

Title	革新的高輝度近赤外発光プローブの創製と生体内癌イメージングへの応用
Sub Title	Creation of bright near-infrared bioluminescent probes and their application to tumor imaging
Author	鈴木, 孝治(Suzuki, Koji) 佐藤, 守俊(Sato, Moritoshi) 金, 誠培(Kim, Sung-Bae)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では世界標準となる人工生物発光イメージングプローブ作製を目標に, 合成発光基質分子と遺伝子工学的手法に基づくタンパク質変異体とから独創的な"融合型人工生物発光分子プローブ"開発を行った。開発したアルキル化CTZ誘導体(6-Al3OH-CTZ)は, 酵素RLuc8.6-535を用いると市販基質DeepBlueCTMの約50倍高輝度の発光バイオイメージングを実現した。また, 分子歪みセンサーと呼ぶ人工酵素系発光プローブは発光酵素タンパク質に物理的歪みを加えることにより発光輝度の増減を制御でき, 従来のスプリット型生物発光プローブの約100倍の強い発光輝度を示す高感度バイオセンサーの開発ができた。</p> <p>Bioluminescence is emitted by an enzymatic reaction involving a bioluminescent substrate luciferin and an enzyme luciferase. One of luciferases, Renilla (RLuc), generates cofactor-free bioluminescence with native coelenterazine (nCTZ). The design of novel CTZ derivatives resulting in enhanced optical intensity with prolonged bioluminescence is challenging. Our developed novel CTZ derivative with extension at the C-6 position of the imidazopyrazinone show significant bioluminescence emission with RLuc variant (RLuc8.6-535). This CTZ derivative exhibited about 50 times higher than that of DeepBlueCTM. Optical bioimaging of protein-protein interactions (PPIs) facilitates comprehensive elucidation of intracellular molecular events. We developed an optical measure for visualizing molecular tension triggered by any PPI named "a combinational probe". This type of probe expands capabilities of luciferases as a tool for analyses of molecular dynamics and cell signaling in living subjects.</p>
Notes	研究種目 : 基盤研究(S) 研究期間 : 2012 ~ 2016 課題番号 : 24225001 研究分野 : 分析化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24225001seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24225001

研究課題名(和文)革新的高輝度近赤外発光プローブの創製と生体内癌イメージングへの応用

研究課題名(英文)Creation of Bright Near-Infrared Bioluminescent Probes and Their Application to Tumor Imaging

研究代表者

鈴木 孝治 (Suzuki, Koji)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授

研究者番号：80154540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 157,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では世界標準となる人工生物発光イメージングプローブ作製を目標に、合成発光基質分子と遺伝子工学的手法に基づくタンパク質変異体とから独創的な“融合型人工生物発光分子プローブ”を開発を行った。開発したアルキル化CTZ誘導体(6-Al30H-CTZ)は、酵素RLuc8.6-535を用いると市販基質DeepBlueCTMの約50倍高輝度の発光バイオイメージングを実現した。また、分子歪みセンサーと呼ぶ人工酵素系発光プローブは発光酵素タンパク質に物理的歪みを加えることにより発光輝度の増減を制御でき、従来のスプリット型生物発光プローブの約100倍の強い発光輝度を示す高感度バイオセンサーの開発ができた。

研究成果の概要(英文)：Bioluminescence is emitted by an enzymatic reaction involving a bioluminescent substrate luciferin and an enzyme luciferase. One of luciferases, Renilla (RLuc), generates cofactor-free bioluminescence with native coelenterazine (nCTZ). The design of novel CTZ derivatives resulting in enhanced optical intensity with prolonged bioluminescence is challenging. Our developed novel CTZ derivative with extension at the C-6 position of the imidazopyrazinone show significant bioluminescence emission with RLuc variant (RLuc8.6-535). This CTZ derivative exhibited about 50 times higher than that of DeepBlueCTM. Optical bioimaging of protein-protein interactions (PPIs) facilitates comprehensive elucidation of intracellular molecular events. We developed an optical measure for visualizing molecular tension triggered by any PPI named “a combinational probe”. This type of probe expands capabilities of luciferases as a tool for analyses of molecular dynamics and cell signaling in living subjects.

研究分野：分析化学

キーワード：分子イメージング 化学発光 生物発光 タンパク質プローブ Bioimaging Coelenterazine (CTZ) Luciferin Luciferase

1. 研究開始当初の背景

体内の癌のような生体内から光信号をとる場合、高輝度かつ生体組織透過性の高い近赤外域に発光がある分子プローブが求められている。その際現状の蛍光プローブが抱える自家蛍光の問題がない生物発光型のプローブが高感度イメージングに有利であると考えられる。そのため、現状でのバイオイメージングは蛍光プローブによるものがほとんどであるが、今後は生物発光イメージングが進展すると考えており、高性能の人工生物発光プローブ開発が鍵になる

2. 研究の目的

本研究では、世界標準となる人工生物発光イメージングプローブ作製を目標に、有機合成手法に基づく高輝度近赤外発光分子と、遺伝子工学的な手法に基づく生物発光タンパク質の高輝度変異体とを、それぞれ専門分野の研究者が連携して開発したものを機能的に融合し、これまでにない独創的な“融合型人工生物発光分子プローブ”開発とその基礎研究を行う。最終目標とするのは高輝度近赤外発光分子プローブであり、研究前半が基礎開発研究で複数の合成基質(分子)と変異酵素または人工酵素(タンパク質)を開発し、研究後半では開発した分子プローブをマウス生体でのイメージングに応用して性能評価を行う。

3. 研究の方法

本研究では、発光基質ルシフェリンに対して今までにない大幅な長波長化と高輝度化のための改変を加えるとともに、これらの合成ルシフェリンに最適の人工発光酵素ルシフェラーゼについても、独自の実験系(大規模な変異導入と変異体のハイスループット評価系)に基づいて作製する。このように、“鍵(基質)”と“鍵穴(ルシフェラーゼ酵素)”をとともに革新するアプローチに基づいて発光の高輝度化と近赤外化を追求する点が独創的であり、本研究で推進する融合型人工生物発光分子プローブの最大の特長である。さらに、上述のアプローチに加えて、生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)に基づく高輝度近赤外発光プローブを開発するとともに革新的な機能分子を開発して、発光イメージング分野を切り拓く。

4. 研究成果

(1) 生物発光プローブは蛍光法より高感度であるが、得られる光信号は非常に小さい。従ってウミシイタケの生物発光基質セレンテラジン(CTZ)の化学修飾を行うことで、発光輝度の改善を目指した。CTZを基質に持つ生物発光系は、その酵素認識メカニズムが未解明であるために、酵素から効率良く認識を受け有意な発光を示す合理的なCTZ誘導体の設計は非常に困難である。本研究では、知見の少ないCTZの6位に数種類の置換基を導入

し、その酵素認識能および生物発光特性への影響を分子構造的見地から検討した。3つの新規CTZ誘導体の開発に成功し、いくつかのウミシイタケの生物発光酵素RLuc/RLuc8/RLuc8.6-535との反応性を調べた。以上の検討により、発光酵素RLuc8.6-535が、6位を誘導体化したCTZ誘導体を効率良く認識し、高輝度な生物発光を与えることを明らかにした。特に新規CTZ誘導体6-pi-H-CTZ/6-pi-Phenyl-CTZは、発光酵素RLuc8.6-535において、唯一のブルーシフト基質として知られるDeepBlueC™(市販品)と同様の発光波長(400 nm)を有し、その発光輝度はDeepBlueC™の約11倍および25倍であることが分かった(図1)。従って新規基質開発による世界で最も高輝度な青色生物発光システム開発に成功したと言える。DeepBlueC™は緑色蛍光タンパク質GFPとのBRET(生物発光共鳴エネルギー移動)研究に利用されており、タンパク質間相互作用解析に代表されるバイオ分析に応用されている。従って新規基質によるこれらバイオ分析の更なる高感度化が期待される。

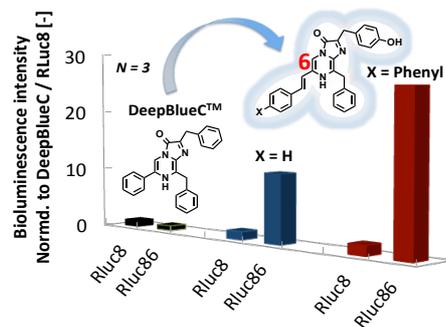


図1. 生物発光輝度比較

(2) CTZを基質に持つ新規人工生物発光酵素ALucは、RLuc発光系の約100倍の発光輝度を持つ発光系であり、より高感度なバイオ分析ツールへの応用が期待できる。生物発光の高輝度化に関する研究では、種々の生物発光系における少数の多価陽イオンによる発光輝度の制御現象に関する報告があるが、その詳細なメカニズムは未解明である。本研究グループは独自のSSC法により、Ca²⁺結合サイトとして知られるEF-handに近い構造がALucに存在していることを発見した。そこで精製によって陽イオンフリー状態のALucを作製し、多価金属イオンのALuc発光系への影響を、天然のCTZ及び新規6位改変体である6-pi-OH-CTZを用いて評価した。その結果、Ca²⁺、Mg²⁺、Cr⁶⁺存在下において、生物発光輝度が増加し、特にCr⁶⁺が強い高輝度化効果を示した。また、種々の金属イオンが生物発光波長に関与しない、すなわち直接CTZ発光中間体と結合して発光メカニズムに関与しないことを示唆する結果を得ている。以上の結果より、ALucにはEF-hand構造に近い構造が、多価金属イオンのreceiverとして発光過程に関与していることを見出した。

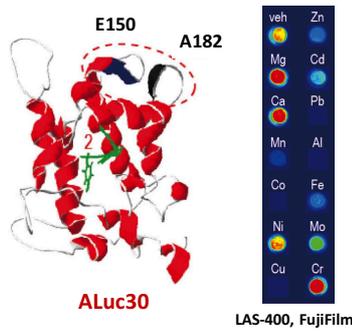


図 2. Ca²⁺イオンの生物発光特性への影響

(3) 分子歪みセンサーと呼ぶ人工酵素系発光プローブは生物発光酵素全長の両端に異なる2つのタンパク質を結合し、生物発光酵素全長に物理的歪みを加えることにより発光輝度の増加・減少を制御するセンサーである。本研究では酵素 RLuc8 の構造中に可動性領域がなく、C 末端が酵素活性部位に近い酵素の立体構造に注目して酵素修飾による分子歪みが酵素活性部位を变形する、すなわち分子歪みによる生物発光制御を目指した。実際に RLuc8 全長の両端に、女性ホルモン受容体(ER LBD)と Src の SH2 ドメイン(リン酸化認識部位)を結合することで、女性ホルモン阻害剤(アンタゴニスト)存在下で、これら2つのタンパク質による分子内タンパク質間相互作用を誘発、結果的に RLuc8 の酵素立体構造が変化することで、発光輝度が増加するセンサー(ERS)を開発した。さらに人工生物発光酵素(ALuc)による分子歪みセンサーを開発した。発光酵素 ALuc23 全長においてラパマイシン結合タンパク質 FRB 並びに FKBP をそれぞれタンパク質分子の両端に結合した分子歪みセンサー(TP2.4)は、ラパマイシンを介して FRB と FKBP が結合(分子内タンパク質相互作用)するため、分子中央部に置いた ALuc23 に分子歪みが生じ、結果的にラパマイシン依存的に発光輝度が約 6.7 倍まで増加した。これら発光酵素全長による分子歪みセンサーは、従来の二分割型生物発光プローブの約 100 倍程度強い生物発光輝度を示すため、今後さらなる高感度バイオセンサー開発への応用が期待できる。

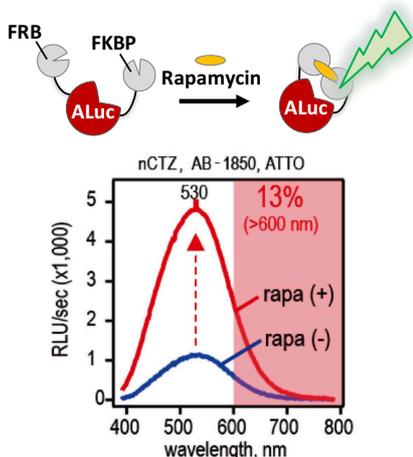


図 3 分子歪みセンサーデザイン

(4) 多色発光イメージング技術の開発は、生体分子の複合的な生理活性を同時に観察する方法として非常に有用である。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いこと、多色発光イメージングへ応用する際、発光信号間のクロストークが懸念される。そこで本研究は、酵素の基質特異性を活かした新たな多成分同時分析ツール開発を目指した。具体的には上記研究成果(1)で見出した基質 CTZ の有用改変可能部位(6 位)と 2 位置換基を改変した新規誘導体を新たに開発することで、生物発光酵素 ALuc23 並びに RLuc8 に各々特異的に反応する基質開発を目指した。19 種類の CTZ 誘導体の合成に成功し、実際に ALuc23 発光系と RLuc8 発光系に特異的な反応を示す新規 CTZ 誘導体(6-pi-OH-2H-CTZ/6-et-OH-CTZ)を見出した。このことから ALuc23 に基づく分子歪みセンサー(TP2.4)または RLuc8 に基づく分子歪みセンサー(ERS)によるタンパク質間相互作用解析実験を進めたところ、2 種類のタンパク質間相互作用を同時に解析する新たなバイオ分析技術の構築に初めて成功した。

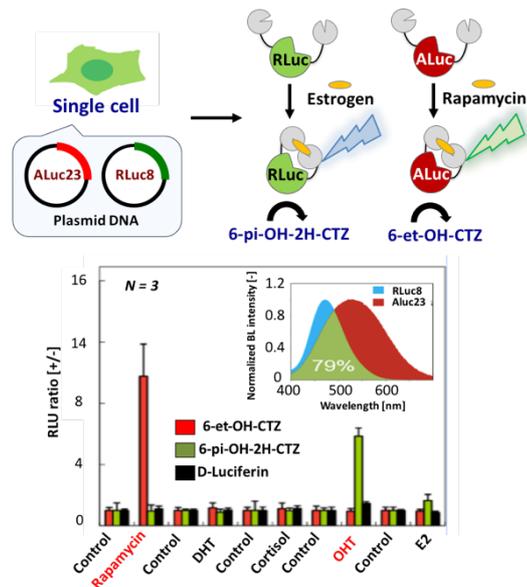


図 4 基質特異性を活かした多成分同時分析

(5) 生体深部の癌細胞を光で可視化するためには、水やヘモグロビン等の生体分子に吸収されにくい近赤外領域(650-900 nm)の光が適している。一方でこれまで報告した CTZ 誘導体は、いずれも青色発光(400-500 nm)を示すものであり、その利用は細胞に限られるものであった。そこで CTZ 発光系の生体内イメージングを目指し、新たに見出した基質改変可能部位に着目して赤色発光型 CTZ 誘導体開発を目指した。具体的には、CTZ の 6 位にローダミン B 等の有機蛍光色素を結合させ、CTZ 誘導体からエネルギー移動により連結した蛍光色素から 2 次的に発光する BRET 分子を合成した。実際に合成した蛍光色素連結型

CTZ 誘導体は、発光酵素 RLuc8.6-535 に酵素認識を受け、結果として天然の CTZ 発光系より約 100 nm の長波長化に成功した。今後、赤色発光基質を用いた生体内における癌細胞イメージングへの応用が期待出来る。

(6) 赤色蛍光タンパク質 (iRFP) はその最大蛍光波長が 700 nm であり、生体分析に応用される代表的な蛍光タンパク質である。他大学と共同でクロロフィル d を有する特殊なシアノバクテリアの光受容ドメインを探索し、ビリベルジンを補因子とする世界で最も小さな近赤外蛍光タンパク質 (AM1_1557g2, 145 アミノ酸) を発見した (iRFP は 316 アミノ酸)。AM1_1557g2 は iRFP 同様、哺乳類に豊富なビリベルジンを補因子とするため、生体 (*in vivo*) でのイメージングに極めて有用である。

(7) CTZ の 6 位置換基をアルキル化した新規誘導体を 20 種類新たに合成し、基質と酵素の網羅的構造活性相関研究を行うことで高輝度生物発光系の構築を目指した。開発したアルキル化 CTZ 誘導体の一つである (6-A13N3-CTZ) は発光酵素 ALuc において、天然の CTZ/ALuc 発光系の約 4 倍、RLuc 発光系の約 60 倍の発光輝度を示すことが分かった。更に他のアルキル化 CTZ 誘導体 (6-A13OH-CTZ) は、酵素 RLuc8.6-535 において DeepBlueC™ とほぼ同様の発光波長 (400 nm) を有し、その発光輝度は約 50 倍であることが分かった。本研究で開発した超高輝度 CTZ 誘導体を用いて高解像度でのシングルセルイメージングを実現することができた。さらに赤色蛍光タンパク質 iRFP を修飾した RLuc8.6 誘導体 (BRET タンパク質) と高輝度基質を組み合わせることで、目的とした赤色発光によるマウスレベルでの癌細胞イメージングにも成功した。

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)

<論文>

1) “Luciferase-Specific Coelenterazine Analogues for Optical Contamination-Free Bioassays”, R. Nishihara, M. Abe, S. Nishiyama, D. Citterio, K. Suzuki, S. B. Kim, *Scientific Reports*, 査読有, 7, 908 (2017).

DOI:10.1038/s41598-017-00955-6

2) “Synthesis of Firefly Luciferin Analogues and Evaluation of the Luminescent Properties”, S. Ioka, T. Saitoh, S. Iwano, K. Suzuki, S. Maki, A. Miyawaki, M. Imoto, S. Nishiyama, 査読有, *Chemistry - A European Journal*, 22(27), 9330-9337 (2016).

DOI:10.1002/chem.201600278

3) “Genetically Encoded Molecular Tension Probe for Tracing Protein-Protein Interactions in Mammalian Cells”, S. B. Kim, R. Nishihara, D. Citterio, K. Suzuki, *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, 27(2), 354-362 (2016).

DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00421

4) “Cation-driven optical properties of artificial luciferases”, S. B. Kim, S. Miller, N. Suzuki, T. Senda, R. Nishihara, K. Suzuki, *Analytical Sciences*, 査読有, 31(10), 955-960 (2015).

DOI: 10.2116/analsci.31.955

5) “A Biliverdin-Binding Cyanobacteriochrome from the Chlorophyll d-Bearing Cyanobacterium *Acaryochloris marina*”, R. Narikawa, T. Nakajima, Y. Aono, K. Fushimi, G. Enomoto, W. Ni Ni, S. Itoh, M. Sato, M. Ikeuchi, *Scientific Reports*, 査読有, 5, 7950 (2015).

DOI: 10.1038/srep07950

6) “New Trends in Near-Infrared Fluorophores for Bioimaging”, K. Umezawa, D. Citterio, K. Suzuki, *Analytical Sciences*, 査読有, 30(3), 327-349 (2014).

DOI: 10.2116/analsci.30.327

7) “Bioluminescent coelenterazine derivatives with imidazopyrazinone C-6 extended substitution”, R. Nishihara, H. Suzuki, E. Hoshino, S. Suganuma, M. Sato, T. Saitoh, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, *Chemical Communications*, 査読有, 51, 391-394 (2014).

DOI: 10.1039/C4CC06886F

[学会発表] (計 31 件)

<招待講演>

1) “Design of Artificial Bioluminescent Probes towards Bioluminescence Imaging”, K. Suzuki, R. Nishihara, S. B. Kim, T. Nakajima, M. Sato, D. Citterio, S. Nishiyama, *Pacificchem* 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

2) “Design of Biochemical Probes”, K. Suzuki, *BCEIA* 2015, Beijing(China), 2015/10.

3) “バイオ分析におけるセンシング材料およびセンサーに関する最近の話題”, 鈴木孝治, 日本分析化学会第 63 年会, 広島, 2014/9/17.

4) “Creation of needs-oriented chemical probes”, K. Suzuki, *CJK* 2014, Shenyang(China), 2014/8/23.

5) “Design of Bioimaging Probes Based on Dyes and Ionophores”, K. Suzuki, *Bio4Apps* 2013, Tokyo(Japan), 2013/10/30.

6) “Design and application of bioimaging probes based on dyes and ionophores”, K. Suzuki, *BCEIA* 2013, Beijing(China),

2013/10/24.

7) "Creation of Chemical Imaging Probes based on Dyes and Ionophores", K. Suzuki, K. Umezawa, N. Iwasawa, C. Daniel, Asiananalysis XII, Fukuoka(Japan), 2013/8/23.

<その他国際会議等>

1) "Structural Modified Firefly Luciferin Analogues for Bioluminescence Assays", Y. Ikeda, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, Pittcon 2017, Chicago(USA), 2017/3

2) "Design of Novel Red-Shifted Coelenterazine Derivatives for in vivo Imaging", M. Abe, R. Nishihara, T. Nakajima, M. Sato, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2016, Makuhari(Japan), 2016/9.

3) "Structural Modified Firefly Luciferin Analogues for Bioluminescence Imaging", Y. Ikeda, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2016, Makuhari(Japan), 2016/9.

4) "Novel BODIPY-Based Chemiluminescent Probes for Bioanalysis", M. Sumiya, M. Yokoo, S. Nishiyama, D. Citterio, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2016, Makuhari(Japan), 2016/9.

5) "Bioluminescence Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells", R. Nishihara, D. Citterio, K. Suzuki, Gordon Research Conference on Bioanalytical Sensors, Newport(USA), 2016/6.

6) "Development of Red-Shifted Firefly Luciferin Analogues Modified with Allyl Group", Y. Ikeda, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, ISBC 2016, Tsukuba(Japan), 2016/5.

7) "Fabrication of Blue-Shifted Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Applications", R. Nishihara, T. Nakajima, S. B. Kim, M. Sato, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, ISBC 2016, Tsukuba(Japan), 2016/5.

8) "Design and Synthesis of Novel Coelenterazine Derivatives with High Functionality", M. Abe, R. Nishihara, T. Nakajima, M. Sato, S. B. Kim, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, Pacificchem 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

9) "Design and Synthesis of Novel Red-Shifted Firefly Luciferin Analogues", Y. Ikeda, T. Toyama, Y. Adachi, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, Pacificchem 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

10) "Synthetic Coelenterazine Derivatives

for Bioluminescence Applications", R. Nishihara, S. B. Kim, T. Nakajima, M. Sato, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, Pacificchem 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

11) "Design of Bright Chemiluminescent Dyes for Bioanalysis", M. Sumiya, M. Iwama, M. Yokoo, S. Nishiyama, D. Citterio, K. Suzuki, Pacificchem 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

12) "Design of Bright Fluorescent Polymers for Bioassays", Y. Takahashi, T. Toyama, R. Kato, Y. Hiruta, Y. Shindo, K. Oka, M. Takai, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, Pacificchem 2015, Honolulu(USA), 2015/12.

13) "Design and Synthesis of Novel Coelenterazine Derivatives for Bio-Applications", M. Abe, R. Nishihara, T. Nakajima, M. Sato, S. B. Kim, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2015, Makuhari(Japan), 2015/9.

14) "Development of Red-Shifted Luciferin Analogues", Y. Ikeda, T. Toyama, N. Iwasawa, D. Citterio, S. Nishiyama, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2015, Makuhari(Japan), 2015/9.

15) "Development of Coelenterazine Derivatives for Bioluminescence Applications", R. Nishihara, S. B. Kim, T. Nakajima, M. Sato, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2015, Makuhari(Japan), 2015/9.

16) "BRETに基づく生物発光基質セレンテラジン誘導体の開発", 角館善樹, 星野笑美, 西原諒, 菅沼さくら, 鈴木秀幸, 佐藤守俊, 西山繁, 岩澤尚子, Daniel Citterio, 鈴木孝治, 日本分析化学会第 63 年会, 広島, 2014/9/17

17) "新規高輝度生物発光基質セレンテラジン誘導体の設計と合成", 西原諒, 星野笑美, 鈴木秀幸, 菅沼さくら, 佐藤守俊, 斎藤毅, 西山繁, 岩澤尚子, チッテリオ ダニエル, 鈴木孝治, 日本化学会第 94 春季年会, 名古屋, 2014/3/29

18) "Novel Coelenterazine Derivatives for Bioluminescence Application", R. Nishihara, E. Hoshino, H. Suzuki, M. Sato, T. Saitoh, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, Pittcon 2014, Chicago(USA), 2014/3/3.

19) "新規高輝度生物発光基質セレンテラジン誘導体の設計と合成", 西原諒, 星野笑美, 鈴木秀幸, 佐藤守俊, 斎藤毅, 西山繁, 岩澤尚子, Citterio Daniel, 鈴木孝治, 日本分析化学会第 62 年会, 大阪, 2013/9/10.

20) "Design and Preparation of Novel Labeling Nanoparticles for

Chemiluminescence Immunoassays”, A. Kusumoto, Y. Katayama, D. Citterio, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2013, 千葉, 2013/9/5.

21) “Design and Synthesis of Novel Coelenterazine Derivatives”, E. Hoshino, K. Ikegami, H. Suzuki, M. Sato, T. Saito, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2013, 千葉, 2013/9/5.

22) “Novel Coelenterazine Derivative for Bioluminescence Applications”, R. Nishihara, E. Hoshino, H. Suzuki, M. Sato, T. Saito, S. Nishiyama, N. Iwasawa, D. Citterio, K. Suzuki, RSC Tokyo International Conference 2013, 千葉, 2013/9/5.

23) “新規生物発光基質としてのセレンテラジン誘導体の開発”, 星野笑美, 池上謙, 鈴木秀幸, 佐藤守俊, 斉藤毅, 西山繁, 岩澤尚子, Daniel Citterio, 鈴木孝治, 第73回分析化学討論会, 函館, 2013/5/18.

24) “高輝度蛍光色素を結合したホタルルシフェリン誘導体の開発”, 横尾雅博, 鈴木秀幸, 佐藤守俊, 斉藤毅, 西山繁, Citterio Daniel, 鈴木孝治, 第73回分析化学討論会, 函館, 2013/5/18.

〔図書〕(計2件)

1) Bioluminescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, R. Nishihara, D. Citterio, K. Suzuki, Springer Nature, 19-31, 2016/7.

2) Bioluminescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, S. B. Kim, R. Nishihara, K. Suzuki, Springer Nature, 183-193, 2016/7.

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 新規セレンテラジン化合物及びその用途

発明者: 鈴木孝治, チッテリオ, ダニエル, 西原諒, 金誠培, 佐藤守敏, 中嶋隆浩

権利者: 学校法人慶應義塾、国立研究開発法人産業技術総合研究所、国立大学法人東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-055985

出願年月日: 平成 29 年 3 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 蛍光色素結合セレンテラジン

発明者: 鈴木孝治, チッテリオ, ダニエル, 角舘善樹, 星野笑美, 西原諒

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: 特願 2014-178104

出願年月日: 平成 26 年 9 月 2 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

○ホームページ

<http://www.applc.keio.ac.jp/~citterio/index.html>

○公開行事: 慶應テクノモール 2014

「健康・環境・医療に向けた化学センサー・バイオセンサー」(説明用ブースおよびパネルディスカッション)、東京フォーラム、2014/12/5

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝治 (SUZUKI, Koji)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 80154540

(2) 研究分担者

佐藤 守俊 (SATO, Moritoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号: 00323501

(3) 連携研究者

金 誠培 (KIM, Sung-Bae)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・環境管理研究部門・主任研究員

研究者番号: 60470043

(平成 26 年 11 月より参加)