

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288088

研究課題名(和文)発光性細胞株アレイを用いた高速PM2.5評価系の構築

研究課題名(英文)Development of a high throughput bioassay system for PM2.5 with luminescent cell arrays

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・環境管理研究部門・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) 5,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、浮遊微粒子状物質(PM2.5)に代表される環境汚染物質の生物毒性・炎症作用を可視化する研究を行った。期間中、福岡と川崎でPM2.5を採集し以下の研究を実施した。新規人工発光酵素の開発や基質合成を通じて、生物毒性・炎症作用可視化プローブの発光性能を大幅に改良した。各プローブ遺伝子を動物細胞に導入し形質変換することによりPM2.5の生物毒性・炎症の発光評価システムを完成した。この評価システムを、独自の多チャンネル光検出機などに適用して高速計測を可能とした。これらの研究成果を取り纏め、国際研究論文8報、学会発表13件、単行本出版1件、総合論文など10報、特許出願7件の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：The present study accomplished a unique assay system to illuminate cytotoxicity / proinflammatory effects of air-polluting substances: i.e., particulate matter with diameters of ca. 2.5 micrometers and smaller (PM2.5). During the designated research term, the researchers collected PM2.5 particles in Fukuoka and Kawasaki cities and made use of them for the following studies: we greatly improved the optical performance of the bioluminescent probes, designed to image cytotoxicity or proinflammatory effects of PM2.5, by fabricating artificial luciferases or the specific substrates. The cDNA constructs encoding the probes were stably introduced into mammalian cells and thus accomplished the above assay system. This assay system was then geared to a custom-made multichannel light detector, allowing a high throughput determination of light. The present studies were finally reported in 8 scientific papers, 13 presentation, 1 book publication, 10 review articles, and 7 patent filing.

研究分野：分析化学、環境科学、遺伝子工学、分子生物学

キーワード：浮遊微粒子状物質 生物発光 ホルモン様活性 細胞毒性 分子イメージング 一分子型生物発光プローブ ルシフェラーゼ バイオアッセイ

### 1. 研究開始当初の背景

浮遊微粒子状物質 (PM2.5) に適した生物毒性・炎症作用評価法は未だ確立されておらず、フィルター捕集後、従来の機器分析に依存してきた。PM2.5 の生体影響を評価する手法として、フィルター捕集後、分散液を全排水毒性試験法 (Whole Effluent Toxicity; WET) を適用することが可能であり、この技術的背景は、魚類や藻類に対する半数致死量 LD<sub>50</sub> 測定法に基づいている (Nature 1991, 353, 489)。しかしながらこのような動物実験は低度の毒性や炎症作用、ホルモン様活性の評価には不向きであり煩雑である。

世界保健機関 (WHO) の国際がん研究機関 (IARC) が 2013 年 10 月 17 日、微小粒子状物質 (PM2.5) を 5 段階のリスク評価で最も危険度が高い「グループ 1」に分類したこと (読売新聞、同年 10 月 18 日) や、学術的研究でもリンパ球 (T 細胞、B 細胞) を通じた人免疫系への損傷が報告されるなど (Occup Environ Med 2013, 70, 426) PM2.5 の生体組織・臓器レベルでの毒性評価は喫緊の課題になっている。

### 2. 研究の目的

PM2.5 に代表される浮遊微粒子状物質の生物毒性・炎症作用を評価する方法の開発は喫緊の課題である。我々はこの課題に資する研究として、**各臓器由来の細胞株にそれぞれ適した生物毒性・炎症作用の可視化プローブを導入して形質変換し、その細胞株アレイ下で PM2.5 の生理活性を高速発光評価するシステムを構築すること**を目的とする。このための細目課題として、既開発の生物毒性・炎症作用可視化プローブの高輝度・高感度化を行い、各臓器を代表する細胞株に前記プローブを安定発現させ、マイクロ流路上にアレイ化することにより、PM2.5 の生物毒性・炎症に応じて発光する細胞株アレイを構築する。我々既開発の多チャンネル多ポイント同時計測式光検出機でその発光輝度を高速同時計測し結果の解析を行う。

### 3. 研究の方法

- 研究期間中、以下の研究課題を解決する。
- (1) 浮遊微粒子状物質 (PM2.5) の毒性・炎症作用を各臓器由来の細胞株アレイ下で測定する発光評価システムを構築する。
  - (2) 臓器由来細胞株アレイ下での PM2.5 毒性評価のために、我々既開発の細胞毒性 (アポトーシス) と炎症活性可視化プローブの分子設計をそれぞれ改良し、既開発の超高輝度人工生物発光酵素と合体させることによりプローブの高輝度化・高感度化を目指す。必要に応じて発光酵素の立体構造解析情報を分子設計改良に用いる。
  - (3) 前記可視化プローブを各臓器由来の細胞株に導入し安定株を樹立し、マイクロ流路上に適用した細胞株アレイを作製する。
  - (4) 既開発の多チャンネル式光検出装置を用いて、PM2.5 刺激後の細胞株アレイから出る生物発光を高速同時計測することにより、細胞株別毒性・炎症作用を判定する。

### 4. 研究成果

**PM2.5 実サンプルの採集と溶媒特性の検討:**  
採択時の研究計画に基づき、当該年度の研究として、まず産総研独自に開発した PM2.5 収集装置を用いて、川崎と福岡で PM2.5 を収集した (図 1, 2, 3)。PM2.5 の採集地点として川崎と福岡を選んだ理由としては、都市起因の PM2.5 (川崎) と長距離輸送による

PM2.5 (福岡) を区別して計測するためであった。

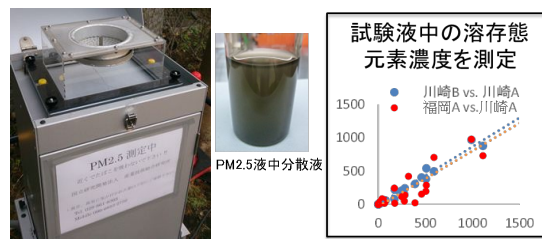


図 1. 左: 今回の PM2.5 実験に用いた産総研独自に開発したエアサンプラーの外見。装置の上部から PM2.5 が採集される。中: 装置により得られた PM2.5 の分散液。右: 共同研究者の中里主任研究員による元素分析。

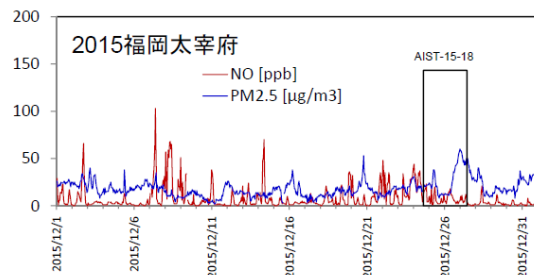


図 2. 川崎で得られた PM2.5 採集量の日割分布。

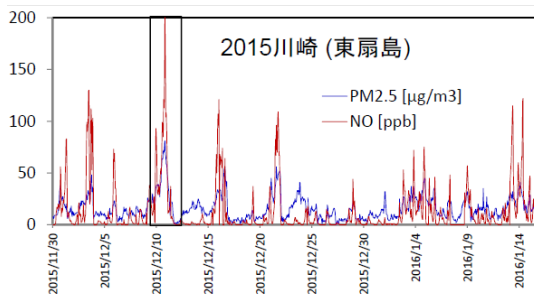


図 3. 福岡で得られた PM2.5 採集量の日割分布。

上記装置により採集された日別 PM2.5 の生理活性を測定するために HEPA フィルターにトラップされている PM2.5 を溶媒へ分散する手法に関する検討を行った。まず、HEPA フィルターを紙片化し緩和条件で PM2.5 を水溶液や培地へ分散させた。その結果、最適な分散条件を見つけることができた。

### PM2.5 由来の重金属類の網羅的な発光測定:

前年度開発した多チャンネル式光計測装置を用いて (図 4) PM2.5 由来の重金属類の有無を網羅的に簡易計測した。この際、前述した知見に基づいて得られた PM2.5 分散液を用いて、PM2.5 由来の重金属類を簡便に検出する生物発光アッセイを実施した。

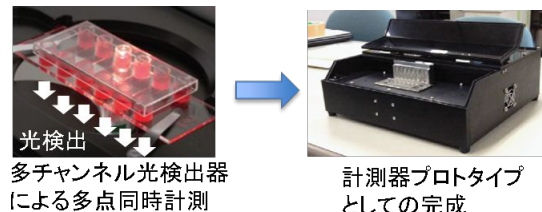


図 4. 多チャンネル光検出装置の外見。

本研究の実施にあたり、本研究者らが独自に開発した人工生物発光酵素群 (ALuc) が 2 価重金属に特異的に発光減衰する現象を発見しており、この成果を国際誌に発表した (Anal Sci 2015; 業績欄参考)。

具体的には、図 5 で示すように、ALuc は  $Mg^{2+}$  や  $Ca^{2+}$  などには発光輝度を若干強めるが、 $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Al^{3+}$  などに対しては発光輝度を失うことを発見した。この現象を用いれば、2 価重金属の有無を環境現場で簡易に測定できることに着目し、分析法を開発した。

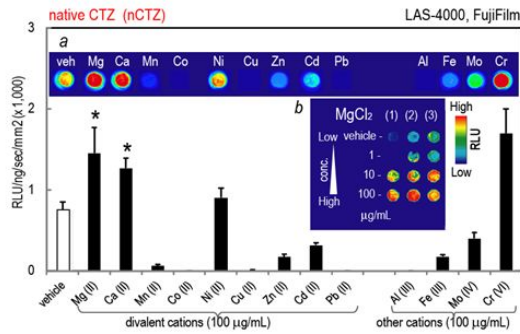
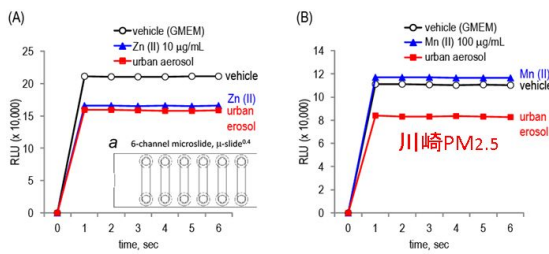


図 5. 重金属特異的に発光減衰する ALuc を用いた PM2.5 由来の重金属に対する発光イメージング研究。

この現象を利用して、PM2.5 分散液中の重金属の有無を発光で簡便に測定できた。この測定には、前述した多チャンネル式光検出装置を用いた (図 6)。



川崎PM2.5サンプルを暴露  
(実大気サンプルでも重金属の発光を確認)

図 6. 川崎で採集された PM2.5 由来の重金属の計測結果。川崎サンプルを導入することにより重金属と同様に発光輝度の減衰現象が確認できた。

図 6 で示したように、重金属特異的に反応する結果が多チャンネル光検出装置により測定できたことを、Methods in Molecular Biology (Springer-Humana) を通じて報告した (Meth Mol Biol 2016; 業績欄参考)。

### 免疫毒性物質の可視化イメージングプロブの開発と応用

更に、本研究期間中に免疫毒性物質に対する可視化手法として分子歪みセンサーを開発した (図 7)。

本手法では、ALuc の全長を用いることが特徴であり、センサーは全長の ALuc を真ん中に挟み、その両端にタンパク質 A と B (実際には FRB と FKBP) を繋げる独特な分子構造をしている。免疫毒性物質 (Rapamycin) が存在した場合、このプロブに繋がった FRB と FKBP は結合する。この分子内結合により、その間に挟んだ ALuc に分子歪みがかかるため、発光輝度の相違が発生する。

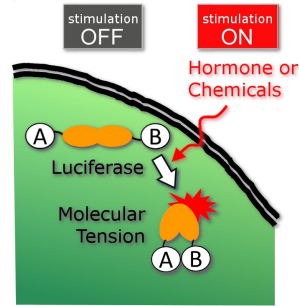


図 7. 分子歪みセンサーの基礎概念。ホルモンや毒性化学物質に対して、分子プロブが分子内結合を起し発光する。

この発光輝度の相違は免疫毒性物質の濃度依存的であるため、発光値による定量分析が可能であることを見出した (図 8)。

この成果は、アメリカ化学会の国際誌に発表した (Bioconjugate Chem 2016; 業績欄参考)。

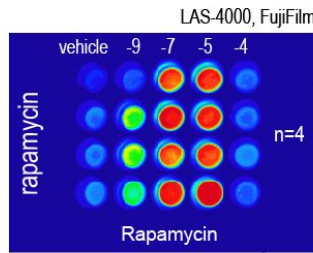
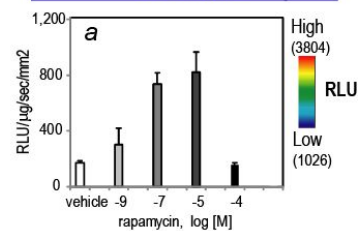


図 8. 免疫毒性物質 (Rapamycin) の濃度依存的な発光輝度の増加。



挿入図 a は、発光輝度の定量値である。

### 発光プロブの高輝度化に向けた新規人工生物発光酵素群の開発

前述した発光プロブの高性能化のためには、搭載する発光酵素の性能が重要である。当研究チームでは、高機能性を持つ新規人工生物発光酵素の開発を行った。その結果、発光性能を持ちながらカラム精製と細胞外分泌能を併せ持つ多能性発光酵素群を開発し (図 9) 国際論文誌に報告した (BBRC 2014; 業績欄参考)。

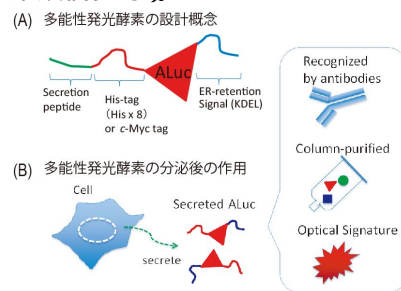


図 9. 多能性発光酵素群の設計概念と機能の概念図。

### マルチプレックスイメージングを可能とする発光基質群の有機合成

マルチプレックスイメージングは、効率的な発光イメージングを可能とする手段である。多数の発光標識の共存下で、マルチプレックスイメージングを可能とする手法の一つとして、それぞれの発光酵素に特異的な発光基質を合成することが有効である。

当研究チームでは、特定発光酵素をピンポイントイメージングできる発光基質の分子設計と有機合成を行った。その結果、15 種類

の発光基質が新規合成され、その一部は、面白いことに特定発光酵素に特異的に反応することが明らかになった(図10)。この結果は、多数の発光標識共存下で行うマルチプレックスイメージングを初めて可能とする成果であった。この成果を纏め、国際誌に報告した(Scientific Reports 2017 (NPG); 業績欄参考)。

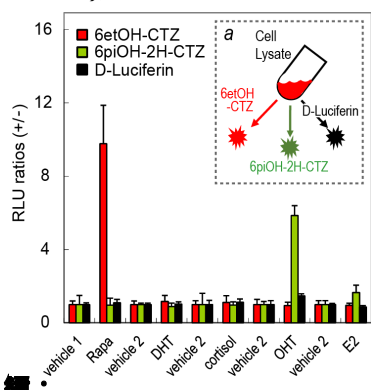


図10. 多数の発光酵素共存下で、特定発光酵素のピンポイントイメージング。

### その他の業績

前述した研究成果以外に、総説や多数の学会発表、知財出願を行った。その中でも特記すべき業績の一つとして、当該発光研究プロトコルを纏めて、本を出版したことである。この本は、2016年8月にSpringer (New York)より出版され2017年1月時点で、オンラインで全世界的に1万部以上が売れている。別途、ハードコピーが販売されている。

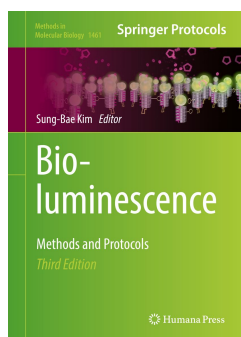


図11. 単行本の出版。  
**“Bioluminescence”**  
 (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7)  
 Sung-Bae Kim, Ed.

5. 主な発表論文等  
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kim, S-B., Izumi, H. “Functional Artificial Luciferases as an Optical Readout for Bioassays”, *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, 448(4), 418-23 (2014)  
 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.04.128

Kim, S-B., Miller, S., Suzuki, N., Senda, T., Nishihara, R., Suzuki, K. “Cation-driven Optical Properties of Artificial Luciferases” *Analytical Sciences*, 31(10), 955-60 (2015)  
 DOI: 10.2116/analsci.31.955

金 誠培, 藤井 理香 “生物発光酵素を用いた分子イメージング技術の進歩 (Recent advances in molecular imaging technologies with

luciferases)” *Journal of the Japan Society of colour Material*, 88(12), 407-411 (2015)  
 DOI: 10.4011/shikizai.88.407

Kim, S-B., Nishihara, R., Citterio, D., Suzuki, K. “A Genetically Encoded Molecular Tension Probe for Tracing Protein-Protein Interactions in Mammalian Cells”, *Bioconjugate Chemistry (ACS)*, 27(2), 354-362 (2016)  
 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00421

Kim, S-B., Fujii, R. “非分割型生物発光イメージングプローブの開発と応用 (Splitting-free Bioluminescence Imaging Probes and Their Applications)”, *Bunseki Kagaku*, 65(7), 361-369 (2016)  
 DOI: 10.2116/bunsekikagaku.65.361

Kim, S-B., Fujii, R. “Fabrication of Molecular Tension Probes”, *MethodsX (Elsevier)*, 3, 261-267 (2016)  
 DOI: 10.1016/j.mex.2016.03.008

Kim, S-B., Ozawa, T., Umezawa, Y. “A genetically encoded bioluminescent indicator for illuminating proinflammatory cytokines”, *MethodsX (Elsevier)*, 3, 483-489 (2016)  
 DOI: 10.1016/j.mex.2016.06.001

Nishihara, R., Abe, M., Nishiyama, S., Citterio, D., Suzuki, K., Kim, S-B. (交信著者) “Luciferase-Specific Coelenterazine Analogues for Optical Contamination-Free Bioassays”, *Scientific Reports (Nature Publishing Group)*, 7(908), 1-8 (2017)  
 DOI: 10.1038/s41598-017-00955-6

〔学会発表〕(計 13 件)

金 誠培(登壇者)  
 “人工生物発光酵素の創製と発光標識としての応用”, 国際医薬品原料・中間体展 (CPhI) 2014, 東京, 口頭発表 (2014/04/09-11)

金 誠培(登壇者)  
 “機能性人工発光酵素の創製と発光標識としての応用”, 日本化学会 第8回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山, 口頭発表 (2014/09/11-13)

Kim, S-B.(登壇者)  
 “Creation of Artificial Luciferases for Bioassays”, World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2014, Seoul Korea, COEX center (2014/09/17)

金 誠培(登壇者)  
 “Creation of artificial luciferases and their applications for molecular imaging technologies”, 日本分析化学会第64年会, 福岡, Z2004A, ASAS講演 (2015/09/09-11)

金 誠培(登壇者)

“生物発光を用いた新規分子診断技術の創製と応用”, 日本分析化学会第64年会, 福岡, D3006, 受賞講演 (2015/09/09-11)

西原 諒, 金 誠培, 中嶋 隆浩, 佐藤 守俊, 岩澤 尚子, Citterio, D., 西山 繁, 鈴木 孝治

“高輝度合成生物発光基質セレンテラジンの開発”, 日本分析化学会第64年会, 福岡, D1019Y (2015/09/09-11)

Kim, S-B. (登壇者)

“Creation of artificial luciferases and their application to bioassays”, Pacificchem 2015, Hawaii, Presentation #: 328 (Biological), Session: Luciferin/Luciferase Engineering (#410) (2015/12/15-20)

Nishihara, R., Nakajima, T., Kim, S-B., Sato, M., Nishiyama, S., Iwasawa, N., Citterio, D., Suzuki, K.

“Fabrication of Blue-Shifted Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Applications”, The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016), Tsukuba, Presentation number: PA-36 (2016/05/29-06/02)

Nishihara, R., Nakajima, T., Kim, S-B., Sato, M., Nishiyama, S., Iwasawa, N., Citterio, D., Suzuki, K.

“Fabrication of Blue-Shifted Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Applications”, The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016), Tsukuba, Presentation number: B3-11 (2016/05/29-06/02)

Kim, S-B. (登壇者), Fujii, R.

“Fabrication of Single-Chain Bioluminescent Probes from Artificial Luciferases”, The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016), Tsukuba, Presentation number: A2-3 (2016/05/29-06/02)

Kim, S-B. (登壇者)

“Fabrication of artificial luciferases and their applications to molecular imaging”, Royal Society of Chemistry (RSC) Tokyo International Conference 2016, Chiba, Presentation #:3 (2016/09/08-09)

金 誠培 (登壇者)

“ホルモン様化学物質の生理活性評価技術の開発と応用”, InterAqua 2017, Tokyo, 産総研水プロジェクトセミナー (2017/02/16)

金 誠培 (登壇者)

“Artificial Luciferases and Their Applications to Bioassays”, Graduate School Seminar at Shenzhen, Tsinghua University, China

(2017/03/14)

[図書](計 11 件)

金 誠培 “人為的に設計・開発した生物発光酵素 (ALuc)” (出版社: 日刊工業新聞社, ISSN 0452-2834), 「工業材料」誌, 62(8), 5 (2014)

Kim, S-B. “Fabrication of Bioluminescent Capsules and Live-Cell Imaging” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-62703-717-4), *Method in Molecular Biology*, 1098, 117-125 (2014)

Kim, S-B. (Editor) “Bioluminescence” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7) (2016)

Kim, S-B., Fujii, R. “How to Fabricate Functional Artificial Luciferases for Bioassays” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7), *Method in Molecular Biology*, 1461, 43-53 (2016) DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_4

Kim, S-B., Tao, H. “Single-chain probes for illuminating androgenicity of chemicals” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7), *Method in Molecular Biology*, 1461, 143-151 (2016) DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_11

Kim, S-B., Umezawa, Y. “Multicolor Imaging of Bifacial Activities of Estrogens” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7), *Method in Molecular Biology*, 1461, 153-163 (2016) DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_12

Kim, S-B., Tao, H. “Circular Permutation Probes for Illuminating Phosphorylation of Estrogen Receptor” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7), *Method in Molecular Biology*, 1461, 165-173 (2016) DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_13

Kim, S-B., Fujii, R. “Fabrication of Molecular Strain Probes for Illuminating Protein-Protein Interactions” (Publisher: Springer – Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7), *Method in Molecular Biology*, 1461, 175-182 (2016) DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_14

Kim, S-B., Nishihara, R., Suzuki, K. “An ALuc-Based Molecular Tension Probe for Sensing Intramolecular Protein-Protein Interactions” (Publisher: Springer – Humana Press;

ISBN: 978-1-4939-3811-7), Method in Molecular Biology, 1461, 183-193 (2016)  
DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_15

Kim, S-B., Naganawa, R. "A Multichannel Bioluminescence Determination platform for Bioassays" ( Publisher: Springer - Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7 ), Method in Molecular Biology, 1461, 271-278 (2016)  
DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_22

Kim, S-B., Naganawa, R., Murata, S., Nakayama, T., Miller, S., Senda, T. "A Bioluminescence Assay System for Imaging Metal Cationic Activities in Urban Aerosols" ( Publisher: Springer - Humana Press; ISBN: 978-1-4939-3811-7 ), Method in Molecular Biology, 1461, 279-287 (2016)  
DOI: 10.1007/978-1-4939-3813-1\_23

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 7 件)

名称: 新規人工生物発光酵素群  
発明者: 金 誠培  
権利者: 金 誠培 (100%)  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2016/079160  
出願年月日: 2016/09/30  
国内外の別: 国外

名称: 人工生物発光酵素に用いるための発光基質  
発明者: 金 誠培, 和泉 博, 田尾 博明, 鳥村 政基, 脇坂 昭弘  
権利者: 金 誠培 (70%), 和泉 博 (5%), 田尾 博明 (10%), 鳥村 政基 (10%), 脇坂 昭弘 (5%)  
種類: 特許  
番号: 15/030281  
出願年月日: 2014/10/16  
国内外の別: 国外

名称: 人工生物発光酵素に用いるための発光基質  
発明者: 金 誠培, 和泉 博, 田尾 博明, 鳥村 政基, 脇坂 昭弘  
権利者: 金 誠培 (70%), 和泉 博 (5%), 田尾 博明 (10%), 鳥村 政基 (10%), 脇坂 昭弘 (5%)  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2014/077618  
出願年月日: 2014/10/16  
国内外の別: 国外

名称: 新規セレンテラジン化合物及びその用途  
発明者: 鈴木 孝治, チッテリオ ダニエル, 西原 諒, 金 誠培, 佐藤 守俊, 中嶋 隆浩  
権利者: 鈴木 孝治(24%), チッテリオ ダニエル(23%), 西原 諒(23%), 金 誠培(10%), 佐藤 守俊 (10%), 中嶋 隆浩(10%)  
種類: 特許  
番号: 2017-055985  
出願年月日: 2017/03/22

国内外の別: 国内

名称: 新規セレンテラジン化合物及びその用途  
発明者: 鈴木 孝治, チッテリオ ダニエル, 西原 諒, 金 誠培, 佐藤 守俊, 中嶋 隆浩  
権利者: 鈴木 孝治(24%), チッテリオ ダニエル(23%), 西原 諒(23%), 金 誠培(10%), 佐藤 守俊 (10%), 中嶋 隆浩(10%)  
種類: 特許  
番号: 2017-055985  
出願年月日: 2017/03/22  
国内外の別: 国内

名称: 人口生物発光酵素に用いるための発光基質  
発明者: 金 誠培, 和泉 博, 田尾 博明, 鳥村 政基, 脇坂 昭弘  
権利者: 金 誠培 (70%), 和泉 博 (5%), 田尾 博明 (10%), 鳥村 政基 (10%), 脇坂 昭弘 (5%)  
種類: 特許  
番号: 2015-542669  
出願年月日: 2016/03/04  
国内外の別: 国内

名称: 新規人工生物発光酵素群  
発明者: 金 誠培  
権利者: 金 誠培 (100%)  
種類: 特許  
番号: 2015-194788  
出願年月日: 2015/09/30  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)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  
・環境管理研究部門・主任研究員  
研究者番号: 60470043

(2)研究分担者  
長縄 竜一 (NAGANAWA, Ryuichi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所  
・環境管理研究部門・主任研究員  
研究者番号: 40357637

中里 哲也 (NAKAZATO, Tetsuya)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所  
・環境管理研究部門・主任研究員  
研究者番号: 10357618

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: