

琵琶湖・淀川水質保全機構  
令和4年度 水質保全研究助成 成果報告会



# 高解像度メタバーコーディング手法で描く 琵琶湖・淀川水系における病原細菌群の全容

京都大学大学院 工学研究科  
中西 智宏

# 背景 | 微生物リスクの評価と管理

これまでの助成研究  
における対象微生物

- 細菌
  - レジオネラ
  - カンピロバクター
  - 薬剤耐性菌
- ウイルス
  - アデノウイルス
- 原虫
  - クリプトスポリジウム
  - ジアルジア

など

定量的微生物リスク評価(QMRA)

対象微生物の決定

水中濃度の調査

曝露評価

感染確率の推定

「当たりをつけた」  
評価とならざるを得  
ない  
(重要な病原体を見  
逃す可能性)

**病原微生物のスクリーニング技術が  
リスク評価の精緻化に有用**

本研究の対象：病原細菌

# 背景 | 既存の遺伝子解析手法の限界

有望な手法：

## 16S rDNAメタバーコーディング

- 16S rRNA遺伝子を網羅解読  
→ 大量の菌種を同時検出できる
- 病原性の判断：「種」レベルまでの推定が必要
- 既存の手法：属レベルまでの推定が限界



DNAメタバーコーディングにおける**分類解像度の向上**が必要

例：細菌の分類階級

分類階級	分類名
界	<i>Bacteria</i>
門	<i>Proteobacteria</i>
綱	<i>γ-Proteobacteria</i>
目	<i>Legionellales</i>
科	<i>Legionellaceae</i>
属	<i>Legionella</i>
種	<i>L. pneumophila</i>
血清型など	(SG1)

# 背景 | ロングリードによる分類解像度の向上

## ショートリード (従来法)

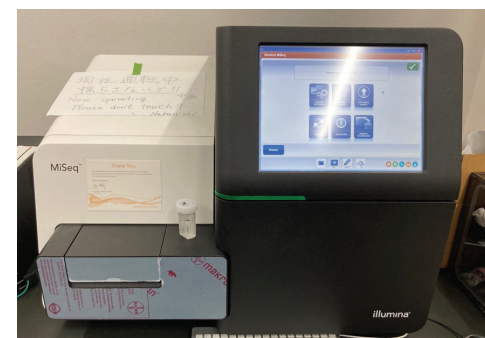
塩基長 : ~500 bp (16S rDNAの部分配列)



情報量が限られる

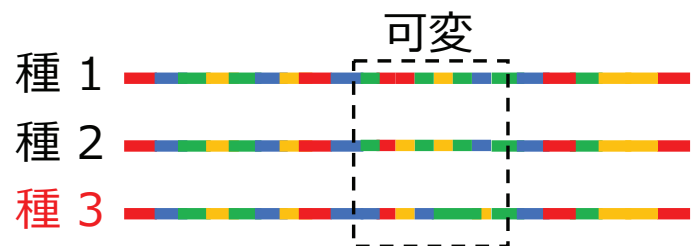
病原種の識別が困難

## 従来型NGS (Illumina社Miseq)



## ロングリード (本研究で用いる手法)

塩基長 : 1500 bp (16S rDNAの全長配列)



情報量が多い

種レベルまで推定  
できる可能性

## ロングリード型NGS



Oxford Nanopore Technologies社  
公式HPより

## 背景 | 昨年度の進捗と課題

桂川水系の河川水に対して、ロングリード型NGSを用いたメタバーコーディング手法を適用

- 同定精度に問題あり (次スライド)
- ロングリード型NGSの**解読エラー**が原因

AGCTTGA

真の配列

→



→ AG**G**TT**G**C

解読された配列

読み間違い

→ 解読エラーの補正によって検出精度の向上が見込まれる

# 研究目的と概要

目的：

琵琶湖・淀川水系における病原細菌を網羅的に検出し、微生物リスクの分布を可視化すること

## 1. 分析手法の改良

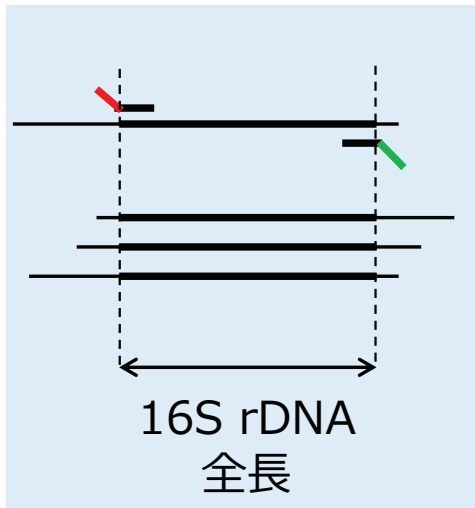
- 完全長16S rDNAを対象としたメタバーコーディング法に  
エラー補正手法を導入
- 標準試料によって検出感度・精度をチェック

## 2. 手法の適用

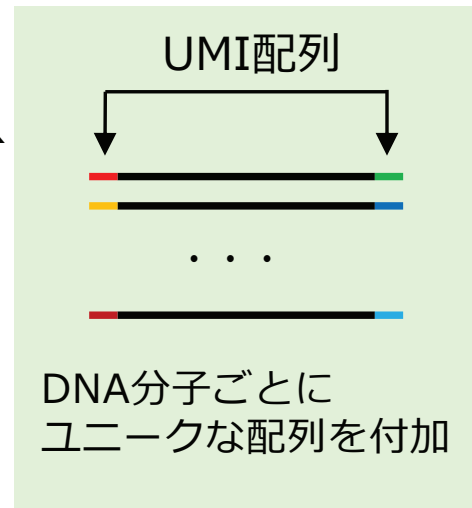
河川の流下過程、下水処理水の放流による影響を把握

# 改善策 | Unique Molecular Identifier (UMI) 法

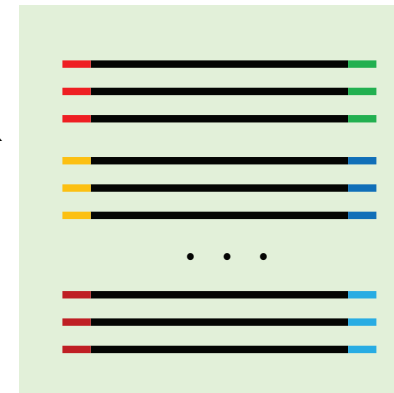
環境水からの抽出DNA



PCR



PCR



参考：  
Karst et al. (2021) *Nat. Methods*,  
18(2), 165-169

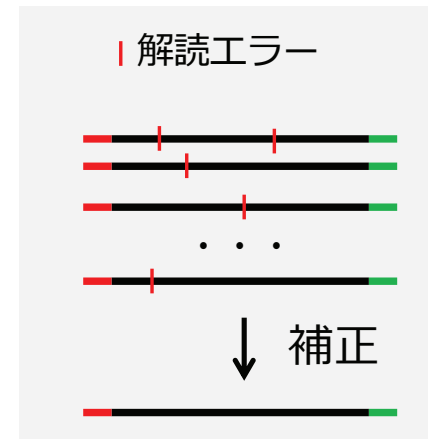
塩基配列  
の解読



使用機器：  
MinION Mk1b  
Flow cell R.10.4.1  
(Oxford Nanopore  
Tech.社)

UMI配列：  
16個のランダム塩基  
を含む人工配列

データ解析：  
UMIごとにリードを  
まとめてエラー補正



# 方法 | 標準DNA試料

既知の細菌種由来のDNAが既知の濃度  
で混合された標準試料

使用製品：

NBRC Microbial DNA Cocktail

(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)

学名	16S rDNAの存在割合 (理論値) (%)
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	6.3
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	10.5
<i>Bacteroides uniformis</i>	4.2
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	5.3
<i>Clostridium butyricum</i>	11.6
<i>Comamonas terrigena</i>	7.4
<i>Corynebacterium striatum</i>	4.2
<i>Cutibacterium acnes subsp. acnes</i>	3.2
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	5.3
<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	7.4
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	8.4
<i>Parabacteroides distasonis</i>	7.4
<i>Pseudomonas putida</i>	7.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6.3
<i>Streptococcus mutans</i>	5.3



# 方法 | ライブラリ調製・データ取得

標準試料/環境水  
からの抽出DNA

ライブラリ調製  
+  
データ取得

データ解析

PCR(1回目) : UMI付加

増幅領域 : 16S rDNA全長

PCR酵素 : Platinum SuperFi II DNA Polymerase (ThermoFisher)

サイクル数 : 2

精製

PCR(2回目) : 増幅

サイクル数 : 25

DNAライブラリ

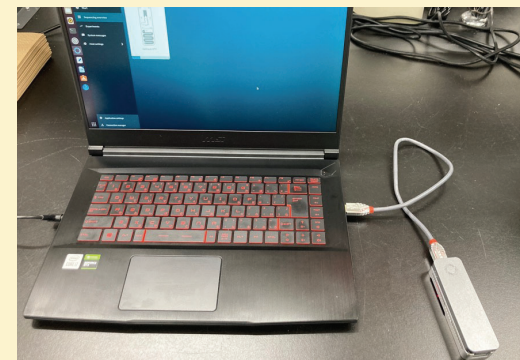
精製

シーケンシング

使用機種 : MinION MK1B + Flow cell R10.4.1

(Oxford Nanopore Tech.社)

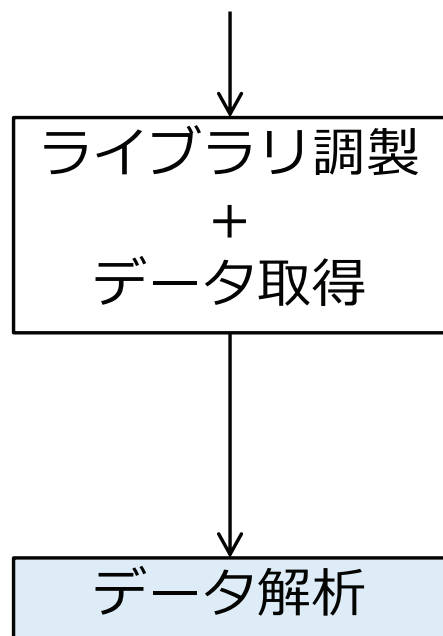
取得リード数 : 約100万リード/サンプル



# 方法 | データ解析

- 1) Krehenwinkel et al. (2019) *Giga-Science*, 8(5)
- 2) Karst et al. (2021) *Nat. Methods*, 18(2), 165-169
- 3) Oxford Nanopore Technologies社
- 4) Seol et al. (2022) *Micobiology Spectrum*, e02017-21.

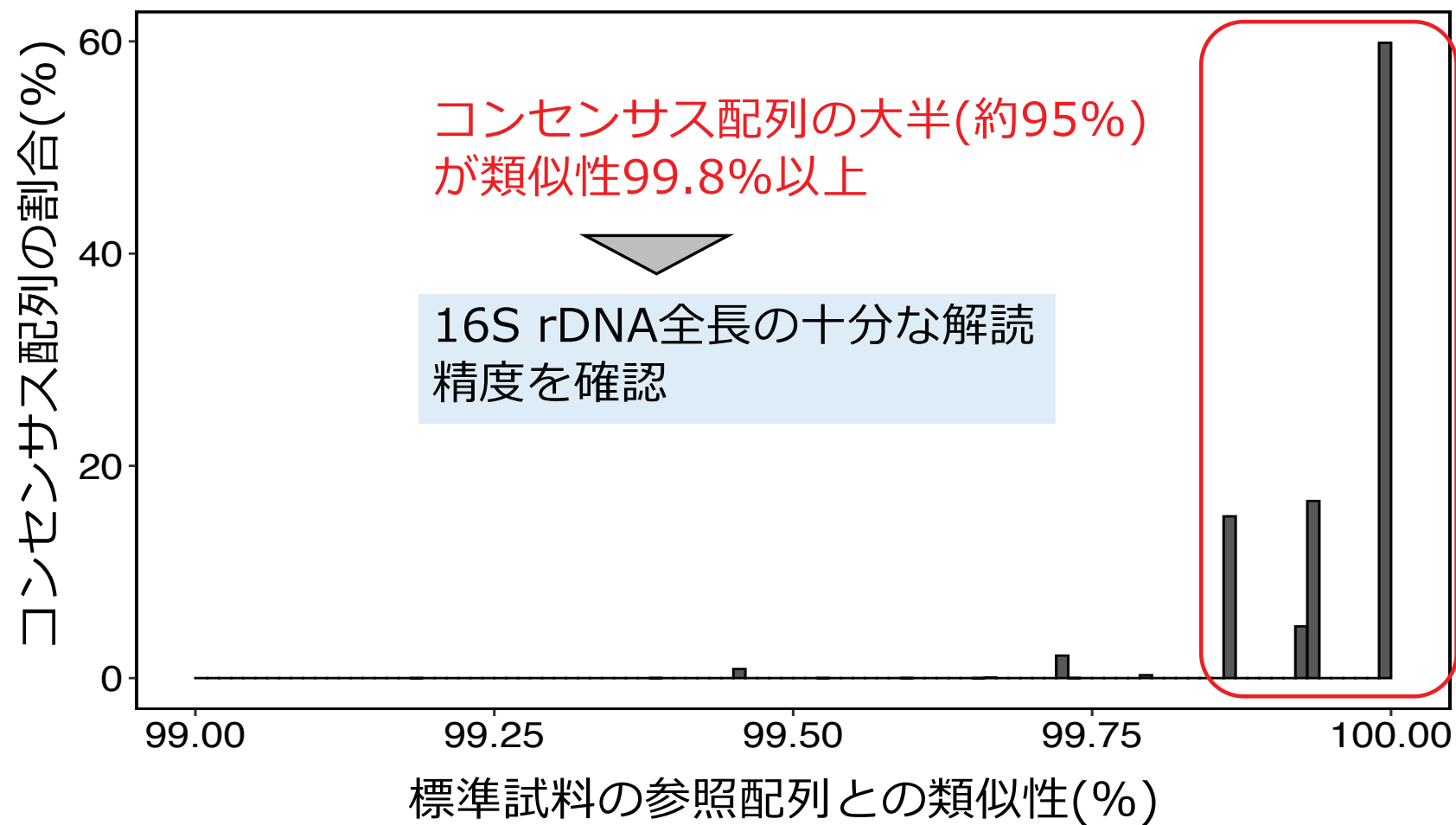
標準試料/環境水  
からの抽出DNA



1. ベースコール(Guppy ver 6.3.4)  
デマルチプレックス(minibar<sup>1</sup>)
2. **解読エラーの補正**(longread\_umi<sup>2</sup>, madaka<sup>3</sup>)  
→ **コンセンサス配列**の生成
3. BLAST検索  
照合データベース: MIRROR<sup>4</sup>)  
→ 上位の複数ヒットから最小共通祖先を取得

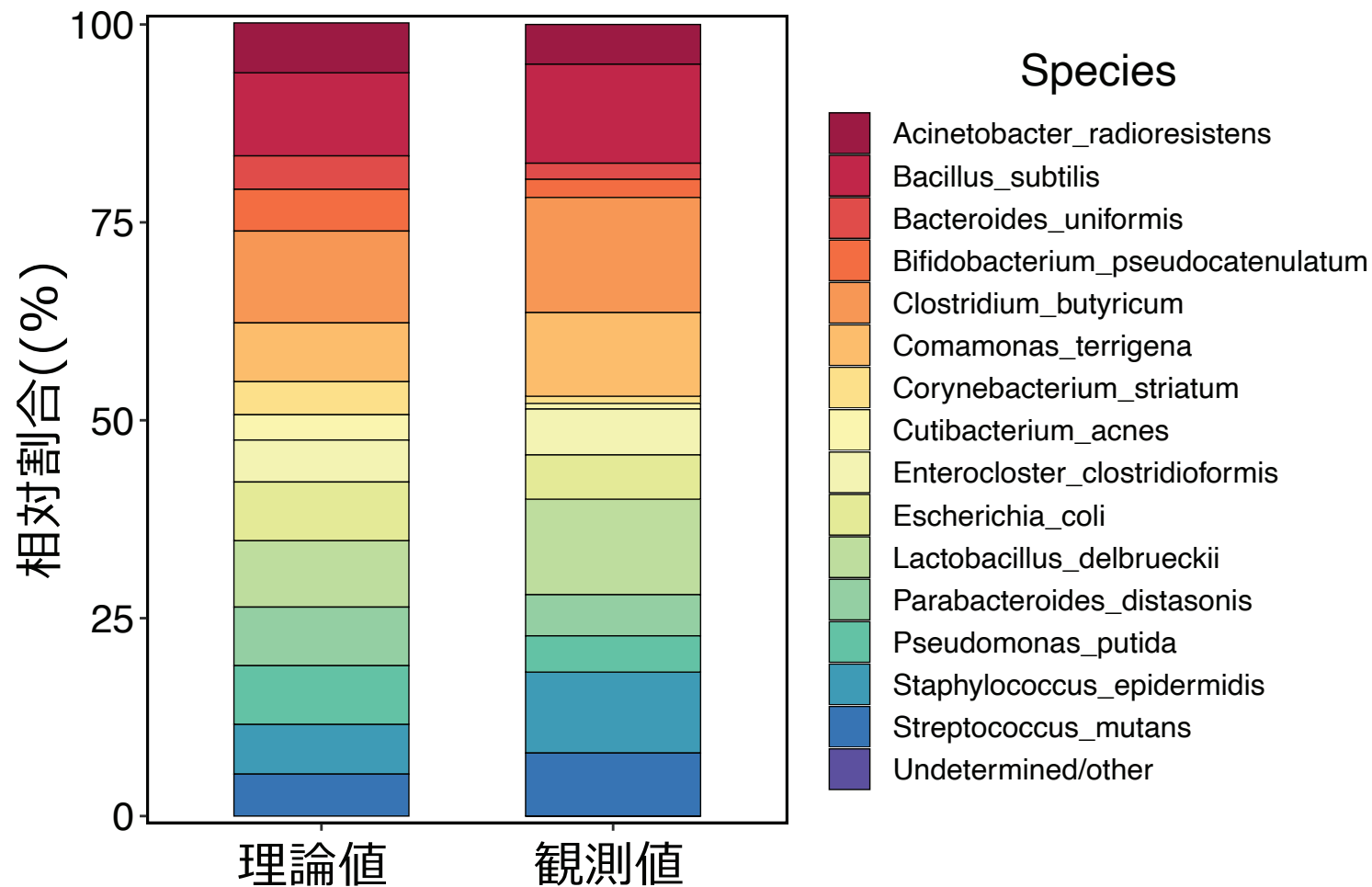
# 結果 | 解読エラーの補正精度

コンセンサス配列数：34678本



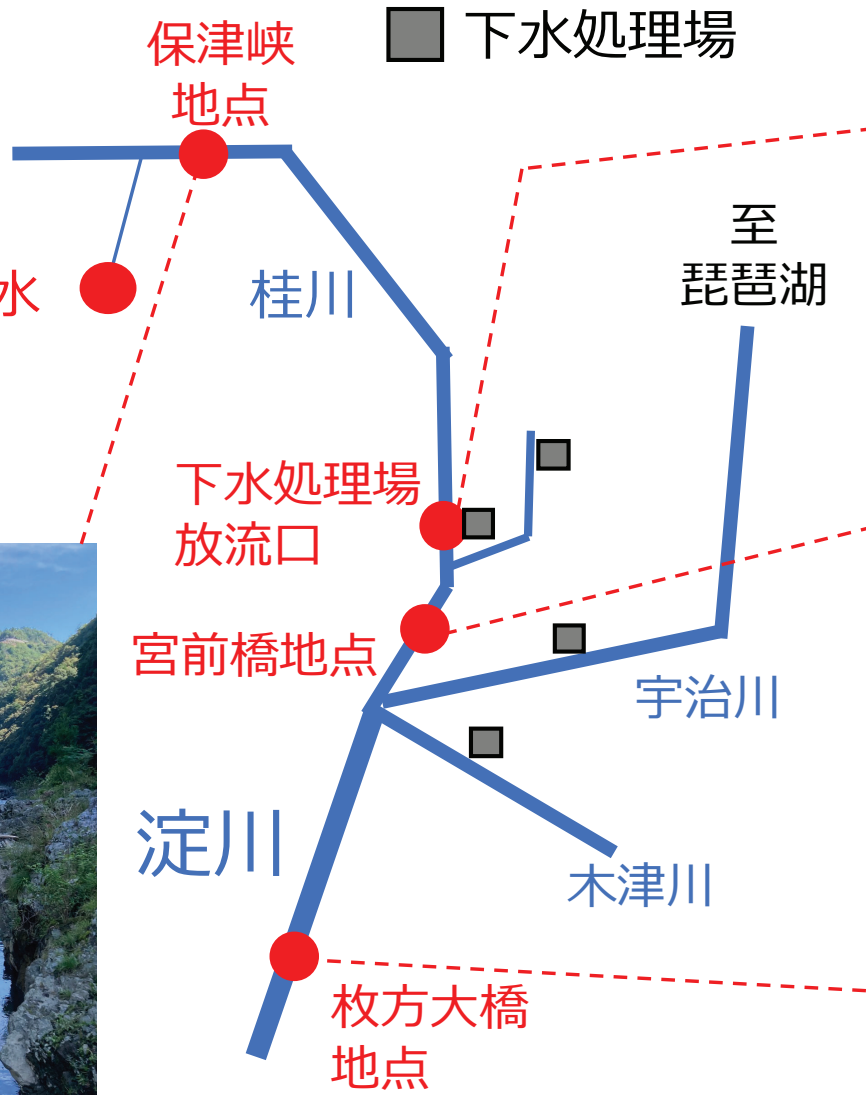
# 結果 | 種の相対割合 (理論値 vs 測定値)

- 15種全て種レベルまで分類群名を正しく推定できた
- 種まで推定できない/誤検出されたリードは5リードのみ  
(計34678リード中)
- 種の組成もほぼ正しく推定可能



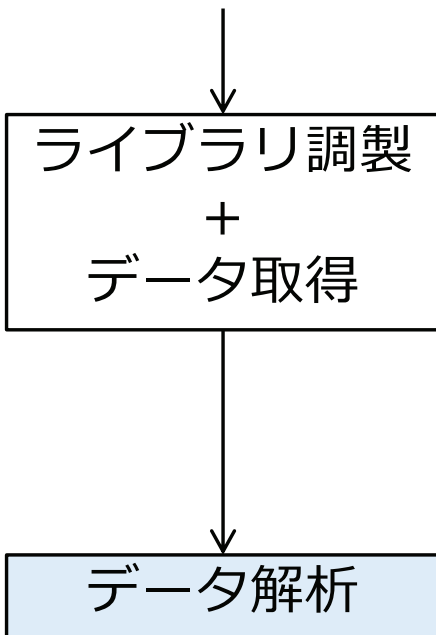
# 桂川～淀川水系における病原細菌の一斉検出

# 調査地点



# 方法 | データ解析 (再掲)

標準試料/環境水  
からの抽出DNA



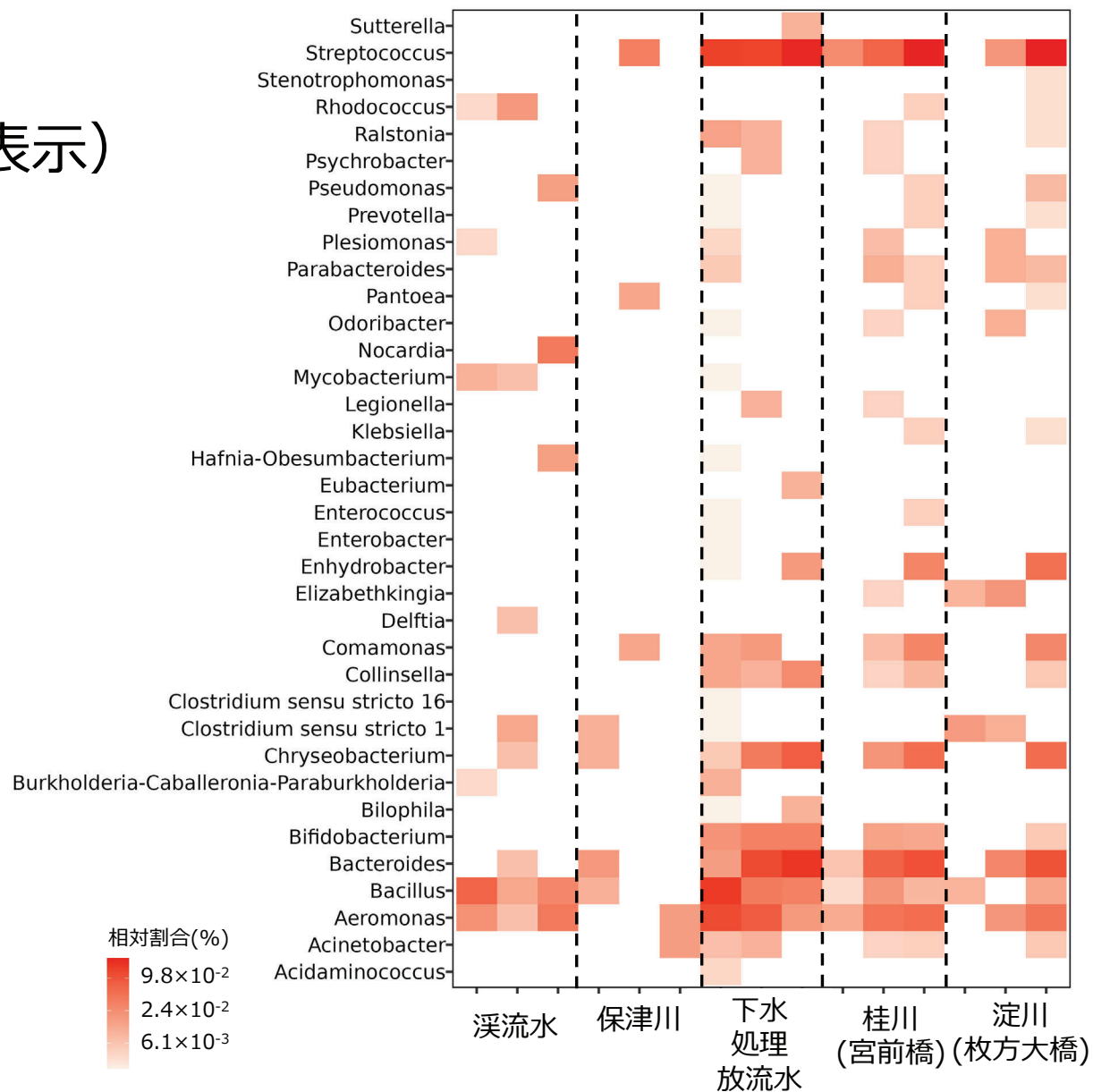
1. ベースコール(Guppy ver 6.3.4)+デマルチプレックス(minibar<sup>1)</sup>)
2. 解読エラーの補正(longread\_umi<sup>2</sup>,madaka<sup>3</sup>)  
→ コンセンサス配列の生成
3. BLAST検索  
照合データベース：MIrROR<sup>4</sup>)  
→ 上位の複数ヒットから最小共通祖先を取得  
→ 病原属を抽出
4. 病原種の確定 (再度BLAST検索)  
照合データベース：基準株・培養株の16S rDNA配列 [SILVA version138<sup>4</sup>)  
より構築]  
→ 参照配列との類似性99%以上のヒットで最小共通祖先を再取得

1)Krehenwinkel et al. (2019) *Giga-Science*, 8(5)  
2)Karst et al. (2021) *Nat.Methods*, 18(2), 165-169  
3)Oxford Nanopore Technologies社  
4)Seol et al. (2022) *Micobiology Spectrum*, e02017-21.  
5)Quast et al. (2012) *Nucleic acids res.*, 41(D1)



# 結果 | 病原種の検出状況 (属でまとめて表示)

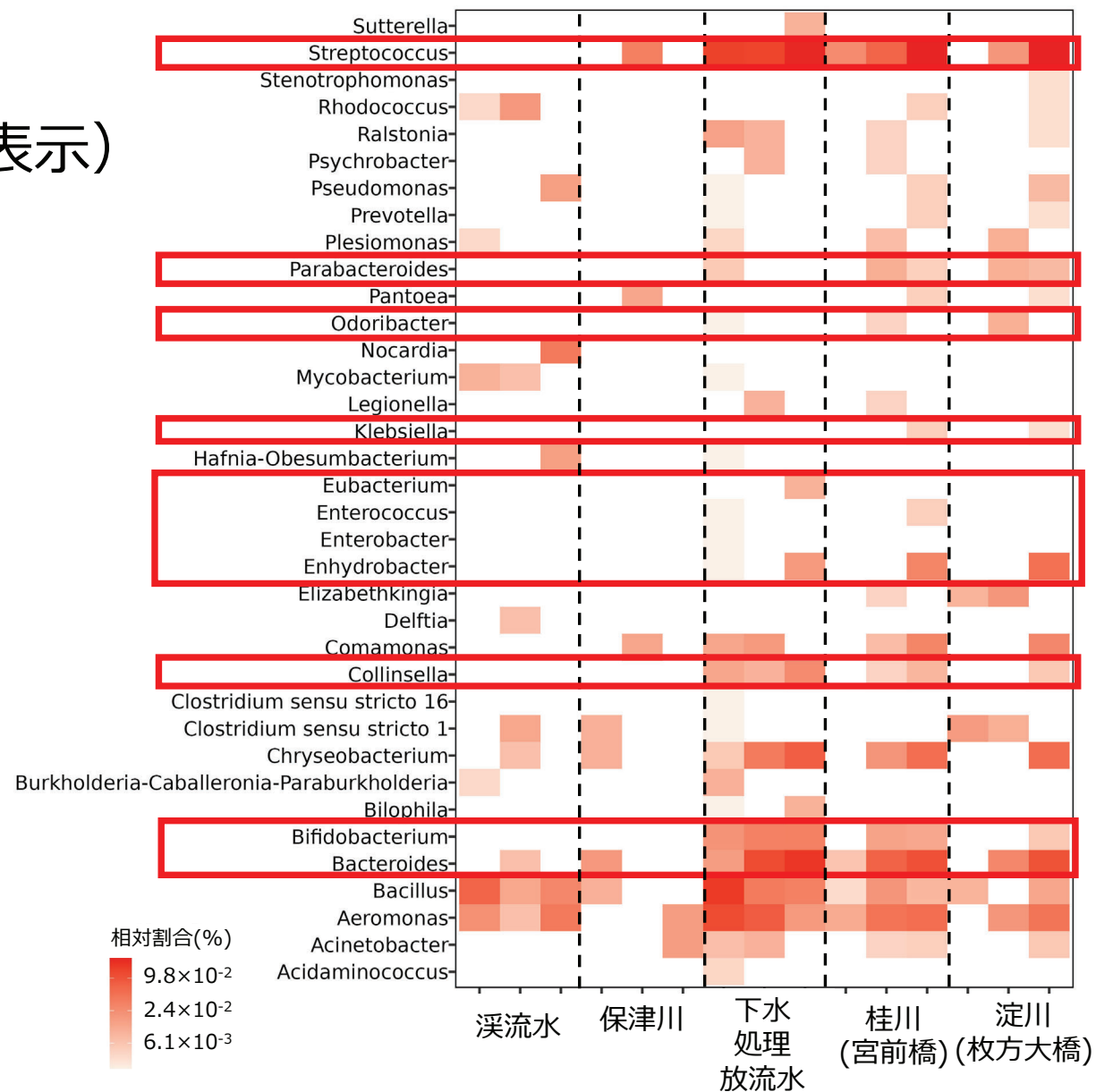
全15検体から  
**37属81種**  
 の病原種を検出





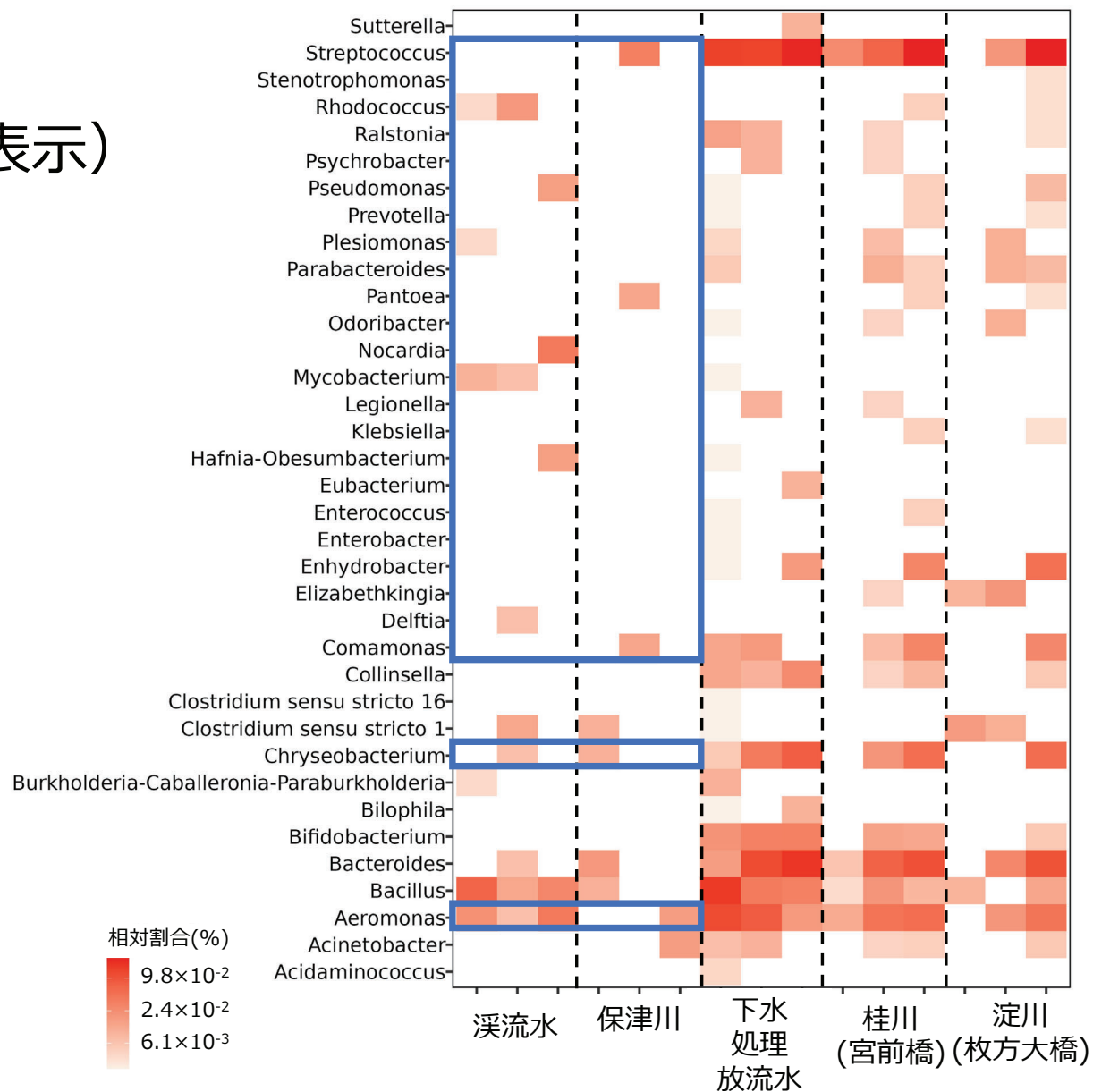
# 結果 | 病原種の検出状況 (属でまとめて表示)

動物の腸管等に由来する病原種が下水処理水の放流によって増加



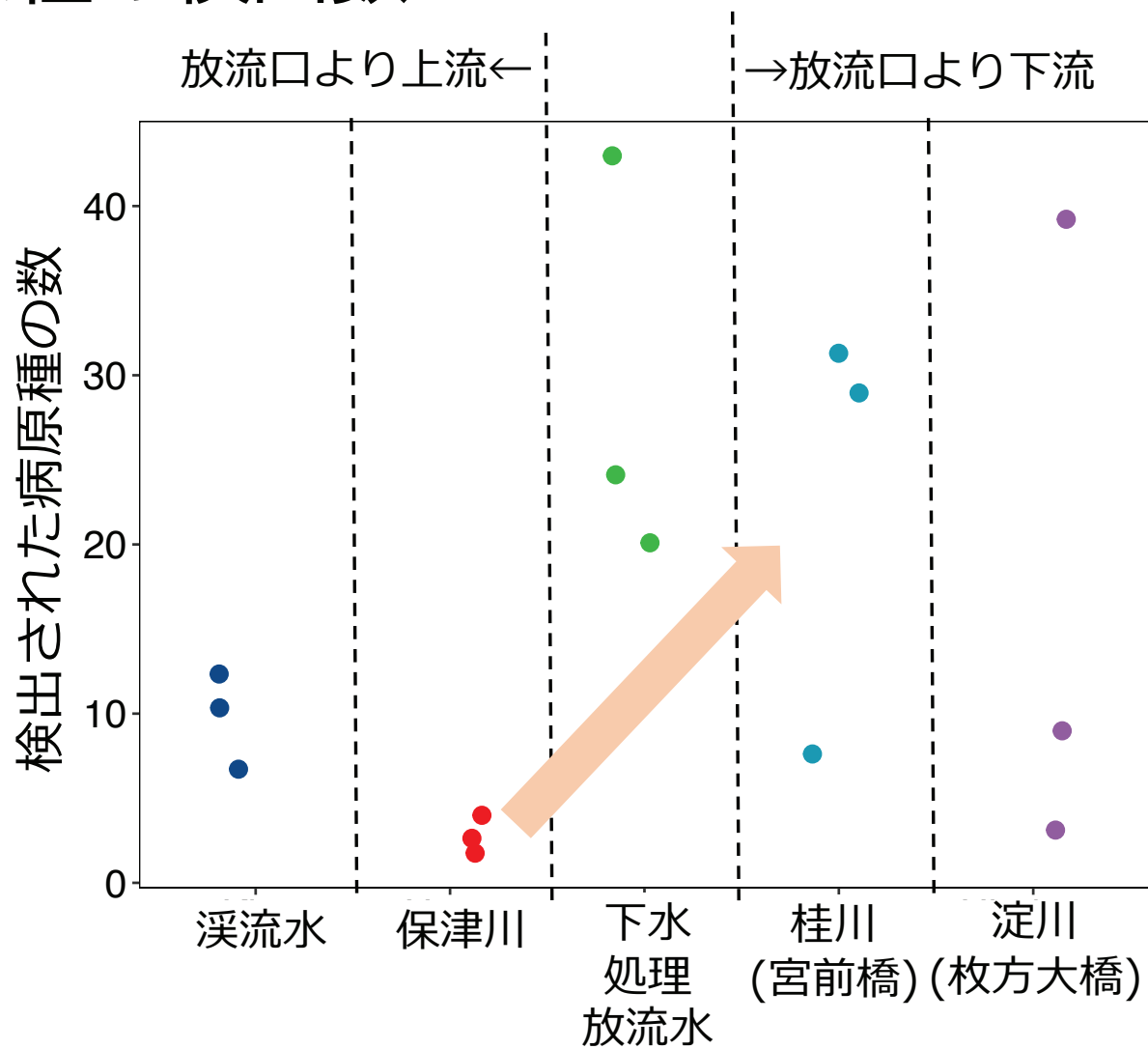
# 結果 | 病原種の検出状況 (属でまとめて表示)

上流の河川・渓流水では  
 土壌・水環境中の常在菌  
 が主要な病原種



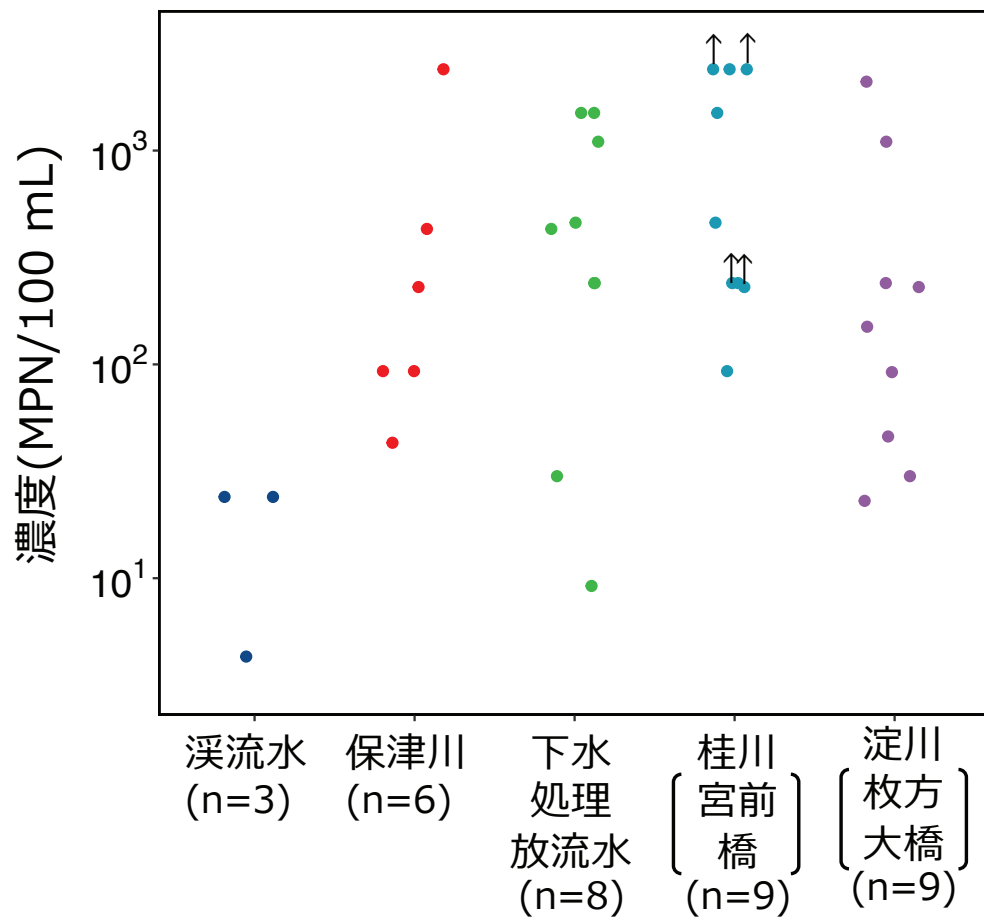
# 結果 | 各地点での病原種の検出数

下水処理水の放流によって病原種の多様性が増加

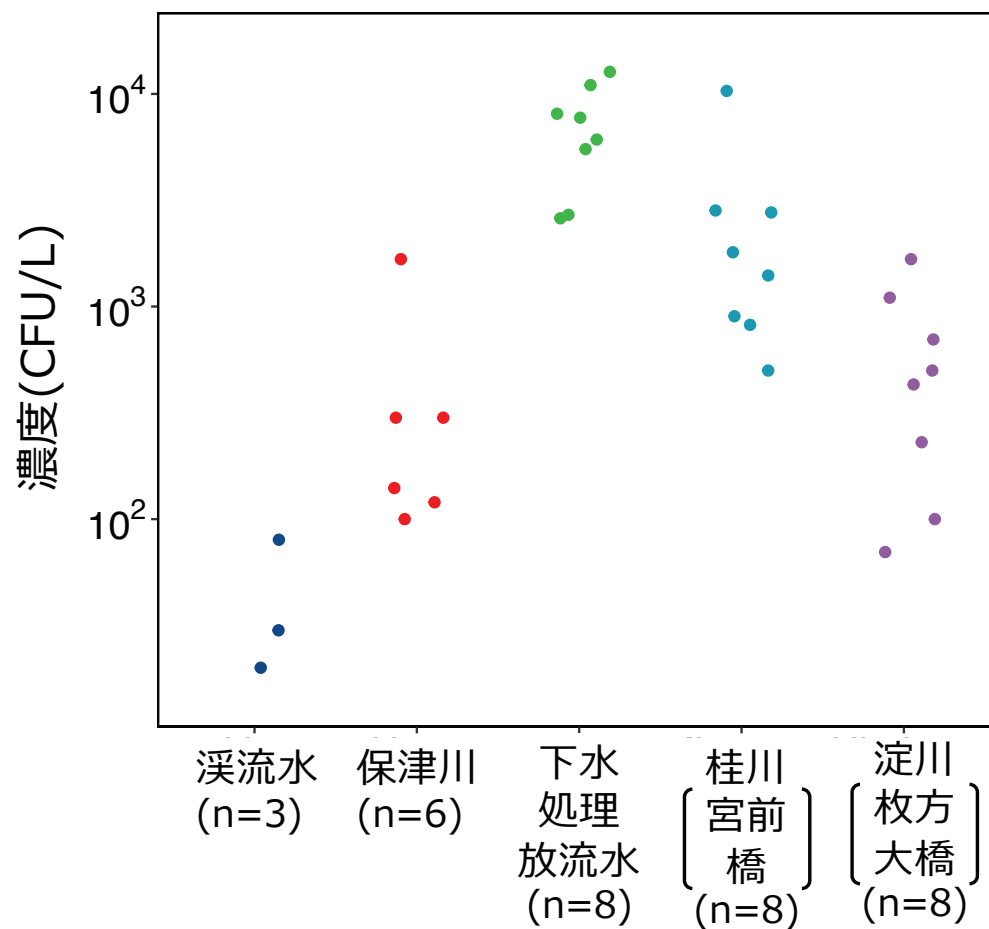


# 補足 | 指標微生物 (2年分の測定結果)

## <大腸菌>

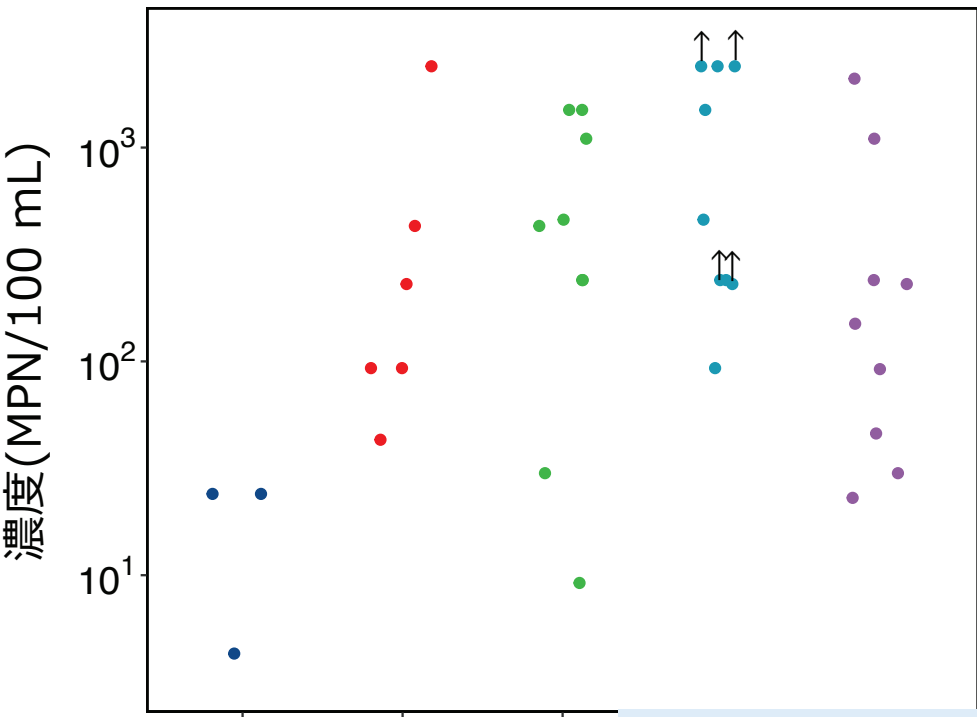


## <嫌気性芽胞菌> (原虫汚染の指標)

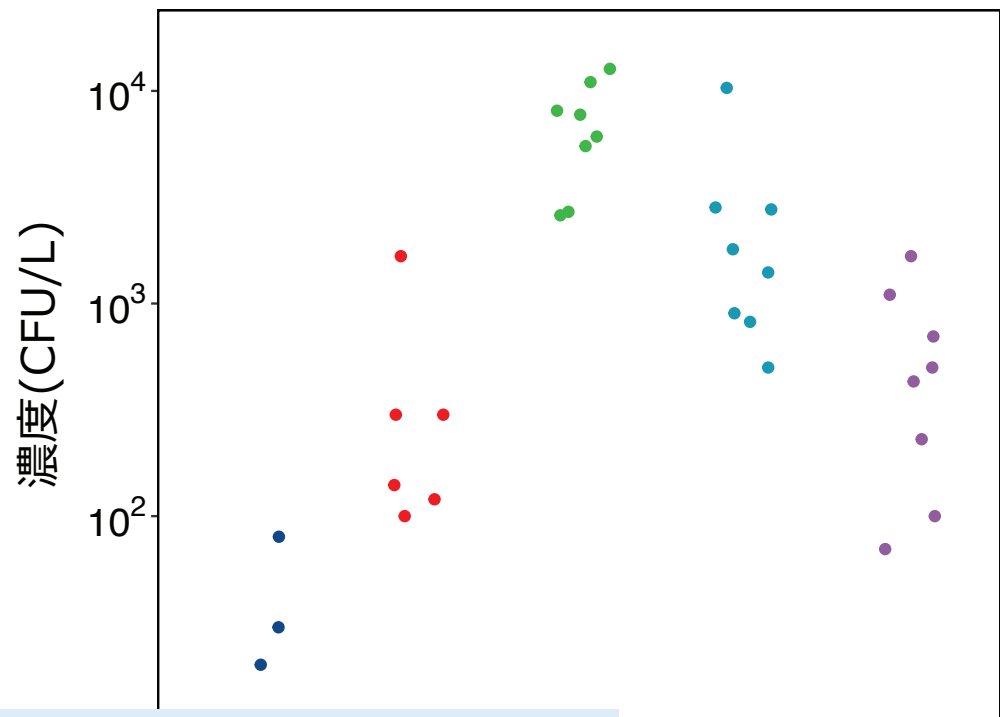


# 補足 | 指標微生物 (2年分の測定結果)

<大腸菌>



<嫌気性芽胞菌> (原虫汚染の指標)



渓流水 (n=3)

保津川 (n=6)

下水処理放流水 (n=8)

- 汚染度の大まかな把握には有用
- 病原細菌の挙動に追従しない場合も多い (特に大腸菌)

桂川  
〔宮前橋〕 (n=8)

淀川  
〔枚方大橋〕 (n=8)

# まとめ

- 完全長16S rDNAメタバーコーディングにエラー補正手法を導入  
→ 解読精度の向上を確認
- 桂川～淀川水系と下水処理放流水に手法を適用
  - 下水処理水の合流によって病原細菌の種数が増加
  - 放流前：土壌・水環境に常在する病原種
  - 放流後：動物の糞便由来と思われる病原種

指標細菌を用いずに病原細菌  
汚染の実態を把握できた

謝辞：  
本研究は公益財団法人 琵琶湖・淀川水質保全機構の「令和4年度水質保全研究助成」を受けて実施されました。ここに記して謝意を表します。