

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

気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価と
その適応性の強化に向けた研究

令和3年度 分担研究報告書

令和4（2022）年 3月

水道水源で発生したカビ臭原因物質藍藻類の
簡易同定・定量法の構築

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)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化に向けた研究
分担研究報告書

研究課題：水道水源で発生したカビ臭原因物質藍藻類の簡易同定・定量法の構築

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 主任研究官
研究分担者 藤本 尚志 東京農業大学 応用生物学部 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・定量法の開発を目的とし、定量 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・定量を試みた。

本研究では単藻株 27 株、NIES 株 39 株、分譲株 19 株、水源 53 試料から抽出した DNA 試料を用いてジェオスミン産生株である *Dlichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属、2-MIB 産生株である *Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属、*Microcoleus* 属に特異的な定量 PCR 系を検討した。結果としては、5 属については非特異的な検出がなく、構築した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。

続いて、2021 年 6 月から 11 月までの半年間において、3 水源にて毎週モニタリングを実施した。数 ng/L からカビ臭原因物質産生藻類に関連する合成酵素遺伝子を定量することが可能であり、優占種が変遷した場合や同時に異なるカビ臭原因物質が発生した場合においても原因種の同定ならびに遺伝子量の把握が可能であった。そのため、本研究で構築した PCR 系の有用性が示され、増殖特性や採水頻度等を考慮することで早期にカビ臭原因物質産生種の同定・定量できる可能性が示された。

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ており、その監視・制御が求められている。

カビ臭原因物質であるジェオスミンと 2-MIB (2-メチルイソボルネオール) 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株と非産生株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、産生株の判断を補助するツールが必要となる。

辻ら (2018) によると *Pseudanabaena* 属の産生株/非産生株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。さらに、定量可能な PCR 系を構築できた場合、増殖予測等に利用できる可能性も考えられる。

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・定量法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. カビ臭原因物質合成酵素遺伝子配列情報の取得

藍藻類を単離培養した試料 5 mL 及び水源試料 100 mL を、それぞれ孔径 0.8 μm 及び 0.22 μm のメンブレンフィルターで吸引ろ過し、藻体を捕

捉し、-20°Cにて冷凍保存した。それぞれ DNeasy Power Soil Kit、DNeasy Power Water Kit(QIAGEN 株式会社)を用いて DNA 抽出を行った。DNA 抽出試料を PCR にて対象領域(2-MIB 合成酵素遺伝子及び *geoA* 遺伝子)⁴⁾の増幅を行い、得られた PCR 精製試料についてユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼して DNA 配列情報を取得した。

2. 定量 PCR 系の構築

取得した配列情報とアメリカ国立生物工学情報センター(NCBI)に登録された配列情報について MEGAX(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて比較し、カビ臭原因藍藻類として下記に示す代表的な 5 属について同定・定量可能なプライマー対を設計した。その後、属ごとにアニーリング温度やプライマー濃度を調整することで、適切な反応系を決定した。なお、検量線用試料は対象領域の PCR 増幅産物より作製した。

ア 2-MIB 合成酵素遺伝子

① *Microcoleus* 属(旧:*Phormidium* 属)、② *Pseudanabaena* 属(旧:*Oscillatoria* 属、*Phormidium* 属)、③ *Planktothricoides* 属(旧:*Oscillatoria* 属)

イ *geoA* 遺伝子

④ *Dolichospermum* 属(旧:*Anabaena* 属)、⑤ *Aphanizomenon* 属

3. 開発した定量 PCR の有用性評価

保有している培養株(カビ臭が発生した水源からの単離培養株 27 株、水道事業体保有株 19 株、国立環境研究所微生物系統保存施設保有株 39 株)及び水源試料(53 試料)の DNA 試料に対し、本研究で構築した定量 PCR を適用した。

続いて、2021 年 6 月から 11 月までの半年間において、毎週モニタリングを実施した。対象水源は①A 湖、②B ダム、③C 湖とした。測定項目は定量 PCR による遺伝子量、固相マイクロ抽出(SPME)-GC/MS によるカビ臭原因物質濃度、顕微鏡観察による生物数、pH、電気伝導率、色度、濁度とした。DNA 試料は水源試料 100 mL を孔径 0.22 µm メンブレンフィルターで吸引ろ過し、藻体を捕捉し、-20°Cにて冷凍保存した後、DNeasy PowerWater Kit(QIAGEN) (6 月まで)、DNeasy PowerSoil Pro Kit(QIAGEN) (7 月以降)により抽出した。なお、DNA 抽出キットの変更は、濁質による抽出効率への影響を考慮し実施した。

C. 研究結果および D. 考察

単離株に対して定量 PCR を適用した結果、非特異的増幅はなく、各プライマー対で判定可能な属と同じ種であるカビ臭原因藍藻類のみを選択的に検出することができた(図 1)。よって、本研究で

構築した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。

さらに原水から抽出した DNA 試料に対して本手法を適用した結果、カビ臭が発生した原水試料とそこから単離培養した株と遺伝子の増幅結果が一致したことから、原水試料から直接 DNA 試料を抽出して本研究で構築した定量 PCR 系を適用することで迅速な同定・定量が同時に可能となったといえる。

続いて、開発した定量 PCR 系を用いて 3 水源において定期モニタリングを行い、カビ臭原因物質濃度と本研究で対象とした 5 属のカビ臭原因物質産生藍藻類の遺伝子量を評価した。A 湖では *Dolichospermum* 属に関連する *geoA* 遺伝子のみが特異的に検出され、ジェオスミン濃度の変動と傾向が一致したことから原因種と同定した(図 2)。また、ジェオスミン濃度 2 ng/L 程度で遺伝子が検出されており、増殖期にはカビ臭原因物質濃度の上昇より先行して遺伝子量が増加する傾向が確認された。C 湖では 6 月と 8 月に 2-MIB 濃度が増加した期間があり、6 月は *Pseudanabaena* 属、8 月は *Planktothricoides* 属に関連する 2-MIB 合成酵素遺伝子が検出されたことから、本手法により 2-MIB 産生藍藻類の優占種の変遷が把握可能であることを示した(図 2)。B ダムにおいても 5 ng/L 程度から遺伝子が検出できた。また、ジェオスミンと 2-MIB が同時に発生した時期にはジェオスミンは *Dolichospermum* 属、2-MIB は *Planktothricoides* 属に関連する合成酵素遺伝子量の変化を同時に確認できた。

E. 結論

水道水源におけるカビ臭産生藍藻類として代表的な 2-MIB 産生株(*Microcoleus* 属、*Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属)及びジェオスミン産生株(*Dolichospermum* 属、*Aphanizomenon* 属)の同定・定量手法を開発した。さらに実用化に向けて 3 水源の原水に適用した結果、数 ng/L からカビ臭原因物質産生藻類に関連する合成酵素遺伝子を定量可能であり、優占種が変遷した場合や同時に異なるカビ臭原因物質が発生した場合においても原因種の同定ならびに遺伝子量の把握が可能であった。また遺伝子量がカビ臭原因物質濃度の上昇前に増加が確認できた期間もあることから、増殖特性や採水頻度等を考慮することで本手法によりカビ臭原因藍藻類の増殖予測ができる可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

矢野留実子, 平健司, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. かび臭発生糸状藍藻類の遺伝子学的試験法の検討. 水道協会雑誌; 91(3), 2-12, 2022.

2. 学会発表

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 秋葉道宏. 定量PCR法によるカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定及び定量解析. 第56回日本水環境学会年会; 2022年3月; 富山(オンライン開催).

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発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。

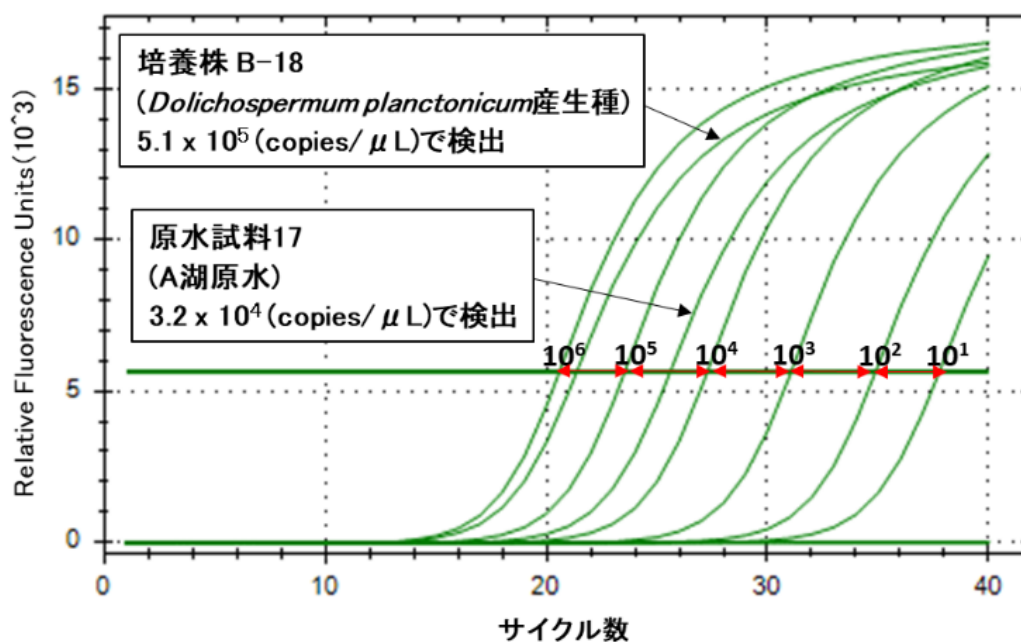


図1 定量PCR結果(例: *Dolichospermum* 属)

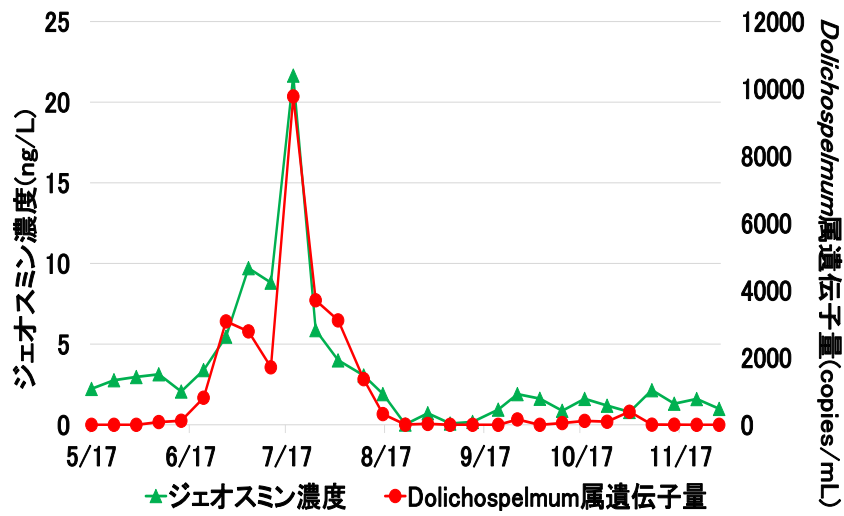


図 2 *geoA* 遺伝子 (*Dolichospermum* 属) のモニタリング結果 (相模湖)

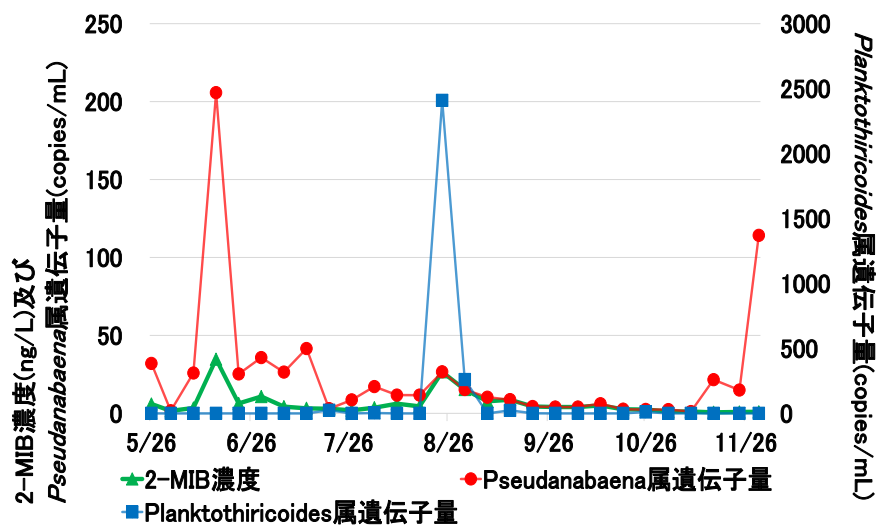


図 3 2-MIB 合成酵素遺伝子 (*Pseudanabaena* 属、*Planktothricoides* 属) のモニタリング結果 (C 湖)