

# 2002 チロシンを標識母体化合物とした 細菌感染症イメージング薬剤の有用性の検討

會澤 梨沙子

(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、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輸送系寄与率評価法を提唱してきた。一方、感染症の病原菌においては増殖のためにアミノ酸を利用するため、特定のアミノ酸が高集積を示すことを確認している。しかし、その集積機序は不明な点が多く、細菌におけるアミノ酸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うえで重要である。本研究では、大腸菌標準株であり病原性をもたない K-12 株、臨床分離株であり病原性を有する大腸菌 EC-14 株をモデル細菌として用いて、放射性ヨウ素標識チロシン誘導体である 3-[<sup>125</sup>I]iodo-L-tyrosine (<sup>125</sup>I-L-MIT), 3-[<sup>125</sup>I]iodo-D-tyrosine (<sup>125</sup>I-D-MIT), 3-[<sup>125</sup>I]iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine (<sup>125</sup>I-L-AMT) の細菌集積を比較した。その結果、K-12 株、EC-14 株ともに <sup>125</sup>I-D-MIT のみ顕著な集積が確認された。また輸送特性を調べるため、非放射性的の L-Tyr, D-Tyr, L-MIT, D-MIT を競合阻害剤として、<sup>125</sup>I-D-MIT および、[ring-3, 5-<sup>3</sup>H]-L-tyrosine (<sup>3</sup>H-L-Tyr) の細菌集積に対する阻害効果を評価した。その結果、<sup>125</sup>I-D-MIT は D 体阻害剤負荷で完全に阻害されたのに対し、<sup>3</sup>H-L-Tyr は L 体阻害剤でほぼ完全に阻害されたため、<sup>125</sup>I-D-MIT と <sup>3</sup>H-L-Tyr にはそれぞれ異なる特異的輸送系が関与していることが示された。以上のことから、ヒト細胞では利用されず細菌特異的に集積する放射性ヨウ素標識 D-MIT の感染症イメージング薬剤への有用性が見出された。

## 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も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。一方、感染症の原因となる細菌においても増殖のためにアミノ酸を利用するため、増殖の過程で methionine や alanine などの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うえで重要である。

そこで本研究では、大腸菌標準株であり病原性をもたない K-12 株と臨床分離株であり病原性を有する大腸菌 EC-14 株をモデル細菌として用い、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、EC-14 株への集積の検討

### (A) 実験方法

大腸菌 K-12 株、EC-14 株をモデル細菌として用いた。放射性ヨウ素標識チロシン誘導体である 3-[<sup>125</sup>I]iodo-L-tyrosine (<sup>125</sup>I-L-MIT), 3-[<sup>125</sup>I]iodo-D-tyrosine (<sup>125</sup>I-D-MIT), 3-[<sup>125</sup>I]iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine (<sup>125</sup>I-L-AMT)の標識は Kawai らの方法に従い<sup>2,3)</sup>、放射化学的純度 95%以上の無担体状態で得たものを使用して、細菌集積を比較した。

前培養の培地として、Todd's hewitt broth (Becton, Dickinson and company) に、0.2% yeast extract (Becton, Dickinson and company) を添加した THY 培地を用いた。前培養条件は、K-12 株は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 14 時間以上とした。EC-14 株は THY 培地を用いて 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で 9 時間培養した後、その培養液の一部を THY 培地に再懸濁し、さらに 14 時間以上前培養した。前培養後の本培養として、アミノ酸不含の Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) 20 mL へ K-12 株においては菌液を 800  $\mu$ L, EC-14 株においては菌液を 400  $\mu$ L 加え、160 rpm, 37 °C で振盪培養した。培養時間は増殖開始早期となる誘導期として K-12 株では 2 時間、EC-14 株では 1 時間、菌体内の酵素活性が活発となり細菌が盛んに増殖する対数増殖期として K-12 株では 6 時間、EC-14 株では 3 時間、栄養分の欠乏や有害代謝産物の蓄積により細菌の増殖速度が低下し死滅と増殖の割合が同程度となる定常期として K-12 株では 12 時間、EC-14 株では 6 時間と判断した (Fig. 1)。各培養時間経過後に、標識アミノ酸を 7.4 kBq 投与し、37 °Cの温浴中で穏やかに振盪しながら 5 分間取り込ませた。その後、7000 G, 4 °Cで 10 分間遠心分離して上清を除去、ペレットをほぐしたところに phosphate buffered saline (PBS; pH 7.3) を 1.0 mL 加えて、遠心分離を行い洗浄した。洗浄終了後、上清を除去してほぐしたペレットに 0.1 M NaOH を 1.0 mL 加えて大腸菌を溶解し、大腸菌に集積した放射能をオートウェル $\gamma$ カウンタ (AccuFLEX  $\gamma$ 7000, Aloka medical) で測定し、得られた放射能 [cpm] から式 (A) を用いて集積率 [%ID] を算出した。

$$\text{集積率 } [\%ID] = \frac{\text{サンプルから得られた counts [cpm]}}{\text{投与した放射能の counts [cpm]}} \times 100 \dots (A)$$

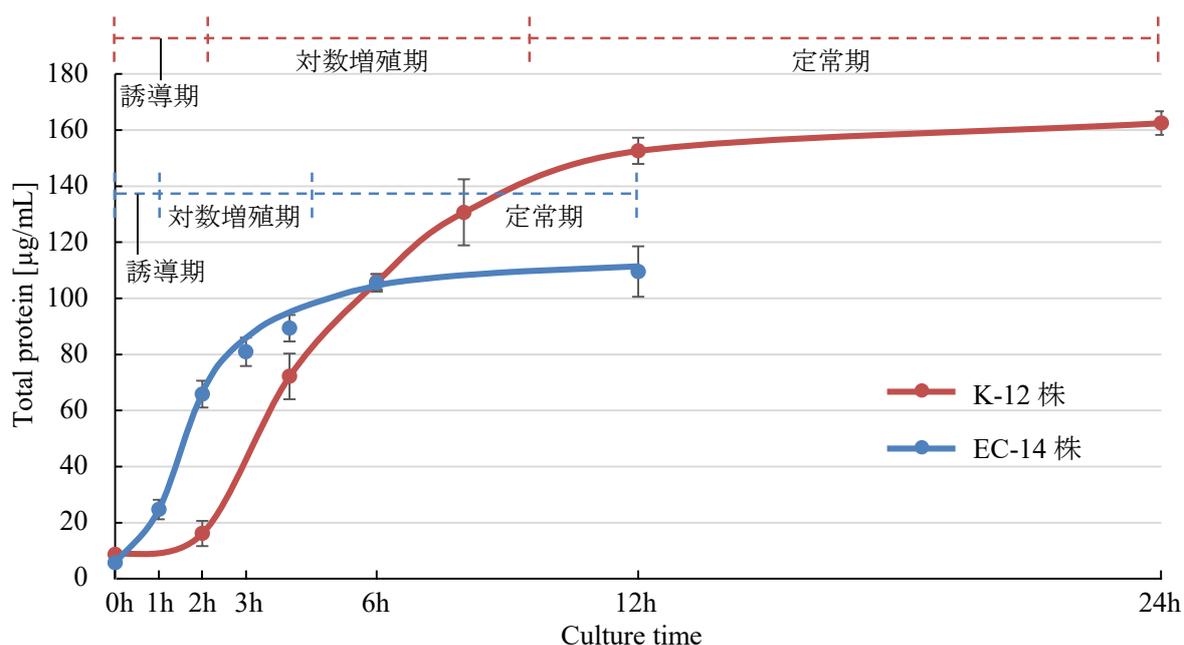


Fig. 1 大腸菌 K-12 株、EC-14 株の増殖曲線

## (B) 結果と考察

### 1. 大腸菌 K-12 株、EC-14 株における標識アミノ酸の細菌集積の比較

大腸菌 K-12 株、EC-14 株における、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-L-AMT}$  の集積を比較した (Fig. 2)。 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-L-AMT}$  の集積に対し、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  の顕著な集積が確認された。比較対象としてラット膵臓組織切片への取り込み実験の結果では、取り込み時間 5 分において、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  は  $^{125}\text{I-L-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-L-AMT}$  ほどの集積は示さない<sup>2)</sup> ため (Fig. 3),  $^{125}\text{I-D-MIT}$  の集積は、細胞とは異なり細菌特異的であると考えられた。また、K-12 株と比べ EC-14 株の方が高集積となった。

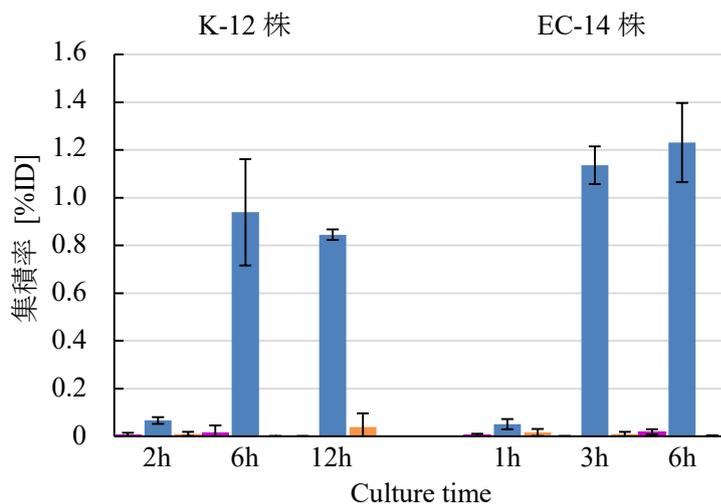


Fig. 2 大腸菌 K-12 株、EC-14 株における標識アミノ酸の集積

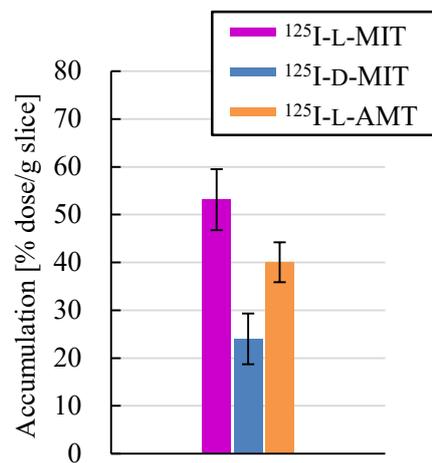


Fig. 3 ラット膵臓組織切片への標識アミノ酸の集積<sup>2)</sup>

## III. 標識アミノ酸を用いた大腸菌 K-12 株、EC-14 株への集積阻害実験

### (A) 実験方法

標識アミノ酸の集積比較の結果、細菌特異的な集積のあった  $^{125}\text{I-D-MIT}$  と、天然の L-tyrosine (L-Tyr) の標識体である  $^3\text{H}$  標識天然アミノ酸の [ring-3, 5- $^3\text{H}$ ]-L-tyrosine ( $^3\text{H-L-Tyr}$ ) をトレーサーとして使用し、阻害剤として非放射性的の L-Tyr, D-Tyr, L-MIT, D-MIT を用いて、集積阻害実験を行った。

II (A)と同様の方法で細菌培養を行った後、各トレーサーを 7.4 kBq と最終濃度が 1.0 mM となるよう調整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。その後、7000 G、4 °Cで 10 分間遠心分離し、上清を除去、ペレットをほぐしたところに phosphate buffered saline (PBS; pH 7.3) を 1.0 mL 加えて、遠心分離を行い洗浄した。洗浄終了後、上清を除去し、ほぐしたペレットに 0.1 M NaOH を 1.0 mL 加えて大腸菌を溶解し、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  の集積はオートウェル  $\gamma$  カウンタで放射能を測定した。 $^3\text{H-L-Tyr}$  の集積については液体シンチレーションカクテルを加え、液体シンチレーションカウンタ (LSC-5100, Aloka medical) で放射能を測定した。

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  $\mu\text{L}$  に 0.1 M NaOH 100  $\mu\text{L}$  を加えて 1 mg/mL に調整した後、BSA 濃度を 0~500  $\mu\text{g/mL}$  に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  $\mu\text{L}$  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率 [%ID/g protein] を算出した。なお、阻害剤を負荷していないときの集積を 100% とし、各条件での標識アミノ酸の集積を相対値 (% of control [%]) で表した。

## (B) 結果と考察

### 1. 大腸菌 K-12 株、EC-14 株における標識アミノ酸の細菌集積の比較

<sup>125</sup>I-D-MIT と <sup>3</sup>H-L-Tyr の大腸菌 K-12 株、EC-14 株への集積を比較した (Fig. 4)。K-12 株と EC-14 株を比較すると、EC-14 株の方が高集積となった。<sup>125</sup>I-D-MIT と <sup>3</sup>H-L-Tyr の集積を比較すると、<sup>3</sup>H-L-Tyr の集積ははるかに高くなった。

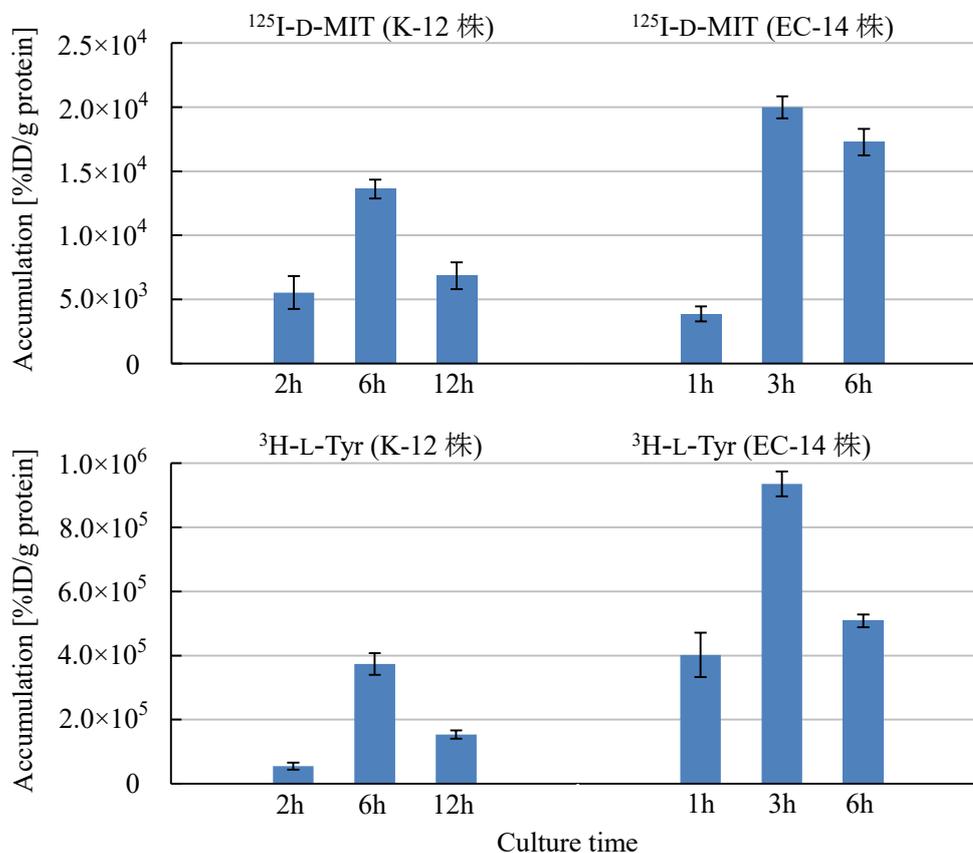


Fig. 4 大腸菌 K-12 株、EC-14 株における <sup>125</sup>I-D-MIT と <sup>3</sup>H-L-Tyr の集積の比較

### 2. 大腸菌 K-12 株、EC-14 株におけるアミノ酸輸送特性の評価

集積阻害実験における各培養時間は III (B) - 1 で最も集積が見られた時間とし、K-12 株では 6 時間、EC-14 株では 3 時間とした。<sup>125</sup>I-D-MIT と <sup>3</sup>H-L-Tyr について、それぞれの競合阻害剤 (L-Tyr, D-Tyr, L-MIT, D-MIT) での阻害効果の結果を Fig. 5 に示す。<sup>125</sup>I-D-MIT, <sup>3</sup>H-L-Tyr の集積に対する各阻害剤の集積阻害効果に関して、大腸菌 K-12 株および EC-14 株では差異はなかった。いずれの標識アミノ酸においても、<sup>125</sup>I-D-MIT に対する D-MIT および <sup>3</sup>H-L-Tyr に対する L-Tyr といった同一

非標識化合物負荷による自己阻害は98%以上であり、大腸菌への集積の大部分が特異的輸送系によるものであることが確認された。また、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  に対しD体の阻害剤 (D-Tyr, D-MIT) においては完全に阻害されていることが確認された。一方、 $^3\text{H-L-Tyr}$  に対しL体の阻害剤 (L-Tyr, L-MIT) ではほぼ完全に阻害されており、D体の阻害剤では阻害効果が確認できなかったことから、大腸菌 K-12 株および EC-14 株への  $^3\text{H-L-Tyr}$  の集積における、L体選択性が確認された。さらに、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  に対しL体の阻害剤においては、K-12 株での L-Tyr で28%, L-MIT で58%の阻害効果が見られ、EC-14 株での L-Tyr で28%, L-MIT で65%の阻害効果が見られたが、 $^3\text{H-L-Tyr}$  に対するD体の阻害剤の相対値評価では阻害効果が確認されなかった。しかし K-12 株における  $^3\text{H-L-Tyr}$  の集積量は  $^{125}\text{I-D-MIT}$  の約30倍であり、EC-14 株でも40倍の集積差があることを確認している。このことから  $^{125}\text{I-D-MIT}$  の輸送系と比較して  $^3\text{H-L-Tyr}$  の輸送系は多く存在し、そのなかで  $^{125}\text{I-D-MIT}$  と共通する輸送系が相対的に少ないため、D-MIT による阻害はかかっているもののその割合はわずかであり、相対値比較には反映されないと推測される。

また、II(B)の結果では  $^{125}\text{I-L-MIT}$  の集積は確認できなかったが、集積阻害の実験では  $^{125}\text{I-L-MIT}$  によって最大で97%の阻害効果が見られた。このことから L-MIT による阻害は競合阻害ではなく、結合による阻害であると推測された。

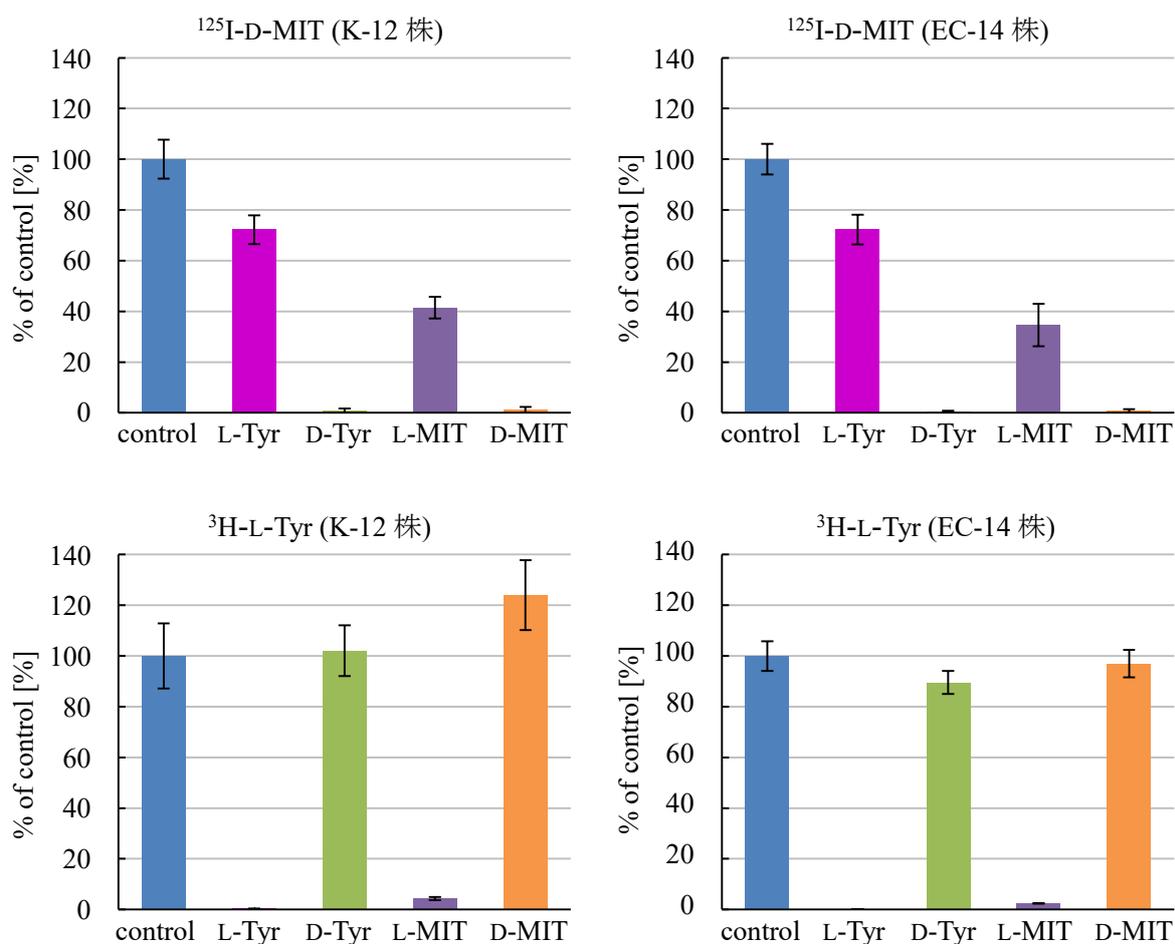


Fig. 5 大腸菌 K-12 株、EC-14 株における各アミノ酸による標識アミノ酸の集積阻害効果

#### IV. 結語

大腸菌 K-12 株、EC-14 株において、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-L-AMT}$  に対し、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  の顕著な集積が確認された。その輸送特性を評価した結果、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  に対し D 体の阻害剤で、完全に阻害が見られ、 $^3\text{H-L-Tyr}$  に対し L 体の阻害剤で、ほぼ完全に阻害されていた。また  $^{125}\text{I-D-MIT}$  においては L 体の阻害剤で一部阻害効果が見られ、 $^3\text{H-L-Tyr}$  においては D 体の阻害剤で阻害はされているものの、その割合はわずかであると推測された。このことから、 $^{125}\text{I-D-MIT}$  と  $^3\text{H-L-Tyr}$  にはそれぞれ異なる特異的輸送系が関与することが示された。D 体アミノ酸はヒト細胞への集積は低く、また D-MIT は生体内脱ヨウ素化反応に対し代謝安定性がある<sup>2)</sup>ため、放射性ヨウ素標識 D-MIT の感染症イメージング薬剤への有用性が見出された。

#### 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。

#### VI. 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) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, et al. Monoiodo-D-tyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. *Nucl Med Biol.* 1990; 17: 369-376.
- 3) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, et al. A strategy for the study of cerebral amino acid transport using iodine-123 labeled amino acid radiopharmaceutical: 3-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine. *J Nuc Med.* 1991; 32(5): 819-824.