

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14765

研究課題名(和文) 生物種を超えたシグナリングに应答するAHL受容体の蛍光標識法の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescent labeling method for AHL receptors responding to cross-kingdom signaling

研究代表者

奈須野 恵理 (Nasuno, Eri)

宇都宮大学・工学部・助教

研究者番号：80709329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：一部のグラム陰性細菌は、シグナル分子であるアシルホモセリンラクトン(AHL)の細胞内濃度に依存して遺伝子の発現を集団で制御している。本研究では鎖長の異なるAHLのアシル鎖末端に発色団として4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD)基を導入し、AHL受容体(LuxR)を特異的に蛍光標識するプローブを開発した。モデルLuxRに対して蛍光標識試験を実施した結果、全てのアシル鎖長のAHL-NBDで標識可能であり特に長鎖のもので蛍光量が高かった。in vitroおよびin vivoでも標識可能であったことから、今後は未知LuxRに対するプローブの標識活性を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

データベースに登録されている3000種以上の細菌ゲノムから同定されたAHL受容体の約80%は、ペアになるAHL合成酵素が存在しない。AHL受容体を特異的に蛍光標識可能なAHL-NBDプローブは、これらのAHL受容体のみを保有する細菌の細胞間情報伝達機構を簡便に特定する新規解析ツールと言える。このAHL-NBDプローブを用いることで細菌にとどまらず細菌と競争・共生関係を構築している動植物まで含む広範な生物種を対象とした細胞間情報伝達機構による遺伝子発現制御システムの解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Some Gram-negative bacteria have a quorum sensing (QS) that controls the expression of genes, depending on the intracellular concentration of an acyl homoserine lactone (AHL) as a signal molecule. In this study, we developed a unique fluorescent probe to specifically label the LuxR which is known as an AHL receptor. 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) groups were introduced to the acyl chain end of AHLs with different chain length as a chromophore. CviR derived from *Chromobacterium violaceum*, which regulates to produce a purple pigment in response to AHL, was selected as a model LuxR. As a result of the fluorescence labeling test, all AHL-NBD probes with acyl chain lengths from C6 to C12 could be fluorescently labeled the LuxR, especially the long-chain AHL-NBD probe showed particularly high fluorescence intensity. Since the AHL-NBD probes were able to label the proteins both in vitro and in vivo, we will further evaluate the labeling activity of our probes for the unknown LuxR.

研究分野：生物工学および微生物生態学

キーワード：クオラムセンシング N-アシルホモセリンラクトン LuxR familyタンパク質 蛍光プローブ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

*N*-acylhomoserine lactone (AHL) と呼ばれるシグナル分子を介したクオラムセンシング (Quorum sensing: QS) 機構が病原性因子や色素の生産、バイオフィルムの形成などに関わる多様な遺伝子の発現を制御していることが 100 種類以上のグラム陰性細菌においてこれまでに報告されている。典型的な AHL 型 QS 機構では、AHL 合成酵素と AHL 受容体の遺伝子がペアでゲノム内に存在するが、NCBI データベースに登録されている 3,000 種以上の細菌ゲノムから同定された AHL 受容体の約 80% はペアになる AHL 合成酵素を持たないことが Subramoni らによって報告されている。これは、自らは AHL を生産せず他の細菌が分泌した AHL を受け取って応答することで代謝を変化させ適応する細菌群が環境中に多数存在することを示唆している。さらに、微生物と共進化した植物も細菌由来の AHL に応答して代謝を変化させるとともに AHL の構造類似物質を合成・分泌する能力を保有し、生物種を超えて AHL を介したシグナリングにより細菌の QS 機構に干渉・対抗していると考えられている。

植物病原菌同士や細菌 - 植物間で利用される QS 機構の解明と制御は、化学農薬に頼らない持続可能な農業の実現に重要であると考えられる。しかし、メタボロミクスやプロテオミクスに代表されるように、メタデータ処理技術の進歩により微生物コミュニティ間の違いや時間的変化を俯瞰的にとらえることが可能になったものの、QS 機構を簡便かつ網羅的に同定可能な手法は未だ確立されていない。そこで本研究では、AHL 受容体とのバイオアフィニティを利用して特異的に蛍光標識するプローブの開発を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌 - 植物間の生物種を超えた AHL シグナリングを解明するために、AHL 受容体を網羅的に蛍光標識するプローブの開発とその標識機能評価である。このプローブは、単独では蛍光を示さず、分子間相互作用により複合体を形成しプローブと AHL 受容体との分子間距離が最近接することで発色団を受容体に転移し、新たな共有結合の形成に伴い強い蛍光発光を示すことが特徴である。この条件を満たす発色団として、本研究では酸素結合型 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (*O*-NBD) 基を選択し、鎖長の異なる AHL のアシル鎖末端に導入した各プローブ分子を設計した。

### 3. 研究の方法

*O*-NBD 基を有するリガンドが標的タンパク質に結合すると、最近接したリシン残基のアミノ基と *O*-NBD 間で共有結合が形成される。蛍光性の *N*-NBD ユニット [ $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$ ] が標的タンパク質に付加されると同時にリガンドは遊離する (Fig. 1)。アシル鎖長の異なる各 AHL (C6 ~ C12) に *O*-NBD 基を導入した AHL-NBD プローブをシリーズ合成した。

本研究で設計・合成した蛍光プローブの標識能を評価するモデル AHL 受容体として、アシル鎖長が C8 以下の短鎖 AHL に応答して紫色色素 Violacein を生産する *Chromobacterium violaceum* 由来の CviR を選択した。CviR は AHL 結合ポケット近傍にリシン残基が存在するため AHL-NBD プローブによる標識が可能であると期待した。AHL 合成酵素の遺伝子を欠失させた *C. violaceum* に蛍光プローブ分子を外部添加して培養し、Violacein 生産が誘導されるかどうかで AHL-NBD プローブが天然の AHL と同様に CviR に分子認識されることを確認した。遺伝子工学的手法により 6 残基のヒスチジンタグを付与した His-CviR を高発現する *Escherichia coli* 変異株を作製し、培養液から His-CviR を抽出・精製した。His-CviR 溶液に合成した C6 ~ C12 AHL-NBD を添加し、十分に混合してから室温でインキュベートした。この反応溶液について励起波長 470 nm における蛍光スペクトル測定および SDS-PAGE 電気泳動を行った。

*C. violaceum* が生合成する CviR を含む全タンパク質を対象に C6 ~ C12 AHL-NBD プローブの細胞外または細胞内での標識能を評価した。細菌細胞を破碎して抽出したタンパク質クルード溶液に各アシル鎖長の AHL-NBD を添加し、室温でインキュベートして標識した。また、細菌細胞の懸濁液に AHL-NBD を添加し室温でインキュベートすることで蛍光プローブの細胞透過性を評価した。標識後の菌体を洗浄後、細胞破碎しタンパク質を抽出した。それぞれの条件で標識・抽出したタンパク質溶液について蛍光スペクトル測定、SDS-PAGE 電気泳動、二次元電気泳動を実施した。

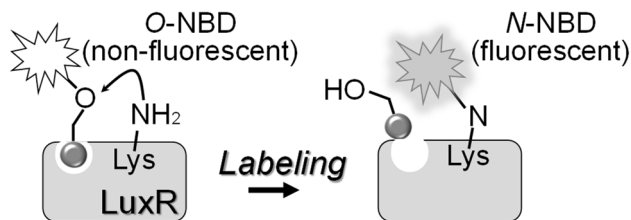


Fig. 1 AHL-NBD プローブによる AHL 受容体(LuxR) 蛍光標識法の概要.

### 4. 研究成果

アシル鎖長が C6 ~ C12 の AHL-NBD 蛍光プローブの合成に成功し、<sup>1</sup>H-NMR にて構造を確認した。AHL 生産能を欠失した *C. violaceum* 変異株にこれらの蛍光プローブ分子を外部添加して

培養したところ、QS 制御下にある Violacein の生産を誘導した。この結果から、アシル鎖末端に *O*-NBD 基を導入したプローブが細菌細胞内に取り込まれて AHL 受容体に分子認識されていることが明らかとなった。

精製した His-CviR を C6 ~ C12 AHL-NBD により標識し蛍光スペクトルを測定したところ、*N*-NBD 基由来の蛍光 (  $\lambda_{ex}$ : 470 nm,  $\lambda_{em}$ : 530 nm) が検出された。SDS-PAGE 電気泳動を行うと His-CviR の単量体と二量体の理論分子量に現れたそれぞれのバンド (約 27, 55 kDa) に蛍光が観測された (Fig. 2A)。AHL-NBD 未添加のサンプルでは蛍光を発するタンパク質バンドが検出されないことから、AHL-NBD プローブにより His-CviR が蛍光標識されていることを示唆している。また、細胞から抽出した全タンパク質に対する標識試験の結果、全ての AHL-NBD プローブ添加条件で精製した His-CviR と同様に 530 nm に *N*-NBD 基由来の蛍光が検出され、C12 AHL-NBD で蛍光量が最大となった (Fig. 3)。細胞から抽出または未抽出の条件で標識した *C. violaceum* 由来の全タンパク質を SDS-PAGE 電気泳動すると、精製した His-CviR の標識時と同様に CviR の単量体と二量体と予測されるバンドに蛍光が検出された。C12 AHL-NBD 添加条件で蛍光量が最大であり、蛍光スペクトル測定の結果と一致する。これは、CviR の AHL 結合ポケット近傍に位置するリシン残基とプローブの *O*-NBD 基が最近接する最適なアシル鎖長が C12 である可能性を示している。

本研究で開発した AHL-NBD プローブは天然の AHL と同様に細胞内に取り込まれ、LuxR に分子認識されるとともに蛍光標識可能であった。ただし、AHL 生産の有無が不明な細菌や AHL を生産しない細菌・植物を対象とした未知 LuxR の網羅的な同定を達成するためには、*O*-NBD 基の導入により水への溶解性が AHL よりも低下する点、AHL との拮抗により LuxR 標識が阻害される点が課題として挙げられる。AHL-NBD プローブは、LuxR を含む AHL と相互作用する未知タンパク質の発見に寄与すると期待される。

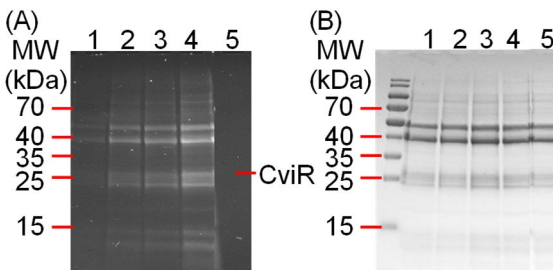


Fig. 2 His-CviR 標識後の SDS-PAGE 結果 . (A) 蛍光 ( $\lambda_{ex}$ : 470 nm,  $\lambda_{em}$ : 530 nm), (B) CBB 染色.

Lane 1-4: 10  $\mu$ M C6, C8, C10, C12 AHL-NBD; Lane 5: AHL-NBD 未添加.

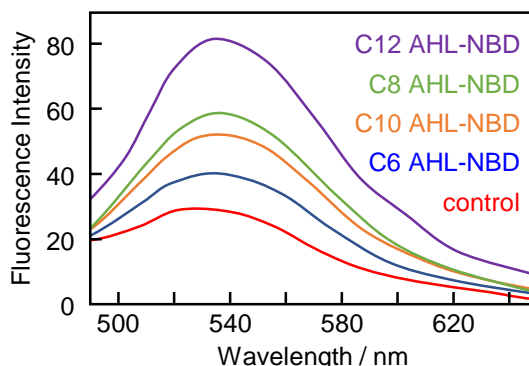


Fig. 3 各 AHL-NBD 添加反応溶液における蛍光スペクトル. [AHL-NBD 終濃度: 10  $\mu$ M]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈須野恵理, 志野裕亮, 加藤紀弘
2. 発表標題 アシルホモセリンラクトン型シグナルを介した生物ドメイン横断的な代謝制御機構への洞察
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志野裕亮, 奈須野恵理, 加藤紀弘
2. 発表標題 シグナル分子受容体を認識する蛍光プローブを用いた細菌の細胞間シグナリングの可視化
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奈須野恵理, 関篤也, 佐々木裕也, 遠藤瑞歩, 加藤紀弘
2. 発表標題 Roseomonas属細菌におけるNアシルホモセリンラクトンを介したクオラムセンシングへの干渉能の進化的関連性評価
3. 学会等名 日本微生物生態学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 紀弘  (Kato Norihiro)	宇都宮大学・工学部・教授  (12201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------