

琉球大学学術リポジトリ

Escherichia coli

モデル株を用いたbla_<CTX-M-14>

のプラスミドから染色体への転位の観察

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学 公開日: 2020-07-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Hamamoto, Kouta, 浜元, 宏太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/46467

(様式第5-2号)

2020年 2月 19日

琉球大学大学院

保健学研究科後期課程委員会 殿

論文審査委員

主査 氏 名 金城 貴夫

副査 氏 名 中尾 浩史

副査 氏 名 照屋 典子



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 保健学	氏名 浜元 宏太	学籍番号	■■■■■		
指導教員名	平井 到					
成績評価	学位論文	合格	不合格	最終試験	合格	不合格
論文題目	Characterization of <i>bla</i> _{CTX-M-14} transposition from plasmid to chromosome in <i>Escherichia coli</i> experimental strain					
審査要旨（2,000字以内）						
<p>抗生剤耐性菌は細菌が抗生剤耐性遺伝子を獲得する事で誘導されるが、近年の抗生剤耐性菌の蔓延は地球規模の問題になりつつある。抗生剤耐性菌の出現に関しては、従来からプラスミド伝達を介した数多くの研究・報告がなされてきた。しかし近年医療機関や一般生活環境から、抗生剤耐性遺伝子が細菌の染色体に存在している事が相次いで報告されるようになり、抗生剤耐性遺伝子がプラスミドから細菌の染色体に転位している事が示唆され、臨床医学的にも公衆衛生学的にも新たな脅威として認識されている。従って抗生剤耐性菌の蔓延を防ぐ上で、抗生剤耐性遺伝子が転位するメカニズムを解明する事は緊急の課題となっている。</p> <p>本研究はプラスミドにあるセフトキシム(CTX)耐性遺伝子(CTX-M型 extended spectrum β-lactamase 遺伝子: <i>bla</i>_{CTX-M-14})が大腸菌の染色体に転位する現象を実験的に証明し、その転位頻度や転位に関わる塩基配列の特徴を明らかにする事を目的とした。プラスミド上ではプロモーターと</p>						

ランスポゾンの機能を兼ね備えた遺伝子(*ISEcp1*)の下流に *blactX-M-14* がある。*ISEcp1* の上流と下流に left terminal inverted repeat sequence (IRL)と right terminal inverted repeat sequence (IRR) があり、さらに下流には alternative IRR (IRRalt)がある。IRL, IRR と IRRalt は *ISEcp1* による *blactX-M-14* の転位に関わり、*ISEcp1* と共に転位ユニットを形成する事が知られている。本研究ではプラスミドを大腸菌に作用させる際に CRISPR/Cas9 システムを用いる事により、実験的な大腸菌染色体への遺伝子転位システムを確立し効果的に検討した。

本研究では最初に *ISEcp1* に変異有りまたは欠失したプラスミドを用いて検討し、プラスミドから大腸菌染色体へ *blactX-M-14* の転位が誘導されない事を確認した。これより *blactX-M-14* の転位は *ISEcp1* に依存している事を明らかにした。次に *ISEcp1* による *blactX-M-14* の大腸菌染色体への転位頻度を求めるため、5回のスクリーニングを行い126株の CTX 耐性大腸菌を得た。希釈法によりスクリーニングした大腸菌数を求め、*ISEcp1* による *blactX-M-14* の大腸菌染色体への転位頻度を平均 0.51% (標準偏差 = 0.37) と算定した。*ISEcp1* による *blactX-M-14* 転位ユニットの確認と大腸菌染色体上の挿入部位を決定するために上記大腸菌株を用いて塩基配列を解析した。*blactX-M-14* 転位ユニットは大腸菌染色体上の102か所の異なる領域に確認され、このうち73か所は coding region に挿入されていた。*blactX-M-14* ユニットの転位が確認された部位は特定の領域に集中している訳では無いものの、大腸菌のゲノム上の370万から420万番塩基の領域に比較的多くみられた。*blactX-M-14* 転位ユニットの塩基配列の解析からは5bpの direct repeat がみられ IRL は一定の塩基配列であったが、IRRalt に関しては厳密な相同性は認められなかった。

本研究によりプラスミド遺伝子の *ISEcp1* による *blactX-M-14* の大腸菌染色体への転位が確認され、さらにプラスミドから大腸菌染色体への遺伝子転位の頻度が初めて明らかにされた。転位ユニットの検討からは、*ISEcp1* による *blactX-M-14* の転位は IRRalt が多様な配列を示す事で大腸菌染色体の様々な部位に発生する事が示唆された。

本研究成果によって市中及び院内で報告されている染色体性 *blactX-M-14* 保有大腸菌の蔓延の一因が明らかにされた事は臨床医学及び公衆衛生学的にも極めて意義深い。さらに挑戦的な研究テーマに対して非常に精緻な実験を行い、また最新の手法を応用しつつ巧妙な手法で検討を行っており、国際的にも高い学術水準にある。

申請者がこれまで報告した学術論文をまとめた参考論文及び公開審査会での発表では、抗生剤耐性菌の疫学から分子生物学的な耐性菌誘導のメカニズムの解明を概説し、さらに申請者が行った抗生剤耐性菌研究の中での本学位論文の位置づけも行っている。

本学位論文が保健学博士後期課程の学位論文としてふさわしく、申請者は保健学博士としての学識を十分有しているものと判断した。