

研究課題名

水環境中から回収した細胞外薬剤耐性遺伝子の活性評価

共同研究者

佐野大輔 (代表、東北大学大学院環境科学研究科)
Mohan Amarasiri (分担、東北大学大学院工学研究科)
小沼千紘 (分担、東北大学大学院環境科学研究科)
鈴木聡 (分担、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究目的

薬剤耐性細菌 (antibiotic resistance bacteria: ARB) による感染症が世界的に拡大しているが、水環境中の ARB・薬剤耐性遺伝子 (antibiotic resistance gene: ARG) の挙動や、それらがもたらすヒト健康へのリスクに関しては、ほとんど解明されていないのが現状である。薬剤感受性細菌が水環境中で薬剤耐性を獲得する方法の 1 つとして、細胞外薬剤耐性遺伝子 (extracellular antibiotic resistance gene: eARG) を外界から取り込む自然形質転換がある。水環境中には細胞外 DNA の存在が指摘されており、その量は河川・海洋の水圏では 0.2-88 ng/ μ L と報告されている 1)。また、細菌の中には細胞外 DNA を取り込みやすい自然形質転換能を持った細菌も存在する 2)。大腸菌も環境条件によっては形質転換しやすいコンピテントな状態となることも報告されている 3)。eARG は別の細菌に取り込まれ、新たな ARB の発生に寄与する可能性がある。

そこで本研究では、環境水中から形質転換可能な eARG の回収方法を確立することを試みた。

研究内容

サンプルとして未処理下水を用いた。eARG の陽性対象としてアンピシリン耐性遺伝子を保持する pUC19 を未処理下水に添加し、eARG の受容体のモデルとして大腸菌のコンピテントセルを使用した。

(1) 前処理

流入下水中に含まれる細菌やウイルスを除去するために、はじめに 1.2 μm 、次に 0.22 μm のフィルターでろ過した。eARG の濃度を上げるために、その濾液を分画分子量 10,000 の Pellicon2 ミニカセットホルダーを用いて濃縮した。

(2) eARG の抽出

濃縮した流入下水の濾液から eARG を回収する方法として、クロロホルム及びイソアミルアルコール処理 (CI) とイソプロパノール沈殿 (イソプロ沈殿)、PureLink HQ Mini Plasmid Purification Kit (プラスミド精製キット) を組み合わせて図 1 のような A~E の 5 つの条件で回収方法を比較した。

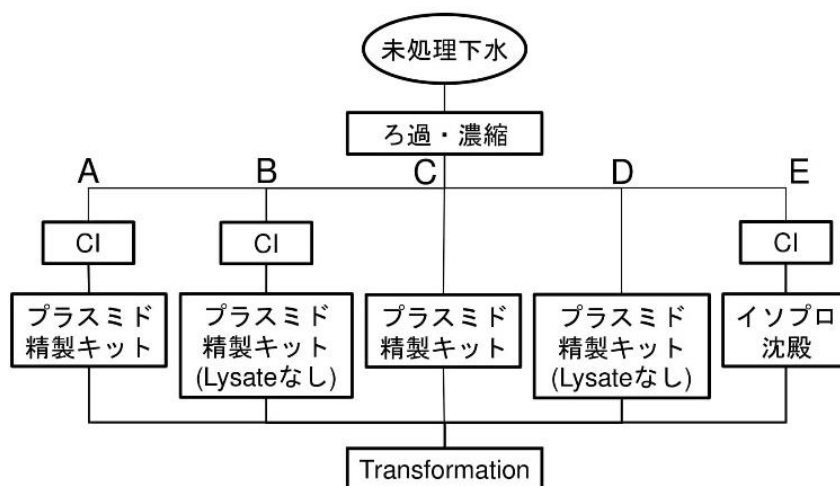


図 1 eARG の回収方法

(3) 形質転換

回収した pUC19 を用い、ヒートショック法で大腸菌コンピテントセルの形質転換を行った。抗生物質はアンピシリンを終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように液体寒天培地に添加した。

研究成果

図 1 の A, C 及び D では形質転換されたコロニーが得られなかったのに対し、B, E では形質転換されたコロニーが得られた。E は B の 106 倍のコロニー数が得られた。形質転換可能なプラスミドを回収するためには、

未処理下水中に存在するタンパク質の除去が重要であることが示された。

成果発表

水環境サンプルからの形質転換可能な細胞外薬剤耐性遺伝子の回収方法
の確立

小沼千紘、Mohan Amarasiri、鈴木聡、佐野大輔

第 54 回日本水環境学会年会

2020 年 3 月 16-18 日、岩手大学

今後の問題点

下水中に形質転換可能な細胞外薬剤耐性遺伝子が存在するときに、その遺伝子を回収可能な方法として有効であることは示されたが、実際に形質転換可能な細胞外薬剤耐性遺伝子が存在するか、また、その遺伝子の種類については今後も引き続き調査する必要がある。