

## 研究終了報告書

### 「発光反応場を構成するペプチドプローブ開発」

研究期間:2020年12月~2025年3月

研究者:西原諒

#### 1. 研究のねらい

10,000種以上存在する発光生物のうち、解明された天然ルシフェラーゼ構造はわずか2種(ホタルと発光珊瑚ウミシイタケ)で、生物発光反応に係るルシフェラーゼ構造やそのアミノ酸に関する知見は少なく、発光反応機構も十分に理解されていない。

本研究は、発光酵素ルシフェラーゼ機能を持つペプチドをボトムアップ的に設計合成するアプローチで、未知の生物発光反応機構の解明と細胞内動的高次構造体を非侵襲的に可視化できる発光イメージング基礎基盤技術の確立を目指した。ここでルシフェラーゼ機能とは、発光基質ルシフェリンの酸化発光反応を触媒する機能を指す。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

研究代表者はルシフェラーゼとして認識されていないヒト血清アルブミン(HSA:ヒトが持つタンパク質)にもルシフェラーゼ機能が潜在的に備わっていることを世界で初めて明らかにした(Nishihara *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2020, *Analyst*, 2021)。HSAより発見した発光反応に係るアミノ酸を組み込んだペプチドを固相合成した結果、海洋発光生物に含まれる天然ルシフェリンの発光反応を触媒する、ルシフェラーゼ機能を持つことが分かった。ルシフェラーゼ機能に必要なペプチドの長さ・構造・アミノ酸を検討した結果、最短で14アミノ酸かつ、 $\beta$ -シート構造(または $\alpha$ -ヘリックス構造)の2次構造を持つペプチドでのみ、ルシフェラーゼ機能が確認された。また、発光反応には塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が必要であることが分かった。塩基性アミノ酸はルシフェリンの酸化反応を開始させ、疎水性アミノ酸には酸化反応効率を高める役割があると考えられる。更に、天然ルシフェリンではなく、ペプチドに適したルシフェリンを設計合成すると、発光強度を300倍以上向上することにも成功した。本研究で開発した最大発光強度を示すルシフェリンとペプチドの組み合わせは、発光珊瑚由来の天然ルシフェラーゼに近い発光量子収率も示した(特願2021-148584, PCT/JP2022/034659)。更に、ペプチドを2量体や3量体にタンデム化させた場合、発光強度の更なる向上を確認できた。これらの性質から、本研究で開発したペプチドは生体分子の離散集合の過程を、非侵襲的に可視化できる新規な発光イメージング技術としての応用展開が期待できる。

また、ペプチド設計開発研究を推進していく過程で、HSAだけでなく、SARS-CoV2粒子表面に存在するスパイクタンパク質にもルシフェリン発光の触媒機能がある事を発見(Nishihara *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, 2024)、ルシフェリンに対するタンパク質の様々な分子認識様式が見えてきた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ 1 「発光反応場を形成するペプチドとそれに適したルシフェリンの設計合成」

HSA にはルシフェリンを結合できる場所として 2 つの薬物結合サイトがある(図 1(a))。各結合サイトで見出した発光反応に係るアミノ酸を連結したペプチドを設計合成すると、KE18(結合サイト 1 由来)が天然に存在する発光基質 Coelenterazine(発光珊瑚由来)と *Cypridina* Luciferin(ウミホタル由来)の発光(酸化)反応を促進させる、ルシフェラーゼ機能を持つことが分かった(図 1(b)-(c))。18 アミノ酸程度の小さいペプチドがルシフェラーゼ機能を示す結果は、前例がない。

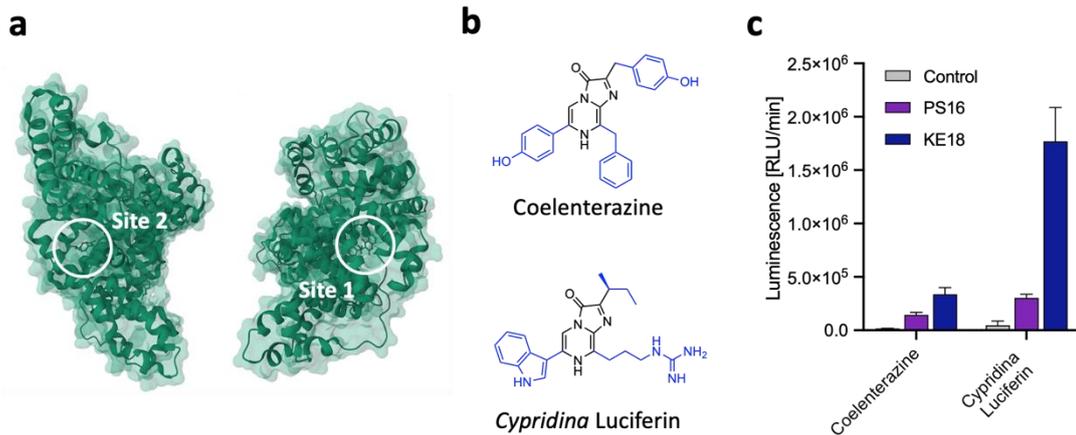


図 1 (a)HSA の薬物結合サイト(Site1-2) (b)天然に存在する発光基質:Coelenterazine, *Cypridina* Luciferin (c)Site1 のアミノ酸で構成した 18 アミノ酸ペプチド(KE18)と Site2 のアミノ酸で構成した 16 アミノ酸ペプチド(PS16)の発光活性

次に、ルシフェラーゼ機能に必要なペプチドの長さやアミノ酸種の検討を実施した(図 2)。KE18 を基に欠損ペプチドを合成した結果、C 末端側を欠損させたペプチド(KI16~KL10)は発光活性が失われたが、N 末端側を欠損させたペプチド(AE15~LE13)は KE18 よりも高い発光活性を示した(図 2(a)-(b))。各ペプチドの CD スペクトル結果より、高活性なペプチドはいずれも  $\beta$ -シート構造を形成する傾向にある(図 2(b):218 nm の CD スペクトル値は  $\beta$ -シート構造由来)。更に MD シミュレーションにより、最も高活性であった 14 アミノ酸ペプチド(RE14)は  $\beta$ -ストランド構造(反平行  $\beta$ -シート)を形成することを確認した(図 2(c))。RE14 の 1 アミノ酸をグリシン(G)に置換していくと、7 番目アミノ酸を G 置換したペプチド(以下 RE14G7 と呼ぶ)で最も高い発光強度を確認できた(図 2(d))。7 番目のアミノ酸は、予測  $\beta$ -ストランド構造の loop 部分に当たる。7 番目のアミノ酸をバリン(V)に置換すると  $\beta$ -シート構造と発光活性が消失した(図 2(e))。V は  $\beta$ -ストランド構造安定化させる効果があり、loop 部分によく使用されるアミノ酸であるが、ルシフェラーゼ機能を持つペプチドの場合は flexible な loop 部分が必要であることが分かった。また図 2(d)の G 置換試験より、発光反応には塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が必要であることが示された。ペプチドは、塩基性アミノ酸から成る親水面と疎水性アミノ酸から成る疎水面を持つ両親媒性で、前者はルシフェリン(7 位のアミド部分)の脱プロトンを誘発して酸化反応を開始、後者は酸化反応効率を高める役割があると考えられる。

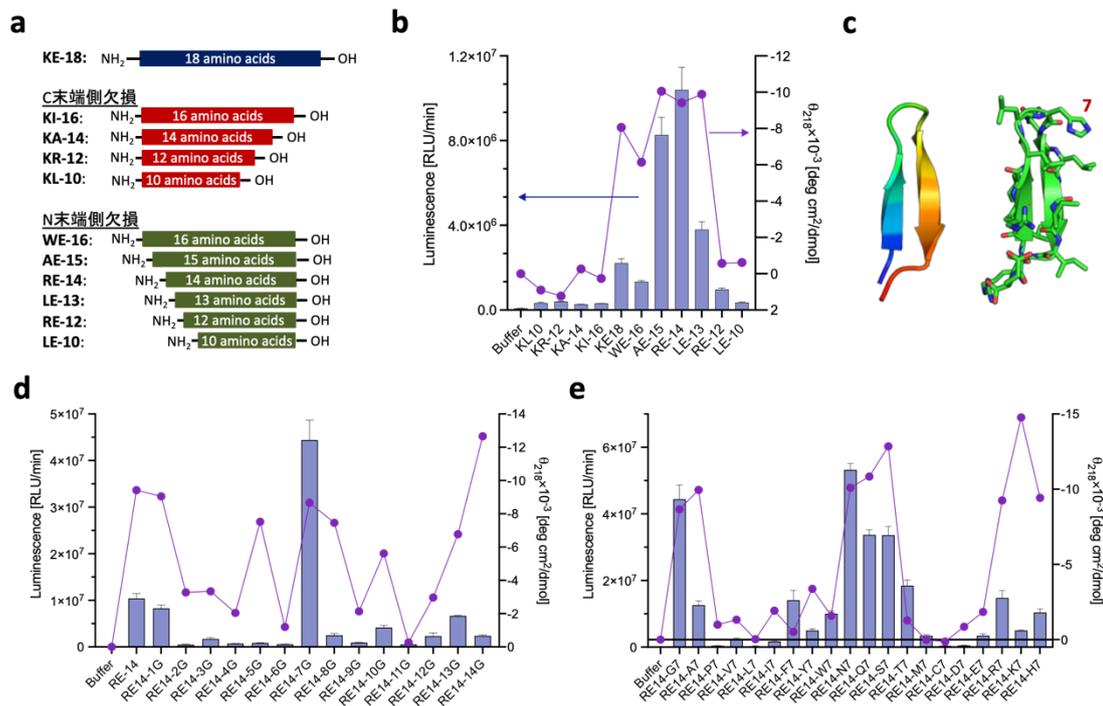


図2 (a)KE18の欠損型ペプチドの分子設計 (b)各ペプチドの *Cypridina* Luciferin に対する発光活性と 218 nm の CD スペクトル値 (c)MD シミュレーション(Amber18)で予測した RE14 構造 (d)RE14 の Gly 置換ペプチドの発光活性と CD スペクトル値 (e)RE14 の 7 番目アミノ酸を変異させたペプチド発光活性と CD スペクトル値

次に、本研究ではルシフェリン化学構造改変による、発光強度の更なる向上を狙った。*Cypridina* Luciferin にはイミダゾピラジノン(IPT)環と呼ぶ発光基本構造が含まれており、このIPT 構造を維持すれば、ルシフェリンは原理的に発光できる。そこで IPT 環の R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub> 置換基を最適化することで(図 3(a))、RE14 ペプチド系におけるルシフェリン発光量子収率向上を目指した。新規に 12 種類のルシフェリン(*Cypridina* Luciferin Analog: CLA)(図 3(a))を合成した結果、CLA8 は *Cypridina* Luciferin の約 300 倍もの発光強度向上に成功した(図 3(a)-(b))。感度校正したルミノメータで CLA8/RE14G7 量子収率を測定した結果、その値は天然ルシフェラーゼ Rluc(4.7)に近い値を示した。

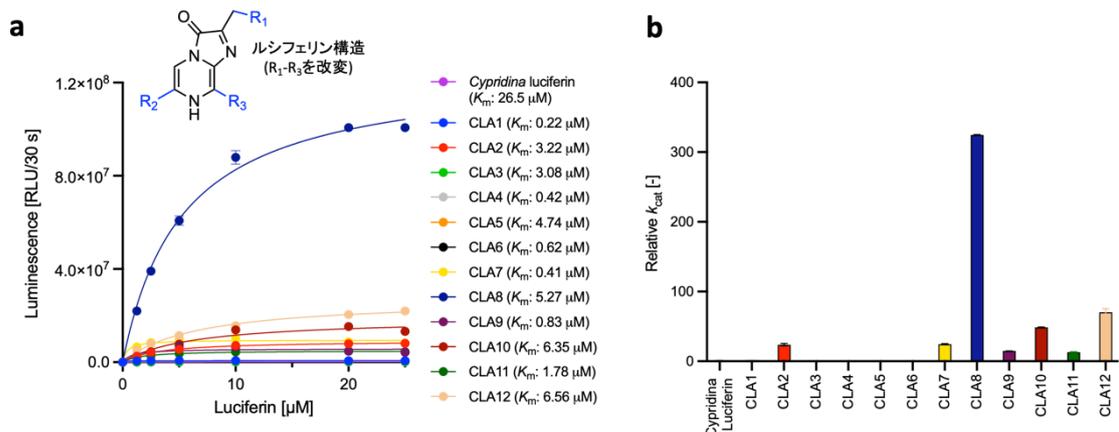


図3 (a)IPT 環を含むルシフェリン化学構造と RE14G7 発光強度の合成ルシフェリン濃度依存性 (b)CLA1-12 における  $k_{cat}$  値の比較

研究テーマ2「タンデム化ペプチドと発光活性の相関検証」

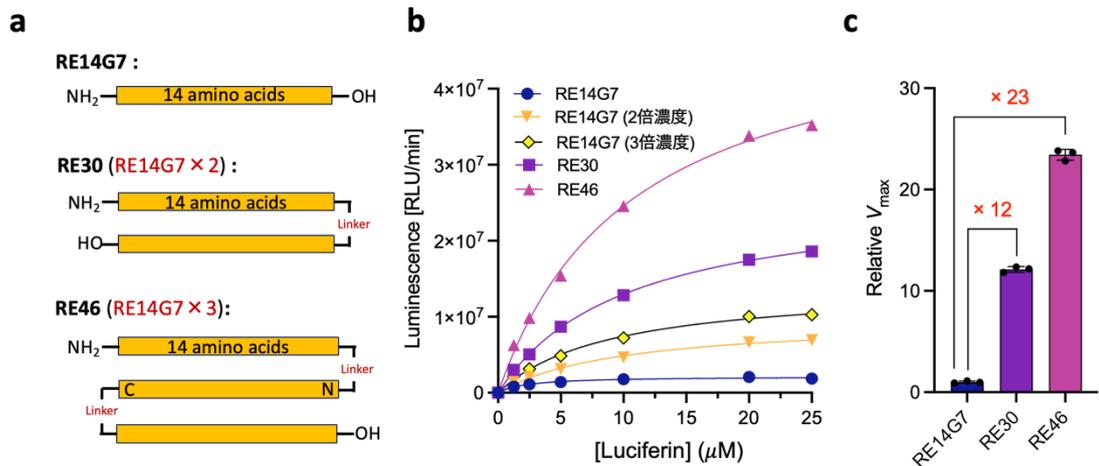


図4 (a)タンデムRE14G7の分子設計 (b)タンデムRE14G7発光強度のルシフェリン濃度依存性 (c)  $k_{cat}$  値の比較

RE14G7をリンカーを介して、2量体(RE30)及び3量体化したタンデムRE14G7(RE46)を設計、固相合成により開発した(図4(a))。その結果、タンデム化したRE14G7はいずれも単量体RE14G7より発光強度が高く(図4(b))、その $k_{cat}$ 値は単量体のそれより、非線形的に上昇することが判明した(図4(c): RE30及びRE46の $k_{cat}$ 値は単量体RE14G7よりも各々12倍、23倍と高い)。これらの測定結果より、ペプチドは多量化すると、ルシフェリン発光をより高効率に促進させることが新たに分かった。これらの知見を基に、単量体ペプチドを外的刺激で自己集合させると、確かに強い発光を観察できた(データ非公開)。今後、生体分子の離散集合を可視化する、新規な発光プローブとしての利用が期待できる。発光ペプチドの構造決定後、速やかに論文投稿する予定である。

研究テーマ3「ルシフェラーゼ機能を持つタンパク質の探索と新たな反応様式の提案」

研究テーマ1~2のペプチド分子設計は、ヒト血清アルブミン(HSA)発光より見出した発光反応場を参考に行っている。ペプチド開発研究を推進していく過程で、HSAだけでなく、SARS-CoV

2粒子表面に存在するスパイクタンパク質にもルシフェリン発光の触媒機能がある事を見出した。スパイクタンパク質はそのタン

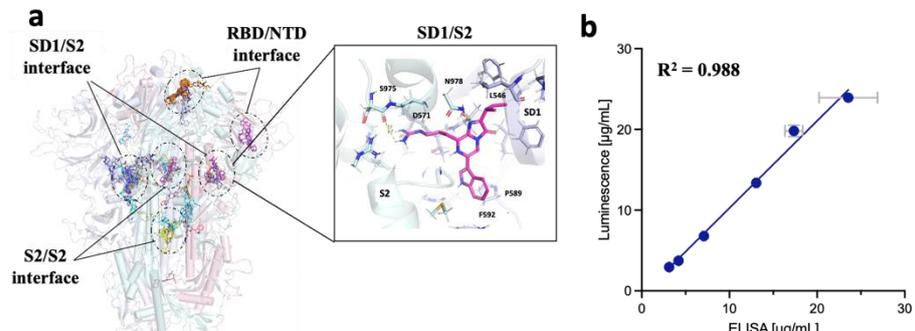
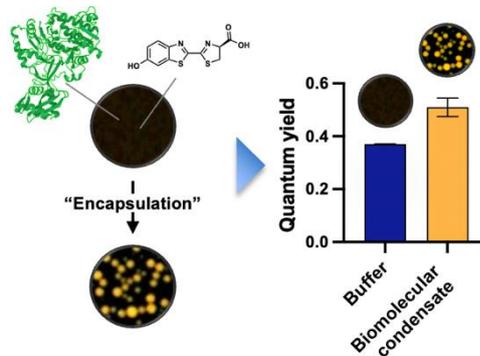


図6 (a)ルシフェリンとスパイクタンパク質のドッキングシミュレーション結果:ルシフェリンが結合し得る場所は、タンパク質ドメイン間の界面。(b)唾液を検体としたスパイクタンパク質の添加回収試験:ELISA法との比較結果。

パク質ドメイン間の界面で *Cypridina Luciferin* を選択的に発光させる事が、領域内共同研究で明らかとなった(図 5(a))。生物発光は通常、ルシフェラーゼ分子の活性ポケットが発光反応場になるとされるが、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の場合は一時的なドメイン間界面が発光反応場になり得る、原理的に新規な発光機構であることが分かった。この結果は、ペプチド発光反応機構の解明に資する重要な知見である。また本研究は、*Cypridina Luciferin* をヒト唾液に添加するだけで、ELISA(酵素免疫測定法)と同等の精度で SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を 1 分で検出できる(図 5(b))。簡便かつ迅速なウイルスタンパク質の計測技術として有用であることも判明した。本成果は、「ACS Central Science」誌(Supplementary カバーにも採用)にて発表した。

#### 研究テーマ4「分子集合体が創る高効率的な発光反応」

発光反応の明るさの定量的評価は、ルシフェリンとルシフェラーゼのみを含む理想的な条件で決定されたものが殆どである。生物発光による細胞内の光イメージング応用が進んでいる一方で、細胞内で高濃度に濃縮されたルシフェラーゼの発光反応特性は詳細に検討されてこなかった。しかし、研究テーマ2の結果を鑑みると、ルシフェラーゼが集合体を形成する場合も、その発光反応効率に大きな影響を与えるはずである。近年、生体分子が液-液相分離して形成した液滴が、細胞内生体分子を時空間的に区画化、細胞内酵素反応の効率を高めるとされる。そこで研究代表者は、電荷の異なる分子(ペプチドと ATP)間の静電相互作用を駆動力とした液-液相分離で形成される人工液滴モデルを作成、これに北米産ホタルルシフェラーゼを濃縮させ、発光酵素反応を検討した。その結果、液滴内へのルシフェラーゼ濃縮が酵素反応速度を大幅に上昇させ、生物発光量子収率を 10%も向上することが判明した(図 7)。市販の発光測定器ルミノメータは検出感度が発光波長(色)に依存するため正確な量子収率は困難であったが、産総研標準計測グループと共同で標準光源を用いたルミノメータの感度校正法を確立することで、これを可能にした。ルシフェリン及びルシフェラーゼ変異体を合成する事で、発光活性を改善する例はあるが、本研究のように発光分子の離散集合を利用して発光の高効率化を実現した例はない。本成果は、「Chemical Communications」誌(フロントカバーにも採用)にて発表した。



### 3. 今後の展開

#### 低分子発光ペプチドが拓く生物発光研究の新展開

本研究で開発した発光するペプチドは非侵襲的な発光イメージングプローブとして有用である。既存のルシフェラーゼは遺伝子工学技術により標的的生体分子(タンパク質等)に融合させることで、生細胞の局所でも標的分子を可視化できるため、細胞生物学研究で広く利用されている。しかし、既存のルシフェラーゼは小さくても 19 kDa 程度であり、融合させる生体分子の種類や挿入位置によっては、観察対象の本来の機能や構造が損なわれる可能性は無視できない。一方、発光ペプ

チドは 2 kDa 以下の低分子であるため、従来技術では課題となっていた観察対象分子本来の機能や構造に干渉する可能性は極めて低い。特にタンパク質の繊維化が原因で発症する疾病メカニズム(アルツハイマー型認知症)の解明を指向したイメージングに、既存のルシフェラーゼは不向きである。本研究で開発したペプチドは集合状態で高活性化するため、タンパク質の繊維化等の動的構造変化を非侵襲かつ高感度にイメージングできる技術として、今後の展開が期待できる。

#### 将来的な社会実装

生物発光反応には通常、発光生物由来の酵素ルシフェラーゼが必要である。一方、本研究では、ルシフェラーゼではないタンパク質(ヒト血清アルブミン、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質等)にも、基質ルシフェリン発光を触媒するルシフェラーゼ機能があることが分かってきた。これらの発見は、ルシフェリンを混合するだけで、標的タンパク質を従来技術以上に簡便かつ迅速に計測する、新たなタンパク質分析技術開発に繋がる。当該技術については特許を複数出願しており、2021年 JST 新技術説明会で発表したところ、多数の企業より問い合わせがあり、共同研究にも発展した。今後、社会実装に向けた活動も積極的に推進する。

#### 4. 自己評価

##### 研究目的の達成状況

ルシフェラーゼ機能を持つペプチドの開発とそれに合わせたルシフェリン設計開発を行った。最大発光強度を示したペプチド(RE14G7)-ルシフェリン(CLA8)の組み合わせは、天然ルシフェラーゼ(Rluc)と同等の発光強度(生物発光量子収率)を示したことから、ペプチドプローブとルシフェリンの開発は概ね達成できたと評価する。さきがけ領域内外の研究者と共同でペプチド構造解析も進めており、構造解析後に発光反応メカニズムを考察、論文投稿する予定である。

##### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は研究代表者が主導して、さきがけ領域内外の研究者との連携を通して研究を進めた。具体的には、ペプチドの MD シミュレーション、基質とタンパク質のドッキングシミュレーション、ペプチドのタンデム化実験、ペプチド構造解析を共同で進めた。本研究プロジェクトに係る研究費はルールに従って適切に執行した。

##### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究成果はいずれも、新原理に基づいた発光研究の成果であり、科学技術及び社会・経済への波及効果は極めて高い。3.の今後の展開でも述べた通り、発光生物由来の酵素ルシフェラーゼに頼らないタンパク質分析技術は既に企業連携が進んでおり、産業競争力の強化にも貢献する。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の発光分析技術は、産総研-理研での共同プレス発表及び ACS(アメリカ化学会)プレス発表も行なった。更にルシフェラーゼ機能を持つペプチド開発研究で得た「分子集合体がルシフェリン発光反応場を形成する」という知見は、未知の生物発光機構を紐解く礎となる可能性があり、分子集合が関連する生命現象を非侵襲的かつ高感度に観察できる、新たな生物発光イメージングプローブとしての利用が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 4件

1. Ryo Nishihara* and Ryoji Kurita*, Mix-and-read bioluminescent copper detection platform using a caged coelenterazine analogue, <i>Analyst</i> , <b>2021</b> , <i>146</i> , 6139-6144.
ヒト血清アルブミン(HSA)で発光するルシフェリンの酸化反応部位(3 位カルボニル基)に保護基(TPA リガンド)を導入すると、HSA の発光活性は一時的に失われるが、銅イオンが共存する場合でのみ、保護基の酸化脱離が生じて発光活性が回復する。この仕組みで、前処理していないヒト血清にルシフェリンを添加するだけで、血清中の遊離銅(タンパク質と結合していない)の特異的な発光検出に成功した。血清遊離銅の異常高値は Wilson 病や Menkes 病のバイオマーカーである。ヒト由来タンパク質のルシフェラーゼ機能を利用すれば、タンパク質だけでなく、金属イオンなどのバイオマーカー分子も計測できることを初めて明らかにした。
2. Ryo Nishihara*, Yoshiki Kihara, Kazuki Niwa, Masahiro Mimura, Shunsuke Tomita*, and Ryoji Kurita, Quantum yield enhancement of firefly bioluminescence with biomolecular condensates, <i>Chemical Communications</i> , <b>2022</b> , <i>96</i> , 13317-13320.
異なる分子間の静電相互作用によって形成される人工液滴の中で、北米産ホタルルシフェラーゼの酵素反応を詳細に検討した。その結果、液滴内の微小環境変化が酵素反応に大きく作用し、生物発光量子収率の向上にも繋がる事が判明した。ルシフェリン及びルシフェラーゼ変異体を合成する事で、発光活性を改善する例はあるが、本研究のように物理化学的手法による発光の高効率化を実現した例は少ない。本成果は、細胞内生体分子の定量を指向した、次世代発光イメージング技術のための重要な知見になると考える。
3. Ryo Nishihara*, Hisham M. Dokainish, Yoshiki Kihara, Hiroki Ashiba, Yuji Sugita, and Ryoji Kurita*, Pseudo-Luciferase Activity of the SARS-CoV-2 Spike Protein for <i>Cypridina</i> Luciferin, <i>ACS Central Science</i> , <b>2024</b> , <i>10</i> , 283-290.
SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と特異的に発光酵素反応を起こすルシフェリンを世界で初めて開発した。ルシフェリンは、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質のみと発光反応を引き起こし、同じコロナウイルスの MERS-CoV のスパイクタンパク質やその他のヒト由来タンパク質では全く反応しない。この極めて高い特異性から、サンプル前処理なしに、ルシフェリンをヒト唾液と混ぜるだけで標的とする唾液中 SARS-CoV-2 スパイクタンパク質濃度を、ELISA(抗体を使用した免疫学的測定法)と同等の精度で定量する事に成功している。ELISA の測定時間は約 3 時間であるが、本技術は約 1 分で定量分析できるなど、測定時間の大幅な短縮と簡便な発光測定を実現した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	西原諒、栗田僚二
	発 明 の 名 称	発光反応を触媒するペプチド
	出 願 人	国立研究開発法人産業技術総合研究所
	出 願 日	2021/09/13, 2022/09/12(PCT 出願)
	出 願 番 号	特願 2021-148584, PCT/JP2022/034659

	概 要	生物発光は、発光生物由来の発光基質と発光酵素の化学反応で光を放つ。本発明では、発光基質化合物の発光反応を触媒する中分子ペプチドを開発した。見出したペプチド配列は、いずれも天然には存在せず、人工的に合成開発された既知ペプチド配列とも全く異なる。新規ペプチド配列、その配列を含んだ化合物、更にはそれら化合物の使用用途等に関する内容で特許出願した。
--	-----	---

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(招待講演のみ)

1. 「タンパク質の副業 ～隠された発光機能～」、西原諒、The 179th Science (2024年2月28日)
2. 「酸化反応に伴う発光現象の新展開」、西原諒、第1回 MA-T 学会年会 (2023年11月18日)
3. 「Pseudo-luciferase activity of non-bioluminescent protein」、Ryo Nishihara, *Bio seminar*, Vidyasirimedhi Institute of Science and Technology (VISTEC), Rayong, Thailand (2023年7月12日)
4. 「非発光タンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性」、西原諒、第23回日本蛋白質科学会年会 (2023年7月7日)
5. 「発光酵素反応の再考」、西原諒、革新的先端研究開発支援事業(AMED-CREST/PRIME)「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」研究開発領域 令和4年度シンポジウム「タンパク質研究はいま新たなステージに入ろうとしている」(2022年12月13日)

主要な著書

1. SUPER サイエンス 生物発光が人類の未来を変える、シーアンドアール研究所、240 ページ、2024年、近江谷克裕、西原諒、ISBN 4863544421
2. Design of Coelenterazine Analogue to Reveal Bioluminescent Reaction of Human Serum Albumin, book chapter in *Bioluminescence*, Editor: Hirobumi Suzuki, 13 pages, 2021, Ryo Nishihara\*, Kazuki Niwa, Tatsunosuke Tomita and Ryoji Kurita

主要なプレスリリース

1. ウイルスのスパイクタンパク質でウミホタルの発光基質が発光、国立研究開発法人産業技術総合研究所 (2024年1月17日)、URL:  
[https://www.aist.go.jp/aist\\_j/press\\_release/pr2024/pr20240117/pr20240117.html](https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2024/pr20240117/pr20240117.html)
2. Glowing COVID-19 diagnostic test prototype produces results in one minute, American Chemical Society (2024年1月17日)、URL:  
<https://www.acs.org/pressroom/presspacs/2024/january/glowing-covid-19-diagnostic-test-prototype-produces-results-in-one-minute.html>