



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | DEVELOPMENT OF A MULTICOLOR AUTONOMOUS BIOLUMINESCENCE IMAGING TECHNOLOGY   |
| Author(s)    | Kusuma, Subhan Hadi   |
| Citation     | 大阪大学, 2024, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/98701">https://doi.org/10.18910/98701</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

|  |   |
|--|---|
| Name (SUBHAN HADI KUSUMA)  |   |
| Title  | DEVELOPMENT OF A MULTICOLOR AUTONOMOUS BIOLUMINESCENCE IMAGING TECHNOLOGY<br>(マルチカラー自発光イメージング技術の開発) |
| <p>Abstract of Thesis</p> <p>Bioluminescence imaging has become a valuable tool in biological research, offering several advantages over fluorescence-based techniques, including the absence of phototoxicity and photobleaching, as well as a higher signal-to-noise ratio. Common bioluminescence imaging methods often require the addition of an external chemical substrate (luciferin), which can result in a decrease in luminescence intensity over time and limit prolonged observation. Because the bacterial bioluminescence system is genetically encoded for luciferase-luciferin production, it enables autonomous bioluminescence (auto-bioluminescence) imaging. However, its application to multiple reporters is restricted because of the limited range of color variants. In this thesis, I present a novel multicolor auto-bioluminescence system named Nano-lanternX (NLX), derived from Nano-lantern based on Lux. NLXs were developed by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) from Lux as the donor and specific fluorescent proteins, such as mTurquoise2, sfGFP, Venus, mKOκ, and mScarlet-I, as the acceptor to generate cyan, green, yellow, orange, and red color variants, respectively. NLXs not only shifted the emission wavelength of Lux, but also increased the luminescence intensity by up to ten-fold owing to the enhancement of the luminescent quantum yield. I successfully applied NLXs to express in bacterial, mammalian and plant hosts, thereby, enabling multiplexed auto-bioluminescence imaging in various living organisms. In addition, I expanded the application of NLXs, not only with a single reporter, but also with multiplex gene reporter assays and protein localization. For the first time, using the strategy of changing the wavelength of Lux, I successfully engineered a Ca<sup>2+</sup> and ATP sensor for auto-bioluminescence technology. Overall, NLXs are promising auto-bioluminescence technologies for future investigations of biological phenomena.</p> |   |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (SUBHAN HADI KUSUMA) |     |       |
|--------------------------|-----|-------|
|                          | (職) | 氏 名   |
| 論文審査担当者                  | 主 査 | 教 授   |
|                          | 副 査 | 教 授   |
|                          | 副 査 | 教 授   |
|                          | 副 査 | 教 授   |
|                          |     | 永井 健治 |
|                          |     | 八木 健  |
|                          |     | 深川 竜郎 |
|                          |     | 上田 昌宏 |

## 論文審査の結果の要旨

発光酵素（ルシフェラーゼと総称）と発光基質（ルシフェリンと総称）の反応によって生じる生物発光を利用したバイオイメーシング法は、光毒性や光退色を起こさず、シグナル対ノイズ比が高いなど、蛍光を用いた手法に比べ様々な利点があるため、生物学研究において有用な解析手法になるものと期待されている。一般的な生物発光イメーシング法では、ルシフェラーゼの遺伝子を観察したい細胞や組織に導入してルシフェラーゼを細胞内で発現させることができるものの、外部から発光基質（ルシフェリン）を添加する必要があった。その結果、時間の経過とともにルシフェリンが消費され、長時間の観察が制限されていた。ルシフェリンの生合成が可能なバクテリアの自律型生物発光システム（Luxシステム）は、LuxA, LuxB, LuxC, LuxD, LuxE, LuxGの5つの遺伝子から構成されLuxAとLuxBがルシフェラーゼをLuxC, LuxD, LuxE, LuxGがルシフェリンの生合成に関与することが解明されている。近年、バクテリアのみならず動植物細胞で効率よく遺伝子を発現させることも可能になり、ルシフェリンの添加なしに長時間の観察を行うことができるようになってきた。しかしながら、発光色が青色しか存在せず、スペクトルの多様性に欠けるため、Luxの応用は単一色のバイオイメーシングに限られていた。スパン氏は、シアン（mTurquoise2）、グリーン（superfolderGFP）、イエロー（Venus）、オレンジ（mKusabira orange- $\kappa$ ）、レッド（mScarlet-I）といった複数の蛍光タンパク質をLuxAに融合し、発光反応によって励起状態にあるルシフェリンの励起エネルギーをそれらの蛍光タンパク質に高効率に移動させることで、融合した蛍光タンパク質の蛍光色で発光させる技術を開発した。また、LuxA-蛍光タンパク質融合遺伝子をLuxB, LuxC, LuxD, LuxE, LuxGと共にバクテリア、哺乳類、植物を含む様々な細胞に発現可能な遺伝子ベクターを構築し、最大5色の自動生物発光イメーシングを行うことに成功した。さらに、NLXシステムを遺伝子発現の長期イメーシングに応用し、イオン（Ca<sup>2+</sup>）と生体分子（ATP）の長期観察のための自立発光型バイオセンサーも構築し、生細胞内でのイメーシングにも世界に先駆けて成功した。

本論文は、ルシフェラーゼとルシフェリンによって生じる生物発光と蛍光タンパク質の双方の物理化学的特性を巧みに融合させるタンパク質をエンジニアリングのスキルのみならず、生理機能を可視化するバイオセンサーの構築から生細胞イメーシングに至る様々な科学分野の知見とスキルが統合されており、その専門知識と研究能力によってなした研究成果である。

よって、博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール“iThenticate”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添える。