

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670219

研究課題名(和文) リボソームRNAの抗生物質耐性変異の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of antibiotic resistant ribosomal RNAs

## 研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki, Kentaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60344123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境ゲノム由来16S rRNA遺伝子を大腸菌欠損株に導入し、生育を相補する16S rRNAをライブラリー化した。この際、PCRプライマーにより19番目の塩基と916番目の塩基との間でミスマッチが生じる場合、ミスマッチの種類や16S rRNA配列全体によってはスペクチノマイシン耐性が現れることが判明した。また、ミスマッチを含まないように設計したPCRプライマーを用いて得た16S rRNA遺伝子置換大腸菌ライブラリーを種々の抗生物質存在下でスクリーニングしたところ、スペクチノマイシン(4)、G418(10)、テトラサイクリン(2)、アプラマイシン(1)に対して耐性を示す株が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have constructed a metagenomic library of 16S rRNA, which complemented the growth of the null mutant of Escherichia coli. When we used a forward primer, which could generate unwanted mismatch between 19 and 916 bases, we found some of the mutant strains happened to obtain a spectinomycin resistance. When a primer, which would not generate mismatch at the site, no such resistance was observed. From the metagenomic library of the 16S rRNA genes, we identified a various antibiotic resistant strains: spectinomycin (4 clones); G418 (10 clones); tetracycline (2 clones); and apramycin (1 clone). These clones contained some new nucleotides that provide the resistance on the host strain.

研究分野：微生物学

キーワード：リボソーム 抗生物質 耐性 遺伝子変異 大腸菌

### 1. 研究開始当初の背景

抗生物質耐性機構の解明は、細菌感染症の予防・治療にとって極めて重要な研究課題であり、最近では耐性遺伝子の網羅的解析（レジストーム解析）が盛んに行われている。その結果、新規耐性遺伝子の発見や、それらが従来想定していなかったような環境等（例えば院内ではなく自然環境）にも流布していることなど、耐性獲得機構の一端が明らかにされた。このように大きな進展を見せているレジストーム研究であるが、解析対象が失活酵素等をコードする遺伝子に限定されており、抗生物質の標的分子の代表格であるリボソーム変異などは研究されていない。これはリボソーム機能解析が本質的に困難なためである。

リボソームは3つのRNAと57もの蛋白質からなる分子量270万の超分子複合体であり、構成要素のどれにも変異が入ったかを同定するのは極めて困難である。また、耐性の主要因となるrRNAも研究歴が長いにもかかわらず変異情報は圧倒的に不足している。16S rRNA 遺伝子配列を単純に並べたところで耐性変異を推定することは不可能に等しい。さらに、rRNA オペロンはゲノム内に複数コピー存在する（例えば大腸菌では7コピー）ため、そのうちの一つに耐性変異が生じたとしても表現型として現れないことが多い。

これに対し我々は、大腸菌のrRNA オペロン欠損株(Δ7株)を用いることで、単一rRNA オペロン機能解析システムを開発した。本システムを用いて異種由来の16S rRNA 遺伝子の機能をハイスループットスクリーニングしたところ、大腸菌の遺伝子欠損を相補可能な異種16S rRNA を次々と発見した

(Kitahara & Miyazaki, *Nature Commun.*, 2011; Kitahara et al., *PNAS*, 2012)。そこで我々は、rRNA のレジストーム研究に本システムを適用すればrrn 遺伝子中の耐性変異を極めて効率的に発見できるのではないかと着想した。

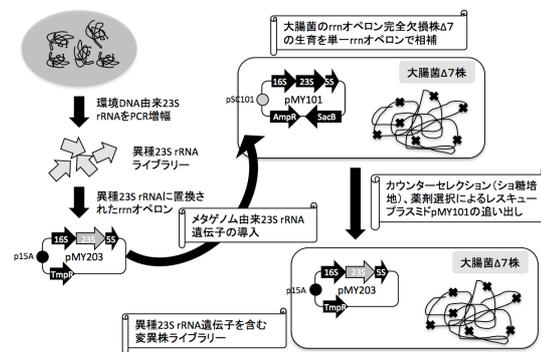
### 2. 研究の目的

本研究課題では、以下の流れに従い、rRNA 変異に起因する耐性変異を網羅的にスクリーニングする。

- (1) 各種環境ゲノムを鋳型に 16S/23S rRNA 遺伝子をPCR増幅する。
- (2) (1)で得た異種生物由来のrRNAをΔ7株に導入し、生育に基づきスクリーニングする。
- (3) (2)で得られた変異株ライブラリーを抗生物質の存在下で培養する。
- (4) 生育の見られた変異株のrRNA 遺伝子解析により耐性変異を明らかにする。本研究では16S, 23S rRNA ライブラリーの大規模スクリーニングにより、rRNA に起因する抗生物質耐性変異の集大成となるデータベースを構築することを目指す。

### 3. 研究の方法

まず、大腸菌のrRNA オペロンの完全欠損株(Δ7株)を宿主として、異種由来の16S rRNA、23S rRNAにより生育の相補された変異株を取得する。16S rRNA、23S rRNA 遺伝子の給源としては種々の環境ゲノムを用い、ライブラリー規模の拡大を図る。次に変異株ライブラリーをアミノグリコシド系、テトラサイクリン系、マクロライド系など、リボソーム攻撃型の抗生物質存在下で網羅的にスクリーニングする。得られた耐性株のrRNA 遺伝子の配列解析から耐性変異を推定するとともに、大腸菌rRNA への変異の組み込みを行い、耐性をもたらず変異を特定する。全く新規な変異点が見られることも予想されるが、大腸菌rRNA とのキメラ創成等の手法により変異点を含む領域の限定を行う。上記研究を通じ、rRNA レジストームに関する情報を統合・体系化する。



### 4. 研究成果

まず、種々の環境より調製した環境ゲノムを鋳型に16S rRNA遺伝子をPCR法により増幅した。この際、増幅プライマーとしては、遺伝子開始直後に位置する系統群ごとに特徴的な部位を含むもの、含まないものの2種類を用い、ミスマッチの影響を合わせて解析した。

ゲノムデータベースに登録されている遺伝子情報からは、大腸菌の属するγプロテオバクテリア細菌は、19番目の塩基としてAを有するものが多く、その他の系統群ではCを有するものが多い。この塩基は916番目の塩基と対応しているが(19A-916Uまたは19C-916G)、本来の組み合わせと異なる場合、機能に影響が出る恐れがある。そこで、19A-916Gまたは19C-916Uとなる人工的な16S rRNAの機能を配列既知の微生物由来の16S rRNAを用いて評価した。その結果、塩基対の組み合わせによってはリボソーム活性をほぼ失うものや、温度感受性の変化するものなどが出現した。さらに興味深いことに、ミスマッチを含む変異体の幾つかにスペクチノマイシン耐性を示すものが出現した。

上記検討とは別に、ミスマッチを含まないように設計したプライマーを用いて得た16S rRNA 遺伝子のうち、大腸菌欠損株内での機能相補性、引き続いて様々な抗生物質存在下で耐性スクリーニングを行ったところ、新規変

異を見いだすことができた。取得したクローンについて塩基配列解析を行った結果、微生物の起源としては、 $\gamma$ -プロテオバクテリアのものや門レベルで異なるものが含まれていた。

種々のリボソーム攻撃性の抗生物質を使用してライブラリーをスクリーニングした結果、スペクチノマイシン (4 株)、G418 (10 株)、テトラサイクリン (2 株)、アプラマイシン (1 株) に対して耐性を示す株が得られた。さらに、いくつかの薬剤に対して多重耐性を示すものも存在した。推定された変異点を大腸菌 16S rRNA に導入した結果、同様の耐性を示す結果が得られる場合が大多数であったが、逆に異種 16S rRNA の推定耐性変異を大腸菌型に戻した場合にも、完全に耐性が消失しない場合も散見された。これは、耐性の発現機構が一塩基支配ではないことや複合的な構造の歪みなどによりもたらされたためと考えている。

従来、rRNA は水平伝播しない分子として信じられていたが、本研究で示されたように、水平伝播により、抗生物質耐性という新たな有用形質を獲得する可能性が強く示唆された。我々は、生物情報解析により、16S rRNA が異種微生物間で頻繁に水平伝播しているのではないかという予備的な結果を得ている。上述の通り、rRNA はゲノム中に複数コピー存在するため、耐性の発現には「潜伏期」があると思われる。すなわちゲノム中の全ての rRNA が水平伝播とそれに引き続くゲノム内組換えにより乗っ取られて初めて強い耐性が現れると考えられる。このモデルを想定すると、抗生物質耐性変異を 1 rRNA レベルで知り、その出現前に適切な対策を取ることが耐性の爆発的な蔓延に重要であると思われる。

今回の課題では 23S rRNA については、技術的な困難 (PCR プライマーの設計) により 16S rRNA を中心に研究を行ったが、16S rRNA について上記耐性発現メカニズムについて早急に論文成果などにまとめ公表するとともに、耐性変異 DB についても構築していきたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- 1 Tsukuda M, Nakashima N, Miyazaki K (2015) Counterselection method based on conditional silencing of antitoxin genes in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 120(5):591-595. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.03.008
- 2 Miyazaki K (2015) Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in *Escherichia coli*. *Biotechniques* 58(2):86-88. doi 10.2144/000114257

- 3 佃美雪、宮崎健太郎 (2015) 「16S リボソームRNAの水平伝播実験から見えてくるリボソームの可塑性」*生化学* 87(4):475-477.
- 4 宮崎健太郎 (2014) 「Ribosomal RNAの人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン」*生物工学会誌* 92(11):607-611.
- 5 宮崎健太郎 (2014) 「リボソーム改変による大腸菌宿主デザイン」*環境バイオテクノロジー学会誌* 14(1):3-8.

〔学会発表〕 (計 16 件)

1. 宮崎健太郎, リニア機動分子リボソームの進化学, 日本化学会 第 96 春季年会, 同志社大学 (京都府京田辺市), 2016/3/27
2. Tsukuda M, Miyazaki K, RINSPEX technique for *Escherichia coli* strain engineering, *Biosystems Design* 2.0, Matrix Level 4, (Biopolis, Singapore), 2016/3/21
3. 宮崎健太郎, リボソーム進化学, 進化学分子工学研究会, 千葉工業大学 (千葉県習志野市), 2015/11/20
4. 宮崎健太郎, 大腸菌リボソームの変異耐性, 第17回 日本進化学会年会, 中央大学 (東京都文京区), 2015/8/21
5. 宮崎健太郎, リボソーム改変によるバクテリア細胞工学, 第17回 日本進化学会年会, 中央大学 (東京都文京区), 2015/8/20
6. 宮崎健太郎, 大腸菌リボソームの変異耐性, 第17回日本RNA学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市), 2015/7/15
7. 宮崎健太郎, メタゲノムを活用した酵素スクリーニング, 第15回 日本蛋白質科学会年会, あわぎんホール (徳島県徳島市), 2015/6/26
8. 佃 美雪, 宮崎健太郎, 大腸菌における 16S rRNAの置換変異によるリボソームの寛容性の検証, 第3回リボソームミーティング, ANAホリデイ・イン リゾート宮崎 (宮崎県宮崎市), 2015/3/17
9. 宮崎健太郎, リボソーム改変によるバクテリア細胞工学, 第10回理研「バイオものづくり」シンポジウム, 理化学研究所 (埼玉県和光市), 2015/3/6
10. 佐藤 允治, 宮崎健太郎, バクテリア16S rRNA遺伝子の進化, 日本ゲノム微生物学会年会, 神戸大学 (兵庫県神戸市), 2015/3/6
11. 佃 美雪, 宮崎健太郎, リボソーム改変による大腸菌の高温適応進化, 第9回日本ゲノム微生物学会年会, 神戸大学 (兵庫県神戸市), 2015/3/6
12. Miyazaki K, Metagenomic screening for 16S rRNA-based antibiotic resistance genes, 1st international Caparica Conference in Antibiotic Resistance,

Hotel Ever Caparica (Caparica, Portugal), 2015/1/27

13. 宮崎健太郎, Diversifying cellular phenotype through ribosome engineering, 細胞を創る研究会7.0, 東京大学(東京都文京区), 2014/11/13
14. 宮崎健太郎, PheS変異体を利用した新規大腸菌カウンターセクションマーカーの開発, 第66回日本生物工学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014/9/11
15. 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎健太郎, Toxin-Antitoxin systemを利用した大腸菌カウンターセクション技術の開発, 第66回日本生物工学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014/9/11
16. 佐藤 允治, 宮崎健太郎, 水平伝播によるバクテリア16S rRNA遺伝子の進化の検証, 日本進化学会 第16回大会, 高槻現代劇場(大阪府高槻市), 2014/8/22

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 新規なカウンターセクションマーカー

発明者: 宮崎 健太郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-155954

出願年月日: H26/7/31

国内外の別: 国内

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

1. <https://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/>

2. <https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-synthe/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki Kentaro)

産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号: 60344123