

(報告書様式)

2018年 4月 29日

金沢大学先端科学・イノベーション推進機構協力会 御中

## 第2回 若手研究者奨励賞 研究実施報告書

所 属 健康増進科学センター  
職 名 助教

ふりがな こばやし まさと  
氏 名 小林 正和

## 研究実施報告書

### (1) 研究テーマ名

アミノ酸代謝を菌活性化の指標とする感染症画像診断薬の開発と新規抗菌剤開発への応用

### (2) 研究の目的および要旨

本研究では、日和見感染症における病原細菌の活性化の指標となるアミノ酸代謝を利用した画像診断薬を開発し、そのアミノ酸を基本骨格とした抗菌剤への応用を試みた。日和見感染症とは、ヒトの免疫力が低下した際に、常在菌が活性化して発症する健康障害である。特に、劇症型感染症や敗血症は、急激に病態が進行する危険性の高い疾患であるため、その病原菌の活性化を早期に検出し、発症・重症化を防ぐ必要がある。申請者は、病原菌の活性化に伴う代謝亢進を標的とし、細菌の増殖に必須である L-tyrosine 等の芳香族アミノ酸が大腸菌の増殖初期段階において、他の増殖段階よりも 10 倍程度多く取り込まれたため、アミノ酸代謝を利用した画像診断薬が感染症の超早期診断に適用できると考えた。本研究では、日和見感染症の活性化を検出するアミノ酸代謝画像診断薬を開発した。その後、この診断薬のアミノ酸を基本骨格とする抗菌剤の開発を目指した。

7 種類の標識天然アミノ酸を用いて *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 由来株への集積を調べたところ、[2,3-<sup>3</sup>H]-L-alanine (<sup>3</sup>H-L-Ala)が最も細菌の増殖活性を反映し得ることが明らかになった。また、低温培養実験により <sup>3</sup>H-L-Alaは*E. coli* K-12 由来株の増殖活性時に特異的に菌体内へと集積することを明らかとした。以上の結果より、alanine をベースとした新規画像診断薬による迅速な診断法、または alanine の構造を利用した新規抗菌薬開発の可能性が示唆された。

### (3)採択されてからの研究の進捗状況

本研究では、本奨励賞取得後、病原細菌の活性化を検出可能なアミノ酸代謝画像診断薬の基本骨格となる天然・人工アミノ酸の探索と、これらのアミノ酸を用いた病原細菌における集積量と集積機序の検討を中心に進めてきた。具体的な実験方法は以下の通りである。

#### 1. 使用菌種と前培養条件

本研究では、*E. coli* K-12 由来株をモデル細菌として使用した。前培養用の培地として、Todd's Hewitt Broth (THB 培地; Becton, Dickinson and Company; Tokyo, Japan)に、0.2 % Yeast extract (Becton, Dickinson and Company; Tokyo, Japan) を添加した THY 培地を用いた。培養条件は、37°C、好気条件下で 14 時間とした。本研究における実験は全てこの状態の菌を使用した。

#### 2. 使用した標識天然アミノ酸

中性天然アミノ酸として、Glycine, L-alanine, L-tyrosine, L-methionine, 酸性天然アミノ酸として、L-glutamic acid, 塩基性天然アミノ酸として、L-lysine, L-histidine をそれぞれ選択し、本研究では上述の天然アミノ酸を放射性トリチウム(<sup>3</sup>H)で標識した [2-<sup>3</sup>H]-glycine (<sup>3</sup>H-Gly), [2, 3-<sup>3</sup>H]-L-alanine (<sup>3</sup>H-L-Ala), [ring3,5-<sup>3</sup>H]-L-tyrosine (<sup>3</sup>H-L-Tyr), [methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (<sup>3</sup>H-L-Met), [2,3,4-<sup>3</sup>H]-L-glutamic acid (<sup>3</sup>H-L-Glu), [4,5-<sup>3</sup>H]-L-lysine (<sup>3</sup>H-L-Lys), [ring2,5-<sup>3</sup>H]-L-histidine (<sup>3</sup>H-L-His) (American Radiolabeled Chemicals; USA) を用いた。

### 3. 本培養条件の選択

本培養用培地にはアミノ酸不含有の Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 培地; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; Osaka, Japan)を使用した。DMEM 培地 5 mL 中に, (1)に示す方法により前培養した *E. coli* K-12 由来株を,  $2.5 \times 10^5$  CFU,  $5 \times 10^5$  CFU,  $1 \times 10^6$  CFU,  $2 \times 10^6$  CFU 量播種し,  $37^\circ\text{C}$ , 160 rpm 下で振盪培養を行った。その後, 可視分光光度計を用いて 600 nm における液体培地の濁度(Optical density; OD)を一定時間ごとに測定した結果を図 1 に示した。この予備検討の結果より, 最終的に *E. coli* K-12 由来株が最も増殖した  $2 \times 10^6$  CFU を本培養時における播種菌量とした。

### 4. *E. coli* K-12 由来株を用いた標識天然アミノ酸の集積実験

(1)の方法で調製した *E. coli* K-12 由来株を, DMEM 培地 5 mL に  $2 \times 10^6$  CFU 量播種し  $37^\circ\text{C}$ , 160 rpm 下で振盪培養した。*E. coli* K-12 由来株の増殖における誘導期 (培養開始後~2 時間), 対数増殖期 (培養開始後 2~8 時間), 定常期 (培養開始後 8~24 時間) に, 約 37 kBq の  $^3\text{H-Gly}$ ,  $^3\text{H-L-Ala}$ ,  $^3\text{H-L-Tyr}$ ,  $^3\text{H-L-Met}$ ,  $^3\text{H-L-Glu}$ ,  $^3\text{H-L-Lys}$ ,  $^3\text{H-L-His}$  を 10  $\mu\text{L}$  添加し,  $37^\circ\text{C}$ , 70 rpm の振盪条件下で 5 分間インキュベートした。インキュベート後,  $4^\circ\text{C}$ ,  $6,000 \times g$  の条件下で 5 分間遠心し菌体を回収した。上清除去後, Phosphate buffered saline(-) (PBS; Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.; Aichi, Japan) 5 mL で菌体を 3 回洗浄した。洗浄後, 0.1 M NaOH 1 mL により菌体を懸濁し, 懸濁液 500  $\mu\text{L}$  と ULTIMA GOLD (Perkin Elmer; USA) 5 mL とを混和後, 液体シンチレーションカウンター (Aloka; LSC-5100)で菌体内に集積した放射能を測定した。

### 5. タンパクへの組込み率算出実験

(4)の方法を用いて調製した懸濁液 190  $\mu\text{L}$  に, 最終濃度 5 %となるように 100 %トリクロロ酢酸 (Nacalai tesque; Kyoto, Japan)を 10  $\mu\text{L}$  加えて混和した。混和後, 沈殿画分を GLASS FIBER FILTER (GC-50; Toyo)に捕集し, 氷冷 5 %トリクロロ酢酸溶液 1 mL で 3 回洗浄した。洗浄後, GLASS FIBER FILTER を  $100^\circ\text{C}$ 下で1時間加熱処理することによりタンパクを固定し, 測定した放射能をタンパク画分への組込み率として評価した。

### 6. 低温培養条件における集積実験

$2 \times 10^6$  CFU 量の *E. coli* K-12 由来株を DMEM 培地 5 mL に播種し,  $16^\circ\text{C}$ , 160 rpm 下で振盪培養を行った。培養開始後 2, 4, 6, 8, 12 時間の時点で(4)と同様の方法により  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積を検討した。また,  $16^\circ\text{C}$  で 12 時間培養後, 培養温度を  $37^\circ\text{C}$ に変更し, 同様に  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積を検討した。

### 7. 集積阻害実験

(4)と同様の条件で *E. coli* K-12 由来株を培養し,  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積阻害実験を行った。阻害剤として, L-alanine, glycine (Nacalai tesque; Kyoto, Japan)を用いた。培養開始後 2, 4, 6, 8, 12, 24 時間の時点で, 約 37 kBq の  $^3\text{H-L-Ala}$  と各阻害剤 (最終濃度 1 mM)を添加し,  $37^\circ\text{C}$ , 70 rpm の条件下で 5 分間インキュベーションした。インキュベーション後, (4)および(5)と同様の方法で *E. coli* K-12 由来株への集積, タンパクへの組込み率を評価した。

#### (4) 研究の成果

日和見感染症とは、ヒトの免疫力が低下した際に、常在菌が活性化して発症する健康障害である。特に、劇症型感染症や敗血症は、急激に病態が進行する危険性の高い疾患であるため、本研究では最初に、その病原菌の活性化を早期に検出し、発症・重症化を防ぐ診断薬の開発に取り組んだ。

##### 1. *E. coli* K-12 由来株の各増殖期における標識天然アミノ酸の集積

*E. coli* K-12 由来株の各増殖期において標識天然アミノ酸の集積に変化が認められ、且つ標識天然アミノ酸の種類によってその集積傾向が異なっていた (図 1)。中性標識天然アミノ酸である  $^3\text{H-Gly}$ ,  $^3\text{H-L-Ala}$ ,  $^3\text{H-L-Tyr}$ ,  $^3\text{H-L-Met}$  は, *E. coli* K-12 由来株の増殖の準備段階である誘導期 (培養開始後 2 時間) には集積量が低い一方, *E. coli* K-12 由来株の増殖活動が最も活発になる対数増殖期 (培養開始後 6 時間) に集積量が最大を示した。また, 増殖活動が低下し, 死菌が増え始める定常期 (培養開始後 12 時間以降) には集積量が低下した。以上の結果より, 中性天然アミノ酸である glycine, L-alanine, L-tyrosine, L-methionine は, 細菌の増殖状態に相関して集積が変化することを明らかにした。また, 酸性標識天然アミノ酸である  $^3\text{H-L-Glu}$  は誘導期に最大集積を示し, その後低下する傾向を示した。一方, 塩基性標識天然アミノ酸である  $^3\text{H-L-Lys}$  と  $^3\text{H-L-His}$  は定常期に最大集積を示した。また, 各標識天然アミノ酸の *E. coli* K-12 由来株への集積量を比較したところ, 誘導期には  $^3\text{H-L-Glu}$ , 対数増殖期には  $^3\text{H-L-Ala}$ , 定常期には  $^3\text{H-L-Lys}$  と  $^3\text{H-L-His}$  が最も多く集積することを見出した(図 1)。以上の結果から, 細菌の増殖状態に相関して集積が変化し, かつ細菌の増殖活動が盛んな対数増殖期における集積量が最も多い  $^3\text{H-L-Ala}$  に着目し, 後述の検討事項を進めることとした。

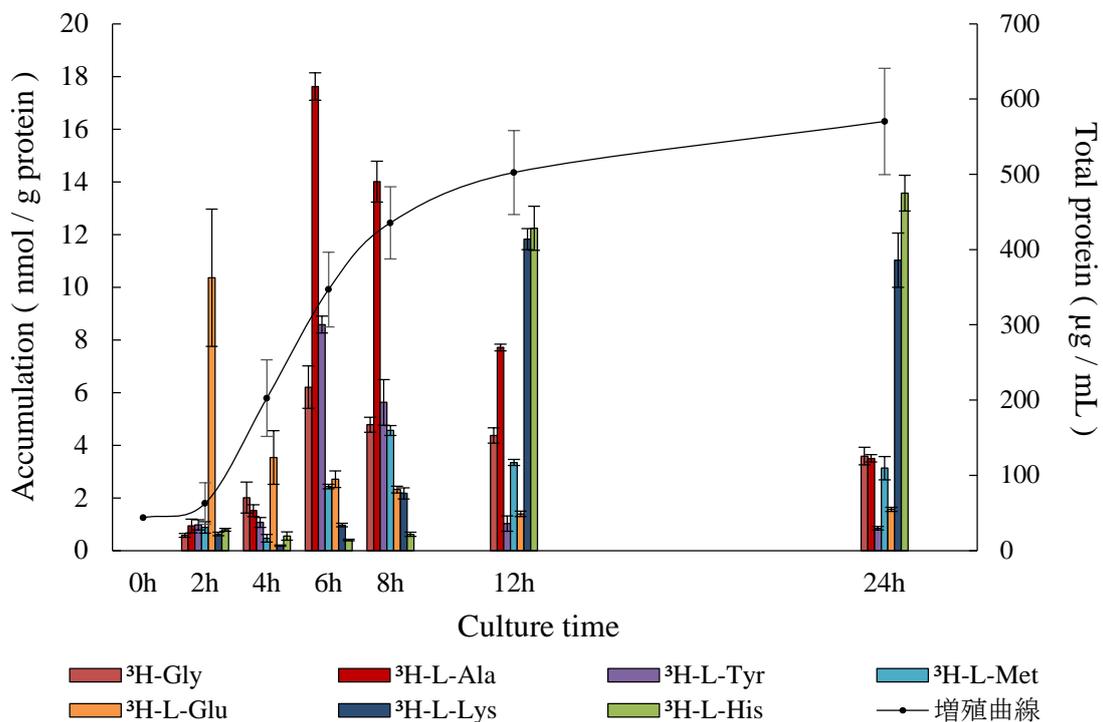


図 1. *E. coli* K-12 由来株への各標識天然アミノ酸の集積量比較

$2 \times 10^6$  CFU の *E. coli* K-12 由来株を DMEM 培地 5 mL に播種し, 振盪培養した。培養開始後 2, 4, 6, 8, 12, 24 時間の時点で, 約 37 kBq の標識天然アミノ酸を添加し 37°C, 70 rpm の条件下で 5 分間インキュベートした。その後, PBS 5mL で菌体を 3 回洗浄し, 液体シンチレーションカウンターにて菌体内に集積した放射能を測定した。標識天然アミノ酸の集積量を Accumulation (左軸), *E. coli* K-12 由来株の増殖を Total protein(右軸)により評価した。

## 2. *E. coli* K-12 由来株の活動状態と $^3\text{H-L-Ala}$ の集積変化

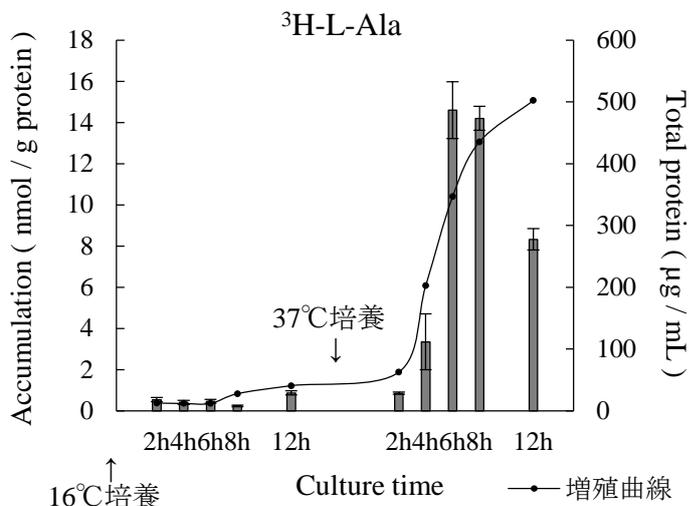


図2. *E. coli* K-12由来株の活動状態の変化に対する  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積変化

$2 \times 10^6$  CFU の *E. coli* K-12 由来株を DMEM 培地に播種し  $16^\circ\text{C}$ , 160 rpm 下で振盪培養を行った. 培養開始後 2, 4, 6, 8, 12 時間の時点で約 37 kBq の  $^3\text{H-L-Ala}$  を添加し,  $37^\circ\text{C}$ , 70 rpm の条件下で 5 分間インキュベートした. その後, 方法 4 と同様の方法にて菌体内に集積した放射能を測定した. また,  $16^\circ\text{C}$  で 12 時間培養後, 培養温度を  $37^\circ\text{C}$  に変更し同様の手順で放射能を測定した.  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積量を Accumulation (左軸), *E. coli* K-12 由来株の増殖を Total protein (右軸)により評価した.

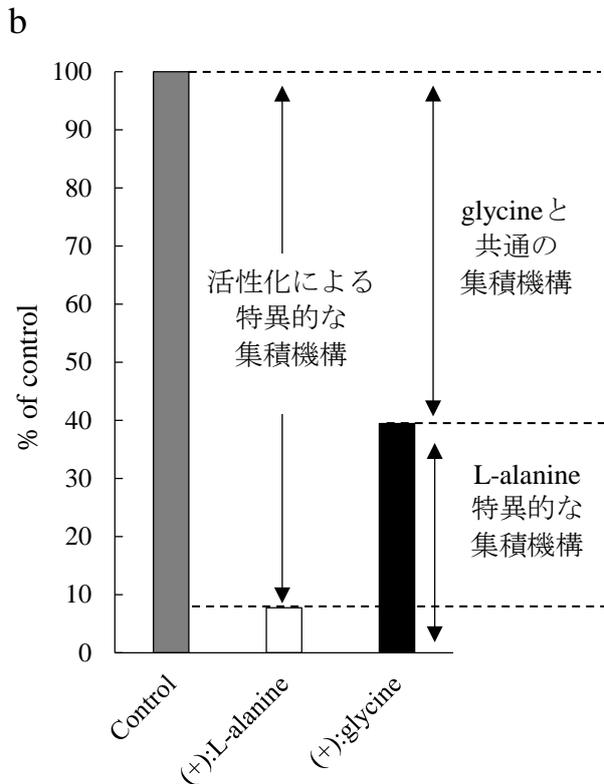
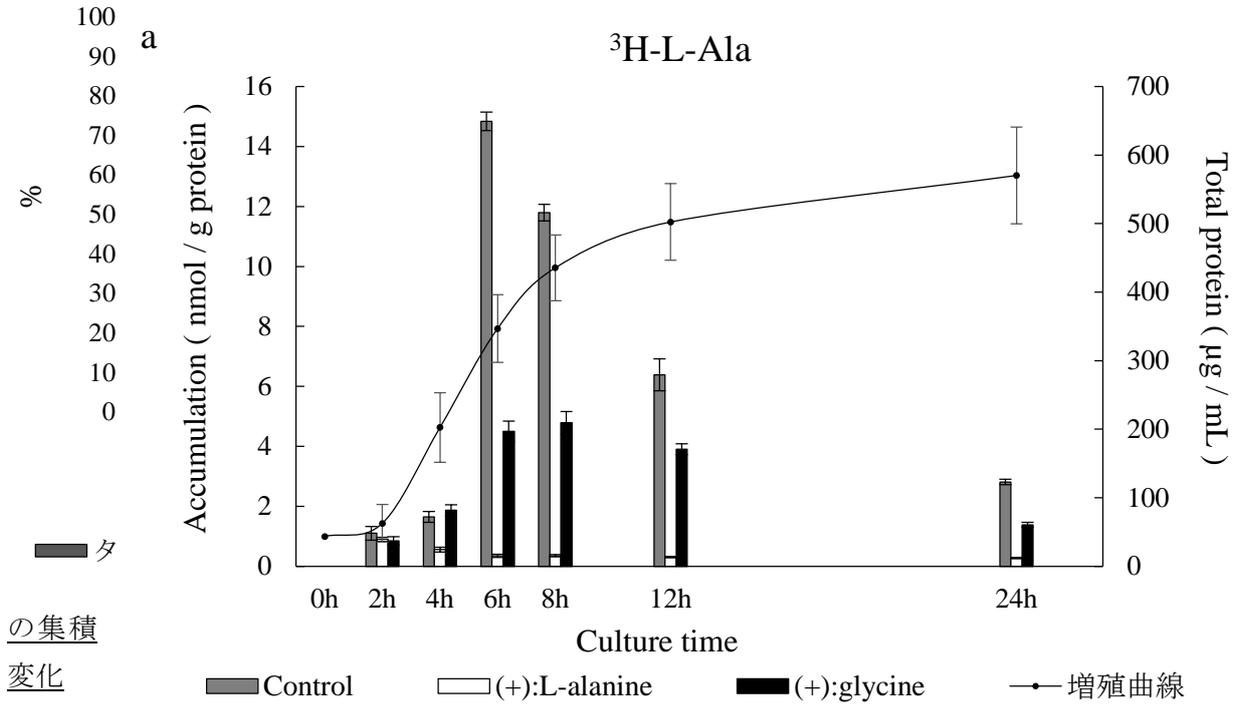
*E. coli* K-12 由来株を  $16^\circ\text{C}$  の低温で培養し, 増殖の準備段階である誘導期の状態を延長させた. 低温培養開始後 2, 4, 6, 8, 12 時間の時点における  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積量は,  $37^\circ\text{C}$  培養時に比べて低値であった (図2). また低温で 12 時間培養後, 培養温度を  $37^\circ\text{C}$  に切り替えると, *E. coli* K-12 由来株の増殖活動が活発になるに連れ  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積量が増大し ( $37^\circ\text{C}$  培養開始後 2~6 時間), 細菌の増殖が最も活発な対数増殖期 ( $37^\circ\text{C}$  培養開始後 6 時間)に最大集積を示した.

## 3. *E. coli* K-12 由来株へ集積した $^3\text{H-L-Ala}$ のタンパクへの組込み率

*E. coli* K-12 由来株の各増殖期において, 菌体内に集積した  $^3\text{H-L-Ala}$  のタンパクへの組込み率を検討した (図3). 誘導期 (培養開始後 2 時間)の細菌において  $^3\text{H-L-Ala}$  が最もタンパクへと組込まれ, 約 50%であった. また, 増殖が進むに連れ  $^3\text{H-L-Ala}$  のタンパクへの組込み率は減少し, 対数増殖期から定常期 (培養開始後 4~24 時間)においては約 10~35%と低値を示した.

図3. *E. coli* K-12 由来株に集積した  $^3\text{H-L-Ala}$  のタンパクへの組込み率

菌体内に集積した  $^3\text{H-L-Ala}$  のうち, タンパク合成系に組み込まれた  $^3\text{H-L-Ala}$  の割合をタンパク画分, タンパク質以外の代謝産物として存在する  $^3\text{H-L-Ala}$  の割合をタンパク画分以外とした. また, 菌体内に集積した  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積率を 100%とし, タンパク画分およびタンパク画分以外の割合を% (左軸), また *E. coli* K-12 由来株の増殖を Total protein (右軸)により評価した.



*E. coli* K-12 由来株の各増殖期において、L-alanine および L-alanine と似た構造を持つ glycine を集積阻害剤として負荷した場合の <sup>3</sup>H-L-Ala の集積変化を検討した (図 4-a). glycine を負荷した場合において、特に対数増殖期 (培

養開始後 6 時間)の集積が低下し, 約 70 %の低下を示した. また,  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積に関して, *E. coli* K-12由来株の活性化による特異的な集積機構の集積寄与率は, 対数増殖期以降 (培養開始後 6~24 時間)において 90 %以上と顕著に高かった. また, そのうち glycine と共通の集積機構の集積寄与率が約 50~75%を示し, glycine とは無関係の L-alanine 特異的な集積機構の集積寄与率は 20~40 %であった.

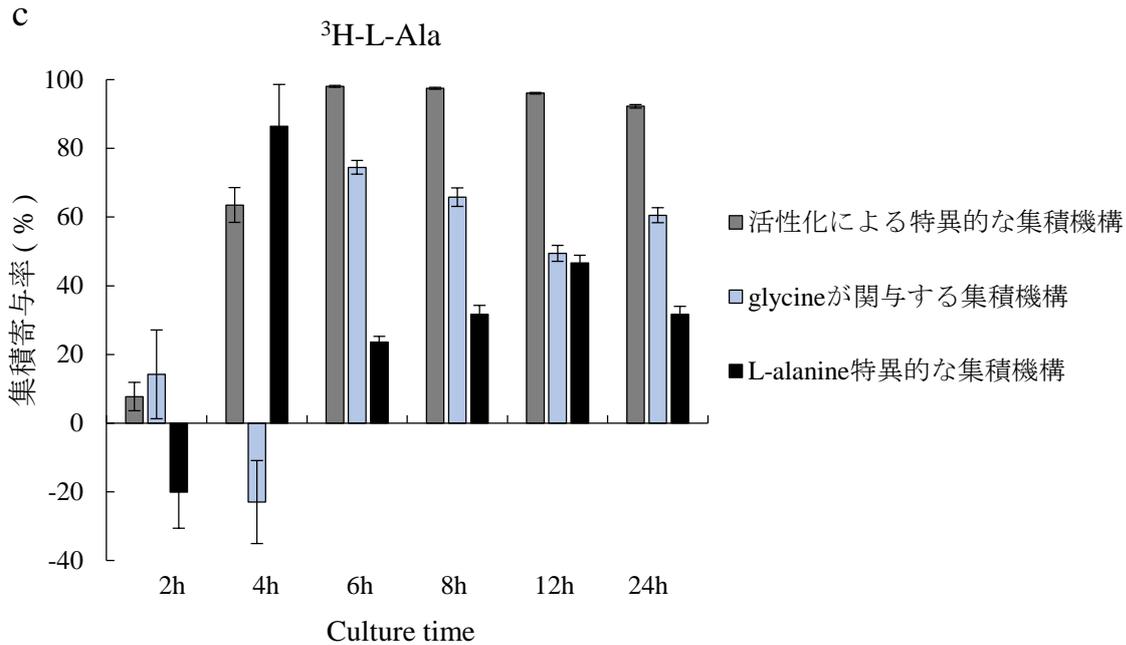


図 4. 阻害剤負荷による <sup>3</sup>H-L-Ala の集積変化 (a) と寄与率の算出 (b, c)

<sup>3</sup>H-L-Ala の集積量を Accumulation (左軸), *E. coli* K-12 由来株の増殖を Total protein (右軸) により評価した(a). また, 阻害剤非添加時 (control) の <sup>3</sup>H-L-Ala の集積に対する各阻害剤負荷時の <sup>3</sup>H-L-Ala の集積を検討した (b, c). control における <sup>3</sup>H-L-Ala の集積率を 100 % とし, 各阻害剤負荷時の <sup>3</sup>H-L-Ala の集積率を % of control (左軸) により評価した (b). さらに control の集積率から各阻害剤負荷時の集積率を差し引くことで, <sup>3</sup>H-L-Ala の集積における各集積機構の集積寄与率 (左軸) を評価した(c).

##### (5) 今後の研究の推進方策

本研究により, 天然アミノ酸の中では, 特に L-alanine が細菌の増殖活性の指標として有用であることを示した. 昨年, 核医学の分野では感染症の診断法において, D-methionine などの非天然アミノ酸を用いた画像診断薬の開発が報告されたが, 現時点では生体感染部における炎症しか検出できず, 感染症発症時における細菌の活性化や増殖を検出可能な画像診断薬は開発されていない. 本研究成果より, L-alanine を用いた画像診断薬を開発することで, 細菌の活性化および増殖を迅速に検出できる新たな診断法が期待できるのではないかと考えられた. また, alanine は細菌の細胞壁の構成成分の一つであり, かつ細菌の増殖が盛んになるにつれ菌体内に積極的に取り込まれることから, alanine の構造を利用した新たな抗菌薬を開発することで, 細菌感染症における効果的な治療が期待できる. しかし, 本研究はグラム陰性菌である *E. coli* K-12 由来株のみを用いた結果であるため, 今後は *Staphylococcus aureus* や *Streptococcus pyogenes* などのグラム陽性菌においても, 増殖活性の指標として alanine が有用であるかどうかを検討していく必要がある.

##### (6) 研究発表 (平成 28 年度、29 年度)

松榮美希, 森裕美子, 小林正和, 湯淺善恵, 長瀬賢史, 大貝和裕, 須釜敦子, 岡本成史, 川井恵一 細菌の増殖活性を反映した劇症型感染症の発症早期診断法の検索 平成 29 年度第 1 回 (通算第 7 回) 健康増進科学センターTT 実施に関する活動報告会&合同ゼミ, 2017 年 7 月

(7) その他顕著な成果

知的財産権申請；小林正和，川井恵一，岡本成史，松榮美希，森裕美子 細菌感染症の放射性診断薬  
特許出願 2018-023992，出願日 2018/2/14