

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590041

研究課題名(和文) グラム陰性菌の毒性発現制御因子である細胞間情報伝達物質の動態解析法に関する研究

研究課題名(英文) Development of novel monitoring system for quorum sensing mediators in Gram-negative bacteria

研究代表者

宮入 伸一 (MIYAIRI SHINICHI)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：50209855

研究成果の概要(和文)：

本研究では、簡便な蛍光検出高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、3位にカルボニル基を有する炭素数6～14個の脂肪酸からなる3-oxo-acyl-HSLの高感度一斉分析法を構築するとともに、緑膿菌をモデルにQS機構解析への適用を検討した。緑膿菌QS機構の解析のため、QS機構により誘導合成されるエラスターゼの簡便な活性測定系も合わせ構築した。これらを用いて緑膿菌の増殖とAI分子の3-oxo-C₁₂-HSL濃度およびエラスターゼ活性の相関を検討した。その結果、連関する2つのQS機構をもつ緑膿菌においては、上位のQS機構(Las系)は菌の増殖と直接的な関連が認められた。一方、下位のQS機構(Rhl系)の産物であるエラスターゼの産生は約2時間のtime-lagをもって開始されるが、その産生は上位のQS機構のAI分子濃度の低下と同調していたことから、上位のQS機構の制御下にあるようにも見受けられた。

研究成果の概要(英文)：

In this project we have developed a convenient and simultaneous determination system of 3-oxo-acyl-HSLs, those are autoinducer molecules of Gram-negative bacteria, by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. Then we have clarified the relation of AI concentration, elastase activity and cell density using *Pseudomonas aeruginosa*, one of Gram-negative bacteria. The results are that AI concentration was well synchronized with cell growth and there were 2 hours-time lag between increasing of AI concentration and that of elastase activity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：グラム陰性菌、緑膿菌、クオラムセンシング、オートインデューサー、高速液体クロマトグラフィー、蛍光誘導体化、エラスターゼ活性測定法、

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性の緑膿菌などの院内感染による日和見感染症が社会問題になっている。

多剤耐性菌が感染すると、敗血症を発症して治療困難な病態を呈することから、新規作用メカニズムに基づく治療薬の創製が望まれ

ている。敗血症の原因菌の毒素は主に菌体外に分泌される高分子化合物であり、これら毒素の合成はクオラムセンシング(QS)機構により制御されている。それゆえ、QS 機構の制御物質には菌の毒性低減効果が期待できる。この阻害物質の探索には、QS 機構に関連する適当なマーカー物質の動態解析法が必要であり、煩雑な前処理を必要としない簡便な方法論の開発が不可欠であった。

2. 研究の目的

QS 機構では菌が自ら菌体密度を感知し、菌体密度が閾値を超えると菌種に特有な様々な反応が惹起される。例えば緑膿菌では、タンパク質分解酵素であるエラスターゼやピオシアニンのような毒素の分泌、バイオフィルムの形成などが観察される。この際、菌体密度の感知に用いられるのが低分子化合物でオートインデューサー (AI) と呼ばれている。AI 分子は、それ自身菌により産生される物質で、その合成酵素や受容体タンパク質の転写も QS 機構により制御されており、菌体密度の上昇に伴い急激に AI 分子の濃度が増大する。グラム陰性菌では、3 位にカルボニル基を有する、あるいは有しない直鎖脂肪酸のホモセリンラクトンアミド(acyl-HSL)が AI 分子として機能しており、菌種により脂肪酸部が異なる。そこで本研究では、簡便な蛍光検出高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、3 位にカルボニル基を有する炭素数 6~14 個の脂肪酸からなる 3-oxo-acyl-HSL の高感度一斉分析法を構築するとともに、緑膿菌をモデルに QS 機構解析への適用を検討することとした。

3. 研究の方法

カルボニル基の発蛍光性誘導体化試薬として、ヒドロキシルアミンあるいはヒドラジンを用いた化合物を検討した。前者は当研究室で合成したアントラセンを発蛍光部とするもので、後者は市販のベンゾオキサジアゾールを発蛍光部とするものである。これら試薬を用いて作成した各 3-oxo-acyl-HSL の発蛍光性誘導体の HPLC による分離を検討した。また、各 acyl-HSL 誘導体の保持時間に基づき、種々検討の結果、内標準物質(IS)として 3-oxo-8-phenyloctanoyl-HSL を選定し、試料の前処理法も含めて高感度測定系を構築した。さらに、QS 機構の活性化により誘導合成される緑膿菌のエラスターゼの酵素活性を簡便に測定するため、FRET (fluorescence resonance energy transfer)を利用する基質を合成し、それを用いたエラスターゼ活性測定系を構築した。

本研究で構築したこれら測定系を用いて、

緑膿菌をモデルに菌の増殖と AI 分子濃度および QS 機構の活性化の相互関係を精査し、QS 機構に影響を与える薬物スクリーニングの基礎的検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 誘導体化の条件は種々検討した結果、0.25% TFA 含有 CH₃CN を反応溶媒として 30 °C で 1 時間の震盪が最も再現性の良いピーク高さを与えた。分離カラムには ODS を、移動相には 0.025% TFA 含有 CH₃CN : H₂O を用い、励起波長 450 nm、蛍光波長 565 nm で検出を行なった。移動相に 0.025% TFA 含有 CH₃CN : H₂O (70:30, v/v)を用いる時、各 3-oxo-acyl-HSL 誘導体の保持時間は、脂肪酸の炭素数が 6、8、10、12、14 でそれぞれ 7.8 分、9.2 分、9.6 分、17.6 分、21.7 分であり、IS のそれは 11.2 分とほぼ満足できるものであった。なお、CH₃CN の割合を高めると分子量の小さい誘導体間でも良好な分離が観察された。また、緑膿菌の AI 分子である 3-oxo-C₁₂-HSL の本誘導体化法による検出限界は数十 fmol/injection であり、本法は十分な感度を有していることが判明した。また、3-oxo-C₁₂-HSL と IS のピーク高さ比の変動を検討したところ、ピーク高さに変動は見られたものの、それらの比は 9 日間一定値を示したことから、ピーク高さ比を用いる検量線法により信頼性の高い測定値が得られること、さらに抽出溶媒を酢酸エチルとした時の LB 培地からの添加・回収試験では 96.4~101.5%の範囲の回収率であったことから、前処理法を含め本法は簡便で優れた 3-oxo-acyl-HSL 測定法であることが明らかになった。
- (2) 次に、緑膿菌をグラム陰性菌の応用例とすることとし、QS 機構を介して産生されるマーカー毒素としてエラスターゼを選択した。しかし、緑膿菌のエラスターゼ活性を簡便かつ高感度に検出する適当な合成基質が市販されていないことから、FRET を利用した基質を合成して用いた。本測定法は、ペプチド結合が切断され発蛍光団と干渉団の分子間距離が大きくなることにより回復した蛍光強度を基に緑膿菌エラスターゼの活性を算出するもので、濃度 400 μM の本基質を用いた場合、加水分解率 50%までの酵素活性は信頼性の高い測定値を得ることができる。さらに、生成物混合物を用いる検量線法により、絶対値で酵素活性を求めることも可能である。
- (3) 引き続き、これら測定系を用いて、緑膿菌の増殖と 3-oxo-C₁₂-HSL 濃度およびエラスターゼ活性の相関を検討した。緑膿菌

PAO1株をLB培地中、35°Cで振盪培養し、菌の増殖の指標である600nmにおける吸光度と共に3-oxo-C₁₂-HSL濃度およびエラストラーゼ活性の経時的変化を調べた。3-oxo-C₁₂-HSL濃度は、培養開始12時間目に菌体密度の上昇が始まると同時に上昇し始め、15時間目をピークに低下に転じ、培養終了時の24時間目にはピーク濃度のほぼ1/20にまで低下した。一方、エラストラーゼ活性は3-oxo-C₁₂-HSL濃度の上昇から約2時間遅れて上昇が始まり、3-oxo-C₁₂-HSL濃度が低下し始めた16時間目には酵素活性の上昇が急速に弱まった。なお、600nmにおける吸光度は17時間目まで急速な上昇が観察され、それ以降は緩やかな上昇へと変化した。以上の結果から、連関する2つのQS機構をもつ緑膿菌においては、上位のQS機構(Las系)は菌の増殖と直接的な関連が認められた。一方、下位のQS機構(Rhl系)の産物であるエラストラーゼの産生は約2時間のtime-lagをもって開始されるが、その産生は上位のQS機構のAI分子濃度の低下と同調していたことから、上位のQS機構の制御下にあるように見受けられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① S.Kimura, K.Tateda, Y. Ishii, M. Horikawa, S. Miyairi, N. Gotoh, M. Ishiguro and K. Yamaguchi : *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella species*. : Microbiology (査読有), 155, 1934-1939 (2009).
- ② N. Hosono, S. Kimura, K. Tateda, M. Horikawa, C. Ueda, Y. Ishii, M. Ishiguro, S. Miyairi and K. Yamaguchi : Roles of *Pseudomonas aeruginosa* autoinducers and their degradation products, tetramic acids, in bacterial survival and behavior in ecological niches.: Microbes and Environments (査読有), Web公開平成23年3月29日

[学会発表] (計3件)

- ① 齋藤弘明、宮入伸一 : Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system by acyl HSL analogs、第25回内藤コンファレンス「ケミカルバイオロジー[II]」、平成21年9月10日(札幌)
- ② 三上泰輝、齋藤弘明、横田康男、三宅宗晴、内山武人、高島 亨、宮入伸一 : グラム陰性菌のオートインデューサーである3-オキ

ソ脂肪酸のホモセリンラクトン誘導体の一斉分析法の開発、日本薬学会第130年会、平成22年3月29日(岡山)

- ③ 横田康男、小倉知佳、三上泰輝、市丸 嘉、齋藤弘明、内山武人、宮入伸一 : 緑膿菌のクオラムセンシング機構研究のための発蛍光性プローブの開発、日本薬学会第131年会、平成23年3月31日(要旨集誌上において)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page.jsp?id=1391>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮入 伸一 (MIYAIRI SHINICHI)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号 : 5 0 2 0 9 8 5 5

(2) 研究分担者

齋藤 弘明 (SAITO HIROAKI)
日本大学・薬学部・助教
研究者番号 : 3 0 3 8 5 9 7 6