

発光甲虫プローブを用いた細胞機能解析

丹羽 一樹, 中島 芳浩, 近江谷 克裕

生物発光を利用したセルベースアッセイやイメージングはこの10年間で大いに進歩し、生命科学の基礎研究や創薬研究になくてはならないツールとなった。また、毒性評価の世界では実験動物の代替法の基盤技術として活用され、たとえば我々の開発した細胞評価系がOECD（経済協力開発機構）のテストガイドラインとして組上に載せられている一方、50年前に報告されたホタルの発光反応の量子収率が書き換えられたり、ルシフェラーゼの3次元構造が精密に解析されたりなど、生物発光の基礎研究にも大きな進展がみられた。筆者らは2004年、本誌に「発光甲虫の生物発光機構の基礎と応用-生物発光によって細胞情報を探る」としてそれまでの研究成果を報告したが、本稿では、この10年間の生物発光研究の基礎、応用面における進展を解説しつつ、これからの生物発光技術の拡がりを展望する。

1. 生物発光プローブの基礎

ホタルに代表される発光生物は我々の目を楽しませてくれるが、科学の進展にも大きく寄与してきた。蛍光タンパク質（GFPなど）、発光酵素（ルシフェラーゼ）、発光基質（ルシフェリン）などの言葉はライフサイエンスの研究者にとって今やきわめてなじみ深いものとなっている。本節では、生物の発光現象としての生物発光をあらためて整理し、この現象を支える生化学、そして応用技術の基盤となる光の定量測定について解説する。

1) 生物による発光現象の生化学

我々に身近なホタルやホタルイカ以外にも発光細菌、発光キノコ、オワンクラゲ、ヒオドシエビ、そしてウミホタルや夜光虫のようなプランクトンなど多くの発光生物が知られている。これまでに多くの発光生物からルシフェリンが単離構造決定され（図1）、発光反応を触媒するルシフェラーゼも多数クローニングされている¹⁻³⁾。特に2014年にロシアのグループにより30年ぶりに新規のルシフェリンが発光ミミズから同定された⁴⁾。しかし発光笠貝ラチアやミミズなどはルシフェラーゼのクローニングが未完で

あり、発光キノコのように基質の構造も明らかにされていないものもある。

生物発光を担う化学反応はルシフェリン-ルシフェラーゼ反応（L-L反応）として広く知られ、光を発する機構は主に二つ考えられる（図2）。一つ目はホタルやウミホタルのように、酸化生成物が蛍光性のクロモフォアを有しているため、L-L反応のみで蛍光放射すなわち発光が起こるものである。二つ目は、L-L反応生成物が蛍光放射を行うのではなく、クロモフォアを持つ蛍光タンパク質などに励起エネルギーを移動させ、蛍光放射により発光を行う機構である。代表例はオワンクラゲなど腔腸動物の蛍光タンパク質である。発光貝ラチアあるいは渦鞭毛藻などもL-L反応生成物が蛍光性のクロモフォアを持たないため、励起エネルギーの分子内あるいは分子間移動が想定されるが、詳細は不明である。

近年では「生物発光（bioluminescence）」という言葉が

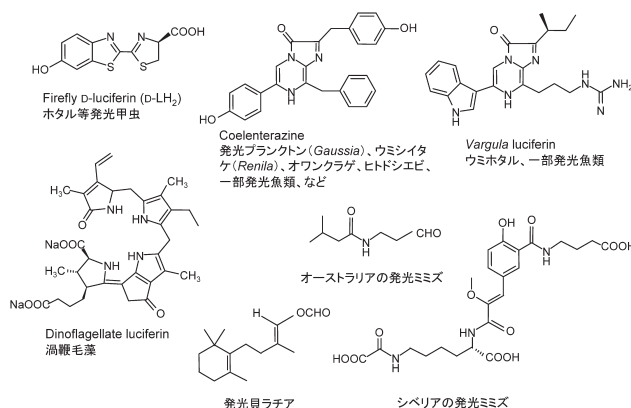


図1 構造決定されたルシフェリン群

国立研究開発法人産業技術総合研究所（〒305-8566 つくば市東1-1-1）

Cell dynamics research using multi-color beetle luciferases

Kazuki Niwa, Yoshihiro Nakajima and Yoshihiro Ohmiya (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870675

© 2015 公益社団法人日本生化学会

L-L 反応とはほぼ同義で用いられ、蛍光タンパク質とは別のものとして位置づけられているが、生物発光とは本来、発光生物が光る現象そのものを意味しており、発光生物であるオワンクラゲから単離された蛍光タンパク質GFP（緑色蛍光タンパク質）も生物発光のためのタンパク質の一つである。しかしサンゴなどの発光生物ではない腔腸動物からも蛍光タンパク質は単離されており、生物界では蛍光を発する生物の方が、自発的に発光する発光生物より広く分散

している。

2) 生物発光反応の酵素

発光生物は図1に示した多様なルシフェリンの酸化反応により発光しており、その反応はルシフェラーゼによって触媒される。すでに多くの発光生物のルシフェラーゼ遺伝子がクローニングされ、大腸菌等で合成した酵素の発光活性が確認されている。このようなルシフェラーゼ遺伝子は遺伝子発現のレポータ酵素等のバイオ研究用ツールとして、広く活用されている⁵⁻⁷⁾。表1に、代表的なルシフェラーゼに関する情報をまとめた。

ルシフェラーゼは細胞内にとどまるタイプ（非分泌型）と分泌されるタイプ（分泌型）に分類される。ホタルやウミシイタケルシフェラーゼは非分泌型であり、最終的に細胞内で分解されるが、その分解速度は酵素によって異なっている。よって、細胞内イメージングに用いる場合には、その酵素の寿命も考慮しなくてはならない。また、レポータアッセイで用いる場合も薬剤等の処理時間や発光を測定するタイミングについて最適化する必要がある。

一方、分泌型のルシフェラーゼは細胞内イメージングのようなツールには適さないが、たとえばウミホタルルシフェラーゼをレポータアッセイに用いれば、タンパク質は即座に細胞外に分泌されるため培地内のルシフェラーゼ

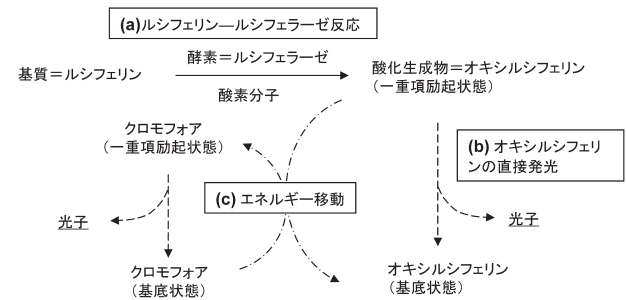


図2 生物発光反応の化学的メカニズムの概略
ルシフェリンルシフェラーゼ反応(a)とそれに続く発光過程(b)と(c)。(b)はオキシルシフェリンが光子を放出して直接発光する経路で、代表的な発光生物はホタルやウミホタル、発光プランクトンのガウシア。(c)はオキシルシフェリンが直接発光せず、GFPのような別の物質に励起エネルギーを移動させて蛍光を放射する経路で、オワンクラゲが代表例。

表1 発光酵素ルシフェラーゼ

生物種	主な製品（購入先）	その他
ホタルルシフェリンを基質とするもの		
<i>Photinus pyralis</i> （北米産ホタル）	ルシフェラーゼレポータシステム（プロメガ）	天然精製物がシグマアルドリッチ社より購入可能
<i>Pyrearinus termitilluminans</i> （ブラジル産ヒカリコメツキムシ）	ELuc（東洋紡）	量子収率が最大（0.61）pH非感受性
<i>Rhagophthalmus ohbai</i> （イリオモテボタル）	SLG（東洋紡）	3色ルシフェラーゼシステムの緑色，pH非感受性
	SLO（東洋紡）	3色ルシフェラーゼシステムの橙色，pH非感受性
<i>Phrixothrix hirtus</i> （鉄道虫）	SLR（東洋紡）	3色ルシフェラーゼシステムの赤色，pH非感受性
<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i> （ジャマイカ産ヒカリコメツキ）	CBG, CBR（プロメガ）	2色ルシフェラーゼシステム
<i>Luciola cruciata</i> （ゲンジボタル）		リコンビナント酵素が和光純薬より入手可能
<i>Luciola mingrelica</i> （欧州産ホタル）		リコンビナント酵素が和光純薬より入手可能
セレンテラジンを経基質とするもの		
<i>Renilla reniformis</i> （ウミシイタケ）	レニラルシフェラーゼ（プロメガ）	分泌型
<i>Gaussia princeps</i> （カイアシ類）	ガウシアシフェラーゼ（New England Biolabs）	
<i>Oplophorus gracilirostris</i> （トゲオキヒオドシエビ）	NanoLuc（プロメガ）	市販品はfurimazineを経基質として使用
<i>Metridia longa</i> （カイアシ類）	MetLuc（タカラバイオ）	分泌型
ウミホタルルシフェリン（Cypridina luciferin）を経基質とするもの		
<i>Vargula hilgendorffii</i> （ウミホタル）	Cypridina Luciferase（New England Biolabs）	分泌型

の活性を測るだけで対象遺伝子の発現レベルを評価できる^{8,9)}。また発光生物の体外に分泌されて発光するウミホタルルシフェラーゼは非分泌型に比べ酵素としての安定性が高いという特長があり、ラベル化試薬として有用である。

ホタルなど発光甲虫のルシフェラーゼは、溶液pHに対する感受性で生化学的に大きく二つに大別される(図3)¹⁰⁾。最初にクローニングされた北米産ホタルのルシフェラーゼはpH感受性であり、細胞内のpHに依存し発光色および発光強度が大きく変化し、定量的な評価に影響を及ぼす。これに対し近年クローニングされたELucあるいは3色ルシフェラーゼのSLG, SLO, SLRのスペクトルはpHが変化しても一定のままであり、発光色の違いを利用した定量解析に適している。

3) 生物発光反応の発光強度評価

明るく光る発光反応は、たとえばイメージングに応用すればより鮮明な画像が得られるなど、有用性はきわめて高い。そのため、より明るく光る発光基質あるいは酵素の開発は発光反応における重要な研究テーマの一つであり、発光強度の客観的な評価はきわめて重要である。しかし発光強度の評価は原理的にも技術的にも煩雑なため、学術論文においても実験に基づく客観的な評価データを求められることはほとんどなかった。そこで、我々は発光反応における発光強度の評価について検討した。以下に、絶対光子数計測に基づく定量的な評価について説明する。

発光強度は全光子束 I_{lm} すなわち反応溶液から放出される全光子数の時間密度が最も客観的な尺度といえる。 I_{lm} は酵素反応速度論的にミカエリス・メンテンの式から以下のように表記することができる。

$$I_{lm} = \frac{QY \times k_{cat} \times [E]}{1 + K_m / [S]} \quad (1)$$

ここで、 QY は発光反応量子収率、 k_{cat} は酵素1分子あたりの反応速度、 $[E]$ は酵素の濃度、 K_m はミカエリス定数、 $[S]$ は基質濃度である。 QY は、基質1分子が反応を経て1光子

を放出する確率と定義されており、反応により消費した分子数を S 、生成した光子数を $Photons$ とすると

$$QY = Photons / S \quad (2)$$

と表せる。通常の酵素反応では $[S]$ は K_m に比べて十分に大きいので、(1)式は次のように単純化することができる。

$$I_{lm} = QY \times k_{cat} \times [E] \quad (3)$$

この式の意味するところは、生物発光反応の明るさは反応系に固有の活性パラメータである QY と k_{cat} によって明確に規定でき、活性状態にある酵素の濃度 $[E]$ に比例する、ということである。それでは、明るい反応系を構築するためには、 QY , k_{cat} あるいは $[E]$ のどのパラメータを改善すればよいのだろうか。

古くからホタル生物発光反応の効率はきわめて高く、発光にあたり熱をほとんど放出しない冷光といわれてきたが、これは1959年に報告された $QY = 0.88 \pm 0.25$ という数字に起因する¹¹⁾。しかしながら、この値には少なからず疑問があった。たとえば、当時は天然のルシフェリンが実験に用いられたはずだが、天然のルシフェリンは精製の過程でラセミ化するので純度は100%ではない。また、全光子束を測定することは現在でも決して容易ではない。我々は2008年に東京大学の秋山らのグループと共同でこの再実験に取り組み、 QY が約0.4という結果を得た¹²⁾。現在、多くの論文、教科書でもこの値が使われている。さらに他の発光甲虫や変異体のルシフェラーゼの QY を求めるため、そしてより簡便な方法で測定するため、新たに光放射計測の国家標準に準じた絶対測定系を構築し、発光甲虫ルシフェラーゼ群の酵素活性パラメータ解析を実施した。

表2に、ホタルのルシフェリンを基質とする代表的な酵素の QY と k_{cat} の値を示す¹³⁾。我々が測定したルシフェラーゼのうち、量子収率が最も高いのはブラジル産ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼELucで、その値は約0.6である。これに対し大部分の発光甲虫ルシフェラーゼは

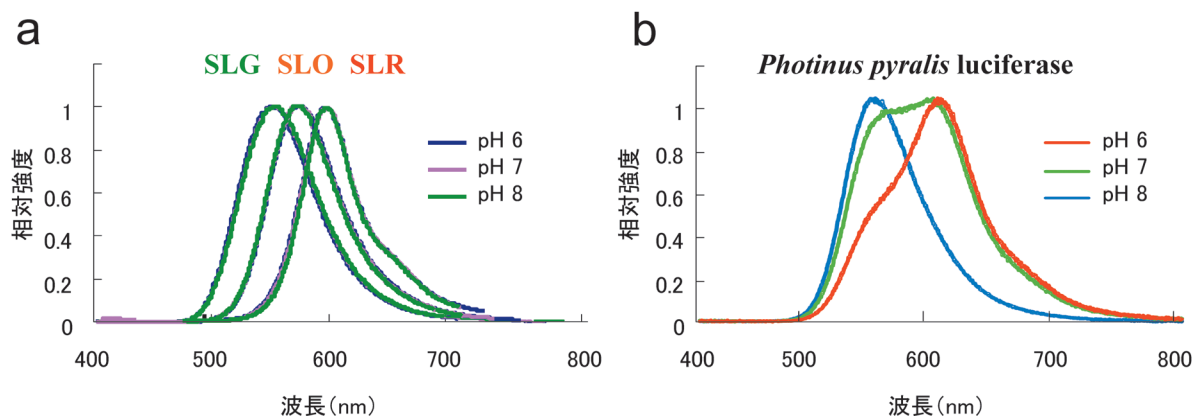


図3 pH非感受性および感受性ルシフェラーゼの発光スペクトル

(a) pH非感受性で、緑、橙、赤色に発光するルシフェラーゼSLG, SLO, SLRのスペクトル。pH6, 7, 8のバッファー中でのスペクトルが完全に重なっている。(b) pH感受性の北米産ホタル*Photinus pyralis*のルシフェラーゼのスペクトル。pHによって変化している。

0.4~0.5, 天然で赤色に光る鉄道虫の頭部由来のルシフェラーゼが最も小さく0.2弱である。このように量子収率は酵素の種類によって異なるが、発光色（発光極大波長）に依存し、発光極大波長が短いほど QY が大きくなるという相関が認められた。また酵素間の QY の違いは数倍程度でしかなかった。同様に k_{cat} は天然型のルシフェラーゼではいずれもほぼ同じ桁数であった。

以上の結果を(3)式に当てはめてみると、 I_{lm} に関する支配的要因は $[E]$ 、すなわち酵素濃度であることがわかる。逆に、酵素そのものには特別に QY や k_{cat} が大きいものが存在するわけではなく、明るい発光反応系を得るためには $[E]$ を大きくすることが重要となる。ここで注意する必要があるのは、 $[E]$ が単なる酵素濃度ではなく活性状態にある酵素の濃度であることである。したがって、明るい発光シグナルを得るためには、細胞内での発現量を向上させ酵素の絶対量を増加させるだけでなく、酵素の安定性を向上させるなどして $[E]$ を高め、発光量 I_{lm} そのものを増大させる必要がある。ただし、変異体ルシフェラーゼにおいて k_{cat} が著しく低下するものがある。これは変異導入により活性が喪失していると解釈できる。変異導入によってルシフェラーゼの改善を試みる場合は、 k_{cat} が低下しないように留意する必要がある。

以上の結果はホタルルシフェリンを基質とする甲虫ルシフェラーゼの話であるが、セレテラジンなど他のルシフェリンを基質とするルシフェラーゼでは違った結果になる可能性もあり、今後の研究課題である。

4) 発光の絶対計測とスペクトル測定

前項で述べたルシフェラーゼの酵素活性パラメータ QY および k_{cat} を決定するためには、全光子束 I_{lm} を実験的に測定する必要がある。 k_{cat} はラインウィーバー・バークプロットから求められる最大反応速度 V_{max} と $[E]$ から求められる。反応速度 V は反応系全体の基質消費速度と同義であり、全光子束と QY から導くことができる。

(2)式で示す $Photons$ は、全光子束を時間積分すること

により測定する。 S は基質濃度より比較的容易に決定できるが、反応によって消費された基質分子数を求める必要がある。我々は5分程度の測定時間内にすべての基質分子の反応が完了するよう基質分子数をきわめて低く設定し、反応開始前から計測を行うことで、全光子数を実測している。100 μ Lの反応液中の基質分子は 10^{-13} mol (6.02×10^{10} 分子)であり、通常の酵素発光反応溶液での基質濃度と比べて4~5桁程度低い。

ここで、光の検出器について少し掘り下げて説明する。光の検出器はバイオイメージングなどでも多くのものが使われているが、発光反応の微弱な光放射を検出するためには、感度の高い光電子増倍管(PMT)が用いられる。アバランシェ・フォトダイオードなどの半導体検出器もPMTより量子効率(1光子が電気シグナルを生む確率)が高く高感度であるが、きわめて微弱な光を測定するためにはノイズ(ダークカウント、暗電流値)が低いことが重要であり、この点ではPMTの方が優れている。実際、ルミノメータと呼ばれる汎用型の測定装置ではPMTが主流である。一方で、スペクトルの測定で用いられるマルチチャンネル分光計ではCCDのような半導体検出器が使われる。発光強度が時間変化しやすい発光反応の場合は、すべての波長のシグナルを同時に測定できるマルチチャンネル式が有効であるが、マルチ計測のためには検出器のアレイ化が必要であり、これには半導体検出器が適している。また検出器は種類を問わず分光応答度(いわゆる波長感度)特性があり、これにも留意する必要がある。たとえばPMTは青色~緑色領域の応答度は高いが、赤色~赤外域での応答度はほぼゼロである。このためルミノメータを用いて測定した赤色ルシフェラーゼの発光シグナルが緑色に比べて小さいからといって、必ずしも赤色の方が暗いわけではない。

ルミノメータは通常、PMT内部に生成する光電子の数が表示される(カウント値)。ルミノメータで全光子束の絶対計測を行うためには、カウント値と発光反応溶液サンプルの全光子束との相関、すなわち全光子束応答度の校正

表2 発光甲虫ルシフェラーゼによるL-L反応の発光極大波長 λ_{Max} 、量子収率 QY および k_{cat}

ルシフェラーゼ		λ_{Max} (nm)	QY	k_{cat} (s^{-1})
<i>Photinus pyralis</i> (北米産ホタル)	リコンビナント	560	0.45	
<i>Photinus pyralis</i> (北米産ホタル)	天然精製物リコンビナント	562	0.48	4.3×10^{-2}
<i>Pyrearinus termitilluminans</i> (ブラジル産ヒカリコメツキムシ)		539	0.61	
<i>Phrixothrix hirtus</i> (鉄道虫)	リコンビナント	625	0.15	
<i>Luciola cruciata</i> (ゲンジボタル)	リコンビナント	565	0.43	
<i>Luciola mingrelica</i> (欧州産ホタル)	リコンビナント	571	0.43	
<i>Pyrocoelia miyako</i> (ミヤコマドボタル)				
野生型	リコンビナント	554	0.45	4.4×10^{-2}
N230S変異体	リコンビナント	606	0.21	1.5×10^{-2}
S199T変異体	リコンビナント	559	0.48	0.3×10^{-2}
S200A変異体	リコンビナント	556	0.46	0.3×10^{-2}

が必要となる。この校正は全光子束が既知の参照用発光反応溶液サンプルを用いて実施する。参照用発光反応溶液サンプルの全光子束は、積分球式マルチチャンネル分光測定装置を用いて決定する¹⁴⁾。この装置は光放射に関する国家標準に準じており、積分球を用いることで、球の外部に設置した標準電球から導入された放射束と、球の内部に設置するサンプルからの全放射束を、マルチチャンネル分光放射計により同等に測定することができる。装置の分光応答度は分光放射照度標準電球を用いて校正することで、他の国家標準にトレーサブルな全光子束測定系となっている。不確かさは $\pm 10 \sim 15\%$ （包含係数 $k=2$ ）程度である。この積分球式マルチチャンネル分光測定装置は残念ながら感度が低いため、 QY の測定にはルミノメータを用いる。ただしルミノメータには波長感度特性があるので、 QY 測定の対象となる発光反応溶液サンプルのスペクトルごとに参照溶液を調製し、全光子束応答度の校正を行う。

ところで、分光計測において、以下の点を留意する必要がある。たとえば入射スリットを広くすると、測定されるスペクトルは実際よりも幅が広がるが、バイオ分野では概して微弱な光を効率よく測定するため、スリット幅を大きくしていることが多い。また光検出器の波長感度特性、そして応答度非直線性などのため、スペクトルの生データは歪んでいる。発光反応を測定するためには分光器の特性を理解したうえで妥当性評価を行い、標準光源を用いた適切な校正が欠かせない。

2. 生物発光プローブによるセルベースアッセイ

実験動物を用いた薬効評価や安全評価試験は3Rの理念のもと細胞を用いたセルベースアッセイに代替されつつある。初期段階における薬効や安全評価のために行われるセルベースアッセイは細胞数や細胞形状の変化を指標にするものであったが、これでは判定性があいまいかつスループット性に問題があった。そこで、これら进行评估する分子マーカーの遺伝子発現を指標とするレポーターアッセイが行われるようになった。第1世代では対象となる遺伝子のプロモーター配列の下流にたとえば β -ガラクトシダーゼ遺伝子を挿入したベクターを構築、これを細胞に導入する。対象遺伝子の発現が活性化された場合、本タンパク質が生産されるので、呈色反応により発色させ、発色性によって遺伝子発現量を推定した。他にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を用いたCATアッセイなどもあるが、定量性や簡便性が低いため、第2世代としてルシフェラーゼや蛍光タンパク質GFPを用いたレポーターアッセイが行われるようになった。二つのレポータータンパク質は簡便性には優れているが、定量性という意味では発光量という数値で評価できるルシフェラーゼを用いたものが、より精度の高いセルベースアッセイとして普及した。本節では表1に取り上げるルシフェラーゼ群を中心に説明する。

ルシフェラーゼを用いたセルベースアッセイでは、細胞

それ自体の変化などを評価できる恒常的に発現するコントロール遺伝子を併せて比較することで、より再現性を高めることができる。つまり二つの遺伝子の発現を指標にセルベースアッセイを行う方法である。プロメガ社はホタルルシフェラーゼとレニラルシフェラーゼを併せたデュアルレポーターアッセイを商品化した。しかしながら、この方法では二種類のルシフェリンを用いるため発光測定が煩雑であり、かつ、二つのルシフェラーゼの細胞内半減期が著しく異なる点、また発光反応のバックグラウンドが異なる点が問題となっていた。そこで、我々は同じホタルルシフェリンを共通の発光基質としながらも発光色の異なる発光甲虫ルシフェラーゼに着目し、各々の発光色を分離することでレポーターアッセイを行うマルチカラールシフェラーゼアッセイを開発した¹⁵⁾。

前述したようにホタルルシフェリンに対して、溶液のpHに依存して発光スペクトルが変化するもの（主にホタルルシフェラーゼ）と、変化しないもの（主に発光甲虫由来ルシフェラーゼ）がある。マルチカラールシフェラーゼアッセイは後者を利用したもので、3色（緑、橙、赤色）のルシフェラーゼ群を用いたものである。本ルシフェラーゼ群は、1) 最大発光波長が30nm程度異なり、色フィルターで分離計測可能、2) 従来のデュアルレポーターと異なり、ルシフェリンが1種類、3) 三つのルシフェラーゼ活性の温度依存性、半減期がほぼ同様であるという特徴を持つ（図4）。

2004年、北山らは我々がクローニングした赤、緑色発光甲虫ルシフェラーゼを用いてシアノバクテリアの二つの遺伝子発現を同時計測した¹⁶⁾。計測には2本の光電子増倍管を用いて、二つの遺伝子の発現を連続的に測定した。同年、我々は哺乳類細胞内の体内時計に関して、時計遺伝子Bmal1プロモーターとBmal1プロモーター内のRev-Erb and ROR response element (RORE) の配列を上流に導入したSLR, SLGを用いて、転写因子ROR α に対する応答性が異なることを明らかにした¹⁷⁾。この際、内部標準としてThymidine kinase (TK) プロモーター下流にレニラルシフェラーゼを導入したベクターを用いた。翌年、さらに内部標準としてSLOを用いることで、三つの遺伝子発現を3発光

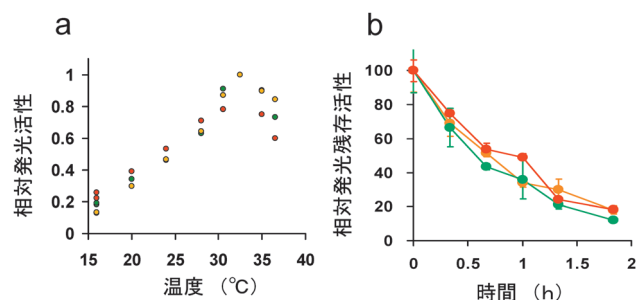


図4 緑、橙、赤色に発光するpH非感受性ルシフェラーゼSLG, SLO, SLRの温度特性、タンパク質寿命 (a) SLG, SLO, SLRの相対発光活性の温度依存性。 (b) PEST配列を付加したSLG, SLO, SLRの37°Cにおける発光残存活性の時間変化。

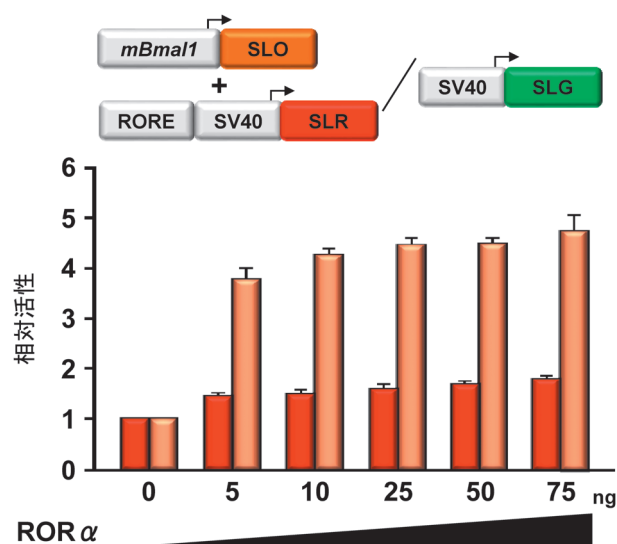


図5 3発光色のルシフェラーゼを用いたROR α によるBmal1プロモータおよびROREの転写活性化の同時測定
3種類のレポーターベクターおよびROR α 発現ベクターをマウス線維芽細胞NIH3T3に一過的に導入し、1日培養後、専用発光溶液 (Tripluc) で細胞を破碎し、緑・橙・赤色ルシフェラーゼの発光強度を同時測定した。

色のルシフェラーゼで同時に計測することにも成功した (図5)¹⁵⁾。2005年以降、BranchiniらやOguraらはホタルルシフェラーゼの変異体を用いることで2発光色による2遺伝子発現計測を行った^{18,19)}。

セルベースアッセイの大きな目的は創薬や毒性スクリーニングにあるが、重要な点はハイスループット性と再現性である。前者を満足するためにはできるだけシンプルな方法とし、計測装置とのマッチングが重要である。一方、後者には細胞の安定性を担保し、再現性を確保するための適切な内部標準が必要となる。創薬スクリーニングを行った例としてDavisらは、nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル伝達経路の活性化を調整する inhibitor of NF- κ B (I κ B α) の細胞内安定性を高める化合物を同定するためCBGをI κ B α と融合し、一方、内部標準としてCBRを用い、二つのバンドパスフィルターを組み合わせたCCDカメラを検出系として用いることで1536穴プレートを対象としたスクリーニング系を構築した²⁰⁾。一方、我々の開発したマルチカラーレポーターアッセイを用いて、皮膚感作性の分子マーカーである interleukin 8 (IL-8) の遺伝子発現をSLO、内部標準として glycerolaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) のプロモータの発現をSLRで評価する細胞が樹立された。本細胞を用いることでヨーロッパ実験動物代替法センターが規定した22化合物に対して82%の再現性、88%の毒性評価信頼度で解析できた²¹⁾。本マルチカラールシフェラーゼアッセイを用いた実験動物代替法は現在、OECDのテストガイドラインに申請準備中である。

これまで紹介したルシフェラーゼアッセイでは、最初のシアノバクテリアの例を除いて細胞に刺激を加えたのち、ある一定時間後、細胞を破碎し、その段階までに合成

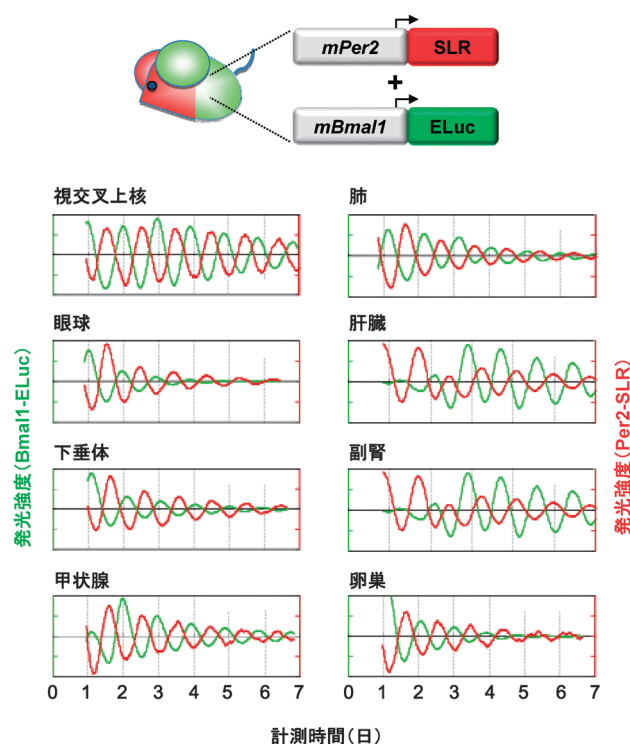


図6 デュアルカラーマウスから単離した組織における2種類の時計遺伝子発現のリアルタイム発光測定
概日時計遺伝子Per2およびBmal1プロモータ制御下でSLRおよびELucが発現するデュアルカラーマウスから単離したスライス組織を7日間リアルタイム発光計測した。赤色はPer2プロモータ、緑色はBmal1プロモータの時間依存的発現変動に伴う発光強度の変化を示す。

され、細胞内で分解されなかったルシフェラーゼの発光量からプロモータの活性を評価した。しかしながら、ホタル発光系のユニークさは、他の発光系のルシフェリンと異なり、ホタルルシフェリンが培養液中で高い安定性を示し、かつ、生きた細胞内に徐々に浸透し細胞内で生物発光反応を起こすことができる点である。具体的には測定開始1週間後でも半減することではなく、一定のシグナルを得ることができる。一方、セレンテラジンやウミホタルルシフェリンの培地内や生体内での寿命は短い。よってホタルルシフェリンを用いれば、生きた細胞内の遺伝子発現を長時間にわたり解析できる。我々は逆位相の関係で発現することが知られている時計遺伝子Bmal1とPer2をそれぞれELuc、SLRによってリアルタイムに解析する方法を開発した。具体的には、これらの組み合わせを持ったトランスジェニックマウスを作製し、世界で初めて2色の発光で体内時計を知らせるマウスの作製に成功、本マウスの各組織におけるPer2とBmal1発現の周期と位相は組織ごとに異なるものの、正確な逆位相を示すことを明らかにした (図6)²²⁾。また、Bmal1プロモータの制御下でELucが発現するトランスジェニックマウスとSLRが発現するRat-1線維芽細胞を個別に作製し、トランスジェニックマウスより単離した組織とRat-1細胞の共培養を行い、両者のリズム発現を同一ディッシュ内でリアルタイムに計測し、組織-細胞間の相

相互作用解析に成功した²³⁾。このように、マルチカラーシフターゼアッセイは細胞、組織レベルで複数の遺伝子発現を明らかにできるユニークな方法として活用されている。

3. 生物発光プローブによるイメージング

光を用いた細胞機能解析は顕微鏡の機能の向上とGFPや量子ドットなどの蛍光プローブ群の開発により進展した。生物発光もまた、発光に特化した顕微鏡を用いることで細胞内の機能解析が十分可能である。蛍光と発光の違いは明確であり、蛍光は励起光が必要であるが、発光は化学反応であり、励起光を必要としない。蛍光では、励起によって強いシグナルを出すことから細胞内の局所における短い時間の可視化（イメージング）が可能である。一方、生物発光では生体内の光が届きにくい領域での変化をとらえることができるもののシグナルが弱く、光を積算する必要があるため、蓄積された画像をパラパラ漫画でみるよ

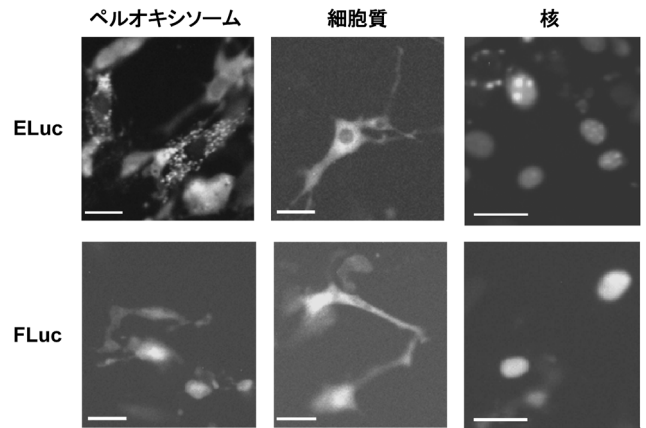


図7 ELucおよびホタルシフターゼ（FLuc）を用いた1細胞発光イメージング

各細胞小器官移行配列を融合したELuc（上段）あるいはFLuc（下段）の発現ベクターをマウス線維芽細胞NIH3T3に一過的に導入、1日後に発光イメージングに供した。200 μ M D-ルシフェリン存在下、40倍レンズを用い3分間の露光によりイメージング画像を取得した。スケールバーは100 μ mを示す。

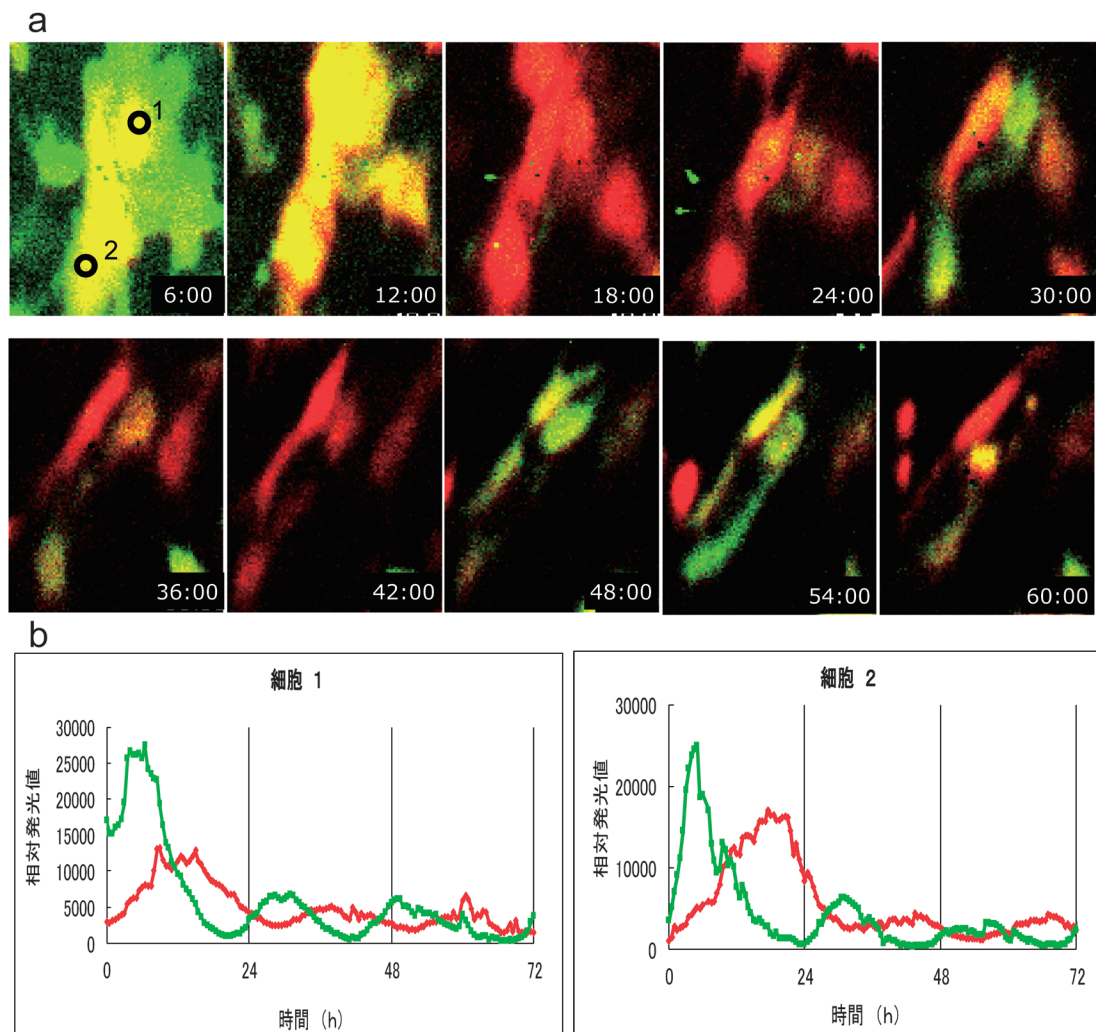


図8 2色発光による2遺伝子発現の1細胞イメージング

概日時計遺伝子*Per2*および*Bmal1*プロモータ制御下でSLRおよびELucが発現するデュアル発光NIH3T3細胞を72時間発光イメージングした(a)。1細胞2色発光細胞の解析にはアトー社製Cellgraph AB-3000bを使用した。細胞の局所の2色の発光量を定量することで時間軸の変化を追跡できる(b)。

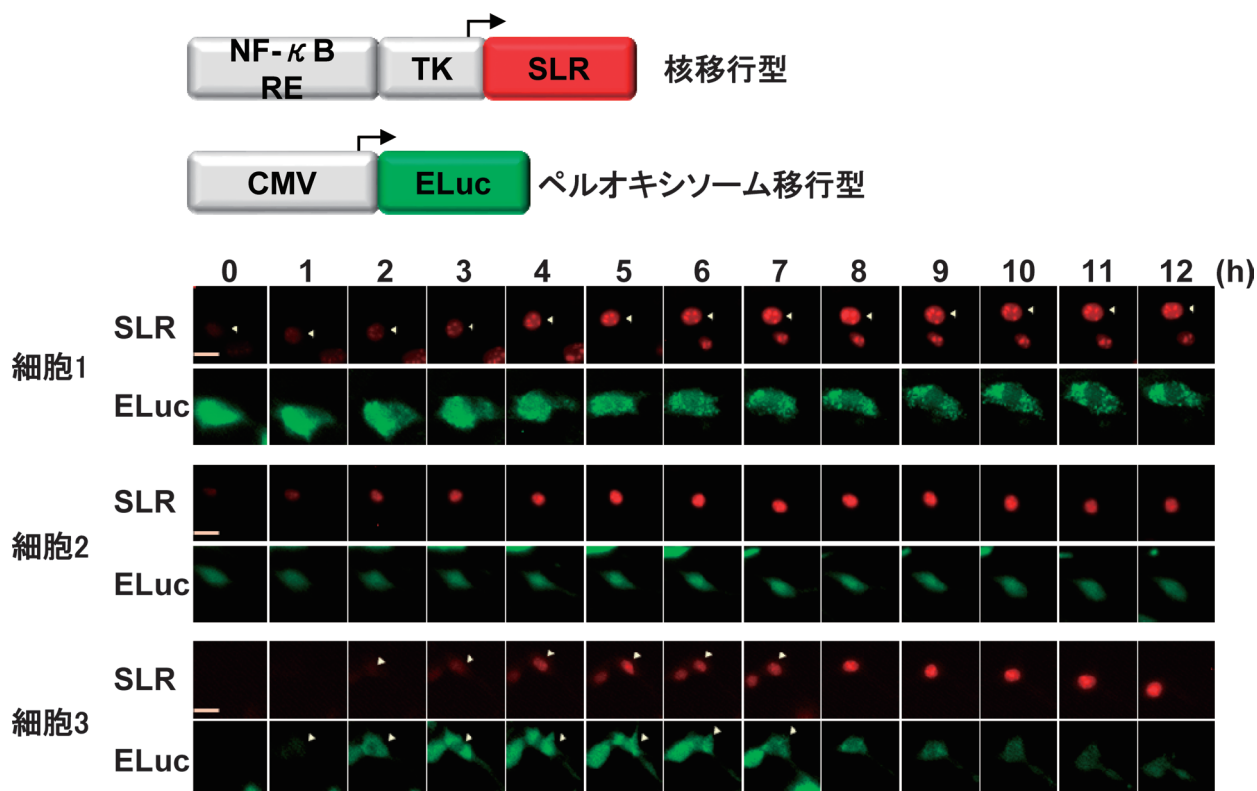


図9 細胞小器官レベルでの2色発光タイムラプスイメージング

核移行シグナルを融合したSLRおよびペルオキシソーム移行シグナルを融合したELucの発現ベクターをマウス線維芽細胞NIH3T3に一過的に導入し、1日後に10ng/mLのTNF α を処理した後、発光イメージングに供した。40倍レンズを用い3分間の露光を15分間隔で12時間行い、ELucの発光はBG39ショートパスフィルター、SLRの発光はR62ロングパスフィルターにより発光イメージング画像を取得した。図は代表的な三つの細胞における1時間ごとのイメージング画像を示す。

うなイメージとなる。ただし、励起光照射による細胞の損傷を考慮する必要がなく、数日以上にわたる長時間の観察が可能である。深さ方向の優位さの一例として、我々はホタルルシフェラーゼおよびGFPをそれぞれ定常的に発現するマウスを用い、それらをドナーとして骨髄移植を行った²⁴⁾。次に移植マウスの脳内にリポ多糖 (LPS) を加え損傷を起こし、骨髄細胞からの浸潤現象をイメージングした。ルシフェラーゼを用いた場合、損傷後、時間経過とともに修復が行われることを光量の変化で可視化することができたが、この変化は蛍光では観察できなかった。多くの研究においてルシフェラーゼを導入したがん細胞をマウス等に移植し、*in vivo* 発光イメージングによって薬剤効果などを検証する方法が一般的であるのは、まさにこの深さ方向の優位性による²⁵⁾。

さらに表2において溶液中で高い安定性と高い量子収率を持つことが示されたELucが細胞レベルでのイメージングでも有用であることを確認した²⁶⁾。前述したように、発光甲虫由来のルシフェラーゼのスペクトルは反応場のpHや温度に依存しない。ELucはホタル由来のルシフェラーゼに比べて約10倍以上の発光強度が得られ、露光時間を大幅に減らすとともに高い空間分解を示すことに成功した (図7)。また、細胞内の局在シグナルをつけてもシグナルが減ずることはなく、細胞小器官の観察も可能であ

る。これを用いれば容易に細胞の動的な変化を1週間程度連続的に可視化できる。また、1細胞レベルでの遺伝子発現も定量的に解析することが可能となる。

発光に特化した顕微鏡でも異なる発光色の光を色フィルターにより分離することでマルチカラーイメージングが可能である。我々は細胞集団レベルで観察した時計遺伝子Bmal1とPer2の動きを二つの発光色で解析する手法を1細胞観察に適用した。図8は発光細胞の画像(a)と1細胞ごと(b)に解析した例である。1個の細胞の中の二つの対象遺伝子の発現パターンを1週間程度観察することができた²⁷⁾。しかしながら、二つの発光色の強度レベルが近すぎたため、色分離が難しい時間帯が存在した。そこで、空間的にも分離することで、より詳細な1細胞2遺伝子変動の解析を行った。NF- κ B応答配列 (NF- κ B RE) の下流に核内に移行するSLR、内部標準としてCytomegalovirus (CMV) プロモータの下流にペルオキシソーム内に移行するELucを用いた。tumor necrosis factorによりNF- κ Bを活性化すると核内の赤色発光は増加するが、内部標準レポータであるペルオキシソーム内の緑色発光はほぼ一定であり、1細胞内の細胞小器官レベルで二つの遺伝子発現の変化を同時に可視化できた (図9)²⁸⁾。細胞小器官の違いでルシフェラーゼの寿命が異なり、遺伝子発現情報が異なるのか、ルシフェラーゼを入れ替えて検証したが違いはなく、

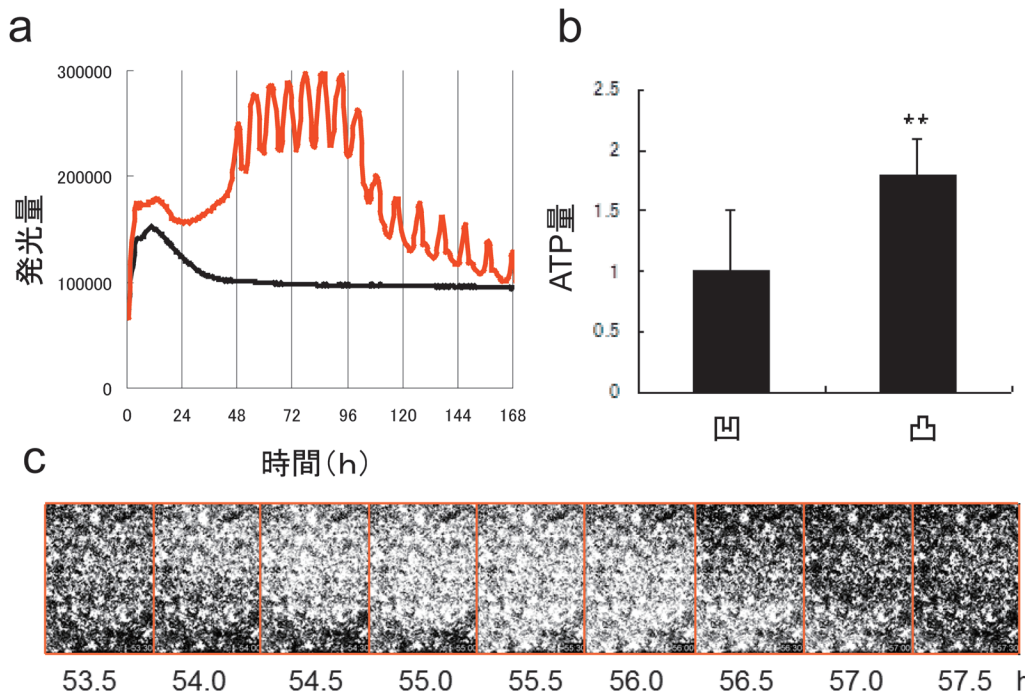


図10 発光甲虫ルシフェラーゼ導入ATDC5細胞におけるインスリン刺激後の発光活性, ATP量の変化, 細胞集団の発光イメージング
(a) アクチンプロモータで制御されたElucベクターを導入したATDC5細胞をインスリンで刺激(赤線)すると2,3日後に4時間周期の発光の変動が観察される。黒線はインスリン刺激なしの場合。(b) 4時間周期の発光が観察された際の凹および凸時のATP量。(c) アクチンプロモータで制御されたElucベクターを導入したATDC5細胞をインスリンで刺激後, 発光イメージング装置で可視化すると光のウェーブが観察される。

小器官の局在, 発光色の異なるルシフェラーゼで細胞情報の可視化が異なることはなかった。

生物発光を用いて細胞機能を解析する際に考慮すべき点は, 発する光の意味を十分に理解することである。たとえば発光甲虫の光で遺伝子発現の変化を可視化するにはルシフェリン, ATP, 酸素が化学反応を律速させないような十分量が必要である。たとえば, 酸素濃度が低下するがん細胞では, 発現の低下によるルシフェラーゼ量の減少ではなく, 酸素量の減少で発光強度が低下することがある²⁹⁾。我々が観測した例では, ATDC5細胞をインスリンで分化させる段階の遺伝子発現を可視化しようと試みたが, すべてのプロモータ配列のレポーターベクターで, インスリン添加2,3日後に4時間周期の発光振動が数日間みられた(図10a)。当初は遺伝子発現がみな同調すると考えたが, ATP量の変動に目を向けたところ, 急激な軟骨分化過程においてATPが4時間周期で変動, そのために発光が変化することが明らかになった(図10b)³⁰⁾。この際, 細胞間に光のウェーブが観察され(図10c), 軟骨分化過程において, 細胞間コミュニケーションが存在する可能性が示唆された。この場合はルシフェリン, ルシフェラーゼ, 酸素量は十分であるが, ATPが変化することによる発光強度の変化となる。ここでヒントを得て, 我々はセファロース表面にルシフェラーゼを結合させ, それをマウス皮下に注入し, 炎症に伴いデンジャーシグナルとしてATPが放出される過程の可視化に成功した³¹⁾。いずれにしても光シグナル

の変化が何に起因するか十分に考慮しながら生物発光を用いることが肝要である。

4. おわりに

発光甲虫ルシフェラーゼのシグナルが本当に対象とした遺伝子の発現を可視化しているのか, これは大きな問題である。たとえば, 転写過程が継続する場合と一過的に上がる場合, 発光プローブの寿命が長ければ, その違いを十分に反映することはできず, プロモータの特徴は十分に解析できない。そこで, 我々は発光甲虫ルシフェラーゼのタンパク質としての半減期を変える研究を続けている。その結果, 短寿命タンパク質として知られるカルパインの一部の配列をルシフェラーゼに付加させることで, 短時間の遺伝子発現の応答性にも対応できる半減期の短い発光プローブの構築に成功した(図11b)³²⁾。一方, 我々は発光甲虫プローブを導入した安定株の作製過程において発光強度や挙動の異なるもの, あるいは樹立したが細胞保存や継代を繰り返すことで, 当初のシグナルと異なる結果を示す細胞群が存在するを経験している。そこで, エピジェネティックの影響を受けにくい人工染色体ベクターに導入した発光甲虫プローブで細胞群を樹立した(図11a)³²⁾。その結果, 遺伝子発現のオン・オフが明確となり, かつ継代を繰り返しても安定したシグナル細胞群の構築に成功した。

一方, 我々は光測定の標準化が重要だと考えている。一

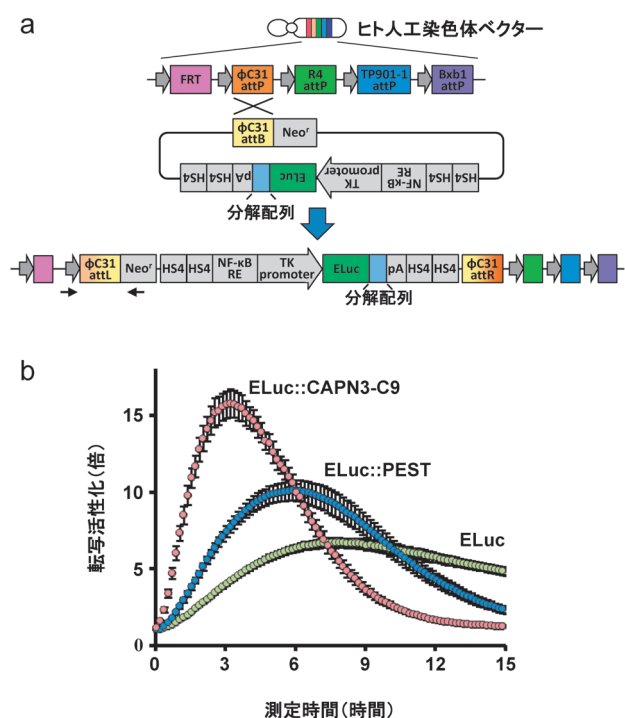


図11 ヒト人工染色体ベクター搭載細胞に細胞内安定性の異なるELucを挿入した安定細胞株を用いたリアルタイム発光測定 (a)野生型ELuc, PEST配列融合ELucあるいはカルパイン3部分配列 (CAPN3-C9) 融合ELucを搭載した発現ベクターをヒト人工染色体ベクター搭載マウス線維芽細胞A9に挿入し, 安定細胞株を樹立した. (b)各細胞を10ng/mLのTNF α で処理後, 15分間隔で15時間リアルタイム発光測定し, NF- κ B活性化のキネティクスを算出した.

定の発光量を生み出す細胞程度の大きさの点光源を開発できれば, 発光細胞用の顕微鏡の校正に使えるし, 発光細胞の発光量の絶対定量化, さらには細胞内で何分子のルシフェラーゼが動いているのか判断できるようになる. 本稿では光測定の絶対定量と生物発光によるセルベースアッセイ, イメージングを解説したが, これら技術が融合することで, 生命現象を絶対数で定量的にとらえることが可能になるであろう. 絶対定量生物学の世界が, そこにあるのかもしれない.

文 献

- Shimomura, O. (2006) Bioluminescence: Chemical Principles And Methods, World Scientific Pub Co Inc.
- Hastings, J.W. (2013) Bioluminescence: Living Lights, Lights for Living, Harvard University Press.
- 今井一洋, 近江谷克裕 (2006) バイオ・ケミルミネッセンスハンドブック, 丸善.
- Petushkov, V.N., Dubinnyi, M.A., Tsarkova, A.S., Rodionova, N.S., Baranov, M.S., Kublitski, V.S., Shimomura, O., & Yampolsky, I.V. (2014) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 5566–5568.
- Roda, A., Guardigli, M., Pasini, P., & Mirasoli, M. (2013) *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**, 826–833.
- Frank, L.A. & Krastiskaya, V.V. (2014) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **144**, 175–197.

- Roura, S., Gálvez-Montón, C., & Bayes-Genis, A. (2013) *J. Cell. Mol. Med.*, **17**, 693–703.
- Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., & Ohmiya, Y. (2004) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 565–570.
- Wu, C., Suzuki-Ogoh, C., & Ohmiya, Y. (2007) *Biotechniques*, **42**, 290–292.
- Ohmiya, Y. (2005) *Jpn. J. Appl. Phys.*, **44**(9A), 6368–6792.
- Seliger, M.H. & McElroy, W.D. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 136–141.
- Ando, Y., Niwa, K., Yamada, N., Irie, T., Enomoto, T., Kubota, H., Ohmiya, Y., & Akiyama, H. (2008) *Nat. Photonics*, **2**, 44–47.
- Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V.R., & Ohmiya, Y. (2010) *Photochem. Photobiol.*, **86**, 1046–1049.
- Niwa, K., Ichino, Y., & Ohmiya, Y. (2010) *Chem. Lett.*, **39**, 291–293.
- Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., Enomoto, T., Asakawa, T., Kubota, H., Ikeda, M., & Ohmiya, Y. (2005) *Biotechniques*, **38**, 891–894.
- Kitayama, Y., Kondo, T., Nakahira, Y., Nishimura, H., Ohmiya, Y., & Oyama, T. (2004) *Plant Cell Physiol.*, **45**, 109–113.
- Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y., & Honma, K. (2004) *FEBS Lett.*, **565**, 122–126.
- Branchini, B.R., Southworth, T.L., Khattak, N.F., Michelini, E., & Roda, A. (2005) *Anal. Biochem.*, **345**, 140–148.
- Ogura, R., Matsuo, N., Wako, N., Tanaka, T., Ono, S., & Hiratsuka, K. (2005) *Plant Biotechnol.*, **22**, 151–155.
- Davis, R.E., Zhang, Y.-Q., Southall, N., Staudt, L.M., Austin, C.P., Inglese, J., & Auld, D.S. (2007) *Assay Drug Dev. Technol.*, **5**, 85–103.
- Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., & Aiba, S. (2011) *Toxicol. Sci.*, **124**, 359–369.
- Noguchi, T., Michihata, T., Nakamura, W., Takumi, T., Shimizu, R., Yamamoto, M., Ikeda, M., Ohmiya, Y., & Nakajima, Y. (2010) *Biochemistry*, **49**, 8053–8061.
- Noguchi, T., Ikeda, M., Ohmiya, Y., & Nakajima, Y. (2012) *PLoS ONE*, **7**, e37093.
- Akimoto, H., Kwon, H.J., Ozaki, M., Yasuda, K., Honma, K., & Ohmiya, Y. (2009) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **380**, 844–849.
- Müller, J., Wunder, A., & Licha, K. (2013) *Recent Results Cancer Res.*, **187**, 221–246.
- Nakajima, Y., Yamazaki, T., Nishii, S., Noguchi, T., Hoshino, H., Niwa, K., Viviani, V.R., & Ohmiya, Y. (2010) *PLoS ONE*, **5**, e10011.
- Kwon, H.J., Enomoto, T., Shimogawara, M., Yasuda, K., Nakajima, Y., & Ohmiya, Y. (2010) *Biotechniques*, **48**, 460–462.
- Yasunaga, M., Nakajima, Y., & Ohmiya, Y. (2014) *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 5735–5742.
- Khalil, A.A., Jameson, M.J., Broaddus, W.C., Lin, P.S., Dever, S.M., Golding, S.E., Rosenberg, E., Valerie, K., & Chung, T.D. (2013) *Int. J. Mol. Imaging*, **2013**, 287697.
- Kwon, H.J., Ohmiya, Y., Honma, K.I., Honma, S., Nagai, T., Saito, K., & Yasuda, K. (2012) *Cell Death Dis.*, **3**, e278.
- Takahashi, T., Kimura, Y., Niwa, K., Ohmiya, Y., Fujimura, T., Yamasaki, K., & Aiba, S. (2013) *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 2407–2415.
- Yasunaga, M., Murotomi, K., Abe, H., Yamazaki, T., Nishii, S., Ohbayashi, T., Oshimura, M., Noguchi, T., Ohmiya, Y., & Nakajima, Y. (2015) *J. Biotechnol.*, **94**, 115–123.

著者寸描

●丹羽 一樹（にわ かずき）



国立研究開発法人産業技術総合研究所物理計測標準研究部門光放射標準研究グループ主任研究員、博士（工学）。

■略歴 1973年京都府に生る。97年慶応義塾大学理工学部卒業，99年同大学院理工学研究科修了，2006年静岡大学大学院電子科学科修了。同年独立行政法人産業技術総合研究所入所，13年より現職。

■研究テーマと抱負 光放射国家計量標

準に基づくインコヒーレント光の高精度分光計測技術により，生物発光反応の分子機構の解明に向けた基礎研究から，発光計測の標準化による応用産業への貢献を目指した活動を行っている。

■ウェブサイト <https://unit.aist.go.jp/ripm/photoradio/index.htm>

■趣味 囲碁，ラグビー観戦。

●中島 芳浩（なかじま よしひろ）



国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門細胞光シグナル研究グループ研究グループ長、博士（学術）。

■略歴 1968年東京都に生る。96年埼玉大学大学院理工学研究科博士課程修了，同年理化学研究所基礎特別科学研究員，97年日本学術振興会未来開拓事業研究員（奈良先端科学技術大学院大学），2001年産業技術総合研究所入所，11年より現

職。

■研究テーマと抱負 複数種の発光レポーターを活用したセルベースアッセイ系を構築し，薬効，毒性，機能性評価などに展開している。近年はリアルタイム発光計測による細胞内ネットワークのダイナミズム解析に挑戦している。

■ウェブサイト https://unit.aist.go.jp/hri/group/2015_ci-4/

■趣味 釣り，ゴルフ，飲酒。