

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19980

研究課題名(和文) 河川水中の薬剤耐性遺伝子の時空間的な伝播・分布を単一細胞全ゲノム情報から解明する

研究課題名(英文) Analysis of spatio-temporal distribution of drug resistance genes in river water with single-cell genome sequencing

研究代表者

西川 洋平 (nishikawa, yohei)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・次席研究員(研究院講師)

研究者番号：90867277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多摩川流域の7地点から河川水の採取を2回行い、メタゲノムおよびシングルセルゲノム解析を実施した。前者では、多摩川の上流から下流にかけて細菌叢が連続的に変化することを示すとともに、各地点における薬剤耐性遺伝子(Antibiotic Resistance Genes: ARG)の分布を明らかにした。後者では、26門329属にわたる3345個の1細胞由来ゲノム情報を獲得し、ARGの種類と保有細菌の系統を紐付けた解析によって、新規および難培養の細菌系統からARGを検出した。また、異なる細菌系統間で共通して検出される19種のARGを同定し、プラスミド等を介した水平伝播の可能性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、河川水中のARGの分布・伝播の評価において、1細胞レベルでのゲノム解析が有用であることが示唆された。個々の細胞のゲノム情報を詳細に解析することにより、メタゲノム由来の配列からは検出が難しいARGが検出可能であることが明らかとなった。また本技術では、ARG保有細菌の割合評価や、多種類のARGを保有する細菌系統の同定に活用が可能であり、対象地点の環境パラメータを合わせて取得することで、環境のリスク評価にも適用できると考えられる。さらに今後は、1細胞ゲノム解析技術とロングリードシーケンサ等の技術を組み合わせることにより、より詳細なARGの伝播解析が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：River water was sampled twice from seven sites in the Tama River, and metagenomic and single-cell genomic analyses were conducted. The former analysis revealed that the bacterial composition changed from upstream to downstream of the Tama River, and revealed the distribution of Antibiotic Resistance Genes (ARGs) at each sampling site. In the latter analysis, we obtained 3,345 single amplified genomes (SAGs) across 26 phyla and 329 genera, which enabled the detection of ARGs from novel and uncultured bacterial strains by linking "ARG types" and "bacterial phylogeny". We also identified 19 ARGs that are commonly detected among different bacterial lineages, and evaluated that the possibility of plasmid-based horizontal gene transfer by referring to the database.

研究分野：生命分子工学

キーワード：シングルセル 全ゲノム解析 薬剤耐性遺伝子 環境微生物 マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

水の安全性を脅かす大きな要因として、水圏中に存在する薬剤耐性菌に世界的な注目が集まっている。薬剤耐性菌の拡大が世界的に進行した場合、2050年には薬剤耐性菌に起因する死亡者数が、がんによる死亡者数を上回るとの試算が発表されている。こうした中、厚生労働省より発表された薬剤耐性対策アクションプランでは、薬剤耐性機構の解明や、予防・診断・治療法の開発等のためには、薬剤耐性遺伝子(ARG: Antibiotic Resistance Genes)を含むゲノム情報の蓄積が重要であり、どの種類の微生物が、どのような機序により耐性を獲得し、どのような経路でどの程度拡散しているのか、について正確に把握する必要があるとされている。

近年、環境細菌を対象とした ARG の検出には、メタゲノムを用いた手法が用いられている。本手法では、次世代シーケンサーによる大規模な解析が可能である一方、DNA 抽出の段階で配列情報が断片化され、細菌ごとの保有遺伝子の情報が失われてしまう。このため、プラスミドを介した水平伝播が主要な伝達経路である ARG の解析では、メタゲノムの情報から「どの細菌が」「どの ARG を」保有していたかを同定することは困難であった。

## 2. 研究の目的

水圏環境全体の ARG の存在量および分布を詳細に解析するために、環境中の ARG 保有細菌を 1 細胞レベルで直接的に同定する技術が有用であると考えた。また、河川に生息する細菌の 1 細胞全ゲノム情報をハイスループットに取得し、配列情報を用いて ARG の探索を行うことにより、従来法では不可能であった「どの細菌が」「どのような機序で」「どの程度の割合で」ARG を獲得しているのかという情報を、網羅的に取得できるのではないかと考えた。そこで、微小液滴を用いた 1 細胞ゲノム解析技術を、都市河川である多摩川の河川水に応用し、河川水中の細菌のゲノム情報の大規模取得を実施した。また、地点・季節ごとに水サンプルを採取してゲノム解析を行うことにより、ARG の保有菌株を同定するとともに、その出現頻度・分布について評価を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 多摩川からの河川水のサンプリング

多摩川流域において、その水域の水質を代表する地点で、環境基準の維持・達成状況を把握するための地点(国土交通省)と設定されている地点を参考に、奥多摩湖から河口域までの 7 地点(和田橋・拝島橋・多摩川原橋・大師橋・峰谷橋・多摩大橋・丸子橋)を採水地点として決定した(以降、上流から順に地点 ~ と表記)。2020 年 8 月 18, 19 日と 11 月 24, 25 日において計 2 回のサンプリングを実施し、各地点の表層水を 3L ずつボトルに採取した。採取した河川水は保冷バッグに保管し、研究室にて即日中に吸引濾過および細菌画分の調製を実施した。また、各地点において、水質調査キットおよびデータロガーを用いて環境パラメータ(COD, アンモニウム態窒素, 亜硝酸態窒素, 硝酸態窒素, リン酸態リン, 水温, 塩濃度, 溶存酸素)を取得した。

### 3.2. メタ 16S rRNA 遺伝子解析、メタゲノムショットガン解析

各地点から採取した河川水 1L を使用し、5 μm 径のフィルターを用いて吸引濾過をおこない、大きな粒子を除去した。次に、0.22 μm 径のフィルターを用いて吸引濾過をおこない、細菌画分をメンブレン上に捕捉した。滅菌済みのジルコニアビーズを用いて細菌画分のビーズ破碎をおこなった後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA の抽出を行った。抽出した DNA に対し、Illumina 社のプロトコル (16SMetagenomicSequencingLibrary Preparation)に従って 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を対象としたライブラリを調製し、MiSeq を用いた配列情報の取得を行った (2×300 bp)。出力された配列に対し、QIIME2 (version 2020.11)を用いて ASV(Amplicon Sequence Variant)レベルでのクラスタリングをおこなった後、SILVA-138-99 database に基づいた系統アノテーションを実施した。

次に、河川水から抽出した DNA に対し、Truseq DNA PCR-free High Throughput Library Prep Kit (Illumina)を用いてショットガン解析用のメタゲノムライブラリを調製し、HiSeq (2×150 bp)もしくは NextSeq (2×150 bp)を用いて配列情報を取得した。メタゲノム配列の解析パイプラインである ATLAS を使用し、リードの品質評価、アセンブリを実施した。また、アセンブリによって得られたコンティグを対象に、RGI(The Resistance Gene Identifier)を用いて、薬剤耐性遺伝子のデータベース CARD(The Comprehensive Antibiotic Resistance Database)を参照することで ARG の検出を行った。

### 3.3. シングルセルゲノム解析

各地点から採取した河川水 1L を使用し、上記と同様の手法で細菌画分をフィルター上に捕捉した後、フィルターをリン酸緩衝液に再懸濁することによって細菌懸濁液を調製した。懸濁液中の細胞濃度をバクテリアカウンターを用いて算出した後、R. Chijiwa, et al., Microbiome, 2020 にて報告した手法を用いて、アガロース性のゲルビーズを用いた 1 細胞ゲノム増幅を実施した。各

地点につき、DNAが増幅されたゲルビーズを384個分取し、QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN)を用いたライブラリ調製およびNextSeq (2×150 bp)による配列情報の取得を行った。出力された配列に対してSPAdesを用いてアセンブリを行い、1細胞由来のゲノム情報 (SAG: Single amplified genome)の構築を行った後、CheckM ()を用いて得られた配列の品質評価を実施した。また、SAGの系統解析には、GTDB-Tk およびそのデータベースを使用した。さらに、RGIを用いてCARDデータベースを参照することにより、メタゲノムと同様の手法でARGの検出を行った。3.2. および3.3.のワークフローの概要を図1に示す。

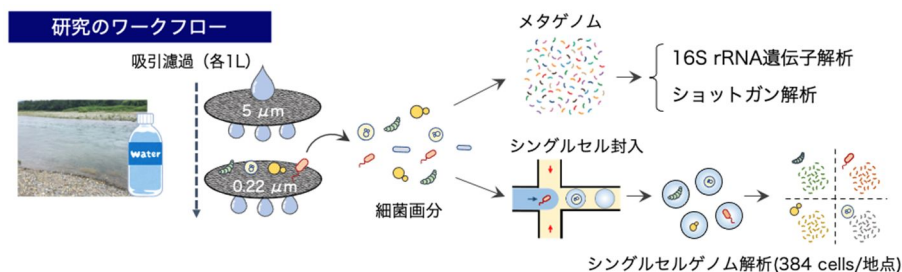


図1 多摩川の河川水を対象としたゲノム解析のワークフロー

#### 4. 研究成果

##### 4.1. 各サンプリング地点における環境パラメータの比較

塩分濃度の測定の結果、地点 1 の値は8月, 11月共に0.56%を示し、その他の地点は汽水域の基準値である0.05%を下回った。これにより、地点 1 ~ 2 は淡水域、地点 3 は汽水域であると判定した。続いて、リン酸態リン、アンモニウム態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素の測定の結果、地点 1 以降において各数値の上昇が確認され、地点 3 以降において、汚れた川の基準となる数値を上回る値が検出された。これにより、排水や処理水の流入によって、多摩川の中~下流において河川の汚染が確認されることが明らかとなった。

##### 4.2. 地点間・季節間における細菌叢の変動解析

16S rRNA 遺伝子を対象とした細菌叢解析を行い、各地点における Phylum レベルの細菌の組成比を評価した(図2A)。多摩川の全地点において、一般的な河川において検出される Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidota が検出され、これらの細菌系統が多摩川においても主要であることが明らかとなった。また、地点 1 と 2 において、2015年に新たに提唱された Candidate Phyla Radiation (CPR)に分類される Patescibacteria が多く確認された。先行研究において、Patescibacteria は活性汚泥や下水処理水に多く含まれることが報告されている。今回、Patescibacteria が多く検出された地点 1, 2 は、下水処理水の流入量が増加する地点であることがわかっており、下水処理水の流入が Patescibacteria の増加の要因であると推察された。次に、NMDS (non-metric multidimensional scaling)解析によって、各地点・採取時期における細菌叢の類似度を比較した(図2B)。これにより、採取時期(8月, 11月)による変動に比べ、河川水の採取地点によって細菌叢組成が大きく変動することが明らかとなった。また、各地点において検出数の多かった上位6000個のASVを対象として地点ごとの検出数を可視化したところ、各地点において検出されるASVのパターンが、上流から下流にかけて連続的に変動していることが明らかになった(図2C)。細菌叢の連続的な変動については、先行研究(K Higashi, et al., PLoS Comput Biol. 2018)においても報告がなされており、連続的に流れる河川水中において、地点ごとに特徴的な細菌叢が形成されていることが明らかとなった。

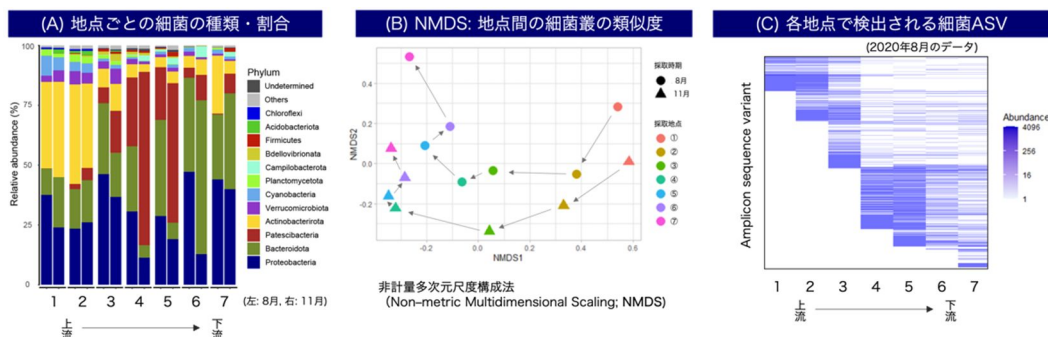


図2 16S rRNA 遺伝子を用いた河川水中の細菌叢解析

##### 4.3. メタゲノム配列を用いた、地点・期間ごとのARGの分布解析

メタゲノム由来の配列(総塩基長: 171.7 Gbp)からContigを構築し、ARGを検出した結果、34種132個のARGが検出された。ARGが耐性を示す薬剤ごとに、地点・期間ごとの検出パターンを可視化した結果、上流から下流にかけて検出パターンの変動が確認された(図3A)。また、各ARGが検出された地点の情報を、Upset図を用いて可視化した結果、特定の地点・期間において

検出される ARG が存在する一方、地点・期間を超えて共通して検出される ARG が存在することが明らかとなった(図 3B)。前者に分類される ARG は 18 種類存在し、ラクタム系抗生物質に耐性を示す IMP-1, OXA-17, OXA-21 等の ARG が検出された。ラクタム系抗生物質耐性遺伝子として、カルバペネムを含むほぼ全てのラクタムを分解するメタロ-ラクタマーゼや、ラクタム環を有する多様な抗生物質を分解する基質特異性拡張型ラクタマーゼ (Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases: ESBL)が近年重要視されているが、11 月の地点 からはメタロ-ラクタマーゼの 1 種である IMP-1 が、また 11 月の地点 からは ESBL をコードする ARG である OXA-17 が検出され、身近な都市河川である多摩川においてもこれらの ARG の保有細菌が存在することが明らかになった。一方で、後者に分類される ARG には、下水処理水からの検出が報告されている *sul1*, *qacEdelta1*, *qacH* などが存在し、地点 以降の下水処理水を含む地点において、広く分布していることが示唆された。

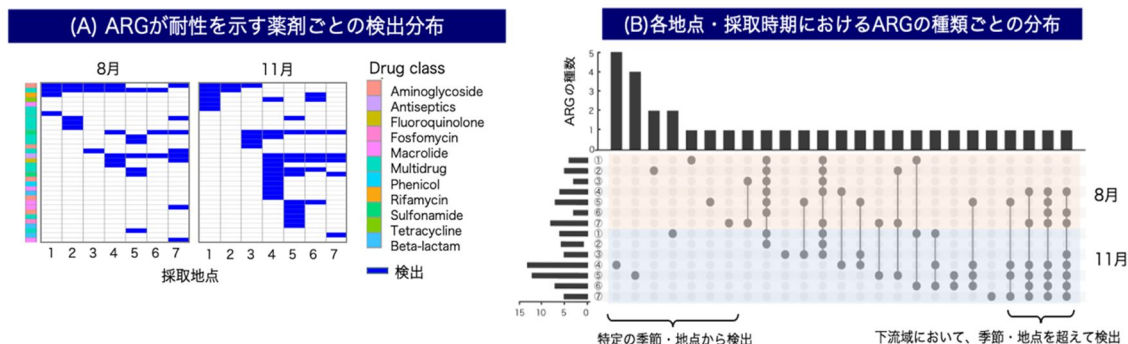


図 3 メタゲノム由来の Contig から検出された ARG の地点・季節ごとの分布

#### 4.4. シングルセルゲノム解析による多様な細菌系統の獲得と ARG の検出

個々の液滴から得られた配列情報 (総塩基長: 587 Gbp) から 1 細胞由来のゲノム情報を構築した。CheckM を用いた品質評価および GTDB-Tk を用いた系統解析の結果をもとに、3,345 個の配列を SAG として以降の解析に使用した。Genomic Standards Consortium (GSC)の基準に従って得られた SAG の品質を評価した結果、High-quality SAG が 16 個、Medium-quality SAG が 679 個分類された。また、系統分類の結果、26 門 329 属にわたる多様な系統の SAG が獲得された(図 4)。細菌系統の割合を評価した結果、メタ 16S rRNA 遺伝子解析において主要な系統として検出された Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteria に分類される SAG が全体の 77.1% (2,859 個)を占めていた。また、地点 以降の地点からは、CPR 群に分類される Patescibacteria 細菌のゲノム情報が多く獲得され、Medium-quality に分類される 24 個の SAG を含めた合計 281 個が獲得された。現在、これらの新規に獲得された SAG に対して、詳細な比較ゲノム解析を進めており、得られた成果は論文として報告する予定である。

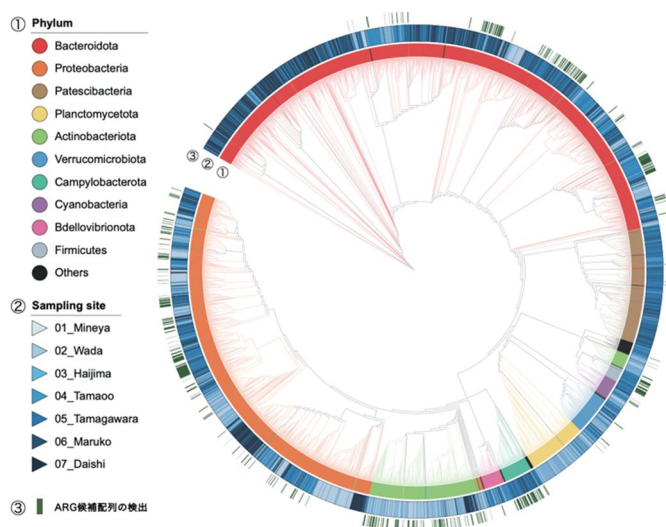


図 4 1 細胞ゲノム解析によって獲得された 3,345 個の Single amplified genome (SAG)の系統樹は Phylum レベルでの細菌系統、 は採取地点、 は ARG が検出された SAG を示す

続いて、SAG 配列から ARG の検出を行ったところ、全体の 9%にあたる 306 個の SAG から、60 種 415 個の ARG が検出された。これらの ARG には、先行研究 (KINOSHITA et al., 2020)において多摩川から検出されたラクタム系、マクロライド系、スルホンアミド系、テトラサイクリン系の抗生物質に対する耐性遺伝子が多く含まれていた。一方で、メタゲノムの Contig から検出された ARG との比較を行ったところ、60 種中、共通する ARG は 12 種となった。メタゲノ

ムの生リードに含まれる情報を調べることにより、Contig から検出されなかった ARG の多くが、生リードからは検出されることが明らかとなった。以上の結果により、1 細胞ゲノム解析によって個々の配列情報を詳細に解析することにより、メタゲノムのアセンブリにおいて失われる ARG の存在を検出できることが明らかとなった。

また、1 細胞ゲノム解析により、ARG の種類と ARG 保有細菌の系統を紐付けた解析が可能となった。一例として、メタゲノム解析において検出されていた ESBL をコードする OXA-17 の保有細菌は、*Tolomonas* 属細菌であることが同定された。さらに、SAG あたりの ARG 検出数を評価することにより、ARG が検出された SAG の 24.8% にあたる 76 個の SAG から複数の ARG が検出されることが明らかとなった。以上の解析により、1 細胞ゲノム解析によって「どの細菌が」「どの程度の割合で」ARG を保有しているか、を明らかにすることができた。

#### 4.5. 細菌間を伝播する ARG の推定

ARG が検出された細菌系統に着目した解析を実施した。SAG から検出された 60 種の ARG の内、複数の同属細菌間で共通して検出された ARG は 11 種 36 個、異なる細菌属間で共通して検出された ARG は 19 種 349 個存在した。さらに、19 種の ARG の内 8 種は、異なる細菌門において共通して検出された。異なる細菌属間で検出された ARG を、伝播によって拡散した ARG と仮定し、ARG が検出された Contig の配列をプラスミド配列の推定を行うツール (PlasFlow) を用いて解析した。その結果、12 種の ARG を含む 33 本の Contig がプラスミド由来と推定された。これらの ARG には、魚類養殖場の海水中から検出された *mefC* (Nonaka, Maruyama, Suzuki, & Masuda, 2015) や *mphG* などのマクロライド耐性遺伝子が含まれていた。また、テトラサイクリンやマクロライドなどの複数の薬剤に耐性を有する *msrE* は、オマーン国の臨床分離株 *Klebsiella pneumoniae* が保有するプラスミドからの検出例が報告されており (Bonnin, Nordmann, Carattoli, & Poirel, 2013)、これらの配列に相同性を示す ARG が多摩川において存在することが明らかになった。

さらに、異なる細菌属から検出された ARG の配列相同性が 99% 以上であるものに着目した結果、*sul1*, *qacEdelta1*, *tetC* の 3 種が該当した。この内 *sul1* については、*Corynebacterium* sp. 由来のプラスミド (LE Williams, et al., Appl. Environ. Microbiol., 2006) に高い相同性を示し、多摩川において 2 つの異なる細菌属および 2 つの地点から検出されることが明らかとなった (図 5)。これらの ARG は、先行研究 (Janda & Abbott, 2010) (Tindall, 1996) においてヒトや魚への病原性が示唆されている細菌系統から検出されており、1 細胞ゲノム解析によって注目度の高い ARG の伝播に関する情報が取得可能であることが示唆された。現在、これまでに得られた成果をまとめ、論文を執筆中である。

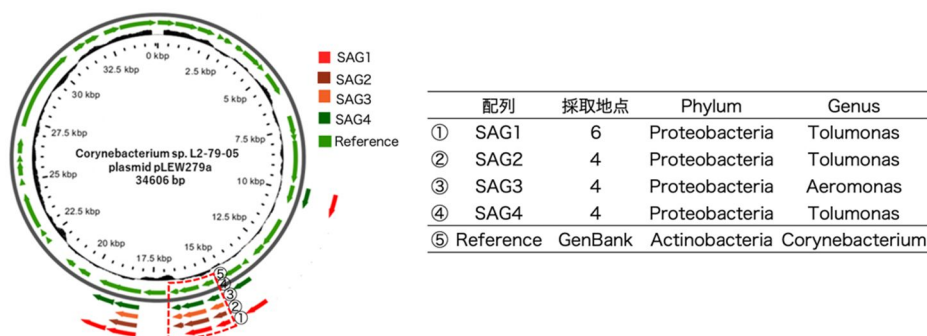


図 4 データベース上のプラスミド配列に対して高い相同性を示す ARG の獲得異なる地点、細菌系統から配列相同性の高い *sul1* 遺伝子を検出

#### 4.6. 結論

本研究では、多摩川の河川水中の ARG の動態を明らかにすることを目的とし、メタゲノム解析およびシングルセルゲノム解析を実施した。まず、16S rRNA 遺伝子を対象とした菌叢解析により、表層水中の細菌叢は上流から下流にかけて連続的に変化していることが明らかとなった。また、ショットガンメタゲノム解析を用いて ARG の検出を行うことにより、多摩川流域における ARG の分布を明らかにした。さらに、1 細胞ゲノム解析を用いて ARG の検出を行うことにより、ARG の種類と ARG 保有細菌の系統情報を紐づけた解析を可能にし、難培養性細菌を含む多様な細菌系統から ARG の検出が可能であることを明らかにした。また、種々のツールを組み合わせた解析により、異なる細菌系統間で共通した ARG を検出し、プラスミド等の伝播機構を踏まえた解析が可能であることを実証した。今後は、1 細胞ゲノム解析技術とロングリードシーケンサ等の技術を組み合わせることにより、より詳細な ARG の伝播解析が可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西川洋平, 小川雅人, 塚田祐子, 井手圭吾, 細川正人, 竹山春子
2. 発表標題 多摩川に存在する薬剤耐性菌のゲノム情報をシングルセルレベルで解析する
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川洋平
2. 発表標題 水圏環境の細菌・ファージの動態解明に向けたシングルゲノム解析
3. 学会等名 第21回マリンバイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川 洋平, 我妻 竜太, 塚田 祐子, 井手 圭吾, 小川 雅人, 細川 正人, 竹山 春子
2. 発表標題 河川水中の細菌・ウイルスを対象とした1細胞・1粒子レベルでのゲノム解析
3. 学会等名 日本水処理生物学会第57回（神奈川）大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Nishikawa, Masato Kogawa, Masahito Hosokawa, Keigo Ide, Ryota Wagatsuma, Yuko Tsukada, Haruko Takeyama
2. 発表標題 Microfluidic droplet-based single-cell genomics in aquatic and marine environments for revealing microbial and phage diversity.
3. 学会等名 2021 AF0B virtual conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yohei Nishikawa, Masato Kogawa, Masahito Hosokawa, Kai Takahashi, Keigo Ide, Kei Yura, Hayedeh Behzad, Takashi Gojobori, Haruko Takeyama
2. 発表標題 Microfluidic droplet-based single-cell genome sequencing reveals biological diversities of environmental microbiome in the surrounding area of the Red Sea
3. 学会等名 The 2020 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2020) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川洋平
2. 発表標題 1細胞・1粒子レベルのゲノム情報から読み解く、環境細菌とファージの相互作用
3. 学会等名 バイオインフォマティクス相談部会 第五回講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川洋平, 小川雅人, 塚田祐子, 井手圭吾, 細川正人, 竹山春子
2. 発表標題 多摩川に存在する薬剤耐性菌のゲノム情報をシングルセルレベルで解析する
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 我妻竜太, 西川洋平, 塚田祐子, 井手圭吾, 千々岩樹佳, 竹山春子
2. 発表標題 ファージ-細菌間の相互作用解析に向けたシングルゲノム解析技術の開発
3. 学会等名 第9回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川洋平, 小川雅人, 細川正人, 峯田克彦, 高橋海, 坂梨千佳子, 由良敬, 井手圭吾, ベザドハイジ, 五條堀孝, 竹山春子
2. 発表標題 紅海周辺の多様な環境微生物を対象とした大規模かつ高精度なシングルセルゲノム解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西川洋平, 堀井俊平, 竹山春子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 104
3. 書名 シングルセル解析の新たな可能性 (新規生理活性物質生産菌のハイスループットスクリーニングプラットフォーム構築の項)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------