

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24760440

研究課題名(和文) 遺伝子定量技術を利用した水源におけるカビ臭産生微生物の早期検出・定量手法の開発

研究課題名(英文) Development of early and quantitative detection method of earthy-musty odor producing microorganisms in water source utilizing quantitative polymerase chain reaction

研究代表者

岸田 直裕 (Kishida, Naohiro)

国立保健医療科学院・その他部局等・その他

研究者番号：10533359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ジェオスミン合成遺伝子を対象とした定量PCR系の特異性を国内の水道水源から分離したシアノバクテリアを用いて調査した。その後、選定された特異性の高い定量PCR系を、カビ臭産生シアノバクテリアが度々発生している国内の貯水池から採取した水試料の検査に適用した。ジェオスミン濃度が低い時期でもジェオスミン合成遺伝子を検出することに成功した。さらに、定量PCR系を用いて測定したジェオスミン合成遺伝子数と貯水池におけるジェオスミン濃度の間に高い相関関係があることがわかった。これらの結果より、定量PCR法は水道水源におけるジェオスミン産生シアノバクテリアの簡便かつ早期定量手法として有効であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The specificity of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays targeting geosmin synthase gene was evaluated using cyanobacterial strains isolated from domestic water sources. Then selected high specific qPCR assay was applied to analyze water samples obtained from one water reservoir where geosmin producing cyanobacteria often occurs. The geosmin synthase gene was successfully detected even when geosmin concentration was low. In addition, the number of geosmin synthase genes analyzed by the qPCR was well correlated with geosmin concentration in the water reservoir. These results demonstrated that the qPCR assay can be used as an early, easy and quantitative detection method of geosmin-producing cyanobacteria in drinking water sources.

研究分野：土木環境システム

キーワード：水道 カビ臭 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

水道水源である湖沼やダム貯水池等において、富栄養化による藻類やシアノバクテリアの異常増殖が問題となっているが、それに伴う飲料水の異臭味被害が国内広範囲にわたって報告されている。厚生労働省が水道事業者等を対象に実施した飲料水の異臭味等被害に関する調査結果によると、浄水（給水栓）で異臭味被害を受けた人口は、平成2年度のピーク時に2,000万人台まで増加し、高度処理の導入等により一旦減少したが、近年でも200万人程度となっている。異臭味被害の種類の内訳を見ると60%程度がカビ臭・土臭となっており、異臭味被害の中でも、最も深刻なのがカビ臭被害であるといえる。水道原水中のジェオスミンや2-メチルイソボルネオール(2-MIB)等のカビ臭原因物質濃度が高まった場合、高度処理が導入されていない通常の浄水場では粉末活性炭の投入によって対応することとなるが、粉末活性炭の投入は浄水処理コスト・環境負荷の著しい上昇を招くこととなる。また、原水中の濃度が高くなりすぎた場合は、粉末活性炭でも処理しきれなくなり、浄水・給水栓水中のカビ臭原因物質濃度が高まることで、需要者に対して深刻なカビ臭被害が発生することとなる。

給水栓水におけるカビ臭原因物質濃度および浄水場におけるカビ臭対策費用等を減少させる上で、水道水源におけるカビ臭原因シアノバクテリア(藍藻)を特定し、適切な対策を行うことが不可欠である。従来、カビ臭物質産生シアノバクテリアの検査は、図1に示す通り、顕微鏡観察で行われてきたが、カビ臭産生株と非産生株の判別には高度な知識・技術を必要とするという問題がある。培養を経ないと、分類に必要な形態学的特徴が現れないこともあり、判別に長時間を有することもある。また、補助的に機器分析によって、シアノバクテリアが含有するカビ臭原因物質を測定することも有効であるが、カビ臭産生能力のあるシアノバクテリアであっても環境条件が整わないと原因物質を産生しないケースもあり、カビ臭物質産生ポテンシャルを持つシアノバクテリアを早期に検出することは困難であった。

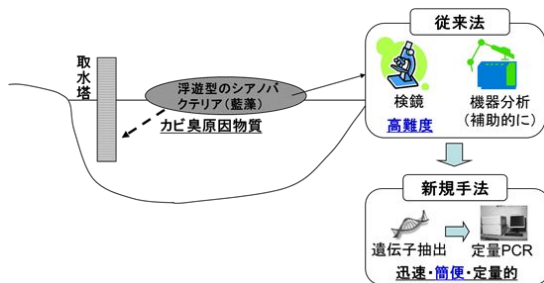


図1 カビ臭産生シアノバクテリアの検査手法

2. 研究の目的

本研究では、カビ臭物質産生シアノバクテリアの新規検出・定量手法として、遺伝子定量技術(定量PCR法)に着目した。定量PCR法は、微生物等の各種遺伝子を対象とした定量手法であり、再現性・定量性が高い手法として知られており、医療や食品衛生分野等で利用されている。水環境・水道分野においては、水中のノロウイルスやクリプトスポリジウム等の病原微生物の検査に利用が進みつつある。近年、カビ臭合成遺伝子を対象とした定量PCR法に関する報告も海外でなされているが、多くは培養株のみを検査しており、水道水源に実際に存在するシアノバクテリアの検出まで至っている研究報告は極めて少ない。

そこで本研究では、国内の水道水源から分離したカビ臭産生シアノバクテリアを対象として、定量PCR系の特異性を確認するとともに、国内の水道水源において調査を実施し、カビ臭原因シアノバクテリア由来の遺伝子数とカビ臭原因物質濃度の関係性等を調査することで、簡便かつ迅速なカビ臭物質産生シアノバクテリアの検出・定量法を確立することを目的とした。

さらに、貯水池底層等に存在し、カビ臭を放出することが知られている放線菌についても、そのカビ臭物質合成遺伝子の保存性について調査した。

3. 研究の方法

(1) 定量PCR系の特異性の確認

国内の水道水源より分離されたジェオスミン産生および非産生のシアノバクテリア(約10種類)より、Giglioらの手法に従い、Qiagen DNA Mini Kitを用いてDNAを抽出した。その後、カビ臭合成遺伝子を対象とした3種類の定量PCRに供し、分離株のジェオスミン産生有無と定量PCR法による定性的な検出有無を比較することで定量PCR系の特異性について検討した。

(2) 国内の水道水源におけるカビ臭原因物質とカビ臭合成遺伝子の挙動

カビ臭被害が過去に高頻度で発生していた国内の貯水池において、平成26年6月～平成27年10月にかけて表層水等を約15回採取した。平成27年7、8月においては台風に伴う流木の影響で他の次期と同一地点での採水が出来なかったため、近隣地点等で採水を行った。400 mLの水試料を、上水試験方法に準じて、ポリカーボネート製メンブレンフィルター(孔径:0.8 μm)を用いて濃縮した後(1次濃縮)さらに遠心濃縮を行った(2次濃縮)。上記(1)で使用した方法でDNA抽出を行った後、上記(1)で特異性に問題がないと判断された定量PCR系を用いてジェオスミン合成遺伝子の検出・定量を行った。さらに、顕微鏡観察法によって主要なカビ臭物質産生シアノバクテリアである *Anabaena* 属

の計数も行った。その際、可能な範囲で有臭株と無臭株に分けて計数した。計数の際には水道の障害生物の長年にわたる検査経験を持つものが担当した。

(3)放線菌のカビ臭合成遺伝子の保存性

国内の一部の貯水池表層水および底層から ISP medium No. 4 を用いて放線菌を単離し、ビーズビーディング法により DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子およびカビ臭合成遺伝子を対象とした PCR クローニングを行った後、PCR 産物の精製を行い、塩基配列解析に供した。得られた塩基配列を blastn 解析に供して、16S rRNA 遺伝子配列を用いた単離菌およびカビ臭合成遺伝子を同定した。また、*geoA* 遺伝子ホモログを保存している細菌を blast 検索により調査した。

4. 研究成果

(1)定量 PCR 系の特異性の確認

特異性の確認に使用した全ての定量 PCR 系においてカビ臭産生株を検出できることがわかった。一方、2つの定量 PCR 系では、カビ臭非産生株まで検出されてしまう（誤検出される）ことが明らかとなり、今回試した定量 PCR 系の中では、非産生株を検出しない1つの定量 PCR 系が最も特異性が高いと判断された。

(2)国内の水道水源におけるカビ臭原因物質とカビ臭合成遺伝子の挙動

図 2 に(1)の検討で特異性が高いと判断された定量 PCR 系を用いて実施した水道水源調査結果を示す。2014 年は夏期においてカビ臭原因物質であるジェオスミンの若干の増加が見られたが（4 ng/L 程度）、台風によって原因シアノバクテリアの大部分が流出したため、顕著なジェオスミン濃度の増加は見られなかった。ジェオスミン濃度が若干増加した際に、カビ臭合成遺伝子が低濃度で検出された。このような水道水質基準を下回る低濃度時においてもカビ臭合成遺伝子は検出されていることから、定量 PCR を用いてカビ臭産生シアノバクテリアを早期に検出できると考えられた。

2015 年も 2014 年と同様に台風が発生し、原因シアノバクテリアの流出が起きたが、残存したシアノバクテリアによって一時的に著しいジェオスミン濃度の増加が見られた（最高約 110ng/L）。同時に、カビ臭合成遺伝子数の著しい増加が見られ、ジェオスミン濃度と同様の挙動を示した。

融解曲線分析を行った結果、水道水源試料と標準試料でメルティングピークが一致したことから、非特異産物ではなく、水道水源中のカビ臭産生シアノバクテリア由来のジェオスミン合成遺伝子を特異的に検出できていると示唆された。

スピアマンの順位相関分析を行った結果、ジェオスミン濃度とカビ臭合成遺伝子数と

の間に強い相関関係 ($P < 0.01$) が確認され、ジェオスミン発生指標としての有用性が高いと考えられた（相関係数：0.84）。

顕微鏡観察によって有臭株であると判断された *Anabaena* 属の計数値や *Anabaena* 属の総数（有臭 + 無臭株数）もジェオスミン濃度と近い挙動を示したが、カビ臭物質合成遺伝子数の方が相関係数は高く、ジェオスミン発生指標としての有用性はより高いと考えられた。また、一般に顕微鏡観察による有臭株と無臭株の判別には高度な専門的知識・経験が必要であるが、定量 PCR 法は高度な技術や経験を必要とせずに実施することが可能であることから、より汎用性の高い手法であると示唆された。

以上の通り、本研究で注目したカビ臭物質合成遺伝子を対象とした定量 PCR 法は国内の水道水源中のカビ臭産生シアノバクテリアの早期・簡便検出および定量に効果的であることを示すことができ、当初の研究目的を概ね達成できたといえる。今後はジェオスミン以外の臭気原因物質（2-MIB 等）の生合成にかかわる遺伝子を検出可能な定量 PCR 系の確立や国内広範囲の水道水源調査への適用等を実施することで、本手法の適用性、有効性等を示していくことが求められる。

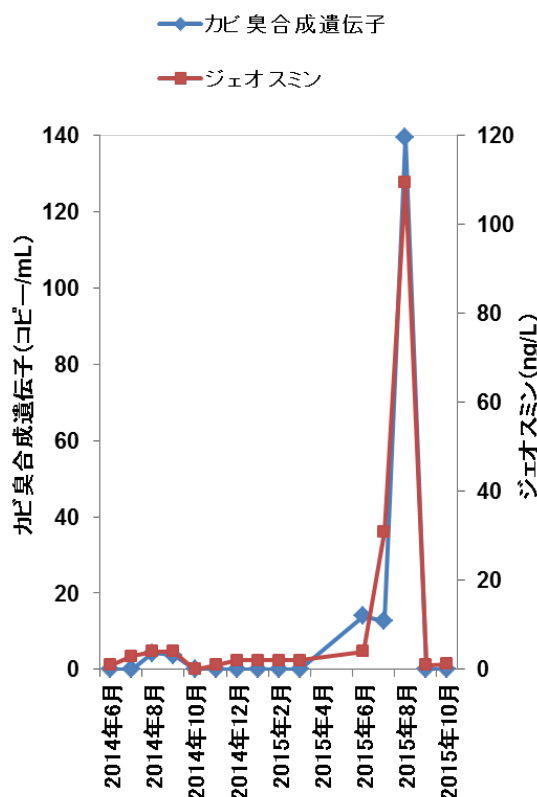


図 2 国内の水道水源におけるジェオスミンとカビ臭物質合成遺伝子の挙動

(3)放線菌のカビ臭合成遺伝子の保存性

16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析の結果、今回の調査で単離された放線菌の多くが主要なジェオスミン産生菌として知られている *Streptomyces* 属であった。これらの株のうち、多くが *geoA* 遺伝子ホモログを保有していることがわかった。

遺伝子データベース上 (DDBJ、NCBI、EMBL/EBI) の *geoA* 遺伝子ホモログは *Kitasatospora* 属等の *Streptomyces* 属以外にも保存されていることがわかり、放線菌にカビ臭物質合成酵素遺伝子が高度に保存されていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kishida N, Sagehashi M, Takanashi H, Fujimoto N, Akiba M. Nationwide survey of organism-related off-flavor problems in Japanese drinking water treatment plants (2010-2012). *Journal of Water Supply Research and Technology - Aqua* 2015;64(7):832-8.
DOI: 10.2166/aqua.2014.171

[学会発表](計1件)

加村瑞希, 遠藤雅也, 篠原健吾, 内海真生, 岸田直裕, 秋葉道宏, 清水和哉. カビ臭物質産生微生物によるカビ臭物質産生特性. 日本水環境学会第50回年会; 2016年3月; 徳島. 同講演要旨集. p.630.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸田 直裕 (KISHIDA, Naohiro)
国立保健医療科学院・生活環境研究部・主任
研究官
研究者番号: 10533359

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

清水 和哉 (SHIMIZU, Kazuya)