

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：12612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650633

研究課題名(和文)長波長発光材料創出のための波長制御指標の確立

研究課題名(英文)The establishment of synthetic design guide for emission maximum of luciferin analogue

研究代表者

牧 昌次郎(Maki, Shojiro)

電気通信大学・情報理工学(系)研究科・助教

研究者番号：20266349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：目標としていた700nmに達する新規化合物の合成に成功した。また市販している長波長材料アカルミネ;の炭素原子を窒素原子に置き換えただけで、発光酵素との反応で波長が長短する現象を見出した。アカルミネの芳香環部位2位の炭素を窒素原子で置換すると50nm程度短波長化するが、同様に5位を置換しても発光波長はほぼ変化しなかった。

研究成果の概要(英文)：We have reached a goal innovating new luciferin analogue having 700nm emission maximum. Besides, we have found emission maximum control method for "NIR luciferin Aka Lumine" by replacing just one atom from C to N, on aromatic site of "NIR luciferin Aka Lumine". When the C5 position on the aromatic site of "Aka Lumine" replaced, the emission maximum has been blue shift ca. 50nm. However, when the C2 position on the aromatic site of "Aka Lumine" replaced, the emission maximum has been not shifted.

研究分野：生物有機化学

キーワード：近赤外発光 為制御 指標 ルシフェリン ルシフェラーゼ ホタル生物発光 インビボイメージング 有機合成 人

1. 研究開始当初の背景

申請者は、北米産のホタル発光酵素に限った技術ではあるが、1つの二重結合の伸長で生物発光波長が100nm程度ずつ長波長化することを見出し、指標技術としている(WO2010/106896)。しかしこれは、ある程度長波長化すると、生物発光では思われるような長波長化を示さなくなる。申請者の材料が事業化(675nm)される以前は、国際的にも630nmの材料(triplus™)が世界最長であった。これに対応するには、新たな指標・原理が必要と考えられる。

2. 研究の目的

ホタル生物発光系における、化学構造デザインによる新規波長制御技術の創製を行う。申請者は世界的に最も一般的な北米産のホタル発光酵素を用いて、発光基質の化学構造のデザインによって発光波長を制御する技術を創製し、世界で初めてホタル生物発光系でRGB発光を実現し、可視領域をほぼ網羅する発光基質を基質の化学構造をデザインすることも達成している(WO2010/106896)。しかし、ホタル生物発光の生体内深部可視化への利用から、700nm以上の長波長化に世界的なニーズと期待が寄せられている。本研究では、申請者が開発した長波長技術を駆使して**指標化に挑戦**し、ライフサイエンス分野の世界中の研究者が望み、また世界中で研究されているが、未だ実現できていない700nm以上の長波長発光材料の創製をもってこれを検証する。

3. 研究の方法

発光が長波長化する発光基質の化学構造変換が指標として有効かどうかを実際に系統だった類縁化合物を実際に合成して酵素反応で検定することで確認する。実際の発光酵素との反応で、期待通りの長波長化が可能なのかどうかを確認し、また輝度や物性なども調べ、実用性ある発光材料であるのかも確認する。期待通りの長波長化を示せば、化合物の構造などにより、シフト幅がどのような関係になっているのかも精査して、化学構造デザインでシフト幅もある程度予想できるような指標にまで高めたい。最終的には、この指標をもとに、700nmを超えるような長波長発光材料の化学構造をデザインして合成し、期待通りの長波長化が達成されているかどうかを、具現化した化合物で検定する。

4. 研究成果

目標としていた700nmに達する新規化合物の合成に成功した。また市販している長波長材料アカルミネ®の炭素原子を窒素原子に置き換えただけで、発光酵素との反応で波長が長短する現象を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7件)

和文

- 名称:「ホタルの光を化学で作る」
単著(2013年) 牧 昌次郎
雑誌名, 巻, 項: 化学と教育(日本化学会), Vol 61, No. 8, 392-395
- 名称:「ホタル生物発光型 in vivo イメージング標識材料の創製」
単著(2014年) 牧 昌次郎
雑誌名, 巻, 項: ファルマシア(日本薬学会), Vol 50, No. 2, 117-120
- 名称:「ホタル生物発光型 in vivo イメージング用長波長発光材料の水溶性化」
単著(2014年) 牧 昌次郎
雑誌名, 巻, 項: 光アライアンス(日本工業出版), 第25号, 33-35
- 名称:「ホタル生物発光の多色化への挑戦」
単著(2014年) 牧 昌次郎
雑誌名, 巻, 項: 生物工学会誌(日本生物工学会), 第92巻・第8号, 432-436

欧文

- Satoshi Iwano, Rika Obata, Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Kazutoshi Hama, Mitsuhiro Nakamura, Yoshiharu Amano, Satoshi Kojima, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa, "Development of simple firefly luciferin analogs emitting blue, green, red, and near-infrared biological window light", *Tetrahedron*, **69**, 3847-3856 (2013).
- Satoshi Iwano, Satoshi Kojima, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa, "Evaluation of Bioluminescence Activity of Firefly Luciferin Nucleotide Derivatives", *ECS Transactions*, **50**, 1-3 (2013).
- Chihiro Miura, Masahiro Kiyama, Satoshi Iwano, Kazuto Ito, Rika Obata, Takashi Hirano, Shojiro Maki, Haruki Niwa, "Synthesis and luminescence properties of biphenyl-type firefly luciferin analogs with a new, near-infrared light-emitting bioluminophore", *Tetrahedron*, **69**, 9726-9734 (2013).

[学会発表] (計 28件)

- 齊藤 亮平、木山 正啓、岩野 智、北田 昇雄、伊藤 和人、軽部 一磨、平野 誉、牧 昌次郎、丹羽 治樹
「in vivo イメージングに適した新規ル

シフェリンアナログの創製」
平成 25 年度個体レベルからみた炎症とがん (滋賀)、抄録集 p. 74 (2014)

2. 木山 正啓、齊藤 亮平、岩野 智、牧昌次郎、丹羽 治樹
「近赤外ルシフェリンアナログ アカルミネ®の水溶性改善化技術」
平成 25 年度個体レベルからみた炎症とがん (滋賀)、抄録集 p. 75 (2014)

3. 林 千尋、山路 稔、牧昌次郎、平野 誉
「オワンクラゲ生物発光機構の解明： π 共役拡張型アナログを用いた発光体アニオン構造の再検討」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2A1-16 (2014)

4. 松橋 拓人、Viviani Vadim、牧昌次郎、丹羽 治樹、平野 誉
「ホタル生物発光の発光色制御機構：アミノルシフェリン誘導体を用いたルシフェラーゼ発光特性の評価」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2A1-17 (2014)

5. 上原 卓也、山路 稔、牧昌次郎、丹羽 治樹、平野 誉
「ホタル α -インスバインド蛍光色素の高効率マルチカラー蛍光特性」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2A1-18 (2014)

6. 岩野 智、金森 茜、口丸 高弘、牧昌次郎、近藤 科江、丹羽 治樹
「近赤外発光材料で革新する in vivo イメージング」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2G4-37 (2014)

7. 後藤 史也、松橋 拓人、岩野 智、牧昌次郎、平野 誉
「ホタル生物発光の発光色制御機構：ルシフェリンの置換基効果による発光特性制御」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 1PC-059 (2014)

8. 鈴木 良尚、中川 達規、牧昌次郎、平野 誉
「置換基を導入したチアゾロピラジン蛍光色素の発光特性制御」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2PC-039 (2014)

9. 齊藤 亮平、木山 正啓、岩野 智、北田 昇雄、伊藤 和人、軽部 一磨、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎
「in vivo イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの創製」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2G7-05 (2014)

10. 軽部 一磨、北田 昇雄、三浦 千弥、岩野 智、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎、齊藤 毅、西山 繁
「世界最長波長で発光する新規ホタルルシフェリンアナログの創製」

日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2G7-06 (2014)

11. 井岡 秀二、齊藤 毅、岩野 智、牧昌次郎、丹羽 治樹、西山 繁
「新規発光アナログの開発を目的としたホタルルシフェリンの構造活性相関研究」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2G7-38 (2014)

12. 安達 悠樹、齊藤 毅、岩野 智、牧昌次郎、丹羽 治樹、西山 繁
「ホタル生物発光反応の解明を目的としたホタルルシフェリンの構造活性相関研究」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2G7-39 (2014)

13. 岩野 智、金森 茜、口丸 高弘、牧昌次郎、近藤 科江、丹羽 治樹
「近赤外発光材料で革新する in vivo イメージング」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 1PB-229 (2014)

14. 浅見 岳宏、松橋 拓人、牧昌次郎、平野 誉
「ホタルデヒドロルシフェリンアナログの合成と分光学的性質」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2PC-069 (2014)

15. 福島 栄一、牧昌次郎、平野 誉
「トリアルコキシフェニル置換イミダゾピラジノン誘導体の化学発光における反応条件依存性の評価」
日本化学会第 9 4 回春季年会 (名古屋)、講演要旨集 2PC-070 (2014)

16. 齋藤 亮平、木山 正啓、北田 昇雄、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎
「全世界待望の近赤外ホタル発光材料で In vivo イメージングを新次元へ」
日本化学会秋季事業第 4 回 CSJ 化学フェスタ (東京：船堀)、講演予稿集 p 45 (2014)

17. 齊藤 亮平、木山 正啓、岩野 智、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎
「in vivo イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの創製」
2014 年電気化学秋季大会 (札幌)、講演要旨集 1N32 (2014)

18. 北田 昇雄、岩野 智、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎
「ホタル発光系における特異的発光を示すルシフェリン中間体アナログの構造活性相関研究」
2014 年電気化学秋季大会 (札幌)、講演要旨集 2N02 (2014)

19. 齊藤 亮平、木山 正啓、北田 昇雄、岩野 智、平野 誉、丹羽 治樹、牧昌次郎
「in vivo イメージングに適した水溶性向上型新規ルシフェリンアナログの創製」

平成26年度がん若手研究者ワークショップ(蓼科)、抄録集 p.105 (2014)

20. 大塚 智史, 木山 正啓, 北田 昇雄, 齊藤 亮平, 平野 誉, 牧 昌次郎

「新規近赤外ルシフェリンアナログの創製」

第37回日本分子生物学会年会(横浜)、講演要旨集 2P-0782 (2014)

21. 三股 舜, 口丸 高弘, 岩野 智, 門之園 哲哉, 丹羽 治樹, 牧 昌次郎, 近藤 科江

「近赤外発光イメージングによるがん細胞の高感度検出」

第37回日本分子生物学会年会(横浜)、講演要旨集 2P-0802 (2014)

22. 木山 正啓, 平野 誉, 牧 昌次郎

「近赤外発光ルシフェリンの高輝度化への取り組み」

第37回日本分子生物学会年会(横浜)、講演要旨集 3P-0937 (2014)

23. 齊藤 亮平, 木山 正啓, 北田 昇雄, 岩野 智, 平野 誉, 丹羽 治樹, 牧 昌次郎

「in vivo イメージングに適した水溶性向上型新規ルシフェリンアナログの創製」

第37回日本分子生物学会年会(横浜)、講演要旨集 3P-0783 (2014)

24. 木山 正啓, 平野 誉, 牧 昌次郎

「ホタルルシフェリンアナログの発光反応解析」

生物発光化学発光研究会第31回学術講演会(長野上田)、講演要旨集 P 2 (2014)

25. 北田 昇雄, 岩野 智, 平野 誉, 丹羽 治樹, 牧 昌次郎

「ホタル発光系における特異的発光を示すルシフェリン中間体アナログの構造活性相関研究」

生物発光化学発光研究会第31回学術講演会(長野上田)、講演要旨集 P 6 (2014)

26. 大塚 智史, 木山 正啓, 北田 昇雄, 齊藤 亮平, 平野 誉, 牧 昌次郎

「近赤外ホタルルシフェリンアナログの新規創製」

生物発光化学発光研究会第31回学術講演会(長野上田)、講演要旨集 P 11 (2014)

27. 大塚 智史, 木山 正啓, 北田 昇雄, 齊藤 亮平, 平野 誉, 牧 昌次郎

「新規近赤外ルシフェリンアナログの創製」

日本癌学会シンポジウム(金沢)、抄録集 C02 (2015)

28. 齊藤 亮平, 木山 正啓, 北田 昇雄, 岩野 智, 平野 誉, 丹羽 治樹, 牧 昌次郎

「in vivo イメージングに適した水溶性向上型新規ルシフェリンアナログの創製」

日本癌学会シンポジウム(金沢)、抄録集 C03 (2015)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3件)

1. 名称: 新規ハロゲン化水素塩
発明者: 牧 昌次郎, 丹羽 治樹.

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: 特願 2013- 97755

出願年月日: 2013年5月7日

国内外の別: 国内

2. 名称: 新規複素環式化合物及びその塩、並びに、発光基質組成物

発明者: 牧 昌次郎, 丹羽 治樹.

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-198998

出願年月日: 2013年9月25日

国内外の別: 国内

3. 名称: 新規複素環式化合物及びその塩、並びに、発光基質組成物

発明者: 牧 昌次郎, 丹羽 治樹.

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-189314

出願年月日: 2014年3月18日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 6件)

1. 名称: ルシフェラーゼの発光基質
発明者: 牧 昌次郎, 小島 哲, 丹羽 治樹.

権利者: 国立大学法人 電気通信大学
共願人 キャンパスクリエイト

種類: 特許

番号: US8,709,821

出願年月日: 2009年 2月 2日

取得年月日: 2014年 4月 29日

国内外の別: 国外

2. 名称: ルシフェラーゼの発光基質
発明者: 西山 繁, 斎藤 毅, 牧 昌次郎, 丹羽 治樹.

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: US8,962,854

出願年月日: 2012年 8月 22日

取得年月日: 2015年 2月 24日

国内外の別: 国外

3. 名称: 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

発明者: 牧 昌次郎, 小島 哲, 丹羽 治樹

権利者: 国立大学法人 電気通信大学

種類: 特許

番号: 特許第 5550035 号

出願年月日：2010年 2月28日
取得年月日：2014年 5月30日
国内外の別：国内

4. 名称：ルシフェラーゼの発光基質
発明者：牧 昌次郎, 小島 哲, 丹羽 治樹.

権利者：国立大学法人 電気通信大学

種類：特許

番号：特許第 5464311 号

出願年月日：2008年 2月 2日

取得年月日：2014年 1月31日

国内外の別：国内

5. 名称：複素環化合物及び発光方法

発明者：牧 昌次郎, 小島 哲, 丹羽 治樹, 平野 誉.

権利者：国立大学法人 電気通信大学

種類：特許

番号：特許第 5194258 号

出願年月日：2007年 3月 26日

取得年月日：2013年 2月 15日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://ganshien.umin.jp/public/research/spotlight/maki/>

<http://www.jichi.ac.jp/kenkyushien/news/2013/20130510.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 牧 昌次郎 (Maki Shojiro)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・助教
研究者番号：24650633

(2) 研究分担者 丹羽 治樹 (Niwa Haruki)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・教授
研究者番号：20135297 (平成24年度で定年退職しており、平成25年度から実務研究より離れるので辞退)