

海洋性発光細菌の発光誘導因子の解明と  
バイオアッセイへの応用

Luminescence Inducer of Marine Luminous Bacterium and  
Applied to Bioassay

2018年 3月

北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科  
環境システム専攻

桑原 眸

Hitomi Kuwahara

(指導教員 森田 洋)

## 要旨

海洋性発光細菌は、海水中や特定の海洋生物の体表、発光器内等に生息する微生物である。この発光現象は、主に細胞密度の上昇とともに引き起こされ、重金属やシアンなどの有害物質との接触により消光することから、毒性を迅速簡便に評価できるバイオアッセイとして主に環境計測分野で利用されてきた。一方、この微生物の生育環境である海水の成分が発光誘導に与える影響や環境計測分野以外の利用に関する知見は少ない。そこで、海洋性発光細菌の海水の成分と発光誘導の相関性を明らかにし、さらに海洋性発光細菌を用いた食品分野へのバイオアッセイの応用を検討した。

海水中における発光細菌の発光挙動を明らかにするために、海洋性発光細菌類を人工海水中で培養したところ、*Aliivibrio fischeri* では菌体の増殖がほとんど認められないにも関わらず、培養 12 h 後に有意な発光増大が認められたことから、人工海水の成分が発光誘導に寄与する可能性が示唆された。そこで、人工海水の 5 つの成分をそれぞれ変化させた条件で培養を行ったところ、KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub> の 3 成分で培養したときに発光量が有意に上昇し、これら 3 成分が発光誘導に寄与する可能性が示唆された。さらに K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> のイオンを含むその他の化合物に置換して培養したところ、同様に有意な発光量の増大が認められた。以上の結果から発光誘導には K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> の 3 つのイオンが寄与することが明らかとなった。

そこで、防ばい剤に対する発光細菌の感受性試験を行ったところ、防ばい剤が高濃度になると消光したことから、発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を有することが明らかとなった。また、実用化の際は何らかの基板に固定することが要求されることから、基板として蚕繭から抽出し作製した不溶化フィブロイン膜(IFF)を選定し、これに発光細菌を固定したところ、高い発光性を示し基板としての有用性が示唆された。一方、IFF は生物由来の膜であるため発光性が膜の状態に左右されやすく、時間の経過とともに発光量が減少することが知られている。そこで、本論文で明らかとなった発光因子(KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>)が発光回復剤としての効果を有するか検討したところ、添加 5 分後に急激に発光量が上昇し、24 時間後まで発光を維持したことから 3 つの発光因子は発光回復剤としての効果を有することが明らかとなった。最後に夾雑物の影響として酸および柑橘類の成分の影響を検討したところ、pH が発光に与える影響は少なく、みかんを熱水処理することで夾雑物の影響を抑制できることが示唆された。以上の結果より、海洋性発光細菌のバイオアッセイ技術としての利用可能性が示唆された。

## Abstract

Marine luminous bacteria live in marine environment. For example, they are free-living in sea water or can also live in a symbiotic relationship with other marine animals. It is well known they induce the luminescence cell-density dependently, and they mainly used as a bioassay in the environmental measurement fields. On the other hand, the relation between seawater components and luminescence is little known. Furthermore, there is little known about application to other fields. Therefore, we investigated about the relation between the luminescence and the composition of artificial seawater media, and we attempted analyze the toxicity for fungicides using *A. fischeri* grown only with the elements essential to induce luminescence.

The luminescence significantly increased at 12 h under artificial sea water (i.e. very low cell density conditions). Moreover, *A. fischeri* induced the luminescence in the presence of KCl, NaHCO<sub>3</sub>, and MgSO<sub>4</sub>, and the luminescence also increased with other compounds, including K<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ions. These results suggest that *A. fischeri* required these ions to induce the luminescence under artificial sea water.

Additionally, when *A. fischeri* which it was cultured in 2.81 % NaCl solutions containing KCl, NaHCO<sub>3</sub>, and MgSO<sub>4</sub> exposed to sodium ortho-phenylphenol, luminescence decreased at > 10 ppm. Moreover, marine luminous bacteria immobilized on IFF-coated tube, the luminescence decreased sensitively. These results suggest that marine luminous bacteria can be used as a bioassay to detect the presence of fungicides. However, when marine luminous bacteria immobilized on IFF-coated tube, the luminescence decrease as time passes. Therefore, we investigated whether the three luminescence factors (i.e. KCl, NaHCO<sub>3</sub>, and MgSO<sub>4</sub>) have an effect as a luminescence restoration agent. When we added the three luminescence factors to IFF-coated tube, the luminescence increased after 5 min, and the luminescence maintained until 24 h. Furthermore, we investigated to the effect of pH or other substances, it was suggested that these effects were minimal. These results suggest that marine luminous bacteria are useful as bioassay to analyze the fungicides, and it is considered that the bioassay is useful for primary screening of remaining fungicides in citrus fruit.

# 目次

## 第1章 序論

1.1 本論文の背景	9
1.1.1 発光細菌の生育環境と発光誘導因子	9
1.1.2 発光細菌を用いたバイオアッセイ	12
1.2 本論文の目的	15
1.3 本論文の構成	15

## 第2章 海洋性発光細菌類の増殖性と発光性

2.1 研究背景と目的	17
2.2 実験方法	17
2.2.1 供試菌株と培養条件	17
2.2.2 菌体量と発光量の測定	18
2.3 実験結果	18
2.3.1 <i>Photobacterium leiognathi</i> の増殖と発光性	18
2.3.2 <i>Vibrio harveyi</i> の増殖と発光性	20
2.3.3 <i>Vibrio (Aliivibrio) fischeri</i> の増殖と発光性	21
2.3.4 <i>Aliivibrio fischeri</i> の増殖と発光性	23
2.4 考察	25
2.5 結論	26

### 第3章 発光誘導因子の解明

3.1 研究背景と目的	27
3.2 実験方法	27
3.2.1 供試菌株と培養条件	27
3.2.2 菌体量と発光量の測定	28
3.3 実験結果	28
3.3.1 4つの無機塩類添加時の発光性	28
3.3.2 1つの無機塩類添加時の発光性	31
3.3.3 2つの無機塩類添加時の発光性	32
3.3.4 3つの無機塩類添加時の発光性	33
3.3.5 KCl、NaHCO <sub>3</sub> 、MgSO <sub>4</sub> の濃度変化と発光性	34
3.3.6 K <sup>+</sup> が発光に与える影響	36
3.3.7 HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> が発光に与える影響	37
3.3.8 SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> が発光に与える影響	38
3.3.9 SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> およびS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> が発光に与える影響	39
3.3.10 含硫アミノ酸が発光に与える影響	40
3.4 考察	42
3.5 結論	44

## 第4章 海洋性発光細菌のバイオアッセイへの応用

4.1 研究背景と目的	45
4.2 分散系における感受性試験	45
4.2.1 目的	45
4.2.2 実験方法	45
4.2.2.1 供試菌株と培養条件	45
4.2.2.2 富栄養条件で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験	46
4.2.2.3 誘導因子で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験	47
4.2.3 実験結果	47
4.2.3.1 富栄養条件で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験	47
4.2.3.2 誘導因子で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験	49
4.2.4 考察	51
4.2.5 結論	53
4.3 基板への固定化と固定した発光細菌を用いた感受性試験	54
4.3.1 研究背景と目的	54
4.3.2 実験方法	54
4.3.2.1 IFF の作製	54
4.3.2.2 IFF チューブとガラスチューブへの固定化	56
4.3.2.3 FE-SEM による基板表面の観察	57
4.3.2.4 IFF に固定化した発光細菌の感受性試験	57
4.3.3 実験結果	58
4.3.3.1 最適培養時間および固定化時間の検討	58

4.3.3.2	FE-SEMによる基板表面の観察	60
4.3.3.3	IFFに固定化した発光細菌の感受性試験	61
4.3.4	考察(分散時と固定化時の比較)	63
4.3.5	結論	63
4.4	発光回復剤としての効果	64
4.4.1	研究背景と目的	64
4.4.2	実験方法	64
4.4.3	実験結果	65
4.4.4	結論	66
4.5	夾雑物が発光に与える影響	67
4.5.1	研究背景と目的	67
4.5.2	実験方法	67
4.5.2.1	供試菌株と培養条件	67
4.5.2.2	pHの影響	68
4.5.2.3	柑橘類の成分に対する影響	68
4.5.3	実験結果	69
4.5.3.1	pHの影響	69
4.5.3.2	柑橘類の成分に対する影響	70
4.5.4	結論	72

## 第5章 総括と今後の展望

5.1 <i>A. fischeri</i> の発光挙動と発光誘導因子の解明	73
5.2 <i>A. fischeri</i> を用いたバイオアッセイへの利用可能性	74
参考文献	76
謝辞	83

# 第1章 序論

## 1.1 本論文の背景

### 1.1.1 発光細菌の生育環境と発光誘導因子

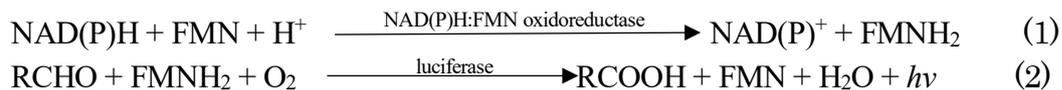
発光する生物は細菌から魚類まで地球上に数多く存在する<sup>1)</sup>。例えば、ホタルやオワンクラゲ、ホタルイカの発光は我々が観察することのできる身近な生物発光といえる<sup>2)</sup>。またチョウチンアンコウの頭部から突き出ている発光器の中には発光細菌と呼ばれる「光る微生物」が生息している。発光細菌はこれまでに19種が確認され、そのうちの16種が海洋性でありその多くが海洋環境に分布している<sup>3)</sup>。海洋性発光細菌の生育環境として、海水や塩性沼沢底泥、前述のチョウチンアンコウや、マツカサウオ、ダンゴイカといった特定の海産動物の発光器内、体表、腸管内等が挙げられる<sup>4)・11)</sup>。

海洋性発光細菌は一般的に波長490 nm付近に極大を示す青緑色の光を放つことが知られている<sup>12), 13)</sup>(図1)。



図1 海洋性発光細菌 *Aliivibrio fischeri* の発光の様子

この発光現象はバクテリアルシフェラーゼの触媒反応によって引き起こされる<sup>14)・18)</sup>。はじめに、フラビンモノヌクレオチド(FMN)が酸化還元酵素によってフラビンモノヌクレオチド(FMNH<sub>2</sub>)に還元される(式 1)<sup>14)・18)</sup>。続いて、バクテリアルシフェラーゼが還元された FMNH<sub>2</sub> と反応し、この複合体が酸素によって酸化され酸化型となる(式 2)<sup>14)・18)</sup>。最後に、アルデヒドがこの酸素を奪うことで、励起型の酵素・FMN 複合体となり、この分解に伴って基底状態にもどるときに発光が引き起こされる(式 2)<sup>14)・19)</sup>。



この発光反応は、細胞間コミュニケーションによって物質生産を調節する **Quorum Sensing** によって制御されている<sup>15), 20)・23)</sup>。この現象は、バイオフィルムや孢子形成、病原物質の発現など、発光細菌以外の微生物においても認められる<sup>21), 23)</sup>。細胞間コミュニケーションの手段としては微生物が増殖時に産生する **autoinducer** と呼ばれるシグナル物質が用いられ、これが臨界濃度に達すると発光が引き起こされる<sup>15), 21)</sup>。*A. fischeri* の **autoinducer** は *N*-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C6-HSL)<sup>15), 24)</sup> や Octanoy-homoserine lactone(C8)<sup>25), 26)</sup> であると同定されており、これが **LuxR** タンパク質と結合すると、発光反応に必要な情報をコードした *lux* オペロンの転写を活性化する<sup>15)</sup>。*lux* オペロンは、**autoinducer** を生合成する *luxI*、発光反応を触媒するバクテリアルシフェラーゼをコードする *luxA* および *luxB*、発光反応に必要なアルデヒドの生合成を担う *luxC*、*luxD*、*luxE*、また FMN を還元する酵素をコードする *luxG* などで構成される<sup>15)</sup>(図 2)。

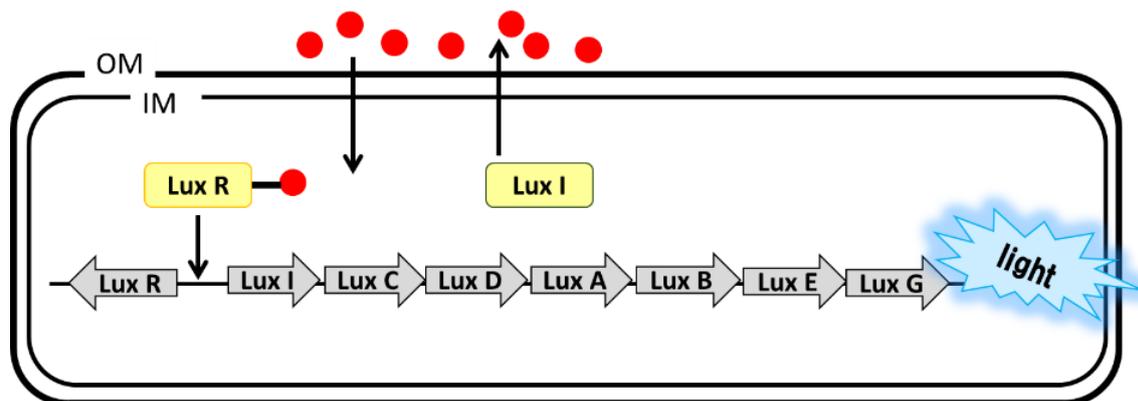


図2 発光メカニズム

このように、発光細菌は一般的に autoinducer を介した細胞間コミュニケーションによって発光遺伝子を発現し、発光反応を引き起こしている。すなわち、発光細菌は菌体量に依存して発光を制御している。また、細胞密度以外にも、紫外線(UV)照射<sup>27)</sup>や酸化還元状態<sup>28)</sup>なども発光誘導に寄与することが報告されている。

近年 Margarita らは、発光細菌は海水中でマリンスノーに付着し発光することで、動物プランクトンや魚をおびき寄せ、これらの生物に捕食されることで、海水中より安全で栄養源となる有機物が豊富なこれら生物の体内（腸管内）に侵入し、効率的に増殖を行い、魚の移動する広範囲に種を拡散している可能性を示した<sup>29)</sup>。しかしながら、海水中では、発光細菌は分散して自由生活を行っているため、発光に必要な高い細胞密度に達していない可能性が考えられる。実際、発光器内において *Vibrio fischeri* の細胞密度は 1 ml あたり  $10^{10}$  から  $10^{11}$  個という高い細胞密度に達し、発光誘導が引き起こされるのに対し、海水中では 1 ml あたり  $10^2$  個以下という低い細胞密度であるといわれ、このような状況下では発光は起こらないと考えられている<sup>20), 30)-36)</sup>。一方、海洋性発光細菌は海水中に生息し、海水中でも発光することを踏まえると、細胞密度以外に発光誘導に寄与する因子が存在すると予想した。そこで、NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub> など多くの無機塩類が溶存する生育環境の海水に着目し、海洋性発光細菌類の海水中の発光挙動を明らかにすることで発光誘導に寄与する因子の解明を試みた。

### 1.1.2 発光細菌を用いたバイオアッセイ

一般的に、水や大気などの環境計測分野では、化学的もしくは物理的な手法によってサンプル中に含まれる有害物質濃度や組成などを高感度に検出している<sup>13), 18)</sup>。一方、このような手法では有害物質が生態系に与える影響までを評価することはできない<sup>13), 18)</sup>。しかしながら、現場において緊急時の毒性評価を行う際は、迅速かつ簡便に生態系への影響を含めた総合的な有害性の判別ができるスクリーニング手法が求められる<sup>13), 18)</sup>。そこで、生態系の影響を評価することができる毒性評価の手法として、藻類やミジンコ、魚類などの生物を用いたバイオアッセイが注目されている<sup>13), 18)</sup>。この手法では、試験生物に有害物質を暴露し、その死亡率や増殖速度、成長速度等を経験することで毒性の強弱を判断するため、化学・物理的な手法では評価することができない生態系に与える影響までを評価することができる<sup>13), 18)</sup>。さらに化学的な試験を行うための前試験や化学・物理的な手法を組み合わせることで、より効果的な有害性評価を行うことができるという特徴がある<sup>13), 18)</sup>。一方、このような生物を利用したバイオアッセイでは、生物の取り扱いづらさ（e.g. 海産魚類では、入手時期が制限される、飼育に手間がかかるなど）や結果が出るまでに数日から1週間ほどの長い時間を要することが課題として挙げられている<sup>13), 18), 37)</sup>。

このような背景から、従来バイオアッセイに利用される生物に比べ、簡便性、迅速性、低コスト性に優れる発光細菌を用いたバイオアッセイに現在注目が集まっている<sup>13)</sup>。発光細菌の発光現象は呼吸代謝と連動して起こり<sup>38)</sup>、有害物質と接触することで発光反応に必要なルシフェラーゼ活性が阻害され、発光量が減少することが知られている<sup>17), 39)</sup>。この原理を利用して、発光細菌を利用したバイオアッセイでは発光阻害率をもとにサンプルの有害性を評価する<sup>12), 13), 18), 37)</sup>。

発光細菌を用いた毒性評価システムは、マイクロトックスという形で実用化され、簡易的に水環境の毒性評価を行うことができるバイオアッセイとして環境教育や工場、研究所、政府機関などで幅広く利用されている。ここで簡単にマイクロトックスを用いた毒性試験法について述べる。はじめに凍結乾燥された発光細菌を融解再生液に懸濁し、さらに希釈液を加えて発光量を安定させたのち、少量の毒性試料を加え、マイクロトッ

クス試験装置で5分後および15分後の発光量を測定する<sup>18), 37)</sup>。次に、試料を添加していない対照の発光量も同時に測定し、最後に対照試験区に対して発光量が50%減少した時の毒性物質濃度をEC<sub>50</sub> (50%影響濃度) として評価する<sup>18), 37)</sup>。発光細菌を用いたバイオアッセイと従来の生物 (e.g. ミジンコ、魚類) を利用したバイオアッセイでは、影響検出方法や作用時間等が異なるため生物間における感受性の比較を行うことはできない<sup>37)</sup>。しかしながら、発光細菌が示すEC<sub>50</sub>と魚類などが示す96 h-LC<sub>50</sub> (96時間半数致死濃度) はほぼ近い値を示すことを明らかになっており、試験法間の感度の比較を行うことが可能であることが報告されている<sup>37)</sup>。このように、マイクロトックス毒性試験法は従来の方法に比べて短時間で水環境の毒性を判断できることが知られている。

前述した発光細菌を利用したバイオアッセイは、主に水環境の汚染度を測定するために利用され、これまで水銀や銅に対する感受性や化学物質の濃度と感受性の相関性を示した知見が多く蓄積している<sup>13), 40)</sup>。一方、環境計測分野以外で発光細菌を用いたバイオアッセイの知見は少ない。そこでこの利用拡大を図ることを目的として、食品分析分野に着目した。「食」は我々が生きていく上で欠かすことのできないものであり、健康に直接影響するものである。そのため消費者にとって、手にする食品が「安心」かつ「安全」なものであるかということは最も関心が高いことである。食品分野における消費者の関心のひとつに残留農薬が挙げられる。その中でも、主に輸入柑橘類の果皮に塗布されているポストハーベスト農薬への関心が高まっている。ポストハーベスト農薬 (防ばい剤) は、外国で収穫された収穫後のレモンやオレンジなどの柑橘類やバナナなどの青果物の果皮に塗布される農薬であり、日本国内ではこのような輸入作物にのみ使用が認められている<sup>41)</sup>。防ばい剤は輸送に伴う長期間の保存を可能にし、果皮の傷から感染し繁殖するカビによって引き起こされる品質低下や腐敗を抑制するために広く利用されている<sup>41)・46)</sup>。現在、防ばい剤としてオルトフェニルフェノール及びそのナトリウム塩、イマザリル、チアベンダゾールなどが指定されている<sup>41), 47)</sup> (図3)。

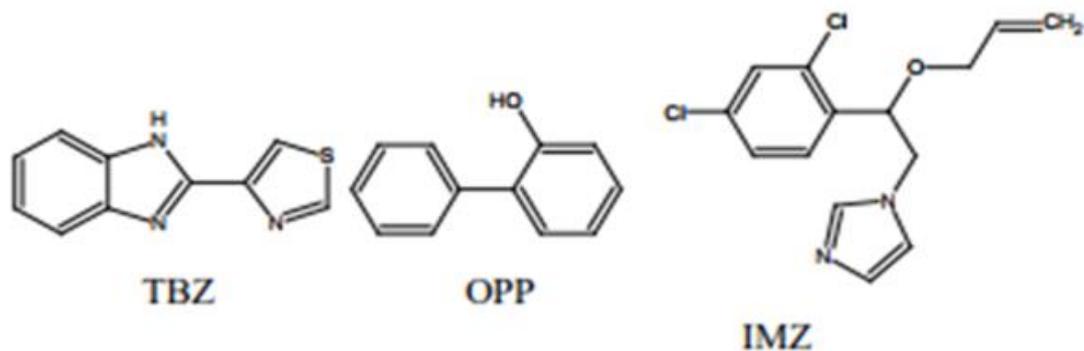


図3 防ばい剤の化学構造<sup>41)</sup>

日本国内ではこれらの化学物質は食品添加物として取り扱われており<sup>41), 46), 47)</sup>、図3に示した防ばい剤については、主にレモン、オレンジ、グレープフルーツなどの柑橘類<sup>46), 47)</sup>、バナナ<sup>46)</sup>などに限定して使用が認められている。またこれらの防ばい剤は国内で残留基準値が定められており、柑橘類を例に挙げると、イマザリルは5 ppm、オルトフェニルフェノール及びそのナトリウム塩、チアベンダゾールは10 ppmと定められている。一方、これらの化学物質は難分解性であり、その残留性や人体に与える影響が懸念されている<sup>46)</sup>。現在、これらの防ばい剤は公定分析法である食品衛生検査指針<sup>48)</sup>によって、イマザリルはHPLC-UVで、オルトフェニルフェノールおよびチアベンダゾールはHPLC-FLで測定することが定められている<sup>47), 48)</sup>。このようなクロマトグラフィーを利用した分析では、高感度にその濃度や組成を測定することができる一方、操作が煩雑で、コストも高く個別試験法であるため、これまで防ばい剤の一斉分析法の検討と妥当性評価に関する研究が行われてきた<sup>41), 47), 49)</sup>。また、現場では簡便かつ迅速に、そして低コストに、毒性の有無や強弱を網羅的に測定できる分析手法が求められている<sup>13), 18), 49)</sup>。そこで、これらの化学的な試験の前試験として、誰もが簡単に扱うことができ、さらに迅速に防ばい剤の有無を総合的にスクリーニングすることができる分析手法として、発光細菌を用いたバイオアッセイへの応用を検討した。

## 1.2 本論文の目的

前節では、発光細菌の発光誘導に関するこれまでの知見と応用分野について述べ、これまでに以下の2点が解明されていないことが明らかとなった。

1. 発光細菌の海水中における発光挙動と誘導因子について
2. 発光細菌を用いたバイオアッセイの環境計測分野以外への応用について

そこで、本論文では人工海水を用いて海洋性発光細菌類の発光挙動を明らかにし、その発光誘導に寄与する成分の解明を行うことを第1の目的とする。そして、発光細菌を用いたバイオアッセイを食品分野へ応用することを第2の目的とする。そのために海水中の発光誘導因子で誘導した発光細菌が防ばい剤に対して感受性を有するかを明らかにし、防ばい剤を検知するバイオアッセイとしての利用可能性を検討する。

## 1.3 本論文の構成

本論文の構成を図4に示す。第2章では、海水中の無機塩類のみを添加した Artificial Sea Water (ASW)と微生物の3大生育因子(無機塩類、窒素源、炭素源)を全て含む Sea Water Medium (SWM)を用いて海洋性発光細菌類の増殖性と発光性を明らかにする。第3章では ASW 中で発光上昇が認められた海洋性発光細菌を用いて ASW 中の発光誘導因子の解明を行う。第4章では、第3章で明らかにした発光誘導因子で誘導した発光細菌を用いたバイオアッセイへの応用を検討する。さらに蚕繭から抽出し、作製した不溶化フィブロイン膜 (IFF)に固定した発光細菌の防ばい剤に対する感受性についても検討する。最後に第5章で本論文の総括と今後の展望について述べる。



図4 本論文の構成

## 第2章 海洋性発光細菌類の増殖性と発光性

### 2.1 研究背景と目的

海洋性発光細菌の発光誘導因子を明らかにするためには、はじめに海水中における発光挙動を明らかにする必要がある。そこで、培地として5つの無機塩類(KCl、CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>)で調製した人工海水(Artificial Sea Water: ASW)を選定し、4種の海洋性発光細菌類の増殖性と発光性を追跡することで人工海水中における発光挙動を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 供試菌株と培養条件

供試菌株として *Photobacterium leiognathi* (ATCC 33469)、*Vibrio harveyi* (ATCC 14126)、*Vibrio (Aliivibrio) fischeri* (ATCC 33715)、*Aliivibrio fischeri* (ATCC 7744)の4種の海洋性発光細菌を選定した。これらは American Type Culture Collection から入手した。*P. leiognathi*、*V. harveyi*、*A. fischeri*を Photobacterium broth (Sigma-Aldrich Co.) 100 ml に 1 ml 接種し、26 °C、70 rpm の培養条件で 16 h 振とう培養した。*V. fischeri*は Marine broth (Becton, Dickinson and Co.) 100 ml に、1 ml 接種し、20 °C、70 rpm の培養条件で 16 h 振とう培養した。これらの培養液と 30 %グリセリン溶液を 700 µl ずつ混合し、-70 °Cで保存したものをグリセロールストックとした。

人工海水中の発光挙動を明らかにするために、培地として ASW (ASW composition; 28.1 g/l NaCl, 0.77 g/l KCl, 1.21 g/l CaCl<sub>2</sub>, 10.2 g/l MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.11 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 7.15 g/l MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)<sup>50)</sup>を用いた。これを 300 ml 三角フラスコに 100 ml 調整し、前述のグリセロールストックを 100 µl 接種した。*P. leiognathi*、*V. harveyi*、*A. fischeri*は 26 °C、*V. fischeri*は 20 °Cの培養温度で、約 48 h、70 rpm で振とう培養し、接種後 2 h おきに培養液を 1 ml ずつサンプリングし、菌体量と発光量を測定した。比較対象として、Artificial Sea Water に 10 g/l Beef extract と 10 g/l Bacto peptone を添加した Sea Water Medium (SWM) を 100 ml 調整し、同様の培養条件で培養を行った。微生物の生育に

は、無機塩類、炭素源、窒素源の全ての因子が必須であることが知られている。本実験で使用する ASW は無機塩類のみで構成しており、栄養が乏しい海水中を想定している。すなわち、菌体は増殖せず、低い細胞密度であるため発光誘導が起こらないことを想定している。一方、SWM は ASW の無機塩類に加え、炭素源である Beef extract と窒素源である Bacto peptone を含み、微生物の生育に必要な因子が全てそろっている培地である。発光細菌の発光現象は菌体量の上昇とともに引き起こされることから、SWM は時間の経過とともに菌体が増殖し、それに伴って発光量も上昇することを想定している。

## 2.2.2 菌体量と発光量の測定

菌体量は Ultrospec 3100 *pro* spectrometer (Amersham Bioscience, Piscataway NJ) を用いて、波長 600 nm における培養懸濁液の光学密度 (Optical Density: OD) を測定することにより評価した。発光量は PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan) を用いて、5 min の積算値で評価した。なお、現在市販されている光を検出する分析機器によって得られた測定値は RLU (relative light unit) という単位で表示され、装置ごとの互換性がないことが知られている<sup>51)</sup>。そこで、本論文を通して得られた全ての発光量の単位は RLU と表記する。また、接種直後 (培養 0 h) の発光量と各培養時間における発光量の t 検定を行い、接種直後と比較したときの有意差 \* $p < 0.05$  で示した。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 *Photobacterium leiognathi* の増殖と発光性

はじめに *P. leiognathi* の増殖性と発光性の経時変化を図 5、6 に示す。*P. leiognathi* を SWM で培養したところ、時間の経過に伴って菌体量の上昇が認められ、OD<sub>600</sub> は最終的に約 3.0 まで達した (図 5)。また、菌体の上昇に伴って発光量の上昇が認められた (図 6)。この結果から、SWM では細胞密度に依存した発光誘導を行っていることが明らかとなった。一方、ASW では菌体の上昇はほとんど認められず (図 5)、発光量も時間の経過に伴い減少した (図 6)。以上の結果より、*P. leiognathi* は SWM および ASW において細胞密度依存的に発光誘導を行っていることが明らかとなった。

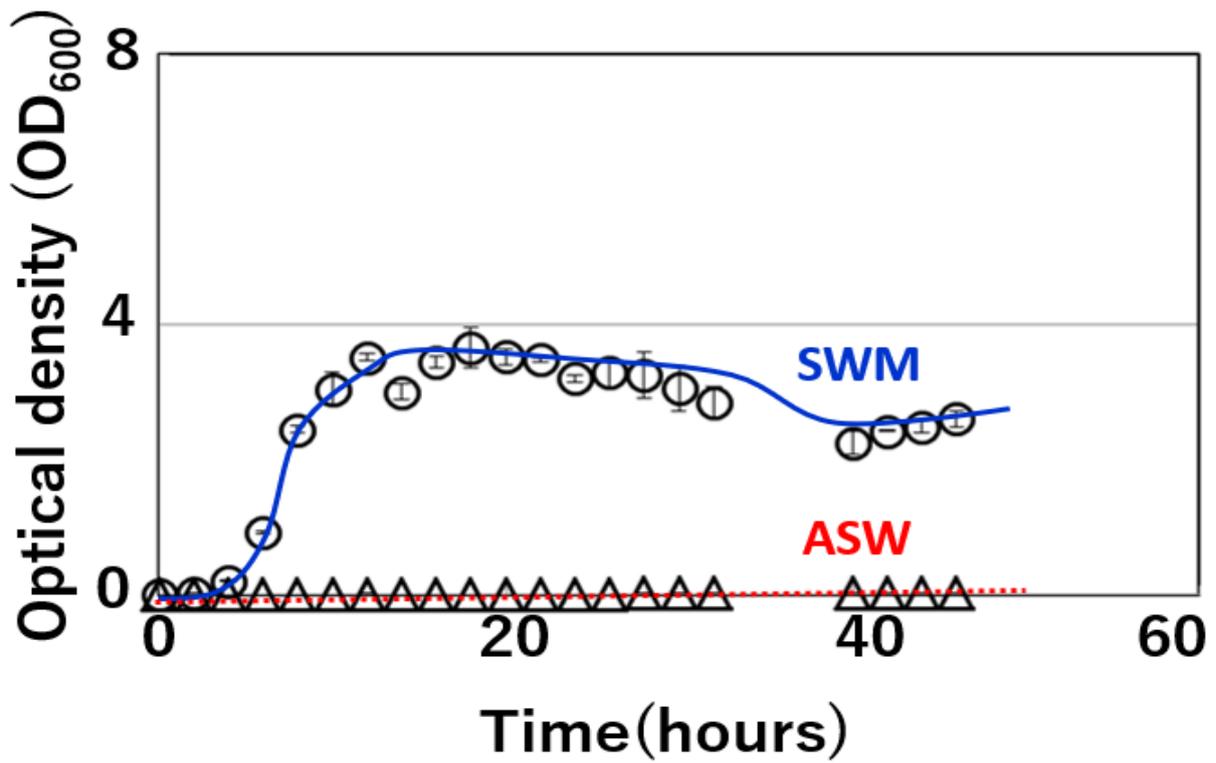


図5 *P. leiognathi* の増殖性

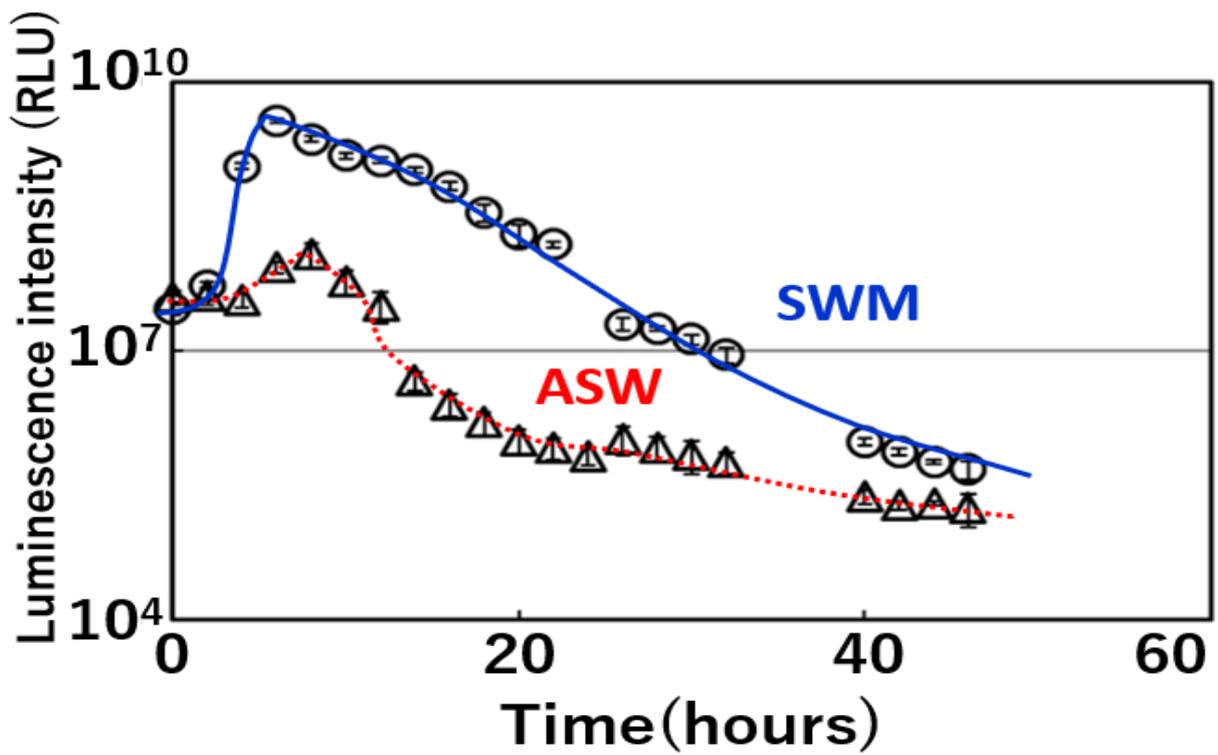


図6 *P. leiognathi* の発光性

### 2.3.2 *Vibrio harveyi*の増殖と発光性

続いて *V. harveyi* の増殖性と発光性の経時変化を図 7、8 に示す。*V. harveyi* を SWM で培養したところ、時間の経過に伴って菌体量の上昇が認められ、OD<sub>600</sub> は最終的に約 4.0 まで達した(図 7)。また、発光量は培養 6 h までは減少したが、その後急激に増大し、その後、高い発光量を維持したことから細胞密度に依存した発光誘導を行っていることが明らかとなった(図 8)。一方、ASW では菌体量はほとんど上昇せず(図 7)、発光量も上昇が認められなかった(図 8)。以上の結果から、*V. harveyi* は *P. leiognathi* と同様に SWM および ASW において細胞密度に依存して発光誘導を行っていることが明らかとなった。

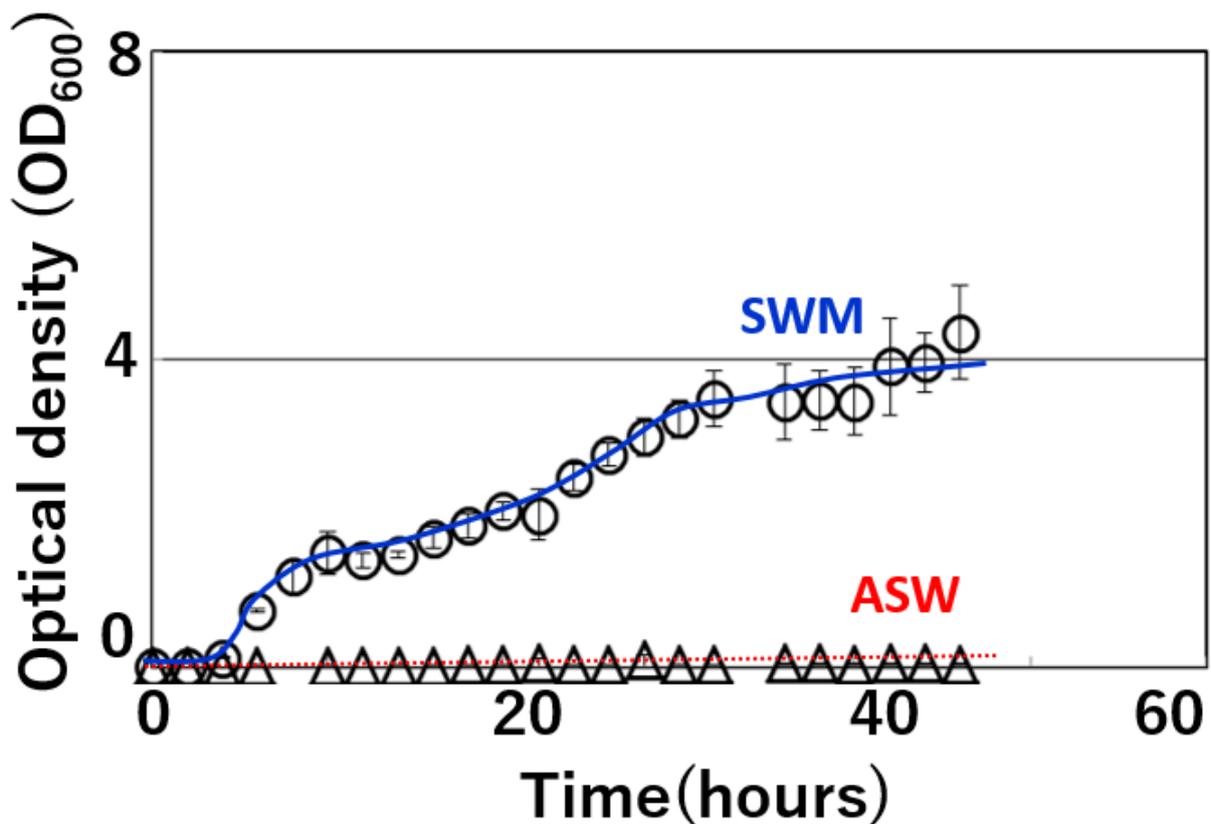


図 7 *V. harveyi* の増殖性

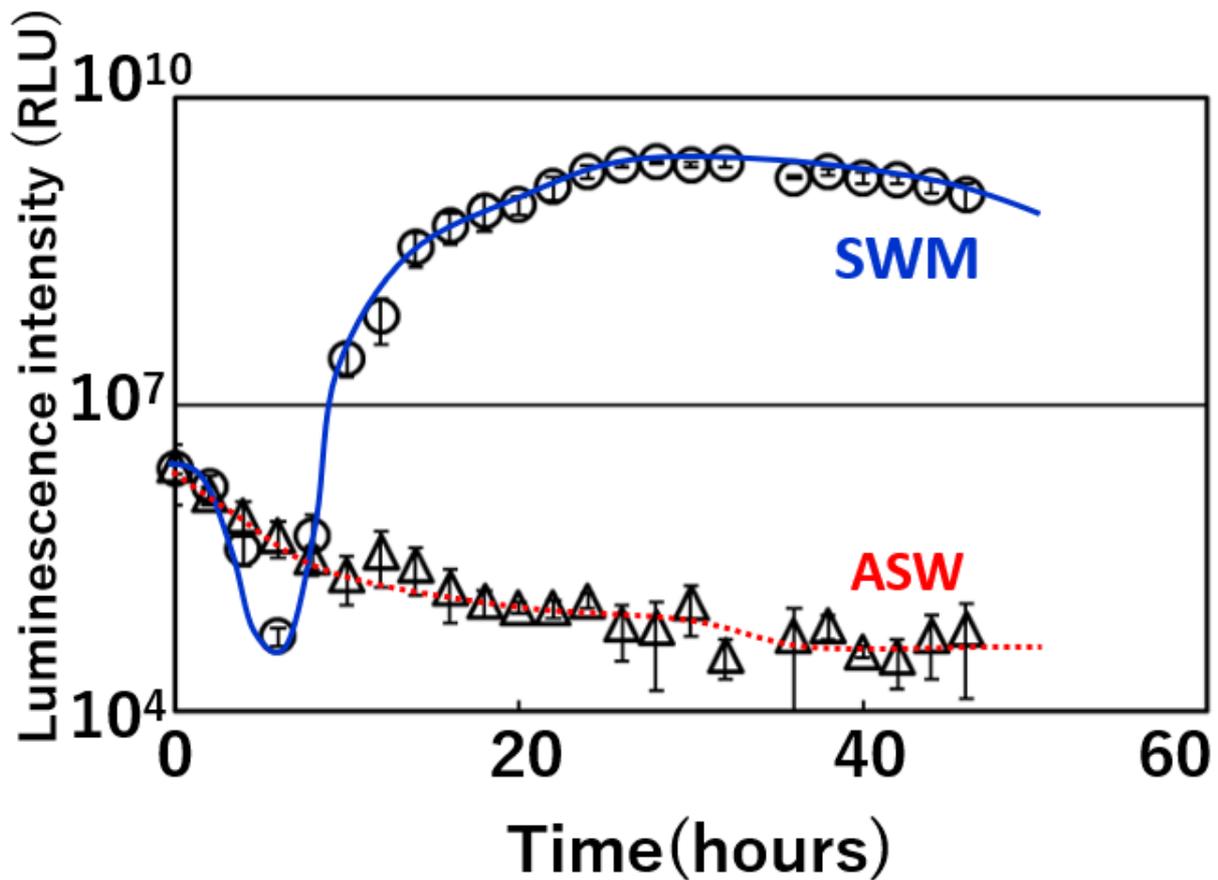


図8 *V. harveyi*の発光性

### 2.3.3 *Vibrio (Aliivibrio) fischeri*の増殖と発光性

次に *V. fischeri* の増殖性と発光性の経時変化を図9、10に示す。*V. fischeri*を SWMで培養したところ、培養22 hまで菌体の上昇が認められなかったが、培養24 h以降に菌体の上昇が認められ、最終的にOD<sub>600</sub>は約3.5まで達した(図9)。発光量も増殖の上昇が認められた培養24 h以降に上昇したことから、細胞密度に依存して発光誘導を行っていることがわかった(図10)。一方、ASWでは *P. leiognathi*や *V. haveyi*と同様に菌体の上昇は認められず(図9)、発光量もほとんど上昇しなかったことから(図10)、細胞密度依存的に発光誘導を行っていることが明らかとなった。

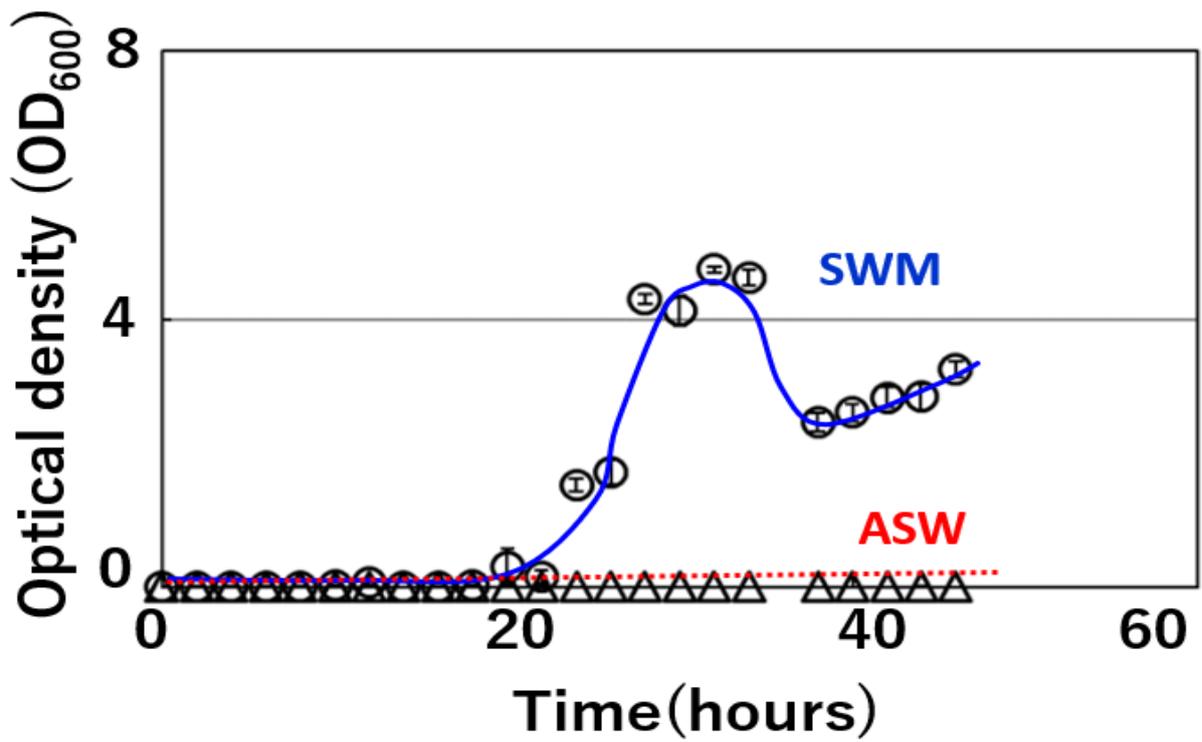


図9 *V. fischeri* の増殖性

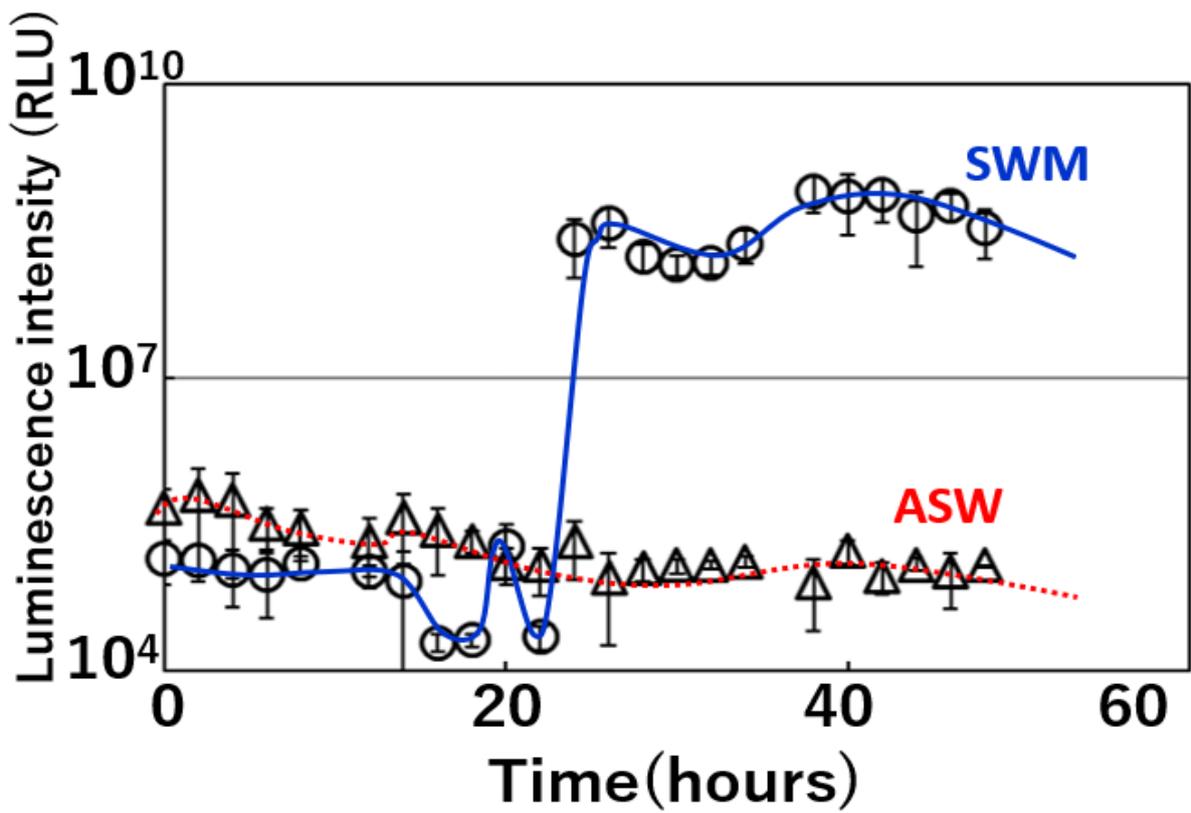


図10 *V. fischeri* の発光性

### 2.3.4 *Aliivibrio fischeri* の増殖と発光性

最後に *A. fischeri* の増殖性と発光性の経時変化を図 11、12 に示す。*A. fischeri* を SWM で培養したところ、時間の経過に伴って菌体量が上昇し、最終的に OD<sub>600</sub> は約 2.0 に達した(図 11)。発光性については、*V. harveyi*(図 8)と同様な傾向が認められた。すなわち、培養 6 h 後までは発光量は減少したが、培養 8 h 以降上昇し、その後高い発光量を維持した(図 12)。この結果から、*A. fischeri* は細胞密度依存的に発光誘導を行っていることが明らかとなった。一方、ASW では発光性について他の 3 菌株と異なる傾向が得られた。増殖性については、他の 3 菌株と同様に菌体の上昇は認められず、OD<sub>600</sub> は 0.001 ~0.006 の間の値を示したが(図 11)、発光性については培養 12 h 後に培養開始時(0 h)と比較して発光量に有意な差が認められた( $p < 0.05$ )(図 12)。他の 3 菌株では、ASW 中において菌体の上昇は認められず、発光量も上昇しなかったのに対し、*A. fischeri* では他の菌株と同様に低い細胞密度であるにも関わらず、発光が有意に上昇したことから、ASW を構成する無機塩類が発光誘導機構に作用したことが示唆された。以上の結果から、*A. fischeri* は autoinducer を介した細胞密度依存的な発光誘導機構の他に、細胞密度に依らない誘導機構を有することが明らかとなった。

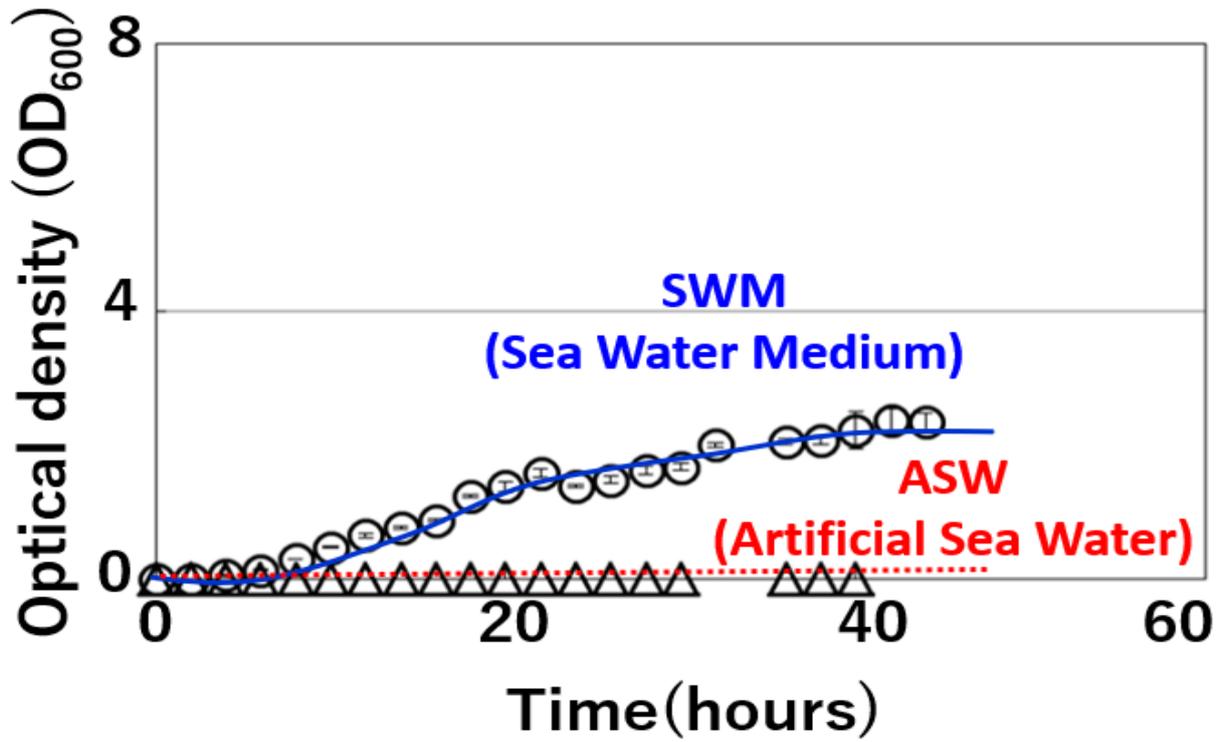


図 11 *A. fisheri* の増殖性

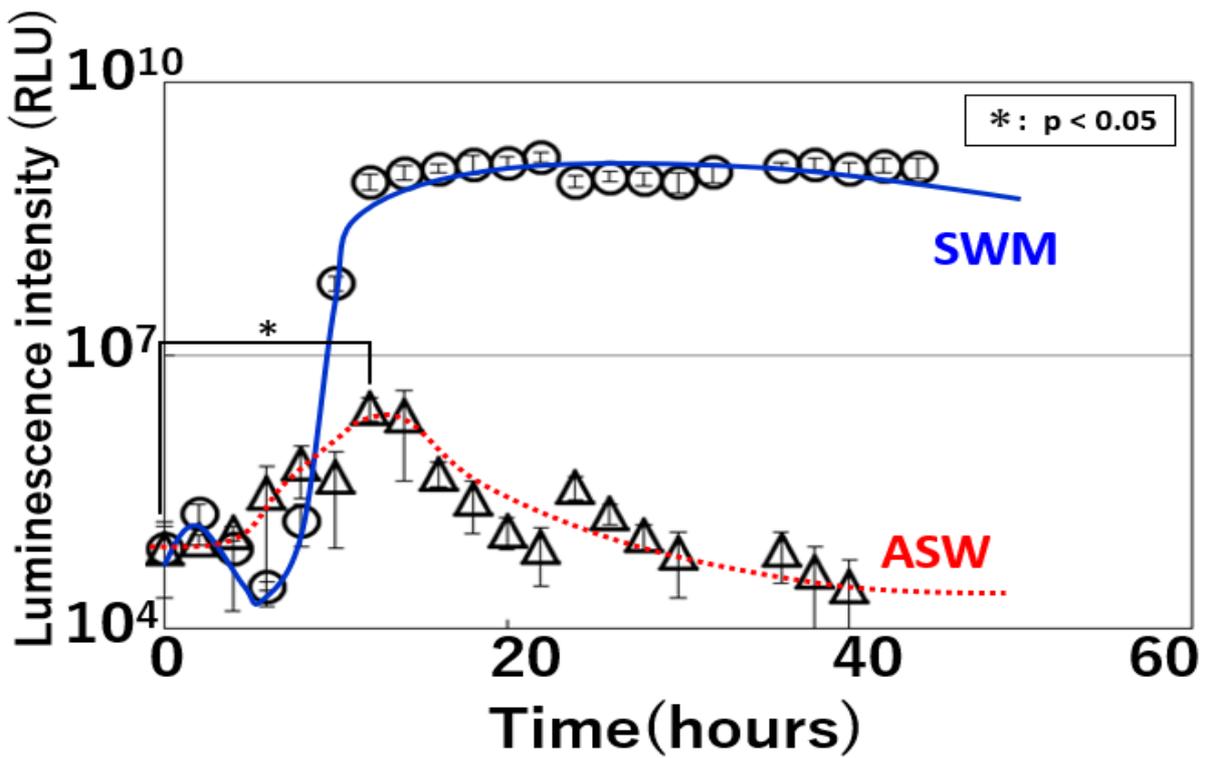


図 12 *A. fisheri* ATCC 7744 の発光性

## 2.4 考察

これまでの実験結果から、*A. fischeri* は細胞密度非依存的に発光量が上昇することが明らかとなった(図 12)。

本研究で使用した海洋性発光細菌類は、全て *Vibrio* 科に分類される。澤辺は *recA* (DNA 修復)や *rpoA* (タンパク質合成)、*ftsZ* (細胞分裂装置)、*mreB* (アクチン様細胞骨格)などの遺伝子を用いて、微生物の分類や同定に用いられる多遺伝子座塩基配列解析 (MLSA) とスプリット分解解析 (SDA)によって *Vibrio* の進化の系譜を試みた<sup>11)</sup>。その結果、本研究で使用した *Photobacterium*、*fischeri*、*harveyi*の間には有意な相同組換えがあり、進化の過程で生態や遺伝的に差が生じた可能性を示した<sup>11)</sup>。また、Urbanczyk らは 16SrRNA の遺伝子配列を用いて、*Aliivibrio* 属と *Vibrio* 属 (*V. harveyi*)および *Photobacterium* 属の塩基配列の相同性について比較したところ、*Aliivibrio* 属は他の2つと相同性に差があることを明らかにした<sup>52)</sup>。またこれら3つの属の間には、インドール産生やアルギニンジヒドロラーゼ活性、ゼラチナーゼ活性などの生化学的試験の結果にも違いがあった<sup>52)</sup>。さらに、*A. fischeri*と *V. harveyi*では発光を誘導するシグナル分子である autoinducer や発光遺伝子である *lux operon* に違いがあることが知られている<sup>10), 15), 53)-56)</sup>。また本結果で、同じ *Vibrio*(*Aliivibrio*) *fischeri*に分類され、ATCC 番号の異なる細菌間で発光誘導機構に差が認められた(図 10、12)。今回、細胞密度非依存的な発光が認められた ATCC 7744 株は、490 nm 付近に吸収極大を示す青緑色の光を発するのに対し、細胞密度非依存的な発光が認められなかった ATCC 33715 株は 540 nm 付近に吸収極大を示す黄色の光を発することが知られている<sup>57), 58)</sup>。そしてこの発光色の違いは、ルシフェラーゼと反応する蛍光タンパク質の違いであると考えられている<sup>57), 58)</sup>。本研究で使用した海洋性発光細菌類間で、ASW で培養したときに発光挙動に差が生じたのは、種や属が異なることによって遺伝子レベルで差が生まれ、これが細菌間に生理的および生化学的な違いを及ぼし、発光の誘導機構にも寄与した可能性が考えられる。また、同じ種でも発光に利用されるタンパク質が異なることで発光誘導機構に差が生まれたと推察される。

さらに、今回使用した菌株は生息場所にも違いがある。いずれの細菌も海水中で自由

生活する共通点はあるが、*haveyi*は海産生物の腸管内に他の種の細菌類とともに生息していることが知られ<sup>59)</sup>、塩性沼沢底泥にも分布するといわれる<sup>11)</sup>。*Photobacterium*はヒイラギ科、ホタルジャコ科およびテンジクダイ科の魚類の発光器内に生息し<sup>60)</sup>、*fischeri*はさまざまな魚やイカの発光器内に純粋培養されている<sup>59)</sup>。*P. leiognathi*はヒイラギ科魚類とホタルジャコ科およびテンジクダイ科魚類の一部に共生することを前述したが、ヒイラギ科魚類に共生する*P. leiognathi*とホタルジャコ科およびテンジクダイ科魚類に共生する*P. leiognathi*では、発光反応を触媒するルシフェラーゼをコードする*luxA*の遺伝子配列が異なることが知られている<sup>60),61)</sup>。また、Visickらは、*luxA*遺伝子が欠損した*fischeri*は、宿主であるイカの発光器内に定着できないことを明らかにし、細菌の生理作用が共生関係の維持に寄与することを示した<sup>62)</sup>。発光細菌の生育環境のちがいでいによっても遺伝子レベルで発光様式が異なることが報告されているため、今回使用した海洋性発光細菌類間で発光挙動に差が認められたのは、これらの生育環境の違いも発光現象に寄与しているかもしれない。

## 2.5 結論

海洋性発光細菌類の増殖性と発光性を明らかにするために、ASWとSWMの2つの培地を用いてこれを検討した。その結果、微生物の生育に必要な3つの生育因子（無機塩類、炭素源、窒素源）で構成されたSWMでは、いずれの発光細菌も時間の経過とともに発光量の増大が引き起こされ、細胞密度依存的に発光を誘導することが明らかとなった。また、4種の海洋性発光細菌類を無機塩類のみで構成したASWで培養したところ、菌体の増殖はほとんど認められず、いずれも同様な傾向を示した。一方、発光性については*A. fischeri*とその他の細菌類において異なる傾向が認められた。*P. leiognathi*、*V. harveyi*、*V. fischeri*では、発光量は変化せず、または減少が認められたが、*A. fischeri*では培養12h後に菌体の接種後(0h)と比較して有意に発光量が上昇した。以上の結果から、ASW下における*A. fischeri*の発光性はASWを構成する無機塩類が寄与する可能性が示唆された。また、海洋性発光細菌類間で、生息環境や生理活性、および遺伝子レベルの差が発光誘導機構に違いを及ぼす可能性が示唆された。

## 第3章 発光誘導因子の解明

### 3.1 研究背景と目的

第2章では、ASWを用いて海洋性発光細菌類の増殖性と発光性を明らかにした。その結果、増殖性に関してはいずれの発光細菌も同様な傾向を示し、時間が経過してもほとんど増殖しなかったが、発光性に関しては *A. fischeri* は他の海洋性発光細菌類と異なり、培養12 h後に発光量が有意に上昇した。これは、ASW中の無機塩類が発光誘導に寄与している可能性が示唆された。

これを受けて第3章では、第2章でみられた *A. fischeri* の発光誘導に寄与する因子の解明を行うことを目的とし、ASW中の無機塩類をそれぞれ組み合わせた条件で培養を行った。さらに、発光を誘導する無機塩類中のイオンの影響を検討するため、発光誘導因子を構成するイオンを含むその他の化合物と発光誘導を引き起こす成分を置換して発光性を評価した。

### 3.2 実験方法

#### 3.2.1 供試菌株と培養条件

供試菌株には、2.2節で使用した *A. fischeri* (ATCC 7744)を用いた。2.2節と同様に、培地には Photobacterium broth (Sigma-Aldrich Co.)を用い、全量が100 mlとなるよう調整した。これに *A. fischeri* を1 ml接種し、26 °C、70 rpmで16 h振とう培養した。このときのOD<sub>600</sub>は約2.0であった。培養液700 µlと30%グリセリン溶液700 µlを混合し、-70 °Cで保存したものをグリセロールストックとした。

発光誘導因子の解明を行うために、ASWを構成する5つの無機塩類 (KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>)の数をそれぞれ変化させた培地を全量が100 mlとなるように調製した。これに前述のグリセロールストックを100 µl接種し、26 °C、70 rpmで振とう培養した。また発光誘導に寄与した無機塩類の濃度が発光に与える影響を検討するために、ASW中のKCl濃度を0.0077、0.077、0.77、3.85、7.7、38.5、77 g/lとなるよう調製した全量100 mlの培地に *A. fischeri* を100 µl接種し、26 °C、70 rpmで12 h

振とう培養した。同様に、 $\text{NaHCO}_3$ 濃度を 0.00011、0.0011、0.011、0.11、0.55、1.1 g/l、 $\text{MgSO}_4$ 濃度を 0.0000715、0.000715、0.00715、0.0715、0.715、7.15、35.8、71.5、143、358 g/l になるよう調製し、前述の条件で振とう培養した。

続いて  $\text{K}^+$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ が発光に与える影響を検討するために、ASW 中の  $\text{KCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4$ をこれらのイオンを含む様々な無機化合物と置換し、培養 12 h 後の発光量を測定した。 $\text{KCl}$ の置換物として、 $\text{KBr}$  (0.0123, 0.123, 1.23 g/l)、 $\text{KHCO}_3$ (0.0103, 0.103, 1.03 g/l)、 $\text{KNO}_3$ (0.015, 0.105, 1.05 g/l)の 3 つの無機化合物を選定し、 $\text{NaHCO}_3$ の置換物として、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (0.001, 0.01, 0.1 g/l)と  $\text{KHCO}_3$ (0.0013, 0.013, 0.13 g/l)を用いた。また、 $\text{MgSO}_4$ の置換物として  $\text{CaSO}_4$ (0.02, 0.2, 2 g/l)、 $\text{MnSO}_4$ (0.022, 0.22, 2.2 g/l)、 $\text{FeSO}_4$ (0.0038, 0.038, 0.38 g/l)、 $\text{CuSO}_4$ (0.0023, 0.023, 0.23 g/l)、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (0.21, 2.1, 21 g/l)、 $\text{K}_2\text{SO}_4$ (0.25, 2.5, 25 g/l)の 6 つの無機化合物を用いた。さらに、硫黄源が発光に与える影響を検討するために、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ (0.002, 0.02, 0.2 g/l)、 $\text{K}_2\text{SO}_3$ (0.0024, 0.024, 0.24 g/l)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.18, 1.8, 18 g/l)の 3 つの無機化合物を用いた。これらの濃度は、ASW 中の  $\text{KCl}$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{MgSO}_4$ のモル濃度とおよそ同じになるように設定し、濃度が発光に与える影響を検討するために、添加濃度を 10 倍および 100 倍変化させた。また硫黄源の影響として有機化合物が発光に与える影響を検討するために、含硫アミノ酸であるシステイン(0.001, 0.01, 0.1 g/l)、シスチン(0.001, 0.01, 0.1 g/l)、メチオニン(0.001, 0.01, 0.1 g/l)、セリン(0.001, 0.01, 0.1 g/l)、タウリン(0.001, 0.01, 0.1 g/l)を用いた。これらの培地を全量が 100 ml になるよう調製し、これに *A. fischeri*を 100  $\mu\text{l}$  接種し、26 °C、70 rpm で振とう培養した。

なお、 $\text{NaCl}$ は海洋性発光細菌の生育に必須な成分であり、海洋性発光細菌は真水では生育できないため上述の全ての条件において終濃度が 2.81 %になるように  $\text{NaCl}$ を添加した。また、発光量は 4 つの無機塩類を添加した培養条件を除き、培養 12 h 後の発光量を測定し、コントロールである 2.81 %  $\text{NaCl}$  溶液で培養したときに得られた発光量と t 検定を行い、有意差\* $p < 0.05$  で評価した。4 つの無機塩類を添加した培養条件では、培養 0~12 h の発光量を 2 h おきに測定し、培養直後(0 h)の発光量と各培養時間で得られた発光量と t 検定を行い、同様に有意差\* $p < 0.05$  で示した。

### 3.2.2 菌体量と発光量の測定

2.2 節と同様に、菌体量は Ultrospec 3100 *pro* spectrometer (Amersham Bioscience, Piscataway NJ) を用いて、波長 600 nm における培養懸濁液の光学密度 (Optical Density: OD) を測定することにより評価した。発光量は PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan) を用いて、5 min の積算値で評価した。また、発光量の単位は 2.2 節と同様に RLU (relative light unit) で示した。

## 3.3 実験結果

### 3.3.1 4 つの無機塩類添加時の発光性

第 2 章で *A. fischeri* を ASW で培養したところ、培養 12 h 後に培養直後と比較して発光量に有意な差が認められ(図 12)、このときの菌体量は  $OD_{600}=0.001$  (培養 0 h) から  $0.004$  (培養 12 h) であった。そこで、この発光誘導に寄与する因子を明らかにするために ASW 中の 5 つの無機塩類 (KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>) のうち、4 つの成分を添加した条件で培養した。はじめに、*A. fischeri* を KCl+CaCl<sub>2</sub>+NaHCO<sub>3</sub>+MgSO<sub>4</sub> (MgCl<sub>2</sub> が欠乏) の 4 成分で培養したところ、培養 4 h および 8 h で有意な発光量の上昇が認められ ( $p<0.05$ ) (図 13(d))、このとき菌体の上昇はほとんど認められなかった ( $OD_{600}=0.000$  (0 h)、 $OD_{600}=0.005$  (8 h))。同様に、*A. fischeri* を KCl+MgCl<sub>2</sub>+NaHCO<sub>3</sub>+MgSO<sub>4</sub> (CaCl<sub>2</sub> が欠乏) の 4 成分で培養したところ、培養 4、6、8、12 h で有意な発光量の上昇が認められた ( $p<0.05$ ) (図 13(e))。このとき、いずれの培養時間においても菌体の上昇はほとんど認められなかった (e.g.  $OD_{600}=0.001$  (0 h)、 $OD_{600}=0.003$  (12 h))。このように MgCl<sub>2</sub> や CaCl<sub>2</sub> を欠乏させた条件では発光量は有意に上昇したことから、これらの成分は発光誘導に寄与しないことが明らかとなった。続いて、*A. fischeri* を CaCl<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub>+NaHCO<sub>3</sub>+MgSO<sub>4</sub> (KCl が欠乏) の 4 成分を組み合わせた条件で培養したところ、発光量に有意な差は認められなかった ( $p>0.05$ ) (図 13(f))。同様に、KCl+CaCl<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub>+MgSO<sub>4</sub> (NaHCO<sub>3</sub> が欠乏) および KCl+CaCl<sub>2</sub>+MgCl<sub>2</sub>+NaHCO<sub>3</sub> (MgSO<sub>4</sub> が欠乏) の条件で *A. fischeri* を培養したところ、発光量に有意な差は認められなかった ( $p>0.05$ ) (図 13(b)(c))。発光量は、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、

MgSO<sub>4</sub>がそれぞれ欠乏した条件では上昇しなかったことから、これらの成分が発光誘導に寄与する可能性が示唆された。

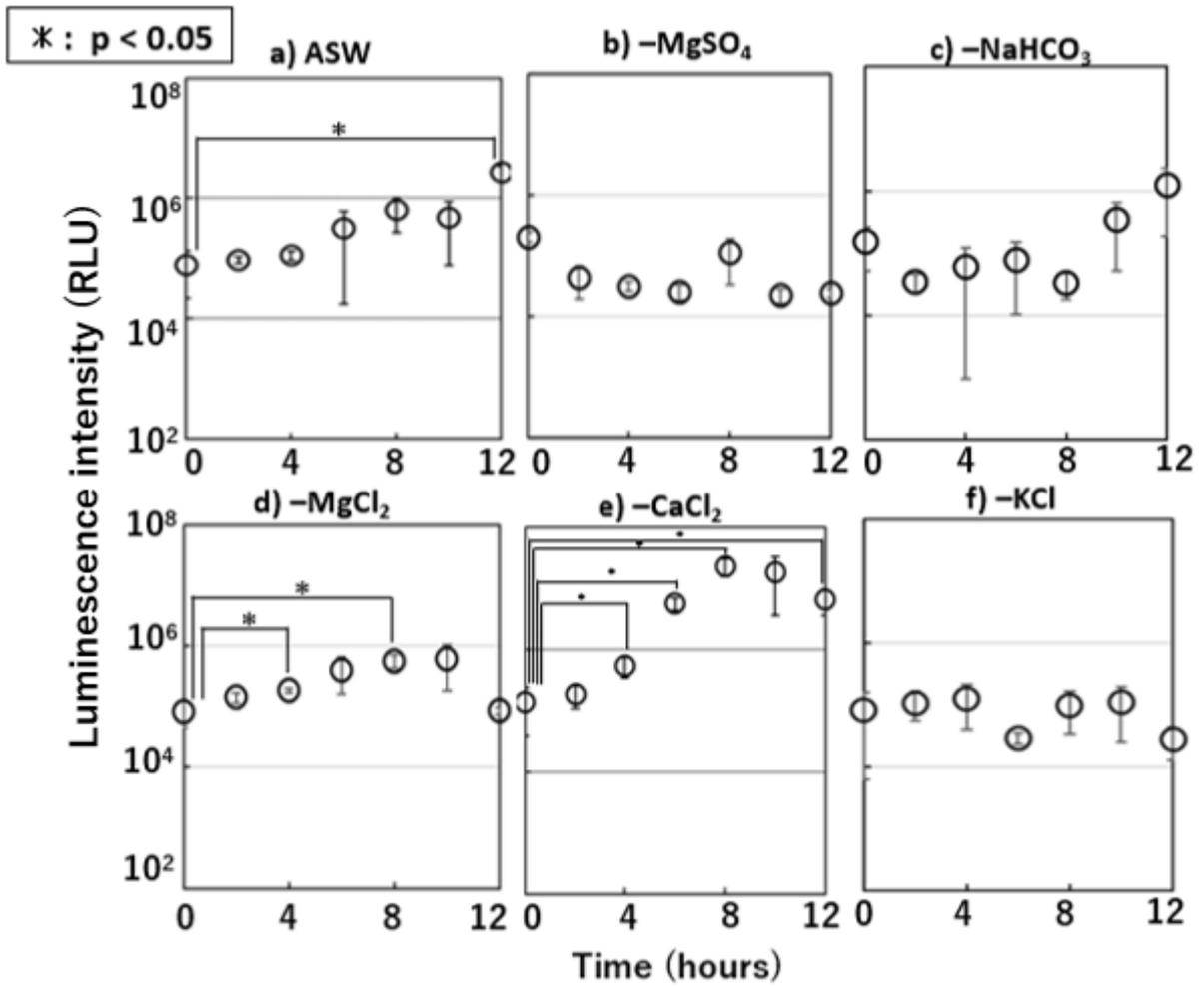


図 13 4つの無機塩類添加時の発光性

### 3.3.2 1つの無機塩類添加時の発光性

前節で KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> の 3 つの成分が発光誘導に寄与する可能性が示唆されたことから、*A. fischeri* を、ASW を構成する各成分に接種し培養した。その結果、KCl(図 14、Lane No. 1)、NaHCO<sub>3</sub>(図 14、Lane No. 4)、MgSO<sub>4</sub>(図 14、Lane No. 5)のみで培養した場合、コントロール(図 14、Lane No. 6)と比較して発光量に有意な差は認められなかった( $p>0.05$ )。この結果から、*A. fischeri* の発光はこれらの成分が単独の条件では誘導されないことが明らかとなった。

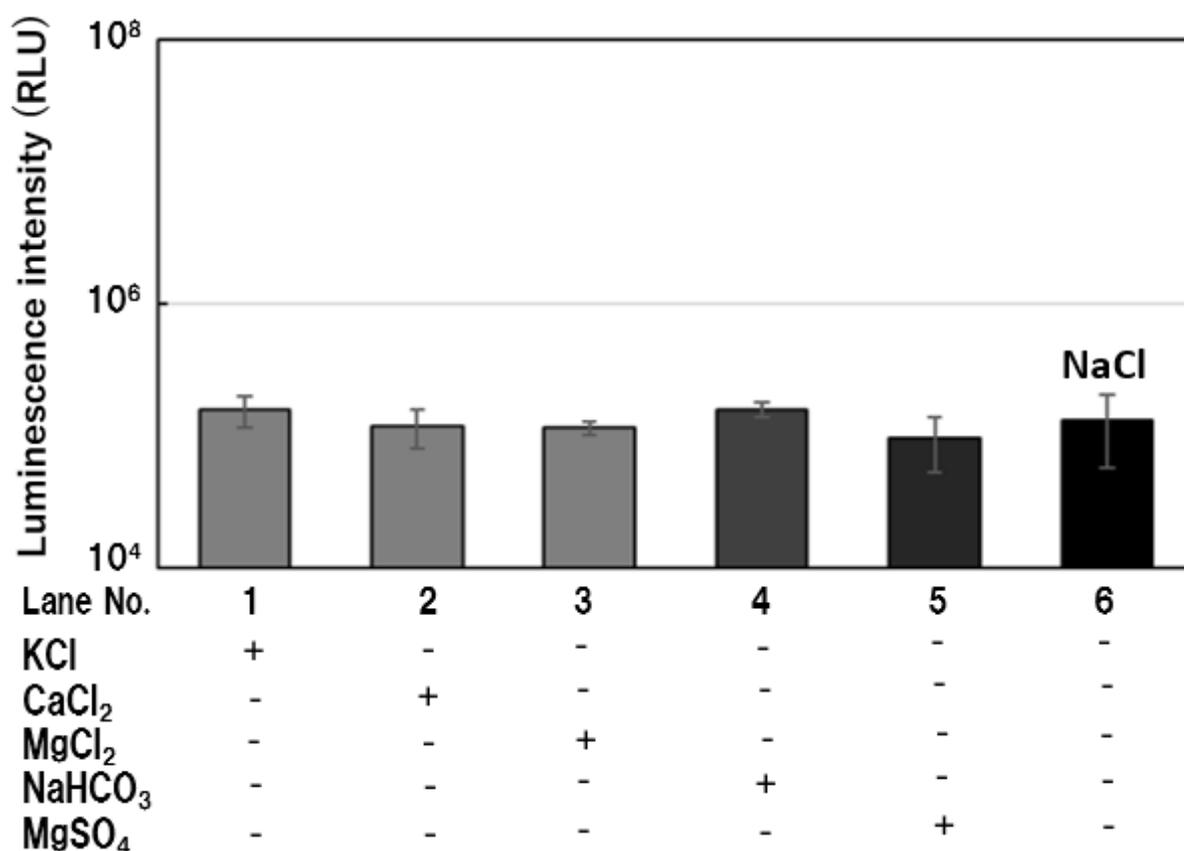


図 14 1つの無機塩類添加時の発光性

### 3.3.3 2つの無機塩類添加時の発光性

前節で、ASW 中の 5 つの無機塩類のうち、それぞれの成分が単独の条件では発光誘導が引き起こされないことが明らかとなった(図 14)。この結果から、発光誘導には ASW 中の無機塩類がいくつか複合する必要があるが示唆された。

そこで、ASW 中の 5 つの無機塩類(KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>)のうち、2 つの成分を組み合わせた条件で培養し、12 h 後の発光量を測定した。その結果、いずれの条件下でもコントロールと発光量に有意な差は認められず ( $p>0.05$ )(図 15)、特に 3.3.1 で発光上昇が認められなかった KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> を組み合わせた条件においても発光量の上昇は認められなかった( $p>0.05$ )(図 15、Lane No. 10, 11, 13)。以上の結果から、発光誘導には 3 つの無機塩類が必要である可能性が示唆された。

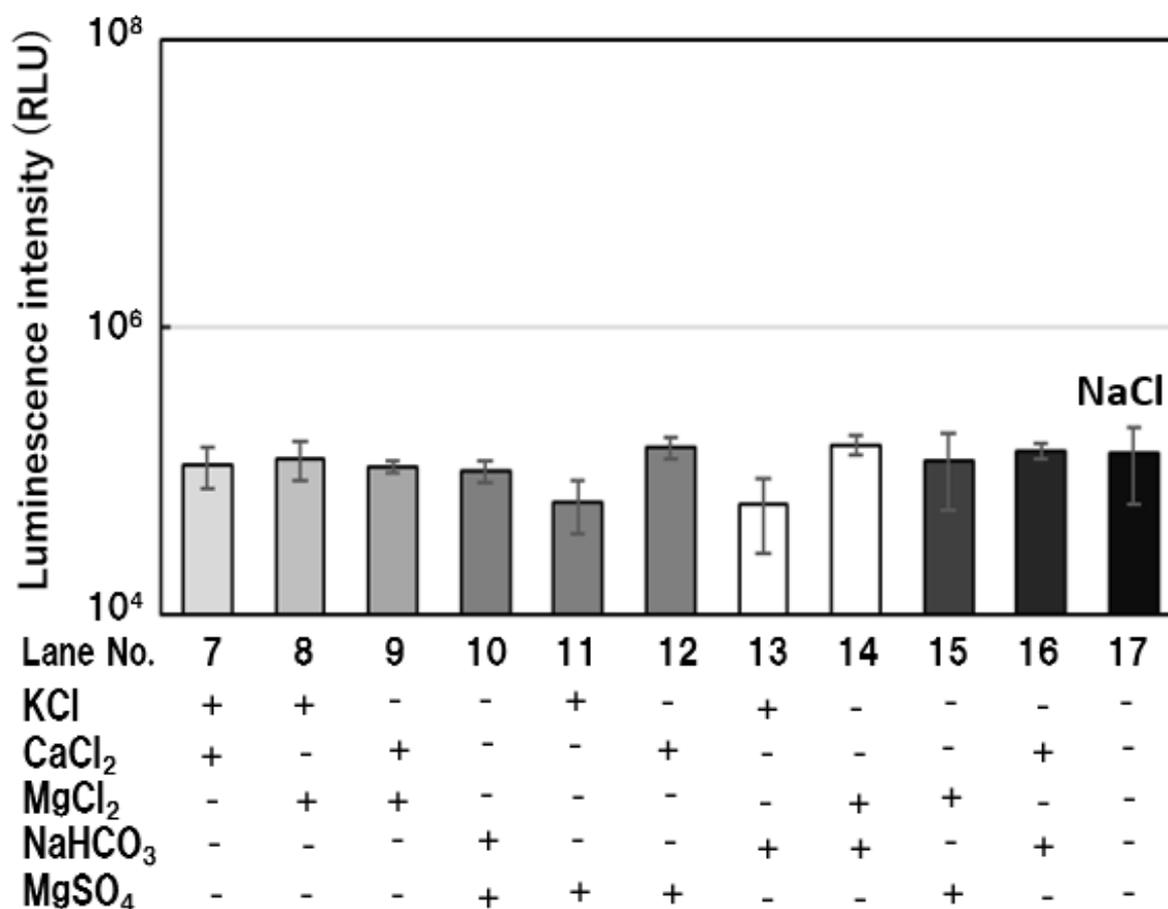


図 15 2つの無機塩類添加時の発光性

### 3.3.4 3つの無機塩類添加時の発光性

前節で ASW 中の無機塩類を 2 つずつ組み合わせた条件で培養しても発光量の上昇が認められなかったことから、発光誘導には 3 つの成分が必要である可能性が示唆された。

そこで、ASW 中の 5 つの無機塩類(KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>)のうち、3 つの成分を組み合わせた条件で培養し 12 h 後の発光量を測定した(図 16)。その結果、KCl+NaHCO<sub>3</sub>+MgSO<sub>4</sub>(図 16、Lane No. 25)の 3 つの成分を組み合わせた条件でコントロールと有意な差が認められた(p<0.05)。このとき、菌体量は培養直後で OD<sub>600</sub>=0.003、培養 12 h で OD<sub>600</sub>=0.004 を示し、この発光量の上昇は細胞密度に対して非依存的であることが明らかとなった。また、その他の成分を組み合わせた条件(図 16、Lane No. 18~24, 26~27)ではコントロールと比較して発光量に有意な差は認められなかった(p>0.05)。以上の結果から、発光誘導には KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>、の 3 成分が全て必要であることがわかり、これらの成分が発光誘導に寄与することが明らかとなった。

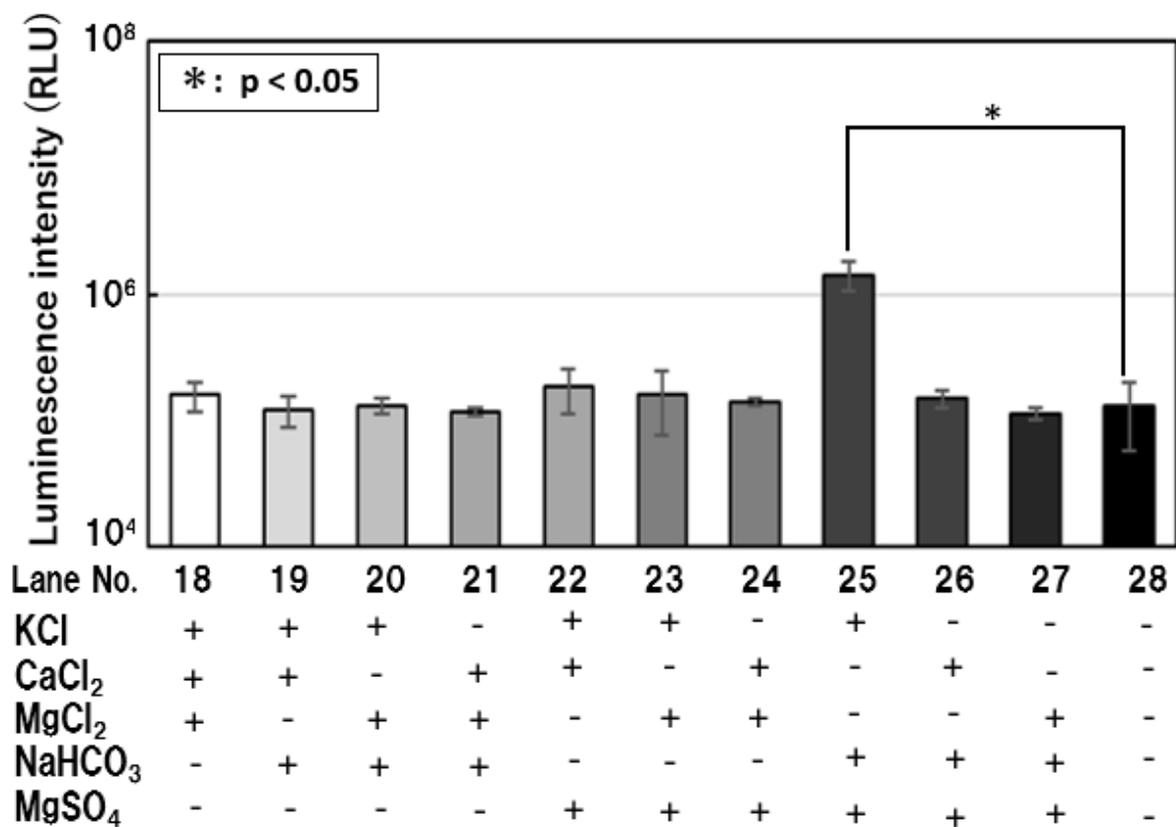


図 16 3つの無機塩類添加時の発光性

### 3.3.5 KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>の濃度変化と発光性

前節において発光誘導には KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> の 3 つの成分が全て必要であることが示された。そこで、これらの濃度変化と発光の相関性について検討した。その結果、KCl は 0.0077 g/l ~ 7.7 g/l の範囲で濃度依存的に発光量が上昇した(図 17)。NaHCO<sub>3</sub> では 0.00011 g/l ~ 0.0011 g/l の範囲で発光量が上昇し(図 18)、MgSO<sub>4</sub> は 0.0000715 g/l ~ 35.8 g/l にかけてゆるやかに発光量が上昇した(図 19)。いずれの成分も添加濃度が上昇すると発光量の上昇が認められたことから、細胞密度非依存的な発光上昇は無機塩類の濃度に依存することがわかった。

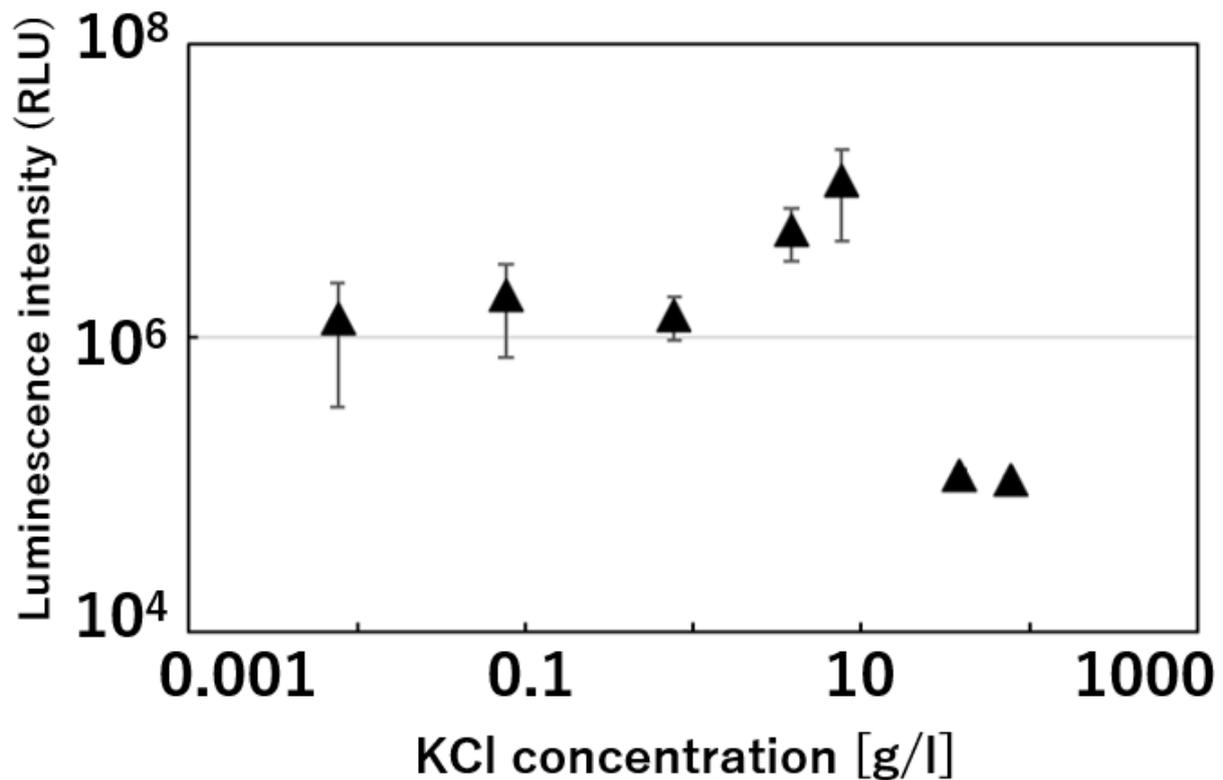


図 17 KCl の濃度変化と発光性

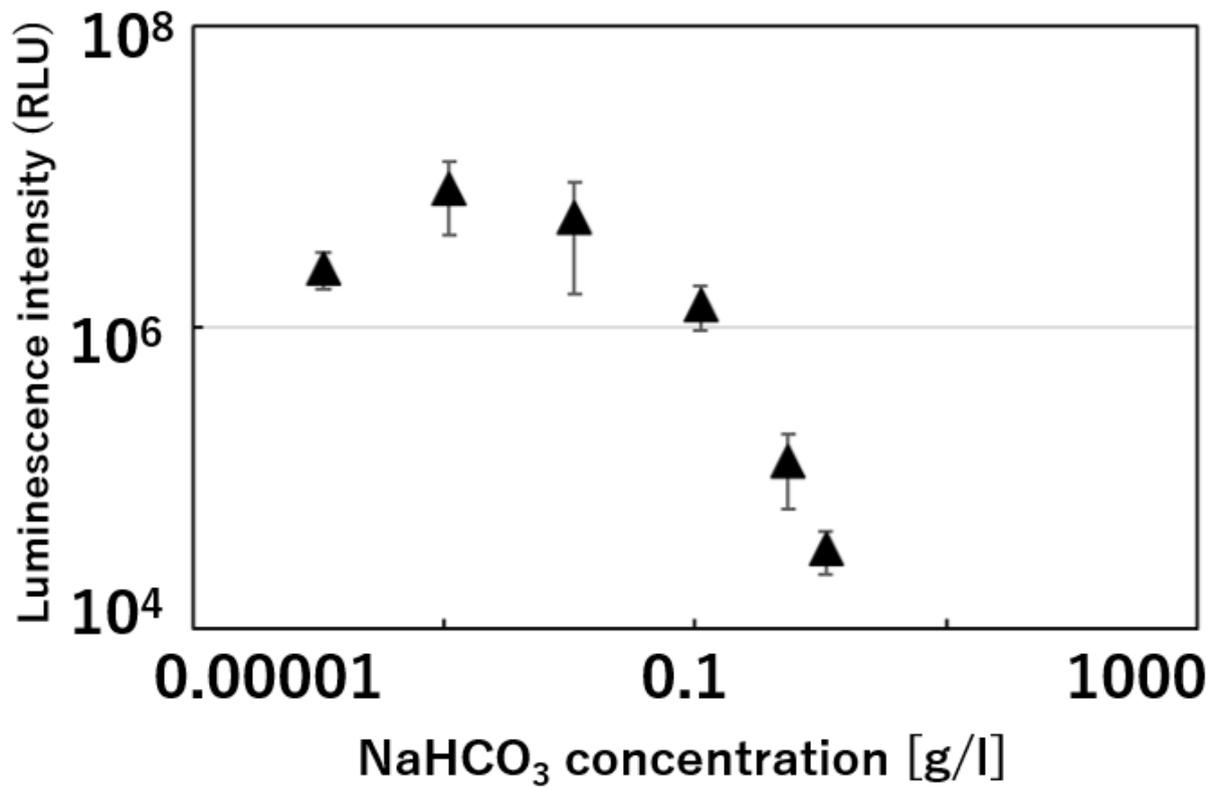


図 18 NaHCO<sub>3</sub>の濃度変化と発光性

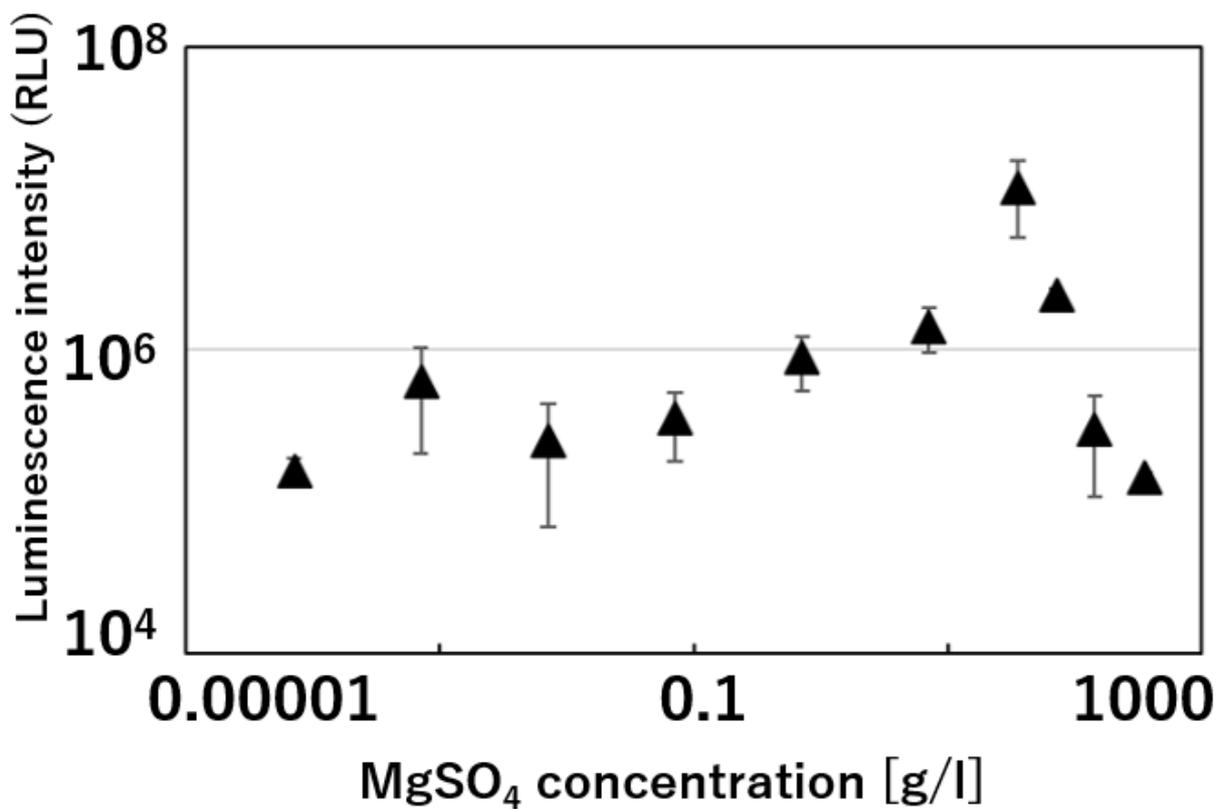


図 19 MgSO<sub>4</sub>の濃度変化と発光性

### 3.3.6 K<sup>+</sup>が発光に与える影響

3.3.4 節で人工海水中の発光誘導では KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> の 3 成分を必須とすることが明らかとなった。そこで、これらの成分を構成する陽イオンもしくは陰イオンが発光に与える影響を明らかにするために、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> の 3 成分を K<sup>+</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含むその他の無機化合物に置換し、培養 12 h 後の発光量を測定することでイオンが発光に与える影響を評価した。

はじめに、K<sup>+</sup>が発光に与える影響を検討した(図 20)。K<sup>+</sup>を含む無機化合物として、KBr(0.0123, 0.123, 1.23 g/l)、KHCO<sub>3</sub>(0.0103, 0.103, 1.03 g/l)および KNO<sub>3</sub>(0.0105, 0.105, 1.05 g/l)を選定した。ASW 中の KCl を 1.23 g/l(図 20(a)、Lane No. 31)の KBr と置換したところ、コントロール(図 20(a)、Lane No. 32)と比較して発光量に有意な差が認められた(p<0.05)。同様に、0.0103 g/l(図 20(b)、Lane No. 33)および 1.03 g/l(図 20(b)、Lane No. 35)の KHCO<sub>3</sub>に置換した場合にも有意な発光量の上昇が認められた(p<0.05)。さらに、0.0105 g/l (図 20(c)、Lane No. 37)もしくは 1.05 g/l の KNO<sub>3</sub>(図 20(c)、Lane No. 39)に置換した場合にもコントロール(図 20(c)、Lane No. 40)と有意差が認められた(p<0.05)。有意な発光上昇が認められたいずれの条件でも、菌体量はほとんど変化しなかった。以上の結果から、K<sup>+</sup>は発光誘導に寄与することが明らかとなった。

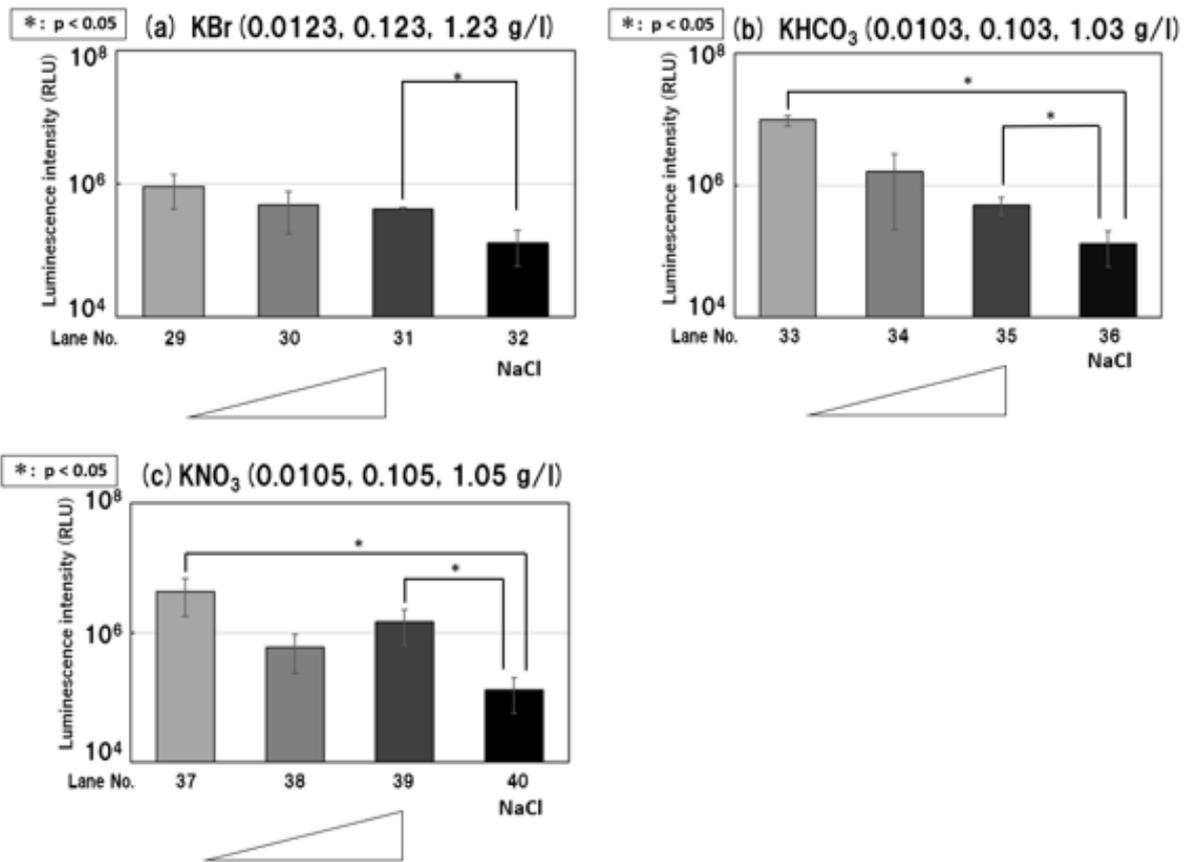


図 20  $\text{K}^+$ を含む無機化合物に置換したときの発光性

### 3.3.7 $\text{HCO}_3^-$ が発光に与える影響

前節で  $\text{K}^+$ が発光誘導に寄与することが明らかとなったことから、続いて  $\text{HCO}_3^-$ が発光誘導に与える影響について検討した(図 21)。  $\text{HCO}_3^-$ が発光誘導に与える影響を検討するために、ASW 中の  $\text{NaHCO}_3$ の置換物として  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0.001, 0.01, 0.1 g/l)と  $\text{KHCO}_3$  (0.0013, 0.013, 0.13 g/l)を選定し、培養 12 h 後の発光量を測定した。その結果、  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (図 21(a)、Lane No. 41~43)もしくは  $\text{KHCO}_3$  (図 21(b)、Lane No. 45~47)のいずれの置換物においても、コントロールと比較して発光量に有意な差が認められた( $p < 0.05$ )。さらに、いずれも菌体量はほとんど変化しなかった。以上の結果より、  $\text{HCO}_3^-$ は発光誘導に寄与することが明らかとなった。

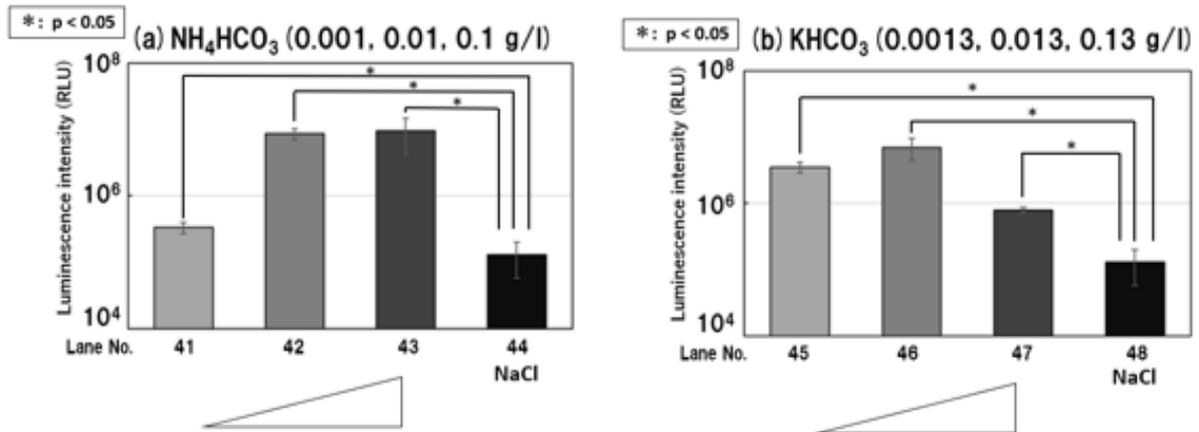


図 21  $\text{HCO}_3^-$ を含む無機化合物に置換したときの発光性

### 3.3.8 $\text{SO}_4^{2-}$ が発光に与える影響

3.3.6 節と 3.3.7 節で発光誘導には  $\text{K}^+$ および  $\text{HCO}_3^-$ が寄与することが明らかとなった。そこで最後に  $\text{SO}_4^{2-}$ の影響を検討した(図 22)。  $\text{SO}_4^{2-}$ が発光誘導に与える影響を検討するために、ASW 中の  $\text{MgSO}_4$ を  $\text{CaSO}_4$  (0.02, 0.2, 2 g/l)、  $\text{MnSO}_4$  (0.022, 0.22, 2.2 g/l)、  $\text{FeSO}_4$  (0.0038, 0.038, 0.38 g/l)、  $\text{CuSO}_4$  (0.0023, 0.023, 0.23 g/l)、  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (0.21, 2.1, 21 g/l)および  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.25, 2.5, 25 g/l)に置換し、培養 12 h 後の発光量を測定した。ASW 中の  $\text{MgSO}_4$ を  $\text{CaSO}_4$ と置換したところ、0.2 g/l の  $\text{CaSO}_4$  (図 22(a)、Lane No. 50)の条件において発光量の上昇が認められた( $p < 0.05$ )。このとき菌体量はほとんど変化しなかった。同様に  $\text{MnSO}_4$  (図 22(b)、Lane No. 53~55)、0.0038 g/l (図 22(c)、Lane No. 57)および 0.038 g/l (図 22(c)、Lane No. 58)の  $\text{FeSO}_4$ 、2.1 g/l (図 22(e)、Lane No. 66)および 21 g/l (図 22(e)、Lane No. 67)の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、さらに 0.25 g/l (図 22(f)、Lane No. 69)および 2.5 g/l  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (図 22(f)、Lane No. 70)を  $\text{MgSO}_4$ と置換した場合に、有意な発光上昇が認められた( $p < 0.05$ )。いずれの条件においても、菌体量はほとんど変化しなかった。一方、 $\text{MgSO}_4$ を  $\text{CuSO}_4$ と置換したとき発光上昇が認められなかった(図 22(d)、Lane No. 61~63)。これは、 $\text{CuSO}_4$ 中の  $\text{Cu}^{2+}$ が発光阻害を引き起こしたことが原因だと考えられる<sup>12)</sup>。しかしながら、 $\text{CuSO}_4$ 以外の無機化合物ではいずれも発光誘導が認められたことから、 $\text{SO}_4^{2-}$ は発光誘導に寄与することがわかった。

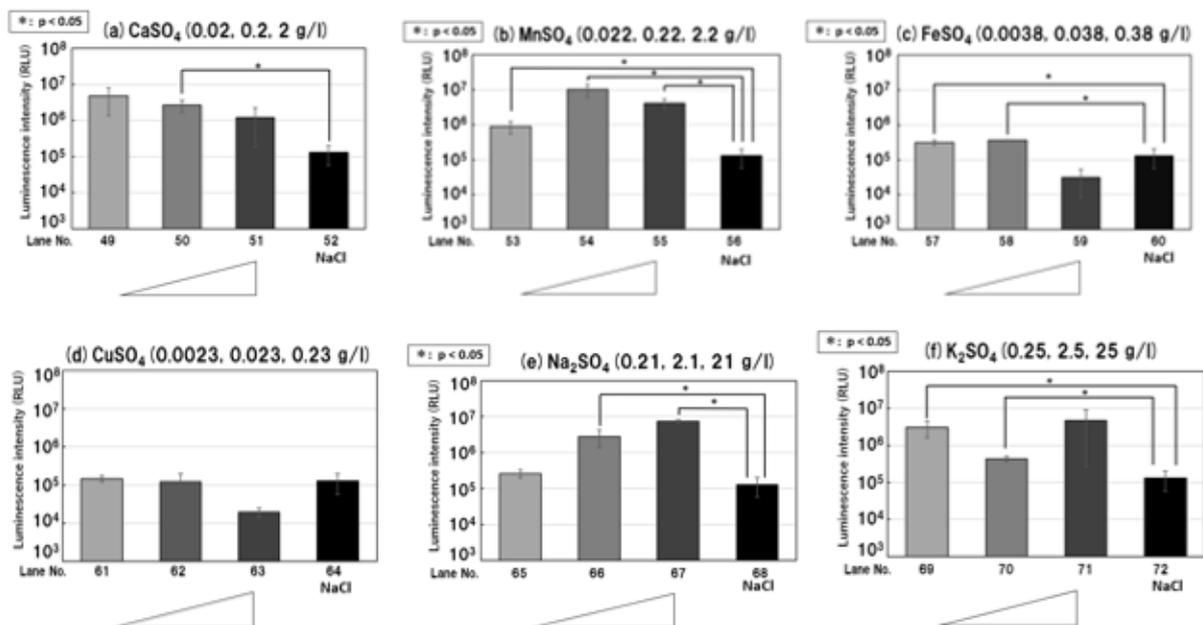


図 22 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む無機化合物に置換したときの発光性

### 3.3.9 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>および S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>が発光に与える影響

これまで K<sup>+</sup>や HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が発光に与える影響については過去にいくつかの知見<sup>63)66)</sup>があるが、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>と発光の相関性に関する知見はほとんどない。しかしながら、前節で ASW 中の MgSO<sub>4</sub>の代わりに SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を含む無機化合物を置換したとき有意な発光上昇が認められたことから、硫黄は発光に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで、硫黄源と発光誘導の相関性をより深く検討するために、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>と S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>を含む無機化合物を MgSO<sub>4</sub> と置換し、発光への影響を評価した(図 23)。SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>を含む無機化合物として、Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0.002, 0.02, 0.2 g/l)、K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (0.0024, 0.024, 0.24 g/l)を選定した。また、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>を含む無機化合物として Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0.18, 1.8, 18 g/l)を選定した。ASW 中の MgSO<sub>4</sub>を 0.2 g/l(図 23(a)、Lane No. 75)の Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>に置換したとき、コントロール(図 23、Lane No. 76)と有意な差が認められた(p<0.05)。同様に MgSO<sub>4</sub>を 0.024 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(図 23(b)、Lane No. 78)および 0.24 g/l K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>(図 23(b)、Lane No. 79)に置換した場合に、コントロールと有意な差が認められた(p<0.05)。Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> もしくは K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> のいずれの条件でも、菌体量に大きな変化はなかった。以上の結果より、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>は発光誘導に寄与することが明らかとなった。さらに、0.18 g/l (図 23(c)、Lane No. 81)および 18 g/l (図 23(c)、Lane No. 83)

の  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  を  $\text{MgSO}_4$  と置換したとき、発光量が上昇し( $p < 0.05$ )、菌体量はほとんど上昇しなかった。以上の結果より、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  も発光誘導に寄与することが明らかとなった。図 23 より、 $\text{SO}_4^{2-}$  を含む無機化合物だけではなく、 $\text{SO}_3^{2-}$  および  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  を含む無機化合物においても発光上昇が認められたことから、硫黄源が発光誘導に寄与する可能性が示唆された。

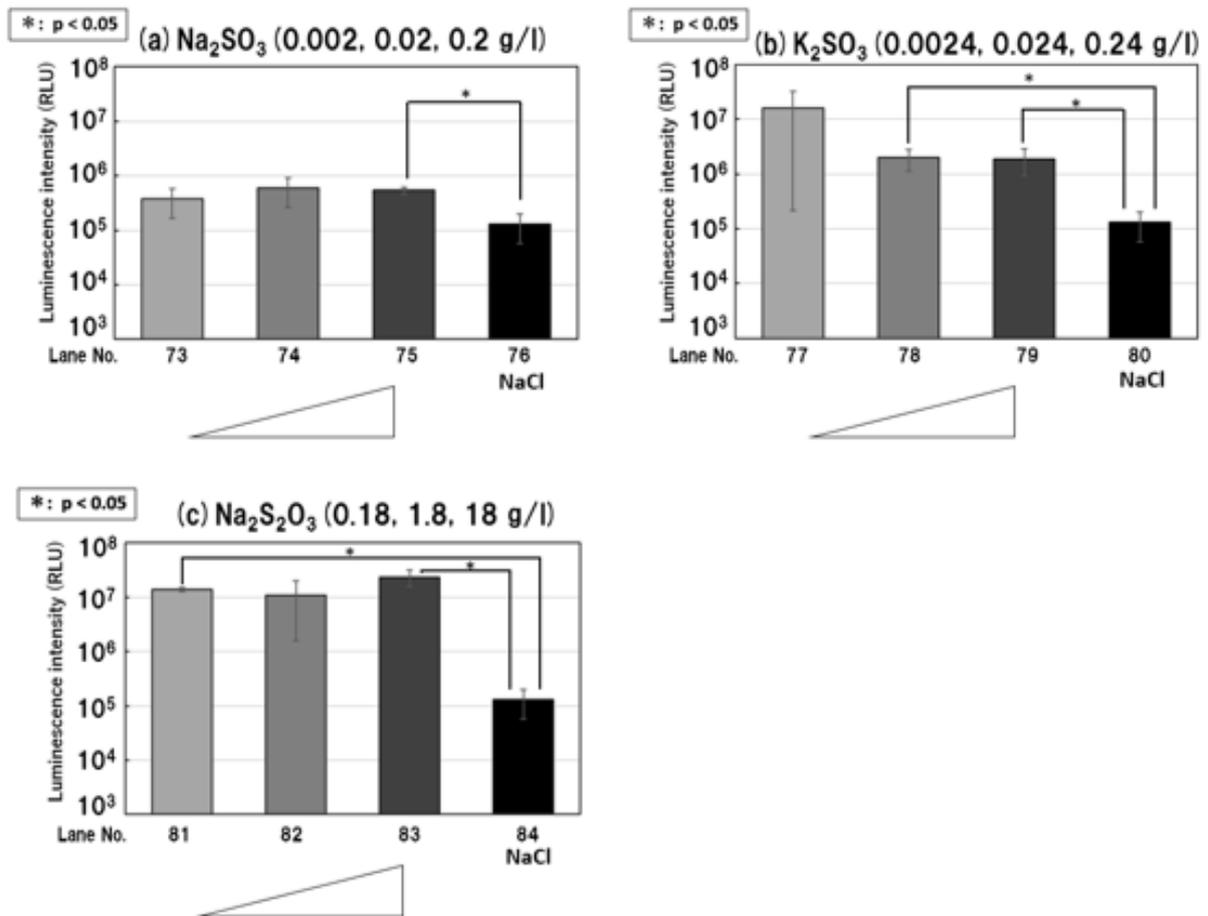


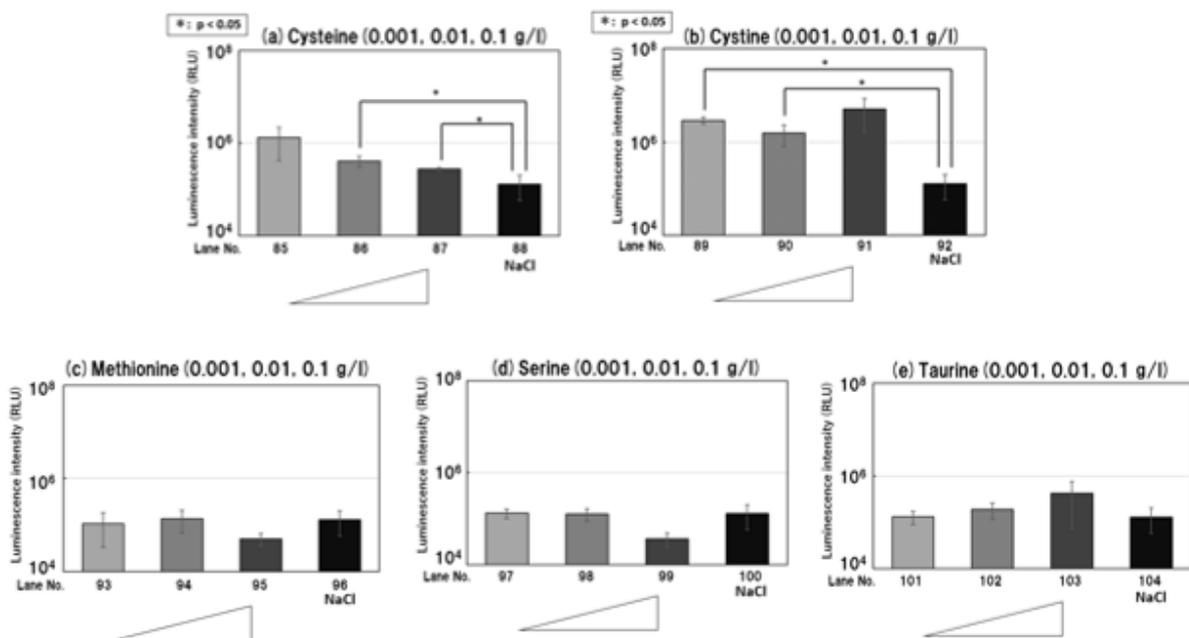
図 23  $\text{SO}_3^{2-}$  および  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  を含む無機化合物に置換したときの発光性

### 3.3.10 含硫アミノ酸が発光に与える影響

3.3.8 節および 3.3.9 節で含硫無機化合物が発光誘導に寄与することが明らかとなった (図 22、23)。そこで、硫黄源が発光に与える影響をさらに検討するため、硫黄を含む有機化合物に着目した。含硫有機化合物として、システイン、シスチン、メチオニン、セリン、タウリンの 5 つの含硫アミノ酸を選定し、これらを  $\text{MgSO}_4$  の代わりに ASW 中へ添加し、培養 12 h 後の発光量を測定した (図 24)。その結果、 $\text{MgSO}_4$  を 0.01 g/l (図 24(a)、

Lane No. 86)および0.1 g/l (図 24(a)、Lane No. 87)のシステインと0.001 g/l (図 24(b)、Lane No. 89)および0.01 g/l (図 24(b)、Lane No. 90)のシスチンと置換した場合に有意な発光量の上昇が認められた( $p < 0.05$ )。このとき、菌体量はほとんど変化しなかった。一方、メチオニン (図 24(c))、セリン (図 24(d))、タウリン (図 24(e))とASW中の $MgSO_4$ を置換した場合は、発光量の上昇が認められなかった( $p > 0.05$ )。

3.3.8節および3.3.9節で $SO_4^{2-}$ や $SO_3^{2-}$ を含むさまざまな無機化合物に置換したときに発光の上昇が起こった(図 22、23)。さらに本節でシステインやシスチンを添加したときに発光量の上昇が引き起こされることが明らかとなった (図 24(a)(b))。微生物はシステインを生合成する過程で $SO_4^{2-}$ や $SO_3^{2-}$ を利用することが一般的に知られていることから<sup>67)</sup>、硫黄を利用した発光誘導は $SO_4^{2-}$ を代謝する過程で発光に寄与している可能性が示唆



された。これまでの実験結果より、発光誘導には硫黄源が必要であることがわかった。

図 24 含硫アミノ酸に置換したときの発光性

### 3.4 考察

本章において、*A. fischeri*はNaCl溶液に $K^+$ 、 $SO_4^{2-}$ 、 $HCO_3^-$ の3つの成分を添加したときに発光量が上昇することが明らかとなった。これまでいくつかの論文が $K^+$ や $HCO_3^-$ が発光細菌の発光に与える影響について報告している<sup>63)-66)</sup>。はじめに $K^+$ が発光に与える影響について、渡辺らは細胞内の $K^+$ の増加が発光量の上昇に寄与することを明らかにし、これは細胞内の $K^+$ が染色体の立体配座を変化させ、細菌のDNA複製に寄与するDNA gyraseに作用することで、発光反応に必要なアルデヒドの生合成を含むlux遺伝子の転写に寄与し、発光量の上昇につながることを示唆した<sup>63)</sup>。同様に、Berglindらも $K^+$ が発光細菌の発光を増強することを示し、発光反応(式1)に寄与するNADHやATPの産生は $Na^+$ と $K^+$ の輸送システムに依存することを述べた<sup>64)</sup>。さらに、海洋に生息する細菌類は呼吸鎖として $Na^+$ ポンプを利用し<sup>68)-72)</sup>、 $Na^+$ は $K^+$ とともにNADHを酸化する酵素であるNADH oxidaseを活性化することが報告されている<sup>65)</sup>。実際、海洋性発光細菌*V. harveyi*の発光系は呼吸鎖とカップルして起こることが知られている<sup>38)</sup>。このように $K^+$ は発光反応に必要なアルデヒド合成や $Na^+$ とともに呼吸の過程でNADHの酸化に寄与したと考えられる。続いて、 $HCO_3^-$ が発光に与える影響について、Nelsonらは生合成の過程で $HCO_3^-$ を利用するアルギニン<sup>73), 74)</sup>が海洋性発光細菌の発光を刺激するとともに、発光反応を触媒する酵素であるルシフェラーゼの生合成に寄与する可能性を示した<sup>66)</sup>。以上をまとめたものを図25に示す。

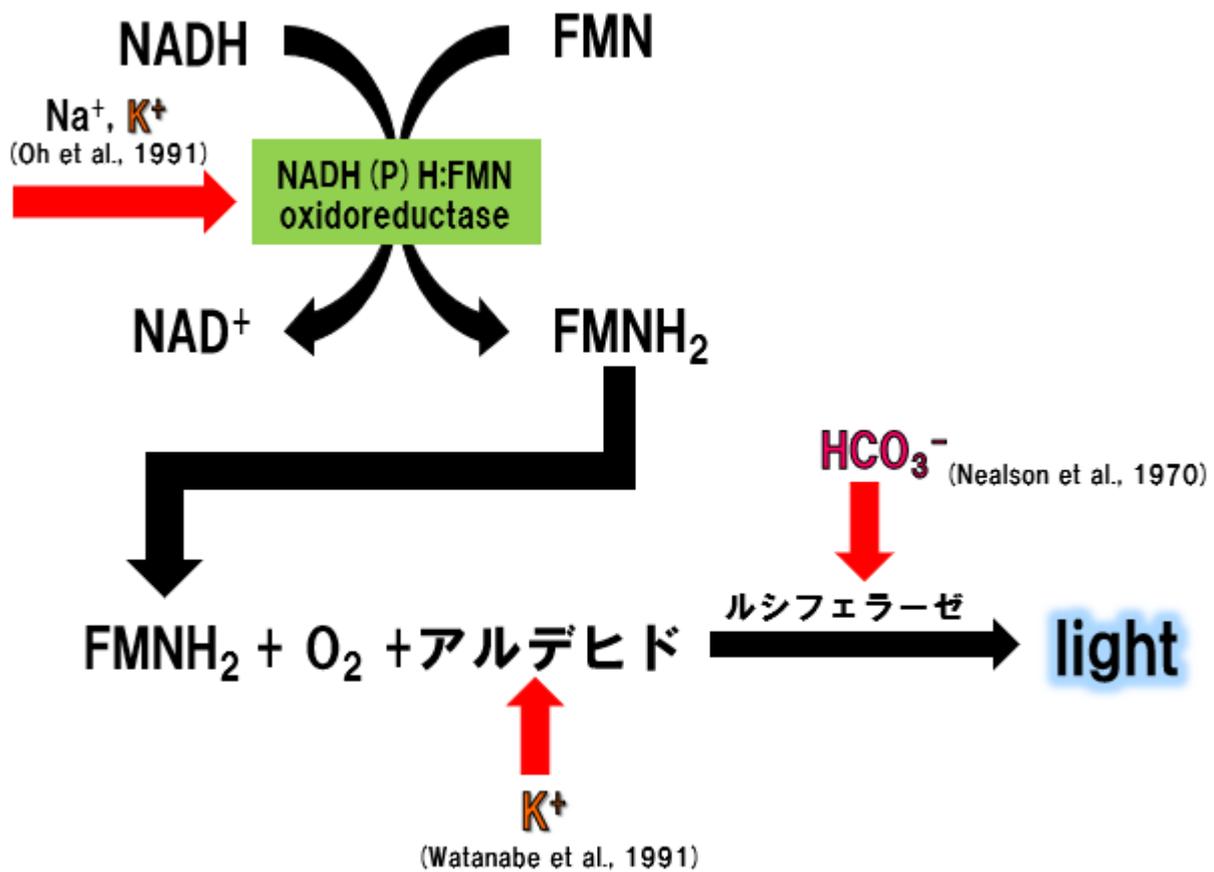


図 25 K<sup>+</sup>および HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>と発光反応との相関性

このように、本実験において K<sup>+</sup>および HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>を添加したときに発光量の上昇が認められたのは、それぞれのイオンが発光反応の各段階に作用したり、刺激を与えたりすることで、発光に必要な因子を生合成が行われ、発光反応が引き起こされたと考えられる。すなわち、それぞれのイオンが発光反応のそれぞれ異なる段階に作用するので、イオンを単独で添加しても発光量の上昇は起こらず、3つのイオンを添加することで発光反応に必要な因子が全て生合成されたために発光量が上昇したと推察した。

一方、硫黄源が発光に寄与する知見は少なく、本研究が明らかにした新たな知見といえる。K<sup>+</sup>や HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>が発光反応に寄与していることから、SO<sub>4</sub>も発光反応に必要な酵素の生合成や反応に寄与していることが考えられる。硫黄は微生物の生育に必要な無機塩類であり、乾燥重量あたり 0.5–1%を占めるといわれる<sup>67)</sup>。また、様々な酵素の補因子や酸化還元反応、鉄–硫黄クラスターの生合成、システインやメチオニンの生合成に利用

される<sup>67)</sup>。さらに、微生物の中には呼吸の際に酸素だけでなく、硝酸や硫酸、二酸化炭素などを電子受容体として利用する種が存在することが知られている<sup>75)</sup>。発光細菌が無機硫黄を用いて呼吸を行うという知見はないが、その他の微生物のように無機硫黄を酸素のように呼吸で利用できるかと仮定すると、無機硫黄は NADH の酸化と同時に起こる FMN の還元反応に寄与するか、これらの酵素の生合成に寄与することで、それに続く発光反応に寄与していると考えた。また、通常、好気条件下では酸素によって非酵素的に FMNH<sub>2</sub> が酸化されることが知られているが<sup>14)</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> が酸素に代わる電子受容体として FMNH<sub>2</sub> を酸化することで、FMN を合成する可能性も考えた。これについて、酸素を過剰に供給した条件下で硫黄源が発光に与える影響を検討したところ、発光性に影響はなかったため、酸素の代わりに硫黄を利用する可能性は低いことがわかった。このように、細胞内へ取り込まれた無機硫黄が、発光反応に必要なタンパク質(e.g. FMNH<sub>2</sub>)や成分の生合成に寄与したり、刺激を与えたりすることで発光量の上昇に寄与していることが推察される。

### 3.5 結論

第 2 章で ASW 中における海洋性発光細菌類の増殖性と発光性について検討したところ、*A. fischeri* は発光量が菌体量に関係なく培養 12 h 後に上昇し、ASW 中の無機塩類が発光量の上昇に寄与している可能性が示唆された。そこで本章では、発光量の上昇に寄与する海水中の成分の解明を行った。その結果、ASW 中の KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> の 3 成分が発光量の上昇に寄与することが明らかとなった。さらに、K<sup>+</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> を含む無機化合物に置換して培養したところ、いずれも有意な発光量の上昇が認められたことから、これらのイオンが発光量の上昇に寄与することが明らかとなった。また、これまで発光との相互関係の報告が少ない硫黄源に着目し、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> および含硫アミノ酸が発光に与える影響について検討したところ、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>、S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> を含む無機化合物でも発光量の上昇が認められ、システインやシスチンなどの含硫アミノ酸でも発光上昇が認められたことから、発光量の上昇には硫黄源が寄与していることが明らかとなった。

## 第4章 海洋性発光細菌のバイオアッセイへの応用

### 4.1 研究背景と目的

第2章、第3章では海洋性発光細菌の発光挙動と発光誘導因子の解明を行った。その結果、発光細菌の発光誘導には ASW 中の無機塩類が寄与する可能性が示唆され、その発光因子は  $K^+$ 、 $HCO_3^-$ 、 $SO_4^{2-}$  の3つのイオンであることがわかった。

この結果を受けて、第4章では発光誘導因子を用いたバイオアッセイへの応用を目的とし、(1) 液体培地で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験、(2) 海洋性発光細菌の基板への固定化の検討と固定化した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験、(3) 発光回復剤としての発光誘導因子の効果、(4) 夾雑物への検討を試みた。

### 4.2 分散系における感受性試験

#### 4.2.1 目的

第1章で述べたように、発光細菌を使用したバイオアッセイは毒性試料を添加していない対照試験区に対して発光量が減少するかどうかで毒性を判断する<sup>12), 13), 18), 37)</sup>。すなわち、発光細菌をバイオアッセイとして利用するためには、測定したい毒性試料に対して高い感受性を示すことが前提となる。そこで、はじめに第2章で使用した微生物の生育因子である無機塩類、炭素源、窒素源の3因子を含む SWM と第3章で明らかにした発光誘導因子( $KCl$ 、 $NaHCO_3$ 、 $MgSO_4$ )で培養した発光細菌が防ばい剤に対して感受性を示すか検討した。

#### 4.2.2 実験方法

##### 4.2.2.1 供試菌株と培養条件

2.2 節と同様に、供試菌株には American Type Culture Collection から入手した *A. fischeri* (ATCC 7744)を用いた。また 2.2 節と同様の方法で調製した Photobacterium broth (Sigma-Aldrich Co.)に供試菌株を 1 ml 接種し、26 °C、70 rpm で 16 h 振とう培養した。この培養液 700  $\mu$ l と 30 %グリセリン溶液 700  $\mu$ l を混合し、-70 °Cで保存した

ものをグリセロールストックとした。

#### 4.2.2.2 富栄養条件で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験

はじめに、発光細菌を使用した従来のバイオアッセイのように十分に発光細菌を増殖させた条件で感受性試験を行うために、4.2.2.1 で調製したグリセロールストックを、2.2 節と同様に全量が 100 ml になるように調整した SWM (SWM composition; 28.1 g/l NaCl, 0.77 g/l KCl, 1.21 g/l CaCl<sub>2</sub>, 10.2 g/l MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.11 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 7.15 g/l MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 g/l Beef extract, 10 g/l Bacto peptone) に 100 μl 接種し、26 °C、70 rpm の培養条件で 16 h 振とう培養した。本試験では、毒性試料として防ばい剤であるイマザリル(C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O)とチアベンダゾール(C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S)を選定した。前述の培養液 180 μl と和光純薬工業株式会社から入手したイマザリルおよびチアベンダゾール 20 μl を混合し、5 min および 15 min 放置後、ルミノメーター(TriStar2 LB942, Berthold, Germany)を用いて発光量を測定した。前述したとおり、海洋性発光細菌は真水では生育できないため、防ばい剤を溶解するための溶媒として 3 % NaCl 溶液を選定し、この溶液に濃度が 10 %になるように Tween 80 を加え、防ばい剤を十分に溶解した。ここで、試験に供する防ばい剤の終濃度は 0.1、1、10、100、1000 ppm となるように調製した。またイマザリルに対する感受性試験では、前述の濃度に加えて、イマザリルの終濃度が 20、40、60、80、500 ppm となるよう調製したものでも試験を行った。コントロールは 3 % NaCl を含む 10 % Tween 80 溶液とした。発光率は以下の式(3)により算出した。

$$\text{発光率 (\%)} = \frac{(\text{コントロールの発光量}) - (\text{毒性試料添加時の発光量})}{(\text{コントロールの発光量})} \times 100(\%) \quad \text{---(3)}$$

#### 4.2.2.3 誘導因子で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験

4.2.2.2 とは反対に、菌体量が少なく発光している条件でも防ばい剤に対して感受性を有するか検討するために、培地として 2.81 % NaCl 溶液に第 3 章で明らかとなった発光誘導因子 (0.77 g/l KCl、0.11g/l NaHCO<sub>3</sub>、7.15 g/l MgSO<sub>4</sub>)を加えたものを用いた。これを全量が 100 ml になるよう調製し、4.2.2 節で調製したグリセロールストックを 100 μl 接種し、26 °C、70 rpm の培養条件で 12 h 振とう培養した。なお、本試験では防ばい剤としてオルトフェニルフェノールナトリウム (C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>NaO) とイマザリル (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>C<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O)を使用した。この培養液 900 μl と和光純薬工業株式会社から入手したオルトフェニルフェノールナトリウム 100 μl を混合し、5 min および 15 min 放置後、PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan)を用いて発光量を評価した。同様の方法でイマザリルに対する感受性も試験した。試験で用いたオルトフェニルフェノールナトリウムは、3 % NaCl 溶液に溶解し、終濃度を 0.1、1、10、100、1000 ppm となるように調整した。また、イマザリルは 4.2.2 節と同様の方法で調製した。なお、イマザリルの試験では 4.2.2.2 とは異なり、終濃度を 0.1、1、10、100、1000 ppm に調整したもののみを試験に供した。オルトフェニルフェノールナトリウムに対する試験では 3 % NaCl 溶液をコントロールとし、イマザリルに対する試験では 3 % NaCl を含む 10 % Tween 80 溶液をコントロールとした。結果は式(3)に準じて算出した。

### 4.2.3 実験結果

#### 4.2.3.1 富栄養条件で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験

SWM で十分に培養した *A. fischeri* に、防ばい剤のイマザリルとチアベンダゾールを接触させ発光量を測定した (図 26、27)。発光細菌を用いたマイクロトックス毒性試験法ではサンプルの毒性により減少した発光量を測定し、対象試験区に対して発光強度が 50 % 減少したときの濃度を EC<sub>50</sub>(50 % 影響濃度)としてあらわすことを第 1 章で述べた<sup>17),35)</sup>。また、環境計測分野においてはこの試験法と従来のバイオアッセイで使用される試験間の感度を比較するための知見も蓄積していることを述べた<sup>37)</sup>。化学的な分析では、実験で得られた測定値は一般的に物理量を単位として整理するが、上述の背景から本試

験では、実験結果を発光率(%)であらわし、発光率 50 %を基準として感受性を評価した。すなわち、発光率が 50 %以上になる濃度では感受性が低く、発光率が 50 %以下になったときに感受性が高いと判断した。

はじめに、100 ppm および 1000 ppm のイマザリルを *A. fischeri* に接触させたとき、発光率は 50 %以下となった(図 26(a))。このとき、100 ppm のイマザリルを暴露すると、5 min の接触で発光率は 0.2 %まで減少した (図 26)。この消光現象をさらに濃度を細かく区切って検討したところ、イマザリル濃度が 40 ppm のとき、5 min 接触させると発光率は 49 %となり、15 min 接触させると 28 %であった(図 26(b))。また、イマザリル濃度が 60 ppm のとき、5 min 接触させることで発光率が 5 %まで減少することが明らかとなった (図 26(b))。また、15 min 接触させることで発光率がほぼ 0 %になったことから (図 26(b))、*A. fischeri* はイマザリルを 10 ppm から 60 ppm の範囲で検出できることが示された (図 26)。以上の結果から、*A. fischeri* はイマザリルに対して高い感受性を示すことがわかった。

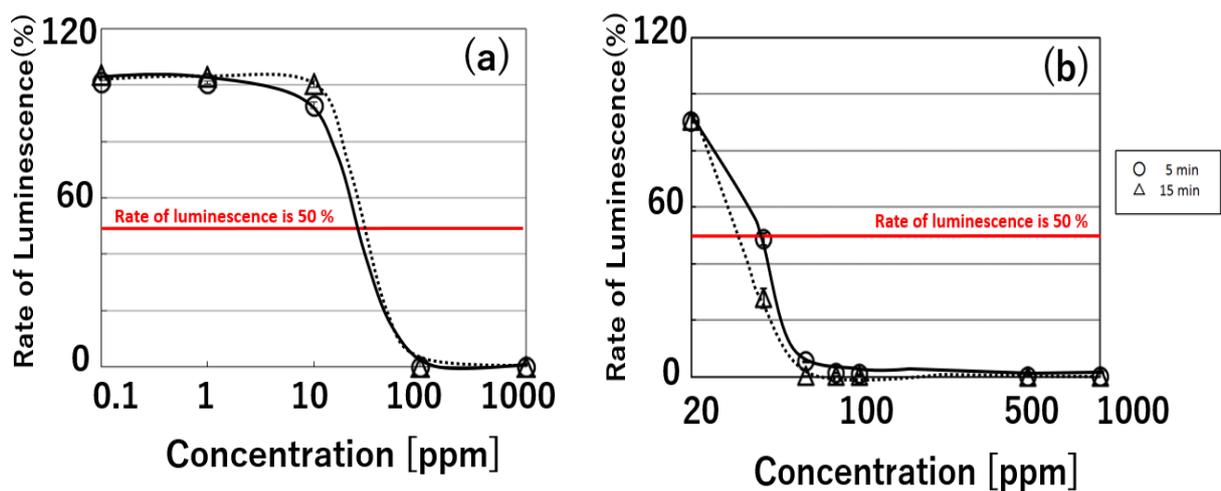


図 26 イマザリルに対する感受性

ここで、本研究では発光細菌を用いた柑橘類に塗布されている防ばい剤の検出を最終的な目的としており、第 1 章で述べたように柑橘類やバナナなどに塗布されている防ばい剤は、厚生労働省によって使用基準値が定められている。そこで、使用基準値の濃度と今回得られた発光性を比較した場合の感受性を評価した。柑橘類に使用できるイマザ

リルの国内基準値は 5 ppm であり、本試験では 10 ppm でも 50 %以上の発光率を示したことから(図 26)、国内基準値をクリアしているかどうかの分析はできないことがわかった。しかしながら、*A. fischeri* はイマザリルに対する高い感受性を示したので、試料中のイマザリルの有無をスクリーニングする手法としては有用であることが示された。

一方、チアベンダゾールを接触させたとき、いずれの濃度においても発光量の減少は認められず、チアベンダゾールに対する感受性は低いことがわかった(図 27)。

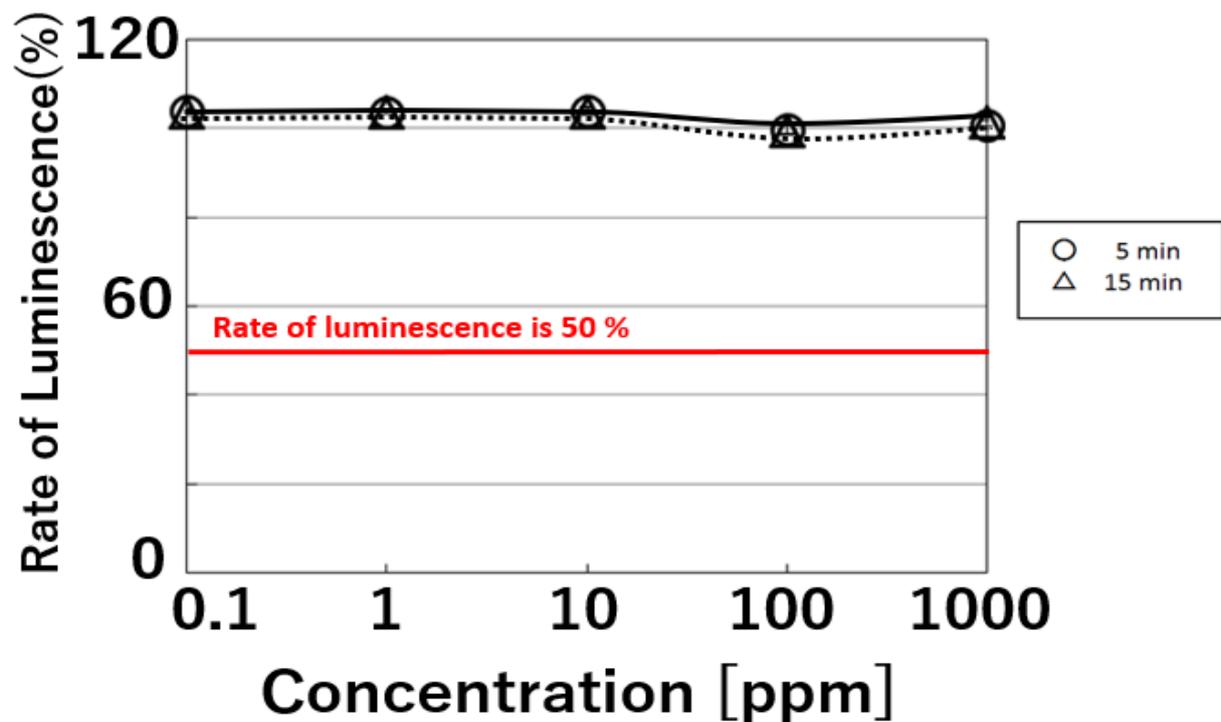


図 27 チアベンダゾールに対する感受性

#### 4.2.3.2 誘導因子で培養した海洋性発光細菌の防ばい剤に対する感受性試験

4.2.3.1 で十分に培養した *A. fischeri* はイマザリルに対して高い感受性を有することが明らかとなった(図 26)。そこで、第 3 章で明らかとなった発光誘導因子(KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>)で培養した発光細菌は防ばい剤に対して感受性を有するか検討した。なお、4.2.3.1 と同様に発光率がコントロールに対して 50 %以上を示す濃度では感受性が低く、50 %以下になったときの濃度を感受性が高いと判断した。

はじめにオルトフェニルフェノールナトリウムと *A. fischeri* を接触させたところ、100 ppm および 1000 ppm で発光率は 50 %以下となったことから、*A. fischeri* は 10 ppm

から 100 ppm の範囲でオルトフェニルフェノールナトリウムを検出することができることがわかった(図 28)。この結果から、海洋性発光細菌はオルトフェニルフェノールナトリウムに対して高い感受性を有することが明らかとなった。

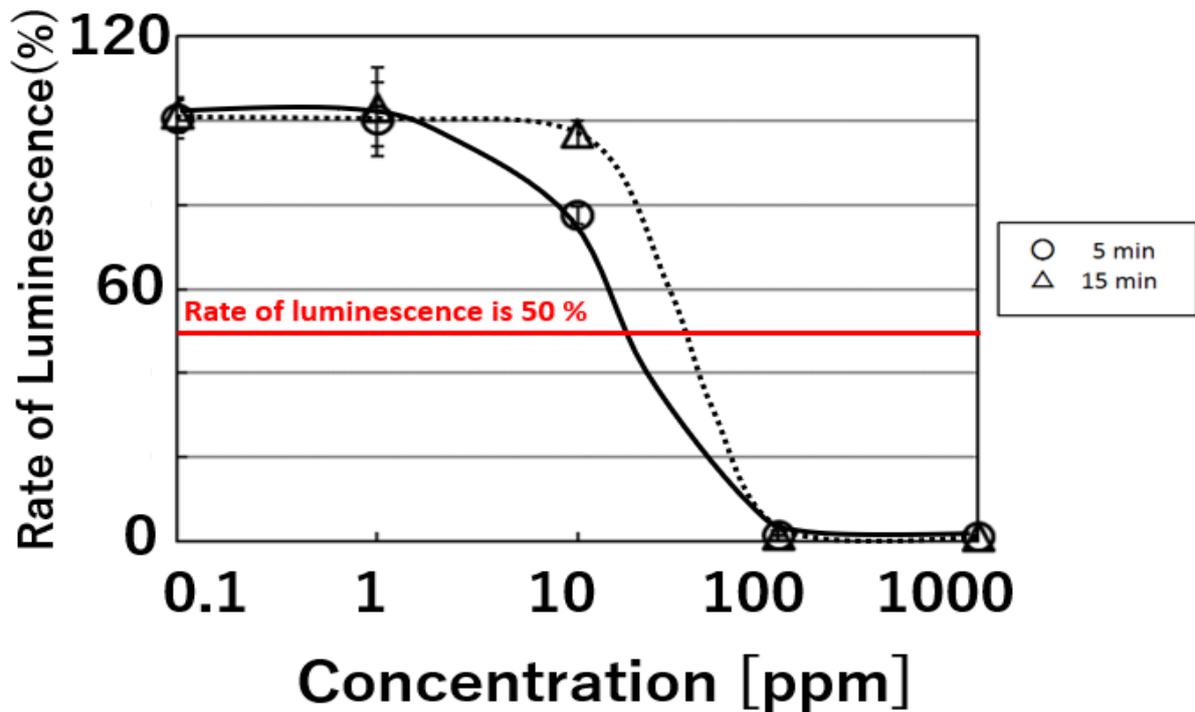


図 28 オルトフェニルフェノールナトリウムに対する感受性

また、オルトフェニルフェノールナトリウムも厚生労働省によって使用基準値が定められていることから、4.2.3.1 と同様に国内基準値と今回の結果を比較した。その結果、オルトフェニルフェノールナトリウムの国内基準値である 10 ppm 以上の濃度で発光率は 50%以下となったことから、国内基準値を考慮したアッセイ法にも利用できることが示唆された。

一方、イマザリルを接触させたときは濃度が 1000 ppm になるまで発光率は 50 % 以上を維持し、10 ppm から 1000 ppm の範囲でイマザリルに対する感受性を有することが明らかとなった(図 29)。

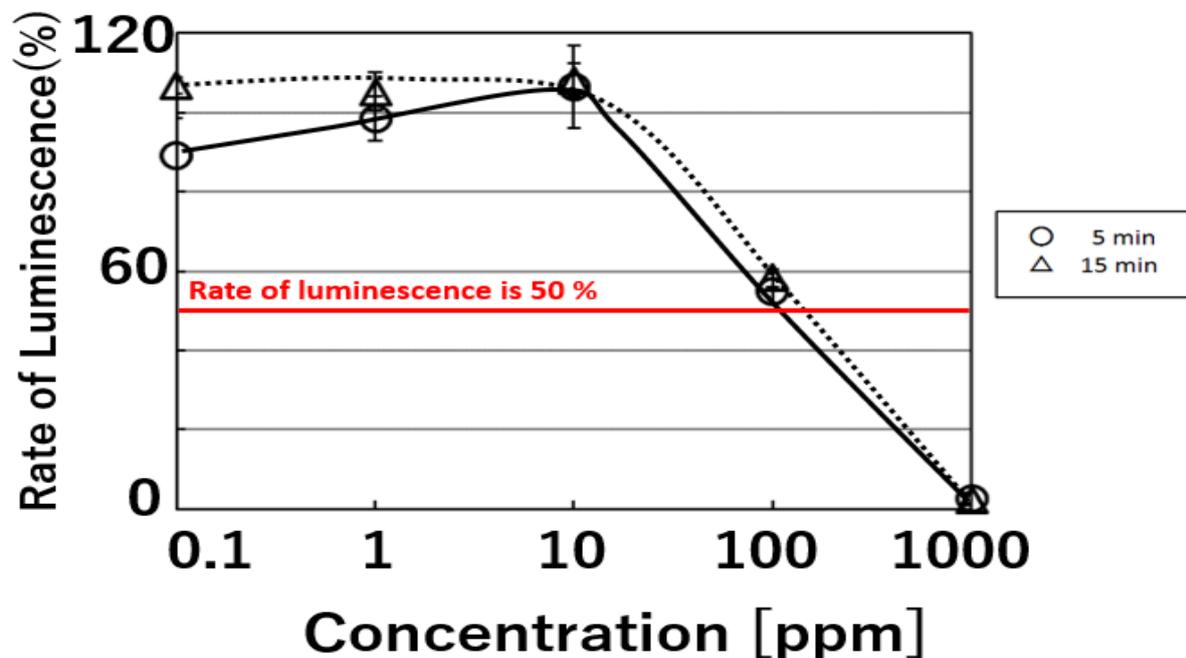


図 29 イマザリルに対する感受性

また、これまでと同様にイマザリルの国内基準値である 5 ppm と今回の結果を比較したところ、10~100 ppm の範囲で発光率は 50 % 以上を示したことから、国内基準値を考慮したアッセイ法としての利用可能性は低いと判断した。一方、*A. fischeri* はイマザリルに対して 10 ppm から 1000 ppm の範囲で感受性を示したので、サンプル中のイマザリルの有無を判別するアッセイ法としての利用可能性が示された(図 29)。以上の結果から、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub> で誘導した発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。

#### 4.2.4 考察

これまでの実験結果より、海洋性発光細菌に防ばい剤を接触させると発光が阻害され消光したことから、発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を有することがわかった。

これまで述べたように、従来、環境計測分野で利用されている発光細菌を使用したバ

イオアッセイは、環境中の重金属やフェノール、シアン化物などと接触することで引き起こされる発光阻害率をもとに毒性を評価している<sup>12), 13), 18), 37)</sup>。これは、発光細菌の発光現象は細胞代謝や呼吸代謝と密接に関係しており、重金属などの毒性物質と接触することで発光反応を触媒するルシフェラーゼの活性が阻害され、発光量の減少が引き起こされる原理を利用したものである<sup>17), 38), 39)</sup>。一方、今回使用した防ばい剤は微生物のエルゴステロール生合成やそれに関連する産生物を阻害することが知られている<sup>76)-78)</sup>。また、Jangらはオルトフェニルフェノールを *Staphylococcus aureus* に暴露させたとき、オルトフェニルフェノールは暴露時間 20 min で多くのアミノ酸生合成を阻害し、リボソームタンパク質の転写をアップレギュレーションすることを明らかにした<sup>79)</sup>。このように、防ばい剤は微生物の代謝を阻害することがいくつかの論文で報告されていることから、本実験で防ばい剤を接触させたときに発光量が減少したのは、発光細菌の代謝が防ばい剤によって阻害されたことが原因だと考えられる。

牧村らは、淡水性と海洋性の発光細菌を用いて有機溶剤に対する感受性試験を行い、測定を開始してから 5 min 経過後に一旦減少した発光量が徐々に回復することを発見し、これは有機溶剤によって発光細菌が死滅するのではなく、一時的に発光が阻害されることが原因であると述べた<sup>80)</sup>。今回は 5 min および 15 min 放置後の発光量しか測定していないため、その発光阻害が一時的なものなのか、菌の死滅によるものなのかわからない。そこで、ルミノメーター(TriStar2 LB942, Berthold, Germany)を用いて SWM で十分に培養した *A. fischeri* に、4.2.2.2 と同様の方法でイマザリルを添加し発光量の変化を経時的に測定した(図 30)。その結果、図 26 で発光率 50 %以上を示した 0.1 ppm ~ 10 ppm のイマザリルと接触させたとき、発光量は接触後 30 min 付近までゆるやかに減少したが、その後徐々に回復することがわかった(図 30)。一方、図 26 で発光率が 50 %以下となった 100 ppm や 1000 ppm では発光量は回復することはなかった(図 30)。以上の結果から、0.1 ~ 10 ppm の範囲では一時的に発光細菌の代謝 (e.g. ルシフェラーゼ活性) が阻害されることで発光量が減少するが、100 ~ 1000 ppm の高濃度では菌体が死滅することで消光した可能性が推察された。

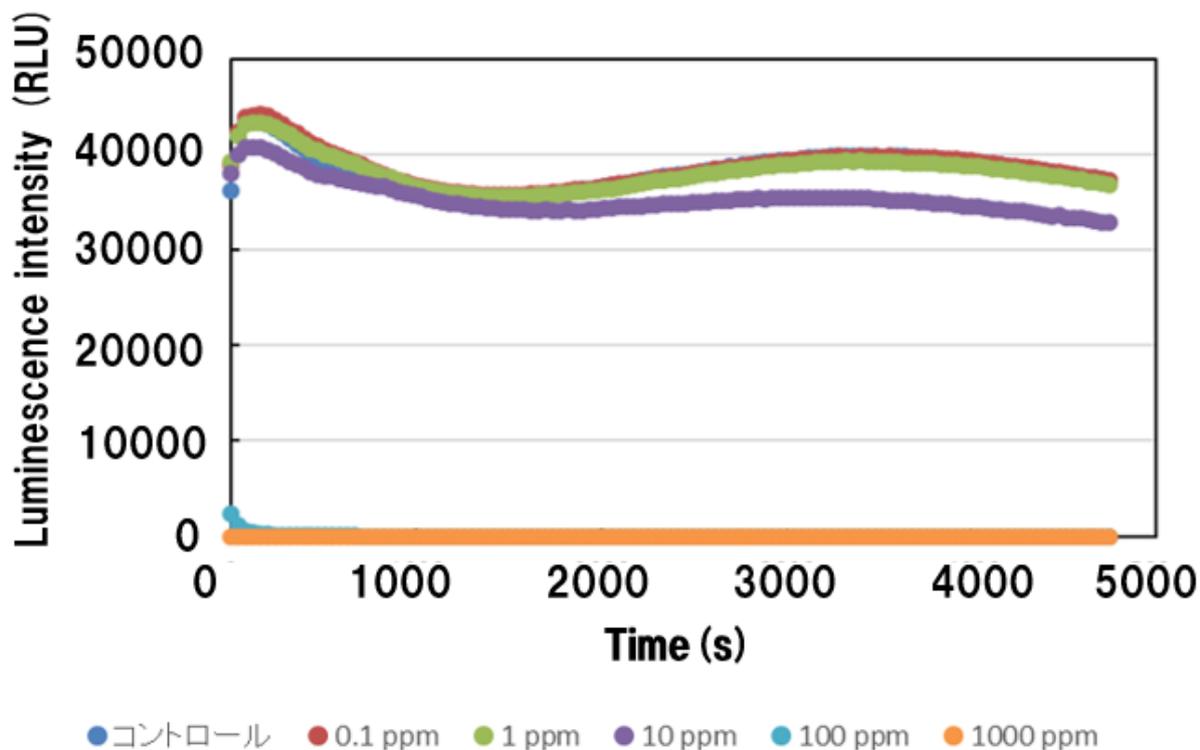


図 30 イマザリル添加時の発光量の経時的変化

#### 4.2.5 結論

海洋性発光細菌が防ばい剤に対して感受性を示すか明らかにするために、2つの液体培地で培養した菌体に防ばい剤を接触させた。はじめに、SWMで十分に菌体を増殖させた培養液に100 ppmおよび1000 ppmのイマザリルを接触させたとき、発光率が50%以下まで減少したことから *A. fischeri* はイマザリルに対して高い感受性を有することが明らかとなった。一方、チアベンダゾールを接触した場合は、発光率の減少が認められなかったことからチアベンダゾールに対する感受性は低いことが示唆された。続いて、第3章で明らかとなった発光誘導因子で誘導した発光細菌に100 ppmおよび1000 ppmのオルトフェニルフェノールナトリウムを接触させたところ、発光率が50%以下となった。また、イマザリルに対しては1000 ppmで発光率が50%以下となった。以上の結果より、発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を示すことが明らかとなり、防ばい剤を検出するバイオアッセイとしての利用可能性が示唆された。

## 4.3 基板への固定化と固定した発光細菌を用いた感受性試験

### 4.3.1 研究背景と目的

4.2 節で *A. fischeri* は防ばい剤に対して高い感受性を有することが明らかとなった。以上の結果から、発光細菌を利用した防ばい剤を検出するバイオアッセイへの利用可能性が示唆された。

4.2 節では濃度を調製した防ばい剤を培養液中に直接滴下して発光性について評価した。すなわち、菌体は液体中に分散して存在することになる。一方、実用化の際は液体のままだとハンドリング性が悪いことが想定され、これを考慮して何らかの基板に細菌を固定する必要があると考えられる。当研究室では、これまで蚕繭から抽出されるフィブロインに着目し、フィブロインの不溶化に係る諸要因や微生物の固定化に係る研究を行ってきた<sup>40),81)</sup>。そこで、本研究でも発光細菌の固定化基板としてフィブロインに着目し、フィブロインに固定した場合の感受性と固定基板としての有用性について評価した。フィブロインは絹タンパク質の約 7 割を占めるタンパク質であり、フィルムや溶液、ゲル、スポンジなどさまざまな形に成形することが可能であることが知られている<sup>81)-83)</sup>。また、生体親和性が非常に高いという特徴がある<sup>81)-83)</sup>。本節では当研究室の先行研究をもとに不溶化フィブロインフィルム (IFF: Insoluble Fibroin Film) をガラスチューブの底に作成し、これに対する発光細菌の固定化と IFF に固定化した発光細菌の防ばい剤に対する感受性を明らかにすることを目的とした。

### 4.3.2 実験方法

#### 4.3.2.1 IFF の作製

IFF の作製は田部井ら<sup>40)</sup>および堤ら<sup>81)</sup>の方法に準じた。はじめに、蚕繭を適当な大きさに切断し、電子天秤で 11 g 秤量した。これを 0.5 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中で約 1 h 煮沸したのち、イオン交換水で 3 回洗浄した。その後、約 60~70 °C に熱したイオン交換水中で 1 h 放置し、同様にイオン交換水で 3 回洗浄した。これを 50 %  $\text{CaCl}_2$  溶液中で繊維が完全になくなるまで煮沸し、フィブロイン抽出物を得た。これをセルロースチューブ (三光純薬株式会社製) に入れて、2 日間透析を行った。得られたフィブロイン溶液をタンパ

ク質濃度がおよそ 2.4 mg/l 程度になるよう調整し、0.2 %グリセリン溶液を添加した。これを 50  $\mu$ l ずつガラスチューブ (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA 製)に分注し、30  $^{\circ}$ C、70 %RH の条件で約 2~3 日間乾燥させた。なお、乾燥の判断は膜が白濁から透明になったときとした。これを IFF チューブとして実験に供した。また同様の方法で調製したフィブロイン溶液を底面が約 18 $\times$ 18 mm のポリプロピレンプレートに流し、同様の条件下で約 1 日乾燥させたものを 4.3.2.3 の FE-SEM 観察で用いた。IFF の作成プロトコルを図 31 に示す。

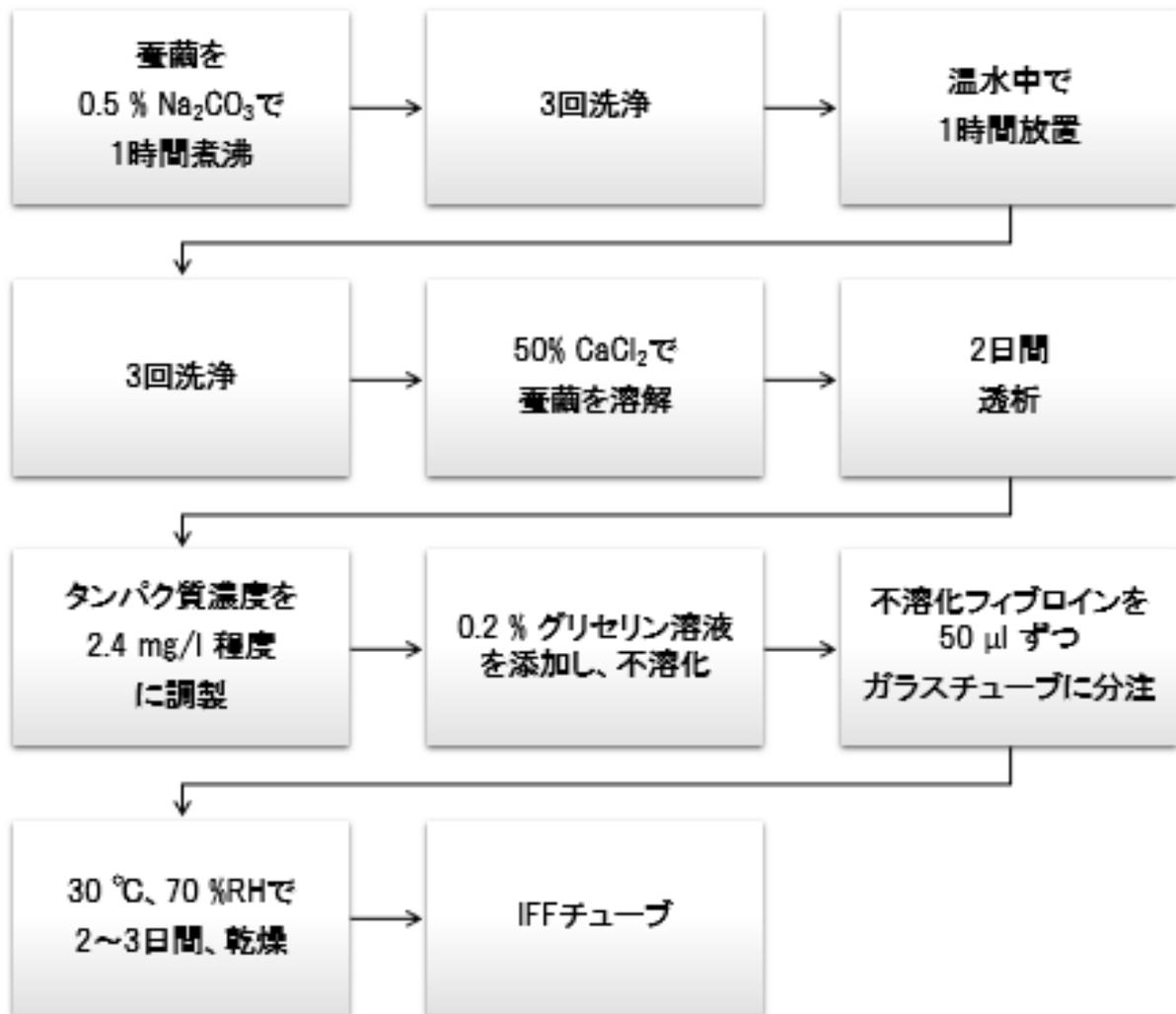


図 31 IFF 作成プロトコル

#### 4.3.2.2 IFF チューブとガラスチューブへの固定化

供試菌株にはこれまでと同様に American Type Culture Collection から入手した *A. fischeri* を用いた。これを 2.2 節と同様に全量が 100 ml となるように調製した Photobacterium broth (Sigma-Aldrich Co.) に 1 ml 接種し、26 °C、70 rpm で 16 h 振とう培養した。この培養液 700 µl と 30 %グリセリン溶液 700 µl を混合し、-70 °C で保存したものをグリセロールストックとした。

IFF チューブへ固定するために、このグリセロールストックを 2.2 節と同様の方法で調整した SWM (SWM composition; 28.1 g/l NaCl, 0.77 g/l KCl, 1.21 g/l CaCl<sub>2</sub>, 10.2 g/l MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.11 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 7.15 g/l MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 g/l Beef extract, 10 g/l Bacto peptone) に 100 µl 接種し、26 °C、70 rpm の培養条件で振とう培養した。また、最適な培養時間を明らかにするために、培養時間を 8、16、24、28 h とした。ここで、この培養時間は微生物の増殖曲線にしたがって設定した。微生物の増殖は、(1) 環境に順応するまでの誘導期、(2) 指数関数的に菌体量の上昇が認められる対数増殖期、(3) 増殖と死滅のバランスがとれた定常期、(4) 菌体が死滅していく死滅期の大きく 4 つのステージに分類される。今回は、2 番目のステージである対数増殖期をさらに対数増殖初期、対数増殖中期、対数増殖後期と分類し、対数増殖初期から 8 h、対数増殖中期から 16 h、対数増殖後期から 24 h、定常期から 28 h を培養時間として設定した。前節で調製した IFF チューブに新鮮な SWM 2 ml を加え、さらに前述の条件で培養した *A. fischeri* を 300 µl 加えた。これにアルミをしたのち、26 °C の培養槽内で静置して IFF 上に微生物を固定した。なお、最適な固定化時間を明らかにするために、固定化時間を 0.5、3、6 h に設定した。固定化後、IFF チューブ内の培養液を、ピペットを使って取り出し、3 % NaCl 溶液 2ml で 2~3 回洗浄した。洗浄後、余分な水分をキムワイプで取り除き、チューブを逆さまにして暗室で 30 min 程度放置し、実験に供した。発光性の比較を行うために、同様の方法でガラスチューブ (Thermo Fischer Scientific Inc., MA, USA 製) にも固定化を行った。発光量は PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan) を用いて評価した。なお、発光量の単位はこれまでと同様に RLU(relative light unit) で表記した。

#### 4.3.2.3 FE-SEM による基板表面の観察

IFF 上に固定した菌の付着性を観察するために、4.3.2.1 で調製した IFF (18×18 mm) に 4.3.2.2 に準じて発光細菌を IFF 上に固定した。なお 4.3.3.1 の結果から、このときの培養時間は 16 h、固定化時間は 3 h とした。付着性を比較するために、同様の方法でカバーガラス (18×18 mm)にも固定した。IFF およびガラス上に発光細菌を固定化後、3 % NaCl 溶液で 2~3 回洗浄し、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.3)で調製した 2.5 % グルタルアルデヒド溶液中で 2 h 固定した。その後、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.3)で 3 回洗浄した。これらのサンプルを 50 %、70 %、90 %、100 %のエタノール溶液中にそれぞれ 10 min 浸漬し、脱水した。これを室温で乾燥させ、白金蒸着 (E-1030;日立製)を行った。その後、FE-SEM (JSM-7800F; JEOL,Ltd 製)で膜およびガラス表面を観察した。

#### 4.3.2.4 IFF に固定化した発光細菌の感受性試験

4.3.3.1 の結果から、グリセロールストックした *A. fischeri*を SWM で 16 h 培養し、これを 4.3.2.2 の方法で IFF ガラスチューブに固定化した。なお、固定化時間は 4.3.3.1 の結果から 3 h とした。IFF に固定した発光細菌も防ばい剤に対して 4.2 節のような感受性を示すか明らかにするために、このチューブにイマザリルとチアベンダゾールを 100  $\mu$ l 滴下し、5 min および 15 min 放置後の発光量を PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan)を用いて測定した。なお 4.2 節と同様に、イマザリル、チアベンダゾールともに 3 % NaCl を含む 10 % Tween 80 溶液で終濃度が 0.1、1、10、100、1000 ppm となるように調整した。結果は式(3)を用いて、発光率を算出した。

### 4.3.3 実験結果

#### 4.3.3.1 最適培養時間および固定化時間の検討

IFF への菌体の最適培養時間と最適固定化時間を明らかにするために、*A. fischeri* を、8 h(対数増殖初期)、16 h(対数増殖中期)、24 h(対数増殖後期)、28 h(定常期)培養した。この培養液を IFF チューブに分注し、26 °C の培養槽内で 0.5、3、6 h 静置し IFF 上に *A. fischeri* を固定化し、洗浄後、発光量を測定した(図 32)。同様の方法でガラスチューブにも固定化を行い、IFF に固定化したときの発光量と比較した(図 32)。

はじめに 8 h 培養した *A. fischeri* を IFF チューブとガラスチューブに 0.5 h および 3 h 固定したところ、発光量に有意な差が認められた( $p < 0.05$ )(図 32(a))。また 16 h 培養した菌体を IFF 上に固定したところ、固定化時間が 0.5 h および 3 h のときに発光量に有意な差が認められた( $p < 0.05$ )(図 32(b))。同様に、24 h 培養した菌体も固定化時間が 0.5 h および 3 h で発光量に有意な差が認められた( $p < 0.05$ )(図 32(c))。最後に 28 h 培養した *A. fischeri* は、3 h および 6 h 固定化したときに有意な差が認められた( $p < 0.05$ )(図 32(d))。以上の結果から、*A. fischeri* を IFF およびガラスチューブに固定化したところいずれの増殖ステージの培養液を固定化した場合においても、ガラスチューブより IFF チューブに固定したほうが高い発光性を示すことがわかった(図 32)。また、菌体の培養時間や固定化時間は発光性に大きな影響を与えない可能性が示唆された。そこで以後の研究では、*A. fischeri* の培養時間を 16 h、固定化時間を 3 h とした。この条件は、培養時間が 24 h および 28 h のときは菌体が増殖しすぎて凝集し、固定化の操作がしにくかったこと、培養 8 h と 16 h の発光性を比較したときに 16 h の培養液のほうが、発光量が高かったことから上述の条件に設定した。なお、固定化時間は最も発光量が高かった 3 h とした。

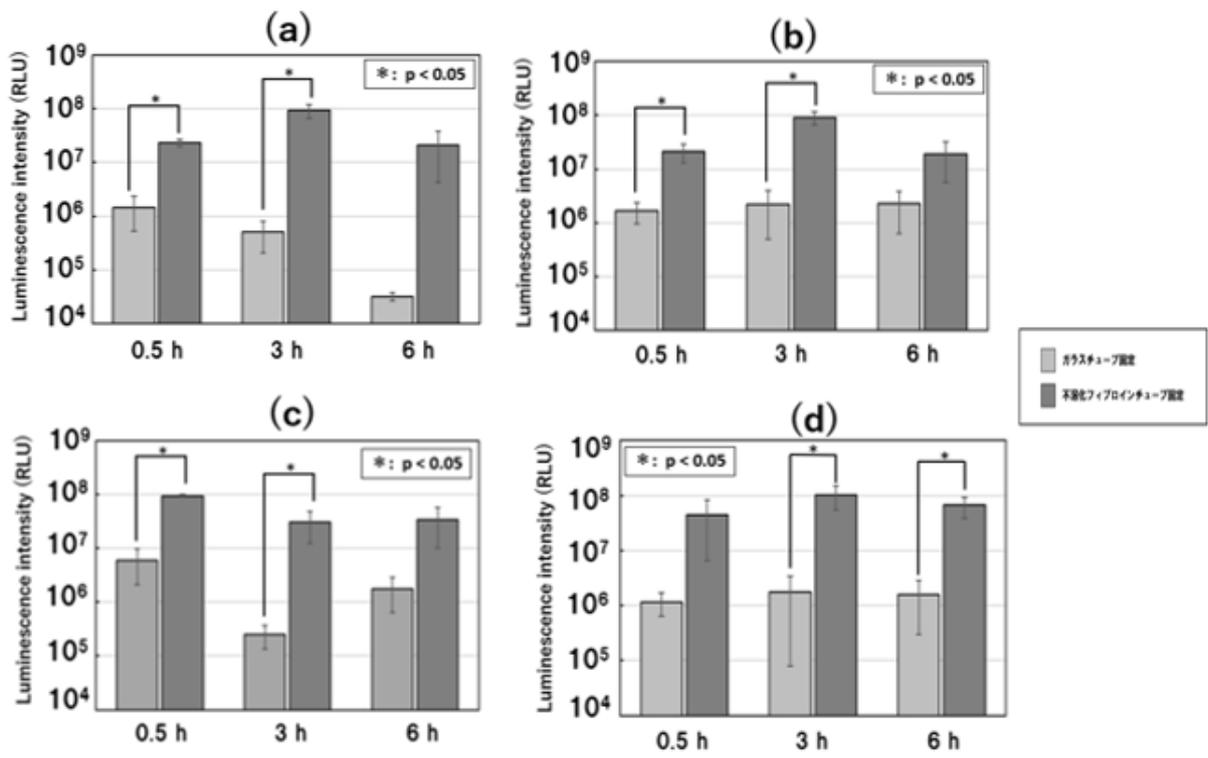


図 32 IFF とガラスに固定した発光細菌の発光性の比較

#### 4.3.3.2 FE-SEM による基板表面の観察

4.3.3.1 で IFF に固定した海洋性発光細菌は、ガラスに比べ高い発光性を示すことがわかった。これは基板表面上の菌体の付着性の違いによるものかを検討するために FE-SEM を用いた基板表面の観察を行った(図 33)。比較対象としてガラス表面に固定化したサンプルも同様の方法で観察した。

FE-SEM でサンプル表面を観察したところ、ガラス表面上には、あまり菌体は付着していないことがわかった(図 33(a)(c))。一方、IFF 上には膜全体に多くの菌体が付着していることがわかった(図 33(b)(d))。以上の結果から 4.3.3.1 で得られた発光性の違いは、基板上に付着する菌体数の違いである可能性が示唆された。フィブロインは、細胞培養の分野において細胞の維持や活動を支える足場材料としてこれまで利用されてきた<sup>82)</sup>。FE-SEM による IFF 上の観察で、膜上に多くの菌体が付着していたことから、IFF は発光細菌の足場材料として有用であることが示され、バイオアッセイへの実用化を考慮した際に固定基板として有用である可能性が示唆された。

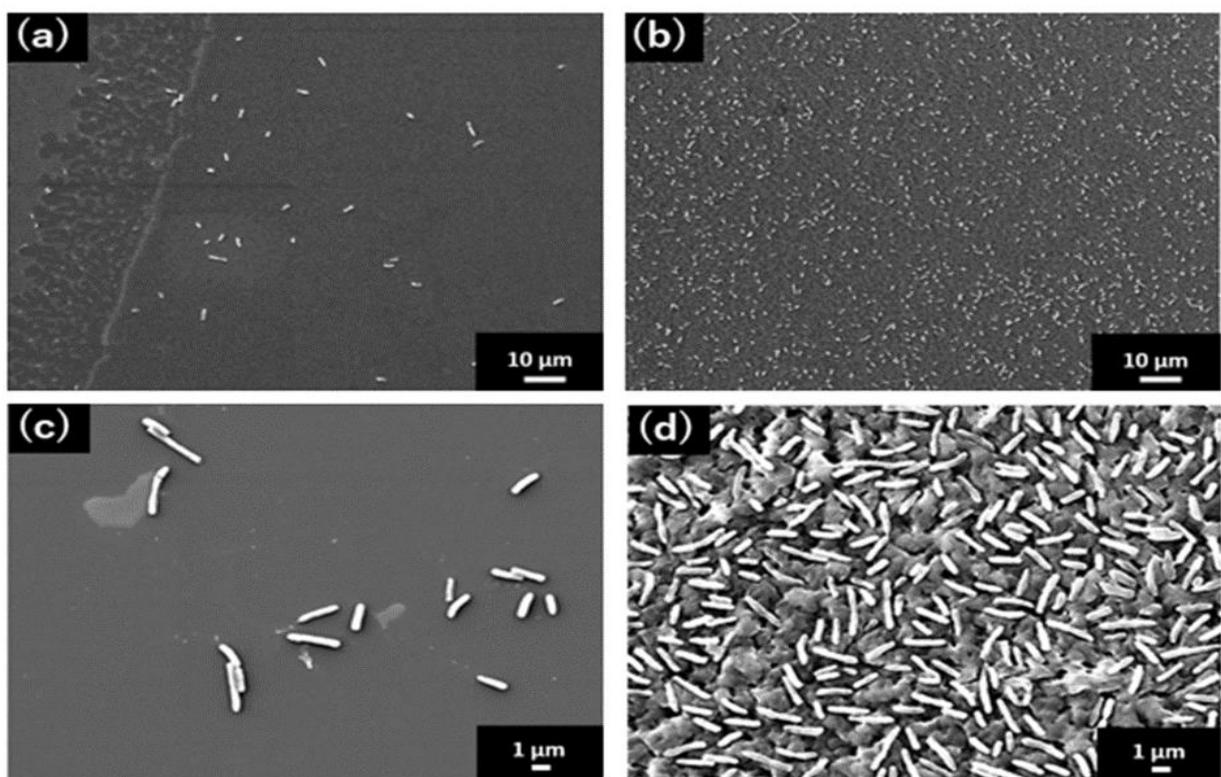


図 33 FE-SEM による付着性の観察

#### 4.3.3.3 IFF に固定化した発光細菌の感受性試験

ここまで IFF とガラスに固定した発光細菌の発光性と付着性について検討し、IFF は発光細菌の固定化基板として有用であることが明らかとなった。そこで、基板上に固定した発光細菌は 4.2 節と同様に防ばい剤に対して感受性を示すか検討した。本試験では、防ばい剤としてイマザリルとチアベンダゾールを選定し、4.2 節と同様に発光率がコントロールに対して 50 % 以下になったときの濃度を感受性が高いと判断した。

はじめに、IFF チューブに固定した *A. fischeri* は 1 ppm よりも高い濃度のイマザリルを接触させたときに発光率が 50 % 以下を示したことから、1 ppm から 1000 ppm の範囲でイマザリルを検出できることがわかった (図 34)。以上の結果から、*A. fischeri* はイマザリルに対して高い感受性を示すことが明らかとなった。ここで、4.2 節と同様に国内基準値と今回得られた結果を比較した。イマザリルの柑橘類に使用できる国内基準値は 5 ppm であり、IFF に固定した *A. fischeri* は 10 ppm 以上の高い濃度で発光率が 50 % 以下まで減少したことから、国内基準値に準じた検査でも使用できる可能性が示唆された。

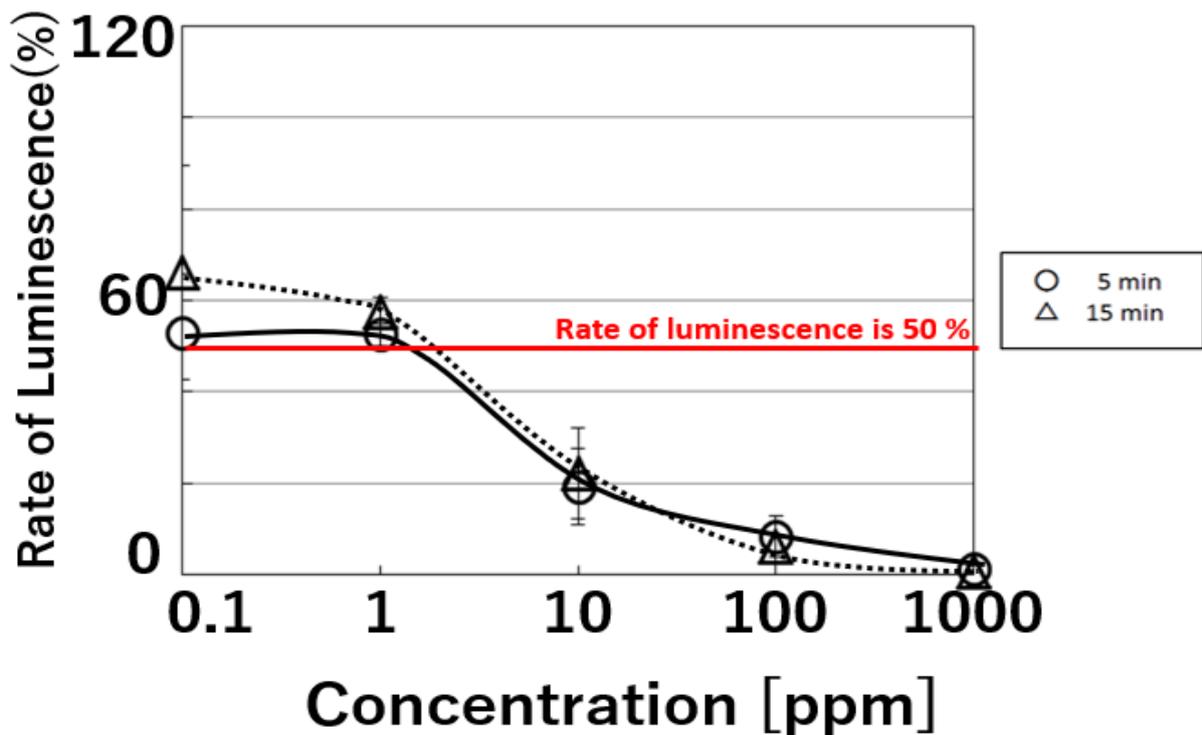


図 34 イマザリルに対する感受性

一方、チアベンダゾールを IFF チューブに固定した *A. fischeri* に接触させたとき、0.1 ppm より高い濃度で発光率が 50 % 以下になった(図 35)。この結果から、IFF チューブに固定した *A. fischeri* はチアベンダゾールを 0.1 ppm から 1 ppm の範囲で検出できることが明らかとなった。この結果から、海洋性発光細菌はチアベンダゾールに対して非常に低濃度でセンシティブに反応し、非常に高い感受性を示すことがわかった。同様にチアベンダゾールの国内基準値である 10 ppm と今回の結果を比較したところ、10 ppm よりも低い濃度で発光率が 50 % 以下となったことから、国内基準値以上の濃度を検出するアッセイ法としては利用できる可能性が低いと判断した。しかしながら、前述したように、IFF チューブに固定した *A. fischeri* はチアベンダゾール濃度が 0.1 ppm から 1 ppm という非常に低濃度の範囲で消光したことから、サンプル中のチアベンダゾールの有無を判別するバイオアッセイとしては有用であることがわかった。以上の結果から、IFF チューブに固定した海洋性発光細菌はイマザリルやチアベンダゾールなどの防ばい剤に対して非常に高い感受性を示し、これを検出するアッセイ法として利用できる可能性が示唆された。

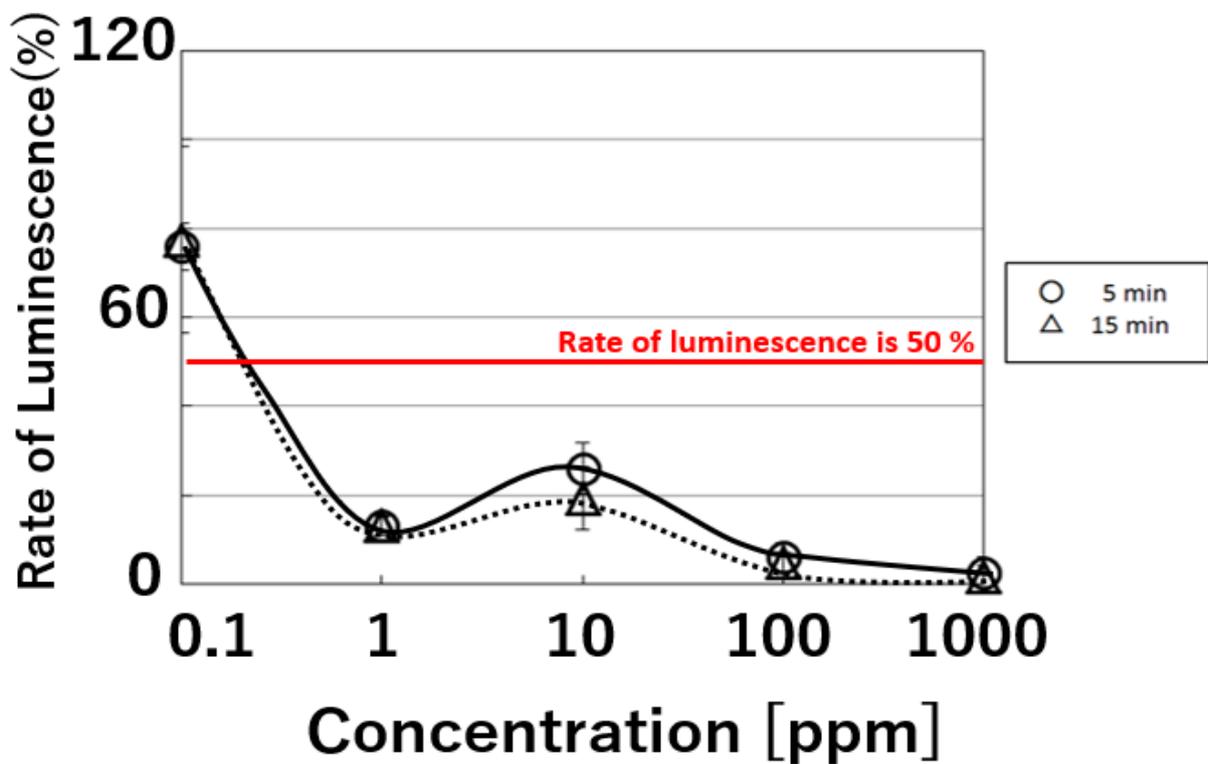


図 35 チアベンダゾールに対する感受性

#### 4.3.4 考察

これまで基板に固定していない発光細菌と IFF チューブに固定化した発光細菌を用いて、イマザリルとチアベンダゾールに対する感受性試験を行ってきた。その結果、イマザリルを暴露させたときはいずれの条件でも発光量の減少が認められた(図 26、34)。一方、培養液へチアベンダゾールを滴下したときは発光量の減少が認められなかったが、細菌を IFF チューブへ固定化すると非常に鋭敏な感受性を示した(図 27、35)。これまでの実験は 2 次元 (i.e. IFF) と 3 次元 (i.e. 液体培地) であるため、正確な比較を行うことはできない。しかしながら、IFF に固定したときの IFF 上の菌体数はおおよそ  $10^4$  CFU/ml であり、一方、液体培地中の菌体数はおおよそ  $10^9$  CFU/ml であるため、菌体数の違いが薬剤の接触効率を向上させた結果、感受性に差がでたと考えられる。

#### 4.3.5 結論

海洋性発光細菌を利用したバイオアッセイの実用化に向けて、菌体の固定化を検討し、菌体の固定基板として IFF に着目した。IFF チューブに発光細菌を固定し発光量を測定したところ、ガラスに固定したときに比べ、発光細菌は高い発光性を示した。また、FE-SEM で膜表面を観察したところ、ガラス表面と比べ、膜全体に多くの菌体が付着していることがわかった。以上の結果から、IFF は発光細菌の固定基板として有用であることが明らかとなった。そこで、IFF チューブに固定した発光細菌を用いて防ばい剤に対する感受性試験を行った。その結果、発光細菌は 1 ppm よりも高い濃度のイマザリルを接触させたときに発光率 50 %以下を示し、チアベンダゾールに対しては 0.1 ppm より高い濃度で発光率が 50 %以下を示した。以上の結果から、IFF チューブに固定した発光細菌は防ばい剤に対して非常に高い感受性を示すことがわかった。

## 4.4 発光回復剤としての効果

### 4.4.1 研究背景と目的

これまでの実験結果より、IFF に固定した発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。一方、IFF に固定した発光細菌は時間の経過とともに発光量が減少することが知られている<sup>40)</sup>。また、IFF は生物由来の膜であることから、一定の発光量を得ることが難しい。しかしながら、発光細菌を利用したバイオアッセイは発光量の減少率から毒性を判断するため、実際に毒性を測定する場合はなるべく高い発光量を示すことが望ましい。そこで、第3章で明らかにした発光誘導因子に着目した。序論において、発光細菌は autoinducer を介して細胞密度依存的に発光を制御することを述べた。実際、Rosson らは培養液中に精製した autoinducer を滴下すると発光量が上昇し、発光量が減少した培地にさらに autoinducer を追加すると急激に発光量が上昇することを示した<sup>84)</sup>。同様に Neelson は autoinducer の添加濃度の上昇にともなって発光量が上昇することを明らかにした<sup>22)</sup>。そこで、第3章で明らかとなった発光を誘導する3因子 (KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>) が autoinducer と同様の効果を示せば、IFF に固定した場合に生じる発光性の課題を解決できると考えた。以上の背景から、本節では発光誘導因子(KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>)が IFF に固定した発光細菌の発光回復剤としての効果を有するか検討した。

### 4.4.2 実験方法

IFF チューブの作製と IFF チューブへの細菌の固定化は4.3節に準じて行った。なお、4.3.3.1の結果より、IFF チューブに固定する発光細菌の培養時間は16h、固定化時間は3hとした。発光細菌を固定した IFF チューブの発光量はこれまでと同様に、PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan)を用いて評価し、発光量の単位はこれまでと同様に RLU(relative light unit)で表記した。発光量は固定した IFF チューブを洗浄後から1hおきに測定し、固定直後と比較して有意に発光量が減少したチューブに、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>を含む2.81% NaCl 溶液を100  $\mu$ l 滴下した。その後、5 min、30 min、60 min、180 min、360 min、1080 min、1440 min 経過後の発光量を測定し、3因子の

効果を検討した。比較として、同様の方法で固定化し、発光量が減少したチューブに 2.81 % NaCl 溶液を 100  $\mu$ l 滴下し、発光量を測定した。

#### 4.4.3 実験結果

IFF チューブに固定化してから 1 h 後に、発光量は有意に減少した( $p < 0.05$ )(図 36)。そこでこのチューブに 3 因子(KCl, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>)を含む 2.81 % NaCl 溶液を滴下したところ、滴下してから 5 min 後に有意な発光量の上昇が認められた( $p < 0.05$ )(図 36)。その後、発光量は有意に上昇を続け( $p < 0.05$ )、滴下 360 min 後に最大発光量を得た(図 36)。このときの発光量は、固定直後の発光量に比べて高かった( $p < 0.05$ )。その後の発光量も滴下直前の発光量と比較して有意な差が認められ、滴下後、24 h (1440 min)まで続いた( $p < 0.05$ )。一方、2.81 % NaCl 溶液のみを滴下した場合、発光量は上昇せず、下降し続けた(図 36)。以上の結果より、第 3 章で明らかとなった 3 因子は、発光量が減少した細菌の発光回復剤として寄与することが明らかとなり、過去の知見<sup>22),84)</sup>で明らかとなった autinducer 添加後のような発光上昇が引き起こされるということがわかった。この結果を応用することで、膜の状態や時間経過によって引き起こる発光の減少を解決し、発光の安定化に寄与することができると考えられる。

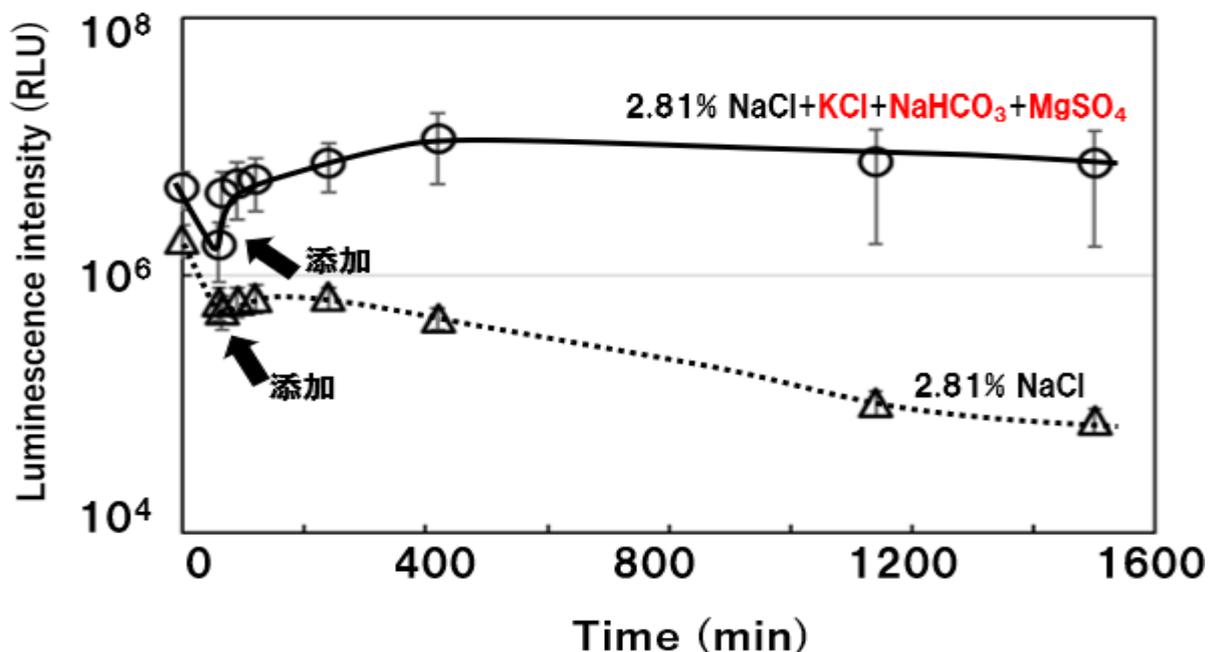


図 36 発光誘導因子の発光回復剤としての効果

#### 4.4.4 結論

第3章で明らかとなった発光誘導因子(KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>)をIFFに固定し、発光量が減少した細菌に添加すると、有意な発光量の増大が認められた。さらに、滴下後360 minでは固定直後の発光量と比較して高い発光量を示した。以上の結果から、KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>は発光量が減少した発光細菌の発光回復に寄与し、autoinducerと同様な役割を担う可能性が示唆された。これを応用することで、固定化した際の発光量の安定化や回復に寄与できる可能性が示された。

## 4.5 夾雑物が発光に与える影響

### 4.5.1 研究背景と目的

4.3 節では IFF に海洋性発光細菌を固定し、その発光性、付着性および防ばい剤に対する感受性について評価した。その結果、IFF に固定したサンプルでは、ガラス表面に固定したものと比べて、高い発光性と付着性を示した。さらに、IFF に固定した発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を有することがわかった。以上の結果から、発光細菌を使用したバイオアッセイを実用化する際の固定基板として IFF は有用である可能性が示唆された。

一方、これまでの感受性試験の結果は、試薬会社から入手した純粋な試薬を用いて得られた結果である。しかしながら、現在使用されている防ばい剤は青果物の果皮表面に塗布されており、毒性試験のサンプルを調製するときに果実の pH や夾雑物の影響が懸念される。すなわち、実際にバイオアッセイとして利用する場合は試料中の夾雑物の影響を受けないことが望ましい<sup>49)</sup>。そこで、本節では夾雑物が発光性に与える影響を明らかにするために、pH と柑橘類の成分に対する影響を評価した。本研究では柑橘類に塗布される防ばい剤の検出を最終目標としているため、低 pH のサンプルが発光に与える影響と柑橘類の果皮に含まれる成分の影響を検討するために上述の影響を評価した。

### 4.5.2 実験方法

#### 4.5.2.1 供試菌株と培養条件

供試菌株には 2.2 節と同様に American Type Culture Collection から入手した *A. fischeri* を用い、Photobacterium broth (Sigma-Aldrich Co.) を全量が 100 ml となるよう調製した。これに *A. fischeri* を 1 ml 接種し、26 °C、70 rpm で 16 h 振とう培養した。この培養液 700 µl と 30 %グリセリン溶液 700 µl を混合し、-70 °C で保存したものをグリセロールストックとした。

pH と柑橘類の成分が海洋性発光細菌の発光性に与える影響を検討するために、2.81 % NaCl 溶液に第 3 章で明らかとなった発光誘導因子 (KCl、NaHCO<sub>3</sub>、MgSO<sub>4</sub>) を添加した培地を全量が 100 ml となるよう調製し、これに前述のグリセロールストックを 100

μl 接種したのち、26 °C、70 rpm で 12 h 振とう培養した。この培養液をガラスチューブに 900 μl ずつ分注し、以後の試験に供した。

#### 4.5.2.2 pH の影響

pH が海洋性発光細菌の発光性に与える影響を検討するために、3 % NaCl を 10 % 希塩酸で pH が 2 から 4 になるように調製した。この溶液を 100 μl 秤量し、4.5.2.1 で調製した培養液 900 μl と混合したのち、5 min および 15 min 後の発光量を PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan) を用いて測定した。なお、結果は式(3)に準じて発光率に換算した。

#### 4.5.2.3 柑橘類の成分に対する影響

柑橘類の果皮の成分が発光に与える影響を検討するために、(1) 熱水処理 (擦り洗い)、(2) 煮沸処理、(3) 果皮すりつぶし、(4) 煮沸処理 (果皮すりつぶし) の 4 つの方法によってサンプルを調製した。なお、本試験では平成 29 年に収穫された佐賀県産の温州ミカンを使用した。

##### (1) 熱水処理 (擦り洗い)

60 °C 程度の温度に熱した 3 % NaCl 溶液を 200 ml 調整し、ミカンを 2 min 浸漬した。その後、家庭用の掃除ブラシで果皮表面を 10 往復ずつ擦り洗いし、この溶液を試験に供した。

##### (2) 煮沸処理

ミカンの果皮を 3 % NaCl 溶液 200 ml 中で 10 min 浸漬したのち、10 min 煮沸した。これを 50 ml 遠沈管に加え、4 °C、5000 rpm の条件で 20 min 遠心分離した。この上清を試験に供した。

##### (3) 果皮すりつぶし

ミカンの果皮をすり鉢に入れ、3 % NaCl 溶液 200 ml を少量ずつ加えながら十分にすりつぶした。続いてこの溶液を 50 ml の遠沈管に加え、4 °C、5000 rpm の条件で 20 min

遠心分離した。この上清を試験に供した。

#### (4) 煮沸処理（果皮すりつぶし）

(2)と同様の方法でミカンの果皮を 10 min 煮沸した。果皮をすり鉢に移し、この溶液を少量ずつ加えながら十分にすりつぶした。この溶液を 50 ml 遠沈管に加え、4 °C、5000 rpm の条件で 20 min 遠心分離し、この上清を試験に供した。

以上の方法で調製したサンプル 100  $\mu$ l と 4.5.2.1 で調製した培養液 900  $\mu$ l を混合し、5 min および 15 min 後の発光量を PSN luminometer (AB-2200, ATTO, Tokyo Japan) を用いて測定した。なお、結果は式(3)に準じて発光率に換算した。

### 4.5.3 実験結果

#### 4.5.3.1 pH の影響

希塩酸で pH を 2 から 4 に調製した 3 % NaCl 溶液と *A. fischeri* を接触したところ、いずれの pH においても発光率は 50 % 以上を示した(図 37)。強酸性の条件(pH=2)でも、発光率は 5 min 接触で 93 % を示し、15 min 接触では 102 % を維持した(図 37)。ミカンの pH は約 3~4 程度なので、今回は希塩酸で pH を調製したが、酸性条件下で毒性試験を行った場合においても発光性に対する影響は少ない可能性が示された。

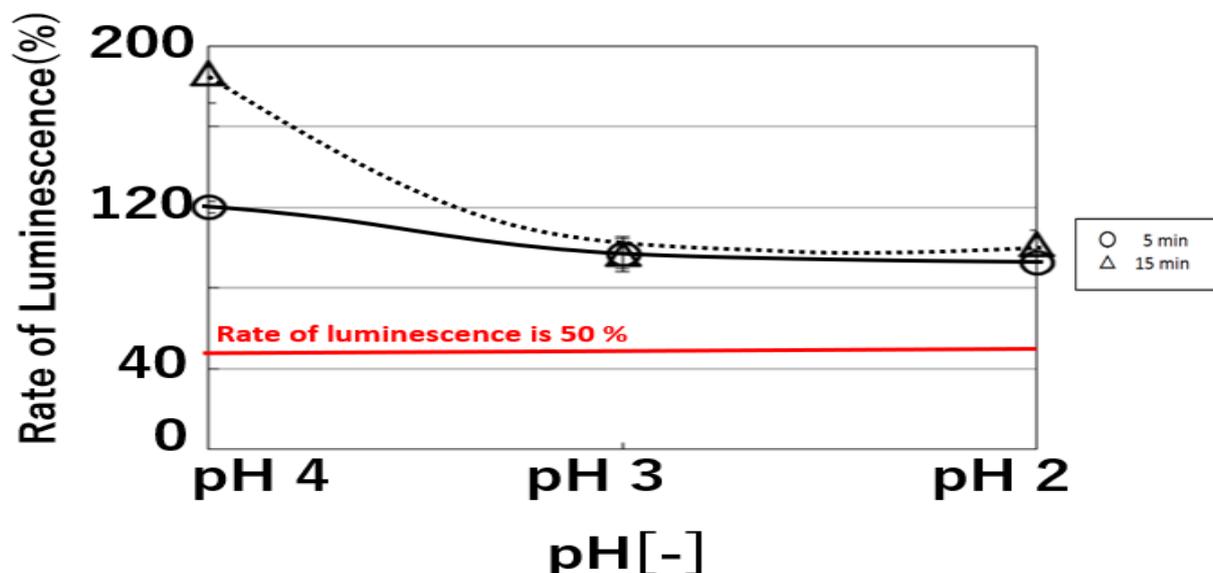


図 37 低 pH が発光に与える影響

#### 4.5.3.2 柑橘類の成分に対する影響

柑橘類の成分が発光に与える影響を検討するために、4つの方法でミカンの果皮から抽出したサンプルを *A. fischeri* と接触させた。はじめに、ミカンを熱水処理したのち、擦り洗いしたサンプルと発光細菌を接触させたところ、接触時間に関わらず、発光率は100%以上を示し、発光性に影響は少ないことがわかった(図38)。

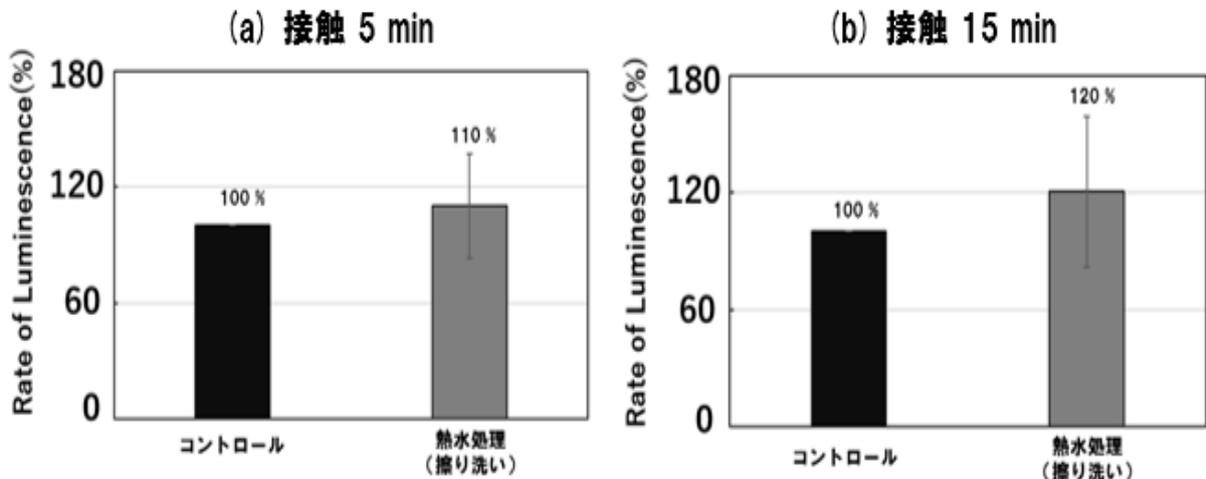


図38 夾雑物が発光に与える影響 (熱水擦り洗い)

次に、煮沸処理を行ったサンプルと *A. fischeri* を接触させたところ、いずれの接触時間においても発光率は約70%を示し(図39)、擦り洗いに比べると発光性に影響を及ぼすことが明らかとなった。

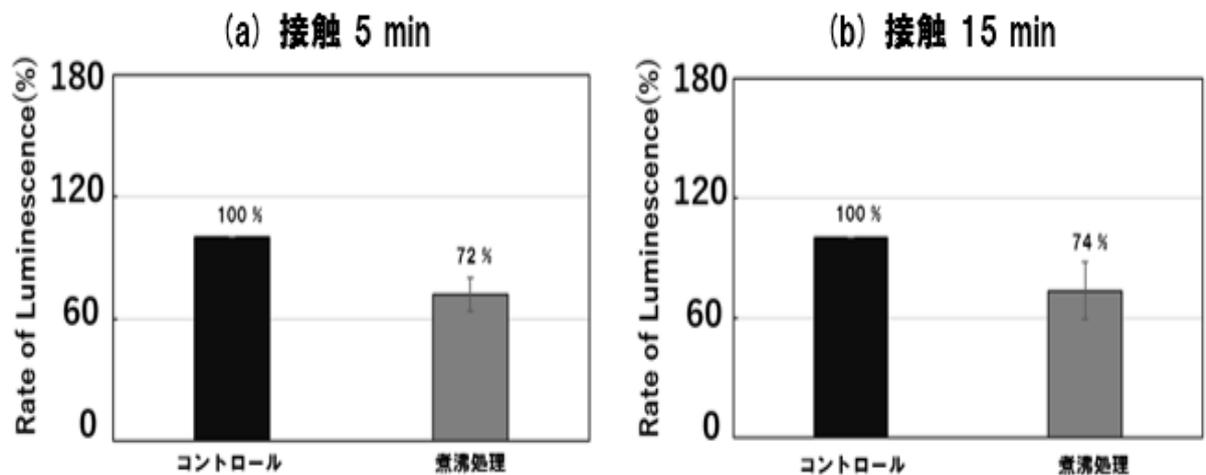


図39 夾雑物が発光に与える影響 (煮沸処理)

続いて、果皮をすりつぶしたサンプルを接触させたところ、発光率は接触 5 min で 50 % を示し、15 min 接触させると 81 % となることがわかった(図 40)。4.2 および 4.3 節で行った感受性試験では、コントロールに対して発光率が 50 % 以下になったときに感受性が高いと判断した。これを踏まえて果皮をすりつぶした場合の結果を考えると、サンプルと 5 min 接触させたときに発光率が 50 % となったことから、この方法でサンプルを調製した場合、実際の分析結果に影響を及ぼすことが考えられる。

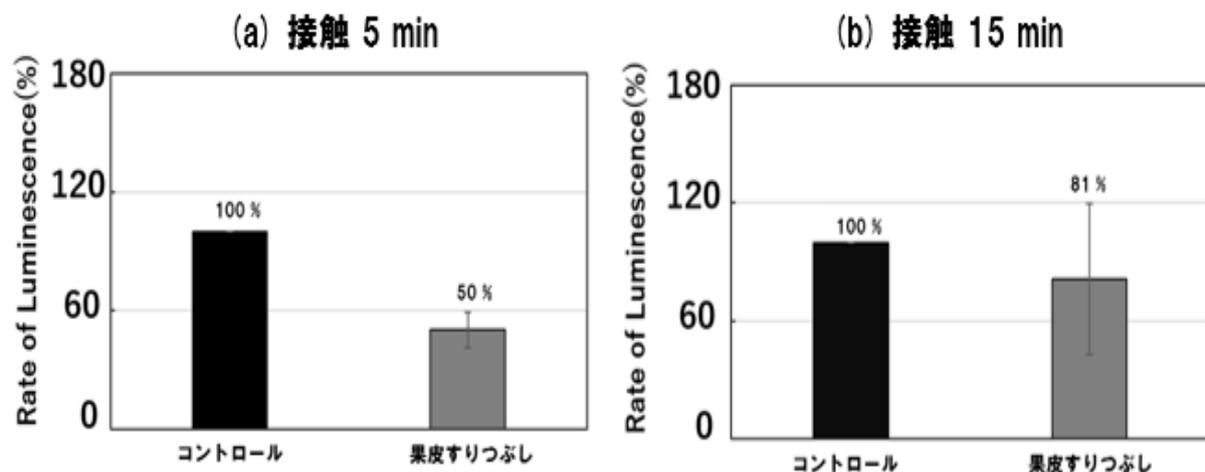


図 40 夾雑物が発光に与える影響 (果皮すりつぶし)

同様に、煮沸処理した果皮をすりつぶしたサンプルに *A. fischeri* を 5 min 接触させた場合の発光率は 28 % となり、15 min 接触すると発光率は 25 % を示した(図 41)。いずれの接触時間においても発光率は 50 % 以下となったことから、この方法では分析結果に影響を及ぼすことがわかった。以上の結果から、海洋性発光細菌を用いて柑橘類に塗布された防ばい剤を検出する場合は、果皮を熱水処理したのち、擦り洗ったサンプルを用いることが最適であることが示唆された。

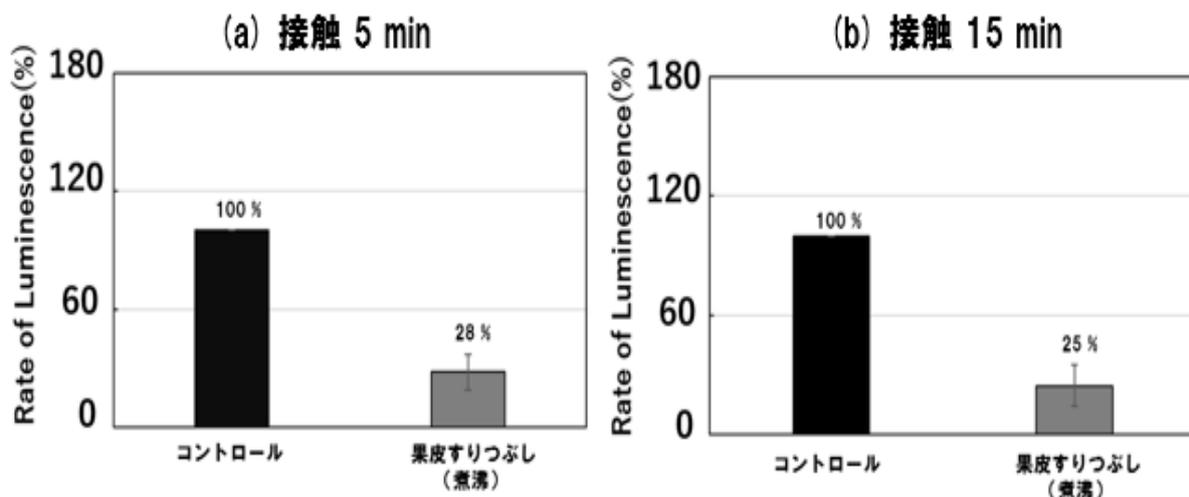


図 41 夾雑物が発光に与える影響 (果皮すりつぶし (煮沸))

#### 4.5.4 結論

海洋性発光細菌を用いて防ばい剤を検出する際、防ばい剤が塗布されている柑橘類の pH や夾雑物の影響を考慮する必要がある。そこで、酸の影響と柑橘類の成分が発光に与える影響を検討した。希塩酸で pH を 2 から 4 に調製した 3 % NaCl 溶液を発光細菌に接触させたところ、発光率は約 100 % から 90 % の範囲を維持した。以上の結果から、発光細菌を用いた毒性試験に酸性のサンプルを使用した場合でも、分析結果に対する影響は少ないことが示唆された。また、柑橘類の成分が発光に与える影響を検討したところ、果皮をすりつぶした場合は発光率が 50 % 前後となり発光に影響を及ぼしたが、熱水処理後に擦り洗いした場合は、100 % 以上の発光率を維持したことから発光への影響は少ないことがわかった。以上の結果から、防ばい剤を検出する分析法として発光細菌を使用する場合は、熱水処理したのちに擦り洗いしたサンプルを試験に供することで夾雑物が発光性に及ぼす影響を抑制できる可能性が示唆された。

## 第5章 総括と今後の展望

### 5.1 *A. fischeri* の発光挙動と発光誘導因子の解明

第2章において発光細菌類の増殖と発光性を検討したところ、発光細菌類間で発光挙動に差があり、*A. fischeri* は人工海水中で細胞密度に非依存的な発光誘導を行うことがわかった。そして第3章でこの発光誘導に寄与する因子を検証したところ、 $\text{KCl}+\text{NaHCO}_3+\text{MgSO}_4$  の3つの成分を組み合わせたときに発光の上昇が認められた。さらに、 $\text{K}^+$ 、 $\text{HCO}_3^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ を含むその他の化合物に置換した場合にも発光誘導が認められたことから、発光誘導にはこれらのイオンが寄与することが明らかとなった。これまで $\text{K}^+$ や $\text{HCO}_3^-$ が、発光反応に必要な発光遺伝子の複製やアルデヒド合成、NADH オキシダーゼの活性化、ルシフェラーゼ合成などに寄与し、発光に影響を及ぼす可能性を示した知見はあるが<sup>63)・66)</sup>、発光誘導に硫黄源を必要とする知見は少ない。また発光細菌の硫黄代謝や硫黄が発光反応に及ぼす影響を分子レベルで解明した知見はない。本研究では、発光反応に $\text{K}^+$ や $\text{HCO}_3^-$ に加えて硫黄源が必要であることを述べたが、分子レベルでの発光反応への作用機構の解明は行っていない。今後の課題として、発光細菌の硫黄代謝や硫黄の作用機構に関して分子レベルで解明することが挙げられる。発光細菌の発光反応は呼吸代謝とカップルしていることが一般的に知られている<sup>38)</sup>。また昨年、哺乳類の硫黄呼吸に対する知見が明らかにされ医療分野への応用が期待されている<sup>85)</sup>。このような背景から、もし発光細菌の硫黄代謝と発光の分子メカニズムの相関性が解明されれば、発光細菌の基礎研究や微生物学の発展に貢献できるだけでなく、光る性質を利用して医療や工学、教育分野など新たな分野への応用に寄与できるかもしれない。

## 5.2 A. *fischeri*を用いた新規バイオアッセイへの利用可能性

第4章において、発光細菌の防ばい剤（イマザリル、チアベンダゾール、オルトフェニルフェノールナトリウム）に対する感受性試験を行った結果、発光細菌は防ばい剤に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。また、固定基板として不溶化フィブロイン膜（IFF）を用いて付着性や発光性についてガラスと比較を行ったところ、IFFは発光性、付着性がともにガラスより優れ、発光細菌の固定基板として有用であることが明らかとなった。さらに、IFFに固定した発光細菌の発光量が減少したときに第3章で明らかになった発光誘導因子を添加すると、発光量が有意に上昇し、添加後6hで固定直後の発光量よりも高い発光量を示した。そして、実用化の際に懸念されるpHや夾雑物の影響を検討したところ、低pHが発光性に与える影響は小さく、また夾雑物の影響についても熱水擦り洗いしたサンプルを用いることで発光に与える影響を抑制できる可能性が示唆された。以上の結果から、発光細菌を用いたバイオアッセイの食品分野への利用可能性が示唆された。

現在市場に流通し、防ばい剤が塗布されている青果物は、今回行った試験のように純粋な1種類の防ばい剤が塗布されているのではなく、複数の防ばい剤を混合して塗布している。前述したとおり、本研究では純粋な防ばい剤を用い、1種類の防ばい剤に対する感受性について評価したため、複数の防ばい剤を混合した場合は感受性が異なる可能性が考えられる。また、今回は柑橘類の中でもミカンに着目したが、対象の青果物が変われば（e.g. レモン、グレープフルーツ）夾雑物の影響が異なると考えられ、発光性にも影響を及ぼすことが想定される。さらに、実際に市場で流通し、防ばい剤が塗布された柑橘類やバナナなどを用いてバイオアッセイを行った場合、今回得られた挙動とは異なる可能性が高い。そこで、実用化にあたっては、複数の防ばい剤を混合したときの発光挙動や防ばい剤が塗布された青果物を用いた場合の発光挙動や防ばい剤が塗布されているさまざまな青果物と発光細菌の感受性について多くの知見を蓄積する必要がある。すなわち、防ばい剤を複数混合した際の感受性試験や、レモンに塗布された試料に対する感受性、オレンジに塗布された試料に対する感受性など、対象と発光性の相関性に関する知見を蓄積することが課題となる。このような知見を蓄積することができれば、前述

した化学的な試験をする前の迅速かつ簡便な分析手法として、検査する果物ごとに、どの程度の濃度の防ばい剤が対象の青果物中に含まれているかを知ることができ、毒性の総合的なスクリーニングを行うことができると考えられる。第1章で述べたようにバイオアッセイでは化学組成や詳細な濃度までは測定することはできないが、このような総合的な毒性評価を行えることがバイオアッセイの最大の利点であり、現在、現場で求められている迅速簡便かつ低コストな毒性評価に寄与できるであろう。また本研究では、シングルチューブで発光性の評価を行ったが、シングルチューブでは多くのサンプルを一斉に測定することができず、時間と手間がかかる。そこで実用化の際はより多くのサンプルを測定する手法も確立しておく必要があると考える。例えば 96 穴ウェルプレートを用いたルミノメーターでも感受性試験が行えるような毒性評価手法の確立である。このとき、シングルチューブで得られた結果との相関性についても知見を蓄積する必要がある。

最終的には、ジャムや缶詰などを製造する食品加工工場、スーパーマーケットなどの事業所や家庭、教育現場において、青果物を食べたり、加工したりする際に簡易的な毒性評価を行うことができるバイオアッセイ手法として実用化されれば、誰もが簡単に取り扱えることができるので、安全・安心な食生活の一助につながると考える。

## 参考文献

- 1) 近江谷 克裕、「発光生物の光る仕組みとその利用」、化学と教育、64(8)、372-375、2016
- 2) 丹波 一樹、「生物発光とルシフェラーゼの科学」、生物工程、第7号、407-410、2015
- 3) P. V. Dunlap, K. Kita-Tsukamoto, “The prokaryotes”, *Academic Press, New York 2001*, chapt. 328.
- 4) Baumann, P., Baumann, L., and Reichelt, J.L., “Taxonomy of marine bacteria: *Beneckeia parahaemolytica* and *Beneckeia alginilytica*”, *J. Bacteriol.*, **113**, 1144-1155, 1973
- 5) Fitzgerald, J. M., “Classification of luminous bacteria from the light organ of the Australian pinecone fish *Cleidophus glorumaris*”, *Arch. Microbiol.*, **112**, 153-156, 1977
- 6) Meighen, E.A. , “Genetics of bacterial bioluminescence”, *Ann. Rev. Genet.*, **28**, 117-139, 1994
- 7) Neelson, K.H., “Isolation, identification and manipulation of luminous bacteria”, *Meth. Enzymol.*, **57**, 153-166, 1978
- 8) Ruby, E.G., and Morin J.G., “Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 406-411,1979
- 9) Ruby, E.G., “Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis”, *Ann. Rev. Microbiol.*, **50**, 591-624. 1996
- 10) Węgrzyn, G. and Czyż, A., “How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology?”, *Oceanologia*, **44** (3), 291-305, 2002
- 11) 澤辺 智雄、「ビブリオの多様性と進化」、日本細菌学雑誌、**65**(3)、333-342、2010
- 12) 荒川 豊、野々村 誠、栗田 恵子、杉森 博和、「海洋性発光バクテリアを用いた簡易毒性試験方法」、東京都立産業技術研究センター研究報告、第2号、110-111、2007
- 13) 山田 悦、「発光バクテリアを用いたバイオアッセイによる環境汚染物質のモニタリングに関する新展開」、ぶんせき、**12**、689-690、2014
- 14) Inouye, S., “NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein”, *FEBS Lett.*, **347**, 163-168, 1994
- 15) Miyashiro, T., Ruby, E.G, “Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*”, *Mol. Microbiol.*, **84** (5), 795-806, 2012
- 16) Jabłoński, E., and DeLuca, M, “Studies of control of luminescence in *Beneckeia harveyi*: properties of the NADH and NADPH: FMN oxidoreductase”, *Biochemistry*, **17**, 672-678, 1978
- 17) Ma, X.Y., Wand, X.C., Ngo, H.H., Guo, W., Wu, M.N., and Wang, N., “Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications”, *Sci. Total Environ.*, 468-**469**, 1-11, 2014

- 18) 細見 正明、金子 栄廣、「急性毒性試験による廃棄物の有害性評価」、廃棄物学会誌、**9(5)**、384-393、1998
- 19) Heelis, P.F., “The photophysical and photochemical properties of flavines(isoalloxazines)”, *Chem. Rev.*, **11**, 15-39. 1982
- 20) Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P., “Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulations”, *J. Bacteriol.*, **176(2)**, 269-275, 1994
- 21) Henares, B.M., Higgins, K.E., and Boon, E.M., “Discovery of a nitric oxide responsive quorum sensing circuit in *Vibrio harveyi*”, *ACS Chem. Biol.*, **7** (8), 1331-1336.2012
- 22) Nealson, K.H., “Autoinduction of bacterial luciferase occurrence, mechanism and significance”, *Arch. Microbiol.*, **112**, 73-79, 1977
- 23) Ke, X., Miller, L.C., Bassler, B.L., “Determinants governing ligand specificity of the *Vibrio harveyi* LuxN quorum-sensing receptor”, *Mol. Microbiol.*, **95(1)**, 127-142, 2015
- 24) Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon GL, Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J., “Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase”, *Biochem*, **20**, 2444-2449, 1981
- 25) Gilson, L., Kuo, A., Dunlap, P.V., “AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins”, *J. Bacteriol.*, **177(23)**, 6946-6951, 1995
- 26) Kuo, A., Callahan, S.M., Dunlap, P.V., “Modulation of luminescence operon expression by *N*-octanoyl-L-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*”, *J. Bacteriol.*, **178(4)**, 971-976, 1996
- 27) Czyz, A., Plata, K., Wegrzyn, G., “Induction of light emission by luminescent bacteria treated with UV light and chemical mutagens”, *J. Appl. Genet.*, **43(3)**, 377-389, 2002
- 28) Bose, J. L., Kim, U., Bartkowski, W., Gunsalus, R.P., Overley, A.M., Lyell, N.L., Visick K.L., Stabb, E.V., “Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is controlled by the redox-responsive regulator ArcA”, *Mol. Microbiol.*, **65(2)**, 538-553, 2007
- 29) Zarubin, M., Belkin, S., Ionescu, M., Genin, A., “Bacterial bioluminescence as a lure for marine zooplankton and fish”, *PNAS*, **109(3)**, 853-857, 2012
- 30) Boettcher, K.J., Ruby, E.G., “Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*”, *J. Bacteriol.*, **172(7)**, 3701-3706
- 31) Dunlap, P.V., Greenberg, E.P., “Role of intercellular chemical communication in the *Vibrio fischeri* monocentric fish symbiosis”, In M. Dworkin(ed.), *Microbial cell-cell interactions. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, 219-253, 1991
- 32) Nealson, K.H., Hastings, J.W., “Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance”, *Microbiol. Rev.*, **43(4)**, 496-518, 1979

- 33) Ruby, E.G., Greenberg, E.P., Hastings, J.W., "Planktonic marine luminous bacteria: species distribution in the water column", *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**(2), 302-306, 1980
- 34) Ruby, E.G., McFall-Nagi, M.J., "A squid that glows at night: development of an animal-bacterial mutualism", *J. Bacteriol.*, **174**(15), 4865-4870, 1992
- 35) Ruby, E.G., Nealson, K.H., "Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*: model of symbiosis based on bacterial studies", *Biol. Bull.*, **151**, 574-586, 1976
- 36) Ruby, E.G., Nealson, K.H., "Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **23**(3), 530-533, 1978
- 37) 田端 健二、「海洋発光細菌を用いる環境モニタリング」、環境技術、**17**(10)、623-627、1988
- 38) Wada, M., Kogure, K., Ohwada, K., and Simidu, U., "Coupling between the respiratory chain and the luminescent system of *Vibrio harveyi*", *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1607-1611, 1992
- 39) Parvez, S., Venkataraman, C., and Mukherji, S.A., "A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals.", *Environ., Int'l*, **32**, 265-268, 2006
- 40) Tabei, Y., Era, M., Ogawa, A., Morita, H., "Luminescence-based acute toxicity bioassay for heavy metals using insoluble-fibroin-film immobilized *Vibrio fischeri*", *Sensors and Materials*, **24**(5), 261-273, 2012
- 41) 小木曾 俊孝、中西 加奈子、新谷 依子、永島 聡子、高橋 浩司、平川 博仙、堀 就英、梶原 淳睦、「果実中防かび剤の分析法開発及び妥当性評価」、福岡県保健環境研究所年報第 43 号、76-81、2016
- 42) Smilanick, J.L., Sorenson, D., Mansour, M., Aieyabei, J., and Plaza, P., "Impact of a brief postharvest hot water drench treatment on decay, fruit appearance, and microbe populations of California lemons and oranges", *Hortechology*, **13**(2), 333-338, 2003
- 43) Smilanick, J.L., Mansour, M.F., Margosan, D.A., and Mlikota Gabler, F., "Influence of pH and NaHCO<sub>3</sub> on effectiveness of imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit", *Plant Dis.*, **89** (6), 640-648, 2005
- 44) Eckert, J.W., and Brown, G.E., "Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. In Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens", (Hickey, K. D., ed.), American Phytopathological Society, St. Paul, MN., 92-97, 1986
- 45) Ismail, M., and Zhang, J., "Post-harvest citrus disease and their control", *Outlooks in Pest Management*, **15**, 29-35, 2004
- 46) 柏倉 桐子、花井 義道、加藤 辰夫、「輸入柑橘果実に残留するイマザリルの調査」、横浜国大環境研究紀要、**19**、11-14、1993

- 47) 吉岡 直樹、林 幸子、稲田 忠明、「かんきつ類における 7 種防かび剤の迅速分析法の検討」、食衛誌、**56**(5)、228-232
- 48) 厚生労働省監修、食品衛生検査指針食品添加物編、東京、日本食品衛生協会、112-126、2003
- 49) 村岡 未彩、「「安心・安全」を守り隊～バイオセンサーが活躍するために～」、生物工学会誌、**92**(9)、511、2014
- 50) Fulladosa, E., Murat, J.C, Bollinger, J.C, and Villaescusa I., “Adverse effects of organic arsenical compounds towards *Vibrio fischeri* bacteria”, *Sci. Total Environ.*, **377**, 207-213, 2007
- 51) 丹波 一樹、「生物発光、化学発光を用いたバイオ計測技術に関する調査研究」、産総研計量標準報告、**6**(1)、53-59、2007
- 52) Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J., Dunlap, P.V., “Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. Nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol*, **57**, 2823-2829, 2007
- 53) Showalter, R.E., Martin, M.O., Silverman, M.R., “Cloning and nucleotide sequence of *lux R*, a regulatory gene controlling bioluminescence in *Vibrio harveyi*”, *J. Bacteriol*, **172**(6), 2946-2954, 1990
- 54) Miyamoto, C.M., Graham, A.F., and Meighen, E.A., “Nucleotide sequence of the *LuxC* gene and the upstream DNA from the bioluminescent system of *Vibrio harveyi*”, *Nucleic Acids Res*, **16**(4), 1551-1562, 1988
- 55) Freeman, J.A., Bassler, B.L., “A genetic analysis of the function of *LuxO*, a two-component response regulator involved in quorum sensing in *Vibrio harveyi*”, *Mol. Microbiol.*, **31**(2), 665-677, 1999
- 56) Dunlap, P.V., “Bioluminescence”, *Microbiol.* In: Editor-in-Chief: Moselio S, editor. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, Oxford, 45-61, 2009
- 57) Daubner, S.C., Astorga, A.M., Leisman, G.B., Baldwin, T.O., “Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein”, *PNAS*, **84**, 8912-8916, 1987
- 58) Macheroux, P., Schmidt, K.U., Steinerstauch, P., Ghisla, S., Colepicolo, P., Buntic, R., Hastings, J.W., “Purification of the yellow fluorescent protein from *vibrio fischeri* and identity of the flavin chromophore”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **146**(1), 101-106, 1987
- 59) Meighen, E.A., “Molecular biology of bacterial bioluminescence”, *Microbiol, Rev.*, **55**(1), 123-142, 1991
- 60) 和田 実、「海洋性発光細菌 *Photobacterium leiognathi* と魚類の共生関係」、化学と生物、**45**(4)、261-264、2007

- 61) Wada, M., Kamiya, A., Uchiyama, N., Yoshizawa, S., Kita-Tsukamoto., K., Ikejima, K., Yu, R., Imada, C., Karatani, H., Mizuno, N., Suzuki, Y., Nishida, M., Kogure K., “LuxA gene of light organ symbionts of the bioluminescent fish *Acropoma japonicum* (Acropomatidae) and *Siphamia versicolor* (Apogonidae) forms a lineage closely related to that of *Photobacterium leiognathi* ssp. *mandapamensis*”, *FEMS Microbiol. lett*, **260**, 186-192, 2006
- 62) Visick., K.L., Foster, J., Doino, J., McFall-Ngai, M., Ruby, E.G., “*Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ”, *J. Bacteriol.*, **182**(16), 4578-4586, 2000
- 63) Watanabe, H., Inaba, H., and Hastings, J. W., “Effects of aldehyde and internal ions on bioluminescence expression of *Photobacterium phosphoreum*”, *Arch. Micorobiol.*, **156**, 1-4., 1991
- 64) Berglind, R., Leffler, P., and Sjöström, M., “Interactions between pH, potassium, calcium, bromide, and phenol and their effects on the bioluminescence of *Vibrio fischeri*”, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **73**, 1102-1112, 2010
- 65) Oh, S., Kogure, K., Ohwada, K., Simidu, U., “Correlation between Possession of a Respiration-Dependent Na<sup>+</sup> Pump and Na<sup>+</sup> requirement for Growth of Marine Bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(6), 1844-1846, 1991
- 66) Nealson, K.H., Platt T., and Hastings J.W., “Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system”, *J. Bacteriol.*, **104**(1), 313-322, 1970
- 67) Kertesz, M.A., “Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria”, *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 135-175, 1999
- 68) Ken-Dror, S., Lanyi, J.K., Schobert, B., Silver, B., Avi-Dor, Y., “An NADH:quinone oxidoreductase of the halotolerant bacterium Ba<sub>1</sub> is specifically dependent on sodium ions”, *Arch. Biochem. Biophys*, **244**(2), 766-772, 1986
- 69) Kogure, K., Tokuda, H., “Respiration-dependent primary Na<sup>+</sup> pump in halophilic marine bacterium, *Alcaligenes* strain 201”, *FEBS Lett*, **256**, 147-149, 1989
- 70) Tokuda, H., Kogure, H., “Generalized distribution and common properties of Na<sup>+</sup> -dependent NADH:quinone oxidoreductase in Gram-negative marine bacteria”, *J. Gen. Microbiol*, **135**, 703-709, 1989
- 71) Tsuchiya, T., Shinoda, S., “Respiration-driven Na<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup> circulation in *Vibrio parahaemolyticus*”, *J. Bacteriol*, **162**(2), 794-798, 1985
- 72) Udagawa, T., Unemoto, T., Tokuda, H., “Generation of Na<sup>+</sup> electrochemical potential by the Na<sup>+</sup>-motive NADH oxidase and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport system of a moderately halophilic *Vibrio costicola*”, *J. Baiol. Chem*, **261**(6), 2616-2622, 1986
- 73) Caldara, M., Dupont, G., Leroy, F., Goldbeter, A., Vuyst, L.D., Cunin, R., “Arginine biosynthesis

- in *Escherichia coli*, experimental perturbation and mathematical modeling”, *J. Biol. Chem.*, **283** (10), 6347-6358, 2008
- 74) Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., and Stalon, V., “Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria” *Micobiol. Rev.*, **50** (3), 314-352, 1986
- 75) 鈴木 庸平、須甲 武志、「地球微生物学（その 1）微生物のエネルギー獲得戦略—岩石と放射性核種で呼吸する微生物」、地質ニュース 630 号、62-66、2007
- 76) Schepers, H.T.A.M., “Decreased sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* to fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis”, *Neth. J. Pl. Path.*, **89**, 33-35, 1983
- 77) Bjørnlund, L., Ekelund, F., Christensen, S., Jacobsen, C.S., Krogh, P.H., Johnsen, K., “Interactions between saprotrophic fungi, bacteria and protozoa on decomposing wheat roots in soil influenced by the fungicide fenpropimorph (Corbel®): a field study”, *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 967-975, 2000
- 78) Onyewu, C., Blankenship, J.R., Poeta, M.D., and Heitman, J., “Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**(3), 956-964, 2003
- 79) Jang, H-J., Nde, C., Toghrol, F., and Bentley, W.E., “Microarray analysis of toxicogenomic effects of ortho-phenylphenol in *Staphylococcus aureus*”, *BMC Genomics*, **9**, 2008
- 80) 牧村 めぐみ、楠井 隆史、「発光細菌を用いた環境モニタリングに関する研究(2)」、富山県工業技術センター研究報告、No.25、121-122、2011
- 81) 堤 一代、小川 あかね、福田 翼、森田 洋、「フィブロイン膜の不溶化に係る諸要因の解明」、日本食品工学会誌、**11**(2)、105-112、2010
- 82) 玉田 靖、「絹の化学と材料開発」、化学と教育、**64**(9)、456-459、2016
- 83) 玉田 靖、「フィブロインの利用」、蚕糸・昆虫バイオテック、**76**(1)、3-8、2007
- 84) Rosson, R.A., Nelson, K.H., “Autoinduction of Bacterial Bioluminescence in a Carbon Limited Chemostat”, *Arch Microbiol*, **129**, 299-304, 1981
- 85) Akaike, T., Ida, T., Wei, F-Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Md. Alam, M.M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tamura, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J.M., Motohashi, H., “CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics”, *Nature*, **8**, 2017

本論文の成果は以下の英文誌に、すでに公表済みである。

- (a) Kuwahara, H., Ninomiya, J., Morita, H., “Control of *Aliivibrio fischeri* Luminescence and Decrease in Bioluminescence by Fungicides”, *Biocontrol Science*, **23**(2), 2018 掲載予定
- (b) Kuwahara, H., Ninomiya, J., Morita, H., “Relationship between cell growth and luminescence of using four marine luminous bacteria in artificial sea water and sea water medium”, *In proceedings of the international congress on, chemicals, biological and environmental sciences*, Kyoto, Japan, 509-524, 2017
- (c) Kuwahara, H., Ninomiya, J., Morita, H., “Application of luminescence of marine luminous bacteria *Aliivibrio fischeri* to toxicity assays for postharvest pesticides imazalil and thiabendazole”, *In proceedings of the international research conference on engineering and thechnology*, Kitakyushu, Fukuoka, Japan, 118-128, 2017

## 謝辞

本研究は、著者が北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科に在籍中に行ったものであり、本研究の遂行のみならず、6年間の研究生活においてこれまで多くのご指導、ご助言を厚く賜りました指導教授の北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科の森田 洋 教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。温かく、そして時には厳しくご指導して頂き、これからの研究生活や人生において大切なことをたくさん教わることができました。また研究室で「海洋性発光細菌」という研究テーマと出会えたおかげで、微生物のおもしろさや神秘を体感することができました。

本論文の審査にあたり、副査をして頂きました、北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科の中澤 浩二 教授、同 磯田 隆聡 准教授、同 情報メディア工学科 佐藤 雅之 教授に心から感謝いたします。的確なご指摘を頂いたことで、自身の研究分野ばかり見ては気づくことのできなかった新たな視点や発見に気づくことができ、研究をよりよいものにすることができました。

また本研究を行うにあたり、研究室に配属された頃より、研究に対するご指導、ご助言を厚く賜りました北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科 上江洲 一也 教授 ならびに 大分工業高等専門学校 一般科理科係（化学）の二宮 純子 准教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。研究に関するご助言やデータ整理のコツ、プレゼン技術、研究技術などを丁寧に教えて頂いたおかげで研究生活の礎をつくることができました。

さらに、研究のイロハや実験操作のコツを指導して頂き、研究を円滑に進めることができるように書類作成から研究室管理に至るまでの研究生活を支え、精神的にも多大なサポートをしてくださった研究員の恵良 真理子 様に深く御礼申し上げます。そして研究生活において精神的に支えて頂いた森田研究室の先輩、同期、後輩の皆様方に心より感謝いたします。

最後に、博士課程の今日まで、生活面、精神面、健康面を支え、見守ってくれました家族に心より深く感謝いたします。博士課程に進学し研究を続け、多くの人と出会い、たくさんのことを学ぶことができたのは、家族の支えがあったからこそできたことでした。本当にありがとうございました。

2018年3月 桑原 眸