

1. 水環境からの大腸菌病原遺伝子7種の 一斉検出系の確立

清水 宏樹^{1*}・真砂 佳史²・小椋 義俊³・糠澤 桂⁴・鈴木 祥広⁴

¹宮崎大学院 工学研究科 工学専攻 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

²国立環境研究所 気候変動適応センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2)

³久留米大学 医学部 感染医学講座 基礎感染医学部門 (〒830-0011 福岡県久留米市旭町67)

⁴宮崎大学 工学部 社会環境システム工学科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

* E-mail: hh15027@student.miyazaki-u.ac.jp

水環境中に存在する病原性細菌による水系感染症は、世界中で問題となっている。そのため、安全な水環境の管理には、病原性細菌の存在実態を正確に把握することが極めて重要である。本研究では、大腸菌の7種類の病原遺伝子を対象にプライマーの設計を行った。そして、同時に複数の標的遺伝子を増幅できるMultiplex PCR法によって、7種類の病原遺伝子の一斉検出法の確立を試みた。設計したプライマーを用いて標的遺伝子の増幅確認を行ったところ、設計した増幅サイズのパンドが確認された。Multiplex PCR法の結果、*stx1*, *stx2*, *ipaH*, *STh*, および*LT*の5つの病原性遺伝子について標的とする遺伝子の増幅が確認され、病原性大腸菌の一斉検出は可能であることが示唆された。

Key Words : Water Environment, Pathogenic bacteria, DNA, Multiplex PCR, Primer Design

1. はじめに

人間活動や各種の産業活動（養殖業、畜産業、農業）など様々な目的で使用された排水が処理され、一部は未処理のまま河川や湖といった水環境に流入している。そのため、水環境中には多種多様な細菌が存在している¹⁾。そして、その中には病原性を有する細菌も存在する²⁾。このような水環境中に存在する病原性細菌による水系感染症は、世界中で問題となっている³⁾。したがって、安全な水環境の管理には、病原性細菌の存在実態を正確に把握することが重要である。しかしながら、河川や沿岸域における病原性細菌の情報は極めて乏しく、抜本的な対策を講じることができないことから、病原性細菌を原因とする水系感染症の事例が世界中で多発しているのが現状である。

現在、病原性細菌を含む細菌の検出法は、細菌のDNAやRNA、遺伝子を標的とした様々な検出技術が開発されており、急速に発展している。その代表的な検出技術であるポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 法は、

標的とする細菌の遺伝子を増幅させて検出する方法⁴⁾であり、臨床診断、食品安全性分析、および環境調査に広く適用されている。また、複数の遺伝子を同時に増幅させ、細菌を検出するMultiplex PCR法も存在する。Multiplex PCR法は多種多様な細菌が存在する水環境試料から病原性細菌を検出する方法として適していると考えられる。一方、近年注目されている検出技術に次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing, NGS) 法がある。本法は、対象試料中に存在する遺伝子の塩基配列を並行してシーケンスすることが可能であり、得られた配列をデータベースと照合することによって、試料の細菌分布を網羅的に把握できる技術である⁵⁾。しかしながら、環境試料中に存在する病原性細菌は、相対的存在量が非常に低く、NGS法による配列決定が困難な場合が多い。これらのことから、Multiplex PCR法によって標的とする多数の病原性遺伝子の増幅をすることができれば、配列決定についての改善が期待できる。そして、NGS法による各遺伝子のリード数からの定量的かつ一斉に解析することが可能となると考えた。

そこで本研究では、水環境における病原大腸菌の汚染・拡散実態を追跡することを目標とし、主要な病原性細菌の一つである大腸菌の7種類の病原性遺伝子についてプライマーを設計して、それらを一斉に検出するMultiplex PCR法の開発を検討した。プライマーは、300～350 bpの狭い領域内で設計を行った。そして、Multiplex PCR法によって標的遺伝子を増幅し、病原性大腸菌の一斉検出を試みた。

2. 実験方法

(1) 標的遺伝子

病原性大腸菌の標的遺伝子は、腸管凝集付着性大腸菌（EAEC）の*aggR*、腸管出血性大腸菌（EHEC）の*stx1*、*stx2*、腸管侵入性大腸菌（EIEC）または赤痢菌の*ipaH*、腸管病原性大腸菌（EPEC）の*eae*、腸管毒素原性大腸菌（ETEC）の*STh*、*LT*の7種類を対象とした。また、大腸菌の特異遺伝子である*uidA*遺伝子も対象とした。なお、各遺伝子のポジティブコントロールは、宮崎県衛生環境研究所と宮崎大学農学部井口純准教授から提供していただいた各標的遺伝子の保有が確認されている菌株のDNA抽出液を用いた。表-1に菌株、保有遺伝子、およびDNA濃度を示す。

表-1 菌株、保有遺伝子、およびDNA濃度

菌株	保有遺伝子	DNA濃度 (ng/μL)
EAEC-1	<i>aggR</i>	207
OT-1	<i>stx1</i>	313
OT-4	<i>stx2</i>	153
SG-2	<i>ipaH</i>	254
OCM-012	<i>eae</i>	314
ETS-002	<i>STh</i>	367
ETS-018	<i>LT</i>	620

(2) プライマー設計

各標的遺伝子について、5つ以上の遺伝子配列をGenBankデータベースから取得した。その後、Primer3Plusを用いて、融解温度（ T_m 値）が $59\pm 3^\circ\text{C}$ 、増幅サイズが300～350 bpの範囲となるように5つのプライマー候補を設計した。設計したプライマー候補についてDDBJ（DNA Data Bank of Japan）のBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）およびClustalWで分析を行い、標的遺伝子の特異的に増幅する可能性が最も高いプライマーを選択した。また、*eae*遺伝子と*uidA*遺伝子のプライマーはKong et al.⁶⁾とWalk et al.⁷⁾のものを参考に作成した。設計したプライマーは、PCR法によって増幅確認を行った。

表-2に、設計したプライマーの配列を示す。

(3) Multiplex PCR法

実験は、KAPA Taq Extra PCR Kit（KAPA Biosystems）を用いて行った。PCR反応混合液には、5 μLの5x KAPATaq EXtra Buffer、1.5 μLのMgCl₂（25 mM）、0.5 μLのKAPA dNTP Mix（10 mM）、0.12 μLのKAPATaq EXtra DNA Polymerase（5 U/μL）、6.88 μLのPCR Grade Water、各プライマー（フォワード・リバース）、およびDNA抽出液を使用し、総容量を25 μLとした。プライマーは終濃度が0.25 μMとなるように調整し、標的遺伝子のDNAは、PCR Grade Waterで1,000倍希釈したものを1 μL使用した。Multiplex PCR反応は、Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler（Thermo Fisher Scientific）で実施した。反応条件は以下の通りである：最初熱変性を 95°C で1分間、 95°C で15秒間、 58°C で15秒間、 72°C で30秒間を40サイクル、最終伸長反応を 72°C で7分間。

(4) 電気泳動

増幅産物をローディングバッファーと混合し、2.0%アガロースゲルで十分に展開するまで電気泳動した。その後、Gel Doc XR（Bio-Rad）によってゲルの撮影を行った。DNAマーカーには100 bp DNA Ladder（TaKaRa）を使用した。

表-2 プライマー配列

標的遺伝子	Forward Primer	Reverse Primer	増幅サイズ (bp)
<i>aggR</i>	TCAGTAAGATTGCAAAAGAAGAAATCA	AGCTTACAGCCGATATATAAAATTGACT	310
<i>stx1</i>	TGATTGATAGTGGCACAGGGG	CAGACTGCGTCAGTGAGGTT	342
<i>stx2</i>	CGGACAGAGATATCGACCCC	CGACACGTTGCAGAGTGGTA	301
<i>ipaH</i>	TGATGCCACTGAGAGCTGTG	CTCTTCACGGCTTCTGACCA	349
<i>eae</i>	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	CGAAGCCATTGCTGGGCGCTC	360
<i>STh</i>	TCACCTTTTCGCTCAGGATGC	CACCCGGTACAAGCAGGATT	167
<i>LT</i>	AGGAACACAAACCGGCTTTG	GTAACCATCCTCTGCCGGAG	349
<i>uidA</i>	CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT	TCAGCGTAAGGGTAATGCGAGGTA	658

3. 結果

(1) PCR法による設計したプライマーの増幅確認

設計したプライマーについて増幅確認を行った結果を図-1に示す。すべての大腸菌の病原性遺伝子で設計した増幅サイズのコンドが確認された。大腸菌の特異遺伝子であるuidA遺伝子も増幅が確認された。

(2) Multiplex PCR法による大腸菌の病原性遺伝子の検出

Multiplex PCR法の結果を図-2に示す。stx1, stx2, ipaH, STh, およびLTの5つの病原性遺伝子については、設計した増幅サイズのバンドが確認された。大腸菌の特異遺伝子であるuidA遺伝子も増幅が確認された。また、ipaHにおいてuidA遺伝子が確認されなかった理由は、実験に使用した標準遺伝子が赤痢菌であったためであると考えられる。aggR遺伝子とeae遺伝子は増幅が確認されなかったが、aggRとeaeの病原性遺伝子については、単独系のPCR法で増幅が確認された。このことから、7種類の大腸菌の病原遺伝子のうち5種類を一斉に検出することが可能である。また、本研究のMultiplex PCR法で増幅させた増幅産物をNGS法で解析することができれば、定量的かつ一斉に検出できる可能性がある。

一方、Multiplex PCR反応において増幅が確認できなかった病原遺伝子も存在した。また、Multiplex PCR法で増幅させた標的遺伝子には増幅効率の違いが確認された。stx1遺伝子に関しては、他の標的遺伝子と比べてバンドの蛍光強度が低かった。Multiplex PCR法における遺伝子の増幅効率は、プライマー性能や反応条件などが影響している⁸⁾。そのため、高効率で増幅することができるプライマーの設計やPCR反応条件の最適化といった課題も確認された。

4. まとめ

- (1) 本研究で設計したプライマーは、すべて単独系のPCR法で標的遺伝子の増幅が確認された。
- (2) Multiplex PCR法によって、7種類の大腸菌病原遺伝子のうち5種類を一斉に検出することが可能であった。

参考文献

- 1) 中村寛治, 濱谷美希, 相澤瑛美, 阿部晋太郎, 川口猛: 広瀬川河川中に生息する細菌群集構造の季節変動, 環境工学論文集, Vol.45, pp.415-422, 2008.
- 2) 岸田直裕, 今野祥頭, 原本英司, 浅見真理, 秋葉道宏:

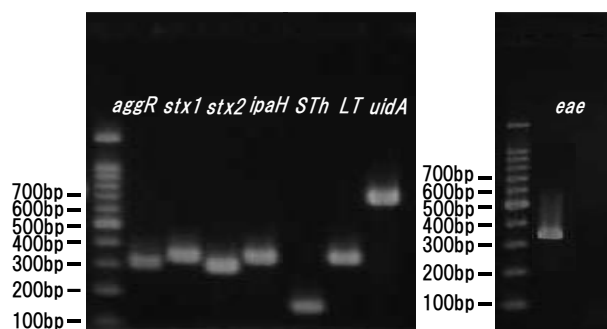


図-1 設計したプライマーでの標的遺伝子の増幅

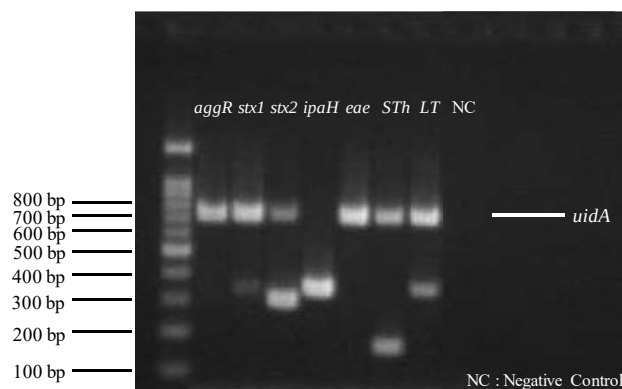


図-2 Multiplex PCR 法によって増幅した増幅産物のアガロースゲル電気泳動

我が国における水道原水中の水系感染性ウイルスおよび原虫の存在実態と指標微生物の有効性, 水道協会雑誌, Vol. 82, No. 10, pp.2-10, 2013.

- 3) 金子光美: 水系感染症の発生とその対策技術, 環境技術, Vol. 32, No. 6, pp.426-432, 2003.
- 4) Toze, S.: PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater, *Water Research*, Vol. 33, pp. 3545-3556, 1999.
- 5) 須田互, 大島健志朗: 次世代シーケンサーを使用した環境中の細菌叢の 16S 解析およびメタゲノム解析, 日本微生物生態学会誌, Vol. 27, No. 2, pp.63-69, 2012.
- 6) Kong, R. Y. C., So, C. L., Law, W. F. and Wu, R. S. S.: A Sensitive and Versatile Multiplex PCR System for the Rapid Detection of Enterotoxigenic (ETEC), Enterohaemorrhagic (EHEC) and Enteropathogenic (EPEC) Strains of *Escherichia coli*, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 38, No. 12, pp. 1207-1215, 1999.
- 7) Walk, S. T., Alm, E. W., Gordon, D. M., Ram, J. L., Toranzos, G. A., Tiedje, J. M. and Whittam, T. S.: Cryptic Lineages of the Genus *Escherichia*, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, pp. 6534-6544, 2009.
- 8) Li, B., Saingam, P., Ishii, S. and Yan, T.: Multiplex PCR coupled with direct amplicon sequencing for simultaneous detection of numerous waterborne pathogens, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, pp. 953-961, 2019.