

УДК 577.34

СРАВНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ СИСТЕМ ПОЧВЕННЫХ ЧЕРВЕЙ

Н. С. Родионова*, В. Н. Петушков

Представлено академиком РАН И. И. Гительзоном 19.12.2018 г.

Поступило 24.12.2018 г.

Представлены результаты сравнительного исследования люциферин-люциферазных систем семи видов биолюминесцентных олигохет: *Henlea petushkovi*, *Henlea rodionovae*, *Fridericia heliota* (Enchytraeidae), *Microscolex phosphoreus* (Acanthodrilidae), *Pontodrilus litoralis* (Megascolecidae), *Eisenia lucens* и *Avelona ligra* (Lumbricidae).

Ключевые слова: биолюминесценция, почвенные черви, люциферин, люцифераза, *Henlea* sp., *Fridericia heliota*, *Microscolex phosphoreus*, *Pontodrilus litoralis*, *Eisenia lucens*, *Avelona ligra*.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524856754-759>

На сегодняшний день установлено, что из 40 семейств олигохет (Annelida: Clitellata: Oligochaeta) только четыре содержат светящиеся виды. В основном это довольно крупные тропические и субтропические черви. Сравнительное исследование 13 видов из шести родов трёх семейств (Acanthodrilidae, Lumbricidae, Megascolecidae), проведённое в конце прошлого века [1, 2], выявило единый тип люминесценции у этих червей. При раздражении все они выделяют целомическую жидкость, в клетках которой сосредоточена зависящая от содержания перекиси биолюминесцентная система. Алифатический альдегид N-изовалерил-3-аминопропаналь (люциферин американской акантодрилиды *Diplocardia longa*) проявляет себя как универсальный субстрат в реакции люминесценции экстрактов целомической жидкости любой из этих олигохет, так как их люциферины являются его аналогами. Однако спектры их люминесценции различаются в диапазоне 500–570 нм, что определяется индивидуальностью червяковых люцифераз. При этом люцифераза *D. longa* (фермент с M_r 300 кДа [3]) также способна стимулировать свечение экстрактов всех 13 видов. Биолюминесцентная система *D. longa* стала своеобразным эталоном для светящихся олигохет, и постулат о едином механизме их биолюминесценции продержался более 20 лет.

Открытие и исследование новых видов светящихся червей сем. Enchytraeidae в Сибири — *Fridericia heliota* и *Henlea* sp. — показало, что их биолю-

минесцентные системы отличаются как друг от друга, так и от всех ранее известных систем [4]. Для светоизлучения *F. heliota* необходимы пять компонентов: люцифераза, люциферин, АТФ, ион магния и кислород. Структура люциферина *F. heliota* уже расшифрована, сделано полное описание уникального механизма биолюминесценции этой энхитреиды [5, 6].

Для светящихся *Henlea* sp. недавно были установлены два близкородственных вида: *Henlea petushkovi* встречаются в окрестностях Красноярска, а *Henlea rodionovae* обитают в Иркутской области. Эти энхитреиды различаются рядом морфологических и анатомических особенностей [7] и имеют биолюминесцентную систему, включающую четыре основных компонента: люциферазу, люциферин, ион кальция и кислород [8]. Недавно в ходе очистки люциферина *Henlea* sp. были обнаружены ещё два низкомолекулярных компонента, обладающих флуоресцентными свойствами и способных активировать люминесценцию реакционной смеси in vitro. Предполагается, что именно они (или один из них), а не люциферин являются эмиттерами в люминесцентной реакции этих червей [9]. Таким образом, на примере сибирских энхитреид экспериментально было доказано разнообразие типов люциферин-люциферазных систем почвенных червей, что пробудило новую волну интереса к этой теме.

Исследователи европейской *Eisenia lucens* (= *Lumbricus submontana* Vejdovský, 1875) в 2016 г. заявили [10], что механизм биолюминесценции этой люмбрициды также отличается от других, ранее известных. Им не удалось разделить люциферин и люциферазу и воспроизвести реакцию биолюминесценции in vitro, но они, проведя аналогию с ме-

Институт биофизики
Федерального исследовательского центра
“Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской Академии наук”
*E-mail: valnat@yandex.ru

ханизмом бактериальной биолюминесценции, предположили, что эмиттером излучения *E. lucens* (493 нм) служит рибофлавин, содержащийся в целомоцитах. Коллеги прислали нам живых *E. lucens* для проведения перекрёстных реакций с сибирскими энхитреидами.

Во Франции несколько лет назад случайно был установлен факт свечения давно известного почвенного червя *Avelona ligra* (= *Octolasion ligrum* Bouche, 1969). Сюжет об этом в научно-популярном фильме BBC “Attenborough’s Life That Glows” 2016 г. содержит прекрасные кадры синей биолюминесценции этой любрициды. Нам удалось получить лиофильно высушенный образец одной особи *A. ligra*.

Недавно в пробах почвы, собранных в посёлках на берегах оз. Байкал, мы обнаружили ещё один биолюминесцентный вид олигохет — *Microscolex phosphoreus*. Эта акантодрилида родом из Южной Америки широко распространилась по всему миру, но в Сибири её ранее не находили [11]. Кроме живых байкальских микросколексов, лиофилизированные образцы *M. phosphoreus*, а также мегасколециды *Pontodrilus litoralis* (= *Pontodrilus bermudensis* Beddard, 1891) мы получили из Японии.

Образец североамериканской акантодрилиды *Diplocardia longa* нам достать не удалось, но мы синтезировали её люциферин — N-изовалерил-3-аминопропаналь.

Настоящая работа посвящена сравнительному исследованию биолюминесцентных систем семи видов из четырёх семейств олигохет. Исследование включало установление типов люциферин-люциферазных систем с помощью кросс-реакций и определение молекулярных масс люцифераз с помощью метода гель-фильтрации. Впервые для подобного исследования мы применили три разнотипных люциферина: синтетический N-изовалерил-3-аминопропаналь и нативные люциферины *F. heliota* и *Henlea* sp.

Для приготовления бесклеточных экстрактов использовали водные гомогенаты замороженных *H. petushkovi*, *H. rodionovae*, *F. heliota*, *M. phosphoreus* (1 г/5 мл) и лиофильно высушенных *M. phosphoreus*, *P. litoralis*, *A. ligra* (1 г/20 мл), а также замороженную целомическую жидкость, собранную после электрической стимуляции живых *M. phosphoreus* и *E. lucens* в небольшом количестве воды. Клетки дополнительно разрушали ультразвуком в течение 10 мин на ледяной бане, применяя дезинтегратор Sonics Vibra-Cell (“Sonics & Materials, Inc.”, США, диаметр зонда 13 мм, амплитуда 60 мкм). Полученные лизаты центрифугировали при 4 °С (центрифуга XPN-100

с угловым ротором Ti 50.2, “Beckman Coulter”, США, 140 000 г, 5 мин). Супернатанты отделяли и использовали для дальнейшего хроматографирования.

На колонку Superdex 200 10/300 GL (“GE Health-Care”, США) в каждом случае наносили 100 мкл супернатанта. Гель-фильтрацию проводили в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 100 мМ NaCl, со скоростью 0,7 мл/мин при комнатной температуре. Колонку калибровали, используя вещества с известной молекулярной массой: ферритин, альдолаза, каталаза, бычий сывороточный альбумин, овальбумин, миоглобин, рибонуклеаза, цитохром с, рибофлавин. Для определения пиков с люциферазной активностью полученные фракции тестировали в реакциях с соответствующими люциферинами и косубстратами. Использовали высокоочищенные препараты нативных люциферин-энхитреид *F. heliota* и *H. petushkovi*, а также люциферин *D. longa*, полученный синтетическим путём.

Изначально все свежеприготовленные супернатанты обладали высокой люминесцентной активностью, которая со временем значительно — на порядки — снижалась. Вернуть свечение на прежний уровень можно было добавками специфических для каждого вида червей субстратов. Для *F. heliota* это был АТФ, для *H. petushkovi* и *H. rodionovae* — термоактивированный нативный люциферин [9], для *M. phosphoreus* и *P. litoralis* — люциферин *D. longa*, для *E. lucens* — перекись водорода. Очевидно, именно эти компоненты “выгорали” в биолюминесцентной реакции первыми и лимитировали свечение бесклеточных экстрактов.

Интересно, что добавление синтетического люциферина *D. longa* почти не сказывалось на люминесценции супернатанта *E. lucens*, притом что перекись водорода стимулировала люминесценцию в 100 раз и более. Зато после полного падения интенсивности свечения (или при сильном разведении супернатанта) биолюминесцентный ответ на добавление люциферина *D. longa* возрастал. В эксперименте к супернатанту *E. lucens* (10 мкл в 100 мкл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7) сначала добавляли 1 мкл этанола в качестве контроля, а затем 1 мкл раствора синтетического люциферина *D. longa* в этаноле (10 мкг/1 мкл), после чего фиксировали вспышку света (рис. 1а). При последовательном добавлении 1 мкл люциферина *D. longa* и 1 мкл 0,03% перекиси водорода к супернатанту (25 мкл в 100 мкл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7) мы наблюдали двухэтапную стимуляции люминесценции (рис. 1б), как и в экспериментах группы Wampler с другими 13 видами светящихся олигохет [1]. Отметим, что интен-

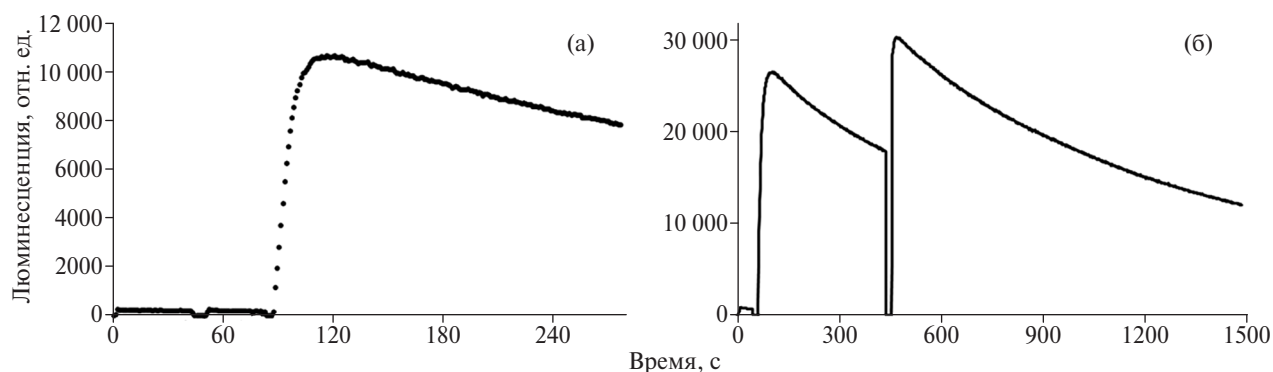


Рис. 1. Динамика люминесценции разной концентрации белкового супернатанта *Eisenia lucens* в ответ на добавление люциферина *D. longa* (а) и последовательное добавление люциферина *D. longa* и перекиси водорода (б).

сивность люминесценции *E. lucens* с люциферинном *D. longa* линейно зависела от концентрации белкового экстракта (рис. 1), что позволило нам предположить наличие лишь одного ключевого для реакции светоизлучения фермента — люциферазы.

В эксперименте с *A. ligra* свежеприготовленный из лиофильно высушенного червя экстракт светился голубым светом, следовательно, компоненты его биолюминесцентной системы на тот момент были сохранены. После обнаружения факта быстрого падения интенсивности свечения мы решили провести поиск реагентов, стимулирующих люминесценцию экстракта. Перекрестные реакции с белковыми экстрактами всех наличествующих червей дали отрицательный результат. Ответ на добавление люциферина *Henlea* sp. и синтетического люциферина *D. longa* как без перекиси, так и с ней также был отрицательным.

Отличительной особенностью *A. ligra* и сибирской энхитреиды *F. heliota* является стационарная, а не секретлируемая биолюминесценция. Их люминесцентные образования расположены на теле, а не в целомоческой жидкости. Логично было ожидать, что люминесцентная система *A. ligra* может оказаться похожей на АТФ-зависимую систему *F. heliota*. Проверка показала, что при внесении 10 мкл бесклеточного экстракта *A. ligra* в реакционную смесь, используемую для *F. heliota* (100 мкл 20 мМ трис-НСI-буфера, рН 8,1, содержащего 1 мМ Mg^{2+} и 0,1% тритон X100), добавка 1 мкл 10 мМ АТФ действительно стимулировала биолюминесценцию (рис. 2). При этом ответ на добавление нативного люциферина *F. heliota*, как до, так и после АТФ, был отрицательным. Увеличение концентрации добавляемого люциферина в 10 и в 100 раз ситуации не изменило. Экстрагировать люциферин *A. ligra*, используя методику для *F. heliota*, нам пока не удалось по причине недостатка биологического материала.

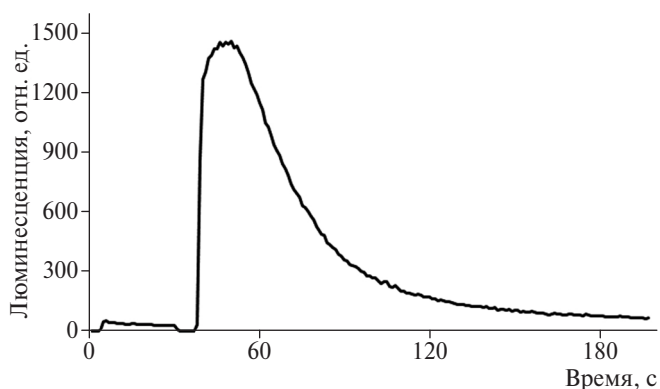


Рис. 2. Динамика люминесценции бесклеточного экстракта *Avelona ligra* в ответ на добавление АТФ.

Метод гель-фильтрации часто применяется для определения молекулярной массы белков, хотя его точность зависит от формы и величины молекул. При хроматографировании происходит разделение компонентов биолюминесцентной системы, поэтому все фракции на выходе с колонки не обладали самостоятельной люминесценцией. Белковый состав наносимых на колонку супернатантов сильно зависел от способа их приготовления: из целых червей (замороженных или лиофильно высушенных) или из целомоческой жидкости. Так, у *M. phosphoreus*, несмотря на разное количество пиков, время удерживания целевых пиков с люциферазной активностью для всех трёх вариантов практически совпало (рис. 3). Этот факт также свидетельствует о схожести люцифераз *M. phosphoreus* из Иркутской области и из Японии. Сибирские микросколексы при этом светились ярко-зелёным светом со спектральным максимумом при 530 нм, а японские — жёлто-зелёным светом с максимумом при 538 нм (табл. 1).

Для *H. petushkovi* и *H. rodionovae* время удерживания люцифераз полностью совпало (рис. 3), что ещё раз подтверждает общность биолюминесцентных систем этих видов из разных регионов РФ.

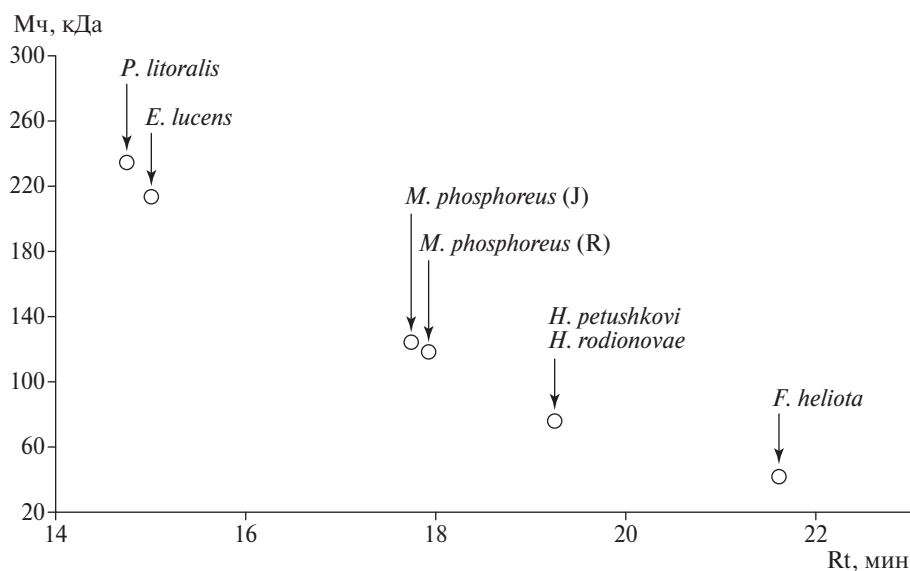


Рис. 3. Время удерживания люцифераз из супернатанта почвенных червей разных видов при гель-фильтрации на колонке Superdex 200.

Таблица 1. Сравнение люминесцентных систем почвенных червей

Вид, семейство	Локализация люминесценции	Максимум эмиссии, нм	Принадлежность люциферина	Люцифераза, кДа	Участие H ₂ O ₂	Участие АТФ и ионов	pH
<i>Microscolex phosphoreus</i> , Acanthodrilidae	Целомоциты, секрция	538 [12] 530 [11]	<i>D. longa</i>	125 [13]	+	—	7
<i>Pontodrilus litoralis</i> , Megascolecidae	Целомоциты, секрция	540 [2]	<i>D. longa</i>	230	+	—	7
<i>Eisenia lucens</i> , Lumbricidae	Целомоциты, секрция	493 [10]	<i>D. longa</i>	220	+	—	7
<i>Henlea petushkovi</i> , Enchytraeidae	Целомоциты, секрция	464	<i>Henlea</i> sp.	77	—	Ca ²⁺	8,2
<i>Henlea rodionovae</i> , Enchytraeidae							
<i>Fridericia heliota</i> , Enchytraeidae	Эпидермальные клетки	478	<i>F. heliota</i>	43	—	АТФ, Mg ²⁺	7,3
<i>Avelona ligra</i> , Lumbricidae	Эпидермальные клетки	470–490	<i>A. ligra</i>	?	—	АТФ, Mg ²⁺	?

Кажущиеся молекулярные массы люцифераз шести видов биолуминесцентных олигохет, рассчитанные по времени удерживания при гель-фильтрации на колонке Superdex 200, приведены в табл. 1. Для седьмого вида — *A. ligra* — обнаружить люциферазную фракцию не удалось ввиду отсутствия специфичного к люциферазе тестового люциферина.

Люминесцентную активность белковых фракций *E. lucens* тоже долго не удавалось зафиксировать при стандартной процедуре тестирования. Лишь стократное увеличение концентраций люциферина *D. longa* и перекиси водорода дало возможность обнаружить два пика с люминесцентной активностью. Один пик элюировался в свободном объеме колонки и соответствовал кажущейся $M_r > 400$ кДа. Вероятно,

эта фракция содержала комплексы люциферазы с различными компонентами гомогената, а второй, доминантный, пик на 220 кДа принадлежал самой люциферазе *E. lucens*. Использование повышенной концентрации N-изовалерил-3-аминопропаналя для реакции с люциферазой *E. lucens* мог свидетельствовать о том, что нативный люциферин этой лумбрициды структурно отличался от люциферина *D. longa*, в отличие от его аналогов у *M. phosphoreus* и *P. litoralis*.

В каждом эксперименте, обнаружив пик с люциферазной активностью с помощью соответствующего тестового люциферина, мы старались отыскать в низкомолекулярных фракциях нативный червяковый люциферин, используя перекрестную

реакцию с фракцией люциферазы. В супернатантах из замороженных червей *F. heliota*, *H. petushkovi*, *H. rodionovae* и *M. phosphoreus* люцифериновые фракции определялись хорошо, т.е. концентрации этих люциферинов были достаточно высоки. Но в случаях с лиофильно высушенными препаратами *M. phosphoreus* и *P. litoralis* детектировать их люциферины на выходе с колонки не удалось. Возможно, они разрушились в процессе сушки червей либо “выгорели” как субстраты биолюминесцентной реакции в течение долгой процедуры приготовления гомогенатов и супернатантов.

Нам не удалось найти фракцию люциферина в организме *E. lucens*. При электростимуляции этих червей происходил выброс целомической жидкости, светящейся ярко, но кратковременно. Субстраты при этом “сгорали” в реакции биолюминесценции с максимальной эффективностью. А сильное разведение фракций в ходе гель-фильтрации является дополнительным фактором того, что при перекрёстной реакции интенсивность светового сигнала оказывается ниже порога чувствительности биолюминетра.

Таким образом, в результате настоящего исследования мы впервые установили, что среди ныне известных светящихся олигохет в биолюминесценции участвуют четыре типа биолюминесцентных систем — четыре разновидности люциферинов и совершенно разные по молекулярной массе люциферазы (табл. 1).

Ранее считалось, что все светящиеся черви семейств Megascolecidae, Acanthodrilidae и Lumbricidae имеют зависимую от содержания перекиси систему, подобную таковой *D. longa*. Некоторые сомнения у ряда исследователей вызывала биолюминесценция люмбрициды *Eisenia lucens*, но нам всё-таки удалось зарегистрировать положительный ответ при перекрёстной реакции люциферазной фракции *E. lucens* с люциферинотом *D. longa*. А вот люциферин другой люмбрициды, *Avelona ligra*, согласно полученным данным, определённо не был аналогом люциферина *D. longa*, и в этом случае для реакции светоизлучения требовалась не перекись, а АТФ. Поэтому можно утверждать, что принадлежность к конкретному семейству олигохет не определяет тип биолюминесцентной системы червей.

Химическая природа люциферина *E. lucens*, несмотря на свидетельство его причастности к группе аналогов N-изовалерил-3-аминопропаналя, всё ещё остаётся невыясненной и требует дальнейшего изучения.

Ещё более интересна ситуация с *A. ligra*. На основе полученных данных уже сейчас можно уверенно утверждать, что люциферин *A. ligra* уникален и исследование его наряду с люциферазой в будущем приведёт к описанию четвёртого типа биолюминесцентной системы среди почвенных червей.

Благодарности. Авторы выражают благодарность за предоставленные образцы червей Dr. Yuichi Oba (Chubu University, Япония), Dr. Peter Taborsky (Masaryk University, Чехия) и Dr. G. Kratassiouk (Université Paris Sud, Франция).

Источники финансирования. Работа выполнена за счёт средств Государственного задания на проведение фундаментальных исследований РАН (проект № 0356–2019–0019) и гранта РФФИ 19–04–00348-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wampler J.E., Jamieson B.G.M. Earthworm Bioluminescence: Comparative Physiology and Biochemistry // Comp. Biochem. Physiol. 1980. V. 66B. P. 43–50.
2. Wampler J.E., Jamieson B.G.M. Cell Bound Bioluminescence From *Pontodrilus bermudensis*, and Its Similarities to Other Earthworm Bioluminescence // Comp. Biochem. Physiol. 1986. V. 84A. № 1. P. 81–87.
3. Bellisario R., Spencer T.E., Cormier M.J. Isolation and Properties of Luciferase, a Non-Heme Peroxidase from the Bioluminescent Earthworm, *Diplocardia longa* // Biochemistry. 1972. V. 11. № 12. P. 2256–2266.
4. Петушков В.Н., Родионова Н.С. Два новых типа люминесцентных систем почвенных энхитреид (Annelida: Clitellata: Oligochaeta: Enchytraeidae) // ДАН. 2005. Т. 401. № 2. С. 263–266.
5. Petushkov V.N., Dubinnyi M.A., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Baranov M.S., Kublitski V.S., Shimomura O., Yampolsky I.V. A Novel Type of Luciferin from the Siberian Luminous Earthworm *Fridericia heliota*: Structure Elucidation by Spectral Studies and Total Synthesis // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2014. V. 53. P. 5566–5568.
6. Dubinnyi M.A., Kaskova Z.M., Rodionova N.S., Baranov M.S., Gorokhovatsky A.Y., Kotlobay A., Solntsev K.M., Tsarkova A.S., Petushkov V.N., Yampolsky I.V. Novel Mechanism of Bioluminescence: Oxidative Decarboxylation of a Moiety Adjacent to the Light Emitter of *Fridericia* Luciferin // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. V. 54. № 24. P. 7065–7067.
7. Rota E., Martinsson S., Erséus C. Two New Bioluminescent *Henlea* from Siberia and Lack of Molecular Support for *Hepatogaster* (Annelida, Clitellata, Enchytraeidae) // Org. Divers. Evol. 2018. V. 18. № 3. P. 291–312.
8. Петушков В.Н., Родионова Н.С., Пуртов К.В., Бондарь В.С. Люминесцентная система почвенных энхитреид *Henlea* sp. (Annelida: Clitellata: Oligo-

- chaeta: Enchytraeidae) // ДАН. 2002. Т. 385. № 3. С. 416–418.
9. Петушков В.Н., Родионова Н.С. Низкомолекулярные участники люминесцентной реакции сибирской энхитреиды *Henlea* sp. // ДАН. 2018. Т. 481. № 4. С. 451–454.
 10. Pes O., Midlik A., Schlaghamersky J., Zitnan M., Taborsky P. A Study on Bioluminescence and Photoluminescence in the Earthworm *Eisenia lucens* // Photochem. Photobiol. Sci. 2016. V. 15. № 2. P. 175–180.
 11. Rota E., Martinsson S., Erséus C., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Omodeo P. Green Light to an Integrative View of *Microscolex Phosphoreus* (Dugès, 1837) (Annelida: Clitellata: Acanthodrilidae) // Zootaxa. 2018. V. 4496. № 1. P. 175–189.
 12. Wampler J.E. The Bioluminescence System of *Microscolex Phosphoreus* and its Similarities to Those of Other Bioluminescent Earthworms (Oligochaeta) // Comp. Biochem. Physiol. 1982. V. 71A. P. 599–604.
 13. Kin I., Oba Y. A Protein Related to the Luminescence of the Earthworm, *Microscolex Phosphoreus*. Abstract // 20th International Symposium for Bioluminescence and Chemiluminescence. May 2018. Nantes, France.

COMPARISON OF EARTHWORMS BIOLUMINESCENT SYSTEMS

N. S. Rodionova, V. N. Petushkov

Institute of Biophysics, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Presented by Academician of the RAS I.I. Gitel'zon December 19, 2018

Received December 24, 2018

The results of a comparative study of the luciferin–luciferase systems of seven species of bioluminescing oligochaetes — *Henlea petushkovi*, *Henlea rodionovae*, *Fridericia heliota* (Enchytraeidae), *Microscolex phosphoreus* (Acanthodrilidae), *Pontodrilus litoralis* (Megascolecidae), *Eisenia lucens*, and *Avelona ligra* (Lumbricidae) — are presented.

Keywords: bioluminescence, earthworms, luciferin, luciferase, *Henlea* sp., *Fridericia heliota*, *Microscolex phosphoreus*, *Pontodrilus litoralis*, *Eisenia lucens*, *Avelona ligra*.