進化実験を用いた薬剤耐性メカニズムの解析

古澤 力^{a,b}

Analysis of Drug Resistance Using Experimental Evolution

Chikara Furusawa^{a,b}^aQuantitative Biology Center, RIKEN; 6-2-3 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874, Japan; and ^bUniversal Biology Institute, The University of Tokyo; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

(Received September 9, 2016)

The emergence of drug-resistant bacteria is a growing concern for global public health. One possible strategy to deal with the problem of resistant bacteria is to understand the dynamics of adaptive evolution under antibiotics and then develop methods to suppress such adaptive evolution. For this purpose, we performed experimental evolution of *Escherichia coli* under various antibiotics and obtained resistant strains. The phenotypic changes in these resistant strains were quantified by transcriptome analysis, and the genomic changes were analyzed using next-generation sequencers. The results demonstrated that the resistance could be quantitatively predicted by changes in the expression of a small number of genes. Several candidate mutations contributing to the resistance were identified, while phenotype-genotype mapping was suggested to be complex and included various mutations that caused similar phenotypic changes. We also found that combinatorial use of appropriate pairs of antibiotics can suppress the emergence of resistant strains. In the presentation, I discussed how the integration of multi-omics data in experimentally obtained resistant strains enables us to develop methods to suppress the adaptive evolution of antibiotic resistance.

Key words——antibiotic resistance; *Escherichia coli*; laboratory evolution

はじめに

抗生物質が効かない耐性菌、特に複数の抗生物質への耐性を持つ多剤耐性菌の出現が世界的な問題となっている。^{1,2)} そうした薬剤耐性を持つ病原菌の出現を抑制するためには、その進化のプロセスを理解することが重要となる。一方で、耐性獲得の進化プロセスは、表現型と遺伝子型の変化が絡み合う複雑なダイナミクスを持ち、その全貌が理解されているとは言い難い。そこで本研究では、様々な抗生物質を添加した環境下において大腸菌の進化実験を行い、その耐性進化のプロセスを解析した。³⁾ 以下、そこでの表現型と遺伝子型の解析から見えてきた、薬剤耐性の進化プロセスが持つ性質を紹介する。

1. 抗生物質添加環境下での大腸菌進化実験

本研究では、様々な作用機序を持つ 10 種類の抗生物質をそれぞれ添加した環境下において、大腸菌 MDS42 株の植え継ぎ培養を行った。この培養では、薬剤濃度を变化させた環境に等量の細胞を植菌し、増殖が確認できた薬剤濃度の最も高い環境から、次の培養への植え継ぎを行っている。90 日間の植え継ぎ培養を 4 つの独立培養系列で行ったところ、最小阻害濃度 (MIC) の有意な上昇が観察され、それらの薬剤への耐性株の取得に成功した (Fig. 1 に例を示す)。

これらの耐性株において生じた表現型の変化を解析するために、それぞれの耐性株について、1 つの薬剤に対する耐性獲得が、他の様々な薬剤に対する耐性・感受性をどのように変化させるかを定量した。Figure 2 はエノキサシン (enoxacin; ENX) の 4 つの耐性株についての解析例を示しており、ENX 耐性株は同じ作用機序を持つ DNA 複製阻害剤や、細胞壁の合成阻害剤に対して耐性を示すが、アミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤については親株

^a理化学研究所生命システム研究センター (〒565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-3), ^b東京大学生物普遍性研究機構 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)
e-mail: chikara.furusawa@riken.jp

本総説は、日本薬学会第 136 年会シンポジウム S58 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. Laboratory Evolution of Antibiotic Resistance

The time courses of the increase in MIC for (a) enoxacin (ENX) and (b) cefixime (CFIX) in 90 d experimental evolution, respectively.

Fig. 2. Changes in MICs for Various Antibiotics in ENX Resistant Strains

The radial axis depicts the log₂-transformed relative MIC to the parent strain. The double circle in the center indicates MICs of the parent strain, and relative MICs of 4 parallel-evolved ENX resistant strains are plotted. Abbreviations: Cefotaxime, CTX; Cefoperazone, CPZ; Ceftazidime, CAZ; Cephalexin, CEX; Cefixime, CFIX; Streptomycin, SM; Kanamycin, KM; Amikacin, AMK; Gentamicin, GM; Neomycin, NM; Tetracycline, TC; Doxycycline, DOXY; Minocycline, MINO; Chloramphenicol, CP; Azithromycin, AZM; Trimethoprim, TP; Rifampicin, RFP; Nalidixic acid, NA; Norfloxacin, NFLX; Ofloxacin, OFLX; Levofloxacin, LVFX; Enoxacin, ENX; Ciprofloxacin, CPF; Lomefloxacin, LFLX; Gatifloxacin, GFLX.

よりも感受性を示すことがわかる。こうした解析から、多くの耐性株において、1つの薬剤への耐性獲得が、他の薬剤に対する耐性・感受性を大きく変化させることが見い出された。興味深いことに、いくつかの薬剤ペアについては、薬剤Aの耐性株が薬剤Bに対して親株よりも感受性となり、またその

逆も成り立つというトレードオフの関係にあることが見い出された。これらのトレードオフの関係にある薬剤ペア（例えばクロラムフェニコールとアミノグリコシド系タンパク質合成阻害剤）を同時に添加した環境下での進化実験を行ったところ、両者への耐性獲得が阻害されることが確認された。この結果は、適切な薬剤の組み合わせによって、耐性獲得の進化過程がコントロールされ得ることを示唆している。⁴⁾

2. 遺伝子発現プロファイルによる耐性予測

この耐性獲得のメカニズムを理解するために、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、それぞれの耐性株において、様々な遺伝子の発現量の変化がみられたが、その数の多さから、発現量変化と耐性獲得の関係を明らかにするのは容易ではなかった。そこで、どのような発現量変化が耐性獲得に寄与するかを見い出すことを目的として、以下の線形モデルを用い、耐性を遺伝子発現量によって予測することを試みた。

古澤 カ

東京都出身。2000年東京大学総合文化研究科・広域科学専攻にて博士号取得。理化学研究所・基礎科学特別研究員、大阪大学大学院情報科学研究科・准教授を経て2011年4月より理化学研究所・チームリーダー。また2016年5月より、東京大学理学研究科・教授（クロスアポイントメントによる兼任）。専門は生物物理学。

$$MIC_j^k = \sum_{i=1}^N \alpha_i^k X_{ij} + \beta^k$$

ここで、 MIC_j^k は対数変換した k 番目の薬剤に対する j 番目の耐性株の最小阻害濃度、 X_{ij} は i 番目の遺伝子、 j 番目の耐性株の対数変換した遺伝子発現量、 N は解析に用いた遺伝子数、そして α_i^k と β^k はフィッティングパラメータである。むろん、大腸菌の全遺伝子をこのフィッティングに用いると、パラメータ数が多すぎるオーバーフィッティングの状態になり、定量的な予測はできなくなる。そこで、クロスバリデーションと遺伝的アルゴリズムを適切に組み合わせることにより、遺伝子発現量から耐性の変化を予測することを試みたところ、7-8 個の遺伝子の発現量を組み合わせた場合が最も高い予測力を持ち、それによって様々な抗生物質への耐性能を高い精度で予測可能であることが示された (Fig. 3).³⁾ この手法によって、どのような発現状態の変化が耐性能の獲得に寄与しているかを定量的に評価することが可能となった。例えば、 β ラクタム系の細胞壁合成阻害剤への耐性には、*ompF* の発現低下が大きく寄与し、またテトラサイクリン系の薬剤やクロラムフェニコールへの耐性には *acrAB* の発現上昇の寄与が大きかった。また、この解析の結果は、耐性能と発現量の変化の相関に基づいたものであり、直接的に因果関係には対応しない。ただし、この解析によって耐性能変化に寄与していると予測された遺伝子を破壊したところ、上の線形モデルで予測されたものに近い耐性変化が見い出され、この解析によってある程度は因果関係の推定までができることが示唆された。

3. 薬剤耐性能におけるトレードオフの出現機構

前節の線形モデルによる解析は、耐性能の獲得に寄与する細胞状態の変化を抽出することを可能としている。その解析に基づき、上述のアミノグリコシド系の薬剤とクロラムフェニコールなどの間にみられる耐性能のトレードオフについて、その出現機構を考察した。アミノグリコシド系薬剤（アミカシン、ネオマイシン）の耐性株では、電子伝達系に関与する遺伝子の発現量が大きく減少をしていた。これは、アミノグリコシドの細胞内への取り入れが、細胞内外のプロトン駆動力に依存することに関係をしていると予想される。⁵⁾ つまり、アミノグリコシド耐性株では、電子伝達系によるプロトンの汲み出

Fig. 3. Prediction of Antibiotic Resistance Using Transcriptomic Data

Comparisons between observed and predicted MICs for 25 antibiotics were calculated by fitting using the following 8 genes: *acrB*, *ompF*, *cyoC*, *pps*, *tsx*, *oppA*, *folA*, and *pntB*. Only test data not used for the fitting are plotted. The error bars in the y-axis were obtained by predicted MICs calculated from 10000 different sets of test data and training data. See for details.³⁾

しが抑制されることにより、耐性能を獲得している。一方で、クロラムフェニコールやテトラサイクリン系の薬剤への耐性株では、多剤排出ポンプである *acrAB* の発現量が上昇しており、その耐性能の獲得に寄与していると考えられている。ここで重要なことは、*acrAB* はプロトンのアンチポーターであり、ゆえにその活性を維持するためには、電子伝達系によるプロトンの細胞外への汲み出しが重要となる。この関係から、電子伝達系の活性が落ちているアミノグリコシドの耐性株では、*acrAB* の活性が落ちることになり、結果としてクロラムフェニコールなどに対して感受性となってしまふ。逆に、*acrAB* の発現量が上昇し、そこで多くのプロトンが細胞内へ流入する状況においては、細胞内外のプロトンフラックスのバランスを維持するため、電子伝達系によるプロトン汲み出しのフラックスが上昇することが予想され、結果としてアミノグリコシドに対して感受性となる。こうした細胞内外のプロトンフラックスという1つの因子により、薬剤耐性の間のトレードオフが出現することが強く示唆された。

4. 超並列シーケンサによる変異解析

少数の遺伝子の発現量から抗生物質への耐性予測が成功したことは、ゲノム、タンパク質、代謝反応といった膨大な要素に係わる抗生物質耐性の獲得について、比較的少数の要素（自由度）によって記述できることを意味している。その変化を引き起こし

た要因をさらに調べるために、得られた耐性株のゲノム配列がどのように変化しているかを超並列シーケンサを用いて解析したところ、それぞれの耐性株で数個から十数個程度の突然変異が同定された。³⁾ 同じ作用機序を持つ薬剤への耐性株は、類似した変異を持つ例が多く観察され、例えば *acrAB* や *marR* への変異は様々な耐性株において見い出された。

一方で、遺伝子発現量とゲノム変異の対応を解析したところ、類似した発現量変化が起こっている耐性株の間で、かならずしも類似した変異が生じているわけではないことが見い出された。この結果から、様々な変異が似通った遺伝子発現量の変化を引き起こし、それが抗生物質耐性の獲得につながっていることが示唆された。これらの結果は、遺伝子発現量や薬剤耐性などの表現型の変化は少数の自由度に強く拘束をされているが、一方で遺伝子型変化への拘束は相対的に弱いことを示唆している。

5. ラボオートメーションによる進化実験システム

進化実験の実施は、しばしば実験者に大きな負担をかける。こうした実験者への負担を回避し、複数環境・複数系列の進化実験を系統的に行うため、全自動の進化実験システムを構築した (Fig. 4)。⁶⁾ クリーンブース内に設置された自動分注ロボットにインキュベーターとマイクロプレートリーダーが接続されており、計算機によって制御される。例えば、一定時間間隔で吸光度により細胞濃度を測定し、適当な植え継ぎ量を計算することによって、対数増殖期を保った植え継ぎ培養を全自動で行うことができる。インキュベーターでは最大で 44 枚のマイクロウェルプレートが培養でき、384-well プレートを用いることによって、16000 列程度の培養を並行に (クロスコンタミネーションなしで) 維持することが可能となっている。このシステムを用いることにより、様々な抗生物質やストレス環境下でのハイスループット進化実験が現在進行中である。

6. 今後の展望

超並列シーケンサや培養自動化などハイスルー

Fig. 4. The Automated Culture System for Laboratory Evolution

A, Microplate reader, B, Pipetting arm, C, Manipulator arm, D, Incubator, E, Microplate hotel.

プットの解析技術の興隆は、適応・進化プロセスにおける表現型と遺伝子型の対応について、詳細な定量データの取得を可能としている。こうした解析から、抗生物質の耐性がどのように獲得され、その進化プロセスをどのように抑制することが可能か、今後明らかになっていくと期待される。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Levy S. B., Marshall B., *Nat. Med.*, **10**, S122–S129 (2004).
- 2) Walsh C., *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**, 65–70 (2003).
- 3) Suzuki S., Horinouchi T., Furusawa C., *Nat. Commun.*, **5**, 5792 (2014).
- 4) Suzuki S., Horinouchi T., Furusawa C., *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 467–469 (2015).
- 5) Au D. C., Gennis R. B., *J. Bacteriol.*, **169**, 3237–3242 (1987).
- 6) Horinouchi T., Minamono T., Suzuki S., Shimizu H., Furusawa C., *J. Lab. Autom.*, **19**, 478–482 (2014).