

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05790

研究課題名（和文）養殖環境で生じる多剤耐性遺伝子の細菌プラスミドから染色体への乗り換え機構の解明

研究課題名（英文）Transposition mechanisms of multiple drug resistance genes from plasmids to chromosome among bacteria in the aquaculture environment

研究代表者

野中 里佐（Lisa, Nonaka）

尚綱大学・生活科学部・准教授

研究者番号：70363265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、養殖環境由来の多剤耐性菌において、伝達性プラスミドが接合体の染色体に組み込まれる分子メカニズムを明らかにした。また、新規の可動遺伝因子である「SE: strand-biased circularizing integrative elements」は伝達性プラスミドがホストの染色体に組み込まれるのをアシストする役割を果たしていることを明らかにした。SEはcopy-out形式で環状化する、4つのコア遺伝子を持つ、宿主範囲が狭く、プロテオバクテリアに限られるというユニークな特徴を持つことから、新規のチロシンリコンビナーゼ利用型トランスポゾンであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水圏と陸上の微生物集団の間における薬剤耐性遺伝子の伝播あるいは循環は公衆衛生上の重大な懸念事項であるが海洋細菌の遺伝子伝達機構に関する知見は極めて少ない。本研究では養殖場から分離された多剤耐性菌を対象に新規の伝達因子の存在とその役割を明らかにした。本研究結果は海洋細菌がこれまで考えられていた以上に多様な遺伝子伝達機構を利用していることを示すものである。本知見は今後養殖場での薬剤耐性菌の出現と拡大のメカニズムを理解し、対策を考えていく上で貴重な知見となる。また現場における抗菌薬の適正使用を促す上でも重要な科学的根拠となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism by which plasmid (pSEA2) from multi-drug-resistant bacteria derived from aquaculture environments is introduced into the chromosome of the host after conjugative transfer. Additionally, we revealed the presence of a novel mobile genetic element called "SE: strand-biased circularizing integrative elements", which assists in the integration of transferred pSEA2 into the chromosome of the host. Furthermore, we elucidated the molecular mechanism behind this process. Notably, SE circularizes in a copy-out-like manner, contains four core genes, and exhibits a narrow host range limited to  $\alpha$ -proteobacteria, making it a unique tyrosine recombinase-utilizing prokaryotic DNA transposon group.

研究分野：環境微生物学

キーワード：遺伝子伝達 多剤耐性菌 養殖場 プラスミド SE ピブリオ属 チロシンリコンビナーゼ トランスポゾン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の増加は近年世界的な問題として、急速に注目度が高まっている。WHOは2011年に世界保健デーに薬剤耐性を取り上げ、ワンヘルスアプローチの概念に基づいた世界的な取り組みの必要性を国際社会へ訴え、2014年には世界の薬剤耐性についての初の調査報告書を公表した。さらに薬剤耐性は2015年のG8サミットでも主要議題として取り上げられ、2016年のG7サミットで議長国であった我が国は薬剤耐性に対する取り組みを強化すべく2020年までの5年間のアクションプランを策定した。

ヒト・水畜産の枠組みを超えた分野横断的なワンヘルスアプローチが注目されるようになった背景には医療現場以外における抗菌薬使用が医療に及ぼす影響が強く懸念されたことによる。実際にヨーロッパの畜産現場ではバンコマイシン耐性腸球菌増加との関連が疑われたアボパルシンの使用が禁止となった。しかし食の生産現場で使用する抗菌薬が医療に及ぼす影響については未だに科学的根拠に乏しく因果関係が明確ではないことから、上述のWHOの報告書内や我が国のアクションプラン内においても水畜産分野における継続的な耐性菌動向の監視および学術的研究を継続・推進することが強く求められている。

養殖環境では抗菌薬はエサに混ぜて直接イクスへ投与されるため、周囲に散逸した抗菌薬は環境中の微生物に大きな影響を与えていると考えられる (Nonaka *et al.*, 2007)。また、申請者のこれまでの研究から沿岸養殖場には、ヒトの日和見病原菌である緑膿菌 (Nonaka *et al.*, 2017) や魚とヒトとの人獣共通感染症原因菌 *P. damsela* subsp. *damsela* が頻繁に分離されることが明らかになっており (Nonaka *et al.*, 2012)、現場における抗菌薬使用はこのような養殖環境中のヒト病原菌の耐性化に関与することで医療に影響を及ぼす可能性も指摘されている (Ref.1)。

応募者らの過去の研究からは養殖環境では抗菌薬投与終了後には耐性菌率が速やかに減少するものの、その後も低レベルで耐性菌が環境中に保持されることが明らかとなっている (Nonaka *et al.*, 2007)。また養殖環境中の多剤耐性菌の多くは遺伝子伝達能を有し、伝達性プラスミドおよび染色体間を移動する伝達因子 ICE に加え、近年プラスミド全長が染色体へ組み込まれる現象が報告されたが (Nonaka *et al.*, 2014) そのメカニズムは不明である。

(Ref.1) FAO/OIE/WHO (2006) Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance: report of joint FAO/OIE/WHO expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance.

### 2. 研究の目的

上述のような背景を受け、本研究では養殖環境中の耐性菌がもつ多剤耐性プラスミドが他の細菌へ伝達された後その全長がレシピエント染色体上に組み込まれる現象のメカニズムを分子レベルで明らかにすること、およびこのような新規機構がどのような細菌種に分布しているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 多剤耐性プラスミドの伝達および染色体への組み込み機構の解明

養殖場から分離された多剤耐性の *Vibrio alfacensis* 04Ya249 株と大腸菌の交配により得られた接合体の全ゲノム配列を行った。またドナーである *V. alfacensis* 04Ya249 株の全ゲノム情報を取得し組み込みに関連している領域の推定を行った (SE-6945)。配列情報の比較から過去に報告した SE-6283 (旧 Tn6283) との類似性が予測できたため、PCRにより SE-6945 の環状態を確認するとともに組換え酵素 *recA*-を欠失している大腸菌株を用いて接合伝達を行った。また複数の接合体を取得し、PCRにより環状化部分の配列を増幅してクローニング後配列多様性の解析を

行った。さらに接合体ゲノムの制限酵素処理とサザンハイブリダイゼーションにより挿入部位および接合体中の SE-6945 のコピー数を決定し耐性レベルとの関連を調べた。環状化部分の分子構造についてはゲノム DNA を分画しそれぞれを鋳型に PCR を行い環状状態の量を推定することで環状化部分の分子構造を予測した。

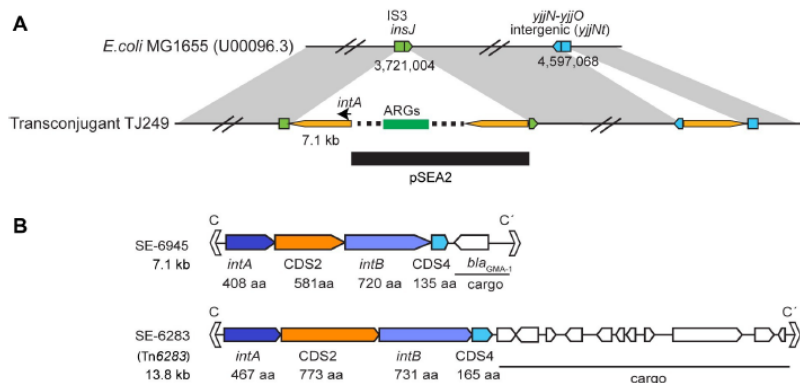
SE (strand-biased circularizing integrative elements) の4つのコア遺伝子についてそれぞれの破壊株を作成し染色体の組み込みに必須の領域を特定した。さらに、SE のコア遺伝子を用いデータベースを利用した網羅的解析により SE を保有する細菌種について明らかにした。

#### (2) 養殖場由来株における SE の分布

これまで調査を行ってきた日本および台湾養殖場から分離した細菌をターゲットに SE の分布を明らかにするとともに伝達性を確認後 SE を保有する細菌種を 16S rRNA 配列解析により明らかにした。

### 4. 研究成果

海洋細菌が利用している遺伝子伝達メカニズムを明らかにするために、養殖場から分離された多剤耐性の *Vibrio alfacensis* 04Ya249 株と大腸菌の交配により得られた接合体の全ゲノム配列を行った。解析の結果、ドナーで



ある *V. alfacensis* 04Ya249 株は伝達性多剤耐性プラスミドを持つことが明らかになりこれを pSEA2 と命名した。一方接合体に伝達された pSEA2 はプラスミドとしては存在せず全長が染色体上に取り込まれていた。pSEA2 の両端にはβ-ラクタマーゼ遺伝子を含む 7.1 kb の DNA 領域 (のちに SE-6945 と命名) が 1 コピーずつそれぞれ挿入されていた (上図 A)。SE-6945 は我々が以前報告した Tn6283 (現 SE-6283) と同性的のある 4 つの連続した CDS を保有していた (上図 B)。さらに PCR により SE-6945 の環状状態が検出可能なこと、および複数の接合体解析から SE-6945 が単独で染色体上に挿入されているパターンが見つかったことから SE-6945 は一旦環状化したのち染色体上に組み込まれていることが予想された。また組換え酵素 recA を欠失している大腸菌をレシピエントとした場合には接合体が得られないことから、SE-6945 は pSEA2 の伝達に伴い大腸菌へ移動したのち単独で染色体上へ組み込まれ、その後染色体上の SE-6945 と pSEA2 上の SE-6945 との間で相同組換えが生じることで pSEA2 全長が染色体へ取り込まれていると考えられた。

複数の環状化の際形成される連結部の配列および SE がコードされていた場所の配列を PCR で増幅後クローニングし複数クローンについて配列を調べた結果 SE-6945 は環状状態を形成する際、元の分子の特定の側の DNA 鎖のみを鋳型としてコピーを作成していることが示唆された。つまり従来のインテグロンや ICE/IME の切り出し方式 (cut-paste) とは異なり、SE は自身のコピーを作成することで元の分子にもオリジナルの SE を残す copy-out 方式を利用していることが示唆された。このようにユニークな分子メカニズムをもつことから、我々は新規の可動遺伝子として SE (strand-biased circularizing integrative elements) という名称を提唱した。

複数の接合体を解析した結果染色体に挿入される SE-6945 のコピー数には 1-3 とばらつきが

あり、コピー数が多い接合体ほどアンピシリンに対する MIC 値が高いことが明らかになった。また染色体上 2 箇所の挿入部位のうち片方のサイトに SE が挿入された接合体が高い MIC を示した。このことから SE-6945 のコピー数と染色体上の挿入部位は接合体のアンピシリン耐性レベルに影響を与えることが示唆された。さらに、データベースを利用して SE-6945 のホモログを検索した結果、他の *Vibrio* 種のゲノム上にも同定され、SE が海洋環境で AMR の伝播に重要な役割を果たしていることが示唆された。上記の結果より SE は伝達性プラスミドを利用し他の細菌へと移動し、その後利用したプラスミドを染色体へ導入する役割を果たす新規の因子であることが明らかになった。以上の結果は 2002 年に PLOS ONE 誌へ発表した (Nonaka *et al.*, 2002, PLOS ONE)。

次に SE の中間体の存在形態についてより詳細な情報を得るために DNA 分画したゲノム DNA を鋳型に attS (環状化部分) の検出を行った。その結果、SE の中間体はで片側にニック (切れ目) が入った環状 2 本鎖 DNA であることが強く示唆された。これは SE の中間体が copy-out 方式であるという我々の仮説 (右図) を支持するものであった。

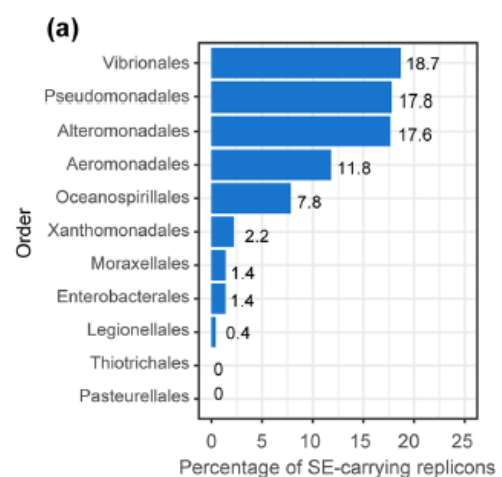
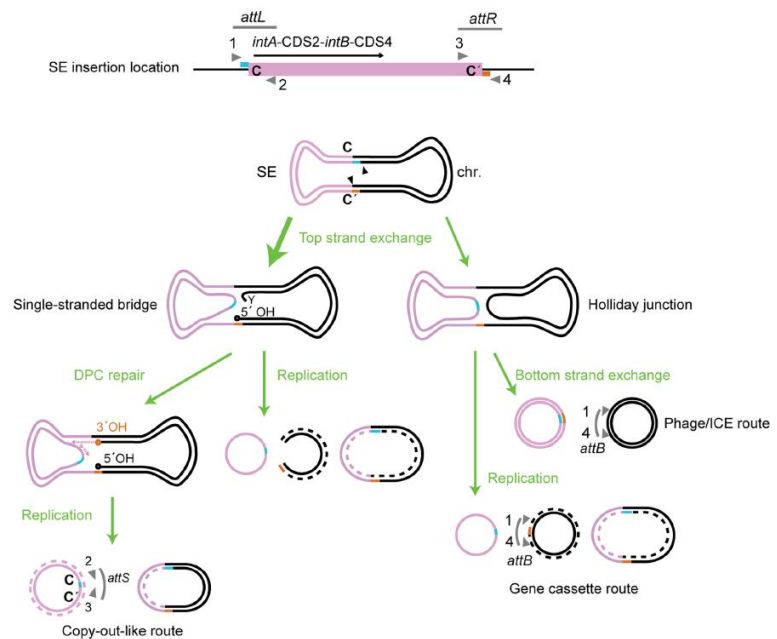
また、SE のコア遺伝子

(*intA*, *tfp*, *intB*, *srap*) の欠失体を作成し SE の働きに対して必須であるかを検討した。SE の左端に位置する 3 つの保存されたコード配列 (*intA*, *tfp*, *intB*) のオペロン構造が SE 中間体の形成 (attL × attR の組み換え) に必須であることが示唆された。

データベース検索の結果 SE は、ビブリオ目 (19%)、シュードモナス目 (18%)、アルテロモナス目 (17%)、エロモナス目 (12%) を中心に分布しており (図 a)、SE の主なホストはγプロテオバクテリアであることが明らかになった。

また種レベルではシェワネラ、ビブリオ、アルテロモナスなど海洋環境に分布するγプロテオバクテリアを中心に (図 b) 分布していたことから、SE の出現が海洋環境である可能性が示唆された。また宿主範囲がこれまでに発見された可動遺伝因子と比較して非常に狭いことから SE の移動が何らかの宿主の因子に依存している可能性が考えられた。

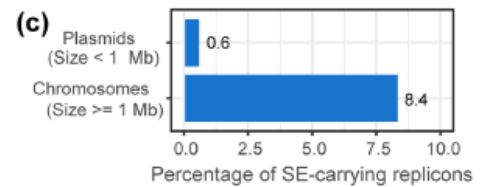
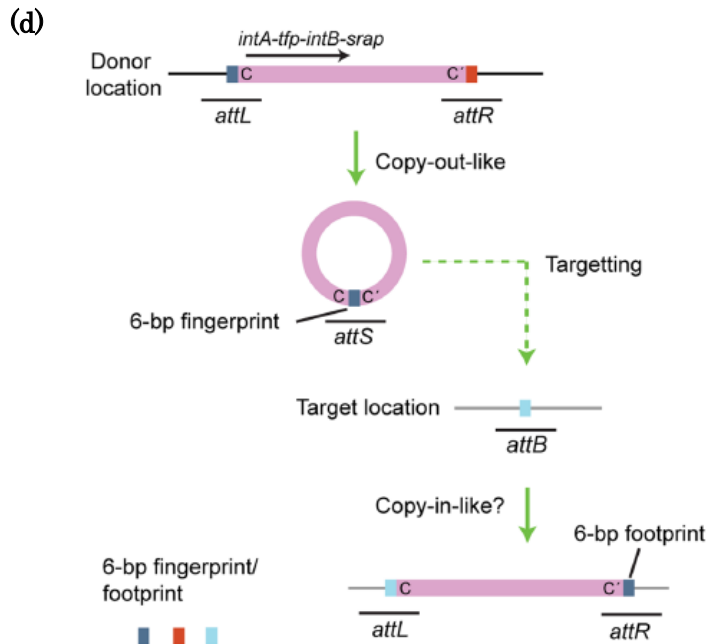
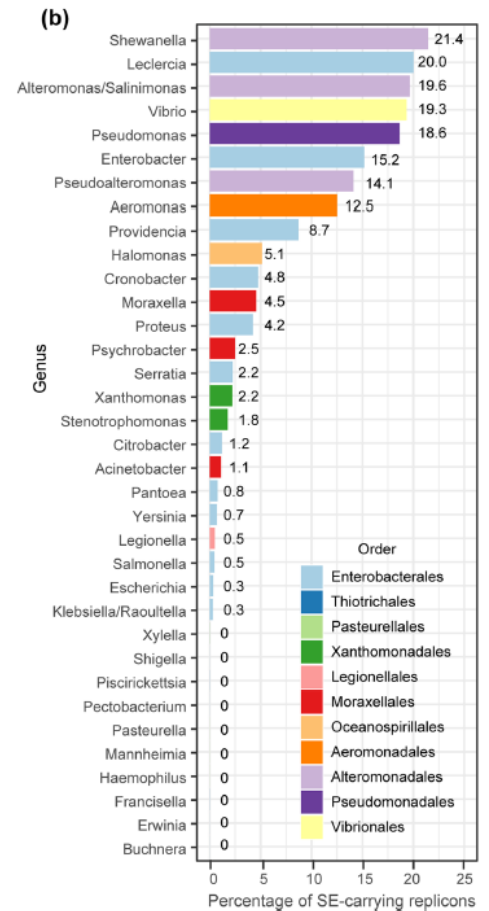
ゲノム比較により、35 の新しい SE メンバーが検出された。SE は主にレプリコンごとに 1 コピーが染色体上に存在することが多く (図 c)、長さの平均値は 15.7 kb であった。さらに、3 つの SE がそれぞれテトラサイクリン耐性、コリスチン耐性、アンピシリン耐性を付与する遺伝子、*tmexCD-toprJ*、*mcr-9*、*bla<sub>GMA-1</sub>* を持つことが示され、これらの耐性遺伝子の伝達にも関与してい



る可能性が示唆された。さらに、新たに見つかった SE メンバーのうち、株の入手が可能であった 3 株 (*V. anguillarum*、*V. alginolyticus*、*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*) は SE 中間体の形成 (*attL* × *attR* の組み換え) を有し、SE が海洋細菌間で AMR 遺伝子の広がりに関与していることが示唆された。以上の結果は 2023 年に *Mobile DNA* 誌へ公表した (Idola *et al.*, 2023, *Mobile DNA*)。

香川県および台湾の養殖環境由来菌、愛媛県養殖マダイ腸内から分離した複数の細菌種から SE-6293、SE-6945 が検出されたことから SE は養殖環境における細菌間の AMR の拡大に寄与していることが強く示唆された (投稿準備中)。

本研究では養殖環境由来多剤耐性菌のプラスミドが接合体の染色体へ導入されるメカニズムについて検証し、SE という新規可動遺伝因子の存在および、SE がプラスミド導入をアシストするメカニズムが分子レベルで明らかになった。また SE は copy-out 形式で環状化すること (d)、4 つのコア遺伝子をもつこと、宿主範囲が狭く、プロテオバクテリアに限られることなどのユニークな特徴を持つことから、原核生物における新規のチロシンリコンビナーゼ利用型トランスポゾングループであることが明らかになった (Table 1)。



**Table 1** Features of five prokaryotic DNA transposon groups encoding tyrosine recombinases

	ICEs/IMEs	SEs	GInts <sup>c</sup>	RITs <sup>d</sup>	Tn554-related elements <sup>e</sup>
Hosts	Archaea Bacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria Betaproteobacteria	Bacteria	<i>Staphylococcus</i> <i>Enterococcus</i>
Proteins involved in recombination	Int, Xis	IntA, Tfp, IntB, Srap	GinA, GinB, GinC, GinD	RitA, RitB, RitC	TnpA, TnpB, TnpC
Target site specificity <sup>a</sup>	+	+	+	NT	+
Empty site <sup>b</sup>	+	-	±	NT	NT
Movement	Cut-out paste-in (excision integration)	Copy-out copy-in?	NT	NT	NT

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lisa Nonaka, Michiaki Masuda, Hirokazu Yano	4. 巻 17
2. 論文標題 Atypical integrative element with strandbiased circularization activity assists interspecies antimicrobial resistance gene transfer from <i>Vibrio alfacensis</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0271627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Desmila Idola, Hiroshi Mori, Yuji Nagata, Lisa Nonaka, Hirokazu Yano	4. 巻 14:7
2. 論文標題 Host range of strand-biased circularizing integrative elements: a new class of mobile DNA elements nesting in Gammaproteobacteria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mobile DNA	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-1499202/v1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野中里佐, 山本達也, 丸山史人, 広瀬侑, 大西勇輝, 小林剛, 鈴木聡, 野村暢彦, 増田道明, 矢野大和
2. 発表標題 養殖場由来 <i>Vibrio</i> 属細菌が保有する伝達性多剤耐性プラスミド pSEA1 の Tn6283 を介した受容菌染色体への組み込み機構
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢野大和
2. 発表標題 IS のように動く非接合型インテグレートイブ・エレメントの発見
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野大和、野中里佐
2. 発表標題 Copy-out and integrative element (COPINE): 原核生物における新しい転移因子クラスの提唱
3. 学会等名 第15回細菌学若手コロッセウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Desmila Idola, Hiroshi Mori, Yuji Nagata, Lisa Nonaka, Hirokazu Yano
2. 発表標題 Host range of strand-biased circularizing integrative elements: a new class of mobile DNA elements nesting in Gammaproteobacteria
3. 学会等名 CSM Annual Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野大和、増田道明、野中里佐
2. 発表標題 鎖バイアスのある環状化を行う新奇インテグレイティブ・エレメントの発見 (Discovery of integrative elements with strand-biased circularization activity)
3. 学会等名 日本細菌学会大会第95回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野大和、野中里佐
2. 発表標題 鎖バイアスのある環状化を行う新奇可動遺伝因子SE (strand-biased circularizing integrative element)の提唱
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野大和、Idola Desmila、森宙史、永田裕二、野中里佐
2. 発表標題 原核生物における新しい可動遺伝因子グループSE(strand-biased circularizing integrative element)の発見
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野中里佐、矢野大和
2. 発表標題 養殖環境細菌集団における新規ベクターラクタマーゼ遺伝子blaGMA-1の伝播
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野大和、Idola Desmila、森宙史、永田裕二、野中里佐
2. 発表標題 新しい可能遺伝因子グループSEの転移経路と宿主域
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	矢野 大和  (Yano Hi rokazu)  (20646773)	国立感染症研究所・薬剤耐性研究センター・主任研究官   (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------