

# 1903 細菌における標識アミノ酸の集積に寄与する アミノ酸輸送系の輸送特性評価

石黒 敦也

(指導教員：川井 恵一 教授，水谷 明日香 助教)

要旨：本研究室ではこれまでにヒト腫瘍細胞におけるアミノ酸腫瘍イメージング薬剤の開発を目指し、腫瘍細胞におけるアミノ酸輸送系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にも細胞と同様に特定のアミノ酸が高集積を示すため、細菌におけるアミノ酸輸送系の輸送特性を評価することは、アミノ酸病原菌イメージング薬剤を開発する上で重要である。本研究では安全性の高い大腸菌 K-12 株をモデル細菌として用い、L-methionine (L-Met), L-alanine (L-Ala) およびヒト細胞への集積が低い光学異性体 D-Met, D-Ala の各  $^3\text{H}$  標識体の細菌への集積を比較した。また、 $\text{Na}^+$  存在下または非存在下において上記 4 種のアミノ酸およびヒトのアミノ酸輸送系の特異的阻害剤である BCH, MeAIB の各標識アミノ酸集積に対する阻害率を評価した。その結果、大腸菌 K-12 株の  $^3\text{H}$  標識アミノ酸集積に対して、BCH, MeAIB による阻害効果が見られなかったことから、細菌はヒト腫瘍細胞とは異なるアミノ酸輸送系を有することが明らかとなった。また、Met では  $\text{Na}^+$  非依存性の L 体選択的輸送系による寄与が大きく L 体を優位に取り込んだ。一方、Ala では  $\text{Na}^+$  依存性の L 体選択的輸送系が存在するもののその寄与は小さく、D 体も L 体と同程度の集積を示した。同様に他の病原菌においても  $\text{Na}^+$  依存性や光学異性体選択性などの輸送特性を明らかにすることで、アミノ酸病原菌イメージング薬剤の設計戦略に有用な情報を与えるとともに、細菌の鑑別診断に繋がる可能性が示された。

## I. はじめに

アミノ酸は、蛋白質の生合成原料として生物にとって必要不可欠な栄養素であり、様々なアミノ酸輸送系により細胞内へ摂取されている。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、本研究室ではこれまでにヒト腫瘍細胞を標的としたアミノ酸腫瘍イメージング薬剤の開発を目指し、腫瘍細胞におけるアミノ酸輸送系寄与率の評価法を提唱してきた。ヒトにおけるアミノ酸輸送系は  $\text{Na}^+$  が存在することで輸送活性を示す  $\text{Na}^+$  依存性輸送系と、 $\text{Na}^+$  の有無に関わらず輸送活性を示す  $\text{Na}^+$  非依存性輸送系の大きく 2 種類に分けられる。一方、感染症の原因となる細菌にも増殖の過程で特定のアミノ酸が高集積を示すことを確認した。特に細菌の増殖活動が最も盛んになる対数増殖期において、特定のアミノ酸の集積が最大となったり。このことから、細菌にもアミノ酸輸送系が存在すると考えられ、その輸送特性を明らかにすることはアミノ酸病原菌イメージング薬剤の開発を目指す上で重要である。

そこで本研究では安全性の高い大腸菌 K-12 株をモデル細菌として用い、 $\text{Na}^+$  依存性や光学異性体による阻害効果等から細菌におけるアミノ酸輸送特性を明らかにすることを目的とした。

## II. 標識アミノ酸を用いた大腸菌 K-12 株への集積阻害実験

### (A) 実験方法

病原性がなく安全性の高い大腸菌 K-12 株をモデル細菌として用いて、標識アミノ酸 [S-methyl-<sup>3</sup>H]-L-methionine (<sup>3</sup>H-L-Met), [2,3-<sup>3</sup>H]-L-alanine (<sup>3</sup>H-L-Ala) および、光学異性体でありヒト細胞への集積が低い [S-methyl-<sup>3</sup>H]-D-methionine (<sup>3</sup>H-D-Met), [2,3-<sup>3</sup>H]-D-alanine (<sup>3</sup>H-D-Ala) の集積について、Na<sup>+</sup>依存性を検討した。測定用培地には Na<sup>+</sup>を含んだ Na<sup>+</sup>-PBS と Na<sup>+</sup>を choline に置き換えた Ch-PBS を用いた。阻害剤として Met, Ala それぞれの光学異性体 (L-Met, D-Met, L-Ala, D-Ala) およびヒト腫瘍細胞において Met を主に取り込む輸送系 (system L) に対する特異的阻害剤である 2-amino-2-norbornanecarboxylic acid (BCH), Ala を主に取り込む輸送系 (system A) に対する特異的阻害剤である  $\alpha$ -(methylamino)isobutyric acid (MeAIB) を用いて集積阻害実験を行った。

大腸菌を 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> で 14 時間以上培養し、アミノ酸不含有の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) 20 mL へ菌液を 800  $\mu$ L 加え、160 rpm, 37 °C で最も増殖活動が盛んになる 6 時間まで振盪培養した。培養培地 D-MEM を測定培地である Na<sup>+</sup>-PBS と Ch-PBS にそれぞれ置換した後、標識アミノ酸 7.4 kBq と最終濃度が 1 mM となるように調製した各阻害剤を投与し、37 °C の温浴中で穏やかに振盪しながら、5 分間取り込ませた。7000 G, 4 °C で 6 分間遠心分離した後、上清を除去し、ペレットをほぐしたところに Na<sup>+</sup>-PBS と Ch-PBS を 1 mL 加えて、遠心分離を 2 回繰り返し洗浄した。洗浄終了後、上清を除去してペレットをほぐし、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 (LSC-5100, Aloka medical) で測定した。

各サンプル中の菌量のばらつきを補正するために BCA protein assay kit (Thermo fisher scientific) を用いて蛋白定量を行った。Kit に付属している bovine serum albumin (BSA, Thermo fisher scientific) 100  $\mu$ L に 0.1 M NaOH 100  $\mu$ L を加えて 1 mg/mL に調整し、table. 1 の分量で希釈したものと残ったサンプル中の大腸菌溶解液を 96 well マルチウェルプレート (Corning) に 1 well あたり 20  $\mu$ L ずつ加えた。さらに BCA protein assay reagent A (Thermo fisher scientific) と BCA protein assay reagent B (Thermo fisher scientific) を 50 : 1 で調整したものを 1 well あたり 200  $\mu$ L ずつ投与し、37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> の環境下で 30 分間インキュベーションした。室温で 10 分間静置した後、Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo fisher scientific) で吸光度を測定し、SkanIt™ software (ver. 2.5.1, Thermo fisher scientific) で解析して蛋白量を算出した。得られた蛋白量を用いて各サンプルの放射能を蛋白 1 g あたりの集積量に補正した単位細菌数あたりの集積量 [nmol/g protein] を算出するとともに、各条件での標識アミノ酸の集積を、阻害剤を負荷していない Na<sup>+</sup>-PBS 中での集積 (Na<sup>+</sup>-control) を 100%とした相対値 (% of control/Na<sup>+</sup> [%]) で表した。

Table.1 BSA の希釈

| Concentration of BSA<br>[ $\mu$ g/mL] | 500 | 250 | 100 | 50  | 25  | 0   |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 mg/mL BSA [ $\mu$ L]                | 50  | 25  | 10  | 10  | 5   | 0   |
| 0.1 M NaOH [ $\mu$ L]                 | 50  | 75  | 90  | 190 | 195 | 100 |

(B) 結果と考察

1. 細菌とヒト腫瘍細胞における標識アミノ酸の集積阻害効果の比較

阻害剤を加えていない control および阻害剤 BCH または MeAIB を負荷した阻害条件において、細菌への  $^3\text{H-L-Met}$ ,  $^3\text{H-L-Ala}$  の集積を、ヒト腫瘍細胞であるヒト前立腺がん細胞 DU145 およびヒト多形性膠芽腫細胞 T98G への集積<sup>2)</sup>と比較した (Fig. 1).  $\text{Na}^+$ -PBS と Ch-PBS 中の Control を比較すると、2 種類の天然アミノ酸  $^3\text{H-L-Met}$  および  $^3\text{H-L-Ala}$  で異なる集積機序が確認された.  $^3\text{H-L-Met}$  においては細菌では  $\text{Na}^+$ 依存性が見られず、腫瘍細胞と同じ特性を示した. 一方、 $^3\text{H-L-Ala}$  においては細菌では 13% の  $\text{Na}^+$ 依存性が確認されたが、腫瘍細胞での 75% 以上の  $\text{Na}^+$ 依存性と比べるとその割合はわずかであった. さらに、集積阻害効果を比較すると、細菌では腫瘍細胞で見られる BCH, MeAIB による顕著な阻害効果が認められなかったことから、細菌はヒト腫瘍細胞とは異なるアミノ酸輸送系を有することが明らかとなった.

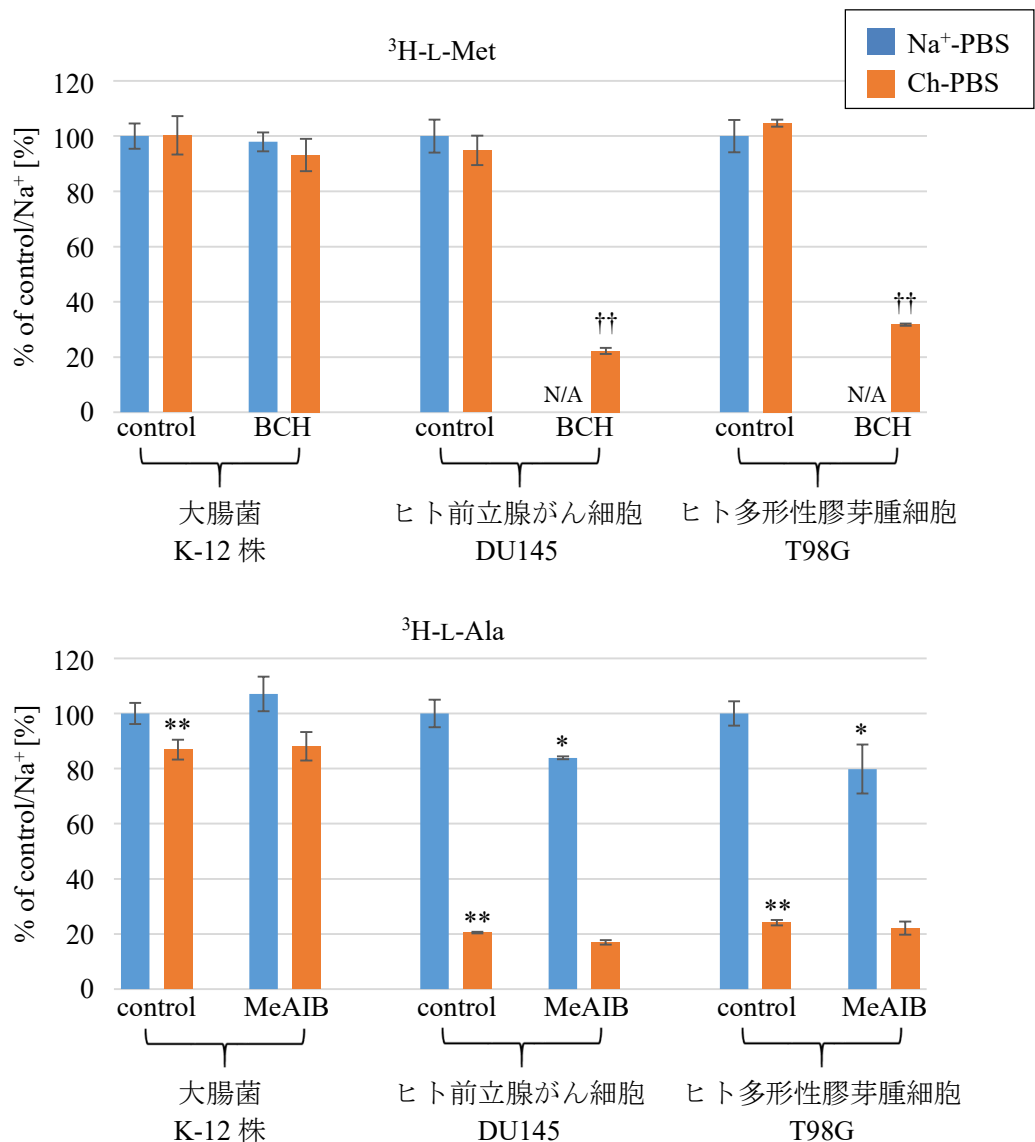


Fig. 1 大腸菌 K-12 株とヒト腫瘍細胞における標識アミノ酸の集積阻害効果の比較

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. control/ $\text{Na}^+$

††  $p < 0.01$  vs. control/Ch

N/A : 未検討

## 2. 大腸菌 K-12 株におけるアミノ酸輸送特性評価

$^3\text{H}$  標識 Met, Ala について、それぞれの光学異性体 (L-Met, D-Met, L-Ala, D-Ala) による阻害効果の結果を Fig. 2 に示す。また、Fig. 2 から算出した各  $\text{Na}^+$  依存性と阻害率を table 2 に示した。Met について見ると、 $^3\text{H-L-Met}$  では  $\text{Na}^+$  依存性は認められなかった。また、 $^3\text{H-D-Met}$  では 14% の  $\text{Na}^+$  依存性が見られたが、有意な差ではなかった。よって Met を運ぶ大部分の輸送系は  $\text{Na}^+$  非依存性であることが確認された。次に各阻害率を比較すると、 $\text{Na}^+$  が存在する  $\text{Na}^+$ -PBS 中では  $^3\text{H-D-Met}$  に対する阻害剤 L-Met において 99% の阻害が見られ、D 体を運ぶ輸送系はすべて、L 体も運んでいることが推測された。一方、阻害剤 D-Met を負荷した  $^3\text{H-L-Met}$  では 50% の阻害が見られ、L 体を運ぶ輸送系は一部、D 体も運んでいることが確認された。これらから、Met を運ぶ輸送系には、D 体は取り込まず L 体のみを選択的に取り込むような“L 体選択的輸送系”が存在することが明らかとなった。また、 $\text{Na}^+$  が存在しない Ch-PBS においても同じ傾向が見られたため、Met を運ぶ L 体選択的輸送系は  $\text{Na}^+$  非依存性であることが確認された。

Ala においても同様に考察すると、 $\text{Na}^+$ -PBS において  $^3\text{H-D-Ala}$  に対する阻害剤 L-Ala では 97% の阻害が見られ、D 体を運ぶ輸送系はすべて L 体も運んでいると推測された。一方、阻害剤 D-Ala を負荷した  $^3\text{H-L-Ala}$  では 87% の阻害が見られ、L 体を運ぶ輸送系の大部分が D 体も運んでいることが確認された。また、Ch-PBS の結果を  $\text{Na}^+$ -PBS での結果と比較すると、阻害剤 D-Ala を負荷した  $^3\text{H-L-Ala}$  では阻害率に差が見られないが、阻害剤 L-Ala を負荷した  $^3\text{H-D-Ala}$  では阻害率が 20% 低下した。これらから、Ala を運ぶ輸送系には  $\text{Na}^+$  依存性の L 体選択的輸送系が存在することが確認されたものの、Met とは異なりその寄与は小さく、大部分が光学異性体を区別せずに L 体と D 体の両方を取り込むことが明らかとなった。

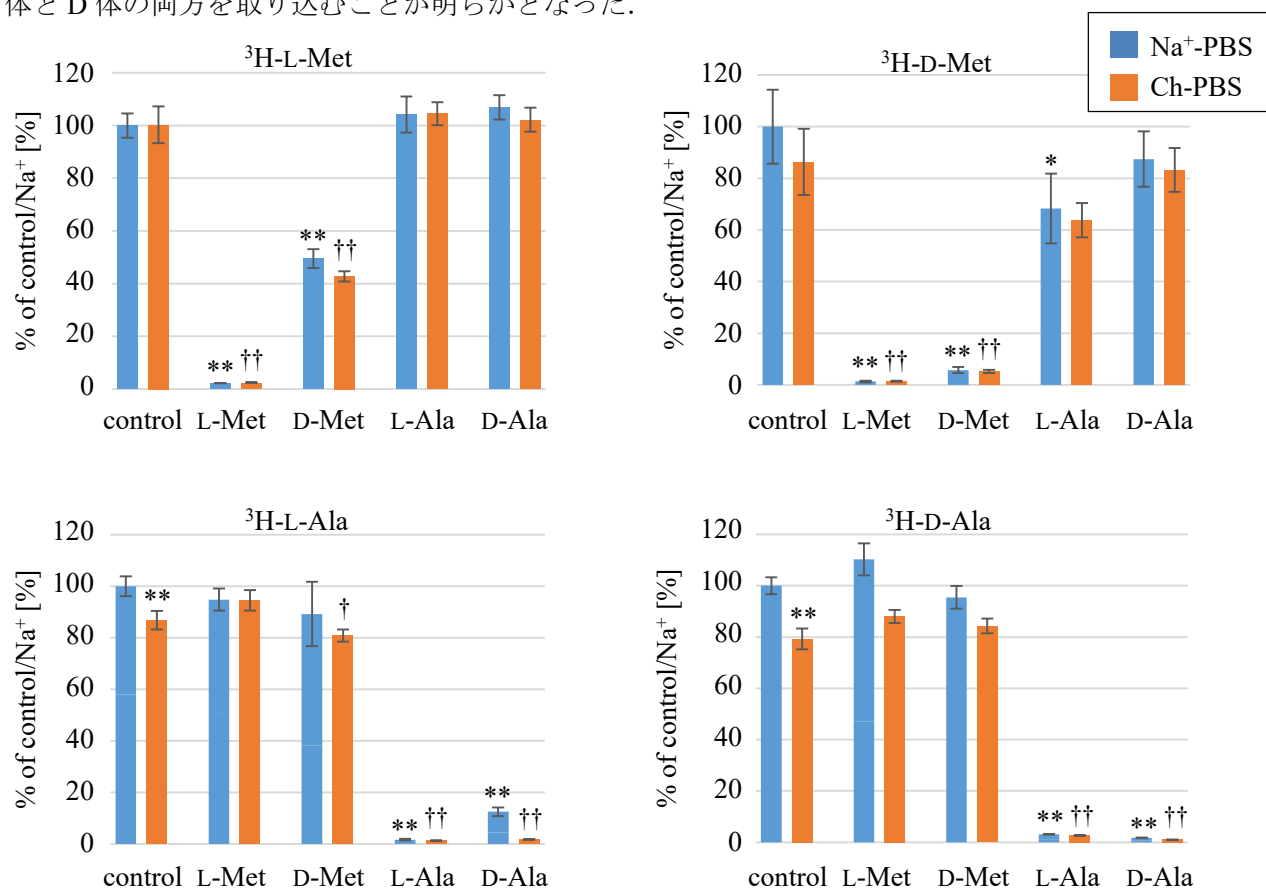


Fig. 2 大腸菌 K-12 株における各アミノ酸による標識アミノ酸の集積阻害効果

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control/ $\text{Na}^+$ , † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  vs. control/Ch

Table 2 各標識アミノ酸を取り込む輸送系の Na<sup>+</sup>依存性と各アミノ酸による阻害率 [%]

| 標識アミノ酸               | Na <sup>+</sup> 依存性 | Na <sup>+</sup> -PBS |    |     |    | Ch-PBS |    |     |    |
|----------------------|---------------------|----------------------|----|-----|----|--------|----|-----|----|
|                      |                     | Met                  |    | Ala |    | Met    |    | Ala |    |
|                      |                     | L                    | D  | L   | D  | L      | D  | L   | D  |
| <sup>3</sup> H-L-Met | 0                   | 98                   | 50 | 0   | 0  | 98     | 58 | 0   | 0  |
| <sup>3</sup> H-D-Met | 14                  | 99                   | 94 | 32  | 13 | 99     | 95 | 36  | 17 |
| <sup>3</sup> H-L-Ala | 13                  | 5                    | 11 | 98  | 87 | 0      | 6  | 86  | 85 |
| <sup>3</sup> H-D-Ala | 20                  | 0                    | 4  | 97  | 98 | 0      | 0  | 77  | 78 |

さらに、<sup>3</sup>H-L-Met、<sup>3</sup>H-D-Ala においては Met に対する Met、Ala に対する Ala のみ阻害効果が認められたが、<sup>3</sup>H-D-Met、<sup>3</sup>H-L-Ala における集積阻害効果はそれらとは異なる傾向を示した。<sup>3</sup>H-D-Met では Na<sup>+</sup>-PBS において阻害剤 L-Ala により 32 %の阻害が見られ、Ch-PBS においても同じ傾向が見られるため、D-Met を運ぶ輸送系はごく一部、Na<sup>+</sup>非依存的に L-Ala も運んでいることが確認された。一方、<sup>3</sup>H-L-Ala でも Na<sup>+</sup>-PBS において阻害剤 D-Met により、有意差は認められないが 11 %の阻害が見られ、Ch-PBS においても同じ傾向が見られたことから、D-Met と L-Ala はごく一部が Na<sup>+</sup>非依存的に同じ輸送系により運ばれていると考えることができる。

### 3. 大腸菌 K-12 株における各アミノ酸集積量の比較

大腸菌 K-12 株における各標識アミノ酸の集積量について、蛋白補正した絶対量を Fig. 3 に示す。Met では Na<sup>+</sup>依存性がなく、L 体を D 体より 80 %多く取り込んだ。また、Ala では 10-20 %程度の Na<sup>+</sup>依存性があり、L 体を D 体より 16 %多く取り込んだ。この集積差には前述した L 体選択的輸送系が影響しており、Met では L 体選択的輸送系による寄与が大きく、L 体を優位に取り込むが、Ala では L 体選択的輸送系による寄与が小さいため、D 体も L 体と同程度取り込まれたと考えられた。ヒトにおけるアミノ酸輸送系では L 体選択性が大きく、Met では細菌においてもヒトと同じ特徴を示したのに対し、Ala では細菌特有の性質を示した。

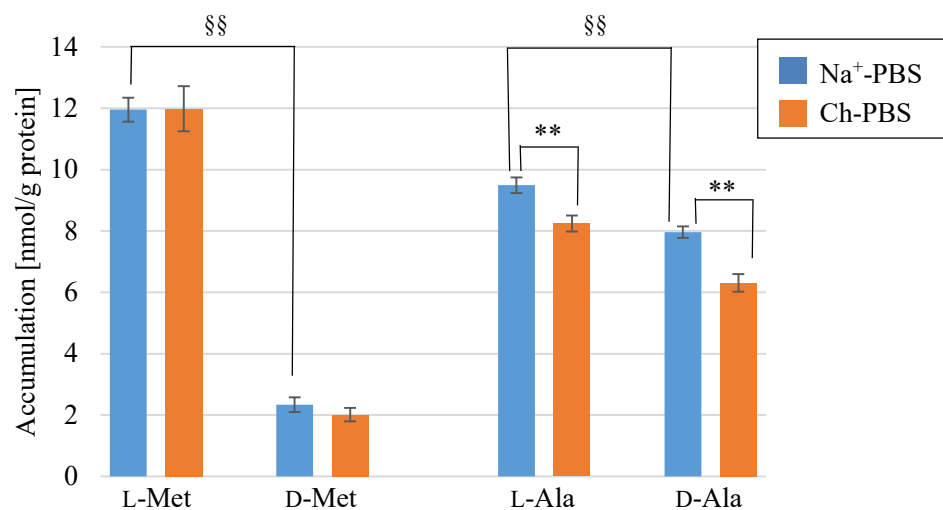


Fig. 3 大腸菌 K-12 株における各標識アミノ酸集積量の比較

\*\* $p < 0.01$  vs. control/Na<sup>+</sup>

§§ $p < 0.01$  vs. L-Met control/Na<sup>+</sup>, L-Ala control/Na<sup>+</sup>

### III. 結語

大腸菌 K-12 株において、ヒト腫瘍細胞とは異なるアミノ酸輸送系を有することを確認した。その輸送特性を評価した結果、Met では Na<sup>+</sup>非依存性の L 体選択的輸送系により L 体を優位に取り込むのに対し、Ala では Na<sup>+</sup>依存性の L 体選択的輸送系がわずかに存在するものの D 体も L 体と同程度取り込むということが確認され、アミノ酸の種類により異なる輸送特性を有していた。同様に他の病原菌でも輸送特性を評価することで、アミノ酸病原菌イメージング薬剤の設計戦略に有用な情報を与えるとともに、細菌の鑑別診断に繋がる可能性が示された。

### IV. 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，小林正和准教授，水谷明日香助教，川井研究室，検査技術科学専攻岡本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

### V. 参考文献

- 1) 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. 2018.
- 2) 坂下真俊. 標識アミノ酸のヒト由来腫瘍細胞集積に寄与するアミノ酸輸送系の細分化評価法の確立. 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. 2014.