

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07565

研究課題名(和文) エネルギー蓄積型persisterの形成機構の解明および根絶技術の開発

研究課題名(英文) Formation mechanism and eradication technology of energy-accumulated persisters

研究代表者

常田 聡 (TSUNEDA, SATOSHI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：30281645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細菌集団の一部でpersisterと呼ばれる休眠状態の細菌が存在しており、抗菌薬から生き残ることが知られている。本研究では、大腸菌をモデル細菌株として用い、ldhA発現を起点としたエネルギー蓄積型persisterの形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。ldhAを過剰発現させた結果、SOS応答の制御遺伝子recAの発現量が有意に増加すること、および抗菌薬処理後のヒドロキシラジカルの産生量が抑制されていることが示された。これらの結果から、ldhA発現によりATPが蓄積され、DNA損傷時にSOS応答を介したDNA修復が活発に起こり、抗菌薬投与下でも生存できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

persisterは感染症患者内に長期間潜伏することによって耐性菌形成を促進させるため、persisterを効率よく根絶させることが重要な課題となっている。従来、persisterはエネルギー代謝が枯渇した状態にあることが一般的であるとされていたが、本研究結果からエネルギー代謝が増加することによって抗菌薬に備える新たなpersisterの生存戦略獲得メカニズムが明らかとなった。本研究の成果を活用し、既存のエネルギー枯渇型persisterと新規なエネルギー蓄積型persisterの分子標的薬剤の開発により、感染症の治療期間が短縮化でき、耐性菌の出現を抑制することが期待される。

研究成果の概要(英文)：There exists dormant bacterial population called "persisters" which survive from antimicrobial agents. The objective of this study is to clarify the mechanism of formation of energy-accumulating persisters induced by ldhA expression. The overexpression of ldhA significantly increased the expression of recA, a regulatory gene of SOS response, and suppressed the production of hydroxyl radicals after antimicrobial treatment. These results suggest that ldhA expression leads to accumulation of ATP and active DNA repair via the SOS response upon DNA damage, enabling survival under antimicrobial treatment.

研究分野：細菌学

キーワード：persister エネルギー代謝 ATP 乳酸デヒドロゲナーゼ SOS応答 抗菌薬抵抗性 DNA修復 大腸菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌集団の中には一部で表現型を変化させた休眠状態の細菌が存在しており、抗菌薬から生き残ることが知られている(引用文献)。生き残った個体(persister)は抗菌薬が除かれると覚醒し、増殖を開始するため、感染症の難治化および再燃を引き起こす(引用文献)。さらに、persister は感染症患者内に長期間潜伏することによって耐性菌形成を促進させるため、persister を効率よく根絶させることが重要な課題となっている(引用文献)。persister を根絶させるためには、(1) persister の形成を阻害する(2) persister を強制的に覚醒させることが必要がある。しかしながら、persister を標的とした感染症治療法は確立されていない。

我々はこれまで persister を見分ける大腸菌マーカー株の開発を行い、分取された細胞集団のトランスクリプトーム解析から、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*ldhA*)の発現を介した新規な persister 形成メカニズムの発見に成功した(引用文献)。さらに、*ldhA* 発現量が増加した環境ではエネルギー活性が増加することを見いだした(引用文献)。従来、persister はエネルギー代謝が枯渇した状態にあることが一般的であるとされていたが、本研究結果から persister を形成する経路は単一ではなく、エネルギー代謝が増加することによって抗菌薬に備える新たな persister の存在が示唆された。しかし、エネルギー蓄積による細菌の生存戦略獲得メカニズムは未知である。

2. 研究の目的

本研究では大腸菌をモデル細菌株として用い、*ldhA* 発現を起点としたエネルギー蓄積型 persister の形成メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)各遺伝子発現量の評価

遺伝子の発現量の定量には qRT-PCR 法を用いた。Total RNA を抽出するために対数増殖期まで培養した後、cDNA に逆転写した。続いて、リアルタイム PCR システムを用いて cDNA を鋳型とした定量 PCR を行い、目的遺伝子の相対発現量を測定した。内部標準のハウスキーピング遺伝子として *ftsZ* を使用した。

(2)抗菌薬処理後の生存率の評価

本研究では、大腸菌 K-12 MG1655 株およびその変異株を使用し、培養には LB 培地を使用した。まず、対数増殖期のサンプルを準備するため、一晚培養した各株を 0.1 mM IPTG を含む LB 培地を用いて 1,000 倍に希釈した後、37°C で 3h 振とう培養した。培養後のサンプルの OD (600 nm) が 0.5~0.8 であることを確認した後、抗菌薬処理前のサンプルとして培養液 100 μ L を分注しておき、残りの培養液に 5 μ g/mL オフロキサシンを添加した。オフロキサシン処理前のサンプルおよび処理後 1, 2, 3, 5 h のサンプル 100 μ L を 1 x PBS に置換および段階希釈した後、LB 寒天培地上にスポットして一晚 37°C で静置培養した。翌日、各時点における CFU を処理前の CFU で割ることで生存率を算出した。

(3)persister の再増殖活性の評価

対数増殖期まで培養した大腸菌(*ldhA* 過剰発現株およびコントロール株)の培養液に 5 μ g/mL のオフロキサシンを加えて 1, 2, 3 h 処理した後、1 x PBS に置換した。適切に希釈した後、20 μ L を LB 寒天培地上にスポットし、37°C で一晚静置培養した。形成されたコロニー領域の面積を画像解析により測定した。

(4)細胞内ヒドロキシラジカル量および遺伝子損傷レベルの評価

細胞内の活性酸素(ROS)レベルを評価するため、ROS の一種であるヒドロキシラジカル特異的に蛍光を示す Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF) を使用した。一晚培養した大腸菌(*ldhA* 過剰発現株およびコントロール株)を 1,000 倍希釈した後、37°C で 3 h 振とう培養した。対数増殖期まで培養した各株に対して 5 μ g/mL のオフロキサシンを加えて 0, 1, 2, 3 h 処理した後、培養液から菌体を回収し、1 x PBS に置換した後、フローサイトメーターで HPF 蛍光を測定した。HPF の蛍光検出には Alexa Fluor 488-A をパラメータとして使用した。つぎに、フルオロキノロン系抗菌薬による遺伝子損傷レベルを可視化するため、transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を用いて損傷 DNA の蛍光検出を試みた(引用文献)。一晚培養した大腸菌(*ldhA* 過剰発現株およびコントロール株)の培養液、および各培養液を 1000 倍希釈した後、37°C で 3 h 回復培養したサンプルをそれぞれ用意し、5 μ g/mL オフロキサシンで 3 h 処理したサンプルを回収し 1 x PBS で置換した後、フローサイトメーターで TUNEL 蛍光 (Alexa Fluor 488-A) を測定した。

4. 研究成果

(1)各遺伝子発現量の評価

ldhA 発現によって誘導された persister の ATP レベルが高いことを踏まえ、persister 形成に関与することが報告されている経路のうち、ATP を消費する経路であるヒートショック応答、緊縮応答、薬剤排出ポンプ、酸化ストレス応答、SOS 応答経路に着目し、*ldhA* 過剰発現株における各遺伝子の発現量を qRT-PCR で測定した。その結果、薬剤排出ポンプ関連遺伝子である *acrA* および *tolC*、酸化ストレス応答遺伝子である *soxS* および *oxyR* の発現量に関しては、*ldhA* 発現による影響は見られなかった。一方、緊縮応答に関与する *dksA*、*obgE*、*relA* の発現量は *ldhA* 発現によって増加したことから、*ldhA* 発現によって緊縮応答が活性化されている可能性が示唆された。また、SOS 応答の関連遺伝子である *recA* の発現量は、*ldhA* 発現によって有意に増加したことから、*ldhA* 発現によって SOS 応答が活性化されることがわかった。このことから、*ldhA* 発現により抗菌薬投与前に ATP が蓄積されることによって、DNA 損傷時に SOS 応答を介した DNA 修復が活発に起こり、抗菌薬投与下でも生存できることが推測された。

(2)抗菌薬処理後の生存率の評価

recA が *ldhA* 発現による persister 形成にどのような影響を及ぼしているのか調べるため、大腸菌の *recA* 欠損株および *recA* 欠損+*ldhA* 過剰発現株を用い、抗菌薬処理後の生存率を比較した。その結果、*recA* 欠損株と比較して *recA* 欠損+*ldhA* 過剰発現株の persister の増加は見られなかった。したがって、*recA* 遺伝子は *ldhA* 発現の下流で persister 形成に関与することが示唆された。

(3)persister の再増殖活性の評価

ldhA 発現による persister 形成の誘導には *recA* が必要であることが明らかになったが、*recA* 遺伝子によってどのようなメカニズムで抗菌薬から逃れて生存しているのかは依然として不明である。我々は *ldhA* 発現による SOS 応答の活性化に伴い、遺伝子修復機構が活性化されることによって再増殖が可能になると予想した。そこで、オフロキサシン処理後に生き残った persister を再増殖させた際のコロニーサイズを比較して再増殖のしやすさを評価した。その結果、空ベクターを入れたコントロール株ではオフロキサシン処理後のコロニーサイズが小さくなったのに対し、*ldhA* 過剰発現株ではオフロキサシン処理後のコロニーサイズ減少量が抑えられ、コントロール株に比べてコロニーサイズが大きいことが明らかになった。また、SOS 応答阻害剤である ZnAc を添加して培養した場合は、*ldhA* 発現によるコロニーサイズの増加が見られなくなったことから、*ldhA* 発現を起点とした SOS 応答の活性化によって細菌の再増殖が促進されることが示唆された。

(4)細胞内ヒドロキシラジカル量および遺伝子損傷レベルの評価

オフロキサシン処理によって損傷した DNA の修復能を調べるため、DNA 損傷を促す活性酸素の一種であるヒドロキシラジカルを蛍光で測定した。その結果、*ldhA* 過剰発現株ではオフロキサシン処理後に産生されるヒドロキシラジカルの増加量がコントロール株よりも抑制された。また、オフロキサシン処理した集団およびオフロキサシン処理後の集団を回復培養させた際の DNA 損傷レベルの変化を TUNEL 法で測定した。その結果、予想に反して、オフロキサシン処理中および回復培養時にはコントロール株と比較して *ldhA* 過剰発現株における TUNEL 蛍光の顕著な減少は見られず、むしろ一部の集団で TUNEL 蛍光が増加した。今回行った TUNEL 蛍光分布は抗菌薬未処理の対数増殖期サンプルでも高い状態にあったことから、今回 *ldhA* 過剰発現による TUNEL 蛍光の増加が見られたのは DNA 損傷が誘導されたというよりは細胞内の遊離核酸に反応したことによるバックグラウンド蛍光が増加したことが原因であると考えられる。

(1)~(4)の結果から、*ldhA* が発現すると *recA* 発現を活性化させることで DNA 修復応答を誘導し生存に寄与する一方、ヒドロキシラジカル産生を抑制することで DNA 損傷を抑制していることが推察された。

<引用文献>

- N. Q. Balaban, J. Merrin, R. Chait, L. Kowalik, S. Leibler, Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*, 305, 1622–1625 (2004).
- K. Lewis, Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 48–56 (2007).
- I. Levin-Reisman, I. Ronin, O. Gefen, I. Braniss, N. Shores, N. Q. Balaban, Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355, 826–830 (2017).
- S. Matsumoto, Y. Kawai, S. Miyagawa, Y. Iwamoto, S. Okuda, A. Sánchez-Gorostiaga, M. Vicente, S. Tsuneda, Unique transcriptional profile of native persisters in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 15–22 (2018).

N. Yamamoto, R. Isshiki, Y. Kawai, D. Tanaka, T. Sekiguchi, S. Matsumoto, S. Tsuneda, Stochastic expression of lactate dehydrogenase A induces *Escherichia coli* persister formation. *J. Biosci. Bioeng.* 126, 30–37 (2018).

F. Rohwer, F. Azam, Detection of DNA damage in prokaryotes by terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1001–1006 (2000).

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 0件）

1. 著者名 Naoki Yamamoto, Yurino Ohno, Satoshi Tsuneda	4. 巻 66
2. 論文標題 ldhA-induced persister in Escherichia coli is formed through accidental SOS response via intracellular metabolic perturbation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 225-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野 友梨乃、山本 尚輝、常田 聡
2. 発表標題 ldhA発現による大腸菌E.coli persister形成機構
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野 友梨乃、山本 尚輝、常田 聡
2. 発表標題 ldhA発現を起点とした大腸菌persister形成はrecA発現を介したDNA修復によって起こる
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------