

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25289176

研究課題名(和文) 蛍光細胞分析分離装置と次世代シーケンサーを用いた水中生菌の網羅的解析技術の確立

研究課題名(英文) Development of an exhaustive detection technique for viable waterborne bacteria by using fluorescence activated cell sorter and next-generation sequencing

研究代表者

秋葉 道宏 (Akiba, Michihiro)

国立保健医療科学院・その他部局等・その他

研究者番号：00159336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分離培養に依存しない解析手法として、蛍光細胞分析分離装置および次世代シーケンサーを用いて、水中の細菌叢の網羅的解析手法を確立することを目的とした。国内の浄水場から収集した処理工程水試料を用いて、確立した次世代シーケンサーを用いた手法を培養に基づく従来の遺伝子解析手法と比較した結果、手法の違いによって細菌叢に差が現れた。培養に基づく手法では、Alphaproteobacteria綱が主要だった。一方、次世代シーケンサーを用いた手法では、Alphaproteobacteria綱およびGammaproteobacteria綱が主要であり、多様な綱に属する細菌が検出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop an exhaustive detection technique for viable waterborne bacteria by using fluorescence activated cell sorter (FACS) and next-generation sequencing (NGS). The developed FACS-NGS method was evaluated using process water samples collected in a drinking water treatment plant, comparing with a conventional cloning and Sanger sequencing (culture-dependent) method. As a result, microbial communities observed in the process water samples were different between the FACS-NGS method and culture-dependent method. Alphaproteobacteria was the major class determined by the culture-dependent method. In contrast, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria were identified as the two major classes in the FACS-NGS method. The results suggested that the developed FACS-NGS method can detect diverse viable waterborne bacteria.

研究分野：水道工学

キーワード：水道 微生物 遺伝子検査

1. 研究開始当初の背景

水道水源や飲料水、医療用水等における微生物叢やその存在量を正確に把握することは、我が国における水衛生問題の健全性を鑑みた上で極めて重要な課題である。現場レベルでは、一般細菌・大腸菌・大腸菌群等の衛生指標微生物を測定することで、微生物学的安全性を間接的に評価しているが、得られる情報には限りがあるのが実情である。

研究レベルでは、近年の分子生物学的手法の発展によって、水試料から直接 DNA を抽出し、培養を経ずに生物叢を解析する手法 (PCR-DGGE 法、T-RFLP 法、クローンライブラリー法等) が下水試料等に適用されてきているが、得られる情報については生菌と死菌の区別がつけられないという欠点がある。特に浄水試料等では塩素消毒によって死菌の割合が高いと考えられるので、生菌のみの情報を得る必要がある。

生菌試料を対象とする場合、従来は培養を行って生菌であることを確認し、分離した後に、通常のシーケンス解析を実施することで菌叢解析を行ってきたが (猪又ら、2008)、短期間の培養期間では培養できない細菌が多く、低温で長期間の培養を行うことで、培養できる細菌の割合を増加できるものの、結果が得られるまでに長期間掛かるといった問題がある。また作業性を鑑みると、1 試料あたり 100 リード (株) 程度の情報しか得られず、存在割合の低い生菌は検出することができない。飲料水や医療用水等の場合は、存在割合が低くても衛生上の問題となりうる病原細菌等の生菌が存在していないかどうか確認することが望まれており、網羅的な解析が可能な新規手法の開発が強く求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、上記の課題を克服するために、蛍光細胞分析分離装置を用いた生菌の分離手法に着目した。染色技術と組み合わせることで、培養法に頼らずに生菌のみを選択的に高速で分離することが可能であり、下水試料のみでなく、海外では浄水試料にも本技術の適用が開始され始めている (Kahlisch et al., 2010)。本研究では、さらに次世代シーケンサーを利用することで、水中の細菌叢の網羅的解析技術を確立することを目的とした。次世代シーケンサーは、従来は導入コストおよびランニングコストが高かったために、ヒトゲノム解析等の一部の研究分野での利用が行われてきたが、近年は低コスト化が進んでおり、多くの分野での利用が期待されている。

3. 研究の方法

(1) 蛍光細胞分析分離装置を利用した生菌の分離

国内の浄水場より水試料を採取し、メンブレンフィルターを用いて濃縮を行った。また、

標準試料として、硝化リアクターより硝化細菌集積試料も採取した。試料は、Kahlisch ら (2010) の方法に従い、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen) を用いた Live/Dead 染色を行った。本キットでは、生菌および死菌における SYTO 9 と Propidium Iodide (PI) の膜透過性の違いを利用した生菌/死菌染色を行う。本研究では、一部の調査で SYTO 9 の代わりに Sybr Green も使用した。また、一部の試料は染色前に 70% イソプロピルアルコールを用いて殺菌した (細胞膜損傷)、生菌/死菌染色を行った後、蛍光細胞分析分離装置 (BD Biosciences) を用いて解析を行った。一部の染色試料については、蛍光顕微鏡を用いた観察も行った。

(2) 次世代シーケンサーを用いた水中細菌叢の網羅的解析

国内のダム貯水池や浄水場等から水試料を採取した。試料はメンブレンフィルターを用いて濃縮した後、CTAB 法や Soil DNA Isolation Kit, PowerSoil (MO BIO Laboratories, Inc.) を用いて DNA 抽出を行った。16S rRNA を増幅対象とした Tailed PCR を実施した後、MiSeq (Illumina, Inc.) を用いた次世代シーケンサー解析 (アンプリコンシーケンサー) に供した。データ解析には、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 菌叢解析のパイプラインとなっている QIIME を用いた。また、比較対象として、一部の試料については、クローンライブラリー法も用いて細菌叢解析を行った。また、別の比較対象として、一部の試料は分離培養に基づく手法でも解析を行った。水試料をメンブレンフィルターを用いて濃縮した後、R2A 培地を用いて従属栄養細菌を培養した。コロニーをピックアップし分離した後、16S rRNA を増幅対象とした PCR に供した。その後、PCR 産物をシーケンサー解析し、塩基配列を得た。得られた塩基配列について、FASTA による相同性検索を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光細胞分析分離装置を利用した生菌の分離

Kahlisch ら (2010) の論文や染色キット記載の通りの染色条件で、SYTO 9 と PI を使用した場合、dot-plot で生菌エリアと死菌エリアが明確に分離できなかった。使用した装置の違い等に原因があると考えられるが、生菌/死菌の選別が困難であると考えられたため、SYTO 9 の代わりに Sybr Green を使用したところ、分離性能の向上が見られたことから (図 1)、蛍光細胞分析分離装置を利用して生菌・死菌を分離し、その後に遺伝子解析 (細菌叢解析) を実施することは可能であると考えられた。一方、蛍光顕微鏡を用いて生菌・死菌試料を観察したところ、明瞭な差は確認できなかった。確実な生菌・死菌の分離を行

うためには、染色条件の最適化等を行うことによって、さらに分離性能を向上させることが求められるが、本研究では染色条件の最適化にまでは至らなかった。

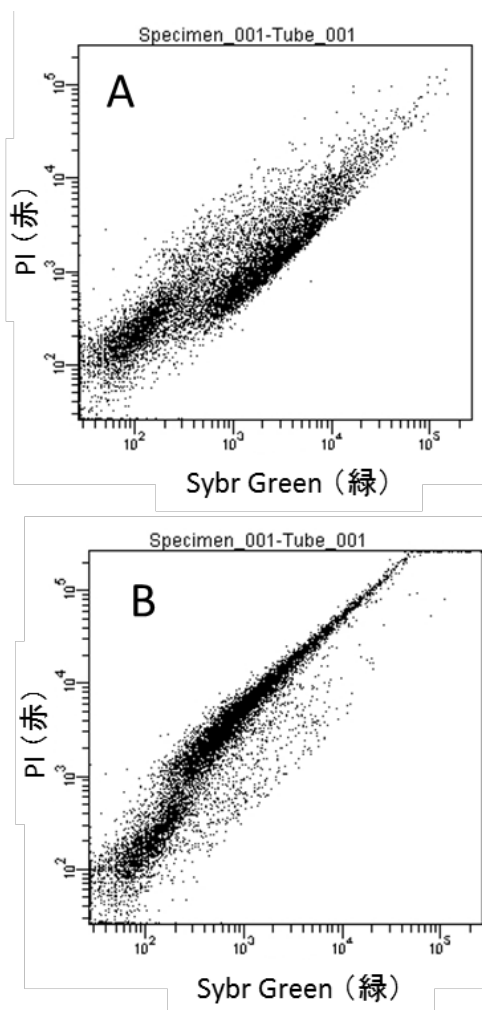


図1．標準試料の蛍光細胞分析分離装置による解析結果

A：生菌試料（未処理）、B：死菌試料（イソプロピルアルコール処理）

(2) 次世代シーケンサーを用いた水中細菌叢の網羅的解析

次世代シーケンサーを用いることで、試料の種類に係わらず、簡便に膨大な細菌叢の情報を得ることができた。微生物の多様性の指標として用いられる Chao 1 を用いて評価した場合、1 試料あたり 10 万リード以上得ることで、その試料中に含まれるほとんどの細菌群を網羅的に捉えることができることが分かった。

次世代シーケンサーを使用した場合、多数の塩基配列を得ることが可能であったため、1 試料あたりの塩基配列取得数に限りのあるクローンライブラリー法では検出することができなかったマイナーな細菌種まで検出することができた。培養に基づく従来の手法の解析結果とも比較した結果、細菌叢に

大きな差が現れた。網レベルで見た場合、培養に基づく手法では、Alphaproteobacteria 網が主要で、一部の試料では Betaproteobacteria 網等も見られた。一方、次世代シーケンサーを用いた手法では、Alphaproteobacteria 網および Gammaproteobacteria 網が主要であり、培養に基づく手法では見られなかった様々な網に属する細菌が検出された。このように、次世代シーケンサーを用いることで、従来の解析手法に比べて、検査結果の網羅性が著しく向上することがわかった。

複数の試料水における細菌叢・存在量を調査した結果、採水地点、時期によって微生物群集構造が大きく異なることを定量的に示すことができた。また、同じ属であっても種や株によって、水中での挙動が異なることも定量的に示すことができた。浄水場工程水で見た場合、処理が進むにつれて多様性が低下したことから、水道原水中に除去されやすい細菌とされにくい細菌が存在しており、されにくい細菌がろ過池から流出していると考えられた。

本研究では 16S rRNA を対象に検討を行ったため、基本的には古細菌・真正細菌が解析対象となるが、真核藻類が保持している葉緑体の中に存在している 16S rRNA が Tailed PCR によって同時に増幅されることから、この葉緑体の塩基配列を解析することで、古細菌・真正細菌のみでなく真核藻類も検出可能であった。真核藻類は、水源貯水池（ダム）や水道原水等で主要な生物叢と成り得ることに加え、浄水処理においてろ過閉塞等の各種障害を引き起こすことが知られていることから、古細菌・真正細菌と同時に解析できることは重要な利点である。一方、葉緑体の 16S rRNA に基づく分類では、詳細な属・種の分類を行うことはできなかった。本研究では検討することができなかったが、18S rRNA を対象とした次世代シーケンサーの利用も一部の研究で提案されており、真核藻類も詳細に解析するためには、このような手法を導入していく必要があると考えられる。

<引用文献>

猪又明子、千葉隆司、保坂三継、水道水中の従属栄養細菌の同定における DNA 塩基配列解析法と表現性状試験との比較、水環境学会誌、2008、Vol.31、No.10、pp.609-614.

Kahlisch L, Henne K, Groebe L, Draheim J, Höfle MG, Brettar I. Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. Water Science and Technology, 2010, Vol.61, No.1, pp.9-14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

渡邊英梨香、藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、秋葉道宏、培養法および16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場ろ過水の細菌相の評価、用水と廃水、査読有、2017、Vol.59、No.3、pp.197-203.

岸田直裕、秋葉道宏、水中微生物検査のありかた、日本防菌防黴学会誌、査読無、2016、Vol.44、No.2、pp.69-73.

Fujimoto N, Mizuno K, Yokoyama T, Ohnishi A, Suzuki M, Watanabe S, Komatsu K, Sakata Y, Kishida N, Akiba M, Matsukura S. Community analysis of picocyanobacteria in an oligotrophic lake by cloning 16S rRNA gene and 16S rRNA gene amplicon sequencing. The Journal of General and Applied Microbiology, 査読有, 2015, Vol.61, No.5, pp.171-176.
doi: 10.2323/jgam.61.171

〔学会発表〕(計6件)

渡邊英梨香、藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、松倉智子、秋葉道宏、浄水場処理工程水における微生物相の長期的評価、第51回日本水環境学会年会、2017年3月、熊本市、同講演集、p.204.

渡邊英梨香、藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、秋葉道宏、培養法と16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場ろ過水の細菌相の評価、日本水道協会平成28年度全国会議、2016年11月、京都市、同講演集、pp.758-759.

藤瀬大輝、渡邊英梨香、藤本尚志、秋葉道宏、次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因微生物の給配水系での挙動、日本水道協会平成28年度全国会議、2016年11月、京都市、同講演集、pp.760-761.

渡邊英梨香、藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、岸田直裕、秋葉道宏、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場処理工程水の微生物相の評価、第50回日本水環境学会年会、2016年3月、徳島市、同講演集、p.274.

渡邊英梨香、藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、岸田直裕、秋葉道宏、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングによる浄水場処理工程水の細菌相の評価、日本水道協会平成27年度全

国会議、2015年10月、さいたま市、同講演集、pp.630-631.

藤本尚志、大西章博、鈴木昌治、藤瀬大輝、岸田直裕、秋葉道宏、クローニング法および次世代シーケンサーによるろ過漏出障害原因生物の評価、日本水道協会平成26年度全国会議、2014年10月、名古屋、同講演集、pp.540-541.

〔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〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋葉道宏 (AKIBA, Michihiro)
国立保健医療科学院・統括研究官(水管理研究分野)
研究者番号: 00159336

(2)研究分担者

岸田直裕 (KISHIDA, Naohiro)
国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任研究官
研究者番号: 10533359

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

藤本尚志 (FUJIMOTO, Naoshi)
東京農業大学・応用生物学部醸造科学科・教授
研究者番号: 50297595