

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

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 特任研究官
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 生活環境研究部 主任研究官

研究要旨

カビ臭原因物質産生藻類である *Pseudanabaena* 属や *Microcoleus* 属の遺伝子による系統の違いとカビ臭原因物質産生能、増殖、カビ臭原因物質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。*Pseudanabaena* 属は 16S rRNA 遺伝子の系統樹において、I～Vの5系統、2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 合成酵素遺伝子の系統樹においてA～Cの3系統に分かれた。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11は10℃、15℃、20℃において増殖し、低水温における *Pseudanabaena* 属の発生やそれにとまう2-MIBの発生を裏付ける結果となった。窒素濃度を1mg/Lに制限したCT培地を用いて10℃で培養を行ったところ2-MIB総濃度は *P. limnetica* WILD-11において他の株に比べて著しく高く推移した。10℃において *P. yagii* WILD-56は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62に比べて2-MIB産生能力が高く、2-MIB合成酵素遺伝子の系統樹においてCに位置づけられる *P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56は低温下における2-MIB産生能力が高いことが示唆された。河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の単離株は16S rRNA 遺伝子および16S-23S ITS領域の系統樹において、2-MIBを産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株が分かれて位置づけられることが明らかとなった。A川とB川において分子生物学的手法により *Microcoleus* 属の16S-23S ITS領域を解析し生物相を評価したところ、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定が困難な OTU (Operational Taxonomic Unit) や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなった。*M. autumnalis* の2-MIB産生株については株間で産生能力の違いが見られたが、分子系統による産生能力の違いは見られなかった。一方ジェオスミン産生株については分子系統によって産生能力が異なることが示唆された。*M. autumnalis* の単離株の中には20～30℃の間で増殖が可能な株、30℃において増殖が抑制される株が存在することが明らかとなった。2-MIB産生株である *M. autumnalis* WILD-54は20℃～30℃において、温度が高まるにつれて溶存態2-MIB濃度が高まり、浄水場における *M. autumnalis* によるカビ臭リスクに温度が影響することが示唆された。

以上の結果から *Pseudanabaena* 属に関しては分子系統によってカビ臭原因物質の産生能が異なることが明らかとなった。10℃において2-MIB産生能力が高まる株の存在が明らかとなり、その系統が存在する水域では、水温が2-MIB濃度に影響する可能性があり、*Pseudanabaena* 属の存在量を注意深く監視する必要があると考えられた。*M. autumnalis* に関しては、30℃において溶存態2-MIBが最も高まったり、株によっては30℃において増殖できなかつたりと、気候変動に伴う温度上昇が、カビ臭被害を促進したり、*M. autumnalis* の生物相に影響を及ぼす可能性が示唆された。さらに *M. autumnalis* について、株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆されている。このような系統によるカビ臭原因物質産生能力の違い、水温といった環境条件による産生ポテンシャルの変化等を踏まえた発生予測モデルの構築が必要と考えられた。

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。これまで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てきている。本年度は2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を産生する藍藻類 *Pseudanabaena* 属の単離株について分子系統解析を行った。さらに窒素を制限した条件、温度を数段階に設定した条件で培養実験を行い分子系統と2-MIB産生能について評価を行った。さらに、河床附着性藍藻類の *Microcoleus autumnalis* の単離株について分子系統解析を行い、*M. autumnalis* によるカビ臭発生メカニズムに関する基礎的知見を得た。次に河床附着物中の *M. autumnalis* のカビ臭原因物質産生に関する表現形質について PCR およびクローニングにより推定を行った。最後に複数の系統に位置する *M. autumnalis* についてカビ臭原因物質産生能力の比較および増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響について検討を行った。

B. 研究方法

1) 藍藻類 *Pseudanabaena* 属の分子系統解析と2-MIB産生能

水道水源から単離された *Pseudanabaena subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57、*P. subfoetida* WILD-62、*P. cinerea* B-6 を用いた。

単離株を CT 培地で 20°C、1500 lux の条件下 3 週間程度培養したのち、孔径 0.2μm のポリカーボネート製のメンブレンフィルター (ADVANTEC K020A047A, アドバンテック東洋株式会社) を用いた吸引ろ過により集菌を行った。ろ過量は培養試料 10mL とした。集菌を行ったフィルターを細かく裁断し、DNeasy® Powersoil® Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出を行った。16S rRNA 遺伝子の増幅には、PLG1.3 (CYA108F) と、16S-1492r のプライマーセットを用いた¹⁾。PCR 反応液は GoTaq Green Master Mix (Promega) 10 μL、ゲノム DNA 1 μL、プライマー(10 μM) をそれぞれ 2 μL、nuclease-free water 5 μL を混合した。サーマルサイクラー(T100 Thermal Cycler, BIO RAD) にセットして PCR 反応条件¹⁾に従って PCR を行った。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の確認を行った。この後精製し、ユーロフィンジェノミクス株式会社に塩基配列の解析を依頼した。本研究で解析した単離株の塩基配列およびこれまで報告されている塩基配列について njplot を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。2-MIB 合成酵素遺伝子については Suurnäkki ら²⁾に従い解析し、単離株の塩基配列について European Bioinformatics Institute (EBI) の EMBoss Transeq(https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)によりアミノ酸配列に変換し、njplot を用いて近隣結合法により系統樹を作成した。

培養実験ではまず、CT 培地を用いて、10°C、15°C、20°C の条件で培養を行った。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11 を用いた。200ml 容三角フラスコを用いて培養を行った。CT 培地を 100ml を分取し、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。照度は

2000 lux (12 時間明/12 時間暗) とした。各条件につき 3 連で試験を行った。定期的に、培養液を採取し、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。また、SPME-GC/MS システム (Agilent 5973C GC/MSD, Agilent 及び Multiple Sampler MPS, Gerstel) を用いて 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) 濃度を測定した。

次に、窒素濃度を実湖沼の濃度に近づけた条件で検討を行った。窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて 10°C および 20°C で培養を行い、2-MIB の産生について比較を行った。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. subfoetida* WILD-62 を用いて培養を行った。10°C においては *P. yagii* WILD-56 も用いて培養を行った。20°C では *P. cinerea* B-6 も用いた。CT 培地は窒素源として Ca(NO₃)₂・4H₂O、KNO₃ が含まれるが、KNO₃ を添加せず、Ca(NO₃)₂・4H₂O を減らして硝酸性窒素濃度を 1mg/L とした。減少した Ca、K はそれぞれ CaCl₂・2H₂O、KCl により補充した。計数および分析は上述の通り行った。

2) 河床附着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の分子系統解析

分子系統解析には水道事業体より提供を受けた株(B と記載)、我々が単離した株(WILD と記載、系統樹では W と記載)を用いた。16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域を特異的に増幅させるプライマー PLG1.3 (CYA108F)、pits-CyanR を用いて PCR を行った¹⁾。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動によりターゲットの増幅確認を行った。その後 DNA を精製し、塩基配列を解析した。前述の通り系統解析を行った。

3) 分子生物学的手法による河床附着物中の *Microcoleus* 属のカビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定

関東地方の A 川の最上流①(S7)と②(S8)、上流①(S9)と②(S10)、中流①(S11)と②(S12)、下流①(S13)と②(S14)の 4 地点の河床から 2021 年 8 月 2 日に採取した 8 試料、および関西地方の B 川の下流(Y1)、中流(本流・Y2)(支流・Y3)、上流(Y4)の 4 地点から 2022 年 3 月 8 日に採取した 4 試料について DNA 抽出を行った。DNA 抽出物について、*Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域を特異的に増幅させるプライマー (m_16S_23S ITS F、m_16S_23S ITS R) を用いて PCR を行った。PCR 終了後、アガロースゲル電気泳動により得られた産物を精製、TOPO TA cloning kit を用いてクローニングを行った。クローニングにより得られた 24 コロニーについて DNA 精製を行い、塩基配列の解析を行った。配列間の相同性が 99% 以上の場合、同一の OTU (Operational Taxonomic Unit) とした。OTU 及び単離株の塩基配列を用いて近隣結合法により系統樹の作成を行った。

4) *Microcoleus autumnalis* の分子系統とカビ臭原因物質産生能の比較

カビ臭原因物質産生能の比較には、2-MIB を産生する 4 株 (B-1, WILD-102, WILD-105, WILD-109)、ジェオスミンを産生する 4 株 (WILD-81, WILD-104, WILD-106, WILD-110) を用いた。ネジ口試験管に窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地

を 10mL 加え、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 0.5~5mm/mL となるように接種した。各株について 15 本程度試験管を用意し、これらを 20°C、2000 lux (12 時間明/12 時間暗)の条件で培養した。培養 28 日目に各測定項目ごとに 3 本ずつサンプリングし測定を行った。クロロフィル a およびカビ臭原因物質について測定を行った。カビ臭原因物質は前述の通り測定した。

5) *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響

2-MIB を産生する *M. autumnalis* WILD-54 およびジェオスミンを産生する *M. autumnalis* WILD-104 を使用した。ネジロ試験管に窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を 10mL 加え、オートクレーブ滅菌後、糸状体が 5mm/mL となるように接種した。WILD-54、WILD-104 それぞれについて 45 本程度試験管を用意し、これらを 20°C、25°C、30°C、2000 lux (12 時間 明/12 時間暗)の条件で培養した。サンプリングはクロロフィル a、2-MIB ごとに 3 本ずつ、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目と経時的に行った。クロロフィル a およびカビ臭原因物質について測定を行った。カビ臭原因物質は前述の通り測定した。

また、*M. autumnalis* WILD-54 について 28 日目に 2-MIB 合成酵素遺伝子である methyltransferase 遺伝子(*mtf* 遺伝子)、2-MIB synthase 遺伝子(*mic* 遺伝子)の発現解析を行った。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 PrimeScript™ RT reagent Kit (タカラバイオ)を用いて 0.5 もしくは 1ng RNA/μL 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 Taq™ II(タカラバイオ)を用いて説明書に従い、16S rRNA 遺伝子、*mtf* 遺伝子、*mic* 遺伝子について qPCR にて遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果および D. 考察

1) 藍藻類 *Pseudanabaena* 属の分子系統解析と 2-MIB 産生能

16S rRNA 遺伝子の系統樹において、株間の相同性について約 98%を目安にグループ分けを行ったところ、*Pseudanabaena* 属はI~Vの5系統に分かれた(図1)。Iは *P. subfoetida*、*P. foetida* を含み、主に 2-MIB 産生株からなる系統、IIは *P. cinerea* の 2-MIB 産生株、非産生株が含まれる系統、IIIは *P. yagii* の 2-MIB 産生株を含む系統、IVは *Pseudanabaena* sp.の非産生株が含まれる系統、Vは *Limnothrix redekei* や *Pseudanabaena* sp.の非産生株からなる系統である。今回解析した 2-MIB 産生株 7 株はI~IVの系統に位置づけられた。*P. subfoetida* WILD-6 と *P. subfoetida* WILD-62 は *P. subfoetida*、*P. foetida* が含まれる系統Iに位置付けられた。*P. cinerea* B-6 は *P. cinerea* の産生株と非産生株が含まれる系統IIに位置づけられた。*P. yagii* WILD-56、WILD-57 は *P. yagii* NIVA-CYA 111 と同じ系統IIIに位置づけられた。*P. limnetica* WILD-11、WILD-18 は非産生株である *Pseudanabaena* sp. Ak1315 と同じ系統IVに位置づけられた。全体的に種名ごとに系統がわかれており、形態による分類と 16S rRNA 遺伝子の解析結果の間に整合性が見られている

と考えられた。

2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において相同性 99%以上で同一の系統としたところ *Pseudanabaena* 属の単離株は、それぞれ *P. yagii* NIVA-CYA 111、*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. limnetica* str Castaic Lake を含む三つの系統(A~C)に位置づけられた(図2)。*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. foetida* NIES-512、*P. subfoetida* WILD-62 は同じ系統Bに位置づけられ、16S rRNA 遺伝子の系統樹でもIに位置づけられているので一致が見られた。*P. subfoetida* WILD-6 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹ではIに位置したが、2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹では、上述の3株とは異なる系統Aに位置した。*P. yagii* NIVA-CYA 111、*P. yagii* NIES-4237、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57 は系統Cに位置づけられた。*P. yagii* NIVA-CYA 111、*P. yagii* NIES-4237、*P. yagii* WILD-56、*P. yagii* WILD-57 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてIIIに位置づけられているので、16S rRNA 遺伝子の系統樹と 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹の間に一致がみられる。一方、*P. limnetica* WILD-11、*P. limnetica* WILD-18 は 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてはIVに位置づけられたが、2-MIB 合成酵素遺伝子では *P. yagii* NIVA-CYA 111 と同じ系統Cに位置づけられた。*P. cinerea* B-6 と *P. cinerea* NIES-4063 の2株はAに位置づけられたが 16S rRNA 遺伝子の系統樹においてもIIに位置づけられており、一致が見られた。以上のことから、16S rRNA 遺伝子の系統樹における位置づけと 2-MIB 合成酵素遺伝子における位置づけが一致する株と一致しない株が存在することが明らかとなった。

次に単離株を CT 培地を用いて 10~20°C で培養を行った。*P. subfoetida* WILD-6 は 10°C、15°C、20°C において増殖し、最大増殖量に温度による違いは見られなかった(図3)。2-MIB 総濃度は培養日数の経過とともに高まり、最大値は 15°C で最も高く、10°C は 15°C の半分以下であった(図4)。20°C で 15°C よりも低いのは、培養を定常期に入ってからすぐに打ち切ったことが影響していると考えられる。10°C と 15°C で、最大増殖量は同程度で、2-MIB 総濃度が 10°C で低いことから、10°C において 2-MIB 産生が抑制されていることが考えられた。定常期における糸状体当たりの 2-MIB 含有量は 10°C 0.0007ng/mm、15°C 0.003ng/mm、20°C 0.0025ng/mm と 10°C において著しく低いことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は 10°C 11.6%、15°C 17.9%、20°C 14.8% であり、温度による違いは見られなかった。

P. limnetica WILD-11 株は 10、15°C においても増殖するが、*P. subfoetida* WILD-6 に比べて増殖が遅れる傾向が見られた(図5)。15°C において 3 本のうち 1 本が生育しなかったため、2 本の平均値を示している。温度間で最大増殖量に大きな違いは見られなかった。2-MIB 総濃度の最大値は 15°C で最も大きく 297000ng/L であった(図6)。10°C においても 242000ng/L 程度であり、WILD-6 でみられたような 10°C における抑制は見られなかった。10°C において *P. subfoetida* WILD-6 と *P. limnetica* WILD-11 の間に大きな差がみられたが、15°C およ

び 20°Cにおいても、*P. limnetica* WILD-11 のほうが 2-MIB 総濃度が高い傾向であった。定常期における糸状体当たりの 2-MIB 含有量は 10°C 0.0037ng/mm、15°C 0.0045ng/mm、20°C 0.0039ng/mm と温度による違いは見られなかった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は 10°C 16.3%、15°C 11.3%、20°C 31.6%であり 20°Cで高いことが明らかとなった。近年、水温が 10°C程度の、低温の条件下においても 2-MIB の発生がみられることが報告されている。芹川ダムにおいて水温が 10°C以下となっても *Phormidium tenue* (*Pseudanabaena* 属)が生息し、2-MIB が検出されることが報告されている³⁾。田中らは、カビ臭発生事例と気象要因の関係性について検討を行い、高滝ダムにおける 10°C以下の 2-MIB 発生は *Phormidium* 属 (*Pseudanabaena* 属) が原因であると報告している⁴⁾。本培養実験において 10°Cにおいても増殖が可能であることが明らかとなったが、低水温における *Pseudanabaena* 属による 2-MIB の発生を裏付ける結果となった。

次に実際の富栄養化した湖沼を想定して窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて検討を行った。なお、通常の CT 培地の窒素濃度は、31.7mg/L である。また、10°Cにおいて、*P. subfoetida* WILD-6 と *P. limnetica* WILD-11 の 2-MIB 産生に違いがみられたことから、10°Cおよび 20°Cで検討を行った。10°C、窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地において増殖の傾きに差は見られるものの、4 株すべて増殖が見られ、21 日以降定常期となった (図 7)。株間で 0 日目における糸状体数が異なるのは、接種に伴う窒素の持ち込みを減らすため接種量を調整したためである。最大増殖量に大きな違いは見られなかった。2-MIB 総濃度は *P. limnetica* WILD-11 において著しく高く推移した (図 8)。2-MIB 総濃度の最大値は *P. subfoetida* WILD-6 4100ng/L、*P. limnetica* WILD-11 3400ng/L、*P. yagii* WILD-56 1000ng/L、*P. subfoetida* WILD-62 340ng/L であり、*P. limnetica* WILD-11 が最も高く、次いで *P. yagii* WILD-56 が高かった。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 では低く、*P. subfoetida* WILD-62 は *P. limnetica* WILD-11 の 10 分の 1 であった。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 0.00061ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.0039ng/mm、*P. yagii* WILD-56 0.0011ng/mm、*P. subfoetida* WILD-62 0.00045ng/mm となり、最大値の大きい順に、含有量も大きいことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は *P. subfoetida* WILD-6 21.4%、*P. limnetica* WILD-11 12.3%、*P. yagii* WILD-56 25.8%、*P. subfoetida* WILD-62 28.5%であった。

20°Cにおいて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 9)。*P. subfoetida* WILD-62 株と *P. cinerea* B-6 株は 14 日以降定常期となった。2-MIB 総濃度の最大値は、*P. limnetica* WILD-11 が最も高く、次いで *P. cinerea* B-6 株であった (図 10)。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は *P. limnetica* WILD-11 と比べると低い傾向であった。溶存態 2-MIB 濃度の最大

値は、*P. limnetica* WILD-11 が他の株の 2 倍程度大きいことが明らかとなった。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 0.0006ng/mm、*P. limnetica* WILD-11 0.002ng/mm、*P. foetida* WILD-62 0.0006ng/mm、*P. cinerea* B-6 0.0008ng/mm となり、*P. limnetica* WILD-11 で最も大きいことが明らかとなった。定常期における総濃度に占める溶存態の割合は *P. subfoetida* WILD-6 24%、*P. limnetica* WILD-11 35.4%、*P. subfoetida* WILD-62 45%、*P. cinerea* B-6 35.8%であり、10°Cに比べて高い傾向であった。

窒素濃度を 1mg/L に制限した培地を用いて 10°C、20°Cで培養した時の最大増殖量、2-MIB 総濃度の最大値、定常期の 2-MIB 含有量をまとめた (表 1)。2-MIB 総濃度の最大値について一元配置分散分析を行ったところ、20°Cでは株間で有意な差はみられなかったが、10°Cにおいて *P. limnetica* WILD-11 とその他の株の間に有意差がみられた ($p<0.05$)。 *P. yagii* WILD-56 と *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 の間にも有意差がみられた。

t-検定により、2-MIB 最大値について温度間の有意差について検討を行ったところ、*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11、*P. subfoetida* WILD-62 いずれにおいても有意差がみられたが ($p<0.05$)、*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は 20°Cにおいて高いに対して、*P. limnetica* WILD-11 は 10°Cにおいて高い。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 は最大増殖量が 20°Cのほうが 10°Cに比較して 1.8 倍大きく、2-MIB 総濃度の最大値は 20°Cのほうがそれぞれ、2.3 倍、3.2 倍大きくくなっている。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 については、20°Cにおいて増殖量の増加に伴い 2-MIB 濃度も高まると考えられた。

定常期における 2-MIB 含有量は 10°C、20°Cにおいて *P. limnetica* WILD-11 が大きいことが明らかとなった。*P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 については定常期における 2-MIB 含有量に温度による違いはみられない。通常の CT 培地では *P. subfoetida* WILD-6 は 10°Cにおいて 2-MIB 産生が抑制される傾向が見られたが、1mg/L に窒素を制限した系では含有量に違いはみられず、そのような傾向は見られなかった。*P. limnetica* WILD-11 は 10°Cにおいて 20°Cの約 2 倍に高まっている。このことから *P. limnetica* WILD-11 は他の株に比べて 2-MIB 産生能力が高いが、特に 10°C、窒素 1mg/L の条件において 2-MIB 産生が促進されることが明らかとなった。Shen ら⁵⁾は *P. foetida* var. *intermedia* NIES-512 について 15°C、25°C、35°C で培養を行い、2-MIB 産生量や 2-MIB 合成酵素遺伝子の発現量について検討を行っている。その結果 2-MIB 総濃度は 15°Cで最も低いことを報告している。*P. foetida* var. *intermedia* NIES-512 と系統樹で同じ位置に位置づけられる *P. subfoetida* WILD-62 は 20°Cに比べて 10°Cで 2-MIB 総濃度の最大値が低いことから一致する傾向にあると考えられる。Shen らはこの論文の中で 2-MIB 合成酵素遺伝子発現量は 15°Cで最も高いことを報告している。一方 Kakimoto ら⁶⁾は、Shen らと同様の株を用いて、20°Cで培養したものを、4°Cもしくは

は 30°C の条件に移し、発現解析を行った。2-MIB 合成酵素遺伝子の発現レベルは 30°C、20°C、4°C の順に、温度が高いほど大きいことを報告している。実験条件が異なるものの相反する結果となり、発現量の温度依存性についてはさらなる検討が必要と考えられるが、*P. limnetica* WILD-11 のような低温で産生能力が高い株についても検討を行う必要があると考えられる。10°C において *P. yagii* WILD-56 は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 に比べて 2-MIB 産生能力が高いことが明らかとなったが、*P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56 は 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において C に位置づけられることから (図 2)、この系統に属する *Pseudanabaena* 属は低温下における 2-MIB 産生能力が高い可能性がある。

2) 河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の分子系統解析

16S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹(約 1290 塩基)において、本研究に用いた 2-MIB 産生株とジェオスミン産生株の多くの株は同じ系統に位置づけられた。次に 16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域に基づいて系統樹を作成したところ、2-MIB を産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株はそれぞれ異なる系統に分かれて位置づけられた(図 11)。本研究で解析した 2-MIB 産生株は 3 系統、ジェオスミン産生株は 3 系統、カビ臭原因物質非産生株は 2 系統に分かれることが明らかとなった。このことからこの領域を解析することでカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できることが示唆された。

3) 分子生物学的手法による河床付着物中の *Microcoleus* 属のカビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定

採取した河床付着物のカビ臭原因物質濃度を表 2 に示す。A 川の S13 において 2-MIB が高濃度であった。B 川では Y1 においてジェオスミン、2-MIB とともに高濃度であった。A 川について塩基配列の解析を行ったところ、4 地点 8 試料で合計 43 OTUs が得られた。さらに相同性が 99% 以上のものを同一の OTU とすると 23 OTUs (D2021_1~D2021_23) が得られた。これを元に系統樹を作成したところ、D2021_19 と D2021_3 は 2-MIB 産生株、D2021_1 と D2021_14 はジェオスミン産生株、D2021_7 と D2021_8 は非産生株のクラスターに位置づけられた(図 12)。これらの OTU は A 川から単離された株(B-1, WILD-109, WILD-105, WILD-106, WILD-110, WILD-104, WILD-108, B-3) と同じ位置に位置づけられた。各 OTU がどの試料において検出されているのか表 3 にまとめた。A 川下流 (S13, S14) においては非産生のクローン数が多いが、S13 からのみ検出された D2021_19 が 2-MIB 産生株と同位置に位置づけられていることからこの OTU が S13 の高濃度の 2-MIB に寄与していると考えられる。上流、中流においては共通した OTU が検出されたが、最上流で採取された試料(S7, S8)は地点間の距離が 50m 程度であっても共通した OTU は検出されなかった。最上流から中流にかけて D2021_1、D2021_3 がクローン数が多く検出され、それぞれジェオスミン、2-MIB の発生に寄与していると考えられた。

B 川について塩基配列の解析を行ったところ、4 地点 4 試料で合計 29 OTUs が得られた。さらに相同性が 99% 以上のものを同一の OTU とすると 17 OTUs (Y2022_1~Y2022_17) が得られた。これを元に系統樹を作成したところ、D2022_3 と D2022_5 は 2-MIB 産生株、Y2022_1、Y2022_8、Y2022_11 はジェオスミン産生株のクラスターに位置づけられた(図 13)。これらの OTU は B 川から単離された株 (WILD-102, WILD-113, WILD-81, B-19) と同じ位置に位置づけられた。各 OTU がどの試料において検出されているのか表 4 にまとめた。Y2022_3 は全試料から検出され B 川の 2-MIB 発生に寄与していると考えられる。また、Y2022_8 は Y1(下流)からクローン数が多く検出されていることからこの OTU が高濃度のジェオスミンに寄与していると考えられる。A 川と B 川から検出された OTU をまとめて系統樹を作成したところ、30 OTUs が同じ位置に位置づけられた。共通して検出された OTU はいずれも A 川最上流部、上流部でクローン数が多く検出されている OTU であった。

以上の結果から、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭産生に関する表現形質の推定が困難な OTU や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなり、*Microcoleus* 属の多様性を示唆する結果となった。

4) *Microcoleus autumnalis* の分子系統とカビ臭原因物質産生能の比較

2-MIB 産生株について、培養 28 日目、培養液 10mL 中の 2-MIB 総量は *M. autumnalis* WILD-102、*M. autumnalis* WILD-109 で 100ng 程度であったが、*M. autumnalis* B-1 では 64 ng と低かった (図 14)。また溶存態の比率は *M. autumnalis* WILD-102、*M. autumnalis* WILD-109、*M. autumnalis* B-1 で 30~40% 程度であったが、*M. autumnalis* WILD-105 で 13% と低いことが明らかとなった。2-MIB 総量に株間での違いはみられるが、系統間での違いはみられなかった。ジェオスミン産生株について、培養液 10mL 中のジェオスミン総量は同系統に位置づけられる *M. autumnalis* WILD-106 と *M. autumnalis* WILD-110 は 10~20ng 程度であったのに対し、*M. autumnalis* WILD-104 は 55ng と高く、系統によって産生能力が異なることが示唆された (図 15)。また溶存態の比率は 3~15% であり、2-MIB 産生株に比べて低い傾向であった。

5) *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響

M. autumnalis WILD-54 は 20°C から 30°C において増殖を示した (図 16)。特に、より高い温度で増殖速度が大きい傾向が見られた。硝酸性窒素もそれに応じて 30°C において最も減少が速いことが明らかとなった (図 17)。2-MIB 総量は温度に関係なく 14 日目で最大となった (図 18)。さらに 20°C~30°C において、温度が高まるにつれて溶存態 2-MIB 濃度が高まることが明らかとなった (図 19)。河床付着性藍藻類の産生する 2-MIB のうち、浄水場で問題になるのは溶存態のものであるた

め、水温が高くなると浄水場におけるカビ臭被害がおこりやすくなる可能性が示唆された。*M. autumnalis* WILD-54 について 28 日目に 2-MIB 合成酵素遺伝子である *mtf* 遺伝子、*mic* 遺伝子の発現解析を行ったところ、20°Cにおいてコピー数が大きいことが明らかとなった。25°C、30°Cは死滅期に近づいていたため低い可能性があり、経時的に測定し、比較する必要性が示唆された。

M. autumnalis WILD-104 について培養を行ったところ 20°C、25°Cにおいて増殖を示したが、30°Cは Chl.a が定量下限以下であった (図 20)。硝酸性窒素の減少は温度が 25°Cのときに最も速いことが明らかとなった (図 21)。Chl.a が定量下限以下の 30°Cでも減少がみられたが、増殖した細胞がすぐ死滅していることが考えられた。ジェオスミン総量は 20°C、25°Cにおいて 21 日目で最大となった (図 22)。30°Cではジェオスミンの増加がみられなかった。ジェオスミン溶存態濃度の経時的変化に関して、20°Cに比べて 25°Cのほうが高く、28 日目に最大となった (図 23)。

単離株によって生育可能な温度範囲が異なることが明らかとなり、このような特性の違いが地点間での生物相の違いの一つの要因と考えられた。

E. 結論

カビ臭原因物質産生藻類の分子系統の違いとカビ臭原因物質産生能、増殖、カビ臭原因物質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。藍藻類 *Pseudanabaena* 属の単離株の分子系統解析と 2-MIB 産生能について検討を行ったところ、16S rRNA 遺伝子の系統樹において、*Pseudanabaena* 属はI~Vの5系統に分かれ、形態による分類と 16S rRNA 遺伝子の解析結果の間に整合性が見られた。2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において *Pseudanabaena* 属の単離株は、それぞれ *P. yagii* NIVA-CYA 111、*Pseudanabaena* sp. dqh15、*P. limnetica* str Castaic Lake を含む 3 系統 (A~C) に位置づけられた。*P. subfoetida* WILD-6、*P. limnetica* WILD-11 は 10、15°C、20°Cにおいて増殖し、低水温における *Pseudanabaena* 属による 2-MIB の発生を裏付ける結果となった。窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地を用いて 10°Cで培養を行ったところ 2-MIB 総濃度は *P. limnetica* WILD-11 において他の株に比べて著しく高く推移した。*P. limnetica* WILD-11 は他の株に比べて 2-MIB 産生能力が高いが、特に 10°C、窒素 1mg/L の条件において 2-MIB 産生が促進されることが明らかとなった。10°Cにおいて *P. yagii* WILD-56 は *P. subfoetida* WILD-6、*P. subfoetida* WILD-62 に比べて 2-MIB 産生能力が高く 2-MIB 合成酵素遺伝子の系統樹において C に位置づけられる *P. limnetica* WILD-11、*P. yagii* WILD-56 は低水温における 2-MIB 産生能力が高いことが示唆された。

河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の単離株は 16S rRNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域の系統樹において、2-MIB を産生する株、ジェオスミンを産生する株、カビ臭原因物質非産生株が分かれて位置づけられることが明らかとなった。

A 川と B 川において分子生物学的手法により河

床付着物中の *Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域を解析し生物相を評価したところ、上流から下流といった採取地点の違いや、地点内における採取場所の違いによって *Microcoleus* 属の生物相が異なることが明らかとなった。さらに系統樹において、単離株と近い系統ではあるが、カビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定が困難な OTU や単離株が存在しない系統の OTU の存在が明らかとなった。

M. autumnalis の 2-MIB 産生株については株間で産生能力の違いが見られたが、分子系統による産生能力の違いは見られなかった。一方ジェオスミン産生株については分子系統によって産生能力が異なることが示唆された。*M. autumnalis* の単離株の中には 20~30°Cの間で増殖が可能な株、30°Cにおいて増殖が抑制される株が存在することが明らかとなった。2-MIB 産生株である *M. autumnalis* WILD-54 は 20°C~30°Cにおいて、温度が高まるにつれて溶存態 2-MIB 濃度が高まり、浄水場における *M. autumnalis* によるカビ臭リスクに温度が影響することが示唆された。

以上の結果から *Pseudanabaena* 属に関しては分子系統によってカビ臭原因物質の産生能が異なることが示唆された。10°Cにおいて 2-MIB 産生能力が高まる株の存在が明らかとなり、その系統の *Pseudanabaena* 属が存在する水域では、水温が 2-MIB 濃度に影響する可能性があり、*Pseudanabaena* 属の存在量を注意深く監視する必要があると考えられた。*M. autumnalis* に関しては、30°Cにおいて溶存態 2-MIB が最も高まり、株によっては 30°Cにおいて増殖できないことが明らかとなり、気候変動に伴う温度上昇が、カビ臭被害を促進したり、*M. autumnalis* の生物相に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、株間、もしくは系統間で産生能力が異なることも示唆されている。カビ臭原因物質産生藻類の分子系統とカビ臭原因物質産生能、増殖・カビ臭原因物質産生に及ぼす温度の影響等について知見を集積した上で、このような系統による違い、水温といった環境条件による産生ポテンシャルの変化を踏まえた発生予測モデルの構築の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

浅田安廣, 藤本尚志, 江崎敦, 松本恭太, 山口晴代, 秋葉道宏. 水道水源で発生するカビ臭原因物質産生藍藻類の監視に向けたライブラリー構築. 京都大学環境衛生工学研究会第 44 回シンポジウム; 2022.7.29-30; 京都.

松本恭太, 浅田安廣, 藤本尚志, 秋葉道宏. 水道水源における複数種のカビ臭原因物質産生藍藻類の同定・定量手法の開発. 令和 4 年度全国会議 (水道研究発表会); 2022.10.19-21; 名古屋.

下川栞, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の分子系統解析およびカビ臭原因物質産生能の比較. 第 57 回日本水環境学会年会; 2023.3.15-17; 松山.

久保田雅也, 藤本尚志, 大西章博, 清水和哉, 浅田安廣, 秋葉道宏. 河床付着性藍藻類 *Microcoleus* 属の増殖およびカビ臭原因物質産生特性. 第 57 回日本水環境学会年会; 2022.3.15-17; 松山.

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) Niiyama, Y., Tuji, A.: *Microcoleus pseudautumnalis* sp. nov. (Cyanobacteria, Oscillatoriales) producing 2-methylisoborneol, *Bulletin of the National Museum of Nature and Science Series B*, 45 (3), 93-101 (2019).
- 2) Suurnäkki, S., Gomez-Saez, G. V., Rantala-Ylinen, A., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K.: Identification

of geosmin and 2-methylisoborneol in cyanobacteria and molecular detection methods for the producers of these compounds, *Water Research*, 68, 56-66 (2015).

3) 高橋 威一郎, 高瀬 勝教, 竹下 佳代子, 河野博幸, 馬見塚 守, 岐津 英明: 芹川ダムにおけるかび臭物質産生藍藻及び 2-メチルイソボルネオール の推移 についての評価, *水環境学会誌*, 39 (2), 51-62 (2016).

4) 田中宏憲, 浅田安廣, 下ヶ橋雅樹, 秋葉道宏: 藍藻類によるカビ臭発生と気象要因の関係性に関する全国事例解析, *用水と廃水*, 64 (2), 131-139 (2022).

5) 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, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 29(8), 12017-12026 (2022).

6) Kakimoto, M., Ishikawa, T., Miyagi, A., Saito, K., Miyazaki, M., Asaeda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M.: Culture temperature affects gene expression and metabolic pathways in the 2-methylisoborneol-producing cyanobacterium *Pseudanabaena galeata*, *Journal of Plant Physiology*, 171, 292-300 (2014).

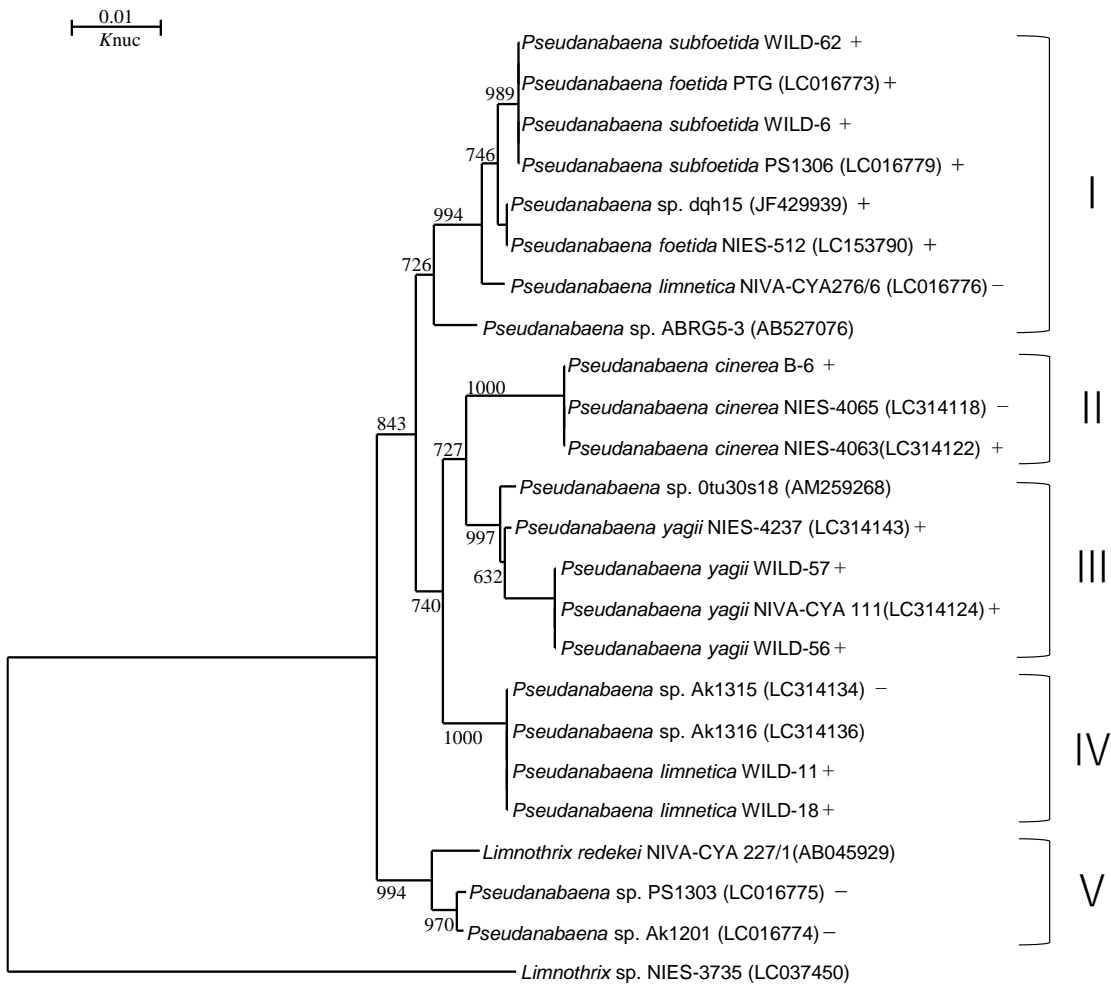


図1 *Pseudanabaena* 属の 16S rDNA 遺伝子に基づく系統樹
1245 塩基に基づいて作成、+は 2-MIB 産生株、-は 2-MIB 非産生株を示す。

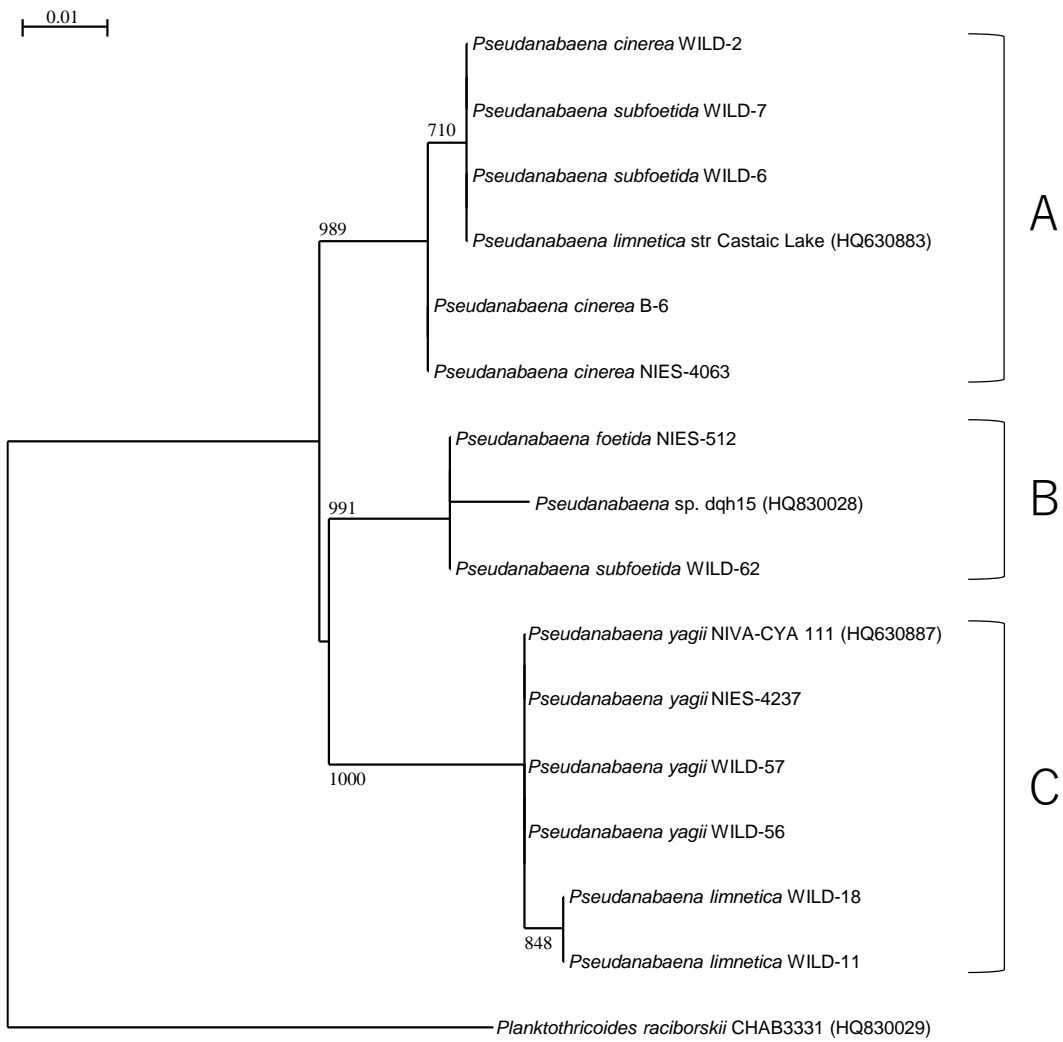


図2 2-MIB 合成酵素遺伝子 (monoterpene cyclase gene) のアミノ酸配列 (216 positions) に基づく系統樹 (バーはサイト当たりの置換数を示している)

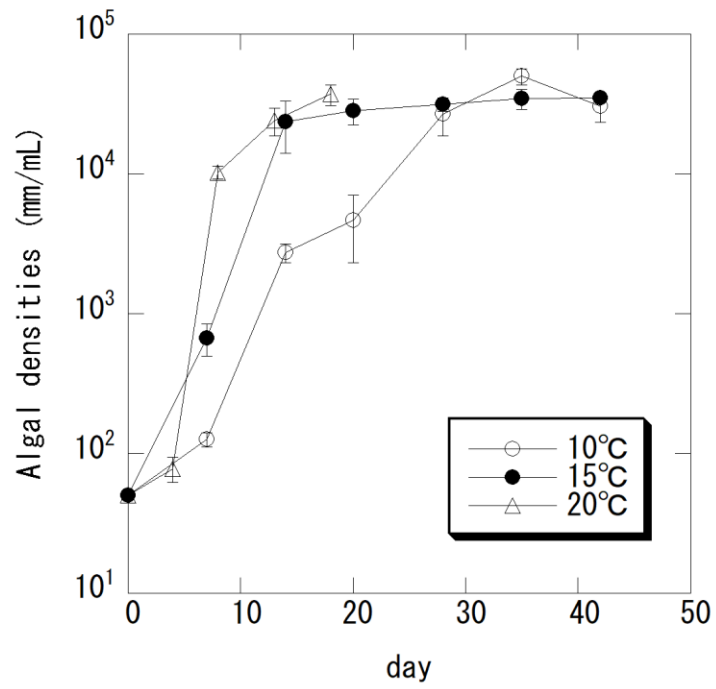


図3 *P. subfoetida* WILD-6 の増殖曲線 (CT 培地)

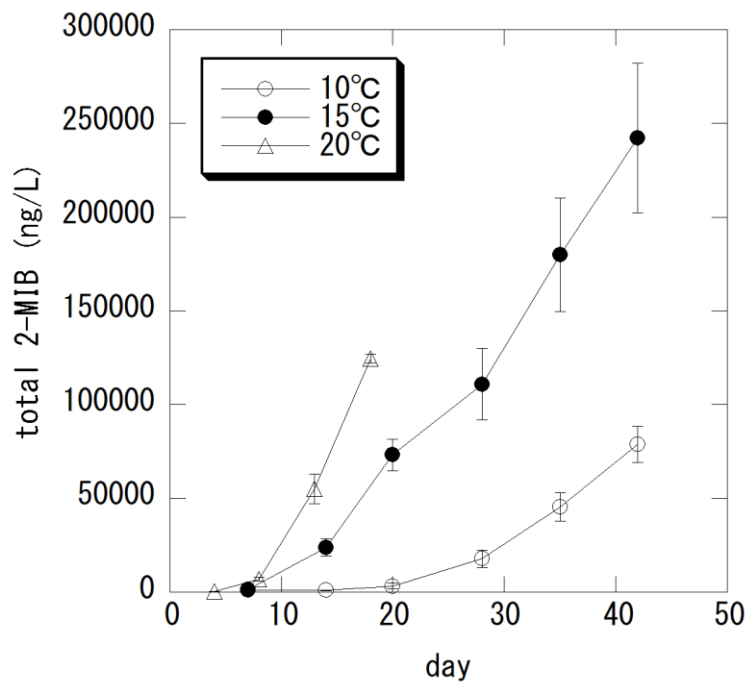


図4 *P. subfoetida* WILD-6 の増殖過程における2-MIB 総濃度の推移 (CT 培地)

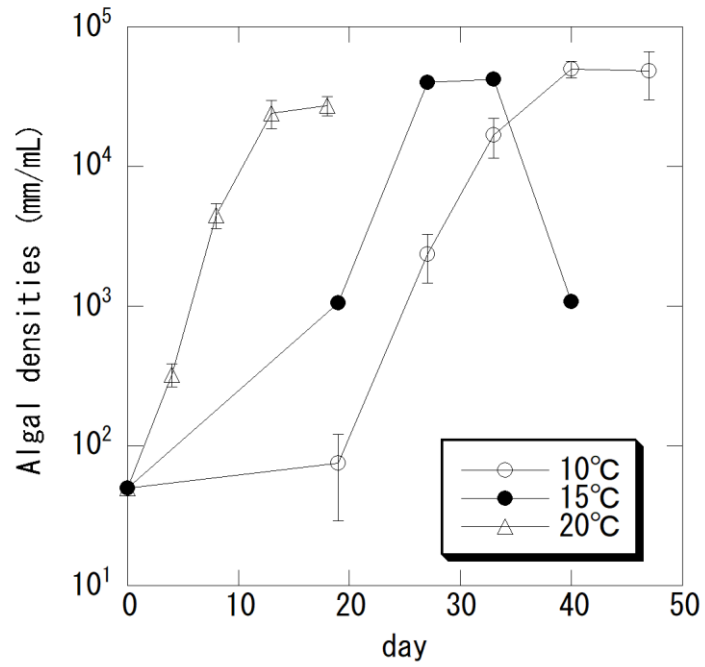


図5 *P. limnetica* WILD-11 の増殖曲線 (CT 培地)

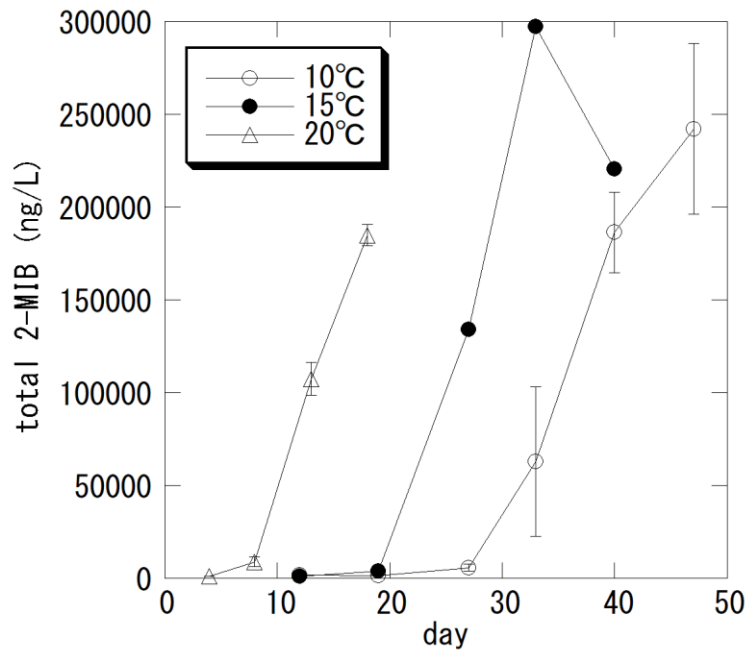


図6 *P. limnetica* WILD-11 の培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (CT 培地)

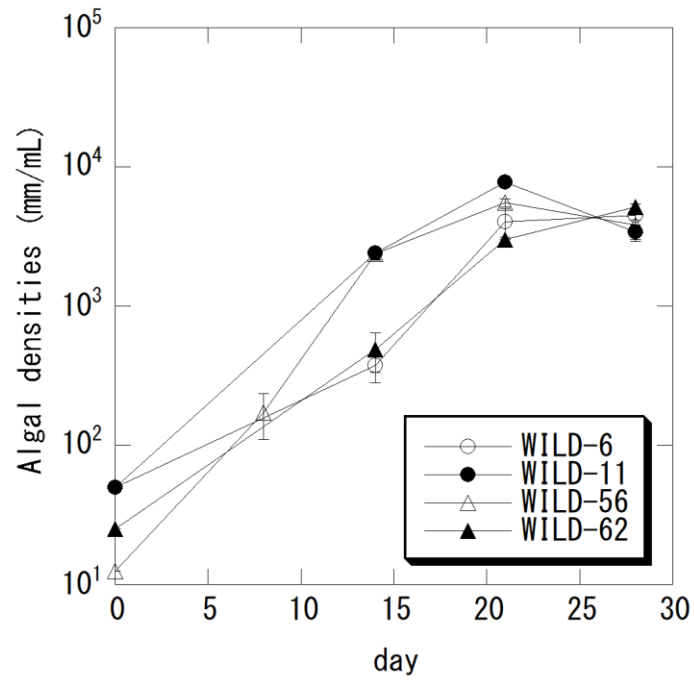


図7 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における増殖曲線 (10°C)

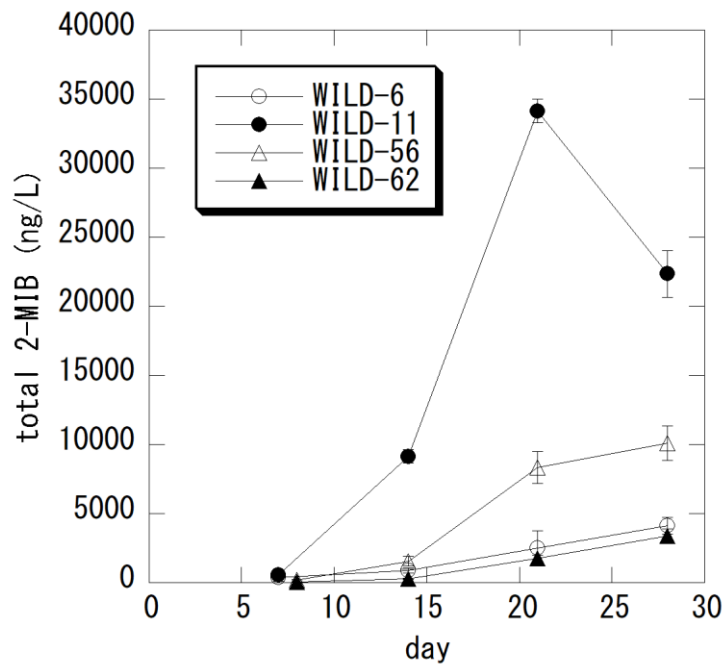


図8 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (10°C)

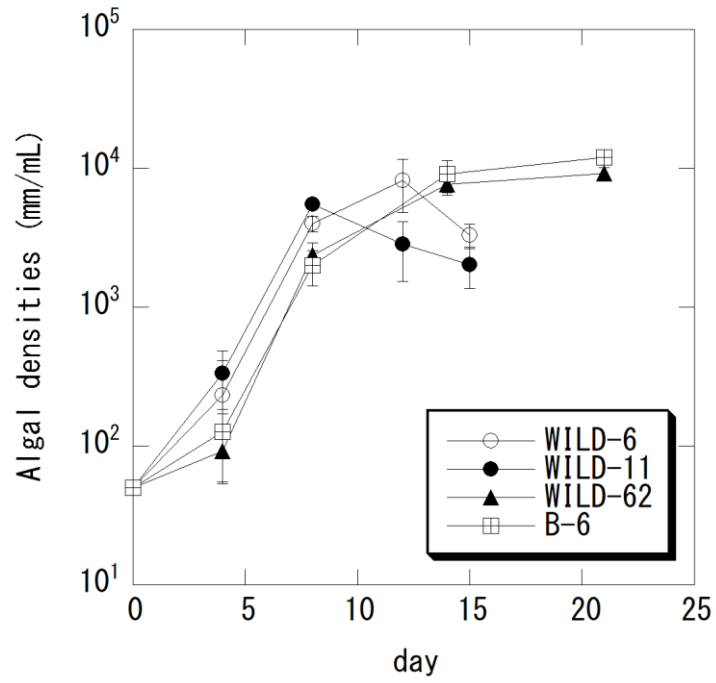


図9 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における増殖曲線 (20°C)

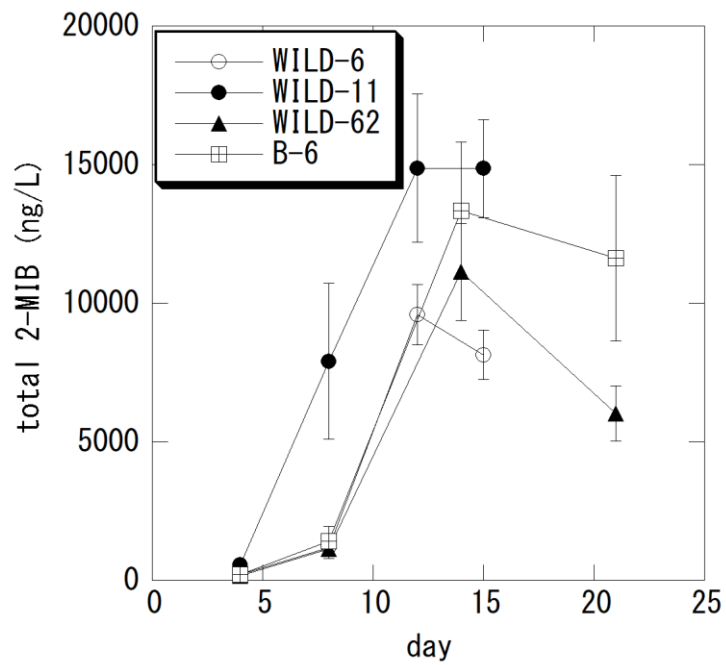


図10 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における培養過程における 2-MIB 総濃度の推移 (20°C)

表 1 窒素濃度を 1mg/L に制限した CT 培地における最大増殖量、2-MIB 総濃度の最大値、定常期の 2-MIB 含有量 (2-MIB 総濃度の最大値、異なる文字間で有意差 (p<0.05))

	最大増殖量(mm/mL)		2-MIB総濃度の最大値(ng/L)		定常期の2-MIB含有量(ng/mm)	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
<i>P. subfoetida</i> WILD-6	4500	8200	4100 ^c	9600	0.0006	0.0006
<i>P. limnetica</i> WILD-11	7800	5500	34000 ^a	15000	0.0039	0.002
<i>P. subfoetida</i> WILD-62	5200	9200	3400 ^c	11000	0.0005	0.0006
<i>P. yagii</i> WILD-56	5500	—	10000 ^b	—	0.0011	—
<i>P. cinerea</i> B-6	—	12000	—	13000	—	0.0008

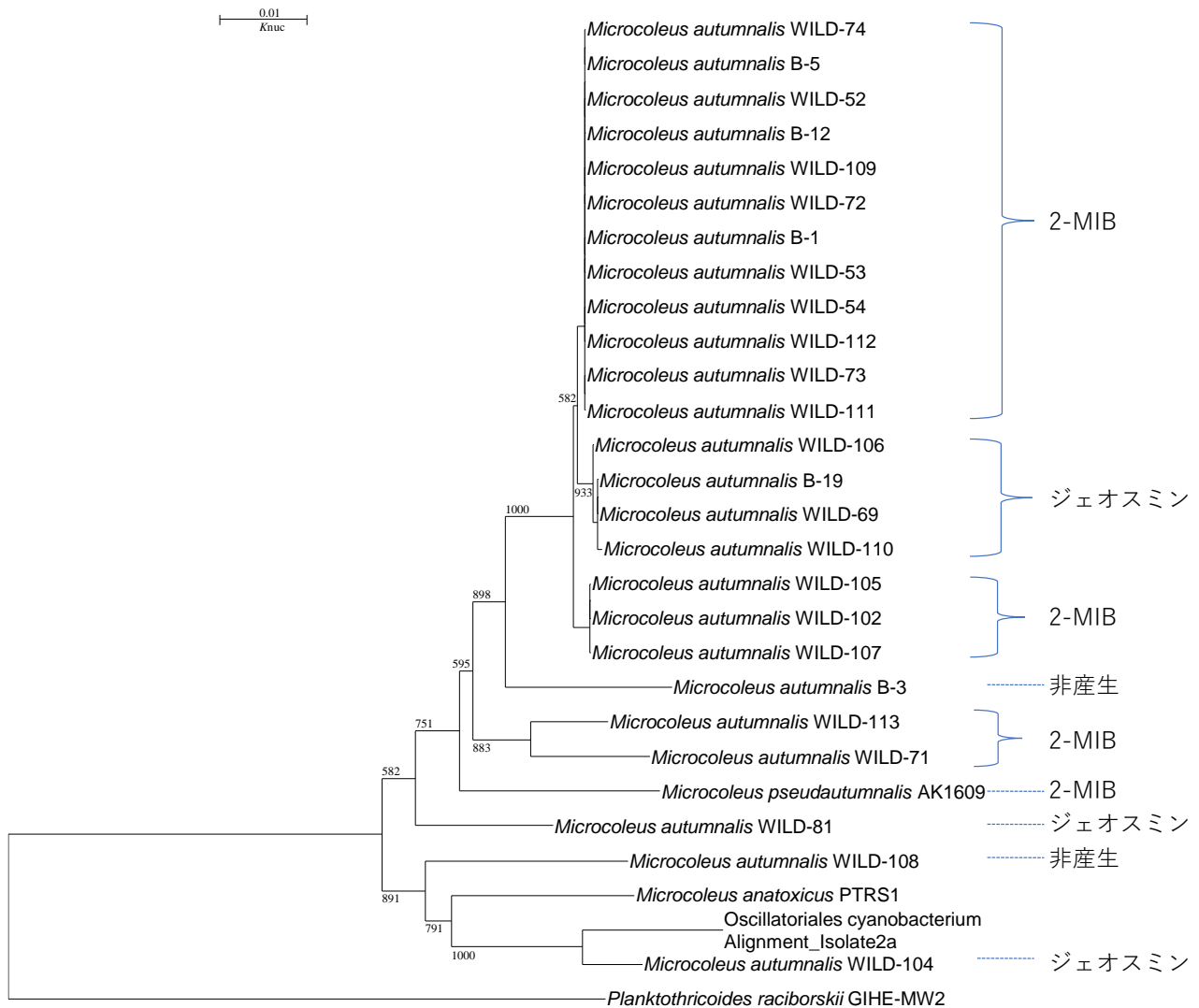


図 11 *Microcoleus* 属の 16S rDNA 遺伝子および 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹 約 1840 塩基に基づいて作成

表 2 河床付着物試料のカビ臭原因物質測定結果

*カビ臭濃度は、固形物を水と共にシェイクして水サンプル部分を測定

	サンプル番号	サンプル名	geosmin(ng/L)	2-MIB(ng/L)
A川	S7	最上流①	1.0	8.2
	S8	最上流②	78.8	215.4
	S9	上流①	26.5	309.2
	S10	上流②	35.7	141.3
	S11	中流①	3.0	13.2
	S12	中流②	36.1	443.9
	S13	下流①	14.8	7634.5
	S14	下流②	5.1	222.9
B川	Y1	下流	302.6	441.3
	Y2	中流 本流	17.5	62.3
	Y3	中流 支流	1.4	1.6
	Y4	上流	21.2	40.0

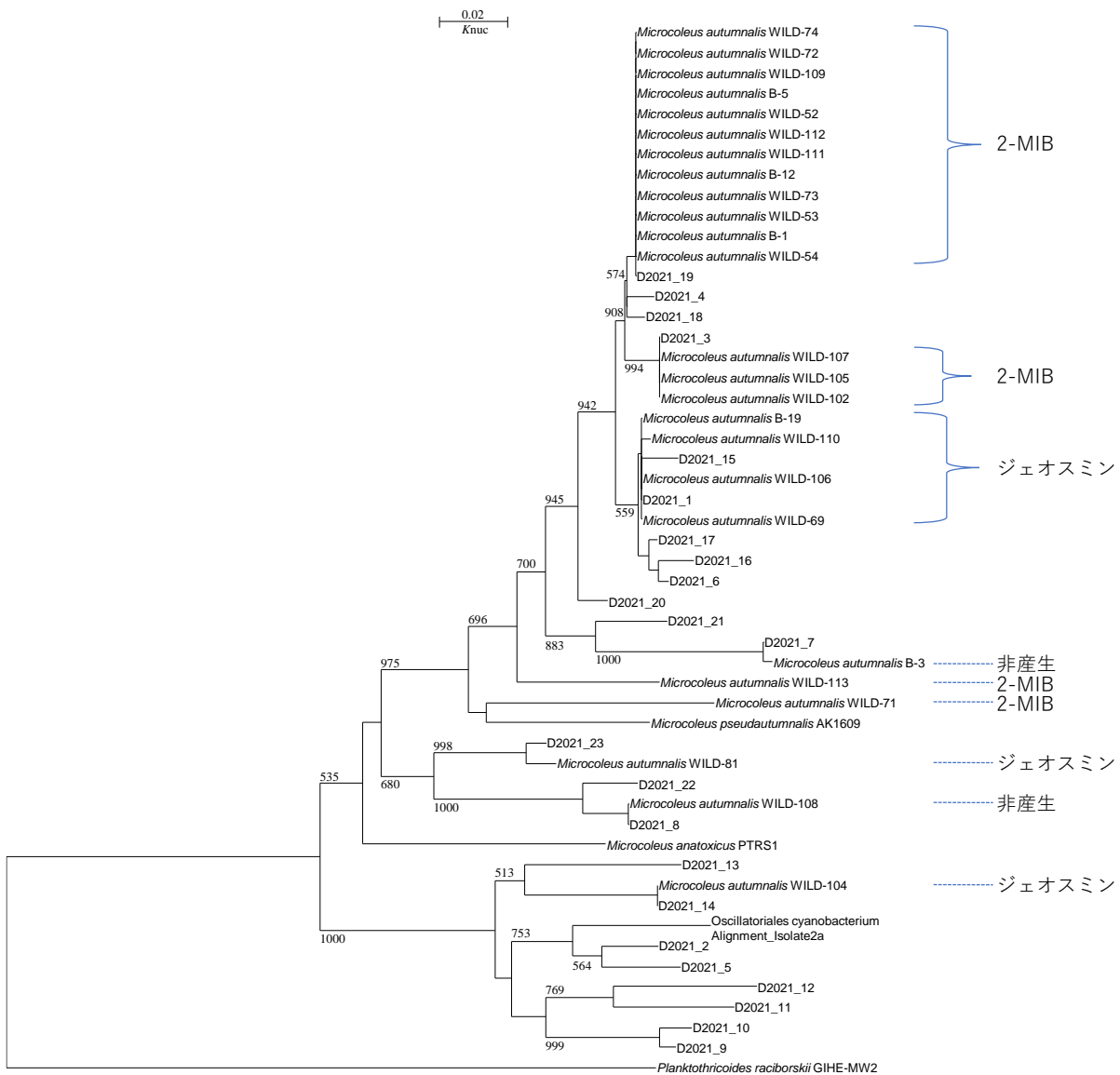


図 12 A 川から検出された OTU および *Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹 約 400 塩基に基づいて作成

表3 A川から検出されたOTUの分布

○：1～4クローン検出、◎：5クローン以上検出

－：単離株との塩基配列の相同性が99%未満でカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できなかった。

		最上流		上流		中流		下流	
		①	②	①	②	①	②	①	②
	カビ臭（推定）	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
D2021_1	geosmin	◎		◎	◎	◎	○		○
D2021_2	－					◎	○	○	○
D2021_3	2-MIB	◎		◎	◎	○			
D2021_4	－			○	○	○		○	
D2021_5	－			○		○	◎		
D2021_6	－	◎			○	○			
D2021_7	非産生							○	○
D2021_8	非産生							◎	◎
D2021_9	－		○						
D2021_10	－		○						
D2021_11	－		◎						
D2021_12	－		◎						
D2021_13	－		○						
D2021_14	geosmin		◎						
D2021_15	－				○				
D2021_16	－				○				
D2021_17	－	○							
D2021_18	－				○				
D2021_19	2-MIB							◎	
D2021_20	－		○						
D2021_21	－			○					
D2021_22	－							○	
D2021_23	－		○						

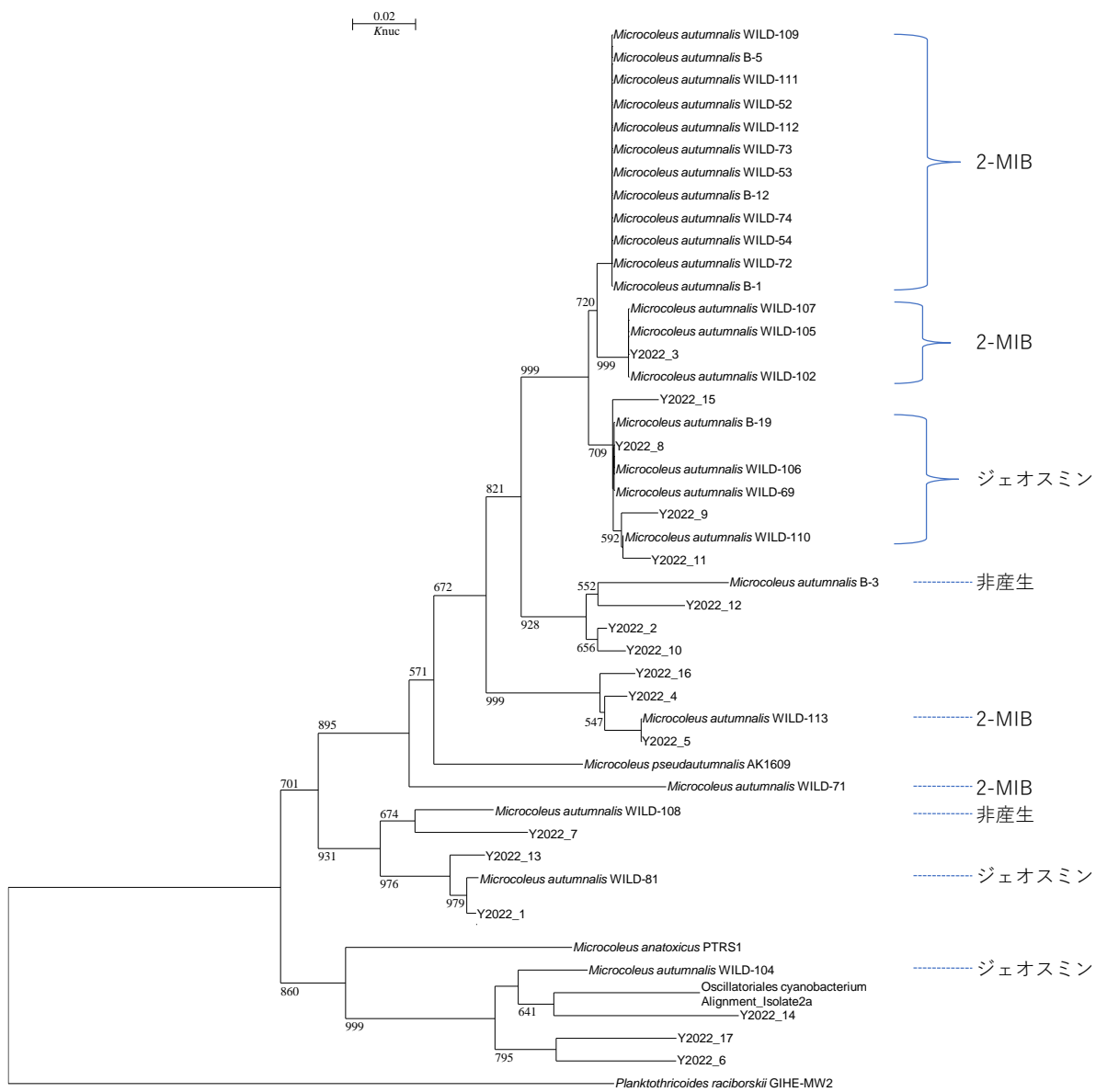


図 13 B 川から検出された OTU および *Microcoleus* 属の 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹
約 350 塩基に基づいて作成

表4 B川から検出された OTU の分布

○ : 1~4 クローン検出、◎ : 5 クローン以上検出

— : 単離株との塩基配列の相同性が 99%未満でカビ臭原因物質産生に関する表現形質を推定できなかった。

	カビ臭 (推定)	下流	中流(本流)	中流(支流)	上流
		Y1	Y2	Y3	Y4
Y2022_1	geosmin		○	◎	○
Y2022_2	—		◎	○	○
Y2022_3	2-MIB	○	◎	○	○
Y2022_4	—			○	○
Y2022_5	2-MIB			○	○
Y2022_6	—	○	◎		
Y2022_7	—	○			
Y2022_8	geosmin	◎			
Y2022_9	—				○
Y2022_10	—				○
Y2022_11	geosmin		○		
Y2022_12	—		○		○
Y2022_13	—			○	○
Y2022_14	—			○	
Y2022_15	—				○
Y2022_16	—				○
Y2022_17	—				○

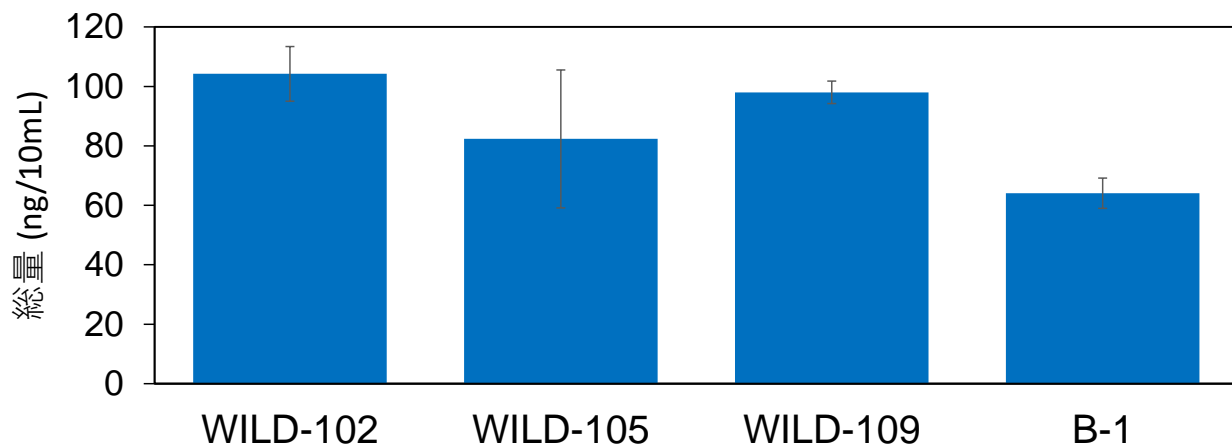


図 14 *M. autumnalis* の各株の 2-MIB 産生能の評価
 WILD-102 と WILD-105、WILD-109 と B-1 は 16S rRNA 遺伝子及び 16S-23S ITS 領域
 に基づく系統樹において同系統

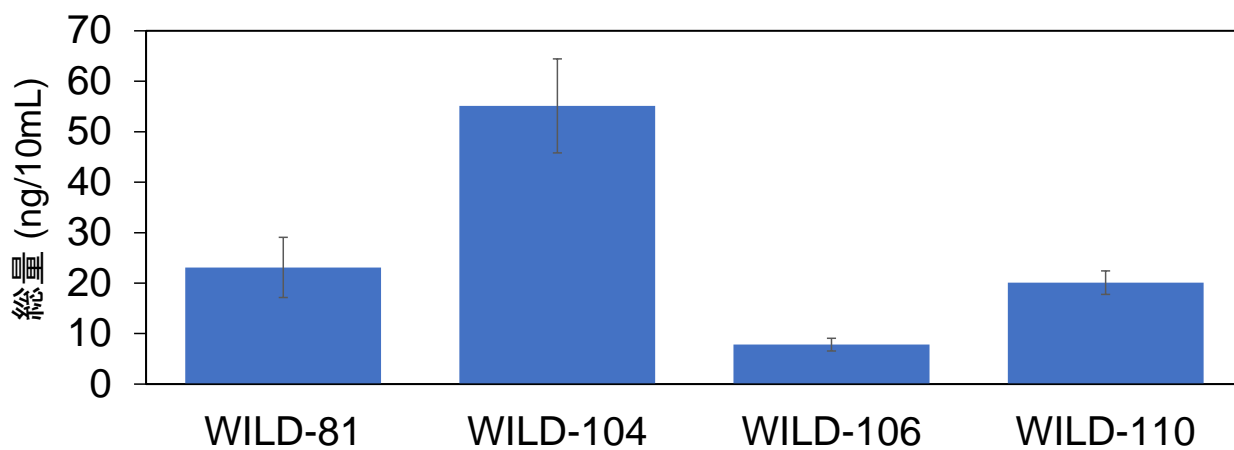


図 15 *M. autumnalis* の各株のジェオスミン産生能の評価
 WILD-106 と WILD-110 は 16S rRNA 遺伝子及び 16S-23S ITS 領域に基づく系統樹
 において同系統

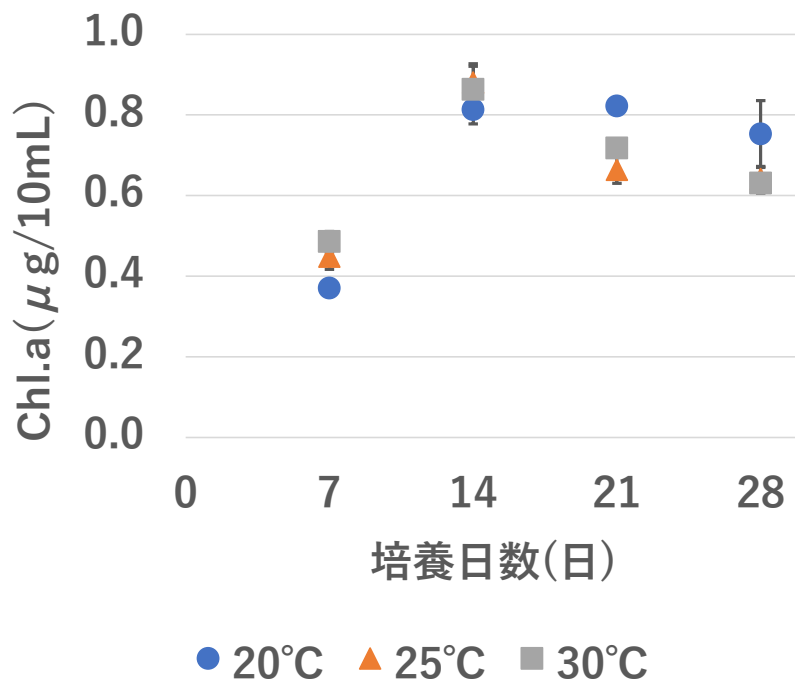


図 16 *M. autumnalis* WILD-54 の増殖に及ぼす温度の影響

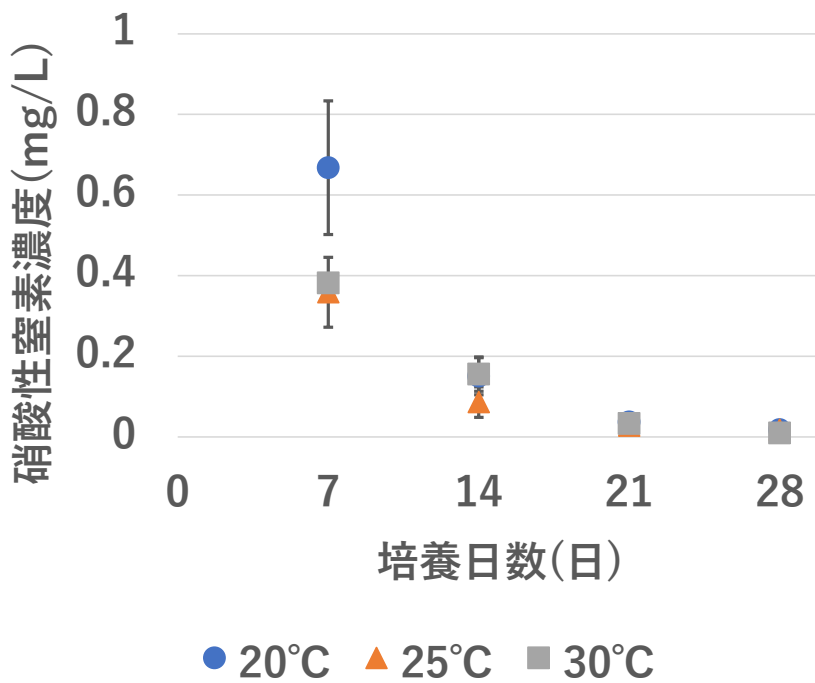


図 17 *M. autumnalis* WILD-54 の増殖過程における硝酸性窒素濃度の変化

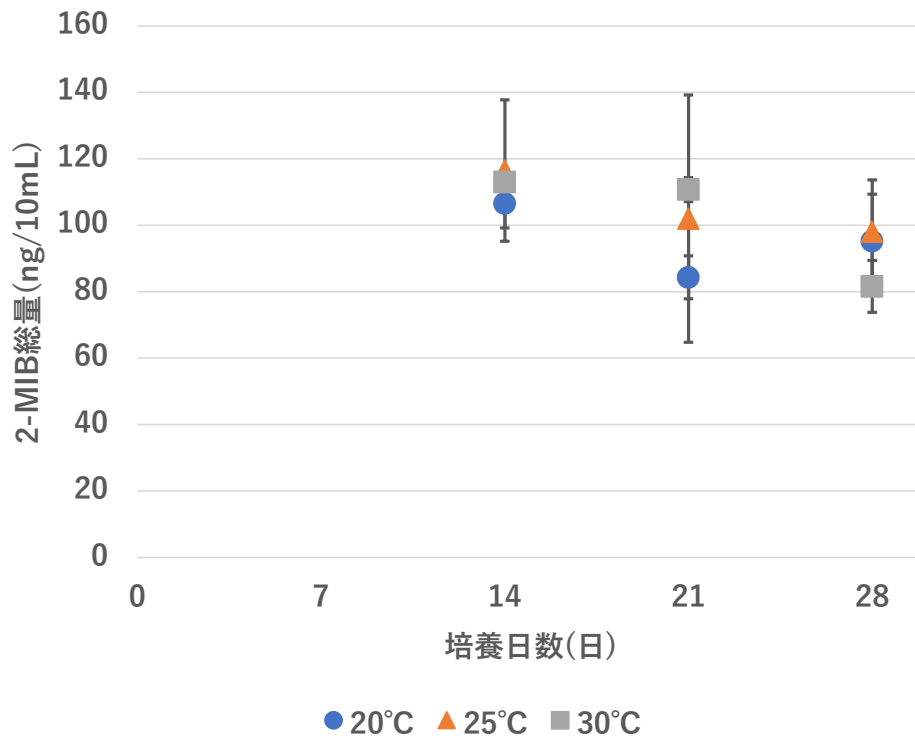


図 18 *M. autumnalis* WILD-54 の各温度の増殖過程における 2-MIB 総量の変化

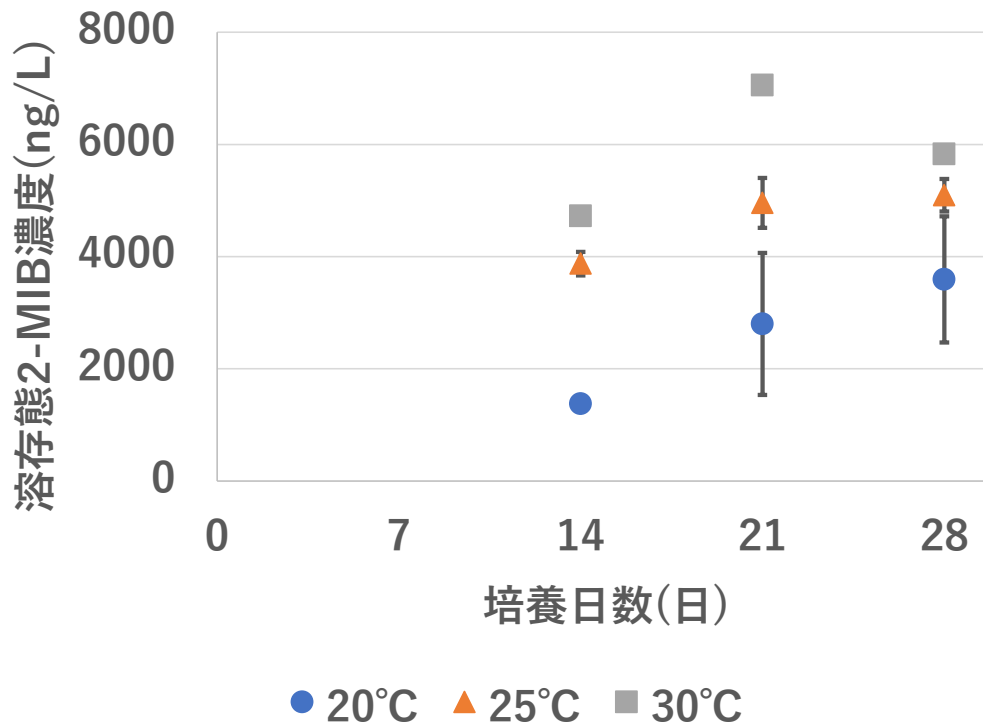


図 19 *M. autumnalis* WILD-54 の各温度の増殖過程における溶解態 2-MIB 濃度の変化

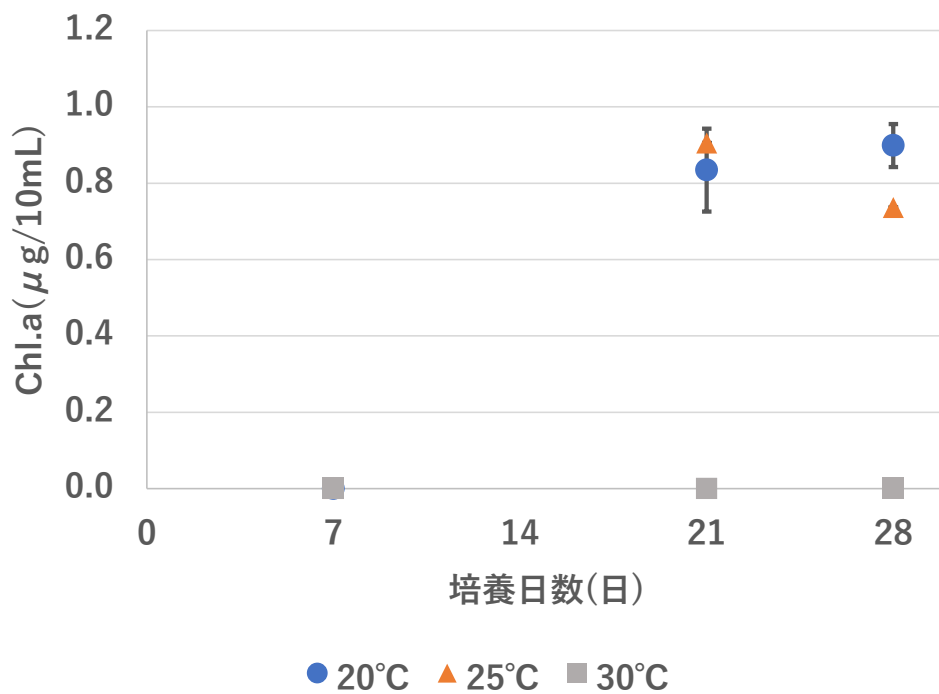


図 20 *M. autumnalis* WILD-104 の増殖に及ぼす温度の影響

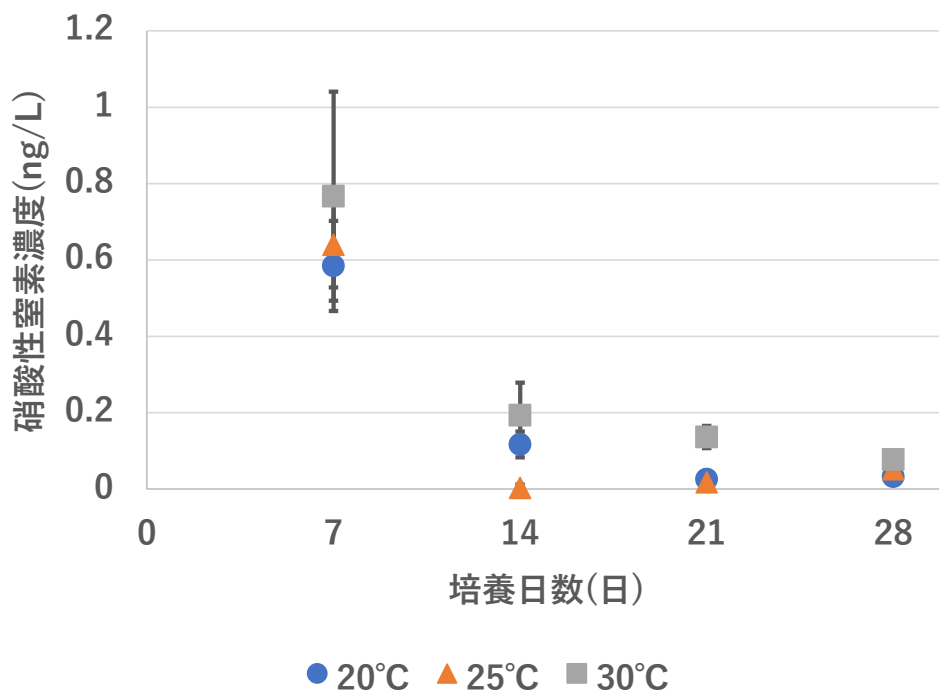


図 21 *M. autumnalis* WILD-104 の増殖過程における硝酸性窒素濃度の変化

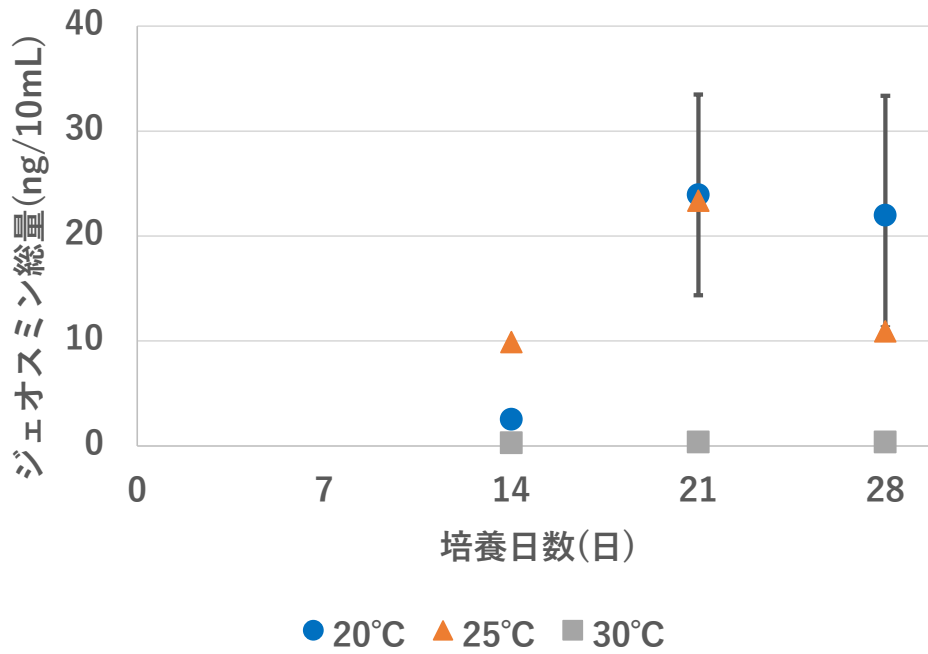


図 22 *M. autumnalis* WILD-104 の各温度の増殖過程におけるジェオスミン総量の変化

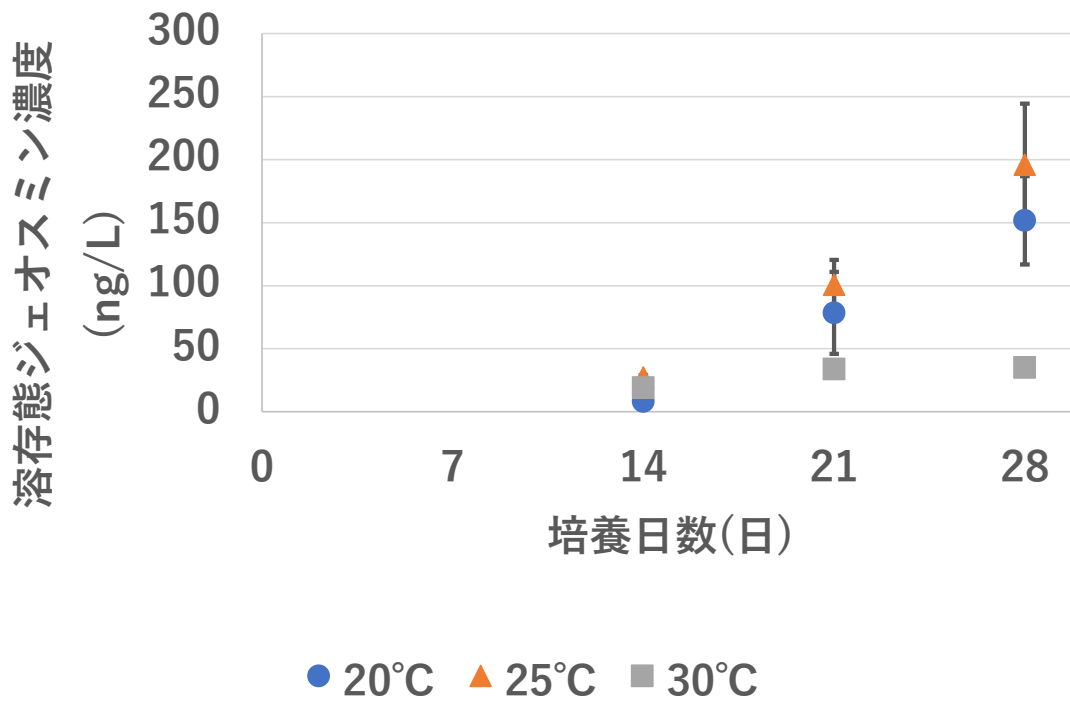


図 23 *M. autumnalis* WILD-104 の各温度の増殖過程における溶存態ジェオスミン濃度の変化

