

潜在的ルシフェラーゼ活性を利用したタンパク質分析技術

Protein Analysis Technique Based on Latent Luciferase Activity

西原 諒

NISHIHARA Ryo

生物発光は、ルシフェリン^{*1}がルシフェラーゼと呼ばれる発光酵素の触媒作用により酸化され、光を発する現象である。筆者は、生物発光イメージング技術^{*2}の開発過程で、ルシフェラーゼが存在しない場合でもルシフェリンが発光する現象に着目し、ルシフェラーゼではないタンパク質が特定のルシフェリンの発光反応を触媒する「擬似ルシフェラーゼ活性」を持つことを発見した。本研究では、タンパク質が潜在的に持つこの擬似ルシフェラーゼ活性を利用し、ルシフェリンを試料に混合するだけで、タンパク質の量や構造変化を検出できるタンパク質の発光分析法を開発した。本稿では、本手法の原理と応用例を概説し、迅速診断および医薬品の品質管理への展開の可能性について述べる。

*1 ルシフェリン：発光酵素ルシフェラーゼの基質となる物質の総称で、酸化によって発光する。

*2 生物発光イメージング技術：ルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞等にルシフェリンを添加することでこれを可視化する技術。例えば、動物個体内がん細胞を可視化する研究に使用される。

キーワード

化学発光, 生物発光, ルシフェリン, タンパク質, 酵素反応, 化学センサー

Bioluminescence is the emission of light resulting from the oxidation of luciferin^{*1} by the catalytic action of the enzyme luciferase. During the development of bioluminescence imaging^{*2} techniques, the author observed that luciferin can emit light even in the absence of luciferase. Building on this finding, the author discovered that proteins other than luciferase possess pseudo-luciferase activity, that is, they catalyze the luminescent reaction of specific luciferins. This study exploits the intrinsic pseudo-luciferase activity of proteins to develop a luminescent assay for quantifying their abundance and structural changes by mixing luciferin with the sample. This article outlines the principles and applications of this technique and discusses its potential use in rapid diagnostics and quality control of biopharmaceuticals.

*1 Luciferin: a class of substrates for enzyme luciferases that emit light upon oxidation.

*2 Bioluminescence imaging: a technique based on the addition of luciferin to cells or organisms engineered to express luciferase, enabling visualization, for example, of cancer cells in vivo.

Keywords

Chemiluminescence, Bioluminescence, Luciferin, Proteins, Enzymatic reactions, Chemical sensors

はじめに

生物発光とは、発光生物由来の基質ルシフェリンが、同じく発光生物由来の酵素ルシフェラーゼの触媒作用により酸化され、その際に生じる化学エネルギーが光として放出される現象である (Figure 1A)^[1]。蛍光とは異なり励起光源を必要としないため、生物発光は自家蛍光や光毒性の影響を受けない高感度な光分析手法として広く利用されてきた。応用範囲は癌細胞検出から食品衛生検査まで多岐にわたり、ライフサイエンス分野をはじめ広い研究分野で重要な役割を果たしている。しかし、既存の生物発光技術では、測定対象 (細胞やタンパク質などの生体分子) に対して、ルシフェラーゼを遺伝子工学的あるいは化学的手法で事前に標識する必要がある。この標識操作は、生物発光を簡便かつ迅速な分析技術として応用する際の制約となっていた。

筆者は、生物発光イメージング技術の開発過程で、ルシフェラーゼを標識していない動物個体に海洋生物由来のルシフェリンを投与した際、その個体内で発光が生じることを発見した^[2]。この結果は、ルシフェリンが本来の酵素であるルシフェラーゼ以外の生体分子とも発光反応を起こし得ることを示唆しており、ルシフェラーゼではないタンパク質に潜在的なルシフェラーゼ活性 (以後、擬似ルシフェラーゼ活性と呼ぶ) の存在を検討する端緒となった。

ウミホタルでは、ウミホタルルシフェリンがウミホタルルシフェラーゼの触媒作用により酸化され、発光が生じる (Figure 1A)。このルシフェリンに含まれるイミダゾピラジノン環^[3] (Figure 1A) は発光反応に必須の構造であり、多

くの海洋発光生物に共通して存在する^[1]。さらに、海洋発光生物が有する複数のルシフェリンの構造を比較すると、生物は進化の過程でイミダゾピラジノン環の炭素2-6位に結合する側鎖^[4]を改変し、自身のルシフェラーゼとの酸化反応に適した形へ最適化してきたように考えられる。筆者が動物個体内で観察した発光も、イミダゾピラジノン環をもつルシフェリンによるものであった。イミダゾピラジノン環は、ルシフェラーゼとの反応に酸素以外の補因子を必要としない比較的単純な反応機構 (ホタルのようにATPを補因子として必要としない) で発光するため、側鎖と結合しやすい内因性分子^[5]と非特異的に反応した可能性が高い。また、イミダゾピラジノン環の側鎖は人工的に改変しても発光能が維持されることが分かっている^[3]。そこで筆者は、この側鎖を標的タンパク質 (protein of interest: POI) と特異的に結合するように設計することで、POIと結合したときのみルシフェリンが発光する仕組みを構築できると考えた (Figure 1B)。

本稿では、POI自身がルシフェリンの発光反応を触媒する「擬似ルシフェラーゼ活性」を利用することで、ルシフェリンを混合するだけで得られる発光シグナルから、従来必要とされていたルシフェラーゼや抗体、酵素を使用せずに、タンパク質を定量・定性の両面から評価できる新規の発光分析技術について述べる。

*3 イミダゾピラジノン環：多くの海洋発光生物が持つルシフェリンの発光基本構造。

*4 側鎖：ここでは中心骨格であるイミダゾピラジノン環に結合している置換基。

*5 内因性分子：生物の体内で自然に発生する分子。

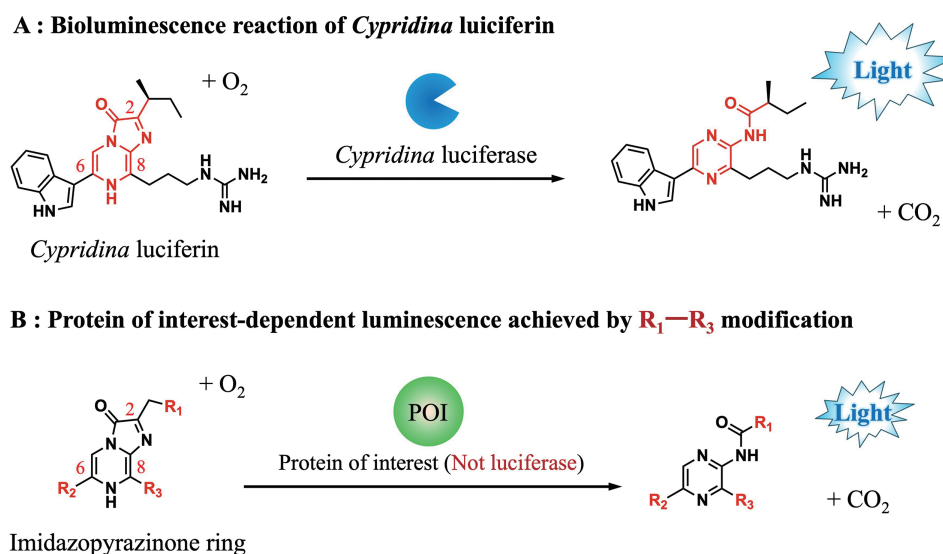


Figure 1 (A) Bioluminescence scheme of *Cypridina hilgendorffii*, a luminous marine organism: *Cypridina* luciferin is oxidized in the presence of *Cypridina* luciferase, producing light. The red region represents the imidazopyrazinone ring. (B) Concept of this study: Modification of the C-2, C-6, and C-8 side chains (R₁–R₃) of the imidazopyrazinone ring to develop luciferins that are oxidized and emit light in the presence of target proteins, enabling their application to protein analysis.

ウイルスのタンパク質の定量発光分析

2019年に発生した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)は、SARS-CoV-2 によって引き起こされ、ウイルス RNA や抗原を標的とした治療・診断技術の急速な発展につながった。中でも、ウイルス表面に存在するスパイクタンパク質は、ウイルスを被感染細胞に侵入させる上で重要な役割を果たすことから、治療・診断技術開発の上で重要なタンパク質として注目されてきた。いくつかの構造解析により、スパイクタンパク質には複数の疎水性ポケットが存在し、リノール酸をはじめとする多様なリガンドが結合することが報告されている^[4]。一方、イミダゾピラジノン環を含むルシフェリンの発光反応には、疎水性ポケットが酸化反応の場として必要であることが知られている。そこで本研究は、スパイクタンパク質の疎水性ポケットに適合する側鎖を持つルシフェリンを選択することで、スパイクタンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性を探索した^[5]。

イミダゾピラジノン環を有するルシフェリンは、酸素以外の補因子を必要としないため、スパイクタンパク質とルシフェリンを混合するだけで発光の有無を評価できる。そこで、海洋生物由来のイミダゾピラジノン型ルシフェリンであるセレンテラジン(Coelenterazine: CTZ)^[6]、ウミホタルルシフェリン、さらにこれらの側鎖を人工的に改変した誘導体を含む合計36種類のルシフェリンについて、スパイクタンパク質との発光を比較した(Figure 2A)。その結果、発光を示したのはウミホタルルシフェリンのみであった(Figure 2A)。このことから、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質には、ウミホタルルシフェリンの発光を特異的に触媒する擬似ルシフェラーゼ活性が存在するを見いだした。スパイクタンパク質は、ウミホタルルシフェラーゼと同様に、ウミホタルルシフェリンを青色に発光させた。さらに興味深いことに、ウミホタルルシフェリンはヒト唾液中に含まれるタンパク質(α -アミラーゼやムチンなど)

*6 セレンテラジン：オワンクラゲや発光珊瑚ウミシイタケなど、多くの発光生物で確認されている天然のルシフェリン

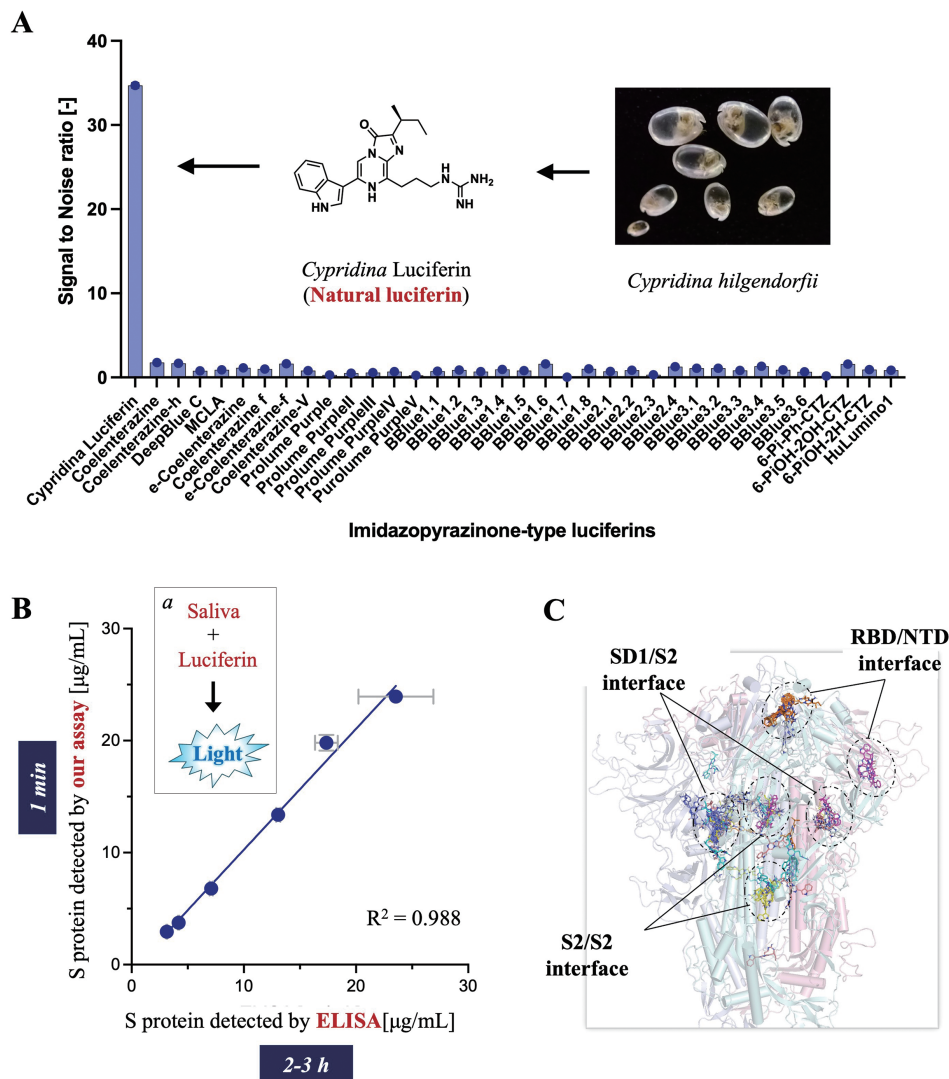


Figure 2 (A) Luminescence response from SARS-CoV-2 spike (S) protein treated with imidazopyrazinone-type luciferins. The signal-to-noise ratio indicates the ratio of the total luminescence of the luciferin/S protein pair relative to that of luciferin only. (B) Correlation between the measured concentrations of SARS-CoV-2 S protein using our developed luminescence assay and ELISA. The inset a depicts the luminescence assay scheme. (C) Docking simulation of luciferin with S protein.

とは発光を示さなかった。この高い反応特異性を利用し、未処理のヒト唾液中にウミホタルルシフェリンを添加し、自発的に生じる青色発光シグナルを市販のルミノメータで測定するだけで、唾液中のスパイクタンパク質濃度を酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)⁷ と同等の精度で定量することに成功した (Figure 2B)。

SARS-CoV-2 の感染診断には、ウイルスに特徴的な遺伝子を増幅して検出する方法 (PCR法) とウイルスタンパク質抗原を検出する方法 (抗原検査法) が主に用いられている。PCR法は感度が高く確定診断に適するものの、結果が得られるまでに約2時間を要するため、大量検体の迅速処理には不向きである。

一方、本技術は検体前処理を必要とせず、わずか1分で定量分析が可能であり、従来技術を大きく上回る迅速性と簡便性を実現した。さらに、ウミホタルルシフェリンは他のコロナウイルスである MERS-CoV のスパイクタンパク質とは反応しないことから、今後は、ウイルス種の識別にも利用できる可能性がある。これは、ルシフェリンが SARS-CoV-2 スパイクタンパク質ドメイン⁸の界面に特有の疎水性ポケットで効率的に発光するためであり、その結合様式はドッキングシミュレーション⁹によって予測された (Figure 2C)。このドメインの界面はすべてのSARS-CoV-2の株に保存されている領域であるため、本手法は標準株 (武漢株) だけでなく、変異株であるオミクロン株に対しても発光検出が可能であることも確認できた。以上より、ウイルスタンパク質自身が持つ擬似ルシフェラーゼ機能を利用した本タンパク質分析手法は、従来法よりも簡便かつ迅速にウイルスタンパク質を定量できる革新的な技術であり、今後、新たなウイルス計測手法としての応用が期待される。

*7 酵素免疫測定法 (ELISA) : 抗体を用いて標的分子を定量分析する手法。

*8 タンパク質ドメイン : 通常100~200個ほどのアミノ酸で形成されるタンパク質の部分構造。

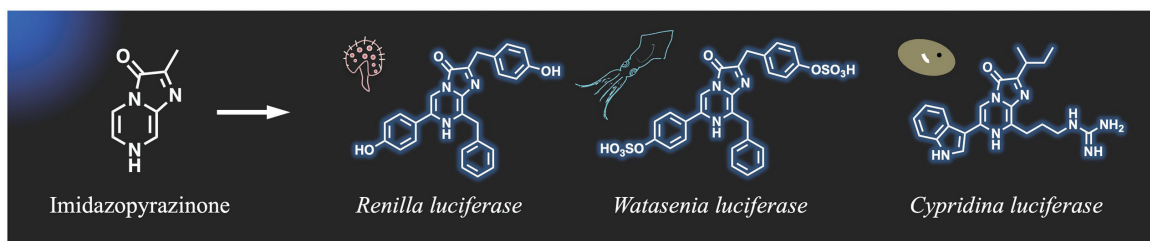
*9 ドッキングシミュレーション : タンパク質と別の化合物の間の相互作用でできる安定な構造を予測する計算科学的手法。

人工ルシフェリン開発による他のタンパク質分析への応用

天然ルシフェリンの化学構造を改変することで、本技術はウイルスタンパク質に限らず、ヒト由来タンパク質の分析にも応用できる。海洋発光生物では、イミダゾピラジノン環の側鎖がそれぞれのルシフェラーゼに適合するよう、進化の過程で調整されている¹¹。例えば、発光珊瑚ウミシイタケ、ホタルイカ、ウミホタルが有するルシフェリンでは、いずれもイミダゾピラジノン環を持つものの、その側鎖構造は互いに異なる (Figure 3A)。すなわち、自然界における生物発光系の多様性は、イミダゾピラジノン環の側鎖の違いが大きく寄与しており、これが異種間で交差性のない独自の発光反応を形成する一因となっている。

本研究では、この自然界の分子進化原理に着目し、標的タンパク質に最適な側鎖をイミダゾピラジノン環に導入した人工ルシフェリンを設計・合成した。これにより、本測定原理をさまざまなタンパク質の分析へ拡張することに成功した。実際に、ヒト由来のタンパク質であるヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA)¹⁶や免疫グロブリンG (Immunoglobulin G: IgG)¹⁷に対して発光反応を示す人工ルシフェリンを開発しており (Figure 3B), SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の場合と同様に、ルシフェリンを混合するだけでこれらタンパク質の検出が可能になった。次章では、人工ルシフェリンを用いた具体的なタンパク質分析技術について述べる。

A : Imidazopyrazinone (IPT)-type luciferins found in nature for luciferases



B: Artificially developed IPT-type luciferins for other proteins

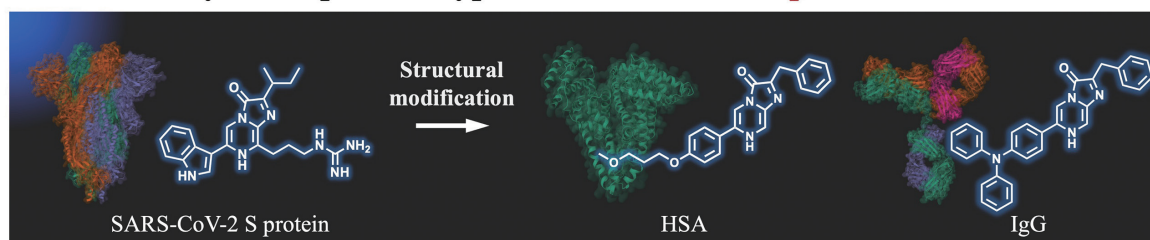


Figure 3 Molecular design of luciferins found in nature (A) and those tailored for protein analysis (B).

ヒト由来タンパク質の定量発光分析

HSAは、血液の浸透圧保持やpH緩衝作用に加え薬物などの外来物質を結合し運搬する機能を持つ。この薬物の結合能はHSAの疎水性ポケットに由来する。そこで、この疎水性ポケットを反応場として発光するルシフェリンを開発することで、腎機能や肝臓関連疾患等の指標となる血清中HSA濃度の定量を目指した^[6]。天然ルシフェリンであるCTZと、その側鎖を改変した人工ルシフェリンを合わせた計18種類のルシフェリンについて、HSAとの発光を比較した。その結果、発光を示したのは人工ルシフェリンのみであった (Figure 4A)。このことから、イミダゾピラジノン環の側鎖を調節することで、ヒト由来のタンパク質に対しても有意な発光を示すルシフェリンを獲得できることが示唆された。

HSAは薬物との共結晶構造解析^[10]により、主に2つの薬物結合サイト(サイト1とサイト2)を有することが明らかになっている^[8]。そこで、各結合サイトに特異的に結合する薬物(Warfarin: サイト1, Ibuprofen: サイト2)を用いて競合阻害試験^[11]を行った(Figure 4B)。その結果、Ibuprofenが人工ルシフェリンとHSAの発光を強く阻害した一方で、Warfarinは阻害効果を示さなかったことから、人工ルシフェリンはサイト2に結合することが示唆された。さらに、ドッキングシ

ミュレーションによって、人工ルシフェリンがサイト2に結合することが裏付けられた(Figure 4C)。サイト2は疎水性ポケットであることから、人工ルシフェリンの発光にも疎水性ポケットの存在が必要であることが示された。

HSAで発光した人工ルシフェリンは、他の10種類以上のヒト由来タンパク質とは発光を示さない(Figure 4A)。また驚いたことに、HSAとアミノ酸配列の相同性が75%と高いウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA)でも発光を示さなかった。BSAにもHSAと同様に薬物を結合するサイト2が存在する。しかし、人工ルシフェリンはBSAとHSAのサイト2のわずかな立体構造の違いを識別し、HSAに対してのみ発光したと考えられる。

次に、人工ルシフェリンを用いて血清中HSAの定量を行った。血清中HSAが35 mg/mL未満に低下すると肝硬変や慢性肝炎などの肝機能障害が示唆されるため、正確で迅速な測定が重要である。現在用いられるBCG (bromocresol green: BCG) 比色法はHSAに対する特異性が低く、ELISA法は測定に2~3時間を要する。これに対して、本技術は人工ルシフェリンを

*10 共結晶構造解析: X線結晶構造解析等を用いてタンパク質とそれに結合する分子と一緒に形成する結晶構造を解析すること。

*11 競合阻害試験: 例えば酵素反応において、基質と酵素の反応を阻害する働きを調べる実験法。

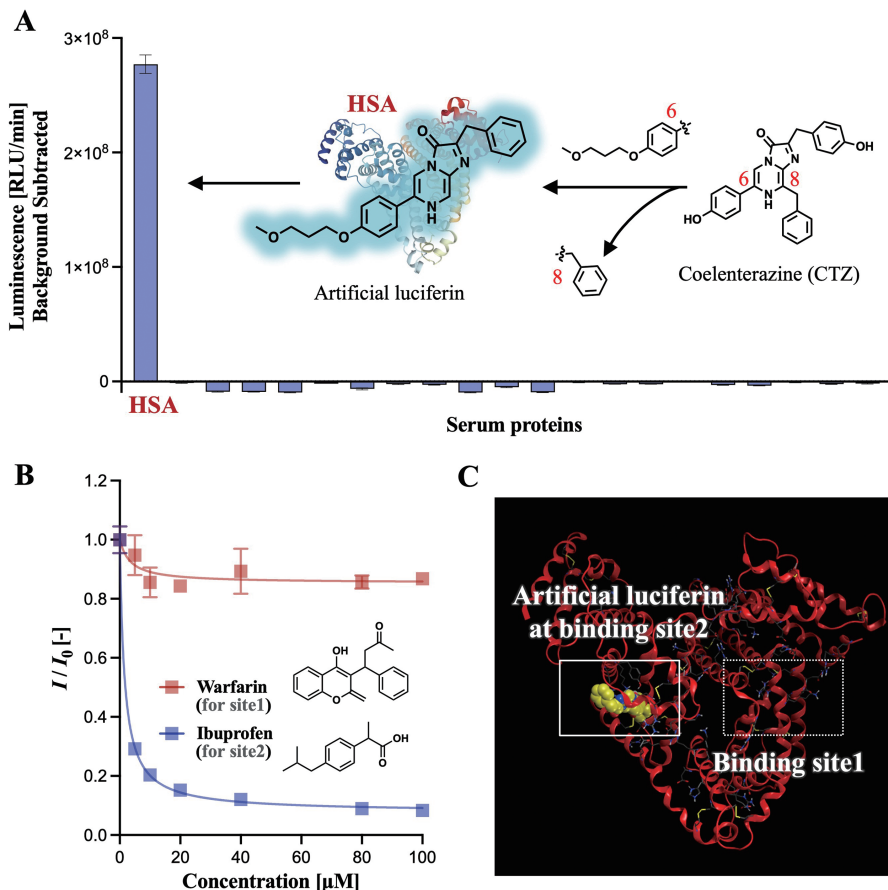


Figure 4 (A) Human serum albumin (HSA)-selective luminescence of artificial luciferin created by modifying the side chains of the natural luciferin CTZ. (B) Luminescence response with (*I*) and without the binding drug (*I*₀) (C) Docking simulation of artificial luciferin with HSA.

混合するだけでHSAを特異的に認識して速やかに発光するため、正確で迅速な測定が特長である。人工ルシフェリンの発光強度はHSA濃度に依存する。血清サンプルの前処理なしにルシフェリン添加後1分間の発光強度測定から算出した血清中HSA濃度は、ELISAによる結果とよく一致した。従ってルシフェリンを混ぜる簡便な操作で、血清中HSAを迅速に定量できることを示した。また近年では、本技術をさらに応用し、尿中の微量アルブミン(糖尿病性腎症の指標)^[9]や血清中の遊離銅(Wilson病やMenkes病の指標)^[10]の定量にも成功しており、さまざまな疾患の迅速診断への適用可能性を示した。

簡便性と迅速性に優れた本技術は、その場で分析・診断を行うオンサイト分析にも適している。例えば、HSAと発光反応を起こす人工ルシフェリンを塗布した、携帯可能な縦横15 mmのテストストリップに血清を1滴滴下するだけで、血清中HSAを定量できた^[11]。肝臓癌患者と健常者では血清中HSA濃度に明確な差があることが知られているが、本手法によってその差も識別できた。本技術は、抗体や酵素を使用せず、低コストで合成可能な低分子の人工ルシフェリンのみを利用したタンパク質試薬フリーの検出方法である。また、テストストリップは室温で保存できるなど、保存安定性にも優れている。さらに、現在ではハンディタイ

プの小型発光測定器も市販されており、本技術と組み合わせることで、日常的に健康状態をモニタリングするオンサイト分析への応用が期待される。

ヒト由来タンパク質の定性発光分析

IgGなどの抗体は、ウイルスや細菌を認識・排除する重要な機能を持ち、診断薬や治療薬としても広く利用されている。しかし、抗体は製造・保存・使用の各過程で環境の影響を受けやすく、変性¹²が生じると本来の機能を失う可能性がある。現在、抗体の変性評価にはサイズ排除クロマトグラフィー(size-exclusion chromatography: SEC)や動的な光散乱(dynamic light scattering: DLS)が用いられているが、これらには専門的な知識と高度な操作が必要である。

そこで、IgGの構造に応じて発光波長(発光の色)が変化する人工ルシフェリンを開発し、この発光特性を利用したタンパク質構造変化の簡便な検出法の確立を目指した(Figure 5A)^[7]。具体的には、イミダゾピラジノン環の炭素6位にトリフェニルアミン(triphenylamine: TPA)基を側

*12 変性: タンパク質がとる特有の構造の一部またはすべてが変化すること。

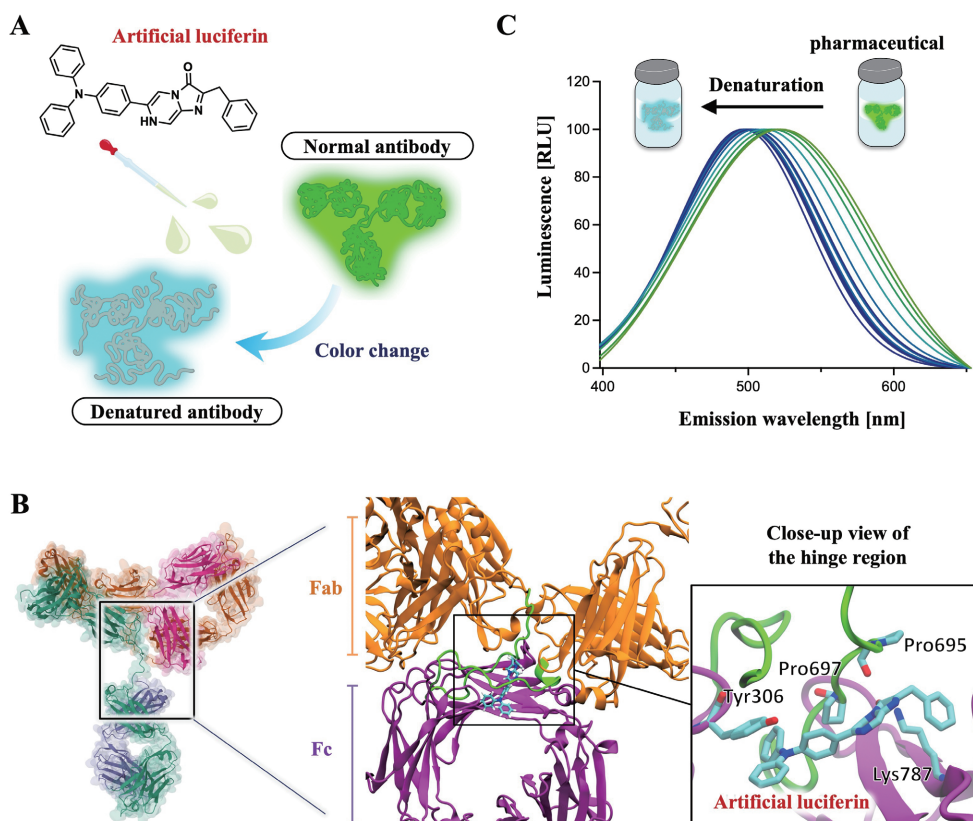


Figure 5 (A) Changes in the luminescence color of artificial luciferin depending on the structural states of IgG. (B) Binding pose of artificial luciferin at the hinge region of IgG obtained from MD simulations. (C) Spectral shift of the emission associated with denaturation of a therapeutic antibody.

鎖として導入した人工ルシフェリンを設計・開発した (Figure 5A)。TPA 基は外部刺激(物理的ストレスや溶媒環境)によって分子内回転を起こし、HOMO-LUMOバンドギャップ¹³を変化させる特性を持つ。この性質を利用し、IgG の構造変化が TPA 基を介して人工ルシフェリンの発光波長を変化させることを期待した。

期待通り、開発した人工ルシフェリンは、IgG と発光反応を示し、正常な IgG では緑色発光、熱で変性させたIgG では青色発光を示した (Figure 5A)。このように本研究では、IgG の構造を発光色によって評価できる人工ルシフェリンの開発にも成功した。さらに、分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーション¹⁴により、ルシフェリンは TPA 基を介して IgG のヒンジ領域¹⁵と呼ばれる疎水性ポケットに結合することが予測された (Figure 5B)。このヒンジ領域は一部の抗体医薬品¹⁶にも含まれる。従って、人工ルシフェリンを用いることで、抗体医薬品の品質評価も可能であると考えた。

抗体医薬品は、主にIgGを基に開発されており、がんや骨粗しょう症などの幅広い疾病の治療に利用されている。IgGには4つのサブクラス (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) があるが、抗体医薬品は、IgG1, IgG2およびIgG4 を基に開発されている。そこで、これらのサブクラスを基に開発された医薬品を対象に人工ルシフェリンの発光特性を検証した。その結果、いずれの医薬品でも発光を確認したが、医薬品の正常状態と変性状態で人工ルシフェリンの発光波長に顕著な変化が認められたのは IgG2医薬品だけであった。IgGは、サブクラスによってヒンジ領域の特徴(長さやジスルフィド結合¹⁷の数など)が異なる。従って、人工ルシフェリンは IgG2 に特有のヒンジ領域の構造変化にตอบสนองして発光波長を変化させたと考えられる。人工ルシフェリンの発光波長は熱で変性させたIgG2 の増加に応じて緑色から青色へと変化するため、発光波長の変化幅を読み取ることで、IgG2医薬品の変性度を定量的に評価できることも分かった (Figure 5 C)。変性した抗体の定量には、蛍光色素を用いた蛍光検出法も利用されている。しかし、この方法は蛍光強度の変化を測定するため、励起光源に由来するバックグラウンドシグナルの影響を受けやすい。一方、本技術は誤差が生じやすい発光強度ではなく、発光波長の変化を指標とすることで、より高い信頼性で定量を行うことが可能となる。また、人工ルシフェリンを混合してから3分以内に計測が完了する。本技術は、SEC や DLSなどの従来法と比較して、より簡便かつ迅速な手法であり、IgG を基盤とする抗体医薬品や診断薬の品質評価技術として有望である。さらに、ルシフェリンの化学構造を改変することで、IgG1 や IgG4 を含む抗体医薬品や診断薬の品質評価への応用も期待できる。

*13 HOMO-LUMOバンドギャップ：分子軌道理論における電子の基底状態と励起状態のエネルギー差。

*14 分子動力学 (MD) シミュレーション：古典力学のニュートン方程式を数値的に解き、原子や分子の運動をシミュレーションすることで、物質の動的性質や構造変化を解析する手法。

*15 ヒンジ領域：FabドメインとFcドメインの間にある柔軟な構造。

*16 抗体医薬品：疾患関連分子に特異的に結合する抗体を医薬品としたもの。

*17 ジスルフィド結合：システイン残基間の共有結合で、タンパク質の構造や機能に影響する。

おわりに

本稿では、測定対象となるタンパク質自身が潜在的に有する擬似ルシフェラーゼ活性を新たに発見し、これを活用することで、ルシフェリンを検体に混合するだけという極めて簡便な操作で、タンパク質の量および質を分析できることを述べてきた。本手法で用いたルシフェリンは、特定のタンパク質を選択的に認識・結合し、反応後には自らが発光するというレポーター機能を有しているため、抗体や酵素が不要となり、わずか数分でタンパク質の測定が完了する。この高い簡便性と迅速性は、測定に数時間を要する従来のELISA法とは一線を画す (Figure 6)。

COVID-19パンデミック時には、感染有無を迅速に判定できるイムノクロマト法が社会に大きく貢献したが、抗体に依存するこれらの手法では、変異を繰り返すウイルスへの対応が容易ではなかった。一方、本研究で使用したウミホタルルシフェリンは、SARS-CoV-2スパイクタンパク質に共通して保存される構造領域で発光することから、標準株 (武漢株) に加えて変異株に対しても適用可能であることが示唆された。また、本技術はイムノクロマト法と同様にテストストリップを利用したオンサイト分析への展開も可能であり、ルシフェリンを塗布したテストストリップは室温保存も可能であることから、将来のパンデミックにおいて既存手法を補完する有力なツールとなることが期待される。

さらに本研究では、人工ルシフェリンを開発することで、抗体の取得が困難なタンパク質の構造変化の検出にも対応できることを示した。医薬品や診断薬として利用される抗体は、製造・保存過程で環境の影響を受けやすく、変性すると本来の機能が失われるだけでなく、生産効率の低下にもつながる。人工ルシフェリンはIgGに共通する構造領域で発光を起こすことから、IgGに関連した診断薬や医薬品の品質管理技術としても利用が期待される。

以上のように、本技術は感染症の迅速検出にとどまらず、バイオ医薬品の開発・製造過程における品質評価にも広く貢献可能な次世代の分析・計測技術である。既存の測定原理に依存しない革新的なアプローチにより、従来は測定が困難だったタンパク質も新たなターゲットとすることが可能となる。迅速検査の新たな選択肢として社会に提供できるよう、今後は有効性と再現性の検証を重ねていく。

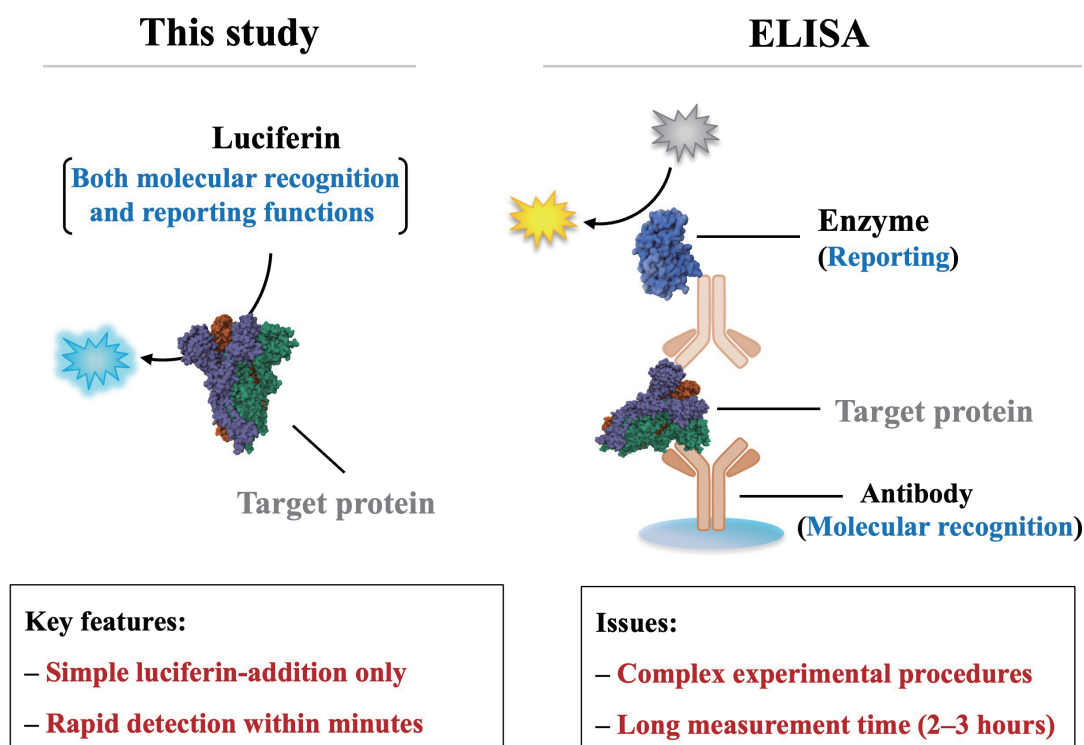


Figure 6 Comparison of the present technique with the conventional protein analytical method ELISA.

参考文献

- [1] Shimomura, O. Bioluminescence: Chemical Principles and Methods. *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods* 2006, 1–471. DOI: 10.1142/9789812773647_0001
- [2] Nishihara, R.; Paulmurugan, R.; Nakajima, T.; Yamamoto, E.; Natarajan, A.; Afjei, R.; Hiruta, Y.; Iwasawa, N.; Nishiyama, S.; Citterio, D. Highly bright and stable NIR-BRET with blue-shifted coelenterazine derivatives for deep-tissue imaging of molecular events in vivo. *Theranostics* 2019, 9, 2646–2661. DOI: 10.7150/thno.32219
- [3] Nishihara, R.; Suzuki, H.; Hoshino, E.; Suganuma, S.; Sato, M.; Saitoh, T.; Nishiyama, S.; Iwasawa, N.; Citterio, D.; Suzuki, K. Bioluminescent coelenterazine derivatives with imidazopyrazinone C-6 extended substitution. *Chem. Commun.* 2015, 51, 391–394. DOI: 10.1039/C4CC06886F
- [4] Toelzer, C.; Gupta, K.; Yadav, S. K. N.; Borucu, U.; Davidson, A. D.; Kavanagh Williamson, M.; Shoemark, D. K.; Garzoni, F.; Staufer, O.; Milligan, R.; Capin, J.; Mulholland, A. J.; Spatz, J.; Fitzgerald, D.; Berger, I.; Schaffitzel, C. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* 2020, 370, 725–730. DOI: 10.1126/science.abd3255
- [5] Nishihara, R.; Dokainish, H.; Kihara, Y.; Ashiba, H.; Sugita, Y.; Kurita, R. Pseudo-Luciferase Activity of the SARS-CoV-2 Spike Protein for Cypridina Luciferin. *ACS Cent. Sci.* 2024, 10, 283–290. DOI: 10.1021/acscentsci.3c00887
- [6] Nishihara, R.; Niwa, K.; Tomita, T.; Kurita, R. Coelenterazine Analogue with Human Serum Albumin-Specific Bioluminescence. *Bioconjugate Chem.* 2020, 31, 2679–2684. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00536
- [7] Nishihara, R.; Niwa, K.; Tomita, T.; Yamamoto, E.; Kurita, R. Discovery of Pseudo-Luciferase Activity in Immunoglobulin G (IgG) and Its Application to the Detection of IgG Denaturation. *Anal. Chem.* 2025, 97, 9935–9943. DOI: 10.1021/acs.analchem.5c00646
- [8] Ghuman, J., Zunszain, P., Petitpas, I., Bhattacharya, A., Otagiri, M., and Curry, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005, 353, 38–52. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.07.075
- [9] Kihara, Y.; Kurita, R.; Nishihara, R. Caged luciferin for the detection of albuminuria based on the pseudo-esterase/luciferase activities of albumin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2025, 98, uoaf074. DOI: 10.1093/bulcsj/uoaf074
- [10] Nishihara, R.; Kurita, R. Mix-and-read bioluminescent copper detection platform using a caged coelenterazine analogue. *Analyst* 2021, 146, 6139–6144. DOI: 10.1039/D1AN01292D
- [11] Kurita, R.; Nishihara, R. Dry chemistry utilizing artificial luciferin for human serum albumin quantification. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2025, 423, 136700. DOI: 10.1016/j.snb.2024.136700



西原 諒

Dr. NISHIHARA Ryo

国立研究開発法人産業技術総合研究所
健康医工学研究部門
主任研究員
Senior Researcher
Health and Medical Research Institute, National
Institute of Advanced Industrial Science and
Technology (AIST)