

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 理工学域工学系 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および環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動把握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、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、個体群数定量に必要なカビ臭物質合成遺伝子を用いた迅速かつ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、環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動を明らかにすることとした。この結果、Whole Cell qPCR 法によるカビ臭物質産生藍藻類の個体群数の定量法を確立し、モバイル型装置や自動装置に応用できる知見を得た。また、高 NO₃-N 濃度において 2-MIB 産生能が高くなることを明らかにした。異なる温度では、増殖に適さない温度（低温）の際に、カビ臭物質合成酵素遺伝子群の発現量が高くなることを見いだした。加えて、温度がカビ臭物質の局在（細胞内もしくは細胞外）の制御の一端を担っていることが推量された。カビ臭発生予測手法に寄与する重要な知見を提供した。

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。各種環境因子の状況におけるカビ臭物質産生藍藻類の個体

群数の挙動およびカビ臭物質産生への影響についての知見もカビ臭発生予測手法の構築に求められている。カビ臭物質産生藍藻類の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することがわかった。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。昨年度までに、従来の遺伝子定量手法で用いられている実験装置（定量 PCR (qPCR) 装置）よりも安価な一般的な PCR 装置（数十万円）を用いた定量法を開発した。ここ数年で、モバイル型の PCR 装置や qPCR 装置が販売され、かつ、自動 qPCR 装置も普及してきている状況となっている。このため、qPCR 装置を用いた Whole Cell PCR 法の開発も有意義である情勢が形成されている。

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迅速かつ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、環境因子が及ぼすカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量への影響とカビ臭物質産生量の挙動を明らかにすることとした。

B. 研究方法

1) 異なる環境因子におけるカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量の変動

1-1) 2-MIB 産生に及ぼす NO₃-N 濃度影響

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 倍量と変化した改変 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 μmol/m²/s、明暗周期を 12 h として培養した。全てのサンプル (n=5) は、植菌後 4 日経過する毎に採取し、細胞密度をあらわすクロロフィル a (Chl.a) の定量および遺伝子発現量の定量、ジェオスミンの定量を実施した。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 qRT-PCR 法により実施した。使用したプライマーは、表 1 に示した。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。

1-2) カビ臭物質産生に及ぼす温度影響

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)、2-MIB 産生藍藻類として *Pseudanabaena foetida* NIES-512 を用いた。両藍藻類ともに標準培地とされている CT 培地にて培養を行った。培養温度は、15°C、25°C、35°C とした。光強度は、30.0 μmol/m²/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) や 2-MIB 合成酵素遺伝子群 (*mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子) の発現解析を qRT-PCR 法により実施した。使用したプライマーは、表 1 に示した。遺伝子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

供試藍藻類は、*D. smithii* NIES-824 (ジェオスミン産生) とし、2-MIB 産生藍藻類は茨城県から分譲いただいた、*Pseudanabaena* sp. の 1705 株と 1803 株、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 *Phormidium tenue* を用いた。

D. smithii NIES-824 は、CT 培地、培養温度 28°C、光強度 60.3 μmol/m²/s、明暗周期を 12 h として培養した。*Pseudanabaena* sp.1705 株と 1803 株は、CT 培地、培養温度 25°C、光強度 30.0 μmol/m²/s、明暗周期を 12 h として培養した。*P. tenue* は、MA 培地、培養温度 25°C、光強度 30.0 μmol/m²/s、明暗周期を 12 h として培養した。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。

ジェオスミン産生藍藻類は *geoA* ホモログを標的とした Whole Cell qPCR 法をインターカレート法で行った。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) とした Whole Cell qPCR 法をインターカレート法およびプローブ法で行った。使用したプライマーおよびプローブは表 1 に示した。インターカレート法による Whole Cell qPCR 法の DNA ポリメラーは TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) とし、Probe 法の Whole Cell qPCR 法 (Takara Bio

Inc, Shiga, Japan)とした。PCR 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*geoA* 遺伝子のサーマルサイクル条件は、初期変性 95°C, 30 秒, 40 回のサーマルサイクル反応; 変性 95°C, 5 秒, アニーリング 60°C, 34 秒とした。

2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena* 属 1705 株, 1803 株と *P. tenue* の *mtc* 遺伝子を標的とした Whole Cell qPCR 法は、インターカレート法と Probe 法の両方を行った。インターカレート法による Whole Cell qPCR 法は、上述と同様である。Probe 法による Whole Cell qPCR 法の DNA ポリメラーゼは、Premix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara Bio Inc, Shiga, Japan)とした。PCR 反応液は、本ポリメラーゼの説明書通りに作成した。*mtc* 遺伝子のサーマルサイクル条件は、初期変性 95°C, 30 秒, 40 回のサーマルサイクル反応; 変性 95°C, 5 秒, アニーリング 60°C, 34 秒とした。

Whole Cell PCR 法の評価は、得られた遺伝子のコピー数と藍藻類の細胞密度を比較した。

C. 研究結果および D. 考察

1) 異なる環境因子におけるカビ臭物質合成酵素遺伝子の発現量の変動

1-1) 2-MIB 産生に及ぼす NO₃-N 濃度影響

NO₃-N 濃度が 2-MIB 合成に対する影響については、遺伝子発現レベルではほとんど知られていない。このため、2-MIB 産生藍藻類バイオマス (Chl-a), 2-MIB 産生量の解析とともに異なる NO₃-N 濃度下での *mtf* および *mtc* 遺伝子の発現を qPCR で解析し、2 つの標的遺伝子間の相関解析を行った。

細胞バイオマス (Chl-a として) は 16 日目に最大となった (対照群および高濃度 NO₃-N 処理でそれぞれ 0.95 mg/L および 0.72 mg/L)。 *P. foetida* の Chl-a 含有量は、高濃度 NO₃-N 処理では低く、8 日目以降は 2 つの NO₃-N 濃度間で有意な差が見られた ($p < 0.05$, 図 1A)。

両 NO₃-N 濃度における 2-MIB 濃度 (総量, 細胞外および細胞内の 2-MIB) の変化は、Chl-a 含有量と同様な傾向を示した。つまり *P. foetida* の 2-MIB 濃度は Chl-a 含有量の増加に伴い増加し、16 日目に最大となり、その後減少した。細胞内の 2-MIB 濃度は、NO₃-N 濃度が高い条件では 12 日目以降に有意に上昇した ($p < 0.05$, 図 1D)。細胞内 2-MIB 濃度の最大値は、対照群と高 NO₃-N 区でそれぞれ 43.00 ng/L と 60.25 ng/L であった。しかし、2 つの NO₃-N 条件では、総 2-MIB 生成量と細胞外の 2-MIB 生成量の両方に大きな違いは認められなかった

(図 1B および C)。さらに、細胞外の 2-MIB の割合は、2 つの NO₃-N 条件のいずれにおいても 40%以上であった。

また、図 2 に示すように、Chl-a 濃度は、総 2-MIB 濃度、細胞外 2-MIB 濃度、細胞内 2-MIB 濃度と良好な正の相関関係を示した ($R^2 = 0.6078, 0.7176, 0.4115$, いずれも $p < 0.05$)。

2-MIB 産生能 (2-MIB/Chl-a) の結果を図 3 に示す。全体として、NO₃-N 濃度が高いほど 2-MIB 産生能は高くなり、Chl-a 濃度とは逆の効果を示した (図 3)。総 2-MIB 産生量は、対照群と高濃度 NO₃-N 群でそれぞれ 30.40-292.53 ng/mg Chl-a, 31.99-625.52 ng/mg Chl-a であった (図 3A)。

2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量においては、NO₃-N 濃度が高い場合、*mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルは、12 日目を除いて有意に高かった ($p < 0.05$, 図 4A および B)。この 2 つの標的遺伝子の発現は、藍藻類 *P. foetida* の死滅期においても安定して転写されていた。また、*mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量には、有意な正の相関関係が見られた ($R^2 = 0.9162, p < 0.01$, 図 4C)。

1-2) カビ臭物質産生に及ぼす温度影響

1-2-1) *D. smithii* のジェオスミン合成における温度影響

本研究では、25°C の温度が *D. smithii* の最適な増殖温度であった (図 5a)。また、15°C では *D. smithii* の増殖が比較的遅かった。増殖速度と Chl-a 濃度は、15°C と 35°C の培養条件に比べて 25°C 条件が明らかに高かった。このように、8 日目以降、3 つの温度処理の間で Chl-a 含有量に有意な差が見られ、25°C でより多くの Chl-a 含有量が得られた (図 5a, $p < 0.05$)。低温 (15°C) では *D. smithii* の生育が抑制され、増殖速度と Chl-a 含有量が最も低くなった。24 日間の培養期間中、15°C, 25°C, 35°C における *D. smithii* の Chl-a 濃度の最大値は、それぞれ 0.90 mg/L, 2.22 mg/L, 1.66 mg/L であった。

Chl-a 濃度と比較して、ジェオスミン濃度についても同様の結果と現象が見られた (図 5b-d)。増殖に最適な温度である 25°C でのジェオスミン濃度 (総ジェオスミン, 細胞外ジェオスミン, 細胞内ジェオスミン) は、12 日目以降、15°C および 35°C でのジェオスミン濃度よりも有意に高かったが、15°C ではジェオスミン濃度は最も低かった (図 5b-d, $p < 0.05$)。培養開始後 8 日間、細胞外のジェオスミン濃度は 35°C で最も高かったことから、高温が細胞からのジェオスミンの放出を促進することを推察でき

る。今回の結果から、総ジオスミン濃度と Chl-a 含有量の間には、良好な正の相関関係が認められた (Spearman's $\rho = 0.989, p < 0.01$)。

温度条件の異なる *D. smithii* のジオスミン産生能 (ジオスミン/Chl-a) は経日的に変動した (図 6)。総ジオスミン産生能は、培養開始から 8 日間は 15°C で最も高かった (図 6a)。また、培養開始から 8 日間の細胞外ジオスミン産生能は、15°C および 35°C で 25°C よりも有意に高かった (図 6b, $p < 0.05$)。このことから、藍藻類細胞の増殖初期にジオスミン合成において、低温が引き金となっていると考えられた。さらに、16 日目からは、総ジオスミン産生能と細胞外ジオスミン産生能が上昇し、25°C では 15°C や 35°C に比べて有意に高くなった (図 6a, b)。また、Chl-a 濃度は 16 日目から変化しなかったが、総ジオスミン濃度は大きく上昇した。

遺伝子発現レベルでの解析では、温度条件が異なると、*geoA* 遺伝子の発現量は有意に異なった (図 7)。*geoA* 遺伝子発現量は、25°C と 35°C の培養条件よりも 15°C の方が高く、16 日目を除いて有意に異なっていた ($p < 0.05$)。また、35°C では *geoA* 遺伝子の転写が抑制されており、全培養期間において *geoA* の発現量は 25°C および 15°C の条件よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。低温では藍藻類の増殖は阻害されたが (図 5a)、*geoA* 遺伝子の発現量は有意に増加した (図 7)。このことから、*D. smithii* の *geoA* 遺伝子の発現とその制御には、温度が重要な役割を担っていることを明らかにした。さらに、培養時間の増加に伴って *geoA* 遺伝子の発現量が減少したことから、*geoA* 遺伝子の発現には代謝活動やイソプレノイド産生能と密接な関係があると考えられた。

1-2-2) *P. foetida* の 2-MIB 合成における温度影響

本研究では、25°C と 35°C の温度が *P. foetida* の最適な増殖温度であった (図 8a)。Chl-a 濃度の変化を見ると、*P. foetida* の細胞は、25°C、35°C、15°C の条件下で、それぞれ 8 日目、12 日目、16 日目に死滅期に入った。*P. foetida* 最大 Chl-a 濃度は、15°C、25°C、35°C でそれぞれ 0.48 mg/L、0.47 mg/L、0.31 mg/L であった。25°C で培養した *P. foetida* は、15°C および 35°C の培養条件よりも、培養開始から 8 日間において Chl-a 濃度および増殖量が有意に高かった (図 8a, $p < 0.05$)。*P. foetida* の低温 (15°C) での細胞成長は抑制され、増殖速度と Chl-a 含有量が大幅に減少した。

温度が異なると、*P. foetida* の 2-MIB 産生量に有意な差が見られた。35°C では、4 日目から 12 日目にかけて、総 2-MIB 濃度および細胞内 2-MIB 濃度が有意に上昇した (図 8, $p < 0.05$)。2-MIB 濃度は、15°C 培養条件で最低となり (図 8b-d)、Chl-a 濃度も最低であった (図 8a)。細胞外 2-MIB 濃度は、35°C では 4 日目と 8 日目に 15°C と 25°C に比べて有意に高かった (図 8b, $p < 0.05$)。12 日目には、25°C での細胞外 2-MIB 濃度が大きく上昇し、15°C および 35°C での濃度よりもはるかに高かった。これは、藍藻類の死細胞から放出された 2-MIB が多かったためと推量された。また 35°C の培養条件における 2-MIB の局在が細胞外よりも細胞内の方が多かったことから、温度が局在を制御することが推定された。本研究では、藍藻類のバイオマス (Chl-a 濃度) の増加に伴い、全体的に 2-MIB 濃度が増加した。Chl-a 濃度と 2-MIB 濃度の間には、有意な正の相関関係 (Spearman's $\rho = 0.850, p < 0.01$) が認められた。このことから、高温が *P. foetida* の 2-MIB 生産を促進することが示唆された。各温度における 2-MIB 産生能 (2-MIB/Chl-a) の値は、2-MIB 濃度 (図 8) と比較して同様の結果を示した (図 9)。35°C における 2-MIB 産生能は、15°C および 25°C における 2-MIB 産生能よりも全般的に高かった (図 10)。特に、4 日目の 2-MIB 産生能は、15°C と 35°C の両方で 25°C のそれよりも高かった。これらの結果は、増殖に好ましくない温度が、増殖の初期段階で藍藻類細胞が 2-MIB を合成する可能性を高めることを示している。

異なる培養温度において、2-MIB 合成に関与する遺伝子の *mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量は有意に異なっていた (図 10)。*P. foetida* では、25°C と比較して、低温 (15°C) と高温 (35°C) の両方で *mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルが上昇した。*mtf* および *mtc* 遺伝子の発現レベルは、4 日目および 12 日目において、15°C および 35°C で 25°C の場合よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。増殖に好ましくない温度が藍藻類細胞の 2-MIB 産生の可能性を遺伝子発現レベルで増加させることが考えられた。また、2 つの 2-MIB 合成酵素遺伝子 (*mtf* および *mtc*) の発現は、温度条件や生育段階が異なる場合において同様であった。これは、GPP メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子と、2-MIB 合成のモノテルペンシクラーゼの遺伝子がオペロンを形成しているためと考えられた^{3,4,5}。

藍藻類におけるジオスミン/2-MIB 合成の主要な生合成経路は、メバロン酸経路 (MV) やノンメバロン酸経路 (MEP) などのイソプレ

ノイド経路であると提唱されている⁶⁾。ジェオスミン、2-MIB、クロロフィル・フィトール、カロテノイドが同様のイソプレノイド経路で生合成されることから、ジェオスミン・2-MIBと藍藻類の光合成色素の合成には密接な関係があると考えられる^{6,7,8)}。従って、温度以外に光もジェオスミンと2-MIB合成の遺伝子発現を調節する可能性がある。既往研究から、*Pseudanabaena* sp.において、2-MIB合成に関連する2つの標的遺伝子の発現レベルが、低光量では増加し、高光量では減少することが報告されている³⁾。藍藻類を暗所で24時間以上培養すると、ジェオスミン合成酵素遺伝子の発現が減少し、6時間以内では減少しないことを報告している^{9,10)}。

以上から、通常の観測項目における環境因子(窒素、水温)から、カビ臭物質産生藍藻類の増殖とカビ臭物質産生の特性を推量する知見を得た。また、カビ臭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迅速な定量法の開発

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、形態観察では産生株か非産生株の判別や顕微鏡検査カウントでのカビ臭物質産生藍藻類の定量は困難であり、迅速かつ簡便な方法での判別法および定量法が求められている。

カビ臭物質産生に關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。この証左として、座学・実技講習を行った後、PCR法を実施したことがない方に、実施していただき、良好な結果を得ることができた。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PCR法が優良な方法として開発してき

た。

これまでに、一般的なサーマルサイクラーを用いた迅速かつ簡便な半定量法として Whole-Cell PCR法を開発した。本研究では、定量PCR装置(qPCR法)を用いて迅速かつ簡便な定量法の開発を試みた。

この結果、*geoA* 遺伝子ホモログを標的とした定量法では、Chl.aによる細胞密度と同様に Whole Cell qPCR法もDNAを鋳型としたqPCR法(どちらもインターカレート法)により定量した遺伝子量も増加し(図11)、Chl.aと*geoA* 遺伝子量の高い正の相関関係を構築できた(図12, Whole Cell PCR法 $R^2=0.9268$)。以上から、Whole Cell qPCR法(インターカレート法)によりDNA抽出せずジェオスミン産生藍藻類の細胞密度を推量する技術を開発した(図11, 図12)。

一方、*mtc* 遺伝子ホモログを標的とした定量法では、*mtc* 遺伝子量もChl.a濃度と同様に増減し(図13,15,17)、正の相関関係を得たが、供試藻類ごとに相関係数が異なっていた(図14,16,18)。インターカレート法がProbe法よりも良好な相関係数を示す傾向にあった。

モバイルqPCR装置も市場に流通しており、現場でサンプリング後にカビ臭物質産生藍藻類を定量できる知見を得られた。加えて、完全自動qPCR装置も市場に流通しており、本研究から、カビ臭産生藍藻類の自動定量化技術に貢献できる知見を得ることができた。各水道事業体の体制に沿って、本研究成果を活用できるものと期待される。

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た。環境因子はカビ臭物質産生藍藻類の増殖に影響を与える。高NO₃-N濃度において2-MIB産生能が高くなることを明らかにした。異なる温度では、増殖に適さない温度(低温)の際に、カビ臭物質合成酵素遺伝子群の発現量が高くなることを見いだした。加えて、温度がカビ臭物質の局在(細胞内もしくは細胞外)の制御の一端を担っていることが推量された。

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と定量に有効と期待できる whole-cell qPCR法を開発した。本手法により、カビ臭物質産生藍藻類を迅速かつ簡便に定量できるため、定期的なモニタリングにより、カビ臭発生の予測に貢献できると期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M. Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environmental Science and Pollution Research, 28 177-184, 2021.

2.学会発表

Qingyue Shen, Kazuya Shimizu, Hanchen Miao, Shinya Tsukino, Motoo Utsumi, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Osamu Nishimura, Yasuhiro Asada, Naoshi Fujimoto, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, Effect of TN/TP ratio on growth and geosmin productive activity in cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2021.3, Tsukuba, Japan.

Hanchen Miao, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Monitoring of geosmin-producing cyanobacteria by whole-cell PCR, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2021.3, Tsukuba, Japan.

Ji Zhang, Qingyue Shen, Satoshi Ichise, Marie Shimada, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Hirokazu Takanashi, Michihiro Akiba, Zhongfang Lei, Zhenya Zhang, Kazuya Shimizu, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment (Livestock Waste 2020), 2021.3, Tsukuba, Japan.

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. その他 (受賞等)

Shen Q ら, ポスタープレゼンテーション賞, Effect of TN/TP ratio on growth and geosmin productive activity in cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment, 2021.3.

Miao H ら, ポスタープレゼンテーション賞, Monitoring of geosmin-producing cyanobacteria by whole-cell PCR, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment, 2021.3.

Zhang J ら, ポスタープレゼンテーション賞, Rapid detection for 2-MIB-producing cyanobacteria, The 4th International Conference on Resent Advancements in Sustainable Management of Livestock Waste and Rural Environment, 2021.3.

J. 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.
- 3) Wang Z, Xu Y, Shao J, et al (2011) Genes associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: Isolation, characterization, and expression in response to light. PLoS One **6**:1
- 4) Komatsu M, Tsuda M, Omura S, Oikawa H, and Ikeda H. (2008) Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisoborneol. Proc Natl Acad Sci **105**, pp.7422-7427
- 5) Giglio S, Chou WKW, Ikeda H, Cane DE, and Monis PT. (2011) Biosynthesis of 2-methylisoborneol in cyanobacteria. Environ Sci Technol **45**, pp.992-998
- 6) Ajikumar PK, Tyo K, Carlsen S, Mucha O, Phon TH, and Stephanopoulos G. (2008) Terpenoids: opportunities for biosynthesis of

- natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm* **5**, pp.167–190
- 7) Tholl D. (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* **9**, pp.297–304
 - 8) Pattanaik B and Lindberg P (2015) Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria. *Life* **5**, pp.269–293
 - 9) Giglio S, Saint CP, and Monis PT. (2011) Expression of the geosmin synthase gene in the cyanobacterium *Anabaena circinalis* AWQC318. *J Phycol* **47**, pp.1338–1343
 - 10) Ludwig F, Medger A, Börnick H, Opitz M, Lang K, Göttfert M, and Röske I. (2007) Identification and expression analyses of putative sesquiterpene synthase genes in *Phormidium* sp. and prevalence of *geoA*-like genes in a drinking water reservoir. *Appl Environ Microbiol* **73**, pp.6988–6993
 - 11) Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, and Akiba M. (2021) Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*. *Environ Sci Pollut Res* **28**, pp.1177–184

K. 謝辞

茨城県企業局水質センターおよび嶋田 麻里恵 氏(茨城県企業局水質センター), 一瀬 諭 博士(滋賀県湖環境科学センター), 北村 壽朗 氏(神奈川県企業庁), 藤瀬 大輝 博士(神奈川県川崎市上下水道局), に感謝いたします。

表 1 本研究で使したプライマーとプローブ

Target genes	Primers/Probe	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>geoA</i>	geoA666F	AAAAGACACATTTGCTGATGGTG	Shen et al. (2021)
	geoA774R	ATCACGCGGTCATCAGGCTT	
<i>mtf</i>	Mtf-RTF	CGATTGGTCGGTATTAGAGGCT	Wang et al. (2011)
	Mtf-RTR	ATCACGCGGTCA TCAGGCTT	
	Mtc-RTF	CGCTCGCTTTGTG AGTGAGATAG	
<i>mtc</i>	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	mibcProbe	ACCTAGATTCAGGACTACTCCAGACA	本研究で 新たに設計
	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	Wang et al. (2011)
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	

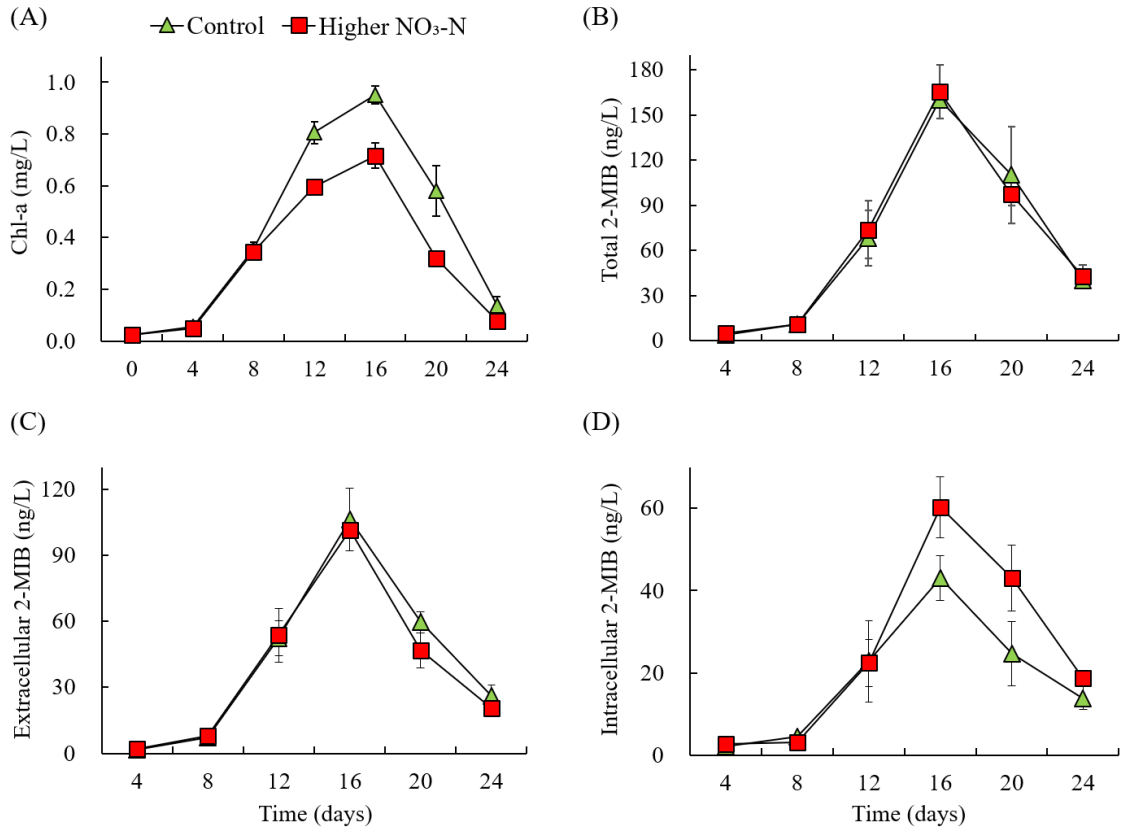


図1 *P. foetida* における異なる $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度での増殖特性と 2-MIB 産生量の経日変化 (A)増殖曲線, (B) 総 2-MIB 濃度, (C) 細胞外 2-MIB 濃度, (D) 細胞内 2-MIB 濃度

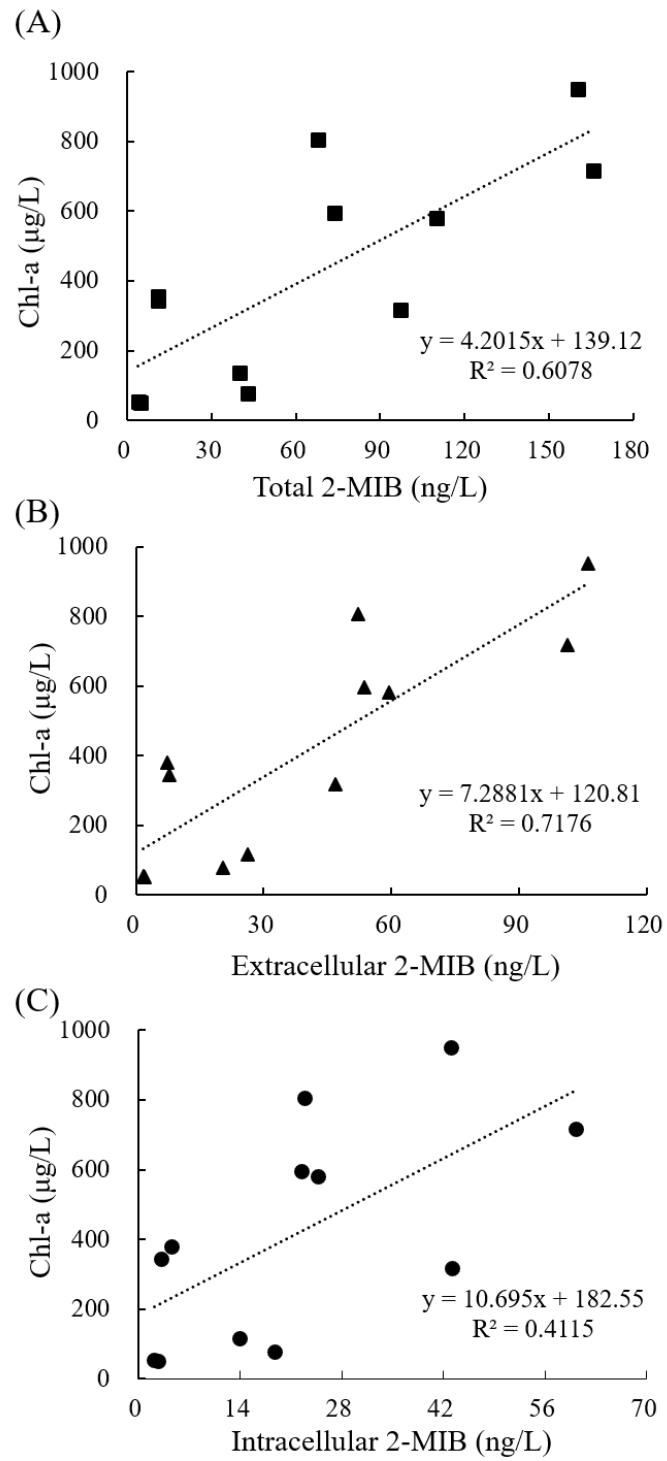


図 2 Chl-a と 2-MIB 濃度の相関分析

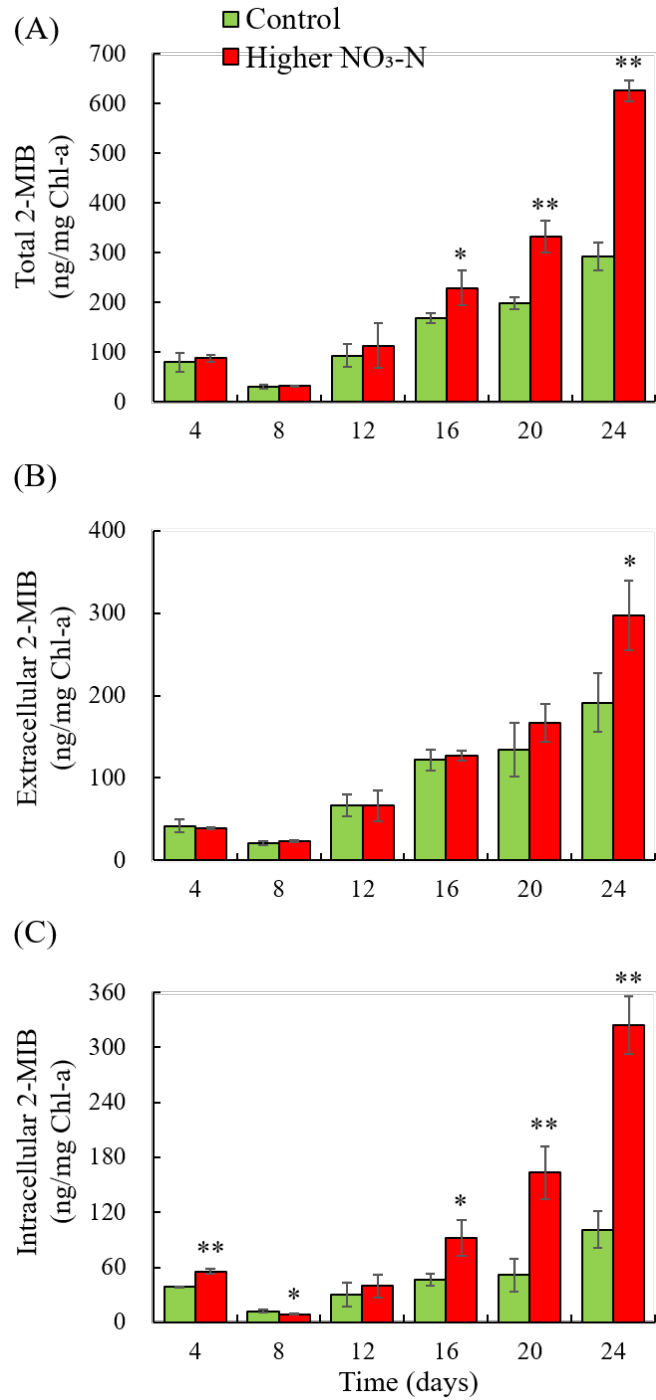


図3 異なる $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度における *P. foetida* の 2-MIB 産生能
 (A) 総 2-MIB 産生能, (B) 細胞外 2-MIB 産生能, (C) 細胞内 2-MIB 産生能
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

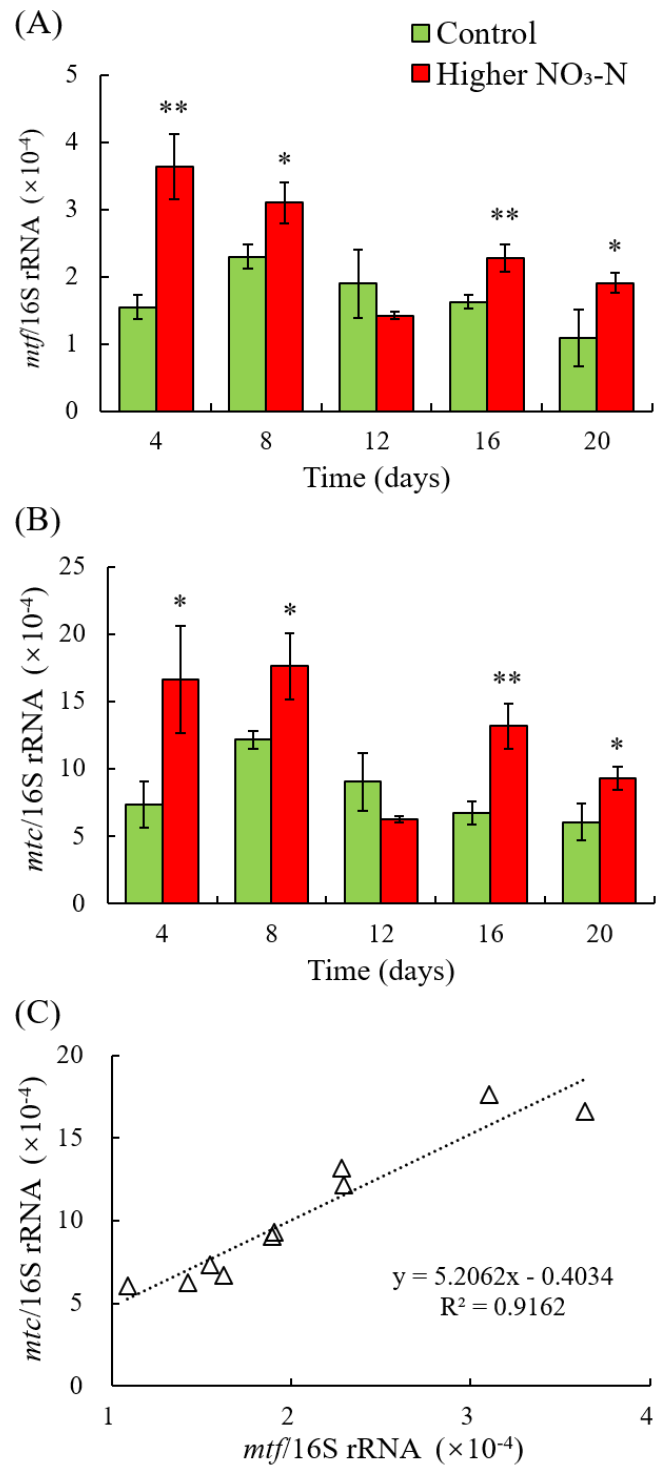


図 4 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量
 (A) *mtf* 遺伝子発現量, (B) *mtc* 遺伝子発現量 gene at different NO₃-N concentrations and correlation analysis (C) between the two target genes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

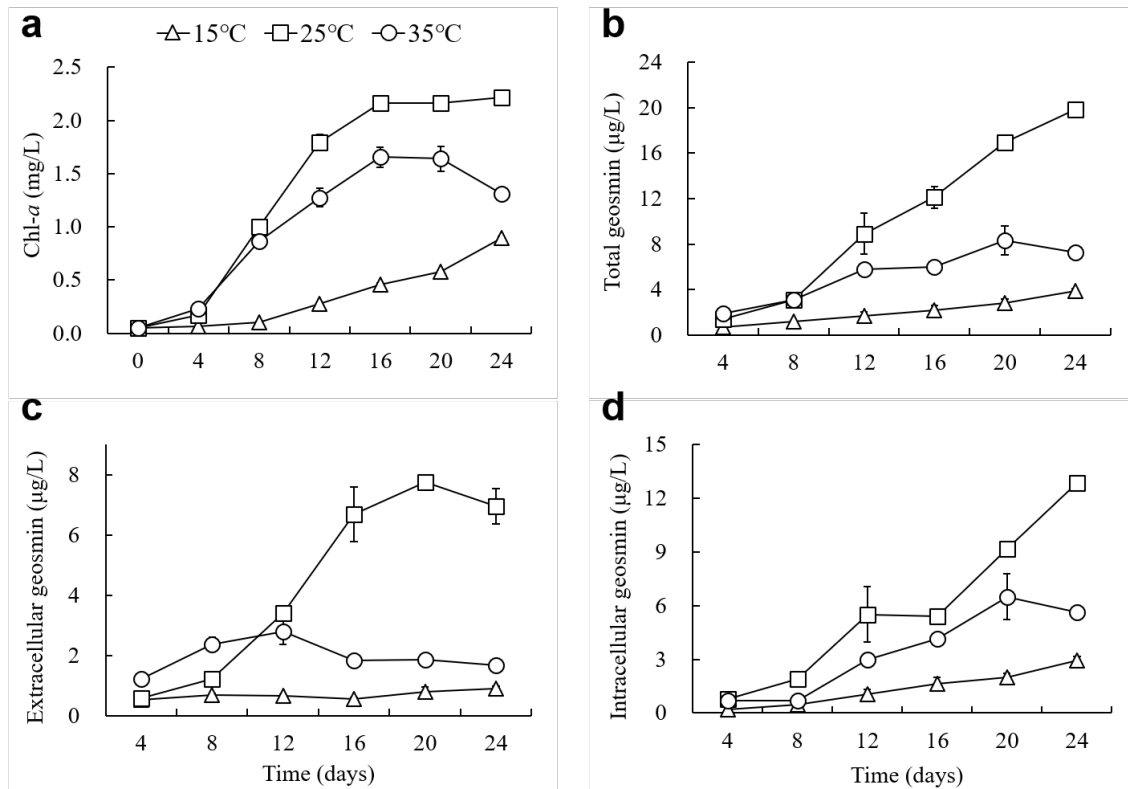


図5 異なる培養温度条件における *D. smithii* の増殖特性とジェオスミン産生量の経日変化
 (a) *D. smithii* の増殖特性, (b) 総ジェオスミン濃度の経日変化, (c) 細胞外ジェオスミン濃度の経日変化, (d) 細胞内ジェオスミン濃度の経日変化

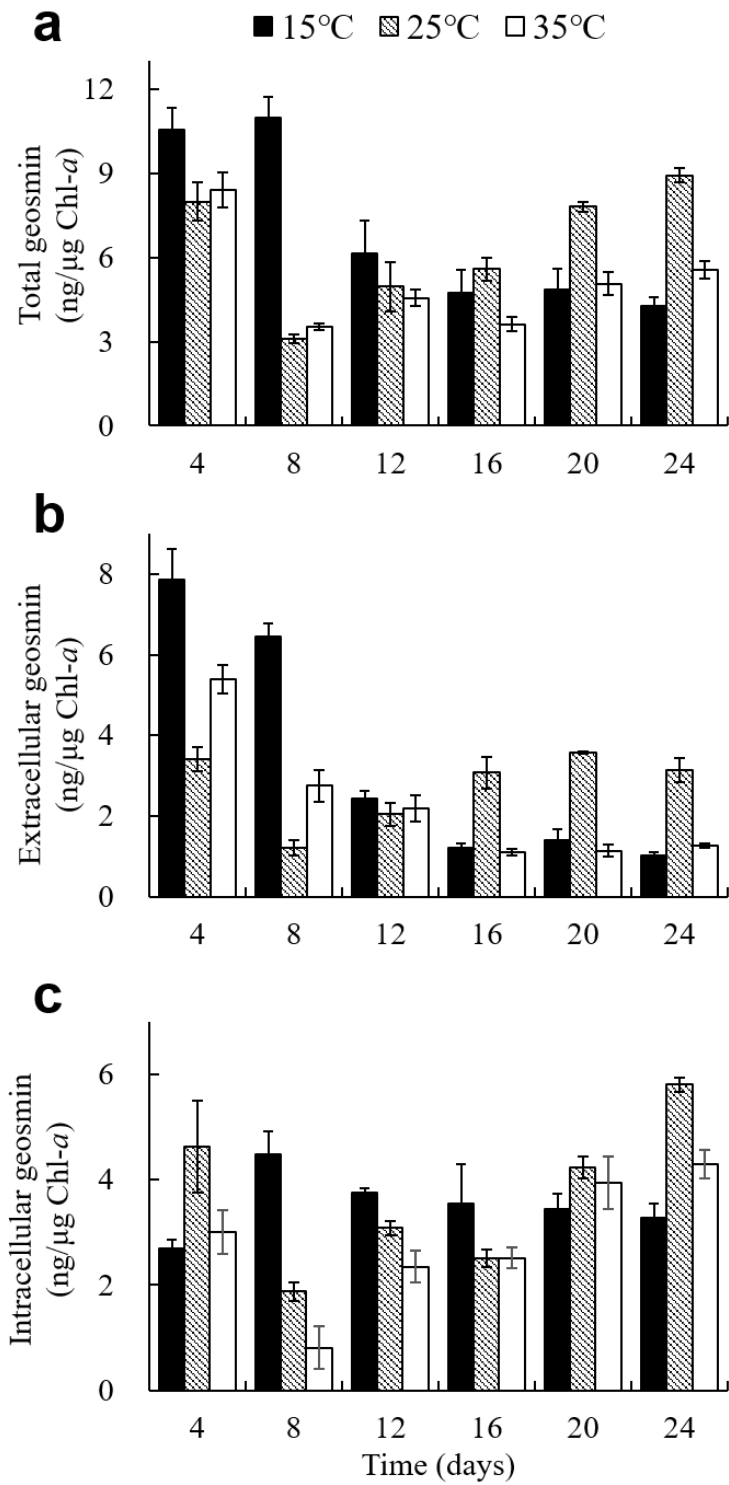


図 6 *D. smithii* のジェオスミン産生能
 (a) 総ジェオスミン産生能, (b) 細胞外ジェオスミン産生能, (c) 細胞内ジェオスミン産生能

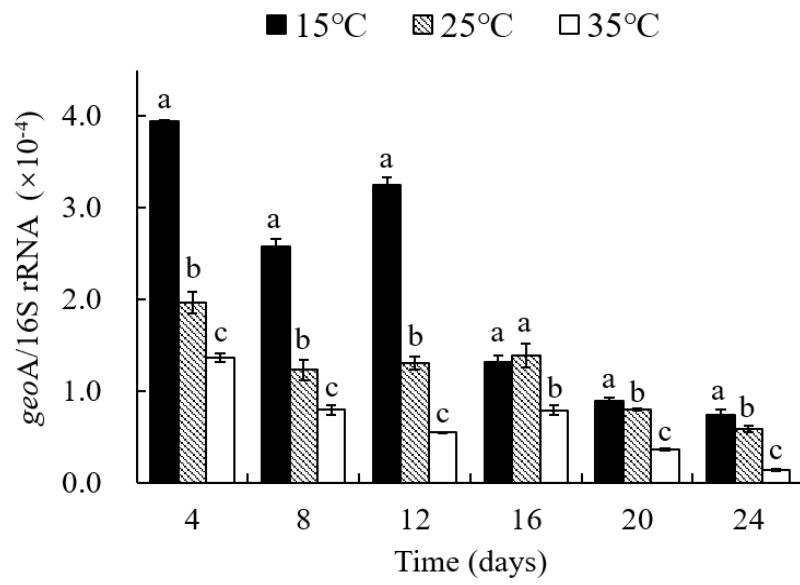


図7 異なる培養温度条件における *D. smithii* の *geoA* 発現量の変化
異なるアルファベット (a, b, c) は, 有意差を示す($p < 0.05$)。

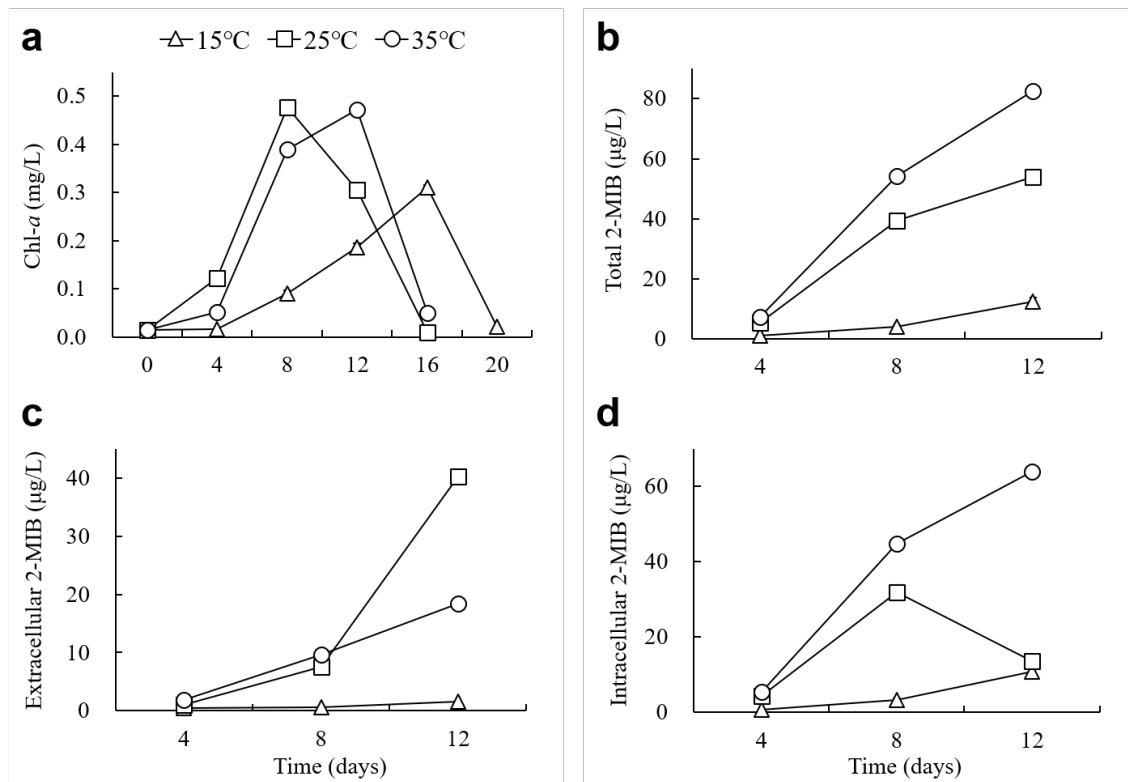


図8 異なる培養温度条件における *P. foetida* の増殖特性と 2-MIB 産生量の経日変化
 (a) *P. foetida* の増殖特性, (b) 総 2-MIB 濃度の経日変化, (c) 細胞外 2-MIB 濃度の経日変化,
 (d) 細胞内 2-MIB 濃度の経日変化

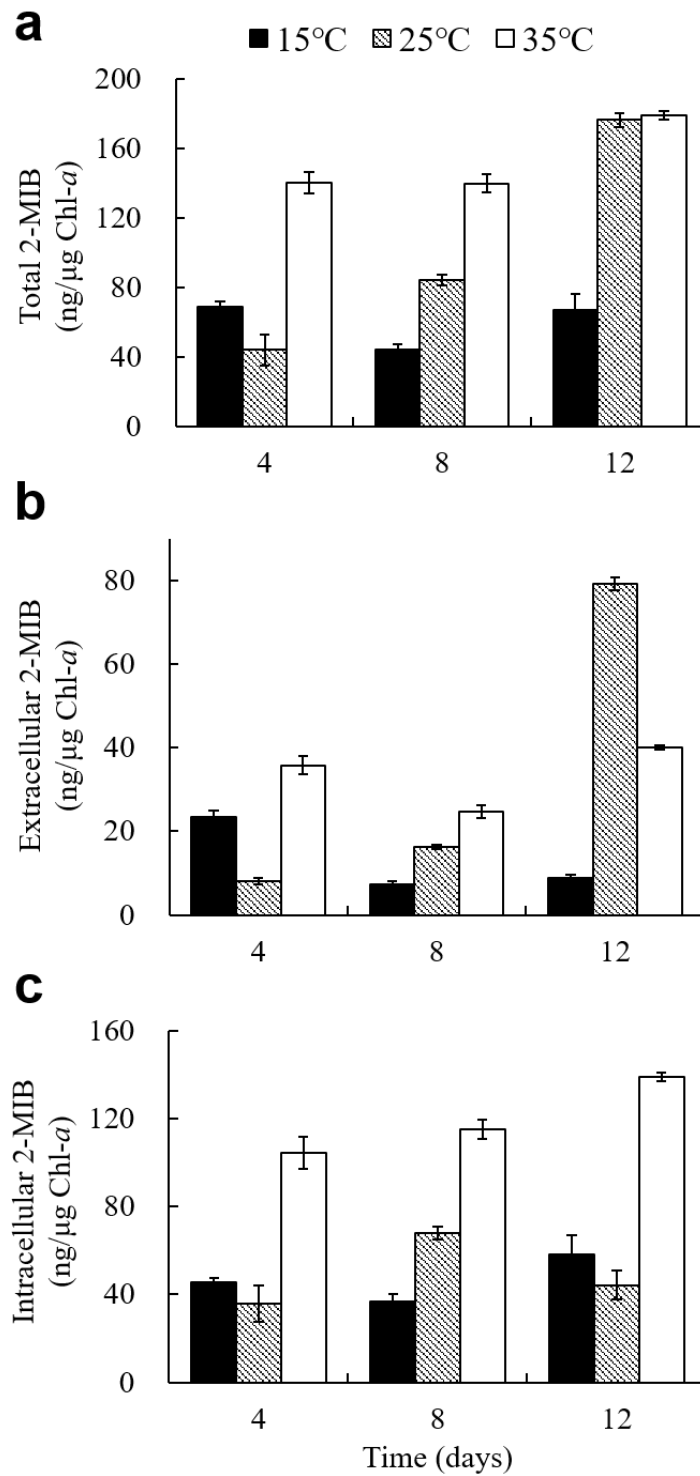


図 9 *P. foetida* の 2-MIB 産生能
(a) 総 2-MIB 産生能, (b) 細胞外 2-MIB 産生能, (c) 細胞内 2-MIB 産生能

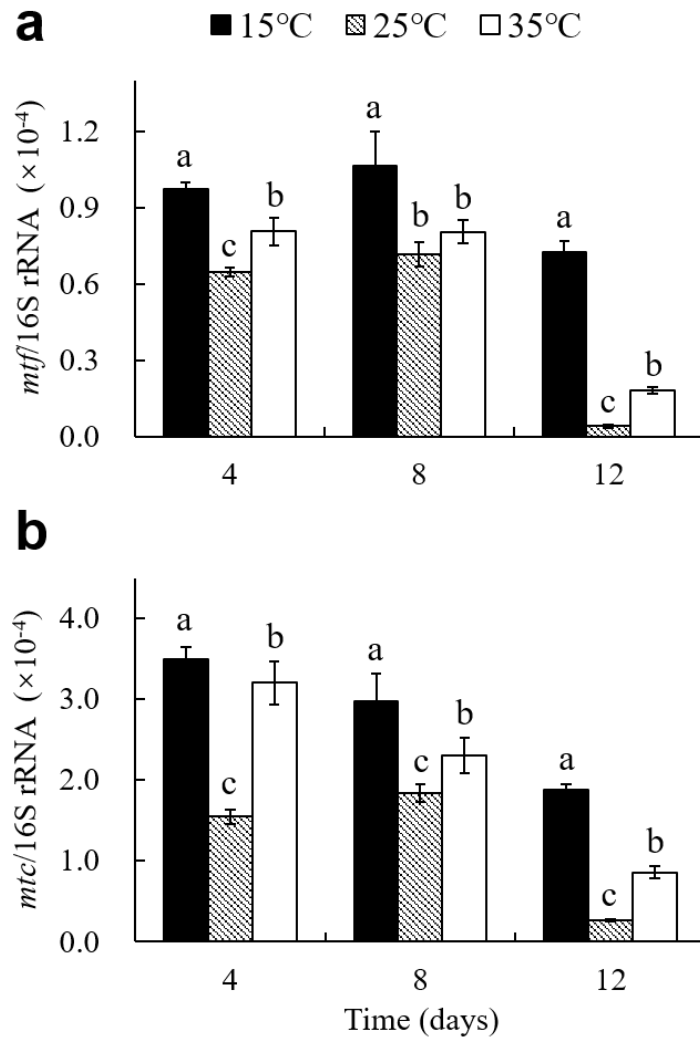


図 10 異なる培養温度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量変化
 (a) *mtf* 遺伝子発現量の変化, (b) *mtc* 遺伝子発現量の変化
 異なるアルファベット (a, b, c) は, 有意差を示す($p < 0.05$)。

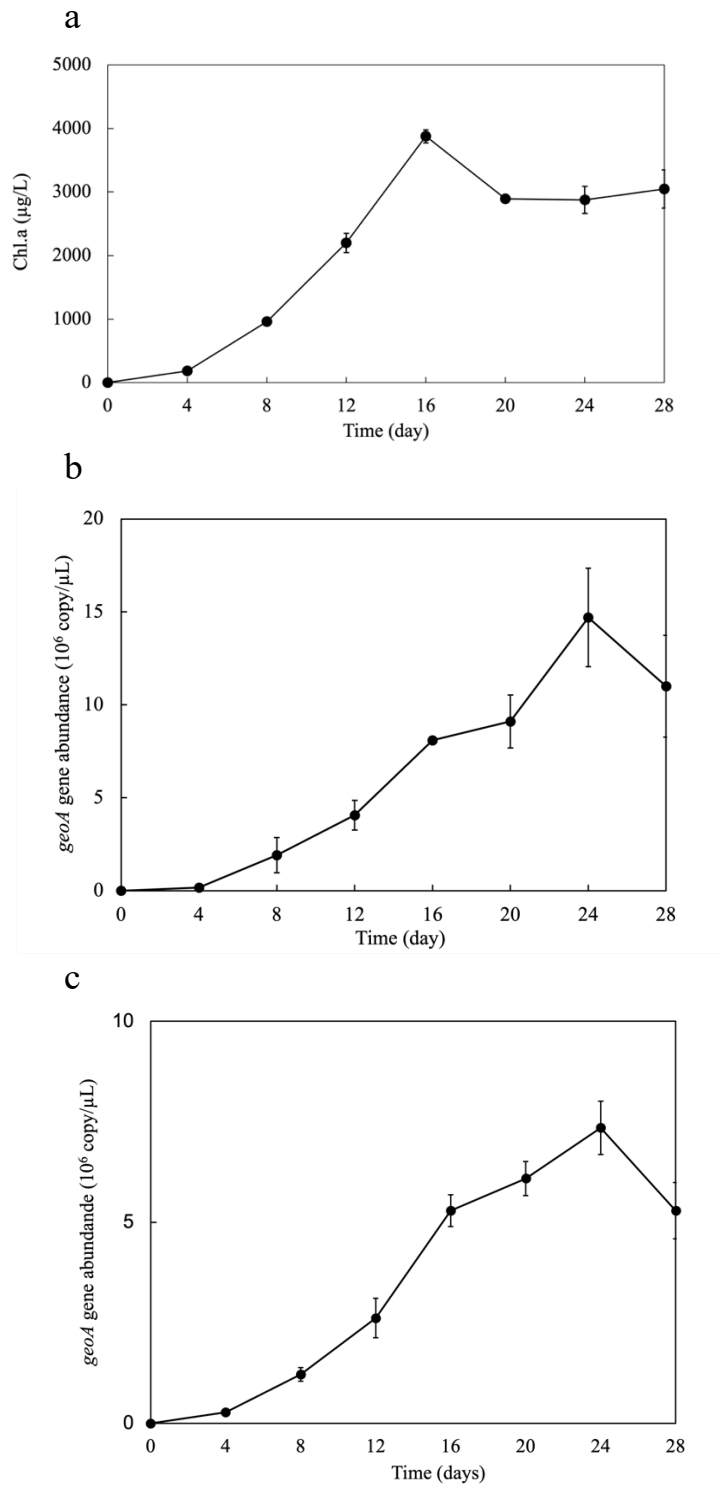


図 11 *D. smithii* の増殖曲線と *geoA* 遺伝子量の経日変化
 (a) *D. smithii* の増殖曲線, (b) DNA を鋳型とした qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量の経日変化, (c) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量の経日変化

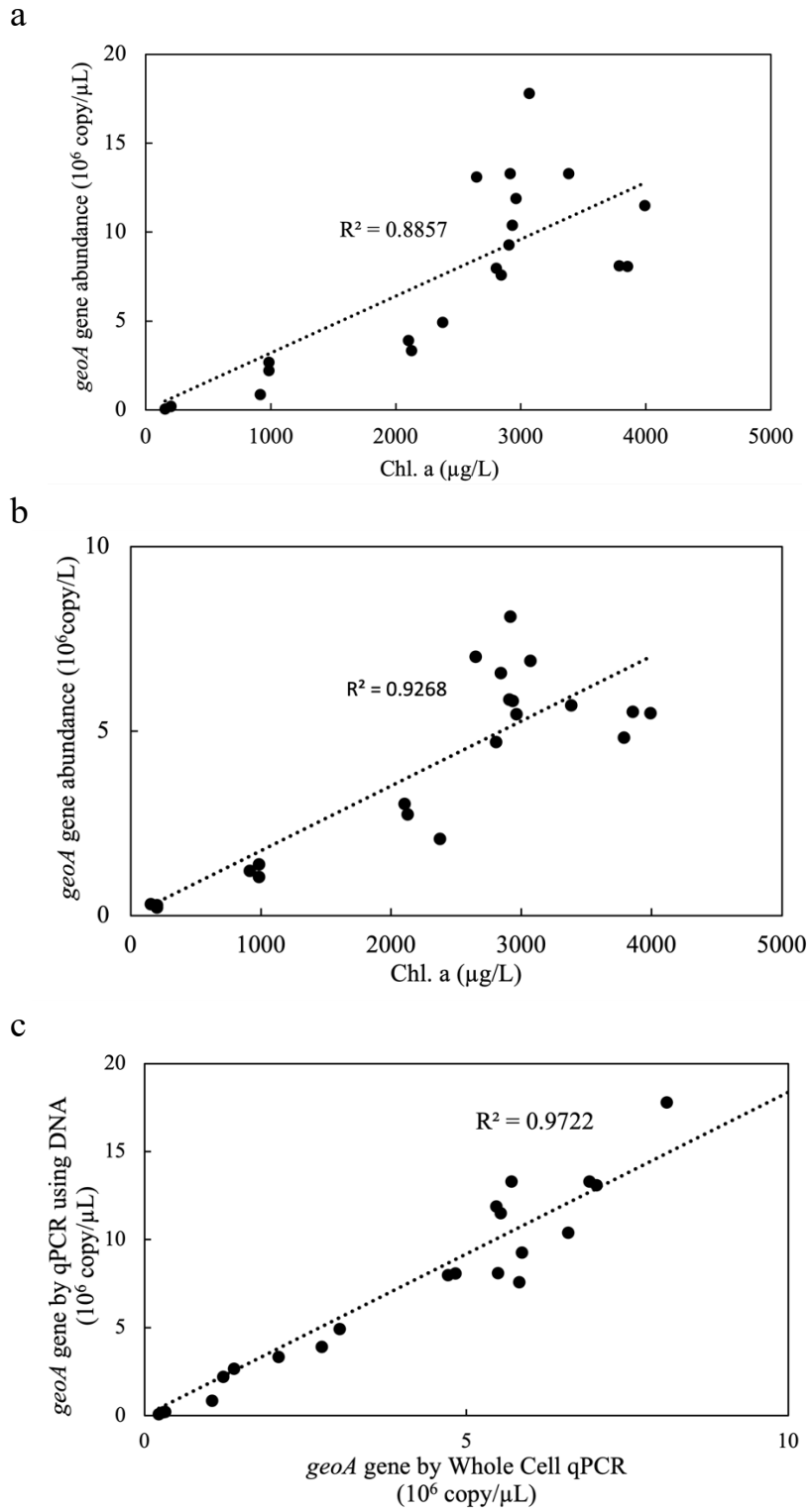


図 12 相関分析

- (a) DNA を鋳型とした qPCR 法を用いた *geoA* 遺伝子量と Chl.a との相関
 (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量と Chl.a との相関
 (c) DNA 鋳型 qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *geoA* 遺伝子量と Whole Cell qPCR 法を用いた *geoA* 遺伝子量との相関

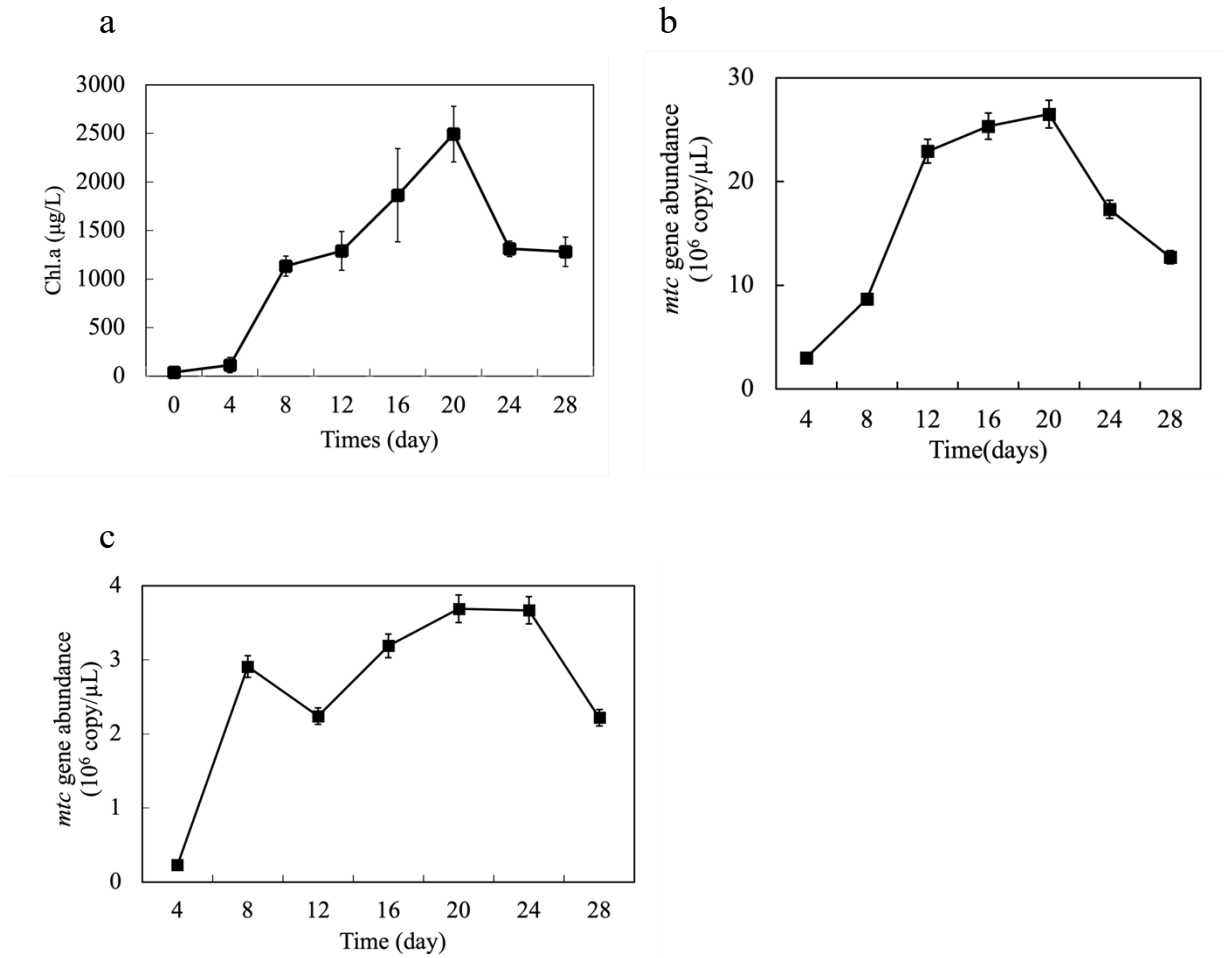


図 13 *Pseudanabaena* sp. 1705 の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化
 (a) *Pseudanabaena* sp. 1705 の増殖曲線,
 (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化,
 (c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

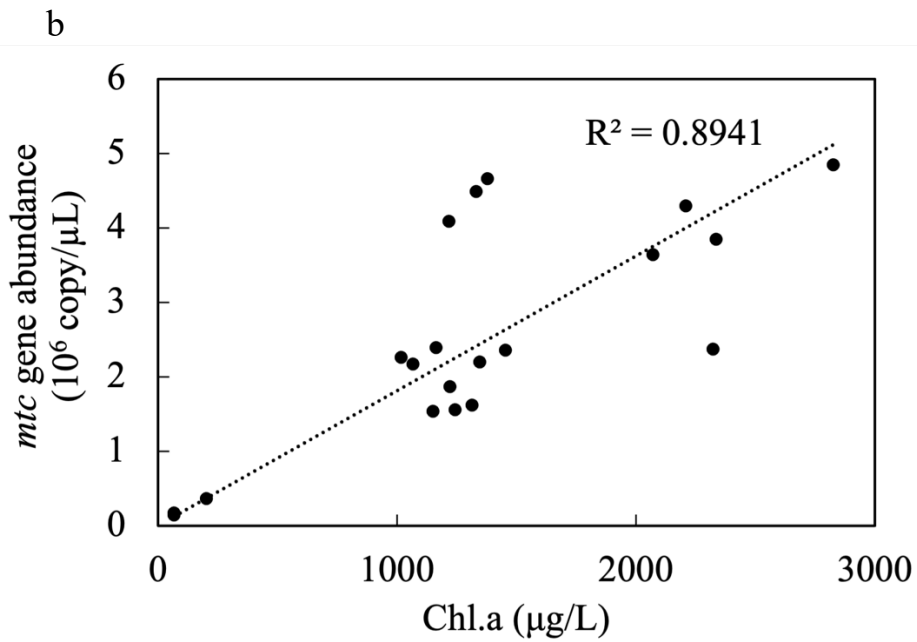
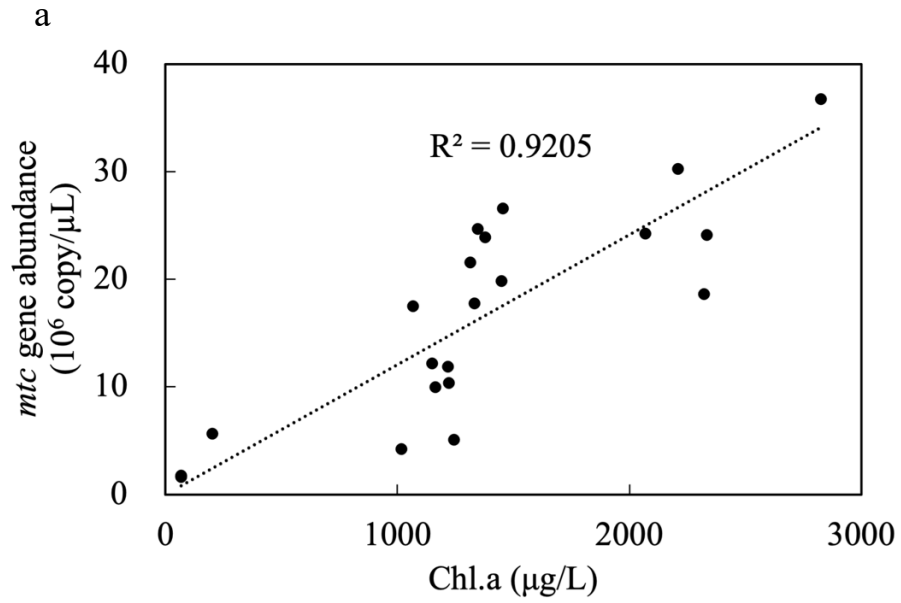


図 14 相関分析 (*Pseudanabaena* sp. 1705)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関
 (b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関

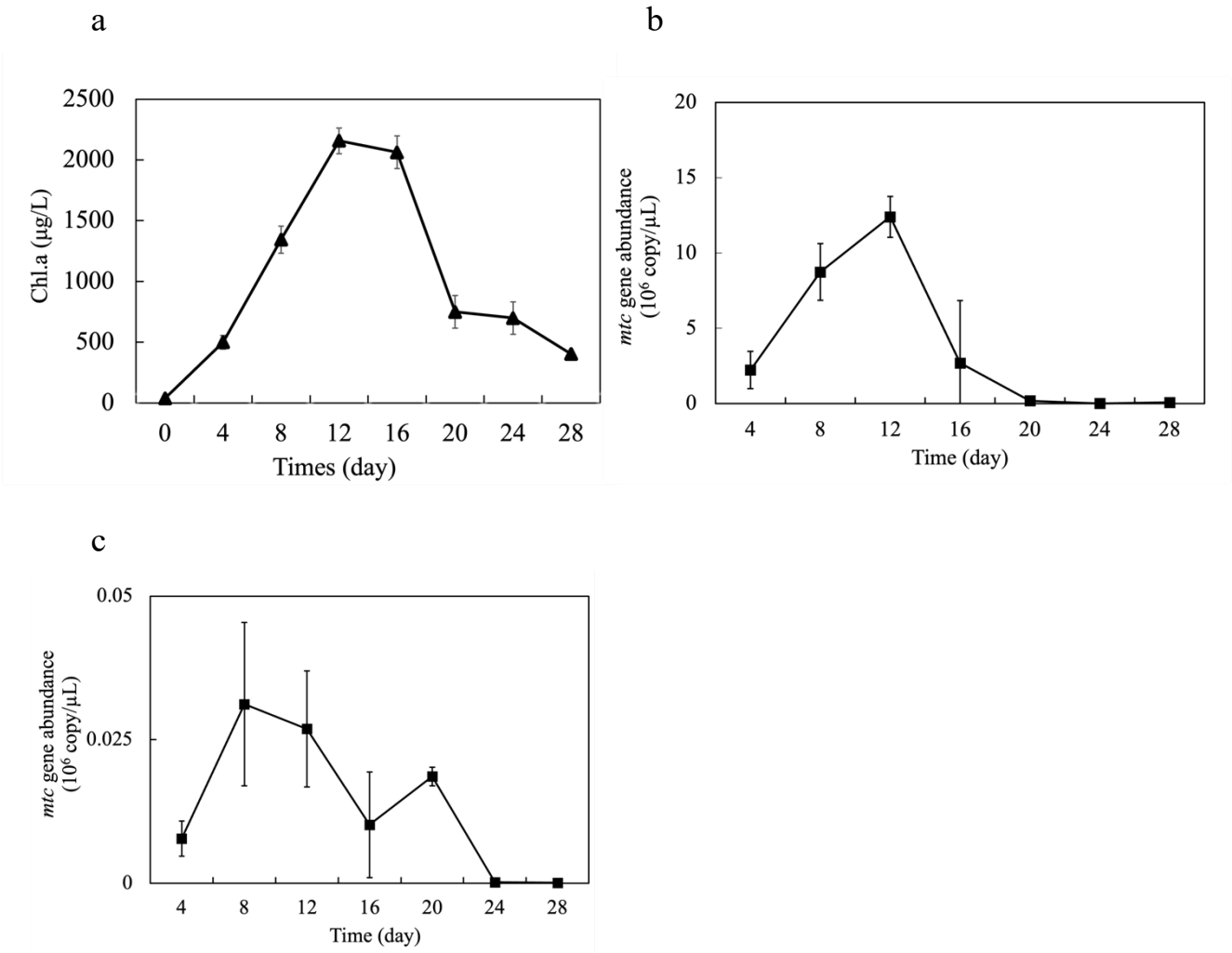
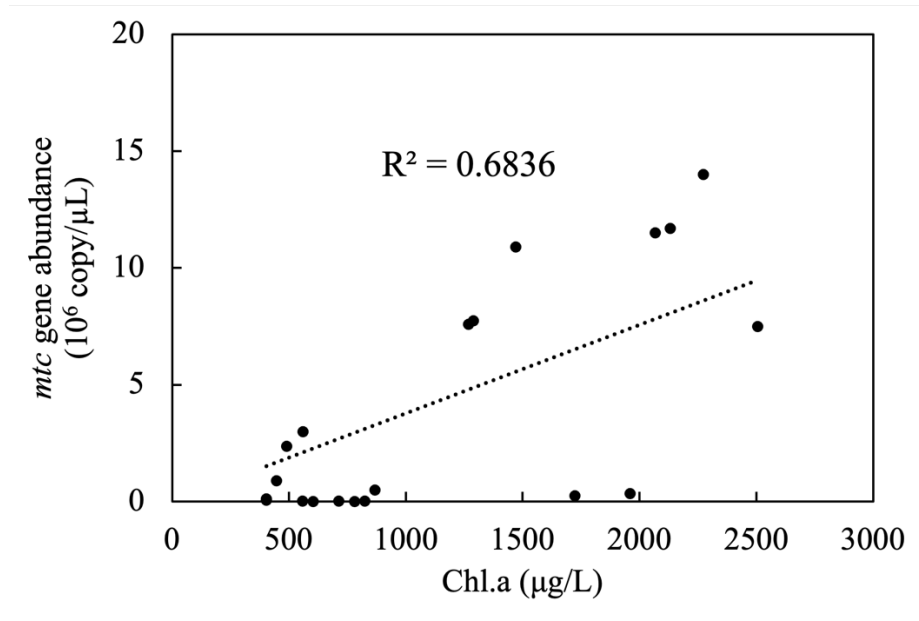


図 15 *Pseudanabaena* sp. 1803 の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化
 (a) *Pseudanabaena* sp. 1803 の増殖曲線,
 (b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) による *mtc* 遺伝子量の経日変化,
 (c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

a



b

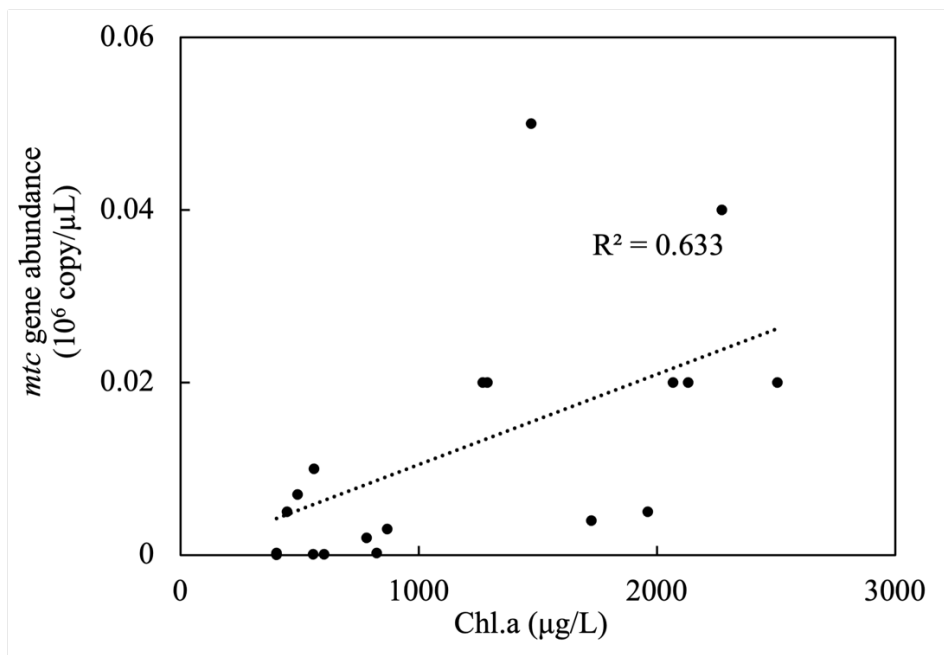


図 16 相関分析 (*Pseudanabaena* sp. 1803)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関
(b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関

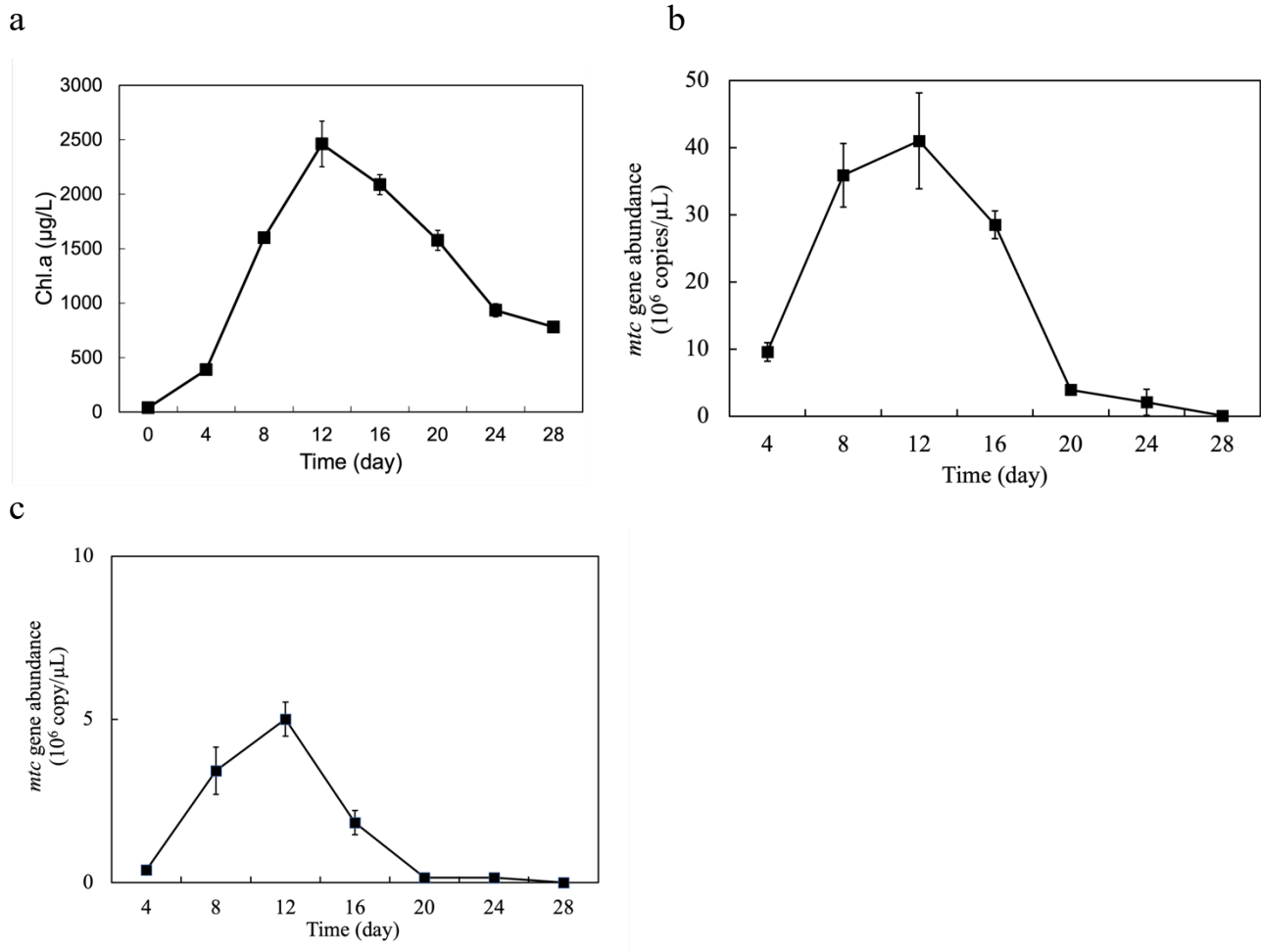


図 17 *Pholmidium tenue* の増殖曲線と *mtc* 遺伝子量の経日変化

(a) *Pholmidium tenue* の増殖曲線,

(b) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) による *mtc* 遺伝子量の経日変化,

(c) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量の経日変化

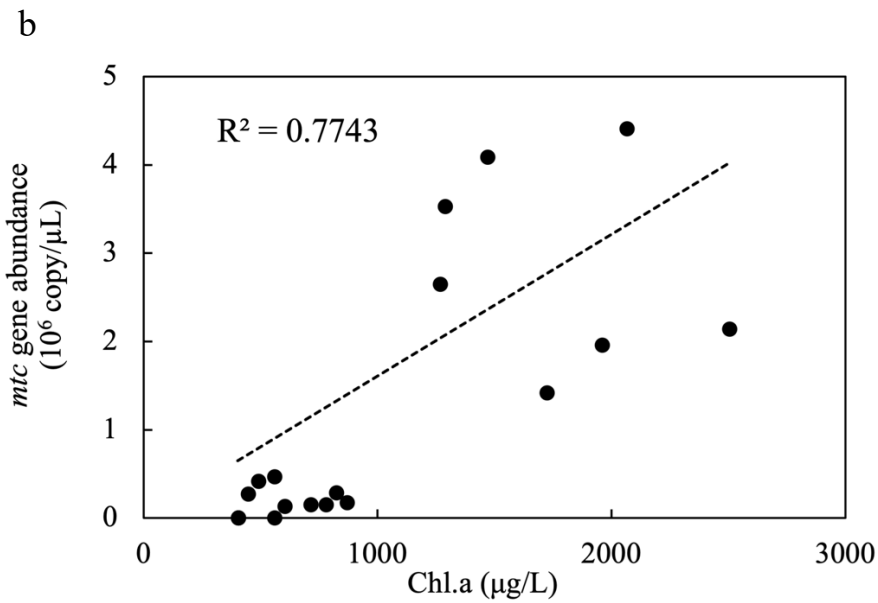
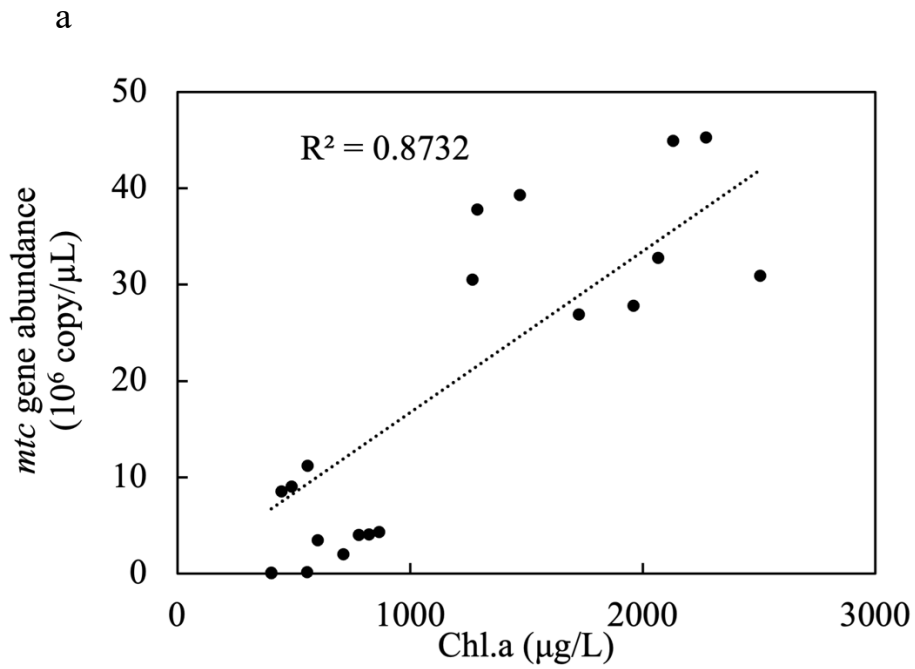


図 18 相関分析 (*Pholmidium tenue*)

- (a) Whole Cell qPCR 法 (インターカレート法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関
 (b) Whole Cell qPCR 法 (Probe 法) を用いた *mtc* 遺伝子量と Chl.a との相関