

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05320

研究課題名（和文）キラルフリーなホタル生物発光を実現する細胞株の作製とバイオイメージングへの展開

研究課題名（英文）Creation of cell lines that realize chiral-free firefly bioimaging

研究代表者

加藤 太一郎 (KATO, Dai-ichiro)

鹿児島大学・理工学域理学系・助教

研究者番号：60423901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ホタル生物発光ではルシフェリン基質の不斉によって発光活性は著しく異なる。本研究において申請者は、ルシフェリン基質の不斉に関係なくD-体L-体いずれからでも効率よく発光するキラルフリー発光細胞を作製することを目指した研究を行った。この目的を達成するために、ホタル体内におけるD-ルシフェリン生合成経路を模倣したデラセミ化反応を活用することとし、標的としたルシフェラーゼ恒常発現Hela細胞に外来性チオエステラーゼを導入するとともに、内在性の遺伝子のノックダウンを試みた。検討の結果、非天然型のL-体からでも微弱ながら発光活性を有する候補細胞株を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホタル生物発光では一般的にL-体基質からは発光しないが、発光基質は反応中に容易にラセミ化するため、イメージング時の光学純度が維持できず発光の定量性や再現性が担保されないという問題点があった。しかしL-ルシフェリンでは発光しないという点を逆手に取れば、本手法によってデラセミ化反応経路が動作している細胞でだけD-ルシフェリンを生成させられる。よってバックグラウンド発光を著しく抑えた創造性の高い発光システムの構築が可能になる。さらに将来的にルシフェリン生合成経路の全体像が明らかになれば、本経路と融合することでD-ルシフェリンを自前供給する細胞システムへと展開することができる。

研究成果の概要（英文）：In firefly bioluminescence, the luminescence activity differs significantly depending on the luciferin enantiomer. In this project, we studied to produce a chiral-free bioluminescent cell that emit light even from non-luminous substrate L-luciferin. To achieve this goal, we decided to utilize a deracemization reaction that mimics the D-luciferin biosynthetic pathway in fireflies and introduced exogenous thioesterase into a luciferase enzyme expression Hela cells, and also knocked down an internal thioesterase. As a result of this examination, a candidate cell line having a luminescent activity even from the non-luminous L-luciferin was obtained.

研究分野：酵素有機化学

キーワード：ホタル生物発光 ホタルルシフェラーゼ チオエステラーゼ 立体反転 デラセミ化

1. 研究開始当初の背景

ホタルの発光は、酵素ホタルルシフェラーゼが、基質 D-ルシフェリンをオキシルシフェリンへと化学変換することで実現される。本現象は化学発光の一種であり、蛍光発光と比較して S/N 比が高いこと、細胞深部の標的でも検出可能であること等の優位性から、医療・食品など様々な分野における検出やバイオイメージング手法へと応用されてきた。

このホタル生物発光を用いたバイオイメージングでは、発光基質 D-ルシフェリンを血中投与するだけでほぼ全身に行きわたらせることが可能という手軽さがある一方、生体内で基質が簡単にラセミ化してしまうという問題があった¹⁾。

つまり、ホタルルシフェリンは分子中に 1 つの不斉炭素を有しており、D-体 L-体という一組の光学異性体が存在する(図 1)。これらの内、現状の発光反応条件下では D-体が発光基質として利用できる一方、L-体は強力な発光阻害剤として働くため、L-ルシフェリンの混入が定量的な発光を妨げたり、再現性を低下させたりする原因となっていた。注目すべきは中性付近であってもルシフェリン分子は容易にラセミ化してしまうためイメージング測定中の光学純度の維持が困難な点であり、発光の定量性や再現性が担保されていないかもしれないということがようやく研究者の間で認識されるようになってきた状況であった。よってラセミ化に対する対策は十分とは言い難い背景があった。

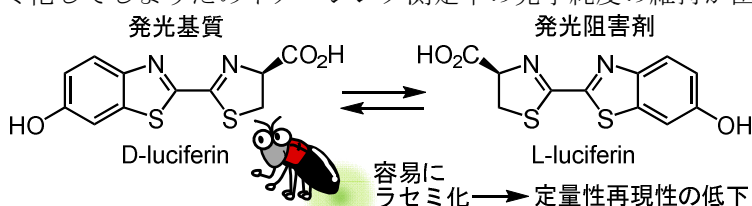


図1. ホタル発光基質ルシフェリンは容易にラセミ化する

2. 研究の目的

本研究において申請者は、基質のラセミ化を気にすることなく、発光追跡期間が長期間にわたる場合でも定量的かつ再現性の高い測定が可能なるホタル生物発光バイオイメージングシステムを構築することを目的とした研究を行った。この目的を達成するために、ホタル体内における D-ルシフェリン生合成経路を模倣したデラセミ化反応を活用することを計画した(図 2)。

デラセミ化は、申請者が、他の研究者に先駆けて *in vitro* にて動作することを確かめた独自性の高いキラルフリー発光システムである(図 2)¹⁾。ホタル体内では、まず非発光基質である L-ルシフェリンが生成し、これがホタルルシフェラーゼのチオエステル化活性によって L-ルシフェリル-CoA へと変換される。本分子は容易にエピメリ化し D-ルシフェリル-CoA へと立体反転された後、チオエステラーゼによって加水分解され発光基質 D-ルシフェリンが生成される。本プロセスを細胞内に再現することで、L-ルシフェリンが混入していたとしても、標的細胞内で適宜 D-体へと戻すことができる。

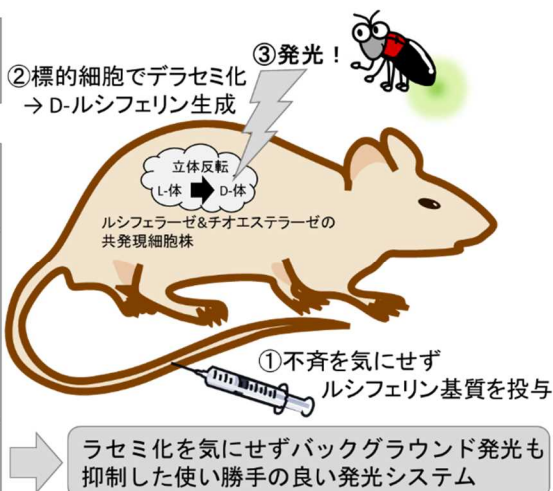
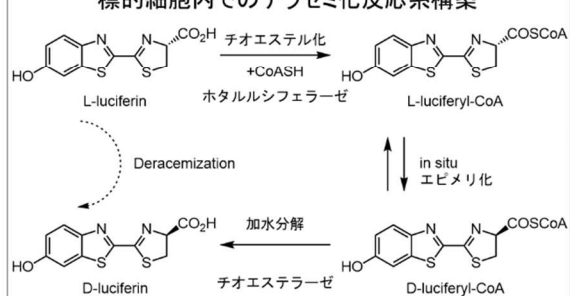
また、L-ルシフェリンでは発光しないという点を逆手に取れば、反応系に L-体を添加することで、デラセミ化反応経路が動作している細胞でだけ D-ルシフェリンを生成させられる。よってバックグラウンド発光を著しく抑えた創造性の高い発光システムの構築が可能になると期待した。

本申請課題の目標

ルシフェリン基質の不斉に関係なく発光するキラルフリー発光細胞の作製とイメージングへの展開!

戦略

チオエステラーゼ遺伝子の導入による標的細胞内でのデラセミ化反応系構築



ラセミ化を気にせずバックグラウンド発光も抑制した使い勝手の良い発光システム

図2. キラルフリーなホタル生物発光を実現するデラセミ化発光システムの概念図

3. 研究の方法

本申請課題では、ルシフェリン基質の不斉に関係なく D-体 L-体いずれからでも効率よく発光するキラルフリー発光細胞を作製すると共に、それを *in cellulo* および *in vivo* イメージングに適用可能な基盤技術へと展開することを目指した研究を行った。期間中に実施した具体的な検討課題は以下の通りである。

(1) 培地中でのルシフェリン基質のラセミ化の可視化

細胞培養液中での発光基質 D-ルシフェリンの光学純度の経時変化をダイセル社製キラルカラム CHIRALCEL OD-RH を用いて測定した。用いた培地は D-MEM 培地とし、ラセミ化の進行速度を比較するために、各種 pH の GTA 緩衝液および超純水中でも測定を行った。

(2) 各種ホタルルシフェラーゼを利用した *in vitro* でのデラセミ化反応の確認

申請者らの先行研究でゲンジボタル由来ルシフェラーゼとチオエステラーゼを組み合わせた *in vitro* デラセミ化経路の進行を確認していたが、*in cellulo* や *in vivo* イメージングに利用される培養細胞に利用されるホタルルシフェラーゼは北アメリカ産ホタル由来(F-luc)、あるいはブラジル産光コメツキムシ由来(E-luc)が一般的であるため、これらのルシフェラーゼでも同様のデラセミ化発光経路が動作するのか確認した。

(3) ホタルルシフェラーゼ恒常発現細胞株を用いた L-ルシフェリンからの *in cellulo* 発光

検討に用いた培養細胞は、ヒト不死化子宮頸がん由来細胞(Hela)に北アメリカ産ホタル由来(F-luc)、およびブラジル産光コメツキムシ由来(E-luc)ルシフェラーゼが導入されたホタルルシフェラーゼ恒常発現細胞株(F-Hela および E-Hela)を利用した。F-Hela は(独)医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクから分譲されているヒトがん細胞由来細胞 JCRB1679 である。E-Hela は(独)産業技術総合研究所より供与いただいた。

(4) 小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムを利用したヒト由来チオエステラーゼの発現とルシフェリル-CoA の加水分解

ヒト由来細胞に存在する内在性チオエステラーゼのデラセミ化経路中の重要中間体ルシフェリル-CoA の加水分解におよぼす影響を調査するために、小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムを利用してヒト細胞由来の内在性チオエステラーゼ(ACOT2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13)を発現し、これらがルシフェリル-CoA を加水分解する際の立体選択性をそれぞれ確認した^[2]。

(5) 外来性チオエステラーゼ導入細胞の構築と siRNA を用いた内在性チオエステラーゼのノックダウンによる *in cellulo* デラセミ化機能評価

In vitro での検討でデラセミ化が進行すると分かっている大腸菌由来のチオエステラーゼ(TESE-B)を Promega 社製 pCI-neo Mammalian Expression Vector を用いて標的細胞(F-Hela および E-Hela)の染色体にノックインした。発光活性に違いがあるいくつかの細胞に対して、デラセミ化反応の進行に悪影響を与える可能性の高い内在性チオエステラーゼ(ACOT13)遺伝子を siRNA 技術によってノックダウン(ThermoFischer 社製 siRNA を利用)し、ルシフェリン基質の光学異性の違い(D-体 L-体)による発光特性を比較した。

4. 研究成果

(1) 培地中でのルシフェリン基質のラセミ化の可視化

細胞培養液中で発光基質 D-ルシフェリンがどの程度ラセミ化し L-ルシフェリンが生成するのかを確かめるために、L-体の存在比率の経時変化を測定した(図 3)。純水中では D-体から L-体への変化はほとんど観察されなかった一方、塩基性条件下では L-体の存在量は増加し、9 日目には 40%程度にまで上昇した(鏡像体過剰率 20% ee)。弱酸性領域ではラセミ化は抑えられるがそれでも 5%程度蓄積していた。D-MEM 培地中では、pH 7 とほぼ同等のラセミ化度合いを示し 9 日後にはおよそ 15% (鏡像体過剰率 70% ee)にまで L-体濃度が高まることを確認された。このことから *in cellulo* および *in vivo* でのイメージングでは、測定時にルシフェリン基質はラセミ化し、発光活性に何らかの影響を与える懸念があることが明らかとなった。

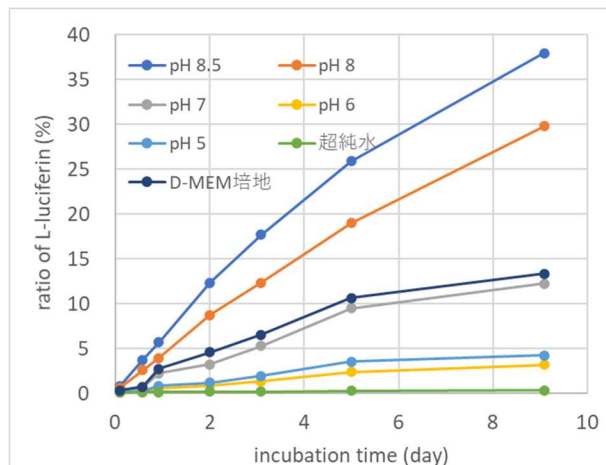


図3. 培地中でのルシフェリン基質のラセミ化

(2) 各種ホタルルシフェラーゼを利用した *in vitro* でのデラセミ化反応の確認

培養細胞に導入されるホタルルシフェラーゼは北アメリカ産ホタル由来(F-luc)、あるいはブラジル産光コメツキムシ由来(E-luc)が一般的である。そこでこれらのルシフェラーゼでも同様のデラセミ化発光経路が動作するのかを *in vitro* デラセミ化反応系にて確認した。その結果、反応条件を整えることで F-luc および E-luc 共に L-ルシフェリンから D-ルシフェリンへと変換され、十分な生物発光を確認できることを確かめることができた。

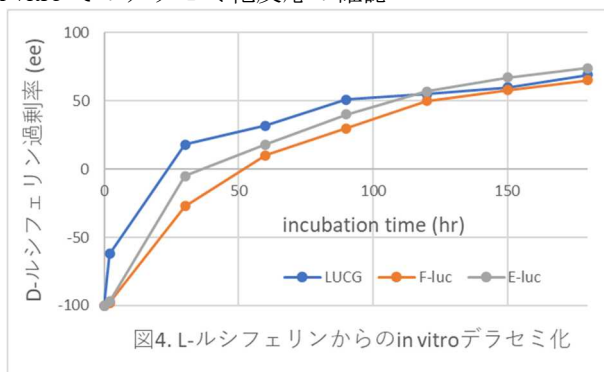


図4. L-ルシフェリンからの *in vitro* デラセミ化

(3) ホタルルシフェラーゼ恒常発現細胞株を用いた L-ルシフェリンからの *in cellulo* 発光

北アメリカ産ホタル由来(F-luc)、およびブラジル産光コメツキムシ由来(E-luc)ルシフェラーゼが導入されたヒト不死化子宮頸がん由来細胞株(F-Hela および E-Hela)を用いて天然基質である D-ルシフェリンを用いた *in cellulo* 発光を確認したところ、E-Hela では十分な発光量が得られた一方、F-Hela の発光量は非常に微弱で検討に利用できるレベルではなかった。よって以下の検討では E-Hela を用いることとした。E-Hela について L-ルシフェリンを用いた発光量は、D-体を用いた場合のおよそ 1/10~1/20 であった。次に L-体からの発光量の向上を期待して、*in vitro* でのデラセミ化活性を確認できている大腸菌由来チオエステラーゼ TES-B 遺伝子を pCI-neo ベクターを利用して E-Hela の染色体上にランダムに導入した細胞株を十数種類作成し、それらを用いて L-ルシフェリンからの発光活性を測定した。しかしいずれも発光活性に変化は見られず、デラセミ化経路が細胞内で機能していないことが懸念される結果を得た。

(4) 小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムを利用したヒト由来チオエステラーゼの発現とルシフェリル-CoA の加水分解

項目 4-(3)にて *in vitro* での変換活性を確かめている TES-B 遺伝子を導入した E-Hela 細胞でもデラセミ化反応が進行しない理由として、ヒト由来細胞に存在する内在性チオエステラーゼによるルシフェリル-CoA の加水分解が考えられた。つまり、内在性のチオエステラーゼがデラセミ化経路中の中間体であるルシフェリル-CoA を加水分解することで、エピメリ化による立体反転過程が十分に進行する前にルシフェリン基質に戻ってしまっているのではないかと考えた。そこで、小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムを利用してヒト細胞由来の内在性チオエステラーゼ(ACOT2, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13)を個別に発現し、これらを用いてルシフェリル-CoA に対する加水分解活性を確認した。その結果、ほとんどのチオエステラーゼは全く加水分解活性を示さないか、非常に低いものにとどまった一方、ACOT-13 はルシフェリル-CoA に対して加水分解活性を示し、かつ非常に高い L-体選択性を示すことが判明した(図 5)。つまり内在性の ACOT-13 が L-ルシフェリル-CoA を立体選択的に加水分解することで、デラセミ化が進行しない可能性が示唆される結果を得た。

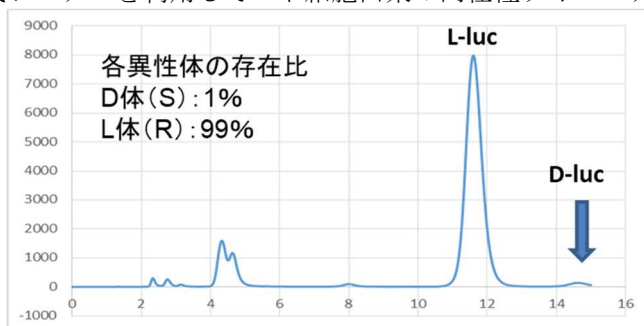


図5. ACOT-13によるルシフェリル-CoAの加水分解の立体選択性

(5) 外来性チオエステラーゼ導入細胞の構築と siRNA を用いた内在性チオエステラーゼのノックダウンによる *in cellulo* デラセミ化機能評価

項目 4-(4)にて内在性チオエステラーゼ(ACOT-13)がデラセミ化反応の進行に悪影響を与える可能性が示唆されたため、本 ACOT-13 遺伝子を siRNA 技術によってノックダウンし、ルシフェリン基質の光学異性の違い(D-体 L-体)によって発光量に違いが出るかを確かめることとした。

大腸菌由来のチオエステラーゼ

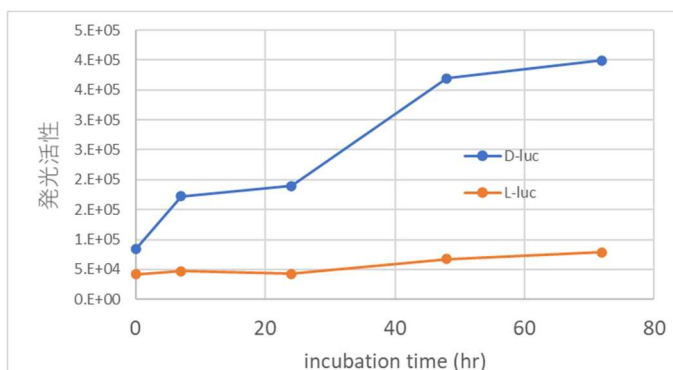


図6. Clone13に対する発光活性の経時変化

(TES-B)を E-Hela の染色体上に導入することで D-ルシフェリンに対する発光活性に違いがある数種類の E-Hela 株を得た。これらに対して siRNA にて ACOT-13 遺伝子をノックダウンし、D-体および L-体のルシフェリンを用いた発光活性の経時変化を測定した。その結果、ほとんどの細胞について D-ルシフェリンに対する発光活性は経時的に上昇していく一方で、L-ルシフェリンに対する発光活性は一定か、低下していく様子が観察された。しかし、ただ一株 Clone13 については、L-体に対する発光活性が微弱ではあるが経時的に上昇していくことが観察された(図 6)。このことから本変異株は当初の目的に合致する L-体をデラセミ化しながら D-ルシフェリンへと変換し、発光している可能性を得ることができた。

今後、は以下のような解析を行っていく計画である。

これまでの *in vitro* での検討より、目的のデラセミ化立体反転反応を実現するためには、ホタルルシフェラーゼとチオエステラーゼの 2 種類の酵素タンパク質の発現量比が非常に重要であることが分かっている。そのため細胞内での発現バランスの制御が難しい場合にはデラセミ化発光を実現できない可能性がある。そこで RT-PCR 解析等によって各遺伝子の発現量を確認する検討が必要である。

将来的にルシフェリン生合成経路の全体像が明らかになれば、本経路と融合することで、D-ルシフェリンを自前供給する細胞システムへと展開することも可能となり得る。本研究プロジェクトにて微弱ながら L-ルシフェリンからも発光する細胞株を見出せたことは、自前発光細胞構築の前段階の要素技術として意義深い研究成果であると考えている。

引用文献

1. J.Maeda, D.Kato, M.Okuda, M.Takeo, S.Negoro, K.Arima, Y.Ito, K.Niwa, "Biosynthesis-inspired deracemizative production of D-luciferin by combining luciferase and thioesterase", *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects*, **2017**, *1861*, 2112-2118.
2. 丹羽一樹, 五島直樹, 福田枝里子, 加藤太一郎, "チオエステル結合加水分解酵素を用いたキラリなカルボン酸化合物の不斉合成方法", 特願 2017-148352.

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 Dai-ichiro Kato, Hirobumi Suzuki, Atsuhiko Tsuruta, Juri Maeda, Yoshinobu Hayashi, Kazunari Arima, Yuji Ito, Yukio Nagano	4. 巻 10
2. 論文標題 Evaluation of the population structure and phylogeography of the Japanese Genji firefly, <i>Luciola cruciata</i> , at the nuclear DNA level using RAD-Seq analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1533
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58324-9	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 Y.Oba, K.Konishi, D.Yano, H.Shibata, D.Kato, T.Shirai	4. 巻 6
2. 論文標題 Resurrecting the ancient glow of the fireflies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabc5705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abc5705	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野陽介, 鶴田篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 赤澤 陽子, 中島 芳浩, 加藤 太一郎
2. 発表標題 アルバカ抗体によるホタルルシフェラーゼの発光活性阻害
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸 愛望, 鶴田篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 加藤 太一郎
2. 発表標題 蛍光タンパク質との複合体化によるホタルルシフェラーゼの発光色変化
3. 学会等名 第21回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金丸 愛望, 鶴田 篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 加藤 太一郎
2. 発表標題 BRET を利用したホタルルシフェラーゼの発光色変換
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 陽介, 鶴田 篤弘, 有馬 一成, 伊東 祐二, 赤澤 陽子, 中島 芳浩, 加藤 太一郎
2. 発表標題 ホタル生物発光のアルパカ抗体による制御
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田 篤弘, 加藤 太一郎, 有馬 一成, 伊東 祐二, 赤澤 陽子, 中島 芳浩
2. 発表標題 ホタルルシフェラーゼ生物発光活性制御におけるアルパカ抗体の利用
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴田 篤弘, 加藤 太一郎, 有馬 一成, 伊東 祐二, 赤澤 陽子, 中島 芳浩
2. 発表標題 シングルドメイン抗体を利用したホタルルシフェラーゼの酵素活性制御
3. 学会等名 第18回泉屋コロキウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴田 篤弘, 加藤 太郎, 有馬 一成, 伊東 祐二, 赤澤 陽子, 中島 芳浩
2. 発表標題 抗体を用いたホタル生物発光制御
3. 学会等名 第25回日本生物工学会九州支部鹿児島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口晃平, 加藤 太郎, 有馬 一成, 伊東 祐二
2. 発表標題 ホタルルシフェラーゼのダイナミックな構造変化の起こるメカニズム
3. 学会等名 第25回日本生物工学会九州支部鹿児島大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsuhiko Tsuruta, Dai-ichiro Kato, Kazunari Arima, Yuji Ito, Yoko Akazawa, Yoshihiro Nakajima
2. 発表標題 Utilization of single domain antibody for controlling the bioluminescent catalytic activity of firefly luciferase
3. 学会等名 The 20th Biocatalysis Symposium of Japan
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野陽介, 鶴田篤弘, 有馬一成, 伊東祐二, 赤澤陽子, 中島芳浩, 加藤太郎
2. 発表標題 ホタル生物発光を阻害するアルパカ抗体の機能解析
3. 学会等名 第22 回生体触媒化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学作成_個人ページ_研究者総覧
http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100005876_ja.html
研究代表者作成_研究グループホームページ
<https://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/kato/>
鹿児島大学作成_個人ページ_研究者総覧
http://ris.kuas.kagoshima-u.ac.jp/html/100005876_ja.html
研究代表者作成_研究グループホームページ
<https://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/kato/>

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
---------	---------