

# 代謝活性変化による緑膿菌へのアミノ酸集積の特徴

五十川 泰雄 (指導教員: 川井 恵一 教授, 水谷 明日香 助教)

## I. はじめに

本研究グループでは、大腸菌へのアミノ酸集積量が対数増殖期に顕著に増加することを明らかにし、細菌へのアミノ酸集積を利用した細菌感染症の早期画像診断法を検討してきた。画像診断法開発のためには、細菌へのアミノ酸集積機構をより詳細に検討する必要がある。本研究では、緑膿菌 SR24 株を使用し、細菌の生存状態やアミノ酸の集積条件を変更することで、代謝活性に伴うアミノ酸集積量の変化の解明を目的とした。

## II. 方法

### (1) 使用菌種と培養条件

病原性細菌として、塩野義製薬株式会社から譲渡された緑膿菌の臨床分離株 SR24 株を使用した。前々培養、前培養の培地として Todd 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。37°C、好気条件下で、前々培養は 9 時間、前培養は 14 時間振盪培養した。本培養にはアミノ酸不含 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Fujifilm wako pure chemical) 培地を用い、37°C、好気条件下で振盪培養した。本研究における実験は全てこの状態の菌を使用した。

### (2) 使用した標識アミノ酸

中性アミノ酸の L-alanine, L-tyrosine, L-methionine をトリチウム ( $^3\text{H}$ ) で標識した、[2, 3- $^3\text{H}$ ]-L-alanine ( $^3\text{H}$ -L-Ala), [ring3,5- $^3\text{H}$ ]-L-tyrosine ( $^3\text{H}$ -L-Tyr), [methyl- $^3\text{H}$ ]-L-methionine ( $^3\text{H}$ -L-Met) (American radiolabeled chemicals) を用いた。

### (3) 培養時間における標識アミノ酸集積率の確認

先行研究で検討を行った大腸菌 K-12 株では、アミノ酸の集積量が対数増殖期に顕著に増加することが示された。そこで本研究で使用する緑膿菌 SR24 株においても、使用する標識アミノ酸集積がいずれも評価可能となる適切な培養時間を設定することから、はじめに、本培養した緑膿菌 SR24 株を 24 時間までの一定時間ごとに蛋白定量し増殖曲線 (Fig.1) を得た。増殖曲線から対数増殖期の 6 時間、8 時間、定常期の 24 時間を選択し、各時間培養した本培養液に標識アミノ酸を 37 kBq/10  $\mu\text{L}$  投与して 37°C の温浴中で穏やかに振盪しながら、5 分間取り込ませた後、7000 G, 4°C で 10 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 phosphate buffered saline (pH 7.4) (PBS, タカラ) を加えて、遠心分離し、洗浄した。2 回洗浄した後、上清を除去して、ペレットをほぐし、0.1 M NaOH (Nacal tesque) を 1 mL 加えて菌体を溶解した後、緑膿菌 SR24 株に集積した放射能を液体シンチレーションカウンタ (LSC-5100, Aloka medical) で測定した。

#### (4) 加熱処理による集積実験

緑膿菌 SR24 株への標識アミノ酸集積が菌体表面への吸着ではなく菌体へ取り込まれていることを確認するため、加熱処理を施した細菌を用いて集積検討を行った。8 時間本培養した菌液を 80 °C の環境に 30 分間置くことで加熱処理とし、殺菌効果があることをコロニーカウント法を用いて確認した。加熱処理後の菌液を (3) と同様の方法で標識アミノ酸を取り込ませ放射能を測定した。

#### (5) 低温条件下における集積実験

緑膿菌 SR24 株の代謝に依存してアミノ酸が取り込まれることを確認するために、低温条件下での集積検討を行った。代謝活性を低下させるため緑膿菌 SR24 株を 4 °C で 8 時間本培養した後、標識アミノ酸を 37 kBq/10  $\mu$ L 投与し、氷冷下で 5 分間取り込ませた。その後 (3) と同様の方法で放射能を測定した。

#### (6) 酸性条件下での集積実験

一般的に細菌は糖を分解し酸を産生する<sup>2)</sup>ため、感染巣は弱酸性になると考えられる。そこで、ヒト体液の pH 7.4 から *in vivo* の感染巣を想定した弱酸性に変化させた場合において、緑膿菌 SR24 株における標識アミノ酸集積率を検討した。8 時間本培養した菌液の D-MEM を pH 5.0, 6.0, 7.0 の緩衝液 (20 mM リン酸 Na buffer, 5 mM 酢酸, 0.01 % Tween80) のいずれかで置換し、(3) の方法で標識アミノ酸を取り込ませ放射能を測定した。

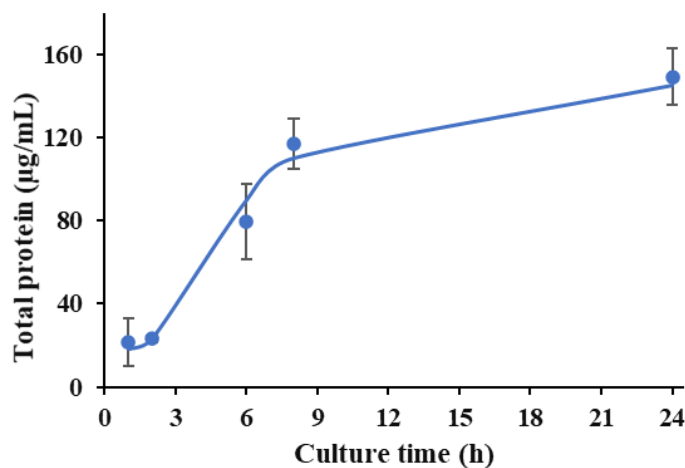


Fig.1 : 緑膿菌 SR24 株における増殖曲線

### III. 結果・考察

#### (1) 培養時間における標識アミノ酸集積率の確認

結果を表 1 に示す。<sup>3</sup>H-L-Ala, <sup>3</sup>H-L-Tyr の集積率は対数増殖期の 6 時間、8 時間で最大値となった。対して <sup>3</sup>H-L-Met は定常期である 24 時間で最大値となる特徴的な集積を示した。先行研究で検討を行った大腸菌では、<sup>3</sup>H-L-Ala, <sup>3</sup>H-L-Tyr, <sup>3</sup>H-L-Met の集積量は対数増殖期に最大を示し、定常期に低下した<sup>1)</sup>

ことから、L-Met の集積と増殖期の関係は大腸菌と緑膿菌で異なると考えられる。また緑膿菌は L-Ala のみの培地では増殖できるが、L-Met のみの培地では増殖できないことが報告されている<sup>3)</sup>ことから、緑膿菌は増殖活性に依存して L-Ala, L-Tyr を取り込むが、L-Met の取り込みは増殖活性に依存しないと考えられる。結果を踏まえ、本検討で使用した標識アミノ酸のいずれにおいても集積の増減が判別可能であると判断できた対数増殖期の 8 時間を以降の実験の培養時間とした。

表 1：本培養時間と標識アミノ酸集積率 [%ID]

	6 時間	8 時間	24 時間
<sup>3</sup> H-L-Ala	14.01±5.63	17.93±0.93	9.14±0.58
<sup>3</sup> H-L-Tyr	30.51±1.41	23.46±1.21	2.62±0.47
<sup>3</sup> H-L-Met	0.28±0.02	1.42±0.07	18.39±2.21

(2) 加熱処理による集積実験

結果を表 2 に示す。本実験では菌体表面への吸着の有無を確認するために集積率を蛋白量で補正した。菌体表面への吸着であれば control と同等の集積率が得られると考えられるが、加熱条件下では標識アミノ酸の集積率は 0.02 % / 100 µg protein 以下となり、control と比較して集積率が顕著に低下したことから、緑膿菌 SR24 株への標識アミノ酸集積は菌体表面への吸着によらないことが示された。また本検討における加熱処理は殺菌効果を有することから、アミノ酸集積には生命活動が関与することが考えられる。

表 2：加熱処理条件下における蛋白量補正後の標識アミノ酸集積率 [%ID / 100 µg protein]

	<sup>3</sup> H-L-Ala	<sup>3</sup> H-L-Tyr	<sup>3</sup> H-L-Met
加熱処理	0.01±0.00	0.01±0.00	0.02±0.00
control	6.25±1.25	0.13±0.02	0.08±0.00

(3) 低温条件下における集積実験

結果を表 3 に示す。低温で培養した条件では集積率 0.07 %以下となり、control と比較して顕著に低下した。37 °C で 8 時間培養した control の緑膿菌 SR24 株 は対数増殖期であり集積率は高いことに対し、低温での培養条件では代謝活性が抑えられているため、標識アミノ酸集積率は顕著に低下したと考えられる。以上の結果からアミノ酸集積は細菌の代謝活性に依存することが示された。

表 3：低温条件下における標識アミノ酸集積率 [%ID]

	<sup>3</sup> H-L-Ala	<sup>3</sup> H-L-Tyr	<sup>3</sup> H-L-Met
低温	0.01±0.00	0.01±0.00	0.07±0.02
control	17.93±0.93	23.46±1.21	1.42±0.07

#### (4) 酸性条件での集積実験

結果を Fig.2 に示す。酸性条件下における標識アミノ酸集積率は低下する傾向が認められたが、酸性条件下においても集積率が保たれていたことが明らかになった。このことから感染巣で起こりうる酸性条件下においても、標識アミノ酸を使用しその集積率を評価できることが示された。

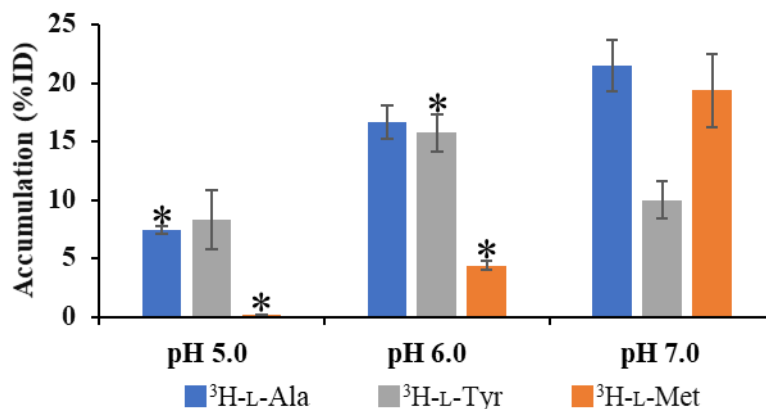


Fig.2 : pH 変化に伴う標識アミノ酸集積率の変化  
\*  $p < 0.05$  compared with pH 7.0

標識アミノ酸 <sup>3</sup>H-L-Ala, <sup>3</sup>H-L-Tyr, <sup>3</sup>H-L-Met は緑膿菌 SR24 株の菌体に吸着するのではなく、代謝に依存して取り込まれることが明らかになった。またその集積率は酸性条件下において低下する傾向を示したが、十分な集積が保たれていた。このことから *in vivo* で想定される酸性条件下においても標識アミノ酸集積率を指標として、感染巣での緑膿菌 SR24 株の代謝活性を評価できる可能性が示された。

#### IV. 謝辞

本稿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、緑膿菌 SR24 株を譲渡していただきました塩野義製薬株式会社、研究を進めるにあたりご協力いただきました検査技術科学岡本研究室と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：アミノ酸の取り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博士前期課程論文, 2017.
- 2) 松本哲哉：最新臨床検査学講座 臨床微生物学. 医歯薬出版株式会社. pp.16-19, 2019.
- 3) Sivolodskii E P. : Application of the profiles of amino acid utilization as the sole carbon and nitrogen sources for pseudomonad taxonomy. Microbiol. 78 (6), 711-716, 2009.