

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651234

研究課題名(和文)細菌特異的プローブ開発と腸内細菌の可視化への応用

研究課題名(英文)Live-imaging probe for strain-selective labeling of bacteria

研究代表者

貞許 礼子 (SADAMOTO, Reiko)

お茶の水女子大学・糖鎖科学教育研究センター・研究協力員

研究者番号：50372264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：腸内細菌と宿主の免疫や健康状態の関連を分子レベルで議論するためには、それらの細菌の空間的位置や増減を時間経過とともにモニタリングする必要がある。従来の腸内細菌の検出法では、それらを明らかにするのは困難であった。本研究では、外部から加えたプローブ分子を腸内細菌に取り込ませることによって可視化を行う新しい手法に挑戦した。グラム陰性菌の表層に存在するリポ多糖のO高原部位の多様性に注目し、ペロサミンという糖の前駆体にラベル化部位をもたせた誘導体を添加して培養することで、大腸菌0157を選択的に蛍光ラベルすることに成功した。これは、グラム陰性菌を株選択的に修飾しうる手法としてその応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed an approach to display various molecules on the bacterial surface using a chemically synthesized cell-wall (peptidoglycan) precursor derivative. In this research, we focused on strain-specific modification of the bacterial surface. E. coli 0157 has an uncommon perosamine moiety in their O-antigen polysaccharide. We chose a precursor of perosamine, as a base for selective surface modification of E. coli 0157. Six bacterial strains including E. coli 0157 were incubated in growth media containing the analog, and the azido groups on the bacterial surface were labeled with a fluorophore. Flow cytometry analysis showed the selective labeling of E. coli 0157.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：大腸菌 リポ多糖 グラム陰性菌 O抗原

1. 研究開始当初の背景

動物の腸管には数多くの細菌が存在し細菌叢を形成し、宿主の健康状態や免疫に深く関係していると言われている。腸管細菌の種類を調べる手法としては、現在、糞便等のサンプルから細菌を培養して同定する方法、あるいは DNA 断片の増幅により種類を推定する方法が多く用いられている。これらの手法では、腸管で細菌が存在した時間、細菌が生息していた場所の情報を得ることはできない。従って生体内の細菌の状態をそのまま可視化できる手法の開発が望まれている。これまでに我々は、乳酸菌に代表されるグラム陽性菌について、細胞壁(ペプチドグリカン)という細菌が共通に持つ糖鎖構造に着目し、その前駆体となるグルコサミン誘導体を利用して蛍光色素や糖鎖など人工的な化合物を表面に提示させることに成功してきた¹⁾。また、2012年には大腸菌などのグラム陰性菌について、リポ多糖に存在する KDO (3-deoxy-D-mannno-octulosonic acid) と呼ばれる糖の修飾に成功した例が報告され²⁾、注目されている。

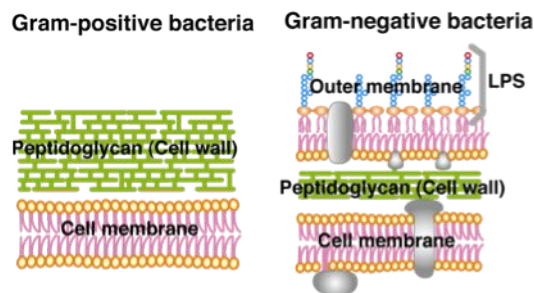


Figure 1. Surface structures of bacteria

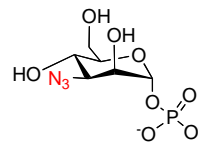
2. 研究の目的

グラム陽性菌や陰性菌を生きたまま修飾することは可能となってきたが、生体内での細菌イメージングのためにはある特定の種類の細菌だけラベル化する手法の開発が必要となる。そこで、グラム陰性菌の外膜に着目した。グラム陰性菌の外膜はリ

ポ多糖 (LPS) で構成され、LPS の最も外側にある O 抗原は株の種類により構成する糖の種類や配列が異なることが知られている。特に大腸菌 O157 株はその O 抗原の繰り返し単位である 4 糖の中に、D-ペロサミンという特徴的な糖をもっている。これを利用して生きたままの大腸菌 O157 株を選択的に標識化することを考えた。

3. 研究の方法

D-ペロサミンはマンノース-1-リン酸を経由して生合成されることが知られているので、その誘導体として、マンノース-1-リン酸の 3 位にアジド基を導入した化合物 (N_3 Man-1-P) を合成した。



D-mannose-1-phosphate analog (N_3 Man-1-P)

この化合物を添加した培養液で細菌を培養し、アジド基細菌表面に提示されるかを調べた。細菌として、大腸菌 O157 のほか、コントロールとして、O 抗原の中に D-ペロサミンを持たない株(大腸菌 O1、O16、B、K12 株と *Citrobacter Sedlakii*)について調べた。細菌を、 N_3 Man-1-P (12.5 mM) を添加した NB 培地、あるいは NB 培地で好氣的に 10 時間培養した。培養した細菌を集菌し、phosphate-buffered saline で洗浄後、表面のアジド基を 10 mM DBCO-PEG₁₂-biotin conjugate と streptavidin-Alexa Fluor 488 conjugate の二段階で蛍光ラベルした(Figure 2a)。洗浄後、細菌 1 個あたりの蛍光強度をフローサイトメーターにより測定した。

4. 研究成果

大腸菌 O157 を用いた場合のフローサイトメーター測定結果を Figure 1b に示す。 N_3 Man-1-P を添加して培養した細菌 (red line) は、 N_3 Man-1-P を添加しないで培

養したバクテリア (black line) に比べて強い蛍光を持っていることがわかった。実験に使用した合計 6 株のバクテリアについて、 N_3 Man-1-P を添加した培地で培養した場合と添加していない培地で培養した場合の蛍光強度の比を図 2b に示した。大腸菌 O157 株では 2 倍以上の蛍光強度の差があった。その他の株では蛍光強度の差は見られなかった。 N_3 Man-1-P は大腸菌 O157 を選択的に標識できる化合物であることが示唆された。

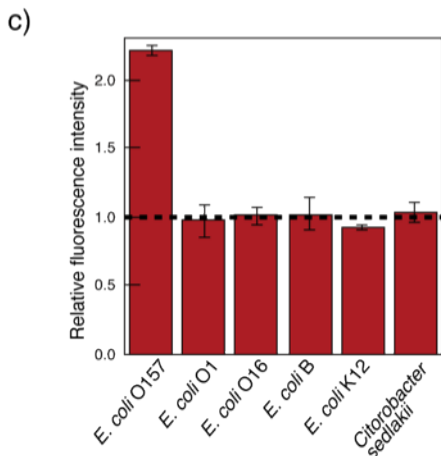
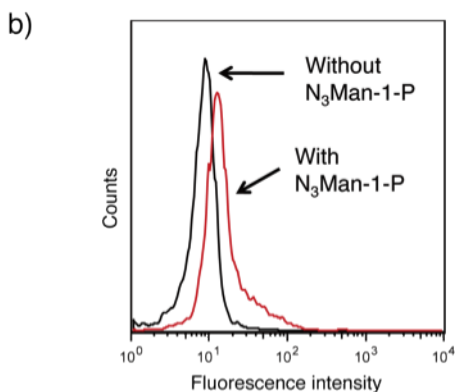
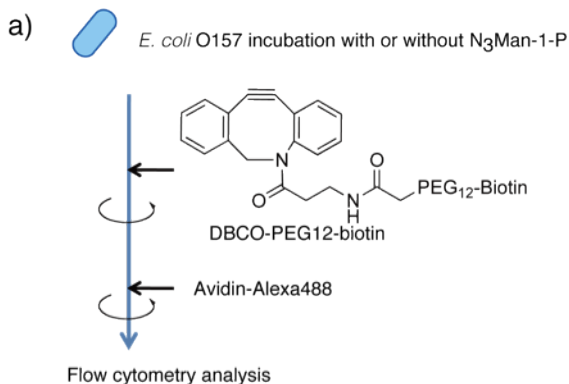


Figure 2. a) Experimental scheme of Experimental scheme of the flow cytometry analysis. (b) Histograms of *E. coli* O157 with or without N_3 Man-1-P. The X axis represents fluorescence intensity (525 nm). The red line represents the bacteria incubated with 12.5 mM N_3 Man-1-P, and the black line those without N_3 Man-1-P. (c) Relative fluorescence intensity (525 nm) of each strain with N_3 Man-1-P compared to without N_3 Man-1-P. The relative fluorescence intensity was calculated by dividing the average fluorescence intensity of bacteria incubated with 12.5 mM N_3 Man-1-P by that of bacteria incubated without N_3 Man-1-P.

次に、外膜成分からリポ多糖抽出キットを用いてリポ多糖を抽出し、SDS-PAGE の分析により、リポ多糖部位に蛍光修飾部位が含まれることを確かめた。この手法により、生きたままのバクテリアを抗原部位の多様性により染め分ける可能性がひらかれた。

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)

(査読有り) Chizu Morisaki, Yusuke Uemura, Katsuhiko Sekimata, Sunao Iyoda, and Reiko Sadamoto, "Escherichia coli O157 labeling using a mannose phosphate" *ChemBioChem*, accepted (DOI: cbic.201400044).

(査読有り) Chizu Morisaki, Yusuke Uemura, Reiko Sadamoto, "Chemical Glycobiology in Bacterial Surface Modification" *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 25(141), 43-51, 2013.

[学会発表](計 3 件)

森崎千珠、上村祐介、貞許礼子、バクテリアのライブイメージングを目指した大腸菌 O 抗原糖鎖の選択的標識化、第 62 回高分子討論会、平成 25 年 9 月 13 日、金沢

Morisaki, C.; Uemura, Y.; Sadamoto, R. Strain-Selective Labeling of Bacteria Using an O-Antigen Precursor Analog, 5th European Conference on Chemistry for Life Science (5th ECCLS), 2013 年 6 月 10 日, Barcelona, Spain.

Morisaki, C.; Uemura, Y.; Sekimata, K.; Sadamoto, R.: "Surface modification of

live bacteria based on polysaccharides on the bacterial surface" 26th International Carbohydrate Symposium (ICS2012). 2012年7月22日-27日 Madrid, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貞許 礼子 (SADAMOTO, Reiko)

お茶の水女子大学・糖鎖教育科学研究センター

ー・研究協力員

研究者番号：50372264

(2) 研究分担者

なし