

## 微生物の薬剤耐性進化を大規模データから予測

——適応度地形を用いた微生物進化の予測手法を開発——

### 1. 発表者：

岩澤 諄一郎（東京大学大学院理学系研究科 物理学専攻 博士課程（研究当時））

前田 智也（北海道大学大学院農学研究院 助教）

古澤 力（東京大学大学院理学系研究科 附属生物普遍性研究機構 教授 /  
理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー）

### 2. 発表のポイント：

- ◆ ロボットを用いて自動化された進化実験を行うことで、微生物の薬剤耐性進化に関わる表現型変化の大規模データを取得しました。
- ◆ 得られたデータをもとにして適応度地形を構築し、これまで困難であった微生物進化の予測・制御を可能にする手法を提案しました。
- ◆ 本研究の手法を応用することで、病原菌の薬剤耐性の進化を抑制する手法の開発や、工学・農学分野における有用微生物の育種につながると期待されます。

### 3. 発表概要：

今回、東京大学大学院理学系研究科の岩澤諄一郎大学院生（研究当時）と古澤力教授らの研究チームは、微生物の一種である大腸菌の進化実験（注 1）から得られたデータを用いて、薬剤耐性進化を予測・制御する手法を新しく開発しました。本研究成果は、病原菌の抗生物質耐性進化を抑制する手法開発や、工学・農学分野における有用微生物の育種につながると期待されます。

抗生物質が効かない病原菌である耐性菌（注 2）の出現が世界的な問題となっており、その対策のためには病原菌の進化を予測できる技術の開発が重要となります。しかし、進化に関わる突然変異の種類が膨大なため、遺伝子型にもとづいた進化の予測はこれまで困難でした。本研究では、表現型進化が比較的少数のパターンに拘束されているという解析結果を背景とし、遺伝子型よりも表現型（注 3）の方が進化の予測に必要なデータ量が少なく済むことに着目しました。そこでロボット（注 4）を用いた大腸菌の進化実験を行い、薬剤耐性進化に関わる表現型変化と薬剤への適応度変化を大規模に測定しました。そして、得られた表現型のデータを用いて、表現型と適応度との対応付けのモデル（適応度地形；注 5）を構築しました。また、得られた適応度地形を用いた進化の制御方法を提案しました。

本研究成果はオンライン科学誌「*PLOS Biology*」において 2022 年 12 月 14 日付け（日本時間）で公開されます。

#### 4. 発表内容：

##### 研究の背景

抗生物質が効かない病原菌、特に複数の抗生物質に耐性を持つ病原菌である多剤耐性菌の出現が、世界的な問題となっています。耐性菌は、突然変異などにより薬剤に適応した病原菌が選択される、いわゆるダーウィン進化（注 6）によって出現すると考えられています。したがって、薬剤耐性菌の出現の対策には、病原菌の進化を予測・制御する技術の開発が重要となります。しかし、進化に関わる突然変異のパターンは膨大であることから、進化の予測はこれまで難しいとされてきました。

薬剤耐性進化では、突然変異などにより遺伝子型が変化した病原菌のうち、より薬剤への適応度が高いもの（つまり、薬剤のある環境でより生き残りやすいもの）が選択されることで耐性化が進みます。したがって突然変異によって変化する遺伝子型とその遺伝子型における適応度を網羅的に調べることができれば、進化の過程でどのような遺伝子型の微生物が選択されやすいかを予測することが可能になります。このような発想から生まれたのが「適応度地形」です（図 1C）。一般に適応度地形では、病原菌の遺伝子型を座標として、各座標での高度を適応度として定義します。したがって高度の高い場所は適応度の高い状態に対応し、進化の過程でこういった高い山に対応した状態が選択されると考えられます。つまり、適応度地形がわかれば進化によってどのような状態が現れるかを予測できることとなります。

適応度地形はこれまで理論的にも実験的にも調べられてきました。特に微生物の薬剤耐性能の進化については、耐性に関与する一つの遺伝子配列にさまざまな変異を加え、各変異体の適応度を調べることによって遺伝子型を座標とした適応度地形を推定する研究がこれまで行われてきました。こうして推定された適応度地形は、着目した遺伝子においてどのような変異が進化の過程で入りやすいかの予測をすることができます。しかし一方で、病原菌の耐性進化では多くの遺伝子に変異が入ることが知られており、それら複数の遺伝子における変異のパターンを網羅的に調べることは現在の実験技術では困難です。そのため、単一の遺伝子における適応度地形は推定できても、複数の遺伝子が複雑に関わりあう耐性進化というプロセスを予測する適応度地形を調べるために十分なデータを取得することが困難でした。

##### 研究内容

これまでの研究によって、突然変異による遺伝子型の変化パターンの膨大さに比べて、進化における表現型の変化パターンは比較的少ないことがわかっていました（表現型変化の低次元性）。したがって、遺伝子型をもとにした適応度地形の推定はデータ取得が難しくても、表現型をもとにした適応度地形であれば十分にデータが取得可能と考え、本研究では進化における表現型の変化に注目しました。

まず進化実験と呼ばれる手法を用いて、3種の抗生物質をそれぞれ添加した環境で、微生物の一種である大腸菌を一ヶ月程度（およそ 300 世代）植え継ぎ培養し、耐性進化の過程を実験室で再現させました。また、進化に沿った表現型の変化を知るために、添加した薬剤を含め 8 種類の薬剤への耐性（表現型の一種）（注 7）の変化を同時に測りました。従来の進化実験では、これだけの数の薬剤での表現型測定は実験の手間により困難でしたが、本研究ではラボオートメーションを応用した進化実験ロボット（図 1A）を用いて実験をハイスループット化することでこの問題を解決しました。これによって薬剤耐性進化に関わる表現型の変化を大規模に測定

し、それぞれの表現型において薬剤への適応度がどのようになるかを調べることができました。得られた表現型変化を次元圧縮（注8）の手法である主成分分析（注9）を用いて解析し、表現型にもとづいた適応度地形を推定しました（図1B、C）。そして推定された適応度地形が、実験的に得られた進化の表現型変化と薬剤への適応度変化を予測できるだけでなく、進化にともなって起こる遺伝子型の変化とも対応していることを示しました。

適応度地形は各表現型において、次にどの表現型が選択されやすいかの情報を提供するため、適応度地形を用いて進化を予測することができます。本研究ではこの性質を生かし、適応度地形と表現型変化のモニタリングを組み合わせることによる薬剤耐性進化の新しい制御方法を提案しました。この制御方法を用いることで、例えば図2のような順番で抗生物質を添加した環境で大腸菌を進化させることで、表現型状態がサイクルを描くように進化を制御できることがシミュレーションにより示唆されました。

### 今後の展望

今回の実験から得られた大腸菌の適応度地形とその推定手法は、様々な生物種の進化過程を予測・制御するために有用であると考えられます。今後、表現型変化に関するデータをさらに取得して適応度地形の精度を高めることで、病原菌の抗生物質耐性進化を抑制する手法の開発や、工学・農学分野における有用微生物の育種に応用できることが期待できます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業（課題番号：17H06389、19H05626）、JST ERATO 深津共生進化プロジェクト（課題番号：JPMJER1902）、日本学術振興会 特別研究員奨励費（課題番号：JP18J21942）の支援により実施されました。

### 5. 発表雑誌：

雑誌名：*PLOS Biology*

論文タイトル：Analysis of the evolution of resistance to multiple antibiotics enables prediction of the *Escherichia coli* phenotype-based fitness landscape

著者：Junichiro Iwasawa, Tomoya Maeda, Atsushi Shibai, Hazuki Kotani, Masako Kawada, Chikara Furusawa\*

DOI 番号：10.1371/journal.pbio.3001920

### 6. 問い合わせ先：

（研究に関すること）

東京大学大学院理学系研究科 生物普遍性研究機構

教授 古澤 力（ふるさわ ちから）

TEL：03-5841-4512 E-mail：furusawa[at]ubi.s.u-tokyo.ac.jp

（報道に関すること）

東京大学大学院理学系研究科・理学部 広報室

TEL：03-5841-0654 E-mail：media.s[at]gs.mail.u-tokyo.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当

TEL：050-3495-0247 E-mail：ex-press[at]ml.riken.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

(JST事業に関すること)

科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 ICT/ライフイノベーショングループ  
今林 文枝 (いまばやし ふみえ)

TEL : 03-3512-3528 E-mail : eratowww[at]jst.go.jp

## 7. 用語解説 :

### 注 1. 進化実験

微生物の進化実験とは、薬剤を添加した環境で微生物を長期に植え継ぎ、遺伝子への突然変異の蓄積と選択を繰り返すことで、進化の過程を実験室で再現することです。これにより、対象とする微生物のゲノム配列や遺伝子発現量などが、どのような変化を経て耐性を獲得するか詳細に調べることができます。

### 注 2. 耐性菌

抗生物質に耐性を持つ微生物を指します。抗生物質による治療が難しい場合があるため、その出現が医学上の大きな問題となっています。また、新しい抗生物質を開発したとしても、臨床で使っているうちにその抗生物質に対する新しい耐性菌が出現してしまうため、耐性菌の対策を講じにくいという問題があります。

### 注 3. 表現型

生物の持つ遺伝子が発現し、実際の形質として現れた特徴を指します。遺伝子型に対する概念です。

### 注 4. 進化実験ロボット

クリーンブース内に設置された自動分注器と、それに接続されたシェーカーインキュベーター・マイクロプレートリーダーなどから構成されています。コンピュータ制御により、微生物の増殖の定量・植え継ぎ操作・培養の全てを自動で行うことができます。

(参考リンク) YouTube : Fully-automated culture system in Furusawa lab

<https://www.youtube.com/watch?v=4k6qCN7ppsk>

### 注 5. 適応度地形

遺伝子型・表現型といった状態変数を座標として、各座標での高度を適応度として定義されたものが適応度地形です。したがって、高度の高い場所は適応度の高い場所に対応し、進化の過程でこういった高い山に対応した状態が選択されると考えられます。

### 注 6. ダーウィン進化

生物がゲノム配列の変化などによってその性質の多様性を持ち、さらに環境条件に応じて選択が働くことにより、世代を経て性質が変化していく現象のことです。

注 7. High-throughput laboratory evolution reveals evolutionary constraints in *Escherichia coli*. Maeda T, Iwasawa J, Kotani H, Sakata N, Kawada M, Horinouchi T, Sakai A, Tanabe K, Furusawa C. Nat Commun. 2020 Nov 24;11 (1) :5970.

### 注 8. 次元圧縮

多くの次元（変数の数）からなるデータを、それが持つ情報を保ったまま、それよりも少ない次元の情報に落とし込む手法のことです。主成分分析や、ニューラルネットワークを用いるものなどさまざまな手法が提案されています。

### 注 9. 主成分分析

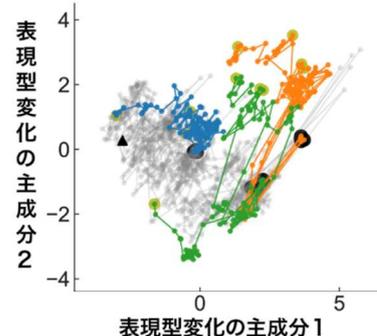
遺伝子発現量データなどの高次元のデータから特徴的な変動を示す成分を取り出す統計的手法です。相関を持つ変数をひとまとめにすることで、互いに相関の無い少数の成分でデータを説明できます。今回のデータでは、その分散を最もよく表す 2 つの成分（主成分）で全体の分散の 60%以上が説明されたため、その 2 つの主成分を軸とする 2 次元平面上での適応度地形を解析しました。

## 8. 添付資料：

### A. 進化実験ロボットを用いて 進化の過程を実験室で再現



### B. 薬剤耐性進化に関わる 表現型変化の大規模測定



### C. 進化を特徴付ける適応度地形の推定

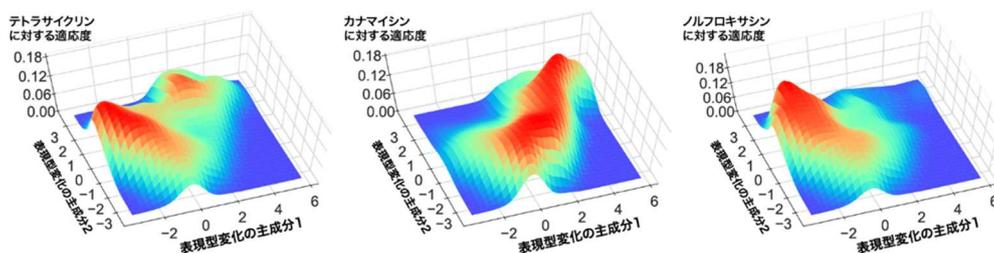


図 1. 本研究で構築した、薬剤耐性進化の適応度地形推定のための実験系。A：進化実験ロボットを用いて実験を自動化することで薬剤耐性進化に関わる表現型の変化を大規模に測定しました。B：結果の一例。2 つの主成分（注 9）を軸とした平面で、テトラサイクリンによって選択をかけた場合にどのような表現型変化が生じるかをプロットしています。C：測定された表現型変化と薬剤適応度をもとに推定された適応度地形。左からテトラサイクリン、カナマイシン、ノルフロキサシン（いずれも抗生物質）に対する適応度地形となっており、底面の座標が表現型に、山の高さが各抗生物質に対する適応度に対応しています。

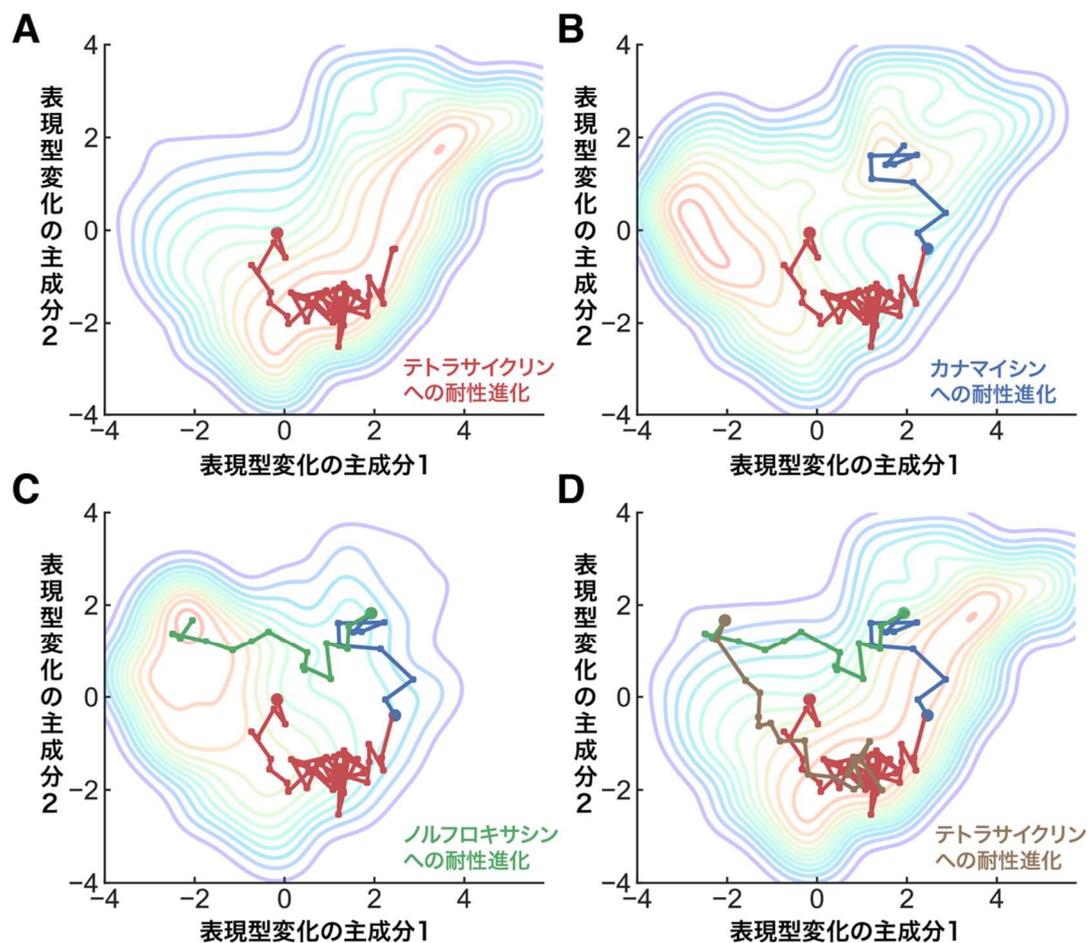


図 2. 適応度地形を用いた進化制御手法の提案 (図はシミュレーション)。図の等高線は本研究で推定された各薬剤での適応度地形をあらわし、折線による軌道は適応度地形によって予測される大腸菌の進化の軌道をあらわしています。適応度地形を用いることによって、テトラサイクリン→カナマイシン→ノルフロキサシン→テトラサイクリンの順番で薬剤を添加することで (図の A→B→C→D) 大腸菌の表現型がサイクルを描くように進化を制御できることが示唆されました。