

発光酵素の蛋白質工学とそのセンサー化

○上田 宏¹

(¹東工大 研究院化生研)

私が生物発光と発光酵素の魅力に取りつかれてはや四半世紀が過ぎた。今回は、発光酵素を材料とした蛋白質工学と、センサー化についての我々のこれまでの試みを簡単にご紹介したい。

1) 発光酵素関連の蛋白質工学

発光研究を始めた当初は、ある企業がクローン化したウミホタルルシフェラーゼ(*Cluc* / *Vluc*)を免疫測定へ応用するため、抗体結合タンパク質と結合させたレポーターとして動物細胞で発現させ、その性質を調べていた。この際、抗体結合タンパク質としてプロテイン A を用いた場合には何も問題なく抗体検出に用いることができたが、より多くの抗体に結合するはずのプロテイン G を用いた際には全く抗体に結合しない事が判明した¹。試行錯誤の結果、 α ヘリカルプロテインであるプロテイン A を挟むとプロテイン G の活性が回復することがわかり、これはその後融合タンパク質の2つのドメインを機能的に結合させるための剛直リンカー(EAAAK)_nの研究²に繋がった。

次いで興味を持って行ったのは、ホタルルシフェラーゼ *Fluc* の発光色決定機構である。当時既に、ゲンジボタル酵素にランダム変異導入することで、その発光色が顕著に変化する事が知られており、多くの方々のご協力を得つつ、同じ事をヒメホタル酵素で試してみた。この結果、短波長から長波長まで様々な変異体を得られたが、その中に、ホタル酵素で通常見られる発光波長の pH 依存性が少ない変異体 V368A が見つかった³。興味深い事に、この変異体にアメリカホタル酵素(以下 *Ppy*)で知られる熱安定化変異を加えると更に波長変化が減少し、発光色決定機構と構造安定性に相関がある可能性を見出すことが出来た。

またほぼ同時に興味を持ったのは、*Fluc* の短縮化である。以前、繰り返し配列を持つ *Vluc* を約半分短縮しても発光活性が維持されるという結果を得ていた⁴ 事もあり、同様のアプローチを *Fluc* に適用してみた。その頃2つのドメインからなる *Ppy* の立体構造が報告されたことから、N 末ドメイン(以下 N ドメイン)のみを発現させてみた。すると大変興味深い事に、通常基質(LH₂+ATP)を用いた場合の N ドメインの発光は野生型に比べて顕著に弱く、かつ時間を要したが、反応中間体であるアデニル化ルシフェリン LH₂-AMP を用いると瞬時に明るく発光することが判明した⁵。おそらく通常基質と N ドメインで生じた LH₂-AMP 中間体は酵素外に漏れ出し、溶液中の中間体濃度に応じて発光すると考えられた。またこれにより、N ドメインを用いて反応開始後すぐに発光量を測定すれば、通常基質の存在下でも LH₂-AMP を選択的に検出できる簡便迅速な手法となることがわかった⁶。さらに中間体測定より、*Ppy* の発光活性変異体のうち K433A 変異体と H245D 変異体は、中間体産生に至るアデニル化活性は残っているが酸化発光活性が大幅に減少していること、K529A 変異体においてはアデニル化活性は大幅に減少しているが LH₂-AMP を用いた酸化発光活性は保たれていることが明確になり、本酵素が2つの半反応を異なる活性残基を用いて行っている⁷ 事を支持する結果となった。

2) タンパク質間相互作用検出への応用

発光酵素を用いたタンパク質間相互作用(PPI)検出系としては、PPI による Luc の再構成を発光で検出する protein-fragment complementation assay (PCA)と、酵素から蛍光団へのエネルギー移動による発光波長変化を利用する bioluminescence resonance energy transfer (BRET)が一般的であり、主に細胞内での PPI 検出に多用されている。我々は上記の結果から、これらとは異なり *Fluc* 変異体間での LH₂-AMP の受け渡しを原理とする PPI 検出系を考案した。分割 *Fluc* を利用する PCA においては、試験管内ではプローブの安定性が足りずに安定な信号検出が難しかったが、*Fluc* 変異体のスクリーニングを続けた所、試験管内と細胞内の両方でワークする系を構築でき、これを firefly luminescent intermediate-based PPI assay (FlimPIA)と名付けた⁸。その後変異導入による改良を加えて、シグナル(S/B 比)と安定性も向上してきた⁹。ただ最も明確な S/B 比が出るのは基質添加後数秒以内であり、その後は漏れ出た中間体によるバックグラウンド発光で結果が不明瞭になる問題が解決出来ていない。本原理は類似のファミリー酵素でも利用可能であり、もう少し可能性を探りたいと思っている。

3) 発光免疫測定法への応用

そうこうするうち、より小さく明るい Nanoluc (NLuc)と、これを用いた PCA 系 NanoBiT と BRET 系 NanoBRET が上市され、試験管内細胞内の両方で良い性能を示す事が知られるようになった。安定性も高い事から、我々もこれを改良して2つの抗体断片間の相互作用変化を検出し、間接的に低分子抗原を混ぜるだけで非競合的に検出可能な open-sandwich bioluminescent immunoassay (OS-BLIA)を構築した¹⁰。Dixonらの ternary complementation の焼き直しではあるが、その高い発光強度から肉眼でも抗原依存的な信号増加が観察できる点は優れている。

最後に、BRET と蛍光免疫測定法との組み合わせについて述べたい。我々は以前、抗体のエピトープペプチドを Ppy の N 末端に付加し、これを認識する抗体の N 末端を蛍光色素で修飾し、両者を混合することで、Ppy から蛍光色素(Cy3, Cy3.5)への発光共鳴エネルギー移動を利用して競合免疫測定を行う事に成功した¹¹。またレニラルシフェラーゼ RLuc と YFP を用いた OS-BLIA にも成功した¹²が、それらの応答は決して大きいとは言えなかった。最近、部位特異的に蛍光色素を修飾したセンサー抗体であるクエンチ抗体(Q-body)と NLuc を組み合わせる事で、Q-body 自体の蛍光より優れた最大 12 倍の発光応答とより高い感度を得ることに成功した¹³。これらは励起光が不要で、発光色変化で抗原検出が可能になる事から、スマートフォンを利用した Point of care test (POCT)に応用できる可能性も高いと考えている。

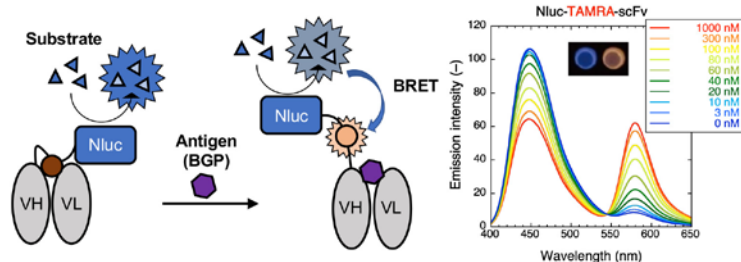


図 1 : BRET Q-body のスキームとスペクトル変化

4) おわりに

現在、大室らが Kim らにより構築された artificial luciferase (ALuc)¹⁴ の短縮化についての試みを進めている。現状、これまで報告された発光酵素の中では最小サイズでありながら、試験管内では NLuc に近い発光強度が得られており、今後の進展が期待される。末筆ながら、研究遂行の色々な場面でお世話になった先生方に改めて御礼申し上げたい。

References

1. Maeda, Y.; Ueda, H.; Kazami, J.; Kawano, G.; Suzuki, E.; Nagamune, T. *Anal. Biochem.* **1997**, *249*, 147-152.
2. Arai, R.; Ueda, H.; Kitayama, A.; Kamiya, N.; Nagamune, T. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 529-532.
3. Kitayama, A.; Yoshizaki, H.; Ohmiya, Y.; Ueda, H.; Nagamune, T. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 333-338.
4. Maeda, Y.; Ueda, H.; Kazami, J.; Kawano, G.; Suzuki, E.; Nagamune, T. *J. Biochem.* **1996**, *119*, 601-603.
5. Zako, T.; Ayabe, K.; Aburatani, T.; Kamiya, N.; Kitayama, A.; Ueda, H.; Nagamune, T. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1649*, 183-189.
6. Ayabe, K.; Zako, T.; Ueda, H. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 4389-4394.
7. Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Wilkinson, S. R.; Khattak, N. F.; Rosenberg, J. C.; Zimmer, M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 1385-93.
8. Ohmuro-Matsuyama, Y.; Nakano, K.; Kimura, A.; Ayabe, K.; Ihara, M.; Wada, T.; Ueda, H. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7935-7940.
9. Ohmuro-Matsuyama, Y.; Gomi, K.; Shimoda, T.; Yamaji, H.; Ueda, H. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 778120.
10. Ohmuro-Matsuyama, Y.; Ueda, H. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 3001-4.
11. Yamakawa, Y.; Ueda, H.; Kitayama, A.; Nagamune, T. *J. Biosci. Bioeng.* **2002**, *93*, 537-542.
12. Arai, R.; Nakagawa, H.; Tsumoto, K.; Mahoney, W.; Kumagai, I.; Ueda, H.; Nagamune, T. *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 77-81.
13. Takahashi, R.; Yasuda, T.; Ohmuro-Matsuyama, Y.; Ueda, H. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 7571-7578.
14. Kim, S. B.; Torimura, M.; Tao, H. *Bioconjug Chem* **2013**, *24*, 2067-75.