

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15134

研究課題名(和文) 難治性感染症の原因となる休止細菌の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism analysis of dormant cells causing refractory nature of bacterial infections

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：代謝活性を止めている休止細菌は、抗生物質存在下において生存できるため、感染症難治化の原因となる。本研究では、細菌の細胞骨格であるFtsZに着目し、細胞分裂時のZ-ringの形成を蛍光共鳴エネルギー移動で検出する遺伝子組換え大腸菌株の開発を行った。その結果、セルソーターを用いることで休止細菌と分裂細菌の分離に成功し、休止細菌は抗生物質(オフロキサシン)に対して高い抵抗性を持つことがわかった。また、トランスクリプトーム解析の結果、休止細菌は乳酸デヒドロゲナーゼの遺伝子発現を亢進させていることがわかった。さらに、マイクロ流体デバイスを用いたシングルセル観察によっても上記の結果が支持された。

研究成果の概要(英文)：Non-dividing dormant bacteria that can survive in the presence of antibiotics by pausing their metabolic activity, cause the refractory nature of bacterial infections. Here we constructed the recombinant Escherichia coli strain generating a fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal from the polymerization of FtsZ (called the Z-ring) during cell division. Then, dormant cells and dividing cells were successfully separated based on the FRET signal using a fluorescence activated cell sorter. The dormant cells showed significantly higher tolerance toward ofloxacin than dividing cells. Transcriptional analysis revealed that the dormant cells promote lactate dehydrogenase to adapt to anaerobic metabolism. In addition, single cell analysis by use of a microfluidic device supported expression of lactate dehydrogenase induces dormant cells.

研究分野：環境微生物学

キーワード：大腸菌 休止細菌 マイクロアレイ 感染症 抗生物質 乳酸デヒドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

遺伝的に同一の単一細菌種の細菌集団中であっても、約 10^{-6} の割合で増殖しない細菌、すなわち休止細菌の亜集団が生じる。通常、抗生物質は、DNA 複製、mRNA からアミノ酸への翻訳、および細胞壁の合成等の増殖に関わる現象を標的として細胞を死に至らしめる。しかし、休止細菌は細胞増殖を行わないため抗生物質の作用を受けず、複数種の抗生物質に対して抵抗性を示し生存し続ける。休止細菌は増殖の抑制という表現型の変異であり、遺伝子型の変異である抗生物質耐性菌とは異なるが、抗生物質抵抗性を有するため、臨床現場において抗生物質治療後の感染症再燃の原因となっている。しかしながら、抗生物質耐性菌ほどは解析が進んでいない。その原因の一つは、休止細菌の分取が難しいことである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸菌の遺伝子組換えによって休止細菌マーカー株を構築し、休止細菌を選択的に分取することで休止細菌形成の分子機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 休止細菌マーカー株の作製

FtsZ の N 末端および C 末端に黄色蛍光タンパク (YFP) および青色蛍光タンパク (CFP) をそれぞれ融合した遺伝子 (YFC) をプラスミド上で構築し、大腸菌 VIP205 株に形質転換した。発現ベクターとして、アラビノースプロモーターを持ち、アラビノースの濃度により低発現領域で遺伝子の発現量を調整できる pBAD24 を用いた。融合タンパク質は分裂時の FtsZ 重合の際に CFP と YFP の距離が近傍に位置することによって FRET を起こす (図 1)。FRET のシグナルに基づいて休止細菌と分裂細菌を見分けることが可能である。

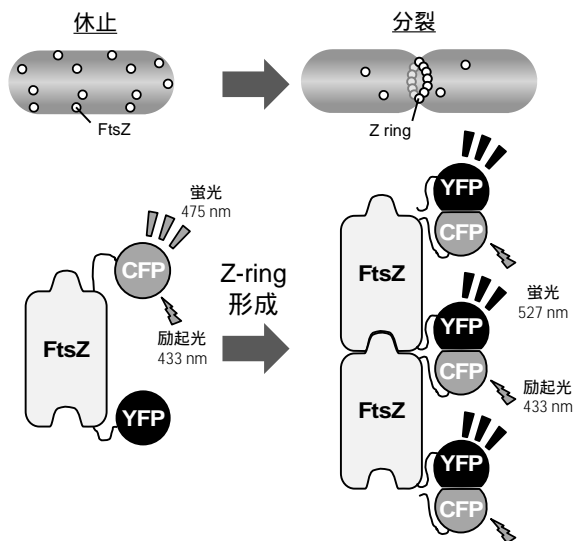


図 1 細胞分裂の可視化技術

(2) フローサイトメトリー解析

作製した VIP205_pBAD24YFC 株を LB 液体培地で一晚培養した後、遠心分離によりペレットを回収した。ペレットをリン酸緩衝液 (PBS) で再懸濁しフローサイトメトリー (FACS Aria II, BD Biosciences) 解析に供した。解析結果として、FRET 蛍光と前方散乱光 (FSC: 細胞の大きさを反映) の強度に基づいたドットプロットを得た。FRET は、405 nm の波長のレーザーで励起して、530/30 nm のフィルターを透過する蛍光により測定した。本研究に用いた検出系では分裂細菌は FRET 蛍光強度が大きいエリアに、休止細菌は FRET 蛍光強度が小さいエリアにそれぞれ分けられると考えられる。

(3) 薬剤抵抗性試験

セルソーターによって分取した細菌集団の抗生物質抵抗性を調べた。菌体懸濁液に 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のオフロキサシンを加え、37 で 3 時間培養した。その後培養液を遠心して抗生物質を含む培地を除き、PBS に懸濁した。適切な濃度で LB 寒天プレートに播種し、16 時間 37 で培養し、形成したコロニーをカウントして生存菌数とした。

(4) トランスクリプトーム解析

休止細菌と分裂細菌で発現量が異なる遺伝子を網羅的に解析するため、マイクロアレイを用いた解析を行った。まず分取した休止細菌および分裂細菌の全 RNA を抽出した。抽出には RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (QIAGEN) を用い、推奨プロトコルで RNA を抽出した。次に抽出した RNA を Poly(A) Polymerase (TaKaRa) を用いて PolyA を附加し、GeneChip® E. coli Genome 2.0 Array (Affymetrix, Inc) 解析に用いた。結果の統計解析は新潟大学大学院医歯学総合研究所の奥田修二郎准教授の助力をいただいた。

(5) シングルセル解析

遺伝子発現解析に用いたマイクロアレイは細菌集団を対象としている。しかしながら、細菌集団中には遺伝子発現、増殖速度、生理状態の不均一性が存在する。したがって、集団の平均値を解析するだけでなく、シングルセルレベルで実際に発生している現象を理解することが正確な分子機構を理解するために重要である。本研究では、細菌のシングルセル観察にマイクロ流体デバイスを用いた。今回使用したマイクロ流体デバイスには、細菌を動かないように固定する高さの小さい溝 (高さ 1 μm) と培地や抗生物質を流す高さの大きい流路 (高さ 25 μm) が設置されている。小さい溝に細菌を固定し、大きい流路から培地や抗生物質を流すことができる。マイクロ流体デバイスを用いることで、培地や抗生物質の供給を自由に変更して様々な環境を作ることができ、その環境中で生きた細菌を長時間観察することが可能となる。本

研究では、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) の発現状態を可視化できるように、ldhA のプロモーター領域下流に蛍光タンパク質 Venus を配置したプラスミドを大腸菌に導入した。この株の挙動をマイクロ流体デバイス内でタイムラプス観察した。また、培地中での細菌の増殖状態と抗生物質 (アンピシリン) に対する抵抗性の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) 休止細菌マーカー株の作製

休止細菌マーカー株として作製した菌株を 37 °C, 24 時間培養した後にスライドグラスに滴下し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) により観察した。その結果、FRET シグナルである YFP の蛍光を確認した。また、FRET を呈する細胞と、FRET は呈さず CFP の蛍光のみを呈する細胞が混在していた。これは、作製した株を CLSM により観察する際には、405nm の波長のレーザーにより CFP を励起するので、FRET を呈していない細胞でも常に CFP 蛍光を呈するためである。

(2) 休止細菌の分離

作製したマーカー株 (VIP205_pBAD24YFC) と野生株をフローサイトメトリーによって解析し、比較した。作製したマーカー株の FRET 蛍光は 2 つの群に分離してはなかったが、野生株よりも FRET 蛍光が上昇している領域 (エリア A) に分裂細菌が、野生株と蛍光強度に差がない領域 (エリア B) に休止細菌が集まっていると考えられた。実際に両領域の細菌をセルソーターによって分取し顕微鏡観察すると、エリア B の菌体はサイズが小さく FRET が起こっていないこと、エリア A の菌体は伸張して複数の FRET が確認できるものが多く存在していることがわかった。

(3) 分裂細菌と休止細菌の薬剤抵抗性の比較

分裂細菌が多く存在すると考えられるエリア A と休止細菌が多く存在すると考えられるエリア B とで比較すると、エリア A に比べてエリア B で抗生物質処理後の生存細菌数が有意に多いことが示され、さらに細かくエリアを設定して分取すると、生存率の差が最大で約 50 倍あることがわかった。

(4) トランスクリプトーム解析結果

抗生物質抵抗性に特に差が見られた細菌集団から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った結果、既往の研究と同様に、休止細菌内ではグアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸 (ppGpp) の発現が亢進していること、および rRNA の発現が減少していることが明らかとなった。また、本研究独自の成果として、乳酸デヒドロゲナーゼ (ldhA) の発現の亢進、さらには、嫌気的環境下で基質となる硝酸や硫酸化合物の代謝遺伝子およびトランスポーターの

発現が有意に亢進していることがわかった。

(5) シングルセル観察結果

ldhA の発現を可視化できる細菌株の挙動をマイクロ流体デバイス内でタイムラプス観察した結果、ldhA の発現は確率的で、一部の細菌が一時的に強く発現することが明らかとなった。また、ldhA を発現した細菌は、発現していない細菌に比べて増殖が抑制され、抗生物質抵抗性を有していることが確認された。

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 8 件)

山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲志, 松本慎也, 常田聡, “好気呼吸と発酵のバランスが崩れると persister が形成される”, 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 19~20 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

河合祐人, 一色理乃, 山本尚輝, 凌一暉, 奥田修二郎, 松本慎也, 常田聡, “ldhA 遺伝子の確率的な発現による大腸菌の persister 形成”, 第 90 回日本細菌学会総会 (招待講演), 2017 年 3 月 20 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲志, 松本慎也, 常田聡, “確率的な ldhA 発現に伴う persister 形成のメカニズム解明”, 第 5 回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2017 年 3 月 2 日, 筑波大学東京キャンパス (東京都文京区)

河合祐人, 一色理乃, 山本尚輝, 松本慎也, 奥田修二郎, 常田聡, “大腸菌の persister 形成を誘導する多様な経路”, 第 31 回日本微生物生態学会, 2016 年 10 月 23 日, 横須賀市文化会館 (神奈川県横須賀市)

山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲志, 松本慎也, 常田聡, “ldhA の確率的な発現による persister 形成と制御”, 第 31 回日本微生物生態学会, 2016 年 10 月 23 日, 横須賀市文化会館 (神奈川県横須賀市)

河合祐人, 一色理乃, 千原康太郎, 山本尚輝, 松本慎也, 常田聡, “嫌気代謝遺伝子の発現ノイズによる Persister 形成の解析”, 第 30 回日本バイオフィルム学会学術集会, 2016 年 7 月 2 日, 第一三共本社ビル (東京都中央区)

常田聡, 河合祐人, 宮川聡史, 一色理乃,

松本慎也，“遺伝子発現解析とシングルセル観察から探る Dormant Persisters の正体”，第 89 回日本細菌学会総会（招待講演），2016 年 3 月 24 日，大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

河合祐人，宮川聡史，一色理乃，奥田修二郎，松本慎也，常田聡，“遺伝子発現から探る休止細菌の分子機構”，2015 年 7 月 11 日，ホテル竹島（愛知県蒲郡市）

6．研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

奥田 修二郎 (OKUDA, Shujiro)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：00512310