

2020 年度若手研究者共同研究プロジェクト実施報告書

法政大学総長 殿

以下のとおり研究実施報告書を提出します。

基 本 情 報	研究課題名：酸性ストレスにおける大腸菌増殖と不均一性の解析
	研究代表者 氏名：山中 幸
	(在籍者) 研究科・専攻・学年： (修了者) 所属・職種：マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・客員研究員
	指導教員(所属・職・氏名)： (※在籍者のみ記入)
	共同研究者(所属・職・氏名)：生命科学部・教授・山本 兼由 (※指導教員と同人の場合は記入不要)
	その他 研究分担者：
	研究期間： 2019 年度 ～ 2021 年度 (※研究修了年度を記載)
年 間 の 研 究 実 施 概 要	本研究では、細菌の酸性ストレス応答に着目し、大腸菌増殖と抗菌薬抵抗性の関連性を理解することを目指した。そのために、酸性ストレスによる「1. 増殖への影響」、「2. 増殖不均一性への影響」および「3. 増殖不均一性を与える大腸菌薬剤耐性への効果」をテーマとした。昨年度(2019年度)までの研究から、酸性ストレス下で、大腸菌増殖が阻害されることを示した。2020年度は、酸性下の増殖阻害について詳細に調べ、関連する遺伝子同定のための条件検討を行った。さらに、酸性ストレスに派生した細胞膜合成阻害剤への抵抗性を検証した。それらの詳細と今後の展望を以下に記す。 1. 酸性下の増殖阻害について 1) 実施内容および結果 昨年度(2019年度)までの研究から、酸性 pH 4.7~pH 6.5 の範囲で、大腸菌増殖が阻害されることを示した。2020年度は、pH 3.5~pH 7.0 までの酸性ストレス下での増殖レベルおよび、生存率を調べた。初めに、塩酸を用いて、pH 3.5/ 4.0/ 4.5/ 5.0/ 5.5 の培地を作製し、24 時間後の培地 pH の変化を調べた。その結果、pH 3.5 では 3.75 ± 0.14、pH 4.0 では 3.78 ± 0.12、pH 4.5 では 4.00 ± 0.27、pH 5.0 では 4.09 ± 0.46、pH 5.5 では 4.12 ± 0.69、pH 7.0 では 6.56 ± 0.22 と変化していたが、全ての酸性 pH 培地は酸性状態を維持していた。そのため、酸性ストレスとして十分であると言える。この条件で、大腸菌 MG1655 の 24 時間後の増殖レベルを濁度 OD₆₀₀ 値として比較したところ、pH 3.5 では 0.01 ± 0.0、pH 4.0 では 0.15 ± 0.01、pH 4.5 では 0.31 ± 0.02、pH 5.0 では 0.50 ± 0.02、pH 5.5 では 0.70 ± 0.03、pH 7.0 では 1.6 ± 0.08 であり、pH 度合いに比例して増殖減少が確認された。 次に、酸性ストレスは、致死ストレスか、または一過的な増殖阻害を誘導しているのかを調べた。pH 3.5~pH 7.0 までの酸性・中性条件下で 24 時間培養後に、pH 7.0 の新しい培地

に均等数になるように植菌し、再び増殖させた。24 時間の OD₆₀₀ 値は、pH 4.5 では 1.47、pH 5.0 では 1.36、pH 5.5 では 1.32、pH 7.0 では 1.42 であり、増殖は回復することが示された。pH 3.5 および pH 4.0 は、現在測定中であるが、少なくとも生菌が十分量存在することは確認した。つまり、酸性条件では一時的に増殖が中断されるが、致死ストレスではないことがわかった。

2) 2021 年度の予定

酸性ストレス下で大腸菌増殖が一時的に中断される現象について、2019 年度に構築した FACS 測定系を用いて、大腸菌集団中の不均一性を評価する。

2. 酸性下の増殖中断を誘導する遺伝子の探索について

1) 実施内容および結果

関連する遺伝子を網羅的に探索するため、ラムダファージを媒介として、テトラサイクリン耐性マーカーを含む Tn10 トランスポゾンライブラリを作製している。さらに、固形培地を用いて、コロニーサイズの変化から遺伝子スクリーニングするための条件を検討した。現在までに、酸性固形培地上では、24 時間後のコロニー形成が小さくなることを確認している。また、コロニーサイズは pH 度合いに比例しているため、液体培地の結果を反映していると言える。

2) 2021 年度の予定

トランスポゾンライブラリと酸性固形培地を利用して、増殖阻害を誘導しない変異体を同定する予定である。その後、得られた変異体のゲノム上マーカー位置を決定し、遺伝子同定する。

3. 酸性ストレスに派生した細胞膜合成阻害剤への抵抗性について

1) 実施内容および結果

酸性ストレス経験後の抗菌薬抵抗性を調べるため、細胞膜合成の阻害薬であるアンピシリンに対する抵抗性を調べた。まず初めに、大腸菌に対する致死量アンピシリン量を決定するためにアンピシリン濃度 3.12 µg/ mL、6.25 µg/ mL、10 µg/ mL、12.5 µg/ mL、20 µg/ mL を含む培地で 24 時間培養し、増殖レベルを濁度 OD₆₀₀ 値として比較した。その結果、10 µg/ mL 以上から劇的な増殖阻害が確認された。そのため、最小生育阻止濃度(MIC)を 10 µg/ mL と決定した。次に、pH 7.0 または pH 5.0 の液体培地で 24 時間培養し、その後、アンピシリン 10 µg/ mL を含む中性培地に移して、コロニー形成能(CFU)から生存率を比較した。全体として、アンピシリン 10 µg/ mL 存在下では、90%以上が生存を示さなかったが、pH 5.0 での生き残り菌は pH 7.0 に比べて 5 倍程度の増加を示した。親株として使用している MG1655 は、基本的なアンピシリン耐性変異は見られないことから、酸性条件を経験することで、一時的に表現型が変化することが予想される。さらに、90%以上の菌体は生存を示さないことから、大腸菌集団中におけるアンピシリン抵抗性の不均一性が示された。

2) 2021 年度の予定

酸性ストレスに派生した抗菌薬抵抗性に薬剤特異性があるのかを確認するために、細菌 DNA 複製阻害剤とタンパク質合成阻害剤について同様の実験を行う予定である。さらに、酸性下での増殖コントロールを担う遺伝子が同定できた場合は、その欠失株を作製し、これらの抗菌薬抵抗性へ寄与するかを調べる。

4. その他

これまでの成果を国内学会で発表する予定である。また、2021 年度に実施する予定の実験が終了した段階で、国際学術誌への論文投稿を予定している。

研 究 業 績	成果発表（学会・論文・研究会等）		
	学会・論文・研究会等の別	タイトル	発行または発表年月
	論文	Measurement of the Promoter Activity in <i>Escherichia coli</i> by Using a Luciferase Reporter	2020 年 1 月
その他（アピールすることがあればご記入ください。）			