

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615013

研究課題名(和文)極微弱LEDの全光子束測定技術の開発

研究課題名(英文)Total photon flux measurement of dim LED reference light source

研究代表者

丹羽 一樹 (Kazuki, Niwa)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：30443211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ホタルなどの生物発光反応を応用して遺伝子の働きを可視化する技術が多方面で応用され、実験キットや発光測定装置が広く普及している。本研究では、発光量を光子数で測定するための絶対測定技術と計測標準の開発を行った。全空間に放出される全光子数測定が可能な積分球式分光測定装置の光子数応答度とその不確かさを精密に評価し、市販の発光測定装置の感度や、校正用光源の光子数測定を行った。更に生物発光反応の量子収率など、発光効率に関わる特性を解析した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of quantitative photon measurements in bioluminescence assays, we measured photon number emitted from reference light sources. For precise and reliable absolute measurements, we evaluated uncertainty of our integrating sphere spectral radiometer in accordance with the methodologies for spectral radiometry standards. This integrating sphere system had been specially designed and constructed to measure quite low level intensity of photons from bioluminescence reaction and calibrated using a national standard traceable spectral irradiance standard lamp. We also investigate quantum yield and other enzyme parameters of mutant luciferases to contribute the understanding the biochemistry of firefly bioluminescence reaction. These quantitative basis of photon measurement will contribute the applications of bioluminescence reaction, which is increasingly employed as gene expression marker to monitor status of cellular activity.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：安全環境計測

キーワード：光放射測定 分光計測 LED 積分球 全放射束 生物発光 量子収率 微弱光

### 1. 研究開始当初の背景

ホタルの生物発光に代表される発光反応は臨床検査など多くの検査・分析産業に応用されており、特に発光培養細胞を用いた毒性検査システムは動物実験禁止という世界的な潮流の“鍵”になる技術として期待されている。以前は顕微鏡を用いて1サンプルずつ細胞の形や色で判断しなくてはならなかったが、生物発光遺伝子を用いることで発光強度の変化として計測することが可能となることから、多検体自動分析をも視野に入れた検査システムとしての実証段階に入りつつある。

この段階では多くのデータの相互比較が欠かせない。しかしながら発光反応により生成される光は極めて微弱であり(  $10^3 \sim 10^8$  光子/秒、あるいは  $10^{-17} \sim 10^{-12}$  W )、このレベルの光を定量的に測定することは容易ではない。微弱光検出には光電子増倍管(PMT)が使われるが、現状では微弱光の計測は定量化されておらず、それも相まって計測装置の感度もばらばらのままである。そのためデータの相互比較に支障を来す事態(特に異なる研究グループによるデータの比較において)が問題となっている。結果として検査方法としての信頼性を確立できない恐れがあり、発光法による検査システムの普及の妨げになることが懸念されている。また、発光物質の発光特性の科学的記述が難しいという学術的な問題も孕んでいる。このような問題点を解決するためには、発光量を絶対値で計測する技術の確立が必要である。



図1：発光溶液などの微弱な光子を測定するための積分球式分光測定システム

我々は本研究を開始するまでに、極めて微弱な生物発光反応の光子数を定量するための積分球式分光測定装置を開発してきた。これを用いてホタル発光反応の量子収率の測定を行い、同反応の基礎データを収集してきた。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、発光反応を応用したバイオアッセイ技術の信頼性を確保することにある。

そのために必要な技術基盤として、ただ単に光子数を計測するだけでなく、その測定不確かさの評価を行う。ここでは、光放射に関する国家標準群に準じた評価を行うことで、計量のトレーサビリティが明確な計測体系

の構築を目指す。

そして本研究で計測する対象は、極微弱LED光源プレートとした。このLEDは発光測定装置の精度管理、校正などの目的で市販されているものであり、光子数計測の普及を促進に欠かせない信頼性確保のための重要なツールとなるからである。

一方、構築した計測システムの実証を兼ねた基礎研究の展開として、ホタル発光反応の量子収率等の酵素反応特性のデータ収集と解析を行う。これまでは、同反応の高効率性のみが注目され、量子収率の測定を主に解析してきたが、今後は同反応のメカニズム全体に目を向けるためである。

以上により、信頼性の高い光子数計測に基づく基礎研究の発展と応用技術普及への貢献を目指す。

### 3. 研究の方法

積分球方式の測定システムの構築は、産総研にて行った。同システムにおいては、極微弱LED光源に適した積分球の設計および作製が必要である。積分球は、その内部で光が拡散反射を繰り返すことを基本原理とするため、黒色の回路部分がほとんどの微弱LED光源(図2)を積分球内部に設置することは好ましくない。そのため積分球の開口から発光部位を臨むような入射ポートが必要である。光源の作製には、連携研究者の浜松ホトニクス社・中谷氏の協力を得た。また、別のメーカより類似の光源(絶対発光量は校正されていない)が市販を開始されたのでこれも測定対象とした。



図2：極微弱LED光源と、これを積分球で測定するための専用ポート

計測結果の妥当性の評価として、これまでにメーカ等が行ってきた簡略法との比較を行った。この簡略法は検出器を光源に直接設置する測定(接触方式)であり、シリコンフォトダイオード(PD)を光源の発光窓を覆うように接触させることで、光を漏らさず測定するもので、本研究において我々が構築した積分球を用いた測定方法(積分球方式)とは、計測のトレーサビリティを含め根本的に異なる計測方式となる。接触方式には後述するような原理的不備が内在しているが、適切な運用を行えばその簡便性において極めて実用的な方法である。接触方式と積分球方式の測定結果を比較検証することにより、接触方式の運用に有意義な知見が得られる。

以上により絶対光子数計測が技術的に大幅に向上することとなるが、その有用性を実

証することも技術普及には不可欠である。そこで、ホタル生物発光反応の発光量子収率等、絶対光子数計測に基づいた研究を展開した。サンプルの調製、生化学実験には研究分担者である兵庫県立大学の加藤助教が中心となり、定量計測を共同で実施した。具体的には、ゲンジボタルルシフェラーゼの活性中心に位置するアミノ酸残基に変異を導入した変異体シリーズを作製し、これに対する生物発光反応の量子収率、 $K_m$  値、 $V_{max}$  値などを実験的に決定した。また、天然基質のアナログであるアミノルシフェリンを用いた同様の実験を行った。

#### 4. 研究成果

極微弱 LED 光源を積分球式分光測定システム(図1)で測定を行った。同システムは、国家標準にトレーサブルな標準光源(分光放射照度標準電球、単位  $\mu\text{W} / \text{nm}^{-1}$ )を用いて校正した。

光子のエネルギーは波長  $\lambda$  (nm)に依存する。1 光子あたりのエネルギー量は  $1.986 \times 10^{-16} / \lambda$  (J)となる。そのため、標準光源で校正された積分球測定装置を用いた分光測定結果より、光源から放出される光子数を算出することが出来る。

光源は連携研究者である浜松ホトニクス社の中谷氏が担当し、発光強度などの最適化を行った(図2左)。産総研では、同光源を積分球で測定するため、光源が効率よく積分球内を覗くためのポート部品(図2右)を作製した。これにより、LED 光源窓から放出される全光子を積分球に取り込むことを可能にした。更に、ポートから覗く光源の位置再現性に起因する不確かさを評価するために、ポートから出し入れできる光源を作製し、光源設置位置に起因する補正係数と不確かさ評価を行った(図3)。この知見は、本 LED 光源のみならず大型の液晶パネルのような 2 配光光源を積分球で測定する際の正確な補正につながるものである。

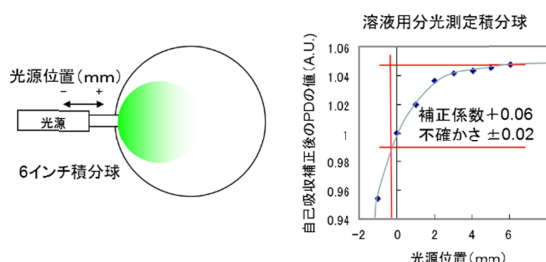


図3：光源位置再現性に起因する補正係数と不確かさの検証

その他、積分球の内面応答度分布、マルチチャンネル分光放射計の応答度非直線性、そして分光器内部迷光に起因する不確かさについても、同型の装置を用いた実験結果などを活用して評価した。これらは、計測対象である LED 光源の発光量、波長分布、空間配光分布などが、標準電球と大きく異なること

により発生する誤差要因であり、より正しい値を導き出すにあたり重要な評価項目である。

以上の計測基盤の上に、極微弱 LED 光源の光子数測定を行った。その結果、本研究のために試作した極微弱 LED 光源による光のエネルギーは  $540 \pm 54$  pW となった。同光源のスペクトル測定結果を元に算出した光子数は  $2.5 \times 10^9$  (photons / sec)となった。同様に別のメーカーから市販されている類似の光源についても測定した結果  $846 \pm 85$  pW という結果が得られた。

一方、フォトダイオード(PD)検出器を光源に覆うことで全発光量を測定するという簡易代替法(接触方式)の妥当性を検討するために、以上で測定した二つの光源の接触方式による測定データを調べた。幸い両光源の発光スペクトルはほぼ同一であったため、PD 検出器が示す測定出力値の比は、 $540$  pW /  $846$  pW となるはずである。しかし、実際は  $383$  pW /  $846$  pW となり、両光源の間で約 30%の差異が生じた。接触方式では PD を光源に接触させて覆うように測定するため、PD 検出面での斜入射特性による過小評価、検出器および光源の間で繰り返される再反射による過大評価など、妥当性を確認することが実験的に困難な不確かさ要因を含んでいる。いずれにしても、光源の発光部分の構造に起因するものであり、同一構造の光源間ではこのような差異は生じないが、逆に発光部分の構造が異なる光源の比較には注意が必要であることが改めて確認できた。

現在、海外の国家計量研究機関においても、本研究と同様の計測を実施している例はない。少なくとも、測光・放射計測分野で先導的な研究を行っている NIST(米国)および PTB(ドイツ)では実施していないが、今後は、これら研究機関と連携して、別の校正系で構築した計測システムとの比較評価を行うことが重要となる。

一方で、計測学的な評価の活用として、絶対光子数測定を基盤とした実証研究を実施した。具体的には、ホタル生物発光反応の定量的解析として、量子収率、 $K_m$  値、 $V_{max}$  値などの酵素反応特性を解析した。

ホタル発光反応は、酵素ルシフェラーゼの作用で反応基質ルシフェリンの酸化反応により発光するものであるが、発光色が生物種によって異なり、また in vitro の反応においても、酵素への変異導入、あるいは溶液の pH によって色が変化することがある。このように発光色が多様に変化するにもかかわらず、発光反応基質および反応機構は共通である。このように発光色が変化するメカニズムは現在でも、研究の対象となっている。



図4：ゲンジボタルルシフェラーゼ S288 アミ



## ノ酸残基変異体の発光色 (pH8)

本研究では、酵素変異体および基質アナログを用いた実験を行い、発光色決定に関する基礎データを実験的に収集した。図4は変異酵素のうち、ゲンジボタルルシフェラーゼのS288 アミノ酸残基に変異を導入した各種酵素を用いた発光反応の写真である。多様な発光色変化を示していることがわかる。

また図5は、これら酵素を用いて、天然の発光基質ルシフェリンと基質アナログであるアミノルシフェリンの代表的な発光スペクトルである。天然基質を変異酵素で発光させた場合、酵素の種類により発光スペクトルが変化するが、アミノルシフェリンの場合にはスペクトルに大きな変化は見られなかった。

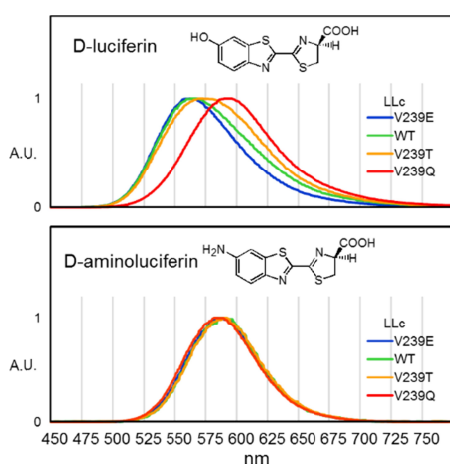


図5：変異酵素によるホタル生物発光反応のスペクトル。天然基質 D-luciferin の場合は発光色が変わる（上）が、アナログである D-aminoluciferin の場合は発光色がほとんど変わらない（下）。

これらの多様な反応系について、各種酵素特性を求めた。その結果、変異導入により  $K_m$  値あるいは  $V_{max}$  値のような反応速度に関係する特性が大きく変化することが明らかになった。またその変化は、天然のルシフェリンに対しての場合とアミノルシフェリンに対しての場合とではかならずしも一致しなかった。これは酵素 - 基質相互作用がそれぞれの組み合わせに寄って多様であることを示している。

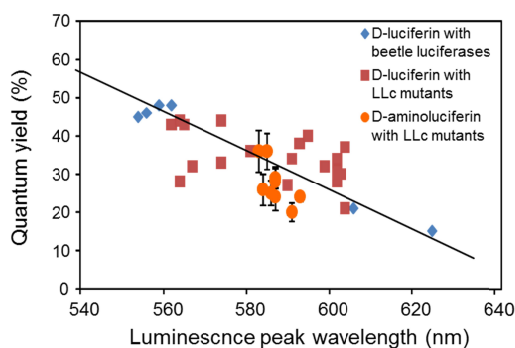


図6：発光極大波長と量子収率の関係。

一方、反応速度と共に発光強度に影響を及ぼす量子収率は、以前の我々の実験結果とほぼ一致する結果となった。即ち、量子収率は短波長で 50%程度、長波長で 15%程度と、発光色（発光極大波長）と相関していた（図6）。

興味深いことに、量子収率は天然のルシフェリンもアナログのアミノルシフェリンもほぼ同等の値であった。この結果、両分子が同じような機構で反応し、発光していることを示唆している。

以上の結果は、発光色決定機構の研究において重要な実験的知見を与えると思われる。特に、酵素の結晶構造解析結果を用いた理論計算において、計算方法の妥当性評価に活用出来ると期待できる。即ち、天然のルシフェリンでの発光色変化を良好に説明できる分子理論に対し、アミノルシフェリンを適用しても発光色が変わらない実験結果を再現できれば、その理論の妥当性を確認できるはずである。

今後は、これら変異酵素とアナログ基質を用いた結晶構造解析などを行い、更に精密な実験データを収集し、色決定機構に関する研究に展開していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 5 件)

D. Kato, Y. Hiraishi, M. Maenaka, K. Yokoyama, K. Niwa, et al. Interconversion of ketoprofen recognition in firefly luciferase-catalyzed enantioselective thioesterification reaction using from *Pylocoeria miyako* (PmL) and *Hotaria parvura* (HpL) just by mutating two amino acid residues., *Journal of Biotechnology*, 査読あり, **168**(3), 2013, pp. 277-283. DOI: 10.1016/j.biotech.2013.04.024

Y. Mitani, R. Futahashi, K. Niwa, N. Ohba, Y. Ohmiya. Cloning and characterization of luciferase from Fijian luminous click beetle. *Photochemistry and Photobiology*, 査読あり, **89**(5), 2013, pp. 1163-1169. DOI: 10.1111/php.12097

T. Takahashi, Y. Kimura, K. Niwa, et al., In Vivo Imaging

Demonstrates ATP Release from Murine Keratinocytes and Its Involvement in Cutaneous Inflammation after Tape Stripping. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読あり, **133**(10), 2013, pp. 2407-2415.  
DOI: 10.1038/jid.2013.163

D. Kato, T. Kubo, M. Maenaka, K. Niwa, et al., Confirmation of color determination factors for Ser286 derivatives of firefly luciferase from *Luciola cruciata* (LUC-G). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 査読あり, **87**, 2013, pp. 18-23.  
DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.10.009

丹羽一樹、ホタルの生物発光反応に関する未解明課題への挑戦、*日本MRSニュース*, **24**(3)、査読なし、2012、pp. 6-8

[学会発表](計 5 件)

K. Niwa, Y. Ichino, D. Kato, et al., Firefly luciferase bioluminescence activity profile based on quantum yield and kinetics. *Biotrance2013*, Manchester, 2013/7/22 - 24.

D. Kato, M. Maenaka, K. Takaya, K. Niwa, et al., Active site environmental effects on the catalytic activities of firefly luciferase. *Biotrance2013*, Manchester, 2013/7/22 - 24.

K. Niwa, et al. Measurement of Angular Nonuniformity of an Integrating Sphere for Total Radiant Spectral Radiant Flux Measurement. *CIE2012*, 杭州, 2012/9/20

K. Niwa, Y. Ichino, Y. Nakajima, D. Kato, et al., Quantum yield and kinetics of bioluminescence reaction using various beetle luciferases. *ISBC2012*, Guelph/Canada, 2012/5/29 - 6/2.

M. Maenaka, D. Kato, T. Kubo, K. Niwa, et al., Color tuning of firefly luciferase bioluminescence by hydroxy bonding network customization around the active site. *ISBC2012*, Guelph/Canada, 2012/5/29 - 6/2.

[図書](計 1 件)

丹羽一樹、湯元昇、バイオテクノロジー領域のISO/TC新設の動き、*幹細胞技術の標準化 再生医療への期待*、日本規格協会、2012/10/10  
ISBN978-4-542-3019-7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 一樹 (NIWA, Kazuki)  
産業技術総合研究所 計測標準研究部門  
研究者番号: 30443211

(2) 研究分担者

加藤 太一郎 (Kato, Dai-ichiro)  
兵庫県立大学 大学院工学研究科  
研究者番号: 60423901

(3) 連携研究者

中谷 崇典 (Nakaya, Takanori)  
浜松ホトニクス株式会社 電子管事業部  
研究者番号: 60600690