Chemical Glycobiology in Bacterial Surface Modification

バクテリアのケミカルグライコバイオロジー

Morisaki, Chizu¹; Uemura, Yusuke²; and Sadamoto, Reiko³

¹Graduate School of Humanities and Sciences, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112–8610, Japan

²Ochadai Academic Production, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112–8610

³Glycoscience Institute, Ochanomizu University, Bunkyo-ku, Tokyo 112–8610, Japan

FAX: 81–3–5978–5344 e-mail: sadamoto.reiko@ocha.ac.jp

(Received on October 22, 2012, accepted on December 7, 2012)

Key Words: chemical glycobiology, metabolic glycan labeling, bacteria cell surface engineering, genetic methods, imaging

Abstract

Recently, imaging of glycans on the cell surface has attracted much attention. There has been a good deal of research on glycan labeling for mammalian cells *in vitro* and also for some vertebrates (mice and zebrafish) *in vivo*, but little on bacterial cells. In this mini review, recent examples of chemical glycobiology, including various modification methods of bacterial surface carbohydrates which can be divided into genetic modification and non-genetic modification (metabolic labeling), are described.

要 約

近年、細胞表面の糖鎖を可視化する研究が盛んに行われている。しかし、その多くの研究対象は主に動物細胞とマウスやゼブラフィッシュなどの脊椎動物であり、バクテリアを対象にしたものは比較的少ない。そこで、このミニレビューでは、バクテリアのケミカルグライコバイオロジーとして、バクテリア表面糖鎖のさまざまな修飾法について、遺伝子組換えを利用するものと遺伝子組換えを用いないメタボリックラベリングに分けて紹介する。

A. Introduction

Recently, imaging of glycans on the cell surface has attracted much attention, particularly metabolic glycan labeling using cell biosynthesis pathways. The metabolic glycan labeling method is based on the metabolization of azide- or alkyne-containing non-natural carbohydrates instead of natural carbohydrates, and the subsequent marking of the azides or alkynes on the cell surface with labeling compounds such as fluorophores. There has been a good deal of research on metabolic glycan labeling for mammalian cells *in vitro* and also for some vertebrates (mice and zebrafish) *in vivo* (1–3), but little on bacterial cells. In this minireview, we describe the current situation regarding bacterial cell surface glycan engineering, including our recent research.

B. Surface Structure of Bacteria

In this section, we explain the major structures of carbohydrates observed in the bacterial surface (Fig. 1)(4). Bacteria are divided into two types according to their surface structures: Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria, such as lactic acid bacteria, have thick peptidoglycan (cell wall) layers. The peptidoglycan consists of polysaccharides made up of GlcNAc- β (1→4)MurNAc repeating units and short peptide chains cross-linking these polysaccharides. Gram-negative bacteria, on the other hand, have thin peptidoglycan layers and an outer membrane.

The outer membrane is an asymmetric bilayer consisting of

A. はじめに

近年、細胞表面の糖鎖を可視化する研究が盛んに行われており、特に、細胞が持つ生合成経路を利用した糖鎖修飾 (metabolic glycan labeling) が注目を集めている。これは、糖鎖の生合成経路に組み込まれる糖誘導体に足場となる官能基 (例えば、アジド、アルキン) を持たせ、これを利用して細胞表面を蛍光などで標識する方法である。動物細胞や脊椎動物 (魚類やマウスなど) をその研究対象にした例 (1–3) は数多いが、バクテリアの表層に存在する糖鎖を利用した研究例はまだ少ない。そこで、このミニレビューではバクテリアの表面糖鎖修飾について、われわれがこれまで得てきた知見とともに概説する。

B. バクテリアの表面構造

ここで、バクテリアの表面を構成する主な糖化合物について簡単に触れておく (4) (Fig. 1)。バクテリアはその表面構造から2種類に大別されることが知られている。一方は乳酸菌やブドウ球菌に代表されるグラム陽性菌で、厚いペプチドグリカン層を持つ。ペプチドグリカンは、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と *N*-アセチルムラミン酸 (MurNAc) が β 1→4 結合した2糖単位の繰り返し構造の糖鎖と、その糖鎖同士を架橋している短鎖ペプチドからなっている。もう一方は大腸菌に代表されるグラム陰性菌で、ペプチドグリカン層が薄く、その外側に外膜がある。

Fig. 1. The surface structure of bacteria. (Upper) Gram-positive bacterial surface. (Lower) Gram-negative bacterial surface

inner leaflet (phospholipid) and outer leaflet (lipopolysaccharide, LPS), which is a characteristic component of Gram-negative bacteria. LPS, also called endotoxin, have various biological activity including induction of fever and the dilation of blood vessels when it enters the blood stream of animals by bacteriolysis, occasionally resulting in a precipitous drop in the blood pressure. The main structures of LPS (from inside to outside) are lipid A, core polysaccharide, and O-antigen polysaccharide. Lipid A has a carbohydrate unit, consisting of two glucosamine, to which some long fatty acid chains are attached. The core polysaccharide, connected to the glucosamine units, contains carbohydrates peculiar to Gram-negative bacteria, such as 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid (Kdo). The O-antigen polysaccharide consists of oligo-saccharide repeating units that vary according to bacterial strains, and which is often

外膜は、外側のリン脂質と内側のリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) から構成される非対称の二重膜である。このLPSはグラム陰性菌に特徴的な成分で、エンドトキシン（細胞内毒素）とも呼ばれ多くの生物活性を持ち、例えばヒトなど動物の血液中に混入すると、発熱を誘導したり血管を拡張させて急激な血圧低下をもたらすことがある。LPSの構造は、内側から順にリポドA、コア多糖、O抗原多糖からなっている。リポドAはグルコサミン2個が結合した2糖に長い脂肪酸側鎖が複数結合した糖脂質である。このグルコサミン部位に結合しているコア多糖には、3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid (Kdo) などグラム陰性菌に特徴的な糖が含まれる。コア領域の外側に結合しているO抗原多糖は、菌株によってその種類や配列が異なる繰り返し構造をもっており、

Fig. 2. The structure of 2-acetamido-4-azidoacetamido-2,4,6-trideoxy-L-altrose (6-deoxy-AltNAc4NAz).

used to identify the bacterial strain.

Flagella, observed in various kinds of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, are known to be related to motility. Many sites in the flagellin protein, the main component of flagella, are glycosylated. Flagellin antigens (H antigens) are also used in the identification of Gram-negative bacteria strains: *Escherichia coli* O157 : H7 are pathogenic but *E. coli* O157 : H1 are generally non-pathogenic.

Other important carbohydrate compounds in the bacterial surface include teichoic acids and capsule polysaccharides.

C. Bacterial Cell Surface Engineering Using Genetic Methods

In this section, we provide a brief description of the modification of bacterial cell-surface carbohydrates using genetic engineering. Protein expression on the bacterial cell surface by genetic engineering is a popular technique, but there have been some recent reports on the display of reactive groups, such as an azide group, which can be used for further chemical labeling. Tirrell *et al.* succeeded in introducing non-natural amino acids, such as azidoalanine and azidohomoalanine, into outer membrane protein C (OmpC) of *E. coli* in place of methionine (Met) (5, 6). There are only three Met residues in *E. coli* OmpC, and only one of them is exposed to the outside of the protein. Therefore, they added six Met residues, exposed to the outside, to OmpC by site-directed mutagenesis in order to increase the number of available functional sites. The *E. coli* was then cultured in a medium containing one of the methionine analogs (azidohomoalanine *etc.*) in place of Met. The cultured bacterial surface was labeled *via* copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition and analysed by flow cytometry.

Tanner *et al.* focused on pseudaminic acid (Pse) found on glycan of flagellin protein in *Campylobacter jejuni*, a common bacteria associated with food poisoning (7). Pse is a nine-carbon carbohydrate related to sialic acid and bacteria cannot make flagella, thereby losing their motility, when Pse is not available. As an azido-functional precursor of Pse, they prepared 2-acetamido-4-azidoacetamido-2,4,6-trideoxy-L-altrose (6-deoxy-AltNAc4NAz, Fig. 2) *via* a chemoenzymatic approach, and added it to the culture medium for the genetically modified *C. jejuni* lacking the biosynthetic pathway for Pse. The cultured *C. jejuni* maintained motility due to the incorporation of the artificial Az-Pse into the flagella.

菌株の同定において一つの指標として用いられる。

鞭毛 (flagella) は、グラム陽性・陰性による表面構造の違いとは直接関わりなく、さまざまな細菌に見られるもので、運動性に関わっていることが多い。フラジェリンと呼ばれるタンパク質から構成されており、その多くのサイトがグリコシル化されている。グラム陰性菌株同定には、O抗原に加えて鞭毛抗原 (H抗原) も用いられることがある。例えば、食中毒の原因菌の一つである大腸菌に O157 : H7 があるが、大腸菌 O157 : H1 株は毒性を持たない。

その他の糖化合物として、タイコ酸 (Teichoic acid) や夾膜多糖 (capsule layer) が細胞表面に多く見られる。

C. 遺伝子組換えを用いたバクテリア表面修飾法

バクテリア表面修飾の方法として、遺伝子組換えを用いる手法を紹介する。遺伝子組換えを用いてバクテリア表面に特定のタンパク質を発現させる手法はよく使われているが、タンパク質を提示させるのではなく、アジド基などラベリングに応用可能な反応性部位をバクテリアの表面に提示させる手法もいくつか報告されている。

Tirrell らは、大腸菌の外膜に存在するタンパク質 outer membrane protein C (OmpC) にアジド基を持つ非天然アミノ酸 (アジドアラニン, アジドホモアラニンなど) をメチオニンの代わりに組み込むことに成功した (5, 6)。大腸菌の OmpC には本来3カ所のメチオニン部位があるが、そのうち外側を向いているのは1カ所だけである。そこで、外側に向けた部位を新たに6カ所遺伝子組換えにより導入した。その大腸菌を、メチオニンを含まず代わりにアジドホモアラニンなどのメチオニン誘導体を含む培地で増殖させた。培養した大腸菌表面のアジド基を copper(I)-catalyzed [3+2] 環化付加反応を用いてラベリングし、フローサイトメトリーなどで検出・評価した。

Tanner らは食中毒の原因菌として知られる *Campylobacter jejuni* の鞭毛糖鎖にあるシュードアミン酸 (pseudaminic acid, Pse) に注目した (7)。Pse はシアル酸と関係の深い9炭糖で、これがないと *C. jejuni* は鞭毛を形成することができず、運動性を失う。Pse のアジド化した前駆体として、2-acetamido-4-azidoacetamido-2,4,6-trideoxy-L-altrose (6-deoxy-AltNAc4NAz, Fig. 2) を酵素反応と化学合成により合成し、遺伝子組換えで Pse 合成経路を欠いた *C. jejuni* 株の培地に添加して培養した。培養した *C. jejuni* には運動性がみられ、アジド化された Pse によって鞭毛が形成されたことがわかった。また、導入されたアジド基がラベル化に使える状態で提

Fig. 3. Strategy for the generation of the modified O-antigen polysaccharide of *E. coli* O86. (a) A graphic representation of O-antigen polysaccharide modification using the genetic method. (b) Schema of the biosynthesis pathways for GDP-fucose: *de novo* pathway and salvage pathway.

They then confirmed the reactivity of the displayed azide group by labeling with biotin-conjugated Staudinger reagent.

Wang *et al.* used a fucose (Fuc) moiety in the O-antigen polysaccharide of *E. coli* O86 (8) (Fig. 3). There are two pathways for the biosynthesis for GDP-Fuc: the *de novo* pathway, which starts from GDP-mannose, and the salvage pathway, which starts from the phosphorylation of Fuc and the subsequent formation of GDP-Fuc. The *de novo* pathway is observed in both prokaryotes and eukaryotes, whereas the salvage pathway was thought to be present in eukaryotes only. However, Comstock *et al.* (9) found the salvage pathway in human symbionts *Bacterioides*. Therefore, Wang *et al.* used genetically modified *E. coli* O86 that did not have the original *de novo* pathway but possessed the salvage pathway in order to allow the incorporation of a C-6 azido fucose derivative (6-N₃-Fuc) into the repeating unit of O antigen.

D. Bacterial Cell Surface Engineering Without Using Genetic Methods

In this section, we introduce some methods of the bacterial surface modification that do not rely on genetic recombination techniques. These methods are based on the metabolism of artificial compounds *via* biosynthetic pathway for cell surface

示されていることを、biotin 結合した Staudinger 試薬によるラベリングで確認した。

Wang らは大腸菌 O86 の O 抗原糖鎖にあるフコース (Fuc) を利用した (8) (Fig. 3a)。GDP-Fuc の生合成経路には GDP-マンノースから出発する *de novo* pathway と Fuc がリン酸化された後に GDP-Fuc になる salvage pathway の 2 つが示されている (Fig. 3b)。*de novo* pathway は原核生物、真核生物ともに持っているが、salvage pathway は真核生物しか持っていないと考えられてきた。しかし、2005 年に Comstock らにより (9)、ヒトの常在菌である *Bacterioides* が salvage pathway を持っていることが発見された。そこで彼らは、遺伝子組換えで大腸菌 O86 の *de novo* pathway をなくして salvage pathway を持たせた株に、C-6 位をアジド化したフコース誘導体 (6-N₃-Fuc) が生合成経路によって O 抗原リピート構造に組み込まれるようにした。

D. 遺伝子組換えを使用しないバクテリア表面修飾法

本項では、遺伝子組換え技術を使用することなく、バクテリア表面糖鎖を修飾した例について紹介する。この手法の多くは、バクテリアの表面が作られるときの生合成経路を利用して、人工的に用意した化合物を取り込ませることを基本としている (メタボリックラベリング)。その化合物の設計

Fig. 4. Strategy for peptidoglycan modification. (a) A graphic representation of peptidoglycan modification using the chemical method. (b) Schema of GlcNAc derivatives.

materials (metabolic labeling). We can select a range of target bacteria depending on the compounds used as a precursor derivative in the metabolic labeling. This is one of the advantages compared to genetic approaches, in which we need to adapt each strain to be engineered. Therefore, metabolic labeling methods are expected to be a powerful tool for visualizing and identifying certain bacterial strains among many bacterial strains in a sample. Here we describe these modification methods targeting peptidoglycan and LPS.

D-1. Metabolic Labeling Targeting Peptidoglycan

Next, we explain the chemical modification of the bacterial cell surface targeting peptidoglycan. We reported our first peptidoglycan labeling methods in 2002 (10) (Fig. 4). As mentioned above in section B, most bacteria possess peptidoglycan, the structure of which is common except for a few residues in the oligopeptide, which cross-links the polysaccharide chains. Therefore, a surface engineering method targeting peptidoglycan can be applicable to almost all bacteria. The biosynthesis pathway of peptidoglycan is shown in Scheme 1. In the biosynthesis, UDP-GlcNAc is converted to UDP-MurNAc, and then an oligopeptide (often a penta-

によって対象となる細菌株の種類を選ぶことができるので、それぞれの菌株ごとに作業しなければいけない遺伝子組換え手法とは異なった特長を持っている。特に、多くの細菌のなかから特定の細菌を可視化して同定するなどイメージングへの期待が大きい。ここでは、われわれが研究してきたペプチドグリカンターゲットにした手法と、最近報告されたLPSを標的とした修飾法について順に紹介する。

D-1. ペプチドグリカンターゲットにしたメタボリックラベリング

本項ではペプチドグリカンターゲットにした化学的表面修飾法について紹介する。ペプチドグリカンを修飾の標的にする手法は、2002年に開発された(10) (Fig. 4)。B項で述べたように、ほとんどすべてのバクテリアはペプチドグリカンをもっている。その構造は、糖鎖を架橋しているオリゴペプチド部分の構造はバクテリアによって部分的にやや違うこともあるが、主鎖の糖鎖構造は共通である。したがって、ペプチドグリカンターゲットにする表面修飾法であれば、ほとんどすべてのバクテリアへの応用が期待できる。ペプチド

peptide) moiety is formed from the carboxyl group of the UDP-MurNAc (Scheme 1).

First, we focused on UDP-MurNAc pentapeptide in the peptidoglycan biosynthesis pathway. The third residue in the pentapeptide moiety, lysine for example, has an additional amino group; therefore, we used the amino group for the introduction of a fluorophore (UDP-MurNAc pentapeptide derivative, **1**). Next, four strains of bacteria (*Lactobacillus plantarum* JCM1149, *L. salivarius* JCM1044, *L. fermentum* no. 20, and *E. coli* C600) were cultured in a broth containing **1**, and the peptidoglycan fractions from the culture were purified. All three strains of tested lactobacillus showed increased fluorescent intensity. In the case of the *E. coli* C600, fluorescence was observed only after additional treatment to increase the cell membrane permeability before incubation. *E. coli*, a typical Gram-negative bacterium with an outer membrane outside the peptidoglycan layer, may require permeabilization treatment in order to incorporate compound **1** within the cells. Observa-

グリカンの生合成経路 (Scheme 1) では、UDP-GlcNAc から、UDP-MurNAc を経てこのムラミン酸のカルボン酸部位にアミノ酸が (5 残基のことが多い) が結合していき、UDP-*N*-アセチルムラミルペンタペプチド (UDP-MurNAc-pentapeptide) となることが知られている。

ペプチドグリカンの生合成経路に見られる中間体の中で、われわれは初めにこの UDP-MurNAc-pentapeptide に着目した。ペンタペプチド中の 3 番目の残基はリジンの場合が多いので、このアミノ基にまず蛍光剤を導入した誘導体を合成した (**1**)。4 種類のバクテリア (*Lactobacillus plantarum* JCM1149, *L. salivarius* JCM1044, and *L. fermentum* no. 20 と大腸菌 C600) を UDP-MurNAc-pentapeptide 誘導体を含む培地で培養し、溶菌後、ペプチドグリカン画分を精製しその蛍光強度を測定したところ、3 種の乳酸菌では蛍光強度の増大が見られた。大腸菌 C600 株の場合は、培養前に外膜の透過性を上げる処理をした場合だけ蛍光強度が増大した。大腸菌はグラム陰性菌で、ペプチドグリカンの外側に外膜があるので、

tion with a fluorescence microscopy showed fluorescence from the bacterial cells. After similar incubation using a ketone-functionalized derivative (2), instead of 1, the surface-displayed ketone moiety was detected *via* the coupling of a hydrazide-containing fluorophore. The observed fluorescence shows that the ketone moiety preserves its reactivity on the surface of the bacteria. According to this method, various molecules can be displayed on the surface of live bacteria using an appropriate linker that has a group reactive to the ketone moiety, such as hydrazide. For example, lactic acid bacteria displaying a ketone moiety were coated with a mannopentaose derivative containing an aminooxy group and showed stronger adhesion to a Con A (mannose-binding protein)-immobilized surface compared to the same strain without the displayed ketone group (11). Next, 4-fluorinated UDP-MurNAc pentapeptide derivative (3) was used as an inhibitor of peptidoglycan biosynthesis that works only when it was incorporated into the peptidoglycan. The fluorinated derivative 3 cannot proceed to the next step in the peptidoglycan synthesis, therefore, it should have a negative effect on bacterial growth. The growth of bacteria cultured in a media containing 3 was slower than the control without 3. This suggested that the UDP-MurNAc pentapeptide derivative could act as a peptidoglycan biosynthesis substrate (12–14).

As the UDP-MurNAc pentapeptide derivative needs multi-step synthesis, the large-scale application of this method is difficult. To overcome these problems, we next focused on GlcNAc-1-phosphate, which is a simple intermediate in the earlier steps of the peptidoglycan biosynthesis pathway. GlcNAc-1-phosphate can be an intermediate of both the MurNAc pentapeptide and GlcNAc component of peptidoglycan. In the peptidoglycan biosynthesis pathway, GlcNAc-1-phosphate is formed from glucosamine-1-phosphate. Therefore, we chose GlcNAc-1-phosphate, and not GlcNAc, as the platform precursor for the introduction of ketone groups into the peptidoglycan. A GlcNAc-1-phosphate derivative (compound 4), in which a ketone group was introduced instead of the *N*-acetyl group of GlcNAc. Lactic acid bacteria (*L. plantarum* JCM1149) were incubated in a *lactobacilli* MRS broth containing 4. To detect the ketone moiety on the bacterial cell surface, collected bacteria were labeled with a biotin-PEO-hydrazide and streptavidin-Alexa Fluor conjugate, and analyzed using flow cytometry. The flow cytometric analysis showed an increase in fluorescence intensity, indicating that the bacteria displayed the ketone moiety on the cell surface (15). When GlcNAc derivative, 5, having no phosphate group, was used, no increase in fluorescence intensity was observed, suggesting that 4 was incorporated *via* the biosynthetic pathway.

For *in vivo* applications, it is important that the bacterial surface modification method does not affect mammalian cell cultur-

膜の透過性を高める処理が必要になったと思われる。また、この蛍光ラベルしたバクテリアを蛍光顕微鏡で観察したところ、菌体からの蛍光が観察できた。次に、蛍光剤の代わりにケトン基を導入した誘導体(2)を用いて同様に培養後、提示されたケトン基を検出するためにヒドラジド基をもつ蛍光剤と反応させた。この場合も蛍光が検出され、ケトン基が利用可能な状態でバクテリア表面に提示されていることが確かめられた。本手法により、ケトン基と反応しやすいヒドラジド基などを持つリンカーを利用してさまざまな分子を提示させることができるようになった。例えば、乳酸菌表面に、オキシシラミノ基を導入したマンノペンタオース誘導体を結合させることで、菌体のコンカナバリリンAを固定した基盤への接着性を上げることができた(11)。次に、ペプチドグリカン生合成経路に入ると生合成を阻害する誘導体として、4位のヒドロキシ基をフッ素に置換した誘導体(3)を合成した。4位にフッ素を置換した誘導体が生合成経路にのった場合、ペプチドグリカン合成が途中で止まり、乳酸菌の増殖に影響を与えることが予想された。フッ素化パーヌクレオチドを乳酸菌の培地に添加して培養すると、添加しないで培養した乳酸菌に比べて増殖率が低下した。したがって、合成した誘導体はペプチドグリカン生合成経路にのったことが推測された(12–14)。

この手法に用いる UDP-MurNAc-pentapeptide 誘導体は合成ステップが複雑であるため、大量合成が難しかった。そのため、より簡単に合成できるペプチドグリカン前駆体候補として、ペプチドグリカンの生合成経路のより上流にある *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸に着目した。GlcNAc-1-リン酸はムラミン酸部位とグルコサミン部位の両方に使われうるため、より効率的な前駆体となりうる。また、バクテリアでは GlcNAc-1-リン酸はグルコサミン-1-リン酸から生合成されることが知られており、1位リン酸化後に2位アミノ基がアセチル化される。したがって、ケトン基を導入する手段として *N*-アセチルの部位を利用する場合、1位がリン酸化された形で生合成経路にのせる必要がある。よって、グルコサミンの2位にレブリン酸を導入してケトン基を持たせた GlcNAc-1-リン酸誘導体(4)を合成し、乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum* JCM1149) の培地に添加して培養した。表面に提示されたケトン基を検出するために、ビオチンヒドラジド、ストレプトアビジン-Alexa複合体でラベルし、フローサイトメーターで菌体一つあたりの蛍光強度を検出したところ、ケトン基の提示を観察することができた(15)。1位がリン酸化されていない GlcNAc 誘導体(5)を用いた場合は蛍光強度は増加しなかったことから、この生合成経路を利用していることが推測される。

次に、*in vivo* への応用のためには、この誘導体を使ったバクテリア表面修飾が、動物細胞に影響をあたえないことが重要である。動物細胞 (Jurkat細胞、Caco-2細胞) の培養系にこの誘導体を加えて、染色・フローサイトメーター測定を行ったところ、蛍光強度の増大はみられなかった。また、使用した濃度では細胞の増殖に影響は見られなかった。以上より、GlcNAc-1-リン酸誘導体はバクテリアのみに作用し、動

Fig. 5. Strategy for Kdo modification

ing. Mammalian cells (Jurkat and Caco-2) were incubated in a culture medium containing **4** and then analyzed using flow cytometry. Fluorescence was not observed for either cells. Both cells grew normally in the presence of **4** at the tested concentrations. These results indicate that **4** has an orthogonal property and is incorporated into bacteria but not mammalian cells (16). We are currently considering the *in vivo* application of this method.

Independent of the method described above, Spiegel *et al.* reported in 2010 that peptidoglycan can be labeled with compounds having a specific amino acid sequence (LPXTG), which are recognized by sortase (17).

D-2. Metabolic Labeling Targeting LPS

Gram-negative bacterial cell surface modification using Kdo derivatives has been reported (18) by Vauzeilles *et al.* (Fig. 5). The biosynthetic pathway of Kdo starts from the condensation of arabinose-5-phosphate with phosphoenolpyruvate. Kdo is then formed from the resulting Kdo-8-phosphate and becomes activated (CMP-Kdo) prior to incorporation into the core oligosaccharide of LPS. Vauzeilles *et al.* synthesized a Kdo derivative having an azide group at the C8 position, and used it for the surface modification of bacteria. Bacteria were incubated in a medium containing the Kdo derivative, and an alkyne fluorescence dye was used to label the azido moiety displayed on the surface of the bacteria for the detection with flow cytometry and microscopic observation. Among the tested bacteria, only Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, showed strong fluorescence. This method can be used for the selective labeling of bacteria that have a Kdo moiety.

E. Conclusion

As part of our discussion of the chemical glycobiology of bacteria, we introduced various methods for the engineering of carbohydrates observed on the bacterial surface. The surface engineering methods are divided in two types: those with or without genetic modification. In the latter method, called metabolic labeling, bacteria can be selected according to the target structure on the bacterial surface, and various labeling compounds are available for the detection or even functionalization of the modified surface. Therefore, wide applications, including *in vivo* labeling techniques, are expected.

物細胞には影響を及ぼさないオルソゴナル性を示すことがわかった(16)。現在、この手法の *in vivo* への応用を検討している。

われわれのこの手法とは別に、ペプチドグリカンターゲットにした手法として、2010年に Spiegel らは、sortase 酵素を使用したラベリング手法を報告している(17)。この酵素は、LPXTG 配列を特異的に認識し、この中のスレオニン(T)残基とグリシン(G)残基の結合を切断し、スレオニン(T)残基と Lipid II のペンタグリシン架橋部のN末端部分を結合させる働きをする。彼らは、この酵素によって認識される特異的配列(LPXTG)を持たせた分子をペプチドグリカンに結合させるラベリング手法を実現した。

D-2. LPSをターゲットにしたメタボリックラベリング

グラム陰性菌全体を化学修飾できるような例として、2012年に Vauzeilles らにより報告された(18)、Kdo 誘導体を用いて大腸菌のLPSを修飾する手法を解説する(Fig. 5)。Kdoは次のようにLPSに取り込まれる。まず、アラビノース-5-リン酸がホスホエノールピルビン酸と縮合しKdo-8-リン酸となり、その後、遊離のKdoを経てCMP-Kdoとして活性化されてLPSに組み込まれる。彼らは、Kdoの8位をアジドで修飾した化合物(以下、Kdo 誘導体)を合成し表面修飾に用いた。このKdo 誘導体を加えた培地でさまざまな細菌を培養し、それぞれの表面のアジド基をアルキンを持った蛍光剤を用いて蛍光ラベルして、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡観察により解析した。その結果、大腸菌などのグラム陰性菌だけに強い蛍光が観測されることがわかった。この方法により、Kdoを持つバクテリアだけをラベリングすることができる。

E. おわりに

このミニレビューでは、バクテリアを対象にしたケミカルグライコバイオロジーとして、さまざまな表面糖鎖修飾法を紹介した。バクテリア表面修飾法には、遺伝子組換えを利用した方法と利用しない方法がある。後者は特にメタボリックラベリングとも呼ばれ、バクテリア表層構造のどの部位を標識化のターゲットにして標識化される細菌群を選ぶか、どのような化合物で修飾し効率的なラベル化や機能化を目指すかなど、*in vivo* への応用も含めてこれからの研究の発展が期待される。

References

1. Prescher, J. A., Dube, D. H., and Bertozzi, C. R. (2004) *Nature*. **430**, 873–877.
2. Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L., and Bertozzi, C. R. (2008) *Science*. **320**, 664–667.
3. Baskin, J. M., Dehnert, K. W., Laughlin, S. T., Amacher, S. L., and Bertozzi, C. R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10360–10365.
4. Black, J. G., and Lewis, L. M. (2005) *Microbiology: principles and explorations*, 6th ed., John Wiley, Hoboken, N.J.
5. Link, A. J., and Tirrell, D. A. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 11164–11165.
6. Link, A. J., Vink, M. K., and Tirrell, D. A. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10598–10602.
7. Liu, F., Aubry, A. J., Schoenhofen, I. C., Logan, S. M., and Tanner, M. E. (2009) *ChemBioChem*. **10**, 1317–1320.
8. Yi, W., Liu, X., Li, Y., Li, J., Xia, C., Zhou, G., Zhang, W., Zhao, W., Chen, X., and Wang, P. G. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 4207–4212.
9. Coyne, M. J., Reinap, B., Lee, M. M., and Comstock, L. E. (2005) *Science*. **307**, 1778–1781.
10. Sadamoto, R., Niikura, K., Sears, P. S., Liu, H., Wong, C.-H., Suksomcheep, A., Tomita, F., Monde, K., and Nishimura, S.-I. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9018–9019.
11. Sadamoto, R., Niikura, K., Ueda, T., Monde, K., Fukuhara, N., and Nishimura, S.-I. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 3755–3761.
12. Sadamoto, R., Niikura, K., Monde, K., and Nishimura, S.-I. (2003) *Methods Enzymol.* **362**, 273–286.
13. Ueda, T., Feng, F., Sadamoto, R., Niikura, K., Monde, K., and Nishimura, S.-I. (2004) *Org. Lett.* **6**, 1753–1756.
14. Sadamoto, R. (2005) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **17**, 97–105.
15. Sadamoto, R., Matsubayashi, T., Shimizu, M., Ueda, T., Koshida, S., Koda, T., and Nishimura, S.-I. (2008) *Chemistry*. **14**, 10192–10195.
16. Morisaki, C., Sato, Y., Oohori, M., Tsuru, R., Sekimata, K., and Sadamoto, R. (2010) *Pacificchem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, Honolulu, HI, United States, HEALTH-291.
17. Nelson, J. W., Chameessian, A. G., McEnaney, P. J., Murelli, R. P., Kazmierczak, B. I., and Spiegel, D. A. (2010) *ACS Chem. Biol.* **5**, 1147–1155.
18. Dumont, A., Malleron, A., Awwad, M., Dukan, S., and Vauzeilles, B. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 3143–3146.

Profile of the Authors

Chizu Morisaki is a student of Ochanomizu University Graduate School of Humanities and Sciences. She graduated from the Department of Chemistry and Biochemistry, the Division of Advanced Science, the Ochanomizu University, and received her M.S. degree in 2011.

Yusuke Uemura is Project Research Fellow of Ochadai Academic Production at Ochanomizu University. He received his Ph.D. degree in 2008 from the United Graduate School of Agricultural Science, Iwate University (supervisor: Prof. Tadasu Urashima of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine). From 2008 to 2009, he joined the laboratory of Dr. Takashi Terabayashi as postdoctoral fellow at Kitasato University and BRAIN (Bio-oriented Technology Research Advancement Institution). After belonged to the current affiliation, he joined Dr. Reiko Sadamoto's Lab for two years and then works at the institute of a domestic milk industry as an internship-program researcher. His current research is understanding host-microbial flora, especially probiotics, relationship focused on their carbohydrate information.

Reiko Sadamoto was born in Tokyo in 1967. She graduated from the University of Tokyo in 1992, and obtained her Ph.D. from the same university in 1998. After postdoctoral researches at the University of Texas at Austin and at The Scripps Research Institute, she began her research with Prof. Shin-Ichiro Nishimura at Hokkaido University in 2000. Since 2003 to 2007, she was Associate Professor at the Shionogi Laboratory of Biomolecular Chemistry, Hokkaido University. In 2008, she moved to Ochadai Academic Production, Ochanomizu University, as an assistant professor. Since 2012, she has been an assistant researcher at Glycoscience Institute, Ochanomizu University.