

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05321

研究課題名（和文）発光反応量子収率の精密測定

研究課題名（英文）Precise measurement of bioluminescence and chemiluminescence reaction quantum yield

研究代表者

丹羽 一樹 (Niwa, Kazuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・研究グループ長

研究者番号：30443211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ホタルなど生物発光反応の量子収率（Quantum Yield, QY）は、発光反応の光生成効率を示す指標である。反応した基質分子数と光子数を測定し、その比から求められる。しかしこれまでの測定方法では、発光量が少ない、暗い反応系では光測定が行うことができないという問題があった。本研究では、基質分子数と光子数の双方の定量精度を、産総研の計量標準研究部門の有する国家計量標準の開発・供給の知見で再検討した。更に、基質残量をHPLCでモニタしながら生成光子数を定量するシステムを構築中である。今後これまでQYの評価が困難であった暗い発光反応系の測定評価を行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発光反応は臨床検査や環境汚染物質分析などで広く応用されており、現在でも多様な発光反応物質の開発や、やそれらの応用方法の開発に向けた研究が展開されている。量子収率は反応の明るさを示す重要な指標であるが、発光量が少ない暗い反応系では測定できないという問題があった。本研究によりこれまでQYの評価が困難であった暗い発光反応系についても量子収率が測定できるようになり、効率的な発光物質の開発に貢献できるものとなる。

研究成果の概要（英文）：The quantum yield (Quantum Yield, QY) of a bioluminescent reaction, such as firefly, is an indicator of the photoproduction efficiency of the luminescent reaction. It is determined from the ratio of the number of reacted substrate molecules to the number of emitted photons. However, conventional measurement methods have had problems with low luminescence levels or dark reaction systems. In this study, the quantitative accuracy of both the number of substrate molecules and the number of photons was re-examined using the knowledge of the national measurement standards by the NMIJ/AIST. Furthermore, a system for quantifying the number of photons produced while monitoring the remaining amount of substrate by HPLC is under construction. In the future, we plan to measure and evaluate dark luminescence reaction systems, which have been difficult to evaluate QY.

研究分野：精密分光計測

キーワード：生物発光 量子収率 分光計測

1. 研究開始当初の背景

ホタルのような光る生物は極めて効率良く（明るく）発光するが、ただ美しいだけではなく、その発光を担う化学反応である「生物発光反応」がバイオ分野における分析ツールとして広く応用されている。「明るさ」は生物発光反応におけるもっとも重要かつ基礎的な特性である。生物発光反応の明るさは酵素による反応速度と光を生成する効率、すなわち発光反応量子収率（quantum yield, QY）の積で決まる。これまでに QY が最も高いブラジルのヒカリコメツキ虫やホタルなどの発光甲虫の他、セレンテラジンなど海洋生物の発光反応系の量子収率などを測定してきた。

しかしながら従来の QY 測定方法は、発光物質が消費し尽くされて消光するまでを測定して積算するというものであり、十分に明るい反応系でなくては計測することが不可能であった。このため、反応速度が遅いために基質消費が進まず、十分な発光量が得られない反応系については、QY の情報は得られていない。また、QY の測定には基質分子数および生成光量子数の両方を高い正確性で定量する必要があり、従来は基質分子数は吸光度により、光量子数は絶対感度を校正したルミノメータで測定してきた。しかしながらこの両者においても、十分に検証しきれていない不確かさ要因が残されている。具体的には、分子数測定については吸湿性による水分など不純物の影響、そして光量子数測定にはルミノメータに内蔵されている光検出器の非直線性について、更なる精査が必要な状況である。

ルシフェリンなど発光基質のアナログ分子については、発光色や明るさを改変することを目的に数多く合成されている。これらのアナログ分子を用いた発光反応系の多くは発光強度が弱いために、多くの場合 QY の測定は行われていない。

これら“暗い”より多くの発光反応系の QY の情報を収集するためには、暗い発光反応系においても精度よく QY を求める技術確立が必要がある。



2. 研究の目的

本研究では、生物発光反応におけるもっとも重要かつ基礎的な特性である「明るさ」を決める反応定数、特に「発光反応量子収率 (QY)」の新しい測定・評価技術を確立し、高感度で高精度な QY データの収集を目的とする。

具体的には、国家計量標準にトレーサブルな分光測定技術と定量的核磁気共鳴（定量 NMR）技術の融合により、これまでは難しかった暗い発光反応系や条件における QY の測定を目指す。

QY は 1 分子が反応により光量子を 1 つ生成する確率と定義される。これまで実験的に QY を求めるためには、十分に明るい反応系でなくてはならず、また発光物質が消費し尽くされて消光するまで測定しなくてはならなかった。

そこで本研究では QY 測定の信頼性の向上を目的に、定量 NMR あるは積分球など、国家計量標準機関で使用する正確な定量分析技術により再検証を行う。更に、基質濃度の随時評価が可能な QY 測定実験系を構築し、暗い反応系での QY 測定の実現を目指す。これにより、より正確で豊富な QY データの収集を行い、発光反応の学術的理解促進に貢献することを最終目標とする。

3. 研究の方法

QY の算出に必要な光量子数計測に関しては、これまでに申請代表者が光放射国家計量標準にトレーサブルな積分球式分光測定装置を用いたシステムを構築しているが、これは光量子数の絶対測定では世界的にも最高レベルの信頼性であり、先導的な立場である。

本研究では主に、QY 測定に重要なもう一つの測定要素である基質分子の定量について再評価を行う。特に吸湿度の評価、そして定量 NMR 法による不純物の測定を行う。定量 NMR 法は、これも国家計量標準供給の基盤となっている極めて正確な分子定量技術である。定量 NMR は 1 種類の参照標準物質の校正値を基に、複数の異なる物質の定量を可能にする技術である。定量 NMR を用いることで発光基質分子数の定量の高精度化が期待できるだけでなく、対象試料の純度評価、また標準品を得ることができない試料の濃度を直接定量することも可能である。これは QY 測定の技術課題の解決に極めて有効である。

また光量子数測定についても、光検出器には入射光量に対する出力値の直線性のずれ（非直線性）があり、これによる結果のずれは十分に評価されていない。そこで検出器の非直線性評価方法についても検討を行う。



発光反応溶液の光子数を測定するための積分球式分光測定装置

4. 研究成果

従来、QY 測定のための基質分子の定量は、吸光度法による濃度の測定結果から算出していた。この方法は正確な吸光係数 ϵ の情報が必要であり、また pH 条件による吸光度の変化など、不確かさ要因が多く残されている。そこでまず、発光基質のなかでは特に安定性の高いホタルルシフェリンを用いて、その分子数測定のための分子特性の再評価を行った。

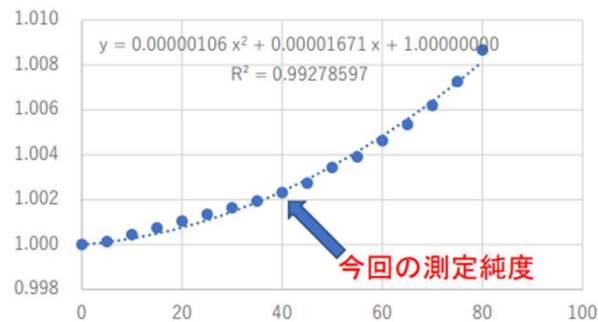


図1、ホタルルシフェリンの吸湿性：周囲雰囲気湿度（横軸）に対するホタルルシフェリンの相対質量（縦軸）をプロットしたもの。例えば湿度40%の実験室で秤量した場合、約0.2%の補正が必要となる。

具体的には、吸湿性試験として基質中の水分量を熱重量測定装置 (TG) により測定し、高純度試薬が吸湿により約0.7%重量変動を示すことが明らかとなった (図1)。次に定量NMRによりルシフェリンの安定性の評価を行ったところ (図2)、水溶液中において15時間以上の安定性があることが確認できた。一方で、定量NMRにより純度を評価し、果高純度試薬のルシフェリンの重量濃度は 0.928 ± 0.08 kg/kg (2σ) であり、約7%の不純物 (吸湿による水分を含む) を含むことが明らかとなった。これにより、定量NMRにより正確度の高い基質定量の基盤を構築することができた。

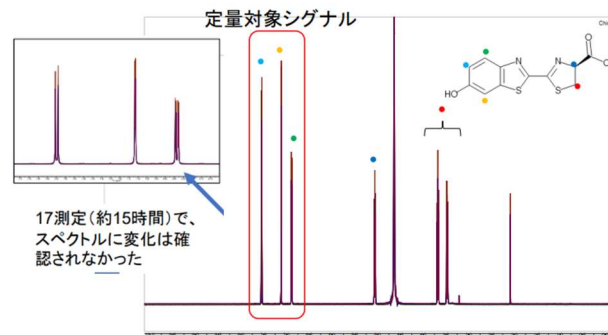


図2、定量NMRのスペクトルチャート：重水溶液中での安定性が確認された。

また、量子収率測定の対象となる発光反応系について、発光反応条件の最適化に向けた評価実験を行った。具体的には、酵素発光反応の発光量を変化させることが知られている添加剤 (CoA、チオールなど発光促進物質および長鎖脂肪酸等発光阻害物質) の効果評価をモデル系として、量子収率測定を実施した。その結果、基本的に添加剤の影響はなく、従来の定量方式での測定結果と再現性のある約40%という結果が得られた。

基質の定量を行うHPLCについては、キラルカラムを用いた定量システムを採用した。ホタルルシフェリンには非発光性の光学異性体があり、これを含めて定量するためにキラルカラムを用いることができる。これにより、HPLCにより基質定量を行いながらの発光量子収率 (QY) 測定の実現を行った。

QY 測定に必要なもう一つの要素である発光測定については、定量分析の前提となる検出応答度直線性についての評価を行った。これまでに我が国の光放射計量標準にトレーサブルな標準電球により絶対分光応答度を校正した積分球式分光放射計により、発光反応により放出される光子数を測定する方法を確立していたが、本研究計画において対象としている微弱な発光と標準電球では光量が大きく異なる。そのため、検出器の線形性の評価が重要となる。そこで、6桁以上にわたり光出力を正確に制御できる広帯域可変光源 (図3) を作成し、光電子増倍管の応答度の直線性評価を行った。その結果シグナル強度が 10^5 程度異なると10%以上の補正が必要となるということが確かめられた。これに関連して、発光反応溶液の絶対発光量の測定技術を活用し、発光測定装置 (ルミノメータ、プレートリーダー等) の管理に使用する微弱LED参照

光源の絶対発光量の測定法を確立し、その方法について論文発表を行った。

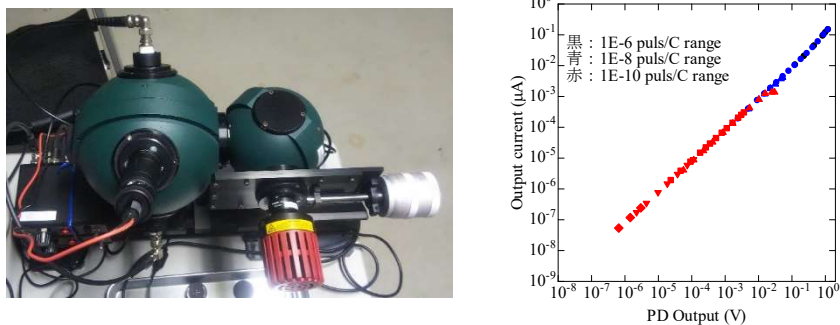


図3、広帯域可変光源: 光検出器の非直線性を6桁以上にわたり評価が可能である。

以上のような検証を加えつつ、QY 測定の実証試験のひとつとして、condensate (凝集体、コンデンセート) 中での発光特性の評価を行った。その結果、コンデンセートによる顕著な QY の上昇が認められ、これについては論文発表 (Chem. Comm.) を行った。

今後、これまで QY の評価が困難であった暗い発光反応系の測定評価を行っていく予定である。

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 Niwa Kazuki, Kubota Hidehiro, Enomoto Toshiteru, Ichino Yoshiro, Ohmiya Yoshihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Bioluminescence Optical Signal	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 223 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios13020223	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 Nishihara Ryo, Kihara Yoshiki, Niwa Kazuki, Mimura Masahiro, Tomita Shunsuke, Kurita Ryoji	4. 巻 58
2. 論文標題 Quantum yield enhancement of firefly bioluminescence with biomolecular condensates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13317 ~ 13320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc04919h	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Niwa
2. 発表標題 Absolute light measurement for the investigation of bioluminescence quantum yield and standardization of bioanalysis instruments
3. 学会等名 生物物理学会第60回年会 (函館) (招待講演)
4. 発表年 2022年 ~ 2023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	山崎 太一 (Yamazaki Taichi) (00462838)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員 (82626)	

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