Journal of Environmental Biotechnology
（環境バイオテクノロジー学会誌）
Vol. 20, No. 1, 71–77, 2020

総　　説（特集）

環境中の微生物群集内におけるプラスミド伝播の実態の解明に向けて

Behaviors of Plasmids in Various Environmental Microcosms

新谷　政己[1,2,3]*，金原　和秀[1]
Masaki Shintani[1,2,3]* and Kazuhide Kimbara[1]

[1] 静岡大学大学院創造科学技術研究科工学専攻　〒 432–8561　静岡県浜松市中区城北 3–5–1
[2] 静岡大学創造科学技術大学院バイオサイエンス専攻　〒 432–8561　静岡県浜松市中区城北 3–5–1
[3] 静岡大学グリーン科学技術研究所グリーンエネルギー研究部門　〒 422-8529　静岡県静岡市駿河区大谷 836
* TEL & FAX: 053–478–1181
E-mail: shintani.masaki@shizuoka.ac.jp
[1] Department of Applied Chemistry and Biochemical Engineering, Graduate School of Engineering, Shizuoka University, Hamamatsu, Shizuoka, 432–8561, Japan
[2] Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Hamamatsu, Shizuoka, 432–8561, Japan
[3] Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, 836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka, Shizuoka, 422-8529, Japan.

キーワード：プラスミド，接合伝達，宿主域
Key words: plasmid, host, database

（原稿受付　2020 年 3 月 2 日／原稿受理　2020 年 3 月 18 日）

1. はじめに

プラスミドは，染色体 DNA とは物理的に独立した環状または線状の自律複製可能な DNA である[1)]。また多くのプラスミドは，種々の微生物間を接合伝達によって水平伝播可能な遺伝因子でもある[2,3)]。プラスミドは，それ自体の複製・維持・伝達に必要な遺伝子とは別に，病原性，抗生物質耐性，物質代謝に寄与する遺伝子を搭載する場合も多い。プラスミドを介したこのような遺伝子の伝播は，受け取った微生物に新たな能力を与えることから，プラスミドの伝播現象は，微生物の急速な進化・適応を促す。従って，本現象は環境バイオテクノロジーや医療分野で重要である[4)]。

1950 年後半から，薬剤耐性遺伝子群を搭載する接合伝達性のプラスミドが R 因子または薬剤耐性プラスミドとして発見され，我が国でも精力的な研究が行われた[5)]。複製や維持機構などが類似するプラスミドは，同一細胞内に安定に維持されない不和合性（incompatibility）を示す。この性質を用いた分類群を不和合性群とよび，「Inc」の後にアルファベットがつけられる[6)]。現在に至るまで，様々な不和合性群のプラスミドが薬剤耐性遺伝子を運搬することが明らかになっている。特に，ここ数年は世界保健機構やアメリカ疾病対策センター（The Centers for Disease Control and Prevention）が警鐘を鳴らし続けているように，世界各国で，これまで効果のあった複数の抗生物質が効かない多剤耐性菌が出現・蔓延し，深刻な問題を引き起こしている。この問題の原因の一端は，薬剤耐性遺伝子を搭載するプラスミドの水平伝播にあるとされている。例えば，「悪魔の耐性菌」とよばれるカルバペネム耐性の腸内細菌からは，種々の耐性遺伝子を搭載した IncFII，IncA（または IncC），IncN，IncL（または IncM），IncP 群プラスミドが見いだされている[7)]。また，このようなカルバペネム耐性の腸内細菌に対し，いわば「最後の切り札」として用いられたコリスチンに対する耐性菌も出現し，その耐性遺伝子が，IncI2，IncX4，IncHI2 および IncP 群プラスミド上に見いだされた[8,9)]。こうした薬剤耐性遺伝子やプラスミド由来の遺伝子は，我々の食する肉や野菜からも発見されており[10)]（一部 Smalla, K ら，および Zhu, Y-G ら私信），多剤耐性菌の蔓延は防ぐべき喫緊の課題となっている。本特集の他の記事でも述べられているように，こうした課題には，ヒトのみならず，動物や環境も対象にしたワンヘルス・アプローチの施行が必要である（渡邉，本特集記事）。事実，土壌や河川など，種々の環境試料や，そこに生息する微生物からもプラスミドが発見されてきた[11)]。その一方で，そのようなプラスミドが，環境中ではどのような動態を示すのかという研究報告は驚くほど少なく，その実態は不明のままである。これは，実際の多剤耐性菌から見出されるプラスミドは，多くの微生物間を伝播してきた結果としての「乗り物」であり，その途中に，どのような「乗り物」を経由してきたのか（あるいはしていないのか），その経過がわからないからである。また，それぞれの「乗り物」がどのような微生物間を伝播しうるのかわかっていないためである。本記事

では，「環境」を対象としたプラスミドの動態について，近年明らかになっていることをまとめるとともに，筆者らが取り組んでいる研究について述べる。

2. 自己伝達性プラスミドの収集手法（プラスミドキャプチャリング）

公的なデータベースには既に20,000を超えるプラスミドの全塩基配列が登録されている（ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GENOME_REPORTS/plasmids.txt）。こうしたプラスミドと，その宿主の系統分類学上の関係が重要であることは筆者らの総説や，以前の本学会誌で述べてきた[12,13]。しかし，これらのプラスミドが，自然界では，いつ，どこで，どの微生物間をどの程度の頻度で伝播しているのかという情報は驚くほど乏しい。この理由の一つは，プラスミドは物質代謝・分解能や薬剤耐性能等，特定の生理的機能を指標にして取得した細菌から，いわば偶然発見された場合がほとんどで，それが自然界で伝播するとは限らないためである。また，もう一つの理由は，プラスミドの接合伝達の可否や，宿主となる細菌の種類（宿主域）は，大半が実験室内の供与菌と受容菌を一種類ずつ用いた接合実験の結果に基づいて決められており，自然界では，どの微生物に伝播するのか不明なためである。そこで筆者らを含むいくつかの研究グループでは，プラスミドが接合伝達することを利用して，環境試料からプラスミドを直接収集する手法（プラスミドキャプチャリング）を用い，どのようなプラスミドが環境中を伝播しているのを明らかにしようと試みている[11,14,15]。本手法には，プラスミド上の特定の遺伝子が，宿主に新たに抗生物質耐性能などの生理的機能を与える性質を利用する二親接合による方法（図1A）と，プラスミド自体の接合伝達能のみを指標にする三親接合による方法（図1B，後述）がある。接合伝達に必要な遺伝子が全て搭載され，それ自体のみで他の細胞に接合伝達可能なプラスミドを自己伝達性プラスミドとよぶ。一方，接合伝達に必要な遺伝子（領域）を部分的に保有し，自己伝達性プラスミドが細胞内に共存する際にのみ伝達可能なプラスミドを可動性プラスミドとよぶ。三親接合では，自己伝達性プラスミドが可動性プラスミドとともに接合伝達する性質を利用して，自己伝達性プラスミドを取得する（図1B）。予め緑色蛍光タンパク質（GFP）と抗生物質耐性を発現させた受容菌を準備し，これとは別の抗生物質耐性遺伝子をもつ可動性プラスミドをもつ中間供与菌を準備する（図1B）。これら2種の菌株を，環境試料由来の細菌群集と混合（接合）し，双方のプラスミドを獲得した受容菌のみが生育できる培地で選抜する（図1B）。また，中間供与菌や受容菌および可動性プラスミドの種類を変えることで，得られるプラスミドの種類は異なる。

3. キャプチャリングで得られたプラスミド

IncP（IncP-1）群プラスミド：プラスミドキャプチャリングで得られたプラスミドは，既知の不和合性群に即して分類されており，多くがIncP（IncP-1）群に属している。IncP群プラスミドは，1970年代に英国で患者から得られた薬剤耐性プラスミドに端を発し，もっとも初期のころにその全塩基配列が決定されたプラスミドである[16–19]。本プラスミド群は，高頻度に門や綱の異なる細菌に接合伝達する広宿主域プラスミドとして知られ，その複製・維持・接合伝達についての分子機構も詳細に調べられてきた[20]。数多くのIncP群プラスミドが，これまで行われたプラスミドキャプチャリングによって得られていることから[14,21,22]，本プラスミドは，種々の遺伝子群の「運び手」として，環境中に広く分布していると考えられる。事実，IncPプラスミドは，先述したように，まだ新しい抗生物質に対する耐性遺伝子を搭載することが判明している[7,8]。また，三親接合の可動性プラ

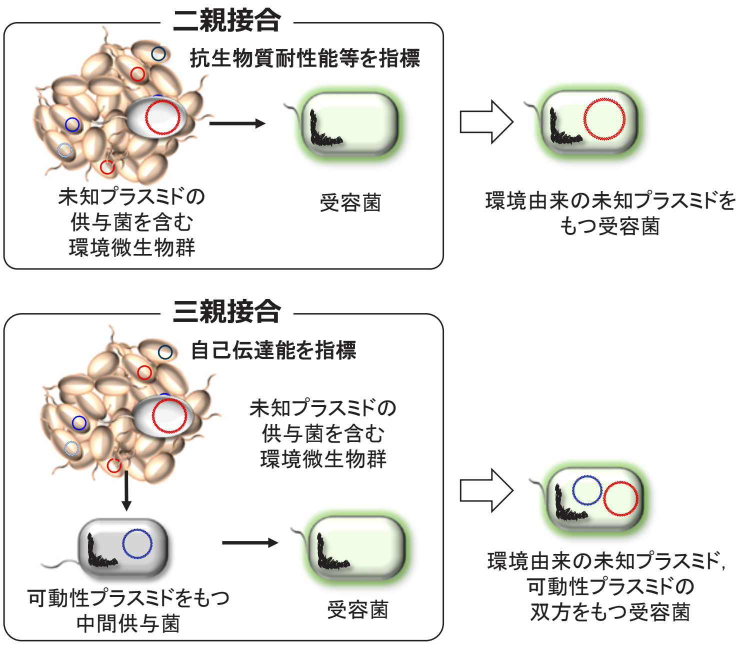

図1. プラスミドキャプチャリング

スミドにIncQ（IncP-4）群プラスミドを使う場合にも，IncP群プラスミドを多く取得できることが知られ，実際，IncQ群プラスミドを用いて植物根圏から，種々のIncP群プラスミドの取得に成功した（Shintaniら未発表データ）。これまでに，キャプチャリングで得られたプラスミドを含め，IncP群プラスミドはαからηの7つのサブグループが提唱されている[14,21,22]。また，先に述べたコリスチン耐性遺伝子をもつIncP群プラスミドは，これまでに提唱されたサブグループとは系統学的に異なる可能性が高い。以上のことから，IncP群プラスミドは，広宿主域プラスミドの「代名詞」ともいうべきプラスミドであり，その環境中における動態については，あまり多くない報告数の中で，大半を占めている[4,23]。

IncPromA群プラスミド：Brownらは可動性プラスミドにpBBR1とその派生プラスミド[24,25]を用いた三親接合によって，IncP群以外のプラスミド（IncU, IncNなど）取得に成功した[14]。そのうちの複数が，類縁の不和合性群とは少し異なるプラスミドや，不和合性群が全く未知のプラスミドであった[14]。筆者らも，受容菌に*Pseudomonas resinovorans* CA10dm4GFP株[26]を，可動性プラスミドとしてpBBR1MCS-2[25]を用いることで新たな自己伝達性のプラスミドの取得に成功した[15]。このうちの4本は比較的最近提唱された，IncPromA群プラスミドであった。IncPromA群プラスミドは，2009年に，van der Auweraらによってpromiscuous plasmid group Aとして命名された[27]。この，「promiscuous」という英単語はそのまま和訳すると，ここに書くのがためらわれる意味ももつが，このプラスミド群の宿主域が広いこと，接合伝達頻度が高いことに由来する。しかし，2009年当時は5本の報告にとどまり，あまり重要視されていないプラスミド群であった。しかし最近になって，上述した三親接合によるキャプチャリングによって取得されたり[28]，農薬の分解菌より認められたりする[29]など，発見例が増大している。また筆者らは，これらのプラスミドのうち，新たなサブグループに属する4本のプラスミドの取得に成功[15]しており，さらにその数は増加している。

不和合性群未知のプラスミド：筆者らは，IncP群，IncPromA群に加え，不和合性群未知のプラスミドpSN1216-29を取得した[15]。本プラスミドは，発見当初，類似のプラスミドがいずれも臨床株由来の*Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*属細菌から見出されていたが，いずれも宿主に特定の形質を与える既知遺伝子を持たず，プラスミドの複製・維持・接合伝達に寄与する遺伝子群のみをもつと推定された[15]。また，このプラスミドが，綱を超えて接合伝達可能なことも示された[15]。さらに，本プラスミドの最小複製単位を決定した[15]。この複製に必要な領域は，別のpSRC119-A/Cという薬剤耐性遺伝子を複数もつIncC群プラスミド[30]上から見出されたため，pSRC119-A/Cが2つの複製機構をもつことが示された。興味深いことに，現在まで知られているIncC群プラスミドの宿主域は，*Gammaproteobacteria*綱に限定されており[31]，pSRC119-A/Cは，pSN1216-29の複製領域を取り込むことで，その宿主域を広げている可能性が示された[15]。

以上から，環境には，自己伝達性プラスミドが数多く未発見のまま残されていること，またプラスミドキャプチャリングは，こうした自己伝達性プラスミドを収集するのに優れた手法であることが示唆された。

4. 環境細菌群集内におけるプラスミドの宿主域

プラスミドが実際に伝播する環境には，多種多様な微生物が生息しており，中には培養が難しい菌株も存在する。このような実際の環境を反映した条件下におけるプラスミドの宿主域については，これまでに少数の研究例[32,33]しかなく，ほとんど解っていない。以前の本学会誌でも述べたように，微生物群集内におけるプラスミドの接合伝達現象を追跡する際，緑色蛍光タンパク質（GFP）を利用する手法がよく用いられる[4]。この方法では，*lac*改変プロモーターと抑制因子LacIを組み合せ，供与菌内ではGFPの発現を抑制し，プラスミドが伝達した後，接合完了体のみGFPを発現させる[34]。その後，フローサイトメトリーとセルソーターを利用して，緑色蛍光を指標に接合完了体細胞を一細胞ずつ選択培地にソートして培養したり，蛍光を示す細胞を多数（10,000以上）マイクロチューブに収集したりした後，DNAを抽出して菌叢解析を行う。Klümperらは，後者の方法を用いて明らかにしたIncP群や，IncPromA群プラスミドの宿主域について報告している[33]。また，筆者らは，上の方法に加え，一細胞ずつ96ウェルプレートにソート後，φ29由来のDNAポリメラーゼによる等温反応での全ゲノムDNA増幅（WGA: whole genome amplification）を行うことで，分離した細胞を培養することなく，遺伝子解析に供し，IncP（IncP-1）群に加え，IncP-7，IncP-9群の宿主域を決定した[35]。最近は，先述した，新たに見出したIncPromA群プラスミドや，pSN1216-29についての宿主域も決定しつつある（Tokudaら，投稿中）。

プラスミドがどのような微生物間を伝播するのかを明らかにする上で，微生物群集のゲノム・メタゲノム解析の結果は重要な情報をもたらす。事実，多剤耐性菌がどのようなプラスミドをもつのか，また，実環境中のどこにどのような微生物や遺伝子（断片）が存在するのかについては，ある程度定量的に明らかになってきている。しかし，上述したプラスミドキャプチャリングを含め，プラスミド（およびその薬剤耐性遺伝子群）は，発見された環境中で，どの微生物が保有しているのか，その「持ち主」を明らかにするのは難しい。近年，プラスミドと染色体が同一の細胞に存在する物理的距離の近さを利用して，細胞内のプラスミド・薬剤耐性遺伝子・染色体DNAを，強制的にPCRで連結させたり，共有結合させたりしてから配列を解読する手法により，どの微生物がどの薬剤耐性遺伝子・プラスミドを持つのかを明らかにする試みが複数なされている[36–38]。前者の手法では，まずプラスミドをもつ細胞を，一細胞ずつポリアクリルアミドの液滴に封入する。次に，プラスミド上の遺伝子や薬剤耐性遺伝子，および染色体上の遺伝子にそれぞれ固有の配列を併せ持つキメラプライマーを準備し，エマルジョンPCRを複数回行う。その後，得られた断片の配列を解読すると，どの遺伝子断片がどの微生物に由来するのかがわかる（図2，emulsion, paired isolation and concatenation PCR, epicPCR）[36]。後者は，いわゆる

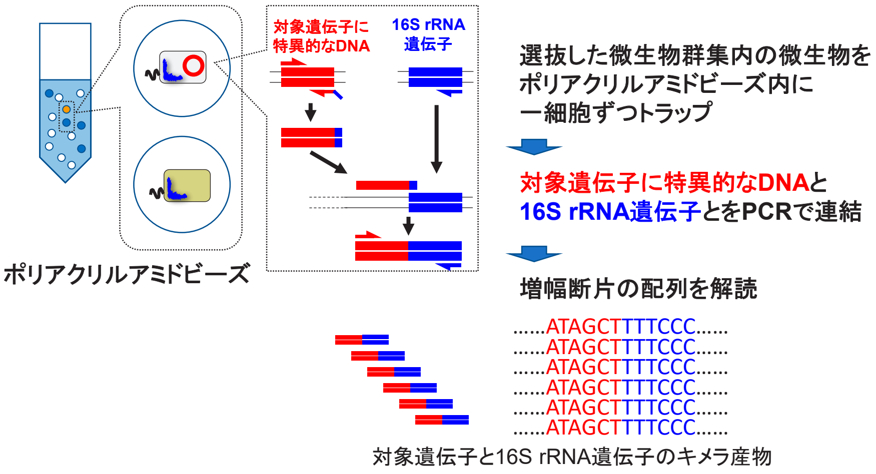

図 2.　EpicPCR（emulsion, paired isolation and concatenation PCR）の概要.

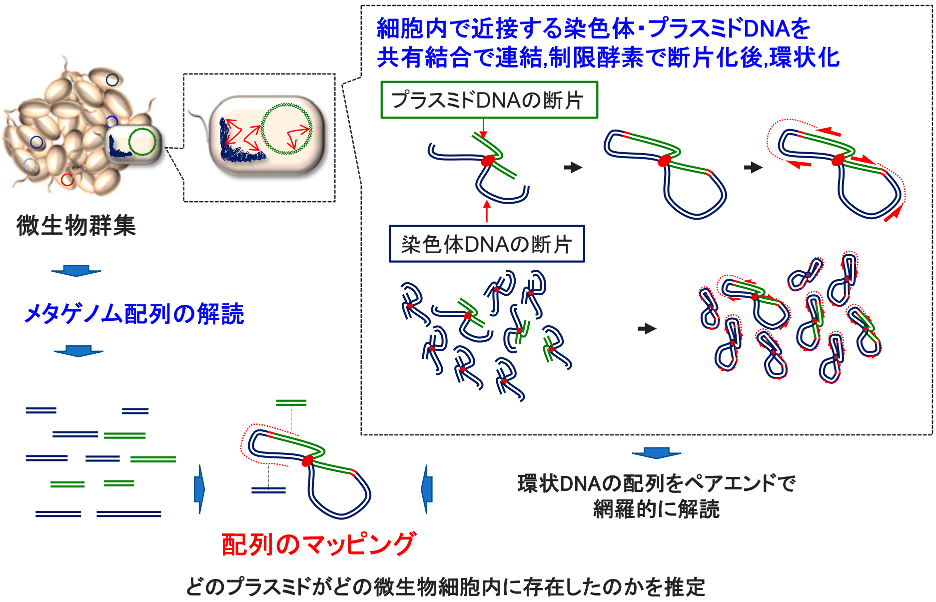

図 3.　Hi-C テクノロジーを利用したプラスミドや対象遺伝子の帰属方法

Hi-C テクノロジーを利用した方法である。プラスミドと染色体 DNA を，細胞内でホルムアルデヒドを用いて共有結合させた後，制限酵素処理した断片を環状化し，ペアエンドリードをシークエンスする。これを，メタゲノム配列とすり合わせることでプラスミドの宿主を同定する（図 3）[38]。いずれも，プラスミドや薬剤耐性遺伝子をもつ微生物の種類を一定数同定することができ，これらの手法の有用性は示されている[37,38]。ただし，プラスミドについては，それ自体のデータベースが不十分なこともあり，網羅的な同定には至っていない。

5.　酸素濃度の違いによるプラスミドの接合伝達性の変化

土壌・堆肥・動物体内などの環境は，酸素濃度が必ずしも大気圧下と同程度ではなく，微好気・嫌気状態にある場合が多い。こうした環境下でもプラスミドは伝播していると予測されるが，このような低酸素濃度の環境を反映した条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度や，宿主域については報告が少なく，ほとんどわかっていない。微生物群集内におけるプラスミドの接合伝達現象を追跡するのに，緑色蛍光タンパク質（GFP）を利用することが多いが，GFP はその発色団の形成に，酸素が必須であるため，GFP は嫌気条件下では蛍光を示さない[39]。Król らは酸素濃度の低い条件下におけるプラスミドの接合伝達性を評価するために，酸素に依存しない蛍光色素として，フラビンモノヌクレオチド（FMN）に基づく蛍光タンパク質（FMN-based fluorescent protein: FbFP）を利用した[40]。本遺伝子を挿入したプラスミドが伝達することを，嫌気条件下で調べており，実際にその伝達頻度が低下することを報告している[40]。一方，Pinilla-Redondo らは，GFP を嫌気条件下で発現させた後，短期間でも酸素に曝されれば，発色団が形成され蛍光を示す現象（aerobic fluorescence recovery: AFR）を利用して，嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度を測定できることを示した[41]。筆者らは，近年，IncP 群に属する pBP136[42] に GFP 遺伝子を挿入した，

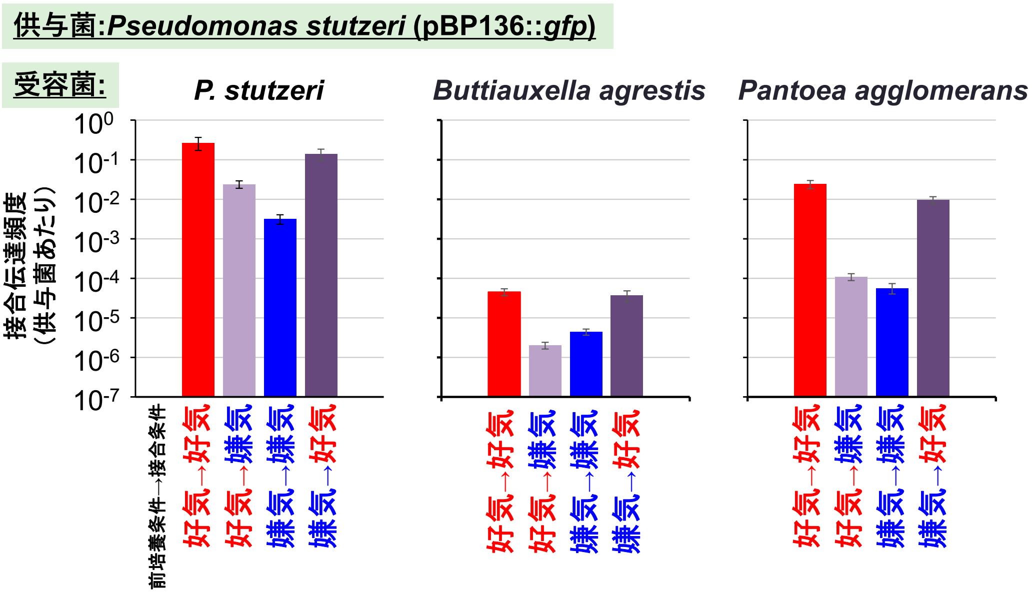

図 4. 好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度の違い
供与菌・受容菌とも通性嫌気性細菌を用い，前培養と接合の酸素条件を変えた 4 条件の接合実験の結果。各 3 連で行い，エラーバーは標準偏差を示す。(Ochi ら，投稿中より一部改変)

接合伝達後の受容菌で蛍光を示す pBP136::*gfp* [35] と，AFR を利用して，好気・嫌気の両条件で生育可能な受容菌三種と接合実験を行い，その好気・嫌気条件下における伝達頻度を比較した。供与菌としては，絶対好気性細菌（*Pseudomonas putida*）と，通性嫌気性細菌（*Pseudomonas stutzeri*）を用いた。前者を用いた際には，前培養は好気条件下で行い，接合実験を好気・嫌気条件で行った。また，後者については，前培養と接合を好気・嫌気の 2 条件ずつ，全部で 4 つの組み合わせで行った。その結果，供与菌・受容菌の種類によらず，どの条件であっても，接合完了体を得ることに成功した。従って，接合伝達自体には酸素が必須でないことが示唆された。また，その接合伝達頻度（ここでは接合完了体のコロニー数を供与菌のコロニー数で割った数値を示した）については，好気条件下よりも嫌気条件下で接合実験を行った場合の方が 10^{-1}～10^{-3} 倍接合伝達頻度の低下が認められた。特に，*Pseudomonas stutzeri* を供与菌とした場合の結果から，前培養の酸素条件の違いよりも，接合実験の酸素条件の違いの方が，接合伝達頻度に大きな違いが認められた（図 4）。従って，酸素は接合時に必須ではないものの，重要な役割を担っていることが示唆された。なお，この現象は，pBP136 とは不和合性群の異なる，pCAR1 でも同様に認められた（Ochi ら，投稿中）。また，酸素濃度の違いによって，プラスミドの見かけの宿主域が変化するかどうかについて，4 で述べた手法を用いて調べたところ，好気条件下・嫌気条件下それぞれでのみ宿主として得られた細菌が存在した（Ochi ら，投稿中）。従って，酸素濃度の違いによって，プラスミドは接合伝達する「相手」を変え，異なる伝播経路をとることが示唆された。現在，酸素自体が，プラスミドの接合伝達性を変えるシグナルになるのかどうか，検証を進めているところである。

6. まとめと今後の展望

本記事では，環境中におけるプラスミドの動態について，近年の情勢を中心に述べてきた。その進展には，近年の革新的なシークエンス技術と，その情報処理手法が必須となっていることは疑いない。また，プラスミド配列だけをメタゲノム配列から取り出す情報処理手法も数多く報告されている [43–48]。筆者らは近年，プラスミドの連続塩基の出現頻度（*k* mer）が，宿主染色体の *k* mer と類似するという性質 [49,50] を利用して，先述した pSN1216-29 の宿主域について予測を試みた。その結果を，実験で得られたプラスミドの宿主域と比較したところ，ある程度の予測が可能であるという結論に至った（Tokuda ら，投稿中）。今後，より網羅的にプラスミドの宿主域の情報を蓄積していけば，プラスミドがどこからどこへと行くのか，精度よく予測することも可能になると期待される。

一方で，筆者らが見出した「酸素濃度の違いによるプラスミドの接合伝達性の違い」を含め，プラスミドがその環境の違いによって見かけの宿主域を変化させる等，環境中におけるプラスミドの動態を理解する上で重要な現象については，その分子機構が不明なことも多い。こうした疑問を解き明かすには，昨今のオミックス解析・細胞レベルの解析技術の進展にあわせながらも，実験室内における「地道な」微生物遺伝学・分子生物学・分子遺伝学的手法による研究を進めていくことも引き続き重要であろう。

謝　辞

本総説で用いたデータの一部は JSPS 科研費 15KK0278，19H02869 および 19H05686 と，公益財団法人旭硝子財団の研究助成を受けて行った。

文　献

1) Kado, C.I. 2014. Historical events that spawned the field of plasmid biology. Microbiol. Spectr. 2(5): doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0019-2013.
2) Hulter, N., J. Ilhan, T. Wein, A.S. Kadibalban, K. Hammerschmidt, and T. Dagan. 2017. An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. Curr. Opin. Microbiol. 38: 74–80.
3) Frost, L., R. Leplae, A. Summers, and A. Toussaint. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat. Rev. Microbiol. 3: 722–732.
4) 新谷政己，松井一泰，金原和秀，野尻秀昭．2013．環境中におけるプラスミドの挙動解析．環境バイオテクノロジー学会誌．13: 125–134.
5) Watanabe, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27: 87–115.
6) Novick, R.P. 1987. Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. 51: 381–395.
7) Mathers, A.J., G. Peirano, and J.D.D. Pitout. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin. Microbiol. Rev. 28: 565–591.
8) Liu, J., Y. Yang, Y. Li, D. Liu, H. Tuo, H. Wang, D.R. Call, M. Davis, and A. Zhang. 2018. Isolation of an IncP-1 plasmid harbouring *mcr-1* from a chicken isolate of *Citrobacter braakii* in China. Int. J. Antimicrob. Agents 51: 936–940.
9) Lv, J., M. Mohsin, S. Lei, S. Srinivas, R.T. Wiqar, J. Lin, and Y. Feng. 2018. Discovery of a *mcr-1*-bearing plasmid in commensal colistin-resistant *Escherichia coli* from healthy broilers in Faisalabad, Pakistan. Virulence 9: 994–999.
10) Founou, L.L., R.C. Founou, and S.Y. Essack. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. Front. Microbiol. 7: 1881.
11) Smalla, K., S. Jechalke, and E.M. Top. 2015. Plasmid detection, characterization, and ecology. Microbiol. Spectr. 3: PLAS-0038-2014.
12) Shintani, M., Z.K. Sanchez, and K. Kimbara. 2015. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front. Microbiol. 6: 242.
13) 新谷政己，金原和秀．2015．プラスミドゲノミクス―全塩基配列解読済のプラスミドデータベースの整備．環境バイオテクノロジー学会誌．14: 81–86.
14) Brown, C.J., D. Sen, H. Yano, M.L. Bauer, L.M. Rogers, G.A. van der Auwera, and E.M. Top. 2013. Diverse broad-host-range plasmids from freshwater carry few accessory genes. Appl. Environ. Microbiol. 79: 7684–7695.
15) Yanagiya, K., Y. Maejima, H. Nakata, M. Tokuda, R. Moriuchi, H. Dohra, K. Inoue, M. Ohkuma, K. Kimbara, and M. Shintani. 2018. Novel self-transmissible and broad-host-range plasmids exogenously captured from anaerobic granules or cow manure. Front. Microbiol. 9: 2602.
16) Datta, N., R.W. Hedges, E.J. Shaw, R.B. Sykes, and M.H. Richmond. 1971. Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 108: 1244–1249.
17) Jobanputra, R.S. and N. Datta. 1974. Trimethoprim R-factors in enterobacteria from clinical specimens. J. Med. Microbiol. 7: 169–177.
18) Pansegrau, W., E. Lanka, P.T. Barth, D.H. Figurski, D.G. Guiney, D. Haas, D.R. Helinski, H. Schwab, V.A. Stanisich, and C.M. Thomas. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP alpha plasmids. Compilation and comparative analysis. J. Mol. Biol. 239: 623–663.
19) Thorsted, P.B., D.P. Macartney, P. Akhtar, A.S. Haines, N. Ali, P. Davidson, T. Stafford, M.J. Pocklington, W. Pansegrau, B.M. Wilkins, E. Lanka, and C.M. Thomas. 1998. Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organisation of the IncP backbone. J. Mol. Biol. 282: 969–990.
20) Adamczyk, M., and G. Jagura-Burdzy. 2003. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. Acta. Biochim. Pol. 50: 425–453.
21) Wolters, B., M. Kyselkova, E. Krogerrecklenfort, R. Kreuzig, and K. Smalla. 2014. Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1epsilon subgroup. Front. Microbiol. 5: 765.
22) Sen, D., C.J. Brown, E.M. Top, and J. Sullivan. 2013. Inferring the evolutionary history of IncP-1 plasmids despite incongruence among backbone gene trees. Mol. Biol. Evol. 30: 154–166.
23) Shintani, M., Y. Takahashi, H. Yamane, and H. Nojiri. 2010. The behavior and significance of degradative plasmids belonging to Inc groups in *Pseudomonas* within natural environments and microcosms. Microb. Environ. 25: 253–265.
24) Kovach, M.E., R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop 2nd, and K.M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. Biotechniques 16: 800–802.
25) Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop, and K.M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene 166: 175–176.
26) 新谷政己，李　美英，松井一泰，大熊盛也，岡田憲典，野尻秀昭．2012．異なる栄養条件下におけるプラスミドの接合伝達頻度の比較解析．環境バイオテクノロジー学会誌，12: 163–167.
27) van der Auwera, G.A., J.E. Król, H. Suzuki, B. Foster, R. van Houdt, C.J. Brown, M. Mergeay, and E.M. Top. 2009. Plasmids captured in *C. metallidurans* CH34: defining the PromA family of broad-host-range plasmids. Antonie Van Leeuwenhoek 96: 193–204.
28) Li, X., E.M. Top, Y. Wang, C.J. Brown, F. Yao, S. Yang, Y. Jiang, and H. Li. 2014. The broad-host-range plasmid pSFA231 isolated from petroleum-contaminated sediment represents a new member of the PromA plasmid family. Front. Microbiol. 5: 777.
29) Werner, J., E. Nour, B. Bunk, C. Spröer, K. Smalla, D. Springael, and B. Öztürk. 2020. PromA plasmids are instrumental in the dissemination of linuron catabolic genes between different genera. Front. Microbiol. 11: 149.
30) Harmer, C.J., K.E. Holt, and R.M. Hall. 2015. A type 2 A/C_2 plasmid carrying the *aacC4* apramycin resistance gene and the *erm*(42) erythromycin resistance gene recovered from two *Salmonella enterica* serovars. J. Antimicrob. Chemother. 70: 1021–1025.
31) Harmer, C.J. and R.M. Hall. 2015. The A to Z of A/C plasmids. Plasmid 80: 63–82.
32) de Gelder, L., F. Vandecasteele, C. Brown, L. Forney, and E. Top. 2005. Plasmid donor affects host range of promiscuous IncP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 71: 5309–5317.
33) Klümper, U., L. Riber, A. Dechesne, A. Sannazzarro, L.H. Hansen, S.J. Sørensen, and B.F. Smets. 2015. Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. ISME J. 9: 934–945.
34) Andersen, J.B., C. Sternberg, L.K. Poulsen, S.P. Bjorn, M. Givskov, and S. Molin. 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2240–2246.
35) Shintani, M., K. Matsui, J. Inoue, A. Hosoyama, S. Ohji, A. Yamazoe, H. Nojiri, K. Kimbara, and M. Ohkuma. 2014. Single-cell analyses revealed transfer ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 plasmids in a soil bacterial community. Appl. Environ. Microbiol. 80: 138–145.
36) Spencer, S.J., M.V. Tamminen, S.P. Preheim, M.T. Guo, A.W. Briggs, I.L. Brito, D.A. Weitz, L.K. Pitkanen, F. Vigneault, M.P. Juhani Virta, and E.J. Alm. 2016. Massively parallel se-

quencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. ISME J. 10: 427–436.
37) Hultman, J., M. Tamminen, K. Pärnänen, J. Cairns, A. Karkman, and M. Virta. 2018. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. FEMS Microbiol. Ecol. 94: (4). doi: 10.1093/femsec/fiy038.
38) Stalder, T., M.O. Press, S. Sullivan, I. Liachko, and E.M. Top. 2019. Linking the resistome and plasmidome to the microbiome. ISME J. 13: 2437–2446.
39) Reid, B.G. and G.C. Flynn. 1997. Chromophore formation in green fluorescent protein. Biochemistry 36: 6786–6791.
40) Król, J.E., H.D. Nguyen, L.M. Rogers, H. Beyenal, S.M. Krone, and E.M. Top. 2011. Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. Appl. Environ. Microbiol. 77: 5079–5088.
41) Pinilla-Redondo, R., L. Riber, and S.J. Sørensen. 2018. Fluorescence recovery allows the implementation of a fluorescence reporter gene platform applicable for the detection and quantification of horizontal gene transfer in anoxic environments. Appl. Environ. Microbiol. 84(6): e02507-17.
42) Kamachi, K., M. Sota, Y. Tamai, N. Nagata, T. Konda, T. Inoue, E. Top, and Y. Arakawa. 2006. Plasmid pBP136 from *Bordetella pertussis* represents an ancestral form of IncP-1beta plasmids without accessory mobile elements. Microbiology. 152: 3477–3484.
43) Antipov, D., N. Hartwick, M. Shen, M. Raiko, A. Lapidus, and P.A. Pevzner. 2016. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. Bioinformatics. 32: 3380–3387.
44) Lanza, V.F., M. de Toro, M.P. Garcillan-Barcia, A. Mora, J. Blanco, T.M. Coque, and F. de la Cruz. 2014. Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. PLoS Genet. 10: e1004766.
45) Rozov, R., A. Brown Kav, D. Bogumil, N. Shterzer, E. Halperin, I. Mizrahi, and R. Shamir. 2017. Recycler: an algorithm for detecting plasmids from *de novo* assembly graphs. Bioinformatics. 33: 475–482.
46) Carattoli, A., E. Zankari, A. Garcia-Fernandez, M. Voldby Larsen, O. Lund, L. Villa, F. Moller Aarestrup, and H. Hasman. 2014. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob. Agents Chemother. 58: 3895–3903.
47) Krawczyk, P.S., L. Lipinski, and A. Dziembowski. 2018. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. Nucleic Acids Res. 46(6): e35. doi: 10.1093/nar/gkx1321.
48) Zhou, F. and Y. Xu. 2010. cBar: a computer program to distinguish plasmid-derived from chromosome-derived sequence fragments in metagenomics data. Bioinformatics 26: 2051–2052.
49) Campbell, A., J. Mrazek, and S. Karlin. 1999. Genome signature comparisons among prokaryote, plasmid, and mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 9184–9189.
50) Suzuki, H., M. Sota, C. Brown, and E. Top. 2008. Using Mahalanobis distance to compare genomic signatures between bacterial plasmids and chromosomes. Nucleic Acids Res. 36(22): e147, doi: 10.1093/nar/gkn753.