



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

氏名 (本籍)	玉井清子 (長野県)
学位の種類	博士 (再生医科学)
学位授与番号	乙第 1491 号
学位授与日付	平成 29 年 4 月 19 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Multidrug-resistant clinical strains identified as <i>Pseudomonas putida</i> group cluster independently of <i>P. putida</i> and <i>Pseudomonas monteillii</i> type strains in a phylogenetic analysis using eight concatenated hypervariable housekeeping sequences
審査委員	(主査) 教授 出口 隆 (副査) 教授 清島 満 教授 藤崎 和彦

論文内容の要旨

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 または 4 種類と少ない遺伝子数で解析を行っており遺伝子の選択根拠も明確でなかった。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ハウスキーピング遺伝子を複数用いて解析を行う方法を考案し、既知の方法と比較することで *Pseudomonas* 属の系統解析における有用性について検討した。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を用いて系統解析を試みた。

【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 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) から *Pseudomonas* 属の *P. aeruginosa* PA01, *P. fluorescens* A506, *P. putida* NBRC 14164, *P. stutzeri* ATCC 17588, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A 及び *Cellvibrio 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 MEGA6 ソフトウェアにより算出した。この結果から、配列多型が多い 8 種の遺伝子 (*Cca*, *DnaG*, *DnaQ*, *GrpE*, *HolB*, *HolC*, *MurB*, *MurF*) 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、選択した 8 種の遺伝子に由来するタンパク配列を連結し C8HKP (Concatenated eight housekeeping protein) とした。

この連結したアミノ酸配列 (C8HKP : *Cca*-*DnaG*-*DnaQ*-*GrpE*-*HolB*-*HolC*-*MurB*-*MurF*) 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

(16S rRNA, *gyrB*, *rpoB* と *rpoD*) による系統解析を比較対照として行った。

P. putida group と同定された多剤耐性株を含む 33 株の臨床分離株の分類学的位置を検討するために、次世代シーケンサーによりドラフトゲノムを決定した後 MiGAP ソフトウェアによりアノテーションを行い、これらの配列について C8HKP を用いて系統解析を行った。

【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 (C8HKP) 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 *P. 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、*P. putida* group および *P. monteilii* 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、多剤耐性株は新たな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された。*P. 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ところ、*P. putida* および *P. monteilii* の基準株とは独立した新菌種の存在が示唆され、*P. putida* group の多剤耐性株は、そのうちの一つの新種に集中していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 玉井清子は、*Pseudomonas* 属のハウスキーピング遺伝子より選択した 8 種類の遺伝子に由来するアミノ酸の連結配列 (C8HKP) による *Pseudomonas* 属の系統解析法の有用性を検討し、従来の方法より解析能に優れていることを示した。さらに、本法を用いて *Pseudomonas putida* group と同定された多薬剤耐性を含むヒト臨床分離菌株を解析し、*P. putida* および *Pseudomonas monteilii* の基準株とは独立した複数の菌種の存在と多剤耐性株がその内の 1 つに集中していることを示唆した。本研究の成果は、細菌分類学および臨床細菌学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Kiyoko Tamai, Hiroyuki Hata, Keiko Tsuchikane, Shoko Oji, Akira Hosoyama, Koji Sakamoto, Atsushi Yamazoe, Nobuyuki Fujita, and Takayuki Ezaki : 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

Japan Society for Microbial Resources and Systematics, 32(2):133-146, 2016