

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22724

研究課題名(和文) 高感度イメージングを目指した新規生物発光基質の創製

研究課題名(英文) Development of novel bioluminescent substrates for high-sensitivity imaging

研究代表者

森屋 亮平(齊藤亮平)(Saito-Moriya, Ryohei)

東京薬科大学・薬学部・嘱託助教

研究者番号：20870801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ホタル生物発光反応の発光強度の増大を目指し新規発光基質を有機合成した。合成した新規化合物5種のうち、ふたつは既存の人工発光基質よりも発光強度が増大し、さらにそのうちの1つは近赤外領域の発光極大波長を有していた。現在は、共同研究者たちとともに、これら新規化合物の発光特性の詳細な評価と、動物実験での有用性を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄緑色に発光するホタル生物発光反応は生体内可視化技術として利用されており、既存技術に比べて、より高い測定感度が求められてきた。これまでは発光基質の改良により、発光波長を黄緑色から赤色や近赤外領域に改変することで、光の透過性を利用して測定感度が向上してきた。本研究で開発した新規化合物は近赤外の発光波長を有し、且つ既存の人工発光基質よりも発光強度が増大している。これにより、たとえば、マウスの深部組織や微小環境において、既存技術に比べ、より高感度に観察できるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, new luminescent substrates were organically synthesized to increase the luminescence intensity of firefly bioluminescence reactions. Of the five new luciferin analogues synthesized, two showed increased luminescence intensity compared to existing luminescent analogues, and one of them had a luminescence maximum wavelength in the near-infrared region. Currently, my collaborators are working on a detailed evaluation of the luminescence properties of these new analogues, and are verifying their usefulness in animal experiments.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生物発光 発光基質 イメージング 近赤外発光

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホタル生物発光反応は基質(ホタルルシフェリン, 図1)と酵素(ホタルルシフェラーゼ)により黄緑色の光を発する。基質や酵素を改良することで、天然の黄緑色だけでなく、生体組織を透過しやすい赤色から近赤外光に発光波長を変化させることができる。そのため、ホタル生物発光は基礎生物医学研究における光イメージング技術として利用されている。しかし、この発光反応を用いた高感度イメージングの重要要素の一つである発光強度の向上は未だになされていない。従来のホタル生物発光イメージングの技術開発のアプローチは、ホタルルシフェリンの波長に関する構造活性相関研究であった。生体組織に対する光の透過性を利用し、透過性の高い赤色や近赤外光の発光基質が創製され、これら発光基質を用いた高感度イメージングが実現してきた。

これまでに当方の研究グループでは、ホタルルシフェリンの構造改変を行い、可視光並びに近赤外領域の発光波長を有する多種多様なルシフェリンアナログを合成してきた。中でも、近赤外領域の発光波長(675 nm)を示す AkaLumine, TokeOni (AkaLumine-HCl), seMpai (図1) は細胞や動物における生物発光イメージング技術に応用しており、ホタルルシフェリンに比して、感度良く発光シグナルを検出している。発光イメージング試薬としてホタルルシフェリンよりも有用性が高いことから、AkaLumine, TokeOni (AkaLumine-HCl), seMpai はシグマアルドリッチ株式会社や和光純薬工業から市販化されている。

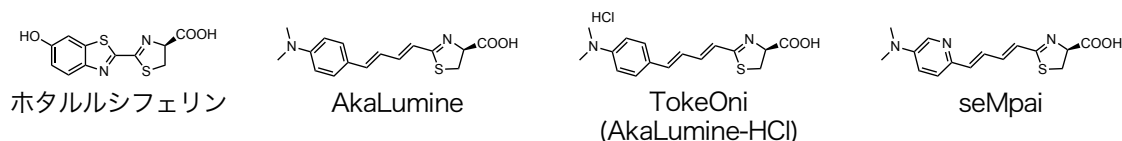


図1 ホタルルシフェリンと市販化したイメージング試薬

2. 研究の目的

発光波長に関する発光基質の開発と構造活性相関は盛んに行われてきたが、一方で、発光強度に関する構造活性相関は十分に研究されていない。本研究では、発光強度の向上による光イメージングの高感度化を目指し、発光強度に対する基質の化学的構造と酵素の関係性を明らかにする。具体的には、AkaLumine や TokeOni, seMpai 以上の発光強度を有した発光基質の開発に取り組む。

3. 研究の方法

新規の発光基質を合成する上で化合物のデザインが非常に重要となる。ホタル生物発光反応は基質-酵素反応のため、この発光反応を制御するには発光基質の光化学的性質だけでなく、同時に酵素との親和性も考慮しなければならない。そこで、AkaLumine や TokeOni, seMpai の基本骨格を基に、ホタルルシフェリンの部分構造を融合した新規化合物をデザインし、合成した。合成した新規化合物は発光測定し、酵素(天然型北米産ホタルルシフェラーゼ)との発光活性を評価した。

4. 研究成果

ホタルルシフェリンが有するベンゾチアゾール部位を AkaLumine の基本骨格と融合させたような複素芳香環含有新規化合物である誘導体 1-5 を合成した (図2)。

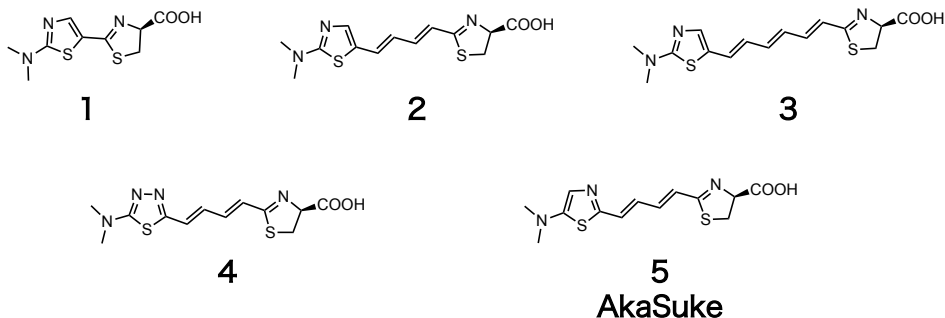


図2 複素芳香環含有新規化合物1-5

2-アミノチアゾールを出発原料にジメチルアミノ体、各種ホルミル体を経て、誘導体 1-3 を得た。同様に 2-アミノチアジアゾールを出発原料に誘導体 4 を合成した。また、5-アミノチアゾールを出発原料に芳香族求核置換反応でジメチルアミノ体を得た後、ホルミル体を経て、誘導体 5 を合成した。

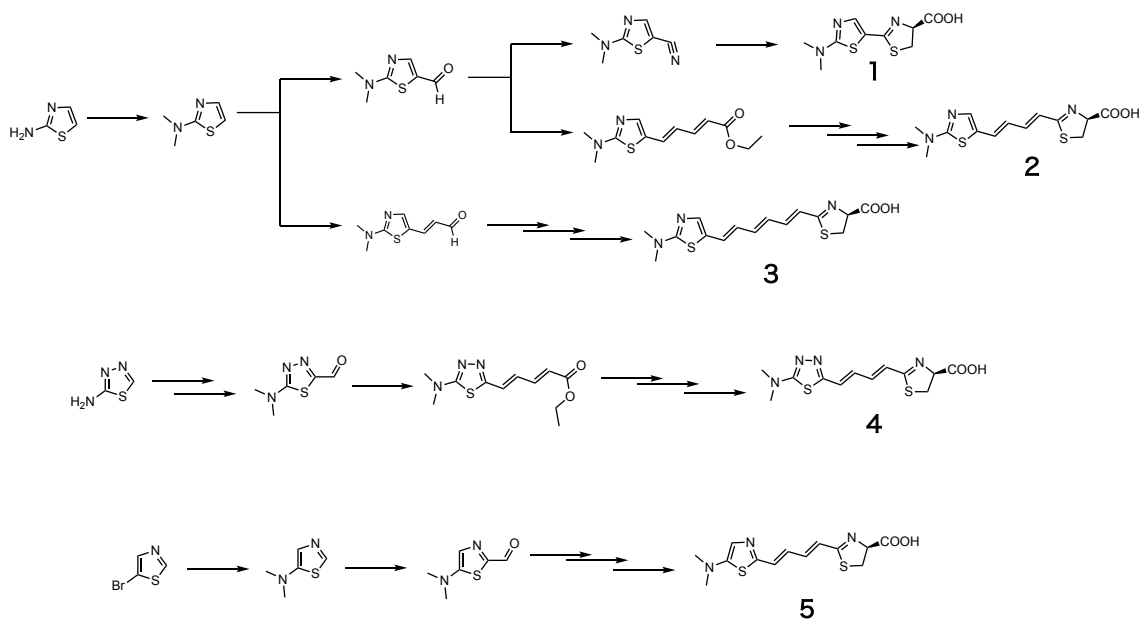


図3 新規化合物1-5の合成ルート

得られた誘導体 1-5 について、酵素ホタルルシフェラーゼ(北米産ホタルルシフェラーゼ、プロメガ社製、QuantiLum® Recombinant Luciferase、Product No. E1701)、ATP と緩衝液中で発光させて、発光特性を調べた(表 1)。誘導体 1-5 の結果だけでなく、比較のために AkaLumine の発光特性の結果を表 1 にまとめた。

表 1 誘導体1-5 の発光特性の結果

	AkaLumine	誘導体1	誘導体2	誘導体3	誘導体4	誘導体5
発光強度*	1	発光せず	3.8	0.01	発光せず	2.3
発光波長	675 nm	発光せず	625 nm	625 nm	発光せず	685 nm

*発光強度はAkaLumine と比較した。

誘導体 1, 4 はほとんど発光シグナルを検出できず、誘導体 3 も非常に弱い発光強度であった。他方、誘導体 2, 5 は AkaLumine よりも 2-3 倍程度発光強度が向上した。また、誘導体 2-3 の発光波長は 625 nm と AkaLumine よりも短波長化し、誘導体 5 の発光波長は 685 nm であり、AkaLumine と比較して、わずかに長波長化した。チアゾールの位置異性体である誘導体 2, 5 の発光特性に大きな差が生じたのは非常に興味深い結果であった。また、 π 共役系を伸長した誘導体 2-3 の結果も予想に反して発光波長は変化しなかった。(W02022/004744)

このように当初の目的である、先行研究の市販品 3 種よりも発光強度の強い誘導体 2, 5 の開発に成功した。中でも誘導体 5 は近赤外領域(685 nm)で発光したため、細胞や動物レベルでのイメージング試薬として非常に期待できる物性であった。誘導体 5 は AkaSuke と名付け、現在、ライフサイエンス系の共同研究者とともに、イメージング試薬としての有用性を検証している。また、分析系の共同研究者とともに、誘導体 1-5 の発光強度の増強及び発光波長の変化の関係性の解明も進めている。現在、これらの研究結果について論文執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito-Moriya Ryohei, Nakayama Jun, Kamiya Genta, Kitada Nobuo, Obata Rika, Maki Shojiro A., Aoyama Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 How to Select Firefly Luciferin Analogues for In Vivo Imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1848 ~ 1848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041848	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Jun, Saito Ryohei, Hayashi Yusuke, Kitada Nobuo, Tamaki Shota, Han Yuxuan, Semba Kentaro, Maki Shojiro A.	4. 巻 21
2. 論文標題 High Sensitivity In Vivo Imaging of Cancer Metastasis Using a Near-Infrared Luciferin Analogue selmpai	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7896 ~ 7896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森屋 (齊藤) 亮平, 口丸 高弘, 岩野 智, 北田 昇雄, 神谷 弦汰, 小島 りか, 伊集院 良祐, 平野 誉, 牧 昌次郎, 青山 洋史
2. 発表標題 高輝度近赤外発光基質AkaSukeによる in vivoイメージング
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森屋 (齊藤) 亮平, 中山 淳, 北田 昇雄, 牧 昌次郎
2. 発表標題 近赤外発光試薬 selmpai によるがん転移のイメージング
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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、北田昇雄、森屋亮平、青山洋史、伊集院良祐	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02022/004744	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------