

カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築へ向けた  
全国水道水源での存在実態調査

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	江崎	敦



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ー構築へ向けた全国水道水源での存在実態調査

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 生活環境研究部 主任研究官  
研究協力者 江崎 敦 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

カビ臭が発生した全国水源から単藻培養した藍藻類 50 株に対して、カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーの構築を目標に、形態情報、16S rRNA 遺伝子解析、カビ臭物質合成酵素遺伝子解析、カビ臭原因物質産生の有無について調査を行った。ジェオスミン産生種は *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属の計 11 株で、2-MIB 産生種は *Pseudanabaena* 属、*Phormidium* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属の計 14 株が確認され、これらの形態情報について整理・比較した。そして、形態情報のみではカビ臭原因物質産生種の同定までは難しいことが示されたが、カビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対しては、得られた形態情報は有益であることが指摘できた。

また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。また配列解析を実施した場合、2-MIB 合成酵素遺伝子については種まで同定ができる可能性を指摘した。このように顕微鏡による形態観察と遺伝子検出によるカビ臭原因物質産生種の早期存在把握の組み合わせが水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類のモニタリングには重要となる。

A. 研究目的

湖沼の富栄養化等による水源水質の悪化に伴う藻類の異常増殖等により、水道水の異臭味被害が生じている。その中でもカビ臭発生事例は日本全国多くの事業体で確認されおり、その監視・制御が求められている。

カビ臭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、水源監視を行う上ではカビ臭原因物質産生種について形態上の特徴について整理し、顕微鏡で監視するためのカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築が必要となる。

一方、辻ら (2018) によると *Pseudanabaena* 属の産生種/非産生種の判定には形態学的特徴では困難であり、カビ臭原因物質自体の測定やカビ臭原因物質産生に関与する遺伝子 (カビ臭原因物質合成酵素遺伝子) の検出との組み合わせが重要となると指摘している<sup>1)</sup>。また *Dolichospermum* 属 (旧名称: *Anabaena* 属) についてジェオスミン合成酵素遺伝子を対象とした PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) による検出において、水源でジェオスミンが上昇する際にターゲット遺伝子が検出す

る結果を示している<sup>2)</sup>。このように形態学的判定が困難な場合においても遺伝子検出を応用することにより、カビ臭原因物質産生種の発生状況を早期に捉えることができる可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究ではカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築と遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の早期把握を目的とし、以下の二項目について検討を行った。

- ・カビ臭原因物質産生藍藻類について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の塩基配列、カビ臭産生の有無に関するデータ集積
- ・カビ臭が発生した水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出ならびに産生種同定の試み

B. 研究方法

1. 対象試料

本研究は、平成 31 年 4 月～令和元年 10 月でカビ臭が発生した水源 21 か所の試料を用いた。試料は水道事業体に協力をいただき、滅菌処理したガラス瓶またはポリ容器を用いて採水し、国立保健医療科学院へ冷蔵便にて送付した。到着後はインキュベータ (CDB-41LA: 大和冷機, 条件: 温度 20 °C, 昼白色 (照度 1000 Lux), 明暗 12 時間)

にて保存し、到着後2日以内にフィルターろ過ならびに単離作業を行った。

またカビ臭原因物質産生藍藻類の情報をより多く集積するために、国立環境研究所微生物保存施設に保有する藍藻株（以降、NIES株と記載）、水道事業体保有の藍藻株（以降、分譲株と記載）についても調査を行った。

## 2. カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築

ピペット洗浄法により各試料から藍藻類の単藻を試みた。単藻株はCT培地を用いてインキュベータ（CDB-41LA：大和冷機）内で、20℃、昼白色（照度1000Lux）、明暗12時間の条件で培養を行った。そしてNIES株、分譲株と共に同条件で継代培養を行い、形態観察、遺伝子解析とカビ臭原因物質検出に供した。

形態観察は光学顕微鏡（BX60、オリンパス）にて行い、イメージングソフトウェア（cellSens、オリンパス）を用いて写真撮影および細胞計測を行った。ネンジュモ目の藍藻類については、トリコーム、栄養細胞、異質細胞、アキネートを観察し、細胞1個当たりの幅と長さ及びらせん間隔、らせん直径を計測した。ユレモ目の藍藻類については、トリコーム、栄養細胞を観察し、栄養細胞の幅と節間隔について計測を行った。また、プレパラート作成時に墨汁を添加し鞘の有無についても観察を行った。

遺伝子解析ではまず、培養液を0.8μm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>3)</sup>、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子解析(*geoA*遺伝子、2-MIB合成酵素遺伝子)<sup>4)</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。

カビ臭原因物質検出には、培養液を超純水製造装置(MilliQ A10, Millipore)で作製した超純水(以降、超純水と記載)で100倍希釈した試料を用いて、固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフ質量分析法(SPME-GC/MS法)によりジェオスミンと2-MIBの検出を試みた。

## 3. カビ臭発生水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出

水源試料100mLについて、孔径0.22μmのセルロースアセテートタイプのメンブレンフィルタ(ADVANTEC)で吸引ろ過し、藻体を捕捉し、-20℃にて冷凍保存した。その後、DNA抽出キット(DNeasy Power Water Kit または DNeasy Power Soil Kit, Gelman社)を用いて、説明書に従い、DNA抽出を行った。そして、カビ臭原因物質合成

関連遺伝子についてPCRによる増幅・精製した後、TOPO™ TA Cloning™ Kit for Sequencing, with One Shot™ TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Thermo Fisher Scientific)でクローニングを行った。最後に得られたDNA試料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。

## C. 研究結果およびD. 考察

### 1. カビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築

本調査では、50株の藍藻類が単藻培養でき、SPME-GC-MSの検出結果より、ジェオスミン産生種は*Aphanizomenon*属と*Dolichospermum*属の計11株で、2-MIB産生種は*Pseudanabaena*属、*Phormidium*属、*Microcoleus*属、*Planktothricoides*属の計14株であった。産生種について形態情報ならびに16S rRNA遺伝子の相同性解析結果に基づき、種同定を試みた。各水源で単離した代表的な産生種の情報を表1ならびに図1-17に示す。なお、形態情報による種同定において、ネンジュモ目の藍藻類判定には、*Dolichospermum*属について新山ら(2012)の判定基準<sup>5)</sup>、*Aphanizomenon*属についてKomárekら(2006)の判定基準<sup>6)</sup>を参照した。またユレモ目については、新山(2012)<sup>7)</sup>と辻ら(2018)<sup>8)</sup>の判定基準に従った。

*Dolichospermum*属において、本研究では直鎖型とらせん型の両方について産生種を獲得することができた。直鎖型については、*Dolichospermum smithii*と*Dolichospermum planctomicum*の2種類であり、形態上の差異はアキネートの形状のみであった。つまり、アキネートが形成していない場合に種を同定することは困難であると予想される。らせん型については、*Dolichospermum cilcinale*と*Dolichospermum crassum*が確認された。これら2種についてもアキネートによる差異が重要となるが、それ以外にも*Dolichospermum cilcinale*のらせん形の大きさは*Dolichospermum crassum*よりも大きい傾向にあった。

*Pseudanabaena*属においては、培養を経過した試料の観察を行うことで種ごとの微小な差異を確認可能であるが、実試料からその差異を判断するのは困難であった。また本研究では16S rRNA遺伝子解析を実施しており、*Pseudanabaena*属の種同定の2次情報として利用可能であることが明らかとなった。

*Microcoleus autumnalis* (旧名称：*Phormidium autumnale*)は形態上の特性と共に付着性という観点から他の種と区別が可能である。しかしながら、貯水池Iより単離された*Phormidium* sp.とは形態上の差異はわずかであった。共に2-MIB産生種であるが野生状態での形態での区別は難しいと予

想される。

続いて、同種に対する産生種、非産生種の形態上の違いについて整理する。本研究で得られた株の中で同種である中で、産生種、非産生種が存在することが確認された(図 18)。さらにこれらの区別は形態情報からは判断できないことが明らかとなった。*Pseudanabaena* 属については辻ら(2018)が指摘しており、本研究でも同様の結果が示された。そのため、産生種の判定において本研究で得られた情報は確定をもたらすものではないことが考えられる。しかし、カビ臭が発生した場合の産生種の可能性を絞り込む判断に対しては有益な情報であるといえる。

続いて、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の解析について検証する。*geoA* 遺伝子の系統樹を図 19 に 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹を図 20 に示す。*geoA* 遺伝子については *Dolichospermum* 属自体は種ごとにほとんど配列に差異はなく、*geoA* 遺伝子により種判定が難しいことが指摘できる。一方、データベースから取得した *Aphanizomenon* 属とは差異があるため、遺伝子検出により属レベルでの判定ができる可能性が考えられる。また、本研究で新たにデータベースに加えられたジェオスミン産生の *Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属は付着性の特徴を有している。近年、日本で付着性藍藻によるジェオスミン産生によるカビ臭問題はあまり取り上げられていないが、今後の拡大の可能性も考慮し遺伝子、カビ臭原因物質産生能などに関する情報を収集していく必要があるといえる。

2-MIB 合成酵素遺伝子については、本研究により配列情報を充実させることに成功した。その結果、遺伝子配列情報により *Pseudanabaena* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属で大きく区分けができ、2-MIB 合成酵素遺伝子の検出で属判定ができる可能性がある。しかしながら、*Dolichospermum* 属と同様に種判定までは難しいと考えられる。*Microcoleus* 属に配列情報が近い *Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属については形態情報も含め、情報の蓄積が課題となる。

以上より、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の相同性解析により属判定までは可能であることが明らかとなったが、属判定であれば顕微鏡観察で可能であることから、本解析を産生種同定に使用することの有用性は低いといえる。一方、本調査によりカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報を多く蓄積することができたことから、この配列情報を利用して、属レベルでの遺伝子検出系を構築し、早期モニタリングへの適用が今後の展開として望まれる。

## 2. カビ臭発生水源でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出

各水源試料でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の検出結果と単離した産生種が保有する遺伝

子検出結果はほぼ一致した(表 2)。その中でも水源試料から対象遺伝子が検出したが、単離培養株からは産生種を確認できなかったケースがある。その可能性としては、試料中の産生種存在数が少なく、ピペット洗浄法では回収できなかったことが考えられる。水源試料からの遺伝子解析では試料 100 mL を利用する一方でピペット洗浄法では数 mL しか利用しない。この点を考慮した場合、カビ臭原因物質産生種の早期検出には、試料量を多く設定できる遺伝子検出が有用であるといえる。

最後に水源試料から検出したカビ臭合成酵素遺伝子の配列情報から、産生種の同定を試みた(図 19,20)。その結果、*geoA* 遺伝子については *Dolichospermum* 属までの判定となった。一方、2-MIB 合成酵素遺伝子については、各水源試料から得られた遺伝子配列と単離培養株の遺伝子配列がほぼ一致する結果となり、本研究で遺伝子データベースを構築したことから、本データベースを用いれば 2-MIB 合成酵素遺伝子の配列情報から種同定が可能であることが示唆された。これは培養よりも早く判定できることから、産生種同定のサポート情報として有用であるといえる。

以上、本研究にてカビ臭原因物質産生藍藻類のライブラリー構築ならびに関連物質合成遺伝子の配列情報の蓄積に成功した。水源での監視において本研究で得られた情報を活用し、顕微鏡による形態観察と遺伝子検出によるカビ臭原因物質産生種の早期存在把握の組み合わせによりカビ臭原因物質産生藍藻類のモニタリングが今後重要となる。

## E. 結論

カビ臭が発生した水源を対象として、単藻培養できた藍藻類 50 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い、カビ臭原因物質産生藍藻類ライブラリーの構築を試みた。その結果、ジェオスミン産生種は *Aphanizomenon* 属と *Dolichospermum* 属の計 11 株で、2-MIB 産生種は *Pseudanabaena* 属、*Phormidium* 属、*Microcoleus* 属、*Planktothricoides* 属の計 14 株が産生種であることが確認された。その中で産生種と非産生種の形態が類似するケースが確認されたが、カビ臭が発生した場合の産生種を絞り込む判断に対しては、本研究で得られた情報は有益であることが指摘できた。

また本研究で蓄積したカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の配列情報より、水源試料を用いた遺伝子解析により早期に産生種の属レベルでの存在把握が可能であることが示唆された。また配列解析を実施した場合、2-MIB 合成酵素遺伝子については種まで同定ができる可能性を指摘した。

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, 井上拓也, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づいた水環境中のカビ臭原因物質産生藍藻類同定の試み. 2019.11.6-8 日; 函館. 令和元年度全国会議(水道研究発表会)講演集. 242-243.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 田中美帆, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏: 全国水道水源を対象としたカビ臭原因物質産生藍藻類の同定. 第54回日本水環境学会年会; 2020年3月; 盛岡. 同講演集. p.123. (学会中止, 誌上发表)

野口暁生, 横井貴大, 船岡英彰, 小倉明生, 浅田安廣: 琵琶湖で発生した *Anabaena* 属の形態的特徴による種分類及びカビ臭産生能評価の試み. 第54回日本水環境学会年会; 2020年3月; 盛岡. 同講演集. p.367. (学会中止, 誌上发表)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)  
該当なし

I. 参考文献

1) 辻 彰洋, 新山 優子 (2018) *Pseudanabaena* 属 (シアノバクテリア) の分類とカビ臭産生の判別

形質, 日本水処理生物学会誌, 54(4), 115-120.

2) 平健司, 矢野留実子 (2019) 浄水場原水中の藍藻類のかび臭産生関連遺伝子の検出方法の検討, 水道協会雑誌, 88(12), 3-9.

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

4) Suurnäkki S, Gomez-Saez GV, Rantala-Ylinen A, Jokela J, Fewer DP, Sivonen K (2015) Identification of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, Water Res., 68, 56-66.

5) 新山 優子, 辻 彰洋 (2012) 藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類学的変更と類似種の比較, 陸水学雑誌, 74(3), 153-164.

6) Komárek J, Komárková J (2006) Diversity of Aphanizomenon-like cyanobacteria, Czech Phycology, 6, 1-32.

7) 新山優子 (2012) 藍藻類ユレモ目の新分類体系の紹介, 陸水学雑誌, 73(3), 187-196.

J. 謝辞

水道原水をご提供いただいた全国の水道事業者及び藍藻類試料を提供いただいた国立環境研究所に謝意を表す。また, 本研究の一部は国立保健医療科学令和元年度院水道工学研修の一部として実施し, 当研修の研修生であった仙台市水道局早坂泰彦氏, 水戸市上下水道局山田晃平氏, 川崎市上下水道局鈴木孝俊充氏に全面的な協力を得ました。記して謝意を表します。

表 1 本研究で得られた代表的なカビ臭原因物質産生藍藻類のまとめ

発生水源	属	種	トリコーム	栄養細胞	異質細胞	アキネート	さや	浮遊性/付着性	臭気検出 (GCMS)
湖沼A	<i>Aphanizomenon</i>	<i>gracile</i>	直線	楕円	楕円	長楕円	無	浮遊性	geosmin
湖沼B	<i>Aphanizomenon</i>	<i>gracile</i>	直線	円筒	楕円	長楕円	無	浮遊性	geosmin
ダムD	<i>Dolichospermum</i>	<i>smithii</i>	直線	球・樽	球	球	有(粘質)	浮遊性	geosmin
ダムE	<i>Dolichospermum</i>	<i>crassum</i>	規則らせん	球・樽	なし	長楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池J	<i>Dolichospermum</i>	<i>planctonicum</i>	直線	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池J	<i>Dolichospermum</i>	<i>circinale</i>	規則らせん	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
湖沼N	<i>Dolichospermum</i>	<i>circinale</i>	不規則らせん	球・樽	なし	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池K	<i>Dolichospermum</i>	<i>crassum</i>	規則らせん	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
貯水池K	<i>Dolichospermum</i>	<i>planctonicum</i>	直線	球・樽	球	楕円	有(粘質)	浮遊性	geosmin
湖沼B	<i>Pseudanabaena</i>	<i>limnetica</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	浮遊性/付着性	2-MIB
湖沼C	<i>Pseudanabaena</i>	<i>sp.</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
貯水池I	<i>Phormidium</i>	<i>sp.</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	有(堅い)	付着性	2-MIB
湖沼L	<i>Pseudanabaena</i>	<i>foetida</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	有(粘質)	付着性	2-MIB
湖沼O	<i>Planktothricoides</i>	<i>raciborskii</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	浮遊性	2-MIB
ダムP	<i>Pseudanabaena</i>	<i>yagii</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
河川Q	<i>Microcoleus</i>	<i>autumnalis</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB
河川R	<i>Microcoleus</i>	<i>autumnalis</i>	直線・やや曲がり	円筒	—	—	無	付着性	2-MIB

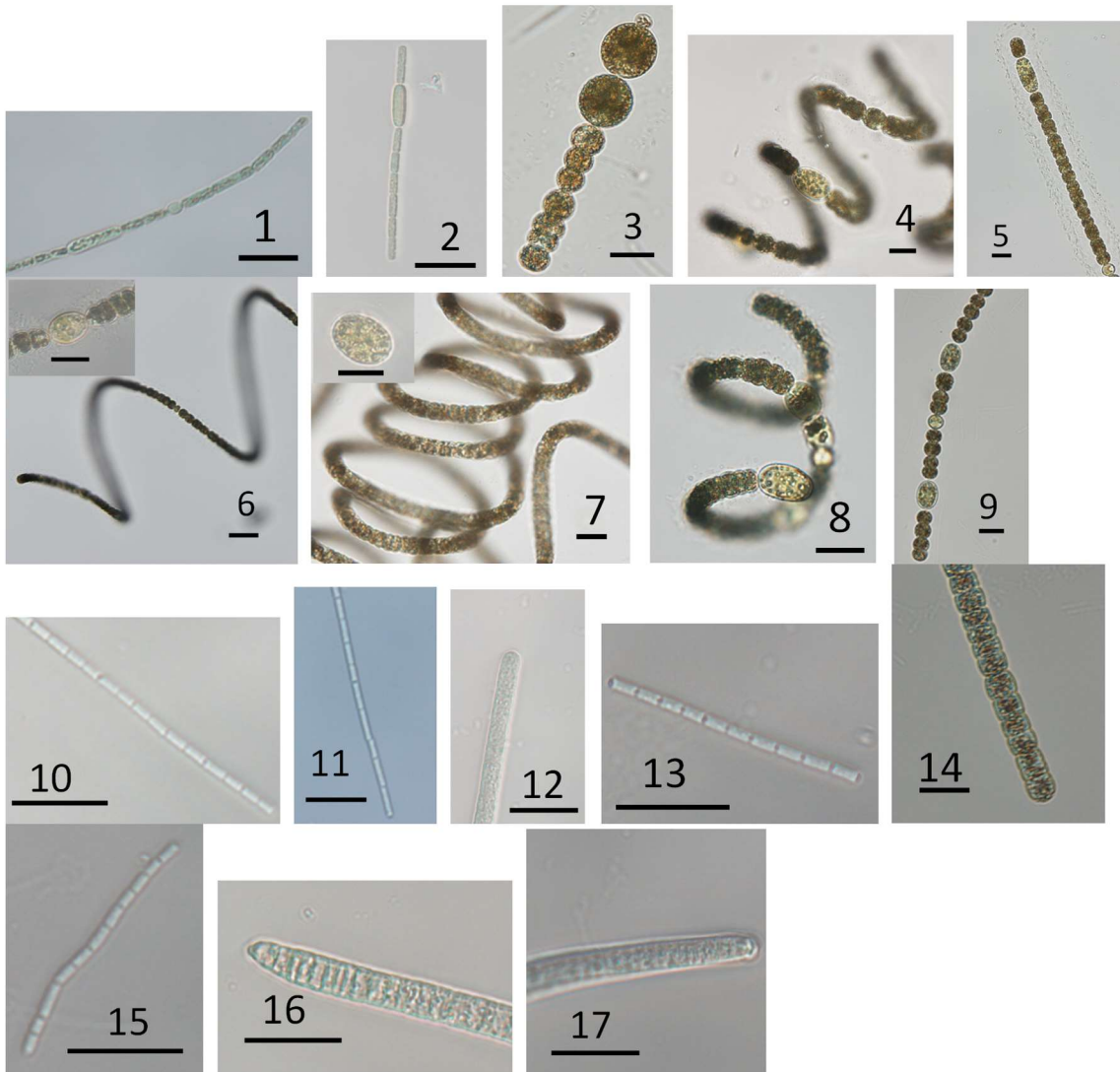


図1 湖沼 A *Aphanizomenon gracile*, 図2 湖沼 B *A. gracile*, 図3 ダム D *Dolichospermum smithii*, 図4 ダム E *D. crassum*, 図5 貯水池 J *D. planctonicum*, 図6 貯水池 J *D. circinale*,  
 図7 湖沼 N *D. circinale*, 図8 貯水池 K *D. crassum*, 図9 貯水池 K *D. planctonicum*,  
 図10 湖沼 B *Pseudanabaena limnetica*, 図11 湖沼 C *Pseudanabaena* sp.,  
 図12 貯水池 I *Phorumidium* sp., 図13 湖沼 L *Ps. foetida*, 図14 湖沼 O *Planktothricoides raciborskii*,  
 図15 ダム P *Ps. yagii*, 図16 河川 Q *Miclocoleus autumnalis*,  
 図17 河川 R *M. autumnalis*

注：バーは図7（アキネート拡大写真は20 μm）のみ50 μmでそれ以外は20 μm

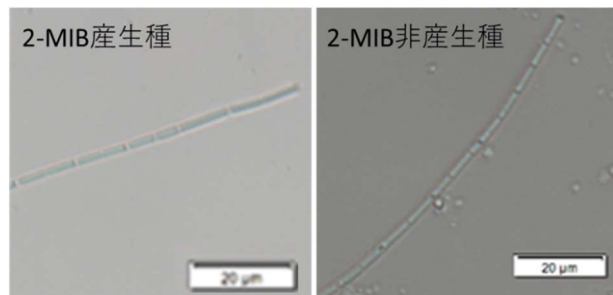
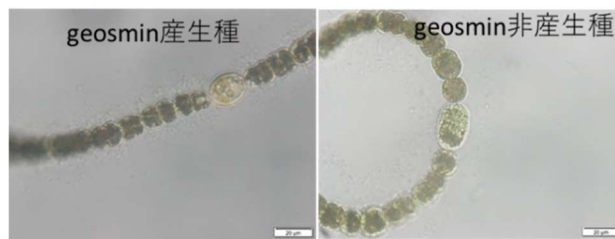
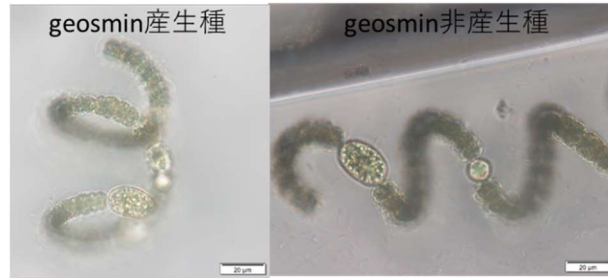


図 18 同水源におけるカビ臭産生種，非産生種比較



# 775塩基に基づいて作成

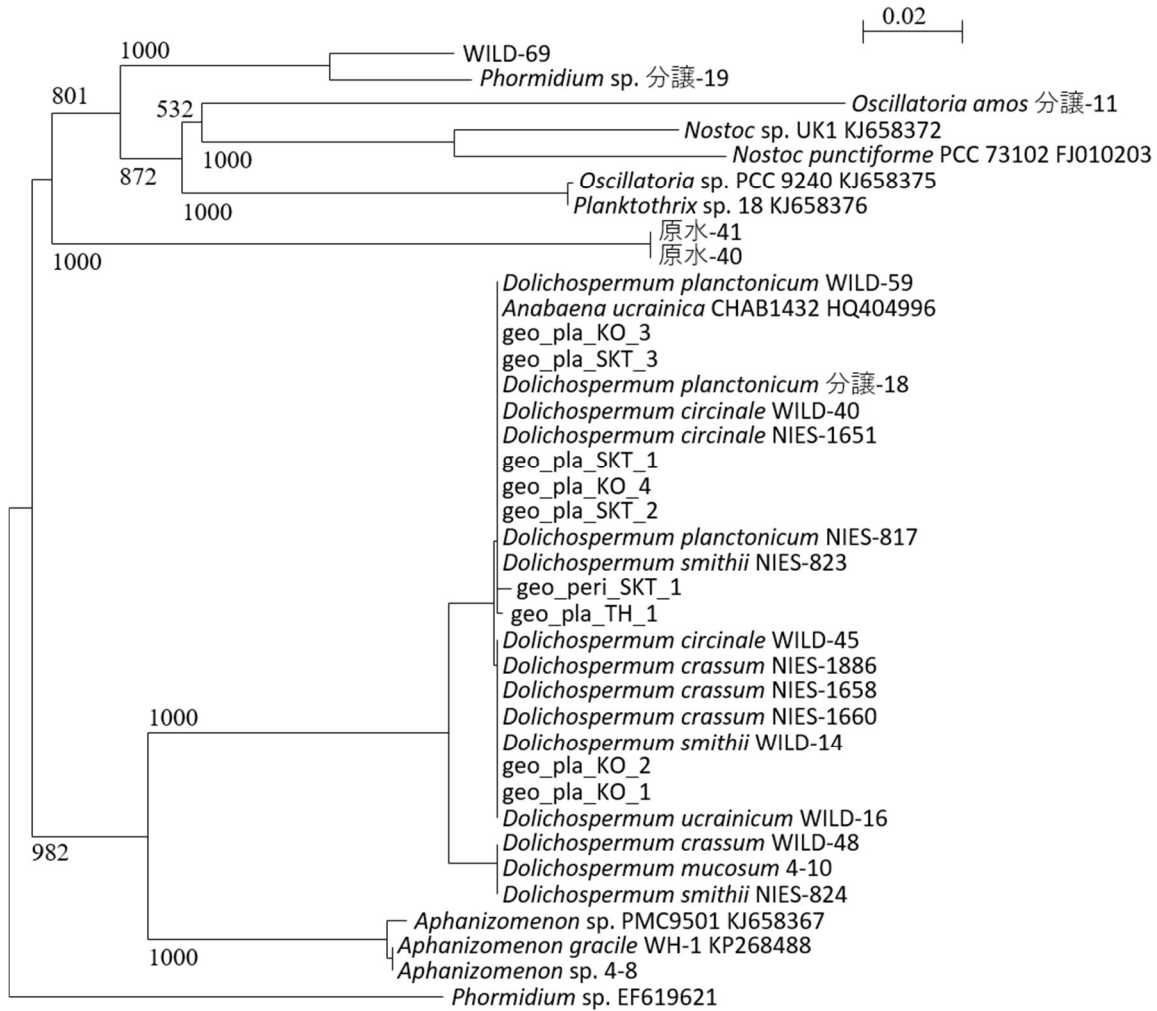


図 19 *geoA* 遺伝子に基づく系統樹

# 649塩基に基づいて作成

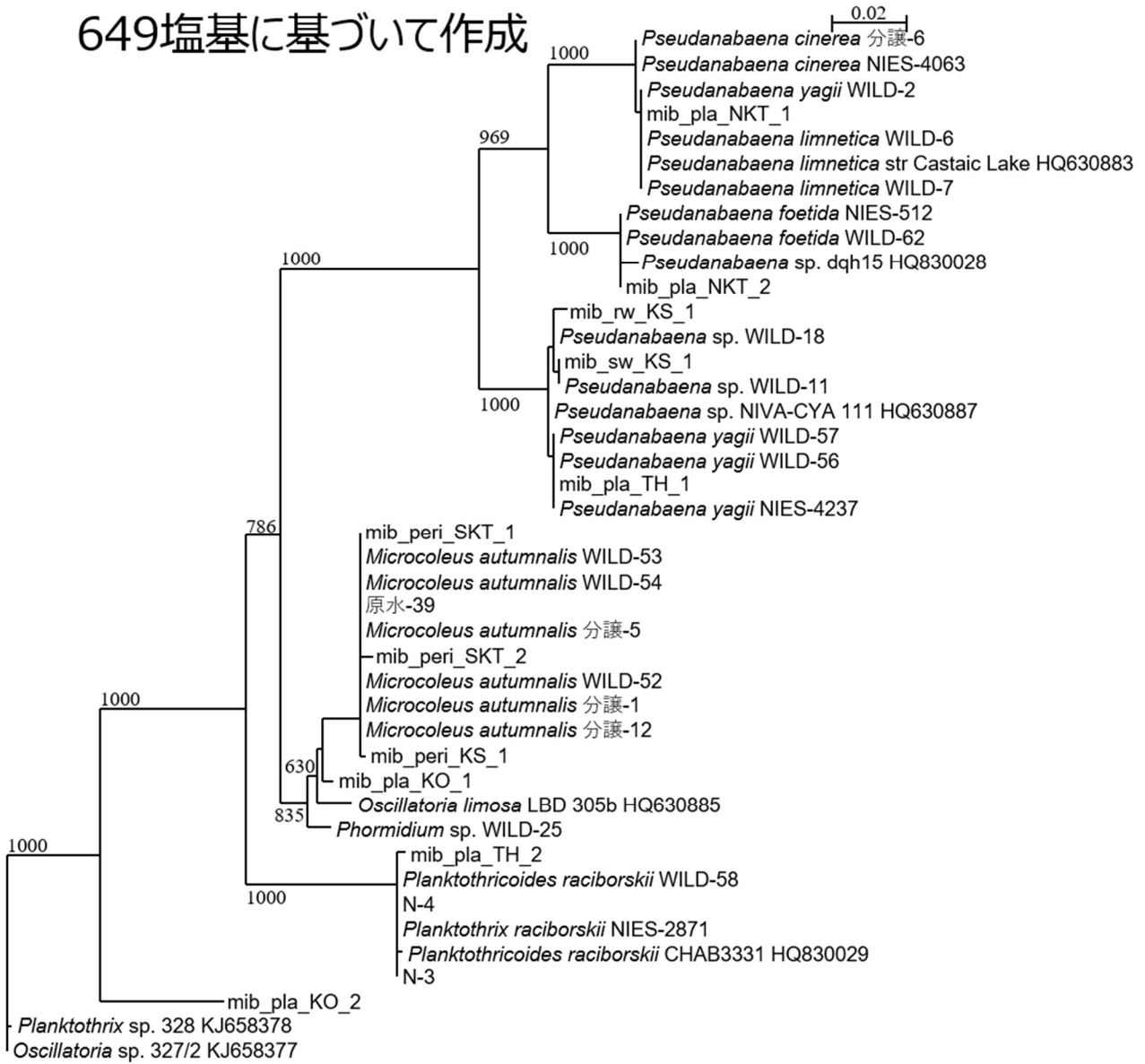


図 20 2-MIB 合成酵素遺伝子に基づく系統樹

表 2 各水源試料でのカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の検出結果

採水 地点	遺伝子検査		単離培養株	
	<i>geoA</i>	2-MIB	名称	保有遺伝子
湖沼C	—	+	<i>Pseudanabaena sp.</i>	2-MIB
ダムD	+	—	<i>Dolichospermum smithii</i>	<i>geoA</i>
ダムE	+	—	<i>D.crassum</i>	<i>geoA</i>
ダムF	—	+	単離培養株無し	
河川G	+	—	<i>D.pseudocompuctum</i>	非検出
河川H	—	+	<i>Phormidium sp.</i>	2-MIB
貯水池I	—	+	<i>Phormidium sp.</i>	2-MIB
貯水池J	+	—	<i>D.planctonicum</i>	<i>geoA</i>
			<i>D.circinale</i>	<i>geoA</i>
貯水池K	+	+	<i>D.crassum</i>	<i>geoA</i>
			<i>D.planctonicum</i>	<i>geoA</i>
湖沼L	—	+	<i>Pseudanabaena foetida</i>	2-MIB
河川M	—	+	<i>Pseudanabaena subfoetida</i>	非検出
湖沼N	+	+	<i>D.circinale</i>	<i>geoA</i>
湖沼O	+	+	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	2-MIB
ダムP	—	+	<i>Pseudanabaena yagii</i>	2-MIB
河川Q	—	+	<i>Microcoleus autumnalis</i>	2-MIB
河川R	—	+	<i>Microcoleus autumnalis</i>	2-MIB
貯水池S	—	+	<i>D.affine</i>	非検出
			<i>D.lemmermannii</i>	非検出
河川T	—	+	単離培養株無し	
湖沼U	—	—	<i>Aphanizomenon gracile</i>	非検出

