

海洋性発光バクテリア *Vibrio fischeri* の生物発光強度に及ぼす Werner 型錯体の酸化還元電位およびイオン価の影響

関根嗣晃¹, 池田四郎², 関根嘉香*³

¹東海大学大学院 総合理工学研究科 総合理工学専攻

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

²東海大学大学院 地球環境科学研究科 地球環境科学専攻

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

³東海大学 理学部化学科

〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1

(2023 年 10 月 13 日受付；2023 年 12 月 8 日受理)

Effect of redox potential and ion valency of Werner-type metal complexes on the bioluminescence intensity of marine luminescent bacterium *Vibrio fischeri*

by

Hideaki SEKINE¹, Shiro IKEDA² and Yoshika SEKINE*³

¹Graduate School of Science and Technology, Tokai University

4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292 Japan

²Graduate School of Earth and Environmental Sciences, Tokai University

4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292 Japan

³Department of Chemistry, School of Science, Tokai University

4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa, 259-1292 Japan

*Corresponding author: E-mail: sekine@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

(Received on Oct. 13, 2023; accepted on Dec. 8, 2023)

Abstract

Marine bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri*, is currently used for determining the toxicity of environmental contaminants. Heavy metal ions, such as Co^{2+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} , in aquatic samples have been known to inhibit the bacterial bioluminescence, whilst we previously found the inhibition (*INH*) was reduced by the formation of octahedral Werner-type metal complexes with bidentate ligands, ethylenediamine and glycine. Though we thought this phenomenon was influenced not only by the complex structure but also by bioavailability, it was not fully explained. In this study, we aimed to explain this nature focusing on the redox potential (*ORP*) and ion valency of each complex solution. The *ORP* was measured for each complex solution and total ion valency was calculated for glycine complexes. The results showed a good linearity was found for ethylenediamine complexes between *ORP* and *INH*, with significant coefficients of determination (>0.9). No clear relationship between *ORP* and *INH* was found for glycine complexes, whilst the *INH* tended to increase with an increase in total ion valency of glycine complexes from zero to +2 which relates to bioavailability of such metal ions by *Vibrio fischeri*.

Keywords: Metal complex; Bioluminescent bacteria; *Vibrio fischeri*; Redox potential; Ion valency

1 緒言

海洋性発光バクテリア *Vibrio fischeri* (以下 *V. fischeri*) は, 細胞密度の増加に伴い quorum sensing (細胞密度感知システム) が誘発され, ルシフェリン-ルシフェラーゼ系の酵素反応により波長 490 nm の生物発光を示す [1-3]. しかしながら, 重金属イオン等の化学物質との接触によって細胞増殖の抑制や酵素活性の阻害が生じると, *V. fischeri* の生物発光は阻害され, 発光強度は減少する. この性質に基づき, 化学物質の *V. fischeri* に対する生物発光阻害度 (Bioluminescence Inhibition, 以下 *INH*) は, 化学物質の有害性の指標となり, 発光細菌試験は種々の化学物質を含む環境試料 (大気, 土壌, 河川水, フライアッシュ等) のバイオアッセイに広く利用され [4-11], また国際標準化機構 (ISO) により急性毒性試験法としても規格化されている [12].

筆者らは先行研究において, 中心金属イオンとして Co^{2+} , Zn^{2+} および Cu^{2+} を対象に両座配位子としてエチレンジアミン (以下 en) およびグリシン (以下, 配位子としては gly^- , 化学物質名としては Gly 使用) を反応させて Werner 型錯体を合成し, 錯体の配位構造が *V. fischeri* の発光強度に及ぼす影響を検討した. その結果, これら重金属イオンの *INH* が錯体の配位構造により緩和されることを示した [13]. この現象には錯体構造のみならず, *V. fischeri* による生物利用性が関与すると考えられたが, 十分に説明することは困難であった.

V. fischeri の生物発光強度に影響を与える物理化学的要因として, 紫外線, 酸化還元電位および浸透圧が知られている [14]. 本研究の目的は, *V. fischeri* の発光強度に及ぼす金属錯体の配位構造の影響を明らかにすることであり, 酸化還元電位 (Redox potential, 以下 *ORP*) に着目し, 各錯イオン溶液の *ORP* と *INH* の関係について検討した. 一方, en 錯体は配位数が変化してもイオン価は常に +2 であるが, Gly 錯体は配位数によって見かけのイオン価は 0 から +2 まで変化する. イオン価は *V. fischeri* による生物利用性に関係すると考えられ, 各錯体溶液のイオン価と *INH* の関係を検討した. その結果, 金属錯体の *INH* には *ORP* またはイオン価が関係することが明らかになったので報告する.

2 実験方法

2.1 金属錯体の調製

金属錯体は既報[13]と同様に調製した。硫酸コバルト(II)七水和物および硫酸亜鉛(II)七水和物、硫酸銅(II)五水和物は富士フィルム和光純薬製試薬特級を用い、滅菌イオン交換蒸留水で溶解・希釈して0.010 M-CoSO₄水溶液、0.010 M-ZnSO₄水溶液および0.010 M-CuSO₄水溶液をそれぞれ調製した。また en および Gly は、富士フィルム和光純薬製試薬特級を用い、滅菌イオン交換蒸留水で溶解・希釈して0.010 M-en 水溶液および0.010 M-Gly 水溶液をそれぞれ調製した。試験管内の0.010 M-金属イオン溶液1.0 mLに0.010 M-配位子水溶液を0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, および5.0 mLそれぞれ添加し、滅菌イオン交換蒸留水で全量を10 mLになるように定容した。金属イオンのモル濃度 C_M に対する配位子のモル濃度 C_L の比 C_L/C_M は0~5.0となる。尚、*V. fischeri* に対する各金属イオンの影響の強さを考慮し、Co²⁺ 錯体はこのまま供試し、Zn²⁺ および Cu²⁺ 錯体は10 μMに希釈して供試した。

2.2 酸化還元電位 (ORP) および pH の測定

各金属錯体溶液の ORP はペン型 ORP 計 (アズワン製 ORP70) を用いて繰り返し3回測定した。また pH はコンパクト pH メーター LAQUA twin (HPORIBA 製 pH-11B) を用いて繰り返し3回測定した。

2.3 イオン価の推定

Gly 錯体については、配位子の配位数によって、イオン価が-1, +0, +1, +2に変化する。一方、調製した Gly 錯体溶液は、配位数の異なる錯体の混合物であることから、見かけのイオン価を推定した。各溶液中の1~3配位の金属錯体の存在割合は、既報[13]に示したように逐次安定度定数[17]から推定し、これに各錯体のイオン価を乗じ、これらの総和を見かけのイオン価とした。Table 1に各 Gly 錯体の各モル比での存在割合、見かけのイオン価を示した。

2.4 生物発光阻害度 (INH) の測定

各金属錯体の *V. fischeri* に対する INH の値は既報[13]より引用した。配位子と金属イオンのモル濃度比 C_L/C_M に対する INH の変化を Appendix に示す。

3 結果および考察

3.1 エチレンジアミン錯体

各試験管溶液中の en と金属イオンのモル比 C_{en}/C_M に対する試料溶液の ORP の変化を Fig. 1 に示す。ORP は $n=3$ の平均値である。Co²⁺-en 錯体では、モル比 C_{en}/C_{Co} の増加に伴い ORP が顕著に減少し、モル比が3.0の領域で顕著な低下が確認された。その他の錯体ではモル比の増加に伴う ORP の低下は緩やかであった。

各モル比の生物発光阻害度 ORP と INH の関係を Fig. 2 に示す。いずれの金属錯体についても、ORP が増加すると INH が直線的に増加する傾向が見られた。そこで、金属イオン毎に最小二乗法による直線回帰式を求めた。Table 2 に結果を示す。決定係数 r^2 は0.86~0.90となり、いずれの金属イオンについても有意な直線関係を示した。*V. fischeri* は生物発光を細胞膜表面の呼吸鎖で消費出来な

Table 1 Estimated coordination structure and total valence of glycine complexes.

C_M	C_{gly^-}/C_M	Abundance of $\{C[M(\text{gly}^-)_i(\text{H}_2\text{O})_{6-2i}]^{2-i}\}$				Estimated total ion valency of complexes
		$i = 0$	$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	
Co^{2+} 1.0 mM	0	1.0	0	0	0	2.0
	0.5	0.65	0.33	0.023	0.000053	1.6
	1.0	0.40	0.51	0.09	0.00049	1.3
	1.5	0.22	0.57	0.20	0.0023	1.0
	2.0	0.14	0.55	0.30	0.0052	0.83
	2.5	0.10	0.51	0.38	0.0091	0.70
	3.0	0.062	0.46	0.46	0.015	0.57
	3.5	0.045	0.41	0.52	0.021	0.48
	4.0	0.033	0.37	0.57	0.028	0.41
	4.5	0.025	0.33	0.61	0.036	0.35
Zn^{2+} 10 μM	0	1.0	0	0	0	2.0
	0.5	0.72	0.27	0.0044	0.0000031	1.7
	1.0	0.51	0.47	0.018	0.000031	1.5
	1.5	0.36	0.60	0.043	0.00013	1.3
	2.0	0.28	0.65	0.065	0.00028	1.2
	2.5	0.21	0.69	0.10	0.0006	1.1
	3.0	0.17	0.70	0.12	0.0010	1.0
	3.5	0.14	0.71	0.15	0.0014	1.0
	4.0	0.12	0.70	0.17	0.0019	0.94
	4.5	0.10	0.70	0.20	0.0025	0.90
Cu^{2+} 10 μM	0	1.0	0	0	0	2.0
	0.5	0.53	0.45	0.018	0	1.5
	1.0	0.15	0.70	0.15	0	1.0
	1.5	0.018	0.45	0.53	0	0.5
	2.0	0.00067	0.11	0.89	0	0.1
	2.5	0.000034	0.026	1.0	0	0.03
	3.0	0.0000086	0.013	1.0	0	0.01
	3.5	0.0000039	0.0091	1.0	0	0.01
	4.0	0.0000022	0.0068	1.0	0	0.01
	4.5	0.0000014	0.0055	1.0	0	0.01
5.0	0.0000010	0.0045	1.0	0	0.00	

かった共存物質に由来する過剰な還元力を除去する為に用いている [16]. 本研究における錯形成に伴う生物発光の増大は、各金属イオンの錯形成による還元力の増加が原因であると考えられる. 回帰直線の傾きは Co^{2+} -en 錯体と Zn^{2+} -en 錯体はそれぞれ 0.39 と 0.42 と非常に近い値を示したが、 Cu^{2+} -en 錯体は 0.23 と低い値を示した. これは Co^{2+} 、 Zn^{2+} に比べて Cu^{2+} のみヤーン・テラー効果が顕著であり錯体の正八面体構造の歪みに起因すると考えられる [15].

尚、試料溶液の pH は、 Co^{2+} 溶液では 6.2~9.7、 Zn^{2+} 溶液では 6.1~7.1、 Cu^{2+} 溶液は 6.2~7.1 であった. *V. fischeri* を用いた生物発光試験では、酸性側または塩基性側ではたんぱく質の変性により発光阻害が生じることから、試料溶液の至適 pH として 6.0~8.5 が推奨されている. Co^{2+} -en 錯体においてモル比 4.0 以上では pH が 8.5 以上となり、pH に起因する発光阻害が考えられたが、結果的には

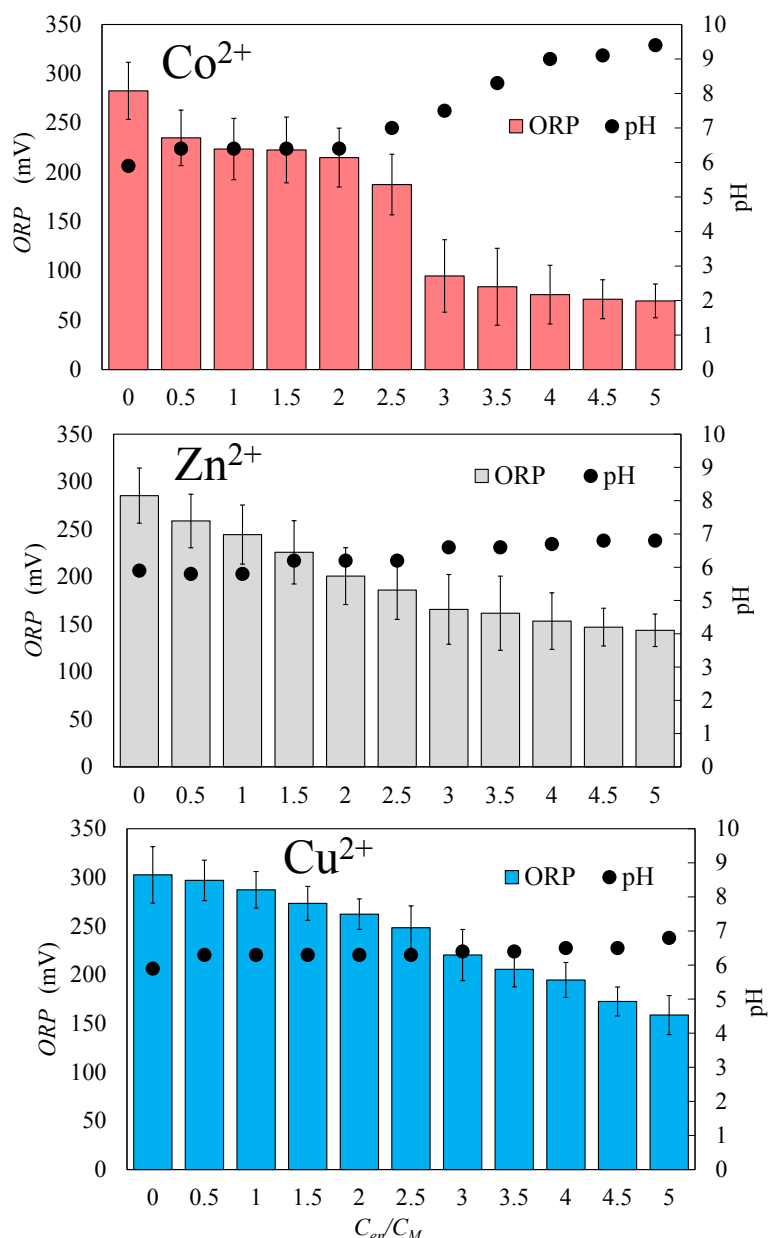


Fig. 1 Changes in *ORP* and *pH* of metal ion solutions with the formation of ethylenediamine complexes as a function of molar concentration ratio of ethylenediamine and bivalent metal ions, C_{en}/C_M .

ORP の効果が優位に表れたものと考えられる。

3.2 グリシン錯体

Gly はアミノ基 ($-\text{NH}_2$) とカルボキシ基 ($-\text{COOH}$) を有するアミノ酸である。存在形態は *pH* によって変化し、錯体を形成する場合、等電点の 5.97 以上で陰イオンにならないと錯体を形成しない。Fig. 3 に示すように、すべての錯体で等電点以上の *pH* の値を示していることから、配位子として Gly は機能していると考えられる。また *V. fischeri* の至適 *pH* の範囲内に入っていることを確認した。各金属錯体溶液中の Gly と金属イオンのモル比 C_{gly^-}/C_M に対する試料溶液の *ORP* の変化を Fig. 3 に示す。*ORP* は $n = 3$ の平均値である。いずれの Gly 錯体についても、配位子を添加しない場合に比べて、わずかに *ORP* の上昇が見られるのみであり、en 錯体とは異なり顕著な変化は見られなかった。

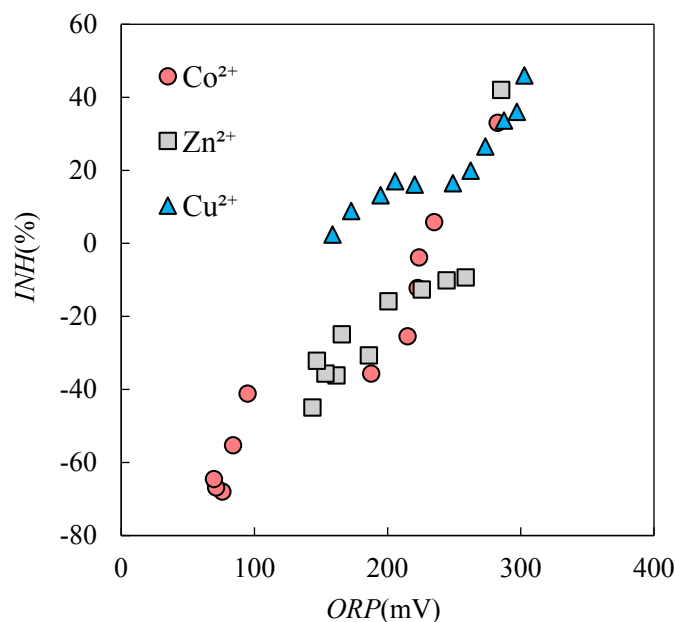


Fig. 2 Relationships between *ORP* and *INH* for each ethylenediamine complex solutions. The values of *INH* were cited from ref. [13].

Table 2 Linear regression analysis for *ORP* and *INH* of ethylenediamine complexes.

	slope	intercept	r^2
Co^{2+}	0.39	-90	0.90
Zn^{2+}	0.42	-100	0.90
Cu^{2+}	0.23	-30	0.86

各試料溶液の *ORP* の変化と *INH* の変化の関係を Fig. 4 に示す。両者には相関関係は見られず、Gly 錯体の場合、*ORP* は *V. fischeri* の生物発光阻害に対する主要な影響因子ではないと考えられる。

Fig. 5 に見かけ上の Gly 錯体のイオン価に対する *INH* の変化を示した。Co²⁺ のモル比 4.0 から 5.0 を除き、見かけのイオン価の増加に伴い、*INH* も増加する傾向が見られた。細菌の細胞表面は、中性付近の水環境中では、細胞表面に露出している分子のカルボキシル基やリン酸基などが解離して負に帯電していることが知られており [18]、Gly 錯体の見かけのイオン価が大きくなるほど細胞表面と Gly 錯体間の引力が働き、*V. fischeri* に作用しやすくなると考えられる。Co²⁺-Gly 錯体のモル比 4.0~5.0 のみ、見かけのイオン価が低いにも関わらず、*INH* が高い値を示した原因として、Co²⁺ が他の金属イオンと比べて 1.0 mM と 100 倍高いため、Gly 濃度も高いことが考えられる。Gly はグラム陰性細菌に抗菌作用が知られており [19, 20]、Gly が過剰に存在すると、細胞の構造を維持するペプチドグリカンの前駆体にアラニンの代わりに Gly が取り込まれ、生成するペプチドグリカンの構造が不安定になり [21]、本来取り込まれ難いモル比 4.0~5.0 の Co²⁺-Gly 錯体も細胞に取り込まれ易くなったためと考えられる。

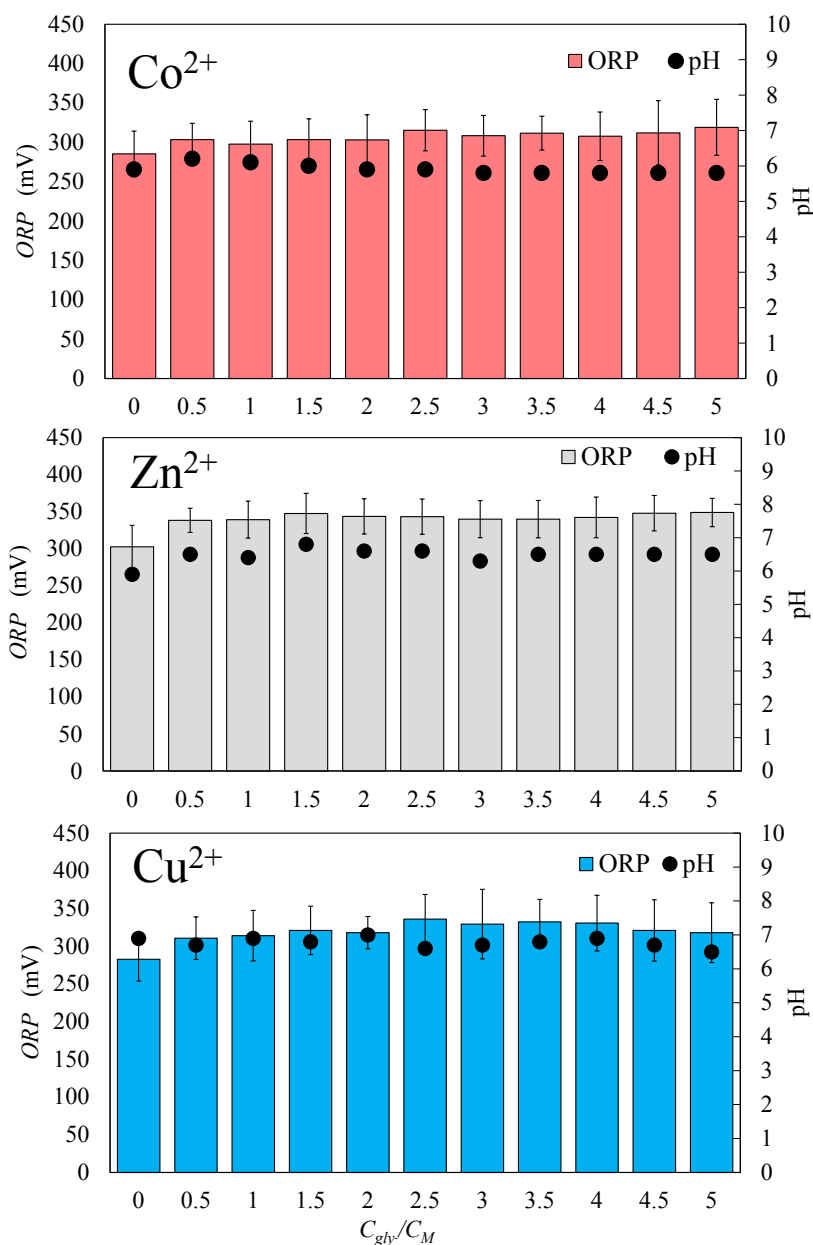


Fig. 3 Changes in *ORP* and pH of metal ion solutions with the formation of glycine complexes as a function of molar concentration ratio of glycine and bivalent metal ions, C_{gly^-}/C_M .

4 結論

Co^{2+} , Zn^{2+} および Cu^{2+} を中心金属イオン, en および Gly を配位子とする Werner 型錯体では, 配位子の配位数の増加に伴い, *V. fischeri* に対する生物発光阻害が緩和される傾向が見られた. この理由を検討した結果, en 錯体の場合は金属錯体溶液の *ORP* が, Gly 錯体の場合は見かけのイオン価が影響することがわかった. 環境中では重金属イオンは様々な配位子と結合して錯体形成していると考えられ, 重金属イオンの環境毒性を評価する場合, その存在形態を考慮する必要がある.

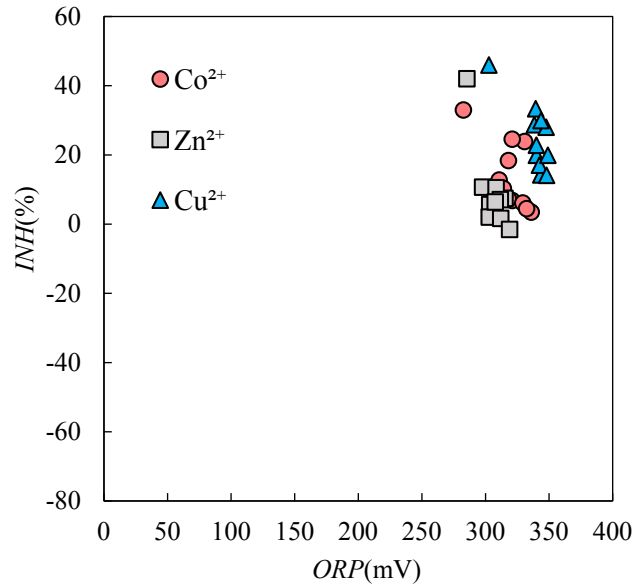


Fig. 4 Relationships between *ORP* and *INH* for each glycine complexes solution. The values of *INH* were cited from ref. [13].

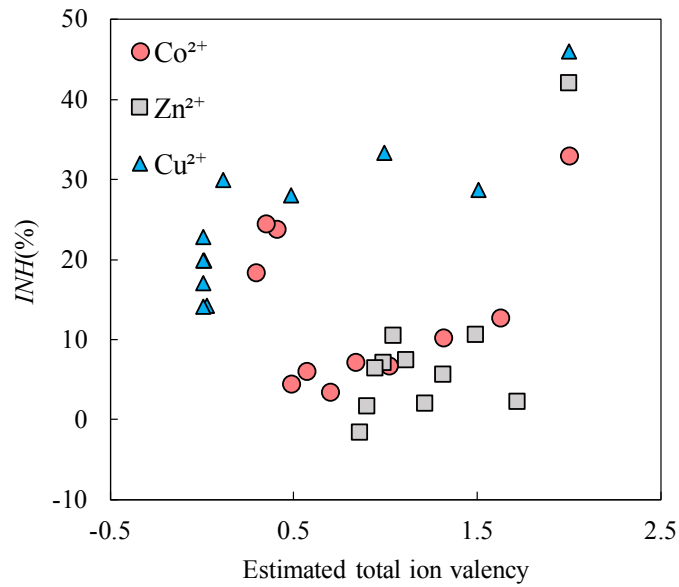


Fig. 5 Relationships between estimated total ion valency and *INH* of glycine complexes. The values of *INH* were cited from ref. [13].

謝 辞

本研究の遂行に際し、日立化成工業株式会社の栗原一義氏、前川 麦氏より ROTAS™ キットをご提供頂くとともに、ご助言を賜りましたので、記して感謝します。

参考文献

- [1] J. W. Hastings, C. J. Potrikus, S. C. Gupta, M. Kurfurst, and J. C. Makemson, *Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria*, Adv. Microb. Physiol., **26** (1985) 235–291. DOI: 10.1016/S0065-2911(08)60398-7
- [2] S. Inouye, *NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium Vibrio fischeri ATCC 7744 is a flavoprotein*, FEBS Lett., **347** (1994) 163–168. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00528-1
- [3] T. Miyashiro, and E. G. Ruby, *Shedding light on bioluminescence regulation in Vibrio fischeri*, Mol. Microbiol., **84** (2012) 795–806. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08065.x
- [4] 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, **5** (1998) 384–393. DOI: doi.org/10.3985/wmr.9.384
- [5] W. Ocampo-Duque, J. Sierra, N. Ferre-Huguet, M. Schuhmacher, and J. Domingo, *Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with Vibrio fischeri*, Chemosphere, **72** (2008) 715–721. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.03.055
- [6] 荒川豊, 野々村誠, 坂口慶, 発光バクテリアを用いたバイオアッセイによる水中の有害物質のスクリーニング, 日本工業用水協会研究発表会講演要旨, **42** (2007) 100–103.
- [7] 小倉哲, 上村由加里, 久保清康, 藤平弘樹, バイオで測る (Ⅱ) 生物検定法による土壌・底質・水質のダイオキシン類測定, 資源環境対策, **44** (2008) 21–24.
- [8] E.C. Faria, T. B. J. Brown, and R.D. Snook, *Water toxicity monitoring using Vibrio fischeri: a method free of interferences from colour and turbidity*, J. Environ. Monit., **6** (2004) 97–102.
- [9] P. Alvarenga, P. Palma, A. P. Goncalves, R. M. Fernandes, A. De Varennes, E. Duarte, A. C. Cunha-Queda, and G. Vallini, *Evaluation of tests to assess the quality of mine-contaminated soils*, Environ. Geochem. Health, **30** (2008) 95–99. DOI: 10.1039/b311137g
- [10] 池田四郎, 関根嘉香, 海洋性発光バクテリア *Vibrio fischeri* の生物発光阻害に基づく大気中粒子状汚染物質のバイオモニタリング手法に関する研究, 大気環境学会誌, **44** (2009) 16–23. DOI: 10.11298/taiki.44.16
- [11] S. Ikeda, I. Kostova, H. Sekine, and Y. Sekine, *Effect of coal fly ash leachate on the bioluminescence intensity of Vibrio fischeri*, Coal Combustion and Gasification Products, **8** (2016) 1–8. DOI: 10.4177/CCGP-D-16-00001.1
- [12] ISO11348, *Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of vibrio fischeri (Luminescent bacteria test)* (1998)
- [13] 関根嗣晃, 池田四郎, 関根嘉香, 海洋性発光バクテリア *Vibrio fischeri* の生物発光強度に及ぼす Werner 型金属錯体の配位構造の影響, 環境化学, **31** (2021) 1–7 DOI: 10.5985/jec.31.23
- [14] H. Kuwahara, J. Ninomiya, H. Morita, *Control of Aliivibrio fischeri luminescence and decrease in bioluminescence by fungicides*, Biocontrol Sci., **23**(3) (2018) 85–96. DOI: 10.4265/bio.23.85
- [15] 山口佳隆, 金属錯体の形と色, 化学と教育, **65**(4) (2017) 198–201. DOI: 10.20665/kakyoshi.65.4.198
- [16] J.-J. Bourgois, F. E. Sluse, F. Baguet, and J. Mallefet, *Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria*, J Bioenerg Biomembr., **33**(4) (2001) 353–363. DOI: 10.1023/a:1010615508916
- [17] 日本化学会編, “化学便覧基礎編Ⅱ”, 丸善, pp.343–354 (2002).
- [18] 堀克敏, 細菌の付着機構, 日本接着学会誌, **46**(2) (2010) 70–75. DOI: 10.11618/adhesion.46.70
- [19] J. Godon, and M. Gordon, *Involution forms of the genus vibrio produced by glycine*, J. Path. Bact., **55** (1943) 63–68. DOI: 10.1002/path.1700550109
- [20] 三浦弘之, 関川三男, グラム陰性桿菌に対するグリシンの抑菌作用, 帯大研報, **11** (1979) 333–352.
- [21] W. Hammes, K. H. Schleifer, and O. Kandler, *Mode of action glycine on the biosynthesis of peptidoglycan*, J. Bacteriol., **116** (1973) 1029–1053. DOI: 10.1128/jb.116.2.1029-1053.1973

Appendix

Changes in the bioluminescence inhibition (*INH*) of metal ion solutions with the formation of ethylenediamine and glycine complexes as a function of molar concentration ratio of ligand and bivalent metal ions, C_L/C_M . The values of *INH* were cited from ref. [13].

C_L/C_M	Co-en	Zn-en	Cu-en	Co-gly ⁻	Zn-gly ⁻	Cu-gly ⁻
0	33	42	46	33	42	46
0.5	5.8	-9.3	36	13	2	29
1	-4	-10	34	10	11	33
1.5	-12	-13	27	7	6	28
2	-25	-16	20	7	2	30
2.5	-36	-31	16	3	7	14
3	-41	-25	16	6	11	20
3.5	-55	-36	17	4	7	23
4	-68	-36	13	24	6	17
4.5	-67	-32	8.9	25	2	14
5	-65	-45	2.4	18	-2	20