

大畑 周星

(指導教員: 川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨: 細胞膜には様々なアミノ酸輸送系が発現しており、また増殖の盛んな腫瘍細胞では正常細胞と比較してアミノ酸代謝が亢進し、特定のアミノ酸輸送系が高発現している。また、基質となるアミノ酸の違いにより、アミノ酸輸送系の寄与する割合はそれぞれ異なっている。本研究室ではこれまでにアミノ酸腫瘍イメージング薬剤の開発を目指す上で、腫瘍細胞におけるアミノ酸輸送系の寄与率の評価法を提唱してきた。一方、感染症の原因となる細菌でも特定のアミノ酸が高集積を示し、その細菌増殖過程との相関が異なることが確認されており、細菌におけるアミノ酸輸送系の寄与率を明らかにすることは重要である。そこで本研究では腫瘍に適用してきた輸送系寄与率の評価法を細菌に応用し、細菌におけるアミノ酸輸送系の評価を目的とした。アミノ酸輸送系は Na^+ 依存性と Na^+ 非依存性に大別されるため、 Na^+ 存在下及び非存在下で、大腸菌 K-12 株に標識アミノ酸 [2,3- ^3H]-L-alanine (^3H -L-Ala), [S-methyl- ^3H]-L-methionine (^3H -L-Met), [^{14}C (U)]-L-tyrosine (^{14}C -L-Tyr) を投与後、細菌への集積率を評価した。その結果、いずれの標識アミノ酸も Na^+ 存在下に比べ非存在下では集積率が 42~65 % 低下し、細菌に存在するアミノ酸輸送系の Na^+ 依存性が明らかになった。 ^3H -L-Met と ^{14}C -L-Tyr は多くのヒト腫瘍細胞においては Na^+ 依存性を示さないため、細菌は腫瘍細胞とは異なるアミノ酸輸送系を有することが示された。

I. はじめに

アミノ酸は生物に必要な不可欠な栄養素であり、生物は生存や増殖のために体内にアミノ酸を摂取することで、蛋白質や他の多くの生化学反応の基質を合成している。アミノ酸輸送系とはアミノ酸を細胞内へ運ぶ役割を持った膜蛋白質群のことであり、 Na^+ が存在すると輸送活性を示す Na^+ 依存性輸送系と、 Na^+ の有無に関わらず輸送活性を示す Na^+ 非依存性輸送系の大きく 2 種類に分けられる。また、アミノ酸は側鎖の違いによって分子の性質が大きく異なり、その多様性に富むアミノ酸を輸送するために輸送系はさらに多岐に分類される (Table 1)。一方、高い増殖能をもつ細菌も、菌体の主成分である蛋白質を合成するため増殖にはアミノ酸を必要とする¹⁾。よって細菌も、必要なアミノ酸を細胞内に効率的に取込むために何らかの輸送系を有すると予想される。

本研究では細菌におけるアミノ酸輸送系寄与率の評価を目的とし、 Na^+ 存在下と Na^+ 非存在下における標識アミノ酸の細菌への集積を評価することで、細菌におけるアミノ酸輸送系の Na^+ 依存性を検討した。

Table 1 アミノ酸輸送系の分類

Na ⁺ 依存性輸送系		Na ⁺ 非依存性輸送系	
System	トランスポーター	System	トランスポーター
A	ATA1, ATA2, ATA3	PAT	PAT1, PAT2
G	PROT	L	LAT1, LAT2, LAT3, LAT4
GLY	GLYT1, GLYT2	T	TAT1
IMINO	SIT1	asc	asc1
B ^{0,+}	ATB ^{0,+}	y ⁺ L	y ⁺ LAT1, y ⁺ LAT2
B ⁰	B ⁰ AT1, B ⁰ AT2	y ⁺	CAT1, CAT2, CAT3, CAT4
ASC	ASCT1, ASCT2	b ^{0,+}	BAT1
β	TAUT	X ^c	xCT
N	SN1, SN2		
y ⁺ L	y ⁺ LAT1, y ⁺ LAT2		
X _{AG}	EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4, EAAT5		

※灰色は癌関連アミノ酸輸送系²⁾

II. 測定用培地置換後の細菌増殖活性の確認

(A) 実験方法

細菌におけるアミノ酸輸送系の Na⁺依存性を検討する上で、Na⁺は主に菌体内外の浸透圧を調節する役目を担っているため³⁾、Na⁺の有無が細菌の増殖活性へ影響を与えるかを確認した。細菌の増殖活性の評価法には生菌数の確認が可能なコロニーカウント法を選択した。大腸菌 K-12 由来株を 37 °C, 5 % CO₂ で 12 時間以上培養し、そこからアミノ酸不含有の D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 富士フィルム和光純薬) 5 mL に菌液を 200 μL 加え、160 rpm, 37 °C で振盪培養した。次に Fig. 1 に示すように大腸菌の増殖活性が変化する誘導期 (培養開始後 2 時間)、対数増殖期 (培養開始後 6 時間)、定常期 (培養開始後 12 時間) に D-MEM を Na⁺を含む PBS (Na-PBS) と、Na⁺を choline に置き換えた PBS (Ch-PBS) にそれぞれ置換した。その後、6000 G, 4 °C で 6 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去し、ペレットをほぐしたところに Na-PBS と Ch-PBS を 5 mL 加えて、遠心分離を 3 回行い、洗浄した。洗浄終了後、希釈した菌液を 100 μL 分取し、寒天培地へ播種した後、37 °C, 5 % CO₂ で 24 時間インキュベーションした。インキュベーション後、寒天培地に現れたコロニー数を計数した。

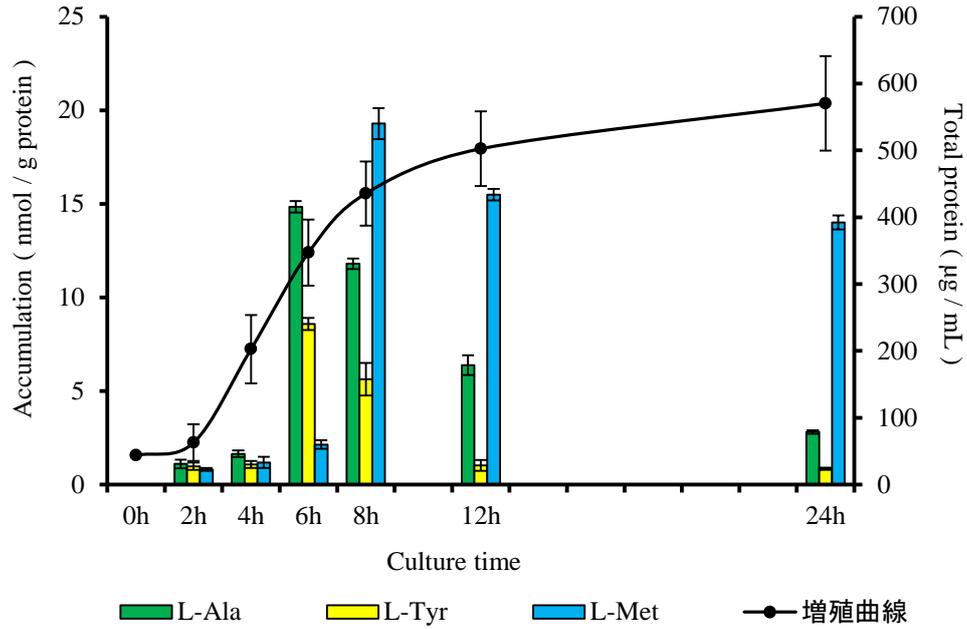


Fig. 1 培養時間による各トレーサーの集積量の変化⁴⁾

(B) 結果と考察

コロニーカウント法の結果を Fig. 2 に示す。

培養開始後 2 時間、6 時間、12 時間において、Na-PBS と Ch-PBS それぞれに置換することで生菌数に有意な差は生じなかった。このことから、測定用培地の Na⁺の有無は大腸菌の増殖活性には影響しないことが確認された。Na⁺の有無が増殖活性に影響しなかったのは、培養時間と比べて測定用培地に置換した後の時間が短かったためだと考えられた。

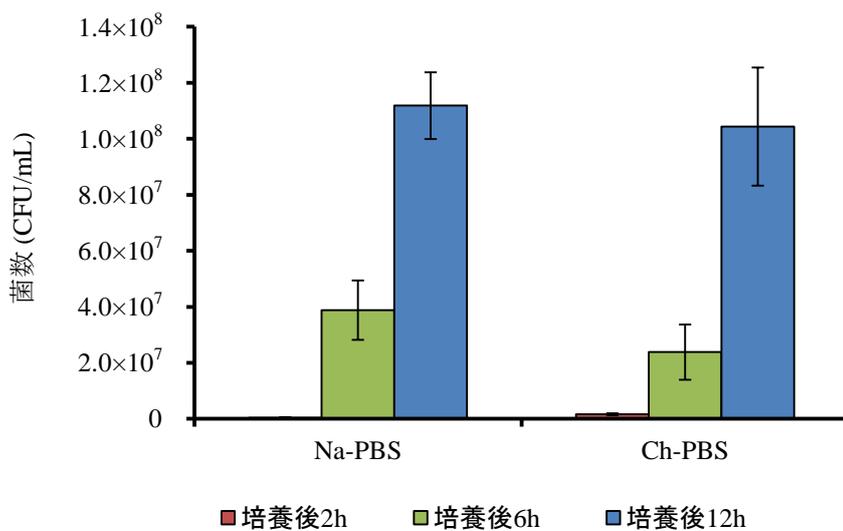


Fig. 2 生菌数の時間変化

III. 標識アミノ酸を用いた大腸菌 K-12 株への Na⁺依存性集積実験

(A) 実験方法

それぞれの測定用培地置換後も細菌の増殖活性に影響は見られなかったことから、次に標識アミノ酸を用いてアミノ酸輸送系の Na⁺依存性を検討した。標識アミノ酸には、Fig. 1 に示すように細菌の増殖活性が高い対数増殖期で集積が顕著に増加する [2,3-³H]-L-alanine (³H-L-Ala), [S-methyl-³H]-L-methionine (³H-L-Met), [¹⁴C(U)]-L-tyrosine (¹⁴C-L-Tyr)を用いて細菌への集積の確認を行った。培養培地にはアミノ酸不含有の D-MEM を、測定用培地には Na-PBS と Ch-PBS を用いた。

大腸菌を 37 °C, 5 % CO₂ で 12 時間以上培養し、そこからアミノ酸不含有の D-MEM 5 mL に菌液を 200 μL 加え、160 rpm, 37 °C で振盪培養した。D-MEM を Na-PBS と Ch-PBS にそれぞれ置換した後、標識アミノ酸を 37 kBq 投与し、37 °C の温浴中で穏やかに振盪しながら、5 分間取込ませた。標識アミノ酸を投与する培養時間は Fig. 1 より、各トレーサーの大腸菌への集積が最大となる時間とし、³H-L-Ala と ¹⁴C-L-Tyr は培養開始後 6 時間、³H-L-Met は培養開始後 8 時間を選択した。その後、6000 G, 4 °C で 6 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去し、ペレットをほぐしたところに Na-PBS と Ch-PBS を 5 mL 加えて、遠心分離を 3 回洗い洗浄した。洗浄終了後、上清を除去し、ペレットをほぐし 0.1 M NaOH を 1 mL 加えて大腸菌を溶解し、大腸菌に集積した放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。蛋白組込み率の測定は、0.1 M NaOH を 1 mL 加えた後、500 mL 分取して大腸菌に集積した放射能を測定するとともに、残った菌液から 190 μL を分取し、最終濃度 5 % となるように氷冷 100 % トリクロロ酢酸 (Nacalai tesque) を 10 μL 加えて析出した沈降物の全量をグラスフィルター (GC-50, Advantec) に捕集した。空チューブに氷冷 5 % トリクロロ酢酸となるように PBS で調整したものを 1 mL 加えて、その溶液も全量フィルターに加え 3 回洗浄した。フィルターを乾燥させ蛋白を固定し、蛋白に組込まれた放射能を測定した。

(B) 結果と考察

標識アミノ酸の大腸菌 K-12 由来株への集積率を Fig. 3 に示す。各標識アミノ酸の Na⁺存在下での集積率と Na⁺非存在下での集積率の差を、Na⁺依存性輸送系の寄与率として評価した。

3 種類全ての標識アミノ酸で、Na⁺存在下に比べ Na⁺非存在下における集積が有意に低下した。またその Na⁺依存性輸送系の寄与率は、³H-L-Ala では 56 %, ³H-L-Met では 42 %, ¹⁴C-L-Tyr では 65 % となった。集積量に対する蛋白組込み率においては、全ての標識アミノ酸で Na⁺存在下と Na⁺非存在下の間で有意な差は見られなかった。

また、ヒト腫瘍細胞と大腸菌 K-12 由来株への各標識アミノ酸の集積におけるアミノ酸輸送系の Na⁺依存性の寄与率を table 2 に示す。L-Ala においては、ヒト前立腺癌細胞 DU145 や脳腫瘍細胞 T98G ではそれぞれ 79 %, 76 % の Na⁺依存性輸送系の寄与率が見られるのに対し、大腸菌 K-12 株では 56 % と寄与率が低下した。一方、L-Met においては、腫瘍細胞ではそれぞれ Na⁺依存性の寄与率が 5 %, 0 % とほとんどないのに比べ、大腸菌 K-12 株では 42 % と寄与率が高くなった。L-Tyr も同様に、腫瘍細胞ではそれぞれ 19 %, 22 % の寄与率であるのに対し大腸菌 K-12 由来株では 65 % となり、同一のアミノ酸を基質としてもその輸送系の Na⁺依存性には腫瘍細胞と細菌で違いがあることが明らかとなった。

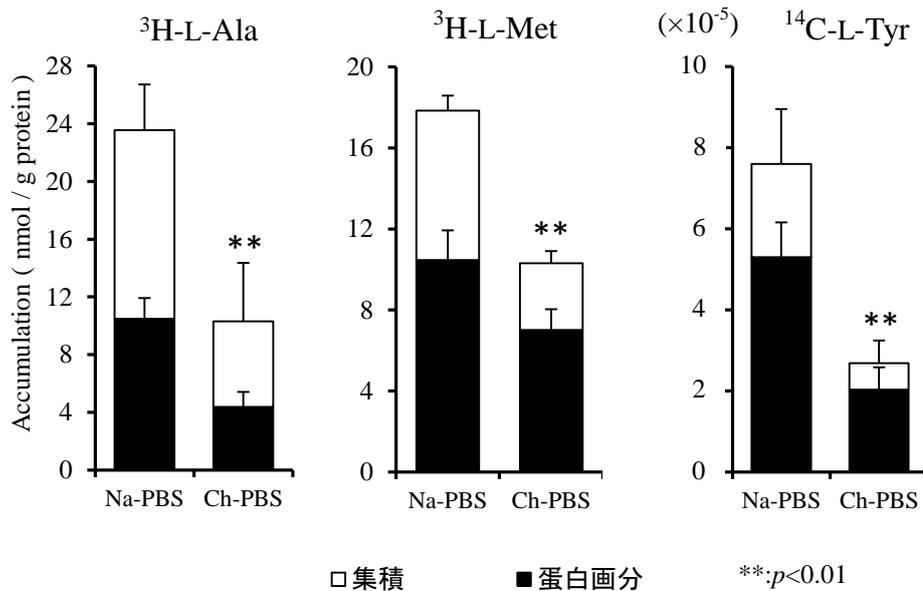


Fig. 3 大腸菌 K-12 株における標識アミノ酸の集積率

Table 2 腫瘍細胞と細菌の Na^+ 依存性輸送系の寄与率

		L-Ala	L-Met	L-Tyr
腫瘍細胞	前立腺癌細胞 DU145	79 %	5 %	19 %
	脳腫瘍細胞 T98G	76 %	0 %	22 %
細菌	大腸菌 K-12 由来株	56 %	42 %	65 %

IV. 結語

細菌にはヒト腫瘍細胞と同じく Na^+ 依存性のアミノ酸輸送系が存在することが明らかとなった。しかし基質となるアミノ酸によって、集積に關与する Na^+ 依存性輸送系の寄与率が腫瘍細胞と細菌で異なることから、細菌は腫瘍細胞とは異なるアミノ酸輸送系を有することが示された。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井恵一教授、小林正和助教、水谷明日香助教ご協力いただきました病態検査学講座 松榮美希さん、湯浅善恵さんをはじめ岡本研究室と本研究室の方々により御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) Burkovski A, Krämer R: Bacterial amino acid transport proteins: Occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58: 265-274, 2002.
- 2) Nakanishi T, Tamai I: Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy. *J. Pharm. Sci.*, 100: 3731-3750, 2012.
- 3) 駒大輔, 山中勇人, 森芳邦彦, 大本貴士: 培地の成分知っていますか. *生物工程基礎講座*: pp199, 2011.
- 4) 松榮美希: アミノ酸の取込みを利用した細菌の増殖形態の検討: 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻修士論文: pp7, 2018.