

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450140

研究課題名(和文) 酵素阻害剤結合ビーズを用いたアシルホモセリンラクトン合成酵素の迅速同定法の開発

研究課題名(英文) Identification of acylhomoserine lactone synthases by affinity beads

研究代表者

甲斐 建次 (Kai, Kenji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：40508404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アシルホモセリンラクトン(AHL)はグラム陰性細菌のクオラムセンシング(QS)シグナル分子である。その合成酵素の迅速同定法の開発は、QS機構の解明に必須である。AHL合成酵素の反応メカニズムに基づいてデザインした酵素阻害剤をリガンドとしたアフィニティービーズを作製し、迅速にAHL合成酵素をプルダウン精製・同定する手法の開発に成功した。目的酵素の収量と特性の向上に大きく貢献したのは、リカンドと固定化用ビーズとの間に導入したPEGスペーサーと、リカンド固定化量の最適化であった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria communicate using chemical signals to sense cell density and regulate diverse coordinated behaviors by a process known as quorum sensing (QS). N-Acylhomoserine lactones (AHLs), one class of QS signals in Gram-negative bacteria, are synthesized from the acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) and S-adenosylmethionine (SAM) by LuxI-type synthases. We here report the affinity purification of AHL synthases using beads conjugated with an enzyme inhibitor, which was designed based on the catalytic intermediate acyl-SAM. This is the first study to show that QS signal synthases could be purified by a ligand-based affinity protocol.

研究分野：生物有機化学

キーワード：クオラムセンシング アシルホモセリンラクトン ケミカルバイオロジー アフィニティービーズ

1. 研究開始当初の背景

細菌はホストに侵入すると、爆発的に増殖しはじめる。この過程で、細菌は同種の菌密度をアシルホモセリンラクトン (AHL) 濃度として感知し、それが閾値に達するとホスト内での生存に関わる遺伝子群を発現する。AHL 類は *S*-adenosylmethionine (SAM) と fatty-acyl acyl carrier protein (FACP) から LuxI タイプの酵素によって生合成される。その機構は、SAM と FACP がアミド結合を形成し、その後分子内ラクトン化反応で AHL 類となる 2 段階からなる。AHL 合成酵素は QS の鍵となる生化学因子であり、AHL 合成酵素遺伝子を迅速に同定することができれば、対象菌 QS 系の解明への大きな足掛かりになる。しかし、AHL 合成酵素は触媒メカニズムが共通しているにも関わらず、それらをコードする遺伝子の相同性は低く、PCR 用の有効な縮重プライマーがデザインできていない。変異体スクリーニングあるいはゲノム解読によって合成酵素遺伝子同定が進められているものの、前者は対象遺伝子欠損株が得られない可能性が残り、後者は未だ非常に高価な手法である。また、申請者が以前報告した接合菌細胞内に共生するエンドバクテリアのような単離・純粋培養が不可能な細菌においては分子生物学的なアプローチをとることが極めて困難であった。そのため、強力かつ迅速な AHL 合成酵素同定法を開発することが強く望まれている。

2. 研究の目的

申請者は AHL 生合成中間体をミミックするアシル化 SAM アナログ類をデザイン・化学合成し、AHL 生合成を阻害する ASI-1 を作出することに成功した (学会発表のみ)。本化合物は植物病原細菌 *Burkholderia glumae* 由来の AHL 合成酵素 TofI を $K_i = 220 \text{ nM}$ で阻害する。本申請では、ASI-1 をリガンドとしたアフィニティービーズを作製し、AHL 合成酵素を迅速に同定するための手法開発と、それを用いた難培養細菌からの AHL 合成酵素同定を目指した。

本申請研究は、近年再注目されているアフィニティー精製手法を用いた AHL 合成酵素の迅速同定法の開発とその利用を目指すものである。阻害剤 ASI-1 は申請者らが作り出したものであるため、申請者は同様の手法開発を目指す競合研究者らに大きくリードしている。さらに、作製したアフィニティービーズのバリデーションと酵素精製条件を組換え TofI (発現・精製系を開発済み) で十分に検討することができる状況である。精製 TofI 系での検討後、*Burkholderia glumae* の粗酵素液を用いて、クルード系でのアフィニティービーズのバリデーションを行う。全てがクリアできたら、接合菌 *Mortierella alpina* 細胞内に共生するエンドバクテリアの AHL 合成酵素を同定する。本申請研究はアフィニティー精製法確立に加え、接合菌・細菌共生系

解明への突破口を与えることまでを目標とした。

本申請研究で達成される成果は、AHL 類をシグナルとした QS 系解明にケミカルバイオロジー手法を導入した先駆的なものとなり、重要な QS 解析手法の 1 つとなり得る。特に、難培養細菌 QS 系の解明を達成するための手段として確立されれば、微生物生態学、微生物共生学、微生物病理学発展へ大きく貢献することが期待できる。近年、哺乳類、昆虫、植物あるいはカビといった様々な真核生物細胞中に難培養細菌が共生していることが分かってきた。生態学や病理学的な関心とともに、細胞の共進化の点からも大きな注目を集めている (Moran, *Curr Biol*, 16, R866)。本研究は、難培養細菌が宿主に共生する意義や生理的機能、共生メカニズム解明に資すると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、以下のような研究計画を進める。阻害剤 ASI-1 にリンカーを導入し、セファロースビーズとカップリングしてアフィニティービーズを作製する。作製したビーズの性能を精製 TofI を用いて評価する。次に *B. glumae* の粗タンパク質中から TofI をプルダウン精製できる条件を検討する。そして、接合菌 *M. alpina* から粗タンパク質画分を調製し、ASI-1 アフィニティービーズにエンドバクテリアの AHL 合成酵素を結合させる。続いて、結合タンパク質を溶出し、電気泳動で分離した後、検出されたタンパク質バンドの MS/MS 解析を行い、得られたシーケンスの相同性に基づいて、AHL 合成酵素を同定する。

ASI-1 をリガンドとしたアフィニティービーズの調製

ASI-1 のアデノシンのアミノ基へコハク酸リンカーを導入する。合成は ASI-1 のアセタール保護体にコハク酸クロライドを処理してアミド結合でリンカーを導入し、脱保護して得る。少スケールでの合成は成功済みである。スケールアップしてリンカー導入 ASI-1 を数百 mg 合成し、EAH-Sepharose と縮合剤によりカップリングさせる。得られたアフィニティービーズの性能評価を組換え発現 TofI を用いて検討した。しかし、TofI に対して十分なアフィニティーが得られなれなかった。そこで、リンカー導入位置の変更、EAH-Sepharose から他社ビーズへの変更、リンカーの種類の変更などを行うことにした。

ASI-1 とビーズをカップリングする手法をクリック反応に変更し、プロパルギルリンカーを ASI-1 のヒドロキシ基に導入することにした。作製したビーズは ASI-1 に対して極めて高い特異性を示した (詳細は以下の項目で述べる)。

項目 で作製したアフィニティービーズを用いて、粗タンパク質画分から TofI を精製できるかどうかを検討する。

TofI 発現大腸菌の粗タンパク質液にアフィ

ニティービーズを加え、項目 で最適化した条件で、ToFのビーズへの結合、洗浄、溶出を行い、電気泳動により ToF の分子量に対応するタンパク質バンドが検出されることを確認した。しかも、その特異性と収量は、アフィニティー精製法として十分なものであることが分かった。

B. glumae 粗タンパク質液からの ToF のプルダウンの検討

項目 までを順調に達成できたため、次は *B. glumae* の粗タンパク質液からの ToF プルダウンを検討したが、ToFのみをプルダウンすることは極めて難しいことが判明した。つまり、項目 までに作製したアフィニティービーズでは、収量と特異性が十分ではないことが判明したことになる。そこで、アフィニティービーズの固定化法を再検討することにした。

改良型アフィニティービーズの作製

ビーズの ToF に対する特性と収量を増加させるため、ポリエチレングリコール(PEG)をスペーサーとして ASI とビーズとの間に導入することにした。PEG の導入長を、1 から 6 まで変化させたビーズを作製し、そのビーズの性能を評価した。その結果、PEG 鎖長が増えるにつれ、収量と特性の両方が上昇し、PEG ×4 と ×6 ではほぼ同じ性能を示した。さらに、リガンドである ASI-1 の固定化量を 5 分の 1 ほどにしたところ、さらに収量と特異性が増加した。

4. 研究成果

AHL 合成酵素の 1 種である ToF に対して、極めて高い特異性と収量を示すアフィニティービーズの作製に成功した。はじめにリンカーに、プロパルギル基を用い、アジド型磁気ビーズを使ったものを作製し、リガンド ASI-1 がアフィニティーリガンドとして優れていること、世界初の AHL 合成酵素アフィニティー精製法を *Chemical Communication* 誌に報告した。

しかし、このアフィニティービーズを用いても、*B. glumae* 粗タンパク質液からの ToF プルダウン精製は成功しなかったため、さらなる ASI-1 リガンド固定化の最適化を進めた。PEG スペーサーの導入と、リガンド固定化量の最適化は、さらに劇的な特異性と収量向上を達成させた。しかし、それでもなお、*B. glumae* 粗タンパク質液からの ToF プルダウン精製は成功しなかった。

ASI-1 リガンドの構造を少し変更した ASI-2 を作製し、アフィニティービーズの性能向上への寄与を現在検討中でしている。ASI-1 の脂肪酸部分とアデノシン部分の間の距離をメチレン鎖分伸長したのが ASI-2 である。この新しい ASI-2 をリガンドしたアフィニティービーズを使ったプルダウン精製の結果を使って、もう一報論文としてまとめ上げたいと考えている。

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. Kai K, Fujii H, Ikenaka R, Akagawa M, and Hayashi H. An acyl-SAM analog as an affinity ligand for identifying quorum sensing signal synthases. *Chemical Communications*, 50, 8586-8589 (2014). 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 山田将太、赤川 貢、甲斐建次 . アシルホモセリンラクトン合成酵素のプルダウンによる精製・同定法の開発 . 日本農芸化学会 . 2016 年度大会 . 2016 年 3 月 28 日

2. 山田将太、赤川 貢、甲斐建次 . 酵素阻害剤結合ビーズによるアシルホモセリンラクトン合成酵素のプルダウン精製 . 日本農薬学会 . 2016 年度大会 . 2016 年 3 月 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐建次 (Kai, Kenji)
大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科・講師
研究者番号 : 40508404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()