

第 415 回雑誌会

(Jul. 19, 2024)

(1) **Cylindrospermopsin enhances the conjugative transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes through glutathione biosynthesis inhibition**

Yang, S., Cao, J., Zhao, C., Zhang, X., Li, C., Wang, S., Yang, X., Qiu, Z., Li, C. Wang, J., Xue, B. and Shen, Z.

Ecotoxicology and Environmental Safety, **276**, 116288 (2024).

Reviewed by K. Tsuda

シアノバクテリアが産生する毒素であるシアノトキシンの 1 種、シリンドロスペルモペプシン (CYN) は、全世界の水環境中から検出されている。同様のシアノトキシンの一種であるマイクロシスチンは、細胞膜透過性の増加によって、薬剤耐性遺伝子 (ARG) の接合伝達を促進することが報告されている。しかしながら、CYN が ARG の接合伝達に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで本研究では、水環境中で検出される濃度の CYN が ARG の接合伝達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。接合実験では、3 種類の ARG を保有するプラスミドを持つ *Escherichia coli* (*E. coli*) HB101 をドナー、リファンピシン耐性の *E. coli* K12 をレシピエントとして使用した。LB 培地に混合比 1:1 で *E. coli* HB101 と *E. coli* K12 を添加し、CYN を 5 段階の濃度 (0, 0.1, 1, 10, 100 µg/L) で添加した後、37°C で各時間 (4, 8, 16, 24 h) 培養した。その後、抗菌薬入りの培地で生育したコロニー数から接合頻度を求めた。さらに、活性酸素の産生、細胞膜透過性、活性酸素を還元的に消去するグルタチオン (GSH) の合成、抗酸化酵素活性、および細胞内のアデノシン三リン酸 (ATP) 量を control と比較し、CYN の添加による細胞特性の変化を評価した。また、RNA を抽出し、Illumina NovaSeq 6000 Platform で塩基配列を取得した。

各条件での接合頻度を比較したところ、CYN 濃度 10 µg/L、16 時間培養後において、接合頻度は最も高く (3.3×10^{-3})、control の 6.5 倍であった。CYN の添加による細胞特性の変化を比較したところ、活性酸素量は、全 CYN 濃度において control よりも増加しており、10 µg/L では約 2 倍に増加した。さらに、CYN の添加によって、抗酸化酵素、酸化ストレス応答に関与する遺伝子、DNA 修復遺伝子、および SOS 反応関連遺伝子の発現量が増加した。一方で、GSH 合成関連遺伝子は 0.6-0.8 倍に減少し、細胞内の GSH 量は低下した。細胞膜透過性は、2 時間後に 1.2-1.3 倍に増加し、細胞膜透過性の変化に関連する遺伝子の発現量も増加した。また、細胞内の ATP 量も増加しており、ATP の合成に関連する遺伝子の発現量も増加した。これらの結果から、CYN は、活性酸素量の増加と細胞内の GSH 量の低下を引き起こし、膜透過性と細胞内の ATP 量を増加させることで、ARG の接合伝達を促進することが明らかになった。

(2) Differential induction of Shiga toxin in environmental *Escherichia coli* O145:H28 strains carrying the same genotype as the outbreak strains

Carter, M. Q., Pham, A., Du, W. X. and He, X.

International Journal of Food Microbiology, **339**, 109029, 2021.

Reviewed by R. Nakamura

志賀毒素産生大腸菌 (STEC) は、表現型によって病原性が大きく異なる。この多様性は、病原遺伝子の種類と遺伝子構造の違いに起因している。STEC の主要な血清型として O157 が挙げられるが、O145 の危険性も報告されている。STEC が保有する志賀毒素遺伝子は、prophage ゲノム上に存在するため、志賀毒素 (Stxs) の産生には prophage の誘導が必須である。本研究では、STEC O145:H28 株 (臨床株 2 株, 環境由来株 12 株: 牛由来 10 株, 河川水由来 1 株, 河川底質由来 1 株) について、牛の腸内環境や畜産で使用される抗菌薬などのストレスによる Stxs 産生量の変化を検討し、株ごとの Stxs 産生量の違いを遺伝子解析によって考察した。STEC の DNA はフェノール/クロロホルムによって抽出した。抽出した DNA は、PacBio RS II を用いて全ゲノム配列を決定した。その後、遺伝子解析によって、STEC 株の遺伝的多様性を評価し、系統分類を行った。さらに、Stx-prophage の推定挿入部位を決定し、Stx-prophage ゲノム配列の類似性解析と相同性解析を行った。ストレス試験では、STEC O145:H28 株を培養し、マイトマイシン C (MMC), エンフロキシサシン, 塩酸 (HCl), 過酸化水素 (H₂O₂) の 4 種類のストレスを与え、Stxs の産生量の比較をした。Stxs の産生量は、ELISA 法を用いて定量した。

遺伝子解析の結果、全ての臨床株と環境由来株が ST-78 に分類された。12 株の環境由来株の中で牛由来株の Stx2a-prophage のみが、米国の臨床 STEC O145:H28 株とドイツの臨床 STEC O104:H4 株の Stx2a-prophage と高い配列類似性を示した。また、牛由来 STEC O145:H28 株の中には、STEC O157:H7 と同様の高い病原性に関連する遺伝子を持つ Stx2a-prophage を保有する株が存在した。ストレス試験の結果、MMC 処理後には、全ての STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加し、Stx1a 産生量は最大 99.4 倍、Stx2a 産生量は最大 509 倍に増加した。抗菌薬のエンフロキシサシン処理後にも、全ての STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加し、Stx1a 産生量は最大 119 倍、Stx2a 産生量は最大 30.3 倍に増加した。胃酸環境を模擬した HCl 処理後にも、Stxs 産生量は有意に増加した。好中球によるストレスを模擬した H₂O₂ 処理後には、11 株の STEC 株の Stxs 産生量が有意に増加したが、Stxs 産生量増加率は、4 つの条件の中で最も低かった。ほぼ同一の Stx-prophage を持つ菌株間で Stxs の産生量に差があることから、宿主細菌が Stxs の産生を制御する役割を担っていることが示唆された。以上より、Stx-prophage は、牛の腸内環境や畜産で使用される抗菌薬などのストレスによって、誘導が促進され、環境中に拡散されていることが推察された。