

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21851

研究課題名（和文）生体内分子イベントを指標とした老化要因物質の高速発光判定基盤技術の創成

研究課題名（英文）Development of a high-speed luminescence assay of aging chemicals based on molecular events in living subjects

研究代表者

金 誠培（KIM, SUNG BAE）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：60470043

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）：本研究期間中、まずデータベース規模（約5万種）の化学物質から潜在的な環境リスクを推定するIn Silico探索実験を行い、リスク候補群をランク付けた。その上位ランクの化学物質に対し、産総研独自の高速発光スクリーニングによりリスク評価を行った。これらの実験の結果、高速発光スクリーニングに用いる新規発光基質の開発、老化要因物質などのリスク候補化学物質にตอบสนองする一分子型発光プローブ類の開発、化学物質の多色発光イメージングポートフォリオの開発などができた。これらを纏め、11報の専門誌論文発表（一部は出版待ち）、研究総説、特許出願、3冊の単行本出版（一部は出版待ち）などの成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生涯にわたる化学物質の非意図的な曝露は潜在的な健康リスクである。当研究は、データベース規模の化学物質より老化要因物質などの健康リスクを効果的に評価する手法を提示するものである。今回のIn Silico研究とWet実験系の技術的融合と連携プレイにより、これまで不可能と思われたデータベース規模の化学物質を対象に、健康リスクという物差しで定量評価できた。今後、化学物質のリスク評価分野において技術的ブレークスルーを引き起こすことを期待している。また本研究結果は、一般市民にも、化学物質選択の際に、「老化要因性」のような健康リスクを判断資料の一つとして提案するものであり、今後の社会変革に資する研究である。

研究成果の概要（英文）：During the 2-year's research period, we conducted an in-silico screening of potential risky chemicals from the database of 50,000 chemicals and ranked the potential impacts on human body. The top-ranked chemicals were further examined if the risks are practical using a highspeed bioluminescence screening system. As the results, we accomplished the development of (i) new bioluminescent substrates, (ii) new single-chain bioluminescent probes, for example, for determining aging chemicals, and (iii) multicolor bioluminescent portfolio. The experimental results were reported in form of 11 scientific journals, reviews, patents, and books.

研究分野：環境科学、分析化学

キーワード：発光 イメージング 化学物質 バイオアッセイ セマンティックウェブ In Silico 健康リスク スクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「老化や長寿」は科学的アプローチに限界のある課題の一つであり、データベース規模の化学物質を対象にそのリスク候補群を絞り込み、老化要因の有効な活性評価法を創出することは、とりわけ特段の技術的なブレイクスルーが必要である。近年、一部の小分子化学物質(ラパマイシン、レスベラトロール、アスピリン、ステロイド系など)は老化要因の活性を持つことがサルの実験などで実証されたが(Nature 2009. 460. 392, Science 2009. 325. 201, Nature 2006. 444. 337)、化学物質の寿命効果に対する体系的な研究はされていなかった。その背景には、(1)対象化学物質が多すぎる事、(2)後天的な長寿要因としての小分子化学物質を診る知見の不足、(3)「老化要因の活性」はパラメーターが複雑なため定量的な評価が困難である事などがある。

本研究チームが独自に開発した知識情報解析技術(AI)を活用した化学物質の老化要因性の効率的な絞り込みと、絞られた老化要因物質評価のための独自の定量可視化技術を融合すれば、前述した難関を新たな方法で突破することが可能であると思に至った。これまで、データベース規模の化学物質を対象に長寿に影響する活性を発光・発色判定する手法はなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、不特定多数の化学物質を対象に老化要因活性を、知識推論アルゴリズム(AI)を用いて効果的に絞り込む。その上位ランクの小分子化学物質を対象に、老化に関わる3大分子イベントを可視化する一分子型発光プローブを設計し、その発光色を指標に「老化要因活性」を高速かつ簡便に判定する発光プラットフォームを創生する。

### 3. 研究の方法

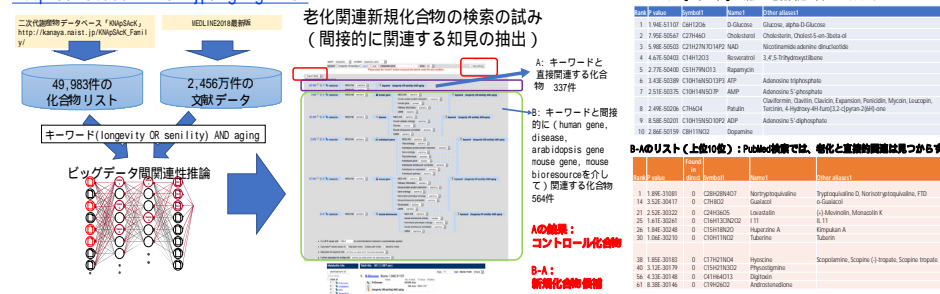
上述した研究課題を解決するため、本研究期間中、以下の3つの要素目標を設定し、研究を遂行した:(1)知識情報解析技術(AI)における「老化(Aging)」に特化した知識推論アルゴリズムの開発、(2)化学物質の老化要因となるシグナルを可視化する一分子型発光プローブの開発と検証、(3)各技術要素を統合し「8チャンネル型光検出装置」上でのシステム化と検証、更に検証結果のフィードバックによるAIアルゴリズムの高度化。

(1)本研究の第1目標は、データベース規模(約5万種以上)の化学物質から効果的に候補物質を絞り込むことである。そこで、榊屋らは、理研が保有する化学物質の公開情報から機械可読な形で記述されたセマンティック・ウェブ(機械可読な形で記述された意味符号;図5)を積極的に活用し、老化要因活性に特化した独自の知識推論アルゴリズム(一種の意味符号の繋がり、in silico評価エンジン)を試作する。この評価エンジンを用いて、約5万種以上の化学物質の老化要因活性を効果的に推論しランク付け、その結果を実験系に提供する。(2)金らは、その上位ランクに位置する化学物質の老化要因活性を3大指標に分類し、各指標に異なる発光色を示す一分子型発光プローブをそれぞれ設計する(第2目標)。(3)この発光プローブを動物細胞に導入し、独自の8チャンネル式光検出装置に搭載させ、老化要因活性を測定する高速発光評価プラットフォームを完成させる(第3目標)。

発光プローブ類を安定発現する動物細胞をマイクロスライドに並べ、独自の多チャンネル式光検出機を用いて高速評価する。またその結果をAIチームにフィードバックすることにより、推定老化要因物質の生理活性予測技術の精度を極める。

### 知識推論処理を用いた老化関連化合物抽出の試み(老化関連事象の探索データベース" AgingMiner"の開発)

<http://metabo.riken.jp/AgingMiner>



**Aging Miner**  
Powered by RIKEN GRACE engine

### 図1. in silico 評価エンジン

である“ Aging Miner ”の開発と運用例。

### 4. 研究成果

前述した3大目標を達成する為に、以下のような方向で研究を実施し、研究成果を得た。

(1)第1目標の研究:理研が持つデータベース規模(5万種以上)の化学物質のセマンティック・ウェブを活用し、老化要因活性に特化した独自の知識推論アルゴリズムを試作した。この知識推論アルゴリズムを“ Aging Miner ”と名付け、ウェブ公開し誰でも試せるようにした(図1)。

図1は、この in silico 評価エンジンによる作業の流れを説明したものである。結果として、老化に影響すると思われる化学物質のリストを得ることができた。厳選された上位100位の内、小分子化学物質でありながら、生体の老化に影響し得る化学物質をピックアップした。具体的には、「第2目標の研究」のところに記述した。

(2)第2目標の研究:金らは、上位ランクに位置する化学物質の老化要因活性を3大指標に

分類し、各指標に異なる発光色を示す一分子型発光プローブ類を開発した。

これらの「一分子型発光プローブ」の基礎発光材料として、更に新規発光酵素と発光基質の開発に着手した。その結果、計 11 種類の発光基質を開発し、各発光酵素との発光特性を検証した。

検証の結果、新規発光基質を既存の発光酵素と組み合わせると青色から赤色までの発光色を示すことが確認できた(図2)。この発光特性から、「虹色発光システム」と名付けた。また、新規発光基質は特定の発光酵素と特異的に反応することが分かった。例えば、基質 1a は発光酵素 RLuc8.6-535SG と特異的に発光し、基質 3d は発光酵素 NanoLuc と特異的に発光することが分かった。この発光特性は、その発光酵素を基に一分子型発光プローブを作った場合、特異的にそのプローブだけを可視化できることを意味する貴重な成果であった。

このような成果を纏めて、科学ジャーナルの *Scientific Reports* (NPG) に 1 報発表し、特許 1 件も出願した(業績リスト参考)。更に「全可視光領域で発色する虹色発光標識のポートフォリオを開発」という題目でプレス発表を行った：

[https://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2021/pr20210126\\_2/pr20210126\\_2.html](https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2021/pr20210126_2/pr20210126_2.html)

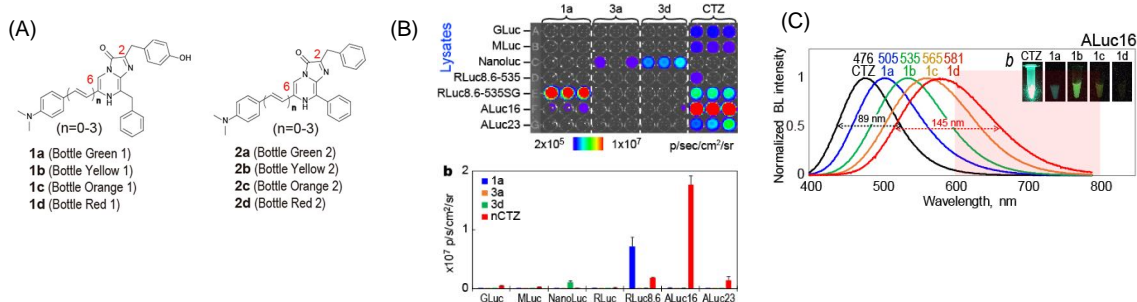


図2.(A)新規合成した発光基質の化学構造例。(B)各発光基質と発光酵素における発光輝度と選択性の検証。(C)新規発光基質と酵素による発光スペクトルの例。

また、理研の Aging Miner により予測された寿命要因物質の一つであるラパマイシンに着目し、ラパマイシンを可視化する一分子型発光プローブの開発に関する実験を行った。ラパマイシンは、生体内で免疫抑制と寿命要因性活性を持つことが報告されている。

まず非細胞系におけるラパマイシンの可視化プローブの精製とラパマイシンに対する反応性を検証した。この可視化プローブのデザインは、ラパマイシンと特異的に結合する FRB と FKBP という蛋白質を両端に置き、その間に全長の人工生物発光酵素 ALuc を挟むような形である。このようなサンドウィッチタイプの発光プローブは、ラパマイシン共存下では、FRB と FKBP の結合が起こり、中に挟んだ ALuc が分子ストレインを受けることになる。その結果、ALuc の輝度が増加する。このような形の発光プローブを「分子歪みセンサー」と名付けた。

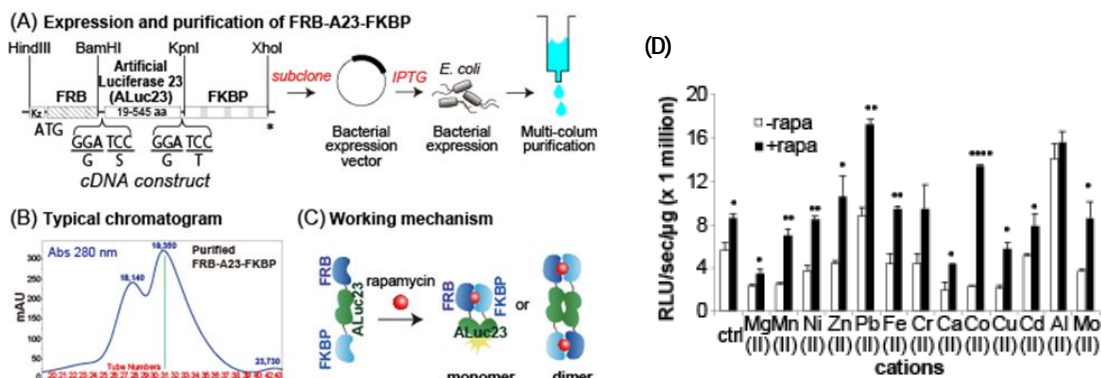


図3.ラパマイシンの可視化プローブ(分子歪みセンサー)を用いた発光イメージング。(A)分子歪みセンサーをコードするキメラ遺伝子の設計と発現、精製のプロセス。(B)分子歪みセンサーを精製する際、アフィニティカラムより抽出される分子歪みセンサーのスペクトラム。(C)本分子歪みセンサーの作動メカニズム。ラパマイシンに反応して分子内蛋白質結合が起こる。(D)多価重金属イオンの影響による分子歪みセンサーの発光輝度の変化。

また、様々な2価重金属イオンの共存下で発光輝度を調べたところ、このプローブの発光輝度が2価重金属イオンの影響を強く受ける現象も確認した(図3)。このような実験手法を纏めてプロトコルの専門誌である *Methods in Molecular Biology* (*Methods Mol. Biol.*; Springer-Nature) に報告した。

さらに、理研の Aging Miner により予測された寿命要因物質の一つであるレチノイン酸(ピタミン A の代謝物)にも着目し、レチノイン酸の発光イメージングに用いられる発光プローブの開

発と実験手法の開発に取り組んだ(図4)

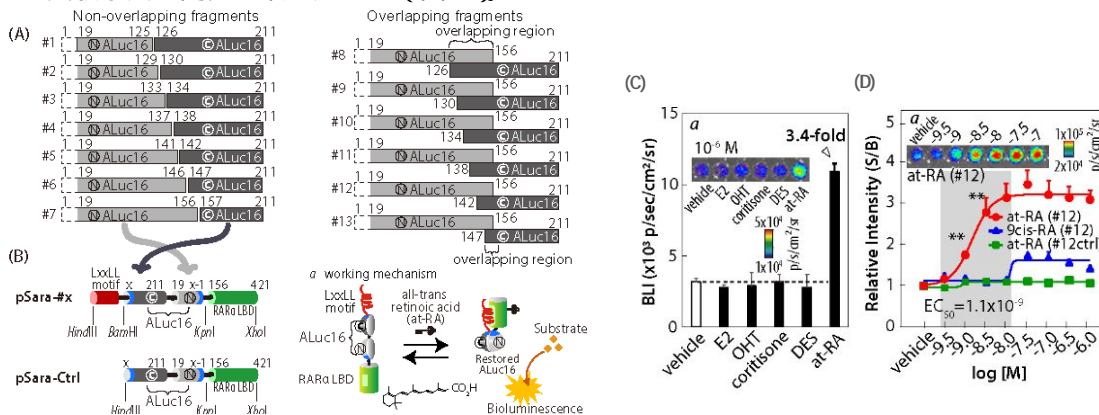


図4 . レチノイン酸 (at-RA) 可視化プローブの開発。(A) 発光酵素 ALuc16 の切断位置に関する検討。(B) 発光酵素 ALuc16 断片を基盤としたレチノイン酸可視化プローブのキメラ遺伝子の構造と作動メカニズム。(C) 当発光プローブのレチノイン酸選択性。(D) 当発光プローブのレチノイン酸に対する検量線カーブ。

まず、発光酵素 ALuc を 2 分割し円順列置換することを特徴とする一連の発光プローブを開発した。その後、各プローブのレチノイン酸感受性を測定した。その結果、プローブ # 12 がレチノイン酸に良く発光することが分かった。その結果を *Methods Mol. Biol.* に報告した。

このような発光イメージングシステムを生体イメージングなどに適用するためには、組織透過性の優れた近赤外線発光が必須である。そのニーズから、従来の発光基質 CTZ に蛍光色素 Cy5 を繋げた形の新規発光基質を開発した(図5)。この発光基質は緑色発光の共鳴エネルギーが蛍光色素を通して近赤外(NIR)発光を示すことが大きな特徴である。この発光基質を用いて、様々な従来の発光酵素条件下での発光輝度と選択性などを検証した。このプロトコルを纏めて *Methods Mol. Biol.* に報告した。

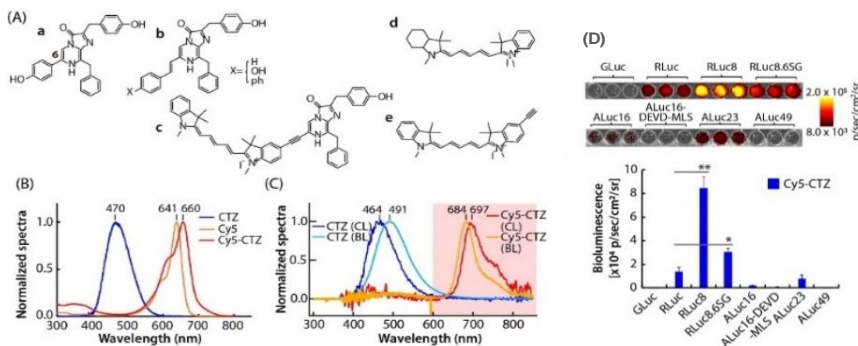


図5 . 近赤外線 (NIR) 発光基質の開発。(A) 新規 NIR 発光基質の化学構造。(B,C) NIR 発光基質のスペクトル。(D) 発光酵素による NIR 発光基質の相対的な発光輝度。

図5は発光基質に依存した NIR 発光技術であるが、図6は、遺伝子組み換えにより発光酵素側が NIR 発光を放つように設計した研究例である。

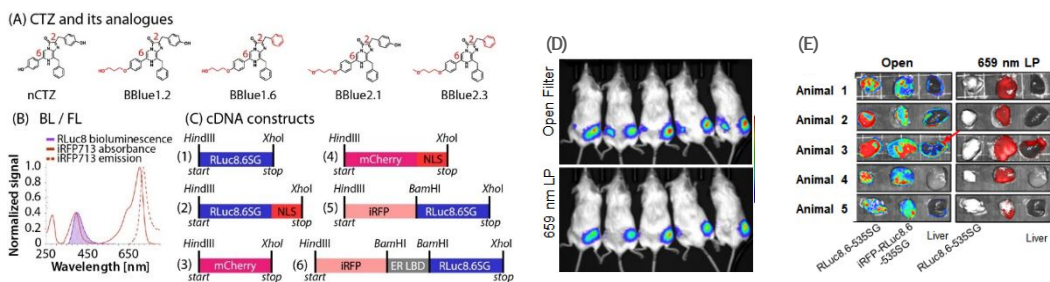


図6 . 新規近赤外発光イメージングシステムの開発。(A) 新規合成した発光基質の化学構造。(B) 本発光システムにおける発光・蛍光スペクトルの例。(C) 本発光システムにおける発光プローブの構造。(D) 本発光システムを用いた動物イメージング。(E) 本発光システムを用いた、癌細胞の臓器転移の可視化。

まず、従来のウミシイタケ由来の発光酵素 RLuc8.6SG に近赤外線蛍光蛋白質 iRFP を付けることで、BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) 現象が起こるよう分子設計を行った(図6(C))。またこのような BRET プローブに最適な発光基質を新規合成した(図6(A))。この新規合成発光基質は RLuc8.6SG と反応して 400 nm あたりの青色を放つ。この青色は iRFP の

吸収ピークの1つと重なるため、共鳴エネルギー移動現象が起こる。このBRET現象をマウス個体で確認し(図6(D))、更にその臓器アレイにより、各臓器への癌の転移を確認することができた(図6(E))。このプロトコルを纏めて *Methods Mol. Biol.* に報告した。

更に長寿要因物質としてのラパマイシンを動物個体レベルで可視化イメージングするために、BRETプローブの開発に取り組んだ(図7)。まず従来の分子歪みセンサーの骨格に蛍光蛋白質類(mOrange, mCherry, mRaspberry, mNeptune, mPlum)を導入し、一連の新規BRETプローブを開発した。その内、v2\_mCheと名付けたBRETプローブの発光信号が強く、シグナル対ノイズ(S/N)比が良かったので、ラパマイシンに対するv2\_mCheの発光検量線を測定した(図7(C))。更に遺伝子組み換え技術を用いてv2\_mCheを動物細胞に導入し、安定発現する動物細胞を樹立した。この動物細胞をマウス個体に移植し、マウス個体レベルでのBRETシグナルの観察ができた(図7(D))。その結果を纏め、*Methods Mol. Biol.* に報告した。

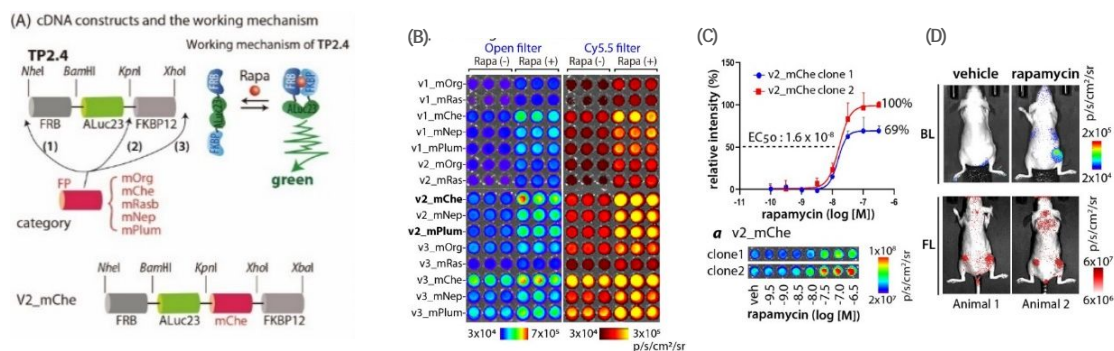


図7. 長寿要因物質(ラパマイシン)可視化プローブの開発と応用。(A)当該発光プローブの構造と作動メカニズム。(B)本発光プローブの最適化。デザインによって異なる発光輝度を示す。(C)本発光プローブの検量線カーブ。(D)本発光プローブを用いた動物イメージング例。

(3)第3目標の研究: この発光プローブを動物細胞に導入し、独自の1チャンネル(1ch)式および8チャンネル(8ch)式光検出装置に搭載し、老化要因活性を測定する高速発光評価プラットフォームを完成した(図8)。

1ch式光検出装置の特徴は、発光サンプルチューブを差し込むミラーキャップ式の蓋とその下の集光光学ファイバー、受光部を動かせるマイクロスライド、ホトマルなどで構成されている点である。一方、8ch式光検出装置は、ホトマルが8つある点が異なっているものの概ね1ch式光検出装置と同様の装置構成をしている(図8)。この8ch式光検出装置の信頼性を確認するために、IVISシステムに入れ、任意の発光サンプルの発光値を同時に測定することで検証を行った。最も難しかった点は、8つの各チャンネルのホトマル感度がまちまちであったため、その感度をソフトウェア的に揃えることであった。この問題解決のために、数学分野の専門家の協力を得て、最終的に信頼性の高い装置として仕上げることができた。これらの結果を纏め、1件の特許出願と共にプロトコル専門誌の *Methods Mol. Biol.* にも報告した。

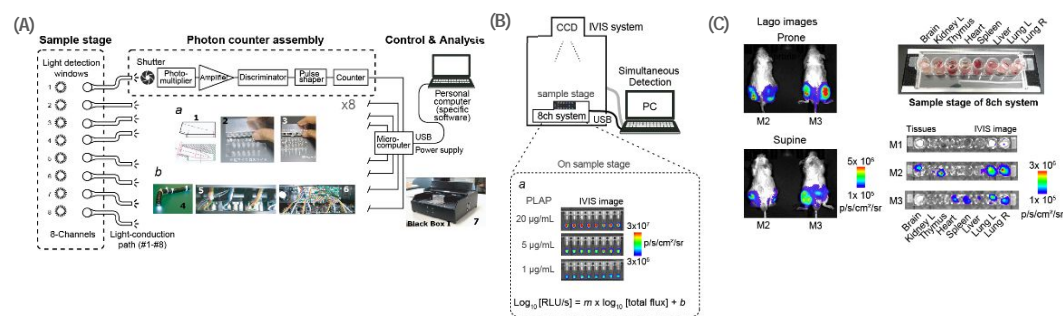


図8. 8チャンネル式(8ch)光検出システムの概要。(A)8ch光検出システムの内部構造と重要部品。(B)8ch光検出システムに基盤した発光サンプルの定量例。(C)右: 8ch光検出システムのサンプルステージに搭載したマウス臓器のアレイ、左: マウスへの癌細胞移植例。

その他、これらの研究を纏めて、研究 Review 論文を *Anal. Sci.* に1報発表した。

本研究で、生涯にわたる非意図的な化学物質の曝露による健康リスクに対処する一定のツールを持てるようになった。当研究結果により、化学物質の老化要因活性を見直すことで更なる技術的ブレイクスルーを期待できるようになった。今後もこの分野の技術的基盤を整え、他分野との技術的融合と連携プレイを進めることが必要である。今回、AIという計算科学技術とWET技術を組み合わせることで、これまで不可能と思われた大規模の化学物質を対象に、「老化」という物差しで発光評価を行い、定量的結果を示すことができた。また本研究結果は、一般市民に、化学物質選択の際に「老化要因活性」を一つの判断材料として呼びかけるものであり、今後の社会変革に一助することを期待する。

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 2件）

1. 著者名 Tamaki Shota, Kitada Nobuo, Kiyama Masahiro, Fujii Rika, Hirano Takashi, Kim Sung Bae, Maki Shojiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Color-tunable bioluminescence imaging portfolio for cell imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81430-1	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 KIM Sung-Bae, PAULMURUGAN Ramasamy	4. 巻 37
2. 論文標題 Bioluminescent Imaging Systems for Assay Developments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 233 ~ 247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20R003	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金 誠培、Sharon Hori、Ramasamy Paulmurugan
2. 発表標題 Highly Sensitive Eight-Channel Light Sensing System for Biomedical Applications
3. 学会等名 日本分析化学会、第69回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 誠培、西原 諒、鈴木 孝治
2. 発表標題 In vitro Determination of Rapamycin-Triggered FKBP-FRB Interactions Using a Molecular Tension Probe
3. 学会等名 日本分析化学会、第69回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 誠培、北田 昇雄、牧 昌次郎
2. 発表標題 Color-Tunable Bioluminescence Imaging Platform for Cell Imaging
3. 学会等名 日本分析化学会、第69回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 誠培、西原 諒、Daniel Citterio
2. 発表標題 Luciferase-Specific Coelenterazine Analogues for Optical Contamination-Free Bioassays
3. 学会等名 日本分析化学会、第69回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 誠培、西原 諒、Daniel Citterio、鈴木 孝治
2. 発表標題 Fabrication of a New Lineage of Artificial Luciferases from Natural Luciferase Pools
3. 学会等名 日本分析化学会、第69回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 Sung-Bae Kim	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 447
3. 書名 Live Cell Imaging ”	

1. 著者名 Sung-Bae Kim, Rika Fujii	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 9
3. 書名 Chapter 5 “A New Lineage of Artificial Luciferases for Mammalian Cell Imaging”	

1. 著者名 Masahiro Abe, Ryo Nishihara, Sung-Bae Kim, Koji Suzuki	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 7
3. 書名 Chapter 10 “Near Infrared Bioluminescence Imaging of Animal Cells with Through-Bond Energy Transfer Cassette”	

1. 著者名 Ryo Nishihara, Emi Hoshino, Yoshiki Kakudate, Koji Suzuki, Sung-Bae Kim	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 15
3. 書名 Chapter 11 “Azide- and Dye-Conjugated Coelenterazine Analogues for Imaging Mammalian Cells”	

1. 著者名 Ryo Nishihara, Masahiro Abe, Koji Suzuki, Sung-Bae Kim	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 12
3. 書名 Chapter 12 “Luciferase-Specific Coelenterazine Analogues for Optical Cross-talk-Free Bioassays”	



1. 著者名 Ryo Nishihara, Koji Suzuki, Sung-Bae Kim, Ramasamy Paulmurugan	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 13
3. 書名 Chapter 21 “Highly bright NIR-BRET system for imaging molecular events in live cells”	

1. 著者名 Sung-Bae Kim, Rika Fujii, Ramasamy Paulmurugan	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer US	5. 総ページ数 9
3. 書名 Chapter 22 “Ligand-Activatable BRET9 Probes for Imaging Molecular Events in Living Mammalian Cells”	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 生物発光酵素の長波長発光基質	発明者 金誠培 牧昌次郎 北田昇雄	権利者 国研)産業技術 総合研究所と国 大)電気通信大
産業財産権の種類、番号 特許、2020-040703	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 マルチチャンネル光検出装置	発明者 金誠培	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、2020-044513	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>全可視光領域で発色する虹色発光標識のポータルサイトを開発  <a href="https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2021/pr20210126_2/pr20210126_2.html">https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2021/pr20210126_2/pr20210126_2.html</a></p>
--

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	小林 紀郎  (Kobayashi Norio)  (20415160)	国立研究開発法人理化学研究所・情報システム本部・ユニットリーダー   (82401)	
研究分担者	榎屋 啓志  (Masuya Hiroshi)  (40321814)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・室長   (82401)	

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