

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14361

研究課題名（和文）多基質・多酵素の共進化で実現する人工多色生物発光システムのバリエーション増加

研究課題名（英文）Development of orthogonal luciferin-luciferase pair for multi color bioluminescent imaging.

研究代表者

岩野 智 (Iwano, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：10734832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ホタル生物発光反応に基づく同時使用可能なマルチカラー人工生物発光反応の開発を目指し、研究を行った。結果、直交する青色基質/青用酵素と赤色基質/赤用酵素という2つのペアの開発に成功し、培養細胞を利用した2色の発光イメージングに成功した。観察の結果、培養細胞レベルでも、使用可能な明るさで、かつ、独立して利用できることから、実用性の高い技術の基盤となるであろう。現在、緑色基質に対応した緑用酵素の開発を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物発光イメージング技術開発が行われているが、一つの課題として、同時利用可能な生物発光システムが少ないことがある。自然界に存在する発光生物の発光メカニズム解明から実用に至るプロセスには膨大な時間を必要とする。そのため生物発光システムのバリエーションが短期間で増加するというのは考えにくい。本研究でホタルルシフェリンの構造改変により、開発したルシフェリンアナログライブラリに対し、特異性を高めた酵素変異体を作製し、直交する生物発光反応を人工的に創出する事ができた。今後、人工基質/人工酵素のペアをどんどん創出する事で、生物発光システムのバリエーションを飛躍的に増加させるという方向性を示す事ができた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop an orthogonal multi-color engineered bioluminescence reaction based on firefly bioluminescence reactions.

As a result, two luciferin-luciferase pairs were developed, one in red and one in blue. These two orthogonal bioluminescence reactions were used for dual color bioluminescence imaging. We are currently developing a green luciferin-luciferase pair.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物発光 直交性 基質 酵素 イメージング

1. 研究開始当初の背景

生物発光イメージングは発光基質ルシフェリンが酵素ルシフェラーゼにより酸化され、生じる発光シグナルを利用する手法である。励起光照射を必要としないことから S/N 比が高い、光毒性を回避できるなど、蛍光を利用する方法とは異なる特性をもつことから、生命科学研究への応用が加速しつつある。

様々な生物発光イメージング技術開発が行われているが、一つの課題として、同時利用可能な生物発光システムが少ないことがある。複数の生命現象を同時に可視化するという極ありふれたニーズであるが、生物発光イメージングにおいては、基質交叉性や波長が問題で、実際に同時利用可能な発光システムは 2-4 種類程度に限られる。自然界に存在する発光生物の発光メカニズム解明から実用に至るプロセスには膨大な時間を必要とする。そのため生物発光システムのバリエーションが短期間で飛躍的に増加するというのは考えにくい。

ホタルの生物発光システムは発光の安定性、定量性の高さから、特に長期間観察が必要なリズム遺伝子の発現モニタや動物個体でのルシフェラーゼ発現細胞の非侵襲イメージングに強みがあり、生命科学分野において最も利用される生物発光システムの一つである。この生物発光システムは発光基質ホタルルシフェリンと酵素ホタルルシフェラーゼで構成され、発光反応の結果、黄緑色 ($\lambda_{\max} = 565 \text{ nm}$) で発光する。

これまでに、我々はホタルルシフェリンの化学構造改変により、可視光をほとんど網羅するような発光アナログの開発に成功している。今回、これらのアナログに対応した特異的に発光活性を示すホタルルシフェラーゼ変異体を作製し、直交する基質アナログ-酵素変異体ペアによる独立した人工生物発光システムを創出し、生物発光システムバリエーションを飛躍的に増加させるという事を目指し研究を行った。



図1 直交する基質アナログ・酵素変異体ペアで生物発光システムを増加させる

2. 研究の目的

概念実証として赤色発光基質、緑色発光基質、青色発光基質にだけ発光活性を有する酵素変異体を試験管分子内進化法により作製し、ホタル生物発光システムを基盤としたマルチカラーの人工生物発光システムの開発を目的とした。目的達成のために、試験管内分子進化法による特定基質でのみ発光活性を示す酵素変異体の作製と発光イメージングへの応用に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 試験管内分子進化法による各種発光基質アナログ特異的に発光活性を有する酵素変異体の作製

ルシフェラーゼ全長に対してランダム変異導入を行い、その後、得られた変異アミノ酸に対して部位特異的変異導入を行い、アミノ酸を最適化するという方法で進める。独自の基質噴霧システムと大腸菌発現系を使った変異ルシフェラーゼのハイスループットスクリーニング技術を活用して、RGB 酵素開発を進める。最初に市販の 7 種類のルシフェラーゼから、RGB 酵素候補を選定し、その後、それぞれのルシフェラーゼに対

して上記2段階の変異導入を以下のようなワークフローで繰り返し行いながら、それぞれの基質の発光に重要なアミノ酸の情報などを蓄積、解析していく。

(2) 複数の基質・酵素ペアによる独立した発光イメージング

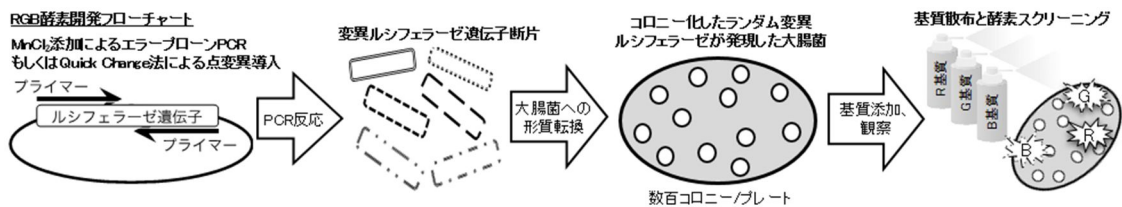


図2 実験の流れ

開発した RGB 酵素候補群を in vitro のデータや培養細胞系での明るさなどを加味して、RGB 酵素を選定する。RGB 酵素が発現する培養細胞に対応する基質を添加し、発光顕微鏡でそれぞれの発光を観察する。蛍光タンパク質の蛍光強度で細胞内での発現量を定量し、単位タンパク質辺の明るさ、定量性を評価する。

4. 研究成果

(1) 試験管内分子進化法による各種発光基質アナログ特異的に発光活性を有する酵素変異体の作製

市販されている発光甲虫由来酵素はホタル由来の4種(luc2, SLG, SLO, SLR)とヒカリコメツキムシ由来のCBG, CBR, E-luc という7種類存在する。まず、これらの酵素と発光基質アナログライブラリの掛け合わせによる発光活性評価(一次スクリーニング)を行った。その結果、赤色基質においては、ヒカリコメツキムシ由来酵素では発光活性が非常に低く、ホタル由来酵素では発光活性が比較的高い事が明らかになった。逆に、青色基質はホタル由来酵素では発光活性が非常に低く、ヒカリコメツキムシ由来酵素では発光活性が高いということがわかった。緑色基質は、どの酵素においても、平均的な発光を示した。

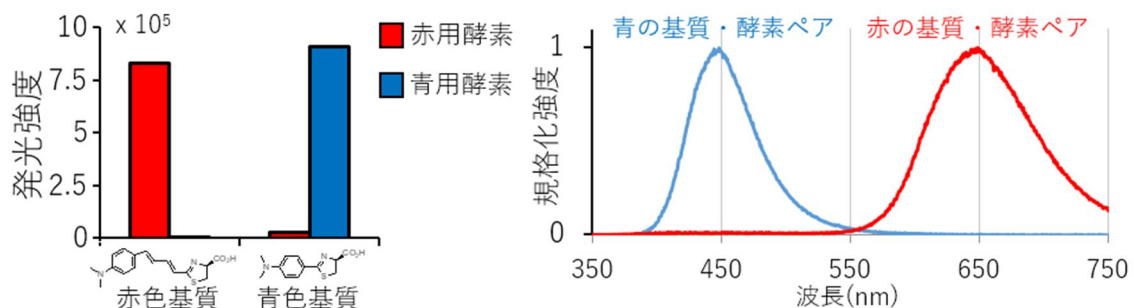


図3 直交する赤・青の基質酵素ペアの発光強度と発光スペクトル

生物発光イメージングにおいては、蛍光イメージングと違い励起光によるたたき分けが難しい。今回、それぞれの発光を十分に分離可能な赤 ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$) と青 ($\lambda_{max} = 450 \text{ nm}$) の2つの基質・酵素ペアを開発することに注力した。一次スクリーニングの結果から、幾度かのランダム変異導入とスクリーニングを行い、赤色基質に対応する赤用酵素と青色基質に対応する青用酵素の作製した(図3)。赤用酵素は赤色基質だけを特異的に発光させ、青用酵素は青色基質だけを特異的に発光させる。ホタル生物発光システムを基に、2つの独立した人工基質/人工酵素ペアを作り出す事に成功した。

(2) 複数の基質・酵素ペアによる独立した発光イメージング

実際に2つのペアで独立に発光イメージング可能かどうかを HeLa 細胞に蛍光タンパク質を融合した赤用及び青用酵素をそれぞれ発現させて、発光顕微鏡を用いたイメージングを行った。2色の蛍光タンパク質により、それぞれの酵素の発現を確認し、その

後，赤色/青色基質の混合液を培地に添加し，それぞれペアから放出される赤色/青色発光を光学フィルターで分割し，その発光性能を評価した．観察の結果，培養細胞レベルでも，使用可能な明るさで，かつ，独立して利用できることから，実用性の高い技術の基となると考えている．

現在，緑色基質に対応した緑用酵素の開発を進めており，これを合わせて基質酵素が独立した RGB のマルチカラーの発光イメージング技術に繋げるべく，研究を進めている．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 Saito Ryohei, Kuchimaru Takahiro, Higashi Shoko, Lu Shijia W., Kiyama Masahiro, Iwano Satoshi, Obata Rika, Hirano Takashi, Kizaka-Kondoh Shinae, Maki Shojiro A.	4. 巻 92
2. 論文標題 Synthesis and Luminescence Properties of Near-Infrared N-Heterocyclic Luciferin Analogues for In Vivo Optical Imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 608 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20180350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史	4. 巻 Vol. 36, No. 19
2. 論文標題 in vivo生物発光イメージングのすゝめ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3273-3281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitada Nobuo, Saito Ryohei, Obata Rika, Iwano Satoshi, Karube Kazuma, Miyawaki Atsushi, Hirano Takashi, Maki Shojiro A.	4. 巻 32
2. 論文標題 Development of near infrared firefly luciferin analogue reacted with wild type and mutant luciferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 922 ~ 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.23236	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 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史	4. 巻 なし
2. 論文標題 動物にやさしいin vivo発光イメージング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学 別冊 発光イメージング実験ガイド	6. 最初と最後の頁 182-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史	4. 巻 70(3)
2. 論文標題 ライフサイエンス指向のホタル発光進化研究-高感度 in vivo生物発光イメージング技術AkaBLI-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 244-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生命科学研究を志向してホタル生物発光反応を進化させる
3. 学会等名 第26回農芸化学Frontiersシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Iwano
2. 発表標題 AkaBLI: An all-engineered bioluminescence system for highly sensitive in vivo imaging
3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of Chemical Society of Japan/Asian International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史
2. 発表標題 高輝度人工生物発光システムの開発と in vivo生体機能イメージングへの展開
3. 学会等名 第21回酸素ダイナミクス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史
2. 発表標題 in vivo生物発光イメージングを革新する新技術AkaBLI
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成30年度 若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生命科学研究を志向してホタル生物発光反応を進化させる
3. 学会等名 細菌学若手コロッセウム in YAMAGATA (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生命科学研究を志向してホタル生物発光反応を進化させる
3. 学会等名 生物発光化学発光研究会 第35回学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生命科学研究を志向してホタル生物発光反応を進化させる
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史
2. 発表標題 AkaBLI: An innovative technology for in vivo bioluminescence imaging
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会・第19回日本蛋白質科学会年会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 in vivo生物発光イメージングの新技术AkaBLI
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 智, 牧 昌次郎, 宮脇 敦史
2. 発表標題 in vivo生物発光イメージングを革新する新技术AkaBLI
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会
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
---------	---------------------------	-----------------------	----