

ルチフェリン、ルチフェラーゼ反応陽性の発光魚キン

メモドキ *Parapriacanthus beryciformis* について

フランク・ハリス・ジョンソン* 羽根田 弥太**

1. 緒 言

生物発光に於て、発光物質は対熱性物質ルチフェリンと、非対熱性物質ルチフェラーゼに分れ、この物質を混合すると光を放つことは、*Dubois* (1885) によって発見され、以来多くの発光生物に就てこの反応が試みられたが、総ての発光生物にこの反応が証明されたわけではなく僅かに、螢類、発光二枚貝 (*Pholas*, *Rocellaria*)、海螢 (*Cyprydina*)、発光エビ (*Systellaspis*, *Heterocarpus*)、ゴカイ類 (*Odontosyllis*, *Syllis*) 淡水巻貝 (*Latia*)、及びバクテリア類に於て証明されたに過ぎない。魚類では深海ソコダラ科のマンジウダラ *Malacocephalus laevis* の発光体はルチフェリン、ルチフェラーゼ反応があると *Hickling* (1925—26) が報告しているが、この魚の発光体は腺内に共棲する発光バクテリア (羽根田1938, 1951) であるから、魚の発光物質についてこの反応が証明されたわけではない。

一方魚類の発光器の形式から考えるとハダカイワシ類その他多くの深海発光魚に見られるように発光器が体表に現われていて古くより知られている発光魚と、ヒイラギ科 *Leiognathidae* (羽根田1940, 1950, 1955)、ホタルジャコ科 *Acropomidae* (羽根田 1950, 松原1953)、ツマグロイシモチ *Apogon marginatus* (加藤1947)、ハリダシエビス *Paratrachichthys prosthemi* (桑原1955, 羽根田1957) などのように発光体が体内深く埋れていて、光は胸部、腹部の半透明な筋肉を通して見られ、外形だけでは発光魚であることがわからない型のものがある。この形式の魚を羽根田は間接照明の発光魚 (羽根田1950) と呼んだが、まだ他に発見の可能性がある。昨年7月上旬、著者の一人羽根田は伊豆下田市内の魚屋の店頭で小アジに混っていたキンメモドキに発光器があることを発見した、胸部及び肛門の前方に筋肉内に埋れた発光腺があり、その外観は胸部発光腺はホタルジャコのそれと似ており、肛門発光腺はソコダラ類 *Macrouridae* (羽根田1938, 1951) の発光腺と似ているので、本種の発光腺内にも発光バクテリアが共棲するものと想像して、発光バクテリアの培養試験を行ったが、いずれもその結果は陰性であった。そこでルチフェリン、ルチフェラーゼ反応を試験した処、明かにその反応のあるのを認めた。著者の一人ジョンソンは発光物質の化学を、羽根田は発光器の構造、組織、発光状態の観察、発光器よりの発光バクテリアの培養試験を夫々分担して取りあえず協著として *Proceedings of the National Academy of Sciences*, に発表した。発光器の構造、組織等、詳細については尙不充分で改めて報告する予定であるが、本報告は和文によるものである。

2. 実験材料と実験経過

本発光魚はハタンボ科 *Pempheridae* に属するキンメモドキ *Parapriacanthus beryciformis* FRANZ で体長75mm、淡紅色の魚で内臓、胸部を除いて筋肉は半透明である。房州、横浜、伊豆半島より南部日本の太平洋岸に広く分布、伊豆方面では6、7月頃多く、下田付近の須崎の集漁灯の網、妻良港の大謀網には小アジに混って多く入る。食用とならず鶏の飼料又は肥料とされている。

材料はフォルマリン固定、セロイデン封埋、*Delafield* の *Haematoxylin-Eosin* 染色を行った。発光バクテリアの培養試験には3%食塩加寒天培養基を用いた。生の発光腺内容を海水及び蒸溜水

*プリンストン大学生物学教室、**横須賀市博物館

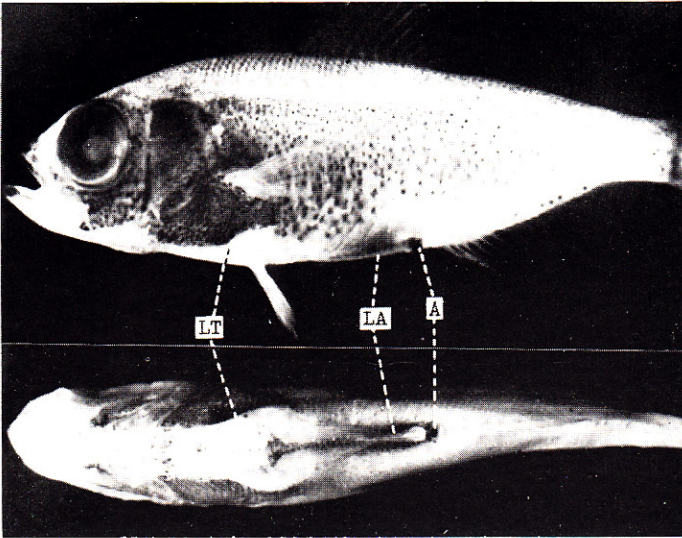


Fig. 1. Luminous organs of *Parapriacanthus beryciformis*, showing thoracic luminous duct (LT, anal luminous duct LA) and anus (A).

いた。又、実験は胸部、及び肛門発光腺を別々に試験し、又胸部及び肛門発光腺を交互に作用させて行った。

Adenosin Triphosphate (ATP), Flavin mononucleotide (FMN), Diphosphopyridine Nucleotide (DPNH), Decaldehyde, FMN+DPNH, 及び FMN+DPNH+Decaldehyde を夫々作用させ、発光の強弱を観察した。

3. 発 光 器

発光器は Fig 1 及び Fig 2 に示すように胸部発光器 (LT) と肛門発光器 (LA) とよりなる。胸部発光器は魚の体長 75mm のものでは長さ 7mm、巾 1mm、厚さ 0.2 mm の V 字状の発光腺よりなり、その外観はホタルジャコ *Acropoma japonicum* の発光腺に似ているが、構造、内容共に全然異っている。即ちホタルジャコの発光腺が開孔式で内容が発光バクテリアであるのに反して、本発光腺 (Fig 3. PHOT) は閉鎖式で内容は魚自体の発光細胞よりなる。眼の中心より 10mm 後方の腺の横断面を見ると発光腺は左右に ? 状となって現われる。発光腺の後方に反射層 (Fig 3 REFL) があり、前方に半透明乳白色の筋肉組織よりなるレンズ (Fig 3. LENS) がある。発光腺とレンズの間には黒色素斑 (Fig 3. CHR) があり、樹枝状に伸縮し、光の明滅を司るものとする。胸部発光器の前方の胸部龍骨筋 (Fig 2. KM) は半透明乳白色で、光をよく拡散、透過する性質がある。従ってこの部の

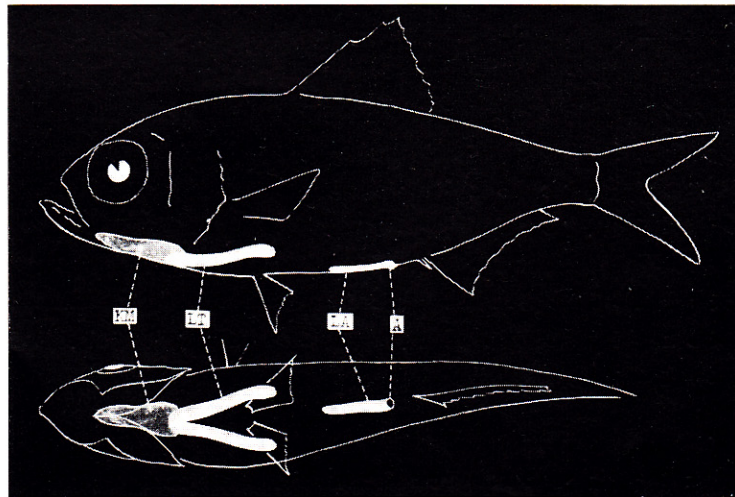


Fig. 2. Diagram of luminous areas of *Parapriacanthus beryciformis*, showing luminous duct LT, LA, Lens (KM) and Anus (A).

に浮遊させ発光の状況を観察、腺内容の染色には Haematoxylin Eosin 及び Carbol-fuchsin 溶液を用いた。

発光体の Luciferin-Luciferase 反応を調べた。Luciferin は 12 個の発光魚の発光腺を切りとり少量の海水と共に 1、2 分間煮沸し、これを急激に冷却した液を使用した。Luciferase は 12 個の魚の発光腺の冷水浸出液、及び等量の発光腺を大量の冷却したアセトンにて脱水し、これを乳鉢にて粉にし、これに海水を加えると発光するが、これを静置し光の消えたものを用

筋肉そのものが発光しているようで、この部も一種のレンズの作用をなしている。これはヒイラギ、ホタルジャコ、ハリダシエビスの場合と全く同様である。肛門発光器は肛門の前方、正中線上にあり、長さ5mm、巾1mm、厚さ0.2mm、外部より見るとソコダラ類 *Macrouridae* の発光腺と似ており、その構造も同様に開孔式で肛門の前方に小孔 (Fig 4. OP) を以て開孔している。ソコダラ類の発光腺の内容が発光細菌であるのに対し、本魚の肛門発光器の内容は自力

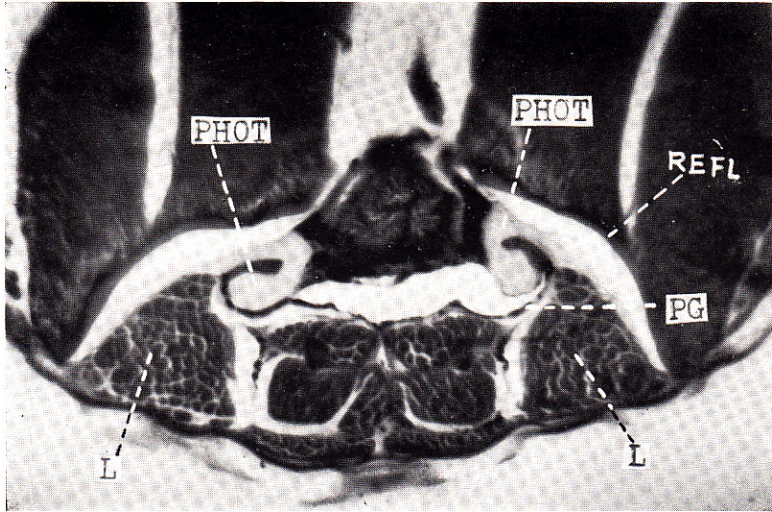


Fig. 3. Transverse section of the thoracic luminous duct, showing luminous tissue (PHOT), reflector (REFL), lens (L) and pigment (PG).

発光腺は多数の発光裸粒と核が見られる。両発光腺内には共に発光細菌を認めることは出来なかった。

発光による発光物質であって、暗所で生の魚の腹部を圧すると開孔より発光液が流出する。肛門発光腺 (Fig 4. PHOT) と表皮との間には透明な層があり、その層と間に黒色色素斑 (Fig 4. CHR) を含む層がある、同様に明滅を司るものと考えられる。胸部発光腺は Haematoxylin にも Eosin にも染色しにくく、平行に走る発光細胞と核が見られる。肛門発

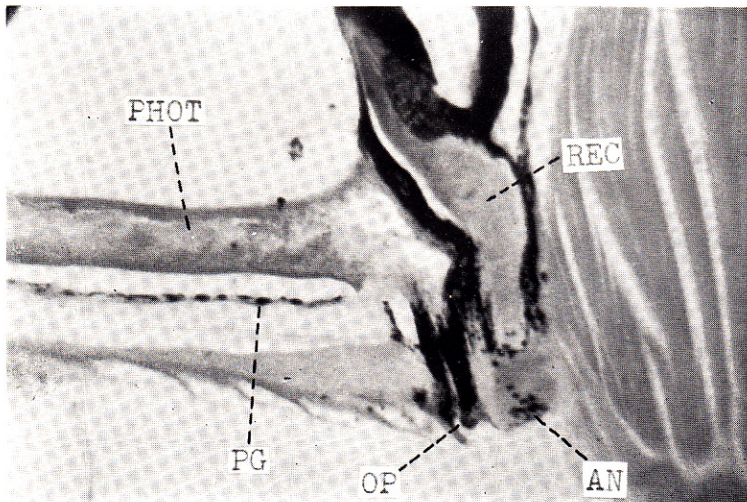


Fig. 4. Longitudinal section of the anal luminous duct, showing luminous tissue (PHOT), its opening (OP) reflector (REFL), pigment (PG) and anus (AN).

4. 発光腺内容の諸反応

発光器を切りとり乳鉢にてすりつぶし、海水及び蒸留水にて懸濁液を作り、暗室にてその発光状況を観察するに、海水よりもむしろ蒸留水懸濁液の方がよく光り、その光は24時間—30時間続く、魚を漁獲後、氷室に保存した場合6日後に於ても尚、発光腺の光を認めた。発光腺内の発光細菌培養試験は総て陰性であった。

Luciferin-Luciferase 反応に於て強い陽性を示した。ATP, FMN, DPNH, Decaldehyde,

FMN+DPNH, FMN + DPNH + Decaldehyde を夫々加えて発光力の変化を見たが、いずれの場合も光の強弱に顕著な影響は認められなかった。

本研究はユネスコ国内委員会委託、日本学術振興会の海洋資源開発委員会、アメリカ海軍調査室 (Nonr 1353 (OO)) 及びプリンストン大学の援助を得た。Proceedings of the National Academy of Sciences に掲載についてはプリンストン大学教授 E. Newton HARVEY 博士の尽力を得、東京教育大学下田臨海実験所長、高槻俊一博士は実験にあたり種々便宜を与えられ、本魚の同定は東海区水産研究所技官阿部宗明博士をわづらわした。茲に以上の諸氏に対して深く感謝の意を示す次第である。

文 献

- FRANZ, V., Abh. Math-phys. Kl, K. Bayer, Akad. Wiss., IV, Suppl. Bd. 1, 1-135, 1919. (cf. p. 33. and Fig. 46).
- HANEDA, Y., Jap. J. Physiol., 3, 319-326, 1938; J. Med. Sci., III Biophys., 5, 355-366, 1938; Pacific Sci., 4 (3), 214-227, 1950; Pacific Sci., 5 (4), 372-378, 1951; Luminous Organisms of Japan and the Far East. in the Luminescence of Biological Systems (F. H. JOHNSON, ed., Washington: A. A. A. S. publishers, 1955), 335-385; Sci. Rep. Yokosuka City Museum., 2, 15-22, 1957
- HANEDA, Y. and F. H. JOHNSON., Proc. National Academy of Sciences 44 (2): 127-129, 1958
- HARVEY, E. N. Bioluminescence (New York: Academic Press, 1952); Survey of Luminous Organisms: Problems and Prospects, in the Luminescence of Biological Systems (F. H. Johnson, ed., Washington: A. A. A. S. publishers, 1955), 1-24.
- HICKLING, C. F. J. Biol. Assoc. Un. King., 13, 914-937, 1925; 14, 495-507, 1926.
- KATO, K., Zool. Mag. Tokyo, 57, 185-198, 1947.
- KUWABARA, S., J. Shimanoseki College of Fisheries 4 (2), 81-95, 1955
- MATSUBARA, K., Mem. Coll. Agri. Kyoto Univ., 66, 21-29, figs 1-3, 1953
- McELROY, W. D. Proc. Nat., Acad. Sci., U. S., 33, 342-345, 1947;
- McELROY, W. D. and J. W. HASTINGS, Biochemistry of Firefly Luminescence, in the Luminescence of Biological Systems (F. H. Johnson, ed., Washington: A. A. A. S. publishers, 1955) 161-198.
- STREHLER, B. L. J. Amer. Chem. Soc., 75, 1264, 1953; Factors and Biochemistry of Bacterial Luminescence, in the Luminescence of Biological Systems (F. H. Johnson, ed., Washington: A. A. A. S. publishers, 1955) 209-255.

Résumé

The Luciferin-Luciferase Reaction in a Fish, *Parapriacanthus beryciformis*, of Newly Discovered Luminescence.¹⁾

Frank H. JOHNSON* and Yata HANEDA**

(With 4 Text-figures)

The small fish commonly known as "kinme modoki" ("false Beryx"), frequently encountered as an unimportant, chance specimen among commercially valuable fish in Japanese markets, was recently found (by Y. H.) to possess internal photogenic organs. The scientific name is *Parapriacanthus beryciformis*,²⁾ of the family Pempheridae, originally described and classified by FRANZ in 1910 on the basis of preserved specimens obtained near Yokohama in the collections of HABERER and DOFLEIN. Understandably, the original description neither mentions luminescence as a characteristic nor refers to the hidden photogenic organs, inasmuch as the luminescence is revealed only through careful examination of living specimens at night, or in the dark, and the source of the light laid is bare only by rather meticulous dissection.

The photogenic organs consist of two ducts underlying translucent muscle tissue on the ventral side between the pectoral fins and anus. The translucent muscle serves as a lens, as in *Acropoma japonicum* (HANEDA 1950), *Acropoma hanedai* (HANEDA 1950, MATSUBARA 1953), *Paratrachichthys prosthemi* (KUWABARA 1955, HANEDA 1957), and several representatives of the Leiognathidae (HANEDA 1940, 1950, 1955). Of the two ducts, the more anterior (thoracic duct) is a V-shaped, thin, white, tubular structure, closed at each end and resembling in appearance the U-shaped duct of *Acropoma japonicum* that contains symbiotic luminous bacteria. The more posterior (anal duct) is linear, extending mid-ventrally to the anus with which it communicates through a small pore; by pressing a living specimen between the fingers a luminous exudate is forced out the anus. In a specimen of 75 mm total length the thoracic duct is 10mm long, 1 mm wide and 0.2mm thick, while the anal duct, with the same width and thickness, is 7mm long.

Attempts to cultivate luminous bacteria, by the usual methods, from the photogenic ducts of 10 specimens gave negative results. On the other hand, a light-emitting, "luciferin-luciferase" reaction resulted on mixing two aqueous extracts, one prepared by boiling for 1-2 minutes, followed by rapid cooling with ice (luciferin, or substrate solution), and the other by grinding the minced ducts in cold water in a mortar (luciferase, or enzyme solution). Extracts prepared separately from the thoracic and anal ducts cross-reacted with light production, but no luminescent cross reaction occurred with extracts from other tissues. Light emission ceased in a vacuum but reappeared on

* Department of Biology, Princeton University, Princeton, New Jersey, U. S. A.

**Yokosuka City Museum, Yokosuka

1)Aided in part by contract Nonr 1353 (00) between the Office of Naval Research and Princeton University and Japanese National Commission for UNESCO.

2)Identified through the kind cooperation of Dr. Tokiharu ABE

admitting air, demonstrating the necessity for oxygen. Diffusible components involved in luminescence of firefly and bacterial extracts, namely, adenosine triphosphate (MC ELROY 1955, 1957), and flavine mononucleotide, decaldehyde and diphosphopyridine nucleotide (STREHLER 1953, 1955), respectively, had no observable effect on the luminescence of the fish extracts, except for a slight increase in intensity in portions containing phosphopyridine nucleotide.

The only previous report of a luciferin-luciferase reaction in fish luminescence (HICKLING, 1925, 1926) is open to question because of bacterial-like properties and because luminous bacteria have since been cultivated from the photogenic organs (HANEDA 1938, 1951). The present results constitute the first clear demonstration of this reaction in a self-luminous vertebrate, and only the seventh or eighth type of bioluminescent organism, out of the myriads known (HARVEY 1952, 1955), that has definitely yielded luminous extracts.