



グラム陰性細菌のコミュニケーション物質の  
分子設計のための基盤研究

課題番号：16580060

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者： 加藤 純一

広島大学図書

0130516814



大学院先端物質科学研究科・教授

グラム陰性細菌のコミュニケーション物質の  
分子設計のための基盤研究

課題番号：16580060

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金

(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年5月

研究代表者： 加藤 純一

広島大学大学院先端物質科学研究科・教授

はしがき

本報告書は、平成 16 年度から平成 17 年度まで科学研究費補助金・基盤研究 (C) の助成を受け行った成果をとりまとめたものである。研究代表者である著者 (加藤純一)、広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻博士課程後期石田丈典君で研究を遂行した。

研究組織

研究代表者： 加藤 純一 (広島大学大学院先端物質科学研究科・教授)  
 (研究協力者： 石田 丈典)

交付決定額 (配分額) (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,700,000	0	2,700,000
平成 17 年度	1,000,000	0	1,000,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等 (査読付)

Ishida, T., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kato, J., and Ikeda, T. (2004) Control of quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* by acyl homoserine lactone analogues. Conference Proceedings of the 10<sup>th</sup> APCCChE Congress, 3P-01-053 (CD-ROM).

Ikeda, T., Morohoshi, T., Kato, N., Inoyama, M., Nakazawa, S., Hiratani, K., Ishida, T., Kato, J., and Ohtake, H. (2004) Quorum sensing control using autoinducer homologues and cyclodextrins in Gram-negative bacteria. Conference Proceedings of the 10<sup>th</sup> APCCChE Congress, 2L-11 (CD-ROM).

(2) 口頭発表



池田宰、石田丈典、諸星知広、加藤紀弘、加藤純一．アイルペンチルアミド誘導体のグラム陰性細菌の Quorum Sensing に対する効果．日本生物工学会平成 16 年度大会、名城大学（名古屋市）、平成 16 年 9 月 22 日．

Ikeda, T., Morohoshi, T., Kato, N., Ishida, T., Kuroda, A., Kato, J. The effects of new synthetic autoinducer analogues and autoinducer binding compounds on quorum sensing in Gram negative bacteria. ASM Conference “Cell-cell communication in bacteria (2<sup>nd</sup>)”, Banff, Canada, July 23-27 (2004).

塩野智隆、諸星知広、石田丈典、加藤紀弘、加藤純一、池田宰．グラム陰性細菌の Quorum sensing 阻害技術に関する研究．日本農芸化学会 2005 年度大会、札幌市、平成 17 年 3 月 30 日．

石田丈典、滝口昇、黒田章夫、大竹久夫、池田宰、加藤純一．アシル化ホモセリンラクトンアナログによる *Pseudomonas aeruginosa* の Quorum Sensing 制御．日本生物工学会平成 17 年度大会、つくば市、平成 17 年 11 月 16 日．

## 序章

**細菌の化学言語と細胞間コミュニケーション** 多くの細菌は、低分子化合物の「言語」を有しており、その化学言語を用いて同種もしくは異種の細菌種とコミュニケーションする能力を持つ。これまでに分子構造、生物機能およびその分子機構が解明されてきた化学言語には、アシル化ホモセリンラクトン（グラム陰性細菌）、環状ペプチド（グラム陽性細菌）、 $\gamma$ -ブチロラクトン（放線菌）、ホウ酸フラノシル（グラム陽性および陰性細菌）(Fig.1)などが明らかとなっている(1,2,3)。

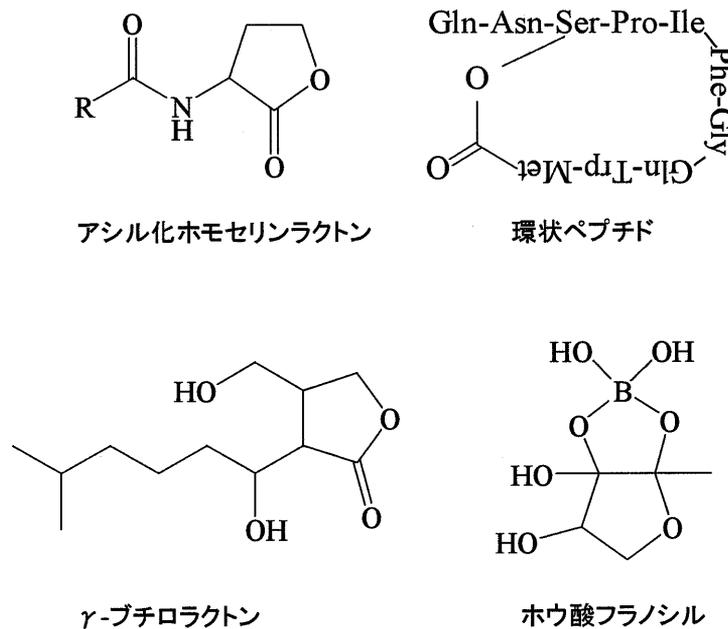
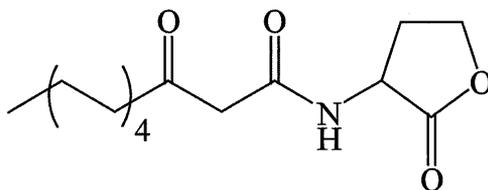
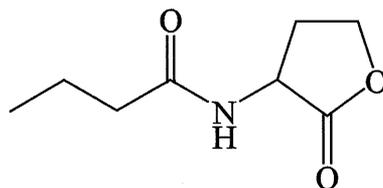


Fig. 1 細菌の化学言語

細胞間コミュニケーションの分子機構を現在もっとも研究が進んでおり、また、本研究でも研究対象としている *Pseudomonas aeruginosa* で説明する。*P. aeruginosa* は *las* 及び *rhl* 系という 2 つの細胞コミュニケーション系を有している。これら細胞コミュニケーション系の主要なコンポーネントは 3 つある。それは、化学言語であるアシル化ホモセリンラクトン、アシル化ホモセリンラクトンを合成する”I”タンパク質 (Inducer 合成の I をとった) およびアシル化ホモセリンラクトンに応答して遺伝子発現を制御する”R”タンパク質 (Regulatory protein) である。*las* 及び *rhl* 系の I タンパク質は LasI および RhlII で、それぞれ、*N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (PAI-1) および *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (PAI-2) (Fig. 2) の生合成を触媒する。R タンパク質は LasR (*las* 系) および RhlR (*rhl* 系) である。*P. aeruginosa* は常時 PAI-1 および PAI-2 を生産している。



*N*-3-oxo-dodecanoyl-L-homoserine lactone (PAI-1)



*N*-butanoyl-L-homoserine lactone (PAI-2)

Fig. 2 *P. aeruginosa* が生産するアシル化ホモセリンラクトンの化学構造

PAI-1 および PAI-2 はその化学的特性から、細胞質膜を受動的に容易に通過することが可能である。したがって、*P. aeruginosa* の細胞密度が低い場合には、細胞周囲の PAI-1 および PAI-2 濃度は低いので、生産された PAI-1 および PAI-2 は菌体外に拡散してしまい、細胞内の PAI-1 および PAI-2 の濃度は低いままである。PAI-1 および PAI-2 を生産・分泌している細胞の密度が高まると、当然細胞周囲の PAI-1 および PAI-2 濃度も増加する。細胞密度が十分高まって細胞外の PAI-1 および PAI-2 濃度がサブ  $\mu$ M オーダーに達すると細胞内の PAI-1 および PAI-2 濃度も閾値を超える。そのとき、PAI-1 および PAI-2 はそれぞれ LasR および RhIR に結合する。対応するアシル化ホモセリンラクトンが結合した LasR および RhIR は活性型となり、特定の塩基配列を持ったプロモーターに結合し、転写を促進する。このように、*P. aeruginosa* の（そして多くの細菌の）細胞間コミュニケーションは、細胞密度をセンシングして遺伝子発現を制御するシステムなのである。細胞密度を感知して、ある細胞密度以上になったら遺伝子発現を on にする制御系であることから quorum sensing (quorum とは法律用語の定足数) と呼ばれている。

*P. aeruginosa* の *las* 系および *rhl* 系によって制御されている遺伝子は、エラスターゼ遺伝子 (*lasA* および *lasB*)、アルカリプロテアーゼ遺伝子 (*apr*)、exotoxin A 合成遺伝子 (*exoA*)、HCN 合成遺伝子 (*hcn*)、細胞毒性レクチン合成遺伝子 (*lecA*)、ラムノリピッド合成遺伝子 (*rhlA* および *rhlB*)、ピオシアニン合成遺伝子 (*phs*) などいずれも病原性因子をコードする遺伝子である。また、*P. aeruginosa* の難治に寄与するバイオフィルムの生合成も quorum sensing の制御下にある。

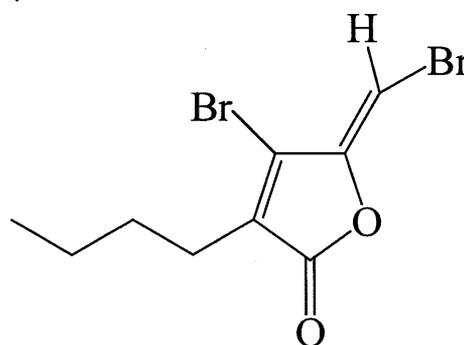
細胞間コミュニケーションを標的にした生物機能の制御 細胞間コミュニケー

シヨンの制御下にある病原性因子は、細胞間コミュニケーションを標的とした人為操作で制御できるのではないかという発想が注目を集めている。それが注目を集めているのは、抗生物質など病原性菌の殺滅する対処法が抱える耐性菌の出現の問題を回避することができるかと期待されているからである。細胞間コミュニケーションは細胞増殖に影響を及ぼさない。だとすれば、もし細胞間コミュニケーションの人為的妨害に耐性な菌が出現したとしても、その変異株は増殖面での優位性は保持していないと考えられる。すなわち、細胞間コミュニケーションを対象にした対処法ならば、その耐性菌が優勢になるとは考えにくい。

Dong らは *Erwnia carotovora* の quorum sensing を標的とした対策でこの菌によるタバコおよびジャガイモへの感染を有効に防除できることを報告している(4)。 *E. carotovora* による植物への感染は quorum sensing の制御下にある。そこで Dong らは *Bacillus* sp. が有するアシル化ホモセリンラクトン加水分解酵素の酵素をタバコおよびジャガイモに移入し、 *E. carotovora* の quorum sensing を妨害する機能を持つトランスジェニック植物を作成した。このトランスジェニック植物の葉(タバコ)や塊茎(ジャガイモ)は確かに *E. carotovora* の感染に対して耐性になった。

自然界でも細胞間コミュニケーションを標的にした感染防御機構を持つ生物が存在する。海洋性の大型藻類 *Delisea pulchra* は *Serratia* 属細菌や *Vibrio* 属細菌の感染を受ける。この感染もアシル化ホモセリンラクトン依存の quorum sensing の制御下にある。 *D. pulchra* はアシル化ホモセリンラクトンに対するアンタゴニスト活性を有するハロゲン化フラノンを分泌して quorum sensing をかく乱し、 *Serratia* 属細菌や *Vibrio* 属細菌の感染を防除している(5)。

このように、細菌の細胞間コミュニケーションは、細菌の生物活動を制御するための有効な標的となりうる。とするならば、細胞間コミュニケーションを支えている化学言語と同等の意味もしくは逆の意味を持つ人工化学言語を創造すれば細菌の生物活動を人為的に制御することが可能になろう。また、化学言語はある程度種特異性があることから、複合生物系における特定細菌種のダイレクトレギュレーションも可能になるかもしれない。本研究では、細菌の細胞間コミュニケーションの有効な人工化学言語を作成すること、また、その化学言語の分子設計に資する基盤技術を確立することを目的としている。



海藻が生産するハロゲン化フラノン

## 第1章 人工化学言語の創製

本研究では *P. aeruginosa* PAO1 株の quorum sensing を対象に細胞間コミュニケーションの人工化学言語の創製を行った。

### 1. 1. 負の人工化学言語 *N*-octanoylcyclopentylamide (C10-CPA) の発見

以前、池田宰教授と共同研究を行い、いくつかのアシル化ホモセリンラクトンアナログの人工化学言語としての活性について検討した(6)。まず、アシル化ホモセリンラクトンのアンタゴニストの候補として天然のアシル化ホモセリンラクトン (*N*-butanoyl-L-homoserine lactone, PAI-2) の光学異性体である *N*-butanoyl-D-homoserine lactone(D-PAI-2)を合成して検討した。アンタゴニスト活性は、*rhl* 系の制御下にある *rhlA* と *lacZ* との融合遺伝子を有するレポータープラスミド p $\beta$ 2 を導入した *P. aeruginosa* PAO-MW1 (p $\beta$ 2)を用いて評価した。この株は *lasI* および *rhlI* の二重変異株であるので、外部からアゴニスト活性を持つアシル化ホモセリンラクトンを加えないと quorum sensing 制御下の遺伝子は発現しない。合成した PAI-2、D-PAI-2 を 10  $\mu$ M 添加した培地で *P. aeruginosa* (p $\beta$ 2)を定常期まで培養し、その後  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した(Fig. 3)。

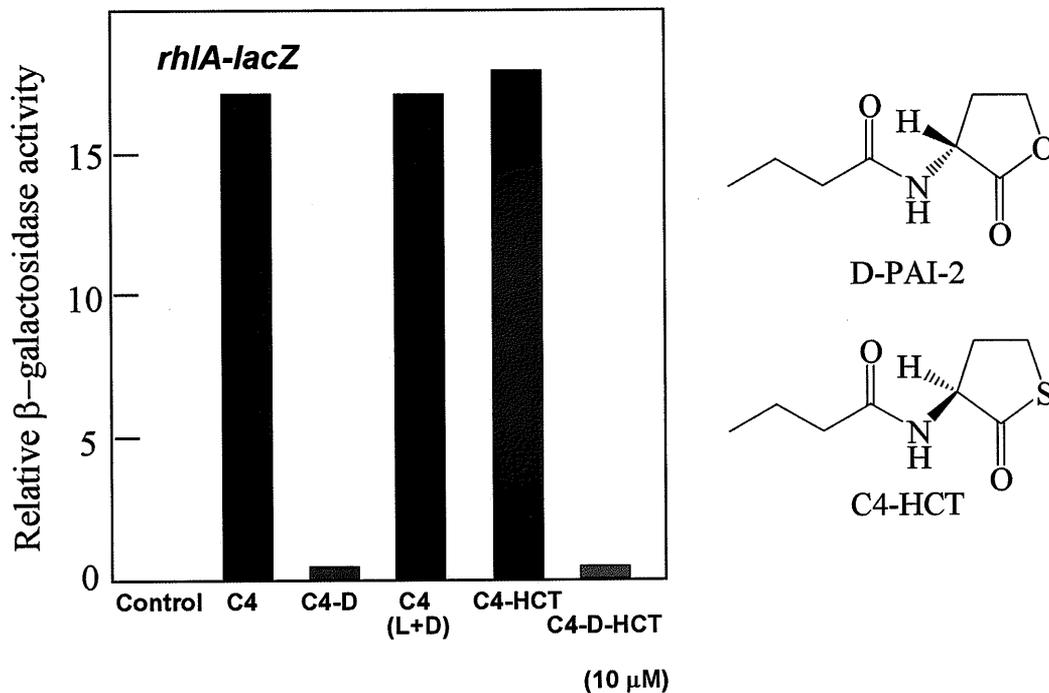


Fig.3 PAI-2 アナログのアゴニスト/アンタゴニスト活性  
C4, PAI-2; C4-D, *N*-butanoyl-D-homoserine lactone; C4-HCT, *N*-butanoyl-L-homocysteine thiolactone; C4-D-HCT, *N*-butanoyl-D-homocysteine thiolactone。これらの化合物を 10  $\mu$ M 添加して *P. aeruginosa* (p $\beta$ 2)を定常期まで培養した後、 $\beta$ -ガラ

クトシダーゼ活性を測定した。

天然型の PAI-2 を添加することで *rhlA* 転写は増加したが、D-PAI-2 では転写の誘導は起こらなかった。D-PAI-2 が *rhl* 系に影響を及ぼさずただ感知されていないのか、それとも PAI-2 に対するアンタゴニスト活性を有しているのかを検討するため、PAI-2 と D-PAI-2 を同時に添加したところ、PAI-2 単独添加時と同等の *rhlA* 転写であった。このことから、D-PAI-2 はアンタゴニストとしては機能しないことが分かった。この研究では、*N*-butanoyl-L-homocysteine thiolactone(C4-HCT)がアゴニストとして機能することが分かった。面白いことに、*N*-butanoyl-D-homocysteine thiolactone(C4-D-HCT)は D-PAI-2 と同様に *rhlA* の転写には何ら影響を及ぼさなかった。

この研究を通じて、*N*-octanoylcyclopentylamide(C8-CPA, Fig. 4F)が *las* 系および *rhl* 系のアンタゴニストとして機能することが分かった。そこで、本研究では C8-CPA をリード化合物として様々な誘導体を合成し、強力なアンタゴニストもしくはアゴニスト活性を有する化合物のスクリーニングを行った。まず、C8-CPA のアシル側鎖の鎖長を C3~12 まで変えた誘導体を作成した(Fig.4A~F)。そして、*las* 系の制御を受けている *lasB* と *lacZ* の融合遺伝子をレポーター遺伝子として有する p $\beta$ 1 を導入した *P. aeruginosa* PAO1(p $\beta$ 1)をそれぞれの化合物 250  $\mu$ M 添加した条件で培養した。24 時間培養後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を計測した結果を Fig. 5 に示す。この結果から、*N*-decanoylcyclopentylamide(C10-CPA)が最も強いアンタゴニスト活性を有することが分かった(Fig. 5)。ついで、アシル鎖は C10 に固定して環状構造部分の誘導体を作成した

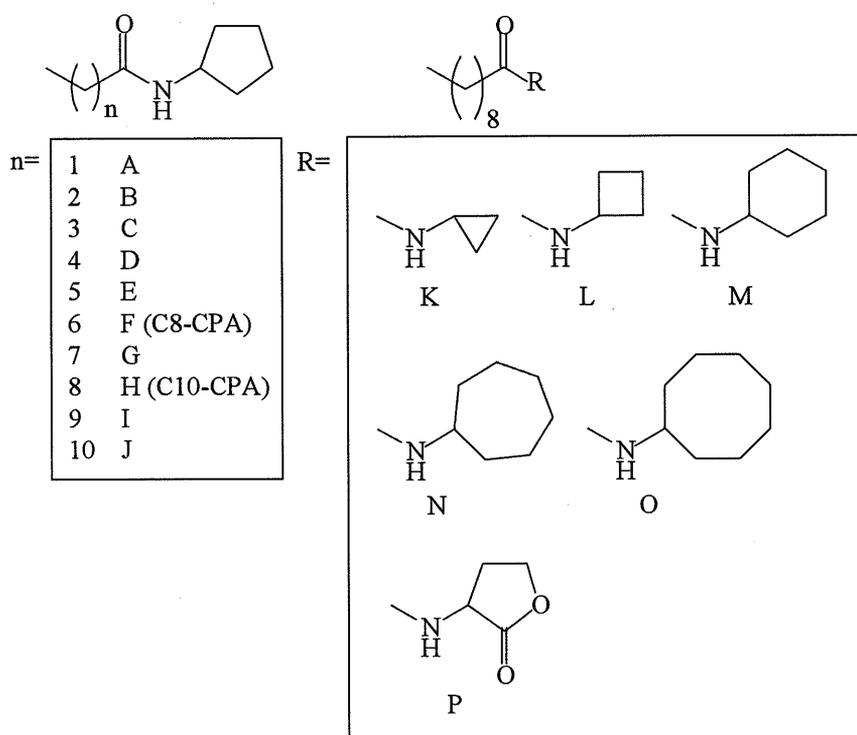


Fig. 4 合成した人工化学言語候補化合物

(Fig. 4K~O)。やはり、*P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 1)を用いてアンタゴニスト活性を計測したところ、五員環である C10-CPA が最も強いアンタゴニスト活性を示した(データ省略)。*P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 1)をレポーター株として用いて *rhl* 系に対するアンタゴニスト活性を調べたところ、やはり C10-CPA が最もアンタゴニスト活性が強かった(データ省略)。

Fig.6 は C10-CPA を 250  $\mu$ M 添加した時の *P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 1)の増殖と *lasB-lacZ* 発現 ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性) の経時変化を示したものである。C10-CPA 添加時の増殖は対照区と同等であった。さらに高濃度 (~1mM) の C10-CPA を添加して増殖を測定したが、やはり対照区と同等の増殖を示した(データ省略)。このことから、C10-CPA は増殖には影響を及ぼさないことが分かった。対照区 (C10-CPA 無添加区) では、*lasB-lacZ* の発現は定常期から開始し、培養 24 時間後まで増加している。それに対し、C10-CPA 添加区では増殖は対照区と遜色ないものの、*lasB-lacZ* の発現は強い抑制を受けている。このように、C10-CPA は増殖を阻害することなしに *lasB* の転写を抑制することが分かった。

ついで、C10-CPA の quorum sensing 抑制効果の濃度依存性について検討した。種々の濃度の C10-CPA を添加した培地で *P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 1)および *P. aeruginosa* (p $\beta$ 2)を 24 時間培養し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。C10-CPA は *lasB-lacZ* および *rhlA-lacZ* の発現とも濃度依存的に抑制した(Fig. 7)。

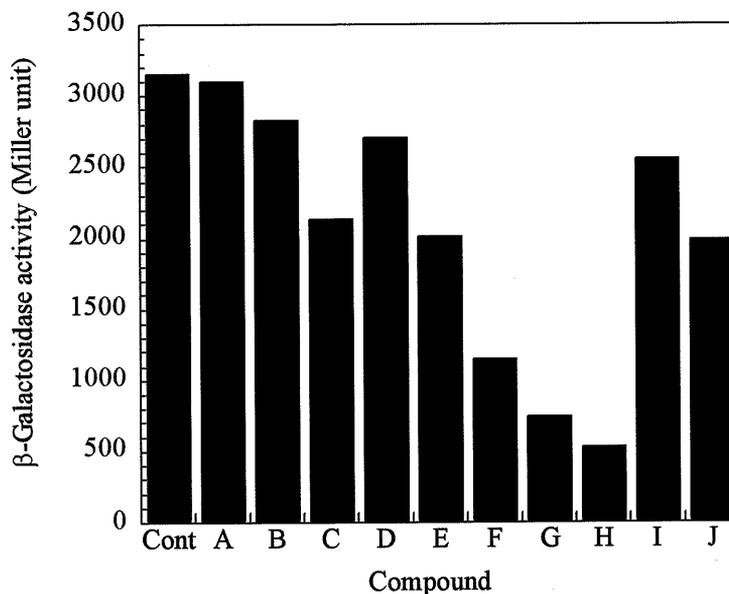


Fig. 5 アシル化シクロペンチルアミド類の *lasB* 発現誘導に対するアンタゴニスト活性

それぞれの化合物を 250  $\mu$ M 添加した培地で *P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 1)を 24 時間培養した後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を計測した。Cont, コントロール。

*lasB-lacZ* および *rhlA-lacZ* 発現に対する C210-CPA の 50% 抑制濃度はそれぞれおよそ 75 及び 30  $\mu\text{M}$  であった。

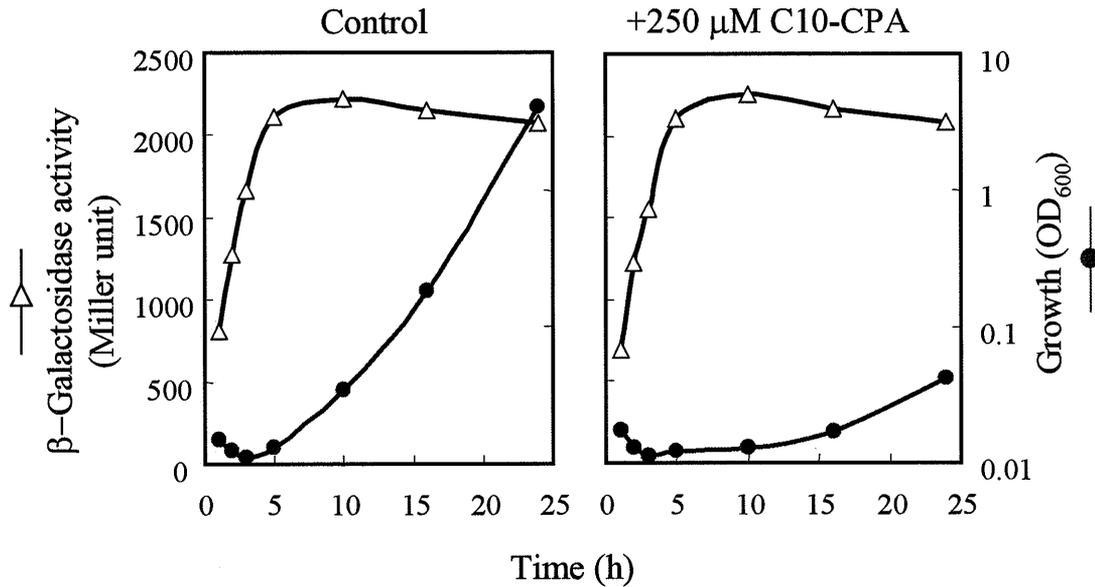


Fig. 6 C10-CPA 添加/無添加時の *P. aeruginosa* PAO1 (p  $\beta$  1) の増殖と *lasB-lacZ* 発現

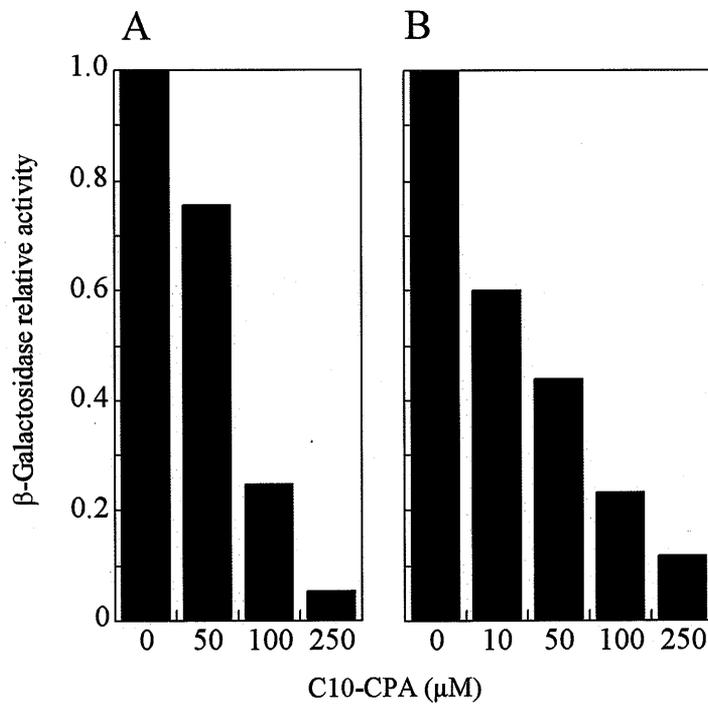


Fig. 7 *lasB-lacZ*(A) および *rhlA-lacZ*(B) の発現に及ぼす C10-CPA の濃度依存的抑制効果

次に *P. aeruginosa* PAO1 が産生する quorum sensing 依存性の病原因子発現に及ぼす C10-CPA の影響について検討した。ラムノリピッド、エラスターゼおよびピオシアニンの生産はいずれも濃度依存的に C10-CPA により抑制された(Fig. 8)。さらにバイオフィルムの形成にも抑制効果があった(Fig. 9)。以上のように、C10-CPA は病原因子の発現抑制効果を持つことが確認された。

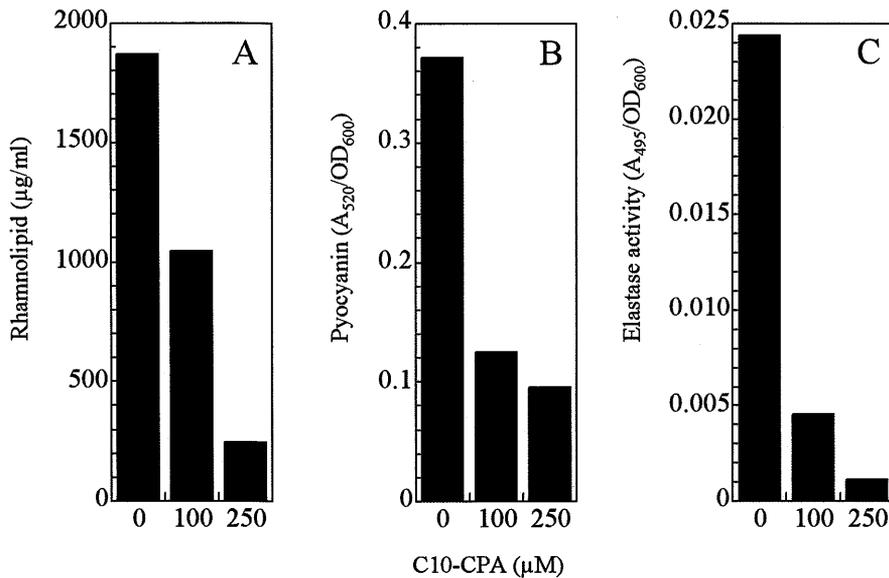


Fig. 8 ラムノリピッド(A)、ピオシアニン(B)およびエラスターゼ(C)の生産に及ぼす C10-CPA の影響

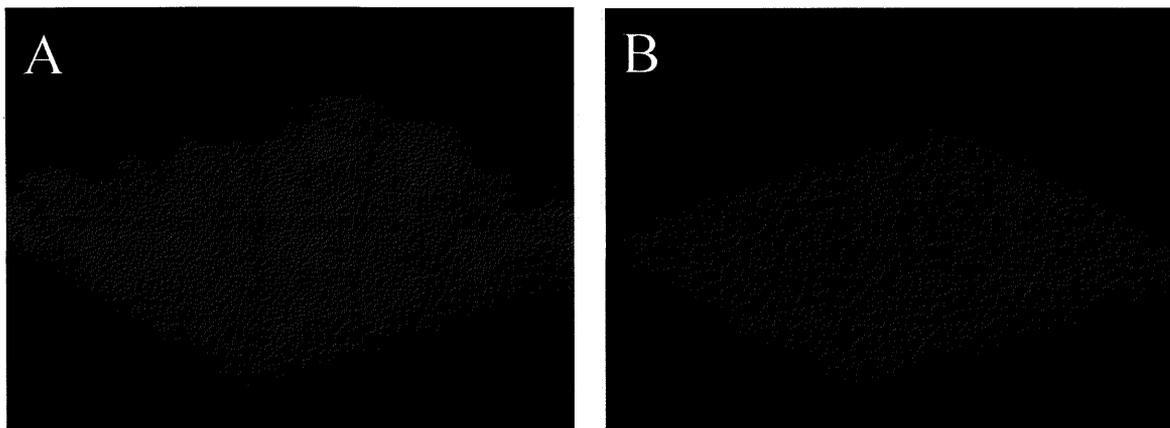


Fig. 9 *P. aeruginosa* PAO1 のバイオフィルム形成に及ぼす C10-CPA の影響  
(A) コントロール、(B) 250 μ M C10-CPA 添加。

## 1. 2. C10-CPA の標的となるステップ

*P. aeruginosa* は 2 つの quorum sensing 系 (*las* 系および *rhl* 系) を有している。*rhl* 系の "R" および "I" 遺伝子をコードする *rhlRI* は *las* 系の制御下にあることから、2 つの quorum sensing 系は独立した制御系ではなく、*las* 系が *rhl* 系の上位に位置するカスケードを形成しているとされている(7)。第 1 章の研究から、C10-CPA は *lasB* および *rhlA* の転写とエラスターゼ、ピオシアニン、ラムノリピッドの生産、バイオフィルムの生成を阻害することが分かった。このうち、*lasB* 転写、エラスターゼ生産およびバイオフィルム生成は主に *las* 系によって制御されている。また、*rhlA* 転写、ピオシアニンおよびラムノリピッド生産は主に *rhl* 系により制御されている。*las* 系が *rhl* 系の上位にある以上 C10-CPA は *las* 系のいずれかのステップを標的としているはずである。そこで、まず C10-CPA がいずれのステップを標的にしているかを検討した。

*lasI* 遺伝子の転写は、RhlR/I の影響は受けず、LasR/I の制御下にある(8)。そこで *lasI-lacZ* および *rhlI-lacZ* のレポーター遺伝子を持つ p $\beta$ 3 および p $\beta$ 4 を

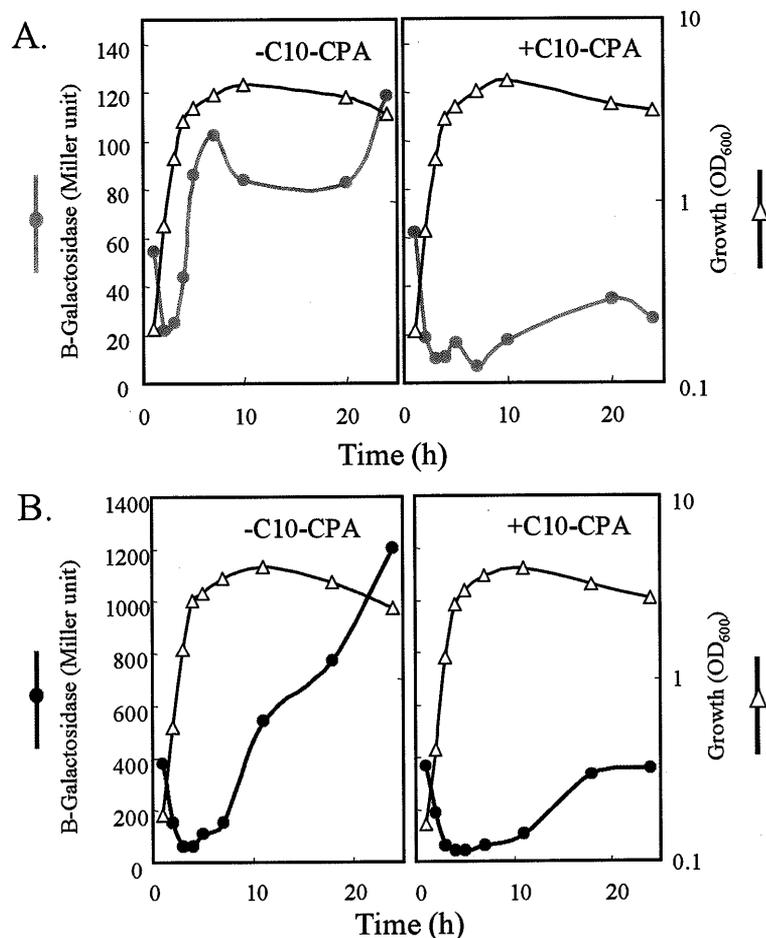


Fig. 10 *lasI-lacZ*(A)および *rhlI-lacZ*(B)の転写に及ぼす C10-CPA の影響  
*P. aeruginosa* PAO1 (p $\beta$ 3)および(p $\beta$ 4)を +/-250  $\mu$  M C10-CPA の条件で培養し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

*P. aeruginosa* PAO1 に導入して C10-CPA の影響を調べた。その結果、C10-CPA は *lasI* および *rhII* の転写をともに抑制することが分かった(Fig. 10)。この結果から、C10-CPA は *las* 系を阻害することが確認された。Fig. 10B の結果から、C10-CPA は *rhII* の転写をも阻害することが示された。しかし、このデータからは C10-CPA が直接 *rl* 系を阻害しているのか、それとも、*las* 系を阻害した間接的な結果として *rhl* 系が阻害されているのかについては断定できない。

*las* 系が C10-CPA の標的となっていることが分かった。そこで、次に、どの *las* 系のどのステップを阻害しているのかについて検討を行った。まず、C10-CPA が LasI の酵素活性(アシル-ACP と S-アデノシルメチオニンから PAI-1 を合成する)の阻害(ステップ a)について検討した。もし、C10-CPA が LasI の活性のみを阻害して PAI-1 による LasR の活性化過程に影響を及ぼさないならば、C10-CPA による *lasI* の転写の阻害は PAI-1 の添加で回復するはずである。そこで、250  $\mu$  M C10-CPA 添加区の培養の途中で 0.1 及び 1  $\mu$  M の PAI-1 を添加し *P. aeruginosa* MW1 株における *lasI-lacZ* の発現を調べた。その結果、0.1 および 1  $\mu$  M の PAI-1 の添加で *lasI-lacZ* の発現は回復した。この結果は、C10-CPA の *las* 系阻害が LasR をめぐる阻害(PAI-1 結合の拮抗阻害、LasR 活性化[DNA 結合活性もしくは転写活性化の活性]の阻害)に由来するのではなく、LasI の酵素活性の阻害に起因することを示唆する。さらに、*lasB-lacZ* を有する *P. aeruginosa* PAO1 株についても同様な検討を行った結果、PAI-1 は C10-CPA による阻害効果を回復することが分かった。厳密には精製した LasI を用いた *in vitro* での試験結果でないと明確な判断はできないものの、ここまでの遺伝学的解析結果は、LasI の酵素活性が C10-CPA の標的となっていることを強く指示するものである。

これまで天然のアシル化ホモセリンラクトン(PAI-1, PAI-2 および 3oxo-C6-HSL)や真核生物が生産する quorum sensing 攪乱物質(ハロゲン化フラノン)をリード化合物としていくつかの quorum sensing のアゴニスト、アンタゴニストが構築されてきた。このうちハロゲン化フラノン誘導体は LuxR タンパク質のターンオーバー速度(分解速度)を高めることにより、quorum sensing を阻害すると報告されている(9)。また、*P. aeruginosa* の quorum sensing に対する人工化学言語は親株 PAO1 における病原性因子生産と *lasI rhII* 二重変異株 PAO-JP2+PAI-1/PAI-2 の条件での種々のレポーター遺伝子の発現を指標に評価されている(10,11)。PAI-1 の環構造アナログはいずれも PAO-JP2+PAI-1/PAI-2 の条件で *lasI*, *rhII*, エラスターゼもしくはピオシアニンの発現を阻害することから、LasR もしくは RhIR もしくはその両方の活性化を阻害していると考えられる。これらのアナログに関する報告で、“I”タンパク質の阻害に言及したものは今のところない。本研究で得られた C10-CPA とそれに関する知見は、人工化学言語を構築する場合、“I”タンパク質の阻害も考慮すべき点であることを指摘するものである。

## 第 2 章 人工言語設計のための基盤ツール

化学言語による細胞間コミュニケーションにはいくつかのステップがある。アシル化ホモセリンラクトン/quorum sensing を例にとってみるとそれらステップは下記のようになる。

- a. "I"タンパク質によるアシル化ホモセリンラクトンの合成
- b. アシル化ホモセリンラクトンの細胞膜透過性
- c. アシル化ホモセリンラクトンの"R"タンパク質との結合
- d. "R"タンパク質の標的 DNA 結合活性の活性化
- e. "R"タンパク質の転写活性可能の活性化

正の人工化学言語の場合には、b~e が効率よく（でき得れば天然アシル化ホモセリンラクトンよりもさらに効率的に）なるよう化学構造を設計する必要がある。また、負の人工化学言語の場合は、a~e のステップいずれもが阻害の標的となる。

これまで quorum sensing の人為的干渉を目指し我々が作成した C10-CPA を含め多くのアシル化ホモセリンラクトンが合成されてきた（付録[アシル化ホモセリンラクトンホモログに関する既報の情報]）。合成された人工化学言語は、主に親株の quorum sensing 制御産物の生産やレポーター遺伝子の発現に対する影響、"I"遺伝子を欠損した変異株でのレポーター遺伝子の発現に対する影響を指標に評価がなされてきた。これらの評価は簡便であることやハイスループットな測定にも耐えることから、便利な評価ツールであることには違いない。しかし、上記のステップを区別して評価することは難しい。そのため、得られた評価結果だけからは、人工化学言語を合理的に設計する指針を導き出すことは困難である。それを反映してか、これまでの人工化学言語合成は、天然アシル化ホモセリンラクトン(PAI-1,PAI-2 および 3oxo-C6-HCL)をリード化合物とした試行錯誤的な方法に依っている。

人工化学言語を合理的に設計するためには、それぞれのステップを評価する手法を構築して多様な化合物を評価し、構造活性相関を構築する必要がある。そこで本章では、特に c~e のステップの評価に必要となる LasR および RhIR の調製を行った。

### 2. 1. LasR の発現・精製

一般的に"R"タンパク質を過剰発現させると容易に封入体 (inclusion body) を形成してしまうため、その精製は極めて難しい。封入体形成を克服するためには、シャペロンである GroEL の共発現、天然アシル化ホモセリンラクトンの添加、低温培養などの工夫がなされている。*P. aeruginosa* PAO1 の LasR の精製についてもそのことを勘案し、精製プロトコールを検討した。

LasR の発現は、T7 プロモーターを有する *E. coli* 発現ベクター pET21b を用い、*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS で行った。*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS は、pLysSRARE がコードする T7 リゾチームにより T7 プロモーターのは転写を厳密に制御する。さらに pLysSRARE は *E. coli* にとって希な 6 つのコドンに対する tRNA も供給する。この Rosetta(DE3)pLysS に *lasR* 遺伝子を組み込んだ pET21b-LasR を導入し、LasR の高発現を試みた。種々培養条件を検討したところ、PAI-1 添加条件下、IPTG の誘導をかけた後に低温(17°C)で培養することにより、可溶性の LasR が著量発現することが分かった。しかし、同じ条件で培養しても、培地に PAI-1 を添加しないと発現した LasR は不溶化してしまった。

LasR の精製は、硫酸沈殿、ついで、Hitrap Q FF をプレカラムとして用いた Hitrap heparin HP カラムクロマトグラフィーで 95%以上の精製標品を得ることができた(Fig. 11)。LasR 結合領域を持つ *lasI* プロモーター領域(12)に対する LasR 精製標品の結合活性をゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、精製した LasR は結合反応の際に PAI-1 を添加しなくとも、*lasI* プロモーター領域に結合することが分かった。また、結合反応時に C10-CPA を添加しても結合活性は影響を受けない。*Agrobacterium tumefaciens* の”R”タンパク質である TraR への天然アシル化ホモセリンラクトン(3oxo-C8-L-HSL)の結合は極めて強固であることが報告されている(13)。おそらく、PAI-1 の LasR への結合も極めて強固であ

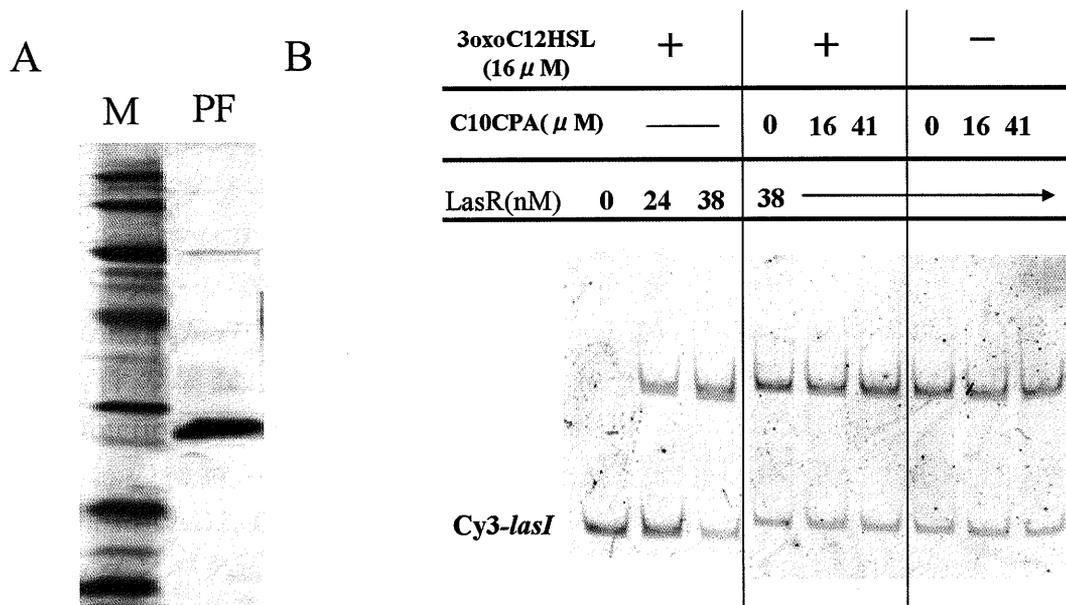


Fig. 11 精製した LasR の SD-PAGE(A)および *lasI* プロモーター領域を用いたゲルシフトアッセイ(B)

(A) M, サイズマーカー; PF, Hitrap heparin HP の精製画分。(B) 精製した LasR を用い、Cy3 標識した *lasI* プロモーター領域に対してゲルシフトアッセイを行った。

ると予測される。精製した LasR を 8 日間にわたり透析を行っても、*lasI* プロモーター領域への結合活性は減少しないことを確認したが、この結果は前述の考えを支持するものである。

LasR-PAI-1 の結合が強固であることから、今回用いた精製法で精製した LasR に人工化学言語を曝露しても LasR-PAI-1 の結合の阻害(ステップ c)の評価は極めて困難であるし、また、LasR に人工化学言語が結合したときの LasR 結合部位への LasR-人工化学言語複合体の結合活性や転写促進活性を調べるのも難しい。ステップ c~e の評価を行うためには、*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (pET21b-LasR)の培養を PAI-1 の代わりに人工化学言語を添加した培地で行い、その菌体から LasR-人工化学言語複合体を調製すればよいと考えられる。また、LasR-PAI-1 複合体形成への阻害効果は PAI-1 と人工化学言語を同時に添加して培養した菌体から LasR を調製し、たとえば、MALDI-TOF-MAS などで LasR 内の PAI-1 と人工化学言語の存在比率を求めることにより評価すればよいと考えられる。これらは、今後の課題である。

## 2. 2. RhIR の発現・調製

PAI-1 の添加と培養温度の制御するのみで、LasR の大量発現は比較的容易に達成できた。それに対し、RhIR の大量発現は困難を極めた。当初は精製の際の便宜をはかるため、pET21b や pIVX24 などの His タグ付加発現ベクターを用い、His タグを付加した RhIR の大量発現を試みた。可溶性の His-RhIR を著量発現させるために下記のような条件を試したが、いずれの条件でもほとんどが不溶性の His-RhIR しか生産できなかった。

- ・ 低温培養 (20~28°C)
- ・ 低温培養+エタノールの添加
- ・ アシル化ホモセリンラクトンの添加
- ・ プロモーターの検討：T7, *lac*, *tac* プロモーター
- ・ pKJE7(*dnaK dnaJ groE*)や pGro7(*groES groEL*)を用いたシャペロンの共発現
- ・ 誘導条件の検討：IPTG 濃度、ラクトースの使用、Overnight Expression Autoinduction System (タカラバイオ)の使用
- ・ 宿主菌株の検討：*E. coli* MV1184, BL21(DE3)pLysS, Rosetta(DE3)pLysS, *P. aeruginosa* PAO1, PAO-MW1[*lasI rhIR*]
- ・ *In vitro* タンパク質発現系 RTS システム (ロシュ)

このうち GroEL を共発現させた系では可溶性の His-RhIR の割合が顕著に増加したものの、それらはほとんどすべて GroEL に結合した状態であり、特異的 DNA 結合能は検知できなかった。

*P. aeruginosa* PAO1 の *rhIR* 変異株に His-RhIR 遺伝子を導入したところ、部分的にしか変異を相補しなかった。このことから、His タグが RhIR タンパク質のホールディングに悪影響を及ぼしている可能性があると考えた。そこで、His タグを付加しない天然型の RhIR の発現を試みた。その結果、*rhIR* 遺伝子を T7

プロモーターの下流に連結した pET21b-RhlR を導入した Rosetta(DE3)pLysS を PAI-2 存在下、低温(28°C)で培養することにより、LasR よりは発現量は劣るが著量の可溶性 RhlR を生産させることに成功した。

Rosetta(DE3)pLysS (pET21b-RhlR)で発現した RhlR は、硫安沈殿-Histrap heparin HP-MonoS PE カラムクロマトグラフィーで精製度 95%程度に精製することができた(Fig. 12)。精製 RhlR の標的 DNA(*rhlA* プロモーター領域)への結合活性をゲルシフトアッセイで検討したところ、特異的結合活性を有することが分かった。

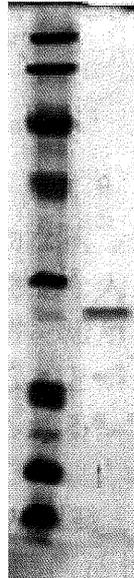


Fig. 12 精製 RhlR の SDS-PAGE

## 結論

- ・ C10-CPA(*N*-octanoylcyclopentylamide)が *P. aeruginosa* PAO1 に対して負の人工化学言語の機能を発揮することを発見した。
- ・ C10-CPA の標的は、PAI-1(*N*-3-oxododecanoyl-L-homoserinelactone)合成酵素 LasI であることが示唆された。
- ・ *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS と pET21b の宿主ベクター系を用いて人工化学言語の評価に必要な LasR と RhlR タンパク質を著量発現する系を構築した。また、発現したタンパク質の精製手法も開発した。

## 今後の課題

人工化学言語の合理的設計に有効な構造活性相関モデルを構築すること、さらには、そのモデルを活用して高性能な人工化学言語を創製することが中間ゴールであり、創製した人工化学言語を活用して複合微生物系における特定細菌のダイレクト制御の手法を確立することが最終的なゴールとなる。近々の課題としては、次のような事項があげられる。

### ◎”I”タンパク質酵素活性の評価系の開発

本研究で初めて”I”タンパク質の酵素活性阻害を通じて人工化学言語機能を発揮する化合物が存在することが示唆された。これまでは、”R”タンパク質機能への影響のみを評価の対象にしてきたが、C10-CPA の発見により、人工化学言語の評価系を”I”タンパク質にまで拡張する必要があることが分かった。そこで、精製”I”タンパク質を用いる *in vitro* 評価系を構築することが、今後の課題のひとつになる。

### ◎”R”タンパク質への影響評価系の開発

本研究により、LasR および RhlR タンパク質の発現・精製系を確立することができた。その手法を活用して、天然アシル化ホモセリンラクトンが”R”タンパク質へ結合する際の阻害効果、”R”タンパク質の標的 DNA 配列結合活性化に及ぼす影響評価、”R”タンパク質の転写促進活性に及ぼす影響評価の系を確立することが次に必要となろう。リガンドフリーの”R”タンパク質の調製は非常に困難なことから、天然アシル化ホモセリンラクトンが”R”タンパク質へ結合する際の阻害効果の評価は、”R”タンパク質を発現させた whole cell を用いて行うのが有効であると思われる。また、”R”タンパク質の転写促進活性に及ぼす影響を *in vitro* で評価するためには、*in vitro* 転写系の確立が必要となる。その代替として、”R”遺伝子およびレポーター遺伝子を持つ whole cell を利用して有効に評価ができるかもしれない。

### ◎確立した評価系を用いた情報の収集

評価系が確立できたら、人工化学言語ライブラリーに対し評価を行う。

参考文献

1. Podbielski, A. and Kreikemeyer, B. Cell density-dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int. J. Infect. Dis.* 8:81-95 (2004).
2. Camara, M., Williams, P., and Hardman, A. Controlling infection by tuning and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* 2:667-676 (2002).
3. Miller, M. B. and Bassler, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199 (2001).
4. Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., and Zhang, L. H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411:813-817 (2001).
5. Kjelleberg, S., Steinberg, P. D., Givskov, M., Gram, L., Manefield, M., and de Nys, R. Do marine natural products interfere with prokaryotic AHL regulatory systems? *Aquat. Microb. Ecol.* 13:85-93 (1999).
6. Ikeda, T., Kajiyama, K., Kita, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., and Otake, H. 2001. The synthesis of optically pure enantiomers of *N*-acyl-homoserine lactone autoinducers and their analogues. *Chem. Lett.* 314-315.
7. Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., and Iglewski, B. H. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:3127-3132.
8. Pearson, J. P., Pesci, E. C., and Iglewski, B. H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum sensing system in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179:5756-5767.
9. Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Gagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoby, N., and Givskov, M. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* 22:3803-3815.
10. Smith, K. M., Bu, Y., and Suga, H. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. 2003. *Chem. Biol.* 10:81-89.
11. Smith, K. M., Bu, Y., and Suga, H. 2003. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer. *Chem. Biol.* 10:563-571.
12. Whiteley, M., and Greenberg, E. P. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J. Bacteriol.* 183:5529-5534.
13. Qin, Y., Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Beck von Bodman, S., and Farrand, S. K. 2000. Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its

release from membranes into the cytoplasm.  
EMBO J. 19:5212-21.

付録 実験手法

[菌株]

菌株	特性・遺伝形質	文献
<i>E. coli</i> MV1184	<i>ara</i> Δ( <i>lac-proAB</i> ) <i>rpsL thi</i> (φ80 <i>lacZ</i> ΔM15) Δ( <i>srl-recA</i> )306::Tn10(Tc <sup>r</sup> ) F' [ <i>traD</i> 36 <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> ΔM15]	(1)
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS	<i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cm<sup>r</sup>)</i>	
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild-type strain	
<i>P. aeruginosa</i> PAO-MW1	PAO1 derivative; <i>lasI</i> :: <i>tetA</i> , <i>rhlI</i> ::Tn501(Hg <sup>r</sup> )	(5)

[プラスミド]

プラスミド	特性・遺伝形質	文献
pUC118	<i>E. coli</i> cloning vector; Ap <sup>r</sup>	(1)
pBluescriptII KS+	<i>E. coli</i> cloning vector; Ap <sup>r</sup>	
pUC4K	<i>E. coli</i> cloning vector, donor of <i>kan</i> cassette; Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	(2)
pET21b	<i>E. coli</i> expression vector; P <sub>T7</sub> , Ap <sup>r</sup>	
pQF50	Broad-host-range plasmid; Cb <sup>r</sup> , <i>mob</i> <sup>+</sup> , <i>lacZ</i> , Inc P	(3)
pβ 1	pQF50 derivative containing the <i>lasB-lacZ</i> fusion gene	(4)
pβ 2	pQF50 derivative containing the <i>rhlA-lacZ</i> fusion gene	(4)
pβ 3	pQF50 derivative containing the <i>lasI-lacZ</i> fusion gene	
pβ 4	pQF50 derivative containing the <i>rhlI-lacZ</i> fusion gene	
pMRP9-1	Broad-host-range GFP expression vector; <i>gfp</i> , Cb <sup>r</sup>	(12)

Ap<sup>r</sup>:アンピシリン耐性、Cm<sup>r</sup>:クロラムフェニコール耐性、Km<sup>r</sup>:カナマイシン耐性、Tc<sup>r</sup>:テトラサイクリン耐性

[培地]

**LB 培地**

ペプトン、10g/L; 酵母エキス、5g/L; NaCl、5g/L

**2x YT 培地**

ペプトン、16g/L; 酵母エキス、10g/L; NaCl、5g/L

[プラスミドの作成]

### p $\beta$ 1 および p $\beta$ 2

*lasB* および *rhlA* とその上流領域を含む PAO1 ゲノム領域をプライマーセット LASBF/LASBR(5'-CCAGAAAGCGTGCAACTGATGATCG-3'/5'-ACACCTGAACTTTAGACCGGGTTCG-3') および RHLAF/RHLBR (5'-CAGATGCTCTTCCTGCAATCCGACG-3'/5'-CACCATAGGCGTAGTAATCGAAGCC-3') で PCR 増幅した。LASBF/LASBR で増幅した 2.0kb 断片は *SaI* 消化した後 *lasB* の 5' 末端領域と *lasB* 上流 331bp を含む 1.0kb 断片を pUC118 の *SmaI-SaI* サイト間にクローニングした。得られたプラスミドを *KpnI/HindIII* カットし、生じた 1.0kb *KpnI-HindIII* 断片を pQF50 の *KpnI-HindIII* 間に導入し p $\beta$ 1 を作成した。RHLAF/RHLBR で増幅した 3.0kb 断片は *BamHI* 消化後 *rhlA* の 5' 末端領域と *rhlA* 上流 524bp を含む 0.6kb 断片を pUC118 の *SmaI-BamHI* サイト間に導入した。得られたプラスミドを *KpnI/HindIII* カットし、生じた 1.0kb *KpnI-HindIII* 断片を pQF50 の *KpnI-HindIII* 間に導入し p $\beta$ 2 を作成した。

### p $\beta$ 3 および p $\beta$ 4

*P. aeruginosa* PAO1 のゲノム DNA を *lasIf*(5'-GCCCCGGAAGGCCATGTTTTG-3') および *lasIr*(5'-GGGCCAGTGGTATCGAGAAT-3') をプライマーとして PCR で増幅し、増幅産物を pQF50 の *SmaI* サイトにクローニングし p $\beta$ 3 を構築した。また、*rhlIf*(5'-CAGAAGAAGTTCGACGCGCC-3') および *rhlIr*(5'-CTCATGGCGACGATGTAGCG-3') をプライマーとした PCR により増幅した *rhlI* プロモーター領域を pGEM-Teasy にクローニングした。ついで得られた pGEM-Teasy 組み換えプラスミドの *SphI-SaI* 断片を pQF50 にサブクローニングすることで p $\beta$ 4 を構築した。

### pET21b-LasR および pET21b-RhlR

*lasR* と *rhlR* をそれぞれ *lasRf/lasRr*(5'-GAATTCGATGGCCTTGGTTGACGG-3'/5'-AAGCTTTCAGAGAGTAATAAGACCC-3') および *rhlRf/rhlRr*(5'-GAATTCGATGAGGAATGACGGAGGCTT-3'/5'-AAGCTTTCAGATGAGACCCAGCGCC-3') で増幅した。増幅断片を *EcoRI-HindIII* で消化後、pET21b にクローニングし、pET21b-LasR および pET21b-RhlR を作成した。

### [アシル化ホモセリンラクトンおよびそのアナログの合成]

Fig. 4 に示したアシル化シクロアルキルアミドはアシルクロライドとシクロアルキルアミンを脱水縮合して合成した。2mmol のシクロアルキルアミンを含む 2mL 無水ジクロロエタンにアシルクロライドを 1mmol 添加し、4~6 時間攪拌した。エバポレーションでジクロロエタンを除去した後、残留物を 20mL のジエチルエーテルに溶解し、5% NaHCO<sub>3</sub>、0.2M HCl および飽和 NaCl 水溶液で洗浄した。MgSO<sub>4</sub> で脱水した後濃縮してアシル化シクロアルキルアミドを得た。*N*-decanoyl-L-homoserine lactone は文献 (4) に従い、1-ethyl-3-(3-dimethyl-

aminopropyl)-carbodiimide を用いて合成した。合成化合物の純度は元素分析と 500 MHz  $^1\text{H}$ -および 125 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR で確認した。

#### [酵素活性等の定量]

##### $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は Miller の方法により計測した(6)。ただし、反応は 37°C で行った。

##### エステラーゼ活性

エステラーゼ活性はエラスチン-コンゴレッドを基質として測定した(7)。菌体細胞を LB 培地で 24 時間振とう培養した。1mL の培養上清に 10mg のエラスチン-コンゴレッド(Sigma)と 2mL の A バッファー(0.1M Tris-HCl [pH7.0], 1mM  $\text{CaCl}_2$ )を添加し、37°C で 2 時間振とうした。0.7M リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)を 2mL 添加して反応を停止させた後、沈殿物を遠心分離で除き、遠心上清の  $A_{495}$  を測定した。

##### ラムノリピッド定量

培養液中のラムノリピッドの定量は、orcinol 法で行った(7, 8)。

##### ピオシアニン定量

ピオシアニンの定量は比色法(9)で行った。5mL の培養液上清に 3mL のクロロフォルムを添加しピオシアニンを抽出した。有機相を新たなチューブに移して 1mL の 0.2M HCl を添加した後遠心分離し、上清の  $A_{520}$  を計測した。

#### [バイオフィーム可視化]

バイオフィームは once-through continuous-culture biofilm reactor system (10) を用いた連続培養法により形成させた。培地は FAB 培地(11)を用いた。フローセル(チャンネルサイズ 3x3.2x40mm)に GFP 標識した *P. aeruginosa* PAO1 (pMRP9-1)を植菌し、一晩培養した。その後 170  $\mu\text{L}/\text{min}$  で培地を流し、バイオフィームを形成させた。バイオフィームは、共焦点レーザー顕微鏡 (Fluoroview, オリンパス) で観察した。

#### [LasR および RhIR の発現と精製]

##### LasR

形質転換後のプレートの *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS(pET21b-LasR)を 2xYT に植菌し、37°C、12 時間振とう培養する。ジャーファーメンター中の 1 L の本培養培地 (10g/L ペプトン、5g/L 酵母エキス、5g/L NaCl、50 mM MOPS[pH7.0]、100mg/L カルベニシリン、20mg/L クロラムフェニコール、3.5  $\mu\text{M}$  PAI-1) に前

培養液を植菌し、37°Cで通気攪拌培養する。OD<sub>600</sub>が0.5になった時点で0.4 mM IPTGを添加、培養温度を17°Cに制御してさらに14時間培養する。培養終了後、遠心分離(7500 rpm, 30min)で菌体を回収し、後に使用するまで-80°Cで保存した。

保存菌体(700mL 分)を取り出し氷上で融解した。融解した菌体を12mL LRP バッファー(25mM Tris-HCl[pH7.8], 150mM NaCl, 1mM DDT, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0.05% Tween20)に懸濁し、ソニケーションで菌体を破碎した。菌体破碎液を超遠心(10000 x g, 30min, 4°C)で分離し、無細胞抽出液(CFE)を得た。CFEに(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を40%飽和添加した後、遠心分離で沈殿を回収した。回収した沈殿は4mL LRP バッファーに懸濁した。LRP バッファーに対して4°C, 8時間透析した。透析サンプルをLRP バッファーで平衡化したHitrap Q FF(5mL)-Hitrap heparin HP(1mL)直列カラムに流した。LRP バッファーで洗浄後、Hitrap heparin HPのみを取り出し、150mM~500mM NaCl(35mM/mL)の濃度勾配で溶出した。LasRはおよそ95%の精製度でNaCl 200~350mMの画分に溶出した。

## RhIR

形質転換後のプレートの*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS(pET21b-RhIR)を2xYTに植菌し、37°C、12時間振とう培養する。ジャーファーメンター中の1Lの本培養培地(10g/L ペプトン、5g/L 酵母エキス、5g/L NaCl、50 mM MOPS[pH7.0]、100mg/L カルベニシリン、20mg/L クロラムフェニコール、50 μM PAI-2)に前培養液を植菌し、37°Cで通気攪拌培養する。OD<sub>600</sub>が0.5になった時点で0.4 mM IPTGを添加、培養温度を28°Cに制御してさらに4時間培養する。培養終了後、遠心分離(7500 rpm, 30min)で菌体を回収し、後に使用するまで-80°Cで保存した。

保存菌体(750mL 分)を取り出し氷上で融解した。融解した菌体を30mL MOPS バッファー(25mM MOPS[pH7.0], 100mM NaCl, 1mM DDT, 1mM EDTA, 10% Glycerol, 0.05% Tween20)に懸濁し、ソニケーションで菌体を破碎した。菌体破碎液を超遠心(10000 x g, 30min, 4°C)で分離し、無細胞抽出液(CFE)を得た。CFEに(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を40%飽和添加した後、遠心分離で沈殿を回収した。回収した沈殿は10mL MOPS バッファーに懸濁した。MOPS バッファーに対して4°C, 8時間透析した。透析サンプルをMOPS バッファーで平衡化したHitrap heparin HP(1mL)カラムに流した。MOPS バッファーで洗浄後、100mM~500mM NaCl(40mM/mL)の濃度勾配で溶出した。RhIRを含む画分をSDS-PAGEで確認し、その溶出サンプルをMOPS バッファーで平衡化したMono S PE 4.6/100に流した。そしてNaCl 100~500mM (40mM/mL)の濃度勾配で溶出した。LasRはおよそ95%の精製度でNaCl 400~500mMの画分に溶出した。精製試料はHitrap Desalting カラム(5mL)で脱塩した後、Amicon mw10000で約5倍に濃縮した。

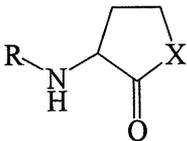
[アシル化ホモセリンラクトンホモログに関する既報の情報]

A.

構造				
文献	Eberhard, A., Widrig, C. A. McBath, P., and Schineller J. B. Analogs of the autoinducer of bioluminescence in <i>Vibrio fischeri</i> . Arch. Microbiol. 146:35-40 (1986).			
特性	<p>◎アゴニスト活性 Autoinducer株である <i>V. fischeri</i> B-61 株をアッセイ株として使用。天然 AI (3oxoC6-HSL)0.001mg/L における発光と比較</p> <p>◎アンタゴニスト活性 (LuxR に対する阻害) 0.01mg/L AI(47nM)における B-61 株の発光を 50%阻害するアナログの濃度</p>			
	側鎖 (R)	(X)	アゴニスト %	アンタゴニスト IC <sub>50</sub> mg/L
	3oxo-C6	O	100	
	■	■	■	
	5oxo-C6	O	10	
	3oxo-C6-4ene	O	10	0.2
	■	■	10	■
	■	■	3	■
	C7	O	1	0.1
	3oxo-C4	O	0.3	0.1
	C5	O	0.3	0.03
	■	■	0.3	■
	2oxo-C8	O	0.03	0.2
	■	■	0.03	■
	2oxo-C4	O	0.02	10
	C4-4-methylester	O		0.5
	3oxo-C6	caprolactam		0.5
	2oxo-C6	O		0.2
	C4	O		0.1
	■	■		■
	C6-2ene	O		<1
	3OH-C6	O		<1

側鎖が重要

B.

構造			
文献	Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Eberhard, A., and Greenberg, E. P. Quorum sensing in <i>Vibrio fischeri</i> : probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. J. Bacteriol. 178:2897-2901 (1996).		
特性	◎アンタゴニスト活性 (LuxR 結合に対する阻害) LuxR を発現した大腸菌への 230nM <sup>3</sup> H-AI 結合の阻害 (x1, x5, x10 濃度) Lux operon (-luxI) を発現した大腸菌での生物発光誘導活性		
	側鎖 (R)	(X)	アゴニスト 100nM 発光
A	3oxo-C4		-
B	3oxo-C5		b
C	3oxo-C6		15000
D	3oxo-C8		450
E	3oxo-C12		b
F	3oxo-C14		b
G	C4		-
H	C5		d
I	C6		c
J	C7		10
K	C8		c
L	C9		b
M	C10		c
N	5oxo-C6		b
O	4phenyl-C4		b
P	3oxo-C6-4ene		b
Q	C6-2ene		b
R	C6-2yne		b
S	2oxo-C6		b
T	2oxo-C8		
U	3oxo-C6	S	b
V	3oxo-C6	aza-HSL	
W	C6	caprolactam	
X	C6	succinimidyl	
Y	3oxo-C12	S	b

LuxR への結合 : 3oxo、C6-8、HSL が重要

結合=活性化ではない、阻害 : 20nM AI, E>Y>J>L>M

C.

構造			
文献	Passador, L., Tucker, K. D., Guertin, K. R., Journet, M. P., Kende, A. S., and Iglewski, B. H. Functional analysis of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> autoinducer PAI. <i>J. Bacteriol.</i> 178:5995-6000 (1996).		
特性	◎アゴニスト活性 <i>Ptac-lasR lasB-lacZ</i> を有する大腸菌をレポーターとして使用。 ◎アンタゴニスト <i>lasR groELS</i> を持つ大腸菌（培養液中）にアナログに 0~180 分曝露した後、 <sup>3</sup> H-PAI-1 に曝露。		
	側鎖 (R)	(X)	
			アゴニスト
			LasR 結合拮抗
A	3oxo-C12		■
B	3oxo-C14		■ b
C	3oxo-C10		■ b
D	3oxo-C8		150
E	3oxo-C6		-
F	C4		-
G	3oxo-C12-6ene		■ b
H	C12		■ b
I	3OH-C12		■
J	3-ED-C12		-
K	3-ED-C10		-
L	3-ED-C14		-
M	3oxo-C12	S	■ ■
N	3oxo-C12	N	400
O	*		-
P	C15		-
Q	C10		250 b
R	C9		- b
S	5oxo-C6		-
T	2oxo-C6		-
U	3Cl-C3-2ene		-

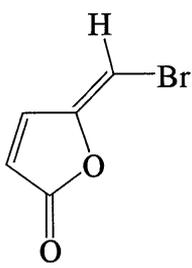
ED: ethylenedioxy, \*: 5-(3-oxododecanoyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione

D.

文献	Kline, T., Bowman, J., Iglewski, B. H., de Kievit, T., Kakai, Y., and Passador, L. Novel synthetic analogs of the <i>Pseudomonas</i> autoinducer. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 9:3447-3452 (1999).		
特性	<p>◎アゴニスト活性 <i>P. aeruginosa</i> JP2 (<i>lasI-lacZ</i>): <i>lasI rhII</i> mutant</p> <p>◎アンタゴニスト活性 JP2 (<i>lasI-lacZ</i>)+40nM PAI-1+10<math>\mu</math>M アナログ</p>		
	構造	アゴニスト	LasR 結合拮抗
1		-	
2		-	
8		-	
11		-	
12		-	
15		weak	+
16		weak	+

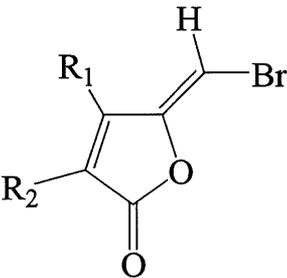
アンタゴニスト活性は認められなかった。

E.

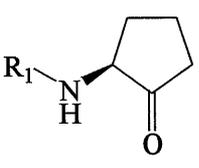
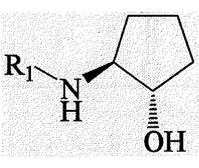
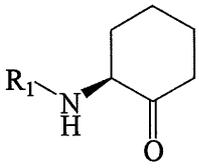
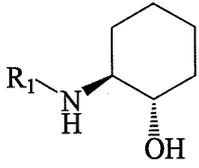
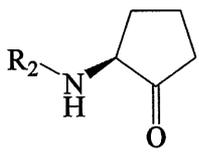
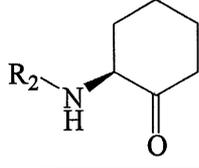
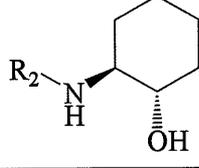
化学名	5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone	
構造		
文献	Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Heydron, A., Andersen, J. B., Parsek, M. R., Rice, S. A., Eberl, L., Molin, S., Hoiby, N., Kjelleberg, S., and Givskov, M. Inhibition of quorum sensing in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. <i>Microbiology</i> 148:87-102 (2002).	
特性	<i>P. aeruginosa</i> JP2 ( <i>lasB-gfp</i> [ASV])	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ PAI-1 の EC50 は 250nM</li> <li>・ 0.1μM PAI-1 のとき IC<sub>50</sub> は 11.4μM</li> <li>・ 完全には阻害されない</li> </ul>
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 ( <i>lasB-gfp</i> [ASV])	28.5μM で 40%阻害、濃度依存的
	JP2 protease activity	PAI-1, -2(1 & 3μM) IC <sub>50</sub> : 17.1μM 濃度依存的
	JP2 chitinase activity	PAI-1, -2(1 & 3μM) IC <sub>50</sub> : 28.5μM 濃度依存的
	JP2 ( <i>lasB-gfp</i> [ASV])	PAI-1 40nM, 11.4μM でバイオフィルム内の <i>lasB</i> 発現を抑制
	PAO1 ( <i>lasB-gfp</i> [ASV])	バイオフィルムの形成が阻害

レポーター遺伝子はシングルコピー

F.

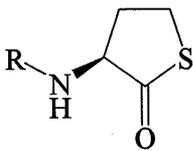
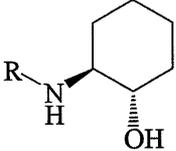
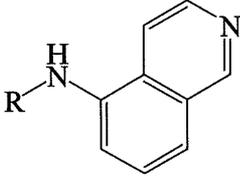
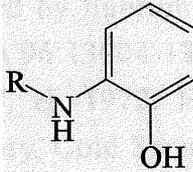
<p>構造</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>Br</td> <td>C4</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Br</td> <td>1OH-C4</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>Br</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>56</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	2	Br	C4	4	Br	1OH-C4	30	Br	H	56	H	H
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>															
2	Br	C4															
4	Br	1OH-C4															
30	Br	H															
56	H	H															
<p>文献</p>	<p>Manefield, M., Rasmussen, T. B., Hentzer, M., Andersen, J. B., N., Kjelleberg, S., and Givskov, M. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. <i>Microbiology</i> 148:1119-1127 (2002).</p>																
<p>特性</p>	<p><i>E. coli</i> XL-1 Blue (<math>P_{tac}</math>-<i>luxR</i>, <i>groELS</i>) IPTG 存在下で培養した後洗浄して IPTG を除去し、アナログを添加して培養。経時的に菌体を回収し Western blot 解析。 アナログの存在で LuxR の消失が促進。 LuxR の消失と <i>luxI-gfp</i>[ASV] の阻害が相関。 3oxo-C6-HSL が共存しても turnover は早まる。</p>																
<p>文献</p>	<p>Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J. B., Riedel, K., Rasmussen, T. B., Gagge, N., Kumar, N., Schembri, M. A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J. W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoby, N., and Givskov, M. Attenuation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence by quorum sensing inhibitors. <i>EMBO J.</i> 22:3803-3815 (2003).</p>																
<p>特性</p>	<p>Compound 30 PAO1: 10<math>\mu</math>M で、exoprotease, 1/5; pyoverdin, ほぼ 100%阻害; chitinase, 50%阻害 バイオフィルムを形成するものの、tobramycin に対する感受性は増大。 0.7<math>\mu</math>g/g の投与でマウス肺における <i>P. Aeruginosa</i> の生残性をシャットダウン。</p>																

G.

文献	Smith, K. M., Bu, Y., and Suga, H. Induction and inhibition of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. Chem. Biol. 10:81-89 (2003).			
特性	<i>P. aeruginosa</i> JP2 PAI-1: 1μM, PAI-1 1μ + PAI-2 10μM, <i>lasI</i> , <i>rhlI</i> PAI-1, -2: 25μM, ピオシアニン、エラスターゼ			
		構造	アゴニスト      アンタゴニスト	
	1		PAO-JP2 ( <i>lasI-gfp</i> ) PAI-1 の 1/100	
	2		-	JP2/ <i>lasI</i> : 100:1[PAI-1]で 70%阻害 JP2/ピオシアニン、100μM で 92%阻害 PAO1/ピオシアニン、100μM でほぼ 100%阻害 PAO1/エラスターゼ、50μM で 60%阻害 JP2 では阻害せず PAO1 のバイオフィーム生成は阻害しないものの、バイオフィームの様相が大きく変化。
	3		-	JP2/ <i>rhlI</i> : 2.5:1[PAI-2]で 50%阻害
	4		PAI-1 の ■	
	5		PAO-JP2 ( <i>rhlI-gfp</i> ) PAI-2 の ■	
	7		PAI-2 の ■	
	8		PAI-2 の 1/100	

R<sub>1</sub> = C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>COCH<sub>2</sub>CO-, R<sub>2</sub> = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CO-

H.

文献	Smith, K. M., Bu, Y., and Suga, H. Library screening for synthetic agonists and antagonists of a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> autoinducer. Chem. Biol. 10:563-571 (2003).	
特性	<p>◎アゴニスト活性 <i>P. aeruginosa</i> JP2 (<i>lasI-gfp</i>) ◎アンタゴニスト活性 JP2 (<i>lasI-gfp</i>)+1<math>\mu</math>M PAI-1, (<i>rhlI-gfp</i>)+1:10 (PAI-1:-2) JP2/エラスターゼ、5:10(PAI-1:-2)</p>	
構造		
アゴニスト	  	
アンタゴニスト	 <p>R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>CO-の場合、<i>rhlI</i> 転写阻害活性を示さない。</p>	<p style="text-align: center;">特性</p> <p>JP2/<i>lasI</i>: 10<math>\mu</math>M で 60%阻害 JP2/<i>rhlI</i>: 10<math>\mu</math>M で 70%阻害 JP2/エラスターゼ、10<math>\mu</math>M で 35%阻害。濃度非依存的。 PAO1/エラスターゼ、10<math>\mu</math>M で 60%阻害。濃度非依存的。 ピオシアニン は阻害せず。 PAO1 のバイオフィーム生成は阻害しないものの、バイオフィームの様相が大きく変化(Fluffy)。</p>

R = C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>COCH<sub>2</sub>CO-

付録文献

- (1) Vieira, J. and Messing, J. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153:3-11.
- (2) Vieira, J. and Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.
- (3) Farinha, M. A., and Kropinski, A. M. 1990. Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. *J. Bacteriol.* 172:3496-3499.
- (4) Ikeda, T, Kajiyama, K., Kita, T., Takiguchi, N., Kuroda, A., Kato, J., and Otake, H. 2001. The synthesis of optically pure enantiomers of *N*-acyl-homoserine lactone autoinducers and their analogues. *Chem. Lett.* 314-315.
- (5) Whiteley, M., Lee, K. M., and Greenberg, E. P. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13904-13909.
- (6) Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- (7) Pearson, J. P., Pesci, E. C., and Iglewski, B. H. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum sensing system in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179:5756-5767.
- (8) Juhas, M., Eberl, L., and Tümmler, B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* 7:459-471.
- (9) Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., and Crawford, I. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *J. Bacteriol.* 172:884-900.
- (10) Christensen, B., Sternberg, B. C., Andersen, J. B., Palmer, R. J., Nielsen, A. T., Gibkov, M., and Molin, S. 1999. Molecular tools for study of biofilm physiology. *Methods Enzymol.* 310:20-42.
- (11) Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., and Molin, S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* 146:2395-2407.
- (12) Parsek, M. R., and Greenberg, E. P. 1999. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Methods Enzymol.* 310:43-55.