

## 障害生物およびその代謝産物の発生メカニズムの解明

研究代表者	秋葉 道宏
研究分担者	清水 和哉
研究分担者	西村 修
研究分担者	藤本 尚志
研究分担者	浅田 安廣



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：障害生物およびその代謝産物の発生メカニズムの解明

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	清水 和哉	筑波大学 生命環境系	准教授
研究分担者	西村 修	東北大学大学院 工学研究科	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	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

#### 研究要旨

気候変動により生じうる環境条件下（温度、光条件、共存微生物）でのカビ臭産生藍藻類の増殖ポテンシャルとカビ臭物質産生能の変化やカビ臭発生メカニズムの解明を目的として研究を実施した。本年度は、温度、光強度、共存微生物群の変化によるカビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムの解明を試みた。さらに、水道水源での障害生物等の微生物群の特徴を把握し、水道水源での生物障害を予測できる環境マーカー等を創出することで、カビ臭発生予測手法を構築することを試みている。この結果、カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温条件は異なる結果を与えやすいことを明らかにした。*mtf* 遺伝子の発現量は、水温では増殖が弱い条件（10°C もしくは 30°C: 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）、光強度では増殖に好条件（10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ :20°C）の際に高くなる傾向となったが、NIES-512 株のみ、増殖が弱くなる光条件（60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ :20°C）において高くなった。*mtc* 遺伝子の発現量は、増殖に好条件もしくは増殖が弱い条件（NIES-512）（20°C: 30  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ）において高い傾向となった。また、微生物群集が *D. smithii* の増殖に好影響を与えていることを明らかにした。

#### 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。環境因子では、気温上昇に伴う水温の上昇や光強度の変動は、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障害物質である。その産生原因生物は、放線菌と藍藻類であり、これら微生物は環境因子の変動に影響を受けやすい二次代謝が発達している。カビ臭物質が、生物由来の物質であることから、産業由来の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が困難である。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<sup>1)</sup>や藍藻類<sup>2)</sup>の定量手法（早期検出技術に応用可能）が構築された。一方、カビ臭発生にいたる際の環境因子、カビ臭産生藍藻類の挙動、カビ臭物質合成メカニズムについて未解明な点がまだ多くある。これら未解明な点が、カビ臭発生予測を難しいものとしている原因と考えられている。水源池におけるカビ臭発生予測手法の確立は、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。カビ臭発生予測が可能となると、例えば、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。今後の気候変動に

より、環境条件、とくに水温や光強度、共存微生物群集、が変化することにより、カビ臭物質産生藍藻類の個体群数の挙動やそのカビ臭物質産生活性に影響を与え、水源におけるカビ臭イベントの発生頻度が変化すると予測されている。そのため、水源におけるカビ臭イベント発生の原因生物が藍藻類であることが多いことから、カビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムを明らかにすることが必要である。また、環境中の温度や光条件の変化は、微生物群集構造も変動することが、既往研究から推測できるため、微生物群集構造の変化が及ぼすカビ臭物質産生への影響を明らかにすることも重要である。

以上から、温度、光強度、共存微生物群の変化によるカビ臭物質産生藍藻類のカビ臭物質産生のメカニズムを解明することを目的とした。さらに、水道水源での障害生物等の微生物群の特徴を把握し、水道水源での生物障害を予測できる環境マーカー等を創出することで、カビ臭発生予測手法の構築を試みる。

#### B. 研究方法

1. カビ臭物質産生に及ぼす温度や光強度の影響

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 2-MIB 産生藍藻類 *Pseudanabaena foetida* NIES-512 (名古屋城より分離)、茨城県が霞ヶ浦より分離した *Pseudanabaena foetida* 1705-12、*Pseudanabaena foetida* 1803-12 を用いた。これら藍藻類は CT 培地にて培養を行った。温度影響および光強度影響を解析するために、1) 光強度を  $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  に固定して、培養温度を、 $10^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$  とした実験系と 2) 培養温度を  $20^\circ\text{C}$  に固定して、光強度を  $10.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、 $60.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  とした実験系を構築した。どちらの実験系でも明暗周期は 12 h とした。

細胞密度の変化は、クロロフィル a (Chl. a) の変化で解析した。Chl. a はホットメタノール抽出法にて行なった。カビ臭物質合成酵素遺伝子への影響を解析するために、一定の培養期間ごとに、全 RNA を抽出後、ランダムプライマーで cDNA を作成し、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、16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子とした標準化を行った。全 RNA 抽出のサンプリングの際に、カビ臭物質 2-MIB の分析のためのサンプリングも実施している。

## 2. カビ臭物質産生に及ぼす共存微生物の影響

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 *Dolichospermum smithii* NIES-824 を用いた。共存微生物群集の供試藍藻類の増殖とカビ臭物質産生への影響を解析するために、霞ヶ浦から夏季 (サンプリング時の水温  $31.5^\circ\text{C}$ ) と冬季 (サンプリング時の水温  $9.2^\circ\text{C}$ ) に湖水をサンプリングして用いた。培養は、CT 培地を用い、培養温度は、温暖化の影響を考慮するため夏季サンプリング時の水温と同様の  $31^\circ\text{C}$  とした。光強度は、 $30.0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。参照系は滅菌水を添加した系とし、微小動物等を除くために、湖水をろ過 ( $5 \mu\text{m}$ ) した湖水を添加した系、ろ過せずに微小動物等も含んだ湖水を添加した系の 3 つ試験系を構築した。

細胞密度の変化は、クロロフィル a (Chl. a) の変化で解析した。Chl. a はホットメタノール抽出法にて行なった。カビ臭物質合成酵素遺伝子への影響を解析するために、一定の培養期間ごとに、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) の発現量解析を qRT-PCR 法により実施し、解析中である。全 RNA 抽出のサンプリングの際に、カビ臭物質 2-MIB の分析のためのサンプリングも実施し、解析中である。加えて、真核および

原核微生物群集構造を 18S rRNA 遺伝子配列および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を次世代シーケンサーにより解読し、解析を行なっているところである。

## C. 研究結果および D. 考察

### 1) カビ臭物質産生に及ぼす温度の影響

細胞密度の指標とした Chl. a では、霞ヶ浦から分離した *P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では培養温度  $20^\circ\text{C}$  にて、名古屋城から分離された *P. foetida* NIES-512 は、培養温度  $30^\circ\text{C}$  にて良好な増殖を示した。培養温度  $10^\circ\text{C}$  においては、どの藍藻類においても増殖が良好ではなかったが、 $30^\circ\text{C}$  においては、*P. foetida* 1705-12 のみが増殖が良好ではなかった (図 1)。同属・同種においても異なる株であると、増殖特性が異なった。

カビ臭物質 2-MIB は、ゲラニル二リン酸 (GPP) メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 (*mtf*) と 2-MIB 合成のモノテルペンシクラーゼの遺伝子 (*mtc*) の 2 つの遺伝子の働きによって合成される。これら遺伝子は、オペロンを形成していると考えられている<sup>3,4,5)</sup>。各藍藻類における *mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量には相関はみられなかった。カビ臭物質 2-MIB の前駆体である 2-methyl-GPP を GPP から変換する *mtf* 遺伝子については、その発現量が *P. foetida* 1705-12 では  $30^\circ\text{C}$ 、*P. foetida* 1803-12 と NIES-512 では  $10^\circ\text{C}$  において高い傾向にあった。また *P. foetida* 1705-12 では  $10^\circ\text{C}$  も、良好な増殖を示していた  $20^\circ\text{C}$  よりも高い傾向にあった (図 2)。カビ臭物質 2-MIB に 2-methyl-GPP から環化する *mtc* 遺伝子 (2-MIB 合成酵素遺伝子ともされている遺伝子) の発現量は、*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では良好な増殖を示した  $20^\circ\text{C}$ 、*P. foetida* NIES-512 では良好な増殖を示した  $30^\circ\text{C}$  において高い傾向にあった (図 3)。

### 2) カビ臭物質産生に及ぼす光強度の影響

全ての *P. foetida* 供試藍藻類において、 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度で良好な増殖を示した。培養温度に対しては、株ごとに異なる結果を示したが、光強度においては、同様の結果となった。*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 では、光強度と増殖の間に負の相関関係がみえたが、*P. foetida* NIES-512 では異なっていた (図 4)。*mtf* 遺伝子の発現量は、*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 においては、良好な増殖を示した  $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度にて高い傾向を示した。一方、*P. foetida* NIES-512 では増殖が良好ではない  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度において高い傾向を示した (図 5)。*mtc* 遺伝子の発現量は、全ての *P. foetida* 供試藍藻類で、 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度の際に高い傾向を示した (図 6)。*P. foetida* 1705-12 と 1803-12 においては、 $30$

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度にても増殖するが、*P. foetida* NIES-512 では、 $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  の光強度では、ほぼ増殖しなかった。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 (*mtf* と *mtc*) 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<sup>3)</sup>。

藍藻類におけるカビ臭物質ジェオスミンや2-MIBの主要な生合成経路は、メバロン酸 (MVA) 経路やノンメバロン酸 (MEP) 経路で生合成されるイソペンテニルニリン酸から開始されるイソプレノイド経路であると提案されている<sup>6)</sup>。イソプレノイド経路では、クロロフィル・フィトール、カロテノイドといった光合成色素も生合成されるため、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<sup>6, 7, 8)</sup>。

### 3) カビ臭物質産生に及ぼす共存微生物の影響

水温の変化は、微生物群集構造の変動要因となる。このため、微生物群集構造のカビ臭物質産生への影響と、水温変化によって変動する微生物群集構造およびそれが与えるカビ臭物質産生への影響を解析している。

*Dolichospermum smithii* NIES-824 を試験藍藻類として用いて、その増殖を解析した。参照系である滅菌水の添加系と比較して、微小動物等の大型微生物を除いたろ過湖水 ( $5 \mu\text{m}$  孔径の膜でろ過) の添加系は、夏と冬のどちらとも *D. smithii* の増殖を促進した (図7)。夏の湖水の方が、より好影響を与えた (図7a)。また、湖水の添加系では、ろ過湖水添加系と同様に夏と冬のどちらとも *D. smithii* の増殖を促進したが、冬の湖水の方が大きな影響を与えていた (図8b)。夏の湖水を用いた場合は、ろ過湖水の添加系が湖水添加系よりも増殖に大きな影響を与えた (図7a)。一方、冬の湖水では、湖水添加系がろ過湖水添加系よりも増殖の大きな影響を与えた (図7b)。大型微小動物等 ( $5 \mu\text{m}$  を超えるサイズのもの) の影響や水温上昇によって変化した微生物群集が *D. smithii* の増殖に影響を与えたことが考えられるが、詳細な解析を行なっている。微生物群集構造解析では、藍藻類の増殖に好影響を与える微生物群集構造や指標微生物の特定を試み、カビ臭発生を予測できる環境マーカーの創出を目指している。

水源では、同属・同種でも多くの異なる株によって微生物群集を形成していることが考えられるため、既往研究における分離株を用いた知見や水源のモニタリング知見も組み合わせ、カビ臭発生予測法へとつなげることが重要である。

### E. 結論

カビ臭物質産生藍藻類の同属・同種で、異なる株の場合、環境因子への応答は異なるものとなり、増殖に対しては、水温影響の方が異なる結果を与えやすいことを明らかにした。*mtf* 遺伝子の発現量は、水温では増殖が弱い条件、光強度では増殖に好条件の際に高くなる傾向となったが、NIES-512株のみ、増殖が弱くなる光条件において高くなった。*mtc* 遺伝子の発現量は、増殖に好条件もしくは増殖が弱い条件 (NIES-512) において高い傾向となった。水源では、同属・同種でも多くの異なる株によって微生物群集を形成していることが考えられるため、既往研究における分離株を用いた知見を加えることが、カビ臭発生予測法へとつなげる上で重要である。また、微生物群集が *D. smithii* の増殖に好影響を与えていることが明らかになったことで、藍藻類の増殖に好影響を与える微生物群集構造や指標微生物の特定により、カビ臭発生を予測できる環境マーカーの創出につながることが期待できる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Shen Q, Wang Q, Miao H, Shimada M, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Nishimura O, Asada Y, Fujimoto N, Takanashi H, Akiba M, Shimizu K. Temperature affects growth, geosmin/2-methylisoborneol production, and gene expression in two cyanobacterial species. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021. (Published Online)

#### 2. 学会発表

Miao H, Shen Q, Zhang J, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. A rapid method for the monitor of geosmin-producing *Dolichospermum* sp. based on whole-cell PCR. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川 (オンライン開催) .

Zhang J, Shen Q, Miao H, Asada Y, Utsumi M, Lei Z, Takanashi H, Shimada M, Fujimoto N, Akiba M, Tian Y, Zhang Z, Shimizu K. Elucidation of 2-MIB production mechanism under different temperature. 日本水処理生物学会第57回大会; 2021年10月; 神奈川 (オンライン開催) .

Kazuya Shimizu. Production of musty odor by Cyanobacteria and Actinomycetes. The International of Workshop of "Three Water Overall Planning as a whole, comprehensively protect and restore the aquatic ecological environment"; Nanjin China; December 2021; Oral presentation (Online).

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.
- 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

J. 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 本研究で使⽤したプライマー

Target genes	Primers/Probe	Sequence (5' to 3')	Reference
<i>mtc</i>	Mtc-RTF	CGCTCGCTTTGTG AGTGAGATAG	Wang et al. (2011)
	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	

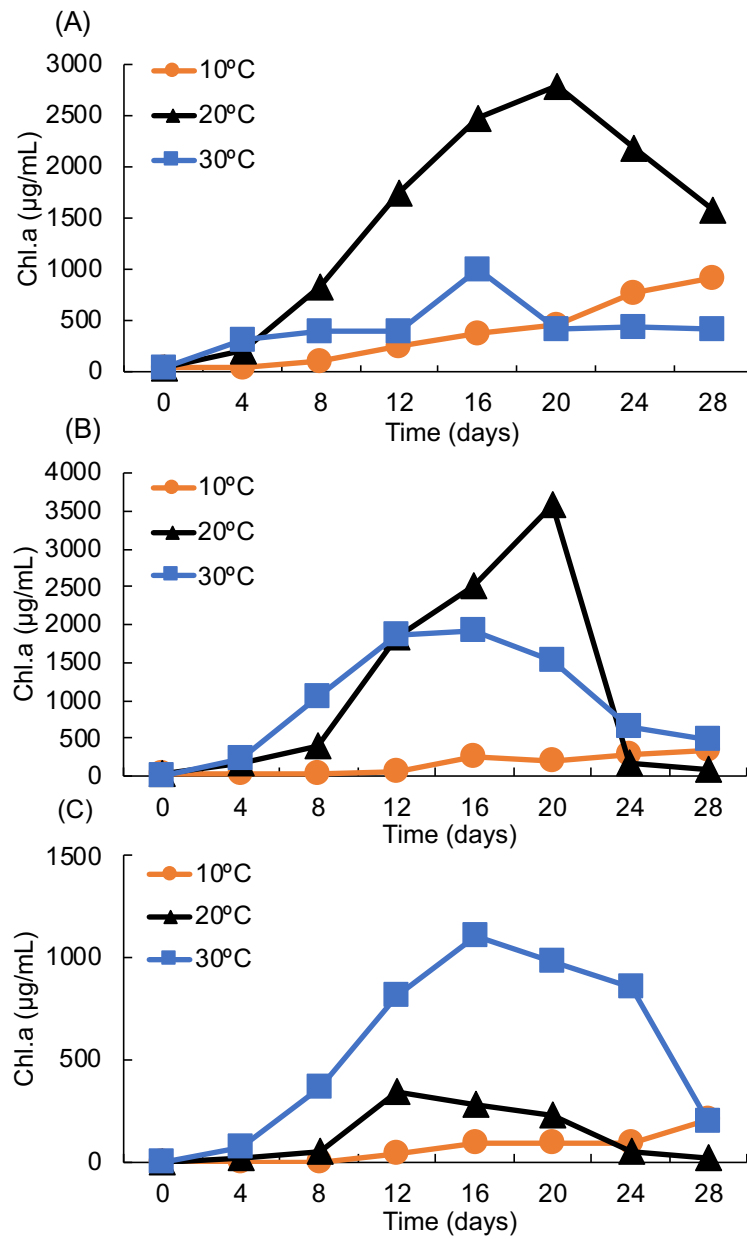


図1 異なる培養温度条件下における増殖特性  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512



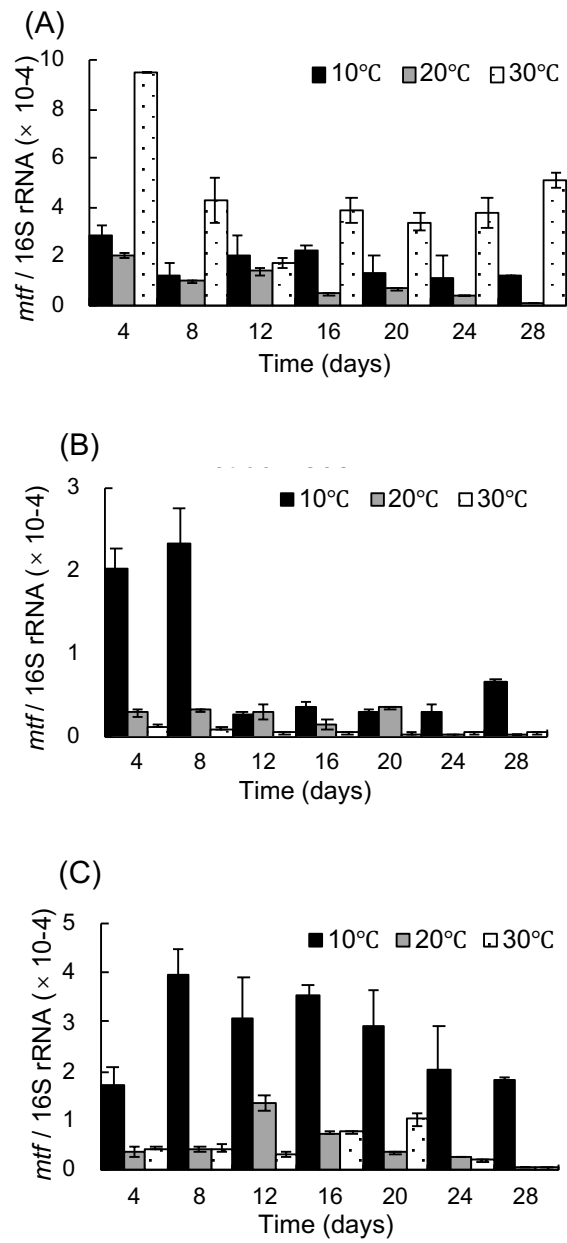


図2 異なる培養温度条件における *mtf* の発現量変化  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

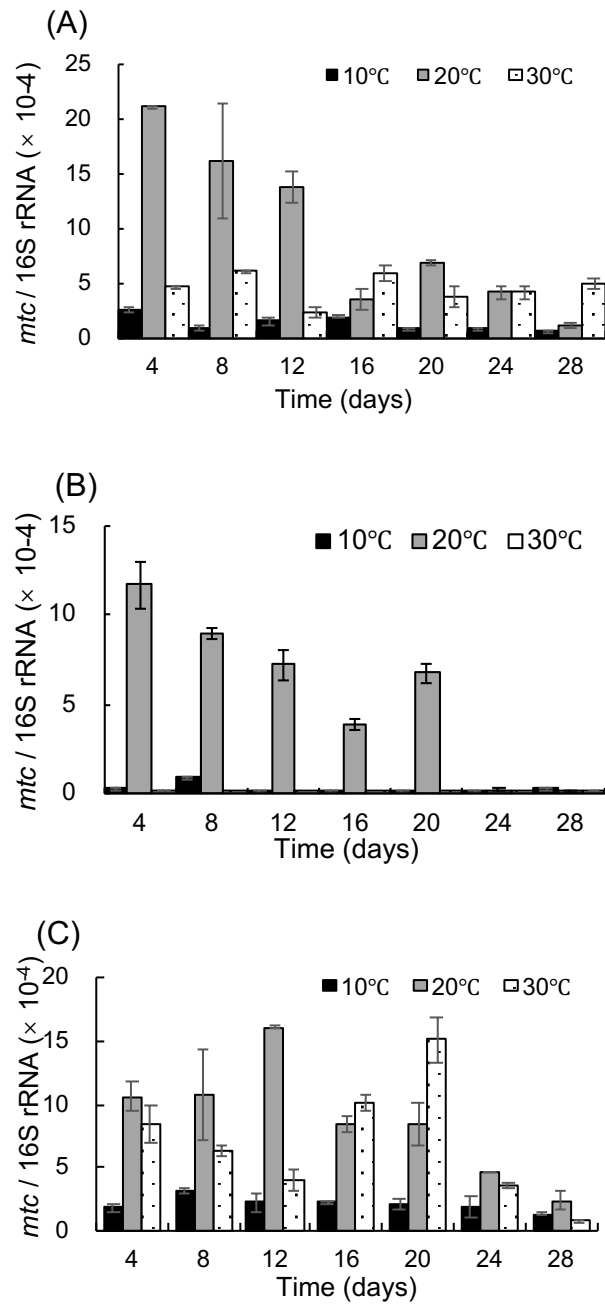


図3 異なる培養温度条件における2-MIB合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

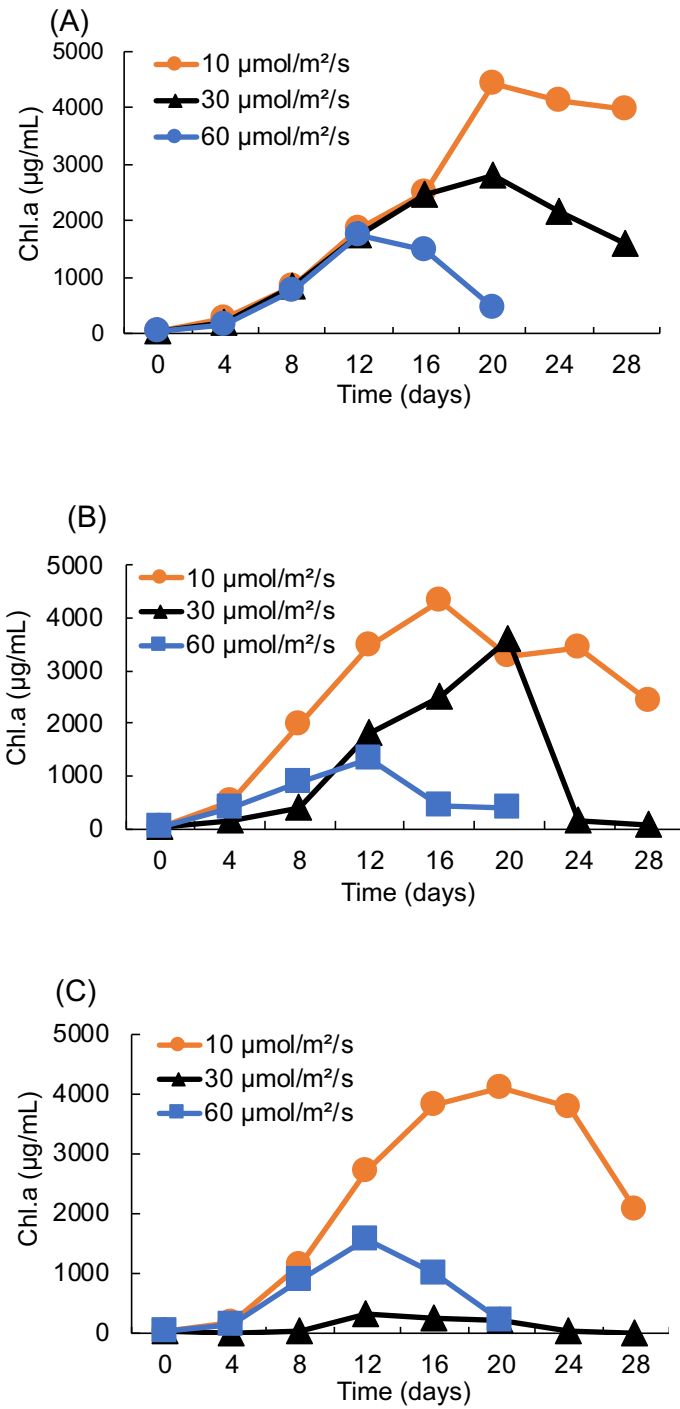


図4 異なる培養光強度条件下における増殖特性  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

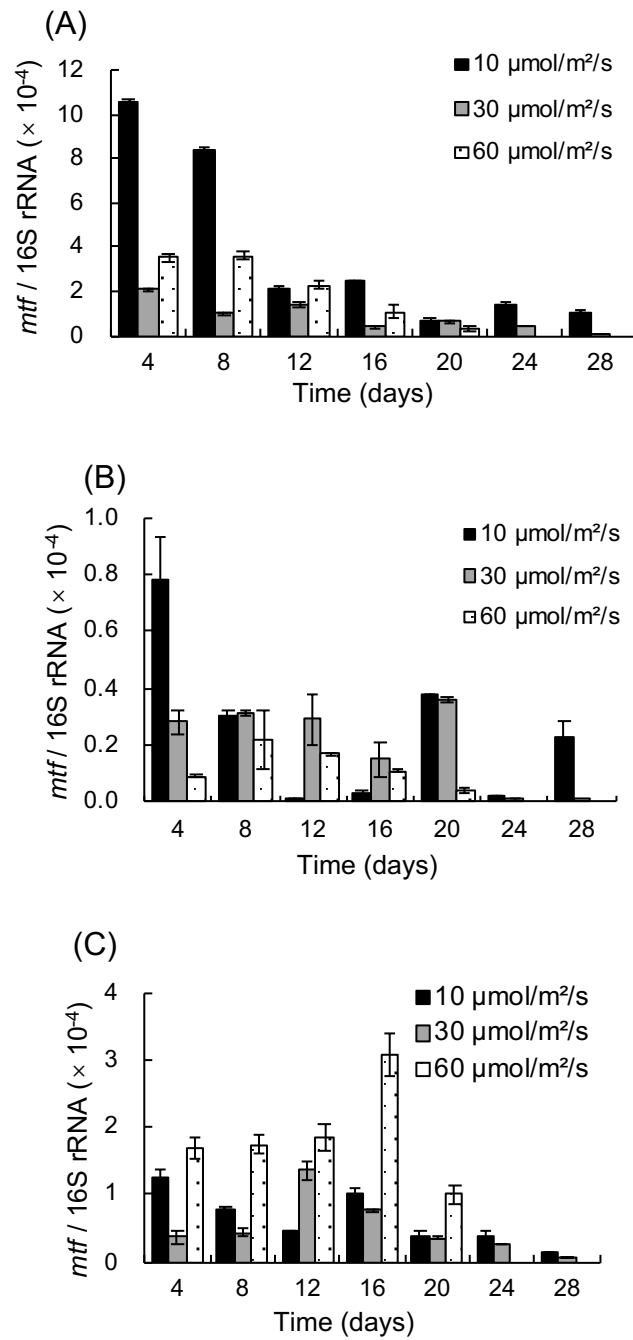


図5 異なる培養光強度条件における *mtf* の発現量変化  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

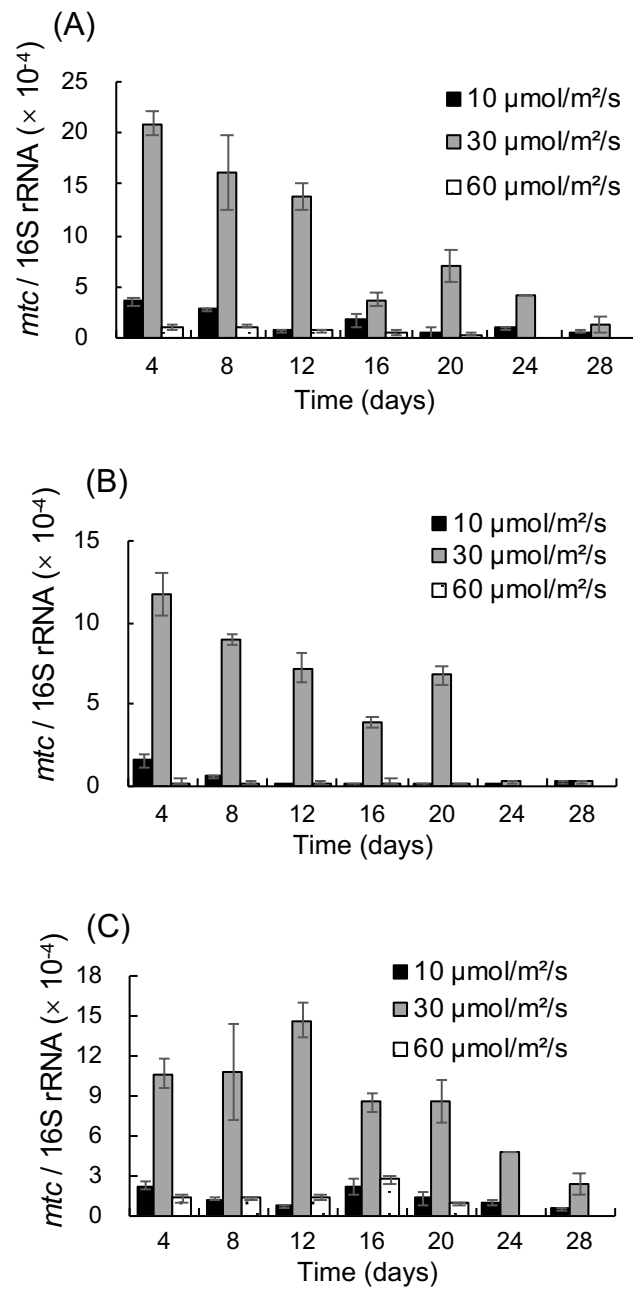


図 6 異なる培養光強度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化  
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

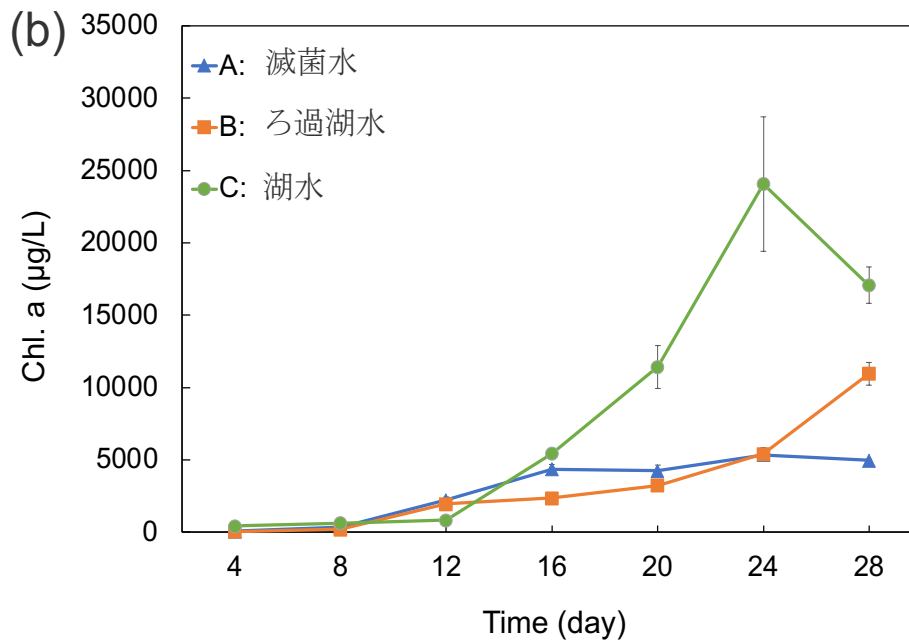
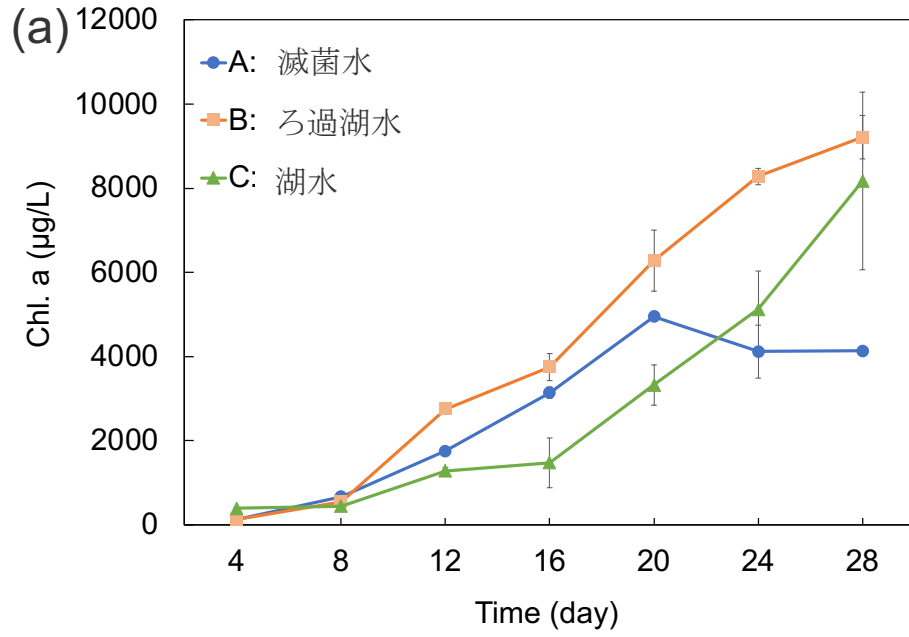


図 7 geosmin 産生藍藻類 *Dolichospermum smithii* NIES-824 の増殖に及ぼす共存微生物の影響、(a) 夏サンプル湖水、(b) 冬サンプル湖水