

カビ臭原因物質産生藍藻類の  
ライブラリ作成に向けた実態調査

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	藤本	尚志
研究分担者	浅田	安廣
研究協力者	井上	拓也



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)  
「水道事業の流域連携の推進に伴う水供給システムにおける  
生物障害対策の強化に関する研究」  
分担研究報告書

研究課題：カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリ作成に向けた実態調査

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 部長  
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学応用生物科学部 教授  
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 主任研究官  
研究協力者 井上 拓也 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により藻類が異常発生し、水道でのカビ臭発生事例が確認されているため、その対策に向けて原因解明が求められている。カビ臭原因物質を産生する主な原因生物として藍藻類があげられるが、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種についてデータ収集を行うと同時にその特徴について整理を行っていく必要がある。

本研究ではカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について形態による分類、16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無についてデータを集積した。

琵琶湖を対象として、単藻培養できた藍藻類 12 株について 16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭産生の有無について調査を行なった。その結果、*Plankthothricoides raciborskii* に近縁な N-3 株および N-4 株が 2-MIB 合成酵素遺伝子を保有し、2-MIB を産生することが明らかとなった。その一方で、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられ、産生種の判定には *geoA* 遺伝子の有無の判定が重要であることが明らかとなった。

A. 研究目的

温暖化や湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化により水道障害生物が異常発生し、様々な生物障害事例を引き起こしている。その中でも水道水の異臭味被害の一つであるカビ臭発生事例は多くの事業体で確認されているため、その原因解明とそれに合わせた対応が早急に求められる。

カビ臭の原因物質はジェオスミンと 2-MIB(2-メチルイソボルネオール)であり、それらを産生する主な原因生物として藍藻類があげられる。しかし、その中にはカビ臭産生種/非産生種が混在しているため、カビ臭を産生する種についてデータ収集を行うと同時にその特徴について整理を行っていく必要がある。

そこでカビ臭原因物質が確認された水源から単離された藻類株について形態による分類、16S

rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無についてデータを集積し、データベースを作成することを本研究テーマの最終目標とした。そして平成 30 年度の取り組みとして、琵琶湖を対象として藍藻類の単離を行い、上述した情報について収集を行った。

B. 研究方法

京都市上下水道局の協力を得て、琵琶湖南湖(6-8 月、月 1 回)、琵琶湖北湖(8 月 1 回)において採水を行った。採水した試料に対して静置状態(浮遊性)、混和状態(浮遊性、付着性混合)の試料を準備し、ピペット洗浄法により各試料から藍藻類の単藻(条件:CT 培地、20 °C、1000-2500 Lux、明暗 12 時間)を試みた。

単藻できた株については CT 培地で、20 °C、

1000 Lux、明暗 12 時間の条件で培養を行った。そして同条件で継代培養(培地:10 mL)・大量培養(培地: 100 mL)を行い、遺伝子解析とカビ臭原因物質検出に供した。

遺伝子解析では、培養液を 0.45 μm メンブレンフィルターで捕捉して凍結させた後、DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN)により DNA 抽出を行った。その後、16S rRNA 遺伝子解析<sup>1)</sup>、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析(*geoA* 遺伝子、2-MIB 合成遺伝子)<sup>2)</sup>を行った。なお、PCR による増幅産物は 1.5%アガロースゲルによる電気泳動でバンドを確認した。そして、精製した DNA 試料(各増幅プライマーを含む)をユーロフィン社に依頼して DNA 配列情報を取得、EMBL-EBI Sequence Similarity Searching により相同性解析を行った。

カビ臭物質検出には、大量培養した培養液に対して藻体を含む試料(総濃度)と 25 mm GD/X シリジフィルター (GMF 0.45 μm 滅菌済) でろ過した試料(溶存態濃度)について、SPME-GC/MS システム (Agilent 5973C GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS, Gerstel) を用いて、表 1 に示した条件によりジェオスミン・2-MIB 濃度を測定した。

#### C. 研究結果および D. 考察

本調査では、12 株の藍藻類が単藻培養できた(写真 1~11)。

各名称と試料の関係は以下の通りである。

- ・琵琶湖南湖(B-1 株、B-3 株、B-4 株、B-5 株、B-6 株、B-7 株、B-9 株、Y-1 株)
- ・琵琶湖北湖(N-1 株、N-2 株、N-3 株、N-4 株)

その中で、*geoA* 遺伝子を保有する株は見られなかった(図 1、2)。2-MIB 合成遺伝子については N-3 株、N-4 株で検出された(図 3)。単離株について 16S rRNA 遺伝子を解析したところ単離株は *Dolichospermum* 属、*Limnothrix* 属、*Planktothricoides* 属に近縁であった(表 1、図 4~5)。

ネンジュモ目の系統樹において、B-3 株は、*geoA* 遺伝子を有し、ジェオスミンを産生する *Dolichospermum mucosum*4-10 株と同様の位置に位置づけられたが、*geoA* 遺伝子を保有せず、さらに GC-MS による解析でもジェオスミンが検出しなかったことから、ジェオスミンを生成しないことが明らかとなった。16S rRNA 遺伝子では、産生種・非産生種の判定が出来ず、*geoA* 遺伝子の有無

の評価が重要であると考えられた。

2-MIB 合成酵素遺伝子を保有する N-3 株、N-4 株からは 2-MIB が検出され(図 6)、2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹では、*Planktothricoides raciborskii* CHA3331 と同じ位置に位置づけられた(図 7)。

#### E. 結論

琵琶湖を対象として、単藻培養できた藍藻類 12 株に対して 16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭産生の有無について調査を行なった。その結果、2-MIB 産生種が明らかとなり、さらに 2-MIB 合成酵素遺伝子を保有していることが確認された。その一方で、16S rRNA 遺伝子解析のみではジェオスミン産生種の判定が難しい可能性が考えられ、産生種の判定には *geoA* 遺伝子の有無判定が重要であることを指摘した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

浅田安廣, 藤本尚志, 高橋可穂美, 井上拓也, 秋葉道宏. カビ臭産生藍藻類のライブラリ作成に向けた試み-琵琶湖流域に生息する藍藻類の調査-. 第 53 回日本水環境学会年会, 2019.3, 甲府市, 同講演集, p.104.

#### 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) Beltran EC, Neilan BA.: Geographical Segregation of the Neurotoxin-Producing Cyanobacterium *Anabaena circinalis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.66(10), pp.4468-4474, 2000.

2) Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, Jokela J, Fewer DP, Sivonen K: Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, Water Res., Vol.68, pp.56-66,

2015..

J. 謝辞

本研究を進めるに当たり、京都市上下水道局の協力を得ました。記して謝意を表します。

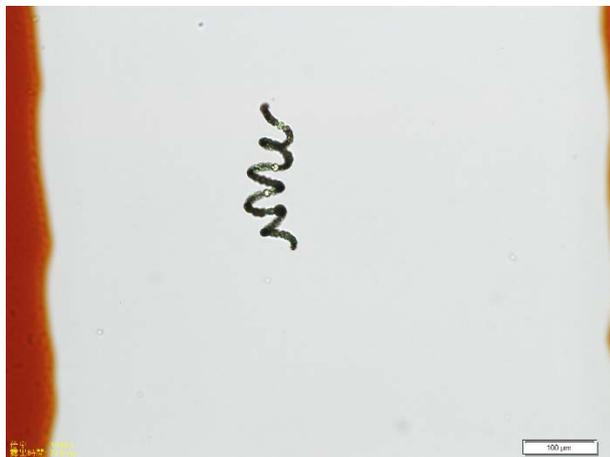


写真1 B-1株の顕微鏡写真

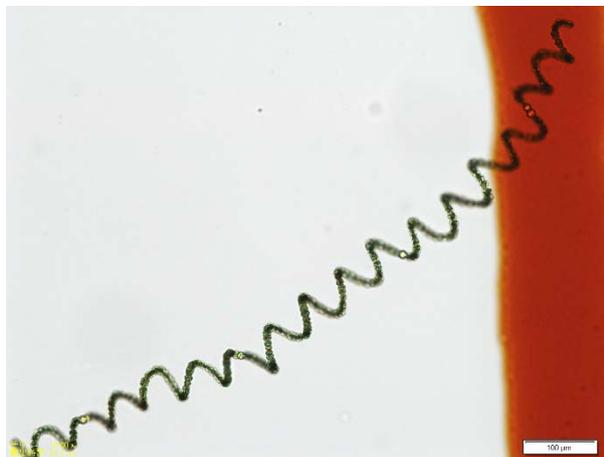


写真2 B-3株の顕微鏡写真



写真3 B-4株の顕微鏡写真

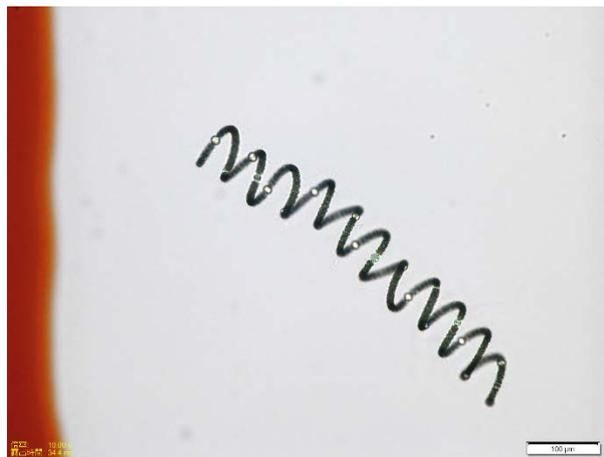


写真4 B-5株の顕微鏡写真

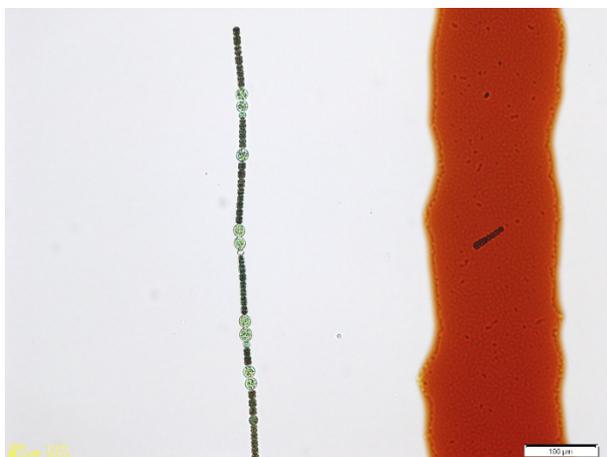


写真5 B-6株の顕微鏡写真



写真6 B-7株の顕微鏡写真

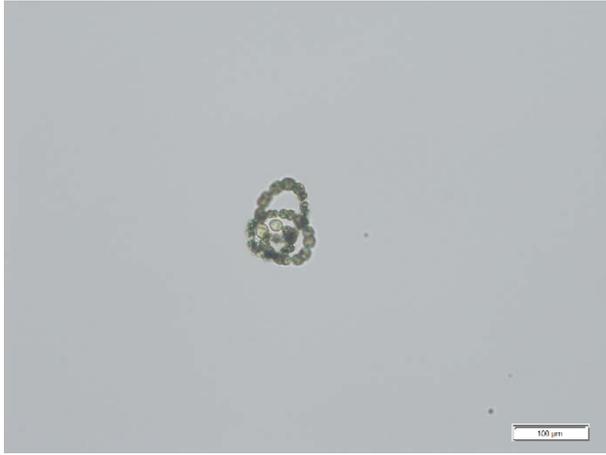


写真 7 B-9 株の顕微鏡写真

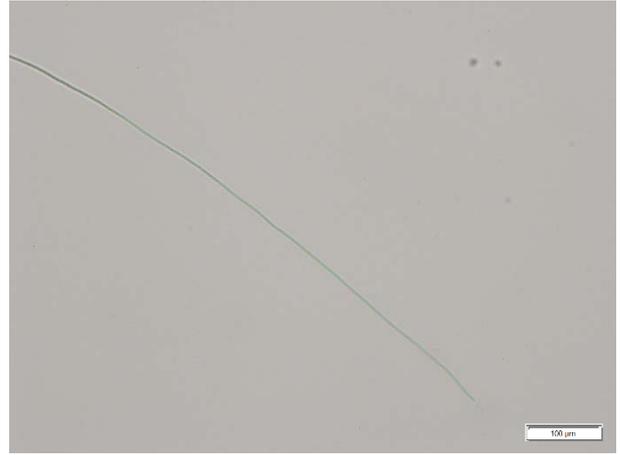


写真 8 N-1 株の顕微鏡写真

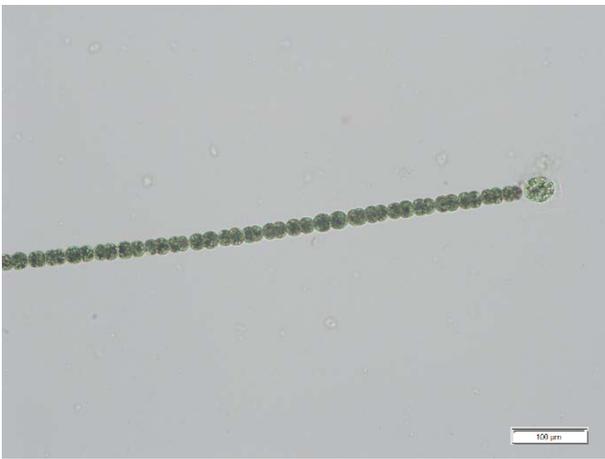


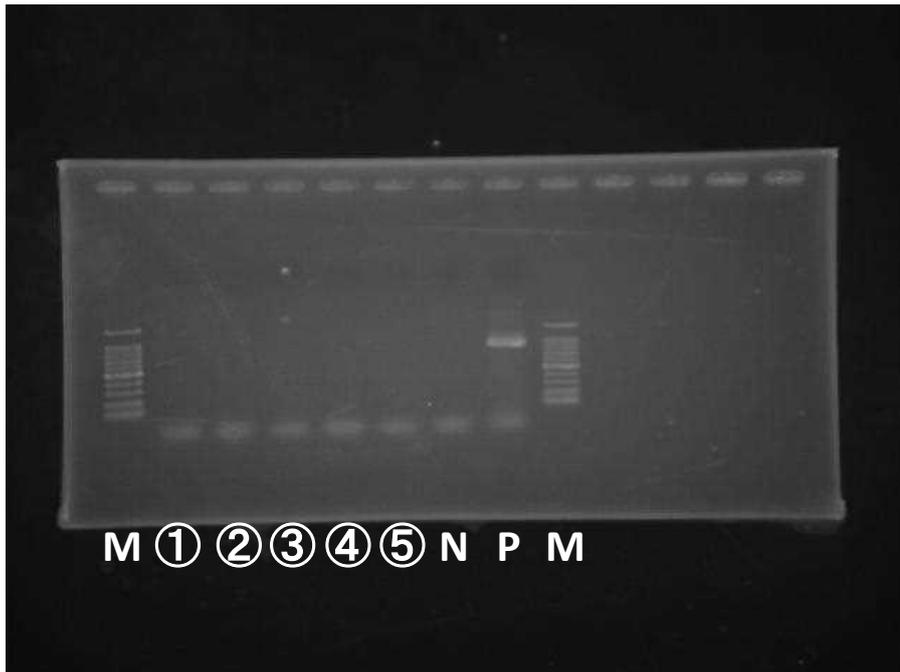
写真 9 N-2 株の顕微鏡写真



写真 10 N-3 株の顕微鏡写真



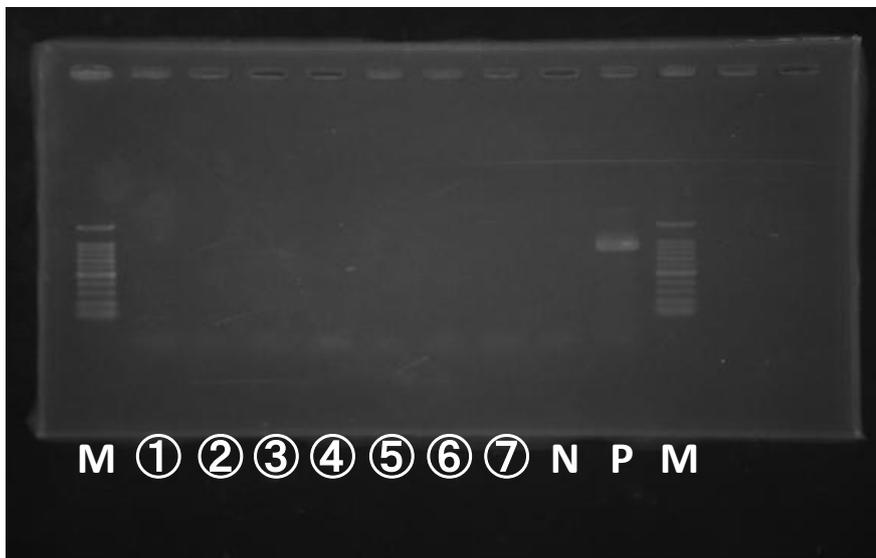
写真 11 Y-1 株の顕微鏡写真



- ① B-1
- ② B-3
- ③ B-5
- ④ B-6
- ⑤ B-7
- N ネガコン
- P ポジコン
- (KK-1)
- M: 100bp
- DNA ladder

プライマー : geo78F, geo982R

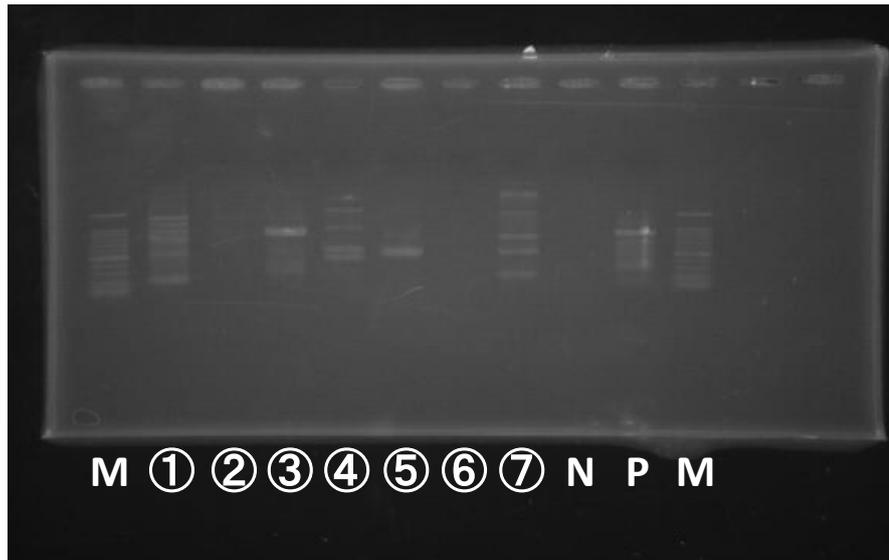
図1 単離株の *geoA* 遺伝子の増幅結果



- ① N-1
- ② N-2
- ③ N-3
- ④ B-4
- ⑤ B-9
- ⑥ B-10
- ⑦ Y-1
- N ネガコン
- P ポジコン
- (KK-1)
- M: 100bp
- DNA ladder

プライマー : geo78F, geo982R

図2 単離株の *geoA* 遺伝子の増幅結果



① N-1  
 ② N-2  
 ③ N-3  
 ④ B-4  
 ⑤ B-9  
 ⑥ B-10  
 ⑦ Y-1  
 N ネガコン  
 P ポジコン  
 (霞ヶ浦)  
 M:100bp  
 DNA ladder

プライマー: MIB3313F, MIB4226R

図3 単離株の2-MIB合成遺伝子の増幅結果

表1 単離株の16S rRNA遺伝子の相同性検索結果、カビ臭合成遺伝子の有無  
 空欄はデータがない、+は検出された、-は検出されなかったことを示す。

単離株	近縁種(相同性%)	geoA遺伝子	2-MIB合成遺伝子
B-1	<i>Anabaena mucosa</i> 1tu35s5 (100)	—	
B-3	<i>Dolichospermum mucosum</i> 06-04 (99.9) <i>Dolichospermum circinale</i> 04-58 (99.9)	—	
B-4		—	—
B-5	<i>Dolichospermum planctonicum</i> NIES-834 (100) <i>Anabaena circinalis</i> 1tu34s5 (100)	—	
B-6	<i>Dolichospermum mucosum</i> 08-03 (100) <i>Anabaena planctonica</i> 1tu36s8 (100)	—	
B-7	<i>Dolichospermum planctonicum</i> NIES-834 (100) <i>Anabaena circinalis</i> 1tu34s5 (100)	—	
B-9	<i>Dolichospermum pseudocompactum</i> NIES-1684(100)	—	—
N-1	<i>Limnothrix</i> sp. NIES-3735 (100)	—	—
N-2	<i>Dolichospermum smithii</i> NIES-824 (100)	—	—
N-3		—	+
N-4	<i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES-207 (100)		+
Y-1		—	—

B: 琵琶湖南湖分離株  
N: 琵琶湖北湖分離株

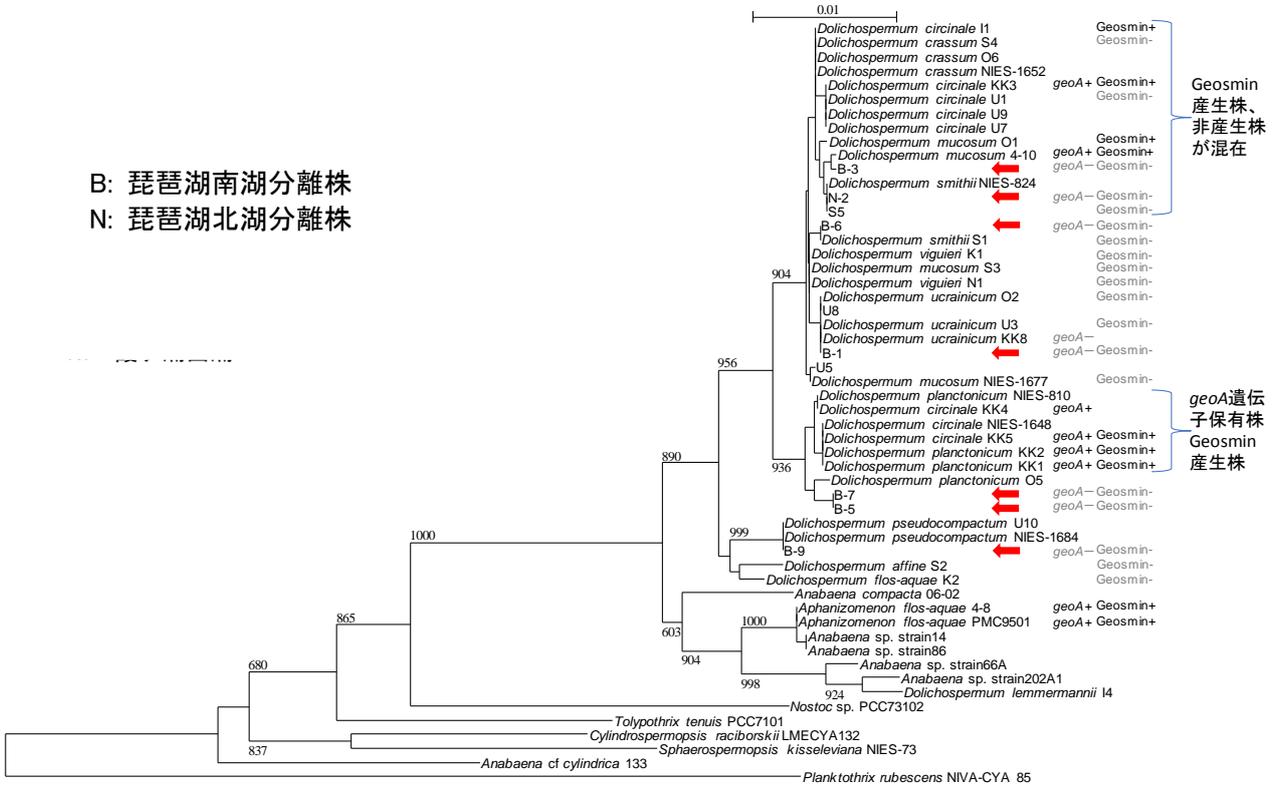


図4 藍藻綱ネンジュモ目の系統樹  
単離株および既知種の16S rRNA 遺伝子約1265塩基に基づいて作成

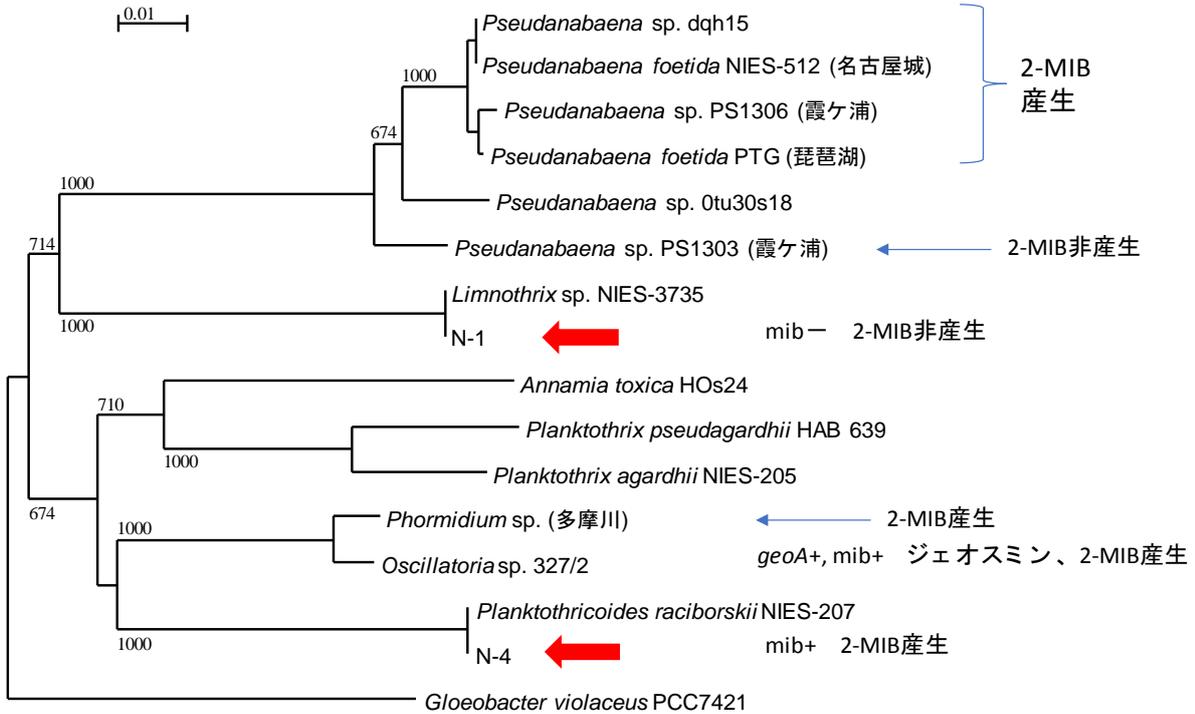


図5 藍藻綱ユレモ目の系統樹  
単離株および既知種の16S rRNA 遺伝子約1285塩基に基づいて作成

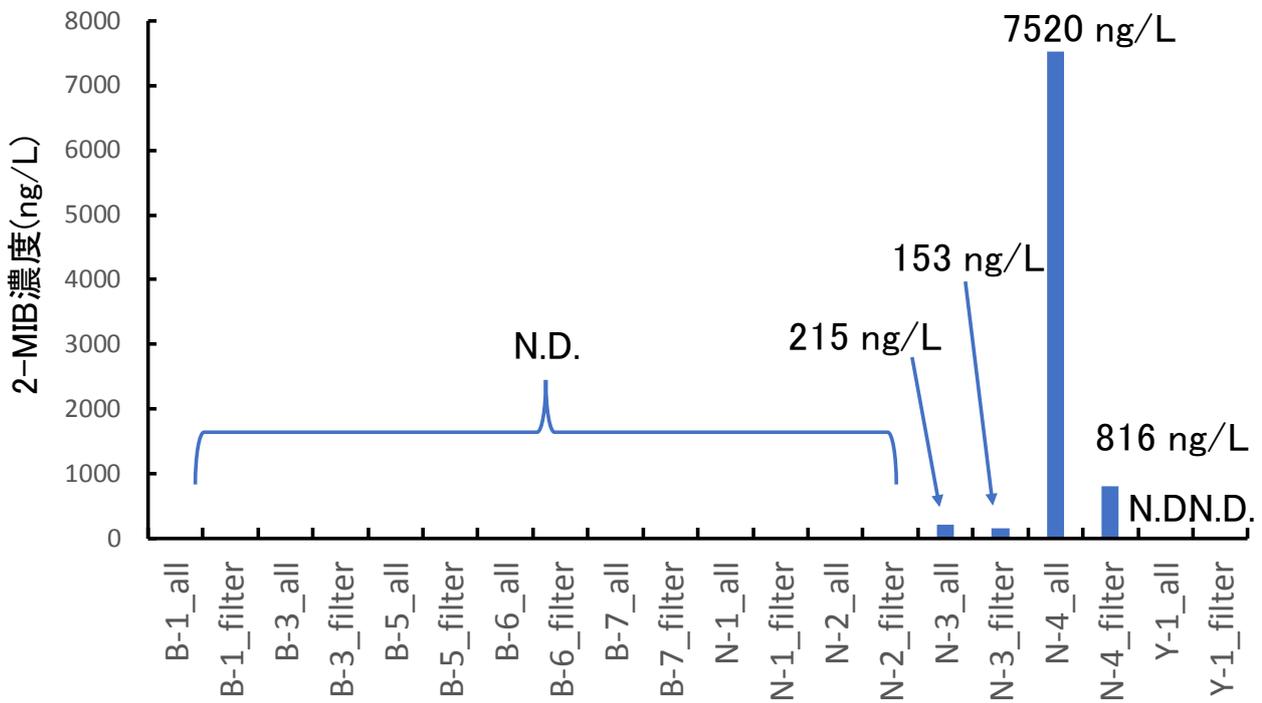


図6 単離培養株の2-MIB分析結果

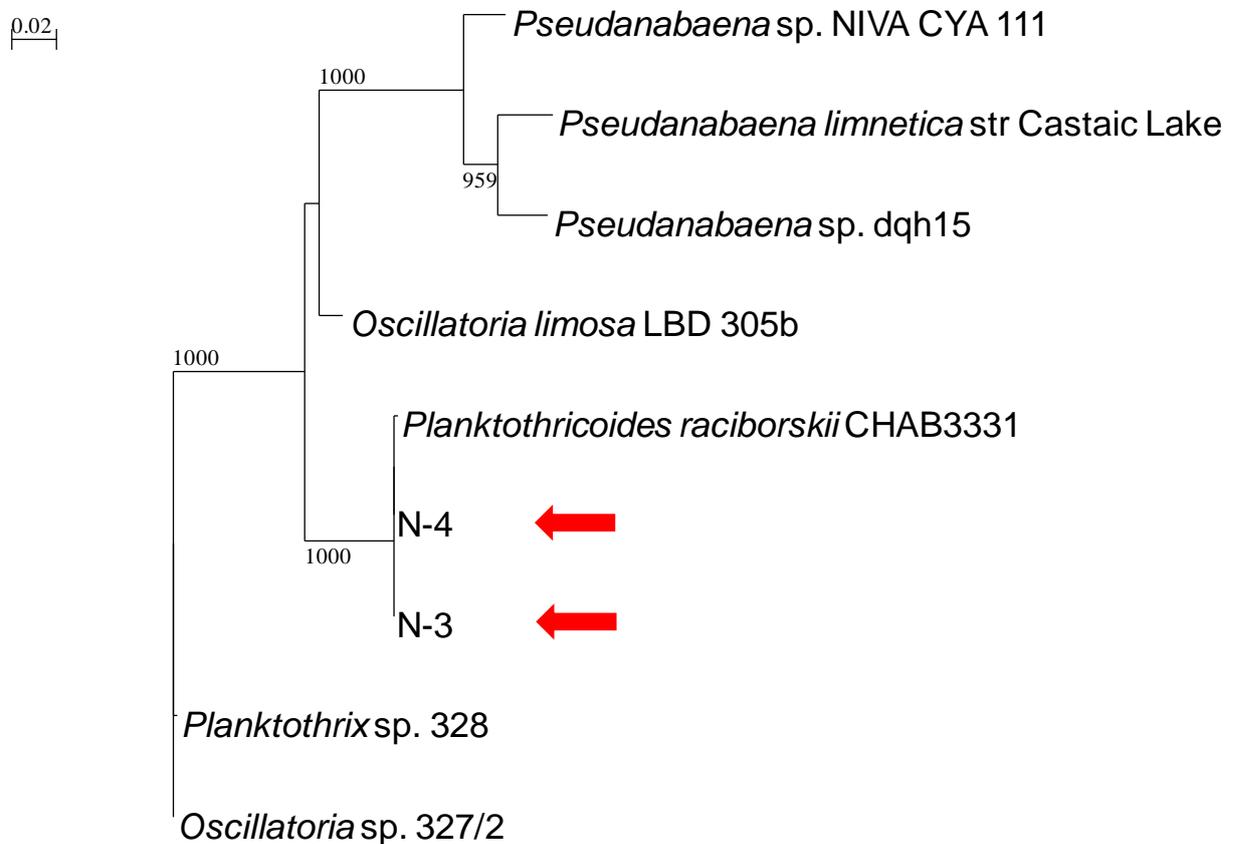


図7 2-MIB合成遺伝子に基づく系統樹  
単離株および既知種の2-MIB合成遺伝子672塩基に基づいて作成