

発光生物に学ぶ人工発光系の創製

牧 昌次郎

Innovation of Emission System by Modeling Firefly Bioluminescence

Shojiro MAKI

Firefly bioluminescence system has suggested in long time ago, though the detail of emission including molecular mechanism is still not clear. Although firefly bioluminescence system is practical used for many detection systems, natural firefly bioluminescence system makes only yellow-green light ($\lambda_{\max}=560$ nm). A method of change color by luciferase mutant is investigated in long-time, especially biochemistry field. At length, orange and yellow luminescence ($\lambda_{\max}=630, 580$ nm) are produced by luciferase mutants and a kit applying these mutants is available recently. However the span of the color is still only ca. 70 nm by gene recombination. Now, detector and analyzer technology is making steady progress so that color variation is strongly required for dual monitoring, deep inside imaging, etc. We have tried to make high end emission materials by approaching from synthesis of artificial luciferin (*i.e.* luciferin analogues).

Key words: bioluminescence, modeling, bio imaging, multicolor probe, biomimetics

生命体が最初に造り出した光，それはおそらく「生物発光」^{1,2)}であろう。

やがて人類は火を使い，そして電気を発見した。しかしその「光」は熱から発せられた光であり，むしろ副産物的なものであろう。しかし生命体で作った光である生物発光は，有機物質と酵素による化学反応でありながら，発熱を伴わないことが特徴である。人類は，発熱を伴わない発光技術（光産生技術）を手にしたのだろうか，と考えるみると，なかなか難しい。その理由は効率にある。使用するエネルギーが効率よく光に変換されれば，熱は発生しない。一方で，与えたエネルギーがうまく光に変換されなければ，多くは熱になって放出される。ホタルはあのように小さな個体であるから，光産生の効率が悪ければ，激しい蓄熱にさらされるはずである。発熱のため，生命の危機にすら直面するであろう。しかし，ホタルは発光効率の高さでこれを切り抜け，見事に生体内で発光することに成功している。

現在，われわれにとって光といえば，通常は「電気発光」を意味するといっても過言ではないだろう。人類が電

気を操れるようになる前，光（明かり）といえば，やはり火を意味していた。さらに人類よりはるか前，地球上に生命が誕生するよりもはるか前の光は，自然現象で生じる放電や燃焼等を除けば，太陽や月，星くらいであっただろう。これらも元は熱を伴う光である。

現在とは全く違う状況だったと考えられる原始地球で誕生した生命は，いつしか自らの生命活動の一環として「光」を造るようになった。「なぜ生物が発光するのか」という理由は諸説あり，いまだ決定的な説明はなされていないが，ひとつの見解を紹介する。

太古の地球の大気は現在の組成とは大きく異なっていたと考えられ，その環境に適応して誕生した古代の生命にとって，酸素は“毒”であった。すなわち生物は，「生体内酸素除去システム」を構築する必要があったと推測される。そこで生体内物質と酸素を反応させることで酸素を消費（無害化）し，体外へ放出したのではないかとする説がある。そのシステムのひとつに生物発光があり，生物は排出物である「光」も無駄にせず，何らかの生命活動（情報伝達や集合信号など）に役立たせているとの解釈であ

る^{3,4)}。確かに、これまでに知られている生物発光は酸素要求型、すなわち発光に酸素を使い、二酸化炭素を出す機構が主流であるが、“ひとつの説”の域を超えてはいない。

一方、生態的には、“音を発する、光る”などは天敵に自らの所在を知らせる危険な行為でもある。メスのセミが鳴かないことはよく知られている。メスも光るホタルはその危険をもいとわない理由があることは、「なぜ光るのか」を考える上で考慮すべきことであろう。生体機能は単一思考では計り知れない。「あちらがたてばこちらがたたず」的な思考ではなく、総合的な思考が必要と思われる。

このように、ホタル生物発光系は現在地上で最も発光効率が高いとされ⁵⁾、医療・衛生関連分野を中心として、世界中でごく日常的に利用されている⁴⁾。医療用の検査診断薬や研究用では遺伝子発現の可視化に、食品や水質の衛生検査関連としては雑菌計測のセンサーとして応用されている。これはホタルの光が字のごとく「蛍光」(ケイコウ)であり、計測機器では感度高く測定できることが大きな理由となっている。また、ホタルの光は「冷光」ともいわれている。先述通り人類が使用する光は電灯が中心であり、光のほかに熱を出している。特に電球は「白熱灯」ともいわれ、光とともに多くの熱を出しており、点灯中の電球は手をかざしただけでも熱を感じる。しかしホタルを両手で囲っても、暖かさすら感じられない。これは単に「量の違い」だけではない。ホタルは産生したエネルギーを「熱」としてロスすることなく、効率よく光(蛍光)に変えているためと考えられる。人類はこれほどまでに洗練されたエネルギー変換技術をいまだに手にしてはいないのではないかと思う。

日本でホタルといえば、圧倒的に「ゲンジボタル」と「ヘイケボタル」が馴染み深い。しかし両者とも成虫になると餌を摂取しなくなり、1週間ほどでその寿命を終える。つまり、遊飛しながら放つホタルの光は“命の光”であり、この儚い光に趣きを覚える心境が、日本人特有のホタルの魅力をさらに強くしているのであろう。科学的な思考では、成虫になるとエネルギーの外部摂取がなくなることの意味する。すなわち、光れば光るほど身を切ることになるのである。発光効率はまさに死活問題なのである。

1. 発光反応経路

現在提唱されているホタル生物発光の反応経路^{6,7)}を図1に示す。発光基質(有機化合物)であるルシフェリン(1)と発光酵素のルシフェラーゼがATP(アデノシン三リン酸)とマグネシウムイオン存在下で反応し、AMP化体である化合物2(LH₂-AMP)となる。AMP化体はさらに酵

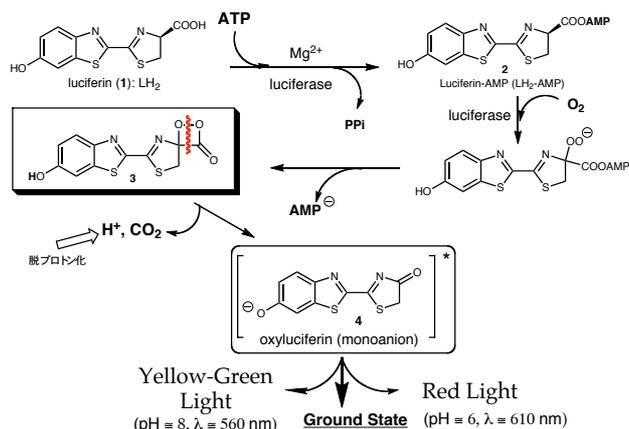


図1 ホタル生物発光の反応経路。

素内で酸素と反応し、高エネルギー中間体の化合物3(ジオキセタノン中間体)となる。この4員環(ジオキセタノン部位)が開裂して分子が脱プロトン化し(化合物3から4に変化する際、-OHがH⁺を放出して-O⁻へと変化する)、さらに高エネルギーな遷移状態を経て励起状態のオキシルシフェリン4となり、これが基底状態へと失活する際に蛍光を発する。これが「ホタル生物発光」である。この基質-酵素反応は、「ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応」(LL反応)とよばれる。また、北米産のホタル発光酵素を使用した場合、発光色が周囲の酸性度(pH)により黄緑と赤橙とに変化すること⁸⁻¹¹⁾は既知であるが、その酵素内における分子機構の詳細は、単純な分子構造の変化やイオンの状態だけでは説明できない。最新の科学技術を駆使した、基質と酵素の相互作用にかかわるさらに詳細な解析が必要であろう。また、有機物質である発光基質がどのように生体内で合成されるのかについても、詳細は不明である。

さて、前述のとおりホタル生物発光系は実用・利用されており、「まだ“開発”する必要があるのか」とのご指摘をよくいただく。

筆者は、ホタル生物発光系の実用的課題を、大きく以下の4点と考えている。

- ① 輝度の向上(感度の向上)
- ② 多彩な発光色(発光色改変技術)
- ③ 多様な用途への適用(材料化技術)
- ④ 複雑な知的財産権からの解放(人工発光系)

輝度の向上は、製品化されている標識材料系の性能アップに直結するのみならず、低価格化の切り札ともなる。すなわち、輝度を100倍向上できる材料が得られれば、飛躍的に高性能な標識系となり、さらに検出器の性能も向上すれば、実際の測定感度は桁違いに向上することになる。また仮に、製造コストがさほど変わらずに高性能な標識系が

製造できれば、現状の光量を得るために必要な材料は桁違いに少なくなる。つまり大幅な低価格化も可能となる。また高輝度化は、医療系以外の分野への利用にも道を開くであろう。

多彩な発光色は、世界的競争技術といって過言ではない。ホタル生物発光を利用した標識系では、主としてホタル天然基質と天然酵素を利用するため（ホタルの天然基質・酵素とも、化学合成とバイオテクノロジー技術により工業生産されている）、発光色も天然と同じ黄緑色（ $\lambda_{\max} \cong 560 \text{ nm}$ ）である。計測機器の性能は日進月歩であり、複数波長の同時モニターや高感度化による微弱光測定技術も格段に向上している。すなわち、次世代可視化技術をひらく多色発光材料は、国境なき技術競争の共通課題となっている。また、計測機器の高性能化により検出感度は向上できても、波長変換は材料開発で解決する以外にどうしようもない。簡単な言葉で表現すれば、ホタル生物発光系を人類は「自在に制御できない」のである。では、どうすれば人為制御できるのであろうか。

2. 生体反応の人為制御による高輝度化と多色化

輝度の向上は、測定機器側の視点では感度の向上とも表現できる。発光系の輝度向上には、①発光量子収率の向上、②発光反応の加速、③阻害からの解放、の3つの要素があろう（図2）。「発光量子収率の向上」とは、L-L反応から放出される単位あたりの光子数を増やすこと、簡単には「反応あたりの発光効率（光子が出る確率）をよくすること」である。これには、発光本体と変化する発光基質の化学構造を、より光子を放出しやすい化学構造へ改変すればよい。これは最も根本的な解決法であるが、一般に化学構造と発光量子収率との関係に確立された理論や法則はなく、現代の科学技術をもってしても、ランダムトライ&エラーを繰り返す以外にすべはない。

一方、単位時間あたりに放出される光子数が増えれば、観測される発光量（輝度）は増加し、見かけの発光効率は向上する。すなわち、初期発光において「単位時間あたりの発光反応を加速する」ことで、用途等に限定はあるかもしれないが、実用的な輝度向上が達成できよう。

私見であるが、「阻害からの解放」は、工学的な高性能化を求める上で避けて通れない課題となろう。輝度を求めて基質と酵素の濃度を上げても、現実にはあるところで限界を迎える。このように生物発光は生体機能であるため、「無制限な機能亢進」を妨げる安全装置的な仕組み（利用側にはネガティブフィードバック）が備わっている。ホタル生物発光の発光基質は、D-システインから工業的に化学

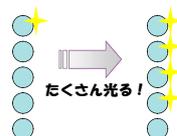
発光量子収率の向上

➡ 1分子（反応）あたりの輝度の向上



発光反応の加速

➡ 単位時間あたりの反応の加速



阻害からの解放:キラルフリー

➡ 阻害物質を発光物質に

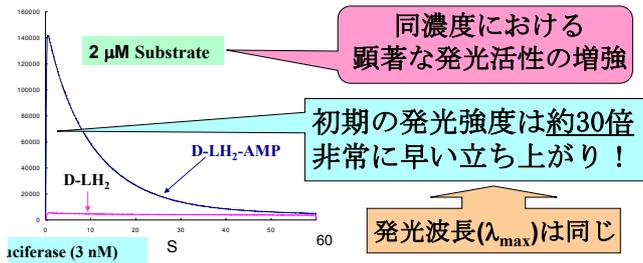


図2 高輝度化方法のイメージ。

合成するため、D体と呼称される（通常、地球上の生命体では、アミノ酸はL体、糖類はD体で構成されている）。しかし発光基質の光学異性体であるL体（L-システインから化学合成される）には発光能はなく、非常に強い発光阻害を示す。通常地球上生物は、L-アミノ酸で構成されている。すなわち、昆虫であるホタルも同じく、生体成分はL-アミノ酸で構成されている。しかしホタル生物発光の発光基質は、それとは異なったD-アミノ酸（非天然型）から作られている。このシステムもいまだ不明である。しかも発光酵素（北米産）との親和性は、天然基質でもアナログ（人工的に合成した構造類似体）でも、L体（天然型）のほうが数倍高い。また発光後生成物（オキシルシフェリン）も強い阻害活性を示すことが知られている。桁違いに発光効率を高める「飛躍的な性能向上」を人為的に行うためには、これらネガティブフィードバックの除去、すなわち「阻害からの解放」は大変重要な鍵と考えられる。このひとつがキラルフリー（L体、D体にかかわらず発光する技術の創出）であり、誰もが望みながら、いまだ達成されていない。

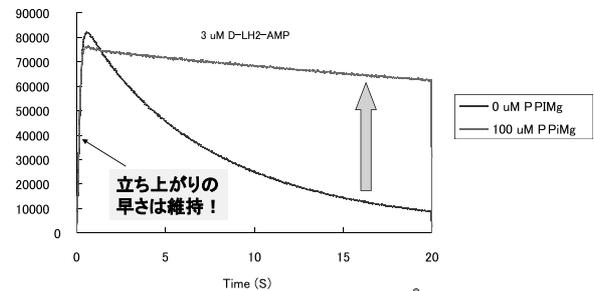
このように課題は整理できたものの、いずれのハードルも非常に高い。しかし、これまでの研究成果と筆者の有機化学的背景を総合すると、「発光反応の加速」に早期ブレイクスルーの可能性を直感できた。ホタル生物発光経路（図1）を再考したところ、「発光酵素は異なった2つの化学反応を行っているが、発光は単段階反応のように観測される」ことに気付いた。これは2つの反応のどちらかが「律速段階」（遅い反応）であることを意味しており、律速段階を工学（人為）的に補助すれば発光反応の加速が可能になると着想した。

有機合成的に発光基質を合成的にAMP化し、活性測定を行ったところ、立ち上がりが加速されただけでなく、その強度も30倍に向上した。一方で著しい発光の減衰



律速段階はAMP化段階(A pocket)

図3 AMP化による発光強度の向上.



発光効率は5倍程度向上!

「定常発光化技術」とは、
発光酵素の「ターンオーバー向上技術」である!

図4 PPI添加による発光の定常化.

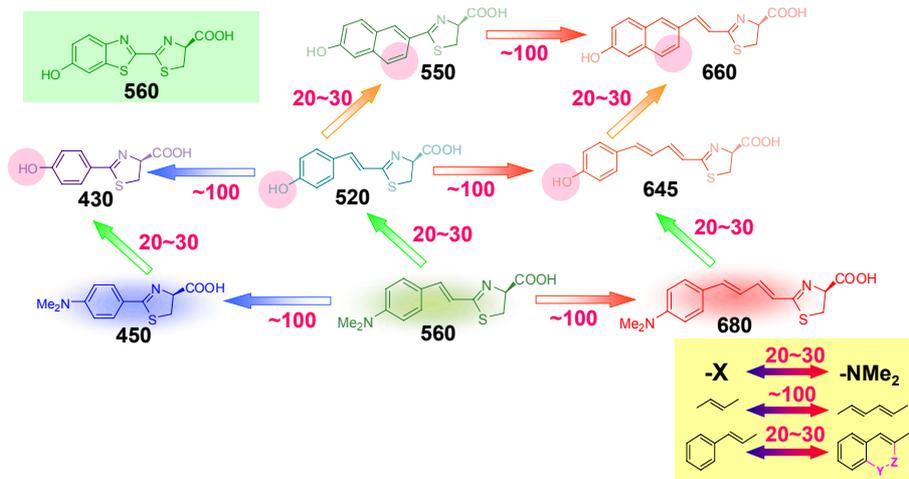


図5 RGB発光基質と化学構造による発光波長変換.

(フラッシュ発光)も観測されたが(図3),地道な添加剤の探索によりピロリン酸(PPI)を添加することで定常化(フラット発光)できることも見だし,初期発光ではあるが,総合的に150倍の輝度向上を実現した¹²⁾(図4).

一方で,「多色化」は「高輝度化」と双璧をなすホタル生物発光系における長年の懸案である.計測機器は急成長を続けており,被検体がマルチカラー標識できれば,複数対象の同時モニターも可能となるレベルにまで技術開発は進んできている.近年は機器の検出感度も続伸しており,数年前に見えなかったものでも鮮明に可視化できるほどである.また最近では,生体内の深部可視化などに資する長波長発光(赤色発光)のニーズも高い.これに対し,ホタルの発光は周知の通り黄緑色であり,天然の基質と酵素を使用する一般的な系も単色である.長年の検討の結果,やっとホタル発光基質と交叉する鉄道虫あるいはヒカリコメツキムシの酵素およびその変異体を利用することで,黄緑色,黄色,赤橙色(550, 580, 630 nm)の3色が商品名Triplucとして最近製品化された.しかしその変換幅は80

nm程度であり,技術の急進は変換幅の拡大を求めよう.また生体内深部可視化に資する長波長となると,700 nm以上の材料に対する要求は強い.

ホタル発光系の場合,発光酵素変異体等で波長を変えるということは「発光環境を変えて波長変換する」ことであり,間接的な方法である.先述通り肝心の発光体は発光基質の酸化物とほぼ同等な化学構造と考えられ,発光体を直接変化させる「基質アナログで波長変換する」方法は,変換幅を拡大するのみならず,シャープな制御も可能になると考えられた.

筆者らは30種以上の基質アナログの合成を行うとともに,構造活性相関(発光基質の化学構造と発光酵素との反応性の関係)も精査し,光の三原色(赤/橙赤:625~740 nm,緑:500~565 nm,青/紫青:450~485 nm)に相当するRGB発光材料(680, 560, 450 nm)の創製を世界で初めて達成した¹³⁾.また化学構造のデザインから発光波長を制御する技術¹⁴⁾も,系統的に構造修飾した基質アナログでついに実現した(図5,ただし北米産ホタル(*Photinus*

発光標識材料化（発光プローブ化）

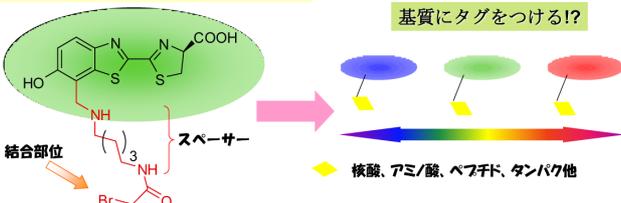


図6 発光プローブと多色化。

pyralis) の発光酵素を使用した場合の波長変換技術である)。

3. 次世代の新規用途にも対応できる材料開発

可視化対象の拡大は、発光材料の多様化にも注文を付けている。例えば「ターゲット物質に発光基質を結合（ラベル化）させて、標的臓器に到達すると発光する」ようなシステムは、現状の発光基質ではできない。つまり発光能を維持したまま、発光基質にタグとなる側鎖とターゲット物質への結合部位を導入した材料の創製が求められている。このような基質があれば、任意の材料に発光基質を固定化（光の固定化）でき、ホタル生物発光系の新しい利用にも道がひらかれる。エネルギーの外部照射が不要な自発光材料を自在に固定化する技術は、新たな可視化ターゲットに対しても汎用に対応できるであろう。

一方で発光基質の修飾は難しく、先の構造活性相関データから、場所によっては些細な改変で発光能が著しく低下したり、発光波長の変化が生じることがわかっている。すなわちプローブ化では、発光能を維持したまま、かつ発光波長に大きな影響を与えずにタグを導入することが求められた。さまざまな検討の結果、ベンゾチアゾール環部7位をタグ化した場合、発光能こそ多少（2桁程度）下がるものの、波長はほぼ560 nmを維持していた（図6）。この発光プローブを使って、代表的なタンパク質であるBSAのラベル化にも成功している¹⁵⁾。

現在、RGB発光基質のタグ化に着手しており、首尾よくできれば多色発光プローブが実現する。そうなれば主として医療・衛生関連分野で利用されているホタル生物発光系の活用分野は一気に拡大でき、例えば安全管理などの新しい分野にも応用範囲は広がると考えられる（図7）。

また、可視化材料は今回紹介したホタル系の発光材料だけではない。一般に多く利用されているのは蛍光標識材料であろう。色を含め多種多様な材料が開発・市販されている。蛍光標識材料の場合はホタル発光系のような自発光とは異なり、光らせるためには外部から標識材料へレーザー等でエネルギーを照射する必要があるが、発光に基質と酵



図7 発光プローブと新規用途分野。

素の2つの要素が必要な生物発光系に比して、系を単純化できる利点がある。

4. 今後の課題と将来展望

筆者らはこれら新技術の開拓にあたり、いくつかの定説を踏み越えることが必要であった。例えば発光酵素はアンルアデニレート合成酵素スーパーファミリーに属することが明らかとなっており¹⁶⁾、このため発光反応では、後天的な獲得機能である“酸化反応が遅い反応”と考えられていた。元来機能であるAMP化が酸化よりも不得手であるという結果には、当事者である筆者ですら驚いているが、よくよく調べてみると、2つの機能の定量的な反応分析にかかわる詳細な検証はなされていなかった。また、図1に示されるように、発光にはフェノレートアニオンになることが必要とされていたが、RGB発光はアニオン化しないジメチルアミノ基を有する材料で実現されている。天然発光基質では、ベンゾチアゾリン環部フェノール性水酸基のメチル化体（アニオン化しない）を有機合成的にAMP化して生物発光を測定したところ、天然基質と同様の発光波長（ca. 560 nm）が観測された（図8）。すなわち、発光（光を作る）という観点では、フェノール部位の“アニオン化”も必須要件ではないことがわかった。ホタル生物発光関連研究の歴史は古いが、そのぶん最新の科学で再度検証すべき点もあろう。

先人の研究を尊重しながら発想を固定化せず、定説をも検証することでひらかれる道があることを、課題のひとつとして示したい。

また、今後クリアすべき課題としては、次の2点を挙げたい。① 技術的課題：飛躍的な高輝度化を可能にする阻害作用の克服。② 国際知的財産的課題：新規発光系；天然基質と天然酵素を使わない人工発光系の創製。

ホタル生物発光系の将来展望は図7に示しているが、こ

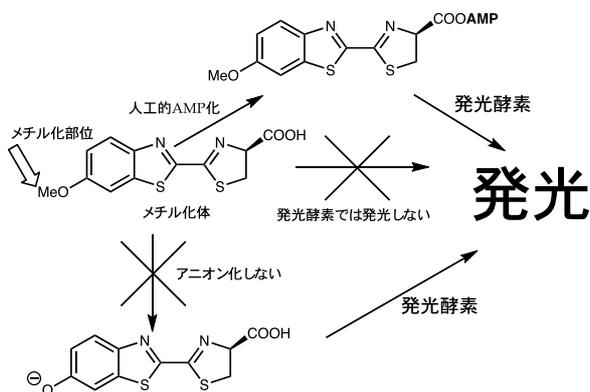


図8 メチル化体のAMP化による発光.

のキーポイントは「バルク使用（大量使用）とその供給技術の開発」にある。多彩な発光基質と発光酵素の安価な工業生産が実現すれば、その用途も大きく広がるであろう。また、バイオテクノロジーとの融合で、夏は涼しげに、冬はクリスマスカラーに輝く街路樹ができれば、環境・エネルギー問題にも福音となろう。可視化技術は日本ではなく、欧米、特に米国が圧倒的なシェアを誇っている。これは、わが国で可視化技術がかかわるリーディングサイエンスを展開する場合、まず欧米から技術を買う必要があることを意味する。特にライフサイエンス関連において、可視化技術は基盤中の基盤技術である。ぜひとも、本邦から国際的な知的財産権もクリアした、可視化のリーディング技術を提案したいものである。

筆者は、ホタルといえば幼虫期を清流で生息し、夏の夕暮れ時に川辺などで淡く光を放って遊飛するものと思っていた。しかしホタル生物発光の研究を開始して、幼虫期が水棲であるゲンジボタルとヘイケボタルの2種は世界的にも珍しく、多くは陸棲であることを知った。また、日本にはホタルが44種も存在することを知ったときには、新鮮な驚きがあった¹⁶⁾。このようにわが国では清流の代名詞ともいえるホタルであるが、これは日本特有の感覚であり、国際的には「ホタルと清流」に高いインスピレーションは期待できない。環境関連のプレゼンテーションとして、ホタルが棲む川から「きれいな川」をイメージするのは、世界的にはきわめて限定された地域であり、むしろ“ゲンジ”と“ヘイケ”が水棲の珍しい種として認識されるのかもしれない。

科学技術が発達したとされる現代でさえ、昆虫のホタルが造る「光」の技術に人類はいまだ遠く及ばない。ホタルに限らず、超高性能かつ精密な生体機能には、最新鋭の科学技術が詰まったロケットにも負けない魅力すらある。何

億年の時を経て、改良に改良を重ねてきた生体機能から、人類はまだ学ぶことが多いと感じている。

生物発光研究において深くご指導いただいております。電気通信大学丹羽治樹教授、平野誉准教授、産業技術総合研究所近江谷克裕先生に感謝いたします。最近は慶應義塾大学理工学部西山繁教授との共同研究をすすめており、研究分野の拡大と異分野技術の融合そして応用に向けたご指導をいただいております。また記載された発光分子材料の研究は、電気通信大学研究員中村光裕先生（研究当時）、同小島哲先生（研究当時）ならびに当研究室の学生諸氏が日々鋭意研究を行った成果の一部であり、ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) 羽根田弥太著：発光生物（恒星社厚生閣，1985）。
- 2) 丹羽治樹：“生物はなぜ光るのか—生物発光とその応用—”，現代化学，**379**（2002）28-36。
- 3) 今井一洋編：生物発光と化学発光（廣川書店，1989）。
- 4) 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）。
- 5) Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Enomoto, T. Irie, H. Kubota, Y. Ohmiya and H. Akiyama: “Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission,” Nat. Photonics, **2**（2008）44-47。
- 6) W. D. McElroy, H. H. Seliger and M. DeLuca: “Insect bioluminescence,” *The Physiology of Insecta*, ed. M. Rockstein (Academic Press, New York, 1974) pp. 411-460。
- 7) W. D. McElroy: “Chemistry of firefly luminescence,” *Bioluminescence in Action*, ed. P. J. Herring (Academic Press, New York, 1978) pp. 109-127。
- 8) J. L. White, R. Rapaport, H. H. Seliger and T. A. Hopkins: “The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states,” Bioorg. Chem., **1**（1971）92-122。
- 9) F. McCapra and D. R. Richardson: “The mechanism of chemiluminescence: A new chemiluminescent reaction,” Tetrahedron Lett., **5**（1964）3167-3172。
- 10) F. McCapra, D. J. Gifoye, D. W. Young, N. J. Church and P. Spencer: “The chemical origin of color differences in beetle luminescence,” *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*, eds. A. K. Campbell, L. J. Kricka and P. E. Stanley (Wiley and Sons, Chichester, 1994) pp. 387-391。
- 11) T. Hirano, Y. Hasumi, K. Ohtsuka, S. Maki, H. Niwa, M. Yamaji and D. Hashizume: “Spectroscopic studies of the light-color modulation mechanism of firefly (beetle) bioluminescence,” J. Am. Chem. Soc., **131**（2009）2385-2396。
- 12) 牧昌次郎，小島 哲，丹羽治樹，平野 誉：“複素環化合物及び発光方法”，WO/2007/116687。
- 13) 牧昌次郎，小島 哲，丹羽治樹：“ルシフェラーゼの発光基質”，WO/2009/096197。
- 14) 牧昌次郎，小島 哲，丹羽治樹：“波長が制御されたルシフェラーゼの発光基質および製造方法”，特願 2009-064595。
- 15) 牧昌次郎，小島 哲，丹羽治樹：“ルシフェラーゼの発光基質”，特願 2009-027654。
- 16) 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。

（2010年2月8日受理）