルルシフェリン (**1**, $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$)、アミノルシフェリン (**40**, $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$)、近赤外発光アナログ (**25**, $\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) の発光を 1 cm の生体モデルフィルター (鶏胸肉と牛血液) でフィルタリングし、その透過光のスペクトルを測定した。基質、酵素 Ppy 存在下で 180 秒間測光した。各基質の透過光のスペクトルの推移を以下に示す (Fig. 4-3)。

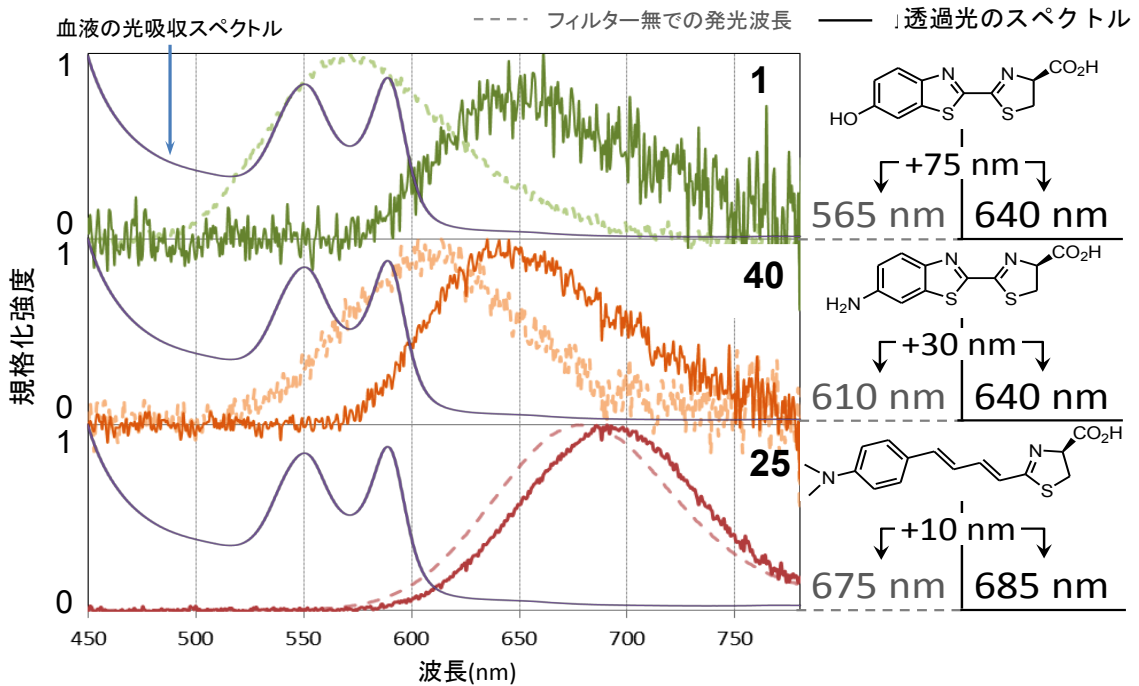


Fig. 4-3 基質 **1**, **40**, **25** の発光の生体モデルフィルター (1cm) 透過光のスペクトル (青線は血液の光吸収スペクトル、破線は各基質の発光スペクトル、実線は各基質の生体モデルフィルター透過光のスペクトルを示した、またスペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

結果からホタルルシフェリンの発光は血液による光の吸収の影響を受けており、可視光の光は殆ど吸収されてしまい吸収されなかった長波長部分 (>600 nm) がかりうじて透過し観測されたただけであった。一方で近赤外発光アナログの発光は血液による光の吸収を避けていることが示された。

4-1-3. *in vitro* での生体モデルフィルターを用いた生体透過性の評価

次にホタルルシフェリン (**1**, $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$)、アミノルシフェリン (**40**, $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$)、近赤外発光アナログ (**25**, $\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) の発光の生体透過性を評価した。それぞれの発光を 1 cm の生体モデルフィルター (鶏胸肉と牛血液) でフィルタリングした透過光の強度とフィルタリングしていない発光の強度を比較し、その生体透過率を%で示した。各基質の生体透過率を Fig. 4-4 に示した。

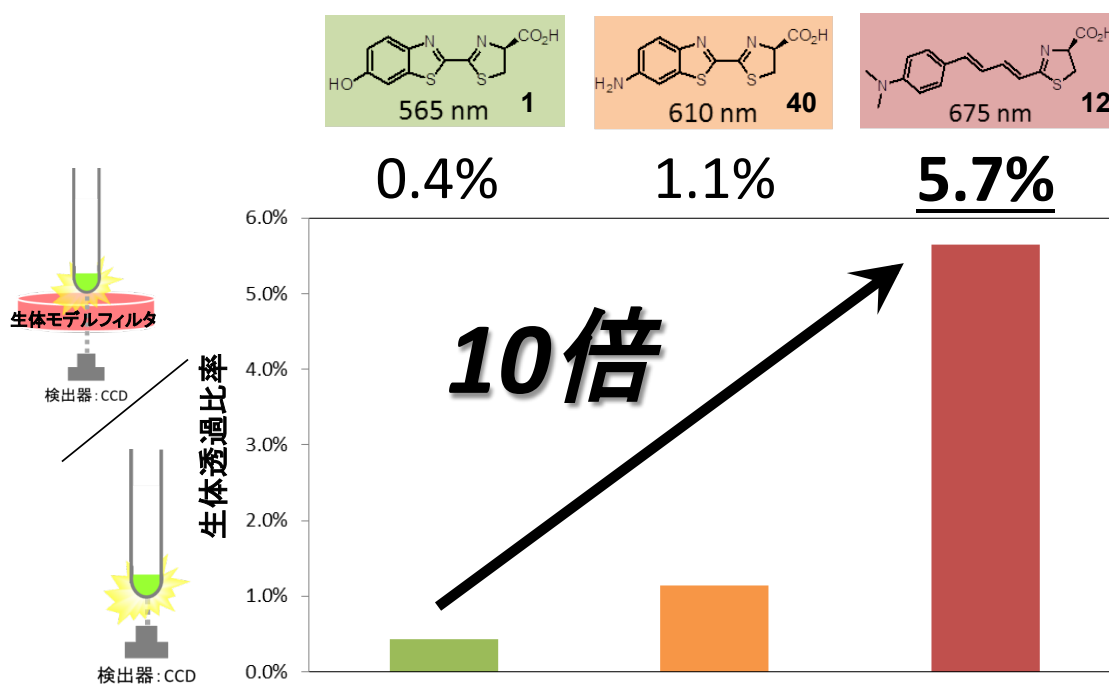


Fig. 4-4 基質 **1**, **40**, **25** の発光の生体モデルフィルター透過率 (各基質の 180 秒の発光積算値で生体モデルフィルターの透過光の 180 秒の積算値を割算し、生体透過比率を算出した)

これらの結果から、ホタルルシフェリン (**1**) の 1 cm の生体モデルフィルターの生体透過率は 0.4%であった。近赤外発光アナログ **25** の生体透過率は 5.7%とホタルルシフェリンよりも 10 倍程度良好なものであった。

4-1-4. *in vitro* での生体モデルフィルターからの透過光の強度

ホタルルシフェリン (**1**, $\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$)、アミノルシフェリン (**40**, $\lambda_{\max} = 610 \text{ nm}$)、近赤外発光アナログ (**25**, $\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) の発光を 1 cm の生体モデルフィルター (鶏胸肉と牛血液) でフィルタリングし、その透過光の発光強度を測定した。基質、酵素 Ppy 存在下で 180 秒間測光した。各基質の透過光の発光強度の比較を Fig. 4-5 に示す。

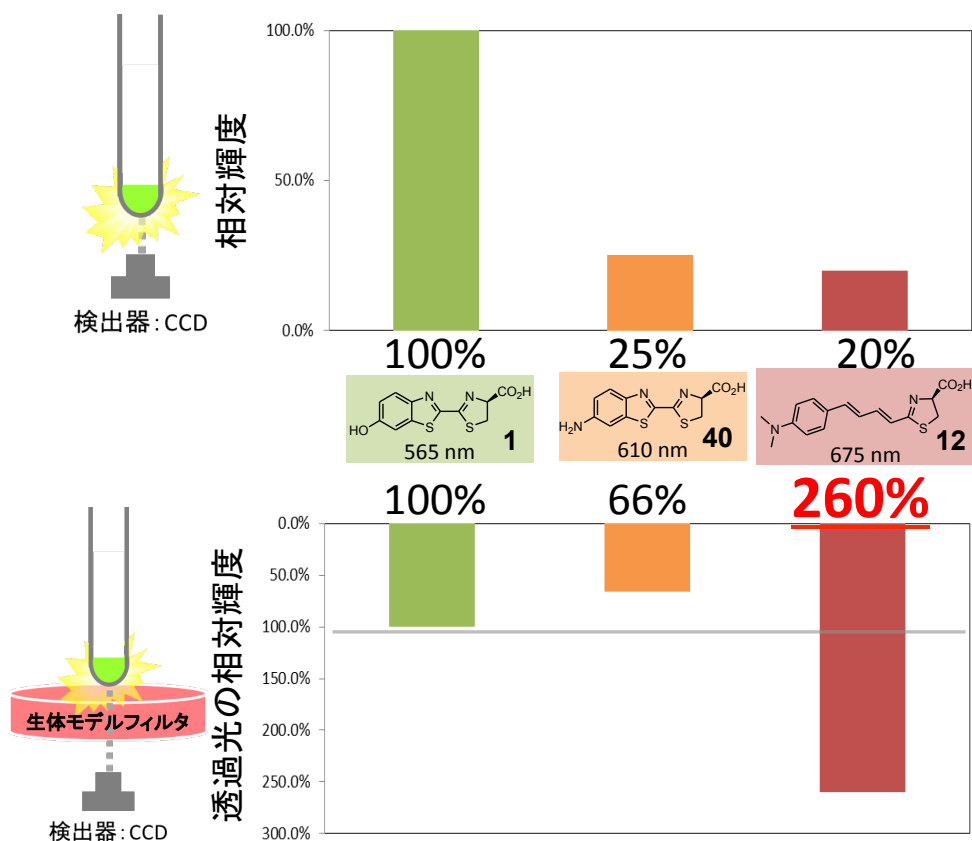


Fig. 4-5 ホタルルシフェリンの発光強度を 100 とした場合の基質 **25**, **40** の相対輝度を示しており、上図はフィルター無しの場合の相対輝度、下図にはフィルター透過光の相対輝度を示した

フィルターがない場合の発光強度はホタルルシフェリン (**1**) を 100%とした場合にアミノルシフェリン (**40**) が 25%、近赤外発光アナログ **25** が 20%であった。これに対し、1 cm の生体モデルフィルタでフィルタリングした透過光の強度はホタルルシフェリン (**1**) を 100%とした場合に近赤外発光アナログ **25** の透過光の相対強度は 260%であった。

生体モデルによる光の吸収の影響を受けにくいため、透過光の相対強度は近赤外発光アナログ **25** の方が強いという結果となった。

以上の結果から、近赤外発光アナログ **25** が生体深部観測に適したルシフェリンであることが示された。次項 (4-3) より実際に腫瘍マウスモデルを用いた *in vivo* イメージングでの近赤外発光アナログ **25** を用いた実験を行った。

4-2. 腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* イメージング実験

in vivo イメージング実験は皮下腫瘍モデルと骨転移モデルを使って行った。実験のイメージ図は Fig. 4-6 に示す。

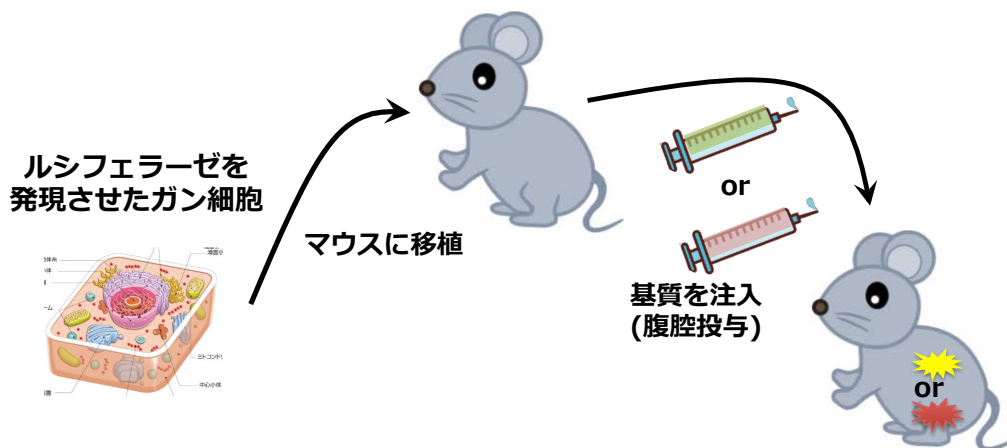


Fig. 4-6 マウスを用いた *in vivo* 発光イメージングの実験概要

皮下腫瘍モデル、骨転移モデルマウスを用いて評価を行った。次項以降に詳細を記載するが、マウスに移植するガン細胞にはルシフェラーゼ (Luc+, promega) が恒常的に発現するガン細胞を用いた。

ルシフェラーゼ Luc+は哺乳細胞発現用にコドンが最適化されている北米産ルシフェラーゼである。これまでの *in vitro* の実験で用いてきたルシフェラーゼ Ppy (promega) と殆ど同様の活性を持つと考えられる。

骨転移モデルは皮下腫瘍モデルよりも腫瘍部位の深度があり、近赤外発光アナログ **25** の性能評価により適したモデルである。

4-2-1. 皮下腫瘍モデルマウスを用いたイメージング実験

皮下腫瘍モデルの場合にはホタルルシフェラーゼ (Luc+, promega) を恒常発現するマウス骨肉腫細胞 LM8 である LM8/luc+ をヌードマウス (6 週間、♂) の背中皮下に 2.0×10^6 cells 移植した。実験には移植 11~13 日後のマウスを用いた。

このモデルマウスに、ホタルルシフェリン (1) と近赤外発光アナログ 25 をそれぞれ 500 μ M の PBS 溶液を 100 μ l ずつ腹腔投与した場合の発光の経時変化を測定し、ピーク発光強度を比較した。基質投与後 6 時間ほどで発光は完全に消光するため、マウスは同一個体で六時間後に別の基質を投与し再度測定を行った。発光の様子は Fig. 4-7 に示す。左側の写真がホタルルシフェリン (1)、右側の写真が近赤外発光アナログ 25 である。

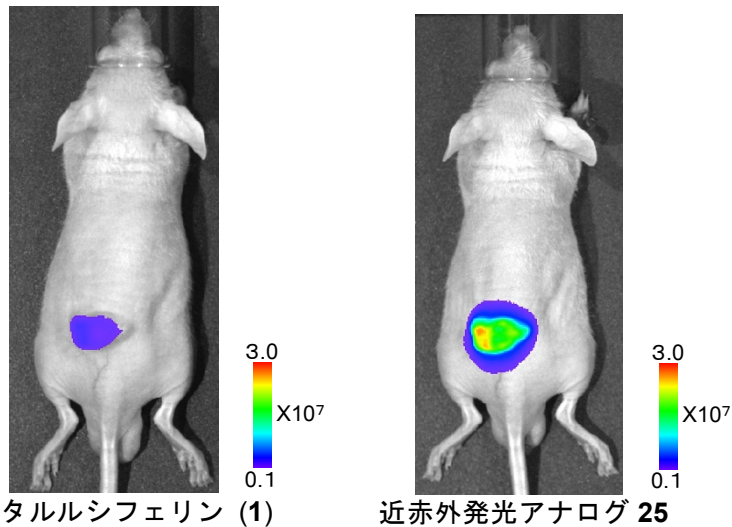


Fig. 4-7 皮下腫瘍モデルでの発光イメージング画像
同一個体のマウスに対し、同一モル量の基質 1 (左図), 25 (右図)を腹腔内投与後の 10 分のイメージング画像を示す、露光時間は一分間である

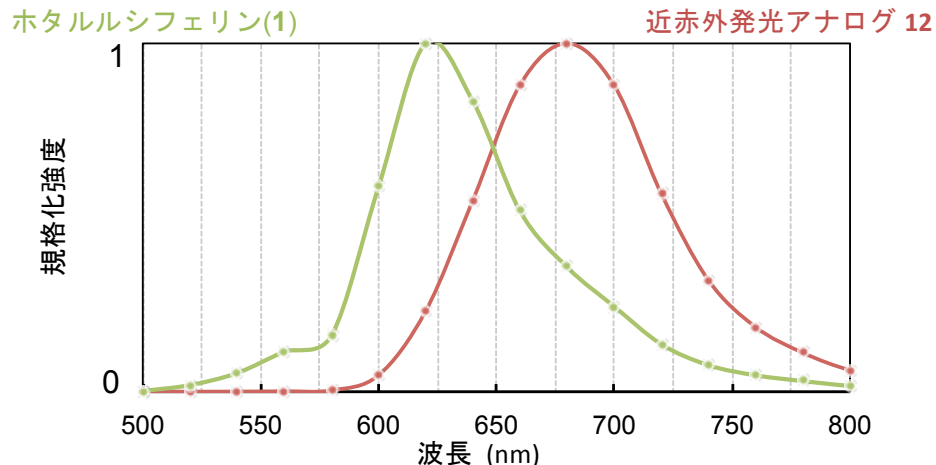


Fig. 4-8 *in vivo* でのホタルルシフェリン (1), 近赤外発光アナログ 25 の発光スペクトル
発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである

近赤外発光アナログ 25 が *in vivo* でも発光波長が変わること無く発光が観測される事がわかった(Fig. 4-8)。また、皮下腫瘍という比較的深度の浅い部位でも、ホタルルシフェリン 1 よりも発光強度は強かった。強度に関しては次項の骨転移モデルの実験で詳細に説明する。

4-2-2. 骨転移モデルマウスを用いたイメージング実験

骨転移モデルマウスの場合には、低酸素応答遺伝子のエンハンサー配列である Hypoxia Responsible Element (HRE) の下流にホタルルシフェラーゼ (Ppy) 遺伝子を連結したベクターを安定導入した線維肉腫細胞株 LM8/luc+ をヌードマウスの左心室から移植した骨転移モデルを 3 頭作成し用いた。この 3 頭の骨転移モデルマウスに対し、ホタルルシフェリン (1) と近赤外発光アナログ **25** をそれぞれ 500 μ M の PBS 溶液を 100 μ l ずつ腹腔投与した場合の発光の経時変化を測定し、ピーク発光強度を比較した。基質投与後 6 時間ほどで発光は完全に消光するため、マウスは同一個体で六時間後に別の基質を投与し再度測定を行った。1 頭の骨転移モデルマウスの発光イメージを抜粋し、以下に示す。左側の写真がホタルルシフェリン (1)、右側の写真が近赤外発光アナログ **25** である (Fig. 4-9)。

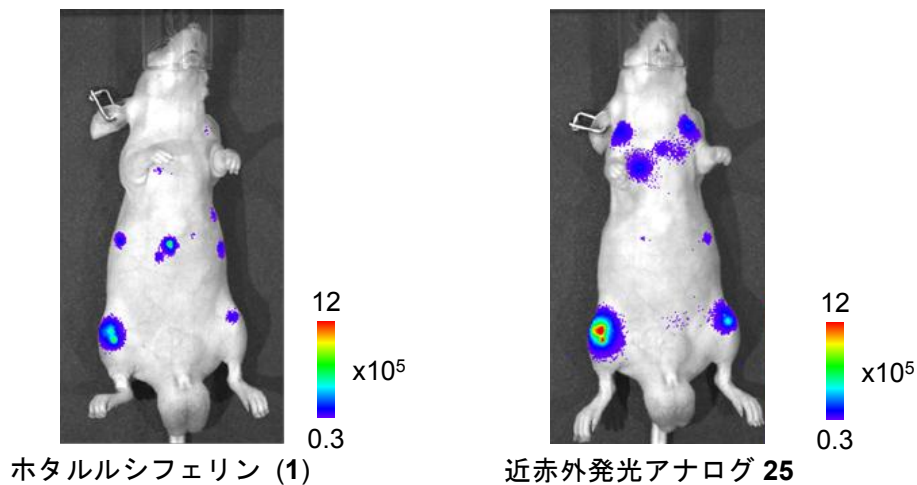


Fig. 4-9 骨転移モデルマウスを用いた発光イメージング画像
同一個体のマウスに対し、同一モル量の基質 **1** (左図), **25** (右図) を腹腔内投与後の 10 分のイメージング画像を示す、露光時間は 1 分間である

発光強度は Fig. 4-10 に示すような結果となった。マウス後肢に骨転移した細胞からの発光強度を示している。近赤外発光アナログ **25** の発光強度はホタルルシフェリン (1) よりも 10 倍以上も高かった。この結果から投与する基質を近赤外発光アナログ **25** に替えるだけで、従来の実験系よりも十倍近く感度良く細胞が観察できる事がわかった。

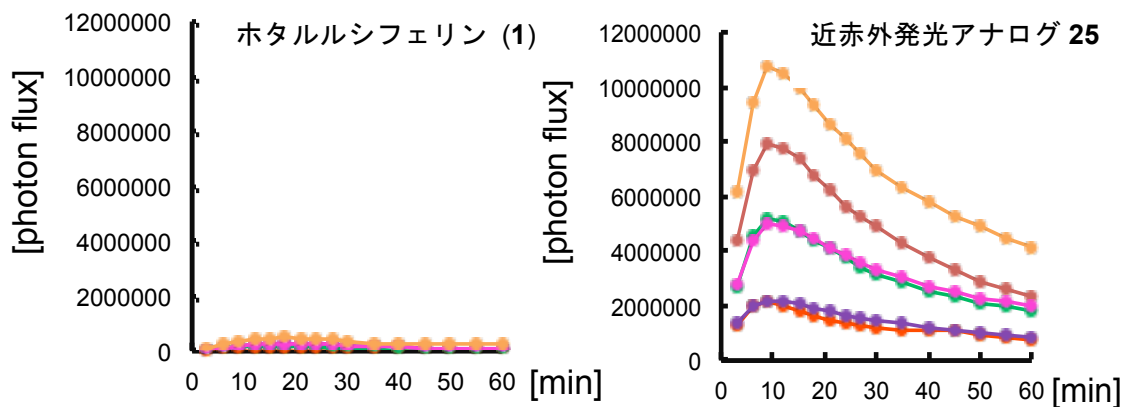


Fig. 4-10 骨転移モデルでの発光経時変化
3 頭の左右の後肢に骨転移した細胞からの発光強度の経時変化を示した。

4-3. マウス体内での基質の動態評価

動物実験では動物体内での基質の血中滞留性、安定性が発光強度に大きな影響を与える。目的の細胞に届く基質量が大きく変わってしまうからである。そこで、各基質の血中滞留性血中での安定性を評価するために、体内動態の評価を行った。

ルシフェラーゼの発現していないマウスに対し、同一モル量の ホタルルシフェリン (1)、近赤外発光アナログ 25 を腹腔投与し、10 分後、30 分後に血液を採取した。その後、高速液体クロマトグラフィーにより分析し、血中のルシフェリン濃度を測定した。10 分後の基質の血中濃度は ホタルルシフェリン (1) が 0.42 μM 、近赤外発光アナログ 25 が 1.26 μM であった。この結果から、近赤外発光アナログ 25 の血中滞留性は ホタルルシフェリン (1) よりも良いということが分かった。30 分後の基質の血中濃度は ホタルルシフェリン (1) が 0.33 μM 、近赤外発光アナログ 25 が 0.82 μM であった。いずれのルシフェリンも、30 分後の血中濃度は、10 分後の血中濃度の 70%程度であった。これらの結果から、血液中での安定性は近赤外発光アナログ 25 の方がホタルルシフェリン (1) よりも良いということが示された。

4-4. 近赤外発光アナログの実用性

本研究で行った動物実験、体内動態の評価結果から、改良型ルシフェリンである近赤外発光アナログ 25 が *in vivo* イメージングに適していることが分かったが、近赤外発光アナログには水溶性の低さに問題があり、反応条件の違いや細胞種の違い、ルシフェラーゼによる違いによる発光活性の変化等の検討など課題も残った。

ホタルルシフェリン (1) と全くの同一条件でルシフェリンアナログの方が強い発光を示したという例は無く、同一条件で発光強度を *in vivo* で比較できた例も現在のところ報告はない。今回の近赤外発光アナログ 25 が *in vivo* イメージング実験でホタルルシフェリン (1) よりも 10 倍近く強い値を示したことは、極めて良好な結果であった。

一方で、*in vitro* の系ではホタルルシフェリン (1) の発光強度の五分の一程度しかない近赤外発光アナログ 25 が *in vivo* で 10 倍以上の強さで発光するというのは、生体透過性の高さという一点の優位性だけでは得られない結果ではないかと考えられる。ホタルルシフェリン (1) も近赤外発光アナログ 25 も *in vitro* の実験では条件により、発光の強度の相関が変わる条件があることがわかっている。基質濃度、pH の変化や ATP 濃度、Mg イオン濃度また温度によってもホタルルシフェリン (1) と近赤外発光アナログ 25 との発光強度の相関が変わる。また本研究で行ってきた *in vitro* の実験では殆ど全ての実験で酵素に対して基質過剰の条件で実験を行っている。一方で *in vivo* の腫瘍モデルマウスでの発光では、ルシフェリン濃度に依存して定量的に発光強度が向上する事が知られている。つまり、*in vivo* ではルシフェラーゼ過剰の条件で発光していると考えられる。またホタルルシフェリン (1) と近赤外発光アナログ 25 は違う化合物であるので、体内での分布等も変わっている事が考えられる。

つまり生体透過性、発光条件の違い、基質の体内分布が近赤外発光アナログ 25 に都合のいいように働くことで、ホタルルシフェリン (1) よりも 10 倍以上の強さの発光が観測されるという結果になったと考察している。今後、なぜ *in vitro* の実験ではホタルルシフェリン (1) の 20%程度の発光強度しか無い近赤外発光アナログ 25 が *in vivo* の動物実験では 10 倍以上の発光強度を示すのかという *in vitro* と *in vivo* の実測強度の相違の原因を精査することで、これまでとは全く違った新しい発光材料の開発指針を得る事が出来るであろう。

本項で行った研究では、*in vivo* 深部イメージングにおける極めて有効な近赤外発光アナログ 25 の機能を実証するとともに、今後の材料評価、開発に有用な知見を得る事が出来た。

近赤外発光アナログ 25 は *in vivo* イメージング実験でホタルルシフェリン (1) の 10 倍程度強い発光を示したが、今まで見ることが出来なかつた臓器や脳深部、脊椎等の深部を高感度にイメージングするには、その発光が強ければ強いほど有用性が高い事は明らかである。

これに対し、近赤外発光アナログ 25 の発光強度は *in vitro* での純粋な発光活性評価実験ではホタルルシフェリン (1) と比較すると 20%程度と輝度が低い事、またこの他の多色アナログの発光強度はホタルルシフェリン (1) と比較し著しく低いことは、今後、深部の高

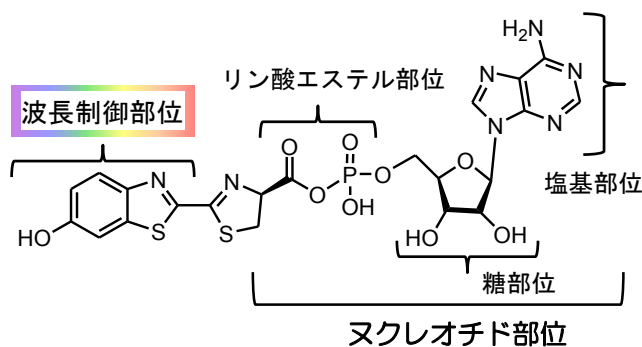
感度 *in vivo* イメージング、多彩な発光色を示すルシフェリンアナログを用いたマルチカラー発光イメージング、また用途に合わせた発光イメージング材料の開発を行う上で大きな課題であると考えられる。

第5章では二段階反応で発光するホタル生物発光を人為的に補助する一段階ホタル生物発光反応の開発を行い、ホタル生物発光の根本的な高輝度化を目指し研究を進めた。

第5章 ホタルルシフェリンヌクレオチドの合成と発光活性評価

5-1. 分子設計

本章では、ホタル生物発光反応中間体の構造安定性を付与し高輝度な高安定性発光ルシ



フェリンアナログの創製を目指し、発光反応中間体のルシフェリンヌクレオチドの核酸構造部分をリン酸結合部位、糖部位、塩基部位の3つに切り分けて、様々に構造を替えることで二段階目の酸素化反応の詳細な解析を行った (Fig. 5-1)。

Fig. 5-1 ホタル生物発光反応中間体

ホタル生物発光反応はホタルルシフェリンが北米産ホタルルシフェラーゼ (*Photinus pyralis*) の作用により、AMP 化反応次いで、酸素化反応の2つの反応が進行することで、黄緑色に発光する ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$)。その発光量子収率は極めて高い (発光量子収率 $\Phi = 0.41$)。一方で、その発光反応のターンオーバーは低く、実際の使用においてはその発光量子収率の高さとは裏腹に輝度の低さが問題点であった。

これまでの研究で、一段回目の反応である AMP 化反応を人為的に補助する事 (つまりホタル生物発光反応の中間体であるルシフェリン AMP 化体を有機合成する) で発光反応を飛躍的に加速できる事がわかっている (輝度 100 倍~1000 倍)¹⁹⁾。Fig. 5-2 に示すようにホタル生物発光反応において、AMP 化反応が律速段階である事がわかっている²²⁾。

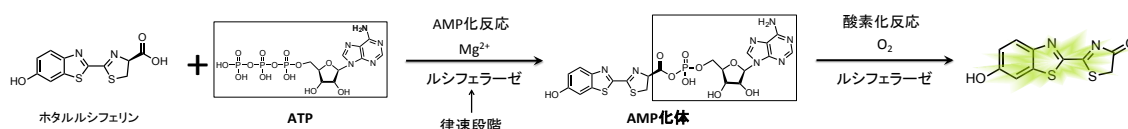


Fig. 5-2 ホタル生物発光反応

これまでに、本研究ではホタルルシフェリンの構造に着目して研究を進めてきたが、ホタル生物発光反応におけるもう一つ反応物質である ATP の構造と発光活性の相関研究は世界的にも殆ど取られていないのが現状である。また、反応中間体アナログ (偽 AMP 化体) を用いた酸素化反応の解析も殆ど行われておらず、これらの構造活性相関研究を行い、高輝度な高安定性一段階ホタル生物発光反応の創製を目指した。

実際には Fig. 5-3 に示すような構造に変換したルシフェリンヌクレオチドの合成と発光活性評価を行った。また、ホタル生物発光反応における二段階の反応も ATP の代わりに種々のヌクレオチド三リン酸を用いて、二段階の反応での核酸構造と発光活性の相関を得た。

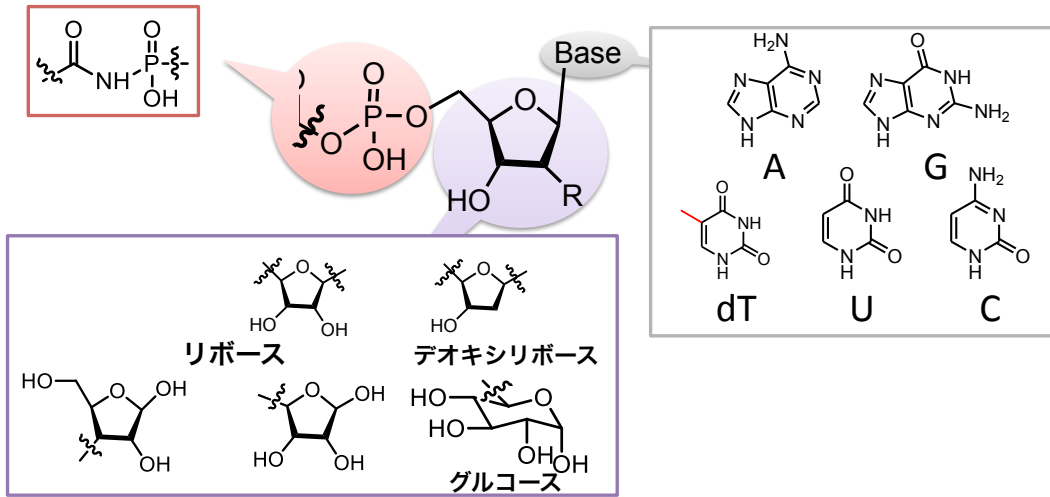


Fig. 5-3 本研究で用いたヌクレオチド部分の構造

5-2. 各種 NTP を用いた場合の相対発光活性評価 (二段階反応の評価)

ホタルルシフェリンに対し、ATP と各種ヌクレオチド三リン酸 (NTP) を加え発光測定を行った (Fig. 5-4)。酵素ルシフェラーゼとして Ppy を用い基質、NTP、Mg⁺存在下で 30 秒間発光測定を行った。発光強度の推移を以下に示した (Fig. 5-5)。天然の発光反応である ATP を加えた場合の発光活性を 100 とした場合の発光比活性を Table 5-1 に示した。

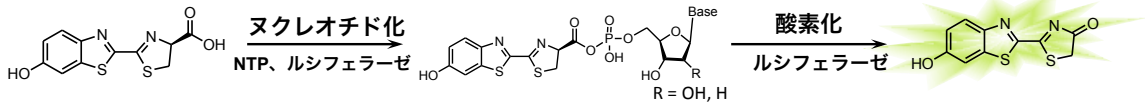


Fig. 5-4 NTP を用いた二段階発光反応

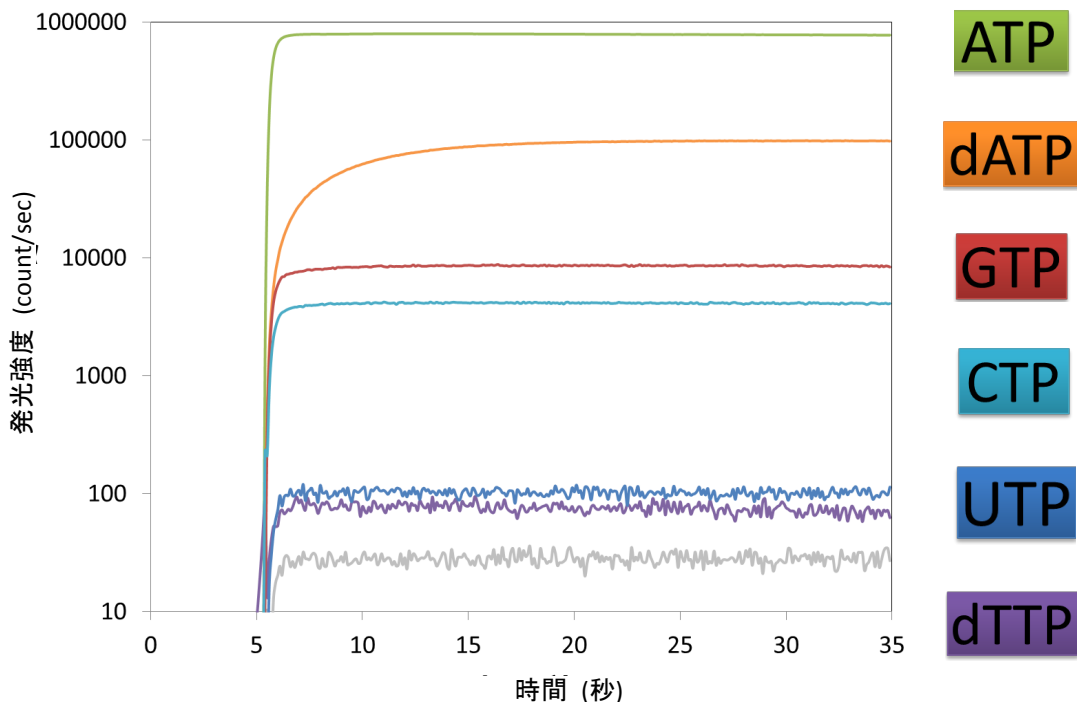


Fig. 5-5 NTP を用いた二段階発光活性 (ATP と dATP, GTP, CTP, UTP, dTTP を用いてホタルルシフェリン (1) を発光させた場合の 30 秒間の発光経時変化を示した)

Table 5-1 NTP を用いた二段階発光比活性 (ATP を用いて発光させた場合の 30 秒の発光積算値を 1 とした場合の発光比活性を示した)

	ATP	dATP	GTP	CTP	UTP	dTTP
発光比活性	1	0.1	0.01	0.005	X	X

dATP を加えた場合にも ATP の 10%程度ではあるが発光活性を有することから、デオキシリボースでも酵素認識に大きな影響は無いことが示唆された。また ATP の塩基部位であるアデニンは二環縮環性の骨格を有するが、単環性であるシトシン (CTP) でも発光活性が確認された。しかしながら、リボースからデオキシリボース、アデニンからグアニンのような比較的小さい構造変換でも発光活性は大きく下がることがわかった。また UTP、dTTP を加えた場合には発光は確認できなかった。

5-3. 各種 NTP を用いた場合の発光スペクトル (二段階反応の評価)

発光が確認できた dATP, GTP, CTP について発光波長の測定を行った。
基質、酵素 Ppy、ヌクレオチド三リン酸、マグネシウムイオン存在下で 180 秒速攻した。
各基質の生物発光スペクトルの推移を Fig. 5-6 に示す。

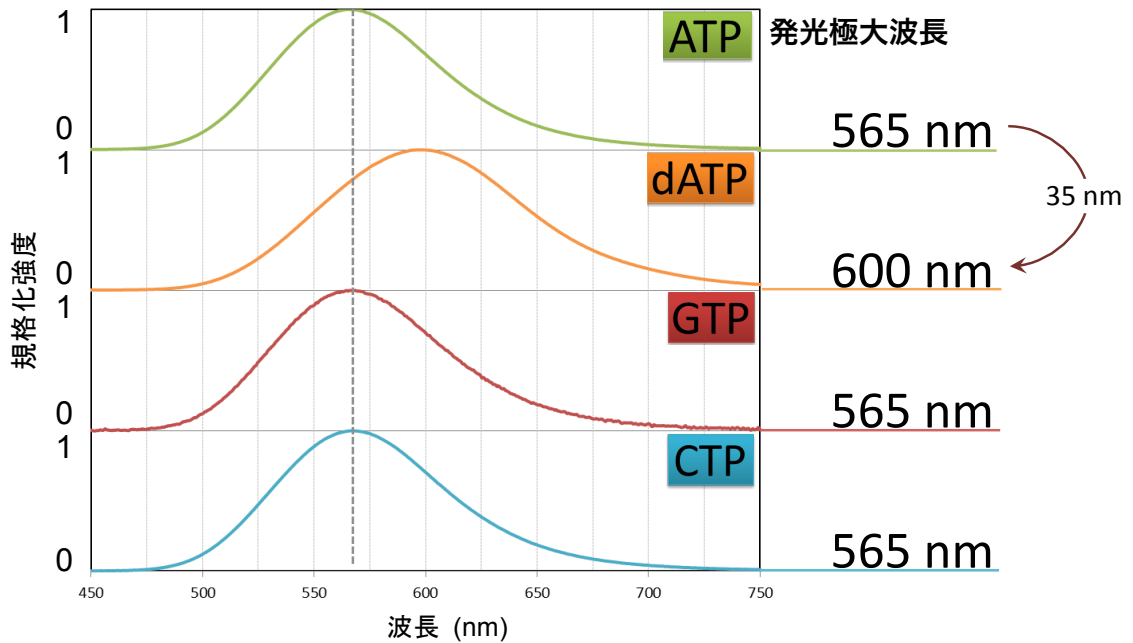
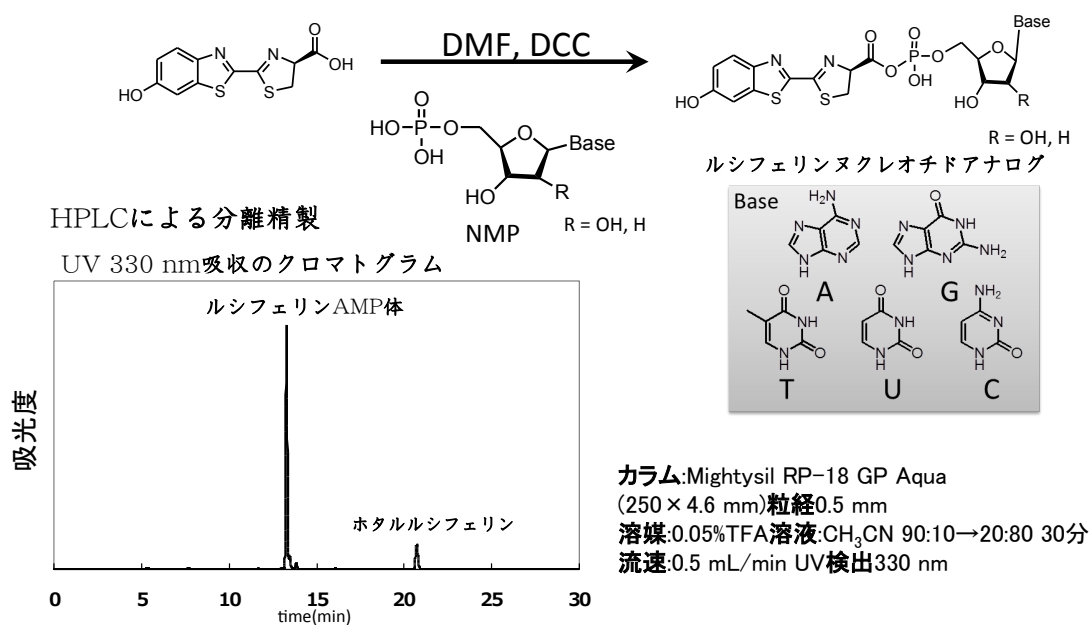


Fig. 5-6 NTP を用いた二段階発光反応の発光スペクトル (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである、図右に発光極大波長を記した)

dATP の場合以外は ATP の場合と同様の発光波長を示した。天然の発光系である ATP を加えた場合の発光波長と GTP、CTP を加えた場合の発光波長は殆ど同等であった。一方で ATP の糖部位がリボースからデオキシリボースに変わること、波長が 35 nm 長波長シフトする事がわかった。

5-4. 各種ルシフェリンヌクレオチドの合成

発光反応中間体 AMP 化体の合成は 2001 年に Branchini らによって報告されている²⁴⁾。本研究ではこの合成法に従い、各種ルシフェリンヌクレオチドの合成を行った。各種ヌクレオチドーリン酸 (NMP) と D-ルシフェリンを反応させた後、HPLC により分離精製を行い、330nm の吸光度から各種ルシフェリンヌクレオチドの濃度決定を行った (Scheme 5-1)。塩基を有さないルシフェリンヌクレオチド、安定化ルシフェリンヌクレオチドの合成も上記の方法に従い行った。



Scheme 5-1 NMP 化体の合成・分離精製

5-5. 各種ルシフェリンヌクレオチド **4**, **41~45** を用いた場合の相対発光活性評価

ホタルルシフェリン **1** と各種ホタルルシフェリンヌクレオチドの発光活性評価を行った (Fig. 5-7)。基質、酵素ルシフェラーゼとして Ppy を用い、30 秒間発光測定を行った。各ルシフェリンヌクレオチドの発光強度の推移を Fig. 5-8 に示した。

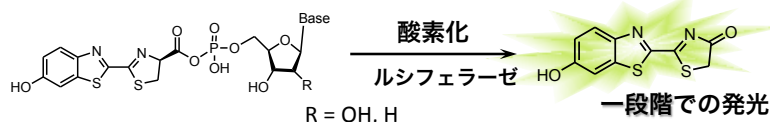


Fig. 5-7 NMP 化体を用いた一段階発光反応

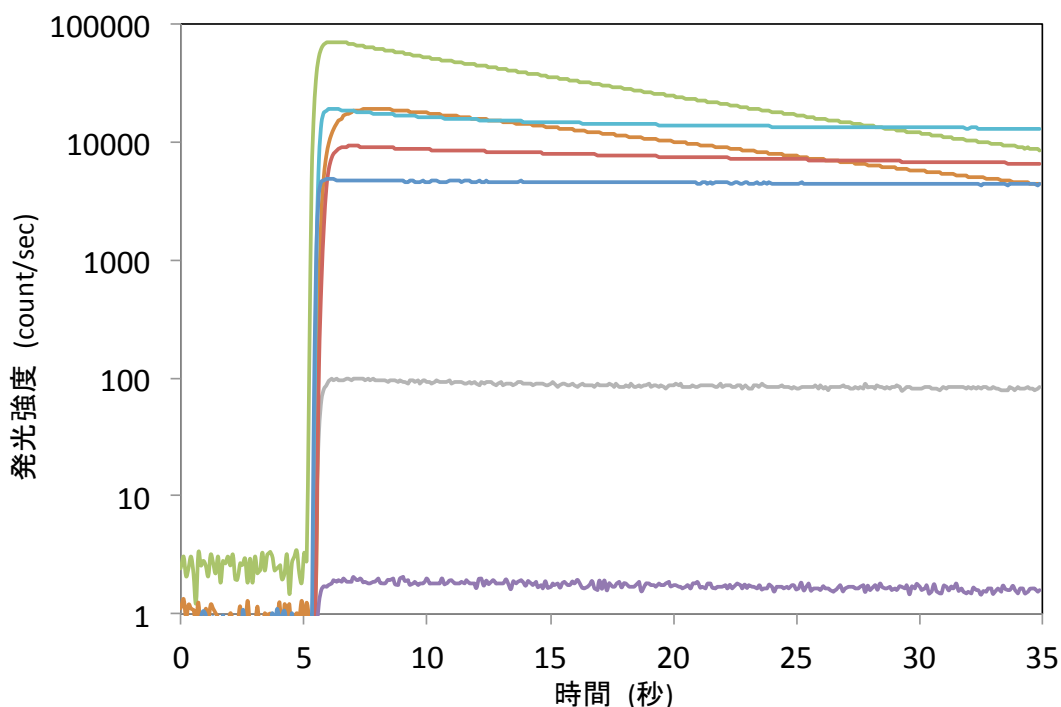


Fig. 5-8 NMP 化体を用いた一段階発光反応の発光経時変化 (AMP 化体 **4** と dAMP 化体 **41**, GMP 化体 **42**, CMP 化体 **43**, UMP 化体 **44**, dTMP 化体 **45** を酵素ルシフェラーゼを用いて発光させた場合の 30 秒間の発光経時変化を示した)

Table 5-2 NMP 化体を用いた一段階発光反応の発光比活性 (AMP 化体 **4** の発光強度を 100 とした場合のこの他 NMP 化体 **41~45** の発光比活性を示した)

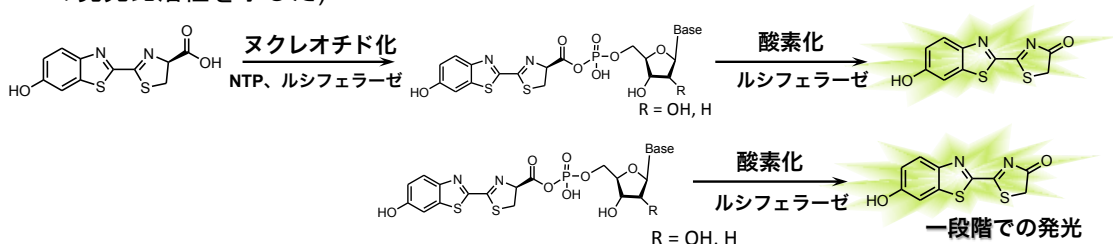
	AMP 化体 4	dAMP 化体 41	GMP 化体 42	CMP 化体 43	UMP 化体 44	dTMP 化体 45
発光比活性	100	10	10	20	5	0.002

いずれのルシフェリンヌクレオチドも発光活性を有していた。また dTMP 化体 **45** を除いて高い発光活性を示した (Table 5-2)。二段階反応では発光しなかった塩基がウリジン (U)、チミジン (dT) の場合にも発光活性が認められた。

5-6. 二段階反応と一段階反応の発光活性の比較

5-2. (p. 48) で行った各種 NTP を用いた場合の相対発光活性評価 (二段階) と 5-5. (p. 51) で行った各種ルシフェリンヌクレオチドを用いた場合の相対発光活性評価の結果を Table 5-3 にまとめた。二段階反応では発光しない **U**、**dT** や発光活性の極めて低い **C** においても、一段階発光反応ではいずれにおいても発光が確認された。またルシフェリンヌクレオチドアナログにおいては **dT** 以外では天然の発光反応であるルシフェリンと ATP の反応よりも 100 程度強い発光を示していた。酵素の高い基質特異性は一段回目の反応であるヌクレオチド化反応によって制御されており、酸素化反応においてはその特異性は著しく低くなっていることが明らかになった。

Table 5-3 各種ヌクレオチドを用いた二段階、一段階発光反応の発光活性の比較
(ホタルルシフェリン (1) を ATP を用いて発光させた場合の発光強度を 1 とした場合の発光比活性を示した)



Base /発光比活性	二段階反応 (NTP, N = Base)	一段階反応 (NMP, N = Base)
A	1	1000
dA	0.1	100
G	0.01	100
C	0.005	200
U	X	50
dT	X	0.02

5-7. 各種ルシフェリンヌクレオチド 41~45 を用いた場合の発光スペクトル

合成したホタルルシフェリンの各種ルシフェリンヌクレオチド 41~45 についての発光波長を測定した。基質、酵素 Ppy 存在下で 180 秒間測光した。各基質の生物発光スペクトルの推移を Fig. 5-9 に示す。天然の二段階発光による発光波長と AMP 化体 4 の発光波長は殆ど同様であったに対し、この他すべてのルシフェリンヌクレオチドにおいて、発光波長が 50 nm 長波長シフトしていた。

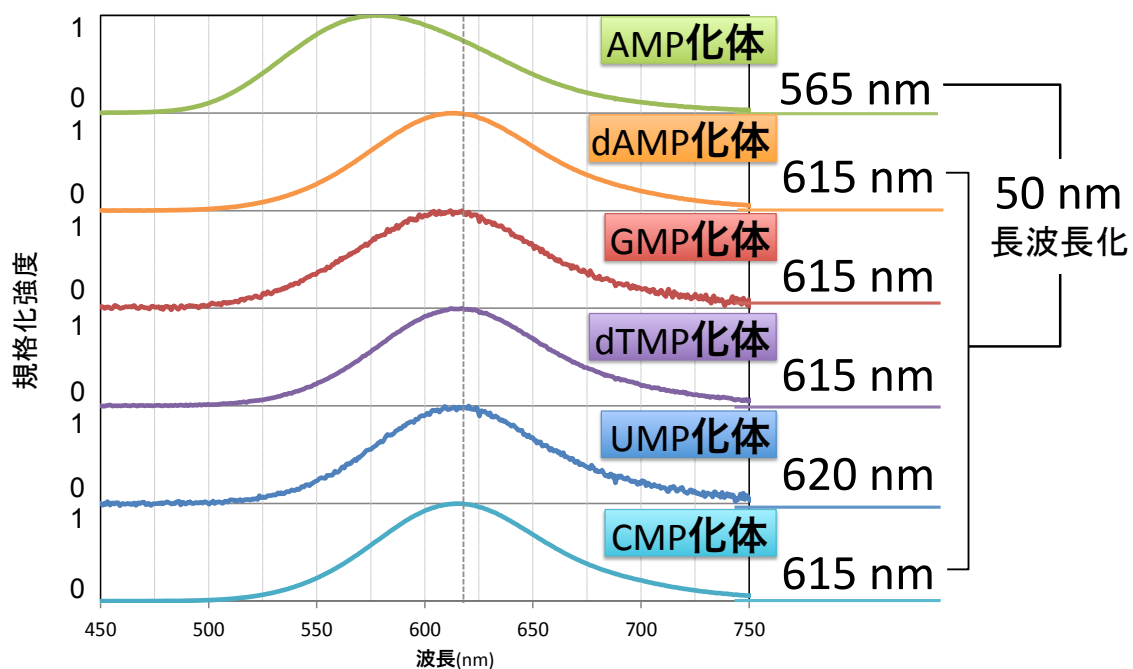


Fig. 5-9 AMP 化体 4 と NMP 化体 41~45 を用いた一段階発光反応の発光スペクトル (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである、図右に発光極大波長を記した)

5-8. 塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチド **46**, **47** を用いた場合の相対発光活性評価

次に、合成した AMP 化体のアデニン部分をなくしたルシフェリンリボース化体 **46** とルシフェリングルコース化体 **47** の発光測定を行った。基質、酵素ルシフェラーゼとして Ppy を用い、30 秒間発光測定を行った。各ルシフェリンヌクレオチドの発光強度の推移を Fig. 5-10 に示した。天然の二段階の発光反応の場合の発光活性を 100 とした場合のルシフェリンヌクレオチドの発光比活性を Table 5-4 に示した。ルシフェリン AMP 化体 **4** から塩基部位をなくしたルシフェリンリボース化体 **46** でも発光することがわかった。またその発光は比較的強く天然の二段階発光の 40% 程度の発光を示した。

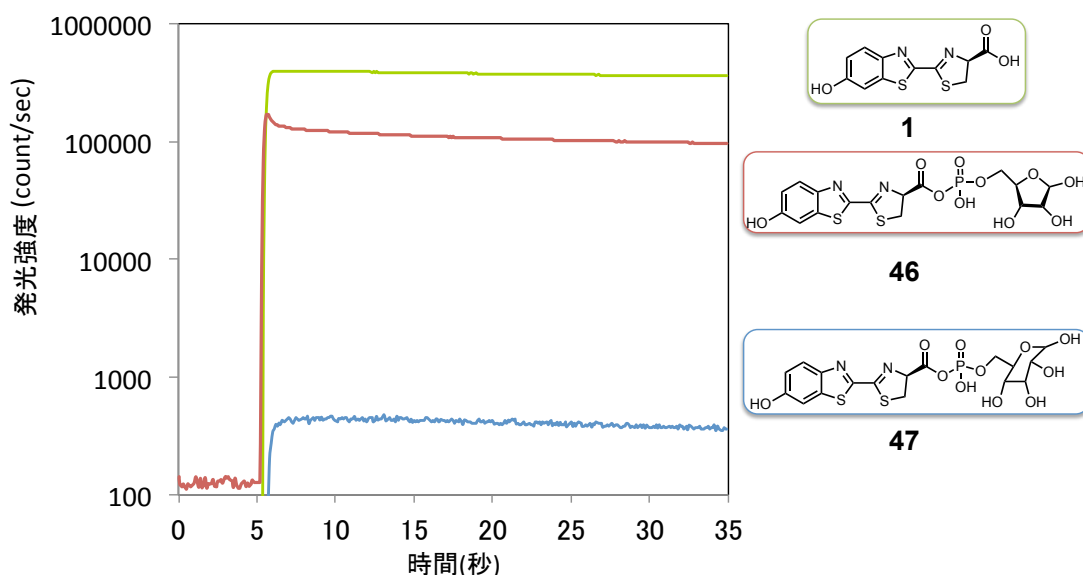


Fig. 5-10 塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチドの発光経時変化 (ホタルルシフェリン (1) とリボース化体 **46** とグルコース化体 **47** を酵素ルシフェラーゼを用いて発光させた場合の 30 秒間の発光経時変化を示した)

Table 5-4 塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチドの発光比活性 (ホタルルシフェリン (1) の 30 秒の発光積算値を 100 とした場合のリボース化体 **46**, グルコース化体の発光比活性を示した)

	ホタルルシフェリン (1)	ルシフェリンリボース化体 46	ルシフェリングルコース化体 47
発光比活性	100	43	0.11

5-9. 塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチド **46**, **47** を用いた場合の発光スペクトル

合成したホタルルシフェリン (**1**) とルシフェリンリボース化体 **46**、ルシフェリングルコース化体 **47** についての発光波長を測定した。基質、酵素 Ppy 存在下で 180 秒間測光した。各基質の生物発光スペクトルの推移を Fig. 5-11 に示す。塩基部位の無いルシフェリンリボース化体とルシフェリングルコース化体は 4-6 で測定した各種ルシフェリンヌクレオチドと同様の発光スペクトルを示した。

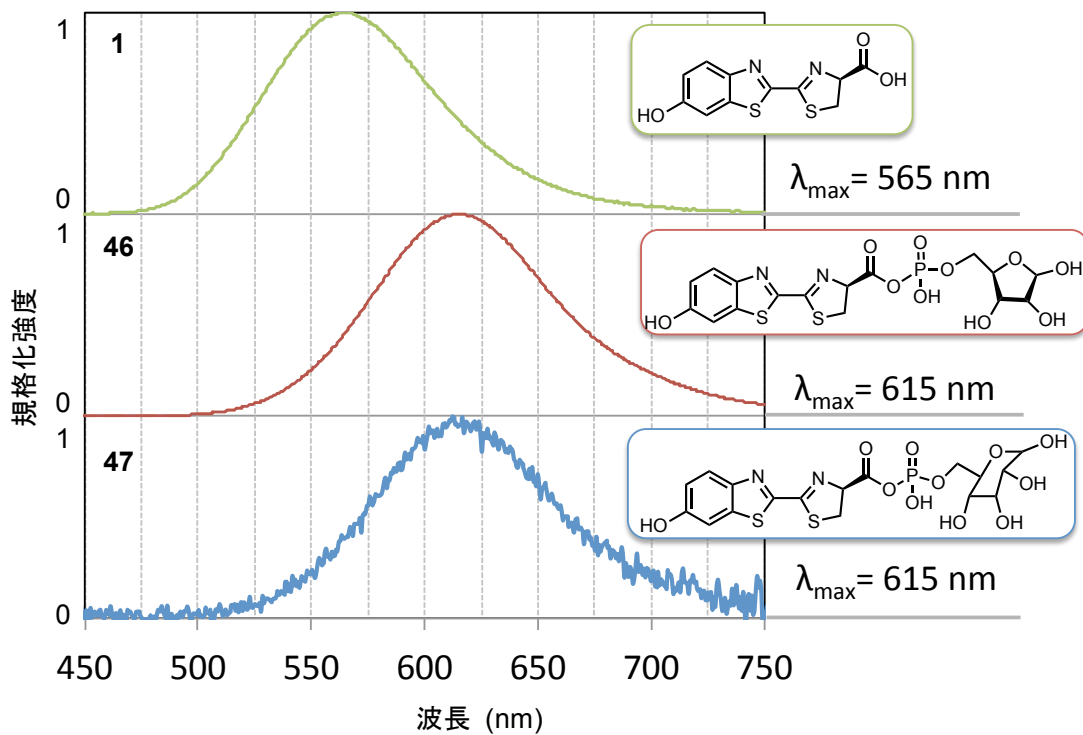


Fig. 5-11 ホタルルシフェリン (**1**) と塩基部位を有さないルシフェリンヌクレオチド **46**, **47** の発光スペクトル (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである、図右に発光極大波長を記した)

5-10. リン酸結合部位を構造改変したルシフェリンヌクレオチドの発光波長測定

ルシフェリンヌクレオチドの構造安定性に大きく関与していると予想されるリン酸ジエステル部分の構造をリン酸アミド構造に変えた安定化ルシフェリンヌクレオチドを合成した。実際の構造はリン酸結合部位の酸素原子を窒素原子に置き換えた構造である。合成した安定化ルシフェリンヌクレオチドについての発光波長を測定した。基質、酵素 Ppy 存在下で 180 秒間測光した。各基質の生物発光スペクトルの推移を Fig. 5-12 に示す。構造安定性を高めた安定化ルシフェリンヌクレオチドでも発光活性が確認できた。また、青色発光アナログ、赤色発光アナログに関しても同様の安定化ルシフェリンヌクレオチドを合成し、発光活性を測定した所、従来の発光スペクトルと同様の発光波長を示した。

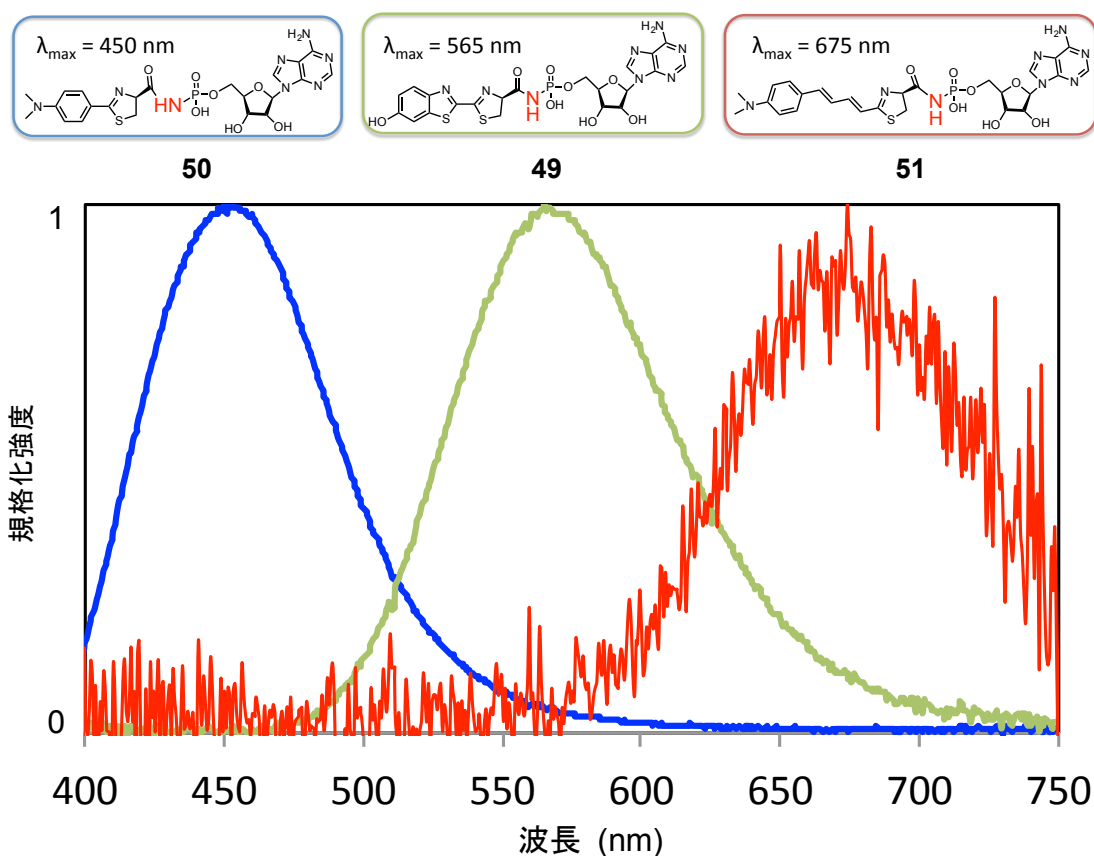


Fig. 5-12 リン酸エステル部位を改変したルシフェリンヌクレオチドの発光スペクトル (発光スペクトルは全て発光極大波長の強度でノルマライズしたデータである)

5-11. 安定化ルシフェリンヌクレオチドの安定性評価

安定化ルシフェリンヌクレオチド **25** を室温で静置し、一日おきに 発光強度の測定を行い、その発光強度から化合物の安定性を評価した。結果を Fig. 5-13 に示す。発光測定の結果、三日間室温で静置してもその発光強度は殆ど変化しなかった。安定性は十分である事が示された。

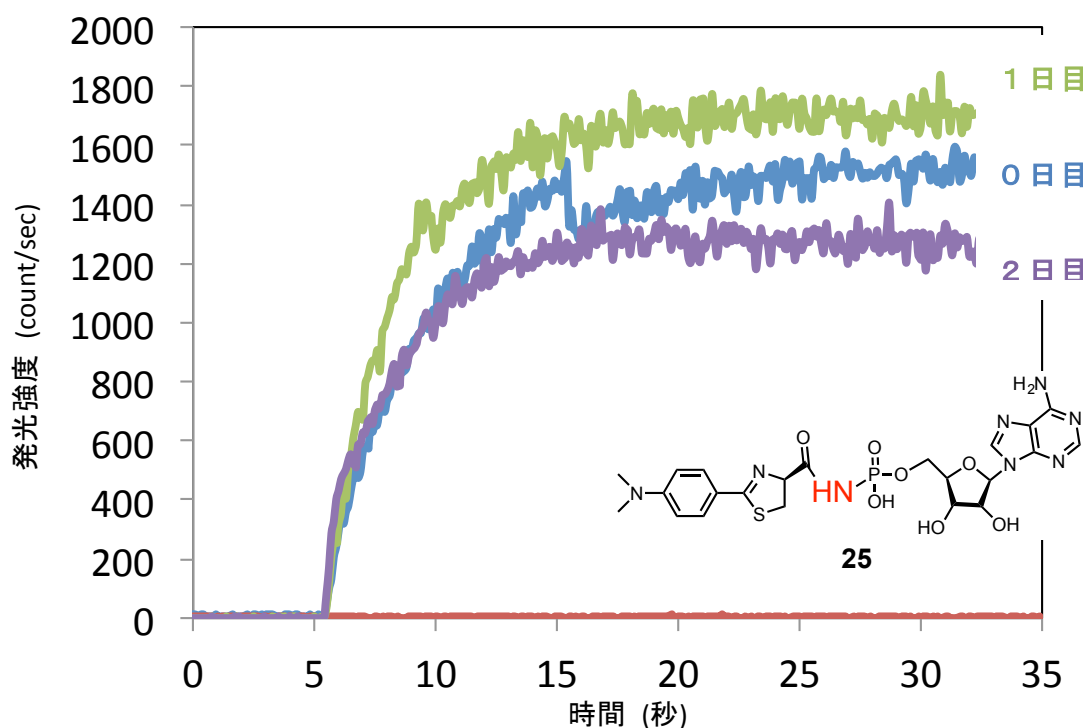


Fig. 5-13 安定化ルシフェリンヌクレオチドの安定性評価 (安定化ルシフェリンヌクレオチド **25** を室温で一日置きに発光測定を行い、30 秒の経時変化を示した)

5-12. ルシフェリンヌクレオチドのヌクレオチド部分の構造活性相関まとめ

第5章ではルシフェリンヌクレオチドアナログの合成をとその発光活性評価を行った。得られた結果は以下に示すような3つである。

1. ルシフェリンヌクレオチドの糖部位、塩基部位の構造を様々に変えたアナログを合成し、その構造活性相関データを明らかにした (Fig. 5-14)。発光反応中間体の塩基部分については、アデニン以外の他の塩基でも十分に強い発光を示すことが明らかになった。また、塩基部位を持たないルシフェリンヌクレオチド **46**, **47** でも発光活性を有する事が明らかになった。このような結果から、ルシフェリンヌクレオチドに対する酵素認識において、塩基(アデニン)の存在が必要でない事を明らかにした (5-5., 5-8.)。

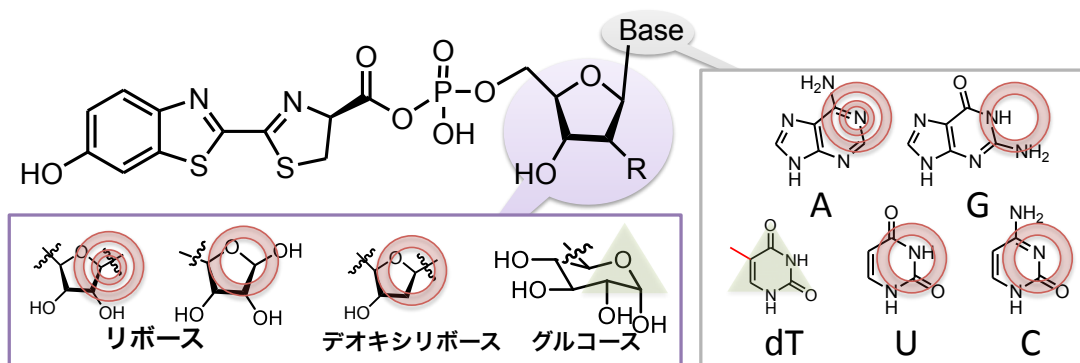


Fig. 5-14 ルシフェリンヌクレオチドアナログの構造活性相関

2. 発光反応中間体のリン酸エステル部位の構造を変えることで安定な発光反応中間体アナログの開発を行った (Fig. 5-15)。構造安定性を高めるために、ルシフェリンヌクレオチドのリン酸エステル部位が低安定性の原因であると考え、この部分を Fig. 5-15 に示すような構造に変換したルシフェリンヌクレオチド **50** を合成した。ルシフェリンヌクレオチド **50** が発光活性を有する事を明らかにした (5-10.)。

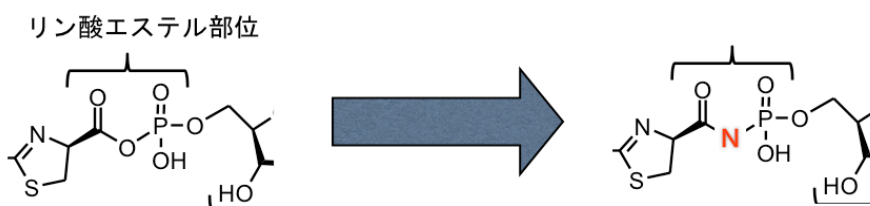


Fig. 5-15 リン酸エステル部位の改変

3. リン酸エステル部分を改変した多色ルシフェリンアナログヌクレオチドを合成し、ホタル生物発光系をモデルとした安定な一段階発光反応の多色アナログへの応用を行った (Fig. 5-16)。特に青色発光アナログは従来の二段階の発光反応での発光活性は無く、発光しないアナログであったが、高安定性青色発光反応中間体を用いることで、強く発光させる事が可能になった (5-11.)。

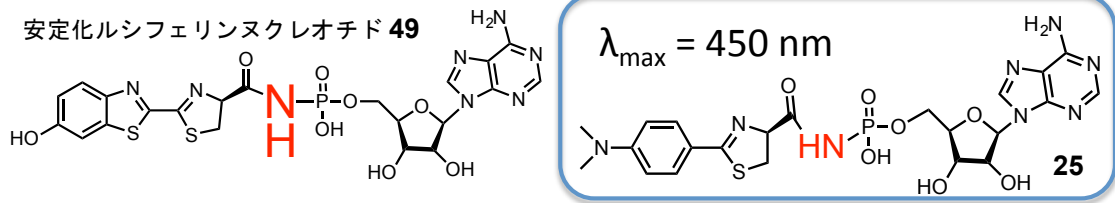


Fig. 5-16 安定化ルシフェリンヌクレオチド

以上の結果は AMP 化反応の厳しい基質特異性と比較し、酸素化反応における基質特異性の低さを示唆しており、核酸部分の構造は様々に変換することが出来ると考えられる。つまり、発光反応の高輝度化のみならず、高安定性発光反応中間体の核酸部分の構造を用途に合わせて、様々に変換していくことで水溶性の付与や発光基質の高機能化など発光基質の機能材料に繋げる事が出来ると考えられる。

第6章 結語

本研究では一貫してホタル生物発光反応に関わる研究を行った。具体的には有機化学的なアプローチからのルシフェリンアナログの合成、in vitro で活性評価と発光反応の解析、個体レベルでの *in vivo* イメージングでの性能評価を行った。

第2章ではホタルルシフェリン 7 位に置換基導入したルシフェリンアナログの合成と発光活性評価を行い、ベンゾチアゾール環上 7 位を電子的、立体的に置換しても発光活性は大きく損なわれる事はなく、また発光波長はいずれの置換基導入においても 5~20 nm 程度の長波長シフトが観測された。これまで殆ど行われていなかったホタルルシフェリンのベンゾチアゾール環上への置換基導入は発光強度に対しても、発光波長に対しても大きな影響は与えない事がわかった。この事から、7 位近傍の酵素内環境には比較的余裕のある空間が存在し、7 位が置換されていても柔軟に受け入れていると考えられる (2-5.)。

第3章では生物発光波長と化学発光波長の違いに着目し研究を行った。ホタル生物発光の発光種であるオキシルシフェリンは溶バトクロミズム性を有することが知られており、反応場の環境により様々に波長を変えることが知られている。本研究では、化学発光波長をルシフェリンが持つ潜在的な発光波長として考えた時に生物発光波長がどのように変化するか、つまり酵素の活性中心付近の反応場がどのように変化するかを合成したルシフェリンアナログを用いて系統的に測定した。主に置換基導入による効果と分子長の違いによる効果を調べた。結果から、置換基導入による効果は殆ど無く、分子長の違いによりアナログの活性中心での環境が変わる事が明らかになった (Fig. 6-1, 3-4.)。

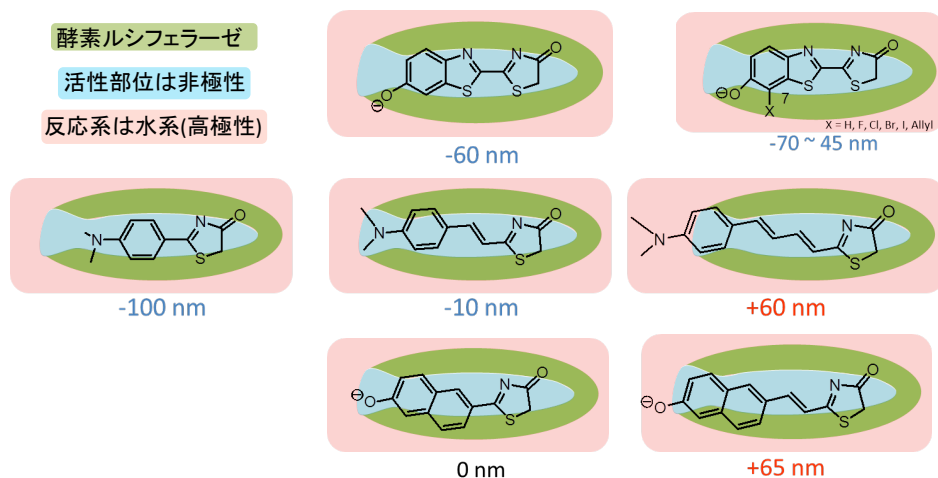


Fig. 6-1 ルシフェリンアナログの酵素活性部位でのイメージ図

第 4 章では近赤外発光ルシフェリンのイメージングへの応用を行った。個体レベルでの *in vivo* 発光イメージング技術は、腫瘍学分野では非常に盛んに用いられているが、これから脳神経科学や再生医療等の先端医学の発展に欠くことのできない技術になるであろう。加えて、現在マウスやラットレベルの動物が主に使用されているが、小動物の実験ではイメージング像の高精細化、三次元化が求められている。第 4 章で示した生体透過性の高い近赤外発光ルシフェリンを用いた *in vivo* イメージング実験の結果、技術はイメージング像の高精細化、高感度化(*in vivo* 一細胞イメージング)、3D イメージングの実現に大きな期待を与える結果となっているであろう。また今後、実験動物の大型化(例えば、マーモセットなど)が進むと考えられるが、実験動物の大型化には同様の技術が必須技術である事は明白である。生体透過性の高い近赤外発光ルシフェリンを用いた動物実験結果は従来の D-ルシフェリンの発光では実現困難であると考えられていた 3D イメージングや大型動物での *in vivo* イメージングへの扉を開いたと言える。

一方で、今回の動物実験では既存の実験系に対して発光基質を D-ルシフェリンから近赤外発光ルシフェリンに変更し、動物に投与するという実験を行った。検出機器の IVIS では波長間の検出感度は 600 nm で最も高く、近赤外発光ルシフェリン ($\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) ではおよそ 30%程度検出感度が低くなる。また、今回用いたルシフェラーゼ luc+は D-ルシフェリンに最適化された酵素である。つまり、近赤外発光ルシフェリンに最適化した検出装置やルシフェラーゼを開発することで、更なる高輝度(感度)化が期待できる。実際に、これまでの *in vivo* イメージング実験では観測できなかった事柄を観察可能にするためには 10 倍程度の高輝度化では不足である事を指摘される。またラットやマーモセットを用いる場合には更なる高輝度化は不可欠である。

第 5 章ではホタル生物発光系の高輝度化を目指しホタルルシフェリンヌクレオチドの構造活性相関研究を行った。これまで、当研究室ではルシフェリンの化学構造と発光活性との間の構造活性相関について調べてきた。本論文では二段階目の反応の基質であるホタルルシフェリンヌクレオチドの特にヌクレオチド部位に注目しその構造活性相関研究を行った (Fig. 6-2)。一段回目の AMP 化反応の厳しい基質特異性と比較し、酸素化反応における基質特異性は非常に低いことが明らかになった (5-6., 5-8.)。この事は核酸部分の構造は様々に変換することが出来る事を意味している。

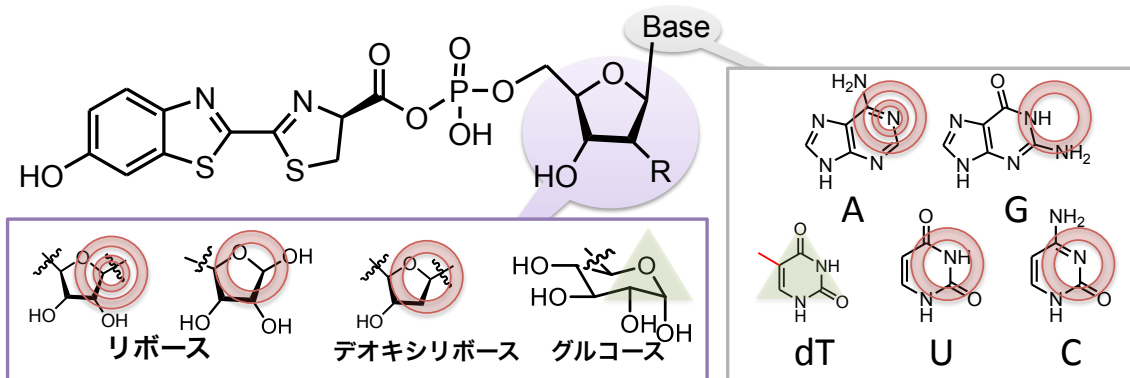


Fig. 6-2 ルシフェリンヌクレオチドの構造活性相関

また安定性に問題のあったルシフェリンヌクレオチドのリン酸結合部分をリン酸アミド構造に変換する事でこれも解決した (5-10., 5-11.)。つまり、高安定性発光反応中間体の核酸部分の構造を用途に合わせて、様々に変換していくことで水溶性の付与や発光基質の高機能化など発光基質の機能材料に繋げる事が出来る結果であると考えられる (Fig. 6-3)。

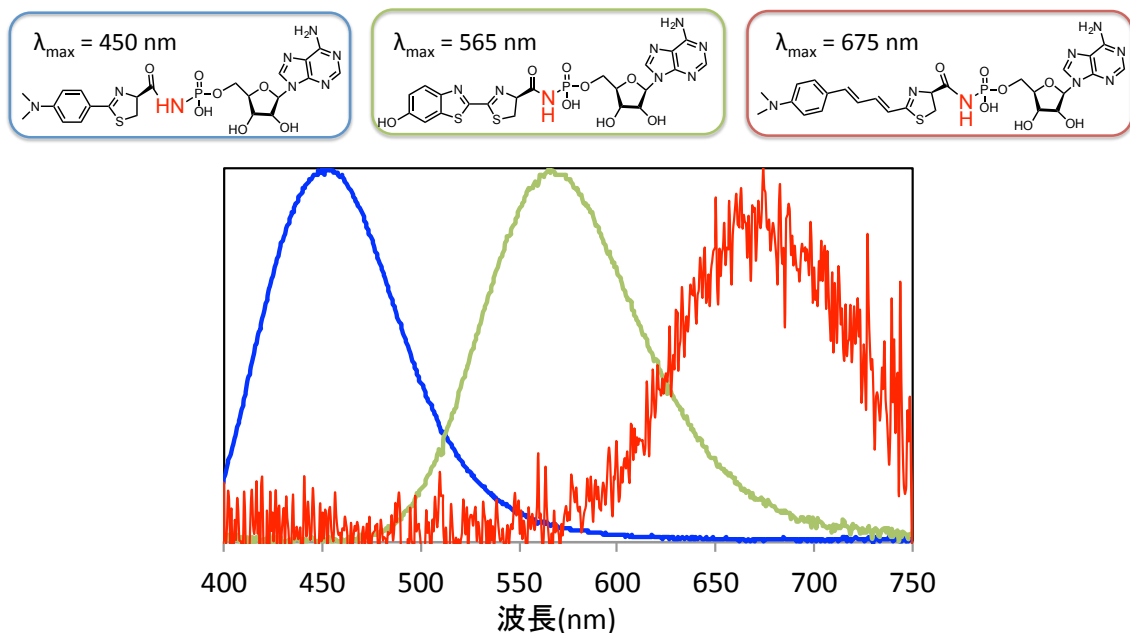


Fig. 6-3 高安定性ルシフェリンヌクレオチドの発光スペクトル

in vivo イメージングは異分野間の複合技術であるため、緑色蛍光タンパク質等を用いた蛍光イメージング法は顕微鏡開発、蛍光イメージング技術開発、蛍光材料開発と異分野の研究者が一体となりめまぐるしく発展を遂げてきた。同様に、発光イメージング法も本論文で示したような多彩な発光材料群と発光技術を軸にイメージング装置開発、イメージング技術開発、実験動物開発と一体となり技術開発を行っていくことで、これまで見ることの出来なかった生命現象のイメージングを実現していきたいと考えている。

第7章 実験の部

7-1. 合成の部

1) 機器分析、測定装置

pH 測定

東洋濾紙株式会社製 pH 試験紙 UNIV を用いて測定した。

融点測定 (m.p.)

Yamamoto 社製 model MP-2 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)

堀場製作所社製 FT-730 フーリエ変換赤外分光光度計を用い、錠剤法 (KBr)、溶液法 (CHCl_3 、 CH_3OH) により測定を行った。測定値は波数 (cm^{-1}) で記載した。なお、幅広い吸収には br と記した。

^1H 核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR)

日本電子社製 Lambda-270 型装置 (270 MHz) を用いて測定し、

“ ^1H NMR (測定周波数, 測定溶媒)

δ 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 ($\delta = 0$) 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}C NMR)

日本電子社製 Lambda-270 型装置 (67.8 MHz) を用いて測定し、

“ ^{13}C NMR (測定周波数, 測定溶媒)、 δ ケミカルシフト値 (多重度)”

と記載した。ケミカルシフト値 (δ) はテトラメチルシラン ($\delta = 0$) 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) で表示した。

質量スペクトル (MS)

日本電子社製 JMS-600H 型二重収束型質量分析計を用い、電子衝撃法 (EI、イオン化エネルギー : 70 eV) により測定した。

日本電子社製 JMS-T100LC 型 TOF 型質量分析計 AccuTOF を用い、エレクトロスプレーイオン化法 (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 温度 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い、流速 50 µl/min とした。

“MS (ESI) *m/z* 質量数 (相対強度)” と記載した。

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った。発色剤としては *p*-アニスアルデヒド (9.3 ml) と酢酸 (3.8 ml) をエタノール (340 ml) に溶解し、濃硫酸 (12.5 ml) を添加したものをを用いた。

分取用薄層クロマトグラフィー (PTLC)

E.Merck 社製の TLC プレート、シリカゲル 60F₂₅₄ (Art.5744) 厚さ 0.5 mm を用いるか、あるいは E.Merck 社製の薄層クロマトグラフィー用シリカゲル 60GF₂₅₄ (Art.7730) を 20 cm×20 cm のガラスプレート上に、厚さ 1.75 mm に調整したものをを用いて行い

“ {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。

シリカゲルカラムクロマトグラフィー

E.Merck 社製のシリカゲル 60F₂₅₄ (Art.7734) を用いて行い、

“使用したシリカゲルの重さ, 展開溶媒” と記載した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

Agilent 社製の 1100 シリーズを用いた。検出部は DAD (吸光度検出)、FLD (蛍光検

出) を用いた。

分析に用いたカラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP Aqua (粒子径 5 μm 、長さ 250 mm、内径 4.6 mm)、光学純度検定にはダイセル化学工業社製 Chiralcel OD-RH、OZ-RH (粒子径 5 μm 、長さ 150 mm、内径 4.6 mm) を用いた。

分析条件はいずれも流速 0.5 ml/min、 CH_3CN 、0.05%TFA 水溶液の混合溶媒系でその比率は CH_3CN : 0.05%TFA 水溶液 = 10: 90 \rightarrow 90: 10 の 30 分間のリニアグラジエントで行った。

液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)

サーモフィッシャーサイエンティフィック社製イオントラップ型質量分析計 LCQ-Fleet を用い、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) により測定した。

分析に用いたカラムはサーモフィッシャー社製 Hypersil GOLD (粒子径 3 μm 、長さ 10 cm、内径 2.1 mm) を用いた。

分析条件はいずれも流速 0.3 ml/min、 CH_3CN 、0.05%TFA 水溶液の混合溶媒系でその比率は CH_3CN : 0.05%TFA 水溶液 = 10: 90 \rightarrow 90: 10 の 30 分間のリニアグラジエントで行った。

3) 基本操作

反応後の抽出溶液の乾燥は、飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸ナトリウム、もしくは無水硫酸マグネシウムを加えることで行った。

溶液の減圧濃縮はアスピレーターでの減圧下 (20~30 mmHg)、ロータリーエバポレーターを用いて行った。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) を用いて行った。

溶媒の混合比は全て体積比で表した。

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、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

関東化学株式会社製の有機合成用脱水溶媒、あるいは特級溶媒を、モレキュラーシーブス (4A) を用いて乾燥させて使用した。

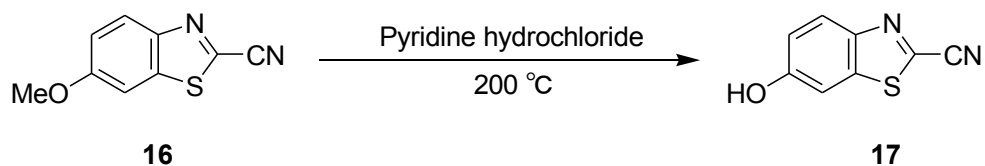
NMR 測定用溶媒

以下に示すものをそのまま用いた。

CDCl_3 : ISOTEC Inc.製 99.7 ATOM%D、0.03% TMS

CD_3OD : ISOTEC Inc.製 99.8 ATOM%D (~0.7 ATOM% ^{13}C)、0.05% TMS

2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** の合成



2-シアノ-6-メトキシベンゾチアゾール (**16**) (51.4 mg, 0.271 mmol) にピリジン塩酸塩 (2.32 g) を加え、アルゴン雰囲気下で 200 °C に加熱し、ピリジン塩酸塩を融解させ 30 分間攪拌した。反応混合物を放冷した後、1 M 塩酸 (50 ml) を加え、酢酸エチル (3×50 ml) で抽出し、有機層を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シリカゲルカラムクロマトグラフィー {20 cm×20 cm×1.75 mm×1 枚; ヘキサン-酢酸エチル (1: 1) } にて精製し、2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール (**17**) (47.2 mg, 99%) を薄黄色固体として得た。

2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール (**17**)

mp 155-170 °C decomp.

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

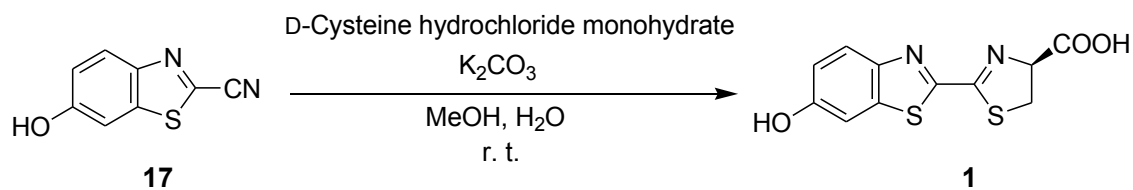
δ 7.17 (1H, dd, *J* = 2.7, 9.2 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 9.2 Hz)

¹³C NMR (67.8 MHz, CD₃OD)

δ 107.00 (d), 114.29 (s), 119.63 (d), 126.58 (d), 133.90 (s), 139.00 (s), 147.28 (s), 160.33 (s)

MS (EI) *m/z* 176 (M⁺, 100), 124 (5)

ホタルルシフェリン 1 の合成



2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** (47.2 mg, 0.268 mmol) 、D-システイン塩酸塩一水和物 (46.9 mg, 0.298 mmol) をメタノール: 蒸留水 (2: 1, 15 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、炭酸カリウム (39.8 mg, 0.288 mmol) を加え、室温で 40 分間攪拌した。反応混合物に 1 M 塩酸 (0.7 ml) を加え酸性にした後、メタノールを減圧下濃縮した。得られた固体を濾過し、蒸留水で洗浄してホタルルシフェリン **1** (53.4 mg, 72%) を薄黄色固体として得た。

ホタルルシフェリン 1

mp 180-187 °C decomp.

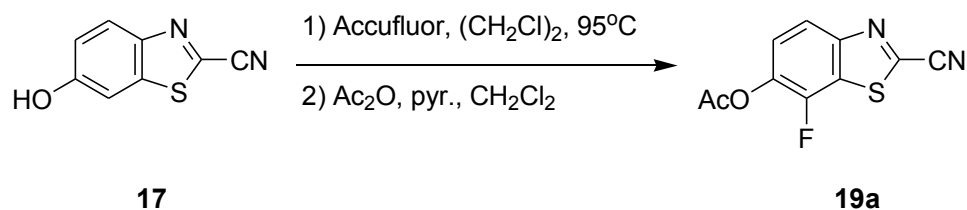
IR (KBr 錠剤法) 3346, 1701 cm^{-1}

¹H NMR (270 MHz, DMSO)

δ 3.56 (1H, dd, $J = 8.1, 11$ Hz) , 3.62 (1H, dd, $J = 9.5, 11$ Hz) , 5.28 (1H, dd, $J = 8.1, 9.5$ Hz) , 6.94 (1H, dd, $J = 2.7, 8.9$ Hz) , 7.33 (1H, d, $J = 2.7$ Hz) , 7.84 (1H, d, $J = 8.9$ Hz) , 10.2 (1H, brs, OH)

MS (ESI) $[M+H]^+$; m/z 281.004

7-フルオロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19a** の合成



2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** (100 mg, 0.56 mmol) をジクロロエタン (5 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、1-フルオロピリジニウムトリフルオロメタンスルホネート (169 mg, 0.68 mmol) を加え、室温で 78 時間攪拌した。反応混合物を冷却後、水 (30 ml) を加え、酢酸エチル (3×50 ml) で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣は分離することなく次の反応に用いた。

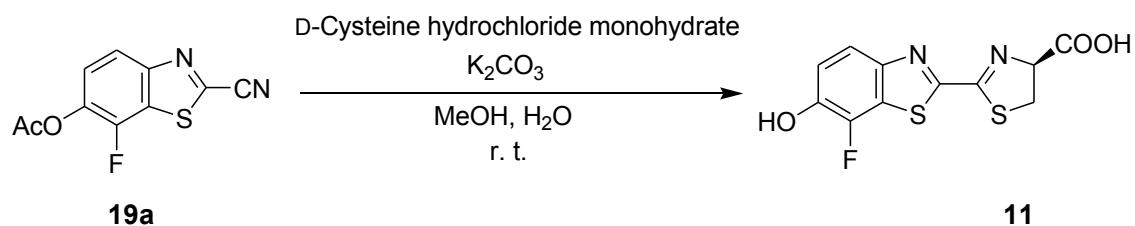
残渣をジクロロメタン (3 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、ピリジン (90 ml, 1.12 mmol) と無水酢酸 (105 ml, 1.12 mmol) を加え、室温で 4 時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を分取薄層シリカゲルカラムクロマトグラフィー {20 cm×20 cm×1.75 mm×1 枚; ヘキサン-酢酸エチル (1:1)} にて精製し、7-フルオロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19a** (26 mg, 二段階収率 22.6%) を薄黄色固体として得た。

7-フルオロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19a**

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 8.09 (1H, dd, *J* = 0.8, 8.9 Hz), 7.41 (1H, dd, *J* = 7.3, 8.9 Hz), 2.38 (1H, s)

7-フルオロ-ホタルルシフェリン **11** の合成



7-フルオロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19a** (52 mg, 0.18 mmol)、D-システイン塩酸塩一水和物 (62.5 mg, 0.36 mmol) をメタノール: 蒸留水 (2: 1, 9 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、炭酸カリウム (49 mg, 0.36 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物に1 M 塩酸 (1 ml) を加え酸性にした後、メタノールを減圧下濃縮した。得られた固体を濾過し、蒸留水で洗浄して7-フルオロ-ホタルルシフェリン **11** (49 mg, 50%) を黄色固体として得た。

7-フルオロ-ホタルルシフェリン **11**

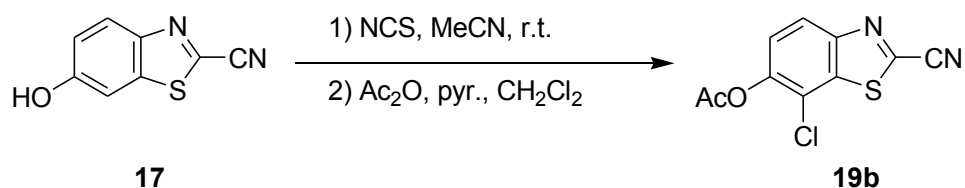
IR (KBr 錠剤法) $3567, 1731\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CD_3OD)

δ 7.74 (1H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), 7.19 (1H, dd, $J = 8.6\text{ Hz}$), 5.39 (1H, t, $J = 9.2\text{ Hz}$),
3.76 (1H, dd, $J = 9.2\text{ Hz}$)

MS (EI) m/z 298 ($M^{+\cdot}$, 19%), 253 (62%)

7-クロロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19b** の合成



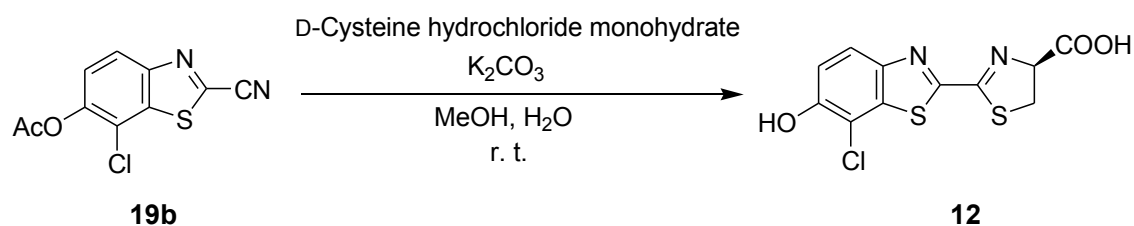
2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** (100 mg, 0.56 mmol) をアセトニトリル (6 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、NCS (81 mg, 0.61 mmol) を加え、室温で1時間撹拌した。反応混合物に水 (10 ml) を加え、酢酸エチル (3×50 ml) で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣は分離することなく次の反応に用いた。残渣をジクロロメタン (3 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、ピリジン (90 ml, 1.12 mmol) と無水酢酸 (105 ml, 1.12 mmol) を加え、室温で4時間撹拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を分取薄層シリカゲルカラムクロマトグラフィー {20 cm×20 cm×1.75 mm×1 枚; ヘキサン-酢酸エチル (1:1) } にて精製し、7-クロロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19b** (94.3 mg, 80%) を薄黄色固体として得た。

7-クロロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19b**

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ7.97 (1H, dd, *J* = 1.4, 9.5 Hz), 7.30 (1H, dd, *J* = 1.6, 8.9 Hz), 2.68 (1H, s)

7-クロロ-ホタルルシフェリン **12** の合成



7-クロロ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19b** (41.5 mg, 0.18 mmol) 、D-システイン塩酸塩一水和物 (61.5 mg, 0.35 mmol) をメタノール: 蒸留水 (2: 1, 6 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、炭酸カリウム (50 mg, 0.35 mmol) を加え、室温で 90 分間攪拌した。反応混合物に 1 M 塩酸 (1 ml) を加え酸性にした後、メタノールを減圧下濃縮した。得られた固体を濾過し、蒸留水で洗浄して 7-クロロ-ホタルルシフェリン **12** (33.6 mg, 46%) を黄色固体として得た。

7-クロロ-ホタルルシフェリン **12**

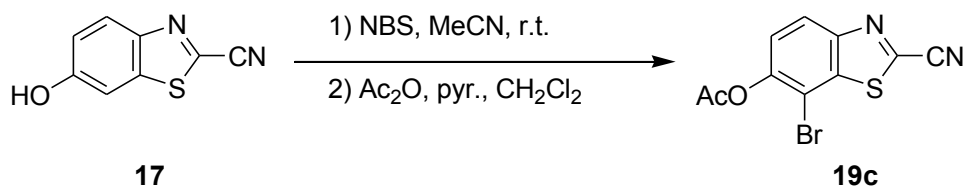
IR (KBr 錠剤法) 3565, 1733, 1716 cm^{-1}

1H NMR (270 MHz, CD_3OD)

δ 7.88 (1H, d, $J = 8.9$ Hz) , 7.07 (1H, dd, $J = 8.9$ Hz) , 5.40 (1H, t, $J = 9.1$ Hz) ,
3.76 (1H, dd, $J = 1.6, 9.1$ Hz)

MS (EI) m/z 314 ($M^{+\cdot}$, 23%) , 269 (100%)

7-ブロモ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19c** の合成



2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** (100 mg, 0.56 mmol) をアセトニトリル (5 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、NBS (108 mg, 0.61 mmol) を加え、室温で2時間撹拌した。反応混合物に水 (30 ml) を加え、酢酸エチル (3×50 ml) で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣は分離することなく次の反応に用いた。

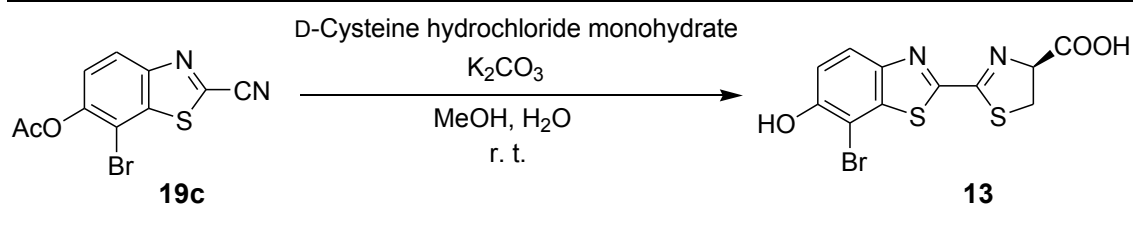
残渣をジクロロメタン (3 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、ピリジン (90 ml, 1.12 mmol) と無水酢酸 (105 ml, 1.12 mmol) を加え、室温で4時間撹拌した。反応混合物を減圧濃縮し、得られた残渣を分取薄層シリカゲルカラムクロマトグラフィー {20 cm×20 cm×1.75 mm×1 枚; ヘキサン-酢酸エチル (1:1) } にて精製し、7-ブロモ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19c** (127 mg, 二段階収率 76%) を薄黄色固体として得た。

7-ブロモ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19c**

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 8.00 (1H, dd, *J* = 1.6, 9.2 Hz), 7.41 (1H, dd, *J* = 1.4, 8.9 Hz), 2.68 (1H, s)

7-ブロモ-ホタルルシフェリン **13** の合成



7-ブロモ-2-シアノベンゾチアゾール-6-アセテート **19c** (52 mg, 0.18 mmol) 、D-システイン塩酸塩一水和物 (62.5 mg, 0.36 mmol) をメタノール: 蒸留水 (2: 1, 9 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、炭酸カリウム (49 mg, 0.36 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物に1 M 塩酸 (1 ml) を加え酸性にした後、メタノールを減圧下濃縮した。得られた固体を濾過し、蒸留水で洗浄して7-ブロモ-ホタルルシフェリン **13** (49 mg, 50%) を黄色固体として得た。

7-ブロモ-ホタルルシフェリン **13**

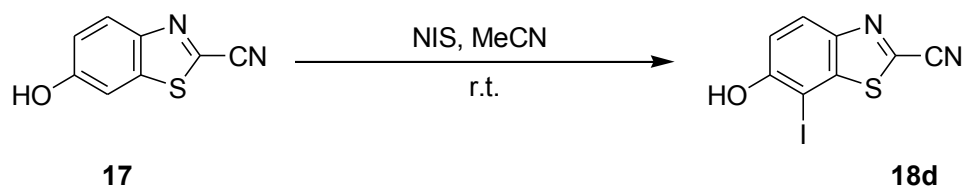
IR (KBr 錠剤法) 3565, 1733, 1716 cm^{-1}

1H NMR (270 MHz, DMSO)

δ 7.89 (1H, d, $J = 8.9$ Hz) , 7.17 (1H, dd, $J = 8.9$ Hz) , 5.40 (1H, t, $J = 9.2$ Hz) ,
3.77 (1H, dd, $J = 0.8, 9.2$ Hz)

MS (EI) m/z 358 ($M^{+\cdot}$, 17%) , 314 (82%)

2-シアノ-7-ヨード-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **18d** の合成



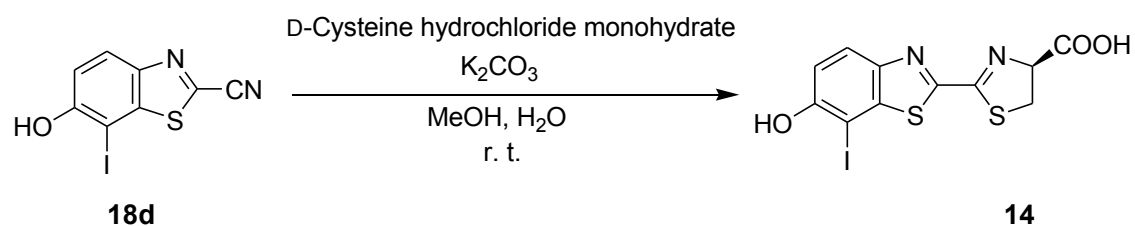
2-シアノ-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **17** (100 mg, 0.56 mmol) をアセトニトリル (6 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、NIS (141 mg, 0.61 mmol) を加え、室温で3時間撹拌した。反応混合物に水 (6 ml) を加え、酢酸エチル (3×30 ml) で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣を分取薄層シリカゲルカラムクロマトグラフィー {20 cm×20 cm×1.75 mm×1 枚; ヘキサン-酢酸エチル (1:1)} にて精製し、2-シアノ-7-ヨード-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **18d** (166 mg, 98%) を薄黄色固体として得た。

2-シアノ-7-ヨード-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **18d**

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 7.98 (1H, dd, *J* = 1.9, 9.1 Hz), 7.17 (1H, dd, *J* = 1.6, 9.1 Hz)

7-ヨード-ホタルルシフェリン 14 の合成



2-シアノ-7-ヨード-6-ヒドロキシベンゾチアゾール **18d** (45.7 mg, 0.15 mmol)、D-システイン塩酸塩一水和物 (33.5 mg, 0.19 mmol) をメタノール: 蒸留水 (2: 1, 10 ml) に溶解し、アルゴン雰囲気下、炭酸カリウム (28.3 mg, 0.18 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応混合物に1 M 塩酸 (1 ml) を加え酸性にした後、メタノールを減圧下濃縮した。得られた固体を濾過し、蒸留水で洗浄して7-ヨード-ホタルルシフェリン **14** (46.6 mg, 76%) を黄色固体として得た。

7-ヨード-ホタルルシフェリン **14**

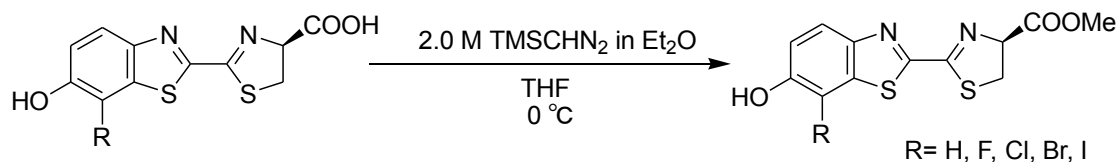
IR (KBr 錠剤法) $3546, 1716\text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H NMR}$ (270 MHz, CD_3OD)

δ 7.86 (1H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), 7.20 (1H, d, $J = 8.9\text{ Hz}$), 5.40 (1H, t, $J = 8.6\text{ Hz}$),
3.77 (1H, dd, $J = 8.6\text{ Hz}$)

MS (EI) m/z 406 ($M^{+\cdot}$, 23%), 362 (78%)

ルシフェリンメチルエステルの一般合成法



ルシフェリン (**1**, 32.8 mg, 0.117 mmol, 1.0 eq.) のテトラヒドロフラン溶液 (6 ml, 30 mM) に氷浴上で 2.0 M トリメチルシリルジアゾメタン ジエチルエーテル溶液 (0.3 ml, 0.6 mmol, 5.0 eq.) を加え、1 時間攪拌した。反応混合物に酢酸 (0.5 ml) を加え更に 5 分間攪拌後、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 [20 cm×20 cm×0.5 mm 2 枚; クロロホルム-酢酸エチル (1: 1)] にて精製し、ルシフェリンメチルエステル (54.1 mg, 66%) を無色固体として得た。

ホタルルシフェリンメチルエステル **27**

mp 214 °C- decomp.

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 3.74 (1H, d, *J* = 9.2 Hz) , 3.75 (1H, d, *J* = 9.2 Hz) , 3.83 (3H, s) , 5.41 (1H, t, *J* = 9.2 Hz) , 7.06 (1H, dd, *J* = 2.3, 8.9 Hz) , 7.33 (1H, d, *J* = 2.3 Hz) , 7.89 (1H, d, *J* = 8.9 Hz)

¹³C NMR (67.8MHz, CD₃OD)

δ 35.68 (t) , 53.23 (q) , 79.33 (d) , 107.33 (d) , 118.24 (d) , 125.94 (d) , 139.11 (s) , 148.11 (s) , 158.29 (s) , 159.09 (s) , 168.02 (s) , 172.20 (s)

MS (EI) *m/z* 294 (M⁺ , 19%) , 235 (100%)

(R = F) 7-フルオロ-ホタルルシフェリンメチルエステル **28** (50%)

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 3.77 (1H, d, *J* = 8.9 Hz) , 3.83 (3H, s) , 5.43 (1H, t, *J* = 8.9 Hz) , 7.21 (1H, t, *J* = 8.3 Hz) , 7.75 (1H, d, *J* = 8.3 Hz)

(R = Cl) 7-クロロ-ホタルルシフェリンメチルエステル **29** (63%)

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

δ 3.77 (1H, dd, *J* = 1.6, 8.9 Hz) , 3.83 (3H, s) , 5.43 (1H, t, *J* = 8.9 Hz) , 7.18 (1H, d, *J* = 8.9 Hz) , 7.85 (1H, d, *J* = 8.9 Hz)

(R = Br) 7-ブromo-ホタルルシフェリンメチルエステル **30** (50%)

¹H NMR (270 MHz, CD₃OD)

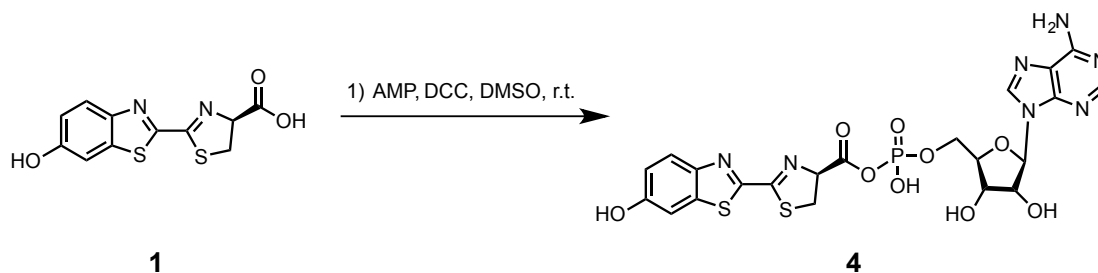
δ 3.77 (1H, dd, *J* = 1.3, 9.2 Hz) , 3.83 (3H, s) , 5.43 (1H, t, *J* = 9.2 Hz) , 7.16 (1H, d, *J* = 8.9 Hz) , 7.89 (1H, d, *J* = 8.9 Hz)

(R = I) 7-ヨード-ホタルルシフェリンメチルエステル **31** (43%)

¹H NMR (270MHz, CD₃OD)

δ 3.77 (1H, dd, *J* = 1.1, 9.2 Hz) , 3.84 (3H, s) , 5.43 (1H, t, *J* = 9.2 Hz) , 7.07 (1H, d, *J* = 8.6 Hz) , 7.88 (1H, d, *J* = 8.6 Hz)

ルシフェリン AMP 化体 4 の合成法



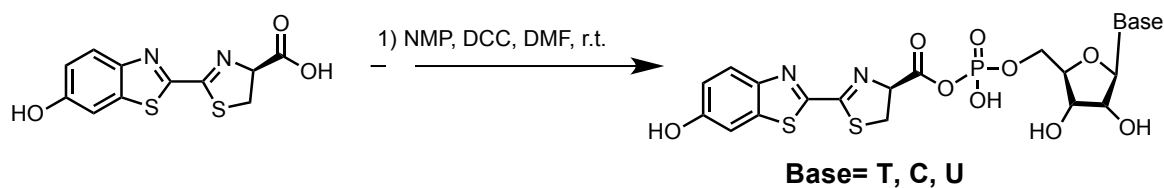
ホタルルシフェリン **1** (1 mg, 3.56 μmol) の DMSO 溶液 (0.5 ml) に室温で AMP (10 mg, 28.9 μmol) と DCC (10 mg) を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトンを 1.5 mg 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後、高速液体クロマトグラフィーによりルシフェリン AMP 化体 **4** の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

ルシフェリン AMP 化体 **4**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 610

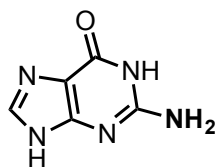
HPLC (UV330) 保持時間; 4.85 min

ルシフェリン NMP 化体の一般合成法

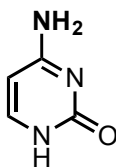


ホタルルシフェリン **1** (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で NMP (10 mg) と DCC (10 mg)、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトン (1.5 ml) を加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

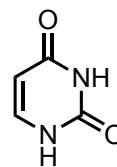
Base=G



Base=C



Base=U



ルシフェリン GMP 化体 **42**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 626

HPLC (UV330) 保持時間; 3.74 min

ルシフェリン CMP 化体 **43**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 586

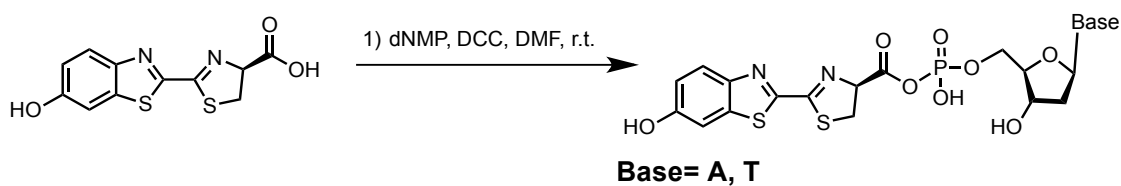
HPLC (UV330) 保持時間; 4.13 min

ルシフェリン UMP 化体 **44**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 587

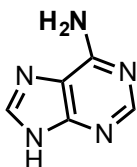
HPLC (UV330) 保持時間; 4.14 min

ルシフェリン dNMP 化体の一般合成法

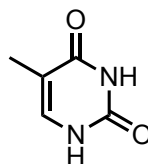


ホタルルシフェリン **1** (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で dNMP (10 mg) と DCC (10 mg)、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトン 1.5 ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

Base=A



Base=T



ルシフェリン dAMP 化体 **41**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 594

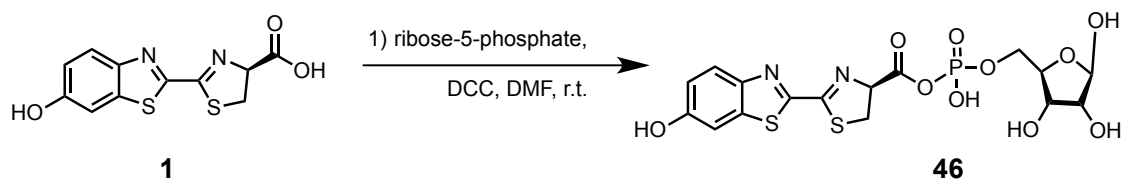
HPLC (UV330) 保持時間; 3.78 min

ルシフェリン dTMP 化体 **45**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 585

HPLC (UV330) 保持時間; 3.74 min

ルシフェリンリボース化体 **46** の合成法



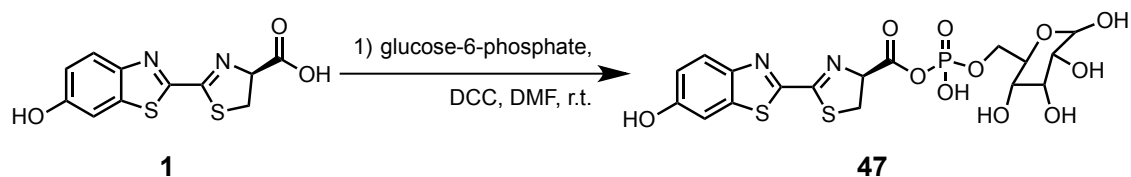
ホタルルシフェリン **1** (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温でリボース-5-リン酸 (10 mg, 43.3 μmol) と DCC (10 mg)、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトンを 1.5 ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

ルシフェリンリボース化体 **46**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 495

HPLC (UV330) 保持時間; 5.45 min

ルシフェリングルコース化体 47 の合成法



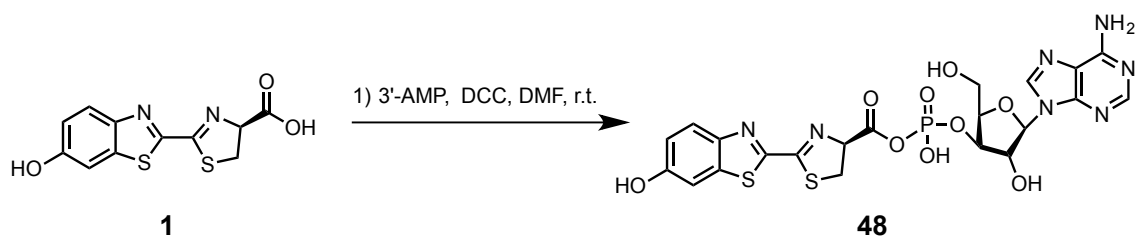
ホタルルシフェリン (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温でグルコース-6-リン酸 (10 mg, 38.4 μmol) と DCC (10 mg)、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトンを 1.5 ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

ルシフェリングルコース化体 47

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 523

HPLC (UV330) 保持時間; 5.44 min

ルシフェリン 3'-AMP 化体 48 の合成法



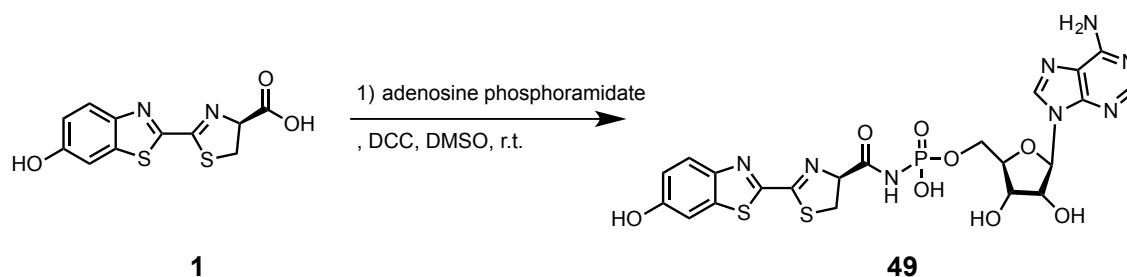
ホタルルシフェリン (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で 3'-AMP (10 mg, 28.9 μmol) と DCC (10 mg)、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトンを 1.5 ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05%TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

ルシフェリン 3'-AMP 化体 48

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 610

HPLC (UV330) 保持時間; 4.17 min

ルシフェリン-N-AMP 化体 49 の合成法



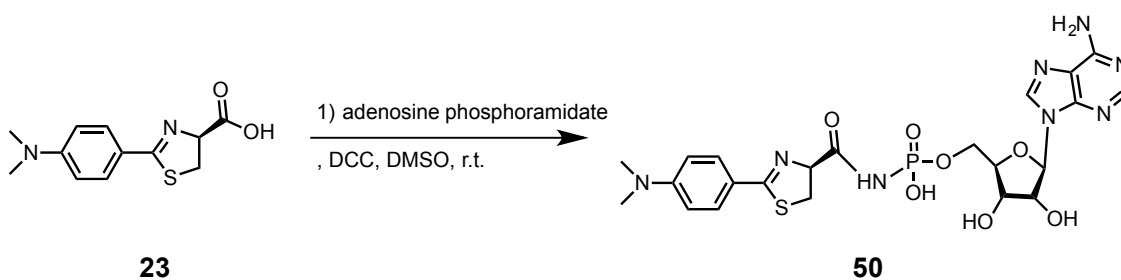
ホタルルシフェリン (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で adenosine phosphoramidate (10 mg, 28.9 μmol) と DCC (10 mg) 、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトン を 1.5 ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

ルシフェリン-N-AMP 化体 49

HRMS (ESI) m/z ; Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 609.07341, found: 609.0739

HPLC (UV330) 保持時間; 3.16 min

青色ルシフェリンアナログ-N-AMP 化体 **50** の合成



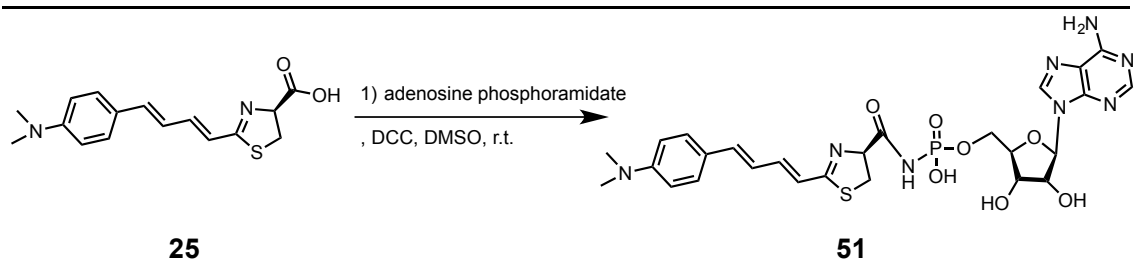
青色ルシフェリンアナログ **23** (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で adenosine phosphoramidate (10 mg, 28.9 μmol) と DCC (10 mg) 、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトンを 1.5ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

青色ルシフェリンアナログ-N-AMP 化体 **50**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 579

HPLC (UV330) 保持時間; 2.76 min

赤色ルシフェリンアナログ-N-AMP 化体 **51** の合成



赤色ルシフェリンアナログ (1 mg, 3.56 μmol) の DMF 溶液 (0.5 ml) に室温で adenosine phosphoramidate (10 mg, 28.9 μmol) と DCC (10 mg) 、 H_2O 一滴を加え、一時間攪拌した。反応混合物に蒸留冷アセトン を 1.5ml 加え、遠心分離 (5 min, 10000 rpm) を行った。得られた沈殿物を 0.75 ml の 0.05% TFA 水で溶解し、その後高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により目的物の分離精製を行った。分取した目的物を遠心濃縮機で濃縮し、目的物水溶液を得た。目的物の濃度は UV330 の吸光度より求めた。

赤色ルシフェリンアナログ-N-AMP 化体 **51**

MS (ESI) $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 631

HPLC (UV330) 保持時間; 3.85 min

7-2. 測定の一部

1) 測定装置

pH 測定

堀場製作所 F-23 型ガラス電極式水素イオン濃度指示計を用いて測定した。

紫外可視吸収スペクトル

Varian 社製 Cary50 を用いて測定した。使用したセルは UV 測定用石英セルで光路長は 1.0 cm である。走査速度は 600 nm/min、データ取込間隔は 1 nm であり、セルホルダーには 25 °C の恒温水を循環させた。恒温槽には、井内盛栄堂社製 低温恒温水槽 LTB-125 を用いて測定した。

発光光子量測定

ATTO 株式会社製 luminescencer-PSN AB-2200 および luminescencer-Octa AB-2270 を用いて測定した。

発光スペクトル測定

ATTO 株式会社製 AB-1850 ルミフルスペクトロキャプチャーを用いて測定した。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。

腫瘍モデルマウスを用いた発光イメージング画像の撮像

パーキンエルマー社製の IVIS Spectrum CT を用いた。なお腫瘍モデルマウスを用いた実験は東京工業大学近藤研究室との共同研究で得られた結果である。

2) 試薬

超純水

MILLIPORE 製 Milli-RX12α から採水したものを使用した。

メタノール、t-ブタノール

関東化学株式会社製の特級溶媒を用いた。

ルシフェラーゼ (北米産ホタル Photinus pyralis 由来)

Promega 社製の組換え型ルシフェラーゼ QuantiLum を用いた。

アデノシン三リン酸マグネシウム (ATP-Mg)

ナカライテスク株式会社製のものを用いた。

アデノシン三リン酸二ナトリウム (ATP-2Na)

東京化成工業株式会社製のものを用いた。

グアノシン三リン酸二ナトリウム (GTP-2Na)

SIGMA 社製のものを用いた。

シチジン三リン酸二ナトリウム (CTP-2Na)

SIGMA 社製のものを用いた。

デオキシチミジン三リン酸二ナトリウム (dTTP-2Na)

SIGMA 社製のものを用いた。

ウリジン三リン酸二ナトリウム (UTP-2Na)

SIGMA 社製のものを用いた。

デオキシアデノシン三リン酸二ナトリウム (dATP-2Na)

SIGMA 社製のものを用いた。

アデノシン一リン酸 (AMP)

SIGMA 社製のものを用いた。

グアノシン一リン酸 (GMP)

SIGMA 社製のものを用いた。

シチジン一リン酸 (CMP)

SIGMA 社製のものを用いた。

デオキシチミジン一リン酸 (dTMP)

SIGMA 社製のものを用いた。

ウリジナーリン酸 (UMP)

SIGMA 社製のものを用いた。

リボース-5-リン酸

MP Biomedicals 社製のものを用いた。

グルコース-6-リン酸

オリエンタル酵母社製のものを用いた。

ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)

SIGMA 社製のものを用いた。

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)

東京化成株式会社のものを用いた。

リン酸緩衝液

和光純薬工業株式会社製のリン酸水素にカリウム・12 水和物 (特級) とリン酸二水素カリウム・二水和物 (特級) を超純水に溶解させ、pH を調節して用いた。

カリウム t-ブトキシド

東京化成工業株式会社製のものを用いた。

蒸留水

関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用溶媒を用いた。

アセトニトリル

関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用溶媒を用いた。

トリフルオロ酢酸 (TFA)

和光純薬工業株式会社製のもの (特級) を用いた。

硫酸マグネシウム

関東化学株式会社製のもの (一級) を用いた。

グリセリン

和光純薬工業株式会社製のもの (特級) を用いた。

ウマ保存血液

日本バイオテスト研究所 (株) のものを用いた。

3) 試料調整

基質溶液

基質を電子天秤で秤量し希釈した。溶媒として、生物発光の測定の場合はリン酸カリウム緩衝液 (50 mM, pH 6.0) を、化学発光測定の場合はt-ブタノールを用いた。

酵素溶液

ルシフェラーゼを 1 mg/ml になるように 10%のグリセロールを含む Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 8) で希釈し小分けにした。これをストック溶液として、-80℃の冷蔵庫に保存した。

実験の際にストック溶液を 35%のグリセロールを含むリン酸緩衝液 (50 mM, pH 8.0) で希釈し使用した。

アデノシン三リン酸マグネシウム、アデノシン三リン酸二ナトリウム水溶液

超純水で希釈し使用した。

4) 測定実験

(1) 生物発光スペクトル測定 (2-4., 2-7.の実験)

2-4-1. ~ 3., 2-7-1. ~ 3.におけるルシフェリン (1), ルシフェリンアナログ 2 ~ 15 の生物発

光スペクトル測定 (Ppy)

PCR チューブ内でトリス塩酸緩衝溶液 (0.5 M, pH 9.0, 5 μ l)、基質溶液 (100 μ M, 5 μ l)、酵素溶液 (1 mg/ml, 5 μ l) を混合し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて ATP-Mg 溶液 (0.2 mM, 10 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-1850 を用いて 180 秒間発光測定を行った。

(2) 化学発光スペクトル測定 (3-2.の実験)

3-2-1. ~ 3-2-3.におけるアナログ 27 ~ 38 の化学発光スペクトル測定

石英セル内で基質溶液 (2.5 mM, 200 μ l) を入れ、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて塩基溶液 (12.5 mM, 800 μ l) を注入し、180 秒間発光測定を行った。

(3) 生体モデルフィルターの作成 (4-1.の実験)

4-1-2. ~ 4.で用いた生体モデルフィルターの作成方法

スパーテルを用いて市販の食用鶏胸肉のミンチに対して、ウマ血液を重量比 10%で良く混合し、これを 35 mm のペトリ皿に封入し、生体モデルフィルターとして用いた。

① 生体モデルフィルターからの透過光のスペクトル測定 (4-1-2.の実験)

PCR チューブ内でリン酸カリウム緩衝溶液 (0.5 M, pH 8.0, 20 μ l)、基質溶液 (100 μ M, 20 μ l)、酵素溶液 (1 mg/ml, 20 μ l) を混合し生体モデルフィルターの上に静置し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて ATP-Mg 溶液 (0.2 mM, 40 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-1850 を用いて 180 秒間発光測定を行い、その積算値を強度として用いた。

② 生体モデルフィルターを用いた生体透過性の評価 (4-1-3.の実験)

PCR チューブ内でリン酸カリウム緩衝溶液 (0.5 M, pH 8.0, 20 μ l)、基質溶液 (100 μ M, 20 μ l)、酵素溶液 (1 mg/ml, 20 μ l) を混合し生体モデルフィルターの上に静置し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて ATP-Mg 溶液 (0.2 mM, 40 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-1850 を用いて 180 秒間発光測定を行い、その積算値を透過光の強度として、同様に溶液を混合し、生体モデルフィルターを置かずに測定した積算値を発光強度とした。この発光強度を透過光の強度で割る事で生体透過性を算出した。

③ 生体モデルフィルターからの透過光の強度測定 (4-1-4の実験)

PCR チューブ内でリン酸カリウム緩衝溶液 (0.5 M, pH 8.0, 20 μ l)、基質溶液 (100 μ M, 20 μ l)、酵素溶液 (1 mg/ml, 20 μ l) を混合し生体モデルフィルターの上に静置し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて ATP-Mg 溶液 (0.2 mM, 40 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-1850 を用いて 180 秒間発光測定を行い、その積算値を透過光の強度として用いた。

(4) *in vivo* イメージング実験 (4-2の実験)

① 4-2-1.における皮下腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* イメージング実験 (発光スペクトル測定、東京工業大学 近藤研究室にて実施)

ホタルルシフェラーゼ (Luc+) を恒常発現するマウス骨肉腫細胞 LM8 である LM8/Luc+ をヌードマウス (6 週齢、♂) の背中皮下に 2.0×10^6 cells 移植した。実験には移植 11-13 日後のマウスを用いた。腫瘍サイズは <8 mm。LM8/Fluc の Luc+ の発現レベルは細胞あたり、 ~ 50 [photons/s] である。

このマウスに対し、まず最初に近赤外発光アナログ **12** を 500 μ M、100 μ l を腹腔投与し、60 秒積算で 1 時間撮像した。6 時間後、同一のマウスを用いてホタルルシフェリン (**1**) を 500 μ M、100 μ l を腹腔投与し、60 秒積算で 1 時間撮像した。

IVIS Spectrum CT に搭載されている 20 nm 刻みのフィルタ (500 ~ 840 nm) を用いて連続的に撮像することで、強度の比率から発光スペクトルを測定した。

② 4-2-2.における骨転移モデルマウスを用いたイメージング実験 (東京工業大学 近藤研究室にて実施)

4-2-1. で用いたマウス骨肉腫細胞 LM8/Luc+ をヌードマウス (8 週齢、♂) の左心室に 1.0×10^5 cells 移植した。実験には移植 11-13 日後のマウスを用いた。LM8/Luc+ の Luc+ の発現レベルは細胞あたり、 ~ 50 [photons/s] である。

このマウスに対し、まず最初に近赤外発光アナログ **12** を 500 μ M、100 μ l を腹腔投与し、60 秒積算で 1 時間撮像した。6 時間後、同一のマウスを用いてホタルルシフェリン (**1**) を 500 μ M、100 μ l を腹腔投与し、60 秒積算で 1 時間撮像した。

③ マウスを用いた基質の体内動態の評価 (4-3の実験)

ルシフェラーゼの発現していないマウスに対し、ホタルルシフェリン (**1**)、近赤外発光アナログ **12** を 500 μ M、100 μ l、それぞれ腹腔投与し、投与後 10 分、30 分に眼底静脈より採血し、遠心分離 (5min x 6000 rpm) で血清を得た (東京工業大学 近藤研究室にて実施)。得られた 20 μ l の血清に対し、80 μ l のメタノールを加え攪拌後、200 μ l の超純水を加え、0.45 μ m フィルターで濾過し、減圧濃縮し乾固させた。得られた結晶を 100 μ l の 10% エタノール水溶液で溶解し、HPLC 分析を行った。UV330 の値より、基質濃度

を決定した。

(6) 各種ヌクレオチド三リン酸 (NTP) を用いた生物発光強度の測定 (5-2.の実験)

5-2.における各種 NTP を用いた場合の相対発光活性評価

テストチューブ内でリン酸カリウム緩衝液 (0.5 M, pH 8.0, 20 μ l) 、ホタルルシフェリン (1) 溶液 (100 μ M, 20 μ l) 、MgSO₄ 溶液 (0.4 mM, 20 μ l) 、各種ヌクレオチド三リン酸ナトリウム (NTP-Na, 0.4 mM, 20 μ l) を混合し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて酵素ルシフェラーゼ (Ppy) 溶液 (0.01 mg/ml, 20 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-2270 を用いて 30 秒間発光測定を行った。

(7) 各種ヌクレオチド三リン酸 (NTP) を用いた生物発光スペクトル測定 (5-3.の実験)

5-3.における各種 NTP を用いた場合の生物発光スペクトル測定

PCR チューブ内でリン酸カリウム緩衝液 (0.5 M, pH 8.0, 5 μ l) 、ホタルルシフェリン (1) 溶液 (100 μ M, 5 μ l) 、MgSO₄ 溶液 (0.4 mM, 5 μ l) 、各種ヌクレオチド三リン酸ナトリウム (NTP-Na, 0.4 mM, 5 μ l) を混合し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて酵素ルシフェラーゼ (Ppy) 溶液 (0.01 mg/ml, 5 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-1850 を用いて 180 秒間発光測定を行った。

(8) 各種ルシフェリンヌクレオチドを用いた生物発光強度の測定 (5-5., 5-8., 5-11 の実験)

5-5., 5-8., 5-11.における各種ルシフェリンヌクレオチド (41 ~ 51) を用いた場合の生物発光活性評価

テストチューブ内でリン酸カリウム緩衝液 (1.67 mM, pH 8.0, 60 μ l) 、ホタルルシフェリンヌクレオチド (41 ~ 51) 溶液 (10 μ M, 20 μ l) を混合し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて酵素ルシフェラーゼ (Ppy) 溶液 (0.001 mg/ml, 20 μ l) を注入し、ATTO 社製 AB-2270 を用いて 30 秒間発光測定を行った。

(9) 各種ルシフェリンヌクレオチドを用いた生物発光スペクトルの測定 (5-7., 5-9., 5-10.の実験)

5-7., 5-9., 5-10.における各種ルシフェリンヌクレオチド (41 ~ 51) を用いた場合の生物発光スペクトル測定

PCR チューブ内でリン酸カリウム緩衝液 (1.67 mM, pH 8.0, 15 μ l) 、ホタルルシフェリンヌクレオチド (41 ~ 51) 溶液 (10 μ M, 5 μ l) を混合し、測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて酵素ルシフェラーゼ (Ppy) 溶液 (0.01 mg/ml, 5 μ l) を注入し、

ATTO 社製 AB-2270 を用いて 180 秒間発光測定を行った。

(10) ミカエリス定数 (2-4-2.の実験)

Fig. 6-1 の様な基質-酵素間の反応では、Michaelis-Menten の速度式 (1) が与えられる。

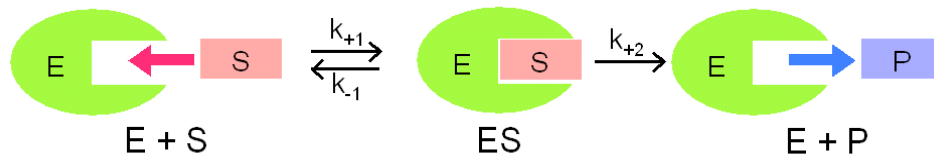


Fig. 7-1 酵素反応

この時の v_0 は反応初速度、 $[S]_0$ は基質濃度、 V_{max} は最大反応速度、 K_m はミカエリス定数となる。(1) 式の両辺の逆数をとると、Lineweaver-Burk 式 (2) が得られる。

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (1)$$

従って、横軸 $1/[S]_0$ に対して縦軸 v_0 をプロットすると測定値は直線に並び、縦軸切片 = $1/V_{max}$ 、横軸切片 = $-1/K_m$ となり、 V_{max} と K_m が求められる (Fig. 6-2)。本研究では、 v_0 を 30 秒間の生物発光量として K_m の測定を行った。生物発光量の測定方法は生物発光活性や生物発光スペクトルと同様である。

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

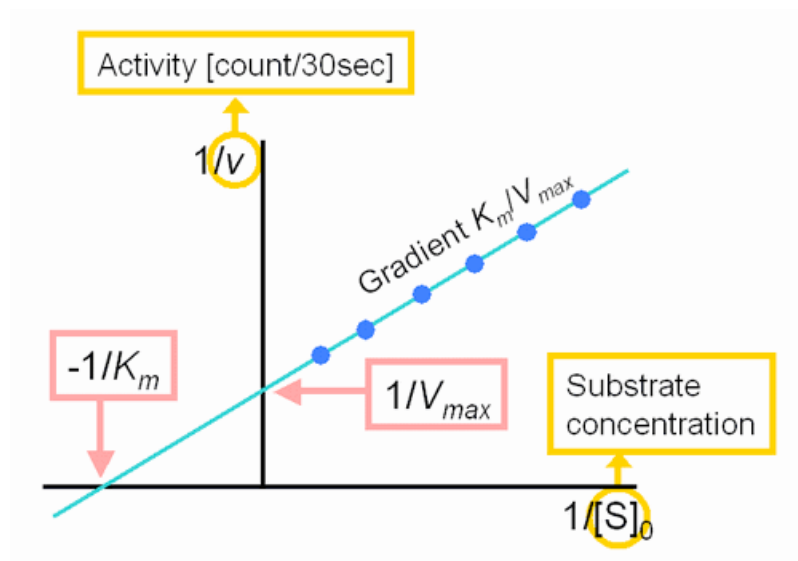


Fig. 7-2 Lineweaver-Burk プロット

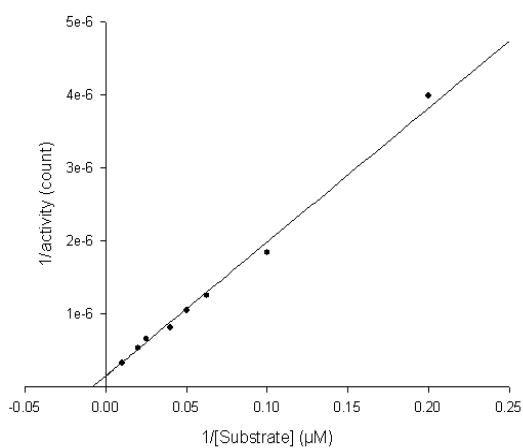


Fig. 7-3 ホタルシフェリン (1) のLineweaver-Burk プロット

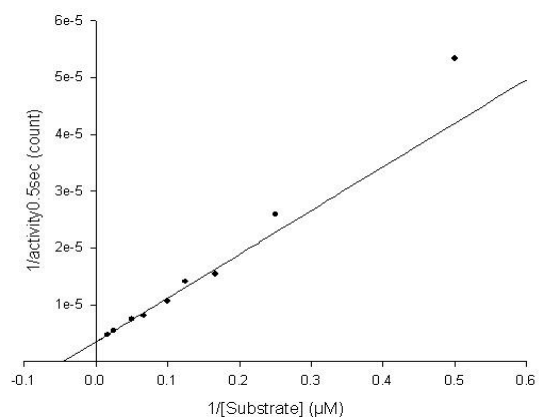


Fig. 7-5 7-F-LH₂ (11) のLineweaver-Burk プロット

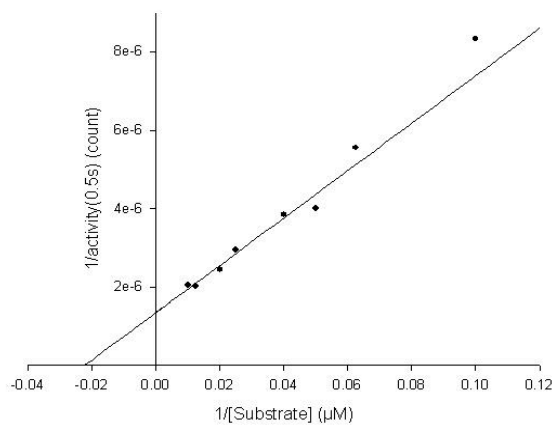


Fig. 7-6 7-Cl-LH₂ (12) のLineweaver-Burk プロット

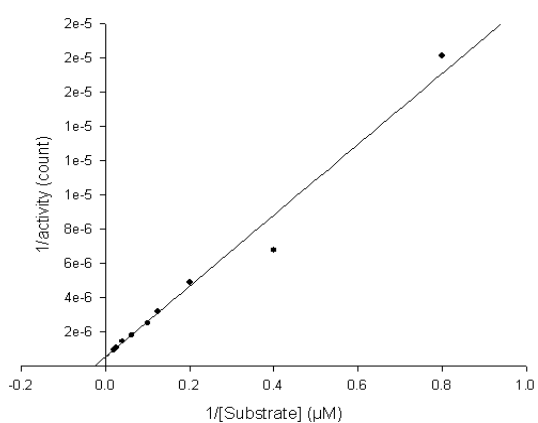


Fig. 7-7 7-Br-LH₂ (13) のLineweaver-Burk プロット

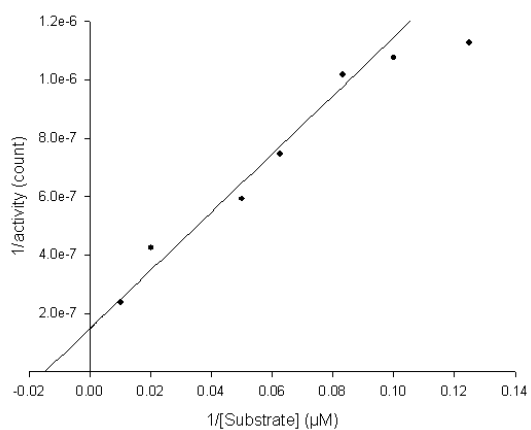


Fig. 7-8 7-I-LH₂ (14) のLineweaver-Burk プロット

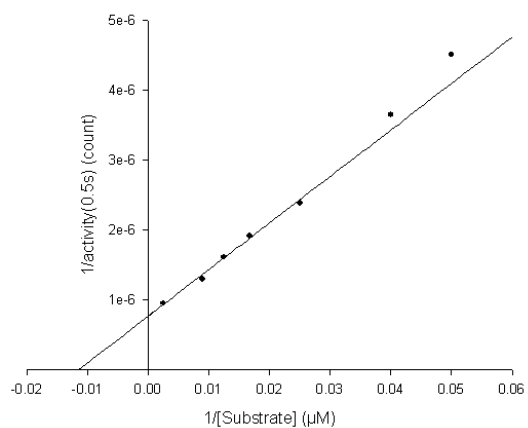


Fig. 7-9 7-Allyl-LH₂ (15) のLineweaver-Burk プロット

文献

- 1) 羽根田弥太：「発光生物」，恒星社厚生閣（1985）
- 2) 丹羽治樹：「生物はなぜ光るのかー生物発光とその応用ー」 現代化学，東京化学同人，10月，28（2002）
- 3) 今井一洋 編：「生物発光と化学発光ー基礎と実験ー」，廣川書店（1990）
- 4) 日本化学会 編：「海洋天然物化学」，学会出版センター（1979）
- 5) Bitler, B.; McElroy W.D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *72*, 358
- 6) White, E.H.; McCapra, F.; Field, G.F.; McElroy W.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 2402
- 7) Conti, E.; Franks, N.P.; Brick, P. *Structure* **1996**, *4*, 287
- 8) Nakatsu, T.; Ichikawa, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobayashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. *Nature*, **2006**, *440*, 372.
- 9) Yoshida, T.; Sato, M.; Ozawa, T.; Umezawa, Y. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 6.
- 10) 今井一洋、近江谷克裕 編著：「バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック」丸善株式会社（2006）
- 11) Miska, W. and Geiger, R. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **1987**, *25*, 23.
- 12) Masuda-Nishimura, I.; Fukuda, S.; Sano, A.; Kasai, K.; Tatsumi, H. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2000**, *30*, 130.
- 13) キャリ, ジェイムス, ジェイ, デイリー, ウィリアムス 特表 2008-545746.
- 14) 高倉栄男, 浦野泰照, 長野哲雄 特開 2007-91695.
- 15) Dothager, S.R. and Piwanica-Worms, D. *Pros.* , **2002**, *3*, 546
- 16) Close, D.M.; Xu, T.; Sayler, G.S. and Ripp S., *Sensors*, **2011**, *11*, 180
- 17) White, E.H.; Wörther, H. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1484
- 18) 牧 昌次郎、小島 哲、丹羽 治樹、平野 誉、特許番号第 5194258 号
- 19) Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C., Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T., Maki, S.; Niwa, H. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 3847
- 20) White, E.H.; McCapra F.; Gield, G.F.; McElroy, W.D. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83* (10), 2402
- 21) 小島 哲、五嶋 温子、牧 昌次郎、平野 誉、丹羽 治樹、日本化学会第一回関東支部大会、P91、2007
- 23) Ralph, W. *Nat. Biotechnol*, **2001**, *19*, 316
- 24) Branchini, B.R.; Murtiashaw, M.H.; Magyar, R.A.; Portier, N.C.; Ruggiero, M.C. and Stroh, J.G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *124*, 2112
- 25) Hirano, T; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 2385

謝辞

本研究は電気通信大学 情報理工学研究科 先進理工学専攻において、丹羽 治樹教授、牧昌次郎助教、平野 誉 教授のご指導のもとで行ったものであり、ここに厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、絶えずご助言をいただいた大橋 陽子 博士、小畠 りか博士に感謝いたします。事務関連の数々の手続きを行って頂いた牧研究室秘書の宮川朋子様にも感謝致します。

特に牧先生には、この研究に携わらせて頂いた事はもちろんですが、企業、知財部との打ち合わせ等やアメリカへの留学、展示会での出展等、常に学生主体でやらせていただきました事、本当に感謝しております。また私自身の多数の学会参加、出張や他学研究者との共同研究、民間財団への研究費の応募など、極めて協力的に促し、助けて頂きました事、感謝しております。また、電通大 TL0 のキャンパスクリエイティブ(株)の河面様、坂田様、角田様、電通大産学連携センターの小島様にはご配慮いただき、ご指導賜りました事、感謝致します。

黒金化成(株)の加藤様、高鳥様には近赤外発光ルシフェリンのサンプル提供を始め、様々にご指導いただきました事、感謝いたします。

アメリカ留学を受け入れて下さったカリフォルニア州立大学バークレー校 Gerard Marriott 教授、また留学の手続き等で大変にお世話になった電気通信大学国際交流センター 鈴木 雅久先生、事務の方々に感謝申し上げます。

理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チームの宮脇 敦史先生に受け入れて頂き、ご指導頂きました。分子生物学的な知識の全く無い筆者を一からご指導いただきました事、感謝申し上げます。また、実験にあたって直接ご指導いただきました下菌 哲博士、事務手続き等様々にご配慮頂きました宮脇研秘書櫻井紘子様、宮脇研の皆様にも感謝申し上げます。

動物実験のデータは東京工業大学生命理工学研究科近藤研究室の口丸 高弘助教、金森茜様、東京大学医科学研究所後藤研究室の日野原 邦彦特任助教、慶応義塾大学先端医科学研究所佐谷研究室の大西 伸幸特任助教との共同研究の成果であり、様々にご指導、ご協力を頂きました事、感謝申し上げます。

ProbeX(株)の三浦研二博士にはスプリットルシフェラーゼに関する共同研究でお世話になり、その後も幾度と無くご指導頂きました事、感謝申し上げます。

研究室に入って間もない頃から、何もできない筆者に実験を一から教えていただいた、森憲一博士、柳内悟修士、斉藤毅博士をはじめとする諸先輩方に深く感謝いたします。また、先輩の木山正啓修士、一色高修士には公私共々大変にお世話になりました。修士時代の同期として、お世話になった浜一敏さん、小林弘一さんに感謝致します。共同実験者としてともに実験を行った三浦千弥修士、松本光久修士、伊藤和人修士、北田昇雄修士に感謝いたします。そして丹羽平野研の皆様にも心からお礼申し上げます。

また研究室の後輩として、大変にお世話になりました小林 義尚さん、伊藤 和人さん、北田 昇雄さん、服部 真司さん、長井 裕之さん、鈴木 良久さん、福田 翔太さんには、急な飲み会、旅行等の気まぐれな筆者に付き合ってくださいました事、深く感謝しております。楽しく過ごすことが出来たのは皆様のお陰です。

本研究の一部に研究費を助成して下さった科研費新学術領域研究「がん研究等の特性を踏まえた支援活動」、日本科学協会様、海外の国際学会への参加の際に助成を下さった丸文財団様、吉田科学技術財団様に感謝申し上げます。

がん支援がん若手ワークショップで知り合いになりました皆様方には、門外漢で何もわからない筆者に色々のご指導いただきました。この繋がりは筆者に、また研究にとっても重要なものとなっています。

末筆ながら、大学院進学に際し理解を示し、絶えず経済的、精神的に支えていただいた両親、兄一家、姉に感謝いたします。

岩野 智

関連論文の印刷公表の方法及び時期

- (1) 全著者名 Satoshi Iwano, Rika Obata, Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Kazutoshi Hama, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiharu Amano, Satoshi Kojima, Takashi Hiraono, Shojiro Maki, Haruki Niwa.

論文題目 「Development of simple fire fly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light」

平成 25 年 *Tetrahedron* **2013**, 69, 1401.

参考論文の印刷公表の方法及び時期

- (1) 全著者名 Satoshi Iwano, Satoshi Kojima, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa.
論文題目「Evaluation of Bioluminescence Actibity of Firefly Luciferin Nucleotide Deribatives」
平成 25 年 *ECS Trans.* **2013**, 50, 1.
- (2) 全著者名 Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Satoshi Iwano, Kazuto Ito, Rika Obata, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa.
論文題目「Synthesis and luminescence properties of biphenyl-type firefly luciferin analogs with a new, near-infrared light emitting bioluminophore」
平成 25 年 *Tetrahedron.* **2013**, 69, 9726.
- (3) 全著者名 Takashi Hirano, Hiroyuki Nagai, Takuto Matsuhashi, Yousuke Hasumi, Satoshi Iwano, Kazuto Ito, Shojiro Maki, Haruki Niwa and Vadim R. Viviani.
論文題目「Spectroscopic studies of the color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence with amino-analogs of luciferin and oxyluciferin」
平成 23 年 *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 11, 1281.



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



Satoshi Iwano, Rika Obata, Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Kazutoshi Hama, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiharu Amano, Satoshi Kojima, Takashi Hirano, Shojiro Maki*, Haruki Niwa*

Department of Engineering Science, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2013
Received in revised form 11 March 2013
Accepted 12 March 2013
Available online 18 March 2013

Keywords:

Bioluminescence
Firefly
Luciferin analog
Near-infrared
Biological window

ABSTRACT

Simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, and red light were developed. The longest emission maximum was observed at 675 nm, which belongs to the NIR biological window (650–900 nm), useful for deep site bioimaging of living animals. The analogs showed a slow rise of emission intensity compared with the rapid emission of natural luciferin. The light emission of the adenylated analogs was strongly enhanced compared with those of analogs themselves.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Firefly luciferase is well known for its highly efficient light emission by catalyzing the oxidation of substrate D-luciferin (D-LH₂). The accepted catalytic mechanism of firefly bioluminescence is shown in Fig. 1.^{1–3} This enzymatic light emission process does not

Because of its substrate specificity and high sensitivity, firefly luciferase and luciferin combination is widely used in the detection of ATP, and biological studies, with luciferase as a reporter gene in cell culture systems,⁴ and recently in noninvasive whole-body bioimaging.⁵ For the bioimaging technique, emissions of light with various colors are useful. In particular, red, or more desirably, the

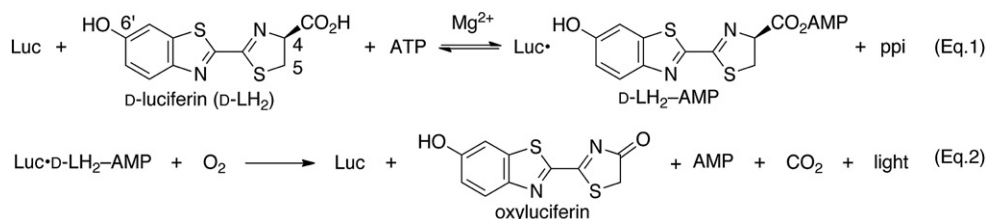


Fig. 1. Proposed reaction catalyzed by firefly luciferase. In the first step of the reaction, luciferase (Luc) catalyzes adenylation of D-LH₂ with ATP in the presence of Mg²⁺ to generate the intermediate luciferyl-AMP (D-LH₂-AMP) accompanied by pyrophosphate (ppi) (Eq. 1). Then the oxidative decarboxylation of the intermediate gives excited-state oxyluciferin, which then releases visible light in the course of relaxation to the ground state (Eq. 2).

require an external light source to fluorescence, thereby an extremely high signal-to-noise ratio is provided by this process.

light around the 650–900 nm region termed the near-infrared (NIR) biological window,⁶ is suitable for noninvasive whole-body imaging. Since the light of the NIR window is not strongly absorbed by oxygenated hemoglobin and melanin in animal tissues, the light is expected to be useful for deeper site imaging.

In addition to Lampyridae (firefly) luciferases, several different isozymes are known to emit light in different colors using the same

* Corresponding authors. Tel.: +81 42 443 5484; fax: +81 42 486 1966 (H.N.); tel.: +81 42 443 5493; fax: +81 42 486 1966 (S.M.); e-mail addresses: maki@pc.uec.ac.jp (S. Maki), niwa@pc.uec.ac.jp (H. Niwa).

substrate D-LH₂.⁷ Based on a bioengineering study, several mutant luciferases emitting various colors were developed.^{8,9} Among various luciferases including their mutants, the shortest emission maximum wavelength was 534 nm and the longest was 623 nm.⁷ Theoretical study of the light emitter oxyluciferin indicated an expected emission range from natural D-LH₂ to be 421–626 nm.¹⁰ This study suggested that a new substrate scaffold, other than the natural luciferin chromophore, is required in order to obtain a wider emission range and longer maximum emission wavelength with Lampyridae luciferases including their mutants.

After the structure of luciferin was elucidated and synthesized in the 1960s, some modified luciferin analogs, such as 6'-aminoluciferin,¹¹ were synthesized and a few of them functioned as light-emitting substrates.³ More recently, *N*-alkylated 6'-aminoluciferins were found to act as substrates¹² and cyclic alkylaminoluciferin was reported to show red light emission (607 nm) by using the mutant of *Photuris pennsylvanica* firefly luciferase (Ultra-Glo).¹³ Some modified luciferins were newly developed for color change and specific purposes.^{14–22} However, most synthetic bioluminescent luciferin analogs consist of benzothiazole and 4-carboxythiazolin-2-yl rings unchanged from natural luciferin, except for quinoly-, coumaryl-, naphthyluciferins,^{17,23a} and very recently published^{23b} heterocyclic luciferin analogs.

In this study, we have substituted a benzothiazole moiety with a simplified aromatic structure to investigate the effect of π conjugation to the emission wavelength (Fig. 2).

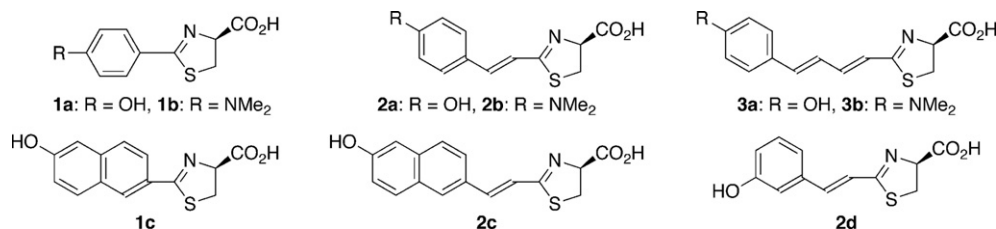


Fig. 2. Chemical structure of synthetic substrates (1–3).

2. Results and discussion

2.1. Molecular design and synthesis of luciferin analogs

Because the scaffolds of these analogs are different from those of existing substrates, we have used molecular modeling to predict the interaction between intermediate species of one of the longest analogs, **3b**, and luciferase. Fig. 3 shows a plausible location of the model compound oxy-**3b** and AMP at the active site of the *Photinus pyralis* luciferase. The crystal structures used (PDB accession number 4G36^{23c} and 2D1R³²) were downloaded from the RSCB protein data bank. Structural alignment, generation of electrostatic surface potential and construction of the figure were carried out using PyMOL (DeLano Scientific; <http://www.pymol.org>). The coordinates of the DLSA-bound *P. pyralis* luciferase structure (chain B of 3G36) superimposed closely on the oxyluciferin and AMP-bound *Luciola cruciata* luciferase structure (2D1R), giving a root-mean-square deviation of 1.1 Å based on 3227 atoms. The local minimum conformation model of oxy-**3b** was obtained using Spartan '04 (Wavefunction; <http://www.wavefun.com>) by Hartree–Fock 3-21G calculation. The 4,5-dihydro-4-oxothiazolin-2-yl moiety in oxy-**3b** was manually aligned onto both a 4,5-dihydro-4-oxothiazolin-2-yl ring of the oxyluciferin and a thiazole ring of DLSA. As shown in Fig. 3, the extended *E,E*-form of oxy-**3b** fitted into the narrow and deep substrate-binding site. Several polar amino acid side chains (Arg218, Ans229, Tyr255, Ser284, Glu311, and Arg337) faced the

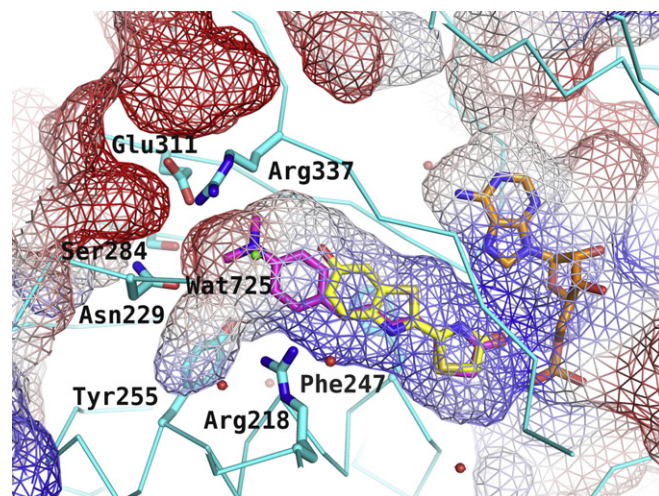
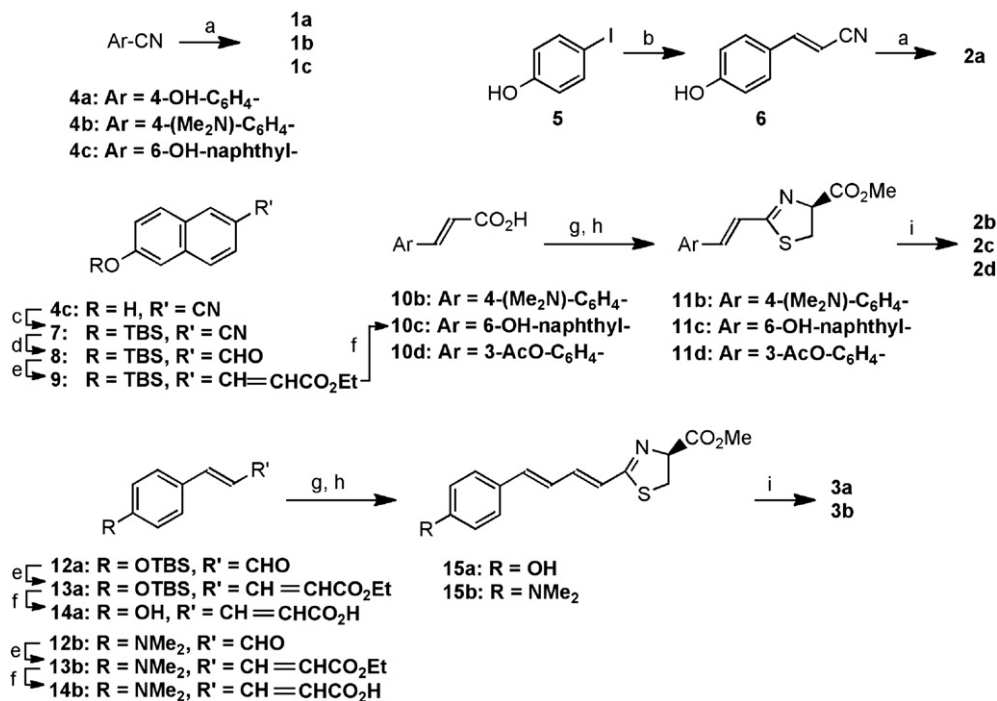


Fig. 3. Structure around plausible ligand-binding site of *P. pyralis* luciferase and overlay model of oxy-**3b**, oxyluciferin and AMP. The backbone structure of luciferase (4G36) is shown in cyan, and the electrostatic surface is presented as a wire mesh with negative and positive charges in red and blue, respectively. The original ligand DLSA is omitted from the figure for clarity. Side chains of Arg218, Ans229, Phe247, Tyr255, Ser284, Glu311, and Arg337 are shown in stick form. The view was sliced to show the binding pocket and some residues were omitted from the figure for clarity. Water molecules are shown as red spheres, except Wat725 is colored green. The ligand atoms are displayed in stick form with the carbon atom of oxy-**3b** in magenta, oxyluciferin in lemon yellow and AMP in orange. Nitrogen is colored blue, oxygen is colored red, sulfur is colored yellow, and phosphorus is colored deep orange.

bottom of the binding pocket and provided the rather negative electrostatic surface expected in a cation-stabilizing environment. Notably, the nitrogen atom of oxy-**3b** closely overlapped the water molecule (Wat725) of the 4G36 crystal structure. This preliminary evaluation indicated that it is structurally possible to locate the designed analogs on the native luciferin binding site.

As a simple bioluminescence chromophore for luciferase substrate, we chose a 4-hydroxyphenyl group as an aromatic part. This part was connected to a 4-carboxythiazolin-2-yl ring directly (analog **1a**), or was connected through one (analog **2a**) or two (analog **3a**) double bonds to study the effect of π conjugation on the emission wavelength (Fig. 2). A 4-(dimethylamino)phenyl group was also selected as an aromatic part (**1b–3b**) with an expectation of a red shift of light emission, through the electron donating effect of the alkylamino group. In addition, 6-hydroxynaphthalen-2-yl analogs **1c**^{23a} and **2c** were also anticipated as shifting emission maxima toward red, because of longer π -conjugated systems than that of the corresponding 4-hydroxyphenyl analogs. The 3-hydroxystyryl-type luciferin analog **2d** was also prepared to evaluate the importance of the hydroxy group position for bioluminescence activity.

The synthesis of luciferin analogs was conducted as shown in Scheme 1. We utilized D-cysteine or (*S*)-trityl-D-cysteine methyl ester for constructing the chiral thiazoline ring. Thus, the analogs **1a**, **1b**, **1c**, and **2a** were synthesized directly by the coupling of D-cysteine with the corresponding nitriles, **4a**, **4b**, **4c**, and **6**,



Scheme 1. Synthesis of aromatic analogs **1–3**. Synthetic conditions: (a) *D*-Cys-HCl, NaOHaq, EtOH. (b) Acrylonitrile, Pd(OAc)₂, CH₃CO₂K, K₂CO₃, water, reflux. (c) TBDMSCl, imidazole. (d) DIBAL. (e) Ph₃P=CHCO₂Et, toluene, reflux. (f) NaOHaq *i*-PrOH. (g) *D*-Cys(S-Trt)-OMe, EDC, DMAP, DMF, rt. (h) Ph₃PO, Tf₂O, CH₂Cl₂. (i) Esterase, EtOH, 10 mM NH₄HCO₃, pH 7.8, 36 °C.

respectively. The analogs **2b**, **2c**, **2d**, **3a**, and **3b** were obtained by the enzymatic hydrolysis (porcine liver esterase) of the corresponding methyl esters **11b**, **11c**, **11d**, **15a**, and **15b**, which were constructed from the corresponding carboxylic acids **10b**, **10c**, **10d**, **14a**, and **14b** via coupling with (*S*)-trityl-*D*-cysteine methyl ester followed by the formation of the thiazoline rings.

2.2. Bioluminescence activity of luciferin analogs

Bioluminescence activity assays were performed with wild-type *P. pyralis* luciferase and ATP-Mg for each compound, and the emitted light count was integrated for a fixed time (180 s). The emission spectra were measured from 400 nm to 750 nm (Fig. 4).

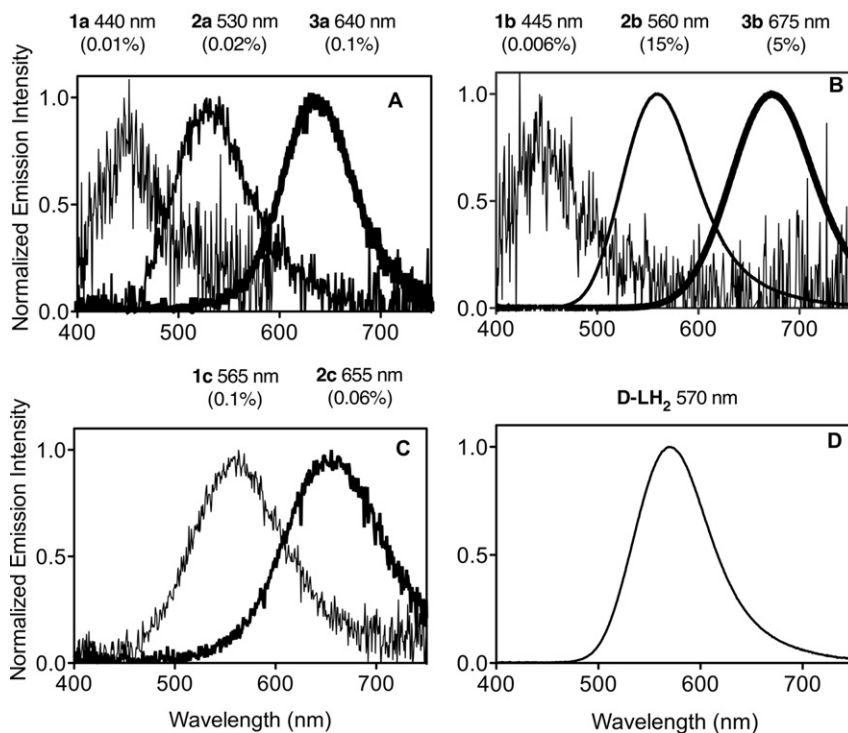


Fig. 4. Bioluminescence emission spectra of compounds of (A) 4-hydroxyphenyl, (B) 4-(dimethylamino)phenyl, (C) 6-hydroxynaphthalen-2-yl analogs, and (D) natural substrate *D*-LH₂. All spectra were normalized at the emission maxima, and relative light emission intensity compared with that of natural *D*-LH₂ is shown in parenthesis in %.

All the synthetic aromatic analogs except **2d** exhibited light-emitting activities. In preliminary measurements, we observed that the light emission intensity of 1:1 mixtures of D- and L-**2b** were approximately 1:3 those of pure D-**2b**. This means that the inhibition ability of L-**2b** and the optical purity of the analogs are not crucial in evaluating the light emission ability of the analogs when we use *P. pyralis* luciferase. Thus, we used the racemic mixtures without further separation. The light emission intensity increased proportionally with an increasing amount of luciferase and/or ATP–Mg (data not shown). Analogs **2b** and **3b** showed comparatively potent bioluminescence activity with 15% and 5% relative light intensities compared with that of natural D-LH₂, respectively. However, the light emission intensities of the analogs other than **2b** and **3b** were less than 1% of that of the natural substrate. Although the bioluminescent intensity of **3b** is only 5% of that of D-LH₂ in aqueous solution, the absorption coefficient of blood against 675 nm light (λ_{max} generated by bioluminescence of **3b**) is less than 1:30 of that for 560 nm light (λ_{max} generated by the bioluminescence of D-LH₂). This means that the light generated by the bioluminescence of **3b** passes through blood-containing tissue better than that of D-LH₂ under the same conditions. Observed emission maximum and light emission intensity for **1c** (λ_{max} 565 nm and 0.1% relative light yield compared with that of D-LH₂) were considerably different from the previously reported values for **1c** (λ_{max} 524 nm, 1.5% relative light yield compared with that of D-LH₂ at pH 9.3).^{23a} This discrepancy may be because of the difference in the experimental conditions.

The inactive 3-hydroxystyryl-type luciferin analog **2d** compared with the active 4-hydroxystyryl-type luciferin analog **2a**, as in the case of phenolic hydroxy positional isomers of luciferin,²⁴ suggested that synthetic substrates bind and act in a similar manner to native D-LH₂, and that the position of the hydroxyl group is one of the important factors for light emission ability. However, the slow emission profile indicated a difference of environment at the catalytic site of the luciferase. The light emission from all the synthetic substrates showed a slow rise to maximum intensity (about a minute), and was sustained for about 1 min, as distinct from light emission from D-LH₂, which rapidly reached maximum intensity within a few seconds followed by a steep decay (will be discussed below).

Among the bioluminescently active compounds, obvious structure–emission wavelength relationships were found. The insertion of conjugated double bonds between an aromatic ring and a thiazoline ring showed an emission maximum wavelength with an approximately 100 nm shift to red per double bond. In addition, the emission maximum of 4-(dimethylamino)phenyl analogs (**1b–3b**) exhibited an approximately 30 nm shift to red, compared with those of corresponding 4-hydroxyphenyl analogs (**1a–3a**). Similarly, the emission maximum of 6-hydroxynaphthalen-2-yl analogs (**1c** and **2c**) exhibited an approximately 130 nm shift to red, compared with those of the corresponding 4-hydroxyphenyl analogs (**1a** and **2a**). Thus, we obtained the synthetic luciferase substrates emitting a variety of colors, such as blue/purple, blue, green/yellow-green, and red. The shortest blue emission ($\lambda_{\text{max}}=440$ nm) was observed for **1a**. Notably, the longest wavelength observed for **3b** ($\lambda_{\text{max}}=675$ nm) was in the NIR window region. Therefore, these results represent the capability of designing light-emitting substrates to obtain a wider range of emission wavelengths than those from native D-LH₂.

One of the reasons for these wavelength shifts was indicated to be that the length of the π conjugation controls the wavelength of the emission maximum. Theoretical calculation for the excited species and prediction of the spectroscopic properties are challenging fields,²⁵ especially the characterization of light emitters (excited oxyluciferins) interacting with various intramolecular factors, including hydrogen bonds and Coulomb interaction, and polarity in the luciferase active site. Commonly, a +30 nm shift per conjugated

double bond was used to estimate the UV wavelength of the organic compounds.²⁶ Even from this rough estimate, a +100 nm shift per double bond seemed to be a bigger shift than we expected.

The other possible reason apart from π conjugation was supposed to be a solvent effect. Previously, we have investigated the light-color modulation mechanism using 5,5-dimethoxy-luciferin and aminoluciferin analogs as model compounds, and showed that it depended on the base/solvent combination.^{27,28} When the emission species is exposed into the polar water from a generally hydrophobic binding site, the emission color may shift to red. Therefore, we presumed the environment of the emission species of the synthetic compounds was more polar than that for natural D-LH₂. The domain alteration hypothesis of firefly luciferase^{29,30} seems to be supportive of this assumption. Firefly luciferase is a family of adenylating enzymes containing acyl- and aryl-CoA synthetases, and nonribosomal peptide synthetases.³¹ Many of them are proposed for the domain movement during the catalytic reaction. According to their crystal structural studies,^{23c,32} the putative substrate-binding site of luciferase is within a cavity of the N-terminal domain, and the AMP moiety is located in-between the N- and C-terminal domains. When this domain movement occurred after the adenylation of D-LH₂ and the C-terminal domain covered the substrate inside the enzyme, the emission species was supposed to exist in the hydrophobic environment. If we assumed that, like native D-LH₂, adenylated synthetic substrates did not induce domain alteration, then the emission species might have been exposed to water, which may have resulted in an emission shift toward red. Study of the whole C-domain-lacking mutant of firefly luciferase showed the importance of the C-terminal domain for bioluminescence.³³ Interestingly, this luciferase mutant, with an altered N-domain only, retains its luminescence activity and showed red emission around 620 nm irrespective of pH with D-LH₂–AMP. We assumed this result also supports the presumption that unnatural conformation of the C-domain causes a polar active site environment for the synthetic compounds.

2.3. Bioluminescence activity of adenylated derivatives of luciferin analogs

Next, we compared the bioluminescence activity of D-LH₂ and analogs to the corresponding adenylated derivatives. The use of the adenylated derivatives allows us to skip the adenylation step in bioluminescence reaction (Fig. 1, Eq. 1), and allows the luciferase to only catalyze the oxidation step of the adenylated substrates (Fig. 1, Eq. 2). If the adenylation step is the rate-determining step in light emission, the speed of light emission should be increased to enhance light emission intensity. The adenylated derivatives were prepared by reported procedures,³⁴ purified by HPLC just prior to use, and subjected to bioluminescence reaction. The adenylated substrate derivatives were rather stable under acidic conditions and no epimerization or hydrolysis was observed in pH 4 buffer solution or in 0.05% TFA-containing HPLC eluent over 1 h at room temperature. However, they were somewhat unstable under basic conditions measuring bioluminescence activity: the half-life for hydrolysis and epimerization in the pH 8 buffer was ca. 1 h and 10 min, respectively, at room temperature. Thus, the adenylated material was prepared and purified by HPLC under acidic conditions just prior to use. The bioluminescence emission profiles of the most active analog **2b** and its adenylated **2b**–AMP are shown in Fig. 5 as representative results. The emission maxima were not changed by adenylation, though the emission intensity was enhanced 10 to several hundred times with shorter rise times (8 s), as for D-LH₂ (6 s). Thus, the slow rise of light emission intensity of the analog itself was suggested to be responsible for the slow reaction of the adenylation step. The emission intensity of adenylated analogs decayed more slowly than that of adenylated D-LH₂. Compared

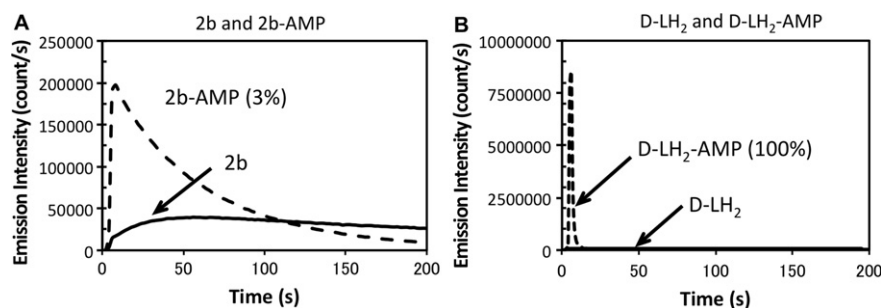


Fig. 5. Comparison of changes in bioluminescence over time of **2b**/ATP with **2b**-AMP, and of D-LH_2 /ATP with D-LH_2 -AMP. The most active **2b** was selected as a delegate for synthesized compounds. (A) **2b**/ATP (thick line) and **2b**-AMP (dashed line). (B) D-LH_2 /ATP (thick line) and D-LH_2 -AMP (dashed line). Relative light emission intensity of **2b**-AMP compared with D-LH_2 -AMP is shown in parenthesis in %.

with D-LH_2 , D-LH_2 -AMP showed a burst of light emission followed by drastic decay. If this quick decay of D-LH_2 -AMP is because of product inhibition,¹ synthetic analogs seem to have fewer product inhibition properties compared with those of oxyluciferin from natural D-LH_2 . The synthetic analogs for *P. pyralis* luciferase may be useful for in vivo whole-body imaging, because of the duration of substantial maximum light production suitable for detecting more stable signals, coupled with availability of vectors for luciferase gene to introduce it into living organisms.

Recently, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) systems utilizing chemically modified luciferin^{18,19} and firefly luciferase^{17,35} were successfully developed to obtain light emission in the NIR window region,^{18,19} and the longest wavelength was recorded at 783 nm.³⁵ This is a far longer wavelength than we observed from **3b**, though our compounds do not require the injection of modified luciferase into organisms to obtain red emission. Nevertheless, our compounds may also have the potential to be used as BRET donors. It should be noted that according to the functional specification of the photomultiplier tube (Hamamatsu R4220) of the luminometer used, sensitivity at 700 nm is more than 10 times less than at 600 nm. We will therefore be required to prepare more suitable apparatus for further development of luciferase substrates with NIR range emission.

3. Conclusion

We developed simple luciferin analogs with various light emission colors ranging from blue to the NIR window region. From study of the structure–emission wavelength relationship, we found that the introduction of conjugated double bonds between aromatic parts and the thiazoline ring was very effective for elongation of wavelengths of emission maxima, producing an approximately 100 nm longer wavelength shift per conjugated double bond. The shortest emission wavelength was observed with **1a** (λ_{max} 440 nm), and the longest with **3b** (λ_{max} 675 nm), reached within the NIR window region of light suitable for bioimaging of deep sites in living animals. The light emission from analogs showed slow increases to maximum intensity (about a minute), and was sustained for about 1 min, being different from that of D-LH_2 light emission, which rapidly reaches maximum intensity within a few seconds followed by a steep decay. The rather weak bioluminescence intensity of analogs could be enhanced 10 to several hundred times by their derivatization to corresponding adenylated substrates.

4. Experimental section

4.1. General

4.1.1. Materials and general method for synthesis. Starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers and used

without further purification. Porcine liver esterase was purchased from Sigma (E3019, lyophilized powder). Solvents used for anhydrous conditions were distilled, or dried over 4 Å molecular sieves. Cation exchange resins (Organo, Amberlite IR-120B NA, and IRA400OH AG) were used to remove ions. Merck precoated Kieselgel 60 F₂₅₄ plates with 0.25 mm (Art. 5715) and 0.5 mm (Art. 5744) thickness were used for analytical and preparative thin layer chromatography (TLC). Visualization of TLC was accomplished with UV-light and by treatment with suitable staining reagents. Merck Kieselgel 60 (Art. 7734) was used for column chromatography. Solvents were removed with a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature below 40 °C. Melting points were measured using a Yamato MP-2 instrument and are uncorrected. Optical purity of synthesized luciferin analogs was analyzed by HPLC (Agilent 1100 series) using a chiral column (Daicel Chemical Industries, OD-RH or OZ-RH, 5 μm , 4.6 \times 150 mm) with linear gradient of 10%–90% acetonitrile in H₂O over 30 min (flow rate 0.5 mL/min) as eluent. Unless otherwise stated, chiral analyses were performed using the OD-RH column. A UV detector set at 330 nm was used for peak detection. The retention times of L-LH_2 and D-LH_2 were 17.2 and 18.2 min, respectively. Synthesized compounds were used for the luminescence assay without further purification. IR spectra were measured using a Horiba FT 730 spectrometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on JEOL Lambda 270 [270 MHz (¹H) and 67.8 MHz (¹³C)] and JEOL ECA 500 [500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C)] instruments. Chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from internal tetramethylsilane ($\delta=0$) and coupling constants in hertz. Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS) were measured with a Finnigan MAT TSQ-700 instrument (glycerol matrix). Electron ionization mass spectra (EI-MS) were measured with a JEOL JMS 600H instrument. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HR-ESI-MS) were measured with JEOL JMS T1000LC mass spectrometers, using tuned conditions of needle voltage: 2000 V, orifice 1 voltage: 85 V, orifice 2 voltage: 5 V, ring lens voltage: 10 V, desolvating gas: 250 °C, orifice 1 temperature: 80 °C, delivery of sample: infusion method, flow speed: 10–30 $\mu\text{L}/\text{min}$ (according to the sample).

4.1.2. Materials and general method for luminescence assay. A 1 mg/mL stock solution of commercial luciferase purchased from Promega (QuantiLum recombinant *P. pyralis* luciferase, E1701) and Sigma (L9506) was prepared by dissolving the luciferase in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) containing 10% glycerol and was stored at –80 °C. Just prior to use, the luciferase stock solutions were diluted 100-fold with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 35% glycerol. The diluted luciferase solution was ice-cooled until use. ATP–Mg was purchased from Nacalai Tesque, and the buffer chemicals from Wako Chemicals or Kanto Chemicals. Stock solution of substrates was prepared by dissolving 5 mM of the substrates in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), and was

stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Deionized water (Millipore, Milli-RX-12 α) was used for aqueous assay solutions. pH was monitored with a Horiba F-23 pH meter. Bioluminescence intensity was measured using an ATTO AB-2200 or AB-2270 luminometer (Hamamatsu, R4220 photomultiplier tube) and bioluminescence spectra were recorded using an ATTO AB-1850 spectrophotometer. Adenylated derivatives were prepared according to the literature,³⁴ and purified using an HPLC system (Agilent 1100 series) equipped with a Mightysil C₁₈ reverse phase column (5 μm , 4.6 \times 250 mm) just prior to use. The flow rate of the mobile phase consisting of a mixture of acetonitrile and 0.05% TFA aqueous solution was 0.5 mL/min, and the column temperature was maintained at 20 $^{\circ}\text{C}$. A linear gradient of 10%–90% acetonitrile over 30 min was applied, and a UV detector set at 330 nm was used for peak detection. D-LH₂-AMP was eluted at 13.4 min, followed by L-LH₂-AMP (13.6 min), and D-LH₂ (20.9 min). D-**2b**-AMP was eluted at 22.2 min, followed by L-**2b**-AMP (22.8 min), and **2b** (26.8 min). The volatiles of the eluted fraction were removed under reduced pressure and the residual aqueous solution containing adenylated product was promptly subjected to bioluminescence activity. The purity and concentration of the synthesized adenylates were determined to be more than 95% using a calibration curve prepared with the HPLC system.

4.2. Preparation of luciferin analogs

4.2.1. (S)-2-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1a). To a solution of 4-cyanophenol (**4a**) (120 mg, 1.01 mmol) and D-cysteine hydrochloride monohydrate (D-Cys·HCl) (211 mg, 1.20 mmol) in EtOH (5 mL) was added 1 M NaOH (5 mL). After the reaction mixture was stirred at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h, additional D-Cys·HCl (422 mg, 2.40 mmol) and 1 M NaOH (1 mL) were added, and the mixture was stirred at room temperature for 4 days. The reaction mixture was filtered and the filtration residue was washed with 50% aqueous EtOH (20 mL). The filtrate and washings were combined and the pH of the mixture was adjusted to pH 2 with 2 M HCl. The precipitates were collected by suction filtration, washed by distilled water, and dried under reduced pressure to give analog **1a** (111 mg, 50%) as a white powder. Mp 200–204 $^{\circ}\text{C}$ dec; 90% ee from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 8.0 min, D-isomer: 8.7 min); ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 3.70 (dd, $J=7.9, 11.5$ Hz, 1H, ABX system), 3.76 (dd, $J=8.9, 11.5$ Hz, 1H, ABX system), 5.23 (dd, $J=7.9, 8.9$ Hz, 1H, ABX system), 6.85 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, AA'BB' system), 7.74 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, AA'BB' system); ¹³C NMR (67.8 MHz, CDCl₃) δ 36.0 (t), 78.0 (d), 116.5 (d) \times 2, 124.5 (s), 131.8 (d) \times 2, 163.0 (s), 173.9 (s), 174.6 (s); FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 2680, 1610, 1580, 1510; EIMS m/z : 223 (M⁺, 44%), 178 (100). HR-ESI-MS: m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₀H₉NNaO₃S, 246.0201; found, 246.0157.

4.2.2. (S)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1b). To a solution of 4-(dimethylamino)benzotrile (**4b**) (103 mg, 0.71 mmol) and D-Cys·HCl (371 mg, 2.12 mmol) in EtOH (4 mL) was added 1 M NaOH (5 mL). After the reaction mixture was stirred at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h, 1 M HCl (5 mL) was added, and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was washed with distilled water to give analog **1b** (50.9 mg, 29%) as a yellow solid. 92% ee from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 11.1 min, D-isomer: 11.5 min); ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 3.01 (s, 6H), 3.50 (dd, $J=9.2, 11$ Hz, 1H, ABX system), 3.61 (dd, $J=9.2, 11$ Hz, 1H, ABX system), 5.00 (dd, $J=9.2, 9.2$ Hz, 1H, ABX system), 6.71 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, AA'BB' system), 7.71 (d, $J=7.0$ Hz, 2H, AA'BB' system); FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 3392, 1608; ESI-MS m/z : 251 [(M+H)⁺]. HR-ESI-MS: m/z : [M+Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₄N₂NaO₂S, 273.0674; found, 273.0649.

4.2.3. (S)-2-(6-Hydroxynaphthalen-2-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1c). In a similar manner to that used for the

preparation of **1b**, 6-cyano-2-naphthol (**4c**) (102 mg, 0.60 mmol) was treated with D-Cys·HCl (290 mg, 1.65 mmol) and 1 M NaOH (2.5 mL) in EtOH (5 mL) to afford analog **1c** quantitatively as a yellow solid. Mp 197 $^{\circ}\text{C}$ dec (lit.^{23a} 201.5–203.5 $^{\circ}\text{C}$ dec); 90% ee from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 10.8 min, D-isomer: 11.2 min); ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 3.71 (dd, $J=8.9, 11.2$ Hz, 1H, ABX system), 3.76 (dd, $J=8.9, 11.2$ Hz, 1H, ABX system), 5.33 (dd, $J=8.9, 8.9$ Hz, 1H, ABX system), 7.12–7.16 (complex, 2H), 7.68 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=9.6$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J=1.6, 8.9$ Hz, 1H), 8.21 (br d, $J=1.6$ Hz, 1H); ¹³C NMR (67.8 MHz, CD₃OD) δ 37.1 (t), 83.0 (d), 110.0 (d), 120.3 (d), 126.2 (d), 127.4 (d), 128.8 (s), 128.9 (s), 130.4 (d), 131.7 (d), 138.1 (s) \times 2, 158.4 (s), 170.0 (s), 178.5 (s); FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 3022, 1589, 1483; HR-ESI-MS m/z : [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₂NO₃S, 274.0538; found, 247.0533, and [M+H-CO₂]⁺ calcd for C₁₃H₁₂NOS, 230.0640; found, 230.0644.

4.2.4. (S,E)-2-(4-Hydroxystyryl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (2a). Following the literature,³⁶ to a solution of 4-iodophenol (**5**) (1100 mg, 5.0 mmol) in water (10 mL) were added CH₃CO₂K (491 mg, 5.0 mmol), K₂CO₃ (865 mg, 6.3 mmol), acrylonitrile (495 μL , 7.5 mmol), and Pd(OAc)₂ (11 mg, 0.05 mmol), and the mixture was heated under reflux for 30 min. After the reaction mixture was cooled to room temperature, precipitates were filtered off through a pad of Celite and the filter cake was washed with water (50 mL). The filtrate and washings were combined, adjusted to pH 7 with 2 M HCl, and the products were extracted with EtOAc (40 mL). The organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, and concentrated to leave a white solid. Recrystallization from EtOAc/*i*-Pr₂O gave nitrile **6** (417 mg, 58%) as colorless needles being a mixture of stereoisomers (cis/trans=1:3 by ¹H NMR). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.30 (d, $J=12.5$ Hz, 0.25H cis), 5.85 (d, $J=16$ Hz, 0.75H trans), 6.75 (d, $J=8$ Hz, 1.5H trans, AA'BB' system), 6.77 (d, $J=9.0$ Hz, 0.5H cis, AA'BB' system), 7.08 (d, $J=12.5$ Hz, 0.25H cis), 7.33 (d, $J=16$ Hz, 0.75H trans), 7.35 (d, $J=8$ Hz, 1.5H trans, AA'BB' system), 7.66 (d, $J=9.0$ Hz, 0.5H cis, AA'BB' system). To a solution of D-Cys·HCl (106 mg, 0.60 mmol) and nitrile **6** (65.0 mg, 0.45 mmol) in MeOH (2 mL) was added 1 M NaOH (2 mL) and the mixture was stirred at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h. The reaction mixture was neutralized with 1 M HCl and was directly purified using a Sep-Pak cartridge (Waters, C₁₈, water to 60% MeOH stepwise gradient) to give analog **2a** (9.2 mg, 8%) as a pale-yellow solid. Mp 138–140 $^{\circ}\text{C}$ dec; 98% ee; from chiral HPLC (retention time of L-isomer: 12.3 min, D-isomer: 12.9 min); ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 3.52 (dd, $J=8.9, 10.9$ Hz, 1H, ABX system), 3.61 (dd, $J=8.9, 10.9$ Hz, 1H, ABX system), 5.01 (dd, $J=8.9, 8.9$ Hz, 1H, ABX system), 6.80 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, AA'BB' system), 6.91 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J=8.9$ Hz, 2H, AA'BB' system); ¹³C NMR (67.8 MHz, CDCl₃) δ 36.5 (t), 81.2 (d), 116.9 (d) \times 2, 119.7 (d), 128.0 (s), 130.5 (d) \times 2, 143.7 (d), 160.7 (s), 172.0 (s), 177.5 (s); FT-IR ν_{max} (cm⁻¹): 3151, 1626, 1568; ESI-MS m/z : 250 [(M+H)⁺]. HR-ESI-MS: m/z : [M+H]⁺ calcd for C₁₂H₁₂NO₃S, 250.0538; found, 250.0516.

4.2.5. S-Trityl-D-cysteine methyl ester [D-Cys(S-Trt)-OMe]. To a solution of S-trityl-D-cysteine (504 mg, 1.39 mmol) in MeOH (100 mL) was added 4 M HCl (5.4 mL in 1,4-dioxane), and the mixture was stirred at ambient temperature for 17 days. The reaction mixture was neutralized by adding ion exchange resin IRA400OH AG. The resin was filtered off and washed with MeOH. The filtrate and washings were combined and concentrated in vacuo. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=1:1) to give D-Cys(S-Trt)-OMe 455 mg (86%) as a pale-yellow oil. ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 2.47 (dd, $J=7.7, 12.4$ Hz, 1H, ABX system), 2.60 (dd, $J=4.8, 12.4$ Hz, 1H, ABX system), 3.20 (br dd, $J=4.8, 7.7$ Hz, 1H, ABX system), 3.65 (s, 3H), 7.18–7.31 (complex, 9H, 3 \times C₆H₅), 7.40–7.45 (complex, 6H, 3 \times C₆H₂); ¹³C

NMR (67.8 MHz, CDCl₃) δ 36.9 (t), 52.1 (q), 53.8 (d), 66.8 (s), 126.8 (d)×3, 127.9 (d)×6, 129.6 (d)×6, 144.5 (s)×3, 174.2 (s); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3381, 3315, 1739, 1595; FAB-MS m/z : 378 (M+H⁺, 10%), 243 (100).

4.2.6. (*S,E*)-2-(4-(Dimethylamino)styryl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**2b**). To a solution of 4-(dimethylamino)cinnamic acid (**10b**) (92.1 mg, 0.48 mmol) in DMF (5 mL) were added *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe (101 mg, 0.53 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimide (EDC) (311 mg, 1.62 mmol), and 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP) (151 mg, 1.23 mmol) under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, water (100 mL) was added. The products were extracted with EtOAc (3×100 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue obtained was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=1:1) to give an *N*-acyl-*S*-trityl *D*-cysteine methyl ester derivative, (*S*)-methyl 2-((*E*)-3-(4-(dimethylamino)phenyl)acrylamido)-3-(tritylthio)propanoate (259 mg, 89%) as a yellow oil (step g in Scheme 1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.72 (m, 2H, ABX system), 3.01 (s, 6H), 3.72 (s, 3H), 4.78 (m, 1H, ABX system), 6.15 (d, *J*=15.5 Hz, 1H), 6.20 (d, *J*=5.9 Hz, 1H, *NH*), 6.68 (d, *J*=8.6 Hz, 2H, AA'BB' system), 7.20–7.42 (complex, 17H), 7.52 (d, *J*=15.5 Hz, 1H); ESI-MS m/z : 573 [(M+Na)⁺]. To a solution of the amide obtained above (118 mg, 0.21 mmol) in dry CH₂Cl₂ (10 mL) were added triphenylphosphine oxide (Ph₃PO) (124 mg, 0.45 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (Tf₂O) (360 μ L, 2.14 mmol) under Ar.³⁷ After the reaction mixture was stirred at room temperature for 40 min, the reaction was quenched by adding water (50 mL), and the products were extracted with CHCl₃ (50 mL), and then EtOAc (2×50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=1:2) to give thiazoline ester **11b** (44.2 mg, 71%) as a yellow solid (step h in Scheme 1). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.96 (s, 6H), 3.53 (m, 2H, ABX system), 3.79 (s, 3H), 5.14 (dd, *J*=8.6, 8.6 Hz, 1H, ABX system), 6.63 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, AA'BB' system), 6.88 (d, *J*=15.5 Hz, 1H), 7.04 (d, *J*=15.5 Hz, 1H), 7.34 (d, *J*=7.5 Hz, 2H, AA'BB' system); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 1724; ESI-MS m/z : 291 [(M+H)⁺]. To a mixture of thiazoline ester **11b** (21.1 mg, 0.07 mmol) in EtOH (2 mL) and 10 mM NH₄HCO₃ (6 mL) was added porcine liver esterase (9.2 mg), and the reaction mixture was stirred at 37 °C under Ar for 19 h. After evaporation of the reaction mixture, the residue obtained was suspended in a mixture of MeOH/CHCl₃. The precipitate was filtered off, and the filtrate and washings of the residue were combined and concentrated to give analog **2b** (14.1 mg, 71%) as an orange solid (step i in Scheme 1). 26% ee from chiral HPLC (retention time of *L*-isomer: 13.2 min, *D*-isomer: 12.9 min); ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 3.00 (s, 6H), 3.62 (m, 2H, ABX system), 5.01 (dd, *J*=8.6, 8.6 Hz, 1H, ABX system), 6.72 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, AA'BB' system), 6.86 (d, *J*=16 Hz, 1H) 7.21 (d, *J*=16 Hz, 1H), 7.44 (d, *J*=9.0 Hz, 2H, AA'BB' system); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD, δ): 31.2 (t), 34.5 (q)×2, 79.7 (d), 112.5 (d)×2, 115.9 (d), 122.5 (s), 130.1 (d)×2, 144.1 (s), 152.1 (s), 170.4 (s), 172.2 (s); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3392, 1602; HR-ESI-MS m/z : [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₁₇N₂O₂S, 277.1011; found, 277.0989.

4.2.7. (*S,E*)-2-(2-(6-Hydroxynaphthalen-2-yl)vinyl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (**2c**). To a solution of 6-cyano-2-naphthol (**4c**) (50.2 mg, 0.30 mmol) in DMF (0.5 mL) were added *tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl, 143 mg, 0.95 mmol) and imidazole (160.7 mg, 2.40 mmol). After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, water (40 mL) was added. The products were extracted from the diluted mixture with EtOAc (3×60 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column

chromatography (Hex/EtOAc=8:1) to yield 6-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)naphthalene-2-carbonitrile (**7**) (69.9 mg, 83%) as a colorless oil. ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 0.23 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 7.12 (complex, 2H), 7.48 (dd, *J*=1.6, 8.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 7.73 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*=0.5 Hz, 1H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3689, 2225, 1274; ESI-MS m/z : 284 [(M+H)⁺], 306[(M+Na)⁺]. Nitrile **7** (99.3 mg, 0.35 mmol) was dissolved in toluene (10 mL) under Ar. To the mixture was added 1 M solution of diisobutylaluminum hydride (DIBAL) in toluene solution (0.5 mL). After the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h, acetone (10 mL) was added to the ice-water-cooled reaction mixture for decomposition of the excess reagent. To the mixture were added saturated potassium sodium tartrate (20 mL) and water (30 mL). The products were extracted from the suspension with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, and evaporated. The residue was purified by PTLC (Hex/EtOAc=10:1) to afford aldehyde **8** (74.4 mg, 74%) as a yellow oil. ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 0.28 (s, 6H), 1.03 (s, 9H), 7.17 (dd, *J*=2.3, 8.6 Hz, 1H), 7.23 (br d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.76 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.89 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 7.90 (dd, *J*=1.6, 8.6 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 10.09 (s, 1H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 1716, 1274; ESI-MS m/z : 287 [(M+H)⁺]. To a solution of aldehyde **8** (63.9 mg, 0.22 mmol) in toluene (2 mL) was added ethoxycarbonylmethylene-triphenylphosphoran (Ph₃P=CHCO₂Et) (121 mg, 0.349 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. After dilution of the reaction mixture with water (50 mL), the products were extracted with EtOAc (3×50 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and evaporated. The residue was purified by PTLC (Hex/EtOAc=25:1) to give ester **9** (76.6 mg, 97%) as a yellow oil (step e in Scheme 1). ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 0.25 (s, 6H), 1.00 (s, 9H), 1.34 (t, *J*=7.0 Hz, 3H), 4.27 (q, *J*=7.0 Hz, 2H), 6.47 (d, *J*=16.1 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J*=2.4, 8.9 Hz, 1H), 7.19 (d, *J*=2.4 Hz, 1H), 7.60–7.79, complex, 4H), 7.85 (br s, 1H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 1623, 1274; ESI-MS m/z : 357 [(M+H)⁺]. To a solution of ester **9** (90.8 mg, 0.253 mmol) in *i*-PrOH (3 mL) was added 1 M NaOH (5 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 5 h. The reaction mixture was neutralized by adding ion exchange resin IR-120B NA. The resin was removed by filtering. The filtrate and washings were combined, and evaporated to give acid **10c** quantitatively as a pale-yellow oil (step f in Scheme 1). ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 6.50 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J*=2.2, 7.6 Hz, 1H), 7.11 (br s, 1H), 7.65 (m, 2H), 7.77 (dd, *J*=1.6, 8.1 Hz, 1H), 7.80 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3689, 1670; ESI-MS m/z : 237 [(M+Na)⁺]. In a similar manner to that used in step g in the synthesis of analog **2b**, acid **10c** (54.9 mg, 0.25 mmol) was coupled with *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe to give an *N*-acyl-*S*-trityl *D*-cysteine methyl ester derivative, (*S*)-methyl 2-((*E*)-3-(2-hydroxynaphthalen-6-yl)acrylamido)-3-(tritylthio)propanoate (58.4 mg, 40%) as a pale-yellow oil. ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 2.75 (m, 2H, ABX system), 3.75 (s, 3H), 4.77 (dd, *J*=2.7, 7.9 Hz, 1H, ABX system), 6.35 (d, *J*=16.1 Hz, 1H), 6.90–7.80 (complex, 23H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3689, 3565, 1868; ESI-MS m/z : 574 [(M+H)⁺]. In a similar manner to that used in step h in the synthesis of analog **2b**, the amide obtained above (60.3 mg, 0.11 mmol) was cyclized to yield thiazoline ester **11c** (17.4 mg, 55%) as a yellow solid. ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 3.63 (m, 2H, ABX system), 3.81 (s, 3H), 5.27 (dd, *J*=8.9, 8.9 Hz, 1H, ABX system), 7.07–7.13 (complex, 3H), 7.33 (d, *J*=16.1 Hz, 1H), 7.65 (complex, 2H), 7.76 (m, 1H), 7.88 (br s, 1H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3689, 1733; ESI-MS m/z : 314 [(M+H)⁺], 336 [(M+Na)⁺]. In a similar manner to that used in step i in the synthesis of analog **2b**, thiazoline ester **11c** (6.3 mg, 0.02 mmol) was hydrolyzed with porcine liver esterase to give analog **2c** quantitatively as a pale-yellow solid. 22% ee from chiral HPLC (OZ-RH column, retention time of *L*-isomer: 17.4 min, *D*-isomer: 18.2 min; ¹H NMR (270 MHz, CD₃OD) δ 3.61 (m, 2H, ABX system), 5.09 (dd, *J*=8.9, 8.9 Hz, 1H, ABX system), 7.06–7.17 (complex, 3H), 7.30 (dd, *J*=16.1 Hz, 1H), 7.65–7.87 (complex, 4H); FT-IR ν_{\max} (cm⁻¹): 3689,

6.66–6.71 (m, 3H), 6.82 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=8$ Hz, 2H, AA'BB' system), 7.44 (dd, $J=12, 15.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 14.5 (q), 40.3 (q) $\times 2$, 60.2 (t), 112.1 (d) $\times 2$, 118.3 (d), 121.9 (d), 124.2 (s), 128.7 (d) $\times 2$, 141.2 (d), 145.9 (d), 151.0 (s), 167.7 (s); FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 1701; ESI-MS m/z : 246 [(M+H) $^+$]. In a similar manner to that used in step f in the synthesis of analog **2c**, ester **13b** (411 mg, 1.68 mmol) was hydrolyzed with 1 M NaOH to give acid **14b** (353 mg, 96%) as a yellow solid. Mp 220–225 °C (lit.³⁹ 248 °C); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 2.97 (s, 6H), 5.84 (d, $J=15$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, AA'BB' system), 6.73–6.87 (m, 2H), 7.36 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, AA'BB' system), 7.40 (dd, $J=11, 15$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CD_3OD) δ 39.0 (q) $\times 2$, 111.9 (d) $\times 2$, 118.7 (d), 121.7 (s), 123.1 (d), 128.6 (d), 130.4 (d), 137.1 (d), 140.6 (s), 145.0 (s), 167.8 (s); FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 2896, 1684; ESI-MS m/z : 218 [(M+H) $^+$]. In a similar manner to that used in step g in the synthesis of analog **2b**, acid **14b** (637 mg, 2.93 mmol) was coupled with *D*-Cys(S-Trt)-OME to give an *N*-acyl-*S*-trityl *D*-cysteine methyl ester derivative, (*S*)-methyl 2-((2*E*,4*E*)-5-(4-(dimethylamino)phenyl)penta-2,4-dienamido)-3-(tritylthio)propanoate (1.2 g, 69%) as a yellow oil. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.73 (m, 2H, ABX system), 2.99 (s, 6H), 3.71 (s, 3H), 4.77 (ddd, $J=6.8, 6.8, 7.5$ Hz, 1H, ABX-XY system), 5.86 (d, $J=15$ Hz, 1H), 6.18 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, *NH*), 6.67 (d, $J=8.0$ Hz, 2H, AA'BB' system), 6.70 (d, $J=11.5$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J=15.5$ Hz, 1H), 7.22–7.42 (m, 18H); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CD_3OD) δ 34.3 (t), 39.0 (q) $\times 2$, 53.0 (q), 53.2 (d), 68.3 (s), 98.7 (d) $\times 2$, 112.5 (d), 115.0 (d), 121.1 (s), 124.1 (d), 128.0 (d) $\times 3$, 129.0 (d) $\times 8$, 130.7 (d) $\times 8$, 145.9 (s), 148.0 (s), 158.0 (s), 159.6 (s), 161.0 (s), 172.0 (s); FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 1739, 1593; ESI-MS m/z : 599 [(M+Na) $^+$]. In a similar manner to that used in step h in the synthesis of analog **2b**, the amide obtained above (43.3 mg, 0.08 mmol) was cyclized to give thiazoline **15b** (17.6 mg, 74%) as a pale-yellow solid. Mp 145 °C dec; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.99 (s, 6H), 3.55 (m, 2H, ABX system), 3.82 (s, 3H), 5.15 (dd, $J=9.2, 9.2$ Hz, 1H, ABX system), 6.53 (d, $J=15$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, AA'BB' system), 6.72 (m, 2H), 6.93 (dd, $J=10, 15$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=9.0$ Hz, 2H, AA'BB' system); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 33.7 (t), 39.1 (q) $\times 2$, 51.7 (q), 76.8 (d), 112.0 (d) $\times 2$, 121.0 (d), 122.0 (d), 128.4 (d) $\times 2$, 140.5 (d), 144.8 (d), 151.3 (s), 171.3 (s), 171.3 (s); FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 1699; ESI-MS m/z : 317 [(M+H) $^+$]. In a similar manner to that used in step i in the synthesis of analog **2b**, thiazoline ester **15b** (39.9 mg, 0.13 mmol) was hydrolyzed with porcine liver esterase to give analog **3b** (37.9 mg, 99%) as a red solid. Mp 144 °C dec; 70% ee from chiral HPLC (OZ-RH column, retention time of *L*-isomer: 9.9 min, *D*-isomer: 12.0 min); ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 2.97 (s, 6H), 3.58 (m, 2H, ABX system), 5.00 (t, $J=8.9$ Hz, 1H, ABX system), 6.49 (d, $J=15$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, AA'BB' system), 6.81 (m, 2H), 7.04 (dd, $J=9.5, 15$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, AA'BB' system); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 34.5 (t), 39.3 (q) $\times 2$, 78.0 (d), 112.0 (d) $\times 2$, 119.8 (d), 121.9 (d), 124.3 (s), 128.8 (d) $\times 2$, 141.9 (d), 146.2 (d), 151.5 (s), 166.0 (s), 172.0 (s); FT-IR ν_{max} (cm^{-1}): 3386, 1734, 989; ESI-MS m/z : 303 [(M+H) $^+$]. HR-ESI-MS m/z : [M+H] $^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 303.1167; found, 303.1145.

4.3. Measurement of bioluminescent activity

4.3.1. Synthesis of 2b-AMP and D-LH₂-AMP. Following the literature,³⁴ adenylated **2b** and *D*-LH₂ were prepared and purified just prior to use. For **2b**-LH₂-AMP: under an argon atmosphere, a solution of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (20 mg, 0.097 mmol) in DMSO (0.8 mL) was added to a solution of **2b**-LH₂ (1 mg, 3.61 μmol) and (–)-adenosine-5'-monophosphoric acid (free acid, Oriental Yeast Co.) (10 mg, 0.029 mmol) in DMSO (0.5 mL). The reaction mixture was stirred vigorously for 10 min at room temperature, then acetone (1.5 mL) was added to quench the reaction. The white precipitates formed were deposited by centrifugation, and the supernatant was discarded. The precipitates were suspended in ice-cold acetone (1 mL) and centrifuged. This washing operation was

repeated. The twice-washed precipitates were dissolved in distilled water containing 0.05% (v/v) trifluoroacetic acid (0.5 mL). The acetone dissolved in the solution was removed under reduced pressure. The resulting aqueous solution was promptly subjected to HPLC purification just prior to use as described in Section 4.1.2. *D*-LH₂-AMP was also prepared by essentially the same procedure and purified by HPLC just prior to use.

4.3.2. Measurements of bioluminescence intensities. Bioluminescence intensities of *D*-LH₂, synthesized analogs, and the adenylated derivatives were measured using an ATTO AB-2200 or AB-2270 luminometer (Hamamatsu, R4220 photomultiplier tube). A reaction mixture was prepared by mixing 20 μL of substrate (100 μM), 20 μL of luciferase solution (0.01 mg/mL), and 20 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0). Luminescence reactions were initiated by injecting 40 μL of ATP-Mg (200 μM) into the reaction mixture at ambient temperature. To evaluate bioluminescence activity of the adenylated derivatives, 20 μL of the adenylated substrate (10 μM), 20 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0), and water (40 μL) were mixed, and the luminescence reaction was initiated by adding 20 μL luciferase solution (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In the both cases, light emission was monitored for 180 s with sampling intervals of 1 s. Emission intensities were expressed as the light count per second (cps).

4.3.3. Measurements of bioluminescence spectra. Bioluminescence spectra of synthesized analogs and the adenylated derivatives were recorded using an ATTO AB-1850 spectrophotometer. A reaction mixture was prepared by mixing 5 μL of a substrate (100 μM), 5 μL of luciferase solution (1 mg/mL), and 5 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0). Luminescence reactions were initiated by injecting 10 μL of ATP-Mg (200 μM) into the reaction mixture. Emission spectra were measured in 1 nm increments from 400 nm to 750 nm. Bioluminescence emission wavelengths of the adenylated substrates were measured in a similar manner. Luminescence reactions were initiated by adding 5 μL of luciferase solution (1 mg/mL) to solutions of adenylated substrates (10 μM , 5 μL) in 5 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0) and 10 μL water.

Acknowledgements

The authors are deeply grateful to Dr. Shigeru Nishiyama (Keio University, Yokohama, Japan) for enthusiastic support and critical review. This work was supported by Grants-in-Aid for Exploratory Research (No. 24650633) to S.M. from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and Adaptable & Seamless Technology Transfer Program through Target-driven R&D (A-Step) (No. AS2321366E) to S.M. from the Japan Science and Technology Agency.

References and notes

- Fraga, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 146–158.
- Marques, S. M.; Esteves de Silva, J. C. G. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 6–17.
- Inouye, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 387–404.
- Thorne, N.; Ingles, J.; Auld, D. S. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 646–657.
- Roda, A.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Mairasoli, M. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 307–322.
- Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- Viviani, V. R. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1833–1850.
- Kajiyama, N.; Nakano, E. *Protein Eng.* **1991**, *4*, 691–693.
- Branchini, B. R.; Ablamsky, D. M.; Davis, A. L.; Southworth, T. L.; Bulter, B.; Fan, F.; Jathoul, A. P.; Pule, M. A. *Anal. Biochem.* **2010**, *396*, 290–297.
- Naumov, P.; Ozawa, Y.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11590–11605.
- White, E. H.; Wörther, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2015–2019.
- Woodroof, C. C.; Shultz, J. W.; Wood, M. G.; Osterman, J.; Cali, J. J.; Daily, W. J.; Meisenheimer, P. L.; Klaubert, D. H. *Biochemistry* **2008**, *47*, 10383–10393.

13. Reddy, G. R.; Thompson, W. C.; Miller, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13586–13587.
14. Zhou, W.; Shlts, J. W.; Murphy, N.; Hawkins, E. M.; Bernad, L.; Good, T.; Moorthart, L.; Frackman, S.; Klaubert, D. H.; Wood, K. V. *Chem. Commun.* **2006**, 4620–4622.
15. Yang, W.; Liu, X.; Peng, X.; Li, P.; Wang, T.; Tai, G.; Li, X. J.; Zhou, Y. *Carbohydr. Res.* **2012**, *359*, 92–96.
16. Cohen, A. S.; Dubikovskaya, E. A.; Rush, J. S.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8563–8565.
17. Takakura, H.; Sasakura, K.; Ueno, T.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Tsuboi, T.; Nagano, T. *Chem.—Asian J.* **2010**, *5*, 2053–2061.
18. Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. *Chem.—Asian J.* **2011**, *6*, 1800–1810.
19. Kojima, R.; Takakura, H.; Ozawa, T.; Tada, Y.; Nagano, T.; Urano, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 1175–1179.
20. Takakura, H.; Kojima, R.; Ozawa, T.; Nagano, T.; Urano, Y. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1424–1427.
21. Conley, N. R.; Dragulescu-Andrasi, A.; Rao, J.; Moerner, W. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 3350–3353.
22. McCutcheon, D. C.; Paley, M. A.; Steinhardt, R. C.; Prescher, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7604–7607.
23. (a) Branchini, B. R.; Hayward, M. M.; Bamford, S.; Brennan, P. M.; Lajiness, E. J. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 689–695; (b) Woodroffe, C. C.; Meisenheimer, P. L.; Klaubert, D. H.; Kovic, Y.; Rosenberg, J. C.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Branchini, B. R. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9807–9813; (c) Sundlow, J. A.; Fontaine, D. M.; Southworth, T. L.; Branchini, B. R.; Gulick, A. M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6493–6495.
24. White, E. H.; Wörther, H. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1484–1488.
25. Hosseinkhani, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 1167–1182.
26. Pretsch, E.; Buhlmann, C.; Affolter, C.; Amemiya, S. *Translation from the English Language Edition: Structure Determination of Organic Compounds*; Springer Tokyo: Tokyo, 2004; p 387 (in Japanese edition).
27. Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2385–2396.
28. Hirano, T.; Nagai, H.; Matsuhashi, T.; Hasumi, Y.; Iwano, S.; Ito, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Viviani, V. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1281–1284.
29. DeLuca, M.; McElroy, W. D. *Biochemistry* **1974**, *13*, 921–925.
30. Branchini, B. R.; Rosenberg, J. C.; Fontaine, D. M.; Southworth, T. L.; Behny, C. E.; Uzasci, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11088–11091.
31. Gulick, A. M. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 811–827.
32. Nakatsu, T.; Ichikawa, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobayashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. *Nature* **2006**, *440*, 372–376.
33. Ayabe, K.; Zako, T.; Ueda, H. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 4389–4394.
34. Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Portier, N. C.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2112–2113.
35. Branchini, B. R.; Ablamsky, D. M.; Rosenberg, J. C. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2023–2030.
36. Bumagin, N. A.; More, P. G.; Beletskaya, I. P. *J. Organomet. Chem.* **1989**, *371*, 397–401.
37. You, S.-L.; Razavi, H.; Kelly, J. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 83–85.
38. Boschi, D.; Tron, G. C.; Lazzarato, L.; Chegaev, K.; Cena, C.; Stilo, A. D.; Giorgis, M.; Bertinaria, M.; Fruttero, R.; Gasco, A. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2886–2897.
39. Jana, S.; Ghosh, S.; Dalapati, S.; Kar, S.; Guchhait, N. *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *78*, 463–468.

Evaluation of Bioluminescence Activity of Firefly Luciferin Nucleotide Derivatives

Satoshi IWANO*, Satoshi KOJIMA, Takashi HIRANO, Shojiro MAKI, Haruki NIWA

The University of Electro-Communications
Chofu, Tokyo 182-8585, Japan.
E-mail: iwano@lumi.pc.ucc.ac.jp

We study firefly bioluminescence to create practical bio imaging tool. Firefly bioluminescence has two serious problems; color and brightness control. We give solutions; archive multi-color emission (430 ~ 680 nm) and Emission Enhancing Technology (EET, 1000 fold brightness than wild type). But these solutions are not enough as practical use because of low brightness (multicolor) and low stability (EET). In this study, we focused on lumenscent intensity, in fact improvement of EET was done for create practical imaging tool.

1. Introduction

Firefly bioluminescence is an enzymatic reaction, which requires Mg^{2+} , ATP, and O_2 . The mechanism of this bioluminescence is as follows; first, the luciferase catalyzes the adenylation of the luciferin and then the oxygenation of the adenylylated luciferin, which makes an excited state oxyluciferin is generated and yellow-green (560 nm) light is emitted (Fig. 1). This high efficiency luminescent system is widely used in the field of life science.

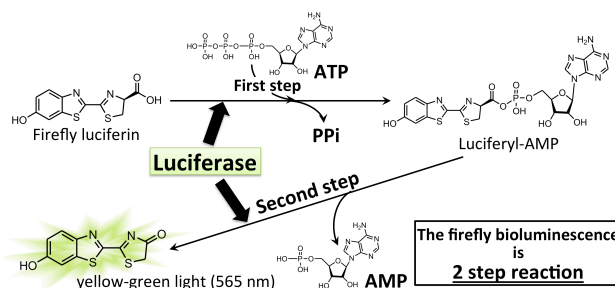


Fig. 1 The firefly bioluminescence reaction

2. Previous research

In order to expand the application of firefly bioluminescence in research, we focused on improving firefly luciferin and the synthesized various analogs. Luciferin is a light emitter, so we modified luciferin's structure to achieve various colors of firefly bioluminescence by luciferin analogs (430 nm ~ 680 nm)^{1, 2}.

However these luciferin analogs are low luminescence intensity in relative to natural firefly luciferin. We have a solution for low intensity (Fig. 2)³.

The firefly bioluminescence reaction is a 2 step reactions (AMP, Oxygenation reaction). When we synthesized the intermediate luciferyl-AMP by organic synthesis skip 1st step, luminescence intensity was enhanced very strongly by skipping the first reaction, although luciferyl-AMP's stability is very low.

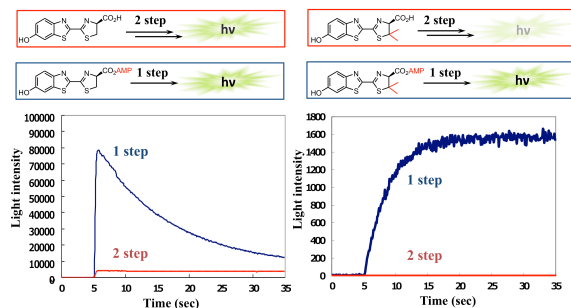


Fig. 2 Luciferyl AMP's high luminescence activity

Additionally, no luminescence analogs have luminescence activity by skipping 1st step. It suggests that 1st step (nucleotidation step) is bottle neck on firefly bioluminescence for strong light and color control.

3. Purpose and Method

In this study, we aspire to create a high intensity and high stability luminescence system: a stable luciferyl-AMP. One has luciferyl-AMP's structure activity correlation. So we need basic data about it. Luciferyl-AMP has four site; fluorophore, phosphate ester, ribose and base (Fig. 3).

I translate sugar and base site, so I can use GTP, TTP, UTP and CTP also Nucleotide Mono Phosphate, easily.

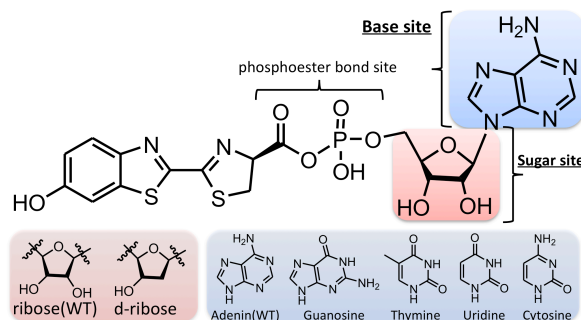


Fig. 3 Luciferyl Nucleotide

2step and 1 step luminescence reaction was evaluated as a measure of luminescence intensity on each.

3. Results and Discussion

3.1 2step assay results by NTP assay

2step assay is luminescent reaction that is added NTP as substitute for ATP. We could evaluate 1st step (AMP reaction) activity from this translate. This result is show Table 1.

Natural luminescent activity (added ATP) was defined as 100.

dATP's activity (only sugar site is substitute deoxy- ribose) is 10, dATP has activity tenth part of natural luminescent. Similarly, GTP and CTP have activity only one and two hundredth part of natural luminescent activity. UTP and dTTP don't have a luminescent activity.

2step	ATP	dATP	GTP	CTP	UTP	dTTP
Relative light intensity	100	10	1	0.5	X	X

Table 1 2step assay's results

Some of NTP have luminescent activity, but very low activity.

Interesting that CTP has luminescent activity, because cytosine is monocyclic base. Adenocyne, Guanine, Cytocyne have amino group in common. It is suggested that recognition of 1st step (nucleotidation step) is critical to amino group on the base more than dicyclic.

We found 1st step is also very good recognition of nucleotide structure as with luciferin structure.

3.2 1step assay results by luciferyl nucleotide

Synthesize of luciferyl nucleotides is shown scheme 1. And then, we use luciferyl nucleotides for evaluation of 1step luminescence assay.

1step assay is that luminescent reaction was added luciferyl nucleotide as substitute for substrate. So we could evaluate only one step (2nd step, oxygenation step) activity from synthesized luciferyl nucleotide. This result is show Table 2.

Natural luminescent activity (2step, added ATP) was defined as 1.

Luciferyl-AMP has suitably activity, 1000 times as high as natural 2step luminescent activity.

Luciferyl- dAMP and GMP have

very high activity, 100 times as high as natural 2step luminescent activity. Luciferyl-CMP's activity is very high, because 2step reaction (added CTP) activity has lowest activity. But 1step reaction (using luciferyl CMP) has second highest activity.

Even more surprisingly, luciferyl-UMP and dTMP have luminescent activity. Nevertheless, they don't have activity in 2step reaction. In addition, luciferyl-UMP has very high activity, 50 times as high as natural 2step.

From 1step assay result, all luciferyl-nucleotide have very high luminescent activity without luciferyl-dTMP., however Luciferyl-UMP is high luminescent activity. Difference on structure between uridine and thymine is only methyl group, but they have big difference on luminescent activity.

We found 2nd step is very poor recognition of luciferyl-nucleotide against 1st step.

4. Conclusion

Firefly bioluminescence is 2step reaction; 1st step is nucleotidation reaction, 2nd step is oxidation reaction. Enzyme activity was evaluated nucleotidation and oxidation activity separately, because luminescent reaction was observed as two reactions by using luciferyl nucleotide.

From the results, 1st step has also very tight recognition of nucleotide structure by enzyme. On the other hands, 2nd step is very slack of substrate structure. We get a structure activity correlation of nucleotide in firefly bioluminescence.

Future research will focus on Phosphoester site translation and stability of luciferyl nucleotide to create useful imaging tool. Mainly we will focus on light intensity.

References

1. Patent, S. Maki, et al, WO 2010/106896
2. Patent, S. Maki, et al, US2011/033878A1
3. Patent, S. Maki, et al, WO2007/116687

1step	AMP	dAMP	GMP	CMP	UMP	dTMP
Relative light intensity	1000	100	100	200	50	0.002
	1	0.1	0.01	0.005	X	X
2step	ATP	dATP	GTP	CTP	UTP	dTTP

Table 2 1step assay's results



Synthesis and luminescence properties of biphenyl-type firefly luciferin analogs with a new, near-infrared light-emitting bioluminophore



Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Satoshi Iwano, Kazuto Ito, Rika Obata, Takashi Hirano, Shojiro Maki*, Haruki Niwa*,†

Department of Engineering Science, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2013

Received in revised form 4 September 2013

Accepted 5 September 2013

Available online 13 September 2013

Keywords:

Bioluminescence

Chemiluminescence

Firefly luciferin analog

Biphenyl-type

Near-infrared

Biological window

ABSTRACT

New firefly luciferin analogs of the 4,4'-substituted biphenyl-type were synthesized. One analog with a 4'-dimethylamino group possessed bioluminescence activity, emitting near-infrared biological window light at 675 nm suitable for deep-site bioimaging of living animals. The chemiluminescence light-emission maximum of the corresponding methyl ester of the bioluminescence active analog was 500 nm, implying that biphenyl and thiazolinone rings in the light emitter might be placed in a coplanar conformation at the polar luciferase active site.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fireflies emit light by a luciferin (substrate)–luciferase (enzyme) (L–L) reaction. The luciferase catalyzes adenylation of firefly D-luciferin (D-LH₂) with adenosine triphosphate (ATP) in the presence of Mg²⁺, and the subsequent oxygenation of the resulting luciferyl AMP gives oxyluciferin and yellow-green light with high efficiency (Φ_{BL} =41%) (Fig. 1).^{1–4} Because the firefly bioluminescence system provides an extremely high signal-to-noise ratio, and exhibits excellent substrate specificity and sensitivity, this system is widely used in ATP detection, reporter gene assays,⁵ and noninvasive whole-body bioimaging.⁶ Near-infrared (NIR) biological-window light (650–900 nm) is expected to be useful for deep-site imaging, because of its low absorption by oxygenated hemoglobin and melanin as well as its diminished scattering in animal tissues.⁷ Recently, bioluminescence resonance-energy transfer (BRET) systems utilizing chemically modified firefly luciferin^{8a,b} and luciferase^{8c,d} were successfully developed to obtain light-emission in the NIR window region,^{8a,b} and the longest wavelength recorded was 783 nm.^{8d}

During the past decade, we designed and synthesized structurally simple luciferin analogs for color tuning of the firefly bioluminescence system, culminating in the development of analogs with a desirable light-emission maximum in the NIR biological window region.⁹

From our study of the structure–emission wavelength relationship,⁹ we found that the introduction of conjugated double bonds between the aromatic parts and the thiazoline ring was very effective in elongating the wavelengths of emission maxima, producing a wavelength shift of approximately 100 nm per conjugated double bond. However, the insertion of more than three double bonds between the aromatic moieties and the thiazoline ring reduced the stability of the luciferin analogs against air and light exposure.

Herein we disclose the synthesis and evaluation of the luminescence properties of new biphenyl-type luciferin analogs (**1a–c**) that are expected to be stable against air and light and to emit NIR biological window light (Fig. 2).

2. Results and discussion

2.1. Molecular design and synthesis of new luciferin analogs

Using essentially the method described in the previous report,⁹ we first predicted interaction of a light emitter (**oxy-1a**) generated

* Corresponding authors. Tel.: +81 42 443 5484; fax: +81 42 486 1966 (H.N.); tel.: +81 42 443 5493; fax: +81 42 486 1966 (S.M.); e-mail addresses: maki@pc.uec.ac.jp (S. Maki), niwa@pc.uec.ac.jp (H. Niwa).

† Present address: Brain Science-inspired Life Support Research Center, The University of Electro-Communications, Japan.

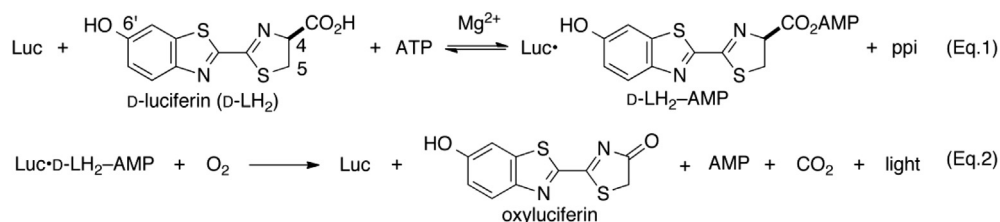


Fig. 1. Proposed reaction catalyzed by firefly luciferase. In the first step of the reaction, luciferase (Luc) catalyzes adenylation of D-LH₂ with ATP in the presence of Mg²⁺ to generate the intermediate luciferyl-AMP (D-LH₂-AMP) accompanied with pyrophosphate (ppi) (Eq. 1). Then the oxidative decarboxylation of the intermediate gives excited-state oxyluciferin, which then releases visible light in the course of relaxation to the ground state (Eq. 2).

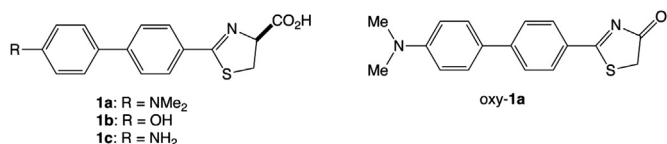


Fig. 2. Structures of new luciferin analogs (1a–c) and oxy-1a.

from a biphenyl analog candidate **1a** at the plausible substrate-binding site in *Photinus pyralis* luciferase. The computer-aided molecular modeling suggested that the light emitter (**oxy-1a**) might be adoptable at the active site in the luciferase (Fig. 3). Molecular

modeling for predicting the plausible location of the model compound **oxy-1a** and AMP at the active site of the *P. pyralis* luciferase was performed as follows. The crystal structures of 5'-O-[N-(dehydro-luciferyl)-sulfamoyl]adenosine (DLSA)-bound *P. pyralis* luciferase (PDB accession number 4G36),¹⁰ inhibitor-bound *P. pyralis* luciferases [4E5D (2-(2-fluorophenyl)-6-methoxy-1,3-benzothiazole),¹¹ 3RIX (aspulvinone J-CR),¹² and 3IES (adenylylated atalurene (PTC124))¹³], and firefly oxyluciferin-AMP-bound *Luciola cruciata* luciferase (2D1R)¹⁴ were downloaded from the RCSB Protein Data Bank. Structural alignment and construction of the figures were performed using PyMOL (DeLano Scientific; <http://www.py-mol.org>). A DLSA-bound *P. pyralis* luciferase (4G36) was selected as a template and all other structures were superimposed onto 4G36.

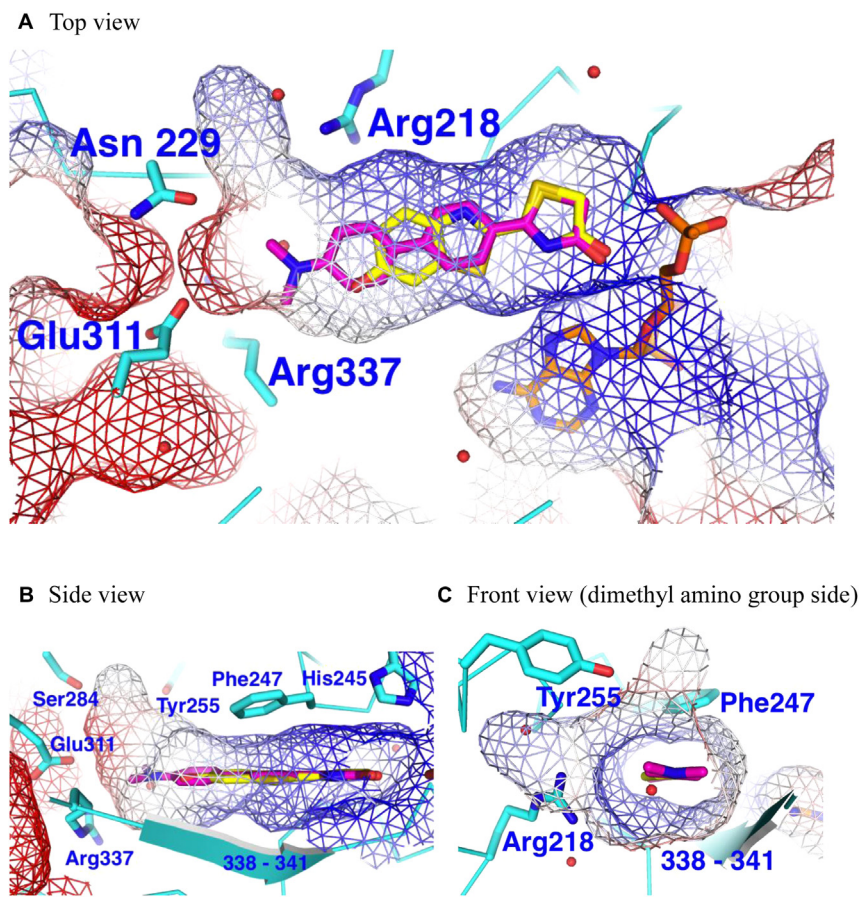
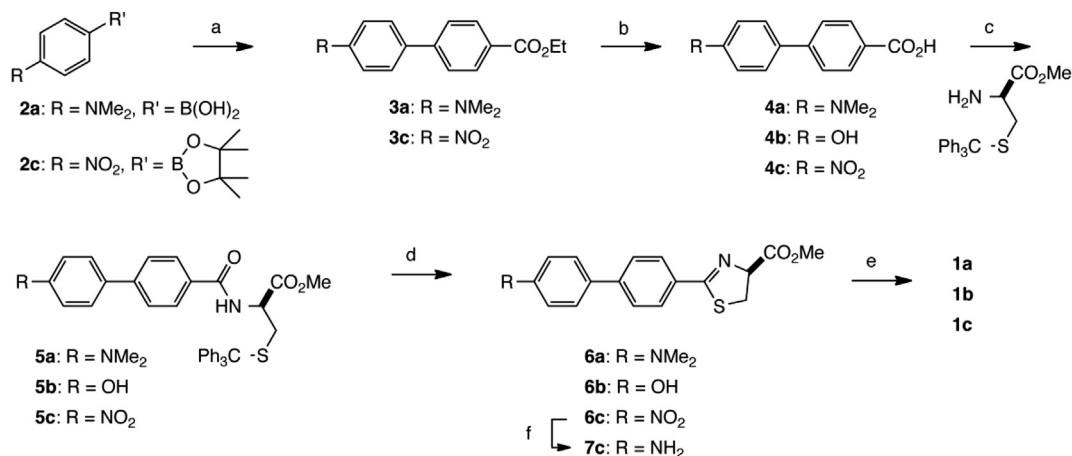


Fig. 3. Structure around a plausible ligand-binding site of *P. pyralis* luciferase and overlay model of **oxy-1a**, oxyluciferin and AMP. The backbone structure of luciferase (RCSB PDB accession number 4G36) is shown in cyan, and the electrostatic potential surface is presented as a wire mesh with negative and positive charges in red and blue, respectively. The original ligand DLSA is omitted from the figure for clarity. Side chains of Arg218, Asn229, His245, Phe247, Tyr255, Ser284, Glu311, and Arg337 are shown in stick form. Top (A), side (B), and front (C) (dimethylamino group side) views were sliced to show the binding pocket and some residues were omitted from the figure for clarity. Ribbons shown in B and C indicate the β -strand structure of residues 338–341. Water molecules are shown as red spheres. The ligand atoms are displayed in stick form with the carbon atom of **oxy-1a** in magenta, oxyluciferin in lemon yellow and AMP in orange. Nitrogen is colored blue, oxygen is colored red, sulfur is colored yellow and phosphorus is colored deep orange.

Root mean square deviations (RMSDs) of all atoms between 4G36 and 4E5D, between 4G36 and 3RIX, between 4G36 and 3IES, and between 4G36 and 2D1R were 0.59, 0.60, 0.53, and 1.11 Å, respectively. The crystal structure of *L. cruciata* luciferase 2D1R was used to extract oxyluciferin and AMP coordinates, so the value of RMSD was higher than for the other three *P. pyralis* luciferase structures. Seeing that the position of oxyluciferin was well overlaid to the dehydroluciferin moiety of DLSA, the ligands of 2D1R were used to construct figures. The local minimum models with several biphenyl ring conformations of **oxy-1a** were obtained using Spartan'04 (Wavefunction; <http://www.wavefun.com>) using Hartree–Fock 3-21G calculations. Pharmacophore generator LigandScout 3.1¹⁵ and Ligand Explorer 1.0 (RCSB Protein Data Bank) were used to examine the models. As shown in Fig. 3, the shape of this plausible luciferin-binding site of the luciferase was long and narrow. All four flat ligands mentioned above were sandwiched between the side chain of Phe247 and Gln338–Gly339–Tyr340–Gly341 β -strand (Fig. 3B). When the thiazolinone moiety of **oxy-1a** was overlaid on the thiazole moiety of DLSA, the biphenyl part fitted within the binding pocket, with the first ring overlapping the thiazole part of the benzothiazole of DLSA and the second ring overlapping the benzofuran moiety of aspulvinone J-CR. Because of the narrow shape of the substrate-binding pocket, the flat conformation of the biphenyl ring seems to be more suitable than the corresponding bulky angled conformation. Thus, we designed new biphenyl-type luciferin analogs (**1a–c**) to evaluate their bioluminescence properties. These analogs have the essential 4,5-dihydrothiazoline ring connected directly to the biphenyl moiety. These were expected to be stable against air and light. The synthesis of luciferin analogs was conducted as shown in Scheme 1. The synthesis of **1a** and **c** was started with 4-dimethylaminophenylboronic acid (**2a**) and 4-nitrophenylboronic acid (**2c**), respectively. The synthesis of **1b** was started with 4-(4-hydroxyphenyl)benzoic acid (**4b**). Suzuki coupling of **2a** and **c** with ethyl 4-iodobenzoate and subsequent hydrolysis of the resulting **3a** and **c** gave carboxylic acids **4a** and **c**, respectively. (*S*)-Trityl-D-cysteine methyl ester prepared from the D-cysteine methyl ester hydrochloride was coupled with **4a–c** to form biphenyl amides **5a–c**, respectively, which were cyclized to give thiazoline esters **6a–c**, respectively. The nitro group of **6c** was reduced to an amino group to give **7c**. The last step of the synthesis of **1a–c** was hydrolysis of the ester moieties of **6a, b**, and **7c**.



Scheme 1. Synthesis of analogs **1a–c**. Synthetic conditions: (a) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DMF; (b) NaOH aq, reflux; (c) D-Cys (S-Trt)-OMe, DMT-MM, DMF; (d) Ph₃PO, Tf₂O, CH₂Cl₂; (e) LiOH, THF/H₂O; (f) Fe/HCl, THF/H₂O/EtOH, reflux.

Enzymatic hydrolysis using esterase for preventing racemization of chiral centers failed because of the poor solubility of the substrates under aqueous conditions. We therefore hydrolyzed esters **6a, b**, and **7c** with an aqueous base, even though

racemization at chiral centers occurred during hydrolysis. Thus, hydrolysis of the ester moieties of **6a, b**, and **7c** with lithium hydroxide provided the desired air- and light-stable luciferin analogs **1a–c** even as racemates.

2.2. Bioluminescence activity of luciferin analogs

In preliminary measurements, we observed that the light-emission intensity of 1:1 mixtures of D- and L-**1a** was approximately 1/3 of that of pure D-**1a**. This means that the inhibition ability of L-**1a** and the optical purity of the analogs are not crucial in evaluating the light-emission ability of the analogs under our assay conditions. Thus, we used the racemic mixtures without further separation. Bioluminescence activity assays of the synthesized analogs **1a–c** were performed with wild-type *P. pyralis* luciferase and ATP-Mg and the emitted light count was integrated for a fixed time (180 s). The emission spectra were measured from 400 nm to 780 nm. Of the synthetic analogs, only **1a** exhibited light-emitting activities, but the light-emission intensity at $\lambda_{\max(\text{bio})}$ of **1a** was far less than 1% of that of the natural D-LH₂ (Fig. 4 and Table 1). The firefly bioluminescence reaction proceeds in two steps, the adenylation of substrates and the oxidation of the resulting adenylylated substrates. As described in our previous work,⁹ we found the rate-determining step of the firefly bioluminescence reaction to be the adenylation step. We also observed drastic light-emission enhancement by using the adenylylated derivatives compared with the substrates themselves.⁹ If suitable substrate derivatives, such as esters possess chemiluminescence activities and the substrates themselves are adenylylated once, the adenylylated luciferin analogs may emit light in the firefly bioluminescence reaction, more or less. As described later, the methyl ester derivatives of analogs **1b** and **c** (i.e., **6b** and **7c**, respectively) exhibited chemiluminescence properties. Thus, the major reason for the absence of bioluminescence activities of **1b** and **c** may be poor adenylation and/or oxidation ability of the firefly luciferase that may evolve from AMP-CoA-ligase and may be evolutionally optimized to the structure of D-LH₂.¹⁶ To construct an emission system for **1a** with higher intensity, we should search for luciferase mutants suitable for our analogs.

The emission maximum of **1a** was $\lambda_{\max(\text{bio})}$ 675 nm, which is almost the same as that of previously synthesized luciferin analogs **A** ($\lambda_{\max(\text{bio})}$ 675 nm) and **B** ($\lambda_{\max(\text{bio})}$ 655 nm),⁹ as shown in Fig. 4. It should be pointed out that the full width at half maximum (FWHM)

of the emission spectrum of **1a** was ca. 1.5 times wider (ca. 150 nm), than those of **A** (ca. 90 nm) and **B** (ca. 100 nm). Although the emission spectrum of **1a** was measured up to 750 nm, the emission wavelength would reach to ca. 800 nm with ca. 10% of the light intensity at

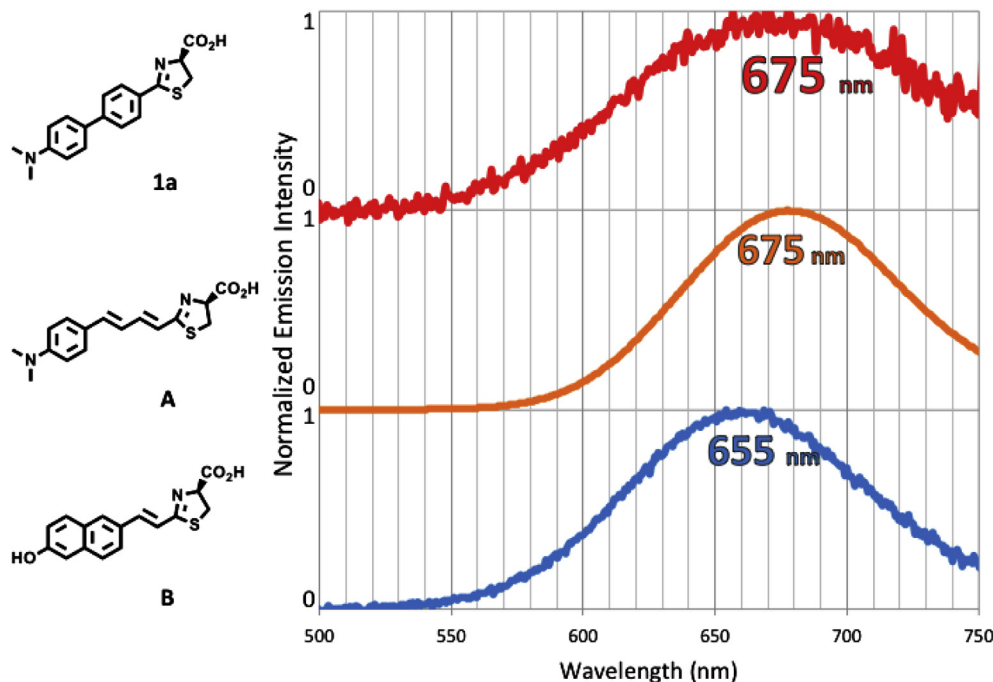


Fig. 4. Bioluminescence emission spectra of compounds **1a**, **A**, and **B**. All spectra were normalized at the emission maxima.

Table 1

Bioluminescence intensities of compounds **1a**, **A**, and **B**. The relative light-emission intensity compared with that of natural D-LH₂ is shown in %

Compound	Relative light-emission intensity (%)
1a	0.01
A	5
B	0.01

Table 2

Relative heats of formation (ΔH), dipole moments (μ), HOMO and LUMO levels, the allowed transitions to the excited singlet states with the lowest excitation energies, excitation wavelengths (λ_{ex}), oscillator strengths (f) and configurations predicted for twisted **oxy-1a** (**oxy-1a-twisted**) and its planar form (**oxy-1a-planar**) with DFT and TDDFT using B3LYP/6-31+G(d)

Structure	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	μ/D	HOMO/eV	LUMO/eV	Transition	$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	f	Configuration ^a
oxy-1a-twisted	0.0	8.75	-5.55	-2.44	$S_0 \rightarrow S_1$	437	0.61	H \rightarrow L (0.71)
oxy-1a-planar	5.3	9.31	-5.54	-2.45	$S_0 \rightarrow S_1$	431	0.82	H \rightarrow L (0.71)

^a Configuration of excitation. H and L denote the HOMO and LUMO, respectively.

λ_{max} . The emission intensity of **1a** was considerably weaker than that of analog **A** ($\lambda_{\text{max}(\text{bio})}$ 675 nm, 5% relative light yield of D-LH₂).

2.3. Chemiluminescence activity of methyl esters of luciferin analogs **6a**, **b**, and **7c**

To confirm the chemiluminescence ability of nonbioluminescent analogs **1b** and **c**, methyl esters of **1b**, and **c** (**6b** and **7c**, respectively) as well as that of **6a** (methyl ester of **1a**) were treated with *t*-BuOK/*t*-BuOH under air[†]. All the resulting methyl esters **6a**, **b**, and **7c**

[†] For chemiluminescence of firefly luciferin and analogs, the hydrogen on the C-4 position in the thiazoline ring (the hydrogen α to the carbonyl group flanking the thiazoline ring) must be removed with an appropriate base to generate the corresponding enolate anion that was oxygenated to generate the oxidation product of an S_1 excited state. To remove the α -hydrogen effectively, the carboxylic acid moiety should be transformed to an ester or more reactive derivatives, such as thioesters, anhydrides, or AMP derivative (i.e., bioluminescence) to prevent formation of the corresponding carboxylate anion, and to increase the acidity of the C-4 position. In this study, we used the methyl esters, which were the synthetic intermediates of the luciferin analogs.

possessed potential chemiluminescence ability with light-emission maxima at 500, 540, and 520 nm, respectively (Fig. 5, only data for **6a** are shown). These profiles differ considerably from those of the previously synthesized⁹ methyl ester analogs **A'** ($\lambda_{\text{max}(\text{chem})}$ 615 nm) and **B'** ($\lambda_{\text{max}(\text{chem})}$ 590 nm), as shown in Fig. 5. Interestingly, the 175-nm difference in light-emission maximum between bioluminescence and chemiluminescence ($\lambda_{\text{max}(\text{bio})} - \lambda_{\text{max}(\text{chem})}$) of **1a** and **6a** caused them to be remarkably red-shifted compared with

those of **A** and **A'** ($\lambda_{\text{max}(\text{bio})} - \lambda_{\text{max}(\text{chem})} = 60$ nm), and of **B** and **B'** ($\lambda_{\text{max}(\text{bio})} - \lambda_{\text{max}(\text{chem})} = 65$ nm), revealing that enzymatic reaction strongly affected the light-emission maximum wavelength for biphenyl-type luciferin analog **1a**. While the chemiluminescence reaction proceeds in *t*-BuOH solution, in which the pivot bonds in **oxy-1a** rotate freely (the rotation barrier of the pivot bonds may be less than 10 kJ/mol), the three-ring system of **oxy-1a** generated by the bioluminescence reaction may possess coplanar conformation at the active site in the luciferase (Fig. 3), causing light-emission at a rather longer wavelength than that supposed.

To understand the light-emission maximum difference between the bioluminescence of **oxy-1a** and the chemiluminescence of **6a** better, density functional theory (DFT) calculations of **oxy-1a** were carried out using the B3LYP/6-31+G(d) method. The twisted conformer of **oxy-1a** (**oxy-1a-twisted**) is the optimized structure as the most stable structure in the ground state, and the planar conformer **oxy-1a-planar** was obtained by optimization after fixing the dihedral angle between the two phenyl rings of the biphenyl part. The results of the DFT calculations are summarized in Table 2. They indicate that the most unstable **oxy-1a-planar** was only 5.3 kJ/mol unstable compared with **oxy-1a-twisted**, meaning that at room

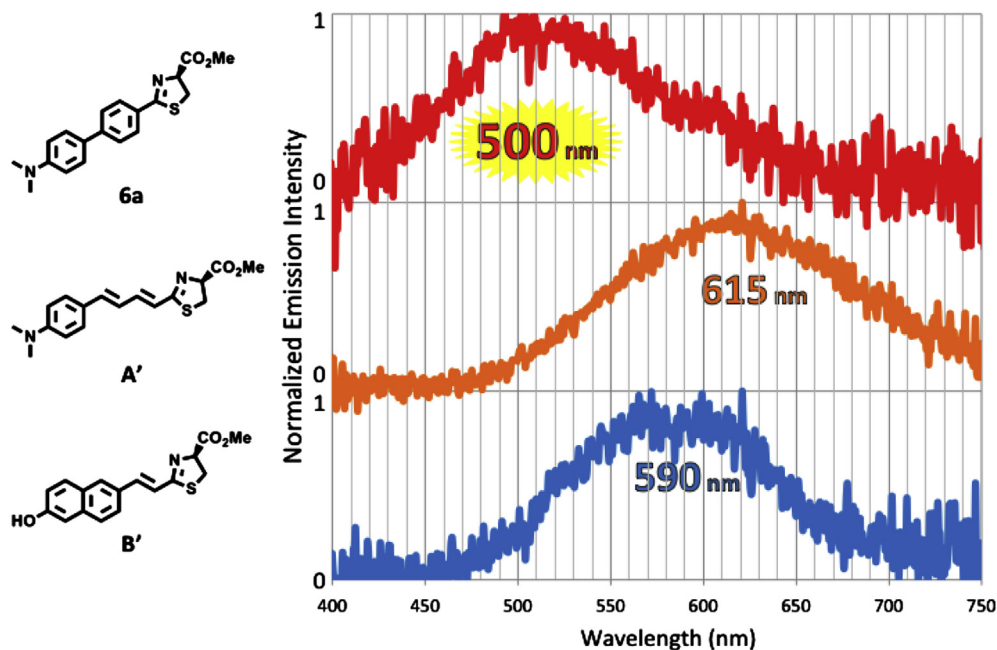


Fig. 5. Chemiluminescence emission spectra for compounds of **6a**, **A'**, and **B'**. All spectra were normalized at the emission maxima.

temperature, the pivot bonds in **oxy-1a** can rotate freely. Thus, the light emitter **oxy-1a** may be readily placed with a planar conformation at the enzyme's active cavity, as shown in Fig. 3. The dipole moment (μ) of the ground state of **oxy-1a-planar** was larger than that of **oxy-1a-twisted**. The HOMO–LUMO energy gap of **oxy-1a-planar** is slightly smaller (0.02 eV) than that of **oxy-1a-twisted**. The calculated HOMO–LUMO energy gap difference between **oxy-1a-planar** and **oxy-1a-twisted** is rather smaller than we expected from the experimental results. The excitation wavelength (λ_{ex}) corresponds to the transition energy for the light absorption. The smaller λ_{ex} value of **oxy-1a-twisted** compared with that of **oxy-1a-planar** may reflect the effects of different configuration interactions of MOs. The oscillator strength (f) of **oxy-1a-planar** is larger than that of **oxy-1a-twisted**, suggesting that the planar structure is preferable to increase the efficiency of the transition between the ground and excited singlet states. Fig. 6 shows the

optimized structures for **oxy-1a-twisted** and the plausible planar conformer, **oxy-1a-planar**, placed in the *P. pyralis* luciferase active site, obtained by DFT calculations. Fig. 7 shows frontier orbitals of the optimized **oxy-1a-twisted** and **oxy-1a-planar**. The figure indicates that the excited states of both conformers of **oxy-1a** possess polar characters. The emission energy (emission color) of such polar excited states is known to be strongly sensitive to the polarity of the surrounding environment (solvents).¹⁷ Previously, we investigated the light-color modulation mechanism using 5,5-dimethyloxyluciferin and aminoluciferin analogs as model compounds, and showed that the modulation depended on the base/solvent combination.¹⁷ Thus, in nonpolar solvents, oxyluciferin model compounds fluoresced with yellow-green light, whereas orange light was emitted in polar solvents. As shown in Fig. 3, polar amino acid side chains, such as Arg218, Asn229, Ser284, Glu311, and Arg337 surround the dimethylamino group of the light

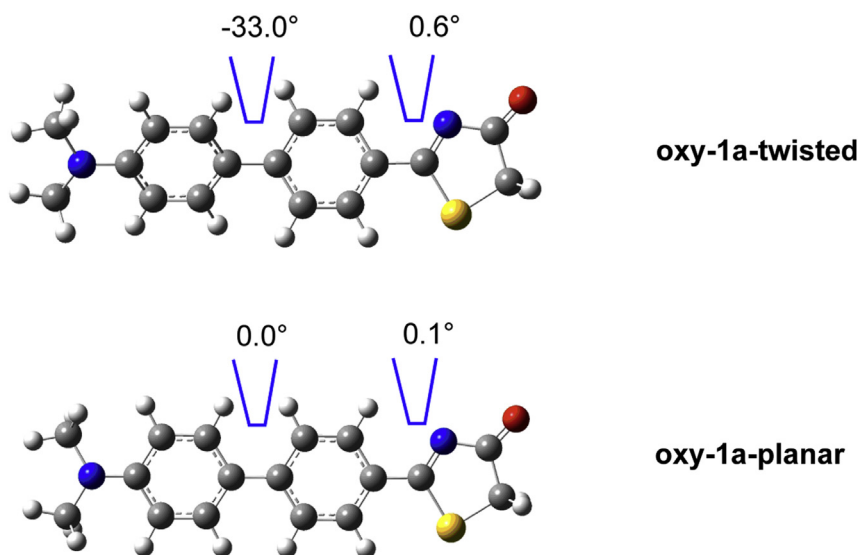


Fig. 6. Structures of twisted **oxy-1a** (**oxy-1a-twisted**) and its planar form (**oxy-1a-planar**) optimized with DFT using B3LYP/6-31+G(d).

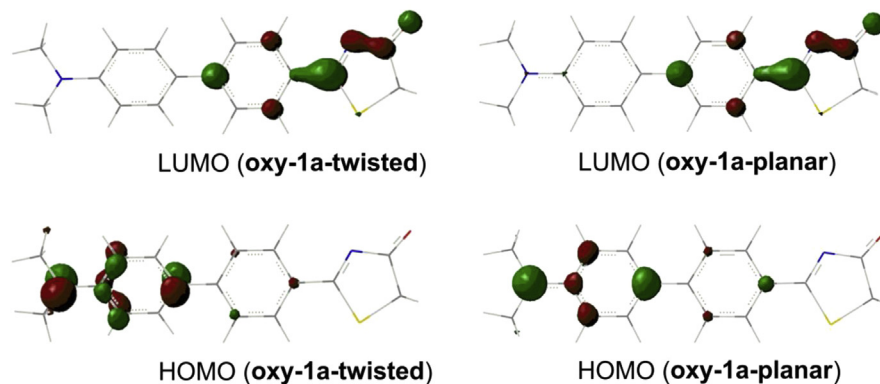


Fig. 7. HOMOs and LUMOs of twisted conformer of **oxy-1a** (**oxy-1a-twisted**) and its planar form (**oxy-1a-planar**).

emitter **oxy-1a**. Among these residues, each residue of Asn229, Ser284, Glu311, and Arg337 is located on different loops or β -sheets of the N-terminal domain. These four different loops and β -sheets seem to cover the substrate-binding pocket. The B-factors of these loops are relatively higher than that of inner residues that form the sidewall of the substrate-binding tunnel. Thus, the movement of the flexible loops and polar side chains may cause the exposure of the light-emitting species **oxy-1a** to the surrounding water molecules, resulting in the emission of the red-shifted light. In addition, as mentioned in the previous paper,⁹ the movement of the active site-covered C-terminal domain may also cause **oxy-1a** to expose to water molecules. When the emission species is placed in the polar binding site, the emission color may shift to red. Thus, the largely red-shifted light-emission of **1a** in bioluminescence may not be caused by conformational change of the light emitter at the luciferase active site for **oxy-1a**, but rather, to exposure of the long light emitter species to the polar environment at the luciferase active site for **oxy-1a**.

3. Conclusions

We have synthesized new luciferin analogs **1a–c**, which were expected to have luminescence in the near-infrared (NIR) window region. While their immediate precursors, the corresponding methyl esters **6a**, **b** and **7c**, showed chemiluminescence with emission maxima of 500, 540, and 520 nm, respectively, only analog **1a** exhibited bioluminescence activity. The bioluminescence maximum of **1a** was observed at 675 nm, whereas the chemiluminescence maximum of **6a** was at 500 nm. From the large emission maxima difference (175 nm) between the bioluminescence of **1a** and the chemiluminescence of **6a**, the emission species may be placed in a polar environment at the luciferase active site for bioluminescence of **1a**, which may have resulted in the large emission shift toward red. In this study, we found that a biphenyl group is a promising simple luminophore for stable luciferin analogs emitting NIR biological-window light suitable for deep-site bioimaging. These luciferin analogs, however, showed low luminescence intensities and poor water solubility compared with natural firefly luciferin. In the next stage, we will attempt to create practically useful luciferin analogs of the biphenyl-type having emission maxima in the NIR window region.

4. Experimental section

4.1. General

4.1.1. Materials and general method for synthesis. Starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers and used

without further purification. Solvents used for anhydrous conditions were distilled, or dried over 4 Å molecular sieves. Merck precoated Kieselgel 60 F_{254} plates with 0.25 mm (Art. 5715) or 0.5 mm (Art. 5744) thickness were used for analytical and preparative thin layer chromatography (TLC). Visualization of TLC was accomplished with UV light and by treatment with suitable staining reagents. Merck Kieselgel 60 (Art. 7734) was used for column chromatography. Solvents were removed with a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature below 40 °C. Melting points were measured using a Yamato MP-2 instrument and are uncorrected. The optical purity of synthesized luciferin analogs was analyzed by HPLC (Agilent 1100 series) using a chiral column (Daicel Chemical Industries, OZ-RH, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm) with a linear gradient of 10%–90% acetonitrile in H₂O over 30 min (flow rate 0.5 mL/min) as eluent. A UV detector set at 330 nm was used for peak detection. Synthesized compounds were used for the luminescence assay without further purification. IR spectra were measured using a Horiba FT 730 spectrometer using the KBr pellet or Attenuated Total Reflection (ATR) methods. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on JEOL Lambda 270 [270 MHz (¹H) and 67.8 MHz (¹³C)] and JEOL ECA 500 [500 MHz (¹H) and 125 MHz (¹³C)] instruments. Chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from internal tetramethylsilane ($\delta=0$) and coupling constants in Hertz. Electron ionization mass spectra (EIMS) were measured with a JEOL JMS 600H instrument. Low- (ESI-MS) and high-resolution electrospray ionization mass spectra (HR-ESI-MS) were measured with JEOL JMS T1000LC mass spectrometers, using tuned conditions of needle voltage: 2000 V, orifice 1 voltage: 85 V, orifice 2 voltage: 5 V, ring lens voltage: 10 V, desolvating gas: 250 °C, orifice 1 temperature: 80 °C, delivery of sample: infusion method, flow speed: 10–30 μ L/min (according to the sample). DFT calculations were performed using the Gaussian 09 program.¹⁸ DFT includes Beck's three-parameter function combined with Lee, Yang, and Parr's correlation function (B3LYP), along with the 6-31+G(d) basis set.^{19–21} Molecular graphics were generated using GaussView, Version 5.²² These DFT calculations were performed with the computer system of the Information Technology Center of UEC.

4.1.2. Materials and general method for luminescence assay. A 1 mg/mL stock solution of commercial luciferase purchased from Promega (Quantilum recombinant *P. pyralis* luciferase, E1701) and Sigma (L9506) was prepared by dissolving the luciferase in 50 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) containing 10% glycerol and was stored at –80 °C. Just prior to use, the luciferase stock solutions were diluted 100-fold with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0) containing 35% glycerol. The diluted luciferase solution was ice-cooled until use. ATP–Mg was purchased from Nacalai Tesque, and the buffer chemicals from Wako Chemicals or Kanto Chemicals.

Stock solutions of substrates were prepared by dissolving 5 mM of the substrates in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), and were stored at -80°C . Deionized water (Millipore, Milli-RX-12 α) was used for aqueous assay solutions. pH was monitored with a Horiba F-23 pH meter. Bioluminescence intensity was measured using an ATTO AB-2200 or AB-2270 luminometer (Hamamatsu, R4220 photomultiplier tube) and bioluminescence spectra were recorded using an ATTO AB-1850 spectrophotometer.

4.2. Preparation of luciferin analogs

4.2.1. *S*-Trityl-*D*-cysteine methyl ester [*D*-Cys(*S*-Trt)-OMe]. To a solution of *D*-cysteine methyl ester hydrochloride (308 mg, 1.80 mmol) in trifluoroacetic acid (1.5 mL), triphenylmethanol (515 mg, 1.98 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue obtained was dissolved in MeOH. To the MeOH solution, ion exchange resin IRA400 OH AG was added to neutralize the HCl salt of the products. The mixture was filtered through a column with a cotton plug, and the resin was washed thoroughly with MeOH. The filtrate and washings were combined and concentrated in vacuo. The crude products were purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=1:1) to give *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe (658 mg, 97%) as a pale-yellow oil. ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 2.47 (dd, $J=7.7, 12.4$ Hz, 1H, ABX system), 2.60 (dd, $J=4.8, 12.4$ Hz, 1H, ABX system), 3.20 (br dd, $J=4.8, 7.7$ Hz, 1H, ABX system), 3.65 (s, 3H), 7.18–7.31 (complex, 9H, $3\times\text{C}_6\text{H}_3$), 7.40–7.45 (complex, 6H, $3\times\text{C}_6\text{H}_2$); ^{13}C NMR (67.8 MHz, CDCl_3) δ 36.9 (t), 52.1 (q), 53.8 (d), 66.8 (s), 126.8 (d) $\times 3$, 127.9 (d) $\times 6$, 129.6 (d) $\times 6$, 144.5 (s) $\times 3$, 174.2 (s); FT-IR (ATR) 3381, 3315, 1739, 1595 cm^{-1} ; ESI-MS m/z : 378 ($\text{M}+\text{H}^+$).

4.2.2. (*S*)-2-(4'-(Dimethylamino)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1a**).** To a solution of ethyl 4-iodobenzoate (250 μL , 1.50 mmol) in DMF (6 mL), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (100 mg, 0.0865 mol) and K_2CO_3 (539 mg, 3.90 mmol) were added under Ar. To this mixture, 4-(dimethylamino)phenylboronic acid (**2a**) (315 mg, 1.91 mmol) was added and the mixture was stirred at 90°C for 14 h. After additional tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (27 mg, 0.0234 mmol), K_2CO_3 (125 mg, 0.904 mmol) and **2a** (97 mg, 0.583 mmol) were added, the reaction mixture was stirred at 90°C under Ar for an additional 24 h. The mixture was filtered through a pad of silica gel. The filtration cake was thoroughly washed with EtOAc. The filtrate and washings were combined and concentrated under reduced pressure. The residue obtained was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=4:1 \rightarrow 0:1) to yield the biphenyl ester **3a** (229 mg, 0.850 mmol, 56%) as a white solid (step a in Scheme 1). Mp $155\text{--}160^{\circ}\text{C}$; IR (KBr) 2981–2807, 1702, 1602, 1540, 1184, 1064 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.40 (3H, t, $J=6.9$ Hz), 3.00 (6H, s), 4.38 (2H, q, $J=6.9$ Hz), 6.79 (2H, d, $J=9.2$ Hz, AA'BB' system), 7.55 (2H, d, $J=9.2$ Hz, AA'BB' system), 7.61 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 8.05 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 270.14 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 292.12 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of biphenyl ester **3a** (148 mg, 0.550 mmol) in EtOH (6 mL), 1 M NaOH aq (6 mL) was added and the mixture stirred at reflux for 4 h under Ar. The reaction mixture was neutralized by the addition of satd NH_4Cl aq (9 mL). The precipitates were collected by suction filtration, washed with distilled water to give the biphenyl acid **4a** (122 mg, 0.506 mmol, 92%) as a yellow solid (step b in Scheme 1). Mp $290\text{--}291^{\circ}\text{C}$; IR (KBr) 3350–2400, 1675, 1598, 1529, 948 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.91 (6H, s), 6.77 (2H, d, $J=7.5$ Hz, AA'BB' system), 7.54 (2H, d, $J=7.5$ Hz, AA'BB' system), 7.49 (2H, d, $J=7.5$ Hz, AA'BB' system), 7.89 (2H, d, $J=7.5$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 242.11 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

To a solution of biphenyl acid **4a** (15.0 mg, 0.0622 mmol) in DMF (2 mL), *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe (31.2 mg, 0.0826 mmol) and 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride hydrate (DMT-MM) (21.6 mg, 0.0735 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h, water (20 mL) was added to the mixture. The products were extracted with CH_2Cl_2 (3×20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue obtained was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=2:1) to give the biphenyl amide **5a** (32.9 mg, 0.0548 mmol, 87%) as a colorless oil (step c in Scheme 1). IR (ATR) 3299, 2919, 2850, 1740, 1637, 1600, 1537, 1487, 1270, 1168 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.75 (2H, complex), 3.01 (6H, s), 3.75 (3H, s), 4.85 (1H, ddd, $J=12.6, 4.6, 7.5$ Hz), 6.70 (1H, d, $J=7.5$ Hz, NH), 6.81 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.15–7.34 (9H, complex), 7.35–7.42 (6H, complex), 7.55 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.63 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.78 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 623.27 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 639.25 ($[\text{M}+\text{K}]^+$).

To a solution of biphenyl amide **5a** (14 mg, 0.023 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1.5 mL), triphenylphosphine oxide (Ph_3PO) (19 mg, 0.068 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (Tf_2O) (50 μL , 0.29 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 2.5 h, the reaction was quenched by adding water (20 mL), and the desired products were extracted with CHCl_3 (3×20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by PTLC (Hex/EtOAc=1:1) to afford the thiazoline ester **6a** (7.0 mg, 86%) as a yellow solid (step d in Scheme 1). Mp $173\text{--}174^{\circ}\text{C}$; IR (ATR) 3296, 2918, 2849, 1739, 1636, 1600, 1537, 1487, 1209, 1168 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.00 (6H, s), 3.61–3.73 (2H, complex), 3.83 (3H, s), 5.29 (1H, dd, $J=9.2, 9.2$ Hz), 6.79 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.54 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.59 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.87 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 341.13 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 363.12 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of the thiazoline ester **6a** (7.7 mg, 0.023 mmol) in THF/ H_2O (2:1, 2 mL), lithium hydroxide (2.0 mg, 0.047 mmol) was added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, it was diluted with EtOAc (30 mL) and the products were extracted with distilled water (2×20 mL). The combined aqueous layers were acidified to pH 3 with 1 M HCl, and the products were extracted with EtOAc (2×20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to afford a solid, which was washed with a small amount of cold EtOAc to give **1a** (4.0 mg, 49%) as a red solid (step e in Scheme 1). Mp $173\text{--}174^{\circ}\text{C}$; 20% ee from chiral HPLC (retention time of *L*-isomer: 18.8 min, *D*-isomer: 20.0 min); IR (ATR) 3500–2400, 1575, 1558, 1600, 1539, 1496, 1199, 938 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.01 (6H, s), 3.73 (2H, m), 5.34 (1H, dd, $J=9.2, 9.2$ Hz), 6.80 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.55 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.62 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.86 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 34.85 (t), 40.52 (q) $\times 2$, 78.10 (d), 112.67 (d) $\times 2$, 114.51 (s), 119.61 (s), 126.11 (d) $\times 2$, 127.91 (d) $\times 2$, 129.17 (d) $\times 2$, 129.63 (s), 131.41 (s), 167.49 (s), 212.40 (s); MS (ESI): m/z 327.17 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); HR-ESI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, m/z 327.1167; found m/z 327.1219.

4.2.3. (*S*)-2-(4'-Hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1b**).** To a solution of 4'-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-4-carboxylic acid (**4b**) (191.0 mg, 0.892 mmol) in DMF (3 mL), *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe (356.0 mg, 0.943 mmol) and DMT-MM (296.5 mg, 1.00 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 15 h, the reaction was quenched by the addition of water (30 mL). The products were extracted with CH_2Cl_2 (2×30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by PTLC (Hex/EtOAc=4:1) to afford the biphenyl amide **5b** (124.0 mg,

0.216 mmol, 24%) as a colorless oil (step c in Scheme 1). IR (ATR) 3400–3200, 1732, 1635, 1604, 1531, 1487, 1435, 1200, 1172 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.73–2.81 (2H, complex), 3.75 (3H, s), 4.84 (1H, ddd, $J=7.5, 5.1, 8.1$ Hz), 5.70 (1H, br, OH), 6.71 (1H, d, $J=8.1$ Hz, NH), 6.93 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.17–7.25 (9H, complex), 7.35–7.40 (6H, complex), 7.50 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.61 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.80 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 596.15 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of biphenyl amide **5b** (21.0 mg, 0.0366 mmol) in dry CH_2Cl_2 (1.5 mL), triphenylphosphine oxide (Ph_3PO) (29.8 mg, 0.107 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (Tf_2O) (20 μL , 0.11 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, the reaction was quenched by adding satd NaHCO_3 aq (20 mL), and the products were extracted with CHCl_3 (2×20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by PTLC (Hex/EtOAc=1:1) to afford the thiazoline ester **6b** (10 mg, 0.031 mmol, 86%) as a yellow oil (step d in Scheme 1). IR (ATR) 3400–3200, 1744, 1497, 1436, 1531, 1268, 1193, 931 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.64–3.75 (2H, complex), 3.83 (3H, s), 5.32 (1H, dd, $J=9.2, 9.2$ Hz), 6.05 (1H, br, OH), 6.90 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.45 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.54 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.87 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 314.08 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 336.05 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of thiazoline ester **6b** (10.0 mg, 0.031 mmol) in THF/ H_2O (2:1, 3 mL) under Ar, lithium hydroxide (4.3 mg, 0.10 mmol) was added. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 10 min, it was diluted with water (20 mL), and the aqueous layer was washed with EtOAc (2×20 mL). The aqueous layers were made acidic (pH two) with 1 M HCl aq, then the products were extracted with EtOAc (2×20 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated to afford a solid, which was washed with a small amount of cold EtOAc to give **1b** (6.0 mg, 57%) as a yellow solid (step e in Scheme 1). Optical purity was not determined. Mp 200–201 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) 3500–2400, 1682, 1575, 1496, 1442, 1229, 1200, 932 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 3.66–3.75 (2H, complex), 5.29 (1H, dd, $J=9.2, 9.2$ Hz), 6.85 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.51 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.63 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.86 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 34.70 (t), 77.93 (d), 115.45 (d) $\times 2$, 126.03 (d) $\times 2$, 127.89 (d) $\times 2$, 128.71 (d) $\times 2$, 130.35 (s), 130.83 (s), 144.58 (s), 157.73 (s), 171.76 (s), 172.69 (s); MS (ESI): m/z 300.07 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 322.03 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$); HR-ESI-MS m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_3\text{S}$, m/z 300.0694; found m/z 300.0694.

4.2.4. (S)-2-(4'-(Amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (1c). To a solution of ethyl 4-iodobenzoate (130 μL , 0.782 mmol) in DMF (4 mL), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (50 mg, 0.0433 mmol) and K_2CO_3 (285.1 mg, 2.06 mmol) were added under Ar. 4-Nitrophenylboronic acid (**2c**) (142.0 mg, 0.851 mmol) was then added and the reaction mixture was stirred at 80 $^\circ\text{C}$ for 12 h. The mixture was subjected directly to silica gel column chromatography (EtOAc) to yield the biphenyl ester **3c** (215.9 mg, 0.796 mmol, 92%) as a yellow solid (step a in Scheme 1). Mp 95–96 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) 3078, 2985, 1702, 1595, 1569, 1511, 1367, 1337, 1268, 1101 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.42 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 4.41 (2H, q, $J=7.5$ Hz), 7.68 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.76 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 8.15 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 8.31 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); MS (EI): m/z 271 (M^+ , 48), 226 (100).

To a solution of biphenyl ester **3c** (169.0 mg, 0.623 mmol) in 2-propanol (4 mL), 1 M NaOH (4 mL) was added and the mixture stirred at reflux temperature for 2 h. The reaction mixture was neutralized by adding satd NH_4Cl aq (10 mL). After the residue was cooled, the precipitates were collected by suction filtration, washed

by water to give the biphenyl acid **4c** (126.0 mg, 0.518 mmol, 83%) as a yellow-white solid (step b in Scheme 1). Mp 290–291 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) 3300–2400, 1682, 1596, 1568, 1514, 1325, 1295, 1108 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.87 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.99 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 8.03 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 8.30 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 244.24 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

To a solution of biphenyl acid **4c** (102.0 mg, 0.419 mmol) in DMF (6 mL), *D*-Cys(*S*-Trt)-OMe (197.0 mg, 0.522 mmol) and DMT-MM (156.0 mg, 0.529 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 90 min, the reaction was quenched by the addition of water (50 mL). The products were extracted with EtOAc (2×50 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue obtained was purified by silica gel column chromatography (Hex/EtOAc=2:1 \rightarrow 1:1) to give the biphenyl amide **5c** (241.0 mg, 0.399 mmol, 95%) as a colorless oil (step c in Scheme 1). IR (ATR) 3307, 3055, 2951, 1738, 1660, 1651, 1596, 1567, 1514, 1339, 1210 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.78 (2H, complex), 3.77 (3H, s), 4.84 (1H, ddd, $J=8.0, 5.1, 7.4$ Hz), 6.74 (1H, d, $J=7.4$ Hz, NH), 7.18–7.26 (9H, complex), 7.37–7.39 (6H, complex), 7.70 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.77 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.88 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 8.33 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 625.12 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of biphenyl amide **5c** (240.0 mg, 0.398 mmol) in dry CH_2Cl_2 (5 mL), triphenylphosphine oxide (Ph_3PO) (342.0 mg, 1.22 mmol) and trifluoromethanesulfonic anhydride (Tf_2O) (200 μL , 1.18 mmol) were added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, the reaction was quenched by the addition of satd NaHCO_3 aq (80 mL), and the products were extracted with CHCl_3 (2×80 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue was purified by silica gel column chromatography ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}=1:0 \rightarrow 50:1$) to afford the thiazoline ester **6c** (137.0 mg, 0.400 mmol, 100%) as a yellow solid (step d in Scheme 1). Mp 217–218 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) 3459, 3081, 2954, 1731, 1591, 1558, 1508, 1336, 1232 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.66–3.78 (2H, complex), 3.85 (3H, s), 5.32 (1H, dd, $J=9.7, 9.7$ Hz), 7.67 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.75 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 7.99 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system), 8.31 (2H, d, $J=8.0$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 343.07 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 365.06 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a vigorously stirred solution of thiazoline ester **6c** (120.0 mg, 0.350 mmol) in EtOH/THF/ H_2O (1:2:1, 4 mL) under Ar, NH_4Cl (100 mg, 1.79 mmol) and powdered Fe (100 mg, 1.79 mmol) were added. After the reaction mixture was vigorously stirred at reflux temperature for 90 min, the mixture was filtered through a pad of silica gel. The filtration residue and silica gel were washed thoroughly with EtOAc. The filtrate and washings were combined, and the products were extracted with EtOAc (3×30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 , filtered, and concentrated. The residue obtained was purified by PTLC ($\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}=50:1$) to afford amino ester **7c** (68.9 mg, 0.230 mmol, 62%) as a yellow solid (step f in Scheme 1). Mp 127–128 $^\circ\text{C}$; IR (ATR) 3463, 3369, 2950, 1740, 1626, 1596, 1575, 1497, 1433, 1189, 1177 cm^{-1} ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.61–3.73 (2H, complex), 3.80 (2H, br, NH_2), 3.83 (3H, s), 5.29 (1H, dd, $J=9.2, 9.2$ Hz), 6.75 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.45 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.57 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system), 7.88 (2H, d, $J=8.6$ Hz, AA'BB' system); MS (ESI): m/z 313.08 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 335.07 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

To a solution of thiazoline ester **7c** (33 mg, 0.10 mmol) in THF/ H_2O (2:1, 3 mL), lithium hydroxide (10 mg, 0.047 mmol) was added under Ar. After the reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min, the reaction was quenched by the addition of water (20 mL), and the aqueous mixture was washed with EtOAc (30 mL). The water layer was made acidic (pH 4) with 1 M HCl aq,

then the water solution was extracted with EtOAc (2×20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated to afford a solid, which was washed with a small amount of cold EtOAc to give **1c** (25 mg, 73%) as a yellow solid (step e in Scheme 1). Optical purity was not determined. Mp 183–184 °C; IR (ATR) 3500–2400, 1634, 1589, 1495, 1395, 1270, 1189, 1252 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 3.01 (6H, s), 3.73 (2H, m), 5.34 (1H, dd, *J*=9.2, 9.2 Hz), 6.80 (2H, d, *J*=8.6 Hz, AA'BB' system), 7.55 (2H, d, *J*=8.6 Hz, AA'BB' system), 7.62 (2H, d, *J*=8.0 Hz, AA'BB' system), 7.86 (2H, d, *J*=8.0 Hz, AA'BB' system); ¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 35.15 (t), 96.88 (d), 115.31 (d)×2, 121.86 (s), 125.53 (d)×2, 127.45 (d)×2, 128.71 (d)×2, 128.93 (s), 129.14 (s), 142.42 (s), 189.47 (s), 218.68 (s); MS (ESI): *m/z* 299.10 ([M+H]⁺), 321.08 ([M+Na]⁺); HR-ESI-MS *m/z*: [M+H]⁺ calculated for C₁₆H₁₅N₂O₂S, *m/z* 299.0854; found *m/z* 299.0831.

4.3. Measurement of bioluminescence and chemiluminescence activity

4.3.1. Measurements of bioluminescence intensities. Bioluminescence intensities of **D-LH2** and synthesized analogs, **1a–c**, **A**⁹ and **B**⁹ were measured using an ATTO AB-2270 luminometer (Hamamatsu, R4220 photomultiplier tube). A reaction mixture was prepared by mixing 20 μL of substrate (100 μM), 20 μL of luciferase solution (0.01 mg/mL), and 20 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0). Luminescence reactions were initiated by injecting 40 μL of ATP-Mg (200 μM) into the reaction mixture at ambient temperature. The light-emission was monitored for 180 s with sampling intervals of 1 s. Emission intensities were expressed as the light count per second (cps).

4.3.2. Measurements of bioluminescence and chemiluminescence spectra. Bioluminescence spectra of **1a**, **A**⁹ and **B**⁹ were recorded using an ATTO AB-1850 spectrophotometer. A reaction mixture was prepared by mixing 5 μL of substrate (100 μM), 5 μL of luciferase solution (1 mg/mL), and 5 μL of potassium phosphate buffer (500 mM, pH 8.0). Luminescence reactions were initiated by injecting 10 μL of ATP-Mg (200 μM) into the reaction mixture at ambient temperature. Emission spectra were measured in 0.5 nm increments from 400 nm to 780 nm.

Chemiluminescence spectra of methyl esters **6a**, **b**, **c**, **A**⁹ and **B**⁹ were recorded using an ATTO AB-1850 spectrophotometer. A reaction mixture was prepared by mixing 240 μL of methyl esters (2.5 mM). Luminescence reactions were initiated by injecting 1 mL of *t*-BuOK/*t*-BuOH (500 mM) into the reaction mixture at ambient temperature. Emission spectra were measured in 0.5 nm increments from 400 nm to 780 nm.

Acknowledgements

This work was supported by Grants-in-Aid for Exploratory Research (No. 24650633) to S.M. from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and Adaptable & Seamless

Technology Transfer Program through Target-driven R&D (A-Step) (No. AS2321366E) to S.M. from the Japan Science and Technology Agency.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.09.018>.

References and notes

1. Fraga, H. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 146.
2. Marques, S. M.; Esteves de Silva, J. C. G. *IUBMB Life* **2009**, *61*, 6.
3. Inouye, S. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 387.
4. Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. *Nat. Photonics* **2008**, *2*, 44.
5. Thorne, N.; Ingles, J.; Auld, D. S. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 646.
6. Roda, A.; Guardigli, M.; Michelini, E.; Mairasoli, M. *Trends Anal. Chem.* **2009**, *28*, 307.
7. Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316.
8. (a) Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *6*, 1800; (b) Kojima, R.; Takakura, H.; Ozawa, T.; Tada, Y.; Nagano, T.; Urano, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 1175; (c) Takakura, H.; Sasakura, K.; Ueno, T.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Tsuboi, T.; Nagano, T. *Chem.—Asian. J.* **2010**, *5*, 2053; (d) Branchini, B. R.; Ablamsky, D. M.; Rosenberg, J. C. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2023.
9. Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C.; Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3847.
10. Sundlov, J. A.; Fontaine, D. M.; Southworth, T. L.; Branchini, B. R.; Gulick, A. M. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6493.
11. Thorne, N.; Shen, M.; Lea, W. A.; Simeonov, A.; Lovell, S.; Auld, D. S.; Ingles, J. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1060.
12. Cruz, P. G.; Auld, D. S.; Schultz, P. J.; Lovell, S.; Battaile, K. P.; MacArthur, R.; Shen, M.; Tamayo-Castillo, G.; Ingles, J.; Sherman, D. H. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1442.
13. Auld, D. S.; Lovell, S.; Thorne, N.; Lea, W. A.; Maloney, D. J.; Shen, M.; Rai, G.; Battaile, K. P.; Thomas, C. J.; Simeonov, A.; Hanzlik, R. P.; Ingles, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 4878.
14. Nakatsu, T.; Ichikawa, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobayashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. *Nature* **2006**, *440*, 372.
15. Wolber, G.; Langer, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45*, 160.
16. Viviani, V. R.; Prado, R. A.; Neves, D. R.; Kato, D.; Barbosa, J. A. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3963.
17. (a) Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2385; (b) Hirano, T.; Nagai, H.; Matsuhashi, T.; Hasumi, Y.; Iwano, S.; Ito, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Viviani, V. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1281.
18. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision A.1*; Gaussian: Wallingford, CT, 2009.
19. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648.
20. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
21. Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623.
22. Dennington, R.; Keith, T.; Millam, J. *GaussView, Version 5*; Semichem: Shawnee Mission, KS, 2009.

Spectroscopic studies of the color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence with amino-analogs of luciferin and oxyluciferin†

Takashi Hirano,*^a Hiroyuki Nagai,^a Takuto Matsuhashi,^a Yosuke Hasumi,^a Satoshi Iwano,^a Kazuto Ito,^a Shojiro Maki,^a Haruki Niwa^a and Vadim R. Viviani^b

Received 14th April 2012, Accepted 24th May 2012

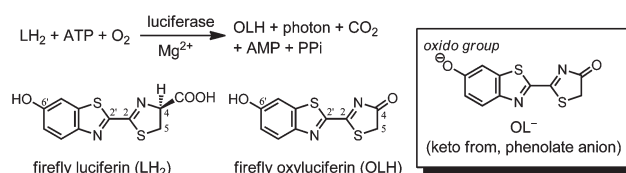
DOI: 10.1039/c2pp25106j

Spectroscopic properties of amino-analogs of luciferin and oxyluciferin were investigated to confirm the color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence. Fluorescence solvatochromic character of aminooxyluciferin analogs indicates that the bioluminescence of aminoluciferin is useful for evaluating the polarity of a luciferase active site.

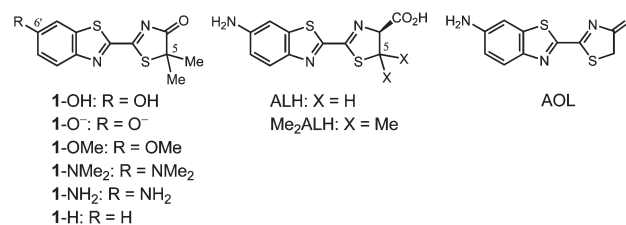
Fireflies and luminous beetles such as click beetles and railroad worms show bioluminescence with the same luciferin–luciferase (L–L) reaction.¹ An enzyme, luciferase catalyzes the luminescence reaction of firefly luciferin (LH₂), ATP and O₂, to give oxyluciferin (OLH) and a photon of visible light (Scheme 1). One of the important characteristics of the bioluminescent system is photon generation in a wide range of colors from green to red (λ_{max} 530–640 nm)² using the common LH₂. To better use the bioluminescent system for practical applications, we have to clarify the fundamental chemical subjects including the mechanism of color modulation.

Color variation of the bioluminescence is caused by the changes in the structure and properties of the excited OLH inside the active site of a luciferase. The most plausible candidate structure of the light-emitter is the keto-form of the phenolate anion (OL[−], Scheme 1) which is supported by the mechanistic evidence reported by Branchini *et al.*,³ while other possible structures were proposed.⁴ We recently supported this conclusion by clarifying the spectroscopic properties of the phenolate anion of 5,5-dimethyl OLH analog (1-O[−]), whose methyl groups make the π -system fix the keto form.⁵ In fact, the fluorescence maximum of 1-O[−] varied in the range of green to red color depending on two factors: (i) the polarity of the molecular environment and (ii) the bonding interaction between the oxido group and a counter cation. Therefore, these two factors will

play essential roles in the color modulation mechanism of the bioluminescence. To establish the mechanism, we need to understand the property of the excited state of OL[−] having the oxido group at C6' as a strong electron-donating group. To reveal the role of the oxido group of OL[−], we compared the spectroscopic properties of OLH analogs (1-NMe₂, 1-NH₂ and 1-H) having a substituent R (NMe₂, NH₂ and H) at C6' with those of 1-OH, 1-O[−] and methoxy analog 1-OMe.⁵ We now report how the spectroscopic property of **1** is affected by the electron-donating ability of a series of R, explaining the color variation of firefly (beetle) bioluminescence. In addition, the data of amino analog 1-NH₂ are useful for evaluating the bioluminescence property of aminoluciferin (ALH), whose fundamentals have been well studied.⁶ Because ALH is a useful analog as a red-emitting substrate,⁷ it is valuable to decipher bioluminescence color modulation behavior with ALH. For this purpose, we reinvestigated the bioluminescence of ALH together with that of the 5,5-dimethyl analog (Me₂ALH), that is the luciferin analog corresponding to 1-NH₂. We also report here the color modulation mechanism of the ALH bioluminescence.



Scheme 1



^aDepartment of Engineering Science, Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo 182-8585, Japan. E-mail: hirano@pc.uec.ac.jp; Tel: +81-42-443-5489

^bLaboratório de Bioquímica e Biotecnologia de Sistemas Bioluminescentes, Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba (UFSCAR), Sorocaba, São Paulo, Brazil

†Electronic supplementary information (ESI) available: General methods, synthesis and NMR spectra of luciferin and oxyluciferin analogs, measurements of bioluminescence activities and spectra, spectroscopic data of oxyluciferin analogs, and DFT and TDDFT calculation data. See DOI: 10.1039/c2pp25106j

OLH analogs 1-NMe₂, 1-NH₂ and 1-H were prepared by the method for preparing 1-OH.⁵ The Hammett σ_p constants of R for 1-NMe₂, 1-NH₂ and 1-H are −0.83, −0.66 and 0.00, respectively, and those of hydroxyl, oxido and methoxy groups for 1-OH, 1-O[−] and 1-OMe are −0.37, −0.81 and −0.27,

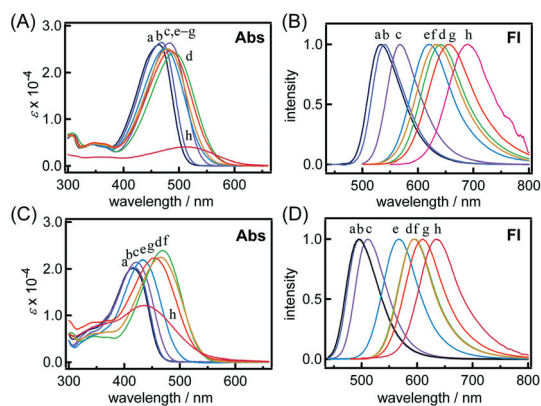


Fig. 1 UV/visible absorption (Abs) and fluorescence (Fl) spectra of **1-NMe₂** (A and B) and **1-NH₂** (C and D) in *p*-xylene (a), benzene (b), chloroform (c), DMSO (d), acetonitrile (e), 2-propanol (f), methanol (g), and H₂O (h) at 25 °C.

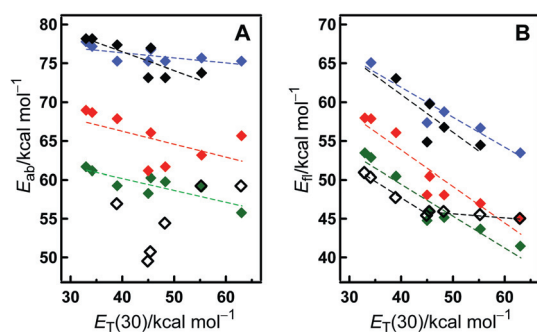


Fig. 2 E_{ab} and E_{fl} values for **1-NMe₂** (◆) and **1-NH₂** (◆) together with those for **1-OH** (◆), **1-O⁻** (◇) and **1-OMe** (◆) plotted as a function of $E_T(30)$.

respectively.⁸ Thus, the electron-donating abilities of the dimethylamino and oxido groups are similar to each other. UV/visible absorption and fluorescence spectra of **1-NMe₂**, **1-NH₂** and **1-H** were measured in various solvents (*p*-xylene, benzene, chloroform, DMSO, acetonitrile, 2-propanol, methanol and H₂O). Analogs **1-NMe₂** and **1-NH₂** showed intense fluorescence ($\Phi_F > 0.1$) similar to **1-O⁻** (Fig. 1), while fluorescence of **1-H** was not observed. The spectroscopic data of **1** are summarized in Tables S1 and S2[†] in the ESI with the solvent polarity scale $E_T(30)$ (in kcal mol⁻¹) that has been used for evaluating dipolar character of a molecule.^{9,10} Analogs **1-NMe₂** and **1-NH₂** exhibited solvatochromism of the absorption and fluorescence bands, and their absorption maxima (λ_{ab}) and fluorescence maxima (λ_{fl}) show a characteristic dependency on the solvent polarity. Variation widths of the fluorescent state energies (E_{fl}) estimated from λ_{fl} of **1-NMe₂** and **1-NH₂** were larger than those of the absorption energies (E_{ab}) estimated from their λ_{ab} . The spectral changes of **1-NMe₂** and **1-NH₂** were evaluated by correlating the E_{fl} and E_{ab} values (in kcal mol⁻¹) with $E_T(30)$ (Fig. 2). Fig. 2 also shows the plots of the E_{ab} and E_{fl} values for **1-OH**, **1-OMe**, and **1-O⁻** generated by using 1,1,3,3-tetramethylguanidine. The $E_{ab}-E_T(30)$ and $E_{fl}-E_T(30)$ plots for **1-NMe₂** and **1-NH₂** show linear correlations similar to those for **1-OH** and **1-OMe**, while the deviations of E_{ab} are

larger than those of E_{fl} . The correlations were estimated to be $E_{ab} = -0.15E_T(30) + 66$ ($r = -0.85$) and $E_{fl} = -0.41E_T(30) + 66$ ($r = -0.95$) for **1-NMe₂** and $E_{ab} = -0.17E_T(30) + 73$ ($r = -0.55$) and $E_{fl} = -0.47E_T(30) + 73$ ($r = -0.93$) for **1-NH₂**. In the case of **1-O⁻**, the $E_{ab}-E_T(30)$ plot shows a low correlation and the $E_{fl}-E_T(30)$ plot shows two correlation lines, because the electronic absorption and fluorescence of **1-O⁻** are affected by the structural character of the ion pair of **1-O⁻** and a counter cation as reported previously.⁵ The negative slopes of the $E_{ab}-E_T(30)$ and $E_{fl}-E_T(30)$ correlations for **1-NMe₂** and **1-NH₂** indicate that both their ground (S_0) and excited singlet (S_1) states have dipolar character. The slopes of the $E_{fl}-E_T(30)$ plots are steeper than those of the corresponding $E_{ab}-E_T(30)$ plots, indicating that the dipolar character of the S_1 states of **1-NMe₂** and **1-NH₂** is stronger than that of the corresponding S_0 states because their electronic excitations have intramolecular charge transfer (ICT) character. The E_{ab} and E_{fl} are in the order **1-OH** \approx **1-OMe** $>$ **1-NH₂** $>$ **1-NMe₂** in a common solvent, indicating that the increase of the electron-donating ability of R causes a red shift of the λ_{ab} and λ_{fl} . The E_{fl} of **1-O⁻** is smaller than that of **1-NMe₂** in a less polar solvent and is varied between those of **1-NMe₂** and **1-NH₂** in a polar protic solvent. The result indicates that the oxido group at C6' of **OL⁻** plays a role as an electron-donating group stronger than the dimethylamino group in less polar environments, while its electron-donating ability is depressed by hydrogen bonding interactions in a protic polar solvent. Analogs **1-NMe₂** and **1-NH₂** showed high Φ_F in the range from 0.1 to 0.9 similar to **1-O⁻**, while **1-OH** and **1-OMe** showed low Φ_F below 0.2 and the fluorescence of **1-H** disappeared. Therefore, we can conclude that the electron-donating ability of R at C6' in the **OLH** structure is essential for fluorescence solvatochromism and increase of the fluorescence efficiency.

To understand the electronic effect of the substituent R at C6' on the spectroscopic properties of **1**, we carried out DFT and TDDFT calculations of **1-NMe₂**, **1-NH₂** and **1-H** using the B3LYP/6-31+G(d) method.¹¹ Calculation data are summarized in Table S3[†] together with the reported data of **1-OH** and **1-OCH₃**.^{5,12} The electric dipole allowed transitions to the excited singlet states with the lowest excitation energies are $S_0 \rightarrow S_1$ for **1-NMe₂** and **1-NH₂** and $S_0 \rightarrow S_3$ for **1-H**. The former $S_0 \rightarrow S_1$ transitions are mainly contributed by the HOMO to LUMO excitation and the latter $S_0 \rightarrow S_3$ transition is mainly contributed by the HOMO - 2 to LUMO excitation. The Kohn–Sham frontier orbitals of **1-NMe₂**, **1-NH₂** and **1-H** (Fig. S6[†] in the ESI) indicate that these allowed transitions are of $\pi-\pi^*$ type. Excitation wavelengths (λ_{ex}) for the allowed transitions of **1-NMe₂** (438 nm), **1-NH₂** (401 nm) and **1-H** (340 nm) correspond to the observed λ_{ab} (**1-NMe₂**, 468 nm; **1-NH₂**, 417 nm; **1-H**, 328 nm) in benzene. The tendency of the red shift of λ_{ex} with increase of the electron-donating ability of R matches the spectroscopic observations for **1**. This red shift of λ_{ex} originates from a change of the frontier orbital levels; an increase of the electron-donating ability of R causes a rise of the HOMO level steeper than that of the LUMO level. Oscillator strengths (f) of **1-NMe₂** and **1-NH₂** are similar to those of **OL⁻** and **1-O⁻**, and larger than those of the remaining analogs. Because a fluorescence rate constant is theoretically related to f ,¹³ introduction of a strong electron-donating R such as the amino group will accelerate the

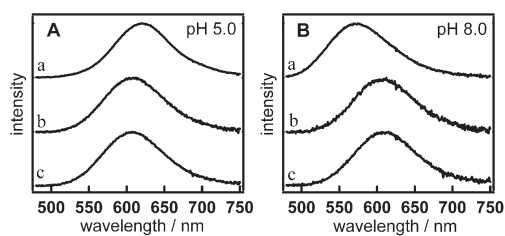
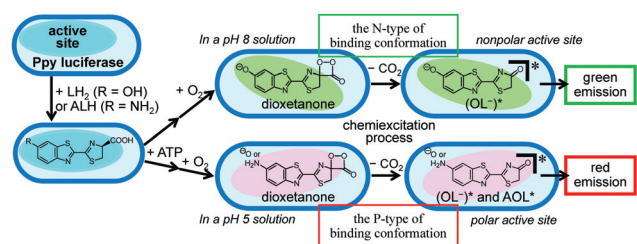


Fig. 3 Bioluminescence spectra of LH₂ (a), ALH (b), and Me₂ALH (c) with a recombinant *Photinus pyralis* (Ppy) luciferase in 0.10 M potassium phosphate buffers at pH 5.0 (A) and pH 8.0 (B).

fluorescence emission process to lead to a high Φ_F . In the cases of **1-NMe₂** and **1-NH₂**, electrons of their HOMOs and LUMOs are distributed around the benzothiazole and thiazolylthiazole moieties, respectively, in a manner similar to those of OL⁻ and **1-O⁻**. Thus, the HOMO to LUMO excitation has ICT character to enlarge the dipole moments of the S₁ states of **1-NMe₂** and **1-NH₂**. This conclusion matches that obtained from the evaluation of the solvent-dependent fluorescence spectral change described above.

To evaluate the bioluminescent property of ALH, we have to confirm the S₁ state structure of aminooxyluciferin (AOL) during the bioluminescence reaction. For this purpose, we investigated L–L reactions of Me₂ALH with a recombinant *Photinus pyralis* (Ppy) luciferase and the luminescence properties of Me₂ALH were compared with those of LH₂ and ALH.^{3,6} L–L reactions with low concentrations of substrates [luciferins (20 μM), Mg-ATP (80 μM), and PPy luciferase (30 nM)] showed steady light emission,¹⁴ and the relative intensity ratios for the reactions with LH₂, ALH and Me₂ALH were 1.0 : 0.13 : 0.001 at pH 8.0 and 1.0 : 0.90 : 0.003 at pH 5.0. Bioluminescence spectra (Fig. 3) of Me₂ALH at pH 5.0 and 8.0 coincided with each other and showed the emission maxima (λ_{bl}) at 608 nm. Observed spectra of LH₂ and ALH at pH 5.0 and 8.0 (Fig. 3) showed λ_{bl} reproducing the reported values: 619 and 571 nm at pH 5.0 and 8.0 for LH₂, respectively, and 609 nm at pH 5.0 and 8.0 for ALH.⁶ Bioluminescence spectra of ALH and Me₂ALH coincided with each other, indicating that the S₁ state of AOL generated by the L–L reactions has the keto form. This result also indicates that the two methyl groups at C5 of Me₂ALH influence to a lesser extent the spectroscopic properties. This is supported by DFT calculations of AOL (Table S4[†]), which showed that the π -electronic properties and excitation character of **1-NH₂** and AOL were similar to each other. Me₂ALH showed pH-independent bioluminescence spectra similar to those of ALH.⁶ This result confirms that the amino groups at C6' of ALH and Me₂ALH play a role to induce their pH-independent luminescence property of the L–L reactions.

We are now able to evaluate the λ_{bl} values for the L–L reactions of ALH and Me₂ALH with Ppy luciferase based on the fluorescent property of **1-NH₂**. Because **1-NH₂** exhibited fluorescence solvatochromism, the λ_{bl} values give information on the polarity of the active site of Ppy luciferase.¹⁵ The λ_{bl} (608–9 nm) for ALH and Me₂ALH are similar to the λ_{fl} (610 nm) of **1-NH₂** in methanol, indicating that the active site provides a polar environment like a methanol solution to the S₁ states of AOL and **1-NH₂**. Polar character of the active site for



Scheme 2

the excited AOL and **1-NH₂** is not affected by the pH of solutions as explained below. On the other hand, the pH dependent bioluminescence of LH₂ indicates that the active site of Ppy luciferase provides two different polarity environments to the S₁ states of OL⁻. Based on the fluorescent property of **1-O⁻**,⁵ it is predicted that the 571 nm emission occurs from the excited OL⁻ located in the active site with nonpolar character like a benzene solution and the 619 nm emission occurs in the active site with polar character like an alcoholic solution. It is also known that bioluminescence quantum yield (Φ_{BL}) with Ppy luciferase shows pH dependent character,¹⁶ indicating that the nonpolar active site dominantly functions in a pH 8 solution to give a high Φ_{BL} and the polar active site dominantly functions in a pH 5 solution to give a low Φ_{BL} . These active sites are interconvertible depending on the pH of a solution. Thus, it is remarkable that the changes of λ_{bl} and Φ_{BL} are related to each other.^{16,17} Because the Φ_{BL} value is mainly determined by the chemiexcitation efficiency,¹⁸ a switch of the active sites with different polarities takes place before the chemiexcitation process (Scheme 2). LH₂ bonded in the active site of Ppy luciferase is adenylated and the following oxygenation gives the dioxetanone intermediate, which takes two types of possible binding conformations in the active site, termed N- and P-types (Scheme 2). Decompositions of the dioxetanones in two binding conformations in the active site generate the S₁ states of OL⁻ with the corresponding binding conformations with different chemiexcitation efficiencies. The excited OL⁻ in the N- and P-types of binding conformations are influenced by the nonpolar and polar character of the active site, respectively (Scheme 2). In the case of the ALH bioluminescence, the amino groups of the dioxetanone intermediate and the excited AOL lead to the P-type of binding conformations preferentially, showing red emission both in pH 5 and 8 solutions (Scheme 2). Thus, the hydroxyl group of LH₂ plays an important role for the interactions with the active site of Ppy luciferase to give the dioxetanone in the N-type of binding conformation in a pH 8 solution. Because a green emitting luciferase may have evolved from a protoluciferase with the red emission ability,¹⁹ the P-type of binding conformation will be a prototype for the dioxetanone in the active site and the active site has the ability to allow an analog structure of the dioxetanone to adopt the P-type binding conformation. The difference in the λ_{bl} for the red emission with ALH (609 nm) and LH₂ (619 nm) corresponds to the different electron-donating abilities of the amino group of AOL and the oxido group of OL⁻. Therefore, the S₁ states of OL⁻ and AOL in the P-conformation are similarly affected by the polar character of the active site.

Conclusions

We have clarified the fluorescent properties of **1-NH₂** and its related compounds and revealed that the amino group, a strong electron-donating group, plays important roles for a red-shift of λ_{fl} , fluorescence solvatochromism, and a high Φ_{F} value. This information leads to the conclusion that the strong electron-donating ability of the oxido group in OL^- is essential for the high efficiency and solvatochromic properties of OL^- as the light-emitter in the firefly (beetle) bioluminescence. It was also clarified that the ALH bioluminescence occurs by the light emission from the S_1 states of the keto form of AOL. The emission colors from the excited AOL are modulated only by the polarity of the active site, while those from the excited OL^- are modulated not only by the polarity but also by the covalent character of the $\text{O8}'\cdots\text{H}$ bonds between the excited OL^- and a counter cation.⁵ Therefore, the λ_{bl} value for the bioluminescence with ALH is useful for evaluating the polarity of the active site of a luciferase by using the fluorescence data of **1-NH₂** as a ruler for the polarity scale. Extended applications of the ALH bioluminescence to various luciferases are currently underway.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research C (No. 22550031) from the Japan Society for the Promotion of Science, the Iketani Science and Technology Foundation and the Izumi Science and Technology Foundation. We thank the Information Technology Center of UEC for technical assistance in computing the quantum chemical calculations.

Notes and references

- (a) W. D. McElroy and M. DeLuca, Chemistry of firefly luminescence, in *Bioluminescence in Action*, ed. P. J. Herring, Academic Press, London, 1978, pp. 109–127; (b) *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, ed. O. Shimomura, World Scientific Publishing, Singapore, 2006, pp. 1–29.
- (a) H. H. Seliger and W. D. McElroy, The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1964, **52**, 75–81; (b) K. V. Wood, Y. A. Lam, H. H. Seliger and W. D. McElroy, Complementary DNA coding click beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors, *Science*, 1989, **244**, 700–703; (c) K. V. Wood, Y. A. Lam and W. D. McElroy, Introduction to beetle luciferases and their applications, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 1989, **4**, 289–301; (d) V. R. Viviani, The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1833–1850.
- (a) B. R. Branchini, M. H. Murtiashaw, R. A. Magrar, N. C. Portier, M. C. Ruggiero and J. G. Stroh, Yellow-green and red firefly bioluminescence from 5,5-dimethyloxyluciferin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 2112–2113; (b) B. R. Branchini, T. L. Southworth, M. H. Murtiashaw, R. A. Magrar, S. A. Gonzalez, M. C. Ruggiero and J. G. Stroh, An alternative mechanism of bioluminescence color determination in firefly luciferase, *Biochemistry*, 2004, **43**, 7255–7262.
- P. Naumov, Y. Ozawa, K. Ohkubo and S. Fukuzumi, Structure and spectroscopy of oxyluciferin, the light emitter of the firefly bioluminescence, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11590–11605.
- T. Hirano, Y. Hasumi, K. Ohtsuka, S. Maki, H. Niwa, M. Yamaji and D. Hashizume, Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 2385–2396.
- E. H. White, H. Wörther, H. H. Seliger and W. D. McElroy, Amino analogs of firefly luciferin and biological activity thereof, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 2015–2019.
- (a) R. Shinde, J. Perkins and C. H. Contag, Luciferin derivatives for enhanced *in vitro* and *in vivo* bioluminescence assays, *Biochemistry*, 2006, **45**, 11103–11112; (b) C. C. Woodroffe, J. W. Shultz, M. G. Wood, J. Osterman, J. J. Cali, W. J. Daily, P. L. Meisenheimer and D. H. Klaubert, N-Alkylated 6'-aminoluciferins are bioluminescent substrates for Ultra-Glo and QuantiLum luciferase: new potential scaffolds for bioluminescent assays, *Biochemistry*, 2008, **47**, 10383–10393; (c) G. R. Reddy, W. C. Thompson and S. C. Miller, Robust light emission from cyclic alkylaminoluciferin substrates for firefly luciferase, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13586–13587; (d) H. Takakura, R. Kojima, Y. Urano, T. Terai, K. Hanaoka, T. Tsuboi and T. Nagano, Aminoluciferins as functional bioluminogenic substrates of firefly luciferase, *Chem.–Asian J.*, 2011, **6**, 1800–1810.
- C. Hansch, A. Leo and R. W. Taft, A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 165–195.
- Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, ed. C. Reichardt, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd edn, 2003.
- Analysis of the Stokes shifts with the Lippert–Mataga equation did not give good correlations as reported in ref. 5
- Details of DFT and TDDFT calculations are described in general methods of the ESI.†
- G. Orlova, J. D. Goddard and L. Y. Brovko, Theoretical study of the amazing firefly bioluminescence: the formation and structures of the light emitters, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 6962–6971.
- Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, ed. N. J. Turro, V. Ramamurthy and J. C. Scaiano, University Science Books, Sausalito, 2010, pp. 169–264.
- M. DeLuca, J. Wannlund and W. D. McElroy, Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase, *Anal. Biochem.*, 1979, **95**, 194–198.
- (a) R. A. Morton, T. A. Hopkins and H. H. Seliger, Spectroscopic properties of firefly luciferin and related compounds; an approach to product emission, *Biochemistry*, 1969, **8**, 1598–1607; (b) M. DeLuca, Hydrophobic nature of the active site of firefly luciferase, *Biochemistry*, 1969, **8**, 160–166; (c) V. R. Viviani, F. G. C. Arnoldi, B. Venkatesh, A. J. Silva Neto, F. G. T. Ogawa, T. L. Oehlmeyer and Y. Ohmiya, Active-site properties of Phrixothrix railroad worm green and red bioluminescence-eliciting luciferases, *J. Biochem.*, 2006, **140**, 467–474; (d) N. N. Ugarova and L. Y. Brovko, Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence, *Luminescence*, 2002, **17**, 321–330.
- (a) H. H. Seliger and W. D. McElroy, Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, **88**, 136–141; (b) Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya and H. Akiyama, Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission, *Nat. Photonics*, 2008, **2**, 44–47.
- (a) K. Niwa, Y. Ichino and Y. Ohmiya, Quantum yield measurements of firefly bioluminescence reactions using a commercial luminometer, *Chem. Lett.*, 2010, **39**, 291–293; (b) K. Niwa, Y. Ichino, S. Kumata, Y. Nakajima, Y. Hiraishi, D. Kato, V. R. Viviani and Y. Ohmiya, Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases, *Photochem. Photobiol.*, 2010, **86**, 1046–1049.
- L. W. Chung, S. Hayashi, M. Lundberg, T. Nakatsu, H. Kato and K. Morokuma, Mechanism of efficient firefly bioluminescence via adiabatic transition state and seam of sloped conical intersection, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 12880–12881.
- (a) V. R. Viviani and Y. Ohmiya, Bovine serum albumin displays luciferase-like activity in presence of luciferyl adenylate: insights on the origin of protoluciferase activity and bioluminescence colours, *Luminescence*, 2006, **21**, 262–267; (b) V. R. Viviani, R. A. Prado, F. G. C. Arnoldi and F. C. Abdalla, An ancestral luciferase in the Malpighi tubules of a non-bioluminescent beetle, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**, 57–61.