

Development of novel imaging system by using  
firefly bioluminescence

March 2017

Shuji Ioka

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	井岡 秀二
主論文題目： Development of novel imaging system by using firefly bioluminescence (ホタル生物発光を利用した新規イメージングシステムの開発)				
(内容の要旨) ホタルの生物発光は、発光基質であるホタルルシフェリンが発光酵素ホタルルシフェラーゼによってAMP化され、続いて酸化化されることで黄緑色(最大発光波長562 nm)に発光する。その発光効率は41%と極めて高く、またS/N比も良好であることから、これまで <i>in vivo</i> イメージングやレポータージーンアッセイ、食品衛生管理などに応用されてきた。このようにホタル生物発光は、生物学的分野において生命現象を可視化するために必要不可欠なツールである。本研究では、有機合成化学的手法を用いて、未だ明らかでないホタルルシフェリンとホタルルシフェラーゼの基質特異性の解明と、それを利用した新しいイメージングツールの開発を行った。				
<b>(1) ホタルルシフェラーゼの基質特異性の解明を目的とした新規ホタルルシフェリンアナログの合成と発光活性評価</b> ホタルルシフェリンは、ベンゾチアゾール及びチアゾリン環の2つの環により構成されている。これまでに、ベンゾチアゾール環の構造と発光活性に関する研究から、芳香環構造を変化させることで発光波長のコントロールが可能であることが見出されている。しかしながら、発光反応の過程で代謝されるチアゾリン環の構造が発光に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。そこで、ホタルルシフェリンのチアゾリン環部位の構造活性相関の解明を目的とし、数種類の誘導体を合成し、発光活性についての評価を行うこととした。チアゾリン環部位の構造が直鎖状である化合物及び環状である化合物を合成し、生物発光測定を行ったところ環状の化合物であるカルボルシフェリンのみ生物発光活性を示した。また、直鎖状の化合物が発光阻害活性を示さなかったことから、チアゾリン環部位の構造は酵素ルシフェラーゼの酵素認識に影響するものと結論づけられた。				
<b>(2) 特異的な酵素による環化反応を用いた発光 OFF-ON 制御可能な新規ホタルルシフェリンアナログの開発</b> 前項の結果より、ルシフェラーゼ認識部位であるチアゾリン環部位の構造が直鎖状である化合物は生物発光を示さず、環状である化合物は生物発光を示すことがわかった。この結果を用いて、特定の生体内物質によりチアゾリン環部位が鎖状構造から環状構造へ変換されることによる、チアゾリン環の構造制御による発光 OFF - ON 制御が可能なルシフェリンアナログの開発を行った。そのようなイメージングモデルを構築するため、特定の生体内物質としてアミノアシラーゼ、発光 OFF - ON 制御が可能な鎖状ルシフェリンアナログとして <i>N</i> -Ac- $\gamma$ -グルタミンルシフェリンを設定し、合成と OFF - ON 制御の検討を行なった。その結果、生物発光を示さない <i>N</i> -Ac- $\gamma$ -グルタミンルシフェリンがアミノアシラーゼの活性化に伴い環化反応を起こし、生物発光を示すことがわかった。このイメージングモデルを応用し、 <i>N</i> -Ac 基を任意のペプチド配列に置き換えることで、そのペプチドを認識する生体内の特定酵素のみを時空間的に検出し生体内現象をモニタリングできるという可能性を見出した。				

## SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name Ioka. Shuji
<b>Title</b> Development of novel imaging system by using firefly bioluminescence		
<b>Abstract</b> <p>Firefly bioluminescence (BL) is generated by the reaction of firefly luciferin with the corresponding luciferase in the presence of <math>Mg^{2+}</math>, ATP, and <math>O_2</math> (<math>\lambda_{max}=562</math> nm; <math>\phi_{BL}=41\%</math>). Because of its high efficiency and S/N ratio, BL has been widely used in biological studies (<i>in vivo</i> bioimaging, reporter gene assays and food hygiene control). In this study, unexplained substrate specificity between firefly luciferin and luciferase was clarified by using organic chemistry, and application of the result proposed a new imaging device.</p> <p><b>(1) Synthesis of firefly luciferin analogues and evaluation of the luminescent properties aiming elucidation of the substrate specificity of firefly bioluminescence</b></p> <p>Firefly luciferin consists of the benzothiazole and the thiazoline rings. It has been reported that the benzothiazole ring affects color development of BL, whereas effect of the thiazoline ring moiety to BL has not been clarified. In this study, to elucidate role of the thiazoline ring, seven luciferin analogues by replacement the thiazoline ring to acyclic amino acid side chains and heterocyclic rings derived from amino acids, were synthesized and their luminescence activities were evaluated. Consequently, only carboluciferin possessing a pyrroline-substituted benzothiazole structure, showed BL activity, whereas no activity of cyclic luciferin analogues, was observed. These results indicated that the thiazoline ring affects the enzyme reaction of firefly luciferase.</p> <p><b>(2) Development of a luminescence-controllable firefly luciferin analogue using selective enzymatic cyclization</b></p> <p>A new firefly luciferin analog that can switch BL activity from ‘OFF’ (acyclic) to ‘ON’ (cyclic) states, was designed and synthesized. BL inactive <i>N</i>-Ac-<math>\gamma</math>-glutamate luciferin contains an acyclic precursor of the thiazoline moiety. Enzymatic treatment of <i>N</i>-Ac-<math>\gamma</math>-glutamate luciferin with aminoacylase resulted in a smooth removal of the acyl protecting group and concomitant cyclization to provide carboluciferin carrying clear BL activity.</p>		