

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82617

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12201

研究課題名(和文) 淡水域で障害を引き起こすカビ臭産生シアノバクテリア情報についての基盤整備

研究課題名(英文) Development of a platform for information on mold odor-producing cyanobacteria that cause problems in freshwater.

研究代表者

辻 彰洋 (Tuji, Akihiro)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：40356267

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)：本邦のカビ臭産生シアノバクテリアについて、網羅的な培養株の確立と遺伝子解析を行った。その結果、ジオスミン産生を行う *Dolichospermum hangangense* が本邦に産することが分かった。また、当初 *Dolichospermum* 属と思われたジオスミン産生種が新属の可能性が高いことも分かった。また、2-MIB産生遺伝子とジオスミン産生遺伝子についても多くの新規株を使って系統関係を調べた。ジオスミン産生種 *geoA* は *Dolichospermum* 属内ではほとんど変異がないことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見つかった新分類群や分類学的知見は水域の植物性プランクトンモニタリングですぐに活用可能であり、私たちもホームページなどでその結果を公表している。また、得られた遺伝子は環境DNA解析(アンプリコン解析)を行うために基礎的な情報となる。

研究成果の概要(英文)：We conducted a comprehensive culture establishment and genetic analysis of mold odor-producing cyanobacteria in Japan. As a result, we found that geosmin-producing *Dolichospermum hangangense* is native to Japan. We also found that the geosmin-producing species initially thought to be in the genus *Dolichospermum* is most likely a new genus. Phylogenetic relationships between 2-MIB-producing genes and geosmin-producing genes were also examined using many new strains. The geosmin-producing species *geoA* was found to have almost no variation within the genus *Dolichospermum*.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：微細藻類の分類と生態

キーワード：カビ臭産生シアノバクテリア シアノバクテリア 2-MIB geosmin

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアノバクテリア(藍藻)が産生するカビ臭物質(ジェオスミン及び2-メチルイソボルネオール)は、上水道や2枚貝等の水産物の異臭味被害の原因物質であり、水域の景観障害の観点からも重要である。高度成長期以降多くの上水道でカビ臭が問題となり、研究がなされており、事例報告が蓄積されてきているが、分類学的な混乱により同定された種に疑念があった。私たちは日本全国から代表的なカビ臭産生種の pseudanabaena 属 (*Pseudanabaena*) について研究を行い、従来3種に誤同定されていた日本産の分類群が全て新種あるいは新変種の3種5分類群であることを明らかにした (Niiyama, Tuji et al. 2016, Tuji & Niiyama 2016, 2018)。また、従来 *Pseudanabaena* 属のカビ臭産生種の判別のため応用的に利用されてきた形質(蛍光顕微鏡を用いた判定や細胞径/長比)では判別できず、現状では遺伝子による判別しか方法がないことを明らかにした(辻・新山 2018)。この様に日本産のカビ臭産生シアノバクテリアの分類学や応用研究は全面的な見直しが必要である。

2. 研究の目的

上記した pseudanabaena 以外のシアノバクテリアのカビ臭産生種についての分類学的検討と新種記載などの分類学的措置は、渡辺眞之氏(～2009)の研究成果について属の海底の研究を行った(辻・新山 2012, 新山・辻 2013, 2019)以外は、ほとんど進んでいなかった。そこで、私たちは淡水域のカビ臭産生シアノバクテリアについて、その分類をすべて確定させることを目的として、カビ臭産生種について網羅的な培養株の確立と、系統解析・カビ臭産生遺伝子解析、分類学的検討を行うこととした。

淡水域のカビ臭産生シアノバクテリアは、種レベルでの研究が進んでいる *Pseudanabaena* 属や *Planktothrix raciborskii*, *Coelosphaerium* sp. を除けば、*Oscillatoria* 属, *Dolichospermum* 属(旧 *Anabaena* 属), *Phormidium* 属等が知られているが、遺伝子も含め現状の報告例を確認した限り、形態的には5～10分類群程度に収まると考えられた。シアノバクテリアは同じ属内でも種ごとに粘質の有無など性質が大きく異なる。そのため、種レベルでの情報を蓄積することで、出現する環境要因の解析や障害対策を検討することが可能となる。そのため、カビ臭産生シアノバクテリアの分類学および応用的研究の基盤が整備されることで、今後の研究の発展の礎となることが期待できると考えられた。

3. 研究の方法

1. 形態分類と分類学的措置

外部研究者・技術者からのカビ臭情報を用いてカビ臭が生じた水域からの株を分離培養する。分離培養はピペットウォッシング法に加えて寒天プレート法も併用する(Tuji & Niiyama 2018)。分類に当たっては遺伝子解析情報も援用しながら、国立科学博物館の微細藻類文献コレクションを用いて分類学的検討を行い、必要に応じ新種記載等を行った。

2. 遺伝子解析

遺伝子解析は、シアノバクテリアの分類学的研究で良く用いられている rRNA オペロン(16S rRNA - ITS - 23S rRNA) および rbcLSX 領域を基本的に用いた。また、カビ臭産生遺伝子(2-MIB: *cnbA*, *mtf*, *mic*, *cnbB*, *geosmin*: *geoA*) 遺伝子についても解析を行った。一部の分類群については、特異的プライマーを設計し、コンタミの影響を受けずに解析できるようにした。プライマー情報については後述の成果論文に記載されている。

近縁種の解析については、長鎖対応第三世代シーケンサー(Nanopore 社 Minion) と次世代シーケンサー(Miseq)を用いて、全ゲノム解析を行い、全ゲノム比較を行った。

4. 研究成果

・新産・新種記載

琵琶湖でジェオスミン産生種として分離された '*Anabaena macrospora*' (AM 株) について、分類学的検討を行ったところ、*Dolichospermum hangangense* である事が分かった。同種は2018年に韓国の漢江(Han River または Hangan)から初めて報告され、形態観察および遺伝子解析(16S rRNA と rbcL 遺伝子、ITS 領域の立体構造)の結果から新種とされた(Choi et al. 2018, Li et al. 2020)。この発表を受けて、日本でこれまで *Dolichospermum planctonicum* とされてきた培養株について再調査を行ったところ、その大半が *D. hangangense* であることが判明した(Tuji et al. 2023)。本種の未熟なアキネートは *D. planctonicum* と似ているが、成熟したアキネートはより細長く円筒形ないし長菱形で、先端は広円形かやや尖っており、長軸方向で非対称形となることがある。また成熟したアキネートはトリコームから離脱しやすい。さらに、日本でこれまで *Dolichospermum circinale* とされていた螺旋形のトリコームをもつ培養株の遺伝子(16S rRNA と rbcL 遺伝子)も *Dolichospermum hangangense* とほぼ一致した(Tuji et al. 2023)。

D. hangangense に関して、*D. circinale* として扱われてきた日本産の培養株の確立を再検

討した結果、そのほとんどが *D. hangangense* であることが分かった。そのため、私たちが管理している日本産淡水浮遊性藍藻データベースでは、同種の存在を不明とした (<https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/aoko/database/0-8-10680.html>)。

本邦で *Dolichospermum crassum* としてきた種に遺伝的に複数の分類群が含まれ、そのうちの1群がジオスミンを産生することが分かった。どのグループが新の *D. crassum* に相当するかについて、本種の模式産地のヨーロッパの研究者とも検討を続けているが、ヨーロッパでも複数分類群が存在するため、検討が難航している。

琵琶湖で2020年以降に出現しジオスミン産生により問題となった種は当初 *Dolichospermum minisporum* と同定した(大塚ら 2023)が、その後一群体を用いて全ゲノム増殖(WGA)法によって遺伝子解析を行ったところ、*Dolichospermum* 属ではなく、付着性の *Anabaena* 属に近いことが分かった。そのため、*Dolichospermum minisporum* (≡*Anabaena minispora*) のタイプとの分類学的検討を行ったところ、新属新種の可能性が高いことが分かった。現在記載論文の作成中である。

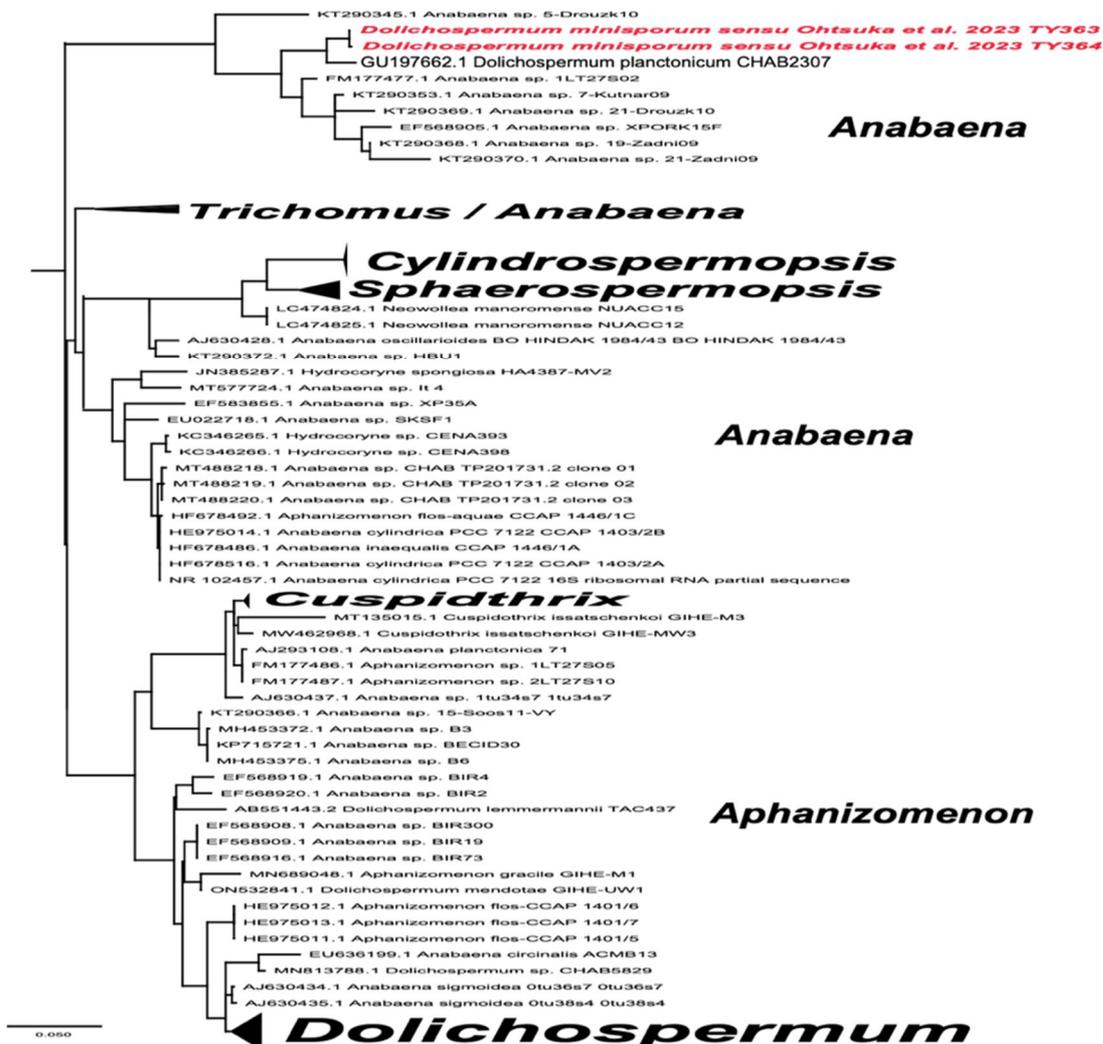
カビ臭産生する pseudocyanobacteria 属については、本研究期間中も培養株の確立を続けたが、私たちが既に記載している3種5分類群以外の分類群は見つからなかった。この期間に発表されたカビ臭産生 pseudocyanobacteria 属に関する論文についても報告されている遺伝子から、すべてこの3種5分類群に相当すると考えられた。

・全ゲノム解析

pseudocyanobacteria 属の3種5分類群について、完全長環状全ゲノム解析が完成した。*P. yagii* と *P. foetida* については、種内の形態変異が大きく *P. foetida* については変種として分けていたが全ゲノム解析を用いて ANI (Average Nucleotide Identity) 解析を行ったところ、バクテリアとしての種の定義に両種とも、遺伝子変異が収まった。全遺伝子を用いた比較も試行しているが、同様の結果が得られている。

・カビ臭産生遺伝子の解析

水のカビ臭の原因となるジオスミン産生遺伝子である *geoA* 遺伝子について、国立科学博物館植物研究部で保有しているシアノバクテリア株ゲノムを網羅的に解析すると共に、genBank に保管されているシーケンシング情報も統合し、*geoA* を産生するシアノバクテリアの全体像を明らかにした(図1)。



)。

引用文献

- Choi, H.J., Joo, J.-H., Kim, J.-H., Wang, P., Ki, J.-S. and Han, M.-S. 2018. Morphological characterization and molecular phylogenetic analysis of *Dolichospermum hangangense* (Nostocales, Cyanobacteria) sp. nov. from Han River, Korea. *Algae* 33: 143-156.
- 大塚泰介・根来健・佐藤晋也・石川可奈子・辻彰洋 2023. 要注意!琵琶湖とその集水域の「ミクロの外來生物」. *地域自然史と保全* 45(1): 25 - 38.
- Li, Z., Mertens, K.N., Choi, H.J. and Shin, H.H. 2020. Validation of “*Dolichospermum hangangense* H.J.Choi & M.-S.Han,” nom. inval. (Aphanizomenonaceae, Cyanobacteria) from Han River, Korea. *Notulae algarum* No. 124 (12 January 2020): 1-2.
- 新山優子, 辻彰洋 (2013) 藍藻ネンジュモ目の浮遊性種の分類学的変更と類似種の比較. *陸水学雑誌* 74: 153-164.
- producing 2-methylisoborneol. *Bull Natl Mus Nat Sci, Ser B* 45: 93-101.
- 新山優子, 辻彰洋, 一柳英隆 (2019) ダム湖のモニタリングにおいて同定上の注意を要する種 (2) 藍藻. *水源地環境技術研究所所報* 2019: in press.
- Niiyama Y, Tuji A, Takemoto K, Ichise S (2016) *Pseudanabaena foetida* sp. nov. and *P. subfoetida* sp. nov. (Cyanophyta/ Cyanobacteria) producing 2-methylisoborneol from Japan. *FOTTEA* 16: 1-11.
- Tuji, A., Niiyama, Y. and Ichise, S. 2023. Distribution and Phylogeny of *Dolichospermum hangangense* (Nostocales, Cyanobacteria) Found in Japanese Lakes and Reservoirs. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci., Ser. B* 49: 83-95.
- 辻彰洋, 新山優子 (2012) 日本産アオコ形成藍藻種のチェックリストおよび分類学的コメント(短報). *日本プランクトン学会報* 59: 101-105.
- Tuji A, Niiyama Y (2016) The identity and phylogeny of *Pseudanabaena* strain, NIES-512, producing 2-methylisoborneol (2-MIB). *Bull Natl Mus Nat Sci, Ser B*, 42: 1-7.
- Tuji A, Niiyama Y (2018) Two new *Pseudanabaena* (Cyanobacteria, Synechococcales) species from Japan, *Pseudanabaena cinerea* and *Pseudanabaena yagii*, which produce 2-methylisoborneol. *Phycol Res* 66: 291-299.
- 辻彰洋, 新山優子 (2018) *Pseudanabaena*属(シアノバクテリア)の分類とカビ臭産生の判別形質. *日本水処理生物学会誌* 54: 115-120.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tuji, A., Y. Niiyama and S. Ichise	4. 巻 49
2. 論文標題 Distribution and phylogeny of <i>Dolichospermum hangangense</i> (Nostcales, Cyanobacteria) found in Japanese lakes and reservoirs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series B	6. 最初と最後の頁 83-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.50826/bnmnsbot.49.3_83	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tuji, A., E. Ogiso-Tanaka and H. Yamaguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Annamia dubia</i> , filamentous colony-making Chroococcales with the analysis of FraC gene influencing filament integrity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Genomics	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/jgen.87678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohtsuka, T., T. G. Suzuki and A. Tuji	4. 巻 59
2. 論文標題 Occurrence of a <i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Cyanobacteria) Bloom in a Pond near Lake Biwa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Water Treatment Biology	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2521/jswtb.59.27	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 大塚泰介・鈴木隆仁・辻 彰洋	4. 巻 59
2. 論文標題 琵琶湖辺の池における ラン藻 <i>Raphidiopsis raciborskii</i> のブルーム形成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本水処理生物学会誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 辻 彰洋, 中川 恵, 溝淵 綾, 大塚 泰介	4. 巻 8
2. 論文標題 淡水棲プランクトン珪藻 <i>Fragilaria longifusiformis</i> ssp. <i>euofusiformis</i> の本邦における近年の出現	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diatom	6. 最初と最後の頁 *
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11464/diatom.38.14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 辻 彰洋, 中川 恵	4. 巻 8
2. 論文標題 霞ヶ浦における <i>Fragilaria saxoplantonica</i> の出現状況	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diatom	6. 最初と最後の頁 *
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihiro Tuji, Haruyo Yamaguchi, Takafumi Kataoka, Mayumi Sato, Tomoharu Sano & Yuko Niiyama	4. 巻 21
2. 論文標題 <i>Annamia dubia</i> sp. nov. with a description of a new family, Geminocystaceae fam. nov. (Cyanobacteria)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fottea	6. 最初と最後の頁 100-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5507/fot.2021.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大塚泰介・根来健・佐藤晋也・石川可奈子・辻彰洋	4. 巻 45(1)
2. 論文標題 要注意! 琵琶湖とその集水域の「ミクロの外来生物」	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 地域自然史と保全	6. 最初と最後の頁 143-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 辻彰洋
2. 発表標題 カビ臭産生シアノバクテリアと遺伝子解析
3. 学会等名 浮遊性シアノバクテリア講演会（ワークショップ）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tuji, A., Y. Niiyama, T. Ohtsuka, M. Nakagawa and S. Ichise
2. 発表標題 Taxonomy and phylogeny of geosmin-producing Dolichospermum species
3. 学会等名 20th International Conference on Harmful Algae（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻彰洋・新山優子
2. 発表標題 基調講演 シアノバクテリアのカビ臭産生種の分類学と遺伝子解析の現状
3. 学会等名 日本水処理生物学会第59回大会 水道生物研究集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新山優子・辻彰洋
2. 発表標題 Phormidium tenuisの学名の正体は？
3. 学会等名 水処理生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 辻彰洋・新山優子
2. 発表標題 Genbankに登録されているgeosmin生成遺伝子(geoA)の存在種は <i>Dolichospermum hangangense</i> の誤同定が多くを占める
3. 学会等名 水処理生物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>淡水浮遊性藍藻データベース https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/aoko/ 浮遊性藍藻データベース https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/aoko/ ダム湖の植物プランクトン https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/microalgae/dam/ ダム湖のプランクトン https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/dam/ HABS 有害有毒藻類ブルーム https://www.kahaku.go.jp/research/db/botany/habs/</p>

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
研究協力者	新山 優子 (Niiyama Yuko)		

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