

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790709  
 研究課題名（和文） 病原細菌のクオラムセンシングシステムを標的とした治療薬開発のための基礎的解析  
 研究課題名（英文） A basic study finding a targeting point upon the Quorum Sensing System of pathogenic bacteria to develop new drug  
 研究代表者  
 五味 和紀（GOMI KAZUNORI）  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：20400335

## 研究成果の概要（和文）：

グラム陰性菌の自律制御因子ホモセリンラク톤の哺乳類細胞における認識機構に関して研究を行った。その結果、マウス RAW264.7 マクロファージ様細胞がこの物質を認識すること、哺乳類細胞の代表的なパターン認識受容体 TLR2、TLR4 はこの物質の受容体ではないこと、ビオチンを用いた実験で RAW264.7 細胞の表面に受容体もしくは担体が存在することが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

Gram-negative bacteria produce homoserine lactones for genetic regulation of their own growth rate. In this study, the principal investigator shows the following facts; (1) Mouse Macrophage-like cell line, RAW264.7, recognizes this molecule. (2) TLR2 and TLR4 that are pattern recognition receptors do not recognize this molecule. (3) By using a homoserine lactone attached biotin, the principal investigator shows that possibly there is a kind of receptor of this molecule on the cell membrane of RAW264.7 cell.

## 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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

## 研究分野：呼吸器感染症

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：Quorum sensing system、Homoserine lactone、パターン認識受容体

## 1. 研究開始当初の背景

細菌が宿主環境に適応するために、周囲の環境における自己の密度を的確に感知し、それに応じて自己の増殖速度、病原因子の発現を自律的に巧妙にコントロールするシステムとして、Quorum sensing system が知られている。これは細菌自身によって産生される

Auto inducer (AI)により、自己の増殖、病原因子の遺伝子発現などが制御されるというものである。

また緑膿菌の AI である OdDHL (3-O-C12-Homoserine lactone, 3O-C12-HSL) は、細菌自身の自律的制御のみならず、宿主生体に対しても生理活性をもち、これまでに

ヒトの肺線維芽細胞に対して IL-8 誘導活性があること、同じく肺線維芽細胞に対して Cyclooxygenase-2 や PGE2 誘導活性があること、ヒトの皮膚細胞に対して IL-1、IL-6 などのサイトカイン、MIP-1、MIP-2、IP-10 などのケモカインの mRNA 誘導活性があること、ヒトのマクロファージや好中球に対してアポトーシス誘導活性があることなどが報告されている。

これらの報告から、細菌によって産生される AI は、宿主免疫機構に作用し、おそらくは細菌自体の生存に有利になるように、周囲の環境を変えている可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は日和見感染菌 *Flavobacterium meningosepticum* の脂質二重膜を構成する脂質 Flavolipin が、哺乳類の病原体認識にかかわる代表的なパターン認識分子 CD14 及び Toll-Like Receptor4 (TLR4) により認識されること、またこの認識メカニズムには脂質部分の構造自体が重要であることを、を証明した (*J. Immunol.* 2002.)。

Flavolipin、緑膿菌を含むグラム陰性菌の AI である 30-C12-HSL は、共に細菌外膜由来の脂質であること、構造的に非常に類似していること、等から宿主に対する生理活性という点に於いても、受容体などのシグナル伝達経路を共有している可能性がある。

申請者は、細菌由来の AI の宿主免疫細胞に対する生理活性を、受容体やシグナル伝達経路の観点から明らかにすることを目的として本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株

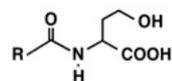
マウス Macrophages 様細胞株 J774. 1、RAW264. 7、及び RAW264. 7 に NF-kB レポーター遺伝子を発現させた細胞株を用いた。

マウスの proB 細胞株 BaF3 に NF-kB レポーター遺伝子を発現させた BaF3/kB 細胞株、さらに BaF3/kB 細胞株にマウス TLR2 受容体を発現させた BaF3/kB/mTLR2 細胞株、マウス TLR4・MD2 受容体を発現させた BaF3/kB/mTLR4mMD2 細胞株を用いた。

これらの細胞株は、一般的にこれらの細胞株の培養に用いられている DMEM 等の培養液に、ウシ血清、抗生剤を加えた培養液中で培養した。

### (2) Homoserine lactone

また細菌由来の Homoserine lactone としては、Fluka 社にて抽出精製され、商品化されている *Chromobacterium violaceum* の HSL (図 1) を実験に用いた。



HSLs (*C. violaceum*)

R	Chemical name	Abbreviation
CH3CH2CH2	N-Butyryl-DL-HSL	BHL (C4-HSL)
CH3(CH2)4	N-Hexanoyl-DL-HSL	HHL (C6-HSL)
CH3(CH2)5	N-Heptanoyl-DL-HSL	HPHL (C7-HSL)
CH3(CH2)6	N-Octanoyl-DL-HSL	OHL (C8-HSL)
CH3(CH2)8	N-Decanoyl-DL-HSL	DHL (C10-HSL)
CH3(CH2)10	N-Dodecanoyl-DL-HSL	dDHL (C12-HSL)
CH3(CH2)12	N-Tetradecanoyl-DL-HSL	tDHL (C14-HSL)

図 1 *Chromobacterium violaceum* の HSL (Fluka)

### (3) サイトカインの測定

マウス Macrophages 様細胞株 J774. 1、RAW264. 7 を用い、細胞数を  $4 \times 10^4/100\text{ml}$  に調整した後、最終濃度 10mcg/ml の C4-HSL~C14-HSL を加え、37°C で 6 時間又は 24 時間刺激した。その後、培養液上清中の TNF を ELISA 法で測定した。

### (4) ルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた NF-kB 活性化の測定

NF-kB 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した細胞株を実験に用いた。

細胞数を  $4 \times 10^4/100\text{ml}$  に調整した後、最終濃度 10mcg/ml の C4-HSL~C14-HSL を加え 37°C で 6 時間刺激した。

ルシフェラーゼアッセイキットに従って、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### (5) 細胞増殖曲線と HSL 感受性の関連に関する測定

RAW264. 7 細胞に NF-kB 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入した細胞を用いた。

細胞数  $4 \times 10^4/100\text{ml}$  /well で培養を開始し、24 時間毎に培養液中に浮遊している培養細胞を回収し、増殖曲線を描いた。

各測定時点における NF-kB 活性化に関して、ルシフェラーゼ法を用いて測定した。

### (6) Biotin 化 HSL による、HSL 受容体の同定

RAW264. 7 細胞を実験に用いた。C12-HSL に Biotin、さらに Streptavidin (蛍光色赤) を結合させ、HSL-Biotin-Streptavidin を作成した。

HSL-Biotin-Streptavidin を最終濃度 3. 3mcM で RAW264. 7 細胞の培養液に添加し、37°C で 1~2 時間培養し、HSL を RAW264. 7 細胞に取り込ませた。

DAPI (蛍光色青) で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

(1) C12-HSL はマウス Macrophages 様細胞株 RAW264.7 を刺激し、J774 細胞を刺激しない

*C. violaceum* の C4~C12-HSL で RAW264.7 細胞を刺激すると、C12-HSL だけがサイトカインを誘導することを申請者らは既に論文報告した (*Infect Immun.* 2006.)。

この C12-HSL の RAW264.7 細胞における認識機構同定のた手がかりを得るために、同じくマウス Macrophages 様細胞株 J774 を C12-HSL で刺激したところ、J774 細胞においては全く活性が見られなかった (図 2)。

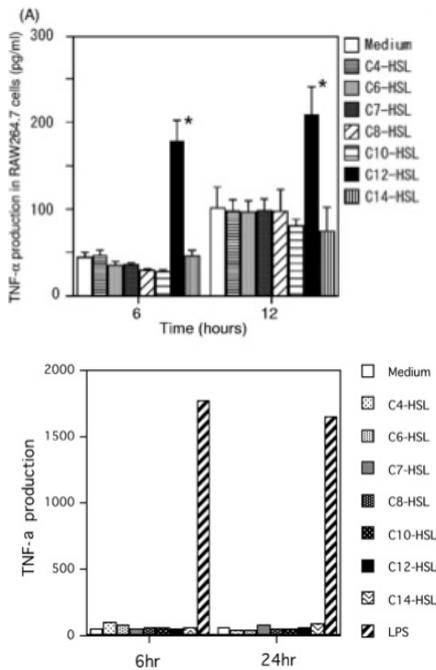


図 2 マウス Macrophages 様細胞株 RAW264.7、J774 を *C. violaceum* の C4~C12-HSL で刺激した

上図：RAW264.7 細胞を *C. violaceum* の C4~C12-HSL で刺激すると、C12-HSL のみが TNF を誘導した。下図：J774 細胞を C4~C12-HSL で刺激しても、TNF は誘導されなかった。

(2) RAW264.7 細胞の C12-HSL 感受性は細胞増殖の phase に依存する

RAW264.7 細胞を様々な条件下で C12-HSL を用いて刺激してみたところ、予想に反して RAW264.7 細胞が log phase で増えているときよりも、stable phase になったときのほうが C12-HSL による NF-κB 誘導活性が高いことが分かった (図 3)。このことは RAW264.7 細胞が stable phase になったときに出現してくる何らかの分子が、C12-HSL のシグナル伝達機序に関わる可能性を示唆する。

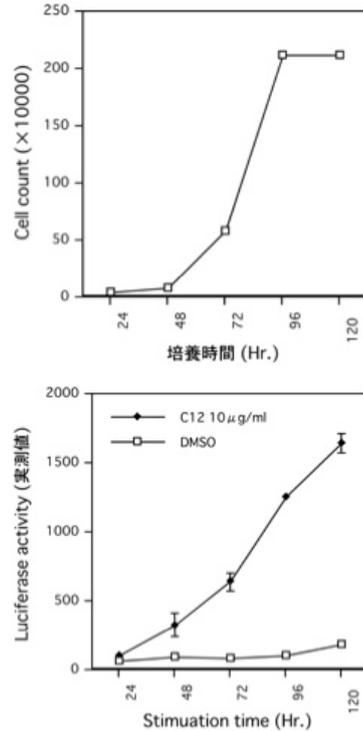


図 3 RAW264.7 細胞の細胞増殖曲線と培養開始後 24 時間毎の C12-HSL 感受性

上図：RAW264.7 細胞の細胞増殖曲線。培養開始後 96 時間で増殖曲線はプラトーに達し、RAW264.7 細胞は stable phase となる。下図：培養開始後 24~96 時間の log phase で増えているときより、96~120 時間の stable phase になったときのほうが C12-HSL による NF-κB 誘導活性が高い。

(3) パターン認識受容体 TLR2、TLR4・MD2 は C12-HSL の受容体ではない

C12-HSL の宿主細胞における認識機構の解明のため、病原細菌の代表的認識受容体 TLR2、TLR4・MD2 をマウスの proB 細胞株 BaF3 に NF-κB レポーター遺伝子と共に発現させた細胞株を用い、これらの細胞株を C12-HSL で刺激してみたが、NF-κB は誘導されなかった。このことから TLR2、TLR4・MD2 は C12-HSL の認識分子ではないことが分かった。他の HSL の受容体になっている可能性も含め、両受容体で C4~C14-HSL の刺激活性についても検討を行ったが、刺激活性は認められなかった (図 4)。

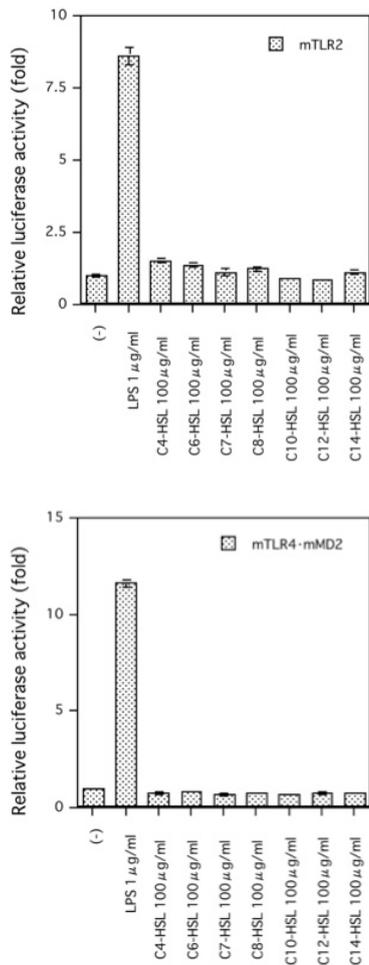


図4 mTLR2 発現細胞株、mTLR4・MD2 発現細胞株を C4~C12-HSL で刺激した

上図：マウス TLR2 受容体を発現させた BaF3/kB/mTLR2 細胞株を C4~C12-HSL で刺激したが NF-κB は誘導されなかった。下図：マウス TLR4・MD2 受容体を発現させた BaF3/kB/mTLR4mMD2 細胞株を同様に C4~C12-HSL で刺激したが NF-κB は誘導されなかった。

#### (4) C12-HSL-Biotin による受容体同定

上記 (1) ~ (3) の研究結果により、① C12-HSL の炭素鎖長に特異的な受容体の存在が想定されること、②代表的自然免疫受容体 TLR2、TLR4/MD2 は C12-HSL の認識分子ではないこと、が分かった。そこで、HSL を Biotin で直接標識する方法を用いて、C12-HSL の宿主細胞への作用起点の解明を試みた (図5)。

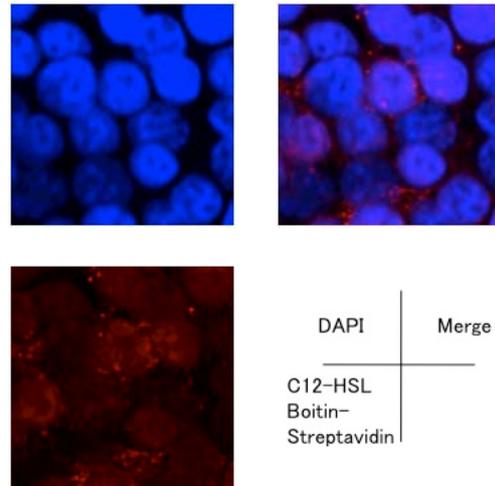


図5 Biotin 化 HSL による、HSL 受容体の同定

C12-HSL に Biotin、さらに Streptavidin (赤) を結合させ、HSL-Biotin-Streptavidin を作成した。この HSL-Biotin-Streptavidin を最終濃度 3.3mM で RAW264.7 細胞の培養液に添加し、37°C で 2 時間培養し、RAW264.7 細胞に取り込ませた。DAPI (青) で細胞核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

この結果、Biotin 化した C12-HSL は RAW264.7 細胞表面に付着し、これまでの研究結果と総合して、この C12-HSL が付着した、RAW264.7 細胞表面の分子が受容体あるいは担体であることが推測された。

#### (5) 結果のまとめ

以上の研究結果をまとめると

- ①マウス Macrophages 様細胞株 J774.1 は反応せず、RAW264.7 は反応する。
- ②C12-HSL の炭素鎖長の HSL に特異的な反応であり、特異的な認識機構の存在を想定させる。
- ③哺乳類細胞の代表的なパターン認識受容体 TLR2、TLR4 は HSL の受容体ではない。
- ④RAW264.7 の細胞表面に HSL の受容体又は担体の存在を、Biotin-Streptavidin を用いた実験で示せた。

このように Biotin 標識 C12-HSL を使用した実験系から、C12-HSL の受容体を同定できる可能性が出てきた。現在のところ具体的な標的分子の同定までには至っていないが、今後、この実験系を中心に C12-HSL の宿主細胞への作用起点やシグナル伝達経路を解明できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. 五味和紀、バイオフィルムとは？クォーラムセンシングとは？、モダンフィジシャン、査読無、28巻、2008年、1396-1397頁

[学会発表] (計1件)

1. 五味和紀、臨床における抗菌薬併用療法の重要性ー嚢胞性線維症の経験例から考えるー、緑膿菌感染症研究会、2010年2月13日、東京

[図書] (計1件)

1. 渡辺彰、五味和紀、他59名、新興医学出版社、最新抗菌薬療法マニュアル、2009年、126-127頁

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

五味 和紀

東北大学・病院・助教

研究者番号：20400335