

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700305

研究課題名(和文) 全自動実験進化システムによる多剤耐性菌の創出と進化プロセスの解析

研究課題名(英文) Establishment of multidrug-resistant bacteria using laboratory automation and analysis of their evolution processes

研究代表者

鈴木 真吾 (Suzuki, Shingo)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：60379154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：複数の抗菌薬に対し耐性(交差耐性)を示す多剤耐性菌の出現および蔓延が大きな社会問題となっている。実験進化的手法を用いて多剤耐性菌の進化プロセスを解析したところ、交差耐性に加え元の株よりも弱くなる超感受性が観察された。本研究では、ゲノム変異解析により超感受性が生じる分子機構を解明するとともに、互いに超感受性を示す抗菌薬を併用することにより顕著にその耐性化を抑制することが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Emergence and spread of bacteria exhibiting resistance to multidrug have become serious problems. Analysis of evolution process of multidrug-resistance using experimental evolution revealed that multidrug-resistant bacteria showed cross-resistance and hypersensitivity to other classes of antibiotics. In this study, whole-genome resequencing of resistant bacteria revealed the molecular mechanism underlying hypersensitivity and combination of two antibiotics showing hypersensitivity to each other could prevent the development of antibiotic resistance.

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：薬剤耐性 多剤耐性 実験進化 大腸菌 進化プロセス トレードオフ 交差耐性 超感受性

## 1. 研究開始当初の背景

作用機序の異なる2種類以上の薬剤に対して耐性(交差耐性)を持つ多剤耐性菌の出現および蔓延が社会問題となっており、多剤耐性菌感染症の治療法および多剤耐性菌を出現させないための方法論等の確立が急務となっている。一般的には、薬剤Aに対する耐性菌が薬剤Bにも耐性を持つことで多剤耐性化すると言われており、原因菌が耐性化しやすい結核などの感染症の治療には、はじめから2種類以上の薬を同時に投与することにより耐性化を防ぐという多剤併用療法が用いられている。しかしながら、抗菌薬の組み合わせによっては、それぞれの薬剤を個別に投与した場合よりも耐性菌が出現しやすいとの報告がなされ、個別の耐性能の積み重ねだけではない、多剤耐性菌への複雑な進化プロセスが存在することが示されている。残念ながら、この複雑な進化プロセスを成立させる機構は未知のままであり、進化学および臨床医学といった基礎・応用の両面からその解明が切望されている。

多剤耐性菌への進化に限らず生物の進化プロセスに関する研究例の多くは、現存する生物種のゲノム配列等を比較することで過去に生じた変化を「推測」してきた。しかしながら、この手法では起源種や進化途中の生物種にアクセスすることができないためデータの不完全性に悩まされることが多い。それに対して、実験室内での長期培養による実験進化的手法を用いて、明確に定義された初期状態からの進化プロセスを追跡するアプローチが存在し、近年、進化生物学を推進する研究手法として注目されている。このような背景から、本研究では臨床現場から得られる薬剤耐性菌にこだわらずに、薬剤耐性能をもたない大腸菌野生株を対象に実験進化的手法を用いることで複数系列の耐性菌を創出し、その進化プロセスを解明するという構成的アプローチを選択した。

## 2. 研究の目的

生物の特徴である安定かつ柔軟な進化プロセスを実現する新たな進化理論を導きだすことを目指し、本研究では、大きな社会問題となっている多剤耐性菌を対象に、その進化プロセス どのような環境で、どのような変化を伴って多剤耐性化したのか を解明することを具体的な目的とした。様々な薬剤投与条件下において多剤耐性菌の実験進化的創出を行い、どのような薬剤投与条件が多剤耐性菌へと進化させやすいのか、また、その進化プロセスの遺伝型解析を行うことで、どのような遺伝子に変異が導入されることによって多剤耐性菌へと進化してしまうのか経時変化を追うこととした。さらにはこれらの結果をもとに、多剤耐性菌の出現を抑制することが可能となる薬剤投与条件の検討およびその原理の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 薬剤耐性大腸菌の実験進化的創出

ゲノム変異解析が容易である大腸菌 MDS42 株を親株とし、細胞壁合成阻害剤、タンパク質合成阻害剤、葉酸合成阻害剤、RNA 合成阻害剤、DNA 複製阻害剤、細胞膜機能阻害剤等の作用機序の異なる 33 種の抗菌薬を用いて実験進化を行った。具体的には、各抗菌薬の濃度を变化させた複数の環境下で大腸菌を培養し、菌体の増殖が確認された最も高い抗菌薬濃度の環境から 24 時間周期で次の環境へ植え継いだ。本研究では、およそ3ヶ月間この植え継ぎ培養を継続し、薬剤耐性大腸菌の実験進化的創出を行った。

### (2) 薬剤耐性大腸菌の交際耐性能および超感受性能の解析

ある抗菌薬に対して耐性能を獲得した薬剤耐性大腸菌が他の抗菌薬に対する交差耐性を示すのか、または逆に親株よりも弱くなってしまふ現象(超感受性)を示すことがあるのか解析するため、実験進化的手法により得られた薬剤耐性大腸菌の他抗菌薬に対する最小増殖阻止濃度(MIC, 対象となる細菌の増殖を抑制できる抗菌薬の最小濃度)を求めることにより、交差耐性能および超感受性能を評価した。具体的には、各抗菌薬の濃度をふった環境にて耐性大腸菌を培養し、増殖しなかった条件の中で最も低い抗菌薬濃度を MIC とした。

### (3) 薬剤耐性大腸菌のゲノム変異解析

得られた薬剤耐性大腸菌のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサとサンガー法を用いてゲノム変異解析を行った。

### (4) 抗菌薬併用条件下における耐性化の抑制

抗菌薬耐性化において互いに超感受性を示すような抗菌薬を同時に添加することで薬剤耐性菌の出現を抑制できるのではないかと考え、そのような抗菌薬を併用した場合、それぞれの抗菌薬を単独にて添加した場合、さらには超感受性とは無関係な抗菌薬を併用した場合、それぞれについて実験進化を行い、耐性化を顕著に抑制できる抗菌薬併用条件の検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 薬剤耐性大腸菌の実験進化的創出

33 種の抗菌薬を用いて実験進化を行ったところ、31 種の抗菌薬について増殖を可能とする濃度の有意な上昇が見られ、薬剤耐性大腸菌の取得に成功した。その結果の一例を図 1 に示す。

### (2) 薬剤耐性大腸菌の交際耐性能および超感受性能の解析

得られた薬剤耐性大腸菌の交際耐性能および超感受性能を定量した。図 2 に一例としてタンパク質合成阻害剤クロラムフェニコール(CP)耐性進化株の耐性プロファイルを示す。CP 耐性進化株は、作用機序の異なる様々な抗菌薬にも交差耐性を示すとともに、

アミノグリコシド系タンパク質合成阻害剤全般には超感受性を示した。興味深いことに、逆にアミノグリコシド系のアミカシン (AMK) 耐性進化株は CP に対して超感受性を示すという耐性間のトレードオフが見いだされた。

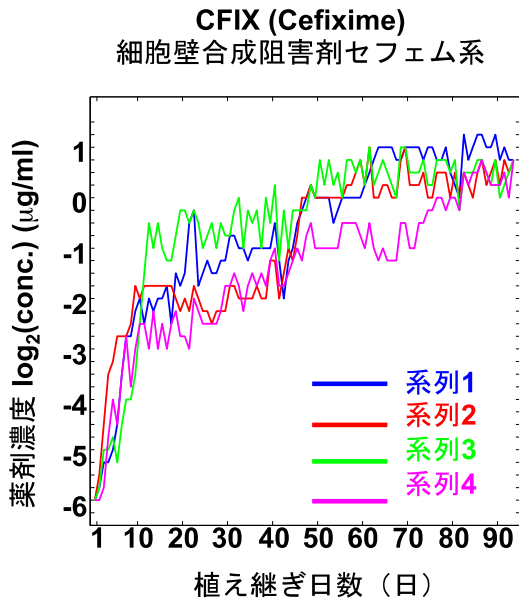


図 1. 抗菌薬添加条件下における進化実験の結果。縦軸は大腸菌が増殖できた最大の薬剤濃度を、横軸は培養日数を示す。各線は進化実験の独立系列の結果。

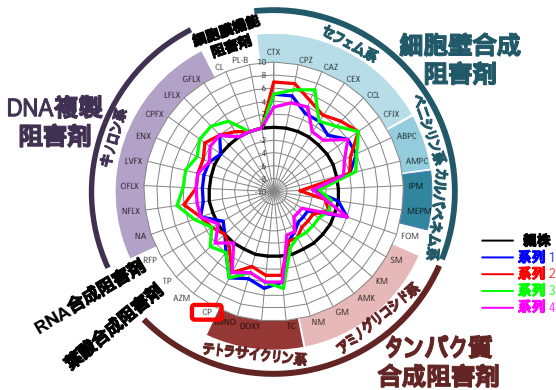


図 2. クロラムフェニコール (CP: タンパク合成阻害剤) 耐性株の交差耐性能と超感受性能。中央の黒い円が親株の薬剤耐性能を示しており、レーダーチャートの軸は親株との耐性能の違いを薬剤の濃度比 (Log2) で示している。ここでは、黒い円より外側が耐性、内側が感受性を表す。CP 耐性株は、アミノグリコシド系全般に対する超感受性を示すという現象が見られる。

### (3) 薬剤耐性大腸菌のゲノム変異解析

11 種類の抗菌薬について得られた薬剤耐性株のゲノム変異解析を次世代シーケンサにて行なったところ、それぞれ 5~20 個程度の塩基置換・挿入・欠損を同定した。耐性に関与することが報告されている多剤排出ポ

ンプや抗菌薬の細胞内への流入経路となり得るポーリン、また DNA 複製阻害剤であるキノロン系のターゲットであるジャイレース等に変異が導入されているとともに、これまで抗菌薬耐性に関与することが報告されていない多数の遺伝子にも変異が導入されていた。いくつかの変異に関して同様の変異を親株に組込むことにより、その薬剤耐性能への寄与を評価しており、未知の耐性機構が多数存在していることが示された。これらの結果は、新たな抗菌薬を開発する上で非常に重要な知見となり得る。

前項に記した薬剤耐性間のトレードオフを生じさせる機構を解明するために、このゲノム変異解析の結果をもとにした変異体の作製および耐性能の定量を行ったところ、多剤排出ポンプと電子伝達系による細胞内のプロトン濃度の緩衝作用の関与が示唆された。そこで、電子伝達系阻害剤を用いてこの仮説を検証したところ、完全ではないがトレードオフが緩和され先の仮説が正しいことが示された。この結果は、未だ不明な点が多い進化のトレードオフに関する分子機構を同定できたという点で進化的生物学の発展に大きく寄与し得る。

### (4) 抗菌薬併用条件下における耐性化の抑制

アミノグリコシド系抗菌薬である AMK に対する耐性化の速度を、トレードオフの関係にある CP を加えた場合、AMK 単独、トレードオフの関係にはない細胞壁合成阻害剤セフィキシム (CFIX) を加えた場合、それぞれの条件にて実験進化を行い比較した。その結果を図 3 に示す。AMK 単独、AMK と CFIX を併用した場合には AMK に対する耐性能が上昇するのに対し、トレードオフの関係にある AMK と CP の併用条件では有意に耐性能の上昇を抑制する結果となった。これらの結果は、臨床における多剤併用療法の改善に有用な知見となる。

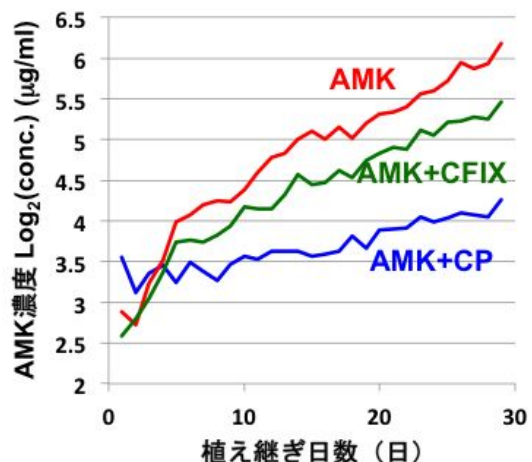


図 3. 抗菌薬併用条件下における耐性能上昇の比較。縦軸は大腸菌が増殖できた最大 AMK 濃度、横軸は培養日数を示す。各線は独立 8 系列の進化実験の平均値。

## 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 1 件)

Takaaki Horinouchi, Teruaki Minamoto, Shingo Suzuki, Hiroshi Shimizu, Chikara Furusawa, Development of an Automated Culture System for Laboratory Evolution, Journal of Laboratory Automation, 査読有, 印刷中, 2014, DOI: 10.1177/2211068214521417

[学会発表](計 11 件)

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, Bacterial evolution of cross-resistance and hypersensitivity to other classes of antibiotics, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 日~2014 年 3 月 28 日, タワーホール船橋

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 異なる系統の抗菌薬に対する交差耐性および超感受性の進化, 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 2014 年 3 月 7 日~2014 年 3 月 9 日, 東京農業大学世田谷キャンパス

堀之内 貴明, 源晃明, 鈴木 真吾, 清水 浩, 古澤 力, 全自動実験室進化システムの構築と大腸菌の多系列・多種ストレス環境下での実験室進化, 生命情報科学若手の会第 5 回研究会, 2014 年 2 月 17 日~2014 年 2 月 19 日, 東京大学検見川セミナーハウス

堀之内 貴明, 源晃明, 鈴木 真吾, 清水 浩, 古澤 力, 全自動実験室進化システムの構築と大腸菌の多系列・多種ストレス環境下での実験室進化, 第 36 回日本分子生物学会年会(MBSJ2013), 2013 年 12 月 3 日~2013 年 12 月 6 日, 神戸国際会議場

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 実験室進化を用いた大腸菌の抗生物質耐性獲得ダイナミクスの解析 Laboratory evolution of antibiotic resistant *Escherichia coli*, 日本生物物理学会第 51 回年会, 2013 年 10 月 28 日~2013 年 10 月 30 日, 国立京都国際会館

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 実験進化的手法による薬剤耐性大腸菌の創出とそのゲノミクス解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日~2013 年 9 月 20 日, 広島国際会議場

堀之内 貴明, 源晃明, 鈴木 真吾, 清水 浩, 古澤 力, ラボオートメーションによる全自動多系列実験室進化システムの構築, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18 日~2013 年 9 月

20 日, 広島国際会議場

鈴木 真吾, 全自動実験進化システムによる多剤耐性菌の創出と進化プロセスの解析. 新学術「ゲノム支援」H25 拡大班会議, 2013 年 8 月 28 日~2013 年 8 月 29 日, 神戸ポートピアホテル

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 薬剤耐性大腸菌の実験進化的創出とゲノミクス解析, 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 2013 年 3 月 8 日~2013 年 3 月 10 日, 長浜バイオ大学

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 人口進化実験による薬剤耐性菌の創出とゲノム変異解析, 「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」平成 24 年度公開シンポジウム, 2012 年 9 月 26 日, 東京大学弥生キャンパス

鈴木 真吾, 堀之内 貴明, 古澤 力, 薬剤耐性大腸菌の実験進化的創出とゲノム変異解析, 日本進化学会第 14 回大会, 2012 年 8 月 21 日~2012 年 8 月 24 日, 首都大学東京南大沢キャンパス

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 真吾 (SUZUKI SHINGO)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号: 60379154