

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

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

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

申請者

山本 尚輝

Naoki YAMAMOTO

生命医科学専攻 環境生命科学研究

2021年7月

## 1. 論文内容の要旨

近年、薬剤による治療が困難な細菌感染症が世界的に問題となっている。感染症の難治化は主に抗菌薬耐性が原因であると考えられているが、近年になって抗菌薬耐性とは異なる抗菌薬抵抗性を持つ *persister* が感染症の難治化に関与することが明らかとなってきた。抗菌薬耐性菌は耐性遺伝子を獲得することで生じるのに対し、*persister* は細菌集団の一部の表現型が非遺伝的に変化することで出現し、ほとんど増殖しない休眠状態で生存している。休眠した *persister* は、既存の抗菌薬から生き残ることが可能であるため、感染症の慢性化や再発に寄与することが問題となっている。*persister* は確率的に出現すると考えられているが、*persister* 形成における分子機構の全容は明らかになっていない。

申請者は、*persister* 研究で最も多く使用されている大腸菌を使用し、新規な *persister* 形成遺伝子の候補として挙げられた乳酸脱水素酵素遺伝子 *ldhA* に着目し、*ldhA* 発現と *persister* 形成との関係性や抗菌薬存在下で *persister* が生存するメカニズムについて研究を行ってきた。

本論文は全4章より構成されている。第1章では、本研究の研究背景をまとめるとともに、本研究の意義および目的を明らかにしている。第2章では、確率的な *ldhA* 発現によって *persister* 形成が誘導されることをシングルセル観察によって明らかにするとともに、*ldhA* 発現による *persister* 形成経路は既往研究で報告されているエネルギー代謝を抑制する *persister* 形成経路とは異なる新規な経路である可能性を示している。第3章では、*ldhA* 発現による *persister* 形成において、遺伝子修復に関与する *recA* が寄与することを明らかにし、メタボローム解析の結果を踏まえて *ldhA* 発現時に蓄積される核酸を基質として遺伝子修復を早め、再増殖を促進させる新しい *persister* 形成モデルを提唱している。第4章では、本論文の結論および展望がまとめられている。

## 2. 論文審査結果

2021年6月7日に行われた公聴会では、論文内容および関連する事項について質疑応答が行われた。その概要を以下に示す。

- (1) 抗菌薬存在下での細菌集団の生存率を表す二相曲線は、適切なパラメーターを設定することでシミュレートすることは可能かという質問があった。これに対して、ある程度限定した条件であればシミュレーションは可能であるが、*persister* の詳細なメカニズムが完全に解明されていないことに加え、培養条件の違いによって *persister* の割合は変動しやすいため、必要なパラメーターを設定するのが難しく、実際の環境で高精度なシミュレーションは実現できていないとの回答がなされた。
- (2) 本論文の Figure 2.3 において、異なる機序の抗菌薬を用いた際に異なる殺菌パターンが見られていたが、このような違いを生物物理学的に解釈することは可能かという質問があった。これに対して、抗菌薬の作用機序によって殺菌メカニズムは異なるため、シミュレーションを行う際に異なるパラメーターを設定する必要があり、高精度なシミュレーションは実現できていないとの回答がなされた。
- (3) オフロキサシン以外の抗菌薬に対する *persister* 形成には別のメカニズムが関与すると考えてよいかという質問があった。これに対して、 $\beta$ -ラクタム系のアンピシリンなど、オフロキサシンとは殺菌の作用機序が異なる抗菌薬に対する *persister* 形成メカニズムを本研究と同様の手法によって確認し、オフロキサシンのときと同じ *persister* 形成モデルが当てはまるかどうかを検証する必要があるとの回答がなされた。

- (4) メタボローム解析における主成分分析のデータに関して、4 群をクリアに分離できなかったと解釈して良いかという質問があった。これに対して、*recA* の有無では顕著な違いが見られた一方、*ldhA* 発現の有無ではクリアに分離できなかったとの回答がなされた。また、他の次元圧縮手法を用いても同様の結果が得られるかどうかという質問に対し、PCA 以外にも PLS-DA による解析を行ったが同様の傾向が得られたとの回答がなされた。
- (5) メタボローム解析におけるエンリッチメント解析の結果、ニコチンアミドの経路の有意差が得られていたことに対してどのように考えているかという質問があった。これに対して、ニコチンアミドの主要代謝物である NADH の対となる NAD<sup>+</sup>が本解析では検出されなかったことから、本研究ではニコチンアミドの経路に着目しなかったとの回答がなされた。
- (6) オフロキサシン以外の抗菌薬でも DNA 損傷を引き起こすのかという質問があった。これに対して、既往研究では本論文で記載したアンピシリンとゲンタマイシンに対して ROS 産生および DNA 損傷を生じることが確認されているとの回答がなされた。
- (7) オフロキサシンでは直接 DNA の二本鎖切断を誘導するのかという質問があった。これに対して、直接的ではないがオフロキサシンがトポイソメラーゼに結合することでいくつかのステップを介して二本鎖切断を誘導することが知られているとの回答がなされた。さらに、トポイソメラーゼ阻害による DNA の損傷スピードよりも活性酸素による DNA の損傷スピードの方が遅いと考えられるため、SOS 応答による *persister* の生存メカニズムがオフロキサシン以外の抗菌薬に対しても同様に適用できるのかは実験で確かめる必要があるという意見が副査から述べられ、申請者もそれに同意した。
- (8) 一過性の *ldhA* 発現によって形成された *persister* は、その後表現型が維持される過程で高いエネルギー状態も維持されるのかという質問があった。これに対して、*ldhA* の一過的な発現は *persister* を誘導する1つのきっかけに過ぎず、*ldhA* 発現後に表現型を維持する何らかのフィードバック機構を介してエネルギーが高い状態に維持されている可能性があるという回答がなされた。また、抗菌薬の投与時間を延ばせば遺伝子修復に必要なエネルギーを消費し続けるため、エネルギー状態が枯渇していく可能性も考えられるという考察が述べられた。
- (9) 確率的な *ldhA* 発現ではどの程度の期間発現が継続しているのかとの質問があった。これに対して、実際の観察結果では *ldhA* の発現時間はばらついているとの回答がなされた。また、*ldhA* 発現後にフィードバック機構を誘導するような代謝状態への移行が生じると考えられるので、シングルセルレベルで確率的な *ldhA* 発現後の代謝状態の変化を調べる必要があるという考察が述べられた。
- (10) 確率的な *ldhA* 発現の上流に何らかの分子メカニズムが関与する可能性はあるかという質問があった。これに対して、確率的な *ldhA* 発現に制御機構が存在しないことは証明できていないとの回答がなされた。さらに、本論文には載せていないが、*ldhA* の  $\sigma$  因子である *rpoH* を過剰発現した際に *ldhA* 発現量の増加と *persister* 数の増加が見られることが明らかになっているが、確率的な *ldhA* 発現前に *rpoH* の発現が観察されるかどうかをシングルセル観察で確認する必要があるという考察が述べられた。
- (11) 確率的な発現が  $\sigma$  因子によって制御されている場合、プロモーター配列が重要ということになるが、今回のレポーターアッセイで本当に *ldhA* の発現パターンを正しく表現できているのかという質問があった。これに対して、今回はプロモーター配列がレポーター系に含まれているので  $\sigma$  因子の制御機構は再現できているが、プロモーター配列から離れた遺伝子配列が遺伝子発現の制御に関与し

ている場合は完全に *ldhA* の発現パターンが再現できていない可能性があるとの回答がなされた。また、その場合は、染色体の *ldhA* 配列の下流に直接蛍光タンパク質遺伝子を導入するレポーターアッセイを作成すれば、再現性向上の可能性があるとこの考察が述べられた。

- (12) *ldhA* 発現における mRNA の安定性について言及する必要はないのかという質問があった。これに対して、確かに原核生物でも non-coding RNA が転写後に遺伝子発現を制御することが報告されているが、現状では non-coding RNA によって *ldhA* 発現が制御されているという報告がなかったため、本論文で言及しなかったとの回答がなされた。今後、*ldhA* の転写後制御を司る non-coding RNA の存在を裏付けるような研究が発表されれば、mRNA の安定性について詳細に調べる必要があるという考察が述べられた。
- (13) 一過性の *ldhA* 発現の後に生じる現象について、細胞内のメタボローム解析から細胞内で生じるフィードバック機構が関与していると主張していたが、細胞外からの刺激によってフィードバック機構が生じる可能性はあるかという質問があった。これに対して、アシル化ホモセリンラクトンのように細胞外に放出される細胞間コミュニケーション物質をメタボローム解析で検出することができれば、細胞内以外のフィードバック機構として興味深い知見が得られるかもしれないとの回答がなされた。
- (14) 先行研究で行われていた FtsZ に着目した persister の検出実験では、SOS 応答や抗菌薬の刺激などがない確率的な persister 形成が誘導されるような条件で行っていたのかという質問があった。これに対して、抗菌薬刺激などの外部ストレスは加えていないが、ストレスのない対数増殖期ではなく persister の割合が高い増殖後期で実験を実施したとの回答がなされた。

以上の質疑応答を通じ、申請者が本研究の意義と実験結果について十分な学識を有し、必要と考えられる考察を行っていることが確認された。また、最終的に提出された学位論文には、剽窃などの研究不正がないことも確認した。申請者は、大腸菌が有する乳酸脱水素酵素遺伝子 *ldhA* が集団内のごく一部で確率的に発現し persister 形成を誘導することを示し、その代謝制御機構や抗菌薬存在下での生存機構に関して新たな生物学的知見を示した。これらの成果は、多種多様な細菌が持つ非遺伝的な生存戦略の理解を深める上で重要であり、感染症の慢性化や再発を防ぐだけでなく薬剤耐性菌感染症の予防や治療技術の創出に寄与することが期待される。このように本論文は細菌学の基礎および応用両面の発展に寄与し得る優れたものであり、博士(工学)の学位論文としてふさわしいと考えられる。

2021年6月

主査	常田聡	早稲田大学教授	博士(工学) 東京大学	_____
副査	佐藤政充	早稲田大学教授	博士(理学) 東京大学	_____
副査	仙波憲太郎	早稲田大学教授	理学博士 東京大学	_____