



国立大学法人

電気通信大学

The University of Electro-Communications



新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings!

2022年5月10日 JST新技術説明会

# 海洋生物発光システムを用いた 新規発光材料の開発

電気通信大学 研究設備センター  
特任助教 北田 昇雄

- 海洋発光生物(オワンクラゲ等)の発光システムを応用した新規発光材料(セレンテラジン類縁体)の開発

- 通常青色発光を示すセレンテラジンをセレンテラジン類縁体によって多色化を達成

特願2020-040703

「生物発光酵素の長波長発光基質」

牧 昌次郎、北田 昇雄、金 誠培

- 構造改変による発光強度の低下を最小限に抑えたセレンテラジン類縁体の開発に成功

特願2022-030488

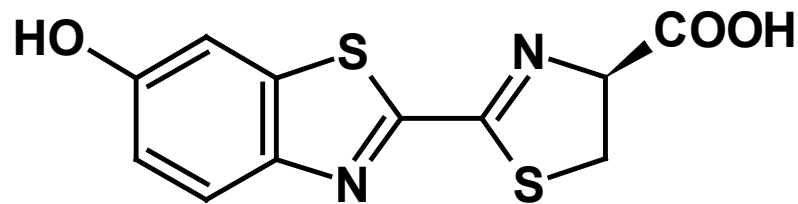
「新規セレンテラジン誘導体」

牧 昌次郎、北田 昇雄、金 誠培

# 生物発光



ホタル



ホタルルシフェリン

$$\lambda_{bl} = 560 \text{ nm}$$

(1) On the beach, <http://www.jaxshells.org>,  
(2) NOAA Photo library, <http://www.photolib.noaa.gov>



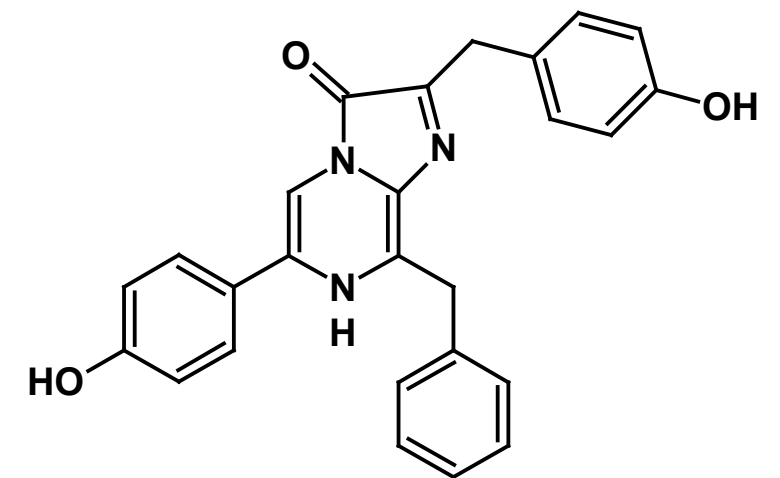
オワンクラゲ



発光エビ<sup>(2)</sup>



ウミシイタケ<sup>(1)</sup>



セレンテラジン (nCTZ)

$$\lambda_{bl} = 450 \sim 480 \text{ nm}$$

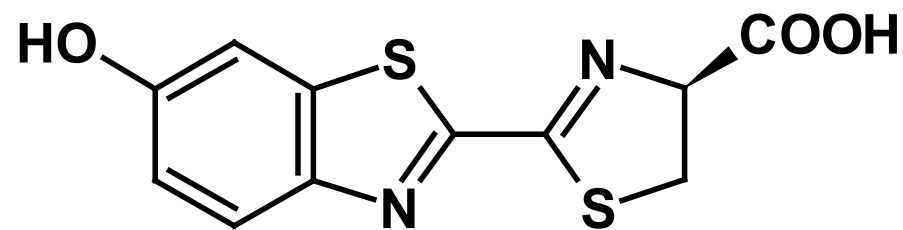
ホタルルシフェリン、セレンテラジンは様々な分野で応用されている。

# ルシフェリンの発光

$\lambda_{bl}$  : 発光波長

発光にATPが必要

## ホタルルシフェリンの発光反応



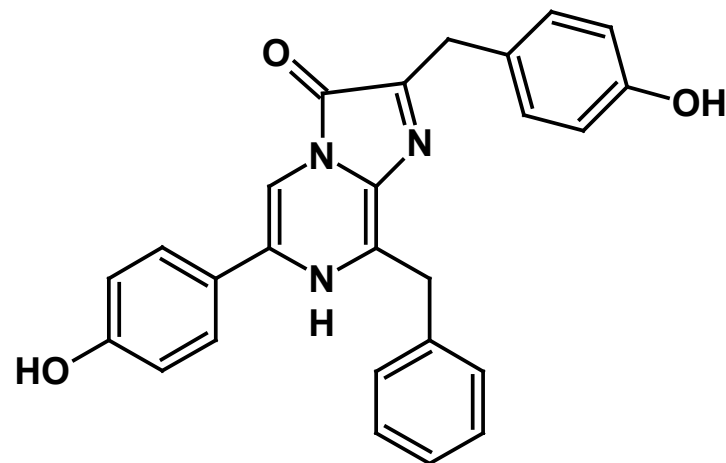
ホタルルシフェリン



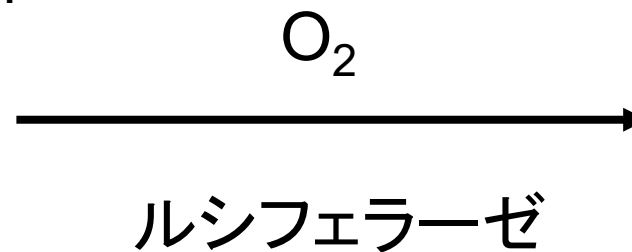
$\lambda_{bl} = 560 \text{ nm}$

## セレンテラジンの発光反応

基質と酵素のみで発光



セレンテラジン (nCTZ)



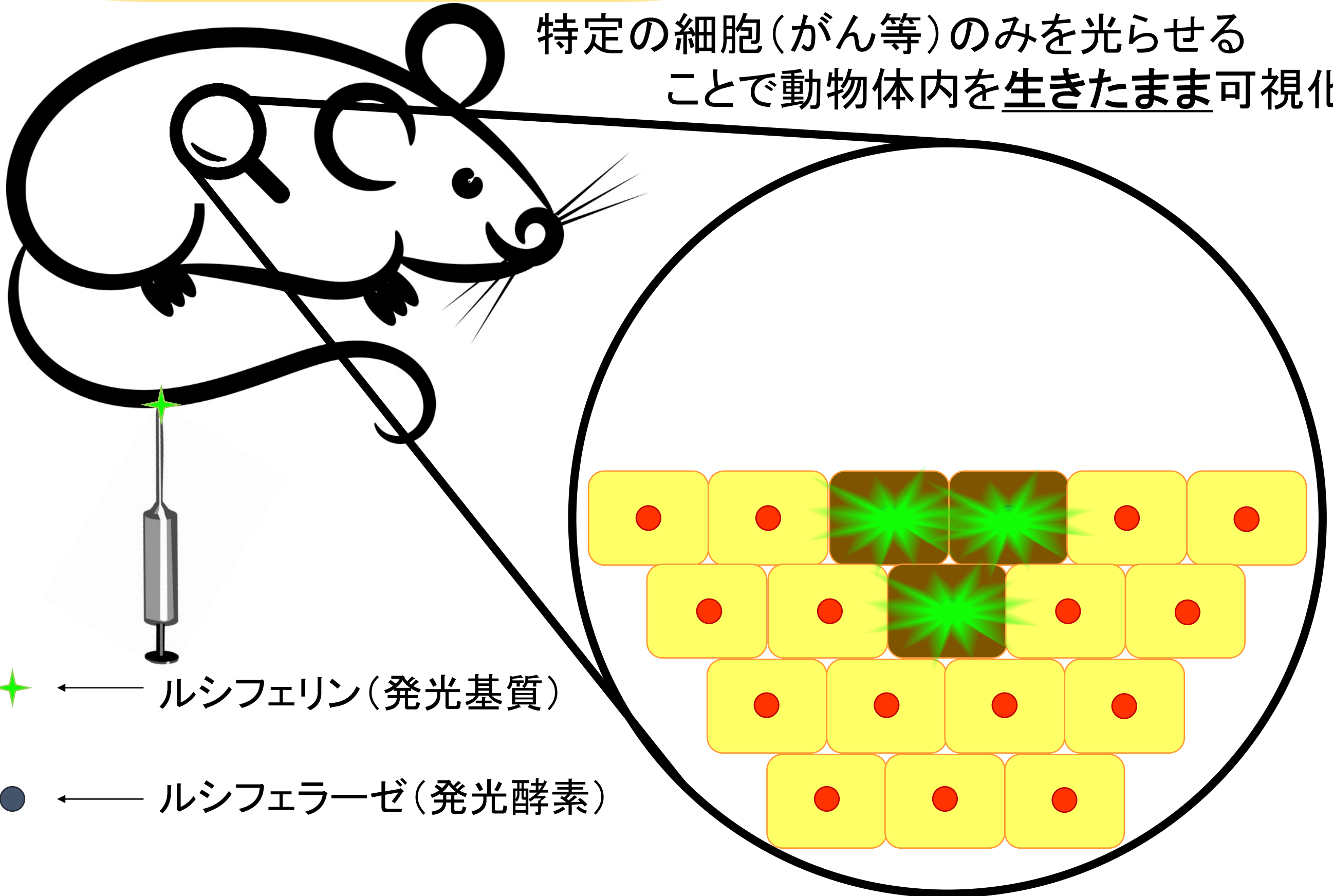
$\lambda_{bl} = 450 \sim 480 \text{ nm}$

生物発光イメージングに応用

# 生物発光イメージングとは？

※人間に用いることを  
目的にしません

特定の細胞(がん等)のみを光らせる  
ことで動物体内を生きたまま可視化



★ ← ルシフェリン(発光基質)

● ← ルシフェラーゼ(発光酵素)

# ホタル生物発光材料

牧研究室で開発された  
ホタル生物発光を応用した近赤外発光材料



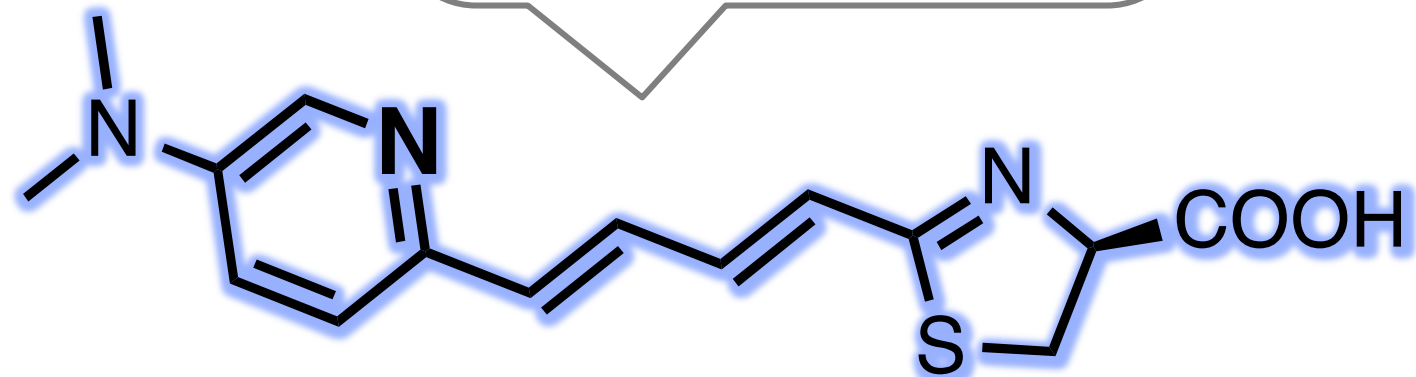
**TokeOni  
(Akalumine-HCl)**

高輝度  
高水溶性  
高細胞透過性  
脳のイメージング  
に最適

木山先生

森屋先生

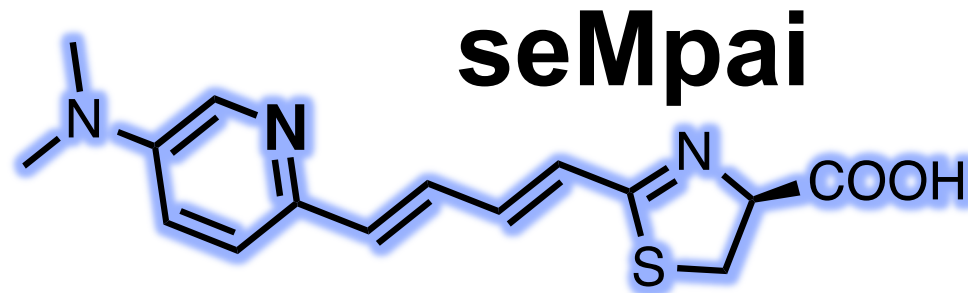
高輝度  
高水溶性  
高安定性  
腹部のイメージング  
に最適



**seMpai**

市販化・実用化に成功！！

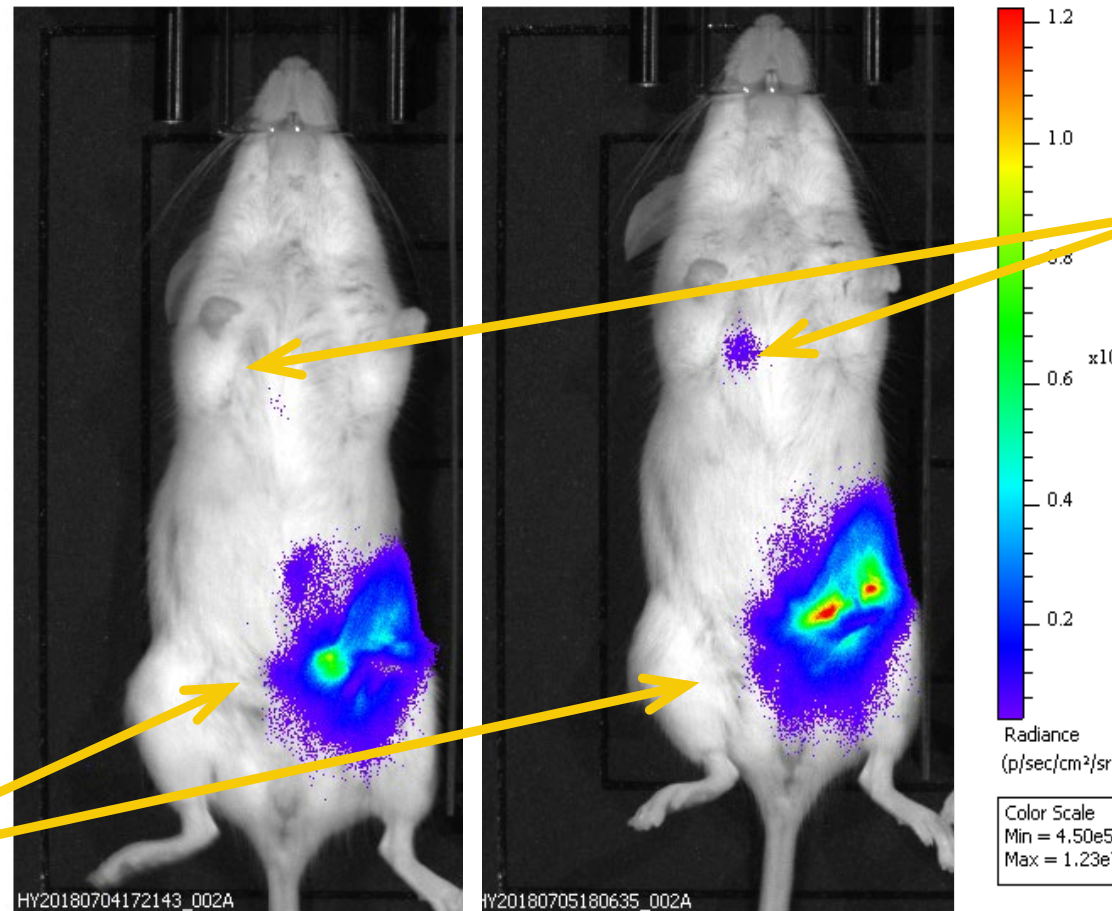
# ホタル生物発光材料を用いたイメージング例



乳がん原発巣  
(19週後)を摘出  
1週間後に  
イメージング

**Protocol**

Rag 2-/- マウス♀, 週  
齢;10 週,  
基質投与5分後に撮影



微小がん  
肺転移の  
検出に成功

乳がん原発巣

LH<sub>2</sub>

47.1 mM 127 uL

seMpai

60 mM 100 uL

ホタル生物発光で十分？

# 海洋生物発光の利点

ホタル発光系と比較して、海洋生物発光系は

- 酵素反応速度が大きい
- 多様な発光酵素が存在
- **発光酵素が小さい**

## 酵素の分子量

FLuc : ホタル	62kDa
RLuc : ウミシイタケ	<b>36kDa</b>
NanoLuc : 発光エビ	<b>19kDa</b>
GLuc : カイアシ	<b>20kDa</b>

ホタルルシフェラーゼよりも  
**小さい**  
➡ **応用の幅が広い**

ウイルスの  
可視化技術にも  
応用可能！

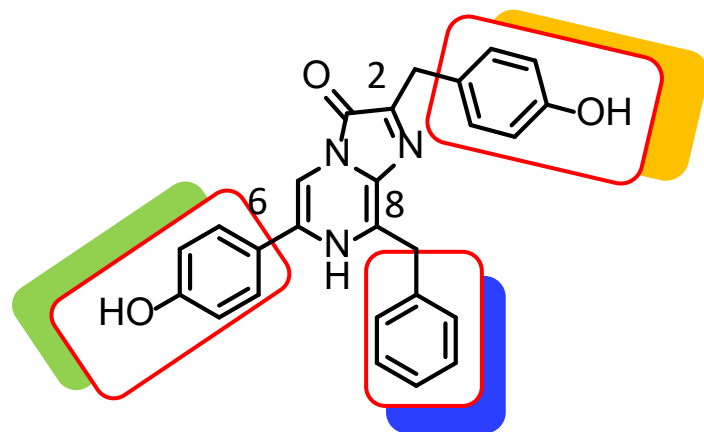


# 海洋生物発光の課題と本研究の目的

1. 発光色が限定的(青から緑)  
→セレンテラジンの構造改変で  
発光波長制御を目指す
2. セレンテラジン類縁体の発光強度が著しく低下  
→構造活性相関研究で  
発光強度の制御を目指す

# 本研究の目的と方法

- 酵素特異性かつ多色発光を示す人工発光基質の開発
- 高強度かつ波長制御可能な人工発光基質の開発



- ✓ C2位、C6位、C8位が構造改変可能な部位
- ✓ C2位の構造は固定
- ✓ C6位、C8位の構造改変を行う

セレンテラジン

多色化セレンテラジン類縁体  
1,2,3-Series

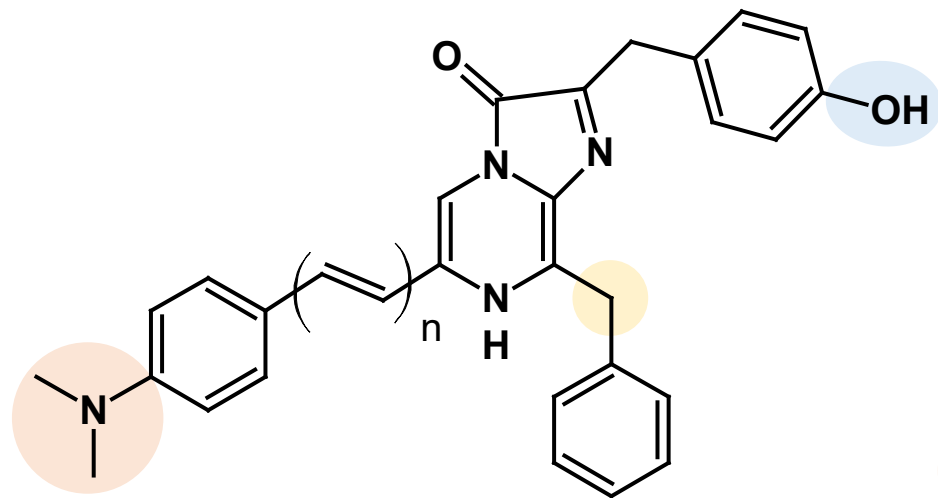
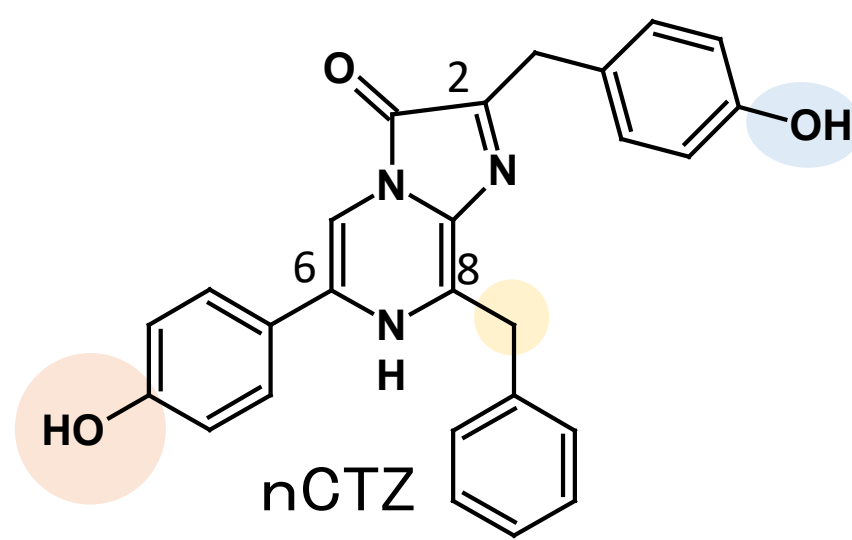
強発光セレンテラジン類縁体  
S-Series



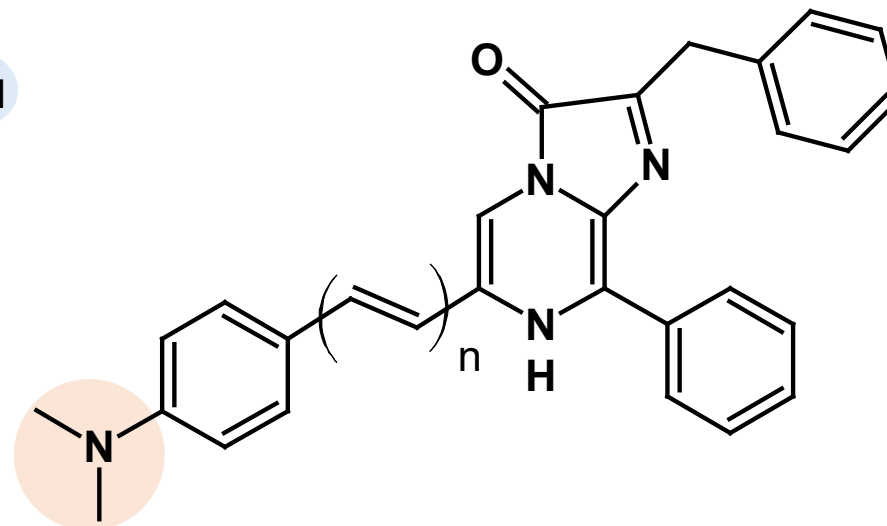
産総研の持つ人工発光酵素A-Lucを含む  
多様な酵素群

# 1,2,3-Seriesの合成

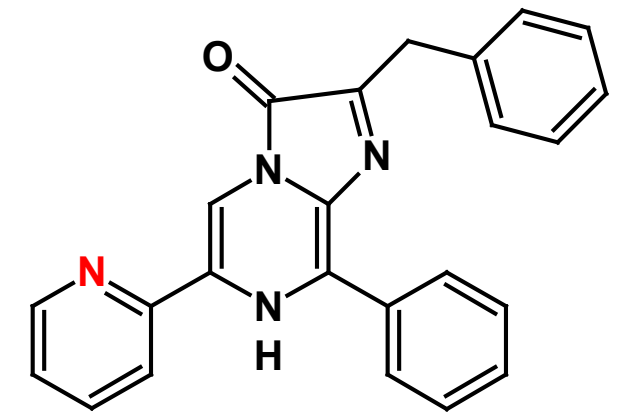
S. Tamaki, et. al., *Sci. Rep.*, **11**(1), 1-10 (2021)



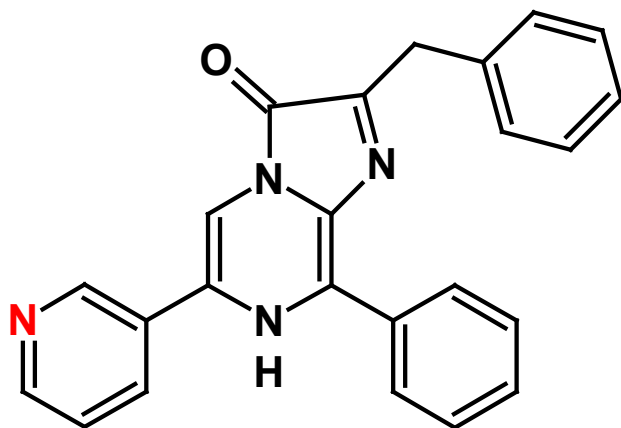
**1a-d**  
n=0-3



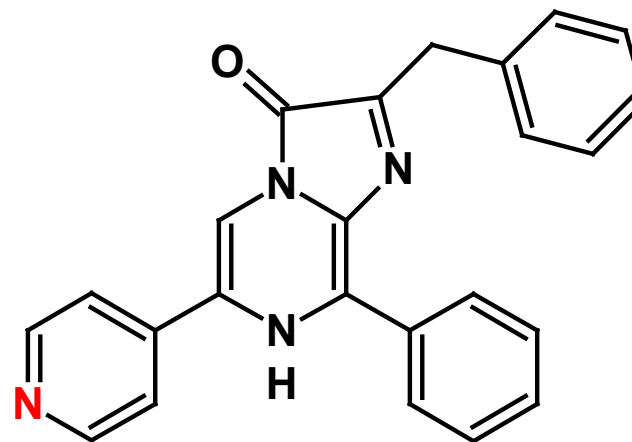
**2a-d**  
n=0-3



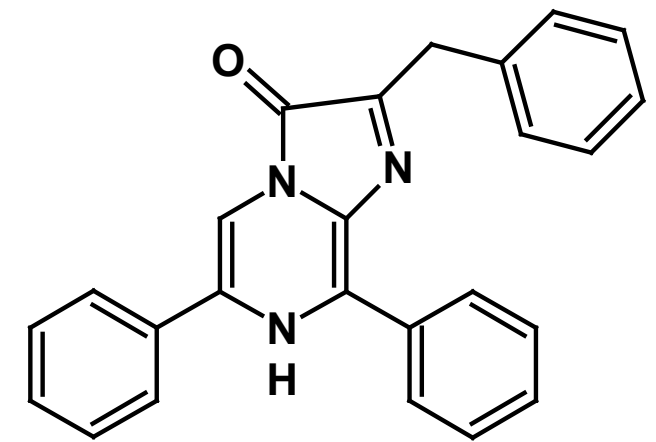
**3a**



**3b**



**3c**



**DTZ**

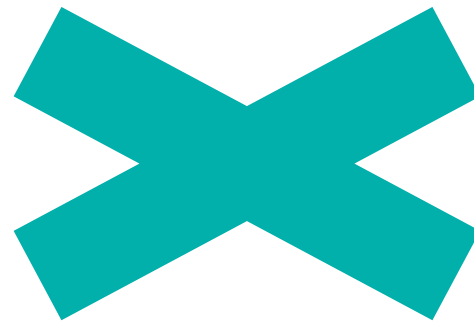
# 本研究の目的: 多様な基質と酵素の掛け合わせ

*in vivo*イメージングに向け

セレンテラジン類縁体 × 酵素で多色化を目指す

セレンテラジン

- 1a-d
- 2a-d
- 3a-d
- nCTZ



酵素

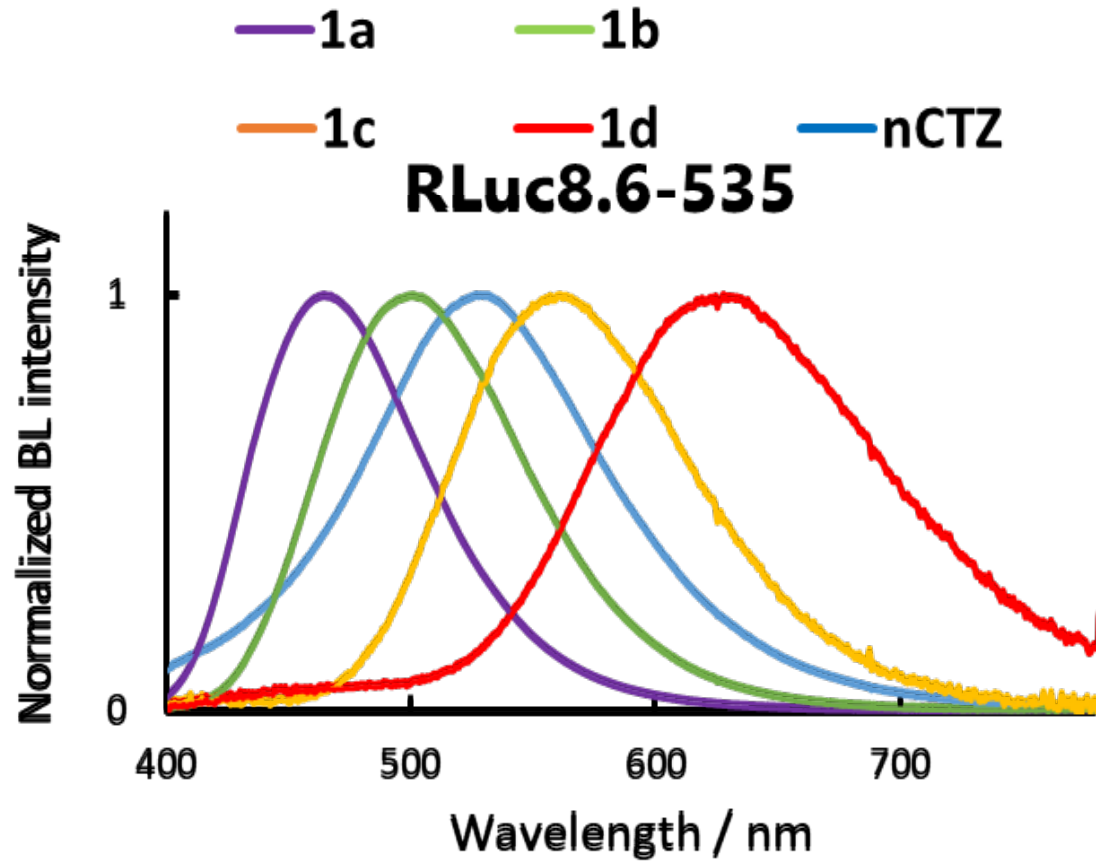
- RLuc
- **ALuc** 産総研にて開発された変異酵素
- NanoLuc etc.

それぞれ組み合わせて発光特性の評価

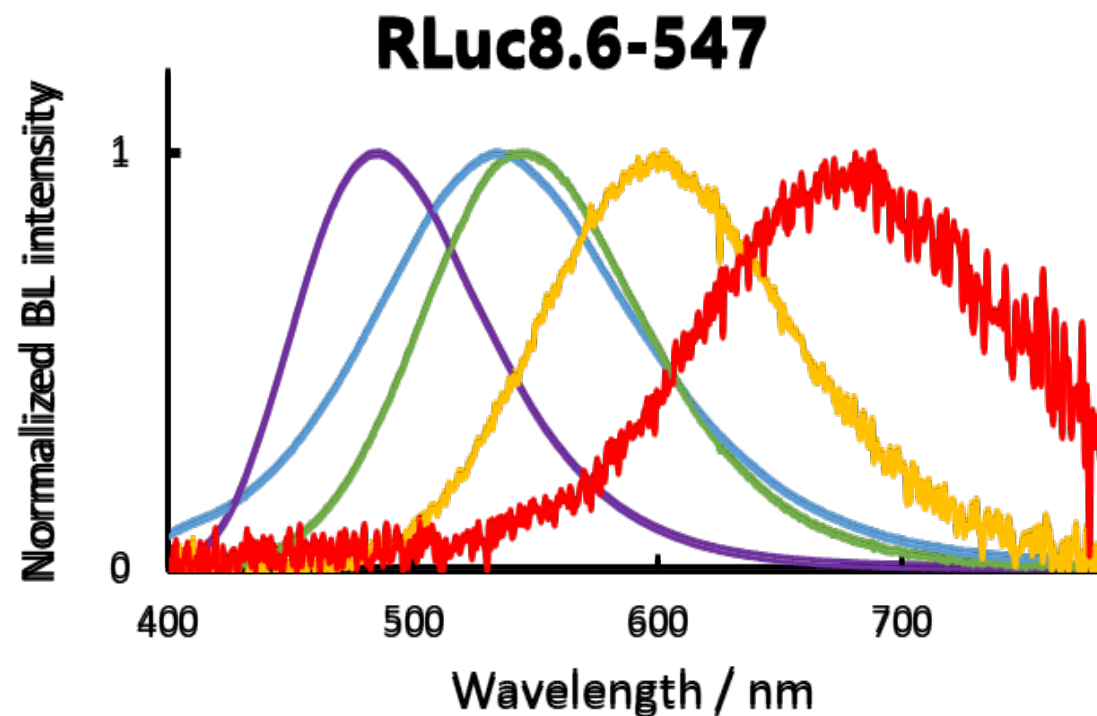
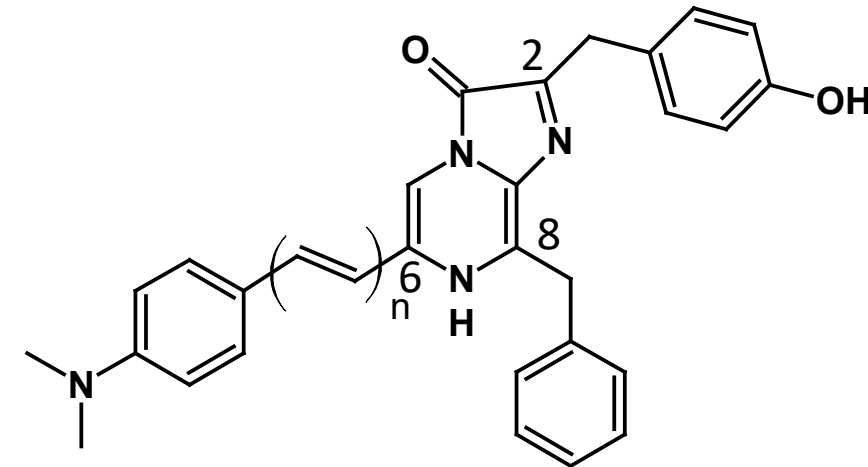
- ◆ 発光スペクトルの測定
- ◆ 細胞での発光測定
- ◆ 酵素の選択性の評価

# RLucによる生物発光波長

Condition:  
100 μM CTZ analogues in HEPES buffer 90 μL  
0.01 mg/mL RLuc 10 μL  
ATTO-1850 LumiFL Spectrocapture  
Slit width : 0.25 mm Exposure time : 60 s



Compound	$\lambda_{bl} / \text{nm}$
nCTZ	525
<b>1a</b>	464
<b>1b</b>	500
<b>1c</b>	560
<b>1d</b>	617



Compound	$\lambda_{bl} / \text{nm}$
nCTZ	533
<b>1a</b>	484
<b>1b</b>	543
<b>1c</b>	599
<b>1d</b>	<b>664</b>

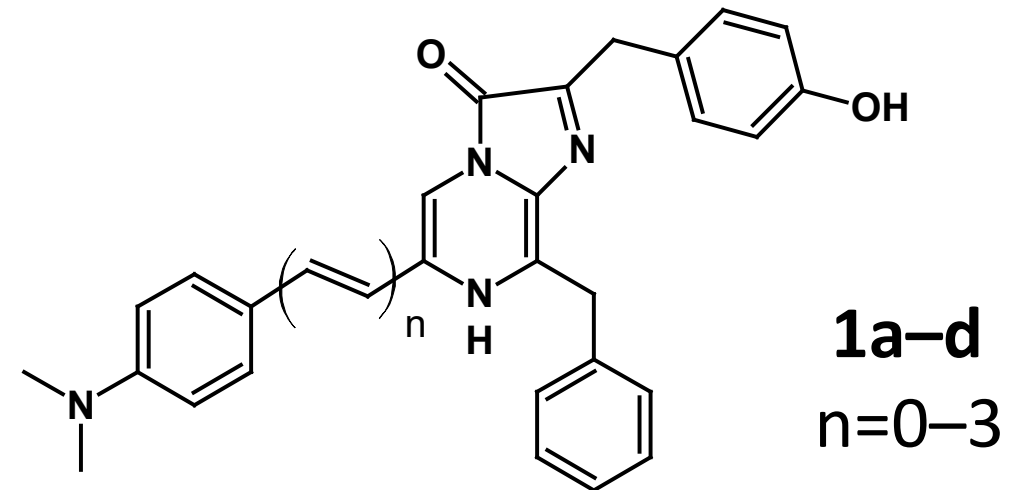
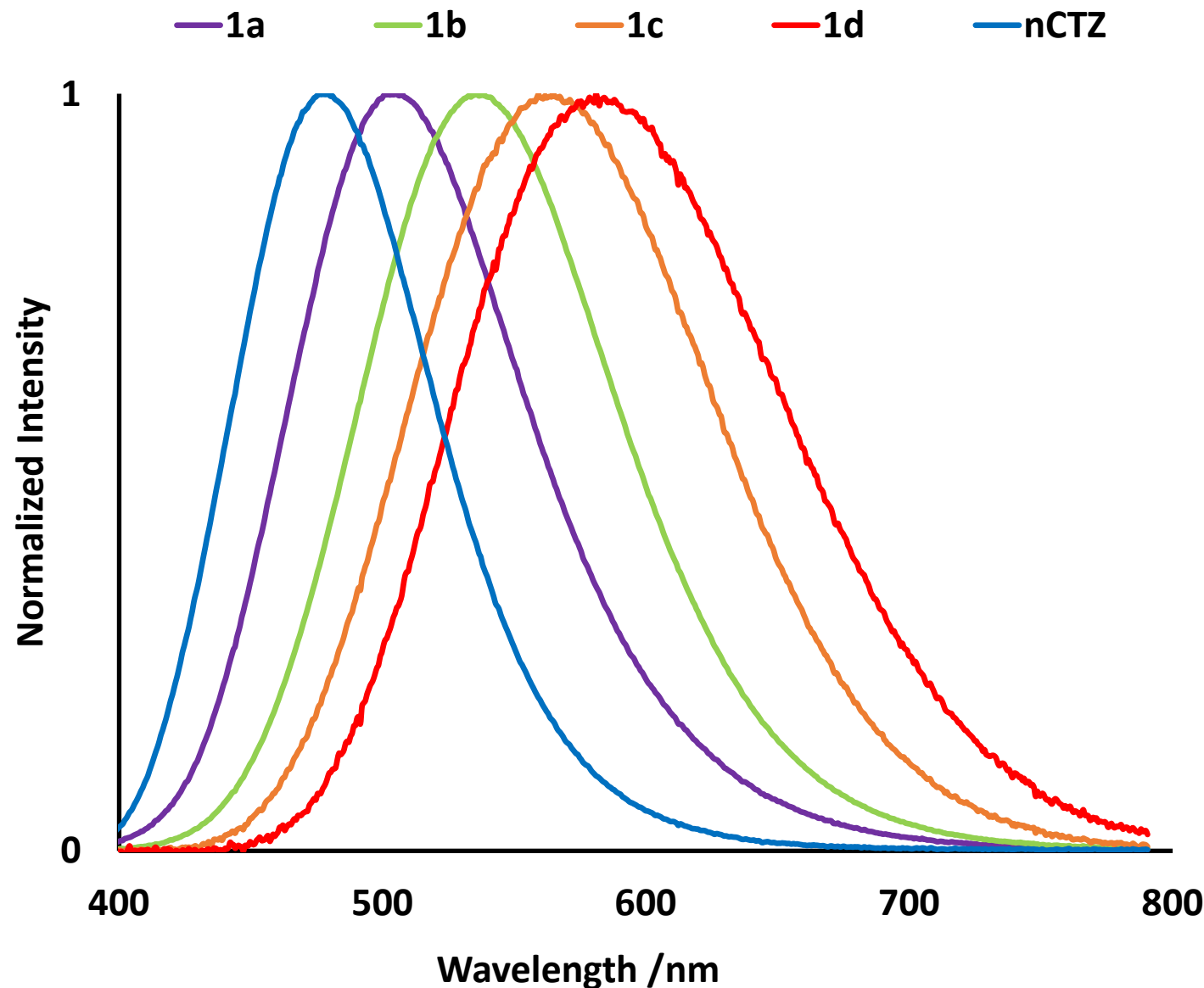
大幅な多色化に成功

セレンテラジン基質単体での  
最長波長発光を達成

# 1a-d / ALuc16の発光スペクトル

Condition:  
100  $\mu$ M CTZ analogues in HEPES buffer 50  $\mu$ L  
2.26  $\mu$ M ALuc16 50  $\mu$ L  
ATTO-1850 LumiFL Spectrocapture  
Slit width : 1 mm Exposure time : 60 s

**ALuc16** : 発光性カイアシ由来の人工酵素  
(産業技術総合研究所が開発)



Compound	$\lambda_{bl}$ / nm
nCTZ	476
<b>1a</b>	505
<b>1b</b>	535
<b>1c</b>	565
<b>1d</b>	<b>581</b>

オレフィンを伸長するとともに**長波長発光**した。

# 2a-d / ALuc16の発光スペクトル

Condition:

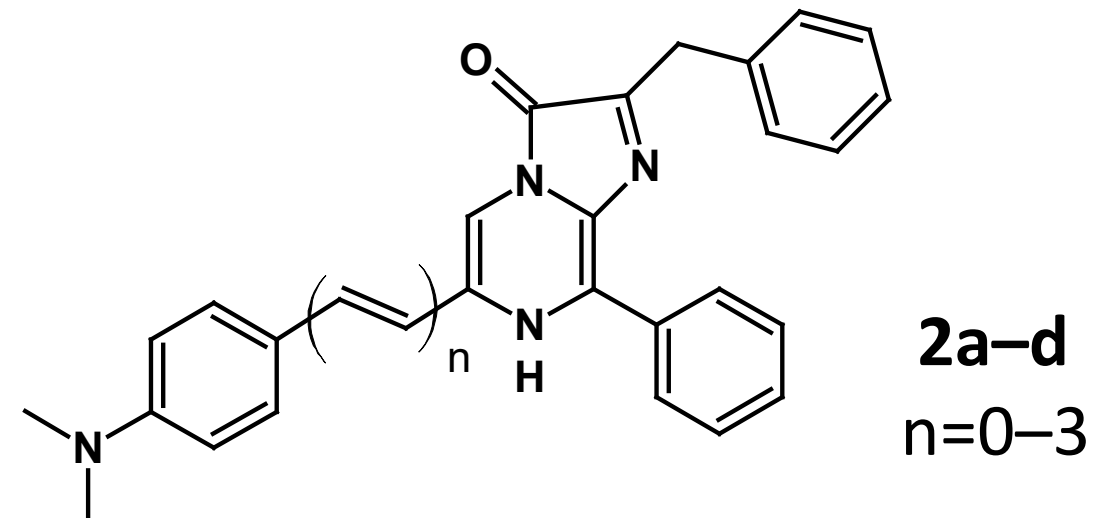
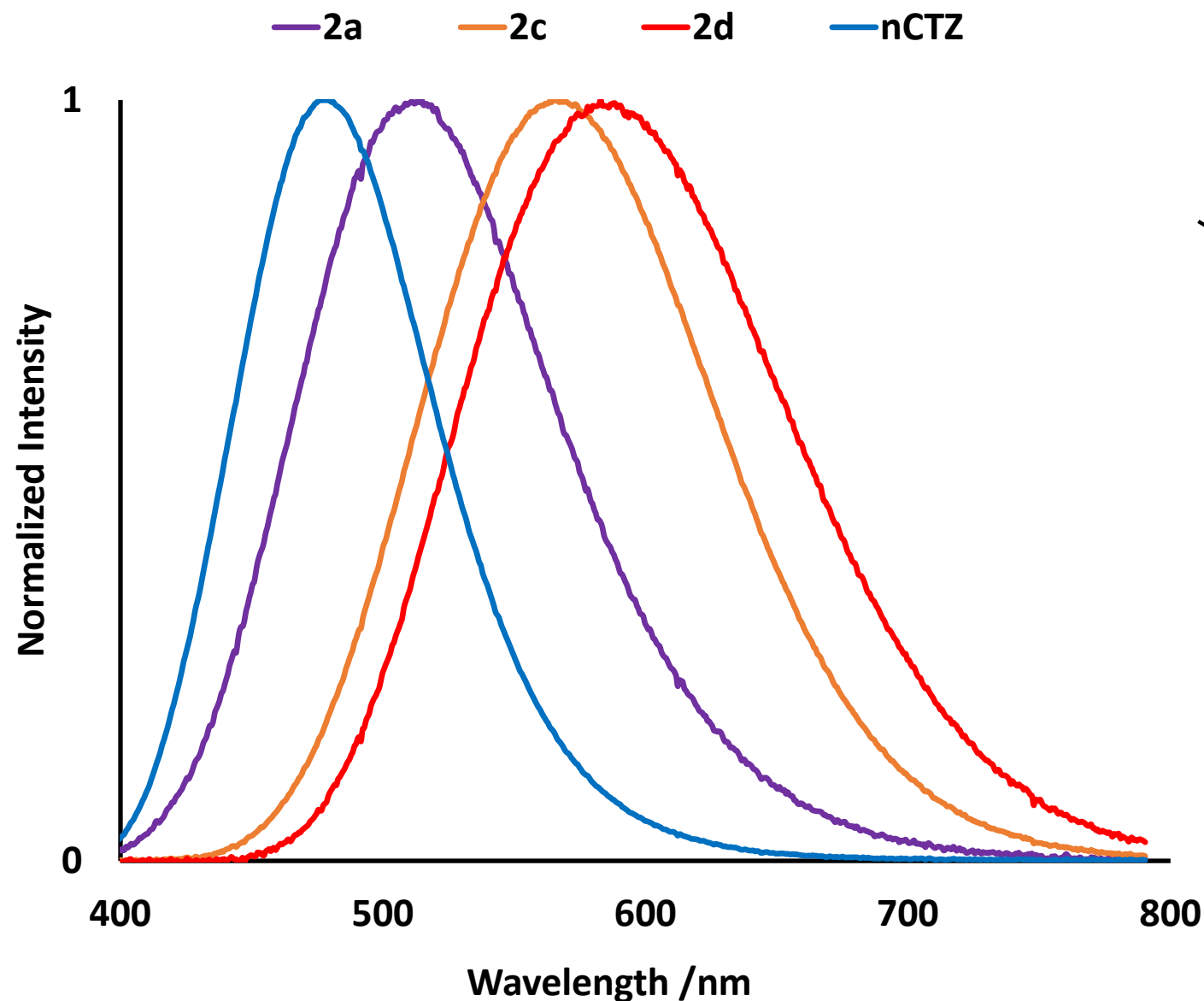
100  $\mu$ M CTZ analogues in HEPES buffer 50  $\mu$ L

2.26  $\mu$ M ALuc16 50  $\mu$ L

ATTO-1850 LumiFL Spectrocapture

Slit width : 1 mm Exposure time : 60 s

**ALuc16** : 発光性カイアシ由来の人工酵素  
(産業技術総合研究所が開発)



Compound	$\lambda_{bl}$ / nm
nCTZ	476
<b>2a</b>	515
<b>2b</b>	—
<b>2c</b>	566
<b>2d</b>	<b>583</b>

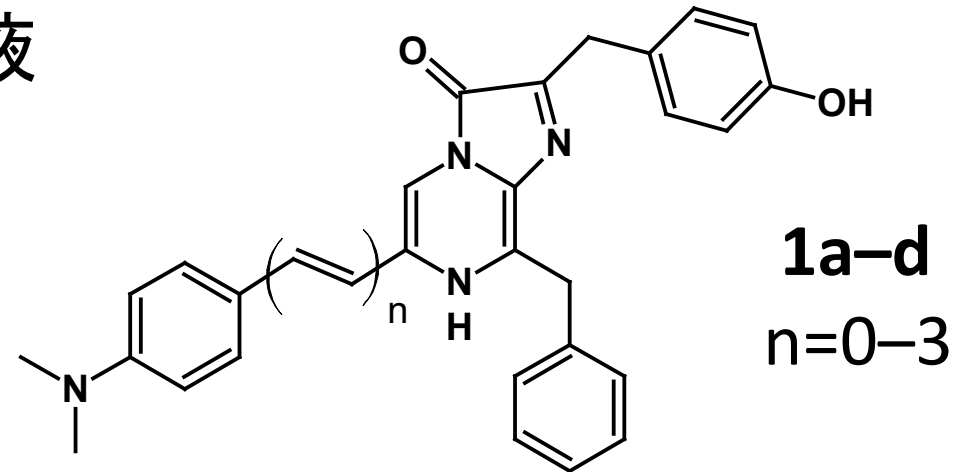
**ALucでの最長発光波長583 nmを記録**

# 1a-dの酵素溶液内での発光

Condition:  
50  $\mu$ M CTZ analogues in HEPES buffer 50  $\mu$ L  
mda-mb-231 Lysate cells  
IVIS Spectrum Exposure time: 120 s

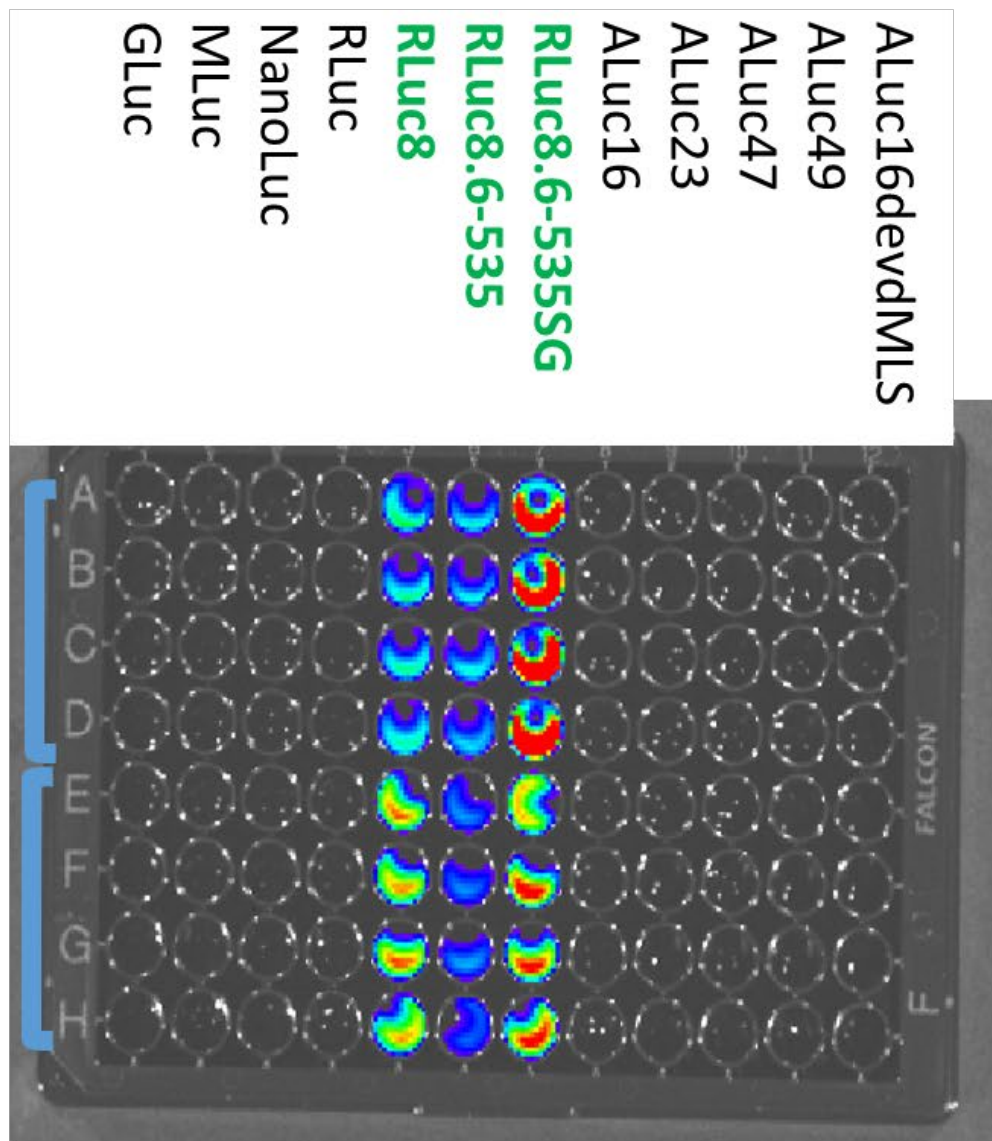
酵素溶液：酵素を発現させた細胞の溶出液

1a-d / RLuc8シリーズは発光した。



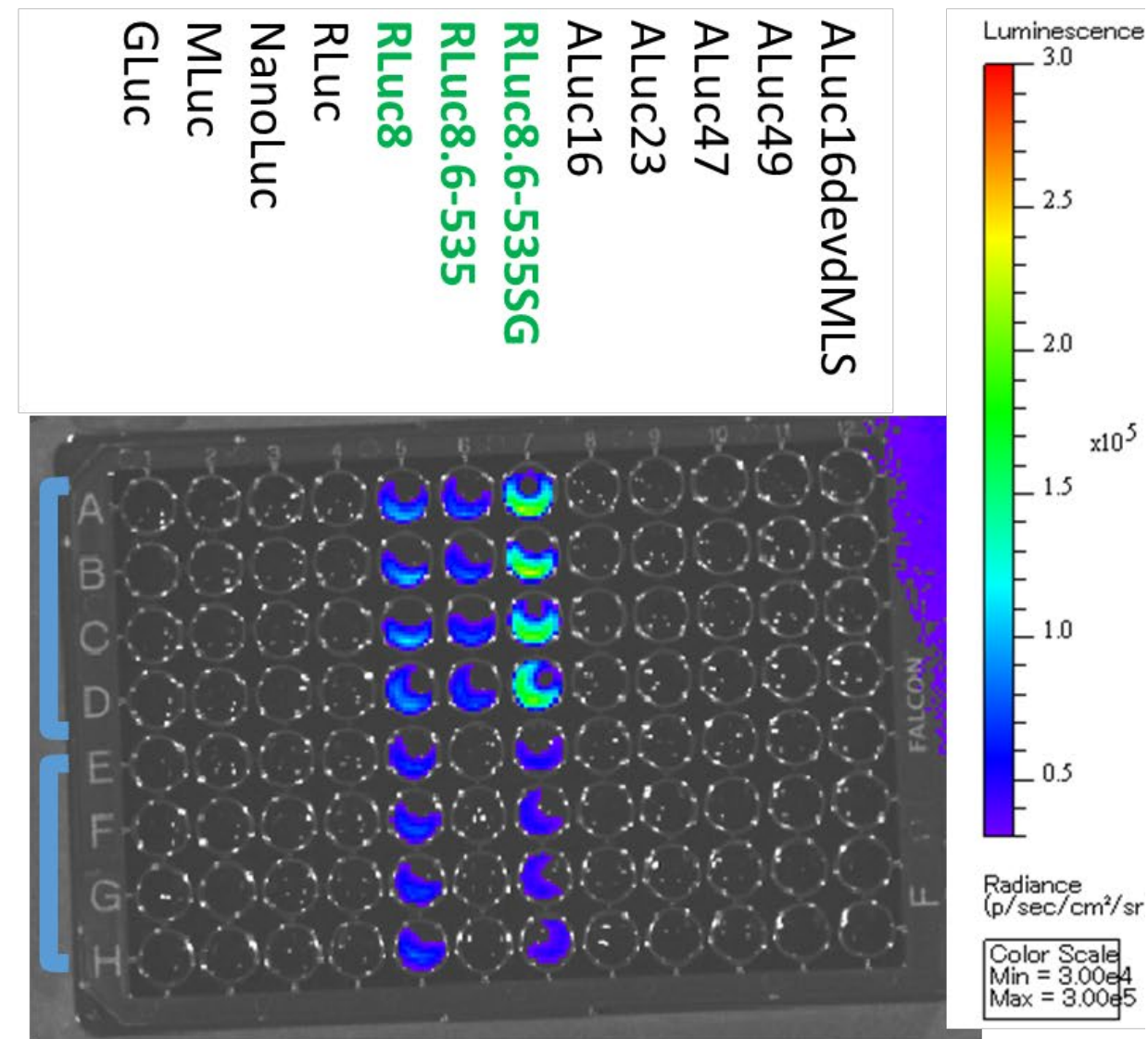
1a

1b



1c

1d

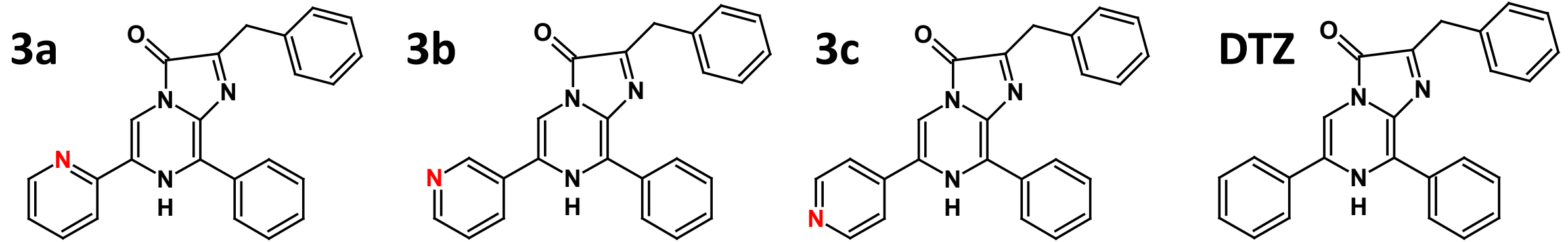




# 3a-c, DTZの酵素溶液内での発光

Condition:  
50  $\mu$ M CTZ analogues in HEPES buffer 50  $\mu$ L  
mda-mb-231 Lysate cells  
IVIS Spectrum Exposure time: 120 s

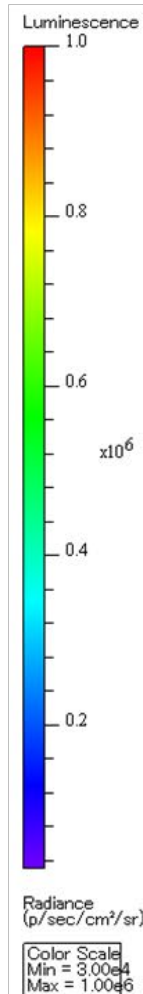
酵素溶液：酵素を発現させた細胞の溶出液



ALuc16devdMLS  
ALuc49  
ALuc47  
ALuc23  
ALuc16  
RLuc8.6-535SG  
RLuc8.6-535  
RLuc8  
RLuc  
**NanoLuc**  
MLuc  
GLuc

3a

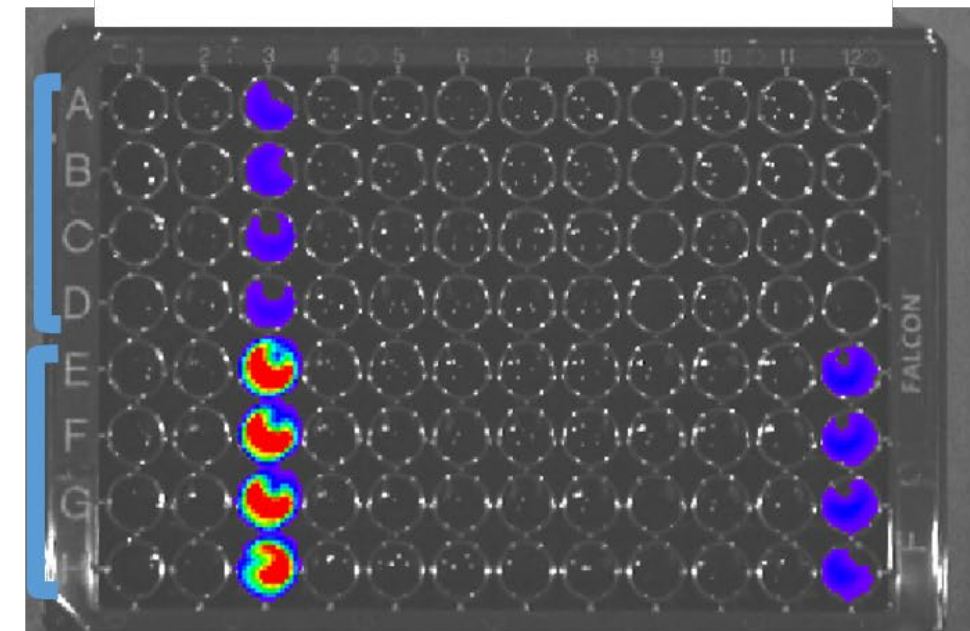
3b



3c

3d


ALuc16devdMLS  
ALuc49  
ALuc47  
ALuc23  
ALuc16  
RLuc8.6-535SG  
RLuc8.6-535  
RLuc8  
RLuc  
**NanoLuc**  
MLuc  
GLuc

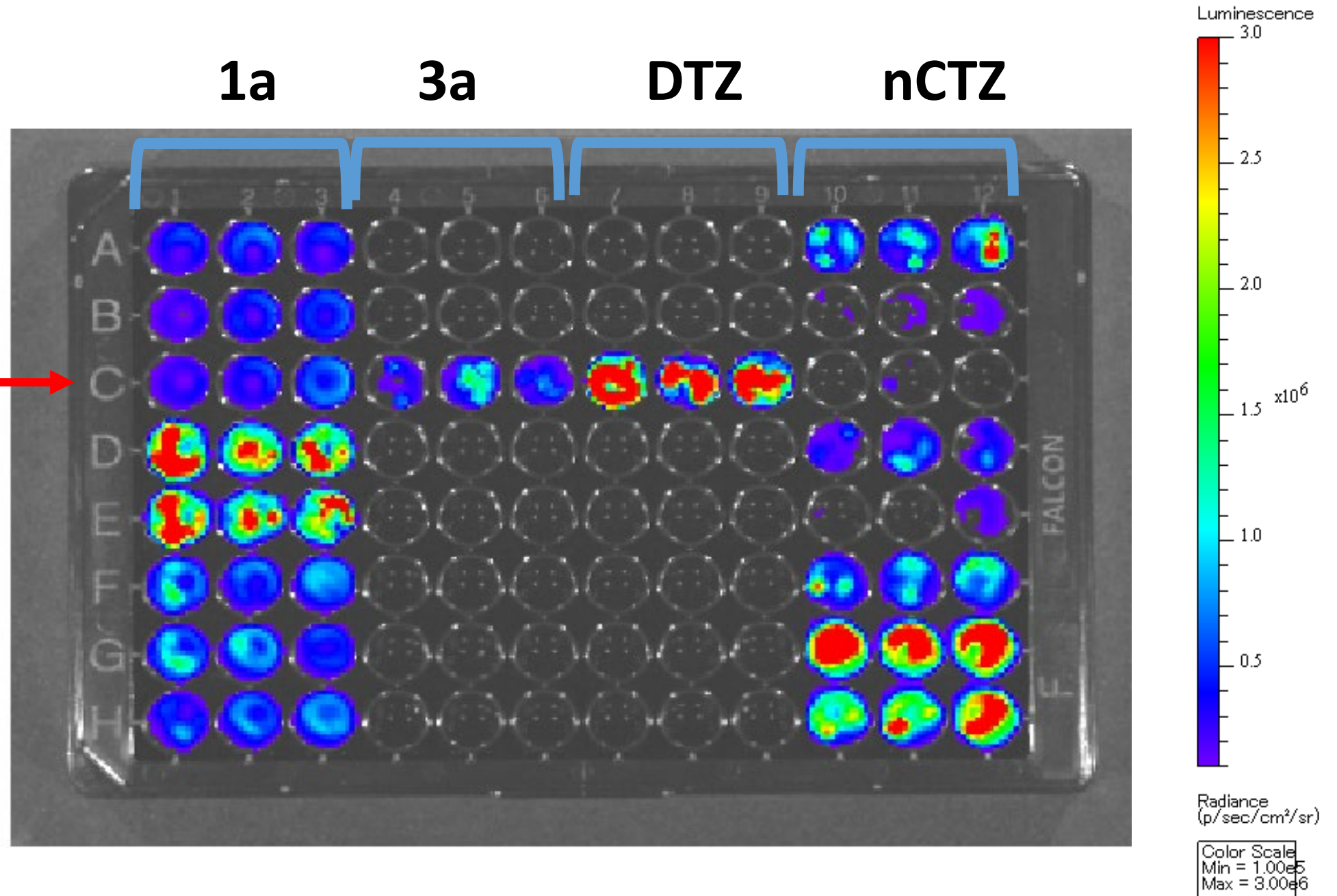


3a,3d / **NanoLuc**は高輝度で発光した。

# 選択性の評価

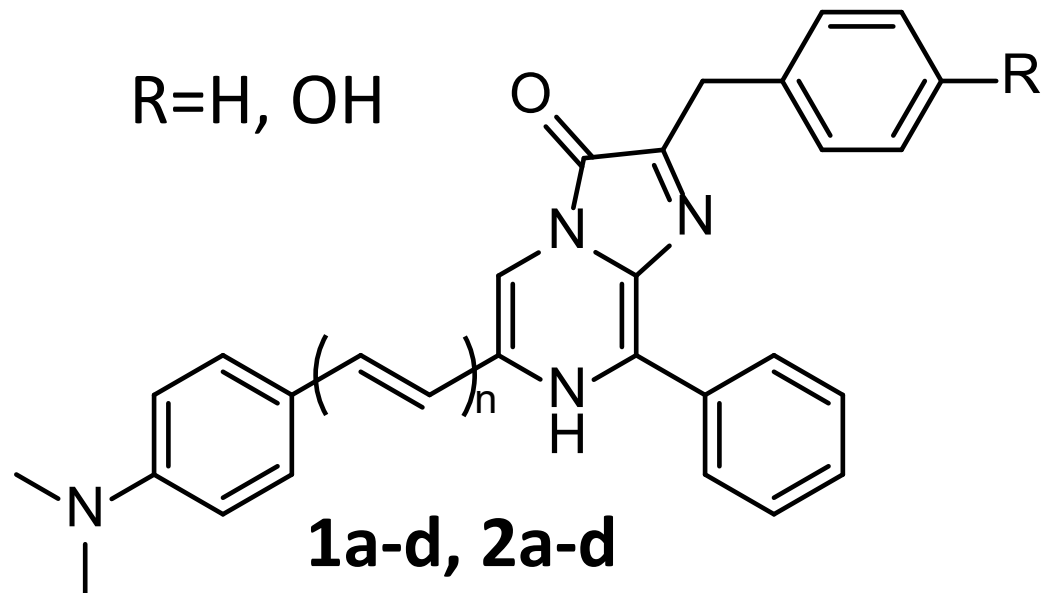
Condition:  
100  $\mu$ M CTZ analogues in HEPES buffer 30  $\mu$ L  
mda-mb-231 Live cells  
IVIS Spectrum Exposure time : 300 s

GLuc  
MLuc  
**NanoLuc**   
RLuc8.6-535  
RLuc8.6-535SG  
ALuc16  
ALuc23  
ALuc16devdMLS



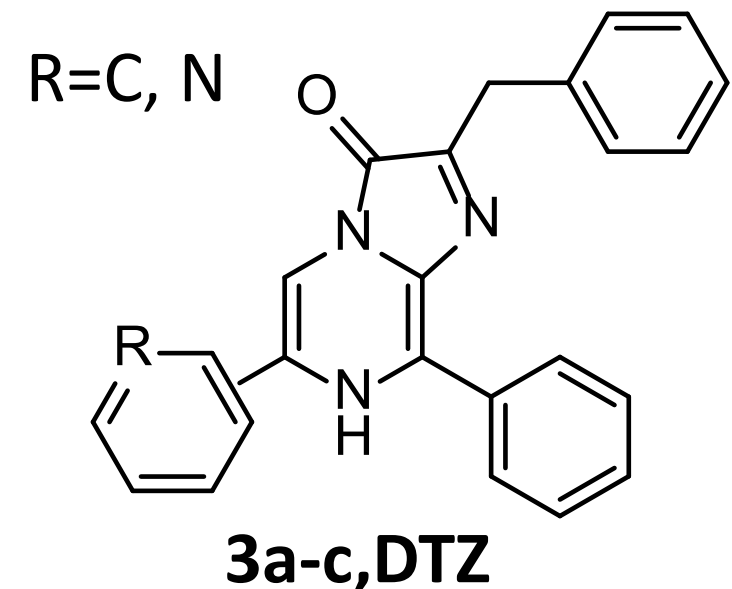
**3a,DTZ** ⇒ 生細胞で**NanoLuc** に特異的に発光した。

# 多色化セレンテラジンまとめ



- Rluc, Alucにて多色化に成功 (ca. 450-650 nm)
- Rlucにて664 nmの最長波長を示した
- Alucにて583 nmの最長波長を示した

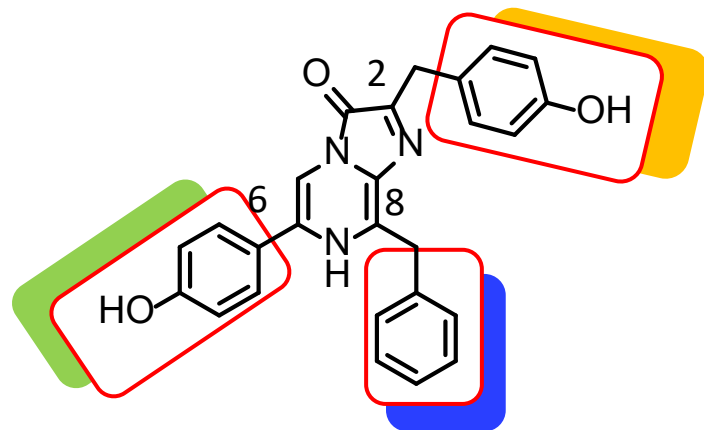
- NanoLucで特異的に発光
- 1a-d, 2a-dとの直交性が見られた



しかし、発光強度の減衰が著しく  
課題も残る

# 本研究の目的と方法

- ✓ 酵素特異性かつ多色発光を示す人工発光基質の開発
- 高強度かつ波長制御可能な人工発光基質の開発



セレンテラジン

- ✓ C2位、C6位、C8位が構造改変可能な部位
- ✓ C2位の構造は固定
- ✓ C6位、C8位の構造改変を行う

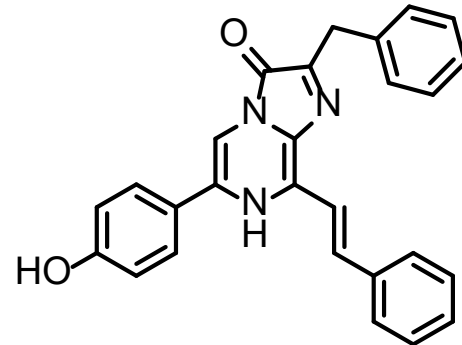
多色化セレンテラジン類縁体  
1,2,3-Series

強発光セレンテラジン類縁体  
S-Series

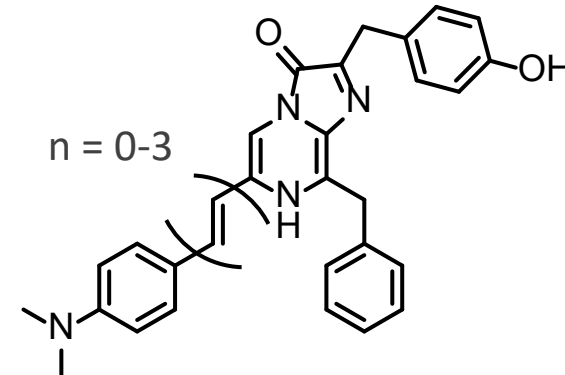


産総研の持つ人工発光酵素A-Lucを含む  
多様な酵素群

# S-Seriesの分子設計



発光活性なし

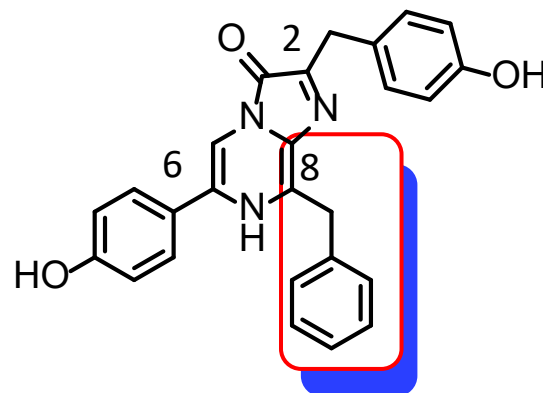


1a-1d (n = 0-3)

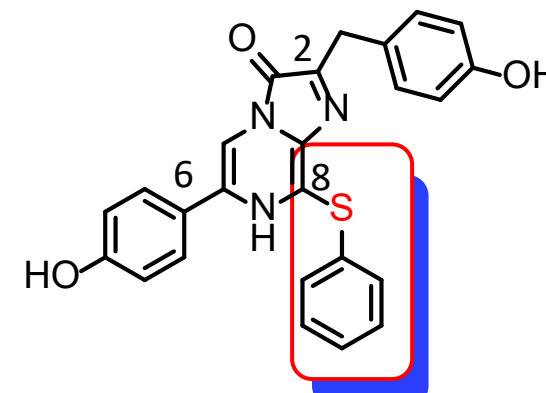
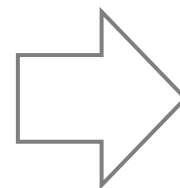
$\lambda_{\max} = 464 \sim 617 \text{ nm}$

1,2-Seriesはオレフィン数を増やす程、発光強度が低下する  
(セレンテラジン比約1/1000以下)

C8位のベンジル構造に類似し共役系が拡張された構造



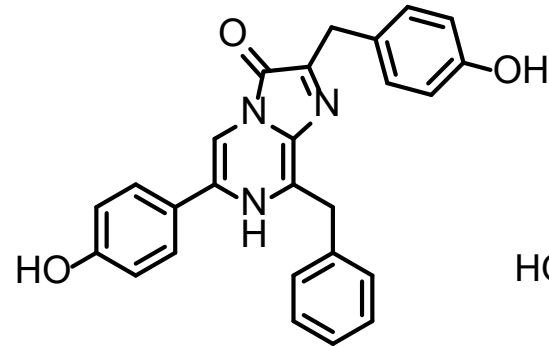
nCTZ



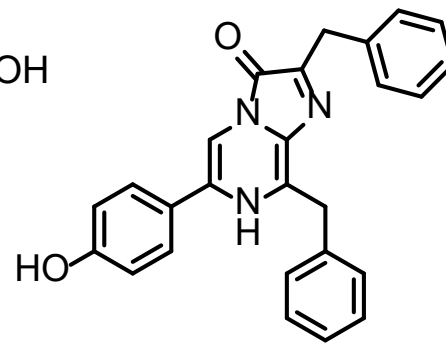
硫黄原子Sを導入  
共役系の拡張

C6位、C8位に置換基を導入し高強度、長波長発光を示す類縁体

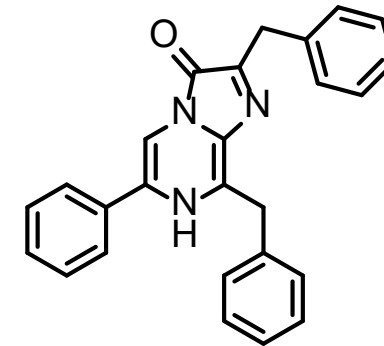
# S-Seriesの化学構造



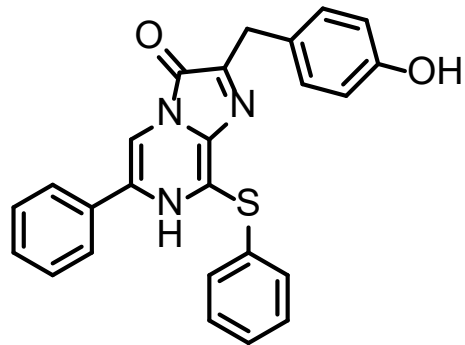
nCTZ



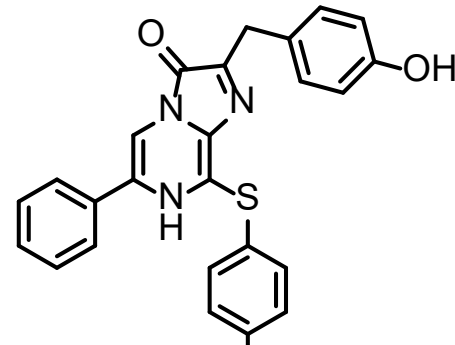
CTZh



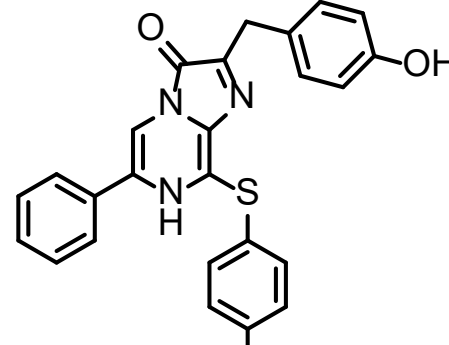
DBC



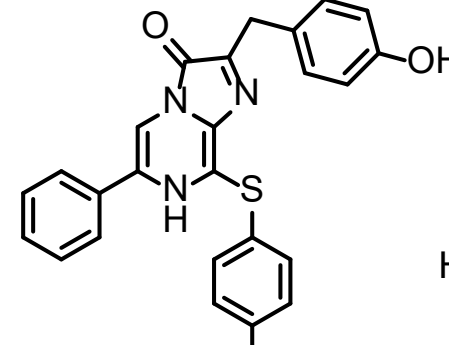
S1



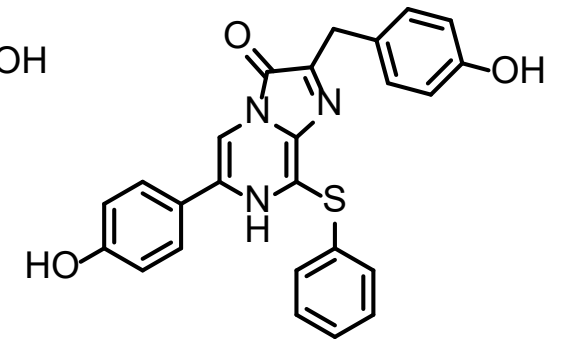
S2



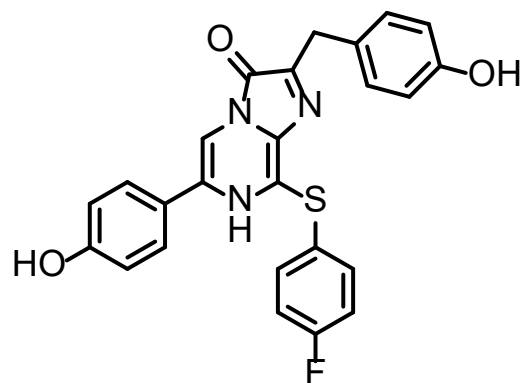
S3



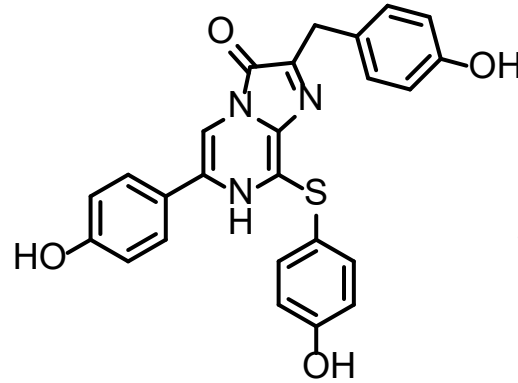
S4



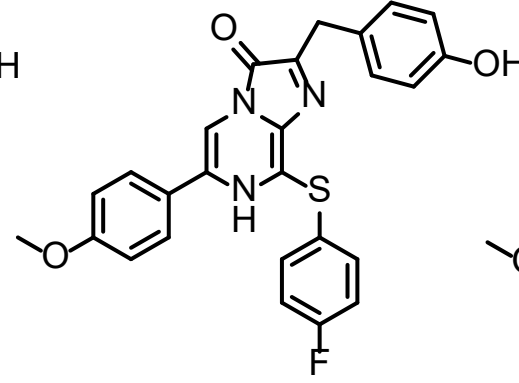
S5



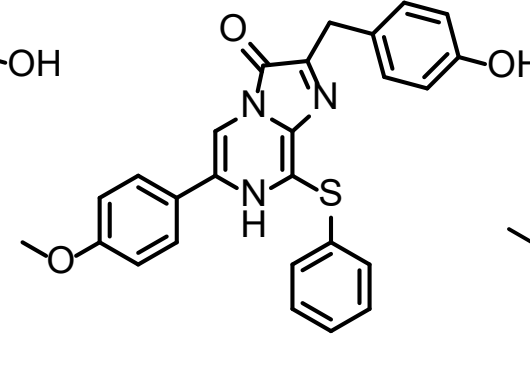
S6



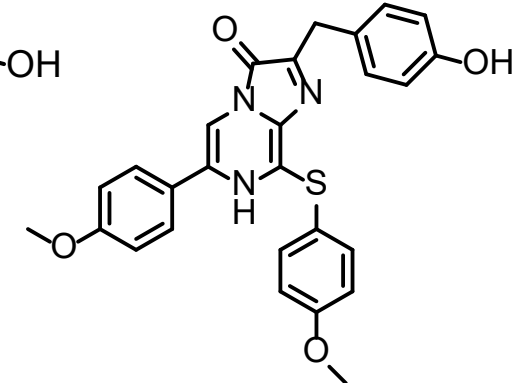
S7



S8



S9



S10

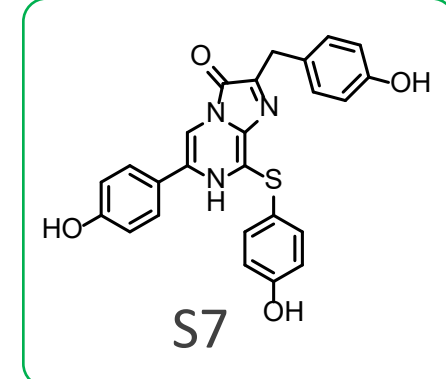
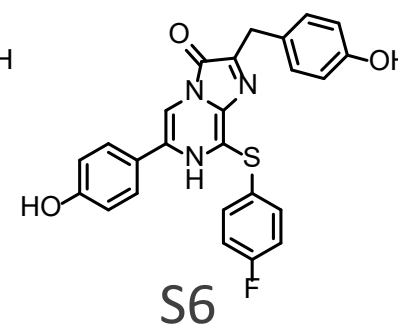
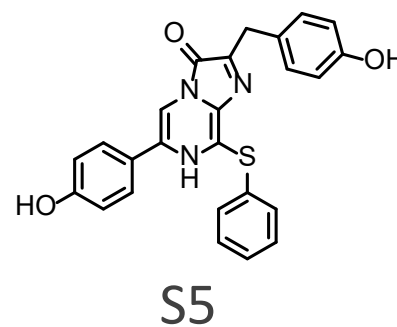
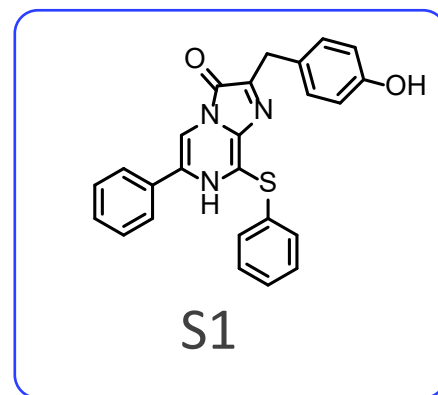
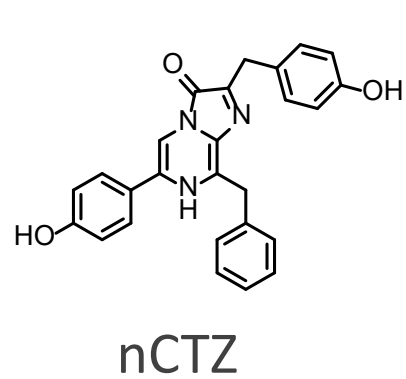
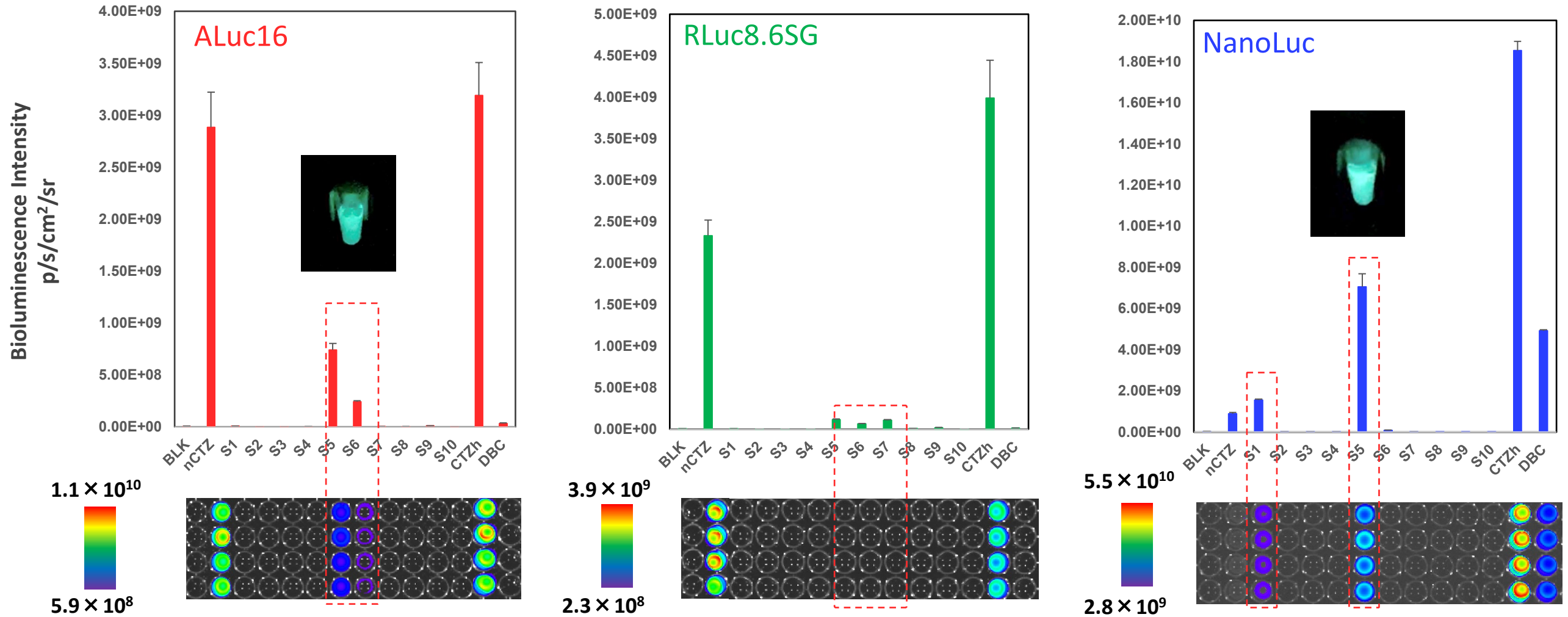
C8位にS原子を導入し、C6位、C8位に置換基を導入した類縁体を合成

# S-Seriesの発光評価

Lysate Cells

Exposure time; 0.5, 0.75 s

CTZ analogues in PBS buffer 100 μM



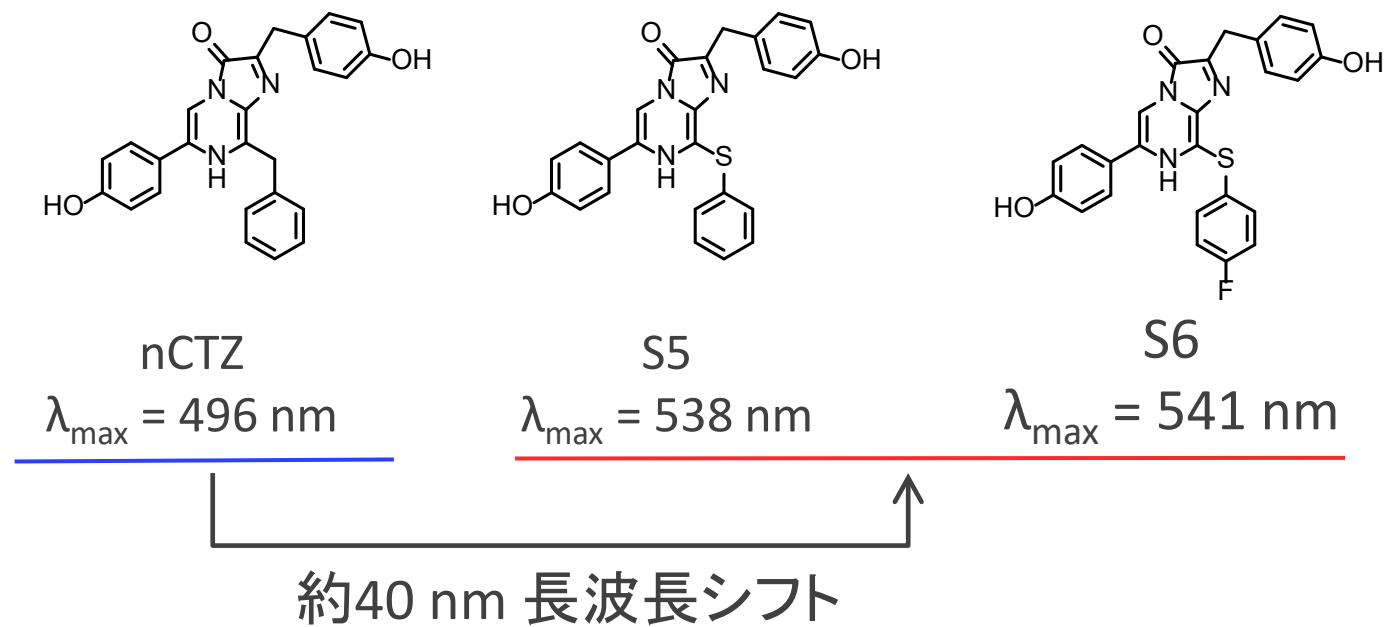
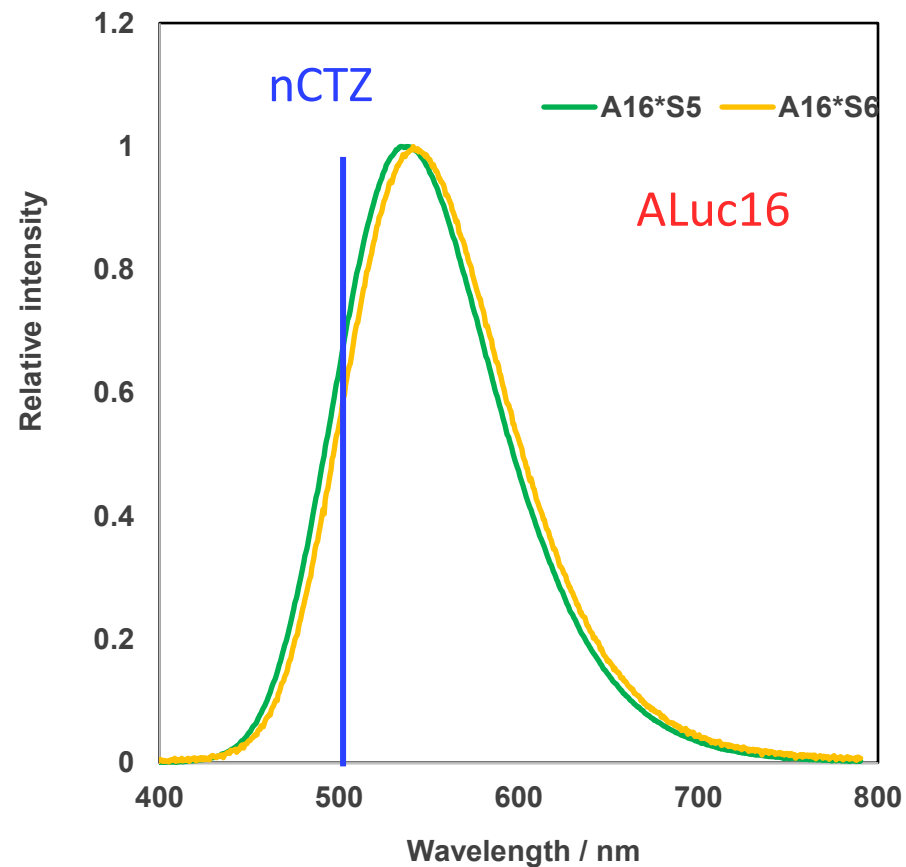
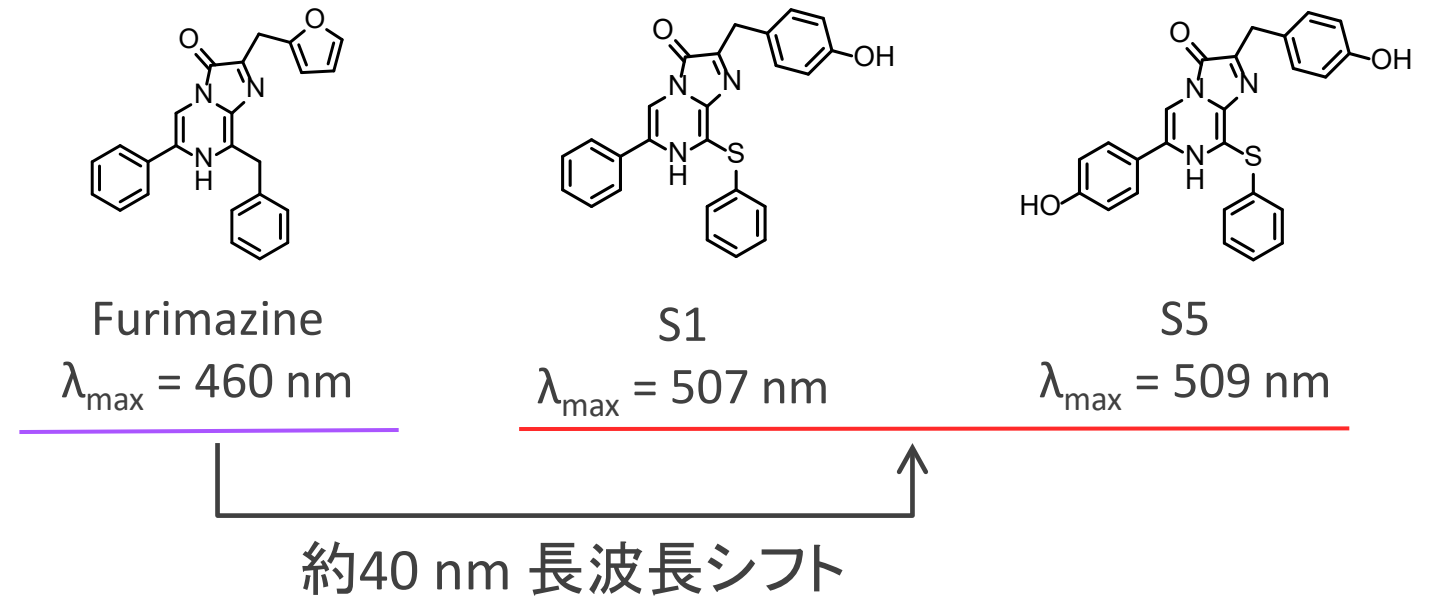
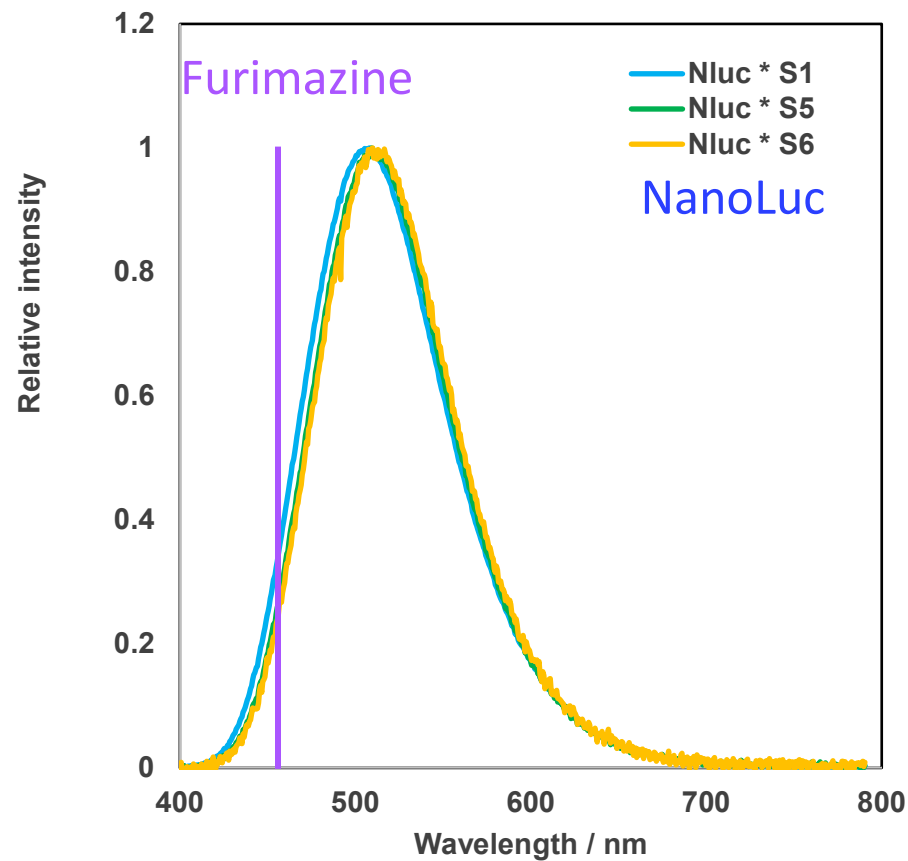
NanoLuc

RLuc8.6SG

類縁体S5はALucとNanoLucに対して高強度で発光を示す

# S-Seriesの発光評価

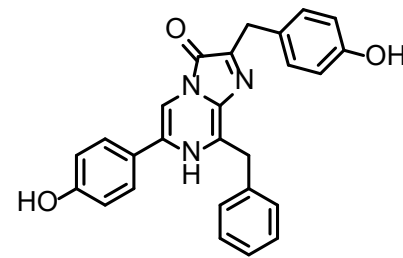
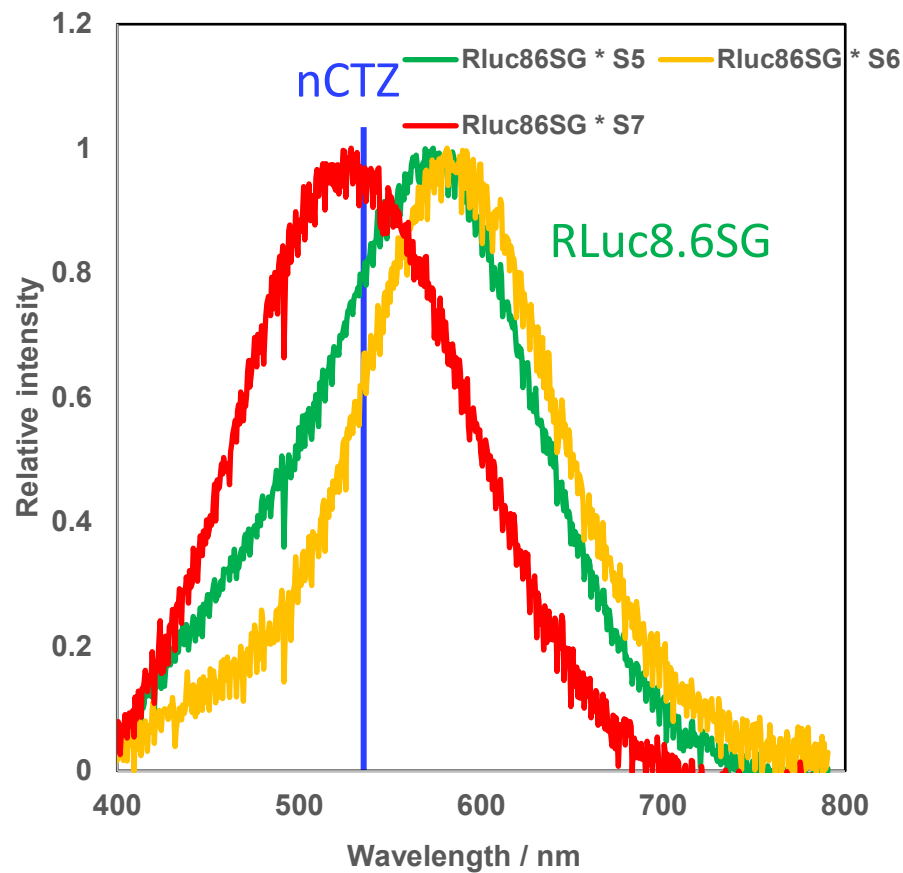
Lysate Cells  
Exposure time; 0.5, 0.75 s  
CTZ analogues in PBS buffer 100  $\mu$ M



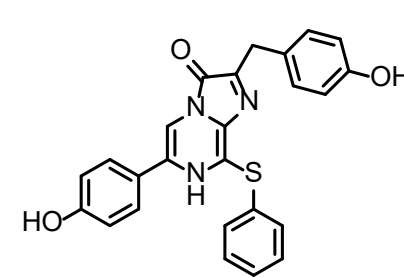


Lysate Cells  
Exposure time; 30 s  
CTZ analogues in PBS buffer 100  $\mu$ M

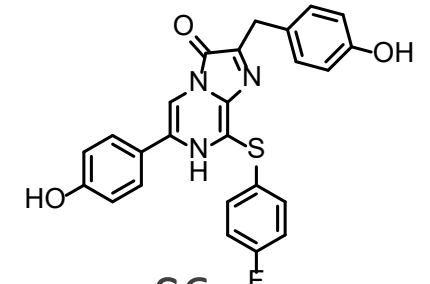
# S-Seriesの発光評価



nCTZ  
 $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$

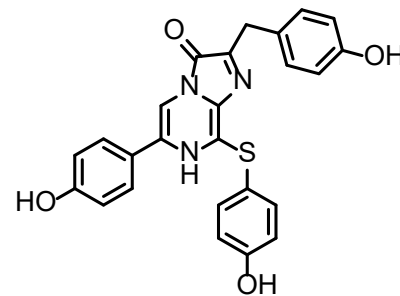


S5  
 $\lambda_{\max} = 573 \text{ nm}$



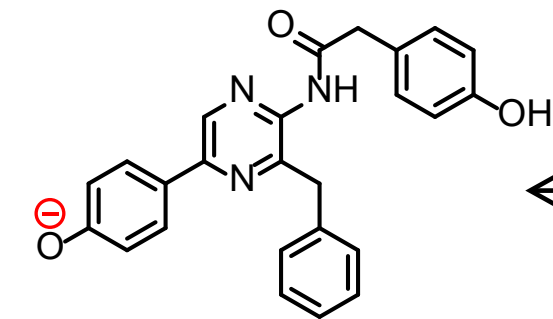
S6  
 $\lambda_{\max} = 581 \text{ nm}$

約40 nm 長波長シフト

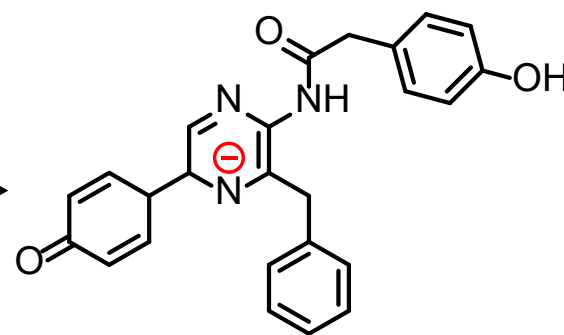


S7  
 $\lambda_{\max} = 528 \text{ nm}$

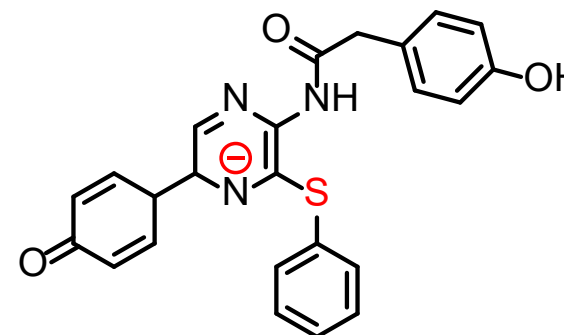
短波長シフト



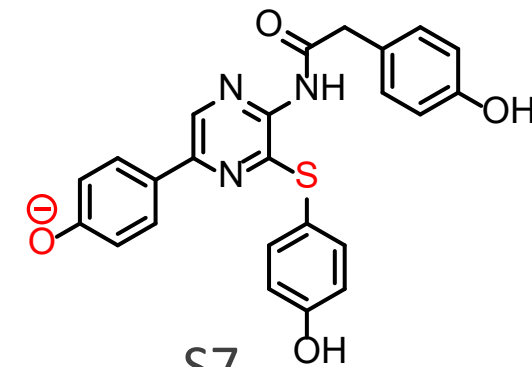
アニオン発光体①  
 $\lambda_{\max} = 480 \text{ nm}$



アニオン発光体②  
 $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$



S5  
 $\lambda_{\max} = 573 \text{ nm}$

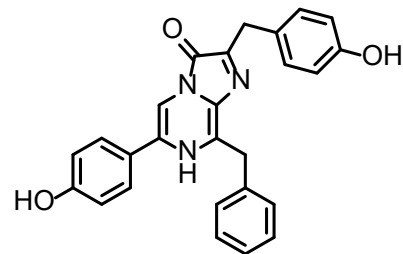


S7  
 $\lambda_{\max} = 528 \text{ nm}$

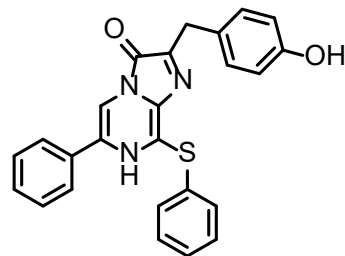
S原子により共役系が拡張され、約40 nmの長波長シフト

# S-Seriesの総括

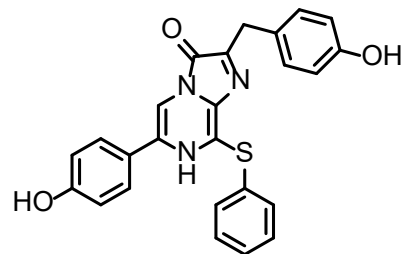
## S-Series 発光結果



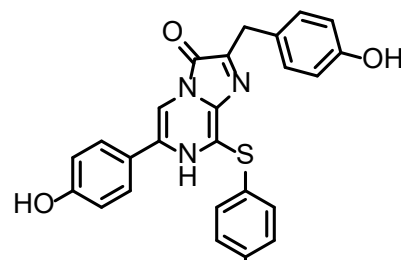
nCTZ



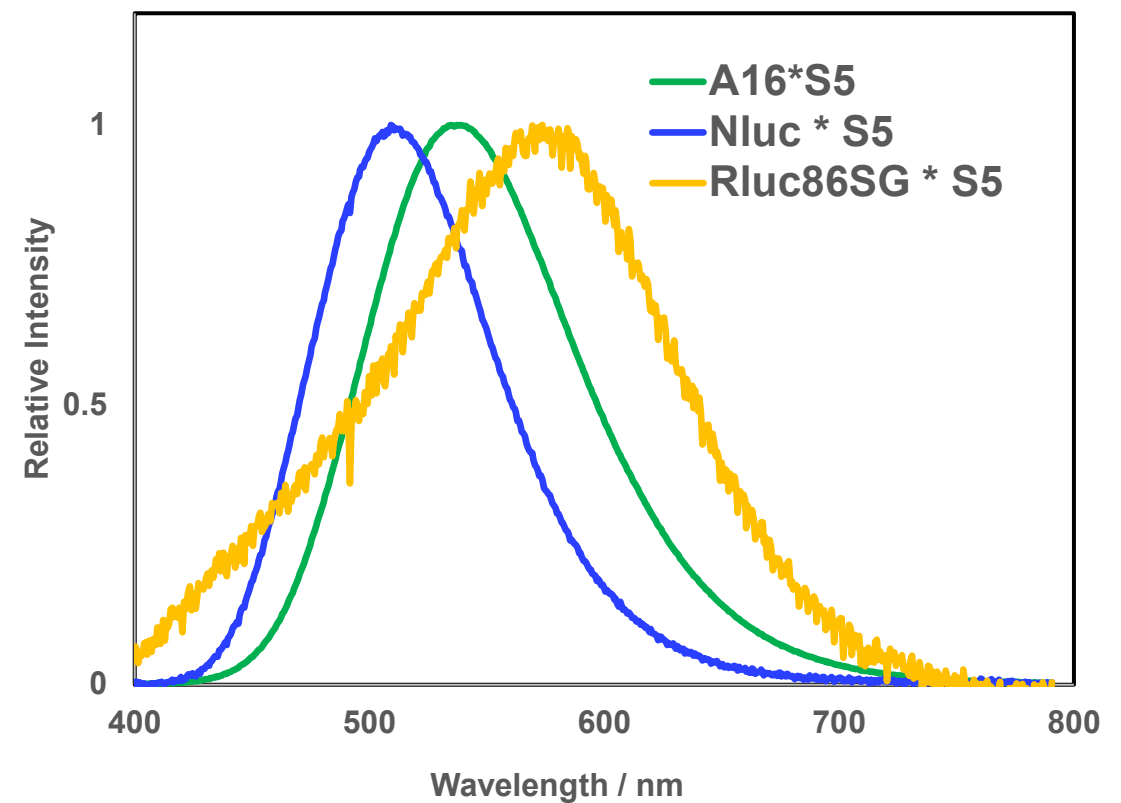
S1



S5



S6



- C8位にS原子を導入した類縁体の合成に成功
- 置換基の制御により**酵素特異的な類縁体を開発**
- セレンテラジン類縁体で**天然基質と同等の発光強度を達成**
- nCTZ等の発光基質より**約40 nmの長波長化**

# 本研究の総括

多色化セレンテラジン類縁体  
1,2,3-Series

強発光セレンテラジン類縁体  
S-Series



産総研の持つ人工発光酵素A-Lucを含む  
多様な酵素群

- ✓ 酵素特異性かつ多色発光を示す人工発光基質の開発
- ✓ 高強度かつ波長制御可能な人工発光基質の開発

## 本技術の応用と連携

- 生物発光イメージングへの応用
- 多彩な発光色を利用した新技術
- 強い発光輝度を利用した新技術

実際にイメージングに  
利用してみないと  
実用化までが困難

新規発光材料の  
新たな活用方法を探索中

etc...

多彩な応用・連携を募集しております  
技術に関するご相談もお受けいたします

# お問合せ先

国立大学法人電気通信大学  
産学官連携センター  
産学官連携ワンストップサービス

TEL 042-443-5871

FAX 042-443-5725

E-mail [onestop@sangaku.uec.ac.jp](mailto:onestop@sangaku.uec.ac.jp)



電気通信大学大学院 基盤理工学専攻  
牧 昌次郎 教授  
木山 正啓 博士  
神谷 弦汰 様(博士課程)  
玉城 翔太 様  
及び牧研究室の学生・卒業生



産業技術総合研究所 環境管理研究部門  
金 誠培 主任研究員  
テクニカルスタッフ  
藤井 理香 研究員