

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

2021年7月

山本 尚輝
Naoki YAMAMOTO

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

2021年7月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
生命医科学専攻 環境生命科学研究

山本 尚輝
Naoki YAMAMOTO

目次

略語	4
第 1 章 序論	6
1.1 緒言	6
1.2 細菌感染症の蔓延	7
1.3 耐性菌の検出方法および耐性メカニズム	7
1.3.1 耐性菌の検出方法	7
1.3.2 耐性メカニズム	8
1.4 抗菌薬抵抗性を示す persister の発見	8
1.5 persister の性質	9
1.5.1 persister の性質は遺伝するのか?	9
1.5.2 persister の増殖活性	9
1.6 persister 研究の意義	10
1.6.1 persister 研究における臨床的意義	10
1.6.2 persister 研究における生物学的意義	10
1.7 persister 形成メカニズム	11
1.7.1 persister の評価方法	11
1.7.2 Toxin/Antitoxin 機構	13
1.7.3 ppGpp を介した緊縮応答経路	13
1.7.4 SOS 応答による persister の生存経路	14
1.7.5 エネルギー代謝抑制を介した経路	16
1.7.6 確率的な persister 発生経路	17
1.8 persister の定義	17
1.9 新規 persister 分取法を用いた persister 遺伝子の探索	17
1.10 研究目的	18
1.11 本論文における各章の構成	19
第 2 章 <i>ldhA</i> 発現による persister 誘導経路の発見および性状解析	20
2.1 緒言	20
2.2 研究目的	20
2.3 実験方法	20

2.3.1 使用した株および培養条件	20
2.3.2 <i>ldhA</i> に着目した遺伝子組換え株の作成	22
2.3.3 persister assay	24
2.3.4 マイクロ流体デバイスの作製	24
2.3.5 シングルセルタイムラプス観察	24
2.3.6 オッズ比を用いた有意差検定	25
2.3.7 定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)	25
2.3.8 細胞外 D-乳酸濃度の測定	25
2.3.9 細菌内膜電位測定	26
2.3.10 ATP 産生量の測定	26
2.3.11 NADH/NAD ⁺ 比測定	26
2.4 結果	27
2.4.1 <i>ldhA</i> 発現による persister 形成誘導の確認	27
2.4.2 自然状態における <i>ldhA</i> 発現細菌の観察	29
2.4.3 <i>ldhA</i> 発現細菌の増殖活性および抗菌薬抵抗性の追跡	30
2.4.4 <i>ldhA</i> 発現によって形成された persister のエネルギー代謝状態の解析	32
2.5 考察	34
2.5.1 なぜ <i>ldhA</i> が確率的かつ一過性の発現を示したのか	34
2.5.2 <i>ldhA</i> 発現による詳細な persister 形成経路について	34
2.6 結言	35
第3章 <i>recA</i> を介した <i>ldhA</i>-persister の生存機構	36
3.1 緒言	36
3.2 研究目的	36
3.3 実験方法	36
3.3.1 使用した株および培養条件	36
3.3.2 qRT-PCR	38
3.3.3 persister assay	39
3.3.4 ヒドロキシラジカル産生量の測定	39
3.3.5 遺伝子損傷レベルの測定	39
3.3.6 再増殖活性の評価	40
3.3.7 CE-MS/MS を用いた代謝物解析	40
3.3.8 統計解析	41
3.4 結果	41
3.4.1 <i>ldhA</i> 発現によるエネルギー依存的なストレス応答経路の探索	41

3.4.2 <i>recA</i> は <i>ldhA</i> 発現による persister 形成に必要か？	42
3.4.3 <i>ldhA</i> 発現による persister 形成と遺伝子修復機構活性との関係	44
3.4.4 <i>ldhA</i> 発現による代謝変化の網羅的な解析	50
3.4.5 <i>ldhA</i> 発現によって増加した代謝経路に関する遺伝子発現量の確認	54
3.5 考察	55
3.5.1 <i>ldhA</i> 発現による <i>recA</i> を介した生存機構	55
3.5.2 <i>ldhA</i> 発現による代謝変化と <i>recA</i> との関係性	57
3.5.3 他の抗菌薬に対する生存戦略	60
3.6 結言	61
第4章 結論および展望	62
4.1 <i>ldhA</i> 発現による大腸菌 persister 形成経路の発見	62
4.2 <i>ldhA</i> 発現によって誘導される persister の生存機構の探索	63
4.3 <i>ldhA</i> 発現による代謝変化と <i>recA</i> 依存的な persister 形成機構との関係	63
4.4 本研究の波及効果	64
謝辞	65
参考文献	66

略語

CFU: Colony forming unit
PBS: Phosphate-buffer saline
TCA: Tricarboxylic cycle
MIC: Minimum inhibitory concentration
PCR: Polymerase chain reaction
FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
IPTG: Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
CCCP: Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
VBNC: Viable but non-culturable
OD: Optical density
DNA: Deoxyribonucleic acid
FACS: Fluorescence-activated cell sorter
qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR
RLU: Relative luminescence unit
HPF: Hydroxyphenyl fluorescein
CE-MS: Capillary electrophoresis mass spectrometry
ZnAc: Zinc acetate
KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes
SCVs: Small colony variants
ROS: Reactive oxygen species
LC-MS: Liquid chromatography mass spectrometry
<代謝物>
MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MeOH: Methanol
ITP: Inosine triphosphate
UTP: Uridine triphosphate
ATP: Adenosine triphosphate
TTP: Thymidine triphosphate
GTP: Guanosine triphosphate
CTP: Cytosine triphosphate
IDP: Inosine diphosphate
UDP: Uridine diphosphate
ADP: Adenosine diphosphate
TDP: Thymidine diphosphate

GDP: Guanosine diphosphate
CDP: Cytosine diphosphate
IMP: Inosine monophosphate
UMP: Uridine monophosphate
AMP: Adenosine monophosphate
TMP: Thymidine monophosphate
GMP: Guanosine monophosphate
CMP: Cytosine monophosphate
NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
FAD: Flavin adenine dinucleotide
PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate
ADMA: Asymmetry dimethylarginine
Gly: Glycine
Ala: Alanine
Ser: Serine
Thr: Threonine
Phe: Phenylalanine
Trp: Tryptophan
Met: Methionine
Cys: Cysteine
Glu: Glutamate
Gln: Glutamine
Asn: Asparagine
Asp: Aspartate
Val: Valine
Ile: Isoleucine
Leu: Leucine
Arg: Arginine
His: Histidine
Tyr: Tyrosine
DHAP: Dihydroxyacetone phosphate
G6P: Glucose 6-phosphate
G3P: Glycerol 3-phosphate
PEP: Phosphoenolpyruvate
ppGpp: Guanosine tetraphosphate

第1章 序論

1.1 緒言

1929年にFlemingが抗菌薬のペニシリンを発見してから現在に至るまで、人類は感染症の撲滅に尽力してきた。しかし、実際は開発した抗菌薬に対する「耐性菌」が続々と出現し、感染症治療の失敗を招いている¹。耐性菌は、特定の抗菌薬を無効化する耐性遺伝子を獲得することによって出現する。耐性遺伝子は子孫に受け継がれるだけでなく、遺伝子が他の細菌種へ「運搬」されることによって耐性菌は爆発的に増加するため、既存の抗菌薬を用いた感染症治療はますます困難になっている²。このまま耐性菌が増加し、何も対策を講じなければ、2050年には耐性菌感染症による年間の死亡者数が1000万人を超えるという推定結果も報告されており、耐性菌対策は世界的にも喫緊の課題となっている³。

耐性菌が問題視されている一方、耐性を持たない細菌による感染症であれば必ず治療が可能であるわけでないことが明らかになってきた。1944年にイギリスの細菌学者であるBiggerは、耐性を持たない細菌集団の一部でペニシリンから生き残る集団を発見し、“persister”と命名した⁴。しかし、当時persisterの存在は感染症治療現場で生死に関わるほど重要な問題ではなかったため、長い間研究対象とされなかった。1983年になって、Moyedらがpersister誘導遺伝子であるhipAを発見して以来persisterの研究が再開され⁵、persisterが遺伝子変異を伴わない表現型の変異体であること^{6,7}、また増殖活性を低下させた「休眠」状態にあること⁸、さらに抗菌薬から生き残ったpersisterは抗菌薬の影響がなくなると再増殖し、感染症の再発や慢性化に寄与することが明らかとなり^{9,10}、persisterが耐性菌感染症とは異なる新たな脅威として再認識され始めた。最近の研究では、病原細菌で形成されたpersisterが感染症患者内で長期間潜伏することで耐性遺伝子を獲得しやすくなるという仮説が提唱されており、persisterは耐性菌形成を助長させるための一時的な生存戦略であると考えられている¹¹。したがって、persisterは単なる感染症治療のための研究だけではなく、細菌が持つ狡猾な生存戦略そのものが生物学的に興味深い研究分野に位置付けられている。現在もなお、persister形成機構を解明するために世界各国で研究が進められている一方、全容は解明されておらず、persisterを対象とした感染症治療への応用には至っていない。本研究では、未知のpersister形成経路を明らかにすることによってpersisterを制御するための知見を蓄積し、将来的にpersisterを標的とした慢性感染症および再発性感染症、そして耐性感染症における治療技術の開発を目指す。

1.2 細菌感染症の蔓延

古来より、人類は体内に感染して悪影響を及ぼす目に見えない病原性細菌に苦しめられてきた。1928年にイギリスの細菌学者である Fleming が世界初の抗菌薬「ペニシリン」を発見して以来、感染症は治療可能な病に位置付けられた^{1,12}。しかし、ペニシリンが1940年に正式に発売された時には、すでにペニシリンを分解するβ-ラクタマーゼをコードする「ペニシリン耐性菌」の出現が確認されていた¹³。その後も新たな抗菌薬が開発・発売される度に耐性菌は出現し、今もなお人類の脅威となっている。

1.3 耐性菌の検出方法および耐性メカニズム

1.3.1 耐性菌の検出方法

ペニシリン耐性を持つ細菌が発見されて以来、耐性菌を検出する様々な手法が開発されてきた。耐性菌は、高濃度の抗菌薬存在下でも活発に増殖することができるため、増殖が阻害される抗菌薬濃度を指標とした最小発育阻害濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC) が考案された¹⁴。MICを測定するにあたり、これまでディスク拡散法や液体希釈法などが開発され^{15,16}、医療現場でも耐性菌を簡便に検出することが可能になった。ディスク拡散法は、抗菌薬の拡散を利用して形成された濃度勾配を利用してMICを測定する手法である。寒天培地上に抗菌薬を染み込ませたディスクを置いた状態で細菌を培養すると、ディスク中から拡散した抗菌薬が周縁の細菌の増殖を阻害して阻止円が形成されることを利用し、阻止円の大きさから簡易的にMICを測定することが可能である (Figure 1.1A)。また、液体希釈法では段階希釈した抗菌薬溶液を培地中に混合し、細菌の増殖が阻害される濃度からMICを測定する手法である (Figure 1.1B)。これらの手法は、国際標準のプロトコルが確立されている。

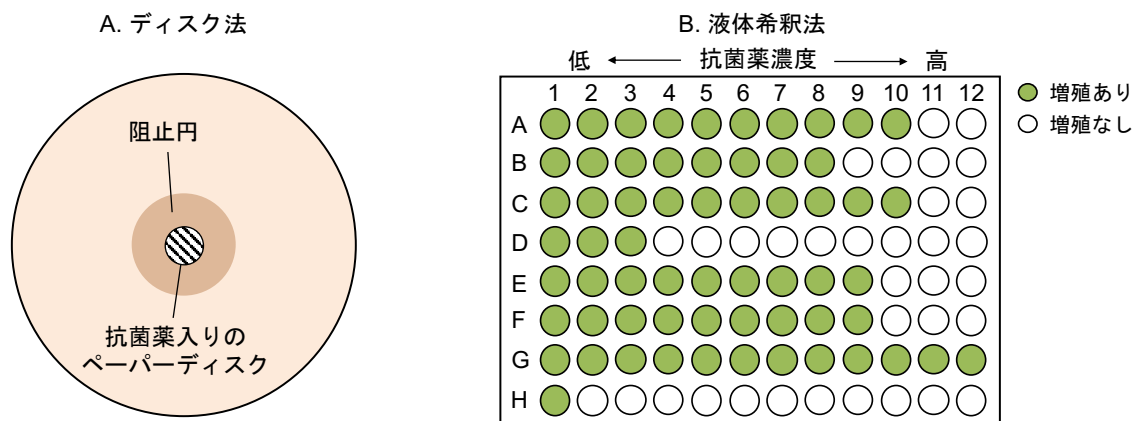


Figure 1.1 MIC 測定手法 (A) ディスク法、(B) 液体希釈法

1.3.2 耐性メカニズム

ペニシリンの発見から様々な抗菌薬に対する耐性菌が報告されてきた。現在、耐性を獲得する主な経路として抗菌薬の不活化、標的部位の変異、薬剤排出ポンプの活性化が報告されており (Figure 1.2)、これらの耐性機構は主に遺伝子の突然変異や水平伝播を介して獲得される²。ただ、薬剤排出ポンプに関しては、遺伝子を獲得する以外にもあらかじめ保有していた自身の遺伝子発現が活性化されることによって耐性化可能であるため、必ずしも遺伝子変異を伴わないことも報告されている¹⁷。また、突然変異による耐性化は確率的な現象であることから、種の全滅を免れる生存戦略としても活発に議論されている¹⁸。

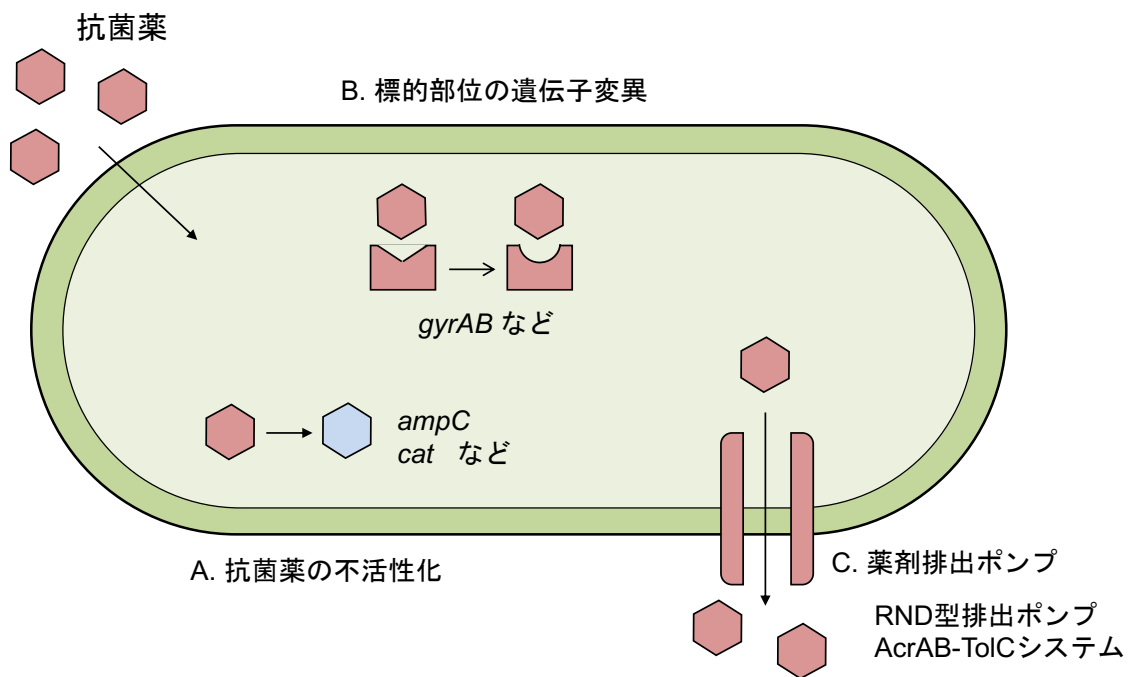


Figure 1.2 細菌の耐性メカニズム (A) 抗菌薬の不活性化、(B) 標的部位の遺伝子変異、(C) 薬剤排出ポンプの活性化

1.4 抗菌薬抵抗性を示す persister の発見

ペニシリンの発見と同時期である 1944 年、同じくイギリスの細菌学者である Bigger は、ペニシリン感受性の化膿レンサ球菌に対するペニシリンの応答を調べた際に「耐性」を持たない細菌であってもごく一部の集団が一定の割合で生き残ることを発見した⁴。Bigger は、この謎に包まれた抗菌薬に対して抵抗性を示す集団を “persister” と命名したが、耐性菌が世界的に深刻な課題になっていたこともあり、しばらくの間 persister について研究されることはなかった。しかし、1970 年代になって臨床検査で耐性菌が検出されなかった感染症に

において慢性化や再発が確認されると、persister に関して再認識されるようになった^{5,19}。

1.5 persister の性質

1.5.1 persister の性質は遺伝するのか？

21 世紀に入ると、多くの研究成果によって persister が持つ性質の一部が明らかになってきた。まず persister の抗菌薬抵抗性が遺伝的な変異によるものかどうかを調べるため、Keren らは、大腸菌の K-12 株に抗菌薬アンピシリンを投与した後、生き残った細菌を新鮮な培地で培養し、再度アンピシリンを投与した。その結果、生存した persister から再増殖した新たな集団における persister の割合は常に一定に保たれていることが明らかとなった⁷(Figure 1.3)。この結果は、臨床分離株を用いた実験でも同様の現象が確認されていることから²⁰、persister の性質は次世代に遺伝せず、表現型のみの変化によって生じることが示唆された。

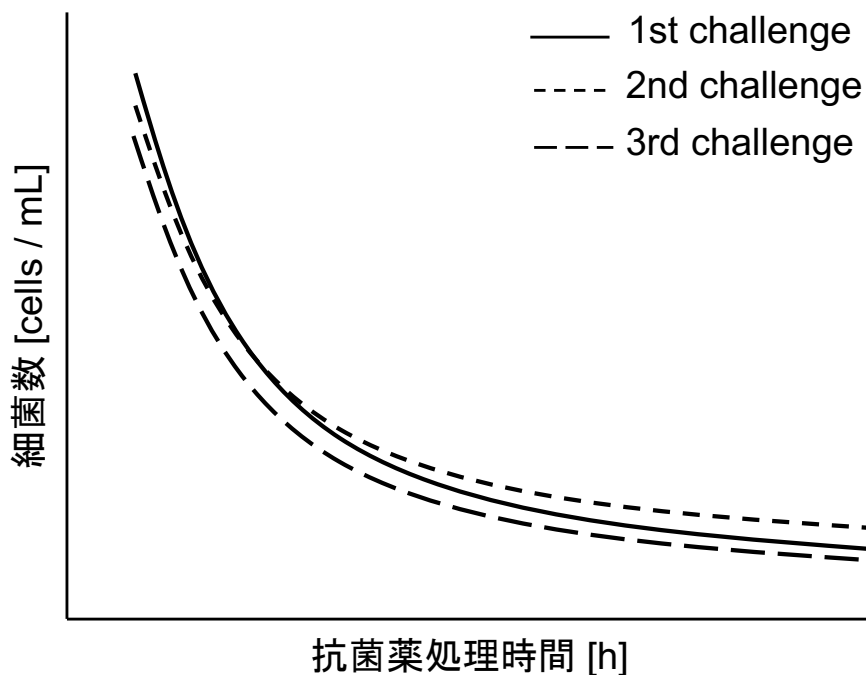


Figure 1.3 抗菌薬に対する生存率測定実験の反復による persister の遺伝性検討⁷

1.5.2 persister の増殖活性

persister は集団の一部においてのみ出現し、性質も遺伝しないことが CFU を指標とした集団レベルの解析によって明らかになったが、CFU による手法では persister は集団の一部でどのような代謝・増殖状態で存在しているのか詳細に解析することができない。Balaban らは、マイクロ流体デバイス技術を応用して、シングルセルレベルで微小な溝に細菌を固定

シタイムラプス観察を行った結果、**persister** は抗菌薬処理する前からほとんど増殖していないことが明らかとなった⁸ (Figure 1.4)。この結果から、**persister** はあらかじめ増殖を抑制することで細菌の増殖プロセスを標的とする抗菌薬から生き残る性質を持つことが示唆された。

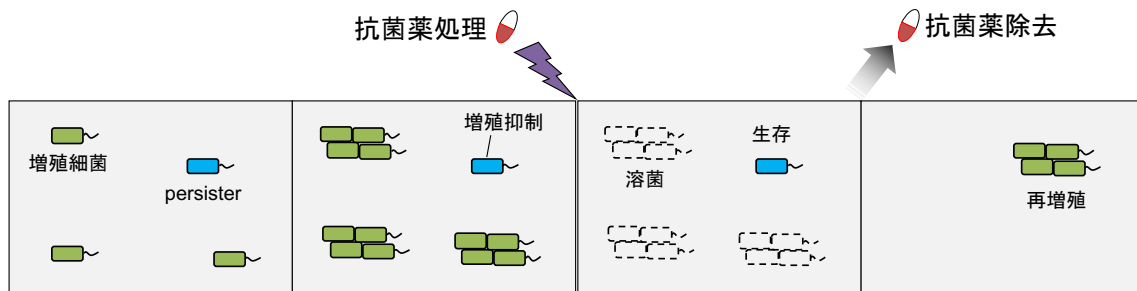


Figure 1.4 **persister** はあらかじめ増殖が抑制された状態にある⁸

1.6 **persister** 研究の意義

1.6.1 **persister** 研究における臨床的意義

persister が初めて報告されたのは、実験室環境における抗菌薬感受性試験であったが、実際の臨床現場においても様々な細菌感染症において **persister** の存在が示唆されている。世界三大感染症の一つである結核の一部の症例では、ストレプトマイシンやイソニアジドを投与しても感染症が完治しないことが報告されており、これらの抗菌薬の開発当初から結核菌が体内で潜伏することが問題視されてきた²¹。また、尿路感染性大腸菌による尿路感染症やサルモネラ感染症で感染症が完治せず、抗菌薬耐性を持たない細菌株による感染症の再発が一部報告されていることから²²、耐性菌では説明できない感染症治療の失敗が今もなお続いているのが現状である。

1.6.2 **persister** 研究における生物学的意義

これまでの研究成果から、**persister** は増殖が抑制されており、本来増殖に貢献しない **persister** が抗菌薬投与前から存在することは一見無駄のようにも思えるため、**persister** の生物学的な意義については活発に議論されてきた。このような表現型のばらつきは細胞の不均一性と呼ばれ、個体間で遺伝子発現パターンに多様性が生じた結果生じると考えられている²³。また、あらかじめ様々な表現型細胞を集団内に形成しておくことで、活発な増殖細菌が死滅するような致命的な脅威に直面した際に種を保存するためのリスク拡散戦略 (ベットヘッジング戦略) として重要視されている²⁴ (Figure 1.5)。このような戦略は **persister** の

他に細菌のコンピテント状態への移行や病原性の増加、さらには酵母細胞からヒト細胞といった真核生物においても保存された重要な生存戦略であると考えられている²⁴⁻²⁶。

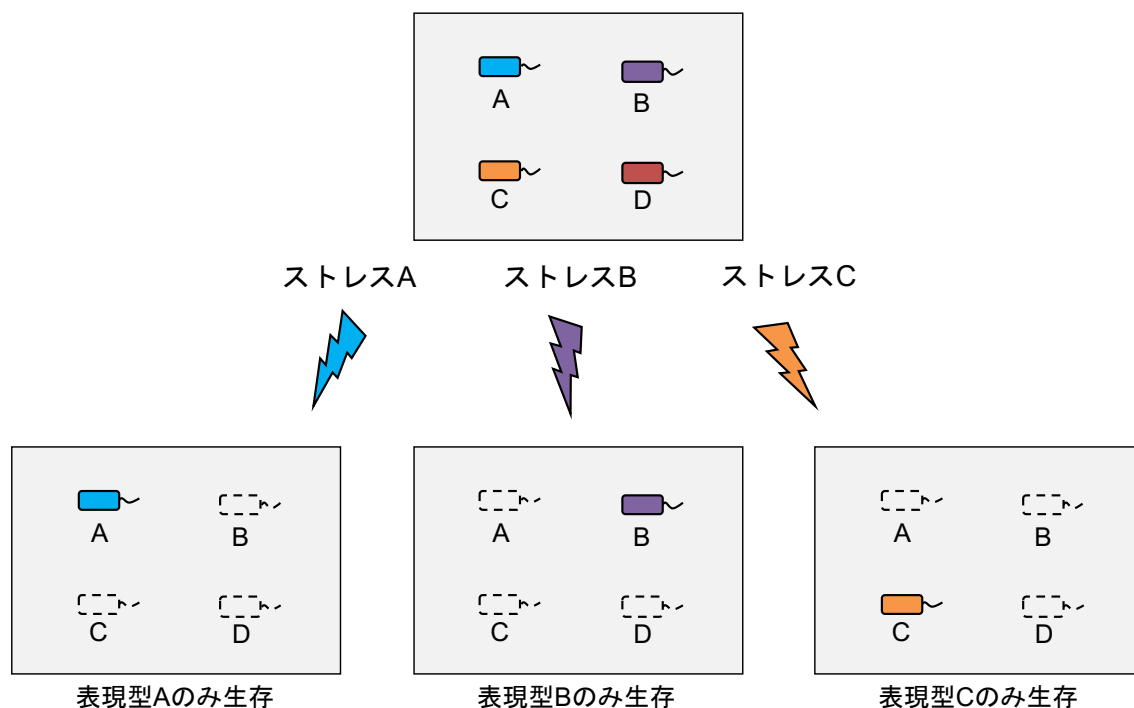


Figure 1.5 表現型の不均一性におけるベットヘッジング戦略

1.7 persister 形成メカニズム

これまでの研究から、persister における大まかな性質が理解されるようになったが、実際にどの遺伝子がどのようなメカニズムで抗菌薬抵抗性を誘導しているのかについては、ほとんど未解明であった。しかし、遺伝子過剰発現株や欠損株といった分子生物学的な手法に加えて、マイクロ流体デバイスを用いたシングルセル解析によって、persister を誘導する遺伝子とその経路が明らかになってきた²⁷⁻³²。本項では、現段階で有力とされている主な persister 形成メカニズムについて紹介する。

1.7.1 persister の評価方法

まず、persister を定量的に解析する手法として、抗菌薬処理した培養液および処理前の培養液の細菌数 (Colony forming unit; CFU) の割合から生存率を算出する方法が一般的に用いられてきた⁷ (Figure 1.6)。細菌集団に対して抗菌薬を投与した際、まず抗菌薬感受性の高い集団が速やかに殺菌された後、抗菌薬感受性の低い persister 集団がゆっくりと殺菌される2相の死滅曲線 (Biphasic curve) が得られる^{9,10,33,34} (Figure 1.7)。したがって、現在の persister

研究においては、2相曲線に基づいて *persister* 形成を評価する手法が一般的である。しかし、このような集団レベルでの評価方法では評価できないシングルセルレベルにおける *persister* の増殖状態や抗菌薬応答を詳細に解析する際は、死滅曲線に加えてマイクロ流体デバイスを用いたタイムラプス観察手法がよく用いられている。

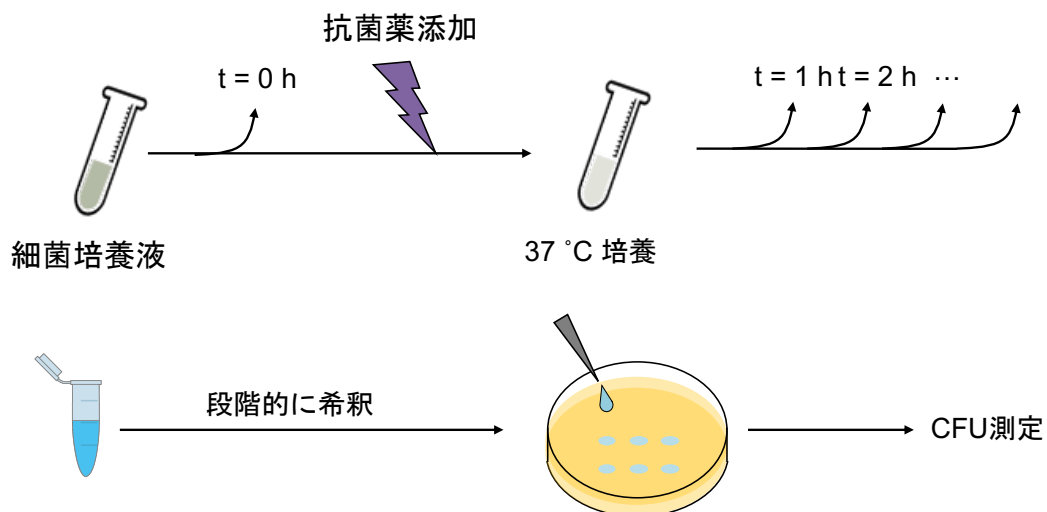


Figure 1.6 CFU 測定を用いた *persister* 測定実験のスキーム

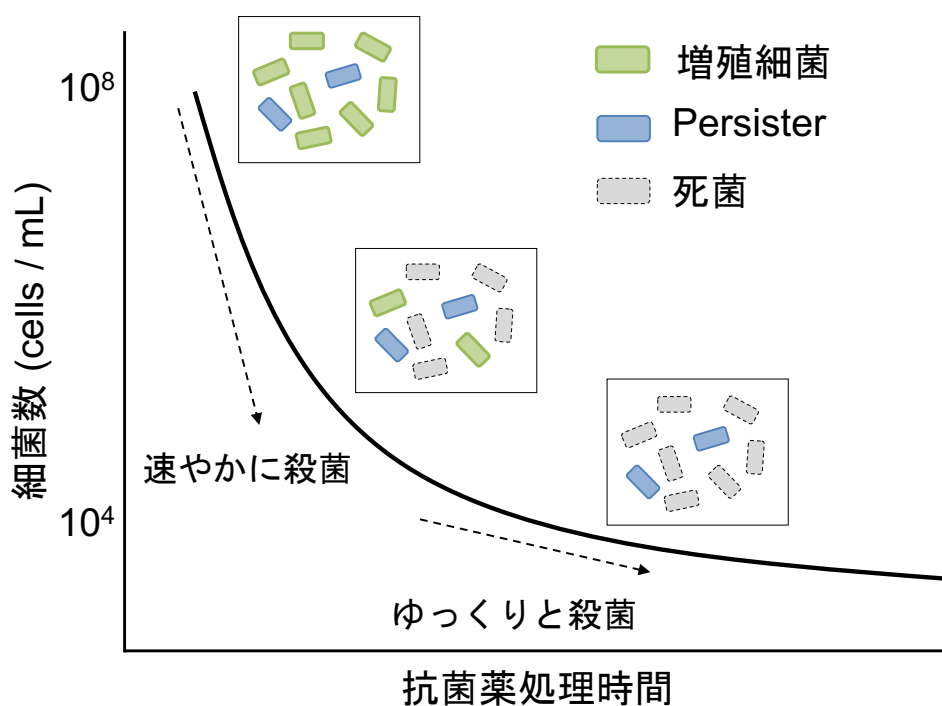


Figure 1.7 抗菌薬処理時に見られる二相の死滅曲線

1.7.2 Toxin/Antitoxin 機構

細菌では、環境ストレスに伴って自身に毒性タンパク質を暴露させることで、代謝や増殖の抑制、あるいは細胞死を誘導する分子機構を保有している。この毒性タンパク質はトキシンと呼ばれており、通常環境ではトキシンの毒性を中和するアンチトキシンによって厳密に制御されている (Figure 1.8)。Moyed らは、*persistor* の誘導遺伝子として *hipA* (high-persistor mutant A) を発見して以来、様々なタイプのトキシン遺伝子が *persistor* の誘導に関与することを報告した^{5,27,35-38}。特に、トキシンおよびアンチトキシンがタンパク質で構成される type II トキシンは *persistor* 遺伝子として報告例が多く、その大半は翻訳阻害によって増殖抑制が誘導されることが原因であると考えられている。しかし、現在報告されているトキシン遺伝子に関しては、*persistor* に対して矛盾した結果が報告されているため、トキシン発現が *persistor* 形成に与える影響について共通理解は得られていない。

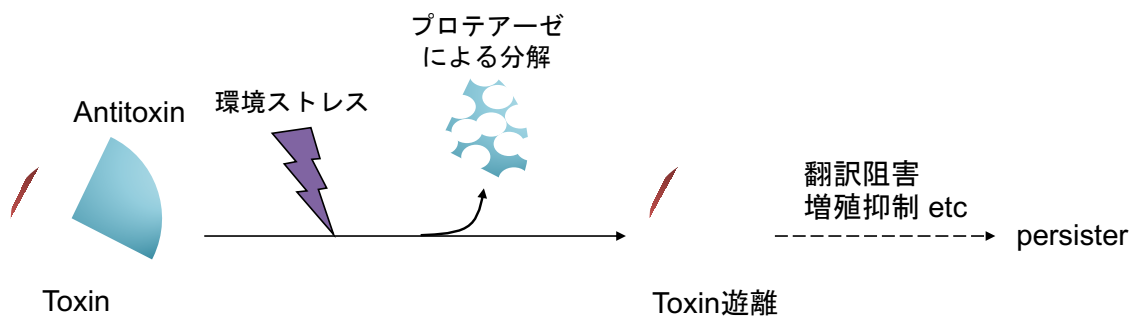


Figure 1.8 Toxin/Antitoxin 機構による *persistor* 経路 (Type II toxin の場合)

1.7.3 ppGpp を介した緊縮応答経路

persistor が発見される以前から、アミノ酸等の栄養枯渇によってグアノシン-4-リン酸である ppGpp が細胞内に蓄積することで代謝活性を抑制するストレス応答の一つとして緊縮応答が研究されてきた (Figure 1.9)。Korch らは、トキシンの一種である HipA の変異型である HipA7 を大腸菌内で発現させた際に ppGpp と呼ばれるストレス応答性のシグナル分子の増加を介して *persistor* 形成を誘導することを示した³⁹。さらに ppGpp 合成遺伝子である *relA* および *spoT* をともに欠損させると *persistor* が減少したことから、ppGpp 合成が *persistor* 形成に必要であることが示唆された^{40,41}。ppGpp は RNA ポリメラーゼに結合して転写因子 DksA を活性化させて下流のストレス応答関連遺伝子を誘導させるだけでなく、他にも様々な生合成関連タンパク質に結合して代謝経路を制御するグローバルレギュレーターである⁴²。また、ppGpp はアミノ酸飢餓だけでなく飢餓ストレス (無機リン酸、脂肪酸、炭素源、

鉄など) や浸透圧ストレス、代謝物の蓄積によっても同様に誘導されることが報告されており、非常に多様なストレス応答を制御していることが知られている⁴³⁻⁴⁸。しかし、これらの ppGpp を介した *persistor* 形成モデルの一部ではプロフェージの混入による影響で生存率が変化していることが影響している可能性があり、現在再実験が行われている^{49,50}。

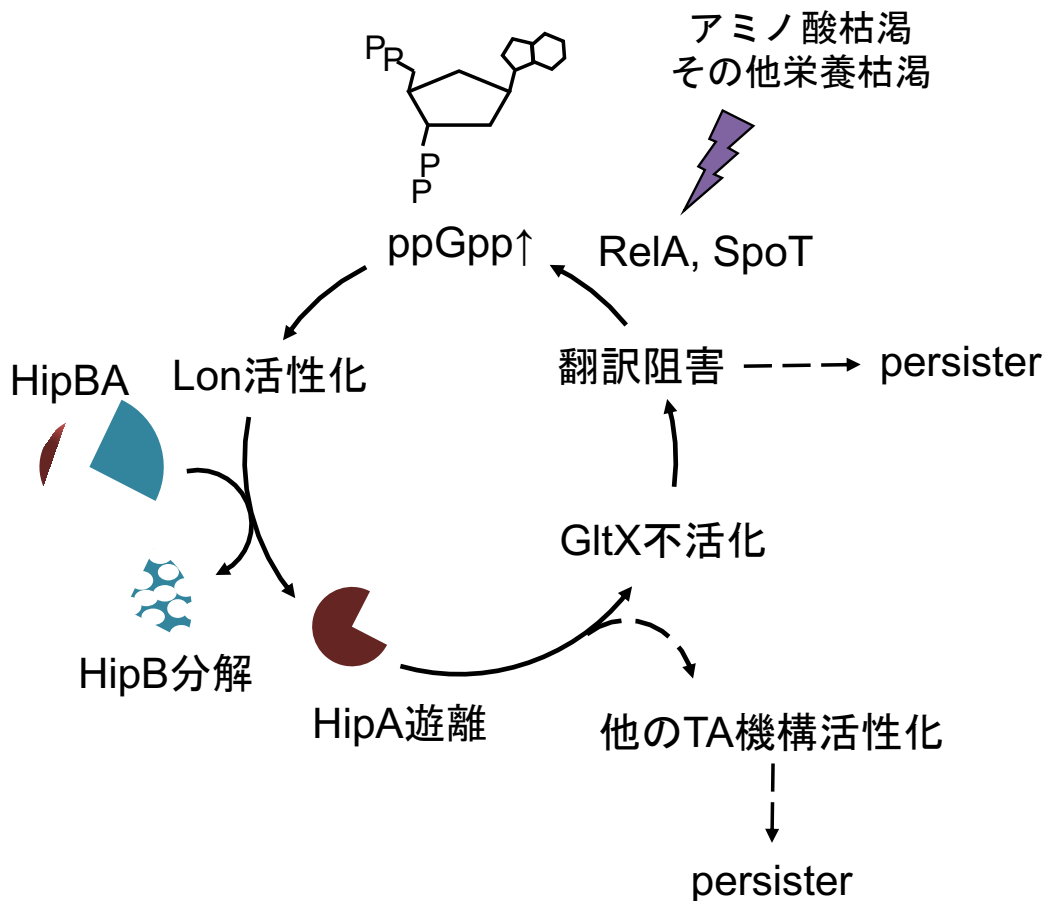


Figure 1.9 ppGpp による緊縮応答を介した *persistor* 経路

1.7.4 SOS 応答による *persistor* の生存経路

SOS 応答とは、DNA 損傷に対する細胞のストレス応答の一種であり、大腸菌ではリプレッサーである LexA とリプレッサーの阻害分子である RecA によって制御されている (Figure 1.10)。DNA 損傷が起きた際、RecA が 1 本鎖 DNA と結合して活性化し、LexA の分解を介して抑制されていた下流の遺伝子群が誘導される⁵¹。一般的に、*recA* を欠損させると *persistor* が減少することが知られており^{52,53}、LexA に変異を導入して SOS 応答が不活性化された LexA3 株を用いても *persistor* は同様に減少することから、SOS 応答が制御する下流遺伝子に *persistor* 形成に重要な遺伝子が含まれることが示唆されている⁵³。

SOS 応答と *persistor* の関係については、DNA の 2 本鎖切断を誘導するフルオロキノロン系抗菌薬を用いた研究例が多く、これらの抗菌薬投与による DNA 損傷に反応して複数種の *persistor* 関連遺伝子が誘導される^{51,54}。まず、SOS 応答によって誘導され、膜電位を破綻させる *tisB* と呼ばれるトキシン遺伝子は、細胞内の ATP レベルを減少させることで細胞内の代謝全体を不活性化し、抗菌薬によるさらなる DNA 損傷を防ぐことも示唆されている³⁶ (Figure 1.10)。また、細胞分裂のチェックポイントを担う *sulA* が SOS 応答によって誘導されると、細胞分裂を阻害するため、増殖抑制による *persistor* を誘導することも知られている⁷。さらに、SOS 応答経路によって本来誘導される DNA 修復経路も *persistor* 形成に関与することが知られており、特に定常期や抗菌薬処理後の細菌が再増殖を開始する前に損傷を受けた DNA が完全に修復されないと *persistor* の DNA 複製は停止したまま再増殖しないことが明らかになっている^{53,55}。この場合、RecA は UmuD などのエラー率の高い DNA ポリメラーゼの遺伝子発現を活性化させて遺伝子変異を生じやすくすることも報告されているため、耐性菌形成にも関連することが示唆されている⁵¹。また、フルオロキノロン系以外の抗菌薬によっても RecA を介した SOS 応答が誘導されることが知られており、SOS 応答を介した *persistor* 経路に関して包括的な理解は得られていない⁵⁶。

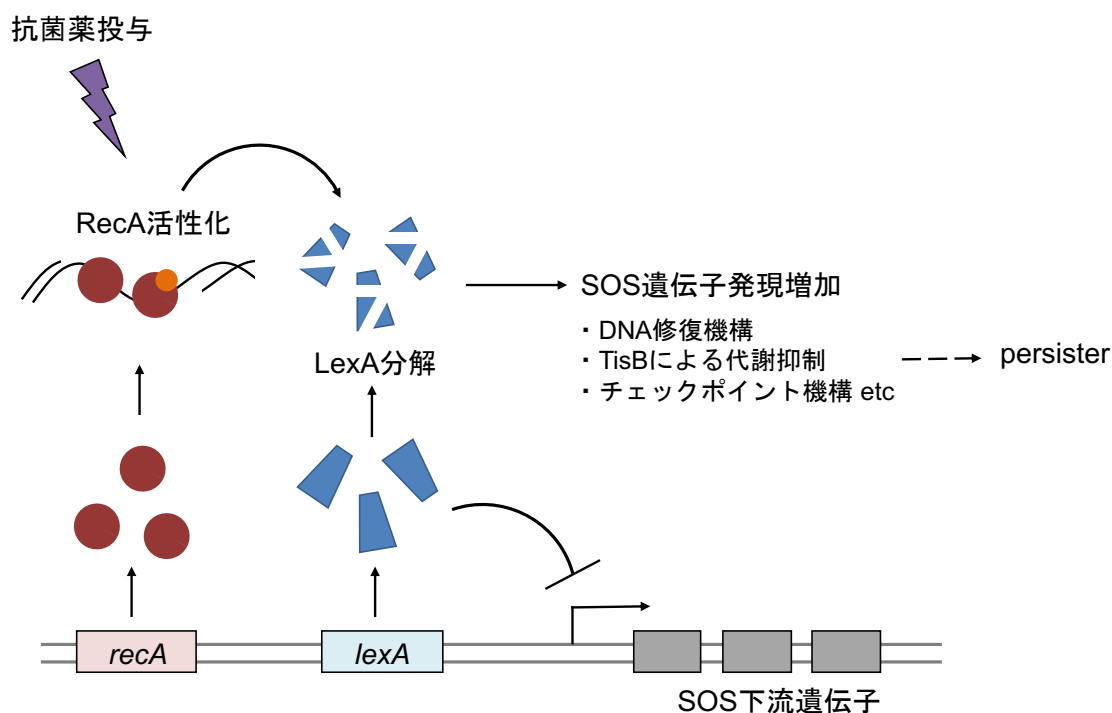


Figure 1.10 SOS 応答を介した *persistor* 経路

1.7.5 エネルギー代謝抑制を介した経路

抗菌薬の種類によらず抗菌薬から生き残るメカニズムとして、エネルギー代謝抑制を介した経路が知られている (Figure 1.11)。1.7.3 で記述した ppGpp によって誘導される HokB タンパク質や SOS 応答下流の TisB タンパク質の発現、あるいは電子伝達系を介したプロトン駆動力生成を阻害する KCN やカルボニルシアニド m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) 添加によって、膜電位を破綻させ persister 形成を誘導することが知られている^{27,36,57}。これらの阻害剤によって細胞内の ATP レベルが減少すると、ATP を必要とする細胞分裂や生合成経路といった多くの細胞プロセスが停止されるため、増殖をターゲットとした様々な抗菌薬の影響を受けにくくなると考えられている^{58,59}。他にも、解糖系や TCA 回路の基質を細胞外から添加することによって電子伝達系を活性化させると抗菌薬に対する生存率が減少するといった報告もあることから^{57,60,61}、細胞内 ATP レベルの減少による persister 形成経路が現在有力なモデルとなっている。しかし、一部の既往研究では培地中の炭素源を人工的に変化させ persister を誘導した条件では細胞内の ATP レベルが増加することが報告されており⁶²、他にも ATP シンターゼをコードする遺伝子欠損により persister が減少する報告例もあることから^{56,63}、細胞内の ATP が高い状態にある persister が存在する可能性が示唆されている。

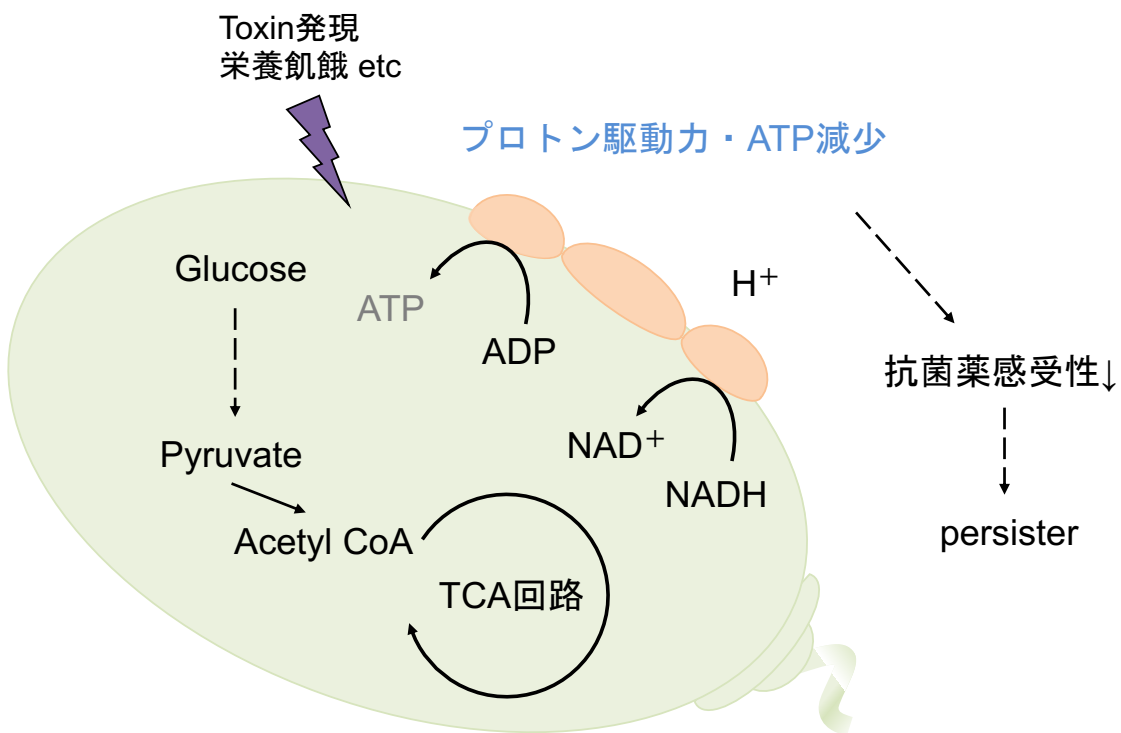


Figure 1.11 エネルギー代謝抑制を介した persister 経路

1.7.6 確率的な persister 発生経路

これまで、栄養飢餓や DNA 損傷などのストレスによって persister が誘導されることが報告されてきた一方、ストレスのない環境で確率的に出現することが報告されている⁸。このような persister は、一過性の遺伝子発現表現型の不均一性が生じることで確率的に発生すると考えられている。確率性 persister を研究する際、標的遺伝子の発現を蛍光で標識した遺伝子レポーター株を作成し、タイムラプス観察やフローサイトメトリーによって遺伝子発現レベルや細胞状態を解析する手法が一般的に使われる^{8,30,32,58,64-66}。しかし、確率性 persister が多いと考えられる対数増殖期集団における persister の割合は 10^{-4} あるいは 10^{-5} 程度と非常に少ないため、重要な persister 遺伝子を欠損させても影響が小さく、有意差が得られない場合も多い⁶⁷。

1.8 persister の定義

persister 形成メカニズムの全体像を明らかにするため、多くの研究が行われてきたが、persister 研究の難しさは persister の定義の不明瞭さにある。現在は、CFU 測定によって得られる死滅曲線が二相を示すことを指標としているものの、本手法では薬剤排出ポンプ関連遺伝子の確率的な活性化に伴う表現型レベルの耐性化も persister と判断されてしまうという主張もあり、persister が正確に定義されていなかった。また、persister の割合がわずかな環境条件の違いによって変動することが報告されており^{49,68}、研究室間で実験条件が統一されていないことから、同じ遺伝子に着目した研究であっても結果が矛盾することが課題となっている。さらに、persister に似た表現型として VBNC (Viable but non-culturable) が知られているが、現在報告されている persister と VBNC の境界も曖昧になっているのが現状である⁶⁹⁻⁷²。最近になって persister の定義に関する声明が報告され始めており、persister 研究に関する専門用語や実験手法などは統一されつつある^{73,74}。

1.9 新規 persister 分取法を用いた persister 遺伝子の探索

これまで persister 研究の多くは、新規 persister 関連遺伝子を明らかにするために persister 集団を分取し、トランスクリプトーム解析を行うことで遺伝子発現プロファイルの変化が網羅的に調べられてきた。persister を分取する手法としては、主に抗菌薬で感受性の高い集団を溶菌させて persister を分取する方法と⁷、rRNA 関連遺伝子 *rrnB* の P1 プロモーター活性を蛍光で可視化することで増殖活性の低い細菌集団をセルソーターで分取する方法が用いられてきた⁷⁵。抗菌薬処理後の集団を分取すると抗菌薬処理によって誘導される SOS 応

答関連遺伝子が大部分のプロファイルを占めてしまい、確率性 *persistor* に関連する遺伝子の影響が見えにくくなってしまうこと、*rrnB*P1 プロモーター活性の評価では、確率性 *persistor* の検出が可能ではあるが、蛍光タンパク質の成熟までのタイムラグによって増殖活性の高い集団が紛れ込んでしまうことが課題であると考えられる。これらの課題を解決するため、当研究室では新たな *persistor* 分取法として細胞分裂時に形成される Z リングの構成タンパク質である FtsZ に着目した⁷⁶。まず、プラスミド上で *ftsZ* の両末端に蛍光タンパク質の CFP および YFP 遺伝子を融合させた大腸菌 YFC 株を作成し、Z リング形成時に FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) を生じさせた。培養集団中の FRET 蛍光の分布を測定したところ、集団の一部で FRET を起こさない非分裂細菌が検出され、これらの集団をセルソーターで分取したところ、抗菌薬に対する生存率が 100 倍程度増加したことが確認された (Figure 1.12)⁷⁶。また、分取した *persistor* の RNA を抽出しマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った結果、分裂細菌集団と比較して *persistor* 集団において有意な増加が見られた遺伝子が 192 種類検出された。特に、これまで *persistor* 形成に関与することが報告されていた遺伝子群の他にも *ldhA* (乳酸脱水素酵素) や *nirB* (亜硝酸還元酵素)、*narU* (硝酸/亜硝酸トランスポーター)、*dmsA* (ジメチルスルホキシド還元酵素) などの嫌気代謝に関与する遺伝子群が *persistor* 集団で増加していたことから、嫌気代謝経路が *persistor* 形成において重要であることが示唆された⁷⁶。

E. coli YFC株 (YFP-FtsZ-CFP)

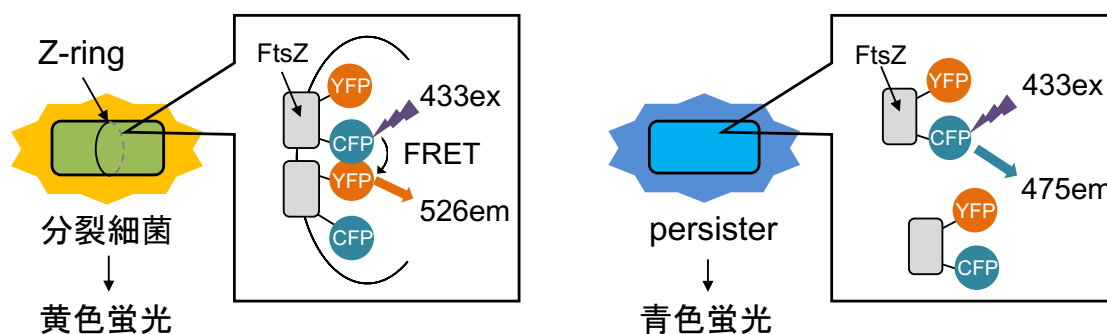


Figure 1.12 当研究室で開発した FRET ベースの新たな *persistor* 検出手法

1.10 研究目的

マイクロアレイ解析の結果において、*persistor* 集団で高発現した嫌気代謝遺伝子の 1 つである *ldhA* がコードする乳酸脱水素酵素は、解糖系によって産生されたピルビン酸を NADH 依存的に乳酸へと変換する酵素である。この乳酸代謝反応が進むことによって、 NAD^+ が再

生されて解糖系反応に再利用することが可能であり、さらに TCA 回路へと反応するために必要なピルビン酸量を制御することから細胞内の中心代謝経路において重要な代謝経路である。そこで本研究では、これまで当研究室で明らかにした新規 *persister* 遺伝子である乳酸代謝遺伝子 *ldhA* による詳細な *persister* 形成メカニズムを解明することを目的とした。

1.11 本論文における各章の構成

本論文では、*ldhA* 発現による大腸菌 *persister* 形成メカニズムを解明する研究を 2 つの章で構成した。まず第 2 章では、*ldhA* 発現が大腸菌の *persister* 形成を誘導することを CFU やタイムラプス観察手法を用いて詳細に確認し、エネルギー代謝経路の観点から既往の *persister* 経路との関連性について解析した。第 3 章では、*ldhA* 発現による *persister* の形成経路を詳細に調べるため、エネルギー依存的なストレス応答経路に着目した。さらに、*ldhA* 発現による活性化がみられた SOS 応答経路に着目し、遺伝子修復機構による *persister* 形成機構について調べた。また、*ldhA* 発現による SOS 応答活性化の原因を調べるため、CE-MS によるメタボローム解析を行った。解析結果に基づいて *ldhA* 発現による代謝変化について考察し、新たな *persister* 形成モデルを提案した。

第2章 *ldhA* 発現による *persister* 誘導経路の発見および性状解析

2.1 緒言

前章で述べたように、本研究室の先行研究において、FtsZ を用いた分裂状態を検出する大腸菌株を用いて *persister* 集団のトランスクリプトーム解析を行った結果、嫌気代謝に関連する遺伝子群が *persister* 集団で高発現していることが明らかとなった⁷⁶。本章では、嫌気代謝遺伝子の中で特に *persister* 形成を増加させる遺伝子であることが明らかとなった *ldhA* に着目した。*ldhA* は解糖系によって得られたピルビン酸から乳酸を産生しエネルギーを獲得する乳酸脱水素酵素をコードしており、大腸菌以外の多くの細菌種や哺乳類など多様な生物種において保存された重要な代謝経路である。乳酸代謝は単なるエネルギー産生経路ではなく、細胞内の酸化還元バランスの調整や他の中心代謝経路の制御に関与することも報告されているため⁷⁷、*ldhA* は細胞の代謝状態を調節し、*persister* 形成に貢献する重要な遺伝子であると考えられる。

2.2 研究目的

マイクロアレイ解析によって、*ldhA* の発現量が *persister* 集団で増加したが、実際に *ldhA* 発現が *persister* 形成を誘導する新規遺伝子であるかは確かめられていない。そこで、本章では *ldhA* が *persister* 形成を誘導する新規遺伝子であるかどうか調べることを目的とした。まず、*ldhA* 発現によって *persister* 形成が誘導されることを集団レベルおよびシングルセルレベルで確認した後、*ldhA* 発現によって形成された *persister* の性状をエネルギー代謝的観点から解析した。*ldhA* 発現による *persister* 形成経路が、これまで報告された *persister* 経路の中でどのような経路に分類されるのかを調べることによって、*ldhA* 発現による詳細な *persister* 形成メカニズムを解明する手がかりとすることが可能である。

2.3 実験方法

2.3.1 使用した株および培養条件

シングルセル観察実験において大腸菌 K-12 BW25113 Δ *flhC* 株を親株として使用し、その他の実験において大腸菌 K-12 MG1655 株を親株として使用した。本研究で使用した菌株およびプラスミドを Table 2.1、使用したプライマーを Table 2.2 に示す。また、菌株の培養には LB Broth, Miller (Luria-Bertani) を使用した。また、株のセレクションおよび抗菌薬処理には 100 μ g/ml アンピシリン、10 μ g/ml ゲンタマイシン、5 μ g/ml オフロキサシン、30 μ g/ml

クロラムフェニコール、10 $\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリンを最終濃度としてそれぞれ使用した。また、過剰発現の際には pCA24N ベクター上で遺伝子発現を誘導させるために 100 μM の Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を使用した。培養期に関して、一晚培養した各株を 100 倍希釈した後、各誘導剤を添加して 37°C で 3 h 振盪培養し、OD₆₀₀ = 0.5-0.8 に達した培養液を対数増殖期とした。また、冷凍したグリセロールストックから 37°C で一晚振盪培養したサンプルを定常期集団として使用した。

Table 2.1 使用した株およびプラスミド

株/プラスミド	Genotype	Sources
株		
MG1655	wild type <i>E. coli</i>	NBRC ^a
BW25113	BW25113	CGSC ^b
MG1655_pCA24N	MG1655 pCA24N	(29)
<i>ldhA</i> OE	MG1655 pCA24N- <i>ldhA</i>	(29)
Δ <i>fliC</i>	BW25113 Δ <i>fliC</i>	NBRP ^c
<i>ldhA</i> reporter	BW25113 Δ <i>fliC</i> pSC101_P <i>ldhA_venus</i>	(29)
BW25113_ Δ <i>ldhA</i>	BW25113 Δ <i>ldhA kanR</i>	NBRP ^c
MG1655_ Δ <i>ldhA</i>	MG1655 Δ <i>ldhA kanR</i>	This study
Δ <i>ldhA</i>	MG1655 Δ <i>ldhA</i>	This study
プラスミド		
pCA24N	<i>cat, lacI</i> , pT5lac promoter	NBRP ^c
pCA24N- <i>ldhA</i>	<i>cat</i> , pCA24N pT5lac:: <i>ldhA</i>	(29)
pSC101	<i>tetR</i> , ptet promoter	NBRP ^c
pSC101_P <i>ldhA</i>	<i>tetR</i> , pSC101 <i>pldhA</i>	(29)
pSC101_P <i>ldhA_venus</i>	<i>tetR</i> , pSC101 <i>pldhA::venus</i>	(29)
pKD4	<i>ampR, kanR, frt</i>	CGSC ^b
pKD46	<i>ampR, araC, gam, beta, exo,</i>	CGSC ^b
pCP20	<i>ampR, cat, flp, mobA</i>	CGSC ^b

a. NBRC; National Bio Resource Center

b. CGSC; Coli Genome Stock Center

c. NBRP; National Bio Resource Project

Table 2.2 使用したプライマー

PCR primer	Sequence (5'-3')	Reference
pCA24N_ldhA_f2	TTAAAGAGGAGAAATTAACATGAAACTCGCCGTTT ATAGCACAAAAC	(29)
pCA24N_ldhA_r	TAATTAAGCTTTTTAAACCAGTTCGTTCTGGGCAGGT TTC	(29)
Inv_pCA24N_f	GCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGC	(29)
Inv_pCA24N_r	GCATGAAGCTTGGTGAGATCCTCTCATAGTTAATT TCTCCTC	(29)
YFP_f_2	TATCACGAGGCCCTTTCGTC	(29)
ldhA_qRT_f	GCGTACCCGTGATGCTAACTTCTC	(29)
ldhA_qRT_r	GCGCCGCTGCACTTGGATAC	(29)
ldhA_reporter_f	CCGTACAGCTGCAGTAATAACAGCGCGAGAACGG	(29)
ldhA_reporter_r	CCGTACTCGAGCCAGCTCAAAGCCAAAGGACTCG	(29)
reporter_f	CAGATTACAACCGTCGCTCGATAGC	(29)
reporter_Venus_r	CTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATC	(29)
ldhA_check_f	CAAGCAGAATCAAGTTCTACCGTGCC	This study
ldhA_check_r	GGTCAGATCCACTTGTGCACCTTCTTT	This study

2.3.2 *ldhA* に着目した遺伝子組換え株の作成

ldhA 発現による *persistor* 形成の影響を調べるため、大腸菌 *ldhA* 過剰発現株、*ldhA* 欠損株、*ldhA* レポーター株を作成した。

2.3.2.1 *ldhA* 過剰発現株の構築

ldhA 過剰発現株は ADKA クローンで使用されている pCA24N プラスミドをベクターとして使用した。あらかじめ制限酵素である BseRI および HindIII の認識配列を付与したプライマーセットで大腸菌 MG1655 ゲノムから *ldhA* 配列を PCR で増幅し *ldhA* 断片を作成した。作成した *ldhA* 断片と pCA24N のマルチクローニングサイトを BseRI および HindIII で制限酵素処理した後、T4 リガーゼでライゲーションさせて得られたプラスミドを大腸菌 MG1655 株に形質転換した。作成した *ldhA* 過剰発現株は、コロニーPCR および PCR 産物のシーケンス解析で正しく *ldhA* 配列が挿入されていることを確認し、*ldhA* 発現量が増加していること

は qRT-PCR で確認した。

2.3.2.2 *ldhA* 欠損株の構築

ldhA 欠損株に関しては、KEIO ライブラリーから購入した大腸菌 BW25113 のゲノム情報を用いて P1 ファージによる形質導入によって大腸菌 MG1655 株を親株とした *ldhA* 欠損株を作成した。まず、一晚培養した BW25113 *ldhA* 欠損株を 5 ml LB + 10 µg/ml カナマイシン + 5 mM CaCl₂ + 0.2% グルコースで 1000 倍希釈し、37°C で 1.5 h 振盪培養した。その後、50 µl の P1 ファージ溶液を添加して、37°C で 2-4 h 振盪培養した。培地が透明になった時点で 500 µl クロロホルム溶液を添加し、ボルテックスした後 3000 rpm で 10 min 遠心分離した。得られた上清を P1 ファージライセートとして回収した。つぎに、一晚培養した MG1655 株に 50 µl の P1 ファージライセートを添加し、30°C で 30 min 静置培養した後、1 ml の LB + sodium citrate を添加し、30°C で 30 min 感染させた。培養液を 8000 rpm で 2 min 遠心分離し、上清を除去した後、100 µl の 1 M sodium citrate で再懸濁し、10 µg/ml カナマイシン含有 LB 寒天培地にプレーティングし、37°C で一晚培養した。翌朝形成された株において *ldhA* が欠損されていることをコロニーPCR およびシーケンス解析で確認した。

2.3.2.3 *ldhA* レポーター株の構築

自然状態における *ldhA* 発現を蛍光で可視化する *ldhA* レポーター株を作成した。まず、低コピープラスミドの pSC101 に *ldhA* プロモーター配列およびその下流に黄色蛍光タンパク質 Venus の遺伝子を挿入した。*ldhA* のプロモーター配列を取得するため、大腸菌 MG1655 ゲノムから *ldhA* 開始コドンの 250 bp 上流および 80 bp 下流までの領域を XhoI および PvuII の認識配列を付与したプライマーで PCR 増幅した。得られたプロモーター配列および低コピープラスミドの pSC101 を XhoI, PvuIII で制限酵素処理した後、各断片をライゲーションさせて pSC101_*P_{ldhA}* を作成した。つぎに、*venus* 配列を XhoI 及び EcoRI の認識配列を付与したプライマーでそれぞれ PCR 増幅した後、XhoI, EcoRI でそれぞれ制限酵素処理した *venus* 配列と pSC101 ベクターを T4 リガーゼでライゲーションさせた後、遺伝子欠損ライブラリーから購入した大腸菌 BW25113Δ*fliC* に形質転換させた。作成した *ldhA* レポーター株は、コロニーPCR 及びシーケンス解析によって *ldhA* プロモーター配列および *venus* 配列が正しく挿入されていることを確認した。

2.3.3 persister assay

ldhA 発現株および *ldhA* 欠損株における persister 形成の変化を調べるため、抗菌薬に対する生存率を経時的に測定した。まず、一晚培養した各株に対して各誘導剤を添加した LB 培地で 100 倍希釈した後、37°C で 3 h 振盪培養した。その後、誘導剤を添加した状態で各抗菌薬を適切な濃度で添加し、37°C で振盪培養した。抗菌薬を添加する際、各時点での培養液を 1x PBS で 10 倍ずつ段階希釈した溶液を LB 寒天培地にスポットして 37°C で一晚静置培養し、得られたコロニー数から CFU を測定した。生存率は、抗菌薬処理前の CFU に対する各処理時点の CFU の割合として算出した。

2.3.4 マイクロ流体デバイスの作製

ldhA レポーター株を用いたシングルセル観察には、既往研究をもとに当研究室で開発したマイクロ流体デバイスを使用した⁷⁸。デバイスの素材には酸素透過性の高い Polydimethylsiloxane (PDMS) を使用し、あらかじめシリコンウエハーにパターニングしておいた培地を流す高さ・幅の大きな流路 (高さ 25 μm 、幅 100 μm) と細菌を固定する高さ・幅の小さな流路 (高さ 1 μm 、幅 20-100 μm) を鋳型として作製した²⁹ (Figure 2.1)。本デバイスでは、観察過程で抗菌薬を投与できるように流入させる培地の入り口を 2 つ用意した。

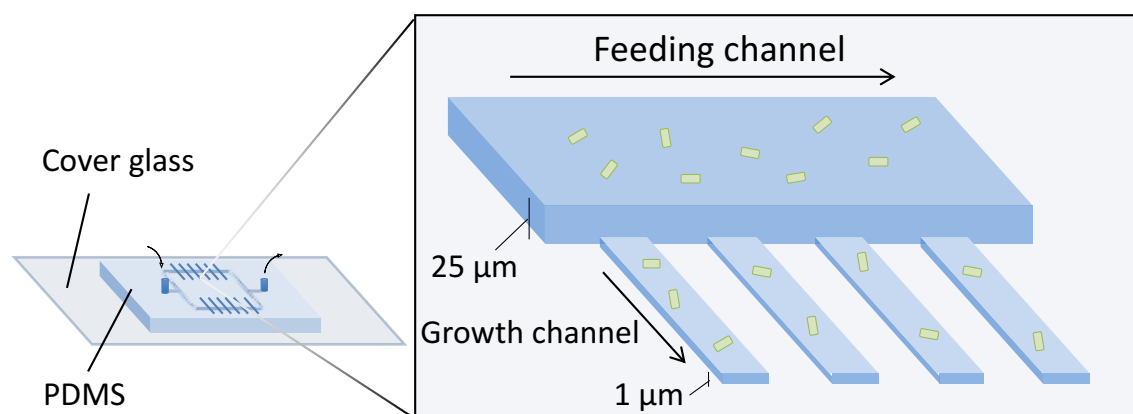


Figure 2.1 マイクロ流体デバイスの概要

2.3.5 シングルセルタイムラプス観察

まず、LB 培地で一晚培養した各株を 100 倍希釈した後、1.5 h 振盪培養した懸濁液を遠心分離操作によって 5 倍濃縮した。つぎに、チューブに接続したシリンジを用いてマイクロ流体デバイス内部に濃縮液を送液して流路に細菌を固定させた。その後、新鮮な LB 培地を送液しながら蛍光顕微鏡 IX81 (Olympus, Japan) を用いて細胞の増殖活性および形態変化を経

時的に観察した。

2.3.6 オッズ比を用いた有意差検定

確率的な *ldhA* 発現によって大腸菌の *persister* 形成を誘導することを統計的に評価するため、タイムラプス観察結果をもとにオッズ比を用いた有意差検定を実施した。*persister* を形成する事象を p とした際のオッズ $p/(1-p)$ と表されることから、*ldhA* 非発現細菌におけるオッズ b/d および *ldhA* 発現細菌におけるオッズ a/c を算出した。さらに、*ldhA* 非発現細菌に対する *ldhA* 発現細菌のオッズの割合からオッズ比 ad/bc を算出した (Table 2.3)。オッズ比が 1 を上回り、さらにその 95%信頼区間 (CI) が 1 を含まなければ、*ldhA* 発現細菌は *persister* を形成しやすいことが統計的に示される。

Table 2.3 オッズ比の算出方法

(cells)	<i>ldhA</i> 発現	<i>ldhA</i> 非発現	オッズ比
<i>persister</i>	a	b	-
non- <i>persister</i>	c	d	-
オッズ	a/c	b/d	ad/bc

2.3.7 定量的逆転写 PCR (qRT-PCR)

ldhA 過剰発現株における *ldhA* 発現量の確認および *ldhA* 発現誘導を制御する経路の探索において qRT-PCR を実施した。まず、LB 培地で一晚培養した各株を LB 培地で 100 倍希釈した後、37°C で対数増殖期まで振盪培養した。RNeasy Mini Kit (Qiagen, Netherland) で total RNA を抽出し、PrimeScript™ Reverse Transcription Kit (Takara Bio, Japan) を用いて逆転写反応させ、cDNA を調製した。用意した cDNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、得られた Ct 値から検量線法を用いて各株における目的遺伝子の相対発現量を算出した。本研究では、内部標準遺伝子として *ftsZ* を使用し、検量線の作成には本研究で用意した cDNA を段階希釈した溶液を使用した。

2.3.8 細胞外 D-乳酸濃度の測定

D-lactate Colormetric Assay Kit (Biovision, USA) に従って培地中の乳酸濃度を測定した。本

試薬に含まれる D-乳酸特異的酸化酵素を投与した際に得られる吸光度の変化を測定することで、D-乳酸濃度を定量することが可能である。まず、LB 培地で一晚培養した各株を 100 倍希釈した後、OD_{600nm} = 0.3 に調整した。その後、培地を遠心分離し上清を -20°C で保存した。得られた上清 50 µl および Reaction Mixture 50 µl を 96 ウェルプレートに添加した後、室温で 30 min 反応させ、450 nm の吸光度をマルチプレートリーダー PowerScan HT (DS Pharma Biomedical, Japan) で測定した。

2.3.9 細菌内膜電位測定

膜電位の評価に BacLight™ Bacterial Membrane Potential Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) を使用した。本キットで使用されている緑色蛍光プローブ 3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide (DiOC₂) は、膜電位に依存して細胞内に取り込まれた後、プロトン駆動力が高い細菌では細胞内で DiOC₂ が凝集し構造を変化させることによって赤色蛍光を示すことが知られている⁷⁹。まず、LB 培地で一晚培養した各株を対数増殖期まで培養した。その後、各サンプルにおいて蛍光試薬を入れたサンプルと蛍光試薬および終濃度 5 µM CCCP を入れたサンプル、蛍光試薬を入れていないサンプルを用意し、それぞれ 30 min 暗所で静置した。その後、FACS Aria IIu (Becton Dickinson, USA) を用いて蛍光強度比 (PE-Texas Red-A/FITC-A) を算出した。

2.3.10 ATP 産生量の測定

ルシフェラーゼ発光を用いた BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega, USA) に従い、大腸菌の ATP 産生量を測定した。まず、LB 培地で一晚培養した大腸菌株を 100 倍希釈した後、37°C で 3 h 振盪培養した。その後、培養液を発光測定用と CFU 測定用に 100 µl ずつ分注し、1x PBS で置換した後、10 倍ずつ段階希釈し、LB 寒天培地に播種し CFU を測定した。また、同培養液を白色の 96 well プレートに 100 µl 添加した後、ATP reagent を 100 µl 添加し、室温で 5 min 振盪培養した。その後、Glo Max 96 (Promega, USA) を用いて発光測定を行った。

2.3.11 NADH/NAD⁺比測定

Amplite™ Colorimetric NAD/NADH Ratio Assay Kit (AAT Bioquest, USA) を用いて NADH/NAD⁺比を測定した。まず、LB 培地で一晚培養した大腸菌を 100 倍希釈した後、37°C で 3 h 振盪培養した。その後、培養液を遠心して得られたペレットに TE with lysozyme および proteinase K を添加し、10 min 室温で振盪培養し、細胞を破砕した。NADH 測定用および

NAD⁺ 測定用の 2 本のチューブに破砕液を等量分注し、NADH 測定用には 0.2 M NaOH を 300 μ l 添加し、NAD⁺測定用には 0.2 M HCl を 300 μ l 添加して 50°C インキュベーターで 10 min 培養して、NADH を取り除いた。その後、氷上に静置し、NADH 測定用に 0.1 M HCl を 300 μ l、NAD⁺測定用に 0.1 M NaOH を 300 μ l 添加して 15,000 rpm で 10 min 遠心分離した。その後、Bicine Buffer を 600 μ l 添加し、96 well プレートにサンプルおよび Recycling Mixture を 50 μ l ずつ添加し、PowerScan HT (DS Pharma Biomedical, Japan) により 575 nm の吸光度を測定した。

2.4 結果

2.4.1 *ldhA* 発現による persister 形成誘導の確認

まず、*ldhA* 発現が大腸菌 persister 形成の誘導に関与するかどうか調べるため、*ldhA* 過剰発現株と *ldhA* 欠損株を作製した。persister は増殖抑制と相関があることから、作製した両株の増殖への影響を調べた。まず、*ldhA* 過剰発現株では若干の増殖抑制が見られた (Figure 2.2)。つぎに、*ldhA* 発現による persister 形成の影響を調べるため、対数増殖期まで培養した *ldhA* 過剰発現株および空ベクター株を 3 種の抗菌薬でそれぞれ処理した際の生存率を測定した。その結果、全ての抗菌薬処理条件において空ベクター株と比較して *ldhA* 過剰発現株の生存率が有意に増加した (Figure 2.3)。一方、*ldhA* 欠損株に関しては、どの抗菌薬においても両株の生存率において有意差は得られなかったものの、オフロキサシンに関しては 1, 2 h 処理時点における *ldhA* 欠損株の生存率が野生株と比較してやや減少傾向が見られた (Figure 2.4)。一般的に、対数増殖期中に形成される persister の割合は 10⁴ 分の 1 程度と非常に少ないことが知られているため、*ldhA* が persister 関連遺伝子であったとしても、最初から低い生存率を遺伝子欠損によって顕著にさらに減少させることは難しいと考えられる。また、既往研究では複数の遺伝子が協調的に persister 形成を誘導することが報告されているため^{39,58}、*ldhA* を欠損させても他の遺伝子が協調的に働いたことで *ldhA* 欠損による persister 形成への影響が小さくなった可能性が考えられる。

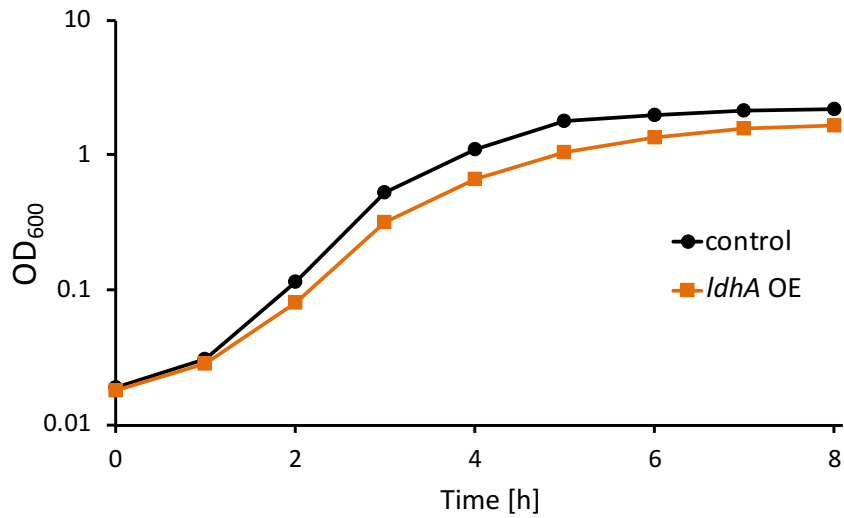


Figure 2.2 *ldhA* 過剰発現株および空ベクター株における増殖曲線²⁹
(n = 1, 文献 29 Figure S1 を一部改変して転載)

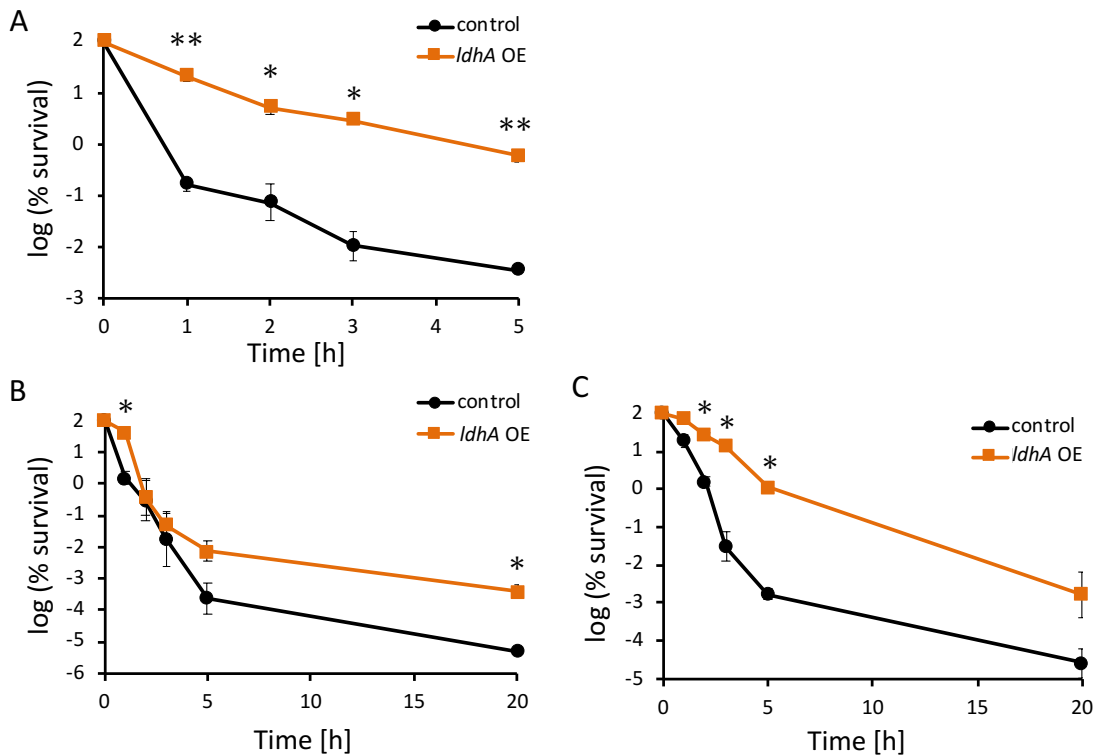


Figure 2.3 *ldhA* 過剰発現株における persister 形成への影響²⁹ (A) 5 µg/ml オフロキサシン
処理条件、(B) 100 µg/ml アンピシリン処理条件、(C) 50 µg/ml ゲンタマイシン処理条件
(文献 29 Fig. 2 を一部改変して転載) (n = 3)

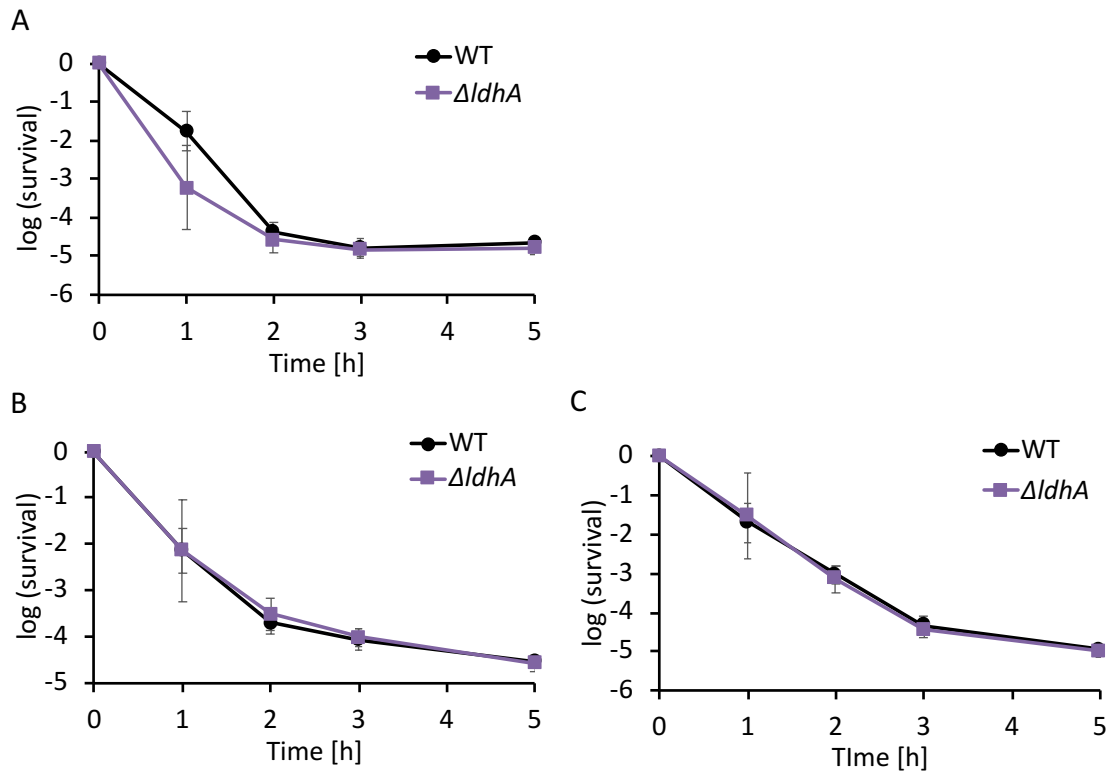


Figure 2.4 *ldhA* 欠損株を用いた persister 形成への影響 (A) 5 μ g/ml オフロキサシン処理条件、(B) 100 μ g/ml アンピシリン処理条件、(C) 50 μ g/ml ゲンタマイシン処理条件 (n = 3)

2.4.2 自然状態における *ldhA* 発現細菌の観察

前項では人工的に遺伝子を過剰発現あるいは欠損させることで persister 形成に与える影響を調べてきたが、遺伝子改変を加えていない自然状態で *ldhA* がどの程度発現しているのかは定かではない。そこで、*ldhA* のプロモーター活性を黄色蛍光タンパク質 Venus で可視化した *ldhA* レポーター株を作製し、対数増殖期における *ldhA* 発現の様子をシングルセルレベルで観察した。マイクロ流体デバイスを用いて *ldhA* レポーター株の Venus 蛍光を観察したところ、全体の 3.6%程度の割合で強い Venus 蛍光を示す細菌が観察された (Figure 2.5)。興味深いことに、*ldhA* 発現を示した細菌のほとんどは 10 min 程度の一過性の発現を行っていた (Figure 2.6)。

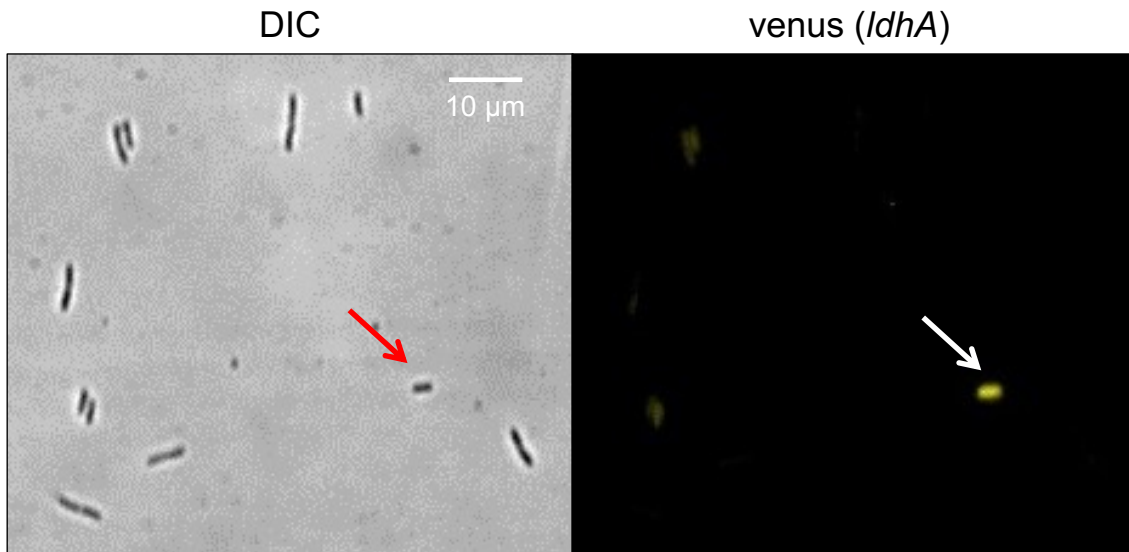


Figure 2.5 自然状態における *ldhA* 発現のシングルセル観察²⁹
 (文献 29 Fig. 3A を一部改変して転載)

2.4.3 *ldhA* 発現細菌の増殖活性および抗菌薬抵抗性の追跡

マイクロ流体デバイスを用いた観察結果から、*ldhA* 発現細菌が *persister* 形成を誘導しているのかどうか調べるため、*ldhA* を発現した細菌をタイムラプス観察によって追跡し、発現後の増殖速度の変化および抗菌薬応答を解析した。まず、*ldhA* 発現後の増殖の有無を追跡したところ、*ldhA* を発現した細菌において増殖が停止する様子が観察された (Figure 2.6)。つぎに、β-ラクタム系抗菌薬のアmpシリンおよびフルオロキノロン系抗菌薬のオフロキサシンに対する応答を追跡した。細胞壁の構成要素であるペプチドグリカン合成を阻害するβ-ラクタム系抗菌薬に暴露された感受性細胞は溶菌作用を示すことから、本研究では抗菌薬に対する生存を溶菌の有無で評価した。一方、DNA ジャイレースを阻害して細胞分裂のみを阻害するフルオロキノロン系抗菌薬に暴露された感受性細胞は異常伸長することが知られているため^{54,80,81}、本研究では抗菌薬に対する生存を異常伸長の有無で評価した。その結果、アmpシリンに関しては、*ldhA* 発現細菌が溶菌されずに形態を維持する様子が観察された (Figure 2.6)。一方、オフロキサシンに関しては、*ldhA* 発現細菌が菌体の異常伸長を示さなかった (Figure 2.7)。以上の結果から、*ldhA* の確率的な発現によって *persister* 形成が誘導されることが示唆された。つぎに、観察結果に基づいて *ldhA* 発現による *persister* 形成が誘導されることを統計的に評価するため、*ldhA* 発現の有無と抗菌薬抵抗性に関してオッズ比を用いて検定した結果、アmpシリンおよびオフロキサシンのどちらの観察結果に関しても 95%信頼区間におけるオッズ比の値が 1 を上回っていたことから、*ldhA* 発現細菌にお

いて抗菌薬抵抗性が有意に増加することが示された (Table 2.4)。したがって、自然状態では確率的な *ldhA* 発現によって persister 形成が誘導されることが統計的に示された。

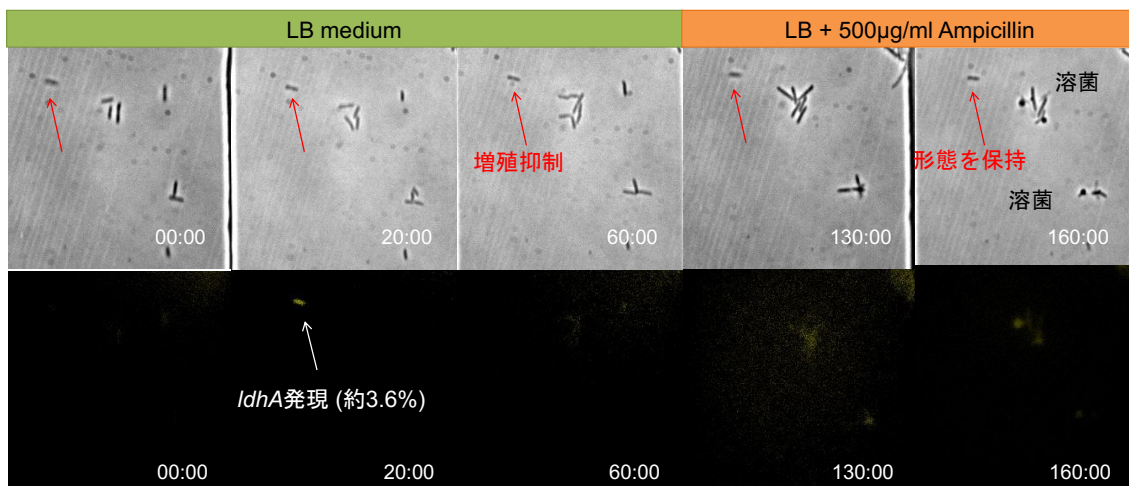


Figure 2.6 *LdhA* レポーター株を用いたタイムラプス観察²⁹
(500 µg/ml Ampicillin, 文献 29 Figure 3B を一部改変して転載)

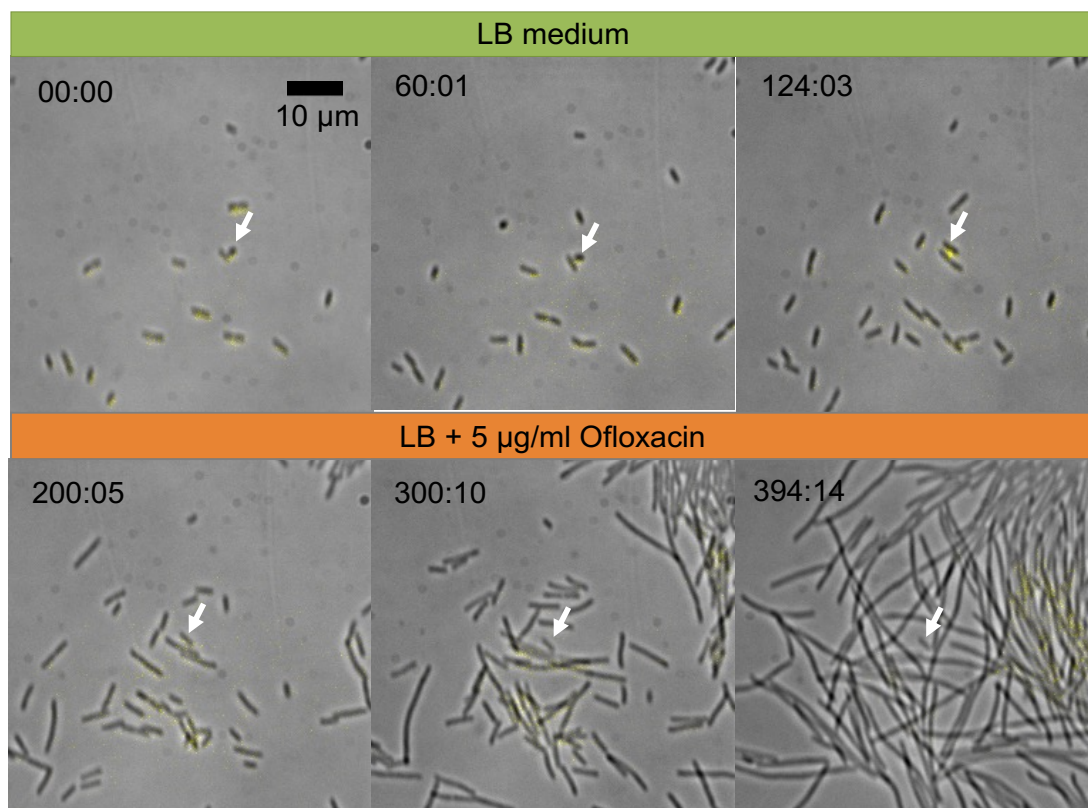


Figure 2.7 *LdhA* レポーター株を用いたタイムラプス観察²⁹
(5 µg/ml Ofloxacin, 文献 29 Fig. S3 を一部改変して転載)

Table 2.4 *ldhA* 発現による各抗菌薬抵抗性の統計解析²⁹

(文献 29 Table 3 を一部改変して転載)

	<i>ldhA</i> 発現細菌 (cells)		<i>ldhA</i> 非発現細菌 (cells)		オッズ比 (95% CI)
	persistor	non-persistor	persistor	non-persistor	
ampicillin	9	0.5 ^a	7	14	36.0 (1.8-715.1)
ofloxacin	6	0.5 ^a	11	90	98.2 (5.1-1880.0)

a. 0 を含むデータは 0.5 に補正した後、オッズ比を算出した

2.4.4 *ldhA* 発現によって形成された persistor のエネルギー代謝状態の解析

これまでの集団レベルおよびシングルセルレベルによる persistor の評価実験から、*ldhA* が persistor 形成を誘導する遺伝子であることが示されたが、代謝遺伝子である *ldhA* がどのように抗菌薬に対する生存戦略を獲得しているのかに関しては謎に包まれている。既往研究でも、ストレス応答経路が直接的に抗菌薬に対する生存に寄与するという報告は数多く存在するのに対し、代謝遺伝子発現に伴う代謝変化と抗菌薬抵抗性との関連性を議論した報告は非常に少ない。ただ、現在最も有力な仮説である ppGpp 産生を介した緊縮応答経路において、好氣的なエネルギー産生経路が抑制を介して細菌全体の代謝反応を抑制し、抗菌薬への感受性を低下させる戦略が取られているのではないかと考えられている^{33,57,58,60,67}。そこで、*ldhA* 発現がこのようなエネルギー代謝状態の変化に寄与しているかどうかを確かめるため、*ldhA* 過剰発現株を用いてエネルギー代謝活性の変化を測定した。

2.4.4.1 *ldhA* 発現による乳酸代謝反応促進の確認

まず *ldhA* 発現によって乳酸代謝反応が亢進されることを確認するため、*ldhA* 過剰発現株およびコントロールの空ベクター株を用いて乳酸脱水素酵素の補酵素である NADH/NAD⁺ 比を測定した。その結果、NADH/NAD⁺ 比は *ldhA* 発現によって減少傾向にあったことから、乳酸産生に伴って細胞内の NAD⁺ が増加したことが示唆された (Figure 2.8A)。また、乳酸測定キットを用いて各株を対数増殖期まで培養した際の培地中の D-乳酸濃度を測定した。その結果、空ベクター株と比較して *ldhA* 過剰発現株の乳酸濃度は 6 倍程度有意に増加したことが確認された (Figure 2.8B)。以上の結果から、本研究で作成した *ldhA* 過剰発現株における乳酸代謝は正常に代謝物レベルで活性化されることが確認された。

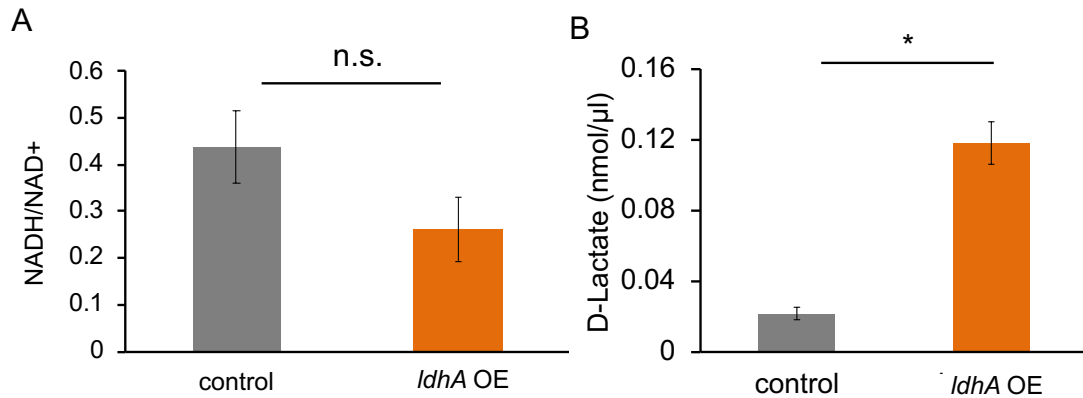


Figure 2.8 *ldhA* 過剰発現株の乳酸代謝亢進の確認²⁹

(A) NADH/NAD⁺の測定 (文献 29 Fig. 6B を一部改変して転載) (n = 3, n.s. : no significance)、(B) 培地中の D-乳酸の測定 (n = 3, * p < 0.05)

2.4.4.2 *ldhA* 発現によるエネルギー代謝活性の解析

ldhA 発現後のエネルギー代謝活性の変化を調べるため、好氣的なエネルギー産生に必要なプロトン駆動力とエネルギー通貨として様々な細胞プロセスに使用される ATP 産生量を測定した。その結果、コントロール株と比較して *ldhA* 過剰発現株のプロトン駆動力および ATP 産生量が増加した (Figure 2.9)。従来の報告では *persistor* 形成経路の多くはエネルギー代謝を抑制することで誘導されていると考えられているが、エネルギー代謝が活性化されるような *persistor* 形成メカニズムは提唱されていない。したがって、本研究で明らかとなった *ldhA* 発現によって誘導される *persistor* は、新規性の高い経路であることが予想された。

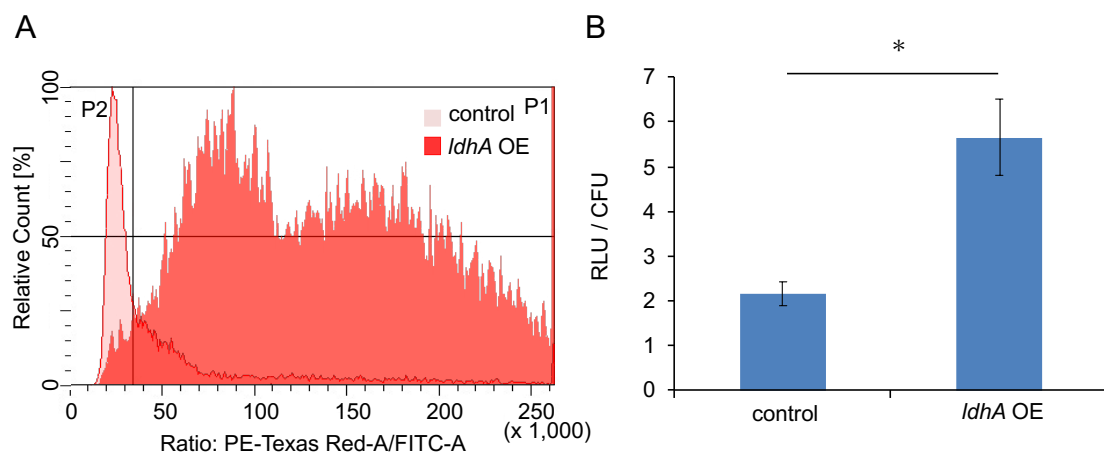


Figure 2.9 *ldhA* 発現に伴うエネルギー代謝活性の測定²⁹

(A) DiOC₂ を用いたプロトン駆動力の測定 (PE-Texas Red-A/FITC-A)、(B) ルシフェラーゼ発光を利用した 1 細菌あたりの ATP 産生量の測定 (RLU: Relative luminescence unit,

CFU: Colony forming unit, n = 4, * p < 0.05, 文献 29 Fig. 5, Fig. 6A を一部改変して転載)

2.5 考察

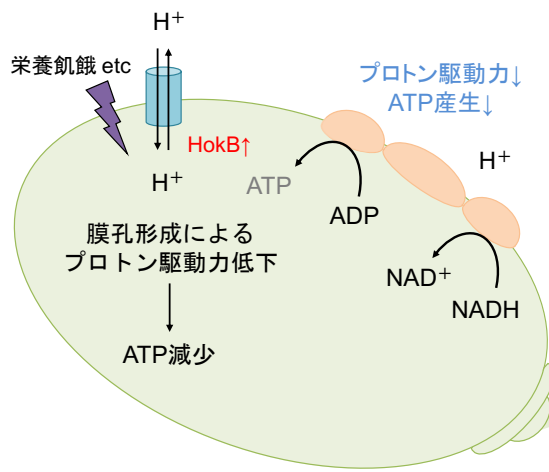
2.5.1 なぜ *ldhA* が確率的かつ一過性の発現を示したのか

本研究では、自然状態の *ldhA* 発現をシングルセルレベルで可視化するため、*ldhA* レポーター株を用いてマイクロ流体デバイスでタイムラプス観察した。集団のごく一部で *ldhA* が確率的に発現し、その発現時間はおおよそ 10 min 程度と短かった。*ldhA* の発現が一時的であった原因としては、*ldhA* 発現レベルが細菌集団内でばらついたためであると考えられる。また、タイムラプス *ldhA* 発現が消失した後も *persister* の性質が維持された。既往研究では、ppGpp の合成遺伝子である *relA* が発現した後にポジティブフィードバックループを介して ppGpp の産生が増強され緊縮応答を維持することが知られているため⁸²、本研究で一過性の *ldhA* 発現を示した細菌が *persister* 形成を誘導した原因として、何らかのフィードバック機構が関与した可能性が考えられる。

2.5.2 *ldhA* 発現による詳細な *persister* 形成経路について

2.4.4.2 において、*ldhA* 過剰発現によって *persister* が増加した集団のエネルギー代謝活性を調べることによって、プロトン駆動力や ATP レベルが増加することを明らかにした。これらの結果から、*ldhA* 発現によって誘導された *persister* が、従来の *persister* 形成モデルでは報告されていないエネルギー代謝の増加を介した新規性の高い *persister* 形成経路であることが示唆された。従来の経路ではエネルギーが細胞内で減少しているため、細胞の増殖や様々な代謝経路が抑制され、抗菌薬感受性が低下することで抗菌薬の影響を受けないような代謝状態に移行していると考えられているが (Figure 2.10)、今回初めて示唆されたエネルギー代謝活性の高い細菌の *persister* 形成メカニズムは未解明である。しかし、*persister* 形成経路として知られている SOS 応答や酸化ストレス応答経路、薬剤排出ポンプに用いられる RND 型のトランスポーターなどは ATP 依存的であることが知られていることから^{17,52,53}、仮にエネルギー代謝活性の高い *persister* が存在しているとすれば、このようにあらかじめ細胞内にエネルギーを貯蔵し、抗菌薬ストレスに備えるような代謝状態に移行している可能性が高い (Figure 2.10)。本仮説を実証するためには、なぜ *ldhA* 発現細菌で ATP が増加したのか、そして増加した ATP がどのように使われて抗菌薬から生存しているのか詳細に調べる必要がある。

■ エネルギー抑制状態にあるpersister



■ *ldhA*発現によって誘導されるpersister

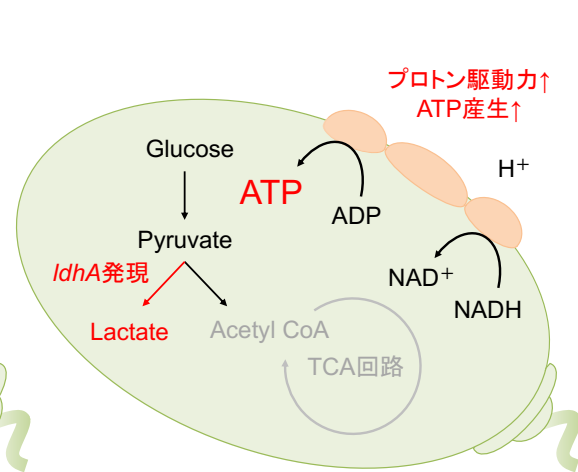


Figure 2.10 *ldhA* 発現による ATP 蓄積を介した persister 形成仮説

2.6 結言

本章では、トランスクリプトーム解析の結果から persister 関連遺伝子として推定された乳酸脱水素酵素遺伝子 *ldhA* に着目し、*ldhA* 過剰発現株を用いた死滅曲線の結果および *ldhA* レポーター株を用いたタイムラプス観察結果から、*ldhA* 発現によって大腸菌 persister が誘導されることを確認した。また、*ldhA* 発現によって誘導された persister のエネルギー的な性状を解析したところ、従来報告されてきた persister 経路とは異なり、エネルギー代謝が増加したことから、エネルギーを蓄積して抗菌薬ストレスに備える新規の persister 経路であることが示唆された。

第3章 *recA* を介した *ldhA*-persister の生存機構

3.1 緒言

第2章において、*ldhA* 発現によって増加した *persister* の性状を解析したところ、多数の既往研究で報告されているエネルギー抑制型の *persister* には見られない高いエネルギー代謝活性を持つことが示唆された。これらの詳細な *persister* 形成メカニズムを明らかにすることで新たな *persister* メカニズムの解明および制御方法の開発に貢献できると期待される。そこで本章では、分子生物学的手法を用いて *ldhA* 発現によって誘導された *persister* が抗菌薬存在下でどのように生き残るのかを詳細に解析した。

3.2 研究目的

これまで報告されてきた研究では、*persister* に関与する遺伝子の中には特定の抗菌薬のみに抵抗性を持つ遺伝子やあらゆる抗菌薬に対して抵抗性を持つことが報告されていることから、*persister* が抗菌薬に対して生存する方法は1つではなく、多様な生存戦略を持っていると考えられている^{33,67}。本研究では *ldhA* を過剰発現させた大腸菌において3種の抗菌薬(オフロキサシン、アンピシリン、ゲンタマイシン)に対して抵抗性を持つことが示された。しかし、興味深いことに、*ldhA* を欠損させた際に生存率の減少傾向を示した抗菌薬はオフロキサシンのみであったことから、*ldhA* はオフロキサシンに対する生存に与える影響は特に大きいと推察される。そこで、本研究では *ldhA* 発現を介したオフロキサシンに対する生存機構を明らかにすることを目的とした。

3.3 実験方法

3.3.1 使用した株および培養条件

大腸菌 K-12 MG1655 株およびその変異株を使用した。使用した菌株およびプラスミドを Table 3.1、使用したプライマーを Table 3.2 に示す。各大腸菌株の培養には LB 培地を使用した。定常期条件では前日にグリセロールストックを植菌したのち 16 h 培養したサンプルを使用し、対数増殖期条件では定常期のサンプルを新鮮な LB 培地で 1000 倍希釈した後、 $OD_{600} = 0.5-0.8$ 程度まで培養したサンプルを使用した。

Table 3.1 使用した株およびプラスミド

株/プラスミド	Genotype	Sources
株		
MG1655	wild type <i>E. coli</i>	NBRC ^a
pCA24N	MG1655 pCA24N	(29)
pCA24N- <i>ldhA</i>	MG1655 pCA24N- <i>ldhA</i>	(29)
BW25113_Δ <i>recA</i>	BW25113 Δ <i>recA kanR</i>	NBRP ^b
MG1655_Δ <i>recA</i>	MG1655 Δ <i>recA kanR</i>	This work
Δ <i>recA</i>	MG1655 Δ <i>recA</i>	This work
Δ <i>recA</i> _pCA24N	MG1655 Δ <i>recA</i> pCA24N	This work
Δ <i>recA</i> _pCA24N- <i>ldhA</i>	MG1655 Δ <i>recA</i> pCA24N- <i>ldhA</i>	This work
プラスミド		
pCA24N	<i>cat, lacI, pT5lac promoter</i>	NBRP ^b
pCA24N- <i>ldhA</i>	<i>cat, pCA24N pT5lac::ldhA</i>	(29)
pKD4	<i>ampR, kanR, frt</i>	CGSC ^c
pKD46	<i>ampR, araC, gam, beta, exo,</i>	CGSC ^c
pCP20	<i>ampR, cat, flp, mobA</i>	CGSC ^c

a. NBRC; National Bio Resource Center

b. NBRP; National Bio Resource Project

c. CGSC; Coli Genome Stock Center

Table 3.2 使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
Δ <i>recA</i> _f pKD4	tattgactatccggattaccggcatgacaggagtaaagtgtaggctggagctgcttc	This work
Δ <i>recA</i> _r pKD4	aagggccgcagatgcgaccctgtgtatcaacaagacgacatatgaatcctccttag	This work
Sequence_f <i>recA</i>	cgtcgtcaggctactgcgtatg	This work
Sequence_r <i>recA</i>	cgtaccgcacgatccaacaggc	This work
qftsZ_f	ATGGAACCTTACCAATGACGCG	(70)
qftsZ_r	TCAACACCTTCAATGCGCTC	(70)
q <i>recA</i> _f	GCGTCACAGATTTCCAGTGC	This work
q <i>recA</i> _r	GGTAAAGGCTCCATCATGC	This work

qrelA_f	CCGGAAAAATGGATCGCAAGTC	This work
qrelA_r	GAGGATCTCCACCATCTCAACAC	This work
qdksA_f	TGGTATTCGCCGTCTGGAAG	This work
qdksA_r	GCCAGCCATCTGTTTTTCGC	This work
qsoxS_f	TCGCATGGATTGACGAGCAT	This work
qsoxS_r	TGTAATCGCCAAGCGTCTGA	This work
qoxyR_f	GGGGCGGATGAAGATACACA	This work
qoxyR_r	AAAGTGATCCCGCTACCTGC	This work
qacrA_f	AACGGCAAAGCCAAAGTGTC	This work
qacrA_r	TTCGGGAAGATAGCGCGTAG	This work
qtolC_f	ACGCCTACAAACAAGCCGTA	This work
qtolC_r	TGGTCGCATCCAACACATCA	This work
qdnaK_f	CCGTATCGCTGGTCTGGAAG	This work
qdnaK_r	ATAGTACGGTTGCCAGTGCC	This work
qobgE_f	TTGATGAAGCATCGATTCTGGTC	This work
qobgE_r	CGATAAGCGTGTTTCAGGTTCTC	This work
qRT-pck_f	TGGTGGGCAGACAAAGGCA	This work
qRT-pck_r	TGAAACGGACGGAAAGACGA	This work
qRT-glgB_f	GATCCCGAACGAATTTGGCG	This work
qRT-glgB_r	ACGAGAAACGCCAGGGAAAT	This work
qRT-glgC_f	ATGAGAACTCCAGCCACGAC	This work
qRT-glgC_r	GGGTCCGATTGTACGCAAGA	This work
qRT-purF_f	TGGACAACCTCCGCCACTAC	This work
qRT-purF_r	TAATCATCGCCACACAGGCA	This work
qRT-purA_f	TCACAACGCAGGCCATACTC	This work
qRT-purA_r	ACCGTTACCGATGATGCTGG	This work

3.3.2 qRT-PCR

まず、RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) を用いて対数増殖期まで培養した各株の Total RNA を抽出した。その後、PrimeScript RT™ reagent Kit with gDNA Eraser (Takara Bio, Japan) を用いて cDNA に逆転写した。最後に、リアルタイム PCR システム (Takara Bio, Japan) を用い

て各株由来の cDNA を鋳型とした定量 PCR を行い、目的遺伝子の相対発現量を測定した。ハウスキーピング遺伝子として当研究室でこれまで実績のある *ftsZ* を使用した⁷⁶。

3.3.3 persister assay

まず、対数増殖期のサンプルを準備するため、一晚培養した各株を 0.1 mM IPTG を含む LB 培地を用いて 1000 倍に希釈した後、37°C で 3h 振盪培養した。培養したサンプルが OD₆₀₀ = 0.5-0.8 程度であることを確認した後、抗菌薬処理前にあらかじめ培養液 100 μl を分注しておき、残りの培養液に 5 μg/ml オフロキサシンを添加した。オフロキサシン処理前のサンプルおよび処理後 1, 2, 3, 5 h 時点のサンプル 100 μl を 1x PBS に置換および段階希釈した後、LB 寒天培地上にスポットして一晚 37°C で静置培養した。翌日、各時点における CFU を処理前の CFU で割った生存率を算出した。

3.3.4 ヒドロキシラジカル産生量の測定

細胞内の遺伝子損傷レベルを間接的に評価するため、ROS の一種であるヒドロキシラジカル特異的に蛍光を示す Hydroxyphenyl fluorescein (HPF; Goryo Chemical, Japan) を使用した。一晚培養した MG1655 pCA24N 空ベクター株および *ldhA* 過剰発現株を 1000 倍希釈した後、37°C で 3 h 振盪培養した。対数増殖期まで培養した各株に対して 5 μg/ml オフロキサシンを添加して 1, 2, 3 h 時点の培養液から菌体を回収し、1x PBS に置換した後、フローサイトメーター (FACS AriaIIIu; Becton Dickinson and Company, USA) で HPF 蛍光を測定した。また、HPF の蛍光検出には Alexa Fluor 488-A をパラメータとして使用した。

3.3.5 遺伝子損傷レベルの測定

フルオロキノロン系抗菌薬による遺伝子損傷レベルを可視化するため、Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法⁸³を用いて損傷 DNA を蛍光検出する In Situ Cell Death Kit (Roche, Switzerland) を使用した。一晚 LB 培地培養した MG1655 空ベクター株および *ldhA* 過剰発現株の培養液および各培養液を 1000 倍希釈した後、37°C で 3 h 培養したサンプルをそれぞれ用意した。また、対数増殖期の培養液に関して、5 μg/ml オフロキサシンで 3 h 処理したサンプルを回収し 1x PBS で置換した後、フローサイトメーターで TUNEL 蛍光 (Alexa Fluor 488-A) を測定した。また、オフロキサシンで 3 h 処理した各株の培養液を新鮮な LB 培地に移し、37°C で 2 h 培養したサンプルを回収し、0.1% Triton-100、0.1%クエン酸ナトリウム溶液に再懸濁し、氷上で 2 min 静置して細

胞透過性を増加させた。つぎに、透過処理後の溶液を遠心分離して上清を除去した後、4% パラホルムアルデヒド溶液に再懸濁して室温で 1 h 静置して、細胞を固定させた。その後、1x PBS に置換した後フローサイトメーターで TUNEL 蛍光を測定した。なお、本実験のネガティブコントロールには、オフロキサシン未処理のサンプルおよび Fluorescein 未添加サンプルを使用した。

3.3.6 再増殖活性の評価

本研究では、抗菌薬オフロキサシン処理後の *persisters* 再増殖活性を、形成されたコロニーサイズから評価した。まず、対数増殖期まで培養した大腸菌 MG1655_pCA24N-*ldhA* および空ベクター株に 5 µg/ml オフロキサシン 1, 2, 3 h 処理した培養液を 1x PBS に置換し、適切に希釈した後 20 µL を LB 寒天培地上にスポットし、37°C で一晩静置培養した。形成されたコロニー画像を撮影した後、画像解析ツールである Fiji を用いてコロニー領域の面積 [cm²] を測定した⁸⁴。

3.3.7 CE-MS/MS を用いた代謝物解析

慶應義塾大学メタボロミクス・コアにメタボローム解析を委託した。代謝物の分離および測定にはキャピラリー電気泳動質量分析計 (CE-MS) を使用した。まず WT_pCA24N, WT_pCA24N-*ldhA*, $\Delta recA$ _pCA24N, $\Delta recA$ _pCA24N-*ldhA* の 4 株を LB 培地で一晩培養した後、100 µM IPTG を含む LB 培地に 1000 倍希釈した後、OD₆₀₀ = 0.5 程度になるまで培養した。各培養液の上清を遠心分離によって除去し、回収したペレットを Mannitol 溶液で洗浄したのち、Internal standard 1 (Negative: MES, Positive: L-Methionine sulfone) /MeOH 溶液に回収した後、超純水を加えて超音波処理した。つぎに、破砕液を遠心分離して上清を採取し、5 kDa の Cut off スピンフィルターを用いて遠心分離し、タンパク質を除去した。得られた代謝抽出物はエバポレーターで濃縮乾燥した後、Internal standard 2 (Negative: 3-Aminopyrrolidine, Positive: Trimesate) 水溶液で再溶解し、CE-MS に供試した。本解析では、代謝物の濃度を定量する際に、内部標準検量法を用いており、各スタンダードに関して作成した検量線に基づいてサンプル内の代謝物濃度を定量した。その後、実際の懸濁液量の値から代謝物量を算出し、各サンプル抽出した全タンパク質量で補正した代謝物量 [nmol/g_{protein}] を使用した。

3.3.8 統計解析

まず、得られた各代謝物量データ (n=4) から欠損値を3つ以上含む代謝物を解析対象から除外したのち、欠損値を含む代謝物を残りの代謝物量の平均値で埋めて補正した。ウェブ解析ツールである Metaboanalyst 5.0⁸⁵ に補正後の代謝物量データファイルをアップロードした後、*ldhA* 発現による代謝経路の変化を統計的に調べるために主成分分析、ヒートマップ、およびエンリッチメント解析を行った。

3.4 結果

3.4.1 *ldhA* 発現によるエネルギー依存的なストレス応答経路の探索

persister が抗菌薬に対して生き残る際、自身の持つ多様なストレス応答が誘導されることが知られており、特定の抗菌薬あるいは幅広い機序の抗菌薬に対して抵抗性を示すことが知られている^{33,67}。前章では、*ldhA* 発現による *persister* 形成に細胞内 ATP レベルの増加が関与する可能性が示唆された一方、どのように抗菌薬に対して生存したのか明らかにされていない。そこで *ldhA* 発現によって誘導された *persister* における生存経路を明らかにするため、これまで *persister* 形成に関与することが報告されている経路のうち、ATP を消費する経路であるヒートショック応答、緊縮応答、薬剤排出ポンプ、酸化ストレス応答、SOS 応答経路に着目した。*ldhA* 過剰発現株における各遺伝子の発現量を qRT-PCR で測定した結果、ヒートショック応答遺伝子である *dnaK* の発現量は *ldhA* 発現によって減少した (Figure 3.1)。*ldhA* はヒートショック応答遺伝子を誘導する *rpoH* によって制御されているため、*dnaK* の発現量が減少した原因に関して、*rpoH* 下流の *ldhA* 発現を人工的に増加させたことによって *dnaK* を含むヒートショック応答関連遺伝子が抑制されるようにフィードバック制御が働いた可能性が考えられる。また、薬剤排出ポンプ関連遺伝子である *acrA* および *tolC*、酸化ストレス応答遺伝子である *soxS* および *oxyR* およびの発現量に関しては、*ldhA* 発現による影響は見られなかった (Figure 3.1)。さらに、緊縮応答に関与する *dksA*、*obgE*、*relA* の発現量は *ldhA* 発現によって増加したことから (Figure 3.1)、*ldhA* 発現によって緊縮応答が活性化されている可能性が示唆された。また、興味深いことに、SOS 応答の関連遺伝子である *recA* の発現量は、*ldhA* 発現によって有意に増加したことから (Figure 3.1)、*ldhA* 発現によって SOS 応答が活性化されることが示唆された。また、第2章で *ldhA* を欠損させた際にオフロキサシンに対してのみ生存率がやや減少したことから、*ldhA* 発現によって誘導された *persister* はオフロキサシンのようなキノロン系抗菌薬に対して特徴的な生存メカニズムを持っていることが予想された。そこで、本研究ではキノロン系抗菌薬に対する *persister* 形成

メカニズムと関連性の高い *recA* に着目した。

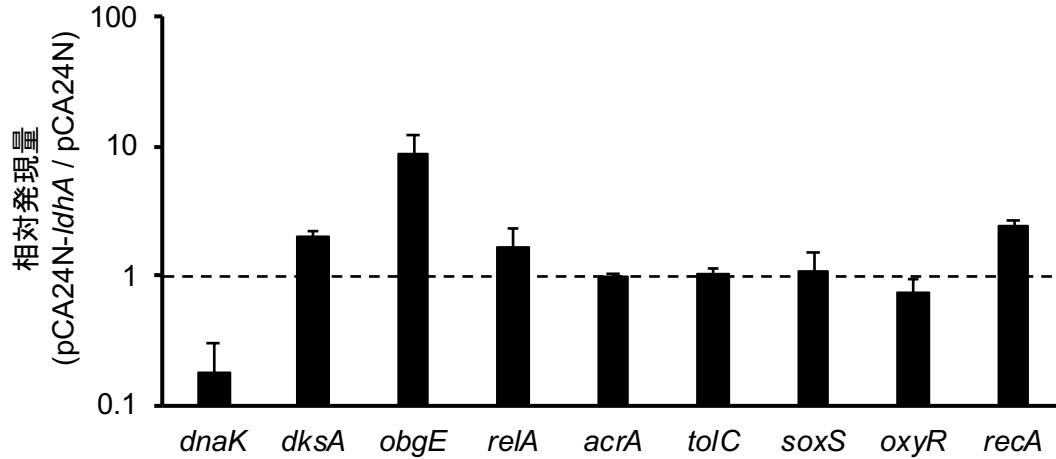


Figure 3.1 *ldhA* 発現による persister 関連遺伝子の相対発現量変化⁸⁶

(*dnaK*: heat-shock response; *acrA*, *tolC*: efflux pumps; *soxS*, *oxyR*: oxidative stress response; *recA*: SOS response, n = 3, 文献 86 を一部改変して転載)

3.4.2 *recA* は *ldhA* 発現による persister 形成に必要か？

recA が *ldhA* 発現による persister 形成に関与することが示唆された一方、実際に *recA* による SOS 応答が *ldhA* 発現による persister 形成経路のどのステップで関与しているのかは明らかでない。*recA* を欠損させた際に *ldhA* 発現による persister 形成の影響を調べることで、*recA* が *ldhA* 発現の上流あるいは下流で制御していることを推測することが可能である。そこで、本研究では *recA* を欠損させた大腸菌株を作製し、作成した *recA* 欠損株にそれぞれ pCA24N 空ベクターと *ldhA* 過剰発現プラスミドを導入した株を用いて *ldhA* 発現による persister 形成の影響を調べた。その結果、 $\Delta recA$ では *ldhA* を過剰発現させても persister の割合が増加されなかったことから、*recA* が *ldhA* 発現の下流で persister 形成を誘導することが示唆された (Figure 3.2)。

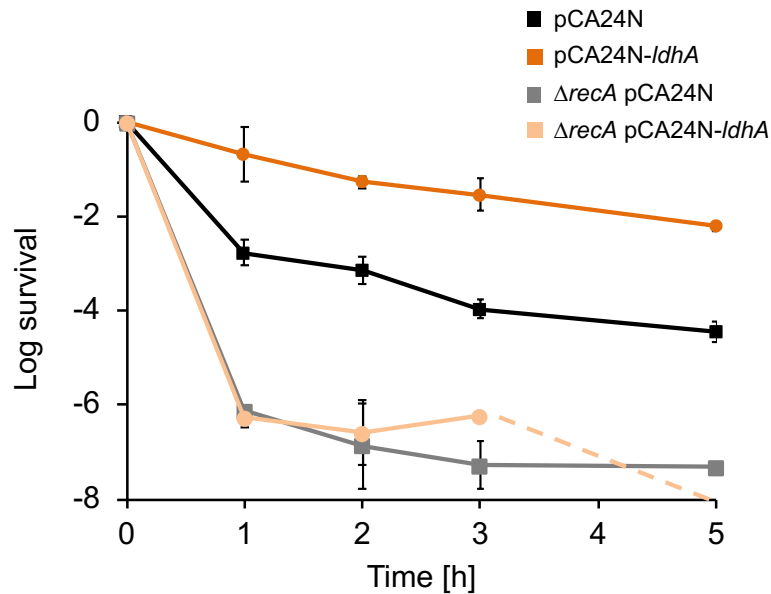


Figure 3.2 *recA* 欠損時における *ldhA* 過剰発現株の persister 形成評価⁸⁶

(pCA24N および pCA24N-*ldhA* のプロットは文献 29 Figure 2A を一部改変して転載, n = 3, Δ*recA*_pCA24N および Δ*recA*_pCA24N-*ldhA* のプロットは文献 86 を一部改変して転載, 一部のプロットは検出限界以下のため点線で表記)

つぎに、SOS 応答の阻害剤である酢酸亜鉛 (ZnAc) を用いて⁸⁷、*ldhA* 発現による persister 形成が阻害されるかどうか調べた。まず、所定濃度の ZnAc を大腸菌培養液に添加して培養し、増殖速度の影響を検討したところ、1000 μM 以上の濃度で増殖阻害が見られたことから (Figure 3.3)、その後の実験は増殖速度に影響の見られない 200-500 μM の ZnAc を用いることとした。200 および 500 μM ZnAc を添加して対数増殖期まで培養した MG1655 pCA24N 空ベクター株および pCA24N-*ldhA* 株に対して persister の割合を測定した。しかし、予想に反して、ZnAc を添加しても *ldhA* 過剰発現株における persister は減少しなかった。(Figure 3.4)。また、空ベクター株においても ZnAc 添加した際の生存率の減少は見られなかったため、本実験から Δ*recA* で実施した生存率の減少を再現することができなかった。しかし、既往研究では、定常期まで培養した大腸菌株に対して 500-1000 μM 程度の ZnAc を添加した際 persister 形成が 100 倍程度減少していたことから⁸⁸、本実験で実施した対数増殖期条件では SOS 応答経路の阻害活性が十分でなかったと推察される。

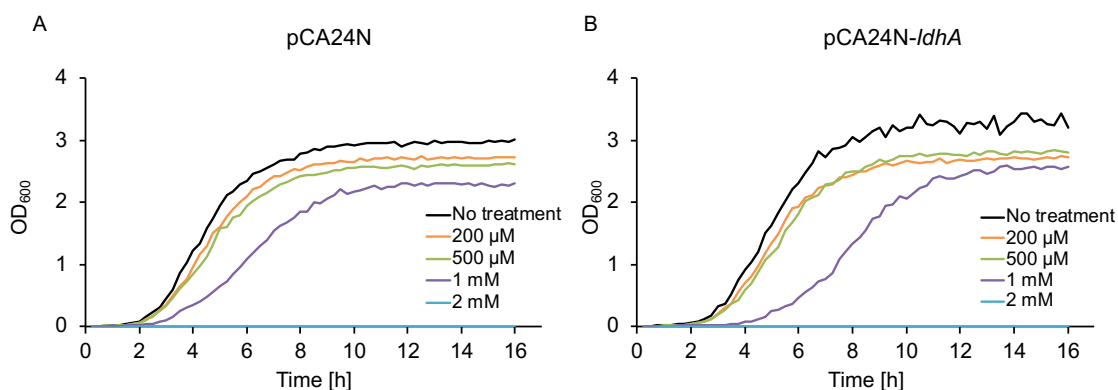


Figure 3.3 各濃度の ZnAc を添加した際の増殖曲線 (n = 1)

(A) 空ベクター株 (B) *ldhA* 過剰発現株

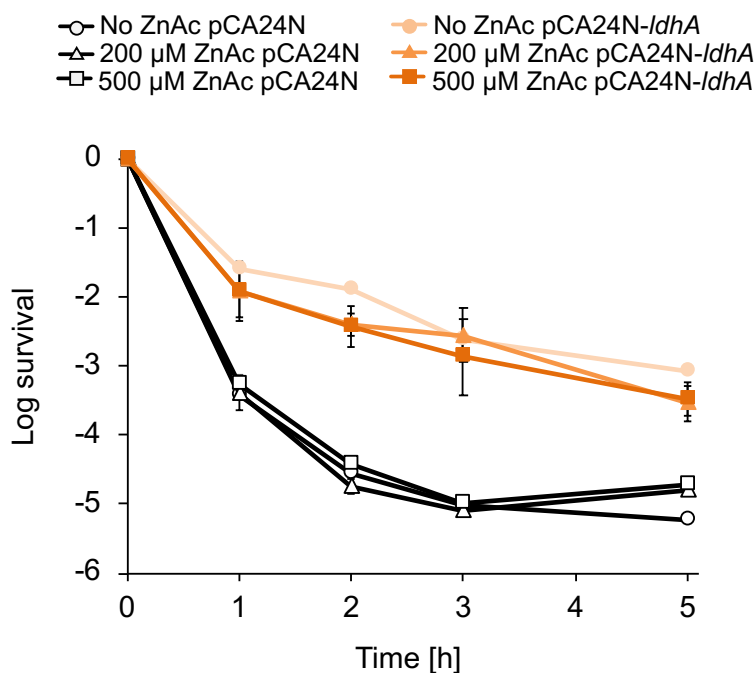


Figure 3.4 ZnAc 添加による *ldhA* 発現由来 persister 形成の影響⁸⁶

(No ZnAc: n = 3, 200-500 μM ZnAc: n = 4, 文献 86 Fig. を一部改変して転載)

3.4.3 *ldhA* 発現による persister 形成と遺伝子修復機構活性との関係

3.4.2 の結果から、*ldhA* 発現による persister 形成の誘導には *recA* によって活性化される SOS 応答が重要であることが示唆された。既往研究ではキノロン系抗菌薬に対して SOS 応答に伴う遺伝子修復機構の活性化を誘導し、再増殖可能な細菌の割合を増加させることが persister の生存メカニズムとして報告されている⁵⁵。そこで、本研究では *ldhA* 発現による SOS 応答の活性化に伴い、遺伝子修復機構が活性されることによって再増殖が可能になる

細菌の割合が増加するのではないかと予想した。

3.4.3.1 抗菌薬処理時における遺伝子修復活性の評価

ldhA 過剰発現によって遺伝子修復応答が活性化されることを確かめるため、本研究では、遺伝子損傷を受けた際に生じる 3'-OH 基に反応する蛍光試薬を用いて断片化 DNA を検出する TUNEL 法に着目した。本手法では、細胞を固定した後にフルオレセインと dUTP を結合した蛍光試薬で染色し、断片化 DNA 特異的に結合したフルオレセイン量に依存して蛍光強度が増加する⁸³。まず、*ldhA* 過剰発現株および空ベクター株を定常期および対数増殖期まで培養した後、フローサイトメーターを用いて TUNEL 蛍光を測定した。その結果、定常期サンプルは両株とも TUNEL 染色していないネガティブコントロールと同程度の蛍光分布を示した一方、対数増殖期のサンプルでは両株とも蛍光強度が増加した (Figure 3.5)。対数増殖期では定常期と比較して環境ストレスがほとんどなく、DNA 損傷は生じにくいと考えられるため、今回対数増殖期で TUNEL 蛍光強度が増加した原因は DNA 損傷による断片化 DNA ではなく、対数増殖期で活発に合成された遊離核酸の 3'-OH に TUNEL 蛍光が反応した可能性が考えられる。

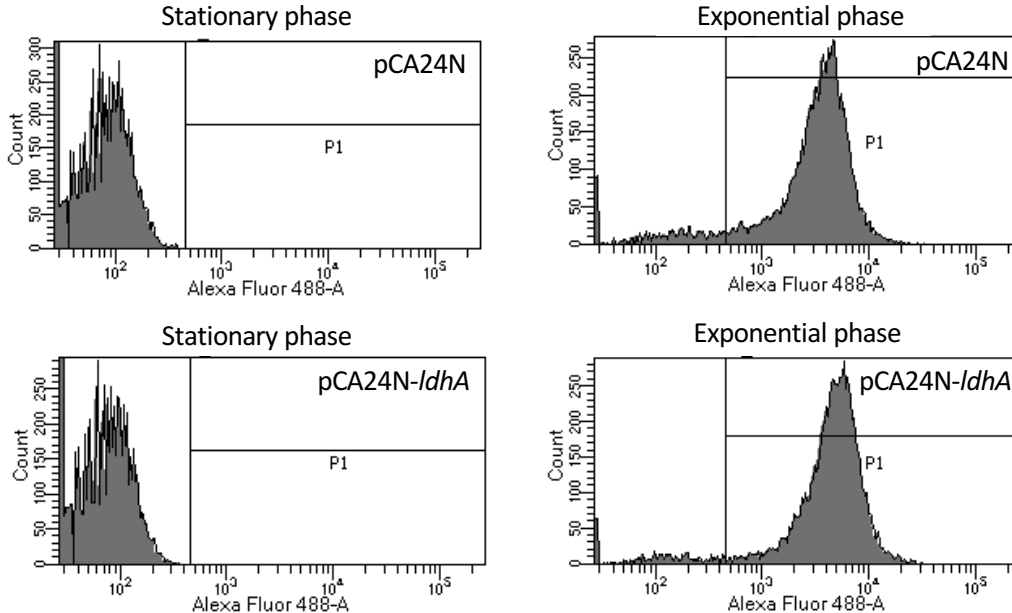


Figure 3.5 定常期および対数増殖期における TUNEL 蛍光分布
(MG1655_pCA24N および MG1655_pCA24N-*ldhA* 株)

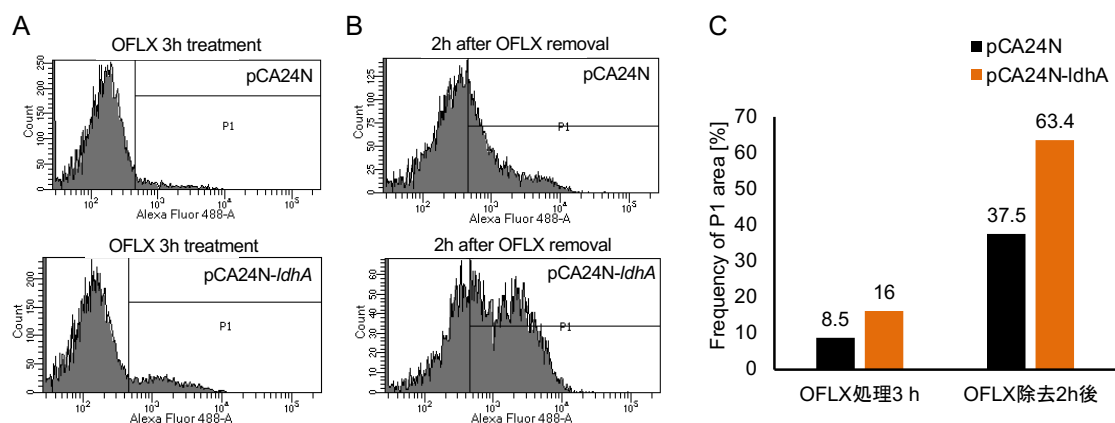


Figure 3.6 *ldhA* 過剰発現株を用いたオフロキサシン処理時の断片化 DNA レベル (A-B) MG1655_pCA24N および MG1655_pCA24N-*ldhA* 株における (A) オフロキサシン 3 h 処理時点および (B) オフロキサシン除去後 2 h 時点における TUNEL 蛍光ヒストグラム, (C) 全集団における高い TUNEL 蛍光強度を示した集団 (P1) の割合

つぎに、オフロキサシン処理 1, 2, 3 h 時点における両株の断片化 DNA 量を測定した。オフロキサシン処理中に関しては空ベクター株と比較して *ldhA* 過剰発現株の TUNEL 蛍光は一部の集団で増加した (Figure 3.6 A, C)。しかし、本手法ではオフロキサシン処理によって損傷を受けた遺伝子量に加えて遊離中の核酸によるバックグラウンド蛍光が一部反映されてしまうことから、*ldhA* 発現によって TUNEL 蛍光強度が増加したのは、*ldhA* 発現によって深刻な遺伝子損傷を受けた可能性と、核酸の生合成経路が活性化された可能性の両方が考えられる。そこで、*ldhA* 過剰発現株とコントロール株においてオフロキサシン処理時どの程度 SOS 応答が活性化されているか確かめるため、*recA* の mRNA レベルを qRT-PCR によって調べた。その結果、両株ともオフロキサシン処理前と比較して 100 倍近く *recA* の発現が増加した (Figure 3.7)。また、一般的にオフロキサシンを投与した際に細胞内の ROS レベルが増加することが報告されているため、*ldhA* 過剰発現株において深刻な遺伝子損傷が起きているとすれば細胞内の ROS レベルは空ベクター株より増加することが予想される。そこで、細胞内 ROS レベルを蛍光標識する HPF を用いて空ベクター株と *ldhA* 過剰発現株に対してオフロキサシン処理した集団の ROS レベルをフローサイトメーターで測定した。予想に反して、pCA24N 空ベクター株と比較して *ldhA* 過剰発現株の ROS レベルが低かったことから (Figure 3.8)、*ldhA* 過剰発現株で DNA 損傷レベルが増加した可能性は低く、むしろ *ldhA* 発現によって細胞内の遊離核酸が増加したと考えられる。

つぎに、オフロキサシンを培地中から除去した後の再増殖期における遺伝子修復機構の活性を調べるため、オフロキサシンで 3 h 処理した培養液からオフロキサシンを含まない新

鮮な培地に置換した後、37°C で 2 h 振盪培養した時点で各株の TUNEL 蛍光を測定した。その結果、再増殖期における *ldhA* 過剰発現株における断片化 DNA レベルは、空ベクター株と比較して断片化 DNA 量は増加した (Figure 3.5 B-C)。この結果に関しても、Figure 3.4 と同様に抗菌薬処理時の遊離核酸によるバックグラウンド蛍光の影響を除くことができていないため、再増殖期においても *ldhA* 発現による遊離核酸の増加が見られているのか、あるいは *ldhA* 過剰発現株において断片化 DNA が完全に修復されずに残ってしまっているのか判断することが困難であると考えられる。

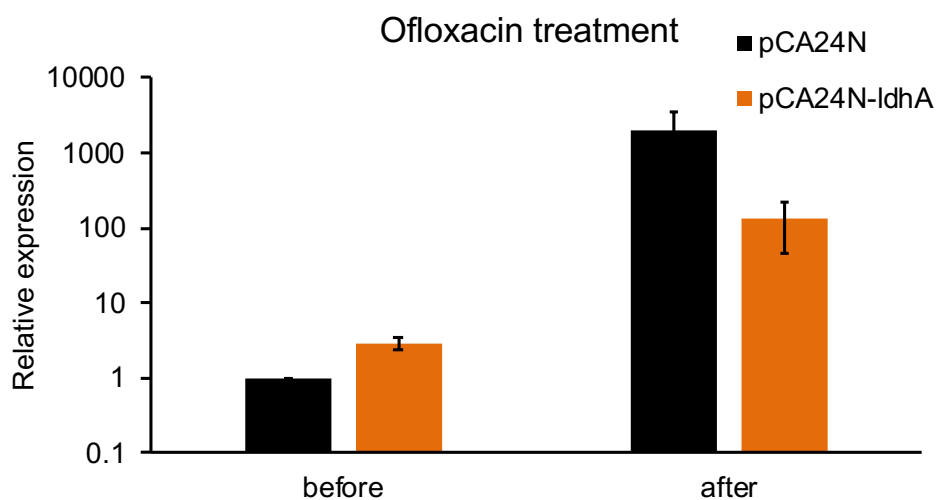


Figure 3.7 qRT-PCR によるオフロキサシン処理前後の *recA* 発現量測定
(抗菌薬処理前の空ベクター株を基準とした, n = 3)

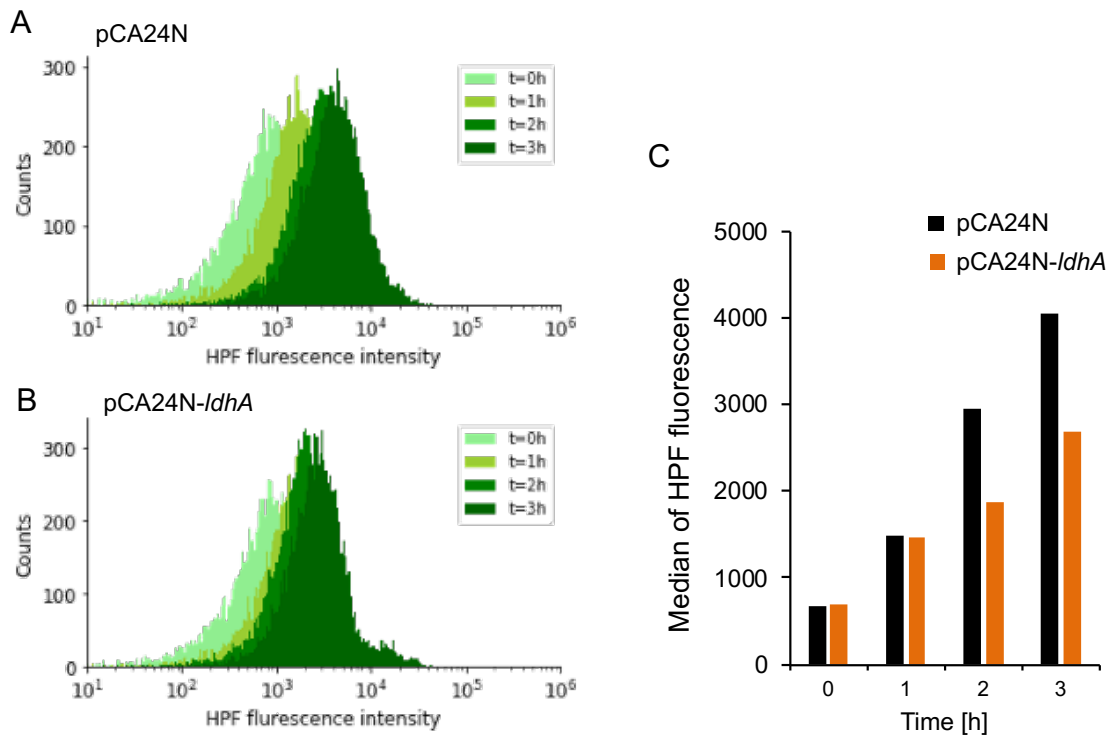


Figure 3.8 HPF を用いたオフロキサシン処理後の細胞内 ROS レベルの測定⁸⁶

(A-C) 5 $\mu\text{g/ml}$ オフロキサシン処理後の (A) MG1655_pCA24N および (B) MG1655_pCA24N-ldhA 株における HPF 蛍光分布のおよび (C) 両株の中央値の変化 (文献 86 Fig. 2B-2D を一部改変して転載)

3.4.3.2 抗菌薬処理後に生存した細菌の再増殖活性の評価

TUNEL 法とは異なる方法で *ldhA* 発現による遺伝子修復の活性化およびそれに伴う persister の再増殖の促進について調べるため、抗菌薬処理した細菌のコロニーの形成能を測定した。対数増殖期まで培養した大腸菌 pCA24N 空ベクター株および *ldhA* 過剰発現株に対してオフロキサシンを投与して 5 h 後の培養液を適切に希釈して LB 寒天培地上にスポットし、37°C で 16 h 培養した際に得られたコロニー画像からコロニーのサイズ (Area [cm²]) を画像解析ソフトの Fiji を用いて解析した。まず空ベクター株に関して、オフロキサシン処理後の集団から得られたコロニーのサイズはどの時点において処理前より著しく減少した (Figure 3.9)。既往研究では、persister の再増殖までに DNA 修復が完了する必要があることが示唆されているため^{53,55}、オフロキサシン処理によってコロニーサイズが減少したのは、損傷した遺伝子が完全に修復されていない細菌再増殖されないあるいは再増殖が遅れたことが原因として考えられる。以上の結果から、*ldhA* 過剰発現株では空ベクター株よりもオフロキサシン処理後の遺伝子修復の完了が早まり、再増殖が活性化されたことが推察され

た。

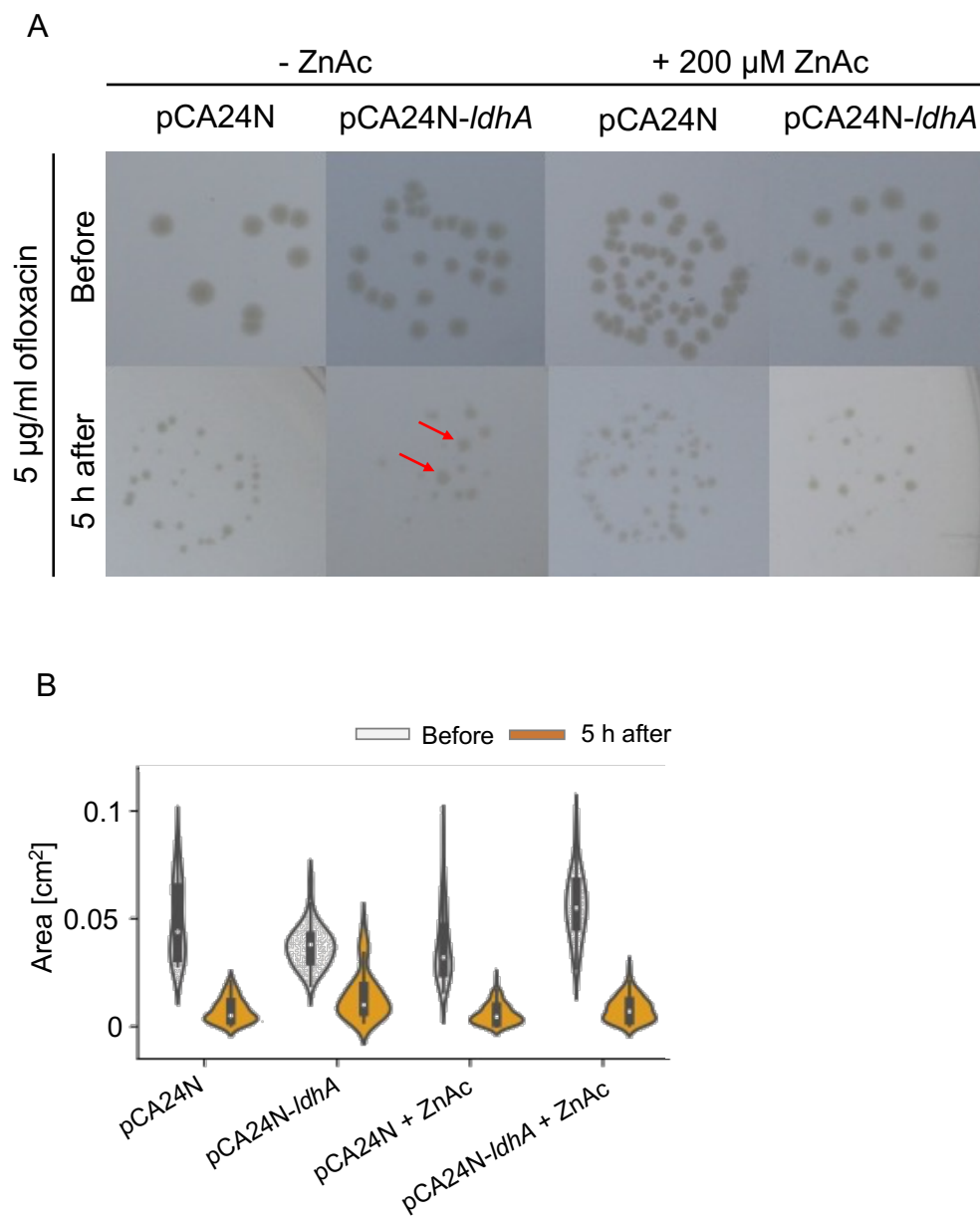


Figure 3.9 抗菌薬処理後の集団のコロニーサイズの分布⁸⁶ (A-B) MG1655_pCA24N および MG1655_pCA24N-*ldhA* 株を用いた、ZnAc 非添加および 200 μ M ZnAc 添加時のオフロキサシン処理後の培養液における (A) コロニー画像および (B) コロニーの面積分布 (赤い矢印はオフロキサシン処理後に得られるサイズの大きいコロニーを示す, 文献 86 Fig. 2A を一部改変して転載)

3.4.4 *ldhA* 発現による代謝変化の網羅的な解析

ldhA 発現によって変化する代謝経路を網羅的に調べるため、大腸菌 MG1655 野生株および *recA* 欠損株に対してそれぞれ空ベクターおよび *ldhA* 過剰発現プラスミドを導入した 4 株 (WT_vector, WT_ *ldhA*, Δ *recA*_vector, Δ *recA*_ *ldhA*) から細胞内代謝物を抽出した後、CE-MS を用いたメタボローム解析を実施した (n = 4)。既知濃度の標準物質における定量結果から各代謝物濃度を算出し、平均値を用いて欠損値を補正した。補正後の各代謝物データは web 解析ツールである Metabolite 5.0 を用いて詳細な解析を行った⁸⁵。まず、株間における各代謝物量の傾向を知るために多変量解析を実施した。その結果、PC 1 で株間の傾向の差がわずかに見られたもののサンプル間のばらつきが大きく、全体で顕著な差は見られなかった (Figure 3.10)。つぎに、各株における代謝物レベルの平均値に基づいたヒートマップを作成した。その結果、一部の糖類、核酸、アミノ酸など一部の代謝物が *ldhA* 発現によって増加する傾向が見られた (Figure 3.11)。しかしながら、本解析結果では、全体の約半数の代謝物が *recA* 欠損によって大きく変動していたことから、*recA* 遺伝子が細胞内の代謝経路を制御する可能性が示唆された。そこで、本研究では *ldhA* 発現によって変動する代謝経路のみを評価するため、WT_vector と WT-*ldhA* の 2 群間でエンリッチメント解析を行い、*ldhA* 発現によって重要な変化が見られた代謝経路に着目した。*ldhA* 発現によって増加あるいは減少した代謝物を KEGG のデータベースに基づいて代謝パスウェイレベルで重要と推定される代謝経路を上位順に調べた。その結果、ニコチンアミド代謝やグルタチオン代謝などの酸化還元バランスの調節に関与する代謝経路、リン酸基を修飾するセリン・トレオニン代謝経路、そしてプリン合成やピリミジン合成経路が *ldhA* 発現によって活性化されており (Figure 3.12A)、実際にプリンおよびピリミジン等の核酸量の増加傾向が認められた (Figure 3.13B)。また、パスウェイ解析では重要な変化は見られなかった代謝物として、ホスホエノールピルビン酸など糖新生経路に関する代謝物量が *ldhA* 発現によって増加していた (Figure 3.13A)。一方、 Δ *recA*_vector と Δ *recA*_ *ldhA* 株を比較した際に上述した代謝経路の変化は見られなかった (Figure 3.12B)。したがって、これらの代謝経路は、*recA* 依存的な代謝変化であることが示唆された。また、*recA* 欠損時は *ldhA* 発現による persister 形成は誘導されないことが示されているため (Figure 3.2)、*recA* 欠損株に *ldhA* を過剰発現させた際に変化した代謝経路に関しては persister 形成とは直接的に関与しないと考えられる。

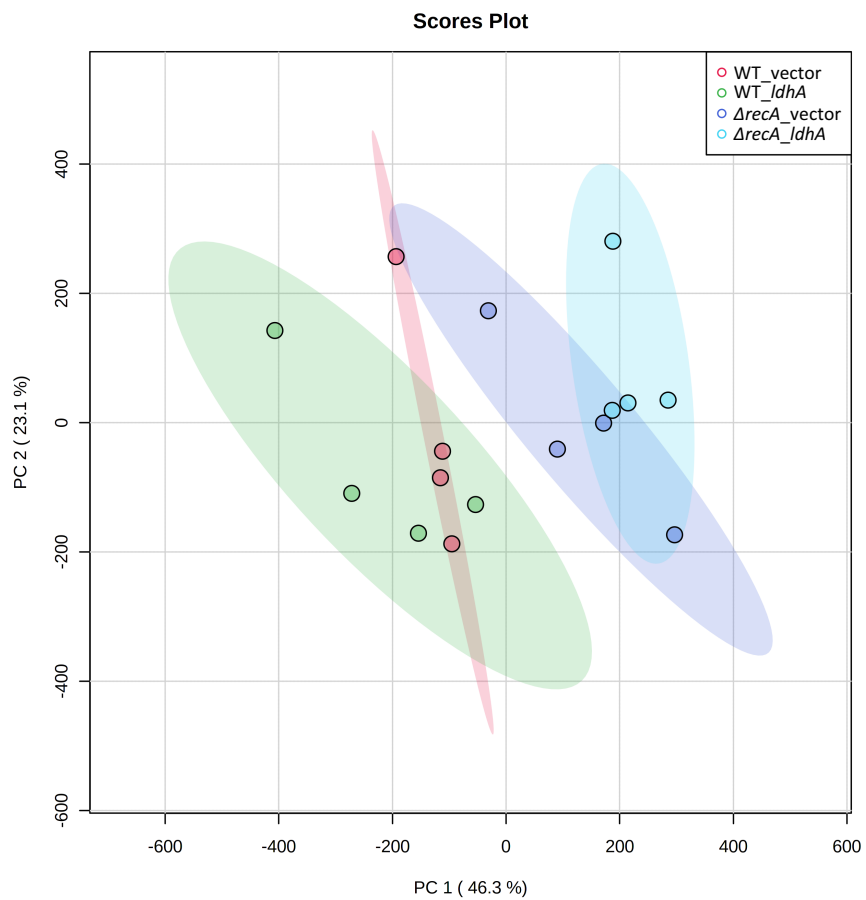


Figure 3.10 各サンプルの主成分分析結果⁸⁶

(文献 86 Fig. S1 を一部改変して転載)

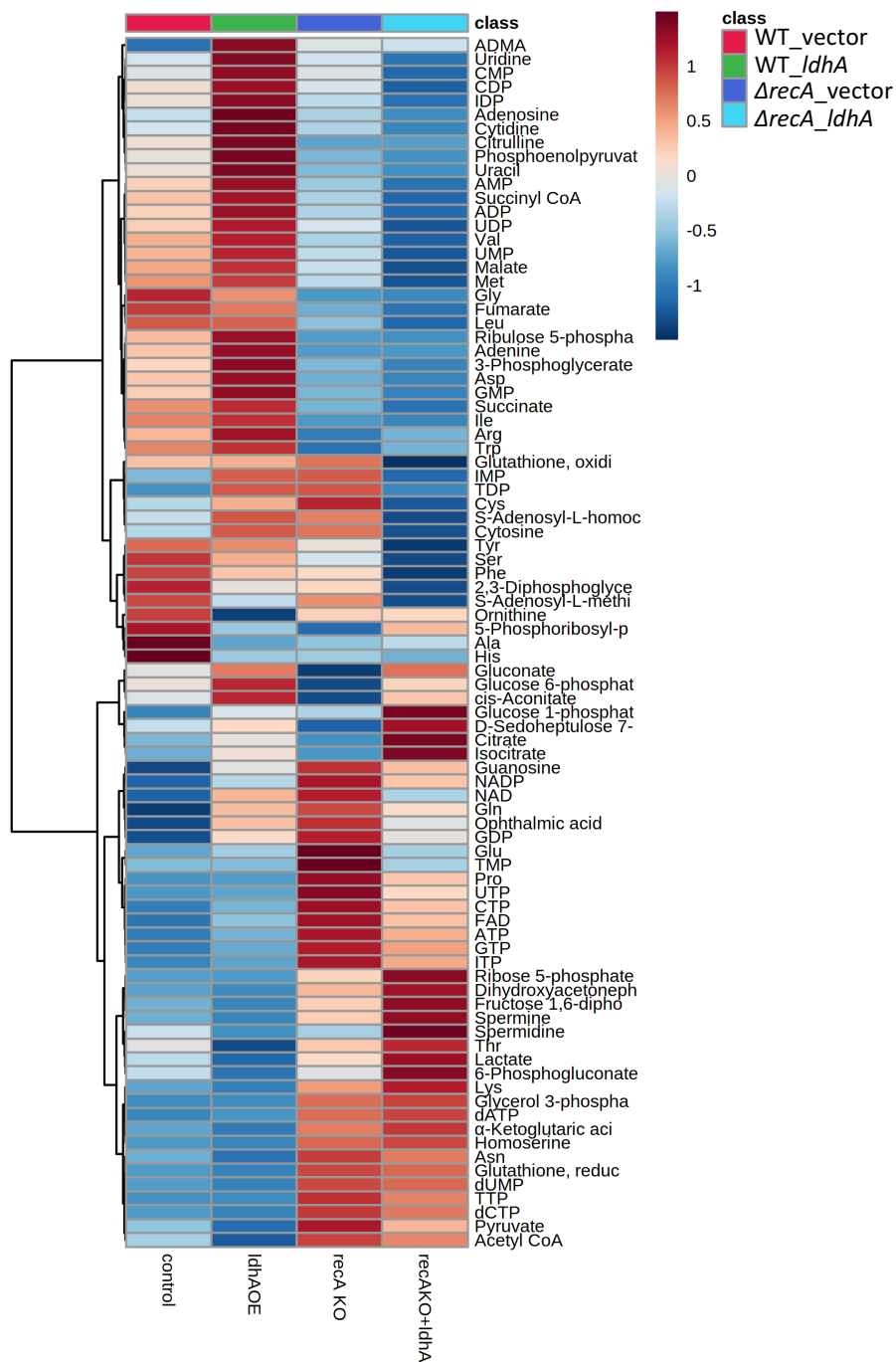


Figure 3.11 Heatmap 解析⁸⁶

(各株の代謝物濃度の平均値を全体のデータを表示, 文献 86 Fig. 3A を一部改変して転載)



Figure 3.12 エンリッチメント解析結果⁸⁶

(A) WT_vector および WT_*IdhA* 株において変化が見られた代謝経路の上位 25 (B) $\Delta recA_vector$ および $\Delta recA_IdhA$ 株間の比較 (文献 86 Fig. 3B-3C を一部改変して転載)

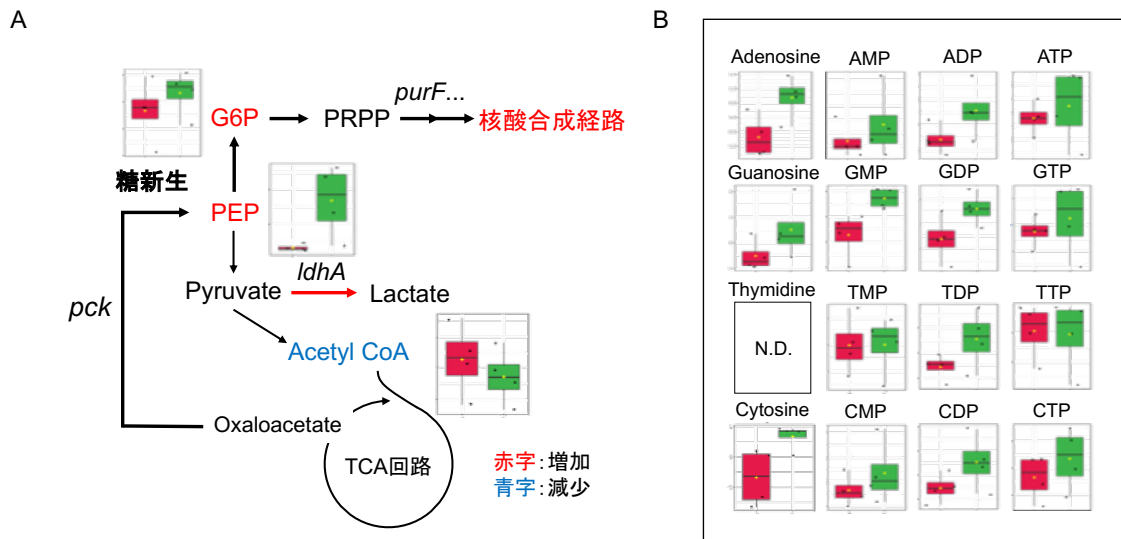


Figure 3.13 WT_ *ldhA* 株で見られた糖新生および核酸代謝物量の測定

(A) 中心代謝経路図および WT_vector 株と WT_ *ldhA* 株における Glucose 6-phosphate (G6P)、Phosphoenolpyruvate (PEP) および Acetyl CoA の代謝物量変化 (赤 : pCA24N 空ベクター株、緑 : pCA24N-*ldhA* 株) (B) WT_vector 株と WT_ *ldhA* 株における各核酸量変化 (Thymidine は本解析で検出されなかったため、N.D.と表示した) (赤 : pCA24N 空ベクター株、緑 : pCA24N-*ldhA* 株)

3.4.5 *ldhA* 発現によって増加した代謝経路に関する遺伝子発現量の確認

これまでのメタボローム解析の結果から、*ldhA* が糖新生やペントースリン酸経路を介してグリコーゲン産生経路やプリン合成経路が誘導されている可能性が示唆された。そこで、注目する代謝経路の主要遺伝子 (糖新生 : *pck*, グリコーゲン産生経路 : *glgC*, *glgB*, プリン生合成経路 : *purF*, *purA*) の発現量の変化を qRT-PCR で調べた。その結果、糖新生関連遺伝子である *pck* は *recA* の有無にかかわらず *ldhA* 発現によって発現量が増加傾向にあった (Figure 3.14)。一方、グリコーゲン産生関連遺伝子の *glgC*, *glgB* の発現量に関して 4 株間で有意な差は見られなかった。興味深いことに、プリン生合成関連遺伝子の *purA* に関して、*pck* と同様に *recA* の有無にかかわらず *ldhA* 発現によって有意に発現が増加し、*purF* も同様の傾向が見られた (Figure 3.14)。以上の結果から、*ldhA* 発現によって乳酸代謝が活性化されると、糖新生経路およびペントースリン酸経路を介してプリン生合成経路が活性化されることで細胞内にプリンヌクレオチド類が蓄積されたと考えられる。

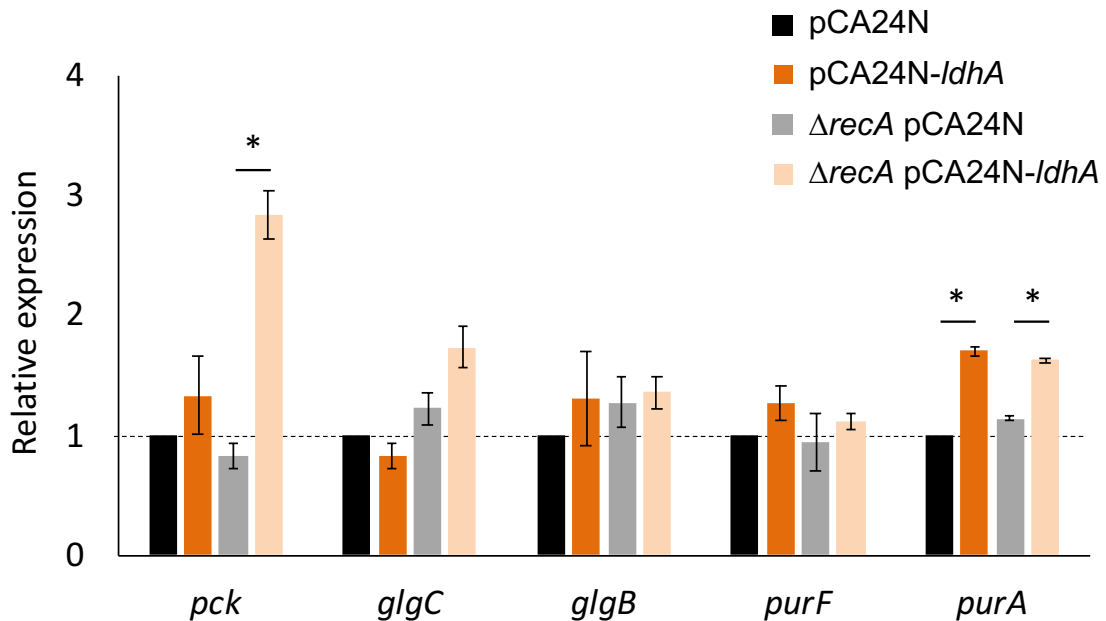


Figure 3.14 メタボローム解析で着目した代謝経路関連遺伝子の発現量測定⁸⁶

(*pck*: 糖新生、*glgC*, *glgB*: グリコーゲン産生、*purF*, *purA*: 核酸合成, 文献 86 Fig. 4 を一部改変して転載)

3.5 考察

3.5.1 *ldhA* 発現による *recA* を介した生存機構

一般的に、SOS 応答は、抗菌薬処理によって生じる DNA の損傷部位に RecA が結合することで活性化され、persister 形成を誘導することが報告されてきた^{35,52,53,55,89}。一方、*recA* 発現に伴う persister 形成に細胞内の代謝プロファイルへの関与は報告されていなかった。これに対して本研究では、*ldhA* 発現によって形成された persister の抗菌薬に対する詳細な生存機構を明らかにするため、ATP をエネルギー源として使用するストレス応答経路に着目したところ、*ldhA* 発現によって SOS 応答の誘導に関与する *recA* の発現量が増加することが示された (Figure 3.1)。さらに、あらかじめ *recA* を欠損させておくと *ldhA* 発現による persister 形成が抑制された (Figure 3.3)。以上の結果から、従来の定説で報告されてきた抗菌薬処理によって生じる現象とは異なり、抗菌薬処理前から *recA* 発現を活性化しておくことで抗菌薬に対して生存することができるという興味深い現象の存在が示唆された。さらに、本研究では SOS 応答経路の阻害剤である酢酸亜鉛 ZnAc を用いて SOS 応答依存的に *ldhA* 発現による persister 形成が誘導されるかどうか確認した。しかしながら、200 μM および 500 μM

の ZnAc を添加しても *ldhA* 過剰発現株のオフロキサシンに対する生存率は減少しなかった (Figure 3.4)。一方、コロニーサイズ解析では *ldhA* 発現による再増殖活性の増加が抑制されていた (Figure 3.5)。この結果に関しては、本研究で用いた ZnAc の作用によって、*persistor* の再増殖が十分に阻害されなかったことで生存率が変化しなかったと考えられる。

また、本研究で行ったコロニーサイズの解析で検出された微小コロニーは Small Colony Variants (SCVs) と呼ばれており、*persistor* と同様に臨床環境中で検出が困難な集団であることが報告されている⁹⁰⁻⁹²。SCVs は、感染部位に形成されるバイオフィーム中に存在することが報告されており、栄養枯渇や酸素枯渇など環境ストレスによって増殖速度の不均一性が生じることで SCVs が出現するため、細菌種の絶滅を防ぐベットヘッジング戦略の 1 つであると考えられている⁹³⁻⁹⁵。SCVs は抗菌薬に対する抵抗性を持つことが知られているため、*persistor* と非常に似た性質を有している一方、SCVs と明確に区別されていない⁹⁰。本研究で着目している *ldhA* 発現によって誘導される *persistor* は、再増殖活性が増加する傾向が見られたことから、*ldhA* 発現によって再増殖速度の遅い SCVs から再増殖速度の速い *persistor* へ移行したことが推察される。今後は、*persistor* の再増殖活性や詳細な代謝状態に着目して SCVs 状態と *persistor* 状態の可逆性や制御メカニズムを解明する必要があるだろう。

また、Mok らはオフロキサシン処理後に生き残った *persistor* の再増殖には SOS 応答依存的な遺伝子修復の完了が必要であることを示唆しているため⁵⁵、本研究でオフロキサシン処理後に得られた微小なコロニー (SCVs) に関しても同様の現象が起きていると考えられる。しかし、本研究で行ったコロニーサイズ解析では取得したコロニー画像の解像度が低く、再増殖が著しく遅いごく微小なコロニーに関しては十分に評価できていない可能性がある。

さらに、オフロキサシン処理後に生存した細菌集団の中には、コロニーとして検出されない、つまり再増殖活性を持たない VBNC の存在も報告されている⁶⁹⁻⁷²。VBNC は、*persistor* とは区別して考えられることが一般的であるが、一部の既往研究では、増殖抑制状態の「深さ」が再増殖の有無を決定することで、最終的に *persistor* あるいは VBNC を形成するかどうかが決まるという仮説も提唱されており⁹⁶、*persistor* と VBNC は類似したメカニズムを持つと考えられる。実際に、Figure 3.4 で示した *recA* 欠損時における空ベクター株および *ldhA* 過剰発現株の生存率を測定した際、オフロキサシン処理後の培養液を LB 寒天培地上で一晩培養させた際のコロニー数を計測したが、数日間培養を継続したところ、一部でコロニー形成が観察された。この結果に関しては、*recA* 欠損によって再増殖ができなくなった *persistor* が遺伝子変異あるいは *recA* 非依存的な遺伝子修復機構を介して徐々に遺伝子修復したことで再増殖に数日要してしまったと考えられる。このような状態は再増殖活性を持たない

VBNC あるいは著しく再増殖の遅い SCVs に近い状態に移行しているとも考えられるが、現在も VBNC 状態、SCVs 状態、および *persistor* 状態が可逆的に遷移し得るのか、またその状態を維持あるいは制御する分子機構に関してはほとんど解明されていない。今後、抗菌薬処理後の再増殖活性を高感度に検出する手法が開発されれば、本研究で着目している *ldhA* 発現によって誘導される *persistor* 形成が VBNC あるいは SCVs 形成とどのように関与しているのか詳細に解析することが可能になるだろう。

3.5.2 *ldhA* 発現による代謝変化と *recA* との関係性

本章の後半では、*ldhA* 発現による細胞内代謝状態の変化を詳細に調べるため、大腸菌野生株および *recA* 欠損株に *ldhA* 過剰発現させた際の代謝変化を CE-MS で解析した。その結果、一部の代謝物では *ldhA* 発現による顕著な代謝変化が確認された一方、大部分の代謝物は *recA* 欠損によって変化することが明らかとなった。これらの結果に関して、大腸菌の *recA* 欠損によって変化する遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した研究では、グルタミン合成遺伝子など窒素同化に参与する代謝遺伝子の発現量が減少していたことから⁹⁷、*recA* が代謝経路を制御する機能を持ち合わせていると考えられる。他にも、*recA* 欠損によって SOS 応答以外のストレス応答経路として知られているヒートショック応答経路やコールドショック応答経路に関する遺伝子において有意な発現量低下がみられたことから、*recA* を介した SOS 応答経路は他のストレス応答経路の誘導する未知の分子機構が存在している可能性も考えられる。本論文で示したメタボローム解析結果では、*recA* 単独で制御する代謝制御機構については詳細に考察することはできなかつたため、*recA* 発現後に生じる代謝変化が *ldhA* 発現による代謝制御機構にどのような影響を与えているのか今後詳細に調べる必要があるだろう。

本メタボローム解析において *ldhA* 過剰発現による代謝変化が見られた代謝物に着目したところ、乳酸代謝を活性化させた際に糖新生経路やプリン生合成経路が活性化されることが明らかとなった。これらの代謝経路は *recA* 欠損時に *ldhA* を過剰発現させても活性化しなかったことから (Figure 3.12)、*recA* 依存的な代謝変化であると考えられる。また、細胞内で蓄積された核酸は細胞内の DNA 合成の基質として用いられることから、*ldhA* 発現の増加によって糖新生やペントースリン酸経路を介して核酸合成を促進させ細胞内に蓄積することでフルオロキノロン系抗菌薬による遺伝子損傷から修復しやすい代謝状態に移行していると推察された。

また、第 2 章で示した *ldhA* 発現による ATP の蓄積と本章で示した *ldhA* 発現による SOS

応答の活性化が生じた原因を今回のメタボローム解析結果から直接関連づけることができなかった。本論文では示さなかったが、解糖系や TCA 回路、電子伝達系の関連遺伝子発現量を qRT-PCR で測定した結果、*ldhA* 発現による顕著な遺伝子発現の変化は見られなかったため、*ldhA* 発現が直接電子伝達系の遺伝子発現を誘導している可能性は低い。しかし、興味深いことに電子伝達機能を持つグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼをコードする *glpD* の転写量が *ldhA* 発現によって増加していたことから (Figure 3.15)、*ldhA* 発現による GlpD の活性化がプロトン駆動力や ATP 産生などのエネルギー代謝を活性化させた可能性が示唆されている。また、既往研究では SOS 応答を誘導するストレス因子として細胞内の pH 減少や酸化還元バランスの変化が報告されており⁵¹、*ldhA* 発現による乳酸代謝の活性化に伴い、細胞内乳酸濃度の増加による pH の低下および NADH/NAD⁺比の減少による酸化還元バランスの崩れがリプレッサーである LexA の分解を促進し、RecA タンパク質のリン酸化を促進させたことも考えられる。また、SOS 応答によって誘導される遺伝子修復に必要な核酸が蓄積されている環境では遺伝子修復効率も高いと予想されるため、*ldhA* 発現が間接的に SOS 応答による遺伝子修復機構を助長している可能性が考えられる。既往研究では、培地中にイノシンやグアノシンを添加した際に細胞内で ADP が蓄積する現象が大腸菌で報告されており、ADP がヒスチジンとトリプトファン合成酵素である PrsA の活性アロステリックに阻害することでアミノ酸飢餓状態に移行し、ppGpp 産生を介した緊縮応答が誘導されることが示唆されている⁴³。実際に、第 3 章では *ldhA* 過剰発現の際に ppGpp 合成遺伝子である *relA* や緊縮応答の下流遺伝子群の誘導に関与する *dksA* の発現量が増加傾向にあった (Figure 3.1)。したがって、細胞内でアデノシンや ADP が増加したことから外部からイノシンを添加した条件と同じようなアミノ酸飢餓状態に陥っている可能性が考えられる。以上の観点から、細胞内の代謝変動がストレス応答経路の制御を介して細胞の運命を決める重要な因子となることが予想される。以上の考察に基づいて本研究では、*ldhA* 発現による persister 形成モデルを考案した (Figure 3.16)。しかし、このモデルはまだ推論の域を出ていない部分も多いため、今後はこの仮説を詳細に実証することが必要である。

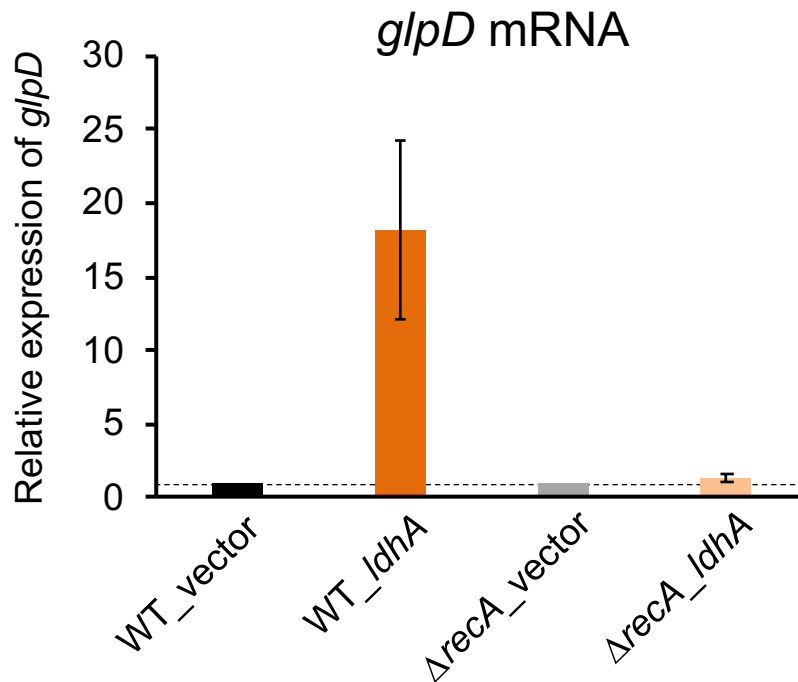


Figure 3.15 グリコーゲン代謝経路に関連する *glpD* の遺伝子発現量の測定⁸⁶
 (文献 86 Fig. S3 を一部改変して転載)

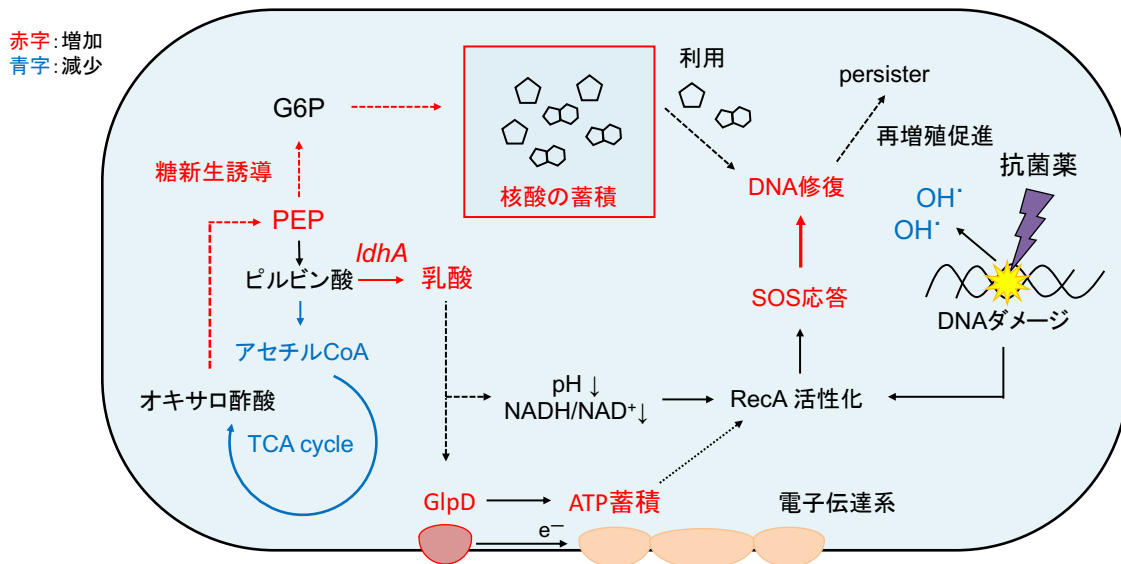


Figure 3.16 *IdhA* 発現による核酸の蓄積を介した抗菌薬生存モデル⁸⁶
 (文献 86 Fig. 5 を一部改変して転載)

今回の CE-MS によるメタボローム解析では、サンプル間のばらつきが大きく、乳酸や ATP など増加することが予想されている代謝物の増加を確認することができなかった (Figure S1)。これらのばらつきは、代謝物の抽出作業、あるいは CE-MS の代謝物分離精度によって左右されるため、ばらつきを最小限にするような実験条件を検討する必要があると考えられる。当研究室でも、これまでに *ldhA* 過剰発現株および空ベクター株において LC-MS/MS によるノンターゲットメタボローム解析を試みてきたが、その際にもサンプル間の代謝物量のばらつきが課題であった。さらに、本研究で用いた *ldhA* 過剰発現株もすべての集団が persister を形成しているわけではないため、persister 形成に重要な代謝物変化が他の代謝物に埋もれてしまう可能性も考えられる。今後、*ldhA* 発現によって形成された persister の詳細な代謝制御機構を探るためには、persister の集団あるいは persister の 1 個体をソーティングした上でメタボローム解析を実施する必要があると考えられる。

3.5.3 他の抗菌薬に対する生存戦略

本研究では、*ldhA* 発現による persister 形成メカニズムを解明するため、フルオロキノロン系のオフロキサシンに対する生存機構に着目してきたが、実際は *ldhA* 過剰発現株において β -ラクタム系のアンピシリンやアミノグリコシド系のゲンタマイシンに対して生存率が増加していた (Figure 2.3)。しかし、*ldhA* 欠損株ではこの 2 種の抗菌薬に対する生存率に変化がなかったことから (Figure 2.4)、*ldhA* 単独でこれらの抗菌薬の生存に寄与している可能性は低いと考えられる。第 3 章で、蛍光試薬の HPF を用いて ROS の一種であるヒドロキシラジカルの産生量を測定した結果、*ldhA* 過剰発現株においてオフロキサシン処理後のヒドロキシラジカル産生の増加が抑制された (Figure 3.8)。このような抗菌薬処理に伴う ROS 産生はアミノグリコシド系や β -ラクタム系抗菌薬においても生じることが知られており、TCA 回路と電子伝達系を強制的に活性化することによってスーパーオキシドラジカルやヒドロキシラジカルが産生されることが知られている⁹⁸。この際、これらのラジカルが DNA 損傷を引き起こすため、オフロキサシンによる DNA 損傷と同じようなストレスが誘導され、SOS 応答が活性化されることが推察される。したがって、本研究で提唱した *ldhA* 発現による persister 形成モデルを実証する上で、フルオロキノロン系以外の抗菌薬においても同様の経路が誘導されるのか検証する必要があるだろう。

3.6 結言

本章では、第2章で明らかにした *ldhA* 発現による詳細な *persistor* 形成機構を調べるため、*ldhA* 発現によって蓄積されたエネルギーを消費するようなストレス応答経路の中から *recA* 発現による SOS 応答経路が関与することを突き止めた。また、*ldhA* 発現は、抗菌薬による遺伝子損傷の修復および再増殖を活性化させることで *persistor* 形成を増加させることが示唆され、細胞内の代謝変化が *persistor* の再増殖活性を制御する可能性が推察された。本章の後半では、メタボローム解析を行うことで *ldhA* 発現による詳細な代謝プロファイルの変化を調べた結果、抗菌薬処理前にも関わらず *ldhA* 発現によって遺伝子修復に必要な核酸類の合成経路が活性化されていたことから、あらかじめ *ldhA* 発現が増加していると抗菌薬による遺伝子損傷ストレスに備えた再増殖活性の高い *persistor* を形成していると考えられる。

第4章 結論および展望

4.1 *ldhA* 発現による大腸菌 *persistor* 形成経路の発見

本研究では、大腸菌 *persistor* 集団のトランスクリプトーム解析で明らかになった *persistor* 形成遺伝子として *ldhA* に着目し、*ldhA* を過剰発現させると集団中における *persistor* の割合が増加することを明らかにした。また、マイクロ流体デバイス上で自然状態の *ldhA* 発現を観察したところ、集団の一部の細菌で確率的かつ一時的な *ldhA* 発現を示す細菌が検出され、その後抗菌薬抵抗性を示した。既往の *persistor* に関する研究では一過性の遺伝子発現をきっかけとしてポジティブフィードバック機構が働き、*persistor* の表現型が維持されることが示唆されている⁸²。したがって、本研究で明らかとなった *ldhA* の発現は何らかの刺激によって継続的に誘導されているわけではなく、細胞内の確率的なノイズによって偶発的に発現したと推察される。確率的な *ldhA* 発現の後にどのようなポジティブフィードバック機構が活性化されるのかは明らかになっていないが、今後一過性の遺伝子発現を蛍光などで記録するような技術を開発することができれば、一度蛍光が消失した細菌を含めた *ldhA* 発現細菌をセルソーターで分取し、トランスクリプトーム解析で詳細なフィードバック経路を明らかにすることができるだろう。一方、今回のシングルセル解析では *ldhA* 発現を示した細菌が抗菌薬を除去した際に再増殖する様子が観察されなかった。これは、培地を交換する際にデバイス内に抗菌薬が残存してしまい、*persistor* 状態から再増殖しにくくなったことが原因と考えられるため、今後は培地の交換効率に特化したデバイスを用いることで観察された生存細胞が再増殖可能な *persistor* であるか確認する必要がある。

また、本研究では、*ldhA* 発現によって形成される *persistor* のエネルギー活性状態を測定した結果、従来では報告のないエネルギー代謝状態の高い *persistor* が形成されることを明らかにし、新規性の高い *persistor* 形成経路であることが示唆された。一部の既往研究では、大腸菌の培養時の炭素源の変化によって細胞内 ATP の高い *persistor* が形成されることが報告されており^{62,63}、*ldhA* 以外にもエネルギーを蓄積するような *persistor* の存在が示唆されている一方、詳細なメカニズムは明らかになっていない。今後、ATP が高い *persistor* 経路にも複数の経路が存在するかどうかを調べる如果能够できれば、エネルギーを消費する *persistor* 形成の全容を解明する手がかりとなるだろう。

4.2 *ldhA* 発現によって誘導される persister の生存機構の探索

ldhA 発現によって誘導された persister の詳細な抗菌薬抵抗性メカニズムを探索するため、エネルギーを消費するストレス応答経路に着目した結果、SOS 応答を誘導する *recA* の発現量が *ldhA* 過剰発現時に増加することが示された。今回、*ldhA* 発現によって *recA* 発現が誘導された原因について詳細なデータを得ることはできなかったが、細胞内が酸性環境に移行した際に LexA リプレッサーの分解を介して SOS 応答が誘導されることが報告されていることから⁵¹、*ldhA* 発現による乳酸の増加に伴い、細胞内 pH が低下し、SOS 応答が活性化された可能性が考えられる。また、*recA* 欠損株において *ldhA* を過剰発現させても persister 形成が増加されなかったことから、オフロキサシンに関して、*ldhA* 発現による persister 形成に *recA* が必要であることが示唆された。さらに、SOS 応答のどの経路が抗菌薬の生存に関与しているのか調べた結果、*ldhA* 過剰発現株では、抗菌薬処理した後の再増殖活性が高かったことから、抗菌薬で処理した後に遺伝子修復が完了することが persister 形成において重要であることが示唆された。

今後は、本研究で正常に評価することができなかった TUNEL 法を用いた蛍光のバックグラウンド蛍光を排除するための洗浄条件の検討や他の遺伝子修復レベルの評価系を構築する必要があるだろう。また、本研究では着目しなかった β -ラクタム系抗菌薬やアミノグリコシド系抗菌薬に関しても persister の生存に SOS 応答が関与しているのか調べることによって、*ldhA* 発現による persister 形成経路が、複数種の抗菌薬で同一の生存メカニズムを持つグローバルな経路なのか、抗菌薬特異的な経路を複数持っているのかを解明することができると思われる。

4.3 *ldhA* 発現による代謝変化と *recA* 依存的な persister 形成機構との関係

ldhA が発現した後、どのような代謝変動を経て SOS 応答を介した persister 形成経路が誘導されたのかを調べるため、メタボローム解析を行った。その結果、*ldhA* 発現によって酸化還元調節に関与する代謝経路や糖新生経路、プリン生合成経路が活性化されることが明らかになった。また、*recA* 欠損時には *recA* 依存的に細胞内で核酸を貯蓄する働きがあり、同時に生じる SOS 応答の活性化の際に必要な ATP や細胞内核酸を利用することで効率的に抗菌薬による遺伝子修復を完了させていることが推察された。今後は、Figure 4.8 で予想された (1) ATP の蓄積、(2) 核酸類の蓄積、(3) *recA* を介した SOS 応答経路に関する遺伝子経路を欠損させた際に *ldhA* 発現による persister 形成が阻害されるかどうか検証することで、本仮説を実証することが望まれる。

4.4 本研究の波及効果

本研究では、集団のごく一部で表現型のみを変化させる *persister* を集団レベルとシングルセルレベルで評価することによって、*ldhA* の確率的な発現が *persister* 形成を誘導することを明らかにした。しかし、本研究で *ldhA* 自体を欠損させても *persister* を十分減少させることができなかつたことから、*ldhA* を標的とした *persister* 阻害への臨床応用は難しいと考えられる。一方、*ldhA* 発現による下流の *persister* 形成経路に着目したことによって、従来報告されてきた SOS 応答が細胞内の代謝制御機構と密接に関連する重要な知見を得ることができた。今後は、本研究で提唱された *persister* 形成モデルに関与する遺伝子欠損株あるいは代謝阻害剤を用いて本モデルの妥当性を検証する必要がある。また、確率的な *ldhA* 発現を示す細菌においても同様の現象が生じることが確認されることができれば、SOS 応答を介した *persister* モデルについて新たな知見を提供することができる。最後に、本モデルにおいて重要となる SOS 応答や核酸の蓄積を標的として、*persister* 形成阻害あるいは *persister* の再増殖を促す新たな薬剤を同定することによって、将来的に慢性感染症や耐性菌感染症の新規治療への応用が期待される。

謝辞

まず、本研究を遂行する上で研究面と研究指導を賜りました主査の常田聡教授に心より御礼申し上げます。

本論文を審査していただいた佐藤政充 教授、仙波憲太郎 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に協力いただいた共同研究先である早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の田中大器 博士および関口哲志 研究員教授、そして慶應義塾大学病院 臨床研究推進センター解析スタッフの皆様に心より御礼申し上げます。

学部 4 年生から 6 年間、研究面、生活面で支えてくださった常田研究室の皆様に感謝申し上げます。特に、本論文を完成させる際に実験面でご協力いただきました松本慎也 博士、河合祐人 博士、一色理乃 博士、大野友梨乃さん、その他研究室の皆様におきましては、厚く御礼申し上げます。

最後に、経済的にも負担となる博士課程での生活を陰で支えていただいた両親に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226–236 (1929).
2. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
3. O’Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. <https://amr-review.org/Publications.html> (2016).
4. Bigger, J. W. Treatment of *Staphylococcal* infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* **244**, 497–500 (1944).
5. Moyed, H. S. & Bertrand, K. P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* **155**, 768–775 (1983).
6. Levin, B. R. & Rozen, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 556–562 (2006).
7. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8172–8180 (2004).
8. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**, 1622–1625 (2004).
9. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 48–56 (2007).
10. Lewis, K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 357–372 (2010).
11. Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shores, N. & Balaban, N. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*. **355**, 826–830 (2017).
12. Fleming, A. Penicillin. *Br. Med. J.* **2**, 386 (1941).
13. Abraham, E. P. & Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* **146**, 837 (1940).
14. Falk, C. R. Adaptation of antibiotic assay methods for routine use. *Am. J. Public Health Nations. Health* **43**, 419–425 (1953).
15. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**, 493–496 (1966).
16. Chitwood, L. A. Tube dilution antimicrobial susceptibility testing: efficacy of a microtechnique applicable to diagnostic laboratories. *Appl. Microbiol.* **17**, 707–709 (1969).
17. Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Ke, Y., Zhu, Y., Chen, H., Baker, M., Ge, H., Sun, Y., Xie, X. & Bai, F. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Mol. Cell* **62**, 284–294 (2016).
18. Lewis, K. & Shan, Y. Why tolerance invites resistance. *Science*. **355**, 796 (2017).
19. Sabath, L. D., Laverdiere, M., Wheeler, N., Blazevic, D. & Wilkinson, B. J. A new type of penicillin

- resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **309**, 443–447 (1977).
20. Mulcahy, L. R., Burns, J. L., Lory, S. & Lewis, K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* **192**, 6191–6199 (2010).
 21. Gomez, J. E. & McKinney, J. D. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* **84**, 29–44 (2004).
 22. Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Quail, M. A., Kankwatira, A. M., Feasey, N. A., Parkhill, J., Dougan, G. & Gordon, M. A. High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal *Salmonella* Typhimurium disease. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 955–963 (2012).
 23. Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D. & Swain, P. S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. **297**, 1183–1186 (2002).
 24. Ackermann, M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 497–508 (2015).
 25. Van den Bergh, B., Fauvart, M. & Michiels, J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 219–251 (2017).
 26. Loewer, A. & Lahav, G. We are all individuals: Causes and consequences of non-genetic heterogeneity in mammalian cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 753–758 (2011).
 27. Verstraeten, N., Knapen, W. J., Kint, C. I., Liebens, V., Van den Bergh, B., Dewachter, L., Michiels, J. E., Fu, Q., David, C. C., Fierro, A. C., Marchal, K., Beirlant, J., Versées, W., Hofkens, J., Jansen, M., Fauvart, M. & Michiels, J. O₂ and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Mol. Cell* **59**, 9–21 (2015).
 28. Berghoff, B. A., Hoekzema, M., Aulbach, L. & Wagner, E. G. H. Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Mol. Microbiol.* **103**, 1020–1033 (2017).
 29. Yamamoto, N., Isshiki, R., Kawai, Y., Tanaka, D., Sekiguchi, T., Matsumoto, S. & Tsuneda, S. Stochastic expression of lactate dehydrogenase A induces *Escherichia coli* persister formation. *J. Biosci. Bioeng.* **126**, 30–37 (2018). doi:10.1016/j.jbiosc.2018.01.016
 30. Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S. & McKinney, J. D. Dynamic persistence of antibiotic-stressed Mycobacteria. *Science*. **339**, 91–95 (2013).
 31. Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A. & Holden, D. W. Internalization of salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*. **343**, 204–208 (2014).
 32. Goormaghtigh, F. & Van Melderen, L. Single-cell imaging and characterization of *Escherichia coli* persister cells to ofloxacin in exponential cultures. *Sci. Adv.* **5**, eaav9462 (2019).
 33. Harms, A., Maisonneuve, E. & Gerdes, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and

- antibiotic exposure. *Science*. **354**, (2016).
34. Maisonneuve, E. & Gerdes, K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* . **157**, 539-548 (2014).
 35. Wu, Y., Vulić, M., Keren, I. & Lewis, K. Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4922–4926 (2012).
 36. Dorr, T., Vulic, M. & Lewis, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **8**, e1000317 (2010).
 37. Wang, X. & Wood, T. K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5577-5583 (2011).
 38. Cheverton, A. M., Gollan, B., Przydarz, M., Wong, C. T., Mylona, A., Hare, S. A. & Helaine, S. A *Salmonella* toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA. *Mol. Cell* **63**, 86–96 (2016).
 39. Korch, S. B., Henderson, T. A. & Hill, T. M. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol.* **50**, 1199–1213 (2003).
 40. Amato, S. M., Orman, M. A. & Brynildsen, M. P. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **50**, 475–87 (2013).
 41. Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K. & Maisonneuve, E. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5171–5176 (2015).
 42. Harshman, R. B. & Yamazaki, H. MS I accumulation induced by sodium chloride. *Biochemistry* **11**, 615–618 (1972).
 43. Wang, B., Grant, R. A. & Laub, M. T. ppGpp coordinates nucleotide and amino-acid synthesis in *E. coli* during starvation. *Mol. Cell* **80**, 29-42.e10 (2020).
 44. Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A. Y., Lee, J. H., Burgos, H. L. & Gourse, R. L. ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Mol. Cell* **62**, 811–823 (2016).
 45. Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M. & D’Ari, R. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**, 958-970 (2005)
 46. Battesti, A. & Bouveret, E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* **62**, 1048–1063 (2006).
 47. Xiao, H., Kalman, M., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980–5990 (1991).
 48. Rao, N. N., Liu, S. & Kornberg, A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* **180**, 2186–2193 (1998).

49. Harms, A., Fino, C., Sørensen, M. A. & Semsey, S. Prophages and growth dynamics confound experimental results with antibiotic-tolerant persister cells. *MBio* **8**, e01964-17 (2017).
50. Goormaghtigh, F., Fraikin, N., Putrins, M., Hallaert, T., Hauryliuk, V., Garcia-Pino, A., Sjödin, A., Kasvandik, S., Udekwu, K., Tenson, T., Kaldalu, N. & Meldere L. V. Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. *MBio* **9**, e00640-18 (2018).
51. Cohen, S. E., Foti, J. J., Simmons, L. A. & Walker, G. C. The SOS regulatory network. *Ecosol. Plus* **3**, (2008).
52. Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., Xu, T., Zhang, S., Wu, J., Zhang, W. & Zhang, Y. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front. Microbiol.* **6**, 1003 (2015).
53. Völzing, K. G. & Brynildsen, M. P. Stationary-phase persisters to ofloxacin sustain DNA damage and require repair systems only during recovery. *MBio* **6**, e00731-15 (2015).
54. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J. & Zhao, X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 385–392 (2008).
55. Mok, W. W. K. & Brynildsen, M. P. Timing of DNA damage responses impacts persistence to fluoroquinolones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 6301–6309 (2018).
56. Lobritz, M. A., Belenky, P., Porter, C. B. M., Gutierrez, A., Yang, J. H., Schwarz, E. G., Dwyer, D. J., Khalil, A. S. & Collins, J. J. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 8173–8180 (2015).
57. Allison, K. R., Brynildsen, M. P. & Collins, J. J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**, 216–220 (2011).
58. Shan, Y., Gandt, A. B., Rowe, S. H., Deisinger, J. P., Conlon, B. P. & Lewis, K. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. *MBio* **8**, e02267-16 (2017).
59. Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung A. L. & Lewis, K. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.* **1**, 16051 (2016).
60. Meylan, S., Porter, C. B. M., Yang, J. H., Belenky, P., Gutierrez, A., Lobritz, M. A., Park, J., Kim, S. H., Moskowitz, S. M. & Collins, J. J. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cell Chem. Biol.* **24**, 195–206 (2017).
61. Peng, B., Su, Y., Li, H., Han, Y., Guo, C., Tian, Y. & Peng, X. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria. *Cell Metab.* **21**, 249–261 (2015).
62. Radzikowski, J. L., Vedelaar, S., Siegel, D., Ortega, A. D., Schmidt, A. & Heinemann, M. Bacterial persistence is an active σ^S stress response to metabolic flux limitation. *Mol. Syst. Biol.* **12**, 882 (2016).

63. Braetz, S., Schwerk, P., Thompson, A., Tedin, K. & Fulde, M. The role of ATP pools in persister cell formation in (fluoro)quinolone-susceptible and -resistant strains of *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. *Vet. Microbiol.* **210**, 116–123 (2017).
64. Henry, T. C. & Brynildsen, M. P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci. Rep.* **6**, 1–17 (2016).
65. Orman, M. A. & Brynildsen, M. P. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3230–3239 (2013).
66. Wheeler, A. R., Throndest, W. R., Whelan, R. J., Leach, A. M., Zare, R. N., Liao, Y. H., Farrell, K., Manger, I. D. & Daridon, A. Microfluidic device for single-cell analysis. *Anal. Chem.* **75**, 3581–3586 (2003).
67. Wilmaerts, D., Herpels, P., Michiels, J. & Verstraeten, N. Genetic determinants of persistence in *Escherichia coli*. *Persister cells and infectious disease*. Springer, 133–180 (2019).
68. Luidalepp, H., Jöers, A., Kaldalu, N. & Tenson, T. Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *J. Bacteriol.* **193**, 3598–3605 (2011).
69. Kim, J. S., Chowdhury, N., Yamasaki, R. & Wood, T. K. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environ. Microbiol.* **20**, 2038–2048 (2018).
70. Bamford, R. A., Smith, A., Metz, J., Glover, G., Titball, R. W. & Pagliara, S. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol.* **15**, 121 (2017).
71. Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R. & Oliver, J. D. Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infect. Immun.* **83**, 4194–4203 (2015).
72. Ayrapetyan, M., Williams, T. & Oliver, J. D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J. Bacteriol.* **200**, e00249–18 (2018).
73. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 320–330 (2016).
74. Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Brynildsen, M. P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J. J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J. M., Hardt, W. D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D. T., Jenal, J., Levin, R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M. W., Tenson, T., Melderen, L. V. & Zinkernagel, A. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 441–448 (2019).
75. Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A. B., Kaldalu, N., Kurg, K. & Lewis, K. Persisters: A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* **6**, 53 (2006).
76. Matsumoto, S., Kawai, Y., Miyagawa, S., Iwamoto, Y., Okuda, S., Sánchez-Gorostiaga, A., Vincente, M. & Tsuneda, S. Unique transcriptional profile of native persisters in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **125**, 15–22 (2017).

77. Jiang, G. R., Nikolova, S. & Clark, D. P. Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**, 2437–2446 (2001).
78. Aldridge, B. B., Fernandez-Suarez, M., Heller, D., Ambravaneswaran, V., Irimia, D., Toner, M. & Fortune, S. M. Asymmetry and aging of mycobacterial cells lead to variable growth and antibiotic susceptibility. *Science* **335**, 100–104 (2012).
79. Hargittai, P. T., Youmans, S. J. & Lieberman, E. M. Determination of the membrane potential of cultured mammalian schwann cells and its sensitivity to potassium using a thiocarbocyanine fluorescent dye. *Glia* **4**, 611–616 (1991).
80. Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P. & Cámara, M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 247–274 (2011).
81. Fernandes, P. B. & Chu, D. T. W. Quinolone Antibacterial Agents. *Annu. Rep. Med. Chem.* **23**, 133–140 (1988).
82. Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B. P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J. & Hauryliuk, V. Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep.* **13**, 835–839 (2012).
83. Rohwer, F. & Azam, F. Detection of DNA damage in prokaryotes by terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end labeling. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1001–1006 (2000).
84. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, Verena, Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
85. Chong, J., Soufan, O., Li, S., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S. & Xia, J. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* **46**, 486–494 (2018).
86. Yamamoto, N., Ohno, Y., & Tsuneda, S. *ldhA*-induced persister in *Escherichia coli* is formed through accidental SOS response via intracellular metabolic perturbation. *under submission*.
87. Bunnell, B. E., Escobar, J. F., Bair, K. L., Sutton, M. D. & Crane, J. K. Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli*. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
88. Usui, M., Yokoo, H., Tamura, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Ghigo, J. & Beloin, C. Zinc acetate potentiates the action of tosufloxacin against *Escherichia coli* biofilm persisters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e00069-19 (2019).
89. Dörr, T., Vulić, M. & Lewis, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **8**, e1000317 (2010).
90. Neut, D., Van Der Mei, H. C., Bulstra, S. K. & Busscher, H. J. The role of small-colony variants in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthopaedica* **78**, 299–308 (2007).

91. Häußler, S., Tümmler, B., Weißbrodt, H., Rohde, M. & Steinmetz, I. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 621–625 (1999).
92. Seifert, H., Wisplinghoff, H., Schnabel, P. & Von Eiff, C. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1316–1318 (2003).
93. Drescher, S. P. M., Gallo, S. W., Ferreira, P. M. A., Ferreira, C. A. S. & Oliveira, S. D. D. *Salmonella enterica* persister cells form unstable small colony variants after in vitro exposure to ciprofloxacin. *Sci. Rep.* **9**, 7232 (2019).
94. Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1067–1073 (2009).
95. Vulin, C., Leimer, N., Huemer, M., Ackermann, M. & Zinkernagel, A. S. Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nat. Commun.* **9**, 4074 (2018).
96. Pu, Y., Li, Y., Jin, X., Tian, T., Ma, Q., Zhao, Z., Lin, S., Chen, Z., Li, B., Yao, G., Leake, M. C., Lo, C. & Bai, F. ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Mol. Cell* **73**, 143-156 (2018).
97. Maeda, T., Horinouchi, T., Sakata, N., Sakai, A. & Furusawa, C. High-throughput identification of the sensitivities of an *Escherichia coli* $\Delta recA$ mutant strain to various chemical compounds. *J. Antibiot.* **72**, 566–573 (2019).
98. Van Acker, H. & Coenye, T. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol.* **25**, 456–466 (2017).

Table S1 メタボローム解析結果（欠損値補正箇所をマーカー済）

Sample [nmol/g_protein]	cont1	cont2	cont3	cont4
group	control	control	control	control
Glucose 1-phosphate	1300.7733	1838.59283	1980.26122	2101.66669
Glucose 6-phosphate+Fructose 6-phosphate	1888.80136	3354.13125	3368.18478	4383.21975
Fructose 1,6-diphosphate	8250.81225	12305.3441	13673.0708	13544.5408
Dihydroxyacetonephosphate	657.804043	886.274643	600.232102	1431.77113
2,3-Diphosphoglycerate	544.673062	615.723448	443.905225	314.412073
3-Phosphoglycerate	8544.51677	10652.2466	10572.273	11037.6564
Phosphoenolpyruvate	2894.55668	3156.74089	2865.76948	2804.18885
Pyruvate	1394.00536	3029.90441	2333.35028	1082.63244
Lactate	13081.2347	4973.79365	6652.12122	4093.69048
Glycerol 3-phosphate	457.292631	644.972017	580.117096	562.779886
Acetyl CoA	1180.94597	1085.67554	1376.49762	844.10434
Citrate	1263.71527	3125.05042	3208.90068	3187.91714
cis-Aconitate	21.2132296	40.4492668	46.3779236	59.1571611
Isocitrate	12.3986926	24.7597807	21.8903628	19.6829453
α -Ketoglutaric acid	1759.91596	2514.01325	2701.38404	1586.85192
Succinyl CoA	532.293584	380.715635	592.963652	211.100829
Succinate	26002.0021	25775.9288	19134.017	21677.4039
Fumarate	1780.62643	3370.47569	3229.1939	3347.32779
Malate	6319.07008	7371.36361	8409.08034	7488.608
Gluconate	46.6934571	56.6673345	68.8925638	67.6360077
6-Phosphogluconate	60.5203166	245.04172	183.963022	229.867638
Ribulose 5-phosphate	2700.71987	2869.04663	4243.98374	2524.44393
Ribose 5-phosphate	63.413217	82.4424117	73.3657427	109.271592
D-Sedoheptulose 7-phosphate	891.523746	1589.58427	1258.97913	1937.84699
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	982.300851	1723.08783	2542.53805	1132.79814
S-Adenosyl-L-methionine	493.086959	634.262503	668.516259	628.678778

Spermidine	484.274774	608.738583	600.671428	628.077622
Spermine	8.48440185	14.7096876	10.7059307	10.3232433
S-Adenosyl-L-homocysteine	12.9891244	17.007481	17.7189914	13.535665
Homoserine	238.262498	326.515328	269.309177	254.254849
Glutathione, reduced form	29944.5887	17912.3367	15716.4156	9469.84401
Glutathione, oxidized form	9409.96135	21660.7859	24511.8673	32720.8557
ADMA	6.78512099	7.59268542	4.31663701	7.97564801
Ophthalmic acid	853.19657	1028.97764	892.935373	1183.44136
Ornithine	21.3681754	24.4011236	23.7236411	15.7766934
Citrulline	39.5201499	67.5689511	46.8411555	39.270773
Gly	6128.94469	7231.27991	6055.79169	7236.28586
Ala	8781.78686	11009.1231	9391.17708	10867.4201
Ser	145.914348	193.51879	219.808467	210.956725
Thr	13754.124	18649.6855	14200.4061	15727.3302
Val	6205.82063	7663.52823	7028.34822	7647.52657
Ile	3743.90214	4778.55089	4696.70943	4822.61361
Leu	12404.3476	13785.2957	12775.2965	14890.391
Lys	5604.07803	3438.90615	5796.25973	4783.15731
Arg	2075.68737	1894.38298	2082.9138	1709.67487
His	1813.75441	2016.35961	1990.94658	2218.44492
Tyr	1117.99299	1368.86623	1227.82039	1429.61527
Phe	2113.22135	2692.85196	2870.36894	2851.62909
Trp	262.384126	379.898839	385.83413	394.926053
Met	3690.50727	6904.15305	4079.28104	3942.03756
Cys	18.7295533	15.0164898	14.8546735	16.2002389
Pro	4224.65735	4703.60527	4008.93498	4914.95561
Gln	10797.1396	14904.7532	11658.9885	11876.8173
Glu	97595.4807	112591.949	95841.8849	101722.751
Asn	68.879889	37.4708985	23.4821605	114.502916
Asp	4177.63031	4879.91245	4790.02676	5120.93815
Adenine	302.351988	404.387112	367.698739	318.238463

Cytosine	25.21203	18.9221634	17.9141416	13.3595037
Uracil	486.414465	836.651278	758.500036	618.37586
Adenosine	401.356192	589.273578	818.813454	370.714299
Guanosine	164.994021	21.1994887	55.3915562	13.1863093
Cytidine	581.83355	1053.96731	1095.52651	671.566542
Uridine	311.0471	674.958834	506.810189	506.350172
AMP	1692.12727	812.674259	812.176786	567.21207
GMP	595.832236	643.911686	682.142105	417.299565
CMP	1015.00837	662.71771	578.092141	413.457814
TMP	252.207233	292.894629	262.498925	231.998595
UMP	1253.87392	1095.85831	831.949091	815.187093
IMP	489.652808	216.853894	182.752286	148.852599
dUMP	90.0551818	98.2881742	115.973523	93.0891567
ADP	2206.1785	1891.74261	1853.63141	1680.85472
GDP	1227.54293	905.438107	941.656268	619.343019
CDP	1458.93937	1210.78	1152.58876	933.3992
TDP	469.291549	513.766219	474.49228	383.959869
UDP	1531.32002	1175.30582	1454.78079	988.032191
IDP	271.783118	213.306898	217.558978	195.430207
ATP	6026.84183	6875.15248	6750.53606	7576.68511
GTP	2851.4244	4037.34995	3540.05913	3474.2681
CTP	4942.51447	6432.67032	5646.18968	6468.99773
TTP	1115.43031	1550.72708	1368.77234	1503.29842
UTP	4590.39007	6657.35945	6189.9784	6683.90071
ITP	896.012116	1002.2399	935.608411	1126.32318
dATP	106.343898	120.489626	102.953664	145.951331
dCTP	1745.41081	2206.24878	2814.54681	2373.72527
NAD	7369.32622	7693.89445	7506.75059	7587.28922
NADP	1434.48886	1504.0277	1506.59897	1469.48081
FAD	165.898925	165.529256	135.992258	165.127753

sample	ldhA1	ldhA2	ldhA3	ldhA4
group	ldhAOE	ldhAOE	ldhAOE	ldhAOE
Glucose 1-phosphate	1760.21629	2076.61324	2003.18488	2043.75688
Glucose 6-phosphate+Fructose 6-phosphate	2774.56329	4494.5187	4139.45438	3936.77353
Fructose 1,6-diphosphate	4614.33218	5711.43648	8375.89388	13860.4072
Dihydroxyacetonephosphate	562.530256	445.068529	429.078944	1419.55389
2,3-Diphosphoglycerate	597.207395	440.126195	310.499937	317.951149
3-Phosphoglycerate	13872.7404	14713.228	12454.6218	11575.3073
Phosphoenolpyruvate	6588.72384	6170.04782	4530.72318	3020.93838
Pyruvate	2252.37171	1886.19146	1562.46844	1432.65321
Lactate	3094.35018	2059.97267	1307.56152	8957.95918
Glycerol 3-phosphate	475.983269	597.114453	500.300725	708.481867
Acetyl CoA	1047.18407	815.467153	1225.30206	979.775793
Citrate	1344.75982	3746.69961	3144.49533	3336.03352
cis-Aconitate	23.9849037	43.2814746	58.4186943	58.5135395
Isocitrate	23.2857326	30.8071927	15.1533447	23.8966603
α -Ketoglutaric acid	509.174878	993.997112	1571.34204	2733.98389
Succinyl CoA	656.917843	665.736044	695.372095	247.614857
Succinate	40072.2783	27822.6178	19351.0419	19066.3185
Fumarate	1950.96736	3540.3675	2717.35447	3086.17642
Malate	5029.75321	8080.19957	9307.00802	8144.40537
Gluconate	67.7707735	53.5600968	71.7305037	63.8768617
6-Phosphogluconate	76.5526196	217.589816	86.0809039	239.084044
Ribulose 5-phosphate	4562.40426	3300.33516	3814.42271	3272.13832
Ribose 5-phosphate	68.6069624	43.2546833	83.9722074	116.852046
D-Sedoheptulose 7-phosphate	850.267984	1927.92606	1439.17272	1703.98931
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	518.563465	1290.63384	1788.70063	1573.13796
S-Adenosyl-L-methionine	496.65698	643.299099	602.941424	591.538683
Spermidine	495.305643	547.114446	492.26584	564.725555

Spermine	10.4090868	12.1170897	9.33087678	10.8695663
S-Adenosyl-L-homocysteine	14.9838981	17.6748487	20.6854697	17.5651465
Homoserine	197.769744	286.980526	282.621971	286.314611
Glutathione, reduced form	25727.7688	18953.5044	16227.4712	11293.056
Glutathione, oxidized form	12707.636	21394.3073	27754.9594	27348.2811
ADMA	7.97582218	9.34424469	7.41070881	6.66132022
Ophthalmic acid	983.38276	1055.09207	1139.53995	1131.26485
Ornithine	21.4950035	15.0794281	18.2666157	14.542327
Citrulline	46.845269	69.7073706	52.6478112	47.2031298
Gly	6160.61188	6760.67385	6270.7762	5542.91511
Ala	9128.75929	9375.17762	9020.10305	10135.4257
Ser	140.337057	172.112082	249.117759	166.971998
Thr	8043.4898	12218.4614	12831.7936	13873.9767
Val	6936.45867	7860.8731	7953.59988	7702.04436
Ile	4066.60122	4772.4013	5301.83517	4617.42299
Leu	12674.4104	13431.7551	14178.9386	13389.1322
Lys	3307.94691	3099.73376	5535.85481	5873.58823
Arg	2343.24588	1930.64387	1981.81997	1905.88405
His	1673.08972	2017.70611	2046.06721	1869.95619
Tyr	1215.44042	1318.54902	1281.10394	1265.98805
Phe	2093.28525	2351.07002	2892.27992	2678.59613
Trp	249.602079	507.277944	313.869482	456.304034
Met	4048.34275	6840.83237	4418.61773	4160.45891
Cys	23.8833607	23.4527081	21.1788093	9.23223191
Pro	4346.94429	4637.27721	4384.34215	4552.31539
Gln	12641.6841	15139.7401	13674.4201	14078.3761
Glu	98618.515	104354.812	107309.183	104249.475
Asn	29.8919903	18.0669941	33.1792344	44.7823274
Asp	5455.69516	7435.78456	7094.06265	4755.34468
Adenine	556.963638	575.321982	443.357997	426.425898
Cytosine	25.2447087	25.5608307	15.7579734	16.6576317

Uracil	764.382101	1010.63611	774.719769	847.277108
Adenosine	1151.13575	951.381324	992.303452	649.290022
Guanosine	366.478731	164.493863	139.117976	57.5497641
Cytidine	1277.70894	1274.4623	1300.44188	1054.35213
Uridine	479.241502	793.195614	763.509082	735.438149
AMP	2895.84775	1333.14245	1008.14385	574.280662
GMP	740.126702	819.88343	824.150695	719.774327
CMP	1721.23927	904.615286	749.308838	468.519399
TMP	263.040056	223.442458	282.276025	272.506425
UMP	2189.15839	1084.53153	771.381872	852.208683
IMP	554.889663	298.295744	152.3192	205.960796
dUMP	52.0328469	51.8023446	91.6248254	129.750645
ADP	2874.18685	2326.48779	2308.15811	1885.73981
GDP	1281.35688	1220.19947	1467.27662	1043.87611
CDP	2089.13981	1637.6599	1507.86555	1103.47413
TDP	707.931637	622.042797	556.496776	424.335103
UDP	2063.20347	1628.75067	1711.49122	1084.57992
IDP	290.637294	354.978858	287.087925	226.301479
ATP	5341.46763	6899.48059	8452.59854	8518.06048
GTP	2371.16827	3652.01763	4742.92242	4820.15377
CTP	5234.69001	6137.84953	7064.1971	7459.57948
TTP	996.673347	1365.23839	1555.50095	1525.75115
UTP	4389.62659	6158.19551	7079.50739	6863.08404
ITP	786.822566	980.803532	1160.2517	1208.35668
dATP	100.222985	129.153298	173.973399	152.934279
dCTP	1026.0152	1560.12305	2698.79116	2712.44551
NAD	8709.09543	7654.30138	7944.17576	7675.19669
NADP	1698.77923	1521.05016	1666.05231	1570.82749
FAD	188.160671	168.431969	146.528949	158.59459

sample	Δ rec1	Δ rec2	Δ rec3	Δ rec4
group	recA KO	recA KO	recA KO	recA KO
Glucose 1-phosphate	1632.72188	1728.12025	2045.53424	2298.08392
Glucose 6-phosphate+Fructose 6-phosphate	1983.21594	2190.17216	2627.64034	3191.96565
Fructose 1,6-diphosphate	15506.8358	23574.4401	20981.7735	32068.0478
Dihydroxyacetonephosphate	896.494812	1254.99245	2940.95084	3326.41064
2,3-Diphosphoglycerate	687.002216	224.732873	531.342319	260.758813
3-Phosphoglycerate	7856.17733	8128.2968	8585.54994	8308.99273
Phosphoenolpyruvate	2147.76267	2107.94175	1906.60845	1939.53157
Pyruvate	1603.44089	2954.99956	2929.29297	2354.84246
Lactate	13324.2012	11376.5537	4260.0562	6674.40927
Glycerol 3-phosphate	1309.97281	1306.82274	1343.37686	1845.55412
Acetyl CoA	1565.81331	1537.72142	807.894287	1261.53031
Citrate	1315.72869	3098.49999	2995.22762	3032.42429
cis-Aconitate	35.8152233	34.0714984	36.8138307	42.6892909
Isocitrate	10.2400578	31.2961159	13.1979237	20.8666041
α -Ketoglutaric acid	3475.56097	6351.12734	5570.79699	6303.50013
Succinyl CoA	447.45055	515.553686	187.7295	152.848865
Succinate	24391.112	11763.0447	11218.1302	10855.9976
Fumarate	1982.24296	2256.00394	2720.14229	2241.65732
Malate	5965.93779	6853.30298	7214.77598	8332.84093
Gluconate	42.3413016	58.7775958	53.6772783	51.6618009
6-Phosphogluconate	139.715652	153.117425	214.292515	235.030587
Ribulose 5-phosphate	2777.33156	814.564058	3981.12789	1562.5309
Ribose 5-phosphate	103.083486	89.7165958	312.779804	383.190989
D-Sedoheptulose 7-phosphate	1054.53145	1221.21753	1180.20585	1646.33856
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	860.862685	1757.76082	791.639625	1270.18587
S-Adenosyl-L-methionine	494.703497	674.92337	578.604501	650.489532
Spermidine	482.21387	566.301774	559.381692	649.517496
Spermine	11.2118066	8.57378705	16.4786714	12.6899321

S-Adenosyl-L-homocysteine	11.8215943	22.4814999	17.2800814	17.6059078
Homoserine	337.530118	302.638946	333.138533	497.560741
Glutathione, reduced form	29943.8184	22501.5587	15078.9861	13818.575
Glutathione, oxidized form	16247.4106	22037.6893	23326.6389	30134.5477
ADMA	5.4900586	8.75577735	4.44319441	9.94463657
Ophthalmic acid	1058.56367	1098.01863	971.131689	1335.74857
Ornithine	15.1243085	20.6431786	22.4231264	22.0814352
Citrulline	41.7197661	50.2087308	42.2702176	45.5242481
Gly	4871.64646	4433.79972	4945.02245	5200.34098
Ala	8802.19265	10402.3788	9140.6751	9539.22162
Ser	145.631187	172.703296	188.694563	180.952585
Thr	14247.6585	16508.7242	15374.1677	20215.2484
Val	6508.47405	6931.10706	6412.97354	6509.25602
Ile	3545.62101	4231.38581	3500.50677	4005.19083
Leu	12050.6345	12764.6318	11767.1337	12375.1851
Lys	6689.99546	7033.55559	6720.51448	7867.75566
Arg	1882.5645	1971.71602	1652.95187	1606.47343
His	1815.93776	2029.34483	1915.28514	1847.0848
Tyr	1124.7364	1283.85927	1109.35189	1330.35199
Phe	2254.0766	2571.4512	2460.06473	2617.70971
Trp	140.784632	286.894584	212.240802	309.690721
Met	3847.85894	5623.66488	3293.21375	4035.90034
Cys	25.8353058	20.989762	23.0159207	20.1590249
Pro	5229.16649	5917.43402	4633.20214	5803.65031
Gln	13722.8742	13689.3739	13545.1196	16641.1345
Glu	114989.772	116399.687	99410.1177	128833.781
Asn	145.656674	200.371028	173.013851	173.013851
Asp	3258.80855	3152.52567	3376.99983	3822.73406
Adenine	319.469877	33.4651267	253.346083	120.391914
Cytosine	24.6464507	16.9703383	23.061186	17.7291217
Uracil	562.473401	504.289379	721.478754	608.118187

Adenosine	418.405694	492.182181	573.220282	560.485219
Guanosine	140.36903	417.032218	12.040787	555.067679
Cytidine	669.602936	617.469204	1071.0223	866.218807
Uridine	395.934708	464.187394	546.553442	577.161078
AMP	1586.34531	357.527574	465.297207	274.669364
GMP	697.876732	105.410927	789.967491	136.265186
CMP	1127.25096	422.383241	666.616411	466.621451
TMP	398.918032	256.968993	305.547338	331.975657
UMP	1454.65797	346.242595	933.701013	456.527113
IMP	572.580201	212.284685	283.428639	144.587907
dUMP	235.438194	232.810454	250.952369	324.008487
ADP	2297.50964	1465.91249	1550.13303	1343.12474
GDP	1749.55202	1288.5529	1332.15379	1511.88204
CDP	1757.23532	774.727349	1139.89767	858.335475
TDP	930.605529	375.223005	537.333889	470.997721
UDP	1826.32404	768.314742	1133.37985	849.173536
IDP	251.985215	212.619791	211.869416	158.809664
ATP	7629.69842	10745.4229	9288.88456	10820.6472
GTP	4288.28212	6786.10684	6358.31488	7792.14464
CTP	8295.17116	9292.46794	9096.19745	11580.587
TTP	2199.61249	2338.69115	2439.32884	2918.32788
UTP	6825.32241	8604.33254	8069.84281	9430.2763
ITP	1159.198	1532.88159	1283.57539	1708.67136
dATP	356.136753	404.450189	492.037079	551.447553
dCTP	4047.0333	5382.15071	5282.91338	6823.07975
NAD	8842.92761	7871.91792	7692.30366	8439.67735
NADP	2011.21362	1679.33337	1715.42914	1995.24746
FAD	212.315195	171.229935	179.503777	193.461074

sample	Δ recldhA1	Δ recldhA2	Δ recldhA3	Δ recldhA4
group	recAKO+ldhA	recAKO+ldhA	recAKO+ldhA	recAKO+ldhA
Glucose 1-phosphate	2037.03965	2150.25914	2365.18778	2535.5475
Glucose 6-phosphate+Fructose 6-phosphate	3053.55403	3158.68184	3507.41633	3674.61138
Fructose 1,6-diphosphate	39325.0867	29064.8187	32735.4317	46059.0068
Dihydroxyacetonephosphate	1779.58046	3980.76001	1258.40392	5337.70873
2,3-Diphosphoglycerate	438.637504	496.306442	155.501553	272.524305
3-Phosphoglycerate	5778.16264	8631.51865	7406.76941	7358.49339
Phosphoenolpyruvate	1119.05113	2074.07402	2069.48092	1438.28693
Pyruvate	2300.05844	2186.5996	2422.20243	1982.79537
Lactate	22237.4829	11160.0471	9856.17717	9389.44217
Glycerol 3-phosphate	1358.91717	1697.92072	1653.83968	1532.94166
Acetyl CoA	1741.54272	773.082542	1247.95553	1245.53442
Citrate	2000.6771	4226.75508	3878.5121	3367.00696
cis-Aconitate	29.266178	48.2733367	49.7782919	45.4450434
Isocitrate	15.884945	37.7993268	26.7480537	39.6070062
α -Ketoglutaric acid	5128.5298	7889.82744	6573.93442	5217.41221
Succinyl CoA	228.776098	194.296444	310.813638	90.4896895
Succinate	14506.1216	10756.3993	10434.3681	9168.65167
Fumarate	1606.2749	2896.65614	2203.22133	1840.01205
Malate	4640.58805	8052.20374	7245.49361	6561.0354
Gluconate	62.1347983	58.6850008	70.1529318	67.0909579
6-Phosphogluconate	173.098091	255.383889	227.679166	260.959667
Ribulose 5-phosphate	2150.11908	2123.74849	3040.9974	1633.26599
Ribose 5-phosphate	123.743745	395.955252	191.900555	837.153651
D-Sedoheptulose 7-phosphate	1423.46594	1557.97861	1359.45397	2221.01193
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	1158.13075	2077.62334	1142.36654	1381.44896
S-Adenosyl-L-methionine	442.4265	618.836086	553.69735	639.916679

Spermidine	711.300854	655.082281	731.960616	801.147235
Spermine	8.9498613	15.087737	14.9560718	15.489474
S-Adenosyl-L-homocysteine	12.8727098	12.0643238	16.0011493	10.6094806
Homoserine	342.488485	337.758068	433.778968	392.677871
Glutathione, reduced form	27495.4192	22425.965	17035.0021	13642.6322
Glutathione, oxidized form	13878.8391	15813.4185	21274.3078	22219.8141
ADMA	9.18011695	6.83097916	5.55998277	6.83873209
Ophthalmic acid	1096.26859	1100.63134	971.682133	1057.55242
Ornithine	14.6731775	15.9109272	23.452401	25.896412
Citrulline	47.5719003	42.6524271	45.7070371	43.3149491
Gly	4664.13922	4232.42819	5808.52352	4369.23396
Ala	9761.14486	8671.88945	8682.70912	11009.6527
Ser	118.502409	167.614864	165.031213	151.443675
Thr	18251.3171	17041.5228	18178.3223	22878.3523
Val	5717.84749	6153.38669	5885.51964	6365.97184
Ile	3946.60031	3347.95701	3893.35678	3861.74982
Leu	11921.9238	12118.2259	10898.8082	11761.6811
Lys	8354.23633	6931.31001	8116.19821	9227.51272
Arg	2025.881	1818.35726	1741.859	1708.70429
His	1972.95458	1758.08526	1904.35781	1927.525
Tyr	1004.27154	1169.68229	1003.92439	1109.50764
Phe	2117.46767	1916.35955	2052.41017	2598.67371
Trp	160.069471	348.693975	279.984005	284.178373
Met	3084.39639	4924.8985	3459.90916	3283.63677
Cys	21.6507058	10.2573099	14.481615	ND
Pro	4959.4684	5523.42462	4662.73931	4663.27717
Gln	13043.7609	13840.6073	14871.8662	13026.6375
Glu	99673.4813	118581.55	106198.185	90596.9603
Asn	283.677975	21.962456	152.820216	152.820216
Asp	2320.58831	3455.10656	3152.22985	2961.02655
Adenine	196.856691	188.251879	267.984711	61.8152934

Cytosine	15.5302008	15.0389423	17.0757393	21.3426561
Uracil	402.810914	498.831989	760.096431	592.84837
Adenosine	221.745932	284.970744	512.472887	568.554699
Guanosine	58.4071826	200.718173	85.5920091	518.080746
Cytidine	402.05817	662.448697	936.824241	672.821349
Uridine	81.4163504	405.129658	575.566643	467.146955
AMP	575.128457	277.523855	467.076772	213.463857
GMP	382.680981	359.956236	670.83129	59.7172608
CMP	483.333038	470.976293	529.668913	300.089553
TMP	231.166888	251.571561	313.627847	263.037205
UMP	564.782197	538.391385	527.252183	336.016716
IMP	354.189423	290.777954	239.033596	84.5640996
dUMP	229.987135	191.532765	290.819205	276.69597
ADP	1429.36133	1319.04145	1531.8438	1056.87072
GDP	1170.10697	1301.19835	1315.43048	1089.5496
CDP	842.36677	659.858424	1099.40273	517.273277
TDP	462.438587	399.977709	571.686724	387.651858
UDP	795.052499	583.249773	1053.09783	530.555547
IDP	128.360866	151.032404	250.619795	141.150568
ATP	7234.52745	10469.9145	8754.95501	8082.53071
GTP	3783.79704	6968.30888	5504.1537	5575.46673
CTP	6614.8034	9869.63251	8222.39549	7295.825
TTP	2125.28622	2414.48031	2231.43822	2209.42669
UTP	6205.87477	8074.40901	6888.35982	6938.1365
ITP	1039.9066	1573.1485	1269.4207	1214.06594
dATP	391.86209	505.864164	548.657621	508.945194
dCTP	3939.93169	4170.41909	5273.55568	6010.98814
NAD	7943.99551	7771.02918	7592.79663	7808.65478
NADP	1757.81422	1713.35167	1652.55992	1714.35727
FAD	198.569601	176.444461	164.092215	167.26941

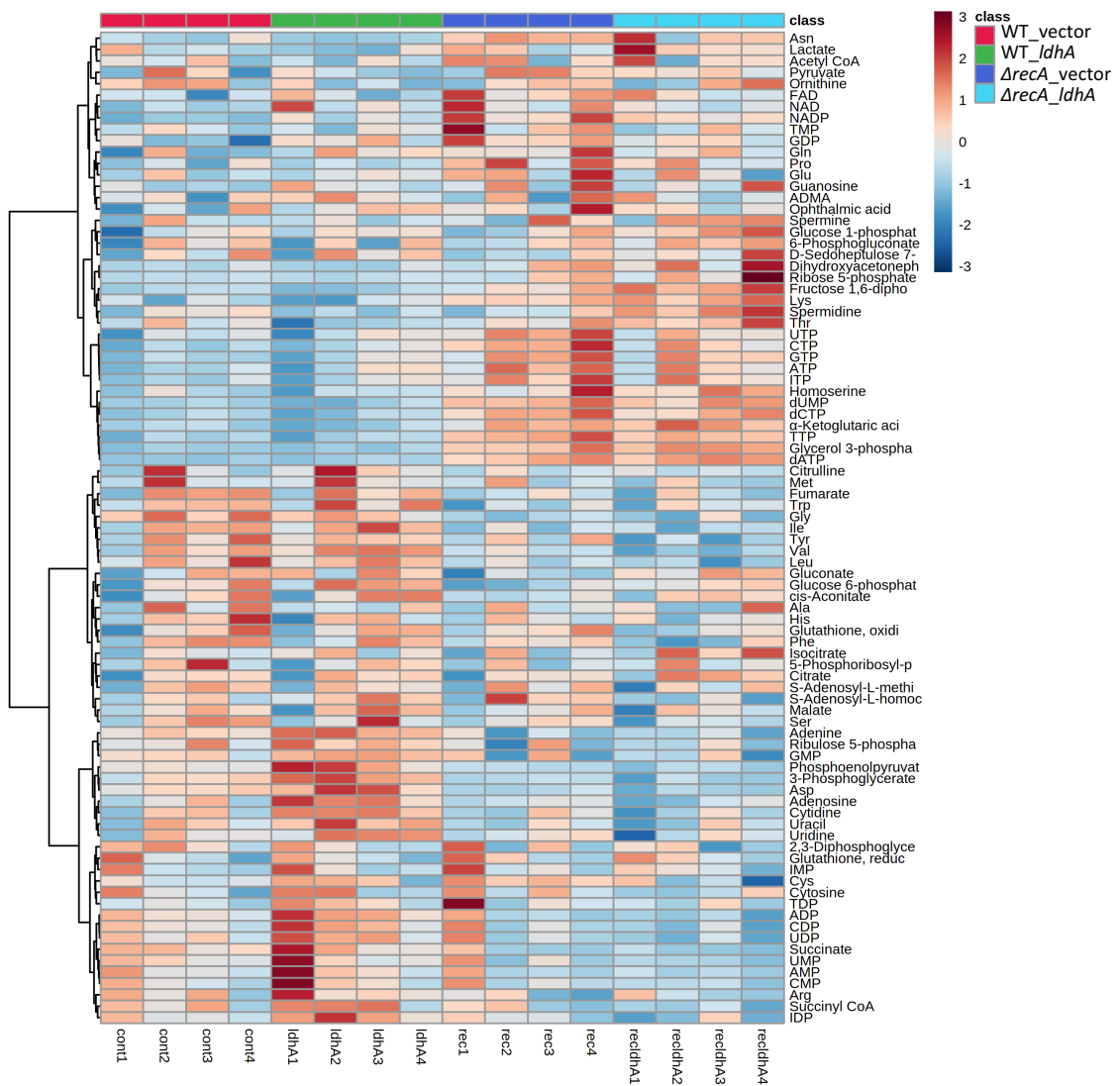


Figure S1 メタボロームによって得られた各サンプルにおけるヒートマップ解析⁸⁶
 (文献86 Fig. S2を転載)

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>