

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19848

研究課題名（和文）水環境中細菌の種ごとの薬剤耐性遺伝子保有率を推定するガラポン法の開発

研究課題名（英文）Development of the GARAPON method for estimating the prevalence of antimicrobial resistance gene in each bacterial species in water environment

研究代表者

渡辺 幸三（Watanabe, Kozo）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・教授

研究者番号：80634435

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：水環境中の細菌群集の「どの種が」「どの薬剤耐性遺伝子を」保有しているかを推定するために、母細菌群集から強制的に群集構造（種構成、各種の相対量）を変更させた標本細菌群集の薬剤耐性遺伝子の保有率の変化に基づいて、耐性遺伝子を有する種を推定するGene Analysis of Randomized Populations（GARAPON：ガラポン法）を開発した。推定の正答率は、耐性遺伝子によって大きく異なっていた。推定対象の8つの耐性遺伝子のうち、37属中9、7、3属だけが有していた耐性遺伝子aada2, tetM, tetGは、3/9、4/7、3/3の比較的高い正答率でその存在を推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したガラポン法の精度を更に向上させることで、薬剤耐性菌研究にブレークスルーを起こすこととなる。例えば、薬剤耐性遺伝子の病原菌への種間の水平伝播が、環境中の主要な培養不可菌を起源（リザーブ）とする現象が証明できれば、細菌群集全体を俯瞰した薬剤耐性遺伝子の環境中動態の解明を可能にする。さらに、薬剤耐性菌だけではなく、例えば、環境微生物から有用な機能性遺伝子（例、環境浄化遺伝子）を有する種を探索する研究分野においても、培養不可菌を含む幅広い細菌からの種の探索を可能にするなど、その適用範囲は極めて広い。

研究成果の概要（英文）：To estimate "which species" of bacterial communities in water environments possess "which antibiotic resistance genes," we developed a method called Gene Analysis of Randomized Populations (GARAPON), which estimates the species possessing resistance genes based on changes in the resistance gene possession rate of sample bacterial communities whose community structure (species composition and relative abundance of each species) was forcibly altered from the original bacterial community. The accuracy of the estimates varied significantly depending on the resistance gene. Among the eight resistance genes targeted for estimation, the resistance genes aada2, tetM, and tetG, possessed by only 9, 7, and 3 genera out of 37, respectively, were estimated with relatively high accuracy rates of 3/9, 4/7, and 3/3.

研究分野：環境工学

キーワード：薬剤耐性菌 メタバーコーディング解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水環境中の薬剤耐性菌が世界的な問題となっている。培養可能な細菌種は、環境試料からその種を単離培養することで、どのような薬剤耐性遺伝子を保有するかを把握できるが、培養方法が確立されていない培養不可菌 (= ダークマター細菌, Nature 2015, 図 1 上) の薬剤耐性遺伝子の実態は未解明である。細菌群集の DNA メタバーコーディング解析は細菌培養を必要としないため、培養不可菌を含む群集全体の構成種や各種存在量の解明を可能にした。そして、環境細菌の 99% 近くの種は培養不可菌であり、培養に依存した研究は、ごく一部の細菌種の断片的情報しか提供できないこともわかってきた。また、環境試料から抽出した細菌群集 DNA の定量 PCR 解析から、培養不可菌を含む群集がどの耐性遺伝子をどの程度保有するのかが解明されてきたが、「どの種」が保有するのかが未知のままである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、水環境中の細菌群集の「どの種が」「どの薬剤耐性遺伝子を」「どの程度の割合」で保有しているかを推定する手法である Gene Analysis of Randomized Populations (GARAPON: ガラポン法) を開発することである。

3. 研究の方法

愛媛県の A 養豚場、2 か所の下水処理場の流入原水と処理水と下水処理水の放流先の河川から水サンプルを採水した。採水したサンプルは 10^{-1} ~ 10^{-6} まで段階希釈を行い LB 培地にそれぞれの濃度で撒き、インキュベーター内で 30 の元で一晩から数日間培養を行った。培養後にそれぞれの LB 培地における生菌数 (CFU/ml) のカウントを行った。また培養後の LB 培地からコロニー 100 程度のものから中心に各採水地点毎にランダムに 20 ~ 100 株を 1/2 の範囲と 1/4 範囲の新しい LB 培地に 1 コロニーずつ単離し再びインキュベーター内で 30 の元で一晩から数日間培養した。その後十分に培養した細菌をグリセロールと共にチューブに入れ、-80 で冷凍保存した。-80 に冷凍保存していた細菌を LB 培地で 1 ~ 2 日間培養を行った。その後 20ml の液体培地が入っている遠心管に培養した細菌を入れ、インキュベーター内で 30 でさらに一晩培養した。翌日に遠心管を 4000rpm, 10min, 4 で遠心を行い、固形化した細菌に触れないよう液体培地を除去し、1 つのサンプルあたり 2 本のチューブに再び溶かした細菌を移した。その後遠心、液体培地除去を再び行いペレット化し -80 で冷凍保存を行った。

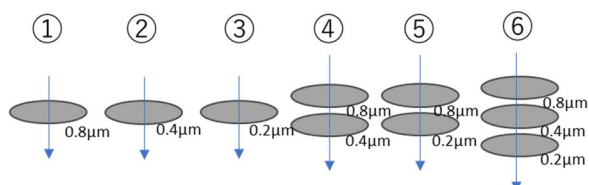
Qiagen 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて、冷凍した 369 株の単離細菌ごとに DNA を抽出した。抽出した DNA の 16SrRNA 領域を、16SrRNA gene 341Forward primer と 16SrRNA gene 907Reverse primer の 2 種類のプライマーを使った PCR 法により増幅させた。PCR 産物を精製し、サンガー法で塩基配列を解読し、BLAST 検索により細菌種名を同定した。また、定量 PCR により、8 つの薬剤耐性遺伝子 (tetG, tetM, strA, strB, floR, sul1, sul2, aadA2) の有無を 369 株についてそれぞれ調べた。

これら 369 株を使用して模擬人工群集を作成した。蒸留水に 1.5% の Bacto Agar と 2.5% の LB broth を配合した LB 培地を作成し、それぞれの株を LB 培地に撒き、インキュベーター内で 30 の元で一晩培養を行った。369 株の単離培養を 2 回に分けて行い、1 回目は 188 株、2 回目は 181 株の培養を行った。研究を 2 回に分けて最終的に等量の DNA の抽出液を混ぜ合わせて 369 株から模擬人工群集を作る方法をとることで、各細菌が混ざり合う研究汚染の危険性を回避した。

LB 培地でそれぞれ単離培養した株を、2 ml チューブ中の 1.5 ml の PBS 溶液に溶かさせた。そして、それぞれの PBS 溶液に対して、菌液の終濃度を合わせるために吸光度測定を行った。吸光度測定の有効な方法として 600 nm での吸光値 (OD600) 測定がある。OD とは散乱光による透過光の濁度 (菌濃度) を表している。最終的に、水平伝播の起こりにくい環境である終濃度 (1×10^6 cell/mL) を目指すため、OD600 の値を約 0.4 に合わせた。そして OD600 の値を合わせた株を混ぜ合わせ、混ぜ合わせた菌液の吸光度の最終測定を行い、その値を正確に 0.4 に合わせた。そして、水平伝播の起きにくい温度である 4 度に設定した滅菌水で菌液を 50 倍希釈し、1 回目の 188 株を使用した研究で 4 L、2 回目の 181 株を使用した研究で 4 L の模擬人工群集を作成し、計 8 L の模擬人工群集を作成した。

準備した模擬人工群集から、種構造が大きく異なる計 31 種類の標本群集を作成した。事前研究により、環境水を 3 段階の孔径の膜に通水して、細菌を分画すると、分画試料間で細菌種構造が大きく変化する現象を確認したことから、本研究では 3 種類の孔径 (0.8 μ m, 0.4 μ m, 0.2 μ m) のセルロース濾紙を用いて連続濾過を行うことで、種構造が異なる 6 種類の標本群集を作成した。図 1 に本研究で行った濾過の模式図を示す。

図 1 の ① から ⑥ はそれぞれ単純濾過、① から ⑤ は連続濾過を表している。また、濾過を行う際に引く水の量 (ml) は、適当に選定した 15 種類の株を用いて模擬人工群集を作成して行った事前研究により、今後行う



メタバーコーディング解析と定量 PCR に必要な DNA 濃度 (15ng/μl 以上) の基準を満たすことができる量を選定した。濾過を行った量は、が 300ml, が 200ml, が 100ml, から が 600ml である。濾過で作成した 6 種類の標本群集を Qiagen 社の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて記載のプロトコルにいくつかの変更を加えた手順でそれぞれ DNA 抽出を行った。付録 1 に DNA 抽出のプロトコルを示す。

そして、抽出した DNA 抽出液を Qubit で DNA の濃度測定を行った。その結果、標本群集 の DNA 濃度が予測値よりも大幅に下回り、メタバーコーディング解析と定量 PCR の基準を満たさない値 (15ng/μl 以上) であったため、標本群集 を本研究から排除した。この結果は、0.8μm 0.4μm と連続濾過を行った標本群集 の DNA 濃度が高かったことから、0.2μm に到達する前に多くの株が 0.4μm の濾紙に引っかかったことが考察される。その後、標本群集 を除いた 5 種類の標本群集を用いて、等量でそれぞれの標本群集を組み合わせることにより、計 31 通りの標本群集を作成した。31 通りの標本群集の詳細は、 から の 5 通り、2 つずつを組み合わせる 10 通り、3 つずつを組み合わせる 10 通り、4 つずつを組み合わせる 5 通り、そして全てを混ぜ合わせる 1 通りである。

本研究では、同じ環境中から異なる様々な標本群集を作成することによって、水環境中の細菌群集の「どの細菌種が」「どの薬剤耐性遺伝子を」保有するかを推定する際に、環境的要因が介入しないことを可能にしている。母群集から種構造の異なる様々な標本群集を作成する手法が、くじ引きの「ガラガラポン」を類推することから、本研究の標本群集を作成する方法のことを Gene Analysis of Randomized Populations (GARAPON: ガラポン法) と呼ぶこととした。

準備した 31 標本群集に対して、定量 PCR で 8 つの薬剤耐性遺伝子 (tetG, tetM, strA, strB, floR, sul1, sul2, aadA2) の各保有率 (各耐性遺伝子の配列コピー数/16S rRNA の配列コピー数) を定量した。耐性遺伝子保有率は、耐性遺伝子を持っている個体数を全個体数で割った値のことである。さらに、31 標本群集の 16S rRNA を対象とする DNA メタバーコーディング解析を行い、各標本群集の種構成および各種の相対量 (各群集の総リード数に対する種ごとのリード数) を定量した。

定量 PCR で定量した 8 つの耐性遺伝子保有率とメタバーコーディング解析から得られるそれぞれの種の相対個体数のデータを用いて、31 通りの標本群集に対して、相対個体数に対する耐性遺伝子保有率のグラフを作成し、相関分析を行った。理論上、耐性遺伝子を高い割合で保有する種の相対個体数が高い標本群集では群集全体の耐性遺伝子保有率が高まり、逆に総体個体数が低い標本群集では群集全体の耐性遺伝子保有率が低下することが期待される。例えば、分類群 A の耐性遺伝子 B の保有率のグラフが正の相関を持つ場合、この考え方に基づくと、分類群 A は耐性遺伝子 B を多く保有していると推察される。この分析をそれぞれの種 × 8 耐性遺伝子のすべての組み合わせで行い、相関係数が正で P 値が 0.05 以下になった組み合わせを見つけることで、水環境中の細菌群集の「どの種」が、「どの耐性遺伝子」を保有するかを推定した。最後にガラポン法で推定した各耐性遺伝子の保有種の推定結果と、株ごとに行った定量 PCR 法による各耐性遺伝子の結果を比較することで、ガラポン法の精度を評価した。

4. 研究成果

表 1 に、模擬人工群集に含まれる 37 属について、PCR で保有の有無を調べた 8 つの薬剤耐性遺伝子 (tetG, tetM, strA, strB, floR, sul1, sul2, aadA2) について、PCR による保有 (○) と非保有 (×) の検出結果と本研究が開発した Gene Analysis of Randomized Populations (GARAPON: ガラポン法) の推定結果を比較して示す。現在のガラポン法による耐性遺伝子の有無を推定の正確性は、耐性遺伝子によって大きくことなることがわかった。

耐性遺伝子別の推定結果を比較すると、5 つの耐性遺伝子 *sul1*, *sul2*, *floR*, *strA*, *strB* では、ガラポン法では耐性遺伝子を保有することを示す高い相関係数を示した属がほとんどなかった (0~3 属)。PCR で耐性遺伝子を有していることが確認された属でも、その保有を正しく推定することができなかった。耐性遺伝子を保有することが PCR で確認されていた属のうち、その保有を正確に推定できた属の割合は 0/12, 0/19, 0/9, 1/10, 0/10 に止まった。

一方で、残りの 3 つの耐性遺伝子 *aadA2*, *tetM*, *tetG* は、比較的多くの属 (9~12 属) が耐性遺伝子を有していると推定され、耐性遺伝子の検出力が高かった。そして、これらの遺伝子の保有を正確に推定できた属の割合は、3/9, 4/7, 3/3 となり、比較的高い正解率で、耐性遺伝子の有無を推定できた。

耐性遺伝子ごとに、耐性遺伝子の検出力や正解率に差が生まれた原因として、模擬群集サンプル中に薬剤耐性菌を保有する属の割合が影響していることが考えられた。例えば、比較的検出力と正解率が高くなった *tetM*, *tetG* は、耐性遺伝子を保有する属数が少ないため、数の少ない耐性遺伝子保有属が、相関係数に与える影響が大きく、比較的高い推定率を得ることができたと考える。特に保有属数の少なかった *tetG* においてその傾向がみられる。しかし、ほかの耐性遺伝子 *sul1*, *sul2*, *floR*, *strA*, *strB* では、保有する属数が多かった。言い換えれば、多くの属がこれらの耐性遺伝子を有していたため、ガラポン法で群集構造を変えた標本群集を準備しても、群集の耐性遺伝子の保有率に及ぼす影響が限定的になり、相関関係を検出しにくくなった可能性がある。

表 1 模擬人工群集に含まれる 37 属について、8 つの薬剤耐性遺伝子の保有 (○) と非保有 (×) に関する定量 PCR による観測結果 (各耐性遺伝子の左行) とガラポン法による推定結果

耐性遺伝子を有する 属数 (○の数)	12 0	19 0	9 0	10 3	10 3	9 9	7 12	3 12
耐性遺伝子を有することが 正確に推定された割合	0 / 12	0 / 19	0 / 9	1 / 10	0 / 10	3 / 9	4 / 7	3 / 3
耐性遺伝子を有しないことが 正確に推定された割合	25 / 25	18 / 18	28 / 28	24 / 27	24 / 27	22 / 28	22 / 30	25 / 34

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Honda Ryo et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Recommendations of Key Elements within an Integrated Monitoring Framework of Antimicrobial Resistance for Asian Countries	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Science & Technology Letters	6. 最初と最後の頁 5~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.estlett.3c00820	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
1. 著者名 Zakaria Md., Sanyal Santonu K., Haque Md. Inja-Mamun, Mandal Shankar Chandra, Watanabe Kozo, Hossain Anwar	4. 巻 2023
2. 論文標題 Bacterial Diversity and Antibiotic Resistance Genes Associated with the Different Farming Systems of Black Tiger Shrimp (<i>Penaeus monodon</i>) in Bangladesh	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Aquaculture Research	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2023/6255586	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
1. 著者名 Shindoh Suzune, Kadoya Aya, Kanechi Reo, Watanabe Kozo, Suzuki Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Marine bacteria harbor the sulfonamide resistance gene sul4 without mobile genetic elements	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1230548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1230548	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 Doloiras-Larano Arnelyn D., Serrana Joeselle M., Takahashi Shinji, Takemon Yasuhiro, Watanabe Kozo	4. 巻 11
2. 論文標題 Short-term influences of flow alteration on microbial community structure and putative metabolic functions in gravel bar hyporheic zones	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Environmental Science	6. 最初と最後の頁 1205561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fenvs.2023.1205561	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植田亮太、三浦郁修、阪本愛、門屋綾、鈴木聡、渡辺幸三
2. 発表標題 異なる環境条件での薬剤耐性遺伝子の伝達率の比較：個体群動態モデルの適用
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
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	鈴木 聡 (Suzuki Satoru) (90196816)	愛媛大学・理工学研究科（工学系）・寄附講座教授 (16301)	

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