

気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価

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：気候変動条件下における障害生物発生ポテンシャル評価

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 応用生物科学部 教授
研究分担者 浅田 安廣 国立保健医療科学院 主任研究官
研究協力者 松本 恭太 国立保健医療科学院 研究生

研究要旨

水源流域における障害生物の発生ポテンシャルを評価することを目的として、複数のカビ臭原因物質産生藻類株を用いてカビ臭合成酵素遺伝子による系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行い、カビ臭原因物質産生藻類の増殖およびカビ臭産生に及ぼす気候変動により生じうる環境条件の影響について検討を行った。さらには付着性藍藻 *Microcoleus* 属の株間や増殖時期によるカビ臭産生能の違いのメカニズムを解明するため、カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析を行った。その結果、水道水源から単離された *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 つの系統に分けられ、系統によってカビ臭含有量が異なる傾向が見られた。*Dolichospermum* 属や *Aphanizomenon* 属といったネンジュモ目について窒素を制限した CT 培地、通常の CT 培地で培養し、細胞数とカビ臭濃度を測定したところ、株によって傾向が異なり、*D. minisporum* WILD-76 は窒素制限下のほうが増殖量、カビ臭濃度が高まることが明らかとなった。さらに *D. minisporum* WILD-76 の窒素制限下における増殖、カビ臭産生に及ぼす温度の影響について検討したところ、最も温度が低い 20°C でカビ臭濃度、含有量が高まることが明らかとなった。付着性藍藻類の *Microcoleus* 属を窒素を 1mg/L に制限した培地を用いて培養したところ、2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが示唆された。同様に *geosmin* を産生する *Microcoleus* 属の WILD-69 株と B-19 株について窒素を制限した培地を用いて培養したところ、*geosmin* 産生能が異なることが示唆された。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量解析において、株間で経時的な変化について検討を行い、2-MIB 産生能の違いを発現量によって説明できる可能性が示唆された。分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によって増殖やカビ臭産生特性が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく必要性が示唆された。

A. 研究目的

近年、地球温暖化の影響と考えられる生物障害や水道原水水質悪化の報告例が目立つ。さらに気候変動による集中豪雨の頻度・規模の増加が確認されており、それら水害による水道事業への影響が生じている。将来的にも気候変動に伴う生物障害事例、集中豪雨・台風による水害頻度の増加等が予想されることから、その生じるリスクに対して適応可能な水道システムを考え、将来にわたって安全で安心な水供給を実現する必要がある。このような水道事業の背景を踏まえながら、気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスクへの適応性の強化に資する成果を得ることを最終的な目標とし、障害生物の発生メカニズムの把握や藻類発生予測システムを構築するための検討を行った。

水源流域における障害生物の発生については各種の気象環境条件が関与する複雑なものであるが、本研究では様々な角度から障害生物の発生ポテンシャルを評価する。具体的な研究内容として、複数のカビ臭原因物質産生藻類の単離株を用い

てカビ臭合成酵素遺伝子による系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行い、カビ臭原因物質産生藻類の増殖およびカビ臭産生に及ぼす気候変動により生じうる環境条件の影響を評価する上での基礎的な検討を行った。さらには付着性藍藻類の株間や増殖時期によるカビ臭産生能の違いのメカニズムを解明するため、カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析を行った。

B. 研究方法

1. カビ臭原因物質産生藻類のカビ臭産生特性の評価

水道水源から単離された *Pseudanabaena subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62、*P. cinerea* B-6、*Aphanizomenon gracile* WILD-9、*Dolichospermum minisporum* WILD-76、*D. circinale* WILD-45 を用いた。付着性藍藻として河川で単離された *Microcoleus autumnalis* WILD-52、*Microcoleus* sp. WILD-69、*Microcoleus* sp. B-19 を用いた。

Pseudanabaena 属は、200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地もしくは窒素濃度を 1mg/L に制限した改変 CT 培地 100ml を入れて、オートクレーブ滅菌後、初期糸状体数が 50mm/ml となるように接種した。20°C で培養を行った。照度は 2000 lux (12 時間明/12 時間暗) とした。各条件につき 3 本ずつ試験を行った。5 日に 1 回程度糸状体数を Fuchs Rosenthal 血球計数盤を使用し光学顕微鏡により計測した。

A. gracile WILD-9、*D. minisporum* WILD-76 については 500ml 容三角フラスコに CT 培地もしくは窒素を除いた改変 CT 培地を 200ml 入れて、オートクレーブ滅菌後、初期接種量が *A. gracile* WILD-9 で 10mm/ml、*D. minisporum* WILD-76 および *D. circinale* WILD-45 で 25cells/ml となるように接種した。培養条件は *Pseudanabaena* 属と同様としたが、*D. minisporum* WILD-76 は 25、30°C でも培養を行った。

Microcoleus 属はねじ蓋付き試験管に CT 培地を 10ml 分注し、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 10mm/ml となるように接種した。照度は 2000 lux (12 時間明/12 時間暗) とした。温度条件は 20°C とした。*Microcoleus* 属は付着性があり、顕微鏡観察による正確な菌数のカウントが困難であるため、増殖量を Shen ら¹⁾に従い Chl.a 量により評価した。

上述の各培養試料について SPME-GC/MS システム (Agilent 5977B GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS robotic^{pro}, Gerstel) を用いて、ジェオスミン・2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 濃度を測定した。

2. カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析

これまで *Microcoleus* 属の単離株の 2-MIB 産生能について検討を行い、株間で 2-MIB 産生能が異なる傾向が見られた。そこで 2-MIB 産生能が異なる要因を解明することを目的として 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現解析を行った。*M. autumnalis* WILD-53 および *M. autumnalis* WILD-54 を用いた。

1. と同様に培養を行い、クロロフィル a、2-MIB、発現解析を同時に行い評価した。14 日目、28 日目、42 日目と経時的に試料を採取し測定を行った。PrimerQuestTM Tool および Primer3Plus を用いて、*M. autumnalis* の 16S rRNA 遺伝子、2-MIB 産生に関わる *mtf* 遺伝子 (methyltransferase gene)、*mic* 遺伝子 (2-MIB cyclase gene) を特異的に増幅するプライマーを作成した。NucleoSpin[®] RNA (タカラバイオ) を使用し、培養試料から RNA を抽出した。その後 PrimeScriptTM RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いて 10ng RNA/10 μ L のリアクションで RT-PCR を行い cDNA を合成した。その後 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (タカラバイオ) を用いて説明書に従い qPCR 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藻類のカビ臭産生特性の評価

16S rRNA 遺伝子の系統樹において、*Pseudanabaena subfoetida* WILD-6 と *P. foetida* WILD-62 は同じ系統に位置付けられた。*P.*

limnetica WILD-11 と *P. cinerea* B-6 はそれぞれ異なる系統に位置付けられた。2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において *P. subfoetida* WILD-6 と *P. cinerea* B-6 は同じ系統に位置付けられた (図 1)。*P. limnetica* WILD-11 と *P. foetida* WILD-62 はそれぞれ異なる系統に位置付けられた。今回用いた *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 系統に分かれることが明らかとなった。CT 培地において *Pseudanabaena* 属 4 株を培養した結果 13 日以降、定常期となった (図 2)。2-MIB 総濃度は定常期を過ぎても増加傾向であった (図 3)。定常期における糸状体あたりの 2-MIB 含有量は *P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62 で高く、*P. subfoetida* WILD-6、*P. cinerea* B-6 で低い傾向であった (図 4)。定常期における 2-MIB 含有量について計算したところ、*P. subfoetida* WILD-6 0.0025ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.0039ng/mm、*P. foetida* WILD-62 0.0043ng/mm、*P. cinerea* B-6 0.0027ng/mm となり、*P. subfoetida* WILD-6、*P. cinerea* B-6 に比べて *P. limnetica* WILD-11、*P. foetida* WILD-62 が約 1.5 倍高いことが明らかとなった。窒素を 1mg/L に制限した条件で検討を行ったところ、*P. subfoetida* WILD-6 は、12 日以降、*P. limnetica* WILD-11 は 8 日以降糸状体数の減少が見られた (図 5)。2-MIB 総濃度は *P. subfoetida* WILD-6 よりも *P. limnetica* WILD-11 のほうが高く推移し、通常の CT 培地と同様の傾向が見られた (図 6)。よって *P. subfoetida* WILD-6 よりも *P. limnetica* WILD-11 のほうが 2-MIB 産生能が高いことが示唆された。しかしながら、通常の CT 培地では総濃度や含有量が低いと判断された *P. cinerea* B-6 が *P. limnetica* WILD-11 と同じくらいに総濃度が高まり、窒素を制限した条件下でこれら 4 株の 2-MIB 産生能の大小関係について明らかにすることはできなかった。

Dolichospermum minisporum WILD-76 を 20°C の条件下、CT 培地、窒素を 0mg/L に制限した CT 培地にて培養したところ、窒素を制限した条件のほうが速やかに増殖することが明らかとなった (図 7)。*geosmin* 総濃度も窒素を制限した条件のほうが約 2 倍高まることが明らかとなった (図 8)。細胞当りの *geosmin* 含有量は通常の CT 培地で高い傾向が見られた (図 9)。窒素を制限した CT 培地のほうが良好な増殖を示したことから、この培地を用いて温度の影響について検討を行った。25°C、30°C で初期の増殖速度が大きく、最大増殖量は温度が低いほど高まることが明らかとなった (図 10)。*geosmin* 総濃度、含有量ともに 20°C において最も高く、温度が高まるにつれて低下することが明らかとなった (図 11、図 12)。*D. circinale* WILD-45 は *D. minisporum* WILD-76 と異なり、窒素を制限した CT 培地より、通常の CT 培地のほうが、増殖量および *geosmin* 総濃度が高まること明らかとなった (図 13、14)。*A. gracile* WILD-9 は *D. circinale* WILD-45 と同様に、窒素を制限した CT 培地より、通常の CT 培地のほうが、増殖量および *geosmin* 総濃度が高まること明らかとなった (図 15、16)。以上の結果から、ネンジュモ目の窒素源の有無における挙動は株によって異なることが明らかとなった。2-MIB 産生株であ

る *M. autumnalis* WILD-52 を窒素を 1mg/L に制限した CT 培地で培養したところ、増殖量は 14 日目以降ほぼ横ばいとなり、35 日には低下した(図 17)。その時の 2-MIB 総量は 14 日目に最大となり、その後低下しほぼ一定となった(図 18)。2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが明らかとなった。これまでの通常の CT 培地を用いた検討では Chl. a 量、2-MIB 濃度が 1 ヶ月の培養期間にわたって増加し続ける傾向にあり、定常期や衰退期における 2-MIB 産生を評価することが困難であったが、窒素を制限することにより増殖過程における 2-MIB 産生特性を評価できると考えられた。geosmin を産生する *Microcoleus* sp. WILD-69 と *Microcoleus* sp. B-19 について窒素を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて培養したところ、Chl. a に関しては同様の推移を示したが(図 19)、geosmin 総量は WILD-69 のほうが 14 日目、28 日目において高く(図 20)、単離株によって geosmin 産生能が異なることが示唆された。

2) カビ臭合成酵素遺伝子の発現解析

M. autumnalis WILD-53 および *M. autumnalis* WILD-54 の *mtf* 遺伝子の発現量に培養日数による有意な差はみられなかった(図 21、22)。*M. autumnalis* WILD-53 は *M. autumnalis* WILD-54 と比べて *mtf* 遺伝子の発現量が高いことが明らかとなった。*mic* 遺伝子の発現量についても培養日数による有意な差はみられなかった(図 23、24)。*mic* 遺伝子に関しても *M. autumnalis* WILD-53 のほうが *M. autumnalis* WILD-54 に比べて発現量が高いことが明らかとなった。培養期間を通して Chl. a あたりの 2-MIB 総量は、*M. autumnalis* WILD-53 のほうが大きい傾向が見られ、遺伝子発現量の違いが 2-MIB 産生に影響している可能性が示唆された。*Microcoleus* 属は単離した株間で 2-MIB 産生能が異なる傾向が見られるため、発現解析により説明できるかどうかデータを蓄積し検討するとともに、環境条件の違いが発現量にどのように影響するのか検討することにより、水道水源における付着性藍藻によるカビ臭の発生メカニズムについて明らかにしていく必要がある。

E. 結論

複数のカビ臭原因物質産生藻類の単離株を用いて分子系統の違いとカビ臭産生能、増殖、カビ臭産生に及ぼす窒素制限および温度の影響等について検討を行った。水道水源から単離された *Pseudanabaena* 属は 2-MIB 合成酵素遺伝子で 3 つの系統に分けられ、系統によってカビ臭含有量が異なる傾向が見られた。*Dolichospermum* 属や *Aphanizomenon* 属といったネンジュモ目について窒素源を加えない条件と通常の CT 培地で培養し、増殖とカビ臭濃度を測定したところ、株によって傾向が異なり、*D. minisporum* WILD-76 は窒素制限下のほうが増殖量、カビ臭濃度が高まることが明らかとなった。*D. minisporum* WILD-76 の窒素

制限下における増殖、カビ臭産生に及ぼす温度の影響について検討したところ、最も温度が低い 20°C でカビ臭濃度、含有量が高まることが明らかとなった。付着性藍藻類の *Microcoleus* 属を窒素制限下において培養したところ、2-MIB 産生量は対数増殖期後期から定常期の最初の段階において最大となることが示唆された。同様に geosmin を産生する *Microcoleus* sp. WILD-69 と *Microcoleus* sp. B-19 について窒素を 1mg/L に制限した培地を用いて培養したところ、geosmin 産生能が異なることが示唆された。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量解析において経時的な変化について検討を行い、株間での 2-MIB 産生量の違いを発現量によって説明できる可能性が示唆された。分子系統によってカビ臭物質の産生能が異なったり、株間で窒素源に対する応答が異なったり、温度によってカビ臭産生量が大きく異なることから、単離株の増殖やカビ臭産生特性に関するデータの蓄積は極めて重要であり、そういった特性を踏まえて、発生予測モデルの構築を行っていく必要性が示唆された。

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

藤本尚志, 倉持綾希子, 浅田安廣, 秋葉道宏. 水道水源等から単離した *Pseudanabaena* 属の分子系統およびカビ臭産生能. 日本水処理生物学会第 57 回(神奈川)大会; 2021 年 10 月; 神奈川(オンライン開催).

武内祐, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の 2-MIB 産生能および合成酵素遺伝子の発現解析. 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。)

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) Shen Q, Shimizu K, Miao H, Tsukino S, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M (2021) Effects of elevated nitrogen on the growth and geosmin productivity of *Dolichospermum smithii*, Environ. Sci. Pollut. Res., 28, 177–184.

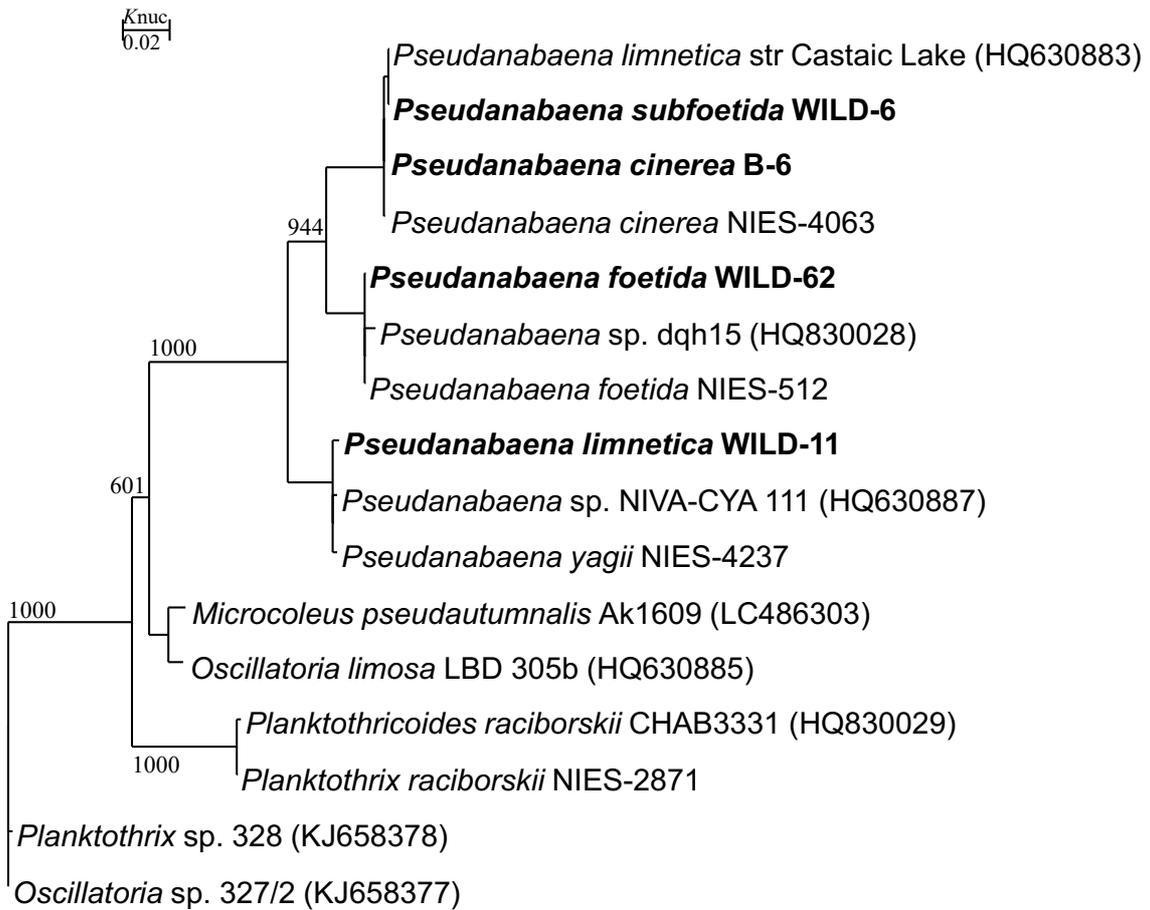


図1 2-MIB 合成酵素遺伝子に基づく系統樹
近隣結合法により 686 塩基に基づいて作成

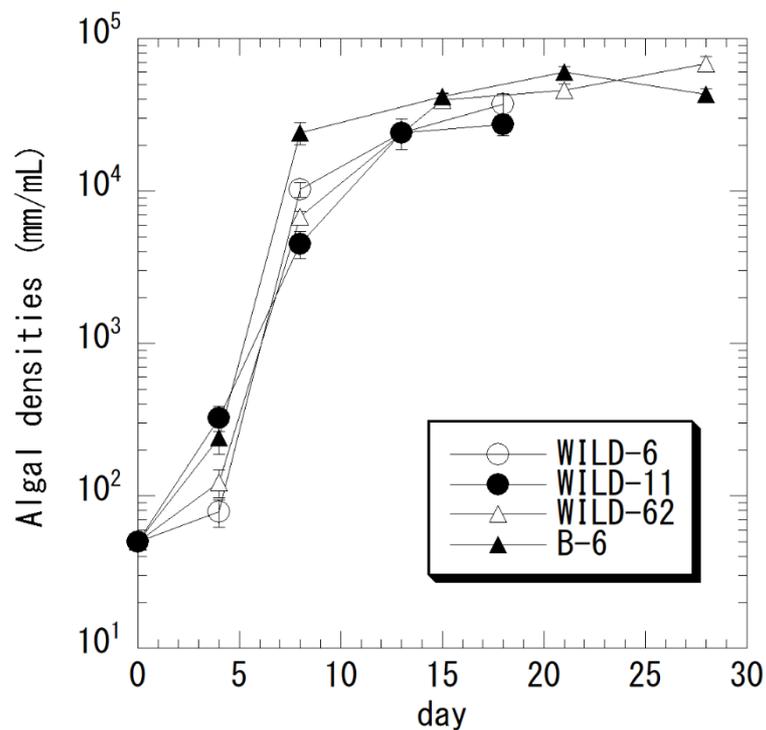


図2 *Pseudanabaena* 属 4 株の増殖曲線 (CT 培地)

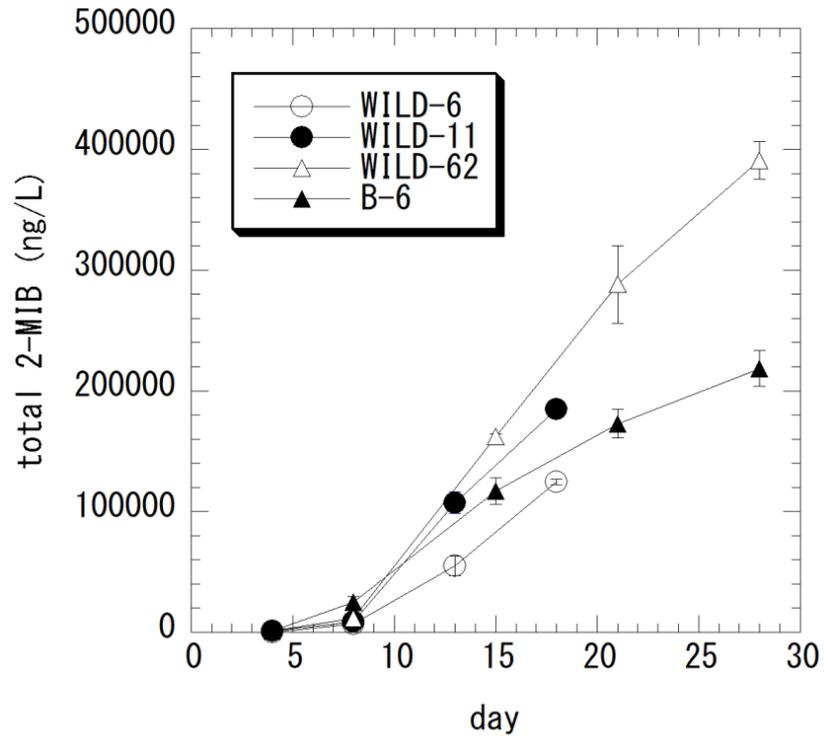


図3 *Pseudanabaena* 属4株の2-MIB総濃度の推移 (CT培地)

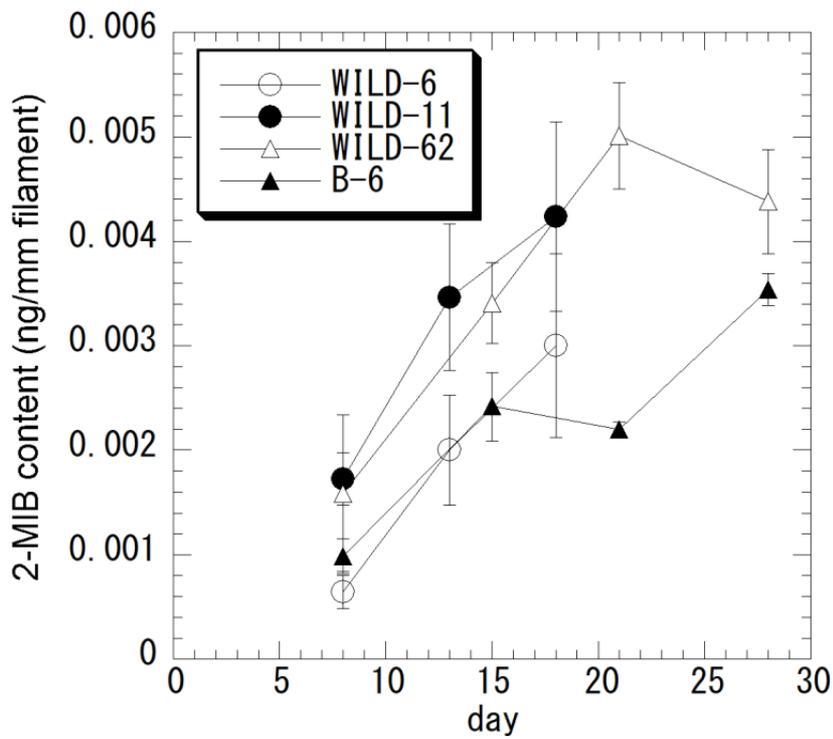


図4 *Pseudanabaena* 属4株の2-MIB含有量の推移 (CT培地)

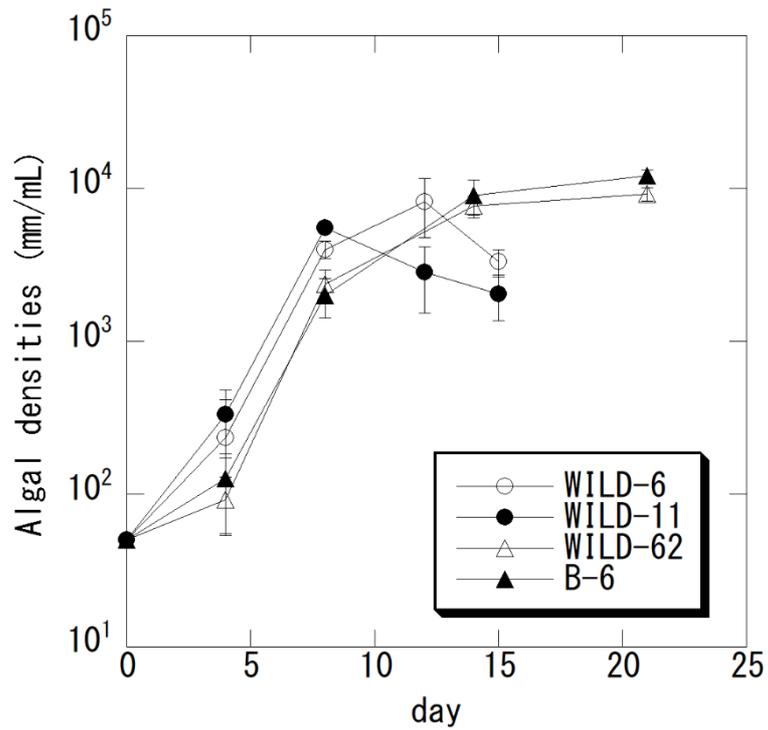


図5 窒素を制限した CT 培地における *Pseudanabaena* 属 4 株の増殖曲線

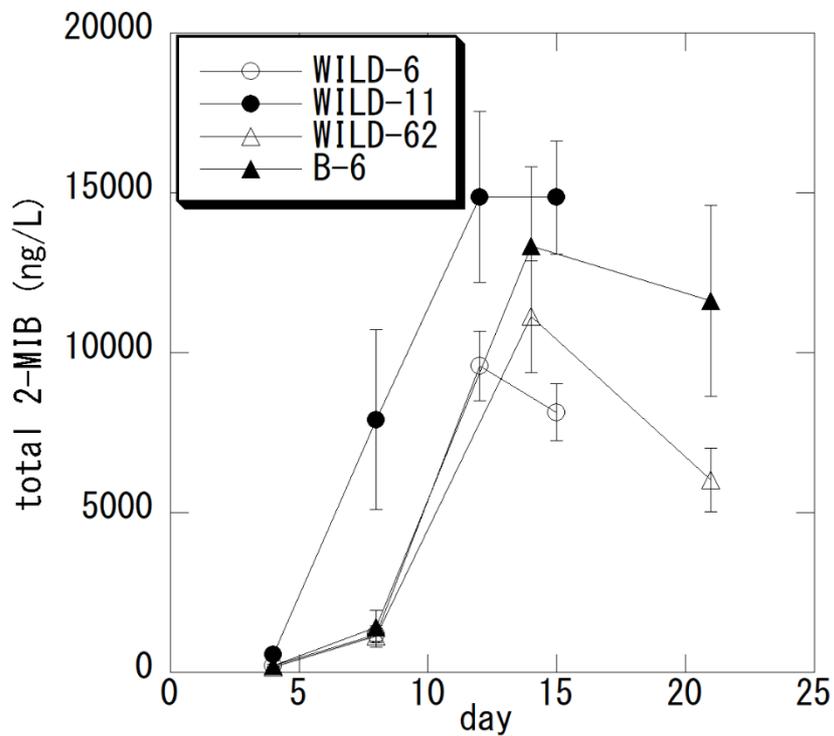


図6 窒素を制限した CT 培地における *Pseudanabaena* 属 4 株の 2-MIB 総量の推移

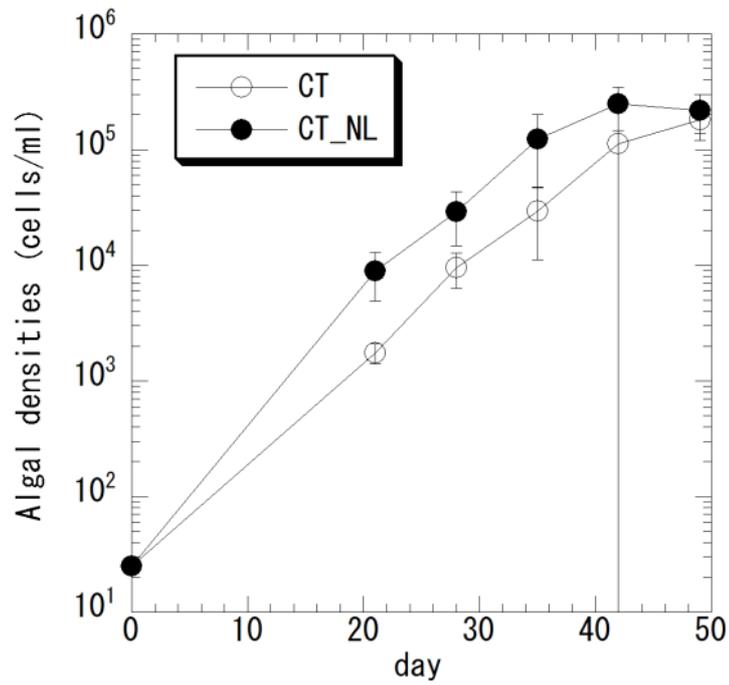


図7 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. minisporum* WILD-76 の増殖曲線
 CT_NL: 窒素 0mg/L

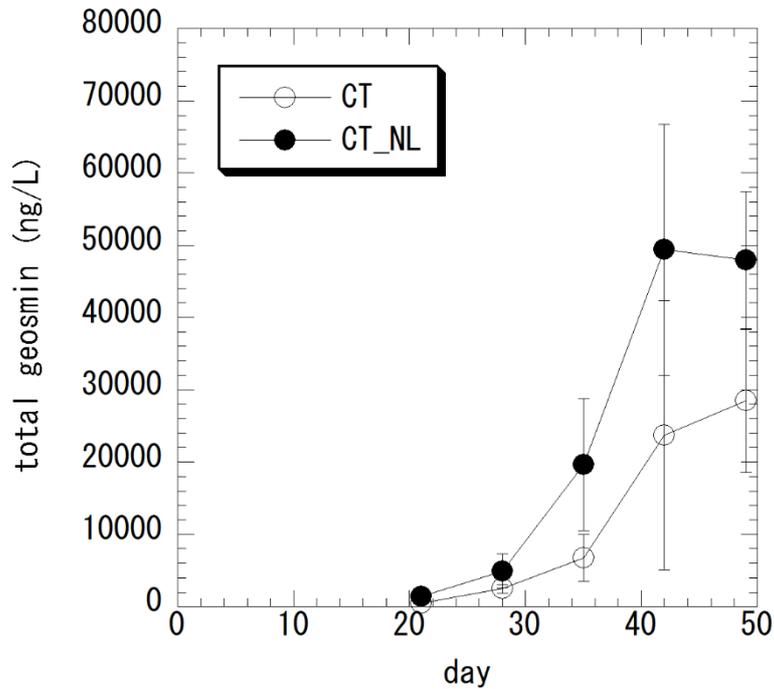


図8 *D. minisporum* WILD-76 の増殖における geosmin 総濃度の推移
 CT_NL: 窒素 0mg/L

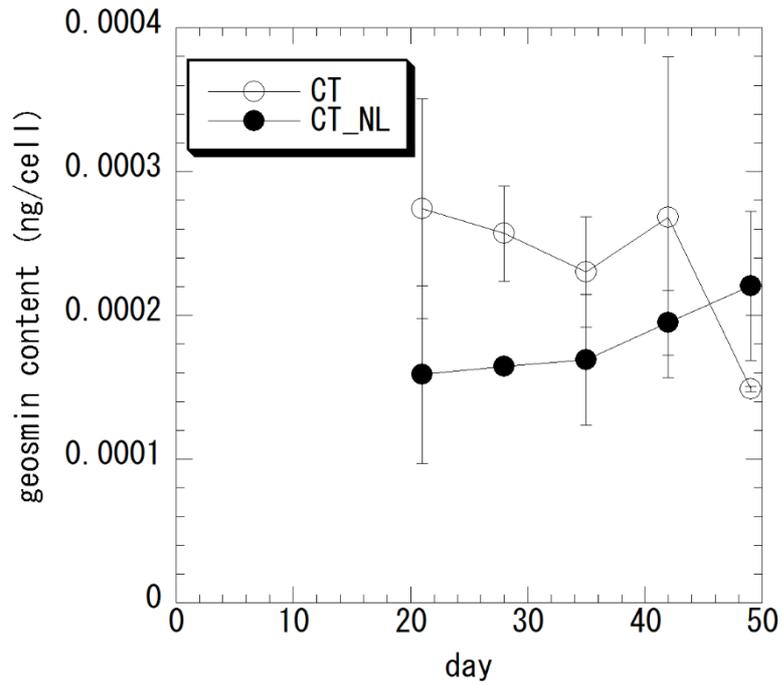


図9 *D. minisporum* WILD-76 の増殖における geosmin 含有量の推移
CT_NL: 窒素 0mg/L

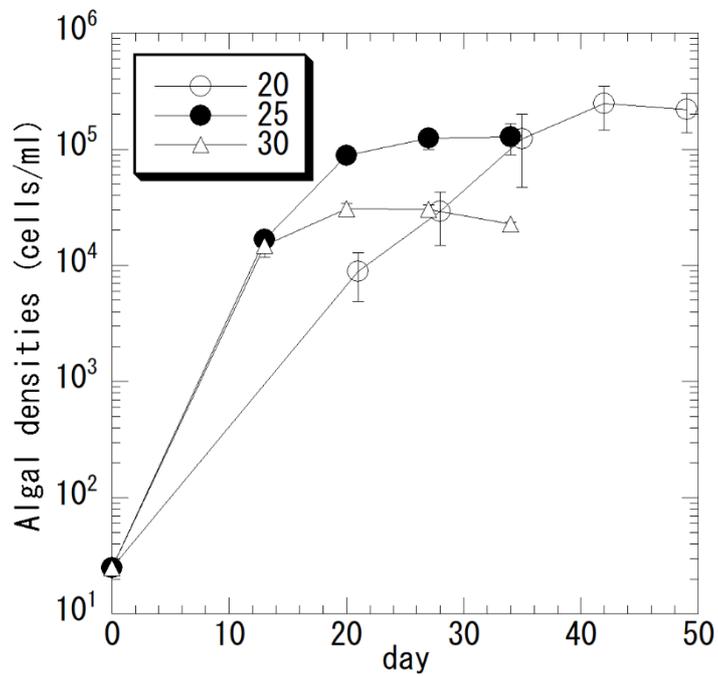


図10 *D. minisporum* WILD-76 の増殖に及ぼす温度の影響
(窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

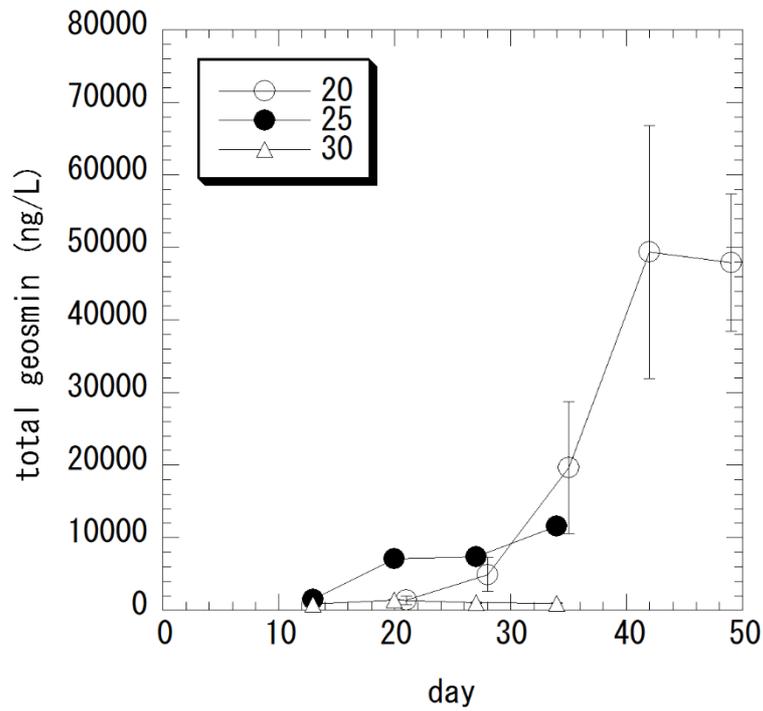


図 11 *D. minisporum* WILD-76 の各温度における geosmin 総濃度の推移 (窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

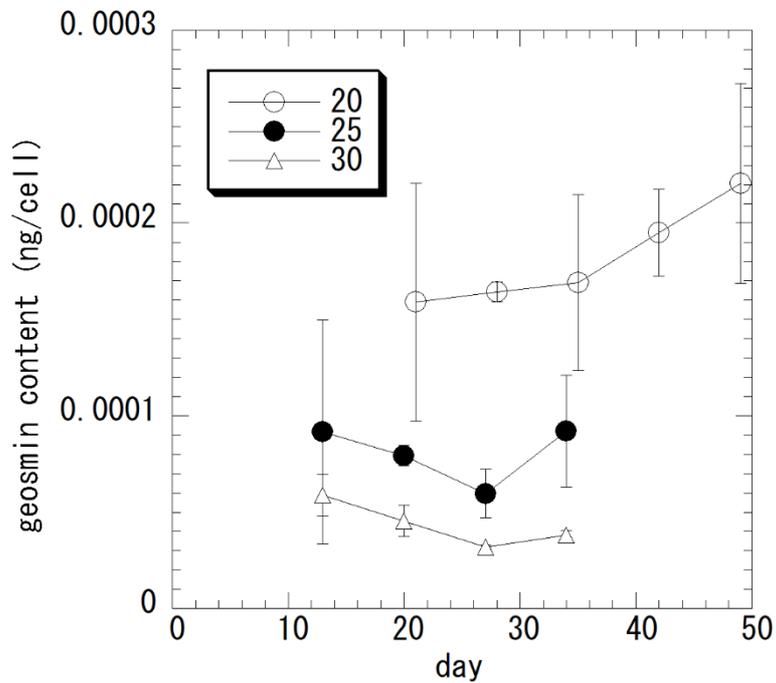


図 12 *D. minisporum* WILD-76 の各温度における geosmin 含有量の推移 (窒素を 0mg/L に制限した CT 培地)

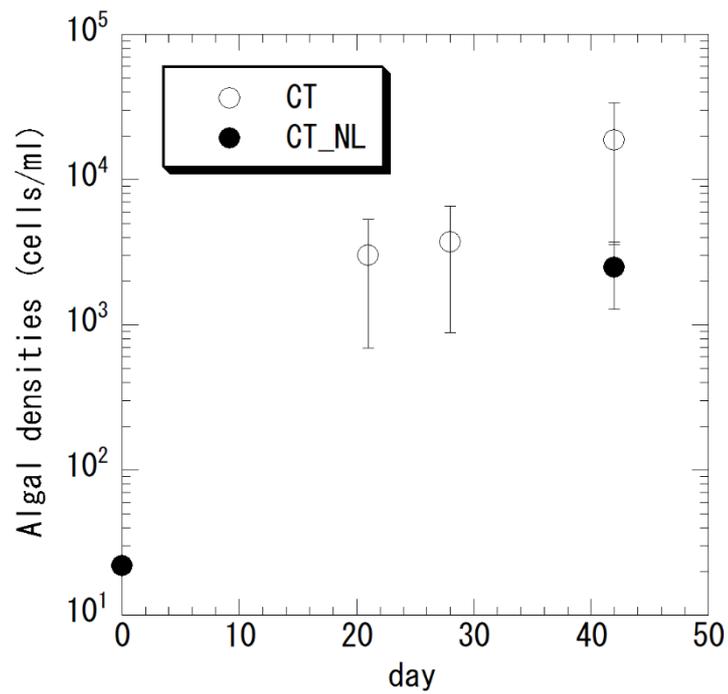


図 13 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. circinale* WILD-45 の増殖曲線
CT_NL: 窒素 0mg/L

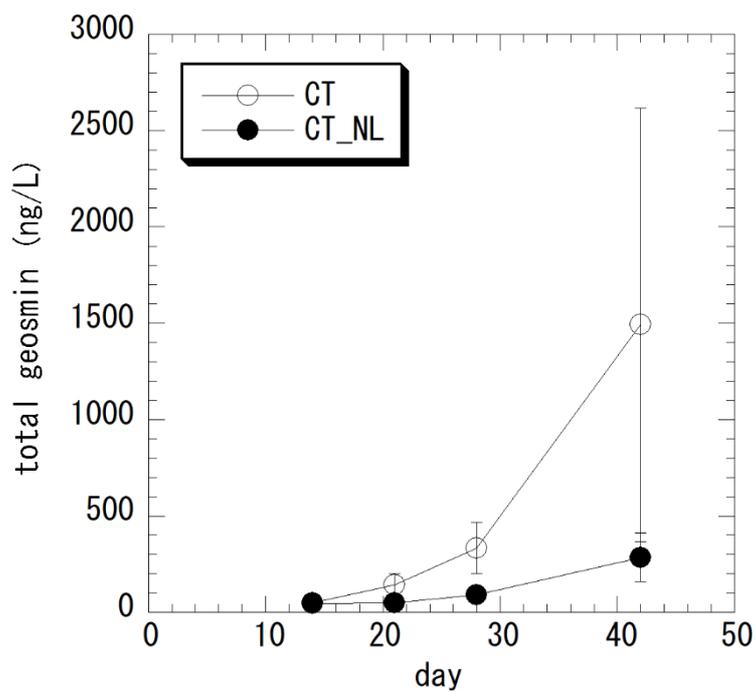


図 14 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *D. circinale* WILD-45 の
geosmin 総濃度の推移
CT_NL: 窒素 0mg/L

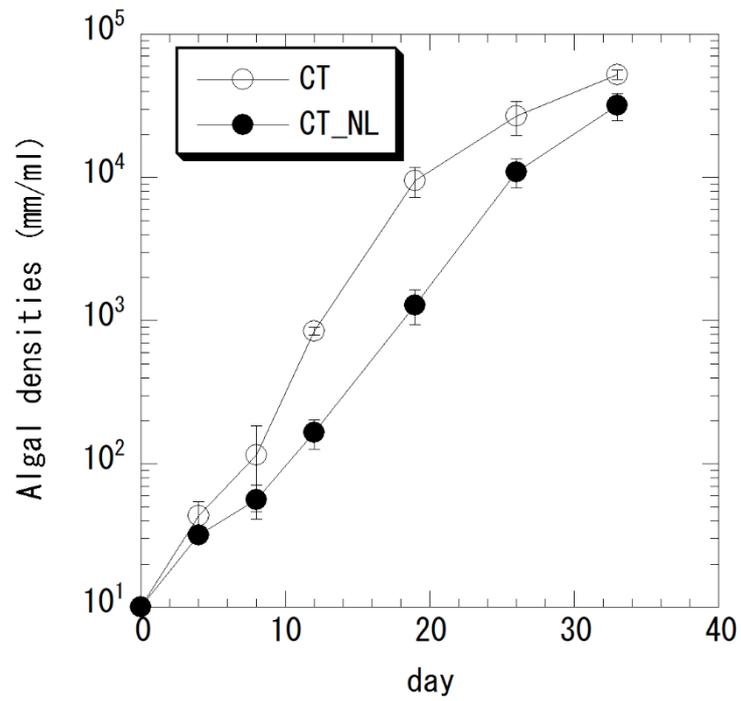


図 15 CT 培地および窒素を制限した CT 培地における *A. gracile* WILD-9 の増殖曲線
 CT_NL: 窒素 0mg/L

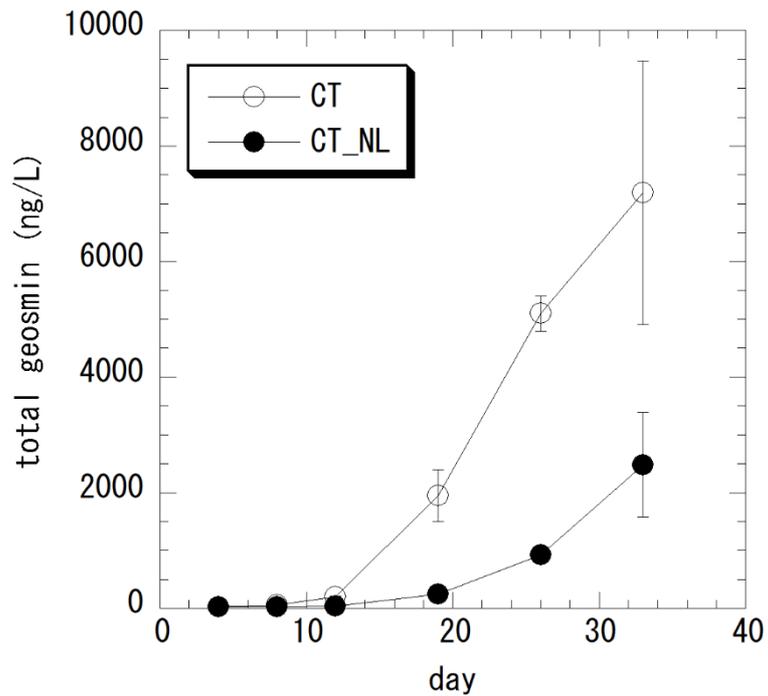


図 16 *A. gracile* WILD-9 の増殖における geosmin 総濃度の推移
 CT_NL: 窒素 0mg/L

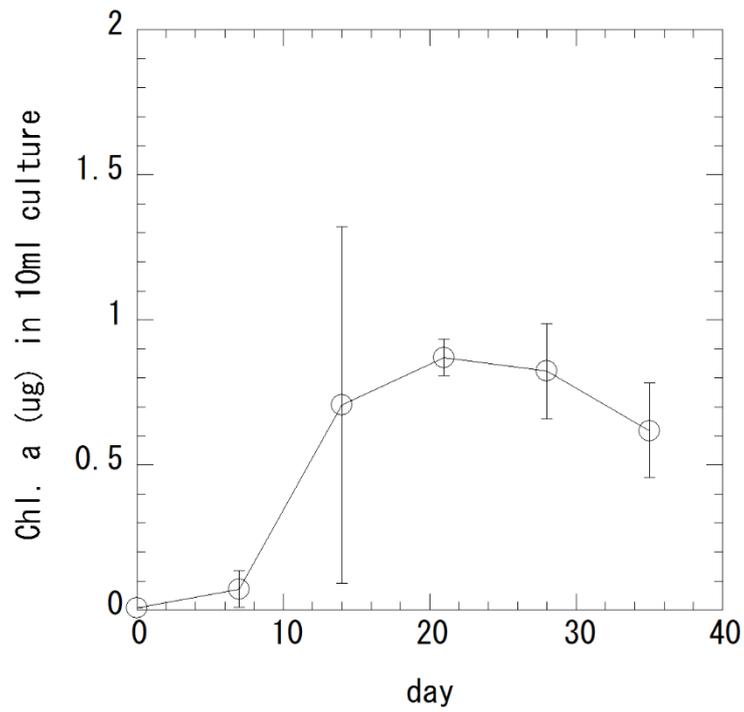


図 17 *M. autumnalis* WILD-52 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における Chl. a の推移

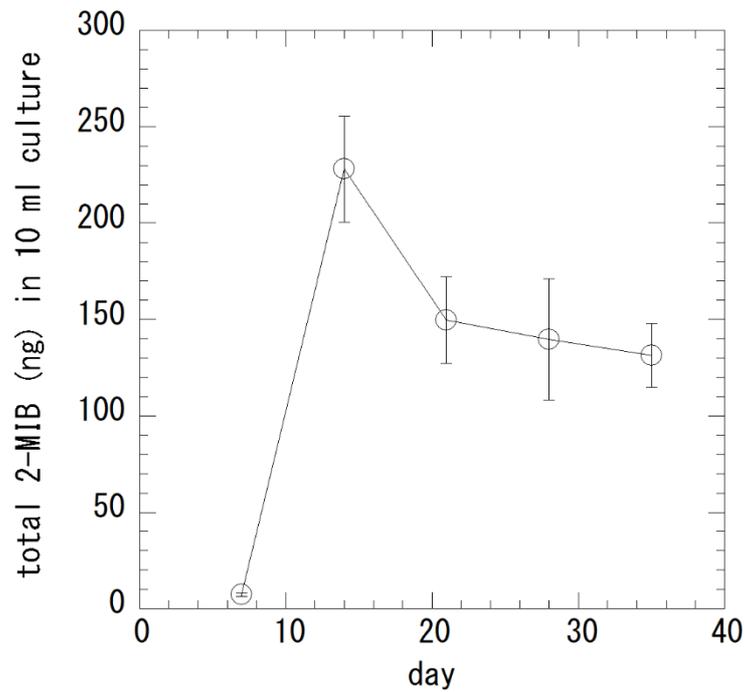


図 18 *M. autumnalis* WILD-52 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における 2-MIB 総量の推移

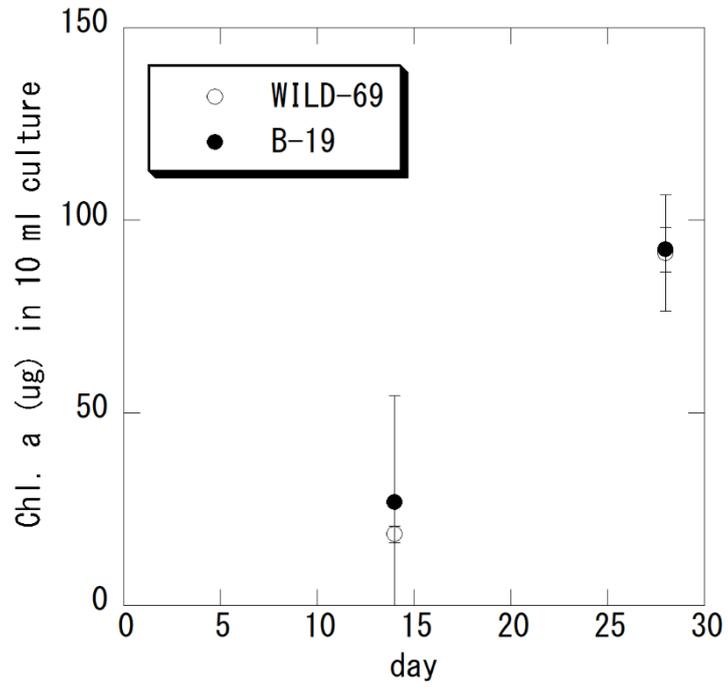


図 19 *Microcoleus* sp. WILD-69 および *Microcoleus* sp. B-19 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における Chl. a の推移

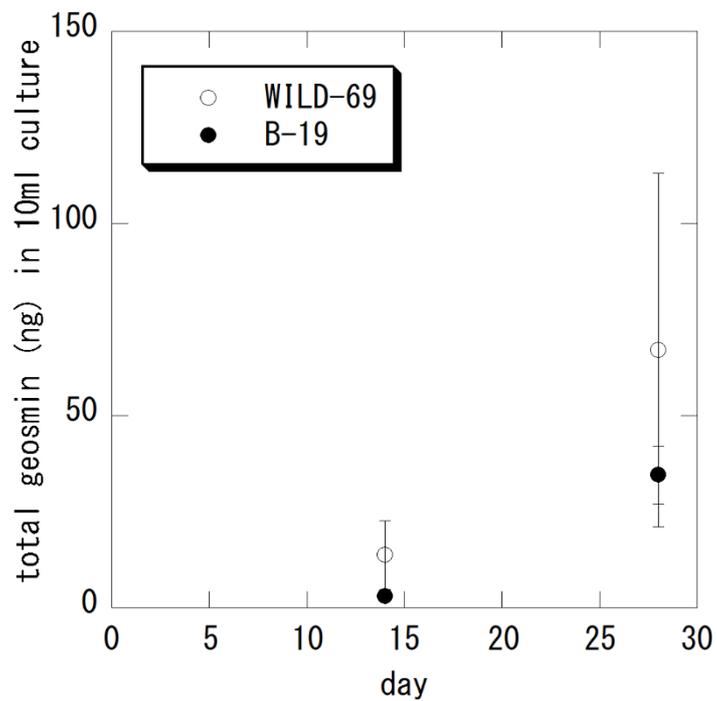


図 20 *Microcoleus* sp. WILD-69 および *Microcoleus* sp. B-19 の窒素を 1mg/L に制限した CT 培地における geosmin の推移

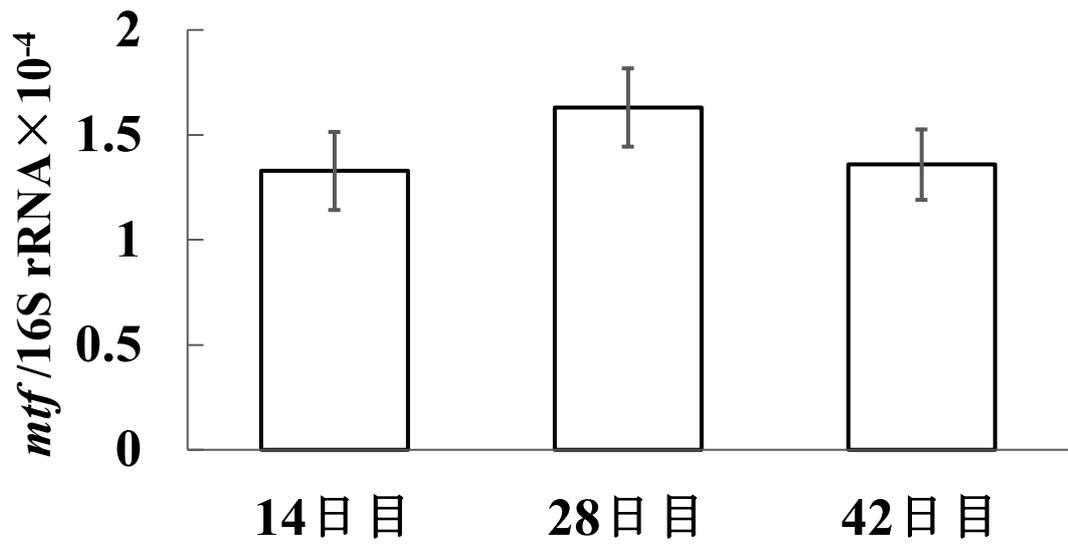


図 21 *Microcoleus autumnalis* WILD-53 の *mtf* 遺伝子発現量の経時的変化

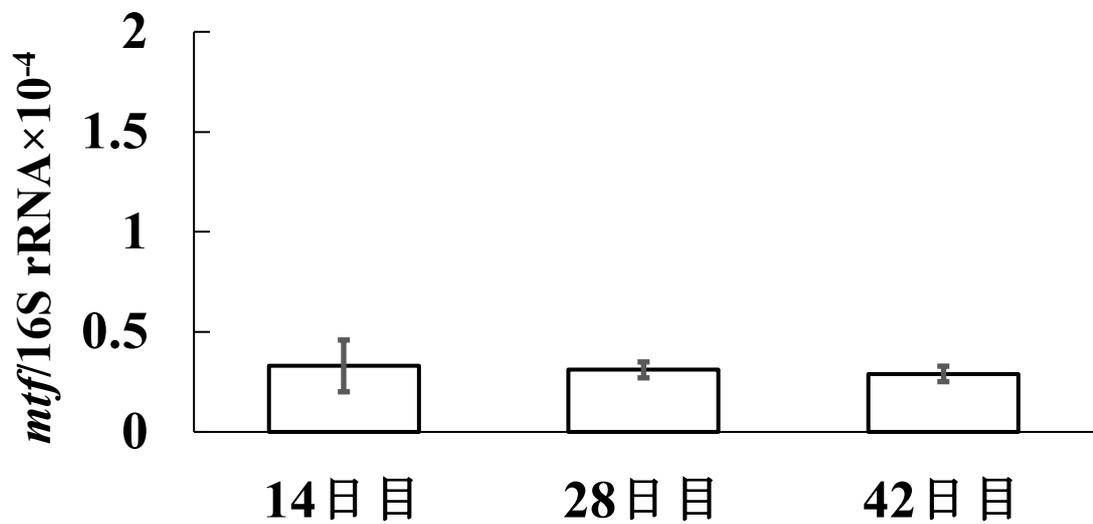


図 22 *Microcoleus autumnalis* WILD-54 の *mtf* 遺伝子発現量の経時的変化

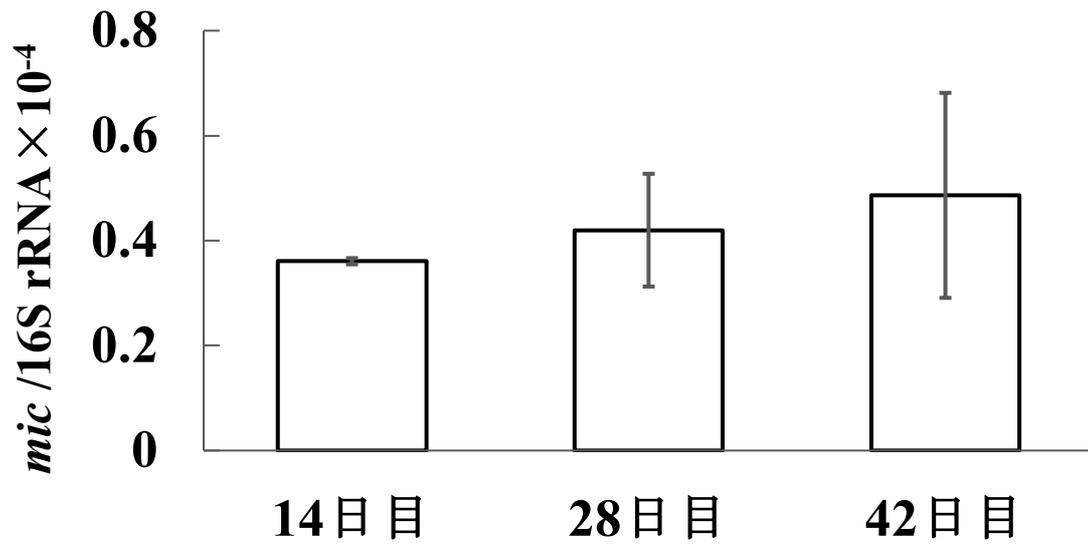


図 23 *Microcoleus autumnalis* WILD-53 の *mic* 遺伝子発現量の経時的変化

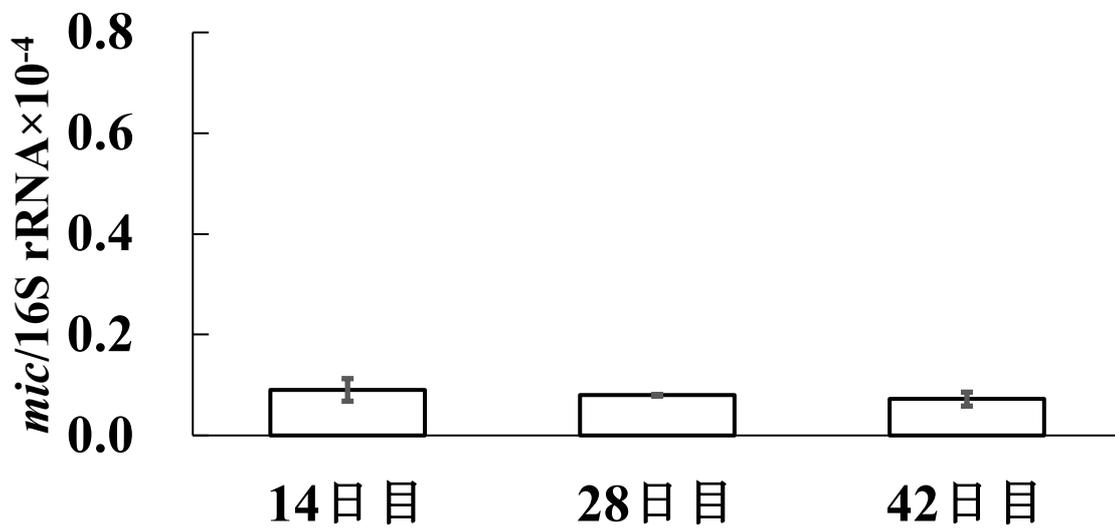


図 24 *Microcoleus autumnalis* WILD-54 の *mic* 遺伝子発現量の経時的変化

