

# 研究報告書

## 「バクテリアのパーシスタンス現象と原始的な表現型適応」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 若本 祐一

### 1. 研究のねらい

バクテリアなどの微生物のクローン細胞集団に抗生物質などの致死的なストレスを与えると、大多数の細胞が死ぬ一方で、ごく少数の細胞が遺伝子変異を伴わない表現型的な耐性を示しながら長期間生き残ることが一般的に観察されます。この現象は「パーシスタンス」と呼ばれ、70年ほど前に発見されていますが、なぜこのような現象が起きるのか、その解明はほとんど進んでいません。その原因としては、感染症の分野などでよく研究されている、遺伝型の変化を伴う「薬剤耐性菌」とは異なり、耐性の差を遺伝型の差に還元できず、遺伝学的な理解が難しい点が挙げられます。したがって、この現象を理解するためには、同じ遺伝情報をもつクローン細胞集団のなかの、ひとつひとつの細胞の状態差とストレスへの応答の差を調べる必要があります。しかし、このような計測は技術的に難しく、研究は進んでいませんでした。

パーシスタンス現象は、与えるストレスの種類や、対象とするバクテリアの種類に依らず、一般的に起こるという特徴があります。ストレスの作用機序や、生物種ごとのストレス応答のメカニズムは大きく異なりうるにもかかわらず、なぜ一般的にパーシスタンスが起こるのか？この点についてもほとんど理解が進んでいません。

以上の背景を受け本研究では、抗生物質への応答を1細胞レベルで直接計測できる新たな技術を作製し、それを用いて、パーシスタンスを示すクローン集団の内部で実際に何が起きているのか、実験的に明らかにすることを目指しました。また、パーシスタンスが一般的に起こる背景として、細胞レベルで普遍的に観察される遺伝子発現揺らぎに着目し、これが集団の適応度に影響を与えパーシスタンスを引き起こすのに十分な性質を有しているのか、理論と実験の両面から理解することを目指しました。さらに、より一般的な見地から「個々の細胞の状態に揺らぎがある場合に細胞集団の性質はどのように決定されるのか？」という問題を設定し、これを解決するための実験技術の構築と理論モデルの検証もおこないました。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

このさがけ研究では、パーシスタンス現象が一般的に生じる原因を理解するため、クローン細胞群を1細胞レベルで解析可能な実験技術を構築し、それを用いて、細胞の抗生物質に対する応答や細胞内の生存関連因子の発現量変動の特徴を明らかにすることを目指した。また、遺伝子発現ゆらぎにもとづくパーシスタンス現象を「原始的表現型適応モデル」として理論的に表現し、その実験検証もおこなった。さらに、一般的に内部状態にばらつきをもつ細胞群によって構成されるクローン集団において、1細胞の性質と集団の性質をつなぐ関係式の解明を目指した。主要な成果は以下である：

- ①. クローン集団の抗生物質への応答を1細胞レベルで計測できる新たな技術を確立した。

- ②. マイコバクテリアを用いた 1 細胞計測を行い、ドーマント細胞の存在がパーシスタンスを引き起こすとする従来の説を否定する直接証拠を得た。
- ③. マイコバクテリアの INH に対するパーシスタンスでは、抗生物質を活性化する酵素が確率的なパルスにより発現することで、細胞ごとの生存確率の差を生み出していることを示した。これにより、確率的な遺伝子発現によりもたらされるパーシスタンス現象の存在を明らかにした。
- ④. 遺伝子の発現揺らぎ条件を改変した一連の大腸菌細胞株を構築し、これを用いて、発現ゆらぎの時間スケールが短いとパーシスタンスの効率が下がることを明らかにした。この結果は原始的表現型適応モデルの予想と一致しており、その妥当性を支持している。
- ⑤. 細胞の時系列情報や系譜を高精度に取得できる「ダイナミクス・サイトメーター」を構築した。
- ⑥. ダイナミクス・サイトメーターを用いた大腸菌の成長・分裂の解析により、大腸菌の増殖過程は Bellman-Harris 過程でモデル化できることを示した。
- ⑦. 大腸菌のクローン細胞集団は、内部の細胞の平均的成長率よりも大きな成長率で成長できることを示すとともに、1 細胞の長期系列に沿った歴史統計量を世代時間分布から予言できることを実験で示した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「1 細胞計測系の立ち上げ」

クローン集団内の細胞の様子を 1 細胞レベルで連続的に追尾観察することを可能にする、新たなマイクロ流体デバイスを開発した。今回の研究では、扱う細胞種の違いに応じて、2 種類のデバイスを作製した。ひとつは、マイコバクテリアの計測に用いるものであり、図 1AB にその概要を示している。このデバイスでは、平らなカバーガラス上に細胞が置かれ、その上部に半透膜を配置し、さらにその上部から、流路構造をもつ PDMS パッドを装着させる構造になっている。もうひとつのデバイスは、大腸菌の計測に用いるものであり、先のデバイスとの大きな違いは、カバーガラスに幅 3  $\mu\text{m}$ 、長さ 80  $\mu\text{m}$  の細い溝がエッチングにより作られており、上面をカバーする半透膜によって細胞はその内部に閉じ込められる構成となっている点である。マイコバクテリアは厚い細胞壁をもつため、直接半透膜を被せても問題なく成長できるのに対し、大腸菌は、直接半透膜とガラスの間に挟まれると、押しつぶされた異常な形状で成長する。この問題を回避するため、溝を作製した。

これらのデバイスを用いることで、抗生物質投与に対する細胞の応答を 1 細胞レベルで計測することが可能となり、また抗生物質投与下での細胞の挙動や、各種遺伝子発現の情報を取得できることを確認できた(図 1C)。

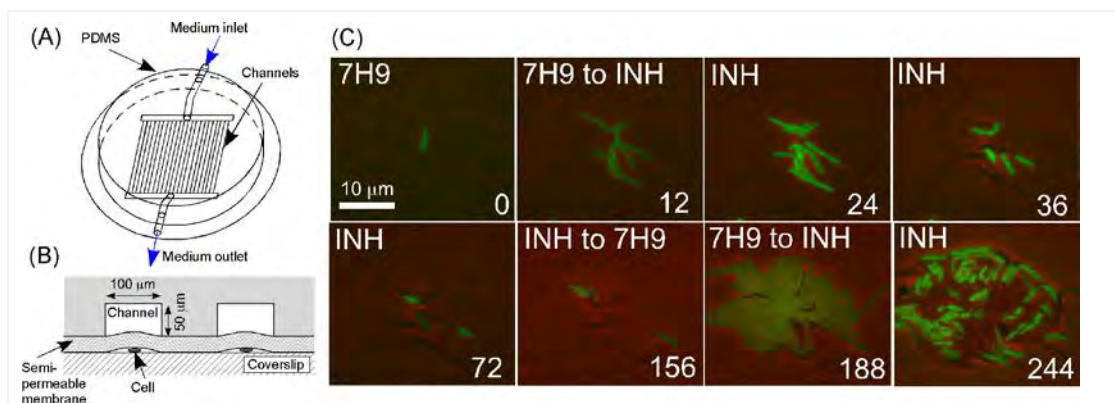


図 1. パーシスタンス現象の1細胞計測。(A) マイコバクテリアの観察に用いるマイクロ流体デバイスの概要図。(B) デバイス内部断面図。(C) パーシスタンス応答のタイムラプス計測。右下の数字は観察開始からの時間(h)。

## 研究テーマ B 「蛍光タンパク質でラベルした生存関連因子を発現する細菌細胞株の構築」

原始的表現型適応モデルを実験検証するためには、実際に細胞の適応度と相関をもつ細胞内因子の発現量と、その細胞の分裂、死亡の関係を直接計測することが必要となる。そのような計測を実現するため、ストレス環境下で細胞の適応度と相関をもつ可能性の高い因子を、蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現する一連の細胞株を作製した。

マイコバクテリアでは、抗生物質イソニアジド(INH)の活性化を触媒する酵素KatGを蛍光タンパク質DsRed2との融合タンパク質として発現する細胞株を、共同研究者のNeeraj Dhar氏が作製した。一方で、大腸菌を用いた実験では、生存関連因子の発現ゆらぎの条件を実験者側から改変し、それぞれのゆらぎ条件でのパーシスタンス応答を調べ、上記モデルを構成的に検証できる細胞株を構築した。具体的には、ストレプトマイシンを不活性化する酵素を蛍光タンパク質Venusとの融合タンパク質として発現する構成を骨格としたもので、その発現に関わる発現誘導プロモーター、リボソーム結合サイト、さらにタンパク質の分解レートに影響を与えるプロテアーゼ認識タグをそれぞれ数種類ずつ用意し、それらを組み合わせることで異なる発現ゆらぎ条件をもつ細胞株ライブラリを作製した。実際、これらの細胞株を用いることで、様々な発現ゆらぎ条件を作り出せることを確認した。特に、プロテアーゼ認識タグを用いることで、ゆらぎの時間スケールを変えられることが確認できた。理論モデルからは、ゆらぎの時間スケールが短い場合には、パーシスタンスの効率が下がることが予想されており、作製した細胞株を用いれば、これを直接検証できる。

## 研究テーマ C 「構築した細胞株を用いた1細胞計測の実行」

上記研究テーマA、Bで作製したデバイスと細胞株を用い、抗生物質ストレスを与えた際のパーシスタンス応答を1細胞レベルで計測した。

従来の研究では、パーシスタンスは、クローン集団内に成長も分裂もほとんどしない「ドーマント細胞」が抗生物質を投与する前から存在し、これが抗生物質投与下で生き残り続けることで生じるのではないかと考えられてきた。しかし、マイコバクテリアを用いた我々の研究の結果、抗生物質INH投与下での生存と、投与直前の成長率のあいだに相関はなく、この従来の説を否定する結果を得た。一方で、INH投与下におけるKatGの発現と、細胞の生死の関係を調べると、KatGは通常ほとんど発現しておらず、各細胞内で確率的にパルス状の発現が起こ

ることを明らかにした。さらに KatG のパルスの発現を起こした細胞の生存確率は、起こさなかった細胞に比べ、有意に低下することも明らかにした。このように細胞内で生存に関連する因子の確率的発現が、クローン集団内の細胞群に、抗生物質に対する感受性の差をもたらしていることを突き止めた。

また、大腸菌細胞株を用いた実験では、構築した一連の細胞株が、野生株に比べストレプトマイシンに対してはるかに高い耐性を示すことを確認した。蛍光量の時間変化を 1 細胞レベルで計測できることも確認し、融合タンパク質が目的の機能を維持していることを明らかにした。さらに、構築した細胞株は典型的なパーシスタンス応答を示し、マイコバクテリアと同様、ドーマント細胞非依存的なパーシスタンスを起こすことが分かった。

#### 研究テーマ D 「1 細胞計測によるタイムラプス画像を解析するソフトウェアの開発」

研究テーマ C の計測でえられるタイムラプス画像を効率的に解析し、細胞の動態や、発現量などの定量情報を取得・解析するためのプログラムを作製した。このプログラムは ImageJ(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)のマクロとして書かれ、ImageJ の各種機能を利用しながら、タイムラプス画像から、細胞の輪郭抽出、サイズ、輝度の計測、さらに異なる時間に撮影された画像間での細胞の対応付けなどをおこない、細胞の系統関係を維持した定量データを提供する。えられたデータは別途作成したデータ解析プログラムにより解析され、下記図2で示した細胞動態の時系列情報などを得ることができる。これらを用いることで、上記研究テーマ C で述べた結果などを取得することができた。

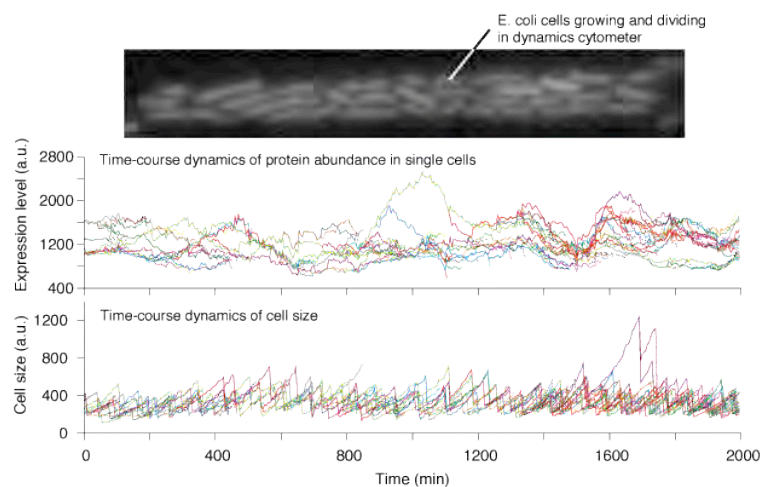


図 2. ダイナミクス・サイトメーターによる細胞動態の長期計測。

#### 研究テーマ E 「えられた結果をもとにした原始的表現型適応モデルの検証・改良」

このさきがけ研究で扱う「原始的表現型適応モデル」では、細胞の適応度と相関をもつ因子の発現ゆらぎの性質がパーシスタンスの効率に影響を与え、特に、発現ゆらぎの時間スケールが短いとパーシスタンスの効率が下がることが予想される。本研究で構築した大腸菌細胞株を用いた研究テーマ C の実験結果から、プロテアーゼ認識タグを結合させ、発現ゆらぎの時間スケールを短くさせた細胞株は、耐性遺伝子の平均発現量が高くても、パーシスタンスの効率が低くなることが明らかになった。また、抗生物質環境下で、耐性遺伝子の集団発現量分布が、元の分布から新たな分布へと緩和する過程が観察されており、これも理論モデルの予想する結果と一致している。現在、各細胞の発現量と、各発現量における生存確率を計測する実験を進めており、この結果から、分布のシフトが説明できるか確認する作業を進めて



いる。この実験は原始的表現型適応モデルのより徹底した検証になると考えられる。

#### 追加研究テーマ「1 細胞系列と細胞集団をつなぐ数学関係式の解明」

このさきがけ研究は、パーシスタンスという表現型適応現象をモデルに、遺伝子発現のゆらぎと集団の適応の関係に着目し立案されたものである。しかしこの研究を進める中で、パーシスタンスという現象だけでなく、より一般的な観点から、細胞の内部状態と適応度に相関があり、内部状態にばらつきが存在する場合、細胞の内因的な性質と集団の性質には差が生じることを理解した。そこで、一般に内部状態にゆらぎをもつ細胞の性質と集団の性質はどのように関係づけられるのかを明らかにしたいという動機がうまれた。以上の背景のもとで、追加テーマを設定し、1 細胞と細胞集団の性質をつなぐ数学関係式を理論・実験の両面から検証する研究をおこなった。

この研究を遂行するために、新たな細胞計測デバイス「ダイナミクス・サイトメーター」を開発し、まず大腸菌の成長・分裂のゆらぎの性質を解析した。その結果、大腸菌の増殖過程は Bellman-Harris 過程と呼ばれる分岐過程モデルできれいに説明できることが分かり、またその帰結として、

- ① 細胞集団は、1 細胞がもつ内因的な成長率よりも大きな成長率で成長できる
- ② 世代時間の分布から、集団の成長率と年齢構成分布を予測できる
- ③ 世代時間の分布から、長時間を定常環境下で増殖する集団内で支配的になる最適細胞系列に沿った年齢構成分布を予測できる。つまり歴史統計量を予測できる。

ことを示した。

また、予期せぬ結果として、異なる環境条件下での世代時間分布の平均と分散には線形関係があることを明らかにした。この線形関係は、各細胞種があらゆる環境中でとれる最大成長率を規定しており、環境条件などの詳細に依存せず細胞の内因的な成長能力の限界を明らかにする処方箋を与えている。この結果は最大成長率など、細胞の普遍的性質を現象論的に明らかにできる重要な可能性を示唆しており、他の生物種でもこの線形関係が成立するのか、今後明らかにすることを計画している。

### 3. 今後の展開

今回の研究で、パーシスタンスはドーマント細胞が生き残ることにより引き起こされるとする従来の仮説は、必ずしも一般的に正しいわけではないことを示した。しかし、大腸菌のある変異株を用いた他の研究では、ドーマント細胞によるパーシスタンス機構を支持する結果も得られている。したがって、ドーマント細胞に依存するパーシスタンス応答と、その他のパーシスタンス応答がどのような条件下で生じるのかを明らかにすることは、重要な課題だと考えられる。ひとつには、追加研究テーマで扱った成長・分裂のゆらぎと、内部の生存関連遺伝子の発現ゆらぎとが密接に相関しており、両者の依存性にしたがって、パーシスタンスの応答モードが変化する可能性も考えられる。実際に、遺伝子の発現ゆらぎの時間スケールを異なる細胞系列ごとに調べると、成長率が大きい細胞系列ほど発現ゆらぎの時間スケールも短くなることが分かっている。これらの解析を今後進め、パーシスタンスを説明する、より一般的なフレームワークの構築に結びつけていきたいと考えている。

今回の研究で、細胞系列の歴史統計量を取得することが技術的に可能になった。実際この研

究で取得した最適細胞系列の年齢構成分布は、各年齢における選択圧の強さの指標になっていることが示される。また他の理論研究により、変動する環境下で、細胞系列にそった分裂頻度の統計を取れば、その環境変動に対し、Stochastic に応答しているか、Responsive に応答しているか区別できることも示唆されている。このように、細胞系列に沿った統計量のもつ生物学的な意義を理解することは、理論的にも重要な課題であり、開発した計測技術を用いた実験と組み合わせ、今後研究を発展させていきたいと考えている。

#### 4. 自己評価

本さがけ研究では、パーシスタンス現象が一般的に生じる背景機構の理解を目指し、特に遺伝子発現ゆらぎの果たす役割を明らかにすることを中心に研究を遂行した。その実験検証に必要となる 1 細胞測定系の確立、構築した測定系用いたマイコバクテリアのパーシスタンス現象の解析、発現ゆらぎ条件を改変した大腸菌細胞株の構築とそれを用いた原始的表現型適応モデルの検証をおこない、従来のパーシスタンスモデルであるドーマント細胞説の反証、細胞内酵素の確率的発現にもとづくパーシスタンスの実証など、当該分野において重要な結果を得ることができたと考えている。生存関連因子の発現ゆらぎの時間スケールを変化させた細胞株を用いて、パーシスタンスの効率を比較した実験では、モデルの予想と一致する結果をえており、理論の妥当性を支持しているが、確定的な結論を得るには、さらに注意深い検証が必要であり、これはまだ今後の課題として残されている。当初予想していなかった結果として、細胞の時系列や系譜を 100 世代以上にわたり計測可能なダイナミクス・サイトメーターを構築でき、さらにそれを用いて、集団と 1 細胞の成長率の差、歴史統計量と世代時間分布の関係などを明らかにできたことは、重要な成果であったと考えている。またこの研究の中で、細胞の長期時系列にそった統計量のもつ生物学的意義を明らかにするという新たな理論的課題を認識することができた。今回のさがけ研究では当初の想定を超えた理論モデルの発展をもたらすことはできなかったが、このような細胞の系譜という観点からパーシスタンス現象を捉えることで、新しい視点の獲得につながるのではないかと期待している。残された課題は、さがけ研究終了後にも引き続き研究を行っていく予定である。

#### 5. 研究総括の見解

微生物のクローン集団が抗生物質などの致死ストレスを与えられても、大多数は死滅するものの極く少数が遺伝子変異を伴わずに原始的表現型適応を示して生き残るパーシスタンス現象に関し、1 細胞レベルで直接抗生物質への応答を計測できる新たな技術を開発して、理論と実験の両面から解明するという難度の高い研究課題に挑戦した。まずマイコバクテリアにおける抗生物質存在下でのパーシスタンス現象について観察を行い、従来のドーマント仮説を否定する結果を得た。さらに、抗生物質活性化酵素の発現にパルス状の揺らぎがあり、パルス発現を起こさない細胞は生存率が高いことを見いだした。これらの観察に基づいてパーシスタンス現象は遺伝子発現の揺らぎに起因するという新しいメカニズムを提唱したことは高く評価される。この成果はサイエンス誌に掲載され、Nature Reviews 誌や一般メディアにも取り上げられて大きな注目を集めた。また、この研究の延長として、100 世代以上に渡る計測が可能な新デバイス「ダイナミクス・サイトメーター」を開発し、光学メーカーや顕微鏡グラス製造メーカーの高い評価を得たため JST から PCT 出願されたことも特筆できる。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Tomita, T., Sugawara, T., Wakamoto, Y. Multitude of morphological dynamics of giant multilamellar vesicles in regulated nonequilibrium environments. Langmuir. 2011, 27(16), 10106-10112.
2. Wakamoto, Y., Grosberg, A. Y., Kussell, E. Optimal lineage principle for age-structured populations. Evolution. 2012. 66(1). 115-134.
3. Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., McKinney, J. D. Dynamic persistence of antibiotic-stressed mycobacteria. Science. 2013. 339(6115). 91-95.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2件

1.

発明者: 若本 祐一、橋本 幹弘

発明の名称: 細胞培養装置、細胞培養方法、および細胞培養観察装置

出願人: 独立行政法人科学技術振興機構

出願日: 2011/7/15

出願番号: 特願 2011-156767

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主な学会発表

1. Wakamoto, Y. Dynamic persistence against lethal antibiotic stress. Aspen Center for Physics 2010 Winter Conference on Biophysics: Populations, Evolution and Physics. Jan. 3-9, 2010, Aspen, CO, USA.

2. Wakamoto, Y. Bacterial persistence based on epigenetically correlated stochastic gene expression. 5<sup>th</sup> International Conference on Analysis of Microbial Cells at the Single Cell Level. Nov. 5-8, 2011, Carry-Le-Rouet, France.

#### プレスリリース

1. バクテリアの抗生物質適応能を高めるパーシスタンス現象の解明進む ～70年信じられた定説を覆す確率的遺伝子発現による適応～. 東京大学、科学技術振興機構.  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130104-2/index.html>