2018年5月18日

### 脳科学ライフサポート研究センター セミナー

# ホタルの光の化学:基礎と応用の最前線

#### 平野 誉

### 電気通信大学大学院情報理工学研究科基盤理工学専攻 thirano@uec.ac.jp



発光生物の生態(何のために光るのか)

発光生物からの発光物質の探索 (発光基質とタンパク質成分の単離・構造決定) 天然物化学 生化学

生物学

発光基質(有機分子)の化学 有機化学研究(合成、反応 メカニズム、化学発光への応用、 理論化学計算) ルシフェリン、発光基質

タンパク質成分の化学 生化学、遺伝子工学研究(構造、 反応制御機構、発光性能の改変、 進化 ) ルシフェラーゼ、アポタンパク質

有機化学 無機化学 物理化学 生化学 分子生物学



#### ルシフェリン–ルシフェラーゼ反応 Luciferin-luciferase reaction (L–L反応)

R. Dubois (1885)





\* ラテン語 "lucifer" = "light-bringing"

#### 生物発光研究の進歩

1885 ・ <mark>ルシフェリンールシフェラーゼ反応の発</mark> 見	
1928 ルミノールの化学発光 / / NMRシク	ブナル観測
1947 <ul> <li>ホタル生物発光にATPが必要</li> <li>(1945)</li> </ul>	
1957 ウミホタルルシフェリンの結晶化 <b>ONA</b> 二重	らせん
1957 ●ホタルルシフェリンの結晶化 (1953)	
1961-1963 ●ホタルルシフェリンの構造決定 ← <sup>市販のFT</sup>	-NMR F#
1962 イクオリンとGFPの発見(発光オワンクラゲ) コド	ンの発見
1966 ウミホタルルルシフェリンの構造決定 (19	61)
1975 イクオリンの発光基質セレンテラジン(ルシフェリン)の	発見
1984-1985 ●ホタルルシフェラーゼのクローニング	<b>注</b>
1985-1986 アポイクオリンのクローニング(発光オワンクラゲ)(19	ය 84)
1992 GFPのクローニング(発光オワンクラゲ)	
1996 ・ ・ ・ ・ 北米産ホタルルシフェラーゼの結晶構造決定	
1996 GFPの結晶構造決定 GFPの結晶構造決定 1996 GFPの結晶構造決定 1996 GFPの結晶構造決定 1996 GFPの結晶構造決定 1996 GFPの 1996 GFP 199	
2000         イクオリンの結晶構造決定	
2006 ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・ ・	
2015 キノコ発光物質の構造決定	

### ルシフェリン/発光基質とルシフェラーゼ









bacteria luciferin 発光バクテリア



dinofllagerate luciferin 夜光虫

irefly luciferase たタル	分子量 等電点	60-62 kDa pH 6.2-6.3			
Vatasenia luciferase トタルイカ	未解明				
Cypridina luciferase ウミホタル	分子量 等電点	60-70 kDa pH 4.35			
Renilla luciferase ウミシイタケ	分子量	35 kDa			
Bacteria luciferase ベクテリア	分子量 70-80 kDa (heterodimer) α subunit 40-42 kDa β subunit 37-39 kDa				

#### ホタルの生物発光:Luciferin-luciferase reaction (L-L反応)



Quantum (1) Seliger H. H.; McElroy, W. D. Arch. Biochem. Biophys. 1960, 88, 136.Yield(2) Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya Y.; Akiyama, H. Nat. Photonics 2008, 2, 44.

# ホタルから何を学び、どのように使うか



# ホタルルシフェラーゼの抽出・単離

北米産ホタル ・ dried and removed lanterns (30 g from 6,000 fireflies)

- grinded, defatted with acetone, and dried > acetone powder (in the cold)
- extraction with 1 mM EDTA (pH 7.8)

# EDTA溶液抽出物

・変性しないように注意
 (温度、pH、塩濃度、キレート剤、
 界面活性剤など)

Green, A. A.; McElroy, W. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *20*, 170–176.

The Johns Hopkins University

# • adsorption on calcium phosphate $[Ca_3(PO_4)_2]$ gel and washed the gel

- > removing soluble impurities
- eluted with 0.82 M ( $NH_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/1 mM EDTA (pH 7.9)
- ammonium sulfate fractionation (4.1 M, pH 7.8)

# 沈殿ルシフェラーゼ

 dissolved and dialysis against a low ionic strength buffer (0.1 M EDTA, 10 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.3)



北米産ホタル Photinus pyralis



# ルシフェリンの抽出・単離(北米産ホタル Photinus pyralis)

生きたホタル
・ dried over CaCl<sub>2</sub> in a vacuum desiccator
・ their lanterns are separated by hand

- acetone powder of dried lanterns
- extraction with boiling water
- adjusting pH 3 and extraction with AcOEt

# 有機溶媒抽出物

- adsorption on Celite-Fuller's earth mixture for column chromatography
- wash with water-saturated AcOEt and elution with alkaline water (pH 8.0-8.5)
- adjusting pH 3 and re-extraction with AcOEt
- partition chromatography [Celite; elution with butanol-chloroform-water (135:15:50)]

### 精製ルシフェリン

・構造や性質が解って いない化合物を扱う (pH調整、溶解度)

#### 存在確認の指標 ・L-L反応(アッセイ) ・UV-vis吸収

Bitler, B. & W. D. McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, 72, 358–368.

結晶ルシフェリン

- adjusting pH 3 and extraction with AcOEt
- evaporation, dissolving in acetone, and addition of water
- slow evaporation of acetone by  $N_2$  gas flow

9 mg from 70 g of acetone powder (12000 fireflies)

### ルシフェラーゼへの分子生物学アプローチ



#### ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列

Sequence

	_					
	1	MEDAKNIKKG	PAPFYPLEDG	TAGEQLHKAM	KRYALVPGTI	AFTDAHIEVN
北米産ホタル	51	ITYAEYFEMS	VRLAEAMKRY	GLNTNHRIVV	CSENSLQFFM	PVLGALFIGV
Photinus pyralis	101	AVAPANDIYN	ERELLNSMNI	SQPTVVFVSK	KGLQKILNVQ	KKLPIIQKII
luciferase	151	IMDSKTDYQG	FQSMYTFVTS	HLPPGFNEYD	FVPESFDRDK	TIALIMNSSG
luciferase	201	STGLPKGVAL	PHRTACVRFS	HARDPIFGNQ	IIPDTAILSV	VPFHHGFGMF
分子量 60734	251	TTLGYLICGF	RVVLMYRFEE	ELFLRSLQDY	KIQSALLVPT	LFSFFAKSTL
	301	IDKYDLSNLH	EIASGGAPLS	KEVGEAVAKR	FHLPGIRQGY	GLTETTSAIL
アミノ酸残基	351	ITPEGDDKPG	AVGKVVPFFE	AKVVDLDTGK	TLGVNQRGEL	CVRGPMIMSG
	401	YVNNPEATNA	LIDKDGWLHS	GDIAYWDEDE	HFFIVDRLKS	LIKYKGYQVA
550	451	PAELESILLQ	HPNIFDAGVA	GLPDDDAGEL	PAAVVVLEHG	KTMTEKEIVD
	501	YVASQVTTAK	KLRGGVVFVD	EVPKGLTGKL	DARKIREILI	KAKKGGKSKL
Section co						
	l Jeque	MENMENDENT	WCDKDFVDT	FECSACTOLR	KYMERVAKLC	ϪͳϪϝͲϒͿϪϒͲϹ
ゲンジボタル	51	VDYSYAEYLE	KSCCLGKALO	NYGLVVDGRI	ALCSENCEEF	FIPVIAGLEI
Luciola cruciata	101	GVGVAPTNEI	YTLRELVHSL	GISKPTIVFS	SKKGLDKVIT	VQKTVTTIKT
	151	IVILDSKVDY	RGYQCLDTFI	KRNTPPGFQA	SSFKTVEVDR	KEQVALIMNS
luciterase	201	SGSTGLPKGV	QLTHENTVTR	FSHARDPIYG	NQVSPGTAVL	TVVPFHHGFG
分子量 60024	251	MFTTLGYLIC	GFRVVMLTKF	DEETFLKTLQ	DYKCTSVILV	PTLFAILNKS
	301	ELLNKYDLSN	LVEIASGGAP	LSKEVGEAVA	RRFNLPGVRQ	GYGLTETTSA
アミノ酸残基	351	IIITPEGDDK	PGASGKVVPL	FKAKVIDLDT	KKSLGPNRRG	EVCVKGPMLM
	401	KGYVNNPEAT	KELIDEEGWL	HTGDIGYYDE	EKHFFIVDRL	KSLIKYKGYQ
548	451	VPPAELESVL	LQHPSIFDAG	VAGVPDPVAG	ELPGAVVVLE	SGKNMTEKEV
	501	MDYVASOVSN	AKRLRGGVRF	VDEVPKGLTG	KTDGRATRET	I.KKPVAKM

Photinus pyralis: De Wet, J. R.; Wood, K.V.; Helinsky, D. R.; DeLuca, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1985, 82, 7870–7873. Luciola cruciata: Masuda, T.; Tatsumi, H.; Nakano, E. Gene 1989, 77, 265–270.



◆酸素化機構: Branchini, B. R.; Behney, C. E.; Southworth, T. L.; Fontaine, D. M.; Gulick, A. M.; Vinyard, D. J.; Brudvig, G. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 7592.
 ◆ジオキセタノン機構(<sup>18</sup>O<sub>2</sub>実験): Shimomura, O.; Goto, T.; Johnson, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*, 2799.
 ◆CTIL機構: Isobe, H.; Takano, Y.; Okumura, M.; Kuramitsu, S.; Yamaguchi K. J. Am. Chem. Soc., **2005**, *127*, 8667.

# ホタルの仲間の発光色制御



ゲンジボタル Luciola cruciata 黄緑色



Photo: Professor Vadim R. Viviani at Universidade Federal de Sao Carlos, Brazil

鉄道虫 Phrixothrix hirtus





生物発光の応用:マルチカラーレポーターアッセイ



Nakajima, Y.; Kimura, T.; Sugata, K.; Enomoto, T.; Asakawa, A.; Kubota, H.; Ikeda, M.; Ohmiya, Y. *BioTechniques* **2005**, *38*, 891.

# ホタルの生物発光の多様性



Ohmiya, Y.; Ohba, N.; Toh, H.; Tsuji, F. I. Photochem. Photobiol. 1995, 62, 309.



(写真)大場信義, '遺伝', vol. 50, no. 11 (1996); 'ホタルの飼い方と観察', ハート出版 (1998); 'ホタルの木', どうぶつ社 (2003).

#### ルシフェラーゼの変異体: 色を変える



写真 3. 発光色変異株による発光 上段左端はゲンジ由来,その他は変異株。

Kajiyama, N.; Nakano, E. Protein Eng. 1991, 4, 691-693.

# 北米産ホタルルシフェラーゼの結晶構造(Photinus pyralis)



Conti, E.; Franks, N. P.; Brick, P. Structure 1996, 4, 287–298.

### ゲンジボタルルシフェラーゼの結晶構造(Luciola cruciata)



**DLSA**: 反応できないルシフェリン アデニル体(反応中間体)のアナログ



Nakatsu, T. Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K.; Kato, H. Nature 2006, 440, 372-376.

#### ゲンジボタルルシフェラーゼの結晶構造:発光色制御









#### DLSAが入った天然型とS286N変異体

**Figure 2**: **a**, Superposition of the LcrLuc (WT) DLSA (green) and LcrLuc(WT)AMP/oxyluciferin (white) complexes. **b**, Superposition of the structures of LcrLuc (S286N) DLSA (pink) and LcrLuc (WT) AMP/oxyluciferin (white) complexes. Polar interactions are shown as dashed lines. **c**, Comparison of van der Waals interactions in the structures of wildtype (left) and S286N (right) luciferase complexed with DLSA. The van der Waals radii of DLSA (blue), Ile 288 of wild-type (green and light green) luciferase, and Ile 288 of S286N (red and pink) luciferase are drawn in colour. The atoms in van der Waals contact with DLSA are highlighted in green and red.

#### ホタルの発光色制御機構に関する研究

#### 機構1:ケトーエノール互変異性 (White)



#### keto-form / phenolate anion red emitter

#### enol-form / phenolate anion green emitter

White, E. H. et al. J. Am. Chem. Soc. 1969, 91, 2178; Photochem. Photobiol. 1991, 53, 131.



Branchini, B. R. et al. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 2112.

ケト型フェノラートイオンの蛍光スペクトル



Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2385.

### ケト型フェノラートイオンの蛍光性:溶媒とイオン対構造の依存性



### ホタルの仲間の発光色制御メカニズム

①オキシルシフェリンのケト型フェノラートアニオンが発光種。 ② アニオン種の性質が変化して発光色が変化する。 (1) ルシフェラーゼの活性部位の極性の変化 (2) アニオン種と陽イオンとの結合の性質の変化



(+)

Base

Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2385.

### ホタルのL-L反応の量子収率測定とpH依存性 北米産ホタルルシフェラーゼ



Figure 1 Quantitative measurements of firefly bioluminescence.

**a**, Quantitative luminescence spectra for  $2.98 \times 10^{11}$  luciferin molecules at various pH values: black, pH 8.5; blue, pH 8.1; green, pH 7.6; yellow, pH 7.2; orange, pH 7.0; pink, pH 6.7; red, pH 6.4. The vertical axis is scaled by the absolute number of emitted photons in units of eV<sup>-1</sup>. **b**, Quantum yields at various pH values with Tris (blue open circles), GTA (red filled triangles, 3,3-dimethylglutaric acid, Tris, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) and glycylglycine (green crosses) buffer solutions at 23.5–26.5 °C. The right vertical axis shows uncertainty in the quantum yields resulting from  $\pm 18\%$  uncertainty (k = 1) in the calibration.

Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama H. Nature Photonics 2008, 2, 44-47.

# ホタルのL-L反応へのpHの影響



Ando, Y.; Niwa, K.; Yamada, N.; Enomoto, T.; Irie, T.; Kubota, H.; Ohmiya, Y.; Akiyama H. Nature Photonics 2008, 2, 44-47.

#### アミノルシフェリンの発光: Photinus pyralis ルシフェラーゼ



White, E. H.; Wörther, H.; Seliger, H. H.; McElroy, W. D. J. Am. Chem. Soc. **1966**, 88, 2015. Hirano, T.; Nagai, H.; Matsuhashi, T.; Hasumi, Y.; Iwano, S.; Ito, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Viviani, V. R. Photochem. Photobiol. Sci. **2012**, 11, 1281.



#### ・置換基の電子供与性が発光波長を決める

Takakura, H.; Kojima, R.; Urano, Y.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Tsuboi, T.; Nagano, T. *Chem. Asian J.*, **2011**, *6*, 1800. Hirano, T.; Nagai, H.; Matsuhashi, T. ; Hasumi, Y.; Iwano, S.; Ito, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Viviani, V. R. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1281. Kakiuchi, M.; Ito, S.; Yamaji, M.; Viviani, V. R.; Maki, S.; Hirano, T., *Photochem. Photobiol.*, **2017**, *93*, 486.

オキシルシフェリンアナログの蛍光特性



・置換基の電子供与性を高める⇒発光極大の長波長化とソルバトクロミズム
 波長範囲の拡大 ⇒活性部位の極性を測る「ものさし」として利用できる

# 様々なルシフェラーゼを用いたL-L反応



LUCIFERASE	$\lambda_{max}$ (nm)			Relative Activity	
				NH <sub>2</sub> LH	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> LH
	LH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub> LH	Me <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> LH	/ LH <sub>2</sub>	/ LH <sub>2</sub>
pH-SENSITIVE					
LAMPYRIDAE ホタル科					
Macrolampis (pH 6.0)	606	594	595	0.15	0.1
Macrolampis (pH 8.0)	<b>563</b>	594	598	0.045	0.045
Photinus pyralis (pH = 6.0)	611	598	594	0.44	0.36
Photinus pyralis (pH = 8.0)	560	603	599	0.6	0.5
Amydetes vivianii (pH = 6.0)	551	582	585	0.083	0.104
Amydetes vivianii (pH = 8.0)	538	584	585	0.6	0.47
pH-INSENSITIVE					
ELATERIDAE ヒカリコメツキ					
Pyrearinus termitilluminans	538	560	559	0.31	0.077
C311A	588	579	579	0.033	0.044
PHENGODIDAE 鉄道虫					
Phrixotrix vivianii (GREEN)	548	580	584	0.17	0.33
RE220GR (YELLOW)	578	584	585	0.23	0.27
Phrixotrix hirtus (RED)	623	607	605	0.48	0.30
C311T	606	589	598	0.7	0.8
C311A	627	607	608	0.9	0.85
T345I	<b>629</b>	604	612	0.26	0.37
TENEBRIONIDAE E-117-L					
Zophobas luciferase-like	611	572	577	0.05	0.1

Viviani, V. R.; Rodrigues, D.; Amaral, D.; Prado, R. A.; Matsuhashi, T.; Hirano, T., Biochemistry, 2014, 53, 5208–5220.

### 天然型とアミノルシフェリンのL-L反応



Viviani, V. R.; Rodrigues, D.; Amaral, D.; Prado, R. A.; Matsuhashi, T.; Hirano, T., Biochemistry, 2014, 53, 5208–5220.





Viviani, V. R.; Rodrigues, D.; Amaral, D.; Prado, R. A.; Matsuhashi, T.; Hirano, T., Biochemistry, 2014, 53, 5208–5220.

# ルシフェラーゼ活性部位の極性が評価できる



Viviani, V. R.; Rodrigues, D.; Amaral, D.; Prado, R. A.; Matsuhashi, T.; Hirano, T., *Biochemistry*, 2014, 53, 5208–5220.

#### 環状アミノ基をもつルシフェリンの発光



\*酵素活性部位との立体障害の微調整による発光特性の制御

Kakiuchi, M.; Ito, S.; Kiyama, M.; Goto, F.; Matsuhashi, T.; Yamaji, M.; Maki, S.; Hirano, T., Chem. Lett. 2017, 46, 1090.

環状アミノルシフェリンの発光特性: Photinus pyralis ルシフェラーゼ



NMe<sub>2</sub> analogue

	λ <sub>bl</sub> /nm	Φ <sub>bl</sub>	K <sub>m</sub> /μM	rel. V <sub>max</sub>
NMe <sub>2</sub>	640	0.069	0.021	1.00
N5	621	0.095	0.020	1.56
N6	629	0.13	0.038	1.20
N7	622	0.11	0.084	3.9
Mor	628	0.009	0.047	0.076



⇒量子収率の向上

⇒N7が良い発光特性を示す(自由度のある環構造)

Kakiuchi, M.; Ito, S.; Kiyama, M.; Goto, F.; Matsuhashi, T.; Yamaji, M.; Maki, S.; Hirano, T., Chem. Lett. 2017, 46, 1090.

#### 生物発光の分子機構の応用



#### Red-shifted luciferase emits light with deeper tissue penetration Light up your life processes

A modified enzyme could light the way to better imaging of brain tumours.

Ariane Söling from the Georg August University in Göttingen, Germany, and colleagues, in a collaboration with Bruce Branchini of Conneticut College, New London, US, have shown that light from Branchini's analogue of a firefly luciferase enzyme penetrates tissue more deeply than the unmodified version.

Luciferases catalyse a lightemitting reaction and the resulting bioluminescence can be used to monitor biological processes in vivo, such as tumour growth or metastasis, 'We are working on malignant brain tumours,' says Söling. 'In vivo studies are relatively difficult to conduct using bioluminescence imaging, as skull reduces the bioluminescent light



**Fireflies use** luciferase to create bioluminescence

signal emitted from the tumour 100fold.' Branchini's enzyme produces light at a slightly longer wavelength than the unmodified luciferase, and she suggests that it is this red-shift that allows the light to penetrate tissue more deeply. 'Red light is known to be less absorbed by tissue,' she explains.

'Red-shifted luciferase reporter proteins could greatly improve in vivo imaging in cancer research,' says Söling. 'New bioluminescent reporters will also allow simultaneous imaging of multiple

molecular processes in vivo,' she adds, 'and may thus help to identify complex molecular interactions." Nikolai Rainov is a senior

consultant neurosurgeon at the Augsburg Clinic, Germany, and carries out academic research in experimental neuro-oncology - the study of tumours of the nervous

system. He says the most important finding of the work is that the light emission of the red-shifted analogue in living animals was up to 3.5 times more efficient than that of its unmodified counterpart, even though the in vitro activity was only a fraction of the activity of the unmodified luciferase.

Headds that 'one of the most interesting aspects of this luciferase is the profound change in the light emitting activity of the enzyme after substitution of a single nucleotide [in the DNA plasmid used to generate the luciferasel. This phenomenon is known with other proteins, but rarely demonstrated in such a highly visual way.' Rachel Cooper

2009, DOI: 10.1039/b814566k

Reference H Caysa er al, Phorochem, Phorobiol. Sci.,



(病巣の可視化)、未解明現象発見

など

参考: January 2009 / Volume 4 / Issue 1 / ISSN 1747-1605 / CBHIBN /www.rsc.org/chembiology

# ホタル(発光甲虫)発光の発光分析への応用



 $\diamond$  low background  $\rightarrow$  high sensitivity

◊ simple setup without excitation light source

# ATPを検出する



#### ふき取り検査方法ルシパックPenの場合(ルシパックAQUA、LSシリーズは弊社サイトをご参照ください。)

0 ふき取る



ルシパックPenの綿棒を水道水で湿らせて、検査対象をふき取る。



チューブ底を押さえて

綿棒ホルダーを本体に戻しワンプッシュ。 チューブ中間の液を底にふりおとし、粉末の試薬を溶かす。 測定する

**ルシパックPenをルミテスターPD-30の測定室に入れて測定。** \*測定単位は、RLU(Relative Light Unit 相対発光量)です。 (新チェッカ) ATP+AMPふき取り検査 ルミテスター PD-30&ルシパック 見えない汚れを、いつでも・とこでも・雌でも・簡単10秒で測定!





「ルシフェラーゼができている」ことを知る



#### 転写因子が働いたことを知る



#### 多色発光系の応用



Noguchi, T.; Michihata, T.; Nakamura, W.; Takumi, T.; Shimizu, R.; Yamamoto, M.; Ikeda, M.; Ohmiya, Y.; Nakajima, Y. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8053.

#### 発光は「見る」ための重要な技術です!







Comparison of Katushka and DsRed-Express in Xenopus laevis. Transgenic 2.5 month old Xenopus laevis expressing Katushka (left) and DsRed-Express (right) under the control of muscle actin promoter. The frogs are shown from the dorsal side under white light. (Photo Courtesy of Andrey Zaraisky)

### 生物発光からノーベル賞(2008年):オワンクラゲの発光



# 体の中を見る技術

- X線CT(コンピューター断層撮影法) (computed tomography)
- MRI(核磁気共鳴映像法) (magnetic resonance imaging)
- 超音波診断装置
- PET(陽電子放出型断層撮影法) (positron-emission tomography)

- 分子レベルのイメージング 「遺伝子発現の可視化」
- ・蛍光イメージング
- ・生物発光イメージング

簡単な装置、安全な光を利用!

СТ

A、B、C、Dの順に下から上に輪切りになっている。周りの白い部分は骨、灰色の部分 が脳で、真ん中の黒い部分は脳脊髄液の入っ ている脳室。脳の周りにたくさんのしわが見 えるが、〈図3〉の若い方に比べるとかなり隙 間が大きい





#### MR

図2と同じ方のMRI。AIはT1強調画像 (CTと同じように脳は灰色で、脳室は黒 い)、BIはT2強調画像(T1強調画像を白 黒反転したように見える)、CIはフレアー画 像(脳梗塞の病巣が見えやすく、白く写る)。 A、B、Cの画像はCTのBと同じぐらいの 部分の断層像で、DIは垂直方向の断層像





引用:国立循環器病研究センターweb

#### 蛍光と生物発光の違い



- ●分析したいときに光励起して観測する
   ●高感度な分析法
- ◆光励起が必要
- ◆光源由来のバックグラウンド

- ●物質を揃えて観測する
   ●バックグラウンドが少ない分析
   法
- ◆物質の消費を伴う

### ルシフェリンアナログによる近赤外発光

\*二光子吸収色素の利用

\*近赤外発光の利用



Me<sup>-N</sup> N N N S COOH Cyc-AL 640 nm

Reddy, G. R.; Thompson, W. C.; Miller, S. C. J. Am. Chem. Soc., **2010**, 132, 13586; Mofford, D. M.; Reddy, G. R.; Miller, S. C. J. Am. Chem. Soc., **2014**, 136, 13277.

# ルシフェリンアナログによる近赤外発光





Iwano, S.; Obata, R.; Miura, C.; Kiyama, M.; Hama, K.; Nakamura, M.; Amano, Y.; Kojima, S.; Hirano, T.; Maki, S.; Niwa, H. *Tetrahedron*, **2013**, 69, 3847.

### 実験動物の深い部位でも観察できる



*Nat Commu.* **2016**, *7*, 11856.

## 実験動物の深い部位が運動していても観察できる



#### 宮脇先生・牧先生の研究プロジェクト

Iwano, S.; Sugiyama, M.; Hama, H.; Watakabe, A.; Hasegawa, N.; Kuchimaru, T.; Tanaka, K. Z.; Takahashi, M.; Ishida, Y.; Hata, J.; Shimozono, S.; Namiki, K.; Fukano, T.; Kiyama, M.; Okano, H.; Kizaka-Kondoh, S.; McHugh, T. J.; Yamamori, T.; Hioki, H.; Maki, S.; Miyawaki, A. *Science* 2018, *359*, 935. 電通大卒業生 岩野智博士が第一著者



BioLet (bioluminescent enzyme-induced electron transfer): Takakura, H.: Kojima, R.; Kamiya, M.; Kobayashi, E.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Hanaoka, K.; Nagano, T.; Urano, Y. J. Am. Chem. Soc. **2015**, *137*, 4010–4013.



Mofford, D. M.; Adams, Jr., S. T.; Reddy, G. S. K. K.; Reddy, G. R.; Miller S. C. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 8684-8687.

#### 生物発光研究の展開

