

桧原湖北部に分布する大腸菌群の *lacZ* 部分塩基配列に基づいた由来の推定

野田真優子 (福島大学大学院共生システム理工学研究科)

奥田圭 (福島大学環境放射能研究所)

難波謙二 (福島大学共生システム理工学類)

1. はじめに

腸内で増殖する病原菌による感染症に罹患したヒト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危険をはらんでいる。そのため、水に糞便が混入したかどうかを糞便に含まれる細菌を検出・計数することで糞便による汚染の評価が行われている。福島県耶麻郡北塩原村に位置する桧原湖は、糞便汚染の指標菌である大腸菌群数が環境基準値 (1000 MPN/100ml) を超過している湖の一つである。大腸菌群は自然環境中に普遍的に存在するものも含まれており必ずしも糞便汚染を反映しているものではないが、桧原湖湖内ではより信頼性の高い糞便汚染の指標菌である大腸菌 (*Escherichia coli*) も検出されていることから糞便汚染が懸念される。しかし、集落の集まっている桧原湖北部周辺地域の下水道加入率は 8 割を超えており、一概に集落が原因であるとは考えにくい。計数を行うのみでは多くの場合汚染源を特定することは困難であるが、*E. coli* 等の指標菌の流入源を推定することで糞便汚染の状況や原因の解明に役立てることが可能である。

E. coli の由来の推定法として表現型や遺伝子型により、*E. coli* をさらに識別することで宿主を推定する方法がいくつか報告されており、DNA 制限酵素分解産物のバンドパターンを比較する方法や、ある標的遺伝子の塩基配列を比較する方法がある。塩基配列を比較に用いる方法には *uidA* 部分塩基配列と *mdh* 部分塩基配列を標的遺伝子としたものが報告されているが、バンドパターンの比較を行う方法よりも正しい宿主に割り当てられる確率は高くない。しかし、塩基配列を比較に用いる方法は塩基配列という正確性と再現性に優れた情報を得ることが出来る利点があり、標的遺伝子によっては高い割合で宿主を推定できる可能性がある方法である。福島県の猪苗代湖にて大腸菌群である *Enterobacter cloacae* の由来の推定のため、 β -ガラクトシダーゼ産生遺伝子 (*lacZ*) を新たな標的遺伝子とし由来の推定が行われた。湖心の *E. cloacae* が高橋川由来であることが示唆され、*lacZ* 部分塩基配列に大腸菌群の識別能があると考えられた。*lacZ* を用いることで桧原湖の *E. coli* の由来ができる可能性があるが、*lacZ* 部分塩基配列に関して、宿主の推定のために必要な動物由来の *E. coli* の解析はまだ行われていない。そこで、本研究では桧原湖北部に存在する *E. coli* の由来の推定を行うことを目的とし、桧原湖北部に出現した *E. coli* と温血動物の腸管に存在する *E. coli* の *lacZ* 部分塩基配列の遺伝子解析を行った。

2. 方法

桧原湖北部湖内とその流入河川から 12 点、解剖から得たイノシシ (4 個体)、ハクビシン (4 個体)、タヌキ (1 個体) の直腸内容物、桧原湖北部流入河川周辺に落ちていたキツネ (2 個体)、テン (4 個体)、クマ (1 個体)、由来不明の糞 (1 個体) から分離した *E. coli* を対象に遺伝子解析を行った。直腸内容物は有害鳥獣捕獲において捕獲された個体から解剖によって得られた。菌の分離は BGLB 発酵管法を用いて大腸菌群の計数を行った後の最高希釈段階

の陽性管からと、Colilert®で *E. coli* 陽性となったウェルから分離したのから行った。菌の同定は菌の性状試験により同定を行う API20E を用いた。遺伝子解析は PCR 法を用いて約 3000~4000 bp ある *lacZ* のうち、264bp の部分配列を増幅し、精製したのちにユーロフィンジェノミクス株式会社に外注し塩基配列を決定した。プライマーは、LZL-389: 5' -ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3' , LZR-653: 5' -GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA-3' を用いた。末端付近の不明瞭な配列を除き 240bp について塩基配列の比較を行い、配列の種類ごとにアルファベットで名前を付けグループ分けを行った。

3. 結果と考察

遺伝子解析の結果、桧原湖北部とその流入河川(29 株 10 グループ)、猪苗代湖とその流入河川 (11 株 6 グループ)、直腸内容物 (42 株 10 グループ)、落ちている糞 (26 株 7 グループ)、NCBI から得た *E. coli* (36 株 13 グループ) の塩基配列データが得られた (表)。合わせると 144 株が 30 のグループに分かれ、そのうちの A1~A4, A12, B8 以外のグループは、NCBI の BLAST 検索の結果初めて見つかった配列であった。イノシシ、ハクビシン、タヌキ、キツネ、テン、クマ、由来不明の糞、ヒトから分離された *E. coli* で宿主特異的であると思われるグループは 15 グループ、広い宿主に存在するグループは 6 グループ確認された。広い宿主に存在するグループは、環境中で得られた際に候補が複数挙げられるため正しい宿主の割り当てが困難となる。

環境中で分離された *E. coli* の 72.4%が今回調べた哺乳類由来の *E. coli* に当てはまった。その中で、宿主特異的であると思われる配列から、桧原湖北部の西側の大川入川に出現した A8 がキツネ由来、大川入川、会津川下流と堂場山北東に出現した A2 がヒト由来であることが示唆された。その一方で、桧原湖北部の東側では西側と異なり広い宿主に存在する A1 が多く、どのような生き物の影響があるのかは明らかにならなかった。広い宿主に存在した *E. coli* は、今回解析された桧原湖北部と流入河川で分離した *E. coli* の 51.7%であり半数以上となる。*lacZ* 部分塩基配列の解析部位の遺伝子の変異の割合は、*uidA* 部分塩基配列や *mdh* 部分塩基配列を対象としたものと同程度であり配列の多様性も同等である。また、*uidA* 部分塩基配列の研究において、広い宿主に存在する特定の *E. coli* グループが湖や河川で優占している報告があることから、*lacZ* 部分塩基配列と *uidA* 部分塩基配列は同様の傾向があると考えられる。今回桧原湖北部の西側と東側で異なる流入源から *E. coli* が流入していることが明らかとなったが、さらに東側からの流入源を推定するためには、*lacZ* 部分塩基配列の他の部位や、新たな標的遺伝子を解析する必要があると考えられる。

表. 宿主種と出現グループの株数

| | | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | A8 | A9 | A10 | A11 | A12 | A13 | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B7 | B8 | B9 | B10 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | | | | |
|----------|--------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|---|--|--|--|
| 哺乳類 | 直腸内容物 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | |
| | イノシシ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ハクビシン | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | タヌキ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | キツネ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | テン | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | クマ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 環境分離株 | 落ちている糞 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 由来不明 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | ヒト | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | データバンク | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 農地の土 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 運動コート | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 桧原湖北岸 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 桧原湖南岸 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 堂場山北東 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 会津川河口 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 会津川下流 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 会津川上流 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 大川入川 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 桧原湖 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 流入河川 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 長井川下流 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 長井川上流 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 早稲沢下流 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 猪苗代湖流入河川 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

横にグループ名、縦に採取場所と宿主を示した。

縦と横で交わった場所の数字は、該当した *E. coli* の株数である。