

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07493

研究課題名（和文）トキシン-アンチトキシン系を利用して薬剤耐性菌の拡大を抑える

研究課題名（英文）Repression of the spread of antimicrobial resistant 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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、薬剤耐性菌（以下、耐性菌）の拡大が深刻な社会問題となり、その対策が急務になっている。耐性菌が増殖することに加えて、薬剤に耐性を与える遺伝子や変異が他の菌に取り込まれる水平伝播が、耐性菌拡大の要因である。水平伝播をおこすしくみとして、形質導入、形質転換、および接合が知られている。本研究では、細菌がもつトキシン-アンチトキシン系（以下、TA）が形質導入の過程にあたる溶原ファージの誘発を抑制することを明らかにした。また、TA系がプラスミドDNAの形質転換を抑制することも見出した。以上の結果は、TA系が水平伝播を抑えるしくみとして機能することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、薬剤耐性菌（以下、耐性菌）の拡大が深刻な社会問題となり、その対策が急務になっている。耐性菌が増殖することに加えて、薬剤に耐性を与える遺伝子や変異が他の菌に取り込まれる水平伝播が、耐性菌拡大の要因である。水平伝播をおこすしくみとして形質導入、形質転換、および接合が知られている。本研究では、細菌がもつトキシン-アンチトキシン系（以下、TA）が形質導入と形質転換を抑えることを見出した。今後、TAを活性化するしくみや物質を発見できれば、薬剤耐性菌の蔓延を抑える対策に応用できる可能性がある。また、本研究はTAの新たな役割を明らかにしたことにともなり、細菌学分野の進展にも貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the spread of drug-resistant bacteria has become a serious social problem, and a solution to this problem is urgently needed. In addition to the proliferation of resistant bacteria, horizontal gene transfer, in which genes or mutations that confer resistance to a drug are taken up by other bacteria, is a cause in the spread of resistant bacteria. Transduction, transformation, and conjugation are known as mechanisms that lead to the horizontal gene transfer. In this study, we found that the bacterial toxin-antitoxin system (TA) which is a genetic module composed of a toxin and its cognate antitoxin, inhibits the induction of lysogenic phages during the transduction process. We also found that the TA system suppressed the transformation of plasmid DNA. These results indicate that the TA system can function as a mechanism to suppress the horizontal gene transfer.

研究分野：分子微生物学

キーワード：トキシン-アンチトキシン系 細菌 ファージ 水平伝播 形質転換 形質導入

1. 研究開始当初の背景

近年、薬剤耐性菌（以下、耐性菌）の拡大が深刻な社会問題となり、その対策が急務になっている。耐性菌が増殖することに加えて、薬剤に耐性を与える遺伝子や変異が他の菌に取り込まれる水平伝播が、耐性菌拡大の要因である。したがって、水平伝播を抑えるしくみや阻害物質の発見は、耐性菌の拡大を抑える対策に貢献すると考えられる。水平伝播は、形質導入、形質転換、接合の3つの機構により引き起こされ、それらの分子メカニズムは解明が進んでいる。一方、水平伝播を抑えるしくみや阻害物質に着目した研究は少なく、知見が乏しいのが現状である。

細菌は自身の増殖を停止させるトキシンをもっており、これはプラスミドの維持やストレス応答、抗ファージ作用など、細菌のさまざまな現象に関わることが知られている。トキシン遺伝子は、トキシンの活性を抑えるアンチトキシンの遺伝子と並んで存在し、トキシン-アンチトキシン系（以下、TA）を構成する。TAは細菌界に広く保存され、染色体やプラスミドには種類が異なる複数のTA遺伝子座が存在する。

申請者は、これまでに大腸菌新規TAを複数発見し、さらにTAの新たな役割として抗ファージ作用を見出した。申請者はこの結果をふまえて、TAがファージを介しておこる形質導入を抑えるのではないかという着想に至った。また、TAはストレスにより活性化することが知られている。したがって、形質転換や接合でおこる外来DNAの導入が菌にとってストレスになり、TAが活性化して、形質導入だけでなく形質転換や接合をも抑制するのではないかという着想にも至った。

2. 研究の目的

トキシン-アンチトキシン系（以下、TA）が形質導入、形質転換、接合を抑える可能性を検証し、その抑制メカニズムを解明する。さらに、TAを活性化する可能性があるペプチド核酸が水平伝播を抑える物質として機能するかを検証する。

3. 研究の方法

本研究では以下の3つの計画を実施した。

計画①：形質導入に対するTAの抑制作用を明らかにする。
TAがファージを介しておこる形質導入を抑える可能性を検証し、その抑制メカニズムを明らかにする。形質導入は、DNAに損傷を与える紫外線や抗生物質マイトマイシンC (MMC) などによりファージが誘発される過程（誘発）とファージ感染後にファージゲノムが細菌ゲノムに組み込まれる過程（溶原化）からなる。そこで、大腸菌 O157 株に感染する溶原ファージ Sp5 を対象として、誘発と溶原化のそれぞれに対するTAの抑制作用を検討した。

計画②：形質転換および接合に対するTAの抑制作用を明らかにする。
ファージ感染（形質導入を含む）だけでなく、紫外線や高温などのストレスはTAを活性化することが知られている。形質転換や接合では、外来DNAが菌内へ導入されるため、受容菌はそれをストレスとして受容し、TAが活性化すると予想される。そこで、TAが形質転換および接合を抑える可能性を検証し、その抑制メカニズムを明らかにする。

計画③：TAを活性化するペプチド核酸が水平伝播を抑える物質として機能するかを検証する。
TAを活性化する物質は、水平伝播の抑制さらには耐性菌拡大の抑制に応用できる可能性がある。計画③では、TAを活性化する可能性があるペプチド核酸が水平伝播を抑える物質として機能するかを検証する。

4. 研究成果

計画①「形質導入に対するTAの抑制作用を明らかにする」では、大腸菌 K-12 株が持つ36種類のTAのうち、トキシンがRNaseをコードする11種類のTAを全て欠失した株（11TA欠失株）を作製し、ファージ誘発に対するTAの関与を調べた。11TA欠失株ではSp5ファージの誘

発率が増加したことから、欠失した TA の複数もしくはどれかが誘発を抑制することがわかった。さらに、Sp5 ファージの溶原化に対する TA の関与も調べたところ、11 種類の TA は溶原化に影響を与えないことがわかった。

TA が誘発を抑制する分子機構の解明するために、誘発に必須な遺伝子（ファージゲノムの切り出しや環状化、DNA 複製を行う遺伝子）の mRNA 量を RT-PCR で測定したが、野生型と TA 欠失株で発現量に大きな違いは見られなかった。さらに、TA 存在下において、誘発時の生菌数を詳細に解析したところ、TA のトキシンが誘発時に活性化して大腸菌の増殖を阻害することで、産生される子ファージ数が減少し、誘発が抑えられる可能性が強く示唆された。ちなみに、この結果は、2023 度から採択された科研費基盤研究 C「新規の抗ファージ機構が薬剤耐性菌の拡大を抑える」の着想をもたらした。

計画②「形質転換及び接合に対する TA の抑制作用を明らかにする」では、11TA 欠失株を用いて、複製起点および分子量が異なる 3 種類のプラスミドの形質転換効率を測定した。その結果、欠失した 11 種類の TA の 1 つ、RnlA-RnlB がプラスミドの形質転換効率を約 1/3 に減少させることがわかった。この結果は TA が形質転換を抑える初めての報告となる。現在、形質転換時に、TA のトキシンが活性化して大腸菌の増殖を阻害することで、形質転換効率が減少する可能性について検討している。接合に対する TA の作用については、接合の実験系の確立ができなかったため、実験が実施できなかった。

計画③「TA を活性化するペプチド核酸が水平伝播を抑える物質として機能するかを検証する」については、本実験の基盤となる Rownicki らの結果（MazE アンチトキシンの mRNA 翻訳開始領域に結合するアンチセンス DNA を用いて、MazE の翻訳を抑制し、MazF トキシンを活性化する）の再現性を試みたがうまくいかず、現在実験系の構築を再検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki Takaomi, Takita Saya, Fujishiro Takashi, Shintani Yunosuke, Nojiri Satoki, Yasui Ryota, Yonesaki Tetsuro, Otsuka Yuichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Phage single-stranded DNA-binding protein or host DNA damage triggers the activation of the AbpAB phage defense system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e0037223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00372-23	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 -

1. 著者名 Suga Akiyo, Kawaguchi Marina, Yonesaki Tetsuro, Otsuka Yuichi	4. 巻 87
2. 論文標題 Manipulating Interactions between T4 Phage Long Tail Fibers and Escherichia coli Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00423-21	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 -

1. 著者名 Takada Kosuke, Hama Kotone, Sasaki Takaomi, Otsuka Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 The hokW-sokW Locus Encodes a Type I Toxin-Antitoxin System That Facilitates the Release of Lysogenic Sp5 Phage in Enterohemorrhagic Escherichia coli O157	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 796 ~ 796
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins13110796	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 劉可, 佐々木優香, 吉岡瑞貴, 茂木優奈, 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ECs3274-ECs3275の解析
3. 学会等名 第10回ファージ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 隠岐大稀、大塚裕一
2. 発表標題 トキシン-アンチトキシンシステムの活性化に関わるファージ因子の同定と解析
3. 学会等名 第1回ファージ若手会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大塚裕一
2. 発表標題 細菌とファージの生存競争
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐々木優香，吉岡瑞貴，茂木優奈，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ECs3274-ECs3275の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 2. 劉可，大塚裕一
2. 発表標題 ファージがコードするトキシン - アンチトキシンシステムhokW-sokW の発現制御
3. 学会等名 第9回ファージ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木優香, 吉岡瑞貴, 茂木優奈, 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ECs3274-ECs3275の解析
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yuichi Otsuka, Maria Grazia Giuliano, Danai Athina Irakleidi, Jagna Chmielowska-Bak, Fabian Hia, Daniel R. Schoenberg, Priyanka Pitcheshwar, Nan Zhang	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 178
3. 書名 RNA Damage and Repair	

〔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
---------	---------