

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 京都大学大学院 工学研究科 准教授

研究要旨

障害生物の発生メカニズムや発生予測システムの構築のための知見を得ることを目的として河床付着物中のカビ臭原因物質産生藍藻類 *Microcoleus 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い、昨年度の結果と併せて評価を行った。またカビ臭原因物質産生株と非産生株について比増殖速度の違いについて検討を行った。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。得られた知見は以下のとおりである。

1) 2021 年 8 月、2022 年 8 月に A 川 4 地点について河床付着物中の *M. autumnalis* のカビ臭原因物質産生に関する表現形質について検討を行い、多くの OTU (Operational Taxonomic Unit) が両年で同地点で検出されていることが明らかとなった。上流と下流の *M. autumnalis* の生物相が異なること、地点特有の OTU が存在することや、ジェオスミン系統 (WILD-106、WILD-110) に位置付けられる OTU は上流から下流にかけて広範囲に分布することが明らかとなった。

2) 2022 年 8 月、A 川 A 地点ではカビ臭原因物質非産生の *M. autumnalis* が優占していることが示唆され、培養実験の結果からカビ臭原因物質非産生株、2-MIB 産生株の増殖速度の違いが一つの要因と考えられた。

3) 上流部、下流部からの単離株間、ジェオスミン産生株、2-MIB 産生株間で増殖およびカビ臭原因物質産生に関する特性が異なることや温度の影響が大きいことが明らかとなった。

気候変動にともなう水温上昇は、カビ臭被害の広域化や深刻化を引き起こす可能性があり、これらの知見を踏まえた上で、*M. autumnalis* 等障害生物の発生メカニズムをさらに解明し、水道水源における *M. autumnalis* 等障害生物の分布、季節的消長に関して知見を集積していくことが気候変動下の水道水質管理において重要であると考えられた。

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る環境条件の影響について検討を行ってきた。本年度は河床付着性藍藻類 *Microcoleus autumnalis* の発生メカニズムを解明

することを目的として、河床付着物中の *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い、昨年度の結果と併せて評価を行った。またカビ臭原因物質産生株と非産生株について比増殖速度の違いについて検討を行った。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) 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

関東地方の A 川の最上流 G 地点、上流 M 地点、中流 R 地点、下流 A 地点の 4 地点の河床から 2022 年 8 月 2 日に採取した 8 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。2021 年 8 月に同様にを行った調査結果と比較を行った。

2) *M. autumnalis* 単離株の系統解析

2022 年 8 月に A 川下流部の A 地点の河床付着物より単離した *M. autumnalis* WILD-300、301、303、305、306 を用いた。採取地点の水試料の 2-MIB 濃度は 43ng/L、ジェオスミン濃度は 0.5ng/L 未満であった。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 CYA108F、pits-CyanR¹⁾を用いて PCR を行い、精製後塩基配列(約 1900 塩基)を解析した。

3) *M. autumnalis* カビ臭産生株、非産生株の増殖速度の比較

2021 年 8 月 A 川下流部より単離されたカビ臭原因物質非産生株である WILD-108 と 2-MIB 産生株である WILD-109 を用いた。硝酸態窒素濃度を 0.2、0.4、0.6、1.0mg/L とした改変 CT 培地をねじ口試験管に 10 mL 加え、滅菌後に糸状体が 1mm/mL となるように接種した。20℃、2000Lux (12h 明/12h 暗)の条件下で培養を行った(各条件試験管 5 本)。培養 14 日目に各条件 3 本の試験管について糸状体数を計数した。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 0.2~1mg/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。さらに硝酸態窒素濃度 1mg/L の条件で 2-MIB 産生株である B-1 (分離源: A 川下流部)、ジェオスミン産生株である WILD-110 (A 川下流部)、2-MIB 産生株である WILD-105 (A 川上流部)、非産生株 WILD-300 (A 川下流部)を同様に培養を行い比増殖速度の比較を行った。

4) *M. autumnalis* 単離株の増殖・カビ臭産生に及ぼす温度の影響

ジェオスミン産生株である WILD-104 (分離源: 最上流部 G 地点)と WILD-110 (下流部 A 地点)、2-MIB 産生株である WILD-105 (上流部 M 地点)と WILD-109 (下流部 A 地点)を用いた。これらの 4 株は ITS 領域に差異があり、系統樹において分かれて位置づけられる。硝酸態窒素濃度を 1mg/L とした改変 CT 培地を用い 3)と同様に 20℃、25℃、30℃で培養を行った(各温度試験管 10 本程度)。培養 14 日目に項目ごと 3 本の試験管についてクロロフィル a およびカビ臭原因物質について測定を行った。

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)、ジェオスミンの濃度を測定した。

C. 研究結果および D. 考察

1) 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

A 川 4 地点 8 試料から 2021 年は合計 43 OTUs、2022 年は合計 41OTUs が得られた。さらに相同性

が 99%以上のものを同一の OTU としたところ各年で 23 OTUs、21OTUs が得られた。21 年と 22 年の道志川の OTU の塩基配列を比較してみると 16OTUs 間の相同性が 99%以上となり共通していた。21 年・22 年で共通して検出された 16OTUs の分布および推定される表現形質を示した(表 1)。左から順に、共通している 16OTUs、検出された場所、系統樹で同じ位置に位置づけられた株を示している。G 地点と A 地点を比較すると共通して検出されている OTU がみられず、生物相が異なることが明らかとなった。多くの OTU が両年で同地点で検出されていることが明らかとなった。非産生 (B-3、WILD-108) の系統に位置づけられた OTU やジェオスミン (WILD-104) の系統に位置づけられた OTU のように 1 か所のみで検出された OTU が、合計で 8 OTU あり、地点特有の OTU が存在することが明らかとなった。WILD-106、WILD-110 のジェオスミン系統に位置付けられる OTU は上流から下流にかけて広範囲に分布することが明らかとなった。

2) *M. autumnalis* 単離株の系統解析

解析した 5 株はすべて非産生株 (WILD-108) の系統に位置づけられた(図 1)。また、カビ臭原因物質合成酵素遺伝子の PCR において増幅が見られなかった。単離した株がすべて非産生の系統に位置づけられたため、本試料において非産生株が優占していることが示唆された。

3) *M. autumnalis* カビ臭産生株、非産生株の増殖速度の比較

WILD-109 は硝酸態窒素濃度 0.2mg/L において増殖がみられなかった(図 2)。両株ともに窒素濃度が高まるにつれて比増殖速度が高まり、すべての濃度において WILD-108 の方が大きいことが明らかとなった。2)に示したように、河床付着物中に非産生の *M. autumnalis* が優占している要因として増殖速度の違いが示唆された。さらに硝酸態窒素濃度 1mg/L の条件で、カビ臭原因物質産生株 3 株と非産生株である WILD-108 と同じ系統の 1 株の比増殖速度の比較を行ったが、非産生株のほうが大きい傾向にあることが明らかとなった(図 3)。

4) *M. autumnalis* 単離株の増殖・カビ臭産生に及ぼす温度の影響

ジェオスミン産生株間の比較において下流部から単離した WILD-110 は 20℃、25℃、30℃において増殖するが、最上流部から単離した WILD-104 は 30℃で増殖しないことが明らかとなった(図 4)。最上流部から単離した WILD-104 は 30℃といった高温に適応していないと考えられた。ジェオスミン総量は WILD-104 で 20℃、25℃で同程度、WILD-110 で 25℃最も高かった(図 5)。WILD-110 の溶存態ジェオスミン濃度は 20℃より 25、30℃のほうが高く、最大で 100ng/L 程度であった(図 6)。溶存態比率は最大で 10%程度であった(図 7)。

2-MIB 産生株間における比較では、両株ともに 20~30℃で増殖し(図 8)、下流部から単離した WILD-109 は 2-MIB 総量に温度依存性は見られないうが、上流部から単離した WILD-105 は温度の増加とともに 2-MIB 総量が高まる傾向がみられた

(図 9)。溶存態 2-MIB 濃度は温度とともに高まり、WILD-109 のほうがより高いことが明らかとなった(図 10)。この結果は A 川において夏季に 2-MIB 濃度が高まる現象と一致すると考えられた。30℃において WILD-110 のジェオスミンの溶存態比率は 10%、藻体内比率は 90%(図 7)、WILD-109 の 2-MIB の溶存態比率は 83%、藻体内比率は 17%であり(図 11)、A 川において 2-MIB が高まり問題となるのはこのような産生特性の違いが一つの要因と考えられた。

E. 結論

- 1) 2021 年 8 月、2022 年 8 月の A 川 4 地点について河床付着物中の *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に関する表現形質について推定を行った結果、多くの OTU が両年で同地点で検出されていることが明らかとなった。地点特有の OTU が存在することや、ジェオスミン系統(WILD-106、WILD-110)に位置付けられる OTU は上流から下流にかけて広範囲に分布することが明らかとなった。
- 2) A 川 A 地点ではカビ臭原因物質非産生の *M. autumnalis* が優占していることが示唆され、カビ臭原因物質非産生株、2-MIB 産生株の増殖速度の違いが一つの要因と考えられた。
- 3) 上流部、下流部からの単離株間、ジェオスミン産生株、2-MIB 産生株間で増殖およびカビ臭原因物質産生に関する特性が異なることや温度の影響が大きいことが明らかとなった。

付着性藍藻類 *M. autumnalis* の生物相が地点間で異なることや地点特有の OTU の存在が明らかとなり、*M. autumnalis* の生態に関する有用な知見が得られた。単離株に関する検討では、カビ臭原因物質産生株よりも非産生株のほうが増殖速度が大きいこと、カビ臭産生株間で特性が異なること、増殖や溶存態カビ臭原因物質濃度に培養温度が影響すること、溶存態濃度はジェオスミンに比較して 2-MIB のほうが高まりやすいことなどが明らかとなった。溶存態の 2-MIB 濃度は 20℃～30℃の温度範囲において、温度が高まるにつれて高まる傾向にあり、気候変動にともなう水温上昇は、カビ臭被害の広域化や深刻化を引き起こす可能性がある。非産生株の比増殖速度が 2-MIB 産生株に比べて大きいことが明らかとなったが、実際の水域で 2-MIB 産生株が淘汰されない要因等いまだに不明であり、さらなる検討が必要と考えられる。様々な表現形質の *M. autumnalis* がすみ分け

をしたり、共存するメカニズムも不明である。これらの知見を踏まえた上で、*M. autumnalis* 等障害生物の発生メカニズムをさらに解明し、水道水源における *M. autumnalis* 等障害生物の分布、季節的消長に関して知見を集積していくことが気候変動下の水道水質管理において重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

藤本尚志, 浅田安廣, 大西章博, 曾厚嘉, 清水和哉, 秋葉道宏. 藍藻類単離株および水道水源試料のカビ臭原因物質合成酵素遺伝子の解析. 水道協会雑誌 2023;92(10): 4-15.

2. 学会発表

藤田優里, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太, 藤原俊一郎, 大西章博, 曾厚嘉, 秋葉道宏. 分子生物学的手法による河床付着物中の *Microcoleus autumnalis* のカビ臭原因物質産生に関する表現形質の推定. 令和 5 年度日本水道協会全国会議; 2023.10.18-20; 東京.

藤田優里, 藤本尚志, 浅田安廣, 松本恭太, 大西章博, 曾厚嘉, 秋葉道宏. 道志川から単離した *Microcoleus autumnalis* の分子系統解析および増殖・カビ臭原因物質産生特性. 第 58 回日本水環境学会年会; 2024.3.6-8; 福岡.

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).

表1 A川において2021年・2022年で共通して検出された16OTUsの分布

D 2021	D 2022	G 地点	M 地点	R 地点	A 地点	系統樹で同位置の株
1	5	2021			2021	geosm in (W 106・W 110)
2	8				2021	
3	4			2021		2-M IB (W 105・W 107)
4	2				2021	
5	1		2021			
6	10			2021		
7	6					非産生 (B3)
8	9					非産生 (W 108)
9	14					
10	14					
11	3			2022	2022	
14	13					geosm in (W 104)
16	16					
20	11					
22	7					
21	18	2022	2021			

濃色は両年で検出、淡色はどちらかの年のみで検出されたものを表す。

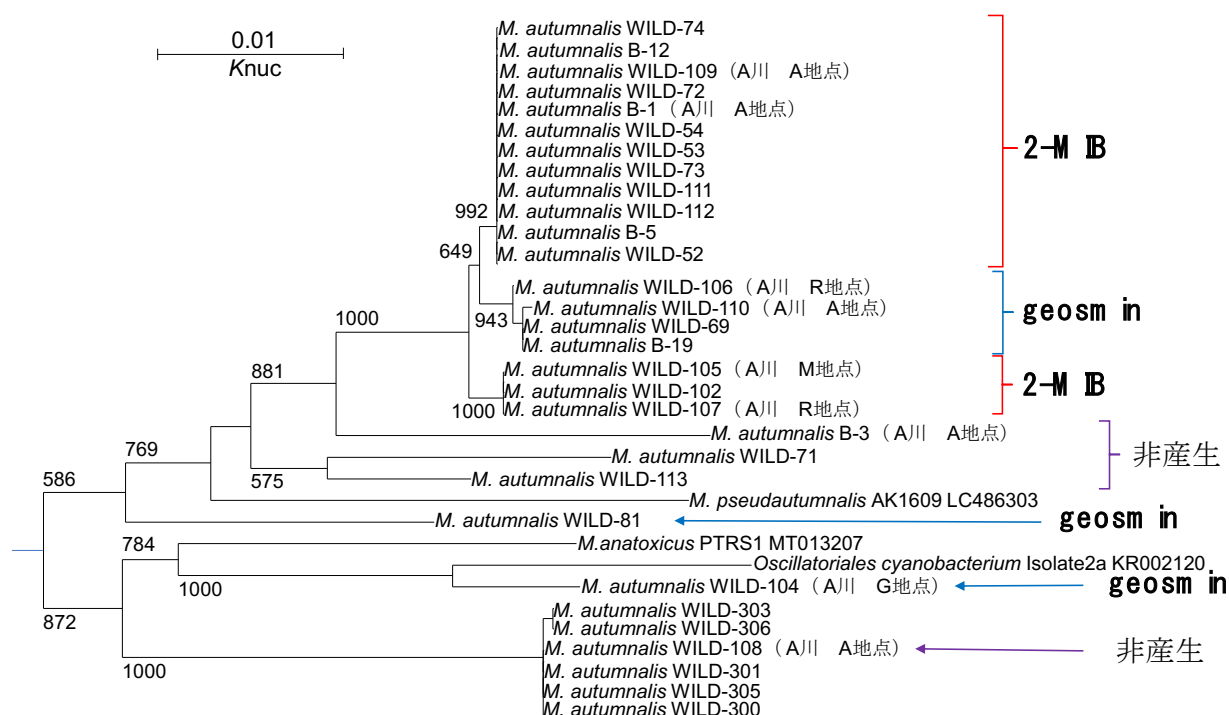


図1 16S rRNA 遺伝子および16S-23S-ITS領域に基づく系統樹 (約1900塩基に基づいて作成・アウトグループは省略)

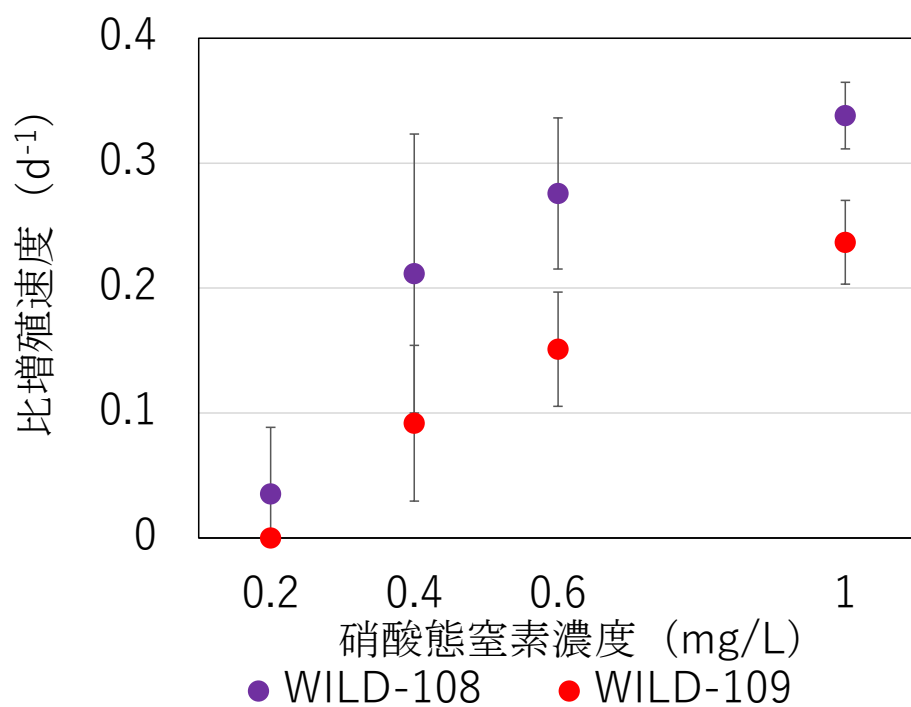


図2 2-MIB 産生株 (WILD-109)、非産生株 (WILD-108) の比増殖速度に及ぼす硝酸態窒素濃度の影響

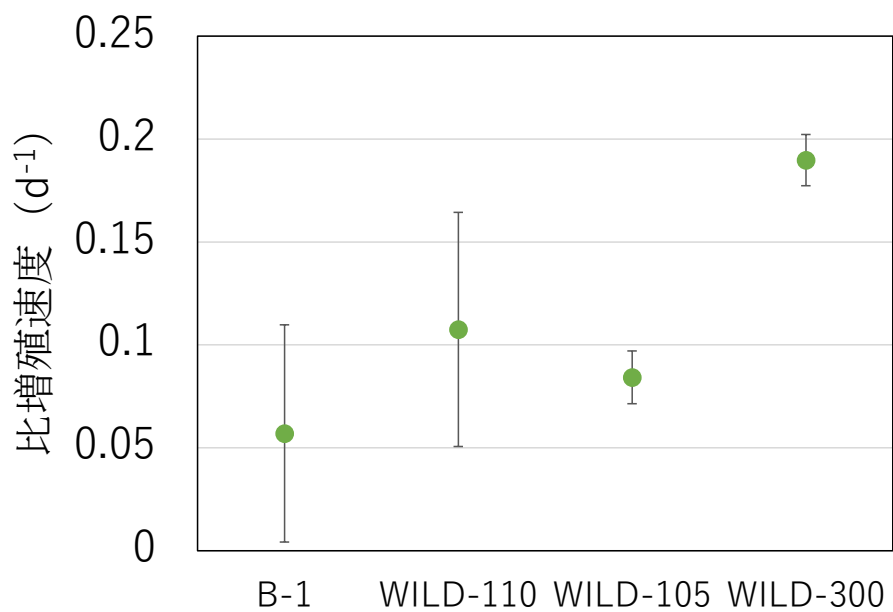


図3 カビ臭原因物質産生株 (B-1, WILD-110, WILD-105)、非産生株 (WILD-300) の比増殖速度の比較 (硝酸態窒素濃度 1mg/L)

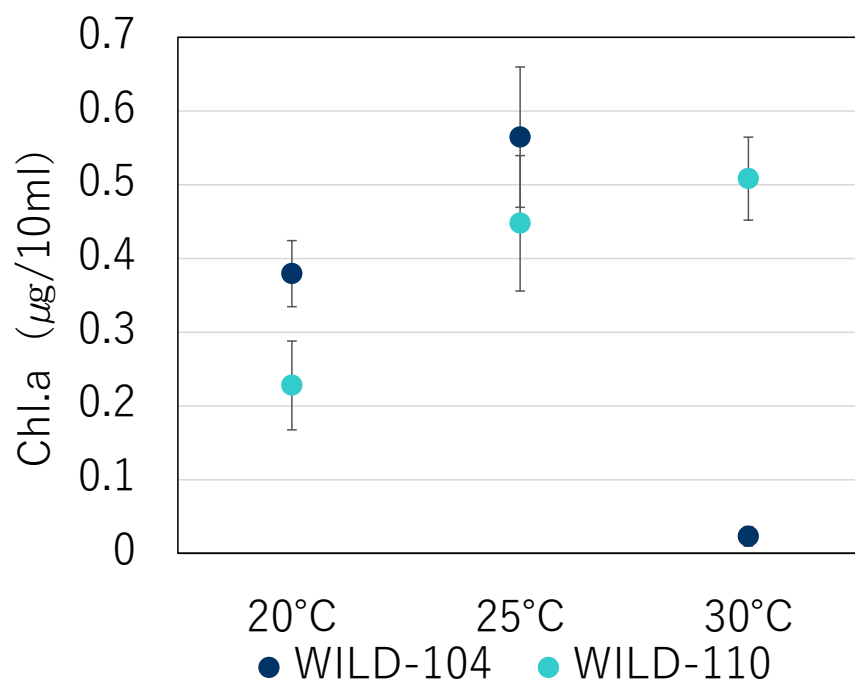


図4 ジェオスミン産生株の培養 14 日目における Chl.a 量

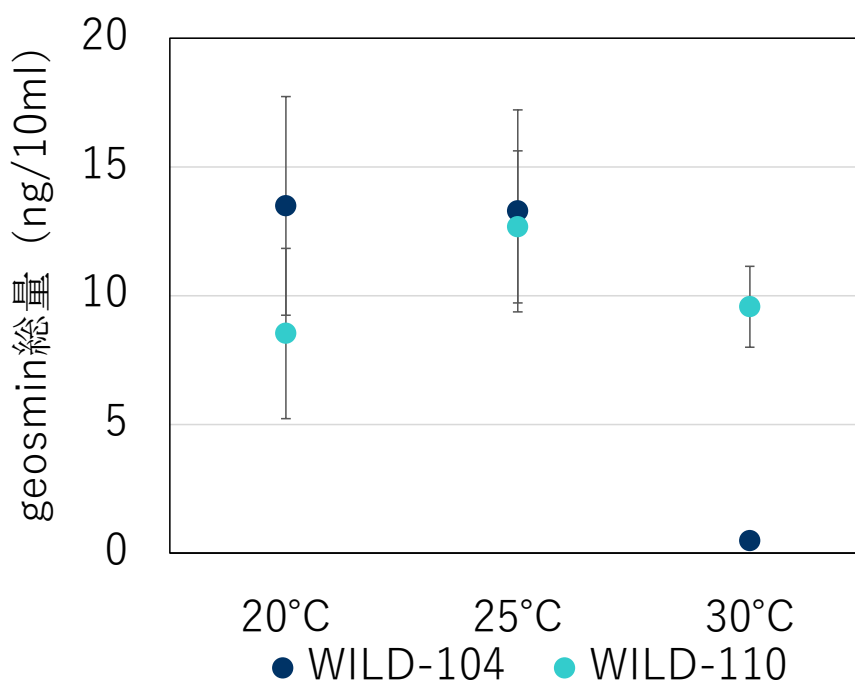


図5 ジェオスミン産生株の培養 14 日目におけるジェオスミン総量

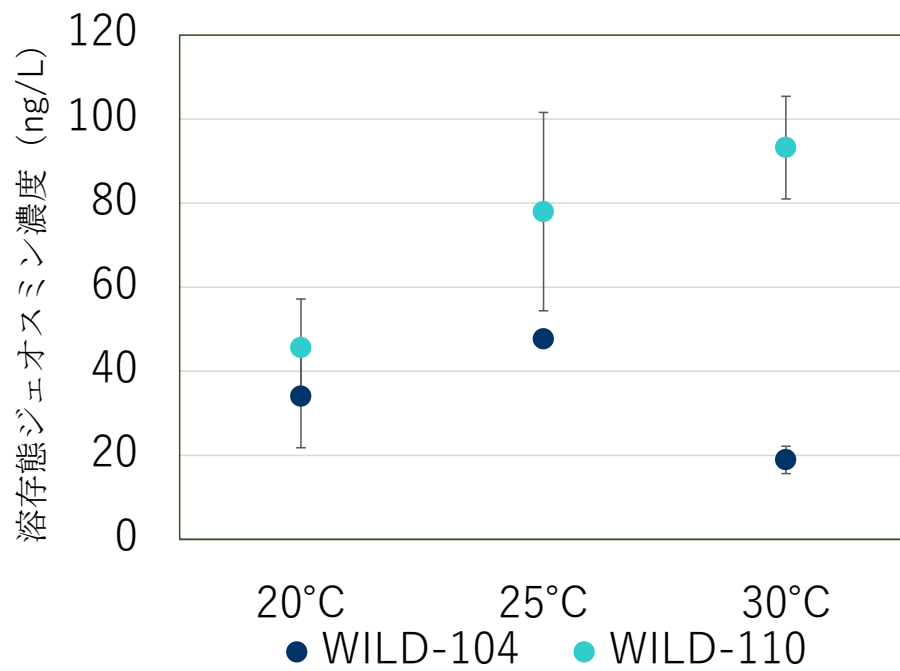


図6 ジェオスミン産生株の培養14日目における溶存態ジェオスミン濃度

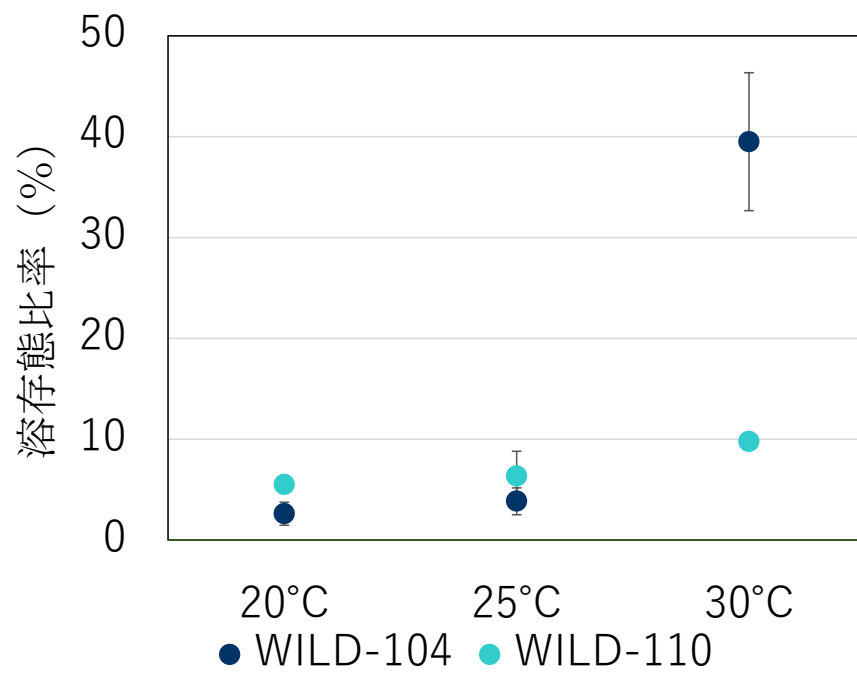


図7 ジェオスミン産生株の培養14日目におけるジェオスミン総量に占める溶存態比率

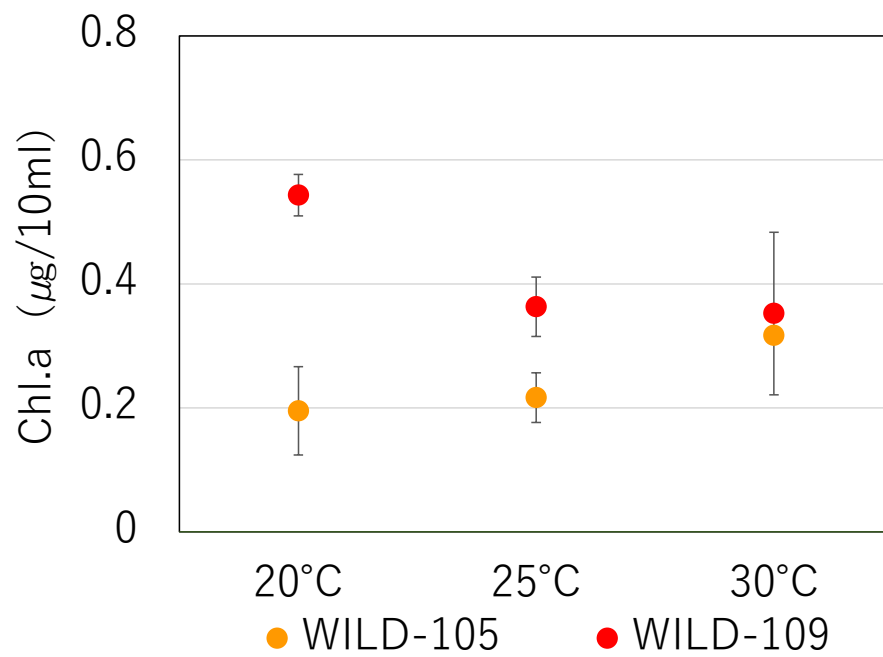


図 8 2-MIB 産生株の培養 14 日目における Chl.a 量

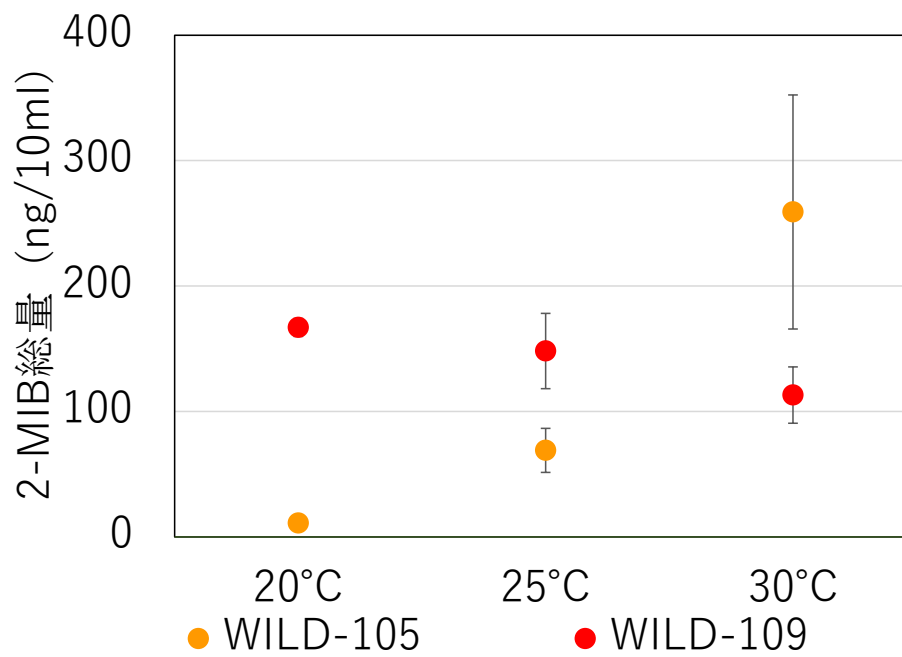


図 9 2-MIB 産生株の培養 14 日目における 2-MIB 総量

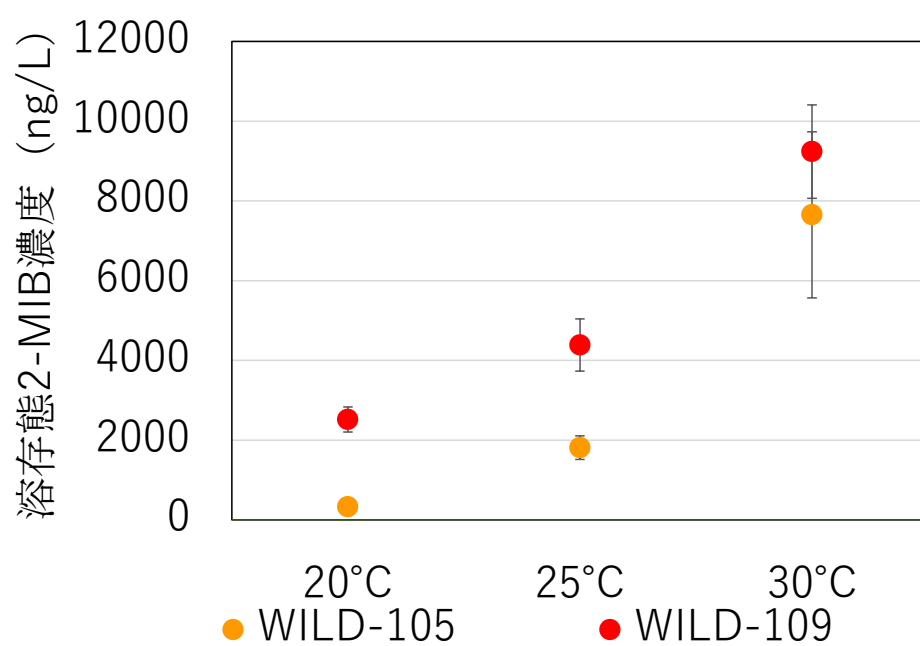


図 10 2-MIB 産生株の培養 14 日目における溶存態 2-MIB 濃度

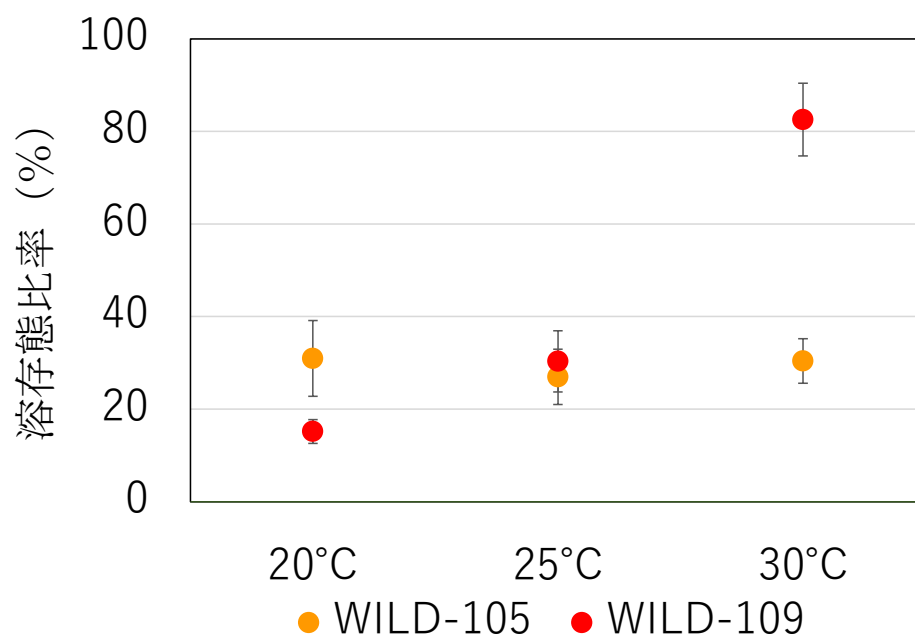


図 11 2-MIB 産生株の培養 14 日目における 2-MIB 総量に占める溶存態比率

