

## N-Acylhomoserine lactone 受容体を標識する蛍光プローブの合成と細菌の細胞間シグナリングの可視化

○大快唯人・志野裕亮・奈須野恵理・加藤紀弘（宇都宮大工）

**Synthesis of Fluorescent Probe Labeling the Receptors Responding to N-Acylhomoserine Lactone and Visualization of Bacterial Intercellular Signaling** (School of Engineering, Utsunomiya University) DAIKAI, Yuito; SHINO, Yusuke; NASUNO, Eri; KATO, Norihiro

一部のグラム陰性細菌は、シグナル物質である N-acylhomoserine lactone (AHL) の細胞内濃度が閾値に達すると LuxR family に属する受容体と AHL が安定な複合体を形成し標的遺伝子の発現を活性化させるクオラムセンシング (Quorum Sensing: QS) を細胞間シグナリングの手段として利用している。塩基配列データベースに登録されている 3,000 種以上の細菌ゲノムから同定された LuxR 受容体のうちゲノム内に AHL 合成酵素をペアで持たないものが約 80% を占める。しかし、この単独で機能する LuxR 受容体を介した QS 機構を実験的に解析した報告例はわずかである。そこで、LuxR の新たな機能解析手法として AHL のバイオアフィニティを利用した LuxR の蛍光標識法を着想した。本研究では LuxR 標識用蛍光プローブを合成しモデル細菌の LuxR に対する標識活性を評価した。

一級アミノ基と特異的に反応する 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (O-NBD) をクロモフォアとしてアシル鎖末端に導入し、アシル鎖長が C6~C12 の AHL-NBD プローブ (Fig. 1) をシリーズ合成した。外部添加した短鎖 AHL に応答し紫色色素 Violacein を生産する AHL レポーター株 *Chromobacterium violaceum* CV026 株を用いて AHL-NBD による LuxR 受容体 (CviR) に対する蛍光標識能を評価した。まず、外部添加した C6~C12 AHL-NBD の QS 機構を活性化する能力を評価した (30 °C, 16 h)。培養液に 10% SDS 溶液を加えて攪拌し、そこに水飽和ブタノールを加えて再度激しく攪拌し Violacein を抽出した。抽出液の 585 nm における吸光度 ( $A_{585}$ ) から Violacein 量を決定し菌体密度 ( $OD_{600}$ ) で規格化した。その結果、C10, C12 AHL-NBD は天然の AHL と同様にアンタゴニストとして働き Violacein 生産を誘導しなかったのに対し、C6, C8 AHL-NBD はそれぞれ 50, 1  $\mu$ M 以上で Violacein 生産を誘導した (Fig. 2)。これは、AHL-NBD が細胞内に取り込まれて CviR に分子認識されることを示唆している。

CV026 株に対して *in vitro*, *in vivo* 条件で C6~C12 AHL-NBD を 10  $\mu$ M ずつ添加して室温で 1 h 反応させ、標識試料の蛍光スペクトル ( $\lambda_{ex}$ : 470 nm) を測定した。クロモフォア由来の蛍光 ( $\lambda_{em}$ : 530 nm) が検出され、蛍光標識が示唆された。また、標識タンパク質を SDS-PAGE で泳動してゲルを蛍光撮影すると、いずれの AHL-NBD 添加条件でも蛍光を発するバンドが観察された。特に C12 AHL-NBD は蛍光標識活性が高く、アシル鎖末端の NBD 基が CviR 受容体との複合体形成時に Lys 残基と最近接して新たな共有結合を形成し CviR 受容体を高効率で蛍光標識すると考えられる。CviR 受容体の結晶構造が明らかなることから、AutoDock を用いた 3D ドッキングシミュレーションにより、各アシル鎖長の AHL-NBD と CviR 受容体との結合エネルギーを概算した。

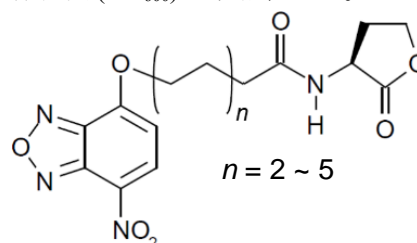


Fig. 1 O-NBD 結合 AHL 蛍光プローブ。

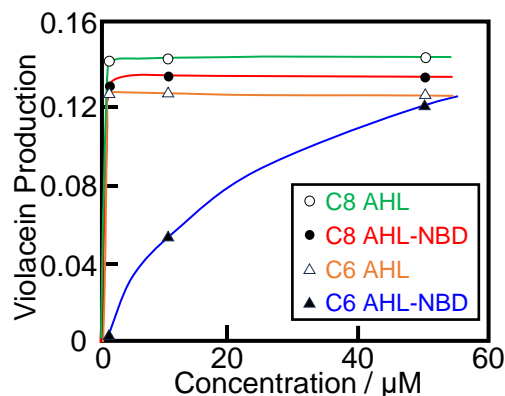


Fig. 2 外部添加した AHL または AHL-NBD による Violacein 生産の誘導試験. Violacein Production:  $A_{585}/OD_{600}$ . (*C. violaceum* CV026, 30 °C, 16 h)