



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Multidrug-resistant clinical strains identified as *Pseudomonas putida* group cluster independently of *P. putida* and *Pseudomonas monteilii* type strains in a phylogenetic analysis using eight concatenated hypervariable housekeeping sequences

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2018-08-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 玉井, 清子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56227

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

氏名： 玉井清子

Full Name

学位論文題目：

Thesis Title

Multidrug-resistant clinical strains identified as *Pseudomonas putida* group cluster independently of *P. putida* and *Pseudomonas monteilii* type strains in a phylogenetic analysis using eight concatenated hypervariable housekeeping sequences.

学位論文要約：

Summary of Thesis

ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌の中で臨床的に重要な位置を占める *Pseudomonas* 属は、現在 200 を超える菌種で構成されている。*Pseudomonas* 属の分類は、古くから脂肪酸解析、SDS-PAGE、DNA-DNA hybridizationなどが用いられてきたが、1990年代以降 16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析が主流となってきた。しかし、これらの手法では分解能が低く一部の菌種は正しく分類されていない状況であった。こうした状況の中、1990年後半より 16S rRNA 遺伝子による系統解析よりも分解能が優れた、*gyrB*、*rpoD*、*rpoB*等のハウスキーピング遺伝子を用いた系統解析が報告されてきた。さらに、ハウスキーピング遺伝子を複数用いた Multilocus Sequence Analysis (MLSA)が開発され、より近縁の菌種を識別することが可能となった。しかしながら、上記の MLSA では 3 から 4 種類と少ない遺伝子数で解析を行っており選択した根拠が明確でない。そこで *Pseudomonas* 属のより妥当性の高い分類を行うために、多型の大きいことが実証された遺伝子を複数用いて解析を行う方法を検討した。

本研究では、既存のデータベースに記載されているハウスキーピング遺伝子 121 種から、より多くの配列多型をもつ 8 種の遺伝子 (*Cca*, *DnaG*, *DnaQ*, *GrpE*, *HolB*, *HolC*, *MurB*, *MurF*) を選び出した上で、これらの遺伝子由来するタンパク配列を結合した配列 (C8HKP : *Cca*-*DnaG*-*DnaQ*-*GrpE*-*HolB*-*HolC*-*MurB*-*MurF*) を用いて *Pseudomonas* 属の系統解析を行う手法を考案し、既知の方法である 16S rRNA 遺伝子による系統解析及び 16S rRNA、*gyrB*、*rpoB*、*rpoD* を用いた MLSA (4MLSA) の 2 種と比較することでその有用性について確認を行った。その結果、C8HKP による系統解析は既知の方法より分解能が高く、かつ各菌種の系統位置が概ね同一であることから、新たな系統解析方法として有用であることが示された。さらに、本法を用いて *Pseudomonas putida* group と同定された多剤耐性株を含む 33 株の臨床分離株のドラフトゲノム解析及び系統解析を試みたところ、新菌種に分類される菌株が複数認められた。

【対象と方法】

系統解析のための対象遺伝子を選択するに当たり、COG データベースから *P. aeruginosa* PA01、*Pseudomonas fluorescens* A506、*P. putida* NBRC 14164、*P. stutzeri* ATCC 17588、*P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A 及び *C. japonicus* Ueda 107 の 6 株に共通して存在するハウスキーピング遺伝子 121 種を選び出し、各菌株間におけるアミノ酸配列の配列置換率を算出した。この結果から、配列多型が多い 8 種の遺伝子を選択した。

Pseudomonas 属に属する 62 菌種 147 株のドラフトゲノム配列を公共データベース (NCBI) より入手し、上記で選択した 8 種の遺伝子のアミノ酸配列を抽出した上で各配列を連結した。この連結した配列 (C8HKP) を用いて、配列置換率の算出及び系統解析を MEGA6 ソフトウェアにより実施した。加えて、16S rRNA 遺伝子及び 4MLSA による系統解析を比較対照として行った。

Pseudomonas putida group と同定された 33 株の臨床分離株の分類学的位置を確認する為に、次世代シーケンサーにより配列を決定した後 MiGAP ソフトウェアによりアノテーションを行った。この解析結果を用いて、C8HKP を用いて系統解析を行うことで分類学的位置を確認した。

【結果及び考察】

Pseudomonas 属 6 株間の配列置換率は、16S rRNA 遺伝子では 5.7%、4MLSA では 16.6%であったのに対し、ハウスキーピング蛋白は 12.1%~39.0%と非常に高い置換率であった。4MLSA と C8HKP の配列置換率間の相関係数は 0.897 であり高い相関が認められた。系統解析の結果、C8HKP は 4MLSA と比較して約 2 倍の解析能があった。これらの結果から、C8HKP を用いた *Pseudomonas* 属の系統解析は既存の解析方法より有用であることが明らかとなった。本手法を用いて *Pseudomonas putida* group と同定された 33 株の臨床分離株の系統解析を行った結果、*Pseudomonas putida* group に属する菌種の基準株とは異なる、新たなクラスターが複数認められた。さらに、多剤耐性株は上記のクラスターの一つに集中して認められた。

【結論】

C8HKP による *Pseudomonas* 属の系統解析方法は、既存の 4MLSA を用いた系統解析方法よりも解像度が約 2 倍高く、各菌種の系統位置も概ね同一であることから、新たな系統解析方法として有用であることが示唆された。*Pseudomonas putida* group と同定された多剤耐性株を含む臨床分離株のドラフトゲノム配列を決定し C8HKP による系統解析を行った結果より、*P. putida* および *Pseudomonas monteilii* の基準株とは独立した新菌種に分類されるクラスターが複数認められ、特に多剤耐性株はこのクラスターの一つに集中して認められた。