

発光タンパク質

2008年ノーベル化学賞は下村 脩先生が受賞した。受賞理由は発光クラゲから取り出した GFP (緑色蛍光タンパク質) である。光る生物からの贈り物が評価されたことであり、光る生き物たちも大いに喜んでいることであろう。本講義では、下村先生が愛し探究した光る生き物たちの発光タンパク質について、その基礎と、いかに分析の世界で役に立っているか解説する。

近江谷 克裕

1 はじめに

宇宙で微生物を検出するとき、ATP を介したホタルの発光系が、また、DNA のギガシークエンス解析にもホタルの発光系が用いられている。このように、微生物の分析、環境ホルモンの検出、生理活性物質の定量、一塩基多型の解析あるいは医療診断など、分析科学の最前線で発光タンパク質は利用されている。

さて、発光タンパク質にあたる英語の言葉には bioluminescent protein (あるいは luminescent protein) と photoprotein がある。また、bioluminescence は生物発光と訳されている。生物発光は、ルシフェリン、ルシフェラーゼによって生み出されることは周知のことであろう。ルシフェリン、ルシフェラーゼの言葉を生み出したのは、19世紀のフランス人研究者 Dubois である。彼は、光る生物の中には「光の素」と「光の素の発光を触媒する酵素」があり、前者をルシフェリン (luciferin, 光るものの意) と、後者をルシフェラーゼ (luciferase) と呼んだ。そして、発光生物より冷水抽出されるタンパク質のうち、ルシフェリンと反応して光を生み出す酵素をルシフェラーゼ、そして発光生物より有機溶媒や熱水で抽出される有機化合物のうち、ルシフェラーゼと反応して光を生み出す化合物をルシフェリンと定義した。しかし、発光生物からルシフェリン、ルシフェラーゼが抽出できない場合がある。その代表が発光オワンクラゲから抽出されたイクオリンタンパク質である。イクオリンは、セレンテラジンが酸素分子を介して結合した複合体タンパク質である。なおセレンテラジンは発光ウミシイタケのルシフェリンと同一の物質である。イクオリンは、カルシウムイオンがトリガーとなって自身が発光するタンパク質複合体であり、従来の定義によるルシフェラーゼとしては抽出されない。発見者のウッズホール研

究所の下村 脩博士は、イクオリンをルシフェリン、ルシフェラーゼとせず、発光タンパク質 photoprotein と名付けたのはそのためであろう。

では、発光タンパク質とは何か？ 筆者は生物発光にかかわるタンパク質と考えている。よって luciferase と photoprotein を含むものとするのが妥当であろう。また、明確に GFP などの蛍光タンパク質と区別するために用いられてきた経緯もある。本講義では、これらの立場に立って、光る生物の光るシステムそのものに関連するタンパク群として、発光タンパク質 bioluminescent protein について話を進める。なお、生物発光全般を知るための成書として3冊の本を紹介する^{1)~3)}。

2 生物発光の基本

2・1 生物発光の基本はルシフェリン

蛍光と発光の基本的な違いは、前者は、蛍光物質 A が励起光 (excitation light) によって励起状態となり、これが基底状態に戻るときに光 (emission light) を発するのに対して、後者は化学反応によって生成した物質 A が励起状態となり、同じく基底状態に戻るとき光を発する点である。生物発光における発光物質ルシフェリンからの生成物が励起状態になり、基底状態に戻るとき、光を発する。

図1にルシフェリンの化学構造を示す。光る生物はバクテリアから魚まで幅広い生物群に存在する生体システムである。しかし、ルシフェリンの種類はそれほど多くはない。例えばウミシイタケルシフェリン (セレンテラジン) は、ウミシイタケ以外に発光クラゲ、ヒオドシエビやウミシャボテンなど種を越えて同じルシフェリンが用いられている。ウミシイタケルシフェリンが発光しないエビなどにもあることを考えると、これらの生き物は食物連鎖の中でルシフェリンを得た可能性がある。このような例からも明らかのように、ルシフェリンはルシフェラーゼほど構造的な多様性がない。

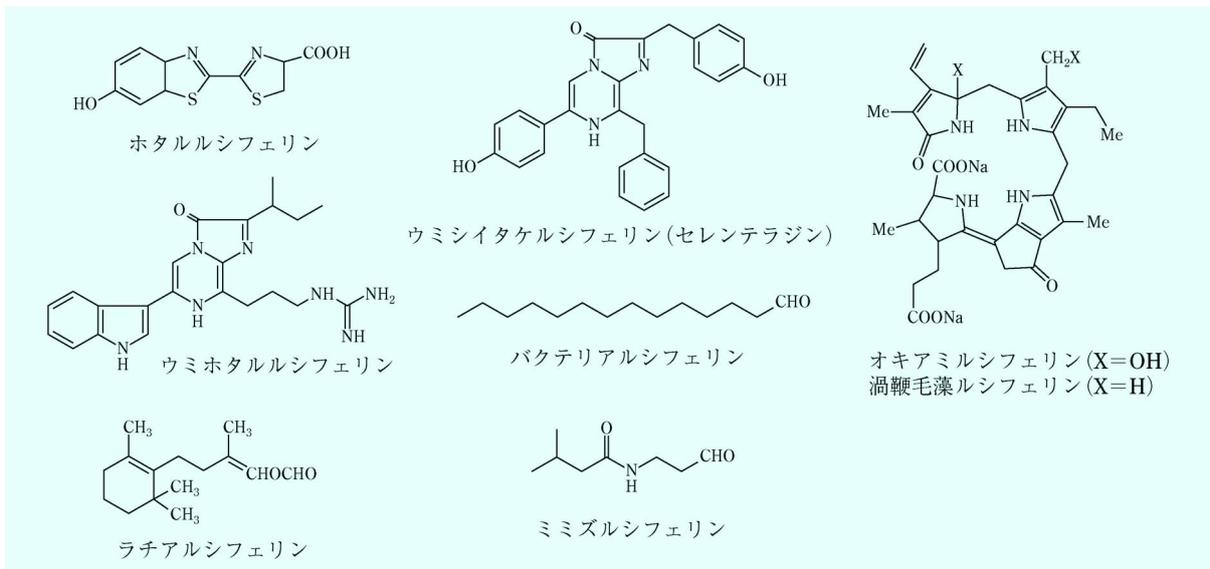


図1 解明されたルシフェリンの化学構造

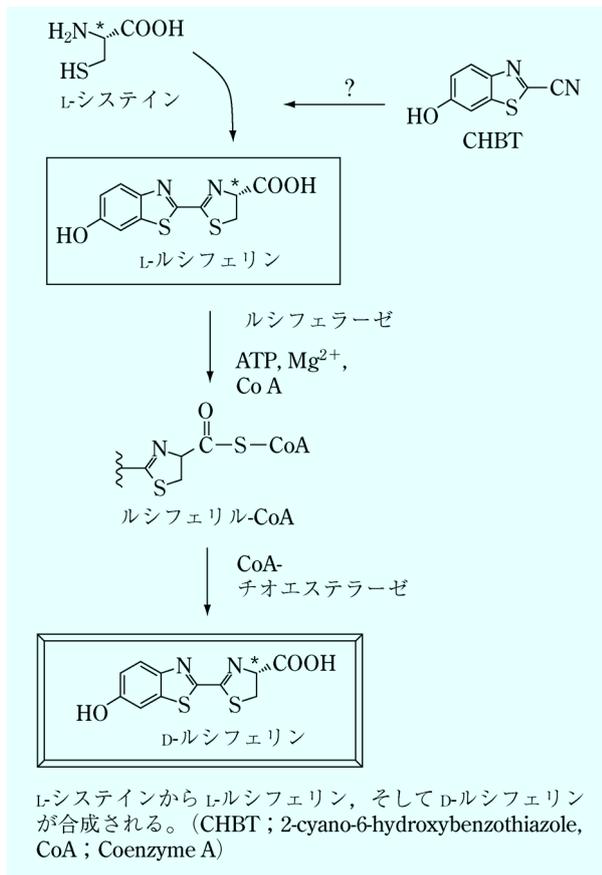


図2 提案されたホタルルシフェリンの生合成経路

ルシフェリンの生合成について、100% 解明された例はないが、渦鞭毛藻ルシフェリンはクロロフィルから⁴⁾、あるいはウミホタルルシフェリンが三つのアミノ酸から合成可能である⁵⁾など、徐々に解明は進んでいる。特に、ユニークなのはホタルのルシフェリンの生合成である。従来、ホタルルシフェリンはチアゾリン環と

ベンゾチアゾール環を有する化合物であり、D体の光学異性体のみ活性があり、L体は不活性なものと考えられていた。しかしアミノ酸は通常L体であることから、これに疑問を持った丹羽らは、ホタルの卵から成虫までのルシフェリンの含量とそのキラル体の組成を分析した⁶⁾。その結果、体内にはD体とL体が共に存在し、成長と共にD体が増加することを、また、CHBT (2-cyano-6-hydroxybenzothiazole) とL-システインが反応してL-ルシフェリンが合成され、その後、L体からD体に変換するメカニズムを確認した(図2)。併せて、この反応を用いれば、システインの定量分析ができることを明らかにした。このように、発光生物内におけるルシフェリン生合成過程の解明は徐々に進んでいる。

2.2 発光タンパク質の多様性

ルシフェリンの化学発光を触媒する発光タンパク質群の最も大きな特徴は、発光生物の種の間にはタンパク質の構造的な相関が少なく、進化上のつながりがないものが多い点である。たとえば、同じセレンテラジンを基質とするウミシイタケルシフェラーゼとコペポーダルシフェラーゼの間には全く構造的な相関はない⁷⁾。

表1に特徴的な生物発光の仕組みをまとめてみる。知っていただきたいのは、1) 冷光ともいわれる生物発光でも、量子収率は高くても0.41程度で、生物発光の仕組みによって差がある; 2) 発光色は青(460 nm前後)から黄色(560 nm前後)が多い。但し、発光甲虫の赤色ルシフェラーゼなら発光ピークが630 nmである。また、種々のルシフェリンアナログも作られ、低波長側では380 nmの光もでる; 3) 発光タンパク質の中には細胞内にとどまるものと分泌するものがある; 4) 分子量は20-60 kDaであるが、記載はしていないが発

表 1 代表的な発光タンパク質の特徴

ルシフェリン	発光タンパク質由来	量子収率	発光ピーク (nm)	分泌性	分子量 (kDa)
ホタルルシフェリン	アメリカ産ホタルルシフェラーゼ	0.41	560	非分泌型	60
ウミシイタケルシフェリン (セレンテラジン)	ウミシイタケルシフェラーゼ	0.05	480	非分泌型	36
セレンテラジン	発光クラゲイコリン	0.18	465	非分泌型	21
セレンテラジン	ガウシアルルシフェラーゼ	—	480	分泌型	20
ウミホタルルシフェリン	ウミホタルルシフェラーゼ	0.3	460	分泌型	61

光性の渦鞭毛藻では 130 kDa になるものもある；5) 酵素反応で必要とする補因子が多種多様である。このように、生物発光システムは驚くほどの多様性を持っている。生物発光の解明は、生体システムの進化を考える上でも大変重要である。

もう一点、注目して欲しい点は、ホタルルシフェラーゼの量子収率である。量子収率の一つの解釈は、1 個のルシフェリンから 1 個の光子を発する確率である。1950 年代の計測により、ホタルルシフェラーゼの量子収率は 0.88 と見積もられてきた。1 個のルシフェリンが反応すればほぼ 1 個の光子を発する、地上で最も効率の良い光を生み出すシステムとされていた⁸⁾。しかし安東らは、この数値に疑問を抱き、再確認の実験を行った。最新の CCD カメラで光計測する装置を立ち上げ、丁寧に光計測の校正を行った結果、ホタルルシフェラーゼの量子収率は 0.41 程度であると報告した⁹⁾。また、発光スペクトルを詳細に解析した結果、3 種類の発光種から成っており、そのうち緑色の発光種が pH の影響で発光強度が変化し、一方、他の二つの赤色の発光種は大きな変化がないことを見いだした。後述するが、量子収率の再検討は、発光メカニズムの研究にも大きな影響を与えている。他方、このような光計測の進歩は発光計測を相対的な光の量ではなく、絶対的な光の量として取り扱うことを可能にする。分析技術にもかかわるが、絶対光量測定の実立は、光計測の標準化に進み、信頼できる分析法に寄与できるのではないだろうか。

3 生物発光研究の今

3.1 ホタルの光が生命科学の最前線に

3.1.1 発光甲虫生物発光の基礎

ホタルルシフェリンを基質とするルシフェラーゼを持つ甲虫はホタル科、ヒカリコメツキ科、ホタルモドキ科とイリオモテボタル科の 4 科より構成される。世界各地の熱帯域から温帯域に生息、例えば、ホタル科だけに目を向けても約 2000 種存在する。また、南西諸島を含む日本列島には、およそ 40 種のホタル科のホタルと 1

種のイリオモテボタル科イリオモテボタルが生存する^{1)~3)}。

発光甲虫のルシフェリン・ルシフェラーゼ反応では、ホタルルシフェリンは Mg^{2+} の存在下、ルシフェラーゼの作用で ATP と反応して AMP 化され、ルシフェリル-AMP が生じ、次にルシフェラーゼの作用で酸素と反応、ペルオキシジアニオンを生成する。さらに酵素内で不安定なジオキセタンに変換される。ここからは諸説があるが、一つの説として、ジオキセタン構造は酵素内で開裂、 CO_2 と励起 1 重項状態のオキシルシフェリンを生成する。このとき、効率よくオキシルシフェリンの励起 1 重項状態のモノアニオンが、ついで脱プロトン化して励起 1 重項状態のジアニオンとなり、それぞれが基底状態に戻るとき、異なる色の光を発する。実際に発光甲虫の発光色は多彩であり、天然のルシフェラーゼの発光のピークを比較すると、ヒカリコメツキムシ由来のものが 535–590 nm (緑色からオレンジ色) の光を、鉄道虫では 545–630 nm (緑色から赤色) の光を、そしてホタル科のものでは 550–570 nm 程度の黄緑光を発している。また、ホタル由来のルシフェラーゼでは測定溶液の pH によってスペクトルが変化、アルカリ性で緑色の発光が、酸性では赤色の発光になる。一方、ホタル以外の発光甲虫由来ルシフェラーゼは全く pH によって発光色は変化しない。ルシフェリンが同一であることを考えると、ルシフェラーゼの一次構造が発光色や pH の感受性を決定している¹⁰⁾¹¹⁾。

これまでに 20 種以上の発光甲虫からルシフェラーゼ群がクローニングされ、多くの変異体が作成された。また、アメリカ産ホタルルシフェラーゼと日本産ゲンジボタルルシフェラーゼの高次構造が決定された¹²⁾¹³⁾。これらの結果をもとに発光の分子メカニズムを探る研究は進展、例えば発光色決定される分子メカニズムが盛んに論じられているが、最終的な解明には至っていない。前述した量子収率の再測定で明らかになった三つの発光種の由来が、これまでの議論で十分に説明できないのが現状である。ホタルの発光の秘密は、まだまだ十分に解明されていない。

3.1.2 ホタル発光・ATP を介した生体分析

発光甲虫の生物発光システムは、生命科学の最前線で生体物質の分析に用いられている。基本的な応用原理は、ルシフェリン、ルシフェラーゼが大過剰にあれば光の量は ATP 量に、ルシフェリン、ATP が大過剰にあれば光の量はルシフェラーゼ量に、さらにはルシフェラーゼ、ATP が大過剰にあれば光の量はルシフェリンにそれぞれ依存することである。応用法は大きく分けて、1) ATP 量を介した、2) ルシフェラーゼ量を介した、3) ルシフェリンを介したシステムが確立されているが、本論では 1 と 2 を紹介する。

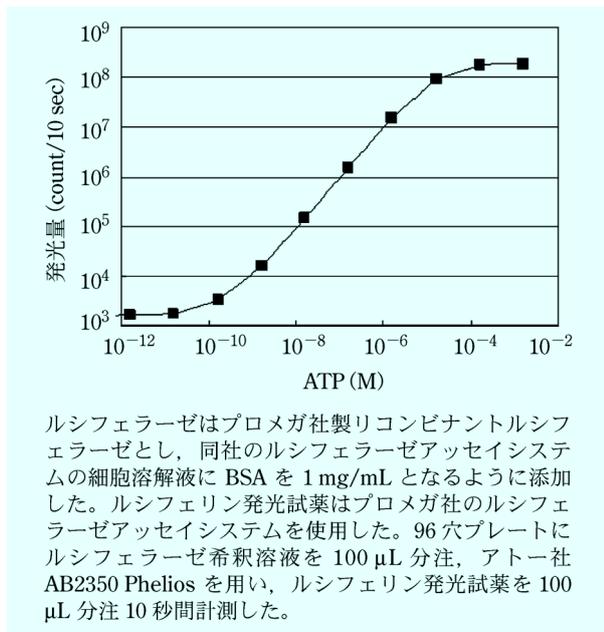


図 3 ATP 量と発光量の相関

ホタルルシフェラーゼで ATP 量を定量すると現時点では 10^{-10} M レベルから定量可能である。大きな特徴は光の量と ATP 量の関係は 5~6 桁オーダーで直線性を保つことである (図 3)。ATP の定量法は単なる定量法だけではなく、これ以外に食品安全管理分野で盛んに活用されている。具体的な例として、食中毒を起こすバクテリアに存在する ATP 量に着目、ATP 量をホタルルシフェラーゼで光として検出する。すでにバクテリアを検出するキットも市販されている¹⁴⁾。たとえば、キッコーマンの「ルシフェールシリーズ」である。「ルシパック II」なら、清浄度を判定する方法として、専用機器で測定、まな板なら 1000 カウントを超えたら、洗浄度としては不合格という具合である。また、一般生菌検査の「ルシフェール 250 プラス」なら、1 測定において、1 mL 当たり最大 100 個の大腸菌を検出可能である。従来、24 時間要していた検査が 5 時間程度で済むのも大きなメリットである。

一方、ATP の量には着目していないが、ATP を合成することを前提として生まれた応用が DNA 配列の分析法の一つピロシークエンスである¹⁵⁾。図 4(A) に示すように、DNA の伸長反応によってピロリン酸はできるが、ピロリン酸は例えば AMP とホスホエノールピルビン酸 (PEP) の存在下、ピルビン酸ホスフェートジキナーゼにより ATP となる。この ATP をホタルの発光により光として検出すれば、DNA が伸長されたことが検出できる。これを DNA 上の 4 種類の核酸で別々に伸張反応を検出することで、どの 1 残基であるか決定できる。この技術は大規模な高速 DNA 配列解析に、一方は、DNA 上にある特定の部分の DNA の配列を決定する技術として使われている。前者では大規模な装置も開

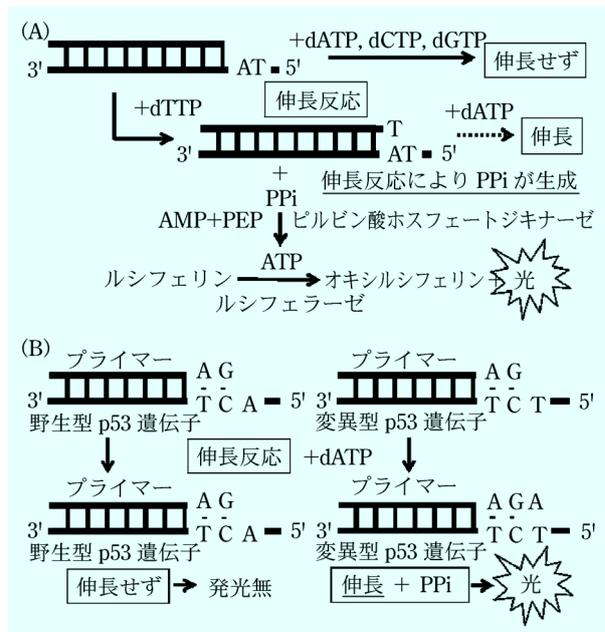


図 4 (A) : ピロリン酸生物発光法による 1 塩基伸長に伴う DNA 配列決定の原理, (B) : がん抑制遺伝子 p53 における 1 塩基伸長反応による 1 分子多型 (SNP) 解析法の原理

発され、高速度、網羅的な遺伝子解析する技術となっている (ギガシークエンス解析)。具体的には、生物から取り出した DNA を短い断片として、20 万個相当数の DNA の断片を基板の上に並べて、それに対して高速でピロリン酸から ATP を合成する反応を繰り返し、合成された ATP をホタルルシフェリン、ルシフェラーゼ反応で検出する。基板上のどのスポットがどの塩基のときに光を発したかを順次記録することで、100 個程度の長さの DNA の配列を解析できるので、大型コンピュータで配列をつなげ、20 メガ塩基相当の長さの DNA 配列が決定できる。これまで数週間要した解析が、数日で終了する。

また、後者の例である一塩基多型 (SNP) 解析にも応用できる。例えば、がん抑制遺伝子 p53 遺伝子の 249 番目の塩基は正常な場合は A だが、がん患者の多くが T に置き換わっている。このような場合、248 番目までの DNA プライマーを患者の DNA に反応させ、伸長反応を行うが、このときアデニンしか入れておかないと、がんの可能性が高い患者の 249 番目は T だから、A し結合できないので、DNA 合成が起こり、ピロリン酸が合成される (図 4(B))。このピロリン酸は ATP となり、ホタルのルシフェリン、ルシフェラーゼにより光が生まれる。つまり、発光した場合は、検体の DNA 配列は T であり、がんの可能性が高いということである。

このように、ホタルの発光する仕組みを利用すれば、手軽にまな板の大腸菌の検出から医療現場での患者の迅速 SNP 診断など、オンサイト分析技術として活用できる。

3.2.3 ホタルルシフェラーゼを利用した生体分析

細胞内の特定の遺伝子の転写活性量を指標として、化学物質の及ぼす毒性、あるいは薬効を分析・評価することが盛んに行われている。ルシフェラーゼは遺伝子転写活性を測定する方法、つまり遺伝子発現検出（レポーターアッセイ）系として現代生命科学において重要なツールである¹⁶⁾。一般に、測定方法は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれたベクターに、対象となるプロモーター領域を挿入したプラスミドを作製、細胞において一過性に発現させ、一定時間経過後、細胞破砕し、細胞内の合成されたルシフェラーゼ量を光の量として測定し、遺伝子の転写活性を評価する。転写産物と発光量が良く相関し、また、発光活性の測定が容易なので、広く普及している。

ただし、上記の方法では内部コントロールがない実験のため、遺伝子転写活性を十分に評価できない。そこで生まれたのが、デュアルアッセイ¹⁷⁾や多色マルチカラーアッセイである。ここでは多色マルチカラーアッセイを説明する。甲虫ルシフェラーゼには生きた細胞内でも発光色の色を変えない、しかも同じホタルルシフェリンにもかかわらず緑、^{だいだい}橙、赤色の光を生み出すことができる。これら3種のルシフェラーゼの光は色フィルターを付けた計測装置で光透過率さえ正しく評価すれば、簡単に色分離し個々の発光量として計測可能である。これを利用することで三つの狙った遺伝子の転写活性を測定できる¹⁸⁾。図5は、化学物質の免疫毒性評価

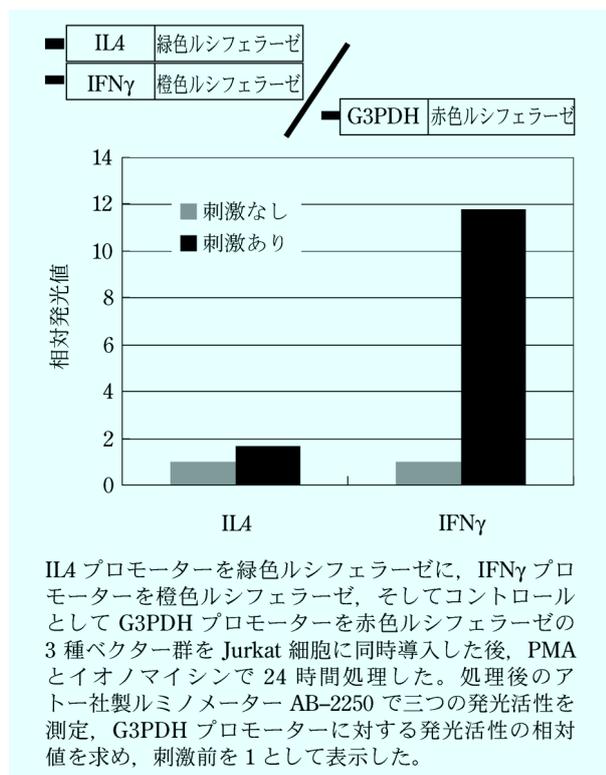


図5 マルチカラーアッセイによる3遺伝子発現同時解析実験の例

を行った例であるが、免疫毒性評価においてキーとなる IL4 プロモーターを緑色ルシフェラーゼに、IFN γ プロモーターを橙色ルシフェラーゼ、そしてコントロールとして G3PDH プロモーターを赤色ルシフェラーゼにつなげたベクター群を評価細胞となる Jurkat 細胞に複数、同時導入した後、PMA とイオノマイシンで化学物質刺激実験を行った例である。刺激によって、IFN γ プロモーターが 12 倍近く活性化されるのに対して、IL4 プロモーターでは比較的変動しないことが明らかになった。同様な実験は、デュアルアッセイでもできるが、対象遺伝子とコントロール遺伝子の転写活性しか測定できないので、操作を2回繰り返す煩雑な実験となる。このように、マルチカラーアッセイなら容易に複雑な細胞内の免疫応答を分析できる。

本方法は生きた細胞でも活用可能である。筆者らは、哺乳類細胞において時計遺伝子群 *Per*, *Bmal*, *Clock* の三つの時計遺伝子発現を解析することに成功した。図6(A)では二つの遺伝子の発現解析を行った例である。*Per2* プロモーター配列を赤色ルシフェラーゼ上流に、また *Bmal1* プロモーター領域を緑色ルシフェラーゼ上流に挿入したベクターを Rat-1 細胞に一過的に導入し、細胞をデキサメタゾン処理した後、二つの転写活性を 120 時間にわたり、発光量の変化として測定した例である。24 時間周期で転写活性が変化し、*Per*, *Bmal* 間

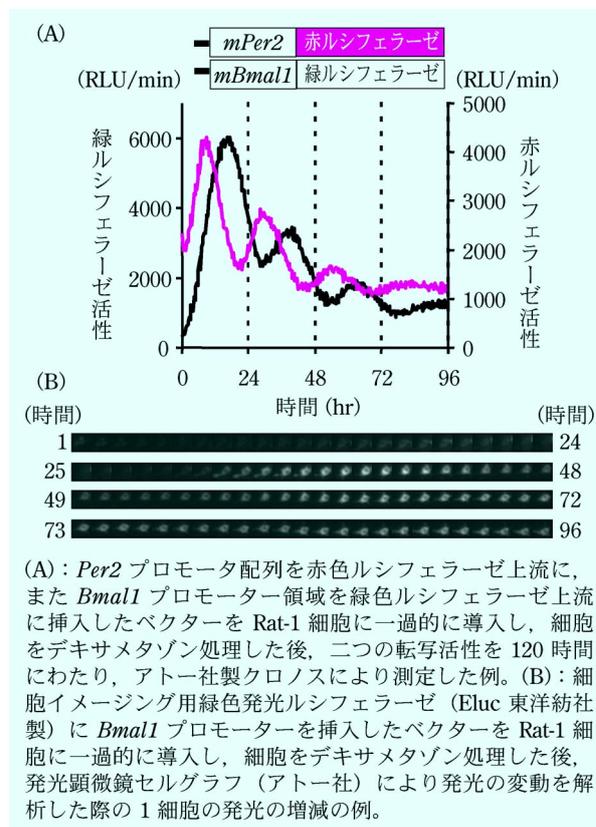


図6 多色ルシフェラーゼによる時計遺伝子のリアルタイム解析 (文献 19 の図を修正)

に約 12 時間の位相のずれがあることがわかる¹⁹⁾。

一方、細胞イメージング用に特化した緑色発光ルシフェラーゼに時計遺伝子 *Bmal1* プロモーターを挿入した遺伝子を導入した細胞を用い、発光イメージング装置で撮影すれば、1 個の細胞レベルで 24 時間周期の遺伝子発現の変化を、発光の増減として観察できる [図 6(B)]²⁰⁾。

3.2 日本発、ウミホタル生物発光

3.2.1 ウミホタルの生物発光反応の基礎

ウミホタルは日本沿岸に棲息する発光生物の一つで、その最大の特徴はルシフェラーゼが細胞外に分泌される点である。ウミホタルはルシフェリンとルシフェラーゼを体内に蓄えておき、危険がせまった時など海の中に放出し目くらましに使っている。この発光反応はシンプルであり、細胞外に分泌するウミホタルルシフェラーゼにイミダゾピラジノン骨格のウミホタルルシフェリンを加えれば発光する。光が生み出される発光量子収率は約 0.3 であり、ホタルに次いで高い値である²¹⁾。ルシフェラーゼは、およそ 555 個のアミノ酸によって構成される糖タンパク質であり、細胞外に分泌される特性を有している。最もユニークな点はルシフェラーゼ中のアミノ酸のうち 34 個も Cys 残基が存在し、多くの S-S 結合が存在すると予想される点である²²⁾²³⁾。この結果、このタンパク質は大変安定であり、室温での半減期（酵素活性が半分になる時間）が 60 時間以上と、他のルシフェラーゼに比べると断然、安定である。また、酵素活性の指標となるターンオーバー数が 1600 分子/分と他のルシフェラーゼに比べて高い点も大きな特徴である²⁴⁾。

発光生物の中には発光と蛍光のシステムが連携する例がある。例えば、発光クラゲの場合、イクオリンから発した青色の光は緑色蛍光タンパク質にエネルギー移動しクラゲとしては緑色の光を発する。これを生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) と呼ぶが、これはウミシタケなどにも見られる現象である。通常、エネルギー移動は自然界に存在するパートナー間で起こるものと考えられてきたが、芦高らはウミホタルルシフェラーゼと蛍光タンパク質の間にも BRET が起こることを見だし、BRET プローブとして細胞内の活性ペプチドプロセッシング過程を定量することに成功している²⁵⁾。ウミホタルルシフェラーゼはとてもユニークな生物発光である。

3.2.2 ウミホタルの生物発光を利用した生体分析

ウミホタルルシフェラーゼの最大の特徴は細胞外に分泌すること、及び他のルシフェラーゼに比べて安定なことであり、これらの特性を生かした実用化が進行している。また、従来、実用化されなかった大きな問題の一つはウミホタルルシフェリンを安価に供給できなかった点

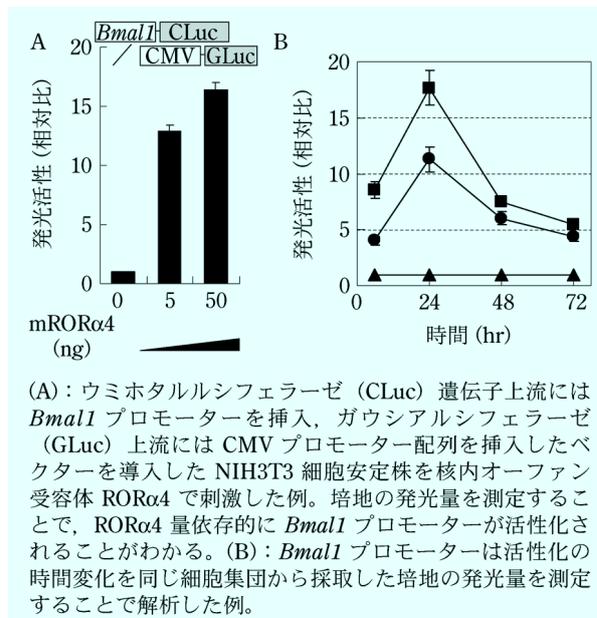


図7 二つの分泌ルシフェラーゼによるデュアルレポーターアッセイの一例 (文献 27 の図を修正)

であるが、呉らの開発した新規の化学合成法により、安定供給が可能になっている²⁶⁾。

通常のホタルルシフェラーゼのレポーターアッセイでは、細胞を破壊して後に発光計測するのが一般的であったが、ウミホタルルシフェラーゼなら発光活性を細胞外で計測でき、細胞を壊すことなく遺伝子発現を解析することができる。筆者らは、同じく分泌する特性を持つガウシアルシフェラーゼを用いてデュアルレポーターの手法を開発、ハイスループットに遺伝子発現を検出する系を確立した²⁷⁾。図 7 は、体内時計を例に *Bmal1* 遺伝子の転写活性の変化を測定したものである。ホタルルシフェラーゼ・ウミシタケルシフェラーゼを用いたデュアルレポーターと同様な結果が得られること、また、細胞を破碎しないことから同じ培養細胞集団から一部の培養液を取り出しながら、連続的に遺伝子発現を観察できる点を明らかにした。また、ウミホタルルシフェラーゼはガウシアルシフェラーゼに比べ、界面活性剤 SDS に対する耐性が高いことを利用して、シングルチューブにおいてガウシアルシフェラーゼを発光させた後、SDS によるガウシアルシフェラーゼ活性の消光、ウミホタルルシフェラーゼの発光測定の順でアッセイすることもできる。

ウミホタルルシフェラーゼは大腸菌で生産することはできないが、酵母や昆虫細胞で生産可能である。ウミホタルルシフェラーゼは容易にビオチン化が可能であり、抗体と融合させても著しく活性が低下しないことを見いだした。ビオチン化ウミホタルルシフェラーゼとインターフェロン α 抗体を用いたイムノアッセイ系を構築したところ (図 8)、従来のペルオキシダーゼを利用したイムノアッセイより 10 倍近く感度が向上、また、1

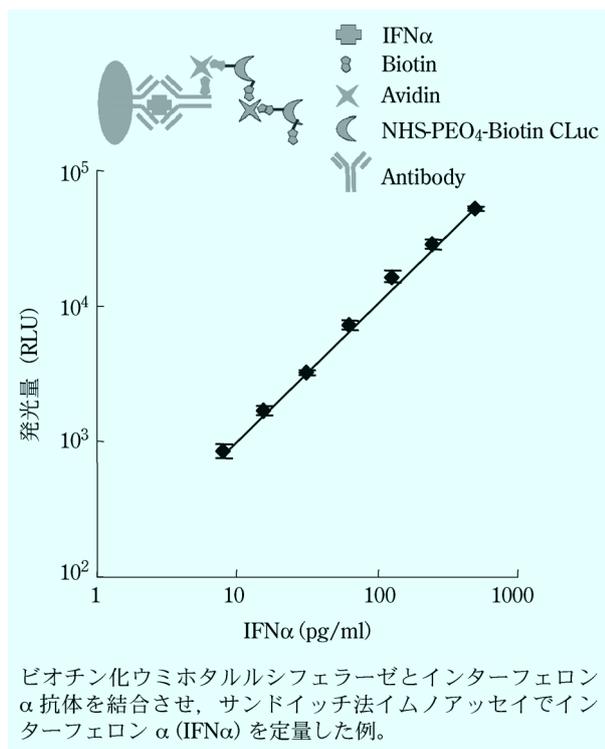


図8 ピオチン化ウミホタルルシフェラーゼを用いた高感度イムノアッセイ (文献28の図を修正)

時間程度にアッセイ時間を短縮できる²⁸⁾。酵素としても安定性が高いことから、室温で活性の低下を気にすることなく、簡便にできる方法である。

4 おわりに

生物発光は進化の過程でアトランダムに現れてきており、生物の持つ多様性をよくあらわしている。これは、光る生き物達が生体内の種々のシステムを活用した結果である。そのため、光の量は生体内の物質群に依存、例えばホタルルシフェラーゼならATPの量を、発光クラゲのイクオリンならカルシウムイオンを定量できるなど、天然の分析手法でもある。本講義では、分量の関係もあり、ホタルとウミホタルの発光系に絞った応用例となったが、他にも重要な用途が広がりつつある。次の機会にぜひ紹介できればと思う。

謝辞

本講義をまとめるにあたり、産業技術総合研究所の丹羽一樹博士、アトー社の浅川篤氏と貴重な議論を重ねていただいたことを、ここに感謝をする。最後に、この講義の機会を与えていただきました東京大学大学院理学研究科の小澤岳昌教授に感謝する。

文献

- 1) E. N. Harvey: "Bioluminescence", (1952), (Academic Press, New York).
- 2) 羽根田弥太: "発光生物", (1985), (恒星社厚生閣).
- 3) O. Shimomura: "Bioluminescence", (2006), (World Scientific publishing Co. Ltd.).

- 4) C. Wu, H. Akimoto, Y. Ohmiya: *Tetrahedron Lett.*, **44**, 1263 (2002).
- 5) S. Kato, Y. Oba, M. Ojika, S. Inouye: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1528 (2006).
- 6) K. Niwa, M. Nakamura, Y. Ohmiya: *FEBS Lett.*, **580**, 5283 (2006).
- 7) C. S. Szent-Gyorgyi, B. J. Bryan: U. S. Patent, 6232107 (2001,5,15).
- 8) H. H. Seliger, W. McElroy: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 21 (1959).
- 9) Y. Ando, K. Niwa, N. Yamada, T. Irie, T. Enomoto, H. Kubota, Y. Ohmiya, H. Akiyama: *Nature Photonics*, **2**, 44 (2008).
- 10) 近江谷克裕: 生化学, **76**, 5 (2004).
- 11) V. R. Viviani: *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1833 (2002).
- 12) E. Conti, N. P. Frank, P. Brick: *Structure*, **4**, 287 (1996).
- 13) T. Nakatsu, S. Ichiyama, J. Hiratake, A. Saldanha, N. Kobayashi, K. Sakata, H. Kato: *Nature*, **440**, 372 (2006).
- 14) 榎原達哉: "バイオ・ケミルミネセンスハンドブック", p. 154 (2006).
- 15) 荒川秀俊: "バイオ・ケミルミネセンスハンドブック", p. 142 (2006).
- 16) 中島芳浩: "バイオ・ケミルミネセンスハンドブック", p. 31 (2006).
- 17) L. H. Naylor: *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 749 (1999).
- 18) Y. Nakajima, T. Kimura, K. Sugata, T. Enomoto, T. Asakawa, H. Kubota, M. Ikeda, Y. Ohmiya: *Biotechniques*, **38**, 891 (2005).
- 19) 中島芳浩, 近江谷克裕: バイオテクノロジージャーナル, **6**, 230 (2006).
- 20) 中島芳浩, 野口貴子, 池田正明, 近江谷克裕: 時間生物学, **13**, 37 (2007).
- 21) O. Shimomura, F. H. Johnson: *Photochem. Photobiol.*, **12**, 291 (1970).
- 22) E. M. Thompson, S. Nagata, F. I. Tsuji: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6567 (1989).
- 23) Y. Nakajima, K. Kobayashi, K. Yamagishi, T. Enomoto, Y. Ohmiya: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 565 (2004).
- 24) O. Shimomura, F. H. Johnson, T. Masugi: *Science*, **164**, 1299 (1969).
- 25) T. Otsuji, E. Okuda-Ashitaka, S. Kojima, H. Akiyama, S. Ito, Y. Ohmiya: *Anal. Biochem.*, **329**, 230 (2004).
- 26) C. Wu, K. Kawasaki, S. Ohgiya, Y. Ohmiya: *Tetrahedron Lett.*, **47**, 753 (2006).
- 27) C. Wu, C. Suzuki-Ogoh, Y. Ohmiya: *Biotechniques*, **42**, 290 (2007).
- 28) C. Wu, K. Kawasaki, Y. Ogawa, Y. Yoshida, S. Ohgiya, Y. Ohmiya: *Anal. Chem.*, **79**, 1634 (2007).



近江谷克裕 (Yoshihiro OHMIYA)

北海道大学大学院医学研究科先端医学講座
光生物学分野 (兼 産業技術総合研究所セル
エンジニアリング研究部門) (〒060-
8638 札幌市北区北15条西7丁目)。群馬
大学大学院医学研究科内分泌学専攻修了。
医学博士。《現在の研究テーマ》生物発光
に関する生物学から細胞工学 (ホタル採集
から発光マウスの作成) 《主な著書》“バ
イオ・ケミルミネセンスハンドブック”
(編著) (丸善)。《趣味》酒と海外旅行。
E-mail: y-ohmiya@med.hokudai.ac.jp