

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04293

研究課題名(和文) 質量分析法によるアナバエナ属の迅速種判定技術の構築と水道水源水質評価への適用

研究課題名(英文) Discrimination among Anabaena species with mass spectrometry

研究代表者

高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)

鹿児島大学・理工学域工学系・准教授

研究者番号：40274740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：水道水の主要なかび臭原因物質はジェオスミンであり、日本においてはアナバエナ属が主に産生する。近年、形態が類似しているために顕微鏡観察では判別が困難だが、ジェオスミンを産生するアナバエナ属と産生しないアナバエナ属が同一水源で発見された。そこで、質量分析により迅速に判別する技術を開発した。

検討の結果、ジェオスミンを産生する4種のアナバエナ属、ジェオスミンを産生しない1種のアナバエナ属を15分程度以内に自動判定可能な技術を確立した。同技術は、夾雑微生物が90%混合された試料であっても、正しくアナバエナ属を判別可能であった。さらに、アナバエナ属が対数増殖期であるか、あるいは死滅期であるかを判別可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、水道水かび臭被害の発生地域が北上しており、対策が必要な地域が広がっている。一方で、浄水場においては、人口減少に伴う水道収入の減少が続いており、顕微鏡観察の高度熟練技能者の育成・確保が困難になっている。このため、迅速かつ簡易な種判別方法に対する期待は大きく、本研究の社会的な意義は大きい。本技術は、試料水のろ過、ろ過残渣の洗浄、測定に用いる金属プレートへの菌体塗布と乾燥、試薬の添加と乾燥のみで測定可能であり、特殊技能は不要で、解析(判断)が自動化されていることから、迅速かつ簡易である。以上より、社会的な要求を満たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The causative compound of earthy-musty odors in Japanese tap water is mainly geosmin. The causative microorganism is mainly Anabaena sp. in Japan. Recently, two types of Anabaena spp. were found in the same water body. One is capable of producing geosmin, while another is not. These strains were similar to each other in shape, size, and color, making microscopic examination difficult. Thus in this study, a discriminative analytical method using mass spectrometry was developed.

The developed method successfully identified four geosmin-producing Anabaena spp. It can also discriminate between geosmin-producing and non-producing strains, and between Anabaena in the logarithmic growth phase and that in the dead phase. The limit of identification was 10% of the Anabaena.

研究分野：環境質量分析学

キーワード：かび臭 水道水 ジェオスミン MALDI 質量分析 アナバエナ属 判別分析

1. 研究開始当初の背景

水道水の異臭味被害は、世界各国から報告されている¹⁾。日本においては、異臭味被害のうち、かび臭被害の被害人口が最も多く、例えば 1990 年における被害人口は 2,000 万人と報告²⁾されている。これは、当時の日本の人口の 18% に相当する。被害人口が多い状況が毎年、継続的に生じているため、対策が重要といえる。

かび臭の原因物質は、2-メチルイソボルネオール (2-methylisoborneol, 2-MIB) およびジェオスミン (geosmin) であり、水道水源に生息する浮遊性藍藻類の *Anabaena* 属 (*Dolichospermum* 属)、*Oscillatoria* 属などが産生する。日本において最も問題になっている原因生物は *Anabaena* 属であり、とくにジェオスミン発生の原因生物の 61% が *Anabaena* 属と報告²⁾されている。

浄水場におけるかび臭対策は、粉末活性炭の投入が一般的である。水道原水からのかび臭物質の検出を待って投入を開始した場合、開始が間に合わずにかび臭被害が発生してしまうことがある。このため、原因物質が検出される前に原因生物が観察されるのが一般的なことを利用し、かび臭被害の発生時期が近づくと、原因生物の顕微鏡観察が行われる。この顕微鏡観察が最初の対策になっているが、近年、形状が類似しており顕微鏡観察では判別困難な複数種の *Anabaena* 属が、同一水源から同時に観察される事例が報告^{3, 4)}されている。ここで問題なのは、それらの種には、かび臭を産生する種と産生しない種が存在することである。すなわち、顕微鏡観察ではかび臭産生種と非産生種の判別が困難という新たな問題が生じ始めており、新たな判別方法が求められている。

このような新たな問題に対処するため、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による判別が検討され始めている⁴⁾。しかし、試料調製や遺伝子増幅に知識、技術および時間を要するため、社会実装が困難と考えられる。とくに、結果が得られるまでに最低 6 時間程度を要することが問題であり、この間に水道原水中の原因生物濃度が上昇し、かび臭被害が発生することが懸念されている。この懸念は、水面を浮遊している *Anabaena* 属が風の影響で吹き寄せられる湖沼などを水源としている浄水場でとくに顕著である。これに対して本研究で開発する技術は、10 分程度以内に判別可能な迅速な方法である。さらに、類似の技術がすでに臨床微生物学において広く用いられており、病院での実務検査で多用されている⁵⁾簡便な技術である。

水道原水から検出された *Anabaena* 属が死滅期にあり発生が終息に向かっているのか、逆に増殖期にあり今後の大量発生が予想されるのかを知ることは重要である。PCR は、ジェオスミン合成遺伝子などを増幅させて検出するので、原理的に菌の増殖過程を判断できない。これに対して本研究で開発する技術は、*Anabaena* 属の増殖過程が異なると代謝産物の生成状況や遺伝子発現状況が異なることを検出できる可能性がある。

以上のように、本研究で開発する技術は多くの利点を有しているが、著者らの文献調査によると類似の先行研究例を発見することはできない。

2. 研究の目的

本研究は、水道水源に存在する *Anabaena* 属の種および増殖過程を、単離を伴わずに、10 分程度以内に判別する技術を開発することを目的とした。その開発戦略として、質量分析と多変量解析を用いた。すなわち、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) を用いて、試料水ろ過残渣中の様々な *Anabaena* 属や夾雑物を分別せずに一度にイオン化し、生成したイオンを高分解能質量分析 (HRMS) で網羅的に分析することにより、*Anabaena* 属の株ごと、増殖過程ごとの特異的なイオンを探索した。試料毎の特異的なイオンの有無や信号強度差に基づき、株および増殖過程を判別するための条件を検討した。

3. 研究の方法

国立環境研究所の微生物系統保存である NIES コレクションなどから、水道水源からの検出事例が多く、かび臭原因物質の産生能が異なる *Anabaena smithii* NIES-824 (ジェオスミン産生株)、*Anabaena macrospora* 琵琶湖野生株 (ジェオスミン産生株)、*Anabaena circinalis* NIES-1651 (ジェオスミン産生株)、*Anabaena crassa* NIES-1660 (ジェオスミン産生株) および *Anabaena crassa* NIES-1653 (ジェオスミン非産生株) の 4 種 5 株を入手し、培養条件を検討して培養した。培養した 4 種 5 株のジェオスミン産生能をガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) を用いて確認した。また、MALDI-TOFMS (autoflex speed TOF/TOF, Bruker Daltonics) 分析を実施してマーカーイオンを探索した。*Anabaena* 属以外の夾雑細菌との判別が可能なことを、学内のため池に生息している微生物を用いて確認した。顕微鏡観察の結果、用いたため池の水には、*Synedra* 属、*Stephanodiscus* 属、*Aulacoseria* 属、*Melosira* 属、*Desmodesmus* 属、*Chloromonas* 属、*Tetracystis* 属と類似した微生物が生息していたが、*Anabaena* 属は発見されなかった。また、ため池の水の中のジェオスミンを分析したが、検出されなかった。微生物の採取は、メンブレンフィルター (親水性 PTFE、0.2 μ m) を用いて行った。マススペクトルの解析は、flexAnalysis (Bruker Daltonics) および MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) を用いて行った。

4. 研究成果

4.1 試料前処理方法の検討

Anabaena smithii と *Anabaena macrospora* の培養液を用いて、MALDI-TOFMS で安定的にマススペクトルを得るための方法と条件を検討した。検討した主な項目は、*Anabaena* 属の細胞破碎方法と条件、タンパク質の抽出方法と条件、試料の濃度、MALDIマトリックスの種類や濃度、マススペクトルの取得範囲、データの取得回数、データ解析時の信号/ノイズ比、信号下限値である。最適化した条件で、培養時期が異なる4試料の*Anabaena smithii* を2回ずつ繰り返して測定した結果、図1に例を示すように、再現性の高いマススペクトルが得られることを確認した。さらに、培養した研究機関や年度が異なっても、再現性の高いマススペクトルが得られることを確認した。一連の試料前処理から測定までに要する時間は、実験者の手技に依存するが概ね15分であった。また、前処理を施すことにより、イオン強度の漸減が認められるものの、一か月程度は試料を保存可能なことを確認した。

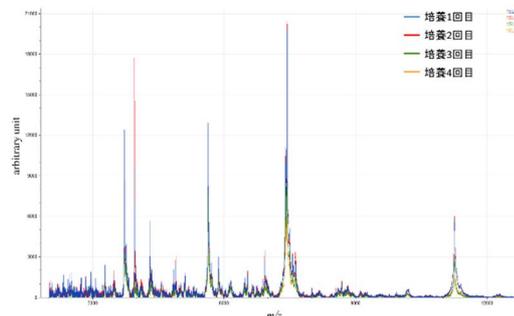


図1 マススペクトルの再現性確認結果の例

4.2 種特異的なイオンの探索

Anabaena smithii と *Anabaena macrospora* の培養液のマススペクトルを得て主成分分析を行ったところ種特異的なイオンが発見され、MALDIでイオン化してマススペクトルを得ることで両者を判別可能なことが示唆された。このため、*Anabaena smithii* NIES-824、*Anabaena macrospora*、*Anabaena circinalis* NIES-1651 および *Anabaena crassa* NIES-1660 の4種について種特異的なイオンを探索したところ、1~3個の種特異的なイオンが発見された。さらに、*Anabaena crassa* NIES-1660 (ジェオスミン産生株) と *Anabaena crassa* NIES-1653 (ジェオスミン非産生株) に特異的なイオンを探索したところ、1個および2個の株特異的なイオンが発見された。

また、*Anabaena* 属に共通するイオンが3個発見された。共通するイオンの強度は相対的に強く、*Anabaena* 属と夾雑物由来の夾雑イオンを区別するのに有利と考え、学内のため池に生息している微生物を用いて確認した。確認は、*Anabaena smithii* と *Anabaena macrospora* を用いて行った。その結果、3個の*Anabaena* 属共通イオンは学内のため池に生息している微生物からは検出されず、*Anabaena* 属に特異的であることが確認された。

4.3 増殖過程特異的なイオンの探索

対数増殖期と死滅期の*Anabaena smithii* 培養液を得てマススペクトルを測定した結果、死滅期に特有のイオンが高強度で発見された。また、死滅期の培養液のマススペクトルは、死滅期特有のイオンと少数のイオンを除いた多くのイオンの強度が低下しており、マススペクトルの類似度が低下していた。このことから、*Anabaena smithii* 培養液では対数増殖期と死滅期の判別は可能と考えられる。*Anabaena smithii* 以外の種では検討していないが、死滅期に特有のイオンが発見されたことから、他の種でも同様に死滅期に特有のイオンが発見される可能性がある。

4.4 マススペクトルの類似度による*Anabaena* 属の自動判定

4種5株の*Anabaena* 属に特有のイオンが発見されたため、マススペクトルの類似度による*Anabaena* 属の自動判定を試みた。自動判定は、MALDI Biotyper を用いて行った。MALDI Biotyper に4種5株の*Anabaena* 属の培養液のマススペクトルを登録し、予め最適化した自動判定条件で検討した結果、4種5株の*Anabaena* 属の培養液はすべて正しく自動判定されることを確認した。次に、学内のため池に生息している微生物と*Anabaena smithii* または *Anabaena macrospora* とを混合比を変化させて混合し、正しく自動判定可能な混合比を検討した。その結果、両方の種とも

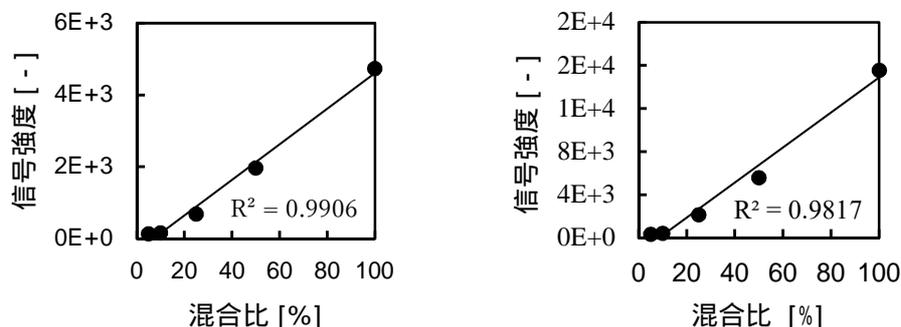


図2 夾雑微生物共存下での*Anabaena smithii* の自動判定下限界の検討

(左図：*Anabaena smithii* 特異的イオン、右図：*Anabaena* 属共通イオン)

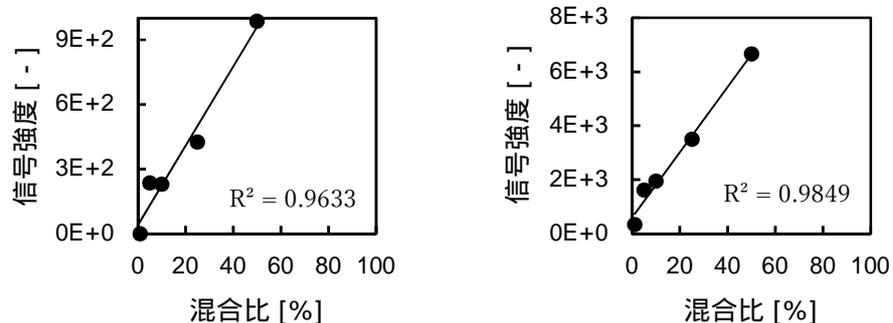


図3 夾雑微生物共存下での *Anabaena macrospora* の自動判定下限界の検討
 (左図: *Anabaena macrospora* 特異的イオン、右図: *Anabaena* 属共通イオン)

に混合比 5% (細胞数基準) 以上で正しく自動判定可能であった。しかし、図2および図3に示すように、*Anabaena smithii* の場合でも *Anabaena macrospora* の場合でも、混合比 5%では混合比と種特異的なイオンの信号強度に用量作用関係が認められず、自動判定の下限値は混合比 10%であった。一方、混合比 10%以上では、*Anabaena smithii* の場合でも *Anabaena macrospora* の場合でも、*Anabaena* 属共通イオンと特異的イオンの両者に、混合比と信号強度に用量作用関係が認められた。

引用文献

- 1) Giglio et al. (2011) Environ. Sci. Technol. **45**(3), 992-998
- 2) Kishida et al. (2015) J. Wat. Sup.: Res. & Technol.-AQUA, **64**(7), 832-83
- 3) 清水ら(2016) 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班会議資料
- 4) 平ら(2016) 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班会議資料
- 5) Sandrin et al. (2013) Mass Spectrom. Rev., **32**, 188

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱田隆太郎、高梨啓和、中島常憲、新福優太、井坂和一、清水和哉
2. 発表標題 質量分析によるアナベナ属の種の判別法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020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
研究分担者	清水 和哉 (Shimizu Kazuya) (10581613)	筑波大学・国際室・准教授 (12102)	
研究分担者	井坂 和一 (Isaka Kazuichi) (40543939)	東洋大学・理工学部・准教授 (32663)	

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
---------	---------