

ホタル生物発光の多色化への挑戦

牧 昌次郎

はじめに

蛍は初夏に川縁を遊飛することで日本人には古くから親しみ深い。しかし、蛍類は日本に40種ほどおり、幼生期に水棲なのは、ゲンジ、ヘイケ、クメジマの3種類くらい¹⁾らしい。蛍と清流の関連は、限られた地域でのインスピレーションと考えた方が良くであろう。また、蛍の光は約560 nm程度の黄色く見える光で、これは海外でもほぼ同様である。「ホタル生物発光」と称される発光技術は、ライフサイエンスでは常用される技術²⁻⁷⁾であるが、単色であることが、技術革新の課題とされている。ホタル生物発光を人為制御して多色化できれば、科学技術革新の手がかりになると考え、雲を掴むような技術開発に挑戦した。

発光機構

ホタル生物発光機構^{8,9)}は、図1に示した通りである。ホタル生物発光は、発光基質である低分子有機化合物(ルシフェリン)とタンパク質の発光酵素(ルシフェラーゼ)がATP、マグネシウムイオン、酸素の存在下で反応して生じる。発光酵素はAMP化と酸素化の二つの反応を触媒する。

まず、発光基質であるルシフェリン(1)が、発光酵素内で、AMP化され、活性化体2となる。これがやはり

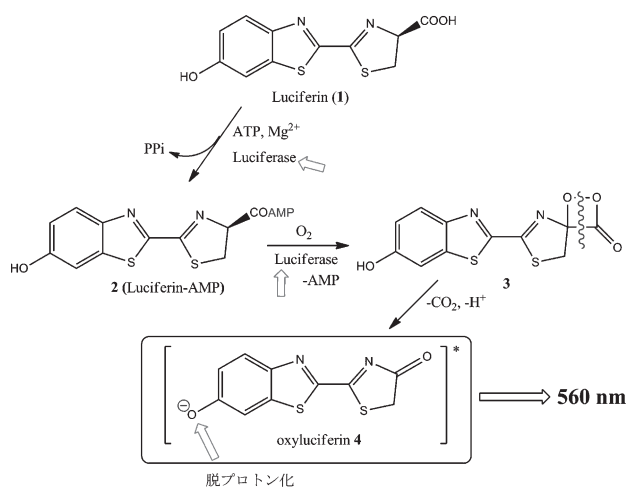


図1. ホタル生物発光機構

発光酵素内で酸素と反応して、高エネルギー状態のジオキセタノン中間体となり、二酸化炭素を放出して分解し、オキシルシフェリン4へ変換されるとき、4の励起状態になる。このとき、脱プロトン化されると考えられている。励起状態の4が基底状態へ失活する際にエネルギーが光として放出される。この光が、約560 nmのホタル生物発光(蛍の光)である。

発光色変換

ホタル生物発光色を変換する試みは、発光酵素変異体など、バイオテクノロジーを駆使して世界中で試みがなされている。Tripluc¹⁰⁾は、発光酵素による発光色変換が実用化された例であり、天然発光基質を使用し、イリオモテボタルの発光酵素とその変異体、鉄道虫の頭の部分の発光酵素を使用することで550, 580, 630 nmの発光色が得られる。また、発光波長を基質変換で実現した例として、アミノルシフェリン¹¹⁾が市販されている。アミノルシフェリンは天然ルシフェリン(1)のフェノール性水酸基をアミノ基に変換した化合物であり(図2)、北米産ホタルの発光酵素を使用することで約610 nmの発光波長へ変換できる。

構造活性相関

発光波長(発光色)変換は、世界中の多くの研究者の努力にも関わらず、Triplucを革新するような技術には至らなかった。酵素変換で発光波長を改変することは、発光環境の変化で発光波長を変えることである。一方で、アミノルシフェリンのように発光基質変換を行えば、発光体を改変することになり、よりドラスティックな発光波長変換が可能と考えられるが、基質酵素反応はきわめて精密な認識反応であり、基質の僅かな差異が、発光活性に大きく影響する。実際に発光基質に対し、有機化学

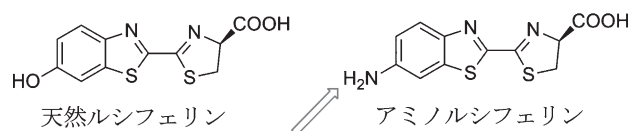


図2. 天然ルシフェリンとアミノルシフェリン

的な修飾をおこなうと、発光活性は大きく低下し、その多くは発光しなくなる。

そこで、もっとも汎用されている、北米産ホタル発光酵素に対して、構造活性相関データを蓄積することで、発光基質の修飾可能部位と必須部位を明確にすることから始めた。天然発光基質の類縁体を約30種合成し、化学構造と発光能について精査した^{12,13)}。図3に示す通り、左環ベンゾチアゾール部の5員環部分は比較的修飾が可能であったが、右環チアゾリン部の硫黄原子を酸素原子に変換した化合物では大きく発光能の低下が見られた。また、フェノール性水酸基部分の位置も活性に大きく影響し、二重結合とパラ位の化合物では発光するものの、メタ位のものでは、発光能を失った。また、左環ベンゾチアゾール部の5員環部分を除去した化合物でも発光が確認された。

化学構造と生物発光波長変換

先述の通り、天然のホタル生物発光は560 nm程度の単色発光であり、測定機器の進歩と科学技術の進歩は、多色化を求めている。そこで、構造活性相関データを元に、研究があまり行われていない、発光基質の化学構造変換で多色化に挑戦することとした。すでに、いくつかの発光基質類縁体（発光基質アナログ）の合成を行っており、これらから北米産ホタル発光酵素に限ってではあるが、化学構造変化に対して系統的な発光波長変化が可能と推測された。

そこで構造活性相関データを考慮して、化学構造のデザインを行った。ホタル生物発光機構では、古くから、左環ベンゾチアゾール部位の水酸基がアニオン化しなければ発光しないとされていたが、アニオン化しないジメチルアミノ基（Me₂N）を導入したアナログを合成し、系統的な構造変換を行い発光活性測定したところ、北米産ホタル発光酵素に限ってではあるが、二重結合を伸長するごとに、約100 nm発光波長がレッドシフトすることがわかった。他のアナログでもこの傾向が確認された。これによりホタル生物発光系でRGB発光¹⁴⁾が実現できた。また、100 nmのシフトは大きいとの注文が出たので、官能基変換などで、30 nm程度のブルーシフトとレッドシフトの経験則的な生物発光波長変換指標を得ることができた。これにより、北米産ホタル発光酵素に限ったものではあるが、発光基質の化学構造から、生物発光波長をある程度デザインできるようになった¹⁵⁾（図4）。

インビボイメージングへの応用

インビボイメージングは、腫瘍研究や再生医療関連の

研究で世界的にも注目されている。また、この技術革新として、生体内深部可視化に資する長波長発光材料に対するニーズは、世界的にも急速に高まっている。

しかし、ホタル生物発光系では、既存技術として、酵素による630 nmが市販技術の最長波長であり、生体内深部可視化に資すると考えられる650 nm以上には満たなかった。生体内深部可視化には、生体の窓¹⁶⁾といわれる650～900 nmの領域（近赤外：NIR）の光が適していると考えられている。この領域は、ヘモグロビンや酸化ヘモグロビン、水の吸収が低くなっており、生体透過性が高い波長域であり、散乱も少ないからである。ホタル生物発光系（ca. 560 nm）は、インビボイメージングにもすでに利用されていたが、より精密に生体内深部可視化を行うためには、NIR領域で発光する材料が望ましいとされている。しかし、NIR領域に発光する材料は世界的に市販されていなかった。そこで、北米産ホタル発光酵素と反応して675 nmで発光する発光基質（uec675）を企業と連携して実用化¹⁷⁾することになった。

ユーザーニーズがあるとはいえ、欧米での市販実績がない材料の実用化には困難があったが、2011年10月に市販に至った。材料創製から実に4年が過ぎていた。「高性能で、ニーズが高ければ、技術が実用化できるのではない」ことがよくわかった。

輝度向上技術の開発

一方で、多色と双壁をなす課題に輝度向上がある。標識材料のユーザーには、輝度が高ければ感度の問題もクリアされる。輝度と感度はユーザーには同意である。しかし、材料開発では、輝度と感度は同意ではない。ユーザーは測定機器で検出するため、輝度が低くても、機器の測定感度が高ければ、可視化される。その逆も同じである。新規化合物の場合、また、人工基質を天然酵素と反応させる場合は、発光しても、天然基質のように輝度は上がらない。まるで、多色化と引き換えに輝度を犠牲にしているような感じすら受ける。多色化は精密な基質酵素反応を騙すような行為なのだから、ある意味で当然であろう。

しかし、技術である以上、これを克服する技術も必要である。そこで、酵素について再度考察することにした。ホタル生物発光において、発光酵素は、AMP化と酸素化の二つの反応を触媒している。発光には2段階の反応が必要であることを意味している。しかし、発光反応を解析すると、単段階反応のように観測される。これは、ホタル生物発光の二つの反応のどちらかが、著しく遅い反応（律速）であることを示唆している。そこで遅い反応

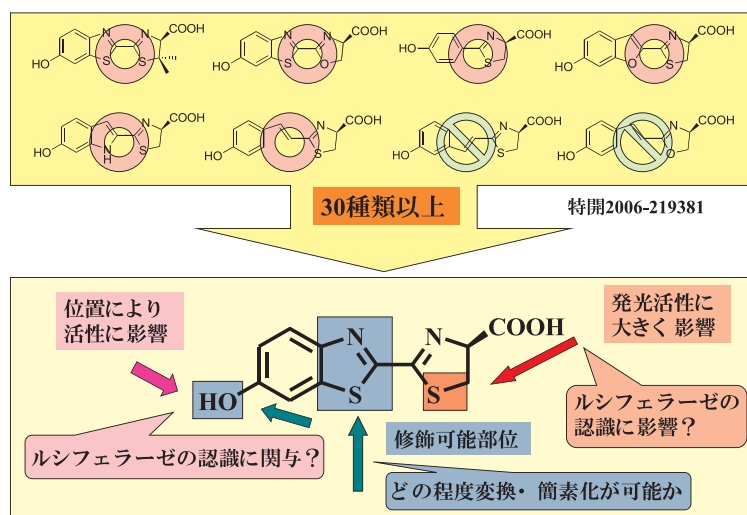


図3. 構造活性相関

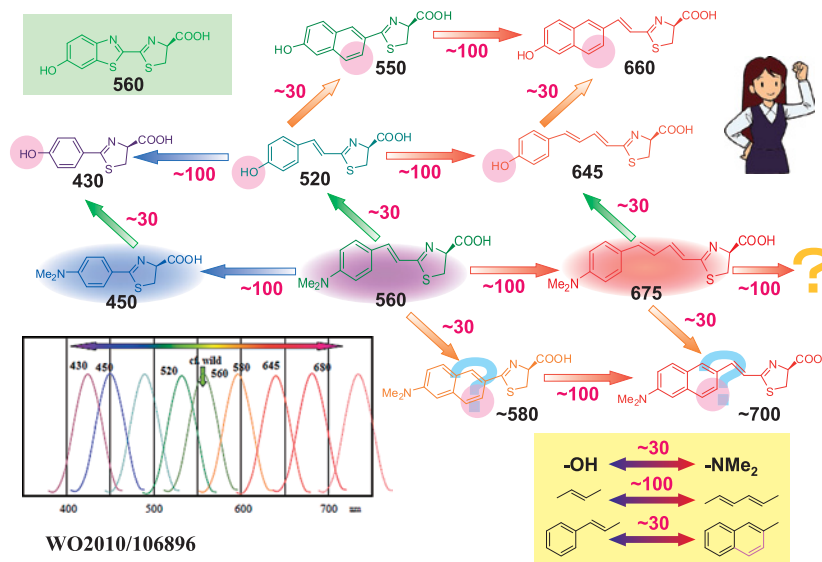


図4. 化学構造と発光波長

を検証することからアプローチした。ホタル発光酵素は、アシルアデニレート合成酵素スーパーファミリーに属しており¹⁸⁾、最初の反応であるAMP化が、酵素の元来の機能であると考えられる。このため、当該研究者には、昔から酸化が律速段階と考えられていた。しかし、単純に化学反応として考えると、有機合成者には、酸化還元反応よりも、結合を伴うAMP化反応の方が難しいと感じられた。そこで、発光基質を有機合成的にAMP化¹⁹⁾し、北米産ホタル発光酵素を用いて反応を行ったところ、発光輝度、速度とも飛躍的に加速^{20,21)}された(図5)。

この技術は人工基質にも有効であり、これにより、ホ

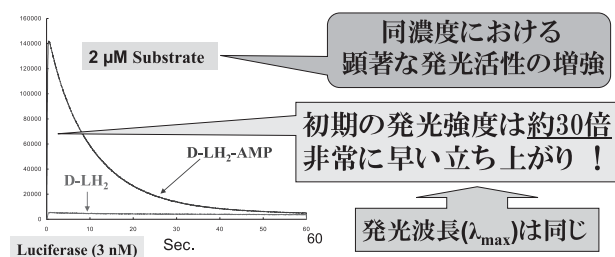


図5. 輝度向上技術。D-LH2（天然発光基質）はAMP化（D-LH2-AMP）すると輝度が向上する。

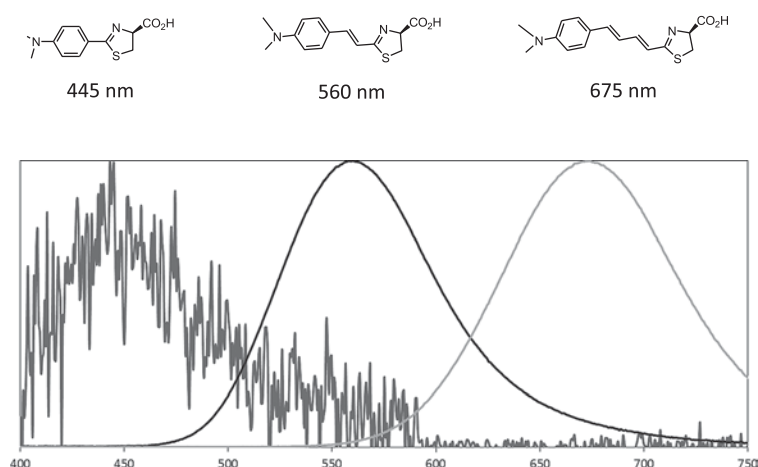


図6. RGB (675, 560, 445 nm, 赤, 緑, 青) 発光

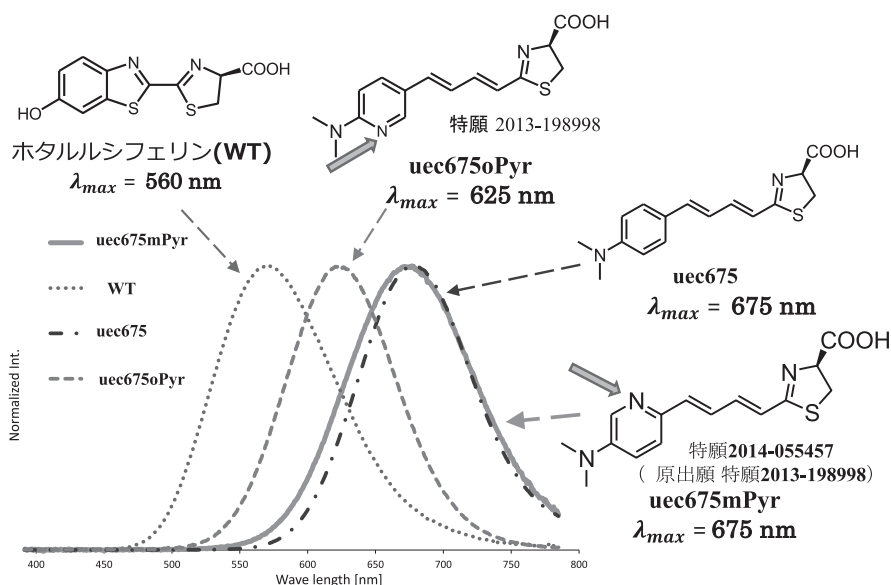


図7. 新規発光材料の波長と化学構造

タル生物発光系で、目視できるほどの輝度でRGB発光が実現できた(図6)。このように、発光基質の有機合成化学的な変換により、多色化と高輝度化の技術を創製できたが、高輝度化技術の実用化・市販には、いまだ至っていない。この実用化を進めるべく鋭意研究を行っている。

実用化と新技術

先述のように、675 nm程度に発光する人工基質(uec675)は実用化されたが、ユーザーからは、水溶性に対して注文がつけられた。生体へ投与するのであれば、水溶性が必要である。uec675では長波長発光は可能と

なったが、この点で天然発光基質とことなっていた。そこで、各種塩に誘導する事で水溶性向上を試みた。有機塩、無機塩いずれも水溶性を向上させる事ができたが、ハロゲン化塩²²⁾(塩酸塩 [HCl] や臭化物酸塩 [HBr])が顕著であった。しかし、ハロゲン化塩では、緩衝溶液ではなく、水に溶解させる事から、溶液のpHの低下が試作の段階で懸念されていた。そこで、化学構造まで遡って、水溶性化の検討を開始した。その結果、uec675の芳香環をピリジン環に変更したuec675oPyrとuec675mPyrの創製²³⁾に至った。

ピリジン環型基質は、残念ながら塩酸塩ほどの顕著な

溶解性は示さなかったものの、uec675に比して10～20倍程度の溶解性の向上ができた。芳香環をCからNに一つ置換するだけで、位置により波長に影響がでる事は、学術的には新しい知見となった。また新規発光材料の輝度はいずれもuec675とほぼ同等（北米産ホタル発光酵素を使用）であった（図7）。

今後の展開と新たな挑戦

インビボイメージングは、がん研究や再生医療研究のツールとして先端技術を開発するためにとっても重要と考えられている。最近、脳神経の研究においても、インビボイメージングが重要視されている。たとえば、脊椎損傷のような重篤な疾患の抜本的な解決は、再生医療の技術で当該神経細胞を誘導・再生させ、これを移植することである。しかし、これをヒトで実現するためには、移植した神経細胞が生着してゆく過程と神経機能も再生していることを数多くの動物実験などで確認する必要がある。対象の実験動物には、神経機能再生がよりヒトに近い環境で検定できることが望ましい。すなわちマウスでは十分ではなく、より高等な動物が必要となろう。これに必要な技術は、生体内深部可視化は当然のこと、脊椎内も可視化できる生体内透過性が必要となろう。生体の窓領域の発光は当然のこと、輝度や水溶性など、総合的な技術の向上が必要と考えている。また、現状のインビボイメージングの装置の多くは、イメージング対象の動物にマウス・ラットが想定されているため、より大型の動物も測定対象となるような機器開発にもニーズが高まるであろう。長波長に感度が高く、マモセットやミニプタのような動物のイメージングが行えるような機器となると、現状機器を単に長波長域に感度が高いカメラに付け替えるだけでは不十分であろう。動物が大型化すれば、可視化標的部位の深度やその画像化にも新たな技術が必要と考えている。

医療分野における全人類的課題は、難易度を増していることは、明白である。高齢社会となった我が国、そして、日本を追従するように高齢社会となる国々が、日本の技術に大きな期待を寄せていることも事実であろう。生体内深部可視化は、単に、長波長発光材料が創製できれば解決できるのではなく、測定装置や疾患モデル動物など、まったく異なった分野、化学、機械、生物の複合技術開発が必要である。総合的科学技术開発により得られる先端技術が、全人類的課題解決の糸口、そして、難治疾患で苦しむ方々の希望となるよう願いながら研究を進めている。インビボイメージングは、関連技術と知的財産権の連携が必要な総合的技術開発段階になったと考

えている。新たな展開と電気通信大学の挑戦にご注視いただければ幸甚である。

謝 辞

本記事執筆に際して、本研究にご注視いただきました、兵庫県立大学加藤太一郎先生に深く御礼申し上げます。またホタル発光研究では、電気通信大学 情報理工学部 先進理工学科 丹羽治樹教授、平野誉教授、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門長 近江谷克弘先生のご指導を頂戴しております。材料合成では、慶應義塾大学理工学部化学科 西山繁教授のご指導とご助力を頂戴しました。本誌を拝借して、深謝いたします。

文 献

- 1) 東京ゲンジボタル研究所著：ホタル百科，丸善株式会社（2004）。
- 2) 羽根田弥太：発光生物，恒星社厚生閣（1985）。
- 3) 丹羽治樹：現代化学，**379**, 28（2002）。
- 4) 丹羽治樹：遺伝，**50**, 35（1996）。
- 5) 山村庄亮ら編：天然物化学—海洋生物編一，p. 71，アイビーシー（2008）。
- 6) 今井一洋編：生物発光と化学発光-基礎と実験，廣川書店（1989）。
- 7) 今井一洋，近江谷克裕編：バイオ・ケミルミネセンスハンドブック，丸善株式会社（2006）。
- 8) McElroy, W. D. *et al.*: Insect Bioluminescence. In the Physiology of Insecta (M. Rockstein, ed.), Academic Press NY, p. 411（1974）。
- 9) McElroy, W. D.: Chemistry of Firefly Luminescence. In Bioluminescence in Action (P. J. Herring, ed.), Academic Press NY, p. 109（1978）。
- 10) Nakajima, Y. *et al.*: *BioTechniques*, **38**, 891（2005）。
- 11) 特開2007-091695「新規ルシフェリン誘導体」
- 12) MAKI, S. A.: *ECS transactions*, **16**, 1（2009）。
- 13) 特開2006-219381「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」
- 14) 特許第5464311号「ルシフェラーゼの発光基質」
- 15) 特許第5550035号「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」但し、北米産ホタル（*Photinus pyralis*）の発光酵素を使用した場合の波長変換技術である。
- 16) Weissleder, R.: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 316（2001）。
- 17) <http://www.jichi.ac.jp/kenkyushien/news/2013/20130510.html>
- 18) 近江谷克裕：生化学，**76**, 5（2004）。
- 19) Branchini, B. R. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2112（2002）。
- 20) 梶谷 誠監修，田中 繁編集：ユニーク&エキサイティングサイエンスII，近代科学社，p. 136（2013）。
- 21) 特許第5194258号「複素環化合物及び発光方法」
- 22) 特願2013- 97755「新規ハロゲン化水素塩」
- 23) 特願2014-055457「新規複素環式化合物及びその塩、並びに、発光基質組成物」