

主論文の要旨

**Bird's-eye MApping of plasmids (BeMAp) for
visualization and comparison of genomic structures of
different plasmids by mapping antimicrobial resistance
genes on spreadsheets**

（スプレッドシート上での薬剤耐性遺伝子のマッピングによる
複数プラスミドの遺伝子構造の比較と視覚化のためのBeMAp）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子病原細菌学分野

(指導：柴山 恵吾 教授)

津田 裕介

【緒言】

細菌間で薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドが伝達することにより、薬剤耐性形質が細菌間に伝播・拡散する。薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの分類は特定のプラスミドの起源や伝播状況の探索に寄与することに加え、薬剤耐性菌の拡散状況の把握と拡散防止に繋がる点で医療環境と公衆衛生の観点から重要である。

プラスミドの分類は不和合性の性質に基づく Inc グループがよく用いられる。近年では次世代シーケンサーの台頭により Inc グループによる分類が *in silico* で容易となってきた。しかし、プラスミドの解析は、Inc グループの分類で用いる replicon の配列がない場合プラスミドを Inc グループで分類できないことに加え、プラスミド間で塩基配列や遺伝子の構成が大きく異なることがあるため困難を伴う。また、多数のプラスミドを一挙に解析し遺伝子の構成を効果的に視覚化するツールはない。

メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、腸内細菌目細菌で見られるカルバペネマーゼの 1 つであり、そのうち IMP 型 MBL は主に日本で検出される。IMP 型 MBL のサブタイプである IMP-6 をコードする *bla*_{IMP-6} は、2010-2014 年に大阪の医療機関でアウトブレイクを起こし遷延した。この原因としては、IMP-6 を産生する細菌はイミペネムに感受性を示すため検出が困難であると共に、*bla*_{IMP-6} が異なる属や種の細菌間で伝播し、また異なる Inc グループに存在し比較が困難となっていたことなどが考えられる。そのため、アウトブレイクを早急に検出し対策に資するために多数のプラスミドを網羅的に解析できるツールの開発が必要となっている。

そこで、我々は、多数の薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドについてプラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子の種類、順序、構成に着目した解析を行い、その結果を鳥瞰的に表示することを可能とするツールである BeMAp (Bird's eye MAPPING of plasmid) を開発した。そして、IMP 型 MBL のいずれかのサブタイプをコードする *bla*_{IMPs} を持つプラスミドを用いてその実用性を評価した。

【対象および方法】

2021 年 8 月に the National Center for Biotechnology Information (NCBI) から *bla*_{IMP-6} の塩基配列を用いて、815 データセットを抽出した。このうち、*bla*_{IMPs} をもつ 303 プラスミドを解析に用いた。

BeMAp を用いて、これらのプラスミドについて薬剤耐性遺伝子の種類を同定した。プラスミドの薬剤耐性遺伝子の類似性を視覚的にわかりやすく表示するために、薬剤耐性遺伝子の種類と配置に着目しプラスミドの集団を分割するアルゴリズムを作成し、それに従って並び替えを行った。並び替え結果に基づいて樹形図を作成し、表計算ソフトでプラスミド上の読み枠を 1 つのセルとして薬剤耐性遺伝子を色付け表示した。プラスミドの不和合性に基づく Inc グループやプラスミドの分離宿主、検出国などについて色付け表示を行なった。

【結果】

まず、カルバペネマーゼをコードする *bla*_{IMP-6} を含む 54 プラスミドの塩基配列情報を公共データベースから取得し、薬剤耐性遺伝子について鳥瞰的に表示した(図 1 a)。そして、それらを Inc グループによる分類で表示し、薬剤耐性遺伝子の種類、局在、順序や構成によるプラスミド間の類似と相違を明らかにした(図 1b)。

次に、*bla*_{IMP-6} のプラスミドの解析と同様に、*bla*_{IMP}s を含む 303 プラスミドを BeMAp で解析した。同じクラスターに属する *bla*_{IMP-4} を持つ 11 プラスミドについては類似した薬剤耐性遺伝子の構成を持つが、9 プラスミドが IncL/M と分類され、2 プラスミドが IncF と IncN に分類された(図 2)。

【考察】

BeMAp を用いた遺伝子構造の解析により、*bla*_{IMP-6} と *bla*_{IMP}s を持つプラスミドを薬剤耐性遺伝子の種類、配置、順序、構成について網羅的に表示し、その実用性を確認した。表計算ソフトに表示することでプラスミドの遺伝子の構造をインタラクティブに認識することができた。既存のツールやアライメント方法によるプラスミドの相同性解析やクラスタリング方法ではプラスミドの類似性の表示が困難となるため、プラスミドの集団を分割するアルゴリズムを作成し、これによってプラスミド上の薬剤耐性遺伝子の類似性を効果的に表示することができた。また、薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドについてその特性に基づいた色付け表示を行うことで、薬剤耐性遺伝子の類似性について特性に関連して比較解析を行うことができた。

薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドが同じ Inc グループに分類された場合には薬剤耐性遺伝子の種類や構成に類似性がみられ、BeMAp で効果的に示すことができた。加えて、類似した薬剤耐性遺伝子の構成を持つ薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドでも異なる Inc グループに分類されており、この結果が BeMAp で視覚的に明らかとなった。このことから BeMAp は Inc グループによる分類に依らない方法で薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドを分類できる可能性が示された。

今回腸内細菌目細菌のプラスミドによる解析であったが、BeMAp はグラム陽性菌などのプラスミドでも表示可能である。また、薬剤耐性遺伝子の表示だけでなく、病原因子やトランスポゾンなどのデータベースを用いることで、これらも表示可能である。加えて、プラスミドのみでなく染色体も表示可能であるが、計算や表示に時間がかかるため BeMAp の改良が必要である。

以上より、BeMAp による薬剤耐性遺伝子に注目した薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの表示は、多数のプラスミドの遺伝子構成を比較表示することができる新規の手法であり薬剤耐性菌のアウトブレイク事例などの際にプラスミドの遺伝的関連性を確認する新しい手段を提供すると考えられる。

【結論】

多数の薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドを解析し、それらの薬剤耐性遺伝子の種類、配置、順序、構成について類似性や相違を視覚的に示すツールである BeMAp を開発

した。BeMApによる薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの方法は、多数の薬剤耐性遺伝子媒介プラスミドの遺伝子構造について比較表示するための実用的な方法となることが期待される。

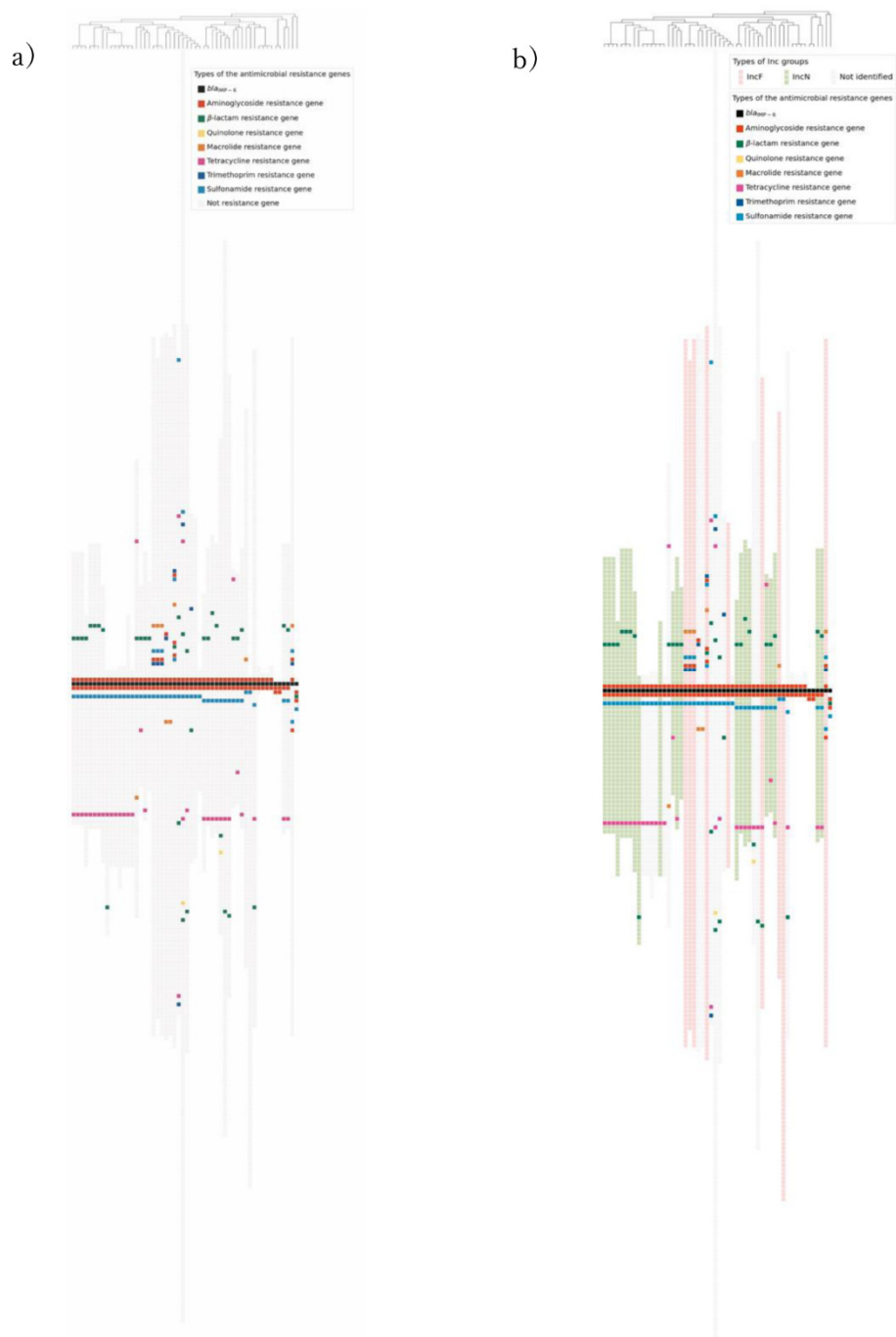


図 1. BeMAP による *bla*_{IMP-6} を持つ 54 プラスミドの鳥瞰的表示

Fifty-four plasmids carrying *bla*_{IMP-6} were aligned using BeMAP and antimicrobial resistance genes were mapped onto the spreadsheet. At the top of the figure, the dendrogram constructed based on the clustering of these plasmids was displayed. The antimicrobial agents indicated in the legend represent the type of antimicrobial resistance genes present.

a) The complete map of plasmids carrying *bla*_{IMP-6} is visualized.

b) The complete map of plasmids carrying *bla*_{IMP-6} with colors representing identified Inc groups is shown.

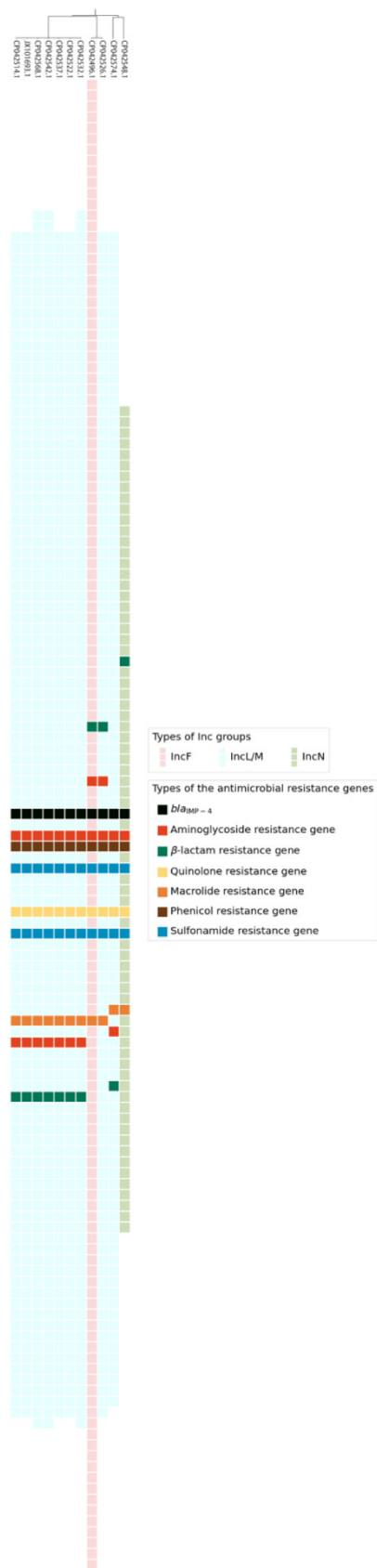


図 2. 類似した薬剤耐性遺伝子の構成を持つ *bla*_{IMP-4} を持つ 11 プラスミドの表示

Eleven plasmids carrying *bla*_{IMP-4} are shown in the same cluster. Nine plasmids were classified as IncL/M. CP042496.1 and CP042548.1 were classified as IncF and IncN, respectively. Although CP042496.1 and CP042526.1 had the same organization of antimicrobial resistance genes, they were classified as IncF and IncL/M, respectively.