

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」
共同研究報告書

平成29年2月26日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 __京都大学__

職 __准教授__

氏名 __丸山史人__

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

遺伝子汚染の新しい視点：環境中の抗菌剤耐性菌・耐性遺伝子の動態解明とそのリスク
評価へむけて

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者	丸山 史人	准教授	
分担者	野村暢彦	教授	
	渡部 徹	教授	
	大田篤	大学院生	
	遠矢正城	大学院生	
	金谷祐里	大学院生	
拠点対応教員	鈴木 聡	教授	

3 研究内容（研究集会）

研究集会名称

遺伝子汚染の新しい視点：環境中の抗菌剤耐性菌・耐性遺伝子の動態解明とそのリスク評価へむけて

開催場所

愛媛大学 校友会館 2階サロン

開催日時

7月27日水曜日

発表者，参加者

参加者は28名、愛媛県衛生環境研、筑波の農研機構動物衛生研、洗剤メーカーなど、遠方および多様な機関からの参加者があった。愛媛大学学内からも工学部、農学部、理学部などから教員、学生らが参加した。

発表者は以下の通りである。

Satoru Suzuki, CMES, Ehime University

Toru Watanabe, Fac. Agriculture, Yamagata University

Yuta Sugimoto, CMES, Ehime University

Bien Thi Lan Thanh, CMES, Ehime University

Fumito Maruyama, Grad. Sch. Medicine, Kyoto University

Nobuhiko Nomura, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba

Masaki Tohya, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba

Yuri Kanaya, Grad. Sch. Agriculture, Yamagata University

Masato Akiba, Nat. Inst. Animal Health, NARO

Kohta Nakanishi, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba

Yoshiaki Kohyama, CMES, Ehime University

Rustam Aminov (Senior Researcher, Technical University of Denmark; Adjunct Professor, University of Aberdeen, UK, and Visiting Professor, Osaka University)

目的

現在 One Health Approach のコンセプトで世界的に取り組まれ始めた薬剤耐性菌対策は、多くの先進国では環境、獣医療、人医療の視点の統合が進んでいる。しかし、日本のアクションプランには環境視点が欠落しており、自然環境での耐性菌の生態はブラックボックスである。

この現状を解消し、環境を含めた耐性菌対策を加速する研究班を形成し、環境の多剤耐性菌研究のグループを日本で初めて形成することを目的とし、各分野で活躍中の中堅研究者と若手（学生）との討論の場を設けることである。日本のこの分野での国際的プレゼンスを上げることのできるメンバーを中心として、バイオフィルム微生物学、バイオインフォーマティクス、微生物リスク評価の分野で日本の先端を走っている3人が愛媛大に集結し、それぞれの研究室で関連研究をしている院生を含めて、既存の薬剤耐性研究とは違うアプローチの研究展開を討論する。フォーラムは公開とし、農、医、理などの関連分野の研究者の参加を得る。また、愛媛大では県内の私立大学や衛生研究所等を含めて組織する微生物研究グループ

(Network Association of Microbiology in Ehime, NAME) があるので、現場の知見も合わせて討論に含めることができる。近年世界的な問題になっている多剤耐性菌の対策では、これまで人・獣医療の分野で考えられてきた。しかし、近年、環境細菌群集が耐性遺伝子の大きなリザーバとなっていることが明らかになってきた。本フォーラムでは、環境に潜伏する多剤耐性遺伝子の定量的議論を行い、遺伝子動態の可視化等の最新研究の発表と議論を行う。さらに出口目標としての「環境の遺伝子汚染のリスク評価」を行うことを目指した研究チームの形成を目的とする。代表者、分担者および大学院生が背景レビュー発表および最新の成果発表を行う。日本ではまだ形成されていない、新しい視点の研究チームを形成することを旨としたフォーラムなので、討論時間を十分にとり、自由闊達な議論ができるようにプログラムを組む。また、愛媛大には化学分析系や動態解析系の研究者がいるので、彼らとの交流によって新しい環境遺伝子リスク分野を拡大することを計画した。

発表内容

薬剤耐性遺伝子(antibiotic resistance genes, ARGs)が人・獣医療現場から環境中に流入した後、自然環境でどのような機構で残存・拡散するのかを解明することは重要である。これまでの耐性菌研究は、培養可能な病原菌が対象であり、環境へ流入した後の耐性菌と ARGs の運命は不明である。本研究での作業仮説は、1)水圏環境では、未知の“未培養菌”(yet-to-be cultured 菌 or unculturable 菌) がリザーバとなる。2) ARGs はバイオフィーム中に残存し、生物由来物質がキャリアとなって安定化する。3) ARGs は細菌種間で拡散する。これらについて、未培養菌を含むマイクロコズム実験および現場のリザーバ、キャリア中で ARGs の網羅解析(レジストーム) および定量分析を行う。最終的に、環境遺伝子のリスク評価を行い、暴露低減策を提言する。この最終目標に向け、下記の演題での講演、討議が行われた。

- Dynamics of ARB and ARGs in environment.
- Mechanisms of spread and residue of ARGs and its risk: Project concept.
- Distribution of ARGs possessed by E. coli in the Chao Phraya River and its tributaries, Thailand
- Detection of novel macrolide resistance gene cluster in Asia.
- Release of multi-drug resistance plasmid from bacteria under coexistence of predators
- “World Vibrio Project” –Preserving drinking water safety on the Earth-.
- Analysis of exogenous methylase toward the understanding of interaction of antibiotic resistance and methylome.
- Cell diversity in biofilm.
- Cell-to-cell communication in P. aeruginosa in various environments.
- Development of dose-response models for skin disease for estimation of burden of ARB infection.
- Analysis of β -lactam antibiotic-resistant Escherichia coli isolated from the environment in India.

- Identification of tetracycline and kanamycin resistant bacteria from activated sludge.
- Horizontal gene transfer in complex biofilm.
- Horizontal gene transfer in starved cell and oligotrophic condition.
- Coping with antibiotic resistance: alternatives to antibiotic treatment

成果

「耐性菌・遺伝子の動態」のセッションでは、鈴木が水圏での耐性遺伝子の残存実態を報告し、暴露リスクになりうるのか？という解明すべき点を投げかけた。山形大の渡部と愛媛大の杉本はアジアの水圏での耐性菌・遺伝子の分布実態を報告した。「ゲノミクス」のセッションでは、京大の丸山から地球規模での水の安全性確保の必要性と戦略がバイオインフォマティクスの視点から語られた。ついで、耐性菌の重要なリザーバと考えられる「バイオフィーム」のセッションでは、筑波大の野村と遠矢がバイオフィームのマイクロ環境における細胞多様性と緑膿菌のコミュニケーション機構が発表された。最後の、「数理モデリング」では、山形大の金谷から耐性菌による健康被害評価のための用量反応モデル開発が発表された。Aminovからは広範な耐性菌への対応策が語られた。

今後の課題

LaMerの概算プロジェクトでも環境の薬剤汚染と微生物生態系を通じた影響について研究が始まったので、今後、遺伝子汚染影響の研究はCMESおよびLaMerのユニークな研究分野の一つとして発展することが期待される。

メンバーは各分野ではすでに大きな成果を挙げて来たが、本フォーラムによって、さらに超学際的グループが形成されたことから、若手牽引のコアになることが期待できた。欧米でもまだこのような「幅広く、医療以外での目的が明確」な耐性菌研究グループは少ない。そのため、世界でもトップの精鋭研究者グループになることが期待できる。このグループで継続的な交流を続けていくことにより、日本が世界を牽引できる数少ない研究

分野となりうる。そのために、多忙を極める各研究者同士が継続的な交流の機会を設けることができる LaMer の枠組みを利用していただくだけではなく、日常レベルでの情報交換の場を提供する、さらには若手研究者のこのグループ内での武者修行的な行き来などの仕組みの構築を考えていく必要がある。

ABSTRACT BOOK

第二回 LaMer共同利用研究集会

遺伝子汚染の新しい視点： 環境中の抗菌剤耐性菌・耐性遺伝子の 動態解明とそのリスク評価へむけて

2016.7.27  9:00-18:00

場所： 愛媛大学 校友会館 2階サロン

趣旨：現在世界的な問題になっている多剤耐性菌の対策では、これまで人・獣医療の分野で考えられてきた。しかし、近年環境細菌群集が耐性遺伝子の大きなリザーバとなっていることが明らかになってきた。本フォーラムでは、環境に潜伏する多剤耐性遺伝子の定量的議論を行い、遺伝子動態の可視化等の最新研究の発表と議論を行う。さらに出口目標としての「環境の遺伝子汚染のリスク評価」を行うことを目指した研究チームの形成を目的とする。

セッション1. 耐性菌・遺伝子の動態 (9:00-10:50)

- 1) 鈴木 聡(愛媛大学沿岸環境科学研究センター教授)
薬剤耐性遺伝子の水圏環境での残存機構と人への暴露リスク評価：総論と研究チームのコンセプト
- 2) 渡部 徹(山形大学農学部教授)
チャオプラヤ流域における大腸菌が有する薬剤耐性遺伝子の地理的分布
- 3) 杉本侑大(愛媛大学大学院農学研究科修士課程)
新規マクロライド耐性クラスター遺伝子のアジア水圏環境からの検出
- 4) Bien Thi Lan Thanh(愛媛大学大学院連合農学研究科博士課程)
Release of multi-drug resistance plasmid from bacteria under coexistence of predators

セッション2. ゲノミクス・エピゲノミクス (11:00-12:10)

- 5) 丸山史人(京都大学大学院医学系研究科准教授)
ピブリオプロジェクト—地球規模での水の衛生微生物学的安全性を保證する—
- 6) 大田篤(京都大学大学院医学系研究科博士課程)
細菌の抗生物質耐性とメチローム相互作用解明に向けた外因性メチラーゼの網羅的解析

セッション3. バイオフィーム (14:30-15:30)

- 7) 野村暢彦(筑波大学大学院環境生命科学研究科教授)
バイオフィームにおける細胞多様性
- 8) 遠矢正城(筑波大学大学院環境生命科学研究科修士課程)
生息環境によって異なる緑膿菌の微生物間コミュニケーション機構

セッション4. モデリング (15:30-16:00)

- 9) 金谷祐里(山形大学大学院農学研究科修士課程)
薬剤耐性菌による健康被害の評価のための用量反応モデル開発—皮膚病を例に

特別講演 (16:15-17:15)

Dr. Rustam Aminov (Senior Researcher, Technical University of Denmark)
Coping with antibiotic resistance: alternatives to antibiotic treatment.

ほかにポスター発表があります。聴講は無料です。

主催：愛媛大学共同利用共同研究拠点(化学汚染・沿岸環境研究拠点)



問い合わせ先：
京都大学・丸山史人(maruyama.fumito.5e@kyoto-u.ac.jp)
愛媛大学・鈴木 聡(ssuzuki@ehime-u.ac.jp)

Program

Session 1. Dynamics of ARB and ARGs in environment

9:00-9:30 Satoru Suzuki, CMES, Ehime University

Mechanisms of spread and residue of ARGs and its risk: Project concept

9:30-10:10 Toru Watanabe, Fac. Agriculture, Yamagata University

Distribution of ARGs possessed by *E. coli* in the Chao Phraya River and its tributaries, Thailand

10:10-10:30 Yuta Sugimoto, CMES, Ehime University

Detection of novel macrolide resistance gene cluster in Asia

10:30-10:50 Bien Thi Lan Thanh, CMES, Ehime University

Release of multi-drug resistance plasmid from bacteria under coexistence of predators

Session 2. Genomics / epigenomics

11:00-11:40 Fumito Maruyama, Grad. Sch. Medicine, Kyoto University

“World Vibrio Project” –Preserving drinking water safety on the Earth-

11:40-12:10 Atsushi Ohta, Grad. Sch. Medicine, Kyoto University

Analysis of exogenous methylase toward the understanding of interaction of antibiotic resistance and methylome

Session 3. Biofilm

14:30-15:10 Nobuhiko Nomura, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba

Cell diversity in biofilm

15:10-15:30 Masaki Tohya, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba

Cell-to-cell communication in *P. aeruginosa* in various environments

Session 4. Modeling

15:30-16:00 Yuri Kanaya, Grad. Sch. Agriculture, Yamagata University

Development of dose-response models for skin disease for estimation of burden of ARB infection

Poster session

- 1) Masato Akiba, Nat. Inst. Animal Health, NARO
Analysis of β -lactam antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from the environment in India
- 2) Toru Watanabe, Fac. Agriculture, Yamagata University
Identification of tetracycline and kanamycin resistant bacteria from activated sludge
- 3) Kohta Nakanishi, Grad. Sch. Environmental Science, University of Tsukuba
Horizontal gene transfer in complex biofilm
- 4) Yoshiaki Kohyama, CMES, Ehime University
Horizontal gene transfer in starved cell and oligotrophic condition

Special lecture

Dr. Rustam Aminov (Senior Researcher, Technical University of Denmark; Adjunct Professor, University of Aberdeen, UK, and Visiting Professor, Osaka University)

Coping with antibiotic resistance: alternatives to antibiotic treatment

Abbreviations through this book

ARB: antibiotic resistant bacteria

ARGs: antibiotic resistance genes

HGT: horizontal gene transfer

MGEs: mobile genetic elements

QS: quorum sensing

PK/PD: pharmacokinetics / pharmacodynamics

薬剤耐性遺伝子の水圏環境での残存機構と人への暴露リスク評価：

総論と研究チームのコンセプト

鈴木 聡

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

【プロジェクト概要】 薬剤耐性遺伝子(antibiotic resistance genes, ARGs)が人・獣医療現場から環境中に流入した後、自然環境でどのような機構で残存・拡散するのかを解明することを目的とする。これまでの耐性菌研究は、培養可能な病原菌が対象であり、環境へ流入した後の耐性菌と ARGs の運命は不明である。本研究での作業仮説は、1) 水圏環境では、未知の“未培養菌”(yet-to-be cultured 菌 or unculturable 菌)がリザーバとなる。2) ARGs はバイオフィーム中に残存し、生物由来物質がキャリアとなって安定化する。3) ARGs は細菌種間で拡散する。これらについて、未培養菌を含むマイクロゾム実験および現場のリザーバ、キャリア中で ARGs の網羅解析(レジストーム)および定量分析を行う。最終的に、環境遺伝子のリスク評価を行い、暴露低減策を提言する。

【ARGs 汚染ソースと環境中残存】

熱帯アジア、南アフリカでの畜産排水・下水処理排水から河川、海までの ARGs 汚染の実態を紹介し、今後の着目点を議論したい。

これまでの多くの研究では、Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes および Actinobacteria のうち、培養可能な菌に着目している。水圏環境の中でも、海洋では全細菌のうち 0.1%程度しか培養できないが、ほかの 99.9%のサイレントマジョリティはなにをしているのか？皆が考えるが解答の出ていない問題である。彼らの機能を知りたいものである。彼らはリスク要因か？

ARGs は海洋中でどのように保存されているのか？細菌が捕食されたとき、ARGs は消化されるのか？消化分解より伝達が早いのか？まだまだ疑問は残る。

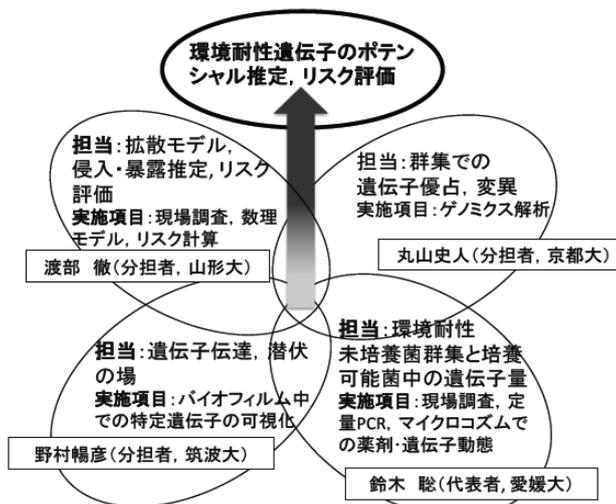


図1. 研究体制(担当者, 項目)

チャオプラヤ流域における大腸菌が有する薬剤耐性遺伝子の地理的分布

○渡部 徹¹, 小澤耕平², 本多 了³, Wilai Chiemchaisri⁴, 伊藤紘晃¹, 渡辺幸三⁵

¹山形大・農, ²山形大院・農, ³金沢大・理工, ⁴カセサート大(タイ)・工,

⁵愛媛大院・理工

【目的】タイ王国チャオプラヤ川流域に生息する大腸菌について、多数の薬剤耐性遺伝子の検出を行い、それらの地理的分布を明らかにする。明らかにされた地理的分布について、流域の土地利用や大腸菌の系統発生解析結果から説明することを試みる。

【方法】チャオプラヤ川およびその支流の 34 地点において分離された 316 株の大腸菌を使用した。すべての分離株から DNA を抽出し、Integrated fluidic circuits を用いた薬剤耐性遺伝子の一斉検出を行った。検出対象とした耐性遺伝子は、4 つの系列の抗生物質に対する耐性に関わる遺伝子の計 38 種類とした。系統発生解析には PCR-RFLP 法を使用した。PCR の対象は H 抗原遺伝子とし、RFLP には制限酵素 Hinf I と Rsa I を使用した。

【結果と考察】38 種類のうち 24 種類の耐性遺伝子が、いずれかの分離株から検出された。ampC 遺伝子の検出率が最も高く(約 60%)、ペニシリン系とテトラサイクリン系の耐性遺伝子で検出率が高かった。これらの遺伝子について、地点別の検出率とその周辺の土地利用の相関を調べたが、ごく限られたケースを除いて有意な相関は確認できなかった。分離株の系統発生解析によって、耐性遺伝子の地理的分布を説明することも困難であった。この目的には、耐性遺伝子の水平伝播に関与するプラスミドの遺伝子配列にもとづく解析が有効かもしれない。

新規マクロライド耐性クラスター遺伝子のアジア水圏環境からの検出

○ 杉本侑大, 鈴木 聡

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

【背景】 薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic resistance genes, ARGs) がもたらす, 細菌の薬剤耐性化は世界的な問題である. ARGs は可動性遺伝因子 (Mobile genetic elements, MGEs) に担われることが多く, 細菌群集間で伝播する. 近年, 香川県の養殖場海水から, 新規マクロライド耐性遺伝子クラスターである *mef(C)-mph(G)* が発見された. この連結した二つの遺伝子は同時発現によって, それぞれ単独の時と比べて耐性能が格段に上昇する. しかし, この遺伝子クラスターの伝播に関する情報はほとんどなかった.

【目的】 本研究では, アジアの水圏環境から分離したエリスロマイシン耐性株から, *mef(C)-mph(G)* の分布とこれらをつなぐ MGEs の調査をした. これにより, *mef(C)-mph(G)* の拡散実態を明らかにし, 遺伝子の環境中における動態を解明することを目的とした.

【調査内容】 *mef(C)-mph(G)* 保有細菌株について, 1) 16S rRNA 遺伝子の解析による属同定, 2) 伝達因子のサイズ解析, 3) 大腸菌への伝達性 の 3 項目を調べた.

【結果】 愛媛県の沿岸養殖場の海水 (4 株) およびマダイ腸内 (15 株), 台湾北部の海水養殖場 (9 株), およびタイ国の首都バンコク周辺の養豚場排水 (1 株) から *mef(C)-mph(G)* 保有細菌を単離した. この単離株は海洋細菌 (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*) だけでなく, 腸内細菌 (*Proteus* および *Citrobacter*) を含んでいた. MGE のサイズは, 多くの愛媛県株は 200~300 kbp であったのに対し, 台湾株はほとんどが 400 kbp 程度であり, 愛媛県株と比べて大きい傾向が見られた ($P < 0.005$). *traI* のシーケンスによって MGEs を調べたところ, 愛媛県株から pAQU1-like プラスミドと SXT/R391 family ICEs が, 宜蘭県株からは pAQU1 が, タイ国からは IncA/C プラスミドが検出された. *mef(C)-mph(G)* の伝達性は, *traI* が検出された 14 株のうち 11 株は伝達性であったのに対して, *traI* 非検出の株は 1 株を除き全ての株で伝達は確認されなかった.

【結論と予見】 新規マクロライド耐性遺伝子 *mef(C)-mph(G)* は, 環境中の様々な細菌群集に保持されており, これらをつなぐ MGEs は多様であることが明らかとなった. このことから, ARGs は MGEs 間で組み換えしながら環境中に広まっていることが示唆される. 今後, 多様な MGEs に担われることで, 群集中での拡散が促進されることが考えられる. この先, 環境から人間生活圏への侵入リスクまでを研究したい.

Release of multi-drug resistance plasmid from bacteria under coexistence of predators

OBien Thi Lan Thanh, Ngo Vy Thao, Shin-Ichi Kitamura, Yumiko Obayashi
and Satoru Suzuki

Center for Marine Environmental Studies, Ehime University, Matsuyama, Japan

Abstract

Extracellular DNA (exDNA) found in many natural aquatic environments may play an important role in horizontal gene transfer through natural transformation. exDNA is released from bacteria by many mechanisms. We herein demonstrated the involvement of marine ciliates and heterotrophic nanoflagellates (HNFs) in the release of multi-drug resistance transferable plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strain 04Ya311. In seawater microcosms containing 04Ya311 and ciliates, the marked increase of extracellular pAQU1 was found at day 3 of incubation, while in microcosms co-culturing 04Ya311 and HNFs, the highest copy number of extracellular plasmid was observed at day 20. The addition of low concentration of oxytetracycline (OTC, 10 µg/mL) was not effective to the release of plasmid. Under grazing pressure of ciliates, no significant loss of plasmid in bacterial population was observed during the incubation both with and without OTC. While under presence of HNFs, plasmid was lost after 7 days in the condition with OTC. The results provide an insight into the effect of prey-predator interactions on horizontal gene transfer in marine environments that valuable for risk assessment and management of environmental drug resistance genes.

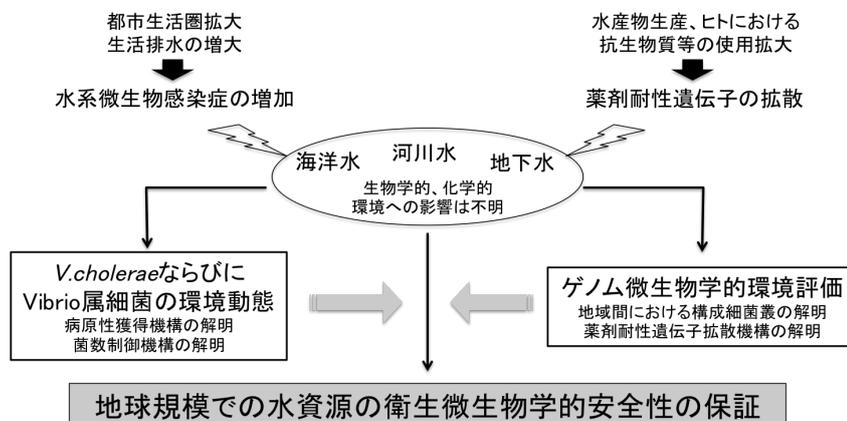
ビブリオプロジェクトー地球規模での水の衛生微生物学的安全性を保証するー

丸山 史人

京都大学大学院医学研究科

【概要】 地理的に隔てられるが、食品の輸入等によるつながりをもつ3地域（チリ、ベトナム、日本）における水環境を研究対象とする。これら地域間における構成細菌叢の比較やその経時的な変動、病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子の拡散機構をゲノムレベルで解明することで、ゲノム微生物学的環境評価に基づいた水資源の安全性の確保を目的とする。同時に、水系感染の主要な病原細菌のひとつである *Vibrio* 属細菌、特に、コレラ菌の全ゲノム解析を行い、限定された抗原型のコレラのみが流行を引き起こす原因およびそのプロセスの解明と、予防疫学の観点から新たな流行株出現予測に資する本菌の環境動態を明らかにする。

【重要性】 本研究は研究フィールドを、我が国の主要な水産物輸入相手国であるチリ、ベトナム、そして、日本に設定するため、「輸入される水産物の安全を生産段階で評価する」目的に適した地域である。本研究では、環境微生物の大部分を占める難培養菌に対して各地域の微生物群集の全体像と、ヒトの健康に影響を及ぼすと考えられる薬剤耐性遺伝子群の動態を明らかにする。加えて、病原細菌の *Vibrio* 属細菌のゲノム生態等を明らかにする。現状、機構に関する知見は非常に限定されているが、未解析の培養不能な細菌群が両者に深く関与することで水圏微生物生態系が維持されていると予想される。さらに、本研究の主要な解析対象とするコレラ菌は、水系感染を介する下痢症感染症として重要な病原細菌であり、今年度発足したAMEDの中核の一つである「新興・再興感染症制御プロジェクト」においても重要な位置づけとなっている。早急な国内外のサーベイランスの整備に加え、ワクチン開発を含む更なる基盤的研究が求められている。このことから、本研究がもたらす成果は、微生物生態系維持機構を解明する端緒になることに加え、構築するゲノムデータベースは今後他の地域における同様の微生物学的評価のプラットフォームとして活用することで、学術的・予防医学的な意義をさらに深化するものと考えている。



細菌の抗生物質耐性とメチローム相互作用解明に向けた 外因性メチラーゼの網羅的解析

○大田 篤, 丸山史人, 中川一路

京都大学大学院 医学研究科 微生物感染症学

【背景】 A群レンサ球菌は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症など多様な病態を示す病原菌である。その病態の多様性については、説明がついていない。本菌ゲノムには平均して5つのプロファージ領域が存在し、それ以外の領域では菌株間で病原因子にほとんど差異がないことから、ファージによる遺伝子伝搬がゲノムの多様化に重要な位置を占めている。近年のアウトブレイクにおいても、MLS耐性遺伝子やM耐性遺伝子 *mef* などの病原因子を遺伝子伝搬により新たに獲得したことが原因と考えられている。さらに、*mef* を持つあるプロファージにはDNAメチル化酵素もコードされ、ゲノムがメチル化されていることが報告されている。メチル化された配列はもともとの認識配列をターゲットとした制限酵素による消化を回避する。これによりファージは自己の生存戦略が結果として本菌の薬剤耐性獲得を強固にしているかもしれない。

以上のことから、A群レンサ球菌が獲得したファージの持つDNAメチル化酵素が本菌の多様なメチロームを生み出し病原遺伝子発現調節に寄与した結果、病原性を多様化しているのではないかと考えた。

【目的・方法】 複数存在するプロファージ領域に関する正確な情報や、1塩基単位でのメチル化修飾を検出することを目的とし、臨床分離株を含めた7株のゲノムについて、一分子リアルタイムシーケンサにより新たに完全長配列を決定した。さらに各株について比較解析を行い、制限修飾系、プロファージ領域予測のほか、1塩基単位でメチル化修飾を検出し、各病原因子への修飾様式を比較、検討した。

【結果・考察】 系統的に非常に近縁である株間においてメチル化酵素の種内多様性が高く、さらにその一部はプロファージ領域上に存在していることが明らかになった。また、メチル化修飾の部位や修飾様式は株ごとにゲノムレベルで異なっていたがいずれも病原因子や発現調節因子周辺は他の遺伝子と比較してメチル化修飾を多くうけていた。さらに詳細な解析が必要ではあるが、これらの結果は外因性メチラーゼによりA群レンサ球菌が病態を多様化している可能性を示唆している。

バイオフィルムにおける細胞多様性

○野村暢彦, 豊福雅典, 尾花 望

筑波大・生命環境系

自然環境中やさらに動物・植物内では、ほとんどの細菌が集団（バイオフィルム）状態で生息していると考えられる。細菌は集団（バイオフィルム）を形成して個性や社会性を発揮することで、多細胞生物的な挙動を示し、高度な生存戦略をとることが明らかになりつつある。バイオフィルムの高次構造を形成するために細菌は細胞外マトリックスと呼ばれる接着因子（EPS, eDN 等）を生産することで、細菌どうしや細菌と基質を繋ぎ止めることがわかっている。そのようなバイオフィルム内では接合伝達のみならずその他の機構で遺伝子の伝播が細胞間で行われていることが推測される。そのような中で、細菌が放出する 10-400nm 程度の膜小胞（メンブランベシクル(MV)）が近年注目を浴びている。MV は細胞膜によって形成された袋状の構造体で、その中に核酸(DNA, RNA)タンパク質、シグナルなど様々な物質を取り込むことで、輸送体の役割を担っている。細胞外 DNA や MV の放出は細胞の主成分を外に放出するという点で共通しており、細胞にとっては大きな負担になると考えられる。よって、細胞外 DNA や MV がどのようにして放出されるのか興味深いところである。

それらの放出メカニズムの解明を進めたところ、集団中の一部の細胞が破裂することで細胞外 DNA と MV が放出され他の細胞に提供されることを明らかにした。さらに、MV 形成時に発現している遺伝子を同定するために、MV に含まれる mRNA を解析したところ、lys 遺伝子 RNA が同定された。lys 遺伝子欠損株を用いた解析により、Lys 及びその細胞壁分解活性が細胞の破裂を誘導するのに必須であることを示した。また、超解像顕微鏡を用いた動画撮影解析により、細胞壁を分解された細胞が形を保てなくなり破裂する様子が観察された。細胞が破裂する様子から、この現象を explosive cell lysis と命名した。破裂した細胞の膜は断片化したのちに、再構成されて MV を形成し、その際に放出された DNA の一部を取り込む様子が観察された。大変興味深いことに、explosive cell lysis を引き起こす遺伝子は、細菌間でグラム陰性・陽性を問わず最もよく保存されている遺伝子の一つであるため、explosive cell lysis は細胞外 DNA や MV 放出に関わる細菌共通のシステムである可能性が高いと推察され、環境中における DNA の伝播にこれらが関与しているか興味深いところである。

緑膿菌のコミュニケーション機構は生息環境によって異なる

○遠矢正城¹, 豊福雅典¹, 木暮一啓², 野村暢彦¹

筑波大・生命環境系¹, 東京大・大気海洋研²

近年の研究では単純な構造をもつ細菌もヒトと同様にコミュニケーションを行うことが明らかとなってきた。微生物間コミュニケーションの一つである Quorum sensing は菌特有のシグナル物質を介して一定以上の菌体密度に到達したことを感知し、様々な遺伝子の転写を促進または抑制する機構である。この機構によって病原性やバイオフィーム形成、運動性などが制御されており、細菌は一菌体では持ちえなかった集団的な性質を示すことがわかってきている。本研究で使用する緑膿菌は QS 研究のモデル細菌であり、QS についてもっとも研究されている細菌の一つである。緑膿菌は免疫力の低下した患者や高齢者に嚢胞性線維症などを引き起こす日和見感染菌としてよく知られ、治療の観点から QS を標的とした研究が臨床由来の緑膿菌株で数多くなされてきた。一方で緑膿菌は宿主体内や院内環境だけでなく、土壌や河川・湖沼といった広範囲な自然環境中に生育する常在菌としての側面も持っており、非常に環境適応能力が高い細菌の一つとして知られている。しかしながら自然環境中の緑膿菌株についてはほとんど研究がなされておらず、病原性やそれを制御する QS についての知見は非常に少ないのが現状である。そこで本研究においては水環境中の緑膿菌株に焦点を当て、ピオシアニン色素およびシグナル物質生産の比較を行い、現在までに研究がなされてきた標準株との違いを解析した。その結果海洋由来の緑膿菌株においてはそれらの生産が著しく減少しており、外部シグナルに対する応答性も持たないことからコミュニケーション機構が欠落していることが明らかとなった。また QS 関連遺伝子のシーケンス解析を行い標準株の配列とアライメントを行った結果、変異があることもわかり現在それらの遺伝子の機能性を網羅的に検証している。本研究をさらに詳細に解析していくことで QS 機構の自然環境中における生態的意義の解明に貢献できると考えている。

薬剤耐性菌による健康被害の評価のための用量反応モデル開発—皮膚病を例に

○金谷祐里¹, 渡部 徹², 浦 剣²

¹山形大院・農, ²山形大・農

【目的】現在の水中の病原微生物に関する安全性は、感染リスクを許容レベル以下にすることを目標に管理されている。しかし、この感染リスクの考え方には一旦感染が成立した後の症状や、治癒の可能性は考慮されていない。障害調整損失年 (DALY) による管理も提案されているが、そこでも耐性菌に感染した場合の治癒の難しさには言及されていない。本研究では、PK/PD 理論にもとづく感染者の体内での薬物動態の予測により、耐性菌に感染後、治癒に至る確率やそれに必要な期間を計算することで、耐性菌による健康影響を評価する手法の開発を目指しているが、その第一歩として、3種類の細菌による皮膚感染の用量反応モデルの開発を行う。

【方法】A群溶血性連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌について、それぞれボランティアに対して行った皮膚感染実験のデータを収集した。各菌のデータに、指数モデルとベータポアソンモデルをフィッティングした。フィッティングには最尤推定法を用い、モデルの適合度評価とモデルの選択にはカイ二乗検定を用いた。

【結果と考察】モデルフィッティングの結果、A群溶血性連鎖球菌には指数モデル($r=2.8 \times 10^{-5}$)、黄色ブドウ球菌 ($\alpha=0.23$, $N_{50}=2.4 \times 10^5$) と緑膿菌 ($\alpha=0.58$, $N_{50}=6.3 \times 10^5$) にはベータポアソンモデルが選ばれた。鶴岡市内の河川における黄色ブドウ球菌と緑膿菌の濃度から試算された毛包炎のリスクは、1回の水浴びでそれぞれ 5.6×10^{-5} , 8.8×10^{-6} であった。同じく下水処理水で1回水浴びをする場合、黄色ブドウ球菌と緑膿菌による毛包炎のリスクは、黄色ブドウ球菌で 4.0×10^{-4} , 緑膿菌で 1.1×10^{-7} と試算された。

インドの環境由来 β -ラクタム系抗生物質耐性大腸菌における耐性遺伝子の分布

○秋庭正人^{1,2}, 関塚剛史³, 山下明史³, 黒田 誠³, 李 謙一⁴, 岩田剛敏¹, 楠本正博¹,

Keerthi S. Guruge¹

農研機構・動衛研¹, 大阪府大院・生命環境², 感染研・ゲノム³, 感染研・細菌^{1,4}

【目的】インドでは第3世代セファロスポリン系抗生物質(3GC)やカルバペネム系抗生物質(CAR)に耐性を示す腸内細菌科細菌が環境から広く分離される。本研究ではこれらの細菌における耐性遺伝子の分布を明らかにすることを目的とした。

【方法】インド国内5州の河川及び污水处理場の水から大腸菌をランダムに分離し、ディスク法による薬剤感受性試験に供した。3GCまたはCARに耐性を示す株が保有する β -ラクタマーゼの遺伝子型をPCR産物の塩基配列解析により決定した。一部の株についてプラスミドの全塩基配列を決定し、レジストーム解析を実施するとともに、ネットワーク解析により、各プラスミドの遺伝的関連を調べた。

【成績】水検体から446株の大腸菌を分離した。薬剤感受性試験の結果、3GCまたはCARに耐性を示した169株を以降の解析に供した。169株中98株が8剤以上に耐性であった。*bla_{CTX}*遺伝子は112株から検出された(*bla_{CTX-M-15}*, 108株; *bla_{CTX-M-55}*, 4株)。CAR耐性の21株中14株で*bla_{NDM}*遺伝子が検出された(*bla_{NDM-1}*, 2株; *bla_{NDM-5}*, 7株; *bla_{NDM-7}*, 5株)。ランダムに選んだ一部の株から抽出した49プラスミドの全塩基配列を解析したところ、50の異なる薬剤耐性遺伝子が検出された。ネットワーク解析の結果、4~17のプラスミドから構成される4つのコミュニティが確認できた。うち3つは異なる州に由来するプラスミドから構成されていた。

【結論】インドの環境に由来する3GCまたはCAR耐性大腸菌は多様な薬剤耐性遺伝子を保有し、多くの薬剤に耐性を示した。プラスミドのネットワーク解析の結果は類似のプラスミドを保有する大腸菌がインドの環境を広範に汚染している可能性を示唆している。

参考文献

Akiba et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60: 2972-2980, 2016

活性汚泥細菌からのテトラサイクリンおよびカナマイシン耐性菌の検索

三浦逸実¹, ○渡部 徹², 風間しのぶ³, 今田義光³, 浦 剣²

¹山形大院・農, ²山形大・農, ³東北大・NICHe

【目的】都市下水や畜産排水の処理に用いられる活性汚泥システムでは、多種多様な微生物が共存し、盛んに増殖を繰り返していることから、細菌の突然変異や耐性遺伝子の水平伝播が起こりやすい環境と言える。本研究では、抗生物質の添加に対する活性汚泥細菌の種構成変化から、活性汚泥システムにおける薬剤耐性菌の発生・伝播に重要な役割を果たしている細菌種を明らかにすることを目的とする。

【方法】鶴岡市内の下水処理場において反応槽から汚泥混合液を採取し、テトラサイクリンまたはカナマイシンを添加した LB 培地中で、24 時間 37°C で振とう培養する。抗生物質の濃度は MIC の最高値の約 5~10 倍とし、感受性菌を速やかに死滅させる濃度とした。培養後の汚泥混合液から抽出した DNA に対して PCR を行い、16SrRNA をコードする領域を増幅する。増幅された遺伝子断片を精製し、次世代シーケンスによってその配列を解読する。解読した配列を OTU にまとめ、BLAST を用いた解析によって培養前後の汚泥混合液に生息していた細菌種を明らかにする。

【結果と考察】抗生物質無添加で培養すると、LB 培地の栄養組成に適応した γ プロテオバクテリア綱の細菌が増殖し、培養前の汚泥細菌の構成と大きく変化した。テトラサイクリンを添加した条件では、培養前に多く存在していた Comamonadaceae 科が培養後も高い割合のまま存在していた。一方、カナマイシンを添加した条件では、Enterobacteriaceae 科の割合が高かった。抗生物質に強い耐性を示すこれらの優占種は、耐性遺伝子を保有し、他の菌に伝播させる可能性がある菌として注視すべきである。

複合バイオフィルム内における遺伝子伝播の解析

○中西康大^{1,2}、山本達也¹、尾花 望¹、豊福雅典¹、金子明寛²、野村暢彦¹

筑波大学・生命環境系¹、東海大学・大学院・医学研究科²

細菌は個々に生きているわけではない。バイオフィルムを形成し、異菌種相互作用しながら集団で生活していることが近年注目されている。口腔内細菌には数百種類の常在菌が存在しており、その中でも同様に異菌種相互作用を起こしている。また、*Streptococcus mutans* は、口腔内細菌の代表の一つであるとともに、自然形質転換能が高く、遺伝子変異を起こしやすい。つまりこのことは、複合バイオフィルム中でも同様に *S. mutans* は遺伝子伝播を受けることが考えられる。複合細菌種によってバイオフィルム形状や細菌の局在性の違いが起き、*S. mutans* の自然形質転換率や、形質転換で取り込む遺伝子にも変化が起こる可能性が考えられるため、これらを解析することで、複合菌における遺伝子伝播の詳細なメカニズムを解明することを目的とした。そこで、われわれはまず複合バイオフィルム中で異菌種相互作用により起こる、バイオフィルム全体の形状の変化と、*S. mutans* の局在変化を観察可能な手法を確立したため、報告する。

われわれは、蛍光タンパク常発現 *S. mutans* 株を構築した。この常蛍光発現 *S. mutans* と口腔内細菌として、有名な *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Aggregatibacter actinomycetumcomitans* (*Aa*) の3菌種を用いてバイオフィルム形成させ、顕微鏡観察することとした。当研究室では反射光を利用することで、バイオフィルム全体を観察できる、共焦点反射顕微鏡システムを保有しており、さらには従来からの共焦点レーザー顕微鏡システムを併用することで、生きたまま無処理の状態バイオフィルム形状と *S. mutans* の局在性を観察することが可能となった。混合培養し、複合バイオフィルムを観察した結果、異菌種相互作用により、*S. mutans*-*Aa* 複合バイオフィルムにおいて、バイオマスの増大が観察された。混合バイオフィルム間でバイオフィルム全体の生菌数に大きな差はないものの、*S. mutans*-*Aa* 複合バイオフィルム中に *Aa* は 0.001 % と極僅かな存在であった。つまりこのことは、*S. mutans* -*Aa* 複合バイオフィルム中において *S. mutans* 遺伝子発現量変化を起こしていることが考えられる。複合菌の種類の違いによって、バイオフィルムの形状や局在性の変化を観察することができた。今後は、バイオフィルム形状や局在性の違いと、遺伝子伝播能の関係性について、解析していく。

飢餓状態の菌および貧栄養環境での遺伝子水平伝達

○香山義明・鈴木 聡

愛媛大学沿岸環境科学研究センター

【背景】 薬剤耐性遺伝子 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) は、水平伝播 (Horizontal Gene Transfer, HGT) によって細菌群集中で拡散する。抗生物質が環境中に放出されると、環境中の細菌群集中に選択圧を与える。同じ ARGs が世界中に広く分布している事例や、ヒトの病原菌と海洋細菌に同じ ARGs が見つかることなどは HGT が人獣病原体と海洋細菌の間で起こっていることを示唆する。しかし、海水中に存在する ARGs が人間生活圏へ侵入するリスクは不明である。今までは、HGT は培養可能な細菌で研究されてきた。海洋の場合は有機物濃度が低い貧栄養環境であるが、このような環境での HGT については報告の例は少ない。海洋環境の ARGs リスクの評価には、貧栄養条件下での HGT 実態を知る必要がある。

【目的】 本研究では飢餓細菌および貧栄養条件下での HGT 頻度を定量することを目的とする。

【方法】 ARGs の供与菌には海洋由来の *Photobacterium* 株を、受容菌には大腸菌株を用いた。細菌を飢餓状態にするために、滅菌した人工海水または PBS に細胞を懸濁し、供与菌、受容菌をそれぞれ 25°C および 37°C で 6 日間放置した。この飢餓細菌と、富栄養条件下で培養した細菌との間でフィルターメイティング法を用いて、MB 培地と PBS 培地の有機物栄養有りと無しとの二つの環境下で HGT を行わせ、その頻度を比較した。ARGs を受け取った受容菌 transconjugant (TJ) は tetracycline (TC) 20 µg/mL を含む LB 培地上に生育したコロニー数を測定し、*tet(M)* の伝達を PCR で確認した。

【結果】 実験の結果を表 1 に示す。陽性対照区 D→R では、貧栄養環境は富栄養環境に比べ 77.4% と低い傾向がみられた。貧栄養環境では HGT 率は低下することが分かった。富栄養環境では d→r でも 53.4% を示し、率は低下するが有機物栄養が豊富であれば飢餓菌どうしても HGT は起こることが示唆された。一方、この条件下で d→R では D→R の約 12 倍伝達率が高かった。飢餓供与菌は有機物栄養を得ると、HGT 能を活性化するのかもしれない。本研究から、HGT は外洋のような貧栄養環境よりは、養殖場付近や排水が流れ込むような有機物豊富な場所のほうが高率に起こりうると考えられた。

表 1 富栄養環境と貧栄養環境での遺伝子伝達率

伝達環境	D → R (%)	D → r (%)	d → R (%)	d → r (%)
富栄養	1.11E-04 ± 2.05E-05 (100)	1.63E-05 ± 1.19E-05 (14.6)	1.40E-03 ± 9.76E-04 (1266.4)	5.90E-05 ± 2.50E-05 (53.4)
貧栄養	8.59E-05 ± 4.09E-05 (100)	3.51E-7 ± 1.94E-07 (0.4)	N. D.	N. D.

D : 富栄養条件下で培養した供与菌 d : 飢餓供与菌

R : 富栄養条件下で培養した受容菌 r : 飢餓受容菌

カッコ内の%は、それぞれの伝達環境での D→R を 100%とした時の伝達率

N. D. : not detected