

立教大学学術推進特別重点資金（立教SFR）
プロジェクト研究（共同プロジェクト研究）
2018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) 2019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					
研究期間	2018年度 ～ 2019年度							
研究経費※ (上段：支出金額)	2018年度		2019年度		年度	総計		
	4,000,000	円	0,000,000	円	0,000,000	円	4,000,000	円
(下段：採択金額)	4,000,000		2,000,000		0,000,000		6,000,000	

※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。)

バクテリアは、抗生物質などにより、細胞壁合成が阻害されても溶菌せずに、L型細菌と呼ばれる細胞壁を持たないバクテリアとして生存可能である。細胞壁合成阻害が解除されると、再び細胞壁合成を開始し、通常の細胞として増殖する。このようなバクテリアの生存戦略の理解は、病原細菌の感染防除、新規抗生物質の開発等に大いに貢献できると考えられる。本研究では、L型への変換過程を詳細に明らかにするために、L型への変換過程をリアルタイムで観察する実験系を構築した。また、L型への変換が亢進する変異株として、外膜合成に変異を持つ株が単離された。これは、L型への変換に細胞表層の外膜構造が重要であることを示唆している。

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。)

抗生物質の多用は、抗生物質耐性菌や多剤耐性菌の出現といった新たな問題を生み出し、大きな社会問題となっている。ペニシリンを含むある種の抗生物質は、バクテリアの細胞壁合成過程を阻害する。その結果、細胞壁を持たないバクテリアは溶菌して死滅する。しかし、集団中の一部のバクテリアは、細胞壁を持たない L 型細菌として生存する。L 型細菌は細胞壁を持たないので、結果として細胞壁を標的とする抗生物質に耐性を示す。L 型細菌は、細胞壁合成阻害が解除されると、再び細胞壁合成を開始し、通常の細胞に戻ることができる。病原細菌も L 型化することができるので、抗生物質が無くなると、L 型から通常の細胞に戻り、再び感染巣で増殖することになる。そのため、L 型および通常の細胞間の変換過程を明らかにすることは重要である。また、L 型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ことが期待されている。今年度は、① L 型化の変換過程の可視化とその条件検討、② L 型変換が亢進した変異株の取得およびその解析、③ これらの解析のための蛍光タンパク質を融合した外膜タンパク質の構築や細胞表層の可視化を目的とした。

① L 型化の変換過程の可視化とその条件検討

L 型化への変換過程の可視化を行うための実験条件の検討を行った。これまでの予備的な実験では、培地灌流装置を用いて、L 型化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、この実験系を用いることにより、確実に L 型への変換過程をリアルタイムで観察することができた。その結果、L 型への変換は以下の過程に分けることができると考えられた。(1) 抗生物質による細胞壁合成阻害により、バクテリアが球状に変形、(2) 球状からアメーバ状の L 型細胞に変形、(3) アメーバ状の L 型細胞が分裂して増殖する。他の研究室でも L 型への変換過程の可視化の試みは行われていたが、アガーパッドを用いた実験では、L 型への変換効率の低さと、増殖の遅さから観察は困難であった。しかし、我々の実験系では、高効率で L 型化変換過程をリアルタイムで可視化することに成功し、本研究分野にとっても大きなブレイクスルーであると言える。この方法では、バクテリアを特殊なチャンバーにトラップして固定するが、その時、バクテリアは適切な高さで挟まれることにより、固定される。我々は、L 型への変換能がバクテリアを挟む高さに依存していること、すなわち、高さが $0.7\mu\text{m}$ で固定されたバクテリアはアメーバ状の L 型化に変換し増殖するが、 $1.1\mu\text{m}$ で固定されたバクテリアは、球状に変形するが、その先の過程には進まない。これはバクテリアとチャンバーが接触することで、一定の圧力がバクテリアにかかることが重要であることを示唆している。この実験系では、一度に一種類のバクテリアの観察しかできないので、従来のアガーパッドを用いた実験系を改良し、新たな実験系の構築を試みた。ここでは、抗生物質を含むアガーパッド上にバクテリアを置いた後、

研究【経過・成果】の概要 つづき

カバーガラスの上から押さえることで一定の圧力を加えることにした。その結果、これまでのアガーパッドを用いた実験系と異なり高効率で L 型に変換することが観察された。これら 2 つの新規実験系を用いて、L 型細胞への変換過程を詳細に観察したところ、L 型の増殖にはマグネシウムイオンが必須であることを明らかにした。マグネシウムイオンは、大腸菌の細胞表層（外膜構造）の安定化に重要であることが知られている。したがって、申請者らの結果は、L 型細胞の増殖に外膜が必要であることを示唆している。

② L 型変換が亢進した変異株の取得およびその解析

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。申請者は①で確立した実験系を用いて、大島により同定された変異を持つ変異大腸菌の L 型への変化過程を可視化した。培地還流装置を用いて実験を行ったところ、上述のように野生株は高さ 1.1 μm で固定された細胞は L 型に変換しなかったが、新たに取得した変異株は高さ 1.1 μm で固定された細胞でもアメーバ状の L 型細胞に変換した。この結果は、大島が取得した変異株では、L 型細胞への変換が、確かに亢進していることを示している。

③ 細胞表層の可視化

上記実験①と②の結果から、L 型細胞への変換には外膜が重要な役割を果たしていることが明らかになった。本研究をさらに推進するためには、外膜を可視化することが重要である。すでに申請者は、外膜タンパク質 Pal と蛍光タンパク質 mCherry を融合した Pal-mCherry を発現する大腸菌を構築済みであった。この株を①の実験系を用いて L 型細胞への変換過程を可視化したところ、L 型細胞は確かに外膜を保持していることが観察された。L 型細胞は、通常の細胞では外膜と内膜の間に存在する細胞壁を失っており、L 型細胞では内膜と外膜がどのように存在しているかを調べることは今後の課題として挙げられる。また、大島が単離した変異株は、その遺伝子の機能から、外膜表層に存在するリポ多糖 (LPS) の構造が異常になっていると予想される。抗 LPS 抗体を用いたウェスタンブロットにより、変異株では確かに LPS が異常になっていることを確認した。

以上の結果は、論文として公表するための準備中である。

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) 「L型大腸菌の変換効率を高める諸要素」

大島 拓、金井 友美、近田 大基、塩見 大輔

第15回21世紀大腸菌研究会 2018年5月24,25日 (山形県南陽市)

ポスター発表

(2) 「細胞壁を失ったL型大腸菌への効率よい変換に求められる条件の検討」

近田 大基、金井 友美、大島 拓、塩見 大輔

第4回法政大学・立教大学 微生物研究会 2018年8月20日 (東京都小金井市)

口頭発表

(3) 「L型大腸菌への変換過程の可視化とその遺伝的基盤の解析」

近田 大基、金井 友美、大島 拓、塩見 大輔

2018年度遺伝研研究会、2019年3月18,19日 (静岡県三島市)

口頭発表