

# 長時間イメージングへの応用を目指した新規生物発光基質フリマジン誘導体

○織岡真理子<sup>1</sup>・水井侑希<sup>1</sup>・江口正敏<sup>2</sup>・池田裕真<sup>1</sup>・吉村英哲<sup>2</sup>・小澤岳昌<sup>2</sup>・

Daniel Citterio<sup>1</sup>・蛭田勇樹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>慶應義塾大学大学院・<sup>2</sup>東京大学大学院)

酵素基質反応で生じる光を利用した生物発光イメージングは、非侵襲・高感度の観察を可能にする技術として、生物医学分野で重要な役割を果たしている。中でも、近年開発された人工生物発光酵素・基質 NanoLuc (NLuc)-Furimazine (FMZ) は、その発光輝度の高さや酵素の優れた特性から、イメージングへの応用が進められている。その一方で、NLuc-FMZ 発光系は、イメージング応用において障壁となる欠点を有する。まず、基質 FMZ は、共通の分子骨格を有するセレンテラジンと同様、化学的に不安定な構造であるため、酵素非存在化でも容易に酸化分解を起こす。また、他の発光系と比較して輝度は高いものの、バッファー中での発光値の半減期は約 70 分と短い<sup>1</sup>。これらが、イメージングの感度や観察時間に制約をかけていると言える。これまで当研究室では、この課題解決に向けた FMZ 誘導体シリーズの開発を進めてきた<sup>2</sup>。具体的には、FMZ の分解機構に着目し、酸化部位である C-3 位のカルボニル基に、アシル系やカルバメート系の保護基を導入することで、非特異的な酸化を抑制した。さらに、この保護基が細胞内の加水分解酵素によって脱保護を受け、本来の基質 FMZ が徐々に遊離するため、発光シグナルの持続にもつながると考えた。このようなアプローチに基づいて設計した FMZ 誘導体シリーズのうち、嵩高いアシル系保護基を導入した基質 (Pivaloyl-FMZ) が、バッファー溶液中で最も高い安定性を示し、NLuc 発現細胞内で最も長く発光を示すことが確認された。

この結果を受けて私たちは、さらなる化学的安定性の向上と発光時間の延長を目指し、引き続き FMZ 誘導体シリーズの開発に着手してきた。本研究では、C-3 位のカルボニル基の保護基として、先行研究の Pivaloyl 基のほかに、さらに嵩高いアシル系保護基である 1-Adamantanecarbonyl 基を導入した。また新たに、C-6 位に位置する芳香環にはヒドロキシ基を導入した。これは、基質の親水性を上げることで、細胞毒性の抑制等を狙ったものである。Su らの研究において、この位置にヒドロキシ基を導入した誘導体 (Hydrofurimazine, FMZ-OH) が、FMZ と同様、NLuc に酵素認識されて発光を示すことは既に確認されている<sup>3</sup>。本研究では、新規 3 基質を含む 6 種類の基質 (図 1) を合成し、これらの基礎特性を評価・比較することで、各官能基の導入による効果を検証した。

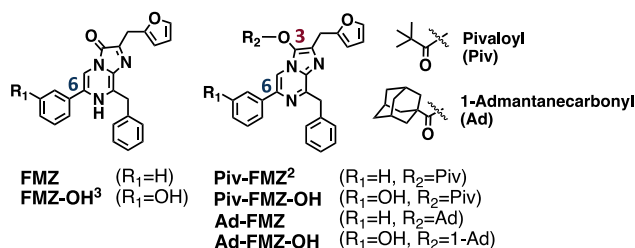


図 1 FMZ 誘導体

バッファー溶液中での基質の安定性評価にお

いて、C-3 位を保護した基質はいずれも、FMZ や FMZ-OH に比べ、高い安定性を示した。また、エステラーゼを含む溶液中で、これらの誘導体は酵素的加水分解を受け、FMZ や FMZ-OH が徐々に遊離されることが確認でき、その分解速度は C-3 位の保護基の種類と C-6 位の水酸基の有無によって異なることが示された。続いて、NLuc 安定発現 HEK293T 細胞に、これらの基質を添加し、冷却 CCD カメラ搭載のイメージャーを用いたタイムラプス撮影により、その発光特性を評価した。結果、C-3 位を保護した基質を添加した細胞では、FMZ や FMZ-OH よりも長時間の発光が見られた。特に Ad-FMZ および Ad-FMZ-OH では、輝度は低いものの 18 時間連続して安定したシグナルを検出できた (図 2)。これらの結果を受けて、顕微鏡での細胞イメージングに応用したところ、FMZ や FMZ-OH では数十分のうちに発光がバックグラウンドレベルに達したのに対し、Ad-FMZ や Ad-FMZ-OH では 24 時間にわたって一細胞レベルでのイメージングを達成した。この結果は、細胞内における生命現象の長時間イメージングへの応用可能性を示唆するものであると言える。

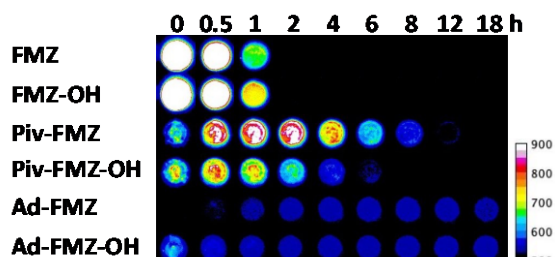


図 2 イメージャーを用いた NLuc 発現 HEK293T 細胞内での発光測定

- (1) Coutant, E. P. et al., *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17 (15), 3709–3713.
- (2) Mizui, Y. et al., *Org. Biomol. Chem.* 2021, 19 (3), 579–586.
- (3) Su, Y. et al., *Nat. Methods* 2020, 1–9.

