

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658067

研究課題名(和文)多剤耐性菌出現頻度の低減化を目指したストレス誘導性突然変異の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanism of stress-induced mutation toward control and prevention of the development of multiantibiotic resistance

研究代表者

米山 裕 (Yoneyama, Hiroshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10220774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アラニン(Ala)要求性大腸菌変異株を100～0.1 ug/mlのAla添加最少培地で培養し対数後期に達した細胞集団に占めるAla非要求性サプレッサー変異株の割合を調べた結果、サプレッサーの出現頻度は添加したAla量に依存して低下した。また、培養開始後経時的にサプレッサーの出現をモニターした結果、培養開始約30時間後からサプレッサーの出現が観察された。以上より、Ala飢餓ストレスを感知した細胞が、未知のシグナル伝達系を介して細胞内の代謝変化を起こした結果、突然変異が蓄積し最終的にAla飢餓環境下で選択されることによってサプレッサー変異株が出現したものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：When an Escherichia coli alanine auxotroph was grown at 37 degrees C in minimal medium containing varying concentrations of alanine (0.1-100 ug/ml) to the late log-phase, the number of suppressors that have no requirement for alanine decreased as the amount of alanine added in medium increased. These alanine-non-requiring suppressors appeared after 30 hours of incubation in minimal medium without alanine supplementation. In addition, individual suppressor clones isolated independently showed different levels of growth recovery in minimal medium. On the basis of these results, we could speculate the following scenario leading to appearance of suppressors: i) sensing of alanine deficiency, ii) metabolic change caused by an unknown signal transduction cascade, iii) introduction of random mutation(s) in the chromosome, and iv) selection of suppressors under the alanine-deficient conditions.

研究分野：動物微生物学

キーワード：大腸菌 アラニン要求変異株 サプレッサー-変異株 突然変異 アラニン飢餓ストレス ストレス誘導性
突然変異 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

ペニシリン発見以来各種抗生物質が見いだされ、かつて人類を苦しめた細菌感染症はもはや制圧されたかの幻想を人々は抱くに至った。しかし、過剰な抗菌剤の使用の結果、多剤耐性緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を始めとした多剤耐性菌が出現し、これらの多剤耐性菌による細菌感染症を制御することが不可能になるのではないかとの危機感から、多剤耐性菌の出現は大きな社会問題となっている。これらの細菌感染症の脅威に対抗するためには、新規抗菌剤の研究開発が必須であり、また社会的にも強く求められている。

これまでの抗菌剤は、細胞壁合成、タンパク質合成、そしてDNA複製など細菌の生存に必須の諸機能をターゲットとしているため突然変異による耐性化は避けられない。この突然変異株出現のメカニズムについて、抗生物質暴露前に細胞集団内に存在する自然突然変異株が抗生物質に曝されることによって選択され集団内に広がることの原因であると考えられている。ところが最近、ストレス環境下に置かれた細菌の突然変異頻度が上昇するストレス誘導性突然変異(stress-induced mutagenesis)という現象が見いだされ、変異頻度上昇に至る分子メカニズムが注目されるようになった。抗生物質も細菌にとってはその生存を脅かすストレス源であり、実際、抗菌剤であるシプロフロキサシンに曝された大腸菌の突然変異頻度が、ストレス誘導性突然変異により上昇することが近年報告されている。

一方で細菌が生存する上で外部ストレスとなり得る環境は抗菌剤に限らない。我々はこれまで未知であった大腸菌のL-アラニン(L-Ala)合成経路の解明を試みる過程で、遺伝学的手法を用いて初めて本菌のL-Ala要求性変異株の取得に成功した。そして、このL-Ala要求株をL-Ala非含有最少培地に接種すると、自然突然変異頻度よりはるかに高い頻度でL-Ala非要求性サプレッサー変異株が出現することを見いだしている。この現象は、“L-Ala飢餓”というストレスに応答して、サプレッサーの出現頻度が上昇するストレス誘導性突然変異のモデルシステムと捉えることができる。

2. 研究の目的

抗菌剤という外部ストレスに暴露されることによって突然変異頻度が上昇し、その結果として抗生物質耐性菌の出現頻度が上昇するという事実は、突然変異頻度の上昇を阻止することができれば耐性菌の出現を抑制できることを意味している。我々は、上述したように大腸菌のL-Ala要求性変異株をL-Ala飢餓ストレス環境下で培養すると、自然突然変異頻度よりはるかに高い頻度でL-Ala非要求性サプレッサー変異株が出現することを見いだしている。このシステムは、

抗菌剤ストレスとは異なるストレスである“L-Ala飢餓”ストレス下に置かれた細菌が環境変化に応答して突然変異頻度を上昇させる新規なストレス誘導性突然変異を評価することができるシステムである。そこで本研究では、このL-Ala非要求性サプレッサー変異株が高頻度で出現する評価系をモデルシステムとして、ストレス誘導性突然変異の分子メカニズムを明らかとし、抗菌剤暴露による突然変異頻度の上昇を抑える新規抗菌剤の開発を目指すための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

(1) L-Ala要求性変異株 Triple-1 を最少寒天培地で培養したときに出現するL-Ala非要求性コロニーの計測

L培地で一夜37℃にて前培養したTriple-1細胞を生理食塩水で2回遠心洗浄し同溶液に懸濁した後、最少寒天(1.5% w/v)培地(22 mM glucose, 7.5 mM (NH₄)₂SO₄, 1.7 mM MgSO₄, 7 mM K₂SO₄, 22 mM NaCl and 100 mM sodium phosphate (pH 7.1))に約10⁸~10⁹ cells塗布し37℃にて培養した。2日目以降、日毎に新たに出てくるコロニーをL-Ala非要求性のコロニーと判断しこのコロニー数を計測した。

(2) L-Ala非要求性サプレッサーの出現頻度に及ぼすL-Ala添加の影響

L培地にて一夜前培養したL-Ala要求株Triple-1を2回生理食塩水で洗浄後、同溶液に懸濁した細胞を1~100 µg/ml L-Alaを含む最少培地に接種(0.1% v/v)し37℃にて振盪培養した。対数後期(OD₆₆₀=0.8~1.0)に達した細胞を集菌後、上記同様に生理食塩水で2回洗浄し同溶液で適宜希釈した細胞を、6.25 µg/ml ゲンタミシンと6.25 µg/ml カナマイシンを含むL寒天培地(全細胞数)および最少寒天培地培地(L-Ala非要求性サプレッサー数)に塗布し37℃にて培養した。全細胞数は1日後、L-Ala非要求性サプレッサー数は2日後に計測した。

(3) L-Ala非要求性サプレッサー出現の経時変化

L培地にて一夜前培養したL-Ala要求株Triple-1を2回生理食塩水で洗浄後、同溶液に懸濁した細胞を新しい最少液体培地に接種(0.1% v/v)し、37℃にて振盪培養した。その後、6時間ごとに細胞を回収し、6.25 µg/ml ゲンタミシンと6.25 µg/ml カナマイシンを含むL寒天培地(全細胞数)および最少寒天培地培地(L-Ala非要求性サプレッサー数)に塗布し37℃にて培養した。全細胞数は1日後、L-Ala非要求性サプレッサー数は2日後に計測した。

(4) トランスポゾン(Tn)挿入変異

トランスポゾン pNKBOR をカナマイシンマーカーを除去したL-Ala要求株#4-3-1にエ

レトロポレーション法を用いて形質転換し、30 で2時間培養してトランスポゾンマーカーであるカナマイシン耐性遺伝子を活性化後、6.25 µg/ml ゲンタミシンと 6.25 µg/ml カナマイシンを含む最少培地に平板あたり約150コロニーとなるように塗布しマスター平板を作製した。その後、両抗菌剤を含む最少寒天培地と両抗菌剤と 20 µg/ml L-Ala を含有する最少寒天培地にピロード布を用いてレプリカし、37 で2~4日培養し最少寒天培地でコロニー形成能を失った、あるいはコロニー形成が対象株である#4-3-1より遅延するコロニーを選抜した。

(5) サプレッサー変異株のゲノム解析

典型的な L-Ala 非要求性サプレッサークローンをランダムに選びそのゲノム DNA を定法にしたがい抽出した後、親株である Triple-1 のゲノム DNA をレファレンスとして両株のゲノムシーケンスを SOLiD5500XL (Life technologies 社) を用い、バーコーディングによるフラグメントライブラリーを作製して行った。

4. 研究成果

(1) 最少寒天培地での L-Ala 非要求性サプレッサー変異株の出現

L-Ala 要求株 Triple-1 を約 $10^8 \sim 10^9$ cells 最少寒天培地に塗布し経時的にコロニーの出現を計測した結果、培養日数とともに出現するコロニーの数が増加した(図1)。

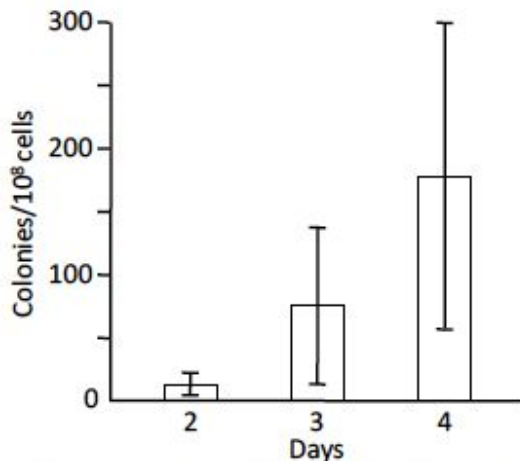


図1 最少寒天培地に出現したL-Ala非要求性コロニー数の経時変化(値は7回の独立した実験の平均と標準偏差を示す)

出現したこれらのコロニーが L-Ala 非要求性のサプレッサーかどうか検証するために、培養2日目、3日目および4日目のコロニーを複数純化しそれらの L-Ala を含まない最少培地での生育を評価した。その結果、これらのクローンは Triple-1 よりも生育の立ち上がり早く、また、その程度はクローンによって多様性があった(図2)。このことから、これらのクローンは個々に異なる変異をもつ L-Ala 非要求性サプレッサーであることが強

く示唆された。そして、図1に示したように、これらのクローンは培養時間に伴い出現するコロニー数が増えたことから、L-Ala 飢餓ストレスにตอบสนองして生じるストレス誘導性突然変異の結果出現したサプレッサー変異株であると考えられた。

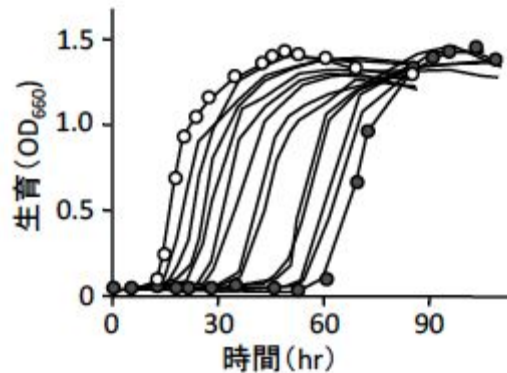


図2 L-Ala非要求性サプレッサー変異株の最少培地での生育
野生株W3110 (○), L-Ala要求変異株 Triple-1 (●), L-Ala非要求性サプレッサー変異株 (実線)

(2) L-Ala 非要求性サプレッサーの出現頻度に及ぼす L-Ala 添加の影響

L-Ala 要求変異株 Triple-1 は最少培地に添加した L-Ala の量に応じてその生育が回復する(図3)。この条件で Triple-1 を培養した場合、2日目以降に生育してくる細胞は L-Ala 非要求性のサプレッサーであると考えられる。そこで、このサプレッサー変異株の出現

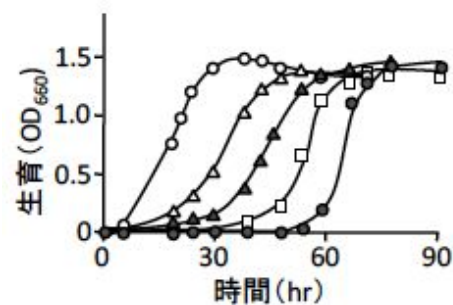


図3 L-Ala要求性変異株Triple-1の最少培地での生育に及ぼすL-Ala添加の影響
L-Ala 100 µg/ml (○), 10 µg/ml (Δ), 1 µg/ml (▲), 0.1 µg/ml (□), 非添加 (●)

に及ぼす L-Ala の影響を調べた結果、L-Ala を含まない最少寒天培地で生育可能なサプレッサーの割合は、最少培地に添加した L-Ala 量に反比例して減少した(図4)。これは、“L-Ala 飢餓”というストレスを感知した L-Ala 要求株が未知のシグナル伝達系を活性化し、そのシグナルが DNA に変異を生じさせるような代謝変化を起こし、最終的に L-Ala 非要求性サプレッサー変異株が選択さ

れてコロニーを形成したと解釈することができる。

興味あることに、L-Ala 非添加最少培地で生育してきた細胞群に占めるサプレッサーの出現頻度は約 32%であり、最少寒天培地で 2 日培養後に出現するコロニー数を計測する判定基準では、細胞集団のすべてがサプレッサーとは判定されなかった。このことは、対数後期に達した Triple-1 細胞集団がヘテロな性質をもつ集団であることを意味しており、L-Ala 飢餓ストレスに遭遇した Triple-1 のゲノム上に様々な変異が生じ蓄積した結果であると考えられる。事実、図 1 に示すように最少寒天培地上で培養 3 日目以降に出現するサプレッサーは本実験条件の判定基

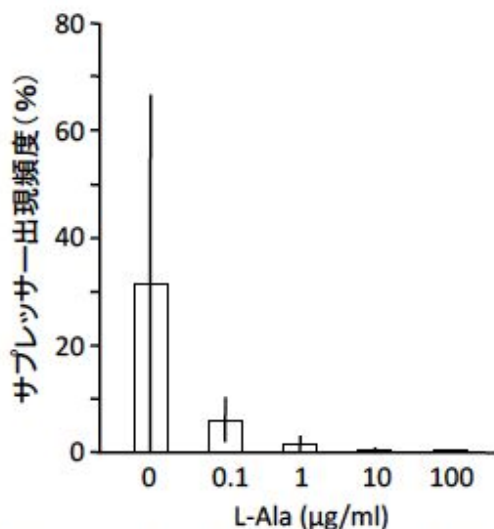


図4 L-Ala非要求性サプレッサー変異株の出現頻度に及ぼすL-Alaの影響
データは3回以上の平均値と標準偏差を示す。

準から外れ、コロニー計測から漏れることになる。また、本実験は図 4 に示すように L-Ala 非添加最少培地上でのサプレッサー出現頻度が実験ごとにデータのばらつきが大きいという特徴があった。これは、L-Ala 飢餓ストレス以外の微妙な環境要因の影響も加味され、それがサプレッサー出現頻度のデータのばらつきとなって現れたものと考えら得る。実際、最少寒天培地に使用する寒天の製造元が異なるとサプレッサー出現頻度が異なることが認められた (data not shown)。

(3) L-Ala 非要求性サプレッサー出現の経時変化

L-Ala 要求株 Triple-1 を最少液体培地に接種後振盪培養を開始し、経時的に全菌数と L-Ala 非要求性サプレッサー変異株の数を計測した結果、約 30 時間以降に最少寒天培地上にコロニーが出現し、その後、サプレッサー数は増加した (図 5)。一方、全菌数は約 60 時間後までは増加がほとんど認められなかった。培養開始時の接種菌数 ($10^6 \sim 10^7$ の

オーダー) に比べ、30~60 時間出現したサプレッサーの数は著しく少なく、全菌数への寄与は測定誤差範囲であると考えられる。しかし、この時間帯に出現したサプレッサー数の全菌数に占める割合は、時間とともに上昇した。これらのことから、培養開始後 30 時間までの間に、L-Ala 要求株 Triple-1 の細胞内で何らかの代謝変化が生じ、その変化が染色体 DNA の突然変異として蓄積した結果、L-Ala 非要求性サプレッサー変異株が出現したものと考えられた。

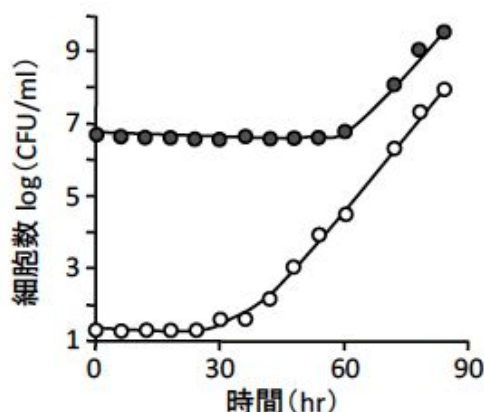


図5 L-Ala非要求性サプレッサー出現の経時変化
L-Ala要求株Triple-1を最少培地で振盪培養し6時間おきに全菌数(●)とL-Ala非要求性サプレッサー数(○)を計測した。

(4) トランスポゾン(Tn)挿入変異

Tn がゲノム上に挿入したカナマイシン耐性クローンライブラリーから、最少寒天培地での生育が親株である L-Ala 要求株#4-3-1 に比べ著しく遅延するクローンを一次スクリーニングした結果、22 クロニーを選抜することができた。

最少寒天培地上で生育不可あるいは生育遅延が認められるクローンは、増殖に必要な栄養素の生合成経路の変異がその原因になりうる。しかし、マスター平板を作製した段階で最少寒天培地上での増殖に必要な遺伝子が仮に Tn 挿入変異により機能消失した場合、それらのクローンは本実験条件下では原理的に除去される。したがって、今回選抜した 22 クロニーにおいて Tn 挿入が生じた遺伝子を同定することによって、L-Ala 非要求性サプレッサー変異株が生じるために発動する情報伝達カスケードに関連した因子を見いだせる可能性がある。

(5) サプレッサー変異株のゲノム解析

典型的な L-Ala サプレッサー変異株の変異部位を同定するために、最少寒天培地上で 2 日後に出現したサプレッサークローン#5-1 のゲノム配列を親株である L-Ala 要求株 Triple-1 をレファレンス配列としてシーケン

ス解析を行った。その結果、ピルビン酸脱水素酵素複合体を構成するピルビン酸脱水素酵素 E1 サブユニットをコードする *aceE* 遺伝子の開始コドンから数えて 775 番目のアデニンがグアニンに置換した変異 (A775G) であることが明らかとなった。この塩基置換は E1 サブユニットである AceE タンパク質の 259 番目のアルギニンがアスパラギン酸へ置換するミスセンス変異 (Arg259Asp) であることが判明した (表 1)。

塩基の置換	Adenine 775>Guanine
コドン変異	AAC>GAC
アミノ酸置換	Arginine 259>Aspartate

塩基の番号は開始コドンからの位置を示す。
アミノ酸の番号は開始コドンである Met からの位置を示す。

ピルビン酸脱水素酵素複合体は解糖産物であるピルビン酸を酸化してアセチル CoA を生成する酵素である (図 6)。通常ミスセンス変異をもつ変異誘導体はその酵素活性の低下が起こることが考えられることから、このサプレッサー-#5-1 のピルビン酸脱水素酵素の活性も低下しているものと考えられる。

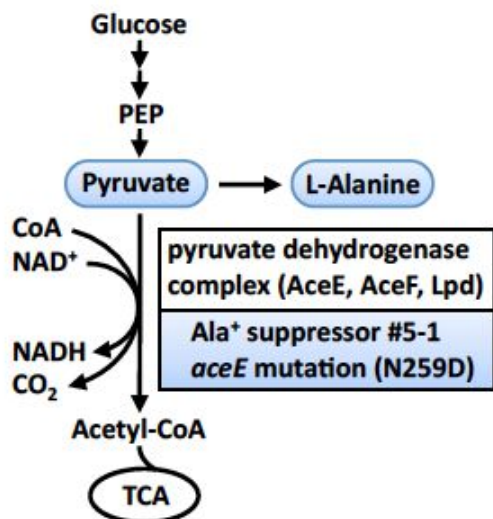


図6 L-Ala非要求性サプレッサー変異クローン#5-1の変異遺伝子の同定、およびその変異酵素が関与する周辺代謝経路

想定されるシナリオは、本酵素活性の低下に伴いピルビン酸からアセチル CoA への代謝フローが制限され、その結果、細胞内ピルビン酸レベルの上昇が起こることが期待される。

大腸菌の L-Ala 合成は 3 つの主要なアラニンアミノトランスフェラーゼ (AvtA, YfbQ, YfdZ) によって触媒されることを我々は最近明らかとした (Biosci. Biotechnol. Biochem. 75, 930-938, 2011)。アミノトランスフェラーゼ

は比較的基質特異性が低く本来の基質とは異なる基質アナログも弱いながら酵素反応の基質として利用することが知られている。実際、上記の 3 つのアミノトランスフェラーゼ遺伝子 (*avtA*, *yfbQ*, *yfdZ*) を欠損した L-Ala 要求株 Triple-1 に L-セリン合成に關与するアミノトランスフェラーゼをコードする *serC* 遺伝子をマルチコピーベクターに載せ導入すると、Triple-1 は L-Ala を含有しない最少培地で生育できることが知られている。しかしながら、この Triple-1 のゲノム上には 1 コピーの野生型 *serC* 遺伝子が存在するにもかかわらず、コロニーを形成するのに必要な L-Ala を合成することができず L-Ala 要求性を示す。

これらのことから、ピルビン酸脱水素酵素 E1 サブユニットに変異をもつサプレッサークローン#5-1 は、酵素活性の低下に伴う細胞内ピルビン酸レベルの上昇によって、ピルビン酸を弱いながら基質としうる L-Ala 合成とは本来関係のない複数のアミノトランスフェラーゼの關与のもと細胞増殖に必要な L-Ala を供給したものと考えられる。

今後さらに多くのサプレッサー変異株のゲノムシーケンスの解析、そしてこれらのサプレッサーで見いだされた変異酵素の活性評価と細胞内外のピルビン酸レベルの測定をすることによって、L-Ala 非要求性サプレッサー変異株出現のメカニズムを解明することが期待される。また、トランスポゾン挿入によって最少寒天培地での生育が遅延したクローンの挿入遺伝子を今後同定することによって、“L-Ala 飢餓”ストレスにตอบสนองして L-Ala 非要求性サプレッサー変異株が出現する分子メカニズムを解明する足がかりをつかむことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

渡邊裕一、内ヶ崎 啓、関 翔太、佐藤一樹、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕 (2013.3.24-27) 大腸菌アラニン要求性変異株由来のアラニン非要求性変異株はアラニン飢餓にตอบสนองして出現する、日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台) 一般演題 (口頭)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米山 裕 (YONEYAMA, Hiroshi)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10220774

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：