

新規基質類似体を用いた近赤外ホタル生物発光  
の定量分光計測  
(Quantitative spectroscopy of near-infrared firefly  
bioluminescence using novel substrate analogues)

氏名 小野 稜平

ホタル生物発光は酵素ルシフェラーゼにおける基質ルシフェリンの酸化反応により生じる発光現象である。この発光は、他の発光生物に比べて極めて高効率な光であり、その発光量子収率は  $41.0 \pm 7.4\%$  であると報告されている。また、この発光は励起光を伴わない自発光であり、酵素や pH の違いによって発光色が変化することも大きな特徴となる。これらの発光特性を活かし、臨床検査や環境計測、食品検査といった ATP 測定や、レポーターアッセイといった遺伝子発現など幅広い分野における発光プローブとして利用されている。

ルシフェリンの一部構造を改変した化合物（基質類似体）は、構造の違いによって、ピーク波長が異なる生物発光スペクトルを示す。特に、近赤外発光を示す基質類似体は、医療分野での生体内深部イメージング材料として期待されている。イメージング材料としての評価には、発光色以外に「明るさ」の情報が必要である。ここで言う「明るさ」とは、

光透過性以外に、発光量子収率や発光反応速度のような定量的指標のことを指し、これらの値の向上は高効率化を意味する。「明るさ」の定量的指標は発光量子収率である。発光量子収率は、1つの基質分子が1つのフォトンを生成する確率で定義される。先行研究では、測定系内に含まれる基質分子の定量と絶対発光量の測定から発光量子収率を決定する系が構築された。しかし、発光量子収率が報告された例は、ルシフェリンのみであり、未だ基質類似体の発光量子収率は、絶対法より決定されていない。そこで、本研究はイメージング材料として最も利用例の多い、近赤外発光基質類似体：TokeOni を中心に、基質類似体の発光特性を明らかにすることを目的とし、近赤外領域までの絶対発光量を測定するための系の構築および試薬純度評価を行った上で、発光量子収率を中心とした発光特性を調べた。

上記目的を達成するためには、近赤外発光までを絶対発光量として測定可能な系の構築が必要である。先行研究を含め、ほとんどの測定系の測定波長域は 800 nm までにとどまる。そこで、本研究では先行研究の発光量絶対値測定系に基づき、波長感度校正範囲の拡張を行い、測定波長域を 930 nm まで拡張した。また、基質類似体は *in vitro* においてルシフェリンよりも相対輝度が一桁ほど小さいため、従来のスリット開口径では十分な信号対ノイズ比を有するスペクトルを取得することが難しい。そこで、発光スペクトルを再現する範囲での、スリット最大開口径を調べ、その値が 1000  $\mu\text{m}$  であることを明らかにした。その結果、同じ測定時間内において取得できる光量が 4 倍に増加した。さらに、先行研究では測定系不確かさが 18%であったが、トレーサビリティを満たした Si フォトダイオードを校正に用いることで、不確かさを低減させることに成功した。

発光量子収率決定のために、qNMR や HPLC を用いた試薬純度評価も行った。結果、純度評価の中で生じる不確かさは測定系不確かさより極めて小さく、発光量子収率測定における不確かさの主要因は測定系不確かさであることがわかった。

改良した測定系および試薬純度評価より、TokeOni の発光量子収率を測定したところ、pH 6.2–8.0 にて、いずれの pH 値に対しても収率は  $4.0 \pm 0.5\%$  であることが明らかになった。また、発光スペクトルのピーク位置や半値全幅は pH に依存しなかった。この特徴は従来 pH 変化に伴い発光色が変化するルシフェリンとは大きく異なる特徴である。ほか、TokeOni の発光減衰率（単位時間あたりの発光減少量）は、pH 8.0 においてルシフェリンの約 17 倍であることも大きな特徴であった。その結果、瞬間的な光の強さの指標である発光初期強度は、pH 8.0 において、TokeOni の方がルシフェリンを上回ることも明らかになった。すなわち TokeOni は、発光量子収率がルシフェリンの 1/10 程度であるにもかかわらず、はじめの短時間では、ルシフェリンよりも高輝度な光を生成する特徴を持つ類似体であることが明らかになった。

TokeOni に対して行った発光特性評価方法を用いて、2 種の近赤外発光基質類似体と 3 種の橙発光基質類似体も評価した。結果、これらの基質類似体はいずれもスペクトルピーク位置や半値全幅に pH 依存性を伴わないことが明らかになった。この理由として、本研究で測定した基質類似体にはいずれも、基質ルシフェリンに存在するヒドロキシ基が存在していないことが原因と推察された。また、発光減衰に関しては、基質類似体ごとに異なる特性が見られたことから、発光量子収率やスペクトル形状の pH 依存性と発光減衰の pH 変化に伴う発光強度の変化には、異なるメカニズムが働く可能性を示した。

本研究の最大の意義はこれまでに測定されてこなかった基質類似体の発光量子収率を世界で初めて決定した点にある。本研究は、今後新たに創製される基質類似体との比較におけるマイルストーンとなるだけでなく、発光機構のさらなる解明にも繋がると期待できる。

Quantitative spectroscopy of near-infrared firefly  
bioluminescence using novel substrate analogues  
(新規基質類似体を用いた近赤外ホタル生物発光  
の定量分光計測)

氏 名 小野 稜平

Firefly bioluminescence is spontaneous without any excitation light. Its reaction is an oxidation reaction of the substrate (luciferin) in the enzyme (luciferase). The efficiency of firefly luminescence reaction is higher than those of reactions of other luminescent organisms. The emission color varies depending on enzymes and pH values. The quantum yield of firefly bioluminescence is reported to be  $41.0 \pm 7.4\%$ . Because of these features, firefly bioluminescence is expected to be used as a luminescence probe in various fields such as medical care, environmental measurement, food safety, and analytical chemistry.

Compounds with partially modified structures of luciferin ("substrate analogues") show bioluminescence spectra with different peak wavelengths depending on the

structure. In particular, the near-infrared emitting substrate analogues with longer emission wavelengths are expected to be luminescence probes in the medical field as in vivo imaging for detecting cells deep within the body. In addition to luminescence color, "brightness" information is necessary for evaluation as a luminescence probe. The term "brightness" here refers to quantitative indicators such as light quantum yields and luminescence reaction rates, in addition to light transmittance. Improvement of these quantitative indicators means higher efficiency. The bioluminescence quantum yield (QY) is defined as the probability that one substrate molecule produces one photon. In the previous study, a system was constructed to measure QYs by the number of substrate molecules and the absolute emission. Although the QY has only been reported for the substrate luciferin, the QY of substrate analogues has not yet been determined by the absolute method. The purpose of this study is to clarify the luminescence properties of substrate analogues, focusing on TokeOni, which is the most frequently used near-infrared luminescent substrate analogues as luminescent probes.

To this end, it is necessary to construct a system that can measure absolute luminescence up to near-infrared luminescence. The wavelength range of most measurement systems, including previous studies, is shorter than 800 nm. Therefore, in this study, the wavelength sensitivity calibration range was extended to 930 nm based on the quantitative bioluminescence spectrometer of the previous study. Because the

relative brightness of substrate analogues is about an order of magnitude lower than that of luciferin in vitro experiments, it is difficult to obtain a spectrum with a sufficient signal-to-noise ratio with conventional slit width. The maximum aperture of the slit width at which bioluminescence spectra can be reproduced was determined as 1000  $\mu\text{m}$ . Using the quantitative bioluminescence spectrometer with the slit, the amount of light acquired within the same measurement time was four times greater than that obtained with a conventional slit. Moreover, by using a traceable Si photodiode to reduce the uncertainty of the quantitative bioluminescence spectrometer, I succeeded in reducing the uncertainty by about 5% compared to that of the conventional measurement system.

The purity and D/L ratio of the reagents were evaluated using qNMR and HPLC to determine the QY. It was found that the uncertainty arising in the purity evaluation is much smaller than that of the quantitative bioluminescence spectrometer. It means that the most part of uncertainty in the QY is the measurement system uncertainty.

The QY of TokeOni was determined using the quantitative bioluminescence spectrometer mentioned above as  $4.0 \pm 0.5\%$  in the pH range of 6.2-8.0. The pH dependence of the spectra was also examined, and no pH dependence was observed in the spectral shape or full width at half maximum (FWHM). This feature is very different from the luciferin, which changes its luminescence color with pH change. The luminescence decay of TokeOni was also measured, and the luminescence decay rate,

which is an index of how much luminescence decreases per second, was obtained. As a result, the initial intensity of luminescence, a measure of instantaneous light intensity, was greater for TokeOni than for the substrate luciferin at pH 8.0. This is an important luminescence property for imaging applications, since TokeOni can produce high intensity light depending on the measurement conditions, even though its QY is about 1/10 that of the substrate luciferin.

In addition to TokeOni, I also evaluated the luminescence properties of two near-infrared luminescent substrate analogues and three orange luminescent substrate analogues. The results showed that the spectral shape and FWHM of all six substrate analogues measured in this study were independent of pH. The reason for this is the absence of the hydroxy group present in the substrate luciferin in all the substrate analogues measured in this study. The different characteristics of luminescence decay were observed for each substrate analog, suggesting that different mechanisms are at work in the pH dependence of QY and spectral shape, as well as in the pH-dependent change in luminescence intensity of luminescence decay.

The most significant aspect of this study is that it is the first to determine the QY of a substrate analogue, which has never been measured before. This study is not only a milestone in the comparison of newly developed substrate analogues but may also lead to further elucidation of the luminescence mechanism.