

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）
「大規模災害および気候変動に伴う利水障害に対応した環境調和型水道システムの構築に関する研究」
分担研究報告書

研究課題：カビ臭発生予測手法の構築

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 統括研究官
研究分担者 清水 和哉 東洋大学生命科学部 講師
研究分担者 岸田 直裕 国立保健医療科学院 主任研究官

研究要旨

水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、水源におけるカビ臭発生の状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を解析した。その結果、平成 16 年から平成 22 年の期間内における水道水質基準値を超えるカビ臭の検出は、継続的に同水源から検出された。カビ臭物質合成酵素遺伝子に関しては、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログは、放線菌内において高度に保存されていることが、単離菌の解析により明らかとなった。藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。従って、ジェオスミン産生微生物個体群数の定量およびジェオスミン合成活性分析において、放線菌と藍藻類を別にして解析できることがわかった。2-MIB 産生関与するゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子およびモノテルペンシクラーゼ遺伝子について解析した。放線菌および藍藻類の塩基配列登録数が少ないことから、放線菌と藍藻類を分けた解析ができるのかについてはわからないものの、ジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログと同様の解析ができることが推測された。

A. 研究目的

我が国の主な上水水源は、表流水であるため気候変動に影響を受けやすく、環境因子の変動や気温上昇に伴う水温の上昇は、水源環境微生物群集構造に影響を与えることが予測される。カビ臭物質は、水道水質を悪化させる生物由来の水汚染物質である。その産生原因生物は、放線菌と藍藻類であるため、環境因子の変動や水源環境微生物群集構造に影響を受けることが考えられる。カビ臭物質が、生物由来水汚染物質であることから、化学物質による水汚染とは異なり、発生および消失の予測や発生抑制制御が困難であった。近年のカビ臭物質産生微生物の分子生物学的知見により、培養や顕微鏡による手法に加えて、カビ臭物質産生微生物群個体数の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築でき

ると考えられる状況となってきた^{1),2)}。しかしながら、分子生物学的解析で標的としているカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性に関する知見が少ないのが分子生物学的手法の適用の課題となっている。一方、カビ臭発生対策手法の構築には、どのような環境因子が引き金となってカビ臭物質産生にいたるのかを解明することが必要となる。そのために、カビ臭物質産生に与える環境因子の解析が報告されてきた³⁾。室内実験による環境因子の知見およびカビ臭発生現場における環境因子の知見を総合させた解析は、極めて少ないのが現状である。そのため、どの環境因子をカビ臭発生抑制の指標とできるのかが不明瞭である。

上水源におけるカビ臭発生抑制手法の構築を目的として、本年度は、上水源における

カビ臭発生の状況およびカビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のためにカビ臭物質合成酵素遺伝子の保存性を放線菌の単離菌を用いた遺伝子配列解読や遺伝子データベース解析により実施した。

B. 研究方法

1) カビ臭発生の状況分析

カビ臭発生現場におけるカビ臭物質産生の引き金に關与する環境因子を同定するために、公益社団法人日本水道協会が発行している「水道統計」⁴⁻¹⁰⁾を用いて、全国の各水源におけるカビ臭発生の状況を分析した。分析方法はカビ臭物質であるジェオスミンと2-メチルイソボルネオール(2-methylisoborneol; 2-MIB)の1年間における検出最高濃度がそれぞれ 1 ng/L $N_1 < 5 \text{ ng/L}$, 5 ng/L $N_2 < 10 \text{ ng/L}$, 10 ng/L N_3 、それぞれ検出された水源を都道府県別に分析した。そして、各都道府県の全浄水場当たりについて、カビ臭が確認された浄水場の割合を算出した。加えて、カビ臭が発生している水源を解析し、どの様な上水源(河川、湖沼、ダム等)で多くカビ臭が発生しているのかを分析した。

2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

カビ臭物質産生微生物群の定量とカビ臭物質産生活性の定量手法の開発のために、上水源や水域から放線菌を単離した。単離源は、ひょうたん池(群馬県邑楽郡板倉町)、草木ダム、渡良瀬川、思川、手賀沼、信濃川、谷中湖から河川堆積物・底泥・表層水サンプルから得た。それぞれ ISP medium No.4 (ISPM4) を用い単離した。表層水サンプルは、 $100 \mu\text{L}$ ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。底泥サンプルは、3日間自然乾燥させた後、30分 110°C で乾熱乾燥させた後に、乾燥重量 1 g を採取し、滅菌水 9 mL に懸濁させた。これを原液とし10倍、50倍、100倍希釈し、それぞれ $100 \mu\text{L}$ ずつ ISPM4 寒天培地に塗布した。また乾燥させていない河川堆積物・底泥サン

プル 1 g を滅菌水 9 mL に懸濁し、同様に塗布した。植菌した ISPM4 寒天培地は、すべて 25°C 、遮光で培養した。ISPM4 寒天培地に生育した細菌をさらに3回、ISPM4 寒天培地に塗布し、単離した。単離菌を YMPD 液体培地で十分な生育が得られるまで1日から5日間、 25°C 、 225 rpm で培養した。液体培地で十分に培養した単離菌から全 DNA をビーズビーディング法により抽出した。また、グリセロールストックも合わせて作成し、 -80°C に保存した。

全 DNA を用いて、16S rRNA 遺伝子(27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') -1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') プライマーセット、16S rRNA 遺伝子解析用のユニバーサルプライマーセット)および *geoA* 遺伝子ホモログ(249F (5'-CTTCTTCGACGACCACTTCC-3'), 1860R (5'-CGTACTCGATCTCCTTCTGG-3')、塩基配列データベース上に登録のあったジェオスミン合成酵素遺伝子ホモログの塩基配列より報告者が作成したプライマーセット)を PCR クローニングし(KOD-Plus-Neo(東洋紡ライフサイエンス))、アガロースゲル電気泳動法を用いた PCR 産物の精製後(NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up(MACHERY-NAGEL))、塩基配列解読に供した。得られた塩基配列を用いて blastn 解析を行い、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた単離菌の同定および *geoA* 遺伝子ホモログの塩基配列を同定した。また、*geoA* 遺伝子ホモログを保存している細菌を blastn 検索により調査した。

塩基配列データベース(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)を用いてジェオスミン合成酵素遺伝子(*geoA* 遺伝子ホモログ)および2-MIB合成に關与する重要な遺伝子である¹¹⁾、ゲラニルニリン酸メチルトランスフェラーゼ遺伝子および2-MIB合成酵素遺伝子であるモノテルペンシクラーゼ遺伝子¹¹⁾をデータベースから探索し、保存性の解析を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭発生の状況分析

全国的に様々な水源でカビ臭発生が確認されているが(図1-図10)、河川や湖沼、貯水池での発生が多かった。濃度に依らない頻度および水道水質基準値 10 ng/L を超える頻度のどちらにおいても、河川が多数を占めた。発生したカビ臭物質濃度の最高値は、湖沼やダム、貯水池が示した。分析した平成16年から平成22年までのカビ臭発生水源において、ほぼ同水源から継続的にカビ臭物質が検出されていた。しかしながら、平成25年以降、これまでにカビ臭発生が観測されていなかった水源の発生報告があり、気候変動等による環境因子の変動が、カビ臭物質産生微生物に影響を与え、カビ臭発生に至っていることが予測された。

平成16年から平成22年において、5 ng/L未満のカビ臭発生においては、2-MIBの検出数が、ジェオスミンよりも多いものの、5 ng/L以上10 ng/L未満においては、ジェオスミンの検出数が多かった。10 ng/L以上では、ジェオスミンの検出数が多い傾向にあったが、2-MIBの検出数が多い年もあった(図11)。カビ臭物質が、水道水質基準値の10 ng/L以上の発生がない水源は、秋田県、富山県、石川県、山梨県、岐阜県、静岡県、愛知県、鳥取県、高知県、熊本県、宮崎県、鹿児島県であった。カビ臭物質濃度が、5 ng/L未満の発生があった水源が多く確認され、山口県の水源が最多検出された。水道水質基準値を超えるカビ臭物質は、ジェオスミンと2-MIBの両方が各都道府県において確認されたが、ジェオスミンのみ(京都府(湖沼)、和歌山県(河川))や2-MIBのみ(北海道(河川)、奈良県(河川)、徳島県(河川))もあった。高濃度カビ臭物質発生は、湖沼やダム等の滞留時間が長い水源であった。近年、河床における付着性藍藻類や定着性藍藻類が、カビ臭発生に寄与していると考えられている。そのため、湖沼やダム等のみならず、河床における藍藻類のカビ臭物質産生の引き金に関与する環境因子の同定が必要である。しかしながら、本年度は、カビ臭物質産生の引き金に

係わる環境因子のカビ臭発生現場と室内実験結果を総合した環境因子同定に至らなかった。来年度以降に、「水道統計」等の水質データベースおよび室内実験から同定し、各水源に適用可能なカビ臭発生抑制対策手法を構築する。

以上から、従来から実施されてきた湖沼やダム等におけるカビ臭発生対策のみならず、持続可能な水道システムの利用のためには、今後、河川においての有効な対策を講じる必要があることが確認された。

2) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の多様性

採取したサンプルから39株を単離した。現在までに16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読を終えた23株をblastn解析に供した結果、15株が、カビ臭物質産生の報告例が多い*Streptomyces*属であった。これら*Streptomyces*属と同定された15株から*geoA*遺伝子ホモログをPCRクローニング後の塩基配列解読により同定した。遺伝子データベース上(DDBJ、NCBI、EMBL/EBI)の*geoA*遺伝子ホモログを保持している主な放線菌は、*Streptomyces*属であった。その他の放線菌でデータベース上に登録されていたのは、*Kitasatospora*属、*Frankia*属、*Kribbella*属等があった。以上から、*Streptomyces*属以外にも多くの放線菌に保存されていることがわかった。ジェオスミン産生藍藻類に関しては、異なる「属」間においては、*geoA*遺伝子ホモログのアミノ酸配列の相同性は高いものの遺伝子塩基配列の相同性が、低い領域があることがわかった。そのため藍藻類においては、遺伝子塩基配列の相同性を利用することにより「属」毎に分けられることがわかった。以上から、放線菌については、*geoA*遺伝子ホモログを標的とした共通配列を用いた分子生物学的手法により、ジェオスミン産生放線菌個体群数を推量でき、藍藻類においては、各「属」におけるジェオスミン産生藍藻類個体群数を推量できることが推測できた。

一方、2-MIB合成に関与する酵素に関して、アミノ酸配列の相同性は、放線菌および藍藻

類のどちらも高いことが報告されていた¹²⁾。また、遺伝子データベース解析から、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログよりも、藍藻類における遺伝子塩基配列の相同性が高いことが確認された。しかしながら、藍藻類の遺伝子登録数は極めて少ないため、*geoA* 遺伝子ホモログと同様に高度に保存されているのかは、決定的ではない。これまでに、2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena limnetica* (Castaic Lake)の全ゲノム解析が一例のみ報告されている¹²⁾。しかし、ゲノム情報は、未だ遺伝子データベースに登録されていない。そのため、どのような分子生物学的な経路によってカビ臭物質産生の引き金が稼働するのか、反対に、カビ臭物質産生抑制の引き金が稼働するのか、の詳細な解析が実施できない状況にある。一方、放線菌においては、ゲノム情報が多数報告されており、とくにカビ臭物質産生の引き金に關与する分子生物学的な経路の解析が進みつつある。放線菌の多くは、ジェオスミンと 2-MIB のどちらも産生できる¹²⁾。しかし、藍藻類の多くは、ジェオスミンもしくは 2-MIB のどちらかのみしか産生することができない。水道水質基準値を超えるカビ臭発生を予測するとともに、基準値を超えるカビ臭の発生後、基準値を下回るのがいつになるのかといったカビ臭消失の予測、発生予測・消失予測のどちらも可能な早期検出技術開発およびカビ臭発生抑制技術の構築のために、ジェオスミン産生藍藻類および 2-MIB 産生藍藻類のゲノム解析を実施することが必要である。

放線菌由来のカビ臭物質がどの程度かび臭被害に寄与しているのかは、明らかにされていないが、例えば、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量と藍藻類の *geoA* 遺伝子ホモログの発現量を比較解析することで、カビ臭発生の主要原因生物を特定でき、原因生物それぞれのカビ臭発生の寄与度を明らかにできると考えられる。

以上から、分子生物学的手法を用いてカビ臭発生予測・消失予測手法を構築できることが見いだせた。来年度以降は、分子生物学的

手法も織り交ぜ、カビ臭発生抑制手法の検討を継続して実施する。

E. 結論

水道水質基準値を超える水源の多くが、河川であったが、カビ臭発生源は上流であると考えられることも多かった。多くのカビ臭発生は、ジェオスミンおよび 2-MIB の両方によるものであったが、水源によっては、それらどちらかのみ事例もあった。

カビ臭物質合成酵素遺伝子群が、放線菌および藍藻類のそれぞれに保存されていることを明らかにした。カビ臭産生微生物個体群数の増加とカビ臭物質濃度の間には正の相関関係がわかっているため、分子生物学的手法を用いてカビ臭物質産生微生物群個体数を推量することにより、カビ臭物質産生予測手法・消失予測手法を構築できることが期待される。

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

- (1) 加村瑞希、遠藤雅也、篠原健吾、内海真生、岸田直裕、秋葉道宏、清水和哉、第 51 回日本水環境学会年会；2016 年 3 月；徳島。要旨集（印刷中）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

I. 参考文献

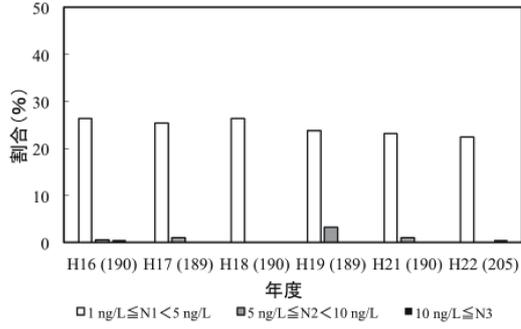
- 1) Auffret M., Pilote A., Proulx É., Proulx D.,

- Vandenberg G., and Villemur R. (2011) Establishment of a real-time PCR method for quantification of geosmin-producing *Streptomyces* spp. in recirculating aquaculture systems. *Water Research* **45**(20), pp.6753-6762.
- 2) Su M., Gaget V., Giglio S., Burch M., An W., and Yang M. (2013) Establishment of quantitative PCR methods for the quantification of geosmin-producing potential and *Anabaena* sp. in freshwater systems. *Water Research* **47**(10), pp. 3444-3454.
- 3) Wang Z. and Li R. (2015) Effect of light and temperature on the odor production of 2-methylisoborneol-producing *Pseudanabaena* sp. and geosmin-producing *Anabaena ucrainica* (cyanobacteria). *Biochemical Systematics and Ecology* **58**, pp. 219-226.
- 4) 日本水道協会 (2004) 平成 16 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 5) 日本水道協会 (2005) 平成 17 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 6) 日本水道協会 (2006) 平成 18 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 7) 日本水道協会 (2007) 平成 19 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 8) 日本水道協会 (2008) 平成 20 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 9) 日本水道協会 (2009) 平成 21 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 10) 日本水道協会 (2010) 平成 22 年度水道統計 . 日本水道協会, 東京.
- 11) Komatu M., Tsuda M., Omura S., Oikawa H., and Ikeda H. (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**(21), pp. 7422-7427.
- 12) Giglio S., Chou W.K.W., Ikeda H., Cane E.D., and Monis T.P. (2011) Biosynthesis of 2-Methylisoborneol in Cyanobacteria. *Environmental Science & Technology* **45**(3), pp. 992-998.

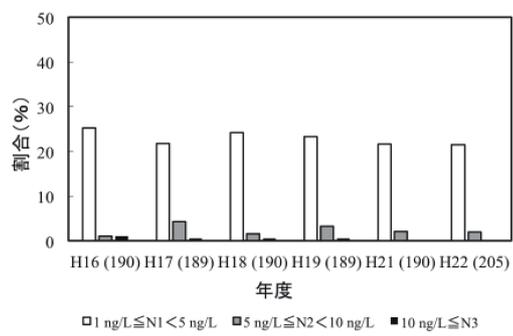
J. 謝辞

神奈川県企業庁北村壽朗氏、川崎市上下水道局藤瀬大輝氏、千葉県水道局田中宏憲氏、千葉県福増浄水場宮崎啓彰氏に感謝いたします。

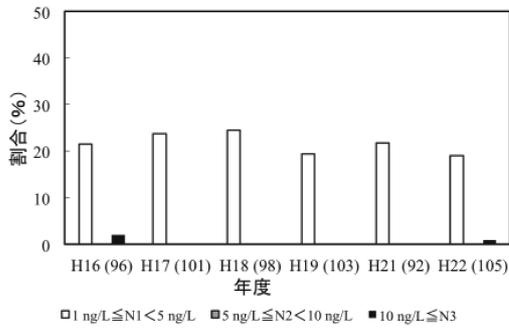
北海道 MIB



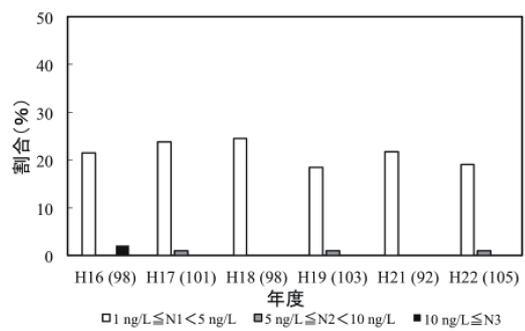
北海道ジェオスミン



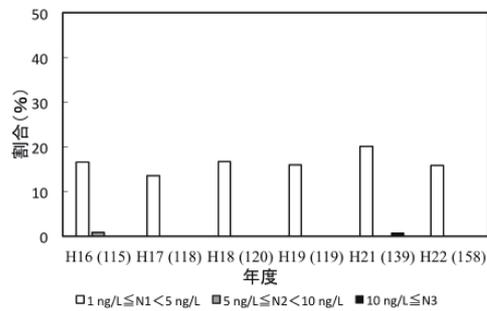
青森県 MIB



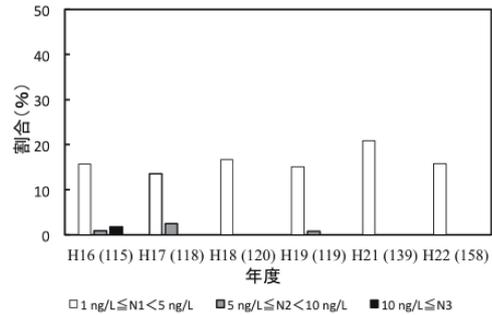
青森県ジェオスミン



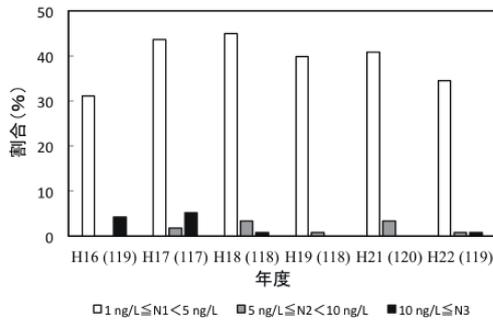
岩手県 MIB



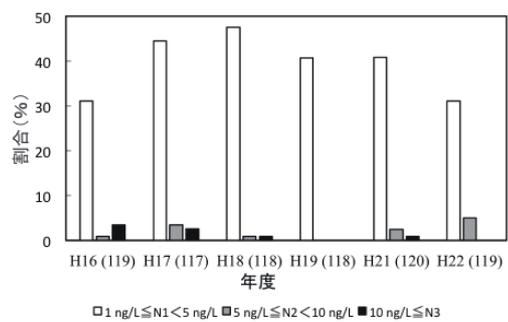
岩手県ジェオスミン



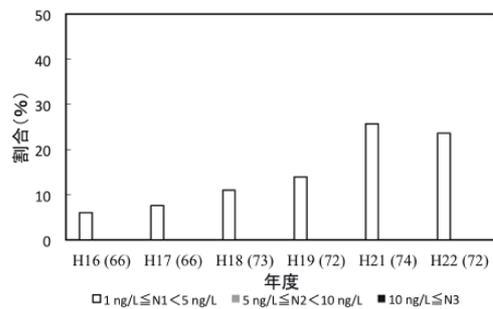
宮城県 MIB



宮城県ジェオスミン



秋田県 MIB



秋田県ジェオスミン

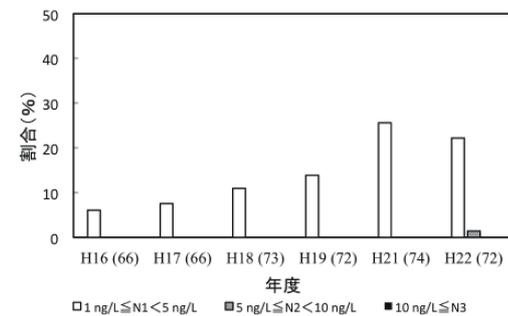
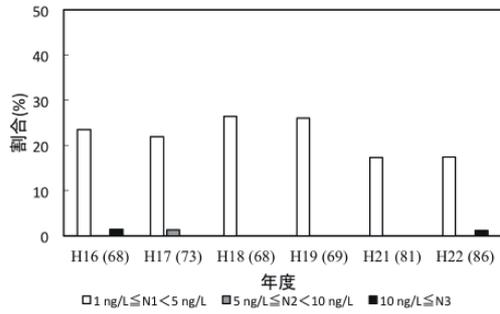
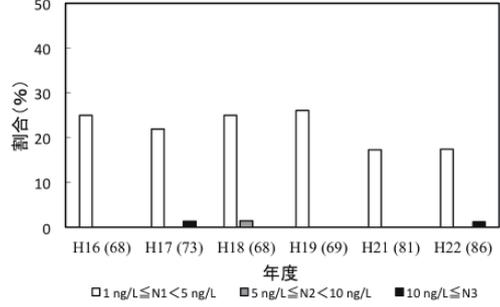


図1 水源におけるカビ臭発生状況(北海道、青森県、岩手県、宮城県、秋田県)

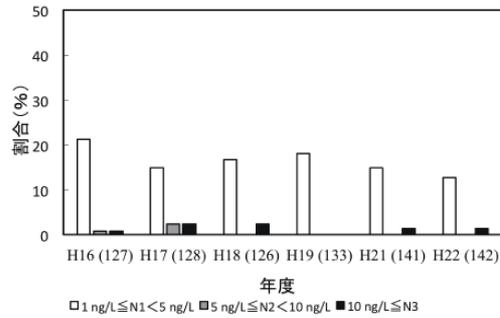
山形県 MIB



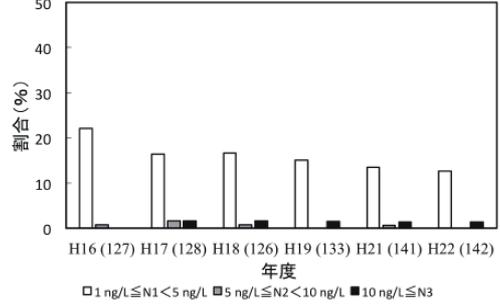
山形県 ジェオスミン



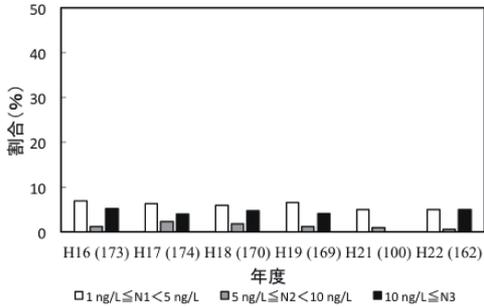
福島県 MIB



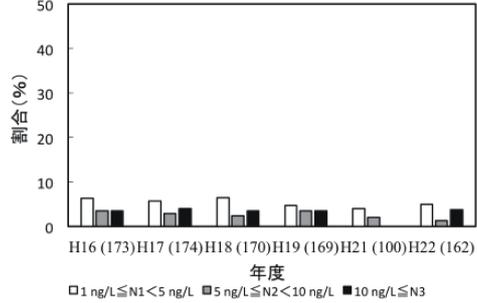
福島県 ジェオスミン



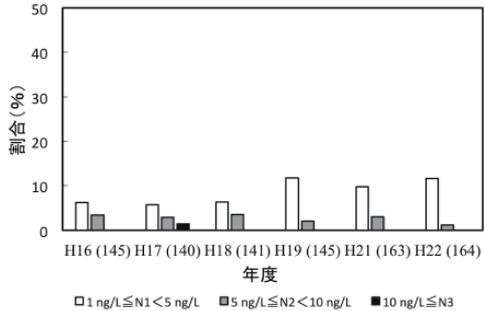
茨城県 MIB



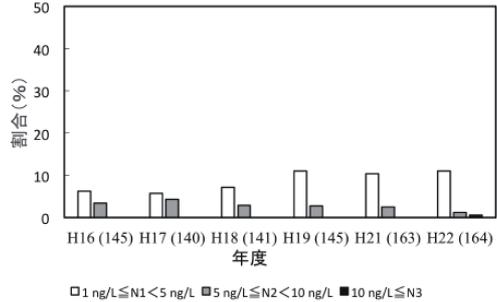
茨城県 ジェオスミン



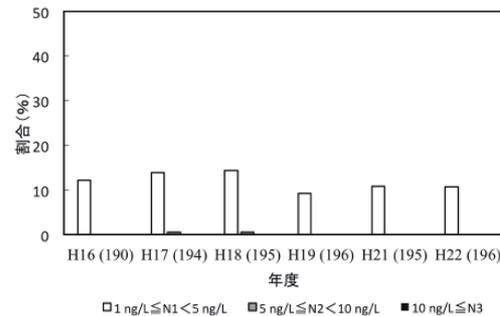
栃木県 MIB



栃木県 ジェオスミン



群馬県 MIB



群馬県 ジェオスミン

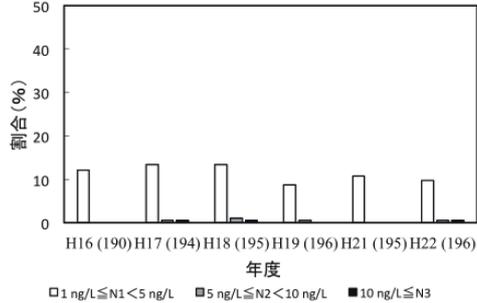
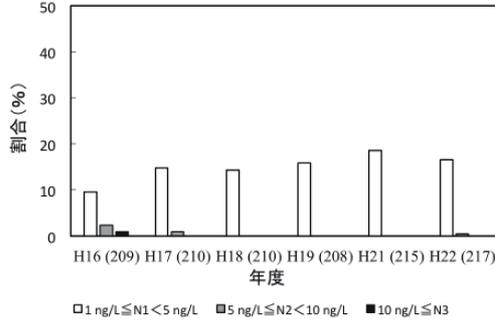
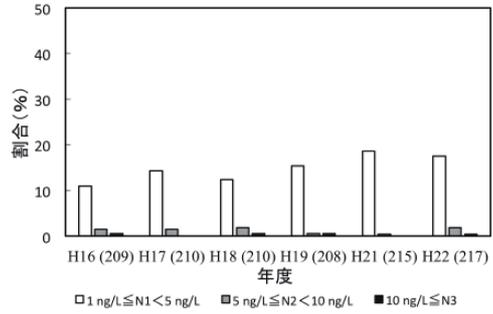


図2 水源におけるカビ臭発生状況 (山形県、福島県、茨城県、栃木県、群馬県)

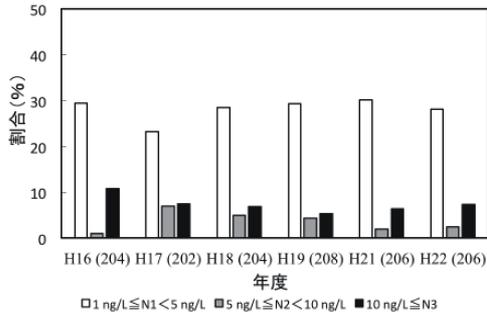
埼玉県 MIB



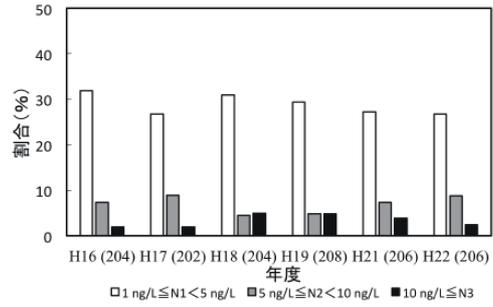
埼玉県 ジェオスミン



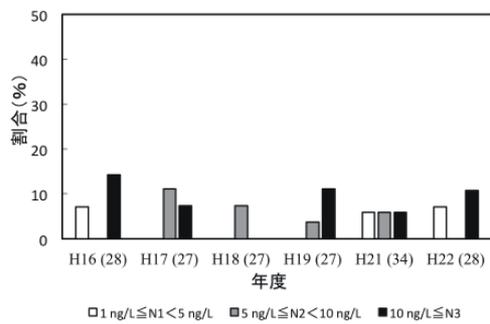
千葉県 MIB



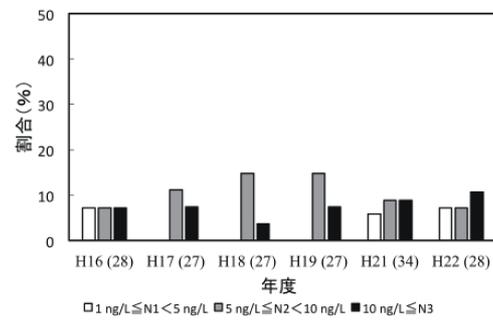
千葉県 ジェオスミン



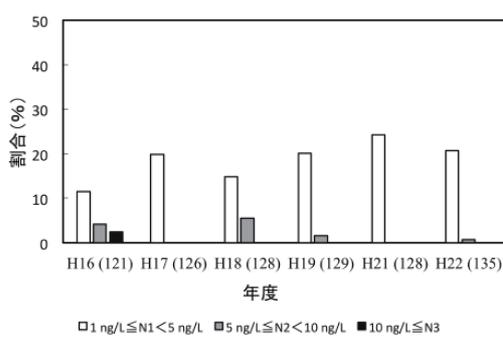
東京都 MIB



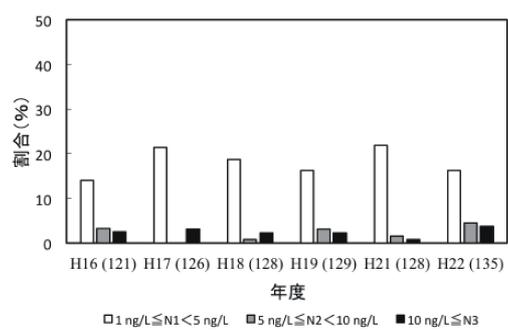
東京都 ジェオスミン



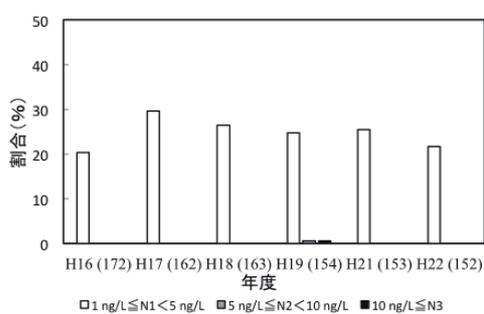
神奈川県 MIB



神奈川県 ジェオスミン



新潟県 MIB



新潟県 ジェオスミン

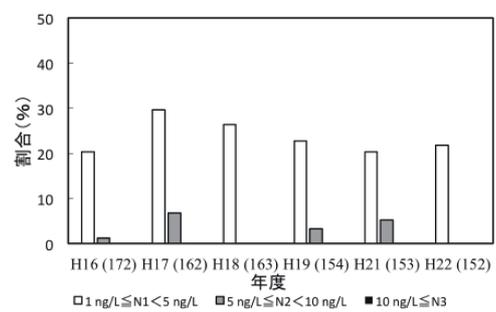


図3 水源におけるカビ臭発生状況(埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、新潟県)

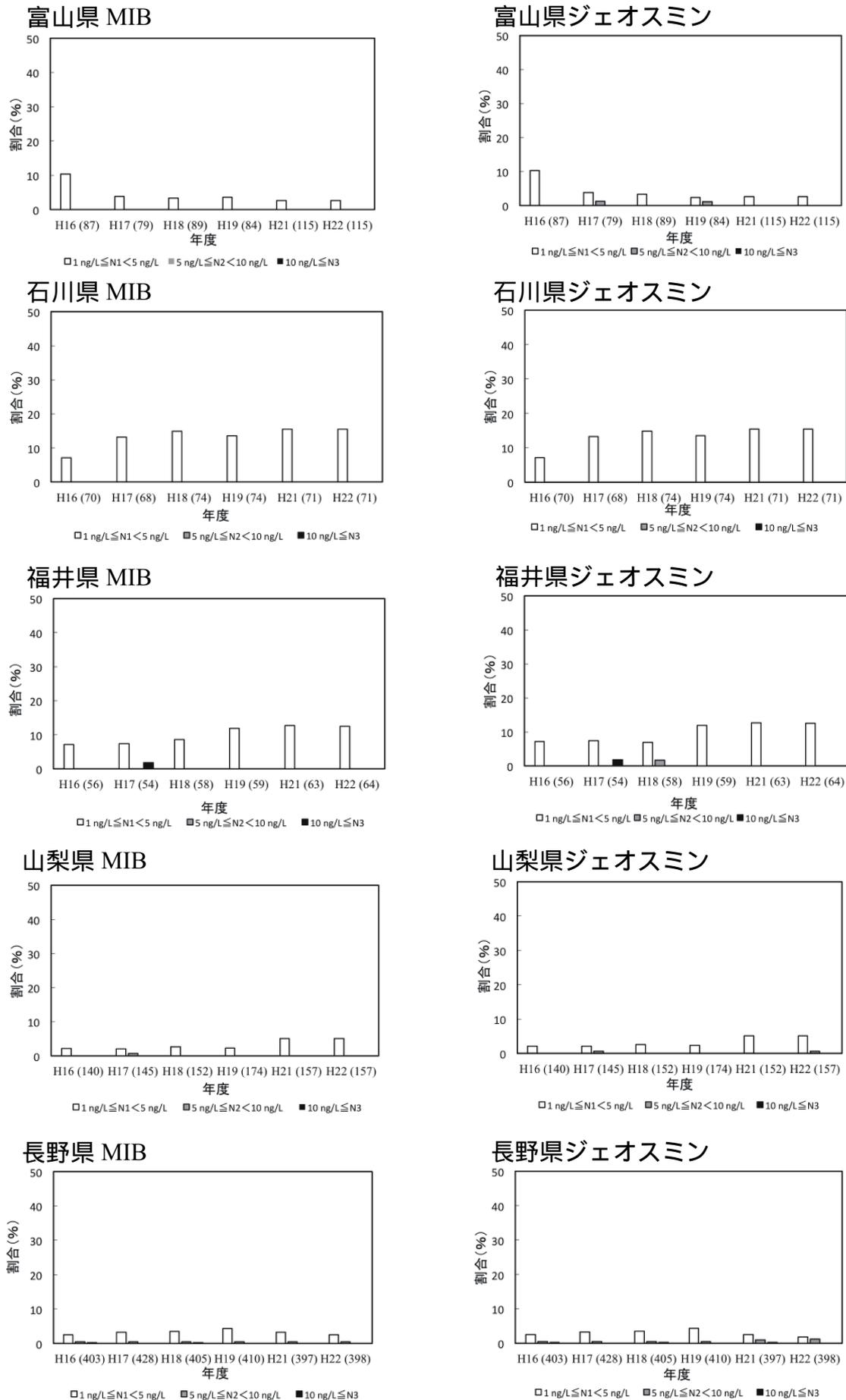
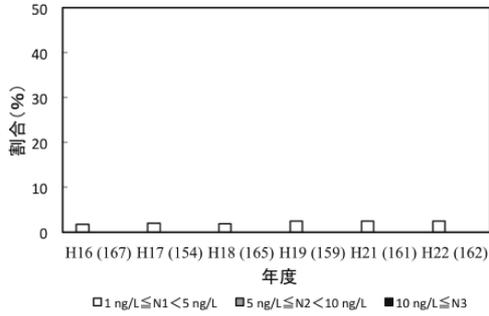
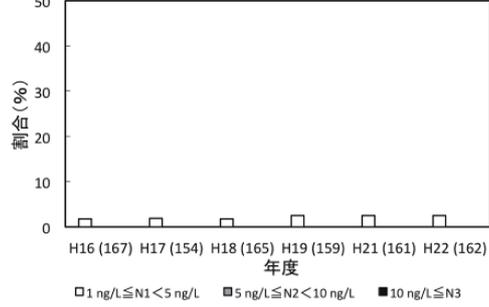


図4 水源におけるカビ臭発生状況(富山県、石川県、福井県、山梨県、長野県)

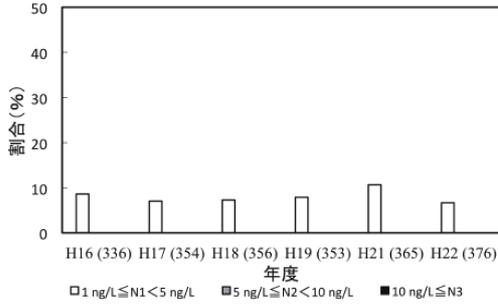
岐阜県 MIB



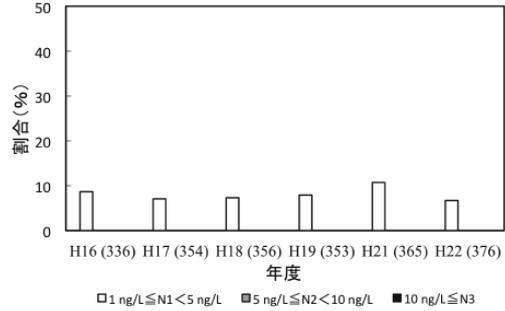
岐阜県 ジェオスミン



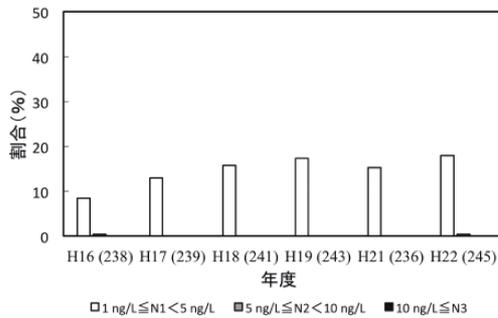
静岡県 MIB



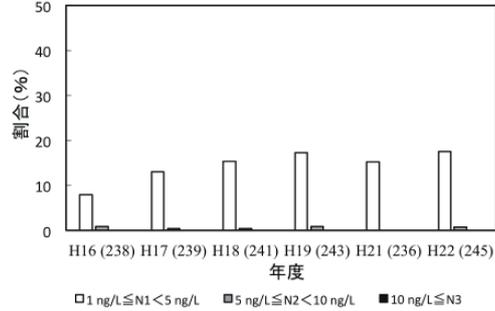
静岡県 ジェオスミン



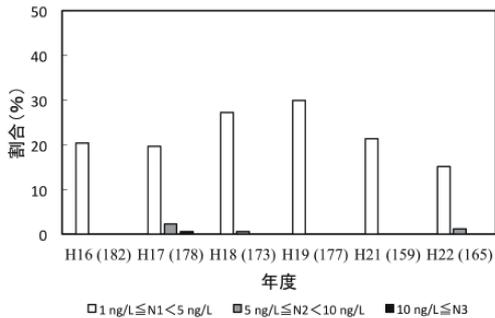
愛知県 MIB



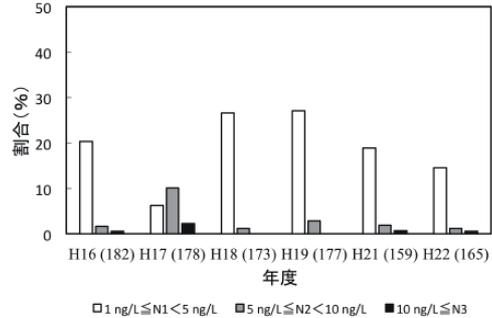
愛知県 ジェオスミン



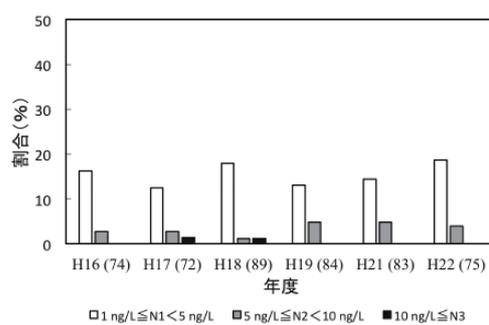
三重県 MIB



三重県 ジェオスミン



滋賀県 MIB



滋賀県 ジェオスミン

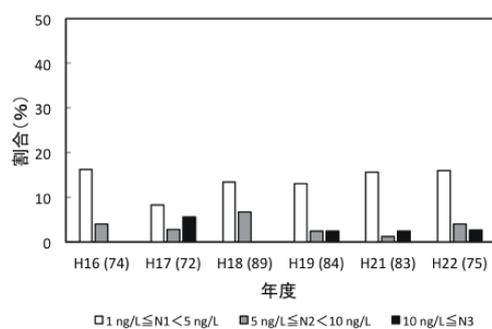


図5 カビ臭発生状況(岐阜県、静岡県、愛知県、三重県、滋賀県)

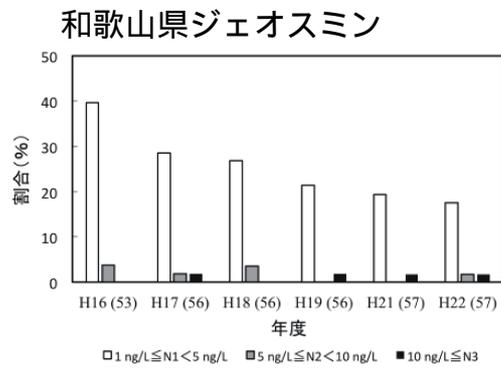
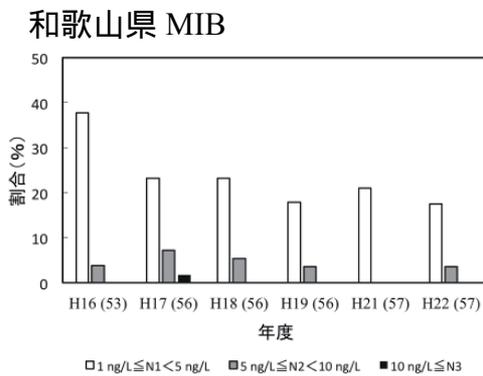
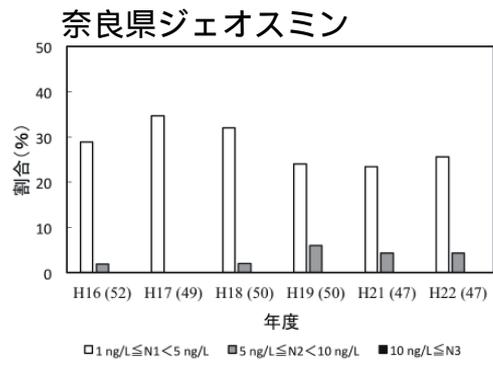
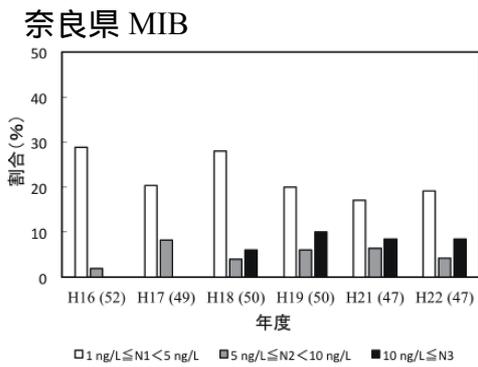
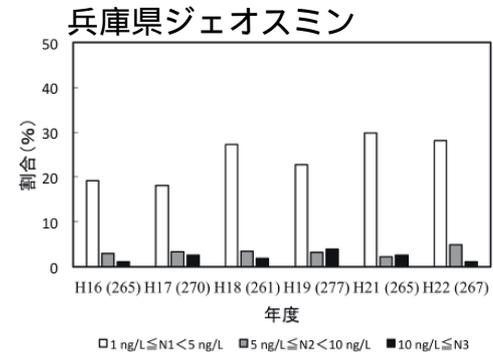
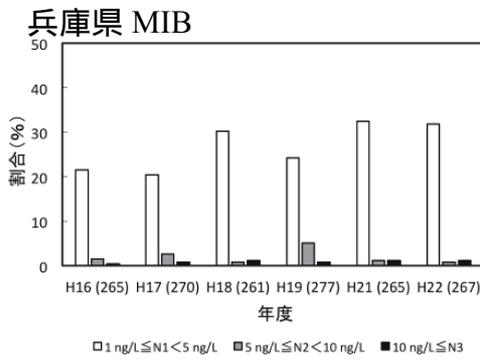
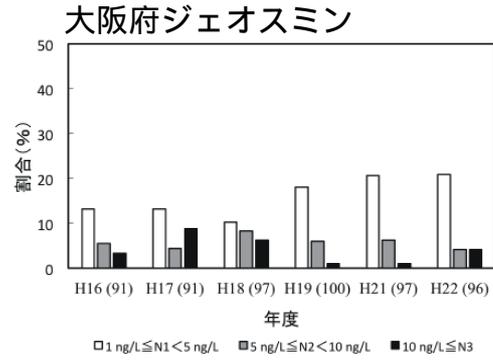
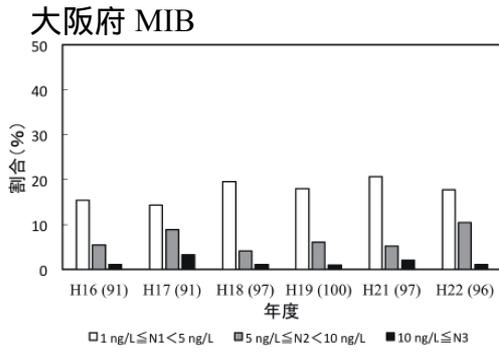
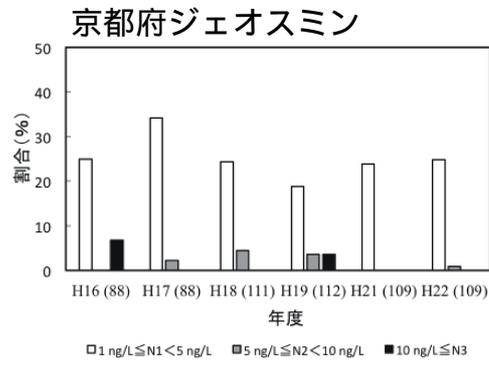
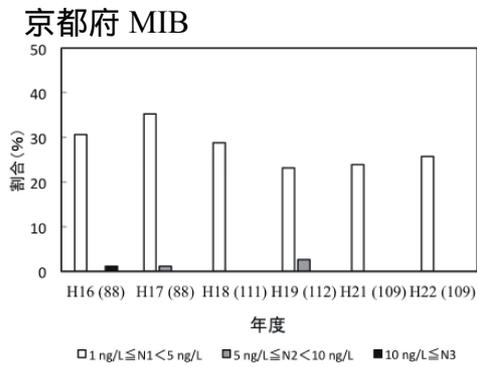


図6 カビ臭発生状況(京都府、大阪府、兵庫県、奈良県、和歌山県)