

Synthetic Coelenterazine Derivatives
for Bioluminescent Imaging

August 2017

NISHIHARA, Ryo

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	甲 第 号	氏 名	西原 諒
<p>主論文題名： Synthetic Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Imaging (生物発光イメージングのための合成生物発光基質セレンテラジン誘導体)</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>緑色蛍光タンパク質 GFP や生物発光酵素に代表される発光タンパク質は、生体中の生命現象をその光で可視化する光イメージング技術としてライフサイエンス分野を牽引する基盤技術となっている。特に生物発光は、発光基質の酸化反応を酵素が触媒する酵素反応(生物発光)によって光を放出するため、蛍光測定での励起光由来の弊害なく、蛍光法以上に高感度かつ非侵襲的な光イメージングが期待される。しかし既存の生物発光イメージング技術では、発光輝度が低くイメージング技術としての感度が十分ではなく、生体組織透過性の高い近赤外領域(650-900 nm)での発光を示すものも少ない。本研究では、有機合成的手法に基づく発光基質セレンテラジン(CTZ)誘導体開発と遺伝子工学的手法に基づく赤色発光酵素の開発により、これらの課題を解決した。</p> <p>第1章では、バイオ分析技術として有用な生物発光系及び既存の CTZ 誘導体の特徴について概説し、本研究の目的を述べた。</p> <p>第2章では、生物発光基質 CTZ の化学修飾による高輝度生物発光システム開発について述べた。まず CTZ の6位に数種類の誘導化を施した新規基質の開発に成功した。更に新規基質がウミシイタケ発光酵素 RLuc の変異体(RLuc8.6-535)において高輝度発光を示し、その発光輝度は市販の CTZ 誘導体(DeepBlueCTM)の約 25 倍であった。今後、世界で最も高輝度な青色生物発光基質としての利用が期待され、実際に生物発光酵素 ALuc を用いた金属イオンや細胞内タンパク質間相互作用解析等、バイオアッセイ系への応用も行なった。</p> <p>第3章では、多成分同時分析のための RLuc8.6-535 または ALuc に特異的な CTZ 誘導体開発について述べた。多色発光イメージング技術は、生体分子の複合的な生理活性を異なる色で同時に観察する有用な手段である。しかし一般的に生物発光は、その発光スペクトル半値幅が広く、発光信号間のクロストークが懸念されるため、多色発光イメージングへの応用が困難となる。そこで CTZ の2位または6位置換基を改変した新規 CTZ 誘導体を合成、生物発光酵素 ALuc 並びに RLuc 誘導体に各々特異的に反応する新規基質開発を行った。これら新規基質と ALuc または RLuc 誘導体に基づくタンパク質間相互作用可視化プローブを組み合わせる事で、2種類のタンパク質相互作用を同時に解析する新たなバイオ分析技術開発に初めて成功した。</p> <p>第4章では、超高輝度生物発光系開発について述べた。CTZ6位水酸基をアルキル化した誘導体を20種類合成し、RLuc8.6-535変異体との発光特性を検討する事で、CTZ6位置換基の酵素認識への効果をより詳細に調べた。結果として、市販品である DeepBlueCTM の約 50 倍の発光輝度を持つ新規 CTZ 誘導体の開発に初めて成功した。更に新規高輝度基質は、高解像度での癌細胞の一細胞イメージングを可能にするだけでなく、赤色発光変異酵素(iRFP-RLuc8.6SG)と組み合わせる事で、マウス生体深部における癌細胞イメージングも実現した。</p> <p>第5章では、赤色発光 CTZ 誘導体開発について述べた。第2-4章で述べた CTZ 誘導体は、単体でいずれも 400-500 nm に生物発光を示す青色発光基質であった。そこで CTZ 生物発光系の更なる発光波長の長波長化を目指し、CTZ6位置換基に有機蛍光色素を修飾、BRET 機構に基づく CTZ からのエネルギー移動で蛍光色素が発光する分子を合成し、生物発光波長の長波長化に成功した。</p> <p>第6章では、生物発光研究分野における新規基質の位置づけと、本研究がもたらす将来の展望を述べた。</p>			

Thesis Abstract

No. _____

Registration Number	<input type="checkbox"/> "KOU" <input type="checkbox"/> "OTSU" No. *Office use only	Name	NISHIHARA, Ryo
Thesis Title Synthetic Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Imaging			
Thesis Summary <p>Luminescent proteins such as GFP and bioluminescent enzymes (luciferases) are widely used in optical readout approaches for monitoring biological processes in living subjects. Compared to fluorescence (FL), bioluminescence (BL) can be considered a better optical readout method in bioassays by virtue of its sensitivity and non-invasiveness, because the luminescence phenomenon occurs through an enzymatic reaction between a bioluminescent substrate (luciferin) and the luciferase with no interference from excitation light. However, BL applied to imaging techniques commonly has the drawbacks of poor optical emission intensity and limited emission color variety, especially when it comes to the near-infrared (NIR) spectral region.</p> <p>To address these drawbacks, this research work tackled the development of novel bioluminescent luciferins based on the coelenterazine (CTZ) structure and engineered variants of luciferases.</p> <p>Chapter 1 summarizes various bioluminescent systems used as bioanalytical tools as well as the BL characteristics of hitherto reported CTZ derivatives and describes the objectives of this thesis.</p> <p>Chapter 2 describes the derivatization of CTZ by the introduction of substituents at the C-6 position of native CTZ to improve the light output. The novel C-6 modified CTZ derivatives show significant BL emission with known <i>renilla</i> luciferase variant RLuc8.6-535, resulting in 25-fold stronger emission than a commercially available CTZ derivative (DeepBlueC™) with RLuc8.</p> <p>Chapter 3 introduces the first ever luciferase RLuc8.6-535- or artificial luciferase (ALuc)-specific CTZ derivatives for use in high-throughput bioassays requiring multiple optical readouts (e.g. multiple luciferases in the reaction mixture). This allows overcoming a general disadvantage of known luciferases, which emission spectra are broad and overlap, preventing optical readouts of multiple luciferases due to optical signal contamination.</p> <p>Chapter 4 describes novel blue-shifted CTZ derivatives, wherein the (p-hydroxy)-phenyl group in the C-6 position was alkylated to investigate the flexibility and limitations of substitution at the C-6 position on enzyme recognition. With 50-fold stronger emission at comparable wavelength, C-6 alkylated CTZ derivatives are useful bright blue-shifted alternatives to DeepBlueC™, which enable single cell analysis with high-resolution and <i>in vivo</i> imaging of cancer cells in combination with NIR fluorescent protein (iRFP) fused RLuc8.6-535 variant.</p> <p>Chapter 5 reports organic fluorescent dye modified CTZ derivatives to aim at red-shift of the emission through bioluminescence resonance energy transfer (BRET), resulting in an extension of the bioluminescent color palette.</p> <p>Chapter 6 summarizes the thesis and describes the future perspective in the BL research field.</p>			