

# 発光細菌の発光分子メカニズム及び ストレス応答性バイオセンサーとしての細菌生物発光

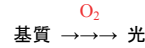
柄谷 肇\*

## はじめに

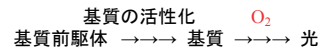
地球上には、海洋、陸水、陸上を問わず、進化の過程において独立的に発生してきたと考えられる多岐多様な発光生物が生息する。原核単細胞生物から脊椎動物まで、発光生物は表1のように分類(計746)される(Thouand 2014)。

発光反応基質(総称ルシフェリン)と発光触媒酵素(総称ルシフェラーゼ)は発光生物間で異なるが、食物連鎖下段のコペポダと上段のオワンクラゲの例に見られるように、食物連鎖と関連して発光基質ルシフェリンの基本構造に共通項が存在することもある。これまでに研究されてきた生物発光の反応メカニズムはそれぞれ異なるものがあるが、酸素分子を要すること、またジオキセタ

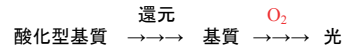
Type I 直接酸化: 基礎的な酵素基質反応: ウミボタルなど



Type II 基質の活性化, それに続く酸化反応: ホタルなど



Type III 還元反応による基質生成, それに続く酸化反応: 発光細菌など



Type IV 基質-酵素複合体, O<sub>2</sub>結合(フォトプロテイン, P), それに続くイオン活性化: オワンクラゲなど

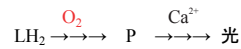


図1 発光メカニズムの分類。

ノン中間体あるいはペルオキシ中間体を経ることを共通項とする。また、発光の分子メカニズムは大きく4つのカテゴリーに分類できる(図1)。

表1 発光生物種の多様性と棲息域。

種類	(陸棲 <sup>*1</sup> /全体 <sup>*2</sup> )
細菌類 (Bacteria)	(2/5)
真菌類 (Eumycota)	(12/12)
褐色植物 (Chromophycota)	(0/11)
有毛根足虫亜門 (Sarcomastigophora)	(0/10)
刺胞動物 <sup>*3</sup> (Cnidaria)	(0/95)
有櫛動物 (Ctenophora)	(0/22)
紐型動物 (Nemertea)	(0/1)
軟体動物 (Mollusca)	(2/77)
環状動物 (Annelida)	(15/43)
節足動物 (Arthropoda)	(153/215)
毛顎動物 (Chaetognatha)	(0/1)
棘皮動物 (Echinodermata)	(0/47)
半索動物・海洋性無脊椎動物 (Hemichordata)	(0/3)
脊索動物・脊髄を有する動物 (Chordata)	(0/204)

\*<sup>1</sup> 陸水を含む \*<sup>2</sup> 海棲 + 陸棲 \*<sup>3</sup> クラゲなどの無脊椎動物の腔腸動物, クシクラゲを除く

## 発光細菌の発光分子メカニズム

還元型フラビンモノヌクレオチド (FMNH<sub>2</sub>) とルシフェラーゼとの複合体形成から細菌ルシフェラーゼ反応が開始されるのである。FMNH<sub>2</sub>は、フラビン還元酵素が触媒として呼吸鎖電子伝達系より漏れ出た電子による還元で生じるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) による FMN の二電子還元生成物 (FMNH<sub>2</sub>) がルシフェラーゼに供されるものと予想される。FMNH<sub>2</sub>は溶存酸素分子によって直ちに自動酸化されることから、フラビン還元酵素とルシフェラーゼは特別なマイクロ環境を形成し、FMNH<sub>2</sub>は酸素分子と接触することなくルシフェラーゼと会合することが予想される。FMNH<sub>2</sub>-ルシフェラーゼ複合体に酸素分子が結合してペルオキシルシフェラーゼ中間体 (L<sub>ase</sub>-FMNH-OOH) を生じ、これにアルデ

\*京都工芸繊維大学大学院分子化学系教授

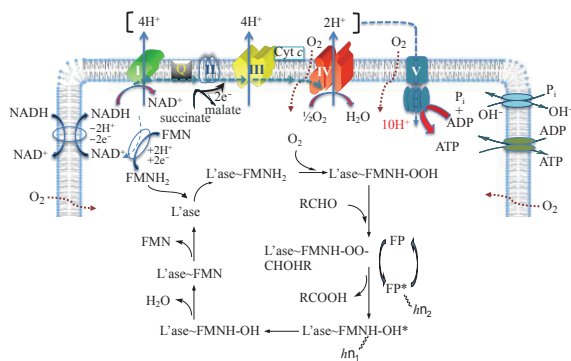


図2 細菌ルシフェラーゼ反応メカニズムと呼吸鎖電子伝達系。

L'ase, 細菌ルシフェラーゼ; RCHO, 長鎖脂肪酸アルデヒド; 第一発光種, 励起ルシフェラーゼヒドロキシフラビン (L'ase-FMNH-OH\*); FP, 蛍光タンパク質 (励起状態, FP\* (第二発光種)). フラビン還元酵素と呼吸鎖複合体Iとの関係は現時点において不明. 細胞膜について, 呼吸鎖タンパク質群を擁する内部の二分子膜のみを記す.

ヒドが結合してヘミアセタール中間体 (L'ase-FMNH-OO-CHOHR) を経て第一発光種が形成される (Hastings 1985). 細菌ルシフェラーゼは一種のモノオキシゲナーゼであり, 反応の駆動力は呼吸鎖で産み出される酸化的リン酸化と同様に, NADH の還元力である (図2).

第一発光種からの光は約 490 nm に極大値を有する幅広い波長分布を示す. ある種の発光細菌では内在性の蛍光タンパク質がヘミアセタール中間体と相互作用することによって, 励起蛍光タンパク質 (FP\*) を生じることがある. *Photobacterium* 属の場合, リビチルルマジンを補欠分子属とするルマジンタンパク質が関与することによって, 発光波長が約 475 nm に短波長側にシフトする (Lee 1990). 黄色発光細菌 *Vibrio fischeri* Y1 (Luby 1977) (現在 *Aliivibrio sifiae* Y1 へと再分属 (以下 Y1) は, 最大発光波長約 540 nm の黄色光を放射する. 黄色光は, FMN を補欠分子族とする細菌黄色蛍光タンパク質 (Y1-YFP; 下記オワンクラゲ由来 GFP 改変 YFP との混同を避けるため, 以下 Y1-Yellow と記す) がヘミアセタール中間体との共鳴エネルギー相互作用によって電子励起状態に上った Y1-Yellow

からの放射光である (Hastings 1985). オワンクラゲで見られるフォトプロテイン (Shimomura 1985) から生じる第一発光種と緑色蛍光タンパク質 (GFP) との間の共鳴エネルギー移動メカニズムとは異なる.

17°C の海水培地において Y1 の増殖過程を詳しく観測すると, 対数増殖期前半ではカルチャーの光の色が青色を示しており, 成長時間の経過につれて黄色光へと変化することがわかった. 成長時間を変数としてカルチャーから一定量ずつ菌体を採取破菌後, 細胞内タンパク質を抽出して電気泳動法で産生タンパク質量の変化を調べた結果, ルシフェラーゼに対する Y1-Yellow の生産量が対数期後半で増大することが明らかとなった (karatani 2006). 図3は生物発光スペクトルと Y1-Yellow の量的関係を示す. 対数期初期においてほとんど生産されない Y1-Yellow が, 後半においてルシフェラーゼに対する相対量を増し, この増加と対応して発光色が変化する. 静止期において光の色が青色に戻ることも Y1-Yellow とルシフェラーゼの相対量の関係に基づく.

細菌生物発光変調の研究からはまた, 細菌生物発光が呼吸鎖近傍で生産されていることも明らかにした.

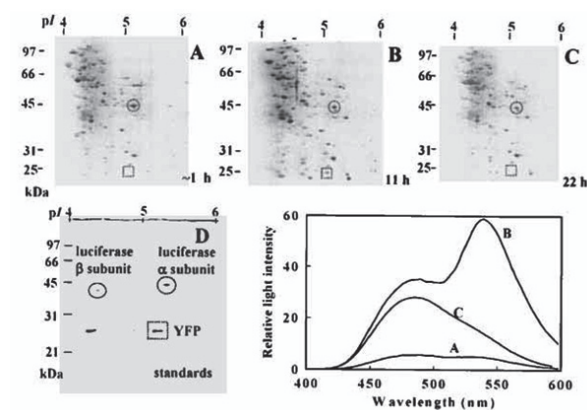


図3 増殖過程における発光色変化とルシフェラーゼおよび黄色蛍光タンパク質量の関係. 二次元電気泳動試料の全タンパク質量は一定にされている. 増殖時間 (h), A, 1; B, 11, および C, 22. D, 単離精製した標準タンパク質の泳動パターン. 発光スペクトル中, A, B, および C は増殖時間と対応する. 図中の YFP は Y1-Yellow と同じ. (Karatani 2006 より)

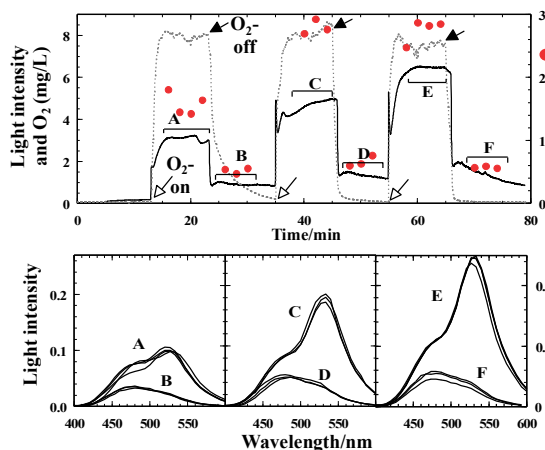


図4 対数増殖期後半の発光に及ぼす酸素バブリングの効果. 最初の酸素バブリングの前にアルゴンをバブリングして溶存酸素を除去した後, 酸素バブリングのオンオフを交互に行った. 左図, 発光の時間過程 (上段) と対応する生物発光スペクトル (下段). 右図, 黄色発光強度 (540 nm) vs. 青色発光強度 (460 nm) 比と酸素濃度の関係. (Karatani 2005 より)

対数期において, アルゴンガスをバブリングしてカルチャーの酸素を除いた後, 酸素ガスのバブリングオンオフを繰り返すと, 黄色発光強度の顕著な増大と減少が可逆的に繰り返し観測される (Karatani 2004 and 2005). 好適な条件下では黄色発光のショルダーを完全に消すことができる (図4). 着目すべき点は青緑色発光すなわち第一発光種からの発光は酸素ガスバブリングの影響を受けないこと, 生物発光強度の増大減少は黄色発光波長領域に限られることである.

Y1-Yellow は FMN を補欠分子族として結合しており酸化型が黄色蛍光を示す. Y1-Yellow は還元条件においてほぼ無蛍光性である. 呼吸鎖近傍を離れた細胞内部は通常還元的な環境にあり, Y1-Yellow/Y1-YellowH<sub>2</sub> のレドックス平衡は Y1-YellowH<sub>2</sub> に傾いているものと予想される. すなわち酸化型のみが黄色発光に関与する (Karatani 2007). 増殖が活発な状態では大きなエネルギーの生産と消費が絶え間なく起こり, 単位時間当たりの酸素分子の消費量が多い. このような状態ではレドックス電子伝達系の副産物としてスーパーオキシドアニオンとその不均化産物過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) は高いレベルにある

ものと考えられる. 過渡的に過剰量生成した ROS は生体に損傷を与えることから, 対数期後半における Y1-Yellow 量の増大と黄色発光は, 過剰 ROS のスカベンジングと関連することが予想される. 詳細な説明には有効な実証データをあげることが求められるが, 発光と呼吸との関係から, 以下に示す種々の応用側面が現れる.

### 細菌生物発光の応用

生物発光は発光関連基質や生体関連物質の高感度検出用シグナルとして応用されている. これまでに, ホタル, ウミボタル, オワンクラゲ, 発光細菌などの生物発光が, それぞれの基質を含む多様な生体関連物質の分析に用いられている (Thouand 2014). 応用はルシフェラーゼ反応を直接利用するものだけでなく, GFP に代表されるように, 発光生物由来蛍光タンパク質が蛍光マーカータンパク質として, またそれらのコード遺伝子がリポーター遺伝子として利用されており, ライフサイエンス研究ツールとして欠かせない (Prasher 1995 and Tsien 2009).

発光細菌の発光は上述の通り呼吸鎖電子伝達系および酸化的リン酸化と関連する. さらに呼吸鎖近傍のレドックス状態や電子伝達系レドックス反応副産物 ROS の量が光の色に影響することも示唆された. 特に Y1-Yellow 蛍光は ROS センサーシグナルとしての活用が期待された. そこでトライアルとして, 酵母細胞を対象としたミトコンドリア (MT) の Y1-Yellow による蛍光可視化を検討した. 真核細胞において ROS の最大供給源は生体エネルギー生産工場ミトコンドリア内膜の酸化的リン酸化過程である. ミトコンドリア内膜での機能発現を目的として, Y1-Yellow の N 末端にミトコンドリア認識シグナルポリペプチドを融合したタンパク質 (MT-Y1-Yellow) をコードする遺伝子 (MT-Y1-Yellow) を作製し, さらに酵母用シャトルベクター (pYES2/CT) にクローニングして酵母の形質転換に供した. 蛍光顕微鏡による生細胞蛍光可視化を行なった結果, 黄色蛍光

を発する MT が観察された。タンパク質産物 MT-Y1-Yellow もまた蛍光性であるが、酵母細胞内で遺伝子発現後ほぼ 100% の効率で MT 内膜に輸送されることも示唆された。輸送された MT-Y1-Yellow は MT プロセッシングプロテアーゼによってミトコンドリア認識シグナルポリペプチドが除去され、Y1-Yellow に戻る。

生体内では恒常的に低濃度の過酸化水素が生産されているが、ミトコンドリアの集団的な挙動に影響することはない。ところが細胞が過酷な条件に晒されて一時的且つ局所的に ROS が多量に発生した場合、ミトコンドリアは損傷を緩和するために集合してクラスターを形成することが知られている。このような自己組織化ミトコンドリアを Y1-Yellow 蛍光による可視化を試みた。機能評価では ROS として過酸化水素を用い、様々な条件のカルチャーに過酸化水素を添加して蛍光画像を観測した。一例を図 5 に示す。

図 5B の赤色蛍光輪郭は Trypan blue によって細胞膜が染色されたものであり、生細胞であることを示す。また C の緑色蛍光ゾーンは ROS 染色試薬 OxyBurstGreen によるものであり、ROS が多量存在することを示す。Y1-Yellow 蛍光ゾーンと OxyBurstGreen 蛍光ゾーンが一致することは、ミトコンドリアの ROS が Y1-Yellow によって好

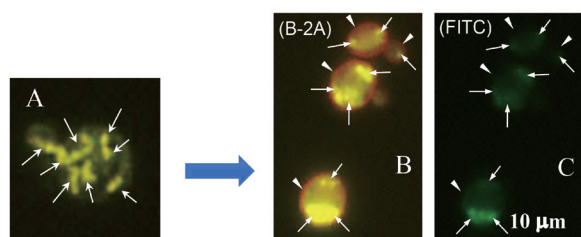


図 5 ミトコンドリアシグナル配列を融合した発光細菌由来黄色蛍光タンパク質による定常状態の酵母ミトコンドリア (矢印) の生細胞蛍光可視化 (A)。過酸化水素 (20 mM) の添加によって誘発された自己組織化ミトコンドリアクラスター (B) (可視化前に Trypan blue および OxyBurstGreen 処理)。A と B・C は別々のプレパラート。OxyBurstGreen による ROS の可視化。ROS 発生ゾーンと Y1-YFP 蛍光ゾーンが一致する。赤い輪郭、Trypan blue によって染色された細胞膜。蛍光画像撮影フィルターブロック、B-2A および FITC。 (Karatani 2013 より)

適に可視化されることを示す。

上述の通り、呼吸阻害状態では余剰の電子による酸素分子の還元が促進されてミトコンドリアの ROS 濃度が過渡的に増加することが予想される。このような呼吸阻害状態のミトコンドリアの Y1-Yellow による蛍光可視化を検討した。一例としてシアン化物イオンで処理した酵母の蛍光画像を示す (図 6)。

Y1-Yellow による蛍光画像からシアン化物処理によりミトコンドリアがクラスターを形成していることがよく分かる。Trypan blue 染色により赤色蛍光 (B-2A フィルターブロック) を示す細胞輪郭は、実験のシアン化物処理条件では酵母が死滅することなく生細胞のままであることを示す。OxyBurstGreen による染色画像 (FITC フィルターブロック) からは、シアン化物処理により、ROS が多量に発生している領域を見ることが出来る。Merge 画像は、OxyBurstGreen による染色領域が Y1-Yellow 蛍光ゾーン (B-2A フィルターブロック) とよく一致していることを示す。さらに時間の経過に連れてミトコンドリアが集合して行く様が窺える。ここで示した一連の結果から、発光細菌由来の蛍光タンパク質がミトコンドリアの動的な挙動を捕らえるのに有用であることが分かる。

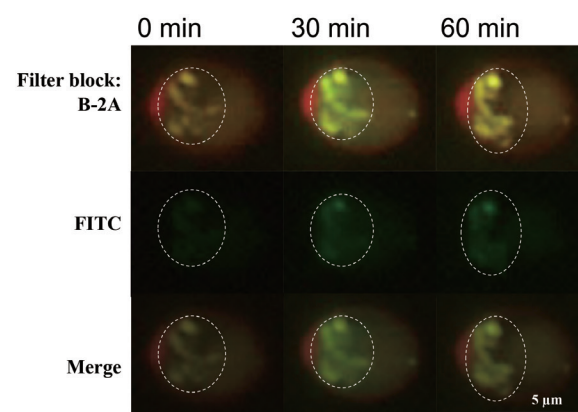


図 6 50 mM KCN で 30 min 処理洗浄後、Trypan blue および OxyBurstGreen 処理した MT-Y1-Yellow コード遺伝子を有する酵母細胞の蛍光可視化。図中時間はシアン化物処理後の経過時間。Merge, Y1-Yellow および OxyBurstGreen で得られた画像を重ね合わせた画像。

## 生物発光をシグナルとする呼吸阻害毒性物質センサー

生体内ホメオスタシスに ROS は不可欠であるが、過剰量生産されると細胞損傷あるいはネクロシスに至る。生体は巧みに ROS 除去機能を発現し活用している。過酸化水素除去酵素カタラーゼは好例である。カタラーゼの発現ではタンパク質 OxyR が重要な役割を演じる (Valéria 2010)。OxyR は通常還元型であるが過剰量の過酸化水素によって酸化されるとカタラーゼプロモーター遺伝子領域に結合し、カタラーゼコード遺伝子の発現が開始され、余剰の過酸化水素を水と酸素分子へと分解する。この機能を生物発光と組み合わせることによって生物発光をシグナルとする ROS センサーの構築が可能となる。具体的にはカタラーゼコード遺伝子に替えて細菌ルシフェラーゼコード遺伝子をプロモーターに融合し、さらに大腸菌を形質転換することにより、過酸化水素に依存して発光する大腸菌を作ることができる (Belkin 1996)。またプロモーター領域を変えることによりヒ素など他の物質のバイオセンサーとして応用範囲を広げることができる (Tauriainen 1997)。

著者らは細菌生物発光をシグナルとする呼吸阻害毒性センサーの研究を展開している (図7)。上述の通り、呼吸阻害が起こると H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> など ROS が呼吸鎖で過渡的に多量生じること、且つ細菌ルシフェラーゼ反応が呼吸鎖近傍で進行すること (Karatani 2006 and 2007) が、細菌生物発光をシ

グナルとする毒性センサーの背影である。

著者らが構築した系を過酸化水素を標準物質として評価した結果、 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  の過酸化水素水系において顕著に発光が放射された。  $1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$  を用いた場合には、ブランクと同程度の発光強度を示した。  $10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  付近の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は恒常的に生体内で生じる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と同レベルの濃度であり、バックグラウンドの原因ともなる。正相関が成り立つ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度範囲は  $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  であった。発光誘導の時間過程を比べると、約1時間後に観測可能な応答比を示すことがわかる。この応答性は生物発光大腸菌より抽出したルシフェラーゼのウエスタンブロット分析結果とよい一致を示した。

ROS を誘導する呼吸阻害物質として Cd<sup>2+</sup> の系で得られた結果を一例として解説する。Cd<sup>2+</sup> を著者らが構築した発光大腸菌カルチャーに添加して誘導される発光はブランクと同程度であり、Cd<sup>2+</sup> を単独に添加した効果は認められなかった。ところが、一定濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と共に種々の濃度の Cd<sup>2+</sup> を添加することにより、Cd<sup>2+</sup> 量に対応する顕著な発光強度の増加が認められた。図8は、Cd<sup>2+</sup> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を併添加して観測された発光応答を示す。

これまでの検討結果より、 $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の共存下、添加した Cd<sup>2+</sup> (0.1 ~ 1ppm) と発光強度の間に相関性が認められた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の共存効果については以下のことが予想される。生体内ではグルタチオン代謝酵素ペルオキシレドキシ

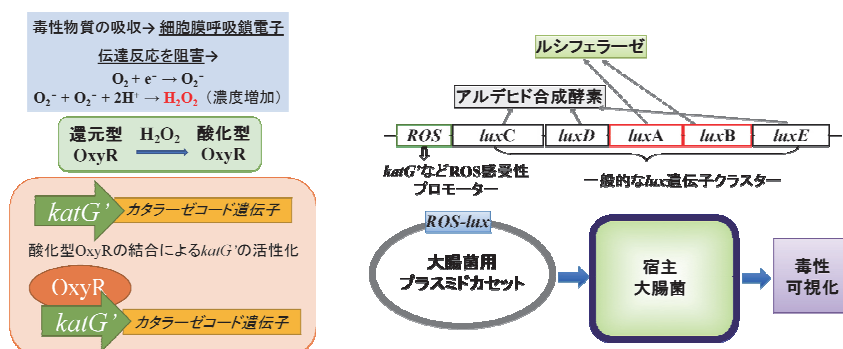


図7 呼吸阻害毒性センシングの原理。左パネル、呼吸鎖電子伝達系阻害による過酸化水素の生産と OxyR の酸化およびカタラーゼコード遺伝子の発現；右パネル、一般的な生物発光発現系の構築。

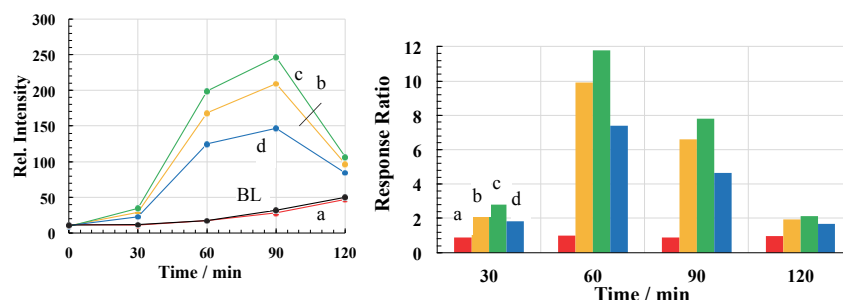


図8 *E. coli-katG-lux* の発現誘導に及ぼす  $\text{Cd}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  供添加の効果. 左図, 相対発光強度 (Rel. Intensity); 右図, 発光応答比 (Response Ratio): BL, ブランク; a, 0.1ppm; b, 0.5ppm; c, 1ppm, d, 5ppm. *katG'* は大腸菌由来のものでありその部分配列を *lux* 遺伝子との融合に供した.

ン (Prx) もまた余剰の  $\text{H}_2\text{O}_2$  の無毒化に参与する. また Prx 活性が高濃度過酸化水素によって阻害されることから, 添加した  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}_2$  によって Prx が阻害され,  $\text{Cd}^{2+}$  の呼吸阻害効果で誘導された  $\text{H}_2\text{O}_2$  が Prx の影響を受けることなく *lux* 遺伝子が発現し,  $\text{Cd}^{2+}$  取り込み量に対応した発光が得られたものと考えられる. 現在種々の毒性物質センサーの系を検討している.

本項では生物発光の概説と特に発光細菌の発光について述べた. さらに, 発光細菌発光関連タンパク質及びそれらをコードする遺伝子を細胞内情報の可視化あるいは毒性を評価する手法について, 著者らの研究結果を中心にして記した. 細菌生物発光は多様な生体内情報シグナルとして捉えることが可能であり, ホタルやオワンクラゲなどと同様に今後のさらなる応用展開が期待される.

## 引用文献

Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology, ed. Gérald Thouand, Robert Marks, Springer, Vol. 1, 2014.

Hastings JW, Potrikus CJ, Gupta SC, Kurfürst M, Makemson JC (1985) Biochemistry and Physiology of bioluminescent bacteria, *Adv Microbiol Physiol.* **26**: 235-291.

Lee J, Matheson IBC, Müller F, O'Kane DJ, Vervoort J, Visser AJWG (1990) The mechanism of bacterial bioluminescence. In *Chemistry and Biochemistry of*

*Flavoenzymes*, ed. Müller F, CRC Press, Boca Raton, vol. 2: 109-151.

Ruby EG, Nealson KH (1977) A luminous bacterium that emits yellow light. *Science* **196**: 432-434.

Shimomura O (1985) Bioluminescence in the sea: photoprotein system. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **39**: 351-372.

Karatani H, Matsumoto S, Miyata K, Yoshizawa S, Suhama Y, Hirayama S (2006) Yellow bioluminescence color modulation of *Vibrio fischeri* strain Y1 coupled with alterable level of endogenous yellow fluorescent protein and its fluorescence imaging. *Photochem. Photobiol.* **82**: 587-592.

Karatani H, Yoshizawa S, Hirayama S (2004) Oxygen triggering reversible modulation of *Vibrio fischeri* strain Y1 bioluminescence *in vivo*. *Photochem. Photobiol.* **79**: 120-125.

Karatani H, S. Yoshizawa S, Hirayama S (2005) Effect of oxygen and hydrogen ion on the modulation of the bioluminescence from luminous bacteria. In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Edited by Tsuji A, Matsumoto M, Maeda M, Kricka LJ, Stanley PE), pp. 75-78. World Scientific Publishing, New Jersey.

Karatani H, Izuta T, Hirayama S (2007) Relationship between the redox change in

- yellow fluorescent protein of *Vibrio fischeri* strain Y1 and the reversible change in color of bioluminescence *in vitro*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 566–570.
- Prasher D C (1995) Using GFP to see the light. *Trends In Genetics.* **11**: 320–323.
- Tsien RY, Constructing and exploiting the fluorescent protein paint box (Nobel Lecture) (2009) *Angew. Chem., Int. Ed.* **48**: 5612–5626.
- Karatani H, Namikawa Y, Mori N, et al. (2013) Visualization of mitochondria in living cells with a genetically encoded yellow fluorescent protein originating from a yellow-emitting luminous bacterium. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**: 566–570.
- Italiani VVS, da Silva Neto JF, Braz VS, Marques MV (2010) Regulation of catalase-peroxidase KatG is OxyR dependent and fur independent in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **193**: 1734–1744.
- Belkin S, Smulski DR, Vollmer AC, Van Dyk TK, LaRossa RA (1996) Oxidative stress detection with *Escherichia coli* harboring a katG: lux fusion. *Appl Environ Microbiol.* **62**: 2252–2256.
- Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M (1997) Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4456–4461.