

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 筑波大学生命環境系 准教授

研究要旨

水源におけるカビ臭発生予測手法の構築を目的とした。カビ臭物質産生微生物の個体群数定量によってカビ臭発生予測手法を構築できると考えており、ジェオスミン合成酵素遺伝子や 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成に関与する遺伝子をそれぞれ、単離菌やカルチャーコレクション由来の藍藻類から新たに塩基配列解読したものを加えた放線菌由来および藍藻類由来の塩基配列を用いて相同性解析をした。ジェオスミンの *geoA* 遺伝子ホモログは、放線菌 *Streptomyces* 属と他の属では相同性が低く、藍藻類では、同じ「属」では相同性が高いものの他の属とでは、相同性が低い結果となった。この結果から、藍藻類では *geoA* 遺伝子ホモログを用いて各「属」を区別できる分子生物学的手法を構築できることがわかった。2-MIB のメチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子は、それぞれ異なる「属」とも高い相同性を示した。一方、放線菌と藍藻類間の各遺伝子の相同性は低く、放線菌と藍藻類を分けた分子生物学的解析が可能となることが推測された。TN/TP が与えるカビ臭物質産生への影響解析から、TN/TP が高い方が 2-MIB 産生量が高くなることがわかった。また、クロロフィルの生合成が活発ではない定常期から死滅期に、カビ臭物質の生合成経路へ切り替わることが推測された。1 細胞あたりのカビ臭合成活性は低いと推測されるものの細胞量が多い際に、高いカビ臭物質濃度が検出されるため、カビ臭物質産生微生物の個体群数の定量は、カビ臭発生予測手法に寄与できるといえる。

以上の成果から、カビ臭発生と消失を、顕微鏡観察では区別し難い、カビ臭物質産生微生物の個体群数を分子生物学的手法で定量することで推測できることがわかった。

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いといえる。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の代謝に影響を与える、とくにカビ臭物質は、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、二次代謝が発達している放線菌と藍藻類であり、環境因子の変動に影響を受けやすいと考えられる。カビ臭物質が、生物由来の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、カビ臭物質産生放線菌¹⁾や藍藻類²⁾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。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く、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。これは、カビ臭発生予測にも重要な知見となるため、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³⁻⁷⁾。今後、水源池におけるカビ臭発生予測手法及びカビ臭発生抑制手法の確立は、持続的な水質管理に極めて重要であると広く認識されていることから、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、それら手法を構築することが急務となっている。

そこで本研究は、カビ臭物質産生微生物の個体群数定量と窒素濃度やリン濃度といった水質が及ぼすカビ臭物質産生量へ与える影響の知見を融合したカビ臭発生予測手法の構築を目的とした。

B. 研究方法

1) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の相同性

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、平成 27 年度に上水源や水域から単離した放線菌様細菌 (106 株) を用いて、単離菌の遺伝子解析を実施した。

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である) および *geoA* 遺伝子ホモログを 249F (5' -CTTCTTCGACGACCACTTCC- 3') と 1860R (5'-CGTACTCGATCTCCTTCTGG - 3')のプライマーセットを用いて、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 (MACHEREY-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。

国際塩基配列データベース (DDBJ (NIG)、GenBank (NCBI)、EMBL (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-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成に関与する重要な遺伝子である⁸⁾、メチルトランスフェラーゼ遺伝子およびシクラーゼ遺伝子⁸⁾を国際塩基配列データベースから探索し、塩基配列を得て、単離菌から得た塩基配列を加えて相同性解析を行った。

2) TN/TP が及ぼす藍藻類のカビ臭物質産生へ影響

供試藍藻類は、国立環境研究所微生物系統保存施設より、ジェオスミン産生藍藻類として、*Dolichospermum smithii* NIES-824 (*Anabaena smithii* NIES-824)、また 2-MIB 産生藍藻類として、*Pseudanabaena galeata* NIES-512 を得た。両藍藻類とも標準培地が CT 培地であり、CT 培地の TN/TP が、8.1 であった。また、CT 培地の窒素成分量を 2 倍量と変化させた改変 CT 培地の TN/TP は、13.1 であった。これらの培地を用いて、TN/TP が与える細胞増殖およびカビ臭物質産生量への影響を解析した。培養温度は、28°C、光強度は、60.3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。細胞増殖量を示すクロロフィル a (Chl.a) と死細胞量を示すフォエ色素は、ホットメタノール法を用いて抽出し、分析した。カビ臭物質は、固相抽出-GC/MS 法により分析した。植菌後 4 日経過する毎にサンプル (n=5) を採取し、分析を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭物質産生合成酵素遺伝子の相同性

単離菌の同定のための 16S rRNA 遺伝子塩基配列解読結果より、59 株がカビ臭物質産生報告例の多い *Streptomyces* 属であった。また *Streptomyces* 属以外に 13 株において *Bacillus* 属、*Acinetobacter* 属、*Ralstonia* 属、*Pseudomonas* 属、*Stenotrophomonas* 属と同定された。*Streptomyces* 属と同定された 59 株のうち、39 株から *geoA* 遺伝子ホモログを確認した。*geoA* 遺伝子ホモログが確認されなかった 20 株は、本研究で供したプライマーセットが 20 株の保持する *geoA* 遺伝子ホモログ

の塩基配列との相同性が低いために確認されなかったことも考えられた。このため、この20株が、*geoA* 遺伝子ホモログを保持していないとは決定されない。次年度に引き続き解析を継続する。また、*Streptomyces* 属以外の細菌であった13株中7株から *geoA* 遺伝子ホモログを確認した。国際塩基配列データベースの遺伝子データにおいても、放線菌ではない細菌も *geoA* 遺伝子ホモログを保持している情報を得た。昨年度の研究成果より、*geoA* 遺伝子ホモログを保持している主な放線菌は、*Streptomyces* 属であるが、*Kitasatospora* 属、*Frankia* 属、*Kribbella* 属等も保存しており、放線菌に広く *geoA* 遺伝子が保存されていることがわかっている。*geoA* 遺伝子ホモログについて、単離菌から得た塩基配列と国際塩基配列データベースから得た塩基配列との相同性解析（図1）、放線菌のみでの相同性解析（図2）、放線菌ではない細菌と放線菌との相同性解析（図3）を我が国で単離された代表的な放線菌のひとつである、*Streptomyces avermitilis* を基に行った。その結果、放線菌において異なる「属」に属する場合、相同性が低い傾向にあることがわかった（図1と図2）。一方、他の細菌との相同性は、*Streptomyces* 属が保持する *geoA* 遺伝子ホモログと相同性があることがわかった。先行研究で、放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログを定量する定量 PCR 用プライマーの開発事例が報告されている¹⁾が、本研究成果より、そのプライマーセットでは、ギャップが存在する領域を増幅させてしまうため、定量 PCR 用プライマーとして適さないことがわかった。そこで現在、*Streptomyces* 属を主として多くの放線菌の *geoA* ホモログを定量するための定量 PCR 用プライマーを開発している。

翻って、2-MIB 産生に関与する遺伝子である放線菌のメチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子の塩基配列情報を国際塩基配列データベースから得て、相同性解析を実施すると、両遺伝子ともに、*Streptomyces* 属のなかで高い相同性を示した。

この結果から、*geoA* 遺伝子ホモログと同様に 2-MIB 産生放線菌を定量する定量 PCR 用プライマーを開発することが可能であることが示された。

一方、藍藻類において、平成28年度では、塩基配列が解読されていなかった *Dolichospermum smithii* NIES-824 (*Anabaena smithii* NIES-824) の *geoA* 遺伝子ホモログの塩基配列を解読し、相同性解析に供した。その結果、*Dolichospermum* 属内では、高い相同性を示したが、他の属とは、相同性が低かった。したがって、平成27年度研究成果と同様に、日本由来のジェオスミン産生藍藻類においても、異なる「属」間においては、*geoA* 遺伝子ホモログの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。

翻って、2-MIB 産生に関与する遺伝子であるメチルトランスフェラーゼ遺伝子は、国際塩基配列データベースでは、7データのみであるものの、異なる「属」間においても高い相同性を有していることがわかった（図4）。同様に 2-MIB 産生に関与するシクラーゼ遺伝子においても高い相同性を有していることがわかった（図5）。加えて、放線菌のメチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子、それぞれとの相同性は極めて低いことがわかった。従って、2-MIB 産生に関して、藍藻類と放線菌を明瞭に区別して、定量できることがわかった。

以上から、カビ臭発生予測法の構築に重要なカビ臭物質産生微生物の個体群数のモニタリングは、カビ臭物質合成遺伝子を標的として定量 PCR 法を用いて、実施できる。

2) 藍藻類のカビ臭物質産生への T-N/T-P の影響

TN/TP の増加に伴い *D. smithii* NIES-824 の細胞量の増加がみられた（図6）。一方、細胞量あたりのジェオスミン産生量は、細胞量が少ない TN/TP 8.1 の条件の方が高く、死滅期におけるジェオスミン産生量は急激に増加することがわかった（図7）。ジェオス

ミンの前駆物質は、ファルネシルニリン酸であり、クロロフィルは、ファルネシルニリン酸から複数の段階を経て生合成される。つまり、死滅期になるとファルネシルニリン酸から、クロロフィルを生合成する経路から、ジェオスミンを生合成する経路に切り替わるために、カビ臭物質ジェオスミン量が多量になったと考えられる。現在、ジェオスミン産生活性の指標となりうる *geoA* 遺伝子ホモログの発現量を解析しているところである。

一方、ジェオスミン濃度は、細胞量が多い際に高かった (図 6、図 7) ことから、ジェオスミン産生藍藻類の個体群数の定量は、ジェオスミン発生予測手法に寄与できる。

翻って、*P. galeata* においては、TN/TP が 8.1 の方が最大増殖量となった (図 8(a))。また、細胞量あたりの 2-MIB は、TN/TP13.1 の条件で、死滅期 (24 h) において最大となった (図 9(a))。TN/TP8.1 の条件では、定常期から死滅期 (16 h – 24 h) まで、統計的な有意な差はなく、TN/TP の条件によって、2-MIB 産生の挙動に変化があることがわかった。実験開始 28 h においては、Chl.a が検出限界以下となり、フェオ色素が検出された (図 8(b))。フェオ色素あたりの 2-MIB 量も TN/TP13.1 の条件が、TN/TP8.1 よりも高い値であった。以上から、2-MIB 産生量は、TN/TP に影響を受けることが推測された。TN/TP13.1 の条件での実験開始 24 h 後において、細胞量あたりの 2-MIB が最大値を示した。ジェオスミン産生の解析結果と同様に、2-MIB の前駆物質であるゲラジルニリン酸は、複数の段階を経て、クロロフィルへと生合成されることから、定常期から死滅期では、2-MIB 生合成が優先されたと考えられた。現在、2-MIB 産生に関与するメチルトランスフェラーゼ遺伝子とシクラーゼ遺伝子の発現量解析を行っている。一方、細胞量が多い際に、検出された 2-MIB 濃度も高いことから、2-MIB 産生微生物の個体群数の定量は、2-MIB 発生予測手法の構築に寄与できる。

先行研究では、*Anabaena ucrainica* CHAB2155 の最小増殖速度を示す条件の時

に、最大 *geosmin* 産生を示したことが報告されている³⁾。また、*Lyngbya kuetzingii* を用いて先行研究においても同様に最小増殖速度において、最大 *geosmin* 産生を示したことが報告されている⁵⁾。したがって、先行研究と本研究結果から、最小増殖速度を示す、つまりクロロフィル合成が活発に起きない際にカビ臭物質産生活性を亢進させ、1 細胞あたりのカビ臭物質産生量が上昇すると考えられた。

E. 結論

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。カビ臭物質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あることを室内実験からも確認し、分子生物学的手法を用いてカビ臭物質産生微生物の個体群数を定量することは、カビ臭発生予測手法の構築に活用できることがわかった。一方、TN/TP カビ臭物質産生への影響の知見から、TN/TP が高い際に 2-MIB 産生量が高くなることがわかった。また、クロロフィル合成が活発ではない定常期から死滅期に、1 細胞あたりのジェオスミン産生量および 2-MIB 産生量が高くなった。

G. 研究発表

1) 論文発表

該当なし

2) 学会発表

(1) 穂山紗耶, 月野慎也, 木村奈々, 中島敦, 岸田直裕, 内海真生, 秋葉道宏, 清水和哉. カビ臭物質産生における引き金因子の解明. 第 51 回日本水環境学会年会; 2017 年 3 月; 熊本. 要旨集 pp.603.

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) Wang Z. Xu Y., Shao J., Wang J. and Li R. (2011) Gene associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in

cyanobacteria: isolation, characterization, and expression in response of light. *PLoS One* **6**(4), pp. e18665.

- 5) Zhang T., Li L., Song L. and Chen W. (2009) Effect of temperature and light on the growth and geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* (Cyanopytha). *Journal of Applied Phycology* **21**(3), pp. 279-285.
- 6) Schrader KK. and Blevins WT. (2001) Effect of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **26**(4), pp. 241-247.
- 7) Schrader KK. and Blevins WT. (1999) Effects of selected environmental conditions on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedii*. *The Journal of Microbiology* **37**(3), pp. 159-167.
- 8) 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.

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に感謝いたします。

Streptomyces sp. kid10_k1_3 (91%/620 bp)
Streptomyces sp. kid10_k1_4 (86%/1083 bp)
Streptomyces sp. oc_lb1 (81%/1238 bp)
Streptomyces sp. sd_2_8 (82%/1448 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_2 (91%/564 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_3 (82%/843 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_3old (85%/1090 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_6 (82%/561 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_8 (83%/1010 bp)
Streptomyces sp. sd10_2_7 (85%/1004 bp)
Streptomyces sp. sd10_2_8 (83%/1005 bp)
Streptomyces sp. sd50_1_1 (84%/1005 bp)
Streptomyces sp. sd50_2_2 (83%/1011 bp)
Streptomyces sp. sntd_k1_3 (84%/976 bp)
Streptomyces sp. std_k2_1 (87%/604 bp)
Streptomyces sp. std_k2_5 (81%/595 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_2 (82%/1144 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_3 (79%/694 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_4 (87%/1006 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_6 (84%/1066 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_7 (80%/1064 bp)
Streptomyces sp. std50_3_7 (83%/997 bp)
Streptomyces sp. std100_1_1 (82%/1186 bp)
Streptomyces sp. std100_1_2 (77%/620 bp)
Streptomyces sp. std100_1_5 (81%/840 bp)
Streptomyces sp. std100_1_7geoA (83%/1464 bp)
Streptomyces sp. std100_2_2 (75%/1003 bp)
Streptomyces sp. std100_k1_2 (84%/1008 bp)
Streptomyces sp. ttd10_k1_4 (84%/1011 bp)
Streptomyces sp. ttd10_k1_5 (84%/1004 bp)
Acinetobacter sp. hm3_5 (75%/1473 bp)
Pseudomonas sp. kd1 (87%/979 bp)
Ralstonia sp. kd4 (90%/691 bp)
Acinetobacter sp. o2_2 (86%/1126 bp)
Acinetobacter sp. o2_3 (90%/692 bp)
Bacillus sp. std_k1_5 (79%/969 bp)
Bacillus sp. std10_k1_5 (81%/914 bp)
Saccharothrix sp.
Saccharopolyspora erythraea
Nocargia vulneris
Nonomuraea sp.
Kineospora aurantiaca
Kitasatospora setae
Actinosporangium sp.
Flankia sp.
Streptomyces coelicolor A3 (2)
Streptomyces albus
Streptomyces griseus

Streptomyces avermitilis

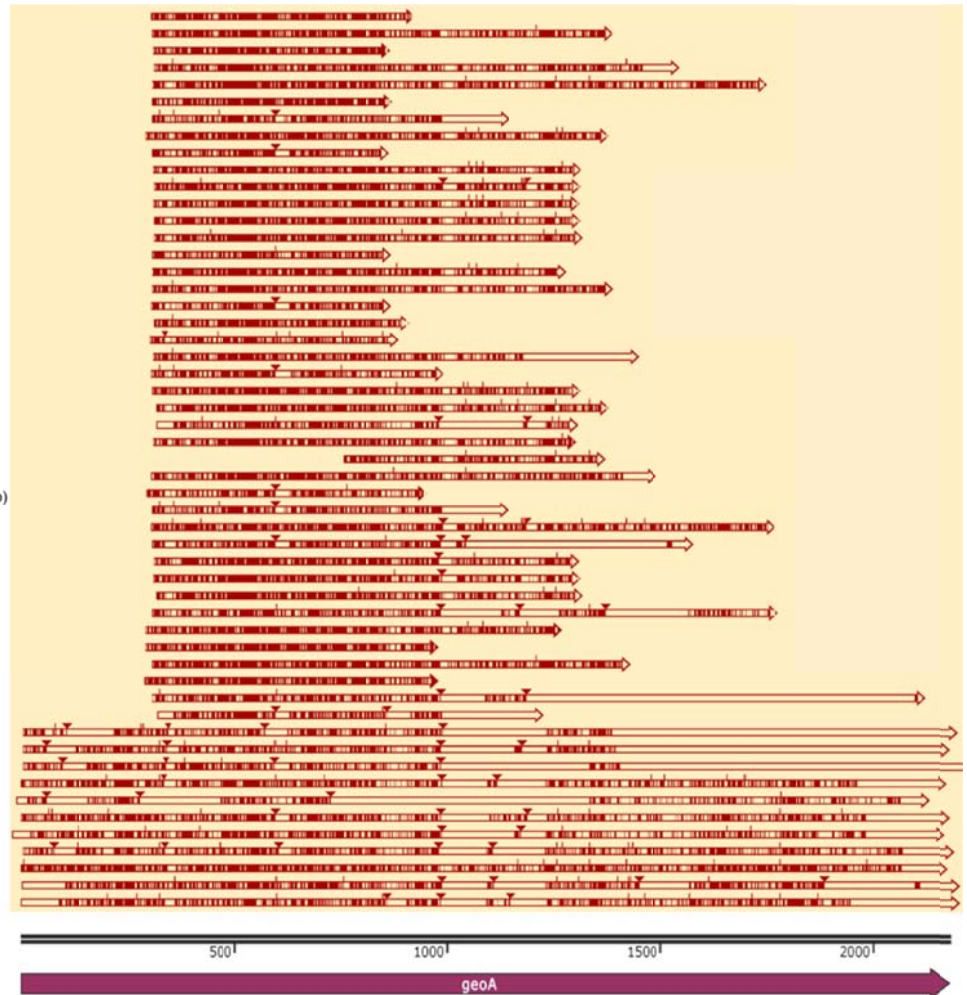
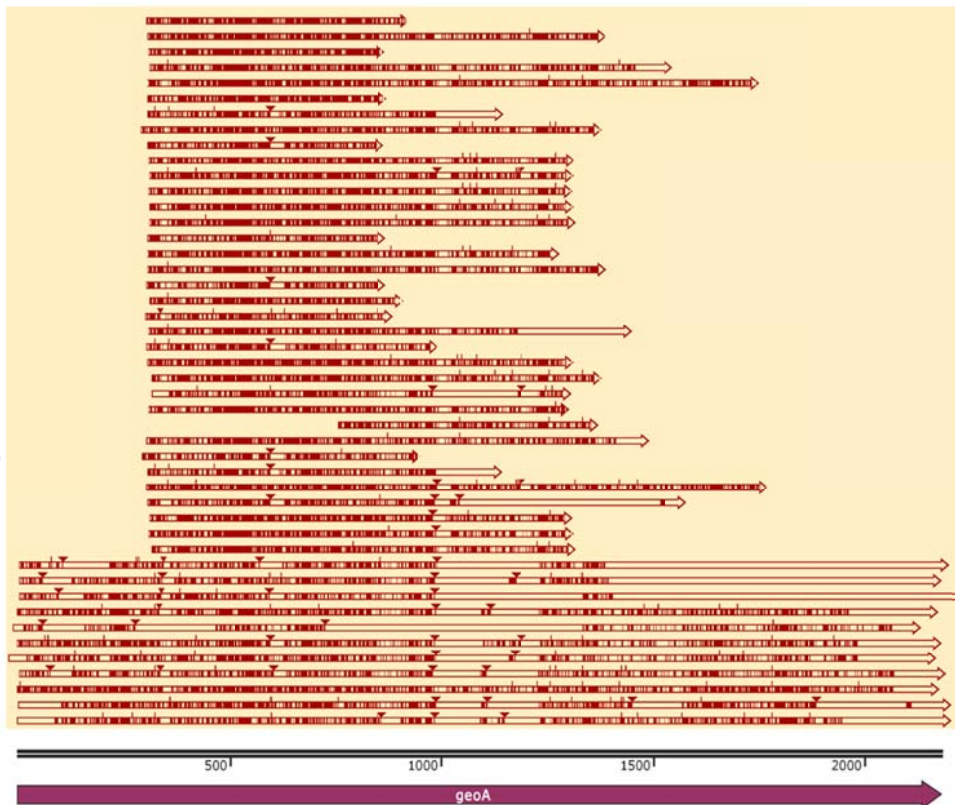


図1 細菌が保持する *geoA* 遺伝子ホモログの相同性解析
 「sp.」の後に続き表記は、単離源と株名を示す。

Streptomyces sp. ktd10_k1_3 (91%/620 bp)
Streptomyces sp. ktd10_k1_4 (86%/1083 bp)
Streptomyces sp. oc_lb1 (81%/1238 bp)
Streptomyces sp. sd_2_8 (82%/1448 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_2 (91%/564 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_3 (82%/843 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_3oid (85%/1090 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_6 (82%/561 bp)
Streptomyces sp. sd10_1_8 (83%/1010 bp)
Streptomyces sp. sd10_2_7 (85%/1004 bp)
Streptomyces sp. sd10_2_8 (83%/1005 bp)
Streptomyces sp. sd50_1_1 (84%/1005 bp)
Streptomyces sp. sd50_2_2 (83%/1011 bp)
Streptomyces sp. sntd_k1_3 (84%/976 bp)
Streptomyces sp. std_k2_1 (87%/604 bp)
Streptomyces sp. std_k2_5 (81%/595 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_2 (82%/1144 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_3 (79%/694 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_4 (87%/1006 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_6 (84%/1066 bp)
Streptomyces sp. std10_k1_7 (80%/1064 bp)
Streptomyces sp. std50_3_7 (83%/997 bp)
Streptomyces sp. std100_1_1 (82%/1186 bp)
Streptomyces sp. std100_1_2 (77%/620 bp)
Streptomyces sp. std100_1_5 (81%/840 bp)
Streptomyces sp. std100_1_7geoA (83%/1464 bp)
Streptomyces sp. std100_2_2 (75%/1003 bp)
Streptomyces sp. std100_k1_2 (84%/1008 bp)
Streptomyces sp. ttd10_k1_4 (84%/1011 bp)
Streptomyces sp. ttd10_k1_5 (84%/1004 bp)
Saccharothrix sp.
Saccharopolyspora erythraea
Nocargia vulneris
Nonomuraea sp.
Kineospira aurantiaca
Kitasatospora setae
Actinosporangium sp.
Flankia sp.
Streptomyces coelicolor A3 (2)
Streptomyces albus
Streptomyces griseus



Streptomyces avermitilis

図2 放線菌が保持する *geoA* 遺伝子ホモログの相同性解析
 「sp.」の後に続き表記は、単離源と株名を示す。

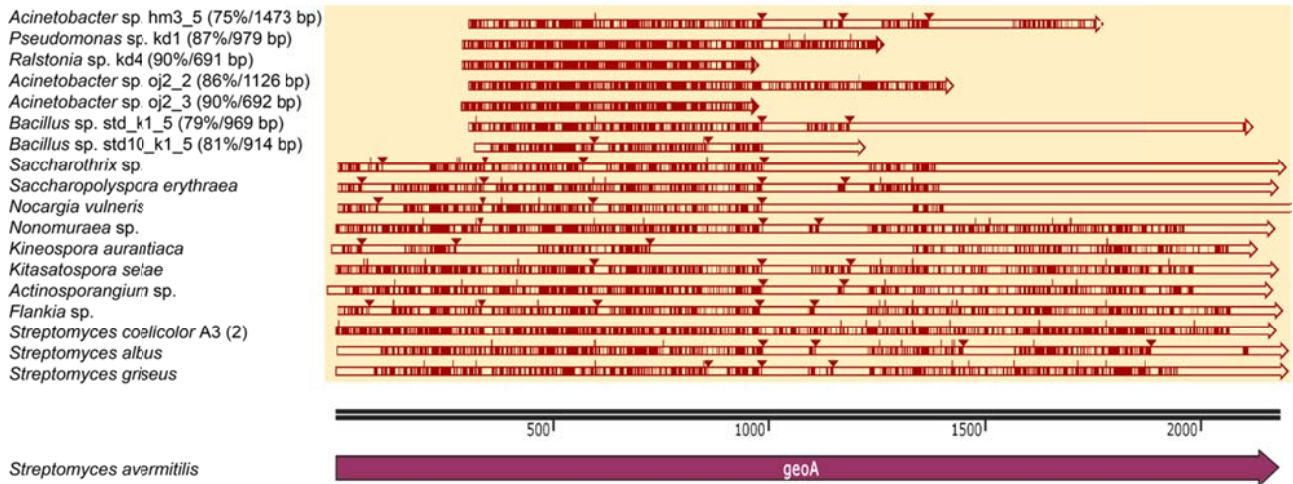


図3 細菌の *geoA* 遺伝子ホモログと放線菌の *geoA* 遺伝子ホモログとの相同性解析「sp.」の後に続き表記は、単離源と株名を示す。



図4 メチルトランスフェラーゼ遺伝子の相同性解析

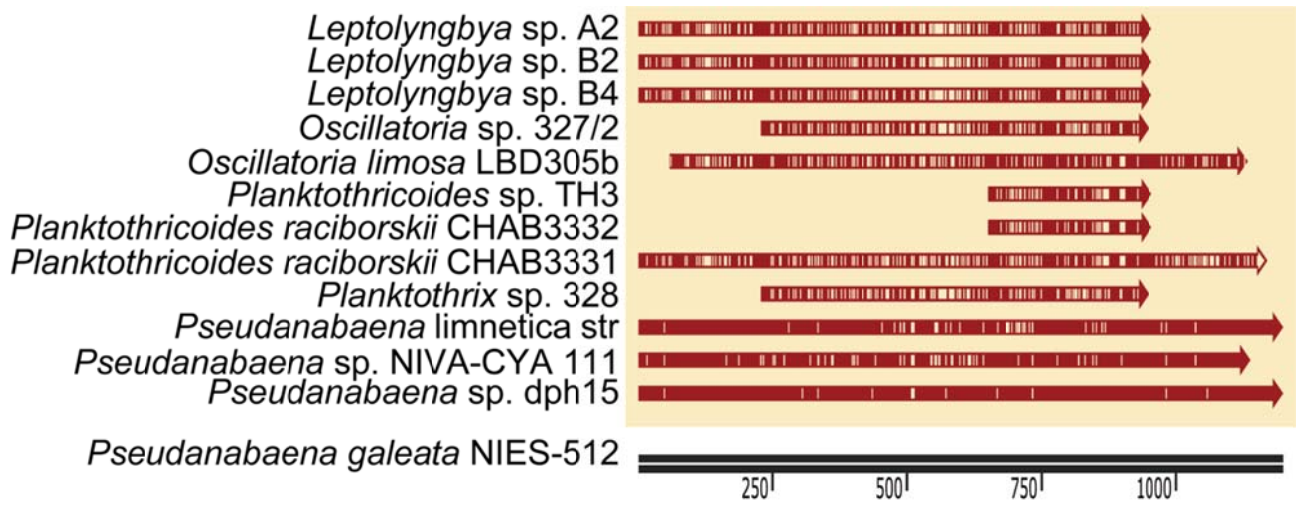


図5 シクラーゼ遺伝子の相同性解析

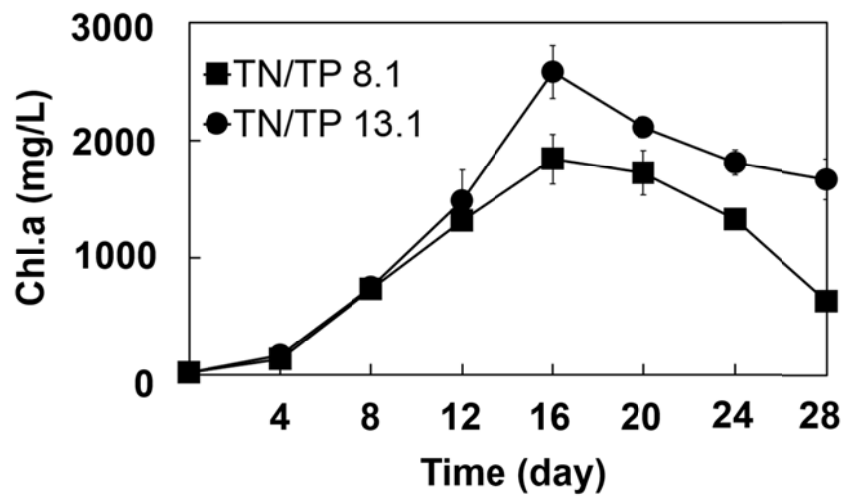


図 6 *D. smithii* の細胞量の経日変化
死細胞を示すフェオ色素は、全て検出限界以下となった。

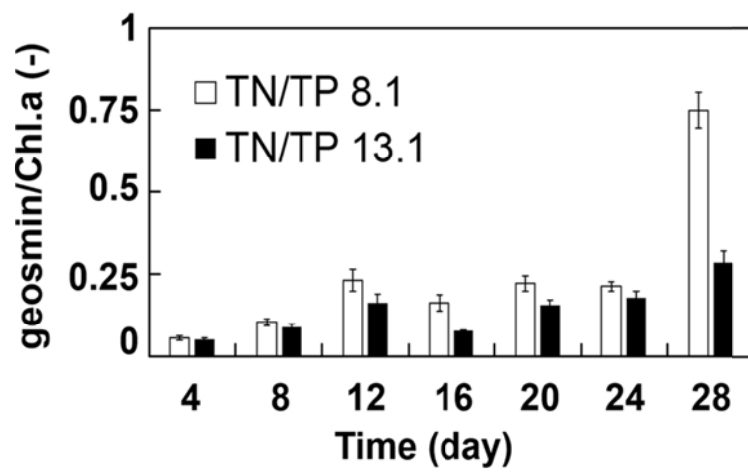
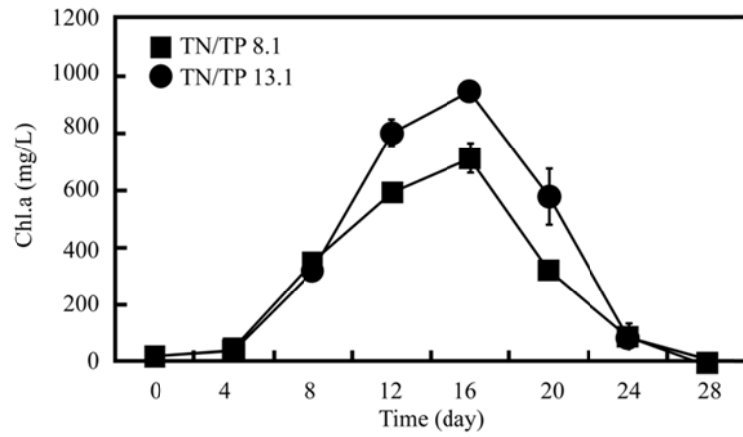
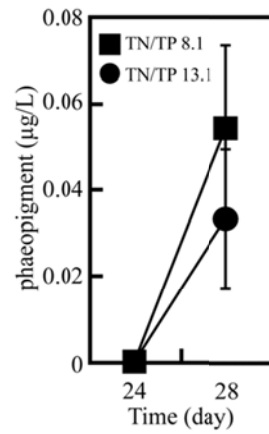


図7 *D. smithii* の細胞量あたりのジェオスミン量の経日変化

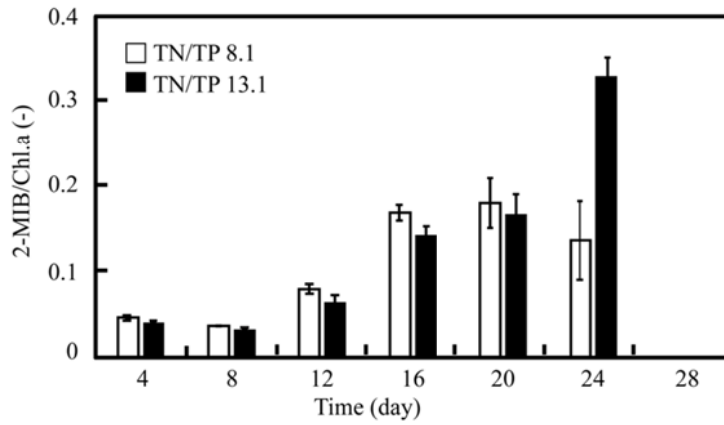


(a)

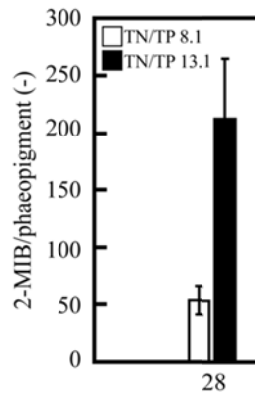


(b)

図 8 *P. galeata* の細胞量の経日変化
 (a) 細胞増殖量を示す Chl.a 量、(b) 死細胞量を示すフェオ色素



(a)



(b)

図9 *P. galeata* の細胞量あたりの2-MIB量の経日変化

(a) Chl.a量あたりの2-MIB量、実験開始28日後のChl.a量は検出限界以下であった、(b) フェオ色素量あたりの2-MIB量、実験開始24日までは、フェオ色素は検出限界以下であった。