

カビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の構築

| | | |
|-------|----|----|
| 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 | 松本 | 恭太 |

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簡易同定法の構築

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 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 松本 恭太 国立保健医療科学院 生活環境研究部 研究生

研究要旨

遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の開発を目的とし、PCRによるカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出に基づくカビ臭産生藍藻類の簡易同定を試みた。

本研究では単藻株 55 株、NIES 株 39 株、分譲株 20 株から抽出した DNA 試料を用いてジェオスミン産生株である *Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属、2-MIB 産生株である *Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属、*Microcoleus* 属に特異的な PCR 系を検討した。結果としては、*Microcoleus* 属を除く 4 属については非特異的な検出がなく、*Microcoleus* 属については 2-MIB 合成遺伝子と相溶性が高い *Phormidium* sp.のみ検出が確認された。

続いて、46 水源試料で構築した PCR 系を適用した結果、*Phormidium* sp.を単離した水源を除き、単離した産生株と同じ属の遺伝子のみが検出した。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 *Phormidium* sp.を単離した水源については *Microcoleus* 属に特異的な 16S rRNA 遺伝子の検出を組み合わせることで、カビ臭産生株が *Microcoleus* 属ではないことを示す結果となった。そのため、本研究で構築した PCR 系の有用性が示され、顕微鏡観察と組み合わせることで早期にカビ臭原因物質産生種の同定が可能となる。

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するとともに、形態での種判断を補助するツールが必要となる。

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¹⁾。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²⁾。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。PCR の検出においては *Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属の検証は進んでいるものの、2-MIB 合成遺伝子については属レベルで判定可能な PCR 系の構築に関する検討が進んでいない³⁾のが現状である。

以上の背景を踏まえ、本研究では遺伝子検出を用いたカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定法の開発を目的とし、PCRによるカビ臭原因物質合成酵素遺伝子検出に基づくカビ臭産生藍藻類の簡易同定を試みた。

B. 研究方法

1. 対象試料

本研究は、平成 31 年 4 月～令和 3 年 3 月でカビ臭が発生した地域で採取した 46 水源試料を用いた。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、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. PCRによるカビ臭産生種の同定方法の確立

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、遺伝子解析に供した。

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、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子解析(*geoA*遺伝子、2-MIB合成遺伝子)⁴⁾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配列情報を取得した。

取得した配列情報をMEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて比較し、カビ臭原因藍藻類として代表的な5属(ジェオスミン:*Dlichospermum*属,*Apanizomenon*属 2-MIB:*Pseudanabaena*属,*Planktothricoides*属,*Microcoleus*属)について判定可能なプライマー対を設計した(表1)。そして、各DNA抽出試料を用いてPCRによるカビ臭原因藍藻類の属レベルでの簡易同定を試みた。

3. カビ臭発生水源でのカビ臭産生藍藻類の同定の試み

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。また、付着性藻類を対象とした場合、岩に付着している藻類をはがし、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、電気泳動にて検出結果を確認し、水源試料に存在するカビ臭産生種の同定を試みた。

C. 研究結果およびD. 考察

単藻株55株、NIES株39株、分譲株20株から

抽出したDNA試料を用いて、表1に示すプライマーを用いて、PCRを実施した。*Dlichospermum*属、*Apanizomenon*属、*Pseudanabaena*属、*Planktothricoides*属については、カビ臭原因物質産生株であり、かつ形態観察ならびに16S rRNA遺伝子解析で既に同定された属種と同じ属のプライマーを使用した場合のみ増幅産物が検出する結果(図1, 2)となった。*Microcoleus*属については、*Microcoleus autumnalis*と形態的に類似しているが16SrRNA遺伝子配列が異なる*Phormidium* sp.からPCR増幅産物の検出が確認された。得られた2-MIB合成遺伝子の一部の配列情報を比較した場合、97.8%一致していることが確認され、さらに塩基配列が異なる連続部分は確認されなかった。そのため、本研究で得られた2-MIB合成遺伝子の配列情報の範囲では、特異的に*Microcoleus*属のみを検出できない可能性がある。しかし、*Phormidium* sp.は一部地域でのみ単離された株であり、日本の多く地域で問題となっているカビ臭原因藻類は*Microcoleus*属である。さらにPCRの検出結果と顕微鏡観察を加えることでより正確に*Microcoleus*属の産生株の存在を判断することが可能であるといえる。

以上、本研究で提案したプライマーを用いることでカビ臭産生藍藻類を属レベルで同定可能であることが示された。

続いて、46水源試料で構築したPCR系を適用したところ、*Phormidium* sp.を単離した水源を除き、単離した産生株と同じ属の遺伝子のみが検出する結果となった(図3)。また、*Phormidium* sp.を単離した水源については、*Microcoleus*属の16S rRNA遺伝子はPCRで検出されず、*Microcoleus*属のカビ臭産生株は存在しないことが明らかとなった。以上、本研究で構築した手法は培養よりも早く産生種を属レベルで判定できることから、顕微鏡での産生種同定のサポート情報として有用であるといえる。

E. 結論

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、日本で代表的なカビ臭産生藍藻類の5属について、属レベルでの同定可能なPCR系を構築することに成功した。また同反応系を水源試料に適用したところ、非特異的な検出はほとんどなく、産生種を属レベルで同定可能であることが明らかとなり、本研究で構築した手法の有用性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 早坂泰彦, 鈴木孝俊, 山田晃平, 秋葉道宏. 形態学的特徴と遺伝子解析に基づく全国水道水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類の存在調査. 水道協会雑誌; 90(5), 2-12, 2021.

2. 学会発表

松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. PCR 法によるカビ臭原因物質産生 *Phormidium autumnale* の遺伝子検出に関する検討. 令和2年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.

江崎敦, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 遺伝子解析に基づくカビ臭原因物質藍藻類の同定. 令和2年度水道研究発表会, 2020.11, 誌上発表.

松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉道宏. カビ臭原因藍藻類の簡易同定に向けた合成酵素遺伝子検出の有用性評価. 第55回日本水環境学会年会, 2021.3, オンライン.

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) Devi A, Chiu YT, Hsueh HT, Lin TF (2021) Quantitative PCR based detection system for cyanobacterial geosmin/2-methylisoborneol (2-MIB) events in drinking water sources: Current status and challenges, Water Res., 116478.

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.

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。

表1 本研究で使用したプライマー一覧

| 対象領域 | 属 | フォワード (F) リバース (R) | 配列 (5' → 3') | PCR 産物の サイズ (bp) |
|-----------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| 2-MIB 合成 遺伝子 | <i>Microcoleus</i> 属 | F | CAGCGGATCTTTTCTTCGAG | 210 |
| | | R | TGAACCAGGTCGTTGTGAAA | |
| | <i>Pseudanabaena</i> 属 | F | CACCAGATATTTTCTTCGAT | 210 |
| | | R | TGAACCAAGTCGTTATGAAA | |
| | <i>Planktothricoides</i> 属 | F | CAGGGGATCTTTTCTTCGAG | 210 |
| | | R | TGAACCAGGTCGTTGTGGAG | |
| <i>geoA</i> 遺伝子 | <i>Dolichospermum</i> 属 | F | ACATTGAAATGCGGCGGAAA | 153 |
| | | R | TCATTGCGGAGATGTACACC | |
| | <i>Aphanizomenon</i> 属 | F | GTACATCTCCGCAACGACCT | 133 |
| | | R | CCGCCTCTTGGGTACTTACA | |

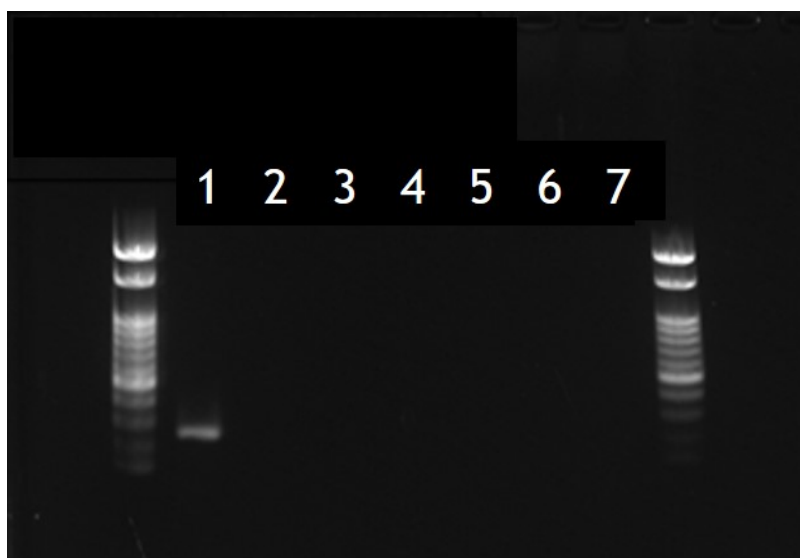


図 1 PCR (*Microcoleus* 属判定) による検出結果 (一部)

1. *Microcoleus autumnalis*, 2. *Microcoleus autumnalis*(非産生株), 3. *Pseudanabaena cinerea*
4. *Planktothricoides raciborskii*, 5. *Dolichospermum smithii*, 6. *Aphanizomenon gracile*,
7. Negative control

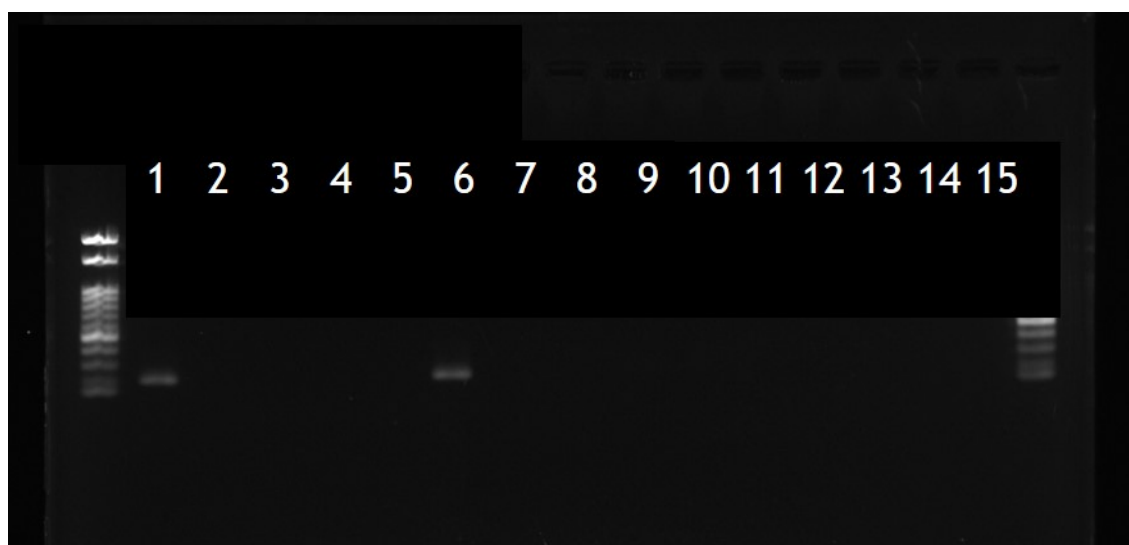


図 2 PCR (*Dolichospermum* 属判定) による検出結果 (一部)

1. *Dolichospermum smithii*, 2. *Pseudanabaena sp.*, 3. *Pseudanabaena yagii*(非産生株), 4. *Pseudanabaena yagii*,
5. *Planktothricoides raciborskii*, 6. *Dolichospermum planctonicum*, 7. *Limnothrix sp.* (非産生株), 8. *Limnothrix sp.* (非産生株),
9. *Pseudanabaena foetida*(非産生株), 10. *Pseudanabaena subfoetida*(非産生株), 11. *Oscillatoria sp.* (非産生株),
12. *Pseudanabaena sp.*, 13. *Dolichospermum affine*(非産生株), 14. *Dolichospermum lemmermannii* (非産生株),
15. Negative control

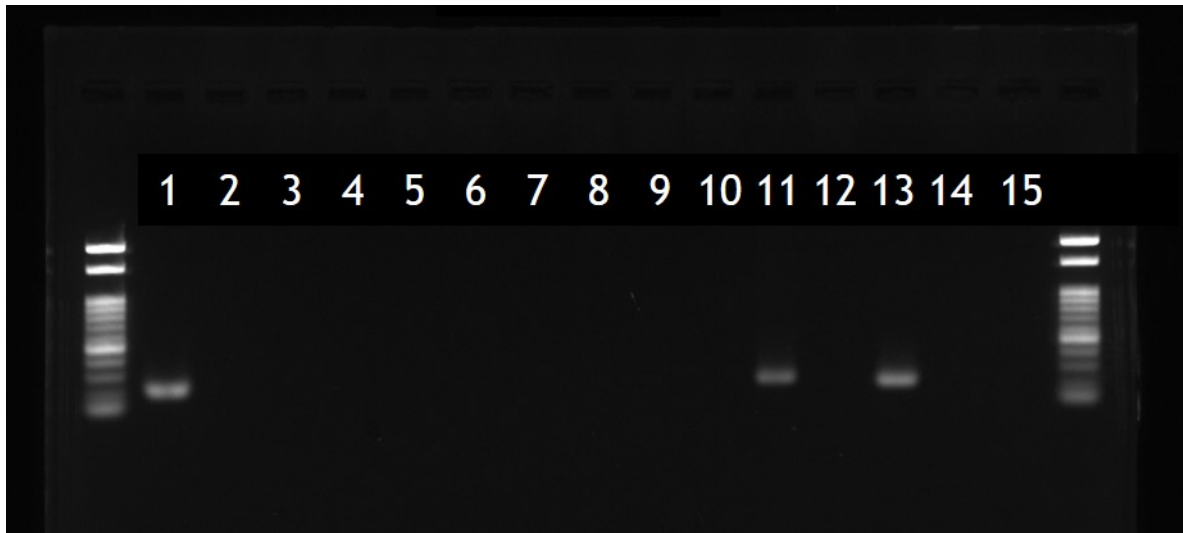


図3 水源試料に対する PCR (*Planktothricoides* 属判定) による検出結果 (一部)
 1. *Planktothricoides raciborskii* (Positive control), 2-14. 水源試料, 15. Negative control

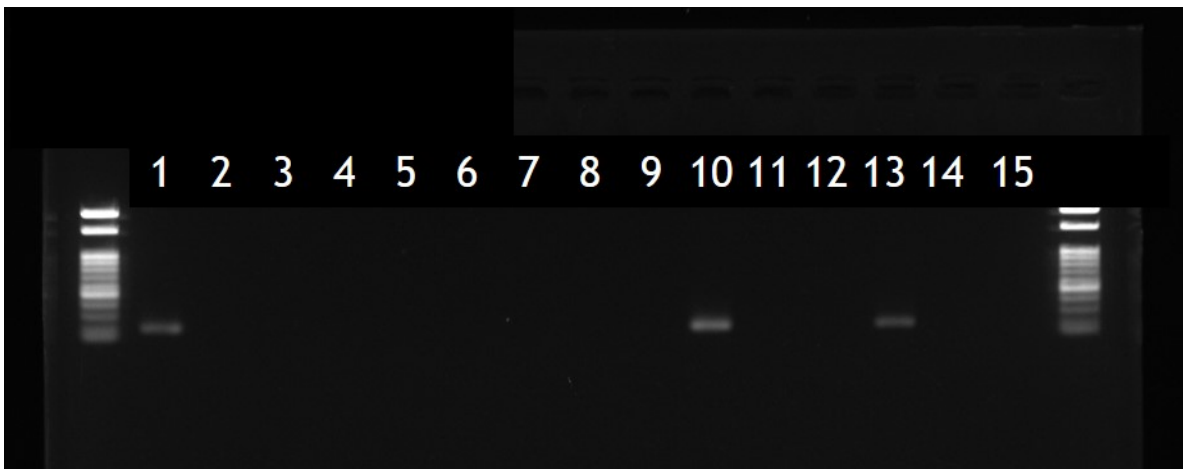


図4 水源試料に対する PCR (*Dolichospermum* 属判定) による検出結果 (一部)
 1. *Dolichospermum smithii* (Positive control), 2-14. 水源試料, 15. Negative control

