

一般社団法人 京都光科学研究所

生物発光・蛍光発光 → 環境科学, 生命科学に展開 研究所独自の発光関連遺伝子の活用

☆☆オリジナル論文(別刷り)につきましては
はご遠慮なくご照会・リクエスト願います。

環境有害物質の生物発光可視化例(環境科学)

H. Karatani, Y. Fuse, H. Mizuguchi, S. Monji, H. Oyama, T. Waku, and M. Iwasaki, *Anal. Sci.*, 2019, 35, 821.

● 遺伝子組換え生物発光大腸菌の発光関連遺伝子, 発光メカニズムおよび発光の特徴

- 完全自家発光(反応基質添加不要)
- 強い発光(右, 写真)
- 取扱い容易(培養, 保管管理, 処理)
- 病原性無
- 発光スイッチにより発光開始制御可能

AMP + PP
NAD⁺ → RCHO → RCOOH → H₂O + FMN + light (λ_{max} ≈ 490nm)

ATP → ADP + P_i
NADH → NAD⁺

プロモータ (OFF/ON)

観測対象物質により発光スイッチON

発光細菌発光関連遺伝子クラスター
Photobacterium phosphoreum bmFPより単離
(琉球海溝水深 500 mより採集)
Karatani, et al, *Photochem. Photobiol.*, 71, 230 (2000)

● 生物発光大腸菌による呼吸阻害毒性物質可視化の概念および対象物質例(呼吸阻害を介して特に過酸化水素を誘導する物質)

ROS感受性生物発光大腸菌概念

環境毒性物質 Input ↑ 発光大腸菌

還元型 red.OxyR → 酸化型 ox.OxyR

プロモータ (OFF/ON) → 生物発光関連遺伝子 → 転写 → 翻訳 → 発光 Output ↑

ROS誘導毒性物質 (発光スイッチONに関わる環境毒性物質)

広く存在する有害物質例

- カドミウム
- その他, 一部の重金属イオン
- ピオローゲン(パラコート) (LD50, 500 mg/kg)
- 農薬や除草剤などに含まれる一部の成分
- 自然界に放出される一部の抗生物質

社会的関心が高い身近な有害物質例

- シアン化物, その誘導体 (LD50, 2.5 mg/kg)
- 亜ヒ酸, その他無機ヒ素化合物 (LD50, 14.6 mg/kg)

● 生物発光大腸菌によるシアン化物の可視化(ゲル, 大腸菌固定化 12 h 後)

シアン化物濃度 mg·L⁻¹ (ppm)

Intensity

生物発光大腸菌 + アルギン酸ゲルマイクロ環境 → 所要時間 < 24時間
検量線正相関 0.1 ~ 100 ppm (1 ppm, 環境省一律排水基準値)

● アルギン酸ゲルマイクロ環境において漸次増幅される生物発光: 今後の計画

アルギン酸ゾルの効果
細胞間接着を阻害?
→ 酸素分子の効率的利用

アルギン酸ゲル固定化媒体としての効果
ゲル外部 → ゲル内部への輸送
→ 10 minutes (ゲル全体)
細胞膜透過および細胞内輸送
→ 単純拡散では ms
→ 他のメカニズムの場合?
遺伝子発現開始
→ ~10 min

最大発光到達時間
→ ~half day (10 hours 遅延)

シアン化物吸収後も大腸菌は死滅することなく連続的に発光が誘導される

ゲル内部において発光能を保持して緩やかに対数期後半から静止期まで増殖(静置培養環境)
→ 最大発光到達遅延

実証化ステージ:

- 毒性物質スクリーニング標準法としての採用を見据え, 現行標準法との性能比較: 特にミカズキモ法
- 自動化測定法を検討する
- 亜ヒ酸および無機ヒ素化合物, 農薬成分などへの応用
- 発光スイッチの検討: 対象毒性物質の範囲拡大
- 技術指導

H₂O₂応答性発光大腸菌 (OFF/ON 発光遺伝子)

A few million of cells or less

One gel

Time passes

Bright cells > 100 million of cells

酸化リン酸化・細胞情報の蛍光可視化例(生命科学)

H. Karatani, Y. Namikawa, N. Mori, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, 12, 944.

● 発光細菌黄色蛍光タンパク質による生細胞ミトコンドリアの蛍光可視化

MT-シグナル (+)

Mitochondria (MT)-シグナルペプチド (28アミノ酸残基)

Met Leu Cys Gln Gln Met Ile Arg Thr Thr Ala
Lys Arg Ser Ser Asn Ile Met Thr Arg Pro Ile Ile
Met Lys Arg Ser Val (= mt signal sequence*)

Y1-Yellow

1 MFKGIVEGIG IIEKIDIYTD LDKYAIRFPE NMLNGIKKES SIMFNGCFLT VTSVNSNIW
61 FDIFEKEARK LDTFREYKVG DRVNLGTFPK FGAASGGHIL SARISCVASI IEIENEDYQ
121 QMWIQIPENF TEFLIDKDYI AVDGISLTD TIKNNQFFIS LPLKIAQNTN MKWRKKGDKV
181 NVELSNKINA NQCW H (6)

Y1-Yellow, MitoTracker Orange, DAPI共染色

酵母ミトコンドリア(→)の選択的蛍光可視化

Color fluorescence image
CCD camera
Barrier filter
Dichroic mirror
Objective
Specimen
Hg lamp
ND filter
EX filter

● 生細胞ミトコンドリアストレス応答の蛍光可視化

呼吸鎖電子伝達系(ETC)と酸化リン酸化

MTクラスター

Y1-yellow (B-2A) H₂O₂ ストレス

OxyBURST Green (FITC)

0 min 30 min 60 min

Filter block B-2A FITC Merge

KCN呼吸阻害 ストレス

4H⁺ 4H⁺ 2H⁺ OXPHOS

2e⁻ NADH → NAD⁺

O₂ + e⁻ → O₂⁻

O₂⁻ + O₂⁻ + 2H⁺ → H₂O₂

→ other ROS

ΔpH, Δψ

H₂O → ~3P_i + ~3ADP → ~3ATP

これまでに構築した発光関連遺伝子および遺伝子組換え実験例

● これまでに構築した発光関連遺伝子

- 発光細菌由来蛍光タンパク質コード遺伝子 (Y1-Blue および Y1-Yellow)
- ルマジン蛍光タンパク質遺伝子
- 発光細菌スーパーオキシドディスムターゼ遺伝子
Aliivibrio sifiae Y1 luciferase (Y1-lux)
- Photobacterium phosphoreum bmFP luciferase (bmFP-lux)
- およびその改変遺伝子

- ミトコンドリアシグナル配列融合 Y1-Blue および Y1-Yellow
- 過酸化水素感受性bmFP-lux遺伝子
- スーパーオキシド感受性bmFP-lux遺伝子
- ⇒ 遺伝子発現産物タンパク質の大量生産系を構築 (蛍光タンパク質およびルシフェラーゼ)
- ⇒ 種々のクロマトグラフィー・電気泳動などによるタンパク質および遺伝子の単離精製法に関する基盤技術

● MTシグナル配列を有するMT-Y1-Yellowの作製

Signal sequence 103 bp

HindIII-MCT primer T_m = 73.4 °C
5'-AGGGAATTAAGCTTAAAGTGTGGCAACAGATG-3'

MT-C primer T_m = 65.9 °C
5'-TACTGACCTCTCAAGATAATAGGTCTGG-3'

Y1-Yellow DNA 614 bp

MT-YFP primer T_m = 63.6 °C
5'-AGGAAAGGTCACGATGTTTAAAGGTATAGTA-3'

Y1-Yellow-3del primer T_m = 78.2 °C
5'-CGAAGGGCCCTCAGCAACACTGGTATGCAATTA-3'

PCR for signal sequence

PCR for Y1-Yellow DNA

pYES2-CF-MT-Y1-Yellow DNA and PCR product for Y1-Yellow