

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15779

研究課題名（和文）大腸菌二重欠失株の網羅的構築による薬剤耐性獲得能を抑制するターゲット遺伝子の探索

研究課題名（英文）Screening drug resistance suppression targets through comprehensive construction of *E. coli* double knockout strains

研究代表者

武藤 愛 (Muto, Ai)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・学振特別研究員RPD

研究者番号：80730506

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細菌の薬剤耐性を抑制するターゲット遺伝子の探索を目指し、大腸菌遺伝子欠失株ライブラリを用いた網羅的探索を行った。混合培養した大腸菌遺伝子欠失株ライブラリを抗生物質に曝した際の各欠失株の頻度の変化を、各欠失株に挿入されている識別配列を用いて検出した時系列ダイナミクスデータを取得し、集団のほとんどの株が死滅する中で増殖を示した薬剤耐性株の候補を得た。得られた候補株について、遺伝子欠失領域をライブラリの全遺伝子欠失株に網羅的に導入するための接合伝達株を構築した。寒天培地上での二重欠失株構築実験を行ったが、候補株の接合伝達効率が非常に低く、薬剤耐性の抑制ターゲットの特定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた薬剤下時系列ダイナミクスデータは、薬剤効果の持続性に遺伝子欠失が与える影響を網羅的に検出したものであり、薬剤耐性だけでなく、薬剤への感受性や薬効の継続メカニズムをターゲットとしたスクリーニングにも活用可能である。また、本研究の副産物として得られた自動分注ワークステーションを用いた寒天培地上でのコロニー整列の系は、従来は液体培地に特化していた実験の寒天培地での実施を同一の機器で可能とするものであり、実験自動化の系に組み込むことで相乗効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to identify target genes that suppress bacterial antimicrobial resistance through a comprehensive screening using an *E. coli* knockout library. We obtained time-series dynamics data by detecting changes in the frequency of each deletion strain, using identifier sequences each strain carries, when the mixed culture of the *E. coli* gene deletion library was exposed to antibiotics. From this data, we identified candidate drug-resistant strains that showed growth while most of the population died. We then constructed conjugation-transfer strains to comprehensively introduce the gene deletion regions of these candidate strains into the entire gene deletion library. Although we conducted double deletion strain construction experiments on agar plates, the conjugation efficiency of the candidate strains was very low, and we were unable to identify targets for drug resistance suppression.

研究分野：システム生物学

キーワード：薬剤耐性 大腸菌 網羅的遺伝子欠失株ライブラリ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌に起因する世界の死亡者数は、2013年には70万人と報告されており、その数は2050年には1000万人に達すると予測されている[1]。本邦においても年間約8,000人が薬剤耐性菌により死亡しており[2]、薬剤耐性菌出現への対策は喫緊の課題である。薬剤耐性株のスクリーニングや遺伝型の特定は様々な研究で行われているが、薬剤耐性を抑止する因子についてはポジティブスクリーニングを行えないことによりトップダウンアプローチが困難であり、薬剤の排出や分解、ターゲット分子の変異などの既知の薬剤耐性機構に基づいた個別の対策が主に行われてきた。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌網羅的遺伝子欠失株ライブラリを用いたトップダウンアプローチによる、細菌の薬剤耐性を抑制する因子の発見を目指した。抗生物質投与下のダイナミクス解析によって特定された薬剤耐性株の遺伝子欠失変異を、大腸菌の接合伝達という、細胞が別の細胞にDNAを送り込む仕組みを利用して遺伝子欠失株ライブラリの全ての株に導入し、他の遺伝子の欠失と組み合わせたときに耐性が失われるかを観察することによる、細菌の薬剤耐性獲得を抑制するターゲット遺伝子の網羅的探索を目的とした。

3. 研究の方法

本研究には、Keio collection[3]とASKA barcode deletion collection[4]という2種類の異なる大腸菌の遺伝子欠失株ライブラリを使用する。

(1) ASKA barcode deletion collection を用いた抗生物質投与下生育集団のダイナミクス解析

ASKA barcode deletion collection[4]は、大腸菌ゲノムDNA配列上の目的遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子と人工識別配列(bar-code)に置き換えた網羅的遺伝子欠失株ライブラリである。ASKAライブラリに含まれる一遺伝子欠失株(以下ASKA株)を混合して、各種抗生物質を含む培地に植菌し、生育が確認された抗生物質を対象とする。抗生物質を含む培地での培養および時系列サンプリングを行い、bar-code領域のPCR増幅と次世代シーケンサーによる検出によって、細胞集団内の各欠失株頻度の変化を観察する適応動態モニタリング実験を行う。集団内の頻度が有意に上昇したASKA株を、その抗生物質環境下における薬剤耐性候補株として特定する。

(2) Keio collection を用いた接合伝達による二重欠失株の網羅的生育測定

Keio collection[3]は、大腸菌の持つすべての非必須遺伝子について、対象遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えて作製された一遺伝子欠失株(以下Keio株)のコレクションである。DNAを送り込む機能をもたらず *tra* 遺伝子群と接合伝達開始起点 *oriT* を導入した遺伝子欠失株(High frequency of recombination株, 以下Hfr株)を寒天培地上に塗布し、そこにKeio株コロニーを植菌すると、Hfr株とKeio株の2つの株のコロニー接触面において接合伝達が起こる。Hfr株の遺伝子欠失領域が相同組換えによって染色体ゲノム上に組み込まれた株を薬剤によってスクリーニングすることで、二重欠失株を構築することが可能である。コロニー整列ロボットを用いて1,536のKeio株を一つの寒天培地上に植菌することにより、Keio collectionに含まれる4,000株全てについて、3枚の寒天培地上で二重欠失株をハイスループットに構築することができる[5]。寒天培地上に整列した1,576のコロニーを時系列観察し、生育度を網羅的に測定する手法も確立されている[6]。

本研究ではこれらの手法を用いて、得られた薬剤耐性ASKA候補株の遺伝子欠失領域を接合伝達によって全てのKeio株へ導入した二重欠失株を網羅的に作製する。対象薬剤を含む培地での生育度を測定し、二重欠失により薬剤耐性を失った株のスクリーニングにより、薬剤耐性を抑制する遺伝子欠失を特定する。

4. 研究成果

(1) ASKA barcode deletion collection を用いた対象抗生物質の決定

8 種類の抗生物質(Ampicillin, Aztreonam, Ciprofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Nalidixic acid, Streptomycin, Vancomycin)をそれぞれ含む液体培地に、ASKA 株混合液のグリセロールストックを植菌し、生育が観察された Ampicillin, Streptomycin, Nalidixic acid を対象薬剤とした。

(2) ASKA barcode deletion collection を用いた抗生物質投与下生育集団のダイナミクス解析

ASKA 株の混合培養液を、抗生物質を含む培地に植菌し時系列サンプリングを行った。各欠失株の頻度の変化を、各欠失株に挿入されている bar-code 領域の PCR 増幅と次世代シーケンサーによる検出により観測した。得られた時系列ダイナミクスデータ(図)から、生育を示した株の候補を得た。個別検証の結果、Ampicillin 存在下で生育した株の薬剤耐性については、ライブラリ構築時に使用したプラスミドの残留によるものであることが明らかとなり、ライブラリの問題点の発見に繋がった。

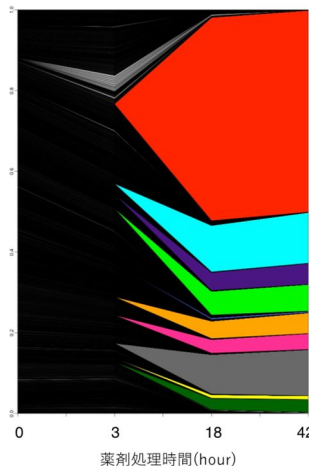


図 抗生物質存在下時系列ダイナミクス変化の一例

(3) 自動分注ワークステーションを用いたコロニー整列システムの構築

所属の変更と COVID-19 感染拡大防止措置により、当初使用する予定であった大腸菌コロニーを寒天培地上に整列するロボットを使用できなくなったため、所属機関の保有する機器で代替するシステムの構築を行なった。前所属で用いていたコロニー整列ロボット Singer rotor 用のプラスチック器具を、現所属の保有する自動分注ワークステーション Biomek のアームで運ぶための装置の作製により、コロニーの植菌・整列が可能となった。

(4) Keio collection を用いた接合伝達による二重欠失株の構築

候補株の欠失変異を全ての Keio 株に網羅的に導入し、二重変異株を網羅的に作成するため、候補株に接合伝達関連遺伝子を導入した Hfr 株の構築を行なった。ところが得られた Hfr 株の接合伝達効率が非常に低く、寒天培地上での網羅的な二重欠失株の構築が困難であった。接合伝達効率向上のための検討を行ったものの、二重欠失株の 4,000 コロニーを安定的に生育させられるだけの向上には至らなかった。

網羅的に作製した二重欠失株の抗生物質存在下での生育度を調べることで、薬剤耐性を抑制するターゲット遺伝子を見つけるスクリーニング実験を行う計画であったが、スクリーニングに耐えられるだけの Hfr 株の接合伝達効率向上を達成できなかったため、網羅的スクリーニング実験を行うために計上していた 300 万円を未使用額として返還した。

[1] J. O'NEILL, "TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE," no. May, 2016.

[2] Tsuzuki S *et al.*, "National trend of blood-stream infection attributable deaths caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in Japan.," *J Infect Chemother.* 2020 Apr;26(4):367-371.

[3] Baba T *et al.*, "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 2, p. 2006.0008, 2006.

[4] Otsuka Y *et al.*, "GenoBase: comprehensive resource database of *Escherichia coli* K-12.," *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D606-17.

[5] Typas A *et al.*, "A tool-kit for high-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*," *Nat Methods.* 2008 Sep;5(9):781-7.

[6] Takeuchi R *et al.*, "Colony-live--a high-throughput method for measuring microbial colony growth kinetics--reveals diverse growth effects of gene knockouts in *Escherichia coli*," *BMC Microbiol.* 2014 Jun 26;14:171.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
英国	サリー大学			