

Fig. 1. FITC-レスペラトロールの化学構造
 (a) 3位の水酸基に FITC 標識したレスペラトロール
 (b) 4' 位の水酸基に FITC 標識したレスペラトロール

用いた細胞内動態解析

Caco-2をFITC-HTで処理後、細胞内小器官マーカー（核マーカー（Hoechst 33342）、リソソームマーカー（Lyso-Tracker Red））と反応させ、細胞内に取り込まれたヒドロキシチロソールの細胞内局在性について検討した。

結果・考察

本研究では、レスペラトロールの3位の水酸基と4'位

病原細菌のIII型分泌装置阻害物質の標的タンパク質の同定

北里大学大学院感染制御科学府 特任助教 浅見行弘

背景

サルファ薬やペニシリンの導入以来、現在に至っても化学療法剤に対して耐性を示す病原体の出現が、深刻な問題となっている。また、治療法が未だに確立されていない感染症も多く、新たな化学療法剤が望まれている。一方、近年、病原性細菌をはじめとした病原体の個々の病原性因子の役割がより詳細に解明され、病原性細菌の宿主への付着や侵入などの病原性に関わる遺伝子や、そのメカニズムが徐々に解明されてきており、これらは新規薬剤の標的として期待されている。

したがって、従来の化学療法剤のような作用を有する薬剤に加えて、病原体の病原性をコントロールできる薬剤や

の水酸基をフルオロセインイソシアネート（以下 FITC）で標識した2つの化合物を合成した。（Fig. 1）

この2種類の FITC-レスペラトロール Caco-2細胞における細胞内局在性を検討した結果、両 FITC-レスペラトロールを 250 μM の濃度で処理すると、ともに Caco-2細胞に取り込まれること、核には局在せず、リソソームにおいて一部局在することが確認された。しかし、リソソームに局在していた FITC-レスペラトロールは一部にとどまっていた結果を踏まえると、他の細胞内小器官への局在も考えられるので、今後検討していく予定である。また、コントロールとして FITC のみの細胞内局在性を検討したところ、わずかに細胞内に取り込まれたものの、顕著に減少していることが示された。従って、今回の FITC-レスペラトロールの細胞内挙動が、FITC によるものではなく、レスペラトロールに依存したものであることが示唆された。

近年、質量分析技術が飛躍的に進展し、質量顕微鏡などによる特定分子の挙動を追跡することは可能になってきたものの、「生きた」細胞のモニタリングはできない。しかし、本蛍光標識化合物は、「生きた」細胞で用いることができるというメリットがある。これらの方針を組み合わせていけば、機能性食品成分の新規機能性評価法に新たな道を開くことになるであろう。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

宿主の免疫力を高める薬剤等を含めた抗病原性細菌薬の研究開発には意義があると考えられる。そこで、菌の「生存」ではなく「感染過程」に作用して効果を示す薬剤を開発できれば、既存の抗菌薬の持つ問題を克服することができると考えてきた。緑膿菌や O-157 などに代表されるグラム陰性病原細菌の「感染過程」で働く III型分泌機構（以下 T3SS）に着目した（図1）。T3SS はグラム陰性病原細菌に高度に保存されている病原性因子宿主移行メカニズムであり、これら細菌が宿主に感染し病原性を発現する際に本機構が必須であることが近年明らかにされつつある（Kauppi, AM. et al. *Chem. Biol.*, 2003, **10**, 241-249）。

しかしながら、これまでの抗グラム陰性細菌薬の開発においては核酸合成阻害、タンパク質合成阻害、膜障害など菌の「生存」に影響して効果を示す薬剤の開発が主流であるため、耐性菌の出現が問題となり、既存の抗菌薬が持つ問題を克服することは非常に困難であった。そのため近年「感染過程」に着目した研究が開始され、これまでに、

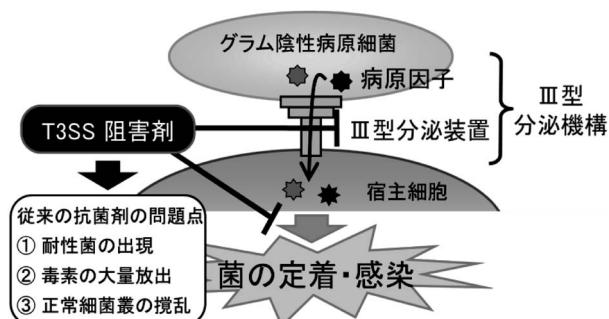


図1 III型分泌装置の活性発現機構とT3SS阻害剤

グラム陰性病原菌III型分泌装置（以下T3SS）とは、腸内細菌科（EPEC, EHEC O-157, サルモネラ菌、赤痢菌etc.）、ボルデテラ族細菌、植物病原菌などに高密度に保存されており、病原菌の宿主への感染過程において病原因子宿主移行装置として機能する。その一方、T3SSは菌の生存に必須ではない。

T3SS阻害物質として数種類の化合物が報告してきたが、いずれも活性の強さが十分でなく、正常細菌の鞭毛などにも影響を及ぼすなどの問題により実用化に至っていなかった（Gauthier, A. et al. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2005, **49**, 4101-4109）。

また現在までに、放線菌二次代謝産物からT3SS阻害物質としてaurodox（図2）やguadinomineが見出されてきたが（Iwatsuki, M. et al. *J. Antibiot.*, 2008, **61**, 222-229, Iwatsuki, M. et al. *J. Antibiot.*, 2008, **61**, 230-236, Kimura, K. et al. *J. Antibiot.*, 2011, **64**, 197-203），医薬品につながるシードには未だ至っていない。

したがって、既存の抗菌剤及びT3SS阻害物質の問題点を克服した機能性分子をこれまで以上に発掘するために、マウス感染実験において、その感染症治療効果が明らかにされているT3SS阻害物質であるaurodoxの標的タンパク質の同定することが必要不可欠だと考え本研究の着想に至った。

研究目的

病原性グラム陰性細菌では、分泌機構により菌体外に様々な毒素タンパク質を分泌、あるいは宿主細胞内にエフェクターと呼ばれる機能性タンパク質を注入することで、宿主の生理機能を攪乱させることが知られている。本研究では、グラム陰性菌III型分泌装置阻害物質であるaurodoxの標的タンパク質を同定することを目的とした。

方法と結果

1) Aurodoxのagarose-beads化体の作製

標的タンパク質を釣り上げるためのリガンド作製は、叶らによって報告されている光親和型小分子固定化法を改良

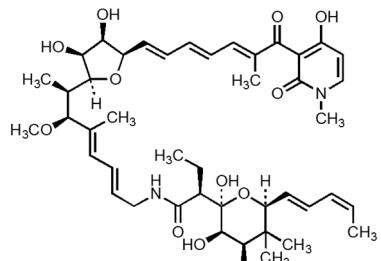


図2 Aurodoxの化学構造

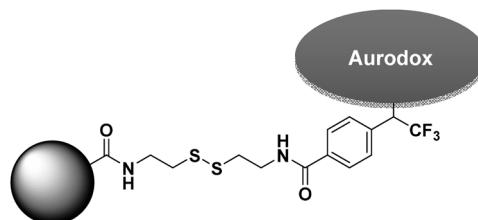


図3 Aurodox/agarose-beadsの化体のモデル

した開裂型リンカーを導入し agarose-beads を用いた (Kanoh, N. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, **42**, 5584-5587. Kanoh, N. et al. *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 182-186)。

開裂型リンカーを使用することで、aurodoxと共有結合する標的タンパク質も検出可能になる。UV365 nmの照射により、アガロースビーズに固定化されたトリフルオロメチルアリールジアジリン（TFMAD基）の光分解により生じるカルベンを利用して、aurodoxをagarose-beadsに固定化し、aurodox/agarose-beads化体を100 mg程度作製した（図3）。現在までに、1 J/cm²、2時間のUV365 nmの照射でaurodoxの分解が起きていないことをLC-MS/MSで確認した。

2) プルダウン実験でのaurodox結合タンパク質の検出

病原性グラム陰性細菌は腸管病原性大腸菌（以下EPEC, enteropathogenic *E. coli*）を用いた。EPECのcell lysateとaurodox/agarose-beads化体をローテーターにより各種の条件（cell lysateとaurodox/agarose-beadsの量比や、結合反応時の温度条件等）でインキュベーションし結合条件を最適化した。

結合反応後に、SDS-PAGEによる分析から特異的な結合タンパク質バンドをクマシーブリリアントブルー染色法により検出した。その後、結合タンパク質群を抽出し、LC-MS/MSおよびマスコット解析から標的タンパク質候補群を同定した（論文未発表のためデータ未記載）。

今後の予定

1) 標的分子候補のタンパク質群ノックアウト株の作製

標的タンパク質候補のノックアウト株の作製は、Red/ET相同組換え法を用いる。この方法は、EPEC内でのλファージによる相同組換え機構を利用する方法である (Zhang, Y. et al. *Nature Genet.*, 1998, **20**, 123–128)。pRed/ETベクターを形質転換させたEPEC内では、λファージ由来のRed遺伝子の発現によって、Red α (エクソヌクレアーゼ) と Red β (DNA結合タンパク質) が生産される。これらにより、標的遺伝子の両端側の相同配列を持つ直鎖状の選択マーカー遺伝子と正確な相同組換えがEPECのゲノム内で起きることで、標的遺伝子を破壊する。さらに本方法は、制限酵素処理やライゲーション反応後のDNA精製が不要であり、標的タンパク質のサイズが大きい場合でも相同組換えによりノックアウト株が作製可能である。ノックアウト株作製後に各破壊株を用いて、III型分泌装置の活性発現を親株と比較することで、活性発現が消失もしくは減少する破壊株を同定する。

2) 標的タンパク質と aurodox/agarose-beads化体の競合実験

標的タンパク質候補群をそれぞれPCRにより増幅し、

クローニングベクターに挿入後、配列を確認する。その後、大腸菌タンパク質発現ベクターにPCR産物を挿入し、タンパク質発現ベクターを作製する。リコンビナントタンパク質は大腸菌BL21株で発現後に精製する。次に、リコンビナントタンパク質を aurodox で前処理後、aurodox/agarose-beads化体とローテーターにより各種の条件（前処理済のリコンビナントタンパク質と aurodox/agarose-beadsの量比や、結合反応時の温度条件等）でインキュベーションし、競合実験を行う。Aurodox で競合作用が見られたものを真の標的タンパク質として同定する。その後、ビアコアを用いて標的タンパク質と aurodox の結合定数を算出する。ビアコアでの分子間相互作用が良好でない場合は、等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter: ITC) を利用した解析を行う。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

ダイズ根粒菌変異株における細胞増殖速度促進機構の解析

東京農工大学大学院農学研究院 講師 大津直子

研究背景・目的

根粒菌は宿主植物の根に「根粒」と呼ばれる器官を形成し、その内部で窒素固定を行う。根粒内で根粒菌はバクテロイドという状態に分化し、窒素固定に必要な遺伝子を発現させる。根粒内にいる根粒菌はペリバクテロイド溶液 (PBS) に包まれており、PBSにはバクテロイド分化のための遺伝子発現を誘導する物質が含まれていると考えられる。報告者が所属する研究室では過去に、PBS溶液を処理した際のダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 の遺伝子発現変化をマクロアレイ法で解析したところ、バクテロイド分化の際の遺伝子発現変化と部分的に模擬していることを見出した (Ohkama-Ohtsu et al., 2015)。またバクテロイド化と PBS処理に共通して発現を抑制する遺伝子領域に blr7984 という TedR型転写抑制因子があり、この転写因子が PBS に応答したバクテロイド化に関与する可能性が考えられた。そこで、この遺伝子の機能解析のために、blr7984 遺伝子破壊株が作成された。

blr7984 遺伝子破壊株は、野生型株よりも増殖が速いという形質を示した。また、blr7984 遺伝子破壊株の増殖期における遺伝子発現変化を野生型株と比較したところ、近

接する blr7983 遺伝子の発現が約40倍上昇していた。このことから blr7983 は、転写抑制因子である blr7984 による転写抑制のターゲットであり、blr7984 が破壊されたことにより blr7983 の発現が上昇したと考えられた。blr7983 は酸化物除去を行うグルタチオントランスフェラーゼをコードしている。過去に根粒菌ではグルタチオン合成の機能が低下すると、酸化物の増加により細胞増殖速度が減少することが報告されていることから (Harrison, et al., 2005)，blr7983 の発現量が増加して、グルタチオンの酸化物除去の働きが上昇し、増殖速度上昇を引き起こした可能性が示唆された。しかし blr7984 破壊株では、blr7983 を含む blr7984 近傍の遺伝子の他に、糖の取り込み、排出、代謝に関わる遺伝子の発現も上昇しており、エネルギー代謝が活発化したことで増殖速度が上昇した可能性も考えられた。blr7984 破壊株において細胞増殖が速まった原因が blr7983 の発現上昇であるかどうかを明らかにするためには、blr7983 を野生株において上昇させた際の、細胞増殖速度を調査する必要があった。そこで本研究では blr7983 過剰発現株を作成し、その増殖速度の測定を行うことにより、ダイズ根粒菌における細胞増殖速度を決定する因子を突き止めることを目的とした。

方法・結果

プラスミド pbjGroEL4::dsRed (Okubo et al., 2013) より