



Tokyo Tech

2022年4月25日

報道機関各位

東京工業大学

世界最小サイズの発光酵素 picALuc[®]の開発に成功

ーライフサイエンス分野・創薬分野の基礎研究や診断・検査薬にー

【要点】

- 実用レベルで世界最小サイズ（13 kDa）の発光酵素 picALuc[®]を開発
- 高い発光活性をもつ既存の発光酵素と同等の活性を実現
- BRET ベースアッセイにおいても有効な結果が得られ、今後、多様な分野での有用なツールとしての利用を期待

【概要】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系の古田忠臣助教、科学技術創成研究院 化学生命科学研究所の上田宏教授は株式会社島津製作所と共同で、世界最小サイズの発光酵素（用語1）「picALuc[®]」を開発した。

創薬スクリーニング・検査・診断のために用いられるレポータータンパク質（用語2）としての発光酵素には、明るさや熱安定性等の高さに加えて、サイズの小ささが求められる。そこで本研究では、カイアシ類由来発光酵素 ALuc[®]（21 kDa）の発光活性を維持したまま、分子量が 13 kDa になるまで小型化することにより、新規発光酵素 picALuc[®]を開発した。これはこれまでに開発されている実用レベルの発光酵素の中で最小のサイズである。また picALuc[®]は、高い発光活性をもつ発光酵素 NanoLuc[®]と同等の発光値と熱安定性を示した。さらに、picALuc[®]を分子間相互作用検出のための汎用法である生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）ベースアッセイ（用語3）に用いたところ、NanoLuc[®]よりも高い応答が観察された。picALuc[®]は今後、ライフサイエンス分野から創薬スクリーニング・診断・検査までの幅広い分野において、有用なツールとなることが期待される。

本研究成果は 2022 年 3 月 16 日、「*ACS Chemical Biology*」にオンライン掲載された。

●背景

現在、レポータータンパク質（図 1）としてさまざまな発光酵素が利用されている。レポータータンパク質としての発光酵素には、明るさや熱安定性等の高さに加えて、サイズの小ささが求められる。その理由としては、発光酵素のサイズが大きいと、標的の挙動を阻害する可能性があることが挙げられる。またもう 1 つの理由として、標的と発光酵素との融合タンパク質を作製した時に、発光酵素が大きいと正しい構造の融合タンパク質が生成しにくいことがある（図 2）。

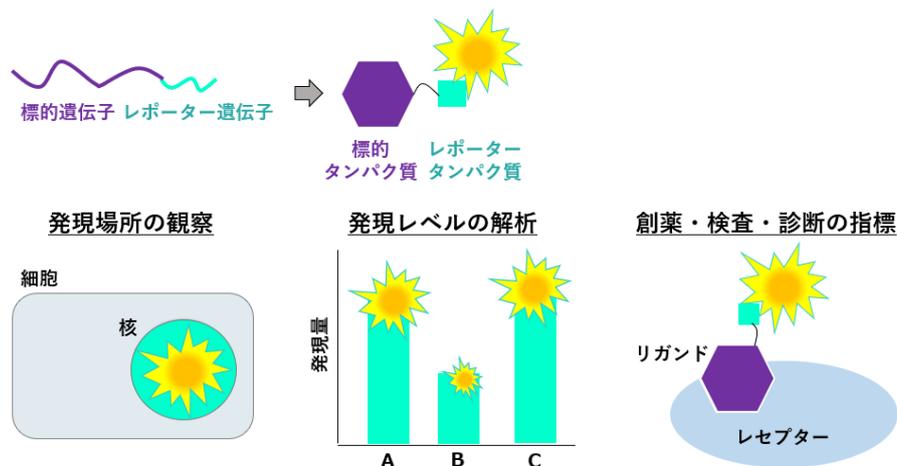


図 1 レポータータンパク質とは？

標的遺伝子とレポーター遺伝子を繋げて発現させることで、標的タンパク質にレポータータンパク質を融合させる（上図）。レポータータンパク質から発せられる光等のシグナルにより、標的タンパク質の挙動・発現レベルを解析できる（下図）。

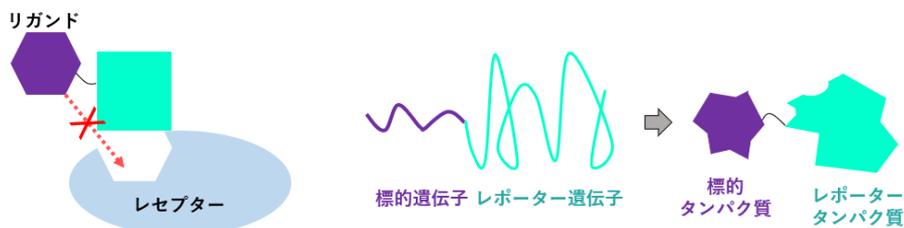


図 2 レポータータンパク質のサイズの影響

レポータータンパク質のサイズが大きいと、標的の挙動を阻害しやすい。また、正しい構造の標的タンパク質-レポータータンパク質の融合タンパク質が生成しにくい。

●研究成果

東京工業大学の研究グループと株式会社島津製作所は、カイアシ類由来発光酵素 ALuc[®] (21 kDa) の発光活性を維持したまま、分子量が 13 kDa になるまで ALuc を削ることにより、新規発光酵素 picALuc[®]を開発した (図 3)。13 kDa というサイズは、これまでに開発されている実用レベルの発光酵素の中で最小のサイズである (図 4)。

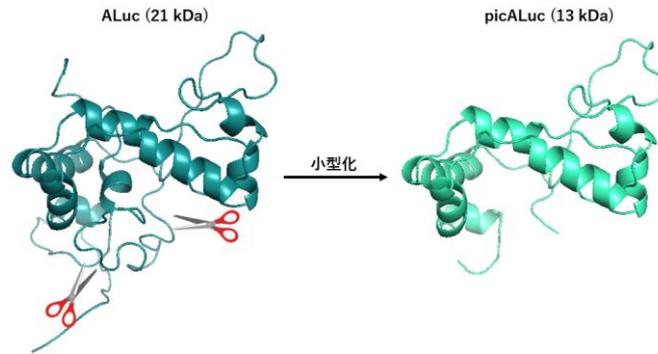


図 3 picALuc[®]の作製

ALuc[®]を小型化することにより picALuc[®]を作製した。

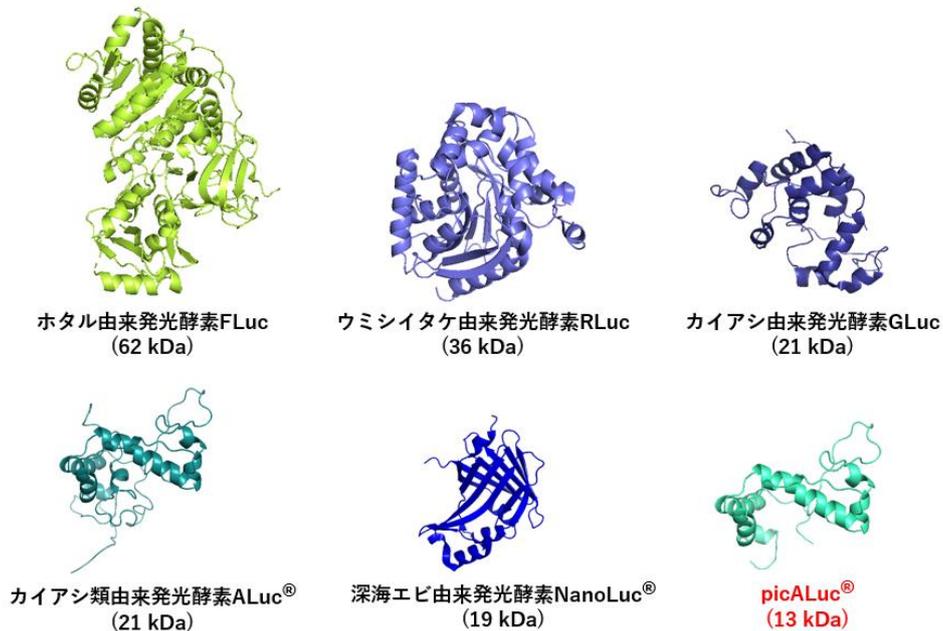


図 4 既存の発光酵素と picALuc[®]のサイズの比較

picALuc[®]は実用的な発光酵素の中で世界最小サイズである。

FLuc、RLuc、GLuc、ALuc[®]はそれぞれ Firefly Luciferase、Renilla Luciferase、Gaussia Luciferase、Artificial Luciferase の略称。また ALuc[®]は産業技術総合研究所の金誠培研究員らが開発した発光酵素、NanoLuc[®]は Promega 社の製品である。

開発した picALuc[®]を、哺乳類由来培養細胞である **Cos-7 細胞**（用語 4）に発現させた時の発光値を調べたところ、既存の発光酵素の中でも高い発光活性をもつ ALuc[®]やトゲオキヒオドシエビ由来 NanoLuc[®]と同等の発光値を示した（図 5）。さらに、大腸菌を利用して picALuc[®]を大量作製することにも成功した。

次に picALuc[®]の安定性を検討した。熱安定性については、レポータータンパク質として汎用的に利用されているホタル由来 FLuc を 60°C で 5 分間インキュベーション（用語 5）すると全く光らなくなるのに対し、picALuc[®]は 80°C で 10 分間インキュベーションしても、80%以上の発光値を示した（図 6）。さらに 37°C で 24 時間インキュベーションした後も、ほぼ 100%の発光活性を維持していた。一方、pH 条件に対する安定性については、塩基性条件（pH 9.5）において、中性条件（pH 7.0）の 80%以上に相当する発光値が測定された（図 7）。picALuc[®]を分子間相互作用検出のための汎用法である生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）ベースアッセイに用いたところ、NanoLuc[®]（19 kDa）よりも高い応答が観察された。このことから、picALuc[®]のレポータータンパク質としての優位性が示されたと言える。

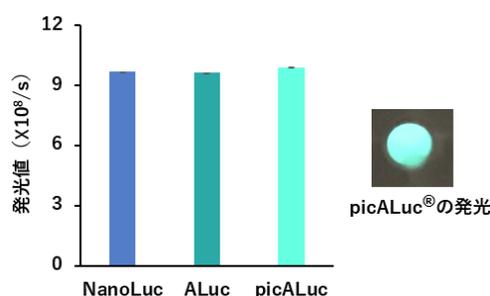


図 5 既存の発光酵素と picALuc[®]の発光値の比較
picALuc[®]の発光値は世界最高レベルである。

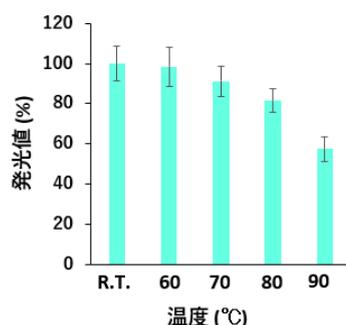


図 6 温度に対する picALuc[®]の発光値の変化
picALuc[®]は高い熱安定性を示す。

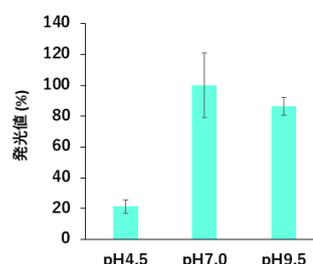


図 7 pH に対する picALuc[®]の発光値の変化
塩基性条件における picALuc[®]の安定性は高い。

●今後の展開

本研究で開発した picALuc[®]は、ライフサイエンス分野から創薬スクリーニング・診断・検査までの幅広い分野において、有用なツールとなることが期待される。研究チームでは、picALuc[®]を利用した創薬スクリーニング系や診断薬、検査薬の開発を目指して、今後も picALuc[®]の機能向上と用途拡大に向けた研究開発を進めていく予定である。なお、picALuc[®]の用途拡大を実現するためには、幅広い分野の多くの研究者による試用が必要となることから、近日、株式会社島津製作所より試供品が国内の研究者・研究機関に提供される予定である。

【用語説明】

- (1) **発光酵素**：生物の発光現象を触媒する酵素。ホタルの発光がよく知られている。発光基質としては、発光酵素に応じてルシフェリンやセレンテラジンなどがよく用いられる。
- (2) **レポータータンパク質**：標的タンパク質の探索・解析や、創薬スクリーニング・検査・診断のための指標として使用されるタンパク質。
- (3) **生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) ベースアッセイ**：発光酵素と蛍光分子（タンパク質や色素）を融合することで生じる生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) に基づく、様々な分子間相互作用を検出・測定できる方法。
- (4) **Cos-7 細胞**：アフリカミドリザルの腎臓由来の細胞。効率の良さから遺伝子導入によく用いられる。
- (5) **インキュベーション**：細胞や個体などを培養、保温、孵化すること。ここでは、温度を一定に保つ熱処理のことを意味する。

【論文情報】

掲載誌：*ACS Chemical Biology*

論文タイトル：Miniaturization of Bright Light-Emitting Luciferase ALuc: picALuc

著者：Yuki Ohmuro-Matsuyama, Tadaomi Furuta, Hayato Matsui, Masaki Kanai, and Hiroshi Ueda

DOI：10.1021/acscchembio.1c00897

【問い合わせ先】

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系 助教
古田 忠臣

Email: furuta@bio.titech.ac.jp

TEL: 045-924-5776

【取材申し込み先】

東京工業大学 総務部 広報課

Email: media@jim.titech.ac.jp

TEL: 03-5734-2975

FAX: 03-5734-3661