

カビ臭発生予測手法の構築

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	清水	和哉

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。水道水源における障害生物の挙動実態の把握および障害生物やカビ臭発生の制御を実施するには、カビ臭物質産生微生物（藍藻類や放線菌）の個体群数の定量、カビ臭物質産生の引き金因子の特定、の知見は重要である。これら知見は、カビ臭発生予測手法および障害生物やカビ臭発生の制御の評価手法の構築に資する。昨年度までの研究成果で、カビ臭物質産生総量は、個体群数と正の相関関係があることを確認し、一細胞当たりのカビ臭物質産生活性は、増殖が抑えられている時であった。つまり個体群数をモニタリングすることで、カビ臭発生予測が可能となることが推察された。一方、産生されたカビ臭物質の局在が明らかにされておらず、産生後、細胞内に蓄積されるのか、速やかに細胞外に排出されるのか、わかっていない。そこで、本年度は、個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子の確認および簡易なカビ臭物質産生藍藻類の定量方法の開発を実施した。ジェオスミン産生藍藻類は、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログを用いて、個体群数を定量できるものの、2-メチルイソボルネオール（2-MIB）合成には、様々な合成に関与するメチルトランスフェラーゼ遺伝子（*mts* 遺伝子）が関与するため、発現解析を行った。加えて、形態観察では判別が困難なジェオスミン産生・非産生藍藻類を簡易に識別する方法の開発を試みた。これらの結果、ジェオスミン産生藍藻類として用いた *Dolichospermum smithii* NIES-824 では、ジェオスミン産生後、細胞内に保持する傾向にあったが、2-MIB 産生藍藻類として用いた *Pseudanabaena galeata* NIES-512 では、ほとんどが細胞外に局在した。2-MIB 合成に関与する *mts* 遺伝子の発現量は、細胞密度が低い増殖初期が最大となり、細胞密度が高い増殖後期では、低かった。一方、ジェオスミン産生藍藻類の簡易識別法として、*geoA* 遺伝子を標的とした whole-cell PCR 法（Cell Direct PCR 法）を開発した。

以上から、カビ臭発生予測法としてのカビ臭物質産生藍藻類の個体群密度の定量法を開発するとともに、カビ臭発生前後での上水処理管理に資するカビ臭の局在を明らかにした。

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、カビ臭発生予測やカビ臭制御の評価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と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。

昨年度までに、昨年度までの研究成果で、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログや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であると推測された。藍藻類では *geoA* 遺伝子ホモログを用いて各「属」を区別でき、「属」毎の個体群数定量を可能とできることがわかった。一方、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、各「属」を区別できないため、2-MIB 産生藍藻類全体の個体群数定量となることがわかった。つまり個体群数をモニタリングすることで、カビ臭発生予測が可能となることが推察された。一方、産生されたカビ臭物質の局在が明らかにされておらず、産生後、細胞内に蓄積されるのか、速やかに細胞外に排出されるのか、わかっていない。この知見は、カビ臭発生前後の水処理プロセスに寄与する。

そこで、本年度は、個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子を用いた簡易なカビ臭物質産生藍藻類の定量方法の開発を実施した。ジェオスミン産生藍藻類は、ジェオス

ミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログを用いて、カビ臭物質産生活性を定量できるものの、2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成には、様々な合成に関与するメチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*mts* 遺伝子)⁸⁾が関与するため、発現解析を行った。加えて、形態観察では判別が困難なジェオスミン産生・非産生藍藻類を簡易に識別する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 藍藻類のカビ臭物質の局在解析

供試藍藻類は、国立環境研究所微生物系統保存施設より得た、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 を用いた。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。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)をホットメタノール法により抽出し、分析した。カビ臭物質は、固相抽出-GC/MS法により分析し、カビ臭物質の局在を解析した。加えて、*P. galeata* NIES-512 から全RNAを抽出後、ランダムプライマーでcDNAを作成し、メチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*mts* 遺伝子)の発現解析を実施した。全てのサンプル (n=5)は、植菌後4日経過する毎に採取した。

2) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・定量法の開発

簡易識別・定量のどちらも実施できる方法として、PCR法に着目した。PCRに必要な機器であるサーマルサイクラーは、近年は、安価に導入できるため、アガロース電気泳動装置等を含めた導入コストは、安価になり、多くの現場において導入が可能であると想定できる。形態観察で判別が困難なジェオスミン産生藍藻類 *Dolichospermum* sp.を対象と

し、供試藍藻類は、*D. smithii* NIES-824 とした。識別には、分離藍藻類が、真核生物の藻類ではなく、原核生物の藍藻類であることおよび PCR 反応の陽性を判断するコントロールとして、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログとともに 16S rRNA 遺伝子も同時に増幅させる multiple whole-cell PCR 法の開発を試みた。昨年度に作成した *Dolichospermum* sp. が保持する *geoA* ホモログのアライメント解析から、複数の PCR プライマーを作成した。本報告書においては、検討した結果として、最適なプライマーとサーマルサイクル条件を示す。*geoA* ホモログ増幅用プライマーは、*geoA_Doli_540F* (5'-ccccattgaatacattgaatgc-3')、*geoA_Doli_774R* (5'-acgtcaactacaagcacacag) を用いた。加えて、16S rRNA 遺伝子用プライマーは、藍藻類ユニバーサルプライマーセットである 27F (5'-agagtttgatcctggctcag-3') と 1494Rc (5'-tacggctacctgttacgac-3') を用いた。DNA ポリメラーゼは、MightyAMP™ DNA Polymerase Ver.3 (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) を用いた。PCR 反応液の条件は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。サーマルサイクル条件は、初期変性 98°C、2 分、30 回のサーマルサイクル反応; 変性 98°C、10 秒、アニーリング 60°C、15 秒、伸長 68°C、90 秒、と設定し、PCR を行った。PCR 結果を確認するため、2% アガロースによる電気泳動を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) 藍藻類のカビ臭物質の局在解析とカビ臭物質合成関連遺伝子の発現量解析

上水で問題となっているカビ臭物質は、ジェオスミンと 2-MIB である。しかしながら、これらの局在について詳細がわかっていない。この局在の知見は、カビ臭発生時の上水処理プロセスでの対策に寄与できる。TN/TP に関係せずに、*D. smithii* NIES-824 が産生するカビ臭物質

geosmin は、最大約 1 割が細胞外、つまり溶存態として存在していることがわかった (図 1)。も総 *geosmin* 濃度が対数増殖期からほぼ一定となるものの、溶存態 *geosmin* 濃度は定常期から死滅期に最大となっている。つまり、産生された *geosmin* は、細胞内に保持され、定常期から死滅期に多くの藍藻類細胞が溶解等により、*geosmin* は細胞内から細胞外へと行こうすると推察された。

ジェオスミン濃度と細胞量には正の相関関係があることから、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。一方、本研究結果から細胞内にジェオスミンが、局在していることから、選択的取水や塩素処理等で細胞破壊を引き起こす処理を行う前に凝集沈殿処理等によって藍藻類細胞を除去することは、後段の水処理プロセスにジェオスミンを極力持ち込まないことに繋がるため、上水の質の管理が改善されると考えられる。

他方、*P. galeata* においては、TN/TP に関係せずに総 2-MIB 濃度と溶存 2-MIB 濃度がほぼ等しく、2-MIB は産生された後に、速やかに細胞外に移行しているものと推測された。2-MIB は、ジェオスミンと比較して、除去しにくいといわれていることから、2-MIB 産生藍藻類の増殖を確認した場合、早期に対応を計画する必要があるといえる。2-MIB 合成の初期に関与するメチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*mts* 遺伝子) の発現解析を実施したところ、2-MIB 濃度が増加する前に、発現量が高いことがわかった (図 3)。したがって、2-MIB 産生が活発になる際に、事前に *mts* 遺伝子発現量が上昇する可能性があり、環境モニタリング解析により確認されれば、2-MIB 発生に対応する早期計画を立案・実行が可能となる。

2) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・定量法の開発

ジェオスミン産生藍藻類である *Dolichospermum* sp. (*Anabaena* sp.) は、ジェ

オスミン産生株と非産生株が、水源においてそれぞれ高密度で発生するため、管理している水源にて確認された *Dolichospermum* sp. (*Anabaena* sp.) が産生株なのか非産生株なのかを判別することは、極めて重要である。しかしながら、形態観察では判別が困難であり、簡便な方法での判別が求められている。ジェオスミン産生株の指標としては、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA*、PCR のポジティブコントロールとしても 16S rRNA 遺伝子を標的として、DNA 抽出を必要としない multiple whole-cell PCR 法を実施した。この結果、*geoA* 遺伝子ホモログと 16S rRNA 遺伝子の増幅を確認した。PCR 法をこれまでに実施したことがない未経験者に講習の上、本試験を実施して頂いたところ、同様に結果を得ることができた。このため、講習後であれば未経験者も実施できる試験法と期待できる。

今後は、検出感度の向上やジェオスミン産生藍藻類の半定量法の確立および本手法を用いた環境モニタリングの実施、2-MIB 産生藍藻類の識別法を確立していく必要がある。

E. 結論

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り、個体群を定量することで、カビ臭発生予測を可能となることが推測された。カビ臭物質の局在は、ジェオスミンは細胞内に、2-MIB は細胞外（溶存態）に多く存在することが明らかになった。以上は、浄水処理プロセスの管理に資する知見である。一方、水源におけるジェオスミン産生株のモニタリングのために、形態観察では困難なジェオスミン産生藍藻類の識別に有効と期待できる multiple whole-cell PCR 法を開発した。本手法は、半定量的な手法へと発展も可能であることから、qPCR 装置を導入していない施設においても有効な手法となると期待できる。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
該当なし

2) 学会発表

- (1) 清水和哉、穠山紗耶、月野慎也、Hanchen Miao, 内海真生、秋葉道宏. 第 55 回日本水処理生物学会年会;2017年11月;大阪. 要旨集 pp.19

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。

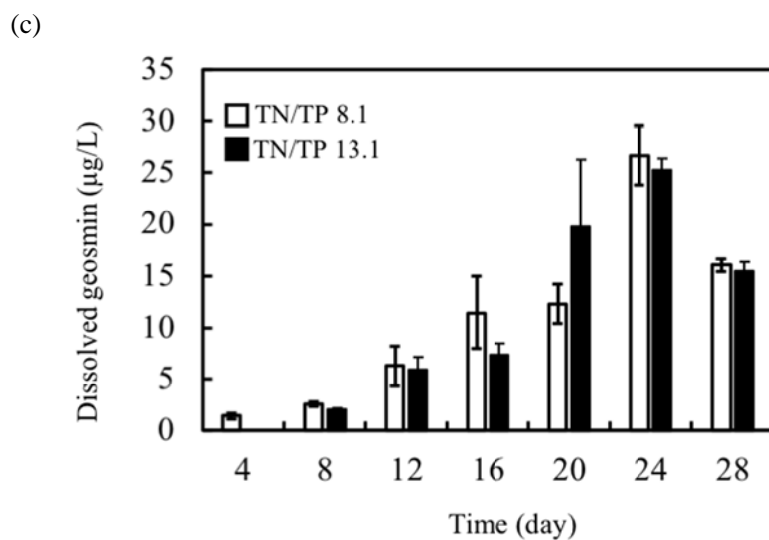
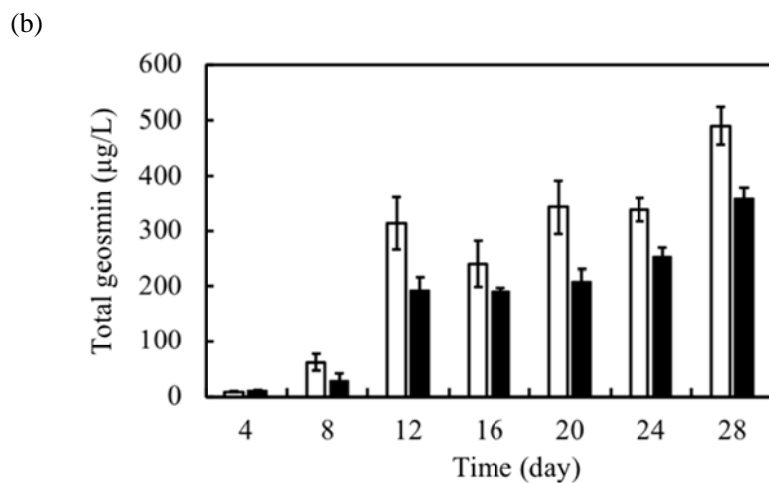
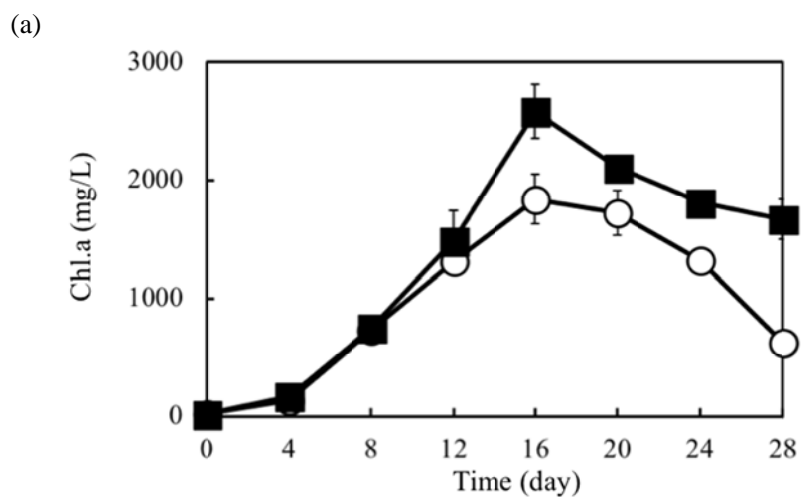
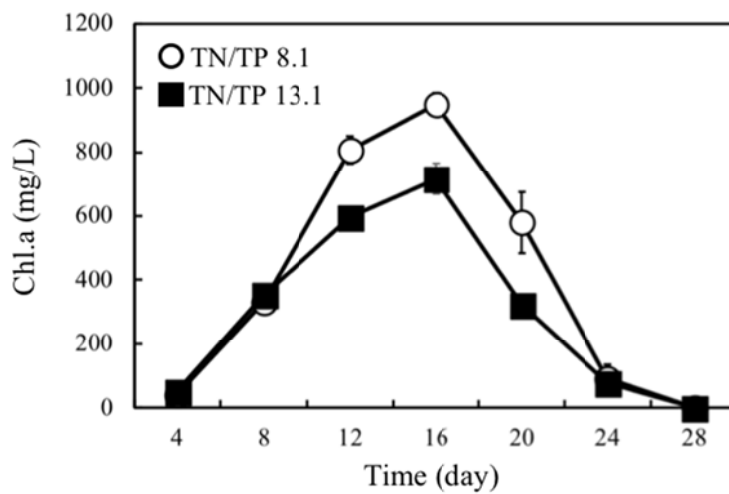
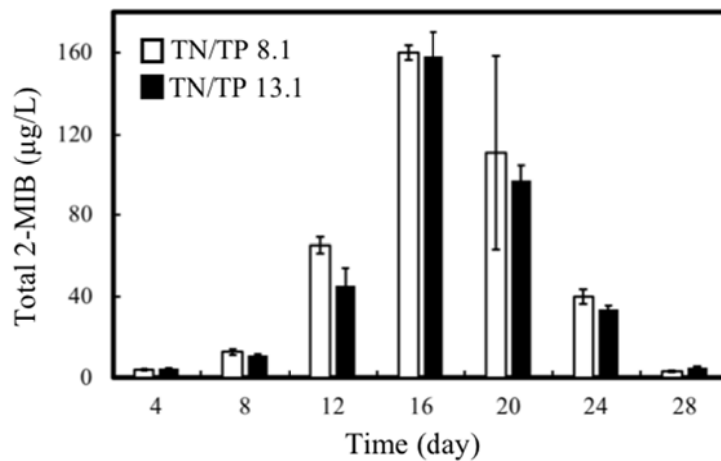


図1 *D. smithii* NIES-824 の増殖とジェオスミン産生
 (a) *D. smithii* の増殖曲線、(b) 総 geosmin 濃度、(c) 溶存 geosmin 濃度

(a)



(b)



(c)

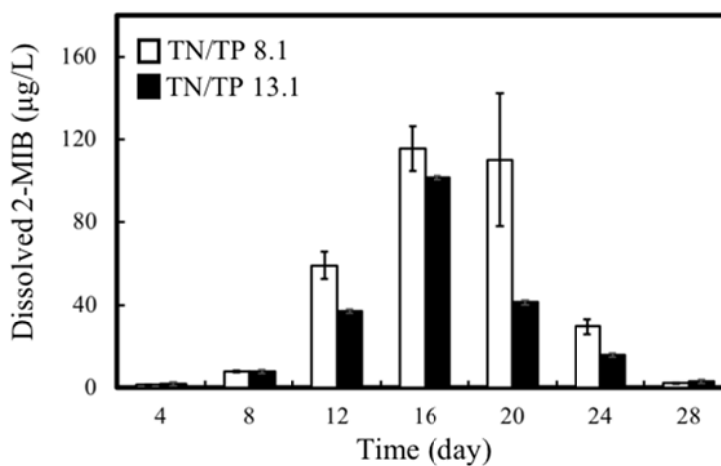


図 2 *P. galeata* の増殖と 2-MIB 産生

(a) *P. galeata* の増殖曲線、(b) 総 2-MIB 濃度、(c) 溶存 2-MIB 濃度

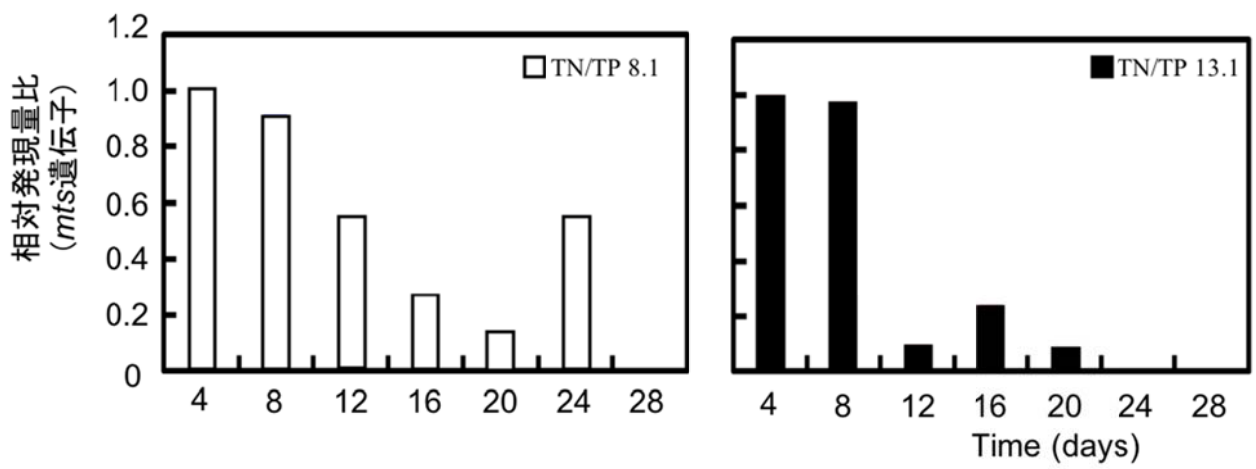


図3 *mts* 遺伝子の発現量変化

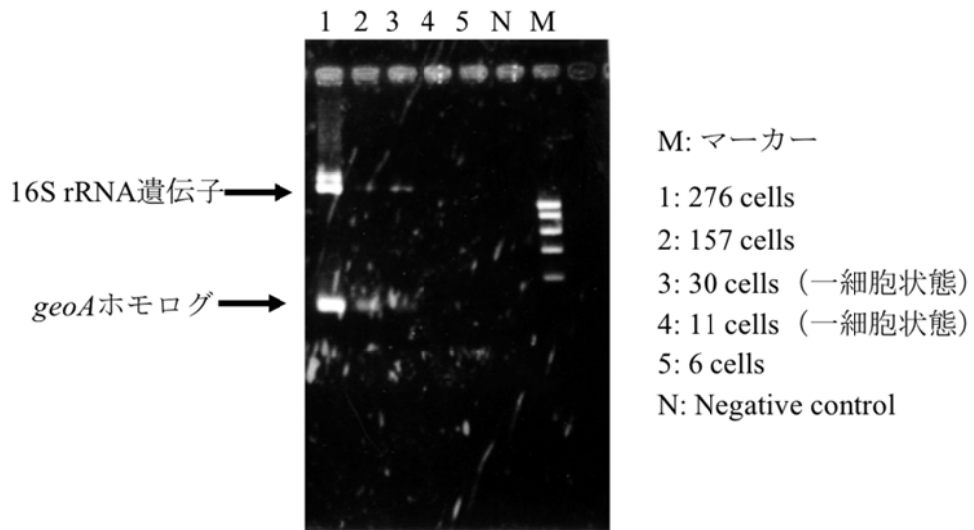


図 4 Whole Cell PCR
 講習後の未経験者が実施した結果

