

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 王瑜

本論文は、ホタルにおける生物発光色の変化を定量的な「その場分光」の手法によって研究したものであり、7章から構成されている。

第1章ではホタルが示す生物発光に関わる化学反応、発光効率、環境（pH や溶媒）による発光色の変化などに関する過去の実験研究および発光色変化を説明するモデルについて紹介している。この研究は、低い pH（酸性環境）で発光色が赤になる原因は緑発光の強度の減少によるという最近の発見に基づいて、様々の条件での発光色変化が同様に理解できるかという問題提起から始まっており、発光色の変化を通じて、発光のメカニズムを解明することを最終目標にすることが述べられている。

第2章では実験手法と試料の調製方法が述べられている。試料は、生物発光に必要な Luciferin, 2 価金属イオン, ATP および発光を起こさせる酵素 Luciferase を緩衝液に混合したものである。発光色は、酵素の種類によって異なるが、ここでは北米ホタル、ゲンジボタル由来の酵素、および後者の変異体である Y257F/E/R, H433Y を用いている。生物発光は ATP をトリガーとして注入することにより開始され、発光スペクトルは、反応終了までの総発光量を定量することにより、反応分子あたりの発光絶対量として定量的に求められることを述べている。

第3章では各種 2 価イオンの添加による発光色の変化が調べられている。その結果、 $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  の添加によって変化するのは主に緑発光であり、赤発光の変化は僅かであることを見出した。さらに緑発光の減少への影響は、大きい方から Hg, (Zn, Cd), (Ni, Co, Fe), (Mg, Mn, Ca) の順であることを見出した。

第4章ではゲンジボタルの野生種と、257番目のアミノ酸残基を置換した4種類の変異体 (Y257F/A/E/R) について発光スペクトルを測定し、やはり緑発光のみが減少または消滅することを見出している。

第5章では生物発光の反応が進行している途中の光吸収スペクトルを逐次測定し、総発光量と吸収強度の間によい相関があること、反応開始から約1時間後まで反応生成物は安定に残存することを確認し、反応終了後の溶液について吸収と光励起発光の詳細な測定を行った。光吸収スペクトルの pH 依存性は裸の酸化 Luciferin (OL) より小さいことを見出し、これは発光分子が収まっている活性ポケットの疎水性のためであると解釈された。光励起発光によっても緑発光が観測され、生物発光の場合と同様に酸性環境で減少することから、発光分子は生物発光時とほぼ同じ状態で活性ポケット内にとどまっていることがわかった。赤発光は非常に微弱で、赤発光を示す分子はほとんど残留していないことも示された。

第6章では赤発光を示す変異体 (H433Y) について、吸収、生物発光、光励起発光スペクトルについて論じている。発光スペクトルの pH 依存性は小さかったが、この試料は元々緑発光を示さないもので、自然な結果といえる。吸収スペクトルも pH 依存性が小さいが、その一方で、光励起発光では北米ホタルと同様に pH 依存性を持つ緑発光が見られた。これらの結果および溶液中

分子の吸収スペクトルとの比較などから、緑発光の起源は活性ポケット内の phenolate-enol-OL<sup>-</sup> であると同定された。これは、赤発光変異体の場合でも緑発光分子そのものは存在していることを示しており、したがって緑発光を示さないのは、その始状態が化学的に生成されないか、もしくは励起状態が無輻射的に緩和してしまうためと結論された。

第 7 章には以上のまとめと今後の課題が書かれている。緑発光は、pH の低下、Zn<sup>2+</sup>などの 2 価イオンの添加、アミノ酸残基置換などによって減少し、それによって生物発光色が変化することが示された。これらの変化はいずれも活性ポケットの形状や大きさの変化をとおして、緑発光の始状態に作用するためと理解された。

この研究は、所属研究室で開発された発光量子効率を定量できる測定装置と技術を最大限に利用し、2 価イオンの添加をはじめいくつかの条件による発光色の変化を極めて精密に定量的に研究したものである。国内外に同種の研究は知られておらず、独創性の高いものである。すべてのケースにおいて緑発光の増減が発光色の変化の起源であることを示した意義は大きい。また、光励起発光測定から最終生成物に大きな違いがないことがわかり、緑発光の強度を支配している要因は化学過程による励起状態の生成またはその緩和にあることも明らかになった。これは生物発光の研究における非常に重要な知見であり、さらなる生物発光の解明に結びつく大きな貢献をなしたものと認められる。

本研究のテーマには、複数の共同研究者が関与しているが、実験、解析および解釈にいたるまで、本人がほぼ独力で遂行したものであり、全体として申請者が主導的に研究を進めたものと認められる。

以上の理由により、提出された論文は、博士（理学）の学位を授与するにふさわしいものであると、審査委員全員の一致によって判断した。