

The Bioluminescence Advantage

生物発光の利点

By Keith V. Wood, Ph.D., R&D Director, Research Fellow, Promega Corporation

アブストラクト

科学者は異なる実験目的ごとに様々な発光反応（光子放出）を利用していますが、生物発光が次第に多くの分析タイプで優先的に選ばれているようになってきました。本稿では、生物学的分析法に生物発光を導入する利点とその理由について概説します。

生物発光の特性

生命科学研究で用いられる多くの定量方法の中でも、発光反応（光子放出）はその特性である高い感度と使い易さにより最も汎用されています。これらの反応様式は、光子を生み出すために必要なエネルギーの獲得の仕方により分類されています。最も広く利用されている反応である蛍光発光は、エネルギー源として光子を利用するため光子発光（フォトルミネセンス）とも呼ばれています。その他の例として、化学エネルギーを利用した化学発光、放射能（例：シンチラント [scintillants]）を利用した放射性発光および電気を利用する電気発光などがあります。

生物発光は化学発光の一種で、発光反応は酵素反応など自然の触媒作用により起こり、発光性のホタル、クラゲ、バクテリアなどで認められます。生物発光反応は、蛍光アッセイよりも10~1000倍高い感度を有しているため次第に汎用されるようになってきました。この感度の向上により、複雑な生物学的サンプルで用いる際のアッセイパフォーマンスを大幅に改善することができました。この要因は、光の発生メカニズムとそれがアッセイ法改良にどのように作用するかを試験した結果あきらかになりました。

全ての発光反応では、エネルギーは光を放出した分子により吸収されて励起状態の中間体となります。このエネルギーが励起状態の中間体から放出され、元の基底状態に遷移する際に光を生成します（図1）。発光反応は励起状態が形成される様式により区別され、これがアッセイ技術の機能性に本質的に影響します。蛍光発光および生物発光では、この違いが相対的シグナル強度やシグナルバックグラウンド比に反映されます。

蛍光発光を利用したアッセイ系では、励起状態を生み出す光子が高い割合でサンプルへ導入されることが考えられるため、比較的明るくなります。しかし、この高い光子流入は次の大きな2つの原因から高いバックグラウンドを誘発します。1) 励起用の光子と蛍光用の光子を区別するための光検出装置への負担と、2) 通常、生物学的サンプル内に存在する弱い蛍光物質による干渉です。蛍光アッセイでは、高いバックグラウンドの要因という観点から見ると、サンプルに添加する蛍光プローブ前駆体は最も重大な加害物質であるとも考えられます。

アッセイにおける蛍光レポーターからのシグナルは、他のプロセスと比較して高効率であると考えられますが、サンプル中に取り込まれている光子の数は、レポーターにより生成される数に比べ通常甚大であることを把握しておくことは重要です。そのため、蛍光アッセイにおける正味のバックグラウンドは著しく高い場合があります。対照的に、生物発光アッセイは、励起状態への遷移速度が遅いため、発光強度は通常低くなりますが、光子がサンプルに取り込まれないため、アッセイバックグラウンドは実質上皆無です。

この明るさとバックグラウンドとの関係は、これらのアッセイ技術の様々なアプリケーションへの適合性と深い因果関係にあります。光子の検出に限界がある状況において、アッセイバックグラウンドは検出装置の性能に大きく左右されます。このような状況としては、細胞を用いた顕微鏡観察、フローサイトメトリーなど個々の細胞検出に要求される光学系が集光能力を制限する技術を用いる場合があります。このようなケースではアッセイ系における明るさを第一に考慮するため、通常 蛍光法が用いられます。

しかし、サンプルがより大きく、光学的な要求がシンプルで、光子の検出効率が高い場合、アッセイ系に固有のバックグラウンドがより重要になります。このようなケースには、個々のサンプルチューブやマルチウェルプレート（例：96ウェル、384ウェルプレート）で測定を行う場合やマウスなどより大きな生物を用いたイメージング解析などが当てはまります。これらのケースでは、生物発光アッセイの有する極めて低いバックグラウンド特性がより高い感度を提供します。さらに、スペクトル分解のための光学フィルターやモノクロメーターを必要とせず、通常 光子検出器をサンプルに近い位置に配置することができるため、生物発光法ではより効率的に光子検出を行うことができます。

その結果、生物発光におけるルーチンな測定レベルは 10^{-20} molesに達し、これはサンプルあたり10,000分子以下に相当します。通常の生物学的サンプルでは、細胞あたり数分子と同等です。さらに、この高い感度は非常に広いダイナミックレンジを与えます。ほとんどの生物発光アッセイは分析対象物濃度で6~8桁の直線性を有します。生物発光を測定する装置の1つであるルミノメーターは、この非常に広いレンジ以上で機能します。

アッセイツールとしての生物発光の有用性は、さらに2つの特性が加わることによりさらに高まります。まず1つは光子の放出機能で、これは生物学的な状況下で自然に進化してきたため、生物システムとの相性に優れています。2つめは光子を放出する分子であるルシフェリンが酵素の分子構造中に隔離されることです。この構造配置がエネルギーの遷移過程を防護し、光学的な収量を底上げしています。

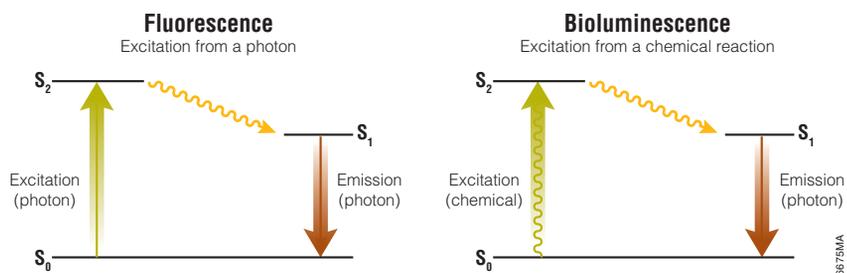


図1. 蛍光発光と生物発光における励起と発光のスキーム

S₀, 基底状態; S₂, 励起状態; S₁, 振動緩和後の励起状態

なぜ蛍光タンパク質ではないのか？

生命科学研究における生物発光を用いた多くの汎用アプリケーションとしてレポーター遺伝子アッセイが挙げられ、通常、遺伝子の転写ダイナミクスをモニタリングする手法として利用されています。通常優先的に用いられるホタルルシフェラーゼは、61kDaの単量体タンパク質で、ホタルルシフェリン、ATPおよび酸素と反応して黄緑色の光(560nm)を生成します。ホタルルシフェラーゼは細胞内生理を調べるための細胞内プローブとして使用されることから、正常な細胞内機能に与える影響は最低限であると考えられます。

細胞内プローブの影響を最低限に抑える最良の方法の1つは低濃度で使用することで、外来成分の導入により起因する可能性のある生理的ストレスを低く抑えることが出来ます。これを超えると、細胞内プローブは通常 特定の細胞内プロセスに連結あるいは統合され、このプロセスに影響を与える可能性があります。例えば、プローブ濃度がこれらのプロセスを正常に保つための許容量を超え始めると、減衰や人為的な挙動を誘導する可能性があります。

この点において生物発光の感度は大きなアドバンテージを提供し、特に生細胞内での分子プロセスをイメージングするために広く使用されるGFPなどの蛍光タンパク質と比較して有用です。蛍光タンパク質は、明るい顕微鏡イメージ取得に十分な明るさが得られる光子の放出がある場合には非常に有用です。明瞭に識別できるシグナルを得るためには、通常蛍光タンパク質をCMVなどの強力なプロモーターで発現させます。ルシフェラーゼは細胞内イメージングへの適正は落ちますが、蛍光レポーターよりも非常に低い濃度でも転写制御用プローブとして使用することができます。

その他、遺伝子レポーターのパフォーマンスとして重要な性状としては応答性のダイナミクスがあります。高い安定性を有するレポーターは、転写率の変化に応じた細胞内の濃度変化に抵抗性を持つ傾向があります。その結果、レポーターは生細胞で起こる転写のダイナミクスを迅速に示さない場合があります。ダイナミックな応答はレポ-

ーター内にタンパク質分解シグナル(例: PEST配列)を組み込むことにより向上させることができます。しかし、これにより細胞内に蓄積されるレポーターも減少することになり、アッセイ感度も低くなる可能性があります。それにもかかわらず、この方策がルシフェラーゼレポーターでうまく機能するのは、生物発光アッセイが高い感度を有するためです。これとは対照的に、蛍光タンパク質は一般的に安定性が高く、分解シグナルの付加によりアッセイ感度を制限する可能性があります。

ルシフェラーゼレポーターのダイナミックな能力は、細胞内生理の研究に広く適用することができます。図2では、HEK293細胞のネイティブな β 2アドレナリン受容体がアゴニストであるイソプロテレノール添加で刺激される様子を示しています。この $G\alpha_s$ -共役型受容体では膜での刺激が細胞内cAMP増加により細胞内部へと伝わり、cAMP 応答エレメント (CRE) を通じた遺伝子発現を活性化へと向かわせます。受容体の活性は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子とその上流につなげたCREによりモニタリングすることができます。

最適化されたpGL4ルシフェラーゼレポーターベクターを用いると、レポーター発現はアゴニスト添加により200倍活性化されました(図2)。さらに、この応答速度および規模は分解配列を付加することにより向上しました。pGL4ベクター内のルシフェラーゼ遺伝子は哺乳動物細胞での使用に合わせてコドンが最適化されており、最大の発現効率を実現しています。さらに転写因子コンセンサス結合サイトが除去され、ベクターに対する予期しない宿主側からの干渉が起こる可能性を最低限に抑えます。

生物発光の広い適応性

生物発光反応により生じた発光強度は反応物質の濃度に依存し、これらの物質に化学結合を施すことにより多様な分子過程と結びつけることができます。通常、1つのアッセイ系においては、標的とするプロセスに連動して変動する1つの物質を除くその他全ての構成物濃度は一定に保たれています。レポーター遺伝子アッセイでは、変動する構成要素は遺伝子発現とつながる酵素自体です。しかし、ATPやルシフェリンなどの基質も変動する構成要素として利用することができます(図3)。

ルシフェリンは蛍光アッセイと同様にアッセイデザインに組み込むことができます。ルシフェリンに修飾基を付加すると、いくつかの生物学的プロセスを経て修飾部位が除去されるまで発光反応で利用できなくなります。例えば、ルシフェリン誘導体 Asp-Glu-Val-Asp-6'-アミノルシフェリンはカスパーゼ3プロテアーゼによりテトラペプチド配列が切除されるまで発光に利用できません。これは、ルシフェリン誘導体を用いることでアポトーシス検出のための感度の高いアッセイを提供できることを意味します。アポトーシスのための類似的な蛍光アッセイでは、ローダミンなどの適切な蛍光プローブにテトラペプチドを組み合わせて使用されます。しかし同様の条件下で比較した場合、生物発光アッセイは約100倍高感度でした(図4)。この高い感度は、バックグラウンドが飛躍的に引き下げられたために得られ、同時に直線的な測定レンジも広がりました。

このアプローチは、カスパーゼ8、カスパーゼ9、DPPiV、カルパイン、プロテアソーム他のプロテアーゼにも適応させることができ、同様の結果が得られます。また、CYP450活性やモノアミノオキシダーゼ活性の測定、その他酵素による切断反応に応用することもできます。

ATPの検出は生物発光を用いた最も古いアプリケーションの1つで、細胞生存性の迅速なアッセイ法としての使用が増え続けています。哺乳動物細胞のアッセイでは汎用されるテトラゾリウムベースのアッセイ法よりも100倍以上感度が高く、所要時間も約5分と非常に短時間で完了します。バクテリアの生存性試験に使用される同様の生物発光アッセイも高感度で約100個のバクテリアでも検出できます(バクテリアの種類に依存)。ATPを利用した生物発光アッセイではATPを消費す

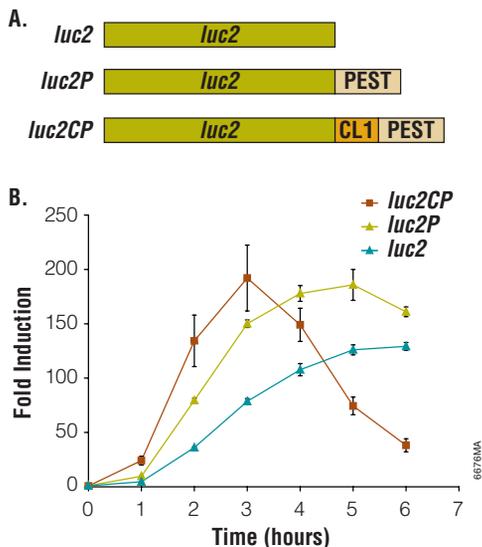


図2. β 2-アドレナリン受容体の生物発光レポーターアッセイ
ルシフェラーゼレポーターに分解配列を組み込むことにより、応答の速さと相対的規模の両方が向上した。パネルA. luc2, ホタルルシフェラーゼ; luc2P, PEST配列(-Pro-Glu-Ser-Thr)を含むホタルルシフェラーゼ; luc2CP, CL1およびPEST配列を含むホタルルシフェラーゼ。パネルB. cAMP応答エレメント(CRE)に応じたルシフェラーゼ遺伝子を安定発現するHEK293細胞。内在性 β 2-アドレナリン受容体は1 μ M イソプロテレノール/100 μ M RO-20-1724で誘導した。

る酵素、特にキナーゼなどの測定にも使用されます。このアプローチの利点は、リン酸のアクセプターがタンパク質、脂質、ポリサッカライドに関わらずほぼ全部のキナーゼ活性を測定できることです。

cAMPアッセイを作製するための1つの戦略として、ルシフェラーゼとタンパク質キナーゼA(PKA)を組み合わせました。このアッセイでは、培養細胞より放出されたcAMPが、アッセイ試薬に含まれるPKA活性を調節し、生物発光反応に利用されるATP量を変動させます。これら2つの反応を組み合わせることで、細胞内のGαs-共役受容体やホスホジエステラーゼの活性を迅速、高感度に測定することを可能にしました。

生物学におけるユニークなビーコン

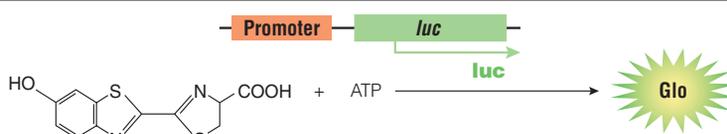
生物発光の化学反応は、生体システムにおける非常に複雑な特性の中に大きな可能性を見いだしました。その反応を構成する要素は、複雑な生化学的環境内にごくわずかな量存在しているにすぎませんが、それでもなお明瞭で定量性のあるシグナルを放ち続けています。これを検出する能力は暗環境に光を放つもののみが存在して初めて発揮されます。このユニークな化学反応により光子のみが存在するという条件を整えることで、多様な環境中での絶対的な単一性が与えられます。その結果、光子を生み出す化学反応の中で、生物発光だけが唯一分子の行方に関する秘密を解き明かすビーコンとして存在しえるのです。生物発光アッセイ技術に関する詳細な情報については以下の記事をご覧ください。

www.promega.com/guides/biolum_assays

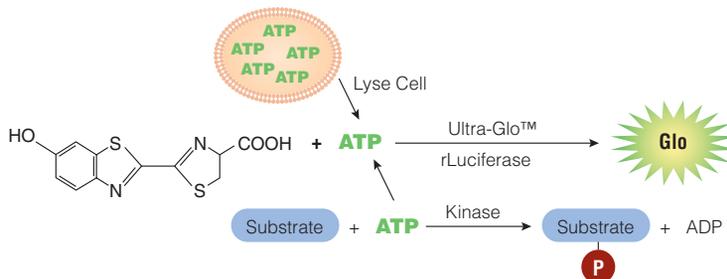
参考文献

1. Fan, F. and Wood, K.V. (2007) ASSAY *Drug Develop. Tech.* **5**, 127-36.

Reporter gene assays measure changes in **luciferase** levels



Cell viability and kinase assays measure changes in **ATP** levels



Protease, P450 and MAO assays measure changes in **luciferin** levels

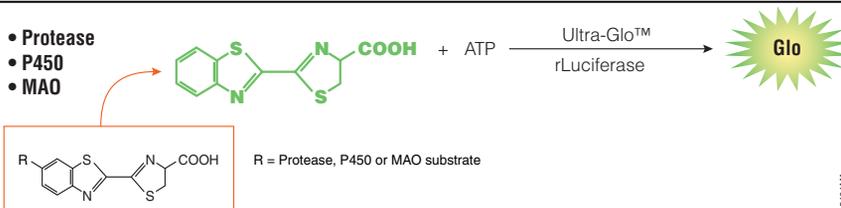


図3. 生物発光を用いたアッセイのストラテジー

luc, ホタルルシフェラーゼ遺伝子; Ultra-Glo™ rLuciferase, 高度に安定化されたホタルルシフェラーゼ変異体; P450, シトクロームP450; MAO, モノアミンオキシダーゼ

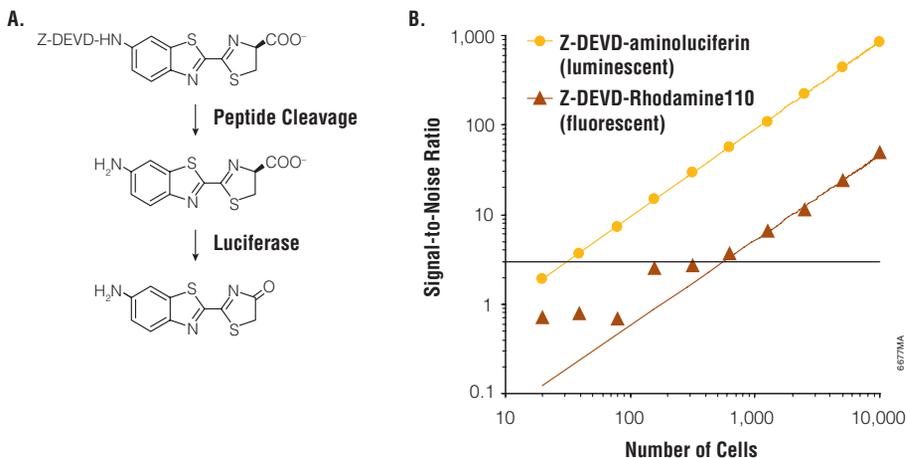


図4. カスパーゼ-3/7活性の生物発光および蛍光発光による測定

パネルA. カスパーゼのZ-DEVD-アミノルシフェリン切断によるアッセイスキーム。パネルB. アッセイは96ウェルプレートで段階希釈したJurkat細胞を抗-FASで処理したもので行った。測定は試薬添加1時間後に行い、細胞を含まないウェルをバックグラウンドとして測定した。シグナル/ノイズ比は測定値の平均からバックグラウンド値の平均を差し引き、バックグラウンドの標準偏差で割って算出した。パネルBはO' Brien, M.A. et al. (2005) *J. Biomol. Screen.* **10**, 137-48より許可を得て転載した。