

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
プロジェクト研究（共同プロジェクト研究）
2019年度研究【経過・成果】報告書

研究代表者	所属部局・職		氏名					
	理学部生命理学科・准教授		塩見 大輔 印					
研究課題	細胞壁合成を標的とする抗生物質の新規作用機序の解明へ向けて							
研究組織 (研究代表者・研究分担者) 2020年3月現在	所属研究機関・部局・職		氏名					
	立教大学・理学部・准教授		塩見 大輔					
	富山県立大学・工学部・准教授		大島 拓					
	大阪市立大学・理学部・教授		宮田 真人					
	立教大学大学院・理学研究科・生命理学専攻・博士課程（前期）1年		近田 大基					
研究期間	2018年度 ～ 2019年度							
研究経費※	2018年度		2019年度		年度	総計		
	4,000,000	円	2,000,000	円	0,000,000	円	6,000,000	円
(上段：支出金額)	4,000,000	円	2,000,000	円	0,000,000	円	6,000,000	円
(下段：採択金額)	4,000,000	円	2,000,000	円	0,000,000	円	6,000,000	円

※1円単位で記入

研究の概要 (200～300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

細菌の細胞壁は細胞形態を決めるだけでなく、膨圧により細菌が破裂することを防いでいる。細菌はペニシリンなど細胞壁合成経路を標的とする抗生物質に晒されると溶菌する。しかし、高浸透圧、嫌気条件下では集団中の一部の細菌は細胞壁がなくても生き残る。この状態の細菌をL型という。L型細菌は細菌感染したヒトからも単離されている。L型は抗生物質やヒトの免疫システムから逃れるための細菌の生存戦略であると考えられる。したがって、L型への変換機構や増殖機構を明らかにすることは感染防除や、新規抗生物質の開発に貢献できると考えられる。今年度は、L型の増殖に必要な因子の特定を行った。ペニシリン存在下でのL型の増殖のためには、細胞壁をリサイクルする経路を正しく機能させることが必要であることを明らかにした。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[抗生物質] [L型細菌] [細胞壁合成]

研究【経過・成果】の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

ペニシリンをはじめとする抗生物質の発見は、感染症を抑制し、人類の医療に大きく貢献してきた。しかし、抗生物質の多用・乱用は、抗生物質耐性菌や多剤耐性菌の出現という、新たな問題を引き起こしている。2050年には、抗生物質耐性菌の感染症による死者数が、癌による死者数を超えるという試算もある。このように耐性菌の問題は世界的にも社会問題化しており、2015年には世界保健総会で薬剤耐性に関するグローバル・アクション・プランが採択された。我が国においても厚生労働省において薬剤耐性対策に対する包括的な議論がなされ、2016年には薬剤耐性対策アクションプランが決定された。このような耐性菌の問題に対処するためには、薬剤がどのように細菌に効くのか、細菌はどのようにして耐性化するのかを理解する必要もある。大腸菌など多くの細菌は細胞壁に覆われている。ペニシリンは細胞壁合成を阻害する抗生物質のひとつである。細菌の細胞壁は膨圧から細菌が破裂するのを防いでいる。したがって、細菌がペニシリンに曝されると溶菌して死滅する。しかし、高浸透圧、嫌気条件下では集団中の一部の細菌は細胞壁がなくても生存し、増殖できる。このような状態の細菌をL型と呼ぶ。L型は細胞壁を持たないので、ペニシリンのような細胞壁合成を標的とする抗生物質は効かない。一方、細胞壁合成を再開できるような環境になると、細菌は再び細胞壁合成を行い、通常の細菌として増殖する。L型細菌は、病原細菌が感染したヒトからも単離されており、病原性との関連も指摘されている。L型と通常の細胞壁を持つ状態の変換機構を明らかにすることは、病原細菌による感染症の抑制に非常に重要である。また、L型細菌を用いた研究により、より詳細に抗生物質の作用機序が明らかになると期待できる。本共同研究プロジェクトでは、①通常の細胞からL型、あるいはその逆の変換過程の可視化、②L型への変換および増殖が亢進あるいは抑制された変異株の取得とその解析、③L型への変換時における細胞表層化の可視化を主要な目的とした。

①通常の細胞からL型、あるいはその逆の変換過程の可視化

L型への変換、および細胞壁をもつ通常の大腸菌への回復過程の可視化のための条件検討を行った。本共同研究プロジェクト開始前までの予備的な実験では、培地灌流装置を用いて、L型への変換過程を可視化することに成功していた。本研究では、この実験を用いる実験条件を詳細に検討し、L型への変換、および細胞壁合成を再開し通常の大腸菌に戻る過程をリアルタイムで可視化した。その結果、ペニシリン存在下で(1)大腸菌は球状に変化し、(2)その後球状からアメーバ状の不定形に変化、(3)アメーバ状のL型が分裂して増殖し、(4)その後ペニシリンを培地から抜くと、再び通常の形態の大腸菌に戻った。L型への変換を実験を行うときにはこれまで寒天培地がよく用いられてきたが、寒天培地では培地を交換することができないので、通常細胞→L型→通常細胞の全ての変換過程を顕微鏡観察することは不可能である。したがって、本研究プロジェクトで構築した実験系が他のシステムよりも圧倒的に優れている。通常、L型への変換には Mg^{2+} が必要である。 Mg^{2+} が上記の(1)から

研究【経過(成果)】の概要 つづき

(4)のどのステップに重要かを検討したところ、 Mg^{2+} が無くてもアメーバ状に形態変化したが、その後の増殖が起こらず、菌が溶菌した。一方、アメーバに変形後、溶菌する前に Mg^{2+} を加えたところ、溶菌が抑制され、増殖した。 Mg^{2+} は大腸菌の表層の、とくに外膜の安定性や構築に重要であることが知られている。顕微鏡観察からも大腸菌 L 型には外膜が存在することは明らかなので、以上の結果は、L 型大腸菌の増殖には外膜が必要であることを示している。

②L 型への変換および増殖が亢進あるいは抑制された変異株の取得とその解析

研究分担者の大島は、トランスポゾン変異導入により、L 型細胞への変換が亢進した変異株の取得を行なった。その変異部位を同定したところ、外膜構造の構築・維持に関わる因子をコードする遺伝子へのトランスポゾンの挿入が確認された。これは、本研究の課題①で明らかにした外膜の重要性とも一致する。逆に、L 型への変換が抑制される遺伝子欠損株も見出した。ペニシリンは、新規に合成された細胞壁を最終的に架橋する酵素を阻害する。したがって、ペニシリンで細胞壁合成が阻害された場合、細胞壁合成過程の中間物質は合成されていることになる。L 型に変換するためには、これら中間物質を分解し、細胞内に取り込み、これらを再利用することが必要であることが分かった。すなわち、そのリサイクリング経路を構成するタンパク質の欠損株は L 型の増殖が著しく阻害された。細胞壁合成に使われる基質は、細胞壁だけでなく、外膜の構成因子など他の構造体にも使われる。おそらく、細胞壁合成に基質が使われたために、外膜合成がうまく行われなくなったのではないかと考えている。本研究では、細胞壁合成の中間物質の“リサイクリング”を正しく行うことが L 型の増殖に重要であることを明らかにした。

③L 型への変換時における細胞表層構造の可視化

上記①と②の結果より、L 型への変換と増殖には外膜が重要な要素であることを明らかにした。本研究で大腸菌の外膜タンパク質 Pal と蛍光タンパク質の融合タンパク質を用いて、L 型には確かに外膜が存在することを明らかにした。また、研究分担者の宮田と共に通常細胞の細胞壁や L 型の細胞表層を急速凍結レプリカ電子顕微鏡で観察するための条件検討を行った。

以上のように、大腸菌のような外膜を持つ細菌の L 型への変換は、L 型が内膜と外膜の間に存在する細胞壁を失っているにも関わらず、外膜は必須であることを明らかにした。本共同研究の成果の一部は、論文としてまとめ、公表する準備を進めている。また、本共同研究の成果の一部を元に CREST 「ゲノム合成」に応募し「合成細菌 JCVI syn3.0B とゲノム操作を用いた細胞進化モデルの構築」(代表者：大阪市立大宮田真人教授、2019.10-2025.3) が採択された。本共同研究の代表者である塩見は主たる共同研究者として研究に参画している。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ② 図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③ シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

① 雑誌論文

該当無し

② 図書

該当無し

③ シンポジウム・公開講演会等の開催

該当無し

④ その他 (学会発表、研究報告書の印刷など)

(1) 「異なる Mg²⁺濃度下における大腸菌 L-form 変換過程の解析」

近田 大基、金井 友美、大島 拓、塩見 大輔

第 16 回 21 世紀大腸菌研究会 2019 年 5 月 29, 30 日 (滋賀県大津市)

口頭発表 (優秀発表賞 (学部・修士部門) 受賞)

(2) 「大腸菌 L-form における PG 分解酵素の重要性」

近田 大基、大島 拓、塩見 大輔

第 5 回法政大学・立教大学 微生物研究会 2019 年 8 月 30 日 (東京都豊島区)

口頭発表

(3) 「大腸菌の L-form 化における細胞壁リサイクリングの重要性」

近田 大基、大島 拓、塩見 大輔

第 18 回微生物研究会、2019 年 11 月 9 日 (東京都豊島区)、ポスター発表

(4) 「細胞壁を持たない L 型大腸菌の増殖機構」 塩見 大輔

遺伝研研究会「微生物における大規模ゲノム・代謝改変技術とその利用」

2019 年 11 月 22～23 日 (静岡県三島市)、口頭発表

(5) 「Outer membrane is required for proliferation of Escherichia coli L-form.」

Daisuke Shiomi, Taiki Chikada, Taku Oshima

第 93 回日本細菌学会総会、2020 年 2 月 19～21 日 (愛知県名古屋市)、口頭発表

(6) 「ペプチドグリカン層を持たない L 型大腸菌の増殖に外膜は重要か？」

塩見 大輔、近田 大基、大島 拓

第 14 回日本ゲノム微生物学会年会、2020 年 3 月 6～8 日 (愛知県名古屋市)

口頭発表