

## 審査の結果の要旨

氏名 高倉 栄男

生物発光法は発光基質 (luciferin)、発光酵素 (luciferase)、酸素、 $Mg^{2+}$ 、ATP からなる luciferin-luciferase 反応を利用した検出法である。励起光を必要としない測定であること、高効率の発光反応であることから簡便で高感度な検出が可能であり、例えば ATP 要求性を利用した微生物の検出や酵素免疫法、またレポーター酵素としてタンパク発現量や遺伝子解析のイメージングに使われるなど様々な応用例が報告されている。最近では、酵素である luciferase の改変により細胞内のイベントや生体分子を検出するより高次の測定系が開発されてきている。しかしながら、基質である luciferin を改変した例は多くない。そのため潜在的に優れた特性を持っている生物発光法だが、有効な生物発光プローブの設計法は確立していなかった。

そこで高倉栄男君は、まず luciferin の 6'位の電子密度が重要であると考え、Aminoluciferin(AL) の *N*-alkyl 化された化合物を合成し機能性生物発光プローブの基本骨格としての利用できるかどうか検討した。具体的には、amino 基から methyl 基や ethyl 基、alkyl 鎖の先に benzene 環を有する基質の合成、評価を行った結果、全ての基質が発光を示すことが明らかとなった。そこで次に、amino 基から修飾部位を付加することでこれまでにない機能化を実現するという戦略に基づき、cholinesterase (ChE) 活性検出プローブ、細胞膜透過性を制御したプローブ、biotin 結合プローブなどの新規プローブ群の開発に成功した。

さらに、当研究室で培ってきた光誘起電子移動 (photoinduced electron transfer、PeT) に基づく蛍光制御原理を生物発光に適用することを考え、まず PeT による生物発光の制御が可能かどうか検証し、本仮説の検証に成功した。このような現象は過去に提唱されたことがなかったため、bioluminescent enzyme-induced electron transfer (BioLeT) と命名した。次にこの BioLeT による消光を利用して、高い反応性を示す活性酸素種 (highly reactive oxygen species、hROS) を検出可能な機能性生物発光プローブの開発を行った。プローブの開発にあたっては hROS が特異的に引き起こす脱アリル化反応を応用し、hROS プローブ APL を設計、合成した。APL は電子供与部として aminophenoxy 部を有するが、この部位は  $-OCl$  や  $ONOO-$ 、 $OH$  などの hROS と反応して脱アリル化することが知られている。APL は hROS と反応する前は luciferase 存在下でも BioLeT により発光を示さないが、hROS と反応後は高い発光特性をもつ AL 誘導体へと変換されるため

hROS 依存的に発光を回復すると期待される。実際、APL をバッファーに溶解させ様々な ROS を添加した後 luciferase と反応させると、hROS 添加時のみ発光が見られその他の ROS では発光は見られなかった。また APL の発光は hROS の濃度と良好な直線性を示した。

更に APL を luc gene transgenic rat (luc Tg rat) に適用し、*in vivo* 炎症イメージングを試みた。*in vivo*での活性酸素発生系として、臓器の虚血再還流 (ischemia/reperfusion, I/R) に着目した。臓器の I/R は臨床的に非常に問題となっており、例えば臓器移植や臓器の切除などにおいて重篤な障害を引き起こし、術後の予後に影響すると考えられている。I/R に起因する臓器の損傷には活性酸素の関与が報告されているものの、*in vivo*系において直接発生を検出した例はいまだにない。そこでラットの肝臓を 20 分の虚血の後に再還流し、3~6 時間経過後に APL を投与したところ無処置のラットに比べて肝臓の発光強度が顕著に増大した。AL を投与した場合には両者に違いが見られなかったことから、肝臓の活性酸素を検出できていると考えられ、世界で初めて臓器の I/R による活性酸素の発生を直接イメージングすることに成功した。この系を用いることで活性酸素の発生を抑える新薬の開発などへの応用が期待される。

この他、全く新たな発光波長を持つ新規 luciferin 誘導体の創製や、これに基づく新規 bioluminescence resonance energy transfer (BRET) プローブの開発などにも成功している。

以上、本論文は luciferin 発光基質の論理的かつ網羅的な改変を通じて、基質の機能化のための原理や特性を見出し、実際に様々な生物発光プローブの開発に成功し、さらに各種アプリケーションでその実用性を十分に示している。今後、本研究の結果を用いて、さらに実用的なプローブの開発や有用なアプリケーション系の構築が行われることが強く期待されることから、これらの成果は博士(薬学)の授与に値するものであると判断された。