

論文要旨

ライブイメージングを目指したバクテリア表層修飾

森崎 千珠

1. 緒言

動物の腸管では多くのバクテリアによる細菌叢が形成され、宿主の健康状態や免疫に関わっている¹⁾。従って、この細菌叢を形成しているバクテリアの種類や役割を明らかにすることは大変重要であり、主に糞便等のサンプルからバクテリアを培養して同定する方法、あるいは DNA 断片の増幅により種類を推定する方法により研究されてきた。しかしながら、これらの手法では、腸管でバクテリアが存在した時間、バクテリアが生息していた場所などの詳細な情報を得ることができない。このため、生体内のバクテリアの状態をそのまま可視化できる手法の開発が望まれている。

2. バクテリア細胞壁前駆体 (Ac₃GlcLev-1-P)の動物細胞への影響

これまでに、乳酸菌に代表されるグラム陽性菌(Gram-positive bacteria, Figure 1)について、細胞壁 (ペプチドグリカン) というバクテリアが共通に持つ糖鎖構造に着目し、その前駆体となるグルコサミン誘導体 (Ac₃GlcLev-1-P)を利用して蛍光色素や糖鎖など人工的な化合物を表層に提示させることが報告された²⁾。この手法により、ほとんどのグラム陽性菌の修飾が可能にな

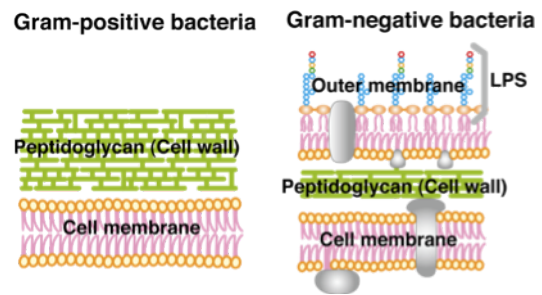
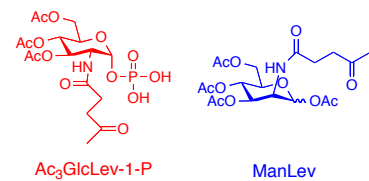


Figure 1. バクテリアの表層構造

った。しかしながら、生体内の腸内バクテリアを可視化するためには、Ac₃GlcLev-1-P が動物細胞に影響を与えないことを明らかにする必要がある。そこで、Ac₃GlcLev-1-P を溶解させた培地で動物細胞を培養して、培養後の動物細胞の様子を調べることで、Ac₃GlcLev-1-P の動物細胞への影響を調べた。

動物細胞として Jurkat 細胞(ヒトリンパ芽球細胞由来)と Caco-2 細胞(ヒト大腸ガン由来細胞。腸管モデルとしてよく用いられる細胞)を用いた。ポジティブコントロール化合物として、Jurkat 細胞などへ取り込まれることが報告されているマンノサミン誘導体³⁾



(ManLev)を用いた。牛胎児血清 (FBS)を 10%加えた RPMI1640 培地に懸濁した Jurkat cells を、12-well プレート各 well に 1.8 mL (2.2×10⁵個)ずつ播種し、これに Ac₃GlcLev-1-P または ManLev の PBS 溶液 (終濃度 20 μM)、あるいは PBS (phosphate-buffered saline)を 200 μL 添加して、3 日間培養 (37 °C, 5% CO₂) した。細胞を回収し、細胞表層に提示されたケトン基を検出するために、まず、biotin-hydrazide (1 mM in PBS, 0.1% FBS, pH6.4)、次に streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate (5.6 mg /mL in PBS, 0.1% FBS, 0.1% sodium azide, pH7.4)によって蛍光ラベルした。そして、フローサイトメーターによりラベルした細胞 1 個あたりの蛍光強度を測定した。また、Caco-2 細胞は牛胎児血清 (FBS)を 10%加えた D-MEM 調整培地を用いて

培養を行い、化合物添加から4日目の細胞回収時にトリプシン処理を行った以外は Jurkat 細胞と同一条件でラベルした細胞1個あたりの蛍光強度を測定した。

化合物添加後の細胞写真と蛍光強度の分布を Figure 2 に示す。Jurkat 細胞、Caco-2 細胞のどちらも化合物を加えてから3 or 4日後の細胞の様子は変わっていない。これは、化合物が細胞に悪影響を及ぼすことがなかったことを示している。

Ac₃GlcLev-1-P を加えて培養した細胞はネガティブコントロール

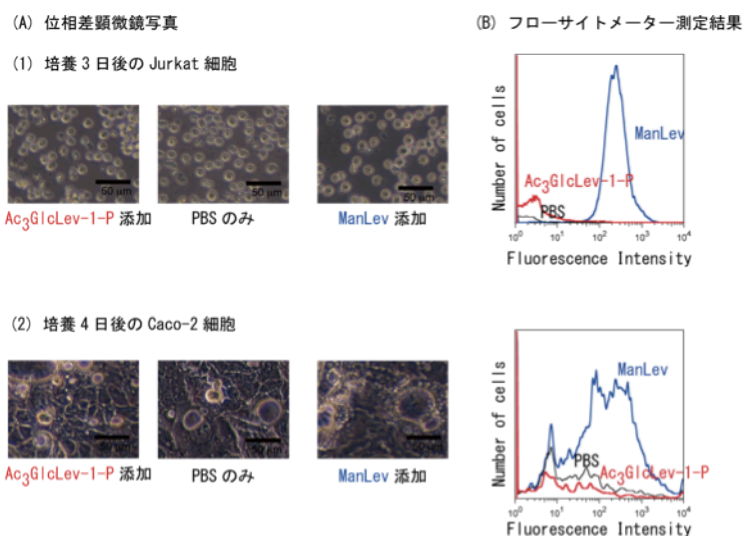


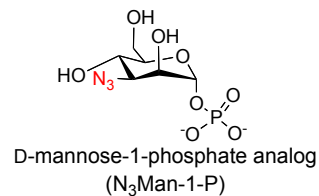
Figure 2.化合物添加後の細胞写真とフローサイトメーター測定結果

ル (PBS だけ添加した場合)と似た蛍光強度を示した。一方で、ポジティブコントロール(ManLev を加えて培養した細胞)は強い蛍光を示した。以上から、化合物 Ac₃GlcLev-1-P はバクテリアには取り込まれるが動物細胞には取り込まれない (オルソゴナル性を持つ)ことがわかった。

3. グラム陰性菌 O 抗原特異的修飾

生体内でのバクテリアイメージングのためには、ある特定の種類のバクテリアだけラベル化する手法の開発が必要となる。そこで、グラム陰性菌 (Gram-negative bacteria, Figure 1)の外膜に着目した。グラム陰性菌の外膜はリポ多糖 (LPS)で構成され、LPS の最も外側にある O 抗原は株の種類により構成する糖の種類や配列が異なることが知られている。特に大腸菌 O157 株はその O 抗原の繰り返し単位である 4糖の中に、D-ペロサミンという特徴的な糖をもっている⁴⁾。これを利用して生きたままの大腸菌 O157 株を選択的に標識化することを試みた。

D-ペロサミンはマンノース-1-リン酸を経由して生合成されることが知られているので、その誘導体として、マンノース-1-リン酸の3位にアジド基を導入した化合物(N₃Man-1-P)を合成した。この化合物を添加した培養液でバクテリアを培養し、アジド基がバクテリア表層に提示されるかを調べた。バクテリアとして、大腸菌 O157 のほか、コントロールとして、O 抗原の中に D-ペロサミンを持たない株(大腸菌 O1、O16、B、K12 株と *Citrobacter Sedlakii*)について調べた。



バクテリアを、N₃Man-1-P (12.5 mM)を添加した NB 培地、あるいは NB 培地で好氣的に 10 時間培養した。培養したバクテリアを集菌し、PBS で洗浄後、表層のアジド基を 10 mM DBCO-PEG12-biotin conjugate と streptavidin-Alexa Fluor 488 conjugate の二段階で蛍光ラベルした(Figure 3a)。洗浄後、バクテリア1個あたりの蛍光強度をフローサイトメーターにより測定した。大腸菌 O157 を用いた場合のフロー

サイトメーター測定結果を Figure 3b に示す。 N_3 Man-1-P を添加して培養したバクテリア (red line) は、 N_3 Man-1-P を添加しないで培養したバクテリア (black line) に比べて強い蛍光を持っていることがわかった。実験に使用した合計 6 株のバクテリアについて、 N_3 Man-1-P を添加した培地で培養した場合と添加していない培地で培養した場合の蛍光強度の比を Figure 3c に示した。大腸菌 O157 株では 2 倍以上の蛍光強度の差があったが、その他の株は蛍光強度の差は見られなかった。 N_3 Man-1-P は大腸菌 O157 を選択的に標識できる化合物であることが示唆された。次に、蛍光ラベルされた部位が O 抗原糖鎖部位であるかを明らかにするため、外膜成分を抽出し、SDS-PAGE を行い解析し、LPS 部分に N_3 Man-1-P があることを明らかにした。

4. 今後の展望

本研究により、 $Ac_3GlcLev-1-P$ が動物細胞に影響を与えないこと、 N_3 Man-1-P は大腸菌 O157 選択的に修飾できることが明らかになった。今後は、*in vivo* で常在バクテリアのライブイメージングに発展させることが可能になる。そして、この手法を通じて、常在バクテリアと宿主との詳細な関係を明らかにすることができ、アレルギーや生活習慣病などの診断、治療などに応用されることが期待できる。

5. 参考文献

- 1) Kiyono Hiroshi *et al.*, *Clinical Mucosal Immunology*, Synergy International, Inc., pp. 2-16, **2010**.
- 2) Reiko Sadamoto *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 10192.
- 3) Eliana Saxon *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 14893.
- 4) M. B. Perry *et al.*, *Biochem. Cell. Biol.*, **1986**, *64*, 21.

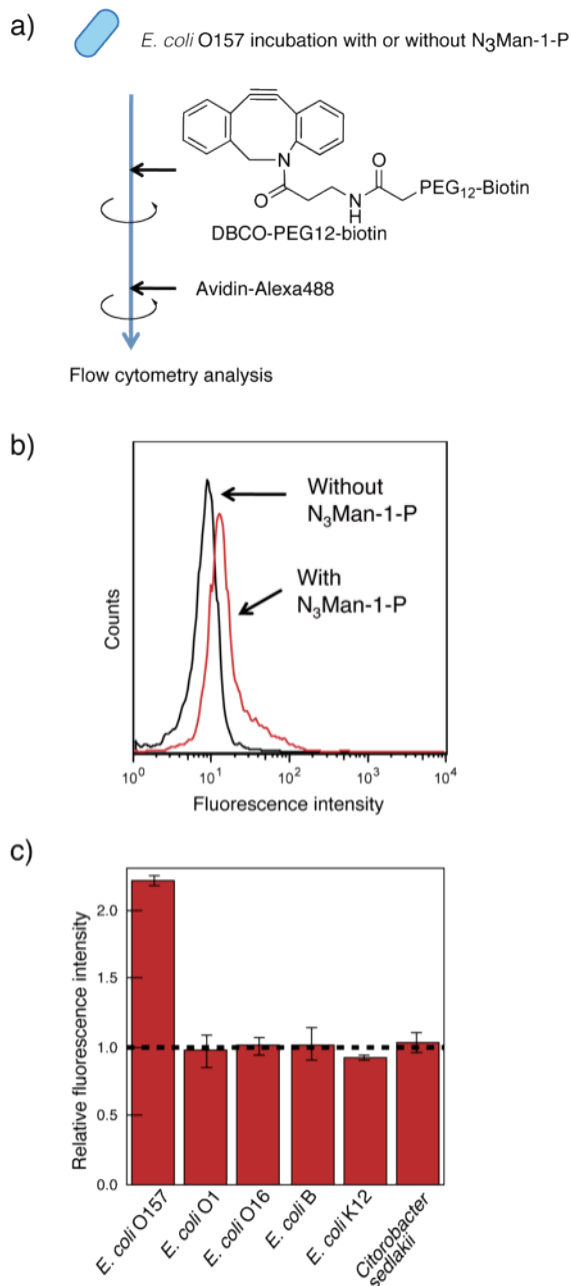


Figure 3. a) フローサイトメーターを用いた実験の概略図。 (b) N_3 Man-1-P を培地に添加して培養した大腸菌 O157 株の フローサイトメーター測定結果。X 軸は蛍光 (525 nm) 強度を表す。赤: 12.5 mM N_3 Man-1-P、黒: コントロール (c) それぞれの株の 12.5 mM N_3 Man-1-P 添加の影響。フローサイトメーターで N_3 Man-1-P の有無でそれぞれ測定し、 N_3 Man-1-P 添加の結果を N_3 Man-1-P を添加していない結果で割って算出した。