

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23654148

研究課題名(和文)発光細菌の同期的発光挙動から演繹される生体の対酸化ストレス緩和メカニズムの導出

研究課題名(英文) Deduction of relaxation mechanism for the anti-oxidative stress on the basis of the synchronized behavior of bacterial bioluminescence

研究代表者

柄谷 肇 (Karatani, Hajime)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：10169659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：発光細菌および新規に作製した生物発光大腸菌をミトコンドリア(MT)モデルとして、酸化ストレス応答を動的な発光パターンから解析した。また真核細胞MTにおいて酸化ストレスのトリガーとなる活性酸素種(ROS)の生細胞蛍光可視化を行った。ROSの可視化では酵母をモデル真核細胞とし、MT選択配列を融合した発光細菌由来黄色蛍光タンパク質コード遺伝子を駆使した。

コロニー発光パターンの解析から、MTモデルとしての原核細胞は集団同期的に酸化ストレスを緩和していることが示唆された。またMTにおけるROSの可視化より、ROSの生成消滅と共に酸化ストレス条件下のMTが自己組織化的に集合することが可視化された。

研究成果の概要(英文)：By using luminous bacterium and bioluminescent Escherichia coli hovering the gene encoding bacterial luciferase, the oxidative stress induced dynamic bioluminescence (BL) pattern on the colony, as a model of the mass of mitochondria (MT), was analyzed. On the other hand, the visualization of reactive oxygen species (ROS) at the MT site in a eukaryotic cell and the oxidative stress has been carried out. In this case, a MT signal sequence fused gene encoding yellow fluorescent protein (Y1-Yellow), originating from a luminous bacterium, was cloned into a plasmid to transform yeast cells.

Analysis of the dynamic BL patterns showed that the oxidative stress response can be visualized as a collective behavior-like regulated bioluminescence. As a result of the transformation of yeast with the MT-Y1-Yellow coding gene, the ROS formation at the MT site was clearly visualized. It has also been shown that MT assembles to make the MT cluster in response to the strong oxidative stress.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：生物物理 生物発光 好氣的代謝 酸化ストレス 酸化的リン酸化 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスの主たる発生中心として、好氣的エネルギー生産の場となるミトコンドリアを挙げることができる。また呼吸鎖における酸化リン酸化過程の副産物として活性酸素種 (ROS) が生成する。呼吸鎖における ROS の局所的な大量生成が結果的に強い酸化ストレス発生の要因となる。発光細菌や大腸菌などの原核単細胞の場合、細胞膜呼吸系はミトコンドリアと同様な機能を有する。このことから、原核単細胞生物の呼吸あるいは酸化リン酸化と関連する事項を調べることによって酸化ストレス発生活動メカニズムや酸化ストレス緩和メカニズムが導出できるものと期待された。

発光細菌は酸化リン酸化で生み出されるエネルギーを用いて発光触媒酵素ルシフェラーゼ反応を駆動し光を放射する。発光細菌はまたコロニーを形成すると多細胞集団として特有のふるまいを示すことがある。研究代表者らはこれまでに酸素分圧の変化で誘発される発光明滅現象を見出してきた。また発光細菌由来組換え蛍光タンパク質による酸化ストレスの生細胞イメージングにおいて、生細胞ミトコンドリアにおける酸化ストレスの可視化を試みた。

上述の経緯より、酸化リン酸化と密接に関わる酸化ストレスが発光パターン生成・消滅の要因であること、逆に発光パターンがミトコンドリアにおける対酸化ストレス緩和メカニズムに関係するものと予想された。

2. 研究の目的

発光細菌のコロニーにおいて、酸素刺激の有無に応じた環状発光パターンが生成・消滅する。本研究では、このような動的な発光パターンは、細胞が呼吸作用に起因して誘発された過度の酸化ストレスを同期的に緩和した結果に因るものと捉えて解析し、過度の酸化ストレスに対する生体の解毒的な緩和システム形成メカニズムを導出することを目的として進められた。発光細菌はミトコンドリアのモデルとして実験に供した。

さらに、これまでに構築したミトコンドリアにおける酸化ストレスの可視化法の多機能化を目指し集団的な生細胞酸化ストレス応答の蛍光可視化法の構築を目指した。

(1) 動的発光パターンの時間過程を詳しく調べ数理的に解析する。さらに解析結果に基づいて対酸化ストレス緩和メカニズムを導出する。

(2) 発光関連酵素コード遺伝子群で形質転換した大腸菌の系で上述 (1) のメカニズムの検証を行なう。

(3) ミトコンドリア標的シグナルを融合した発光細菌由来黄色蛍光タンパク質 (Y1-Yellow) コード遺伝子に基づいて酸化ストレスの可視化を高度化すると共に酸化

ストレス応答メカニズムを考察する。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス応答の視点からの動的発光パターンの解析。

野生型発光細菌 *Photobacterium phosphoreum* bmFP (以下 *Pp*bmFP) を対象として、酸素分圧を変化させてタイムラプス生物発光イメージングを獲得し、離散フーリエ解析に供した。図 1 は酸化リン酸化と発光細菌ルシフェラーゼ反応との分子的な関連性を示す。

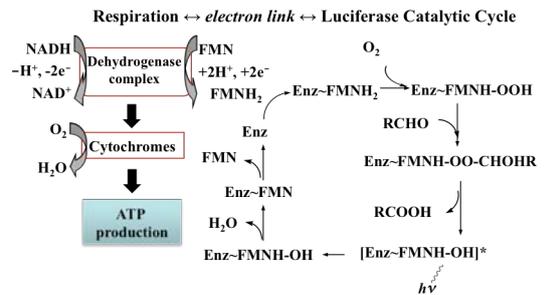


図 1 発光細菌ルシフェラーゼ反応と呼吸鎖電子伝達系・酸化リン酸化との分子リンク。Enz, 酵素ルシフェラーゼ; FMN および FMNH₂, 酸化型および還元型フラビンモノスクレオチド; RCHO, 脂肪族アルデヒド; RCOOH, 脂肪酸; Enz~FMNH₂, 酵素 FMNH₂ 複合体; Enz-FMNH-OOH, 酵素ペルオキシフラビン; Enz-FMNH-OO-CHOHR, 酵素フラビンヘミアセタール中間体; Enz-FMNH-OH*, 励起酵素ヒドロキシフラビン中間体。

単一コロニーは NaCl 平板寒天培地上に作製し、直径 1 mm 以下のコロニーに対しては、酸素濃度を変えながらカラー CCD を取り付けた蛍光顕微鏡 (対物レンズ; 4x) を、他方、直径 1 mm 程度以上の大きさのコロニーに対してはデジタルカメラ (Nikon, D3100) を用いて一定時間ごとに生物発光画像を収集した。図に計測システムの概要を示す。

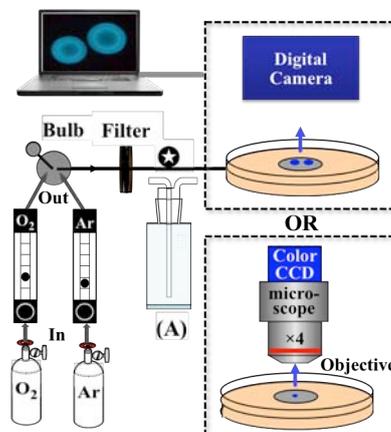


図 2 コロニー発光計測システム。アルデヒド負荷の場合、星印の箇所においてアルデヒド蒸気飽和容器を接続しガス圧により気化アルデヒドをコロニーに供給した。

生物発光画像の計測において、ストレスを付加するため酸素とアルゴンを交互に平板培地に流した（それぞれ流速約 0.3 mL min^{-1} ）。他方アルデヒドを負荷する場合、蒸気圧の大きいデカナルを洗気びん(A)に入れ、エアポンプを $\text{O}_2\text{-Ar}$ 通気システムと取り替え空気と共に気化デカナルをコロニーに与えた。

カラー静止画像群は明度を画素値とする明度画像群に変換後、離散フーリエ変換することによって振幅と位相を求めた。次に画像中の該当座標位置に振幅と位相データを与え、正規化周波数 k における振幅画像と位相画像を構築した。具体的な計算を以下に示す。

まず明度画像の時系列データ $\{I_p(n); n = 0, 1, \dots, N-1\}$ の離散フーリエ変換を行う（式1）。

$$f(t) = \sum_{n=0}^{N-1} (e^{-i\frac{2\pi kn}{N}} I_p(n)) \quad \text{式1}$$

ここで $k = 0, 1, \dots, N-1$ は正規化周波数を表す。次にフーリエ変換値 $L_p(k)$ から振幅 Amp（式2）と位相 Phase（式3）を求めた。

$$\text{Amp} = |L_p(k)| \quad \text{式2}$$

$$\text{Phase} = \arg L_p(k) \quad \text{式3}$$

位相については $(-\pi, \pi)$ で正規化する。次に計算で得られた振幅と位相を、画像中のすべての該当座標位置に与え、それぞれの k における振幅画像と位相画像を作成する。詳細な解析法は成果雑誌論文①および④に記した。またタイムラプス生物発光画像の強度ラインプロファイルデータの離散フーリエ解析等の数値解析を行った。

(2) 生物発光大腸菌の構築とパターン挙動解析の一般化。

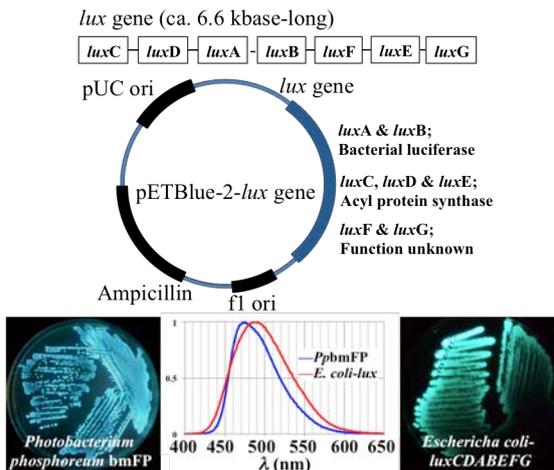


図3 発光細菌ルシフェラーゼ遺伝子群 (*lux* gene (CDABEFG)) のクローニング (上段)。プラスミド, pETBlue-2; 宿主, *E. coli* BL21(DE3)。下段; 寒天培地上の高密度コロニー生物発光。左, *Photobacterium phosphoreum* bmFP (*PpbmFP*); 右, *Escherichia coli-lux* gene (*E. coli-lux*)。下段中, 生物発光波長分布。

発光細菌の系で得られる結果の一般化を目的として、大腸菌に発光細菌の発光能を付与した。具体には発光細菌の発光関連タンパク質をコードする *lux* 遺伝子群を用いて形質転換を行った。*lux* 遺伝子群は *PpbmFP* より抽出したゲノム遺伝子を鋳型とする PCR により得た。PCR 産物を In-Fusion 反応により、目的制限酵素で線状化したプラスミドにクローニングした。次にヒートショックにより大腸菌を形質転換した。発現誘導にはイソプロピル- β -ガラクトピラノシド (IPTG) を用い、発現誘導温度は 20°C とした。図3はまた *PpbmFP* と作製した生物発光大腸菌 (*E. coli-lux*) からの発光も示す。発現誘導後、*E. coli-lux* は自家発光して青緑色を放射した ($\lambda_{\text{max}} \sim 490 \text{ nm}$)。 *E. coli-lux* は *PpbmFP* と異なり内性青色蛍光タンパク質を生産しないため光の色は *PpbmFP* と比べてわずかに長波長側にシフトした。他方 *E. coli-lux* の成長速度は野生型 *PpbmFP* よりも速い特徴を有しており観測の効率化において有用であった。

生物発光大腸菌のタイムラプス生物発光イメージング法と解析法は *PpbmFP* の系と同様に行った。

(3) ミトコンドリアにおける酸化ストレスの蛍光イメージング。

この実験は2009-11年基盤研究B (研究課題番号: 21370071) と密接に関わる。ミトコンドリアシグナル配列を融合した Y1-Yellow コード遺伝子で形質転換した酵母の系において、酸化ストレスの可視化を行った。真核細胞モデルとして出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた。発現誘導は β -ガラクトースにより行い、誘導後は $20\sim 30^\circ\text{C}$ で培養した。具体には上記基盤研究で構築したミトコンドリアシグナル配列を有する Y1-Yellow 発現系の性能を向上させ、酸化ストレスを負荷したミトコンドリアにおける Y1-Yellow の蛍光発現パターンを調べた。

過酸化水素あるいは呼吸阻害剤としてのシアン化カリウムなどを酵母細胞に摂取させて強い酸化ストレスを与えた。生細胞蛍光イメージング法については研究成果雑誌論文③に詳しく記した。

4. 研究成果

①酸化ストレス応答および集団的挙動の視点に基づく発光細菌生物発光の解析

寒天培地で培養すると、発光細菌は同心円状に光の環を広げるように増殖し、発光コロニーを形成する。成長したコロニーに対して、図2に記した手法で酸素を供与すると、コロニー成長前線の明るい発光リングの内側に動的な同心円状の発光パターンを生じた。動的パターンは再現性よく観測された。酸素刺激で生じた発光環は酸素の供給の間半径を変化させながら、中心に向けて収束する変化

を示した。このような高酸素分子条件で発生する発光パターンの時間変化を、周期的現象の視点から、離散フーリエ変換を基礎とする画像解析に供した。

フーリエ解析結果例を図4に示した。振幅画像の場合、色調が白い領域において振幅が大きく、周期的現象が生じているものと判断できる。他方、位相画像の場合、今回用いた処理では緑色が強くなるほど位相が揃っているものと捉えることができる。他方赤色が強い領域は位相の揃い方が極めて弱いか、あるいは位相一致の無い領域と捉えられる。

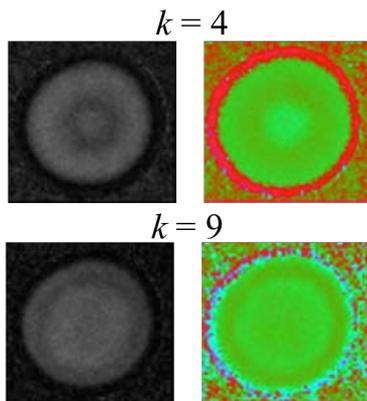


図4 酸素供給時の典型的な発光応答画像の離散フーリエ解析結果.正規化周波数;上段, $k=4$; 下段, $k=9$. 左図, 振幅画像; 右図, 位相画像.

一連の解析から、一般に小さい正規化周波数領域において明瞭な振幅画像と位相がよく一致した位相画像が得られた。さらにコロニーの生の生物発光画像と比較すると、酸素刺激において動的な発光パターンが誘導される領域において、振幅が大きく発光が振動しているものと考えられた。さらに位相画像は、発光パターンが誘導された領域において位相がよく一致を示していること示した。これらの結果は、酸素刺激で誘導された動的発光パターン領域において、生物発光が同期していることを示唆する。

換言すると酸素刺激に対する発光細菌の集団的な応答挙動が規則的な生物発光として可視化された事になる。このような挙動はアルヒドの供給時には見られず、呼吸活性の変動と関連するものと推察された。好氣的代謝過程に含まれ特定の過程が同期的な発光と関連すること、また動的発光パターンは発光細菌の集団的な酸化ストレス応答の統制されたアウトプットであると考えられた。

②発光細菌の系で観測された集団的挙動の一般化

発光細菌の系で得られた結果の一般化を図った。LB あるいは 2YT 培地において、*E.coli-lux* もまた *PpbmFP* と同様に成長前線が明るく光りながら円形コロニーを形成した。成長した *E.coli-lux* コロニーに対して、図 2

に記した手法で *PpbmFP* の系と同様に観測を行った。いろいろな条件で実験を行った結果、*E.coli-lux* のコロニーにおいても、*PpbmFP* と同様に高酸素濃度条件において同心円状の動的発光パターンが繰り返し再現性よく観測された。この観測結果は酸素刺激によって誘発される同心円状発光パターンが野生型発光細菌に特有の現象ではないことを示す。さらに興味深いことには、動的発光パターンが *PpbmFP* の系よりも明瞭に観測されたことである。典型的な酸素刺激応答を図5に示す。

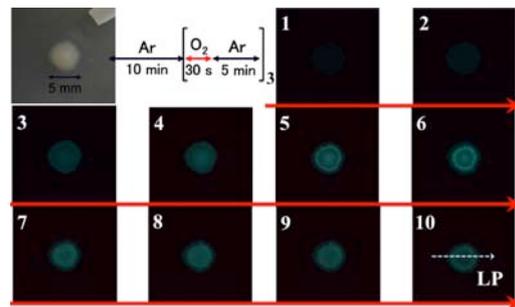


図5 *E. coli-lux* コロニーの酸素刺激応答 (抜粋). Ar 通気 10 分後に O_2 (30 s)-Ar (10 min) 通気サイクルを繰り返した. LP, 発光強度数値データ抽出ライン.

酸素分子が細菌の細胞膜やミトコンドリアの二分子膜の透過に要する時間は sub-us と算出される。したがって、酸素供給とほぼ同時に細胞内酸素分子は飽和状態に達するものものと予想され、酸素分子の拡散過程が律速過程とはならないと期待できる。さらなる検討を要するが、高酸素状態において、呼吸作用に含まれるなんらかの過程が規則的に応答し、結果として生物発光過程が規則的に応答しているものと示唆される。時間を変数とする生物発光画像ラインプロファイルの離散フーリエ変換は、動的パターン領域において振動成分が存在することを示した。さらに離散フーリエ変換に基づく画像解析を行い、正規化周波数 k における振幅画像と位相画像を作成した。出力結果例を図6に示す。

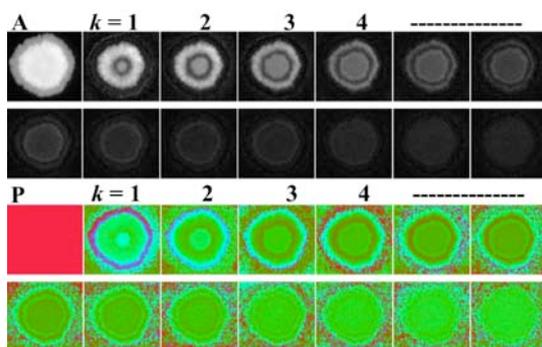


図6 *E. coli-lux* コロニーの解析から得られた振幅画像 (A) および位相画像 (P). それぞれ低正規化周波数領域の結果を示した. (A) と (P) のシリーズ左上段, 直流成分 ($k=0$).

PpbmFP の系で得られた結果と同様に、*E.*

coli-lux コロニーの系においても、酸素刺激下、動的な同心円状発光パターンが誘発される領域に着目すると、特に正規化周波数 $k = 1$ において振動成分が観測されるだけでなく、位相がよく一致していることが判った。これらの結果もまた動的発光パターン領域において、*E. coli-lux* コロニーからの発光が同期していることを予想させるものである。

高濃度酸素分子条件下において、余剰の酸素分子は呼吸鎖 ETC の電子を得てスーパーオキシドアニオンを生じる。これはさらに不均化により過酸化水素さらには他の ROS へと変化することが予想される。呼吸鎖において局所的に多量に生じる酸素分子由来の ROS による酸化ストレスを軽減するため細菌は何らかの化学物質によるコミュニケーションを通して規則的なふるまいをすることが期待できる。またこのような対酸化ストレス応答と考えられる集団的なふるまいが規則的な生物発光応答（動的発光パターン）として観測されたものと捉えられる。

(3) 酸化ストレス条件におけるミトコンドリアの自己組織化

本研究ではミトコンドリアのモデルとして発光細菌あるいは大腸菌を実験に供した。その結果、酸素刺激において集団的な挙動を示すことが判った。集団的なふるまいがミトコンドリアで観測されるかに関しては興味深い課題である。これまでに構築した生細胞ミトコンドリアの蛍光可視化法に基づいて、酸化ストレス条件下のミトコンドリアの挙動を調べた。代表的な結果として $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (mM) 過酸化水素を添加した系で観測されたミトコンドリアの酸化ストレス応答を図7に示す。

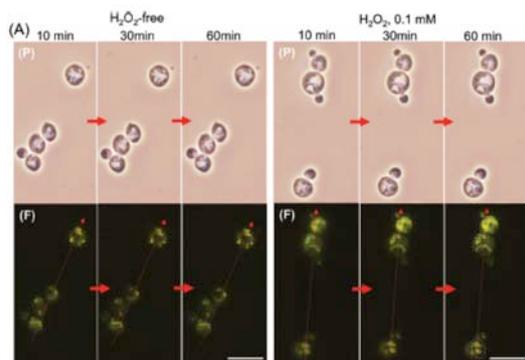


図7 発光細菌由来黄色蛍光タンパク質コード遺伝子で形質転換した酵母（生細胞）の位相差画像（上段）および蛍光画像（下段）。左3列； H_2O_2 添加前；右3列添加後（添加後濃度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (mM)）。それぞれプレパラート作製後、10, 30, 60 分後の画像。バー、10 μm （研究成果雑誌論文②より転載）

図7の蛍光画像において黄色蛍光スポットがミトコンドリアのサイトである。過酸化水素添加前において個々のミトコンドリアの

多くは独立的に存在するが、過酸化水素添加による強い酸化ストレス条件下において時間の経過と共にミトコンドリアが自己組織化的にクラスターを形成することが観測された。過酸化水素はそれ自身が ROS の一種であるだけでなく、分解の過程において局所的に高濃度酸素分子生成の要因となる。酸素分子はまた呼吸鎖 ETC との相互作用において別の種類の ROS へと変化する。このように酸化ストレスを誘発する ROS が多量に存在する条件においてミトコンドリアは対酸化ストレス応答としてクラスターを形成することが画像から示唆された。同様な自己組織化的なクラスター形成はシアン化物の吸収による呼吸阻害条件下（ROS が一時的に多量に生じることが実験結果からも予想された）においても観測された。

まとめ

呼吸鎖近傍において一時的に且つ局所的に多量の ROS が生じると強い酸化ストレスのトリガーとなる。このような状況においてストレスを軽減することは生命維持のために必須である。本研究では発光細菌をミトコンドリアモデルとして、高酸素条件下での発光応答を調べ、規則的な発光応答を示すことを明らかにした。このような規則的な発光応答は、細胞が酸化ストレスを軽減するためにとった集団的挙動であり、それが結果的に生物発光によって可視化されたものと考えられる。逆に、発光応答から酸化ストレス応答メカニズムを演繹できることが示唆された。

ミトコンドリアの系の場合、酸化ストレスが強まると自己組織的にクラスターを形成し、ストレス緩和を図っていることが本研究の観測結果からも予想された。

ミトコンドリアが生物発光能を有することが可能となれば、酸化的リン酸化と密接に関わる生物発光を観測することにより、より詳しく対酸化ストレス応答メカニズムを解き明かすことが可能になるものと期待される。さらに対酸化ストレス応答メカニズムにおいて存在が予想されるコミュニケーション物質、即ちクラスター形成（あるいはコロニー形成）過程において自己組織化を促す物質や、すでにクラスター化（あるいはコロニー形成）した段階において同期的な酸化ストレス応答を誘発する物質を同定することが可能になるものと期待できる。

ここに述べた仮説については、現在進行中の基盤研究 C (25440068) において詳しく実験検討を重ね、得られた解析結果に基づいて実証を進めたい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

① Hajime Karatani, Hajimu Kawakami, Yukihiro Nishikawa, Dynamic flash of light pattern on a luminous colony induced by oxygenation: Journal of Luminescence, 査読無, in press.

② Hajime Karatani, Yuki Namikawa, Naomi Mori, Yukihiro Nishikawa, Saki Imai, Yutaka Ihara, Aya Kinoshita, Kengo Kitadokoro, Hiroshi Oyama, Visualization of mitochondria in living cells with genetically encoded yellow fluorescent protein originating from a yellow-emitting luminous bacterium, Photochem. Photobiol. Sci., 査読有, **12**, 944-956 (2013).
DOI: 10.1039/c3pp2536k

③ Susumu Yoshizawa, Hajime Karatani, Minoru Wada, Kazuhiro Kogure, *Vibrio azureus* emit blue-shifted light via an accessory blue fluorescent protein, FEMS Microbiology Lett., 査読有, **329**, 61 – 68 (2012).
DOI:10.1111/j.1574-6968.2012.02507.x

④ 服部謙作, 柄谷肇, 川上肇, 刺激応答性微生物コロニー発光パターンの時空間画像処理, 電子情報通信学会信学技報 (IEICE Technical Report), 査読無, **111**, 11 – 16 (2011)
ISSN 0913-5685

その他の雑誌論文

⑤ Etsu Yamada, Takaaki Hiorta, Naoko Hatori, Yuuki Kitao, Yasuro Fuse, Shinichi Aoki, Hajime Karatani, Toshiro Matsunaga, Characterization of protein-like fluorophores released from Lake phytoplankton on the basis of fractionation and electrophoresis. Anal. Sci., 査読有, **28**, 595-600 (2012)
doi.org/10.2116/analsci.28.595

[学会発表] (計 8 件)

① Hajime Karatani, Hajimu Kawakami, Yukihiro Nishikawa, The 18th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 23-28 June 2014 (ポスター発表採択) Uppsala, Sweden.

② 柄谷肇, 川上肇, 第 94 回日本化学会年会: 形質転換生物発光大腸菌コロニーの発光パターンに及ぼす酸素化学種の効果: 2014-3-27 名古屋大学, 愛知県.

③ 柄谷肇, 山下朋也, 森奈穂美, 並川由紀, 伊原裕, 増田遥平, 尾山廣, 竹谷茂, 第 86 回日本生化学会大会: 発光細菌由来レドックス蛍光タンパク質による活性酸素種の生細胞可視化: 2013-9-12 横浜パシフィコ.

④ Hajime Karatani, Tomoya Yamashita, Naomi Mori, Yuki Namikawa, Saki Imai, Yukihiro Nishikawa, Hiroshi Oyama, Shigeru Tketani, Bacterial fluorescent proteins as probes for reactive oxygen species in living cells. 15th Congress of the European Society for Photobiology (ESP2013), 2013-9-6 (口頭発表) Liège Congress Centre, Liège, Belgium.

⑤ Hajime Karatani, Yuki Namikawa, Naomi Mori, Yutaka Ihara, Kengo Kitadokoro, Hiroshi Oyama, Visualization of mitochondria in living cells using a redox yellow fluorescent protein with a mitochondrial targeting signal. 36th Meetings of the American Society for Photobiology (ASP2012), 2012-6-25 (口頭発表) Delta Center-Ville, Montreal, Canada.

⑥ Hajime Karatani, Hajimu Kawakami, Effect of oxygen stimulation on dynamic bioluminescence pattern on luminous colony. 36th Meetings of the American Society for Photobiology (ASP2012), 2012-6-23 (ポスター発表) Delta Center-Ville, Montreal, Canada.

⑦ 柄谷肇, 森奈穂美, 山下朋也, 並川由紀, 北所健悟, 竹谷茂, 第 85 回日本生化学会大会: 発光細菌由来青色蛍光タンパク質に基づく酸化ストレスの蛍光イメージング: 2012-12-15 福岡国際会議場, 福岡県.

⑧ 服部謙作, 柄谷肇, 川上肇, ME とバイオサイバネティックス (MBE2011) : 刺激応答性微生物コロニー発光パターンの時空間画像処理: 2011-11-20 名古屋工業大学, 愛知県.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柄谷 肇 (HAJIME KARATANI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号: 10169659

(2) 連携研究者

田嶋 邦彦 (KUNIHICO TAJIMA)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号: 50163457

川上 肇 (HAJIMU KAWAKAMI)

龍谷大学・理工学部・電子情報学科
研究者番号: 60298734