

ダム貯水池におけるDNAを用いた動植物プランクトン等のモニタリング手法の開発に向けた研究

對馬育夫・山下洋正

1. はじめに

環境負荷の増大により湖沼やダム貯水池における水質の悪化が問題となっている。湖沼における環境基準達成率は約50%と低く、国土交通省および独立行政法人水資源機構が管理するダム貯水池においても、約3割が環境基準を満たしておらず、約4割のダム貯水池において、アオコやカビ臭等の富栄養化現象が確認されている¹⁾。ダム管理者は、「河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】V. 動植物プランクトン調査」²⁾に準じ、定期的に動植物プランクトンのモニタリングを行っているが、そのモニタリング方法に関しては、改善の余地が多く残されている。

現在、動植物プランクトンのモニタリングは、光学顕微鏡を使用した検鏡による同定が行われている。しかしながら、光学顕微鏡を用いた同定には、熟練した技術が必要な上、対応できる技術者も年々減少傾向にある。また、熟練者であっても、形態が似通ったプランクトンの同定は非常に困難で個人差が大きいといった問題点がある。また、カビ臭物質産生プランクトンやアオコの原因となる植物プランクトンは、主にシアノバクテリア（藍藻）に属す細菌であるが、シアノバクテリアは一般的な植物プランクトンより小さく、光学顕微鏡で同定できる種は非常に限られている。一方、近年、ゲノム解析技術の急速な発展により、次世代シーケンサー※（New Generation Sequencer：以下「NGS」という。）を使った大規模DNA塩基配列データの取得がより手軽に行えるようになってきている³⁾。

我々は、NGSを用いたDNA塩基配列に基づく安価で迅速な動植物プランクトンモニタリング解析手法の確立に取り組んでおり、従来のモニタリングでは貯水池の水質悪化現象を捉えられなかった部分を解明することで、水質の維持管理に有効な方法を提案することを目指している。本報では、



写真-1 次世代シーケンサー（NGS）外観

ダム貯水池の水試料に含まれる細菌および動植物プランクトンについて、NGSおよび光学顕微鏡による同定結果の比較について報告する。

2. 実験方法

2.1 対象試料

本研究では、2箇所のダム貯水池（Aダム及びBダムと表記。AダムはBダムの約50 km上流に位置している。Aダムは清澄、Bダムは比較的富栄養化が進んでいる）を対象に、堤体付近の水深50cmで採水（2L）した試料をNGSによる塩基配列解読及び光学顕微鏡による検鏡試験に供した。

2.2 次世代シーケンサー（NGS）による塩基配列解読

採水した試料500mLを孔径0.2μmのフィルターでろ過し、フィルターに捕集された残渣を回収しDNA抽出に供した。DNA抽出は、細菌や藻類から効率的にDNAを抽出でき、効果的にPCR阻害物質を除去できる市販のDNA抽出キットを用いた。一般的に、微生物種を同定する場合、細菌等の原核生物は16S rRNA遺伝子配列、動植物プランクトン等の真核生物は18S rRNA遺伝子配列をそれぞれ500～1,500塩基対程度解読する必要がある。そのため、NGSの前処理として、同

定に必要な塩基配列をPCRで増幅させ、解析対象のDNAを調整した。塩基配列を解読するNGSはイルミナ社製MiSeq（写真-1）を用いた。

2.3 光学顕微鏡による同定

採水した試料1Lを中性ホルマリンで固定し、光学顕微鏡を用いた検鏡試験を行い種の同定を行った。分析方法は「平成28年度版河川水辺の国勢調査マニュアル【ダム湖版】」に従った。実際の同定試験は、専門の業者へ委託して行った。

3. 結果と考察

3.1 NGSで同定された細菌

NGSを用いてAダム及びBダムで採水した試料に含まれる細菌由来のDNA配列を解析した。解析の結果、それぞれから約10万リード（取得データ量）分の塩基配列データを取得することができた。取得したリードを約20万種のDNA配列データが登録されているデータベース（細菌データ：約17万種、プランクトンデータ：約3万種）と照合し、それぞれの種を同定した。同定の結果、1リード以上検出された種はAダムで448種、Bダムで556種であり、Bダムの方が細菌種の多様性が高かった（図-1）。また、AダムとBダムから共通して検出された種は278種であった。NGSを使うことで、検出率（検出リード数/全取得リード数）が極めて低い種（0.001%程度）でも検出可能であることが示された。検出率が0.1%以上だった種は、Aダムで152種、Bダムで154種、共通して検出された種は100種であった（図-1）。

図-2に各ダムにおいて検出率が0.1%以上だった細菌の構成を示す。図の積み上げ棒グラフで色分けされた領域は、検出された種を示している。門レベルの比較において、各ダム貯水池間で検出率に大きな差はなかったが、ウェルコミクロビウム門は、Aダムでは検出率が約20%を占めたのに対して、Bダムでは検出率が約10%だった。ウェルコミクロビウムは未分離培養株が多く生理生態が不明な種も多いが、メタン酸化細菌が含まれることが知られている⁴⁾。Aダムからは、同様にメタン酸化細菌として知られるガンマプロテオバクテリア綱メチロバクター属(*Methylobacter* sp.)が比較的多く検出されたことから、メタン酸化細菌の生育に適した環境になっていることが示唆された⁵⁾。また、シアノバクテリア門からはアオコ

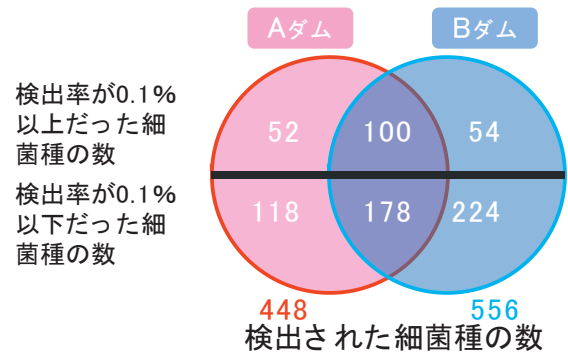


図-1 NGSで同定された各ダムにおける細菌種数

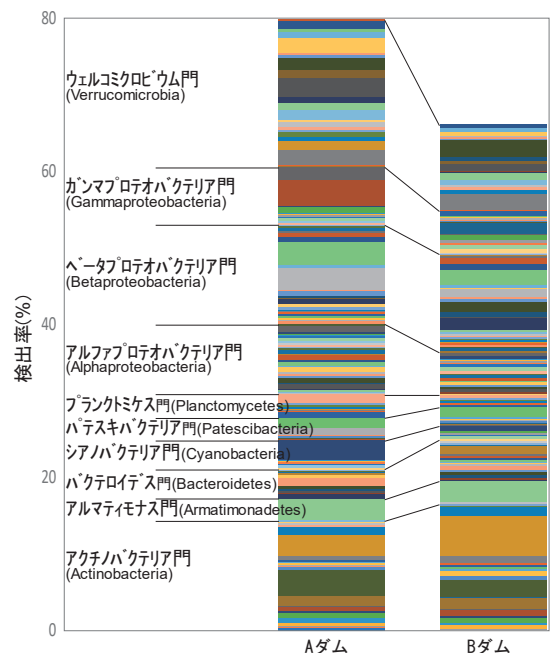


図-2 NGSで同定された各ダムにおける細菌構成（検出率0.1%以上）

やカビ臭の原因となる種は検出されず、シネココッカスに近縁な種（*Synechococcus* sp.）が検出された。

3.2 NGSで検出されたプランクトン

細菌と同様、プランクトン種について、試料に含まれるプランクトン由来のDNA配列を解析した。解析の結果、それぞれから約30万リードを取得することができた。同定の結果、1リード以上検出された種はAダムで385種、Bダムで365種とほぼ同数だったが、検出率が0.1%以上だった種を比較した場合、Aダムの方が若干多い結果となった（Aダム：226種、Bダム：193種）（図-3）。図-4に各ダムにおいて検出率が0.1%以上だったプランクトン種の構成を示す。検出率が0.1%以上だった種を合計すると、Aダムでは全体の約

95%、Bダムでは約70%に相当した。細菌の結果同様、Bダムでは検出率が0.1%に満たない種が占める割合がAダムより大きかった。各構成に関して、Aダムからは系統的に門の異なるプランクトンが比較的均衡して検出されていたが、Bダムからは珪藻の一種であるニセコアミケイソウ (*Thalassiosira* sp.) が全体の約16%の割合で検出された (図・4の☆印)。

3.3 光学顕微鏡による同定結果とNGSとの比較

Aダム及びBダムにおける光学顕微鏡による同定結果を表-1に示す。光学顕微鏡による同定では、各ダムから16種ずつ、計25種の細菌・プランクトン (細菌1種、プランクトン24種) が同定された。それらのNGSでの検出状況もあわせて表-1に示す。NGSでは、細菌を726種、プランクトンを522種同定できたことから、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGSで検出されたことになる。今回、光学顕微鏡で同定された25種のうち、16種については、NGSで同種が検出された。また、7種については、解析に用いたデータベース上に登録のない種であったため、同種は検出されなかったが、その近縁種が検出されていたことから、データベースを更新することにより検出されるものと考えられる。珪藻の一種である *Stephanodiscus* sp. に関しては、光学顕微鏡では非常に多く検出されたのに対して、NGSではわずかししか検出されなかった。一方、NGSでは、この珪藻と近縁な *Thalassiosira* sp. が多数検出されていたため、*Thalassiosira* sp. が光学顕微鏡では *Stephanodiscus* sp. と誤同定されていた可能性が考えられる。ミドリムシ藻 (ユーグレナ藻) である *Trachelomonas* sp. に関しては、光学顕微鏡ではある程度観察されたのに対して、NGSでは全く検出されなかった。この種はデータベース上にも登録されており、近縁種も検出されていなかったことから、NGSの前処理の段階で、DNAが抽出されなかった、PCRでDNAが増幅されなかった等の問題が生じていた可能性が考えられることから、今後、詳細な調査・検討が必要である。

4. おわりに

本研究では、ダム貯水池の水試料に含まれる細菌および動植物プランクトンについて、NGSおよび光学顕微鏡による同定結果を比較した。その

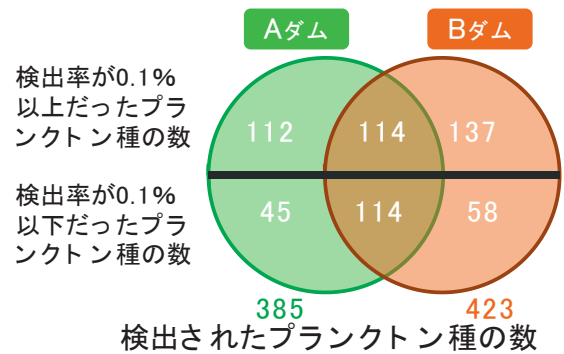


図-3 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン種数

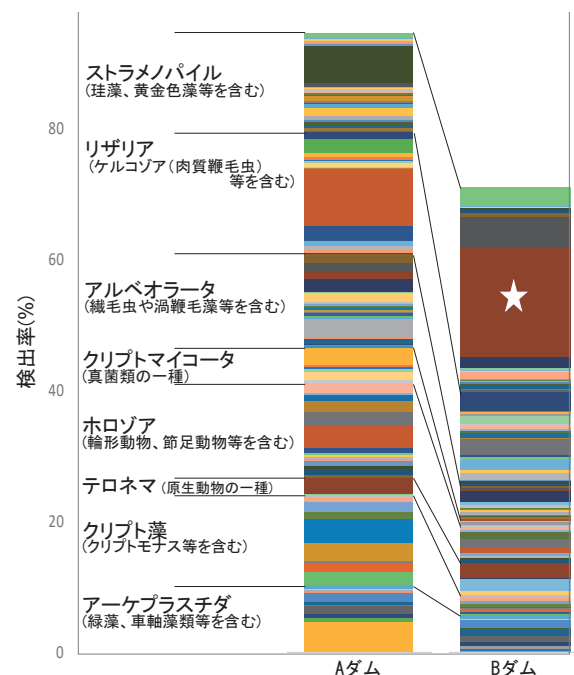


図-4 NGSで同定された各ダムにおけるプランクトン構成

結果、光学顕微鏡で同定されなかった多くの種が、NGSで検出されたことを確認した。また、光学顕微鏡で同定された種はNGSではほぼ検出可能であった。今後、本技術が確立すれば、ダム貯水池における微生物由来の水質変化現象 (アオコ、カビ臭、淡水赤潮等) に対して、簡便で迅速、低コストで発生原因や発生箇所を特定することができる。また、水質変化予測に活用することも見込まれ、ダム貯水池の効率的な水質の維持管理が期待される。

表-1 光学顕微鏡により同定された種とそれらのNGSによる検出状況の比較

門・綱	種名	Aダム		Bダム		備考
		顕微鏡	NGS	顕微鏡	NGS	
シアバクテリア綱	<i>Synechococcus</i> sp.	○	○		○	
黄金色藻綱	<i>Chrysococcus</i> sp.		○	○	○	
珪藻綱	<i>Discostella stelligera</i>	○	○		○	
珪藻綱	<i>Skeletonema</i> sp.			○	○	
珪藻綱	<i>Stephanodiscus</i> sp.		△	○	△	△: 検出された <i>Stephanodiscus</i> sp. はわずかなが、近縁種である <i>Thalassiosira</i> sp. が多数検出
珪藻綱	<i>Aulacoseira ambigua</i>	○	○	○	○	
珪藻綱	<i>Aulacoseira granulata</i>			○	○	
珪藻綱	<i>Aulacoseira pusilla</i>			○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
珪藻綱	<i>Melosira varians</i>			○	○	
珪藻綱	<i>Acanthoceras zachariasii</i>	○	○			
珪藻綱	<i>Asterionella formosa</i>	○	△	○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
珪藻綱	<i>Fragilaria</i> sp. (cf. <i>asterionelloides</i>)	○	○		○	
珪藻綱	<i>Fragilaria</i> sp. (single cell)	○				
ミドリムシ藻綱	<i>Trachelomonas</i> sp.			○	未検出	未検出: NGSでは検出されなかった
緑藻綱	<i>Yamagishiella unicocca</i>			○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
緑藻綱	<i>Spondylosium planum</i>	○	△			△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
肉質鞭毛虫門	<i>Trinema</i> sp.	○	○			
繊毛虫門	<i>Coleps</i> sp.	○	○		△	△: わずかに検出
繊毛虫門	<i>Tintinnopsis</i> sp.		△	○	○	△: わずかに検出
輪形動物門	<i>Keratella cochlearis</i> f. <i>macracantha</i>	○	△	○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
輪形動物門	<i>Polyarthra</i> sp. (cf. <i>remata</i>)	○	△	○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が多数検出
輪形動物門	<i>Synchaeta</i> sp.	○	○			
輪形動物門	<i>Filinia longiseta</i>	○	○			
節足動物門	<i>Cyclopoida</i> sp.	○	○	○	○	
節足動物門	<i>Copepoda</i> sp.	○	○	○	○	
節足動物門	<i>Bosmina tanakai</i>			○	△	△: 同種はデータベースに存在していないが近縁種が検出

謝 辞

本研究を遂行するにあたり試料を提供頂いた関係者の方々、NGSデータ取得・解析に協力頂いた水質チーム非常勤職員 沼尻いく子氏、インターンシップ生 塚田健人氏に、謝意を表する。

参考文献

- 1) 国土交通省：ダム貯水池水質改善の手引き、pp.1～105、2018.3
- 2) 国土交通省：河川水辺の国勢調査基本調査マニュアル【ダム湖版】Ⅴ 動植物プランクトン調査編、pp.1～56、2016.1
- 3) 野田尚宏、関口勇地：次世代DNAシーケンシング技術による環境中の複合微生物相解析の現状と今後の展望、水環境学会誌、35 (9)、pp.290～297、2012
- 4) 玉木秀幸：培養アプローチで切り拓く未知微生物の新機能、環境バイオテクノロジー学会誌、14 (2)、pp. 87～98、2015

- 5) O. Nercessian, E. Noyes, M. G. Kalyuzhnaya, M. E. Lidstrom, L. Chistoserdova: Bacterial populations active in metabolism of C1 compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11) pp. 6885-6899, 2005

對馬育夫



土木研究所水環境研究グループ水質チーム 主任
研究員、博士(工学)
Dr. TSUSHIMA Ikuo

山下洋正



土木研究所水環境研究グループ水質チーム 上席
研究員
YAMASHITA Hiromasa