

第 447 回雑誌会

(May. 13, 2026)

(1) Discovery of large molecules as new biomarkers in wastewater using environmental proteomics and suitable polymer probes

Carrascal, M., Abián, J., Ginebreda, A. and Barceló, D.

Science of The Total Environment, **747**, 141145, 2020.

Reviewed by R. Tachibana

下水疫学は、集団の健康状態を把握するための有効な手法である。しかし、従来の研究は薬物や医薬品などの低分子化合物のモニタリングが主流であり、生体反応を直接反映するタンパク質の研究は、下水の複雑さや非ヒトタンパク質の混在により十分な知見が得られていない。そこで本研究では、ポリマープローブを用いた簡便なタンパク質抽出法を開発し、下水中のタンパク質を網羅的に同定・分析することを目的とした。スペインの下水処理場の流入水、無酸素槽、および放流水にポリマープローブを 11 日間浸漬し、タンパク質を吸着させた。回収したポリマープローブの表面をスライスし、抽出液 (2% SDS, 50 mM DTT, 75 mM Tris-HCl) 500 μ L を添加後、95°C で 30 分間加熱振とうした。その後、ジルコニアビーズを 250 μ L 加えてホモジナイズし、18°C で 7 分間遠心分離を行った。そして、上澄み中のタンパク質を SDS-PAGE で分離・濃縮し、還元・アルキル化・消化後、HR-LC-MS/MS で分析した。スペクトルデータは、PEAKS ソフトウェアを用いて UniProt データベースと照合し、タンパク質を同定した。

質量分析の結果、計 690 種類のタンパク質が同定され、そのうち 508 種類が細菌由来であった。これは、11 日間の浸漬によって、プローブの表面にバイオフィームが形成された影響だと推察される。ヒト由来のタンパク質は 68 種類が同定され、毛髪・皮膚由来のケラチンや便由来の膀胱酵素が優占した。また、尿細管機能のバイオマーカーであるウロモジュリンや炎症性腸疾患の指標となる S100A8 が同定された。データベースに登録されているタンパク質の平均分子量と平均等電点は、それぞれ 39.9 kDa と 7.1 である一方、同定されたタンパク質はそれぞれ、55.5 kDa と 5.8 であった。このことから、分子量が大きく、等電点が低いタンパク質がプローブに吸着しやすいことがわかった。流入水、無酸素槽、および放流水で同定されたタンパク質は、それぞれ 337, 397, および 171 種類であった。無酸素槽で同定されたタンパク質が多様であった理由は、活性汚泥由来のタンパク質が寄与したためだと考えられる。ケラチン以外のヒトタンパク質の多くは、流入水のみで検出された。これは、下水処理プロセスによってヒトタンパク質が効率的に除去・分解されることを示しており、下水を用いた公衆衛生モニタリングには流入水の分析が最適であると結論付けられた。以上のことから、本手法は、下水中のタンパク質プロファイルを可視化し、新たな地域健康診断手法として社会に貢献し得る可能性が示された。

(2) Evaluation of potential ARG packaging by two environmental T7-like phage during phage-host interaction

Junlin, L., Peng, L., Fenglin, F., Junxuan, Z., Fulin, L., Mianzhi, W. and Yongxue, S.
Viruses, **12**, 1060, 2020.

Reviewed by M. Hayashida

家畜由来の多剤耐性大腸菌は、人獣共通感染症との関連が懸念されており、公衆衛生における脅威である。薬剤耐性遺伝子 (ARG) の細菌への伝播に寄与すると考えられるバクテリオファージは、子孫ファージを形成する際に、宿主中の ARG を誤って獲得する誤パッケージングが生じ、ARG をファージ内に保持することが明らかとなっている。誤パッケージングの頻度は低いとされているが、ARG の重要な伝播経路となっている可能性がある。本研究では、家畜由来のファージが誤パッケージングによって ARG を獲得する特徴について検討した。試料は、ブタの糞便から分離された大腸菌 135 株と、養豚場に併設される排水施設から分離された 2 種の溶菌性ファージ (HZP2, HZ2R8) とした。はじめに、予備調査としてファージの性状試験を実施し、ファージの耐熱性・pH 安定性・宿主域・多重感染度 (MOI)・バーストサイズを評価した。また、Illumina HiSeq 4000 により、ファージ中の ARG を解析した。そして、それぞれ異なる濃度条件において、多剤耐性大腸菌とファージを共培養し、qPCR によって ARG (*ermB*, *qnrS*, *cmlA*, *tetM*, *blaTEM*, *sul3*, *mcr-1*) のコピー数を測定した。

両ファージは、4~37 °C、pH6~9 の範囲で安定であった。また、HZP2 と HZ2R8 は、どちらも低 MOI (0.01, 0.001) 条件で感染力が最大となった (2.11×10^9 pfu/mL, 9.89×10^8 pfu/mL)。バーストサイズはそれぞれ 120 pfu/cell と 93 pfu/cell であり、一般的な値であった。ゲノム解析の結果、両ファージの全ゲノム中に ARG は確認されなかったが、共培養試験後のファージは断片的な ARG を保持していた。これらの ARG は、誤パッケージングによってファージが獲得したと考えられる。また、宿主細菌濃度 10^8 CFU/mL かつ高 MOI (10^3) の各高条件において、ファージの各 ARG 獲得量が最大 ($10^3 \sim 10^7$ copies/mL) となった。一方で、宿主細菌濃度 10^5 CFU/mL かつ低 MOI (10^1) の各低条件では、ARG の獲得量 ($10^3 \sim 10^5$ copies/mL) が最小となった。このことから、宿主とファージの存在量がファージのパッケージングに影響を及ぼすことがわかった。加えて、定量 PCR の結果、両ファージ共に特に *tetM* と *blaTEM* の誤パッケージング頻度が高かったことから、ファージが取り込む ARG には選択性があると推察される。以上の結果をまとめると、ファージが獲得する ARG には特異性があり、溶菌性ファージであっても ARG の伝播に関与する潜在的リスクがある。