

タンパク質の高速分子育種を基盤技術とする先端バイオ産業の創出

＜受託事業名＞	平成 19～21 年度都市エリア事業 「創薬シーズスクリーニングの高速化に向けた基盤整備に関する研究」
＜委託元＞	文部科学省
＜研究期間＞	平成 19～21 年度
＜研究テーマ名＞	タンパク質の高速分子育種を基盤技術とする先端バイオ産業の創出
＜担当所属／担当者＞	北部研究所 生物学担当／富永達矢、現 産業支援課／仲島日出男
＜概要＞	

1 はじめに

抗菌物質のスクリーニングは、標的細菌の増殖抑制等を指標に莫大な数のシーズから候補物質を選抜する作業である。シーズライブラリーの規模が大きいほど、より有望な抗菌物質候補を得られる可能性が高い。しかし、ライブラリー規模の拡大に伴い、抗菌活性の評価に多大な時間を要していた。

Green Fluorescent Protein(GFP)は、オワンクラゲ(刺胞動物)で初めて発見された緑色蛍光タンパク質である¹⁾。GFP は成熟までの時間が非常に速く、細胞毒性がほとんどないため、細菌増殖のモニターで用いられる。近年、甲殻生物から輝度の高い GFP がクローニングされた²⁾。このような GFP を標的細菌に発現させ、蛍光強度の増減を細菌の増減の指標とすれば、微量な細菌数の増減を捉えられる。そのため、培養に時間を要せず、迅速にシーズの抗菌活性を評価できる。

本研究では、甲殻生物 Copepod 由来の GFP を発現する大腸菌を標的に、抗菌物質の迅速スクリーニング系の構築を試みた。

2 研究内容

2.1. 蛍光強度と吸光度の感度測定

pCop-GreenTM-B を形質転換した大腸菌(以下、蛍光大腸菌)を LB 培地にて 37°C で培養した。培養液を段階的に希釈し、測定限界を蛍光強度測定(励起波長：482nm で蛍光波長：502nm)と吸光度測定(OD₆₀₀)とで比較した。原液～2⁴ 倍希

釈の範囲では、両測定法ともに高い直線性が得られた(図 1)。この希釈度以上になると、吸光度測定では直線性が得られなかったが($R^2 = 0.893$)、蛍光法では、原液を 2⁹ 倍以上に希釈しても、検量線の直線性が維持された($R^2 = 0.996$)。菌数に換算すると、吸光度測定では 6.3×10⁶ cfu 以上で、蛍光強度測定では 6.3×10⁴cfu 以上で検量線の直線性が得られた。この結果から、蛍光強度測定は吸光度測定よりも 400 倍以上感度が高いと考えられた。

2.2. 抗生物質を用いたモデル薬効確認試験

クロラムフェニコール(CP)は、細菌のリボソームに結合してタンパク質の合成を阻害する抗生物質である。薬効を確認できる最小初発菌数および最小測定時間を調べた。10⁶ cfu, 10⁵ cfu, 10⁴ cfu に相当する数の蛍光大腸菌を初発菌数としてアッセイ溶液に加え、21 時間培養した後に溶液を測定すると、CP が一定の濃度以上になると蛍光強度および吸光度が非常に弱くなり、この抗生物質の抗菌効果が確認された。そこで、培養時間を 5 時間に短縮して同様の試験を行った(図 2)。蛍光測定においては、21 時間培養したときと同様の結果が得られたが、吸光度測定では、初発菌数が 10⁴ cfu 相当数のときの抗菌効果の確認は困難であった。以上の結果から、蛍光測定を用いれば、5hr 以内に、10⁴ cfu 相当以下の初発菌数で抗菌活性測定をできることが分かった。

2.3. 細菌培養液を用いたモデルスクリーニング

細菌は培養密度が高くなると、様々な抗菌物質を分泌することが知られる³⁾。大腸菌群(15種)の培養液中の抗菌物質の存在について、蛍光大腸菌を被検菌として調べたが、抗菌活性は検出されなかった。同様に、乳酸菌(15種)の培養液の抗菌活性を調べたところ、全ての種において活性が検出された。代表的な6種について図3に示す。図2と同様、乳酸菌抽出液が一定濃度以上になると蛍光強度が急速に減衰した。抽出液中に何らかの抗菌物質が存在していることを示唆している。

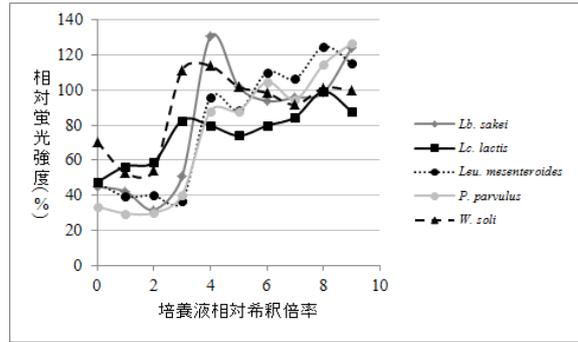


図3 乳酸菌培養液の抗菌活性測定

乳酸菌を MRS 培地にて 4 日間培養し、0.22 μm フィルターを通過した溶液を 2 倍ずつ段階希釈し、蛍光大腸菌の生育を調べた。横軸は乳酸菌培養液の希釈倍率の対数、縦軸は乳酸菌を培養していない MRS 培地を添加したときの大腸菌の蛍光強度を 100 としたときの相対測定値を示す。

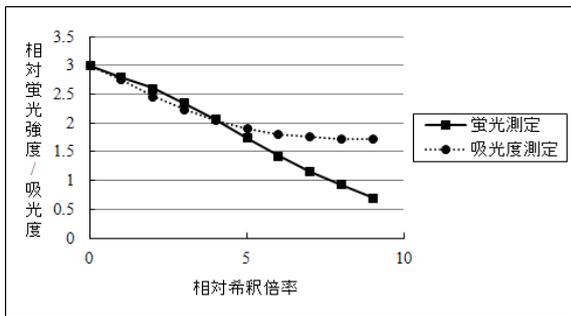


図1 蛍光強度と吸光度の測定

蛍光大腸菌の飽和溶液を 2 倍ずつ段階希釈し、蛍光強度と吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。横軸は原液の希釈倍率の対数、縦軸は測定値の対数を原液の値が 3 となるように補正した値を示す。

3 まとめと展望

被検菌の蛍光強度を指標に抗菌活性を測定すると、従来の 1/4 以下に評価時間が短縮された。本研究では、被検菌として大腸菌を用いたが、標的菌専用開発されたプラスミドを用いて当該菌の形質転換株を得れば、今回のスクリーニング法を様々な菌に対して適用できる。新規多剤耐性菌が出現するなど、これまで知られていなかった細菌が現在、社会では大きな問題となっている。今後、このような細菌に対する新規な抗菌物質の開発が望まれる。

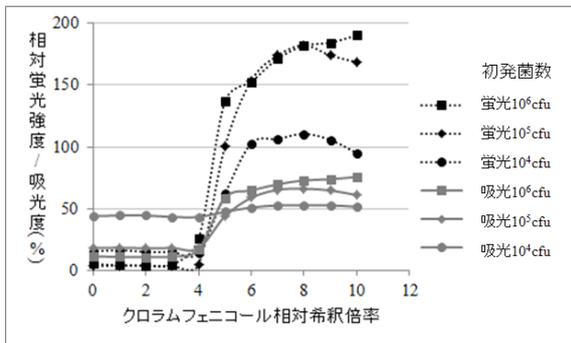


図2 抗生物質の薬効確認試験

横軸は CP を 2 倍ずつ段階希釈した希釈倍率の対数、縦軸は CP 非添加画分の蛍光大腸菌の蛍光強度・吸光度を 100 としたときの相対測定値を示す。

参考文献

- 1) Chudakov, D.M., Lukyanov, S. and Lukyanov, K.A.: Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging., Trends Biotechnol. **23**(2005)605.
- 2) Shagin, D.A. et al.: GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity., Mol. Biol. Evol. **21**(2004)841.
- 3) Gautam, N. and Sharma, N.: Bacteriocin: safest approach to preserve food products., Indian J. Microbiol. **49**(2009)204.