

令和元年6月24日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07531

研究課題名(和文) 養殖環境中の多剤耐性菌が利用する遺伝子伝達メカニズムとその多様性

研究課題名(英文) Mobile genetic elements associated with multi-drug resistance in the bacteria from aquaculture environments

研究代表者

野中 里佐 (Lisa, Nonaka)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：70363265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では養殖環境より分離されたVibrio属細菌が有する伝達性多剤耐性プラスミドpSEA1の全塩基配列を決定し、受容菌である大腸菌染色体への組み込みはプラスミド上に存在する約14kbのトランスポゾンTn6283が関与する新規メカニズムによるものであることを提唱した。すなわちTn6283は自身がコードしているリコンビナーゼの働きによりプラスミド上から切り出されて環状化し、大腸菌染色体上の特定の領域に組み込まれること、さらにこのTn6283と元のプラスミド上のTn6283の間で相同性組み換えが生じることで多剤耐性プラスミドpSEA1全長が大腸菌染色体へ取り込まれていることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌間で行われる遺伝子の伝達は薬剤耐性菌の出現・拡大を理解するための重要なファクターである。本研究ではこれまで現象のみが知られていた、伝達性プラスミドが受容菌へ伝達された後にその染色体へ潜り込むメカニズムを明らかにした。学術的意義としてはプラスミド上のトランスポゾンがプラスミド全長の染色体への組み込みをアシストしているというトランスポゾンの新規機能を明らかにした点である。一方、耐性遺伝子がこれまで考えられてきた以上に多様かつ複雑なメカニズムで細菌間を移動している可能性を示した点は薬剤耐性菌問題を考える上で重要な知見であり非常に社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Here, we show a new pattern of interspecies antimicrobial resistance genes (ARGs) transfer involving a ‘non-conjugative’ integrative element. We conducted whole-genome sequencing of a transconjugant obtained by mating between Escherichia coli and V. ponticus. This revealed integration of a plasmid (pSEA1) into the chromosome, consisting of ARGs, and a 13.8-kb integrative element Tn6283. Molecular genetics analysis suggested a two-step gene transfer model. First, Tn6283 integrates into the recipient chromosome during suicidal plasmid transfer, followed by homologous recombination between the Tn6283 copy in the chromosome and that in the newly transferred pSEA1. Tn6283 is unusual among integrative elements in that it apparently does not encode transfer function and its excision barely generates unoccupied donor sites. Overall, this study reveals the presence of a previously unrecognized type of MGE in a marine organism, highlighting diversity in the mode of interspecies gene transfer.

研究分野：微生物学

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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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 は薬剤耐性菌問題に対して、ヒト・食用動物の枠組みを超えた分野横断的なワンヘルスアプローチとして取り組む重要性を強調している。この背景として食の生産現場における抗菌薬使用と臨床分野における耐性菌増加の関連が強く懸念されているものの、一部を除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があげられる。水産・畜産分野においても抗菌薬は相当量が使用されており、今後も耐性菌動向を監視するとともに学術的研究を継続・推進することが強く求められている。

一方、日本の食文化を担う水産物供給を支える養殖は我が国の重要な産業である。養殖過程で発生する魚介類の感染症対策として現在約 30 の水産用医薬品が認可されており、その多くは臨床と共通した系統の抗菌薬である。双方の現場で分離される耐性菌からは共通の耐性遺伝子が検出され、上述のように耐性遺伝子の伝播・循環が懸念されている。研究代表者らのこれまでの研究から、養殖場由来耐性菌の多くは遺伝子伝達能を有し、そのメカニズムは多様であることが明らかとなってきたが、単純なプラスミド伝達とは異なり、耐性プラスミドが受容菌へ伝達された後、染色体へ組み込まれる現象に関しては長らく機構不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では養殖場底泥から分離された多剤耐性菌 (*Vibrio ponticus* 04Ya108、以下 *Vibrio*) がもつ新規多剤耐性プラスミドの全塩基配列を決定し、*Vibrio* から大腸菌へ伝達されている全遺伝情報を明らかにし、ヒト腸内細菌の一種である大腸菌への伝達および染色体上へ組み込まれるメカニズムについて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 pSEA1 の全塩基配列決定および新規トランスポゾン Tn6283 の同定  
*Vibrio* と大腸菌を混合培養し、耐性化した大腸菌 (接合体) の全ゲノム配列を高速シーケンサー (FLX454+) により取得した。大腸菌ゲノム配列は既知であるため、これを情報処理的に差し引くことにより *Vibrio* 由来の配列情報を取得し、個々の coding region にアノテーション (注釈) をつけた。同時に大腸菌染色体中における本プラスミドの組み込み部位の推定を行い、該当領域の PCR および得られた産物のシーケンスにより確認した。接合体を抗菌薬無しで培養することで染色体上にトランスポゾン領域のみが残った大腸菌 (LN5 株) を作製し、トランスポゾンと予測された領域が実際に切り出されて環状化していることを確認した。
- (2) pSEA1 の大腸菌クロモソーム上におけるプラスミド挿入部位の特定  
独立した接合伝達実験により得られた 20 の接合体についてパルスフィールドゲル電気泳動およびサザンハイブリダイゼーションを行い、pSEA1 が染色体へ組み込まれていることを確認するとともに特定の領域に組み込まれていることを PCR により解析した。また pSEA1 が大腸菌染色体に組み込まれるパターンの多様性を明らかにするために、複数の接合体について、PCR 増幅パターンにより挿入部位を特定するとともにトランスポゾンのコピー数を明らかにした。
- (3) 大腸菌がもつ相同性組み換え機構の関与  
本プラスミドの受容菌クロモソームへの組み込みは「先に組み込まれた Tn6283 とプラスミド上の Tn6283 との相同性組み換えによるものである」という仮説を証明するため、相同性組み換えを司る *recA* 遺伝子欠損株 (JW2669,  $\Delta recA::kan$ ) および LN5 株を受容菌として接合伝達実験を行い、親株 (BW25113) との伝達頻度の比較を行った。
- (4) Tn6283 がコードするインテグラーゼの特性解析  
Tn6283 がコードするチロシンリコンビナーゼ (インテグラーゼ) の特性を明らかにするために、LN5 株を用いて Tn6283 の切り出し・環状化の際に生じる結合部分 (スパーサー領域) および Tn6283 が切り出されたあとに生じる配列それぞれをクローニングし、得られた 10 および 20 クローンの解析からそれぞれの配列の多様性を明らかにした。またリアルタイム PCR によりそれぞれの分子種のコピー数を求めた。
- (5) Tn6283 が宿主に与える影響  
Tn6283 の染色体への挿入が大腸菌に与える影響を明らかにするために LN5 株、*bcp* 遺伝子破壊株 (LN3) および大腸菌 W3110 を用いて最大増殖速度、生菌数および集団内の死細胞率を比較した。

#### 4. 研究成果

*Vibrio* から大腸菌へ伝達されているのはラクタム系、マクロライド系、テトラサイクリン系、サルファ剤、およびクロラムフェニコールに対する7つの薬剤耐性遺伝子をコードする約300kbの多剤耐性プラスミドであることが明らかになった (Fig 1A)。我々はこれをpSEA1と命名し、配列をDDBJへ登録した。pSEA1は伝達性プラスミド分類のMOBHグループに属する、新しい系統のプラスミドであることが明らかになった (Fig 1B)。

また本プラスミド上には、約12kbの新規トランスポゾン Tn6283 が存在し (Fig 2A)、プラスミド全体が大腸菌染色体上に取り込まれる際に重要な役割を果たしていることが示唆された。トランスポゾン Tn6283は自身がコードしているチロシンリコンビナーゼ (DNA 組み換え酵素) の働きによりプラスミド上から切り出されて環状化し、大腸菌染色体上の特定の領域に組み込まれていることが示唆された。さらに pSEA1 の染色体への挿入は *recA* 欠損体をレシピエントとした場合には起こらず、Tn6283を染色体上に持つ LN5 株をレシピエントとした場合は親株を用いた場合より高頻度で起きたことから (Fig 3)、pSEA1 の全長が取り込まれるには大腸菌の相同性組み換え能力が必須であり、先に組み込まれた Tn6283 と元のプラスミド上の Tn6283 の間で相同性組み換えが生じることで多剤耐性プラスミド pSEA1 全長が大腸菌染色体へ取り込まれていることが強く示唆された。

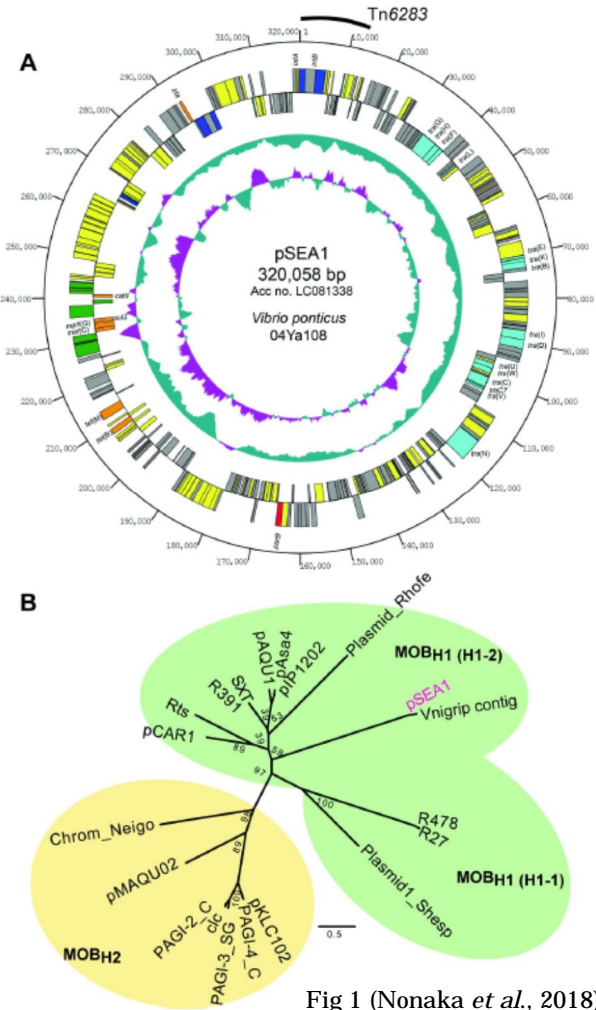


Fig 1 (Nonaka *et al.*, 2018)

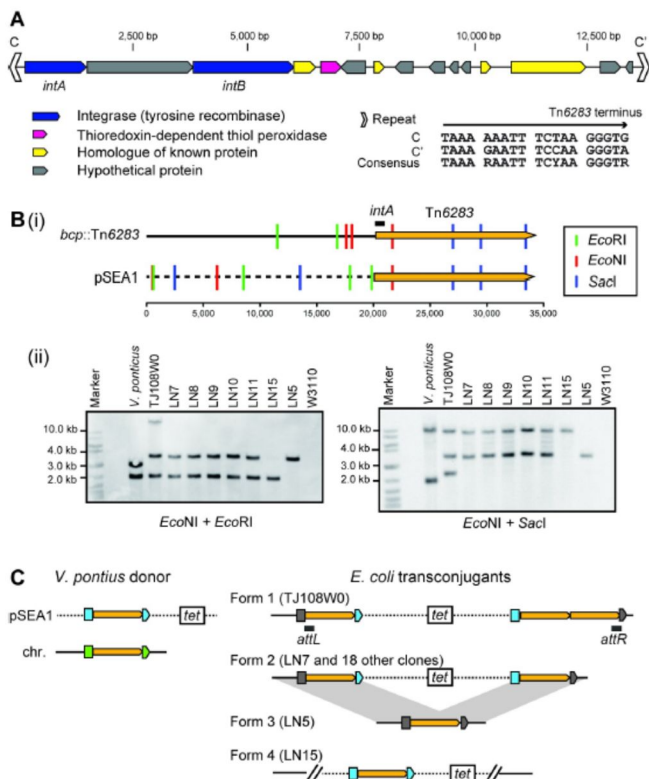


Fig 2 (Nonaka *et al.*, 2018)

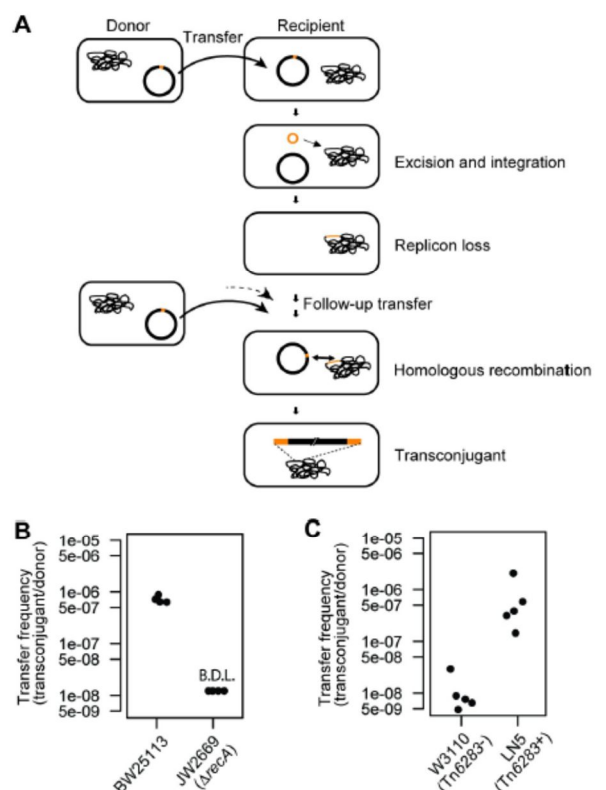


Fig 3 (Nonaka *et al.*, 2018)



次に、Tn6283が切り出されて環状を形成する際の結合部位、およびTn6283が切り出されたあとに生じるDNA配列の多様性解析からTn6283はDNAの片側の鎖から切り出されていることが示唆された (Fig 4)。またLN5株およびVibrioどちらにおいても、切り出されて環状化しているTn6283が一定数検出されるのに対し、トランスポゾンが抜けて閉じた状態の分子はほとんど検出されなかったことから (Fig 5)、Tn6283は切り出される際にオリジナルの配列を残す「copy-out-paste タイプ」のトランスポゾンであることが強く示唆された (Fig 6)。

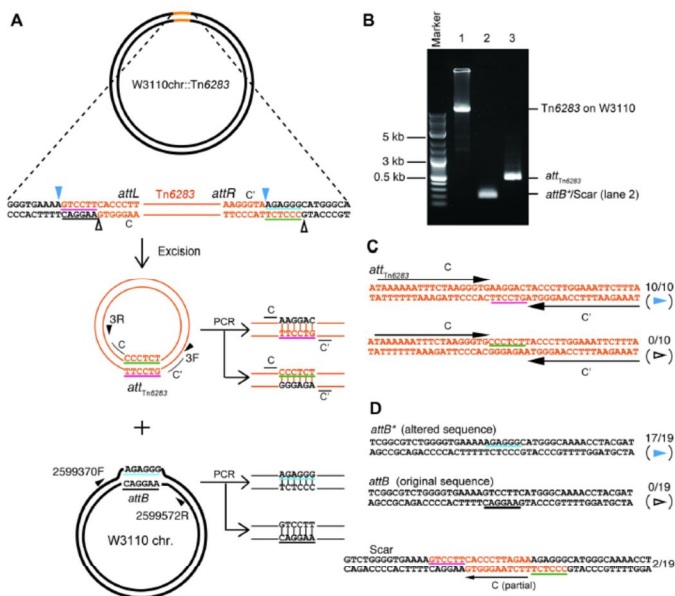


Fig 4 (Nonaka et al., 2018)

さらに、Tn6283を大腸菌染色体上に持つLN5株の最大増殖速度や生菌数を親株である大腸菌W3110と比較した結果、有意差はなく、Tn6283の挿入が大腸菌の生理状態に与える影響は極めて低いと考えられた。またLN5株においてTn6283は安定的に保たれることが10日間の非選択環境下の継代培養により示された (data not shown)。

このように、Tn6283は既知の可動性因子と異なり、自身は伝達能力をもたずプラスミドの伝達能を利用する形で大腸菌へと伝播し、大腸菌内でプラスミドの染色体への組み込みをアシストするという非常にユニークな可動性因子であることが明らかになった。またTn6283がコードするリコンビナーゼは recombinase directionality factor をもたないという既知のものとは異なる特徴を有することから、より原始的な可動性因子である可能性がある。

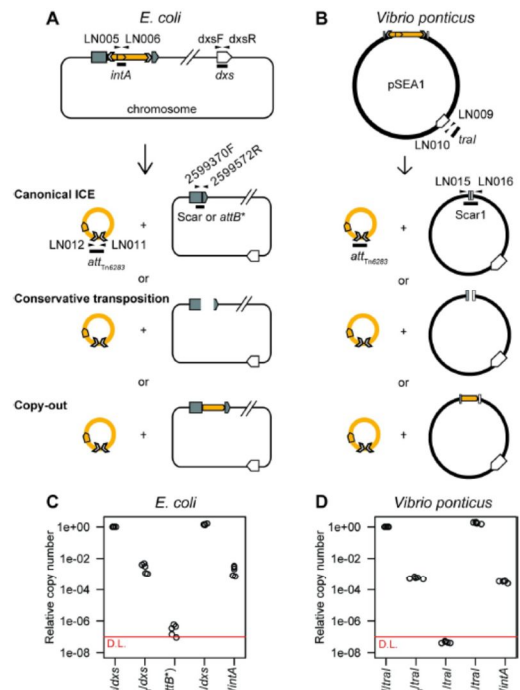


Fig 5 (Nonaka et al., 2018)

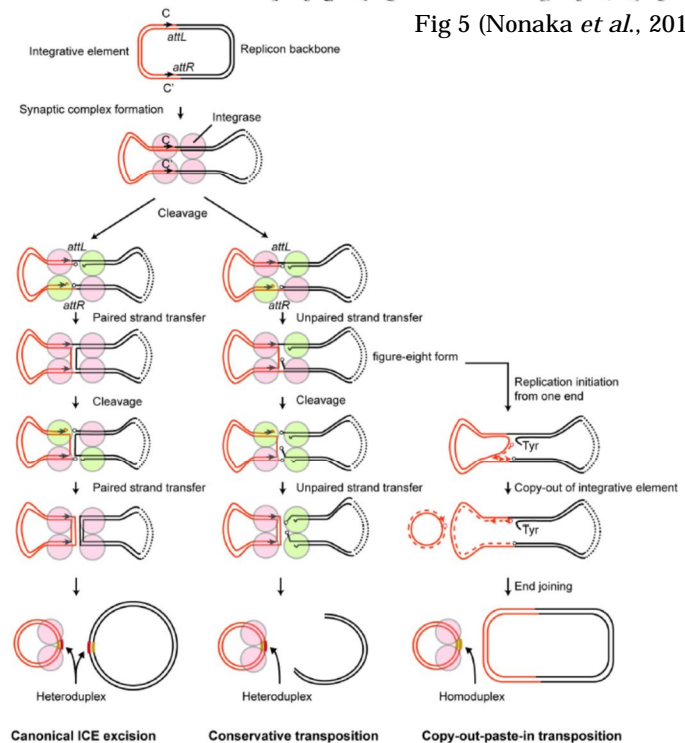


Fig. 6 (Nonaka et al., 2018)

本リコンビナーゼのホモログはVibrio科細菌および腸内細菌科細菌に広く分布することがデータベース解析から明らかになった。養殖場底泥1グラム中には $10^{10}$ と非常に高密度に細菌が存在すること、およびヒトの生活圏に近い沿岸環境には大腸菌をはじめとするさまざまなヒト関連細菌が存在することを併せて考えると、今回我々が発見した新規遺伝子伝達メカニズムは水環境に生息する細菌間、あるいはVibrio科細菌からヒト腸内細菌との間での遺伝子の伝播に重要な役割を果たしている可能性がある。今後は本リコンビナーゼの普遍性と機能を明らかにし、本リコンビナーゼが水圏環境および陸圏環境間の遺伝子の伝播および広がりにも果たす役割を明らかにする必要がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1371/journal.pone.0198613.

Interplay of a non-conjugative integrative element and a conjugative plasmid in the spread of antibiotic resistance via suicidal plasmid transfer from an aquaculture *Vibrio* isolate.

Nonaka L, Yamamoto T, Maruyama F, Hirose Y, Onishi Y, Kobayashi T, Suzuki S, Nomura N, Masuda M, Yano H.

PLoS One

13

e0198613

2018

査読有り

1016/j.jgar.2017.03.015

The novel *mef(C)-mph(G)* macrolide resistance genes are conveyed in the environment on various vectors.

Sugimoto Y, Suzuki S, Nonaka L, Boonla C, Sukpanyatham N, Chou HY, Wu JH.

Journal of Global Antimicrobial Resistance

10

47-53

2017

査読有り

〔学会発表〕(計1件)

養殖場由来 *Vibrio* 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

日本微生物生態学会

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

2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：矢野 大和

ローマ字氏名：Hirokazu Yano

所属研究機関名：東北大学

部局名：生命科学研究科

職名：講師

研究者番号(8桁): 20646773

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 聡

ローマ字氏名：Satoru Suzuki

研究協力者氏名：丸山 史人

ローマ字氏名：Fumito Maruyama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。