

## バイオ発光デバイスの可能性

近江谷 克裕

### Potential of Luminescent Cells as a Device

Yoshihiro OHMIYA

In the post genome era, molecular imaging is an essential approach to understanding the physiological system of the whole animal. The fact that bioluminescent probes based on luciferase technology utilize both natural and quantitative light energy in comparison with fluorescent probes such as GFP has resulted in their ability to visualize the molecular diversity of genes and proteins in living cells. We have created luminescent cells based on the luciferase technologies for visualizing of cell functions. Using beetle luciferases that emit various colors with one luciferin, we developed a revolutionary tricolor luminescent cell device in which three gene expressions are monitored simultaneously using green-, orange- and red-emitting beetle luciferases. Also, using a secreted ostracod luciferase that emits various colors with various luciferin analogues, we have developed real-time monitoring for a pharmacological or toxicological device that is based on targeted promoter activity.

**Key words:** bioluminescence, cell device, luciferase, luciferin, visualization

遺伝子 DNA はヌクレオチド、つまりアデニン、チミン、シトシン、そしてグアニン塩基の 4 種の文字で書き込まれた巨大な生命の百科事典であり、生命を紡ぐ糸である。これはすべての生命で共通であり、細胞内における DNA → RNA → タンパクへと変換される遺伝子情報の流れも共通である。例えば、ヒトの遺伝子 DNA は約 3100 メガ塩基から成り立ち、その中には約 2 万数千種のタンパク情報がコード化され、さらに、それらタンパクがいつ、どこで、どの程度つくられるかなどの、生体の維持制御の基本データもあわせて書き込まれている。この生命の糸は細胞 1 個ごとに収められている。一方、すべての生物で遺伝子情報とその流れが共通であることから、例えば植物のタンパクをコードした遺伝子情報は哺乳類の細胞の中でも有効に働き、植物タンパクをつくることのできる。また、DNA → RNA → タンパクの流れを制御する情報も、DNA の中に含まれている。これは転写調節配列とよばれているもので、タンパクの遺伝子情報と同じく

DNA 上に 4 つの文字で書かれている。現代生命科学の主要な仕事のひとつは、DNA 上にある 4 つの文字配列の情報を解読することであり、どこにタンパクへと変換される情報があり、どの配列が、それを調節しているかを決定することが重要である。遺伝子転写調節とは他分野の方にはわかりにくいかもしれないが、例えば、環境ホルモンによって、メス化するという現象がある。これは DNA 中に含まれる女性らしさをつくるタンパク遺伝子情報を調節・制御する配列に、ダイオキシンなどの環境ホルモンが核レセプターを介して結合したため、女性らしさをつくるタンパク群が活発に合成されたことに起因する。この遺伝子情報が調節・制御されるということは、細胞に加えられた外的因子は何らかの形でセンシングされ、DNA 中の転写調節が変化、タンパクの生産量が変化するのである。つまり、細胞はスイッチ、センサーや制御回路などが組み込まれ、かつ栄養代謝というエネルギー部をもつ自立型デバイスである。よって、細胞内のセンシングシステムを利用すれば

細胞は外的因子を検出するセンサーに、あるいは細胞内の自前の情報発信系、例えば体内時計を利用すれば細胞は時刻を発信する自立情報発信デバイスとして活用できる。では、センシングした情報をいかに発信するか。筆者らは、ホタルなどの生物発光のシステムを利用して、細胞でセンシングされた情報などを光で発信するバイオ発光デバイスを構築した。つまり、遺伝子情報の調節・制御された出力を生物発光システムによって発信するのである。

### 1. 生物発光システムの多様性

身近な発光生物といえばホタルであるが、バクテリアから脊椎動物である魚類まで、発光キノコ、夜光虫（正式には発光性渦鞭毛藻あるいは渦鞭毛虫）、甲殻類ウミボタルなど多種多様に存在する。発光生物の生み出す光が生物発光（バイオルミネセンス：bioluminescence）である<sup>1,2)</sup>。発光の生物学的な意義は十分に科学的に解明されていないが、発光を触媒する酵素が生まれた発端は、酸素分子のスカベンジャー機能という考えが定着しつつある<sup>3)</sup>。これは、生物に必須の酸素分子でも、反応性の高い活性酸素は生体内でよけいな化学反応を起こす可能性があり、この活性酸素を効率よく除去するシステムとして生物発光が生まれたという考え方である。つまり、危険な酸素分子を可視光（いわゆる冷光）に変換することで生物を守るのである。この際、もし紫外光ができてしまえば、生体内の遺伝子に傷をつけることになるので、可視光というのは生物が生み出した賢い選択でもある。では、光らない生物が多く存在するのは、どうしてであろうか。これは、活性酸素を処理する方法が何通りも存在するため、光るシステムを維持、あるいは選択しなかったためではないかと考えられている。よって、光る生物の祖先は偶然にこのシステムを獲得したのかもしれない。生物発光は、発光基質（ルシフェリン：luciferin）の酸化を発光酵素（ルシフェラーゼ：luciferase）が触媒する酵素反応である<sup>4)</sup>。簡単に定義すれば、ルシフェラーゼとは、生物発光において生体内で光を生み出す化学反応であるルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を示す発光酵素の総称であり、ルシフェリンとは、生物発光において生体内で光を生み出す化学反応であるルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を示す発光基質の総称である。つまり、発光生物より冷水抽出されるタンパクのうち、ルシフェリンと反応して光を生み出す酵素がルシフェラーゼで、ルシフェラーゼの一次構造は発光生物種によって大きく異なる。逆に、発光生物より有機溶媒あるいは熱水抽出される有機化合物のうち、ルシフェラーゼと反応して光を生み出す化合物がルシフェリンで、ルシフェリンの

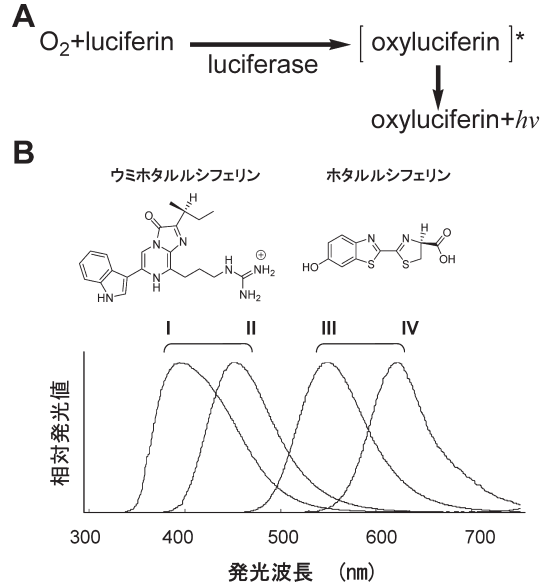


図1 (A) ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応の化学式。(B) ホタル、ウミホタルルシフェリンの化学構造とルシフェリン・ルシフェラーゼ反応によって得られる発光スペクトル。

構造は発光生物種によって異なる。しかしながら、ユニークなことに発光クラゲ、ウミシイタケ、発光エビなど種を越えて同じ場合もある。これは低分子のルシフェリンが代謝過程でつくられたことに起因するかもしれないが、十分に解明されていない。

生物発光は、基本的には物質の化学変化によって光が放出される化学発光と、反応機構としては大きな違いはない。つまり、化学発光では、物質の化学変化により生まれた  $S_1$  状態の励起分子  $[\text{oxyluciferin}]^*$  から蛍光が放出される (図1A)<sup>5)</sup>。この化学発光反応の大部分は酸化反応であり、反応性の高い酸素分子は基質の酸化反応によってスカベンジされ、その一方、基質はエネルギーレベルの高い不安定な過酸化物となり、この分解に伴って基底状態に戻るとき、きわめて高いエネルギーを放出する。化学発光では、例えば代表的な発光物質ルミノールの量子収率は約1.2%程度<sup>6)</sup>であるが、ウミホタルの生物発光では約28%<sup>7)</sup>の量子収率となっている。つまり、生物発光では、ルシフェラーゼというタンパクが化学エネルギーから光エネルギーへの変換を効率よく触媒する。この際、発光色はおもに励起されたルシフェリンのエネルギー状態に依存する。発光スペクトルはシャープなものでなく、半値幅も50 nm以上になり、ブロードではあるが青色から赤色まで存在する。図1Bは、ウミホタルおよびホタルルシフェリンの構造と、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応から生み出された発光のスペクトルである。ウミホタルルシフェリンは、ウミシイタケルシフェリン (別名セレンテラジン) と共通

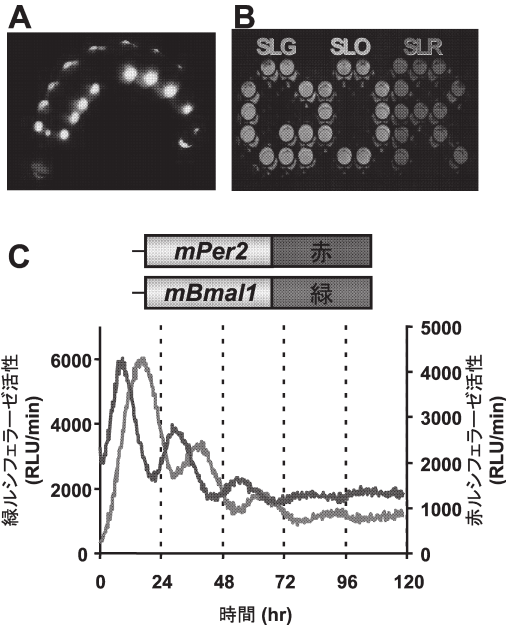


図2 (A) 南米産鉄道虫。(B) ルシフェリンと鉄道虫およびイリオモテボタル由来の赤、橙、緑色ルシフェラーゼの反応を96穴プレート上でを行い、その発光を撮影。(C) 赤、緑色ルシフェラーゼを導入したバイオ発光デバイス (Rat-1細胞由来) の発光日内変動 (*Per2* プロモーター制御赤色ルシフェラーゼおよび *Bmal1* プロモーター制御緑色ルシフェラーゼ), RLUは relative light unit 相対発光値の略。(巻頭カラー口絵参照)

のイミダゾピラジノン骨格を有し、共に青色の発光色である (図1 B-II: 最大発光波長はおよそ 460 nm)。この発光色は、ルシフェリンやルシフェラーゼの構造を変えることで制御することができる。最近、筆者らはルシフェリンの構造を変えることで、最大発光波長 390 nm (図1 B-I) の光を生み出すことに成功した<sup>8)</sup>。これは、これまで報告された生物発光の中では最も短波長の光であり、新しい光源としての応用展開が期待できる。一方、ホタルの生物発光は同一のルシフェリンであるにもかかわらず、緑色から赤色 (図1 B-III, B-IV: 最大発光波長 530~630 nm の範囲) の光を生み出すことができる<sup>9)</sup>。発光色が決定されるメカニズムは明確ではないが、ルシフェラーゼ構造が発光色を決定していることだけは確かである。つまり、発光色を決定するオキシルシフェリンの励起状態を、触媒であるルシフェラーゼが制御するのである。現在、筆者らは、ルシフェリンやルシフェラーゼの構造をうまく取り扱うことで、最大発光波長 390~640 nm の光を自在に扱うことができる段階にいる。特に、ウミホタル、ホタルの生物発光を利用したバイオ発光デバイスの構築を試みており、以下にこれまでの成果を紹介する。

## 2. 甲虫三色ルシフェラーゼを用いたバイオ発光デバイス

ホタルを含めた甲虫からクローン化 (遺伝子を特定、物質として取り扱うことができること) されたルシフェラーゼには、測定溶液の pH に連動して色を変えるものと、変えないものがある<sup>2)</sup>。前者はホタル科のルシフェラーゼ群であり、測定溶液の pH が 8 → 6 に変化すると、発光強度が減少しながら赤色の発光になる。後者はヒカリコメツキムシ科等のルシフェラーゼ群であり、測定溶液の pH が変化してもその発光色は変化せず、発光強度が減少する。後者のひとつである鉄道虫 (図2 A) から、筆者らは緑色、赤色発光ルシフェラーゼをクローン化することに成功した。筆者らを含めた多くのグループがこれまで多くのルシフェラーゼをクローン化、さらにはルシフェラーゼ結晶構造解析を行ってきたが、発光色の変化する分子メカニズムは十分に解明されていない。甲虫由来ルシフェラーゼ群のタンパクや遺伝子は、それぞれ市販されている。また、ルシフェリンも市販されている。筆者らがクローン化した鉄道虫由来の赤色ルシフェラーゼも、東洋紡より Tripluc シリーズとしてレポーターアッセイシステムとして市販されている。本来、レポーターアッセイでは解析したい転写調節領域 (プロモーター、エンハンサー、サイレンサーなど) をルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したベクター (遺伝子の運搬体) を用いる。Tripluc シリーズは、世界ではじめて細胞内の3つの対象遺伝子の転写活性を測定するシステムである。図2 Bは、Tripluc シリーズにある鉄道虫およびイリオモテボタル由来の多色ルシフェラーゼ遺伝子を動物細胞上で発現・回収した溶液に、ホタルルシフェリンを加えた場合の発光を撮影したものである。緑、橙、赤色の光を生み出すルシフェラーゼ群であることが一目瞭然である。レポーターアッセイでは、フィルターを用いたルミノメーター (光量測定装置) により、色分割し個々の発光量を決定、同時に3つの遺伝子転写活性を測定している<sup>10)</sup>。色分割の方法や *in vitro* アッセイについては、中島らの総説を参考にさせていただきたい<sup>11)</sup>。

哺乳類細胞では、*Per*, *Bmal*, *Clock* などとよばれる複数の時計遺伝子発現とそのタンパク産物によるフィードバックループが、あたかも歯車の回転によって時計が時を刻むように、正確な体内時計を刻んでいる<sup>12)</sup>。代表的な時計遺伝子である *Per*, *Bmal* などは 24 時間周期で、そのタンパク量の増減を繰り返しているが、前述したように、タンパクの発現量を調節するのが遺伝子転写調節配列である。よって、体内時計遺伝子の転写調節配列にルシフェラーゼ遺伝子をつなげたベクターを細胞内に導入すれば、細

胞内のルシフェラーゼのタンパク量は24時間周期で変動、発光量もまた24時間周期で変動する。図2Cは、*Per2* プロモーター配列を赤色ルシフェラーゼ上流に、また *Bmal1* プロモーター領域を緑色ルシフェラーゼ上流に挿入したものを動物細胞 Rat-1 細胞に一過的に導入し、細胞をデキサメタゾン処理した後、2つの転写活性を120時間にわたり、アトー社製クロノスにより測定した例である<sup>13)</sup>。24時間周期で転写活性が変化し、*Per2*、*Bmal1* 間に約12時間の位相のずれがあることがわかる。細胞をデキサメタゾンという薬剤で処理するが、これは個々の細胞が発している時計リズムをリセットし、多数の細胞の働きを同調させる効果であると考えられている。いずれにしても、赤色と緑色ルシフェラーゼの光で細胞内に備わっている時間軸の情報を発信できる。これは Rat-1 細胞に限ったことではなく、この2色ルシフェラーゼシステムを導入したマウス（トランスジェニック生物）などでも同様に、体内時計の情報を発信、24時間周期で発光を繰り返すマウスを作製することができる。では、細胞1個でも発光を検出できるのだろうか。最近、筆者らは、アトー社と細胞レベルの発光に特化した発光計測顕微鏡を製作した（セルグラフとして市販されている）。図3は、NIH3T3細胞1個の *Bmal1* プロモーターの動きをモニターしたものである。多くの細胞が発光しているが、1個の細胞に目を向けてみると、1個の細胞レベルで24時間周期の光の増減が観察できる（図3下図）<sup>13)</sup>。つまり、10数 $\mu\text{m}$ サイズの時計を構築したことになる。まだまだ、何に役立つかは不明であるが、微小空間で活用できる、生体分子だけで構築された時計は、新しい可能性を秘めているのではないだろうか。

### 3. 分泌ルシフェラーゼを用いた細胞発光デバイス

細胞では、細胞内で作られたタンパクを分解するペロキシゾームという細胞内小器官があり、ホタルルシフェラーゼは細胞内でいったんとどまるものの、数時間レベルで分解される。これに対して、分泌シグナル配列（細胞外にタンパクを分泌させるためのアミノ酸配列を指す）があるものは、細胞内にとどまることなく細胞外に放出される。ルシフェラーゼは多種多様であるとはじめに記したが、ルシフェラーゼの中にも細胞外に分泌されるものがある。その代表がウミホタルルシフェラーゼである。ウミホタルは日本沿岸に棲息する発光生物のひとつで、敵に襲われたときにルシフェリン・ルシフェラーゼを海中に放出し、光の煙幕でその姿を隠すという。また、光を吐き出しながら求愛ダンスをするともいわれている。ウミホタルの生物発光は、イミダゾピラジノン骨格のルシフェリンが分

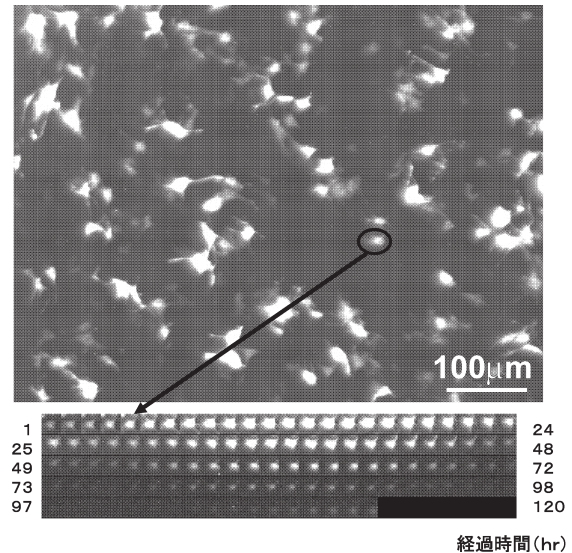


図3 *Bmal1* プロモーター制御緑色ルシフェラーゼを導入したバイオ発光デバイス (NIH3T3細胞由来) の発光および1個の細胞における発光の日内変動。

泌シグナルをもつルシフェラーゼによって酸化触媒され光を発する<sup>1)</sup>。前述したように、ルシフェリンの構造を変えることで、発光色を最大発光波長で390~510 nmまで変化させることが可能である<sup>8)</sup>。

これまでに、ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子をCHO (チャイニーズハムスター卵巣がん) 細胞に導入し、培養液中に発光基質を加えることで、ひとつの細胞上の数点からタンパクが分泌される様子をリアルタイムにルシフェラーゼの光によって画像上で観察できた<sup>14)</sup>。この際、細胞内の移送経路を遮断する試薬を培養液に加えると、瞬時に発光が消失、試薬が細胞に与える影響を評価することが可能である。一方、GH3 (成長ホルモン産生) 細胞では、成長ホルモンの合成される量が経時的に変化する様子を連続的にモニターできた<sup>15)</sup>。ここでも、成長ホルモンの合成に及ぼす試薬の影響を評価可能である。さらに、ウミホタルルシフェラーゼがBRET (生物発光共鳴エネルギー移動) として機能し、蛍光タンパクのドナールシフェラーゼとなり、本ルシフェラーゼから発した光はアクセプターである蛍光タンパクを励起できることを発見した。つまり、ウミホタルルシフェラーゼから発した青色光エネルギーは、蛍光タンパク、この場合、黄色蛍光タンパクへとエネルギー移動し、黄色光を生み出すことができる。このウミホタルルシフェラーゼおよび黄色蛍光タンパクを1分子内に融合させたBRETプローブの中に、活性ペプチドが切り出されるアミノ酸配列を挿入、このアミノ酸配列が切断されることによってエネルギー移動が変化することを利用して、アミノ酸配列の切断を定量することができる<sup>16)</sup>。このよう

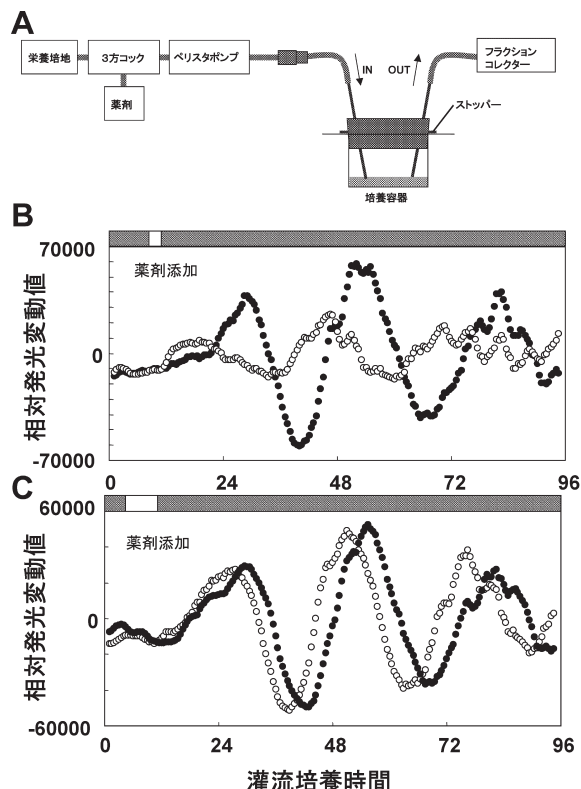


図4 ウミホタルルシフェラーゼを導入したバイオ発光デバイス (Rat-1細胞由来) による薬剤の評価。(A) 灌流型培養装置の概略図。(B) デキサメタゾン処理による日内変動の変化 (● 2時間灌流処理, ○ 処理なし)。(C) 処理による日内変動の変化 (● デキサメタゾン4時間灌流処理, ○ デキサメタゾン+SP1600125 試薬4時間灌流処理)。

に分泌するルシフェラーゼは、細胞内の特定遺伝子の発現や、ルシフェラーゼ融合体の発光の変化を細胞外で観察できるという際立った特徴をもっている。よって、ウミホタルルシフェラーゼシステムを導入した発光細胞を灌流装置上に設置すれば、日オーダーの長時間にわたって、例えば薬剤等の影響を評価できるバイオ発光デバイスが構築できる<sup>17)</sup>。図4Aは、基本となる灌流培養の概略図である。灌流培養装置には、細胞を維持する栄養培地と薬品等の2つの導入部があり、適宜、切り替えが可能である。発光細胞の固定法などには改良の余地もあるが、チャンバー中の細胞を3~4日間にわたり活性化状態で維持可能である。モデル実験として、*Bmal1* プロモーターの下流にウミホタルルシフェラーゼを挿入したベクターをつくり、Rat-1細胞に導入、*Bmal1* プロモーターによりウミホタルルシフェラーゼが発現、細胞培地中に分泌できる安定形質変換体を作製した。本細胞を灌流培養装置のチャンバーにセットすれば、数日間にわたり24時間周期の遺伝子発現の変動をモニターできるバイオ発光デバイスとなる (図4Bの●)。前述したように、時計遺伝はデキサメタゾンという薬剤で

処理することにより同調し、24時間周期のリズムを発信する。図4Bは、灌流開始後、2時間程度デキサメタゾン処理 (●)、無処理 (○) の場合の、培地中の発光を測定した例である。処理後8時間程度経過した後、24時間の発光の周期性が開始される。図4Cは、灌流開始後、4時間程度デキサメタゾン処理 (●) あるいはデキサメタゾン+SP1600125 試薬 (JNK 抑制薬剤; 細胞の増殖・分化シグナル伝達経路の一種を抑制する薬剤) で処理 (○) した場合の培地中の発光を測定した例である。SP1600125 試薬を添加することで、発光変動の周期性が明らかにシフトすることがわかる。また、初期データであることから、どのようなメカニズムで周期性が変動したかは不明であるが、本バイオ発光デバイスにより任意のタイミングに、任意の濃度で処理しながら、細胞内の変化をモニターすることができることが明らかである。最近、リズム創薬が重要であるといわれている。つまり、ある疾患に対して薬を投与する場合、1日のどのタイミングで投与すれば最も有効であるのか、それは体内時計のリズムに依存するという考えである。つまり、リズム創薬とは、体内時計を理解したうえで、適切なタイミングで投与することを前提に有効性の高い薬を探すという手法である。筆者らがつくり出したウミホタルルシフェラーゼを導入した細胞は、灌流装置と組み合わせることによって、長時間にわたり、細胞にとって最も穏やかな条件が再現でき、細胞内の応答性を利用して薬剤や化学物質の影響をセンシングできる、ユニークなバイオ発光デバイスである。

細胞は1個の完成したシステムであり、エネルギーの維持機能、情報センシング機能および情報伝達・発信機能を持ち合わせた理想的なデバイスである。一方、生物発光は生物が生み出した多種多彩、エネルギー効率の高い、かつナノレベルで取り扱うことのできる生体分子で構築する光源である。2つの技術を融合化したバイオ発光デバイスの可能性を広げる研究は、ますます重要になるであろう。

## 文 献

- 1) 今井一洋, 近江谷克裕編: バイオ・ケミルミネセンスハンドブック (丸善, 2006)。
- 2) 近江谷克裕: “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—”, 生化学, **76** (2004) 5-15。
- 3) J. F. Rees, B. de Wergifosse, O. Noiset, M. Dubuisson, B. Janssens and E. M. Thompson: “The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools,” J. Exp. Biol., **201** (1998) 1211-1221。
- 4) N. Harvey: *Bioluminescence* (Academic Press Inc., New York, 1952)。

- 5) 丹羽治樹：“発光反応”，遺伝, **50** (1996) 35-41.
- 6) J. Lee and H. H. Seliger: “Absolute spectral sensitivity of phototubes and the application to the measurement of the absolute quantum yields of chemiluminescence and bioluminescence,” *Photochem. Photobiol.*, **77** (1965) 1015-1048.
- 7) F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds and J. R. Waters: “Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*,” *J. Cell Comp. Physiol.*, **59** (1962) 265-272.
- 8) 近江谷克裕, 呉 純：特願 2006-130203.
- 9) V. R. Viviani, E. J. Bechara and Y. Ohmiya: “Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: Relationship between bioluminescence spectra and primary structures,” *Biochemistry*, **38** (1999) 8271-8279.
- 10) Y. Nakajima, T. Kimura, K. Sugata, T. Enomoto, T. Asakawa, H. Kubota, M. Ikeda and Y. Ohmiya: “A multicolor luciferase assay system, one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate,” *Biotechniques*, **38** (2005) 891-894.
- 11) 中島芳浩, 菅田和法, 近江谷克裕：“3色発光ルシフェラーゼを用いた転写活性同時測定法”, *バイオテクノロジージャーナル*, **7-8** (2005) 453-455.
- 12) 内匠 透：“分子時計の概日転写制御機構”, *生化学*, **78** (2006) 425-429.
- 13) 中島芳浩, 近江谷克裕：“遺伝子発現リアルタイム解析への発光イメージングの応用”, *バイオテクノロジージャーナル*, **3-4** (2006) 230-232.
- 14) S. Inouye, Y. Ohmiya, Y. Toya and F. I. Tsuji: “Imaging of luciferase secretion from transformed Chinese hamster ovary cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** (1992) 9584-9587.
- 15) Y. Tanahashi, Y. Ohmiya, S. Honma, Y. Katsuno, H. Ohta, H. Nakamura and K. Honma: “Continuous measurement of targeted promoter activity by a secreted bioluminescence reporter, *Vargula hilgendorfi* luciferase,” *Anal. Biochem.*, **289** (2001) 260-266.
- 16) T. Otsuji, E. Okuda-Ashitaka, S. Kojima, H. Akiyama, S. Ito and Y. Ohmiya: “Monitoring for dynamic biological processing by intra-molecular bioluminescence resonance energy transfer system using secreted luciferase,” *Anal. Biochem.*, **329** (2004) 230-237.
- 17) K. Yamagishi, T. Enomoto and Y. Ohmiya: “Perfusion-culture-based secreted bioluminescence reporter assay in living cells,” *Anal. Biochem.*, **354** (2006) 15-21.

(2006年6月9日受理)