

テーマ 2. ホタルの光を作ってみよう(1)

ホタル生物発光基質の合成と機器分析

1 はじめに^{a, b)}

ホタルに代表される光る生物には様々なものが知られている。バクテリア、キノコ類、ほとんどの無脊椎動物門や硬骨魚類など、広範な生物群で発光するものが見出される。その数は 1000 種以上にのぼるが、発光甲虫やキノコ類を除けばほとんどは海棲である（発光する植物はいまのところ見出されていない）。光り方も多彩である。ホタル（写真 1）は明滅し、オワンクラゲ（写真 2）、ホタルイカ、夜光虫などは機械的に刺激すると光り、ヤコウタケ（写真 5）は昼夜光り続ける。いずれも体内にある発光器官での発光であるが、ウミホタル（写真 3）や発光ゴカイ（写真 4）は発光液を体外に放出して光る。



写真 1 ヘイケボタル



写真 2 オワンクラゲ



写真 3 ウミホタル



写真 4 *Odontosyllis* 属の発光ゴカイ



写真 5 ヤコウタケ

生物発光の進化的起源は地球大気環境が嫌気的から好気的に変化した際の酸素毒性に対する防御システムであったと言われるが、実はよく解っていない。進化の過程で酸素酸化にともない効率よく光が作り出されるシステムが作り出され、様々な目的に積極的に利用するようになったと考えられる。ホタルの仲間、ホタルイカ、発光ゴカイは雌雄間の合図に、ウミホタルや発光イカは敵への威嚇・敵からの逃亡に、チョウチンアンコウやアラキノカンパ（蚊の仲間）の幼虫では捕食動物の誘因などに利用している。またミッドシップマンという魚は腹側を光らせることにより背景光の中に自分の姿を隠し、下からやってくる捕食者にみつかりにくくしている（カウンターイルミネーション）。

生物発光とは酵素・タンパク質が関与する「化学発光：物質の酸化に伴って光りが放出される現象」である。すなわち発光基質ルシフェリンが発光酵素ルシフェラーゼの働きで酸素酸化されて不安定（高エネルギー状態）な過酸化物となり、ついでこのものが分解する過程で電子的励起 1 重項 (S_1) 状態の分子（オキシルシフェリン）を生じる（図 1）。こ

のものが基底 (S_0) 状態に戻る時に過剰なエネルギーが光として放出される。ルシフェリンやルシフェラーゼは生物種により異なる。図 2 に代表的なルシフェリンの構造を示す。

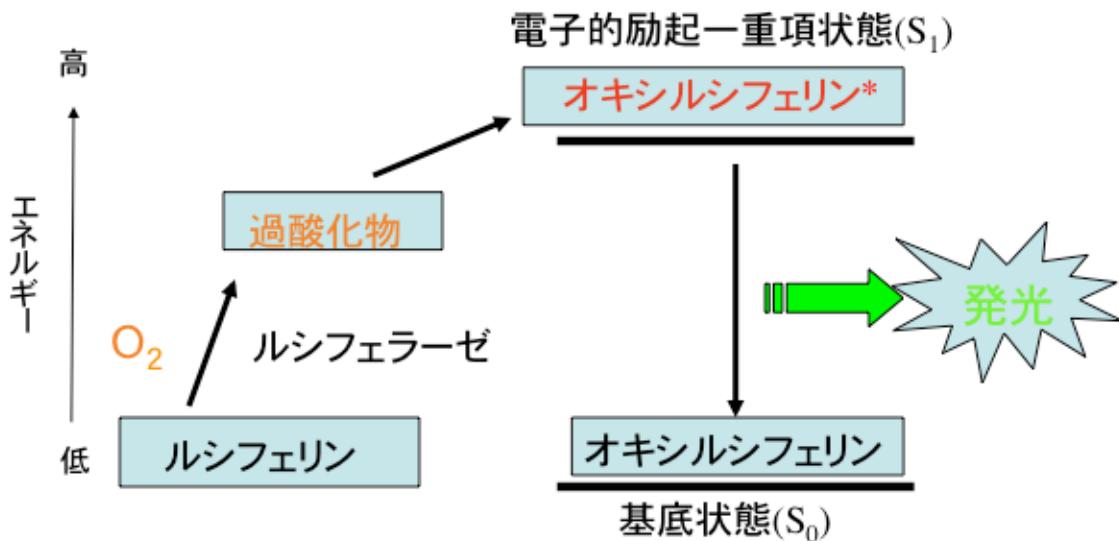


図 1 生物発光反応とエネルギー概念図

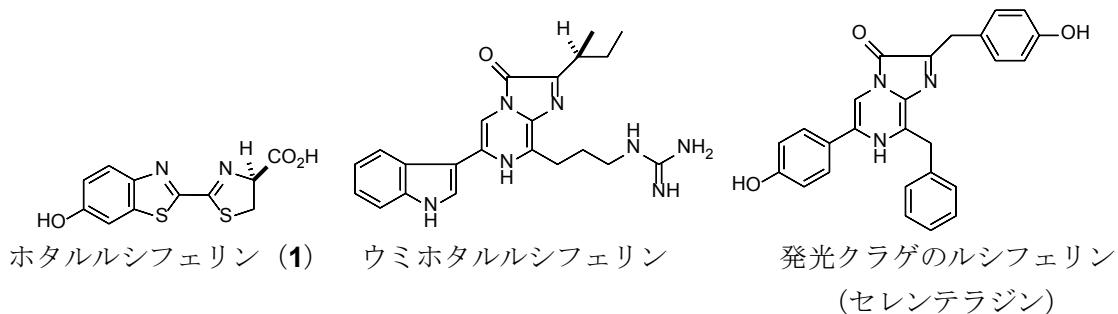


図 2 各種発光生物のルシフェリンの化学構造

ホタルの生物発光システムはバイオイメージングをはじめとして生命科学や環境科学、臨床・衛生検査など、様々な分野で幅広く利用されている。

本体験実験ではホタルの生物発光基質ホタルルシフェリン (1) の合成実験を行ない、「有機合成」と構造決定の現場を体感する。本実験で合成したホタルルシフェリン (1) を用いてホタルの光を作る（生物発光させる）実験を行う。

2 体験実験：ホタルルシフェリン (1) の有機合成

「有機合成」とは欲しい有機化合物（炭素化合物）を安価で簡単に入手し得るものから化学反応を組み合わせて作り上げる、有機化学的一大分野である。現代の有機合成の力量は合成できないものは無いといつても過言ではない。医薬・農薬、機能性物質・材料の開発や生産ではもはや「有機合成」は欠かせないものとなっている。

「有機合成」の4本柱は

- ① 炭素 - 炭素結合の形成
- ② 環構造の構築
- ③ 官能基 (物理・化学的性質を決める、特徴的な原子・原子団のこと) の導入・相互変換
- ④ 立体化学(構成原子の空間配置)の制御

である。標的化合物の合成は一般には多段階を要する。その際①-④のステップは、個別に、あるいは同時に、そして繰り返し行なわれる。実際の合成では標的化合物の構造を勘案して、適切な出発原料と経路を考案する。図3にホタルルシフェリン(1)の最新の合成経路を示す。^{c)} この方法では1の6員環(ベンゼン環)構造に着目し、*p*-アニシジンを出発原料に選んでいる。まずベンゼン環部にチアゾール環(S、Nを含んだ5員環構造)が縮環したベンゾチアゾール環構造(点線で囲った部分)を2段階で構築する。最後に、CHBTのニトリル基(C≡N)とD-システインとを縮合させ、不斉炭素(●印炭素)の立体化学を制御(保持)しつつ、もう一つの5員環部を構築し、1の合成を達成している。

本体験授業では最後の段階(赤い四角で囲った反応)を自分で行なってみる。操作自体は簡単であるが、有機合成の3本柱が1段階で達成される、ホタルルシフェリン(1)合成の見事な最終ステップである。

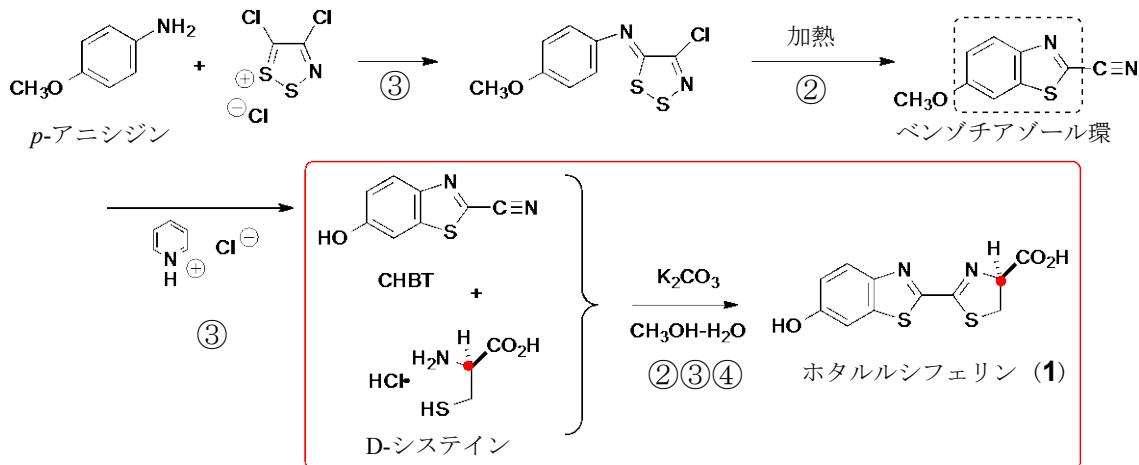


図3 ホタルルシフェリン(1)の合成経路^{c)}

2.1 使用する試薬

- ・ CHBT (2-cyano-6-hydroxybenzothiazole) (分子量 176.2) 44.0 mg (0.250 mmol)
- ・ D-システイン塩酸塩一水和物 (分子量 175.6) 44.4 mg (0.253 mmol)
- ・ 無水炭酸カリウム (K₂CO₃) (分子量 138.2) 35.0 mg (0.253 mmol)
- ・ 1 M 塩酸 1.0 mL (1.0 mmol)
- ・ メタノール 30 mL (使用直前に脱気しておく)
- ・ 酢酸エチル 10 mL
- ・ 蒸留水 30 mL (使用直前に脱気しておく)
- ・ 万能pH試験紙

2.2 使用する器具

- ・\$15/25 共通擦ナスフラスコ；20 mL 2 個
- ・\$15/25 共通擦三方コック 1 個
- ・\$15/25 共通擦減圧用連結管 1 個
- ・桐山ロート V-8 (ϕ 8 mm) or S-21 (ϕ 21 mm) 1 個
- ・シリコーンゴム製ロートアダプター（減圧用連結管への桐山ロート装着用）
- ・ろ紙 (V-8 用 ϕ 8 mm or S-21 用 ϕ 21 mm) 2 ~ 3 枚
- ・マグネチックスターラー 1 台
- ・磁気攪拌子 1 個
- ・アスピレーター(水流ポンプ) 1 台
- ・三角フラスコ (30 ~ 50 mL) 2 個
- ・パストールビペット 5 本 または駒込ビペット (2 mL) 5 本
- ・ビペット用ゴムキャップ 5 個
- ・薄層クロマトグラフ用 展開層 (ϕ 4 cm x 6 cm 程度の秤量びんで代用可) 1 個
- ・スペーテル、サンプル管 (~2 mL、試薬秤量用)、薬包紙、ゴム風船

2.3 実験操作

- ① 20 mL ナスフラスコを実験台にクランプで固定し、フラスコ内に磁気攪拌子を入れ、アルゴン風船を装着した三方コックを取り付ける。フラスコの下にはマグネチックスターラーを置く(図 4)。
- ② CHBT 44.0 mg (0.250 mmol)、D-システイン塩酸塩一水和物 44.4 mg (0.253 mmol)、無水炭酸カリウム 35.0 mg (0.253 mmol)をそれぞれサンプル管に量り取る (図 5)。
- ③ 量りとった CHBT を脱気メタノール 1 mL、D-システイン塩酸塩一水和物を脱気蒸留水 0.25 mL、無水炭酸カリウムを脱気した蒸留水 0.25 mL に溶解する。
- ④ CHBT のメタノール溶液と D-システイン塩酸塩水溶液を、パストールビペットを用いてフラスコ内に注入し (図 6)、マグネチックスターラーで攪拌する。
- ⑤ ついで炭酸カリウム水溶液を、パストールビペットを用いて加え、フラスコ内をアルゴン雰囲気 (アスピレーターで減圧し、アルゴンガスでリークする操作を 3 回ほど繰り返す) としたのち、反応溶液を室温にて攪拌する (図 7)。30 分後、反応の進行具合を薄層クロマトグラフィ (TLC) でモニターする (後述)。
- ⑥ 反応が終了したことを確認したのち、反応溶液を氷冷水 5 mL で希釈し、フラスコごと氷浴で冷却する。
- ⑦ 1 M 塩酸 1.0 mL (1.0 mmol) を加えて (発泡注意) 酸性 (pH 3 以下) にする。結晶が生じたことを確認。
- ⑧ 新たに 20 mL ナスフラスコをクランプで固定し、減圧用連結管、桐山ロートを装着し、桐山ロートにろ紙をセットする (図 8)。フラスコ内容物を桐山ロートに注ぎ込む (図 9、駒込ビペットを用いて移しても良い)。減圧用連結管をアスピレーターに接続し、吸引する。フラスコ内に残った結晶はろ液を使って洗い出す。
- ⑨ ろ紙上に残った結晶を少量の氷冷水で洗う。
- ⑩ 得られた結晶をサンプル瓶に移し替え、減圧乾燥し、重さを量り、

収率[(実際の収量／理論収量) × 100%]を計算する。なお理論収量は 70.1 mg である [280.3 (1 のモル質量) × 0.250 mmol(用いた CHBT の物質量) = 70.1 mg]。



図 4 反応容器全体図



図 5 試薬の秤量



図 6 試薬を移し替える様子



図 7 反応中の様子



図 8 吸引ろ過装置



図 9 吸引ろ過の様子

[実験操作の補足]

- ・実験器具はしっかりと固定されているか、触って確かめること。
- ・反応の進行を TLC (後述) でチェックするため CHBT をごく少量残しておくこと。
- ・吸引ろ過装置の桐山ロートにろ紙をセットする時は、まずろ紙を目皿部に置き、水で濡らし、アスピレーターで吸引し、ろ紙とロート目皿部を密着させる事。
- ・吸引ろ過の手順は「アスピレーターのスイッチを入れる→アスピレーターと連結管を繋ぐ」の順で行なうこと。吸引を止めるときはその逆で「連結管からアスピレーターをはずす→アスピレーターのスイッチを止める」。外さずにアスピレーターのスイッチを切ると水がアスピレーターから逆流する。

2.4 薄層クロマトグラフィー (TLC)

固定相と物質との吸着などの相互作用の違いを利用して混合物を分離する手法をクロマトグラフィーという。薄層クロマトグラフィー (TLC) はシリカゲルなどの微粒子状の固定相を薄膜（通常 0.25mm）にしたプレートを用いる。反応の進行具合や物質の純度などを、短時間に簡便に検定できる極めて便利な分析法。移動相（展開溶媒）は有機溶媒、有機溶媒-水混合溶媒、水などを用いる。

化合物が同じであれば、同一条件下では同じ展開挙動をしめす。化合物の展開距離と溶媒の先端までの距離の比は一定となる。この比を Rf 値といい、 Rf 値が大きければその溶媒ではあまり吸着されずよく展開されることを示す(図 10)。 Rf 値は 0.1~0.8 の間になるように溶媒を調整する。 $(Rf = a/b)$

[TLC の操作法]

- ① 原料 CHBT をごく少量サンプル管にとり、0.1 mL 程度の酢酸エチルに溶解する。
- ② 2 cm×5 cm 程度に切り出した TLC 用シリカゲルプレートを用意する。原料、反応溶液、およびその混合物を、プレートの下から約 1 cm の位置に毛細管でスポットする。
- ③ 展開層に酢酸エチルを深さ 0.5 cm 程度入れ、蓋をし、数分間放置する。
- ④ スポットした点を下にしてプレートを展開層にそっと置き、蓋をし、展開する。
- ⑤ 溶媒の先端が下から 4.5 cm 程度に達するまで展開する。
- ⑥ UV ランプでスポットの位置を確認する。あるいは適当な発色剤で発色させる。

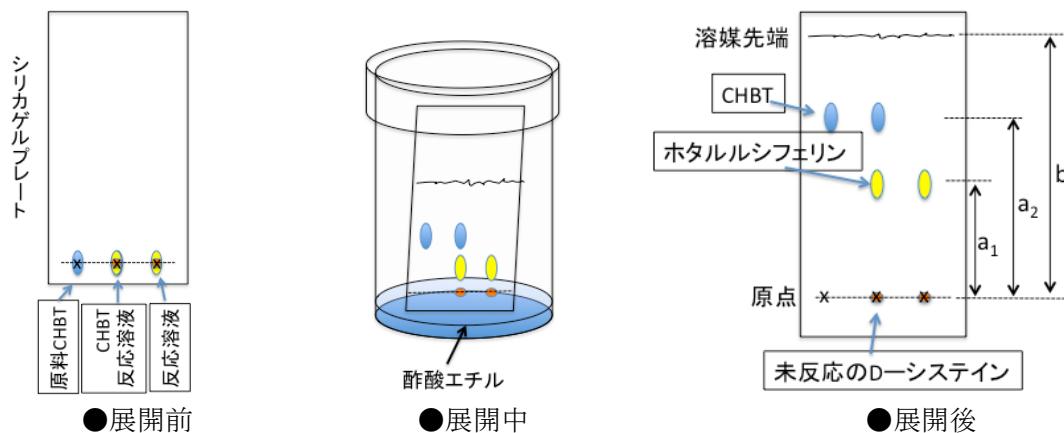


図 10 薄層クロマトグラフィーの様子

3 ホタルルシフェリン (1) の構造決定：機器分析^{d)}

有機合成、反応開発、生体成分の抽出・単離研究など、いかなる場合でも手にした化合物が目的物かどうか、構造確認・決定する必要がある。そのために各種の機器分析を行なう。機器分析法としては下記の方法がある。

- ① 核磁気共鳴分光法 (NMR)：炭素骨格や官能基（物理・化学的性質を決める、特徴的な原子・原子団）の並び方を決定できる。
- ② 赤外分光法：特定の官能基の有無が解る。
- ③ 質量分析法：分子量や分子式（原子の組成）が決定できる。ある程度、構造情報（特定の官能基の有無、炭素骨格情報）等が得られる。
- ④ 紫外・可視分光法：どのような π 電子系を持つか決定できる。
- ⑤ X 線構造解析：構成原子の 3 次元的配列 (=分子構造) が直接求まる。一般には単結晶が必要（最近、少量・非晶質で単結晶が得られないものでも可能となった）。

今回、合成したホタルルシフェリン (1) について、NMR スペクトルと赤外吸収スペクトル、マススペクトルを測定し、スペクトル解析を行ない、構造が正しいか検討する。

3.1 核磁気共鳴分光法 (NMR)

有機化合物の最も重要な機器分析法である。得られる情報も多い。

核磁気共鳴分光法では磁場の中におかれた有機分子中の¹H核(天然存在比99.9%)や¹³C核(天然存在比1.1%)の動きを観測する。¹Hや¹³C核は磁場の中では小さな棒磁石のようにふるまう。分子に磁場をかけると、分子を構成する¹Hや¹³C核棒磁石はコマの様にみそり運動(歳差運動)する。みそり運動の周波数(“共鳴周波数”という)は、分子中の¹Hや¹³C核のおかれた環境(すなわち分子構造)を反映して少しずつ異なる。この共鳴周波数の違いを、電磁誘導を利用した電気信号として検出する。横軸に個々の¹Hや¹³C核のみそり運動の共鳴周波数、縦軸に信号強度(シグナル)をプロットすると核磁気共鳴スペクトルが得られる。

シグナルの位置(共鳴周波数)は用いる装置の磁場の強さに比例する。そこで試料と基準物質(テトラメチルシランTMS)のシグナルの共鳴周波数の差(Hz単位)をその装置が示す孤立した¹Hや¹³C核に対する共鳴周波数(MHz単位)で割り、10⁶倍した値、δ(ppm)で表記する。これを化学シフトと呼ぶ(TMSのケミカルシフト値はδ=0となる)。これにより、構造が同じであればどの装置で測定しても、化学シフトは同じ値を持つことになる。

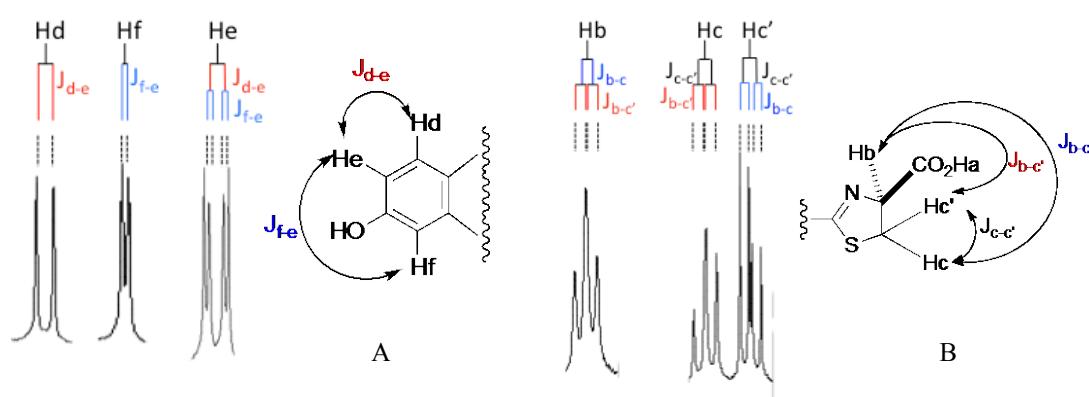
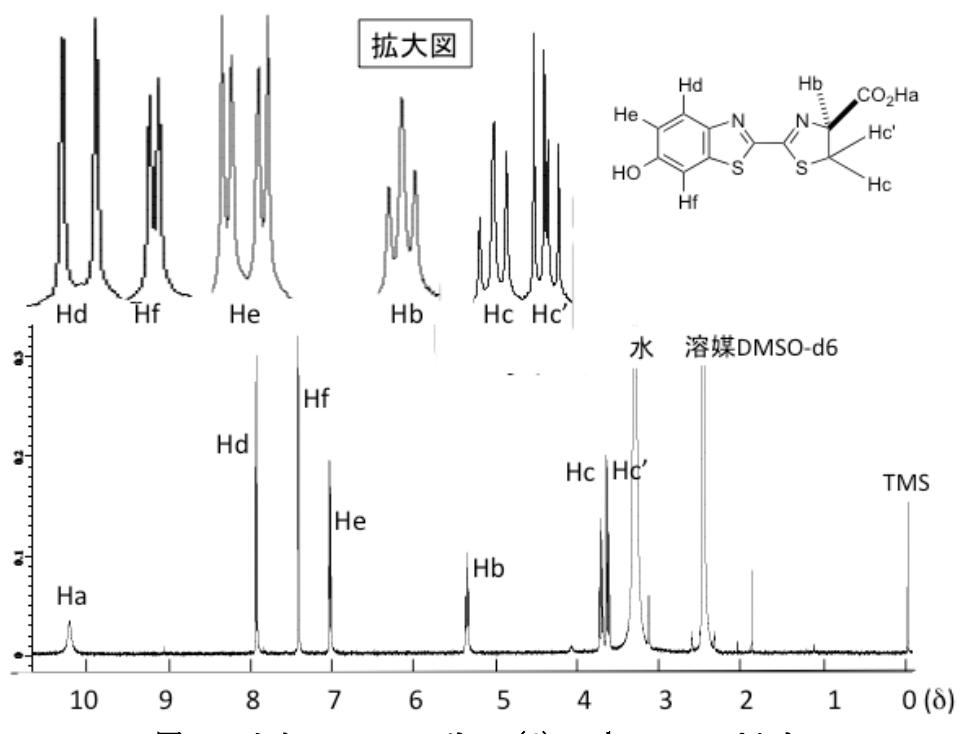
有機化合物中の¹Hや¹³C核のおよその化学シフト値を表1と表2に示す。本実験では日本電子株式会社製ECA500(¹H, 500MHz; ¹³C, 125MHz)を用いて、測定溶媒DMSO-d₆でスペクトルを測定する。図11にホタルルシフェリン(1)の¹H NMR、図13に¹³C NMRスペクトルを示す。構造決定ではHやCの数や化学シフト値と、隣接H核とのスピニスピックアップリング(相互作用)によるシグナルの分裂の大きさ・パターンを詳細に検討し、HやCのつながりを求め、構造を導き出す。図12にホタルルシフェリン(1)のカップリングパターンを示す。たとえばベンゼン環上の水素Hdは隣の水素Heとのスピニスピックアップリングによりカップリング定数J_{d-e}Hzで、2重線に分裂する。水素HjはHeとJ_{e-j}Hzでカップリングし、2重線に分裂する。水素HeはHd(J_{d-e}Hz)およびHj(J_{e-j}Hz)とカップリングし、4重線に分裂する。¹³C NMRの場合は直結する水素の数で分裂パターン(多重度)が規則的に変化する。直結水素を持たない炭素は1重線、1個の場合は2重線、2個の場合は3重線、3個の場合は4重線となる。

表1 有機化合物中の水素のケミカルシフトの概略値

官能基	$-\text{CO}_2\text{H}$				X: O, N etc.	
化学シフト δ (ppm)	~10	7-9	5-7	3-5		0.5-3

表 2 有機化合物中の炭素のケミカルシフトの概略値

官能基						
化学シフト δ (ppm)	180-160	160-120	150-100	100-30	90-30	40-10

図 12 スピン-スピンカップリングによるシグナルの分裂パターン (^1H NMR)

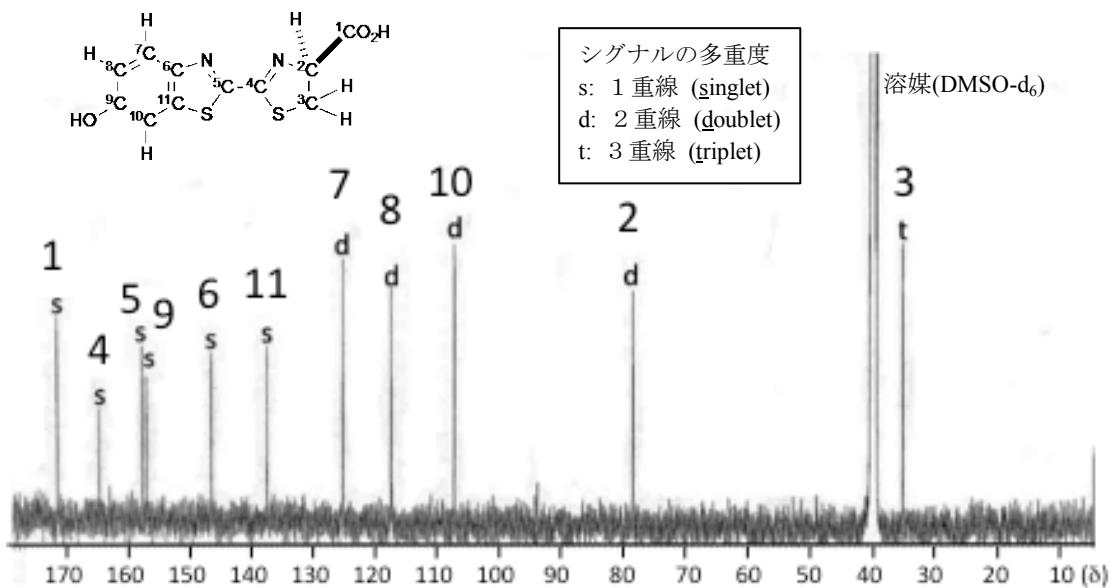


図 13 ホタルルシフェリン (1) の ^{13}C -NMR スペクトル

C1, C4, C5, C6, C9, C11 は水素原子と結合していないため 1 重線(s)、
C2, C7, C8, C10 は 1 個の水素原子が結合するため 2 重線(d)、
C3 は 2 個の水素原子が結合するため 3 重線(t)となる。

3.2 赤外分光法

分子の共有結合はばねのように伸縮や変角振動している。このような分子に赤外線領域波数 $4000 \text{ cm}^{-1} \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ (波長 $2.5 \mu\text{m} \sim 25 \mu\text{m}$) の電磁波を照射すると、分子の特定の官能基(CO_2H 基、OH 基など)や分子固有の振動エネルギーが吸収される。この吸収の様子から特定の官能基の存在など、有用な構造情報が得られる。表 3 に主な結合の吸収領域を示す。本実験ではサーモフィッシュサイエンティフィック株式会社製フーリエ変換赤外分光光度計(Nicolet6700 FTIR)を用い、全反射法(ATR)で赤外吸収スペクトルを測定する。図 14 にホタルルシフェリン (1) の IR スペクトルを示す。

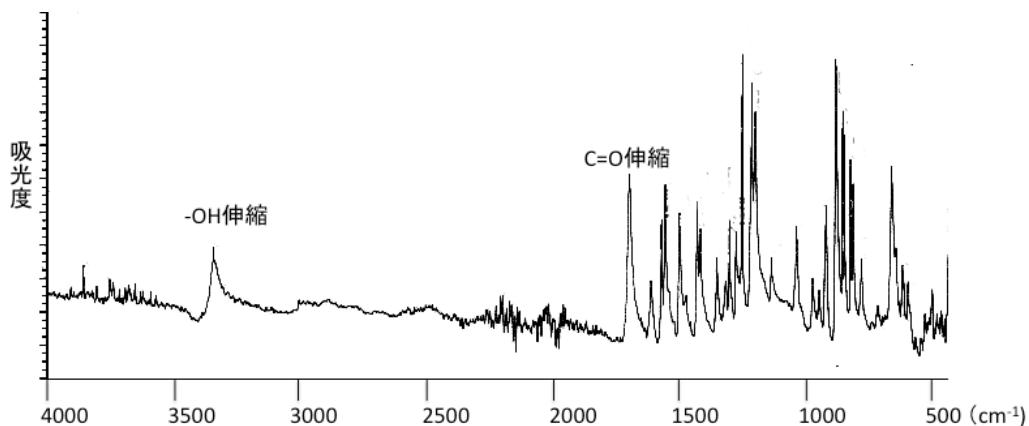


図 14 ホタルルシフェリン (1) の IR スペクトル

表3 結合の種類と赤外線吸収領域

結合の種類	吸収領域 (cm^{-1})
C—H, O—H, N—H	3800 ~ 2700
C≡C, C≡N	2300 ~ 2000
C=C, C=O, C=N	1900 ~ 1500
C—C, C—O, C—N	1300 ~ 800

3.3 質量分析法

何らかの方法で、質量 m の分子に電荷 z を持たせ（イオン化し）、荷電した分子イオンや分解で生じた荷電分子断片（フラグメントイオン）を何らかの方法で質量/電荷比(m/z)に応じて分離・検出し、分子1個の質量 m （すなわち分子量）や分子の構造情報（特定の官能基の有無や骨格情報）を得る。精密な測定をすると元素組成が判別できる〔例えばエチレン C_2H_4 (m/z 28.03)、窒素 N_2 (m/z 28.01)、一酸化炭素 CO (m/z 27.99) が区別できる；整数質量はいずれも 28〕。イオン化法には電子衝撃法、エレクトロスプレー（ESI）法（2002、ノーベル賞）、MALDI 法（2002、田中耕一、ノーベル賞）等が挙げられる。検出法としては飛行時間型（Time of Flight =TOF型）、磁場型、イオントラップ型、4重極型（Q ポール型）などがある。本実験では日本電子株式会社製 JMS-T100LC 型質量分析計を用い、ESI 法で測定する。図 15 にホタルルシフェリン（1）の ESI-TOF マススペクトルを示す。

4 レポート課題

- CHBT とシステインからホタルルシフェリン（1）が生成する反応機構を考えよう。
- 実験収率は 100%にならない。その理由としてどんな事が考えられるだろうか。
- 図 13, B に示した Hb、Hc、Hc' のシグナルの分裂パターンを説明してください。

参考文献

- 今井一洋、近江谷克裕編：バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック、丸善、2006.
- Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*; World Scientific, 2006.
- McCutcheon, D. C.; Porterfield, W. B.; Prescher, J. A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2117-2121.
- 荒木賛ほか訳、有機化合物のスペクトルによる同定法（第5版），東京化学同人、2006.

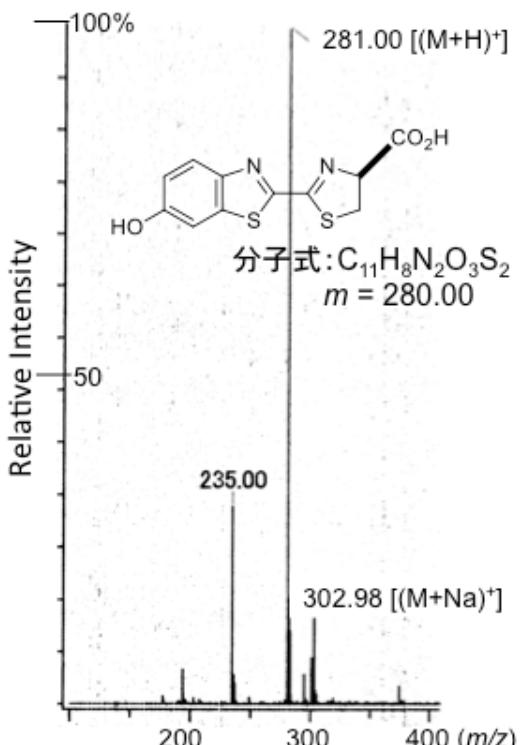


図 15 ホタルルシフェリン（1）の
ESI-TOF マススペクトル

テーマ 2. ホタルの光を作つてみよう (2) 生物発光測定

2.1 ホタルの生物発光反応について^{a), b)}

ホタルの生物発光は酵素反応である(図 1)。基質であるホタルルシフェリン (**1**) は Mg^{2+} イオン共存化で 酵素ルシフェラーゼの作用でアデノシン三リン酸 (ATP : 生体内に普遍的に存在する、生体内エネルギーの運び屋) と反応してルシフェリル AMP **2**となる。ついで **2** はルシフェラーゼの作用で酸素分子と反応して、ペルオキシド **3** を与える。さらに **3** はジオキセタノン中間体 **4** を経て電子的励起一重項状態 (S_1 状態) のオキシルシフェリン **5*** と CO_2 に分解する。そして酵素と結合した **5*** から黄緑色 (560 nm) の光が出る。ホタル生物発光の発光効率は約 41% (100 個のルシフェリン分子から 41 個のフォトンが生成する) で、大変効率が高い。発光効率は①「酸化反応 (**1**→**5**) の化学収率」②「励起状態の **5*** が生成する効率」③「**5*** から蛍光を発する効率」の掛け算である。ホタルの生物発光システムが極めて効率よく化学反応エネルギーを光りエネルギーに変換していることが理解できる。ホタルの光が「冷光」と言われる所以である。ホタルと近縁のヒカリコメツキや鉄道虫などの発光甲虫もホタルとおなじ **1** を発光基質として用いているが、ヒカリコメツキは個体によって緑、黄緑、オレンジ色、と発光色が異なる。一方、鉄道虫は一個体で頭が赤く、胴体が緑色に光る。基質 **1** は同じなのに色の違いが出るメカニズムについては諸説があったが、最近、電通大、平野らにより解決を見ている。^{c)}

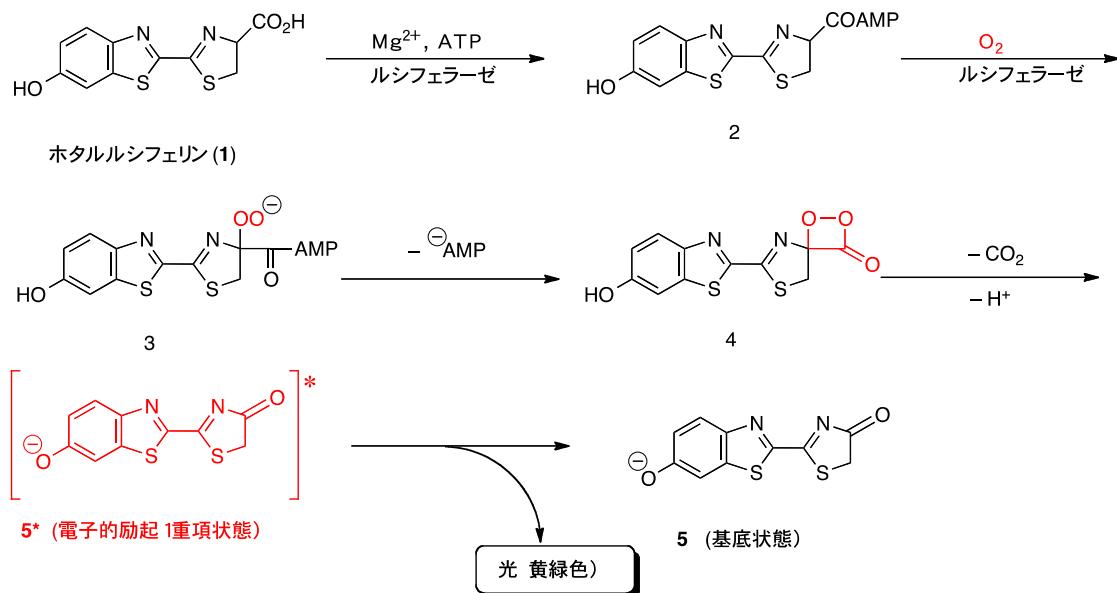


図 1 ホタルの生物発光反応

2.2 ホタル生物発光系の応用^{d), e)}

図1に示したように、ホタルの生物発光系はATPを必要とする。これを逆に利用すれば極めて高感度なATP検出系を構築できる。実際に食品、環境水、手術室などのバクテリアのモニタリング(ATPを検出)などの衛生検査、ATP産生・消費とリンクした各種生体微量成分の検出・各種酵素活性の測定などの臨床検査や高速遺伝子(DNA)解析技術に利用されている。またある酵素反応でホタルルシフェリン(1)が生成するようにしておけば高感度な酵素活性測定系が構築できる。また膨大な数の化学物質の危険性評価に、時間と手間と費用のかかる動物実験に換わり、低コストでハイスループット化が可能なホタルやバクテリアの生物発光系が利用されつつある。地球外生命探査(=ATPを検出)にもホタルの発光系が利用されるという。

ホタル発光系は緑色蛍光タンパク質GFP(下村脩、2008年ノーベル化学賞)とともに生命現象のバイオイメージングツールとして広く利用されている。ホタルの酵素ルシフェラーゼの遺伝子はホタル以外の生物でも発現させることができ(=ルシフェラーゼが生成する)。そこでモニターしたい遺伝子が発現したとき、同時にルシフェラーゼ遺伝子も発現するように遺伝子操作しておけば、ATP、Mgイオン、酸素は生体内に常在しているのでホタルルシフェリン(1)の投与により、特定の遺伝子が発現するタイミングや場所をホタルの光でモニターできる(プロモーターアッセイあるいはレポーターアッセイ)。ウイルスや病原菌感染の可視化、遺伝子治療の評価、実験動物における抗がん剤の評価やがん転移の検出、oncolytic治療(ウイルスによるがん細胞破壊治療)の評価、iPS細胞の研究でもホタルの生物発光が威力を発揮している。しかし、生体深部からの光をとらえるには、血液による光の吸収があるため、ホタルの光(560~600 nm)では不十分である。血液があっても透過する、近赤外領域の700~1300 nm(“生体の窓”と呼ぶ)で発光するものが望ましい。最近、電通大、牧らは“生体の窓”にまで発光領域を持つホタル人工基質アカルミネ®を開発し、世界初の実用化に成功している(図2)。¹⁾

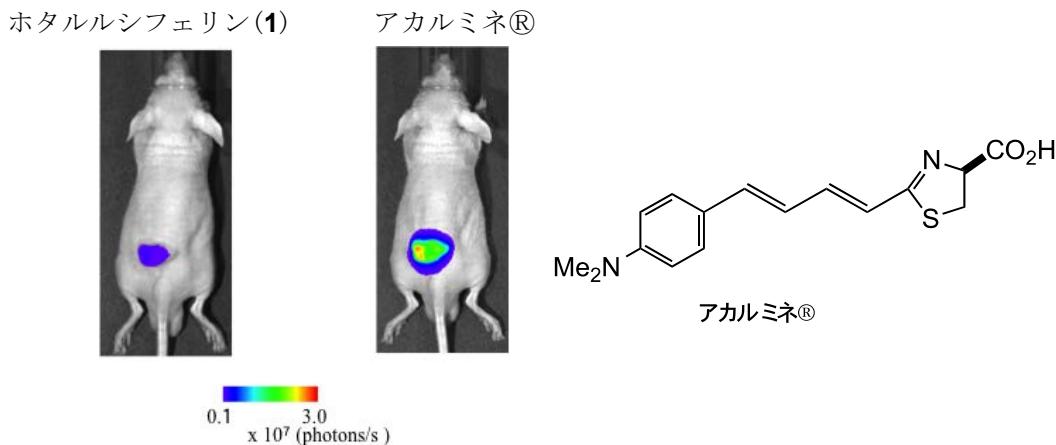


図2 マウス体内でのホタルルシフェリン(1)とアカルミネ®の生物発光の比較

ホタルルシフェラーゼ遺伝子が発現している腫瘍細胞をマウスに植え付け、当モル量のホタルルシフェリン(1)とアカルミネ®を投与して発光させ、マウス体表で光量を計測した。アカルミネ®を投与した方(右)が、明らかに体表面に出てくる光量が多い。(写真提供、東工大、口丸高弘助教、近藤科江教授)

本実験実験ではテーマ1で合成したホタルルシフェリン（1）と市販の近赤外発光性人工ホタル発光基質アカルミネ®を用いて生物発光反応を行い、発光スペクトルと発光の経時変化を計測し、両者の違いを比較・検討する。

2.3 ホタル生物発光の計測

2.3.1 実験に用いる装置、試薬、器具

1) 測定装置

- pH 測定：堀場製作所製 F-23 型ガラス電極式水素イオン濃度指示計を使用。
- 生物発光量測定：アト一製 Luminescencer-PSN AB-2200 を使用。
- 生物発光スペクトル測定：アト一製 AB-1850 LumiFL Spectrocapture を使用。

2) 試薬

- ホタルルシフェリン：実験テーマ1で合成したもの。
- アカルミネ®：和光純薬薬品工業製、特級。
- 超純水：MILLIPORE 製 Milli-RX12α から採水したもの。
- ルシフェラーゼ（北米産ホタル *Photinus pyralis* 由来）：Promega 社製、組み換え型ルシフェラーゼ（QuantiLum® Recombinant Luciferase）
- ATP-Mg：Sigma 社製。
- リン酸水素二カリウムとリン酸二水素カリウム：和光純薬工業製、特級。
- トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール）（通称 Tris）：関東化学製、特級。
- グリセロール：和光純薬工業製、特級。
- 6 M 塩酸および1 M 塩酸。

3) マイクロピペット（20 μL, 200 μL, 1000 μL）とマイクロピペット用チップ

4) 各種プラスチックチューブ（図3）

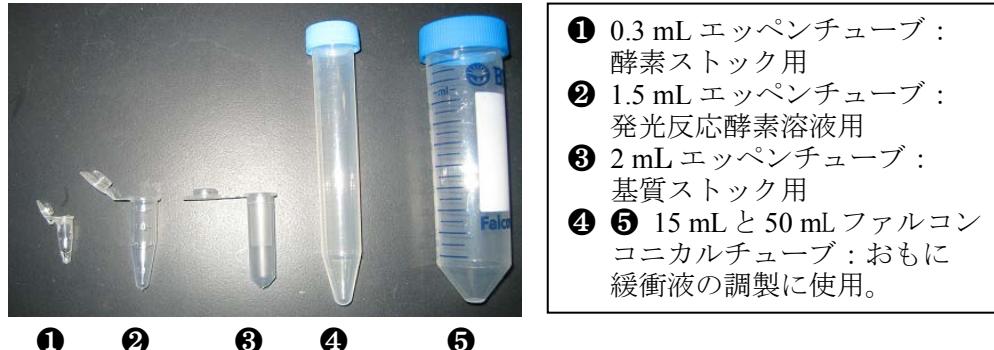


図3 各種プラスチックチューブ

2.3.2 緩衝液の調製

1) pH メーターの操作法

緩衝液の調製では水素イオン濃度（pH）を調節する必要がある。pH 調節は堀場製作所製 F-23 型ガラス電極式水素イオン濃度指示計（pH メーター）で行う。図4に pH メーターの操作法とガラス電極を使用した pH 測定の様子を示す。



- ① pH メーター本体（左写真）の電源を入れる。
 - ② **校正ボタン**を押す。
 - ③ ガラス電極を pH 4, 7, 9 の標準液に浸し、校正を行う。
 - ④ **ESC**を押して校正終了。
 - ⑤ 試料溶液の pH を測定。溶液混合を繰り返し目的の pH にあわせる。
- pH 測定は溶液攪拌しながら行う。攪拌子がガラス電極にぶつからないようにする。

電極保護キャップ :
測定時にあけ、終了時に閉める



図4 pH メーター操作法とガラス電極による pH 測定の様子

2) 500 mM pH 8.0 および pH 6.0 リン酸緩衝液の調製

- ① リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4 : 特級、分子量 174) 4.35 g、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4 : 特級、分子量 136) 3.40 g をそれぞれ超純水 45 mL に溶解し、最終的に体積を 50 mL にメスアップし、濃度 500 mM の溶液を調製。 K_2HPO_4 水溶液は pH 8~9、 KH_2PO_4 水溶液は pH 4~5 となっていることを pH メーターで確認。
- ② 500 mM pH 8.0 リン酸緩衝液の調製 : pH メーターでモニターしながら pH 8.0 になるよう 500 mM K_2HPO_4 (pH 8~9) 10 mL に 500 mM KH_2PO_4 (pH 4~5) を加えていく。
- ③ 500 mM pH 6.0 リン酸緩衝液の調製 : 500 mM KH_2PO_4 (pH 4~5) 10 mL に 500 mM K_2HPO_4 (pH 8~9) を加えて行き、pH 6.0 に調整。

3) 50 mM pH 6.0 のリン酸緩衝液の調製

500 mM pH 6.0 リン酸緩衝液 5 mL を超純水で 10 倍希釈し、調製。

- 4) グリセロールを 35%含む 50 mM pH 8.0 リン酸緩衝液の調製
500 mM pH 8.0 リン酸緩衝液 1 mL とグリセロール 3.5 mL を混合し、さらに超純水で全体の体積を 10 mL にして調製する。
- 5) 500 mM pH 8.0 および pH 9.0 Tris-HCl 緩衝溶液の調製
 - ① トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール)(通称 Tris、特級、分子量 121) 3.03 g を約 40 mL の超純水に溶解し (pH 10) し、6 M 塩酸で pH を 8.0 に調節した後、室温に冷却 (pH に温度依存性があるため)。1 M 塩酸で pH を pH 8.0 に調節後 全体の体積を 50 mL にして、500 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝溶液を調製。
 - ② 同様にして pH 9.0 の 500 mM Tris-HCl 緩衝溶液を調製。
- 6) グリセロールを 10%含む 50 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液の調製
 - ① 500 mM pH 8.0 の Tris-HCl 緩衝液 20 mL を超純水で 5 倍希釈し、100 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液を調製する
 - ② 100 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液 20 mL とグリセロールを 4 mL を混合し、超純水で全体の体積を 40 mL にし、グリセロールを 10%含む 50 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液を得る。

2.3.3 試料調製

- 1) 基質溶液
 - ① ストック溶液：
 - ・ホタルルシフェリン (1) (分子量 280) : 1.4 mg (5 µmol) を電子天秤で 2 mL エッペンチューブに量り取り、50 mM pH 6.0 リン酸カリウム緩衝液 1.0 mL に溶解し、5 mM 溶液を調製。
 - ・アカルミネ® (分子量 302.4) : 1.5 mg (5 µmol) を電子天秤で秤量し、50 mM, pH 6.0 リン酸カリウム緩衝液 10 mL に溶解し、0.5 mM 溶液を調製。
 - ② 実際に使用する基質溶液 :
 - ・上記ストック溶液をリン酸緩衝液 (50 mM pH 8.0) で希釈し、100 µM の濃度にして用いる (ホタルルシフェリンは 50 倍希釈、アカルミネ®は 5 倍希釈する)。
- 2) 酵素溶液
 - ① ファントム計測用 : 購入した酵素溶液を希釈せずに用いる。なお購入したルシフェラーゼは、重量は 1 mg に統一されているが、濃度はロット間でバラつきがある (取扱説明書に濃度は記載されている)。過去に購入したルシフェラーゼの濃度は 13.2 mg/mL、14.7 mg/mL などである。
 - ② ストック溶液 : 購入したルシフェラーゼ 1 mg を 1 mg/mL になるように、グリセロールを 10%含む Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 8.0) で希釈し、20~30 µL ずつ 0.3 mL のエッペンチューブ (図 3、①) に小分けし、-80 °C の冷凍庫に保管する。
 - ③ 実際に使用する酵素溶液 : 冷凍保存してあった 1 mg/mL ストック溶液を

20~30 μL を解凍し、グリセロールを 35%含むリン酸緩衝液 (50 mM pH 8.0) で 100 倍希釈し、10 μg/mL の濃度にして用いる。

3) ATP-Mg 溶液の調製

① 10 mM ATP-Mg の溶液の調製 :

ATP-Mg (2Mg 塩の分子量 : 551) 11 mg を超純水 2 mL に溶解し、調製。

② 200 μM ATP-Mg 溶液の調製 :

10 mM ATP-Mg 0.1 mL を 4.9 mL の超純水で 50 倍希釈し、調製。

2.3.4 生物発光測定

1) Luminescencer-PSN AB-2200 による生物発光量測定

Luminescencer-PSN AB-2200 の操作法を図 5 に示す。表 1 に示した測定溶液の体積で、図 6 に記載した手順で発光量を測定する。



- ① 電源を入れると、“Set Conditions”と表示されるので **Enter** を押すと測定条件の設定画面になる。
- ② 上から Mul, 35 sec, Integral, 0 sec, 35 sec, off を選んで **Enter** を押す。すると“Set Conditions”と表示される。
- ③ **UNK** を押す。Sample name を入れる。測定回数を入力する。
- ④ “UNK Analysis”と表示されるので試料をセットし、**Start** を押すと測定開始。
- ⑤ 測定終了時は **ESC** を押す。
- ⑥ “Save a UNK File”と表示されるので Save する場合は“Yes”、しない場合は“No”を選択。

図 5 Luminescencer-PSN AB-2200 の操作法

表 1 Luminescencer-PSN AB-2200 による生物発光量の測定条件

	濃度	体積 (μL)	最終濃度
pH 8 リン酸緩衝溶液	500 mM	20 μL	100 mM
基質	基本は 100 μM *	20 μL	20 μM
酵素	10 μg/mL	20 μL	2 μg/mL
Mg-ATP	200 μM	40 μL	80 μM

* 発光強度が飽和する場合は 10 μM 濃度の基質溶液を用いる

アカルミネ®の場合は 0.5 mM 溶液を用いる（最終濃度は 0.1 mM）



Luminescencer-PSN AB-2200
(カウントは9桁ぐらいになると飽和するので注意)



基質、酵素などのストック溶液はこのように、氷上で冷却しながら使用する。



①計測用キュベットに酵素と基質溶液、500 mM pH 8 リン酸緩衝液を入れる。



②キュベットを計測器ホルダーに装填。



③ATPを入れ、発光を開始させる。

- ① Luminescencer 用の計測キュベット内で、リン酸カリウム緩衝液(500 mM, pH 8.0, 20 µL)、基質溶液[100 µM(発光強度が飽和する場合は 10 µM), 20 µL]、酵素溶液(10 µg/mL, 20 µL)を良く混合する。
- ② 計測キュベットを測定装置内に挿入。
- ③ 測定装置の上部からマイクロシリンジを用いて測定開始五秒後に ATP-Mg 溶液(200 µM, 40 µL)を注入（事前に ATP-Mg 溶液も加え、確実に混合させてから計測用キュベットを測定装置内に挿入して計測しても良い）。
- ④ 30 秒間発光測定。生物発光量は発光開始から 30 秒間の発光強度の総和である。
- ⑤ アカルミネ®は最大発光強度に達するのが遅い。天然型基質 1 とアカルミネを比較する場合は 180 秒間の発光測定を行う。

図 6 Luminescencer-PSN AB-2200 による生物発光量測定の手順

2) AB-1850 LumiFL Spectrocaptureによる生物発光スペクトルの測定

発光スペクトルは AB-1850 LumiFL

Spectrocapture (図 7) 用いて測定する。安定した測定を行なうには luminescencer-PSN AB-2200 で $10^{7\sim 8}$ のカウント数を示す溶液が望ましい。極大波長がわかれれば良いのであれば、カウント数 5~6 衍程度で計測できる。長時間発光するものなら測定時間を長くすればきれいな発光スペクトルが得られる。測定時間での総発光量が 5 ~7 衍あれば発光スペクトル測定可。経時変化を測定する機能も備わっているが、短時間の経時変化を見るのは難しい。AB-2200 でカウントが 10^8 程度で飽和する恐れがある。AB-1850 LumiFL Spectrocapture の操作手順を以下に示す。



図 7 生物発光スペクトル
測定装置 AB-1850
LumiFL Sectrocapture

- ① パソコン、装置の電源を入れる。
- ② パソコンの「LumiFL Spectrocapture」というアプリケーションを開く。CCD カメラの冷却に数分かかる。“ready”のランプがオレンジから緑になったら測定可。
- ③ 計測条件設定：測定モード、測定時間、バックグラウンド、計算方法を設定。
基本的には下記設定で測定。

測定モード	シングル
測定時間	適時
バックグラウンド	基本は自動、試料のバックグラウンドを取りたい時はバックグラウンド開にする
計算方法	測定値一バックグラウンドにする
スリット幅	1 mm

- ・測定に使えるチューブ：主に PCR チューブ (200 μ L)、石英セル、ディスポセル、ペトリ皿、ルミチューブ。
- ④ 計測チューブにリン酸カリウム緩衝溶液(500 mM, pH 8.0, 5 μ L)、基質溶液[100 μ M 5 μ L]、酵素溶液(1 mg/mL, 5 μ L)、ATP-Mg 溶液 (200 μ M, 10 μ L)を加え、良く混合する。
 - ⑤ 試料をセットして画面上の青い丸をクリック(バックグラウンド測定)。バックグラウンド測定は測定時間を変えるたびに必要。
 - ⑥ 赤丸をクリックして測定開始。
 - ⑦ 測定が終わったら表示→再計算→光子にかえる、でファイルを保存。
 - ⑧ 保存したファイルを一括ファイル変換で asc ファイルに変換。

- ⑨ 終了時：パソコン上のアプリケーションを終了させる。すると「冷却解除中」という表示が出るので消えるまでまつ。それが消えたら機械、パソコンをシャットダウン。

生物発光波長測定器に対応している測定容器は様々あるが、小さい体積で測定可能なPCRチューブをよく用いる(図3、①)。その際の、測定溶液の体積を表2に示す。この条件の酵素濃度であれば、3分間積算で天然型基質では綺麗なスペクトルが得られる。アカルミネ®では、極大発光波長は分かるもののノイズが出ると思われる。綺麗なスペクトルを得たい場合には、酵素濃度を濃くするか、測定時間を長くする必要がある。いずれの場合も発光強度が飽和しないように注意する。

表2 AB-1850 LumiFL Spectrocaptureによる生物発光スペクトル測定条件

	濃度	体積(μL)	最終濃度
pH 8 リン酸緩衝溶液	500 mM	5 μL	100 mM
基質	100 μM *	5 μL	20 μM
酵素	1 mg/mL	5 μL	0.2 mg/mL
Mg-ATP	200 μM	10 μL	80 μM

*アカルミネ®の場合は0.5 mM溶液を使用(最終濃度は0.1 mM)

2.5 レポート課題

- ホタル生物発光系はどのように利用されているか、調べてみよう。
- ホタル生物発光系の新しい利用法を考えてみよう。

参考文献

- a) 今井一洋、近江谷克裕編：バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック、丸善、2006.
- b) Shimomura, O. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*; World Scientific, 2006.
- c) Hirano, T.; Hasumi, Y.; Ohtsuka, K.; Maki, S.; Niwa, H.; Yamaji, M.; Hashizume, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2385-2396.
- d) Adams, S. T. ; Miller, S. C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 112–120.
- e) Porterfield, W. B. ; Prescher, J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *22*, 121–130.
- f) 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*, 3847-3856.