

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440068

研究課題名(和文) 酸化的リン酸化 - 活性酸素の同時可視化及びミトコンドリアの自己組織化機構の解明

研究課題名(英文) Visualization of oxidative phosphorylation - reactive oxygen species and its application to self-organization of mitochondrion

研究代表者

柄谷 肇 (Karatani, Hajime)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：10169659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果は以下のように要約される：(i) 発光細菌由来蛍光タンパク質(Y1-Yellow及びY1-Blue)の蛍光能を調べた結果、ミトコンドリアシグナル配列が蛍光特性に影響しないことを示した。(ii) 発光細菌ルシフェラーゼコード遺伝子及びホタルルシフェラーゼコード遺伝子大腸菌発現系の改善を進めると共にそれらを融合した。(iii) 過酸化水素に対して感受性を有する生物発光及び蛍光関連遺伝子を構築し大腸菌発現系を構築すると共に過酸化水素の生細胞可視化に有用であることを示した。(iv) 形質転換発光大腸菌コロニーの発光を詳しく調べ、細胞集団における呼吸活性の可視化に生物発光が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Results obtained are summarized as follows: (i) From the fluorescent characterization of the recombinant MT-Y1-Yellow and MT-Y1-Blue originating from luminous bacterium, it was found that the mitochondrial signal sequence (MT) does not affect their fluorescence properties; (ii) the expression systems for bacterial luciferase coding gene cassette and firefly luciferase coding gene were improved to yield these luciferases efficiently and these luciferase coding genes were fused; (iii) hydrogen peroxide sensitive genes, both of which are leading to the production of either bioluminescence or fluorescence, have been developed and applied for visualization of hydrogen peroxide in living Escherichia coli; (iv) Based on the further investigation into the bioluminescence ring pattern appearing in the colony of the bioluminescent E. coli, it was found that there is a possibility that the respiratory activity in living cells can be characterized on the basis of bioluminescence.

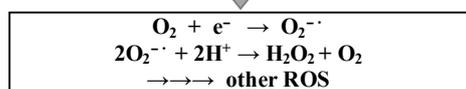
研究分野：生物分子科学

キーワード：生物発光 発光細菌 大腸菌 ミトコンドリア 酸化的リン酸化 活性酸素種 ルシフェラーゼ 蛍光タンパク質

1. 研究開始当初の背景

主に呼吸鎖電子伝達系 (ETC) とアデノシン三リン酸 (ATP) 合成酵素が共役する酸化リン酸化過程において生体エネルギーが生産される。酸化リン酸化の場合は、真核細胞ではミトコンドリア (MT) であり、他方大腸菌のような原核細胞の場合、細胞膜呼吸鎖がその役割を担う。生産されるエネルギーは一旦 ATP として保存される。還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化反応から開始される ETC では電子ターミネーターとして最終的に酸素分子が水分子に還元される。同時に活性酸素種 (ROS) が副産物として生じることもある。比較的多く産生される ROS として、ETC から漏れ出した電子による酸素分子の還元反応産物スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) とその不均化反応によって生じる過酸化水素 (H_2O_2) であると捉えることもできる。ROS は生体の恒常性の維持において不可欠であるものの、呼吸系阻害等により一時的あるいは局所的に ROS が大量に生じると、MT あるいは細胞は損傷を受けることもある。スキーム 1 に呼吸阻害と ROS の発生の関係を概略的に示す。

細胞膜呼吸系酸化的リン酸化阻害



スキーム 1 予想される酸化的リン酸化阻害関連活性酸素種 (ROS) 生成機構。

エネルギー生産拠点であり、且つ ROS の主要な発生源でもある酸化的リン酸化の動的過程の観測法の開発は、生命科学において興味深い課題であると着想され、本研究が計画された。

尚、本研究課題は科研費研究挑戦的萌芽 (課題番号 23654148) 及び民間助成金研究 (第 8 回 KRI 萌芽研究) と一部重複する。

2. 研究の目的

原核生細胞さらには細胞小器官 MT における酸化的リン酸化過程及びそれと密接な関係にある ROS の生物発光・蛍光発光に基づく可視化を目指した。また構築する手法に基づき、ROS が細胞膜呼吸系あるいは酸化的リン酸化過程に及ぼす効果を調べることも目指した。

3. 研究の方法

研究の流れは以下のように要約される: (i) MT シグナル配列を有する ROS プローブとして期待される発光細菌由来蛍光タンパク質 (Y1-Yellow 及び Y1-Blue) の蛍光能について *in vitro* 系のデータを獲得する。(ii) 生物発光に直接関連する遺伝子として、*Photobacterium phosphoreum* bmFP よりクローニングした *lux* 遺伝子 (*luxCDABFEG* 遺伝子カセット; 以下 *bmFPlux*) 及びホタルルシフ

ェリンコード遺伝子 (*luc* 遺伝子) を用い基礎的な発現系の構築及び改良を進めた。(iii) ROS 感受性を有する *KatG'-bmFPlux* 及び *KatG'-Y1-Blue* を構築し、特に H_2O_2 感受性について評価すると共に H_2O_2 の生細胞可視化を検討した。(iv) 大腸菌を MT モデルとみなし、高酸素状態における発光挙動の観測結果に基づいて細胞集団における酸化的リン酸化過程の生物発光可視化を試みた。

4. 研究成果

(i) MT シグナル配列を有する Y1-Yellow および Y1-Blue の *in vitro* 蛍光特性:

これまでに MT-Y1-Yellow 及び MT-Y1-Blue は MT 得意的に蛍光を発することは実証したが、サイトゾルにおいて蛍光性を有するかについて不明であった。今回、*in vitro* 蛍光特性を評価することによって上記の課題を実証した。実証実験ではまず MT-Y1-Yellow 及び MT-Y1-Blue の大腸菌発現系を構築し、目的タンパク質の単離精製法の確立を目指した。

具体には MT-Y1-Yellow および MT-Y1-Blue をコードする遺伝子上記科研費研究で構築した発現ベクター (pYES2/CT-MCT-Y1-Yellow 及び pYES2/CT-MCT-Y1-Blue) を鋳型とし、以下のプライマーを用いて調製した。

pET-mt-XbaI-F (forward 共通):

GTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAATGTTGTGCCAACAAATGATC

pET-mt-Y1-Blue-Xho I -R (MT-Y1-Blue):

GGTCTATATCGGCCATTGACCGAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTATT

pET-mt-Y1-Yellow-Xho I -R (MT-Y1-Yellow):

AATTACGGTTGGTTACGACCGAGCTCGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTATT

得られた目的遺伝子を大腸菌用発現ベクター pETBlue-2 にクローニング後、大腸菌を形質転換した。形質転換大腸菌を大量培養し Y1-Yellow 及び Y1-Blue をカラムクロマトグラフィーに基づいて単離精製した。単離精製タンパク質の蛍光測定の結果、MT シグナル配列の有無と無関係に蛍光タンパク質の蛍光スペクトル (図 1) が観測されたことからサイトゾルにおいても蛍光性を有することが示唆された。

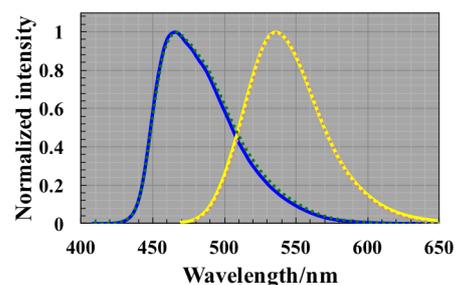


図 1 Y1-Yellow (黄色) 及び Y1-Blue (青色) の蛍光スペクトル。実線, MT シグナル配列フリー Y1-Yellow (黄色) 及び Y1-Blue (青色); 破線, MT 配列を有する. 励起波長/nm,

Y1-Blue, 400; Y1-Yellow, 460.

特に Y1-Yellow の場合、上述の結果はまた発現誘導した MT-Y1-Yellow のほぼ全てが MT に移行することを示唆するものである。しかしながら、これまでに ROS プローブとしての Y1-Yellow の有用性は示されたものの、哺乳類細胞への応用は今後詳細な検討を要する。

(ii) *bmFPlux*、*luc* 遺伝子発現系および *lux-luc* 融合遺伝子の構築

luc 遺伝子が大腸菌における安定発現の検討を進めた。既に国内メーカーによりヒト用に開発された *luc* 遺伝子であるが、開発メーカーの許可を得て大腸菌用にコドン最適化を図り、pETBlue-2 に再構築して形質転換に供した。一方、*bmFPlux* の発現条件の最適化を検討し、特に 25°C あるいはそれより低温条件でルシフェラーゼの発現効率と細胞密度当たりの発光が強まることを示した。*luc* 遺伝子 *lux* 遺伝子及び発現系で得られた生物発光及びその波長分布を図 2 に示す。

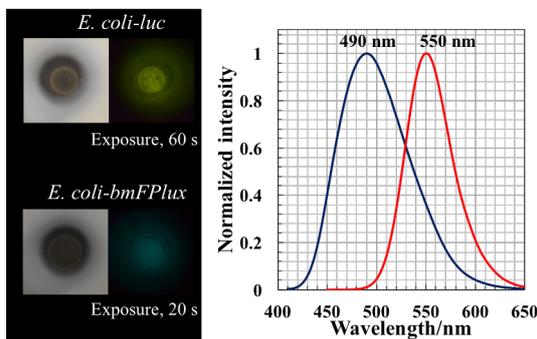


図 2 *E. coli-luc* 及び *E. coli-bmFPlux* より粗抽出したルシフェラーゼが触媒する生物発光。左図、均一溶液系における *in vitro* 発光; 右図、*in vitro* 生物発光スペクトル。

luc 遺伝子を有する大腸菌の生物発光は野生型と同様な発光色を示した。また弱酸性領域において強度は低下するも赤色発光が認められた。*E. coli-bmFPlux* はこれまでも発光を観測したが、発現条件の改善により比較的収量が大きい発現系を得た。それぞれのルシフェラーゼは単離精製し、一部は *in vitro* ルシフェラーゼ反応の実験に供した (研究成果 学会発表 ⑤, ⑩)。

さらに *lux-luc* 融合遺伝子の構築を進めた。酸化リン酸化過程では ETC 上流の NADH と ATP の量は互いに逆の関係にあることから、ATP を基質とするホタルの発光と、NADH 脱水素酵素と共役する細菌生物発光は位相をずらして出現するものと予想された。またそれらの発光挙動を同時に調べることでより酸化リン酸化と量的変動が可視化できるものと着想した。そこで自家発光をコードする *luxCDABFEG* 遺伝子カセットと *luc* 遺伝子の融合を検討した (図 3)。

遺伝子の融合は In-Fusion 法に基づいて進めた。

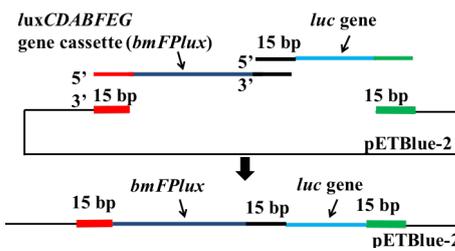


図 3 *luxCDABFEG* 遺伝子カセット (7158 bp) と *luc* 遺伝子 (1638 bp) の In-Fusion 反応に基づく融合及び pETBlue-2 へのクローニング。

プライマー:

luxC forward primer
AGGAGATATACC ATGATAAAGAAAATCCCAATGAT
luxG reverse primer
AATATATTCCTTTGG TCACATATATGCAAAAAGCATCA
luc 遺伝子 forward primer
CCAAAGGAATATATT
ATGGTCATGGAGGAAACATCGTGG
luc 遺伝子 reverse primer
GGTGGTGGTGCTCGAG
CATCTTTGCACGAGGCTGTTT

鋳型: pETBlue-2-*bmFPlux* 及び Firefly luciferase-pUC minus

また発現用プラスミドベクターのサイズ (約 3.6kbp) と比べて融合遺伝子のサイズは約 10 kbp と大きく安定性に問題もあると予想されたことから *luxCDABFEG* 遺伝子カセットよりルシフェラーゼのみをコードする遺伝子 *luxAB* (2107 bp) 断片を PCR で増幅し、*luc* 遺伝子との融合についても検討を進めた。

用いたプライマー:

*luc*FNcoI:
TTAAGAAGGAGATATACATGGTCATGGAGGGA
*luc*R BamHI:
CGCCTGTACAGAATTCGTTACATCTTTGCACG
luxF AscI:
AACGAATTCTGTACAGGATGAAGTTTGAAAT
luxR NotI:
CGTGTATACAGCTGTGCTTACGAGCTTGGTAA

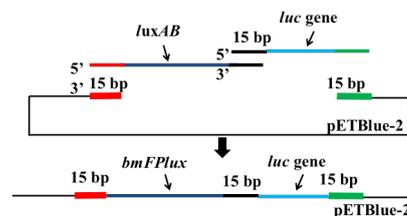


図 4 *luxAB* 遺伝子 (2107 bp) と *luc* 遺伝子 (1638 bp) の In-Fusion 反応に基づく融合及び pETBlue-2 へのクローニング。

(iii) ROS 感受性生物発光大腸菌 (a) 及び青色発光大腸菌 (b) の構築と評価

(a) H₂O₂ 感受性生物発光大腸菌: (研究成果

成果, 学会発表①, ②, ④, ⑥, ⑧, ⑨, ⑪)

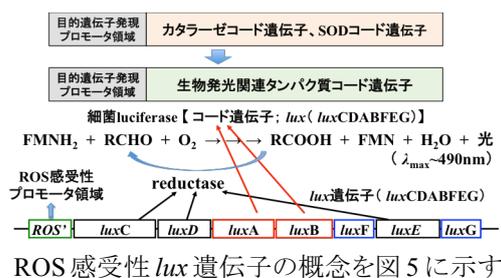


図5 ROS感受性lux遺伝子の概念図とルシフェラーゼ反応メカニズム.

図5に示したように、ROSが遺伝子誘導のトリガーとなる系の構築を目指した。特に本研究では、 H_2O_2 が発現誘導物質産生のトリガーとなるカタラーゼコード遺伝子プロモーター (*KatG'*遺伝子) と *bmFPlux* を pETBlue-2 プラスミドベクターにクローニングした (pETBlue-2-*KatG'*-*bmFPlux*)。さらに同プラスミド遺伝子で形質転換して生物発光大腸菌 (*E.coli-KatG'*-*bmFPlux*) を構築した。すなわち H_2O_2 が生物発光誘導のトリガーとなる。実験では標準物質として添加した H_2O_2 あるいは毒性物質として添加した重金属イオンと発光強度の関係を評価した。コントロールとして、上述の *E.coli-bmFPlux* を用いた。*KatG'*は大腸菌由来であり、すでに知られている塩基配列を基にして合成を委託した。

pETBlue-2-*KatG'*-*bmFPlux* の調製は二段階に分けて進めた。まず *AgeI* 及び *XbaI* を用いて線状化した pETBlue-2 に同制限酵素で処理した *KatG'* を挿入した。この段階で同時に pETBlue-2 の T7 プロモーター領域を削除した。次に *NcoI* 及び *KpnI* を用いて上の段階で得たプラスミドを処理すると共に同制限酵素で処理した *bmFPlux* を In-Fusion 反応により融合した。

用いたプライマー

第一段プライマー:

KatG' Forward *AgeI*:

CATAAGTGC GCGACGACGACGAAATGAGGGCGGG

KatG' Reverse *XbaI*:

GAATGGAAATTGTAAAGTTCCTCCTACAGTGT

第二段:

bmFPlux Forward *NcoI*:

TTAAGAAGGAGATATACATGATAAAGAAAATC

bmFPlux Reverse *KpnI*:

TCGAACGCGTATCGATGTCACATATATGCAAA

種々の濃度の H_2O_2 を添加して、発光応答を調べた結果、添加 H_2O_2 によって生物発光が誘導されることを確認した。測定条件を変化させながら発光応答を調べた結果、25°C あるいはそれよりも低温条件において且つ対数増殖期前半において H_2O_2 に対応した発光応答を示した。生細胞内では恒常的に微量の H_2O_2 が生じることからこれがバックグラウンド生物発光として見られた (図6)。

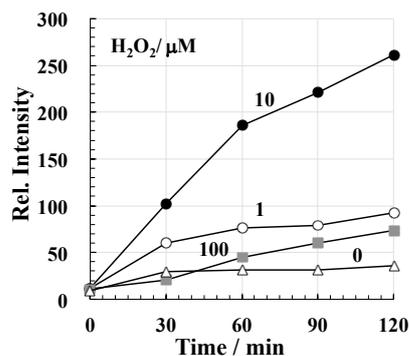


図6 時間を変数とする添加 H_2O_2 濃度と誘導された発光強度の関係 (25°C).

図6より、細菌生物発光が H_2O_2 のシグナルとして放射されたものと捉えることができる。要因として添加した H_2O_2 が直接 *KatG'* に作用したのではなく、添加した H_2O_2 の分解産物が呼吸鎖に影響し ETC 近傍において H_2O_2 を一時的に高濃度にしたものと考えられる。 H_2O_2 高濃度条件における発光強度の大きな低下はネクロシスによるものと考えられる。添加 H_2O_2 濃度ゼロで見られる発光は生細胞内で恒常的に産生する H_2O_2 によるものと考えられる。

また添加する H_2O_2 を一定濃度にし、 Cd^{2+} イオン濃度を種々変化させて観測された生物発光を図7に示す。

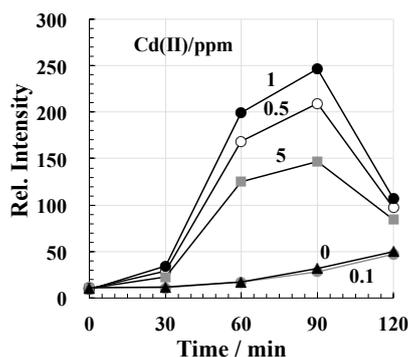


図7 一定濃度の H_2O_2 (1×10^{-4} M) を含む系に種々の濃度の Cd^{2+} を添加して観測される生物発光と添加後経過時間との関係 (25°C).

添加した Cd^{2+} は細胞に取り込まれ呼吸障害を惹起することが知られている。即ち Cd^{2+} の摂取による呼吸障害によって H_2O_2 濃度が細胞膜呼吸系近傍において一時的に増大するものと予想される。図7に示すように、特に 1 ppm (8.9 μ M) のときに顕著な発光誘導が記録された。観測された発光は呼吸鎖で生じる H_2O_2 に誘導されたものと捉えられる。

図6及び7に示した結果は、呼吸障害等に起因して ROS が産生すると、10分前後で *lux* 遺伝子が発現誘導され発光することを示している。さらに対数増殖期前半において発光

応答が顕著であることは、対数増殖期のような細胞分裂が活発な条件において、ROS が多量に生じていることを生物発光として捕らえたといえる。本系はまた毒性物質のバイオアッセイに有用であることも判った。MT における実証実験は今後の課題として残るが、可能性は示唆されたものと捉えられる。

(b) H₂O₂ 感受性青色蛍光大腸菌：（研究成果成果, 学会発表③, ⑦）

設計の概念と基本的な構築法は ROS 感受性生物発光大腸菌と同様である。以下に構築に用いたプライマーを示す。また Y1-Blue コード遺伝子の増幅のための鋳型は科研費研究（課題番号：21370071）で作製した pETBlue-2-Y1-Blue を用いた。

用いたプライマー

第一段プライマー 制限酵素サイト AgeI 及び XbaI

KatG' Forward AgeI :

CATAAGTGGCGGCGACGACGAAATGAGGGCGGG

KatG' Reverse XbaI :

GAATGGAAATTGTAAGTTCCTCCTACAGTGTT

Y1-Blue コード領域

第二段プライマー 制限酵素サイト NcoI 及び KpnI

Y1-Blue Forward NcoI :

TTAAGAAGGAGATATACATGTTTAAAGGTAAT

Y1-Blue Reverse KpnI :

TGCAACGCGTATCGATGCCAATTACCTGCAAT

対数期のカルチャーに種々の濃度の H₂O₂ を添加して得られた結果を図 8 に示す。

$t = 3/\text{min}$

H₂O₂/M, 10⁻⁶

10⁻⁵

10⁻⁴

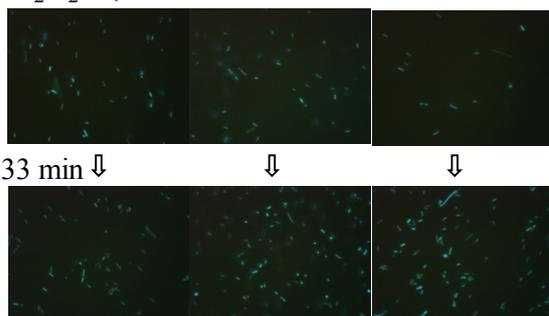


図 8 H₂O₂ (1×10⁻⁶ ~ 1×10⁻⁴ M) を添加して誘導される大腸菌 Y1-Blue 蛍光。プレパラートの作製では同一のカルチャーより同量ずつ採取し H₂O₂ を添加した。H₂O₂ 添加後経過時間：上段, 3 min (プレパラート作製に要する時間)；下段 33 min. Exciter, 400 nm (V-2B)；露光, 1 s；ISO, 400；色温度, 5600 K；対物レンズ, Planfluor100×；減光フィルター, ND4.

恒常的に生じる H₂O₂ によってバックグラウンド蛍光が生じるものの、H₂O₂ 感受性生物発光大腸菌と同様に、添加した H₂O₂ に応答して Y1-Blue 蛍光が観測された。特に 10⁻⁴ M のとき青色蛍光の時間変化は顕著であった。より高濃度の H₂O₂ を含む系では青色蛍光は見られないが、これは上述の通りネクロシスによるものである。蛍光強度はカルチャーに

も依存するが、ここで得た結果は、ROS の効果は顕著に青色蛍光として反映されることを示唆する。しかしながら、哺乳類細胞で用いるには、Y1-Yellow の系と同様に発現系を詳しく検討する必要がある。

(iv) MT モデルとしての大腸菌の集団発光の解析：（研究成果, その他雑誌論文①）

科研費研究課題（挑戦的萌芽：23654148）と関連して、*E.coli-bmFPlux* コロニーの発光に及ぼす高濃度酸素分子の効果について解析を進めた。実験は同科研費研究成果報告書に記述した手法に基づき、十分に成長したコロニーの発光を、酸素濃度と時間の変数として観測した。図 9 に示すように、高酸素濃度条件下、比較的再現性よく発光リングパターンが観測される。具体には酸素供給時コロニー外側に出現する発光リングがコロニーの中心に向かって半径を狭めるように伝播する。

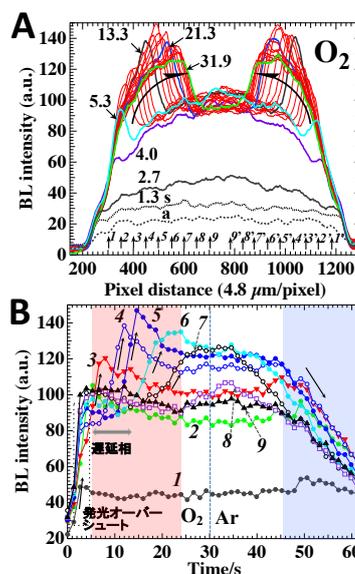


図 9 *E.coli-bmFPlux* 発光コロニー（直径 ~5mm）のラインプロファイル時間過程。A, 発光リングの中心方向への同心円の伝播。横軸, 動径方向。縦軸, リング位置における発光強度。図中数値は酸素供給を開始してからの経過時間 (s)。ピクセル距離 (4.6 μm/pixel)；B, 発光リング伝播の時間過程 (横軸上数値 (A) 位置における強度 vs. 時間)。中央, 30 s より右側, 酸素からアルゴンにスイッチして観測される発光減衰過程。

時間を変数として記録したラインプロファイルの解析から、発光細菌ルシフェラーゼ反応が同期していることを仮説として提唱した。この仮説と関連して、酸化的リン酸化過程がある規則に従って秩序よく進行することも期待されるが、今後より詳しい実験と、実験結果に基づく解析が求められる。しかしながら、本研究において細菌生物発光が好氣的呼吸の可視化に有効であることが示された。

総括：生物発光能を有する MT の構築及びその自己組織化に関する検討は期間内に達成できなかったが継続して取り組み、原核細胞と共に MT における ROS の量的変動と酸化的リン酸化活性との関係について、継続して検討を進める。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 1 件)

その他の雑誌論文

① H. Karatani, H. Kawakami, Y. Nishikawa, Dynamic flash of light pattern on a luminous colony induced by oxygenation: *Journal of Luminescence*, 29 (Suppl. 1): 71 (2014). (査読無)

〔学会発表〕(計 11 件)

① H. Karatani, Y. Ihara, D. Okamoto, Biosensor for detecting toxic substances by luminous *Escherichia coli* carrying the genes responsible for light production, International Symposium on Advances in Sustainable Polymers (ASP-16) : 2016 年 8 月発表予定(京都工芸繊維大学, 京都市)

② 伊原裕, 岡本大希, 柄谷 肇, 生物発光大腸菌による呼吸阻害毒性物質のセンシング, 日本化学会 第 96 春季年会:2016 年 3 月(同志社大学 京田辺キャンパス, 京田辺市)

③ Y. Ihara, D. Okamoto, H. Karatani, Visualization of toxic substance in environmental water by using Blue fluorescent *Escherichia coli*, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015 : 2015 年 12 月 (Honolulu, Hawaii, USA)

④ H. Karatani, Y. Ihara, D. Okamoto, Bioluminescent sensing of toxic substance in environmental water by using luminous *Escherichia coli*, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015 : 2015 年 12 月 (Honolulu, Hawaii, USA)

⑤ 増田遥平, 岡本大希, 伊原 裕, 柄谷 肇, 電気化学的手法に基づく形質転換生物発光大腸菌発光挙動の解析, 第 60 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会:2014 年 11 月(京都工芸繊維大学, 京都市).

その他学会発表

⑥ 岡本大希, 伊原 裕, 柄谷 肇, 活性酸素種感受性生物発光大腸菌による環境有害物質のセンシング, 日本化学会 5th CSJ : 2015 年 10 月(タワーホール船橋, 東京)

⑦ 伊原裕, 岡本大希, 柄谷 肇, 形質転換青色蛍光大腸菌による環境水中の毒性物質の可視化, 日本分析化学会第 64 年会 2015 年 9 月(九州大学伊都キャンパス, 福岡市)

⑧ 柄谷 肇, 岡本 大希, 伊原 裕, ROS 感受性生物発光大腸菌による環境有害物質の生物発光センシング, 日本分析化学会第 64 年会:2015 年 9 月(九州大学伊都キャンパス, 福岡市)

⑨ 岡本大希, 伊原 裕, 柄谷 肇, 過酸化水素感受性遺伝子組換え生物発光大腸菌に基づく環境水中の急性毒性モニタリング法活性酸素種感受性生物発光大腸菌による環境有害物質のセンシング, 日本化学会 4th CSJ : 2014 年 10 月(タワーホール船橋, 東京)

⑩ 柄谷 肇, 活性酸素種-好氣的呼吸間分子リンクに着目した電気化学法に基づく細菌生物発光の研究, 第 60 回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会: 2014 年 11 月(京都工芸繊維大学, 京都市).

⑪ 伊原 裕, 岡本大希, 柄谷 肇, 環境水の毒性物質センシング用生物発光大腸菌の構築, 日本化学会第 94 年会: 2014 年 3 月(名古屋大学, 名古屋市, 愛知県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

柄谷 肇 (KARATANI, Hajime)
京都工芸繊維大学・分子化学系・教授
研究者番号: 10169659

(2)連携研究者

尾山 廣 (OYAMA, Hiroshi)
・摂南大学・理工学部・教授
研究者番号: 50221700