

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

細胞内代謝変動を介した乳酸代謝遺伝子ldhA発現による大腸菌  
persister形成機構の解明

Understanding of E. coli persister formation induced by ldhA expression  
via intracellular metabolic changes

申請者

山本 尚輝  
Naoki YAMAMOTO

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2021年5月

1929年にペニシリンが発見されて以来、抗菌薬による感染症治療が可能となった。しかし、現在、抗菌薬で細菌感染症を治療することができない難治性の感染症が世界規模の課題となっている。感染症を難治化させる主な原因として、抗菌薬耐性 (Antibiotic resistance) を持った細菌の出現が挙げられる。抗菌薬耐性菌は水平伝播や突然変異を介した遺伝的変化を伴うことが知られており、既存の抗菌薬で治療ができない場合、菌血症によって死に至る場合もある。このまま耐性菌感染症の対策を講じなければ、2050年には耐性菌感染症による年間死者数が世界全体で1,000万人を超えるという統計的な推測結果も得られている。一方、耐性菌の出現以外にも感染症を難治化させる現象として抗菌薬抵抗性 (Antibiotic persistence) が近年注目されている。抗菌薬抵抗性が原因の治療の失敗は結核、尿路感染症、およびサルモネラ感染症などで見られ、しばしば感染症の慢性化や再発を引き起こすため、長い年月にわたって人々の健康に悪影響を及ぼす。抗菌薬抵抗性は *persister* と呼ばれる非遺伝的な生存機構が原因で生じることが知られている。*persister* は、集団のごく一部で形成され、ほとんど増殖しない休眠状態で生存している。休眠した *persister* は、増殖プロセスを標的とした様々な抗菌薬に対して生き残ることが知られており、生き残った *persister* は抗菌薬の脅威がなくなると再増殖するため、感染症の慢性化や再発に寄与することが問題となっている。*persister* は個体間の遺伝子発現変動によって集団の一部で確率的に生じると考えられているが、集団の一部で *persister* が確率的に出現するメカニズムは全く明らかになっていない。また、*persister* を誘導する代謝経路として、栄養枯渇や遺伝子損傷に対するストレス応答経路や細胞内のエネルギー代謝状態の抑制経路が一部報告されているものの、*persister* 形成経路の全容を説明する十分な知見は得られていない。そこで、本研究では *persister* 根絶による感染症治療を実現させるため、未解明の *persister* 形成経路を解明することを目的とした。

第1章では、本研究を進める上で重要となる研究背景を示した。当研究室では、これまでモデル微生物である大腸菌を用いて、遺伝子型で検出できない *persister* を見分ける新規手法を開発した。細胞分裂の収縮環を担うZリングの構成タンパク質であるFtsZの両端に蛍光タンパク質であるCFPとYFPを融合させたマーカータンパク質を発現させた大腸菌株を作成し、蛍光共鳴エネルギー移動を利用して分裂状態にある細菌を特異的に検出することに成功した。本手法を用いて、非分裂状態の *persister* 集団と分裂細菌集団をセルソーターで分取し、トランスクリプトーム解析を実施した結果、乳酸脱水素酵素をコードする嫌気代謝遺伝子 *ldhA* が *persister* 集団で高発現することを明らかにした。以上の既往研究より、本研究では *ldhA* が大腸菌の *persister* 形成を誘導する新規経路であると予想し、詳細な *persister* 形成メカニズムを解明することとした。

第 2 章では、*ldhA* 過剰発現株を用いて大腸菌の persister 形成の影響を調べた。その結果、*ldhA* 過剰発現株では、機序の異なる 3 種の抗菌薬であるオフロキサシン、アンピシリン、およびゲンタマイシンに対してそれぞれ persister の割合が増加したことが明らかになった。また、自然状態における大腸菌の *ldhA* 発現を蛍光で可視化した *ldhA* レポーター株を作成し、マイクロ流体デバイス中でタイムラプス観察したところ、集団の一部で *ldhA* が一時的に発現した後、増殖抑制および抗菌薬抵抗性を示したことから、*ldhA* は集団の一部で確率的に発現し persister を形成していることが示唆された。つぎに、*ldhA* 発現によって誘導された persister がどのような性質を持っているのか調べるため、既往研究で報告されている persister の性質と比較した。これまで、persister の多くは細胞プロセスに必要なプロトン駆動力や ATP などのエネルギー代謝を抑制させることで細胞の代謝全体を抑制することが知られていた。そこで、*ldhA* 発現によって誘導された persister の性状を調べるため、*ldhA* を過剰発現させ persister を誘導した際の細胞内のエネルギー代謝活性を測定した。その結果、空ベクター株と比較して *ldhA* 過剰発現株のプロトン駆動力と ATP が増加することが明らかとなった。以上の結果から、本研究で着目した *ldhA* 発現による persister 形成経路は既往研究で報告されているエネルギー代謝を抑制する persister 形成経路とは異なる新規な経路であることが推察された。

第 3 章では、*ldhA* 発現によって細胞内に蓄積された ATP が抗菌薬に対する何らかのストレス応答経路に利用されることで生き残っているのではないかと予想し、*ldhA* 発現による詳細な persister 形成メカニズムについて調べた。まず、*ldhA* 発現によって増加したエネルギーを消費するストレス応答経路としてヒートショック応答、薬剤排出ポンプ、酸化ストレス応答、緊縮応答、および SOS 応答経路に着目した。*ldhA* を過剰発現させた際の各経路の主要遺伝子の発現量を qRT-PCR で測定したところ、緊縮応答関連の *relA*、*dksA*、*obgE* と SOS 応答関連遺伝子の *recA* の発現量が増加した。本研究では、特にオフロキサシンなどのフルオロキノロン系抗菌薬に対する生存機構として知られている SOS 応答に着目し、*ldhA* 発現による persister 形成への関与を調べることにした。まず、*recA* が *ldhA* の下流で persister 形成を誘導しているかどうか調べるため、大腸菌 *recA* 欠損株を作成したところ、*ldhA* を過剰発現させた際の persister の増加は見られなくなった。したがって、*recA* 遺伝子は *ldhA* 発現の下流で persister 形成に関与することが示唆された。そこで、*recA* が担う詳細な persister 経路を調べるため、SOS 応答による遺伝子修復機構に着目した。既往研究では、キノロン系抗菌薬に伴う遺伝子損傷の修復が persister の再増殖に重要であることが報告されているため、*ldhA* 発現時に前もって SOS 応答を介した遺伝子修復機構を活性化させることで将来的な抗菌薬ストレスの際に再増殖可能な persister が誘導

されているのではないかと予想した。そこで、抗菌薬除去後の再増殖活性を調べるため、オフロキサシンで 5 h 処理した *ldhA* 過剰発現株から形成させたコロニーのサイズを測定したところ、空ベクター株と比較してコロニーサイズの大きい集団が増加することが示された。この結果から、SOS 応答による遺伝子修復機構を介して抗菌薬除去後の再増殖を活性化させていることが示唆された。さらに、抗菌薬処理時の遺伝子損傷レベルを間接的に調べるため、遺伝子損傷時に産生することが知られているヒドロキシラジカル量をフローサイトメーターで測定した。その結果、*ldhA* 過剰発現株においてオフロキサシン処理 2 h 以降においてヒドロキシラジカル量の産生が抑制されたことから、*ldhA* 発現によって損傷を受けた遺伝子が修復されていることが示唆された。以上の結果から、*ldhA* 発現は、SOS 応答を介した遺伝子修復機構の活性化を介してキノロン系抗菌薬存在下における生存および再増殖が可能な persister を誘導していると考えられる。

つぎに、*ldhA* 発現による代謝変化がどのような経路で SOS 応答を介した persister 形成を誘導しているのか調べるため、メタボローム解析を実施した。大腸菌野生株および *recA* 欠損株に対してそれぞれ *ldhA* 過剰発現プラスミドとその空ベクタープラスミドを導入した 4 株から細胞内代謝物を抽出し、キャピラリー電気泳動質量分析計を用いて代表的な代謝物濃度を測定した結果、*recA* が存在する場合のみ、*ldhA* 発現によってプリン類やピリミジン類などの核酸の合成経路が増加する傾向が見られた。また、代謝物レベルで見ると、*ldhA* 発現によってホスホエノールピルビン酸の増加やアセチル CoA の減少傾向が見られたことと、qRT-PCR の結果から *ldhA* 発現によって糖新生に必要な *pck* 発現量の増加が見られたことから、*ldhA* 発現による糖新生を介した核酸合成経路の活性化を介して核酸を貯蔵することで遺伝子修復を早めていることが予想された。以上の結果から、本研究では *ldhA* 発現による SOS 応答の活性化経路と細胞内の核酸貯蔵を介して抗菌薬による DNA 損傷から生き残る新たな persister モデルを提唱した。

第 4 章では、本研究の結論および今後の展望を示した。本研究では、確率的な *ldhA* 発現による persister 形成過程において、細胞内の核酸貯蔵と SOS 応答経路の活性化が起きているという重要な知見が得られた。今後、本研究で提唱した persister モデルを分子生物学的手法でさらに検証することで、persister を標的とする感染症治療への応用に繋がることが期待される。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名： 山本 尚輝

印

(2021年 4月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	○Naoki Yamamoto, Rino Isshiki, Yuto Kawai, Daiki Tanaka, Tetsushi Sekiguchi, Shinya Matsumoto, Satoshi Tsuneda, “Stochastic expression of lactate dehydrogenase A induces <i>Escherichia coli</i> persister formation”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 126 (1), 30-37, 2018
講演 (海外)	Naoki Yamamoto, Rino Isshiki, Yuto Kawai, Daiki Tanaka, Tetsushi Sekiguchi, Shinya Matsumoto, Satoshi Tsuneda, “Dormant and metabolic-active persister formation in <i>Escherichia coli</i> mediated by the expression of lactate dehydrogenase A”, 8th Congress of European Microbiologists FEMS, Glasgow, July, 2019 Naoki Yamamoto, Rino Isshiki, Yuto Kawai, Daiki Tanaka, Tetsushi Sekiguchi, Shinya Matsumoto, Satoshi Tsuneda, “Stochastic ldhA expression induces <i>Escherichia coli</i> persister formation irrespective of energy repression”, EMBO workshop Bacterial Persistence and Antimicrobial Therapy, Ascona, June, 2018
(国内)	山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 大野友梨乃, 松本慎也, 常田聡, “エネルギーを貯蓄して抗菌薬に備える大腸菌persisterの形成機構”, 第92回日本細菌学会総会, 札幌, 2019年4月 山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, “エネルギー蓄積を伴う大腸菌persisterの形成機構”, 第101回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 2018年11月 山本尚輝, 河合祐人, 常田聡, 「大腸菌ldhA発現によるpersister形成メカニズムの解明」, 第91回日本細菌学会総会, 2018年3月, 福岡, 口頭発表（依頼講演） 山本尚輝, 「確率的なldhA発現による大腸菌persister形成の分子機構解明」, 第6回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2018年3月, 東京, 口頭発表 山本尚輝, 河合祐人, 常田聡, 「ldhA発現による大腸菌persister形成と好気代謝制御との関係」, 2017年日本細菌学会関東支部インターラボセミナー, 2017年11月, 群馬, 口頭発表 山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, 「大腸菌の乳酸発酵遺伝子ldhA発現によるpersister形成とプロトン駆動力との関係」, 第69回日本生物工学会大会, 2017年9月, 東京, ポスター発表 山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, 「ldhA発現による大腸菌persister形成と中心代謝経路の関係」, 環境微生物系学会合同大会2017, 2017年8月, 仙台, ポスター発表 山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, 「ldhAの発現による大腸菌persister形成メカニズムの解明」, 第11回細菌学若手コロッセウム, 2017年8月, つくば, 口頭およびポスター発表

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名： 山本 尚輝

印

(2021年 4月 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, 「ldhAの発現による大腸菌persister形成メカニズムの解明」, 第11回細菌学若手コロッセウム, 2017年8月, つくば, 口頭およびポスター発表</p> <p>山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 松本慎也, 常田聡, 「ldhA発現を介したpersister形成とプロトン駆動力との関係」, 第31回日本バイオフィルム学会学術集会, 2017年7月, つくば, 口頭発表</p> <p>山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲史, 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, 仙台, ポスター発表</p> <p>山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲史, 松本慎也, 常田聡, 「確率的な ldhA 発現に伴う persister 形成メカニズムの解明」, 第5回日本生物工学会東日本支部コロキウム, 2017年3月, 東京, ポスター発表</p> <p>山本尚輝, 一色理乃, 河合祐人, 田中大器, 関口哲史, 松本慎也, 常田聡, 「確率的な ldhA 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, 横須賀, ポスター発表</p>
その他	<p>山本尚輝, 大野友梨乃, 常田聡, 「サルモネラ菌の1細胞レベルのエネルギー量のばらつきが多様な persisterを生む」, 第94回日本細菌学会総会, 2021年3月, オンライン, 口頭発表</p>