

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656292

研究課題名(和文)貯水池管理に向けたカビ臭生産藍藻類の代謝特性の解明とそれを用いた増殖制御法の開発

研究課題名(英文)The metabolism of odour producing cyanobacteria and their control for reservoir management

研究代表者

浅枝 隆 (ASAEDA, Takashi)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40134332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：水道水のカビ臭の原因となる物質2MIBについてシアノバクテリアの*Pseudoanabaena galeata*を用いて実験を行った。まず、2MIBの産出の関係遺伝子GPPMTとMIBS及び2MIB濃度を分析することで、2MIBの産出量の評価にこれらの遺伝子解析が有効な手段であることを示すことで、細胞の持つ2MIBの産出能の分析が可能になった。次に、これらの遺伝子の発現頻度の計測で、水温、乾燥処理等の環境要素が2MIB産出能に与える影響を把握した。水温については30度程度までであれば水温の上昇と共に2MIB産出能は上昇すること、乾燥処理をすることで2MIB産出能は低下すること等を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Musty odour in drinking water is a world-wide problem and its management involves a lot of effort. *Pseudoanabaena galeata* is one of the cyanobacteria responsible for the odour by producing 2-methylisoborneol (2MIB). The frequencies of two genes, GPPMT and MIBS in *P. galeata*, and 2MIB concentration in water and *P. galeata* cells were analysed using RT-PCR and GC-Mass. It was found that there is an extremely high correlation between the frequencies of these genes and 2MIB concentration. It appeared that the analyses of the frequencies of these genes are a convenient method to predict 2MIB production by cyanobacteria, which is otherwise difficult to monitor. The gene analyses were applied to derive effects of environmental factors on the production of 2MIB by cyanobacteria. We found that rising water temperature up to 30 °C promotes the 2MIB production, whereas drying treatment reduces its production.

研究分野：応用生態工学

 キーワード：カビ臭 異臭味対策 ジメチルイソボルネオール *Pseudoanabaena galeata* シアノバクテリア GPPMT
MIBS 貯水池

1. 研究開始当初の背景

貯水池管理において、カビ臭防除は非常に重要な課題である。カビ臭は主に糸状性藍藻が産生する2MIBやジオスミンに由来するが、それらを産生する藍藻の種に関しては、明確になっているわけではない。近年、渡良瀬貯水池で行われている実験で、干し上げが藍藻による2MIBの発生を防ぐという知見が経験的に得られ、これからの対策として注目を集めている。しかし、その機構は全く不明であり、機構に基づいたより効果的な方法の考案、他の貯水池への適用などは不可能な状況にある。当初、藍藻類の一種 *Phormidium tenue* が年間を通じて発生し、干し上げによってその生態学的性質が変化すると考えられた。しかし、その後、種自体の継続性にも疑問がもたれ、これまでの形態的分類からはその機構解明は不可能になっている。こうした背景の下、カビ臭を発生させる種を特定し、防除のための方策を考案するためには、2MIBやジオスミンを発生させる遺伝子の分析は必須であり、それをもとに、カビ臭の発生を防ぐ遷移の機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

貯水池管理におけるカビ臭産生藍藻類の防除と生育コントロールを目的として、

(1) カビ臭産生藍藻類の遺伝学的同定と生育/代謝特性の解析

(2) カビ臭物質(2MIB)代謝酵素遺伝子の同定

(3) 環境ストレスの影響の把握

によるカビ臭産生藻類の生育制御と、分子遺伝学的手法によるカビ臭産生藻類検出のための分子マーカー開発を行い、貯水池管理のための新手法を提案する。

3. 研究の方法

(1) カビ臭産生藍藻類の生育/代謝特性の解析

これまで、国内でカビ臭産生藍藻類の代表的存在として、貯水池における監視対象とされていた *Phormidium tenue* が、実際には遺伝学的な同定を受けていない複数種の混在した集団であり、個々の調査地におけるカビ臭産生藍藻種の正確な種名、カビ臭物質の産生量などは不明である。そこで、本研究では、単種無菌培養系で培養された種について、16S rRNA の PCR(polymerase chain reaction)法による増幅、増幅断片のクローニングと塩基配列決定により、カビ臭産生菌の同定を遺伝学的レベルで行う。さらに、ガスクロマトグラフィー質量分析計による2MIB、ジオスミンの産生量の計測により、湖沼の水質管理の為にモニタリングが必要となるカビ臭産生菌の選定を行う。また、これらの藍藻類の生育特性を生育光の波長、光強度、栄養分の観点から解析するとともに、キャピラリー電気泳動質量分析計を用いた基礎代謝物解析により、生育環境がカビ臭産生藍藻類

の生育速度とカビ臭物質の産生量に及ぼす影響を明らかにする。

(2) これらの実験により、これまでに提案された干し上げなどのカビ臭防除のための手法による生物種の遷移過程を実証し、その効果を検討する。

4. 研究成果

研究は研究の目的に沿って行われたが、ここでは主たる結果について示す。

(1) 2MIB 代謝酵素遺伝子の同定

2MIB の産出過程においては、ゲラニル 2 リン酸がメチルトランスフェラーゼによってメチル化、次に、シクラーゼによって2MIBが作られるという経路が確認されている(Gilgio et al. 2011)。これらメチルトランスフェラーゼ、シクラーゼの生成に関わる遺伝子はそれぞれ GPPMT、MIBS であり、これらを RT-PCR で計量する際のプライマーも開発されている(Wang et al. 2011)。ここでは、それらの結果を用いて、単離培養された、*Pseudoanabaena galeata* を用い、これらの遺伝子の発現頻度を求め、同時に GC-Mass で測定していた2MIB量との比較を行った。

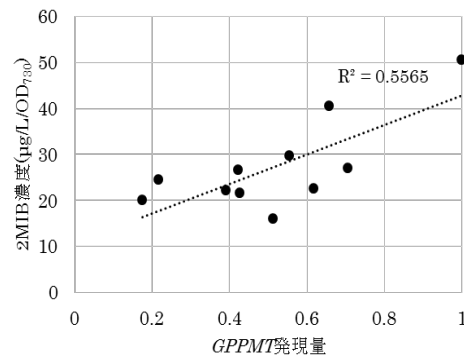


図1 遺伝子 GPPMT の発現頻度と2MIB濃度の関係

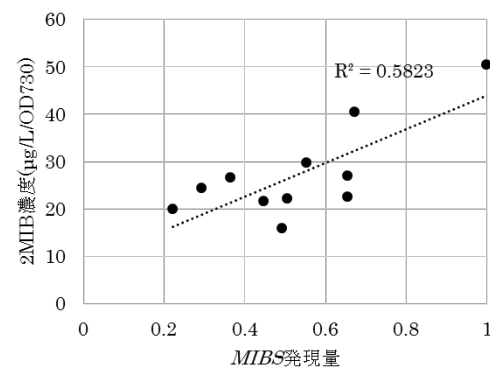


図2 遺伝子 MIBS の発現頻度と2MIB濃度の関係

図1に2MIB濃度とGPPMT及び遺伝子発現頻度との関係を示している。良好な正の相関が得られており、2MIBの産出においてこれ

らの遺伝子が関与していることが確かめられる。

これまで、一部のシアノバクテリアや放線菌の一種(*Streptomyces*)で 2MIB 産出関連遺伝子として報告されていたが、GPPMT と MIBS の出現の順序について様々な形態が指摘されていた。*Pseudoanabaena galeata* においては、GPPMT と MIBS の順に並んでいること等も明らかになった。

(2) 環境ストレスの影響が 2MIB 産出に与える影響の把握

含水率 15%で行われた干し上げ後、再び、完遂させた時に産出する 2MIB 量に対する、乾燥ストレスに対する影響を示す。

図 3 は、乾燥日数に対する OD730 及び細胞内及び培養液中のものを加えた 2MIB 濃度の関係を示す。ここで OD730 の値は細胞数を示す指標である。

OD730 の値は乾燥日数の増加に対してほとんど変化が見られず、*Pseudoanabaena galeata* が乾燥に対して高い耐性を有している種であることが示される。一方で、2MIB 濃度については、乾燥処理日数の増加とともに徐々に減少が見られ、細胞が枯死する数は少ないものの再び冠水すると 2MIB を産出、ただしその量は乾燥日数の増加とともに減少することが示される。

なお、2MIB は、枯死に伴って細胞内から細胞外に放出することが確認されており、この程度の乾燥度合いであれば枯死する割合は限られ、かなりの量が細胞内に蓄積されていることも明らかになった。

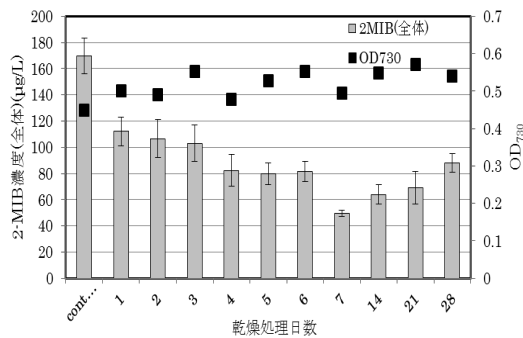


図 3 乾燥処理日数と再冠水後の 2MIB 濃度の関係

次に、図 5 に、乾燥日数と二つの遺伝子の発現頻度との関係を示す。

まず、二つの遺伝子の発現頻度の挙動は極めてよく一致していることが確認される。これは、この二つの遺伝子は同じオペロン上に存在しているためであり、必要に応じて、片方の遺伝子のみ測定することで遺伝子の動向を知ることが可能であることを示している。次に、遺伝子発現頻度そのものについては、乾燥日数の増加とともに発現頻度が減少していることが示される。これによっても、遺

伝子の発現頻度で、2MIB 産出能の定量化が十分可能なこと、乾燥日数の増加とともに 2MIB 産出能が低下することが示される。

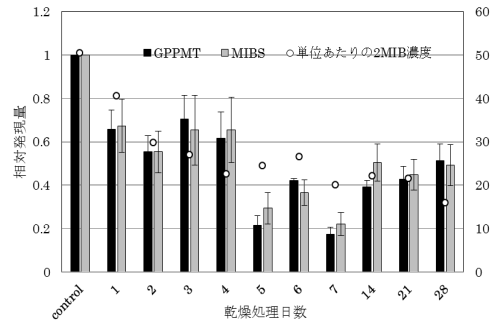


図 4 乾燥処理日数と再冠水後の両遺伝子の発現頻度の関係

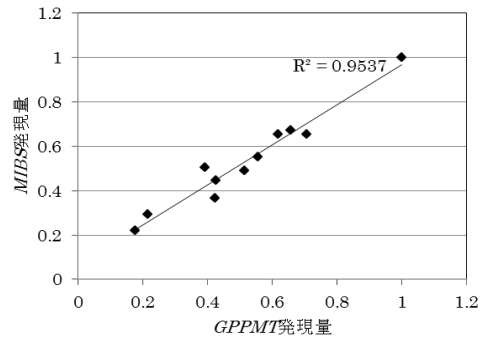


図 5 両遺伝子の発現頻度の関係

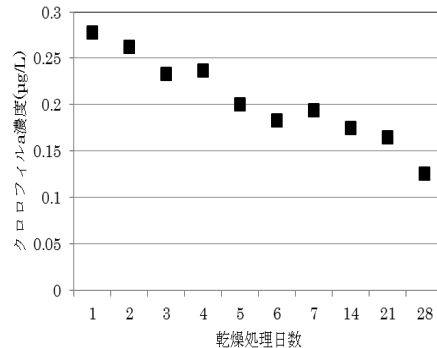


図 6 乾燥処理日数とクロロフィル a 濃度との関係

< 引用文献 >

- S.Giglio, W.K.W. Chou, H.Ikeda D.E.Cane, and T.Monis Biosynthesis of 2-Methylisoborneol in cyanobacteria, *Environmental Science and Technology*, Vol.45, pp.992-998,2011.
- Z. Wang, Y. Xu, J. Shao, J. Wang, and R. Li Gene associated with 2-methylisoborneol biosynthesis in cyanobacteria: Isolation, characterization, and expression in response to Light, *Plos One*, Vol.6, pp.1-9, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

M.Kakimoto, T.Ishikawa, A.Miyagi,
K.Saito, M.Miyazaki, T.Asaeda,
M.Yamaguchi, H.Uchimiya, and
M.Kawai-Yamada
Culture temperature affects gene
expression and metabolic pathways in
the 2-methylisoborneol- producing
cyanobacteria *Pseudanabaena galeata*.
Journal of Plant Physiology, Vol.171,
PP.292-300, 2014.
DOI:10.1016/j.jplph.2013.09.005 査読
有

〔学会発表〕(計 1件)

浅枝 隆 ダム工学におけるフロンティア、植物生理学を用いたアオコ対策、平成27年度ダム工学会総会招待講演、2015年5月、星陵会館(東京都千代田区)。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅枝 隆 (ASAEDA, Takashi)
埼玉大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：40134332

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

()
研究者番号：