

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

北田 昇雄

電気通信大学大学院情報理工学研究科

博士学位申請論文

2018年8月

博士論文審査委員会

主査 牧 昌次郎 准教授

平野 誉 教授

石田 尚行 教授

狩野 豊 教授

三瓶 巖一 准教授

著作権所有者

北田 昇雄

2018年

Structure-activity Relationship of Firefly Bioluminescence Analogues for *in vivo* imaging

Nobuo Kitada

Abstract

Firefly bioluminescent system is attracting widespread attention as an *in vivo* imaging tool. Recently, near-infrared (NIR) light (650-1000 nm) has become a hot topic due to high living tissue penetrance. NIR bioluminescence imaging tools is employed in *in vivo* imaging for mice. However, the aim here is to utilize the same imaging tools in much larger organism for *in vivo* imaging. How much an existing imaging tool can be used for big animal imaging was evaluated, and it was found that improvements in wavelength and brightness were necessary.

Chapter 2: The existing NIR imaging tools (AkaLumine and TokeOni) were trialed for large animal model imaging. The NIR light could be detected from a depth of 5 cm in large animal model test. Therefore, The NIR imaging tool could be used for *in vivo* imaging for a miniature pig.

Chapter 3: An allyl group at the C7 position of D-luciferin induced a red-shift in the emission wavelength. Because there were previously no other luciferin analogs carrying an allyl group, allyl luciferin analogs were synthesized and the structure-activity relationship was revealed. As a result, NIR luciferin analogs with emission wavelengths that are near 700 nm were synthesized.

Chapter 4: It is known that emission efficiency increases 1,000 fold by using the AMP-luciferin intermediate instead of luciferin. However, the issue is that it is very unstable. Thus, various AMP-luciferin analogs were synthesized and investigated for structure-activity relationships. AMP-luciferin analogs with modified nucleotide groups was found to have luminescence activity and intermediate effect on wavelength.

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

北田 昇雄

和文概要

ホタルの生物発光は非常に高効率な発光を示すため、ライフサイエンスの分野で生体内を可視化する *in vivo* 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章では既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であった。この結果により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-ルシフェリンにアリル基を導入すると長波長化する知見から、他の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が起きることが明らかとなり、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 化ルシフェリンの構造活性相関を明らかにした。AMP 化ルシフェリンのヌクレオチド部位を改変しても発光活性を失わなわず、また、反応中間体が発光輝度のみならず波長の制御にも影響していることが明らかとなった。

目次

第1章	序論	1
1.1.	生物発光	1
1.2.	ホタル生物発光	1
1.3.	ホタル生物発光の応用	7
1.4.	ホタルルシフェリンの構造活性相関	9
1.5.	近赤外光イメージング材料	11
1.6.	AkaLumine (15a)・TokeOni (36)の有用性	13
1.7.	高水溶性赤色発光材料	16
1.8.	特化酵素を用いた新規発光イメージングシステム	17
1.9.	本研究の目的	17
第2章	大型動物発光イメージング実験	19
2.1.	大型動物発光イメージングの障壁	19
2.2.	大型動物モデル実験	19
2.3.	中大型動物 <i>in vivo</i> 発光イメージングの実現	25
2.4.	まとめ	27
第3章	ホタルルシフェリンのアリル基の導入による波長制御	28
3.1.	波長制御を可能とするルシフェリンアナログの分子設計	28
3.2.	アリル基導入型ルシフェリンの合成	29
3.3.	アリル基導入型ルシフェリンの発光特性	34
3.4.	アリル基導入型ルシフェリンの生物発光イメージング実験	42
3.5.	まとめ	46
第4章	反応中間体の構造活性相関研究	48
4.1.	ホタル生物発光の2段階反応	48
4.2.	発光反応測定	52
4.3.	まとめ	55
第5章	結語	57
第6章	実験の部	58
6.1.	合成の部	58
6.2.	測定の部	99
第7章	参考文献	105

第1章 序論

1.1. 生物発光

世界中には様々な種の生物が存在するが、進化の過程でそれぞれ特有の能力を持つ種も存在している。その中でも、一際目立つ能力は「生物発光」である。発光を示す生物は細菌や昆虫、海洋生物など広範囲な生物種で確認されており、種によって発光色や発光様式は様々である。発光の仕方も様々で、ホタルのように体内の一部で発光を示すもの、ヤコウタケのように全身で発光を示すもの、ウミホタルのように体外に発光液を放出して発光を示すものなどが存在する (Fig. 1.1)¹。



Fig. 1.1. 発光生物 (左:ホタル (撮影場所: 白浜フラワーパーク)

中央:ヤコウタケ (撮影場所: 八丈島・八丈植物公園)

右:ウミホタル (写真提供:産総研 近江谷克裕博士、オリンパス株式会社 小江克典博士)

発光の目的は様々で、雌雄間の合図、威嚇・逃亡、餌の獲得など、目的が考えられている種も存在するが、いまだに発光の目的が明らかとなっていない種も多く存在する²。多くの研究者がこの発光現象に魅了され、発光機構やその目的の解明をするべく研究を進めてきた。

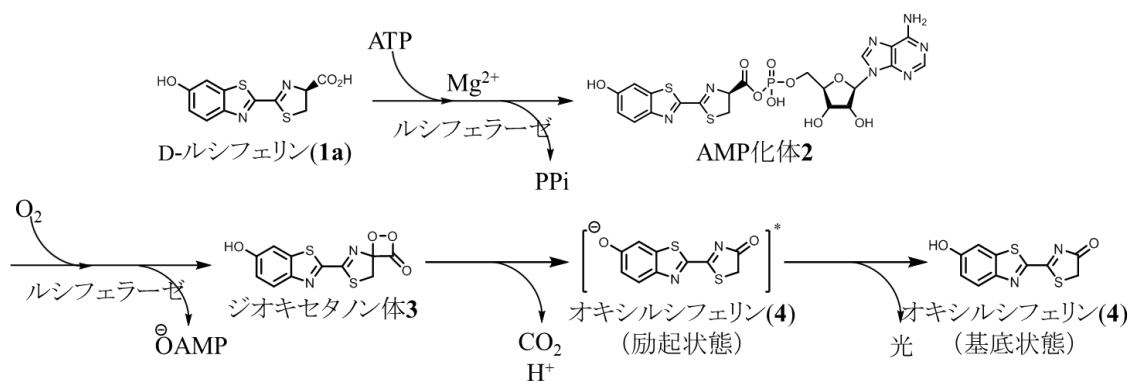
1.2. ホタル生物発光

ホタルは発光生物の代表格である。ホタルはコウチュウ目・ホタル上科・ホタル科 (*Lampyridae*) に属する昆虫を指し、世界におよそ2000種が存在しているとされる。しかしホタルのすべての種が発光を示すわけではなく、卵、幼虫、サナギではほとんどの種が発光するものの、成虫で発光をするものは限られている。

ホタルの発光は発光基質であるルシフェリンと発光酵素であるルシフェラーゼ、アデノシン三リン酸 (Adenosine TriPhosphate: ATP)、マグネシウムイオン、酸素の化学反応によって発光を示すルシフェリン-ルシフェラーゼ反応 (L-L反応) によって引き起こされる。これは1916年にHarveyらによって発見された。その後、1957年にMcElroyらにより北米産ホタル (*Photinus Pyralis*) から発光基質であるホタルルシフェリンが単離され、その4年後、1961年にWhiteらによってルシフェリンの合成、構造決定がなされている^{3,4}。また発光酵素であるルシフェラーゼについては1996年にContiらにより北米産ホタルのホタルルシフェラーゼの3次元構造が報告され、2006年に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。^{5,6}

1.2.1. ホタル生物発光機構

ホタル生物発光の発光機構として、次の説が一般的に提唱されている。まず、ホタルルシフェラーゼの作用によりホタルルシフェリン (**1a**) がマグネシウムイオン存在下、ATPと反応し、アデニル化が起き、反応中間体であるAMP (Adenosine MonoPhosphate) 化体**2**が生成される。続いて酸化反応により不安定な反応中間体であるジオキセタン体**3**が生成され、これが脱炭酸を伴い分解し、励起状態のオキシルシフェリンが生成される、このオキシルシフェリンが基底状態に遷移する際に、その差分のエネルギーが高効率な発光として観測される (Scheme 1.2.1)^{7,8}。



1.2.2. ホタル生物発光色

ホタルの仲間の発光甲虫は共通のホタルルシフェリン (**1a**) からScheme 1.2.1のようにして発光するが、種類によってその酵素は異なり、酵素の種類によって発光色の変化を起こす。北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) では発光極大波長560 nm の黄緑色の発光を示すが、ヒカリコメツキムシのルシフェラーゼ (Eluc) では537 nmと僅かに短波長化した発光が見られ、鉄道虫頭部のルシフェラーゼ (SLR) では630 nmの赤色発光を示す。このようにホタル生物発光は一つの発光基質から、種あるいは部位ごとに発光酵素を変化させることで発光色を変化させている (Table 1.2.2)⁹。

Table 1.2.2 各種ルシフェラーゼと発光波長⁹

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

1.2.3. 発光色変化メカニズム

上記のように、同じ発光基質であるD-ルシフェリン(1a)を用いた発光であるのかかわらず、酵素を変えることによって発光色が黄緑色から赤色に変化している。また、酵素間のみならず、同じ酵素を用いても発光色が変化することが知られている。D-ルシフェリン(1a)と北米産ホタルルシフェラーゼ(Ppy)の組み合わせの場合、塩基性条件下(pH8)においては黄緑色発光(560 nm)を示すのに対し、酸性条件下(pH6)では赤色発光(620 nm)を示す。これはルシフェラーゼの活性中心の変化によって引き起こされているものと考えられており、発光を示すオキシルシフェリンの励起状態に影響を与えたためである。当初はこの発光色の変化は、発光体であるオキシルシフェリンが、ケト-エノール互変異性を起こすことによって発光色が変化するものと考えられていた¹⁰。しかしながら近年ではエノール型は発光には関与しておらず、ケト型のみで黄緑色から赤色までの発光を示すと考えられている。ケト型のみで発光色変化が起きる理由として、基質ルシフェリンが酵素に取り込まれた際の位置がしばしば議論されている(Fig. 1.3)。周辺のアミノ酸残基の影響を受け、基質が酵素で非極性下に置かれると黄緑色発光を示し、一方、酵素内で極性条件下に置かれると赤色発光を示すことが示唆されており、環境の変化(pHの変化等)によってこの2つの存在比に変化が起きるために発光色変化を起こすと考えられている。実際にゲンジボタルのルシフェラーゼの遺伝子改変により、286番目のアミノ酸SerをAsnに変えるだけで発光色が赤色に変化する¹¹。その他にも、酵素のアミノ酸残基にランダムミューテーションをかけることによって発光色の変化が起きている¹²。これにより活性中心付近のアミノ酸残基が発光色の変化に大きく関わっているとされる。現在も、この発光色変化のメカニズム解明をするため発光体であるオキシルシフェリンの発光特性の評価や、基質が取り込まれた状態の酵素結晶構造解析など、様々な研究がなされている^{13,14}。

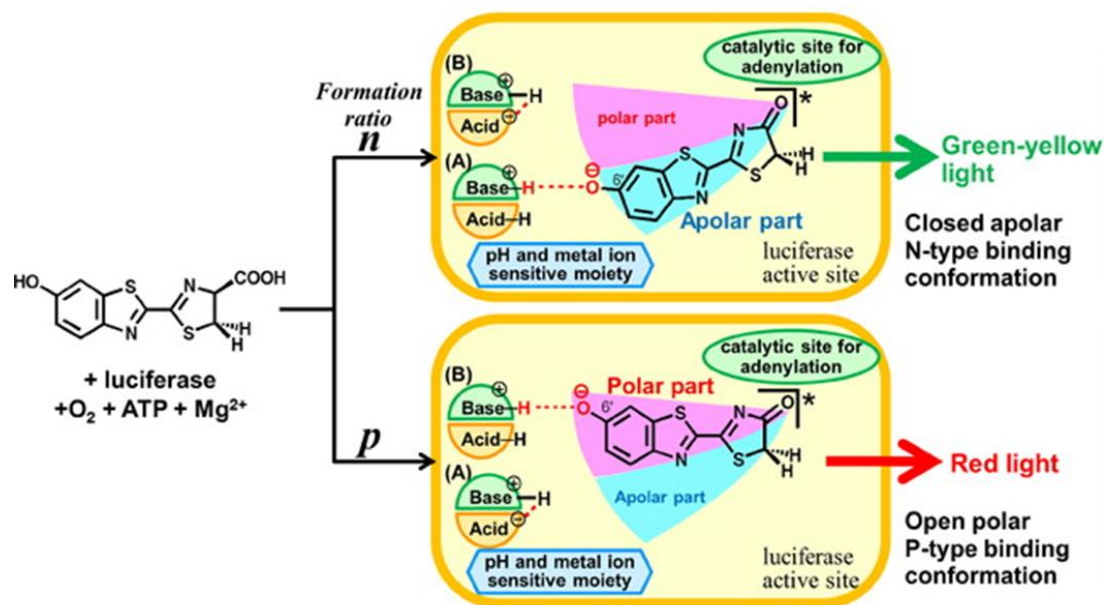


Fig. 1.3. 酵素内のオキシルシフェリンの位置と発光色の関係¹⁵

1.2.4. 酵素反応速度論解析

ホタル生物発光については様々な解析が行われているが、この発光はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L反応)によって発光するために、酵素反応特性の解析においてしばしば酵素反応速度論解析が行われる^{16,17}。酵素反応は、基質Sと酵素Eが複合体ESを形成し、複合体ES内で化学反応を起こすことで生成物Pが生成する(Fig. 1.2.4a)。



Fig1.2.4a 酵素反応の模式図

このとき基質濃度[S]と発光反応速度Vの間にはFig. 1.2.4bのような関係性が成り立つ。

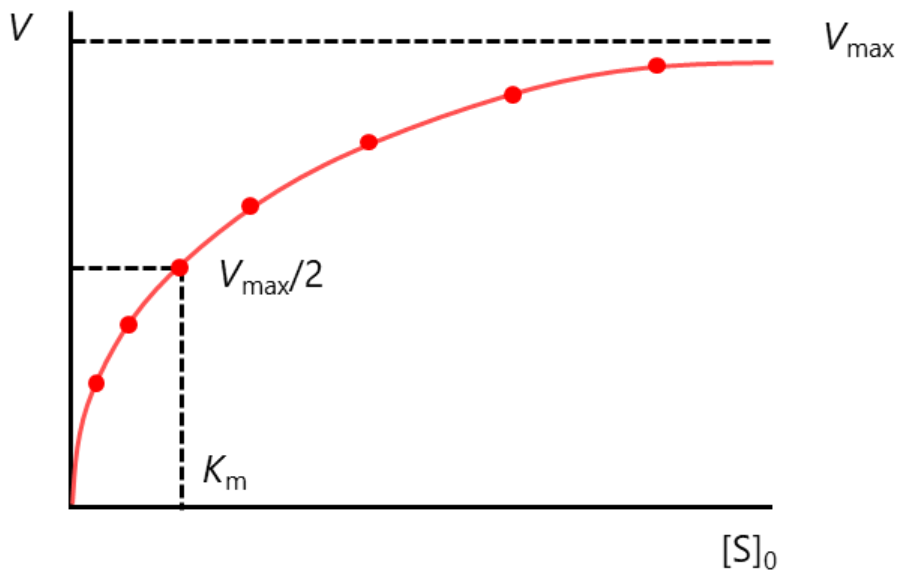


Fig. 1.2.4b 基質濃度[S]と発光反応速度Vのグラフ

初期発光反応速度 V_0 、最大基質濃度 $[S]_0$ 、最大発光反応速度 V_{max} 、ミカエリス定数 K_m とした時、以下のミカエリス-メンテンの速度式(式1-1)が与えられる。

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

この式を V_0 および V_0 の逆数に置き換えると、Lineweaver-Burk式(式1-2)が得られる。

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

横軸 $1/[S]_0$ に対して縦軸 $1/V_0$ をプロットすると測定値は直線に並び、縦軸切片 = $1/V_{\max}$ 、横軸切片 = $-1/K_m$ となり、 V_{\max} と K_m が求められる (Fig. 1.2.4c)。

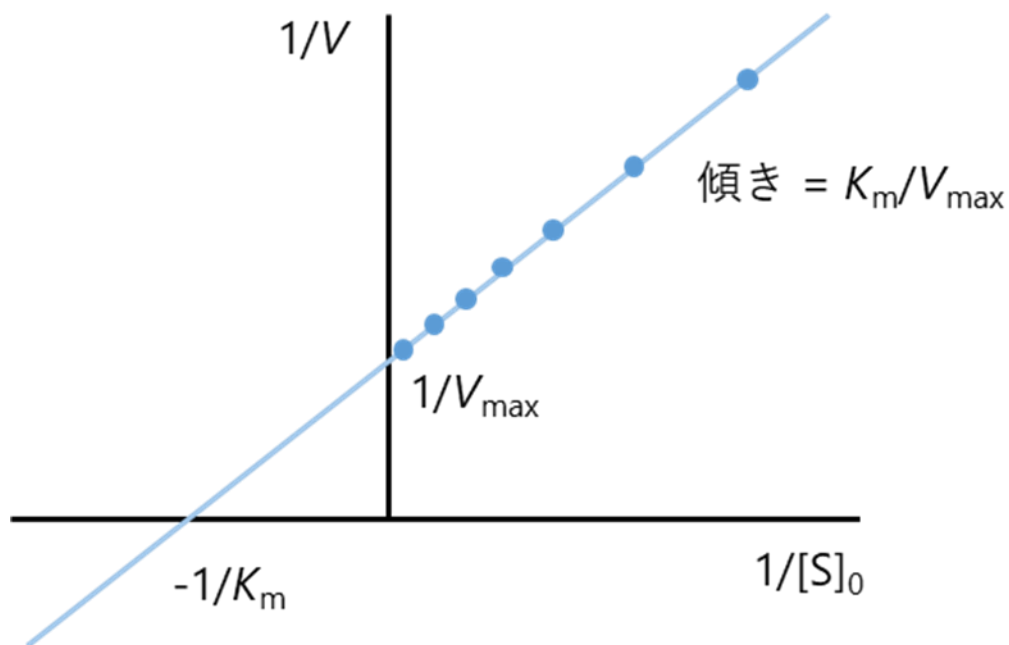


Fig. 1.2.4c. Lineweaver-Burk プロット

ホタル生物発光では、基質Sがホタルルシフェリン、酵素Eがホタルルシフェラーゼ、複合体ESがルシフェリン-ルシフェラーゼ複合体を表している。測定時のATP濃度とMg²⁺濃度を固定し、また反応系中における溶存酸素は一定であると考えられるため、単一基質反応の酵素反応様式に当てはめることができる。生成物はオキシルシフェリンではなく、オキシルシフェリンから生成される光子を生成物Pとして発光量の観測から求めている。そのためV_{max}値を発光強度として比較することができる。また、ホタル生物発光はAMP化およびその酸素化の2段階反応で発光するものの、酸素化過程がAMP化過程と比較して速く、AMP化反応が律速過程であるため酸素化過程を省略し、擬一次反応として解析している (Fig. 1.2.4d)^{18,19}。

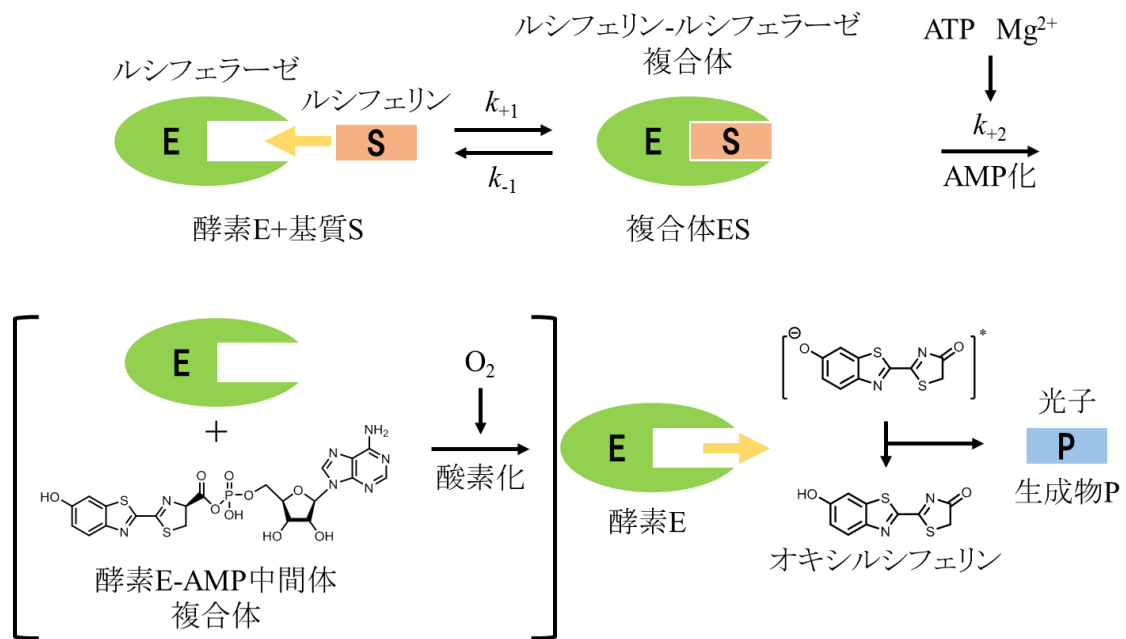


Fig. 1.2.4d. ホタル生物発光の酵素反応の模式図

1.2.5. ホタル生物発光量子収率

一般的に生物発光は化学発光に比べ効率のよい発光を示すことが知られている。中でもホタル生物発光は非常に高効率で、北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) を用いた場合、約48%もの量子収率で発光を示す^{20,21}。代表的な化学発光であるルミノール反応の3.6%と比較して非常に高効率であることがわかるだろう (Table 1.2.5)⁹。

Table 1.2.5. 発光量子収率⁹

	量子収率
生物発光	
Bacteria	0.12~0.17
<i>Cypridina</i> (ウミホタル)	0.28
<i>Renilla</i> (ウミシイタケ)	0.05
<i>Photinus pyralis</i> (ホタル)	0.48
<i>Aequorea</i> (オワンクラゲ)	0.23
化学発光	
Luminol	0.036

ホタル生物発光の発光量子収率 (φ_{BL}) は反応生成収率 (φ_r)、励起一重項生成効率 (φ_s) および蛍光量子収率 (φ_{FL}) の積で求まる。

$$\varphi_{BL} = \varphi_r \times \varphi_s \times \varphi_{FL} \quad (\text{式1-3})$$

また、上述した反応速度 (V_{max}) は発光量子収率 (φ_{BL}) と酵素代謝回転数 (k_{cat}) 及び酵素濃度 [E] によって求めることができる。

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

1.3. ホタル生物発光の応用

このようにホタルの発光は非常に高効率な生物発光システムであるため、生物発光の利点を活かし、様々な分野で応用されている。

ホタル生物発光にはATPが必須であり、ATP濃度と発光量に相関があることを利用し、キッコーマン株式会社から衛生検出キットが実用化されている。微生物や細菌の増殖によって生じるATPを発光量によって定量し検出することで細菌量の計測を行っている (Fig. 1.3左)。また、遺伝子にルシフェラーゼを導入することによって発光させることができるため、プロモーター遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドを用いることで、特定の遺伝子発現量を発光量によって定量化できるレポーターアッセイキットとしても用いられている (Fig. 1.3右)。



Fig. 1.3. ホタル生物発光の応用

(左:衛生検査キット「ルミテスターPD10N」と「ルシパックワイド」【キッコーマン株式会社】
右: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】)

1.3.1. *in vivo*イメージング

また、ホタル生物発光は生体内の細胞やタンパク質などの動態を生きたままの状態でも可視化する*in vivo*イメージングツールとしても広く用いられている^{22,23}。発光生物発光イメージングを含む、光学イメージング法は、生体内の光を検出することで観察するために、非侵襲的に生体内を可視化することができ、基本的には暗箱とカメラを用いたイメージング装置を使用するために大型の装置や特殊な設備を必要としないため、ライフサイエンス研究において広く用いられている。他の*in vivo*イメージング法としてはX線コンピュータ断層撮影法(CT)、陽電子放射断層撮影法(PET)、単一光子放射断層撮影法(SPECT)、核磁気共鳴画像法(MRI)等が存在し、それぞれにメリット・デメリットが存在する。(Table 1.3.1)

Table 1.3.1. *in vivo*イメージング法の比較

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

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

を使用せず、高解像度のイメージングが可能であるが、測定時間が比較的長くなり、かつコストが高い。

光学イメージングは放射線を使用せずに、高感度かつ低コストで細胞や分子のイメージングが可能である。蛍光イメージングでは、GFP等の蛍光タンパク質や蛍光プローブに励起光を照射し、得られた蛍光をCCD(charge coupled device)カメラで検出する。空間・時間分解能が著しく高い点や、安全で操作的にも簡便な点で非常に有用である。蛍光波長幅の狭さから、デュアルイメージングにも多く用いられている。近年では蛍光共鳴エネルギー移動(Forster redonance energy transfer: FRET)の利用によって発光のON/OFFの切り替えや波長のシフトによって生体内の活動を可視化できるようになったことで応用の幅が広がっている。しかしながら汎用されている可視光領域の蛍光は生体透過性が悪く、その使用を組織表面など励起光により励起される範囲に限定せざるを得ない問題点を持つ。多光子励起顕微鏡を利用することでこれまでよりも深部の観察が可能となっているが、数mmが限界である²⁴。

一方で、近年上記問題を解決する手法として生物発光イメージング法が注目されている。生物発光イメージングでは、観察したい対象の遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、ルシフェリンを体外から投与することで、生きたまま特定の遺伝子が存在する部位のみを限定的に発光させることができる。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を用いた自発光をするために、蛍光イメージング法と異なり励起光を必要とせず、S/N比が高く生体内の深部の可視化に有効であると考えられている。ホタル生物発光をイメージング材料として最適化することで、いままで検出が難しかった生体内の深部の可視化も可能になると考える。

1.4. ホタルルシフェリンの構造活性相関

生物発光は酵素の認識が重要であるため、認識部位の改変により発光活性を失う。当研究室ではホタルルシフェリンの構造の改変を行い、その発光必須部位と改変可能部位を明らかにしてきた(Fig. 1.4)。

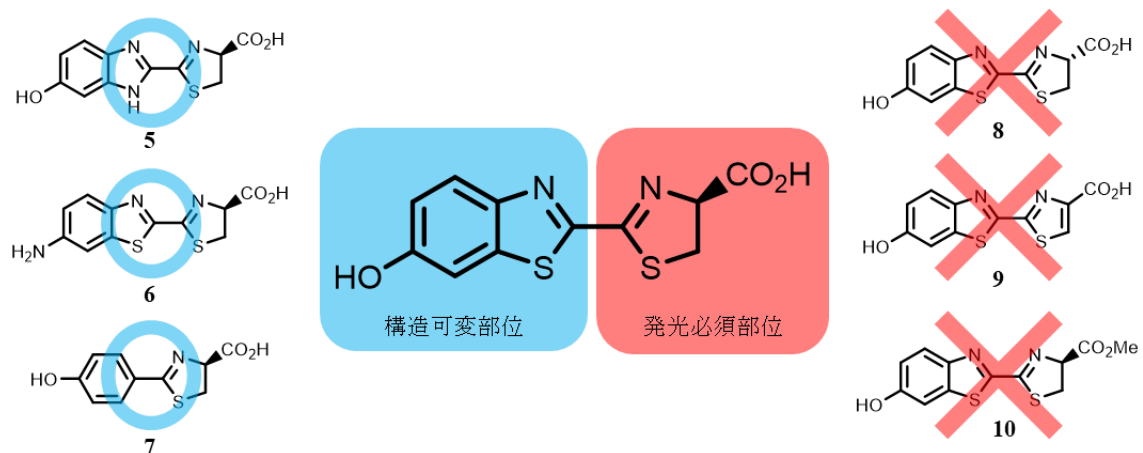


Fig. 1.4. 構造可変部位と発光必須部位

1.4.1. ホタルルシフェリンの波長改変

ルシフェリンのチアゾリン環部位は発光必須部位であり、少しの構造改変によって発光活性を失ってしまう事が多い。チアゾリン環の不斉炭素原子は非常に重要であり、通常D体で存在するルシフェリンのカルボン酸であるが、ルシフェリンアナログ**8**のようにL体に改変したり、ルシフェリンアナログ**9**のようにカルボン酸の付け根を二重結合にしたりすることで発光活性を失ってしまう。また、反応点となるカルボン酸をエステルに改変したルシフェリンアナログ**10**も同様に発光活性を失ってしまう。このようにチアゾリン環の環構造や不斉炭素、カルボン酸に改変を加えると発光活性を失ってしまう事が多い²⁵。一方、ベンゾチアゾール部位は比較的改変が可能であり、ベンゾチアゾールをベンゾイミダゾールに変えたルシフェリンアナログ**5**やヒドロキシ基をアミノ基に変えたアミノルシフェリン(**6**)も発光活性を失わない⁴。またベンゾチアゾールをベンゼン環へと大幅に改変したルシフェリンアナログ**7**も発光活性を失わず、このベンゼン環構造を中心に様々なルシフェリンアナログを合成し、青から赤まで可視光をほぼ網羅する発光色の改変に成功してきた(Figure 1.4.1)²⁶。これらのアナログから、ベンゼン環の置換基や、ベンゼン環とチアゾリン環の間のオレフィンの数が波長改変に大きく関与していることが明らかとなった。

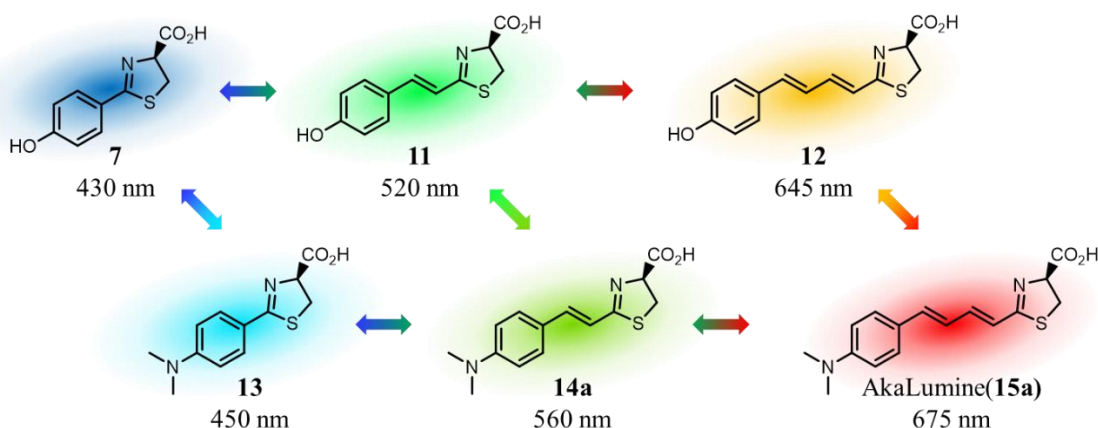


Fig 1.4.1. 多色化ルシフェリンアナログ

1.4.2. 長波長発光の有用性

上述したように当研究室では多くの構造活性相関研究が行われ、その結果、世界初の赤色発光イメージング材料であるAkaLumine(**15a**)が開発された。AkaLumine(**15a**)は675 nmの発光極大波長を示し、*in vivo*イメージングに有用であると考えられる。天然のホタルの持つD-ルシフェリン(**1a**)は560 nmの発光極大波長で黄緑色の光を放つ。しかしながら、560 nmの発光波長は生体内のヘモグロビンや酸化ヘモグロビンの吸収波長帯(<650 nm)と重なっており、これらの物質に吸収されてしまうために生体透過性が低い(Fig. 1.4.2)²⁷。したがって、生体内深部からの発光が生体表面まで届くことが困難であり生体内深部のイメージングには適していない。同様に、900 nmを超える波長帯では生体の大部分を占めている水の吸光度が高まるために生体内深部のイメージングに適さない。一方、この間の領域である赤から近赤外(650-900 nm)の波長帯を「生体の窓」と呼び、

これらの吸収を避けることができるためにイメージングに有用であると考えられており、AkaLumine (15a)はこの波長帯に発光極大波長を持つために生体透過性が高く、また光の散乱も抑えられるため、生体内深部のイメージングに有用であると期待できる。

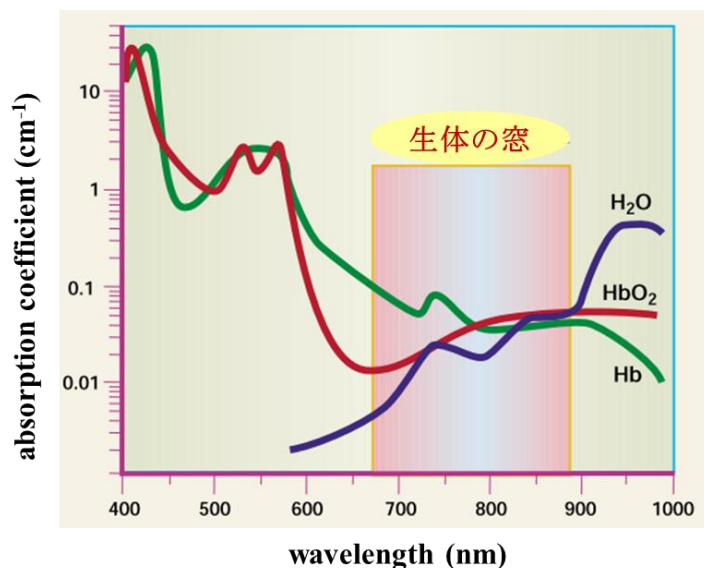


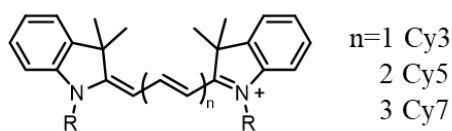
Fig1.4.2. ヘモグロビン(Hb)、酸化ヘモグロビン(HbO₂)、水の吸光度

1.5. 近赤外光イメージング材料

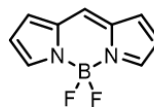
近赤外光が生体内イメージングで有用なことは広く知られているため、様々な近赤外光イメージング材料が開発されてきた。

1.5.1. 近赤外蛍光イメージング材料

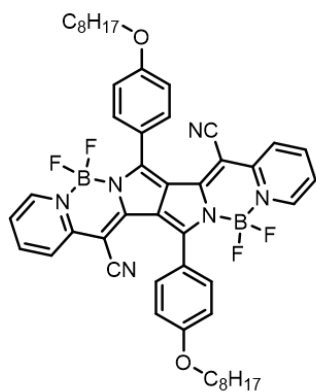
シアニン色素を元にした近赤外材料は古くから研究されておりイメージング材料として古くから注目されている^{28,29}。この中でも Cy3、Cy5、Cy7(16-18)は広く研究されており現在でも蛍光プローブとして幅広く用いられている。ピロロピロールシアニン(PPCy)(19)骨格を持つアナログでは 800 nm を超える蛍光波長も達成している^{30,31}。BODIPY(boron-dipyrrromethene)(20)やその骨格をもよく用いられる蛍光色素の一つである³²。この骨格を持つKFLシリーズ(21-30)は高い蛍光量子収率を持ち多彩な蛍光色を示す(547-738 nm)³³。しかしながら、近赤外蛍光色素は化学的な安定性や光安定性に乏しいことが問題となっていた。最近ではこの問題を解決した、ローダミン色素にリン原子を導入した化学的安定性と光安定性を併せ持つ近赤外蛍光色素「PREX 710」(31)の開発もされている³⁴。



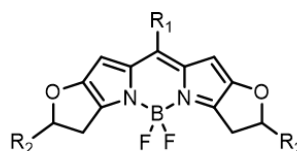
Cy3(16), Cy5(17), Cy7(18)



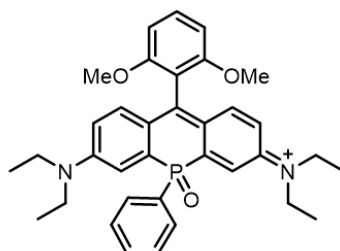
BODIPY(20)



PPCy(19)



R ₁ =H	R ₂ =Me	KFL-1(21)
R ₁ =CF ₃	R ₂ =Me	KFL-2(22)
R ₁ =H	R ₂ =4-MeO-Ph	KFL-3(23)
R ₁ =CF ₃	R ₂ =4-MeO-Ph	KFL-4(24)
R ₁ =H	R ₂ =Ph	KFL-5(25)
R ₁ =H	R ₂ =2-MeO-Ph	KFL-6(26)
R ₁ =H	R ₂ =4- <i>i</i> Pr-Ph	KFL-7(27)
R ₁ =H	R ₂ =2- <i>i</i> Pr-Ph	KFL-8(28)
R ₁ =H	R ₂ =2,5-MeO-Ph	KFL-9(29)
R ₁ =H	R ₂ =2,4-MeO-Ph	KFL-10(30)



PREX 710(31)

Fig. 1.5.1. 近赤外蛍光イメージング材料

1.5.2. 近赤外発光イメージング材料

近赤外発光イメージング材料と比べると数は少ないが、近赤外発光イメージング材料も存在する。多くの研究グループはホタルルシフェラーゼの選択的基質特異性が高い **D**-ルシフェリン (**1a**) の構造に基づき、ルシフェリンアナログを設計している。ベンゾチアゾール構造のヒドロキシ基のアミノ基に置換したアミノルシフェリン (**6**) は、発光波長約 600 nm のオレンジ色で効率的な生物発光を示すことが見出された²³。アミノルシフェリン構造のアミノ基に蛍光色素 BODIPY と Cy 7 を結合させた類縁体 **32,33** は、分子内 Förster 共鳴エネルギー移動によってそれぞれ 679 と 772 nm に発光波長を示すことが報告された^{35,36}。他の手法として、アミノルシフェリンの C6'位アミノ基と C'5 位を縮

環し、アザシクロに変換した類縁体(Cycluc シリーズ)は長波長発光を示す($\lambda_{bl} \leq 648 \text{ nm}$)^{37,38}。その内縮合ピロリジンを持つ Cycluc1 (**34**)は、生物発光イメージングにおいて高い生物発光活性を示す。セレンチアゾリン環を持つセレンウムアミノルシフェリン(**35**)も 600 nm で発光する³⁹。このように 700 nm 近い発光を示すルシフェリンアナログもいくつかは存在するが、数はあまり多くない。

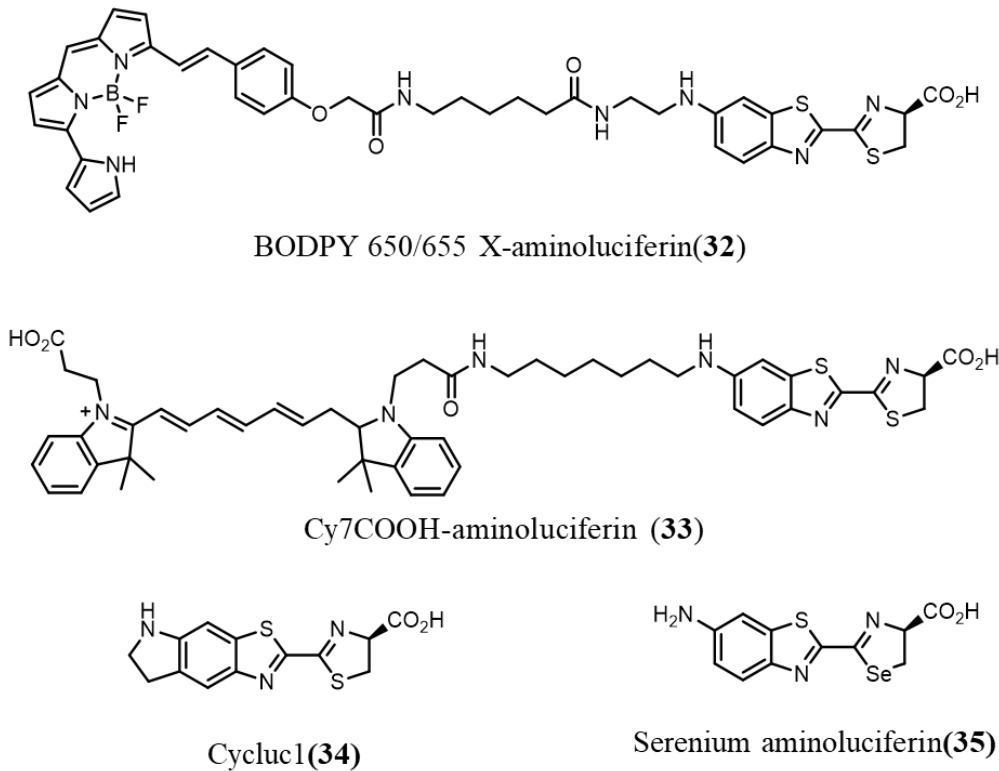


Fig. 1.5.2. 赤色発光イメージング材料

1.6. AkaLumine (**15a**)・TokeOni (**36**)の有用性

実際に赤色の発光材料がどれほど有用であるかを *in vitro* の実験と、マウスを用いた *in vivo* イメージング実験で明らかにされている。

1.6.1. *in vitro* 実験

簡易的に生体内の状態を再現するために、鶏胸肉とウマ血液を混合したバイオモデルフィルターを調整し、1 cm のバイオモデルフィルターの有無によって D-ルシフェリン (**1a**)、アミノルシフェリン (**6**)、AkaLumine (**15a**) についてその発光強度がどう変化するかを ATTO 社製のルミノメーター (AB-2270) を用いて評価した (Fig. 1.6.1a, b)⁴⁰。バイオモデルフィルターのない状態では、AkaLumine (**15a**) は D-ルシフェリン (**1a**) の 20% ほど、アミノルシフェリン (**6**) は 25% ほどの発光強度しか示さない。構造の変更による発光強度の低下は、ほとんどのルシフェリンアナログにおこり、構造に変更を加えているために、酵素の認識が低下するためだと考えられている²⁵。このように基質としての発光強度は低下しているアミノルシフェリン (**6**) と AkaLumine (**15a**) であるが、バイオモデル

フィルターを検出器との間に入れることによって、675 nm の発光波長を示す AkaLumine (15a) の発光強度は 560 nm の発光波長を示す D-ルシフェリン (1a) と比較して 260% の発光強度を示した。これは AkaLumine (15a) の発光波長 (675 nm) がバイオモデルフィルターの吸収波長帯を避けることができたため、吸収されやすい波長帯である 560 nm の発光波長を示す D-ルシフェリン (1a) よりも強い発光強度を示している。一方 610nm の発光波長を示すアミノルシフェリン (6) の発光強度はフィルターを使用すると D-ルシフェリン (1a) と比較して 66% の発光強度が示された。フィルター無し の条件に比べ発光強度は向上しているものの、AkaLumine (15a) と比較してその値は小さい。これにより、より長波長の発光が生体深部の可視化に有用であることが示唆される。

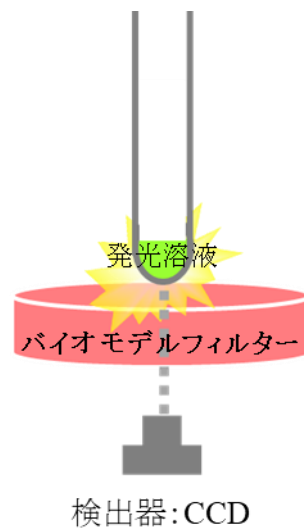
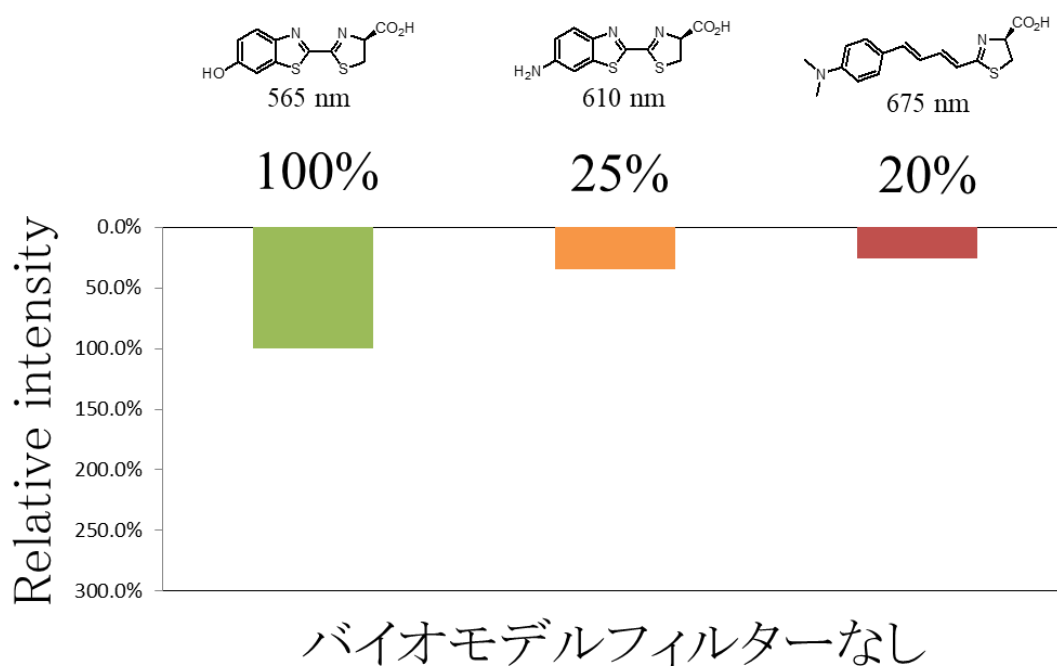


Fig. 1.6.1a. 生体透過性疑似実験

D-ルシフェリン(1a) アミノルシフェリン(6b) AkaLumine(15a)



D-ルシフェリン(1a) アミノルシフェリン(6b) AkaLumine(15a)

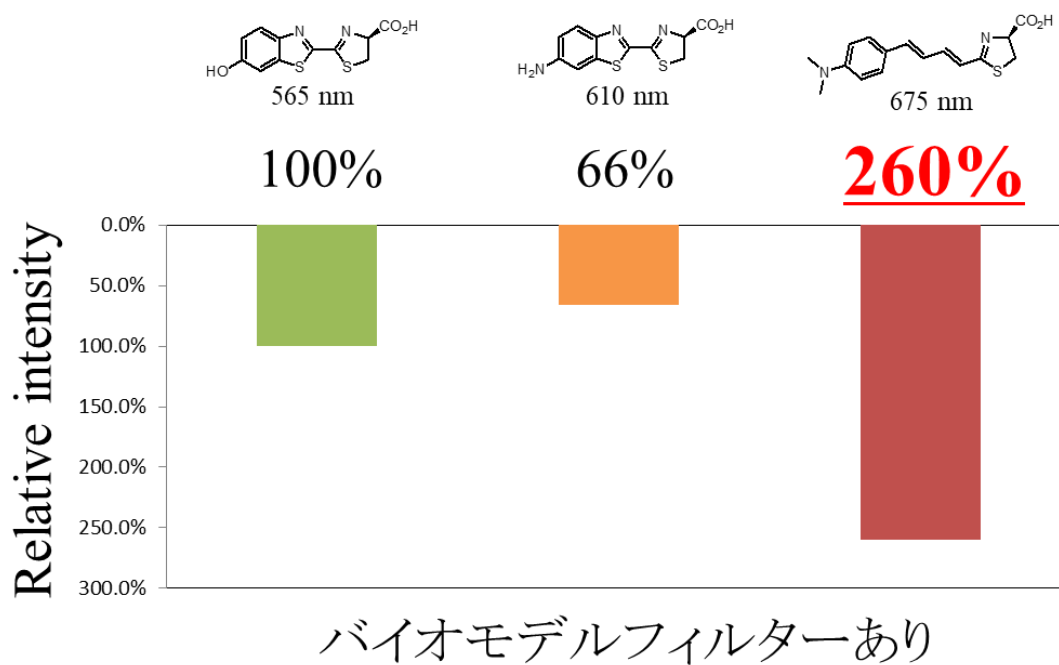


Fig. 1.6.1b D-ルシフェリン(1a)を基準とした相対発光強度⁴⁰
(上)バイオモデルフィルターなし(下)バイオモデルフィルターあり

1.6.2. マウスを用いた *in vivo* イメージング実験

バイオモデルフィルターを使用した場合には D-ルシフェリン (**1a**) よりも有用な結果となったが、実際にマウスを用いた *in vivo* イメージングでも評価を行っている⁴⁰。ホタルルシフェラーゼを発現させた腫瘍細胞を移植した 2 種類のモデルマウスを用いて実験を行った。皮下腫瘍モデルマウスと骨転移モデルマウスに 500 μM の D-ルシフェリン (**1a**) と AkaLumine (**15a**) を 100 μL 投与した際のイメージング像が Fig. 1.5.2 のようになった。どちらのモデルマウスも AkaLumine (**15a**) のほうが感度良く観察されている (Fig. 1.6.2)⁴¹。

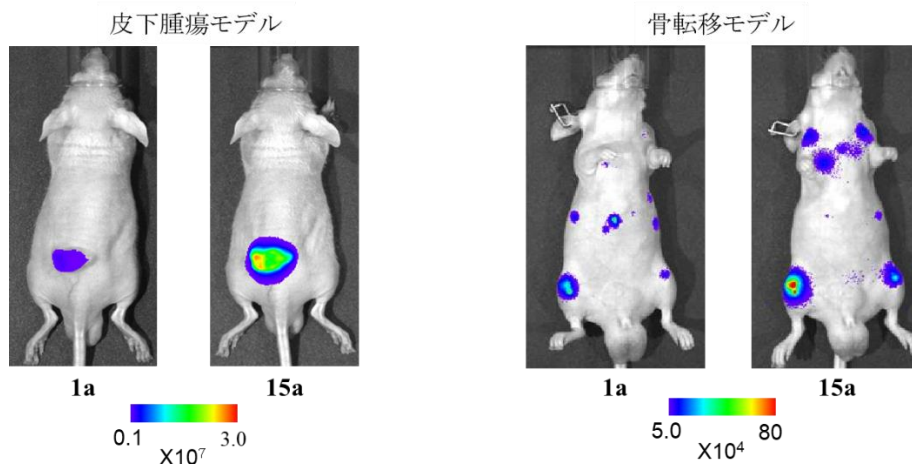


Fig. 1.6.2. マウスを用いた *in vivo* イメージング実験 (左:皮下腫瘍モデル、右:骨転移モデル)

しかしながら、実験系によっては更に高濃度での条件で使用することもあり、高濃度条件での D-ルシフェリンだと更に感度は向上する。一方 AkaLumine (**15a**) は水溶性が低く、これ以上高濃度での投与は難しく水溶性の改善の必要があった。

1.7. 高水溶性赤色発光材料

そこで開発されたのが TokeOni (**36**) である。AkaLumine (**15a**) を塩酸塩化させ、純水への水溶性を 50 倍以上に改善している (Fig. 1.7a)⁴¹。



Fig. 1.7a. AkaLumine (**15a**) と TokeOni (**36**)

TokeOni を用いることで、マウスの中でも深部にあり血流の多い臓器である肺転移モデルマウス

のイメージングにおいても D-ルシフェリン (**1a**) の 10 倍近い感度で検出することが可能である (Fig. 1.7b)。

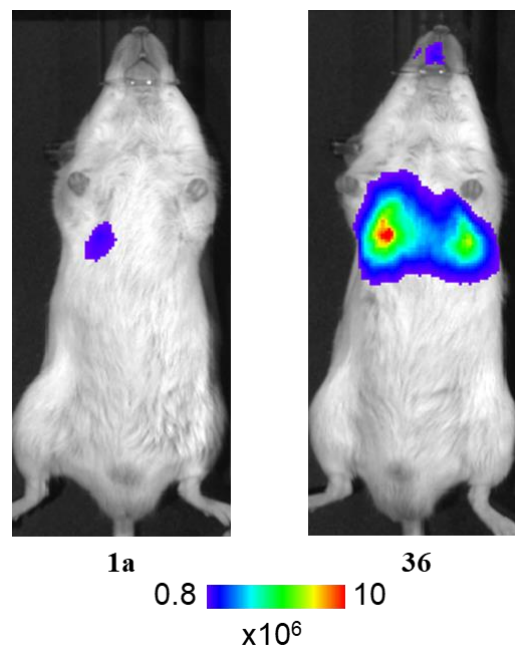


Fig. 1.7b. 肺転移モデルマウスの *in vivo* イメージング像

1.8. 特化酵素を用いた新規発光イメージングシステム

通常 AkaLumine (**15a**) や TokeOni (**36**) を用いる際は天然の北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) を用いて発光させているが、一般的に酵素を改変することで発光特性が変化することも知られている。近年、岩野らによって、AkaLumine (**15a**) と TokeOni (**36**) に特化した発光酵素 Akaluc が開発された。この特化酵素である Akaluc と、赤色発光材料の AkaLumine (**15a**) または TokeOni (**36**) を組み合わせたシステムを Aka-BLI (BioLuminescence Imaging) と呼ぶ。Aka-BLI は D-ルシフェリン (**1a**) と北米産ホタルルシフェラーゼの天然型発光システムを用いたイメージングと比較して 100~1000 倍もの輝度を示している⁴²。また、Aka-BLI を用いることでマウスのリアルタイムイメージングが可能であることも明らかとなっている。

1.9. 本研究の目的

このように赤色発光材料を用いたマウスの *in vivo* 発光イメージングは非常に有用である。しかしながら、今後ライフサイエンス分野の発展には小型のマウスだけではなく、更に大型の動物での発光イメージングが必要不可欠となるであろう。ヒトに類似した高次機能を持つ霊長類や、ヒトと同程度の大きさの臓器をもつブタ等の動物での発光イメージングが可能となることで様々な疾病の治療や再生医療の発展に貢献できるだろう。その足がかりとして、中大型の動物 (小型のサルのマーマセットやミニブタ (Fig. 1.9)) での発光イメージングが必要となる。しかしながら、それを可能とする発光イメージングシステムは存在しない。

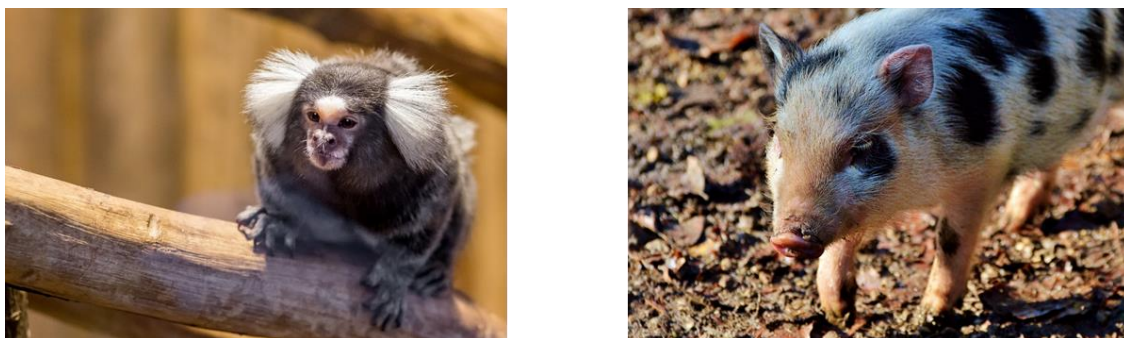


Fig. 1.9. 左:コモンマーモセット(撮影場所:神戸動物王国) と 右:ミニブタ(<https://pixabay.com/>)

ライフサイエンス研究を今後進める上で必要不可欠であると考えられる中大型動物での発光イメージングシステムがいままで開発されていない理由として、中大型動物での発光イメージングの例がないことが大きな要因となっている。発光イメージングシステムは、発光材料と実験動物、イメージング機器の3つが揃って初めて1つのシステムとして完成する。そのために、どれか一つが欠けている状態で開発を進めても発光イメージングシステムの実現には至らない。そのために、企業や研究所はこのシステムの開発に着手できない状態である。

本論文では、中大型動物の発光イメージングシステムの実現を目的に研究を行った。第2章では、当研究室で開発した赤色イメージング材料が、中大型動物で実用可能かを明らかにするため、ブタの骨格筋を用いたモデル実験を行い、材料の有用性を評価した。第3章、第4章では既存の材料を改変し、イメージングに最適化された材料を開発すべく、発光材料の構造活性相関を明らかにした。第3章では長波長化材料の開発を目指した。オレフィン伸長とは異なる長波長化の手法としてD-ルシフェリン(1a)にアリル基の導入により長波長化を生じることを確認し、これより、各種ルシフェリンアナログにアリル基を導入し、その汎用性を確かめた。第4章では反応中間体であるAMP化体を発光させることで輝度の向上が起きるため、この反応中間体の構造を改変することで、発光中間体アナログの構造活性相関を明らかにした。

第2章 大型動物発光イメージング実験

2.1. 大型動物発光イメージングの障壁

大型動物での発光イメージングを実現するためには、発光材料、実験動物、イメージング機器の3つが揃う必要がある。その中でも、前述したように大型動物で使用できるとされている材料が現状存在しないことが大型動物発光イメージングの実現の一つの大きな障壁となっている。生物発光イメージングを応用するためには遺伝子改変をした大型動物や、その大型動物を入れることができるイメージング機器が必要となるが、イメージングが可能であることがわからない限りそれらを準備することはできない。したがって、大型動物の発光イメージングの例を示さない限り大型動物の発光イメージングを実現することは困難である。

そこで本研究では、TokeOni (36)を用いて、この材料でどの程度の発光イメージングモデル実験より大型動物での発光イメージングの可能性を示し、大型動物 *in vivo* 発光イメージングシステムの開発を促進することを目的とした。

2.2. 大型動物モデル実験

はじめに、どれほどの生体内組織を透過可能か、市販の豚肉(ブタの骨格筋)を使用してモデル実験を行った。1.5.1 においてもバイオモデルフィルターを用いた透過性の検証実験を行っているが、本章の実験とは目的が大きく異なる。1.5.1 では発光測定用の装置(ATTO 社製ルミノメーター AB-2270)を用い、1 cm のバイオモデルフィルターを用いて赤色発光材料(AkaLumine(15a)やTokeOni (36))の透過性が D-ルシフェリン(1a)と比較してどの程度高いのかを検証した。本章では実際に動物の発光イメージングに使う装置を用いて、1.5.1 で証明された透過性の高い発光物質を用いて、生体組織(ブタの骨格筋)を透過した光が実際に観測できることを明らかにするために行った。D-ルシフェリン(1a)よりも赤色発光材料のほうが生体内で有用なことはマウスの実験からすでに証明されているが、大型動物に匹敵する生体組織を透過した実験例は未だにない。そのため大型動物モデル実験によって生体組織の透過性を明らかにすることで大型動物の発光イメージングの実現を目指した。

大型動物モデル実験には市販の豚肉を使用した。豚肉にはミオグロビン、ヘモグロビン、シクロロム c のヘム色素が含まれており、いずれもホタルの発光波長(560 nm)付近に吸収ピークを示す(2.2a)⁴³。豚肉は部位によって色の違いがあるが、この主な要因としては骨格筋のミオグロビン含量であり、活動量の多い筋肉はミオグロビン含量が多く赤色をしており、一方活動量の少ない筋肉はミオグロビン含量が少なく赤色が薄い。使用した筋肉は、市販されている食肉のロース肉とヒレ肉である。ロース肉は背中筋の筋肉でミオグロビン含量の少ない白色骨格筋であり、ヒレ肉は背中よりも腹部に近い位置にあるミオグロビン含量の多い赤色骨格筋である。本研究では骨格筋の色の違い(ヘム色素の含有量の違い)による透過性の違いについても評価した。

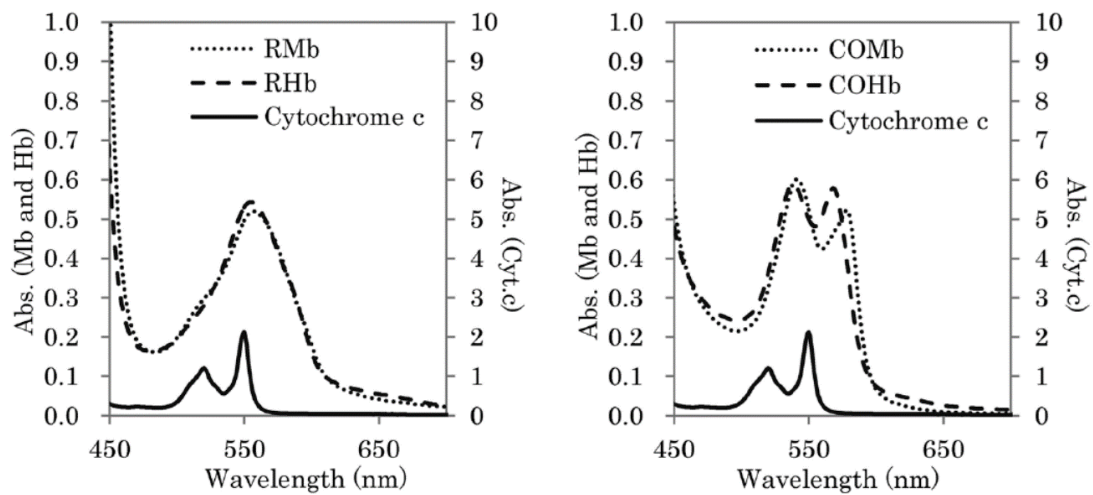


Fig. 2.2a. ヘム色素の吸収スペクトル(ミオグロビン(Mb)、ヘモグロビン(Hb)、シトクロム c)⁴³
 (左)還元型ヘム色素の吸収スペクトル(右)CO 誘導体ヘム色素の吸収スペクトル

イメージング装置は BURKER 社製の「Xtreme」を用いた (Fig. 2.2b)。この装置は大型動物用のイメージング装置ではないが複数匹のマウスを並べて観察するために中大型動物でも入る大きさ (約 30 cm) の検出器を有している。発光材料として D-ルシフェリン (1a) と TokeOni (36) を、酵素は北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) を用いた。

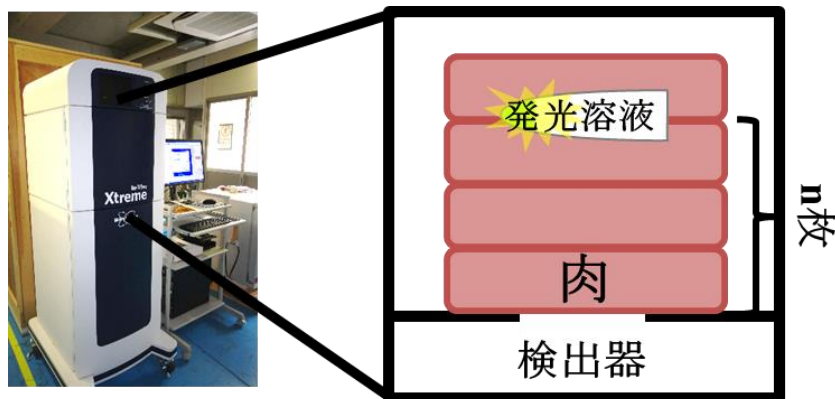


Fig. 2.2b. 左:イメージング装置「Xtream」 右:測定の模式図

この測定装置は底面に検出器があるために、測定する骨格筋を積み上げ、その上にチューブに入れた発光溶液を設置、その上から光の漏れを防ぐ目的で上にも厚さ 1 cm 骨格筋をかぶせて測定を行った (Fig.2.2c)。



Fig. 2.2c. 実際の測定の様子(底面に検出器)

2.2.1. 白身肉の透過実験(高輝度条件)

ミオグロビン含量の少ない白色骨格筋を用いた実験を行った(Fig. 2.2c)。はじめにどの程度の感度で検出できるのかを確認するために、D-ルシフェリン(1a)を目視できる明るさで発光させる条件で調整した。基質を pH8 50 mM Tris-HCl 緩衝液で溶解し、酵素濃度 1 mg/mL の条件で測定を行った(Fig. 2.2.1)。

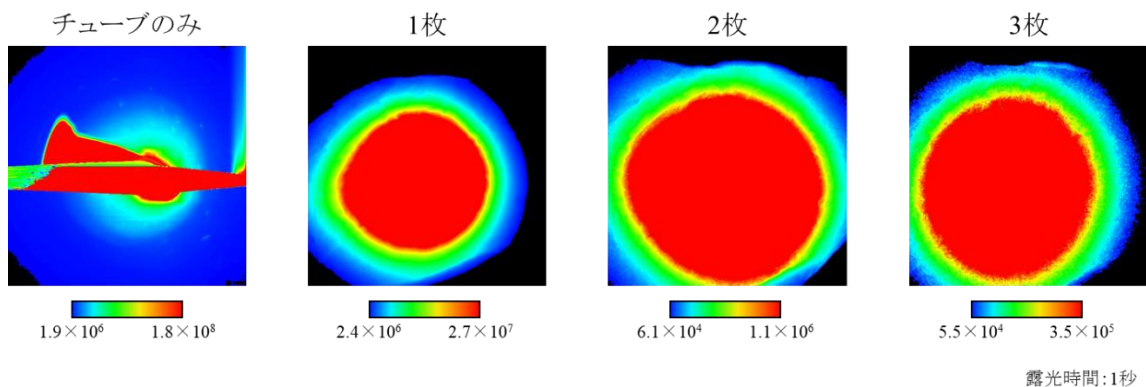


Fig 2.2.1. 白色骨格筋の透過実験(D-ルシフェリン(1a)高輝度条件)

目視できるほどの発光強度であり、白色骨格筋厚 3 cm も十分に透過した。しかしながら、白色骨格筋厚が 1 cm 増えるごとに最大強度が 1/5~1/10 程度低下していた。吸収と散乱の影響を強く受けているものと考えられる。D-ルシフェリンの場合、白色骨格筋厚 1 cm につき約 80~90%減衰することが明らかとなった。

実際に生体内でこれほどの輝度で発光することはないと考えられるが、十分な検出能があることが明らかとなったため、次に実際のイメージング実験に近い条件で測定を行った。

2.2.2. 白色骨格筋の透過実験(D-ルシフェリンと TokeOni (36))

通常生体内に投与する際はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が用いられる。そのため、D-ルシフェリンを PBS に、TokeOni (36)を純水(AkaLumine (15)の塩酸塩のため、緩衝液に溶解すると溶解度が低くなってしま)に溶解し、酵素濃度を 100 µg/mL の条件で測定を行った(Fig2.2.2)。

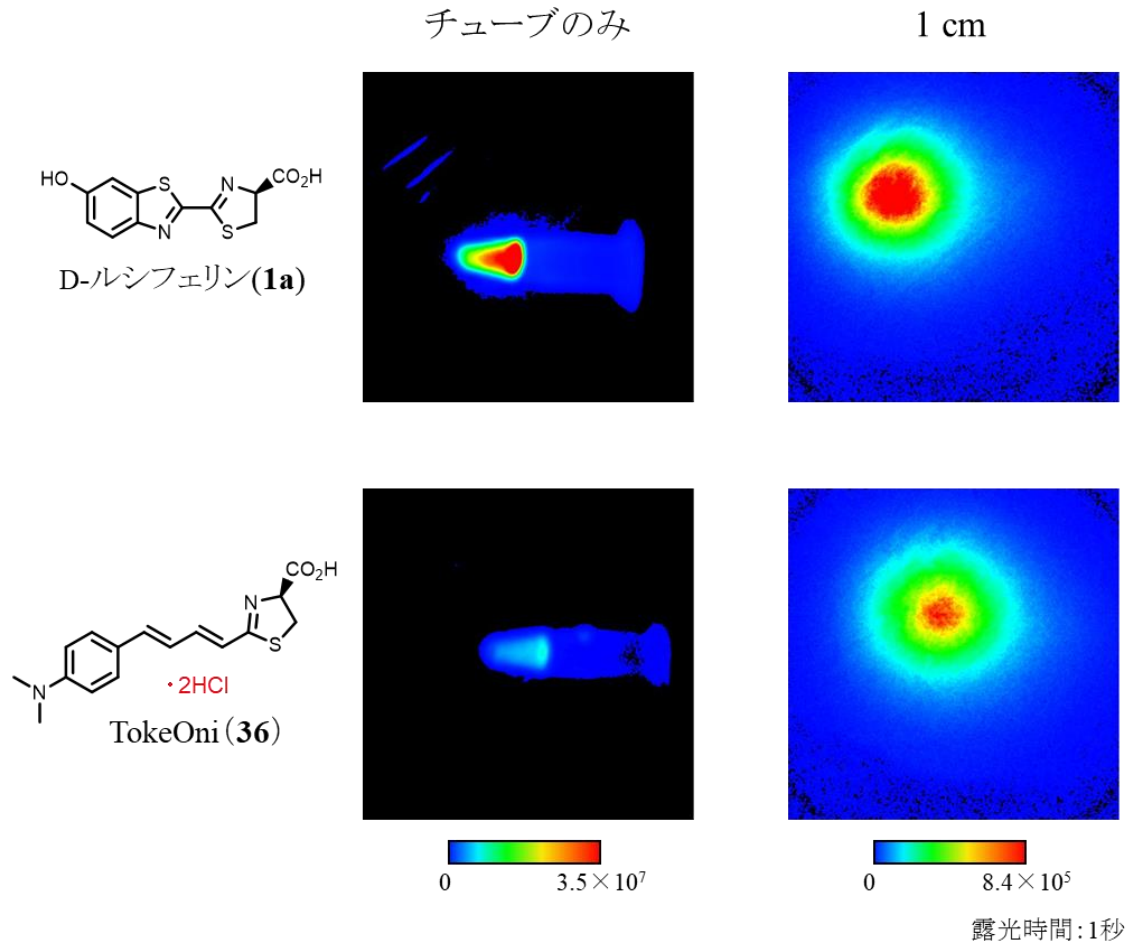


Fig. 2.2.2. 白色骨格筋の透過実験

チューブのみだと TokeOni (36)と比較して D-ルシフェリン (1a)のほうが 6 倍ほど輝度が高いが、同じ発光条件で 1 cm の白色骨格筋を挟むことで発光強度の値は D-ルシフェリン (1a)が 1.2 倍程度となりほぼ同じ値を示した。これは発光色による生体内物質の吸収の影響が大きいと考えられる。

2.2.3. 赤色骨格筋の透過実験

モデル実験では血液がない状態で測定をおこなっているため、実際の生体内よりも透過性が高くなっていると考えられる。そのため、ミオグロビン含量の少ない白色骨格筋よりも実際の生体内の条件に近づけるために、ミオグロビン含量の多い赤色骨格筋での実験も行った(Fig. 2.2.3a)。測定条件は同様に D-ルシフェリン (1a)は PBS 溶液を、TokeOni (36)は純水溶液を用い、酵素濃度

100 μ g/mL で測定を行った。

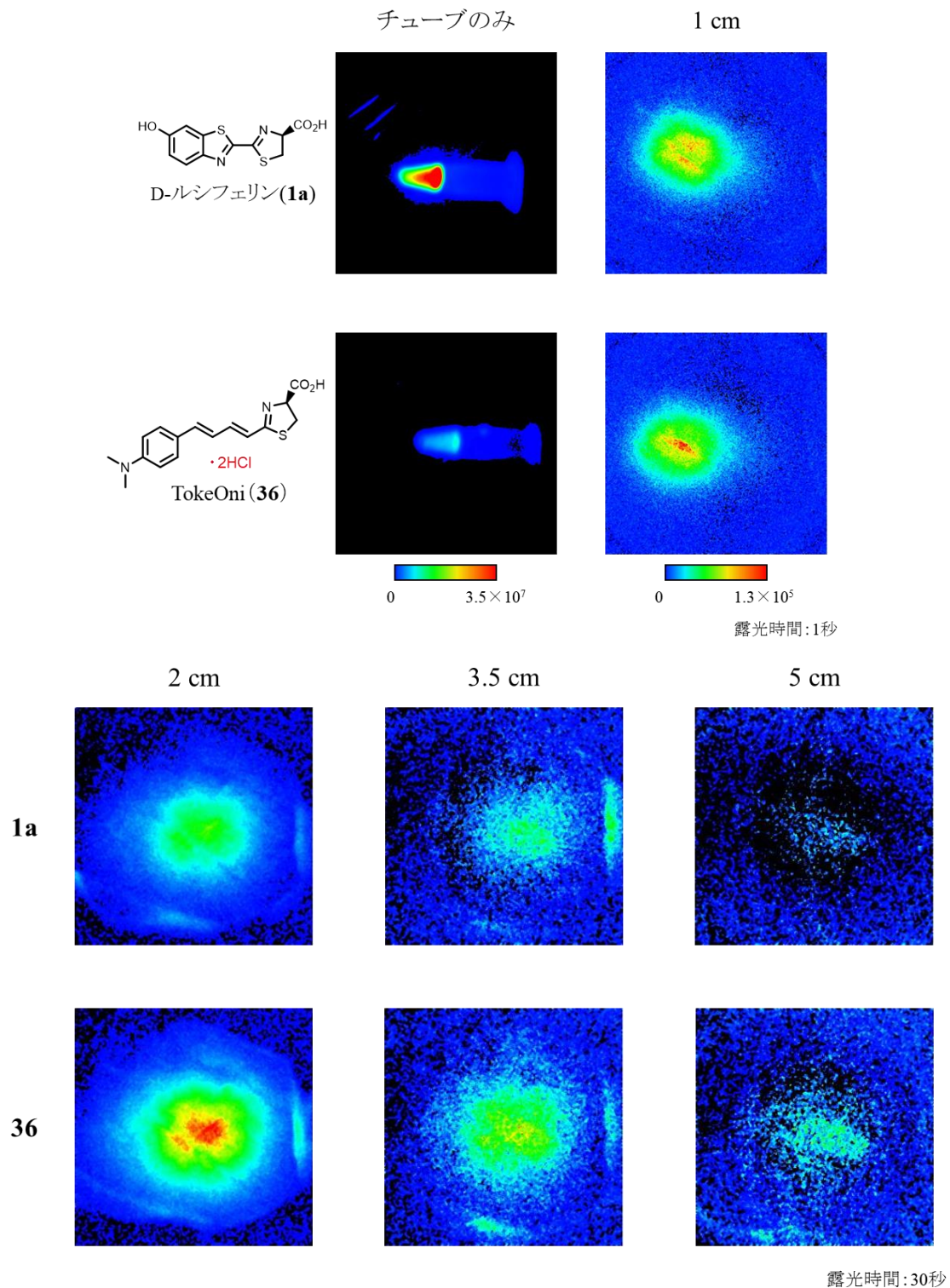


Fig. 2.2.3a. 赤色骨格筋の透過実験

赤色骨格筋を 1 cm 透過させることで D-ルシフェリン(1a)と TokeOni(36)の発光強度はほぼ同等になっていた。また、TokeOni(36)のほうが D-ルシフェリン(1a)よりもチューブの形がくっきりと観察できているのは、赤色発光のほうが散乱の影響を受けにくいためだと考えられる。赤色骨格筋の場合

合、D-ルシフェリン(1a)に関しては骨格筋の厚みが 1 cm 増えるだけで 2 桁ほど最大強度が減衰していることから、D-ルシフェリン(1a)の波長帯(560 nm)では生体内物質による吸収が白色骨格筋よりも大きくなっていることが伺えた。

2 cm 以上の赤色骨格筋の厚みでは、露光時間 1 秒では観測が困難であったため、露光時間を 30 秒に伸ばして測定を行った。2 cm だと TokeOni(36)のほうが D-ルシフェリンよりも発光強度は 2 倍程度強く検出された。3.5 cm だと TokeOni(36)のほうが 3~4 倍ほど高い強度を示しており、5 cm になると D-ルシフェリン(1a)ではほぼ観測不可能であったが、TokeOni(36)では検出可能な発光量を示しており、チューブの形も確認できている。このときの測定状況を Fig. 2.2.3b に示した。

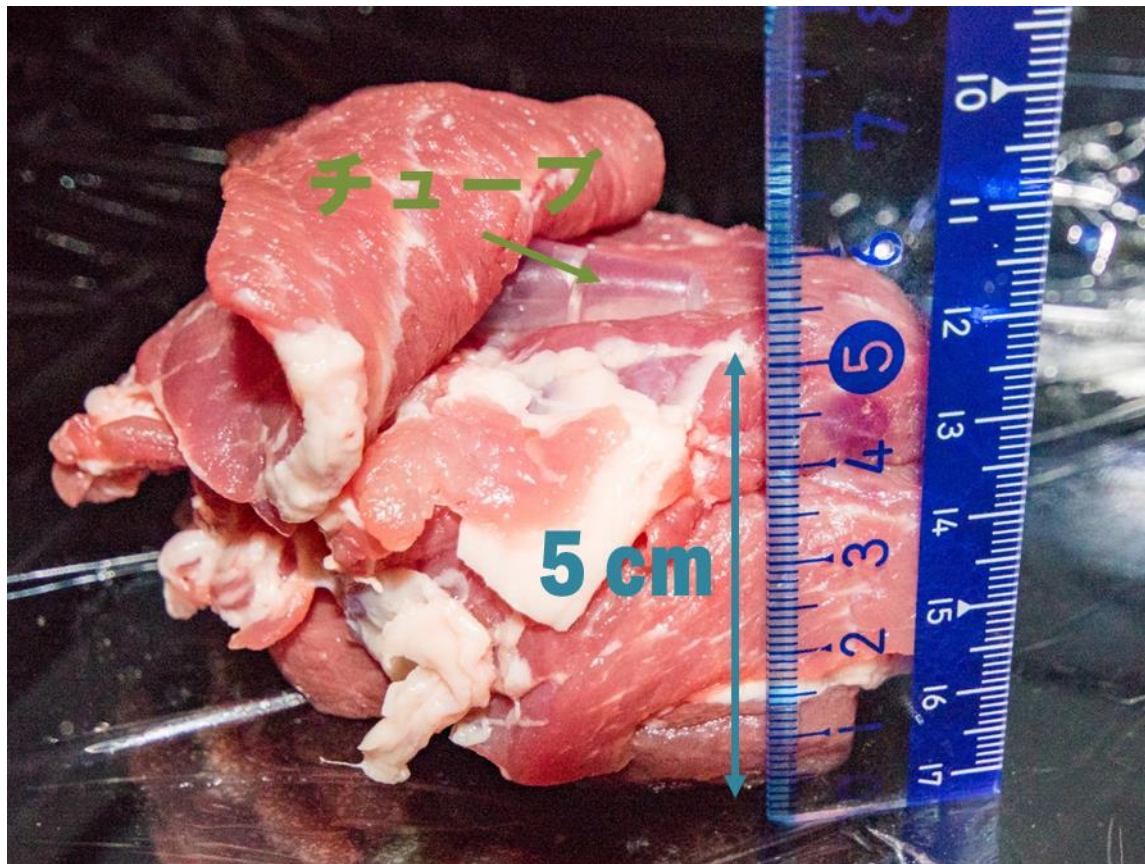


Fig. 2.2.3b. 赤色骨格筋での測定状況

このように赤色発光材料 TokeOni(36)のほうが生体内深部観察に有利なことが確認でき、ミオグロビン含量の多い赤色骨格筋の場合でも、5 cm もの厚さの生体組織を透過させることが可能であることが明らかとなった。これは市販の豚肉を用いて大型動物モデル実験として行っており、血液のない環境での観察となっているため、実際の生体内の環境では更に赤色発光のほうが有利になるものと考えられる。

血流の有無など、実際の環境とは異なるため、生体内にて 5 cm もの光透過性があるとは限らないが、大型動物で使用できる可能性は十分に考えられた。

2.3. 中大型動物 *in vivo* 発光イメージングの実現

大型動物モデル発光イメージングの実験にて、大型動物での発光イメージング実験の可能性が示唆されたことは非常に大きな影響を与えた。前述した通り、大型動物発光イメージング開発の障壁は、実例がないことであった。大型モデル動物実験ではあくまでも生体組織のモデルとして市販の食肉を用いたため血液もない状態ではあるが、TokeOni (36)を用いて実験を行えば5 cmの肉を透過させることができるという結果は、大型動物発光イメージングの可能性を十分に示唆することができたであろう。しかしながら、実際に生体内で発光させることができるかどうかは未だに明らかではない。マウスでは発光をさせることが可能であるが、他の動物では発光をしない可能性や、基質の体内動態が変わり特定の部位まで到達しない可能性など様々な問題が考えられる。それを払拭するためには実際に大型動物での発光イメージングを行うことが必要とされることから、マイクロミニピッグを用いた *in vivo* イメージング実験を行った。

2.3.1. マイクロミニピッグの *in vivo* 発光イメージング

マイクロミニピッグを使用してイメージング実験を行った。マウスのように遺伝子改変によってルシフェラーゼを持つブタは現状存在していないため、ルシフェラーゼを発現させたヒト子宮頸がん (HeLa) 細胞をブタの腹部に注射することで移植を行った。深さは体表から約5 mm程度である。その後 TokeOni (36)を血中に投与し、BERTHOLD 社製のイメージング機器「NightSHADE LB985」を用い測定を行った (Fig. 2.3.1) (データ提供: 口丸高弘先生)。

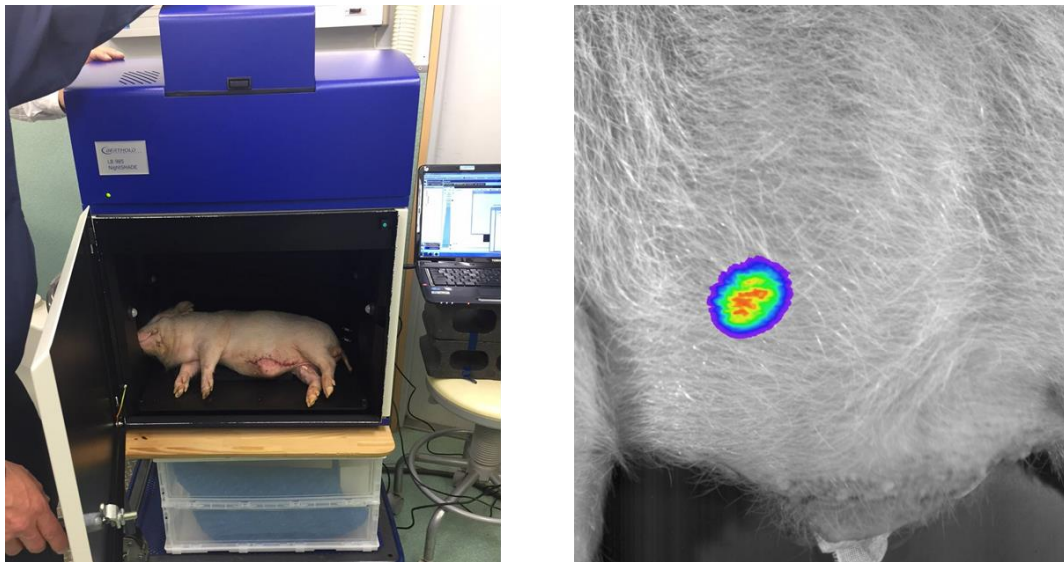


Fig. 2.3. 左: 測定機器に横たわるブタ 右: 腹部から観測された発光

投与から15分後、マイクロミニピッグの腹部から発光を確認した。この発光は深さ約5 mmとまだ浅い部位からの発光であるが、TokeOni (36)を使用してマイクロミニピッグでも発光イメージングが可能だと判明したことは非常に有益であった。

2.3.2. 特化酵素を用いたマイクロミニピッグの *in vivo* 発光イメージング

序論で述べたように、TokeOni (36) に特化した発光酵素 Akaluc が遺伝子改変により作られており、非常に優れた発光能をもつ AkaBLI という発光システムが開発されている。当時は AkaLuc はまだ未公開技術であったが、本挑戦では、この発光システム AkaBLI を用いてマイクロミニピッグの *in vivo* 発光イメージングを行った。

AkaLuc を発現させた HeLa 細胞をマイクロミニピッグの肝臓に注射し移植を行った。その際、正確に肝臓に移植できていることを確認するため、開腹した状態で HeLa 細胞の注射を肝臓に正確に行い、その後縫合した状態で測定を行った(腹部の縫合痕はそのためできたものである)。この位置が体表から 0.5~1 cm の深さである。その後 TokeOni (36) を投与し PerkinElmer 社製のイメージング機器「IVIS」で測定を行った(Fig. 2.3.2)。

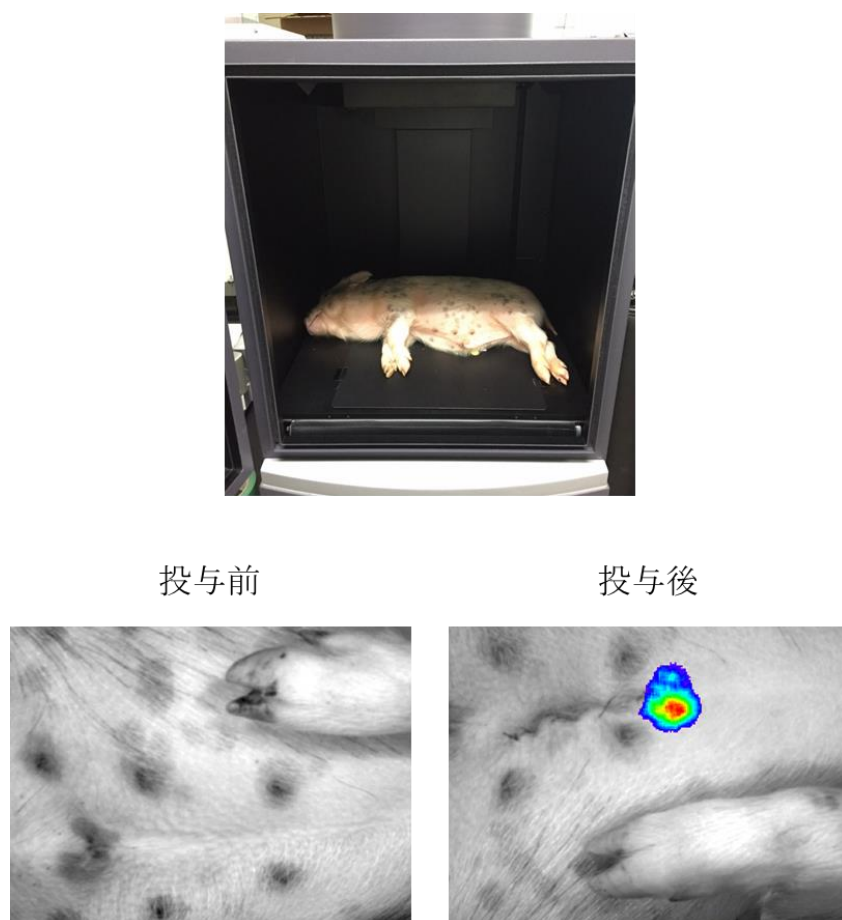


Fig. 2.3.2. 上:測定装置に横たわるブタ

左下:TokeOni (36) 投与前の腹部 右下:TokeOni (36) 投与後の腹部

Aka-BLI のシステムを用いても北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) を用いたとき同様、マイクロミニピッグの体内からの発光の観測は可能であった。このときの発光の深さは 0.5~1 cm ほどであった。この発光システムは Ppy と TokeOni (36) を用いた発光システムと比較しても十分に強い発光強度を示すため、更に深部の発光も観察可能であると考えられる。また、この実験では確実に肝臓に

HeLa 細胞を移植しているため、実際に観察された発光は肝臓の細胞から放たれた発光である。マイクロミニピッグの肝臓が発光イメージングできるという結果はライフサイエンス研究において非常に重要な結果であり、本研究では直接肝臓にルシフェラーゼを持つ細胞を移植した簡易的な実験であったが、実際に免疫不全の遺伝子改変マイクロミニピッグを用いた、ルシフェラーゼをもつ肝臓細胞の発光イメージングが行われる足がかりになったと言えるだろう。

2.4. まとめ

本章での大型動物モデル発光イメージング実験は、大型動物に匹敵する生体組織を透過した発光イメージングの実例を示した点で有益である。大型動物モデルイメージング実験をもとに、マイクロミニピッグを用いた中大型動物イメージング実験につながり、更に大型動物での発光イメージングが実現した。これにより、大型動物での発光イメージング研究が発展し、遺伝子改変による *in vivo* 発光イメージング用の大型実験動物の開発や、大型動物に最適化されたイメージング機器の開発が進むことで、大型動物の発光イメージングが更に発展するであろう。

第3章 ホタルルシフェリンのアリル基の導入による波長制御

前章では、赤色発光材料(AkaLumine(15a)と TokeOni(36))が、大型動物でのイメージングに実用可能な材料であるかを評価してきた。赤色発光材料は大型動物で用いるに十分な生体組織の透過性をもつことを明らかとし、中大型動物での *in vivo* イメージングの実例を示した。

しかしながら、これらの材料は既存の材料の中では最適な材料であるが、さらに機能を改善することで、イメージングに最適化を図ることができるであろう。AkaLumine(15a)と TokeOni(36)の発光波長は生体透過性の高いと言われている「生体の窓」領域(650-900 nm)の入り口である。さらに長波長化をすることで生体透過性が高まる可能性も十分に考えられる。

そこで本章では、波長の改変を中心に、発光活性の構造活性相関を得ることを目的とし研究を行った。

3.1. 波長制御を可能とするルシフェリンアナログの分子設計

当研究室で得られている構造活性相関研究により、長波長化の方法が明らかとなってきた⁴⁴。ヒドロキシ基をジメチルアミノ基に置換することで約 40 nm の長波長化、ベンゼン環とチアゾリン環の間にオレフィンを導入することにより約 100 nm の長波長化、ベンゼン環をナフタレン環にすることによって約 30nm の長波長化が起きる(Fig. 3.1)⁴⁵。これらの指標に基づいてルシフェリンアナログ 15a やルシフェリンアナログ 38a など赤色発光ルシフェリンアナログが合成されてきた。

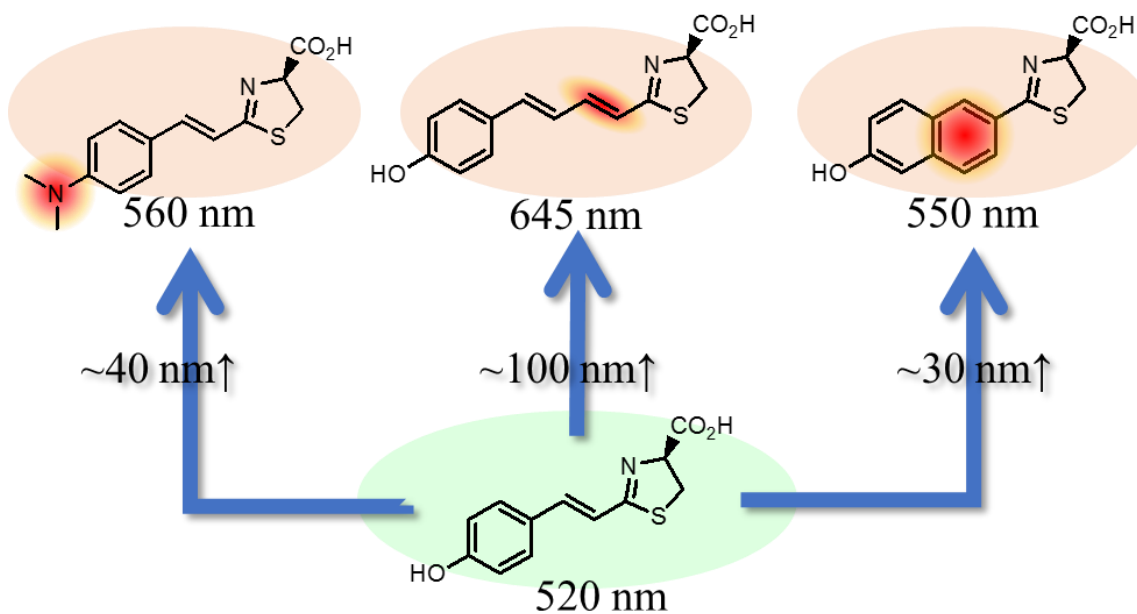


Fig. 3.1. 長波長化の指標

ルシフェリンアナログ 15a にさらにオレフィンを伸長した例もあるが、発光波長は長波長化せず、逆に短波長化する結果となった(2015 大塚智史 電気通信大学卒業論文 Unpublished data)。この

ようにルシフェリン骨格そのものを改変することで波長を改変することも可能であるが、必須部位の改変によって発光活性の失活の恐れもある。ベンゾチアゾール環のヒドロキシ基の位置を 4,5,7 位に変えることで発光活性が失われてしまうことも知られている⁴⁶。構造の改変を最小限に抑えるため、ルシフェリン骨格をそのまま用い、ベンゾチアゾールの 4,5,7 位にハロゲンやアルキル基等の官能基を導入し構造活性相関を得た例もある^{47,48,49}。それぞれ波長の変化が見られたが、中でも 7 位にアシル基を導入したルシフェリンアナログ **1b** では 40 nm の長波長化が見られた⁵⁰。

この長波長化の効果は天然の D-ルシフェリンのみで確認されており、他のアナログでの活性は未知である。そこで、各種アナログの 7 位相当部位にアシル基を導入し発光活性を得るとともに赤色発光ルシフェリンアナログの合成を目指した。

3.2. アリル基導入型ルシフェリンの合成

アリル基を導入するアナログとして Fig. 3.2 の 4 つのアナログ (**1a**, **14-38a**) を選択した。ジメチルアミノベンゼン骨格を持ちオレフィンが 1 つのルシフェリンアナログ **14a**、オレフィンが 2 つのルシフェリンアナログ **15a**、また、ナフトール骨格を持ちオレフィンを持たないルシフェリンアナログ **37a** と、オレフィンが 1 つのルシフェリンアナログ **38a** の 4 つである。それぞれにアリル基を導入したアリルルシフェリンアナログ (**1b**, **14-38b**) に関してアリル基による発光活性の変化について評価を行った。これらのアリルルシフェリンアナログ (**14-38b**) は以下に示す手順で合成した。

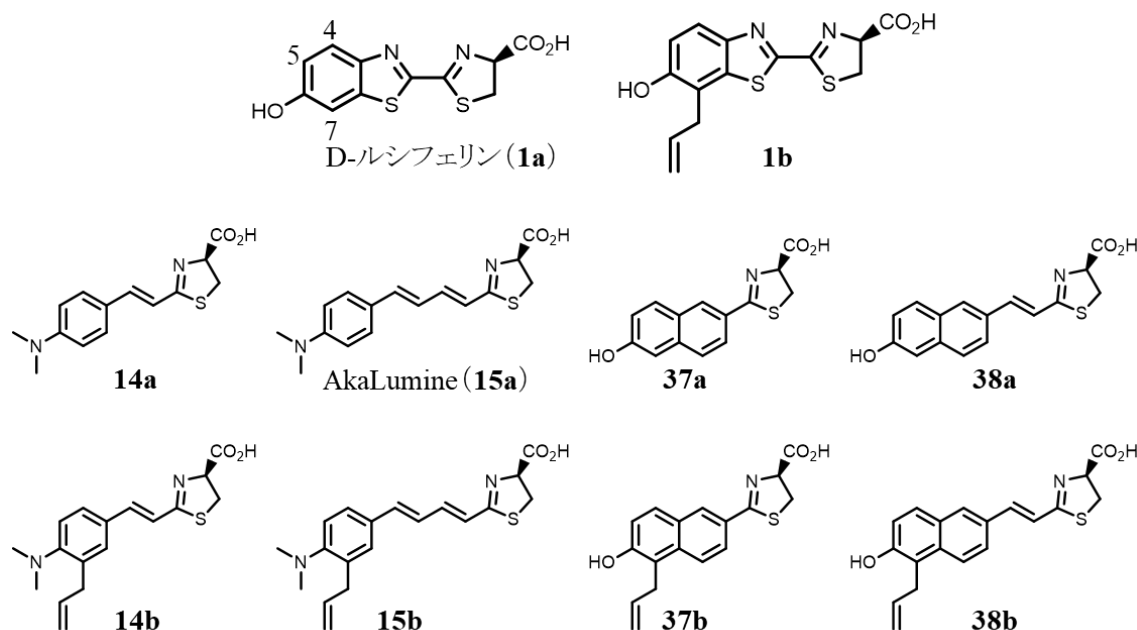
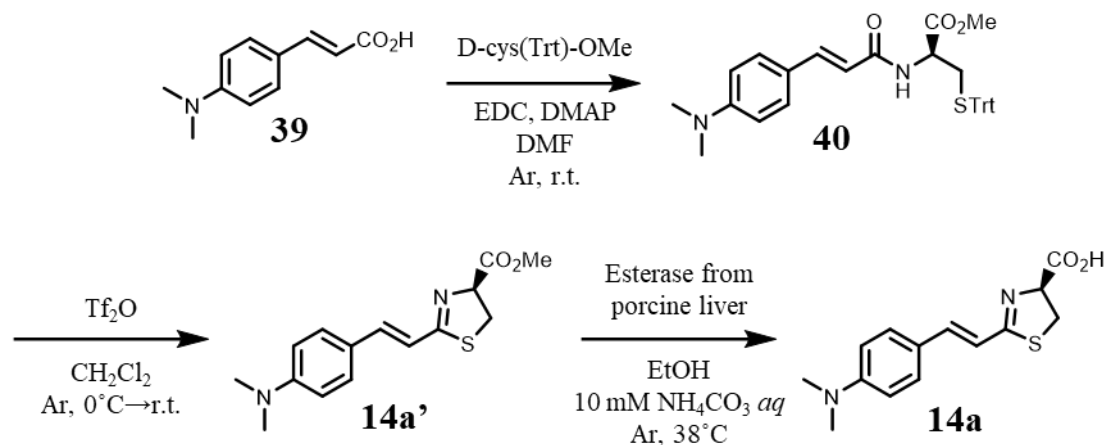


Fig. 3.2. 各種ルシフェリンアナログ (**1a**, **14-38a**) とアリルルシフェリンアナログ (**1b**, **14-38b**)

3.2.1. ルシフェリンアナログ **14a** の合成

4-ジメチルアミノカハル皮酸 (**39**) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) と縮合させ、アミド体 **40** を合成し、これをトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) によって環化させるこ

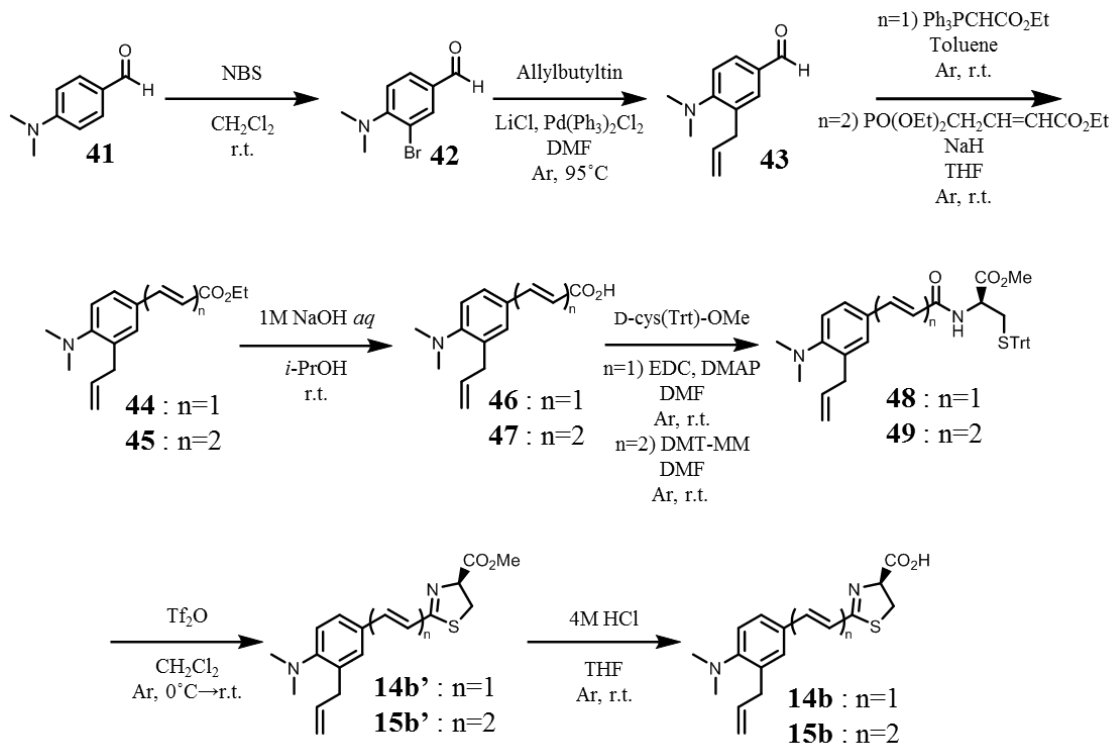
とでチアゾリンメチルエステル体 **14a'**を得た。これをブタ肝臓エステラーゼで加水分解することでルシフェリンアナログ **14a** を合成した。



Scheme 3.2.1 ルシフェリンアナログ **14a** の合成スキーム

3.2.2. ルシフェリンアナログ **14b**、**15b** の合成

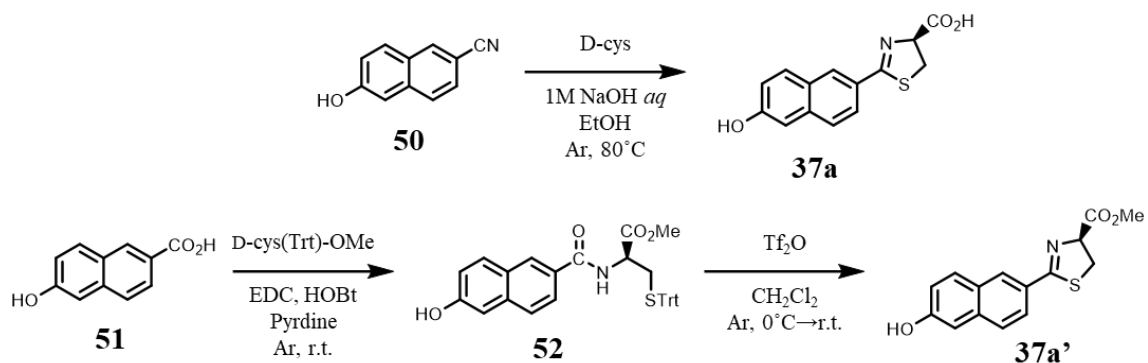
ルシフェリンアナログ **14b**、**15b** の合成法は類似している。原料はどちらも 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド(**41**)を用い、これを N-ブロモスクシンイミドによってプロモ化しプロモ体 **42** を得た。これにパラジウム触媒下でアリルトリブチルすずを用い Stille カップリングによってアリル基を導入しアリル化体 **43** を得た。ルシフェリンアナログ **14b** では Wittig 試薬を用い 2 炭素の増炭をしエステル体 **44** を、ルシフェリンアナログ **15b** ではリン酸ジエステル (PO(OEt)₂CH₂CH=CHCO₂Et)を用い、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって 4 炭素の増炭をしエステル体 **45** を得た。これらを加水分解することでカルボン酸体 **46**、**47** を合成し、ルシフェリンアナログ **14a** と同様に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) と縮合させ、アミド体 **48**、**49** を合成し、これをトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) によって環を巻くことでチアゾリンメチルエステル体 **14b'**、**15b'** を得た。これを塩酸で加水分解することでアリルルシフェリンアナログ **14b**、**15b** を合成した。



Scheme 3.2.2 ルシフェリンアナログ **14b**、**15b** の合成スキーム

3.2.3. ルシフェリンアナログ **37a** の合成

6-ヒドロキシ-2-ナフトニトリル (**50**)に D-システインを用い、チアゾリン環を形成することでアリルルシフェリン誘導体 **17a** を合成した。また、チアゾリンメチルエステル体合成のため、6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (**51**)に D-cys(Trt)-OMe と縮合させ、Tf₂O で環巻を行うことでチアゾリンメチルエステル体 **37a'**を得た。

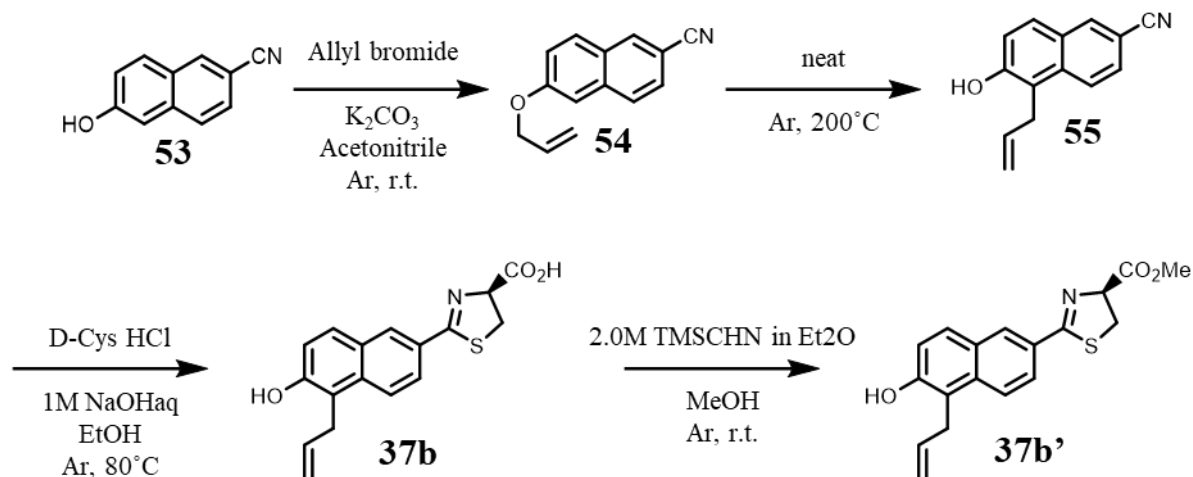


Scheme 3.2.3. ルシフェリンアナログ **37a** の合成スキーム

3.2.4. ルシフェリンアナログ **37b** の合成

6-ヒドロキシ-2-ナフトニトリル (**53**)に臭化アリルを作用させ、アリルエーテル体 **54** を合成し、これを

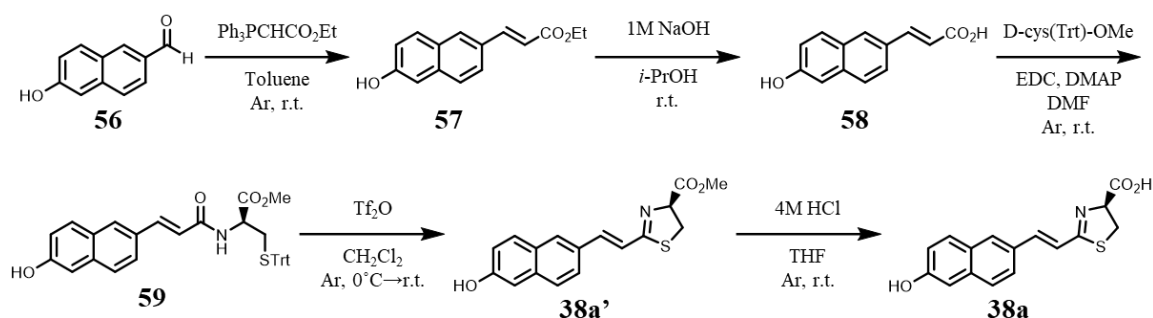
クライゼン転位によりナフタレン環の5位に選択的にアリル基を導入し、アリル体 **55** を合成した。D-システインを用い、チアゾリン環を形成することでアリルルシフェリンアナログ (**37b**) を合成した。またメチルエステル体合成のため、アリルルシフェリンアナログにトリメチルシリルジアゾメタンのジエチルエーテル溶媒を用い、メチル化させることでチアゾリンメチルエステル体 **37b'** を得た。



Scheme 3.2.4. ルシフェリンアナログ **37b** の合成スキーム

3.2.5. ルシフェリンアナログ **38a** の合成

6-ヒドロキシ-2-ナフトアルデヒド (**56**) に Wittig 試薬を作用させることで2炭素増炭したエステル体 **57** を得て、これを加水分解することでカルボン酸体 **58** を合成した。これに S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) との縮合、 TiF_2O によるチアゾリン環の形成をおこないチアゾリンメチルエステル体 **38a'** を得た。これを加水分解することでアリルルシフェリンアナログ (**38a**) を合成した。

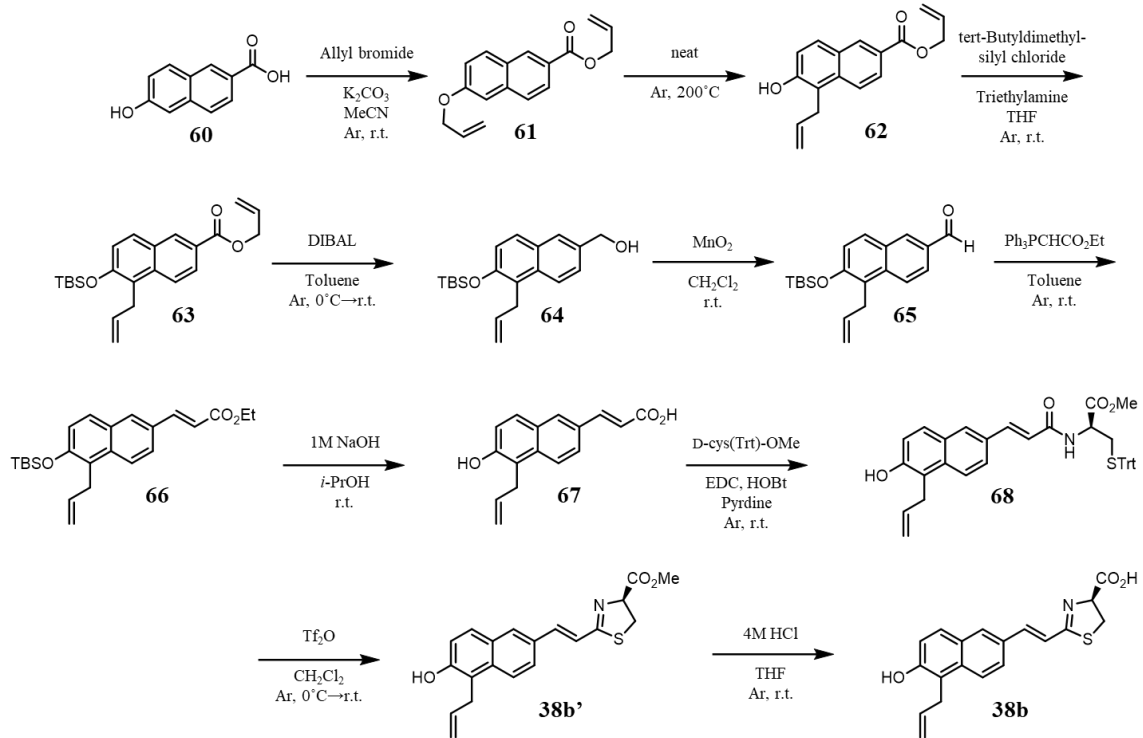


Scheme 3.2.5. ルシフェリンアナログ **38a** の合成スキーム

3.2.6. ルシフェリンアナログ **38b** の合成

6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (**60**) に臭化アリルを作用させアリルエーテル体 **61** を合成し、これをクライゼン転位によりナフタレン環の5位に選択的にアリル基を導入しアリル体 **62** を合成した。ヒドロキシ

シ基を *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) によって保護し、DIBAL 還元によってアルコール体 **64** に還元し、酸化マンガンによって酸化することによりアルデヒド体 **65** を得た。Wittig 試薬を作用させることで 2 炭素増炭したエステル体 **66** を得て、これを加水分解することでカルボン酸体 **67** を合成した。ルシフェリンアナログ **38a** 同様、S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) との縮合、Tf₂O によるチアゾリン環の形成をおこないチアゾリンメチルエステル体 **38b'** を得た。これを加水分解することでアリルルシフェリンアナログ **38b** を合成した。



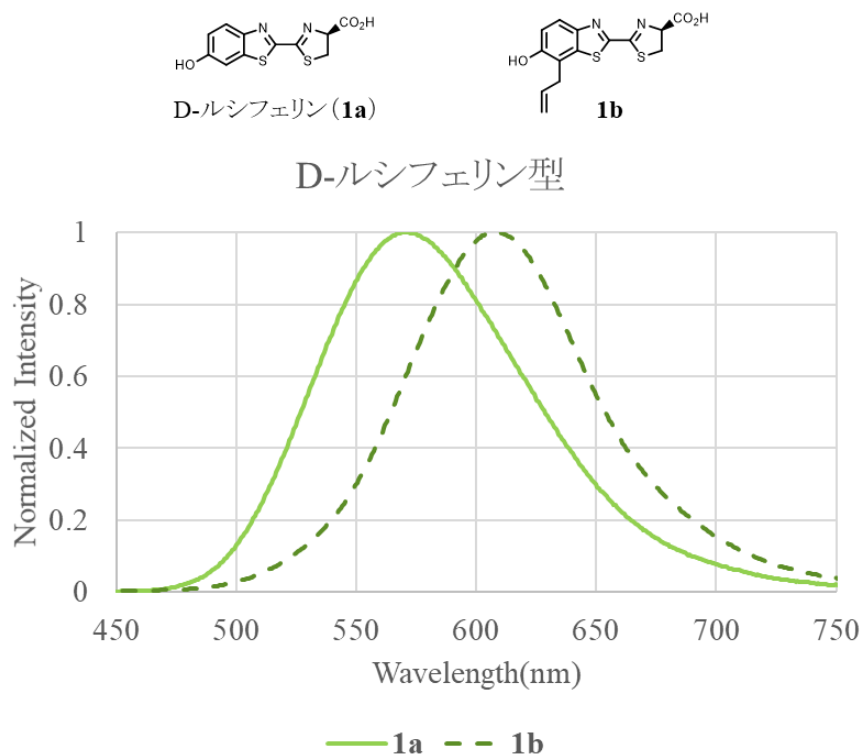
Scheme 3.2.6. ルシフェリンアナログ **38b** の合成スキーム

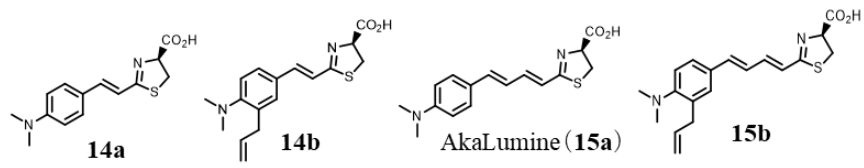
3.3. アリル基導入型ルシフェリンの発光特性

アリル基導入による発光特性変化を評価するために、生物発光、化学発光を測定し、それぞれの発光活性を評価した。生物発光測定には、いずれのルシフェリンアナログの測定にも、ホタルの発光実験に一般的に用いられる北米産ホタル (*Photinus pyralis*, *Ppy*) の持つ発光酵素ルシフェラーゼ (*Ppy*) を用いて測定を行った。

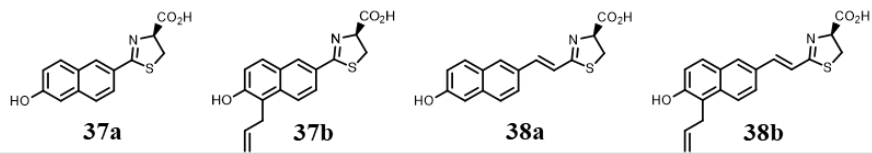
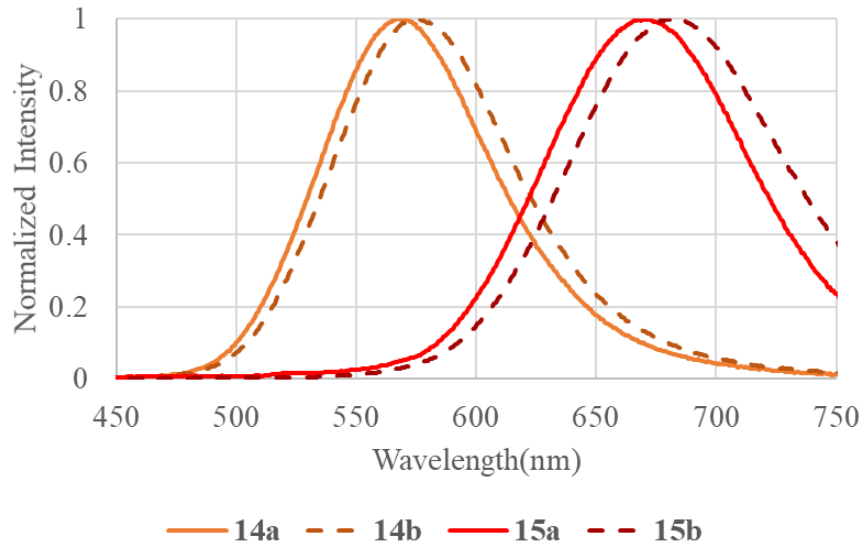
3.3.1 生物発光波長の測定

ルシフェリンアナログ **1a**, **14-38a** とアリルルシフェリンアナログ **1b**, **14-38b** について北米産ホタルルシフェラーゼ (*Ppy*) を用いて pH8.0 リン酸カリウム緩衝液 (KPB) 中、ATP-Mg 存在下にて発光測定を行った。発光測定には ATTO 社製のスペクトロメーター AB-1850 を使用し、10 分間の積算で測定した。各種アナログの発光波長は Fig. 3.3.1 のようになった。





ジメチルアミノ型



ナフトール型

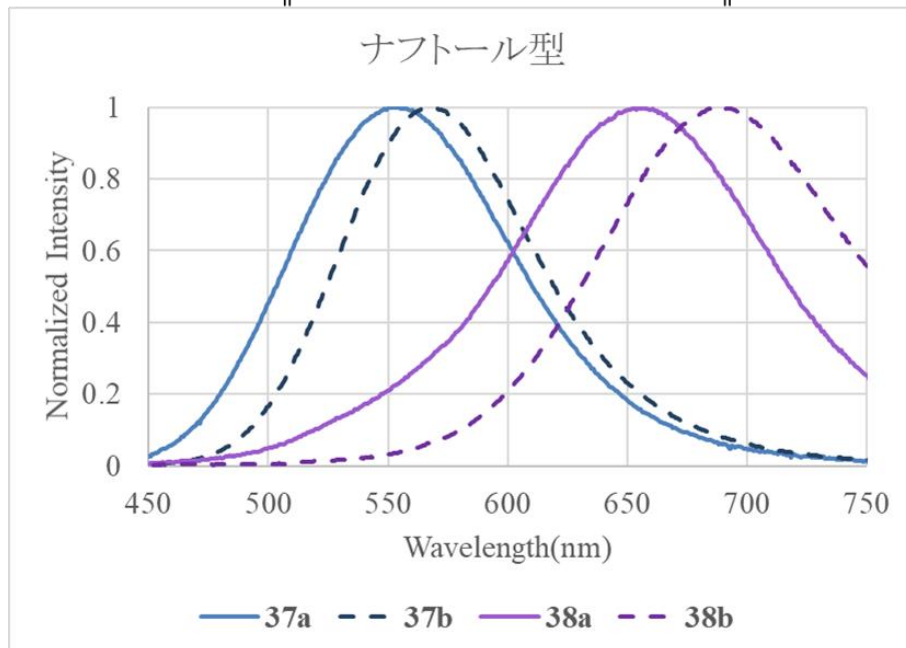


Fig. 3.3.1. 各アナログの生物発光波長

ジメチルアミノ型のアリル基の導入されたルシフェリンアナログ **14b**, **15b** はそれぞれ 580 nm と 685 nm の波長を示し、アリル基の導入されていないルシフェリンアナログ **14a**, **15a** の 570 nm、670 nm と比較して 10~15 nm の長波長化を示した。D-ルシフェリン (**1a**) とルシフェリンアナログアナログ **1b** ではアリル基の導入によって 40 nm 波長変化をしているため、それと比較すると短いものの、アリル基の導入により長波長化が確認された。同様に、アリル基の導入されたナフトール型のオレフィンのないルシフェリンアナログ **37b** は 570 nm の発光波長を示し、アリル基の導入されていないルシフェリンアナログ **37a** と比較して 20 nm の長波長化を示した。また、アリル基の導入されたナフトール型のオレフィンを持つルシフェリンアナログ **38b** は 690 nm の波長を示し、アリル基の導入されていないルシフェリンアナログ **38a** に比べ 35 nm もの大きな長波長化を示した。これはルシフェリンアナログ **1b** と近い波長変化を示している。ルシフェリンアナログ **15b** と **38b** に関してはそれぞれ 685 nm と 690 nm の近赤外発光を示し 700 nm 近い発光波長を実現することができた。

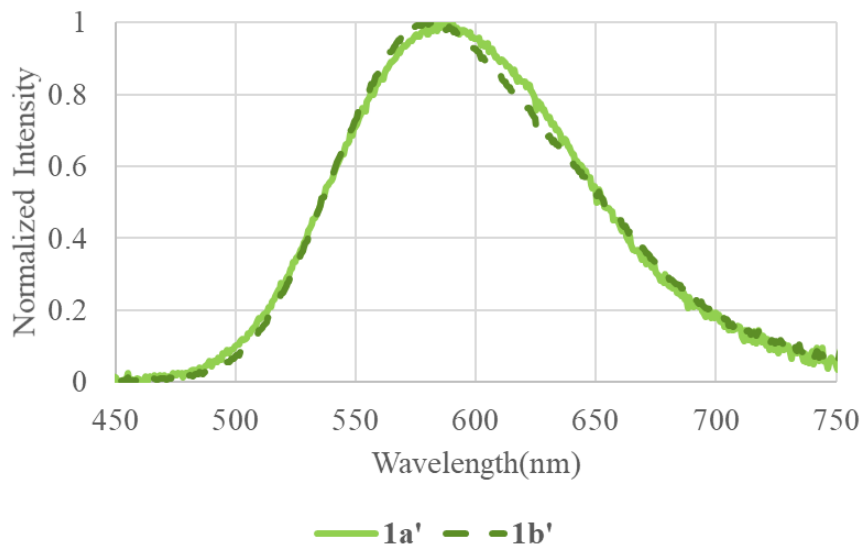
いずれのルシフェリンアナログでも長波長化を示すことは確認されたが、アリル基の効果は基質によって大きく異なり、同様の波長変化を示さないことが明らかとなった。この発光波長変化の原因として、アリル基の導入による基質自体のエネルギー状態の変化や、酵素内での基質の位置や環境の変化などが考えられる。一般的に共役の伸長により基質の安定化が起こり長波長化することが知られており、実際にこれらのルシフェリンアナログもオレフィン伸長により長波長化を達成しているが、アリル基では共役が伸長されていないため共役の影響は考えにくい。これを明らかとするため化学発光測定を行い、基質からの発光波長を測定することで、アリル基導入による長波長化は基質自身のエネルギー状態の変化によって生じているのか、酵素による影響があるか、評価を行った。

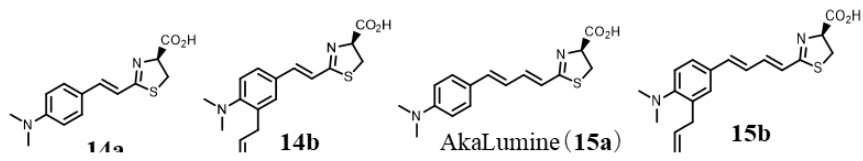
3.3.2. 化学発光波長の測定

ルシフェリンアナログ **1a**, **14-38a** とアリルルシフェリンアナログ **1b**, **14-38b** について、化学発光波長を測定した。ルシフェリンアナログ (ルシフェリン型、ナフトール型) についてはチアゾリンメチルエステル体 **1**, **37**, **38a'**, **b'** を基質として用い、DMSO 溶媒中で t-BuOK を塩基として用いて発光させて波長測定を行った。一方、ルシフェリンアナログ (ジメチルアミノ型) については DMF 溶媒中でプロピルホスホン酸無水物溶液 (T3P) と反応させ、その後塩基としてトリエチルアミンを用いて発光させて波長測定を行った。⁵¹ 発光測定にはスペクトロメーター AB-1850 を使用し、3 分間の積算で測定した。各種アナログの化学発光波長は Fig. 3.3.2 のようになった。

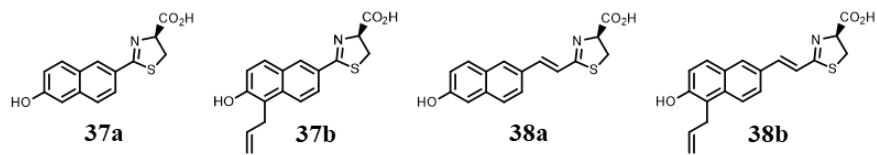
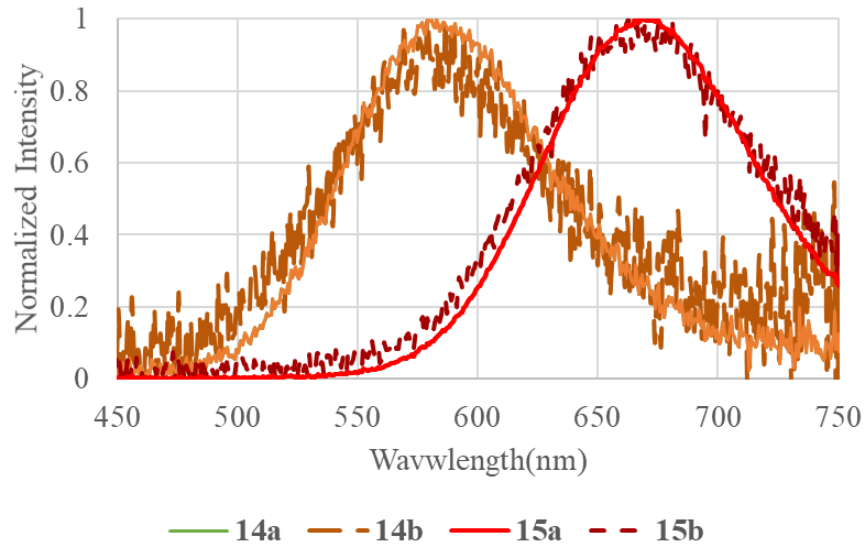


ルシフェリン型





ジメチルアミノ型



ナフトール型

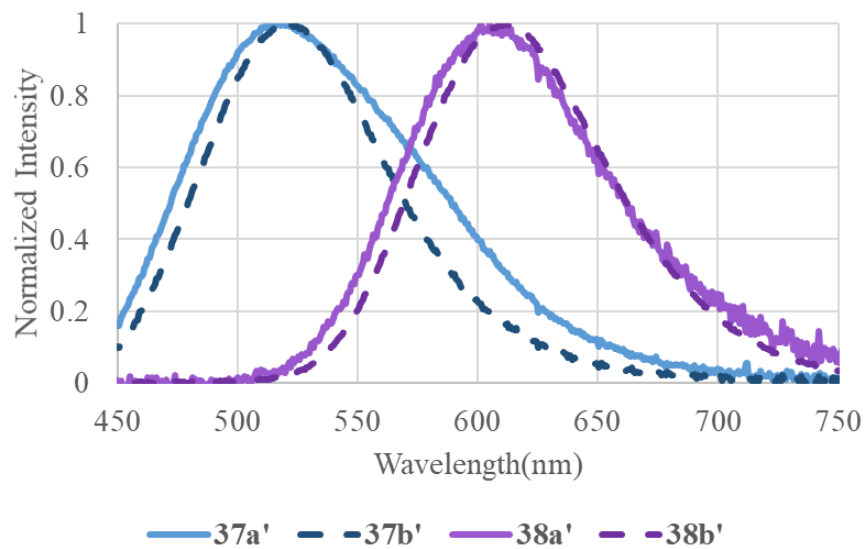


Fig. 3.3.2. 各アナログの化学発光波長

化学発光波長では、いずれのアリルルシフェリンアナログ **1b**, **14-38b** でもルシフェリンアナログ **1a**, **14-38a** との間で大きな波長変化を見ることは出来ず、最大でも 5 nm 程度の波長変化しか起こさなかった。アリル基の導入によって共役の伸長等も起きておらず、化学発光波長のシフトは見られていないため、アリル基によって構造的安定化は生じていないことが明らかとなった。これにより、生物発光波長の長波長化した要因は酵素由来であることが示唆される。

3.3.3. 生物発光強度の測定

ルシフェリンアナログ **1a**, **14-38a** とアリルルシフェリンアナログ **1b**, **14-38b** について北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy) を用いて、pH8.0 リン酸カリウム緩衝液 (KPB) 中、ATP-Mg 存在下にて発光測定を行った。発光測定にはスペクトロメーター AB-1850 を使用し、露光時間 15 秒で 10 分間の積算で測定した。測定された極大発光波長強度に半値幅をかけ合わせ発光強度とした。D-ルシフェリンの発光強度を 100 とした時の各種アナログの相対発光強度は Table 3.3.3 のようになった。

Table 3.3.3. 各アナログの相対生物発光強度

	1a	1b	14a	14b	15a	15b
rel. Intensity	100	1.99	1.69	0.24	1.23	0.30
		37a	37b	38a	38b	
rel. intensity		0.20	0.23	0.25	0.34	

D-ルシフェリン (**1a**) やジメチルアミノベンゼン型のルシフェリンアナログ (**14a**, **15a**) はアリル基の導入によって大幅に輝度が低下した (1/5~1/50)。一方、ナフトール型のアナログでは発光輝度はほぼ変わらない結果となった。ホタル生物発光は酵素の認識によって発光反応を起こすため、構造を改変することで輝度は低下しやすく、アリル基の導入によって輝度が低下すると考えられる。しかしながら、ナフトール型に関しては、アリル基を導入しても発光輝度にほとんど変化が見られていない。輝度低下の要因としては、反応効率の低下、基質の蛍光量子収率の低下、励起状態の生成効率の低下等が考えられるが、どの要因が大きな寄与を与えているかは定かではない。当研究室では多くのルシフェリンアナログを合成しているが、発光輝度と構造との活性相関は詳細に得られてはいない。アリル基の導入の影響をあまり受けていないナフトール型のデータも興味深いものである。他の基質は発光輝度が低下しているにもかかわらずナフトール型だけが輝度が低下していないのは、酵素に取り込まれる際に他の基質とは違うアリル基が影響しないような部位に結合していることも考えられる。本研究の結果のみでは詳しく考察することはできないが、酵素内に基質が取り込まれている状態の X 線結晶構造解析等を明らかにすれば、この発光輝度とアリル基の影響が明らかになるかもしれない。

3.3.4. ミカエリス定数 (K_m) 及び最大反応速度 (V_{max}) の測定

ルシフェリンアナログ **1a**, **14-38a** とアリルルシフェリンアナログ **1b**, **14-38b** において発光強度からミカエリス定数 (K_m) 及び最大反応速度 (V_{max}) を計算した^{52,53}。発光測定には北米産ホタルルシフ

フェラーゼ (Ppy) を用いて、pH8.0 KPB 中、ATP-Mg 存在下にて発光測定を行った。Ppy 濃度を 0.01 mg/mL に固定し、基質濃度を変化させることによってそれぞれの発光量を測定し、Sigma plot により K_m および V_{max} を求めた。発光測定には ATTO 社製のルミノメーター AB-2270 を用いて 10 分間の積算で測定を行った。この装置は波長によって感度に変化が生じるため、波長による感度変化の少ないスペクトロメーター AB-1850 を用いて感度補正をおこない、補正した値で計算を行った (6.3.2.4 参照)。求めた K_m 、 V_{max} は Table 3.3.4 のようになった。 V_{max} は D-ルシフェリンの V_{max} を 100 とした時の相対値 (rel. V_{max}) を表示している。

Table 2.3.4. 各種アナログの K_m 、rel. V_{max}

	1a	1b	14a	14b	15a	15b
K_m	160	370	0.30	71	1.5	17
rel. V_{max}	100	4.1	5.5	0.97	2.4	0.12

	37a	37b	38a	38b
K_m	58	28	3.1	3.3
rel. V_{max}	0.10	0.12	0.10	0.12

最大反応速度 (V_{max}) は生物発光量子収率 (ϕ_{BL}) と酵素代謝回転数 (k_{cat})、酵素濃度 [E] との積で表される。光子量から算出しているため、基質の発光強度として比較することができる。本研究では酵素濃度 [E] は一定の条件で測定しているため、 V_{max} の値は ϕ_{BL} と K_{cat} によって決定されている。ミカエリス定数 (K_m) は $1/2 V_{max}$ に到達するときの基質濃度を表しており、酵素と基質の親和性の指標となっている。 K_m が大きいと $1/2 V_{max}$ に到達するまでに多くの基質を要するために、基質の酵素との親和性が低いと言える。逆に K_m が小さいと酵素との親和性は高い。

D-ルシフェリン (**1a**) とジメチルアミノベンゼン型のアナログ **14,15a** とアリル基を導入したルシフェリンアナログ **1b,14,15b** の rel. V_{max} を比較すると $1/5 \sim 1/20$ 小さい値をとることが示された。また、 K_m に関してはアリル基の導入によりいずれの値も上昇していることから、基質と酵素の親和性はアリル基の導入によって低下していることが明らかとなった。これより、ルシフェリン型やジメチルアミノベンゼン型のアナログでは、アリル基の結合により、基質とルシフェラーゼ間の親和性は低下し、相互作用に影響を及ぼし、その結果 K_{cat} や ϕ_{BL} の低下、もしくはその両方が引き起こされていると考えられる。一方、ナフトール型アナログ **37,38a** の rel. V_{max} はアリル基を導入したルシフェリンアナログ **37,38b** と近い値を取っているため、ナフトール型のアナログはアリル基の結合によって K_{cat} や ϕ_{BL} に大きな影響を及ぼさないことが示唆される。前述の発光強度でも同様の結果が得られているため、ナフトール型のアリル基導入による発光輝度への影響は少ないことが明らかとなった。また、 K_m 値についても大きな変化は見られないことから、酵素との親和性においても大きな影響は与えないものと考えられる。

3.3.5. 発光特性のまとめ

ルシフェリンアナログ **1a, 14-38a** とアリルルシフェリンアナログ **1b, 14-38b** のそれぞれの生物極大

発光波長 (λ_{BL})、蛍光極大発光波長 (λ_{CL})、相対生物発光強度 (rel. Intensity)ミカエリス定数 (K_m) 及び相対最大反応速度 (rel. V_{max}) を Table 3.3.5 にまとめた。

Table 3.3.5. 各種発光データまとめ

		オレフィン数	アリル基	λ_{BL} (nm)	λ_{CL} (nm)	rel. Intensity	K_m	rel. V_{max}
ルシフェリン型	1a	0	-	570	590	100	160	100
	1b	0	○	610	585	1.99	370	4.1
ジメチル アミノ ベンゼン型	14a	1	-	570	580	1.69	0.30	5.5
	14b	1	○	580	580	0.24	71	0.97
	15a	2	-	670	670	1.23	1.5	2.4
	15b	2	○	685	670	0.30	17	0.12
ナフトール型	37a	0	-	550	515	0.20	58	0.10
	37b	0	○	570	520	0.23	28	0.12
	38a	1	-	655	605	0.25	3.1	0.10
	38b	1	○	690	610	0.34	3.3	0.12

いずれのアナログに関してもアリル基の導入によって生物発光波長の長波長化が生じている。しかしながら、アリル基によって共役の伸長は起きておらず、化学発光波長の変化が見られないことから、アリル基の立体障害が発光色変化に寄与しているものと考えられる。序論でも触れたように、発光色変化には酵素内の環境が大きく影響している。本研究の場合、アリル基の効果により、酵素内の変化や周辺のアミノ酸残基からの影響、フィッティング部位の変化等、酵素内での環境が変化したことにより発光体のオキシルシフェリン (**4**) およびオキシルシフェリンに相当するアナログの位置が赤色発光する環境下に移動し、その励起エネルギー状態が低下したために長波長化につながったと考えられる。ジメチルアミノベンゼン型の K_m 値はアリル基の導入により増加し酵素と基質との親和性が弱まっていることが示唆される。この影響によるものか、発光強度や V_{max} も大きく低下している。これはルシフェリン型と似た傾向を示しており、基質の親和性の低下により発光活性に大きな影響を及ぼしているものと考えられる。

一方、ナフトール型では、生物発光波長に大きな長波長化が生じたが、発光強度や K_m 、 V_{max} の変化はほぼ見られていない。この詳しい要因は解明することができていないが、酵素との結合部位が他のアナログと大きく異なっている可能性が示唆される。他のアナログに関しては基質と酵素の親和性の低下や輝度の低下が見られているため、アリル基が酵素の発光に関わる部位に影響を与えていることが考えられるが、ナフトール型にはそれが見られないため、異なるフィッティングの仕方をしており、アリル基導入部位が発光活性に関連するアミノ酸残基の存在しない場所などにあることが考えられる。そのために発光活性にはあまり影響を与えず、アリル基によって多少の環境の変化のみに影響を与えたため、発光色の変化が生じたのではないかと考える。そのため、今後この解析を進めるにあたって酵素内に基質が取り込まれた状態の X 線結晶構造解析は重要である。

3.4. アリル基導入型ルシフェリンの生物発光イメージング実験

本章で合成したルシフェリンアナログが、実際にイメージング実験で使用可能か確認するために以下の実験を行った。D-ルシフェリン (**1a**)とイメージング材料として販売されている AkaLumine (**15a**)、本研究で合成したアリル基導入型ルシフェリンアナログで近赤外発光を示したルシフェリンアナログ **15b**, **38b** に関して、ホタルルシフェラーゼを発現させたガン細胞を用いたイメージング実験とホタルルシフェラーゼの全身発現マウスを用いた *in vivo* イメージング実験をそれぞれ行った。

ホタル生物発光を用いたイメージング実験は、通常ホタルルシフェラーゼを発現するようにした細胞(ガン細胞等)に D-ルシフェリン (**1a**)等の基質を散布や注射、投与することによって発光させる。3.4.1 で用いる Ppy ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 Venus 発現 HeLa 細胞は HeLa 細胞(ヒト乳がん細胞)に北米産ホタルルシフェラーゼ (Ppy)と緑色蛍光タンパク質 Venus を発現させた細胞である。Venus は蛍光によって細胞数を確認するために発現させている。3.4.2 では Ppy ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 Venus 全身発現マウスを用いており、全身に Ppy と Venus が発現している。そのために、ルシフェリンを投与することによって全身が発光を示す。

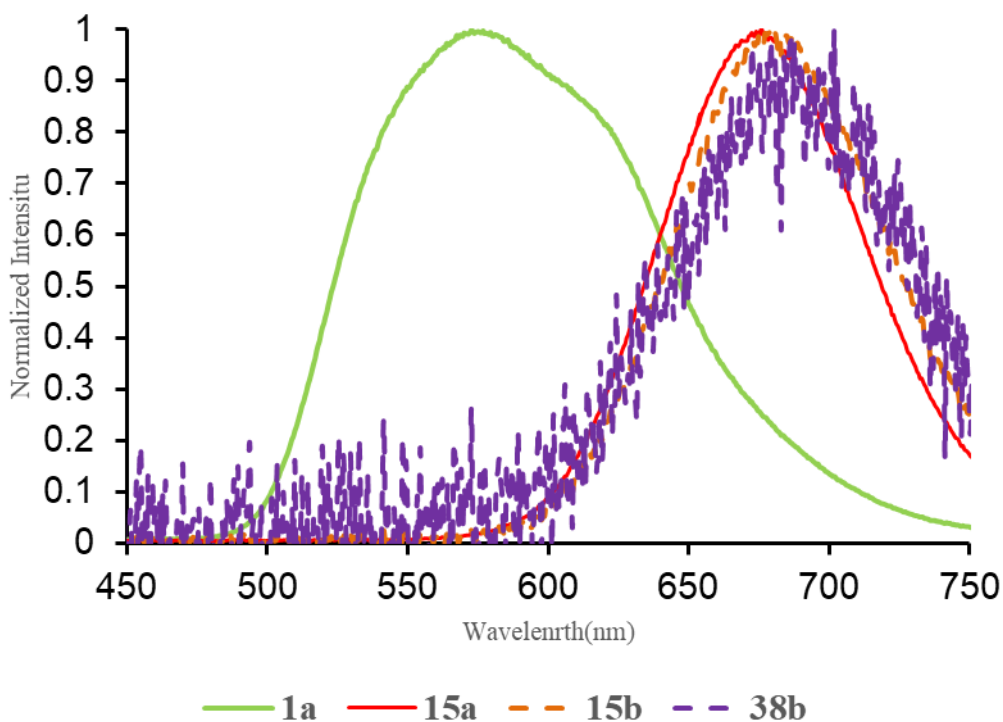
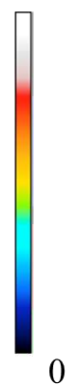
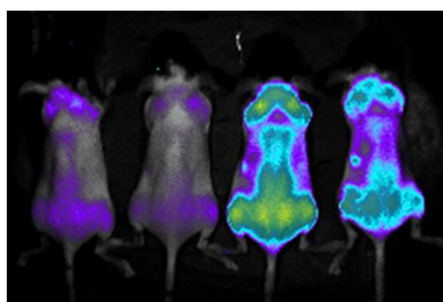
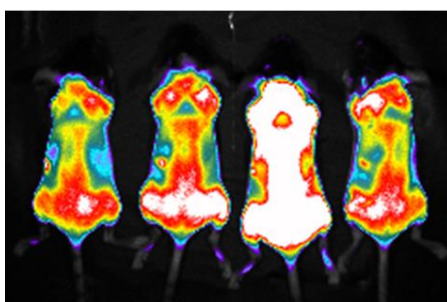
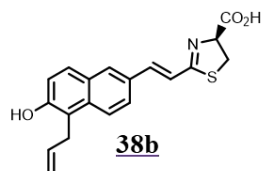
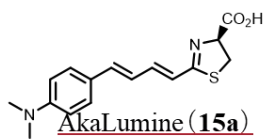
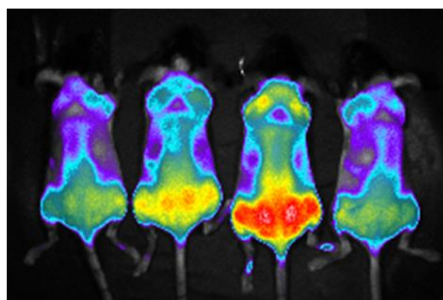
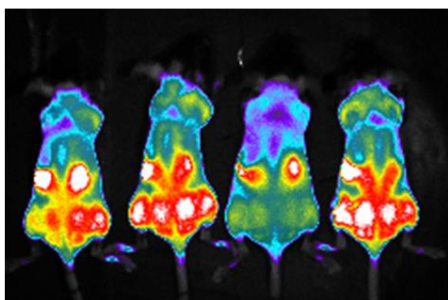
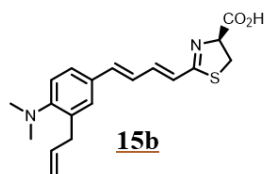
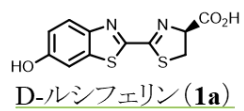


Fig. 3.4.1b. 発光波長

ルシフェリンアナログ **15b**, **38b** はどちらも細胞内に発現したルシフェラーゼにおいて発光能を示すことが明らかとなった。しかしながら D-ルシフェリン (**1a**) や AkaLumine (**15a**) と比較して輝度は低くなっている。これは基質の発光能自体が構造改変により低下しているために、細胞内の発光でも輝度が低くなっているものと考えられる。*in vitro* 実験では発光強度に顕著な差が見られなかったルシフェリンアナログ **15b** と **38b** であるが、細胞発光イメージングではルシフェリンアナログ **15b** のほうが輝度が高くなっていた。これは細胞透過性が大きく関わっているものと考えられる。一般に、薬物の細胞透過性は化合物の親水性特性のオクタノール/水 分配比率 Log P と相関する^{54,55}。ChemDraw により計算した結果、ルシフェリンアナログ **15b**, **38b** の Log P はそれぞれ 4.25 と 4.06 であった。これより、ルシフェリンアナログ **15b** はルシフェリンアナログ **38b** に比べ脂溶性が高く、細胞膜透過性が高いため、細胞内に存在するルシフェラーゼとの反応が効率的に進み、ルシフェリンアナログ **38b** と比較して高い発光輝度を示していると考えられる。

3.4.2. マウスを用いた *in vivo* イメージング実験

Ppy ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 Venus 全身発現マウスを用いて *in vivo* 生物発光イメージング実験を行った。それぞれの基質を PBS 溶液としてマウスの尾静脈から D-ルシフェリン (**1a**) と AkaLumine (**15a**) は 1 mM を 100 μL 、ルシフェリンアナログ **15**, **38b** は 500 μM を 200 μL 投与した。生物発光イメージング装置を用いて D-ルシフェリン (**1a**) と AkaLumine (**15a**) は露光時間 1 秒、ルシフェリンアナログ **15**, **38b** は露光時間 20 秒で 1200 秒間測定を行った。*in vivo* イメージング像を Fig. 3.4.2a に、マウス全身生物発光イメージング総発光強度経時変化を Fig. 3.4.2b 示した。



露光時間1秒

露光時間20秒

Fig. 3.4.2a マウスを用いた *in vivo* イメージング像

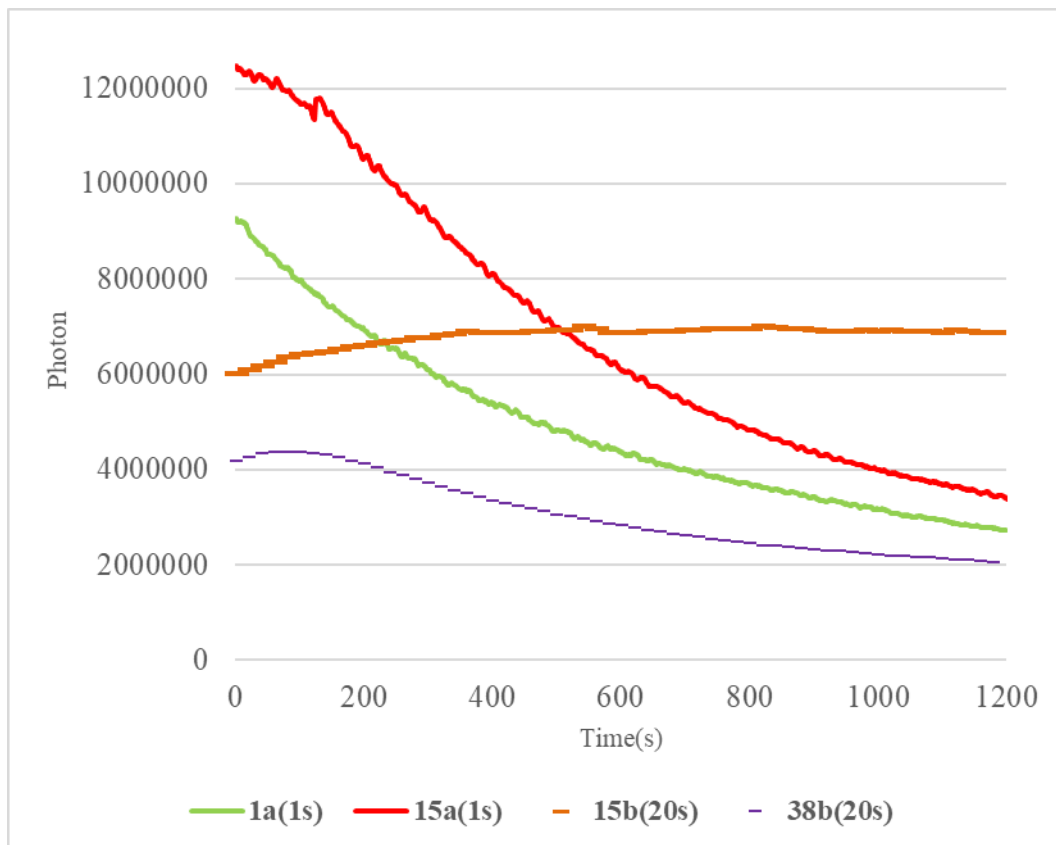


Fig. 3.4.2b マウス全身生物発光イメージング総発光強度経時変化

ルシフェリンアナログ **15b**, **38b** においても生体内での発光を示しており、*in vivo* 生物発光イメージングが可能であることが明らかとなった。しかし D-ルシフェリン (**1a**) と AkaLuciferin (**15a**) は露光時間1秒でイメージング像を得ることが出来るが、ルシフェリンアナログ **15b**, **38b** は 20 秒間の露光で像を得た。これはルシフェリンアナログの輝度の低下の影響が大きく響いていることが明らかとなった。細胞の実験では D-ルシフェリン (**1a**) よりも輝度が低かった AkaLuciferin (**15a**) であるが、整体透過性の高い赤色発光のメリットにより *in vivo* イメージングでは、AkaLuciferin (**15a**) のほうが輝度の高い像が得られていた。しかしながら、更に長波長化されたルシフェリンアナログ **15b**, **38b** だが、長波長化の効果よりも輝度の低下が著しく、1 秒露光の D-ルシフェリン (**1a**) と AkaLuciferin (**15a**) と比較しても輝度の低い像しか得ることが出来なかった。総発光量経時変化 (Fig. 3.4.2b) から発光量減衰はルシフェリンアナログ **15b**, **38b** のほうが緩やかだった。

3.5. まとめ

本章ではルシフェリンアナログへのアリル基導入による発光活性の評価を行ってきた。D-ルシフェリン (**1a**) をアリルルシフェリン (**1b**) にした際に生じたように、本研究で合成したルシフェリンアナログ **14b-38b** は基質によって波長変化に差があるものの、いずれも長波長化を示していた。ルシフェリン型とジメチルアミノ型は、アリル基導入により長波長化、輝度の低下、基質と酵素の親和性の低下が生じた。一方、ナフトール型のルシフェリンアナログでは、大きな長波長化が生じたが輝度の

低下や親和性の低下は生じなかった。これはナフトール型のアナログが酵素との反応には影響を及ぼさないものの、酵素内での環境がアリル基によって大きく左右されるために発光色の変化のみが生じたものと考えられる。この解明には至っていないため、今後も研究を進める必要があるだろう。

また、近赤外発光を示した **15b**, **38b** は細胞と *in vivo* でのイメージング実験も行った。細胞の実験でも、イメージング実験でもいずれのルシフェリンアナログも発光を示した。したがって、これらのアナログはイメージング材料として使用可能である。しかしながらD-ルシフェリン (**1a**) や AkaLumine (**15a**) と比較すると非常に輝度が低かった。そのために、現状ではこのルシフェリンアナログはイメージングに不向きであるが、近赤外発光のイメージング材料として有用な発光波長を示していると言えるため、この基質の輝度を上げることができればイメージングに実用可能である。

第4章 反応中間体の構造活性相関研究

第3章では近赤外発光を示すルシフェリンアナログ **15b**, **38b** の合成は達成したが、発光輝度の低下によりイメージング材料として十分な性能を得ることができなかった。構造改変による発光輝度の低下は多くのアナログで起こる問題で、いまだに輝度の低下と構造の相関は明らかになっていない。そのため、新たな輝度向上の技術が求められている。そこで本章では、輝度向上技術の開発を目指し、研究を行った。

4.1. ホタル生物発光の2段階反応

序論で述べたように、ホタル生物発光は大きく分けて2段階反応で発光を示している。1段階目のアデニル化によって反応中間体である AMP 化ルシフェリン **2** が生成され、続く酸素化によってジオキサタン体を経由し、発光体であるオキシルシフェリン (**4**) となり発光を示す。1段階目の反応であるアデニル化が律速段階にあることが知られており、発光反応全体の反応速度がこの過程で決められる。したがって、ホタル生物発光が高効率な発光であるにもかかわらず、反応速度により単位時間あたりの輝度が低い理由となっている。

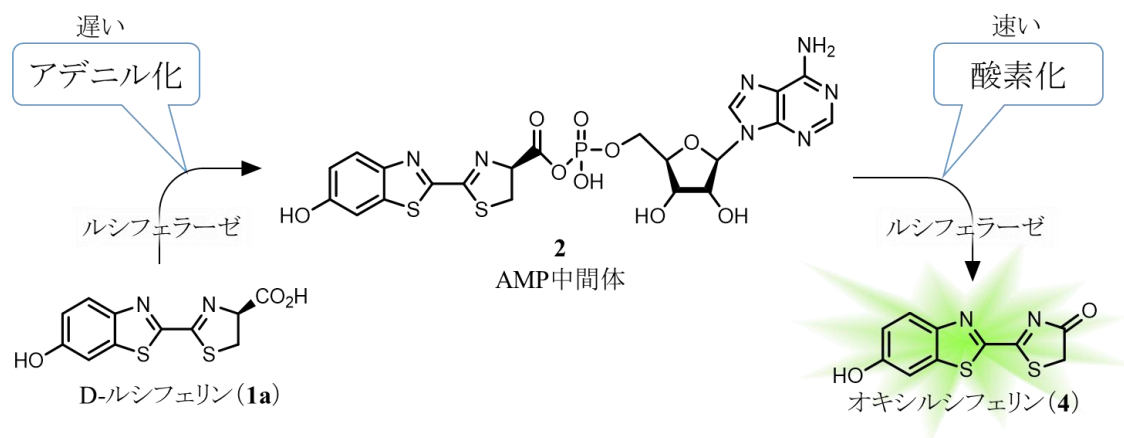
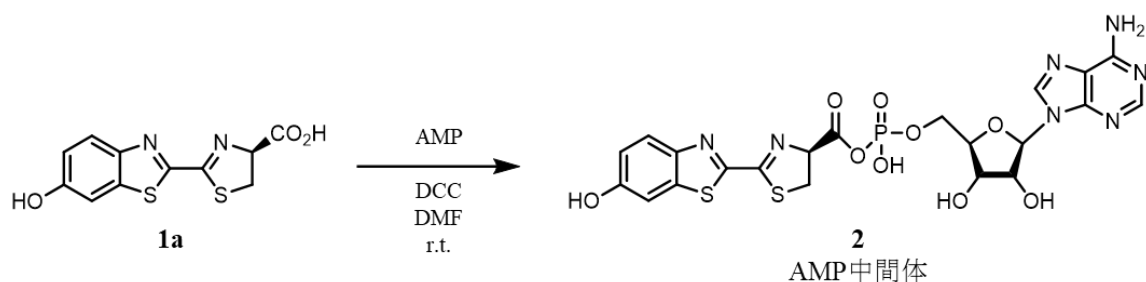


Fig. 4.1. ホタル生物発光の2段階反応

4.1.1. 発光反応中間体 AMP 化体

ホタル生物発光反応の反応中間体である AMP 化ルシフェリン **2** は有機合成によって人為的に合成されている。AMP 化ルシフェリン **2** は 1958 年に W. C. Rhodes らによって報告されており、合成法は 1988 年に K. Imai らによって確立されている^{56,57}。D-ルシフェリン (**1a**) とアデノシン-リン酸 (AMP) をピリジンに溶解し *N,N'*-ジシクロカルボジイミド (DCC) を用いることでリン酸エステル結合を形成し AMP 化ルシフェリン **2** を合成した。また HPLC によって単離、¹HNMR にて構造解析を達成している⁵⁷。現在では、D-ルシフェリン (**1a**) と AMP を DMF 中で DCC によって縮合することによって AMP 化ルシフェリン **2** を合成できる (Scheme 4.1.1)⁴⁰。AMP 化ルシフェリン **2** を人工的に合

成したことにより律速段階となっているアデニル化を省略し、酸素化の1段階反応のみで発光反応をさせることが可能である。実際に、発光反応速度が飛躍的に向上し、単位時間あたりの発光輝度が100~1000倍にまで向上することが知られている²⁶。この高輝度発光を示すAMP化ルシフェリン**2**を発光材料として使用することが可能であれば高輝度高効率で発光を示すためにイメージングのみならず、様々なツールへの応用が期待できる。また、AMP化によってルシフェリンアナログの輝度の向上が起これば、未だ確立できていないホタルルシフェリンアナログの輝度向上技術として確立できるであろう。しかしながら、この中間体は非常に不安定であるために、発光ツールとしての使用には不向きである⁵⁶。



Scheme 4.1.1. AMP 中間体の DCC による合成

ホタル発光酵素の変異体による発光活性制御研究や、ホタル発光基質 D-ルシフェリン (**1a**) の構造改変による構造活性相関研究は多く行われているが、反応中間体である AMP 化体に関する研究は世界中を見ても未だに多くなされておらず AMP 化体の構造改変体とその発光活性の相関はあまり知られていない。そこで、AMP 化体 **2** の構造に改変を加えた反応中間体アナログを合成することで発光活性を明らかとした。

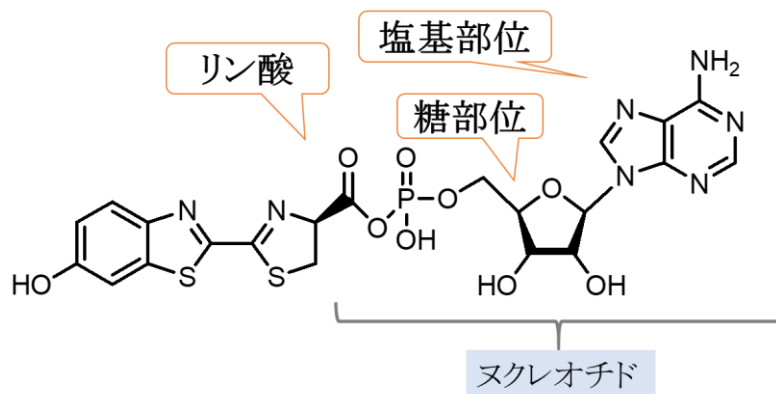


Fig. 4.2. 発光反応中間体である AMP 化ルシフェリン **2**

4.1.2. 反応中間体アナログの構造活性相関

反応中間体アナログとして、ヌクレオチド部位に改変を加えたものがいくつか報告されている⁴⁰。アデニン以外の塩基(チミン、グアニン、シトシン、ウラシル)に置換したものや塩基をなくして糖のみの構造(リボース、グルコース)のものなどがあるが、いずれも AMP 化ルシフェリン **2** と比較して発光強度は落ちてしまうものの、発光活性を失わないことがわかっている (Fig. 4.1.2)。

また、不安定性の原因となっている、リン酸エステル結合に改変を加え、リン酸アミド結合にすることによって安定性を高めた例もある⁴⁰。

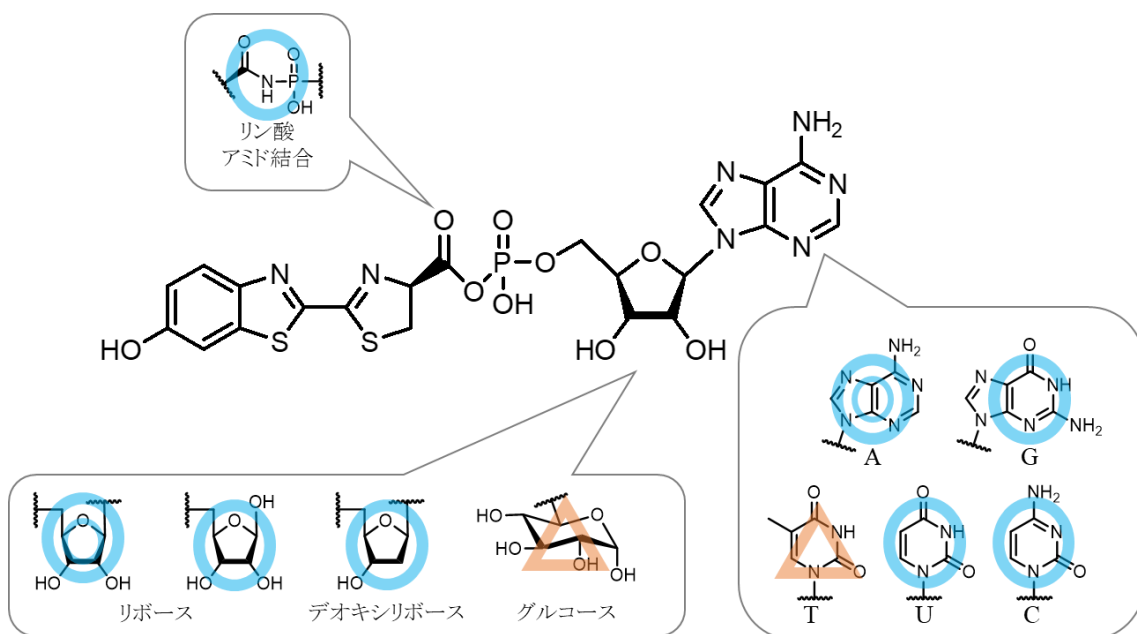


Fig.4.1.2. 反応中間体アナログの発光活性

現在得られている反応中間体の構造活性相関はあまり多くなく、反応中間体の発光活性を明らかにしていくには十分なデータが得られていない。本研究では、この糖と塩基部位にさらに改変を加えることによって構造活性相関研究を深めた。

4.1.3. ヌクレオチド部位の改変

アデニン、チミン、シトシン、グアニン、ウラシルの代表的なヌクレオチドを結合させた反応中間体アナログでは発光活性を失わないことが知られている。本研究では、これらのヌクレオチドがさらに修飾された化合物と、ヌクレオチド類似構造を持つもの、さらにその他の糖についての反応中間体アナログを合成し、それらの発光活性を明らかにした。用いた化合物を Fig. 4.1.3 に示した。

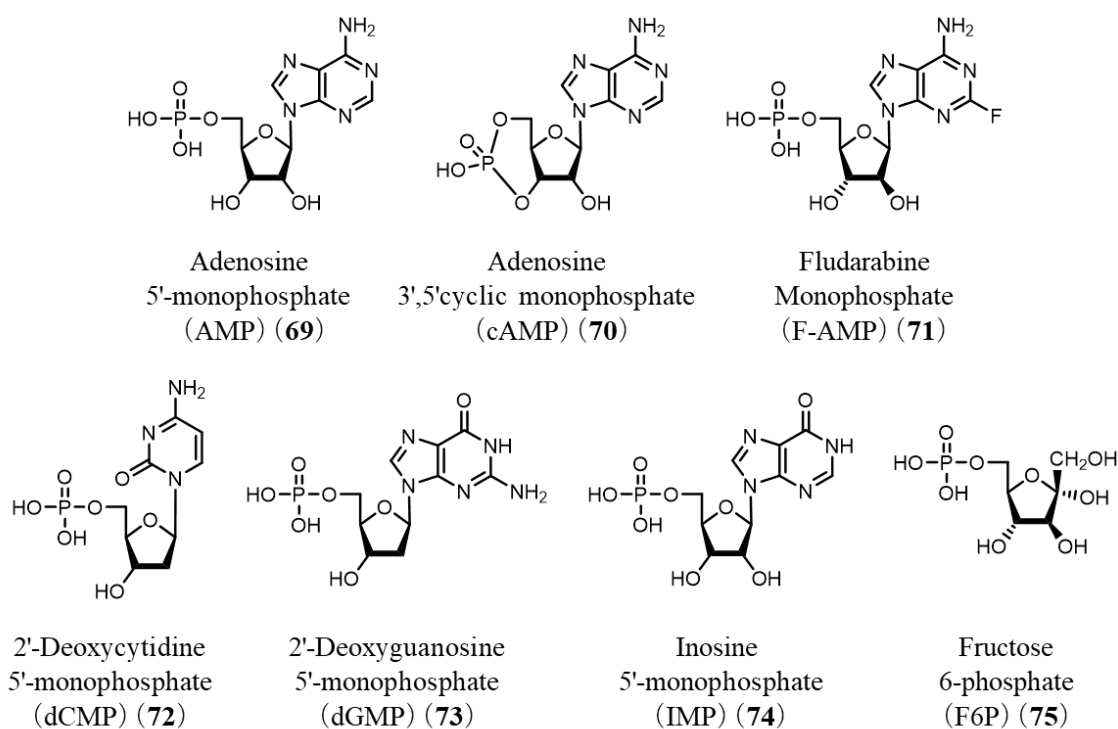
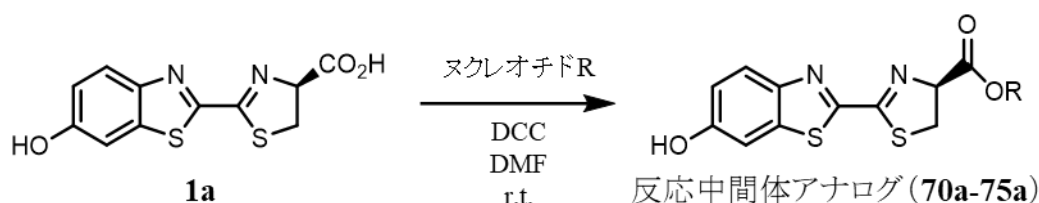


Fig. 4.1.3. 各種ヌクレオチド体 69-74 と糖 75

4.1.4. 反応中間体アナログの合成

D-ルシフェリンの DMF 溶媒中に、各種ヌクレオチド体または糖を加え、DCC を用いて縮合させた。1 時間攪拌した後、冷却アセトンを加え、生じた沈殿を遠心分離し、冷却アセトンで洗浄した。遠心分離と冷却アセトン洗浄を 2 回繰り返し、真空乾燥させることによって反応中間体アナログ 70-75a を合成した。各種ヌクレオチドと糖 (70-75) から生成された化合物を反応中間体アナログ (70-75a) とする。AMP 化ルシフェリン 2 については同様の合成法にて単離がなされているが単離操作で分解が進むため、反応中間体アナログ (70-75a) は単離せずに用いた。しかしながら、これは文献に従った合成法であり、AMP 化ルシフェリン 2 は合成されているため、同様に各種反応中間体アナログも合成できているものとして発光反応に用いた。中間体アナログ 71-75a は LC-MS を用いて評価を行っており、分子量より生成を確認している。



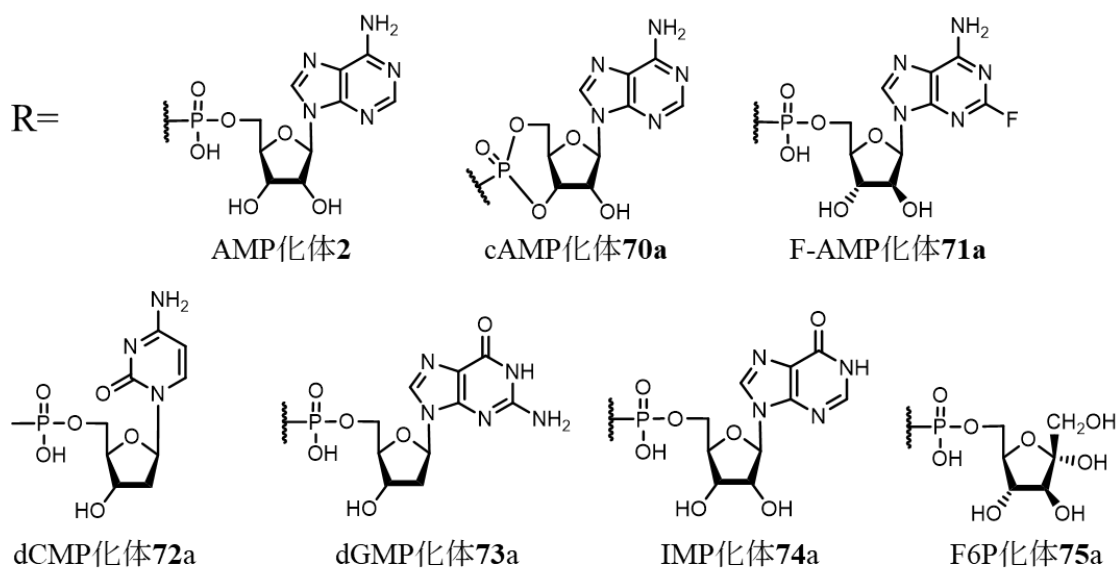


Fig. 4.1.4. 反応中間体アナログ (**2**, **70-75a**)

4.2. 発光反応測定

合成した反応中間体アナログ (**70-75a**) を純水に溶解して基質溶液を調整した。500 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH8) に純水と基質溶液を加え、ルシフェラーゼ (Ppy) 溶液をシリンジで加えることによって発光させた。発光輝度はルミノメーター AB2270、発光波長はスペクトロメーター AB1850 にて測定を行った。

4.2.1. 発光活性評価

反応中間体アナログ (**70-75a**) について発光活性の有無を評価した。その結果を Table 4.2.1 にまとめる。

Table 4.2.1. 反応中間体アナログの発光活性

	AMP 2	TMP	GMP	CMP			
	+++	+	++	++			
dAMP	cAMP 70a	F-AMP 71a	dCMP 72a	dGMP 73a	IMP 74a	F6P 75a	G6P
++	++	++	++	++	++	+	+

いずれの中間体アナログも発光活性を持つことが明らかとなった。ヌクレオチド構造を持つ中間体アナログ (**70-74a**) は AMP 化体 **2** 同様に高い発光活性を持っていた。しかしながら、リン酸と糖のみの構造をした中間体アナログ (**75a**) は活性が低かった。

基質の構造改変に比べてヌクレオチド部位の構造を大きく変化させても発光活性が失われなか

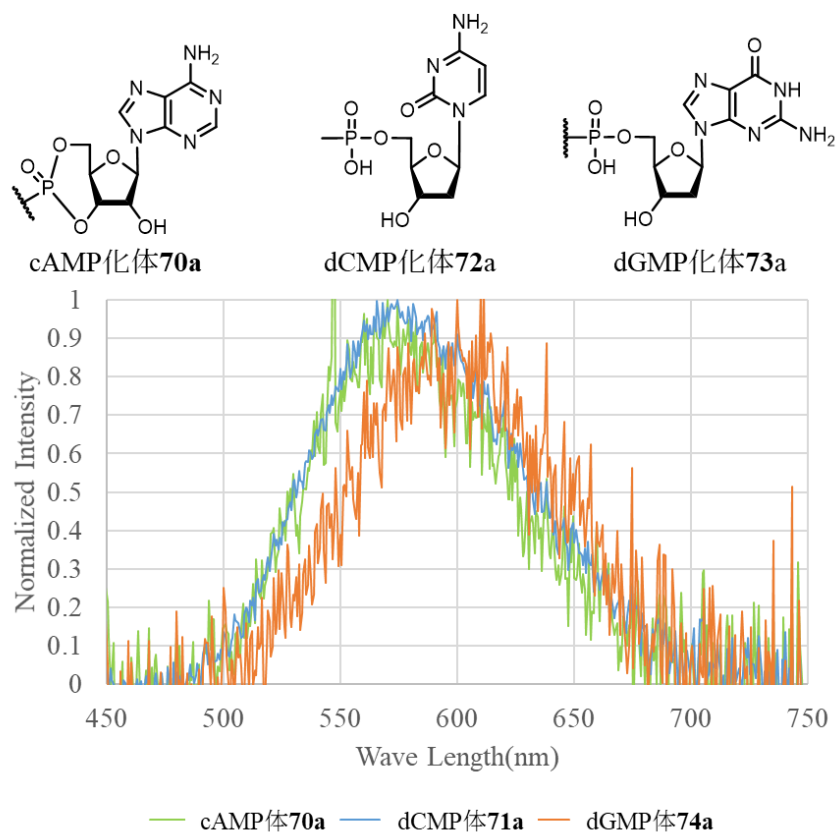
った。しかしながら、核酸塩基部位を持たないリン酸と糖だけの構造だと酵素認識が低下するよう
で、核酸塩基部位の有無が発光活性に影響していることが明らかとなった。

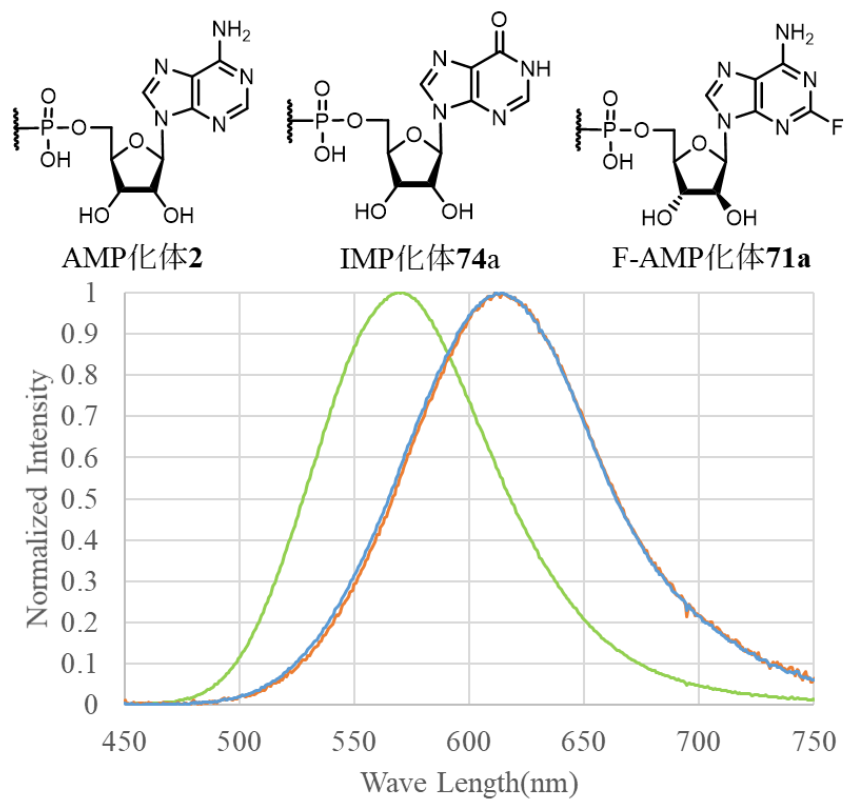
4.2.2. 発光波長測定

反応中間体アナログ(70-75a)の発光波長をそれぞれ測定した。それぞれの発光波長を Table 4.2.2 に、それぞれの発光波長のグラフを Fig. 4.2.2 に記した。F6P 体 75a は輝度が低くノイズが多く生じている。通常 560 nm 前後の発光波長を示す D-ルシフェリン(1a)であるが発光波長に変化が見られたものも存在した。中でも F-AMP 体 71a と IMP 体 74a は 50 nm もの長波長化を示した。

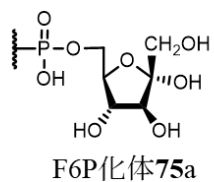
Table 4.2.2. 反応中間体アナログ(2,70-75a)の発光波長

AMP 2	cAMP 70a	F-AMP 71a	dCMP 72a	dGMP 73a	IMP 74a	F6P 75a
560 nm	560 nm	610 nm	560 nm	590 nm	610 nm	580 nm

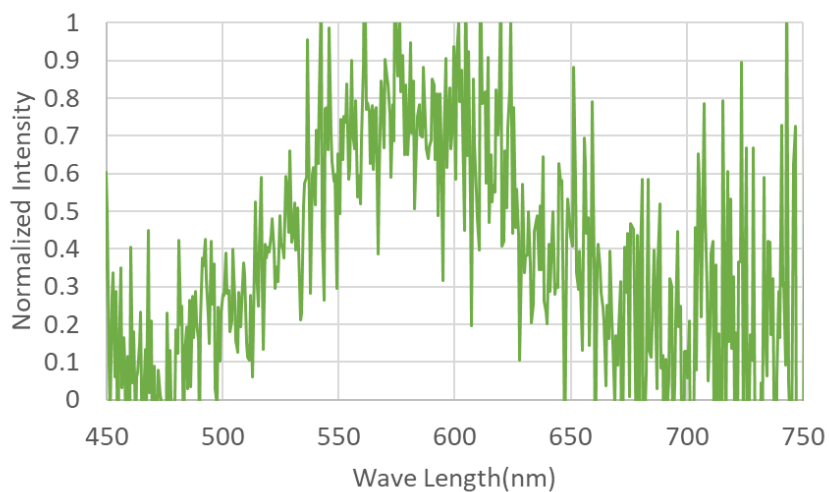




— AMP化体2 — F-AMP化体71a — IMP化体74a



F6P化体75a



— dCMP化体71a

Fig. 4.2.2. 中間体アナログの発光波長

反応中間体アナログの合成によって発光波長が変化する現象は非常に興味深い結果となった。反応中間体の構造を改変しても、ヌクレオチド部位は最終的に脱離するために、発光体であるオキシルシフェリン(4)の構造に影響を与えないものと考えられる。そのために反応中間体アナログの発光波長の変化は生じないと予想されたが、実際は最大 50 nm の大きな発光波長変化をもたらした。

序論でも述べたように D-ルシフェリン(1a)の生物発光は pH の変化によって発光色の変化を起こすことが知られており、同一基質でも、酵素内の環境の変化によって発光色の変化を起こすことが知られている^{15,20}。本研究では、発光段階では同一のオキシルシフェリン(4)が生成され、また発光条件は揃えているため、酵素外部の pH の変化は考えにくく、他の要因によって発光色の変化が起きていると考えられる。また、本研究で赤色発光を示した反応中間体アナログの発光波長はいずれも 610 nm で、Ppy を用いて酸性条件下(pH6)で D-ルシフェリン(1a)を発光させたときの発光波長(620 nm)と近い値をとっていた。したがって、反応中間体の影響によって発光体のオキシルシフェリン(4)の環境が、酸性条件下でのオキシルシフェリン(4)と似た環境下に存在していることが示唆される。

発光色変化のメカニズムとして、酵素に取り込まれる際のルシフェリンの位置が議論されることがある。Ppy と D-ルシフェリン(1a)の発光では 2 種類の酵素内環境が存在すると考えられており、黄緑色発光を示すときと、赤色発光を示すときで、基質と周辺のアミノ酸残基との相互作用が変化しており、その環境の違いにより 2 種類の発光色が示される。外部的要因(pH 変化等)で酵素の状態に変化が起きることによって基質との相互作用に変化が起きていることは知られているが、本研究の結果から、反応中間体の変化によって発光色変化が引き起こされることを示す。

本研究の結果から、反応中間体のヌクレオチド部位の酵素との相互作用によって酵素環境の変化が引き起こされ、最終的にオキシルシフェリン(4)の発光時の酵素内の位置の変化や、相互作用の変化が生じていることを示している。その環境の変化により、反応中間体アナログ(71a,74a)は赤色発光を示す環境下に置かれたため、この 2 つのアナログに関しては赤色発光を示したものと考えられる。

4.3. まとめ

本章では、発光輝度向上技術として知られていた反応中間体の AMP 化ルシフェリン(2)の発光反応に着目し、この反応中間体について研究を行ってきた。AMP 化ルシフェリンの構造活性相関を得るためにヌクレオチド部位を改変した反応中間体アナログ(70a-75a)を合成し、これらの発光活性を明らかとした。

いずれのアナログも発光活性を示しており、反応中間体は比較的変動的な基質であることが明らかとなった。また、発光波長の変化も示すことがわかり、これは発光色変化のメカニズム解析の面からしても非常に興味深い結果となった。

これらの反応中間体アナログはイメージング材料としての実用化には至っていないものの、これらの構造活性相関研究から、今後の発光材料開発、輝度向上技術開発に貢献できるものと考えられる。

中間体合成による発光輝度向上技術が確立されれば、今まで輝度の低下が大きな問題であった近赤外発光材料を始めとしたルシフェリンアナログ共通の輝度向上技術となりうる。そのために、今後 D-ルシフェリン(1a)の AMP 化体のみならずルシフェリンアナログの AMP 化体についても構造活性相関を得る必要があるだろう。

第5章 結語

第2章では現存の材料が大型動物を用いたイメージングに実用か検討してきた。ブタの骨格筋を用いた実験は、あくまでも生体組織の一部を用いたモデル実験であり、生体内の環境を正確に再現できているわけではないが、近い条件で光らせることが可能であれば5 cmもの生体透過性を持つことが明らかとなった。

また、この結果から中大型動物イメージングの計画が進行し、実際にマイクロニッピグを用いて、生きたままの状態での腹部からの発光をイメージング可能であると示せたことは、非常に革新的な結果であった。大型の動物での発光イメージングが実用可能であることが示されることで、ライフサイエンス研究は更に発展するであろう。

大型動物発光イメージングが現実的になったことより、大型動物イメージングに最適化された発光材料の開発により、さらにこの研究は加速だろう。そのため、第3,4章では発光材料の改善を目指し波長と輝度に注目し研究を行った。

第3章ではアリル基による長波長化の効果を確認した。D-ルシフェリン(1a)のみではなく、その他のルシフェリンアナログに関しても生物発光において、アリル基の導入によって長波長化を示した。これは非常に興味深い結果であり、アリル基によって共役の伸長等が起きているわけではないのにもかかわらず、酵素内環境の変化によって、どの化合物でも長波長化を示したことより、D-ルシフェリンの7位相当部位が酵素内の環境を変化させるのに大きな影響を与えていると考えられる。

また、新たな長波長化の指標が得られたことも非常に有益である。700 nm 近い発光を示すルシフェリンアナログが新たに合成され、イメージング実験において発光を示すことが明らかとなった。発光輝度は大幅に低下しており、現状ではイメージング材料としての実用化は実現していないが、酵素の改変や中間体の改変によって、輝度の改善を試みることができる。

第4章では、ルシフェリンの構造改変以外の新たな輝度向上技術の確立を目指し反応中間体の研究を行い、多くの知見の得られていなかった発光反応中間体の構造活性相関を明らかにした。AMP 化体の有機合成によって発光反応速度の向上が起きることは既知であったが、ヌクレオチド部位が発光反応にどのように影響を及ぼすか、詳細な知見は得られていなかった。本研究では、反応中間体アナログを合成したことにより、ヌクレオチド部位が発光輝度だけではなく発光波長にも影響を及ぼすことがわかった。これは非常に興味深い知見であり、発光体であるオキシルシフェリン(4)には中間体の影響はないと考えられていたが、波長の変化が生じることから、反応中間体の構造が発光時のオキシルシフェリン(4)の環境にまで影響を与えていることが明らかとなった。

このように、これらの実験から、多くのイメージング材料の指標を得ることができた。本研究でイメージングに最適化された発光材料の実用化に至っていないものの、発光基質の構造改変、変異型発光酵素の作成、また中間体物質の最適化等、これらの技術、指標を組み合わせることで今後の発光技術開発に大きく貢献できるであろう。

第6章 実験の部

6.1. 合成の部

6.1.1. 機器分析、測定装置

・赤外吸収スペクトル (IR)

Thermo 社製 フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) Nicolet 6700 を用い、全反射測定法 (Attenuated Total Reflection, ATR)により測定を行なった。測定値は波数 (cm^{-1}) で記載した。なお、幅広い吸収には br と付記した。

・ ^1H 核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR)

日本電子社製 ECA 500 (500 MHz) を用いて測定し、“ ^1H NMR (測定周波数、測定溶媒) ケミカルシフト値 (水素の数、多重度、スピン結合定数)”と記載した。ケミカルシフト値 (δ) はテトラメチルシラン ($\delta = 0$) 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 ECA 500 (126 MHz) を用いて測定し、“ ^{13}C NMR (測定周波数、測定溶媒) ケミカルシフト値”と記載した。ケミカルシフト値 (δ) はテトラメチルシラン ($\delta = 0$) を内部基準とし、ppm で表記した。

・質量スペクトル (MS)

エレクトロスプレーイオン法 (ESI)

日本電子社製 JMS-T100LC AccuTOF 質量分析計を用い、高分解能エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) により測定した。サンプル送液はインフュージョン法で行なった。“ESI-MS : m/z [M + 付加イオン] 質量数”と記載した。

JEOL JMS-T100LC 質量分析計を用いて、高分解能エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量スペクトルを得た。

6.1.2. クロマトグラフィー

・分析用薄層クロマトグラフィー (TLC)

和光社製の TLC プレート、Wako Silica gel 70 F254 TLC プレートを用いた。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つて行なった。

- ・分取用薄層クロマトグラフィー (PTLC)

ANALTECH 社製の UNIPLATE^{TE}、厚さ 0.5 mm もしくは厚さ 2.0 mm を用い、“[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) を用いて行ない、展開溶媒を記載した。

- ・液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS)

Thermo Fisher Scientific LCQ Fleet LC-MS を使用し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関東化学社製 Mightysil RP-18GP Aqua (粒子径 5 μm、長さ 250 mm、内径 2.1 mm) を用いて、CH₃CN : 0.1% ギ酸水溶液 = 10 : 90 → 90 : 10 (流速 0.3 mL / min) による 30 分のリニアグラジエントで分析した。

6.1.3. 基本操作

- ・反応後の抽出溶液の乾燥は、無水硫酸ナトリウムを加えることで行なった。

- ・溶液の減圧濃縮はアスピレーターの減圧下 (20~30 mmHg)、ロータリーエバポレーターを用いて行なった。痕跡量の溶媒の除去は、冷却装置「UNI TRAP UT-1000 (EYELA 社製)」で冷却したトラップを装着させた真空ポンプ (約 1 mmHg) を用いて行なった。

- ・溶媒の混合比はすべて体積比で表した。

6.1.4. 溶媒

・蒸留水

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

・トルエン、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N, N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル

関東化学株式会社製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

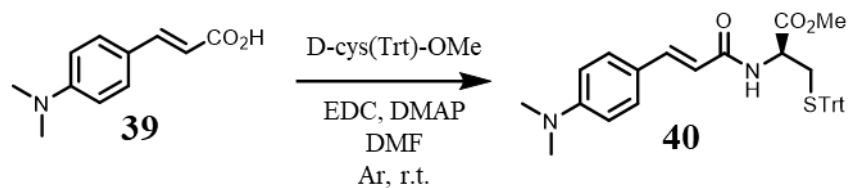
以下に示すものをそのまま用いた。

CDCl₃ : ISOTEC Inc.製 99.7 ATOM%D、0.03% TMS

CD₃OD : ISOTEC Inc.製 99.8 ATOM%D(～0.7 ATOM%¹³C)、0.05% TMS

6.1.5. 合成

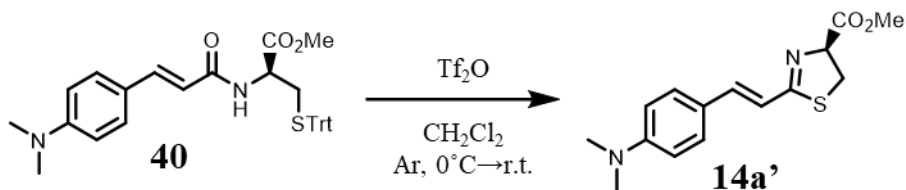
6.1.5.1. アミド体 **40** の合成



p-ジメチルアミノけい皮酸 (**39**) (790.0 mg, 4.13 mmol) の DMF 溶液 (12 mL) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) (1.78 g, 4.71 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (1.63 g, 8.49 mmol) N,N-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (0.994 g, 8.14 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 16 時間攪拌した後、蒸留水 (100 mL) でクエンチした。ヘキサン:酢酸エチル=1:1 溶媒 (3×100 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=2:1) で精製し、アミド体 **40** (2.20 g, 4.00 mmol, 97 %) を薄黄色固体として得た。.

¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.38-7.41 (complex, 8H), 7.26-7.29 (m, 6H), 7.19-7.22 (m, 3H), 6.68 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.14 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 4.77-4.78 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.01 (s, 6H), 2.68-2.76 (m, 2H).

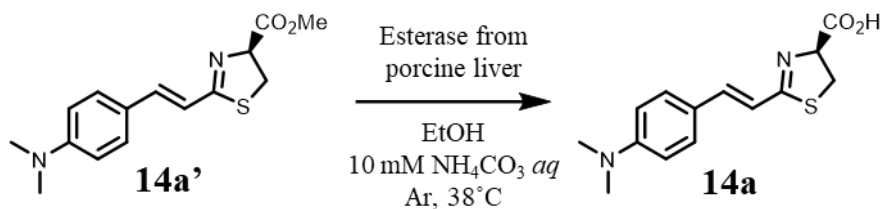
6.1.5.2. チアゾリンメチルエステル体 **14a'**



アミド体 **40** (1.14 g, 2.07 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 溶液 (30 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf_2O) (0.60 mL, 3.7 mmol) をアルゴン雰囲気下、 0°C で加えた後、室温で 1 時間攪拌した。飽和重曹水 (15 mL) を加えて中和し、混合物に蒸留水を加え、塩化メチレンで抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル =2:1) で精製し、チアゾリンメチルエステル体 **14a** (288.3 mg, 0.993 mmol, 48%) を黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 5.17 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.51-3.61 (m, 2H), 3.01 (s, 6H).

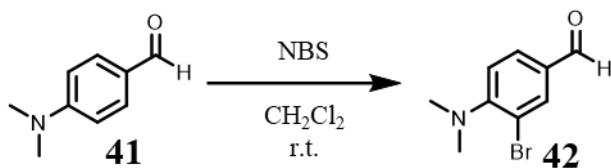
6.1.5.3. ルシフェリンアナログ **14a** の合成



チアゾリンメチルエステル体 **14a'**をエタノール(5 mL)と10mM 炭酸アンモニウム水溶液(10 mL)で溶解し、ブタ肝臓エステラーゼ(27.6 mg)を加えて38°Cで10時間攪拌した。ODS フラッシュクロマトグラフィー(水:メタノール=9:1→1:9)で精製し、ルシフェリンアナログ **14a**(9.7 mg, 0.035 mmol)を橙色固体として得た。

¹HNMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.43 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 5.00 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.54-3.65 (m, 2H), 3.00 (d, *J* = 3.4 Hz, 6H).

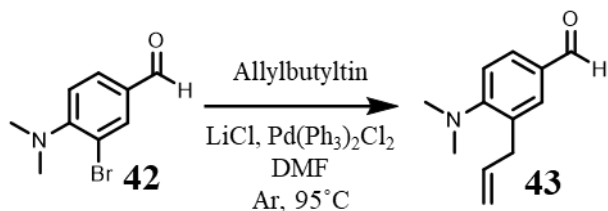
6.1.5.4. ブロモ体 **42** の合成



p-ジメチルアミノベンズアルデヒド (**41**) (3.45 g, 23.1 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液にテトラブチルアンモニウムトリブロマイド (TBAB) (12.5 g, 25.9 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 20 時間攪拌した後、チオ硫酸ナトリウム水溶液 (50 mL) でクエンチした。生成物を酢酸エチル (3×150 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=4:1) で精製し、アルコール体 **42** (3.67 g, 16.1 mmol, 70%) を黄色油状物質として得た。

¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ 9.81 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 2.95 (s, 6H).

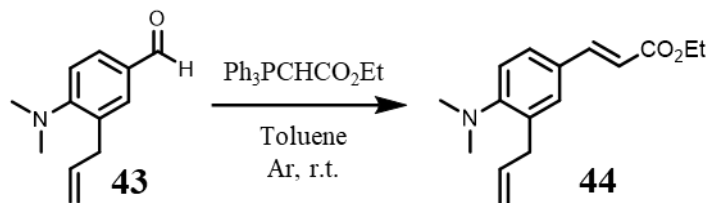
6.1.5.5. アリル体 **43** の合成



ブロモ体 **42** (1.06 g, 4.66 mmol) の脱水 DMF 溶液 (10 mL) に、アリルトリブチルすず (3.0 mL, 9.8 mmol)、LiCl (564 mg, 13.3 mmol) と bis(triphenylphosphine)-palladium(II)dichloride (226 mg, 0.322 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、90°C で 11 時間攪拌した後、10%炭酸カリウム入りシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で粗精製した。この粗精製物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=9:1→5:1) で精製しアリルアルデヒド体 **43** (689.3 mg, 3.64 mmol, 78%) を黄色油状物質として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1681, 1593, 1563, 1499, 1435, 1314, 1093; ^1H NMR(500MHz, CDCl_3)d 9.85 (s, 1H), 7.64-7.73 (m, 2H), 7.05 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H), 5.94-6.02 (m, 1H), 5.13-5.17 (m, 2H), 3.48 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.80 (s, 6H); HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}$ 190.1232; found 190.1226.

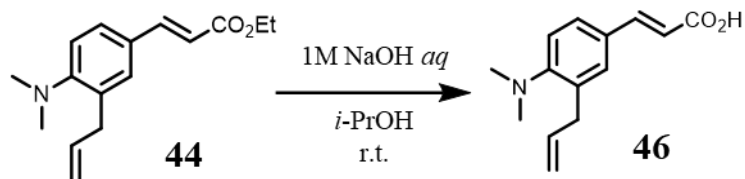
6.1.5.6. エステル体 **44** の合成



アリルアルデヒド体 **43** (504.7 mg, 2.67 mmol) のトルエン溶液 (20 ml) に wittig 試薬 ((カルベトキシメチレン)トリフェニルホスホラン: $\text{Ph}_3\text{C}=\text{CHCO}_2\text{Et}$) (4.41 g, 12.6 mmol) を加えた。室温で 2 日間攪拌した後、濃縮した。残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 9:1) で精製しエステル体 **44** (626.3 g, 2.41 mmol, 90%) を白色固体として得た。 .

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1704, 1630, 1600, 1499, 1310, 1261, 1154, 1094, 1037, 981; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H), 7.02 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.31 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 5.93-6.01 (m, 1H), 5.11-5.14 (m, 2H), 4.24 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.72 (s, 6H), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H) ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 167.49, 154.74, 144.73, 137.27, 133.93, 130.27, 128.60, 127.13, 118.91, 116.49, 115.95, 60.38, 44.50, 35.26, 14.46; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{NO}_2$ 260.1651; found 260.1651 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2\text{Na}$ 282.1470; found 282.1466.

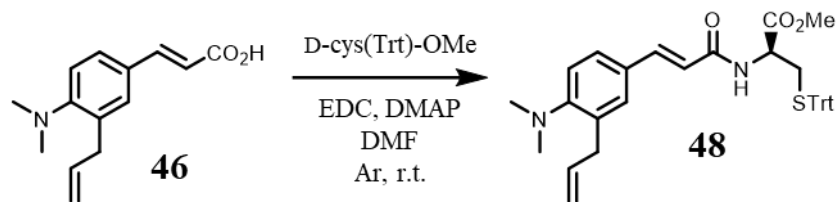
6.1.5.7. カルボン酸体 **46** の合成



エチルエステル体 **44** (249.1 mg, 0.960 mmol) をイソプロパノール 1 mL と 1M 水酸化ナトリウム水溶液 2 mL に溶解した。室温で 14 時間攪拌した後酢酸エチルを 50 mL 加えた。この溶液を飽和重曹水 (3×30 mL) で抽出し、水層を 4M 塩酸で中和した後、酢酸エチル (3×100 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮しカルボン酸体 **46** (147.9 g, 0.640 mmol, 67%) を白色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1668, 1598, 1499, 1311, 1200, 1094, 979; ^1H NMR(500MHz, CD_3OD) δ 7.58 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.40 (dd, J = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.37 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.06 (dd, J = 46.7, 8.3 Hz, 1H), 6.33 (t, J = 15.8 Hz, 1H), 5.96-6.04 (m, 1H), 5.12-5.13 (m, 1H), 5.10 (s, 1H), 3.48 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.71 (s, 6H); ^{13}C NMR(126MHz, CD_3OD) δ 170.47, 154.57, 144.01, 137.44, 134.04, 129.93, 129.05, 126.70, 118.90, 117.09, 115.08, 43.60, 34.80; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_2$ 232.1338; found 232.1341 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{Na}$ 254.1157; found 254.1191.

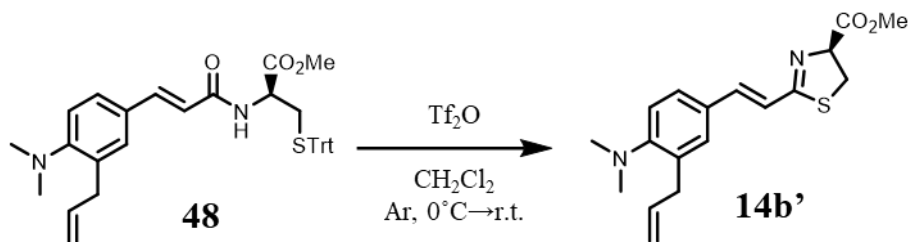
6.1.5.8. アミド体 **48** の合成



カルボン酸体 **46** (200.4 mg, 0.87 mmol) の DMF 溶液 (12 mL) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) (423.8 mg, 1.12 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (649.6 mg, 3.39 mmol) N,N-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (245.0 mg, 2.01 mmol) をアルゴン雰囲気下で加えた。室温で 20 時間攪拌した後、蒸留水 (30 mL) でクエンチした。ヘキサン:酢酸エチル=1:1 溶媒 (3×50 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=4:1→3:1) で精製し、アミド体 **48** (399.4 mg, 0.68 mmol, 78 %) を黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1739, 1598, 1495, 1435, 1200, 978; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.37-7.41 (m, 7H), 7.20-7.32 (m, 10H), 7.03 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.22 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.96-6.04 (m, 2H), 5.15-5.18 (m, 2H), 4.75-4.79 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.48 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.73 (s, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 171.14, 165.70, 154.42, 144.41, 141.84, 137.37, 133.99, 129.76, 129.60, 128.83, 128.13, 127.19, 127.00, 118.95, 117.79, 116.52, 67.05, 52.78, 51.21, 44.56, 35.25, 34.13 ; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}$ 613.2501 ; found 613.2476.

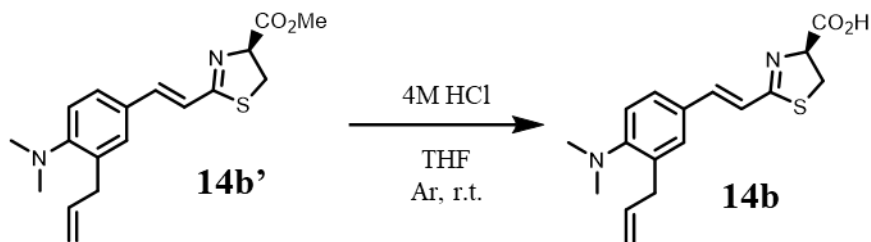
6.1.5.9. チアゾリンメチルエステル体 **14b'** の合成



アミド体 **48** (290.1 mg, 0.491 mmol) の脱水 CH₂Cl₂ 溶液 (20 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) (300 μL, 1.83 mmol) をアルゴン雰囲気下、0°C で加えた後、室温で 2 時間攪拌した。陰イオン交換樹脂 (IRA400 OH AG) を加えて中和し、混合物を綿栓したカラムに通し、メタノールで洗浄し濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=2:1) で精製し、チアゾリンメチルエステル体 **14b'** (67.6 mg, 0.205 mmol, 42%) を黄色固体として得た。

IR (neat, v, cm⁻¹): 1735, 1599, 1499, 1434, 1196, 1094; ¹HNMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.34-7.36 (m, 2H), 7.12 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 5.93-6.00 (m, 1H), 5.20 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 5.11-5.12 (m, 1H), 5.09 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.57-3.60 (m, 2H), 3.45 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.69 (s, 6H); ¹³CNMR (126 MHz, CD₃OD) δ 173.62, 172.54, 155.94, 144.44, 138.73, 135.46, 131.05, 130.43, 127.79, 120.29, 120.14, 116.47, 78.29, 53.08, 44.89, 36.17, 35.10; HR-ESI-MS: *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₈H₂₃N₂O₂S 331.1480; found 331.1475.

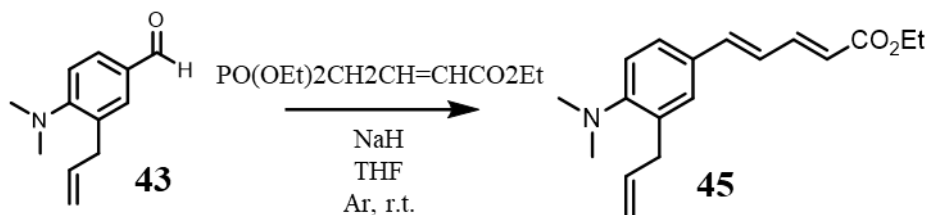
6.1.5.10. ルシフェリンアナログ **14b** の合成



チアズリンメチルエステル体 **14b'** (57.2 mg, 0.17 mmol) の THF 溶液 (1 mL) にアルゴン雰囲気下で 4M 塩酸 (2 mL) を加えた。室温で 1 日攪拌した後、炭酸水素ナトリウムでクエンチした。混合物を ODS フラッシュクロマトグラフィー (メタノール: 水=1:9→9:1) で精製し、ルシフェリンアナログ **14b** (23.9 mg, 0.076 mmol, 44%) を黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1574, 1498, 1392, 1192, 957; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.34-7.38 (m, 2H), 7.06-7.10 (m, 2H), 6.99 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 5.95-6.03 (m, 1H), 5.11-5.13 (m, 1H), 5.09 (t, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.99 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 10.9, 9.2$ Hz, 1H), 3.46-3.52 (m, 3H), 2.67-2.70 (m, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 176.85, 169.62, 154.19, 141.61, 137.48, 134.15, 129.64, 129.47, 126.25, 120.05, 118.97, 115.09, 80.77, 43.67, 35.35, 34.82; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{S}$ 340.1007; found 340.0999 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 362.0827; found 362.0828.

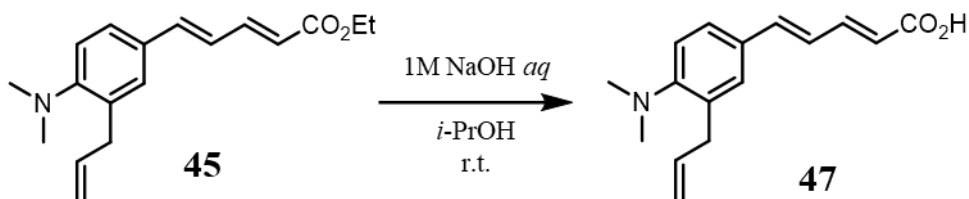
6.1.5.11. エステル体 **45** の合成



4-ホスホノクロトン酸トリエチル(1.0 mL, 4.5 mmol)の THF 溶液(3 mL)に水素化ナトリウム(146.0 mg, 6.1 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下、0°C で 10 分間攪拌し、そこにアリル体 **43** (312.0 mg, 1.7 mmol)の THF 溶液(3 mL)を加えた。3 時間攪拌した後、飽和塩化アンモニウム水溶液(30 mL)でクエンチした。酢酸エチル(3×30 mL)で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル=10:1)で精製し、エチルエステル体 **45** (130.0 mg, 0.45 mmol, 27.6%)を黄色油状物質として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 2923, 2852, 1702, 1620, 1594, 1453, 1366, 1239, 1016, 876 cm^{-1} ; ^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 7.43 (dd, J = 15.5, 10.9 Hz, 1H), 7.27-7.29 (m, 2H), 7.02 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.72-6.79 (m, 1H), 5.97-6.03 (m, 1H), 5.94 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 5.11-5.16 (m, 2H), 4.22 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 3.47 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 2.71 (s, 6H), 1.31 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR(126MHz, CDCl_3) δ 14.45, 29.81, 35.21, 44.73, 60.33, 116.39, 119.11, 120.17, 124.66, 126.08, 129.44, 130.68, 134.10, 137.40, 140.52, 145.14, 167.37; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_2$ 286.18070; found 286.17830.

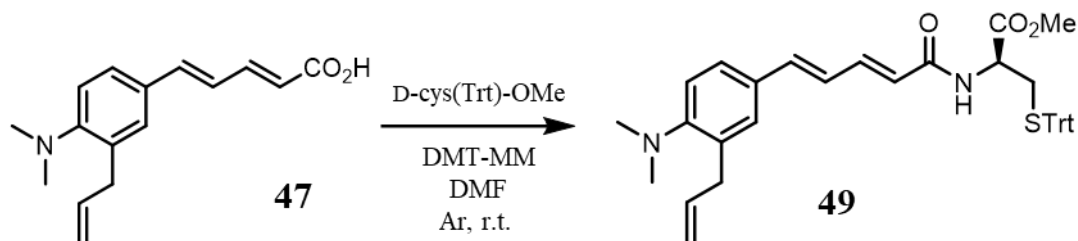
6.1.5.12. カルボン酸体 **47** の合成



エチルエステル体 **45** (373.0 mg, 1.3 mmol) をイソプロパノール (7 mL) と 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (7 mL) で溶解し、室温で 2 時間攪拌した後、1M 塩酸 (4 mL) でクエンチした。酢酸エチル (3×40 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮しカルボン酸体 **47** (189.0 mg, 0.83 mmol, 90%) を白黄色固体で得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 2922, 1660, 1590, 1421, 1262, 1143, 913, 824 ; ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.51 (dd, $J = 15.5, 10.9$ Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.28-7.29 (m, 1H), 7.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.79 (dd, $J = 15.5, 10.9$ Hz, 1H), 5.93-6.01 (m, 2H), 5.14 (d, $J = 13.2$ Hz, 2H), 3.47 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.72 (s, 6H) ; ^{13}C NMR (126MHz, CDCl_3) δ 172.51, 153.99, 147.63, 141.93, 137.45, 134.10, 130.22, 129.63, 126.34, 124.26, 119.09, 119.02, 116.45, 44.65, 35.30 ; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$, 258.1494; found 258.1465.

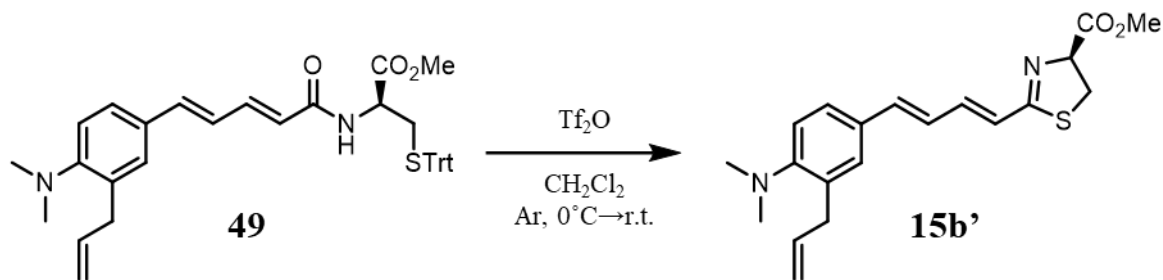
6.1.5.13. アミド体 **49** の合成



カルボン酸体 **47** (60.3 mg, 0.23 mmol) の DMF 溶液 (5 mL) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-Cys(S-Trt)-OMe) (104.3 mg, 0.28 mmol) 4-(4,6-ジメトキシ-1,3,5-トリアジン-2-イル)-4-メチルモルホリニウムクロリド (DMT-MM) (107.8 mg, 0.36 mmol) をアルゴン雰囲気下で加えた。室温で 14 時間攪拌した後蒸留水 (50 mL) でクエンチした。生成物を酢酸エチル (3×50 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル=2:1) で精製し、アミド体 **49** (98.0 mg, 0.16 mmol, 69%) を黄色固体としてえた。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 3271, 3055, 2939, 2829, 2781, 1735, 1649, 1593, 1493, 1442, 1356, 1238, 1142, 1044, 997, 911 ; ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 7.28-7.39 (m, 14H), 7.22 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J = 15.5, 10.9$ Hz, 1H), 5.94-6.04 (m, 2H), 5.89 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 5.16 (q, $J = 1.7$ Hz, 1H), 5.14 (s, 1H), 4.74 (dd, $J = 11.7, 4.9$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.48 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.72 (s, 6H) ; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3\text{SNa}$, 639.2657; found, 639.2654..

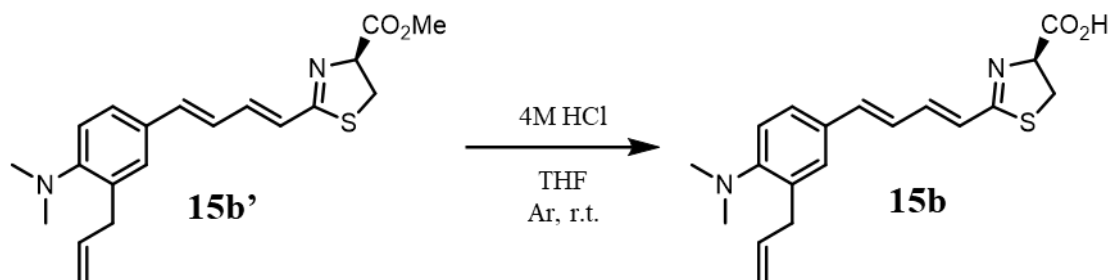
6.1.5.14. チアゾリンメチルエステル体 **15b'** の合成



アミド体 **49** (47.8 mg, 0.078 mmol) の脱水 CH₂Cl₂ 溶液 (5 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf₂O) (300 μL, 1.83 mmol) とトリフェニルホスフィンオキシド (Ph₃PO) (65.2 mg, 0.23 mmol) をアルゴン雰囲気下、0°C で加えた後、室温で 30 分撹拌した。反応混合液に飽和重曹水 (20 mL) を加えクエンチし、クロロホルム (3×20 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=6:1) で精製し、チアゾリンメチルエステル体 **15b'** (18.3 mg, 0.051 mmol, 66%) を橙色油状物質として得た。

IR (neat, ν, cm⁻¹): 2945, 2828, 1735, 1618, 1594, 1567, 1497, 1434, 1406, 1318, 1195, 1143, 1046, 986 ; ¹HNMR (500MHz, CDCl₃) δ 7.42 (dd, *J* = 14.6, 11.2 Hz, 1H), 7.28-7.30 (m, 2H), 7.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.73 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H), 5.94-6.02 (m, 1H), 5.15 (s, 1H), 5.12-5.13 (m, 1H), 4.44 (q, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.45-3.52 (m, 3H), 3.33-3.40 (m, 1H), 2.72 (s, 6H) ; ¹³CNMR (126MHz, CDCl₃) δ 189.01, 169.42, 154.42, 144.07, 143.78, 137.38, 134.05, 129.97, 129.82, 126.58, 125.37, 123.78, 119.07, 116.53, 57.26, 53.52, 44.58, 35.36, 31.60 ; HR-ESI-MS: *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₀H₂₅N₂O₂S, 357.1637; found, 357.1617 [M + Na]⁺ calcd for C₂₀H₂₄N₂O₂SNa, 379.1456; found, 379.1439.

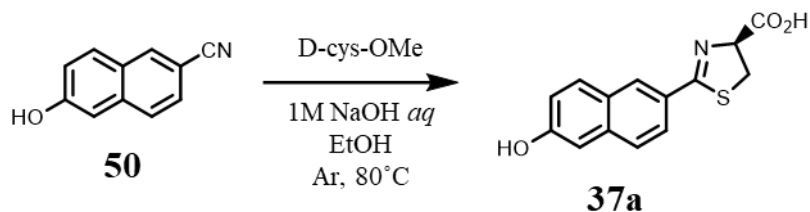
6.1.5.15. ルシフェリンアナログ **15b** の合成



チアゾリンメチルエステル体 **15b'** (220.5 mg, 0.619 mmol) を 4M 塩酸 (4 mL) に溶解し、室温で 1 日攪拌した後、炭酸水素ナトリウムでクエンチした。沈殿物をろ過し、ろ物を蒸留水で洗浄し、減圧下で乾燥させ、ルシフェリンアナログ **15b** (74.4 mg, 0.217 mmol, 35%) を赤色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1661, 1496, 1385, 1134, 984; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.35 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.02-7.05 (m, 1H), 6.84-6.93 (m, 2H), 6.59 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.96-6.04 (m, 1H), 5.07-5.13 (m, 3H), 3.55-3.65 (m, 2H), 3.47 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.71 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 175.30, 173.07, 154.84, 145.27, 140.94, 138.90, 135.40, 132.24, 130.52, 127.18, 126.32, 124.13, 120.28, 116.32, 79.06, 45.06, 36.10, 35.88; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 343.1480; found, 343.1474. $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{SNa}$, 365.1300; found, 365.1296.

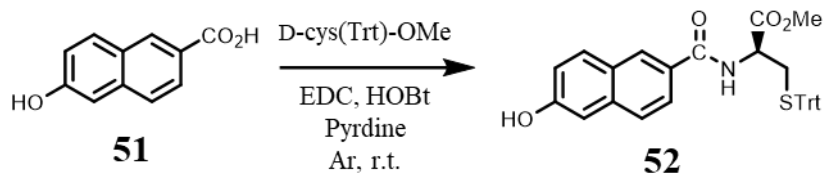
6.1.5.16. ルシフェリンアナログ **37a** の合成



6-ヒドロキシ-2-ナフトニトリル (**50**) (341.2 mg, 2.02 mmol) をエタノール (5 mL) と 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (12 mL) に溶解し、D-システイン塩酸塩一水和物 (1.07 g, 6.09 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、80°C で 10 時間攪拌した。1M 塩酸でクエンチし、この一部を ODS フラッシュクロマトグラフィー (水:メタノール=9:1→1:9) で精製しルシフェリンアナログ **37a** (184.4 mg, 0.675 mmol, >33%) を黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 8.28 (s, 1H), 7.83-7.87 (complex, 2H), 7.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.14-7.17 (complex, 2H), 5.40 (dd, $J = 9.2, 7.4$ Hz, 1H), 3.80-3.89 (m, 2H).

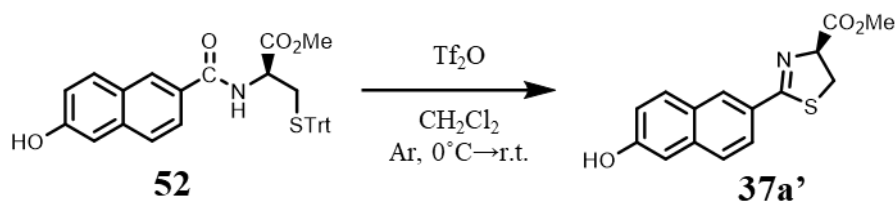
6.1.5.17. アミド体 **52** の合成



6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (**51**) (103.5 mg, 0.550 mmol) のピリジン溶液 (3 mL) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-Cys(S-Trt)-OMe) (205.1 mg, 0.543 mmol) と 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (216.6 mg, 1.13 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (138.6 mg, 1.03 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 10 時間攪拌した後、トルエンを加え減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで精製し、アミド体 **52** (199.7 mg, 0.365 mmol, 66%) を黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (s, 1H), 7.81 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.38-7.39 (m, 6H), 7.21-7.24 (m, 6H), 7.14-7.19 (complex, 4H), 6.79 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.12 (q, $J = 7.3$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.76-2.84 (m, 2H).

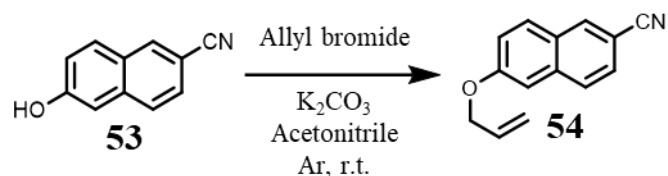
6.1.5.18. チアゾリンメチルエステル体 **37a'** の合成



アミド体 **52** (429.1 mg, 0.784 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 溶液 (10 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 ($\text{ Tf}_2\text{O}$) (0.25 mL, 1.52 mmol) をアルゴン雰囲気下、 0°C で加えた後、室温で 30 分攪拌した。反応混合液に飽和重曹水 (10 mL) を加えクエンチし、水 (20 mL) を加え、クロロホルム (3×30 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣を ODS フラッシュクロマトグラフィー (水:メタノール=9:1→1:9) で精製し、チアゾリンメチルエステル体 **37a'** (136.2 mg, 0.474 mmol, 60%) を橙色油状物質として得た。

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.80 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 5.35 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.63-3.74 (m, 2H).

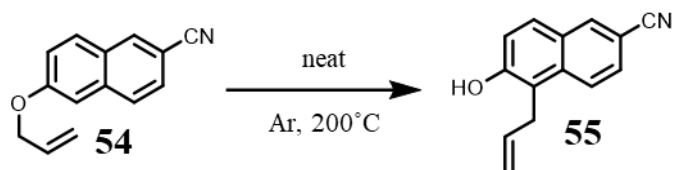
6.1.5.19. アリルエーテル体 **54** の合成



6-ヒドロキシ-2-ナフトニトリル (**53**) (194.0 mg, 1.15 mmol) のアセトニトリル溶液 (5 mL) に臭化アリル (500 μ L, 5.91 mmol) と炭酸カリウム (415.1 mg, 3.00 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で7時間攪拌した。反応混合物に蒸留水 (20 mL) を加えクエンチし、酢酸エチル (3 \times 100 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=4:1 \rightarrow 2:1) により精製し、アリルエーテル体 **54** (224.5 mg 1.07 mmol, 93%) を白色固体として得た。

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07 (s, 1H), 7.73 (dd, J = 8.6, 5.2 Hz, 2H), 7.51 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 9.2, 2.9 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.06-6.14 (m, 1H), 5.45-5.49 (m, 1H), 5.34 (dd, J = 10.3, 1.1 Hz, 1H), 4.65-4.66 (m, 2H) .

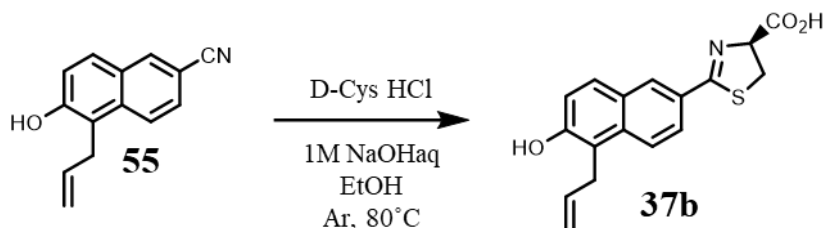
6.1.5.20. アリルナフタレン体 **55** の合成



アリルエーテル体 **54**(74.8 mg, 0.357 mmol)をアルゴン雰囲気下、200°C で 2 時間攪拌した。反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Hexane:EtOAc = 2:1)で精製し、アリル体 **55**(50.1 mg, 0.239 mmol, 75%)を橙色固体として得た。

^1H NMR(500MHz, CDCl_3) δ 8.14 (s, 1H), 7.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.57-7.59 (m, 1H), 7.23 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.00-6.08 (m, 1H), 5.81 (s, 1H), 5.11 (dd, $J = 10.3, 1.7$ Hz, 1H), 5.01 (dd, $J = 17.2, 1.1$ Hz, 1H), 3.81 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H) ; ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 154.08, 135.23, 135.12, 134.83, 129.13, 128.33, 127.14, 124.51, 119.82, 119.68, 117.65, 116.57, 106.40, 29.23.

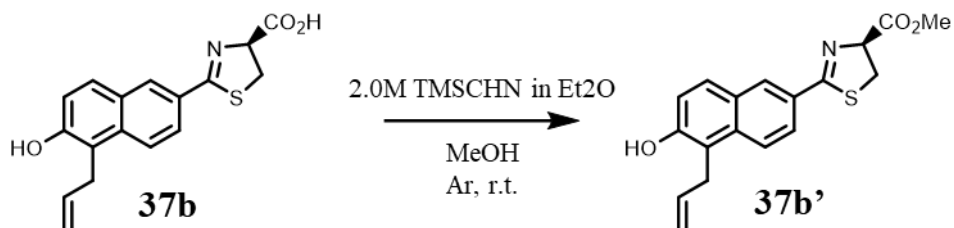
6.1.5.21. ルシフェリンアナログ **37b** の合成



アリルナフタレン体 **55**(36.7 mg, 0.175 mmol)のエタノール溶液(1 mL)に D-システイン塩酸塩一水和物 (100.5 mg, 0.572 mmol)と 1M NaOH 水溶液 (1 mL, 1 mmol)を加えた。アルゴン雰囲気下、80°C で 2.5 時間攪拌した後、1M 塩酸(1 mL)でクエンチした。得られた固体をろ過し、蒸留水で洗浄した。ろ物を ODS フラッシュクロマトグラフィー(MeOH:H₂O=1:9→9:1)により精製しルシフェリンアナログ **37b**(51.8 mg, 0.165 mmol, 94%)を黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1557, 1477, 1361, 1288, 1200, 971; ¹HNMR(500MHz, CD₃OD) δ 8.20 (s, 1H), 7.88-7.92 (m, 2H), 7.72 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.95-6.03 (m, 1H), 5.31 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.92-4.94 (m, 1H), 3.79 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.68-3.76 (m, 2H) ; ¹³CNMR(126MHz, CD₃OD) δ 174.18, 173.73, 155.71, 137.66, 136.87, 131.46, 130.12, 129.25, 127.71, 125.59, 124.70, 119.76, 118.95, 115.23, 79.17, 36.00, 29.89 ; HR-ESI-MS: m/z : [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₆NO₃S 314.0851 ; found 314.0842 [M + Na]⁺ calcd for C₁₇H₁₅NO₃SNa 336.0670 ; found 336.0667.

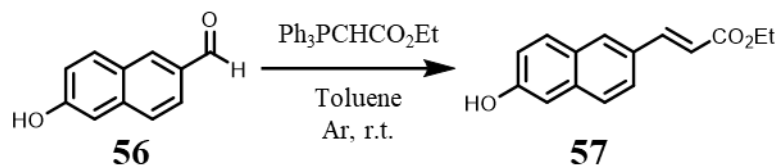
6.1.5.22. チアゾリンメチルエステル体 **37b'** の合成



ルシフェリンアナログ **37b** (20.4 mg, 0.065 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に 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 (325 μ L, 0.65 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 2 時間攪拌した後、反応溶液に酢酸 (70 μ L) を加えクエンチした。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (Hex:EtOAc = 7:3 \rightarrow 1:1) で精製しチアゾリンメチルエステル体 **37b'** (17.2 mg, 0.053 mmol, 81%) を黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1724, 1573, 1435, 1282, 1204, 985; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 9.2, 1.7$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.00-6.07 (m, 1H), 5.35 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.08 (dd, $J = 10.0, 1.4$ Hz, 1H), 5.02 (dd, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.66-3.80 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 171.73, 171.61, 153.20, 135.61, 135.22, 130.42, 129.48, 128.51, 127.27, 125.49, 123.48, 118.91, 117.35, 116.10, 78.32, 52.98, 35.44, 29.30; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_3\text{S}$ 328.1007; found 328.1002 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{SNa}$ 350.0827; found 350.0827.

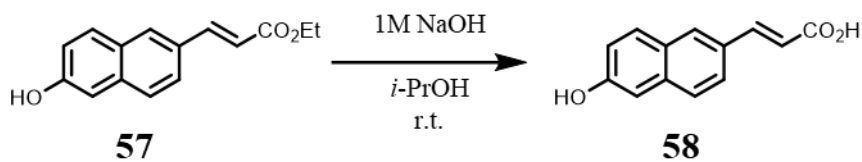
6.1.5.23. エステル体 **57** の合成



6-ヒドロキシ-2-ナフトアルデヒド (**56**) (1.01 g, 5.88 mmol) のトルエン溶液 (20 mL) に wittig 試薬 ((カルベトキシメチレン)トリフェニルホスホラン: $\text{Ph}_3\text{C}=\text{CHCO}_2\text{Et}$) (5.10 g, 14.6 mmol) を加えた。室温で 15 時間攪拌した後、濃縮した。残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製しエステル体 **57** (1.36 g, 5.62 mmol, 96%) を白色固体として得た。 .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.75-7.85 (m, 3H), 7.61-7.67 (m, 2H), 7.11-7.14 (m, 2H), 6.49 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

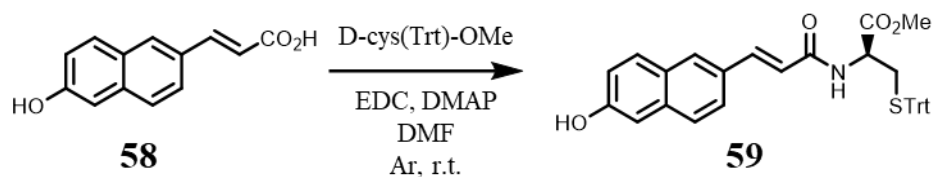
6.1.5.24. カルボン酸体 **58** の合成



エステル体 **57** (515.3 mg, 2.13 mmol) をイソプロパノール (5 mL) と 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (5 mL) に溶解した。室温で 1 日半攪拌した後、酢酸エチルを 50 mL 加えた。この溶液を飽和重曹水 (3×50 mL) で抽出し、水層を 4M 塩酸で酸性にした後、酢酸エチル (5×50 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮しカルボン酸体 **58** (450.7 mg, 2.10 mmol, 99%) を白色固体として得た。

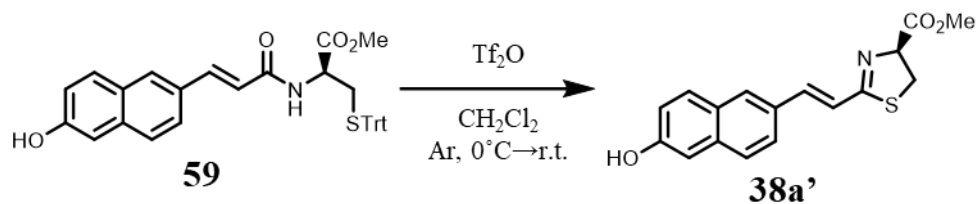
^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.88 (s, 1H), 7.75-7.79 (m, 2H), 7.64 (s, 2H), 7.07-7.10 (m, 2H), 6.49 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H).

6.1.5.25. アミド体 **59** の合成



カルボン酸体 **58** (241.1 mg, 1.13 mmol) の DMF 溶液 (15 mL) に S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-cys(Trt)-OMe) (449.2 mg, 1.19 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (487.0 mg, 2.54 mmol) N,N-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) (283.2 mg, 2.32 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 1 日攪拌した後、蒸留水 (50 mL) でクエンチした。ヘキサン:酢酸エチル=1:1 溶媒 (3×100 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで精製し、アミド体 **59** の粗生成物を黄色固体として得た。

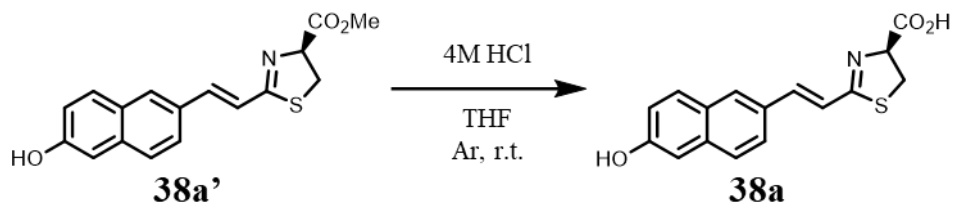
6.1.5.26. チアゾリンメチルエステル **38a'**の合成



アミド体 **59** 粗生成物 (136.0 mg) の脱水 CH_2Cl_2 溶液 (10 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 (Tf_2O) (0.15 mL, 0.91 mmol) をアルゴン雰囲気下、 0°C で加えた後、室温で 40 分撹拌した。反応混合液に飽和重曹水 (5 mL) を加えクエンチし、水 (10 mL) を加え、塩化メチレン (2×10 mL) と酢酸エチル (2×10 mL) で抽出し、有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーで精製し、チアゾリンメチルエステル体 **38a'** (22.9 mg, 0.073 mmol, 19% (2 段階)) を橙色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (s, 1H), 7.68 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.08-7.13 (m, 3H), 5.25 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H), 3.58-3.69 (m, 2H).

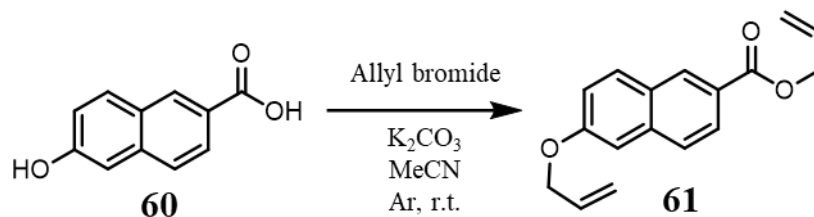
6.1.5.27. ルシフェリンアナログ **38a** の合成



チアゾリンメチルエステル体 **38a'** (12.6 mg, 0.040 mmol) を 4M 塩酸 (3 mL) に溶解し、室温で 1 日攪拌した後、水酸化ナトリウム水溶液でクエンチし減圧濃縮した。残渣を ODS フラッシュクロマトグラフィー (メタノール:水=1:9→9:1) で精製し、ルシフェリンアナログ **38a** (4.0 mg, 0.013 mmol, 33%) を黄色固体として得た。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.83 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.61-7.65 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 7.05-7.09 (m, 2H), 4.99 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.50-3.63 (m, 2H).

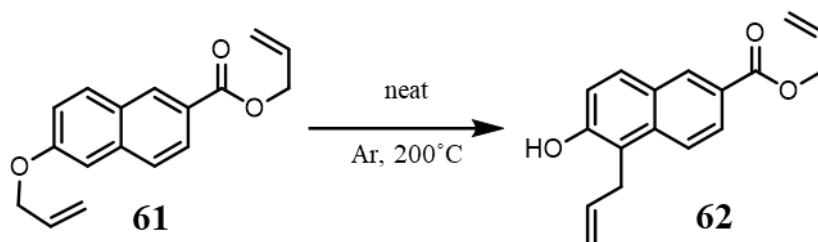
6.1.5.28. アリルエーテル体 **61** の合成



6-ヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (**60**) (1.88 g, 10.0 mmol) のアセトニトリル溶液 (30 mL) に臭化アリル (5 mL, 58 mmol) と炭酸カリウム (2.76 g, 20 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 2 日間攪拌させた後、蒸留水でクエンチし、酢酸エチル (3 × 100 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 2: 1) で精製し、アリルエーテル体 **61** (1.99 g, 7.41 mmol, 74%) を無色油状物質として得た。

¹HNMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (s, 1H), 8.04 (dd, *J* = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.05-6.16 (m, 2H), 5.43-5.50 (m, 2H), 5.30-5.35 (m, 2H), 4.87 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.69 (dd, *J* = 16.9, 5.4 Hz, 2H) ; HR-ESI-MS: *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₁₇H₁₆O₃Na 291.0997 ; found 291.0974.

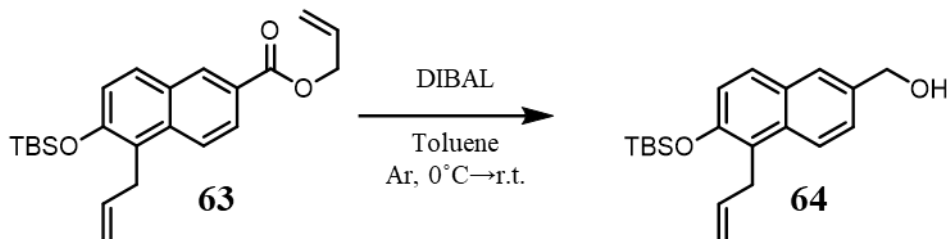
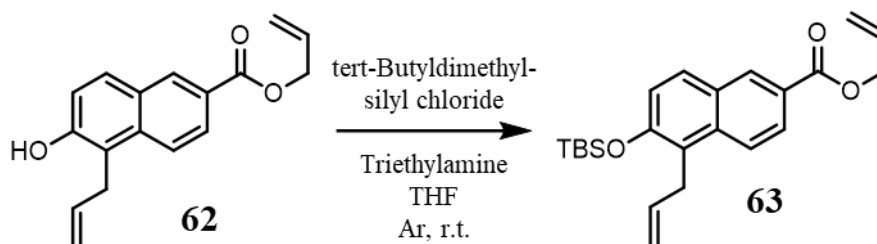
6.1.5.29. ナフタレンアリル体 **62** の合成



アリルエーテル体 **61** (1.75 g, 6.52 mmol) をアルゴン雰囲気下、200°C で 5 時間攪拌した。反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）で精製し、アリルナフタレン体 **62** (1.29 g, 4.80 mmol, 73%) を褐色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1679, 1625, 1281, 1187, 1105, 968; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.03-6.13 (m, 2H), 5.41-5.47 (m, 2H), 5.32 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 5.12 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 5.05 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H), 4.88 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 166.72, 153.52, 135.94, 135.45, 132.52, 131.97, 130.11, 128.53, 126.10, 124.85, 123.41, 118.89, 118.38, 117.21, 116.40, 65.72, 29.41; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$ 291.0997; found 291.1011.

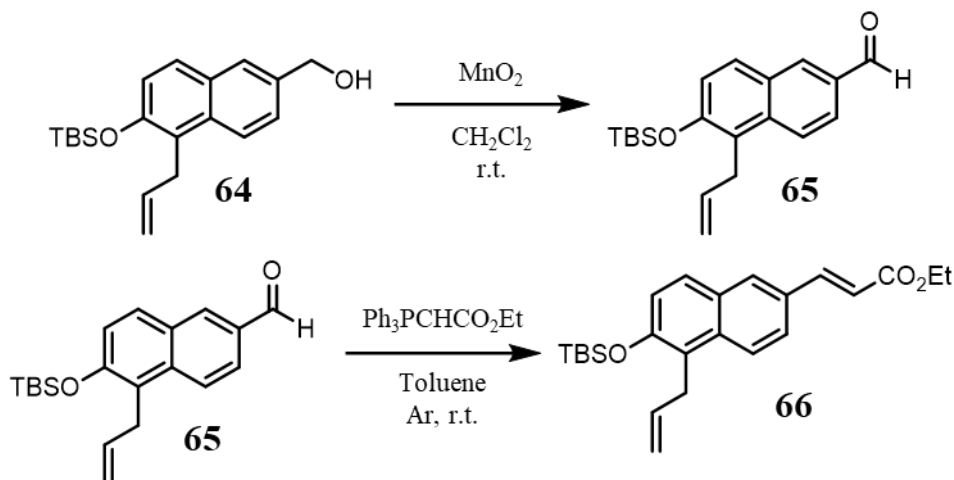
6.1.5.30. アルコール体 **64** の合成



アリルナフタレン体 **62** (731.4 mg, 2.73 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 (8 mL) に *tert*-ブチルジメチルクロロシラン (2.05 g, 13.6 mmol) とトリエチルアミン (1.12 mL, 8.0 mmol) を加え室温で 1 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにて原料の消失を確認した後、水素化ジイソブチルアルミニウム (19%ヘキサン溶液、約 1.0 M) (14 mL, 14 mmol) を 0°C で反応溶液に加え、7 時間攪拌した。室温に昇温した後、1M 塩酸 (5 mL) でクエンチした。反応混合物を酢酸エチル (3×70 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:酢酸エチル=6:1→酢酸エチルのみ) で精製し、アルコール体 **64** (893 mg, 100%) を褐色油状物質として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1599, 1472, 1249, 987; ^1H NMR (500 MHz, CHCl_3) δ 7.91 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.9, 2.0$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.99-6.06 (m, 1H), 5.02 (dd, $J = 10.0, 2.0$ Hz, 1H), 4.95 (dd, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.85 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.08 (s, 9H), 0.28 (s, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CHCl_3) δ 150.97, 136.73, 135.76, 133.28, 129.49, 127.72, 126.30, 125.66, 124.44, 122.78, 120.87, 115.28, 65.53, 29.79, 26.00, 18.46, -3.76; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{SiNa}$ 351.1756; found 351.1771.

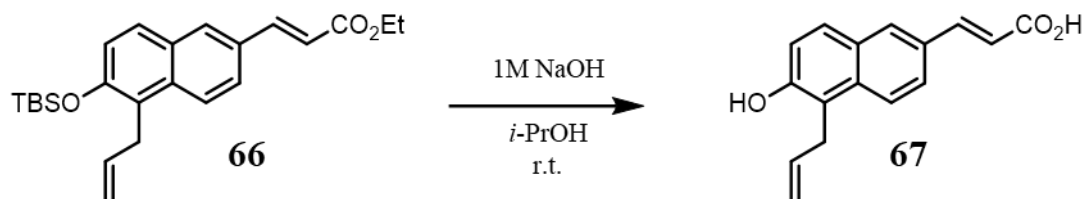
6.1.5.31. エチルエステル体 **66** の合成



アルコール体 **64** (893 mg, 2.72 mmol) の塩化メチレン溶液 (70 mL) に二酸化マンガンを加えた。室温で 4 時間攪拌した後、セライトろ過で不純物を取り除いた。濾液を減圧濃縮し、アルデヒド体 **65** の粗生成物を得た。この粗生成物のベンゼン溶液 (40 mL) に wittig 試薬 ((カルベトキシメチレン)トリフェニルホスホラン: $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$) (6.23 g, 16 mmol) を加え、アルゴン雰囲気下、室温で 1 日間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮し、その残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=4:1) で精製しエチルエステル体 **66** (848 mg, 2.2 mmol, 81%) を薄黄色固体で得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1707, 1592, 1471, 1373, 1254, 1161, 985; ^1H NMR (500 MHz, CHCl_3) δ 7.90 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.82-7.86 (m, 2H), 7.64-7.67 (m, 2H), 7.13 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.02 (dq, $J = 22.8, 5.3$ Hz, 1H), 5.03 (dd, $J = 10.3, 1.7$ Hz, 1H), 4.95 (dd, $J = 17.2, 1.7$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.83 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.06 (d, $J = 10.3$ Hz, 9H), 0.28 (s, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CHCl_3) δ 167.36, 152.20, 144.87, 136.44, 134.71, 130.58, 129.55, 129.31, 128.54, 124.69, 123.86, 123.16, 121.17, 117.37, 115.42, 60.52, 29.69, 25.93, 18.43, 14.49, -3.79; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{SiNa}$ 419.2018; found 419.2047.

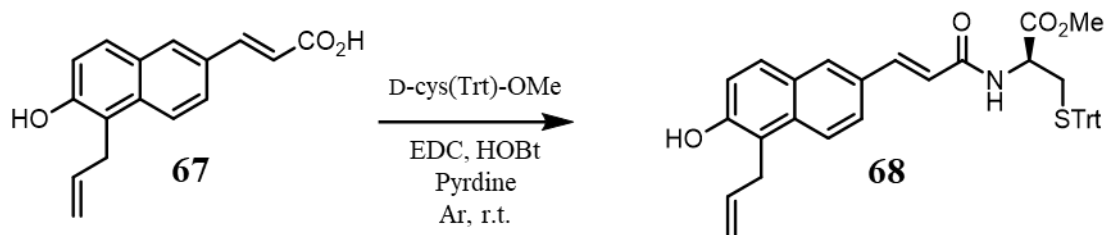
6.1.5.32. カルボン酸体 **67** の合成



エチルエステル体 **66** (844 mg, 2.21 mmol) をイソプロパノール (15 mL) と 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (15 mL, 15 mmol) に溶解した。室温で 3 時間冷やしながら攪拌した後、陽イオン交換樹脂 (Amberlite IR-120H) で中和した。綿栓ろ過で樹脂を取り除き、飽和重曹水 (3×20 mL) で抽出した。4M 塩酸 (100 mL) で酸性にした後、酢酸エチル (3×150 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮しカルボン酸体 **67** (400 mg, 1.6 mmol, 70%) を薄黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1661, 1597, 1411, 1268, 1190; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.88-7.90 (m, 2H), 7.80 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.67-7.69 (m, 2H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 5.96-6.04 (m, 1H), 4.97 (s, 1H), 4.93-4.95 (m, 1H), 3.79 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 170.79, 155.12, 146.83, 137.78, 136.10, 131.91, 129.95, 129.85, 129.75, 125.12, 124.59, 119.43, 118.99, 117.68, 115.15, 29.91; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{Na}$ 277.0841; found 277.0865.

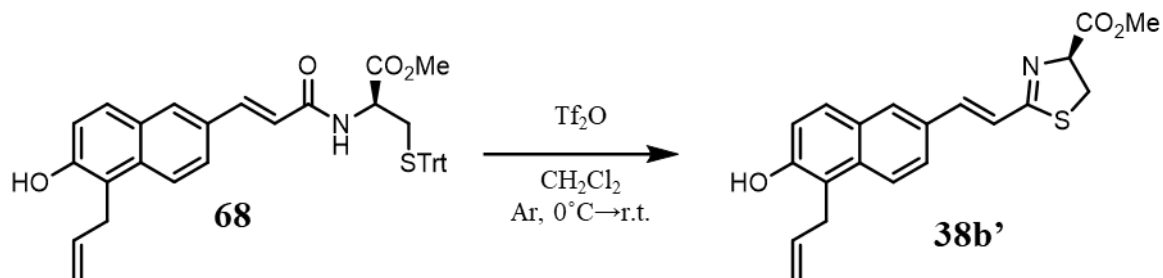
6.1.5.33. アミド体 **68** の合成



カルボン酸体 **67** (259 mg, 1.0 mmol) と S-トリチル-D-システインメチルエステル (D-Cys(S-Trt)-OMe) (500 mg, 1.3 mmol) のピリジン溶液 (15 mL) に 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC) (389 mg, 2.0 mmol) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) (284 mg, 2.1 mmol) を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で 1 日間攪拌した後、トルエン (30 mL) を加え減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc=3:2→1:1) で精製し、アミド体 **68** (383 mg, 0.63 mmol) の粗生成物を白色固体として得た。

HR-ESI-MS: m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{39}H_{35}NO_4SNa$ 636.2185 ; found 636.2192.

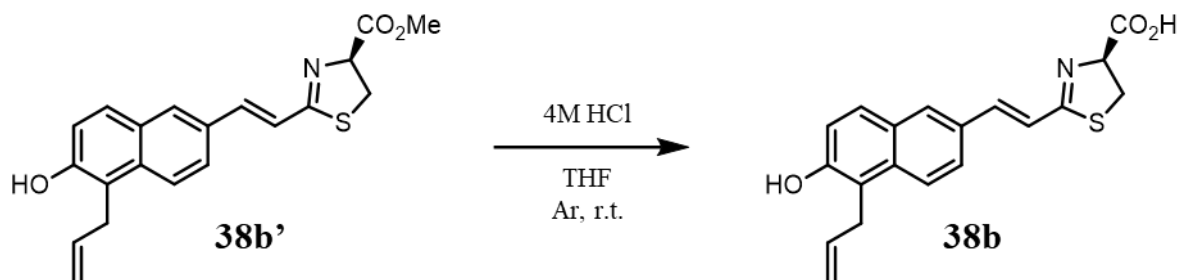
6.1.5.34. チアゾリンメチルエステル体 **38b'** の合成



アミド体 **68** 粗生成物 (243 mg) の脱水 CH_2Cl_2 溶液 (20 mL) にトリフルオロメタンスルホン酸無水物 ($\text{ Tf}_2\text{O}$) (0.30 mL, 1.83 mmol) をアルゴン雰囲気下、 0°C で加えた後、室温で 30 分攪拌した。反応混合液に飽和重曹水 (15 mL) を加えクエンチし、塩化メチレン (3×50 mL) で抽出し、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane : EtOAc = 1:1) で精製し、チアゾリンメチルエステル体 **38b'** (67.6 mg, 0.205 mmol, 32% (2 段階)) を橙色固体として得た。

IR (neat, v, cm^{-1}): 1732, 1616, 1557, 1433, 1194, 1164, 959 ; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CHCl_3) δ 7.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.49-7.52 (m, 2H), 7.23 (s, 1H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.00-6.08 (m, 1H), 5.27 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 5.00-5.05 (m, 2H), 3.77-3.83 (m, 5H), 3.59-3.70 (m, 2H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CHCl_3) δ 171.75, 171.47, 153.05, 143.21, 136.01, 134.32, 130.07, 129.42, 128.92, 128.81, 124.06, 123.78, 120.72, 119.00, 117.99, 115.69, 77.42, 53.04, 34.65, 29.28 ; HR-ESI-MS: m/z : $[\text{ M} + \text{ H}]^+$ calcd for $\text{ C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_3\text{S}$ 354.1164 ; found 354.1169.

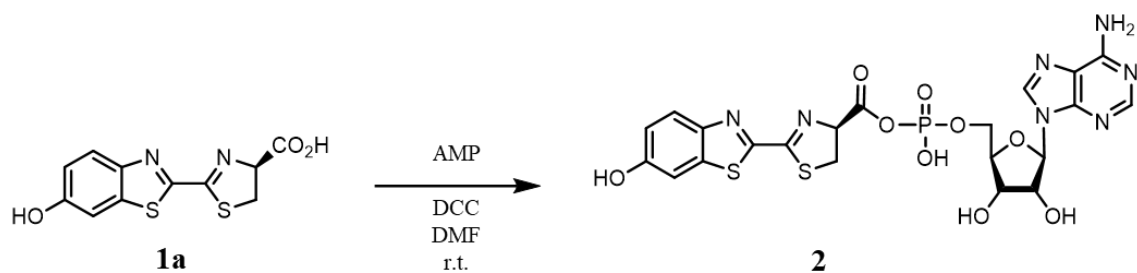
6.1.5.35. ルシフェリンアナログ **38b** の合成



チアゾリンメチルエステル体 **38b'** (10.7 mg, 0.030 mmol) に THF (100 μ L) と 4M 塩酸 (100 μ L) で溶解した。アルゴン雰囲気下、室温で 1 日間攪拌した後、15%アンモニア水溶液でクエンチし、減圧濃縮した。残渣を ODS フラッシュクロマトグラフィー (メタノール:水=1:9 \rightarrow 9:1) で精製し、ルシフェリンアナログ **38b** (7.6 mg, 0.022 mmol, 44%) を黄色固体として得た。

IR (neat, ν , cm^{-1}): 1571, 1364, 1195, 1160, 956 ; ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.88 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.12-7.15 (m, 2H), 5.95-6.03 (m, 1H), 5.19 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 4.94 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 3.78 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.61-3.70 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_3OD) δ 173.09, 172.45, 153.81, 143.72, 136.45, 134.62, 130.07, 128.93, 128.66, 128.41, 123.83, 123.11, 119.29, 118.13, 117.69, 113.82, 77.14, 34.22, 28.58.

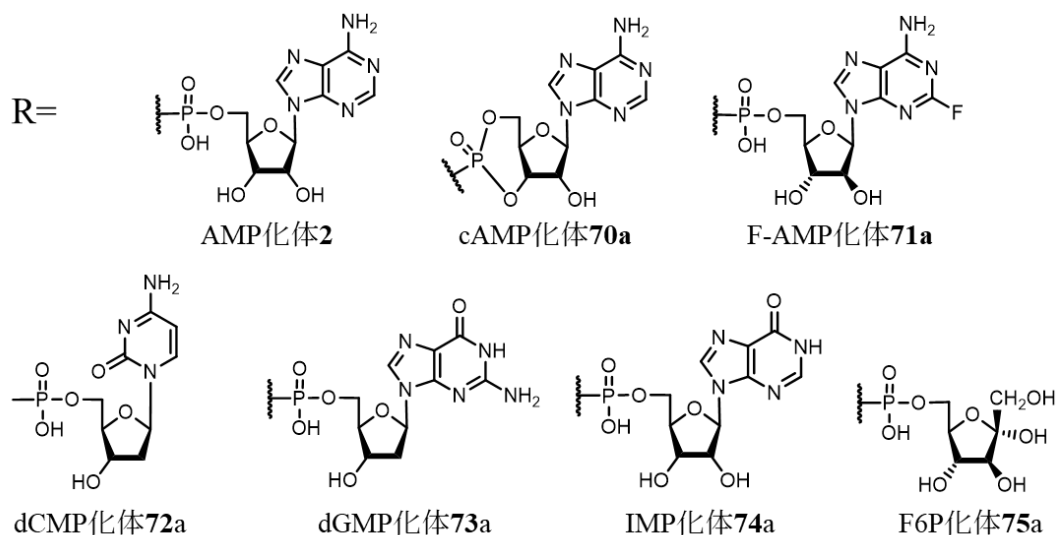
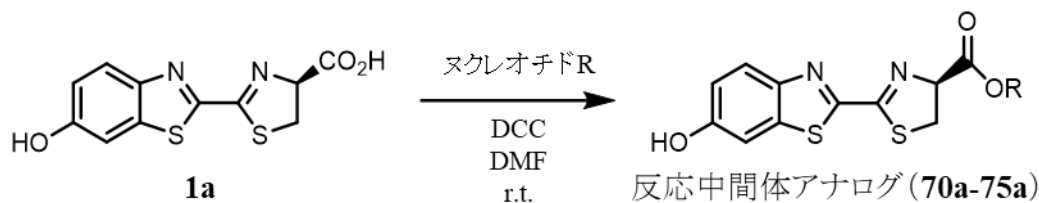
6.1.5.36. AMP 化ルシフェリン **2** の合成



D-ルシフェリン (**1a**) (1 mg) の DMF 溶液 (0.5 mL) にアデノシン-リン酸 (10 mg) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (10 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物に冷アセトン (1 mL) を加え遠心分離 (5 min, 10000 rpm) した。上澄みを捨て、再び冷アセトンを加え遠心分離 (5 min, 10000 rpm) した。これを 2 度繰り返す、沈殿物を真空乾燥させ、AMP 化ルシフェリン **2** を白色固体の粗生成物として得た。

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 12.5 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 610.09.

6.1.5.37. 反応中間体アナログ **70a-75a** の合成



D-ルシフェリン (**1a**) (1 mg) の DMF 溶液 (0.5 mL) にヌクレオチド R (**70-75**) (10 mg) と N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) (10 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物に冷アセトン (1 mL) を加え遠心分離 (5 min, 10000 rpm) した。上澄みを捨て、再び冷アセトンを加え遠心分離 (5 min, 10000 rpm) した。これを 2 度繰り返す、沈殿物を真空乾燥させ、反応中間体ルシフェリンアナログ **70a-75a** を白色固体の粗生成物として得た。

・反応中間体アナログ **70a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : No Data

・反応中間体アナログ **71a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 17.2 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 627.87

・反応中間体アナログ **72a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 13.2 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 569.81

・反応中間体アナログ **73a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 14.0 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 609.89

・反応中間体アナログ **74a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 15.0 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 610.89

・反応中間体アナログ **75a**

LC/MS (Mightysil RP-18GP Aqua) : RT 17.5 min ESI-MS: m/z : $[M + H]^+$ 523.04.

6.2. 測定の一部

購入した試薬および溶媒は、さらに精製することなく使用した。

In vitro 生物発光測定では、組換え Ppy ルシフェラーゼ(Quantum Lum recombinant luciferase, Promega corp., USA)および天然ホタルから精製した Ppy ルシフェラーゼ(Sigma-Aldrich Co. LLC.)を使用した。

AMP 化体アナログの分析には、Thermo Fisher Scientific LCQ Fleet LC-MS を使用し、ODS カラム(Mightysil RP-18 GP Aqua)を用いて、10%~90%アセトニトリル(流速 0.3 mL /分)による勾配溶出で、330nm の UV 検出器で検出した。

生物発光強度は ATTO AB-2200 ルミノメーターを用いてモニターし、生物発光スペクトルは ATTO AB-1850 分光光度計(データ間隔 1 nm、スリット幅 1mm)を用いて測定した。

LogP は ChemDraw 13.0 を用いて計算した。

生物発光イメージングは、多機能インビボイメージングシステム(MIIS, Molecular device, LLC)を用いて測定した。

6.2.1. 大型動物モデル実験(本論 2.2)

市販の豚肉(白色骨格筋、赤色骨格筋)を使用し、1 枚約 1 cm 厚で準備した。底面に検出器があるため、骨格筋を並べた上に発光させた 1.5 mL チューブに発光溶液を乗せ、上部からの散乱光が入らないため上から 1 cm の骨格筋を載せた。基質は純水に溶解し調整した。2.2.1 の高輝度条件では pH8 50 mM Tris-HCl緩衝液 30 μ L に 1 mg/mL 酵素(*Ppy*) 30 μ L、1 mM 基質 30 μ L、10 mM ATP-Mg 60 μ L で発光させた。2.2.2 と 2.2.3 ではリン酸緩衝生理食塩水(PBS) 30 μ L に 0.1 mg/mL 酵素(*Ppy*) 30 μ L、1 mM 基質 30 μ L、10 mM ATP-Mg 60 μ L で発光させた。

6.2.2. ミニブタの発光イメージング(本論 2.3)

2.3.1 では測定機器に「NightSHADE LB985(Berthold 社製)」を用いた。オスの Micro mini pig (6.8 kg, 体長 52 cm)を用いた。TokeOni60 mM を 17 mL (50 mg/kg) 投与した。

2.3.2 では測定機器に「IVIS (Perkin Elmer 社製)」を用いた。16-4433Micro mini pig (オス、生後 38 日、3.5 kg, 体長 30 cm、鼻長 10 cm)を用いた。HeLa/luc2 細胞(300 万細胞)を移植した。TokeOni を 50 mg/kg 投与した。

6.2.3. 発光活性測定(本論 3.3)

6.2.3.1. 生物発光波長

ルシフェリンアナログ 50 mM KPB (pH = 6.0) 溶液 20 μ L と Ppy ルシフェラーゼ 35%グリセロール 50 mM KPB (pH = 8.0) 20 μ L、500 mM KPB (pH = 8.0) 20 μ L をポリスチレンチューブ内で混合し、ATP-Mg 40 μ L をシリンジにて注入して測定した。発光波長をスペクトロメーター AB-1850 にて 10 分間測定 (1a: 露光時間 15 秒、その他: 露光時間 10 分) した。それぞれの濃度を Table 6.2.3.1 に示した。

Table.6.2.3.1. 発光波長測定条件

	調整濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	250	0.1	10
1b	500	0.1	10
5a	500	0.1	10
5b	500	1.0	10
6a	500	0.1	10
6b	500	1.0	10
3a	500	1.0	10
3b	500	1.0	10
4a	500	1.0	10
4b	250	1.0	10
	最終濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	50	0.02	4
1b	100	0.02	4
5a	100	0.02	4
5b	100	0.2	4
6a	100	0.02	4
6b	100	0.2	4
3a	100	0.2	4
3b	100	0.2	4
4a	100	0.2	4
4b	50	0.2	4

6.2.3.2. 化学発光波長測定.

化学発光条件はルシフェリンアナログ (**1**, **37**, **38a**, **b**) とルシフェリンアナログ (**14**, **15a**, **b**) で測定方法を分けた。

ルシフェリンアナログ (**1**, **37**, **38a**, **b**) はチアゾリンメチルエステル体 (**1**, **37**, **38a'**, **b'**) を用いた発光測定を行った。2.5 mM 基質 DMSO 溶液 200 μL をポリスチレンチューブに入れ、シリンジで 250 mM *t*-BuOK DMSO 溶液 40 μL を注入して発光させた。発光波長はスペクトロメーター AB-1850 で 180 秒間測定した。

ルシフェリンアナログ (**14**, **15a**, **b**) はプロピルホスホン酸無水物溶液 (T3P) を用いた発光測定を行った。ルシフェリンアナログ DMF 溶液 (**14a,b**: 50 mM, **15a,b**: 20 mM) 20 μL と 150 mM T3P DMF 溶液 180 μL をポリスチレンチューブに入れ、シリンジで 500 mM トリエチルアミン DMF 溶液 200 μL を加えて発光させた。発光波長はスペクトロメーター AB-1850 で 30 秒間測定した。

6.2.3.3. 生物発光強度

250 μM ルシフェリンアナログ 50 mM KPB (pH = 6.0) 溶液 20 μL と Ppy ルシフェラーゼ (0.1 mg/mL) 35% グリセロール 50 mM KPB (pH = 8.0) 20 μL 、500 mM KPB (pH = 8.0) 20 μL をポリスチレンチューブ内で混合し、10 mM ATP-Mg 40 μL をシリンジにて注入して測定した。発光波長をスペクトロメーター AB-1850 にて露光時間 15 秒で 10 分間測定した。発光強度は極大発光波長強度と半値幅をかけ合わせることで近似値を求めた。

6.2.3.4. ルミノメーター AB-2270 の感度補正

ATTO 社製のルミノメーター AB-2270 は長波長帯の感度が悪いことが知られている。そのため、本研究で合成した長波長化材料に関しては発光強度が実際よりも弱く測定されてしまう。そこで、波長帯によつての感度変化の少ないスペクトロメーター AB-1850 を用いて感度補正を行った。

ルシフェリンアナログの 50 mM KPB (pH = 6.0) 溶液 20 μL と Ppy ルシフェラーゼ (0.1 mg/mL) 35% グリセロール 50 mM KPB (pH = 8.0) 20 μL 、500 mM KPB (pH = 8.0) 20 μL をポリスチレンチューブ内で混合し、10 mM ATP-Mg 40 μL をシリンジにて注入して測定した (Table.6.2.3.3a)。ルミノメーター AB-2270 とスペクトロメーター AB-1850 にて同条件で同時に測定を行い、得られた AB-1850 の発光量を AB-2270 の発光量で除することで補正值とした (Table.6.2.3.3b)。

Table.6.2.3.3a. 発光強度補正測定条件

	調整濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	100	0.01	0.2
1b	100	0.01	10
14a	50	0.01	10
14b	50	0.1	10
15a	500	0.1	0.2
15b	500	0.1	10
17a	100	0.1	10
17b	100	0.1	10
18a	500	0.1	10
18b	250	0.1	10
	最終濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	20	0.002	0.08
1b	20	0.002	4
14a	10	0.002	4
14b	10	0.02	4
15a	100	0.02	0.08
15b	100	0.02	4
17a	20	0.02	4
17b	20	0.02	4
18a	100	0.02	4
18b	50	0.02	4

Table.6.2.3.3b. 発光強度補正值 (AB-1850/AB-2270)

	発光強度		補正值 (AB-1850/AB-2270)
	AB-2270	AB-1850	
1a	234280000	11081161	0.047
1b	205935667	13746828	0.067
14a	24748700	7813140.9	0.316
14b	68655967	23878348	0.348
15a	102125767	15954511	0.156
15b	77689700	30861659	0.397
17a	248515667	15024467	0.060
17b	94268967	6260460.4	0.066
18a	87675167	5909796.7	0.067
18b	164617000	11243376	0.068

6.2.3.5. ミカエリス定数 (K_m) および最大反応速度 (V_{max}) の測定

ルシフェリンアナログ 50 mM KPB (pH = 6.0) 溶液 20 μ L と Ppy ルシフェラーゼ 35%グリセロール 50 mM KPB (pH = 8.0) 20 μ L、500 mM KPB (pH = 8.0) 20 μ L をポリスチレンチューブ内で混合し、ATP-Mg 40 μ L をシリンジにて注入して測定した。発光強度をルミノメーター AB-2270 にて 10 分間測定した。それぞれの濃度を Table 6.2.3.4 に示した。求めた発光強度に強度補正值 (AB-1850/AB-2270) をかけ合わせ、その測定値を使用し、SigmaPlot にてミカエリス定数 (K_m) および最大反応速度 (V_{max}) を求めた。

Table.6.2.3.4. ミカエリス定数 (K_m) および最大反応速度 (V_{max}) の測定条件

	調整濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	10-500	0.01	0.2
1b	50-1000	0.01	0.2
14a	1-100	0.01	0.2
14b	10-200	0.01	0.2
15a	5-100	0.01	0.2
15b	10-500	0.01	0.2
17a	10-200	0.01	0.2
17b	5-100	0.01	0.2
18a	1-50	0.01	0.2
18b	1月 25日	0.01	0.2
	最終濃度		
	基質 [μ M]	酵素 (Ppy) [mg/mL]	ATP-Mg [mM]
1a	2-100	0.002	0.08
1b	10-200	0.002	0.08
14a	0.2-20	0.002	0.08
14b	2-40	0.002	0.08
15a	1-20	0.002	0.08
15b	2-100	0.002	0.08
17a	2-40	0.002	0.08
17b	1-20	0.002	0.08
18a	0.2-10	0.002	0.08
18b	0.2-5	0.002	0.08

6.3. イメージング実験

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

HeLa 細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および 1% penicillin-streptomycin 溶液を含有するダルベッコ変法イーグル培地中の 60 mm ディッシュ上で増殖させた。cDNA トランスフェクションをコードする Venus-Ppy(luc2、Promega corp.)は、polyethlenimine(PEI, linear, MW 25,000)を用いて行った。トランスフェクションの 24 時間後にトリプシン処理し、PBS で懸濁した Venus-Ppy 発現 HeLa 細胞を使用した。

250 μ M のルシフェリンアナログ 10%MeOH 含有 PBS 緩衝液(50 μ L)を Venus-Ppy 発現 HeLa 細胞(1000 cell/ μ L、50 μ L)に注入することによって L-L 反応を開始した。多機能インビボイメージングシステム(露光時間:20 秒)を用いて 5400 秒間測定した。

6.3.2. *in vivo* 生物発光イメージング測定

生物発光イメージング測定のために、CAG-ffLuc-cp156トランスジェニックマウス 85(C57BL / 6,6 ヶ月齢)を脱毛クリームによる除毛後に使用した。マウスを 2%イソフルランで麻酔し、ルシフェリンアナログ(20%MeOH 含有リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中(1a,15a:1 mM-100 μ L、15b,38b:500 μ M-200 μ L))を腹腔内注射した。注入後直ちに、多機能インビボイメージングシステムを用いて測定を実施した。発光を 5,400 秒間モニターした(露光時間 1a,15a:1 秒、15b,38b:20 秒)。動物の実験手順および飼育条件は、理化学研究所の動物実験委員会によって承認され、すべての動物は動物実験のための施設ガイドラインに従って処理された。

第7章 参考文献

- (1) 羽根田弥太. 発光生物—*Luminous Organisms*; 恒星社厚生閣, 1985.
- (2) 丹羽治樹. 生物はなぜ光るのか—生物発光とその応用—; 現代科学, 2002.
- (3) Bitler, B.; McElroy, W. D. The Preparation and Properties of Crystalline Firefly Luciferin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 72 (2), 358–368.
- (4) Seliger, H. H.; McElroy, W. D.; White, E. H.; Field, G. F. Stereospecificity and Firefly Bioluminescence, a Comparison of Natural and Synthetic Luciferins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1961**, 47 (8), 1129–1134.
- (5) Conti, E.; Franks, N. P.; Brick, P. Crystal Structure of Firefly Luciferase Throws Light on a Super-Family of Adenylate-Forming Enzymes. *Structure* **1996**, 4 (3), 287–298.
- (6) Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. Structural Basis for the Spectral Difference in Luciferase Bioluminescence. *Nature* **2006**, 440 (7082), 372–376.
- (7) Viviani, V. R. The Origin, Diversity, and Structure-Function Relationships of Insect Luciferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59 (11), 1833–1850.
- (8) Fraga, H. Firefly Luminescence: A Historical Perspective and Recent Developments. *Photochem. Photobiol.* **2008**, No. 7, 146–158.
- (9) 今井一洋; 近江谷克裕. バイオ・ケミルミネセンスハンドブック; 丸善, 2006.
- (10) White, E. H.; Steinmetz, M. G.; Miano, J. D.; Wildes, P. D.; Morland, R. Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102 (9), 3199–3208.
- (11) Kajiyama, N.; Nakano, E. Isolation and Characterization of Mutants of Firefly Luciferase Which Produce Different Colors of Light. *Protein Eng. Des. Sel.* **1991**, 4 (6), 691–693.
- (12) Hirokawa, K.; Kajiyama, N.; Murakami, S. Improved Practical Usefulness of Firefly Luciferase by Gene Chimerization and Random Mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, 1597 (2), 271–279.
- (13) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Gonzalez, S. A.; Ruggiero, M. C.; Stroh, J. G. An Alternative Mechanism of Bioluminescence Color Determination in Firefly Luciferase. *Biochemistry* **2004**, 43 (23), 7255–7262.
- (14) Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T. Spectroscopic Properties of Amine-Substituted Analogues of Firefly Luciferin and Oxyluciferin. *Photochem. Photobiol.* **2017**, 93 (2), 486–494.
- (15) Viviani, V. R.; Neves, D. R.; Amaral, D. T.; Prado, R. A.; Matsuhashi, T.; Hirano, T. Bioluminescence of Beetle Luciferases with 6'-Amino-D-luciferin Analogues Reveals Excited Keto-Oxyluciferin as the Emitter and Phenolate/Luciferin Binding Site Interactions Modulate Bioluminescence Colors. *Biochemistry* **2014**, 53, 5208–5220.
- (16) Thompson, J. F.; Geoghegan, K. F.; Lloyd, D. B.; Lanzetti, A. J.; Magyar, R. A.; Anderson, S.

- M.; Branchini, B. R. Mutation of a Protease Sensitive Region in Firefly Luciferase Alters Light Emission Properties. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (30), 18766–18771.
- (17) Branchini, B. R.; Magyar, R. a; Murtiashaw, M. H.; Anderson, S. M.; Zimmer, M. Site-Directed Mutagenesis of Histidine 245 in Firefly Luciferase: A Proposed Model of the Active Site. *Biochemistry* **1998**, *37*, 15311–15319.
- (18) Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Wilkinson, S. R.; Khattak, N. F.; Rosenberg, J. C.; Zimmer, M. Mutagenesis Evidence That the Partial Reactions of Firefly Bioluminescence Are Catalyzed by Different Conformations of the Luciferase C-Terminal Domain. **2005**, *44*, 1385–1393.
- (19) Kiyama, M.; Saito, R.; Iwano, S.; Obata, R.; Niwa, H.; Maki, S. A. Multicolor Bioluminescence Obtained Using Firefly Luciferin. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16* (24), 2648–2655.
- (20) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama, H. Firefly Bioluminescence Quantum Yield and Colour Change by PH-Sensitive Green Emission. *Nat. Photonics* **2008**, *2* (1), 44–47.
- (21) Wang, Y.; Kubota, H.; Yamada, N.; Irie, T.; Akiyama, H. Quantum Yields and Quantitative Spectra of Firefly Bioluminescence with Various Bivalent Metal Ions. **2011**, No. 9, 846–852.
- (22) Close, D. M.; Xu, T.; Saylor, G. S.; Ripp, S. In Vivo Bioluminescent Imaging (BLI): Noninvasive Visualization and Interrogation of Biological Processes in Living Animals. *Sensors* **2011**, *11* (1), 180–206.
- (23) White, E. H.; Worthner, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. Amino Analogs of Firefly Luciferin and Biological Activity Thereof. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88* (9), 2015–2019.
- (24) Kobat, D.; Horton, N. G.; Xu, C. In Vivo Two-Photon Microscopy to 1.6-Mm Depth in Mouse Cortex. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16* (10), 106014.
- (25) 丹羽治樹; 牧昌次郎; 平野誉. 複素環化合物及び発光甲虫ルシフェラーゼ発光系用発光基質. 特開2006-219381, 2006.
- (26) Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C.; Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T.; Maki, S.; et al. Development of Simple Firefly Luciferin Analogs Emitting Blue, Green, Red, and near-Infrared Biological Window Light. *Tetrahedron* **2013**, *69* (19), 3847–3856.
- (27) Weissleder, R. A Clearer Vision for in Vivo Imaging Progress Continues in the Development of Smaller , More Penetrable Probes for Biological Imaging . Toward the Phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19* (4), 316–317.
- (28) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4* (2), 105–111.
- (29) Ballou, B.; Fisher, G. W.; Waggoner, A. S.; Farkas, D. L.; Reiland, J. M.; Jaffe, R.; Mujumdar, R. B.; Mujumdar, S. R.; Hakala, T. R. Tumor Labeling in Vivo Using Cyanine-Conjugated Monoclonal Antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**, *41* (4), 257–263.
- (30) Fischer, G. M.; Isomaki-Krondahl, M.; Gottker-Schnetmann, I.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A.

- Pyrrolopyrrole Cyanine Dyes: A New Class of near-Infrared Dyes and Fluorophores. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (19), 4857–4864.
- (31) Huang, S.; Yang, C.; Huang, J.; Wang, X.; Wang, M. Near-Infrared Fluorescent Pyrrolopyrrole Cyanine Derivatives and Colloidal Nanoparticles with Tunable Optical Properties for in Vivo Bioimaging. *Dye. Pigment.* **2018**, *154*, 269–274.
- (32) Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M.; Jung, G. Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-Bora-(3a,4a)-Diaza-s-Indacene. *J. Fluoresc.* **2009**, *19* (4), 755–758.
- (33) Umezawa, K.; Matsui, A.; Nakamura, Y.; Citterio, D.; Suzuki, K. Bright, Color-Tunable Fluorescent Dyes in the Vis/NIR Region: Establishment of New “Tailor-Made” Multicolor Fluorophores Based on Borondipyrromethene. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (5), 1096–1106.
- (34) Grzybowski, M.; Taki, M.; Senda, K.; Sato, Y.; Ariyoshi, T.; Okada, Y.; Kawakami, R.; Imamura, T.; Yamaguchi, S. A Highly Photostable Near-Infrared Labeling Agent Based on a Phospha-Rhodamine for Long-Term and Deep Imaging. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *0295*, 10137–10141.
- (35) Kojima, R.; Takakura, H.; Kamiya, M.; Kobayashi, E.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y. Development of a Sensitive Bioluminogenic Probe for Imaging Highly Reactive Oxygen Species in Living Rats. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, *54* (49), 14768–14771.
- (36) Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T. Aminoluciferins as Functional Bioluminogenic Substrates of Firefly Luciferase. *Chem. - An Asian J.* **2011**, *6* (7), 1800–1810.
- (37) Evans, M. S.; Chaurette, J. P.; Adams, S. T.; Reddy, G. R.; Paley, M. A.; Aronin, N.; Prescher, J. A.; Miller, S. C. A Synthetic Luciferin Improves Bioluminescence Imaging in Live Mice. *Nat. Methods* **2014**, *11* (4), 393–395.
- (38) Mofford, D. M.; Reddy, G. R.; Miller, S. C. Latent Luciferase Activity in the Fruit Fly Revealed by a Synthetic Luciferin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (12), 4443–4448.
- (39) Conley, N. R.; Dragulescu-Andrasi, A.; Rao, J.; Moerner, W. E. A Selenium Analogue of Firefly D-Luciferin with Red-Shifted Bioluminescence Emission. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (14), 3350–3353.
- (40) 岩野智. 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. 電気通信大学博士論文 **2013**.
- (41) Kuchimaru, T.; Iwano, S.; Kiyama, M.; Mitsumata, S.; Kadonosono, T.; Niwa, H.; Maki, S.; Kizaka-Kondoh, S. A Luciferin Analogue Generating Near-Infrared Bioluminescence Achieves Highly Sensitive Deep-Tissue Imaging. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11856.
- (42) Iwano, S.; Sugiyama, M.; Hama, H.; Watakabe, A.; Hasegawa, N.; Kuchimaru, T.; Tanaka, K. Z.; Takahashi, M.; Ishida, Y.; Hata, J.; et al. Single-Cell Bioluminescence Imaging Ofdeep Tissue in Freely Moving Animals. *Science.* **2018**, *359*, 935–939.

- (43) 和賀正洋; 押田敏雄; 坂田亮一. 豚肉中のミオグロビン, ヘモグロビンならびにシトクロム c の同時定量法の検討. *日豚会誌* **2016**, *53*, 10–16.
- (44) 牧昌次郎; 小島哲; 丹羽治樹. 波長が制御されたルシフェラーゼの発光基質および製造方法. 特許第5550035号, 2014.
- (45) Branchini, B. R.; Hayward, M. M.; Bamford, S.; Brennan, P. M.; Lajiness, E. J. NAPHTHYL- AND QUINOLYLLUCIFERIN: GREEN AND RED LIGHT EMITTING FIREFLY LUCIFERIN ANALOGUES. *Photochem. Photobiol.* **1989**, No. 49, 689–695.
- (46) White, E. H.; Wörther, H. Analogs of Firefly Luciferin. III. *J. Org. Chem.* **1966**, *31* (5), 1484–1488.
- (47) Takakura, H.; Kojima, R.; Ozawa, T.; Nagano, T.; Urano, Y. Development of 5'- and 7'- Substituted Luciferin Analogues as Acid-Tolerant Substrates of Firefly Luciferase. *ChemBioChem*. 2012, pp 1424–1427.
- (48) Steinhardt, R. C.; Rathbun, C. M.; Krull, B. T.; Yu, J. M.; Yang, Y.; Nguyen, B. D.; Kwon, J.; McCutcheon, D. C.; Jones, K. A.; Furche, F.; et al. Brominated Luciferins Are Versatile Bioluminescent Probes. *ChemBioChem* **2017**, *18* (1), 96–100.
- (49) Pirrung, M. C.; Biswas, G.; De Howitt, N.; Liao, J. Synthesis and Bioluminescence of Difluoroluciferin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (20), 4881–4883.
- (50) Ikeda, Y.; Saitoh, T.; Niwa, K.; Nakajima, T. An Allylated Firefly Luciferin Analogue with Luciferase Specific Response in Living Cells †. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1774–1777.
- (51) Kato, D.; Shirakawa, D.; Polz, R.; Maenaka, M.; Takeo, M.; Negoro, S.; Niwa, K. A Firefly Inspired One-Pot Chemiluminescence System Using n-Propylphosphonic Anhydride (T3P). *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (12), 1640–1645.
- (52) Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A.; Anderson, S. M. The Role of Lysine 529, a Conserved Residue of the Acyl-Adenylate-Forming Enzyme Superfamily, in Firefly Luciferase. *Biochemistry* **2000**, *39* (18), 5433–5440.
- (53) Branchini, B. R.; Magyar, R. A.; Marcantonio, K. M.; Newberry, K. J.; Stroh, J. G.; Hinz, L. K.; Murtiashaw, M. H. Identification of a Firefly Luciferase Active Site Peptide Using a Benzophenone-Based Photooxidation Reagent. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (31), 19359–19364.
- (54) Waring, M. J. Lipophilicity in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, *5* (3), 235–248.
- (55) Waring, M. J. Defining Optimum Lipophilicity and Molecular Weight Ranges for Drug Candidates—Molecular Weight Dependent Lower LogD Limits Based on Permeability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (10), 2844–2851.
- (56) Rhodes, W. C.; McELROY, W. D. The Synthesis and Function of Luciferyl-Adenylate and OxyLuciferyl-Adenylate. *J. Biol. Chem.* **1958**, *233*, 1528–1537.
- (57) Imai, K.; Goto, T. Improved Synthesis of Firefly D-Luciferyld-Adenylate—A Key Intermediate of Firefly Bioluminescence. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52* (11), 2803–2809.

謝辞

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

また学部時代から博士課程に至るまで研究のご指導やご助言、論文執筆のご協力いただきました、慶應義塾大学 西山繁名誉教授、慶應義塾大学 小畠りか博士、筑波大学 斉藤毅助教に深く感謝いたします。

丹羽研究室配属当初から、研究のみならず様々なご指導をいただきました岩野智博士をはじめ、木山正啓博士、小林義尚氏、諸先輩方に深く感謝いたします。先輩方のおかげで研究室生活を非常に楽しく過ごすことができました。学部時代から同期として学業から研究、私生活と大変お世話になりました伊藤和人氏に深く感謝いたします。後輩ながら、公私共に様々なサポートをしていただいた齊藤亮平氏に感謝いたします。牧研究室の後輩として大変お世話になりました大塚智史氏、盛満玲氏、鉢呂佳史氏、諸後輩たちに感謝いたします。丹羽研究室、牧研究室、平野研究室の先輩後輩方皆様に感謝いたします。皆様のおかげで大変充実した研究室生活となりました。

共同研究でお世話になりました、慶應義塾大学西山研究室、Daniel 研究室の皆様、東京都医学総合研究所原孝彦研究グループの皆様感謝いたします。

大西伸行先生をはじめ、先端モデル動物支援プラットフォームの若手研究者の方々には様々なご指導いただき大変お世話になりましたこと、感謝いたします。

黒金化成株式会社 加藤様、河合様には AkaLumine および Tokeoni のサンプル提供をはじめ、様々なご指導をいただき、感謝致します。

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

動物実験のデータは、理化学研究所 脳科学総合研究センター(理研 BSI)・細胞機能探索技術開発チーム 宮脇敦史チームリーダー、岩野智博士に行って頂きました。厚く感謝申し上げます。

マイクロミニピッグの *in vivo* イメージング実験にあたり、主導してくださった東京工業大学大学院(現:自治医科大学) 口丸高弘先生をはじめ、マイクロミニピッグ提供をしていただいた静岡県畜

産技術研究所中小家畜研究センター 大竹正剛先生、実験場所を提供していただいた中田動物病院 古守悟院長に感謝いたします。

本研究は日本学術振興協会特別研究員 DC2 及び笹川科学研究助成の支援を受けて行われたものであり、本助成に感謝いたします。

海外の国際学会への参加や留学の際に助成を下された笹川科学研究助成、吉田科学技術財団殿、本学創立 80 周年記念学術交流基金、学長裁学長裁量経費海外派遣助成に感謝いたします。

末筆ながら、博士課程取得に理解をいただき、10 年以上電気通信大学に通うことを経済的、精神的に支えていただいた両親に深く感謝申し上げます。

北田昇雄