

第 395 回雑誌会

(Jun. 21, 2023)

(1) Disinfectants facilitate the transformation of exogenous antibiotic resistance genes via multiple pathways

Jia, Y., Wang, Z., Zhu, S., Wang, Z. and Liu, Y.

Ecotoxicology and Environmental Safety, **253**, 114678, 2023.

Reviewed by S. Tamai

薬剤耐性菌による健康被害は国際的な問題となっている。細菌は、形質転換によって外来の DNA を取り込み、薬剤耐性を獲得することが可能である。一方で、COVID-19 の流行によって消毒剤の使用量が世界的に増加している。消毒剤の過剰な使用は、消毒効果の低下を招き、細菌の遺伝子伝播頻度を促進する恐れがある。そこで本研究では、消毒剤が細菌の形質転換頻度に与える影響を評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。形質転換実験では、レシピエントとして *Escherichia coli* (*E. coli*) 標準株 (DH5 α) と 2 つの臨床株 (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*), ならびにドナー遺伝子として大きさの異なる 4 つの薬剤耐性プラスミド (pUC19 : 2686bp, pET-28a : 5369bp, pUT-mini-Tn5 : 7385bp, pWM91 : 8261bp) を使用した。コンピテントセルにプラスミドと 7 種類の消毒剤を 4 段階の濃度 (0, 0.001, 0.01, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で添加後、ヒートショック法によってプラスミドを導入した。その後、抗菌薬入りの培地で生育したコロニー数から形質転換頻度を求めた。さらに、細胞の細胞膜透過性、呼吸活性、運動性、および遺伝子の発現量の変化をコントロール試料と比較し、消毒剤の添加による細胞特性の変化を評価した。

DH5 α と pUC19 の形質転換実験において、7 つの消毒剤の効果を検討したところ、臭化ベンザルコニウム、塩化ベンザルコニウム、およびポリヘキサメチレングアニジン (PHMG) の添加によって形質転換頻度が 2~4 倍に上昇した。これらの消毒剤は、コントロールと比較して全ての濃度区 (0.001~0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) において形質転換頻度が有意に増加した。臨床株と pET-28a, pUT-mini-Tn5, または pWM91 を使用した場合においても、消毒剤の添加によって形質転換頻度が有意に上昇した。細胞膜透過性と呼吸活性について検討したところ、細胞の外膜透過性、内膜透過性、および呼吸活性は消毒剤の添加によって有意に増加した。さらに、膜関連遺伝子と呼吸に関連する ATP 遺伝子の発現が有意に促進された。また、細菌の運動性も消毒剤の添加によって向上した。PHMG を添加した際にはコントロールと比較してコロニー径が 2 倍以上に拡大し、鞭毛の合成に関連する遺伝子の発現が促進された。これらの結果から、消毒剤の添加によって細胞の膜透過性と呼吸活性が向上し、ATP 遺伝子の発現量が増加することで、鞭毛の活動が活発になり、形質転換頻度が大幅に向上することが明らかになった。

(2) Plant resistome profiling in evolutionary old bog vegetation provides new clues to understand emergence of multi-resistance

Obermeier, M. M., Wicaksono, W. A., Taffner, J., Bergna, A., Poehlein, A., Cernavaand, T., Lindstaedt, S., Lovric, M., Mueller-Bogota, C. A. and Berg G.
The ISME Journal, **15**, 921–937 (2021).

Reviewed by E. Nishimura

抗菌薬に耐性を有する微生物の起源やその変遷を辿るには、自然界中のレジストームに関する理解が不可欠である。在来植物は二次代謝産物が極めて多様であることから、レジストームも多様な可能性があり、理想的な研究媒体として期待できる。そこで本研究では、ヒトの手が加わっていない湿地生態系を対象に、主要な在来植物であるミズゴケのレジストームプロファイルを作成し、薬剤耐性の獲得に関する情報を蓄積した。始めに、ナスタチン含有 R2A 寒天培地を用いて、ミズゴケから計 437 株の細菌を分離した。その後、細菌の DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を標的とした菌叢同定を実施した。また、10 種類の抗菌薬を対象としたスクリーニングによって細菌分離株の薬剤耐性を調べた。次に、ミズゴケから直接得られたメタゲノムショートリードを用いて、メタゲノム解析を実施し、レジストームプロファイルを作成した。その後、OTU から遺伝子の多様性を評価した。さらに、ミズゴケの DNA 断片を大腸菌 EPI300 にクローニングし、9 種類の抗菌薬を対象とした機能性メタゲノミクススクリーニングを実施した。その後、検出された特異的な薬剤耐性クローン（大腸菌 EPI300-Mm3）について、De novo シーケンスを用いて、ミズゴケが保有する新規薬剤耐性遺伝子（ARGs）を検索した。

細菌分離株の薬剤耐性率は 88% (385/437 株) であり、その大半が半合成、および合成抗菌剤に対する耐性であった。また、耐性菌の 18% (71/385 株) は多剤耐性株であり、*Serratia* 属、*Rouxiella* 属、*Paraburkholderia* 属、*Pseudomonas* 属から多く確認された。メタゲノム解析の結果、ミズゴケから 943 種類の ARGs が検出された。多様性評価の結果、ミズゴケのレジストームは非常に多様であり、グリコペプチド系と β ラクタム系抗菌薬に係る ARGs が優占して存在した。また、排出ポンプをコードする遺伝子が優占して検出され、細菌の薬剤耐性の獲得において重要な薬剤耐性機構であることが示唆された。新規 ARGs の保有を確認した結果、新規クラス A の β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla_{Mm3}*) が同定された。以上のことから、植物のレジストームは多様であり、排出ポンプの存在が細菌の薬剤耐性獲得に強く寄与していることが示唆された。また、臨床で重要な抗菌薬の耐性を自然に保有していることも明らかとなった。