

lacZ 遺伝子の塩基配列に基づいた大腸菌群の分布

野田真優子（福島大学大学院・共生システム理工学研究科）

・難波謙二（福島大学・共生システム理工学類）

要旨

福島県桧原湖北部では、大腸菌群数の計数と同定による糞便汚染の調査が行われてきた。種内でも識別可能な手法として桧原湖北部、その流入河川および野生動物の糞便から検出される大腸菌群の遺伝子解析を行うことで菌の由来推定を行った。大腸菌群が共通に持っている *lacZ* 遺伝子の 240bp の部分塩基配列について検討を行ったところ、大腸菌群の中でも *Escherichia coli* は 26 株で 10 種類の塩基配列パターンのものがみられた。それらの分布は、桧原湖北部の西側と東側の *E. coli* で異なっており、付近の流入河川で出現したものと類似していた。この結果から、桧原湖北部水系の *E. coli* は流入河川から入ってきたものが多い可能性が示唆された。また、データバンク (NCBI) から得たヒト由来の *E. coli* の配列と比較を行ったところ、4 種類の配列が桧原湖北部のものと同一であった。さらにその 4 種類の配列のうち、3 種類はハクビシンとイノシシの糞便から単離された *E. coli* と同じ配列であった。

I. はじめに

コレラや腸チフスなど、腸内で増殖するような病気に感染した人間の糞便には病原菌が含まれており、水への糞便の混入は病原菌の混入の懸念をはらんでいる。福島県桧原湖では 1989 年の観測開始以来糞便汚染の指標菌である大腸菌群数が基準値 (1000 MPN/100 ml) をたびたび超過し、貧栄養湖である猪苗代湖でも 2006 年以降大腸菌群数の基準値の超過が確認されている (難波・丸山, 2013)。しかし、大腸菌群 (coliforms) は必ずしも糞便にのみ含まれている菌ではない。大腸菌群とは、乳糖を分解し酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の芽胞を形成しないグラム陰性桿菌 (American Public Health Association, 2005) であり、BGLB 液体培地で 36°C 48h の培養で乳糖を分解しガスを発生させる菌全てを指す。これらの中には大腸菌 (*Escherichia coli*) の他

に、腸管にも存在するが自然環境も生息地とする *Enterobacter* 属, *Citrobacter* 属, *Klebsiella* 属なども含まれる。*E. coli* は他の大腸菌群と比較して温血動物に特異的だが、近年自然界に生息しているものがあると示唆されるような結果も得られている (Ishii *et al.*, 2006)。大腸菌群数の計数や種の同定を行うのみでは糞便に含まれる大腸菌群の増加であるのか、自然に生息している大腸菌群が増加しているのか区別が難しい。これは特に水質の悪化が顕著ではない水域で問題になる。どのような由来の大腸菌群が増加しているかを区別するには、遺伝子レベルなど細かな違いをみていく必要があると考えられる。

猪苗代湖に出現する大腸菌群である *Enterobacter cloacae* の遺伝子レベルで異なる株の分布を調べるため、小野 (2011) は修士論文で *lacZ* 遺伝子の塩基

配列を用いて比較を行った。大腸菌群の定義に関する乳糖分解酵素 (β -D-ガラクトシダーゼ) をコードしている *lacZ* 遺伝子において、比較的由来をたどれることが示唆される結果が得られている。*lacZ* 遺伝子の塩基配列の違いから今回新たに桧原湖においてどのような分布を示しているのかを調べ、大腸菌群の由来の推定を行った。

II. 方法

サンプリングを桧原湖北部とその流入河川計 12 か所の観測点で行った (図 1)。流入河川の観測点として、集落がない大川入川、会津川上流下流、長井川上流下流、早稲沢上流下流で観測を行った。集落の影響をみるため、集落を挟んで上流下流を観測点とした。イノシシ 3 個体とハクビシンの糞便サンプルは、有害駆除個体の直腸から得た。

得られた水試料は滅菌した 100 ml ショット瓶に入れ、氷を入れたクーラーボックスで持ち帰り実験室で処理を行った。水試料は BGLB 液体培地を用いた最確数法で大腸菌群を計数し、Colilert®(IDEXX Laboratories)で *E. coli* の計数を行った。糞便試料は 1 g の糞便を滅菌水に段階希釈で 10,000 倍まで希釈し、水試料と同様に BGLB 液体培地にて計数を行った。遺伝子解析に用いた菌は、計数を行った後の培養液から単離した大腸菌群である。単離した菌を BGLB 液体培地にて 36°C で 48±3 時間培養した後 15 m 遠沈管に移し、3000 rpm で 15 分間遠心機 (himac CT6E, HITACHI) にかけた。上澄みを捨て滅菌水を 10 ml 加え攪拌し、洗浄を行った。再び遠心を行い上澄みを捨て、同様に洗浄を行ったあと上澄みを取り除き、-20°C で冷

凍保存した。遺伝子の抽出には DNA 抽出キット (Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit, MO BIO) を用いた。冷凍していた菌を室温で融解し、キットのプロトコルに従い DNA の抽出を行った。 β -ガラクトシダーゼ産生に関わる *lacZ* 遺伝子の一部分を増幅することのできるプライマー (LZL-389: 5'-ATG AAA GCT GGC TAC AGG AAG GCC-3'; LZR-653: 5'-GGT TTA TGC AGC AAC GAG ACG TCA-3'; Bej *et al.*, 1991) を用いて PCR を行った。PCR 反応液の組成は 10×Buffer 10%, 0.2 mM dNTP mix, 0.05-0.1 μ g/l 抽出 DNA, プライマーペア 0.4 μ M 用い, HotStarTaq DNA Polymerase (QIAGEN) は 1.25 U/ μ l で、最終量が 50 μ l となるように調製した。PCR にはサーマルサイクラー (Mastercycler epgradient S, Eppendorf) を用い、PCR 条件はタッチダウン PCR サイクルを用いた。ホットスタートとして 95°C 15 分、そして 94°C 45 秒、58°C 1 分、72°C 2 分のサイクルでアニーリング温度を 0.5°C ずつ下げながら 10 サイクル繰り返した。その後 94°C 45 秒、53°C 1 分、72°C 2 分を 20 サイクル繰り返し、最後に 72°C 10 分とした。PCR 産物は電気泳動でバンドを確認した後、精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) を使用して精製を行った。精製方法はキットのプロトコルに従った。精製産物は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (<http://eurofinsgenomics.jp/>) にシーケンスの解析を依頼した。シーケンスの解析により得られた波形データは FinchTV (<http://www.geospiza.com/finchtv/>) を用いてアセンブルを行い、データバンクである NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されているヒト由来の *E. coli* の配列と比較を行った。データの処理として

塩基配列の10のパターンにはアルファベットでグループ名を付けた(表1)。

大腸菌群の同定には、20種類の乾燥基質で構成された腸内細菌科およびその他栄養要求性の厳しくないグラム陰性桿菌の同定キットであるAPI 20 E(シスメックス・ビオメリュー)を用いた。同定方法はプロトコルに従った。

III. 結果および考察

解析対象となりうる大腸菌群は *E. coli*, *E. cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter amnigenus1*, *Enterobacter amnigenus2*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braaki*, *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* および *Enterobacter sakazakii* である。その中でも今回は、温血動物の糞便汚染の指標としてより高い信頼性のある *E. coli* の結果について述べる。

lacZ 遺伝子の部分配列において240bpの塩基配列データが得られた。この配列で検討を行ったところ、大腸菌群の中でも桧原湖水系の *E. coli* では26株で22箇所の多型部位を有し、10種類の塩基配列のパターンがみられた。イノシシ3個体から得た13株とハクビシン1個体から得

た3株の *E. coli* は5種類の塩基配列パターンを有していた。

E. coli が有する塩基配列の種類ごとに桧原湖北部流域での分布をみたところ、広く分布していたのはA, B, D, G, Mグループの *E. coli* であった(図1)。Mは会津川下流と会津川河口で出現し、Gは桧原湖の西側である大川入川、会津川下流、および会津川河口に出現した。大腸菌群の種数は湖内よりも流入河川の方が多くなる傾向になることがわかっている(難波・丸山, 2013)が、*E. coli* の塩基配列グループの種数についても同様の傾向がみられた。湖内で検出される *E. coli*



図1. 桧原湖北部に出現した *E. coli* の塩基配列の種類と分布。

(E) 付きのものは湖底堆積物から単離された *E. coli* である。

表1. 桧原湖北部に出現した *E. coli* の *lacZ* 遺伝子の塩基配列240bpにおける多型部位

グループ名	多型部位														
	35	41	44	54	68	86	95	119	131	133	141	143	182	185	221
A	C	C	G	C	G	C	C	G	A	G	G	A	C	T	C
B	T
C	A
D	T	T	T
E	.	.	A	T	.	.	.	C	.	.	.	W	Y	C	.
F	.	.	A	T	.	.	.	C	.	.	.	T	T	C	.
G	.	T	.	T	A
H	.	T	.	T	T	C	.
J	T	.	.	T	.	A	T	.	T
M	T	.	C	A

は河川からの流入量が多いものか、他の *E. coli* と比較して湖内で生残しやすい特性を持つ可能性がある。

また、桧原湖北部の西側と東側では、出現する *E. coli* の塩基配列の種類が異なっていた（図 1）。桧原湖北部の東側の *E. coli* の多くが A パターンの配列を有し、西側の *E. coli* は東側では確認されなかった B, G, M パターンを有していた。加えて湖内のサンプリング地点とその付近の流入河川で出現した *E. coli* の塩基配列を比較すると、それぞれ同一のパターンを有する *E. coli* が出現していることがわかった。このことから、桧原湖北部に出現する *E. coli* は流入河川から入ってきたものが多い可能性が示唆された。

出現した *E. coli* が温血動物の糞便由来であるかを検討するため、動物と NCBI から得たヒト由来の *E. coli* の塩基配列との比較も行った。イノシシの *E. coli* は 5 株が B, 2 株が D の配列であり、ハクビシンの 5 株は A の配列であった。残りのイノシシの 6 株は桧原湖水系のものとして NCBI から得た配列と異なっていた。ヒト由来 *E. coli* では A, B, C, D の配列がみられた。このことから、A, B, C, D の配列を有する *E. coli* は温血動物由来の可能性が示唆された。また、それ以外の桧原湖水系 *E. coli* は他の動物か、自然環境由来である可能性がある。

IV. まとめ

今回の結果から、桧原湖の北部は流入河川の影響を受け湖内の *E. coli* は東側と西側で異なっていることが明らかになった。また、イノシシ、ハクビシン、ヒト由来の *E. coli* と同じ配列の *E. coli* が出現したことから温血動物の糞便汚染がある

ことが示唆された。今後、解析部位や菌株数を増やし検討を行っていく必要がある。

引用文献

- American Public Health Association (2005) 9221 Multiple-tube fermentation technique for members of the coliform group. *In* Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21st ed. APHA, AWWA, WEF. Port City Press, Baltimore, Maryland. pp9. 48-9. 59.
- Bej, A. K., M. H. Hahubani, J. L. Dicesare, Ronald M. Atlas (1991) Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 3529-3534.
- Ishii, S., W. B. Ksoll, R. E. Hickes, M. J. Sadowsky (2006) Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior Watersheds. *Applied and Environmental Microbiology*, 612-621.
- 難波謙二・丸山瑠美 (2013) 裏磐梯桧原湖北部の水質と大腸菌群。「共生のシステム：磐梯朝日遷移プロジェクト」, pp80-87.
- 小野公嗣 (2011) 猪苗代湖に出現する大腸菌群とその由来。平成 22 年度福島大学共生システム理工学研究科修士論文。