

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780264

研究課題名 (和文) 変異型 R タンパク質を用いた Quorum Sensing 阻害法の開発

研究課題名 (英文) Inhibition of quorum sensing by recombinant R protein.

研究代表者

峰松 健夫 (MINEMATSU TAKEO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00398752

研究成果の概要 (和文) : 抗生物質に代わる新たな感染症対策法の開発を目的に、Quorum Sensing シグナル物質 (AHL) 受容体 LasR の In vitro 合成を試みた。アミノ酸配列解析の結果、LasR タンパク質は AHL 結合ドメインと DNA 結合ドメインから成ることが明らかとなった。また、LasR タンパク質の合成を試みたところ、大腸菌や培養細胞を用いた系では LasR タンパク質が速やかに分解されるため、無細胞系合成システムを使うことで初めて合成が可能であることが示された。また、本研究の過程において副次的に AHL の創傷治癒促進作用が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : In order to develop the novel technique to prevent the bacterial infection, I tried to synthesize the recombinant protein of receptor for quorum sensing-signaling molecule (AHL), LasR. The analysis of amino acids of cloned *lasR* gene indicated that LasR consists of AHL-binding domain and DNA-binding domain. The recombinant LasR was successfully synthesized by in vitro system using insect cell extraction, while LasR was rapidly digested when the protein was synthesized in *E. coli* competent cells or cultured cells. In addition, the effect of AHL to promote the wound healing was discovered during the process of this research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病原微生物

1. 研究開始当初の背景

人口増加、新興国における食生活の質の向上、農地の劣化や減少、水資源の不足、気候変動など様々な要因により、近い将来には世界的食糧危機が訪れることが予測されている。これに対応するために、農業各分野では生産性の向上が可及的課題として取り組まれている。特に畜産物生産では、作物生産に

比べて多くのエネルギーを要することから、より一層の努力が求められている。畜産物の生産性向上のためには、品種改良やバイオテクノロジーによる優良家畜の増産および普及、未利用資源の飼料化および食糧との競合の回避、家畜飼育技術の改善などが挙げられるが、同様に事故や疾病などによる家畜資源損失の軽減も重要な課題である。

近年、家畜管理方式の大規模化・集約化に伴い、感染症蔓延の危険性と、感染による経済的損失の拡大が問題視されている。古くから感染症の防除に抗生物質が有効な手段として用いられてきた。しかし、生産物への抗生物質の残留を避けるため、抗生物質投与後は休薬期間を設けることが義務付けられており、この間生産物の出荷は禁止されている。従って、抗生物質の使用は感染症防除に効果的である一方で、同時に多大な経済的損失を招いてしまうことになる。また、抗生物質の使用による耐性菌の出現も大きな脅威である。こうしたことから、抗生物質に代わる有効な感染症防除法の開発が期待されている。近年、感染症防除の新たなターゲットとして Quorum Sensing (QS) 機構が注目されている。QS は、一部の真正細菌（緑膿菌や連鎖球菌、ブドウ球菌、ビブリオ、サルモネラなど）における、オートインデューサーとよばれるホルモン様物質を介した細菌間情報伝達機構である。

緑膿菌は代表的な常在菌であるが、宿主の免疫力が低下すると、日和見感染や敗血症などの原因となる。また、畜産においては、乳房炎や蹄葉炎などの慢性感染症の原因として、莫大な被害をもたらしている。緑膿菌は消毒液や抗生物質への抵抗性が高く、後天的に薬剤耐性を獲得したものも多いため、治療が困難な感染症である。

緑膿菌などのグラム陰性細菌は、I タンパク質の働きにより合成される N-アシル-L-ホモセリンラクトン (AHL) をオートインデューサーとして用いている。AHL は膜透過性であるため、細菌密度が低い場合には細胞外へ拡散する。細菌密度が高くなると細胞内 AHL 濃度も高くなり、転写制御因子 R タンパク質に結合してターゲット遺伝子の転写を促進し、病原因子の放出やバイオフィルムの形成などを促進する。従って、AHL の伝達を阻害することによって病原因子の発現を抑制することができるものと考えられる。

これまで AHL 伝達阻害法として、

- ・AHL デコイ
- ・AHL 分解酵素
- ・シクロデキストリン

などの利用が考案されているが、これらは特異性や阻害効率、DDS、安全性などの点において十分とは言えない状況である。

そこで本研究では、より効果的な AHL 伝達阻害法として、変異型 R タンパク質の開発とその効果を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、抗生物質に代わる感染症防除法の開発を目指した基礎研究として、緑膿菌における Quorum Sensing 機構の新たな阻害法の確立を目的とする。

本研究では、期間内に以下の 5 つの項目の達成を目標とする。

- (1) R 遺伝子のクローニングおよび配列の解析
- (2) DNA 結合部位欠損 R タンパク質 (変異型 R タンパク質) の作製
- (3) 変異型 R タンパク質による細胞外 AHL の補足の検討
- (4) 創傷感染モデルラットにおける変異型 R タンパク質の塗布による緑膿菌耐性獲得の検討
- (5) 培養細胞における変異型 R 遺伝子導入による緑膿菌耐性獲得の検討

3. 研究の方法

(1) R 遺伝子のクローニング・塩基配列解析
緑膿菌 (PA01) より genomic DNA を抽出し、特異的プライマーを用いた RT-PCR 法により緑膿菌 R 遺伝子 (LasR, Gene ID: 881789, 720 bp) を増幅した。増幅産物を TA クローニングベクターへ挿入し、クローニングした。また、増幅産物の塩基配列を判読した。

(2) 変異型 R タンパク質の作製

クローニングされた R 遺伝子を用いて、PCR 法により全長 (full length lasR, fLasR) および AHL 結合部位のみ (short form lasR, sLasR) を作製する。両配列を pTriEx-7 (Takara, GST 標識) および pTD1 (Shimadzu, 10xHis 標識) に挿入した (それぞれ pTri-fLasR/sLasR, pTD-fLasR/ sLasR とする)。pTri-fLasR/sLasR は、大腸菌 HIT-21 に導入し、pTD-fLasR/sLasR は無細胞系タンパク質合成システム (Transdirect Insect cell, Shimadzu) を用いて fLasR/ sLasR の合成を試みた。

4. 研究成果

(1) R 遺伝子のクローニング・塩基配列解析
PA01 gDNA よりクローニングした R 遺伝子の塩基配列を解析したところ、全長 720bp であり、AHL 結合ドメイン (56-483bp) と DNA 結合ドメイン (529-591bp) から構成されていることが確認された。fLasR は開始コドンから 708bp、sLasR は 516bp を含んでいる。

(2) 変異型 R タンパク質の作製

先行研究でも、LasR タンパク質の抽出の困難さは報告されており、いずれもシグナル物質 AHL と結合させることで初めて抽出されるものとされている。しかし、本研究の目的である細胞外での AHL の捕捉による Quorum Sensing Signal の阻害法を確立するためには、AHL と結合させずに LasR タンパク質を抽出・精製することが必要である。また、LasR タンパク質の抽出の困難さは、同タンパク質の疎

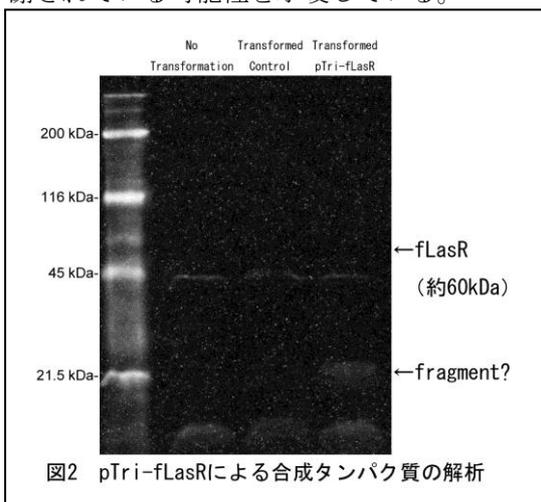
水性によって蛋白分子が凝集し封入体を形成するためとされていた。

そこで、まず LasR タンパク質のアミノ酸配列からその疎水性を解析した (図 1)。



その結果、LasR タンパク質は親水性が高く、従来試みられてきた親水基の付与では、LasR タンパク質の回収効率の改善は期待されないことが明らかとなった。

続いて、pTri-fLasR を用いて、大腸菌 HIT-21 に発現させたタンパク質をウェスタンブロッティング法で解析した (図 2)。その結果、予想された分子量に合成タンパク質は検出されず、その断片と思われるタンパク質が強く検出された。この結果は、LasR タンパク質の抽出の困難さは、蛋白の疎水性に原因があるのではなく、発現後速やかに分解・代謝されている可能性を示唆している。

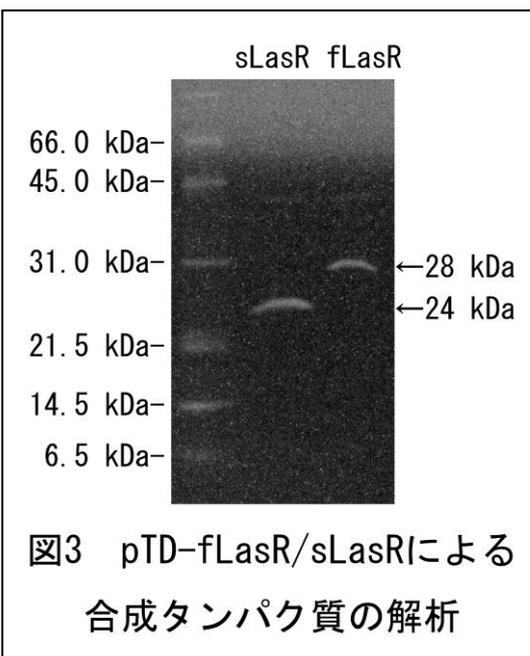


そこで、続いて pTD-fLasR/sLasR を用いた無細胞系タンパク質合成システムを用いて合成を試み、更にウェスタンブロッティング法にて解析したところ、予想された分子量に確かに合成タンパク質が検出された (図 3)。

現在、合成した R タンパク質と AHL の結合、R タンパク質の Quorum Sensing 阻害効果等についての検証に、鋭意努力中である。

これらの研究に付随して、R タンパク質のリガンドである AHL の創傷治癒促進効果を見出すに至った。創部に AHL を塗布すると肉芽組織において α Smooth Muscle Actin 陽性線維芽細胞 (筋線維芽細胞) が増加し、創収縮を促進すること、糖尿病ラットの創部では上皮化の阻害要因を改善し、治癒を促進するこ

とが明らかとなり、特許出願に至っている。



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 1 件)

- ① Nakagami G, Minematsu T, Asada M, Nagase T, Akase T, Huang L, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone can accelerate cutaneous wound healing through myofibroblast differentiation in rats. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 査読あり. 2011 Feb 24. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00796.x. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Asada M, Paes C, Sanada H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, induces matrix metalloproteinase expression via MAPK/AP-1 pathway in rat fibroblast. European Wound Management Association (EWMA) 2011, Brussels (Belgium), 25 May 2011.

- ② Paes C, Nakagami G, Minematsu T, Nagase T, Morohoshi T, Ikeda T, Sanada H. In vitro effect of the Pseudomonas aeruginosa quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone, on keratinocyte migration. European Wound Management Association (EWMA) 2011, Brussels (Belgium), 25 May 2011.
- ③ 仲上豪二郎, 峰松健夫, 浅田真弓, 長瀬敬, 黄麗娟, 赤瀬智子, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルによる MMP 発現制御機構の解明. 第 40 回日本創傷治癒学会, 都市センターホテル, 東京, 2010 年 12 月 3 日.
- ④ 峰松健夫, 黄麗娟, 仲上豪二郎, 赤瀬智子, 大江真琴, 長瀬敬, 須益淳子, 真田弘美. 糖尿病ラットの皮膚創傷治癒過程における新生上皮の形態学的異常と Acylhomoseline lactone による改善. 第 40 回日本創傷治癒学会, 都市センターホテル, 東京, 2010 年 12 月 2 日.
- ⑤ 仲上豪二郎, 浅田真弓, 峰松健夫, 諸星知広, 池田宰, 大田泰徳, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングシグナルが皮膚創傷治癒に与える影響. 第 12 回日本褥瘡学会学術集会, 幕張メッセ, 千葉, 2010 年 8 月 21 日.
- ⑥ 仲上豪二郎, 峰松健夫, 浅田真弓, 黄麗娟, 赤瀬智子, 長瀬敬, 真田弘美. 緑膿菌クオラムセンシングによる創傷部における炎症の誘導. 第 39 回日本創傷治癒学会, 都市センターホテル, 東京, 2009 年 12 月 8 日.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 創傷治癒の為の医薬

発明者: 峰松健夫, 仲上豪二郎, 真田弘美

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-165523

出願年月日: 2010 年 7 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.rounenkango.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰松 健夫 (MINEMATSU TAKEO)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号: 00398752

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし