

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04767

研究課題名（和文）オンサイト調査に向けたカビ臭原因物質産生藍藻類の迅速モニタリング手法の開発

研究課題名（英文）Development of on-site monitoring method for identification of musty odor producing cyanobacteria

研究代表者

浅田 安廣（Asada, Yasuhiro）

国立保健医療科学院・その他部局等・主任研究官

研究者番号：60610524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：近年、藻類が産生するカビ臭原因物質である2-メチルイソボルネオール(2-MIB)及びジェオスミンが多くの水道事業者へ異臭味被害をもたらしている。対策として水源でのカビ臭産生藍藻類のモニタリングとその情報に基づく浄水場での対応が挙げられるが、モニタリングで実施される顕微鏡による形態観察において、水源に存在する様々な生物の中から形態のみで産生株、非産生株を判断することが難しい。そこで、本研究ではカビ臭産生藍藻類を簡易同定可能な定量PCR系を構築し、現地あるいは浄水場で簡易的にモニタリング可能な手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
カビ臭産生藻類の代謝経路に関連する合成酵素遺伝子に対して、遺伝子検査を用いてカビ臭産生藻類を検出、監視しようとする試みはすでに実施されている。しかし、属レベルで同定可能な定量PCRについては十分な成果があげられていない。本研究では、新たに属レベルで簡易同定可能なPCR系を構築した点で、学術的に意義が大きいと考えられる。また、現地あるいは浄水場で簡易的にモニタリング可能な手法を開発でき、カビ臭が産生した水源での原因藻類を数時間で同定可能であることから、今後の藻類監視への活用は大いに期待でき、社会的意義が非常に高い成果を得たと言える。

研究成果の概要（英文）：2-methylisoborneol(2-MIB) and geosmin produced by cyanobacteria have been causing taste & odor problems in drinking water system. Drinking water utilities usually monitor cyanobacteria in water sources. However, it is difficult to identify musty-odor producing cyanobacteria in the water source by morphological observation using a microscope. In this study, we constructed a quantitative PCR for identification of genus of mold odor-producing cyanobacteria, and developed a method that enables easily monitoring at the site or water purification plant.

研究分野：水道工学

キーワード：藍藻類 カビ臭 遺伝子検査 監視技術

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

水道ではカビ臭原因物質による異臭味問題が顕在化しており、その対策が求められている。対策の一つとしては、水源でのカビ臭原因藍藻類の制御、早期モニタリング、浄水場での粉末活性炭による除去が挙げられるが、浄水場取水口に急激に上昇したカビ臭原因物質が流入した場合、粉末活性炭による除去で制御できないケースが存在する。そのため、水源でのカビ臭原因藍藻類の管理が水道水のカビ臭問題を制御する上で重要となる。水源流域における原因生物の発生について、その把握方法は顕微鏡観察が主となっている。藍藻類において、属レベルでの違いは簡易に区別可能であるが、同じ属ではあるがカビ臭原因物質を産生する種と産生しない種が水源には混在しており、その形態について区別するのは困難である。そのため、顕微鏡観察による藻類のカウント数の増加とカビ臭原因物質濃度の上昇が一致しないケースが存在してしまう。そこで、顕微鏡観察に代わるカビ臭原因物質産生種の存在把握を水源調査で実施可能な新たな手法が求められる。

カビ臭原因物質産生藍藻類を感度高く検出する手法として、リアルタイム PCR による定量が挙げられる。様々な研究者が、カビ臭原因物質の代謝経路に関連する合成酵素遺伝子(ジェオスミン: *geoA* 遺伝子、2-MIB: 2-MIB 合成遺伝子)を対象として、カビ臭原因物質産生藍藻類の検出を既に試みている<sup>1)</sup>。しかし、対象としている遺伝子領域では各遺伝子の保有については把握可能ではあるが、属ごとの存在については把握することができない。水道水源での管理においては顕微鏡観察も重要視されることから、検出の際には「どのような種が存在するのか」という情報も不可欠である。そして情報を早く取得する必要があることから、水源、あるいは浄水場で簡易的に操作できる手法が求められる。

### 2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、原因となる藍藻類を管理する方法として、属判定も含むカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易迅速検出方法を検討し、水道事業者が利用可能な、新たにポータブル型遺伝子検出装置を用いた現地でのカビ臭原因藍藻類の簡便で迅速な検出方法について確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 定量 PCR 系の構築

水道水源より単離したカビ臭物質産生藍藻株を培養し、DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN) を用いて培養液から DNA を抽出した。そして、PCR にて対象領域(2-MIB 合成酵素遺伝子及び *geoA* 遺伝子<sup>2)</sup>)の増幅を行い、得られた PCR 精製試料について DNA 配列情報を取得し、MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)を用いて比較し、カビ臭原因藍藻類として下記に示す代表的な 5 属について同定・定量可能なプライマー対を設計した。

#### 1. *geoA* 遺伝子

① *Dolichospermum* 属、② *Aphanizomenon* 属

2. 2-MIB 合成酵素遺伝子

③ *Pseudanabaena* 属、④ *Planktothricoides* 属、⑤ *Microcoleus* 属

そして、カビ臭物質産生藍藻類と判定した株から抽出した DNA 溶液を用いて、定量 PCR 系の構築を行った。カビ臭が発生する水源 A の水試料を用いて、構築した定量 PCR 系の有用性を評価した。

#### (2) オンサイトモニタリング方法の検討

現場でも迅速に PCR が実施可能なモニタリング手法を検討するために、バッテリー式のポータブル型リアルタイム PCR 装置、そして全て内蔵バッテリー式あるいは電池式の装置を用いて検討を行った。

水源 B の水試料(カビ臭原因藻類が検出しないことを確認済)に対して、カビ臭産生が確認されている水道水源から単離培養した 4 種の藍藻類① *Dolichospermum circinale*、② *Aphanizomenon gracile*、③ *Pseudanabaena limnetica*、④ *Planktothricoides raciborskii* の単離培養液を添加し、DNA 抽出用試料とした。試料中の各藻類の細胞数は、プランクトン計数盤を用いて測定した。DNA 抽出に当たっては、試料を Merck 社製 Sterivex フィルターユニットを用いて 50 mL をろ過後、DNA 抽出液を添加し、電池式ボルテックスミキサーを用いて 10 分間振とうを行った。その後、DNA 抽出液を押し出し、得られた抽出液を PCR に供した。

DNA 抽出方法の比較検討の為、A 社製 DNA 簡易抽出キット及び B 社製 DNA 簡易抽出キットの 2 種類を使用し、振とう時の粉碎ボール(以下、ビーズと呼ぶ。)の添加の有無を分け、計 4 パターンで比較した。抽出方法の違いによる DNA 回収率を比較するため、DNeasy PowerSoil Pro Kit (QIAGEN) で抽出した DNA の回収率を 100% とし、それぞれの抽出方法の回収率を評価した。

付着性藻類である *Microcoleus* 属の検証では、*Microcoleus autumnalis* の単離培養株を用いた。まず、単離培養した藻体をピックアップして、1.5mL チューブに入れ、電池式のホモジナイザーで藻体をすりつぶした。そして、遠心後の上澄液をそのまま定量 PCR に供した。

最後にカビ臭が確認された水源 C の水試料、水源 D の岩試料を用いて、各手法の有用性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 定量 PCR 系の構築

実験室で保有している培養株及び水源試料の DNA 試料に対し、本研究で構築した定量 PCR を適用した結果、非特異的増幅はなく、各プライマー対で判定可能な属と同じ種であるカビ臭原因藍藻類のみを選択的に検出することができた(図 1)。よって、本研究で決定した定量 PCR を適用することで、カビ臭原因物質産生藍藻類として代表的な 5 属を簡易同定及びその遺伝子量を定量できることが示された。

水源 B では、月 1 回のサンプリングでジェオスミンと 2-MIB が同時に発生した時期にはジェオスミンは *Aphanizomenon* 属、2-MIB は *Pseudanabaena* 属に関連する遺伝子量の変化が同時に確認できた。このように、本手法を用いることで、水源で発生したカビ臭原因物質産生藻類の原因種を属レベルで同定可能であり、さらに遺伝子量の変化からカビ臭原因物質産生藻類の挙動を監視できる可能性を示した。

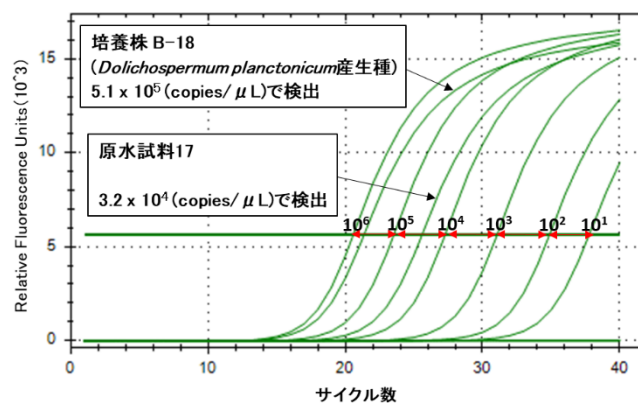


図 1 *geoA* 遺伝子の定量結果 (*Dolichospermum* 属)

##### (2) オンサイトモニタリング方法の検討

DNA 抽出方法の検討では、A 社製はビーズ添加の有無に関わらず、PCR による遺伝子検出が可能であったが、B 社製は、ビーズ添加の有無に関わらず検出できないケースが多くを占めた。そのため、本手順で DNA 抽出を行う場合は適切な DNA 抽出試薬を選択する必要がある。DNA 回収率は、いずれの抽出方法も DNeasy PowerSoil Pro Kit より劣る結果となったが、A 社製にビーズを添加した方法であれば、回収率が最低でも数%は確保されることから、本研究で検討した手法を用いることで、水源からカビ臭原因藍藻類を迅速に検出することが可能であると考えられた。一方、付着性藻類の DNA 抽出については、ホモジナイザーによる抽出により十分に DNA 抽出可能であることが示された。

最後にカビ臭が発生した水源試料を用いて、決定したオンサイトモニタリング手法の有用性を評価した。水源 C の水試料では 2-MIB 産生の *Pseudanabaena* 属の藻体が顕微鏡観察で確認され、単離培養により同種が原因種であることが明らかとなった。オンサイトモニタリングの結果では、*Pseudanabaena* 属に関連する遺伝子のみが検出した。本手法は、DNA 抽出までに 20 分以内、PCR による検出までに 2 時間程度と迅速に結果を得ることができ、その有用性示された。水源 D の岩試料では 2-MIB 産生の *Microcoleus* 属の藻体が顕微鏡観察で確認され、単離培養により同種が原因種であることが明らかとなった。本手法を用いることで、数分で DNA 抽出が可能であったが、PCR を行う場合は DNA 抽出液原液を使用した場合 PCR 阻害が確認されたことから、少なくとも 10 倍希釈を行い、PCR を実施する必要があることを示した。

以上より、オンサイトで属判定も含むカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易迅速検出方法を構築し、その手法の有用性を示すことができた。

#### <引用文献>

- 1) Devi, A., Chiu, Y. T., Hsueh, H. T., Lin, T. F.: Quantitative PCR based detection system for cyanobacterial geosmin/2-methylisoborneol (2-MIB) events in drinking water sources: Current status and challenges, *Water Res.*, 188, 116478 (article ID), 2021.
- 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 Res.*, 68, 56-66, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅田安廣、松本恭太、藤本尚志、清水和哉、山口晴代、秋葉道宏
2. 発表標題 水道水源でのカビ臭原因物質産生藍藻類監視に向けた定量PCR法の開発
3. 学会等名 京都大学環境衛生工学研究会第45回シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅田安廣、山口晴代
2. 発表標題 定量PCRを用いた霞ヶ浦に生息するカビ臭原因物質産生藍藻類の存在把握
3. 学会等名 第 57回 日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本恭太、浅田安廣、江崎敦、藤本尚志、秋葉 道宏
2. 発表標題 定量PCR法によるカビ臭原因物質産生藍藻類の簡易同定及び定量解析
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本恭太、浅田安廣、藤本尚志、秋葉 道宏
2. 発表標題 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
3. 学会等名 令和 4 年度水道研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松本恭太, 浅田安廣, 江崎敦, 藤本尚志, 秋葉 道宏
2. 発表標題 カビ臭原因藍藻類の簡易同定に向けた合成酵素遺伝子検出の有用性評価
3. 学会等名 第 55 回 日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------