

Photobacterium leiognathi ルシフェラーゼ発現に及ぼすグルコースの効果

渡部俊彦, 鈴木拓也, 吉川直樹, 上野将明, 三上 健, 松本達二*

Effect of Glucose on Luciferase Expression in *Photobacterium leiognathi*Toshihiko WATANABE, Takuya SUZUKI, Naoki YOSHIKAWA,
Yukihiro UENO, Takeshi MIKAMI, and Tatsuji MATSUMOTO*Department of Microbiology, Tohoku Pharmaceutical University, 4-4-1 Komatsushima,
Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received April 23, 2004; Accepted July 20, 2004)

Photobacterium leiognathi cultured in marine broth emits a luminescence that is temporarily enhanced and then extinguished by glucose. Glucose reduces the luciferase level and the expression of *lux ABG* mRNA in *P. leiognathi*. The amount of ATP in *P. leiognathi* is temporarily increased and then declines to the normal level. These results indicate that the extinguishing by glucose in *P. leiognathi* is induced by the interruption of the translation of luciferase.

Key words—*Photobacterium leiognathi*; glucose; luciferase

緒 言

P. leiognathi は、発光魚ヒメヒイラギなどの発光器官内に生息し、ヒメヒイラギの発光現象を引き起こしている海洋発光微生物の一種である。生物による発光現象は、化学物質による発光 (chemiluminescence) に対して生物発光 (bioluminescence) と呼ばれ、生物発光の機構もホタルなどの昆虫類と微生物では大きく異なっている。ホタルの発光はルシフェリンと ATP、酸素がルシフェラーゼの存在下で触媒される酸化脱炭酸反応による発光現象であるが、¹⁻³⁾ 微生物ではより複雑な経路を介して発光する。すなわち、ルシフェリンに相当するフラビンモノヌクレオチド (FMN) が、NADH によって還元され FMNH₂ となり、ルシフェラーゼと複合体を形成する。FMNH₂-ルシフェラーゼ複合体が分子状態により酸化されると、フラビン部分はルシフェラーゼと結合したままの状態でも過酸化型となる。次に細胞内の長鎖脂肪酸アルデヒドが、ルシフェラーゼ表面で過酸化型 FMN から酸素を奪うとともに、これを励起型に変える。この反応の最終段階でフラビン部分は FMN に、アルデヒド部分はカルボン酸

となって酵素ルシフェラーゼから遊離し、これと同時に青緑色の光が発せられる。⁴⁻⁸⁾

P. leiognathi の生物発光に関する遺伝子は、LuxCDABEG を含む Lux オペロンを形成している。LuxA と LuxB 遺伝子は、ルシフェラーゼの α と β サブユニットをエンコードしていて、LuxC, LuxD, LuxE は脂肪酸のアルデヒドへの変換に関する脂肪酸レダクターゼ複合体を形成するための酵素をエンコードしている。また、LuxG は、フラビン還元酵素をエンコードしている。⁹⁾

解糖作用は、細胞内の多くの中間代謝物質やエネルギー産生の中心代謝経路であり、¹⁰⁾ 細菌では菌体外のグルコースが体内に取り込まれ解糖系で代謝を受けると、この代謝産物がホスホエノールピルビン酸 (PEP)-糖リン酸化経路 (carbohydrate phosphotransferase system; PTS) によりリン酸化されることが知られている。¹¹⁻¹³⁾ PTS は、Enzyme I (EI), Histidine-phosphorylatable protein (HPr), 及び Enzyme II (EII) からなる。EII は、*crr* によりエンコードされる細胞タンパク質 IIA^{Glc} と *ptsG* によりエンコードされる膜レセプター IICB^{Glc} からなり、膜に存在する PEP からのリン酸基は、EI→HPr→EII と伝達され、最後には、グルコースのリン酸化に利用される。¹⁴⁾

cAMP は、cAMP レセプタータンパクに結合することで、ルシフェラーゼの発現を促進させることが知られ、¹⁵⁾ 菌体内に取り込まれたグルコースは、PTS を介して cAMP 産生を促進させるとされていることから、グルコース添加は生物発光の促進因子と予想されたが、われわれの行った実験では、*P. leiognathi* へのグルコース添加は、生物発光抑制を引き起こす結果が得られた。

本論文では、グルコースによる *P. leiognathi* 生物発光抑制の機構について解析を行ったので報告する。

方 法

1. 使用菌株 実験には、*P. leiognathi* IFO14169 株を用い、marine broth (Difco 社) で 25°C、一晩培養したものを実験に使用した。

2. 発光量及び菌体内 ATP 量の測定 *P. leiognathi* (1×10^8 cells/ml in marine broth) 990 μ l にグルコース (100 mg/ml) 10 μ l を加え、25°C 条件下で培養し、培養直後からの菌体の発光量を 1 時間毎に Minilumat luminometer (Berthold 社, Germany) にて測定した。また、菌体内 ATP 量は、ルシフェロール 250 プラス (キッコマン株) を用いて測定し、結果には 1×10^4 cells 当たりの発光量 (RLU; Relative Light Unit) として表示した。

3. ルシフェラーゼの定量 *P. leiognathi* (1×10^8 cells/ml in marine broth) 990 μ l にグルコース (100 mg/ml) 10 μ l を加え、25°C で 0.5 又は 5 時間培養した。培養終了後、菌体を MINI-BEAD-BEATER (Biospec Products Inc., USA) で破碎し、上清を回収した。回収した上清中のルシフェラーゼ含量は、Murakami らの方法¹⁶⁾に従い Enzyme Immuno Solvent Assay により定量した。すなわち、上清 0.1 ml を 96 well plate (ナルジェヌンクインターナショナル株) に加え、37°C 飽湿条件下で一晩放置後、Blockace (大日本製薬株) によるブロッキングを行い、一次抗体として Anti-luciferase (*Photobacterium fischeri*) IgG (Rockland Inc., USA) を、二次抗体として Goat anti-rabbit Ig-horseradish peroxidase conjugates (Biosource International, USA) を用いてルシフェラーゼの検出を行った。二次抗体による反応終了後、発色剤 (o-フェニレンジアミン 0.2 mg/ml, 30% 過酸化水素水 0.1 μ l/

ml) を加え、色調の変化を 490 nm の吸光度で測定し、この値をルシフェラーゼ量とした。また、上清中に含まれる ATP 量をルシフェロール 250 プラスで測定し、この値から破碎された菌体数を算出した。結果には、*P. leiognathi* 1×10^4 cells 当たりのルシフェラーゼ量を表示した。

4. *P. leiognathi* LUX mRNA の定量 *P. leiognathi* (1×10^8 cells/ml in marine broth) 990 μ l にグルコース (100 mg/ml) 10 μ l を加え、25°C で 0.5 又は 5 時間培養した。培養終了後、Total RNA Purification Kit (Toyobo 社) を用いて RNA を抽出し、One Step RNA PCR Kit (Takara 社) を用いて目的遺伝子を増幅した。PCR は、94°C, 2 min の反応後、(94°C, 15 秒→64°C, 30 秒→68°C, 60 秒) のサイクルを 35 回繰り返す。その後、68°C, 7 分間処理し反応を終了させた。PCR 産物は Agilent 2100 Bioanalyzer で解析し、結果には total RNA 1 mg から増幅された DNA 量を表示した。*P. leiognathi* LUX 遺伝子の配列は、米国国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の Entrez システムを利用して検索し、この配列を基に、BCM Search Launcher System (Human Genome Sequencing Center, Baylor College of Medicine) を利用して PCR 用のプライマーを設計した。

LUX プライマーはセンスとして、5'-GGATGATAGTCAACAAAAGCGTATCG-3'、アンチセンスとして、5'-GCAACGTGATGTAAACACGTATCG-3' を使用した。

結 果

1. グルコースの発光量への効果 *P. leiognathi* 生物発光に及ぼすグルコースの影響を調べるため、グルコース添加後の発光量を経時的に測定した (Fig. 1)。グルコース未添加群では、*P. leiognathi* の生物発光は、約 4×10^4 RLU で、ほぼ一定の値であったのに対し、グルコース添加群では添加後 1 時間以内に、一時的な発光量の増加が認められ、その後発光は、急激に低下し、6 時間後には完全に消光した。この結果から、*P. leiognathi* の生物発光は、グルコースによって抑制されることが明らかになった。

2. ルシフェラーゼの定量 発光微生物における発光現象は、ルシフェラーゼによって活性化され

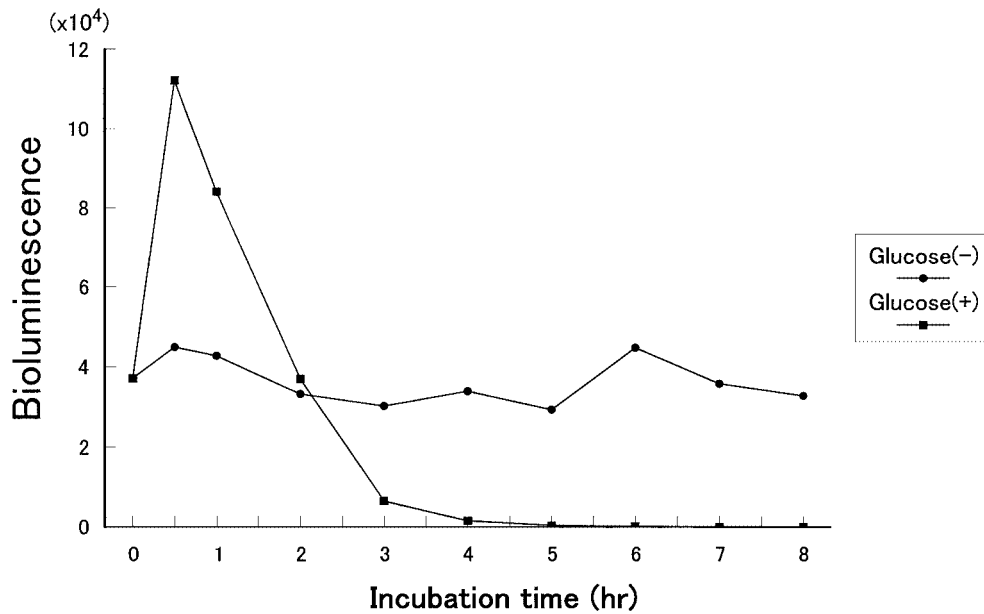


Fig. 1. Effect of Glucose on Bioluminescence in *P. leiognathi*

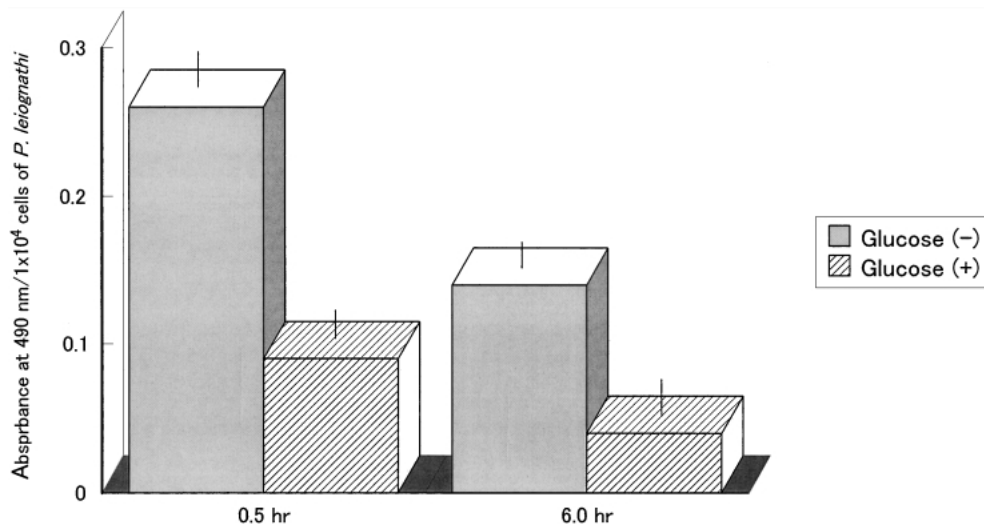


Fig. 2. Amount of Luciferase in *P. leiognathi* Cultured with/without Glucose

ていることから、¹⁻³⁾ グルコース添加が、*P. leiognathi* 菌体内ルシフェラーゼ発現を抑制しているか否かを検討した。グルコースの添加により生物発光が一時的に上昇する0.5時間目と生物発光が完全に消光する6時間目の菌を回収・破碎し、上清中に放出されたルシフェラーゼ量を測定したところ、グルコース添加0.5時間目及び6時間目の菌体ともに、グルコース未添加群と比較してルシフェラーゼ発現量の低下が明らかになった (Fig. 2)。

3. *LUX* mRNA の定量

グルコース添加によ

るルシフェラーゼ発現抑制を、*LUX* mRNA 発現量からも比較・検討した。ルシフェラーゼをエンコードしている *LUX* mRNA 発現量を、RT-PCR 法により測定したところ、グルコース添加0.5及び6時間目の相対的 *LUX* mRNA 発現量 (ng/mg of total RNA) は、グルコース未添加群と比較してともに有意に低下していた ($p < 0.001$, Fig. 3)。

4. 菌体内 ATP の変化

グルコース添加後の菌体内 ATP 量の変化を経時的に測定したところ、グルコース添加から1時間以内に ATP の一過性上

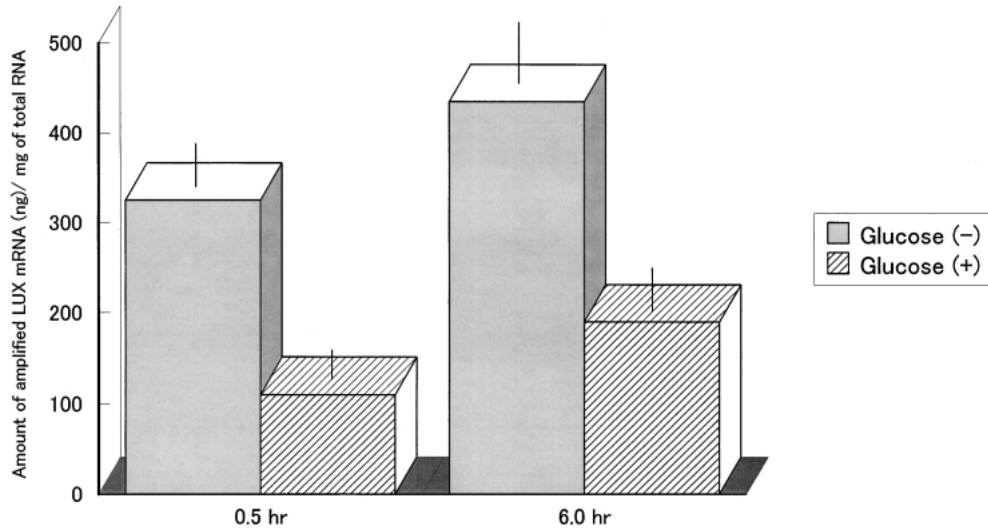


Fig. 3. Expression of *LUX* mRNA in *P. leiognathi* Cultured with/without Glucose

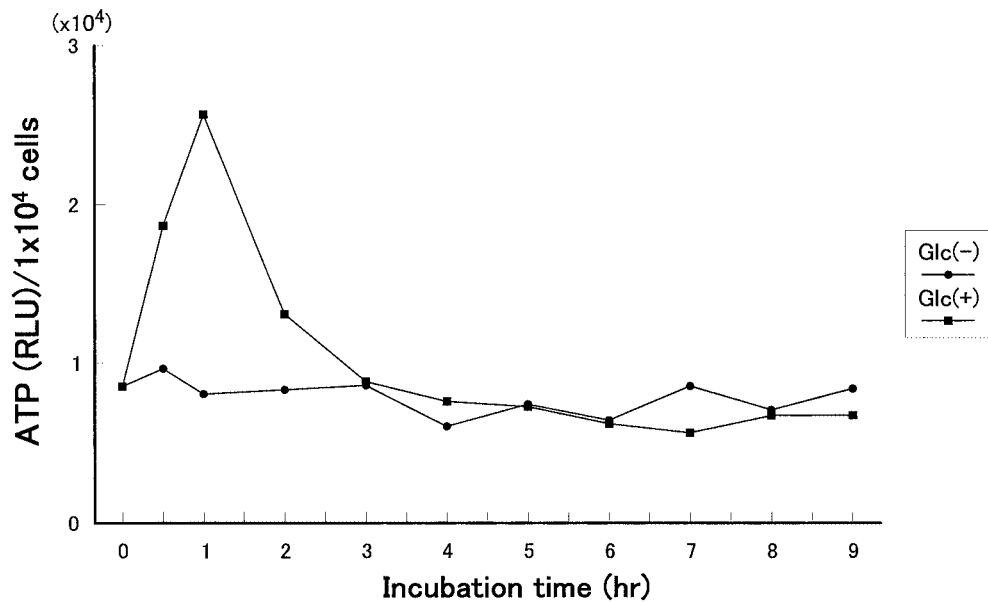


Fig. 4. Amount of ATP in *P. leiognathi* Cultured with/without Glucose

昇が認められ、その後、グルコース未添加群と同程度のレベルにまで ATP 量は減少した (Fig. 4)。

考 察

グルコースは、ATP 産生に関わる細胞代謝の中心物質であり、細胞代謝に様々な影響を与える。菌体内に取り込まれたグルコースは、解糖系で代謝されたあと、PTS を介してアデニルサイクラーゼの活性化を誘発する。⁹⁻¹³⁾ 発光微生物による生物発光やルシフェラーゼの発現は、cAMP と cAMP レセ

プタータンパクの結合により誘発されることから、¹⁵⁾ グルコースの刺激は生物発光を促進させることが予想された。しかし、*P. leiognathi* へのグルコース刺激は生物発光の抑制を引き起こし、その理由についても不明であることから、本研究では、グルコースによる *P. leiognathi* 生物発光阻害が、どのような経路で引き起こされるのか検討を行った。

発光状態にある *P. leiognathi* にグルコースを加え培養を行ったところ、添加から 1 時間以内に生物発光の一過性の上昇が認められ、その後約 6 時間で

生物発光は完全に消光した (Fig. 1). グルコース添加による消光現象に関しては, グルコース添加6時間後の *P. leiognathi* 菌体内ルシフェラーゼ量が, グルコース未添加群と比べ有意に低下しており (Fig. 2, $p < 0.001$), グルコースがルシフェラーゼ産生機構を抑制することにより生物発光能力が低下することが考えられた. グルコース刺激によるルシフェラーゼ発現抑制状態では, ルシフェラーゼをコードする *LUX* mRNA 発現量もまた低下しており (Fig. 3), グルコースが, *LUX* mRNA の転写抑制又は mRNA の分解を促進させていることが推察された.

しかし, グルコース添加後に起こる一時的な発光上昇では, 発光時のルシフェラーゼ量及び *LUX* mRNA 発現量が, グルコース未添加群と比較して有意に減少しており (Figs. 2, 3), ルシフェラーゼ発現量の変化からでは, 発光増強の理由を説明することができなかった.

P. leiognathi の生物発光は, 長鎖脂肪酸から ATP, NADPH を介した還元反応により得られる長鎖脂肪酸アルデヒドが, ルシフェラーゼを励起型に代謝して発光を誘導させる.⁴⁾ そこでわれわれは, ルシフェラーゼを励起型に代謝するために必要な ATP 量が, グルコース添加直後に増加していないか検討を行った. その結果, グルコース添加直後に一過性の ATP 産生量の増加が認められ, その変化は生物発光の推移と相関していた (Fig. 4). この結果から, グルコースによる発光増強は, 長鎖脂肪酸アルデヒドを介したルシフェラーゼの励起反応が ATP の一時的な上昇によって促進されたために起きた現象と推察された. ATP 量の増加が一過性である理由については今回明確にすることはできなかったが, 急激な ATP 上昇に対するフィードバック的反応が菌体内部で起きているのではないかと予想された.

P. leiognathi のような発光微生物は細胞密度が高いときに光を放つとされ, この反応は細菌がある一定の菌密度に達したときに始まる形質発現 (quorum-sensing) として知られている.¹⁷⁾ *P. leiognathi* の quorum-sensing による発行促進メカニズムは不明であるが, 今回の実験で, *P. leiognathi* 生物発光シ

グナルに対し, グルコースが抑制的に作用することから, *P. leiognathi* の生物発光は菌の増殖に伴う quorum-sensing の1つで, 菌が栄養素の不足状態にあることを意味する指標と考えられた.

REFERENCES

- 1) Theodore K. C., Norman H.L.C., *Anal. Chem.*, **67**, 4290-4294 (1995).
- 2) Gould S. J., Subramani S., *Anal. Biochem.*, **175**, 5-13 (1988).
- 3) Ow D. W., Wood K. V., DeLuca M., De Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H., *Science*, **234**, 856-859 (1986).
- 4) Meighen E. A., Dunlap P. V., *Adv. Microb. Physiol.*, **34**, 1-67 (1993).
- 5) Zioegler M. M., Baldwin T. O., *Curr. Top. Bioenerg.*, **12**, 65-113 (1981).
- 6) Meighen E. A., *Ann. Rev. Microbiol.*, **42**, 151-176 (1988).
- 7) Meighen E. A., *Microbiol. Reviews*, **55**, 123-142 (1991).
- 8) Meighen E. A., *Ann. Genet.*, **28**, 117-139 (1994).
- 9) Lin J. W., Chao Y. F., Weng S. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 938-947 (1995).
- 10) Deutscher J., Kuster E., Bergstedt U., Charrier V., Hillen W., *Mol. Microbiol.*, **15**, 1049-1053 (1995).
- 11) Meadow N. D., Fox D. K., Roseman S., *Ann. Rev. Biochem.*, **59**, 497-542 (1990).
- 12) Postma P. W., Lengeler J. W., Jacobson G. R., *Microbiol. Rev.*, **5**, 543-594 (1993).
- 13) Hueck C. J., Hillen W., *Mol. Microbiol.*, **15**, 395-401 (1995).
- 14) Kimata K., Tanaka Y., Inada T., Aiba H., *EMBO J.*, **20**, 3587-3595 (2001).
- 15) Paul V. D., *J. Bacteriol.*, **171**, 1199-1202 (1989).
- 16) Murakami T., Hiraoka K., Mikami T., Matsumoto T., Suzuki M., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 616-618 (1993).
- 17) Taga M. E., Bassler B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **25**, 14549-14554 (2003).