

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08837

研究課題名(和文) 薬剤耐性菌や病原菌の蔓延の抑制：トキシン - アンチトキシン系を利用して

研究課題名(英文) Repression of the spread of antimicrobial resistant bacteria and pathogenic bacteria using the bacterial toxin-antitoxin system

研究代表者

大塚 裕一 (Otsuka, Yuichi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10548861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌のトキシン - アンチトキシン系(TA)は、ストレスを乗り越える戦略の一つとして自身の増殖を制御するしくみである。本研究では、まず腸管出血性大腸菌0157株がもつTAのZor0トキシンの作用機序を明らかにした。次に、Zor0の毒性に必要な5アミノ酸(Ala-Leu-Leu-Arg-Leu; ALLRL)が黄色ブドウ球菌(MRSAを含む)や枯草菌、カンジダ属の菌の細胞膜に作用して増殖を阻害することを明らかにした。一方、哺乳類細胞に対しては細胞毒性を示さなかった。最後に、TAが遺伝子水平伝播の一因となるファージの形質導入を抑制することを明確にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会の問題である薬剤耐性菌や病原菌の蔓延は、菌の増殖に加えて、薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子の水平伝播が要因になっている。その対策には、新規の抗菌物質や水平伝播を抑えるしくみの探索が求められる。本研究において、様々な菌に対して抗菌作用が明らかになったALLRLペプチドは新規抗菌薬の有用なシーズとして期待される。また、本研究ではTAが水平伝播の一因となる形質導入を抑えることを明確にできたので、今後TAを活性化物質を発見できれば、薬剤耐性菌や病原菌の蔓延を抑える対策に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The toxin-antitoxin (TA) system is a genetic module composed of a toxin and its cognate antitoxin. The Zor0 toxin in *Escherichia coli* O157 is composed of 29 amino acids and its endogenous expression inhibits *E. coli* growth. Here, we demonstrated that the Zor0 localized in the inner membrane affects the plasma membrane integrity. We further showed that five internal amino acids (Ala-Leu-Leu-Arg-Leu; ALLRL) of Zor0 are necessary for its toxicity. Exogenously-added ALLRL peptide to Gram-positive bacteria, *S. aureus* and *B. subtilis*, and a fungus, *C. albicans*, trigger cell membrane damage and exhibit growth defect. Importantly, this peptide has no toxicity against mammalian cells. Taken together, an effective and short peptide, ALLRL, would be an attractive antimicrobial to Gram-positive bacteria and *C. albicans*. Furthermore, we demonstrated that the TA system suppresses the transduction which is one of the mechanisms that lead to the horizontal gene transfer.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：トキシン - アンチトキシン系 細菌 ファージ 抗菌ペプチド 形質導入

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌や病原菌の蔓延は現代社会の大きな問題である。蔓延は、これらの菌が増殖することに加えて、薬剤耐性や病原性にかかわる遺伝子が水平伝播により他の菌へ伝達されることが要因になっている。よって、蔓延を抑える対策には、新規のメカニズムをもつ抗菌物質や遺伝子の水平伝播を抑える仕組みの探索が求められる。

細菌が産生するトキシンには、分泌されずに細菌自身の増殖を停止させるものがある。これは、ストレス応答やバイオフィーム形成など細菌のさまざまな生理現象にかかわる。このトキシンの特徴として、その活性を抑えるアンチトキシンの遺伝子がトキシン遺伝子と並んで存在し、トキシン - アンチトキシン系 (TA) を構成する。TA は細菌界に広く保存されており、染色体やプラスミドには複数の TA 遺伝子座が存在する。

【TA トキシンによる毒性メカニズム】

これまでに複数の大腸菌 TA を発見して、トキシンがもつ毒性のメカニズムを明らかにしてきた。例えば、腸管出血性大腸菌 O157 株の ZorO-orzO TA の場合、29 アミノ酸からなる ZorO トキシンが発現すると、細胞膜に局在して膜の脱分極を引き起こす。その結果、活性酸素が発生して菌の増殖が阻害される。最近、ZorO トキシンの一部である 5 アミノ酸 (Ala-Leu-Leu-Arg-Leu; ALLRL) を、黄色ブドウ球菌と枯草菌に添加したところ、菌の生存率が著しく減少する結果を得た。この結果をふまえて、ALLRL ペプチドを新しい抗菌薬として利用できるのではないかとこの着想に至った。

【TA トキシンによる抗ファージ機構】

これまでに TA の新たな役割として抗ファージ作用を明らかにした。例えば、RnlA-RnlB TA の場合、ファージが感染すると、RnlB アンチトキシンが消失し、RNase である RnlA トキシンが活性化される。その結果、ファージの mRNA が分解され、増殖が抑えられる。ファージには、感染後速やかに子ファージを産生して溶菌する溶菌ファージと、溶菌以外に自身の DNA を細菌ゲノムへ組み込む経路をもつ溶原性ファージの 2 種類がある。遺伝子の水平伝播の一因となる形質導入は、溶原性ファージにより引き起こされ、興味深いことに、一部の溶原性ファージは、薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子をコードしている。これまでの成果をふまえて、TA が溶原性ファージの増殖を阻害することで、形質導入を抑制し、薬剤耐性遺伝子や病原遺伝子の拡散を抑えているのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、薬剤耐性菌や病原菌の蔓延を抑える薬の開発を目指して、ZorO トキシンを改変した ALLRL ペプチドを抗菌薬へ応用するための基盤となる研究を行う。また、O157 株のペロ毒素遺伝子をコードする溶原性ファージを対象に、TA による形質導入の抑制作用についても明らかにする。期間内には以下の 6 つの研究項目を実施する。

- 研究項目 (1) ALLRL ペプチドの性状と抗菌スペクトル
- 研究項目 (2) ALLRL ペプチドによる抗菌メカニズム
- 研究項目 (3) 培養細胞に対する ALLRL ペプチドの影響
- 研究項目 (4) TA によるファージ誘発の抑制
- 研究項目 (5) TA によるファージ溶原化の抑制
- 研究項目 (6) TA トキシンを活性化するペプチドによる形質導入の抑制効果

3. 研究の方法

研究項目 (1) ALLRL ペプチドの性状と抗菌スペクトル
抗菌作用に必要なペプチドの性状を明確にする。また、さまざまなグラム陽性菌 (薬剤耐性菌 MRSA を含む)、陰性菌、さらには真菌類に属するカンジダ菌への増殖阻害効果を調べる。

研究項目 (2) ALLRL ペプチドによる抗菌メカニズム
細菌内で発現した ZorO は、細胞膜に局在して膜の脱分極を引き起こし、活性酸素を発生して菌の増殖を阻害する。そこでこの現象をふまえて、ALLRL ペプチドの添加による抗菌メカニズムを明らかにする。

研究項目（3）培養細胞に対する ALLRL ペプチドの影響
ALLRL ペプチドが培養細胞の増殖や生存に与える影響について調べる。

研究項目（4）TA によるファージ誘発の抑制
形質導入は、ファージの誘発とゲノムの組込み（溶原化）の2つの過程からなる。TA を欠失した供与菌を作製して、TA が溶原性ファージの誘発を抑えるか調べる。誘発を抑える TA の作用メカニズムを明らかにする。

研究項目（5）TA によるファージ溶原化の抑制
薬剤耐性遺伝子を導入したファージを、TA を欠失した受容菌へ感染させて、薬剤耐性を指標に、溶原化の効率を調べる。溶原化を抑える TA の作用メカニズムを明らかにする。

研究項目（6）TA トキシンを活性化するペプチドによる形質導入の抑制効果
大腸菌 TA MazE-MazF と ChpBK-ChpBI のトキシンを活性化する EDF ペプチド（Asn-Asn-Trp-Asn-Asn; NNWNN）が、形質導入を抑制できるか検討する。

4. 研究成果

研究項目（1）ALLRL ペプチドの性状と抗菌スペクトル
抗菌活性に必要なペプチドの性状を知るため、5 アミノ酸（ALLRL）より短いもの、この配列を含む長いもの、アミノ酸の配列を変えたものなど、様々なペプチドを作製して抗菌活性を調べた。ALLRL が最も強く、ALLRLI、ALLR、LRLLA、LLRL も抗菌活性を示した。次に抗菌スペクトルを検討したところ、グラム陰性菌である大腸菌には効果を示さなかったが、MRSA を含むグラム陽性菌には抗菌活性を示した。さらに真菌類に属するカンジダに対しても抗菌活性を示した。

研究項目（2）ALLRL ペプチドによる抗菌メカニズム
既知の抗菌ペプチドの多くは、細胞膜に損傷を引き起こす。そこで ALLRL ペプチドについてもその可能性を検討したところ、黄色ブドウ球菌、枯草菌、カンジダのどの菌に対しても、細胞膜損傷を引き起こすことが分かった。

研究項目（3）培養細胞に対する ALLRL ペプチドの影響
ALLRL ペプチドを抗菌薬へ応用するためには細胞毒性を検討する必要がある。そこで、Vero 培養細胞や BHK 培養細胞に対して ALLRL ペプチドの細胞毒性を調べたところ、細菌の増殖を阻害するペプチド濃度でも、培養細胞にはほとんど毒性を示さなかった。

研究項目（4）TA によるファージ誘発の抑制
溶原ファージ Sp5 が溶原化した大腸菌 K12 株から MazE-MazF または RnlA-RnlB の遺伝子を欠失させた株を作製し、抗菌薬マイトマイシン C で処理してファージの誘発率を測定した。*mazE-mazF* 欠失によりファージの誘発率が 1.3 倍増加した。よって、MazE-MazF は溶原ファージの誘発を抑えることが示唆された。一方は *rnlA-rnlB* 欠失は誘発に影響を与えなかった。

研究項目（5）TA によるファージ溶原化の抑制
大腸菌 K12 株の TA である MazE-MazF または RnlA-RnlB の遺伝子を欠失させた株を作製し、溶原ファージ Sp5 の溶原化率を野生株と比較した。溶原化率は *mazE-mazF* 欠失により 1.2 倍、*rnlA-rnlB* 欠失により 1.5 倍増加した。また、MazE-MazF または RnlA-RnlB の過剰発現が溶原化率を低下させることも確認した。従って、これら TA は溶原ファージの溶原化を抑制することが明らかとなった。

研究項目（6）TA トキシンを活性化するペプチドによる形質導入の抑制効果
5 アミノ酸からなる EDF ペプチド（NNWNN）を化学合成して、大腸菌の増殖に対する影響を調べた。予想に反し、これまでに報告されていた EDF ペプチドによる MazF や ChpBK の活性化と菌の増殖阻害は観察されなかった。よって、当初予定していた形質導入に対する EDF ペプチドの作用の有無については今回検討できていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuichi Otsuka, Tomohiro Ishikawa, Chisato Takahashi, Michiaki Masuda	4. 巻 11
2. 論文標題 A Short Peptide Derived from the ZorO Toxin Functions as an Effective Antimicrobial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 392 ~ 392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins11070392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚裕一、石川知弘、高橋知里、増田道明
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌0157株がもつZorOトキシンの作用機序の解明と抗菌ペプチドへの応用
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚裕一、石川知弘、高橋知里、増田道明
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌0157株がもつZorOトキシンの作用機序の解明と抗菌ペプチドへの応用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田香介, 大塚裕一
2. 発表標題 トキシン - アンチトキシン系が溶原ファージの生活環に与える影響
3. 学会等名 第18回微生物研究会「微生物研究の新しい潮流」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河野誠也, 鈴木智也, 多田峻佑, 大塚裕一
2. 発表標題 大腸菌0157株がもつトキシン - アンチトキシン系Zor0-0rz0の発現メカニズムと生物学的役割の解明
3. 学会等名 第18回微生物研究会「微生物研究の新しい潮流」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 裕一
2. 発表標題 細菌とファージとの攻防 ~ トキシン - アンチトキシン系 ~
3. 学会等名 第17回微生物研究会「微生物分子生物学のフロンティア」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚裕一
2. 発表標題 この世はウイルスだらけ
3. 学会等名 第7回日本微生物学連盟フォーラム「微生物：変わり者たちの素顔」(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 知里 (TAKAHASHI Chisato)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高田 香介 (TAKADA Kousuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関