

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2011～2015

課題番号：23405015

研究課題名(和文)新規発光・蛍光技術ソースの探索を目指した発光生物調査

研究課題名(英文)Surveying bioluminescent organism for creating new techniques

研究代表者

近江谷 克裕(OHMIYA, Yoshihiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究部門長

研究者番号：20223951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界中にはまだまだ未解明な生物発光現象があり、これらの解明が進めば新規発光・蛍光技術が確立できる。そこで、更なる新規発光・蛍光技術を生み出すことを目標に世界各地の発光生物の海外調査・収集を行う。調査はフィジー島、南米ブラジル、ベルギー、ニュージーランド、中国南部、ロシア及び国内で実施、発光ミミズ、星虫、クモヒトデ、発光貝ラチア、発光ゴカイ、発光甲虫などを研究対象とした。その結果、フィジー島のヒカリコメツキムシ、雲南省シャングリラ地方のホタル及び富山県の発光ゴカイのルシフェラーゼ遺伝子のクローニングに成功した。また、ブラジル産ヒカリコメツキムシの系統進化に関する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：There are still unresolved bioluminescent phenomenon all over the world, these elucidation can establish new bioluminescence and fluorescence techniques. For creating further new bioluminescence and fluorescence techniques as a goal, we collected the light-emitting organisms all over the world. We were surveying of the light-emitting earthworms, Brittle star, bioluminescent snail Latia, luminescent beetles in Fiji Island, South America Brazil, Belgium, New Zealand, southern China, and Japan. As a result, we had identified three luciferases from Fijian click beetle, Yunnan Shangri-La firefly and Toyama Lugworm. In addition, we estimated the systematic evolutionary pathway of Brazilian click beetle.

研究分野：光生物学

キーワード：発光生物 光イメージング ルシフェラーゼ ルシフェリン ホタル

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、ウミホタルの青い光を最大限利用することで私たちは近赤外線発光プローブを創製、体内のガン組織のイメージングに成功した。また、発光甲虫の多彩な発光色を利用することで私たちは同時に複数の遺伝子発現を評価する手法を開発、毒性評価の世界に革新をもたらした。一方、私たち以外の代表的な研究例の一つである発光クラゲでは、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緑色蛍光タンパク質 GFP 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ツールであり、2008 年下村脩博士がノーベル賞を受賞したことは記憶に新しい。GFP を用いた論文は毎年 1000 報以上にも達するなど、生命科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。

また下村博士は”Bioluminescence”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。

これまでに研究代表者の近江谷は「発光性甲殻類分布海域を指標とした地球温暖化評価に関する研究」【学術振興会科学研究費萌芽研究 2002-03】で得られた南海性ウミホタルシフェラーゼを、「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】で得られたブラジル産ヒカリコメツキムシルシフェラーゼを基盤に発光プローブを実用化、既に国内外の企業で製品化した実績があり (NEB 社 CLuc 及び東洋紡 ELuc)、未知の発光生物の中に大きな研究資源があることを証明した(前述済み)。また、2010 年度まで実施した「新規発光プローブの探索を目指した発光生物調査」【学術振興会科学研究費基盤研究(B)・海外学術調査 2007 - 2010】からも発光サメや発光クモヒトデの遺伝子資源の確保に成功している。このように近江谷らは

世界各地の調査現場から持ち帰った貴重な発光生物資源を基に確実に実用化するトップランナーであり、更なる新規発光・蛍光技術の開発を先導する役割を持っている。

2. 研究の目的

生命情報をイメージングする手法が注目され、その基盤技術として発光生物由来の蛍光タンパク質や発光タンパク質などが活用されている。しかしながら、世界中にはまだまだ未解明な生物発光現象があり、これらの解明が進めば新規発光・蛍光技術が確立できる。研究代表者近江谷は、これまでに 2 つの科研費海外調査等を通じて中国、南米の発光甲虫や太平洋地域のウミホタルの調査を原点とし発光プローブの開発に成功、併せて次世代の研究資源として発光貝や発光サメを収集、遺伝子等の単離を行った。そこで、更なる新規発光・蛍光技術を生み出すことを目標に海生・陸生発光生物の生物資源を確保、データベース化を目指し、特に今回は発光生物及び発光生物内の物質循環の担い手である発光生物共生微生物の海外調査・収集を行う。

3. 研究の方法

新規の生物発光・蛍光技術を創出するソースとしての世界各地の発光生物及びその共生微生物群を現地調査する。採取されたサンプルは、現地協力者の実験室にて遺伝子を抽出、或いは低分子化合物も抽出し、協力者の許諾のもと一部は現地の研究者に、一部は申請代表者の産総研に持ち帰り、データベース化を行い国内外からアクセス可能な形とする。発光生物として 6 つの地域、8 種の発光生物について特に注目する。

具体的には、5 年間の海外学術調査を計画、調査対象は発光ミミズ、星虫、ツチボタル、発光サメ、クモヒトデ、発光貝ラチア、発光ゴカイ、発光甲虫など陸生及び水生発光生物とし、調査地域は主にフィジー島、南米ブラジル、ベルギー、ニュージーランド、中国南部、ロシアとし、併せて比較検討のため国内の発光生物の収集を計画する。但し、調査地域の国情、環境及び天候等を累意し、柔軟に対応しつつ調査を実施する。全体の調査の概要は下図に示す。研究代表者の近江谷が研究全体を統括、現地研究者との打ち合わせ等を実施する。研究分担者の二橋は共生微生物の専門家であり、三谷は分子生物学の専門家である。3 人で現地の共同研究者と連携して調査を実施、採集を行う。発光生物の共生微生物は二橋が、発光生物の遺伝子資源は三谷が中心に収集、解析する。併せて、近江谷は低分子化合物を中心に解析を進める。

4. 研究成果

新規発光・蛍光技術の確立、新規の生物発光・蛍光技術を創出するソース探索のため、世界各地の発光生物及びその共生微生物群

を現地調査する。採取されたサンプルは、現地協力者の実験室にて遺伝子を抽出、或いは低分子化合物も抽出し、協力者の許諾のもと一部は現地の研究者に、一部は申請代表者の産総研に持ち帰り、知財確保、論文作成を目指した。

(1) 2011 年度：気候変動や現地協力者の状況に応じて3カ国（中国、フィジー、ブラジル）を中心に現地調査、研究打合せを行った。①平成23年6月下旬、研究代表者近江谷は中国雲南省昆明市で研究協力者の中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授と打ち合わせを行い、同教授が発見した星虫の野外調査に関して平成24年6月下旬に行う事で調整した。②平成23年12月、研究代表者近江谷、共同研究者二橋、研究協力者大場、三富氏らとともにフィジー島を調査、南太平洋諸島では唯一フィジー島に生息するヒカリコメツキムシを採取、遺伝子抽出を行った。三谷がライブラリーを作成し、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングに成功、本ルシフェラーゼ遺伝子を解析、本遺伝子ベースに分子系統樹図（図1）を作成したところ、中米とブラジル産ヒカリコメツキの中間に位置するものであった。どのように進化拡散したのか詳細は不明であるが、フィジー島ヒカリコメツキムシの発光に関する論文を報告した（発表論文2）。③平成24年3月に研究代表者近江谷はブラジルサンパウロ、国立サンカラロ大学 Viviani 教授を訪問、サンパウロ沿岸の海洋性発光生物に関して意見交換を行い、共同研究契約のもとサンパウロ周辺の発光生物を翌年度以降に調査することで合意した。

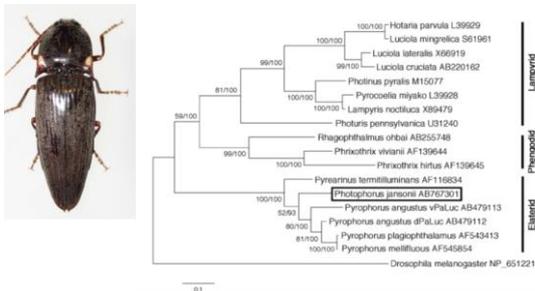


図1 フィジーヒカリコメツキ(右図)とクローニングされたルシフェラーゼ遺伝子をベースに作成した分子系統樹

(2) 2012 年度：気候変動や現地協力者の状況に応じて3カ国（中国、ベルギー、ブラジル）を中心に現地調査、研究打合せを行った。①平成24年6月下旬、研究代表者近江谷、共同研究者二橋、及び研究協力者大場は中国での研究協力者の中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授とともに同教授が発見した星虫の野外調査を実施した。しかしながら、季節的な端境期のため、ホタルは採取されたが星虫の採取には至らなかった。②平成24年

8月上旬、共同研究者三谷はベルギーのルーベン大学 Jerome Mallefet 教授の実験室を訪問、発光クモヒトデの遺伝子の抽出作業を行い、同時にライブラリーの作成を行った。現在、ルシフェラーゼ遺伝子のクローニングを行っている。③平成25年3月に研究代表者近江谷、共同研究者三谷はブラジルサンパウロ、国立サンカルロス大学 Viviani 教授を訪問、共同研究契約のもとサンパウロ周辺の発光生物を調査した。各種発光甲虫を確認した（図2）。

図2 サンパウロ州南西部で確認したヒカリコメツキムシ

(3) 2013 年度：気候変動や現地協力者の状況に応じて2カ国（中国、ブラジル）を中心に現地調査、研究打合せを行った。及



び海外との比較を行うことを目的に国内富山県魚津市を中心に現地調査、研究打合せを行った。①平成25年8月29日-9月2日、研究代表者近江谷は中国での研究協力者の中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授とともに同教授が発見した発光甲虫の野外調査の一環として中国青海省黄河の源流域を調査した。本年度は予備調査として現地の森林の環境調査を行った。季節的には発光甲虫の採取は困難であったが、生息可能な地域であることを確認した。②平成25年9月30日-10月2日まで月上旬、共同研究者三谷と共に富山県魚津市にて魚津水族館の協力を得て発光ゴカイの採取を行った（図3）。発光ゴカイの遺伝子の抽出作業を行い、同時にライブラリーの作成を行った。③平成26年3月に研究代表者近江谷、共同研究者三谷、二橋でブラジルサンパウロ、国立サンカルロス大学 Viviani 教授を訪問、共同研究契約のもとサンパウロ周辺の発光生物を調査した。インターバル国立公園にて鉄道虫の採取に成功した。また、Viviani 教授と共に発光甲虫の進化・拡散を探るため、ミトコンドリア遺伝子の解析を行い、後日、論文を発表した。（発表論文4、5）

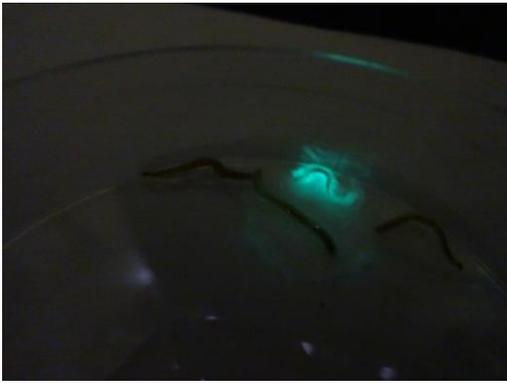


図3 富山湾で収集した発光ゴカイ

(4) 2014 年度：気候変動や現地協力者の状況に応じて3カ国（ロシア、中国、ニュージーランド）及び海外との比較を行うことを目的に国内富山県魚津市を中心に現地調査、研究打合せを行った。具体的には、①平成26年7月9-25日まで研究代表者近江谷と共同研究者三谷はロシア・クラスノヤルスク市ロシア科学アカデミーシベリア支所の Eugene Vysotski 博士のもとシベリアに生息する発光生物の採取を行った。この結果、ホタルは採取できなかつたが、発光ミミズ1種の採取に成功した。②平成26年10月27-30日、研究代表者近江谷は中国での研究協力者の中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授と、来年度夏期に計画する発光生物の現地調査について意見交換を行った。平成27年7或は8月に雲南省シヤングリラ地方で高地の発光生物を採取する方向で意見をまとめた。③平成27年3月14-20日まで研究代表者近江谷、共同研究者三谷、二橋でニュージーランドに国立水環境研究所の協力を得て、発光貝ラチアの採集を行った（図4）。研究所の許可のもとサンプルを日本に持ち込み、現在、遺伝子等の解析中である。④平成25年10月5日-7日まで研究代表者近江谷、共同研究者三谷、二橋及び研究協力者の安野と共に富山県魚津市にて魚津水族館の協力を得て発光ゴカイの採取を行った。



図4 ニュージーランドワイト周辺での発光貝ラチアの収集

(5) 2015 年度：気候変動や現地協力者の状況に応じて2カ国（中国、ブラジル）及び海外との比較を行うことを目的に国内富山県魚津市を中心に現地調査、研究打合せを行った。①平成27年8月2-12日、研究代表者近江谷、二橋は中国での研究

協力者の中国科学院昆明動物研究所の Andy Liang 教授と、雲南省シヤングリラ地方で高地の発光生物の採取を行った（図5）。シヤングリラ地方の低温で飛翔するホタルを採取、現地で RNA を抽出した。中国の研究者と共にシヤングリラホタルのルシフェラーゼをクローニング、同定した。その構造解析及び機能解析を行った。現在、論文作成中である。②平成28年2月23-29日、研究代表者近江谷はブラジルサンパウロ州ソロカバ市に滞在、サンカルロス大学の Viviani 教授の協力のもと、ソロカバ市周辺の発光生物調査を行うと共に次年度以降の国際共同調査の打ち合わせを行った。③平成27年10月4日-76日まで研究代表者近江谷、共同研究者三谷及び研究協力者の安野と共に富山県魚津市にて魚津水族館の協力を得て発光ゴカイの採取を行った。発光ゴカイの遺伝子の抽出作業を行い、次世代シーケンサーにより網羅的に遺伝子配列を解析した。一方、精製したルシフェラーゼより一部の構造を同定し、その情報を元にルシフェラーゼ遺伝子の特定に成功した。得られた発光ゴカイルシフェラーゼ遺伝子を細胞に導入、発現及び発光活性を確認し、特許出願を行った（特許1）。現在、発光ゴカイの有機溶剤抽出作業を行い、低分子化合物の精製を行った。ルシフェリン構造の同定を行っている。



図5 雲南省シヤングリラ地方で高地の風景と採取したホタルの発光

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

- ① Prado RA, Barbosa JA, Ohmiya Y, Viviani VR: Structural evolution of luciferase activity in Zophobas mealworm AMP/CoA-ligase (protoluciferase) through site-directed mutagenesis of the luciferin binding site (2011) Photochem Photobiol Sci. 10:1226-32 doi. 10.1039/C0PP00392A
- ② Mitani Y, Futahashi R, Niwa K, Ohba N, Ohmiya Y: Cloning and characterization of luciferase from a Fijian luminous click beetle. (2013) Photobiology and Photochemistry, 89(5):1163-9 doi. 10.1111/php.12097.
- ③ Ohtsuki H, Yokoyama J, Ohba N, Ohmiya Y, Kawata M: Expression of the nos gene and firefly flashing: a test of the

nitric-oxide-mediated flash control model. (2014) J Insect Sci. 19;14:56. doi: 10.1093/jis/14.1.56

- ④ Amaral DT, Mitani Y, Ohmiya Y, Viviani VR: Organization and comparative analysis of the mitochondrial genomes of bioluminescent Elateroidea (Coleoptera: Polyphaga). Gene pii: S0378-1119(16)30257-8. doi: 10.1016/j.gene.2016.04.009.
- ⑤ Amaral DT, Mitani Y, Oliveira G, Ohmiya Y, Viviani VR: Revisiting Coleoptera a + T-rich region: structural conservation, phylogenetic and phylogeographic approaches in mitochondrial control region of bioluminescent Elateridae species (Coleoptera). Mitochondrial DNA A DNA MappSeq Anal. 2016 Apr 22:1-10

[学会発表] (計 2 件)

- 1 Mitani Y., Niwa K., and Ohmiya Y: Cloning and characterization of luciferase from a Melanesian luminous click beetle. ISBC-2014, Uppsala, 2014/06/27
- 2 Mitani Y., Futahashi R., Liang X., and Ohmiya Y.: Low temperature adaptation of luciferase in Tibetan firefly. International Symposium of Bioluminescence and Chemiluminescence, Tsukuba, 2016/05/30

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 発光ゴカイ由来発光酵素
発明者: 近江谷克裕、三谷恭雄、安野理恵
権利者: 産業技術総合研究所
種類: 特許
番号: 特願 2016 - 048403
出願年月日: 平成 28 年 3 月 11 日
国内外の別: 国内

[その他]

- 1) 近江谷克裕「まばゆく光る蟲」高校生・大学生向けレクチャー・海の学び舎 (主催: 東京都葛西臨海水族園、平成 27 年 8 月 23 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近江谷克裕 (OHMIYA, Yoshihiro)
国立研究開発法人・産業技術総合研究所・
バイオメディカル研究部門
研究者番号: 20223951

(2) 研究分担者

三谷恭雄 (MITANI, Yasuo)
国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

生物プロセス研究部門

研究者番号: 10358103

(3) 研究分担者

二橋 亮 (FUTAHASHI< Ryo)
国立研究開発法人・産業技術総合研究所・
生物プロセス研究部門
研究者番号: 50549889