

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15860

研究課題名（和文）ロングリード次世代シーケンサーを用いた湖沼のシアノバクテリアモニタリングの高度化

研究課題名（英文）Advanced cyanobacteria monitoring in lakes using long-read next-generation sequencers.

研究代表者

山口 晴代（Yamaguchi, Haruyo）

国立研究開発法人国立環境研究所・生物多様性領域・主任研究員

研究者番号：20722672

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：シアノバクテリアは湖沼の重要な一次生産者である一方、有毒種を含むことから、その動態を常に監視することが必要である。本研究では、霞ヶ浦をモデル湖沼として、そこに生息するシアノバクテリアの動態を、USB型ロングリード次世代シーケンサーMinIONを用いたメタバーコーディング解析で明らかにすることを目的とした。解析の結果、最新のQ20+キットを用いた場合、16S rRNA配列のほぼ全長を得ることができ、また、ショートリードの次世代シーケンサーで得られる組成と類似した結果を出すことが確かめられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シアノバクテリアの種のマーカー遺伝子として今も16S rRNA配列のほぼ全長配列が使われている。しかし、環境DNA解析ではショートリードの次世代シーケンサーが使われることが主であり、ショートリードの次世代シーケンサーでは、16S rRNA配列の部分配列しか得られず、高度な種同定をすることが難しかった。そこで、本研究ではUSB型ロングリード次世代シーケンサーMinIONを用いたメタバーコーディング解析を実施し、いくつかの問題点は残るものの環境DNA解析でも16S rRNA配列のほぼ全長配列を使って、より解像度の高い解析を実施することができた。

研究成果の概要（英文）：While cyanobacteria are important primary producers in lakes, their dynamics must be constantly monitored because they contain toxic species. In this study, using Kasumigaura as a model lake, I aimed to clarify the dynamics of cyanobacteria in the lake by meta-barcoding analysis using a USB-based long-read next-generation sequencer, MinION. The analysis confirmed that the latest Q20+ kit could obtain almost the full length of 16S rRNA sequences and produce results similar to the composition obtained with a short-read next-generation sequencer.

研究分野：生物資源保全学

キーワード：アオコ シアノバクテリア 次世代シーケンサー 藻類 モニタリング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

霞ヶ浦は日本で2番目に大きな面積を持つ面積の湖で、その流域に暮らす人口は100万人にもおよび飲料水、農業用水、工業用水など広く利用されている。しかしながら、湖の平均水深が約7mと浅い上に水の平均滞留日数は200日と長く、加えて下水道の整備状況が63.5%（茨城県令和2年度）であり富栄養化しやすい環境にある。そのため、代表的な水質基準である化学的酸素要求量（COD）は現在でも国の基準値を上回っており、その水質を監視することが求められてきた。国立環境研究所による霞ヶ浦長期環境モニタリングの結果、富栄養湖である霞ヶ浦の主要な一次生産者はシアノバクテリアと珪藻であること、特に夏期にはアオコと呼ばれるシアノバクテリアの大量発生が引き起こされることが明らかになっている。アオコを形成するシアノバクテリアの一部には、ミクロキスチン（肝臓毒）やサキシトキシン（神経毒）に代表されるシアノトキシンを産生する種があり、詳細なモニタリングが必要である。これまでのモニタリングでは主として光学顕微鏡を用いてその同定がされてきたが、シアノバクテリアは真核藻類と比べ、形態形質に乏しく、また細胞サイズが小さいことから同定には困難を伴う。

光学顕微鏡観察によるシアノバクテリアの同定の困難さを解決するため、ショートリードの次世代シーケンサーを用いた環境DNA解析を実施したところ、光学顕微鏡観察と比べれば、シアノバクテリア組成を詳細に把握出来るものの、読み取り可能な配列長の制限のため、16S rRNA 遺伝子の部分配列しか解析に用いることができず、属、ましてや種といった低次分類体系でシアノバクテリア組成を把握することが難しい状況にあった。近年の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析から、シアノバクテリアは同種でも、個体レベル（株レベル）で数百以上も遺伝子数が異なり、また毒性の有無も異なることが明らかになりつつある（e. g. Humbert et al. 2013, PLOS ONE; Pancrace et al. 2017, Scientific Reports）。さらに地球温暖化などの気候変動によって、日本にこれまでいなかった有毒シアノバクテリアが沖縄県に侵入したと示唆される例も報告されている（Zarenezhad et al. 2012, Phycological Research）。よって、水圏生態系の理解や有毒種の侵入の検出といったリスク管理をする上で、環境中に存在するシアノバクテリア組成をより低次分類体系、つまり種レベルで網羅的に把握する技術が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、ロングリード次世代シーケンサーであるオックスフォード・ナノポアテクノロジー社のUSB型シーケンサーMinION及び霞ヶ浦から得られたDNA試料を用いて、シアノバクテリアの16S rRNA 遺伝子全長（約1400 bp）に基づくメタバーコーディング解析を行い、これまで研究代表者の研究によって得られた16S rRNA 遺伝子の部分配列（約400 bp）の結果と比較することで、その精度を確かめることを目的とする。また、霞ヶ浦において、その優占が確かめられているシアノバクテリアの新規培養株を網羅的に確立してその分類学的同定を行い、メタバーコーディング解析の際の高品質リファレンス配列に資する16S rRNA 遺伝子配列を収集することも目的とする。

### 3. 研究の方法

#### （1）テストサンプルでのメタバーコーディング解析

シアノバクテリアのメタバーコーディング解析を行う前に、国立環境研究所微生物系統保存施設に保存されている無菌のシアノバクテリア株10株（8属10種）を使って、16S rRNA 遺伝

子配列に基づくメタバーコーディング解析を行った。10 株の組成は以下の通りである。*Anabaenopsis circularis* (NIES-21)、*Aphanothese elebens* (NIES-42)、*Dolichospermum crassum* (NIES-78)、*Dolichospermum planctonicum* (NIES-810)、*Dolichospermum planctonicum* (NIES-815)、*Merismopedia* sp. (NIES-3779)、*Microcystis aeruginosa* (NIES-843)、*Planktothrix agardhii* (NIES-204)、*Raphidiopsis raciborskii* (NIES-1041)、*Spirulina subsalsa* (NIES-27)

16S rRNA 遺伝子配列ほぼ全長を増幅させるプライマーセットを用いて、PCR をした後、増幅したアンプリコンを Q20+キットを用いて、MinION で配列解読を行った。配列のベースコールは super accuracy mode を使用して行った。NanoFilt (Coster et al. 2018, Bioinformatics) を用いて、得られた配列より平均塩基クオリティスコアが 20 より大きく、配列長が 1350 bp から 1650 bp のものを抽出した。さらに、5' 側と 3' 側の 30 bp を削除した後に分類群の割り当てに使用した。種レベルでの分類群の割り当てには、Emu (Curry et al. 2011, bioRxiv) を用い、データベースには RDP (Wang et al. 2015, Microbiome) を用いた。

## (2) シアノバクテリアのメタバーコーディング解析

2015 年 3 月に国立環境研究所霞ヶ浦長期モニタリングステーション 9 (湖心) の表層 (0 m) で採取された湖水から得られた DNA 試料を用いて、前述の通り、MinION で配列解読を行った。また、同じ DNA 試料を用いて NanoAmpli-Seq 法 (Calus et al. 2018, Gigascience) と呼ばれるローリングサークル法で 16S rRNA 遺伝子配列をタンデムに増幅し、増幅された配列を MinION で解読し、コンセンサス配列を得る手法を用いて、16S rRNA 遺伝子配列を取得した。これらの二通りで取得した配列を用いたメタバーコーディング解析の結果とショートリードの次世代シーケンサー (IonPGM) から得られた結果を比較した。

## (3) シアノバクテリアの新規培養株の確立と配列解読

霞ヶ浦の湖水から顕微鏡下でマイクロピペット法を用いて、シアノバクテリアの単藻培養株を確立した。単藻が確認された培養株から DNA 抽出を行い、16S rRNA 遺伝子配列ほぼ全長を増幅させるプライマーセットを用いて、PCR をした後、サンガー法により配列決定を行った。配列の確認は GENETYX を用いて行い、曖昧な塩基については目視によって確認を行った。また、国立環境研究所微生物保存施設に保存されているシアノバクテリア培養株の全ゲノム解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列を抽出した。

## 4. 研究成果

### (1) テストサンプルでのメタバーコーディング解析

配列のクオリティスコアを 18 から 21 でそれぞれフィルタリングを行い、残った配列から生成される OTU 数を調べた結果、種レベルでも属レベルでも OTU 数が過大推定された。その中でもクオリティスコアが 20 の時に現実に一番近い結果を出したため、(2) で実施する解析では、クオリティスコアを 20 でフィルタリングすることとした。

### (2) シアノバクテリアのメタバーコーディング解析

(1) の方法を用いて、Q20+キットで解読した配列のメタバーコーディング解析を実施した。その結果、219 OTU を検出し、このうちシアノバクテリア由来のものは 55 OTU であった。次に、NanoAmpli-Seq 法を用いてメタバーコーディング解析を実施した結果、77 OTU を検出し、このうちシアノバクテリア由来のものは 5 OTU のみであった。IonPGM から得られた結果は、136 OTU を検出し、このうち 61 OTU がシアノバクテリアのものであったことから、16S rRNA 遺伝子配列の取得方法によって、得られるシアノバクテリア由来の OTU 数は異なることが

わかった。また、Q20+キットで得られた配列の OTU 組成と IonPGM から得られた配列の OTU 組成はかなり類似していた一方で、NanoAmpli-Seq 法を用いて得られた配列では 50%以上を *Anabaena* 属が占め、他の方法と比べ偏った OTU 組成を示していた。NanoAmpli-Seq 法は配列の正確性を高める方法であるが、アンプリコン生成過程にローリングサークル法を含むため、偏った OTU 組成になったものと推定された。また、霞ヶ浦で頻繁に見られる *Pseudanabaena* 属や *Planktothrix* 属の配列は MinION から得られた配列 (Q20+キット及び NanoAmpli-Seq 法を用いて得られた配列) のみから検出され、IonPGM から得られた配列には含まれていなかった。

### (3) シアノバクテリアの新規培養株の確立と配列解読

霞ヶ浦の湖水から新規にシアノバクテリア株を 53 株確立した。確立したシアノバクテリア株の内訳を表 1 に示す。

目	種名	株数
Synechococcales	<i>Cyanobium</i> sp.	12
	<i>Merismopedia tenuissima</i>	1
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	2
	<i>Pseudanabaena foetida</i>	2
	<i>Pseudanabaena minima</i>	1
	<i>Pseudanabaena</i> sp.	5
	<i>Pseudanabaena yagii</i>	1
	<i>Synechococcus</i> sp.	21
	Nostocales	<i>Aphanizomenon gracile</i>
Oscillatoriales	<i>Ancylothrix rivularis</i>	1
	<i>Ancylothrix terrestris</i>	1
	<i>Microcoleus</i> sp.	2
	Oscillatoriales cyanobacterium	1

表 1 確立した新規シアノバクテリア培養株

確立した新規培養株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し、形態形質と併せて種同定を行った。その結果、種レベルで同定できるものもあったが、種レベルまたは属レベルでの同定が難しい培養株も多く存在したことから、データベースにこれらの配列を加えることによって、メタバーコーディング解析における種同定の正確性を高めることが期待された。また、国立環境研究所微生物系統保存施設に保存されている霞ヶ浦産のシアノバクテリア株のうち、遺伝子配列がない *Annamia dubia* (NIES-4383)、*Dolichospermum planctonicum* (NIES-80)、*Microcystis aeruginosa* (NIES-102、NIES-3787、NIES-3804、NIES-3806、NIES-3807) について、全ゲノム解析を実施し、そこから 16S rRNA 遺伝子配列の抽出を行うことで、配列取得を行った。

本研究から、シアノバクテリアの種レベルでの同定に必要な 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長配列の取得には Q20+キットを使った MinION による配列解読が有効であることが示された。同時に MinION によって解読される raw reads でも十分にショートリードと同様のメタバーコーディング解析が実施できることが示された。今後シアノバクテリア由来の OTU の割合を増やすためにはプライマーセットの検討が必要であると同時にデータベースに霞ヶ浦産のシアノバクテリア培養株由来の 16S rRNA 遺伝子配列を増やしていくことが重要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hirose Yuu, Ohtsubo Yoshiyuki, Misawa Naomi, Yonekawa Chinatsu, Nagao Nobuyoshi, Shimura Yohei, Fujisawa Takatomo, Kanasaki Yu, Katoh Hiroshi, Katayama Mitsunori, Yamaguchi Haruyo, Yoshikawa Hirofumi, Ikeuchi Masahiko, Eki Toshihiko, Nakamura Yasukazu, Kawachi Masanobu	4. 巻 28
2. 論文標題 Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsab024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsab024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Tuji, Haruyo Yamaguchi, Takafumi Kataoka, Mayumi Sato, Tomoharu Sano, Yuko Niiyama	4. 巻 21
2. 論文標題 Annamia dubia sp. nov. with a description of a new family, Geminocystaceae fam. nov. (Cyanobacteria)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fottea	6. 最初と最後の頁 100-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5507/fot.2021.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山口晴代	4. 巻 43
2. 論文標題 アオコ形成シアノバクテリア <i>Microcystis</i> 属におけるゲノム解析の研究動向と環境遺伝子モニタリング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 水環境学会誌	6. 最初と最後の頁 346-349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi H., Suzuki S., Osana Y., Kawachi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Genomic characteristics of the toxic bloom-forming cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-102	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/jgen.40978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi H., Suzuki S., Kawachi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft genome sequences of four <i>Microcystis aeruginosa</i> strains (NIES-3787, NIES-3804, NIES-3806, and NIES-3807) isolated from Lake Kasumigaura, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00052-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00052-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki S., Yamaguchi H., Kawachi M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Three Filamentous Cyanobacterial Strains, <i>Dolichospermum planctonicum</i> NIES-80, <i>Planktothrix agardhii</i> NIES-905, and <i>Sphaerospermopsis reniformis</i> NIES-1949	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 00605-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00605-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

環境儀「アオコの実像 シアノバクテリアの遺伝子解析からわかること」  
<https://www.nies.go.jp/kanko/kankyogi/73/02-03.html>

#### 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------