

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19525

研究課題名(和文)ケミルミノジェネティクスによる構成的エネルギー生合成系の創出

研究課題名(英文)Creation of constitutive energy biosynthesis platform by chemiluminogenetics

研究代表者

永井 健治 (Takeharu, Nagai)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：20311350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、発光タンパク質を蛍光タンパク質と融合させて発光特性の高輝度化と多色化を実現し、発光基質の生合成系遺伝子群とともに植物に導入することで人工自発光植物を開発することである。本研究では、バクテリア発光タンパク質に蛍光タンパク質を融合することで高輝度化に成功した。高輝度発光遺伝子を導入したゼニゴケから酸素発生が確認でき、赤色発光タンパク質が光合成を誘導している可能性が示唆された。さらに、高等植物であるベンサミアナタバコとシロイヌナズナにヤコウタケの自発光遺伝子群を導入し、人工自発光植物の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この計画が樹木などにも応用できれば、超省エネ社会実現のための電力不要の照明灯として利用できるであろう。さらに葉が生い茂った樹木では日照不足の葉が存在するが、自らの放つ光で光合成できれば、光合成量は増加して生産性が高まることも予想される。本研究では、ゼニゴケ、シロイヌナズナ、タバコなどの高等植物の生理機構を有している植物を用いたことにより、将来の植物科学の基盤技術となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop artificial light-emitting plants by fusing luminescent proteins with fluorescent proteins to achieve bright and multi-coloured luminescence, and to introduce them into plants together with the biosynthetic genes of luminescent substrates. We successfully increased the luminescence by fusing a fluorescent protein to the bacterial luminescent protein. The genes coding for enhanced luminescence were introduced into liverwort, and the oxygen evolution suggested that the red luminescence may induce photosynthesis. Furthermore, we introduced fungi derived genes required autoluminescence into two higher plants, *Benthamiana tobacco* and *Arabidopsis*, and succeeded in producing artificial autoluminescent plants.

研究分野：生物物理学

キーワード：自発光植物 発光バクテリア Nanolantern 光合成 ルシフェラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物の中で植物と光合成細菌のみが太陽エネルギーを利用して水の分解によって酸素を発生し、空気中の二酸化炭素を固定して炭水化物を生産する光合成能力を有する。一方、ホタルやヤコウタケなどの発光生物は電力を一切必要とせず光を放つ化学発光の仕組み（ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応）を有することが知られている。本研究では生物発光の仕組みを植物に導入することにより人工発光自発光植物を作出し、電力を必要としない植物デバイスの基盤技術の確率を目指した。我々は、生物発光タンパク質（ルシフェラーゼ）と蛍光タンパク質をハイブリッド化し、前者から後者への高効率 FRET により発光強度を大幅に増加させた緑色発光タンパク質「ナノ・ランタン」を開発することに成功し(Nat.Comm. 2012)、その発光色変異体 (PNAS 2015) の光度を更に 10 倍程度増加させた「増強型ナノ・ランタン」の開発にも成功している (Nat.Comm. 2016)。発光バクテリア由来のルシフェラーゼ遺伝子を導入したタバコが Krichevsky らによって報告されている (PLoS ONE 2010) が、高感度カメラによる 5 分間の露光を必要とするのに対して、我々の人工発光植物は目視で発光を確認でき、高感度カメラによるビデオ撮影 (30 枚/秒) が可能な点で、桁違いに明るいことが確認された。さらに、発光生物の基質（ルシフェリン）生合成に関わる全遺伝子を導入すれば「完全人工自発光植物」を作製でき、暗黒下でも植物自らが発する光によって、世界初の「人工的に光合成を行う自発光植物」を作製できると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、バクテリアの発光タンパク質（バクテリアルシフェラーゼ）を蛍光タンパク質と融合させて発光特性の高光度化と多色化を実現し、発光基質の生合成系遺伝子群とともに植物に導入することで人工自発光植物の開発を目指した。さらに、発光色の最適化により、自ら放つ光で高効率に光合成を行わせ、太陽光に依存しない人工光合成デバイス、さらには電気エネルギーを必要としない照明デバイスの創出も目指した。自発光植物の作製と評価のための研究課題は以下となる。

- (ア) 発光バクテリアルシフェラーゼの高輝度化と多色化
- (イ) 発光ゼニゴケの光合成活性の評価
- (ウ) 高輝度自発光ラン藻の作製と光合成活性の評価
- (エ) 自発光高等植物の作製と光合成活性の評価

3. 研究の方法

上記目的に対して以下の方法を実施した。

(ア) 発光バクテリアルシフェラーゼの高光度化と多色化

発光バクテリアは発光システムの全容が解明されている二つの発光生物の一つである。luxA、luxB、luxC、luxD、luxE の 5 種類の遺伝子からなっており、そのうち luxA、luxB が発光タンパク質、luxC、luxD、luxE が発光基質生合成系の遺伝子である。本研究では、luxA、luxB を試験管内進化させるとともに、蛍光タンパク質を励起エネルギー移動(FRET)効率が最大になるようにハイブリッドさせることでオリジナルに比べて高光度化を図った。

(イ) 発光ゼニゴケの光合成活の評価

発光関連遺伝子導入植物が自ら放つ光によって光合成が誘導されるかどうかを調べるために、3色の発光ゼニゴケを用いて、発光基質添加により、暗黒条件下で光化学反応依存的に O₂ が発生することを酸素電極により測定し評価した。

(ウ) 自発光ラン藻の作製と光合成活性の評価

ラン藻への遺伝子導入のため、発光バクテリアの発光基質生合成系遺伝子群と高光度発光蛍光ハイブリッドタンパク質の遺伝子を酸素発生型の原核生物ラン藻に導入して、発光基質の添加に依存せずに発光する人工自発光ラン藻の作製を目指した。

(エ) 自発光高等植物の作製と光合成活性の評価

ゼニゴケ、ラン藻の結果をもとに、発光バクテリアの遺伝子群と高光度発光タンパク質の遺伝子を導入し、「人工的に光合成を行う自発光植物」を作製した。植物の形質転換法が確立しているシロイヌナズナ、タバコ、ペチュニアなどを利用した。形質転換ベクターは植物種に応じて作製し、自発光に必要な遺伝子群を同時に発現させるために全ての遺伝子を 1 つまた 2 つのベクターに組み込み、植物で発現・導入した。

4. 研究成果

(ア) 発光バクテリアルシフェラーゼの高輝度化と多色化

植物内で十分な明るさを発する発光タンパク質を開発するため、バクテリア発光タンパク質の遺伝子改変を行った。発光タンパク質を蛍光強度の高いタンパク質と融合させることにより、発光タンパク質の励起エネルギーが蛍光タンパク質に移動し、高輝度化することが期待される。高効率にエネルギー移動を起こさせるためには、両者の距離が重要となるため、両者の間に数種類の長さのリンカーを挿入して発光強度の高いものを選抜し、作出した融合タンパク質は蛍光タンパク質の持つ特定の色波長を発することになるため、さまざまな蛍光タンパク質を用いることにより発光色の多色化が可能となる。青緑色 (490nm) の発光を放つバクテリア発光タンパク質に黄緑色を発する蛍光タンパク質 (Venus) を融合し、高輝度化と黄色化を試みた。また、酵素などアミノ酸配列に循環置換 (circular permutation) を行うことにより酵素活性が顕著に増加することが報告されている。そこで、本研究でもバクテリア発光タンパク質に融合した黄色蛍光タンパク質の循環置換による高輝度化を試みた (図1 A)。これらの改変発光タンパク質の遺伝子を大腸菌に導入し発現させ、発光強度と波長を計測した。大腸菌における発光強度は、マルチプレートリーダーを用いることで多検体を迅速に測定することができ、FRET が起きていることが示唆され、157番目のアミノ酸配列で循環置換を行った cp157Venus 従来よりも10倍程明るく光ることが確認された (図1 B、C)。

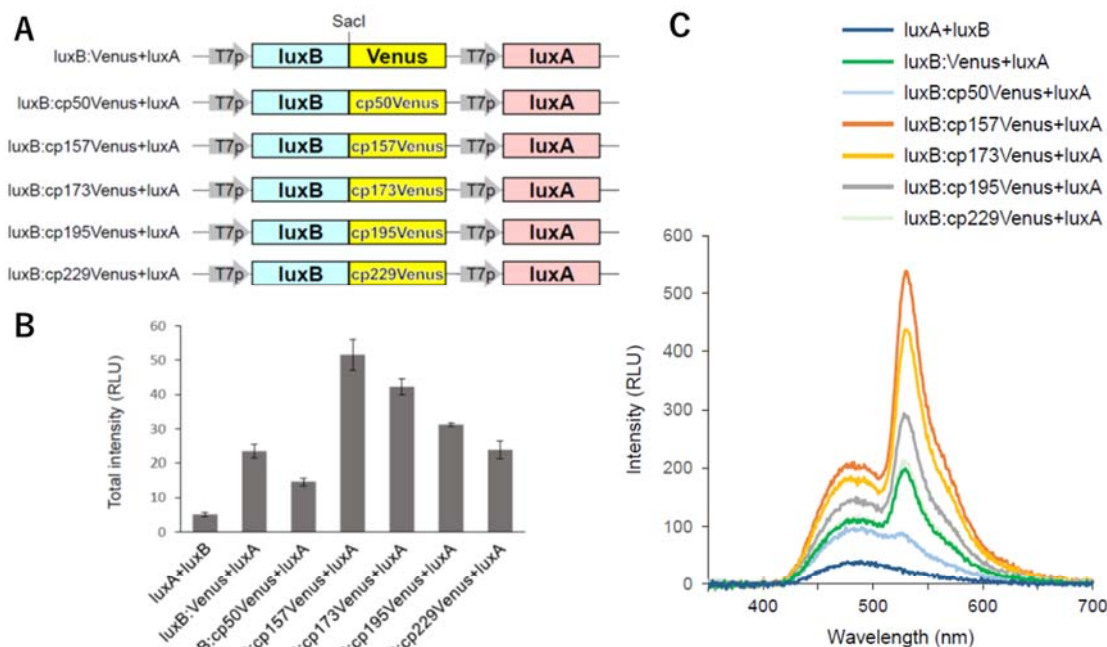


図1. バクテリア発光タンパク質の改変と発光測定。「cp」は循環置換を行ったアミノ酸位置を示している。T7pはバクテリア遺伝子発現に使われたプロモーターを示している。A)バクテリア発光タンパク質 (luxB) に黄色蛍光タンパク質 (Venus) とその変異遺伝子を融合させ作製した6つのベクター。B)各luxB-黄色蛍光タンパク質変異体の発光強度。変異体cp157が強い発光を示している。C)各luxB-黄色蛍光タンパク質変異体のスペクトラム。バクテリア発光タンパク質の発光ピーク (490nm) とVenusの蛍光ピーク (528nm) との比率からcp157変異体が効率良くFRETを起こしていることが示唆された。

(イ) 発光ゼニゴケの光合成活の評価

植物は太陽光エネルギーを利用して水と二酸化炭素から炭水化物と酸素を産生する。光合成の第一段階は葉緑体チラコイド膜でおこる。光エネルギーによりクロロフィル・タンパク質複合体で水が分解され、プロトンと酸素分子、電子が作られる。電子は電子伝達系を流れ還元型ニコチンアミドアデニン時ヌクレオチドリン酸 (NADPH) が生成し、チラコイド膜内外のプロトン勾配でアデノシン三リン酸 (ATP) が合成される。第二段階はストロマでおこる反応で、NADPH と ATP を用いて二酸化炭素を固定・還元して炭水化物が合成される。従って、光合成活性の評価は、酸素分子の発生速度、二酸化炭素の固定速度、クロロフィル蛍光測定から得られる光化学系の電子伝達速度などで評価できる。これまでに青・緑・赤の3色にそれぞれ光るゼニゴケを作出し、目視で確認出来る程明るいことが確認されている。これらの発光ゼニゴケを解析し、赤色発光ゼニゴケでは暗黒下でも、ルシフェリン添加によりクロロフィルの励起と酸素発生が起ることを発見した (図2)。このことから、植物が昼間の太陽光エネルギーを用いてATP依存的に発光基質を生成し、昼間に蓄積した基質を消費して夜間に自家発光・光合成を行うことで、昼夜を間

わずに炭素固定が可能なデバイス開発の着想を得た。しかしながら植物は暗所で光合成を行わないため、単純に発光タンパク質を導入してその発光で光合成を促しても、実際の植物内でどのような生理的反応が起こるかは予測がつかない。今後は暗所での自発光植物の二酸化炭素固定機能を評価するために二酸化炭素の放出量を測定し、野生株と比較してどの程度機能が強化されているか調べる。また、高等植物であるペチュニアでも緑色発光タンパク質の発光を確認できたため、高等植物での発光による酸素発生や二酸化炭素固定機能も評価する。

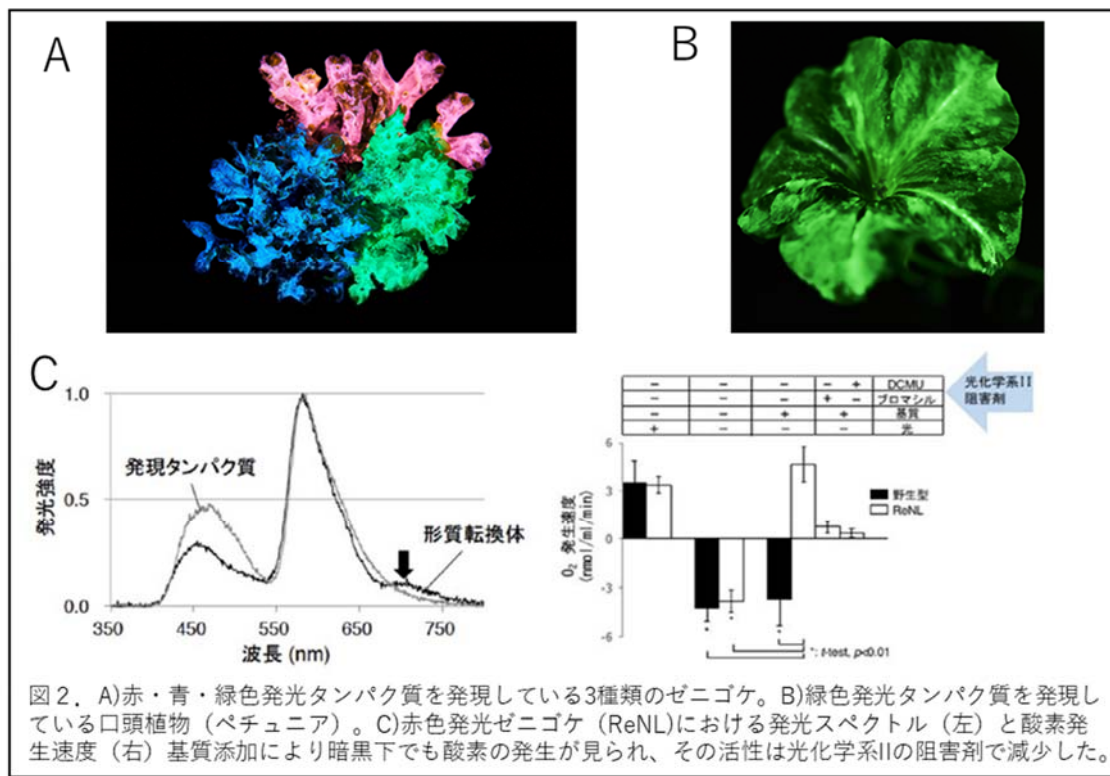


図2. A)赤・青・緑色発光タンパク質を発現している3種類のゼニゴケ。B)緑色発光タンパク質を発現している口頭植物（ペチュニア）。C)赤色発光ゼニゴケ（ReNL）における発光スペクトル（左）と酸素発生速度（右）基質添加により暗黒下でも酸素の発生が見られ、その活性は光化学系IIの阻害剤で減少した。

(ウ) 自発光ラン藻の作製と光合成活性の評価

lux 遺伝子群に含まれる luxA, luxB, luxC, luxD, luxE 遺伝子のうち発光タンパク質をコードする遺伝子は luxA, luxB であり、luxC, luxD, luxE が発光基質合成系の遺伝子である。自発光ラン藻を作製するためには、lux 遺伝子群 (luxCDABE) をラン藻 *Synechococcus elongates* PCC 7942 に導入した。ラン藻における外来遺伝子の発現コンストラクトは、通常 psbAI 遺伝子のプロモーター領域下が使われるが、機能未知遺伝子 pAM570 のプロモーター領域の下流に luxCDABE を連結したコンストラクトを発現させた結果、psbAI プロモーター制御下で発現させた系統に比べて4倍程度明るい自発光ラン藻が得られた。また、luxCDABE を IPTG 誘導型高発現プロモーター制御下で発現させた結果、IPTG の添加により輝度が4倍程度向上した。

(エ) 自発光高等植物の作製と光合成活性の評価

本研究課題では自発光植物の開発するためヤコウタケの自発光システムを植物に導入することを計画した。ヤコウタケの自発光遺伝子群は同定されているので(Kotlobay et al., PNAS 2018)、報告された情報を基に、5つの相同遺伝子 (HisP, H3H, LUZ, CPH, PPTase) のクローニングを行い、自発光植物デバイスの開発を進めることとした。既報のヤコウタケ由来のものだけでなく、ナラタケやコウジカビからも相同遺伝子を同定することに成功した。

これらの5つの遺伝子を植物に導入することで自発光するかどうかを検証するため、全て或いは一部の遺伝子をベンサミアナタバコ葉に導入した。その結果、図3に示すように全ての遺伝子を導入した領域でのみ強い発光が確認された。また、これら5つの遺伝子のうち、1つでも欠けると、発光が見られないか、弱くなることから、強い発光の為には、5つの遺伝子が全て必要であることが示された。このことは5つの遺伝子導入で植物の自発光化には必要十分であることを示しており、自発光植物デバイスの開発基盤の最も根底をなす部分のノウハウを確立することができた。

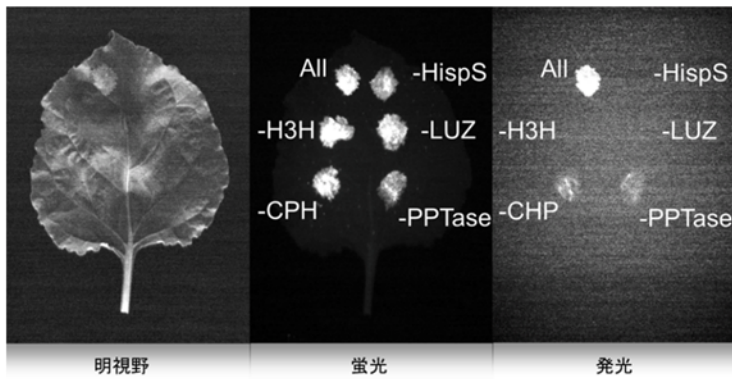


図3. タバコ葉でのヤコウタケ発光遺伝子群の発現。自発光遺伝子群 (Hisps, H3H, Luz, CPH, PPTase) をベンサミアナタバコ葉に発現させた。蛍光タンパク質Venusを形質転換マーカーとして共発現させた。5つの遺伝子を発現させたところ(全て)、発光が確認された。5つのうち4つを発現させた場合は、発光が見られないか、弱かった。蛍光タンパク質Venusを、遺伝子導入マーカーとして共発現させた。

次に考慮すべきは、安定的に5つの遺伝子を発現させる技術の確立である。図3では5つの遺伝子を別々のベクターに乗せて細胞に導入したが、最も単純で低コストな方法は1つの遺伝子導入ベクターに5つの遺伝子を載せて細胞に導入することである。そこで5つの遺伝子を連結し、連結部位に自己切断活性を持つP2Aペプチドの遺伝子配列を挿入した、ポリシストロニック*発現ベクターを構築し、ベンサミアナタバコ葉に導入した。しかしながら、発光が全く確認できなかった。

*ポリシストロニックとは1本のmRNAに複数のタンパク質をコードしていること

次に、2つの遺伝子導入ベクターで5つの遺伝子を導入できるように、ベクターの構築を行った。一方のベクターにはHispsとLUZを、もう一方のベクターにはH3H、CPH、PPTaseを挿入した。これら二つのベクターを同時にベンサミアナタバコ葉に導入したところ、発光が認められた。しかもその発光強度は目で確認できるほどの明るさであった。また、観察した限りにおいて発光が数週間に渡って持続すること、植物の生育に影響がないことも確認できた。さらに、5つの遺伝子全てを1つのベクターに挿入し、2つのベクターと変わらない発光をベンサミアナタバコ葉で確認出来た。5つの遺伝子を別々のベクターに載せて植物細胞に導入した場合に比べ、飛躍的な発光強度の上昇が見られたことから、自発光植物を構築する基盤技術となると考える。



図4. (上)ヤコウタケの自発光遺伝子群をベンサミアナタバコで一過性発現させた様子。(下)ヤコウタケの自発光遺伝子群をゲノムに導入した遺伝子組み換え体シロイヌナズナ(左:明視野、右:暗所での自発光)。

上記は、植物細胞に導入した遺伝子がゲノムに取り込まれて自発光に必要なタンパク質が合成されている訳ではなく、あくまでもゲノムに取り込まれていない遺伝子が一過的に発現したことによるものである。永続的かつ安定的に自発光する植物を作成するにはこれら5つの遺伝子をゲノムに導入する必要がある。上記の結果から、ゲノムに導入したい5つの遺伝子を1つのベクターに挿入し形質転換を行えば、効率よく自発光する植物を作成できる。そこで、ゲノムへの遺伝子導入法が確立しているシロイヌナズナを利用してゲノムへの遺伝子導入を行った。5つの遺伝子を導入した自発光シロイヌナズナの作出に成功した(図4)。

また、さらなる発光強度の向上を目指して、奈良先端科学技術大学院大学の加藤晃准教授が開発した、植物細胞での組換えタンパク質の発現量向上技術の導入を検討している。さらに、ルシフェラーゼ (LUZ) へのランダム変異導入や、当研究室が得意とする蛍光量子収率の高い蛍光タンパク質への励起エネルギー移動 (FRET) によって、熱として放出されるエネルギーを光に変換して発光色の変換や発光強度を増強することも検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 15件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Kenji Osabe, Megumi Iwano, Ryuichi Nishihama, Kazushi Suzuki, Sakiko Ishida, Tomomi Kaku, Takayuki Kohchi, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Sunlight independent plant cell photosynthesis by self-contained bioluminescence
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 健治
2. 発表標題 発光タンパク質が拓く未来社会
3. 学会等名 大阪大学名誉教授会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atika H Rahasta , Quang Tran, Megumi Iwano, Takayuki Kohchi, Kenji Osabea, and Takeharu Nagai
2. 発表標題 Self Photosynthesis Plant for Space Farming
3. 学会等名 The 23rd SANKEN International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 光るタンパク質が拓く未来社会
3. 学会等名 北海道大学 公共政策大学院 第6回文理融合セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Quang Tran, Kenji Osabe, Takeharu Nagai
2. 発表標題 Visualization of cell wall pH in Arabidopsis thaliana root by genetically encoded chemiluminescent
3. 学会等名 The 61st Annual meeting of the Japanese Society of Plant Physiologists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Kenyo Kaneko, Hiroshi Ito, Takao Kondo
2. 発表標題 KaiCの代謝速度のリズムへの影響とK a i Cの分解に関連する因子の探索
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 今井圭子 北山陽子 藤原正幸 金子健陽 伊藤浩史 近藤孝男
2. 発表標題 Search for proteins involved in the degradation of KaiC and the effect on rhythm by KaiC turnover.
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2018年～2020年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 蛍光・化学発光タンパク質の開発と社会実装への展開
3. 学会等名 第 59 回公開講演会（繊維技術）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩野 恵、永井 健治
2. 発表標題 ライブイメージングのための高光度発光植物の開発
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagai T.
2. 発表標題 Various Application of Super-duper Chemiluminescent Proteins:From Bioimaging to Glowing Plants.
3. 学会等名 Special Lecture (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠田肇
2. 発表標題 化学発光3Dイメージングに向けたデジタルホログラフィー顕微鏡の開発
3. 学会等名 第二回 ルミノジェネティクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 高光度発光タンパク質が拓く未来社会
3. 学会等名 特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 高光度発タンパク質を利用したバイオイメーjing
3. 学会等名 特別講義 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 高光度化学発光タンパク質が可能にする次世代バイオイメーjing
3. 学会等名 第36回分子病理学研究会 「フェニックスシンポジウム in 宮崎」 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治、岩野恵
2. 発表標題 化学発光タンパク質「ナノ・ランタン」による新たな価値の創造
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 多彩なナノランタンで未来の世界を彩る
3. 学会等名 2017年光化学討論会・市民公開講座「バイオイメーjing最前線講演会」 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井健治
2. 発表標題 高光度化学発光タンパク質の様々な応用展開ーバイオイメージングから発光植物までー
3. 学会等名 2017年応用物理学会秋季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今井圭子、北山陽子、藤原正幸、伊藤浩史、近藤孝男
2. 発表標題 KaiCの代謝速度のリズムへの影響と関連する因子の探索
3. 学会等名 第22回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagai T.
2. 発表標題 Bioluminescent probes for multi-purpose use in wide range of bioimaging
3. 学会等名 8th Asia and Oceania Conference on Photobiology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagai T.
2. 発表標題 Various applications of super-duper bioluminescent proteins: From bioimaging to glowing plants
3. 学会等名 29th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 服部 満、小澤 岳昌、永井 健治
2. 発表標題 3次元発光イメージングを利用した生細胞観察法の開発
3. 学会等名 2017年度 人・環境と物質をつなぐイノベーション創出 ダイナミックアライアンスG3 分科会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永井 健治
2. 発表標題 化学発光が拓く次世代バイオフォトニクス
3. 学会等名 第10回つくばがん研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagai T.
2. 発表標題 Super-duper bioluminescent probes for next generation neuroscience. (plenary session)
3. 学会等名 SPIE Photonic West BIOS 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nagai T.
2. 発表標題 Vivid Application of Super-duper Chemiluminescent Proteins - From Bioactivity Imaging to Glowing Plants.
3. 学会等名 Bioengineering Seminar Series（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Imai, Yohko Kitayama, Masayuki Fujiwara, Takao Kondo
2. 発表標題 Search for proteins involved in the degradation of KaiC and the effect on rhythm by KaiC turnover.
3. 学会等名 第59回 植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井 健治
2. 発表標題 光る生きものの研究 -研究って面白い!-
3. 学会等名 特別講義(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井 健治
2. 発表標題 化学発光イメージングの応用例
3. 学会等名 第3回化学発光イメージングワークショップ
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	岡野 圭子 (今井圭子)	関西医科大学・医学部・講師	
	(Okano Keiko)		
	(90454610)	(34417)	