

厚生労働科学研究費補助金（健康安全・危機管理対策総合研究事業）
「水道システムにおける生物障害の実態把握とその低減対策に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：分子生物学的手法によるろ過漏出障害の原因生物の解明

分担研究者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 教授

研究要旨

ピコプランクトンとは大きさが 0.2~2 μ m のプランクトンであり、水源において細胞数が高まると、浄水場においてろ過池の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが困難になる。これまで分子生物学的手法（クローニング）により浄水場におけるろ過漏出障害原因生物の調査を行い複数の系統に位置づけられるピコシアノバクテリアのクローンおよび緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンが検出され、これらの微生物がろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された。しかしながらクローニングにより生物相を完全に評価できていない可能性が示唆された。そこで本年度ではさらに知見を集積するとともに次世代シーケンサーによる詳細な生物相評価手法の確立を行った。長沢浄水場ろ過水から 2013 年 6 月から 9 月にかけてオーストリアのモンド湖からの分離株である *Synechococcus* sp. MH305 に近縁なクローンが高い割合で検出され、主要なるろ過漏出障害の原因生物である可能性が示唆された。原水では *Synechococcus* sp. 0BB26S03 に近縁なクローンの割合が大きく、ろ過水では *Synechococcus* sp. MH305 に近縁なクローンの割合が大きくなる傾向があり、*Synechococcus* 属の種類によって処理工程における除去特性が異なる可能性が示唆された。ろ過水から真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子が高い割合で検出されることがあり、真核藻類をターゲットとした解析も必要と考えられた。沈澱水から PE-type の *Synechococcus* 属の分離に成功し、16S rRNA 遺伝子を解析したところ、未培養の系統に位置づけられることが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により水道水源の微生物群集構造を門レベルから属レベルまで定量的に評価することが可能であった。

A. 研究目的

近年、湖沼・貯水池を水源とする浄水場においてピコプランクトンによるろ過漏出障害が発生し問題となっている。平成 19 年に厚生労働省が水道事業に対して義務付けた「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」において、クリプトスポリジウム等による汚染の対応措置として、リスク判断がレベル 4(クリプトスポリジウム等による汚染のおそれが高い)またはレベル 3(クリプトスポリジウム等による汚染のおそれがある)の場合、ろ過池またはろ過膜の出口の濁度を 0.1 度以下に維持することが可能なろ過設備(急速ろ過、緩速ろ過、膜ろ過等)を整備することが義務付けられている。しかしながらピコプランクトンによるろ過漏出障害が発生すると、この対策指針に従って濁度 0.1 度以下に維持することが困難になり、浄水場では対応に苦慮している。この問題となるピコプランクトンとは 0.2~2 μ m の大きさのプランクトンを指し *Synechococcus* 属等の藍藻類と真核生物に属するものが含まれる。ピコプランクトンはこれまで落射蛍光顕微鏡による観察における蛍光の色調により 3 グループに分けて検討されているが、ろ過池から漏出する種に関する知見が不足しているのが現状である。これまで、分

子生物学的手法により浄水場工程水を調査し、複数の系統に位置づけられるピコシアノバクテリアのクローンおよび緑藻綱 *Mychonastes homosphaera* に近縁なクローンが検出され、これらの微生物がろ過漏出障害の原因となる可能性が示唆された。しかしながらろ過水の生物相が多様であり、クローニングにより生物相を完全に評価できていない可能性が示唆された。そこで本年度はピコプランクトン対策に関する基礎的知見を得ることを目的として、相模湖を水源とする川崎市上下水道局長沢浄水場の各工程水を対象とし、継続して分子生物学的手法を用いてピコプランクトンの生物相について解析した。また、次世代シーケンサーによる詳細な群集構造解析法を確立するため、水源の真正細菌の 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析を行った。

B. 研究方法

B-1 供試試料

2013 年 1 月 23 日、2 月 20 日、3 月 19 日、4 月 17 日、5 月 22 日、6 月 21 日、7 月 17 日、8 月 21 日、9 月 18 日、10 月 16 日、11 月 20 日、12 月 18 日に川崎市上下水道局長沢浄水場着水井、凝集沈殿池、急速砂ろ過池より採水した試料を用いた。

次世代シーケンサーによる解析には以下の試料を用いた。群馬県草木ダム堰堤直上流の表層より、2012年7月2日、8月21日、10月23日に採水した試料、宮ヶ瀬湖ダム中央の表層より2012年、8月1日、9月5日、2013年4月17日、5月8日、6月5日に採水した試料、江戸川矢切取水場より、2012年8月7日、2013年5月29日に採水した試料、茨城県鰐川より2012年6月13日、2013年4月23日、5月29日に採水した試料を用いた。鰐川は霞ヶ浦(北浦)から流れる河川である。これらのダム湖、河川は水道水源として利用されている。

B-2 細胞数測定方法

長沢浄水場原水は50ml、沈殿水は200ml、ろ過水は300ml、孔径0.2 μ mメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過を行った。ろ過したフィルターについて落射蛍光顕微鏡のB励起、G励起で20視野それぞれ写真を撮影し、PE-type、PC-type、CH-typeの細胞数を計測した。

B-3 クローニングによる生物相の解析

ピコシアノバクテリアのクローニングはIvanikovaら¹⁾に従って行った。ナノプランクトンの除去を目的として試料を孔径3 μ mもしくは5 μ mのメンブレンフィルターを用いて吸引ろ過を行い、前処理を行った後、そのろ液を0.2 μ mのポリカーボネート製メンブレンフィルターを用いて吸引ろ過し集菌を行った。集菌したフィルターを裁断して50ml容ファルコンチューブに回収した。CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 法により遺伝子の抽出を行った。アガロースゲル電気泳動によりゲノムDNAの確認を行った後PCRに供した。16S rRNA 遺伝子のPCRには106Fおよび789Rのプライマーペアを用いて行った。PCR終了後、アガロースゲル電気泳動によりPCR産物の確認を行い、切り出したゲルをQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用いてゲル精製を行った。精製したPCR産物を用いてTOPO TA Cloning Kitによりクローニングを行った。コロニーPCRにより挿入部分の遺伝子を増幅し、RFLP法により、グルーピングを行った。これに基づいて目でグループ分けを行い、各グループについて塩基配列の解析を行った。クローンの塩基配列約600塩基の前半100塩基、後半100塩基についてFASTAサーチを行い、近縁種が一致するか確認を行った。一致しないものはキメラとした。その後、アライメントを行い決定した塩基配列を基に相同性検索を行った。

B-4 ピコシアノバクテリアの分離

分離・培養にはシクロヘキシミドを添加したCB培地を用いた。CB培地10mlを試験管に分注しオートクレーブ滅菌した。孔径5 μ mメンブレンフィルターを用いて試料をろ過した。そのろ過液のピコシアノバクテリア細胞数を10cells/mlに

なるまで希釈し、各試験管に0.1ml、0.2ml、0.3ml添加した。培養は1,500 lx、20℃の恒温器で行った。

B-5 次世代シーケンサーによる群集構造解析
真正細菌の16S rRNA 遺伝子の特異的に増幅させるプライマー515F、806Rを用いてTailed PCRを行った。増幅を確認した後、精製、濃度調整を行い、Illumina社のMiSeqによりアンプリコンシーケンシングを行った。得られた塩基配列はQIIMEを利用して解析を行った。

C. 研究結果およびD. 考察

C-1 長沢浄水場工程水の生物相評価

長沢浄水場の原水においてPE-typeおよびPC-typeのピコシアノバクテリアが観察された。細胞数は最大で 10^3 cells/mlであった。沈殿水の細胞数は最大で 7.0×10^2 cells/mlであった。定量はしていないが、2、3、5、9月の原水、沈殿水において1 μ m以下の自家蛍光を有する粒子が多く観察された。ろ過水において自家蛍光が弱まっているもののピコシアノバクテリアと考えられる細胞が観察された。この期間におけるろ過水の濁度は0.01~0.03の間で推移した。2013年3月の沈殿水、2013年4、5月のろ過水においてPCRによる増幅が見られなかった。1~3月の原水において真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子が検出され、ピコシアノバクテリアは検出されなかった。4月~9月の原水において本研究のターゲットではないVerrucomicrobia門の細菌が多く検出され、*Synechococcus*属系統の生物相を正確に評価できなかった。原水に比べてろ過水ではVerrucomicrobia門が検出される割合が低く、*Synechococcus*属が検出される割合が高まる傾向が見られた。

本年度工程水において*Synechococcus*属は58塩基配列が検出され、99%以上を同一のOTUとしたところ8OTUsに分けられた(表1)。全工程水を解析できた月の*Synechococcus*属の組成を比べたところ、原水では*Synechococcus* sp. 0BB26S03に近縁なクローンの割合が多いことが明らかとなった(図1~5)。ろ過水では7月、10月を除いて*Synechococcus* sp. MH305に近縁なクローンの割合が大きく、*Synechococcus*属の種類によって処理工程における除去特性が異なる可能性が示唆された。3、7、9、10、12月はろ過水において真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子のクローンが多く検出された。

8月の原水より一株(N-1)、10月の原水より一株(N-2)、9月の沈殿水より一株(N-3)の計3株のピコシアノバクテリアの分離に成功した(写真1~3)。N-1株、N-2株はPC-typeの桿菌であった。N-3株はPE-typeの桿菌であった。

分離株の遺伝子解析の結果、N-1株は

Synechococcus sp. 0BB26S03、N-2 株は *Synechococcus* sp. PS721、N-3 株は Uncultured *Synechococcus* sp. clone LS51 に近縁なピコシアノバクテリアであることが明らかとなった(図 6)。

N-3 株は未培養の系統である PD に位置する *Synechococcus* 属であることが明らかとなった。

C-2 次世代シーケンサーによる水源における真正細菌群集構造の評価

1) 草木湖
1 試料あたりのリード数は 16 万リードから 20 万リードであった。各門のリード数の割合を評価したところ Proteobacteria 門のリード数は各月において 43~60% であり主要な微生物群であることが明らかとなった(図 7)。Cyanobacteria 門のリード数は細胞数が $10^5 \sim 2 \times 10^5$ cells/ml と高い 7、8 月は 20% を占めたが、 4×10^4 cells/ml と低下した 10 月は 1% となった。Cyanobacteria 門に占める *Synechococcus* 属の割合は 70% 以上であり、細胞数の高い 7、8 月は約 90% となった。*Synechococcus* 属について種レベルで評価すると、細胞数が高い 7、8 月は *Synechococcus* sp. MH305 の割合が高く 90% 以上を占めた(図 8)。細胞数が低下した 10 月は *Synechococcus* sp. PS721 が約 60% を占め、季節によって *Synechococcus* の種組成が変化することが示唆された。

2) 宮ヶ瀬湖

2012 年 8、9 月、2013 年 4~6 月の 1 試料あたりのリード数は 13 万リードから 22 万リードであった。各門のリード数の割合を評価したところ、Actinobacteria 門、Proteobacteria 門のリード数が多く合計で 65~86% を占め、主要な微生物群であることが明らかとなった(図 9)。Cyanobacteria 門は 2%~11% の間で推移した。*Synechococcus* 属系統のリード数は 700~1 万 8 千リードであった。細胞数が 10^5 cells/ml 程度であった 8 月、9 月は、*Synechococcus* 属の割合が高く 75% 以上を占めた。細胞数が 10^4 cells/ml 前半であった 4~6 月において、*Synechococcus* 属の割合は低く 20%~30% であった。このとき、珪藻綱等の葉緑体に含まれる遺伝子のリード数の割合が高かった。次世代シーケンサーで検出された *Synechococcus* 属は 8 OTUs に分けられ、各試料に共通して *Synechococcus* sp. MW6B4 に近縁な OTU のリード数の割合が高く 29~80% を占めた(図 10)。また、*Synechococcus* sp. LBB3、*Synechococcus* sp. MH301、*Synechococcus* sp. PS680 等クローニングでは検出できなかった存在割合の低い種も各試料で検出できた。

3) 江戸川

1 試料あたりのリード数は 2012 年 8 月は 13 万 4 千リード、2013 年 5 月は 23 万 3 千リードであった。Proteobacteria 門の占める割合が大きくそれぞれ 44%、91% を占めた(図 11)。ピコシアノバクテリアの細胞数が 10^5 cells/ml を超えていた 2012

年 8 月においても Cyanobacteria 門のリード数は 1% 程度と低かった。これは下水処理場の放流水が流入し、従属栄養の細菌数が多いことが原因として考えられた。シアノバクテリア門のうち、真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子のリード数が 3 割程度を占めており、*Synechococcus* 属の系統が 6~7 割を占めていた。*Synechococcus* 属の種組成として 2012 年 8 月は *Synechococcus* sp. PS721 が 71%、2013 年 5 月は *Synechococcus* sp. 0BB26S03 が 67% 占めていた(図 12)。*Synechococcus* sp. PS721 は琵琶湖からの分離株、*Synechococcus* sp. 0BB26S03 はイタリア Bubano Basin からの分離株である。

4) 鰐川

1 試料あたりのリード数は 16 万 9 千リードから 18 万 7 千リードであった。Actinobacteria 門、Bacteroidetes 門、Cyanobacteria 門、Proteobacteria 門のリード数は各月において 10% 以上であり、主要な微生物群であることが明らかとなった(図 13)。Cyanobacteria 門は 2013 年 4 月、5 月において 30% 以上と高く推移した。

Cyanobacteria 門の総リード数に占める、真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子のリード数の割合は 2012 年 6 月、2013 年 4 月、5 月においてそれぞれ、33%、61%、42% であり、2013 年 4 月に高かった。このとき、珪藻綱 *Nitzschia* 属、*Synedra* 属、*Aulacoseira* 属、*Skeletonema* 属、クリプト藻綱 *Cryptomonas* 属、渦鞭毛藻綱 *Dinophysis* 属の葉緑体に含まれる遺伝子に近縁な塩基配列のリード数が多かった。Cyanobacteria 門について目レベルで評価すると、2012 年 6 月、2013 年 5 月は *Synechococcales* 目のリード数が多く、それぞれ、89%、68% であった(図 14)。富栄養貯水池においてピコ植物プランクトンが植物プランクトン総量に占める割合は 10% 以下と小さいと報告されているが²⁾、本水域では、シアノバクテリアに限ってみると、割合が高い時期もあることが明らかとなった。2013 年 4 月は Nostocales 目が 53.6%、Pseudanabaenales 目が 24.9% を占めた。Nostocales 目として *Aphanizomenon flos-aquae* NIES81、Pseudanabaenales 目として、*Pseudanabaena* sp. PCC7402 に近縁な塩基配列のリード数がほとんどを占めた。2013 年 4 月は 2-MIB 濃度が 240ng/l と他の月よりも高く、*Pseudanabaena* sp. PCC7402 に近縁な藻類が 2-MIB の原因となっていると推察された。

Synechococcus 属としては、*Synechococcus* sp. PCC7009 および *Synechococcus* sp. PS680 が主要であった(図 15)。*Synechococcales* 目のリード数が多い 2012 年 6 月、2013 年 5 月は *Synechococcus* sp. PCC7009 に近縁な塩基配列のリード数がそれぞれ 42%、60% を占めた。*Synechococcus* sp. PCC7009 はピコシアノバクテリアの PC(Phycocyanin rich)type である³⁾。

E. 結論

長沢浄水場の工程水についてクローニングを行った結果、原水では *Synechococcus* sp. 0BB26S03 に近縁なクローンの割合が大きく、ろ過水では *Synechococcus* sp. MH305 に近縁なクローンの割合が大きくなる傾向があり、*Synechococcus* 属の種類によって処理工程における除去特性が異なる可能性が示唆された。月によっては真核藻類の葉緑体に含まれる遺伝子のクローンが多く検出され、真核藻類をターゲットとした解析の必要性が示唆された。工程水から 3 株のピコシアノバクテリアを分離し、そのうち一株は未培養の系統に位置する *Synechococcus* 属であることが明らかとなった。

次世代シーケンサーにより水道水源の微生物群集構造を門レベルから属レベルまで定量的に評価することが可能であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 論文発表

(1) 藤本尚志, 村田昌隆, 大西章博, 鈴木昌治, 矢島修, 岸田直裕, 秋葉道宏 (2013) 分子生物学的手法による浄水場における濁度障害原因生物の解明、水道協会雑誌, 82(5), pp.2-10.

2) 学会発表

(1) 水野恵伍, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 岡崎慎一, 岸田直裕, 秋葉道宏, 野田尚宏, 松倉智子, 関口勇地. クローニングおよび次世代シーケンサーによる宮ヶ瀬湖のピコシアノバクテリア群集構造解析. 第 48 回日本水環境学会年会; 2014 年 3 月; 仙台. 同講演集 (印刷中).

(2) 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 岸田直裕, 秋葉道宏, 村田直樹, 野田尚宏, 松倉智子, 関口勇地. 次世代シーケンサーによる鱈川の植物プランクトン生物相の評価. 第 48 回日本水環境学会年会; 2014 年 3 月; 仙台. 同講演集 (印刷中).

(3) 福田真美子, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 村田直樹, 岸田直裕, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による鱈川の植物プランクトン生物相の評価. 第 48 回日本水環境学会年会; 2014 年 3 月; 仙台. 同講演集 (印刷中).

(4) 遠藤沙紀, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による浄水場におけるろ過漏出障害原因生物の評価. 第 48 回日本水環境学会年会; 2014 年 3 月; 仙台. 同講演集 (印刷中).

(5) 小高千裕, 藤本尚志, 大西章博, 鈴木昌治, 藤瀬大輝, 岸田直裕, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による相模湖のピコシアノバクテリア生物相の評価. 第 48 回日本水環境学会年会; 2014 年 3

月; 仙台. 同講演集 (印刷中).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む.)

該当なし

I. 参考文献

1) Ivanikova, N. V., Popels, L. C., McKay, R. M. L., Bullerjahn, G. S., Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4055-4065 (2007).

2) 一柳淳一, 千葉信男, 後藤光亀, 須藤隆一: 水源貯水池における植物ピコプランクトンの出現実態、水環境学会誌, 20, 29-35(1997).

3) Crosbie, N. D., Pöckl, M., Weisse, T., Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer Sequence Analyses, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5716-5721 (2003).

表1 クローニングにより検出された OTU の近縁種とその推移
(は原水、 は沈澱水、 はろ過水で検出されたことを示す)

OTU名	近縁種	相同性(%)	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
OTU_1	<i>Synechococcus rubescence</i> SAG3.81	99.8-100												
OTU_2	<i>Synechococcus</i> sp. OBB26S03	98.8-99.7												
OTU_3	Uncultured <i>Synechococcus</i> sp. clone LS51	99.5-100												
OTU_4	<i>Synechococcus</i> sp. MH305	99.3-100												
OTU_5	<i>Synechococcus</i> sp. MW6B4	99.2-100												
OTU_6	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607K	98.6												
OTU_7	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607K	99.5-99.7												
OTU_8	<i>Synechococcus</i> sp. LBB3	99.7												
OTU_9	<i>Synechococcus</i> sp. PS721	99.8												
OTU_10	<i>Synechococcus</i> sp. MA0607A	99.5-100												
OTU_6、OTU_9は2012年に検出されたOTU														

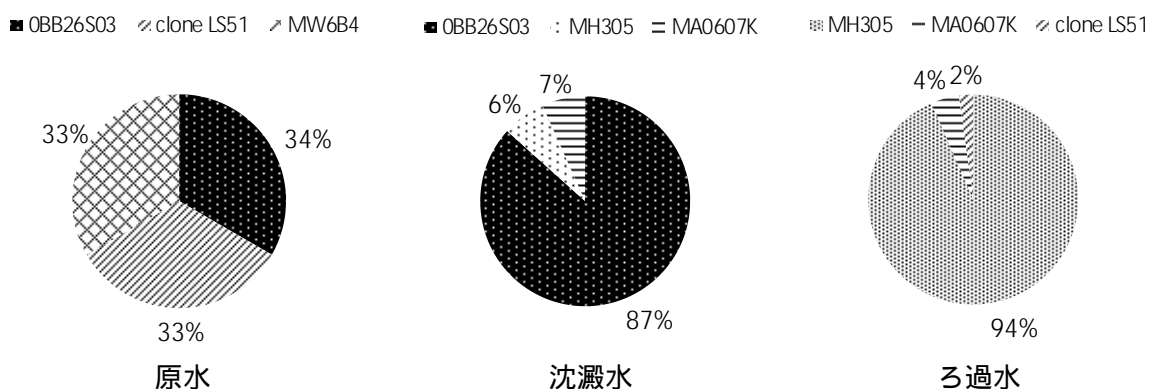


図1 長沢浄水場工程水から検出された *Synechococcus* 属の組成(2013年6月)

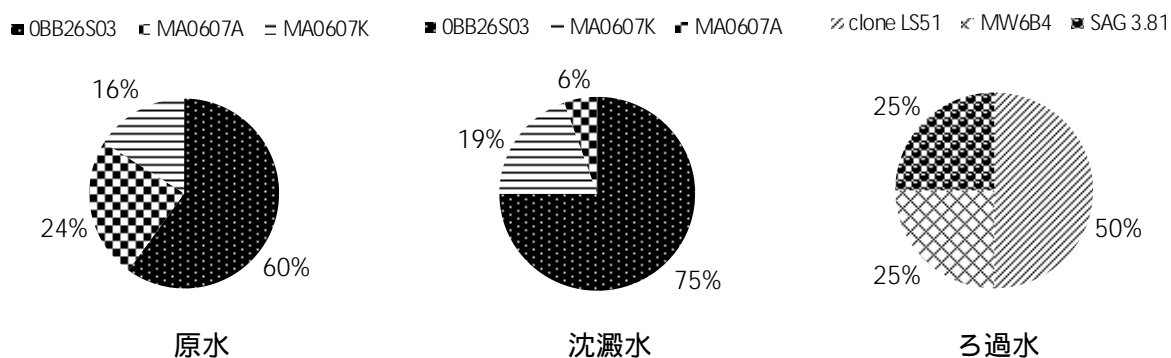


図2 長沢浄水場工程水から検出された *Synechococcus* 属の組成(2013年7月)

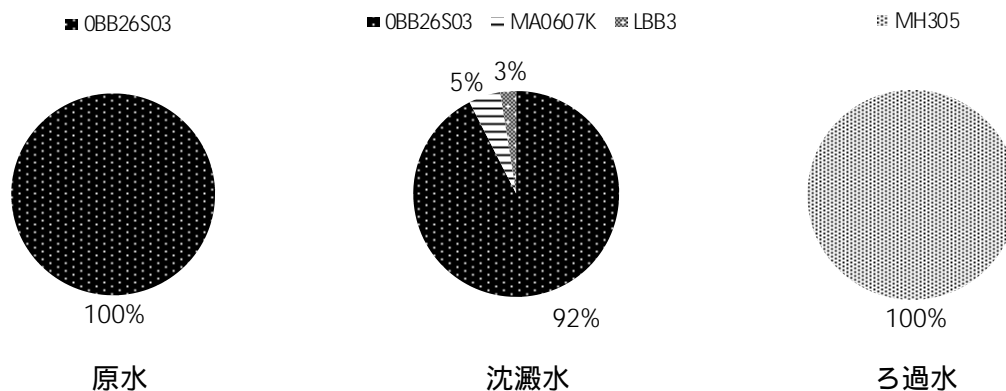


図3 長沢浄水場工程水から検出された *Synechococcus* 属の組成(2013年8月)

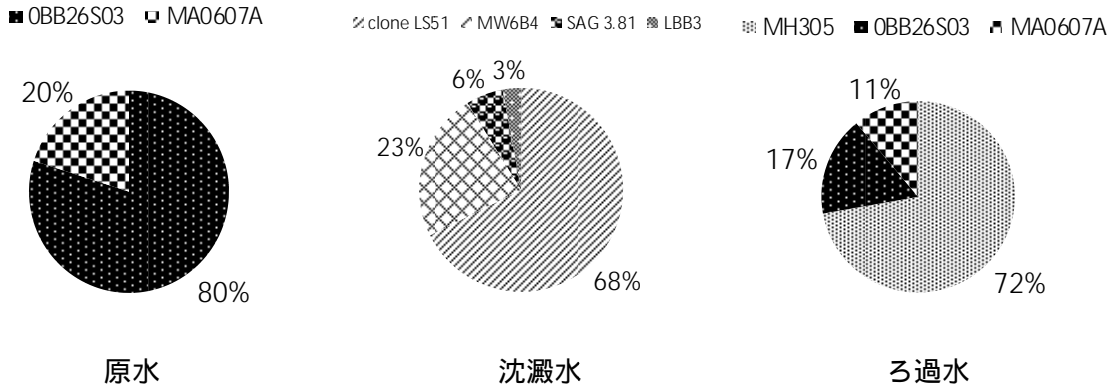


図4 長沢浄水場工程水から検出された *Synechococcus* 属の組成(2013年9月)

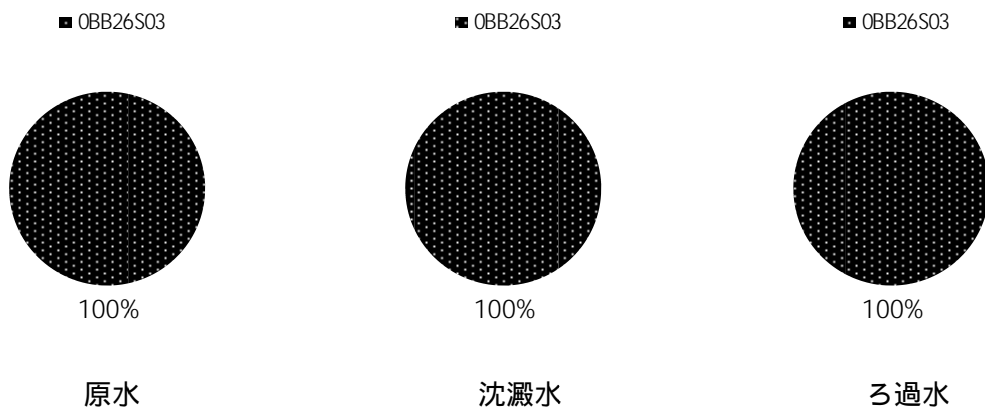


図5 長沢浄水場工程水から検出された *Synechococcus* 属の組成(2013年10月)

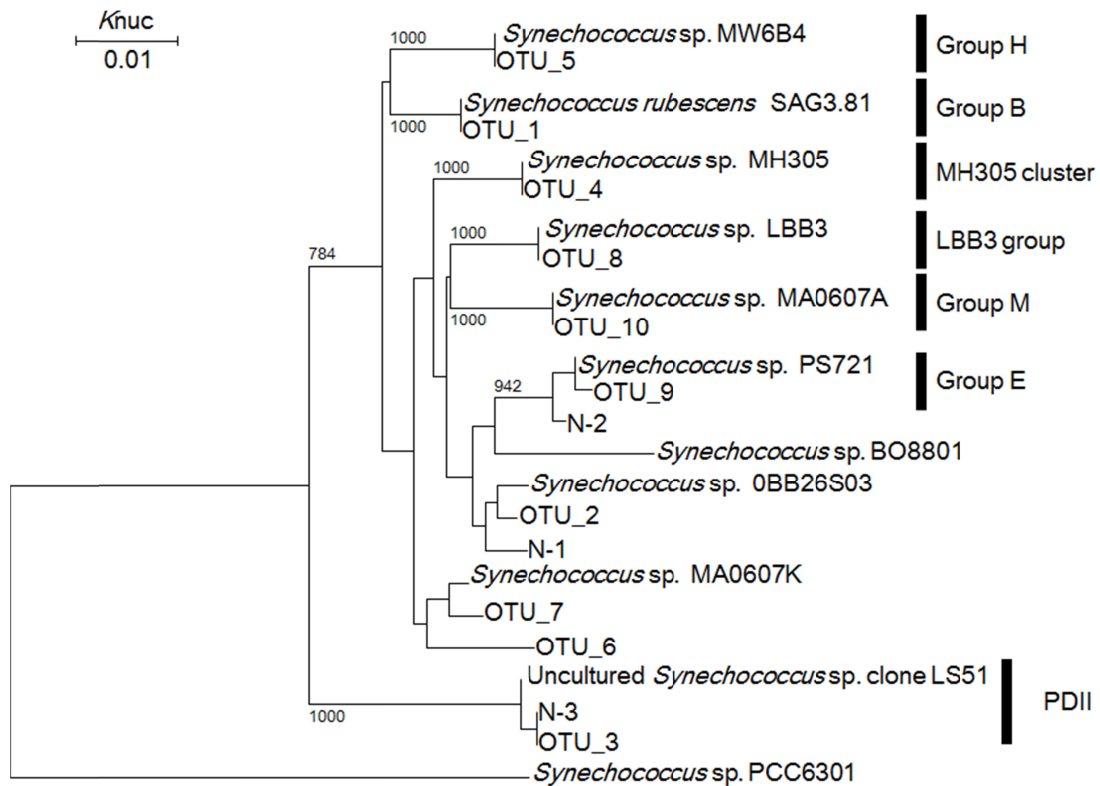


図6 長沢浄水場工程水から検出された OTU および分離株の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹、約 580 塩基に基づいて作成

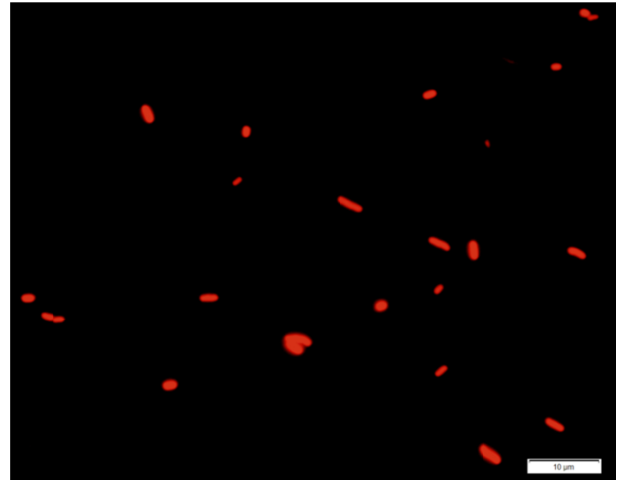
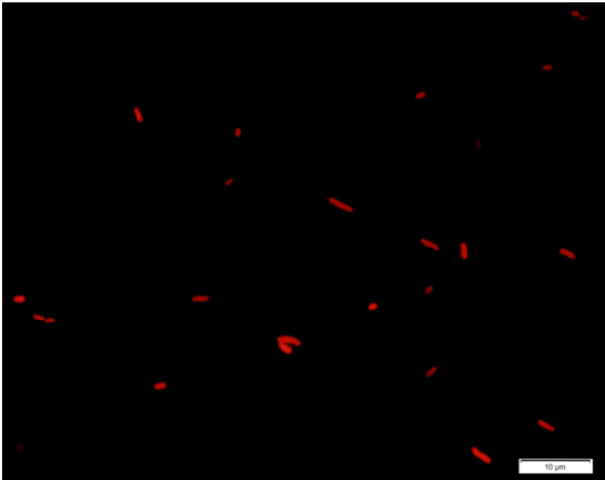


写真 1 長沢浄水場原水から分離した N-1 株の落射蛍光顕微鏡写真
(左:B 励起、右 G 励起、バーは 10μm)

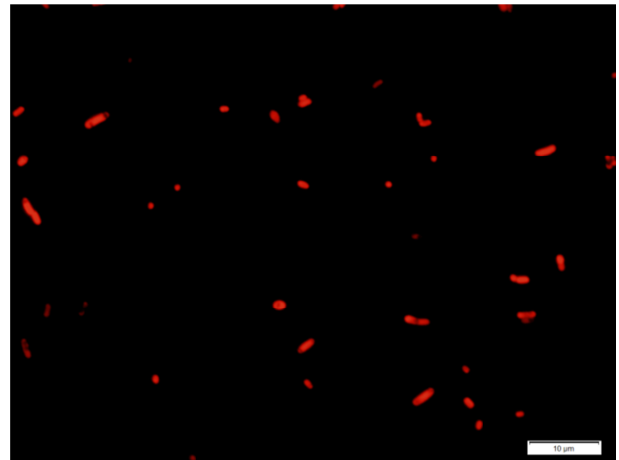
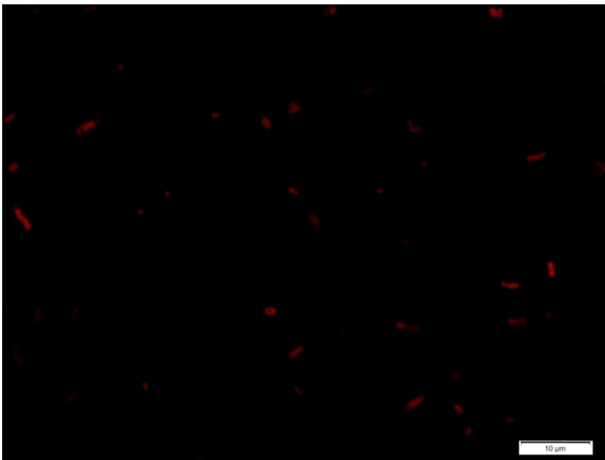


写真 2 長沢浄水場原水から分離した N-2 株の落射蛍光顕微鏡写真
(左:B 励起、右 G 励起、バーは 10μm)

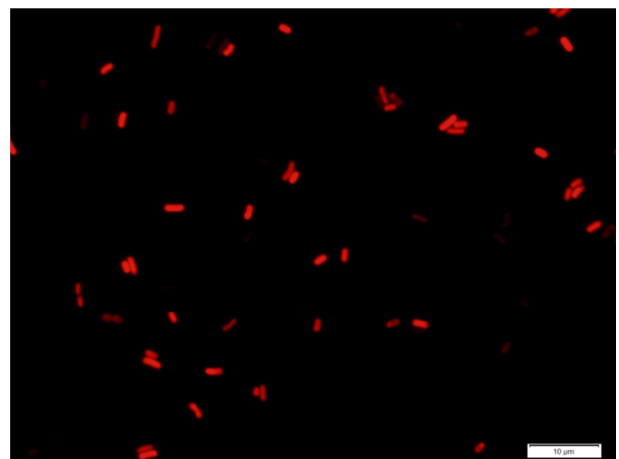
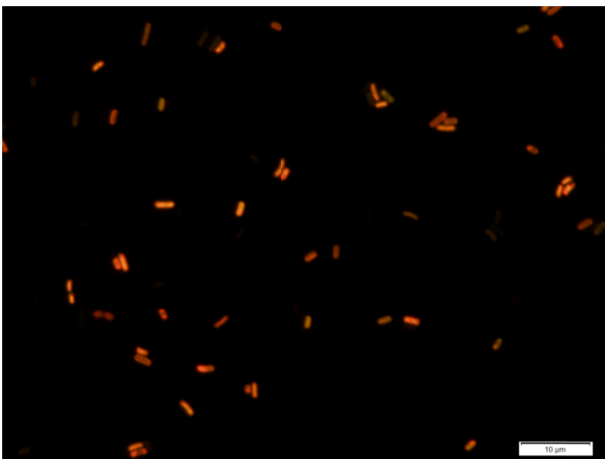


写真 3 長沢浄水場沈澱水から分離した N-3 株の落射蛍光顕微鏡写真
(左:B 励起、右 G 励起、バーは 10μm)

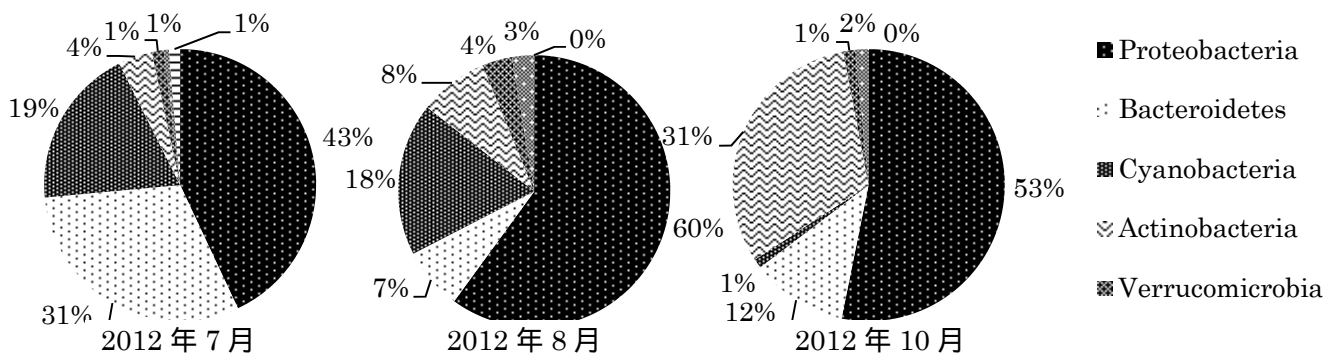


図7 草木湖の真正細菌の門レベルの組成

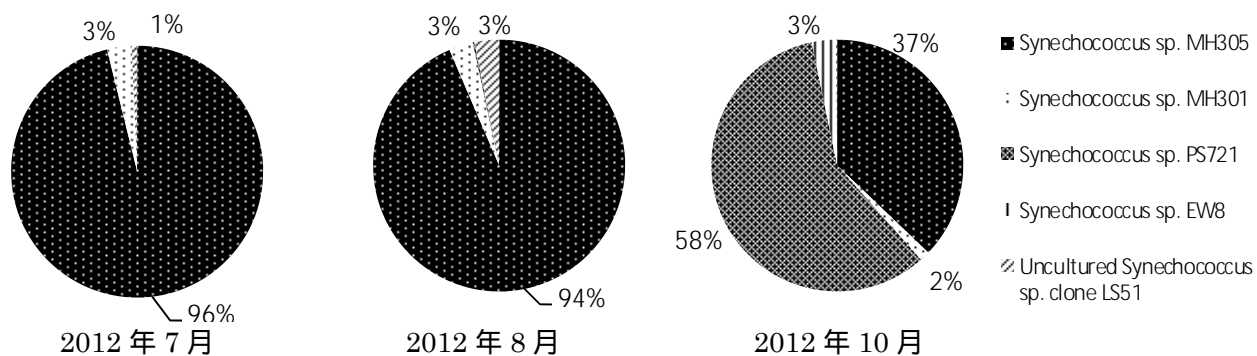


図8 草木湖の *Synechococcus* 属の組成

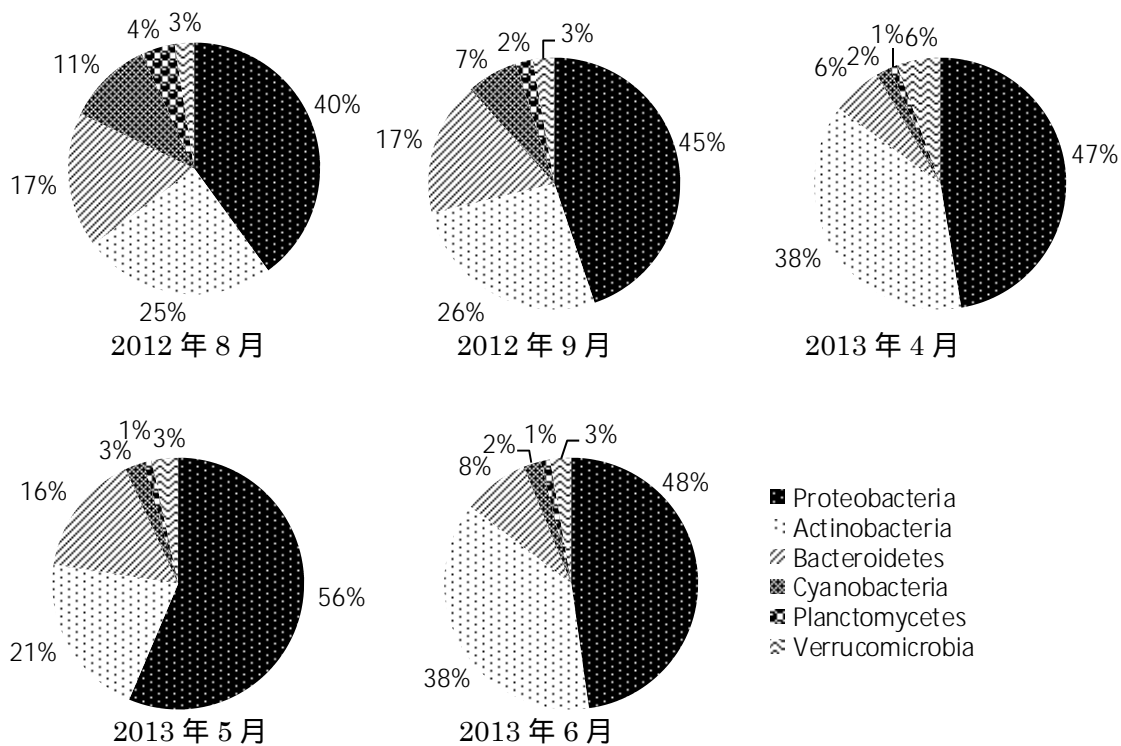


図9 宮ヶ瀬湖の真正細菌の門レベルの組成

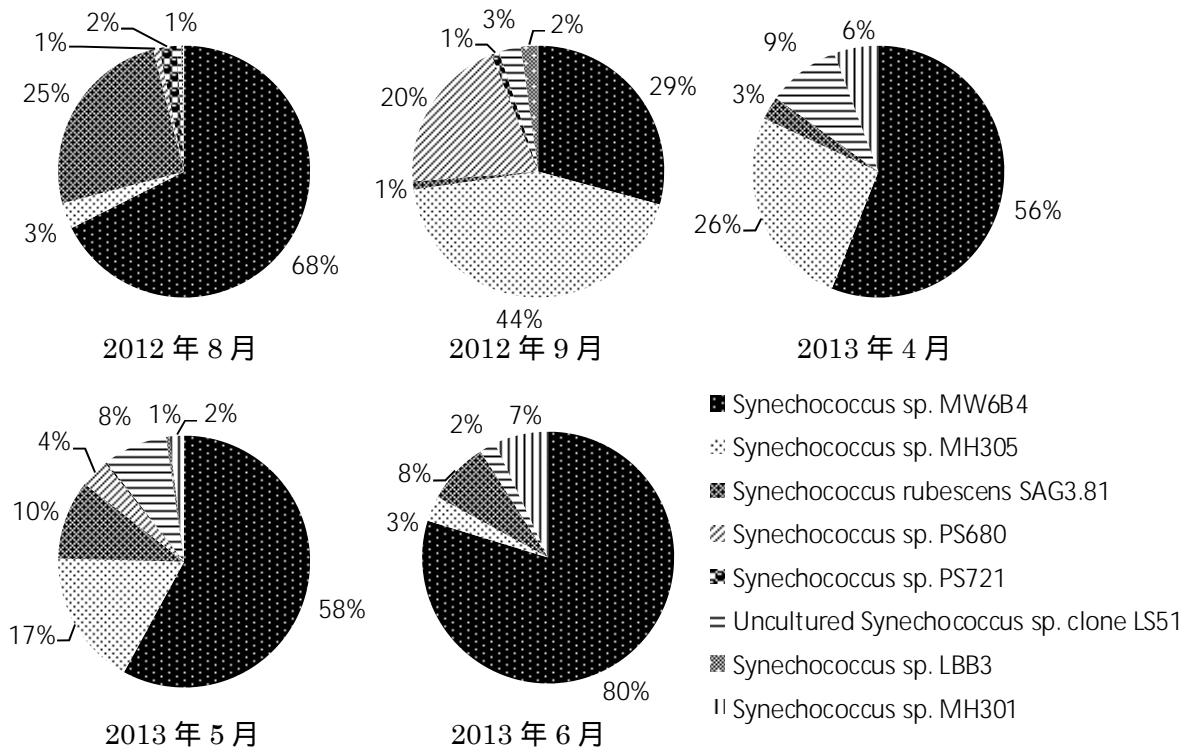


図 10 宮ヶ瀬湖の *Synechococcus* 属の組成

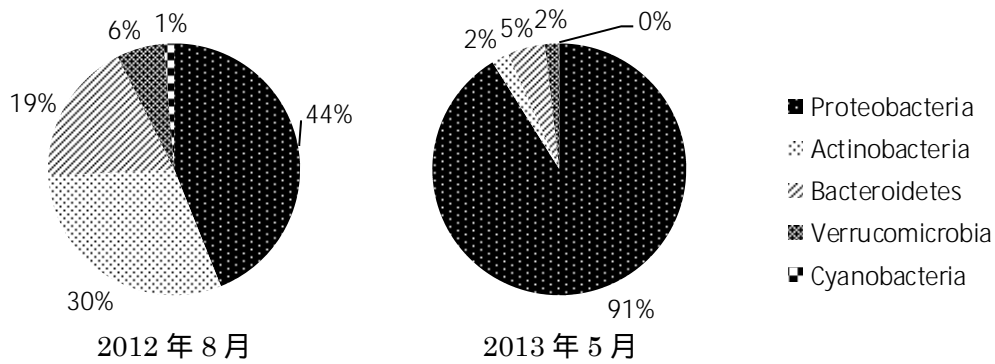


図 11 江戸川の真正細菌の門レベルの組成

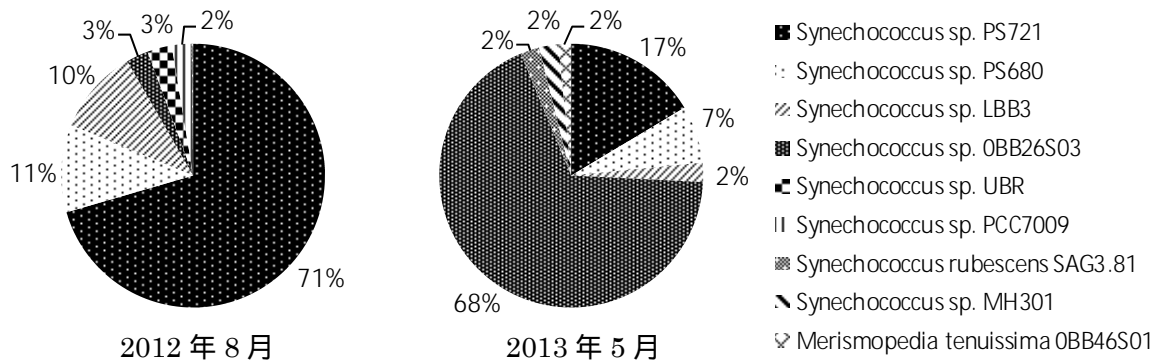


図 12 江戸川の *Synechococcus* 属の組成

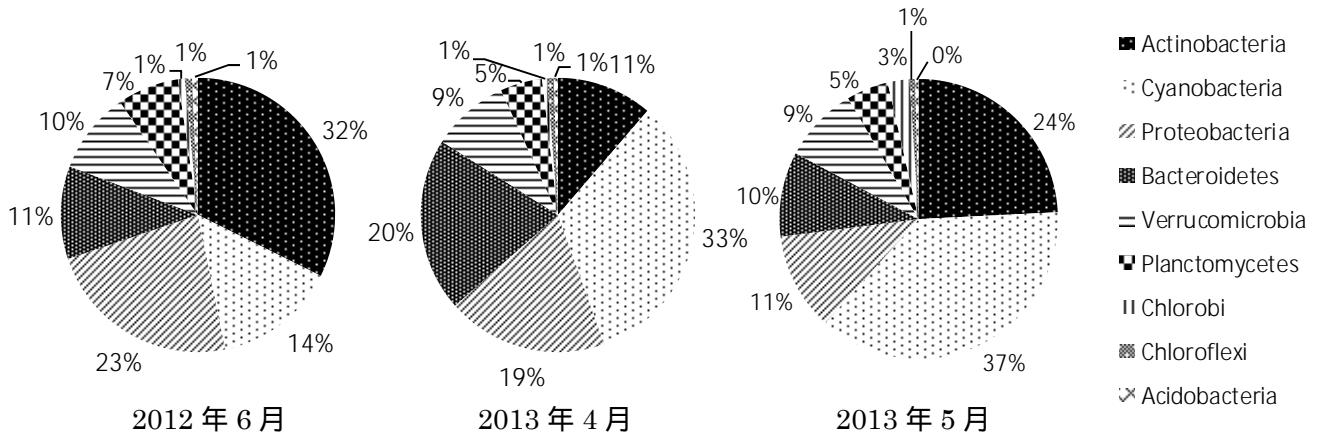


図 13 鱈川の真正細菌の門レベルの組成

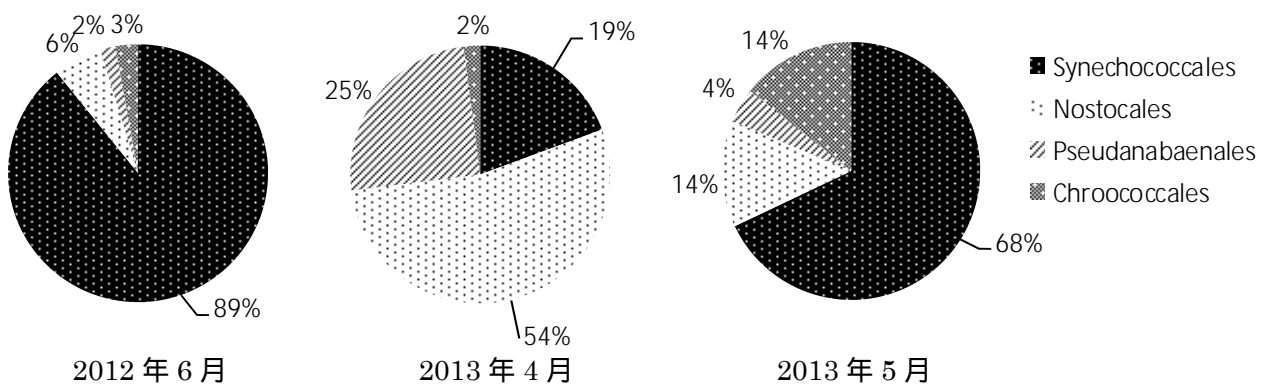


図 14 鱈川の Cyanobacteria 門の組成

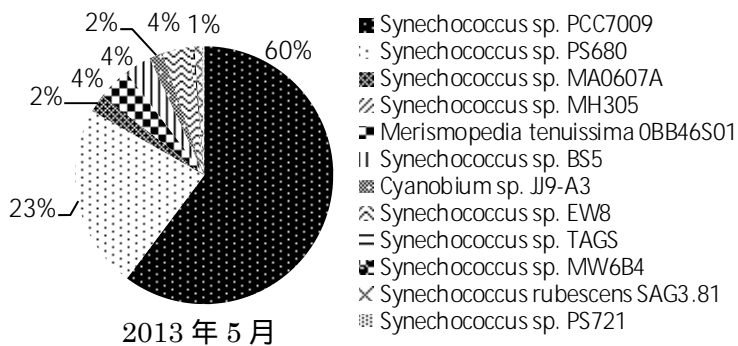
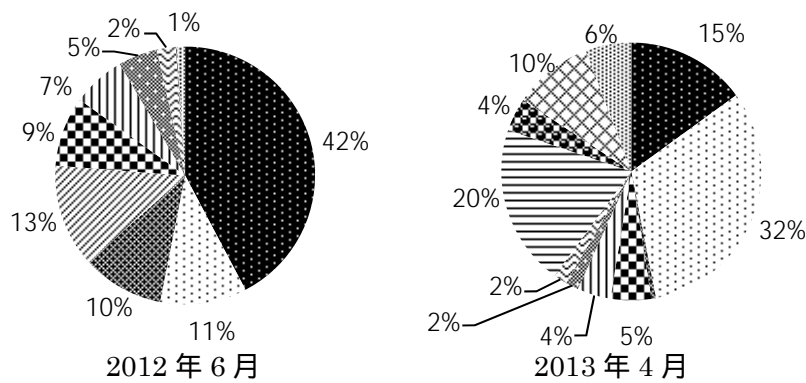


図 15 鱈川の *Synechococcus* 属の組成