

# ルシフェラーゼでないタンパク質と 発光反応を起こすルシフェリン

産業技術総合研究所 健康医工学研究部門

ナノバイオデバイス研究グループ

研究員 西原 諒

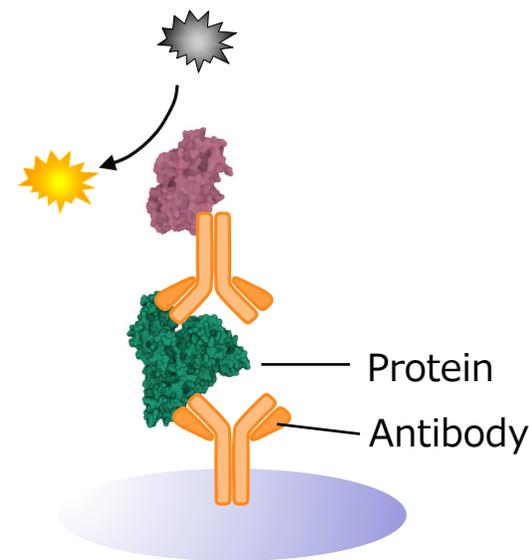
2021年9月9日

# 従来技術と問題点

## 従来技術: ELISAなど、抗体を用いたタンパク質検出

**利点:** 夾雑系で標的タンパク質定量が可能

**問題点:** 複雑な実験操作  
長時間の測定(2-3時間)



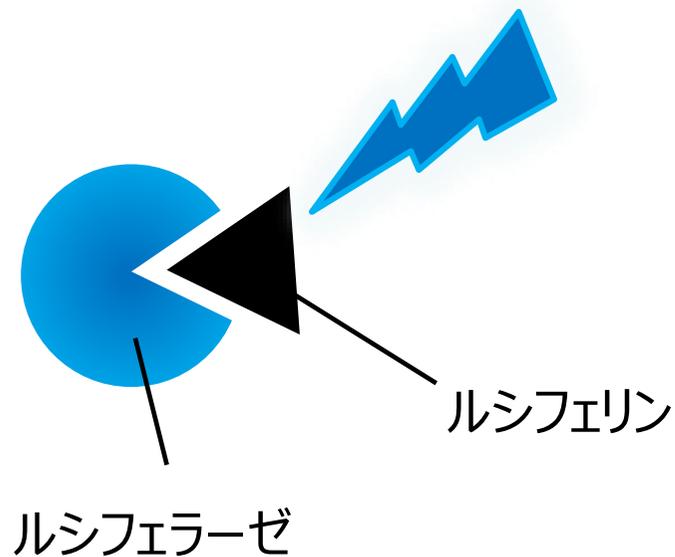
### 課題

目的タンパク質に対して

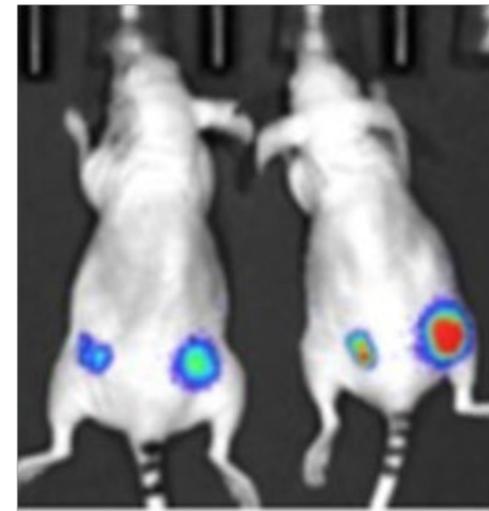
高い“親和性”と“選択性”を併せ持つ材料の設計開発は困難

# 新技術の背景

## 生物発光: 化学反応で自発的に発光



癌細胞の可視化



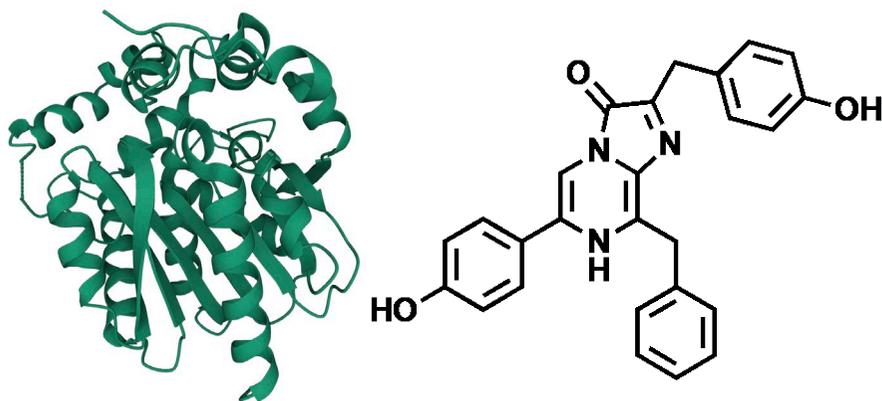
Nishihara R et al. *Theranostics*, 2019, 9, 2646-2661.

特異的かつ高感度な分析技術として利用

# 新技術の背景

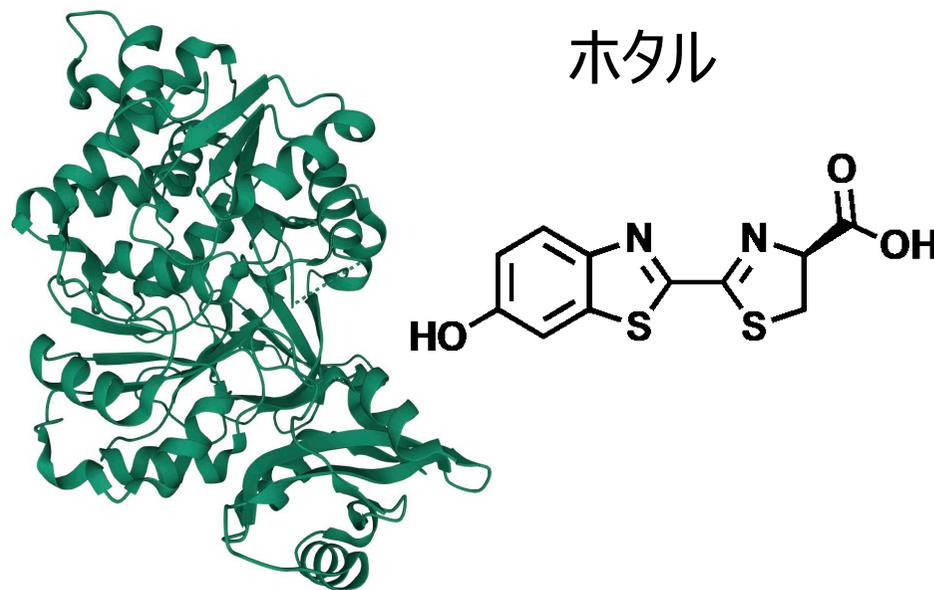
## 天然の発光システム –限定的な組み合わせ–

ウミシイタケ



Loening A.M. et al. *J. Mol. Biol.*, **2007**, 374, 1017-1028.

ホタル

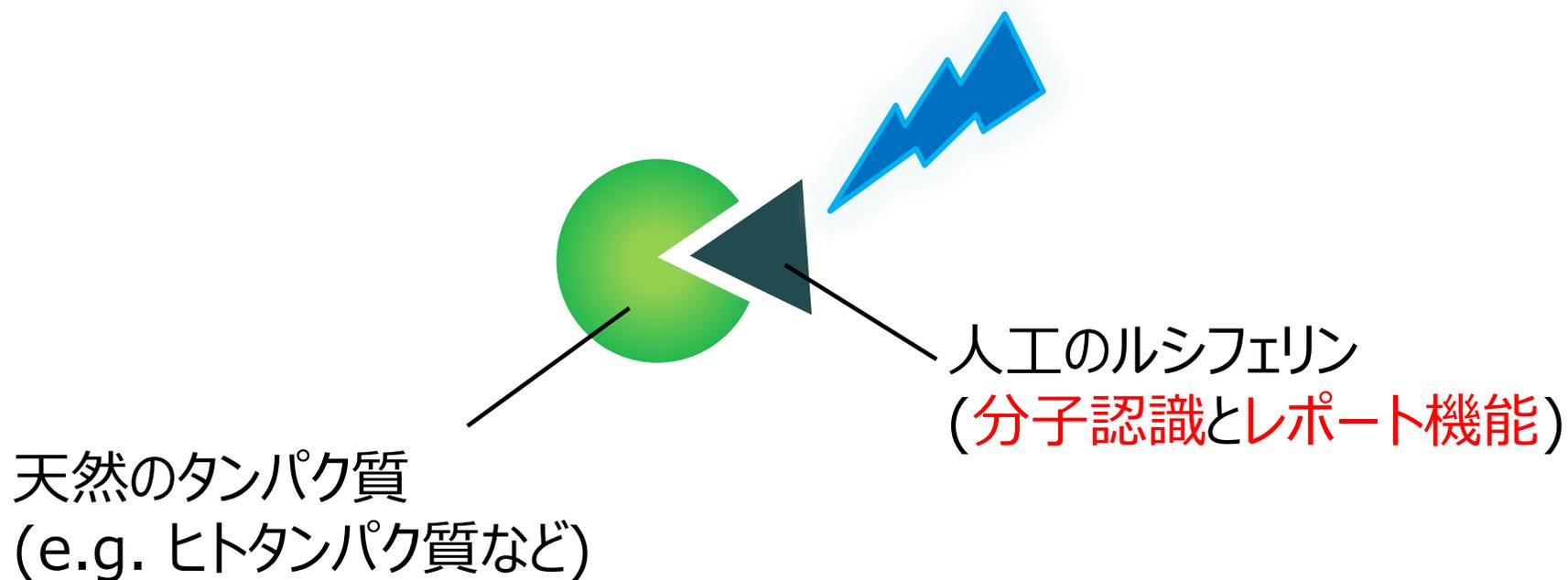


Nakatsu T et al. *Nature*, **2006**, 440, 372-376.

ルシフェリンの交差反応性はない = 特異性が高い

# 新技術の特長1

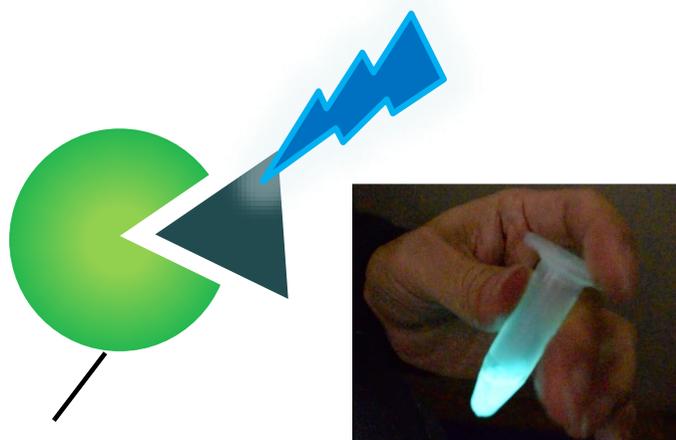
## 天然タンパク質で光る人工ルシフェリン開発



“混ぜるだけ”でターゲットタンパク質を特異的かつ迅速に検出

# 新技術の特長2

## 従来の発光測定器で測定可能



天然のタンパク質  
(e.g. ヒトタンパク質など)



1)



2)



- 1) プレートリーダー (Promega株式会社HPより)
- 2) 小型発光検出器 (キッコーマンバイオケミファ株式会社HPより)

市販の発光測定器を用いて測定可能

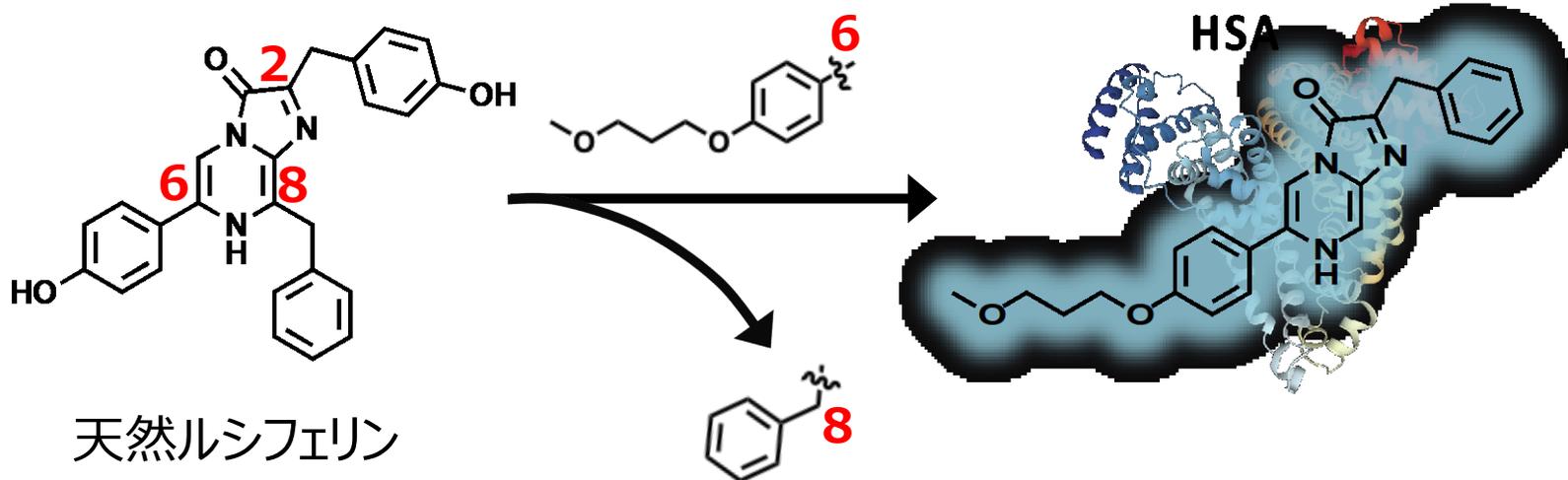
# 従来技術との比較

- 既存のタンパク質分析法に比べて
  - **測定時に光源不要（装置：発光ルミノメータのみ）**
  - **測定が簡便（サンプルに試薬を添加するだけ）**
  - **短時間での検出（約1分で測定が可能）**

**簡便、迅速かつ高感度に目的タンパク質を定量可能**

# 人工ルシフェリン分子設計

## ヒト血清アルブミン(HSA)で光るルシフェリン

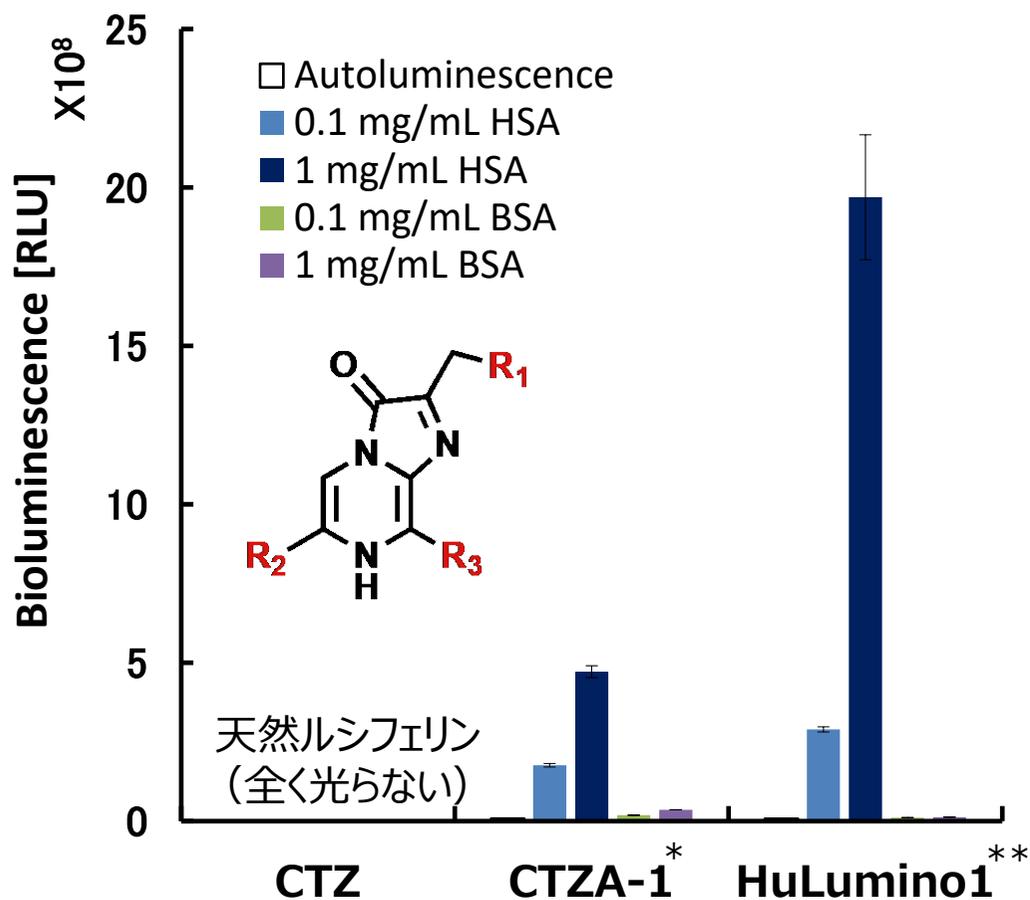


Nishihara R et al. *Bioconjugate Chem.*, 2020, 31, 2679-2684.

血清アルブミンの異常低値：肝障害、栄養不良などの指標

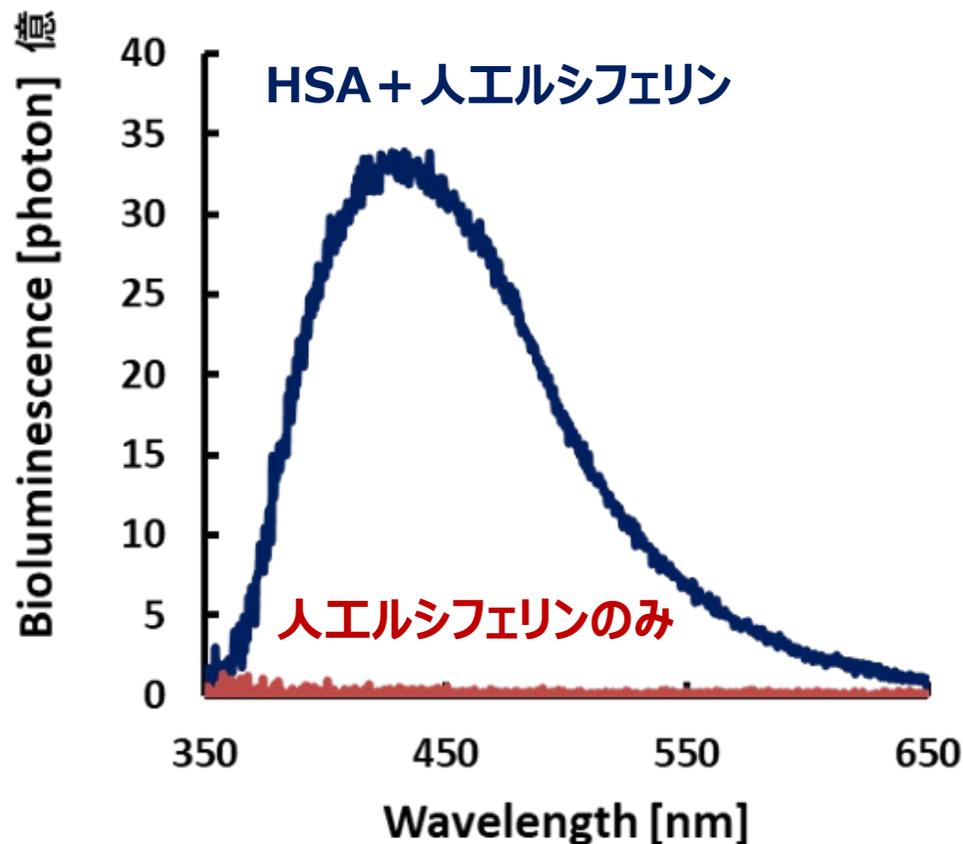
独自の化合物ライブラリー(50種以上)より分子設計

# HSA検出のためのルシフェリン



\*Coelenterazine Analogue 1

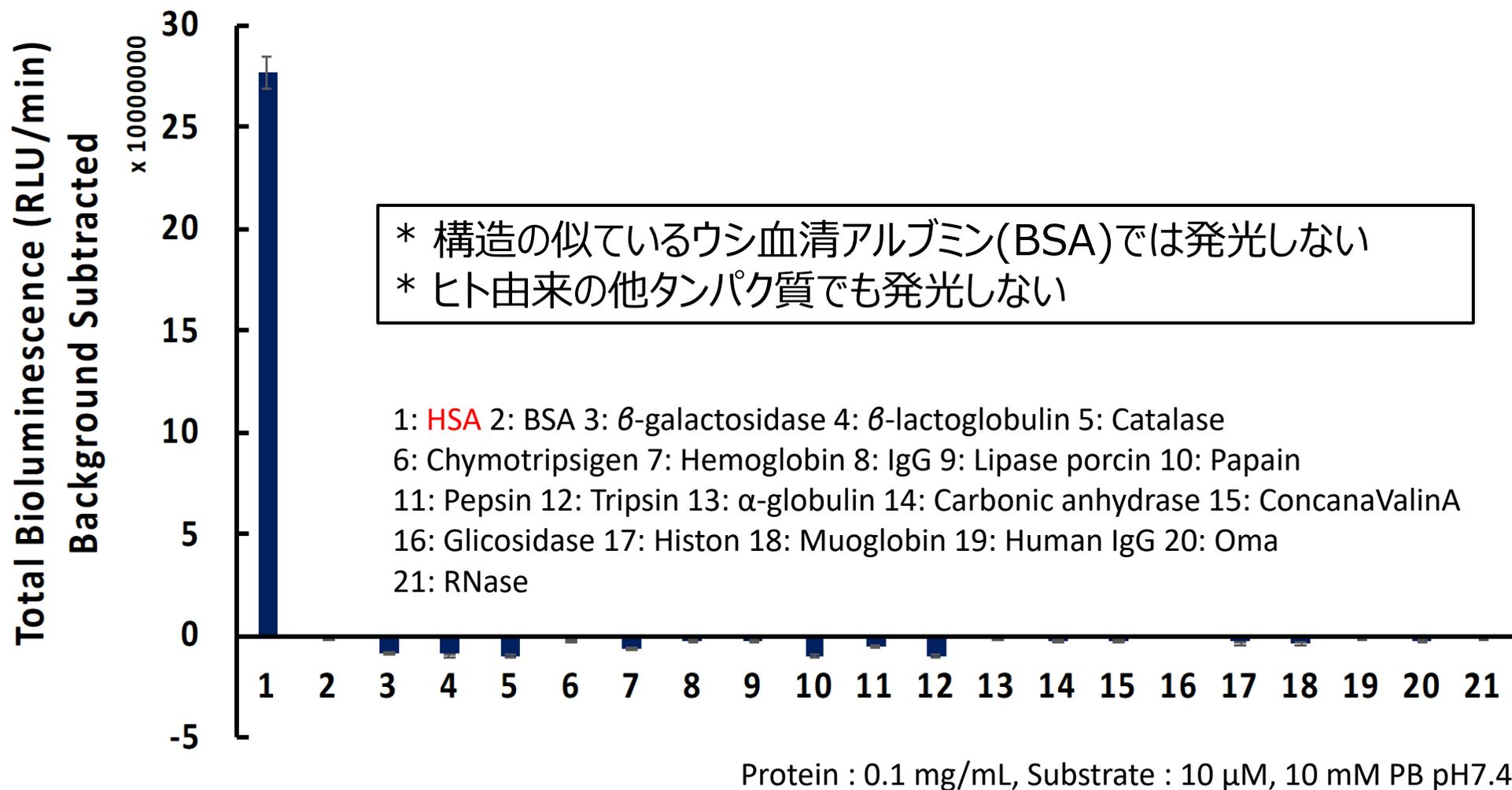
\*\*Human Luminophore 1



Substrate : 10  $\mu$ M, 10 mM PB pH7.4

各官能基(R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>)の最適化で  
HSAによって高輝度発光するルシフェリン開発に成功

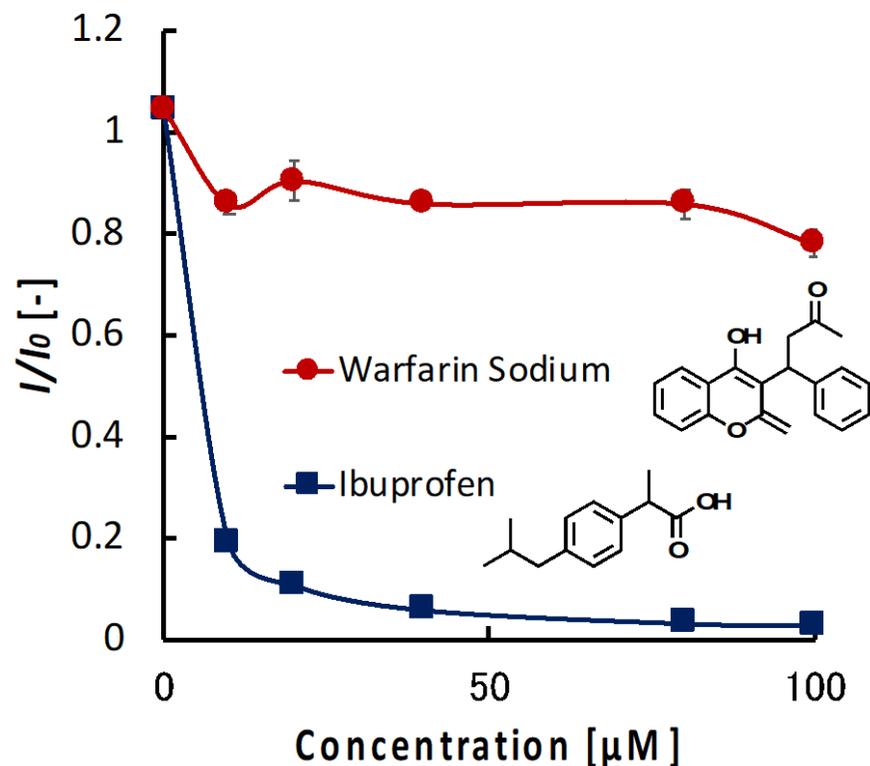
# HSAに対する特異性



HSAに対して高い特異性を持つルシフェリン開発に成功

# 高い特異性の理由

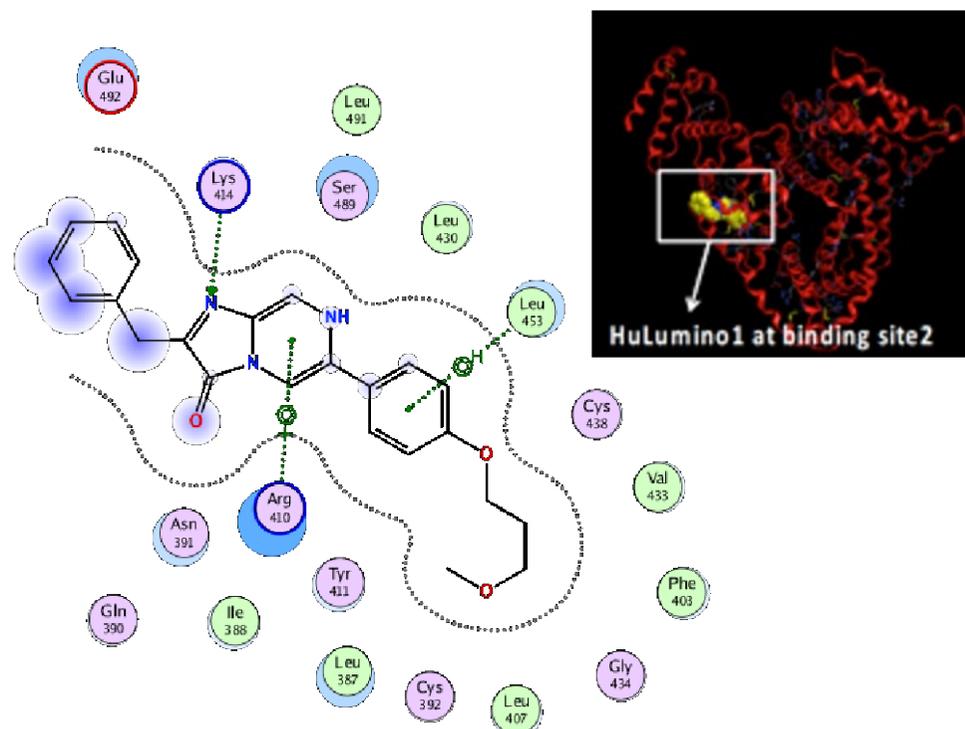
## 競争阻害反応 (HSA発光)



Ibuprofen存在下で発光強度が低下  
→同一サイトでの反応を示唆  
(Sudlow's drug site2)

## ドッキングシミュレーション

Molecular Operating Environment

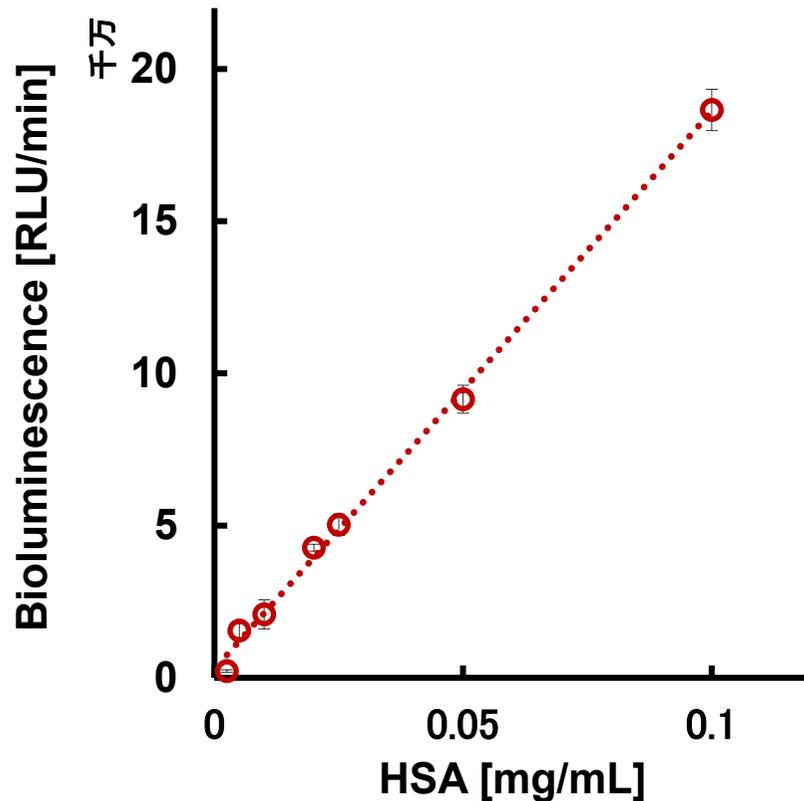


安定構造の推定と  
発光に寄与するアミノ酸の同定

タンパク質が有する疎水ポケット構造を認識して発光

# ELISAとの比較

## 検量線



Substrate : 20  $\mu$ M, 10 mM PBS pH7.4

## ヒト血清中のアルブミン定量

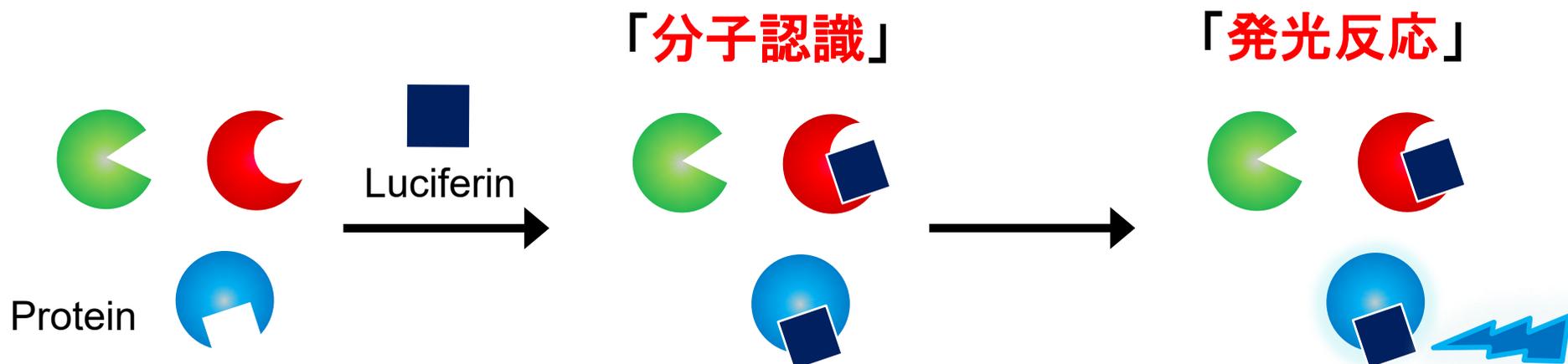
HSA [mg/mL] Bioluminescent assay <sup>a</sup>	HSA [mg/mL] ELISA <sup>b</sup>	Recovery
39.0 $\pm$ 3.1	41.0 $\pm$ 3.6	95.2

<sup>a</sup>発光測定時間: 1分

<sup>b</sup>ELISA (フナコシ社製、E88-29)測定時間: 約3時間

**(前処理なしで1分) ヒト血清サンプルのHSAを検出可能**

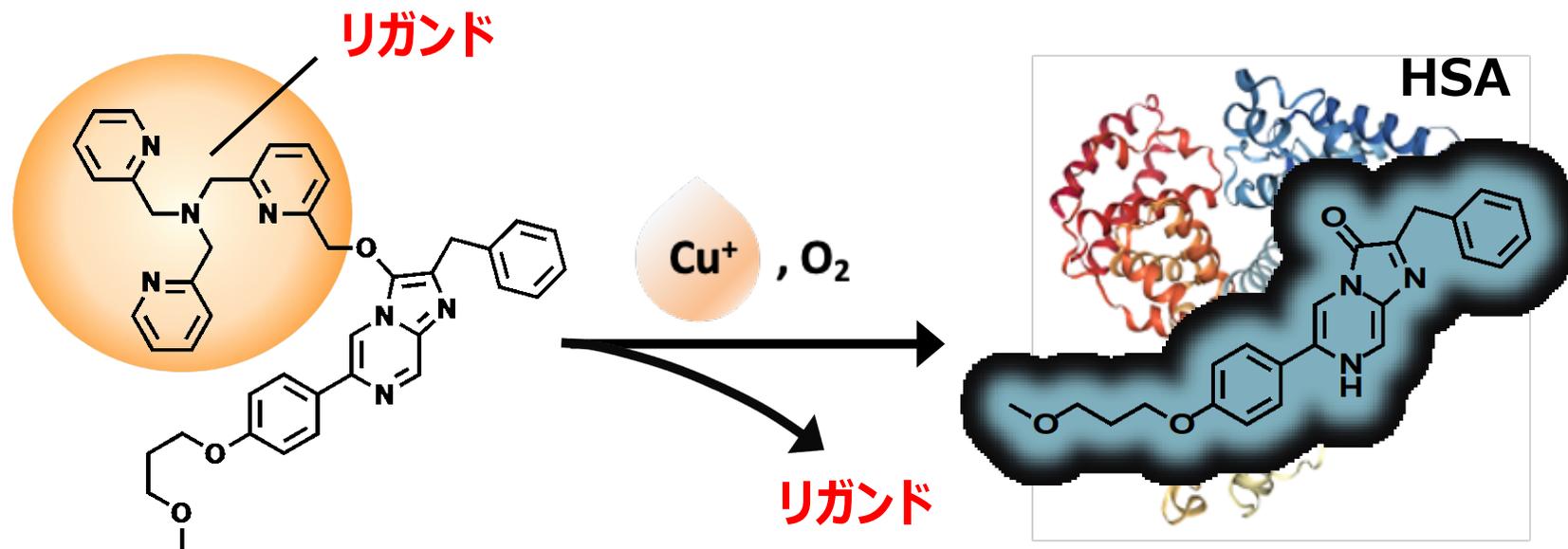
# 新技術の特徴1



- 「分子認識」と「化学反応(発光)」の2つの機能で混ぜるだけで目的タンパク質を検出。
- ELISAと同等の精度で検出。
- ELISAなどの従来法と比べて検出系がシンプルかつ迅速。

# タンパク質以外のバイオマーカー

## 血清中の金属イオン分析

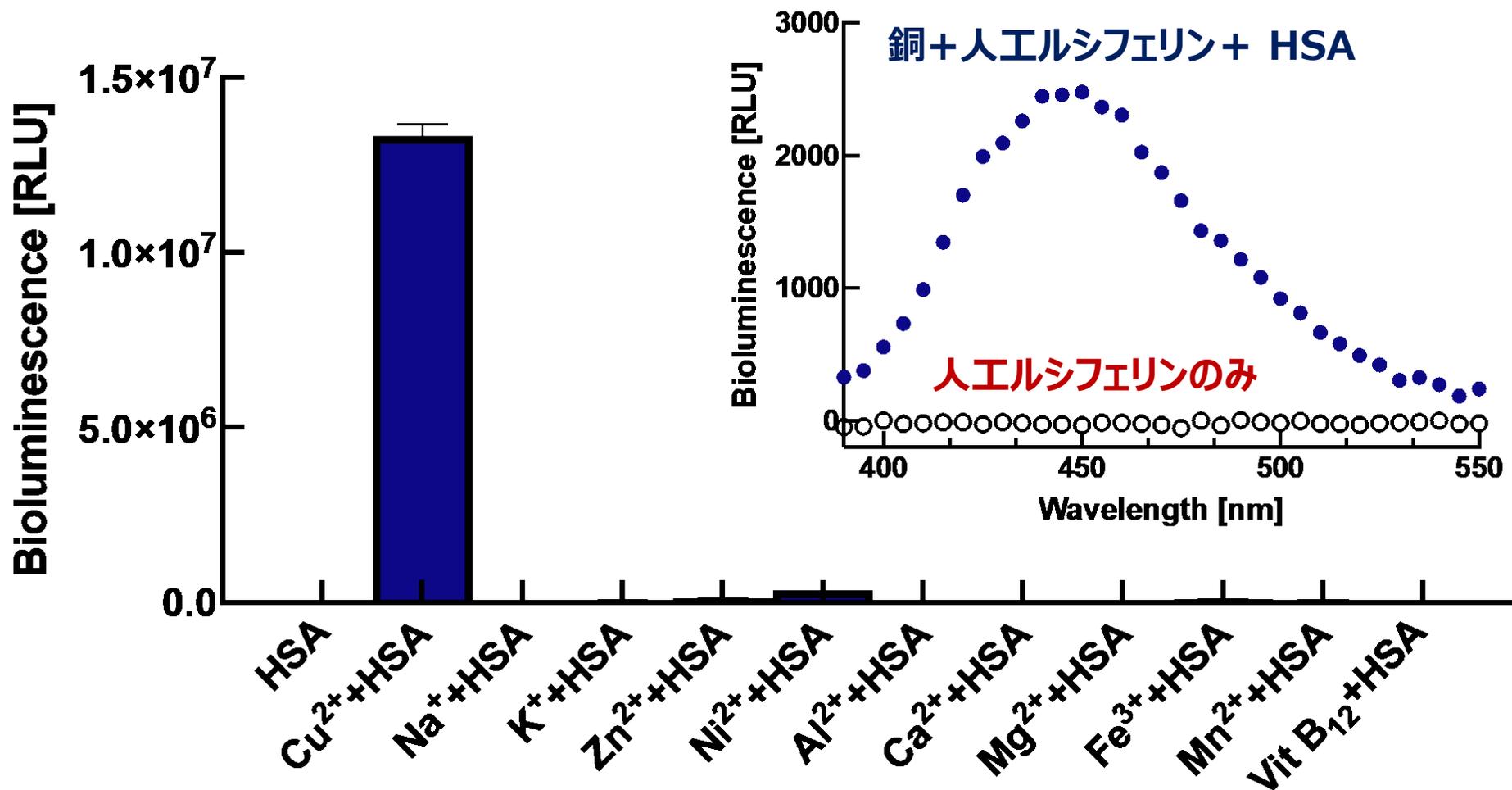


Nishihara R et al. *Analyst*, 2021, in press.

血清銅の異常低値：Wilson病、Menkes病の指標

タンパク質以外のバイオマーカー検出に転用可能

# 銅イオンに対する選択性

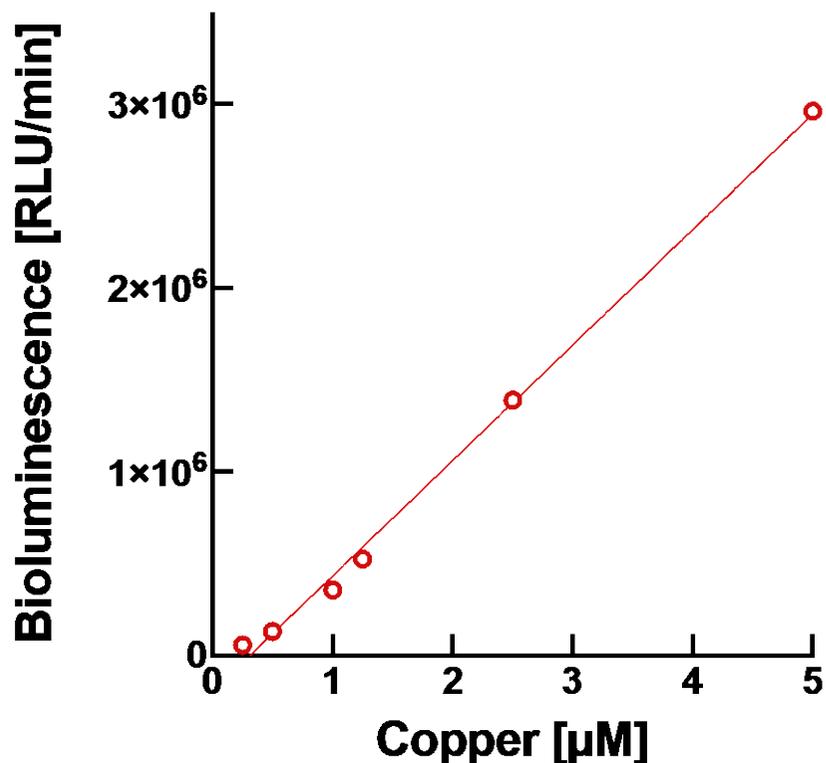


HSA : 20 μM, Substrate : 20 μM, 2 mM GSH, 10 mM HEPES pH7.4

試薬を混合するのみで銅イオンと特異的に反応

# 市販アッセイキットとの比較

## 検量線



Substrate : 20 μM, 10 mM HEPES pH7.4

## ヒト血清中の遊離銅

CuCl <sub>2</sub> added [μM]	Bioluminescent assay <sup>a</sup>	Assay kit <sup>b</sup>	Recovery
0.5	0.54 ± 0.00	0.52 ± 0.00	94.3
2.5	2.49 ± 0.05	2.60 ± 0.41	95.8
5	4.82 ± 0.05	5.00 ± 0.62	96.4

<sup>a</sup>発光測定時間: 1分

<sup>b</sup>Metallogenics社製(CU04M) 測定時間: 約10分

1分でヒト血清中の遊離銅を検出可能

## 新技術の特徴2

- **タンパク質以外のバイオマーカーも混ぜるだけで検出可能**  
(アルブミンが触媒)。
- **ルシフェリンの化学構造を修飾することで、その他のバイオマーカー検出も可能。**
- **発光生物由来の酵素(ルシフェラーゼ)フリーに発光検出。**

# 想定される用途

- 診断薬開発の技術シーズ
- タンパク質の品質管理  
(変性タンパク質で発光特性が変化)
- 生命科学分野における基礎的解析ツール

# 実用化に向けた課題

- 測定できるタンパク質が限定的
- デバイス実装による測定系の簡易化
- 発光試薬の安定性

## 企業への期待

- 測定したいタンパク質及び生体試料の提案とそれに対する共同研究を希望

# 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：発光基質化合物
- 出願番号：特願2020-046137,PCT/JP2021/010852
- 出願人：国立研究開発法人産業技術総合研究所
- 発明者：西原 諒、栗田 僚二

# お問い合わせ先

産業技術総合研究所  
知的財産部 技術移転室

T E L 029-862-6158

F A X 029-862-6159

e-mail [aist-tlo-ml@aist.go.jp](mailto:aist-tlo-ml@aist.go.jp)