

(2019-10-5)

# 生物発光化学発光研究会

## 第35回学術研究会

一般社団法人 京都光科学研究所・京都工芸繊維大学  
きょうとうかがくけんきゅうしょ

柄谷 肇

**細菌生物発光および  
発光細菌研究から生まれた  
化学発光**

一般社団法人 京都光科学研究所  
Kyoto Luminous Science Laboratory  
(KLSL)

設立： 2018年12月27日  
代表理事・所長：柄谷 肇

研究拠点：

けいはんな学研都市

(関西文化学術研究都市)

京都府相楽郡精華町光台一丁目7

けいはんなプラザラボ棟

研究員 (as of 2021-4-1) :  
常勤(1名)・非常勤(5名)

事業内容：

広く光科学に関する学術研究を行い、得られる成果を  
科学技術・学術・教育・芸術並びに産業の発展に活かす

# ● けいはんな学研都市(関西文化学術研究都市)・けいはんなプラザおよび周辺



# 生物発光

## Outline

# ● 生物発光研究(観測)の歴史

◇ アリストテレス (384 - 322 BC) 海洋生物種180種類について記述

“cold light (冷光)”を最初に認識

◇ プリニウス

(Pliny the Elder (23-79 AD) )

広範で体系的な記述

◇ コロンブス(1490年頃 大航海)

外洋表層大規模発光現象 San Salvador “burning sea”

◇ ロバート ボイル (1667)

腐肉やキノコからの発光と空気との因果関係

◇ H. M. S. Challenger (1873)

生物発光の科学的研究を目的とする航海

◇ Raphael Dubois (1885)

二枚貝の発光(発光関連化学物質の抽出)

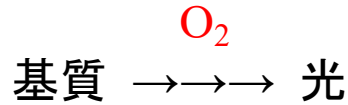
用語“luciferine”と熱に対して不安定な“luciferase”という新語を創世

➤ 生物発光の化学的な研究の端緒



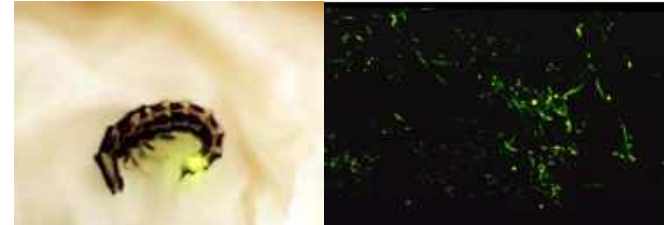
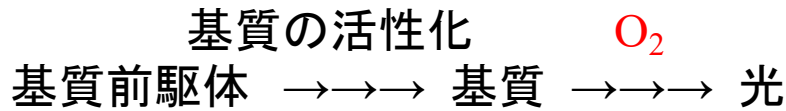
# ● 生物発光反応のタイプと共通点

Type I 直接酸化: 基礎的な酵素基質反応:



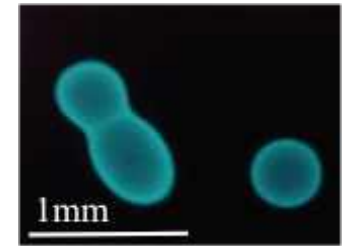
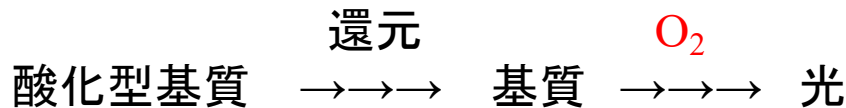
写真, 「はてのうるま」 小江克典博士

Type II 基質の活性化, それに続く酸化反応:



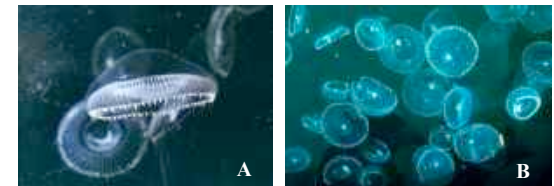
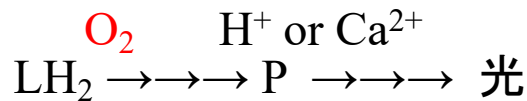
写真, 「日本ホテルの会」 鈴木浩文博士

Type III 還元反応による基質生成, それに続く酸化反応:

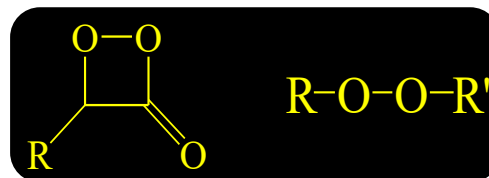


Karatani

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



写真, 下村脩先生の好意による



発光細菌

細菌生物発光

## ● 発光細菌の種類

---

### 海棲

*Vibrio*属\*, *Aliivibrio*属, *Photobacterium*属, *Schwanella*属

**4 属 21種**

\*淡水産 *Vibrio cholerae*も *Vibrio*属に含める

(日本国内でも発見されている:いわゆるホタルエビ)

### 陸棲

*Photorhabdus*属(線虫と共生)

(米軍職業軍人の血液から単離されたこともある)

**1 属 3 種**

---

**計 5 属 24 種**

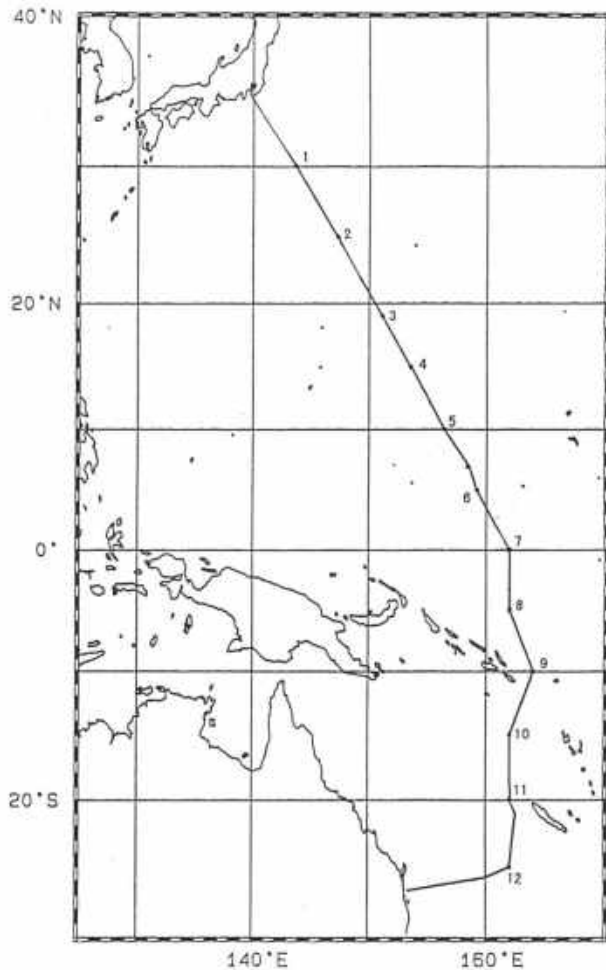


# ● 発光細菌の棲息域

(微小プランクトン)

## 発光微生物の分布

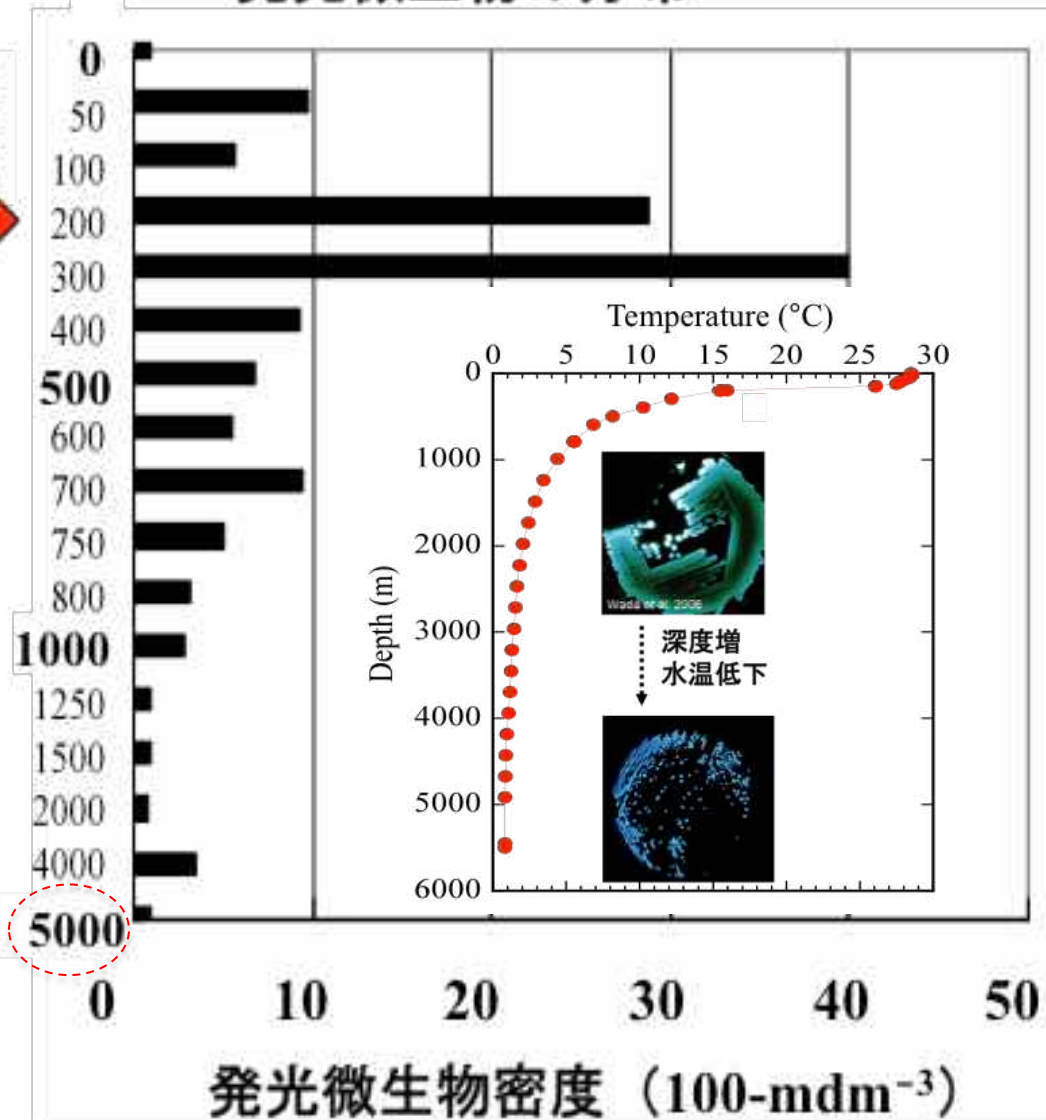
KH-00-1 Leg.1 TRACK CHART



太陽光  
到達深度



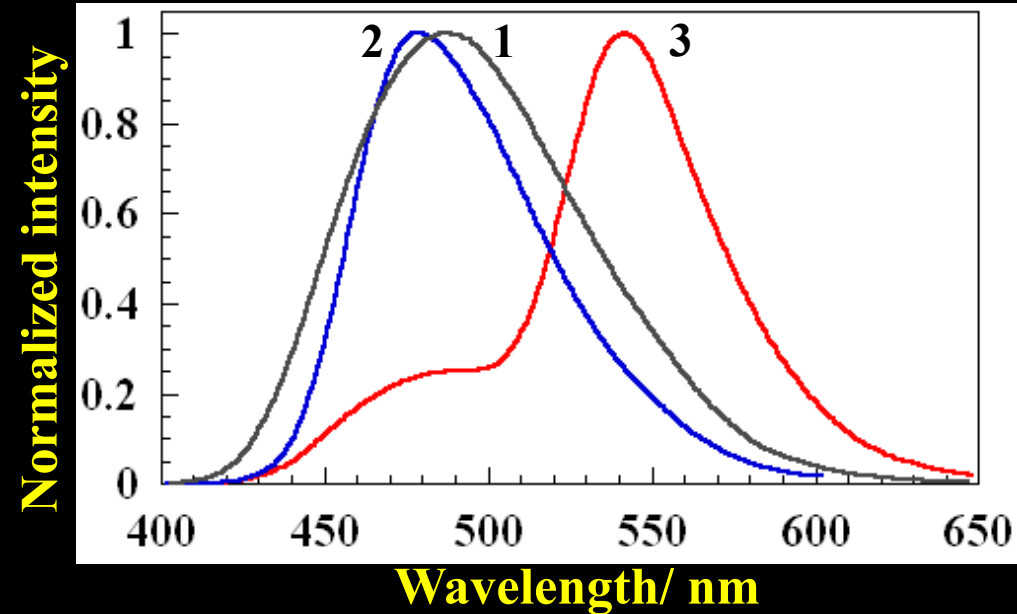
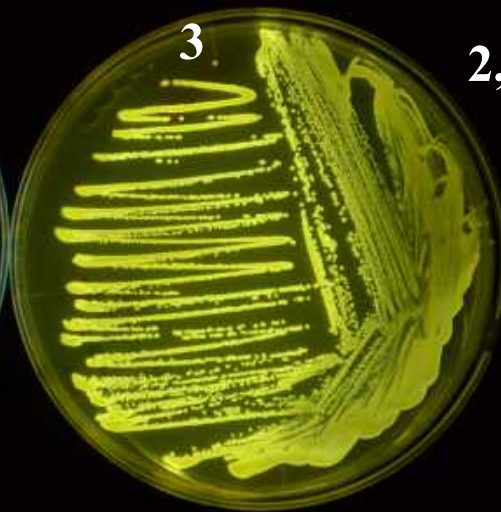
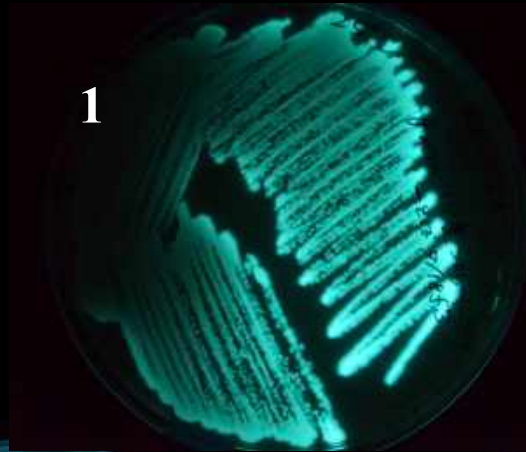
深度(m)



1 L 中に  
10 個

発光微生物密度 (100-mdm<sup>-3</sup>)

● 発光細菌の発光および光の波長分布：  
特徴，光の色の多様性



1, *Vibrio harveyi*

2, *Photobacterium phosphoreum* bmFP

3. *Aliivibrio sifiae* Y1



(発光生物)  
発光細菌は  
なぜ光るの？

光る目的は何？



## ● 仮説 発光細菌はなぜ光るのか

進化の初期

遊離ラジカル捕捉剤 : hydrogen sulfide, alkylthiols

↓

光合成 (酸素濃度飛躍的増加)

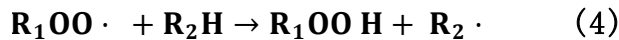
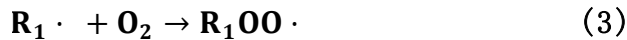
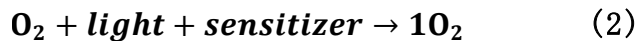
↓

生物は新たな抗酸化システムを備える必要に迫られた

初期生物発光反応

- ➔ 余剰酸素分子消費による酸素毒性に対するプロテクション
- ➔ 酸素毒を惹起する高酸素分子濃度を低下させる直接的メカニズム

酸素分子の毒性発現に関連する基礎反応



反応式(3)と(4)はラジカルの増幅に相応する。

余剰酸素分子消費エンジン (酵素 : catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase) ➔ 生物エネルギー的にハイコスト

酸素濃度低下 ➔ 酸素分子関与生体損傷プロテクション

☆ 基質の酸化に何らギブズエネルギーを必要としないことである。且つ生成物は無害である。

**自発的に進む発熱反応**

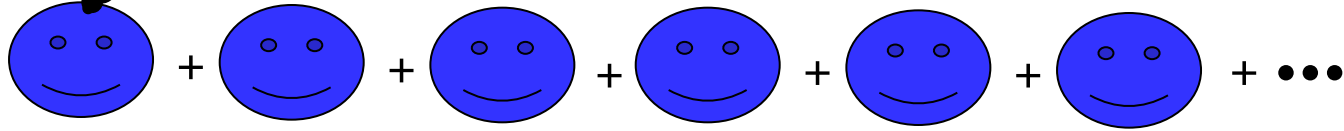
The Evolution of Bioluminescence Oxygen Consumption as an Ancient Oxygen Detoxification

Mechanism *J. Mol. Evol.* 52, 321-332 (2001)

● だけでもそう物理化学的な説明だけでは済まされない

● 単一細胞の発光と多細胞集団の発光

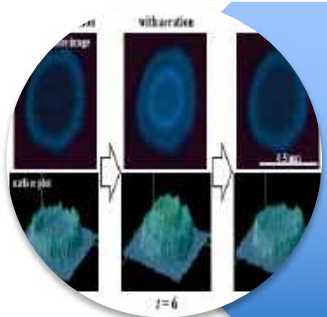
ただ光る  
だけ？

 + ...  $\neq \sum n_i$

A diagram showing six blue smiley faces representing individual cells, followed by an ellipsis and a plus sign, and then the mathematical expression  $\neq \sum n_i$ . A large bracket underneath all the smiley faces and the plus sign indicates that the sum of individual cells is not equal to the sum of  $n_i$ .



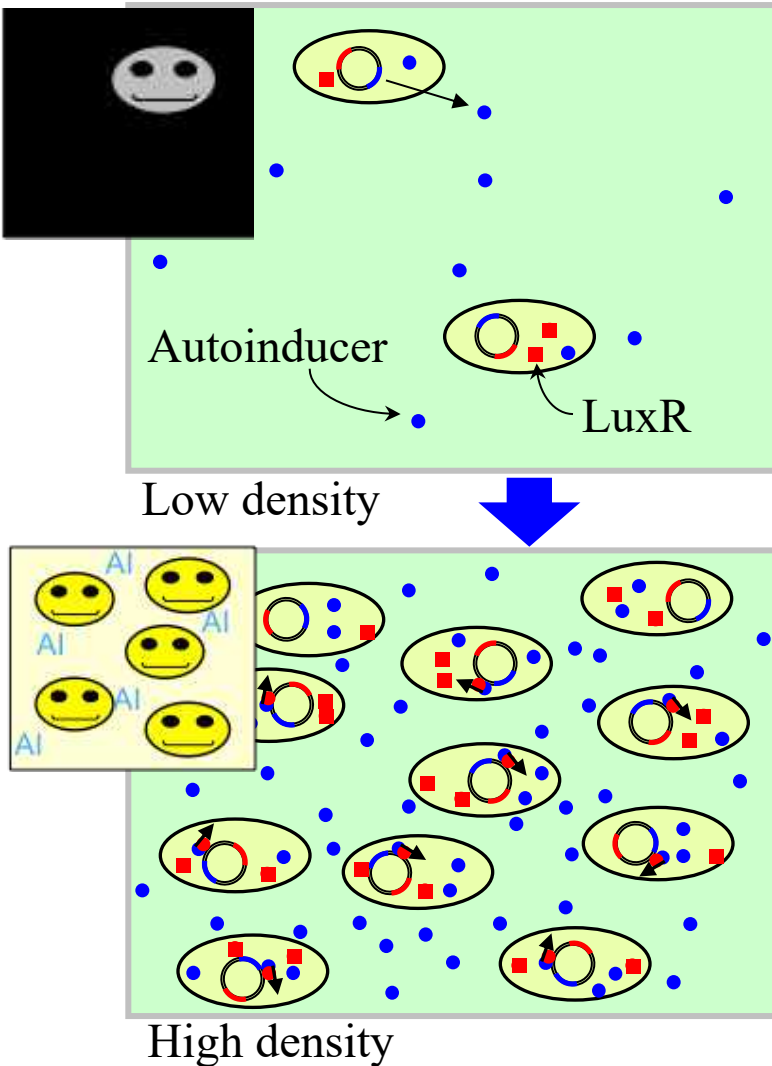
クオラムセンシング



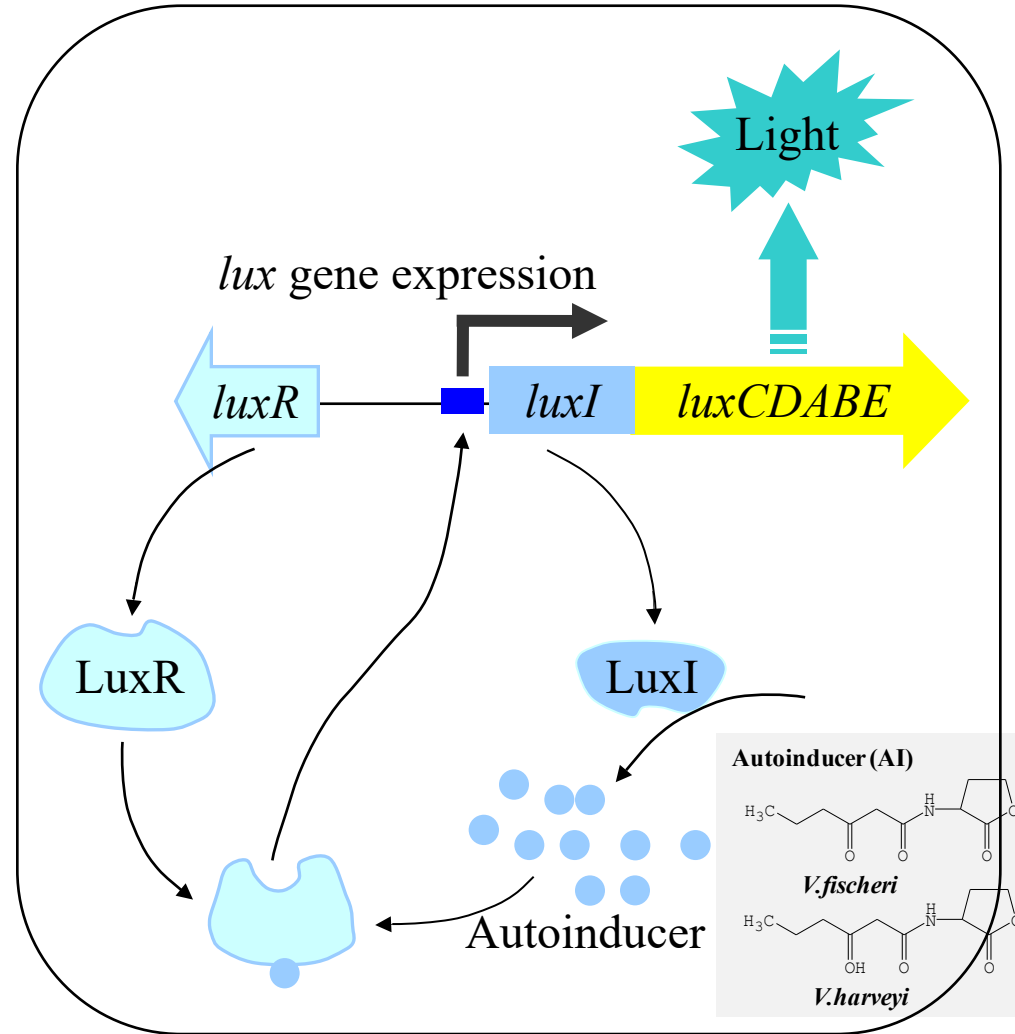
集団同期

# ● 細胞集団の発光・クオラムセンシング

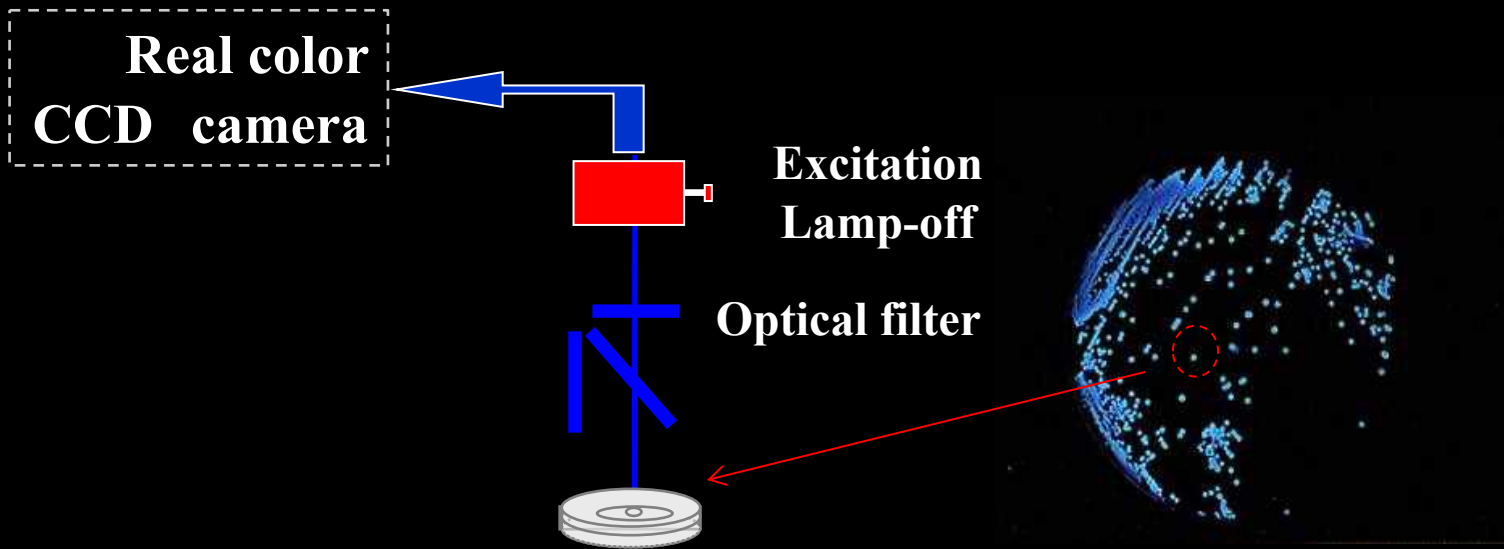
細胞間ケミカルコミュニケーション  
Hastings, *et al.*



*lux*遺伝子発現のon-off  
Meighen, *et al.*



● 発光細菌のコロニーに現れる規則性

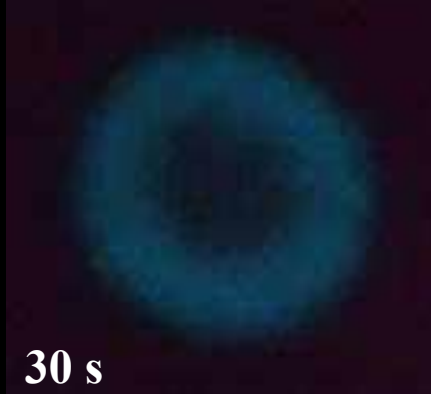


*P. phosphoreum*bmFP



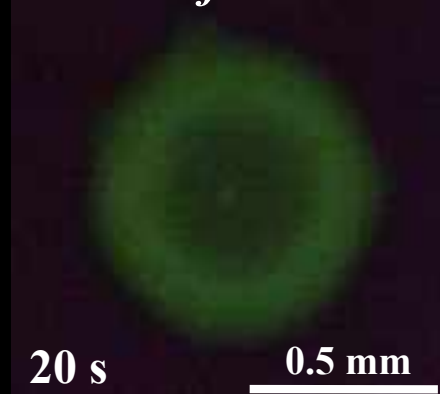
Exposure, 20 s

*Vibrio shewanella*



30 s

*Aliivibrio fischeri* Y1



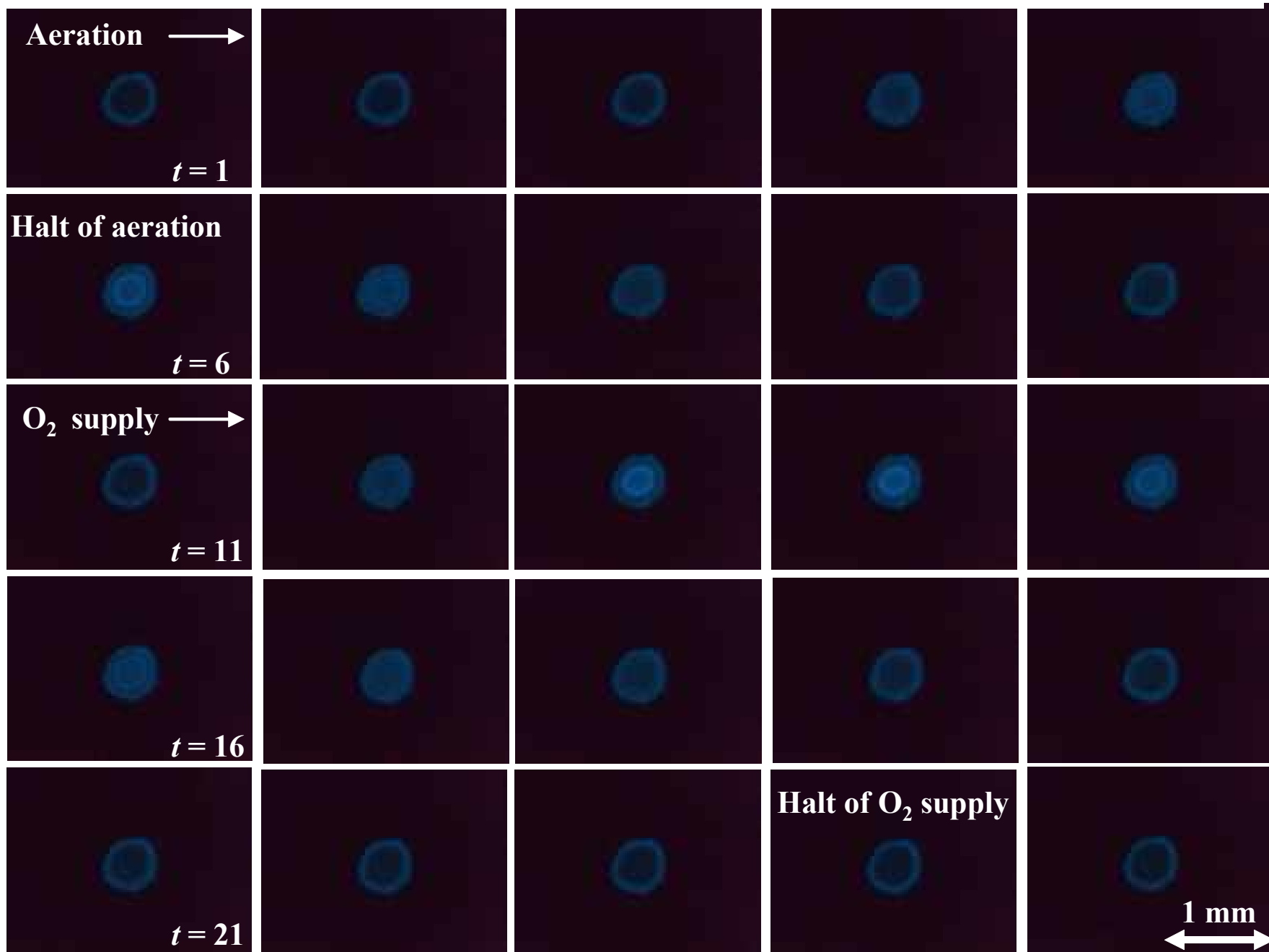
20 s

0.5 mm

発光細菌  
酸素分子  $O_2$   
刺激応答



● 集団同期的？な発光パターン ( $O_2$  vs. *P. phosphoreum* bmFP)



● *P. phosphoreum lux* 遺伝子組換え大腸菌コロニーの酸素刺激応答



$pO_2 \uparrow$



発光パターンは発光細菌に固有のものではない  
➤ 酸素刺激と関連して出現する

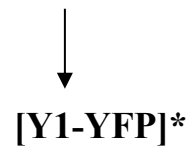
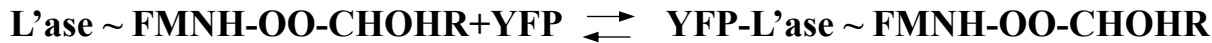
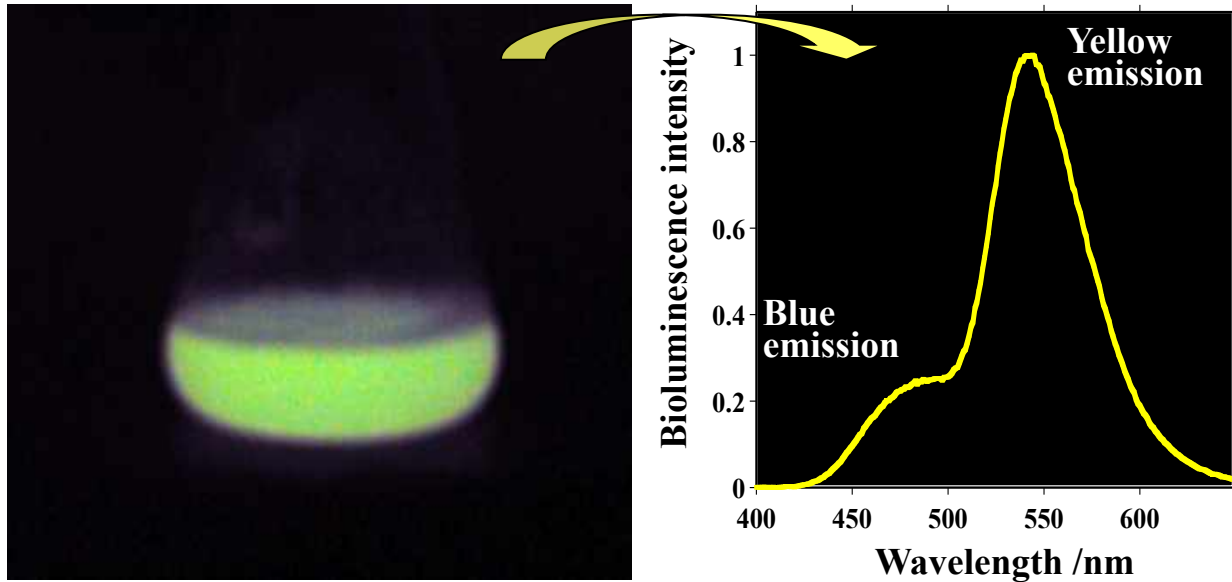
$O_2$  vs. 発光  
黄色発光細菌

*Aliivibrio sifiae* Y1  
(*Vibrio fischeri* Y1)

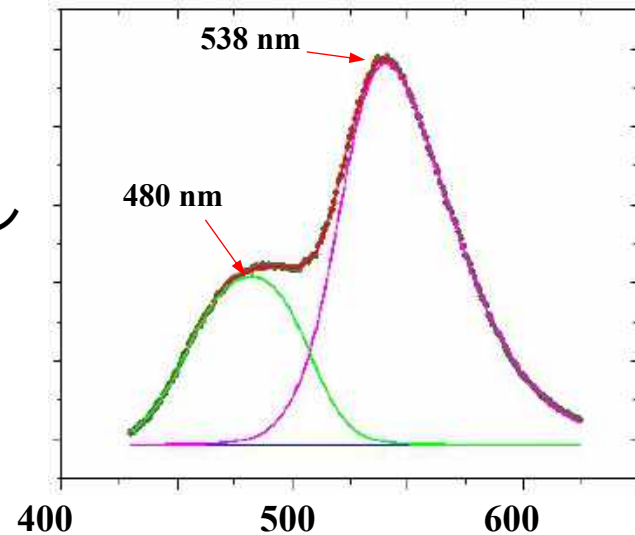
に着目



# ● Y1生物発光色は蛍光タンパク質の関与による



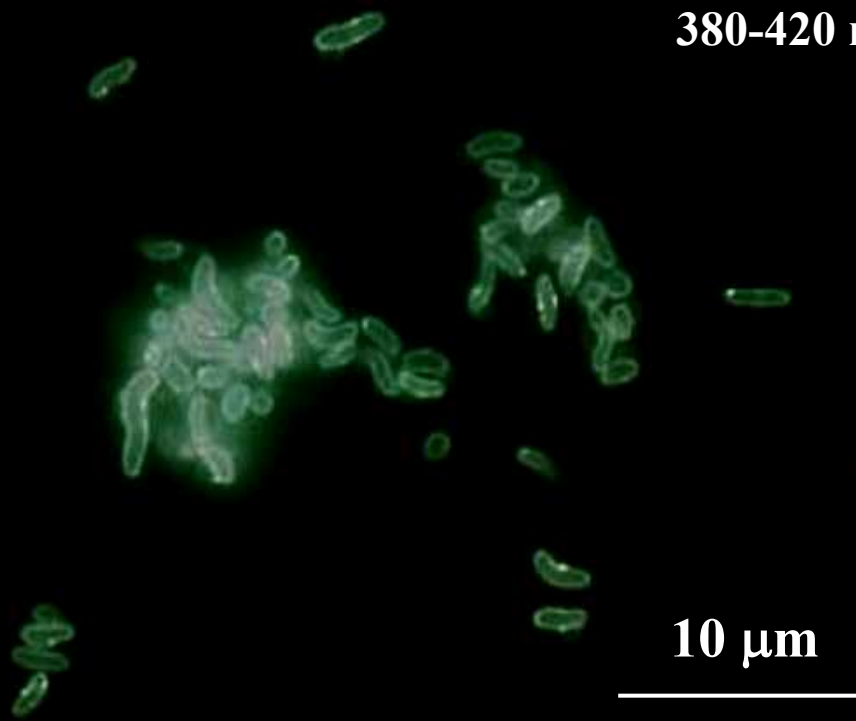
高エネルギー中間体 - 蛍光タンパク質間の電子移動反応



● Real color fluorescence images of *A. sifiae* Y1

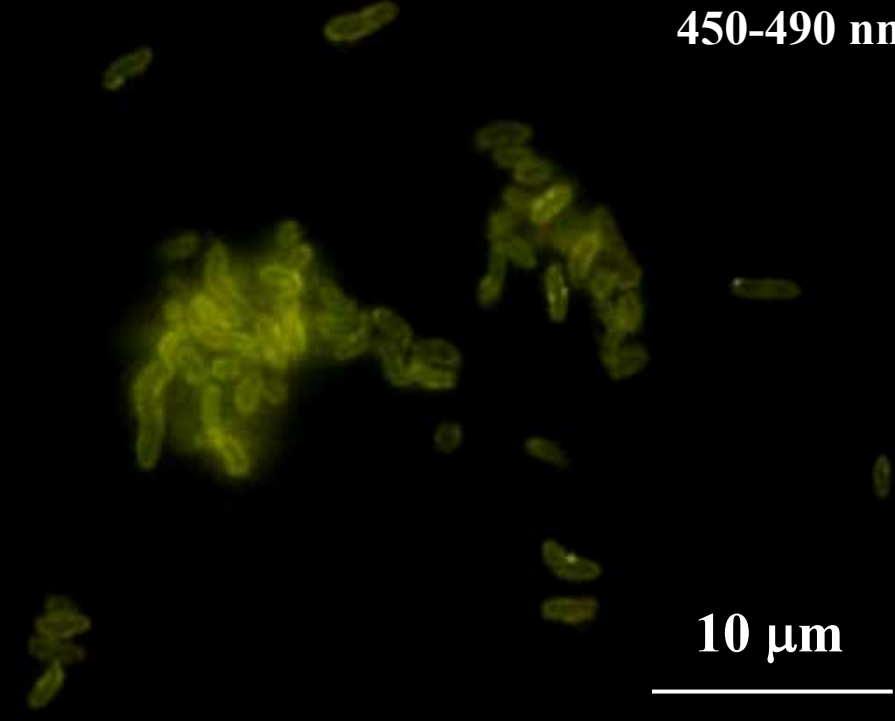
Y1-BFP \* (Y1-Blue) and  
[L'ase~FMNH-OH]\*

Exciter,  
380-420 nm



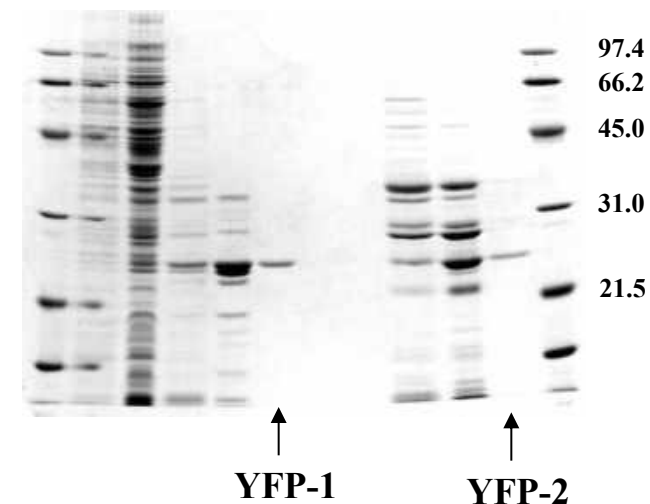
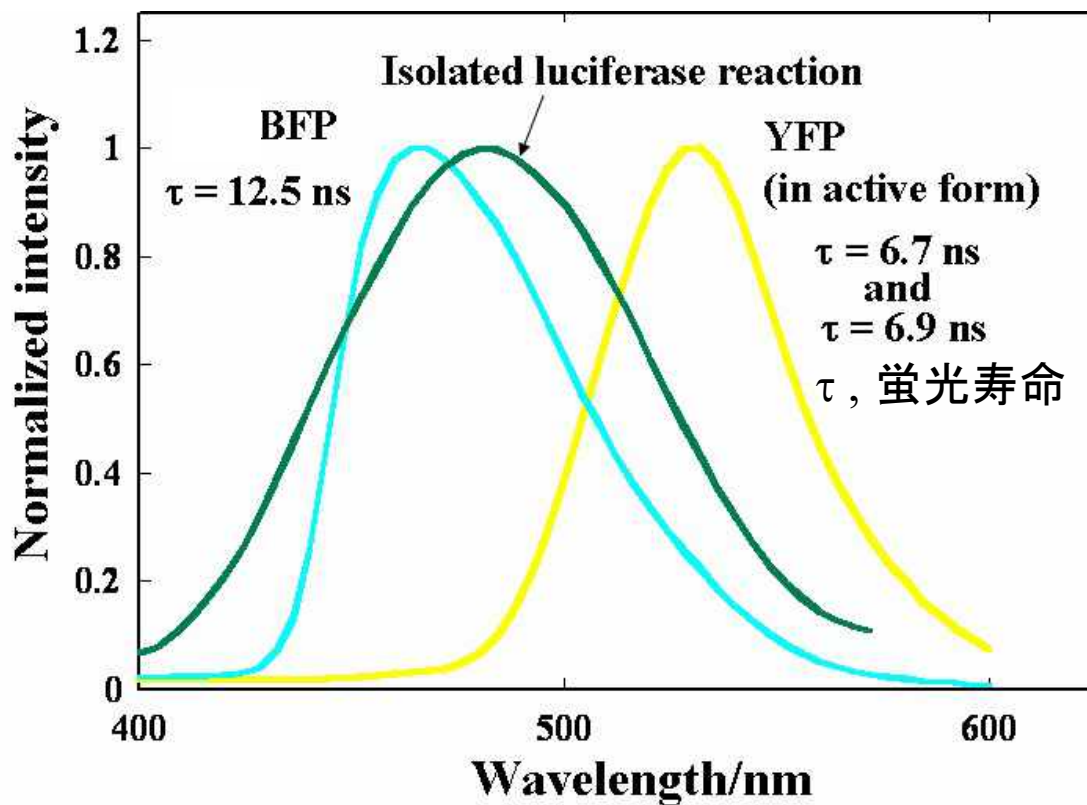
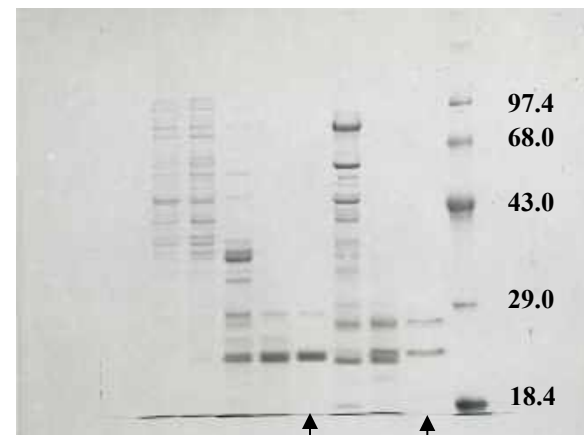
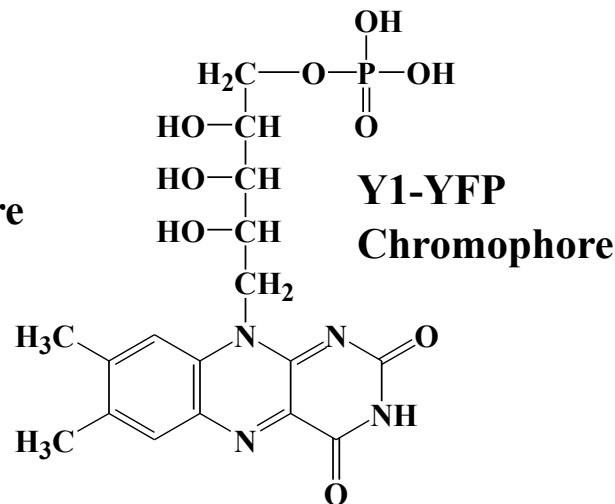
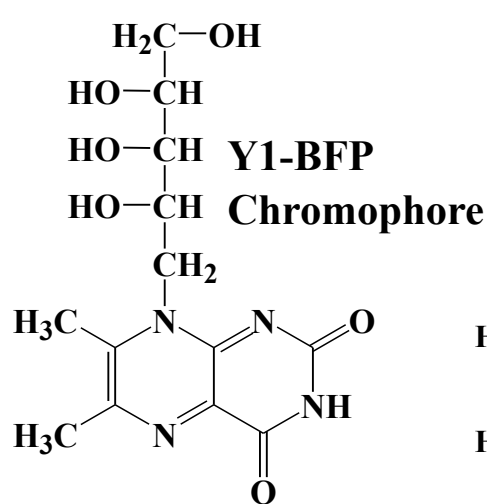
Y1-YFP\* (Y1-Yellow)

Exciter,  
450-490 nm

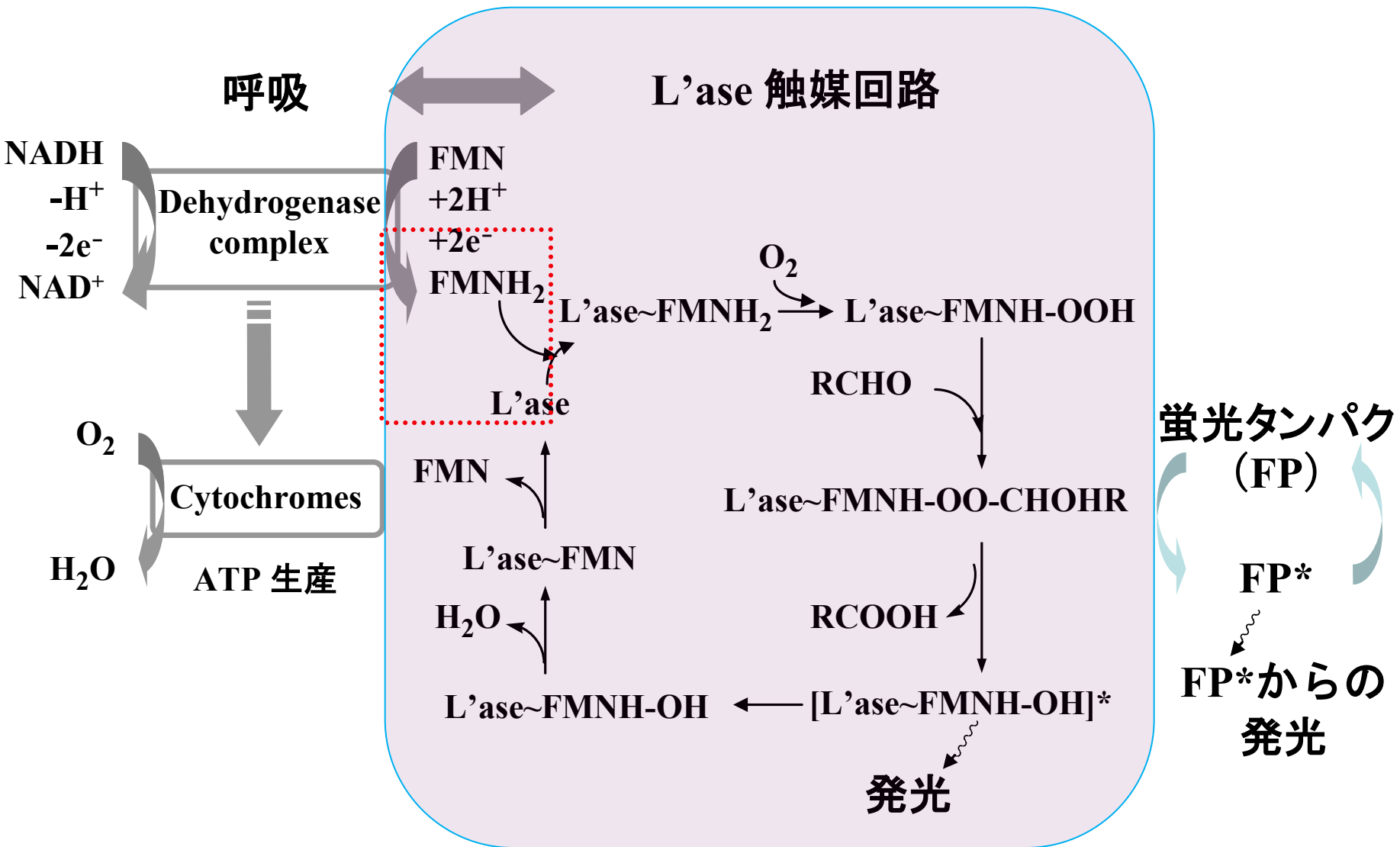


Nikon Fluorescence microscope Eclipse E600W with a Keyence Color  
CCD VB-600:Objective (CFI Plan APO 100 × (oil)).

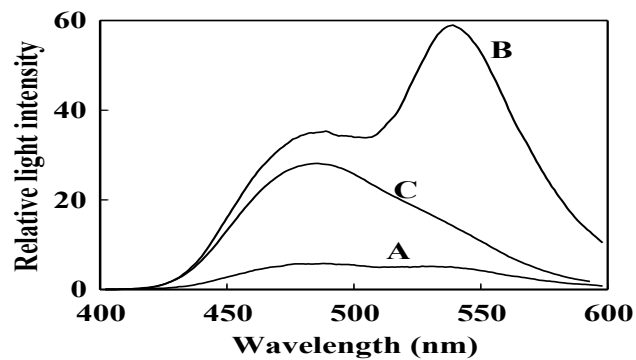
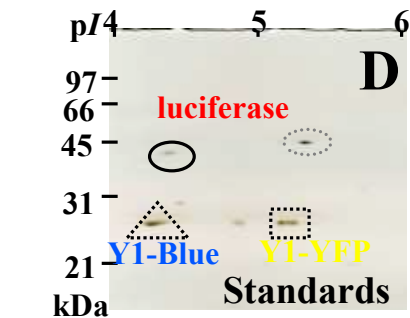
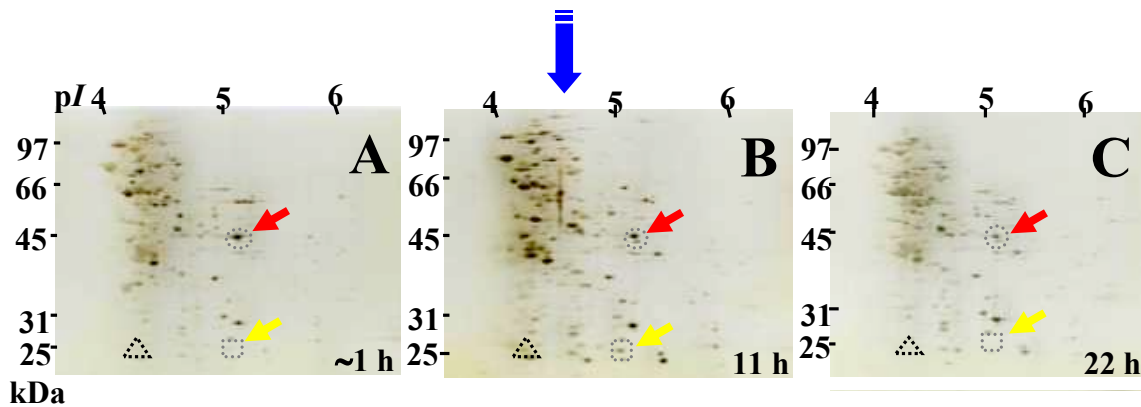
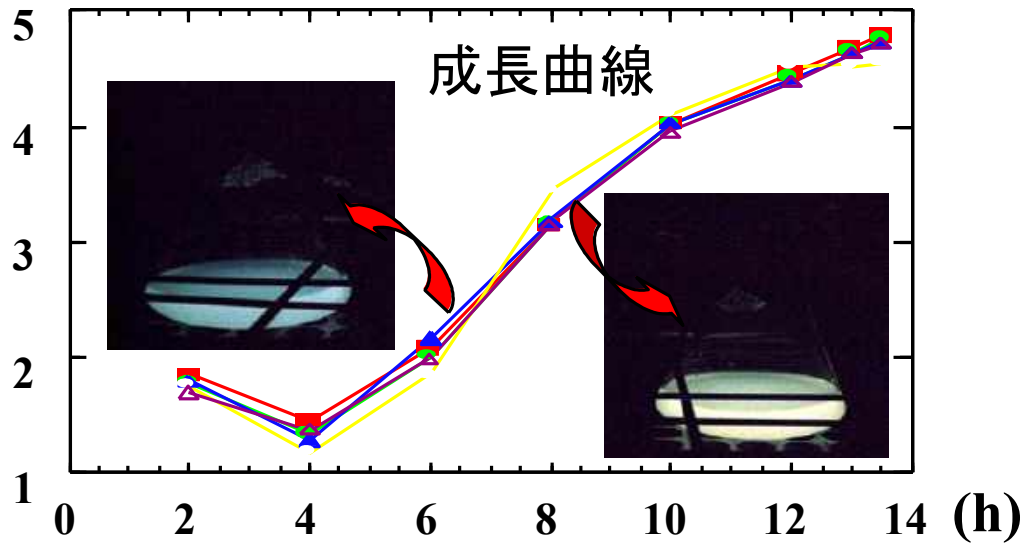
# ● Y1蛍光タンパク質



# ● 細菌生物発光のメカニズム



● 発光色変化: Y1-YFP (Y1-Yellow) vs. luciferase

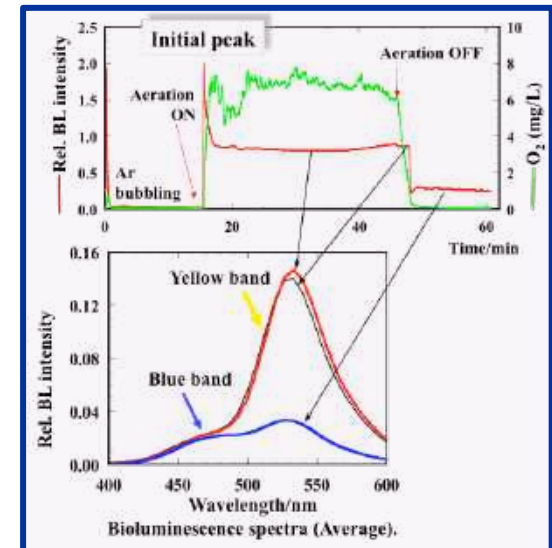
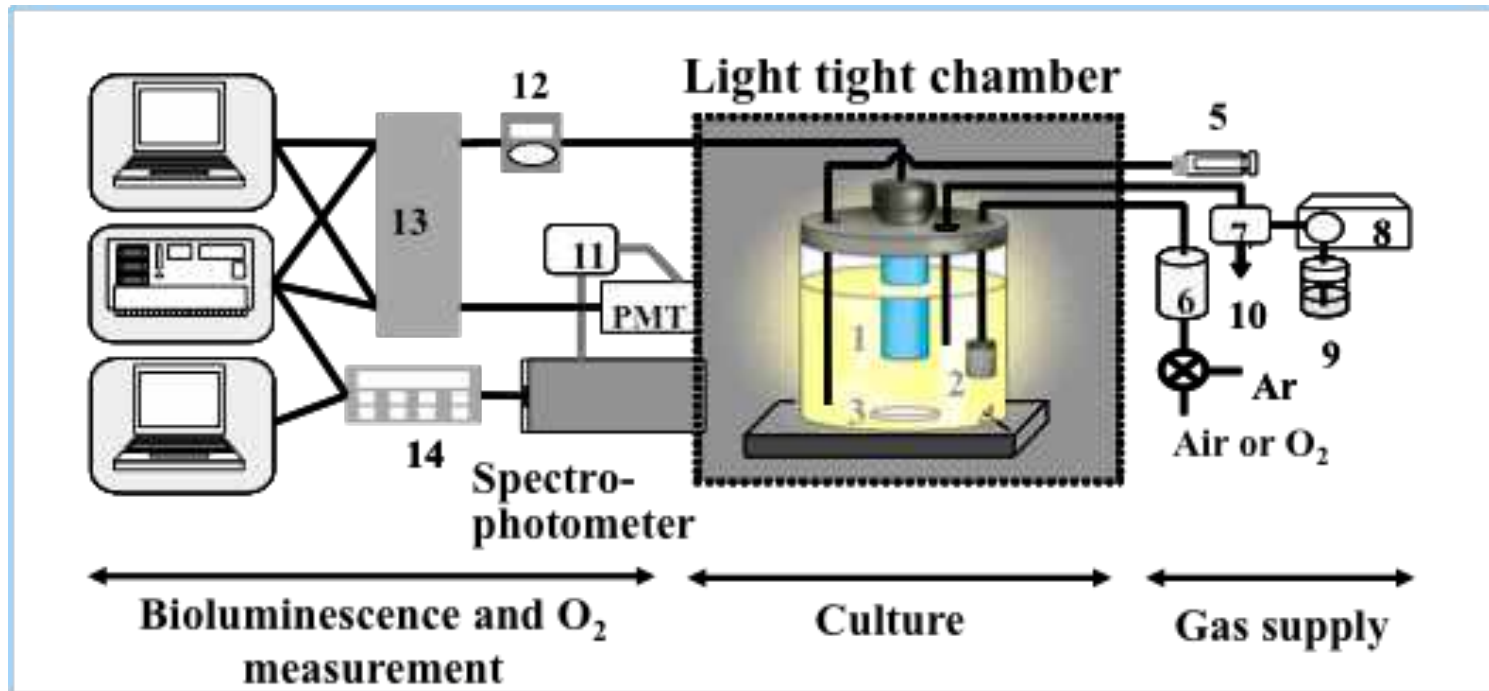




Y1 発光挙動  
vs. 酸素分子

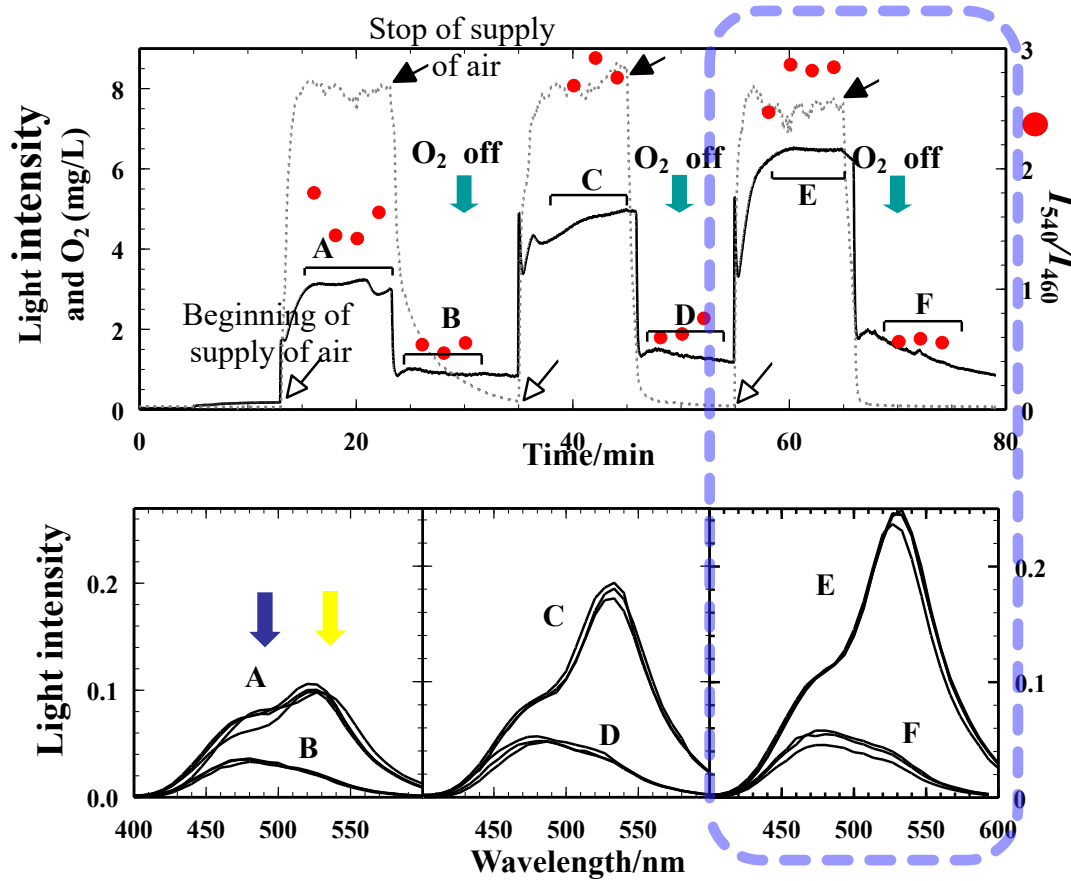
$O_2$

# ● 発光色の酸素分圧依存性

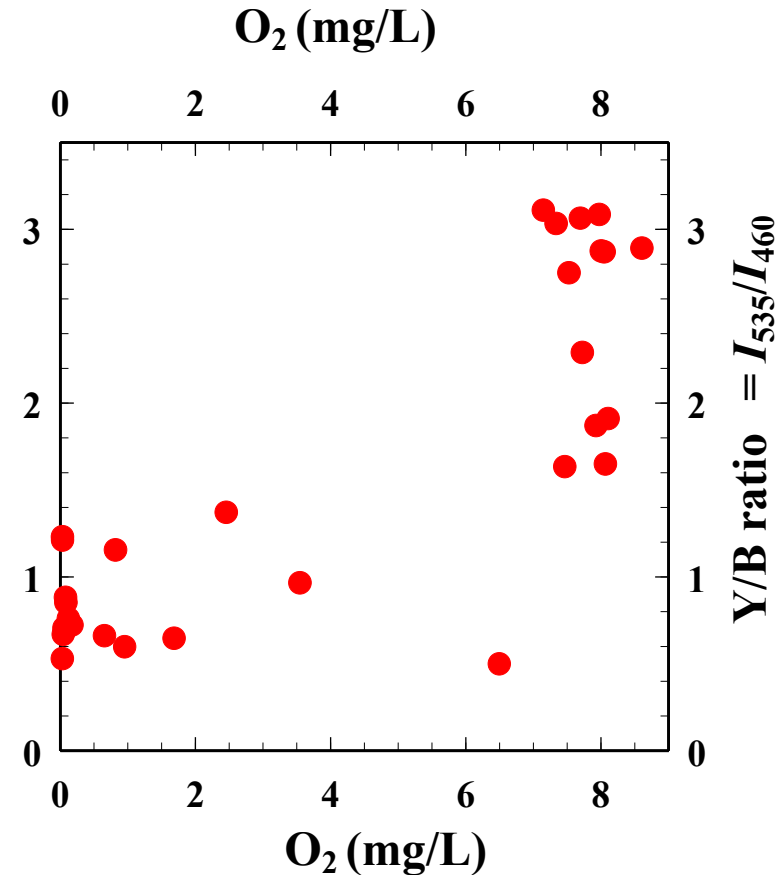


# ● 高細胞密度 *A. sifiae* Y1カルチャー，酸素分圧変化に対する応答

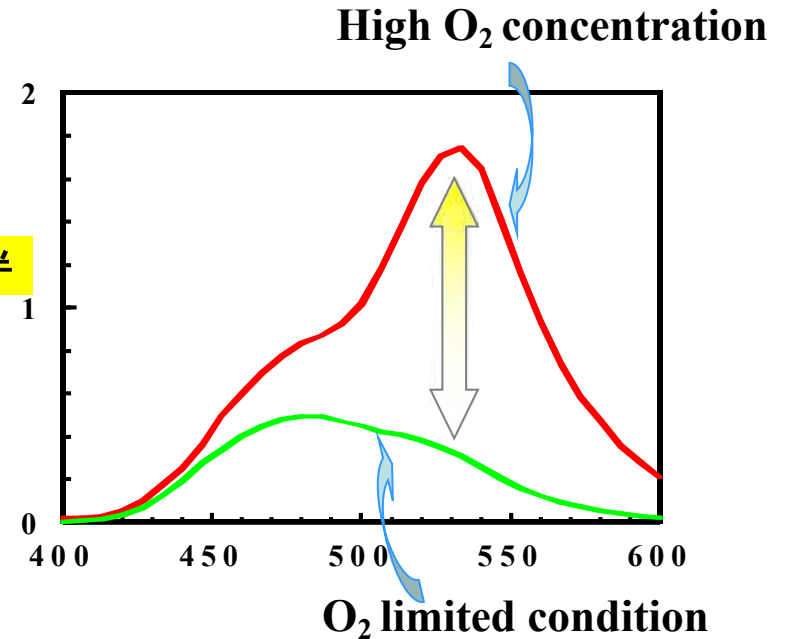
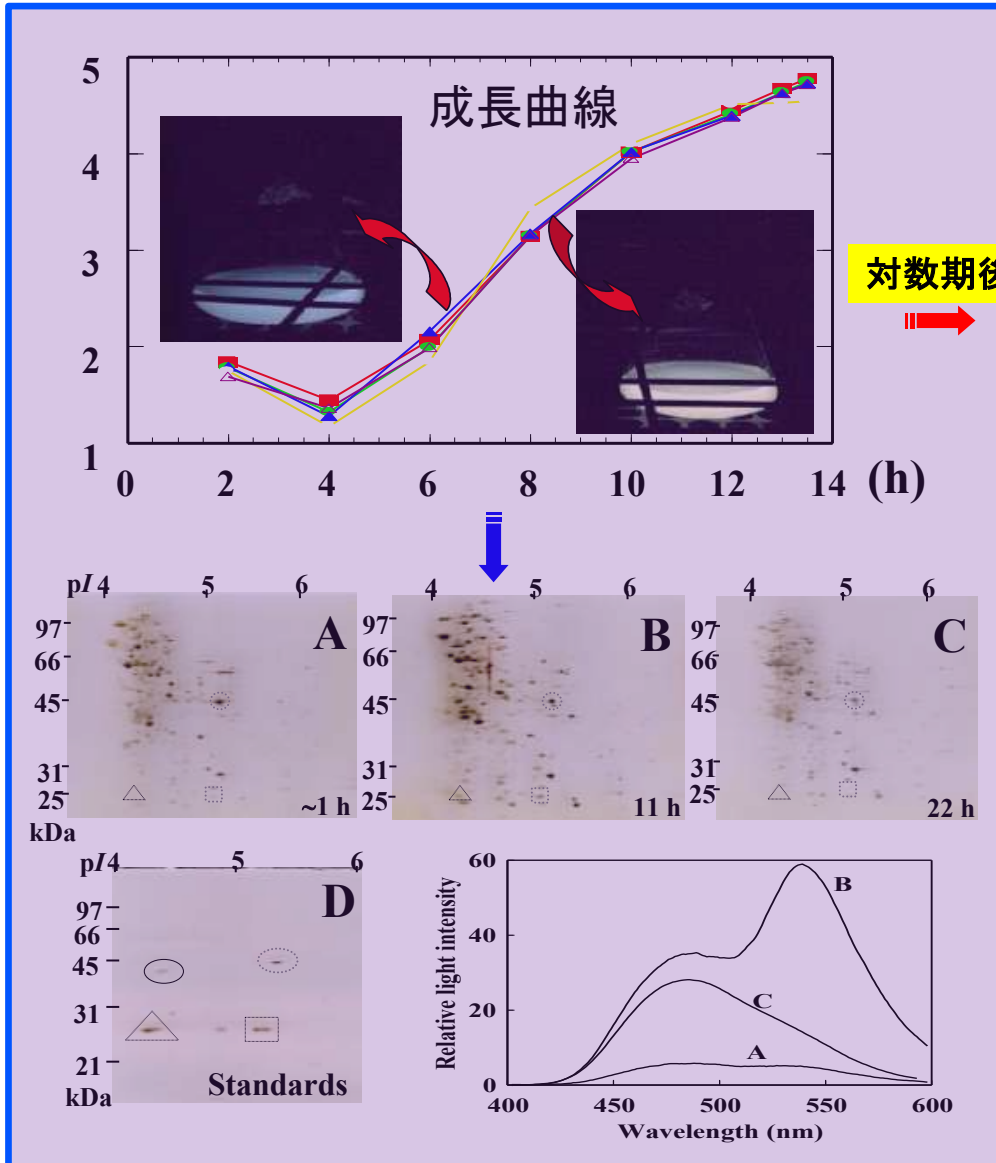
*A. sifiae* Y1 in stationary phase at 16 °C.  
Cell population >  $2.1 \times 10^9$  /mL.



Time-courses for *A. sifiae* Y1 BL intensity and O<sub>2</sub> concentration (upper panel) and spectral distribution (lower panel). Open arrowheads, aeration on and closed arrowheads, off.



# ● 発光色の酸素分圧依存性(対数期後半) ⇔ 可逆的な発光色変化



青色発光



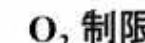
黄色発光



O<sub>2</sub> 供給



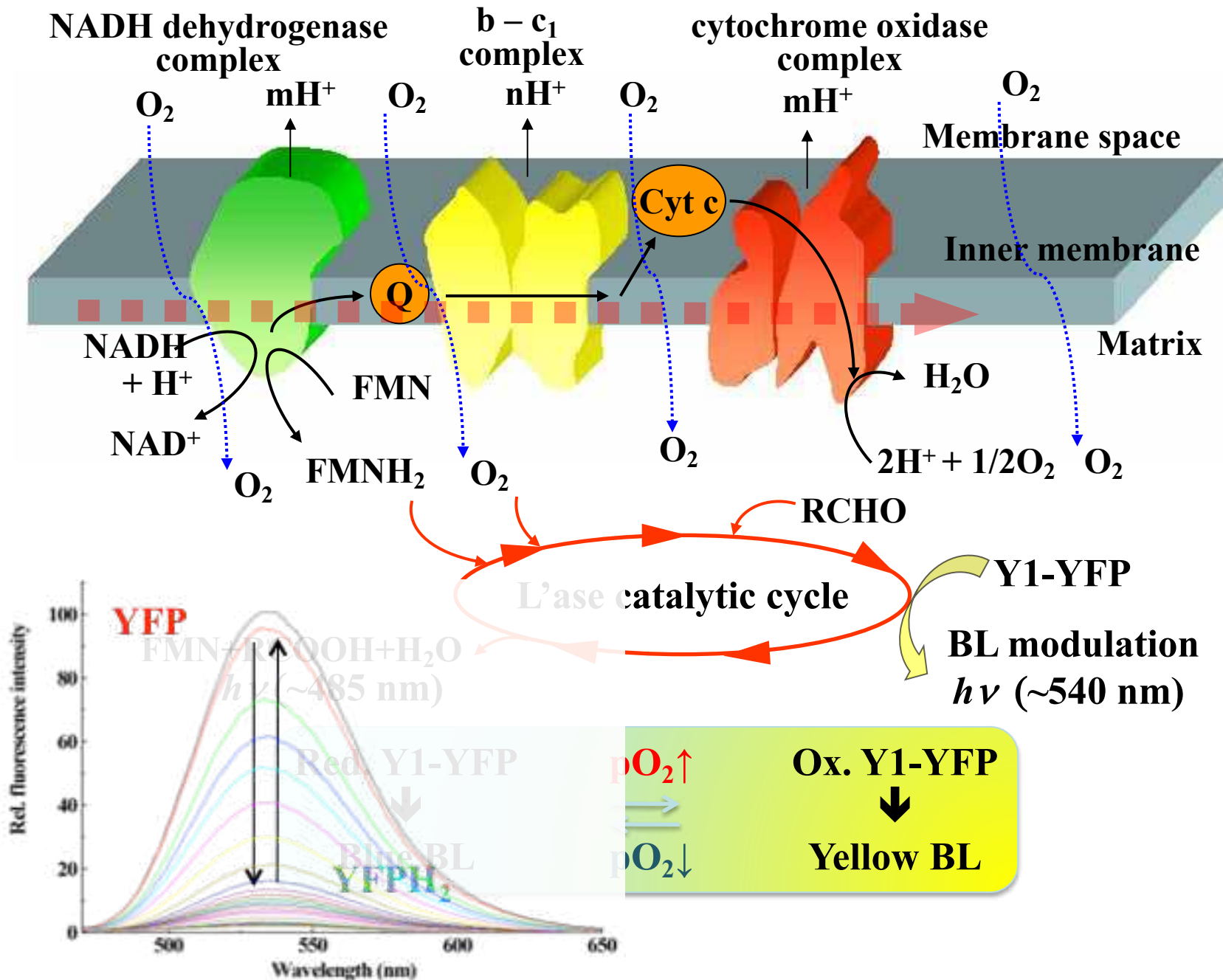
O<sub>2</sub> 制限



可逆的発光色変化に要する時間  
< 10 s

化学反応によるものであろう！  
Y1-YFP (Y1-Yellow)のレドックス  
の特性と関係しているのでは？

# ● 可逆的な発光色変化の分子メカニズム



(現象論として, また結果論的だが)

通常, 主に還元型で存在するY1-  
Yellowを動員して, ルシフェラーゼ反  
応を活性化



余剰酸素分子  $O_2$  の効率的消去

それでも活性酸素種 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , etc.)  
は発生するであろう

● 細菌ルシフェラーゼに関してはさらなる検討が必要だが、少なくともY1-Yellowは余剰酸素分子、またROSと相互作用する



発光細菌由蛍光タンパク質遺伝子による可視化

🔦 細胞小器官：ミトコンドリア  
(最大の酸素分子消費エンジン)

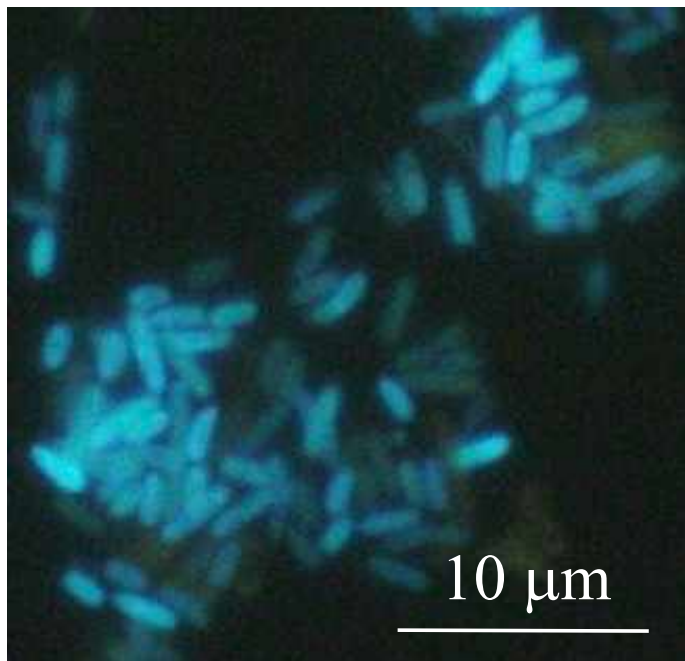
🔦 細胞内分子：O<sub>2</sub> および 活性酸素種

✧ 💡💡 自前の遺伝子で観てみたい!!

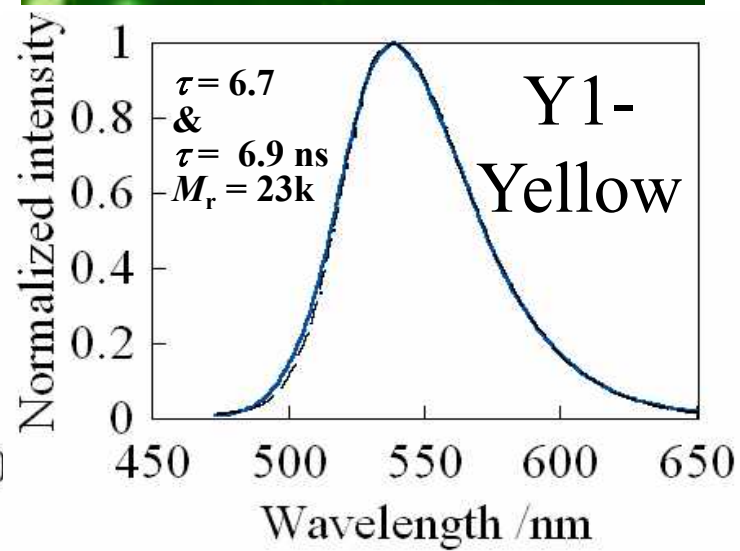
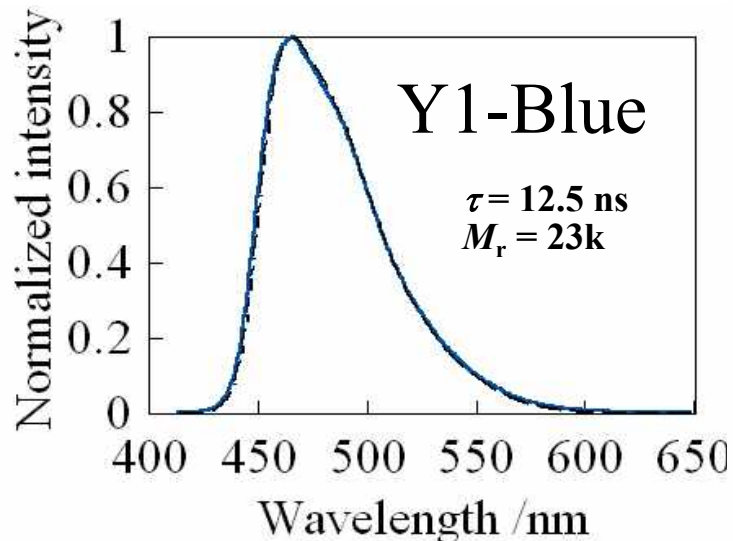
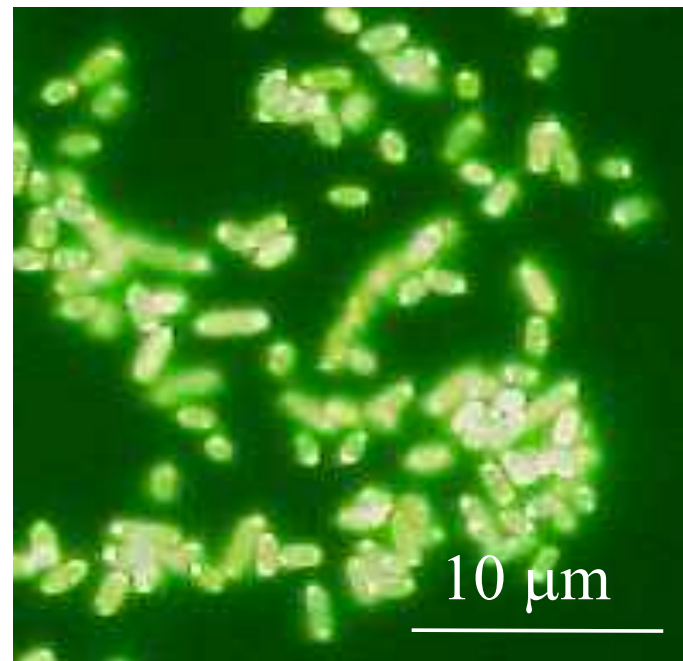
● 蛍光タンパク質発現例: Y1-Blue, Y1-Yellow

上段, 蛍光顕微鏡イメージ; 下段, 蛍光タンパク質の蛍光スペクトル

*E. coli-Y1-Blue*



*E. coli-Y1-Yellow*

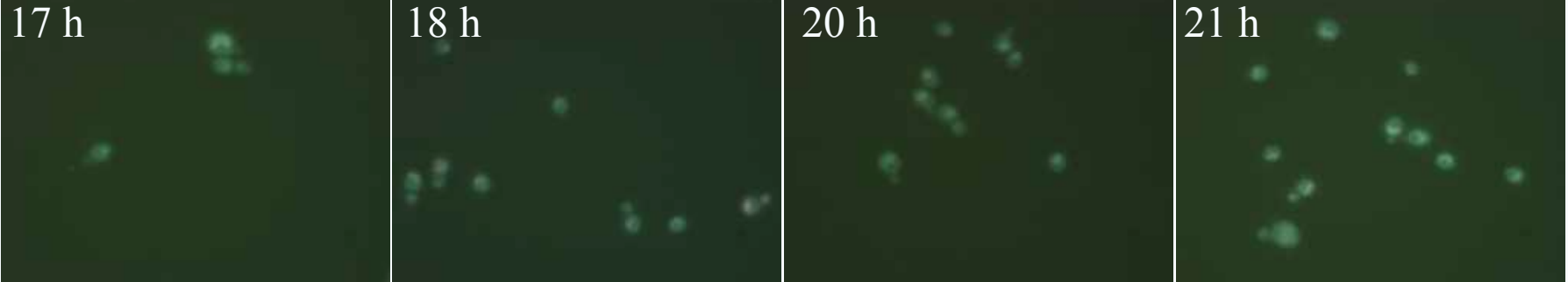




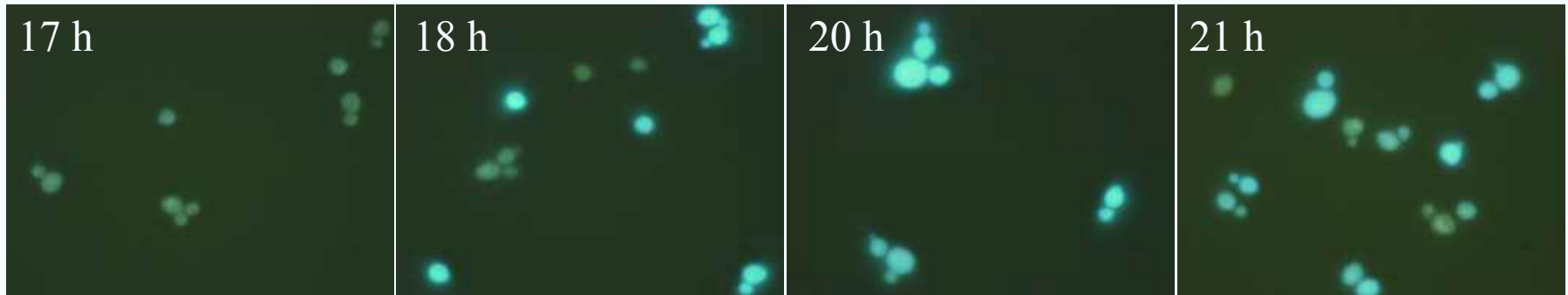
● *Y1-Blue* 酵母発現系の時間過程: 上段, *Y1-Blue*を持たない酵母; 下段, *Y1-Blue*形質転換酵母(プラスミド, pYES2/CT): 特徴, 細胞全体にわたって強い青色蛍光放射

*Sc-control*

time (h)

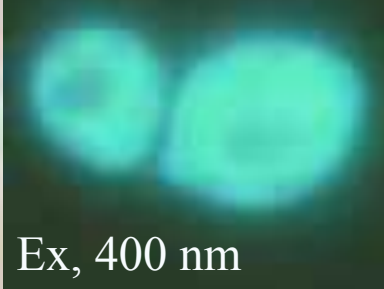
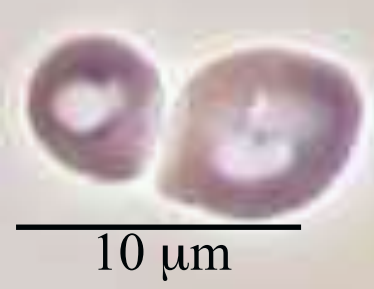


*Sc-Y1-Blue*

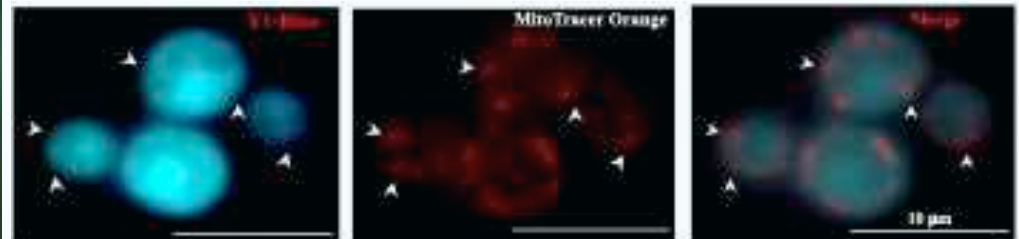


Phase contrast

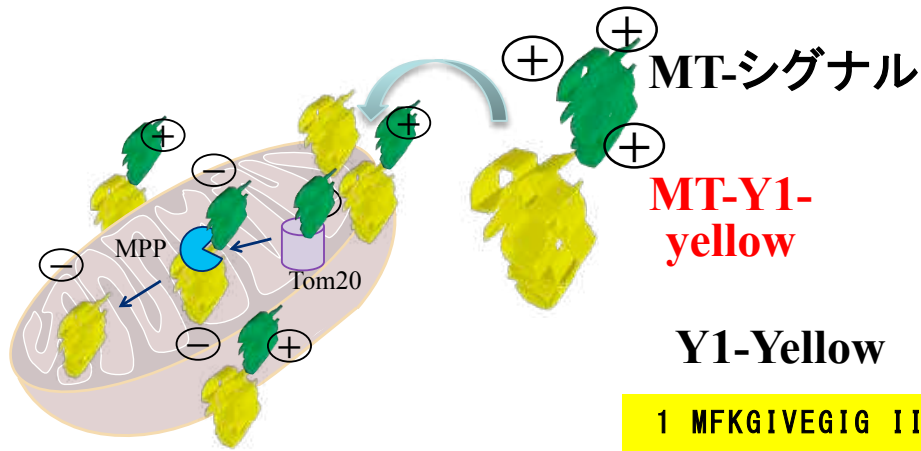
Fluorescence



●  $H_2O_2$  (0.2 mM) 添加効果: ミトコンドリア近傍消光



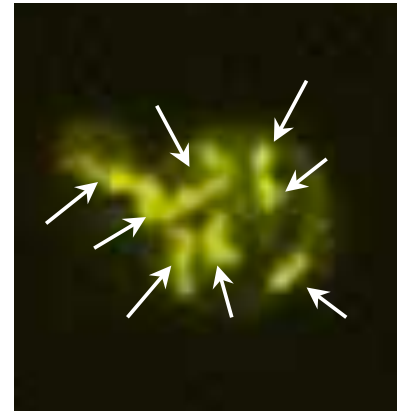
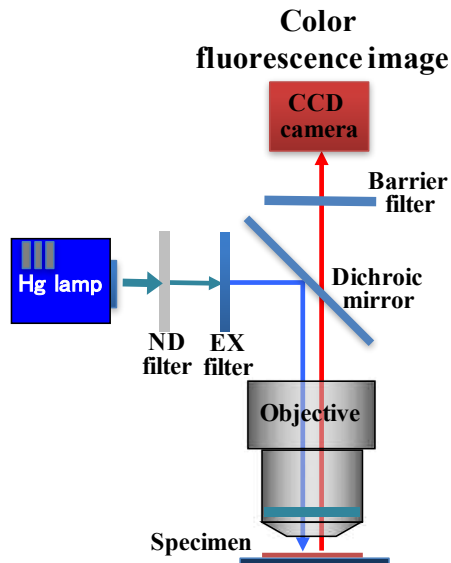
# ● 発光細菌黄色蛍光タンパク質による 酵母ミトコンドリアの蛍光可視化



Mitochondria (MT)-シグナルペプチド  
(28アミノ酸残基) (由来: 酵母 cytochrome c oxidase, subunit VIII)

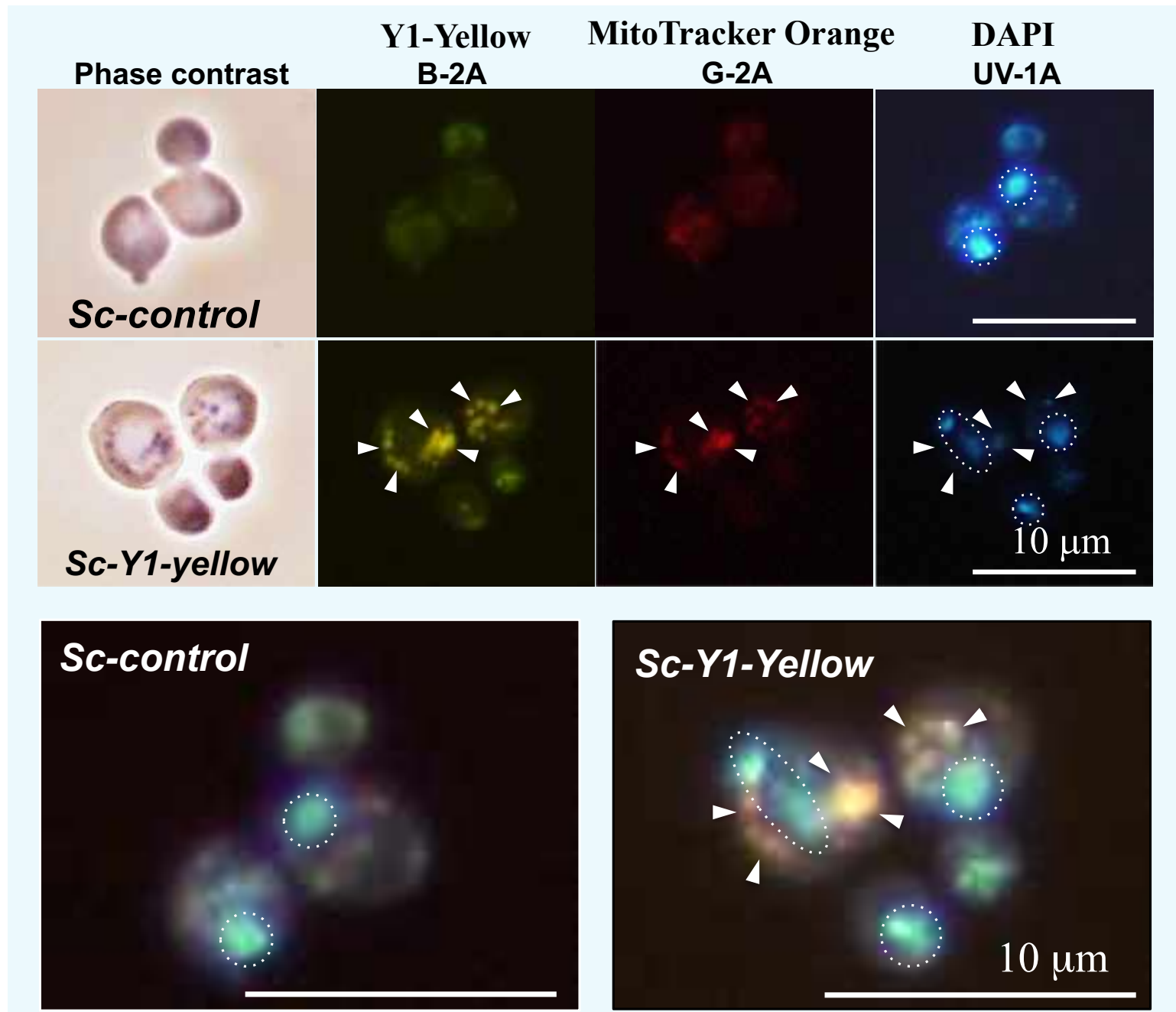
Met Leu Cys Gln Gln Met Ile **Arg** Thr Thr Ala  
**Lys Arg Ser Ser Asn Ile Met Thr Arg** Pro Ile Ile  
Met **Lys Arg Ser Val** (= mt signal sequence\*)

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



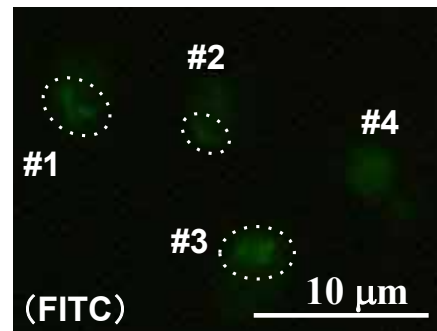
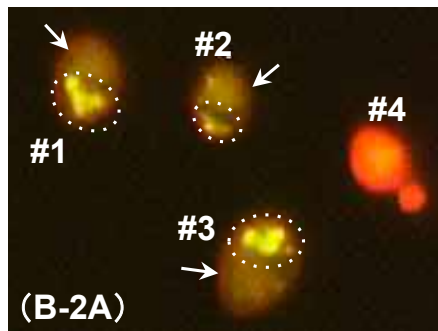
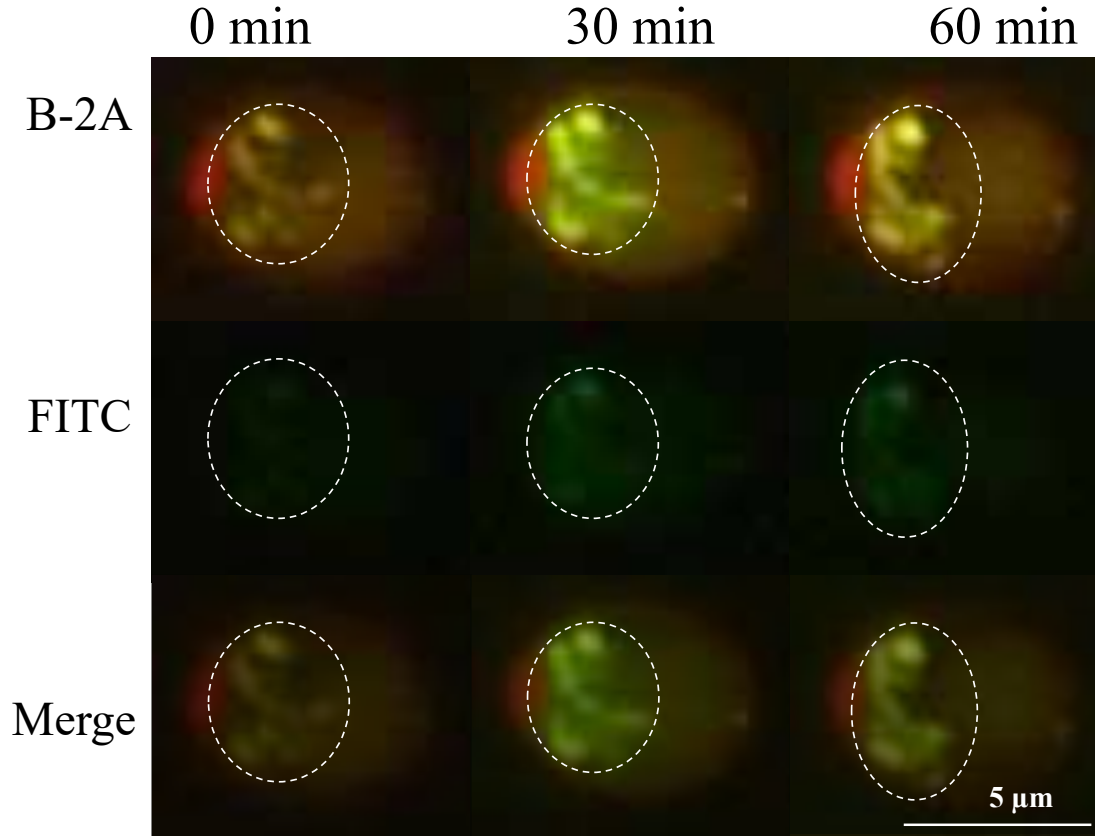
正常酵母生細胞ミトコンドリア  
の選択的蛍光可視化(→)

● 酵母-MT-Y1-Yellow の発現(一般細胞染色試薬との共染色による評価):



# ● 呼吸阻害剤KCNが*Sc-Y1-yellow* に及ぼす効果の可視化

50 mM KCN 中において30分間浸漬後,  
oxyBURST Green 及び Trypan Blueにより染色



# Visualization of mitochondrial Y1–Yellow fluorescence at an early stage after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

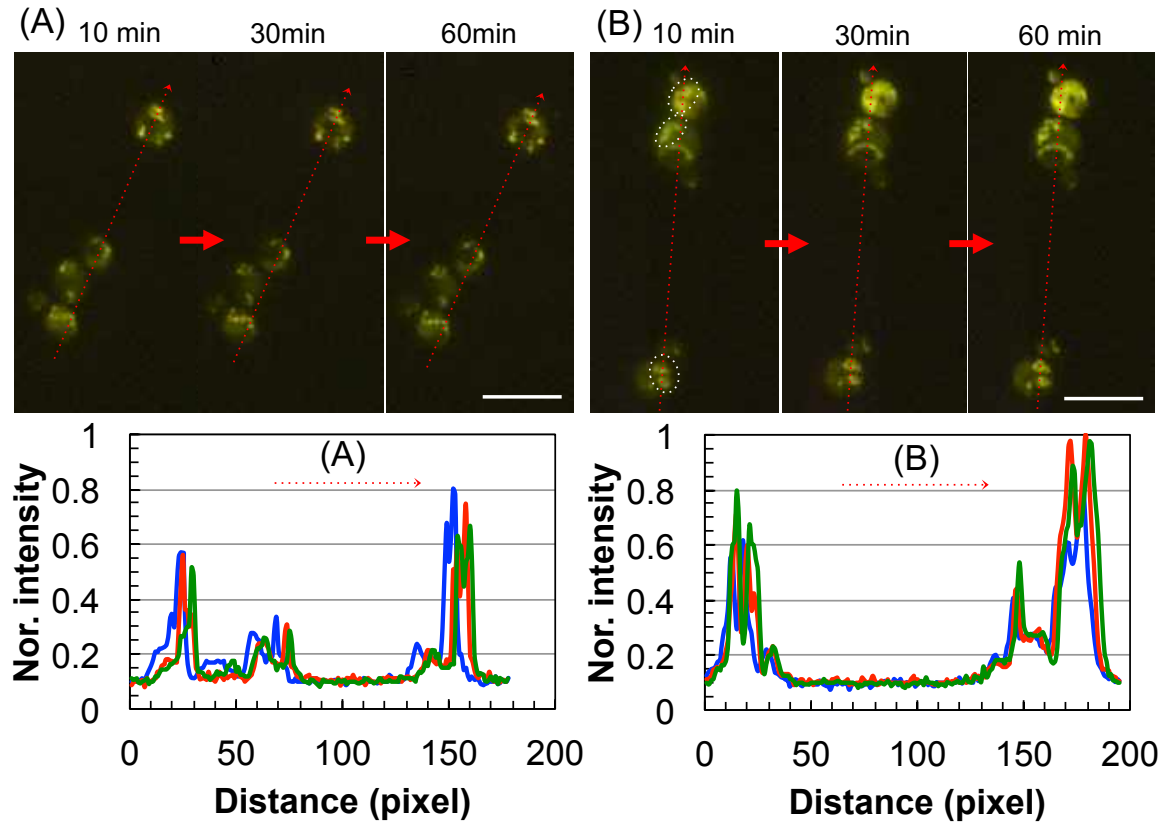
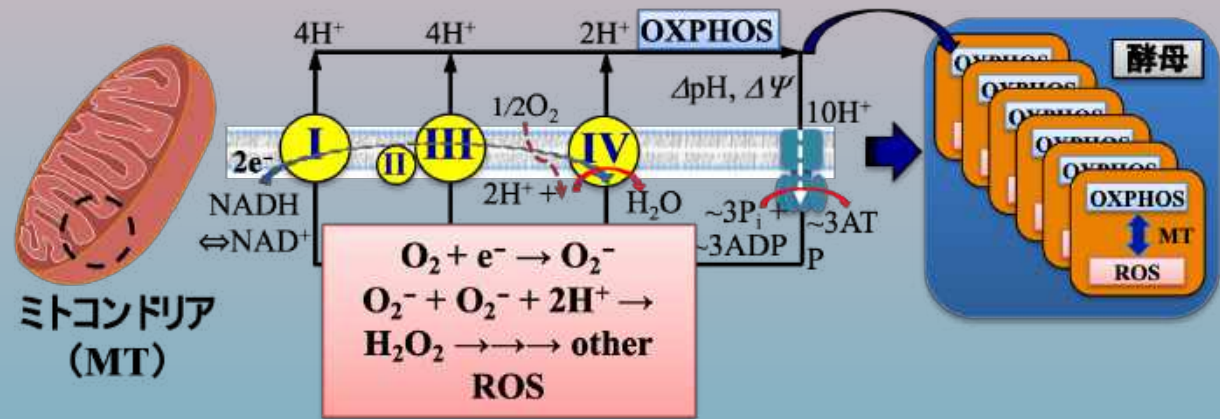
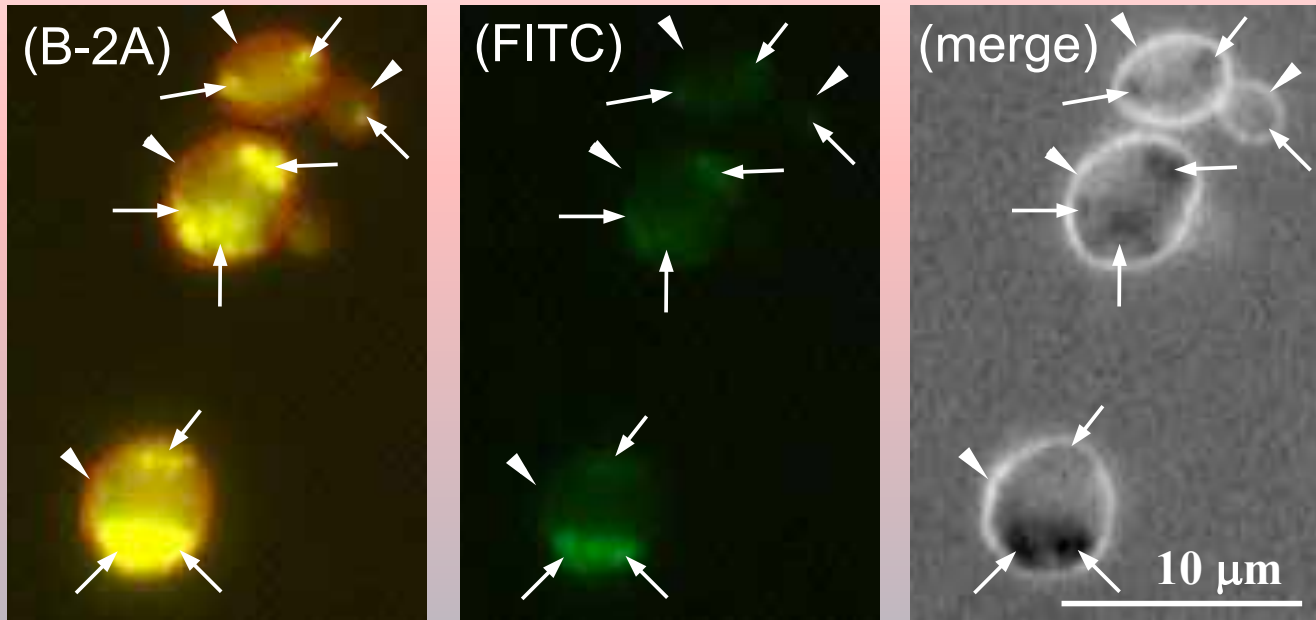


Fig. 6 Visualization of mitochondrial Y1–Yellow fluorescence at an early stage after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sc-mtY1–Yellow cells are from an identical culture. Fluorescence microscopic observations are performed under the same conditions. (A) Fluorescence images acquired over time in the absence or presence of 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The time at the top of each image indicates the elapsed time after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (P) phase contrast image. (F) fluorescence image (filter block: B-2A). In (A), strongly fluorescent cells are selected for comparison (see ESI Fig. 6†). Mitochondrial clusters are encircled with dotted curves. Exposure: phase contrast, 0.1 s; fluorescence, 1 s. Scale bar = 10 μm. (B) Corresponding intensity profiles on the line drawn on each fluorescence image. Intensity, normalized to the maximum intensity (= 1 at asterisk) in (B), is the average of green- and red-light components. Blue curve, 10 min after addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; red, 30 min; and green, 60 min.

● 酸化ストレス下の酵母 (oxyBURST Green および Trypan-Blue 共染色)  
 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加酵母カルチャー (merge: B-2A+FITC merge後、画像処理)



発光細菌黄色蛍光タンパク質  
コード遺伝子による  
酵母細胞ミトコンドリア活性酸素種  
(ROS)  
の蛍光可視化

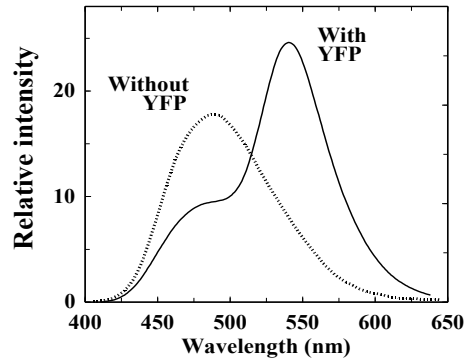
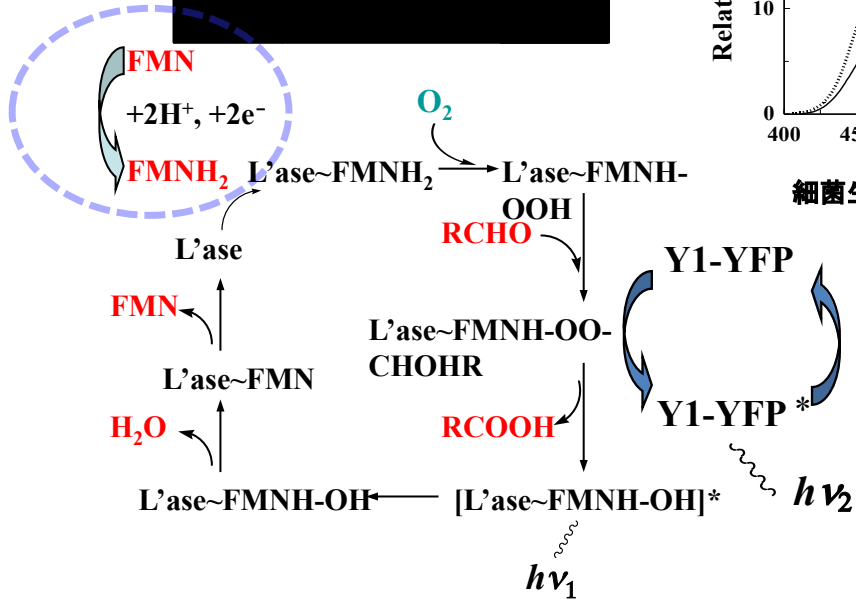
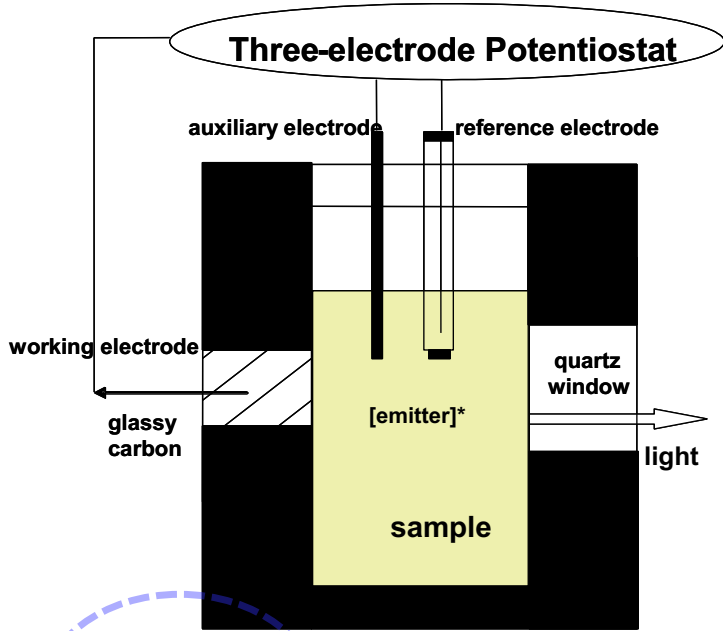
標的細胞毒性物質 → 活性酸素種  
標的細胞小器官 → ミトコンドリア

主題から少し離れますが、

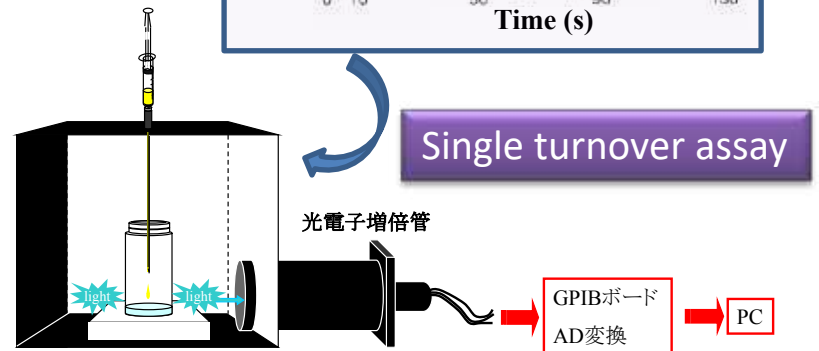
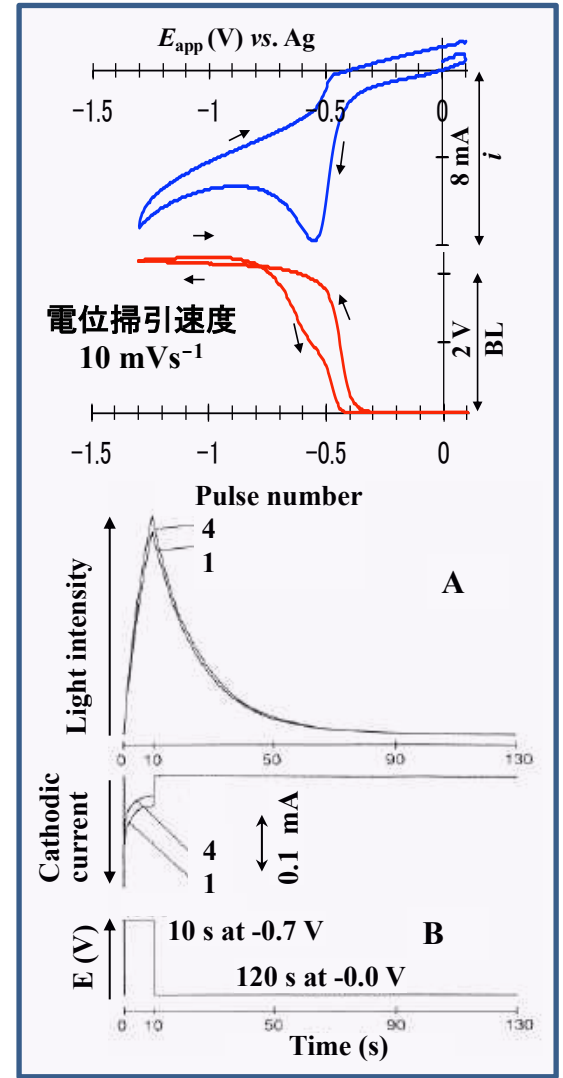
**細菌生物発光の研究から  
生まれた(電解)化学発光**



# ● 細菌生物発光：電極溶液界面における再現ルシフェラーゼ触媒回路の電気化学的 ON-OFF

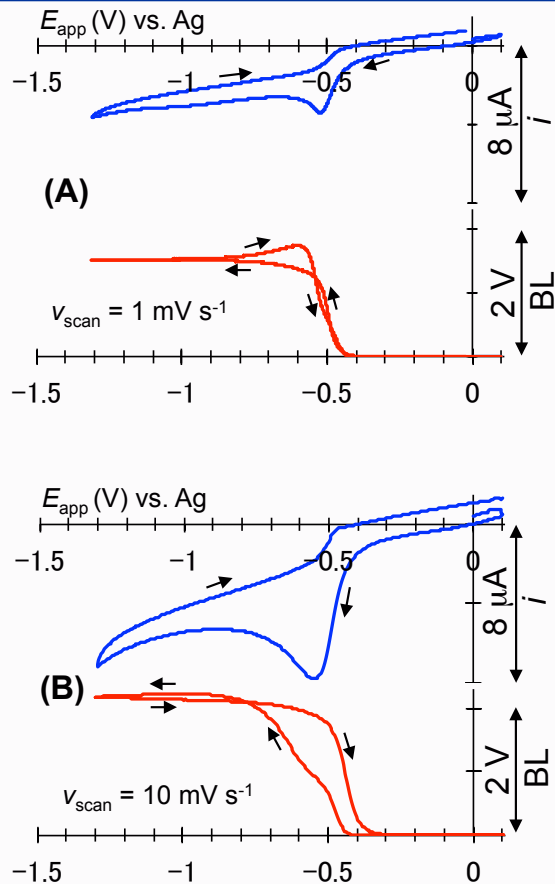


細菌生物発光スペクトル *in vitro*



# ● 細菌生物発光 *in vitro* : 印加電位応答

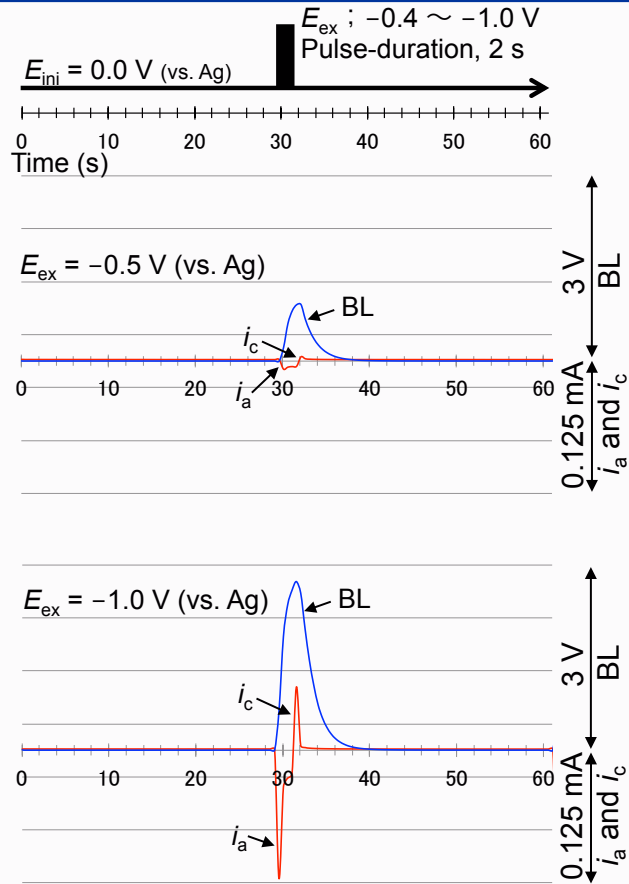
初濃度 : Luciferase = 1.8 mM; RCHO = 100 mM;  
 FMN = 133 mM; O<sub>2</sub> = 0.6 mM; KCl = 100 mM.



サイクリックボルタモグラム  
 (blue) および対応する 発光応答  
 (red) .

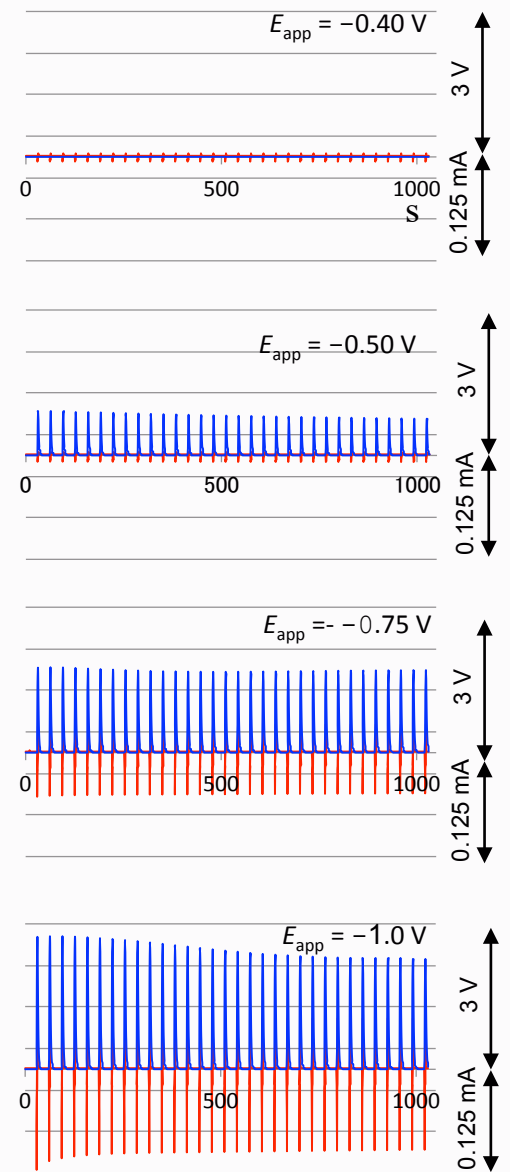
$E_{ini} = 0 \text{ V}$ ;  $E_{app}$  vs. Ag.

電位掃引速度 (A)  $1 \text{ mV s}^{-1}$  (B)  $10 \text{ mV s}^{-1}$



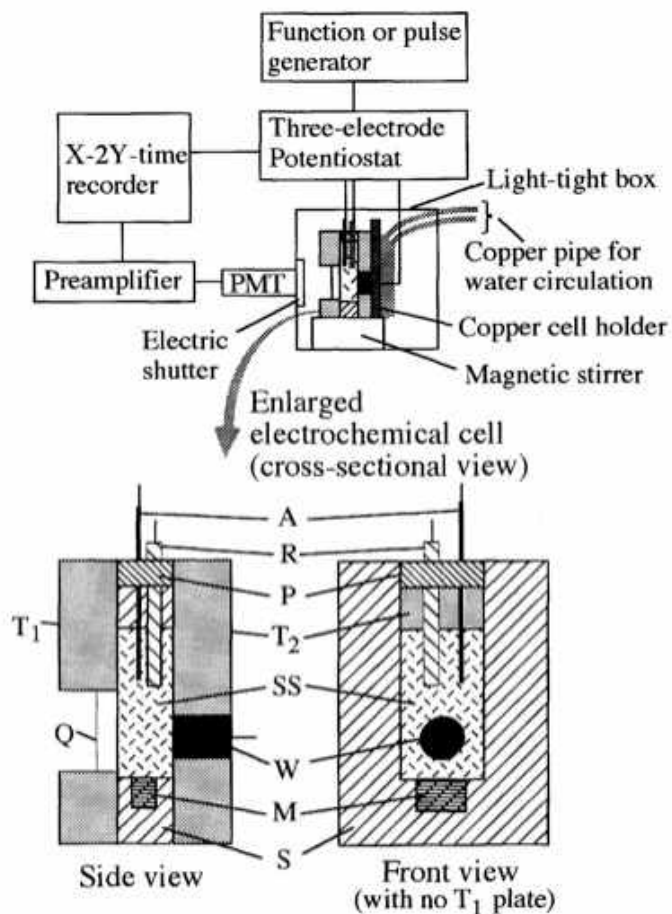
励起電位パルスに伴う発光応答および  
 電流応答. 上段パネル: 励起電位パルスサ  
 イクル;  $E_{ini} = 0 \text{ V}$ ,  $\Delta t = 30 \text{ s} \Leftrightarrow$   
 $E_{ex} = -0.5 \text{ \& } -1.0 \text{ V}$ ,  $\Delta t = 2 \text{ s}$

下段パネル: 発光応答 (blue); 還元電流  
 応答 (red)

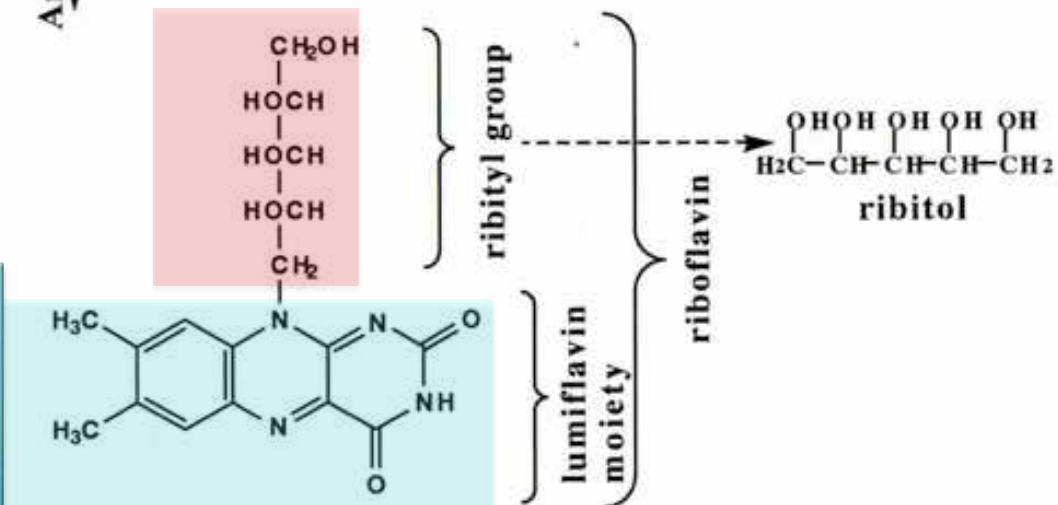
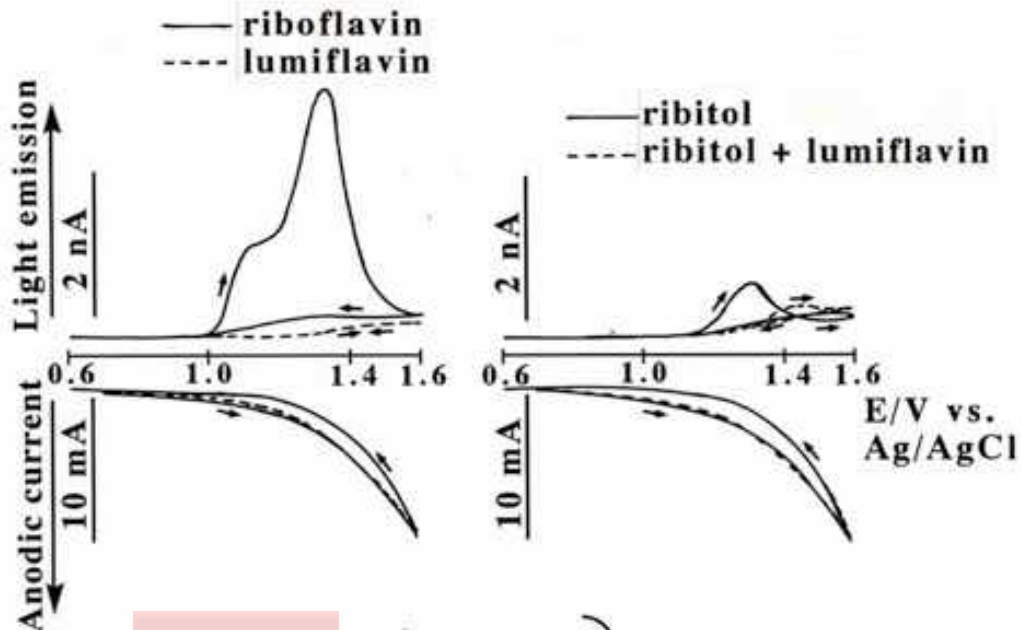


繰返し励起電位パルスサイクルに対  
 する発光応答 (blue); 還元電流  
 応答 (red) :  $E_{ini} = 0 \text{ V}$ ,  $\Delta t = 30 \text{ s} \Leftrightarrow$   
 $E_{ex} = (-0.4 \sim -1.0 \text{ V}, \Delta t = 2 \text{ s}) \times n$

# ● ヒドロキシ化合物の電解化学発光



0.5 mM each in 0.5 M NaOH, aerated; 50 mV/s



**L' ase~FMNH-OO-CHOHR**

FMN部位から-OO-への

分子内CIEELはあり得るか?

FMN部位は酸化されなければならない!

# ● ヒドロキシル化合物の電解発光 (発光スペクトル分布)

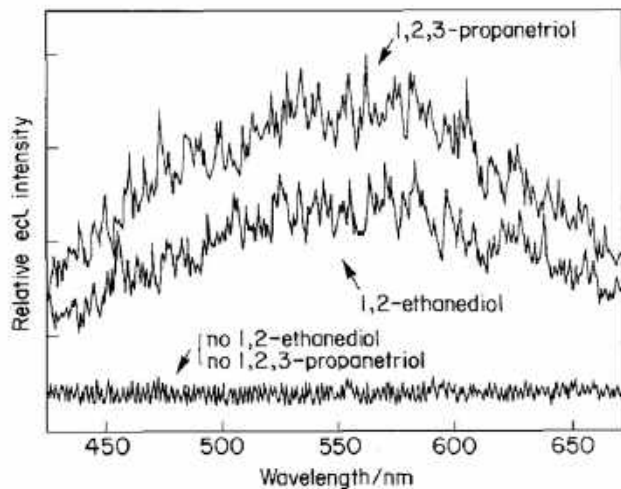
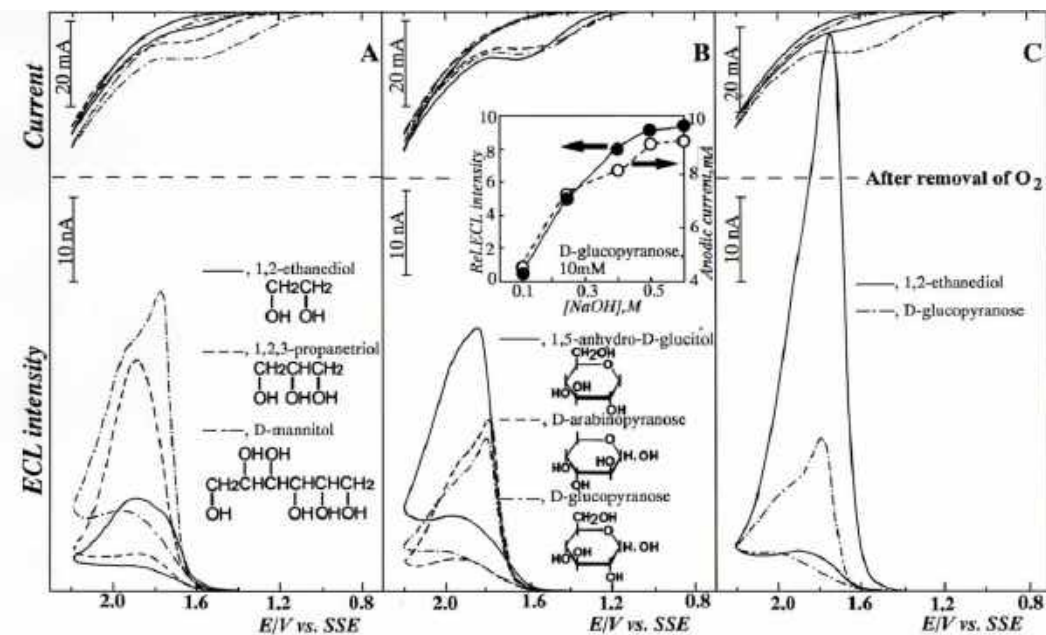


Fig. 3. Ecl spectra for 1,2-ethanediol and 1,2,3-propanetriol, 10 mM (each) in 0.5 M NaOH, aerated. Each ecl spectrum was recorded just after the application of the constant potential (+1.75 V vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl). Sampling time = 6.64 s.

	major aldehyde or ketone	major carboxylic acid
1. $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	HCHO	HCOOH ( $\lambda=508\text{nm}$ )
2. $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	HCHO	HCOOH ( $\lambda=508\text{nm}$ )
3. $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	HCHO	HCOOH ( $\lambda=508\text{nm}$ )
4. $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	HCHO	HCOOH ( $\lambda=508\text{nm}$ )
-----		
5. $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	CH <sub>3</sub> CHO	CH <sub>3</sub> COOH ( $\lambda=521\text{nm}$ )
6. $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CHO	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH ( $\lambda=525\text{nm}$ )
7. $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	CH <sub>3</sub> CHO	CH <sub>3</sub> COOH ( $\lambda=527\text{nm}$ )
8. $\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	
9. $\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	CH <sub>3</sub> CHO	CH <sub>3</sub> COOH ( $\lambda=525\text{nm}$ )
10. $\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	CH <sub>3</sub> CHO	CH <sub>3</sub> COOH ( $\lambda=525\text{nm}$ )
-----		
11. CH <sub>3</sub> OH	HCHO	HCOOH ( $\lambda=513\text{nm}$ )
12. CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub> CHO	CH <sub>3</sub> COOH ( $\lambda=527\text{nm}$ )
13. (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	
14. (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> COH	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	

Scheme 1. Carbonyl fragments electrogenerated.

1, 1,2-ethanediol; 2, 1,2,3-propanetriol; 3, erythritol; 4, D-mannitol; 5, 1,2-propanediol; 6, 1,2-butanediol; 7, 2,3-butanediol; 8, pinacol; 9, 1,3-propanediol; 10, 1,4-butanediol; 11, methyl alcohol; 12, ethyl alcohol; 13, *i*-propyl alcohol; 14, *t*-butyl alcohol.

# ● ヒドロキシ化合物からの発光および増感

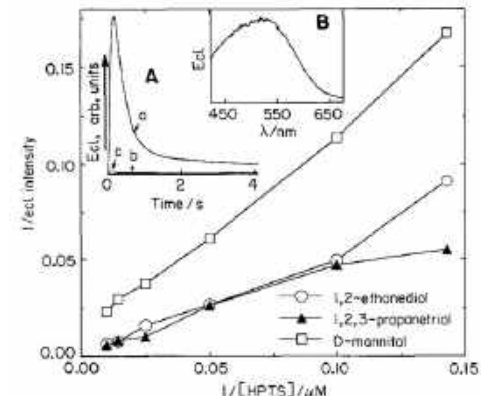
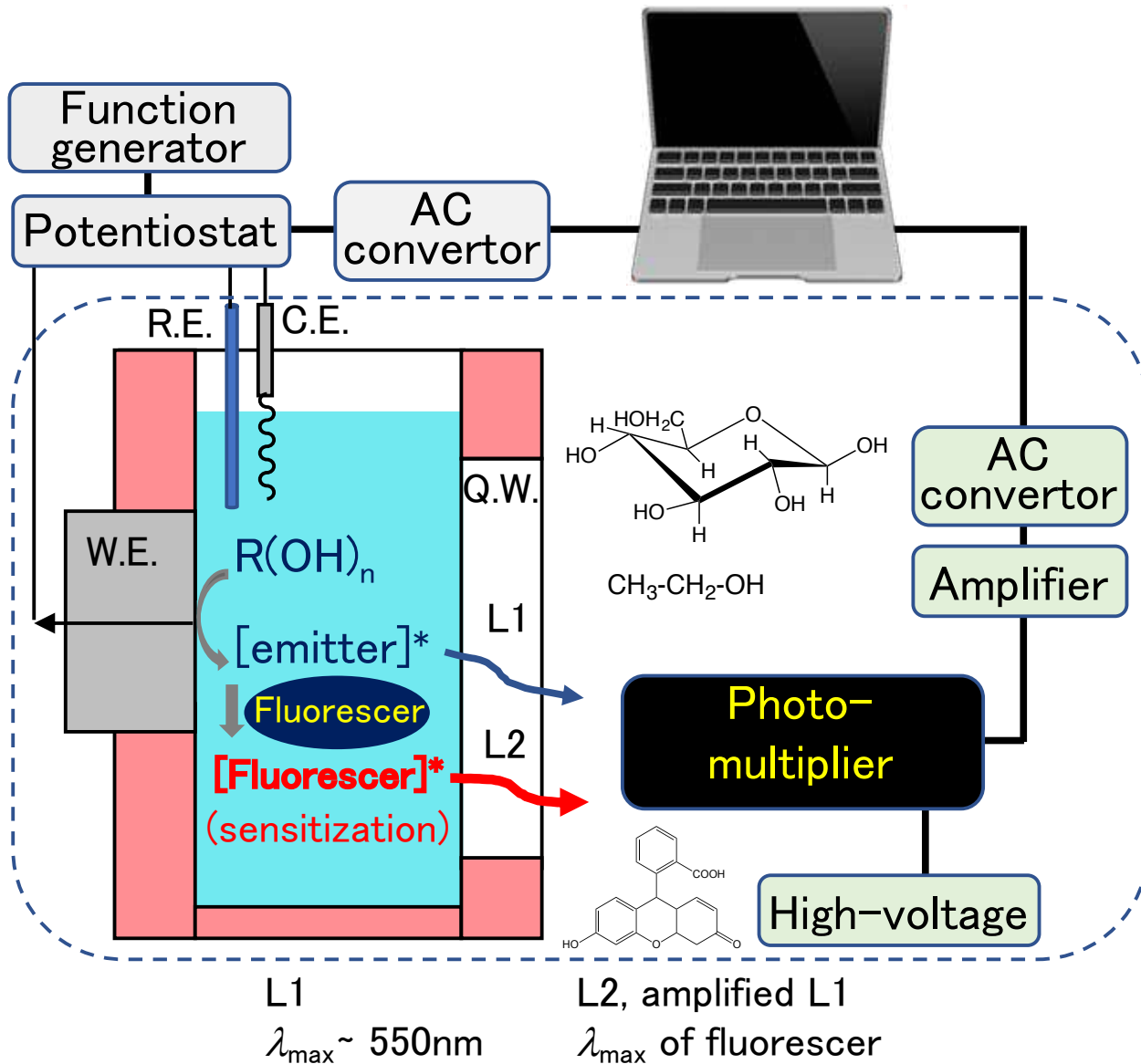


Fig. 4. Reciprocal plots between ecl intensity in the presence of a fluorescer and its concentration. Sample concentration = 10 mM (each) in 0.5 M NaOH, aerated. Fluorescer added, 1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid, trisodium salt (HPTS) (7 μM ~ 100 μM). Inset (A) Time courses of 1,2-ethanediol ecl (10 mM in 0.5 M NaOH, aerated) at the constant potential (+1.75 V vs. Ag/AgCl, 3 M NaCl) in the presence of HPTS (70 μM) (a) and in its absence (b); (c), Time course of HPTS ecl (70 μM in 0.5 M NaOH, aerated). Inset (B) Ecl emission spectrum for 1,2-ethanediol (10 mM in 0.5 M NaOH, aerated) in the presence of HPTS (70 μM). Measurement conditions for a spectrum, as shown in Fig. 3.

**Luminescence Arising from Oxidation Reaction of Hydroxyl groups**

Electrooxidation or Mediated oxidation

(Fluorescence Sensitization)

★★★★

**Practical Application**

*A novel chemiexcitation procedure*

*A new sensing tool for alcohols, carbohydrates, DNA*

# ● ヒドロキシル化合物の電解発光 (分析化学への応用)

Analytica Chimica Acta 357 (1997) 207-215

## Development and characterization of anodically initiated luminescent detection for alcohols and carbohydrates

Hajime Karatani<sup>a,\*</sup>, Motohiro Kojima<sup>a</sup>, Hiroyoshi Minakuchi<sup>1,b</sup>, Naohiro Soga<sup>b</sup>,  
Takahiro Shizuki<sup>2,a</sup>

<sup>a</sup>Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan  
<sup>b</sup>Department of Material Chemistry, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

Received 23 June 1996; revised 16 August 1996; accepted 21 August 1996

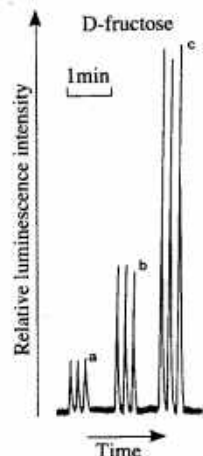
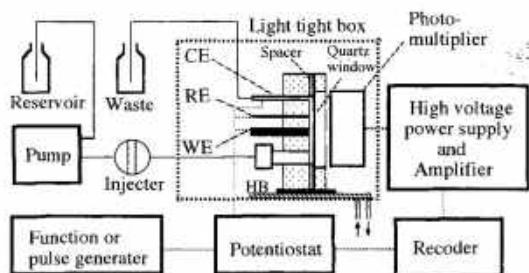


Fig. 8. Typical recordings of luminescence signals for D-fructose. Injected volume, 50  $\mu$ l; flow rate, 5.0 ml min<sup>-1</sup>; applied potential, +1.3 V vs. AgCl-coated Ag; fluorescein concentration in the carrier solution (1.0 M NaOH), 50  $\mu$ M. Sample concentration (per injection): a, 0.5 nmol (10  $\mu$ M); b, 2.0 nmol (40  $\mu$ M) and c, 5.0 nmol (100  $\mu$ M).

Table 1  
Comparison of limits of detection<sup>a</sup>

Compound	$\mu$ M	pmol <sup>b</sup>	ng <sup>b</sup>
Methanol	2.8	140	4
Ethylene glycol	5.5	280	17
Glycerol	4.8	240	22
Glucitol	0.3	13	3
DL-glyceraldehyde	6.0	300	27
D-ribose	11.5	580	86
D-xylose	8.5	430	64
2-deoxy-D-ribose	8.3	410	56
2-deoxy-D-glucose	12.5	630	100
1,5-anhydro-D-glucitol	5.3	260	43
D-glucose	2.5	130	23
D-fructose	1.8	88	16
Raffinose	9.3	460	230
Maltose	13.5	680	230

<sup>a</sup>Signal-to-noise ratio of 3.

<sup>b</sup>Per 50  $\mu$ l injection.



Analytica Chimica Acta 357 (1997) 191-198

ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA

## Sensitized luminescence induced by nickel electrocatalysis to detect aliphatic hydroxy compounds

Hajime Karatani<sup>a</sup>, Motohiro Kojima

<sup>a</sup>Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Received 23 June 1997; received in revised form 26 November 1997; accepted 7 January 1998

### Abstract

A well-defined luminescence, induced by the electrocatalytic oxidation of simple hydroxy compounds at a Ni electrode in alkaline media containing a fluorescein compound, has been studied with a view to make use of it for the sensitive detection of these compounds. For luminescence reactions with various substrates, including ethanol, propanol and glucose, the potentials required to elicit light were in the range of +0.4 to +0.5 V vs. Ag/AgCl when an active nickel film surface was anodically formed. This property was observed at a flow-through system under the condition of constant potential electrolysis at about -0.6 V vs. AgCl coated on Ag. For ethanol, this luminescence in combination with liquid chromatography separation allowed us to determine in the range of  $5 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-1}$  mol dm<sup>-3</sup> with the lower limit of detection of ca. 0.5 nmol per 10  $\mu$ l injected signal to noise ratio (S/N). © 1998 Elsevier Science B.V.

Keywords: Sensitized luminescence; Electroanalysis; Ni electrode; Aliphatic hydroxy compound; Ethanol sensor

Table 1  
Comparison of normalized luminescence intensities ( $I_{\text{max}}^*$ )

Compound	$I_{\text{max}}^*$	
	1.0 mM (10 nmol/10 $\mu$ l) <sup>b</sup>	10.0 mM (100 nmol/10 $\mu$ l) <sup>b</sup>
Methanol	ND	ND
Ethanol	1.00	8.17
1-propanol	0.25	1.39
1-butanol	0.06	0.54
2-propanol	ND	0.43
2-methyl-2-propanol	ND	ND
2-methyl-1-propanol	0.03	0.22
1,4-butanediol	ND	0.14
1,3-butanediol	0.84	3.63
1,2-butanediol	1.56	6.23
2,3-butanediol	3.37	15.81
1,2-ethanediol	0.07	0.15
Erythritol	0.09	0.23
Glucitol	0.14	1.16
Glucose	0.18	1.73
Fructose	0.05	0.51
Gluconic acid	0.13	0.46

<sup>a</sup>Normalized to the value for 1.0 mM of ethanol.

<sup>b</sup>Reaction conditions: [NaOH]=0.75 M; [HPTS]=100  $\mu$ M; flow rate=2 ml min<sup>-1</sup>; excitation potential, +0.370 V for monohydric alcohols, diols, and +0.400 V for erythritol; for glucitol, glucose, fructose, and gluconic acid, +0.425 V vs. AgCl coated Ag; injected volume, 10  $\mu$ l. ND, not detectable or extremely weak.

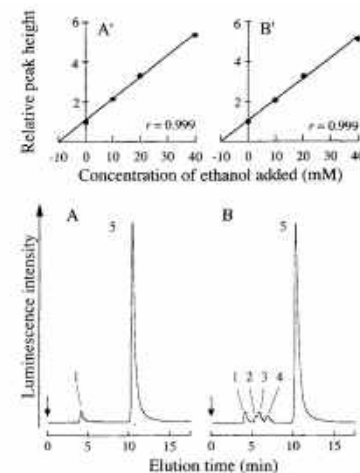


Fig. 5. Chromatographic separation of ethanol in a beer sample with sensitized luminescent detection. A, 100-fold diluted with water; B, diluted beer spiked with glucose, maltose and maltotriose (0.35 mg ml<sup>-1</sup> each in the 100-fold diluted beer sample). Upper panels: standard addition plots in the absence (A') and presence of spiked saccharide (B'). 1, possibly mixture of amino acids, polypeptides and oligo-saccharides; 2, maltotriose; 3, maltose; 4, glucose; and 5, ethanol.  $r$ =correlation coefficient. Other conditions, as in Fig. 4.

- 法人における主たる事業テーマ(これまでの知見を背景とする)

## 光をシグナルとする バイオセンサーおよびバイオイメーjingg 公益事業 教育活動

1. 生物発光をシグナルとする  
様々な環境有害物質の可視化法の実証化研究
2. 生物発光関連遺伝子による哺乳類細胞内毒性物質  
の生細胞可視化イメージング法の研究開発
3. 教育活動: 広く光科学を背景とする体験型理科授業  
(対象;小中高生, 一般社会人)  
理科教育の普及・啓発

# 環境毒性物質の 生物発光可視化

--- 急性環境毒性物質  
迅速スクリーニング ---



# ● 環境有害物質の起源とその影響 (研究開発の必要性と重要性)

工場, 大学など事業所, 農地,  
一般家庭, 自然界(鉱物など)  
から湖沼, 河川, 地下水系, 海  
洋への有害物質の流入・溶出,  
プランクトン由来毒の発生



水環境の悪化 ↑



水生生態系, 上水, 農業用水  
に被害波及



市民生活, 産業活動に影響

生物学的環境毒性評価  
(スクリーニング)



環境毒性陽性判定



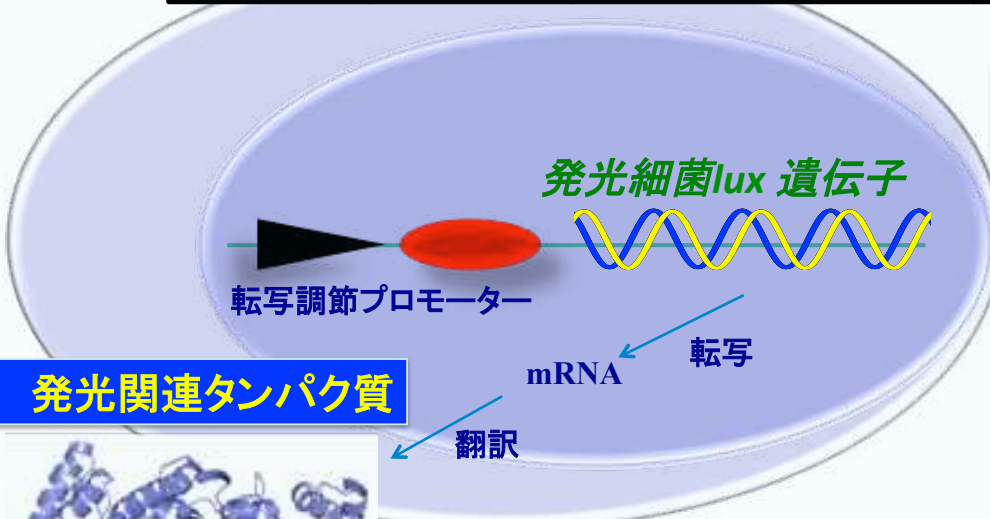
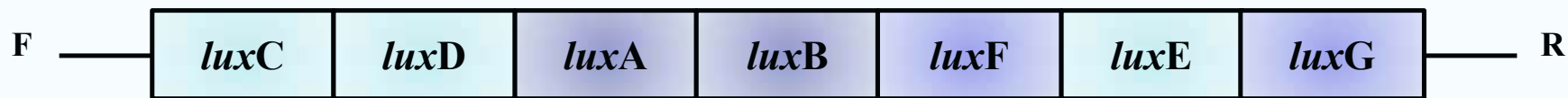
環境有害物質の同定



環境政策立案・実行  
・環境水の無毒化  
・水環境の保全

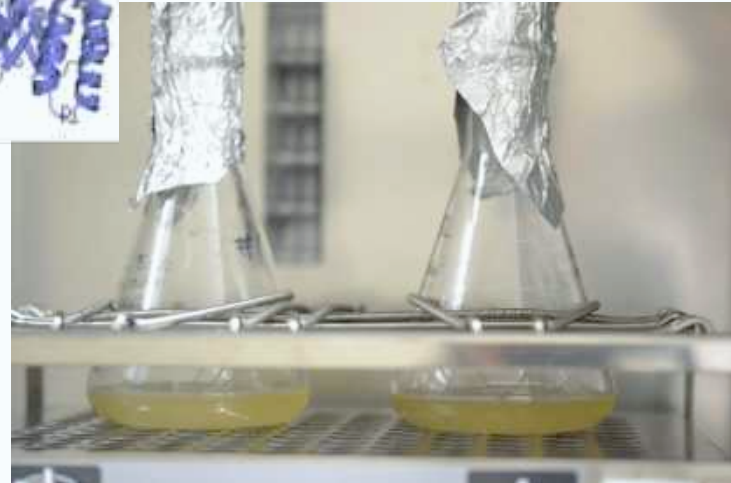
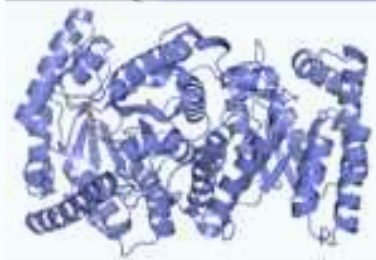
● *Photobacterium phosphoreum* bmFP 生物発光関連遺伝子発現例:

特徴, 完全自家発光: *lux* 遺伝子クラスター, 7158-塩基長



*lux A, B* : ルシフェラーゼ $\alpha\beta$ サブユニット  
*lux C, D, E* : アルデヒド合成酵素

発光関連タンパク質



In the light



In the dark

# ● 生物発光に基づく呼吸阻害毒性可視化の基本原理

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup> などの活性酸素種 (ROS) 局所的大量発生**

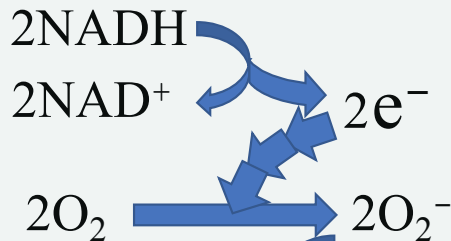
ROS感受性プロモータ領域

カタラーゼ遺伝子あるいはSOD遺伝子

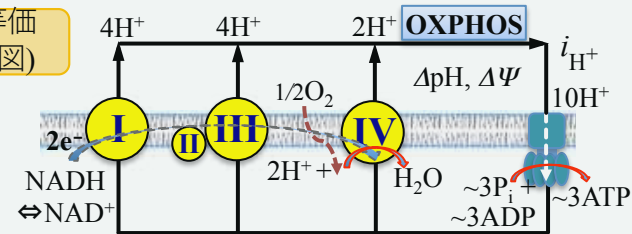
ROS感受性プロモータ領域

発光細菌発光関連タンパク質遺伝子

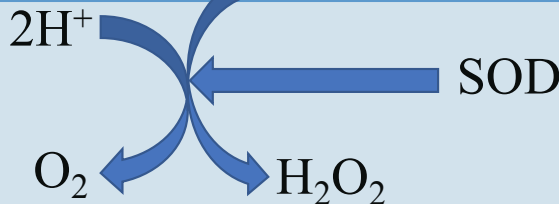
呼吸阻害



呼吸鎖等価回路 (右図)



無毒化



活性化



活性 (酸化) 型 OxyR 結合による *katG'* の活性化

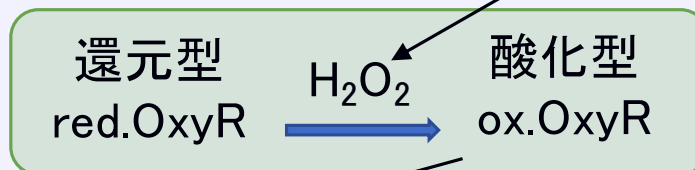
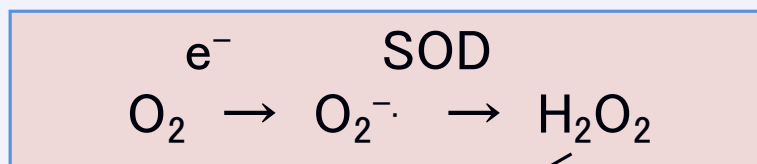


遺伝子発現

● 生物発光大腸菌による呼吸阻害毒性物質可視化の概念  
対象物質例(呼吸阻害により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



ox.OxyR

プロモータ

生物発光関連遺伝子

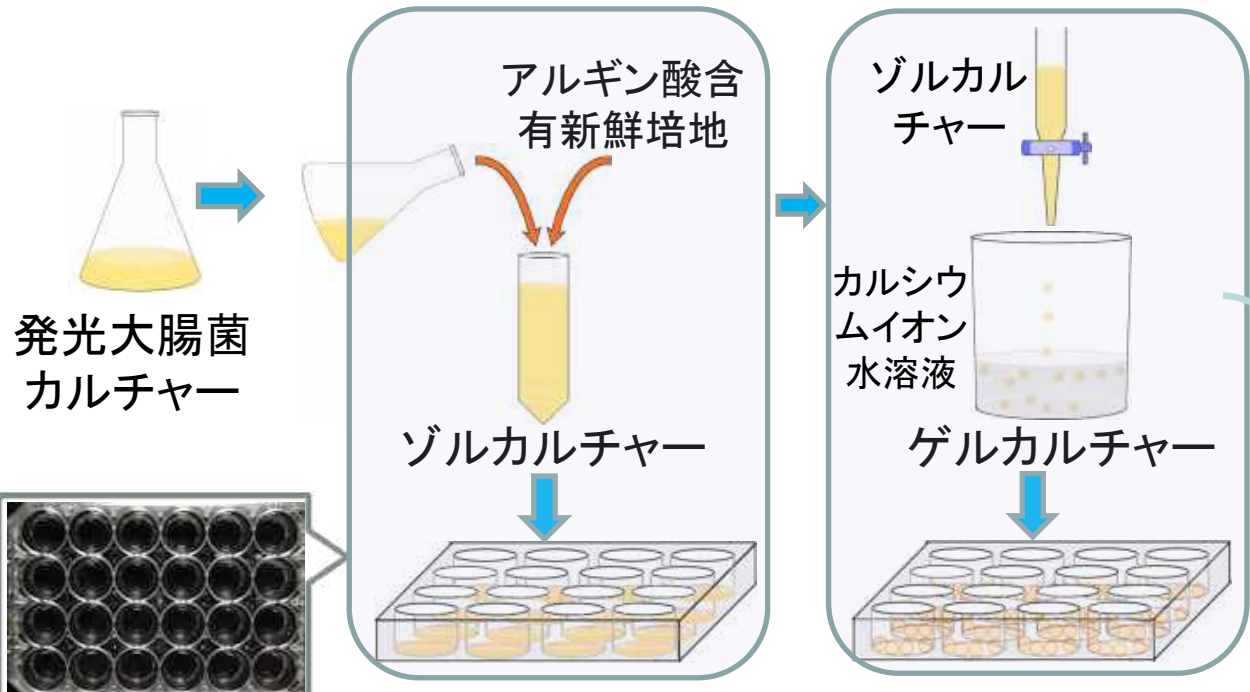
OFF ON

転写  
翻訳

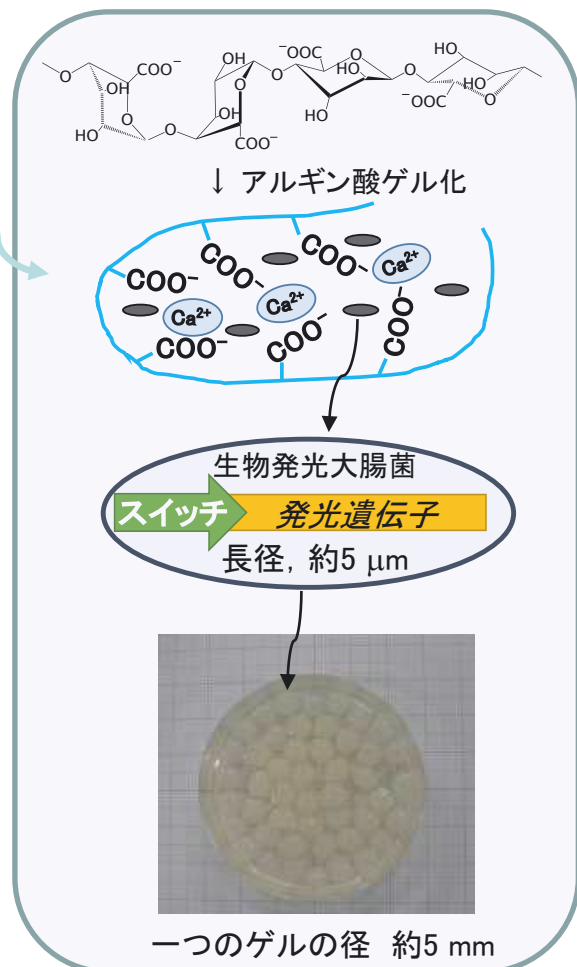
発光 Output ↑

# シアン化物の生物発光可視化実施例

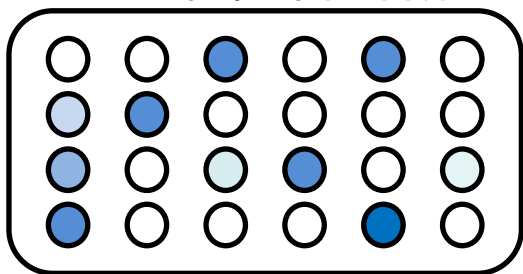
## 発光大腸菌の発光（プラス）アルギン酸マイクロ環境効果（2-way）



### 発光大腸菌固定化の概念

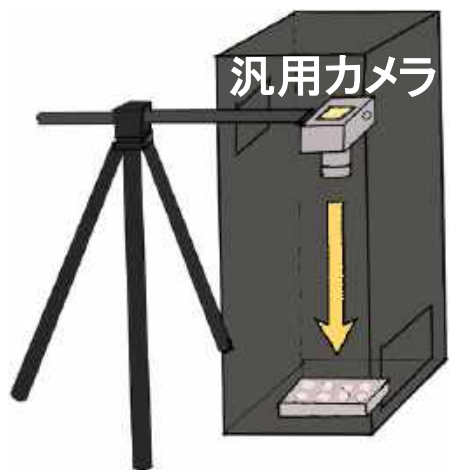


### シアン化物標準試料添加



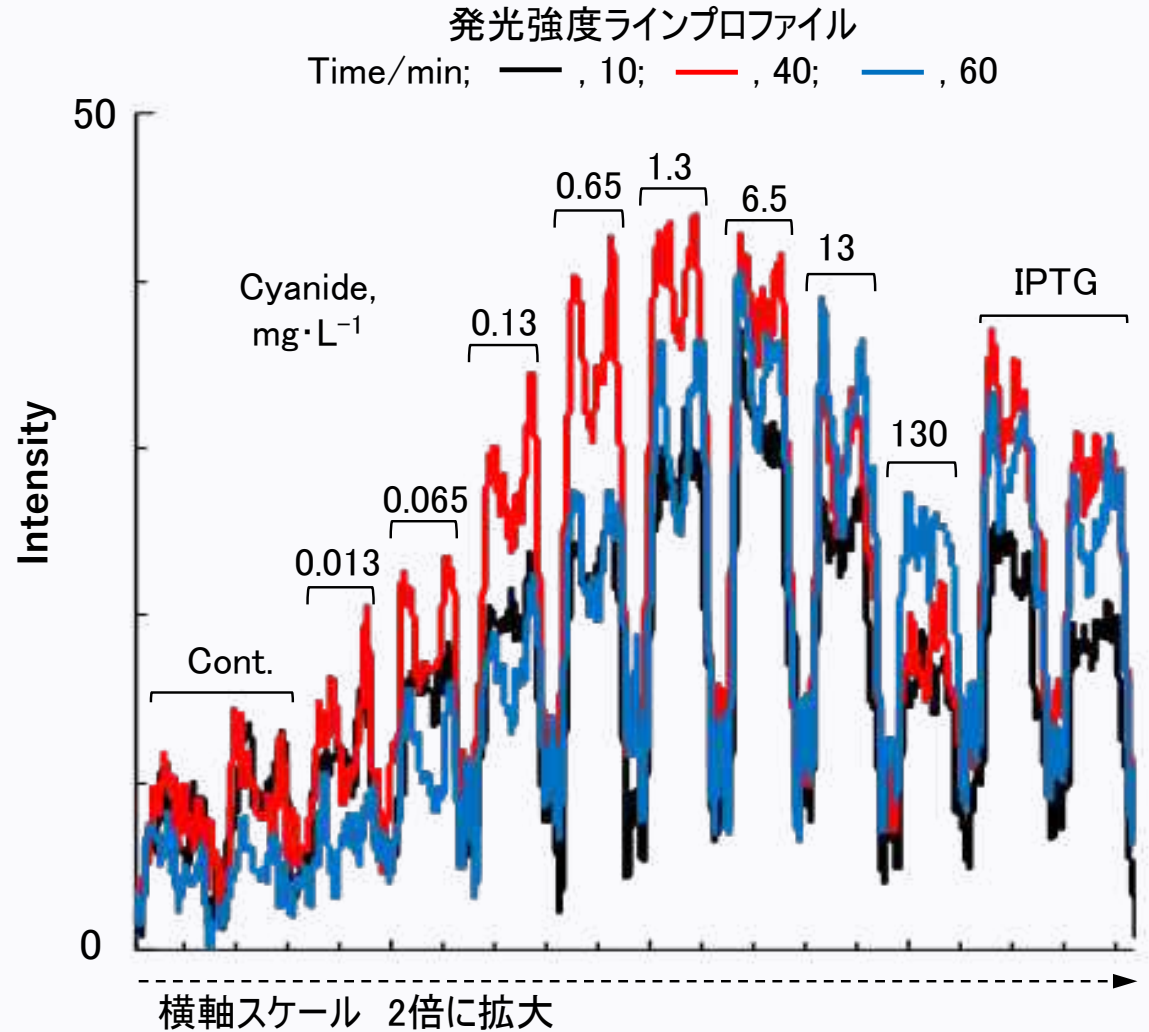
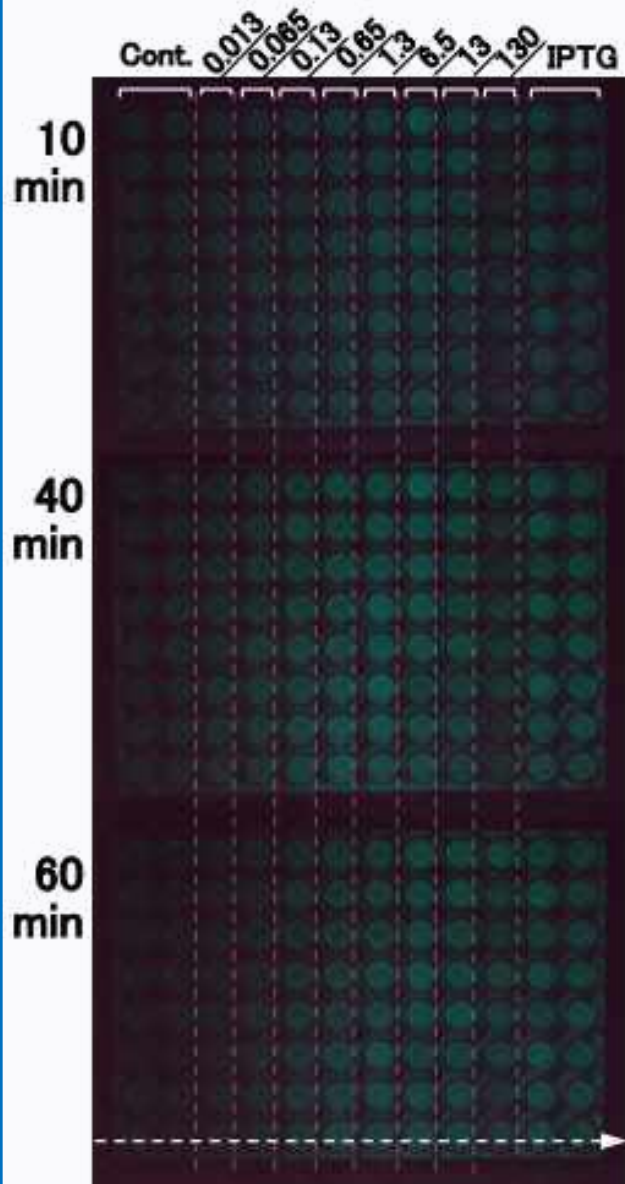
カメラ撮影 (生物発光可視化)  
有害性物質含有試料

発光 ∝ シアン化物濃度



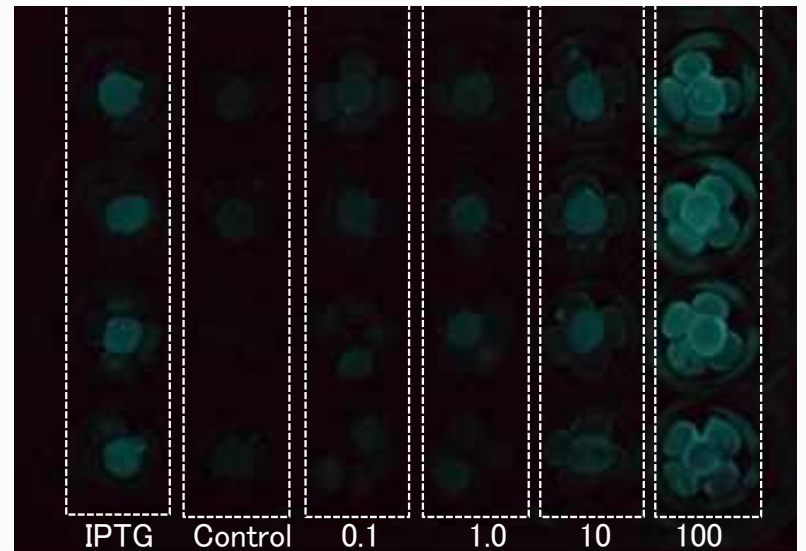
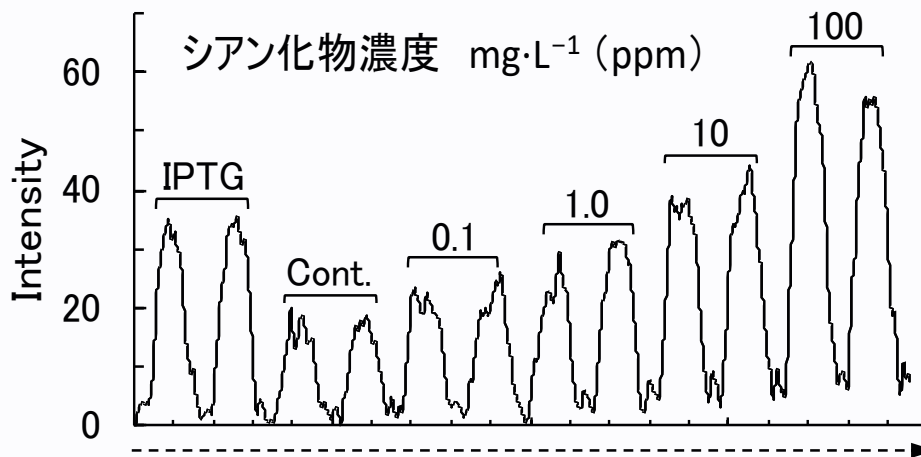
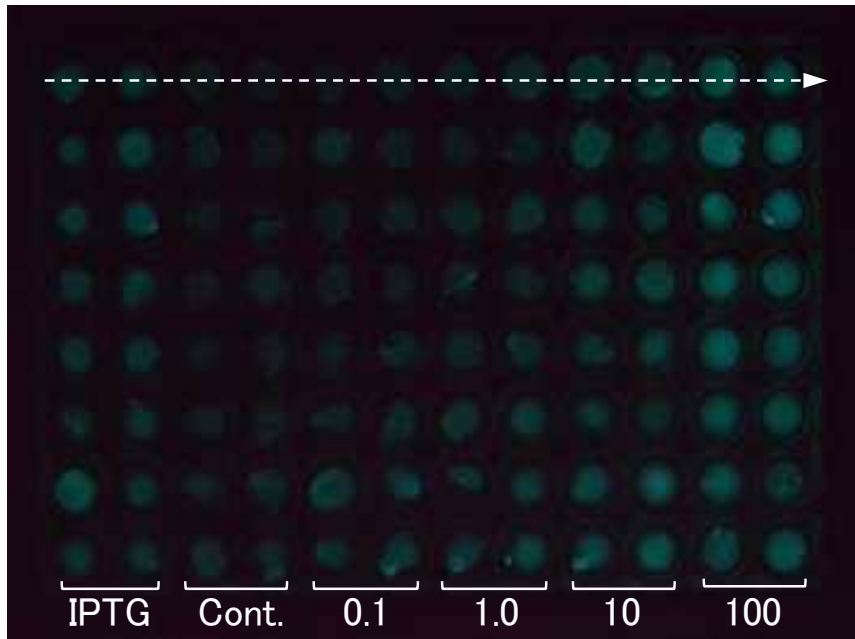
アルギン酸  
▶ 食品増粘剤, 安定剤, ゲル化剤などとして 広く使用されている

● 生物発光大腸菌によるシアン化物の可視化(ゾル系) シアン化物濃度  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (ppm)



検量線正相関 0.01 ~ 1 ppm  
( $<0.01\text{ppm}$ , 厚生労働省国内水質基準)

● 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)



生物発光大腸菌 + アルギン酸ゲルミクロ環境 → 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)

# ● アルギン酸ゲルミクロ環境において漸次増幅される生物発光

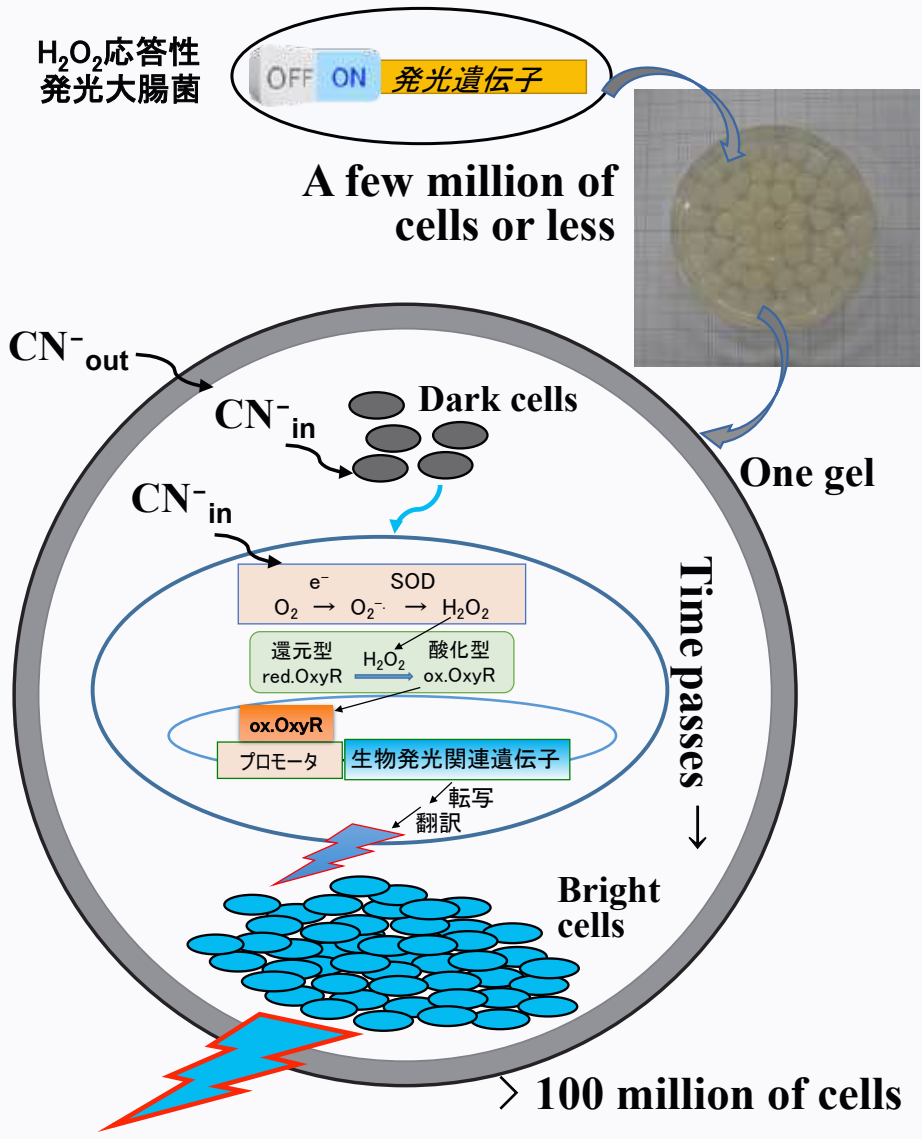
- アルギン酸ゾルの効果  
細胞間接着を阻害?  
⇒ 酸素分子の効率的利用
- アルギン酸ゾル固定化媒体としての効果  
ゲル外部 → ゲル内部への輸送  
⇒ 10 minutes (ゲル全体)  
**細胞膜透過および細胞内輸送**  
⇒ 単純拡散では ms  
⇒ 他のメカニズムの場合?
- 遺伝子発現開始  
⇒ ~10 min

## 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:

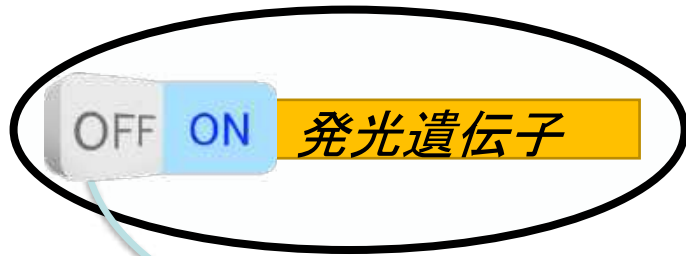
- 🔥 毒性物質スクリーニング標準法としての採用を見据え、現行標準法との性能比較: 特にミカズキモ法
- 🔥 自動化測定法を検討する
- 🔥 亜ヒ酸および無機ヒ素化合物, 農薬成分などへの応用
- 🔥 発光スイッチの検討: 対象毒性物質の範囲拡大
- ✅ 技術指導





# 生物発光大腸菌による環境有害物質の可視化

- 適用範囲の拡張と高機能化
- オーダーメイド型生物発光可視化



OFF ON 物質:→ 適用範囲の拡張

## ROS誘導性有害物質

- カドミニウム  
(一般に重金属イオン)
- ビオローゲン(パラコート)
- 鉱物由来無機ヒ素
- 食品由来シアン化物, 無機ヒ素
- 殺虫剤, 農薬由来の有害物質など

## 他の重要な有害物質

- 有機スズ
- プランクトン由来の自然毒素  
(例, サキシトキシン:LD50(10 $\mu$ g/kg)  
琵琶湖など)
- 自然発生的な有害物質  
(発生事例, ホルムアルデヒド;  
東京都水道局埼玉県三郷浄水場)

OFF ON 高機能化

## 選択的取込み能の付与

- 遺伝子組換えによる選択的  
取り込みチャネル形成
- イオン対形成試薬の選択  
(キレート試薬を含む)

## 他の有害物質への対応

- 生物を模倣したスイッチ遺  
伝子の応用研究
- 活性酸素種(ROS)依存  
性スイッチ  
KatG', SoxS', Prx',  
Gpx', など
- 重金属依存性スイッチ  
MTF1', など

ご静聴ありがとうございました