

## 2021 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	<p><b>【概要】</b></p> <p>酸性環境は、細菌が頻繁に経験する化学的ストレスである。本研究では、大腸菌が酸性ストレスで増殖不均一性を誘導し、細菌集団中の抗菌薬抵抗性を確保することを示す。酸性ストレスは、病原性細菌の抗菌薬抵抗性を向上させる報告があるが、その詳細な分子機構は解明されていない。酸性 pH は大腸菌の増殖を一過的に停止させ、その阻害度合いの菌体間ばらつきを増大させた。酸性から中性環境に戻ると大腸菌は増殖を再開した。機能未知遺伝子である <i>hdeD</i> を調べた結果、酸性適応増殖に必要な膜レギュレーターであることが示唆された。酸性を経験した大腸菌は、集団としての <math>\beta</math> ラクタム系抗菌薬への感受性が高くなる一方で、確実に生き残る菌体が存在した。これらの結果は、酸性ストレスで誘導される HdeD が抗菌薬抵抗性獲得する菌体で重要な働きをしている可能性を示唆した。</p> <p><b>【研究方法】</b></p> <p><b>1. 異なる pH 条件における大腸菌生存率、増殖、および個体差の測定</b></p> <p>一晚培養した大腸菌を異なる pH に調製した M9-Glc-Cas 培地 (pH7.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 2.5) に加えて 100 倍希釈した後、37°C で 24 時間振とう培養し、OD<sub>600</sub> を測定した。生存率は、培養前と一晚培養液を段階希釈したのちに CFU を測定した。増殖個体差は、異なる pH に調製した M9-Glc-Cas 培地で一晚培養した大腸菌を位相差顕微鏡で観察し、細胞伸長度合いから変動係数を算出した。</p> <p><b>2. 酸性ストレス経験後の <math>\beta</math> ラクタム系抗菌薬への抵抗性</b></p> <p><math>\beta</math> ラクタム系抗菌薬として、アンピシリンを用いた。M9-Glc-Cas (pH7.0) 培地で一晚培養した大腸菌を pH 7.0 または pH 4.5 の新しい培地に 100 倍希釈した後、37°C で 24 時間振とう培養した。その後アンピシリン添加培地 (pH 7.0) に、菌数が同程度になるよう加え、37°C で 24 時間暴露した。生存率は、暴露前および 24 時間後の培養液を段階希釈したのちに CFU を測定した。</p>

### 3. トランスクリプトーム解析

大腸菌野生株と *hdeD* 欠失株をそれぞれ培養後、全 RNA の回収を行った。野生株から得られた cDNA を Cy3 で、*hdeD* 欠失株から得られた cDNA を Cy5 で、それぞれ精製後に標識し、DNA アレイにハイブリダイズさせた。アレイスキャナーによって各スポットの蛍光強度を測定し、全蛍光強度に対する割合を算出した。

### 4. 透過型電子顕微鏡による大腸菌べん毛観察

大腸菌野生株と *hdeD* 欠失株を M9-Gly-Cas (pH7.0) 培地で一晚培養し、菌体表面のべん毛数を透過型電子顕微鏡で観察した。

#### 【結果と考察】

#### 1) 異なる酸性 pH に対する大腸菌集団の増殖

異なる酸性 pH 環境における大腸菌増殖度合いを調べた結果、培地の pH が低くなるほど OD<sub>600</sub> の濁度が小さくなり、pH に相関して増殖が阻害されていることが示された。また、pH4.5 以下の条件では培養液の濁度が全く確認できないことから、増殖していない、または死滅したことが示唆された。各 pH における大腸菌の生存率を調べたところ、pH 4.5 から 3.5 では、培養前と同程度の菌数であり、生存が確認された。一方で、pH 2.5 では菌数が 100 倍以上減少した。これらの結果より、pH 4.5 から 3.5 の範囲では増殖を停止しているが生きている一方で、pH 2.5 は致死 pH であることが示された。

#### 2) 異なる酸性 pH に対する大腸菌の増殖個体差

各 pH 環境で一菌体における増殖の影響を調べるため、菌体の形態を位相差顕微鏡で観察した。その結果、pH 5.5 から pH 4.3 の範囲では細胞が伸長し、細胞分裂が阻害されていた。また、細胞伸長度合いは、プロトン量増加に伴いばらつきが大きくなり、増殖状態がヘテロな集団となった。pH 3.9 以下では、酸性に移行する前の形態と同等であり、菌体間でのばらつきは確認されなかった。

#### 3) 酸性ストレスによる大腸菌の $\beta$ ラクタム系抗菌薬抵抗性の獲得

$\beta$  ラクタム系抗菌薬であるアンピシリンに対する大腸菌感受性調べた。pH 7.0、pH 5.0、および pH 4.5 の環境で大腸菌を 24 時間培養し、10  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む培地に 24 時間暴露した。その結果、0 時間（暴露前）に比べて pH 7.0 で培養した細菌の生存率は 2.5%、pH 5.0 では 1.2%、pH 4.5 では 0.1% 以下であった。酸性ストレスを経験した細菌集団において、アンピシリン抵抗性の向上は見られなかったが、確実に生き残る菌体がいることが示された。

#### 4) 酸性ストレス後の適応増殖に必要な膜タンパク質 HdeD

酸性ストレスを経験した大腸菌の生理機能は、ストレス前と比べ大きく変化していると予想される。酸性時に発現誘導される機能未知遺伝子 *hdeD* について調べた。トランスクリプトーム解析から *hdeD* 欠失株では、べん毛合成遺伝子の発現量が増加した。さらに透過型電子顕微鏡観察により、*hdeD* を欠失した菌体のべん毛本数が増加することを確認した。以上より、HdeD は酸性で発現後、中性 pH に移行した大腸菌が増殖する時にべん毛合成を抑制する膜レギュレーターであることが明らかとなった。

#### 【まとめ】

本研究で、大腸菌は、環境中のプロトン量増加に協調して増殖を停止することが示され、増殖停止度合いの異なる多様な個体形成を可能にすると考えられる。増殖を一旦停止した菌体は、中性環境に戻ると見かけ上変わりなく増殖を再開させる。この時、膜レギュレーター HdeD がべん毛合成を積極的に抑制することで細胞エネルギーを分裂へ集約していると示唆される。酸性を経験した大腸菌は、集団としての  $\beta$  ラクタム系抗菌薬への感受性が高くなる一方で、確実に生き残る菌体が存

在する。 $\beta$ ラクタム系抗菌薬は、増殖している菌体の細胞壁合成に作用することから、増殖に有利な菌体が淘汰されると予想される。そのため、酸性ストレスによる抗菌薬抵抗性の獲得には、酸性適応増殖に必要な HdeD 活性状態が重要な要因であることが示唆され、今後の解析に期待される。

**【謝辞】**

本研究の透過型電子顕微鏡観察は、県立広島大学・相沢慎一名誉教授のご協力のもとで行われました。pH 変化に対する大腸菌増殖および抗菌薬実験は、法政大学・M1 木口遼香さん、B4 半澤遥さんのご協力のもとで行われました。深く感謝申し上げます。

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	The <i>hdeD</i> gene represses the expression of flagella biosynthesis via LrhA in <i>Escherichia coli</i> K-12	2022 年 1 月
シンポジウム	大腸菌における酸性適応増殖機構の解明	2022 年 1 月
学会	Roles of the distinct proton motive force from flagella and F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> ATPase on the acid adaptive survival of <i>Escherichia coli</i>	2021 年 12 月
研 究 業 績	<p>その他（アピールすることがあればご記入ください。）</p> <p>論文「The <i>hdeD</i> gene represses the expression of flagella biosynthesis via LrhA in <i>Escherichia coli</i> K-12」は、掲載雑誌 Journal of Bacteriology の Editor's pick に選出された。</p>	