

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03178

研究課題名（和文）生命科学研究を拓く生物発光技術の開発

研究課題名（英文）Development of novel bioluminescent technology

研究代表者

岩野 智（Iwano, Satoshi）

宮崎大学・研究・産学地域連携推進機構・講師

研究者番号：10734832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,600,000円

研究成果の概要（和文）：AkaBLIを基盤として非侵襲的な生体分子イメージングのためのプローブ技術の開発を実施した。生物発光反応の詳細解析と分子進化によって、特定分子のプローブとしての利用性を見出し、これを動物個体の生体分子イメージングへと実装した。また多様なニーズに対応可能なプローブの作動原理確立のため、分割型Akaluc、BRETによる波長変換型の基盤的データを取得した。前者について、網羅的な分割位置スクリーニングにより、分割断片の親和性の有無で発光活性をON-OFFする分割Akalucを見出した。後者について、蛍光色素+タンパク質性タグによりAkalucの発光波長変換を誘導できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物個体内で起こる生命現象の理解には、観察による情報が重要である。生物発光に基づく、個体レベルのバイオイメージング技術は遺伝学的標識と非侵襲的かつ経時（日）的な観察が可能である点で代替手法の無い技術である。一方、生体分子プローブに乏しいことが課題であった。本研究では、強度変化型の生物発光性の生体分子プローブを開発した。また生物発光性のプローブ化を多様に展開するために重要な2つの基盤となるデータ（分割型AkalucとBRETによる波長変換型）を取得した。本課題で開発したプローブや蓄積したデータは、動物個体内で起こる現象の理解や、新規の生物発光性のプローブ開発への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop bioimaging techniques for the non-invasive visualization of biomolecular dynamics based on AkaBLI. Analysis of bioluminescence reactions and molecular evolution revealed the potential use of specific molecules as an indicator. This indicators were implemented in the biomolecular imaging of individual animals. Additionally, we obtained fundamental data for the development of split Akaluc and BRET probes. For split Akaluc, comprehensive split-position screening was employed to identify the optimal split position. For the BRET probe, we discovered that the emission wavelength of Akaluc can be modulated using a fluorescent dye and HaloTag.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物発光 バイオイメージング in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

動物個体で起こる生命現象を生きたままに可視化する in vivo イメージング技術は盛んに技術開発が進められている。特に、蛍光タンパク質プローブを活用した in vivo 蛍光イメージング技術が中心に開発されている。蛍光を発するためには励起光が必要であるが、励起光は生体組織を通過することは出来ず、ごく表面にしか届かない。生きたマウスでの蛍光観察では、臓器を露出させる、内視鏡を突き刺すなど、光学系を観察対象に近接させなければならない。このため侵襲的な観察になり、動物への影響は大きい。また、in vivo 蛍光イメージングの観察対象は極めて局所的である。例えば動物個体全体にわたって癌細胞の転移を検出するというようなことは難しい。in vivo 蛍光イメージングでは、励起光照射が必要なため、侵襲的かつ狭い観察視野が問題となっている。

その一方、発光生物由来する生物発光システムを利用する in vivo 生物発光イメージング (Bioluminescence imaging; BLI) は励起光を必要としない。酵素(ルシフェラーゼ)を発現する細胞の体内分布を、発光基質(ルシフェリン)の全身性投与によって生じる発光シグナルで画像化するという仕組みである。同一個体で非侵襲的に繰り返し観察できることから、例えば、マウスなど小型実験動物を利用したがん細胞の増殖や転移の解析には盛んに利用されている。しかし検出感度低さから、細胞が個体内で増えやすいがん研究分野以外ではあまり普及しておらず、生体分子プローブ技術も乏しい。代表者の岩野は、2018年に in vivo BLI の検出感度を劇的に向上することのできる人工発光システム AkaBLI を開発した。AkaBLI を用いると、深部からの発光シグナルを従来法と比べ 100~1,000 倍の強さでの検出が可能となった。

AkaBLI は高感度に非侵襲、自由行動下という生理的な環境下の動物体内で起こる生命現象を観察できる新技術であり、in vivo イメージングの新しい扉を開く要素技術であると考えられた。しかし、カルシウム、ATP などの生体内分子の濃度変化に呼応して発光シグナルが増減する生体内分子プローブ化技術が存在しない。

2. 研究の目的

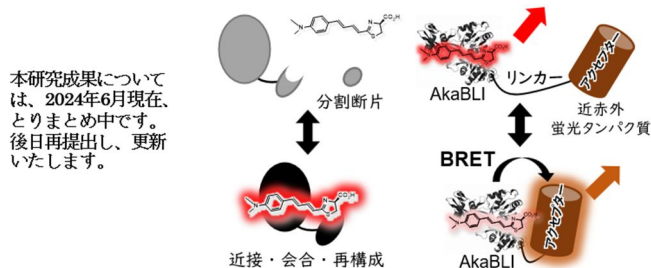
AkaBLI を基盤として非侵襲的な生体分子イメージングを可能にするプローブ技術の開発研究を実施した。AkaBLI の強みは in vivo イメージングにおける検出感度である。発光機能プローブを目指した。

3. 研究の方法

(1) AkaBLI の酵素反応性を利用した強度変化型の生体分子プローブ

全ての生物発光は酵素反応により発光を生成する。ホタル生物発光反応においては基質、酵素の他に、 Mg^{2+} や ATP、 O_2 も必須因子である。pH や金属イオン、ATP や生体内分子、環境要因など様々な条件下での発光強度測定を行い、それらの発光反応への影響を試験管での in vitro 実験で調べる。加えて、独自の Akaluc 変異体ライブラリーも動員し、際立った反応特性を持つ Akaluc 変異体の探索も行う。発光反応特性を理解し巧みに利用することで、環境変化に応じて発光シグナルの強度が変化する機能プローブ化技術の開発に繋げる。

1) 強度変化型のプローブ 2) 分割型 Akaluc 3) 波長変換型のプローブ



本研究成果については、2024年6月現在、とりまとめ中です。後日再提出し、更新いたします。

図1 開発する生物発光性のプローブの概念図

(2) 分割型 Akaluc の開発

Akaluc を二つに断片化し、その両者が近接すると会合し、発光機能を回復する分割型 Akaluc を開発する。様々な生体内因子に感受性を持つタンパク質と蛍光タンパク質との融合により、様々な蛍光タンパク質性の生体分子プローブが開発されてきた。分割型 Akaluc が完成すれば、蛍光タンパク質性のプローブの知見が適応でき、生物発光性の生体分子プローブの拡充に重要な基盤技術となることが期待し、研究を実施した。

(3) 波長変換型の機能プローブ化技術の開発

これまでに Förster 共鳴エネルギー移動(FRET) を作動原理とする波長変換型の蛍光タンパク質性のプローブが多様に開発されてきた。AkaBLI をドナー分子として高効率な波長変換を誘起するようなアクセプター分子の探索により高効率な波長変換システムの構築を検討した。これにより、(2)と同様、蛍光タンパク質性のプローブの知見の適応による生物発光性生体分子プローブの拡充を目指した。

(4) AkaLumine 含有餌の開発

一般に in vivo BLI においては発光基質の注射による全身性投与が不可欠である。注射に伴う保定、痛みなどのストレスを生み出す行為は排除されるべきである。このようなストレスからの解放が真に生理的な動物のバイオイメージングにつながると考え、発光基質含有餌の開発による人為操作を介さない基質投与法の開発を実施した。

4. 研究成果

(1) AkaBLI の酵素反応性を利用した強度変化型の生体分子プローブ

本研究成果については、2024年6月現在、とりまとめ中です。技術の詳細を含む報告になるため、論文公開時期まで、詳細を控えさせていただきます。公開できる段階(2025年春頃目標)になり次第、迅速に本報告書を再提出により、更新いたします。

(3) 分割型 AkaLuc の開発

AkaLuc の祖先である Fluc はこれまでに様々な分割されてきた。Fluc は2つのドメインからなるタンパク質である。このため、ほぼすべての分割型 Fluc は2つのドメインを繋ぐリンカー部分近傍で分割されている。しかしながら、この分割型 Fluc は概ね全長 Fluc に比べ、発光活性が著しく減弱する(1-2桁)。発光活性を著しく損なうにも関わらず、リンカー部分が最も適した分割位置であると考えられており、ルシフェラーゼの全長を限なく分割するような網羅的なスクリーニングは、今日に至るまで実施されていない。そこで全長の AkaLuc と比べて、同等程度に明るい分割型 AkaLuc の開発のため、適切な分割位置の網羅的探索を実施した。

(3) 波長変換型の生体分子プローブ化技術の開発

AkaBLI の発光極大波長は $\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$ である。適切なアクセプター分子として、AkaBLI の発光波長近傍に吸収を持つ iRFP 各種と AkaLuc の直列融合により、波長変換が誘起出来るかを検討した。しかしながら、全く発光波長は変化しなかった。この結果を受け HaloTag と AkaLuc を融合し、適切なドナー分子となる蛍光色素(有機分子)を探索した。結果、HaloTag と Janelia Fluor 646 ($\lambda_{ex} = 646 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 664 \text{ nm}$) との組み合わせで、比較的良好な波長変換が誘導できることが明らかとなった(図 2A)。現在、更なるダイナミックな波長変換を誘導するため、別の蛍光色素や、HaloTag と AkaLuc の融合方法の検討を進めている。引き続き、研究を進め、波長変換型の生物発光性の生体分子プローブ化技術の構築を目指す。

本研究成果については、2024年6月現在、とりまとめ進行中です。技術の詳細を含む報告になるため、論文公開時期まで、詳細を控えさせていただきます。公開できる段階(2025年春頃目標)になり次第、迅速に本報告書を再提出により、更新いたします。

(4) AkaLumine 含有餌の開発

AkaLumine は粉末、室温放置でもラセミ化、分解などにより、純度が低下する。このため、餌開発に当たり、室温においても長期間安定である AkaLumine 誘導体(保護基を付与)を新規に作成した。この保護基は、生体内のごくありふれた分子によって、脱保護され AkaLumine が生成する。まず初期検討として、AkaLumine 誘導体含有餌(粉末)をマウスが摂取有無を秤量により、摂取した場合に血中の AkaLumine 濃度を LC/MS により定量した。マウスが無事に餌を摂取すること、また血中の AkaLumine 濃度が上昇することが明らかとなった。

次に、マウス用の飼料 CRF-1 粉末に AkaLumine 誘導体の粉末を混合し、乳鉢ですりつぶし均一にした。その後、混合餌 30 g に対し、15 ml の超純水を混合し、成形した後に、48 時間室温で乾燥した固形飼料を作成した(図 2B)。AkaLuc を脳(線条体)に発現させたマウスに与えた。重量比 0.5% で AkaLumine 誘導体を混合した餌においては、0.1% よりも優位に発光強度が強く、またその発光が安定する(即ち血中の AkaLumine 濃度が安定)ことが明らかとなった(図 2C)。一定間隔で発光を観察し、AkaLumine 誘導体含有餌による持続的な安定発光を実現できるかどうかを検証した(図 2D)。

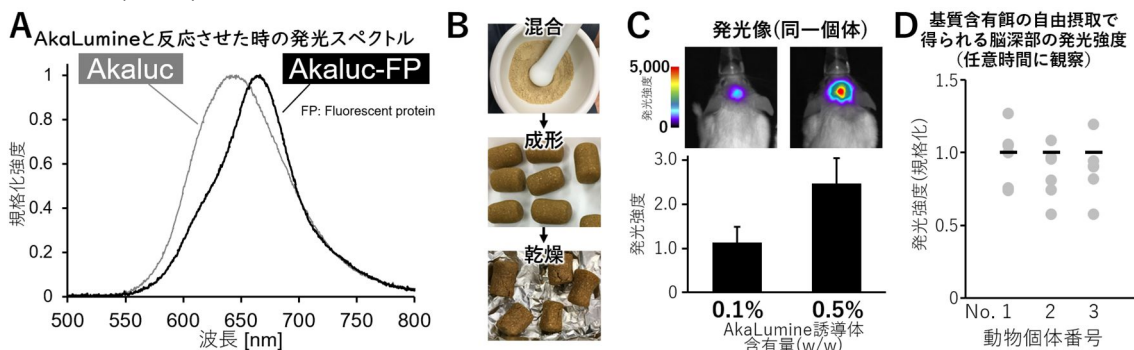


図2 得られた成果 (一部)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakashiba Toshiaki, Ogoh Katsunori, Iwano Satoshi, Sugiyama Takashi, Mizuno-Iijima Saori, Nakashima Kenichi, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihiro, Yoshiki Atsushi, Miyawaki Atsushi, Abe Kuniya	4. 巻 52
2. 論文標題 Development of two mouse strains conditionally expressing bright luciferases with distinct emission spectra as new tools for in vivo imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab Animal	6. 最初と最後の頁 247 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41684-023-01238-6	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 Tamura Tomokazu, Ito Hayato, Torii Shiho, Wang Lei, Suzuki Rigel, Tsujino Shuhei, Kamiyama Akifumi, Oda Yoshitaka, Tsuda Masumi, Morioka Yuhei, Suzuki Saori, Shirakawa Kotaro, Sato Kei, Yoshimatsu Kumiko, Matsuura Yoshiharu, Iwano Satoshi, Tanaka Shinya, Fukuhara Takasuke	4. 巻 27
2. 論文標題 Akaluc bioluminescence offers superior sensitivity to track in vivo dynamics of SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109647 ~ 109647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109647	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 Ago K, Nagoshi N, Imaizumi K, Kitagawa T, Kawai M, Kajikawa K, Shibata R, Kamata Y, Kojima K, Shinozaki M, Kondo T, Iwano S, Miyawaki A, Ohtsuka M, Bito H, Kobayashi K, Shibata S, Shindo T, Kohyama J, Matsumoto M, Nakamura M, Okano H	4. 巻 5
2. 論文標題 A non-invasive system to monitor in vivo neural graft activity after spinal cord injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03736-8	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 Ichise Hiroshi, Tsukamoto Shoko, Hirashima Tsuyoshi, Konishi Yoshinobu, Oki Choji, Tsukiji Shinya, Iwano Satoshi, Miyawaki Atsushi, Sumiyama Kenta, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional visualization of NK cell-mediated killing of metastatic single tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e76269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.76269	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 Kaniya Genta, Kitada Nobuo, Saito-Moriya Ryohei, Obata Rika, Iwano Satoshi, Miyawaki Atsushi, Hirano Takashi, Maki Shojiro	4. 巻 50
2. 論文標題 Development of phenyl oligoene-type firefly luciferin analogues with extended -electronic conjugation for near-infrared bioluminescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1523-1525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kayamori K, Nagai Y, Zhong C, Kaito S, Shinoda D, Koide S, Kuribayashi W, Oshima M, Nakajima-Takagi Y, Yamashita M, Mimura N, Becker Hans J, Izawa K, Yamazaki S, Iwano S, Miyawaki A, Ito R, Tohyama K, Lennox W, Sheedy J, Weetall M, Sakaida E, Yokote K, Iwama A	4. 巻 5
2. 論文標題 DHODH inhibition synergizes with DNA-demethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndromes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 438 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020001461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitada Nobuo, Saito Ryohei, Obata Rika, Iwano Satoshi, Karube Kazuma, Miyawaki Atsushi, Hirano Takashi, Maki Shojiro A.	4. 巻 32
2. 論文標題 Development of near infrared firefly luciferin analogue reacted with wild type and mutant luciferases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 922 ~ 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.23236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生物発光による動物個体の非侵襲イメージング
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第43回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生物発光を利用した脳機能の非侵襲イメージング
3. 学会等名 第127回2本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Iwano
2. 発表標題 Bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生物発光を利用したバイオイメーシング技術の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩野 智
2. 発表標題 生物発光を利用したバイオイメーシング技術の開発
3. 学会等名 つくばがん研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	蛭田 勇樹 (Hiruta Yuki) (60710944)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授 (32612)	

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