

# レポーターアッセイの視野が広がる

## MultiReporter Assay System -Tripluc™-

### Introduction

## ホタルの発光で拓く、新しい生命科学・マルチ遺伝子発現Tripluc™への道

(独) 産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループ・グループ長

(独) 科学技術振興機構「さきがけ研究21・光と制御」研究者

静岡大学大学院電子科学研究科生体処理情報講座助教授を兼任

近江谷 克裕

### ホタルへの想い

日本人が最初にホタルを意識したのは何時のことであろうか…「アマテラス大神の御子、(中略)しかしこの国は、蛍火のように輝いている悪い神々、五月の蝸のようにかしましく湧き立つ荒びた神々が、多勢いた。云々(日本書紀 神代の部、福永武彦訳)」とあり、古代の人々にとって、その光輝く姿はさぞ不可思議なものであったに違いありません。…21世紀に暮らす我々科学者にとっても、不思議な存在である点は変わりません。私の生物発光研究の始まりも古代の人々の疑問と大きく違ふことなく、何故ホタルの光が多彩なのか?という素朴な疑問からでした。

ホタルの発する光(生物発光:Bioluminescence)はホタル発光基質(ルシフェリン:Luciferin)の酸化をホタル発光酵素(ルシフェラーゼ:Luciferase)が触媒する酵素反応によるものです。ホタル発光システムの不思議な点は、発光甲虫の仲間はホタル科だけでも2000種あまり、これ以外にヒカリコメツキ科、ホタルモドキ科、イリ

オモチボタル科が加わり、その総数は数千種以上となりますが、同じルシフェリンを使っているが、少しずつ異なる発光色を持つ点、さらに、このルシフェリン・ルシフェラーゼ反応は、その反応環境のpHに連動して発光スペクトルが変化する場合と変化しない場合がある点等です(図1)。85年からホタルルシフェラーゼが次々とクローン化され、大腸菌で発現したルシフェラーゼも天然型と同様に反応溶液のpH環境に連動して発光色が変化する点が明らかになってきました。私も日本産ヒメホタル、ミヤコマドボタルのルシフェラーゼをクローン化し、この現象を確認しました。一方、89年にKV Woodらはヒカリコメツキムシから発光スペクトルが異なる複数のルシフェラーゼをクローン化し、pHに依存しない発光であると報告しました。しかしながら、このルシフェラーゼをこのグループ以外では実験的に取り扱うことができません、私は同じ基質を使いながら、そこまで異なる現象を頭で理解できず、遠くで不思議に思うだけでした。

### 鉄道虫との出会い

鉄道虫は南米ブラジルサンパウロから内陸部にかけて棲息する発光甲虫で、その光る姿が列車のようであることから鉄道虫と名づけられました(図2)。正式には*Phrixothrix*と呼ばれ、その種数も多く、主にサンリなどが共生するアリ塚に棲息します。頭部の発光色は橙色から真紅色まで、腹側部は緑色から黄緑色と多彩な発光色の甲虫たちです。因みに、VR Viviani(後に私のポストドクであり、現在は友人、且つ共同研究者)が発見した*Phrixothrix vivianii*は腹側部が最も緑色に発光する種の一つで、この緑色ルシフェラーゼは最終的に我々の手によってクローン化できました。話はそれますが、昨年、

私はブラジルサンパウロ周辺で鉄道虫の採取を行ったのですが、ブラジルも環境変化が激しく、念願の鉄道虫は採取できませんでした(図3)。夜中、毒蛇やピユーマがいると驚かされつつ調査した経験は貴重な体験です。

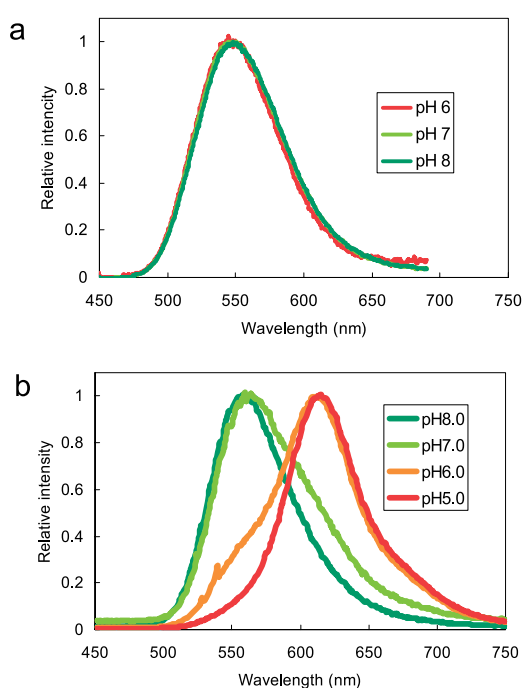


図1. ルシフェラーゼ発光スペクトルとpHとの関連  
a: pH非感受型、b: pH感受型

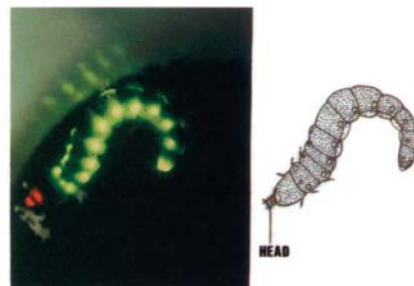


図2. *Phrixothrix hirtus*の成虫(メス)  
(左) 生物発光の様子  
(右) 頭部と発光部分の略図

(*Biochemistry*, **38**: 8271-8279 (1999) より引用)



図3. 鉄道虫の採取を行った現地にて撮影  
 VR Viviani : 左から3番目  
 近江谷 克裕 : 左から2番目

さて、私と鉄道虫の直接的な出会いは91年、当時所属していた大阪バイオサイエンス研究所に南米ブラジルサンパウロ大学の学生であったVivianiがやってきた頃に遡ります。彼は頭が赤色、腹側部が緑色に光る鉄道虫を持ってきたのです。そして、本に記載されていた通りに、列車の様に光ったまま動き回る姿は圧巻でした。そこで我々是一緒にクローニングを始めることになりましたが、この滞在は短期で、また、私の技術も未熟で、クローニングに成功することはできませんでした。その後、96年に私は静岡大学に移りましたが、鉄道虫ルシフェラーゼのクローニングの夢は断ち難く、Vivianiとのコンタクトを復活させたところ、幸運にも、学位を取得したばかりの彼が私の研究室のポスドクとして来日することになり、97年春から一緒にクローニングを始めました。一年後にはクローン化に成功、世界で初めて、鉄道虫からホタルルシフェリン発光を緑色と真紅色(世界で最も赤い発光)の光に制御できる酵素を手に入れることができました。早速、我々は大腸菌で発現させ、本酵素の特性を解析したところ、反応溶液のpH環境に連動することなく緑色、赤色ルシフェラーゼが生み出す発光スペクトルは一定でした。ホタルルシフェラーゼとアミノ酸レベルの相同性が60%程度もあり、活性部位では特に相同性が高いのにも関わらず、全く異なる発光挙動を示しました。やはりホタルの光は不思議でした。本成果は98年7月イタリアポローニアで開かれた国際生物発光化学発光カンファレンスで絶賛を浴び、VivianiはDeLuca賞(若手奨励賞)を獲得できました。

**ホタルの光とルシフェラーゼ、Tripluc™の役者達**

何故、発光色が微妙に変化するのか、或いは反応溶液pHに連動して色を変えたり変えなかったりするのか?これに対し、ルシフェリンのエネルギー状態をルシフェラーゼが制御するという考え方で3つの解釈があります(生化学の私の総説\*を参照ください)。細かい点は十分に解明されていませんが、この光の色の違いを上手く制御できれば新しい何かができるのではないかと考えたわけです。97年当時までに、私は発光色の異なるヒメホタル、ミヤコマドボタルのルシフェラーゼのキメラタンパクを作成、色決定に200番代のアミノ酸残基が重要であることを明らかにしました。また、98年には、イリオモテボタル由来の緑色ルシフェラーゼをクローン化、このタンパクでもpH環境に連動しない発光であることを確認、さらに、色決定に重要な部位と思われる200番代を中心に変異体を学生と多数作成し、pHに変動することなく橙色に発光するルシフェラーゼを作成しました。やっと、Tripluc™の役者達を揃える事ができたのです。

\*: 近江谷克裕(2004) 生化学, 76, 5~15

**レポーターアッセイTripluc™の開発へ**

従来のレポーターアッセイは白黒テレビというのが、私の印象です。やっと3つの色を手に入れたのだから、細胞内の情報をカラーテレビのように見たいと思うのは、当たり前な研究目標のように思えます。2001年秋、私は産総研に移り、いよいよ新規レポーターアッセイの開発に乗り出しました。問題は哺乳類細胞での発現でした。これまでも鉄道虫由来ルシフェラーゼは大腸菌では発現するのですが、哺乳類では安定に発現しなかったのです。これを精力的に解決してくれたのは、産総研の中島芳浩研究員です。中島研究員らはルシフェラーゼの転写・翻訳の効率の向上がキーであると考え、遺伝子のコドンの改変等を行い、03年には何とか哺乳類細胞でつかえるレベルになりました。次の問題は、pHに変動せず安定なスペクトルとはいえ重なるスペクトルをどのように分割定量するかという問題になりました。当たり前を考えれば、重ならない部分だけをフィルターで分けて定量すれば良いことになります。でも、これでは緑と赤色の両端を取ることで2つの発光色しか相手にできません(実際、同時期に開発されたPromega社のものはこの考え方です)。この問題を解決したのは、JSTのさきがけ研究で一緒だった東大物性研秋山英文助教授です。発光する光を無駄にすることなく、フィルター2枚で3つの発光色を分割、定量してくれたのです。04年、何とかTripluc™にたどり着きました。

**Tripluc™システムの進化は続く**

最近、私は中国雲南省が発光甲虫のルーツではないかと考え、イリオモテボタルやホタルの採取を年数回、現地で行っています。現場で思うことですが、比較的温かい地に棲息する彼らは、こんな不安定な酵素(実験室レベルでは室温以上で失活しやすい)を上手に使用しているという点です。まだまだ、発光するシステムの中には何かあるというのが私の印象です。発光を司る何かを見つけることで、Tripluc™システムは進化できるのではないかと。このシステムをよりユニークなもののできるの否か。私のホタル発光システムにおける不思議探しの研究は、これからも続きそうです。

最後に、Tripluc™の芽はJSTさきがけ研究21「光と物質」で育んでいただき、静岡大学、産総研で葉を繁らせ、NEDO細胞内ダイナミズム解析プロジェクトで結実した点を、また、多くの方々の協力、支援があった点を記させていただきます。



**近江谷 克裕先生**

おうみ や よしひろ

**PROFILE**

(独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループ・グループ長、(独)科学技術振興機構「さきがけ研究21・光と制御」研究者および静岡大学大学院電子科学研究科生体処理情報講座助教授を兼任)

1983年群馬大学工学部卒業、1990年同大学院医学研究科修了、医学博士。1990年(財)大阪バイオサイエンス研究所特別研究員、1992年新技術事業団(現(独)科学技術振興機構)「さきがけ研究21・光と物質」研究者を経て、96年静岡大学教育学部助教授。2000年に通商産業省(現独立行政法人産業技術総合研究所)に入所、04年より現職。

