

流域モニタリングネットワークのための
簡便な生物障害検出方法の構築

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	清水	和哉
研究分担者	藤本	尚志
研究分担者	高梨	宏和

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：流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築

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	清水 和哉	筑波大学生命環境系 准教授
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	高梨 宏和	鹿児島大学学術研究院 准教授

研究要旨

流域モニタリングネットワークのための簡便な生物障害検出方法の構築を目的として研究を実施した。水道水源における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・運用には、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、の情報は重要である。カビ臭物質産生総量は、個体群数と正の相関関係があり、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ことを、我々のこれまでの研究成果および既出論文を総合解析した結果、多くの藍藻類と同様であることがわかった。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。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 whole-cell PCR 法を用いた判定量技術および multiplex whole-cell PCR 法を用いた検出技術の開発を実施した。本年度は、とくにカビ臭物質産生と非産生の表現型が形態観察では不明な *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を対象としたジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* ホモログの半定量法による個体群数の半定量および検出を実施した。この結果、ジェオスミン産生 *Anabaena* 属の半定量法および識別法を開発し、次年度に環境モニタリングに志向する段階へと達成できた。

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。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。これら定量手法で用いられている実験機器は、近年、安価になりつつあるが、未だ数百万円台であるため、全ての水道事業体に導入することは困難である。一方、水道流域が連携してモニタリングを行う場合、従来の形態観察法に加えた統

一した方法によってモニタリングを実施することが望ましい。我々の研究成果により、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。また、個体群数とカビ臭物質濃度に正の相関関係があることを確認した。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。カビ臭発生予測が可能となると、カビ臭発生前に粉末活性炭等の準備が可能となる他、粒状活性炭の再生処理の時期策定、等、日常の水道事業の業務遂行に多大に貢献できる。

以上から本研究の目的は、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検出および定量方法の開発・運用法を構築することであった。本年度は、形態観察では判別が困難なジェオスミン産生・非産生 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を簡易に識別・定量する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 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。本研究には、A 社と B 社から販売されている定価 50 万円程度のサーマルサイクラーを用いた。形態観察で判別が困難なジェオスミン産生藍藻類 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) を対象とし、供試藍藻類は、*A. smithii* NIES-824 および滋賀県琵琶湖環境科学センターの一瀬諭 博士から分

譲いただいた *Anabaena macrospora* とした。

検出法として、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。判定量法としては、*geoA* ホモログを標的とした半定量法の開発を試みた。半定量法の開発には、異なる細胞密度を鋳型として、PCR のサイクル数を 5 サイクルから 30 サイクルまで、5 サイクルごとに変化させて行った。検出法および半定量法のどちらも、*geoA* ホモログは、これまでに我々が作成した PCR プライマー、*geoA_Doli_540F* (5'- cccattgaatacattgaaatgc-3')、*geoA_Doli_774R* (5'- acgctcaactacaagcac acag)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 と 1494Rc、および、520F、929R、1241F 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、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) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・半定量法の開発

ジェオスミン産生藍藻類である *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) 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 *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属) 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 whole-cell PCR 法（半定量法; *geoA* 遺伝子ホモログを標的）および multiplex whole-cell PCR 法（検出法; 16S rRNA 遺伝子および *geoA* 遺伝子ホモログを標的）を実施した。この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、25 サイクルが良好であることが推察される結果を得た（図 1）。また、3 つの multiplex whole-cell PCR 条件（*geoA* 遺伝子ホモログと 16S rRNA 遺伝子）が良好であることを確認した。加えて、水道事業者の実務者に、事前講義後、両方を実施していただいたところ、同様な結果を得ることができた。このため、講習後であれば導入可能な試験法と期待できる。

一方、運用面として、DNA 抽出や前処理等を施さずに、ただちに冷凍保存したサンプルを用いて上述の *geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法の PCR を実施したところ、アガロース電気泳動法において、PCR 産物を確認できなかった。このため、上述の実験と同様に、サンプルを採取後、速やかに (multiplex) whole-cell PCR に供し、アガロース電気泳動法による PCR 産物の確認後、PCR 産物を冷凍保存することが望ましいと考えられた。

次年度は、検出感度の向上や実環境サンプルを用いたジェオスミン産生藍藻類の半定量法・検出法の確立および 2-MIB 産生藍藻類への拡張を行う予定である。

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。

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
該当なし

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.

J. 謝辞

滋賀県湖環境科学センターの一瀬諭 博士
神奈川県企業庁の北村壽朗氏、川崎市上下水
道局の藤瀬大輝氏に感謝いたします。

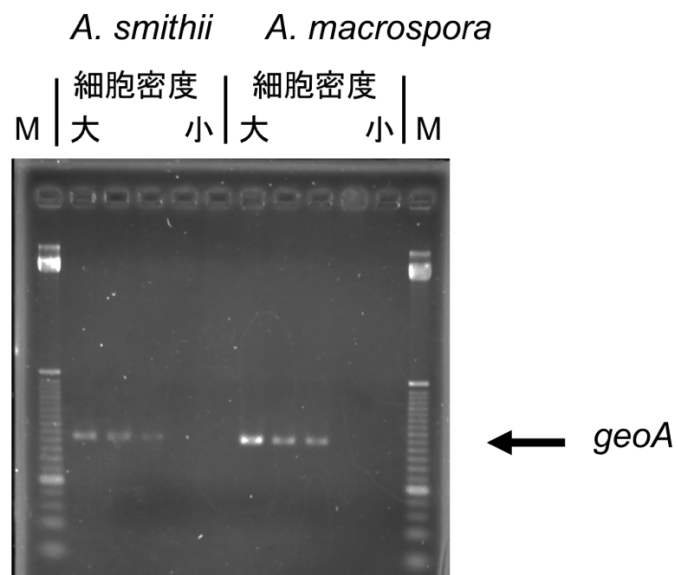


図 1 whole-cell PCR 半定量法の結果
(25 サイクルの場合)

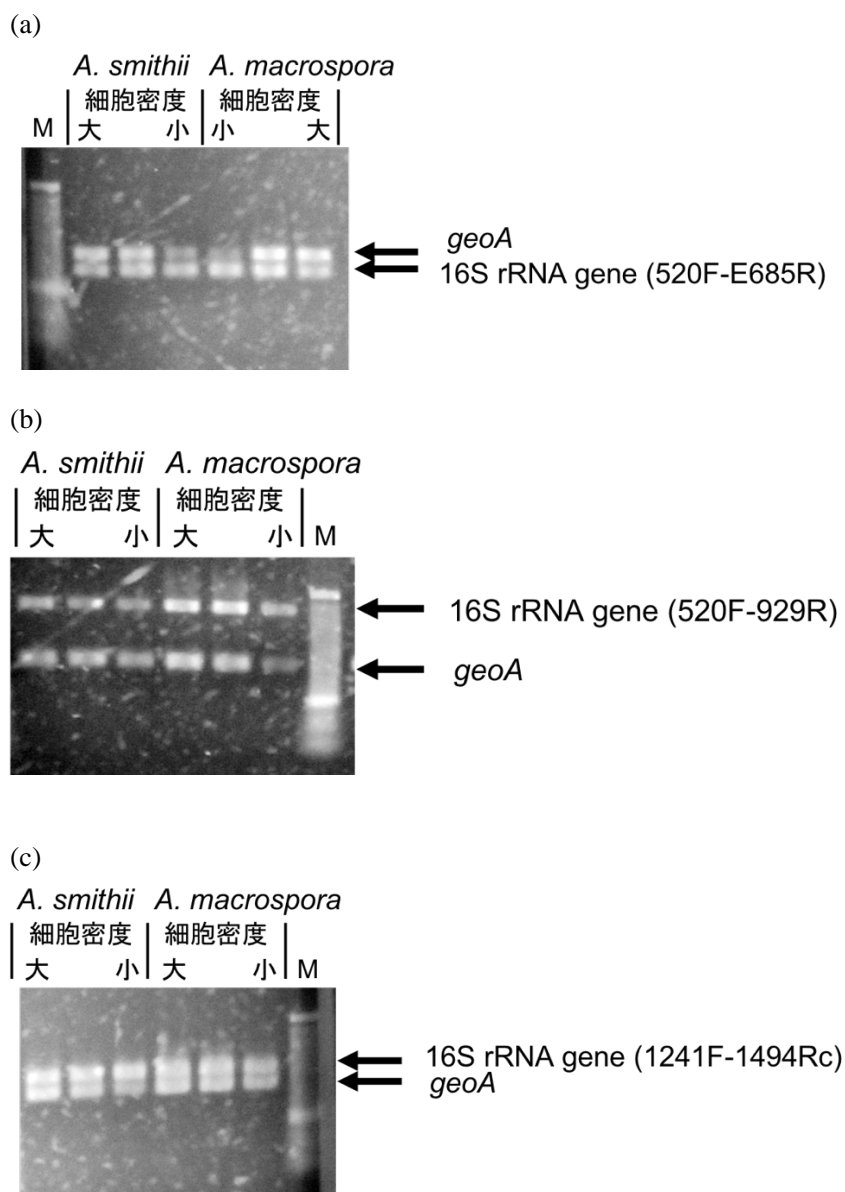


図 2 multiplex whole-cell PCR 検出法の結果(代表的データ)
 (a) 16SrRNA 遺伝子プライマーが 520F-E685 の場合、(b) 16SrRNA プライマーが 520F-929R の場合、(c) 16SrRNA プライマーが 1241F-1494Rc の場合