

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82691

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14055

研究課題名(和文)トランスクリプトーム解析による大腸菌の塩耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of salt-resistant Escherichia coli strains using transcriptome analysis

研究代表者

真砂 佳史(Masago, Yoshifumi)

国際連合大学サステナビリティ高等研究所・サステナビリティ高等研究所・リサーチフェロー

研究者番号：50507895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「大腸菌は海域において塩耐性を獲得し、通常の測定法で検出されるより高濃度で広く存在している」という仮説を立て、その検証を行った。下水処理水の影響を受けている国内の沿岸海域を対象とした現地調査により、夏季に塩を添加した培地の方がコロニー数が高い傾向が認められた。しかし現地試料から単離した大腸菌株であっても、塩添加培地における増殖速度は非添加培地に比べ著しく遅く、塩の存在は生育に負の影響を与えていると考えられた。以上より、環境中の大腸菌の一部は塩耐性を持ち、条件が整えば塩存在下でも増殖できることが示された。これは、海域において大腸菌の見かけの減衰速度が遅くなることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study tested a hypothesis that a part of Escherichia coli in coastal area acquires resistance against salt (sodium chloride), and they cannot be detected using ordinary selection media". A field survey at a coastal area in Japan found higher concentration of E. coli using selective agar supplemented with salt compared to the ordinary agar in summer season. But the salt-resistant E. coli strains isolated from the water samples showed low growth rates in salt-supplemented media, indicating that salt inhibits growth of salt-resistant E. coli strains. These finding implies that E. coli in coastal water shows lower overall decay rates due to the strains possessing salt-resistance.

研究分野：環境工学

キーワード：大腸菌 塩 耐性 水環境

1. 研究開始当初の背景

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、糞便汚染の指標細菌として世界中で使われている。塩素に対する耐性が低い、病原ウイルスに対する指標性があまり高くない等の課題も指摘されているが、大腸菌は様々な水における糞便汚染指標のスタンダードである。

代表者らが過去に行った下水処理水放流海域での水質調査において、特定酵素基質培地を用いたメンブレンフィルター法により大腸菌を測定する際、培地に海水と同程度の塩分を添加することで、大腸菌濃度が最大100倍高くなることを発見した。また、対象海域は下水処理水以外に大きな糞便汚染源が認められないにもかかわらず、海水中の大腸菌濃度はある濃度レベル(数CFU/100mL程度)以下にはならず、海岸から約10km離れた海域でも同程度の濃度(塩非添加培地)で検出された。

上記の結果をあわせて考えると、少なくとも海岸から10km程度までの沿岸域では汚染源の有無によらず大腸菌が広く定着しており、その多くは塩耐性を持っている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では「大腸菌は海域において塩耐性を獲得し、通常の測定法で検出されるより高い濃度で存在している」という仮説を立て、その検証を行った。

大腸菌は塩耐性を持たない種であるとみなされているが、この仮説が正しければ、大腸菌は限られた条件下で塩耐性を獲得できることになる。この機構を解明することは、環境ストレスに対する細菌の新たな適応機構として微生物学的に意義がある。また、この仮説が立証されると、海域における糞便汚染指標細菌としての大腸菌の特性が一変するため、水質管理上重要な知見となる。

3. 研究の方法

本研究は、1) 下水処理場やその処理水放流先における大腸菌の存在状況調査、2) 大腸菌単離株を用いた塩耐性に関する室内実験の2つからなる。

1) 下水処理場やその処理水放流海先における大腸菌の存在状況調査

下水処理水の影響を受けている国内の沿岸海域を対象として、塩耐性大腸菌の存在状況について現地調査を行った。A 下水処理場の流入下水と塩素添加前の下水処理水、および放流先海域11地点にて2015年8月と10月の2回水試料を採取した。大腸菌群数及び大腸菌数は選択培地(クロモカルトコリフォ

ーム寒天培地 ES) を用いて測定した。並行して、塩耐性大腸菌の計測を目的として、同培地に海水と同程度の塩化ナトリウムを添加した培地を用いて同様に培養、コロニー計数を行った。下水処理水と放流先のうち2地点で採取した試料(計3試料)については、培地上に形成した青紫色のコロニーを釣菌し、寒天培地および液体培地で順次培養することで菌株を単離した。

2) 大腸菌単離株を用いた塩耐性に関する室内実験

現地試料から単離した大腸菌株を用いて、塩存在下での大腸菌の増殖について実験を行った。単離した大腸菌株の中で、高濃度の塩添加培地で増殖し、かつ塩添加液体培地中の増殖速度が速い株を選択した。

2015年8月と10月に行った現地調査で単離した大腸菌株(各月19株、計38株、塩添加クロモカルトコリフォーム寒天培地 ES 上でコロニーを形成したものを10%、20%、および30%の塩化ナトリウムを添加したクロモカルトコリフォーム寒天培地 ES 上で培養した。次に、増殖が確認された株を塩添加液体培地(塩化ナトリウム濃度:15%)と塩非添加液体培地でそれぞれ培養し、増殖速度を比較した。

さらに、高濃度塩培地で増殖が確認された6株のうち増殖速度が速い2株(Oc-6、Oc-24株)を選択し、塩非添加液体培地と塩添加液体培地(塩化ナトリウム3.5%、7.0%、14.0%添加)において増殖速度を確認した。培養した大腸菌は、増殖した液体培地と同濃度の塩添加寒天培地で細菌数を確認した。

4. 研究成果

1) 下水処理場やその処理水放流海先における大腸菌の存在状況調査

流入下水および下水処理水中の大腸菌数は、2015年8月、10月の調査ともに塩添加培地を用いた測定値が塩非添加培地の約半分になった。一方、放流先海域で採取した試料については、8月の調査では塩を添加した培地の方が4.6倍(大腸菌が検出された8地点の幾何平均値を比較)高くなったのに対し、10月の調査では大小が逆転し、0.36倍となった。塩非添加培地で培養した(通常の)大腸菌数は2回の調査で同程度であったが、塩を添加した培地上に形成したコロニー数が10月の調査時は8月の10分の1以下となっており、これが影響したと考えられる。釣菌を実施した放流先海域2地点にて2015年12月と2016年1月にも追加で調査を行ったところ、濃度が非常に低かったものの10月の結果と同様の傾向を示した。大腸菌群も大腸菌と同様の傾向を示し、処理場内試料では塩を添加しない培地の方が高く、放流先海域では8月と10月で相反する結果となった。

塩添加が大腸菌数に与える影響については、2回の全域調査で異なる傾向がみられ、今後より詳細な調査が必要になると考えられた。

2) 大腸菌単離株を用いた塩耐性に関する室内実験

様々な濃度の塩を添加した培地で37℃、48時間の培養により増殖した株は、添加濃度10%の培地では36株(94.7%)、同20%の培地では31株(81.6%)であり、単離した大腸菌株の多くは塩に対する耐性を保有していることが確認された。添加濃度30%の培地ではいずれの株も培養が確認されなかった。次に添加濃度20%の培地上で増殖した31株から6株を選択し、塩添加液体培地と塩非添加液体培地における増殖速度を確認した。その結果、すべての株が塩添加液体培地中で増殖したものの、塩添加培地における増殖速度は非添加培地に比べ著しく遅いことが確認された。したがって、これらの塩耐性株においても、塩の存在は生育に負の影響を与えていると考えられた。

さらに6株の中から2株(Oc-6株、Oc-24株)を選択し、再度詳細な調査を行った。様々な塩濃度(3.5%、7.0%、14.0%)における増殖速度を比較した。塩非添加培地および3.0%塩添加培地における培養実験から、Oc-6株は0時間において 2.35×10^1 CFU/mLから24時間後に 5.55×10^7 CFU/mLに増殖した。塩添加培地では、0時間において 1.69×10^1 CFU/mLから24時間後に 3.75×10^3 CFU/mL、72時間後に 5.24×10^5 CFU/mLと緩やかに増殖した。Oc-24株では、0時間において 2.05×10^0 CFU/mLから24時間後に 2.25×10^7 CFU/mLに増殖した。塩添加培地では、0時間において 1.10×10^0 CFU/mLから24時間後に 5.10×10^4 CFU/mLに増殖した。すなわち、Oc-6株、Oc-24株とも3.0%塩添加液体培地より塩非添加液体培地において増殖速度が速く、塩耐性大腸菌であっても塩による増殖阻害が生じていることが確認された。また塩非添加培地では24時間後にコロニーの形成が確認できたが、3.0%塩添加培地においては48-72時間を要した。塩添加培養液での両株の増殖は対数増殖期の期間が短く、早い段階で増殖と死滅が均衡状態に達すると考えられた。より塩濃度が高い7.0%、14.0%塩添加液体培地では目視により若干の増殖がみられたが、培養後72時間後も寒天培地上にコロニーの形成は確認されなかった。前回の実験では20%塩添加培地上でもコロニー形成が確認されたが、死菌上で増殖しコロニーを形成したものと考えられる。この現象は細菌の抗生物質の影響を回避した増殖活動に類似した現象と示唆される。細菌は抗生物質存在下の増殖において、死菌上で増殖し、抗生物質の影響から回避し増殖することが確認されている。塩添加寒天培地においても同様に死菌上で増殖しコロニーを形成

したものと考えられる。

発現遺伝子解析を目的として培養12時間後の塩添加培養液からRNA抽出を行った。塩非添加液体培地では解析に十分なRNAが回収されたが、塩添加液体培地では解析に十分な量および純度のRNAを得られなかった。

3) まとめ

本研究により、環境中の大腸菌の一部は塩耐性を持つこと、そのような株は条件が整えば塩存在下でも増殖できることが確認された。これは、海域において大腸菌の見かけの減衰速度が遅くなることを示しており、海域における大腸菌の消長を解析するにあたり重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 下山愛祐美、黒岩祐有美、佐野大輔、加藤毅、河川水中大腸菌数予測のための符号制約回帰分析、情報処理学会第80回全国大会、2018
2. 加藤毅、小林美里、佐野大輔、符号制限SVMと水文水質データを利用した大腸菌数予測への応用、第20回日本水環境学会シンポジウム、2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

特にありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真砂 佳史 (MASAGO, Yoshifumi)

国際連合大学・サステイナビリティ高等研究所・リサーチフェロー

研究者番号：50507895

(2) 研究分担者

佐野 大輔 (SANO, Daisuke)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80550368

久保田 健吾 (KUBOTA, Kengo)
東北大学・工学研究科・准教授
研究者番号：80455807

(3)連携研究者

稲葉 愛美 (INABA, Manami)
東北大学・工学研究科・産学官連携研究員
研究者番号：60749448