

巨大都市を流れる多摩川流域で薬剤耐性遺伝子を伝播しうる
プラスミドの同定とその伝播経路の解明

2021年

新谷 政己

共同研究者

道羅 英夫

森内 良太

目次

はじめに ～本研究の背景と目的～	2
1 多摩川の河川底泥からの広宿主域プラスミドの取得とその性質の比較	3
1-1 緒論	3
1-2 実験方法と材料	3
1-2-1 試薬・試料	3
1-2-2 菌株とプラスミド	3
1-2-3 環境試料	3
1-2-4 培地	6
1-2-5 プラスミドキャプチャリング	6
1-2-6 PCR によるプラスミドグループの判別	6
1-2-7 プラスミド抽出による接合完了体のプラスミド保持の検出	7
1-2-8 プラスミドの全塩基配列解読	9
1-2-9 プラスミドの系統分類学的解析	9
1-2-10 PCR-サザンプロット解析	9
1-3 実験結果と考察	10
1-3-1 プラスミドキャプチャリングの結果	10
1-3-2 取得したプラスミドの全塩基配列の決定	10
1-3-3 IncP-1 群プラスミドの系統学的解析	11
1-3-4 PromA 群プラスミドの系統学的解析および比較ゲノム解析	20
1-3-5 種々のプラスミドの分布調査	20
1-4 本章の総括と今後の課題	22
2 多摩川に存在するプラスミドの宿主域比較	23
2-1 緒論	23
2-2 実験方法と材料	23
2-2-1 試薬・試料	23
2-2-2 培養条件	23
2-2-3 使用菌株とプラスミド	23
2-2-4 環境サンプル	23
2-2-5 環境試料中の微生物群集との接合実験	23
2-2-6 FACS を用いた接合完了体の取得と同定	25
2-2-7 接合完了体の同定および遺伝子型の解析	25
2-2-8 環境試料からの DNA 抽出と菌叢解析	25
2-3 実験結果および考察	27
2-3-1 環境試料中の微生物群集との接合実験で取得した接合完了体	27
2-3-2 多摩川から採取した試料の菌叢解析	28
2-4 本章の総括と今後の課題	33
3 本研究のまとめ	34
報告書以外の成果公表	35
参考文献	36

はじめに ～本研究の背景と目的～

2020年の新型コロナウイルス COVID-19による感染症の拡大は、我々の日常生活を大きく変え、まさに「世界が一変」してしまった。パンデミックから1年が経つ2021年3月になっても、その問題の深刻さはさほど変わりがないようにさえ思える。この問題を深刻にしたのは、病気を引き起こすウイルスに対して、有効な治療薬がなかったことである。しかし、このような事態が訪れることは、原因が細菌かウイルスか、という違いはあるにせよ、2015年以降、世界保健機構(WHO)が警鐘を鳴らし続けていたのである。それは、これまで効果のあった複数の抗生物質が効かない多剤耐性菌が出現・蔓延することで、有効な治療薬がなくなってしまうと予測されていたからだ。この多剤耐性菌による感染症の拡大は、サイレントパンデミックとよばれ、新型コロナウイルスと同様、対策を講じるべき喫緊の課題である。ヒト臨床株の研究から、こうした多剤耐性菌の出現・蔓延には、プラスミドというDNA因子が寄与することが知られている。プラスミドは、種々の異なる微生物間を接合伝達によって移動可能な遺伝因子であり(Figure A)、薬剤耐性遺伝子群を搭載するものを薬剤耐性プラスミドという。プラスミドは、それが細菌内で複製・維持されるために必要な遺伝子群の類似性によって不和合性群というグループに分類される。薬剤耐性プラスミドは、IncA/C, IncB/O, IncF, IncG/U, IncH, IncI, IncK, IncL/M, IncN, IncP, IncQ, IncRなど、既知の不和合性群に属するほとんどのプラスミドが該当する。

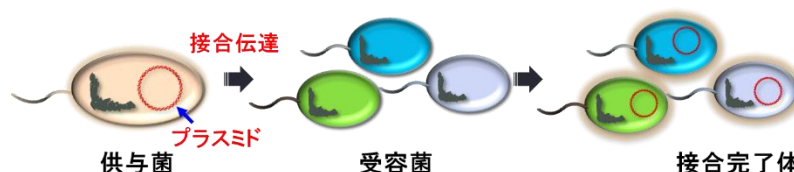


Figure A. プラスミドの接合伝達.

接合伝達性プラスミドは種々の細菌間を接合伝達によって移動し、受容菌の形質を大きく変える(接合完了体)。

近年、薬剤耐性菌やその耐性遺伝子は、病院内のみならず、多摩川を含む河川流域(浦野ら, 2013)や、我々が食する野菜からも発見されている(Blau et al., 2018; Hölzel et al., 2018)。これは、我々の生活に密着した環境中でも、薬剤耐性遺伝子が伝播していることを示唆するものであり、その実態を知ることは多剤耐性菌の蔓延を防ぐ上で重要である。しかし、ヒト臨床株由来の薬剤耐性プラスミドが、実際の環境中で伝播するのか、またどの細菌間を伝播可能なのかを調べた研究例は極めて少ない。また、実際の環境中には、多剤耐性菌の出現を促す、ヒト臨床株で見出されたものとは別のプラスミドが存在する可能性もある。多剤耐性菌の出現や蔓延を防ぐためには、薬剤耐性プラスミドの動態を追跡し、排除すべき対象プラスミドや、当該プラスミドをもつ細菌、そのプラスミドを受け取ることが可能な細菌(群)の種類を明らかにすることが非常に重要である。そこで、本研究では、東京という巨大都市を流れ、抗生物質濃度が比較的高いレベルにある多摩川を対象に、その流域で薬剤耐性遺伝子の伝播を担うプラスミドを同定し、その分布と伝播経路を解明することを目的とした。

1 多摩川の河川底泥からの広宿主域プラスミドの取得とその性質の比較

1-1 緒論

本章では巨大都市を流れる多摩川に、薬剤耐性遺伝子を伝播しうるプラスミドが存在するのかわか検証し、同定を行うために、プラスミドを収集することとした。収集には、プラスミドの自己接合伝達能を利用する、プラスミドキャプチャリングと呼ばれる方法を用いた。本手法は、あらかじめ受容菌を準備し、環境試料由来のプラスミドの接合伝達能と、プラスミド上の薬剤耐性遺伝子をマーカーとしてプラスミドを収集する二親接合と、受容菌の他に、中間供与菌を準備し、環境由来のプラスミドの自己伝達能のみを利用する三親接合による方法がある (Smalla et al., 2000)。いずれの方法でも、得られるプラスミドは、分離源となる環境試料内で接合伝達能をもつものに限られる。二親接合の指標には、古くから用いられてきた抗生物質であるテトラサイクリンと、グラム陰性の多剤耐性菌に対して「最後の切り札」として用いられるコロリスチン(CL)を用いた。また、三親接合には、pBBR1という可動性プラスミド(自己伝達能をもつプラスミドの存在下のみ伝達可能なプラスミド)をもつ中間供与菌を準備した。多摩川の試料としては、異なる季節に上流から下流の6箇所から河川水と底泥を同時に採取して用いた。また、対照として、全国各地の他の水環境試料も同時に用いた。

1-2 実験方法と材料

1-2-1 試薬・試料

実験に使用した試薬は、試薬品特級の「生化学・分子生物学用」のグレードのものを使用し、特に記載のない限りそのまま使用した。

1-2-2 菌株とプラスミド

本研究で使用した菌株とプラスミドを Table 1-1 に示す。受容菌として Rif 耐性, Gm 耐性, GFP 遺伝子を有する *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4RGFP, または Rif 耐性, Km 耐性, GFP 遺伝子を有する *Escherichia coli* MG1655RGFP を使用した。

P. resinovorans CA10dm4GFP を受容菌とした三親接合では既知の可動性プラスミドとして Km耐性を持つ pBBR1MCS-2を使用し、これを保持する中間供与菌として *E. coli* DH5 α を使用した。接合完了体は Rif耐性, Gm耐性, Km耐性, GFPによる蛍光により選抜した。二親接合では Tc 耐性遺伝子をもつプラスミドの取得を目指し, Rif耐性, Gm耐性, Km耐性, GFPによる蛍光により選抜した。

E. coli MG1655RGFP を受容菌とした系では可動性プラスミドとして Gm耐性を持つ pBBR1MCS3を、これを保持する中間供与菌として *E. coli* JM109株を使用した。接合完了体は Rif耐性, Km耐性, Gm耐性, GFPによる蛍光により選抜した。以下に本章で使用した菌株とプラスミドを示す。

1-2-3 環境試料

本実験では以下のように全国各地 (Fig. 1-1) から採取した河川水, 湖水, 底泥, 土壌, 活性汚泥などの 97 種類の環境試料を使用した (多摩川以外の環境試料の採取場所については, プラスミドを得られた箇所の情報のみ後述の Table 1-4と1-5に示す)。

Table 1-1 本章で使用した菌株とプラスミド

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristic(s)	Source or reference(s)
Bacterial strains		
<i>Escherichia coli</i>		
MG1655	Type strain	BRC-JCM
MG1655RGFP	MG1655R, miniTn5(Km) P _{A1/O4/O3} <i>gfp</i> -mut3* was inserted into the chromosome (Km ^r , Cm ^r)	This study
JM109	F ['] [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i>], <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), <i>e14⁻</i> (<i>mcrA⁻</i>), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>)	(Sambrook and Russell, 2001)
DH5α	F ⁻ , φ80 <i>dlacZΔM15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	RBC Bioscience
<i>Pseudomonas resinovorans</i>		
CA10dm4RGFP	CA10dm4R, miniTn7(Gm) P _{A1/O4/O3} - <i>gfp</i> -mut3* was inserted into chromosome (Gm ^r , Cm ^r)	(Yanagiya et al., 2018)
Plasmid		
pBBR1MCS-2	Km ^r , <i>lacZα mob</i> ; compatible with IncP, IncQ, and IncW plasmids	(Kovach et al., 1995)
pBBR1MCS-3	Tc ^r , <i>lacZα mob</i> ; compatible with IncP, IncQ, and IncW plasmids	(Kovach et al., 1995)

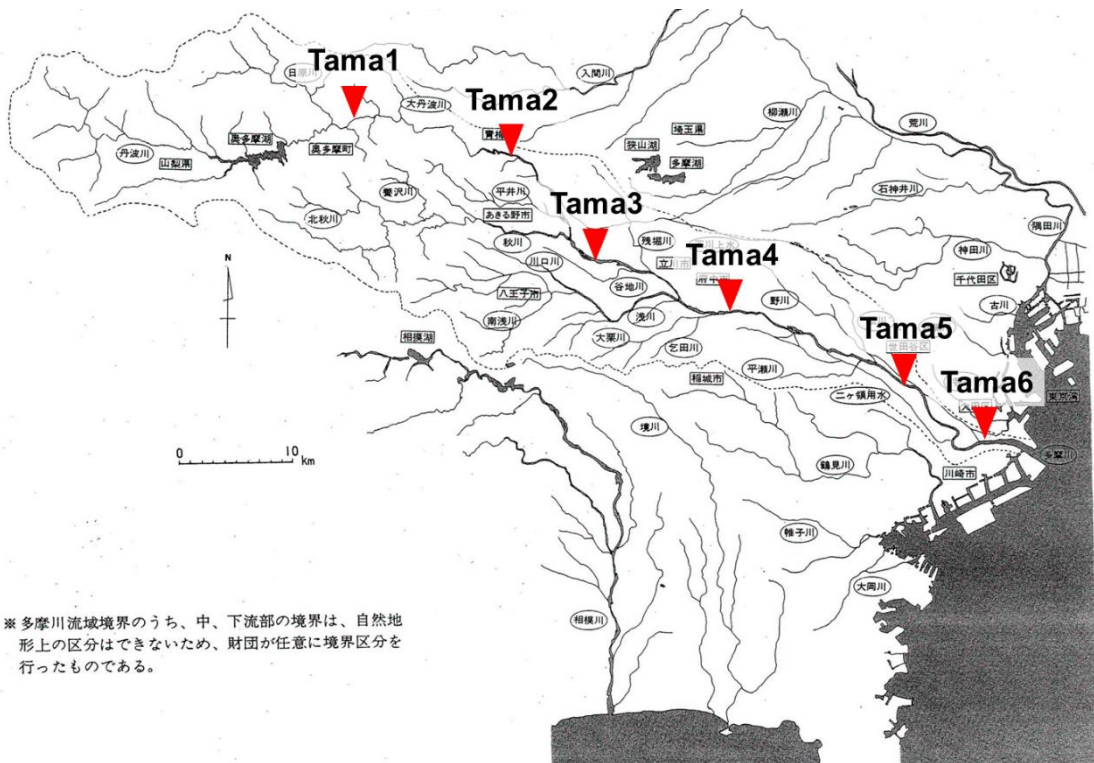


Figure 1-1 本章で使用した環境試料の採取箇所。
 (上)全国、(下)多摩川(東急財団から提供された図を一部改変)。

1-2-4 培地

培地は、Lysogeny-Broth (LB) 培地 (Sambrook and Russell, 2001) および R2A 寒天培地 (Difco) を使用した。また、寒天培地を作る際には Agar (Wako) を 1.5% (w/v) となるように添加した。また、選択培地には、濾過滅菌した抗生物質を添加した。カビの生育を防止するため、必要に応じて cycloheximide (CHX) を添加した。以下に、LB 培地の組成、R2A 培地の組成、各抗生物質の略称、溶媒と終濃度 (mg/L) を示す。リファンピシン (Rif, 溶媒: dimethyl sulfoxide, 50), ゲンタマイシン (Gm, 溶媒: 水, 30), カナマイシン (Km, 溶媒: 水, 50), テトラサイクリン (Tc, 溶媒: 50% エタノール, 12.5), コリスチン (CL, 溶媒: 水, 4), シクロヘキシミド (CHX, 50% エタノール, 100)。なお、菌体の懸濁には、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) を用いた。

1-2-5 プラスミドキャプチャリング

三親接合および二親接合による環境中からのプラスミドとキャプチャリングには、*P. resinovorans* CA10dm4GFP, または *Escherichia coli* MG1655RGFP を受容菌として用い、以下の手順で行った。

- ① 中間供与菌と受容菌を、抗生物質を含む 5 mL の LB 培地で、振とう培養 (180 rpm, 30°C, overnight) した。
- ② 培養後の菌液をそれぞれ遠心 (13,000×g, 1 min) により集菌し、上清を捨てた。
- ③ 集菌後の菌体を 1.0 mL の PBS に懸濁し、遠心 (13,000×g, 1 min) により集菌し、上清を捨てた。
- ④ 菌体を 500 μL の液体 LB に懸濁し、50 mL 遠沈管に加え、混合した。
- ⑤ 環境試料 5 g を 10 mL の PBS に懸濁し、30 min 静置した。
- ⑥ 静置後の環境試料の上清 (微生物画分) 5 mL を、④ の遠沈管に加えて混合した。
- ⑦ 数回の遠心 (13,000×g, 1 min) により集菌後、菌体を 350 μL の液体 LB に懸濁した。
- ⑧ ⑦ の懸濁液 300 μL を、CHX を含む R2A 培地上の 0.2 μm メンブレンフィルター (ADVANTEC) 上に滴下し、静置 (30°C, 48 h もしくは 37°C, 24 h) して接合させた。
- ⑨ フィルター上の菌体を 3.0-5.0 mL の PBS に懸濁した後、10 倍ごとの段階希釈を行い、抗生物質を含む (CHX も含む) LB 寒天培地に塗布して、培養 (30°C, 48 h または 37°C, 24 h) した。
- ⑩ トランスイルミネーター (ビーエム機器) を使用し、GFP に由来する緑色蛍光を示すコロニーを分離対象として、その後の遺伝子解析に供した。

1-2-6 PCR によるプラスミドグループの判別

得られた接合完了体と推定された菌株から全 DNA を抽出 (Shintani et al., 2014 の方法) し、PCR 解析を行うことでプラスミドグループの判別を試みた。PCR 解析には、特定のプラスミドグループを特異的に増幅させるプライマーセットを用いて PCR を行い、得られたプラスミドが属するプラスミドグループを検証した。

PCR には TAKARA Ex Taq® GXL (TAKARA BIO) もしくは KOD One™ PCR Master Mix (東洋紡) を用いた。以下に、PCR 条件および使用したプライマーセットについて示す。また、PCR の条件も以下に示す。PCR 産物は、1% アガロースゲル (ナナカライテスク, アガロース ME) を用い、100 V, 30 min (1×TAE バッファー) または 135 V, 20 min (0.5×TAE バッファ

一)の条件で電気泳動して確認した。

(i) **Ex Taq** を使用した **IncPromA** を検出する PCR の反応条件: 96°C, 3 min, (96°C, 45 sec, 57°C, 1 min, 72°C, 1 min), 72°C, 7 min, 15°C hold. カッコ内を35サイクル繰り返した。

(ii) **PrimeSTAR** を使用した **IncP-1 $\alpha\beta\epsilon$** , **IncP-1 δ** , **IncP-1 γ** を検出する PCR の反応条件: 98°C, 30 sec, (98°C, 20 sec, 67°C, 20 sec, 72°C, 30 sec), 72°C, 5 min, 15°C hold. カッコ内を30サイクル繰り返した。

(iii) **PrimeSTAR** を使用した **pSN1216-29** を検出する PCR の反応条件: (98°C, 10 sec, 55°C, 15 sec, 68°C, 1 min), 15°C hold. カッコ内を30サイクル繰り返した。

(iv) **KOD one** を使用した **IncP-1 $\alpha\beta\epsilon$** , **IncP-1 δ** , **IncP-1 γ** を検出する PCR の反応条件: (98°C, 10 sec, 67°C, 5 sec, 68°C, 1 sec), 15°C hold. カッコ内を30サイクル繰り返した。

(v) **KOD one** を使用した **pSN1216-29**, **IncA/IncC**, **IncL/IncM**, **IncU**, **IncW** 群プラスミドを検出する PCR の反応条件: (98°C, 10 sec, 55°C, 5 sec, 68°C, 1 sec), 15°C hold. カッコ内を30サイクル繰り返した。

(vi) **KOD one** を使用した **IncPromA** 群プラスミドを検出する PCR の反応条件: (98°C, 10 sec, 60°C, 5 sec, 68°C, 1 sec), 15°C hold. カッコ内を30サイクル繰り返した。

1-2-7 プラスミド抽出による接合完了体のプラスミド保持の検出

取得した接合完了体候補株のうち、どのプライマーセットを用いたPCRでも増幅が検出されなかったサンプルについて、プラスミド DNA を抽出後、電気泳動を行った。プラスミド抽出はKa & Tiedjeの手法 (Ka and Tiedje, 1994) を一部改変して行った。

- ① 各接合完了体を、抗生物質を含む液体LB培地で培養し、培養液1 mLを集菌した。
- ② 菌体を100 mLの超純水に懸濁し、250 μ Lのlysing solution (組成は下に示す)を加え、穏やかに転倒攪拌して、室温で15 min静置した。
- ③ 80°C, 2 minインキュベート後、フェノール/クロロホルム(ニッポンジーン)を350 μ L加え、チューブを横にして一晩室温静置した
- ④ 遠心(15,000 rpm, 4°C, 20 min)した後、上清を新しい1.5 mLチューブへ移し、これをプラスミドDNA 溶液として使用した。

※Lysing solutionは10% SDS solution (ニッポンジーン)と1 M tris-HCl(pH 8.0)(ナカライテスク)をそれぞれ終濃度30% (v/v), 5% (v/v)となるように混合し、2 Nの NaOHでpH 12.6となるように調製し、蒸留水で希釈したものを使用した。

Table 1-2 PCR に使用したプライマーセット

Group	Gene	Sequence (5'-3')	size (bp)	Reference
IncP-1 $\alpha\beta\epsilon$	F	TTCACSTTCTACGAGMTKTGCCAGGAC	281	(Bahl et al., 2009)
	R	GCWAGCTTGC GG TACTTCTCCCA		
IncP-1 γ	F	TTCACGTTCTACGAGCTTTGCACAGAC	281	
	R	GACAGCTCGCGGTACTTTTCCCA		
IncP-1 δ	F	TTCACTTTTTACGAGCTTTGCAGCGAC	281	
	R	GTCAGCTCGCGGTACTTCTCCCA		
IncPromA	F	TCATTTTCRTGCCRSTACGARGG	346	This study
	R	YKRAARTCRCGCARSCCYTG		
pSN1216- 29	F	AGCAGACGCCACCAGAGGTAT	732	(Yanagiya et al., 2018)
	R	CAATGAGACTTTCCCGCTTCC		
IncA and IncC / P-3	F	GAGAACCAAAAGACAAAAGACCTG	465	(Carattoli et al., 2005)
	R	ACGACAAAACCTGAATTGCCCTCCTT		
IncL and IncM	F	CGGAACCGACATGTGCCTACT	853	This study
	R	GAACTCCGGCGAAAAGACCTTC		
IncN	F	AGCGGTTCTCTGGTTATG	388	(Carattoli et al., 2005)
	R	GTTCTCAGGCCCGTAAATGT		
IncW	F	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242	
	R	GGTGGCGGGCATAGAACCGT		

1-2-8 プラスミドの全塩基配列解読

取得したプラスミドの全塩基配列の解読は、NucleoSpin® 96 Tissue (TAKARA BIO) を使用して抽出した接合完了体の全DNAについて、HiSeq (illumina) を用いたショットガンシーケンス解析にて行った。アッセンブルは SPAdes (Bankevich et al., 2012) を用いて行い、アッセンブル後に一本になった配列末端のオーバーラップを重ね合わせて環状化した。アノテーションは DFAST (Tanizawa et al., 2018) を用いて行った。

1-2-9 プラスミドの系統分類学的解析

全塩基配列を決定したプラスミドのうち、IncP-1群プラスミドとIncPromA群プラスミドの系統樹を作製し、系統分類学的解析を行った。IncP-1群プラスミドの系統樹の作製は、各サブグループ数本の既知のIncP-1群プラスミドを使用し、プラスミドの複製開始タンパク質をコードする *trfA*, *relaxase* をコードする *traI*, IncP-1群プラスミドに共通に保存されている遺伝子を連結させた配列を用いた。IncPromA群プラスミドの系統樹作製には、現在までに塩基配列が決定されているIncPromA群プラスミドを使用し、保存遺伝子を連結させた配列を用いた。系統樹の作製には、MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al., 2016) を使用した。ClustalW programによって multiple alignment を行った後、ML (maximum likelihood) 法を用いて系統樹を作製した。Bootstrap値は1000とした。

1-2-10 PCR-サザンブロット解析

各プラスミドの分布を調査するには、PCR-サザンブロット解析を行った。上述したプライマーセットに加え、検出用プローブを作製するため、各種プラスミドに特異的な配列を増幅するPCRを行った。その後、PCR増幅産物から、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (ロシユ) を使用してプローブを作製した。

環境試料中の微生物群集からのDNA抽出は、DNeasy Power Soil Kit (QIAGEN) を用いて行った。得られたDNAを鋳型として、各プラスミドに特異的なプライマーセットで増幅後、アガロースゲル電気泳動を行った。その後、ゲル内のDNAを、ポジティブチャージナイロンメンブレン (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) に、VacuGene XL Vacuum Blotting System (GEヘルスケア) を使用して転写した。サザンブロット解析は、Merck社のDIGシステム (DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Merck) を利用し、製品のマニュアルに従って行った。

1-3 実験結果と考察

1-3-1 プラスミドキャプチャリングの結果

各環境試料から単離まで行った接合完了体数, 既存のプライマーセットを用いた PCR, プラスミドの有無の判別結果を Table 1-3 に示す. また, いずれのプライマーセットでも PCR 産物を検出できなかったサンプルに対しては, プラスミドの有無をプラスミド抽出後の電気泳動によって判別した. その結果, 多摩川からの 18 試料を含む 97 種類の環境試料から, 自己伝達性プラスミドを保持すると推定される接合完了体 1156 株の単離に成功した (Table 1-3). 得られた接合完了体に対し, 既知のプラスミド配列から設計したプライマーを用いて PCR, 電気泳動を行い, 増幅産物が得られるかどうか検証した.

IncP-1群プラスミドを保持すると推定される接合完了体は底泥(湖, 河川, 池, 海), 活性汚泥, 土壌など, 27種類の様々な環境試料から162株が取得された. またPromA群プラスミドについても, 底泥(湖, 河川), 活性汚泥, 土壌等, 19種類の環境試料から212株が取得された. どちらのプラスミドも, 受容菌の種類(*P. resinovorans*か*E. coli*)に依らずに取得された一方で, PromA群プラスミドは, ほぼすべてが三親接合で取得され, 二親接合で取得されたものは213株中1株のみであった (Table 1-3).

なお, これ以外のプラスミドとして, 以前に見出した新規性の高いプラスミド, pSN1216-29に類似したプラスミド (Yanagiya et al., 2018) や, 薬剤耐性遺伝子をもつことが知られるIncA群またはIncC 群, IncN群プラスミドを保持すると推定された接合完了体が, それぞれ2株(三親接合), 2株(二親接合), 14株(二親接合)取得された. 一方, IncL群プラスミド, IncM群プラスミド, IncW群と推定されるプラスミドは本実験では得られなかった (Table 1-3). さらに, いずれのプライマーセットでも増幅産物を検出できなかった618株の接合完了体 (Table 1-3)のうち, 121株からプラスミドが検出された. これら121株は, 調べた既知のプラスミドとは異なるプラスミドを有すると考えられた. なお, 残りの432株からはプラスミドを検出できなかった. これは, その単離中にプラスミドを脱落してしまったか, 接合時に可動性プラスミドのみが受容菌に伝達し, 自己伝達性プラスミドが接合伝達しなかった菌株であると考えられた.

また, コリスチン耐性を指標に行った二親接合によるプラスミドキャプチャリングでは, プラスミドを得ることはできなかった. さらに, コリスチン耐性菌のスクリーニングも試みたが, 耐性菌を得ることはできなかった(詳細なデータは示さない). これらのことは, 多摩川にはコリスチン耐性菌が検出できるほどには存在しないことを示唆していた.

1-3-2 取得したプラスミドの全塩基配列の決定

取得したプラスミドのうち, PCR解析によりIncP-1群(16本), IncPromA群(28本)に属すると推定された44本と, 既知のプラスミド群に属さない15本の全塩基配列の決定を行った. その結果, 53本のユニークなプラスミドの完全長配列を得ることに成功した. このうち, 多摩川から得られたプラスミドは, IncP-1群が3本, PromA群が8本, その他が3本であった(その他3本については現在解析中).

得られた既存のIncP-1群プラスミドと相同性の高かったプラスミドの多くは, 薬剤耐性遺伝子(群)を有していた (Table 1-4). また, 耐性遺伝子の有無は, 二親接合・三親接合のどちらの手法によって得られたかに依らなかった. IncP-1群プラスミドが広く環境中に分布していること(詳細は後述)を考慮すれば, 本プラスミド群は, 様々な環境で遺伝子を伝播する重要なプラ

スミド群であることが改めて示された。その一方で、得られたPromA群プラスミドは、どれも宿主に特定の形質を与える既知遺伝子をもたないことが判明した。

なお、PCRによって不和合性群の同定に至らなかったプラスミドのうち、8本は、IncP-1群プラスミドの複製開始タンパク質をコードする*trfA*遺伝子を有すると推定された。さらに、これらのプラスミド上の、複製、維持、接合伝達に寄与すると推定される遺伝子群の配置が、既知のIncP-1群プラスミドと極めて類似していた。そこで次節では、上記8本のプラスミドと、既知IncP-1群プラスミドについて、より詳細に比較することとした。

1-3-3 IncP-1 群プラスミドの系統学的解析

IncP-1群に属すると推定された全27本のプラスミドについて、塩基配列情報に基づく系統分類学的解析を行った。その際、本研究で得られたIncP-1群プラスミドの他に、既存のIncP-1群プラスミドを、各サブグループからそれぞれ1~3本を選抜して行った。特に、ごく最近発見されたIncP-1群類縁のプラスミドであるpCFSA664-2 (Hu et al., 2019), pMCR_1511 (Zhao et al., 2017), pEN3600 (Zheng et al., 2020), pHS102707 (Li et al., 2015) も加えた。IncP-1群の複製開始タンパク質をコードする *trfA*、接合伝達の開始に重要なrelaxaseをコードする*traI*それぞれの塩基配列に基づいて作成した系統樹はFigure 1-2のようになった。*trfA*は2種類の複製開始タンパク質TrfA1とTrfA2を同一の読み枠内にコードしている(Yano et al., 2016)。いくつかのプラスミド(pAKD4, pDS1, pCFSA664-2, pMCR_1511, pEN3600, pHS102707, pTT60, pMNBM077, pMNCG080, pMNCG082)は*trfA2*のみしか有していなかった。そこで、alignmentおよび分子系統樹の作製にあたって、これらのプラスミドについては*trfA2*を、それ以外のプラスミドについては*trfA1*を使用した。

Figure 1-2とTable 1-4に示した通り、多摩川からはIncP-1β-1群、IncP-1ε-1群、IncP-1γ群に属するプラスミドと、*trfA*と*traI*いずれも既存のIncP-1群のサブグループとは系統学的に離れたpYKBL037、およびpMNBM077が得られた。興味深いことに、他の水再生センターから得られたpMNCG080 とpMNCG082は、*traI*に基づく系統樹では類縁のクレードに位置しているのに対し(一致度98%)、*trfA*に基づく系統樹ではクレードが離れて位置していた(一致度64%)。これら2本のプラスミドが同じ試料から取得されたことを考えると、その祖先は同じプラスミドであったが、複製に関わる領域(遺伝子)が別々に進化してきた可能性が考えられた。そこで、全てのIncP-1群プラスミドに保存された複製・維持・接合伝達に関わる遺伝子を結合した配列を用いることで、全体の塩基配列に基づく系統学的解析を行った。まずFigure 1-2に示したプラスミドの中から代表的なプラスミドを選抜し、プラスミドの基本機能である複製、維持、接合伝達に関わる遺伝子を比較した。このとき、プラスミドの維持に寄与する*incC*には*incC1*と*incC2*の2つの遺伝子が含まれるが、本解析には*incC2*を使用した。なお、pA81, pAKD4, pMCBF1 はGenBankに登録されている*incC2* がアノテーションされていなかったため、それぞれpSN1104-59, pEST4011, pSN1104-59を参考として推定した配列を使用した。以下にその結果を示す(Figure 1-3)。比較した全プラスミドで*trfA*, *trbA*, *trbB*, *trbC*, *trbD*, *trbE*, *trbF*, *trbG*, *trbH*, *trbI*, *trbJ*, *trbL*, *trbN*, *traC*, *traD*, *traE*, *traF*, *traG*, *traI*, *traJ*, *traK*, *traL*, *traM*, *korB*, *korA*, *IncC*, *korC*, *klcA*の 28遺伝子が保存されていた。次にこれらの遺伝子の塩基配列を連結し、系統樹を作製した。その結果、多摩川から得られた pYKBL037, pYKBR045, pMNBM077は、既存のIncP-1群のサブグループとは異なることが示唆された。そのほかの試

料から得られた, pYKBG036, pMNCG080, pMNCG082についても同様であった. 各サブグループ内での保存遺伝子の連結配列の一致度を比較すると, IncP-1 γ 群以外のサブグループでは, いずれも82%以上の一致度を示した(IncP-1 γ 群のみpQKH54とpYKCS045が72.0%と低い一致度であった. IncP-1 γ 群は, さらに2つの亜群に分けられるべきかもしれない). 従って, IncP-1 γ 群を除けば, 28の保存遺伝子を連結させた配列の一致度が82%以上の場合に同一のサブグループとし, 82%未満の場合には異なるサブグループとするのが妥当であると考えられた. Figure 1-3に示すように, pYKBL037とpYKBR041は系統樹上で既知のサブグループとは別のクラスターを形成していた. またこの2本の保存遺伝子の連結配列は, 互いに98.7%の一致度を示し, その他のプラスミドとの一致度は最大でも72.0%であった. 同様に, pMNBM077は系統樹上で他のプラスミドとクラスターを形成しておらず, 他のプラスミドとの一致度が最大でも54.9%であった. 以上より, これらのプラスミドは, 既知のサブグループとは独立していると考えられたため, 新たな2つのIncP-1群のサブグループとしてIncP-1 ι (iota) 群(pYKBK037 と pYKBR041)およびIncP-1 κ (kappa)群(pMNBM077)を提唱することとした.

上述した2つの新たなサブグループに属するプラスミドは, *bla* (β -lactam耐性), *strA*, *strB* (streptomycin耐性), *aac* (aminoglycoside耐性), *ereA* (erythromycin耐性), *tetA* (tetracycline耐性)などの薬剤耐性遺伝子をもつプラスミドであった. また, pYKBG036, pYKAM101, pMNCG080, pMNCG082についても, 系統学的解析や他のプラスミドとの一致度の比較から, 既知のサブグループに属しないと考えられたため, それぞれIncP-1 \omicron (omicron), IncP-1 λ (lambda), IncP-1 μ (mu)とした(Figure 1-3).

ところで, 本研究で得られたIncP-1群プラスミドは, 系統樹上で大きく2つのクレードに分けられる(それぞれクレードI, クレードIIと命名, Figure 1-3). 興味深いことに, クレードIは *Gammaproteobacteria*綱(*Pseudomonadaceae*科, *Enterobacteriaceae*科), *Betaproteobacteria*綱(*Alcaligenaceae*科)など, *Proteobacteria*門の様々な綱に属する菌株から発見されたIncP-1群プラスミドを含む. 一方, クレードIIは, *Enterobacteriaceae*科の限られた菌株から発見されたプラスミドが大半である. これは, クレードIのプラスミドが広宿主域である一方で, クレードIIのIncP-1群プラスミドが狭宿主域である可能性を示している. 事実, クレードIIに含まれるpMNCG080, pMNCG082やpDS1は, 大腸菌同士を接合伝達する一方で, *Pseudomonas*属細菌には接合伝達しない, という予備データも得ている. また, クレードIIについて特筆すべきこととして, グラム陰性の病原菌に対して臨床で広く用いられている抗生物質であるカルバペネムに耐性を示す菌株から見出されたプラスミド(pEN3600, pHS102707)や, カルバペネム耐性菌に対して有効とされるコリスチンに対して, 耐性を示す菌株から見出されたプラスミド(pMCR_1511, pCFSA664-2)を含むことが挙げられる. 興味深いことに, 後述するように, クレードIIに属するプラスミドから作製したプローブによる分布調査から, 本クレードに属するプラスミドが多摩川にも存在することが判明した(1-3-5). さらに, これら2つのクレードのちょうど「狭間」とも言うべきpMNBM077が見出されている. 以上のことを考慮すると, 多摩川では, 従来知られた広宿主域型から, 腸内細菌科を主な宿主とする狭宿主域型まで, 種々のIncP-1群が混在しており, 薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与している可能性が高いと考えられる. 今後は, これらのプラスミドの性状について, より詳細に比較し, その伝播経路を明らかにすることが重要であろう.

Table 1-3. プラスミドキヤプチャリングの結果.

Recipient	Mating	Number of isolates	PCR※											
			$\alpha\beta\epsilon$	δ	γ	IncP/P-1	IncPromA	pSN1216-29	IncA and IncC/P-3	Incl and IncM	IncN	IncW	PCR-negative	
<i>P. resinovorans</i>	triparental	1027	70	67	5	192	2	0	0	0	0	0	0	542
	biparental	2	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	triparental	87	3	3	2	18	0	0	0	0	1	0	0	45
	biparental	40	15	13	10	1	0	2	0	0	11	0	0	9
Total		1156	93	88	20	212	2	2	0	0	12	0	0	618

※1 表中の数値は PCR 解析によって増幅産物を検出できたサンプルの数を示す。また、PCR-negative はいずれのプライマーセットを用いた PCR でも増幅産物を検出できなかったサンプルの数を示す。また、複数のプラスミドを保持する可能性が高い菌株も存在した。

Table 1-4. プラスミドキヤプチャリング (B: 二親接合, T: 三親接合) で得られた IncP-1 群プラスミド (薬剤耐性遺伝子を赤で示す).

Name	group	Size (bp)	Method	Recipient	Source	Latitude (N)	Longitude (E)	Accessory
pMNCN061	α	64346	B	<i>E. coli</i>	shallow sediment	33.8888	130.76881	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>blashv</i> , <i>aph(3')-Ib</i>
pMNCN064	α	68925	T	<i>E. coli</i>	shallow sediment	33.8888	130.76881	<i>tetAR</i> , transposon (Tn402-class I integron (<i>qacH</i> , <i>aadAI</i> , <i>sulI</i>), <i>mer</i> operon), <i>aph(3')-Ib</i> Tn402 with <i>mgfAC</i>
pSM0227-07	β -1	51612	T	<i>P. resinovorans</i>	UASB granule	-	-	
PMH0621-02Tc	β -1	64795	B	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.708333	137.684167	<i>sul2</i> , <i>tet(X6)</i> , <i>tetG mer</i> operon, Tn2I-like transposon
pYKAZ004	β -1	58771	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	35.138333	136.830000	Tn402-class I integron (<i>qacEA-sulI-orf5</i>), IS1071
pYKBF005	β -1	60124	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment	37.440556	140.569167	Tn402-class I integron (<i>qacEA-sulI-orf5</i> , <i>aac</i> , <i>aadA</i> , <i>bla_{oxa1}</i>), Tn (<i>relE</i>) IS1071
pYKBG006	β -1	51488	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	34.823611	135.516944	IS1071
pYKBU009	β -1	53186	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment	34.10963	134.49602	Tn50I (<i>mer</i> operon), IS1071
pYKCT011-1	β -1	57620	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Yama6)	35.544467	139.725906	Tn50I (remnant) (<i>mer</i> operon), IS21, Tn3 family (<i>bla_{NPS}</i>), <i>relE</i>
pMNCI060	β -1	56363	B	<i>E. coli</i>	river sediment	37.8587	139.02358	transposon (<i>aph(3')-Ia</i> , <i>tetC</i> , <i>tetR</i> , <i>strAB</i>), <i>tetA</i> , <i>tetR</i>
pMNCI062	β -1	38628	T	<i>E. coli</i>	river sediment	37.8587	139.02358	no accessory
pMNCI063	β -1	52178	T	<i>E. coli</i>	river sediment	37.8587	139.02358	<i>aroA</i>
pYKAM033	β -2	42722	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	35.166667	138.152500	no accessory
pYKBP039	β -2	55596	T	<i>P. resinovorans</i>	activated sludge	-	-	Tn402-class I integron (<i>bla_{oxa}</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>ere(A)</i> , <i>blamr</i> , <i>aac(6')-Ib</i>)

pYKCS045	γ	49370	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama4)	35.601667	139.624847	Tn402-class I integron (like) (<i>bla</i> _{GES-5} , <i>aac</i> (6')- <i>Ib</i>)
pSM0227-02	δ	47983	T	<i>P. resinovorans</i>	UASB granule	-	-	<i>dam</i> , <i>dtwI</i>
pYKBO007	ε-I	42530	T	<i>P. resinovorans</i>	activated sludge	-	-	Tn
pMNBL056	ε-I	52432	B	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama4)	35.652894	139.504669	class I integron (<i>dfrBI</i> , <i>qacEA-sulI-orf5</i> , <i>tetRA</i>)
pMHAD031	θ	42885	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.710833	137.693889	no accessory
pYKBL037	ι	64506	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama4)	35.652894	139.504669	transposon (<i>strAB</i> , class I integron (<i>aac</i> (6')- <i>Ib</i> , <i>ere(A)</i> , <i>qacEA-sulI-orf5</i>), transposon (<i>bla</i> _{AER} , <i>qacL</i>))
pYKBR041	ι	45846	T	<i>P. resinovorans</i>	activated sludge	-	-	<i>aac</i> (6')- <i>3I</i>
pYKCG107	ι	46366	T	<i>P. resinovorans</i>	activated sludge	-	-	transposon
pYKBG036	ο	43728	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	34.823611	135.516944	<i>ompA</i>
pMNBM077	κ	53339	B	<i>E. coli</i>	river sediment (Tama5)	35.601667	139.624847	transposon (<i>tetAR</i> , transposon)
pYKAM101	λ	69067	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	35.166667	138.152500	Two ISs
pMNCG080	μ	69494	T	<i>E. coli</i>	activated sludge	-	-	no accessory
pMNCG082	μ	74115	T	<i>E. coli</i>	activated sludge	-	-	<i>bcs</i>

Table 1-5 プラスミドキヤチャリング (B:二親接合, T:三親接合で得られた PromA 群プラスミド).

Name	group	Size (bp)	Method	Recipient	Source	Latitude (N)	Longitude (E)	Accessory
pMH0613-68	β-1	41831	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.710833	137.693889	no accessory gene
pYK0413-01	β-1	42291	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment	39.700556	141.140556	no accessory gene
pYK0422-04	β-1	42189	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	34.725833	137.717778	no accessory gene
pYK0709-71	β-1	41972	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama4)	35.652894	139.504669	no accessory gene
pYK0709-104	β-1	41611	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama6)	35.544467	139.725906	no accessory gene
pYKCT011-2	β-1	42060	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama6)	35.544467	139.725906	no accessory gene
pMHAA012	β-1	42059	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.710833	137.693889	no accessory gene
pMHAD016	β-1	41022	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.710833	137.693889	no accessory gene
pYKAR019	β-1	41954	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	36.134722	138.271111	no accessory gene
pYKBG020	β-1	41022	T	<i>P. resinovorans</i>	soil	34.823611	135.516944	no accessory gene
pYKBL021	β-1	44255	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama4)	35.652894	139.504669	no accessory gene

pYKBM022	β -1	42027	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama5)	35.601667	139.624847	no accessory gene
pYKBS026	β -1	42060	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment	37.8587	139.02358	no accessory gene
pYK0414-12	β -2	42497	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	39.668889	140.966944	no accessory gene
pYKCT010	β -2	41020	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama6)	35.544467	139.725906	no accessory gene
pSN0517-01	γ	41117	T	<i>P. resinovorans</i>	UASB granule	-	-	no accessory gene
pMH0621-74	γ	39677	T	<i>P. resinovorans</i>	lake sediment	34.708333	137.684167	no accessory gene
pYKBM023	γ	40648	T	<i>P. resinovorans</i>	river sediment (Tama5)	35.601667	139.624847	no accessory gene
pYKBP024	γ	41237	T	<i>P. resinovorans</i>	activated sludge	-	-	no accessory gene
pMNBM065-1	γ	41504	B	<i>E. coli</i>	river sediment (Tama5)	35.601667	139.624847	no accessory gene
pMNCE066	γ	41168	T	<i>E. coli</i>	activated sludge	-	-	no accessory gene
pMNCE067	γ	40940	T	<i>E. coli</i>	activated sludge	-	-	no accessory gene
pMNCK068	γ	40940	T	<i>E. coli</i>	river sediment	34.10963	134.49602	no accessory gene

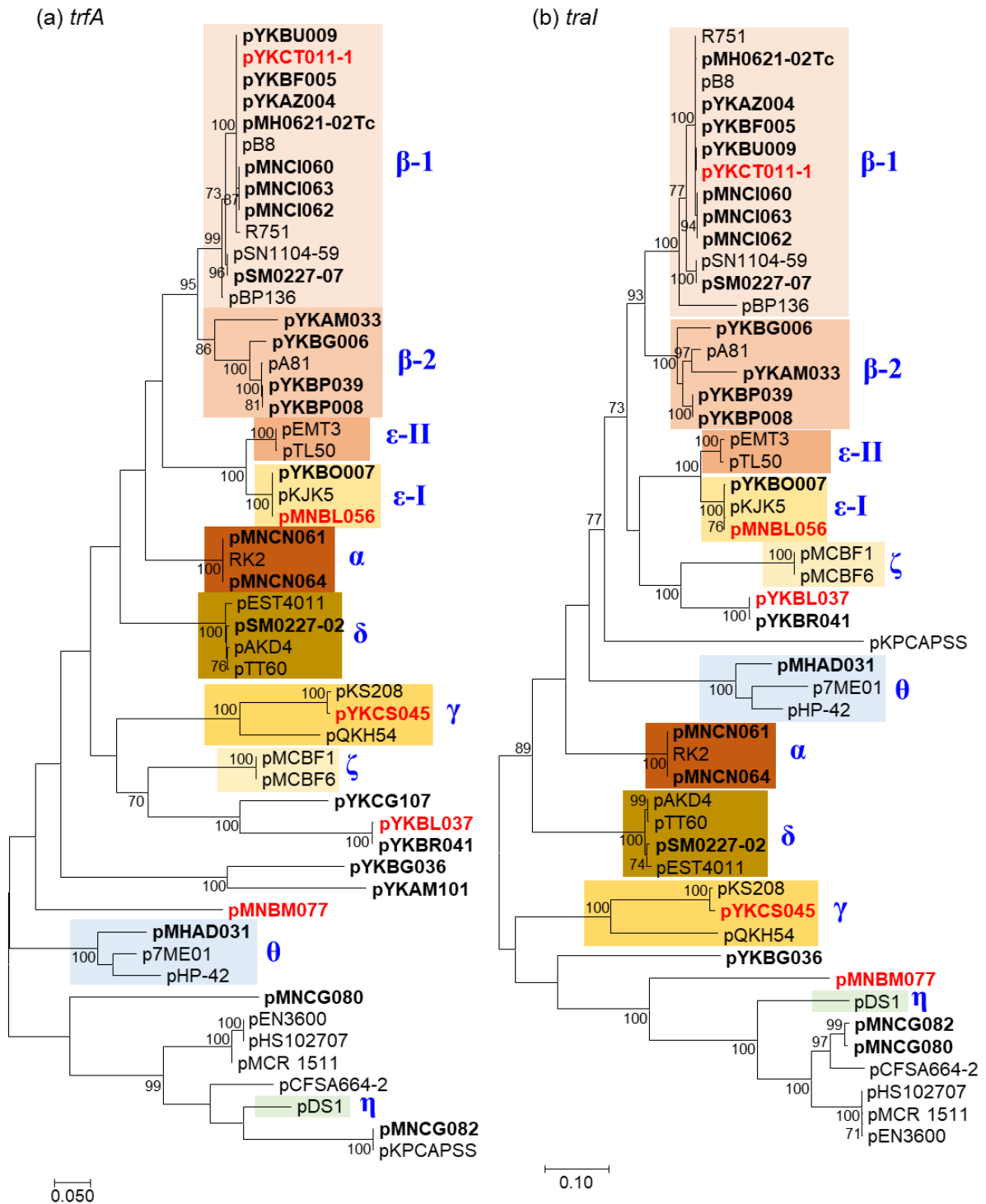


Figure 1-2. *trfA* (a) および *tral* (b) の塩基配列に基づく IncP-1 群プラスミドの系統樹。本研究で取得したプラスミドを太字で示し、特に多摩川から得られたプラスミドを赤で示す。また、既存のサブグループをギリシア文字で示した。数字は bootstrap 値(1000 回のうちの割合)を表し、70 以上の場合のみ示した。また、各図の右下のスケールバーの数値は塩基置換率を示す。

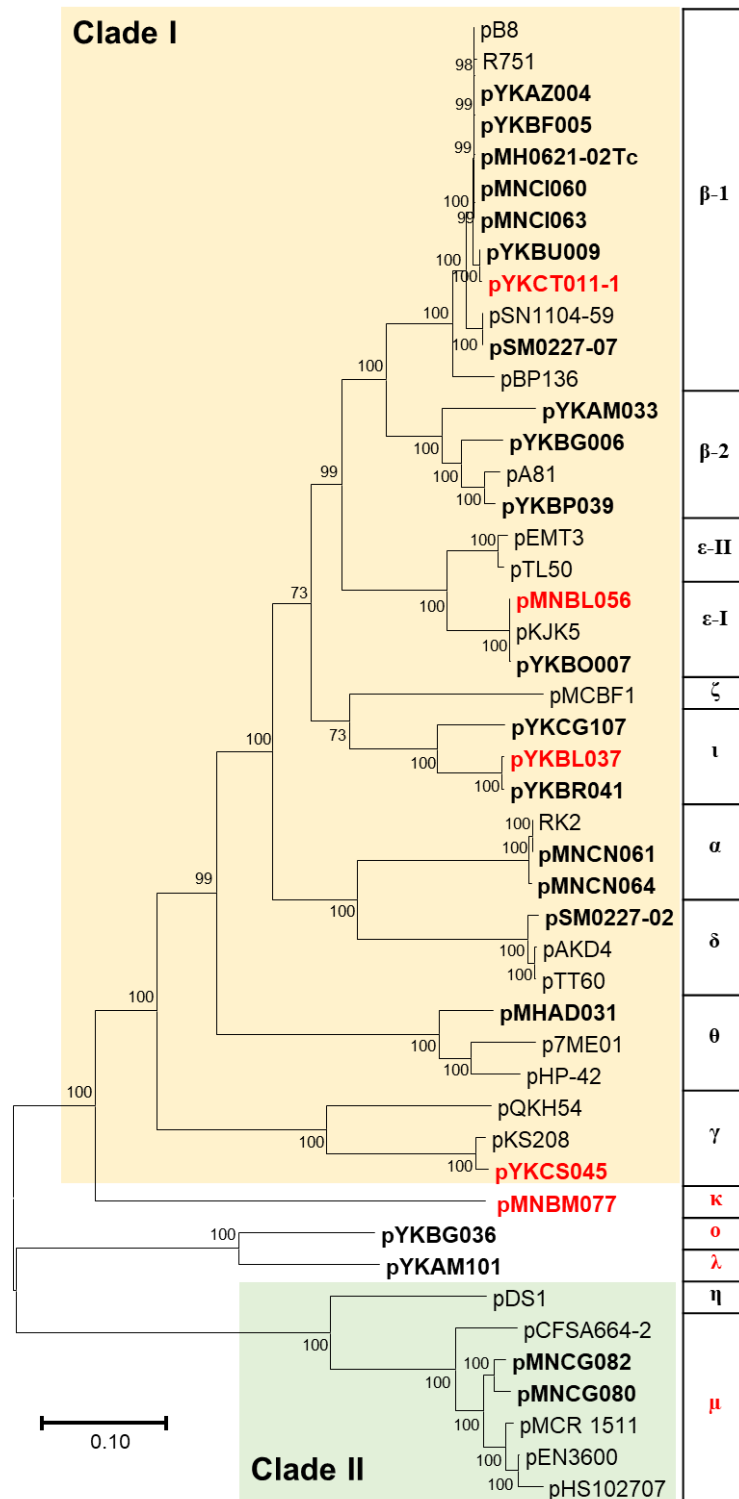


Figure 1-3. 28 の保存遺伝子を連結した塩基配列に基づく **IncP-1** 群プラスミドの系統樹。本研究で取得したプラスミドを太字で示し、特に多摩川から得られたプラスミドを赤で示す。また、サブグループをギリシア文字で示し、特に本研究で新たに提唱したグループを赤で示した。数字は bootstrap 値(1000 回のうちの割合)を表し、70 以上の場合のみ示した。また、各図の右下のスケールバーの数値は塩基置換率を示す。

1-3-4 PromA 群プラスミドの系統学的解析および比較ゲノム解析

PromA群プラスミドについても、IncP-1群と同様に、保存された24の遺伝子を連結させて系統樹を作製した(Figure 1-4). その結果、多摩川から得られたpYKCT010は、他に得られたpYKBL021, pYKBM022, pYK0709-71, pYK0709-104, pYKCT011-2や、先行研究で取得したPromAβ群内のいずれのプラスミドとも異なる位置にクレードを形成した. 岩手県の湖から得られたpYK0414-12と合わせて2本のプラスミドの遺伝子を連結させた塩基配列は互いに93.7%の一致度を示し、他のPromAβ 群プラスミドとは80.0-83.3%の一致度を示した. さらに、これら2本を除いたPromAβ群プラスミドどうしを比較すると、88.2%以上の一致度を示した. 以上から、上記 2本のプラスミドをPromAβ-2群、それ以外をPromAβ-1群とした. また、pYKBM023, pMNBM065-1はPromAγ群であった.

得られたプラスミドがいずれもアクセサリ遺伝子をもたなかったことについて考察する. 通常、プラスミドをもつ宿主細胞は、プラスミドという付加的なDNAを複製・維持するために、プラスミドをもたない細胞よりも多くのエネルギーを消費する. そのため、プラスミドをもつことが、その細胞の生存に有利にならない環境下では、プラスミドをもつ宿主は淘汰されてしまう. そうだとすると、本研究で取得したアクセサリ遺伝子を搭載しないPromA群プラスミドは、宿主にとっての利点がないように思える. この点は、薬剤耐性遺伝子等、種々の機能遺伝子(群)を搭載するIncP-1群プラスミドとは大きく異なる. しかし、それなら何故PromA群プラスミドは、IncP-1群プラスミドと同様に広く環境中に分布しているのだろうか. これは、(i) PromA群をもつことが、何らかの形で宿主の生存にとって有利にはたらく、(ii) PromA群を収集する過程でアクセサリ遺伝子が失われてしまった、という2つの理由が考えられる. これらの点は今後の研究によって明らかにするべきであろう. 特に (ii)については、ごく最近、農薬分解遺伝子や、薬剤耐性遺伝子をもつPromA群が報告された(Werner et al., 2020). ただし、それらの報告内では、プラスミド自体の遺伝子構造が不安定になることが示唆されており、PromA群のDNA伝播のメカニズムは、他のプラスミドと異なる可能性も考えられる.

1-3-5 種々のプラスミドの分布調査

多摩川から見出された新規IncP-1・PromA群や、薬剤耐性プラスミドとして、既存のヒト臨床株からも得られているIncA/CおよびIncN群プラスミドについて、それぞれ特異的なプライマー・DNAプローブを構築し、河川流域の試料中に当該プラスミドがどの程度分布するのか、PCR-サザンブロット法によって調べた. その結果、87種類の環境試料のうち、27種類からIncP-1群プラスミドを、24種類からPromA群プラスミドを検出した(Table 1-6). 従って、IncP-1群、PromA群プラスミドが存在する環境試料の数は、それぞれ47, 38種類と、ほぼ同数であると推定され、多摩川については、どちらも少なくともTama4, 5, 6の三か所に存在していた. このことは、双方の不和合性群に属するプラスミドとも実環境中に広く分布することを示しており、多摩川に関しても同様であった. また、Table 1-6に示すように、IncA/CおよびIncN群プラスミドは、活性汚泥を除けば、他の環境試料からは見出されにくかったことを考えると、多摩川は多様性に富むプラスミドが分布していることが示唆された.

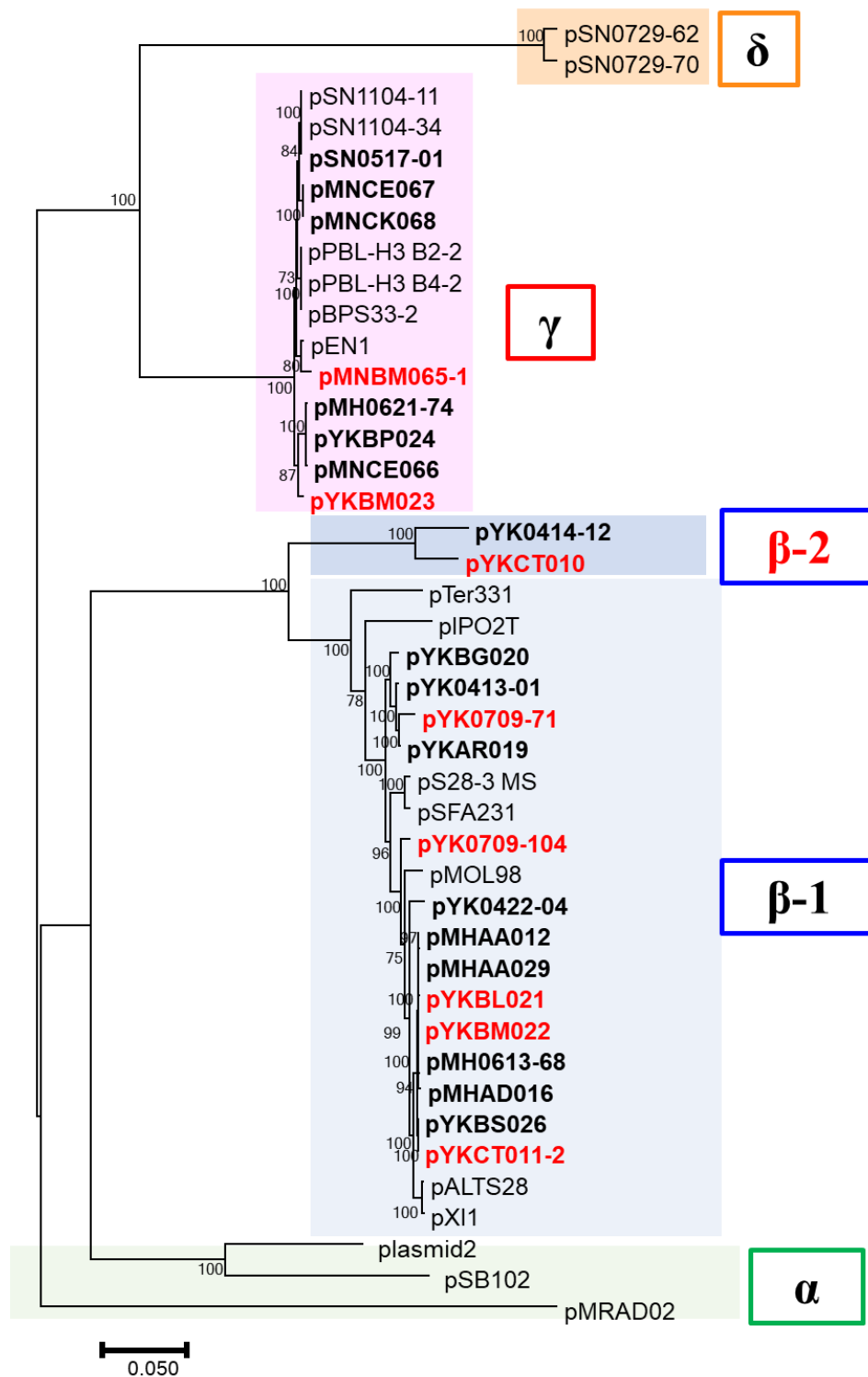


Figure 1-4. 24 の保存遺伝子を連結した塩基配列に基づく PromA 群プラスミドの系統樹。本研究で取得したプラスミドを太字で示し、特に多摩川から得られたプラスミドを赤で示す。また、サブグループをギリシア文字で示し、特に本研究で新たに提唱したグループを赤で示した。数字は bootstrap 値(1000 回のうちの割合)を表し、70 以上の場合のみ示した。また、各図の右下のスケールバーの数値は塩基置換率を示す。

Table 1-6. 各プラスミドの分布調査の結果(カッコ内は多摩川の試料の数を示す)

	IncP-1	IncPromA	IncA/C	IncN
Activated sludge (40)	10	5	10	3
Cow manure (2)	0	1	1	0
Lake sediment (32)	5	7	0	0
Marine sediment (16)	0	0	0	0
Paddy sediment (1)	1	1	0	0
Pond sediment (3)	2	1	1	0
River sediment (59)	7(0)	6(3)	2(2)	3(2)
Soil (12)	2	3	1	0
Total (163)	27	24	15	6

1-4 本章の総括と今後の課題

本章では多摩川の試料と、その他の環境試料から *P. resinovorans* または *E. coli* を受容菌として三親接合と二親接合を用いて自己伝達性プラスミドを収集し、種々の接合伝達性プラスミドを得ることに成功した。特に、IncP-1群プラスミドとPromA群プラスミドが多く収集された。従って、多摩川には、異なるサブグループのIncP-1群が存在していること、また、広宿主域型、狭宿主域型の双方の新たなIncP-1群プラスミドが、様々な薬剤耐性遺伝子を伝播していることが示唆された。また、PromA群プラスミドは、これまであまり発見例がなかったが、IncP-1群と同様、多摩川をはじめ様々な環境中で実際に伝播していることが示唆された。今後は、発見したIncP-1群プラスミドや、PromA群プラスミドが、どのような微生物間を伝播しているのかを明らかにする必要がある。次章ではこのうち、PromA群プラスミドについて、その宿主域を比較することとした。

なお、本研究ではコリスチン耐性遺伝子をもつプラスミドや、コリスチン耐性菌を得ることはできなかった。これは、多摩川を含む日本の環境試料には、コリスチン耐性菌が極めて少ないことを示しており、今のところ本薬剤の耐性菌については、大きな問題になっていないことが示唆された。

2 多摩川に存在するプラスミドの宿主域比較

2-1 結論

前章では多摩川流域から種々のプラスミドを収集することに成功した。本章では、得られたプラスミドがどのような細菌種を伝播するのかを明らかにするために、接合実験を行い、その宿主域について比較した。

2-2 実験方法と材料

2-2-1 試薬・試料

実験に使用した試薬は、全て試薬品特級の「生化学・分子生物学用」のグレードのものを使用し、特に記載のない限りそのまま使用した。

2-2-2 培養条件

前章の培養条件と同様の条件で行った。

2-2-3 使用菌株とプラスミド

本章で使用した菌株・プラスミドを Table 2-1 に示す。プラスミドの供与菌としては、*Pseudomonas putida* SMDBS 株を使用した。また、プラスミドについては、多摩川から得られた PromA 群の 3 つのサブグループ (PromA β -1, PromA β -2, PromA γ) に属するプラスミドと、先行研究で既に得られていた別のサブグループ (PromA δ) の宿主域を比較した (なお、各プラスミドは、多摩川から得られたプラスミドそのものではなく、既に先行研究で得られていた各サブグループに代表的なプラスミドを用いた)。各プラスミドに GFP および Km, クロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子を、ミニトランスポゾンを利用して挿入したものを用いた。

2-2-4 環境サンプル

環境サンプルとしては、2020年7月17日(天気晴(前日雨), 気温:24°C)に静岡大学工学部3号館付近(N34.725556, E137.7175), 2020年8月12日(天気晴, 35°C)に静岡大学佐鳴会館付近(N34.723056, E137.718333)で採取した土壌, および2020年8月12日(天気晴, 35°C)に佐鳴湖北東(N34.7175, E137.696944)で採取した湖水を用いた。

*本来は多摩川の河川水・底泥を用いるべきであったが、新型コロナウイルス感染症拡大のため、2020年度のサンプリングのための出張ができず、代わりに静岡大学工学部から徒歩でサンプリング可能な試料を用いた。

2-2-5 環境試料中の微生物群集との接合実験

より多くの微生物を対象として宿主細菌を決定し、比較するため、土壌、湖水中に生息する微生物群集を受容菌候補として用いて接合実験を行った。接合条件は栄養源を含む LB 平板培地上を介する方法を LBAgar 接合、栄養源を含まない Agar 培地上のみで行う方法を Agar 接合とし、本研究では、環境試料に土壌(7月に採取)を使用して LBAgar 接合を行った接合条件を SoilLBA, 同土壌(8月に採取)を使用して Agar 接合を行った SoilA, 佐鳴湖の湖水を使用して LBAgar 接合を行った Lake Sanaru LBA の3種類を行った。

Table 2-1 本研究で使用した菌株およびプラスミド

Strain or Plasmid	Relevant characteristics	Reference
Bacterial strains		
<i>Aeromonas media</i> JCM 2385	<i>Gammaproteobacteria</i> , type strain	BRC-JCM, RIKEN
<i>Burkholderia plantarii</i> JCM 5492 ^T	<i>Betaproteobacteria</i> , type strain	BRC-JCM, RIKEN
<i>Comamonas teststeroni</i> JCM 5832 ^T	<i>Betaproteobacteria</i> , type strain	BRC-JCM, RIKEN
<i>Delftia acidovorans</i> JCM 5833 ^T	<i>Betaproteobacteria</i> , type strain	BRC-JCM, RIKEN
<i>Rhizobium pusence</i> JCM 20371 ^T	<i>Alphaproteobacteria</i> , type strain	BRC-JCM, RIKEN
<i>R. radiobacter</i> JCM 16209	<i>Alphaproteobacteria</i>	BRC-JCM, RIKEN
<i>Pseudomonas putida</i>		
SMDBS	A <i>dapB</i> -deleted strain of SM1443, Rif ^r of KT2440 with mini-Tn5- <i>lacI</i> ⁺ cassette inserted into the chromosome	(Shintani et al., 2014)
SMDBS (pMH0613-68:: <i>gfp</i>)	SMDBS harboring pMH0613-68:: <i>gfp</i>	This study
SMDBS (pYK0414-12:: <i>gfp</i>)	SMDBS harboring pYK0414-12:: <i>gfp</i>	This study
SMDBS (pSN1104-11:: <i>gfp</i>)	SMDBS harboring pSN1104-11:: <i>gfp</i>	This study
SMDBS (pSN0729-62:: <i>gfp</i>)	SMDBS harboring pSN0729-62:: <i>gfp</i>	This study
Plasmid		
pMH0613-68:: <i>gfp</i>	mini-Tn5-Km-P _{A1/04/03} -RBSII-gfpmut3*-T ₀ -T ₁ was inserted in 40,893 nt of pMH0613-68.	This study
pYK0414-12:: <i>gfp</i>	mini-Tn5-Km-P _{A1/04/03} -RBSII-gfpmut3*-T ₀ -T ₁ was inserted in 35,137 nt of pYK0414-12.	This study
pSN1104-11:: <i>gfp</i>	mini-Tn5-Km-P _{A1/04/03} -RBSII-gfpmut3*-T ₀ -T ₁ was inserted in 38,362 nt of pSN1104-11.	This study
pSN0729-62:: <i>gfp</i>	mini-Tn5-Km-P _{A1/04/03} -RBSII-gfpmut3*-T ₀ -T ₁ was inserted in 35,614 nt of pSN0729-62.	This study

受容菌候補とする微生物群集は、密度勾配溶媒としてHistodenz (C₁₉H₂₆I₃N₃O₉) (Sigma-Aldrich)を用いて(Shintani et al., 2014の手法を利用), 土壌・湖水から抽出したものを使用した。また、接合実験は、LB寒天培地(LBA), または寒天のみの培地(Agar)上に孔径0.45 μmメンブレンフィルター(ADVANTEC)を用いて行った。

2-2-6 FACSを用いた接合完了体の取得と同定

FACSによる接合完了体細胞の検出と分離は、Moflo XDP Intellisort II instrument (Beckman Coulter)を用いて行った。488 nmアルゴンレーザーと70 μL nozzle orifice を使用し、ソーティングした(詳細な条件は、Shintani et al., 2014の手法を利用した)。

2-2-7 接合完了体の同定および遺伝子型の解析

前章に示した方法で抽出したDNA(場合によっては菌株の培養液)を鋳型DNAとし、各プラスミドに特異的な遺伝子を増幅するプライマーを用いてPCRを行った。その後、産物をアガロースゲル電気泳動に供し、目的の増幅産物が認められた菌株について、16S rRNA遺伝子をPCRで増幅した。得られた増幅産物の塩基配列を、r2Lプライマーを用いてサンガー法で塩基配列を決定(ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託)し、16S Microbial database (NCBI <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/>, 2021年1月)およびGeneious Prime 2021 (Kearse et al., 2012) 内のBLAST機能を使用して接合完了体の同定を試みた。各プラスミドに特異的な遺伝子および16S rRNA遺伝子を増幅するプライマー配列をTable 2-2に示す。またPCRは、前章で述べたKOD Oneを用い、(98°C, 10 sec, 55°C, 5 sec, 68°C, 5 sec), 12°C hold(カッコ内を30サイクル繰り返す)の条件で行った。

一方、FACSで収集した15000細胞の接合完了体候補株から、直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を増幅してアンプリコンシークエンス解析を行った。アンプリコンシークエンスは、株式会社生物技研に委託し、ExTaq HS(タカラバイオ)による16S rRNA遺伝子のPCR増幅後、MiSeq (illumina)を用いて行った。2回のPCRに使用したプライマーをTable 2-2に示す。なお、接合完了体15000細胞を収集したことから、リード数の割合が1/15000よりも小さい場合には、当該リードにあたる細菌は存在しないものとして扱った。解読された塩基配列から、Fastx toolkitのfastq barcode splitter (Joshi and Fass, 2011) を用いて、使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出した。プライマー配列と3'末端の50 bpを削除したのち、上述した方法と同様に接合完了体を同定した。

2-2-8 環境試料からのDNA抽出と菌叢解析

前章で示した方法によって環境試料中の微生物群集からDNAを抽出した後、菌叢解析に供した。菌叢解析は、株式会社生物技研に委託して解読した16S rRNA遺伝子配列から、上述の16S Microbial databaseおよびGeneious Prime 2021 (Kearse et al., 2012) のBLAST機能を使用して行った。

Table 2-2 使用したプライマー

Target	Template (Primer name)	Sequence (5'→3')	Reference
<i>repA</i> pMH0613-68	pMH0613-68	F CGATGAAGCAGAGCTTGATAA	This study
		R CTGGGGTACATCACCAGTCC	
<i>repA</i> pYK0414-12	pYK0414-12	F GTTGAAGGCTTTCAGGCAAT	This study
		R CAAAACGTGTTCGATGCACT	
<i>repA</i> pSN1104-11	pSN1104-11	F AGGCATGAGCGCAGAAGAC	(Yanagiya et al., 2018)
		R CCACCATCACATGCTTCAAC	
<i>repA</i> pSN0729-62	pSN0729-62	F TTGACGAAGACGCTTACACG	(Yanagiya et al., 2018)
		R AGAACAAGGCCGTTAGCAGA	
16S rRNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	(Lane, 1991; Turner et al., 1999)
	1496R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	
1st PCR	r2L	GACTACCAGGGTATCTAATC	(Hiraishi, 1992)
	1st-515f_MIX	GCCAATCAGTGACATTGTGG	
2nd PCR	1st-806r_MIX	TGCGTTCGTAGATGGTCTTG	
	2ndF	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	
	2ndR	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	

2-3 実験結果および考察

2-3-1 環境試料中の微生物群集との接合実験で取得した接合完了体

4種類のPromA群プラスミドをそれぞれ保持する供与菌*P. putida* SMDDBS株と、環境試料から抽出した微生物群集とを接合させた。その後、各菌体懸濁液をFACSに供し、緑色蛍光を指標にして接合完了体細胞をLB培地へソーティングした。培地上でコロニーを作るまで培養した後、各プラスミドについて、192コロニーをランダムに選択して遺伝子レベルの解析(プラスミドの有無・16S rRNA遺伝子配列に基づく同定)を行った。その結果、*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*の、合わせて4門7綱36属の細菌を、PromA群プラスミドの接合完了体として得ることができた(Table 2-3)。このうち、pSN1104-11, pYK0414-12は3門, pSN0729-62は2門, pMH0613-68は、*Proteobacteria*門の3綱の細菌を宿主とすることが示された。この結果は、広い宿主域を示すという過去の知見と一致していた (Klumper et al., 2015; Yanagiya et al., 2018)。また、新たなサブグループ (PromAβ-2) に属するpYK0414-12についても広い宿主域が認められた。

次に、各プラスミドの接合完了体として同定された属の種類や、得られた接合完了体数に着目する。接合完了体のうち、*Alphaproteobacteria*綱に属する菌株は、取得された9株(4属)のうち、8株がpSN1104-11の接合完了体であった(Table 2-3)。これに対し、取得された*Betaproteobacteria*綱の54 / 80株(特に*Comamonas*属)がpMH0613-68の接合完了体であった(Table 2-3)。pYK0414-12とpSN0729-62の接合完了体の大部分を占めた属は、*Gammaproteobacteria*綱の属であり、*Stenotrophomonas*属細菌は17 / 32株がpYK0414-12の接合完了体として取得され、pSN0729-62の接合完了体のうち、62 / 170株は*Pseudomonas*属細菌であった(Table 2-3)。従って、接合完了体の種類・数のいずれについても、プラスミドごとに固有の特徴が認められた。4本全てのプラスミドの接合完了体として得られた菌株は、*Gammaproteobacteria*綱の*Enterobacter*属、*Klebsiella*属、*Stenotrophomonas*属、*Raoultella*属、*Aeromonas*属、*Pseudomonas*属の6属のみであった(ただし、これら6属は全体の70%を占めた)(Table 2-3)。従って、4本のプラスミドが、同一の不和合性群に属するにもかかわらず、それぞれを宿主とする細菌が異なる傾向があることが示唆された。

各プラスミドの接合完了体数は、遺伝子レベルの解析を行った192コロニーの数よりも少なかった(Table 2-3, 最下行の「プラスミド保持数／解析数」参照)。これは複数のコロニーからプラスミドが検出されず、接合完了体として認められなかったためである。プラスミドが検出されなかった菌株は、接合伝達後、そのプラスミドを複製できなかった可能性や、細胞分裂の過程でプラスミドを脱落した可能性が考えられる。特にpYK0414-12では、プラスミド保持株は解析した192株のうち58株のみであり、他と比べて極端に少なかった(Table 2-3)。この現象は特にSoilLBA条件で顕著(7 / 96株)であった。

一方、収集した15000細胞から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子に基づくアンプリコンシーケンス解析を行った結果、接合完了体として、計16門37綱65目110科に属する細菌が同定された。各接合条件における接合完了体の綱レベルでの割合をFig. 2-1に示す。全てのサンプルに共通して*Alphaproteobacteria*綱と*Gammaproteobacteria*綱細菌が主要な接合完了体として検出された(Fig. 2-1)。ただし、上述した2つの綱の細菌の割合は、プラスミドによって異なった。例えば、Lake Sanaru LBA条件では、pSN1104-11, pYK0414-12の接合完

了体として得られた *Gammaproteobacteria* 綱細菌の割合が、それぞれ33%、36%であった (Fig. 2-1C). 一方, pMH0613-68, pSN0729-62 の場合は、それぞれ 80%、63%と大部分を占めた (Fig. 2-1C). 反対に, *Alphaproteobacteri* 綱細菌の割合は、pSN1104-11, pYK0414-1 では49%、39%であったのに比べ、pMH0613-68, pSN0729-6 では 8%、26%と、低い割合であった (Fig. 2-1C). この傾向は、他の2種類の接合条件においても同様であった (Fig. 2-1AB).

以上の点から、同一不和合性群に属する上記4本のプラスミドの宿主域が異なることが接合実験によって示された。特に、多摩川から見出された **PromA β -1**、**PromA β -2**、**PromA γ** の宿主域が異なったことは、各プラスミドの伝播経路が異なることを示唆していた。

2-3-2 多摩川から採取した試料の菌叢解析

前章でプラスミドを収集した、多摩川の試料(3シーズン、6箇所、計18試料)から、全DNAを抽出後、菌叢解析を行った。結果をFigure 2-3示す。その結果、季節の違いに依らず、Tama1~3とTama4~6で菌叢に大きな違いが認められた (Figure 2-3)。これはTama3-Tama4の地域に、多摩上流水再生センター、北多摩一号水再生センターまで、複数の下水処理場があり、処理水が河川に流入するためと考えられた。この点、同様の菌叢解析が、当財団の助成を受けた、春日によっても報告がある(2020)。菌叢について詳細を比較すると、*Bacteroidetes*門の*Flavobacteriaceae*科や*Proteobacteria*門*Betaproteobacteria*綱の*Comamonadaceae*科や*Oxalobacterales*綱の*Oxalobacteriaceae*科および*Gammaproteobacteria*綱の*Pseudomonadaceae*科、*Moraxellaceae*科が主要な細菌として得られた。興味深いことに、これらのうち、*Flavobacteriaceae*科、*Comamonadaceae*科、*Pseudomonadaceae*科および*Moraxellaceae*科は、PromA群プラスミドの宿主として、比較的多数が土壌や佐鳴湖水から得られた (Figure 2-1, 2-2)。従って、多摩川でも、こうした細菌間を伝播しているのかもしれない。

Table 2-3. 各接合条件で取得した接合完了体(属)の数 (EzBioCloud server を用いて同定し, 97%以上の相同性を示した属を示す).

Genus	pSNI1104-11		pMH0613-68		pYK0414012		pSN0729-62		Family	Class	Order	
	Soil/LBA	Soil/A	Sanaru	Soil/LBA	Soil/A	Sanaru	Soil/LBA	Soil/A				Sanaru
<i>Rhizobium</i>	1		1						Rhizobiaceae	Alpha-proteobacteria		
<i>Agrobacterium</i>		1										
<i>Beijerinckia</i>	1											
<i>Ensifer</i>	1	3										
<i>Comamonas</i>			54				6		Comamonadaceae	Beta-proteobacteria		
<i>Variovorax</i>		2										
<i>Burkholderia</i>				1				1				
<i>Delftia</i>	2											
<i>Achromobacter</i>		1	3			2	1	3	Alcaligenaceae			
<i>Aquimonas</i>												
<i>Stenotrophomonas</i>	3	3		3	12	2		1	Xanthomonadaceae			
<i>Enterobacter</i>	3			4	1			1				
<i>Klebsiella</i>		8		5	1							
<i>Kosakonia</i>	4			2								
<i>Lelliottia</i>								1				
<i>Leclercia</i>			2	2								
<i>Siccibacter</i>				1								
<i>Pluralibacter</i>				1								
<i>Yokenella</i>	2											
<i>Raoultella</i>	33	1		3	2	1		18	Enterobacteriaceae	Gamma-proteobacteria	Proteobacteria	
<i>Citrobacter</i>				1	2							
<i>Buttiauxella</i>				2								
<i>Kluuyvera</i>				1								
<i>Erwinia</i>									Erwiniaceae			
<i>Hefnia</i>									Hafniaceae			
<i>Pseudomonas</i>	14	5	6	8	1	2	2	54	Pseudomonadaceae			
<i>Acinetobacter</i>							3		Moraxellaceae			
<i>Aeromonas</i>			17		2	8	16	1	Aeromonadaceae			
<i>Vibrio</i>			1				1		Vibrionaceae			
<i>Shewanella</i>					1				Shewanellaceae			
<i>Bacillus</i>						1			Bacillaceae	Firmicutes	Firmicutes	
<i>Flavobacterium</i>								1	Flavobacteriaceae	Flavobacteria		
<i>Chryseobacterium</i>			1									
<i>Myroides</i>												
<i>Sphingobacterium</i>									Sphingobacteriaceae	Sphingobacteriia		
<i>Krasilnikoviella</i>		1							Promicromonosporaceae	Actinobacteria	Actinobacteria	
プラスミド保持株 / 解析数	64 / 96	25 / 48	30 / 48	8 / 96	25 / 48	30 / 48	7 / 96	25 / 48	26 / 48	88 / 96	39 / 48	43 / 48
		119		140		58		170				

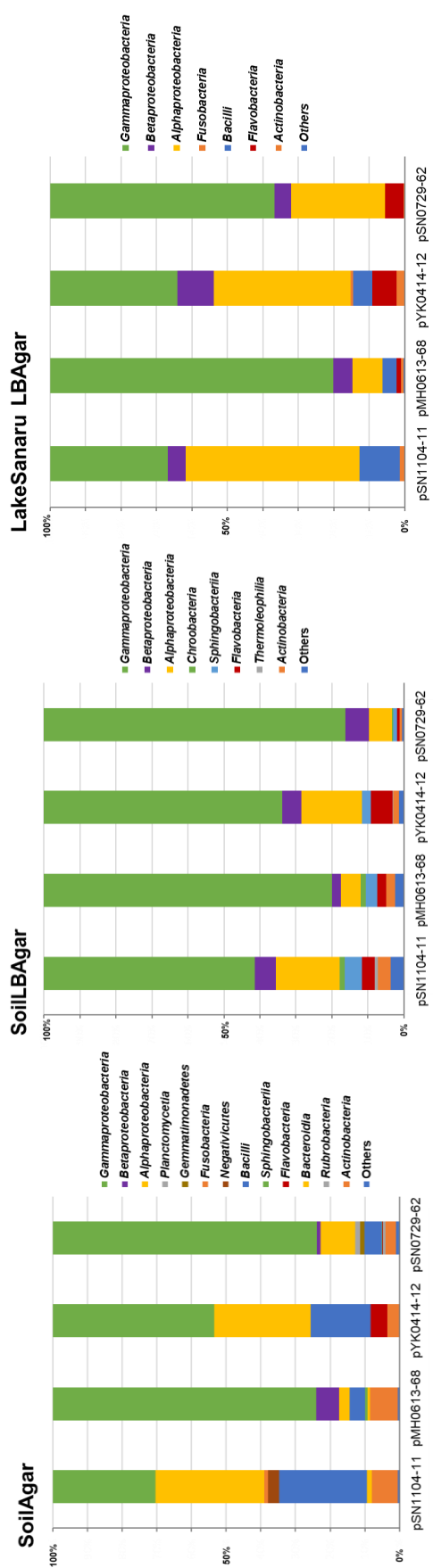
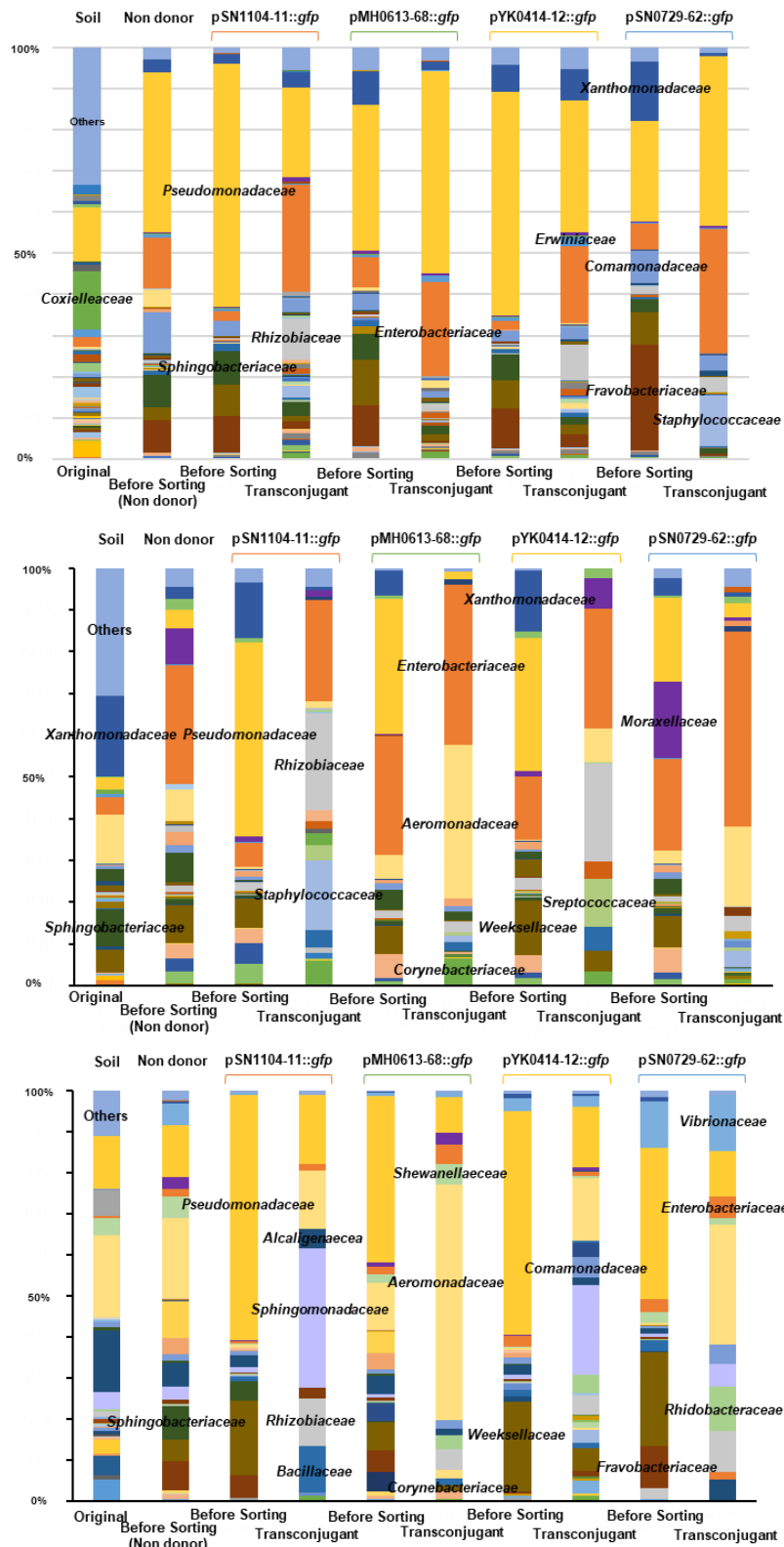


Fig. 2-1. 各接合条件で得られた15,000の接合完了体細胞の菌叢(網レベル)

左から, (A) SoilLBA (B) SoilA (C) Lake Sanaru LBA とする.



Fi

Fig.2-2 環境試料と微生物画分の接合前後の菌叢，および接合完了体の菌叢（科レベル．上から(A) SoilLBA, (B) SoilA, (C) Lake Sanaru LBA.

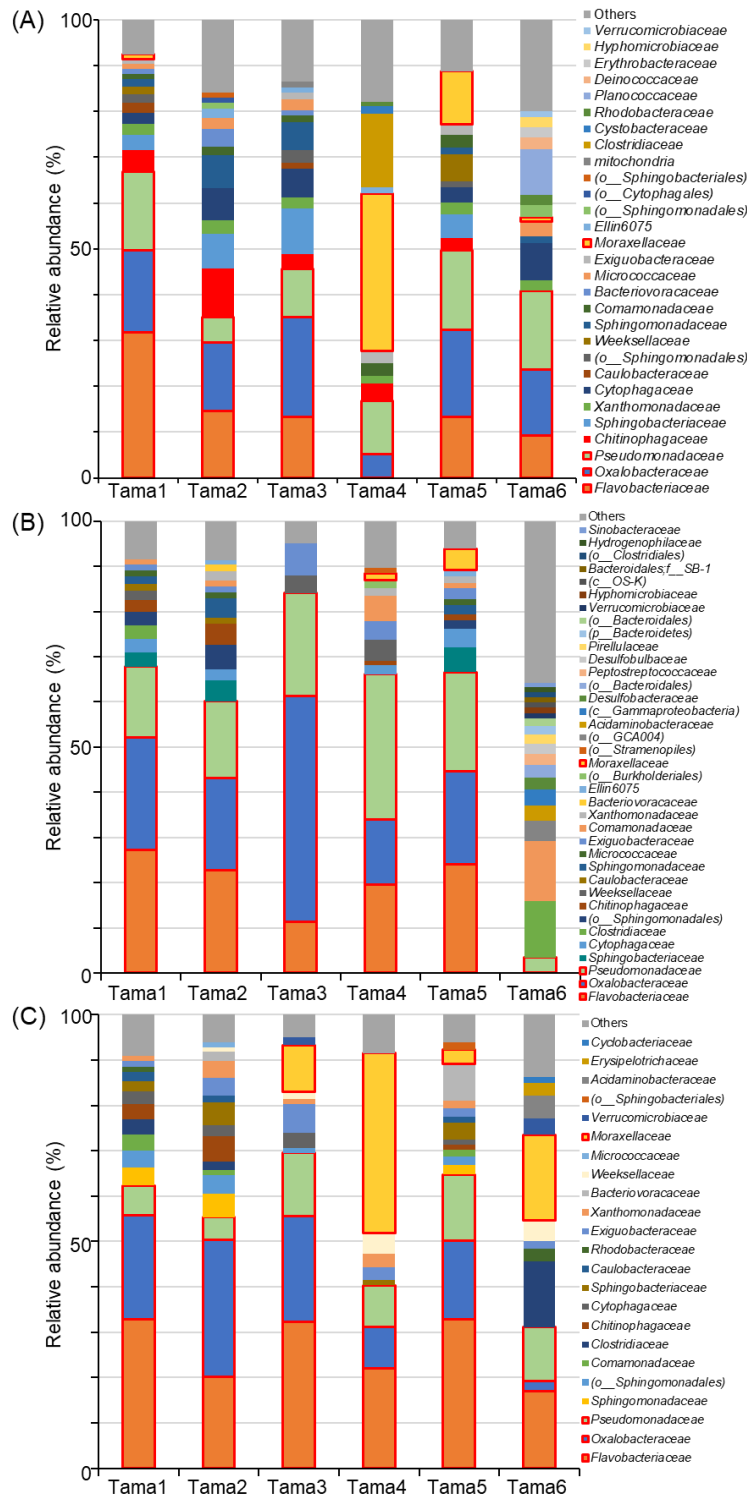


Fig. 2-3 多摩川より採取した試料の菌叢 (科レベル).

(A) 2019年7月6日, (B) 2019年10月6日, (C) 2020年2月15日に採取. 場所 (Tama1~6)については, Figure 1-1を参照. 高い割合を示した科について, 赤枠で示した.

2-4 本章の総括と今後の課題

本章では多摩川をはじめ多くの環境試料から得られた、新規広宿主域プラスミドPromA群プラスミドについて、その宿主域を比較した。その結果、PromA群の異なるサブグループ間で宿主域が異なることが示された。これは、PromA群プラスミドが種々の細菌間を伝播する過程で、サブグループごとに接合伝達しやすい細菌を「選んで」伝播している可能性を示していた。本来であれば、多摩川より収集した細菌画分そのものを用いて宿主域の比較をするべきであるが、本研究期間内に、新型コロナウイルスによる感染拡大の影響が払しょくされず、静岡県浜松市周辺の環境試料を使わざるを得なかった点は、再検討する余地があると考えられる。特に、多摩川の河川水は、中流域から下流域にかけて、大半が下水処理水になることもあり、他の河川の菌叢とは異なることが示唆されている。従って、この流域で生じているプラスミドの接合伝達現象は、今後も注意して追跡する必要があるだろう。

また、前章で PromA 群プラスミドが薬剤耐性遺伝子などのアクセサリー遺伝子をもたないことを示した。これは、アクセサリー遺伝子をもつ PromA 群プラスミド自体が、キャプチャリングに用いた宿主内では不安定化する可能性が考えられる。もしかすると、自然界には、アクセサリー遺伝子を搭載する PromA 群プラスミドを保有するのに適した宿主が存在するが、我々はその宿主を同定できていないのかもしれない。本研究で得られた PromA 群プラスミドの宿主にそのような細菌が含まれていないか、今後のより詳細な検証が必要となるだろう。

3 本研究のまとめ

本研究は、東京という巨大都市を流れる、多摩川で遺伝子の水平伝播を真に担うプラスミドの同定を最終的な目標として実施した。その結果、多摩川からは、IncP-1群やPromA群プラスミドをはじめとして、多様なプラスミドを多数得ることに成功した。特に、IncP-1群に属するプラスミドであるのに、*Enterobacteriaceae*科のみを宿主とするプラスミドの発見は特筆すべきものである。何故なら、元来広い宿主域を示すとされてきた IncP-1群プラスミドが、限定された宿主域を持つプラスミドとして進化し、既知のIncP-1群とは異なる性質をもつようになった可能性が高いからだ。また、これらのプラスミドには、重要な薬剤耐性遺伝子(カルバペネム耐性遺伝子やコリスチン耐性遺伝子)をもつものが、他の研究で報告されている。従って、発見した新たなプラスミドの性質を、それ以外のプラスミドと詳細に比較することが重要であろう。

幸運なことに、コリスチン耐性菌は見出されなかった。しかし、得られたIncP-1群プラスミドの多くが、カルバペネム耐性遺伝子をはじめとする、多剤耐性菌の出現に重要な薬剤耐性遺伝子を搭載していた。これは、多摩川で薬剤耐性遺伝子が種々の細菌間を伝播しうることを示すものである。

また、PromA群プラスミドという、薬剤耐性遺伝子や他のアクセサリ遺伝子をもたない広宿主域プラスミドを得た。本プラスミドが、こうした遺伝子群を伝播するのかもしれないのか、という点については、本研究では結論が出なかったが、ごく最近、薬剤耐性遺伝子をもつPromA群プラスミドがDNAの公共データベースに登録されている(GenBank accession no. MF495477, MN366357)。従って、本群プラスミドも、薬剤耐性遺伝子をはじめとする種々の遺伝子を伝播しうる可能性は十分に高い。本研究では、異なるサブグループに属するPromA群プラスミドの宿主域についても比較を行い、違いを見出すことに成功した。この結果は、多摩川には、伝播経路の異なるPromA群プラスミドが存在することを示唆する。本研究内では、このPromA群プラスミドの役割を理解するには至らなかったが、多摩川と、それ以外の環境試料にも広く分布していることを考慮すると、何らかの形で遺伝子の伝播に寄与していると考えるのが自然である。特に、PromA群の元の宿主については、ほとんど情報がない。従って、本群プラスミドは、まだ培養できていない細菌を宿主にする可能性も考えられる。こうした観点から、本群プラスミドの元の宿主についての同定も重要になるだろう。

以上の結果は、我々の巨大都市に住む我々にとっても身近な河川である多摩川には、薬剤耐性菌の出現・蔓延となりうる伝播性のプラスミドが存在することを示すものである。こうした情報を社会に正しく公表することは、例えば医師が処方した抗生剤を正しく飲み切るとか、薬剤耐性菌の蔓延という「サイレントパンデミック」の危険性についての情報を平時から「知っておく」ことで、人々の啓蒙に繋がると考えられる。本研究を遂行中に、不幸にも世界規模でウイルスによるパンデミックが起きてしまった。多剤耐性菌によるパンデミックを引き起こさないためにも、こうした環境中における薬剤耐性菌や薬剤耐性遺伝子の伝播現象を追跡し、その動態を理解することは重要である。引き続き、重要なプラスミドの性状を理解するとともに、より網羅的にその伝播経路の推定・解明を可能にする新たな手法開発を行うことが、今後の課題として重要であろう。

報告書以外の成果公表

学会発表(いずれも発表済み):

日本農芸化学会 2021 年度大会・一般講演(口頭)

「多摩川流域における薬剤耐性遺伝子の伝播を担うプラスミドの収集と比較」,

発表者: 中道孝一郎, 金子健成, 森光矢, 森内良太, 道羅英夫, 金原和秀, 二又裕之,
新谷 政己

日本進化学会第 22 回オンライン大会・一般講演(ポスター)

「薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与するプラスミドの収集」

発表者: 中道孝一郎, 金子健成, 森光矢, 森内良太, 道羅英夫, 金原和秀, 二又裕之,
新谷政己

日本農芸化学会 2020 年度大会・一般講演(口頭)(大会は中止になったが発表は成立)

「薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与するプラスミドの収集」

発表者: 中道孝一郎, 森光矢, 金原和秀, 新谷政己

参考文献

- Bahl, M. I., Burmolle, M., Meisner, A., Hansen, L. H., and Sorensen, S. J. (2009). All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel epsilon subgroup, are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. *Plasmid* 62, 134–139. doi:10.1016/j.plasmid.2009.05.004.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., et al. (2018). The transferable resistome of produce. *mBio* 9. doi:10.1128/mBio.01300-18.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., and Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63, 219–228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Hiraishi, A. (1992). Direct automated sequencing of 16S rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 210–213. doi:10.1111/j.1472-765x.1992.tb00765.x.
- Hölzel, C. S., Tetens, J. L., and Schwaiger, K. (2018). Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: A need for quantitative risk assessment. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 671–688. doi:10.1089/fpd.2018.2501.
- Hu, Y., Nguyen, S. V., Liu, C., Wang, W., Dong, Y., Fanning, S., et al. (2019). Complete genome and plasmid sequences of seven isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* harboring the *mcr-1* gene obtained from food in China. *Microbiol Resour Announc* 8. doi:10.1128/MRA.00114-19.
- Joshi, N. A., and Fass, J. N. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. Github Available at: <https://github.com/najoshi/sickle> [Accessed April 21, 2020].
- Ka, J. O., and Tiedje, J. M. (1994). Integration and excision of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid in *Alcaligenes paradoxus* and evidence of its natural intergeneric transfer. *J. Bacteriol.* 176, 5284–5289. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8071203>.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Klumper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L. H., Sorensen, S. J., et al. (2015). Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *ISME J.* 9, 934–945. doi:10.1038/ismej.2014.191.

- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., et al. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176. doi:0378111995005841.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.
- Lane, D. J. (1991). “16S/23S rRNA sequencing,” in *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, eds. S. E. and G. M. (Chichester: John Wiley & Sons), 115–147.
- Li, G., Zhang, Y., Bi, D., Shen, P., Ai, F., Liu, H., et al. (2015). First report of a clinical, multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolate coharboring fosfomycin resistance gene *fosA3* and carbapenemase gene *bla_{KPC-2}* on the same transposon, Tn1721. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 338–343. doi:10.1128/AAC.03061-14.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Shintani, M., Matsui, K., Inoue, J., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., et al. (2014). Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 138–145. doi:10.1128/AEM.02571-13.
- Smalla, K., Heuer, H., Götz, A., Niemeyer, D., Krögerrecklenfort, E., and Tietze, E. (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4854–4862. doi:10.1128/aem.66.11.4854-4862.2000.
- Tanizawa, Y., Fujisawa, T., and Nakamura, Y. (2018). DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 34, 1037–1039. doi:10.1093/bioinformatics/btx713.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., and Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461381>.
- Yanagiya, K., Maejima, Y., Nakata, H., Tokuda, M., Moriuchi, R., Dohra, H., et al. (2018). Novel self-transmissible and broad-host-range plasmids exogenously captured from anaerobic granules or cow manure. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.02602.
- Yano, H., Wegrzyn, K., Loftie-Eaton, W., Johnson, J., Deckert, G. E., Rogers, L. M., et al. (2016). Evolved plasmid-host interactions reduce plasmid interference cost. *Mol. Microbiol.* 101, 743–756. doi:10.1111/mmi.13407.
- Zhao, F., Feng, Y., Lü, X., McNally, A., and Zong, Z. (2017). IncP plasmid carrying colistin

resistance gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from hospital sewage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. doi:10.1128/AAC.02229-16.

Zheng, B., Xu, H., Guo, L., Yu, X., Ji, J., Ying, C., et al. (2020). Genomic and phenotypic diversity of carbapenemase-producing enterobacteriaceae isolates from bacteremia in china: A multicenter epidemiological, microbiological, and genetic study. *Proc. Est. Acad. Sci. Eng.* doi:10.1016/j.eng.2020.10.015.

浦野直人ら (2013), 病原性菌を含むスーパー多剤耐性菌の多摩川における存在調査, 公益財団法人とうきゅう環境財団, 研究助成・学術研究 VOL. 42-No. 304

春日郁朗 (2020), 多摩川における薬剤耐性遺伝子の動態に及ぼす下水処理水の影響評価, 公益財団法人 東急財団, 研究助成・学術研究 VOL. 49-No. 343

巨大都市を流れる多摩川流域で薬剤耐性遺伝子を伝播しうる
プラスミドの同定とその伝播経路の解明

(研究助成・学術研究 VOL. 50—NO. 355)

著 者 新谷 政己

国立大学法人静岡大学 工学部・准教授 (採択当時)

発行日 2021年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>