

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290071

研究課題名(和文) 進化実験を用いた抗生物質耐性の進化ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Analysis of antibiotic resistance evolution by laboratory evolution

研究代表者

古澤 力 (Furusawa, Chikara)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：00372631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年大きな問題となっている抗生物質耐性菌の出現を抑制するためには、その進化ダイナミクスを理解し、制御する必要がある。そこで本研究では、複数の抗生物質を同時に添加した環境下での大腸菌の進化実験を行い、その進化ダイナミクスを解析した。結果として、耐性進化が抑制される組み合わせや、逆に促進される組み合わせが存在することが見出された。また、酸・アルカリ・界面活性剤などさまざまなストレス環境下での大腸菌進化実験を行い、そうした薬剤耐性進化の抑制や促進を引き起こし得るストレス環境のスクリーニングを行い、その候補の同定に成功した。こうした結果は、抗生物質耐性進化をコントロールするための基盤になる。

研究成果の概要(英文)：The emergence of multidrug-resistant bacteria is a growing concern for global public health. To suppress the emergence of antibiotic resistant bacteria, it is important to understand its evolutionary dynamics. In this study, we performed laboratory evolution of *Escherichia coli* under addition of two antibiotics and analyzed its evolutionary dynamics. As a result, we identified drug combinations by which resistance acquisition was suppressed and accelerated. In addition, to screen stress environment which can cause suppression or acceleration of drug-resistant evolution, we performed laboratory evolution of *E. coli* under various stress conditions, including an addition of acid, alkali, and so forth. As results, we successfully identified some candidate for the suppression of drug resistance evolution. These results provide the basis for controlling antibiotic resistance evolution.

研究分野：進化生物学

キーワード：進化実験 抗生物質耐性 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

近年、抗生物質が効かない耐性菌の出現が大きな問題となっている。新たに開発した抗生物質であっても、それらの投与を続けることにより、耐性を獲得した菌が出現し、健康被害を引き起こす感染をもたらしてしまう。この耐性菌の出現プロセスは適応進化のダイナミクスに他ならず、つまりは耐性菌の出現を抑制するためには、その進化のダイナミクスを制御する必要がある。適応度地形を何らかの環境摂動によって変形させ、高い適応度 (= 耐性) を持つ表現型への遷移を抑制することが重要となるが、その抑制のための合理的手法が開発されているとは言い難い。医療現場でしばしば行われる、複数の薬剤添加による耐性株出現の抑制は、この適応度地形を変化させることに対応する。しかし、あくまでも経験的な投与として行われており、それら複数薬剤の添加がどのように耐性能の進化ダイナミクスを変化させるか、その機構の多くは明らかにはなっていない。

そこで本研究では、抗生物質を添加した環境での進化実験と、超並列シーケンサなどによる大規模解析を統合することにより、進化ダイナミクスにおける表現型・遺伝子型変化を高精度で解析し、その進化ダイナミクスがどのように制御可能かを検証する。特に、複数の環境摂動を付与した場合の進化ダイナミクスに注目し、それら摂動によってどのように進化の軌跡が影響を受けるか、そのメカニズムを解析する。それらのデータを統合することによって、適切な環境摂動によって抗生物質耐性の進化ダイナミクスを制御する手法を開発し、また新規抗生物質開発のための基礎情報の提供を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、抗生物質を添加した環境での進化実験と、超並列シーケンサなどによる大規模解析を統合することにより、進化ダイナミクスにおける表現型・遺伝子型変化を高精度で解析し、その進化ダイナミクスがどのように制御可能かを検証する。特に、複数の環境摂動を付与した場合の進化ダイナミクスに注目し、それら摂動によってどのように進化の軌跡が影響を受けるか、そのメカニズムを解析する。それらのデータを統合することによって、適切な環境摂動によって抗生物質耐性の進化ダイナミクスを制御する手法を開発し、また新規抗生物質開発のための基礎を構築する。

3. 研究の方法

研究代表者のグループでは先行研究として、10種類の抗生物質をそれぞれ添加した環境下での大腸菌の進化実験を行い、薬剤耐性株を取得している。また、それら薬剤耐性株について、次世代シーケンサを用いたゲノム変異の同定している (Suzuki et al., Nature Comm. 2014)。本研究では、これら耐性株の

データを基盤として、その進化ダイナミクスの性質を理解し、制御をするために以下の解析を行った。

複数の薬剤を同時添加した環境下での進化実験：トレードオフの関係にある薬剤ペアなどを含んだ複数の組み合わせについて、2種類の薬剤を同時添加した環境下での進化実験を行い、進化ダイナミクスが単独添加の場合の単純な足し合わせで説明できるか、何らかの非加法性が見出されるかを解析する。

新規の環境摂動による薬剤耐性進化の制御：これまでの研究で見出されてきた薬剤耐性におけるトレードオフの関係は、耐性菌出現の抑制に重要な役割を果たすと期待できる。そこで代謝反応の阻害剤など様々な摂動と抗生物質を同時添加した環境下で進化実験を行い、耐性能の進化ダイナミクスに影響を与える環境摂動をスクリーニングし、そうした環境摂動による進化ダイナミクスの制御を試みる。

4. 研究成果

複数の薬剤を同時添加した環境下での進化実験

研究代表者のグループによる抗生物質耐性進化に関する先行研究において、アミノグリコシド系のタンパク質合成阻害剤への耐性株は、異なるタイプのタンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコールなどへの耐性能が親株よりも低くなり、その逆も成り立つという耐性能の間のトレードオフが見出されている。この結果などを背景として、複数の抗生物質を同時に添加した場合の耐性進化ダイナミクスがどのような性質を持つかが興味を持たれていた。

そこで本研究では、図1に示すように96ウェルプレートにおいて2種類の抗生物質の濃度をそれぞれ変化させた環境において大腸菌の進化実験を行い、その耐性進化ダイナミクスが単独の薬剤を添加した場合とどのような差異があるかを解析した。この実験では、植菌の24時間後に細胞増殖が確認できたウェルのうち、2つの薬剤の対数濃度の和が最大となったウェルから菌体を回収し、再び同じ2種類の薬剤を添加したプレートへ植菌する。この植え継ぎ操作を繰り返すことにより、2種類の薬剤に同時に耐性を持つ方向

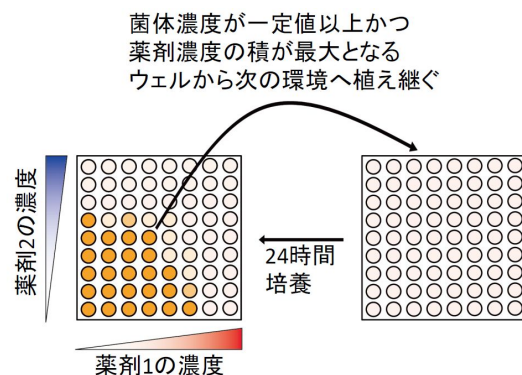


図1: 実験手法の模式図

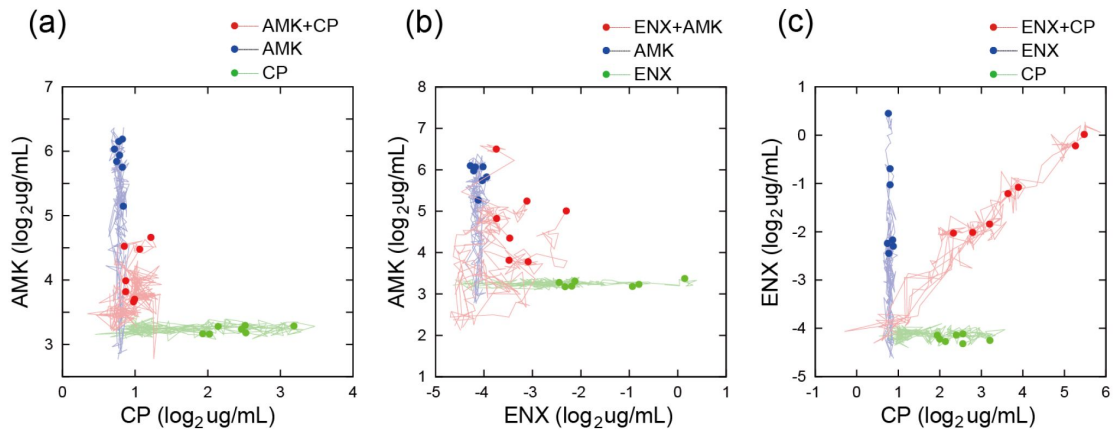


図2: 2種類の抗生物質を添加した環境での大腸菌進化実験。アミカシン (AMK)、クロラムフェニコール (CP)、エノキサシン (ENX) の組み合わせにおいて、図1で示す2次元の濃度勾配を形成した環境での進化実験を行い、植え継いだウェルの位置をプロットしている。また、単独の抗生物質を添加した進化実験の結果もプロットしている。AMK+CPの添加により、単独添加の場合と比較して耐性獲得が抑制され、ENX+CPの添加の場合、CPへの耐性獲得が単独添加の場合と比較して促進される。詳細は文献⑨を参照。

へ選択圧をかけることが可能となり、その耐性能を2種類の抗生物質に対する最小阻害濃度 (MIC) として評価することが出来る。本研究では、アミノグリコシド系タンパク質合成阻害剤であるアミカシン (AMK)、タンパク質合成阻害剤であるクロラムフェニコール (CP) そして DNA ジャイレース阻害剤であるエノキサシン (ENX) の3種類の抗生物質を用い、その3通りの組み合わせで図1に示す2次元で濃度勾配を構成した環境での進化実験を行うとともに、それぞれを単独で添加した場合の進化実験も対照実験として行った (Suzuki et al. BMC Genomics 2017/業績欄雑誌論文)。

図2に2種類の抗生物質を添加した環境での進化実験結果を示す。図では、2種類の薬剤に対するMICが、29日間の植え継ぎ培養でどのような軌跡を描いたかをプロットしている。また、対照実験として行った、それぞれの抗生物質を単独添加した場合のMICを上書きしている。結果として、耐性能がトレードオフの関係にあるAMKとCPを同時に添加した進化実験では、耐性能 (=MIC) の上昇が抑制されることが見出された。これは、AMKへの耐性を獲得した株はCPへ感受性となり、その逆も成り立つために、両方への耐性能を同時に上昇させることが出来ないことに起因すると考えられる。この結果は、耐性能がトレードオフの関係にあるような適切な組み合わせの薬剤を同時に添加することにより、耐性進化を抑制することが可能であることを示している。

この研究において見出されたもう一つの興味深い結果は、ENXとCPを同時に添加した進化実験において、CPへの耐性獲得が単独進化の場合と比較して有意に促進された点である。この促進のメカニズムを明らかにするために、超並列シーケンサ Illumina Miseq を用いて得られた耐性株のゲノム変異解析を行った。結果として、ENXとCPを同時に添加した進化実験で得られた耐性株では、単独添加の場合と比較して固定された変異の

数が有意に多いことが示された。また、同定された変異を親株のゲノムに導入することにより、変異間の相互作用 (エピスタシス) を解析したところ、それぞれの変異は耐性能に対して相加的に作用し、有意なエピスタシスは観察されなかった。これらの結果は、DNA ジャイレースの阻害剤であるENXを添加することにより、突然変異率が上昇し、その結果としてCPへの進化速度が上昇したことを示唆している。

新規の環境摂動による薬剤耐性進化の制御:

耐性能がトレードオフの関係を持つ複数の抗生物質や環境ストレスの組み合わせを系統的に探索するために、抗生物質に加えて酸・アルカリ・界面活性剤など合計で96種類のストレス環境において大腸菌の進化実験を行い、それぞれの環境に対する耐性株が、他のストレス環境に対する耐性能をどのように変化させるかを定量した。このような大規模な進化実験を行うために、我々のグループで開発したラボオートメーションによる全自動の進化実験システム (図3) を用いた。このシステムは、クリーンブース内に設置されたオートメーションシステムと、それに接続されたマイクロプレートリーダーとインキュベータから構成され、384ウェルプレートを用いることで、合計で16,000程度の独立培養系列を全自動で維持することが出来る。このシステムを用いて、約30日間の植え継ぎ



図3: ラボオートメーションを用いた全自動進化実験システムの外観。

培養による進化実験をそれぞれの環境について4つの独立培養系列で行った。結果として、86種類の環境について耐性能(MIC)の有意な上昇が観察された。

得られた耐性株のそれぞれについて、他のストレス環境に対する耐性能を定量したところ、有意な耐性能の変化がさまざまな組み合わせにおいて見出された。例えば、例えば、DNA複製阻害剤であるノルフロキサシンの耐性株は、ある種のヒドラジド化合物に超感受性を示した。こうしたストレス耐性の間にある関係性を定量的に評価することは、抗生物質耐性の進化を抑制する新たな手法の構築の基盤となる。今後、ゲノム変異解析とトランスクリプトーム解析の結果と統合することにより、上記のような超感受性を生み出すメカニズムの理解と、それに基づく耐性出現抑制が可能になると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

“Suppression of antibiotic resistance acquisition by combined use of antibiotics”, S. Suzuki, T. Horinouchi, *C. Furusawa, Jour. Biosci. Bioeng., 120(4), 467 (2015) doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.02.003 査読有

“Phenotypic convergence in bacterial adaptive evolution to ethanol stress”, T. Horinouchi, S. Suzuki, T. Hirasawa, N. Ono, T. Yomo, H. Shimizu, and *C. Furusawa, BMC Evo. Biol., 15, 180 (2015) doi: 10.1186/s12862-015-0454-6 査読有

“Global relationships in fluctuation and response in adaptive evolution”, *C. Furusawa and K. Kaneko, Jour. Roy. Soc. Interface, 12(109), 20150482 (2015) doi: 10.1098/rsif.2015.0482 査読有

「微生物の適応進化過程の理解とその応用」, 堀之内貴明, 鈴木真吾, 古澤力, 生物工学会誌 93(9), 536-538 (2015) 査読無

“Phenotypic changes associated with the fitness cost in antibiotic resistant Escherichia coli strains”, S. Suzuki, T. Horinouchi, *C. Furusawa, Molecular Biosystems, 12(2), 414-20 (2016) doi: 10.1039/c5mb00590f 査読有

「大腸菌進化実験を用いた遺伝子発現量からの抗生物質耐性メカニズムの解析」, 古澤力, 鈴木真吾, 堀之内貴明, バイオサイエンスとインダストリー, 72(2), 138-140 (2016) 査読無

“Expression profiling of antibiotic resistant bacteria obtained by laboratory evolution”, S. Suzuki, T. Horinouchi, *C. Furusawa, Meth. Mol. Biol., 1520, 263-279 (2017) doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_16 査読有

“Analysis of Drug Resistance Using Experimental Evolution”, *C. Furusawa, Yakugaku Zasshi, 137(4), 373-376 (2017) doi: 10.1248/yakushi.16-00235-1 査読有

“Acceleration and suppression of resistance development by antibiotic combinations”, S. Suzuki, T. Horinouchi, *C. Furusawa, BMC Genomics, 18(1): 328 doi: 10.1186/s12864-017-3718-2 査読有

[学会発表](計19件)

古澤力, 抗生物質を添加した環境での大腸菌進化実験, 第87回日本生化学会大会シンポジウム, 2014/10/16, 国立京都国際会館(京都府京都市)

古澤力, 進化実験から見えてきたもの: 微生物の適応進化過程の理解とその応用, 合成シンポジウム, 2014/11/25, 神戸大学(兵庫県神戸市)

古澤力, 代謝デザインへ向けたシステムバイオロジー, 第105回発酵学懇話会, 2014/8/19, キリンビール(株)神戸工場(兵庫県神戸市)

Chikara Furusawa, Creating stress tolerant bacterial cells by experimental evolution, 5th Asian Symposium on Innovative Bio-production and Biorefinery, 2014/9/10, Tainan(Taiwan)

Chikara Furusawa, Theoretical/experimental analysis of robustness and plasticity in biological systems, 第56回日本植物生理学会年会シンポジウム, 2015/3/16, 東京農業大学(東京都世田谷区)

堀之内貴明, ハイスループット実験室進化とオミックス解析による大腸菌のさまざまなストレスへの耐性機構の解析, 第66回日本生物工学会大会, 2014/9/10, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Chikara Furusawa, Phenotypic Convergence in Experimental Evolution of Antibiotic Resistant Bacteria, 2nd Symposium on Complex Biodynamics Networks,

2015/5/12, 鶴岡市先端研究産業支援センターレクチャーホール(山形県鶴岡市)

古澤力, ゲノム解析の先に見えるもの: 大腸菌進化実験の表現型・遺伝子型解析, NGS現場の会第4回研究会, 2015/7/2, 筑波国際会議場(茨城県つくば市)

Chikara Furusawa, Toward Understanding of Adaptive Evolution: Computational Analysis and Experimental Evolution, QBIC Symposium: High-dimensional data for the design principles of life, 2015/8/24, 理化学研究所生命システム研究センター(大阪府吹田市)

古澤力, 大自由度ダイナミクスから「生きている状態」の記述へ, 第53回日本生物物理学会年会, 2015/9/14, 金沢大学

角間キャンパス(石川県金沢市)

堀之内貴明, ハイスループット実験室進化とオミックス解析による大腸菌の適応進化の解析, 生命情報科学若手の会第7回研究会, 2015/10/2, 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス(山形県鶴岡市)

堀之内貴明, 全自動実験室進化による様々な化合物ストレスに対する耐性大腸菌の創生と耐性化機構の解析, 第67回日本生物工学大会, 2015/10/26, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

古澤力, 大腸菌の進化実験を用いた進化ダイナミクスの解析とその応用, 第67回日本生物工学大会, 2015/10/28, 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

堀之内貴明, 大腸菌進化実験と細胞シミュレーションを用いた適応進化ダイナミクスの解析, 第38回日本分子生物学会年会, 2015/12/2, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

古澤力, 大腸菌進化実験と細胞シミュレーションを用いた適応進化ダイナミクスの解析, 第38回日本分子生物学会年会, 2015/12/2, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Chikara Furusawa, Shingo Suzuki, Takaaki Horinouchi, Prediction of Stress Resistance By Gene Expression Profiles, Metabolic Engineering XI, 2016/6/28, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

Chikara Furusawa, Toward Understanding of Biological Plasticity : Computational Analysis and Experimental Evolution, QBIC Symposium 2016, 2016/9/6, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)

Chikara Furusawa, Analysis of evolutionary constraints and plasticity by laboratory evolution and computational models, Genome Evolution Conference2016, 2016/11/2, Rehovot(Israel)

Chikara Furusawa, Toward Understanding of Adaptive Evolution : High-throughput Laboratory Evolution and Computational Analysis, International Symposium on Universal Biology, 2016/11/28, 東京大学(東京都文京区)

〔図書〕(計2件)

「進化学に残された謎：複数の形質が絡み合う進化プロセスはどのようにして可能か?」, 古澤力, 進化の謎をゲノムで解く, 学研メディカル秀潤社, p. 8-19 (2015)

「適応進化はどのように起こるのか? ~進化実験によるアプローチ~」, 堀之内貴明, 古澤力, 進化の謎をゲノムで解く, 学研メディカル秀潤社, p. 32-39 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/mbd/index.html>

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ubifurusawa/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古澤力 (FURUSAWA, Chikara)

理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号: 00372631

(2)研究分担者

堀之内貴明 (HORINOUCI, Takaaki)

理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 60610988