

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
研究協力者	藤本	尚志
研究協力者	高梨	啓和

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 啓和 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る。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、カビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* の異なる栄養塩条件下における発現量変化、昨年度に開発した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と細胞密度との比較を実施した。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ジェオスミン産生 *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および 2-メチルイソボルネオール産生 *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) を対象として MIB 合成酵素遺伝子ホモログの半定量法による個体群数の半定量法を確立した。

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（早期検出技術に適用可能）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

に關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、昨年度に開発した簡便迅速な判定量 Whole Cell PCR 法を用いた個体群定量法の確立および異なる栄養塩濃度におけるカビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1) 異なる栄養塩濃度におけるカビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動

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) を用いた。本藍藻類とも標準培地が CT 培地とされ、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。全 RNA を抽出後、ランダムプライマーで cDNA を作成し、ジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 遺伝子) の発現解析を qPCR 法により実施した。プライマーは、*geoA_Doli_666F* (5'-aaaagacacatttgctgatggtg-3')、*geoA_Doli_774R*

(5'- acgctcaactacaagcacacag) を設計し用いた。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。発現量の定量の際には、細胞密度の変化による影響を除くために、内部標準遺伝子による標準化を行う。本研究では、16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子として用いた。

2) カビ臭物質産生藍藻類の簡易識別法・定量法の開発

形態観察で判別が困難なジェオスミン産生藍藻類 *Dolichospermum* 属 (*Anabaena* 属) を対象とし、供試藍藻類は、*D. 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 *Dolichospermum macrospora* とした。一方、2-MIB 産生藍藻類 *Pholmidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) 1705 株と 1803 株を、茨城県から分譲いただいた。

ジェオスミン産生藍藻類は *geoA* ホモログを標的とし、2-MIB 産生藍藻類は、テルペン環化酵素遺伝子 *mtc* ホモログ (2MIB 合成酵素遺伝子) とし、半定量 Whole Cell PCR 法を行った。*geoA* ホモログは、これまでに我々が設計、作成した PCR プライマー、*geoA_Doli_540F* (5'-CCCCATTGAATACATTGAAATGC-3')、*geoA_Doli_774R* (5'-ACGC TCAACTACAAGCACACAG-3') を用いた。*mtc* ホモログは、*mtc-F* (5'-CGCTCGCTTTGTGAGTGAGATAG-3')、*mtc-R* (5'-GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAG-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、PCR 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*Dolichospermum* 属を対象とした際のサーマルサイクル条件は、どちらの遺伝子も初期変性 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、20 秒、サイクル数 25 サイクルと設定し、Whole Cell PCR を行った。Whole Cell 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。得られたバンドの輝度をフリーの画像

解析ソフトウェア Image J を用いた。

2-MIB 産生藍藻類 *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) 1705 株と 1803 株については、最適な条件を検討するため、アニーリング温度を 57°C, 60°C, 63°C, サイクル数を 20, 25, 30, 35 サイクルとそれぞれ設定し、サーマルサイクル条件は、*Dolichospermum* 属と同様にして検討を行った。その結果、60°C, 25 サイクルで良好な結果を得たことから、本報告書においてはこの条件にて実施した結果を報告する。

Whole Cell PCR 法の評価は、得られた PCR 産物の輝度と藍藻類の細胞密度を比較し、PCR 産物の輝度から細胞密度を用いて実施した。供試藍藻類は、CT 培地で培養し、培養開始後 4 日経過する毎にサンプルを採取し、細胞密度を表すクロロフィル a (Chl.a) の定量および Whole cell PCR を実施した。

C. 研究結果および D. 考察

1) 異なる栄養塩濃度におけるカビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量の変動

カビ臭物質ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現量は、ジェオスミン産生活性と正の相関関係にあると考えられる。このことから、発現量の変動を分析することは重要である。

カビ臭物質ジェオスミン産生合成酵素遺伝子 *geoA* の発現量は、栄養塩が異なる場合、発現量に有意な差が見られた培養日数があったものの、全培養日数において発現が認められる構成的発現をしている遺伝子であることがわかった (図 1)。このことから、カビ臭原因物質産生藍藻類の個体群密度の定量が、カビ臭発生予測の重要な位置付けとなることを強く示しているといえた。顕微鏡観察による形態観察では、カビ臭物質産生藍藻類のみの細胞密度の定量が困難であることから、カビ臭物質産生藍藻類のみ定量する手法が極めて重要である。

2) 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 *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。

カビ臭物質産生に関与する重要な特定遺伝子を検出できる PCR 法は、扱いやすく、産生者のみを推量できる方法であるといえる。このため、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* ホモログ、2-MIB 産生株の指標としては、モノテルペン環化酵素遺伝子 (2-MIB 合成酵素遺伝子) *mtc* ホモログを用いた。

この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、Chl.a による細胞密度と同様に PCR 産物の輝度も上昇しており、細胞密度を推量できることがわかった (図 2)。一方、*mtc* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法では、Chl.a による細胞密度が 200 µg/L を越えると安定して PCR 産物を得た (図 3)。これは、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした半定量法と同様であった (図 2, 図 3)。したがって、カビ臭産生藍藻類由来の Chl.a がおよそ 200 µg/L を越えると検出・半定量が可能であると考えられた。

また、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、実施できる強みがあるものの、実務者が作業しなければならない。このため、完全自動化 (サンプルをセットすれば、あとは結果を確認できる) が求められる場合もあることが、水道事業者からのヒアリングからわかった。こちらについては、すでに医療分野をマーケットにした自動核酸抽出・定量 PCR 装置が市場にて販売されているため、応用利用すれば可能であると考えられる。

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ることを明らかにしていた。さらに今年度は、ジェオスミン合成酵素遺伝子 *geoA* の発現様式は構成的発現であることがわかった。つまり、個体群を定量することで、カビ臭発生予測を可能となるといえる。水源におけるカビ臭物質産生藍藻類のモニタリングのために、形態観察では困難なカビ臭物質産生藍藻類の識別に有効と期待できる 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ったことから、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

Hanchen Miao, Ji Zhang, Yasuhiro Asada, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing *Anabaena* by whole cell PCR, 日本水処理生物学会第 56 回大会, 2019 年 11 月 8 日 - 11 月 10 日, 金沢 (口頭発表) .

Ji Zhang, Hanchen Miao, Yasuhiro Asada, Zhongfang Lei, Hirokazu Takanashi, Satoshi Ichise, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid Detection and Quantification of Musty Odor Production by Cyanobacteria, 第 54 回日本水環境学会年会, 2020 年 3 月 16 日-18 日, 盛岡 (ポスター発表) .

Qingyue Shen, Hanchen Miao, Saya Akiyama, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang

Lei, Zhenya Zhang, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of TN/TP ratio on growth and geosmin productive activity in cyanobacteria, The 4th International Conference on Recent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), March 26-30, 2020, Tsukuba (ポスター発表; COVID-19 により延期).

Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing cyanobacteria by whole-cell PCR, The 4th International Conference on Recent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), March 26-30, 2020, Tsukuba (ポスター発表; COVID-19 により延期).

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

茨城県企業局水質センター, 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, 神奈川県川崎市上下水道局の藤瀬 大輝 博士, に感謝いたします。

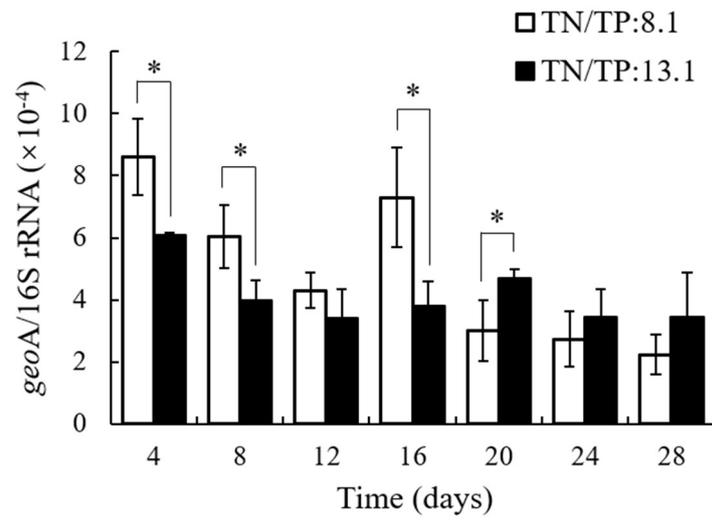


図1 異なる栄養塩濃度における *geoA* 遺伝子の発現量変動

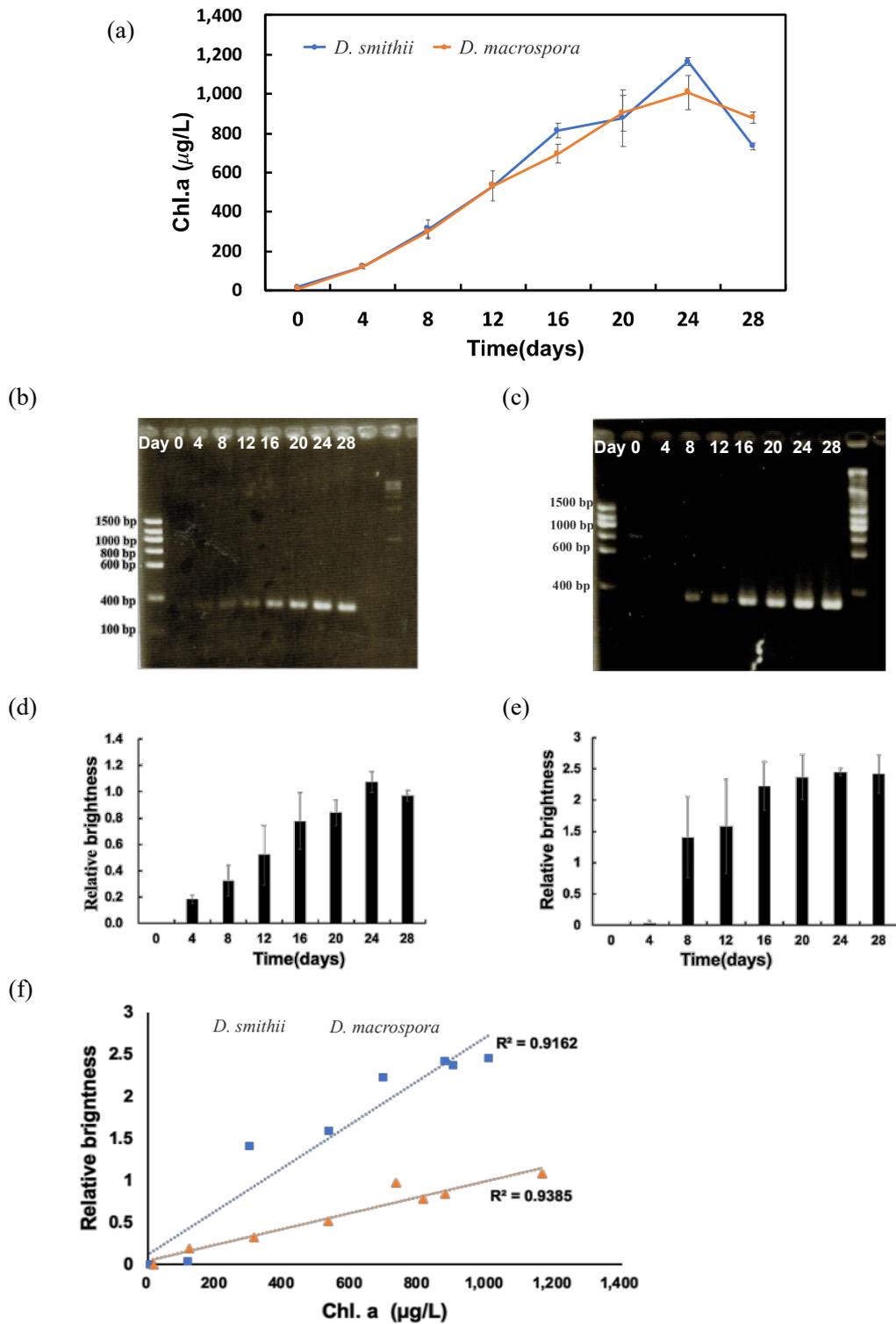
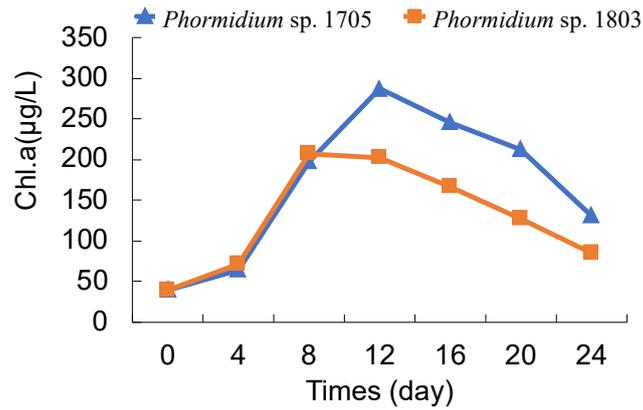
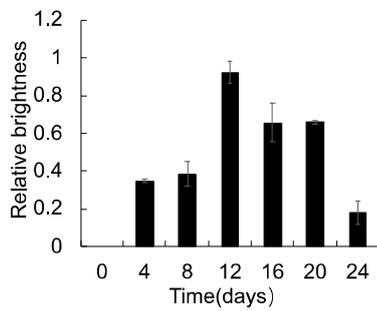


図2 ジェオスミン産生藍藻類の個体密度の変動 (代表的データ)
 (a) Chl.a を用いた個体群密度, (b) *A. smithii* の PCR 産物, (c) *A. macrospora* の PCR 産物, (d) *A. smithii* の PCR 産物の輝度, (e) *A. macrospora* の PCR 産物の輝度, (f) Chl. a と PCR 産物の輝度の相関関係

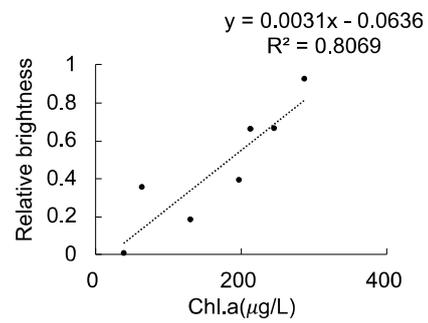
(a)



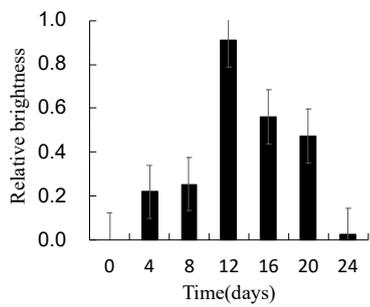
(b)



(c)



(d)



(e)

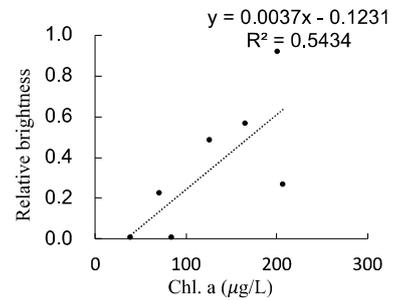


図3 2-MIB 産生藍藻類の個体密度の変動 (代表的データ)

(a) Chl.a を用いた個体群密度, (b) *Phormidium* sp. 1705 の PCR 産物の輝度, (c) *Phormidium* sp. 1705 の PCR 産物の輝度と Chl. a との相関関係, (d) *Phormidium* sp. 1803 の PCR 産物の輝度, (e) *Phormidium* sp. 1803 の PCR 産物の輝度と Chl. a との相関関係