

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15421

研究課題名(和文) 特異性を重視したヒトタンパク質発光検出プローブの創製

研究課題名(英文) Development of luminescence probes for specific detection of human proteins

研究代表者

西原 諒 (Nishihara, Ryo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50846988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非発光タンパク質の潜在的なルシフェラーゼ活性探索を目的として、イミダゾピラジノン型ルシフェリン(HuLumino1)を設計・合成した。HuLumino1は、ヒト血清アルブミン(HSA)とのみ発光し、他のタンパク質は発光しない。HuLumino1の高い特異性を利用すると、試料の前処理を必要とせず、酵素免疫測定法の誤差5%以内でHSA量を定量することができた。これらの結果は、一般に酵素として機能しないタンパク質を非標識に検出するためのタンパク質分析用新規プラットフォームの利点を示すものである。更にこの「ルシフェラーゼ非依存型」生物発光アッセイは、銅イオン等、他のバイオマーカー検出にも利用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非発光タンパク質と発光反応を起こす人工型ルシフェリンを開発する独自の研究アプローチで、ルシフェリンを混合するだけで、特異的かつ迅速に、更には従来法(ELISA)と同等の感度で目的タンパク質または低分子バイオマーカーを発光検出できる新規分析技術の基礎基盤を確立する事に成功した。本技術は、従来のタンパク質分析技術とは原理的にも全く異なるもので、今後のタンパク質分析技術の発展に大きく貢献するものだと考える。

研究成果の概要(英文)：We report the design and synthesis of an imidazopyrazinone-type luciferin, Human Luminophore1 (HuLumino1), with the aim of unmasking the latent luciferase activity of non-luminous proteins. The investigation of reaction behavior of HuLumino1 for the biological proteins revealed that only human serum albumin (HSA) led to a distinct luminescent enhancement, while other proteins resulted in no emission. HSA levels were quantified within 5% error margins of an enzyme-linked immunosorbent assay without the need for any sample pretreatments because of the high specificity of HuLumino1. These results indicate the advantages of the novel platform for protein analysis to detect non-labeled proteins, which generally do not function as enzymes. In addition, the "luciferase-independent" luminescence assay can also be used to detect other biomarkers, such as copper ions.

研究分野：分析化学

キーワード：生物発光 ルシフェリン ルシフェラーゼ タンパク質 酵素反応 化学センサー 発光

1. 研究開始当初の背景

タンパク質定量分析技術には、タンパク質の 280 nm の紫外光吸収特性を利用した紫外吸光度法や銅の還元反応を利用した BCA 法など用途に応じた多種多様な検出方法があるが、これらの分析法は核酸やリン脂質などの他の生体分子が分析の弊害となる。現状、比色及び蛍光法に基づくタンパク質の分析法は、いずれもサンプル前処理が必要であり、簡便かつ高感度にタンパク質をあらゆる組成の溶液で定量及び定性分析する手法としては十分でない。

2. 研究の目的

本研究は、サンプル前処理なしにタンパク質を高感度検出する新奇分析手法の確立を目指し、その検出原理として化学反応で自発的に光を放つ生物発光に着目した。ホタルをはじめ殆どの発光生物は、発光基質(ルシフェリン)の酸化反応を発光酵素(ルシフェラーゼ)が特異的に補助する酵素反応によって光を産生する。一方で発光オワンクラゲにも含まれる海洋発光生物由来の発光基質セレンテラジン(CTZ)はルシフェラーゼだけでなく、ウシ血清アルブミンやインスリンとも非特異的発光反応を示す事が知られている。これは発光過程に補因子を必要としない CTZ のシンプルな発光反応機構に由来する。

筆者はこれまでに、発光生物由来のルシフェラーゼに適した CTZ 誘導体を合成する事で、体内イメージングを可能にする高感度生物発光イメージングプローブを開発してきた(①)。本研究では、ルシフェラーゼではなく、ヒト由来タンパク質に適合するルシフェリンを開発する事で、本来ルシフェラーゼとして機能しなかったタンパク質も発光タンパク質として機能するのではと考えた。この独自の知見を基に、任意のタンパク質と特異的発光を示す CTZ 分子設計指針を確立し、酵素反応に基づく簡便で迅速かつ高感度なタンパク質発光分析法を開発した。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼではないタンパク質で発光する人工ルシフェリンの創出(②③):

従来の生物発光法では、発光生物由来酵素ルシフェラーゼを利用する必要があるが、本研究ではヒト由来タンパク質を直接発光酵素として利用する人工ルシフェリンを創出する事で、それから得られる発光シグナルで定量する独自の発光検出法の開発を目指した。

(2) ヒト血清アルブミン発光の応用展開(④):

発光触媒(ルシフェラーゼ)機能を持つ HSA は、通常 38 mg/mL 以上血清中に豊富に存在するタンパク質である。HSA を発光レポーターとして利用する事で、タンパク質以外のバイオマーカーを発光検出する基盤技術を創出した。

4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼではないタンパク質で発光する人工ルシフェリンの創出:

はじめに、ルシフェリン酸化発光反応を触媒し得るヒト由来タンパク質探索から開始した。発光測定に用いる基質ルシフェリンは、ATP やマグネシウムを発光反応に必要とするホタルルシフェリンではなく、海洋発光生物種由来で、発光反応に酸素分子以外の補因子を必要としない CTZ と本研究で新規合成した CTZ 誘導体 50 種を活用した。種々の内因性タンパク質と側鎖化学構造の異なる合成 CTZ 誘導体 50 種類を混合して発光強度を評価した。その結果、特にヒト血清アルブミン(HSA)で CTZ 誘導体が比較的強く発光することを見出した(図 1(i))。更に HSA と高い親和性を持

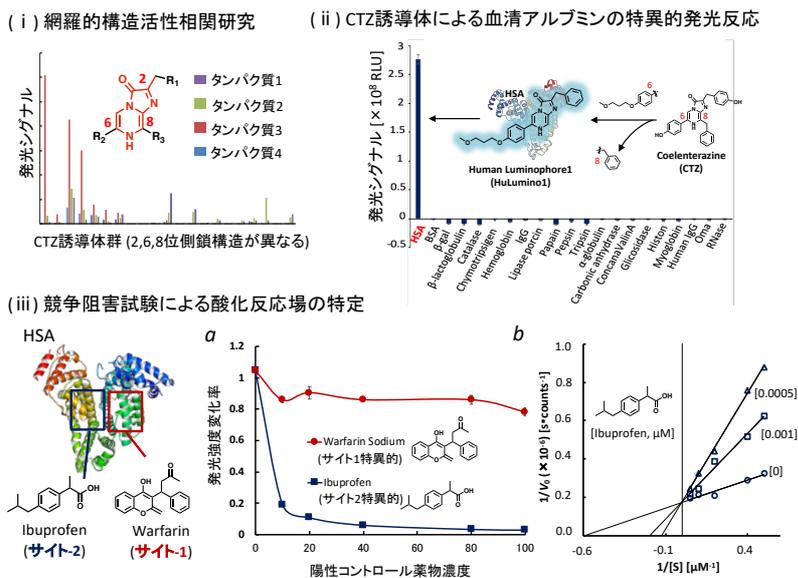


図 1 (i) 発光測定による構造活性相関研究 (ii) ヒト血清中でも特異的に反応。BSA にも反応しない。(iii) 競争阻害反応による反応場の特定 (a: サイト 2 が発光反応場 b: Lineweaver-Burk plot でも確認)

つ官能基を導入した新規 CTZ 誘導体については、相同性の高いウシ血清アルブミン (BSA)では反応せず、HSA と特異的かつ高輝度発光を示す事が判明した(図 1(ii))天然の CTZ の 6,8 位炭素における側鎖構造を改変した誘導体: Human Luminophore1 [HuLumino1]。その発光反応は HSA と極めて特異的に進行し、その他 20 種類のタンパク質との発光シグナルは得られなかった(図 1(ii))。以上の結果より、内因性タンパク質である HSA の新たな触媒機能(ルシフェラーゼ機能)を世界で初めて見出す事に成功したと言える。次に酸化発光反応場の特定と酵素反応速度定数を算出する事で、HSA ルシフェラーゼ機能を詳細に評価した。HSA は、血清中に最も多く含まれる単純タンパク質であるが、DDS(ドラッグデリバリーシステム)の薬物担体としても機能するマルチ機能タンパク質でもある。発光生物由来ルシフェラーゼとは異なり、薬物との共結晶構造も報告されており、薬物結合サイトが明らかとなっている(図 1(iii))。HSA 薬物結合サイトはサイト 1 と 2 に大別され、それらを構成するアミノ酸も知られている。そこで陽性コントロール薬物 (Warfarin はサイト 1、ibuprofen はサイト 2 に各々特異的に結合)と HuLumino1 との競争阻害試験を実施した所、ibuprofen が発光反応を阻害した一方で warfarin の影響は見られなかった(図 1(iii a))。更に Lineweaver-Burk plot より ibuprofen が拮抗阻害を示した事により(図 1(iii b))、発光反応場は薬物結合サイト 2 である事が判明した。

また Molecular Operating Environment(MOE)を用いた HuLumino1 と HSA のドッキングシミュレーション結果は、図 1 で見出した HuLumino1 が薬物結合サイト 2 に結合する結果を支持した(図 2)。次に、全空間に放出される全光子数測定が可能な積分球式分光測定装置を用いて校正した発光ルミノメータを用いて酵素反応速度定数(基質の酵素親和性を示すミカエリスメンテン定数 K_m と代謝回転速度 k_{cat})を算出した結果、HuLumino1 と HSA における K_m , k_{cat} は、天然の生物発光系(レニラ生物発光系:酵素レニラルシフェラーゼと基質 CTZ より構成される天然の発光系)と同等である事も判明した(表 1)。即ち、HSA のようなヒトタンパク質が、生物発光イメージング研究にも利用される発光酵素ルシフェラーゼ同様に発光分子の酸化反応を高効率に触媒していることが分かった。

最後に HuLumino1 の特異的発光反応を利用した ヒト血清中のアルブミン定量分析を実施した。血清中 HSA は低濃度(<35 mg/mL)になると、肝硬変や慢性肝炎を引き起こす原因となる。現状、プロモクレゾールグリーン (BCG) による比色法や ELISA 法が主な検出法に挙げられるが、前者では他のタンパク質との交差反応が見られ、後者では複雑な測定操作に伴い 2-3 時間もの測定時間を要する。本研究で開発したルシフェリン最大の特長は、標的タンパク質を特異的に分子認識、酸化反応に伴い自発的かつ迅速に光を放

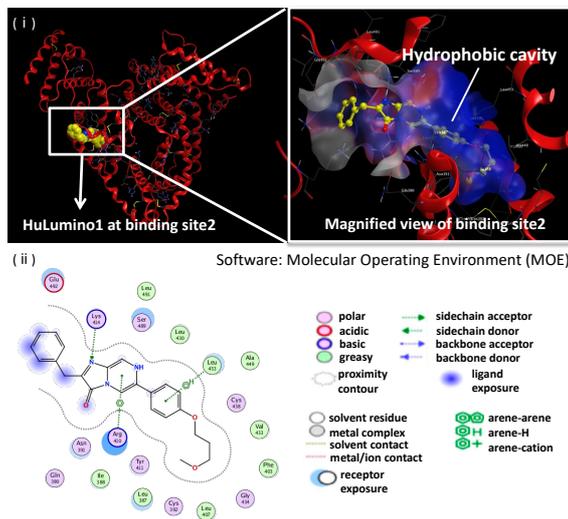


図 2 HuLumino1 と HSA のドッキングシミュレーション (i) HuLumino1 が薬物結合サイト 2 の疎水場と相互作用する様子 (ii) HuLumino1 とアミノ酸残基との相互作用

表 1 HSA とルシフェリンの酵素反応速度定数

Pair	K_m^a [μM]	k_{cat}^b [s^{-1}]
CTZ/HSA	25.3 ± 5.2	2.75 ± 0.3
HuLumino1/HSA	4.28 ± 1.24	0.30 ± 0.06

^{a,b} Errors represent standard error of the mean values for triplicate experiments.
^a Michaelis-Menten constant (K_m) values were determined by Lineweaver-Burk plots via measurements of initial rates of light emission over a range 0.5 to 20 μM .
^b Turnover rate (k_{cat}) values were calculated by dividing maximum velocity (V_{max}) by the φ_{BL} . The V_{max} were determined by Lineweaver-Burk plots.

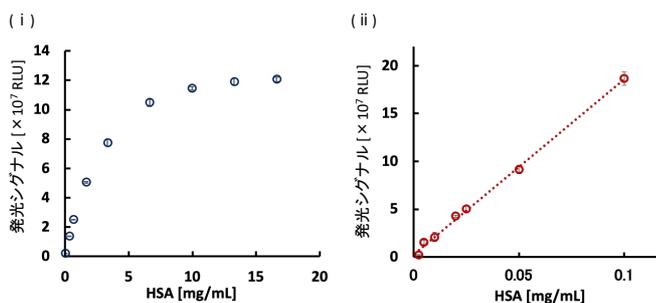


図 3 HSA 濃度依存的な HuLumino1 の発光強度変化(i) HSA(0-17 mg/mL), HuLumino1(20 μM), PBS, $n = 4$ (ii)HSA(0-0.1 mg/mL), HuLumino1(20 μM), PBS-diluted plasma (100-fold), $n = 4$

表 2 血清中の HSA アッセイ

Amount of HSA added (mg/mL)	HSA (mg/mL) determined by developed method ^a	HSA (mg/mL) determined by ELISA	Recovery (%)
0	39.0 ± 3.1	41.0 ± 3.6	95.2
1	44.5 ± 0.5	ND	106.1
2.5	45.2 ± 0.5	ND	104.1

ND: Not Determined.
^a Conditions: HuLumino1 (20 μM) in PBS-diluted serum (1000-fold, 10 mM, pH7.4)

出できる点である。ルシフェリンの発光強度は、HSA 濃度に依存的である(図 3(i, ii))。サンプル前処理なしに、HuLumino1 添加後、わずか 1 分の測定時間で血清中の HSA を定量した結果、ELISA 法で得られた結果と良く一致した(表 2)。発光試薬の添加のみで任意のタンパク質を特異的に検出できる本技術は、従来のタンパク質分析技術とは原理的にも全く異なるものであり、今後のタンパク質分析技術の発展に大きく貢献するものだと考える。

(2) ヒト血清アルブミン発光の応用展開：

HSA の発光レポーター機能を利用して、タンパク質以外のバイオマーカー検出法を開発した。ルシフェリン HuLumino1 の 3 位カルボニル基に TPA リガンドを修飾した誘導体(TPA-H1)を設計合成した。ルシフェリン中心骨格であるイミダゾピラジノン環 3 位カルボニル基は酸化反応に関与する重要部位であるため、この部位へのリガンド導入は、HSA との発光反応を阻害する。一方で、TPA リガンドは 1 価の銅イオンを特異的に捕捉する事が知られているため、銅イオン捕捉に伴うリガンドの酸化脱離反応で、HuLumino1 が再生され、結果として HSA による発光シグナルが得られる(図 4(i))。即ち、HSA による発光シグナルで間接的に銅イオンの検出が可能となる。実際にグルタチオン(還元型)存在下において、TPA-H1 の各金属イオンとの反応性を検討した結果、図 4(ii)に示す通り、銅イオンに選択的に反応し、発光シグナルを得ることができた。また TPA-H1 の発光強度は、銅濃度依存的である。血清中の銅イオン濃度も、サンプル前処理なしに、TPA-H1 添加後、測定時間 1 分で定量する事に成功した(表 3)。血清銅、特に遊離銅の異常高値は Wilson 病や Menkes 病のバイオマーカーになる。簡易さの観点からも、本技術がこれらバイオマーカーの新規検出手法として今後ますます利用される事を期待する。

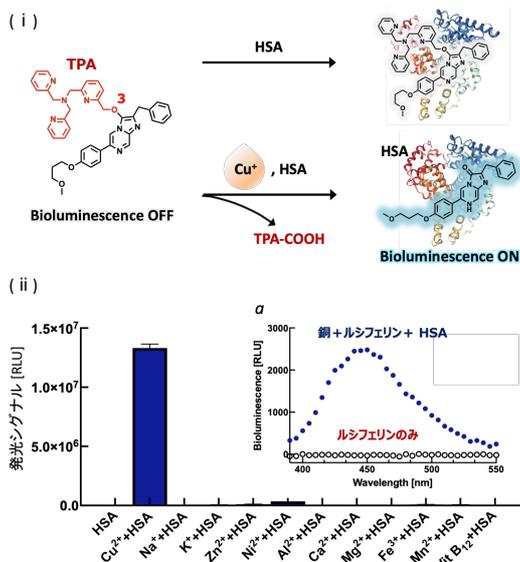


図 4 (i) 検出原理：TPA リガンドが結合している状態では発光反応は起きないが、銅イオン存在下で TPA リガンドが脱離すると HSA とルシフェリンが発光反応を起こす。(ii)選択性：各金属イオン存在下におけるルシフェリン誘導体 (TPA-H1)の発光[挿入図a:TPA-H1 の発光スペクトル]

表 3 血清中の銅アッセイ (添加回収試験)

CuCl ₂ added [μM]	Bioluminescent assay ^a [μM]	Assay kit ^b	Recovery (%)
0.5	0.54 ± 0.00	0.52 ± 0.00	94.3
2.5	2.49 ± 0.05	2.60 ± 0.41	95.8
5	4.82 ± 0.05	5.00 ± 0.62	96.4

^a TPA-H1 (20 μM) in HEPES-diluted serum (10 mM, pH7.4)
^b Metallogenics (CU04M)

<引用文献>

- ① Nishihara, R., Paulmurugan, R., Nakajima, T., Yamamoto, E., Natarajan, A., Afjei, R., Hiruta, Y., Iwasawa, N., Nishiyama, S., Citterio, D., Sato, M., Kim, S., and Suzuki, K.: Highly bright and stable NIR-BRET with blue-shifted coelenterazine derivatives for deep-tissue imaging of molecular events in vivo, *Theranostics*, 9, 2019, 2646-2661.
- ② Nishihara, R.*, Niwa, K., Tomita, T., and Kurita, R.*: Coelenterazine Analogue with Human Serum Albumin-Specific Bioluminescence, *Bioconjugate Chemistry*, 31, 2020, 2679-2684.
- ③ Nishihara, R.*, Niwa, K., Tomita, T., and Kurita, R.: Design of Coelenterazine Analogue to Reveal Bioluminescent Reaction of Human Serum Albumin, *IntechOpen*, 2021, Book chapter in *Bioluminescence*, Editor: Suzuki, H., 13 pages.
- ④ Nishihara, R.*, and Kurita, R.*: Mix-and-read bioluminescent copper detection platform using a caged coelenterazine analogue, *Analyst*, 146, 2021, 6139-6144.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Nishihara Ryo, Niwa Kazuki, Tomita Tatsunosuke, Kurita Ryoji	4. 巻 31
2. 論文標題 Coelenterazine Analogue with Human Serum Albumin-Specific Bioluminescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 2679 ~ 2684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00536	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 Nishihara Ryo, Kurita Ryoji	4. 巻 146
2. 論文標題 Mix-and-read bioluminescent copper detection platform using a caged coelenterazine analogue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 6139 ~ 6144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1AN01292D	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nishihara Ryo, Niwa Kazuki, Tomita Tatsunosuke, Kurita Ryoji	4. 発行年 2021年
2. 出版社 IntechOpen	5. 総ページ数 13
3. 書名 「Design of Coelenterazine Analogue to Reveal Bioluminescent Reaction of Human Serum Albumin」 Book chapter in Bioluminescence	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 発光基質化合物	発明者 西原諒、栗田僚二	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-046137	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------