

## 論文の内容の要旨

論文題目	ホタル生物発光を用いた特異的発光を示す発光材料の創製
学 位 申 請 者	北田 昇雄

ホタルの生物発光は高効率発光を示すため、ライフサイエンスの分野で生体内を可視化する *in vivo* 光イメージング材料として応用されている。ホタル生物発光を用いたイメージング材料は、マウス等の小型動物での有用な結果は得られているが、今後、医学研究の発展、特に再生医療研究の発展には更に大型の動物での光イメージングが必要不可欠であろう。しかし、現在大型動物での光イメージングが行われた例はない。そこで、本研究では大型動物光イメージングの実現を目指し研究を行った。

第2章では現存の赤色発光基質を用いた大型動物モデル実験を行い、その有用性を確認した。モデル実験ではあるものの、5 cmもの肉厚を透過しての光検出が可能なることを示した。この結果を踏まえ、中大型動物イメージングの実現にも至った。

第3章では、D-ルシフェリンへのアリル基導入が生物発光を長波長化する知見を基に、応用性の高い赤色ルシフェリンアナログにアリル基を導入した際の構造活性相関を明らかにした。いずれのルシフェリンアナログもアリル基の導入により長波長化を起こすことを見出し、700 nm近い発光を示すルシフェリンアナログの合成を達成した。

第4章では、反応中間体であるAMP化ルシフェリンについて、そのヌクレオチド部位の改変による構造活性相関を明らかにした。ヌクレオチド部位の改変が発光活性を大きく損なわず、発光輝度向上に働くとともに波長制御にも働くことを見出した。

このように本研究では、これまで大型動物には難しいと考えられていた *in vivo* 光イメージングを大型動物へ適用するための基盤となる実験データを示しており、さらにこの技術を発展させるために必要と考えられる、共役伸長以外の新たなホタル生物発光系の長波長化技術と高輝度化の試みについても記載され、*in vivo* 光イメージング技術の新しい展開の起点となる研究論文である。

## 論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名 北田 昇雄

審査委員主査 牧 昌次郎

委員 石田 尚行

委員 狩野 豊

委員 三瓶 厳一

委員 平野 誉

委員

委員

ホタルの生物発光は、発光基質ホタルルシフェリン (D-ルシフェリン) と酵素ホタルルシフェラーゼ (F-luc) を用いた化学反応により高効率な黄緑色 ( $\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$ ) の発光を示す。このホタル生物発光は様々な分野で発光材料として用いられており、中でもライフサイエンス分野では光イメージング材料として広く用いられている。*in vivo*光イメージングは現在、小動物の体内および細胞内で起こる生命活動を、非侵襲的かつ高感度で迅速、安価で簡便にモニタリングできる分析方法として広く使用されている。生物発光の反応は酵素反応に基づいており、蛍光アッセイのように励起光源を必要とせず、自発光を検出するだけの分析系が構築できる。そのため生物発光イメージングは、蛍光イメージングよりもノイズが低減された高感度イメージングが可能である。しかしながら、ホタル生物発光の黄緑色発光の波長域の光は動物組織で容易に吸収され、*in vivo*光イメージングでは透過光が弱くなる。哺乳動物の発光イメージングにおける光組織透過性を改善するためには、“生体の窓”領域の光 ( $\lambda = 650\text{--}900 \text{ nm}$ ) を用いるのが効果的である。そのため、申請者の研究室では、ルシフェリンの構造改変による発光色の多色化を検討し、青から赤まで可視光をほぼ網羅する発光色のルシフェリンアナログ (類縁体) を創製に成功している。その中で見出された赤色発光を示すルシフェリンアナロ

グ AkaLumine(ca. 675 nm) は世界初の赤色発光イメージング材料として販売されている。

第1章では序論として生物発光を含め研究基盤を簡潔に概説している。特に AkaLumineはマウスの深部観察において既存のD-ルシフェリンよりも高輝度な発光を示すことを紹介し、今後のライフサイエンス研究の発展に向けて、さらに大型の動物(マーモセットやミニブタ)での*in vivo*光イメージングの必要性とそれを実現するための分析手段と材料設計を解説している。中・大型動物での*in vivo*光イメージングの実現に向けて、既存の赤色発光材料を用いた生体内深部可視化の実験系の設計および発光材料の設計指針について本研究の目的を述べている。

第2章では、大型動物イメージング実験について記載されている。

既存の材料で大型イメージングの実例を示すため、赤色発光材料AkaLumineとその塩酸塩であるTokeOniを用いた発光が、実際にどれほどの生体組織を透過可能か検証した。ブタの骨格筋を用いてモデル実験を行ったところ、AkaLumineを用いた発光が5 cmもの生体組織を透過することを明らかにした。この結果を踏まえ、マイクロミニピッグを用いた*in vivo*発光イメージングを試み、肝臓からの発光を検出することに成功した。これにより実際の大型動物イメージングが実現された。

第3章では、ホタルルシフェリンのアリル基導入による波長制御について記載している。

D-ルシフェリン構造の改変による従来の生物発光の長波長化の方法として、オレフィンの伸長やジメチルアミノ化、ナフタレン環の導入などが挙げられる。これらの指標に基づいてAkaLumineなど赤色発光ルシフェリンアナログが合成されてきた。本論文では、新たな長波長化指標としてD-ルシフェリンのベンゾチアゾールの7位にアリル基を導入することで約40 nmの長波長化が可能なことを明らかにした。このアリル基導入の手法を、赤色発光アナログを含めた他のルシフェリンアナログに適用し、これらの発光活性評価を行った。アリル基の導入により、いずれのルシフェリンアナログも生物発光の長波長化を示すことが明らかとなり、695 nmの発光極大波長を持つアナログの合成にも成功した。アリル基導入が $\pi$ 共役系に大きな影響を及ぼさないことは、これらのアナログの化学発光波長がアリル基を持たないものと同等

であることから確認される。従って、アリル基導入による生物発光波長の変化は、生物発光が酵素発光反応であるため、基質と酵素との相互作用の変化により引き起こされていることが明らかとなった。

第4章では、生物発光の反応中間体であるAMP化ルシフェリンアナログの構造活性相関について記載している。

ホタル生物発光は2段階反応で発光している。1段階目はD-ルシフェリンのアデニル化反応であり、律速段階となっている。2段階目はアデニル化ルシフェリンの酸素分子との反応による励起分子の生成過程であり、1段階目よりも速く進行する。従って、2段階反応では1段階目の律速により単位時間あたりの発光輝度が低下する。これに対し、反応中間体であるAMP化ルシフェリンを人工的に合成して生物発光を行うと、1段階目の反応を省略することで反応速度が向上し、単位時間あたりの発光輝度が最大約1000倍も向上することが明らかとなっている。しかしながらAMP化ルシフェリンは不安定な化合物であるため、現状では直ちに発光材料への実用化は難しい。この安定性を含め、反応中間体の改変体の構造活性相関は確立されていない。本研究ではAMP化ルシフェリンのヌクレオチド部位を改変した反応中間体アナログを複数合成し、そのそれらの生物発光特性を調査して構造活性相関を明らかにした。この結果、ヌクレオチド部位を改変することで、発光輝度の変化のみならず、発光波長も変化することを見出した。

以上により、本論文はホタル生物発光を用いた中・大型動物での*in vivo*光イメージングの実現に向けた研究成果を示し、生物化学と生体機能材料等の分野において世界的に高水準かつ基盤となる知見を与えるものであり、博士（理学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと認められる。