

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした 医薬品の開発

所属 社団法人 北里研究所基礎研究所
研究者 阿部 章夫

要 旨

病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品を開発するために、細菌の言語として機能する物質のバイオアッセイを確立した。また、ODS カラムによる分画とバイオアッセイを組み合わせることで、言語物質の特性と解析を可能にした。

1. 研究目的

バクテリアの生活環のなかでも最もユニークな点は、バイオフィームと呼ばれる共生体を形成することであろう。一端バイオフィームが形成されると、バクテリアは抗生物質に対して強い耐性を示すようになる。このバイオフィームの形成は、バクテリアが分泌する autoinducer と呼ばれる低分子物質の濃度によって厳密に規定されている。Autoinducer はバクテリアが互いにコミュニケーションをとるための言語として機能し、最近では細菌の病原性をも制御していることが明らかになった。Autoinducer の特筆すべき点は、同種だけではなく異種のバクテリアのふるまいをも制御できる点である。本研究の最終的な目標は、autoinducer のなかでも AI-2 と呼ばれる構造が未だに明らかにされていない物質の解析を行い、この物質のアナログを創製することを目的としている。AI-2 は、バクテリアの中でも最も共通性の高い言語と考えられており、サルモネラ、ヘリコバクターピロリ、エルシニア、コレラ菌、結核菌、病原血清型大腸菌、腸管出血性大腸菌等に高度に保存されている。AI-2 の構造が解析され、そのアナログ体を合成することができれば、バクテリア間のコミュニケーションと病原性発揮のシグナルを遮断することが可能であると思われる。現在、わが国では抗生物質の多用による薬剤耐性菌の出現が深刻な社会問題となっている。細菌を殺菌排除せず、細菌の持つ病原性の機能を抑えることで感染症に対処する、いわば細菌との共存と調和を重視した抗感染症薬を開発することは、わが国の医療問題に対処するためにも重要であると思われる。本研究は海洋性細菌のひとつである *Vibrio harveyi* をバイオセンサーチップとした autoinducer の検出系を確立し、さらには autoinducer の単離精製の手法を開発することを目的としている。

2. 研究方法

菌株と培地

Vibrio harveyi IFO15634 (発酵研究所より入手)、*Bordetella bronchiseptica*、*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株 (ATCC15692)、*Salmonella typhimurium* SR11 株 (ATCC14028)、enteropathogenic *Escherichia coli* (以下 EPEC と略す) E2348/69 株を使用した。*V. harveyi* は autoinducer bioassay (AB) 液体培地 (0.3 M NaCl, 50 mM MgSO₄, 0.2% vitamin free Casamino acids, 10 mM potassium phosphate (pH7.0), 1 mM L-arginine, 1% glycerol, pH7.5) で 30℃ で振盪培養し成育させた。*V. harveyi* 以外のバクテリアに関しては、LB 液体培地 (1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl) を用い 30℃ で振盪培養した。

Autoinducer のバイオアッセイ

試験菌を LB 培地、あるいは改変された LB 培地に植菌し、30℃ で 16 時間振盪培養した。一夜培養液を新鮮な培地に移して 100 倍希釈し、これをさらに 30℃ で 6 時間振盪培養した。培養後、8000 rpm で遠心し、その上清を 0.2 μm のフィルターにてろ過滅菌し、滅菌上清を autoinducer のバイオアッセイに使用した。*V. harveyi* を 3 ml の AB 液体培地に植菌し、30℃ で 16 時間振盪培養した。一夜震盪した培養液を新鮮な AB 液体培地に移し 1000 倍に希釈した。この培養液を 96 穴マイクロプレートに 90 μl ずつ分注した。これに 10 μl の試験菌上清を加え 30℃ で振盪培養した。*V. harveyi* の発光はルミノメーターにて測定した。

Autoinducer の分画

試験菌を 100ml の 0.4 M NaCl 含有 LB 培地で培養し、研究方法で述べた方法にて培養上清を調製した。この上清を、ODS カラム (Senshu SSC-ODS-7515-12, 3.0 X 15 cm, 100 cm³) で、0 から 100% までのアセ

トニトリルの直線濃度勾配によって溶出し、12.6 ml ずつ 100 分画した。

3. 研究結果

病原細菌における autoinducer の産生量の比較

V. harveyi は、AI-1 と AI-2 と呼ばれる二つの autoinducer を産生し、菌体外に分泌する。環境中の autoinducer の濃度がある一定のしきい値を超えたときに、各々の autoinducer のセンサーが働きバクテリア内部にシグナルが伝達される。これらシグナルの下流にはルシフェラーゼをコードする遺伝子が含まれる。そのため、環境中の autoinducer の濃度がある一定のしきい値を越えると、シグナルがルシフェラーゼ遺伝子に伝達され、その結果として *V. harveyi* は発光する。この発光を目安にすることによって、環境中の autoinducer をモニターすることが可能である。これまでに、AI-1 はホモセリンラクトン系の化合物であることが報告されている。しかしながら、グローバルランゲージとして機能する AI-2 の本体については依然として不明である。本研究の目的は、グラム陰性と陽性のボーダーを越えて機能する AI-2 の本体を明らかにすることである。初めに、*V. harveyi* が autoinducer の刺激を受け発光するという現象を利用してバイオアッセイを確立することにした。試験菌として、サルモネラ、EPEC、緑膿菌、ボルデテラを用いて *V. harveyi* の発光を誘導するかについて検討した。LB 培地に終濃度 0.5% となるようにグルコースを添加すると、autoinducer の産生が上昇することが既に報告されているので、0.5% グルコース含有 LB 培地で上記試験菌を培養し遠心後上清を得た。この培養上清を研究方法に示すように *V. harveyi* 培養液に加えバイオアッセイを行なった (図 1)。対照は培養上清を添加していない指示菌の *V. harveyi* のみであるが、対照においても 0 時間で *V. harveyi* の発光は観察された。これについては、*V. harveyi* を 1000 倍に希釈しても autoinducer の若干の持ち込みがあるためと考えられた。対照において発光は培養経過 5 時間まで徐々に低下し、5 時間以降は *V. harveyi* が増殖して自らの autoinducer が培地中に蓄積されるために発光強度が増加した。このことから、試験菌の autoinducer の測定には、指示菌に用いる *V. harveyi* 自身の autoinducer の影響を最も受けない培養開始後 5 時間から 6 時間が適していると考えられた。一方、指示菌に *V. harveyi* 自身の一夜培養上清を加えたものは、対照に比べ培養開始後 6 時間で約 8 倍の活性を示した (図 1 A)。このことから、この培養上清の調整法にて autoinducer の検出が可能であると示唆された。そこで、ボルデテラと緑膿菌に関してバイオアッセイを行なった (図 1)。その結果、緑膿菌は *V. harveyi* の培養上清に含まれるのと同程度に *V. harveyi* の発光を誘導した。一方、ボルデテラにおいてはシグナルがほとんど観察されず対照と同じような挙動を示した。次にサルモネラと EPEC についてバイオアッセイを行なったところ、興味深いことに、これらの菌株は *V. harveyi* に対して非常に強い発光を誘導した (図 1 B)。サルモネラの培養上清を添加した場合、培養開始後 6 時間で *V. harveyi* の培養上清添加時よりも約 14 倍強い活性を示し、EPEC においては 94 倍もの活性の強さを示した。このことから、*V. harveyi* は、異なった病原細菌の autoinducer を感知することを明らかにした。また、サルモネラと EPEC から産生される autoinducer は、*V. harveyi* のそれよりもはるかに高い活性を持つことを明らかにした。

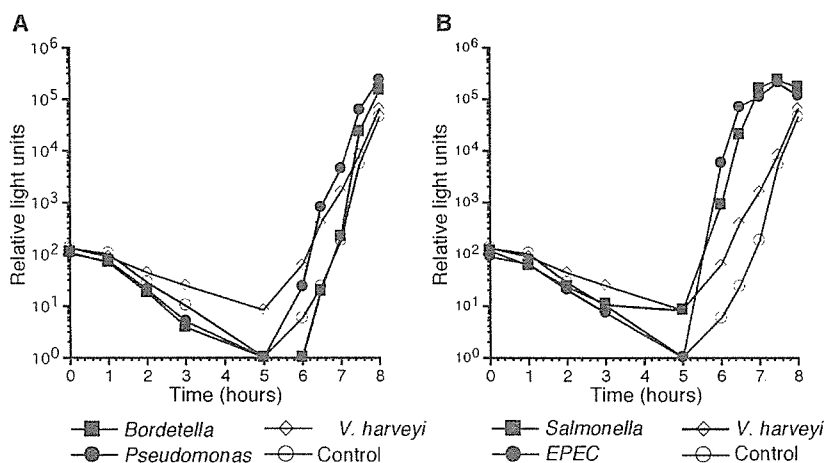


Fig. 1. Production of extra-cellular signalling molecules by pathogenic bacteria. *V. harveyi* was inoculated into AB media containing 10% culture supernatant from *Bordetella*, *Pseudomonas* (A), *Salmonella*, and EPEC (B), respectively. Cultures were incubated at 30°C with shaking, and aliquots were removed at serial time points for measurement of luminescence.

病原細菌の autoinducer の発現に関わる環境因子について

上記実験において、*V. harveyi* を用いたバイオアッセイを確立した。上記実験では、autoinducer 発現の至適条件として報告されている 0.5% グルコース含有 LB 培地にて検討したが、*V. harveyi* の発光を強力に誘導したサルモネラと EPEC を試験菌として、autoinducer の発現に影響する環境中の因子をさらに詳細に解析した (図 2)。バイオアッセイは、*V. harveyi* の autoinducer の影響を最も受けにくい培養開始後 5 時間で行なった。その結果、サルモネラにおいてはグルコース濃度がより低い 0.1% 含有 LB 培地で活性の上昇が認められたが、EPEC ではグルコース濃度の変化で顕著な差は認められなかった。栄養に富む Tryptic soy broth においても同様に、サルモネラにおいて活性が著しく上昇したが、EPEC では活性の上昇が認められなかった。また、細胞培養用の培地であるダルベッコ改変培地 (DMEM) では、両者ともに高い活性が観察されなかった。興味深いことに、EPEC においては 0.4 M NaCl 添加 LB 培地にて著しい活性の上昇が認められた。サルモネラにおいても NaCl 添加において活性の上昇が認められたが、Tryptic soy broth ほどの上昇は認められなかった。以上、サルモネラにおいては Tryptic soy broth のような栄養に富んだ培地で最も高い活性を示した。一方、EPEC においてはグルコースの濃度を変えても活性の差が認められなかったが、NaCl に変えた場合、著しい活性の上昇が認められた。

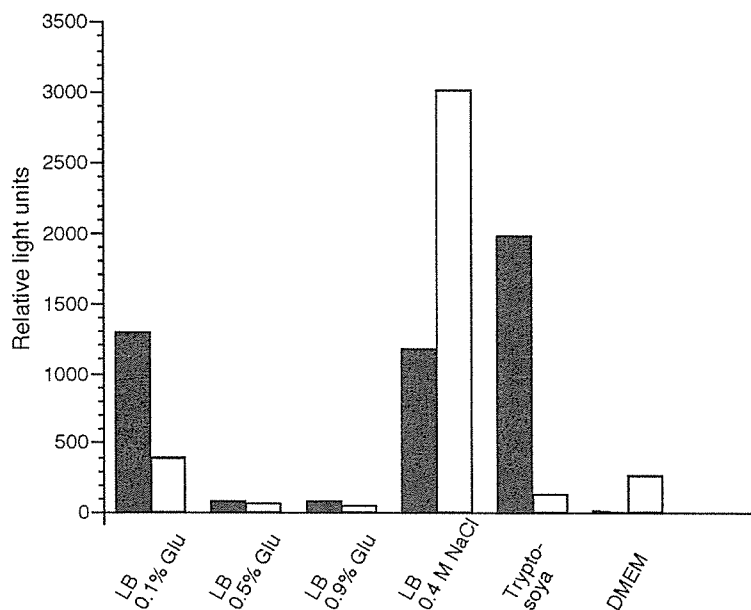


Fig. 2. Effect of growth media on production of extra-cellular signalling molecules. *V. harveyi* was inoculated into AB media containing 10% culture supernatant from *Salmonella* (solid box) or EPEC (open box). Cultures were incubated for 5 hour at 30°C with shaking, and luminescence was measured.

Autoinducer の分画

上記実験において、*V. harveyi* によるバイオアッセイで病原細菌の autoinducer のモニタリングが可能となった。そこで、各病原細菌の autoinducer の単離精製を試みるために、ODS カラムによる活性画分の分画を検討した。まず、ODS カラムによる分画が可能かどうかについて検討するために、autoinducer の活性が高い EPEC とサルモネラを選び条件を設定した。サルモネラにおいては Tryptic soy broth のほうが 0.4 M NaCl 含有 LB 培地より高い活性を示したが、autoinducer の単離を目的とするために、培地組成がより単純な 0.4 M NaCl 含有 LB 培地に条件を統一して実験を行なった。両菌株を 0.4 M NaCl 含有 LB 培地 100 ml で培養し、研究方法に示される方法で培養上清を調製した。培養上清をそれぞれ ODS カラムに充填し、研究方法に示される方法にて分画した。分画された溶出液の 200 μ l を 96 穴プレートに加え、試料溶液を自然乾固後、指示菌である *V. harveyi* の培養液を加えて、30°C で 6 時間振盪培養後、*V. harveyi* によるバイオアッセイを行なった。その結果、EPEC では、1 から 40 画分に活性があるのに対して、サルモネラでは 80 から 100 画分の脂溶性画分に活性が認められた (図 3A)。これらの活性画分について、アッセイに供する試料を 200 μ l から 20 μ l に下げて再アッセイした。その結果、サルモネラに関しては安定した結果が得られなかったが、EPEC については 30 から 40 画分に単一のピークが認められた (図 3A)。

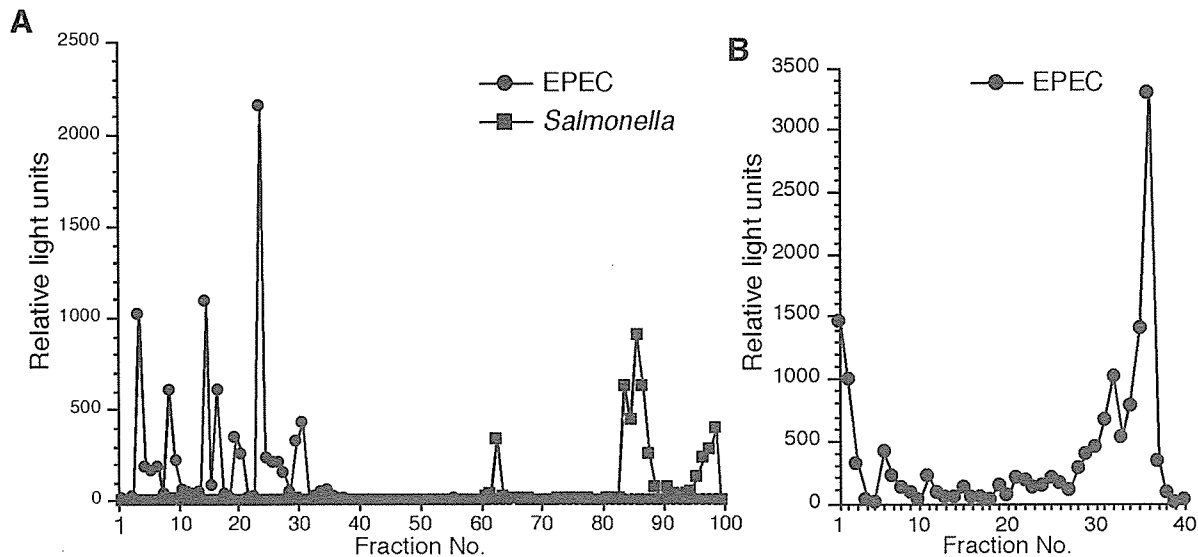


Fig. 3. Fractionation of the extra-cellular signalling molecules from *Salmonella* and EPEC by an ODS column. (A) *Salmonella* and EPEC were inoculated into LB media containing 0.4 M NaCl and culture supernatants were prepared as described in Materials and Methods. The resulting supernatants were applied to the ODS column and were fractionated by elution from H₂O to 100% CH₃CN as linear gradient. Each eluted sample was collected and measured as described in Materials and Methods. (B) The eluted EPEC aliquots corresponding 1 through 40 fractions obtained by the ODS column were assayed.

4. 考察

今回、*V. harveyi* が環境中の autoinducer の濃度を感知して発光するという現象を用いて、病原細菌の autoinducer を解析するシステムを確立した。Autoinducer の活性は菌種によって大きく異なり、ボルデテラのように活性が検出限界以下のものも存在した。ボルデテラの成育は他の菌属とは大きく異なり、植菌する菌量が少ないと菌は全く成育しないことが明らかになっている。このことから、ボルデテラにおいては autoinducer の産生量の少なさが成育の遅さに関係しているのではないかと推察された。一方、サルモネラと EPEC においては、*V. harveyi* 自身が持つ autoinducer をはるかに越える活性を有していた。特に EPEC については、*V. harveyi* 自身の autoinducer よりも 90 倍以上もの活性値を示した。菌の増殖に関しては両菌株とも大差はなく、増殖の違いを反映しているものではないことを明らかにしている。このことから、EPEC では *V. harveyi* と比較して autoinducer の産生量が高いか、autoinducer 自体の活性が強いことが示唆された。

Autoinducer がどのような環境下で発現されるのかについて培地の条件を変えて検討を行なった。その結果、サルモネラに関しては、LB 培地のグルコース濃度を従来報告されている 0.5% の至適条件よりも 0.1% にしたほうが高い活性を示したが、EPEC においてはグルコース濃度の変化に呼応しなかった。しかしながら EPEC においては、LB 培地に 0.4 M NaCl を添加することで著しい活性の上昇を認めた。これらのことから autoinducer が発現される環境は、病原細菌の種類によって大きく異なることを明らかにした。

バイオアッセイの結果、サルモネラと EPEC の autoinducer がそれぞれ高い活性を示した。そこで、ODS カラムにて両菌株から autoinducer の単離を試みた (図 3 A)。我々の予想に反して EPEC とサルモネラが産生する autoinducer の特性は全く異なっており、EPEC では親水性の領域で特異的に分画されるのに対して、サルモネラの活性画分はアセトニトリル濃度の高い疎水性領域で溶出された。EPEC とサルモネラはともに、AI-2 が優位に発現されていることが知られており、少なくとも 1 つは同じ特性を持った物質が分画されるものと予想したが、ODS による分画の結果、両菌株が異なった特性の autoinducer を産生していることが示唆された。今回の実験では、サルモネラの活性画分において再現性が認められなかった。両菌株ともに培養条件を統一するために、0.4 M NaCl 含有 LB 培地で解析を進めたが、サルモネラにおいては Tryptic soy broth のほうが autoinducer の活性値が高かった (図 2)。サルモネラに関しては培養条件を Tryptic soy broth に変えて再度分画を行ない、EPEC で得られた活性画分と比較検討する予定である。

一方、EPEC の活性画分は室温で 4 日間放置後、凍結融解を 2 度行なっても依然として活性が保たれていた。このことから、EPEC の autoinducer は比較的安定な物質であることが推察された。EPEC のバイオアッセイ再検討の結果 (図 3 B)、30 から 40 画分に単一のピークが得られたので、現在この活性画分の精製を行なっている段階である。また、*V. harveyi* の AI-1 と AI-2 のセンサーに相当する遺伝子の欠損株をそれぞれ作成している段階である。これにより、EPEC とサルモネラで得られた活性画分の差異についてより詳細な解析が可能となると思われる。

今回の研究の結果、バクテリアの産生する autoinducer は、病原細菌の違いによって活性の強さも多岐に渡るが、異種間のバクテリアにおいても autoinducer を通して互いにコミュニケーションを取ることが明らかになった。現在、EPEC の活性画分の NMR による構造決定を進めている段階であるが、これにより EPEC が用いる言語を解明できるのではないかと思われる。構造が決定されればこれらのアナログ体を作成することによって、バクテリアの伝達能力を遮断するような新たな医薬品の創製に繋がるのではないかと思われる。また、病原細菌のグローバルな言語体系を理解することができれば、腸内細菌叢をより健全に保つような新たな手法、あるいはその調和を保つような薬剤が開発されるのではないかと思われる。

5. まとめ

V. harveyi が外界の autoinducer を感知して発光するという現象を利用して、病原細菌の autoinducer を解析するシステムを構築した。その結果、病原細菌の autoinducer の発現の強さと、発現に至る環境中の刺激は様々であり、これらの多様性が個々の病原細菌の病原性発揮のタイミングと場の違いを与えているものと示唆された。また、考案されたバイオアッセイと ODS カラムによる分画による組み合わせで、autoinducer の特性を大別することができた。これにより、病原細菌の autoinducer の分類が可能となるだけでなく、微量の autoinducer の精製を可能とした。今後は構築されたシステムにより、EPEC の autoinducer の本体を明らかにするばかりではなく、結核等の公衆衛生上危惧されるべき病原細菌の autoinducer の解明を進める予定である。

6. 研究発表

準備中

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社