

## リボソーム RNA の抗生物質耐性変異を解析する技術の開発

### — 耐性菌の早期発見に有用な耐性変異データベース構築に向けて —

平成 30 年 4 月 4 日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

国立大学法人 北海道大学

#### ■ ポイント ■

- ・ 産総研独自のリボソーム RNA (rRNA) の機能解析技術を抗生物質耐性のスクリーニングに適用
- ・ 環境バクテリア由来の 16S rRNA に新たな抗生物質耐性変異を発見
- ・ さまざまな抗生物質に対する新たな耐性変異データベースの構築に期待

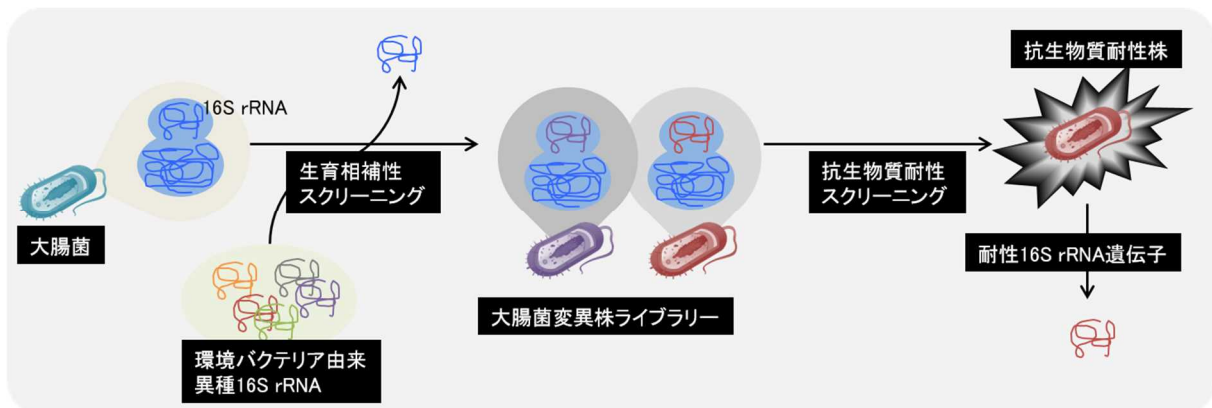
#### ■ 概要 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所【理事長 中鉢 良治】(以下「産総研」という)生物プロセス研究部門【研究部門長 田村 具博】合成生物工学研究グループ 宮崎 健太郎 研究グループ長は、北海道大学【総長 名和 豊春】大学院理学研究院 北原 圭 特任助教らの協力を得て、環境バクテリアの 16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子ライブラリーの中から、淋菌感染症治療に用いられる抗生物質のスペクチノマイシンに対して耐性を示す 16S rRNA 遺伝子を複数発見した。さらに、耐性遺伝子の 変異解析 の結果、新たな耐性変異を発見した。

rRNA は抗生物質の主要なターゲットの一つであり、rRNA に耐性変異が生じると、抗生物質が効かなくなる。このため、耐性変異の情報は耐性菌の早期発見に有用であるが、これまで rRNA の耐性変異の同定は困難で、耐性変異に関する情報は十分に蓄積されていなかった。今回、大腸菌を宿主として異種バクテリア由来の 16S rRNA を機能解析する産総研独自の技術が、抗生物質耐性の検証に適用できることが分かった。この技術により、環境中のバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子から 4 種の耐性遺伝子を同定し、それらの遺伝子の変異解析により新たにスペクチノマイシンに対する 3 つの耐性変異を発見した。今回の方法をさまざまな抗生物質の耐性変異の検証に適用することで、耐性菌の発見・診断に有用な、耐性変異のデータベース構築が期待される。

なお、この研究の詳細は、2018 年 4 月 3 日 (英国時間) に英国科学雑誌 *Scientific Reports* にオンライン掲載された。

\_\_\_\_\_は【用語の説明】参照



16S rRNA の機能解析技術を用いた抗生物質耐性スクリーニングの概要

## ■ 開発の社会的背景 ■

抗生物質は病原性菌を死滅させる効果を持つため、感染症を抑制するため抗生物質の開発が行われている。しかし、多くの場合、病原性菌は他の生物と同様に抗生物質の攻撃を逃れる仕組みを持ち、抗生物質耐性を獲得する。耐性菌の早期発見・診断には耐性変異に関する情報が重要であるが、十分な知見が蓄積されていない。その原因の一つは、多くの抗生物質の標的である rRNA の機能解析法が確立されていないことである。rRNA は生体内で最も多く生産される重要な遺伝子であるため、多くのバクテリアはゲノム上に複数のコピーを持っている。そのため、単一のバクテリア内にも、耐性を獲得した遺伝子とそうでない遺伝子が混在することがある。複数のコピーの一部の遺伝子だけが耐性を獲得した場合、一般的には強い耐性を示さず、耐性変異が「潜伏」した状態となっている。こうした潜伏状態の耐性変異を確実に検出するには、ゲノム全体に含まれる複数の rRNA について、個別に抗生物質耐性の有無を解析する必要があるが、これまで、解析手法がなく、その開発が求められていた。

## ■ 研究の経緯 ■

これまで産総研では、リボソームの機能解析手法の一つとして16S rRNAを生物種間で交換する遺伝学的手法を開発し、翻訳装置であるリボソームに翻訳以外の機能(RNA分解酵素阻害活性)を発見するなど、リボソームの機能解析に革新をもたらした(2011年11月23日 産総研プレス発表)。また、大腸菌とは進化系統分類の「綱」や、さらに上位の「門」のレベルで異なる生物種の16S rRNAが大腸菌遺伝子と機能的に互換であることを発見した(2012年10月30日、2017年8月30日 産総研プレス発表)。

今回、この16S rRNAを生物種間で交換する手法を用いて、環境中のさまざまなバクテリア由来の16S rRNAの中から、16S rRNAに作用する抗生物質の一つであるスペクチノマイシンに対して耐性を示す16S rRNA遺伝子をスクリーニングし、発見した耐性16S rRNA遺伝子の変異解析による新たな耐性変異の同定に取り組んだ。

なお、この研究は、独立行政法人 日本学術振興会の科学研究費助成事業 挑戦的萌芽研究「リボソームRNAの抗生物質耐性変異の網羅的解析」(平成26~27年度)による支援を受けて行った。

## ■ 研究の内容 ■

16S rRNA 遺伝子は生育に必須の遺伝子で、これを欠いた大腸菌は生育できない。また、16S rRNA 遺伝子は生物種に固有の遺伝子であり、生物種間では機能の互換性がないと考えられてきた。しかし、産総研では2012年に、大腸菌の16S rRNA 遺伝子欠損株に異種バクテリア由来の16S rRNAを組み込んで、生育できるかどうかを調べ(生育相補性スクリーニング)、多くの異種バクテリア由来の16S rRNAにより大腸菌16S rRNA 遺伝子欠損株が生育できることを見出した。

そこで、今回この方法を利用して、環境中のバクテリアの16S rRNAの抗生物質耐性の有無をスクリーニングするため、まず、大腸菌16S rRNA 遺伝子欠損株が生育できる環境バクテリア由来の16S rRNA 遺伝子を大量に取得し、数万種の大腸菌変異株からなるライブラリーを作製した。次に、スペクチノマイシンに対して耐性を示す16S rRNA 遺伝子を得るため、この大腸菌変異株ライブラリーを、スペクチノマイシンを含む培地で培養し、生育できた大腸菌変異種、すなわち耐性を示す大腸菌変異種を分離した。これらの16S rRNA 遺伝子の解析により、4種のスペクチノマイシン耐性16S rRNA 遺伝子を同定した(図1)。

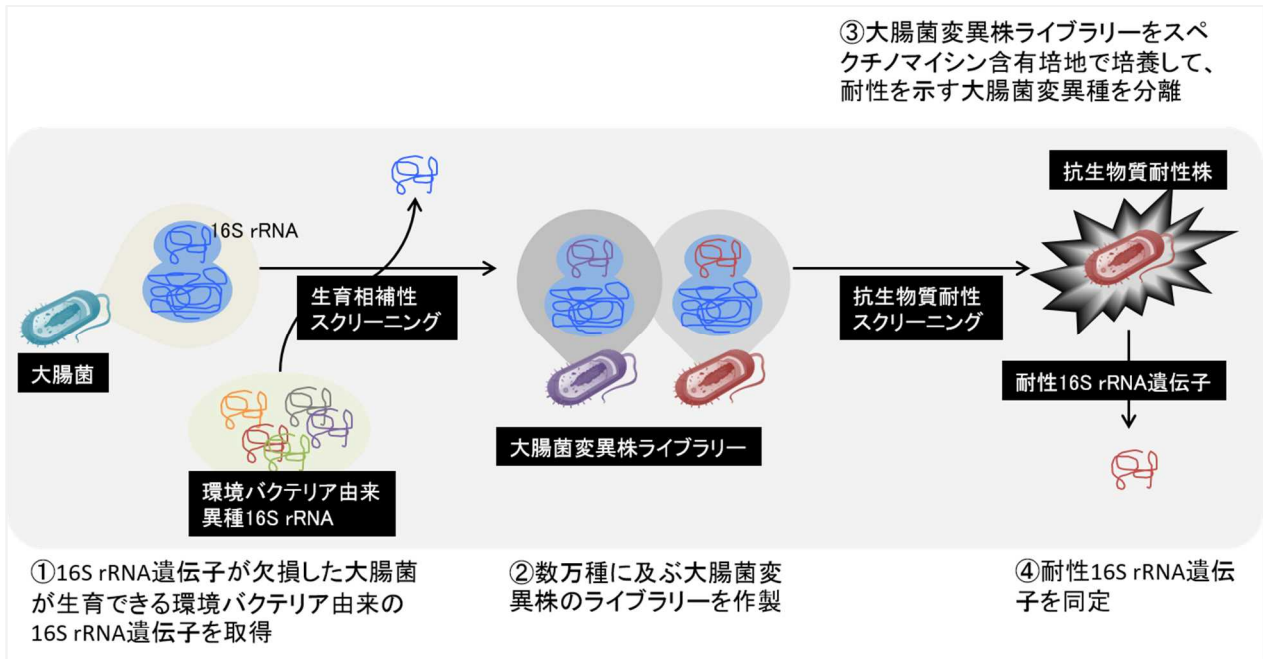


図 1 抗生物質耐性スクリーニングの流れ

これら 4 種のスペクチノマイシン耐性 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し、米国バイオテクノロジー情報センター (NCBI) の遺伝子配列データベースから、耐性 16S rRNA 遺伝子に類似した遺伝子を検索した。データベース中の相同遺伝子はスペクチノマイシン耐性ではないと考えられるため、耐性遺伝子とデータベース中の遺伝子の配列を比較すれば、耐性遺伝子中の耐性変異を推定できる (図 2)。例えば、環境由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子の一つである mgSpc2 では 1066 番目の塩基が T であるのに対し、NCBI の遺伝子配列データベースに見出された相同遺伝子 (図 2 では mgSpc2hom と表記) では C である。この場合、1066 番目の塩基 C が T に置き換わることで耐性になったと推定できる。

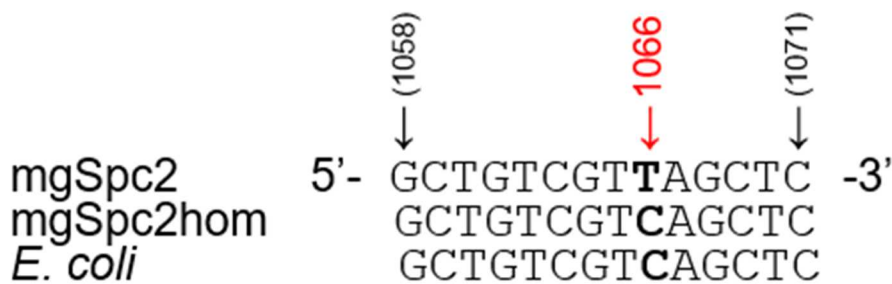


図 2 16S rRNA 遺伝子(一部の領域)の塩基配列の比較

(上段)スペクチノマイシン耐性を示す 4 種の 16S rRNA 遺伝子の一つ

(中段)NCBI の遺伝子配列データベースから検索した相同遺伝子

(下段)大腸菌の 16S rRNA 遺伝子

この耐性変異の推定が正しいかどうかを検証するため、環境中のバクテリア由来のスペクチノマイシン耐性 16S rRNA 遺伝子の耐性変異を、部位特異的変異導入法により相同遺伝子に含まれるタイプの塩基に変換して(図 2 の例では mgSpc2 の 1066 番目の T を C に変換する)、その大腸菌変異種が耐性を失うかどうかを調べた。また、推定された耐性変異をスペクチノマイシン非耐性大腸菌の 16S rRNA 遺伝子に組み込んで耐性が現れるかどうかを確認した。これらの検証の結果、既知の 5 つの耐性変異のほか、新たに 3 つの変異を同定した(図 3)。

スペクチノマイシンはバクテリアリボソームに作用する抗生物質として 50 年以上前に開発され、臨床応用歴も長く、その耐性機構や耐性変異についても多くの研究が行われてきた。スペクチノマイシンに関する知見は相当に蓄積されてきたにもかかわらず、今回、新しい耐性変異が同定できたことは、環境中には数多くの未知の耐性変異が眠っていることを示唆する。

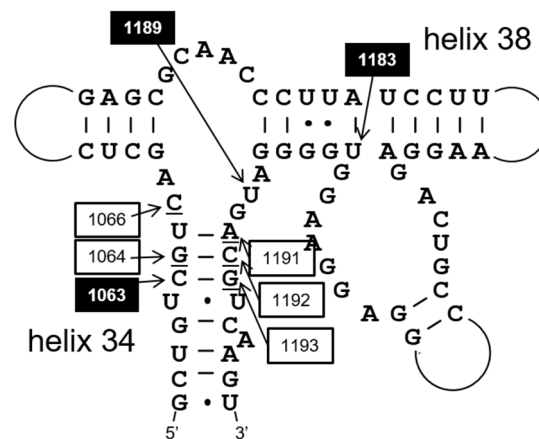


図 3 大腸菌 16S rRNA の二次構造

スペクチノマイシン耐性変異が集中する領域の拡大図。既知の耐性変異は白地に黒数字、今回見つかった新規耐性変異は黒地に白数字で示した。

これまで、バクテリアの複数の rRNA を個別に調べて抗生物質耐性を持つものを特定できる有効な手段はなかったが、大腸菌を宿主として 16S rRNA の機能を解析する産総研独自の手法であれば、個々の 16S rRNA の機能を調べて抗生物質耐性を持つものを特定できることが分かった。また、この手法はスペクチノマイシン以外の抗生物質にも適用できる。そのため、今後、この手法でさまざまな抗生物質の耐性スクリーニングを行い耐性変異に関するデータを蓄積すれば、耐性菌の早期発見・診断に有用な、抗生物質耐性変異のデータベースの構築も可能である。

### ■ 今後の予定 ■

今後は、16S rRNA を攻撃する他の抗生物質や、さらに、23S rRNA を攻撃する抗生物質にもスクリーニング範囲を拡張する。それにより、rRNA の変異に基づく抗生物質耐性変異の網羅的なデータベースを構築し、病原菌に対して特定の抗生物質が有効かどうかを迅速に高精度で調べる技術の確立を目指す。

■ 本件問い合わせ先 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 合成生物工学研究グループ

研究グループ長 宮崎 健太郎 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6

TEL:029-861-6897 FAX:029-861-6897

E-mail:miyazaki-kentaro@aist.go.jp

---

---

【取材に関する窓口】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 企画本部 報道室

〒305-8560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第 1

つくば本部・情報技術共同研究棟 8F

TEL:029-862-6216 FAX:029-862-6212 E-mail:press-ml@aist.go.jp

国立大学法人 北海道大学 総務企画部 広報課

〒060-0808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目

TEL:011-706-2610 FAX:011-706-2092 E-mail:kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

## 【用語の説明】

### ◆16S リボソーマルRNA(16S rRNA)

原核生物のリボソームの30Sサブユニット(小サブユニット)に含まれるリボソーマルRNA。約1500塩基からなる。適度な情報量と種に固有な特性から、微生物の進化系統解析に用いられる。

### ◆変異解析

生物個体の性質の差異を遺伝子解析により明らかにすること。

### ◆耐性変異

生物を死滅させる抗生物質やさまざまな薬剤に対し、死滅を免れることにつながる遺伝子変異のこと。

### ◆スクリーニング

多数の検体の生物機能をしらみつぶしに検証すること。今回は、数万種規模の16S rRNAを、スペクチノマイシン耐性の観点から検証している。

### ◆リボソーム

DNAからRNAへと「転写」された遺伝情報をタンパク質へと「翻訳」する機能を担う細胞小器官。大小2つのサブユニット、3つのrRNAと57のタンパク質から構成され、非常に複雑な超分子複合体である。

### ◆翻訳

DNAからRNAへと転写された核酸の遺伝情報を機能分子であるタンパク質へと変換すること。

### ◆綱、門

他の生物界と同じく細菌(バクテリア生物界)の分類階級は上位から、門(phylum)、綱(class)、目(family)、科(order)、属(genus)、種(species)に分けられており、門は最上位の分類群、綱は門に次いで上位の分類階級にあたる。

### ◆遺伝子欠損株

野生株にある染色体上の遺伝子が部分的あるいは完全に欠損した株のこと。大腸菌の染色体には16S rRNA遺伝子が7個コードされているが、完全欠損株ではそのすべてを欠損している。

### ◆生育相補

生物は、生きていくために必須な遺伝子を欠いた場合、生きていけなくなるが、機能的に同等な遺伝子を補うことで生育が可能となる。このように、生育に必要な遺伝子を補うことを生育相補と呼ぶ。

### ◆相同遺伝子

ほとんどすべての生物は類似した遺伝子セットを持っており、ある遺伝子について別の生物でも類似した遺伝子が見つかることが多い。このような遺伝子を相同遺伝子と呼ぶ。

### ◆部位特異的変異導入法

塩基配列の特定の部位を任意の塩基に変換する技術。