

# ホタルの光の基礎研究から製品化研究へ

## —— 生物発光タンパク質に基づくマルチ遺伝子発現検出キット ——

近江谷 克裕\*、中島 芳浩

ヒトを含めた生き物の生命現象は、細胞内の多くの分子とその複雑な化学反応のネットワークにより制御されており、近年、このネットワークを解析する技術の開発が望まれていた。我々は発光色の異なるホタル(甲虫)の発光タンパク質(ルシフェラーゼ)に着目し、細胞内の複数の遺伝子発現を同時に検出する技術を開発した。開発した技術は実用化研究を経て、企業による製品化に結びついた。現在、本研究成果は、第1種基礎研究などへの回帰を経て、新たな実用化研究へと進展中である。

### 1 はじめに

生物発光はホタルなどの発光生物が生み出す光であり、光る生物の体内には「光の素」と「光の素の発光を触媒する酵素」がある。前者をルシフェリン(Luciferin、光るものの意)、後者をルシフェラーゼ(Luciferase)と呼んでいる。このルシフェリン、ルシフェラーゼの言葉を生み出したのが19世紀のフランス人研究者Duboisであり、発光生物学は先人達の弛まぬ努力が支えてきた学問である。欧米の研究者が中心になって先導してきた学問かという、そうではなく、日本人の貢献が非常に大きい、例えば第二の熊楠とも言われた神田左京は戦前に「ホタル」という国内外に知られた名著を著し、また横須賀博物館初代館長の羽根田弥太は世界的な発光生物学者、そしてウッズホール研究所の下村脩博士は細胞標識技術を変えた緑色蛍光タンパク質GFPの発見者であるなど、輝かしい足跡をたどることができる<sup>[1][2]</sup>。

1990年代より生物発光を利用したバイオツールが日米欧の企業から製品化されたが、学問分野として生物学、化学、物理学、生化学や工学の幅広い研究領域の上に成り立つ複合領域であるがゆえ、広い分野の知・技・人・資金の結集が進まず、革新的な技術開発は十分に行われてはいなかったのが現状である。これは広い学問分野の上に成り立つ複合分野であるにも関わらず、個々の学問分野間の融合が不十分だった点もあるが、基礎研究における「死の谷」を超える道筋が明確でなかった点に起因する。また、既に生物発光に関わるバイオツールの製品化を達成した企業に対して、明確に製品を差別化し、新たな製品を生み出し、市場に対する明確なメッセージを発する基礎研究の成

果も不十分であったためである。

一方、生命科学の分野では90年代に始まったゲノムプロジェクトは知・技・人・資金の結集により著しい進展を遂げ、10年も経たずにヒトゲノムの解読に成功した。しかし、この進展は、次なる学問分野の登場を待つというジレンマに陥ることになる。それは、科学者たちは、当初、ゲノムの解読は革新的な基盤情報となり、それによって大きなイノベーションが起きると信じたのであるが、それまで信じていたヒトゲノム上には10万種以上のタンパク情報があり、それは「ヒトと他の動物たち」との明確な違いを示してくれるとの淡い期待があったためである。しかしながら、脊椎動物の直系である脊索動物ナメクジウオの遺伝子はおおよそ2万1600種であり、ヒトも2万数千種程度の遺伝子情報しかないという現実である。また、ヒトとサルでさえ遺伝子の違いは2%以下なのである。では、どうして生物間に違いがあるのか?ヒトは高度に発達したのか?ポストゲノム時代の今、多くの課題が突きつけられている。現在、この答えを見つける手法の1つとして、生命を織りなす生体分子群の動態解析やイメージングが注目され始めた。

筆者の1人である近江谷は90年代より生物発光に興味を持ち、科学技術振興機構のさががけ研究21プロジェクトでホタルの発光色決定機構の研究を行った。その後、静岡大学教育学部において、発光甲虫やウミホタルの発光メカニズムを生物学、生化学の視点から研究を続けた。その結果、ブラジル産の鉄道虫の赤色及び緑色ルシフェラーゼ遺伝子のクローン化に成功、また、ホタルルシフェラーゼ中の216番目のアミノ酸が発光色の決定に大きく関わることを見出した<sup>[3][4]</sup>。特に、鉄道虫は南米ブラジルにしか生息しな

い発光甲虫であり、地上で最も強い赤色の光を発するルシフェラーゼを発現していた。これらの研究成果は、生物発光システムよりバイオツールを生み出す新しい研究成果へのスポットではあるが、明確にこれらのスポットを結びつけ展開できる方策はなかった。大学の中の研究と教育の挟間の中では、明確に第2種基礎研究を行うことができないのが現状であった。そのような背景のもと、産業技術総合研究所の誕生と同時に、近江谷と中島は産総研で研究を開始することになった。第1種基礎研究というスポットを第2種基礎研究で展開するチャンスが与えられたのである。おぼろげながら、発する光の色に着目したバイオツールの開発がアウトカムとして浮かび、それを21世紀のバイオサイエンスが模索していた生体分子群の動態観察やイメージングに結びつけるという明確な目標が設定できた。

## 2 何を開発するのか

ゲノムプロジェクトが一段落した21世紀の生命科学では、1つの生体分子を追跡する手法に限界があることが理解されていた。また、これまでの延長線の計測装置の開発だけではバイオサイエンスの革新が行われなことも認識されていた。その背景の元、2002年、経済産業省、NEDOが母体となり「細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発」プロジェクトが始動した。本プロジェクトでは生体組織の構築・機能発現の基となる細胞内生体分子のネットワークの時間的・空間的な動態変化を細胞が生きている状態で効率的に計測し、機能解析を可能とする技術の確立を目的とし、複数の生体分子が作り出す情報伝達ネ

ットワークの解明を目標とした。我々は本プロジェクトに複数種生体分子の細胞内識別技術の開発として発光タンパク質の利用を提案して、参加した。

我々の研究コンセプトは単純で、従来、ホタルの発光の利用では、その光の量しか注目されていなかったことに対し、ホタルの発光の持つ多色性に注目して、細胞内の複数の情報を発信することを模索した。つまり、従来の生物発光を応用したツールが白黒テレビの延長線であったものを、光の色の違いというキーワードでカラーテレビ化、細胞内の複数種生体分子の動きをリポートしようと考えた。これは90年代の大学における基盤研究で得た研究成果のスポットを結びつける作業でもある。図1は提案において用いたスライドの1枚を修正したものであり、研究コンセプトのストラテジーが描かれている。つまり多種多様な生物発光のルシフェラーゼを活用することである。我々の有力な武器は世界に先駆けて特定した頭が赤色、身体が緑色の光を放つ鉄道虫のルシフェラーゼという第1種基礎研究の成果である。

目標設定は従来技術との明確な差別化を狙い、その実用化の絵姿としてマルチ薬剤スクリーニングシステムとした(図2)。最終的に、2006年4月には東洋紡績より「TripLuc」、東洋ビーネット社から「マルチカラールク」として販売され、提案時の出口としてイメージしていたキットを企業から販売することができた。企業が最終的に販売するか否かの判断は、それが世の中のニーズに合致し、ある技術に関して改良なりを欲求するユーザー、及び新たな技術の導入を期待する潜在的なユーザーの存在が重要である。日本人バイオ研究者の一つの習癖だが、自分で判断

研究開発のストラテジー  
異なる発光色の発光タンパクを取得・特許化（7色の発光を目指す）

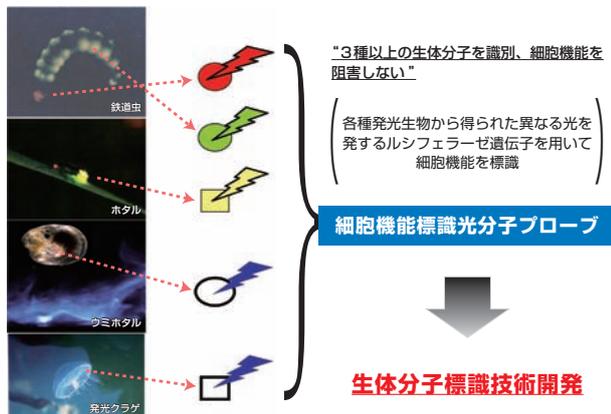


図1 研究開発のストラテジーを表したもの。NEDO「細胞内ダイナミズム解析」のヒアリングに用いたスライドの一部を修正。左の写真は上から鉄道虫、ゲンジボタル、ウミホタル、発光クラゲである。我々が目指した細胞機能標識技術は、各種発光生物から得られた発光色の異なるルシフェラーゼ群（発光のための酵素、触媒）をもとに、“3種以上生体分子を識別、細胞機能を阻害しない”ことを可能にする細胞機能標識光分子プローブによるものである。

想定する製品化の姿と現状

“目標：より細胞機能に即した創薬システムの開発”

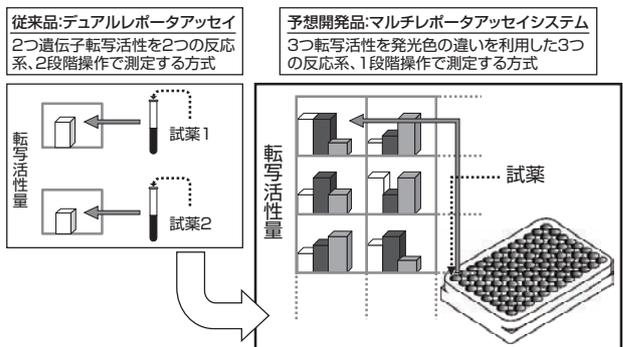


図2 研究開発のアウトカムの一例を表したもの。NEDO「細胞内ダイナミズム解析」のヒアリングに用いたスライドの一部を修正。従来技術では2つの遺伝子転写活性を2段階で2つの試薬を用いて行ったが、開発を目指したマルチレポーターアッセイシステムは3つの遺伝子転写活性を1段階で1つの試薬で可能にする方法である。これによって、一度に多くのサンプルの解析を行うことを目指した（ハイスループット解析）。

し新しい技術を導入するより、外国の雑誌等に掲載された技術を導入する傾向が多いように思える。この点を注意すべきであり、新しいバイオ技術を生み出した者は、技術の素晴らしさを多くのチャンネルを使って発信すべきである。つまり特許でスタートする第2種基礎研究、実用化研究を行うだけでは真の製品化には至らず、アフターケアをする一連の流れが重要である。何をやってアフターケアとするのか、1つの答えは、研究者自らが生み出した技術をもとに第1種基礎研究で堅実な成果を上げることであろう。

さて、我々の目指した細胞内の複数種生体分子の標識技術は、細胞内で起きている複数の遺伝子発現をモニターするものである。細胞内では外的刺激に対して速やかに、あるいはゆっくりと応答し、複数の遺伝子発現が調節される結果、各種のタンパク質が作られる。例えば、環境ホルモンが細胞内に到達すれば、細胞はそれに応答して、女性ホルモンといわれる物質を生産するのである。そこで特定遺伝子の発現量を検出する手段としてホタル発光酵素（ルシフェラーゼ）を用いたレポーターアッセイが製品化されていたのである。レポーターアッセイでは遺伝子の発現を調節する遺伝子配列をホタルルシフェラーゼ上流に挿入、細胞導入する。もし細胞内で遺伝子の発現が誘導されれば、それに応じてルシフェラーゼが合成される。ルシフェラーゼにルシフェリンを加えれば発光するので、発光量で遺伝子発現量を評価できる。この手法はバイオ・メディカル領域で活用され、たとえば創薬分野における薬剤スクリーニングや環境分野における化学物質評価（環境省では公定法として認めている）として、市場に定着しており、02年の段階でも国内市場5億円、世界的には200億円産業であった。

では、この分野で、新たに企業が製品化に動く可能性はあるのだろうか？ 02年まで、市場で支持されていたレポーターアッセイはP社の販売するデュアルレポーターである。この方法は2遺伝子-2基質による2ステップの測定法であり、米国で成立した特許を持つP社が、ほぼ独占的な状態にあった。よって、この独占状態を打破したい企業にとっては、レポーターアッセイに関わるシーズの探索が重要であった。また、ユーザーサイドは2つの遺伝子の発現しか評価できない点、また、2基質2ステップというコストと工程に関する不満があった。また、レポーターアッセイがさらに汎用性の広い手法であるなら、使ってみたいという潜在的なユーザーの存在もあった。ここでレポーターアッセイでの明確な目標設定が可能になった。我々は発光色の多様性を活用した「3遺伝子-1基質による1ステップレポーターアッセイ」の開発を目指した。

### 3 第2種基礎研究から製品化を目指すための特許構築

ホタルの発する光はホタルルシフェリンの酸化をホタルルシフェラーゼが触媒する酵素反応である。我々が着目した甲虫の発光システムのユニークな点は、発光甲虫はホタル科、ヒカリコメツキ科、ホタルモドキ科、イリオモテボタル科があり、同じルシフェリンを使っていながら、少しずつ異なる発光色を持つ点、さらに、このルシフェリン・ルシフェラーゼ反応が反応環境のpHに連動して発光色が変わる場合と変化しない場合がある点である。我々はpH変化に影響を受けないが異なる色の光を持つルシフェラーゼを用いて複数の遺伝子発現を検出しようと考えた。既に、南米産の鉄道虫（頭部の発光色は橙色から真紅色まで、腹側部は緑色から黄緑色と多彩な発光色の甲虫）から赤色と緑色の光を発するルシフェラーゼ遺伝子を取り出し、大腸菌レベルでこのルシフェラーゼを発現させることに、さらにはこれらの遺伝子情報を用いて、オレンジ色の発光を生み出すことに成功していた<sup>[3][4]</sup>。

しかしながら、2002年にマルチ遺伝子発現検出キットの実用化を目指した段階では、哺乳類細胞でルシフェラーゼを安定に発現することに成功していなかった。つまり、コンセプトとして新規のキットのイメージはあったが、特許実施例を書くことはできなかったのである。中島らは鉄道虫ルシフェラーゼの細胞内で合成される際の転写及び翻訳過程の効率の向上がキーであると考え、遺伝子配列の並びの改変等を行い、03年に哺乳類細胞で使えるレベルの酵

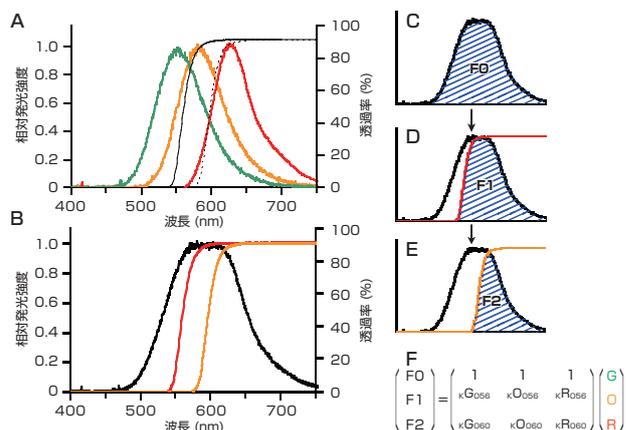


図3 3つの発光色を2枚のフィルターで色分割し計測する技術の概略。  
 A) 緑、橙、赤色ルシフェラーゼの発光スペクトル群  
 B) 3つの発光色が混じり合った場合の発光スペクトル及び用いる2枚のフィルターの光吸収効率  
 C) フィルターなしで全光を測定した場合の光の量をF0  
 D) 1枚目のフィルターを透過することで緑色光の大部分は吸収、計測されない光の量をF1  
 E) 2枚目のフィルターを透過することで緑、橙色光の大部分は吸収、計測されない光の量をF2  
 F) 予め決定した2つの光学フィルター毎の透過係数とF0、F1、F2を演算することで元の各発光量を算出する式。

素の遺伝子構造の改変に成功した<sup>[5]</sup>。次の段階の問題は、pHに連動せず安定なスペクトルとはいえ、重なるスペクトルをどのように分割し定量するかという点である。当たり前に考えれば、重ならない部分だけをフィルターで分けて定量すれば良いことになるが、これでは緑と赤色の両端を取ることになり2つの発光色しか相手にできないし、発光量の大部分は無駄になる。そこで、産総研が中心となり、共同研究先のアトー社の技術者と共同で、さらには東大物性研秋山准教授と協力して光を無駄にすることなく、フィルター2枚で3つの発光色を分割、定量する技術を開発した<sup>[6]</sup>。新しく開発した技術は、あらかじめ各ルシフェラーゼをフィルターの非存在下、および複数の光学フィルター存在下でそれぞれ測定、ルシフェラーゼごとに各フィルターを用いた際の透過係数を決定しておき、試料に対する複数のフィルターの測定値から透過係数をもとに各ルシフェラーゼ量を算出する方式である（図3）。これら一連の研究がまさに第2種基礎研究の成果である。大きな発想の転換で生まれる部分もあるが、現状の技術レベルを正確に把握、その段階の「最高の知」を活用することが重要である。つまり最高の知を生み出すのではなく、適切に利用することが第2種基礎研究のアプローチであろう。

このような記載は2005年当時、商品化が成功した際の説明であり、一見、簡単に実用化に成功できたようにみえるが、内実は違っている。早くコンセプトを特許化したかったので、赤、緑色鉄道虫由来ルシフェラーゼと既存のウミシイタケルシフェラーゼを用いた3遺伝子-2基質が成功した段階で特許を構築、「同一の発光基質で異なる色を発光する少なくとも2つの発光タンパク遺伝子のいずれかを哺乳類細胞で安定発現可能なように組み込んでなる遺伝子構築物。」という要約で03年度に出願<sup>[7]</sup>、誌上発表した<sup>[8]</sup>。その段階で1年間の猶予を得たわけで、落ち着いて他のルシフェラーゼを検討、当時もう1つの素材であったイリオモテボタル由来の緑色ルシフェラーゼとその橙色変異体を組み合わせることで、最終的に3遺伝子-1基質を書き加えることができた<sup>[6]</sup>。

このような特許構築戦略において、弁理士のアドバイスにより、1) 特許出願後の1年間を有効に活用する、2) 特許に関わる根幹はなるべく少人数で実施例をまとめ単独で出願する、などの点を注意した。また、特許はコンセプトを重視し、いろいろな用途の範囲やそれを証明する実施例は書き込んだが、企業に対しての自由な研究活動や製品化を妨げるような細部にわたる書き込みは避けた。具体的には、マルチ遺伝子発現検出キットにおける試薬の要件などは書き込まず、企業が独自にキット用の試薬を作るなどの研究活動を阻害しない方向で、研究の余地を設けることに

した。つまり、技術全体の幹となるコンセプトは産総研が単独で押さえるが、実際に用いる場合の用途特許は企業との共同研究による共同出願や、企業単独出願を優先させ、特許の全体像を構築することにした。その結果、前述した2社の企業が製品化を実施、独自ブランドで販売可能となった。また、2つの企業はバイオ関連であるが、ソフト面に強い一方、ハード面は弱いことから、計測機器メーカーA社を紹介、製品化全体がスムーズに進むための橋渡しも行った。ただし、企業は各々の風土があることから、無理強いせず、個々の企業の活動に深く立ち入らないことも研究者の要諦であろう。

#### 4 マルチ遺伝子発現検出キットは何ができるか

東洋紡績より販売した商品名：MultiReporter Assay System -Tripluc<sup>®</sup>-を例に、我々の開発したシステムの現状を探る。まず名前だが、Triplucは“Triple color (3色のルシフェラーゼの意)”と“Trip (従来品を超え、別次元を旅するの意)”を掛けたものである。全体のイメージを良く現わしており、企業ならではのセンスである。命名は決して研究者が提案してはいけないというのが持論で、提案しても大体において陳腐である。

東洋紡績のキットはイリオモテボタル由来の緑色ルシフェラーゼ ( $\lambda_{\max}$  550 nm)、その部位特異的変異体である橙色ルシフェラーゼ ( $\lambda_{\max}$  580 nm)、及び鉄道虫由来赤色ルシフェラーゼ ( $\lambda_{\max}$  630 nm) の遺伝子群がパッケージされ、それぞれにコントロールとなるプロモータ配列が含まれたものである。最終的には試薬は自社開発したものが販売されている。3色の発光スペクトルを光学フィルターによって分割・定量化し、2つもしくは3つの転写活性を同時に測定するシステムである。これらのルシフェラーゼはいずれもD-ルシフェリンを発光基質として利用するため、検出反応は1ステップで行われ、測定は光学フィルターを備えたルミノメーターで行われる。

遺伝子の発現は、遺伝子の転写開始点近傍に存在するプロモータやシスエレメントに転写因子が結合することによって調節される。ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイでは、プロモータなどの遺伝子の発現を調整する配列をルシフェラーゼ遺伝子に繋げ、試験細胞に導入し、発現したルシフェラーゼの活性を測定することで遺伝子発現を評価する手法である。このレポーターアッセイによって、対象遺伝子の転写調節領域の機能や転写因子による調節機構の解析、逆に、ある事象で発現変動する遺伝子の転写調節領域にルシフェラーゼ遺伝子を繋げ、その事象に関わるシグナル伝達や受容体・リガンドの作用機構を解析することができる。

我々の開発したマルチ遺伝子発現検出キットは複数の遺伝子発現を同時に解析するシステムである。キットは転写調節領域を挿入可能にした3色のルシフェラーゼ遺伝子の各々のベクターによって構成される。使用者は、何らかの方法で計測対象となる遺伝子の転写調節領域を取り出し、これをキットのベクターの中に挿入する。この挿入された遺伝子群を細胞や動物の個体の中に、化学的に、あるいは電気的に導入する。例えば、細胞に導入した場合、ここに化学物質を加えると、その刺激によって細胞内では対象となる遺伝子の発現が調整され、合成されるルシフェラーゼの量は変化する。細胞を破碎し、これに測定条件が最適化されたルシフェリン溶液を加え、それぞれの色の発光量を測定、遺伝子の発現量の変化を評価するのである。我々の特許がカバーするのは3色で3つの遺伝子発現を解析するコンセプトと3色のルシフェラーゼである。最適化されたルシフェリン溶液は企業の特許がカバーする。

図4に測定したモデル実験の結果を示す<sup>16)</sup>。モデル実験では哺乳類細胞に存在する時計遺伝子 *Bmal1* プロモータ配列内の転写活性因子結合部位 (RORE 配列) とその周辺配列の役割について検討した。*Bmal1* プロモータ配列中には遺伝子転写活性因子 ROR $\alpha$ 4 が結合できる配列として RORE 配列が1つ及び類似した配列が2か所存在、*Bmal1* プロモータ配列と単独の RORE 配列の役割の比較検討を試みた(図4A)。そこで赤色ルシフェラーゼには RORE 配列とその配列の役割をサポートできる SV40 配列を、橙色ルシフェラーゼには RORE 配列を含むプロモータ配列全体を、そして緑色ルシフェラーゼにはコントロール

となる SV40 配列を、それぞれ配置した遺伝子ベクターを作り、細胞内に遺伝子導入した(図4B上)。転写活性因子 ROR $\alpha$ 4 を細胞内に加えた場合、ROR $\alpha$ 4 量に依存的に *Bmal1* プロモータは活性化し遺伝子の発現が促進されるのに対して、RORE 配列の転写活性を表す赤色ルシフェラーゼの発光量は増加せず、十分に遺伝子発現が促進されない(図4B)。つまり、予想されてはいたが、RORE 配列の類似配列にも全体の転写を制御する大きな役割を担っていることが明らかになった。このように、マルチ遺伝子発現解析システムは従来難しかった3つの遺伝子の遺伝子発現情報を同時に得ることを可能にした。また、生きた細胞において細胞内で複数の遺伝子発現をほぼ同時に長時間解析することにも世界で初めて成功した<sup>19)</sup>。その応用範囲は我々の検証した体内時計の解析に留まることなく、細胞生物学、薬理学、分子生理学など大いに広がっていくものと思われる。

本研究成果であるマルチ遺伝子発現検出キットによって、3つ以上の遺伝子の応答性の違いを比較できるため、例えば、動物実験の代替法として化学物質の毒性を評価する場合や薬剤スクリーニング系として薬効を評価する場合など、信頼度の高い生体情報を得ることができる。現在、NEDO「高機能簡易型有害性評価手法の開発／培養細胞を用いた有害性評価手法の開発／高機能毒性予試験法基盤技術の開発」にて、毒性評価マルチカラーレポート細胞を構築し、技術の普及を目指している。また、今後、化学物質の毒性評価などでは、多サンプルを計測し、計測データ間の互換性も重要となることから、我々は新しい光計測装置の開発を「高感度化」と「光計測の標準化」という観点で進めている。前者は先端ガラス集光技術が、後者は光校正技術が重要であり、新規光計測技術の活用はマルチ遺伝子発現検出キットの普及には大変重要である。

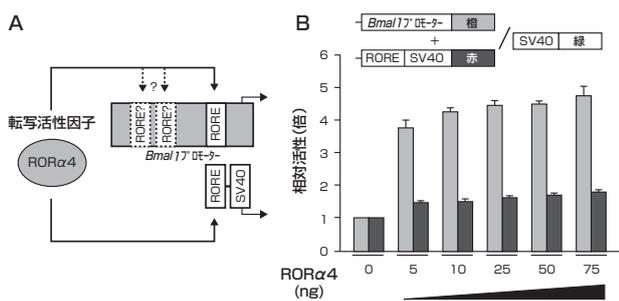


図4 マルチ遺伝子発現キットで解析した遺伝子発現の解析例。A) 哺乳類細胞にある時計遺伝子 *Bmal1* プロモータ配列内には遺伝子転写活性因子 ROR $\alpha$ 4 が結合し発現量を変化させる転写活性因子結合部位 (RORE 配列) が1箇所、その類似配列が2か所存在する。RORE 配列単独を抜き出しコントロールプロモータ SV40 配列に挿入することで、RORE 配列の遺伝子転写活性を評価できる。B) 赤色ルシフェラーゼには RORE 配列とその配列の役割をサポートできる SV40 配列を、橙色ルシフェラーゼには RORE 配列を含むプロモータ配列全体を、そして緑色ルシフェラーゼにはコントロールとなる SV40 配列を、それぞれ配置した遺伝子ベクターをつくり、細胞内に遺伝子導入、転写活性因子 ROR $\alpha$ 4 を細胞内に加えた場合、ROR $\alpha$ 4 量に依存的に *Bmal1* の発現が促進されるのに対して、RORE 配列のみの場合、十分に遺伝子発現が促進されない。

## 5 製品化のシナリオに決して終わりはない

これまでマルチ遺伝子発現検出キットの基本コンセプト、つまり「発光色の異なるルシフェラーゼによる3遺伝子-1基質のレポートアッセイ」は実用化、最終的に製品化され、シナリオ通りに進んでいるが、我々のシナリオはなお道半ばにあり、達成されてはいない。これまでの点を含めシナリオを達成する上で3つの課題と我々なりの解答がある。1) 本当にコンセプトは正しいのか?これは、第2種基礎研究の研究を通じて解決する、2) 企業が本当に製品化できるのか?これは、実現可能な企業と対話の中で解決する、3) コンセプトは社会に受け入れられるか?この答えは「努力」、研究者、企業ともにアトラクティブな情報を発信する、ことがそれぞれ肝要であろう。具体的には、

1) 本当にコンセプトは正しいのか?→当初正しいと思っても、アイデア倒れは往々にある。我々を含めて多くの研究者が経験しているかもしれない（ただし、公表されないのだから）。第2種基礎研究の重要性はここにある。我々自身は、論文を探ることもあったが、多くのセミナーや研究討議の場を増やすことで、多くの研究者の持つ情報収集に努めた。これは、それまでの研究者としての人脈が生きるものであり、その時代の最高の「知・技術」を知ることによって、コンセプトを実用化する方法である。大事なことは自らの発想で最高の知を生み出すことではなく、最高の知を活用することにより最適な（あるいはより適切な）知を生み出すことである。また、分野の違いを超えることも重要である。我々のキットでは3色ルシフェラーゼの混じった光、発光スペクトルが得られるため、これから個々の光を定量する方法を生み出す必要がある。これは、物理の領域の研究者なら解決可能な問題ではあったが、我々が悩んでも解決しない問題でもある。分野融合が第2種基礎研究推進のキーであろう。

2) 企業が本当に製品化できるのか?→企業サイドが魅力を感じるコンセプトと成果、企業サイドが安心して使える特許、そして企業サイドが予感できるユーザーの存在が重要であり、それを満足できれば、技術力のある企業により製品化は達成される。その場合、相手企業サイドの研究者だけを相手にするのではなく、後ろにいる企業の知財部、法務部、営業部、そして当然、経営者らを納得させる必要がある。従来技術の差別化と優位性（技術、コスト、ユーザー層など）および技術の正当性を明確に示せれば良く、これ自体が第2種基礎研究の成果にあたる。ただし、研究者サイドは他の企業との製品化の道を閉ざすべきでなく、特許は単独出願を心掛け、

また、契約書に則った冷静な判断と決断が必要であろう。  
3) コンセプトは社会に受け入れられるか?→研究者サイドは2つの点を実践せねばならない。第一に、企業サイドと連携して情報発信に努める。企業主催のセミナーの講演や総説等の執筆を行うことが重要であろう。これには節度が求められている点を忘れてはいけない。第二に第1種基礎研究に回帰、自ら生み出した技術を最大限活用した知を生み出さなければならない点である。これらによって技術の価値を高め、社会的に認知されなければならない。よって、これは終わりのない作業であり、シナリオには完結がないはずである。

図5はこれらをまとめたものである。第1種基礎研究の第2種基礎研究へと展開、具体的に企業と製品化する過程で、再び第1種基礎研究に回帰することが重要であり、各々のステップの中で、研究者間の、さらには企業との双方向的な連携が重要であろう。

## 6 夢を現実にする戦いのために

光を通じて生命情報を引き出す。当然のこのように、我々の得る情報は光がもたらす影であるが、上手に光で情報を引き出せば有用な情報を手に入れることが可能である。そのような観点で「健康を光で支える、光で守る」技術の開発を夢見ている。マルチ遺伝子発現検出キットの実用化は1つステップであり、生物発光の持つ光の多様性によって信頼度の高い生体情報を得ることが可能になった。これによって、たとえば高機能簡易型有害性評価手法などに応用、細胞レベルから得られる生体情報の信頼度を向上させることで動物実験の代替法に発展できればと考えている。これにより「健康を光で守る」技術に結実させることが可能であろう。また、生体情報を同時に複数見ることによって、細胞内のダイナミズムを、光を通じてあらわすことが可能になり、今までわからなかった生命の側面を垣間見ることができ、「健康を光で支える」ための情報収集に役立ち、新たな知を生み出すことになろう。前者は新たな製品を生み出すための第2種基礎研究への回帰であり、企業との連携、共生がテーマである。後者は第1種基礎研究への回帰であり、自らの知的な好奇心との戦いであろう。ただし、これらは平面的な研究の回転の輪ではなく、立体的な回転の輪になろう。決して始点に回帰することのない戦いを続けなくてはならないはずである。

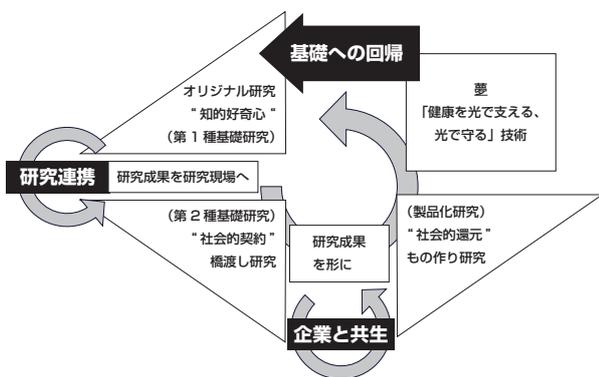


図5 筆者らの考える第1種基礎研究、第2種基礎研究そして製品化研究の永続性。

第1種基礎研究から第2種基礎研究へと展開する場合、第2種基礎研究から第1種基礎研究への回帰が重要。また具体的に企業と製品化する第2種基礎研究から製品化研究へと展開する場合、研究成果を形にするため、時には第2種基礎研究への回帰することが重要。さらに製品化された場合でも研究は終わることがなく、第1種基礎研究へと回帰、但し新たな位置の基礎研究に回帰しなければならない。

## 謝辞

本マルチ遺伝子発現検出キットの開発の第2種基礎研究は、セルエンジニアリング研究部門セルダイナミクス研究グループスタッフの皆さんによって達成されたものである。製品化は東洋ビーネット株式会社：龍福正行氏、鈴木知恵

氏、竹内利行氏ら、東洋紡績株式会社：浅井友実氏、西井重明氏の協力によるものである。マルチカラーのスペクトルの解析法は東京大学物性研究所秋山英文准教授やアト株式会社久保田英博氏、榎本敏照氏、関口修司氏らの協力で解決した。また、研究資金はNEDO細胞内ダイナミズム解析プロジェクトの支援による。

## キーワード

製品化研究、生命科学、バイオツール、光技術、遺伝子解析

## 参考文献

- [1] O. Shimomura: *Bioluminescence*, World Scientific publishing Co. Ltd. (2006).
- [2] 今井一洋, 近江谷克裕編: バイオ・ケミルミネセンスハンドブック, 丸善 (2006).
- [3] V.R. Viviani, E.J. Bechara and Y. Ohmiya: Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: Relationships between bioluminescence spectra and primary structure, *Biochemistry*, 38, 8271-8279 (1999).
- [4] V.R. Viviani, A. Uchida, N. Suenaga, M. Ryufuku and Y. Ohmiya: Thr-226 is a key-residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 1286-1291 (2001).
- [5] Y. Nakajima, T. Kimura, C. Suzuki and Y. Ohmiya: Improved expression of novel red- and green-emitting luciferases of *Phrixothrix* railroad worms in mammalian cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 948-951 (2004).
- [6] Y. Nakajima, T. Kimura, K. Sugata, T. Enomoto, T. Asakawa, H. Kubota, M. Ikeda and Y. Ohmiya: A multicolor luciferase assay system: One-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate, *Biotechniques*, 38, 891-894 (2005).
- [7] 近江谷克裕, 中島芳浩 特願2005-506020 (H16/04/30) マルチ遺伝子転写活性測定システム.
- [8] Y. Nakajima, M. Ikeda, T. Kimura, S. Honma, Y. Ohmiya and K. Honma: Role of orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system, *FEBS Lett.*, 565, 122-126 (2004).
- [9] T. Noguchi, M. Ikeda, Y. Ohmiya and Y. Nakajima: Simultaneous monitoring of independent gene expression patterns in two types of cocultured fibroblasts with different color-emitting luciferases, *BMC Biotechnol.*, 8, 40 (2008).

(受付日 2008.7.7, 改訂受理日 2008.9.10)

## 追記

本論文を執筆後、2008年ノーベル化学賞を下村脩博士が受賞する知らせが来た。受賞理由はGFP(緑色蛍光タンパク質)の発見であるが、下村博士は1960年代に発光するオワンクラゲの発光機構の解明を目指す中、発光するタンパク質イクオリンとGFPを発見した。この研究成果のうち、発光タンパク質イクオリンはカルシウムの検出試薬として当初から製品化が行われていたが、GFPは単にきれいなタンパク質という認識以外、応用研究に給されると

は誰もが信じていなかった。これは、タンパク質が自ら蛍光を発するとは誰も信じていなかったからである。発見から30年を経た90年代に、ノーベル賞の受賞者ではないPrasher博士がGFPの遺伝子を取り出し(1992年)、自らが蛍光を発するタンパク質であることが判明した後、これを動物細胞に応用したのが今回のノーベル化学賞を同時に受賞したChalfie博士(1994年)であり、蛍光色の異なるGFPを作成、普及に努めたのがTsien博士(1998年)である。本ノーベル賞における研究者たちの役割を位置づけてみると、下村博士及びPrasher博士は第1種基礎研究を、Chalfie博士が第2種基礎研究を、そしてTsien博士が製品化研究を行っていたことになる。本格研究の重要性をあらためて認識できるし、第2種基礎研究及び製品化研究が時代を変革できる力があることが十分に理解できる。

近江谷は下村博士とは旧知の間柄であり、研究について相談できる関係にある。下村博士は第2種基礎研究に取り組む我々に対して、第1種基礎研究の重要性を指摘、未解明の発光メカニズムの研究に取り組むよう促すことが多い。しかしながら、その理由は発光メカニズムが解明されることで、新たな応用の道が開かれることを意識したものである。例えば、下村博士は発光具の一種では発光のために銅イオンが必要な可能性が高く、発光メカニズムが解明されれば、新たな金属イオンセンサーを作ることが可能であろうと指摘している。第1種基礎研究がなければ第2種基礎研究が生まれず、逆に第2種基礎研究、製品化研究が行われなければ、第1種基礎研究が光輝かないことを下村博士は十分に理解されている。

今回のノーベル化学賞は本格研究の重要性を再認識させるものであり、我々の研究グループでは下村博士が最初に手がけたウミホタルの発光に関わる第2種基礎・製品化研究、及び未解明な発光現象の第1種基礎研究を推進することで、下村博士の期待に答えたいと考えている。(近江谷)

## 執筆者略歴

近江谷 克裕 (おおみや よしひろ)

1990年群馬大学大学院医学研究科内分泌学専攻修了。(財)大阪バイオサイエンス研究所特別研究員、新技術事業団独創的個人研究事業「さきがけ研究21光と物質」研究員、静岡大学教育学部助教授を経て2001年より産業技術総合研究所、2006年10月より北海道大学医学研究科先端医学講座光生物学分野教授に就任。セルエン지니어リング研究部門セルダイナミクス研究グループ・グループ長を兼業、NEDO「高機能簡易型有害性評価手法の開発」の一部を担当。日本生化学会評議員、生物発光化学発光世話人、国際学術雑誌Luminescence編集長を担当した。本論文では研究の全体統括を担当した。本論文では研究の全体統括を担当。

中島 芳浩 (なかじま よしひろ)

1996年埼玉大学大学院理工学研究科生産情報科学専攻修了。理

化学研究所基礎特別科学研究員、日本学術振興会未来開拓研究員（奈良先端科学技術大学院大学）を経て2001年産業技術総合研究所入所。2007年内閣府総合科学技術会議事務局に外向。本論文ではルシフェラーゼおよび測定システムの構築と最適化を主に担当した。

## 査読者との議論

### 議論1 製品化を目指すための特許構築について

質問・コメント（栗山 博）

「3. 第2種基礎研究から製品化を目指すための特許構築」で東大物性研の秋山准教授と協力して、「光を無駄にすることなく発光色を分割・定量する方法を開発した」とありますが、その内容は第2種基礎研究の中身として重要な点に思われます。具体的に記述していただけないでしょうか。

回答（近江谷 克裕）

わかりにくい表現でしたので、図3を加え、さらに「新しく開発した技術は、あらかじめ各ルシフェラーゼをフィルターの非存在下、及び複数の光学フィルター存在下でそれぞれ測定、ルシフェラーゼごとに各フィルターを用いた際の透過係数を決定しておき、試料に対する複数のフィルターの測定値から透過係数をもとに各ルシフェラーゼ量を算出する方式である（図3）。」と追記いたしました。

### 議論2 マルチ遺伝子発現検出技術への構築について

質問・コメント（小林 直人）

著者がマルチ遺伝子発現検出キット実現と言う目標に向けて、そのためのシナリオを明確に描き、それに沿って研究開発を実施して来たことは極めてよく理解できます。その意味で、世界初の3遺伝子発現の同時検出という成果の実用化への戦略的取り組みがよく分かり、本論文は大きな価値があると考えられます。その一方で、肝心の本研究の中心となった「生物発光現象を利用したマルチ遺伝子発現検出技術」の構成学的記述が不足しているように見受けられます。本技術の詳細については、すでに他の論文で発表してあるでしょうが、それらからどのようにしてマルチ遺伝子発現検出技術へと構築できたのかの詳細を述べて頂ければと思います。

回答（近江谷 克裕）

我々の開発したマルチ遺伝子発現検出キットは、複数の遺伝子発現を同時に解析するシステムです。キットは、転写調節領域を挿入可能にした3色のルシフェラーゼ遺伝子の各々のベクターによって構成されます。使用者は、何らかの方法で研究対象となる遺伝子の転写調節領域を取り出し、これをキットのベクターの中に挿入します。これを細胞に導入した場合、例えばここに化学物質を加えると、その刺激によって細胞内では対象となる遺伝子の発現が調整され、合成されるルシフェラーゼの量は変化します。細胞を破碎し、これに測定条件が最適化されたルシフェリン溶液を加え、それぞれの色の発光量を測定、遺伝子の発現量の変化を評価するわけです。我々の特許がカバーするのは、3色で3つの遺伝子発現を解析するコンセプトと3色のルシフェラーゼです。最適化されたルシフェリン溶液は企業の特許がカバーすることになっています。このようなマルチ遺伝子発現検出技術の技術的構成方法を、4章を補強する形で追記いたしました。

### 議論3 光計測技術の改善点について

質問・コメント（小林 直人）

本手法の光計測技術の側面についてお伺いします。光計測技術としては光学フィルターを備えたルミノメーターを利用しているとのこと

ですが、その測定感度や測定範囲、SN性能等も含めて技術的にはすでに完成されたと考えてよいでしょうか、特に今後の光計測技術の改善点等があれば記載して頂ければよいと考えられます。

回答（近江谷 克裕）

光計測技術の活用が我々の技術の普及には必須であり、その観点で次のとおり追記いたしました。「また、今後、化学物質の毒性評価などでは、多サンプルの計測、計測データ間の互換性も重要となることから、我々は新しい光計測装置の開発を“高感度化”と“光計測の標準化”という観点で進めている。前者は先端ガラス集光技術が、後者は光校正技術が重要であり、新規光計測技術の活用はマルチ遺伝子発現検出キットの普及には大変重要である。」

### 議論4 動物実験の代替と将来的な展望について

質問・コメント（小林 直人）

本研究成果は実用化において大きな意義があったと考えられますが、今後本手法が実際に動物実験を代替できるのかどうかという問題や、細胞内のダイナミクスを観察するのに本手法による観察が生体内反応をそのまま表現していると考えてよいのか等について、将来的展望も含めて説明して頂けるとよいと思います。

回答（近江谷 克裕）

光によって生体情報を得る技術は、当然のことながら決して万能ではありません。それ以上に光を読み取ることを間違えれば間違えた結論を導くこととなります。生命情報を光を通じて引き出した場合、当然のこのように、我々の得る情報は光をもたらし影であるので、上手に光を計測しなければ有用な情報を手に入れることはできません。そのような観点で本文にも追記をしました。「また、将来的な展望の1つは動物実験の代替であり、光技術をうまく活用すれば細胞レベルから得られる生体情報の信頼度を向上させることで、動物実験の代替法に発展できればと考えています。さらには、細胞内のダイナミクスを光を通じてあらわすことが可能になり、今までわからなかった生命の側面を垣間見ることができ、「健康を光で支える」ための情報収集に役立ち、新たな知を生み出すことになる」と考えられます。」この点も本文に書き加えました。

### 議論5 精度の向上について

質問・コメント（小林 直人）

「生物発光現象を利用して同時に3つの遺伝子の発現を検出する手法」は極めて有効であると理解しましたが、今後精度の向上に向けては3色以上のより多色化が必須でしょうか。それとも基本的な手法としては3色で十分と考えられるのでしょうか？

回答（近江谷 克裕）

精度の向上という意味では3色以上の光で同時に解析することも重要だと思います。しかしながら、ホタルの光で作れる光は緑から赤色の発光ピーク540-430 nmの光です。人間の目なら微妙な色の違いを認識できるのですが、カメラを通じてみる微弱な光では限界があります。しかも生物発光の光はブロードな光です。よって我々が用いた検出法では30 nm以上離れたブロードな光でのみ対応可能であり、よって、現時点では3色が限界と考えられます。更なる第2種基礎研究の必要性はまさにこの点であり、計測系の進歩が次の可能性を広げます。また、3色以上の遺伝子の発現解析では細胞への遺伝子の導入法も課題となります。これもまた重要な課題となります。よって、第2種基礎研究は更なる第2種基礎研究を生み出すことになると思います。