

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19404007

研究課題名(和文) 新規発光プローブの探索を目指した発光生物調査

研究課題名(英文) Field research of Bioluminescent organism for new bioluminescent probes

研究代表者

近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・副研究部門長

研究者番号：20223951

研究成果の概要(和文)：我々は新規の生物発光技術を創出する資源を確保するため、世界各地の発光生物群を現地調査した。調査した地域は中国、アメリカ、ヨーロッパ、ブラジル、ニュージーランド及びオーストラリアであり、発光甲虫、発光ヒトデ、発光サメや発光昆虫を調査、採取した。収集したサンプルより、現地協力者の実験室にて遺伝子や低分子化合物を抽出し、協力者の許諾のもと一部を申請代表者の産総研に持ち帰り、生物発光システムの解明研究に活用した。

研究成果の概要(英文)：To secure the resource that created a new bioluminescence technology, we local investigated the living thing of luminescent organisms in all parts of the world. The surveyed region was China, the United States, Europe, Brazil, New Zealand, and was Australia. In these eras, we investigated and collected luminescent beetles, the brittle stars, the luminescent shark, and the luminescence insect. We extract a gene and low molecular compound from collected samples in local cooperator's laboratory. Under the permission of local researcher, we took out a part of original sample in AIST and had been studying the bioluminescence system including the identification of luciferase and luciferin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	10,100,000	3,030,000	13,130,000

研究分野：光生物学、生化学

科研費の分科・細目：4706

キーワード：発光生物、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、発光甲虫、発光ヒトデ、発光魚

## 1. 研究開始当初の背景

“生物発光 Bioluminescence” 研究は基礎から応用まで多岐に渡る。例えば、ホタルの発光は遺伝子発現のレポーター酵素であるばかりでなく、ATPの定量や更にはATP検出を通じたバクテリア検出など食品分野を支える技術でもある。また、発光クラゲから抽

出された発光タンパクイクオリンは細胞内のカルシウムイオンによって発光がトリガーされるが、これを利用した細胞内のカルシウムイオンの可視化に用いられている。さらに、もう一つの抽出物であるGFP(緑色蛍光タンパク質)は細胞内において発現すると何の因子も必要とせず蛍光を発することか

ら、細胞内の情報を探る大きなツールとなり、GFPを用いた論文は毎年 1000 報以上にも達するなど、生命学者にとって身近なものとなっている。このように生物発光が 21 世紀の生命科学を支えるといっても決して過言ではない。後者の例とした発光クラゲについて、イクオリン及び GFP の発見者がウッズホール海洋研究所に在職した下村脩博士であり、博士は 1950 年代から現在まで生物発光研究の最前線で弛まぬ研究を続けている。最近、下村博士は”Bioluminescence”という著作を出版、生物発光研究において、この半世紀で生物発光がどこまで明らかになったかを解説し、GFP、イクオリン以外の生物発光メカニズムの面白さと、さらには解明されていない現象について解説している。また、下村博士は我々後継の研究者が解明すべき生物発光の世界が未だに多く残されていることを強く指摘している。つまり、ホタル、発光クラゲ、ウミホタル、発光性渦鞭毛藻或いは発光バクテリアなどは、その発光機構の解明が進み、さらにはその原理を利用した応用研究も始まったが、未だ、多くの発光生物の発光機構が未解明である。一方、未解明な発光現象の中には、新しい原理のもの、さらには「光イメージング」を支える可能性のものもあるだろうと下村博士は予見している。

ゲノムプロジェクトの成果に立つ 21 世紀の生命科学の分野では、細胞内の様々な現象について、どのようなゲノム情報を基盤に起きるのかを知ること、それをイメージングすることが大変に重要であるといわれている。このような現状の中、生物発光のプロープ群は細胞内カルシウム量の変動、細胞内タンパクのリン酸化、エネルギーである ATP の分布或いは遺伝子の転写活性の測定など、細胞内に起きるさまざまな現象をイメージングする手段として注目されているのである。しかしながら、十分にイメージングツールが揃ったかといわれれば、充分でないのが現状であり、新規の発光、蛍光プロープが活躍する場は無限にある。よって、本申請では新規の発光・蛍光プロープを探索するため、世界の発光生物の収集と物質レベルのデータベース化を計画する。

申請者らは、生物発光を研究する下村博士の後継者であると自認している。研究代表者の近江谷は、昨年、「バイオ・ケミルミネセンスハンドブック(丸善)」を編集、生物、化学、生化学、及び分子生物学に渡る生物発光の世界を広く紹介した。また、これまでに、**新規生物発光系と発光行動に関する分子基盤研究【文部省科学研究費国際学術研究・学術調査(代表丹羽治樹)1997-99, 11,000 千円】**において、研究分担者である大場とともに南太平洋ニュージーランド及びフィジー

島の発光生物の探索を行い、ツチボタルの発光行動や棲息地の確認、発光貝ラチアの採集を行った。更には、**ホタルのルーツを求めた中国雲南省の発光甲虫生態調査【学術振興会科学研究費海外調査研究2002-05, 11,000 千円】**中国雲南省の南西部、南部の調査を行い新種のホタル、イリオモテボタル及び半水棲ホタルを発見、半水棲ホタルは日本のゲンジボタル等の祖先系である可能性を明らかにした。他方、研究代表者は、06 年 10 月より北海道大学大学院医学研究科分子・細胞イメージング部門の教授に就任、生物発光をリードし、生物発光プローブによる生命現象のイメージングを邁進する立場に、また、国際生物発光化学発光のカウンセルメンバーとして、発光生物を研究する研究者と強く連携できる立場にもある。このような現状の中、次の 10 年を見据えた新規生物発光系の解明を目指し、本海外研究調査を立案した。

## 2. 研究の目的

世界各地の発光生物から単離、同定された生物発光プローブ群は細胞内カルシウム量の変動、細胞内タンパクのリン酸化、エネルギーである ATP の分布或いは遺伝子の転写活性の測定など、細胞内に起きるさまざまな現象をイメージングする手段として有用である。更なる生物発光系発光プローブを探索するため、世界の発光生物を収集、物質レベルのデータベース化する必要がある。本研究では、これまでの調査研究や世界的な生物研究者のネットワークの情報を基に、ニュージーランドの発光貝ラチア、オーストラリアのアラキノカンパ(俗称ツチボタル)、中国雲南省の星虫及び発光ミミズ、ベルギー王国の発光クモヒトデ、ノルウェー王国の発光サメなどのサンプルを確保、遺伝子やタンパク質群のバンク化を進める。

## 3. 研究の方法

対象地域は中国西南部雲南省及び四川省。ニュージーランド、オーストラリアの南太平洋地域。ヨーロッパ北西部のベルギー及びノルウェー。南米ブラジル。また情報収集のためのアメリカ東部ハーバード大学等を海外調査した。研究対象は発光甲虫、発光ミミズ、アラキノカンパなどの陸生の発光生物、及び発光ヒトデ、発光サメ、発光性渦鞭毛藻などの海生の発光生物である。

調査方法は現地のホスト研究者(中国科学院昆明動物研究所、ニュージーランド水研環境研究所 NIWA、ブリスベン大学、ハーバード大学、サンカルロ大学)の研究室を拠点に野外調査を行った。発光生物の採取は個々の国の法律に準拠し行った。採取した生物試料は現地研究者の許可のもと、遺伝子や低分子化合物の抽出を行い、生物標本と共に日本国内

に持ち込み、標本や野外調査データを保存した。また、持ちこんだ遺伝子のライブラリー化などを行った。

#### 4. 研究成果

これまでの4年間で、6カ国で発光生物の情報収集、野外観察、及びサンプル採取を行った。国毎に研究成果をまとめる。

**(1) 中国雲南省、四川省の発光生物の野外調査：**2007-2010年度まで中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授らの協力のもと、星虫、発光ミミズや発光甲虫等の野外調査を実施した。

より具体的には、2007年7月、日本側から近江谷、藤森、大場(研究協力者・産総研客員研究員)が、中国側から Andy Liang、Li 研究員や大学院生の総勢9名が参加、雲南省西部の三江流域を中心に保山、大理周辺の発光甲虫の採取を行った。併せて棲息地、棲息状況、生態などを詳細に調査した。得られたサンプルは近江谷、藤森が持ち帰り、組織標本を作製併せてサンプルを保存した。大場は生息状況等を記録、映像及び試料を日本にて解析、整理した。

2008年7月、日本側から近江谷、藤森、大場(研究協力者・産総研客員研究員)が、中国側から Andy Liang、Li 研究員や大学院生の総勢13名が参加、雲南省南西部の三江中下流域を中心に保山周辺の発光甲虫の採取を行った。併せて棲息地、棲息状況、生態などを詳細に調査した。得られたサンプルは近江谷、藤森が持ち帰り、組織標本を作製併せてサンプルを保存した。大場は生息状況等を記録、映像及び試料を日本にて解析、整理した。

2009年9月、日本側から近江谷、藤森、大場(研究協力者・産総研客員研究員)が、中国側から Andy Liang、Li 研究員や大学院生の総勢9名が参加、雲南省南部のシーモアからシーサーパンナを中心に発光甲虫の採取を行った。併せて棲息地、棲息状況、生態などを詳細に調査した。得られたサンプルは近江谷、藤森が持ち帰り、組織標本を作製併せてサンプルを保存した。大場は生息状況等を記録、映像及び試料を日本にて解析、整理した。特に本年度は中国で初となる *Stenocladus*(クシヒゲボタル属)の幼虫を採集、シンガポールの星虫にも似ている中間形態を持った種であり、インドシナ半島・マレー半島との関係が強く示唆される結果を得た。

2010年8月、日本側から近江谷、大場(研究協力者・産総研客員研究員)が、中国側から Andy Liang、Li 研究員や大学院生の総勢5名が参加、四川省西部から雲南省北部にかけてのチベット台地にて星虫及び発光甲虫の調査を行った。発光甲虫の棲息地、棲息状況、生態などを詳細に調査した。得られたサン

プルは近江谷が持ち帰り、組織標本を作製併せてサンプルを保存した。大場は生息状況等を記録、映像及び試料を日本にて解析、現在、データを検討中である。多くの発光甲虫の観察、採取し、中国科学院の許可の元、一部のサンプルを持ち帰り、現在、日本国内にて遺伝子の抽出等を行っている。特に下記写真のシャングリラ周辺の3500mの高地で3種のホタルを世界で初めて同時に収集した。



図 シャングリラ(3,500m)高地で収集

なお、星虫、発光ミミズの採取には成功していない。

**(2) 米国での発光生物情報収集：**2007年12月、ハーバード大学 Hastings 教授、ウッズホール海洋研究所下村博士らと面談、世界各地の発光生物に関する情報収集を行った。特に、ハーバード大学生物科 Woody Hastings ラボの発光性渦鞭毛藻類ライブラリーの調査研究を行った。日本側より近江谷、呉(研究協力者・産総研研究員)が参加、Woody Hastings ラボにある発光性渦鞭毛藻類の生態観察、日本での生育可能な種を同定した。これらの情報を元に、4種の発光性渦鞭毛藻類を日本に持ち帰ったが、生育条件をコントロールできず死滅した。同様の調査を2009年11月にもハーバード大学 Hastings 教授、ウッズホール海洋研究所下村博士らと面談、世界各地の発光生物に関する情報収集を行った。

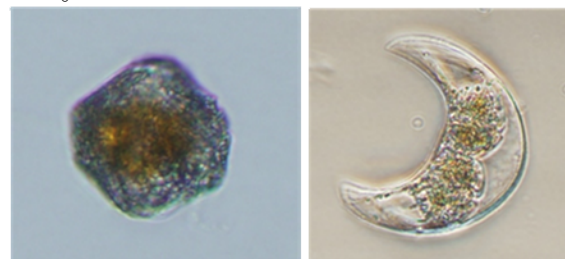


図 持ちかえった発光性渦鞭毛藻2種

**(3) ニューージーランドの発光貝の野外調査：**2009年3月ニューージーランドハミルトン市周辺でニューージーランド環境研究所 NIWA の協力を得て、日本側近江谷、丹羽(産総研研究



員)が発光貝ラチアを採取、サンプル収集した。ラチアはニュージーランド水系環境研究所 NIWA の許可の元、日本国内に持ち帰りタンパク質や遺伝子を抽出、保存した。併せてワイトモ洞窟周辺のアラキノカンパの生息調査を行った。

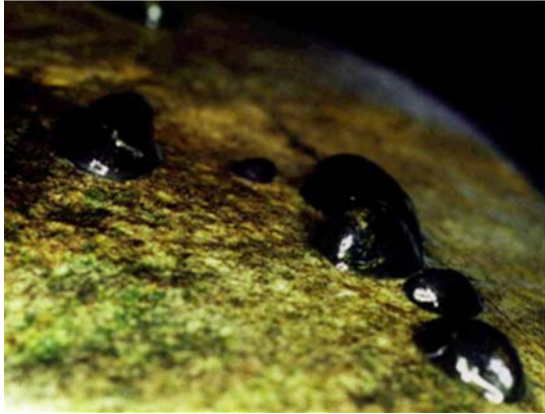


図 発光貝ラチア(全長0.5-1cm)

(4)ベルギー王国の発光クモヒトデの調査：研究代表の近江谷は2009年6、9月にはベルギー王国ルーベン大学のJerome Mallefet教授の研究室にて飼育されるクモヒトデを観察、一部のサンプルを収集、同教授の許可の元、日本国内に持ち帰りタンパク質や遺伝子を抽出、保存した。なお、Mallefet教授より未解明発光生物の一つである発光サメの収集が可能であるとの情報を得、2010年7月にノルウェーにて共同で調査を行った。

(5)オーストラリアのアラキノカンパの野外調査：2010年2月オーストラリア国ブリスベン市周辺をクイーンズ大学David Merritt博士の指導のもと調査した。山間部の水辺でアラキノカンパ(俗称ツチボタル)を観察、収集し、同教授の許可得て日本国内に持ち帰った。



図 岩肌に生息するアラキノカンパ

なお、サンプルが十分確保できなかったことから、サンプル収集が今後の課題であるが、同教授よりタスマニア島では多量の収集が可能であるとのコメントを得た。

(6)発光サメの野外調査：2010年7月6-11日までノルウェー王国ベルゲン大学海洋研究所にて、ベルギー王国ルーベン大学のJerome Mallefet教授のグループ(大学院生2名)と共同で、産業技術総合研究所近江谷、三谷研究員が参加して発光サメの採取、生態・発光観察、及び発光部位の採集を行った。一部はDNAとして採取、日本に持ち帰り、現在、発光酵素のクローニングを実施中である。

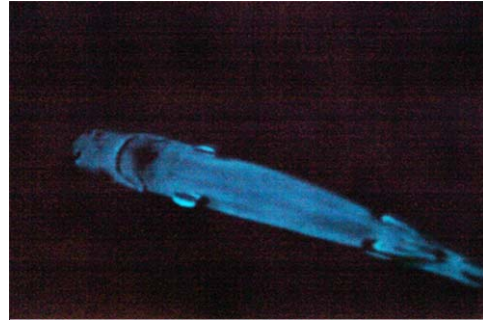


図 飼育中の発光サメの発光

(7)2011年2月22日-3月2日までブラジル国ソロカバ市の国立サンカルロ大学ソロカバ校のVadim Viviani教授のラボを訪問、飼育中の各種ブラジル産発光甲虫類を観察、飼育法などの情報収集を行った。さらにソロカバ市近郊の大西洋亜熱帯雨林にて発光甲虫の採取、観察を行った。日本側より近江谷が参加、今後の共同調査研究の方針を確認した。



図 採取したヒカリコマツキムシ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計16件)

- ① Viviani VR, Scorsato V, Prado RA, Pereira JG, Niwa K, Ohmiya Y, Barbosa JA: The origin of luciferase activity in Zophobas mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase): luciferin stereoselectivity as a switch for the oxygenase activity. Photochem Photobiol Sci 2010; 4, 1111-1119、査読有
- ② Nakajima Y, Yamazaki T, Nishii S, Noguchi T, Hoshino H, Niwa K, Viviani VR, Ohmiya Y: Enhanced beetle luciferase for high-resolution

- bioluminescence imaging. *PLoS One*. 2010 Apr 2;5(4):e10011、査読有
- ③ Li X, Nakajima Y, Niwa K, Viviani VR, Ohmiya Y : Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. *Protein Sci*. 19:26-33, 2010、査読有
- ④ Ohtsuki H, Yokoyama J, Ohba N, Ohmiya Y, Kawata M: Nitric oxide synthase (NOS) in the Japanese fireflies *Luciola lateralis* and *Luciola cruciata*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 69(4):176-188, 2008、査読有
- ⑤ Viviani VR, Arnoldi FG, Neto AJ, Oehlmeier AT, Bechhara FJ, Ohmiya Y: The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. *Photochem Photobiol Sci*. 7, 159-69, 2008、査読有
- ⑥ Arnoldi FG, Ogoh K, Ohmiya Y Viviani VR: Mitochondrial genome sequence of the Brazilian luminescent click beetle *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae): Mitochondrial genes utility to investigate the evolutionary history of Coleoptera and its bioluminescence. *Gene* 405, 1-9, 2007、査読有
- ⑦ Li X, Ogoh K, Ohba N, Liang X, Ohmiya Y: Mitochondrial genomes of two luminous beetles, *Rhagophthalmus lufengensis* and *R. ohbai* (Arthropoda, Insecta, Coleoptera). *Gene*. 392, 196-205, 2007、査読有
- ⑧ Ogoh K, Ohmiya Y: Concerted evolution of duplicated control regions within an ostracod mitochondrial genome. *Mol Biol Evol*. 24, 74-8, 2007、査読有
- ⑨ 近江谷克裕 : 光る生物の応用研究の最前線—光る生物のしくみをさぐる—、*Biophilia* 6 52-55、2010、査読無
- ⑩ 近江谷克裕 : 光る生物の応用研究の最前線—光る生物のしくみをさぐる—、*Biophilia* 5(3) 49-53、2009、査読無
- ⑪ 近江谷克裕 : 海洋性発光性渦鞭毛藻 L p をめぐる3つの話題、*海洋* 51, 45-53, 2009、査読無
- ⑫ 近江谷克裕 : ニューージーランドは光る生き物でいっぱい、*ミクروسコピア* 25, 287 - 291、2008、査読無
- ⑬ 近江谷克裕 : 体内時計が光を制御する渦鞭毛藻、*ミクロスコピア* 25, 123 - 126、2008、査読無
- ⑭ 近江谷克裕、星野英人、中島芳浩 : 生物発光で細胞活動を長時間計測する、*バイオサイエンスとインダストリー* 66、199-201、2008、査読無
- ⑮ 近江谷克裕 : 発光クラゲが変えた21世紀の生命科学、*ミクロスコピア* 24, 279 - 283、2007、査読無
- ⑯ 近江谷克裕 : ウミホタルの光が教えてくれる進化の道、細胞内の未知、*ミクロスコピア* 24, 184 - 189、2007、査読無
- [学会発表] (計3件)
- ① 近江谷克裕 「生物発光が開くイメージングの世界」\_第115回 日本解剖学会シンポジウム (2010年3月29日、盛岡市)
- ② 近江谷克裕 「生物発光の基礎と応用 こんなに利用されている生物の光 - 」第12回北海道バイオテク交流会 (2009年11月17日、札幌市)
- ③ 近江谷克裕 「光る生物にとりつかれたわたしと応用研究」動物学会年次大会一般公開 (2009年9月19日、静岡市)
- [図書] (計1件)
- ・近江谷克裕 「発光生物のふしぎ」ソフトバンク アイ、2009.2、236頁
- [産業財産権]
- 特記事項なし
- [その他]
- ホームページ  
<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-bpi/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
近江谷 克裕 (OHMIYA YOSHIHIRO)  
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・副研究部門長  
 研究者番号 : 20223951
- (2) 研究分担者  
藤森 一浩 (FUJIMORI KAZUHIRO)  
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員  
 研究者番号 : 60273025
- 三谷 恭雄 (MITANI YASUO)  
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員  
 研究者番号 : 10358103
- (3) 連携研究者  
大場 信義 (OHBA NOBUYOSHI)  
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・客員研究員  
 研究者番号 : 60100153

呉 純 (WU CHUN)  
独立行政法人産業技術総合研究所・健康工  
学研究部門・研究員  
研究者番号：90415646