



Title	大腸菌における薬剤耐性獲得に伴うゲノムDNA配列の変異解析
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95189
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	きたがわ まい 北川 舞衣	学部 学科	基礎工学部 化学応用科学科	学年	1 年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	山元 淳平	所属	基礎工学研究科		
研究課題名	大腸菌における薬剤耐性獲得に伴うゲノム DNA 配列の変異解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

目的

進化の過程で特定の物質に対する耐性を獲得することは様々な生物が行う生存戦略である。私は、耐性獲得において遺伝子レベルでどのような変化があり、その遺伝子上の変化がタンパク質に翻訳される過程でどのような影響があるのか、疑問を持った。そこで、全ゲノム配列が解明されており遺伝子情報の手に入りやすい大腸菌を研究対象とし、薬剤耐性獲得機構を遺伝子レベルで解明することを目的とした。

計画

本研究計画では、全ゲノム DNA 配列がすでに明らかになっている大腸菌 K-12 MG1655 株を用いる。アンピシリンやカナマイシンといった、一般的に使用される抗生物質をさまざまな濃度で含む寒天培地プレートに大腸菌を播種し、自然に薬剤耐性を獲得した大腸菌のコロニーを発生させる。その際、対照実験として薬剤を含まない培地に同様に大腸菌を播種することで、薬剤の有無で生育割合がどのように変化するか、定量的に算出する。

次に、薬剤を含む培地にて生育した大腸菌コロニーを培養したのちに大腸菌からキットを用いてゲノム DNA を抽出し、DNA シーケンス解析用のサンプルを PCR により作成する。また、薬剤を含まない培地にて培養した野生型大腸菌についても同様にサンプルを調製する。薬剤耐性を獲得する過程で遺伝子がどのように変化したのかを調べる。

これまでに、薬剤耐性を獲得しうる大腸菌 DNA 領域についてデータベース化されているので¹⁾、データベース中のさまざまな DNA 配列領域を選択的に PCR により増幅し、その DNA 配列を調べる。当該領域がタンパク質をコードする場合、そのタンパク質の機能を調べ、アミノ酸配列が変異前の大腸菌とどのように異なっているのかを調べる。変異したタンパク質構造を、深層学習によるタンパク質三次元構造予測ツールである AlphaFold2 にて予想し、野生型タンパク質化学構造との比較から、化学構造の変化が薬剤耐性にどのような影響を与えたか考察する。また、タンパク質によってはヒトをはじめとした真核生物と共通の機能を持つ可能性もあるため、そのような場合には本研究の結果が大

腸菌以外にも応用可能かなども考慮に入れながら研究を進める。

この研究は遺伝子組換え実験には該当しないが、大腸菌の取り扱いについてアドバイザー教員から指導を受け、外部拡散しないよう適切に実験を行う。

方法

国立遺伝学研究所より大腸菌 MG1655 株を購入し、無菌状態で LB 培地寒天プレートに播種して野生型の大腸菌を育成した。このプレートからコロニーを二つ取り、それぞれ S0-1 および S0-2 と命名した。S0-1 および S0-2 を液体 LB 培地にて培養後、Nucleospin Microbial DNA 抽出キットを用いてゲノム DNA を精製した。今回、薬剤排出に関わることが知られている 11 個の大腸菌遺伝子群²⁾³⁾ (*acrB*-*acrA* : 多剤排出トランスポーター、*emrE* : 多剤排出系、*mdfA* : 多剤排出トランスポーター、*macAB* : 多剤排出システム、*mcrA* : 可動性コリスチン耐性遺伝子、*evgAS* : 二成分情報伝達系、*acrEF* : 多剤排出トランスポーター) に着目し、これらの大腸菌遺伝子を増幅する PCR プライマーを設計した。PrimeSTAR MAX DNA ポリメラーゼを用いた S0-1 および S0-2 ゲノム DNA の PCR を行い、増幅産物の生成を 1%アガロースゲル電気泳動で確認した。その後、Gel and PCR Clean up キットを用いて PCR 産物を精製し、アゼンタ株式会社の DNA シーケンス解析サービスを利用して DNA 配列解析を行った。データベースの配列情報とシーケンス結果の alignment を行った。その後、S0-1 株を 50 µg/mL アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播種したところ、大部分の大腸菌は死滅したが、コロニー四つが発生した。それぞれ S1-1、S1-2、S1-3 および S1-4 と命名した。これらを再び 50 µg/mL アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播種したところ、プレート一面に大腸菌が広がって生育していたことから、突然変異株が薬剤耐性を獲得していることを確認した。これら突然変異株からゲノム DNA を抽出し、上記注目遺伝子群の PCR 産物の DNA 配列解析を行った。野生型で得られた DNA 配列解析結果と比較することで、薬剤耐性の獲得過程で遺伝子の配列がどのように変化するかを調べた。

結果

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動(マーカーには NEB fast DNA ladder を使用)にて分析したところ、いずれの場合でも *mcrA* のみ PCR 産物に帰属されるバンドが観測されなかった(図1)。このことから、今回デザインした *mcrA* 遺伝子用プライマーの配列が適切でないと判断し、以降の PCR 産物の精製とシーケンス解析は *mcrA* を除いた 10 種類について行った。また、野生株 S0-1 および変異株 S1-1~4 について、図2で示した PCR 産物の生成パターンに変化はなかった。複数の

PCR 産物バンドが見られた *macA* および *acrE* については、主生成物をアガロースゲル電気泳動で分離・精製した。DNA シーケンス結果のアラインメントを行ったところ、野生株である S0-1 では、注目する 10 種の遺伝子配列はデータベースと完全に一致していた。一方で、薬剤耐性を獲得した S1-1~S1-4 では、*mdfA* のリバーズ側 1~150 塩基付近にノイズが発生していた(図2)。また S1-1 では *acrF* のフォワード側 110~140 塩基付近にノイズ、S1-2~S1-4 では *acrF* のフォワード側 110~210 塩基付近でノイズが認められた。また S1-2 と S1-4 のみ、*macB* のフォワード側 370 塩基付近までノイズが発生していた。

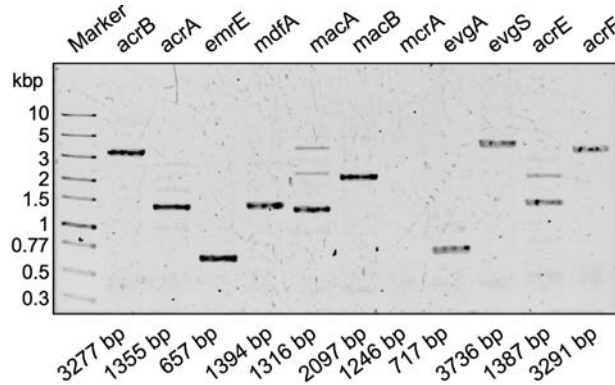


図1 : S1-2 アガロースゲル電気泳動(図上部は遺伝子名、下部の数値は予想される DNA 鎖長)

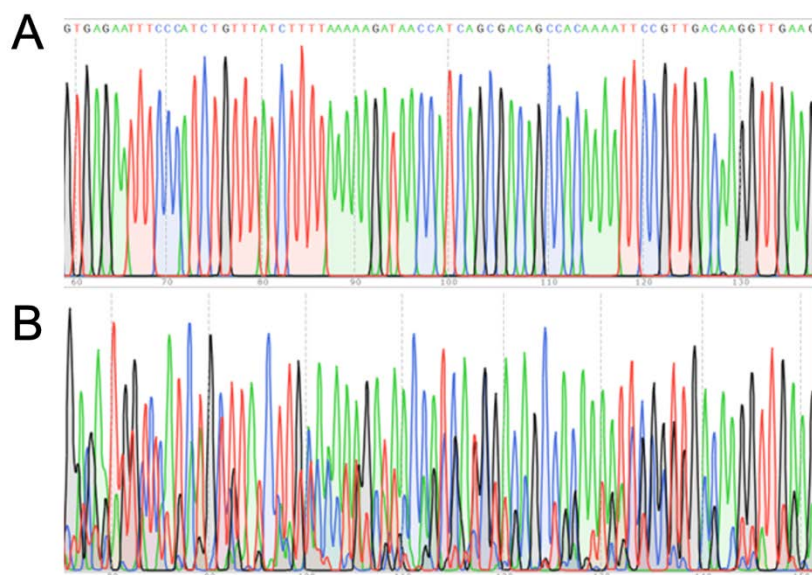


図 2 : *mdfA* のリバース側 DNA 配列解析の結果。野生株 S0-1 (A) および突然変異株 S1-2 (B) の同じ配列領域を示している。

考察

遺伝子配列の変化によってその遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸側鎖が変化する。従って、DNA 配列解析で見られた上記ノイズが見られる遺伝子領域がタンパク質構造のどの領域に対応するのか、タンパク質三次元構造を調べることにした。まず、*acrF* 遺伝子の変異ノイズについては、野生型 S0-1 でも同じ箇所で同程度のノイズの発生が見られたため、これは薬剤耐性の獲得と関係がないと考えられる。一方、*mdfA* 遺伝子と *macB* 遺伝子のノイズに関しては、野生型には同じようなノイズが見られないことから、薬剤耐性獲得の中で得られた変化であると考えられる。

MdfA タンパク質は多剤排出トランスポーターの一つであり、プロトンとの対向輸送により薬剤を輸送する膜貫通型アンチポーターである⁵⁾。*mdfA* 遺伝子の変異ノイズが発生している領域がコードするタンパク質の部位を 3D モデルで確認したところ、C 末端の部分にあたる箇所であることが分かった (図 3A)。過去の文献から、薬剤結合に重要なアミノ酸側鎖は 34 番目のアスパラギン酸であることが報告されている⁵⁾。今回の変異は 378 番目のグリシン以降に導入されており、薬剤に直接結合する部位ではない。従って、この領域のアミノ酸の置換が薬剤耐性にどのように影響するかについては、さらなる調査が必要である。

MacB タンパク質は ABC トランスポーター TolC-MacA-MacB 三者複合体の構成因子であり⁴⁾、外膜貫通チャンネル TolC と膜融合トランスポーター MacA を介して結合する、内膜貫通トランスポーターである (図 3B)。*macB* 遺伝子領域の変異ノイズがコードするアミノ酸領域を調べたところ、ノイズの発生している部分は ABC トランスポーターが内膜側から薬剤をとりこむ入り口部分であることが分かった (図 3B)。このことから、この部分の遺伝子配列が変化することによって、*macB* タンパク質の薬剤取り込み口の大きさが変わり、薬剤がより効率良く排出しやすく変化した結果、薬剤耐性を獲得したのではないかと考えられる。

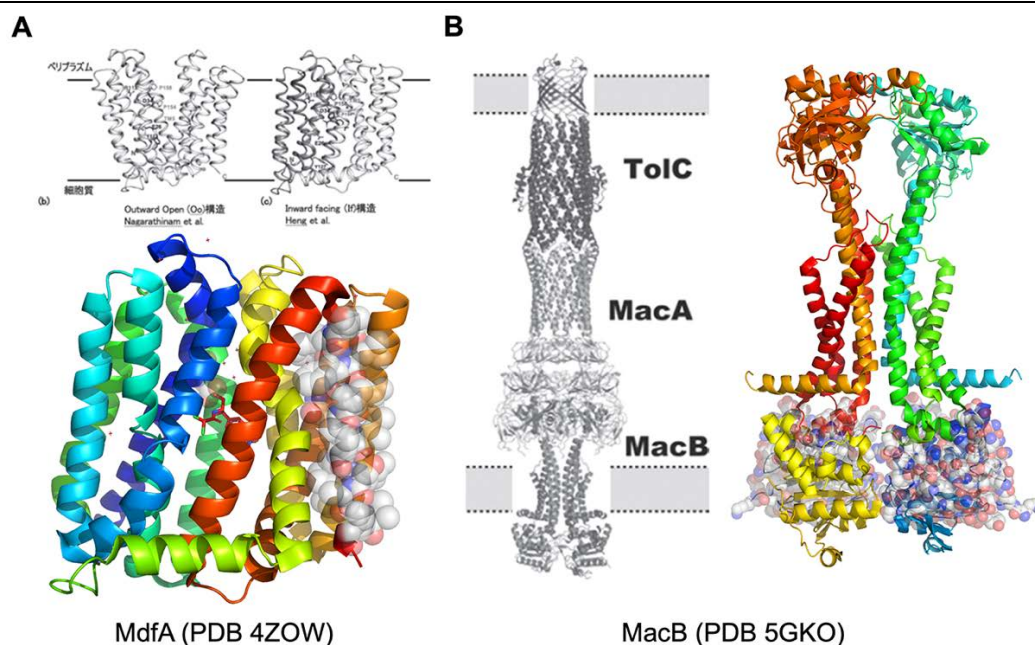


図3：変異が見られた薬剤排出タンパク質群。MdfA (A) および MacB (B)のうち、変異が導入されているアミノ酸領域を球体モデルで示した。また、パネル A 上部およびパネル B 左の図は、文献 4 および 5 から引用した。MdfA および MacB のタンパク質構造は、Protein Data Bank に登録されている座標情報から PyMOL にて再構成した (MdfA: 4ZOW⁶, MacB: 5GKO⁷)。

今回得られたアンピシリン耐性大腸菌株のゲノム配列の中で、配列解析を行なった領域は全体の約 0.0044%とごく一部の領域であり、薬剤耐性獲得の全容を知るためには、次世代 DNA シーケンサーを用いた全ゲノム配列解析などが必要となってくる。一方で、ごく限られた遺伝子領域であっても、タンパク質アミノ酸配列の変化が有意に引き起こされていることがわかった。MG1655 株の薬剤耐性獲得の要因はいくつか考えられるが、一つは薬剤排出トランスポーターの入り口を緩めることで、細胞内に取り込まれた薬剤を排出しやすくしているのではないかと考えられた。

参考文献

- 1) Zankari et al., Identification of acquired antimicrobial resistance genes, *J. Antimicrob. Chemother.* 67; 2640–2644 (2012)
- 2) 西野邦彦・山口明人, 細菌ゲノムに潜む薬剤耐性因子, *日本細菌学雑誌* 57; 453–464 (2002)
- 3) 和知野純一, 薬剤耐性獲得機構～グラム陰性菌を中心に～, *日本臨床微生物学会雑誌* 30; 1-12 (2020)
- 4) 岡田有意・村上 聡, 三者複合体形成型 ABC トランスポーターMacB の構造解析, *ファルマシア* 56; 499-503 (2020)
- 5) 田辺幹雄, MFS 型多剤排出トランスポーターMdfA の薬剤輸送に伴う構造変化のメカニズム, *ファルマシア* 56;509-513 (2020)
- 6) Heng et al., Substrate-bound structure of the E. coli multidrug resistance transporter MdfA, *Cell Res.* 25; 1060-1073 (2015)
- 7) Okada et al., Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*, *Nat. Commun.* 8, 1336 (2017)