

PNA (Peptide Nucleic Acid) を利用した塩基配列特異的な 微生物生育抑制技術の開発

水圏土壌環境制御研究室 中井一文
指導教官 大橋晶良、原田秀樹、井町寛之

1. はじめに

DNA や RNA などの核酸は Watson-Crick 塩基対合則・Hoogsteen 塩基対合則に従って相補的な配列の核酸と 2 重鎖・3 重鎖を形成する。この核酸の塩基対結合の性質に着目したアンチジーン・アンチセンスと呼ばれるタンパク質合成過程を止める技術が現在注目を集めている。

本研究はアンチジーン・アンチセンス技術を用いて塩基配列特異的に細菌の生育抑制技術を開発することを最終目標に掲げ研究を始めた。本技術が開発されたならば、病原性細菌を特異的に殺傷することができるだけでなく、例えば、環境中のある特定の微生物の生育を抑制することで、地球上における元素循環の流れを解明する手がかりを得ることができるようになるかも知れない。

そこで、私の研究では本技術開発の第一歩として、(1) 既往の研究である Goodらの報告¹⁾に従って Acyl carrier protein をコードする *acpP* mRNA をアンチセンスの標的とした再現実験を行うことで、人工核酸 PNA²⁾ (peptide nucleic acid) が大腸菌 (*Escherichia coli*) に対して本当に生育抑制効果を持つのかどうか確認を行った。続いて、(2) 細菌の生育に極めて重要な箇所である 16S ribosomal RNA の 3' 末端領域である mRNA binding site 領域を標的とした生育抑制実験を行った。最後に、(3) 系統分類学に基づいた細菌の種ごとに生育抑制が可能となるかを調査す

るために 16S ribosomal RNA の EUB338 領域に相補的な PNA を用いた実験を行った。

また、PNA 以外の生育抑制に関する要素を考慮するため、PNA の溶媒に使用したジメチルスルホキシド (DMSO) と PNA に化学修飾している細胞膜透過ペプチド³⁾の影響を調べる予備実験を行った。

2. 実験方法

2.1. 菌株及び培地

使用した菌株 *Escherichia coli* strain K12 (DSM 498) は Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) から購入した。菌株の保存にはグリセロールストックを作成し、通常使用する分は Luria-Bertani (LB) 培地で継代培養を行った。

E.coli の菌数確保のための前培養、実験用の培地には Mueller-Hinton (MH) 培地 (Difco) を使用した。*E.coli* のコロニーカウントには、LB 寒天培地を使用した。

実験ではまず、継代培養を行っている *E.coli* を MH 培地に接種し、37 °C で一晚培養した。この培養により *E.coli* の CFU (Colony Forming Unit) は 5×10^8 CFU/ml 程度となる。

次に、一晚培養した *E.coli* を MH 培地で 1000 倍希釈し、 10^5 ~ 10^6 CFU/ml 程度の菌数となるように調製した。

2.2. PNA

実験に使用した PNA は株式会社グライナー・ジャパンにて委託合成した。この PNA の N 末端 (DNA の 5'末端に相当) には 4 価の正電荷を持つ細胞膜透過ペプチド(KFF)₃K を化学修飾している。

実験に使用した PNA の配列と標的を Table 1 に示す。

Target	5'-PNA sequence-3'
<i>acpP</i> (mRNA)	ctcactactct
mRNA binding site (16S rRNA)	aaggaggtga
EUB338 region (16S rRNA)	ctgcctcccgttaga

2.3. 実験結果の評価

試薬を添加した *E.coli* は 37 °C で振とう培養し、0、3、6、12 そして 24 時間経過時点でコロニーカウントをするためサンプリングをした。DMSO の影響を調べる実験ではコロニーカウントを行うため 50 μ l ずつ、それ以外の実験では 10 μ l ずつ LB 寒天培地 3 枚に適当に希釈したサンプルを接種した。サンプルを接種した LB 寒天培地は 37 °C で培養し、12-20 時間後にコロニーがはっきりと視認できるようになってからコロニーカウントを行った。

3. 実験結果と考察

3.1. DMSO による *E.coli* への影響

本研究で使用する PNA は疎水性が高いと考えられるため、有機溶媒である DMSO 50 % (v/v) に溶かしストックソリューションを作成している。しかし、DMSO 単独で *E.coli* の生育に影響を与え

ることが考えられるため、DMSO 単独での生育抑制効果を調査した。

DMSO による *E.coli* 生育への影響の実験結果を Fig. 1 に示す。DMSO 50 % (v/v) では 3 時間経過時点でコロニーが確認できなくなった。しかし、20 %では 24 時間経っても初期菌数を維持し、10 %では、N.C.に比べると劣るものの、菌数の増加が認められた。DMSO 50 %は殺菌的 (菌を死滅させる) に、20 %や 10 %では静菌的 (菌の増殖を阻止する) に作用した可能性が考えられる。

本研究では PNA を実験に使用する際、DMSO の濃度を 10 %以上にすることはない。従って、10 %の DMSO 濃度で PNA の実験を行って、CFU がオーダーレベルで下がるのならば、PNA 自体に生育抑制の効果があることを確認できる。このことから、以降の実験では特に DMSO の影響を考慮しないで実験を進めた。

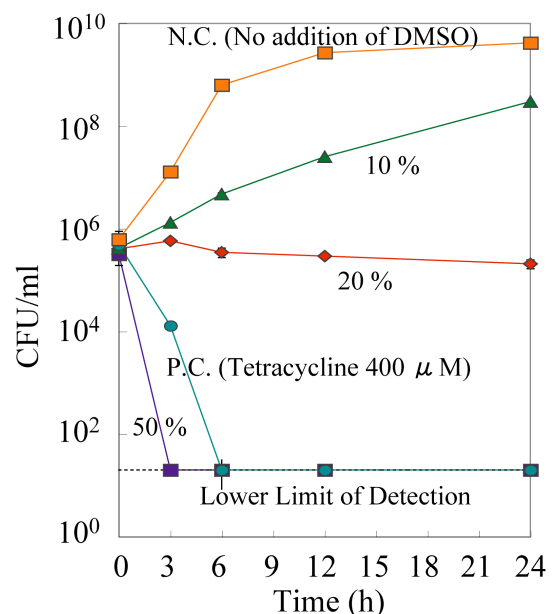


Fig. 1 Inhibition of *E.coli* growth by some DMSO-concentrations (v/v). Dashed line shows lower limit of CFU detection based on inoculum dose of colony counting. Error bars show standard deviation (n=3).

3.2. 細胞膜透過ペプチドによる *E.coli* への影響

本研究で使用する PNA には細胞膜透過ペプチド(KFF)₃K を化学修飾している。このペプチド(KFF)₃K にはこれ単独で *E.coli* の生育を抑制する効果が知られていることから、ペプチド単体での生育抑制効果を調査した。

ペプチド(KFF)₃K による *E.coli* 生育への影響の結果を Fig. 2 に示す。この結果ではペプチドの濃度が 20 μM 以下ならば目立った *E.coli* 生育への影響は確認できなかった。しかし、複数回行った 20 μM の結果の再現性は低く信頼性の高いデータが得られなかった。

本研究ではこのペプチド(KFF)₃K を PNA に化学修飾して実験に使用しており、この PNA を最大 20 μM で用いることがある。従って、ペプチド(KFF)₃K 20 μM に *E.coli* の生育抑制効果があると

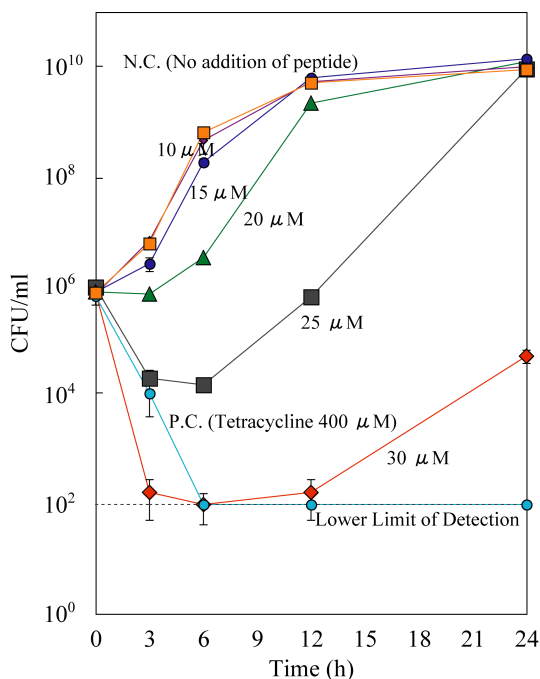


Fig. 2 Inhibition of *E.coli* growth by some peptide concentrations. Dashed line shows lower limit of CFU detection based on inoculum dose of colony counting. Error bars show standard deviation (n=3).

ると、PNA の効果を定量するのが困難になる。このことから、PNA の濃度はなるべく 15 μM 以下にして実験を行うのが望ましいことがわかった。

3.3. *acpP* を標的とした *E.coli* 生育抑制

acpP は Acyl carrier protein をコードする配列であり、このタンパク質が存在しないと脂肪酸が合成できず、*E.coli* は増殖能を失う。本実験では *acpP* mRNA をアンチセンスの標的とすることで *E.coli* の生育を抑制することを目的としている。

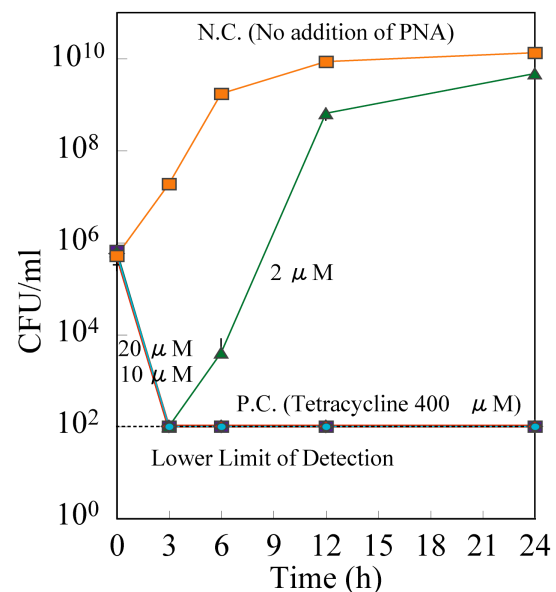


Fig. 3 Inhibition of *E.coli* growth by some PNA concentrations. Dashed line shows lower limit of CFU detection based on inoculum dose of colony counting. Error bars show standard deviation (n=3).

acpP PNA による *E.coli* 生育抑制の実験結果を Fig. 3 に示す。PNA 10 μM と 20 μM では 3 時間経過時点でコロニーが確認できなくなり、その後もコロニーは確認できなかった。PNA 20 μM の結果は、3.2.のペプチド(KFF)₃K の影響があるためアンチセンスによる *E.coli* 生育抑制かどうか判断することが難しい。しかし、Fig. 2 に示したペプチド(KFF)₃K 10 μM のみでの *E.coli* の増殖と、Fig. 3 に示した本実験の PNA 10 μM での *E.coli* 生育抑制とを比

べることにより、*acpP* PNA のアンチセンス効果を確認することができる。

PNA 2 μM では、3 時間経過時点でコロニーは確認できなかったが、その後菌数が増加し始め、24 時間経過すると N.C. とあまり変わらない菌数となった。PNA 2 μM において一旦減少した CFU が増加に転じる原因として以下の仮説が考えられる。

実験開始後数時間はペプチド-PNA の構造が保持されているため PNA が *E.coli* の細胞内によく取り込まれ、PNA のアンチセンス効果が強く現れる。しかしその後タンパク質分解酵素などによってペプチドが分解され、PNA のアンチセンス効果が弱まることにより、増殖能を失っていなかったごく少数の *E.coli* が増殖した。PNA 濃度が高いサンプルではペプチドが分解される前に全ての *E.coli* に PNA がアンチセンス効果を発揮し、増殖能を失ったことにより 24 時間経過後でも CFU の増加が見られなかった。

これはあくまで仮説であり、PNA に化学修飾されたペプチドがどのくらいの速度で分解されるのか検証しなければ、この仮説を立証することはできない。

3.4. mRNA binding site を標的とした *E.coli* 生育抑制

mRNA binding site は 16S rRNA の 3'末端に存在し、タンパク質翻訳の初期段階においてリボソームと mRNA が結合するのを補助する領域である。

この領域を標的とした実験は現在継続中である。現段階で確認できている結果では、mRNA binding site PNA 10 μM と 5 μM には *E.coli* の生育抑制効果があるようであるが、3.3. で述べたような菌数が増加する現象が見られた。

3.5. EUB338 領域を標的とした *E.coli* 生育抑制

EUB338 領域は 16S rRNA 中に存在し、細菌でよく保存されている領域である。

この領域を標的とした実験は現在継続中である。この領域を標的とした *E.coli* の生育抑制効果は現段階では確認できていないが、PNA に化学修飾されたペプチド(KFF)₃K は *E.coli* の生育抑制効果が低下することを示唆する結果が得られている。

4. まとめ

PNA を利用した塩基配列特異的な微生物生育抑制技術の開発の第一歩となる本研究により、生育抑制効果を確認するための必須検証項目である DMSO と細胞膜透過ペプチドが *E.coli* の生育に与える影響を定量化することができた。また、既往の研究に従って *acpP* を標的とした *E.coli* の生育抑制を行うことができた。最後に 16S ribosomal RNA を標的として *E.coli* の生育抑制を行える可能性が強く示唆された。

参考文献

1. Good, L., S. K. Awasthi, et al. (2001). "Bactericidal antisense effects of peptide-PNA conjugates." Nat. Biotechnol **19**(4): 360-4.
2. Nielsen, P. E., M. Egholm, et al. (1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide." Science **254**(5037): 1497-500.
3. Vaara, M. and M. Porro (1996). "Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria." Antimicrob Agents Chemother **40**(8): 1801-5.