

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	浅田 安廣
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

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	特任研究官
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
研究分担者	清水 和哉	東洋大学	生命科学部	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

研究要旨

気候変動により生じうる環境条件下（光条件（光強度、日長）、共存微生物）や水の硬度に関連するとともにカビ臭原因物質合成酵素に必要とされる Mg^{2+} 濃度に着目して、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖ポテンシャルとカビ臭物質産物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た研究を実施した。この結果、10 mg- Mg^{2+} /L において、細胞密度、Chl. a、総ジェオスミン/総 2-MIB 濃度が最大となった。一方、過剰な Mg^{2+} (50 mg/L) は細胞増殖を抑制し、細胞密度と Chl-a 含有量は 10 mg- Mg^{2+} /L よりも低かった。さらに、*geoA*、*mtf*、*mtc* 遺伝子の発現量は 0 mg- Mg^{2+} /L で最も低く、過剰条件 (50 mg- Mg^{2+} /L) 条件では 10 mg- Mg^{2+} /L と比較して遺伝子発現を促進した。カビ臭原因物質産生藍藻類の同属・同種で、分離源が異なる場合、環境因子への応答は異なり、とくに、光強度と総 2-MIB 産生量は負の関係性が見られる場合や、2-MIB の細胞内外の局在が異なっていた。実際の水環境において藍藻類と共存する微生物（夏期と冬期）がカビ臭原因物質産生藍藻類 *Dolichospermum smithii* NIES-824 に与える影響を解析した。その結果、藍藻類群集構造とジェオスミン産生は、異なる微生物群によって変化した。冬期の微生物群集が夏期の微生物群集よりも *D. smithii* が増殖したが、培養の後期には明らかに他の藍藻類が優占となった。日長の長短は、*D. smithii* の増殖や *geoA* 遺伝子発現量、溶存有機物濃度 (DOC) 産生に影響を与えた。日長が長い (16 h) 場合は、増殖が早く、*geoA* 遺伝子発現量は培養初期に最大を示し、また DOC も多く産生した。日長が短い (9 h) 場合は、増殖とともに *geoA* 遺伝子発現量も増加していったが、DOC 産生量は低かった。

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、とくにカビ臭原因物質は、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。カビ臭原因物質が、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。近年のカビ臭原因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、カビ臭原因物質産生放線菌¹⁾や藍藻類²⁾の定量手法(早期検出技術に応用可能)が構築された。一方、カビ臭発生にいたる際

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、水温や光強度といった環境条件が変化し、またその変化に伴って共存微生物群集が変化することが予想される。それら条件の変化が、カビ臭原因物質藍藻類の個体群数の挙動やそのカビ臭原因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ものと予測されている。カビ臭原因物質ジェオスミンや 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) の合成経路について、カビ臭原因物質産生の藍藻類と放線菌のそれぞれで解析が進み、生合成に関与する酵素遺伝子群が明らかとなっている^{3,4,5)}。このジェオスミンや 2-MIB 合成酵素 Mg^{2+} が重要であることが明らかにされている^{5,6)}。また、 Mg^{2+} は、細菌の正常な増殖と細胞分裂に用いられている。特に藍藻類のクロロフィルは、 Mg^{2+} が中心イオンであるため Mg^{2+} は光合成に必須である⁷⁾。これまで、藍藻類のジェオスミン/2-MIB 生産に対する Mg^{2+} の影響に関する研究は行われていない。

以上から、温度、光強度、共存微生物群の変化や Mg^{2+} が及ぼすカビ臭原因物質産生藍藻類の増殖やカビ臭原因物質産生への影響を明らかにし、カビ臭原因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に試みる。

B. 研究方法

1) カビ臭原因物質産生に及ぼす Mg^{2+} 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 *Dolichospermum smithii* NIES-824、2-MIB 産生藍藻類として *Pseudanabaena foetida* NIES-512 を用い、CT 培地で 25°C 、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。表層水の平均 Mg^{2+} 濃度がおおよそ 10 mg/L と報告されている⁸⁾ことから、 Mg^{2+} 濃度を 0、10、24、50 mg/L とした条件で解析を実施した。 Mg^{2+} 濃度 10 mg/L で培養したものを対照群とした。

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) と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。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、カビ臭原因物質ジェオスミンや 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光強度の影響

供試藍藻類は、2-MIB 産生藍藻類 *P. foetida* NIES-512、茨城県が霞ヶ浦より分離した *P. foetida* 1705-12、*P. 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 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ に固定して、培養温度を、 10°C 、 20°C 、 30°C とした実験系と 2) 培養温度を 20°C に固定して、光強度を $10.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、 $60.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 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、Chl. a の変化で解析した。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。

3) 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、ジェオスミン産生藍藻類 *D. smithii* NIES-824 (非無菌であるが単藻化された培養株) 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°C) と冬季 (サンプリング時の水温 9.2°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°C とした。光強度は、 $30.0 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗周期を 12 h として培養した。参照系は滅菌超純水を用いた CT 培地 (SW) とし、微小動物等を除くために、湖水をろ過 (孔径 $5 \mu\text{m}$ フィルター) したろ過湖水を用いた CT 培地 (FW)、ろ過せずに微小動物等も含んだ湖水を用いた CT 培地 (LW) の 3 つ試験系を構築した。

細胞密度の変化は、Chl. a の変化で解析した。ジェオスミン合成酵素遺伝子 (*geoA* 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、*geoA* 遺伝子 (フィコシアニン遺伝子を内部標準遺伝子とした) の発現解析を 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、カビ臭原因物質ジェオスミン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、原核微生物群集構造を 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。

4) カビ臭原因物質産生に及ぼす日長の影響

ジェオスミン産生藍藻類として *D. smithii* NIES-824 を用い、CT 培地を用いて、 28°C 、 $60 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、明暗サイクル 12 h : 12 h の条件で培養した。日長の影響解析のために、対数増殖期まで前培養した細胞を初期 Chl. a 濃度は $20 \mu\text{g/L}$ に調整する様、100 mL の CT 培地に接種し、温度 28°C 、 $60 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の条件の下、日長条件を明 16 h : 暗 8 h、9 h : 15 h、12 h : 12 h (対照系) として実施した。培養は 21 日間行い、サンプルは 3 日ごとに採取した。すべてのグループは 3 連で採取した。採取したサンプルを用いて、Chl. a や *geoA* 遺伝子発現量 (16S rRNA 遺伝子を内部標準遺伝子とした)、溶存有機物濃

度 (DOC) を分析した。

C. 研究結果および D. 考察

1) カビ臭原因物質産生に及ぼす Mg^{2+} の影響

Mg^{2+} 制限条件下 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、*D. smithii* は正常に生育できず、8日目以降に培養液が黄色に変化した。 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での細胞密度および Chl. a 含有量は、8日目以降、 $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ でのそれよりも著しく低かった ($p < 0.05$, 図 1)。Chl. a 濃度では、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件の間に、明らかな差はなかったが、細胞密度は $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ でわずかに高くなった。しかし、4日目以降の細胞密度および Chl. a 濃度は、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも低く ($p < 0.05$, 図 1)、過剰な Mg^{2+} は細胞の成長を阻害する可能性も示した。異なる Mg^{2+} 濃度条件下で、細胞密度および Chl. a 濃度と比較した総ジェオスミン濃度についても同様の結果となった (図 2)。総ジェオスミン濃度は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で最も低く、8日目以降は $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ よりも有意に低い値となった ($p < 0.05$, 図 2)。4日目から 16日目までは、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下で総ジェオスミン濃度に明らかな差はなかった。しかし、8日目から 16日目にかけて、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下では、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも総ジェオスミン濃度が低くなった ($p < 0.05$, 図 2A)。ジェオスミン生産性 (ジェオスミン/Chl. a 濃度) については、異なる Mg^{2+} 条件下で明らかな差は認められなかった (図 2B)。 Mg^{2+} 制限条件下 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、12日目以降、ジェオスミン生産性は $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ のものよりわずかに高くなったが、これは細胞死と Chl. a 濃度の減少が原因と考えられた (図 2B)。

全実験期間中 (20日間) において、*geoA* 遺伝子発現量は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で最も低かった (図 3)。培養4日目には $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の間で差はなかった。*geoA* 遺伝子発現量は、12日目から 20日目にかけて、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で $0\text{--}24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。また、8日目から 16日目にかけては、 $20\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも *geoA* 遺伝子発現量が少なかった。

P. foetida の細胞バイオマスは 8日目に最大となり、その後急速に減少した (図 4)。異なる Mg^{2+} 濃度での細胞増殖は、*D. smithii* と比較して *P. foetida* で同様の結果が得られた。細胞密度および Chl. a 濃度は、8日目および 12日目において、 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。最大細胞密度 (1.82×10^6 filament/mL) と Chl. a 濃度 (0.61 mg/L) は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の条件下であった。 $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件と $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件の間には、明らかな差は見られなかった。

異なる Mg^{2+} 条件下での総 2-MIB 濃度の変化は、細胞増殖の傾向と一致した (図 5)。総 2-MIB 濃度は、8日目以降、 $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合よりも $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の場合の方が有意に低かった ($p < 0.05$, 図 5A)。総 2-MIB 濃度は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で、24 および $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも高くなった。最大総 2-MIB 濃度 ($118.5\text{ }\mu\text{g/L}$) は、12日目の $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下であった。また、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での総 2-MIB 濃度は、 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ での濃度に比べて低かった。2-MIB の生産性 (2-MIB/Chl-a) については、異なる Mg^{2+} 条件下で明確なパターンは見られなかった (図 4 および 図 5)。培養開始後 8日間は、 $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ の方が総 2-MIB 生産性がわずかに高かった。 $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ では、 0 、 24 、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下よりも 2-MIB の生産性が有意に増加した ($p < 0.05$, 図 5B)。

試験した 4条件の Mg^{2+} 濃度 (0 、 10 、 24 、 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) のうち、*P. foetida* の *mtf* 遺伝子および *mtc* 遺伝子の発現量は、8日目と 12日目に $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ で $10\text{--}50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ に比べ有意に低く ($p < 0.05$, 図 4~図 6)、*geoA* 発現結果とも一致した (図 3)。 $50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ では、4日目および 12日目に $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ および $24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と比較して、*mtf* 遺伝子および *mtc* 遺伝子の発現量が増加した。

以上から、本研究結果から Mg^{2+} 濃度が、遺伝子発現レベルよりも細胞増殖とジェオスミン/2-MIB 産生に影響を与えた。 Mg^{2+} 制限条件 ($0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) では、*D. smithii* と *P. foetida* の細胞成長を阻害された。その上、*D. smithii* と *P. foetida* の総ジェオスミンと 2-MIB 濃度は、それぞれ $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下で最低であった。高 Mg^{2+} 濃度 ($50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) でも、 $10\text{--}24\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 条件下と比較して、細胞増殖およびジェオスミン/2-MIB 濃度をわずかに抑制された。これは、高 Mg^{2+} 濃度により他のイオン (Ca^{2+} や K^+ など)の細胞への取り込みが抑制されたことが原因であると考えられた⁷⁾。遺伝子発現量では、*geoA* 遺伝子、*mtf* 遺伝子、*mtc* 遺伝子の発現量は $0\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 処理で最も低く、過剰な Mg^{2+} ($50\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$) 条件下では $10\text{ mg-Mg}^{2+}/\text{L}$ 処理と比較して標的遺伝子の発現量が高いことが確認された。既往研究において、 Ca^{2+} が *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 の Chl. a 濃度およびジェオスミン産生に影響を与え、 Ca^{2+} 濃度が高い条件下において低い条件下よりもジェオスミン濃度が高くなることを明らかにされている⁹⁾。以上から、天然水の硬度は、増殖や二次代謝産物 (ジェオスミンや 2-MIB など) 産生に影響を与えていることを示している。

2) カビ臭原因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、 $10\text{ }\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ の光強度で良好な増殖を示した

(図 7)。 *P. foetida* NIES-512 のみ光強度に対する増殖の応答が異なっていた。

mtf 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 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度にて発現量が高い傾向を示した (図 8)。一方、*P. foetida* NIES-512 では増殖が良好ではない 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の光強度において発現量が高い傾向を示した。また、*mtc* 遺伝子の発現量は、全ての *P. foetida* 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 9)。 *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。

異なる光条件下で、*P. foetida* 株の総 2-MIB 濃度は有意差を示し (図 10)、*P. foetida* 1705-12、*P. foetida* 1803-12、*P. foetida* NIES-512 の総 2-MIB 濃度は 20 日目の 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ において、それぞれ 593 ng/L、460 ng/L、360 ng/L だった。総 2-MIB 産生量は *P. foetida* 1705-12、*P. foetida* 1803-12 では、明確な光強度と負の相関があり、*P. foetida* NIES-512 では、明確な関係が見出されなかったが、全株において 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件下にて産生した 2-MIB 濃度は他の光強度条件と有意な差 ($p < 0.05$) があつた。細胞内 2-MIB 濃度では、3 株ともに 10 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$ 条件で最大を示した (図 11)。 *P. foetida* 1705-12 と *P. foetida* NIES-512 の細胞内 2-MIB 濃度は、20 日目に 502 ng/L、260 ng/L だった。 *P. foetida* 1803-12 は 16 日目に 313 ng/L であつた。細胞外 2-MIB は、*P. foetida* 1705-12 と *P. foetida* 1803-12 では細胞内 2-MIB よりも少ないことが示されたが、*P. foetida* NIES-512 では細胞外 2-MIB が細胞内 2-MIB よりも高い傾向にあつた (図 11 と図 12)。2-MIB の細胞外および細胞内といった局在は、いくつかの物理化学的要因に影響されると考えられるが、本研究では、光強度を上げると、より多くの 2-MIB が培養液中に放出される傾向であることが示された (図 12)。

本研究では、藍藻類のバイオマス (Chl. a として評価) の増加に伴い、2-MIB 濃度は一般的に増加した。光強度が低いと *P. foetida* による 2-MIB 産生が促進されることが提案されている。光強度は、藍藻類の増殖や二次代謝産物である 2-MIB 産生に影響を与える環境条件のひとつであるが、焦点を当てた研究報告は少ない。既往報告に、*Pseudanabaena* sp. Dqh15 を用いて、2-MIB 産生と 2-MIB 合成酵素遺伝子発現に対する光の影響がある³⁾。報告では、*mtf* 遺伝子と *mtc* 遺伝子の発現量は、対照条件 (30 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) と比較して低光条件 (10 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) では増加し、高光条件 (60 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) で減少したが、暗条件においてはこれらの遺伝子が誘導されていなかった。また、底生性 *Planktothrix* sp. の増殖制限のメカニズムを解

析し、2-MIB 産生と水中光の強度 (5, 17, 36, 85, 250 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) の間に負の関係を明らかにし、高光量 (250 $\mu\text{mol photons}/\text{m}^2/\text{s}$) では 2-MIB 産生の抑制されることを見出した¹⁰⁾。以上から、光によって制御される 2-MIB 合成過程は即時的かつ一過性であると提案されている。

3) カビ臭原因物質産生に及ぼす共存微生物の影響

夏期実験群の 28 日間の培養期間中 (図 13A)、滅菌超純水系 (SW) が他の系よりも先んじて最大 Chl. a 濃度を示した (20 日目に 4,951 $\mu\text{g}/\text{L}$)。他の 2 つのグループ (ろ過湖水系 (FW) と湖水系 (LW)) は、実験終了まで増殖を維持した。これは、FW 系や LW 系では SW 系には含まれない湖水中に含まれる成分によるものと考えられた。一方、冬に培養したグループは異なる挙動を示した (図 13B)。SW 系の Chl. a は 24 日目に 5335 $\mu\text{g}/\text{L}$ の最大値に達し、夏期実験系とほぼ同じ傾向であつた。FW 系も夏期実験系とほぼ同様であつた。しかし、LW グループの Chl. a は他の 2 系よりもはるかに高い Chl. a を示した。

geoA 発現量は、夏期実験系のうち、SW 系、FW 系、LW 系のいずれも培養初期 (4 日目) は、他の培養日数での発現量と比較して相対的に高かつた (図 14)。これは、藍藻類が新しい培地に添加され、増殖するために代謝が活発になったためと考えられた。その後、徐々に減少するものの、細胞増殖が活発な時期と考えられる 16 日目または 20 日目に発現量が高くなつた。冬期実験系での *geoA* 発現量も同様な傾向であつたが、夏期実験系よりも発現量が全体的に高かつた。これは、季節によつてもたらされる共存微生物の違いに関係していると考えられた。

夏期実験系で採取湖沼水由来の共存微生物が存在する培地に接種した実験系 (FW、LW) は、対照系 (SW) に比べて、総ジェオスミン濃度 (図 15) および細胞外ジェオスミン濃度 (図 16) は、非常に低かつた。また、FW 系の総ジェオスミン濃度と細胞外ジェオスミン濃度のピークは、LW 系に比べはるかに高かつた。このことから、SW 系以外の 2 系では、*D. smithii* を含むジェオスミン産生藍藻類の細胞密度が低いことが推量された。ジェオスミンの生態系内での役割は未解明であるが、捕食者に対する防御機構のひとつとして機能していると考えられている。このため、藍藻類によるジェオスミンの放出は、他の生物に危険信号を伝達する機能を持つ可能性がある。そこで、ジェオスミンの局在解析から、増殖期間は、産生されたジェオスミンは、細胞内に局在していることが示された (図 17)。また増殖後期は、細胞の崩壊に伴い、多くのジェオスミンが放出されることが明らかにされた。冬期実験系における総ジェ

オオスミン濃度 (図 18) は、夏期実験系と比較して SW 系 (対照系) や LW 系は、同様の傾向であった。FW 系は、夏期実験系と比較して高いジェオスミン産生量を示した。一方、細胞外ジェオスミン濃度 (図 19) は、夏期実験系と異なり、LW 系が FW 系よりも高い時期があった。ジェオスミンの局在解析から、夏期実験系と異なり FW 系は、SW 系と同様に実験期間全体でジェオスミンは細胞内に局在していることが示された (図 20)。

培地に用いた「水」の前処理 (超純水/濾過/無処理 (湖水)) の違いにより、微生物群集構造と多様性に大きな違いが見られた (図 21)。細菌群集の相対存在量が最も高かったのは、LW であった。Nostocaceae はフィラメント状を形成する藍藻類の科であり、供試藍藻類である *Dolichospermum* 属も、Nostocaceae に分類されている。藍藻類に分類される Oscillatoriaceae は、夏期実験系の LW と FW の両方で優占種となった (28 日目の群集はそれぞれ 40%以上、50%以上)。Oscillatoria 属 (現在は、Planktothrix 属に再分類されたものもある) はジェオスミンの一般的な産生者として知られており、過去の霞ヶ浦のかび臭発生時の原因藍藻類であった。一方、冬期実験系では、異なる結果が得られた。当初、FW 系では、添加した *Dolichospermum* が優占したことから、Nostocaceae が圧倒的に優勢であった。LW 群では、霞ヶ浦湖水由来の Oscillatoriaceae が保持され、28 日目に優占種となった。以上の結果から、FW 系および LW 系のジェオスミン濃度が SW 系より低い結果は、ジェオスミン産生藍藻類が十分に増殖していないためと考えられた (図 15, 図 16, 図 21)。

微生物群集構造の変化を解析するために、8 日目と 28 日目の微生物群集構造を主成分分析 (PCA) した結果、対照系 (SW) の微生物群集構造は、ほぼ変化がないことが示された。また冬期実験系は、夏期実験系よりも培養 8 日目 FW 系と LW 系の微生物群集構造が SW 系のそれと近いことが明らかとなった。一方、夏期および冬期実験系のどちらの FW 系および LW 系の微生物群集構造は、8 日目から 28 日目に至る際に大きく変化することが示された。

水圏生態系における淘汰によって、優占される藍藻類が決定されるが、夏期と冬期の微生物群集の差が添加 *Dolichospermum* の増殖に影響を与えることが示された。どの様な機構によってかび臭原因物質産生藍藻類が優占できるのか、冬期実験系の 8 日目の FW 系において *Dolichospermum* が属する Nostocaceae が優占していることに着目して解析を深める。加えて、霞ヶ浦は、夏期は *Microcystis* が多くなり、かび臭原因物質産生藍藻類は、冬期~早春期に多くなる傾向であることにも着目して解析する。

4) カビ臭原因物質産生に及ぼす日長の影響
日長が *D. smithii* の増殖への影響は顕著に観察された (図 23)。培養 12 日目まで、長期群 (L:D=16:8 時間) の Chl. a は、短期群 (L:D=9:15 時間) および対照群 (L:D=12:12 時間) よりも常に高い値を示した。また、定常期に至るまでの期間が長期群よりも長かった。一方、長期群は、12 日目以降に急速に死滅期に入った。短期群は、培養 21 日においても Chl. a の減少は見られなかった。つまり、*D. smithii* の増殖は日長の長さに応じて増加し、その結果、指数関数期だけでなく減衰期にも早く至ることが明らかとなった。また、長期群の *D. smithii* の最大値 Chl. a (2606 $\mu\text{g/L}$) は、対照群 (3018 $\mu\text{g/L}$) および短期群 (2829 $\mu\text{g/L}$) よりも小さかった。

日長条件ごとの *geoA* 遺伝子発現量は、長期群 (L:D=16h:8h) では 15 日目まで *geoA* 遺伝子の発現が徐々に減少し、短期群 (L:D=9h:15h) では発現が徐々に増加することがわかった (図 24)。以上から、日長が長い (L:D=12h:12h) 場合、*D. smithii* は急速に増殖するものの、*geoA* 遺伝子発現量は、短期間 (3 日目) で最大値となり、増殖期間は、ある程度の一定値を示した後、死滅期に入ると急速に減少することが明らかになった。対照群 (L:D=12h:12h) では、*geoA* 遺伝子発現量は、増殖に伴い徐々に増加し、最大 Chl. a に到達する前の 15 日目に発現量が最大となった。定常期/死滅期に到達する最大 Chl. a を示した 18 日目から減少した。この様に、*D. smithii* の増殖が最大 Chl. a なるまで、*geoA* 遺伝子発現量は増加傾向となり、その後、減少した。短期群 (L:D=9h:15h) では、実験終了までに *D. smithii* の増殖は、定常期/死滅期を示さなかった。他の 2 群よりも、試験期間における最大 Chl. a に到達するのは培養日数を要し、増殖期間中に *geoA* 遺伝子発現量は増加する傾向となり、他の 2 群と同様であったが、最大 *geoA* 遺伝子発現量を示したのは、細胞増殖期の途中であった (15 日)。その後、Chl. a は増加しているものの、*geoA* 遺伝子発現量は減少する傾向となり、他の 2 群とは異なった。1 日の平均日照時間は季節によって大きく異なり、例えば、日本における最大日照時間は、夏季で約 14.5 時間、冬季で約 9.8 時間である。かび臭発生時期も水源に応じて季節によって異なり、日照時間は重要な影響要因のひとつと考えられる。前項 3) の研究において冬期実験の培養 8 日目では、FW 系における添加した *D. smithii* 由来の Nostocaceae が優占した。日長条件が対照群 (L:D=12h:12h) と同様であり、*geoA* 遺伝子発現量も同様な傾向であった本項目での結果を合わせて勘案すると、冬期の短い日長条件下では、長期間 *geoA* 遺伝子発現量を維持することが推測された。また、増殖中は、*geoA* 遺伝子発現量が高値に維持されている

ことから、ジェオスミンが産生藍藻類の増殖の促進に関連していることが仮説として考えられた。この結果、冬期において、水源におけるカビ臭発生が引き起こされているのではないかと考えられた。

異なる日長条件下で、DOC として分析した細胞外有機代謝物の放出量の変化は、有意に異なっていた。3 群の *D. smithii* 細胞濾液について、培養 3 日目に対する DOC 変化量 (Δ DOC) について分析した (図 25)。DOC の増加は、長期群 (L:D=16:8 時間) で他の 2 群より有意に高く、常に増加傾向にあった。最大は 21 日目で、3 日目に比べて 94.85 mg/L も増加した。しかし、短期群 (L:D=9 h:15 h) の Δ DOC 最大値は 21 日目の 13.48 mg/L で、長期群 (94.85 mg/L、L:D=16 h:8 h) および対照群 (34.50 mg/L、L:D=12 h:12 h) より低かった。3 群とも、増殖期における死滅期においても全体的に Δ DOC が増加する傾向が見られた。これは、細胞の崩壊や分解によって細胞内の代謝物がより多く放出されているからと考えられた。したがって、細胞を破壊せず無傷に藍藻類細胞を除去することは、ジェオスミンを含む細胞内有機物を放出するリスクを低減すると考えられた。

E. 結論

水の硬度にも関連する Mg^{2+} は、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖およびカビ臭原因物質産生に影響を与えた。水圏の Mg^{2+} の平均濃度と報告がある 10 mg- Mg^{2+} /L の条件下で、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖、カビ臭原因物質の濃度が最大となった。カビ臭原因物質合成酵素遺伝子群の発現量は他の条件と比較して、高い傾向を示した。

カビ臭原因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るが、採取源が同じ場合、応答は類似な結果となった。低光強度の際に、藍藻類の増殖が良好かつ *mtf* 遺伝子発現量も高くなったが、*mtc* 遺伝子は低かった。一方、日長条件では、長期 (16 h) では、増殖が早く、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子発現量の最大地も早い時期に到達したが、短期 (9 h) では、増殖は遅く、遺伝子発現量は、徐々に増加した後最大となった。日長が長期の場合には DOC 産生量が高かった。

夏期と冬期の微生物群集構造は、カビ臭原因藍藻類の増殖に影響を与えることを明らかにした。夏期の微生物群集は、冬期よりも添加したカビ臭原因藍藻類の増殖を抑制することが明らかになった。各対象水源のカビ臭発生時期の微生物群集が、カビ臭原因物質産生藍藻類の増殖が可能となっていることが考えられた。

以上から、対象水源から分離したカビ臭原因物質産生藍藻類を用いた検証が、対象水源におけるカビ臭発生予防対策とカビ臭発生

対策に重要である。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Zhang J, Shen Q, Miao H, Li Q, Shimada M, Yuan T, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Ichise S, Asada Y, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of a Quantification and Detection Method for 2-MIB-producing Cyanobacteria. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2023;23(4): TRJFAS21811(Article number).
- Miao H, Zhang J, Shen Q, Ichise S, Asada Y, Tian Y, Utsumi M, Lei Z, Zhang Z, Takanashi H, Fujimoto N, Nishimura O, Akiba M, Shimizu K. Development of Rapid PCR Methods for the Detection and Quantification of Geosmin-Producing *Dolichospermum* spp.. Water, Air, & Soil Pollution, 2022; 233(9): 394(article number).

2. 学会発表

- Hanchen Miao, Chi Zhang, Ji Zhang, Zhenya Zhang, Zhongfang Lei, Tian Yuan, Naoshi Fujimoto, Yasuhiro Asada, Michihiro Akiba, Kazuya Shimizu, Effect of Light/Dark Cycle on the Growth and Expression of Genes Related to Geosmin from Cyanobacteria, The 1st International Conference on Bioprocess and Sustainability (ICBS 2023)、2023 年 3 月 25 日 - 3 月 26 日、茨城県.

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) Giglio S, Jiang J, Saint CP, Cane DE, Monis PT (2008) Isolation and characterization of the gene associated with geosmin production in cyanobacteria. *Environ Sci Technol* **42**: 8027–8032.
 - 7) Pohland AC, Schneider D (2019) Mg²⁺ homeostasis and transport in cyanobacteria - at the crossroads of bacterial and chloroplast Mg²⁺ import. *Biol Chem* **400**: 1289–1301.
 - 8) Potasznik A and Szymczyk S (2015) Magnesium and calcium concentrations in the surface water and bottom deposits of a river-lake system. *J Elem* **20**: 677–692.
 - 9) Zhang T, Li L, Zheng L, Song L (2017) Effects of nutritional factors on the geosmin production of *Lyngbya kuetzingii* UTEX 1547 (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Phycologia* **56**, 221–229.
 - 10) Zeyu J, Su M, Liu T, Guo Q, Wang Q, Burch M, Yu J, Yang M (2019) Light as a Possible Regulator of MIB-Producing *Planktothrix* in Source Water Reservoir, Mechanism and in-Situ Verification. *Harmful Algae* **88**:101658
 - 11) Suzuki M.T., Taylor L.T., DeLong E.F. (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4605–4614.
- 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	
	Mtc-RTR	GGCAGTAGAGTGGTGAGGCAGTT	
16S rRNA	16S-RTF	ACGGAGTTAGCCG ATGCTTATTC	3
	16S-RTR	CGAAAGCCTGACGGAGCAATA	
	TM1389BACT2	[FAM]-CTTGTACACACCGCCCGTC- [TAMRA]	11
	geoA666F	AAAAGACACATTTGCTGATGGTG	
<i>geoA</i>	geoA774R	ATCACGCGGTCATCAGGCTT	This study
	geoAprobe	[FAM]-TTCACCTTCCTCTTCCACCTCTC- [TAMRA]	
	cpcB36F	GCTTAAATGGCTTACGGGAAACC	
phycocyanin	cocB115R	TTTCATTTTGCCAACACCAACTGC	This study
		[FAM]-CAAGCTTTGGGTACTCCTGG- [TAMRA]	
	cpcBprobe36-115	[TAMRA]	

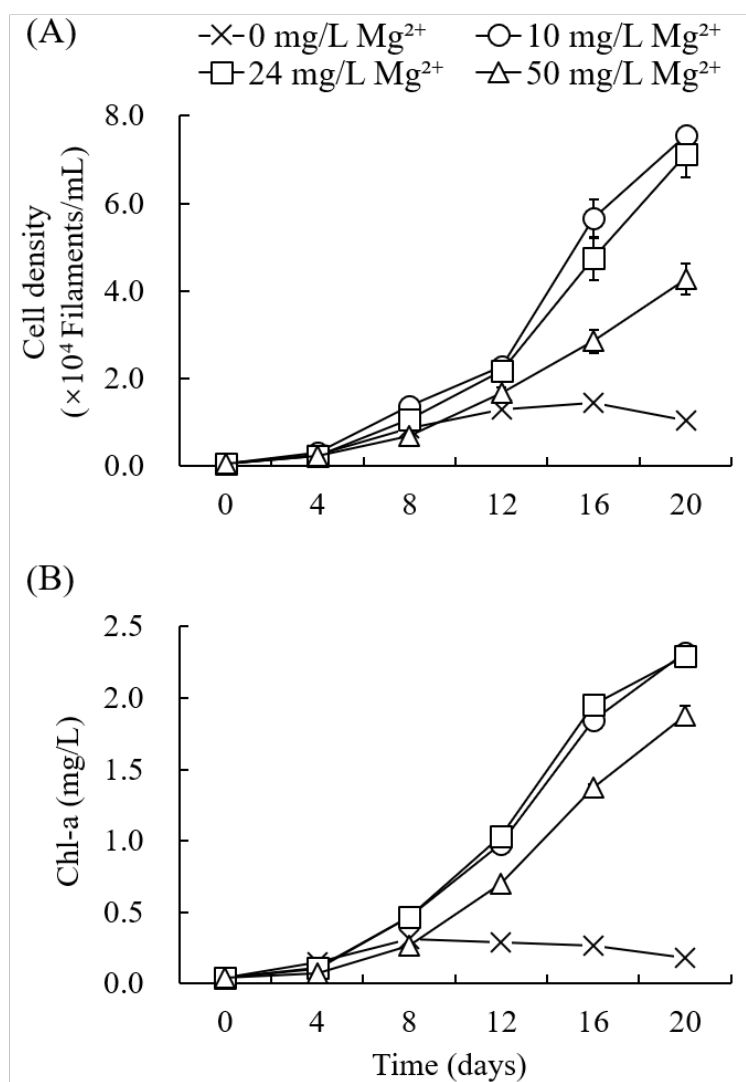


図1 異なる Mg^{2+} 濃度条件下における *D. smithii* 増殖特性
(A) 細胞密度 (B) Chl-a 量

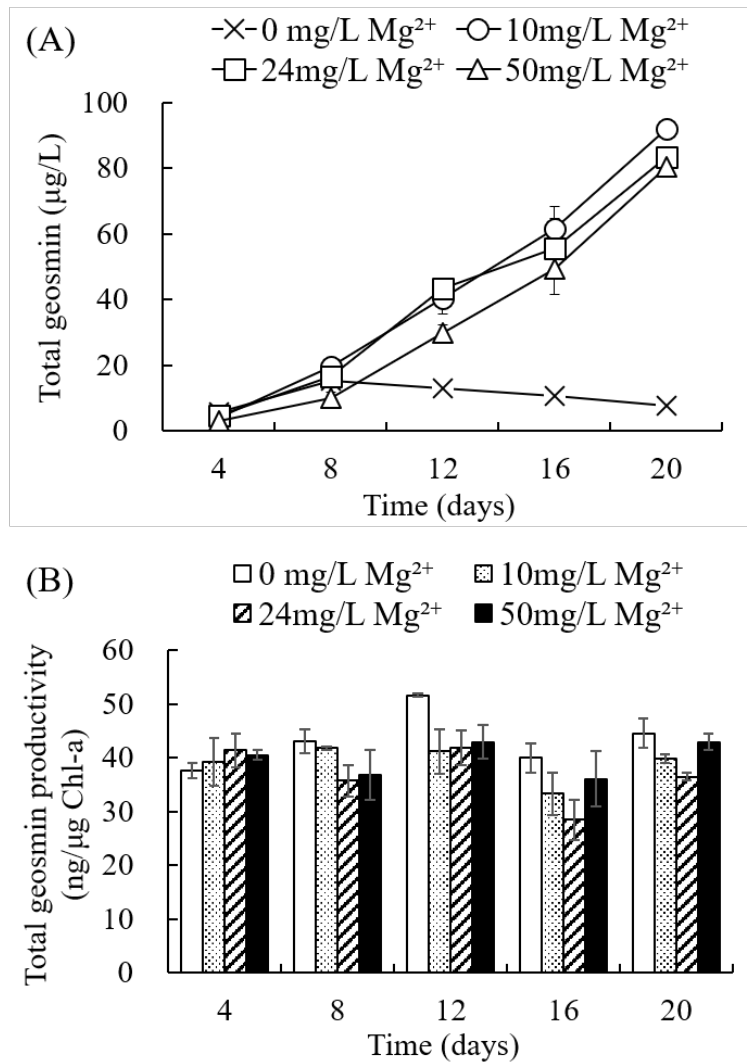


図2 異なる Mg²⁺濃度条件下における *D. smithii* による geosmin 産生量
 (A) 総 geosmin (B) 総 geosmin 産生活性

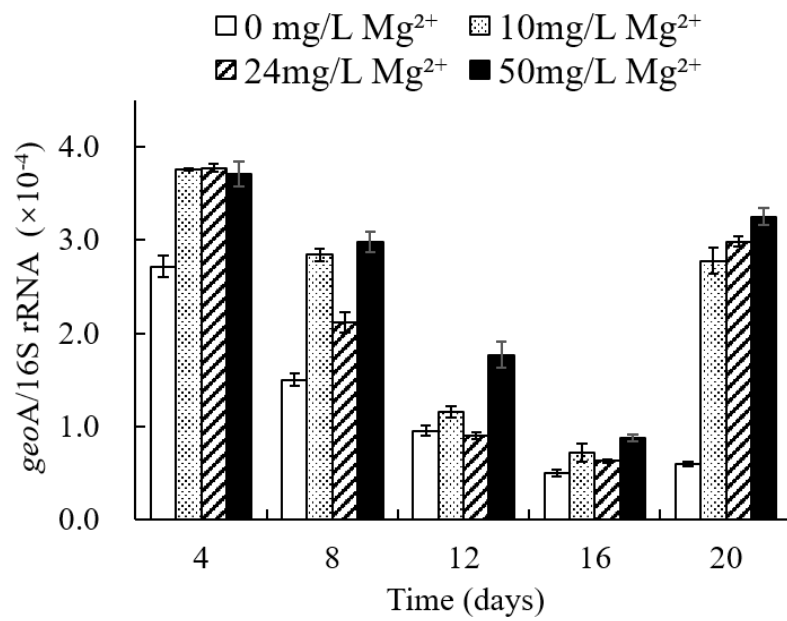


図3 異なる Mg²⁺濃度条件における geosmin 合成酵素遺伝子 *geoA* の発現量変化

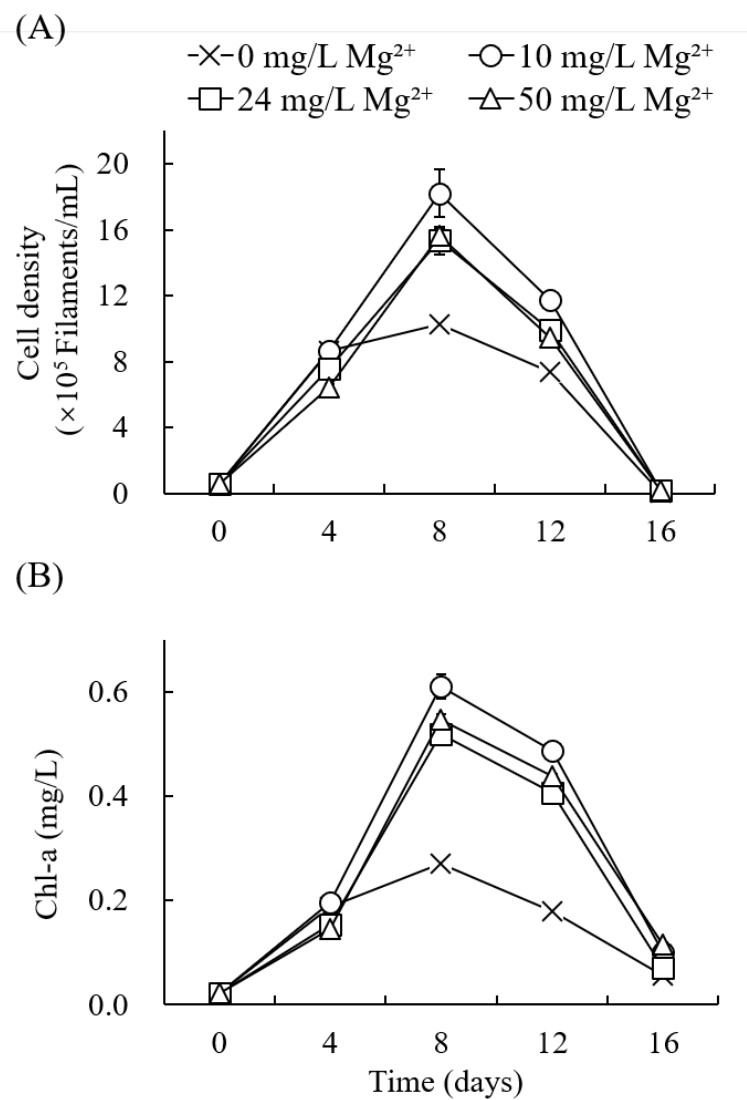


図4 異なる Mg^{2+} 濃度条件下における *P. foetida* NIES-512 による増殖特性
(A) 細胞密度 (B) Chl-a 量

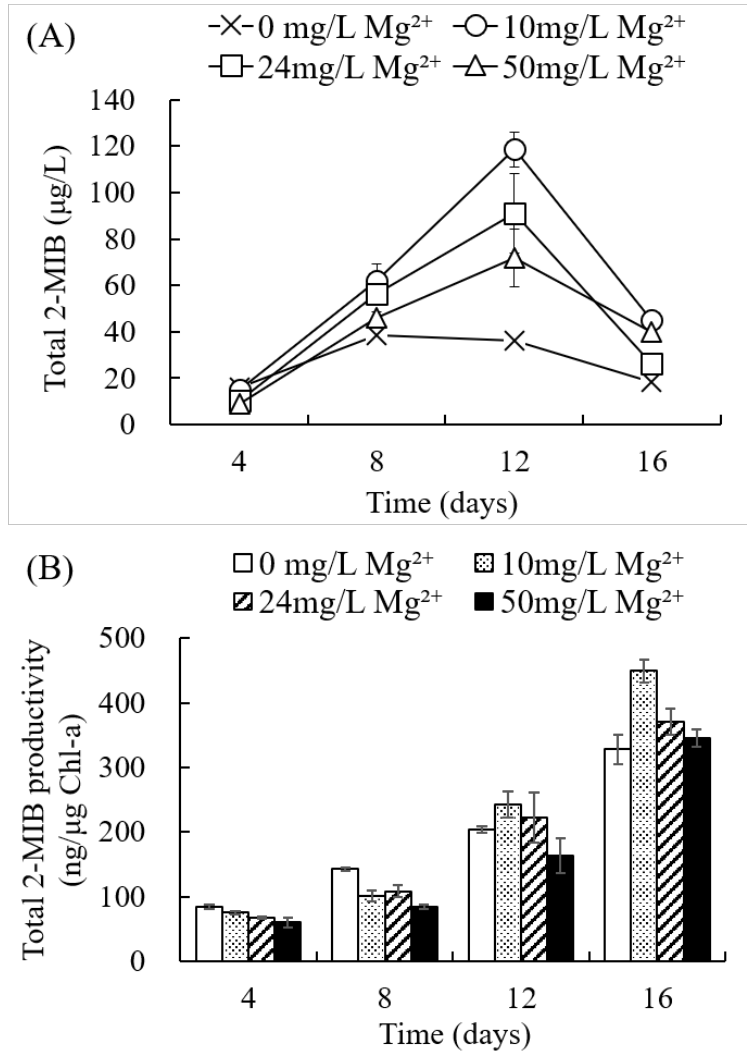


図5 異なる Mg²⁺濃度条件下における *P. foetida* NIES-512 による 2-MIB 産生量
 (A) 総 2-MIB (B) 総 2-MIB 産生活性

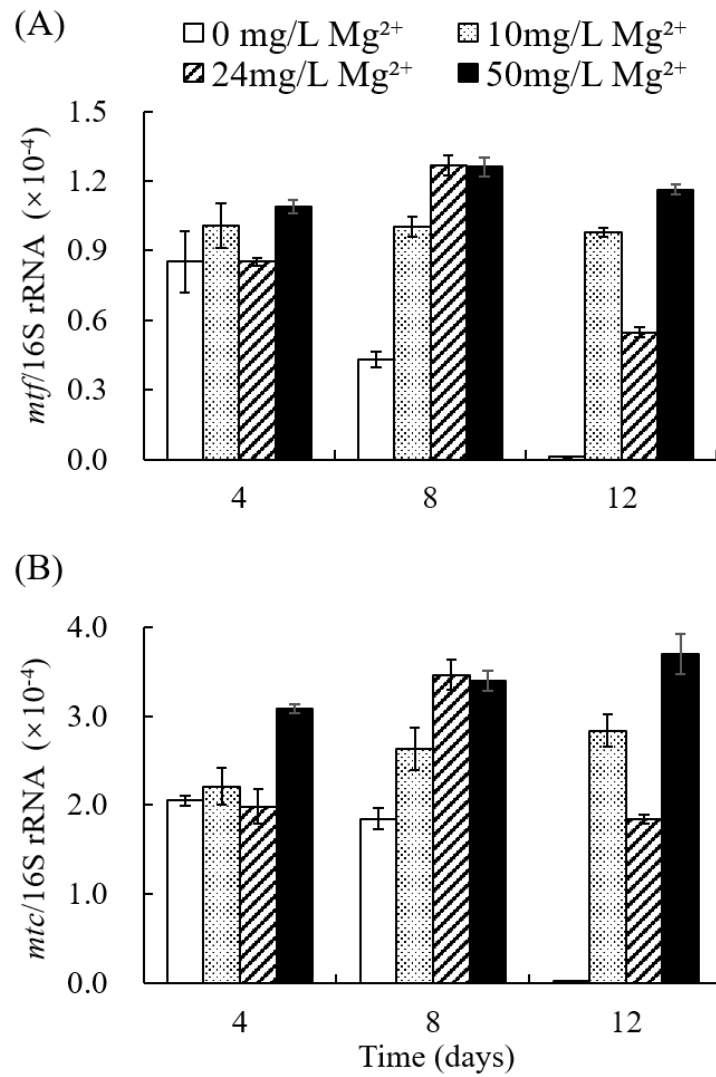


図6 異なる Mg²⁺濃度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子群の発現量変化
 (A) *mtf* 遺伝子 (B) *mtc* 遺伝子

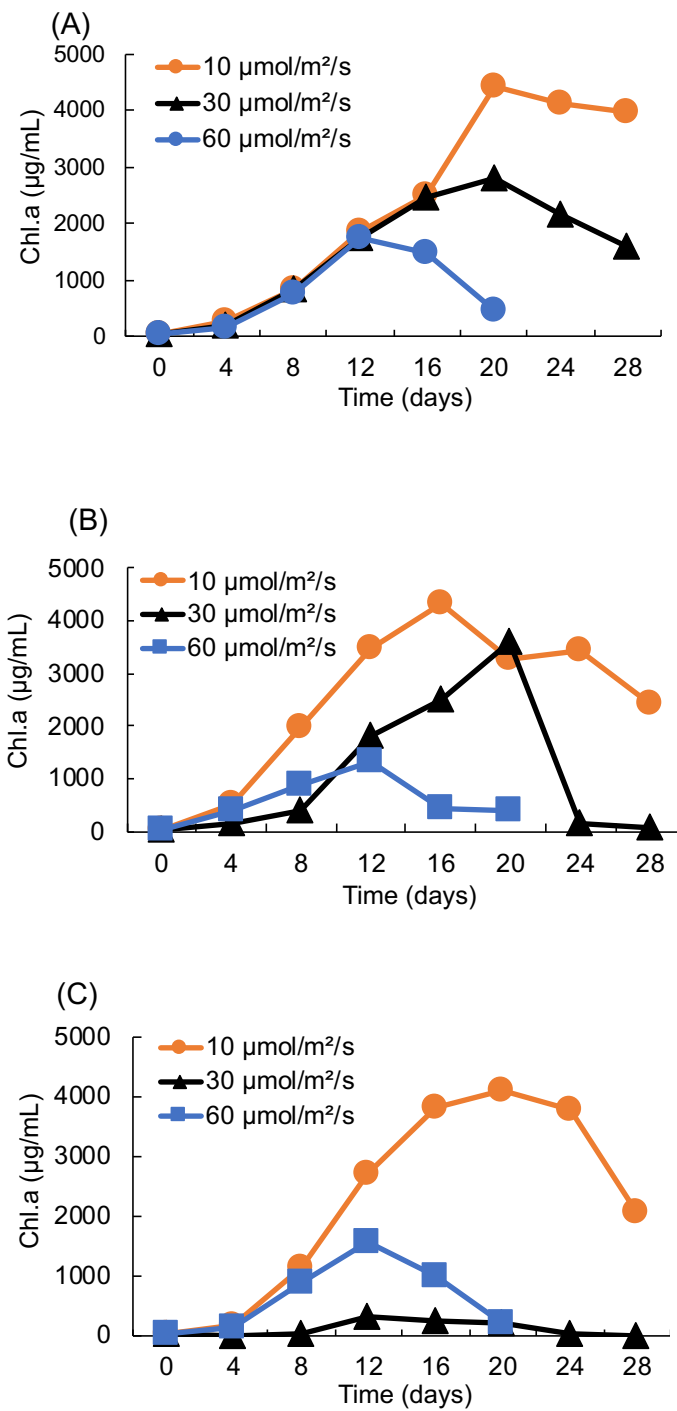


図7 異なる培養光強度条件下における増殖特性
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

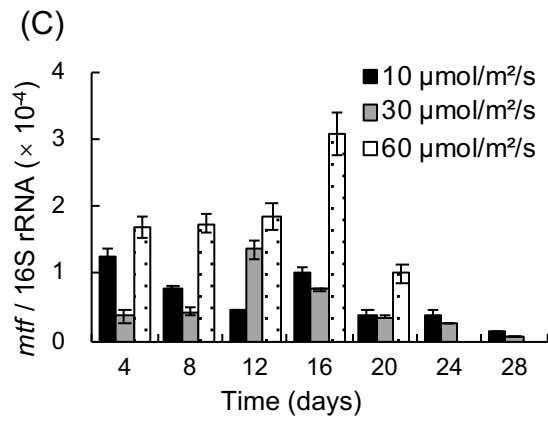
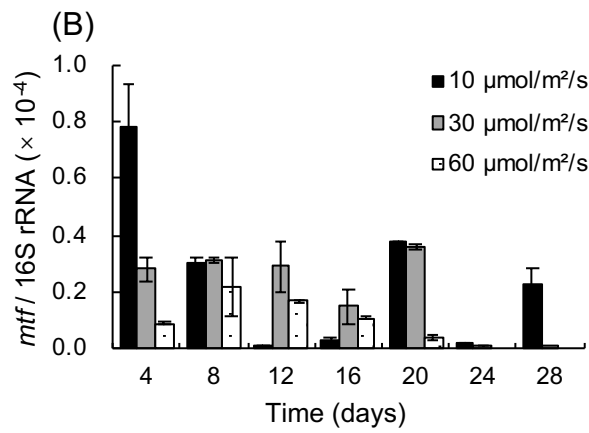
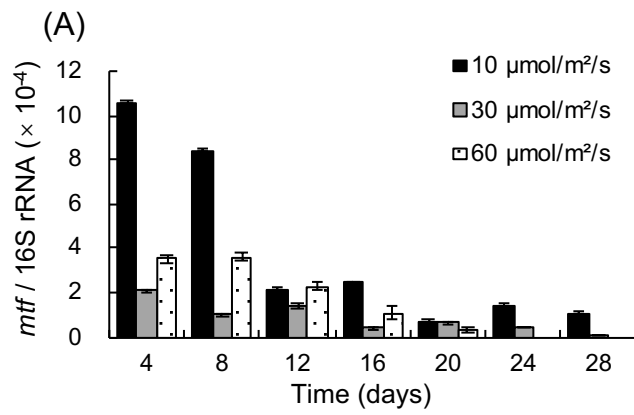


図 8 異なる培養光強度条件における *mtf* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

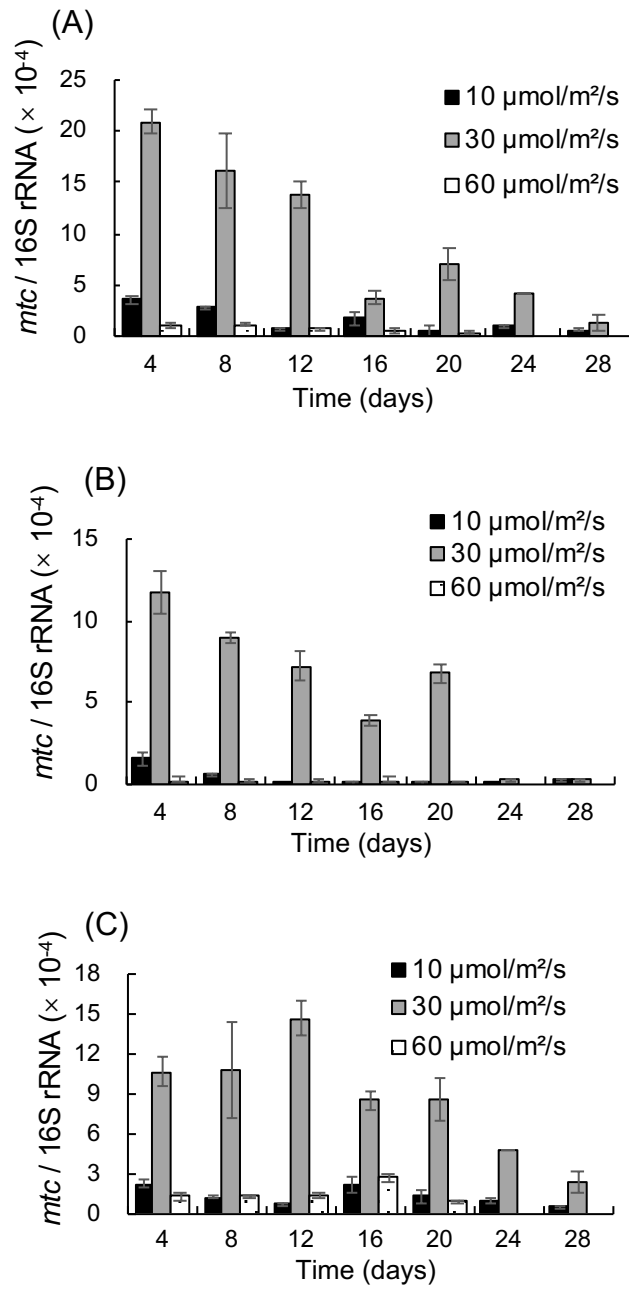


図9 異なる培養光強度条件における 2-MIB 合成酵素遺伝子 *mtc* の発現量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

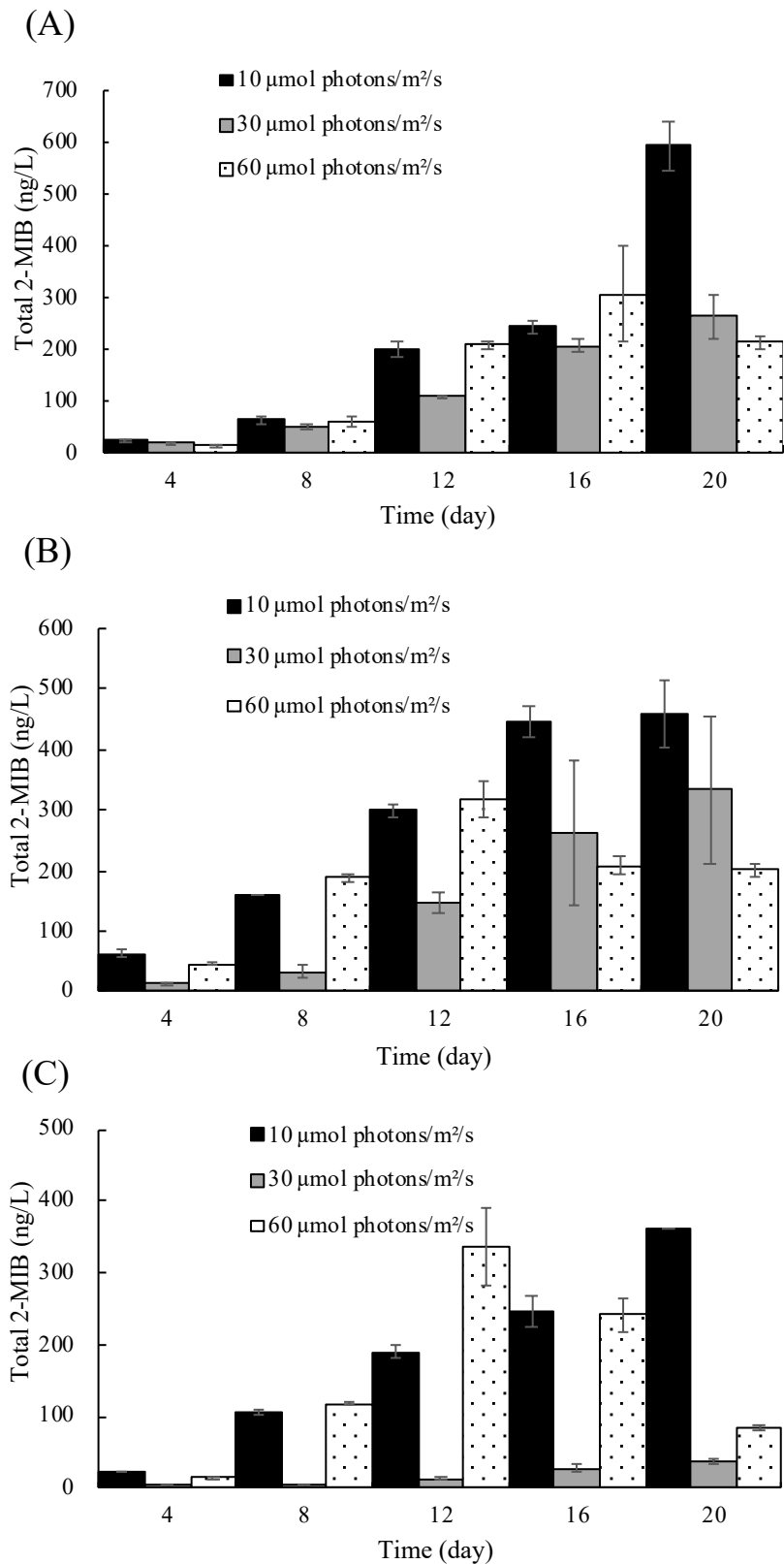
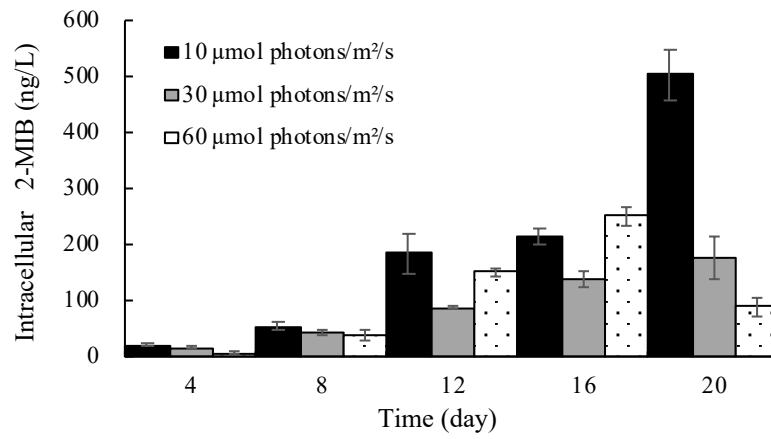
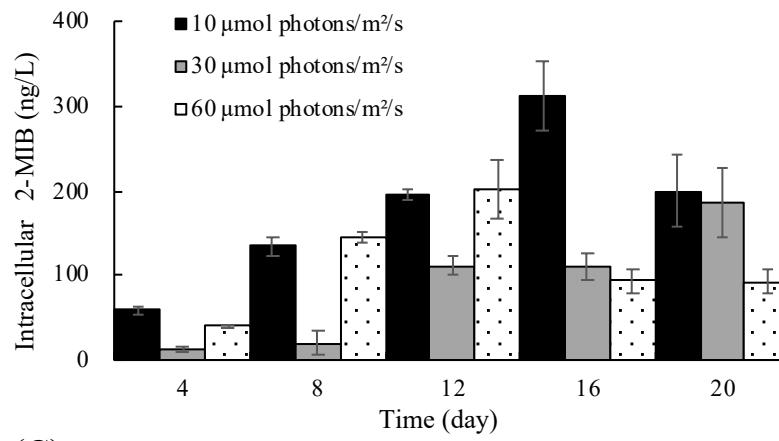


図 10 異なる培養光強度条件における総 2-MIB 産生量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

(A)



(B)



(C)

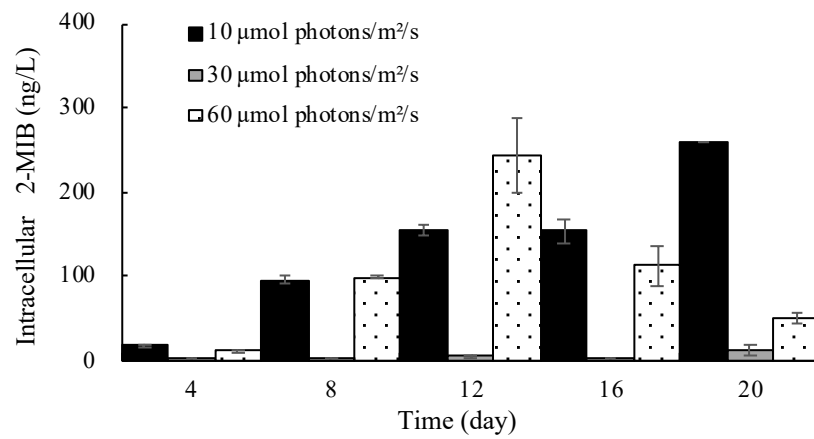


図 11 異なる培養光強度条件における細胞内 2-MIB 産生量変化
(A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

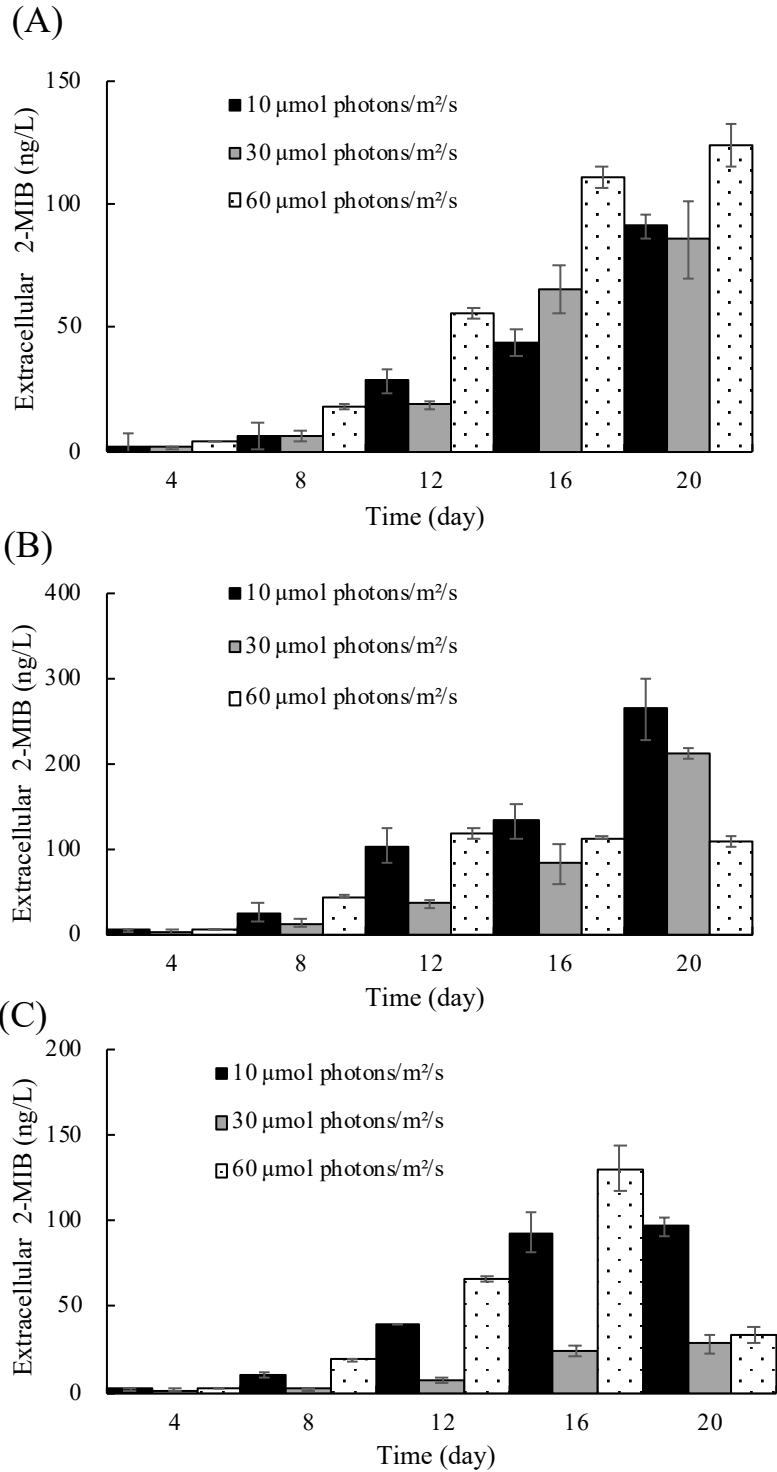


図 12 異なる培養光強度条件における細胞外 2-MIB 産生量変化
 (A) *P. foetida* 1705-12, (B) *P. foetida* 1803-12, (C) *P. foetida* NIES-512

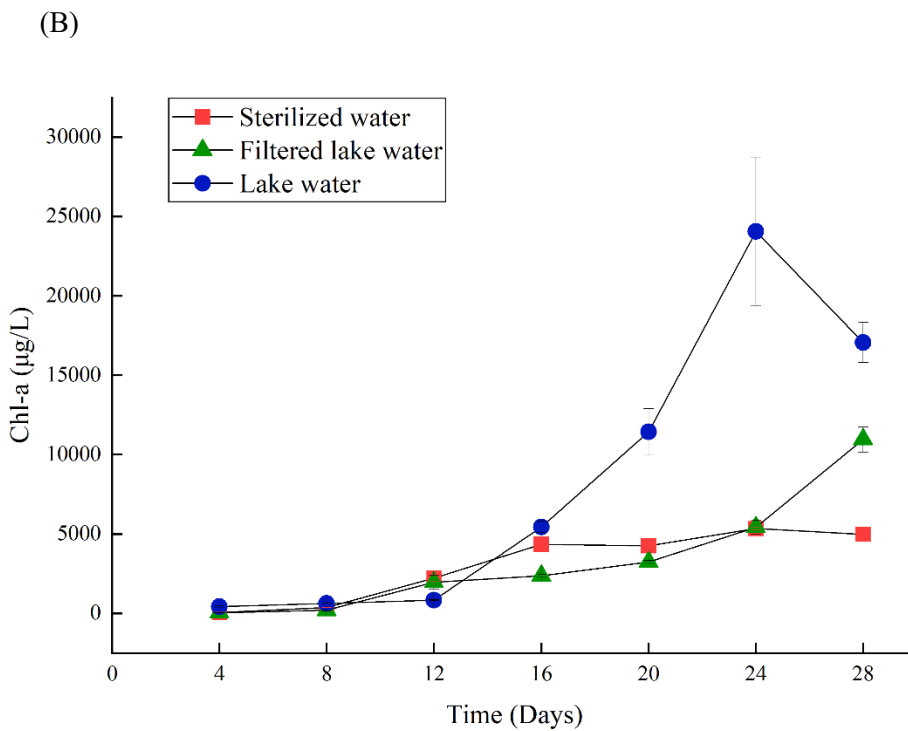
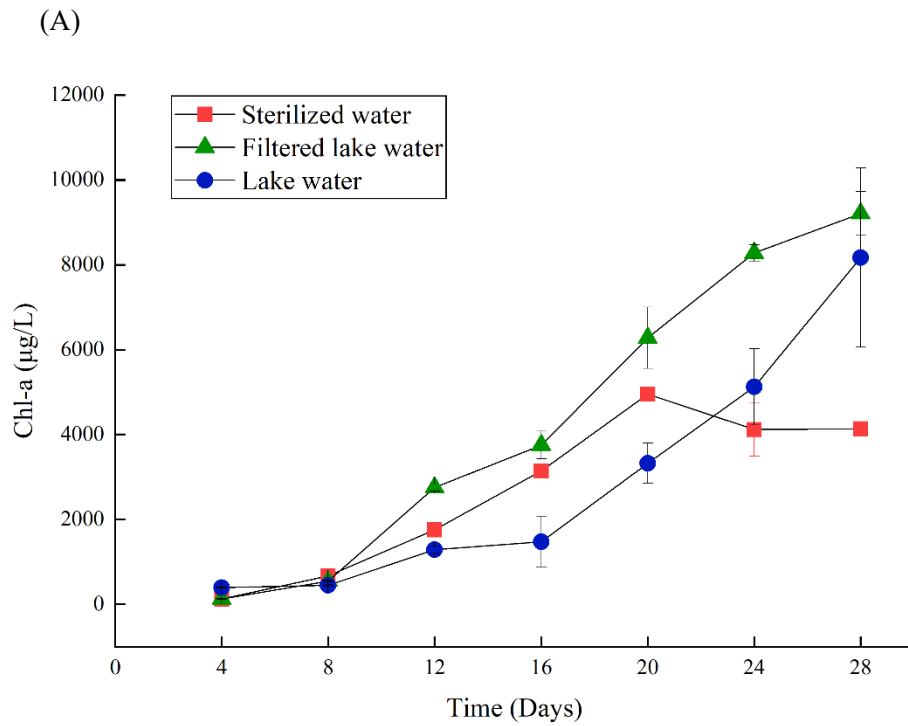


図 13 geosmin 産生藍藻類 *D. smithii* NIES-824 の増殖に及ぼす共存微生物の影響
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

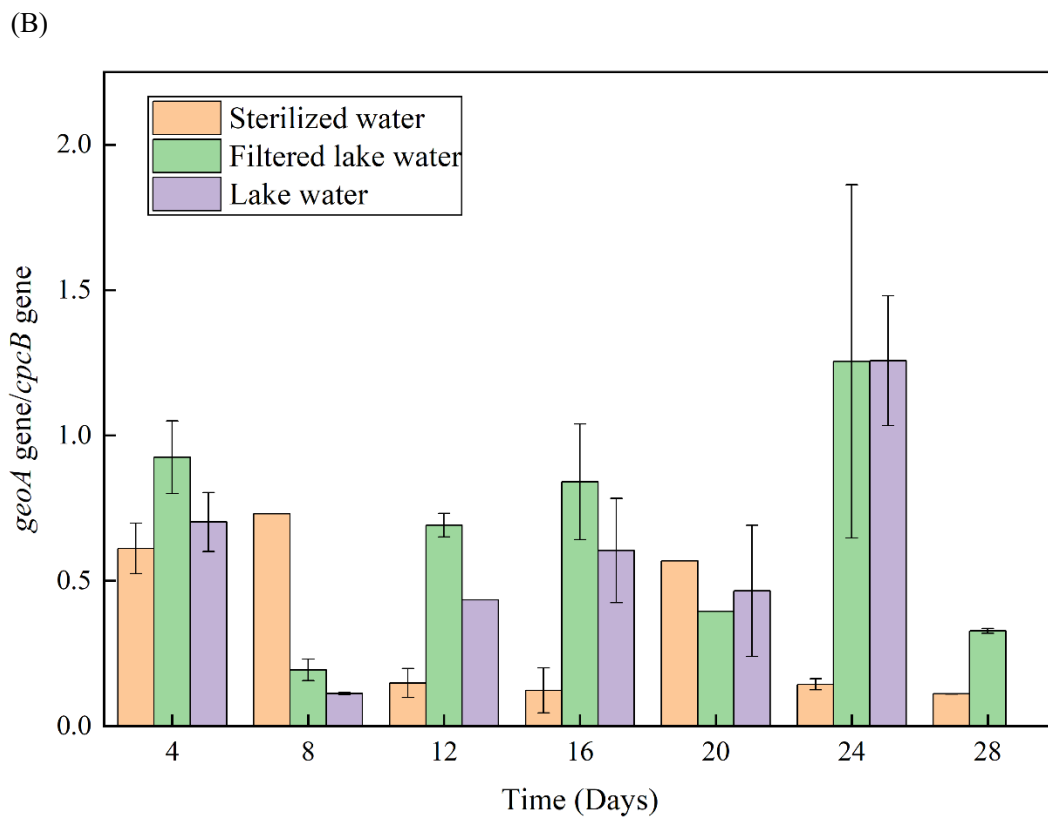
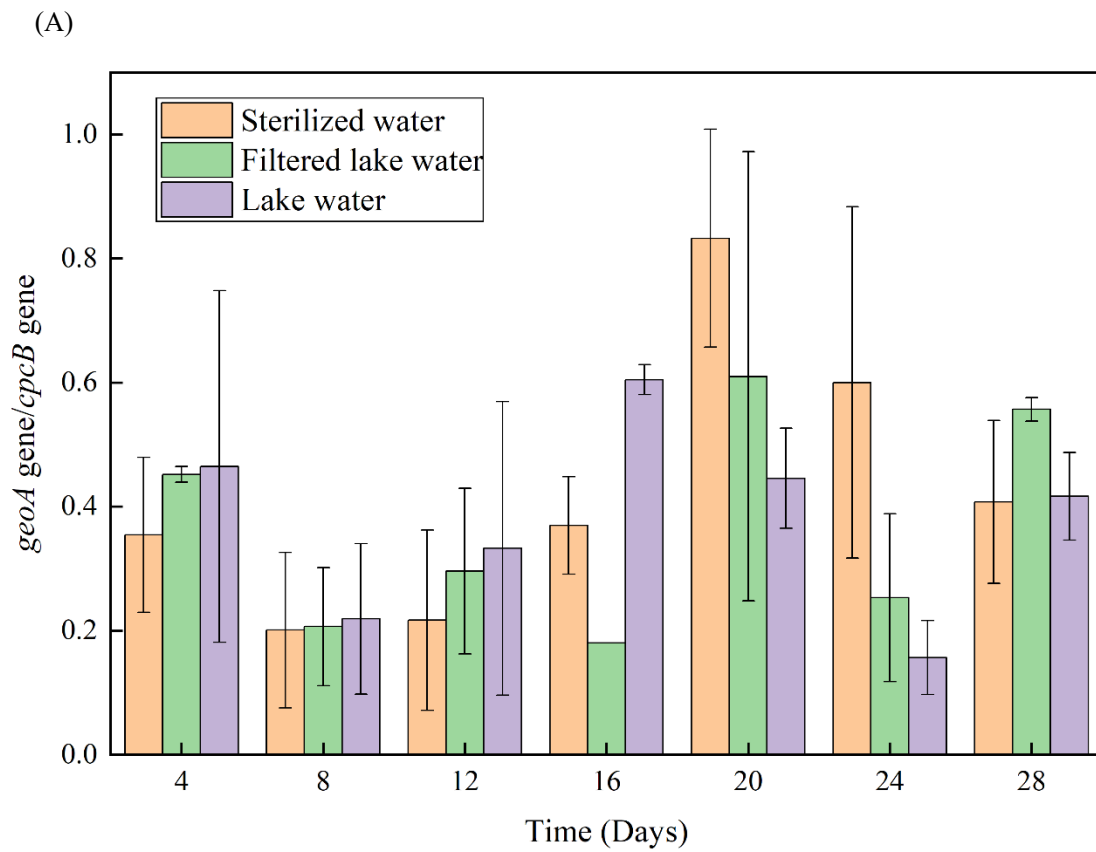


図 14 *geoA* 遺伝子発現量に及ぼす共存微生物の影響
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

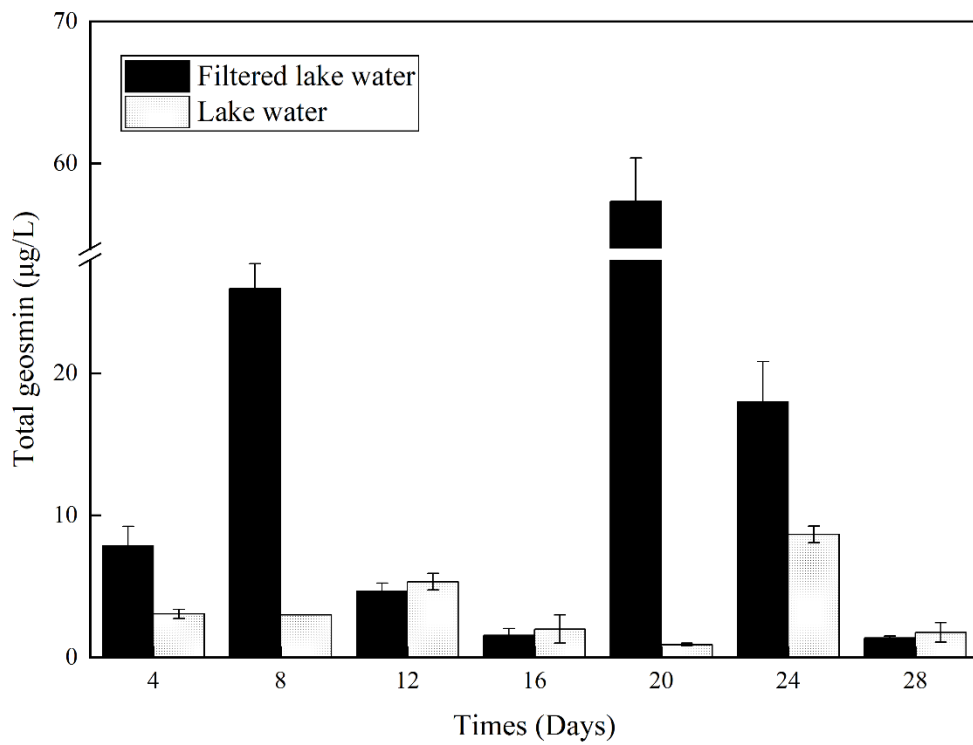
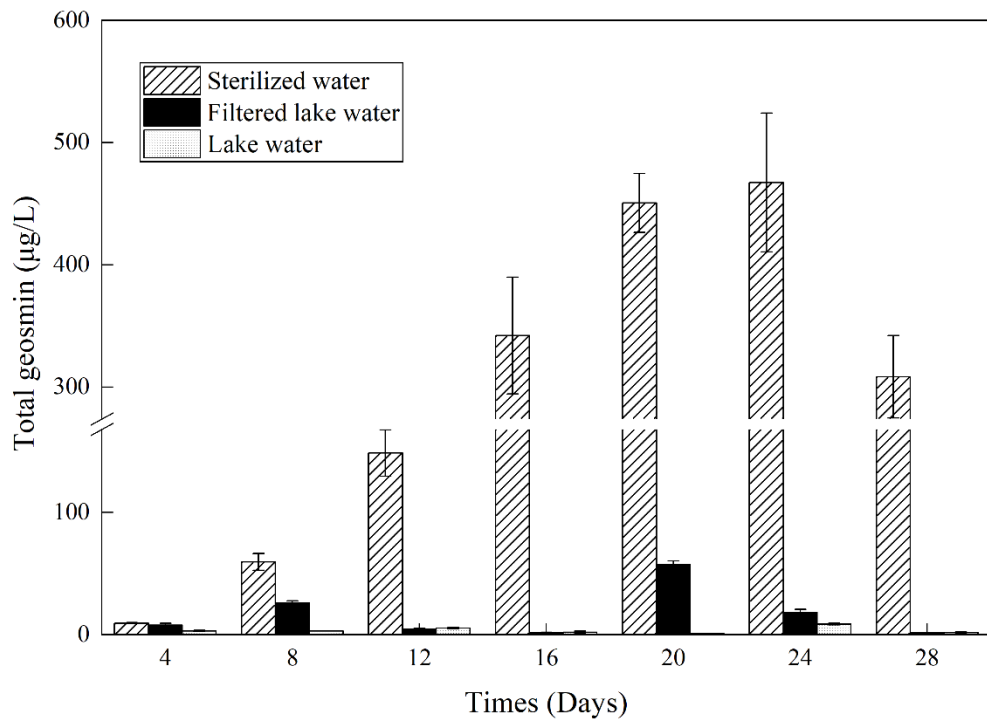


図 15 *D. smithii* NIES-824 の総 geosmin 産生の変化
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 夏サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

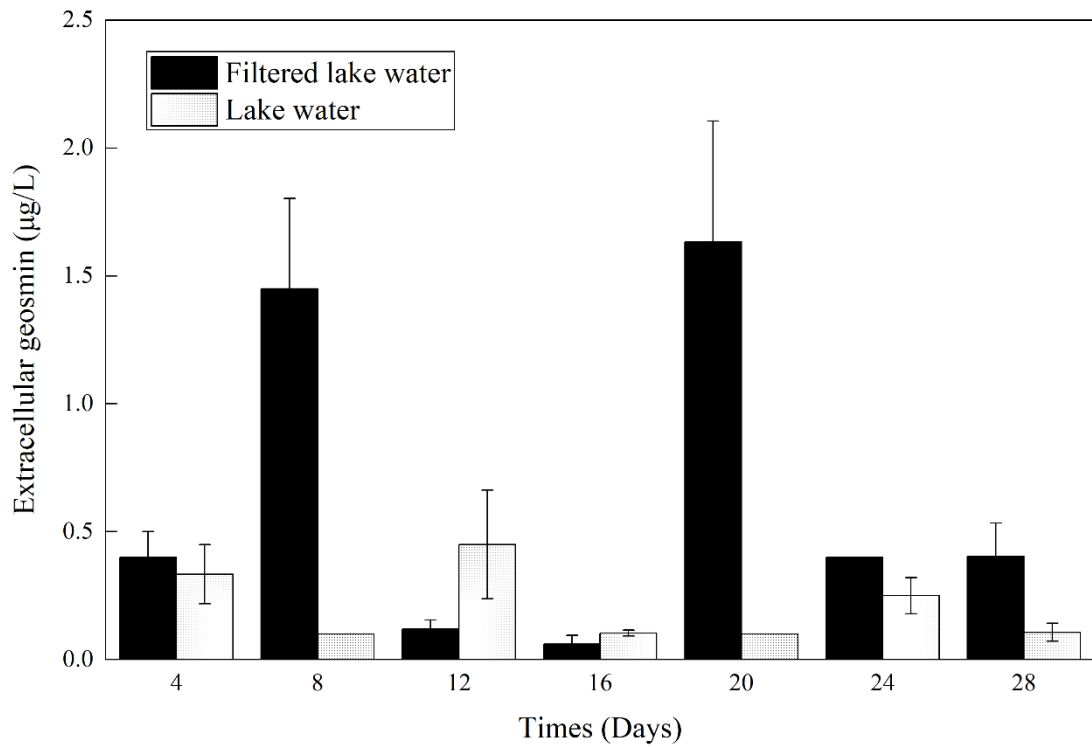
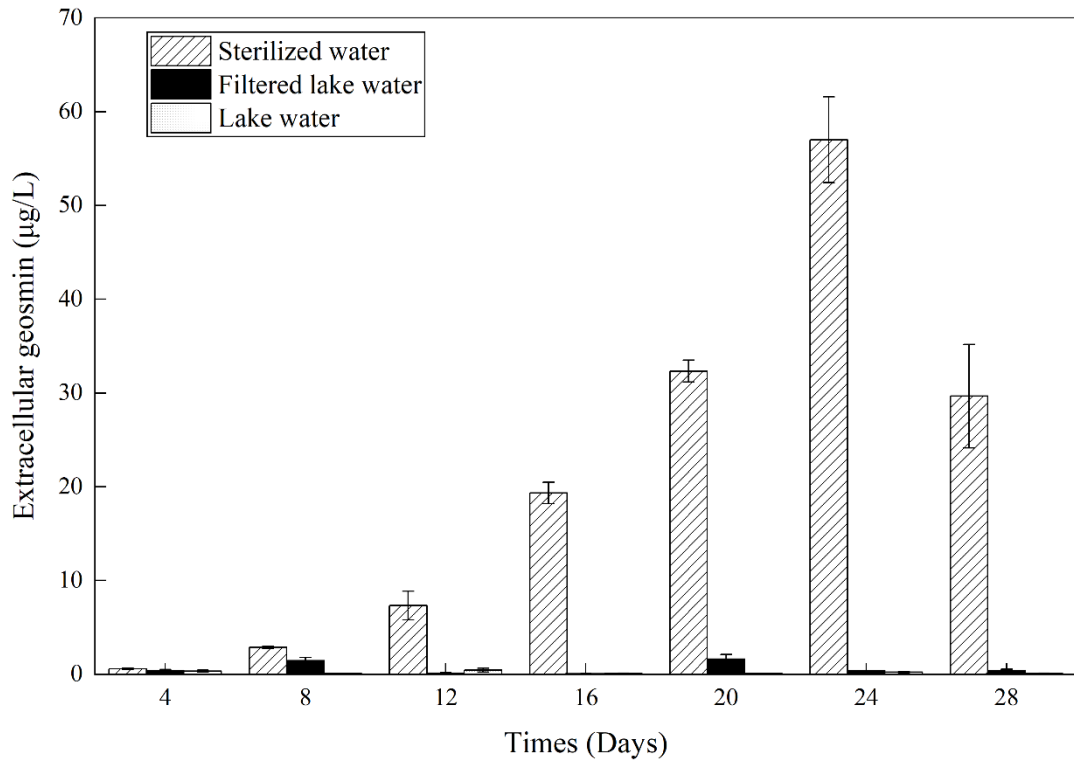


図 16 *D. smithii* NIES-824 の細胞外 geosmin 産生の変化
 (A) 夏サンプル湖水、(B) 夏サンプル湖水（低濃度結果の拡大図）

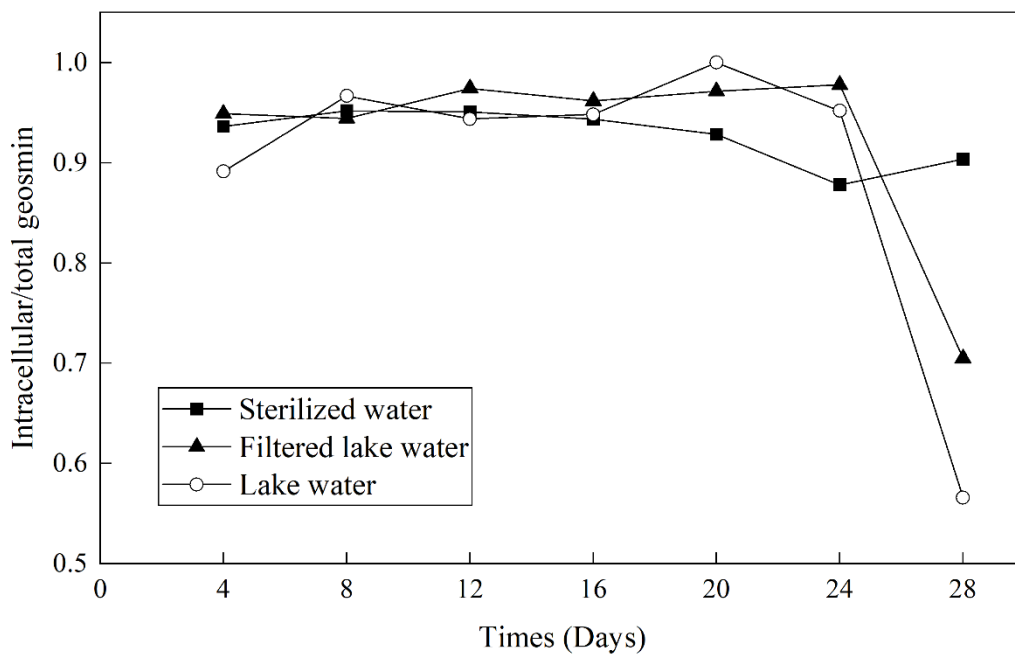


図 17 夏サンプル湖水における *D. smithii* NIES-824 の細胞内 geosmin 比率の変化

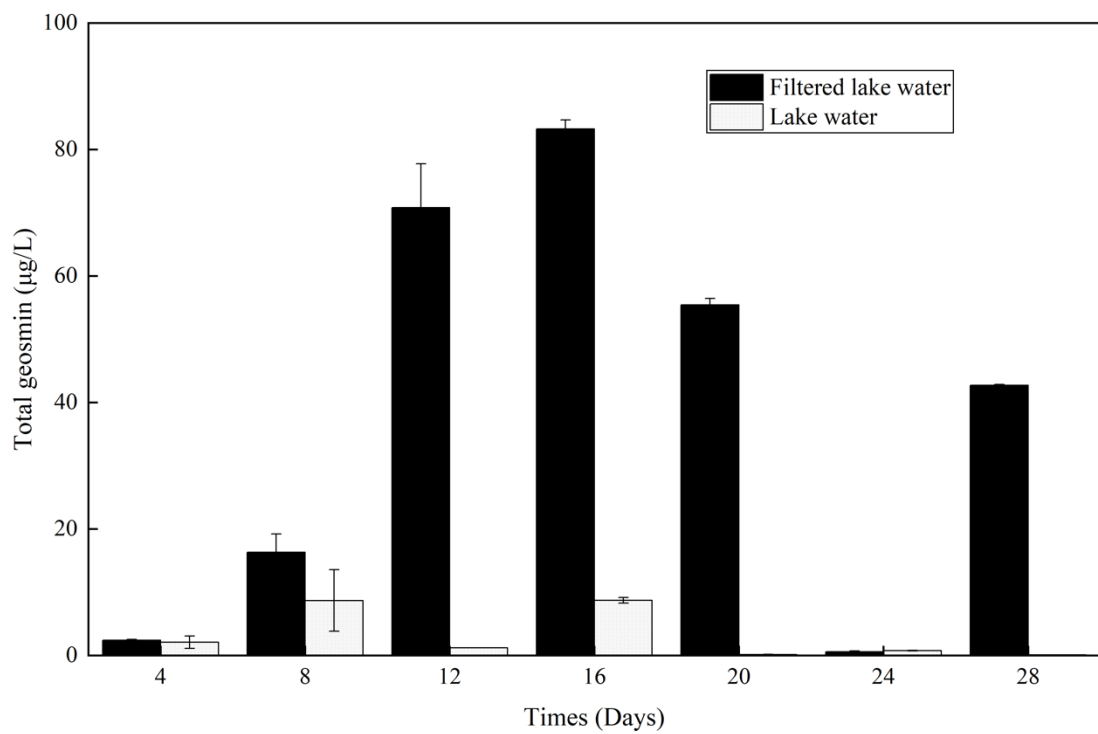
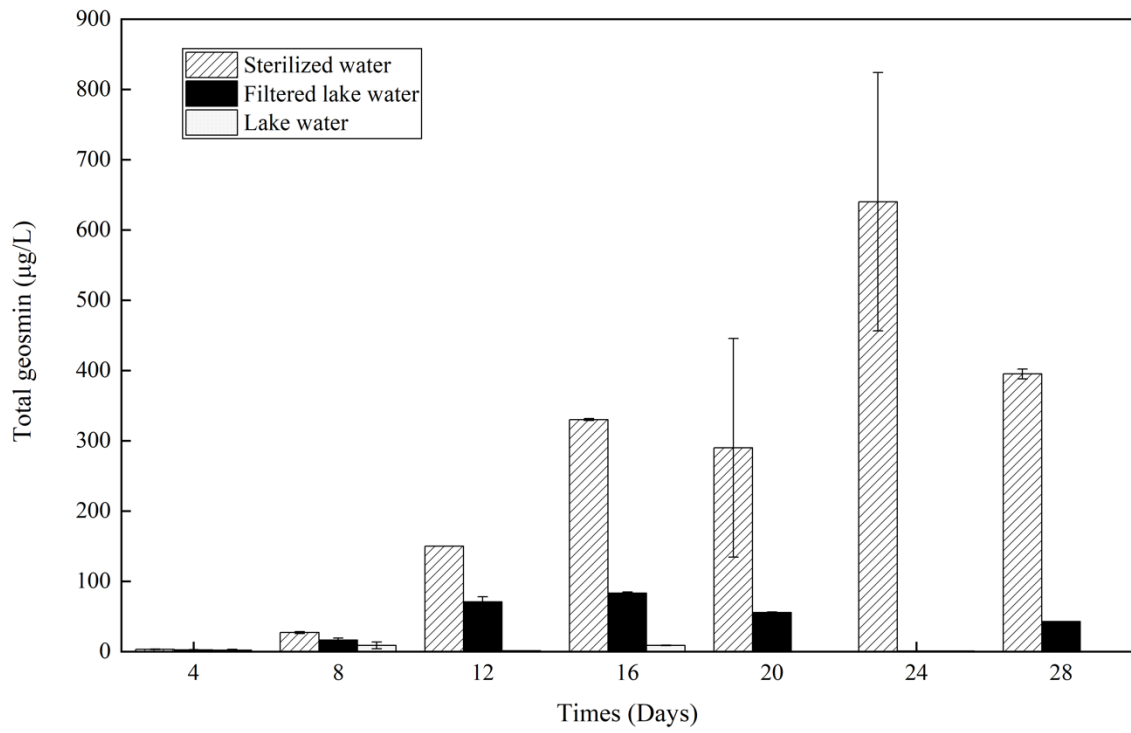


図 18 *D. smithii* NIES-824 の総 geosmin 産生の変化
 (A) 冬サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

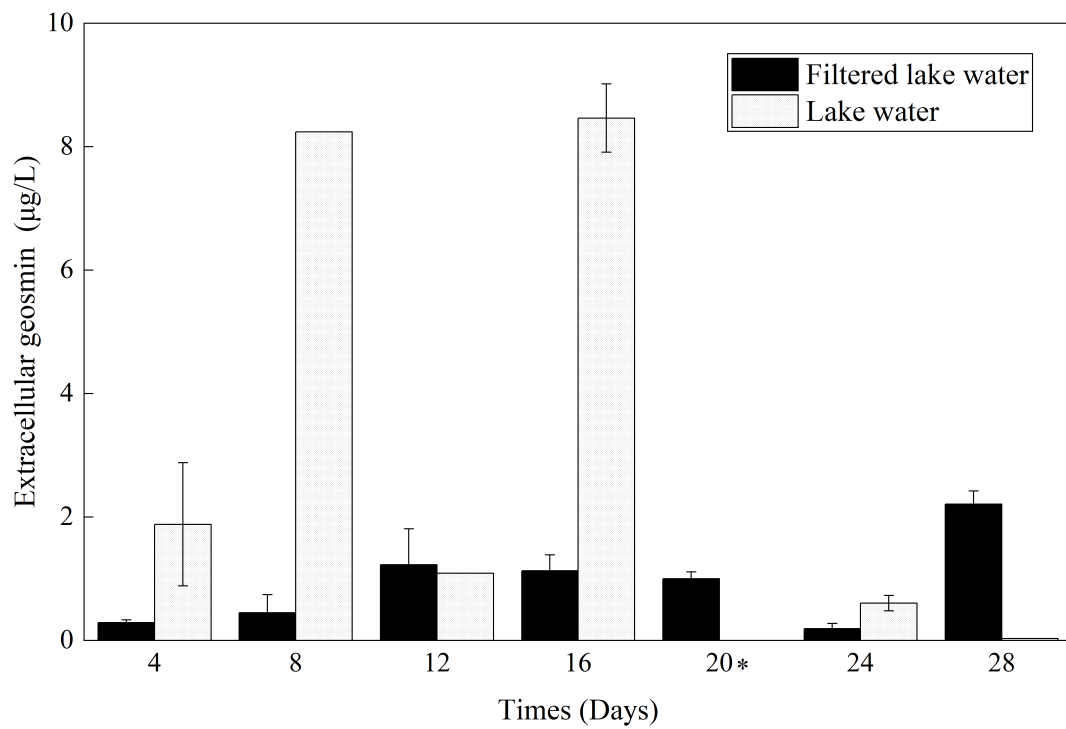
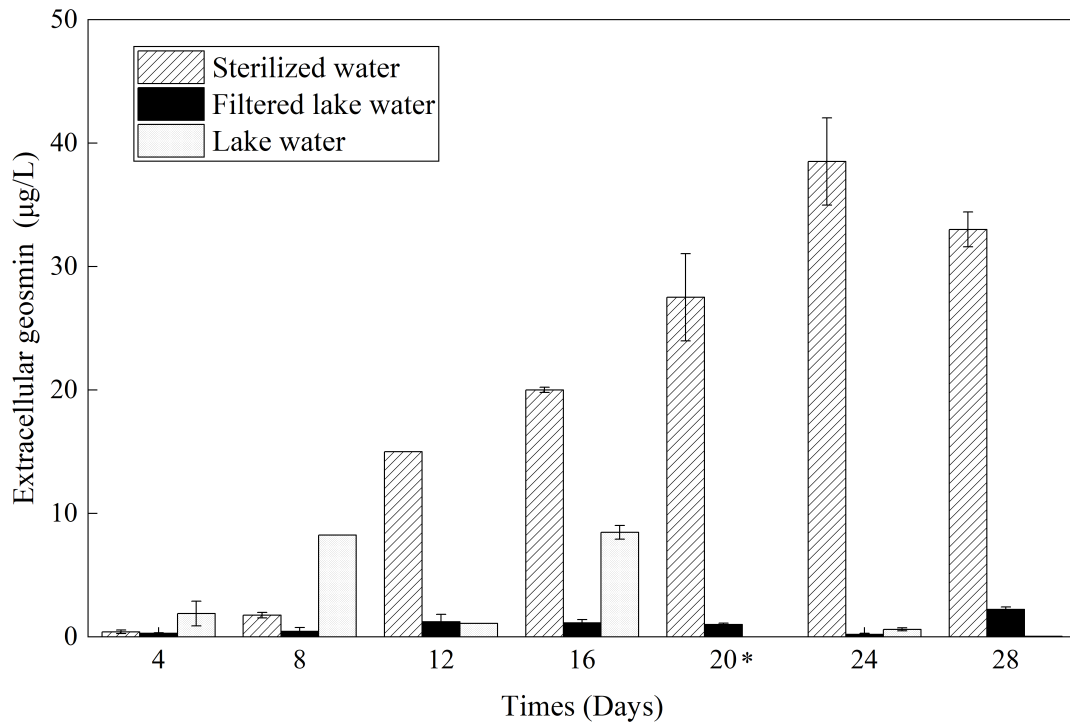


図 19 *D. smithii* NIES-824 の細胞外 geosmin 産生の変化

(A) 冬サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水 (低濃度結果の拡大図)

* 培養 20 日のデータは、分析装置エラーのためデータ無

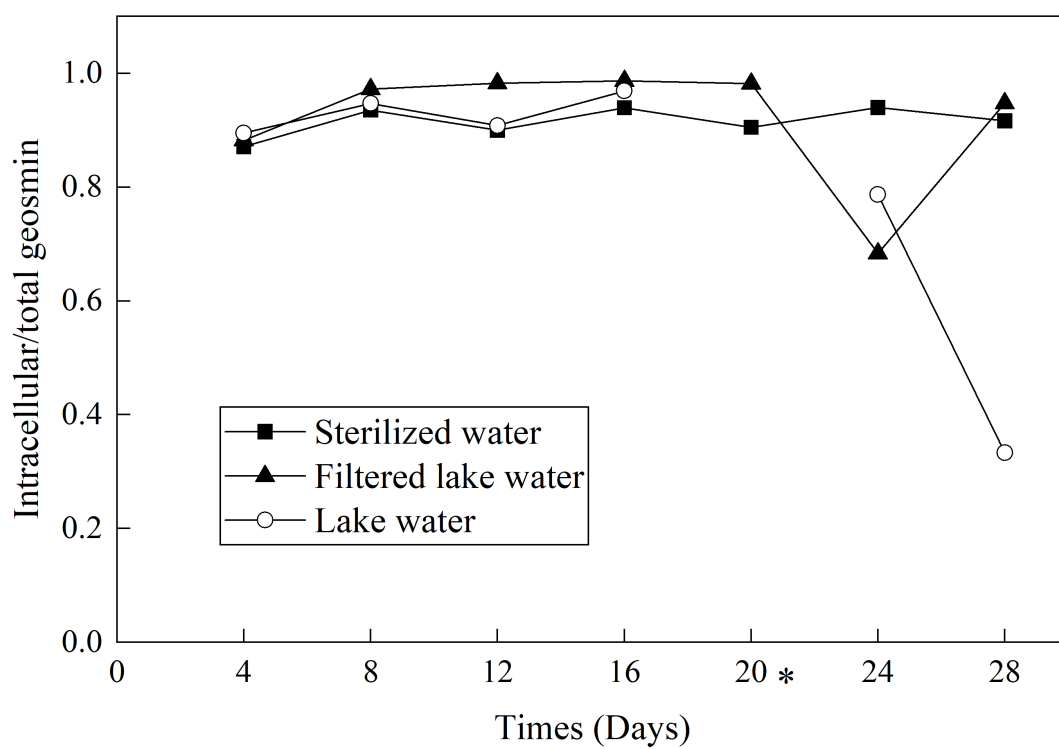


図 20 冬サンプル湖水における *D. smithii* NIES-824 の細胞内 geosmin 比率の変化

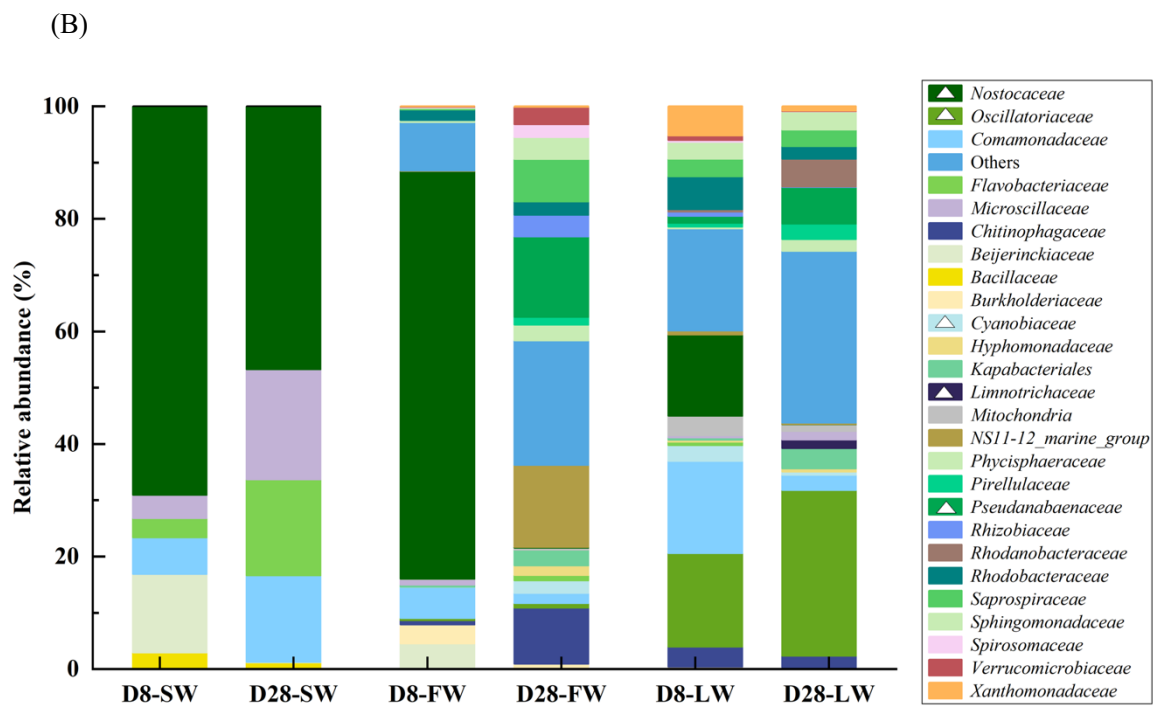
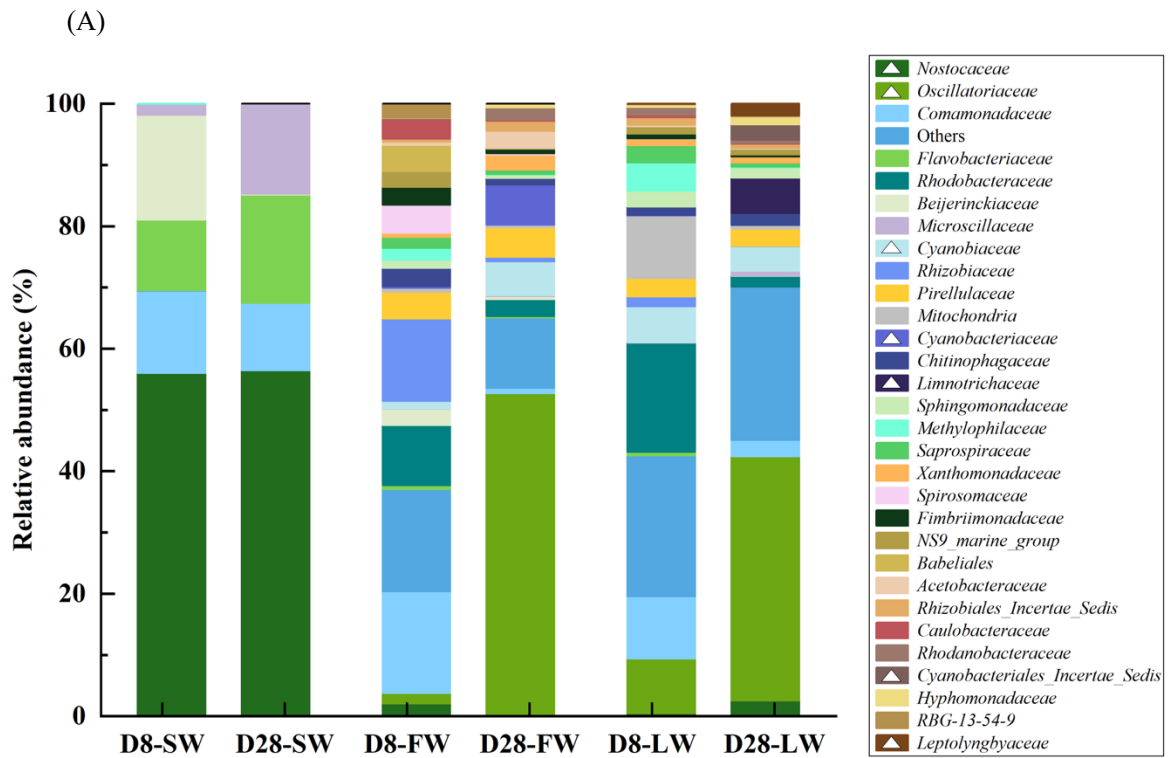


図 21 微生物群集構造解析

(A) 夏サンプル湖水を用いた実験結果、(B) 冬サンプル湖水を用いた実験結果

D8: 培養 8 日目、D28: 培養 28 日目、SW: 滅菌水系、FW: フィルターろ過湖水系、LW: 湖水系
シアノバクテリア門に属する科は、白三角で示す。Others は、比率が 5%未満であった科をまとめた。

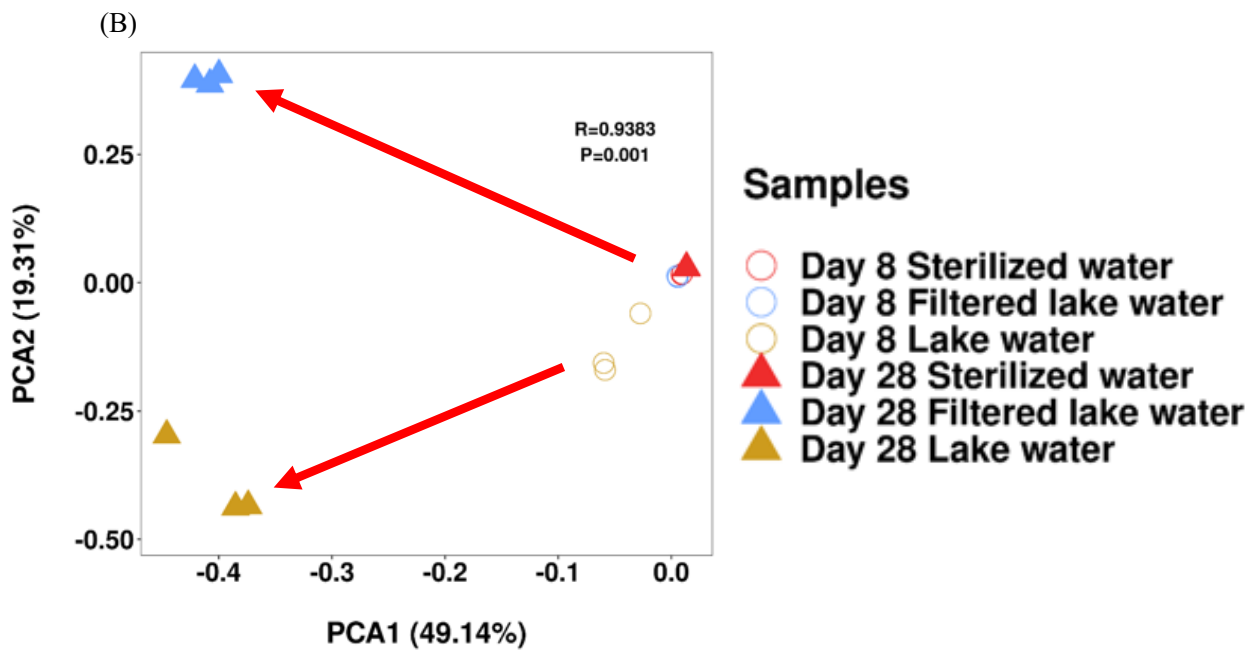
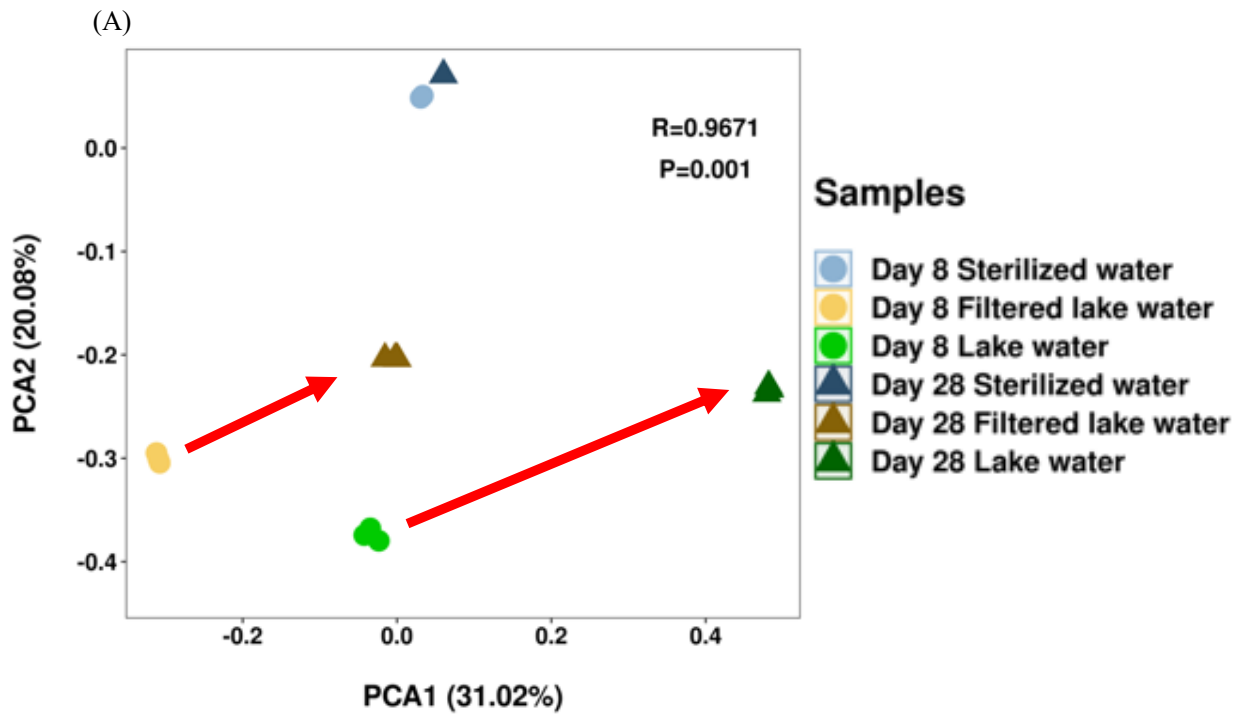


図 22 微生物群集構造の変化
(A) 夏サンプル湖水、(B) 冬サンプル湖水

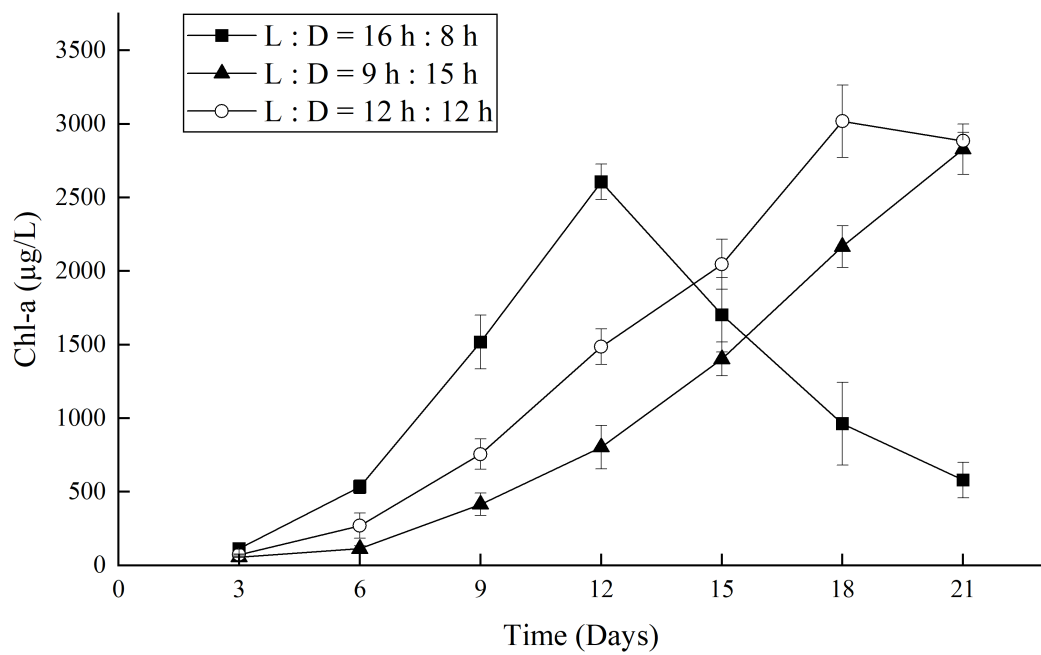


図 23 異なる日長条件における *D. smithii* NIES-824 の増殖特性

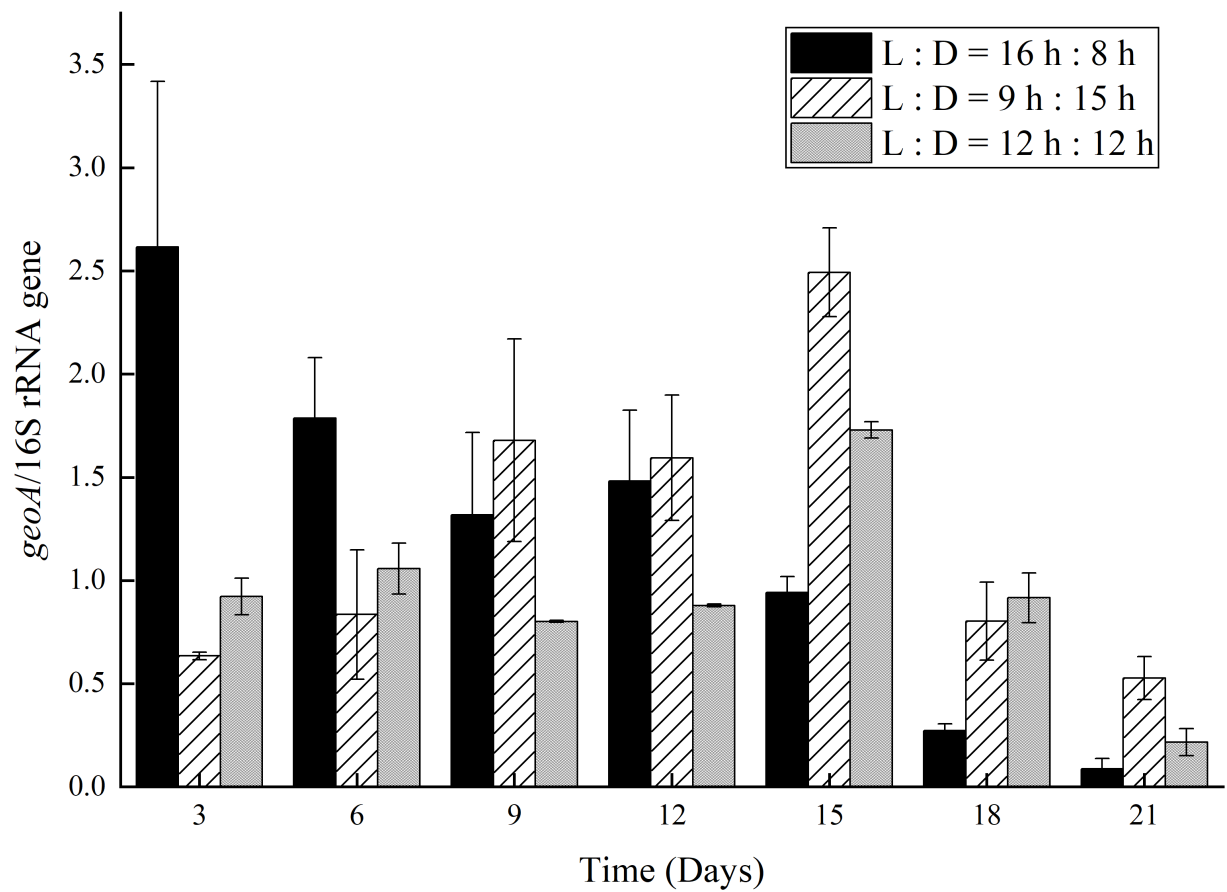


図 24 異なる日長条件における *geoA* 遺伝子発現量の変化

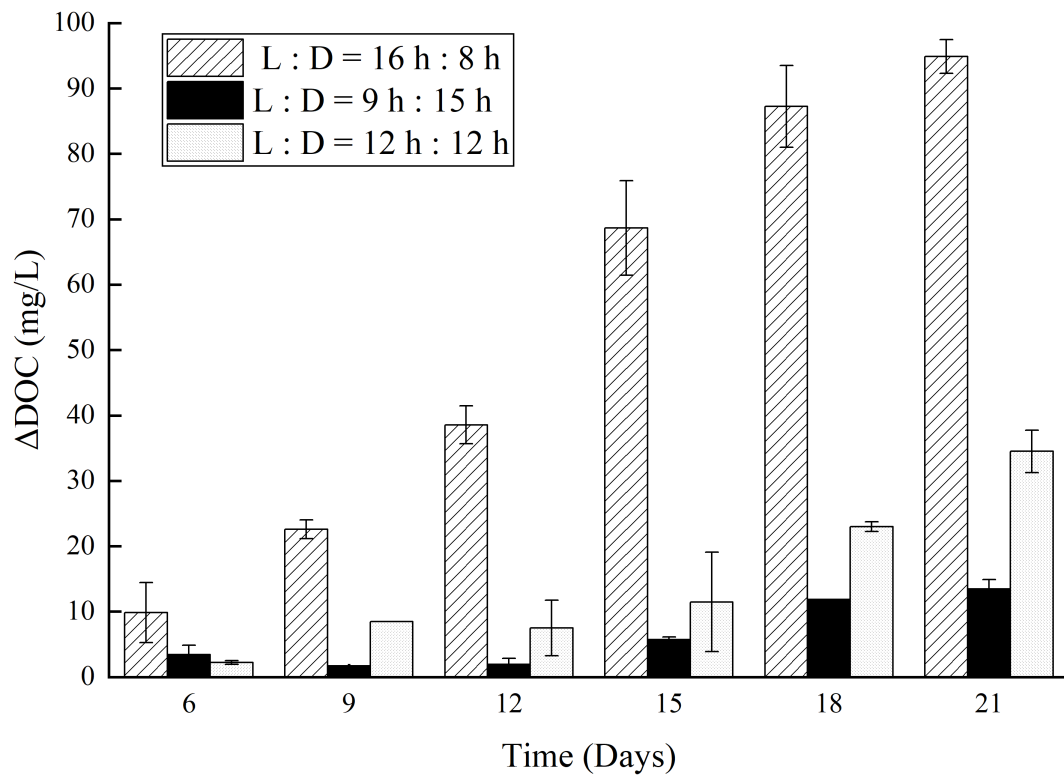


図 25 異なる日長条件における DOC の変化

