

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14051

研究課題名(和文)再生水中の生理活性物質による潜在的健康リスクの発色評価

研究課題名(英文) Determination of potential health risks of bioactive chemicals in reclaimed water

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) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究期間中、再生水の健康への潜在的なリスクを網羅的に評価するための発光発色判定技術の開発を行った。まず、本研究者独自の人工生物発光酵素を用いて、汚染水内の2価重金属類の発光発色評価を網羅的に行った。また、中国の実再生水サンプルに産生された人工化合物を獲得し、それらの女・男性ホルモン様活性及び阻害性、催奇形性などを網羅的に発光計測した。再生水中に産生された一部の化学物質は、女性ホルモン阻害性は弱い、他の化合物とシナジー効果を示すことが分かった。汚染水中の免疫毒性物質の活性を判定する新たな発光プローブも開発した。これらの成果を纏めて、8件の論文発表と6件の研究発表を行った。

研究成果の概要(英文)：During the period, the researchers conducted a series of studies on colorimetric technology for determining unexpected, potential risk factors of man-made chemicals in reclaimed water. First, divalent cations in reclaimed water were colorimetrically examined with cation-sensitive artificial luciferases (ALucs), which was originally developed by the researchers. Further, we determined (i) the male and female sex hormone-like activities and the antagonistic effects, and (ii) teratogenicity of man-made chemicals in reclaimed water. The study revealed that some chemicals have a synergistic effect by combining with other chemicals, although they are poor in the antagonistic activity to female sex hormones. A new luminescent probe was also developed for determining immunotoxicity of chemicals in reclaimed water. We published 8 science journals and conducted 6 presentations in academic society meetings.

研究分野：分析化学、環境科学

キーワード：再生水 生物発光 発光プローブ イメージング 化学物質 ホルモン様活性 毒性 生理活性

### 1. 研究開始当初の背景

再生水の滅菌プロセスにおいて様々な化学物質が産生される。これらは非意図的に産生されるため、明示的に認識されることが少なく、人の健康への隠れたリスクとなる。従来の分析法では産生される物質を特定しながら、個別に時間をかけて分析する必要があるため、短時間でリスクの全貌を明らかにすることは困難であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、応募者が独自に開発した3つの技術(超高輝度生物発光酵素、発光可視化プローブ、多チャンネル光検出技術)を、例えば発光マイクロスライドに集約・融合することで、再生水中の多様なホルモン様活性物質の有無を迅速かつ網羅的に発色判定により潜在的な環境リスクを判別する分析法を開発する。並びに発色判定に必要な発光物質の基盤技術を開発する。

### 3. 研究の方法

再生水中のホルモン様化学物質の発光判定には、従来より高い検出感度と速度を必要とし、瞬時に発光判定できることがもっとも望ましい。当研究では、応募者独自の以下の3技術(超高輝度生物発光酵素、発光可視化プローブ、多チャンネル光検出技術)を融合して、再生水中の化学物質の生理活性にตอบสนองする高輝度・高感度発光プローブを開発する。

再生水中に産生された微量化学物質のホルモン様活性(約  $10^{-9}$  M)を原液のまま、若しくは低度濃縮による測定を実現する。

更に個別の高感度発光プローブを各臓器由来細胞に導入することにより、一連の形質変換細胞株をマイクロアレイ化する(図2)。このマイクロアレイの化学物質の生理活性に応じた発光強度を、応募者が独自に開発した世界唯一の多チャンネル同時計測式光検出機などを活用し、多点同時計測する。

### 4. 研究成果

当研究期間中、再生水の健康への潜在的なリスクを網羅的に評価するための発光発色判定技術の開発が主な目的であった。

この目的を達成するために、まず、水汚染の重要な原因物質の一つである重金属類を高速に発光評価する技術の開発に着手した。まず本研究者らの以前の研究からヒントを受け、人工生物発光酵素(ALuc)を用いて、汚染水内の2価重金属類の発光発色評価を網羅的に行った(図1)。

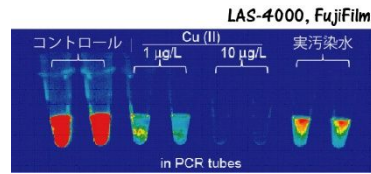


図1. 人工生物発光酵素(ALuc)を用いた汚染水中の重金属の発光発色判定例。

また、汚染水中の化学物質の生理活性を評価するために、本研究者が直接中国に渡り、中国の実生水サンプルから再生水中に産生された化学物質を獲得し(図2)、その男性ホルモン様活性、女性ホルモン様活性、女性ホルモン阻害性・催奇形性などを網羅的に発光計測した(本研究は、中国・清華大学の呉先生の協力を得て行った)。

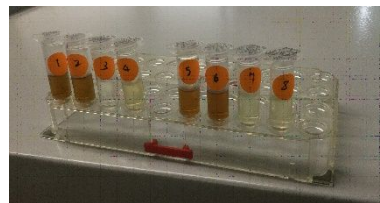


図2. 中国の再生水中に産生された化学物質の実サンプル。

今回獲得した再生水中に産生された化学物質の生理活性を多様な側面から測定した。その一例を図3に示した。この研究結果は、再生水中に産生された化学物質の一部は、女性ホルモン阻害性は弱いが、他の化合物とシナジー効果を示すことが分かった(図3)。

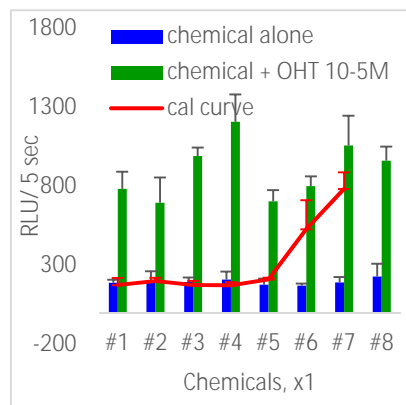


図3. 再生水中に産生された化学物質の女性ホルモン阻害性評価。他の阻害性化合物とシナジー効果を示す(緑バー)。

更に、汚染水の中には、免疫毒性物質の存在も十分想定できることから、その一種であるラパマイシンを測定する新たな発光プローブを開発した(図4)。このプローブは、ラパマイシンと結合する蛋白質であるFRBとFKBPの間に、本研究者独自のALuc23を組み込んだことを大きな特徴とする。このプローブはラパマイシン共存下で、FRBとFKBPが結合するため、分子歪みが挟んだALuc23にか

かるように設計されている。そのため、ALuc23 の発光輝度が上昇する現象を発見した。このような発光プローブを「分子歪みセンサー」と名付け、アメリカ化学会（ACS）の雑誌に報告した。

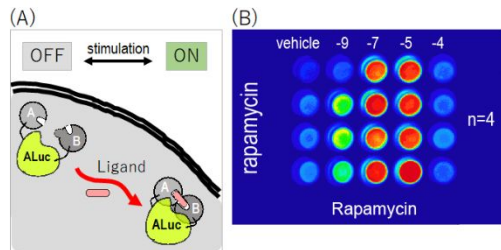


図4 (A) 人工生物発光酵素 (ALuc) を挟んだことを特徴とする発光プローブ (分子歪みセンサー) の作動原理。ラパマイシン (Ligand) 依存的に ALuc に歪みがかかる。(B) 当該分子歪みセンサーにより形質変換された動物細胞のラパマイシン濃度依存的な発光輝度の変化。

また、本研究は「萌芽研究」でもあることから、このホルモン様化学物質の生理活性評価を支える基盤技術に関する研究も継続して行った。特に、前述した再生水内に産生されるホルモン様化学物質の高感度測定に資する発光材料の研究を並行して行った。

まず、本研究は「発光発色判定」を目標とする研究であることから、発光色を青色、緑色、赤色などに変色できるような斬新な発光基質の開発を試みた。

前述した多色イメージングを実現するために、発光の基となる発光基質に蛍光色素を繋げた新規発光基質類を多数有機合成し、その発光性能を検討した (図5)。

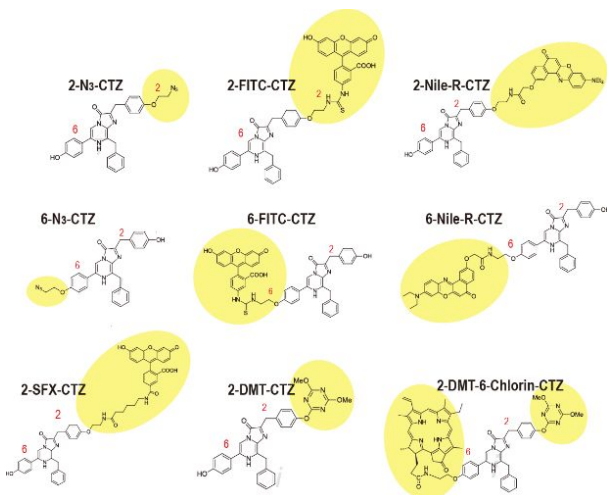


図5 多色発光を実現する蛍光色素付き発光基質の合成戦略。基質の官能基に蛍光色素を連結する。

その一部の合成発光基質においては、従来にない高輝度特性 (6-N3-CTZ, 2-N3-CTZ) を示すことが分かった。また、新しく開発した

人工生物発光酵素 (ALuc) 類と特異的な発光輝度を示すことも確認できた (図6)。

また一部の蛍光色素付き発光基質は、青色から近赤外線または赤色まで、多様な発光色を示すことも確認できた。一方、発光輝度が弱い点は、今後の課題として残る。

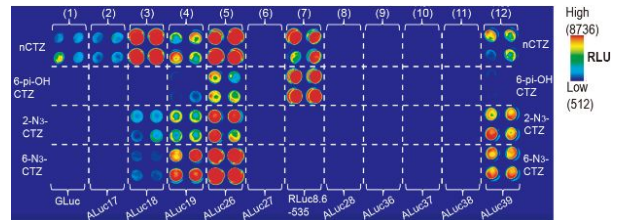


図6 新規合成した生物発光基質と人工生物発光酵素間の発光反応マトリックス。それぞれの発光基質と発光酵素間に相対的な選択性があるか分かる。

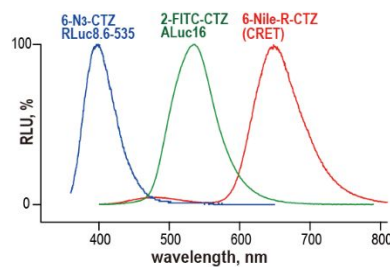


図7 蛍光色素付き生物発光基質の発光色の例。青色から赤色まで多様な発光色を示す。

他にもこのような研究の一軸を占めるのは発光酵素である。本研究で目標とする「汚染水中の化学物質の生理活性」を高感度で測定するためには、より高輝度、高安定性の発光酵素を新規開発する必要がある。

この目標を達成するために、発光プランクトン (copepod) 由来の生物発光酵素の配列データベースから頻度の高いアミノ酸をソフトウェア的に抽出して、新たに人工的な配列を作りあげた。この配列は、いずれの自然の発光酵素にも属しないものであり、遺伝系統図から見ても、既存の発光酵素とははっきり区別される別種であることが分かる (図8 (A))。

また、新しく開発した新規 ALuc 類の発光輝度を調べたところ、一部の新規 ALuc においては、従来の発光プランクトン由来やウミシイタク由来の発光酵素より極めて明るい発光輝度を示すことが確認できた (図8 (B))。

この2年間の研究期間中に行った研究成果と今後の課題について、以下に考察する。

今まで、再生水中に産生される化学物質のホルモン様活性を計測する斬新な発光発色手法を開発することを目標とした研究を進めてきた。

本研究を通じて分かったことは以下に要約できる。再生水中に産生される化学物質は



主に女性ホルモンや男性ホルモン阻害性を持つ可能性があるが、その活性は非常に弱いいため、単独ではその活性を十分示さない。しかし、他のホルモン阻害性物質と組み合わせると一部相乗効果により女性・男性ホルモン阻害性が増すことがある。

今後の課題としては、このような再生水中に産生される化学物質は、その濃度が低く、そのホルモン様活性が弱いため、今まで以上に高い感度の発光発色ツールを開発することが必要である。おおよそ、現在の発光感度より10-100倍程度高い感度が実現できれば、実サンプル測定が可能になると思われる。

今回行った挑戦のように、今後とも、環境汚染物質の生理活性を効率的に評価するためには、化学物質の多様な生理活性（男性・女性ホルモン様活性、向精神性活性、催奇形性活性、またはその阻害性）に備える発光ツールを揃え、各発光ツールを集約・アレイ化することにより、より高度な環境計測と迅速な発色判定に繋がると考えられる。

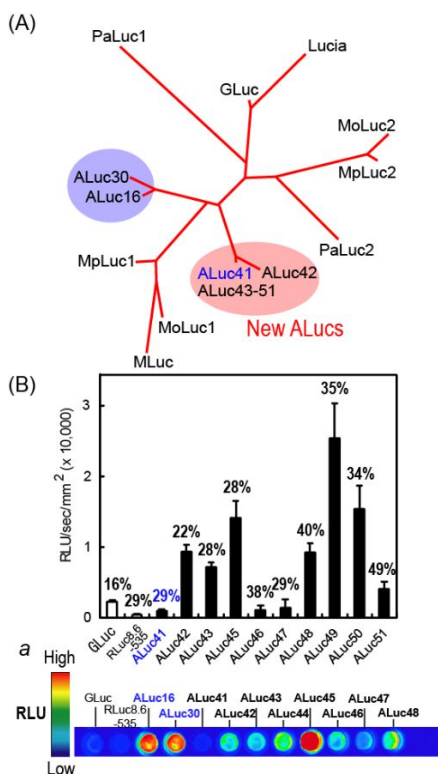


図8.(A)新規開発した人工生物発光酵素(ALuc)群の遺伝系統図。青影は既存のALuc類であり、赤影のところは今回新しく開発したALuc類である。(B)新規ALucの相対的な発光輝度。挿入図aは、それぞれの発光輝度のCCDカメラ写真である。

## 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)

Sung Bae Kim, Ryo Nishihara, Daniel Citterio, Koji Suzuki, A Genetically Encoded Molecular Tension Probe for Tracing Protein Protein Interactions in Mammalian Cells, *Bioconjugate Chemistry* (ACS)、査読有、27 (2)、2016、354-362

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00421  
金 誠培, 藤井理香, 人工生物発光酵素の樹立とバイオアッセイへの応用、*分析化学*、査読有、65(7)、2016、361-369

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.65.361

Sung Bae Kim, Rika Fujii, Fabrication of Molecular Tension Probes, *MethodsX* (Elsevier)、査読有、3、2016、261-267

Sung Bae Kim, Takeaki Ozawa, Yoshio Umezawa, A genetically encoded bioluminescent indicator for illuminating proinflammatory cytokines, *MethodsX* (Elsevier)、査読有、3、2016、483-489

Ryo Nishihara, Masahiro Abe, Shigeru Nishiyama, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Sung Bae Kim, Luciferase-Specific Coelenterazine Analogues for Optical Contamination-Free Bioassays, *Scientific Reports* (Nature Publishing Group)、査読有、7、2017、908

Sung Bae Kim, Ryo Nishihara, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Fabrication of a New Lineage of Artificial Luciferases from Natural Luciferase Pools, *ACS Combinatorial Science*、査読有、19、2017、594-599

金誠培, 藤井理香, 化学物質による生理活性の発光イメージング, *Pharm Tech Japan*、査読有、34 (2)、2018、1-6

Ryo Nishihara, Emi Hoshino, Yoshiki Kakudate, Satoshi Kishigami, Naoko Iwasawa, Shin-ichi Sasaki, Takahiro Nakajima, Moritoshi Sato, Shigeru Nishiyama, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Sung Bae Kim, Azide- and Dye-Conjugated Coelenterazine Analogues for a Multiplex Molecular Imaging Platform, *Bioconjugate Chemistry*、査読有、2018、in press

[学会発表](計 6 件)

Ryo Nishihara, Takahiro Nakajima, Sung-Bae Kim, Moritoshi Sato, Shigeru Nishiyama, Naoko Iwasawa, Daniel Citterio, Koji Suzuki, Fabrication of Blue-Shifted Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Applications, The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016), May 29-June 2, 2016, Tsukuba Japan, Presentation number: PA-36

Ryo Nishihara、Takahiro Nakajima、Sung-Bae Kim、Moritoshi Sato、Shigeru Nishiyama、Naoko Iwasawa、Daniel Citterio、Koji Suzuki、Fabrication of Blue-Shifted Coelenterazine Derivatives for Bioluminescent Applications、The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016)、May 29-June 2、2016、Tsukuba Japan Presentation number: B3-11

Sung Bae Kim、Rika Fujii、Fabrication of Single-Chain Bioluminescent Probes from Artificial Luciferases、The 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2016)、May 29-June 2、2016、Tsukuba Japan Presentation number: A2-3

Sung Bae Kim、Fabrication of artificial luciferases and their applications to molecular imaging、Royal Society of Chemistry (RSC) Tokyo International Conference 2016、September 8-9、Makuhari Messe、Chiba、Presentation number: 3

金 誠培、産総研水プロジェクトセミナー、Feb 16、2017、InterAqua 2017、East Hall 1、Tokyo Big Sight、Tokyo Japan

金 誠培、Artificial Luciferases and Their Applications to Bioassays、Graduate School Seminar、April 14、2017、Graduate School at Shenzhen、Tsinghua University、Shenzhen China

〔図書〕(計 9 件)

Sung-Bae Kim ( Editor )、  
「 Bioluminescence 」 ( Publisher:  
Springer - Humana Press; ISBN:  
978-1-4939-3811-7; New York )

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、43-53

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、143-151

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、153-163

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、165-173

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、175-182

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、183-193

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、271-278

Sung Bae Kim 他、Method in Molecular  
Biology 2016、1461、279-287

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

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：同上

種類：特許

番号：特願 2017-055985

出願年月日：平成 29 年 3 月 22 日

国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：新規人工生物発光酵素群

発明者：金 誠培

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2016/079160 (H28/09/30)、US  
15/763779

取得年月日：平成 28 年 9 月 30 日

国内外の別：

〔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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

藤井理香 (FUJII, Rika)

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

呉乾元 (WU, Qian-Yuan)

清華大学深圳研究生院