

Perron, G. G., Zasloff, M., Bell, G.: Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide, *Proc. R. Soc. B*, 273, 251-256 (2006).

抗菌ペプチドに対する耐性の実験的出現

要約

多細胞生物の免疫ペプチドの抗菌性を基礎とした新しい種類の抗菌剤は、耐性微生物に対する主たる武器として関心が高まっている。陽イオン性抗菌ペプチドは細菌細胞の基礎的な特徴を利用するので、従来からの抗生物質に比べて、耐性は非常に出にくいと言われてきた。しかし、耐性の進化遺伝学の菌数モデルは、この意見に疑問を投げかけるものであった。私たちは、実験室での連続的な選抜によって、陽イオン性抗菌ペプチドに対する耐性の出現を実験的に示した。この選抜実験では、*Escherichia coli* [大腸菌] と *Pseudomonas fluorescens* [蛍光菌] の 24 系列のうちの 22 系列が、マガイニンの類似物のペキシガナンに対し、この抗菌ペプチドを加えた培地で 600-700 世代繁殖した時、後代にまで遺伝する耐性メカニズムをそれぞれ独自に出現させた。

1. 緒言

商業的に広く使われているすべての抗生物質に対する耐性の出現は、抗細菌化学療法の最近の進歩を無効にしつつある。過去 50 年間では、どの新しい抗生物質についても、使い始めてから 2-3 年のうちに微生物中に耐性が出現した。現行の治療の効率の低減は、多細胞生物の生来の免疫システムの一部である陽イオン性ペプチドに基づく抗菌剤を含む新しい種類の薬の探索へと向かわせた。

陽イオン性抗菌ペプチドは、タンパク質合成の通常の方法でリボソームを使って合成されるので、RAMP (ribosomally synthesized antimicrobial peptides) と呼ばれている。RAMP は遺伝子に書き込まれているポリペプチドで、100 個以下のアミノ酸からなり、リシン残基とアルギニン残基により全体としてプラスの電荷を持つ。細菌細胞への RAMP の選択的毒性は、主として、このペプチドと、細菌の細胞膜の外側にある陰イオン性のリン脂質の頭部との間の最初の静電的な相互作用のためである。RAMP は膜の本来の姿を壊すように働くと一般的には考えられているが、その詳しい働き方はいろいろあり、Yeaman & Yount (2003), Brogden (2005), Lohner & Blondelle (2005) に広くまとめて書いてある。

RAMP 耐性の分子機構は、いくつかの細菌群について明らかになっているが、効果的な耐性を得るのに必要な膜構造の基本的な変化ゆえに、これらは例外的かもしれない (Zasloff 2002)。抗菌ペプチドは、細菌の生存する環境の中に常にありながらも、細菌感染に対して少なくとも 1 億年の間有効であった。そこで私たちは、耐性が短期間で出現することはとても起こりそうにないと推定するかもしれない (Zasloff 2002)。RAMP が非常に多様であること、感染場所により異なる種類のものが存在すること、および働き方が異なることが、自然の細菌集団ちゅうでの耐性の出現を妨げたのかもしれない。しかし、進化生物学者は、特定の RAMP を治療に使うことが、容易に耐性を出現させ

るような特異的で継続的な選抜の源を作り出すことによって、自然の環境を変えるであろうと論じた (Bell & Gouyon 2003)。これは、ヒトの防御ペプチドへの交差耐性の可能性があるから、特に心配な事柄である。

RAMP 耐性は、ある種の細菌で病原性にとって必要な要素であることが明らかにされ、実験室で耐性が構築された。しかし、治療薬に長期にさらされたときの耐性の出現応答について十分な実験的な調査がない。以前の選抜試験は、数世代の短い出来事しか考えていない。従来の抗生物質に対する耐性は、この時間スケールで出現するかもしれないが、いくつかの場所を含む複数の変化による耐性の出現を除外してはいけない。

今回の研究の目的は、RAMP 耐性が継続的な選抜で出現するかどうかを調べることである。私たちは選抜方法をデザインした。そこでは、蛍光菌と大腸菌のクローン系列が、数百世代にわたって、RAMP の濃度をだんだんと増加させた培地で育てられた。私たちの実験には、耐性が染色体上の新規な変異の出現と広がり蓄積を通じてのみ生じるような遺伝子的に均一な系列を用いた。

2. 材料と方法

(a) 生物と個体群の設定

私たちは、グラム陰性細菌である蛍光菌と大腸菌とを、遺伝子的に均一な野生株と変異株のクローン系列を作るために使った。異常に高い変異率をもつ細菌が病気感染者からしばしば分離されていて、これが抗菌剤への適応の速度を高めるかもしれないので、私たちは変異株も使うことにした。Paul Painy (オークランド大学) が、蛍光菌の野生株 SBW25 を提供してくれた。Craig Maclean (マックギル大学) が、遺伝子的に均一な変異株 SBW25 $\Delta muts$ を作った。大腸菌の野生株 PS8, 均一の分離株 REL606, 変異株 PS2350 (*mutL* タイプ) は、P. D. Sniegowski (ペンシルバニア大学) に提供してもらった。両方の菌において、メチル化によるミスマッチ修復機構の欠損は、DNA 複製後の一塩基変異の発生を約 100 倍に増加させることで、高い変異率を与えた。(注: 実験に用いられた蛍光菌の変異株も大腸菌の変異株も、DNA 複製時の間違い (ミスマッチ) の修復にかかわる *mut* 遺伝子の欠損株である)

(b) 抗菌剤

私たちが耐性菌の選抜に用いた薬剤は、陽イオン性抗菌ペプチドのペキシガナン (アミノ酸配列の記述は省略) で、Ge ら(1999a) が記載しているとおりである。ペキシガナンは、アフリカツメガエルから分離された抗菌ペプチドであるマガイニンの類似品で、治療薬として使うために合成で少し変えたものである。保存液は使用前にろ過滅菌した。ペキシガナンは、Ge ら (1999a) の記載に従って合成し精製した。

(c) 選抜試験

私たちは、それぞれの菌について、ペキシガナンの存在下で生育させる 6 つの野生株系列と 6 つの

変異株系列を作った。これを選抜系統と呼ぶ。さらに、私たちは、2つの菌について全実験期間を通じてペキシガナンが存在しない中で生育させる2つの野生株系列と2つの変異株系列を作った。これを対象系統と呼ぶ。培養には MHB 培地を用い、蛍光菌は 28°C で、大腸菌は 37°C で振盪培養を行った。50 μ l の培養液（静止期）を、5 ml MHB 培地に毎日植え継いだ。これは 100 倍希釈、つまり 6-7 世代に当たる。最初の培養液は 25% グリセロールに入れて -80°C で凍らせて保管した。最初は、ペキシガナンが含まれていない初期環境で 20 回植え継いだ。21 回目の植え継ぎで、選抜系統には、Ge ら(1999b)が調べた非阻害濃度である 0.5 μ g/ml のペキシガナンを培地に添加した。その後、ペキシガナンの濃度を 10 回の植え継ぎごとに（その選抜系統で旺盛な増殖が認められたときは、もっと少ない間隔で）2 倍にした。ペキシガナンの濃度を増すごとに、それぞれの培養液の一部を 25% グリセロールに入れて -80°C で凍らせて保管した。実験は 100 回の植え継ぎ（600-700 世代に相当する）まで行った。

私たちは、大腸菌については 200 μ l の接種液を、蛍光菌については 50 μ l の接種液を 150 μ l の MHB 培地で薄めたものを 96 穴のマイクロタイタープレートに入れて、マイクロプレートリーダーを用いて、毎日、各選抜系統の培養液の濁度（OD₆₆₀）を測定した。各穴の測定値をブランクの測定値で補正し、これを菌の生育の測定値とみなした。

(d) 試験管内での感受性試験

私たちは、分離したコロニーを使うのではなくて、培養液を使って、各選抜系統のペキシガナンの最小阻害濃度（MIC: Minimal Inhibitory Concentration）を測定することで、耐性の出現を調べた。その方法は、NCCLS が出版した培養液希釈ガイドラインを少し変更したものである。私たちは、順々に薄めた 12 のペキシガナン濃度で、各選抜系統の生育を測定した。このため、私たちは MHB 培地にペキシガナンを入れた 5ml の液を用意し、各系列の静止期の培養液 50 μ l を接種した。これらの培養液での生育を 24 時間の培養の後に上述の方法で調べた。各培養液の MIC₅₀ は、菌の増殖を 50% またはそれ以下にするペキシガナンの最小濃度とした。

私たちは、20 回植え継ぎの培養液の 32 系列の全てについて、0~512 μ g/ml のペキシガナン濃度で初期 MIC₅₀ 値（選抜前）を測定した。培養液は、まずペキシガナンを加えていない培地で 2 回植え継いだ。最終 MIC₅₀ 値（選抜後）は 0~1024 μ g/ml のペキシガナン濃度で、静止期の培養液で調べた。NCCLS は RAMP に耐性がある分離株の標準出現点を定義していないので、私たちは、対象系統と比べた時に、選抜系統に MIC₅₀ の有意な増加があった時を、耐性の出現を定義した。

(e) 耐性の安定性

出現した耐性の遺伝的性質を確認するため、私たちは、すべての対象系統と選抜系統を冷凍保存から戻し、ペキシガナンを添加していない MHB 培地で 4 回植え継いだ（約 25~30 世代）。次に、ペキシガナンを添加していない培地と、すでに行った測定で明らかになっている耐性の上限と下限に近い濃度でペキシガナンを含んでいる培地とで生育を 2 回ずつ測定した。

(f) 耐性のコスト

選抜への直接的でない応答を調べるため、私たちは蛍光菌の各系統について 2 回ずつ、ペキシガナンを添加していない培地と、最小阻害濃度でペキシガナンを含む培地で、増殖上限濁度、増殖速度、ラグフェーズを測定した。

3. 結果

(a) 耐性の初期のレベル

選抜前の 20 回目の植え継ぎの菌で測定された耐性のレベルは、病院での分離株ですでに報告されているレベルと同じであった。16 系列の蛍光菌の MIC₅₀ は、野生株系列では 2-8 μ g/ml、変異株系列では 16-32 μ g/ml であった。Ge ら (1999b) は、病院での蛍光菌分離株 35 株のペキシガナンの MIC 値は 4-16 μ g/ml と報告している。16 系列の大腸菌の MIC₅₀ は、野生株系列では 32-128 μ g/ml、変異株系列では 16-256 μ g/ml であった。Ge ら (1999a) は、最初の報告では、病院での大腸菌分離株 53 株のペキシガナンの MIC 値は 4-256 以上 μ g/ml としている。2 つ目の報告 (1999b) では、病院での大腸菌分離株 137 株のペキシガナンの MIC 値は 2-64 μ g/ml としている。

選抜系統と対象系統は、蛍光菌の野生株でも変異株でも、大腸菌の野生株でも変異株でも、20 回目の植え継ぎでは、統計的に見て違いのない MIC₅₀ を有していた。

(b) 選抜後の耐性

蛍光菌の選抜系統では、対象系に比べて、高い濃度のペキシガナンで、高度に有意な増殖を示した (表 1)。6 つの野生株の選抜系統は、2 つの野生株の対象系統よりも高い MIC₅₀ を示した。また、6 つの野生株の選抜系統は、2 つの野生株の対象系統よりも高いペキシガナン耐性を示した。大腸菌のすべての選抜系統でも MIC₅₀ が増加した。選抜後では、6 つの野生株の選抜系統は、対象系統よりも高い MIC₅₀ を示した。野生株の 2 つの選抜系統はペキシガナンが 200 μ g/ml 以上では増殖しなかった。私たちは、この 2 つの系統を 160 μ g/ml でさらに 10 回植え継いだがペキシガナン耐性は 200 μ g/ml を超えなかった。6 つの変異株の選抜系統の MIC₅₀ は、対象系統よりも高かった。

(c) 耐性の安定性

RAMP を入れていない培地で 4 回植え継いだ後でも、両菌の全ての選抜系統は、最小阻害濃度において順当に増殖した。一方、すべての対象系統は増殖しなかった。

(d) 耐性のコスト

ペキシガナンに耐性を持った数株の増殖特性を、培地だけの場合と、致死濃度以下のペキシガナンを加えた培地の場合とで調べ、対象株と比較した。ペキシガナン耐性の獲得は、ペキシガナン存在下でも不存在下でも、増殖速度や試験管内で達する菌数濃度を変えることはなかった。しかし、ペキシガ

ナン耐性は、元の株と比較すると、ペキシガナン不存在下ではラグフェーズが長く、ペキシガナン存在下では短かった。

4. 考察

私たちの実験結果は、陽イオン性抗菌ペプチドに対する高いレベルの遺伝的な耐性が、蛍光菌と大腸菌の実験系でくり返し出現することを明白に示している。野生株も変異株も両方ともペキシガナンに耐性を持つようになったことから、私たちは、自然に起こる変異の速度が、その集団内に選抜可能な変化体を生み出すのに十分であると結論付けた。さらに、微生物感染は、5ml の試験管の中の菌数に匹敵する菌数をしばしば含んでいることから、私たちの実験の菌数パラメーターは、相当に現実的であったと考えられる。どの特定の臨床的状況で耐性菌が出現するかどうかは、感染場所の上皮表面近くでどのように微生物が RAMP に接触するかの詳細に依存するかもしれない。にもかかわらず、私たちの実験結果は、一般的な法則として、Bell & Gouyon (2003)が予言したように、細菌集団の処理が、連続的な選抜を通じて細菌集団の中に RAMP への耐性機構を出現させるように誘導できるということを示した。

耐性は実験室では得るのが難しいとした過去の報告 (Zaslouff 2002) と、この実験は矛盾する。しかし、私たちの実験は、以前の研究には欠けていた2つの面を持っている。1つ目は、実験中を通じてペプチドの濃度をゆっくりと上げたことである。このやり方が穏やかに有利な効果をもたらして突然変異の広がりを容易にした。そしてこれが、次に同様の効果の更なる変異で補完され、または大きな効果の変異によって変わられた。大きな効果の1回の変異が稀なときには、高濃度のペプチドでの選抜試験や短時間の実験は、効果的ではなさそうである。2つ目は、実験を100回の植え継ぎにまで延ばしたことである。これが、耐性変異株が出現し広がる時間を許した。無性生殖の一倍体集団の中での固定の初期の頻度を m とした時の、変異一選抜間の平衡から広がる選抜計数を s とすると、有利な方向への変異に必要な時間は、 $-2(\ln m)/s$ である。そして、適応がいくつかの穏やかな効果を持つ変異の積み重ねを要求するところでは、2~3 サイクル続く選別は、その頻度を効果的には高めない。

実験室で抗菌ペプチドへの耐性が容易に出現することは、自然の集団中では出現するにしても稀であろうという見解とは、明らかに一致しない。逆に、これは、細菌群が濃度の上昇する抗菌ペプチドに一貫して接触するならいつでも耐性がすぐに生じると予期できるということを示している。一見したところでは、この結論は、ほとんどの細菌群が実際のところ耐性を持っておらず、低い濃度の抗菌ペプチドで殺されるという所見に一致しないように見える。しかし、細菌が自然で経験する条件は、実験室での選抜試験で経験する条件とは大いに異なる。実験室では、その系統の株は、増殖を制限する特別なストレスに、世代から世代へと常に遭遇する。これは、特異的な適応を生じやすい強力な選抜を生み出すであろう。同様の状況は化学薬剤が治療に使用されたときによく起こる。もっと自然な環境では、1つの系列の株は、世代ごとに変化する変幻極まりないストレスにさらされる。普段、動物にくっついていてる系列でも、各種の宿主で異なった種類の RAMP に遭遇し、1種類の宿主中でも

違う組織ではしばしば違う RAMP に遭遇するであろう。選抜が首尾一貫して特定の方向へ働くことはほとんど起こらず、したがって、特定の適応が生じることは起こりそうにない。同様の理由で、ペニシリンやストレプトマイシンのような従来の抗生物質が最初に使われたときは、細菌は、土壌中でそれらに何百万年もの間さらされてきたにもかかわらず、低いレベルの耐性しか示さなかった。それに、私たちの選抜株は、抗菌剤がない時に、長いラグフェーズがあるという形で、耐性への実質的な負担をしている。

RAMP が非常に多様であることは、もちろん、RAMP が病原菌の進化とともに進化してきたことを示唆する。最も単純な仮説としては、それぞれの RAMP は非常に特異性が高く、特定の種で生産される RAMP の抗菌範囲はその種を攻撃する微生物の範囲に一致していて、この微生物の構成が変化すれば RAMP も変化しやすいというものである。それぞれの病原菌の適応が、薬剤の変化につながる。そしてそれは、変化した薬剤はそれが病原菌にとって稀なものである間は効果的であり、頻繁になれば耐性菌の出現で効果を失うことを暗示している。RAMP が宿主-病原菌の連続的な共進化によってもたらされる高度に動的なものであるという解釈は、私たちの実験結果に一致する。

この研究は、従来の抗菌剤と同様に、RAMP の治療薬としての使用が耐性菌の蔓延を引き起こすことを示唆している。このような治療薬は、治療を受けた個人からや、病院や家畜飼育場のように大量の抗菌剤が配達されるような環境から耐性菌が出現するのを最小限に抑えるために、注意深く、そして適切に管理されなければならない。私たちは、有用と考えられる抗菌剤の開発をやめさせたり、遅らせたりすること意図しているのではない。私たちが言いたいのは、私たちがヒトや家畜用の抗菌剤として RAMP を開発する時には、耐性菌の出現の影響もまた真剣に考えるということである。ペキシガナンのような合成 RAMP に耐性になった微生物は、生物が作る自然の抗菌ペプチドにも耐性を示すであろうか？ このような耐性微生物は、非耐性のものよりも病原性が高いのであろうか？ 生体内で、たとえば、動物と長時間接触させることで、合成ペプチドへの耐性が出現するであろうか？ このような懸念は、最終的に新しい抗感染薬を承認する政府規制当局にどのように反映されるべきであらうか？ これらの新しい抗感染薬が広く使われる前に、これらへの耐性が出現するかもしれないことを思慮深く分析することは、私たちの意見としては、社会に対するこれらの究極的な利点を最大限にする助力になるであろう。

私たちは、MacLean と Sniegowski に菌株の提供について感謝する。Bell はカナダの NSERC から研究資金をもらった。

表1 ペキシガンンへの耐性のための選抜に対する応答。(選抜系統は、ペキシガンンを添加した培地で培養し、一方、対象系統は添加していない培地で培養した。最小阻害濃度(MIC))は、ペキシガンンの段階的希釈を用いて測定した。それぞれの測定はそれぞれの系統について、別個に2回ずつ行った)

微生物	系列	選抜処理	系列の数	MIC範囲	
				選抜前	選抜後
蛍光菌	野生株	選抜系統	6	2-8	768-1024
		対象系統	2	4	48-96
	変異株	選抜系統	6	16-32	1024+
		対象系統	2	32	48-96
大腸菌	野生株	選抜系統	4	32-128	768-1024
		対象系統	2	64	128
	変異株	選抜系統	4	16-256	512-1024
		対象系統	2	32-64	48-64

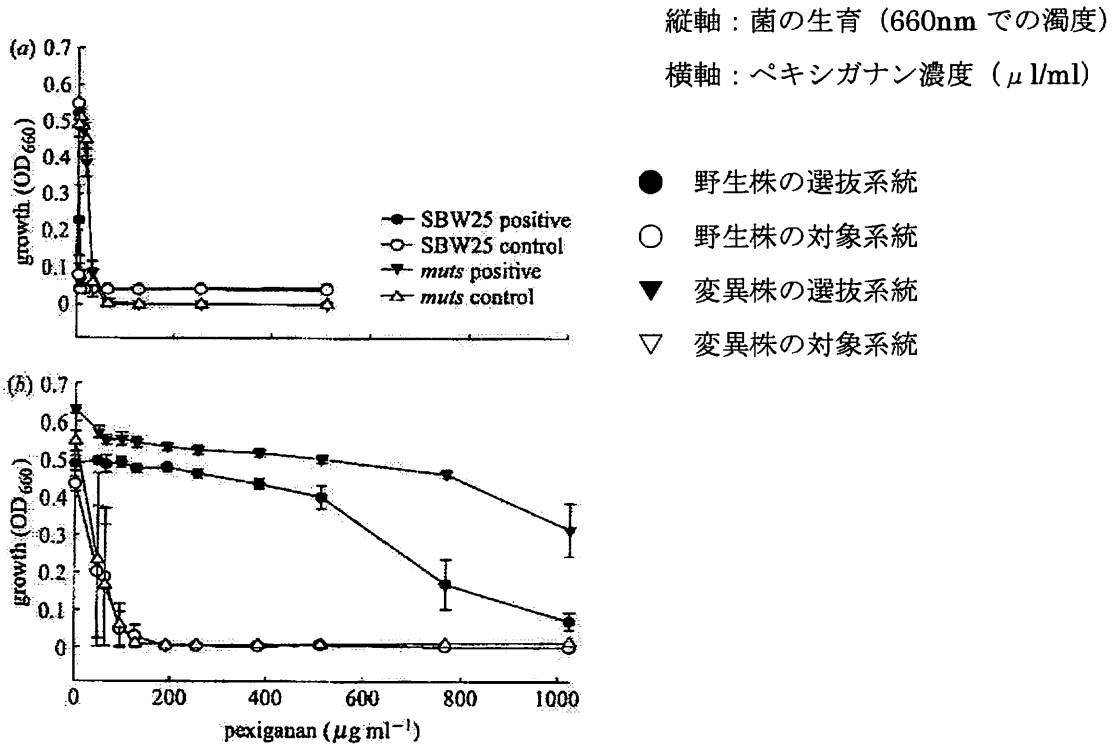
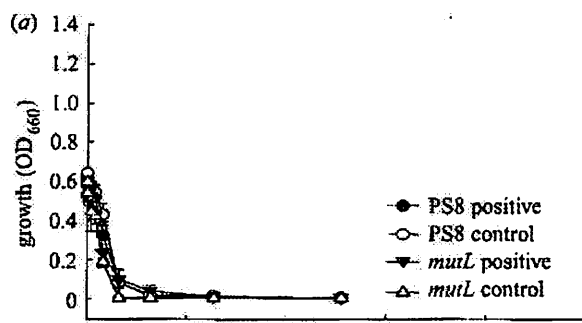


図1. ペキシガナン濃度と蛍光菌の生育。

生育の平均値を (a) 選択の前に、(b) 選択の後に、濁度で測定し、野生株 (SBW25) と変異株 (SBW25 Δ *mutS*) の選抜系統と対象系統のデータを示した。選択の前の系列は、512 $\mu\text{l/ml}$ を超える濃度では測定しなかった。理由は、全く生育しなかったから。

Perron ら 図2



縦軸：菌の生育 (660nm での濁度)

横軸：ペキシガナン濃度 (μ l/ml)

- 野生株の選抜系統
- 野生株の対象系統
- ▼ 変異株の選抜系統
- ▽ 変異株の対象系統

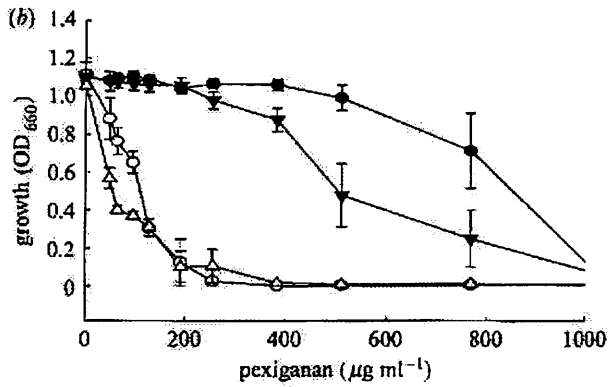


図2. ペキシガナン濃度と大腸菌の生育。

生育の平均値を (a) 選択の前に, (b) 選択の後に, 濁度で測定し, 野生株 (PS8) と変異株 (PS8 *mutL*) の選抜系統と対象系統のデータを示した。選択の前の系列は, 512μ l/ml を超える濃度では測定しなかった。理由は, 全く生育しなかったから。