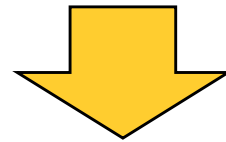


Coelosphaerium sp. の種特異的分析

背景

- ・ 2007年～2009年に宍道湖でカビ臭が発生



原因は、藍藻 *Coelosphaerium* sp. が産生する ジェオスミン であることを発見 (Godo, 2017)

Coelosphaerium sp.

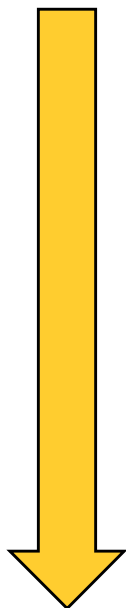
- ・ 球形の群体で均等な間隔で一層に並ぶ
- ・ 宍道湖でたびたび出現
- ・ カビ臭産生株と非産生株が存在する
- ・ 産生株と非産生株の形態的判別は困難



背景と目的

Coelosphaerium sp. の

カビ臭発生株と非発生株の形態的判別は困難



Coelosphaerium sp.のカビ臭発生株には
ジェオスミン合成遺伝子*geoA*が存在し、
その配列を同定した (Hayashi, 2019)

目的

遺伝子分析によりカビ臭発生株と非発生株とを判別し、
発生状況の確認や発生予測につなげる

研究計画

<i>Coelosphaerium</i> sp. の種特異的分析	R6	R7	R8
<i>Coelosphaerium</i> sp. カビ臭発生株と非発生株の判別	→		
定量性の検討	→		
宍道湖・中海でのモニタリング	→		
モニタリング結果と水質データの解析			→

R6では...

- ・リアルタイムPCRを用いて*Coelosphaerium* sp. のカビ臭発生株と非発生株を判別した
- ・リアルタイムPCRの結果（遺伝子数（コピー数））と、細胞数およびジェオスミン濃度の関係を調査
⇒遺伝子数にばらつきが見られた。

今年度(R7)の研究概要

①遺伝子分析の定量性の検討

リアルタイムPCRの結果（遺伝子数（コピー数））と、細胞数およびジェオスミン濃度の関係を調査する

- ・ 分析方法の変更
- ・ PCR阻害物質有無の確認

②宍道湖・中海のモニタリング

宍道湖・中海の*Coelosphaerium* sp.カビ臭産生株の実態を調査する

今年度(R7)の研究概要

①遺伝子分析の定量性の検討

リアルタイムPCRの結果（遺伝子数（コピー数））と、細胞数およびジェオスミン濃度の関係を調査する

- ・ **分析方法の変更**
- ・ PCR阻害物質有無の確認

②穴道湖・中海のモニタリング

穴道湖・中海の*Coelosphaerium* sp.カビ臭産生株の実態を調査する

遺伝子分析方法の変更

G2,G3 培養液

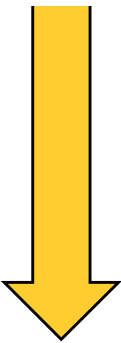


DNA抽出



qPCR

(リアルタイムPCR)

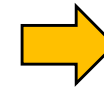


結果 (copies/ μ L)

網羅的解析の抽出
方法に合わせるため

前回

Qiagen Blood & Tissue Kit
(環境DNAマニュアル推奨)



今回

GITC法

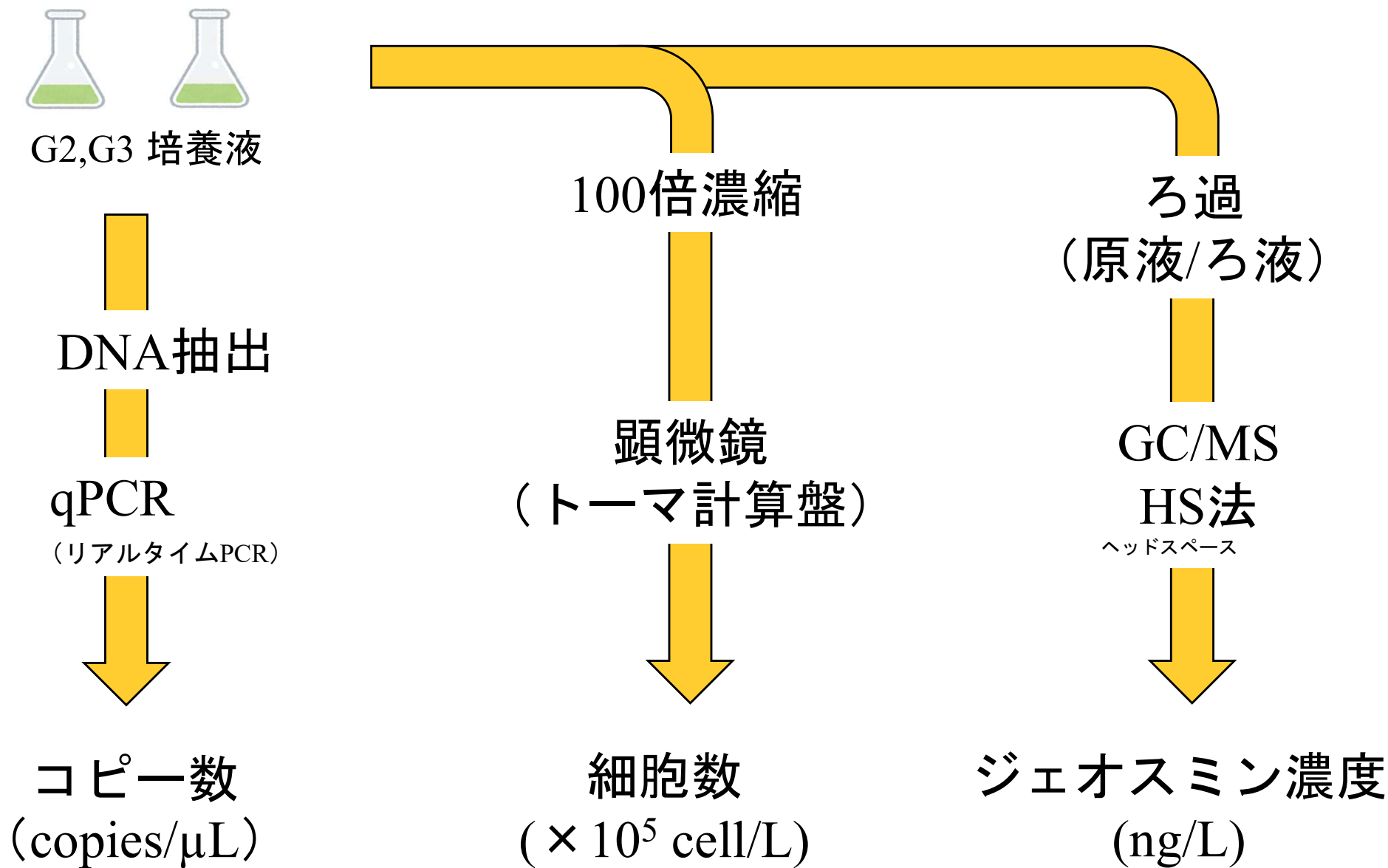


DNA Template	2 μ l
Primer Probe Mix	1 μ l
TaqMan ポリメラーゼ	10 μ l
AmpErase Uracil N-Glycocylase	0.1 μ l
milliQ	6.9 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l



50°C	2min	55 cycle
95°C	10min	
95°C	15sec	
60°C	1min	

定量性の検討



定量性の検討



G2,G3 培養液

DNA抽出

qPCR

(リアルタイムPCR)

コピー数
(copies/ μ L)

細胞数 $10 \times 10^5 \sim 1000 \times 10^5$ cell/L 程度
(推定ジェオスミン濃度 : 10~1000 ng/L)

【参考】

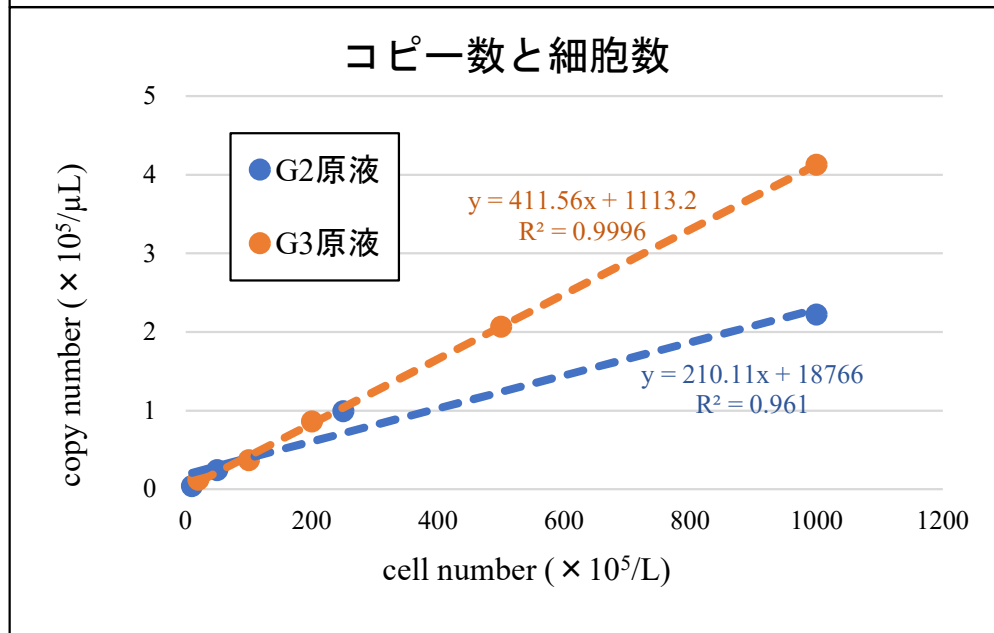
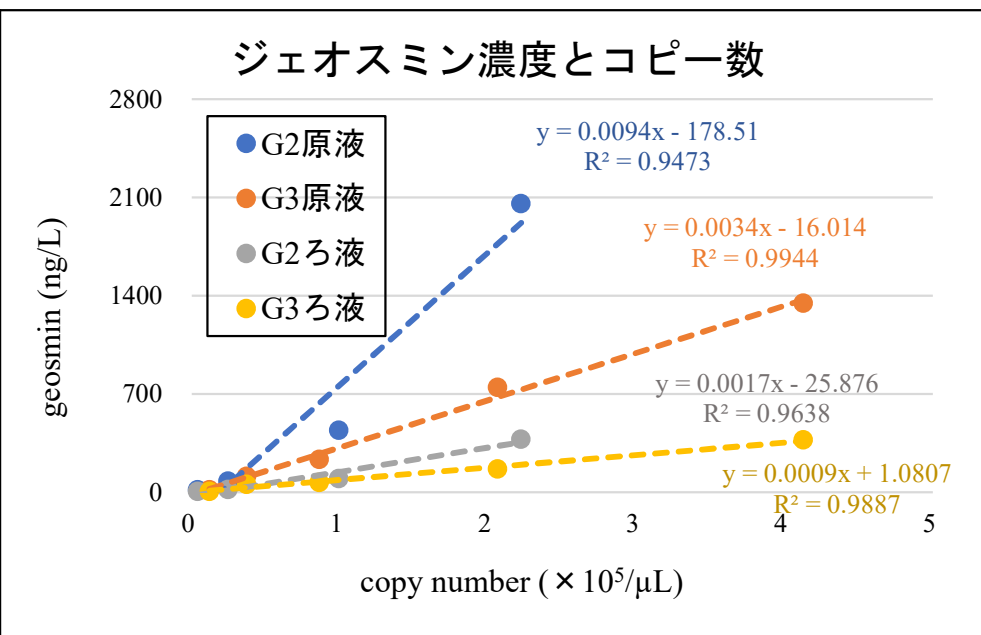
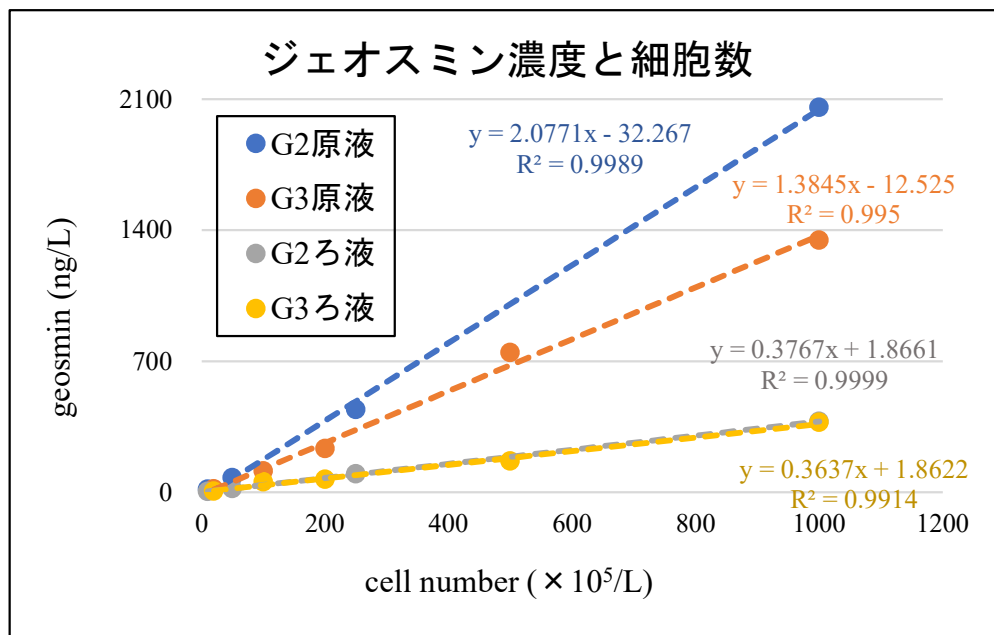
水道水質基準 : 10ng/L
嗅覚閾値 : 4~10 ng/L以上*

※(Watson, 2003)

過去、宍道湖湖心でカビ臭を感じた際の
細胞数とジェオスミン濃度

	細胞数 ($\times 10^5$ cell/L)	ジェオスミン (ng/L)	
		原液	ろ液
2008/4/22	1042	610	11
2008/4/30	1638	640	31
2008/5/7	2353	750	45
2009/9/18	-	40	22
2009/10/27	612	660	20
2010/2/1	-	210	72

結果 (各項目の相関)



- 各項目同士でそれぞれ相関が得られた

今年度(R7)の研究概要

① 遺伝子検査による定量性の検討

リアルタイムPCRの結果（遺伝子数（コピー数））と、細胞数およびジェオスミン濃度の関係を調査する

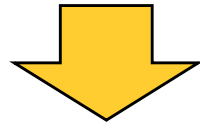
- ・ 分析方法の変更
- ・ PCR阻害物質有無の確認

② 穴道湖・中海のモニタリング

穴道湖・中海の*Coelosphaerium* sp.カビ臭産生株の実態を調査する

PCR阻害物質の確認

- ・環境中にはPCRを阻害する物質が存在
(フミン酸、一部多糖類など)
- ・偽陰性や、検出感度の低下につながる



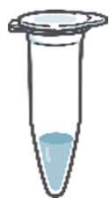
実フィールドの阻害物質の有無を確認

PCR阻害物質の確認

分析方法

宍道湖・中海

※*geoA* 陰性



抽出液
原液



10倍希釈液



100



1000



10000

段階希釈した標準物質をそれぞれに添加

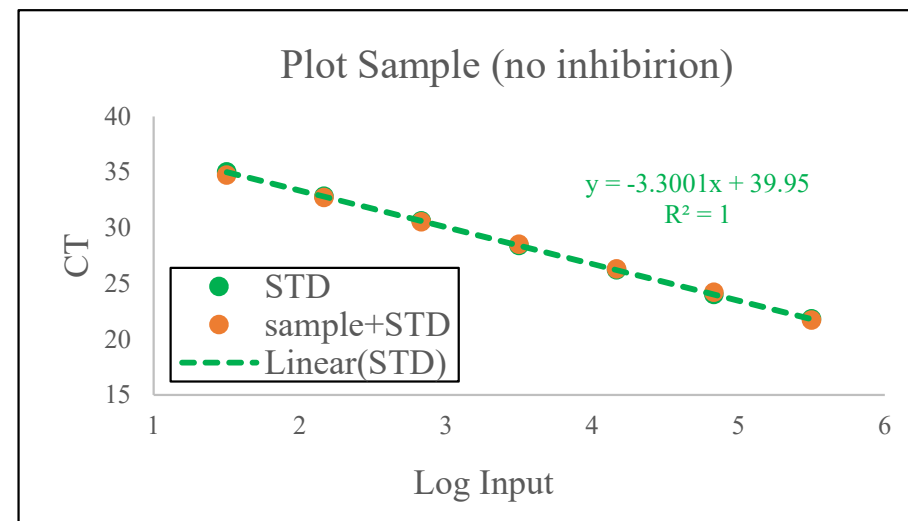


図1. 阻害なし例

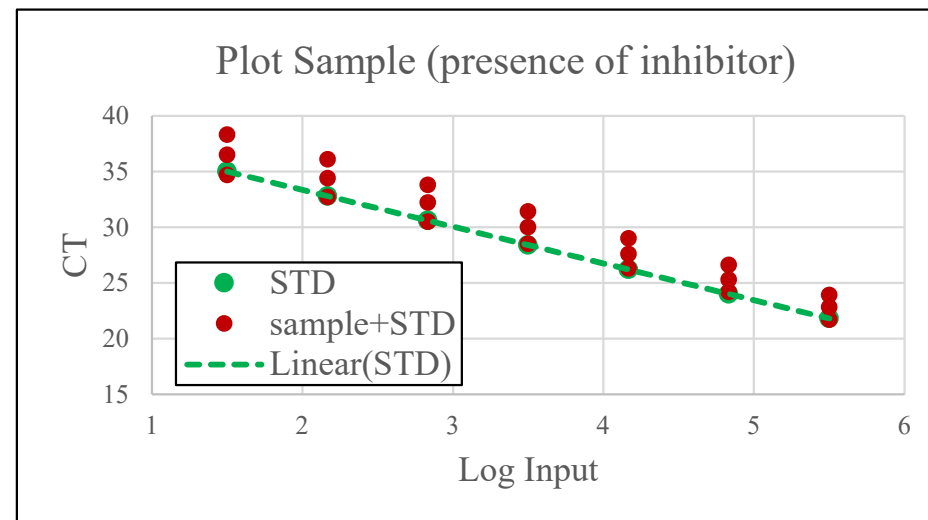
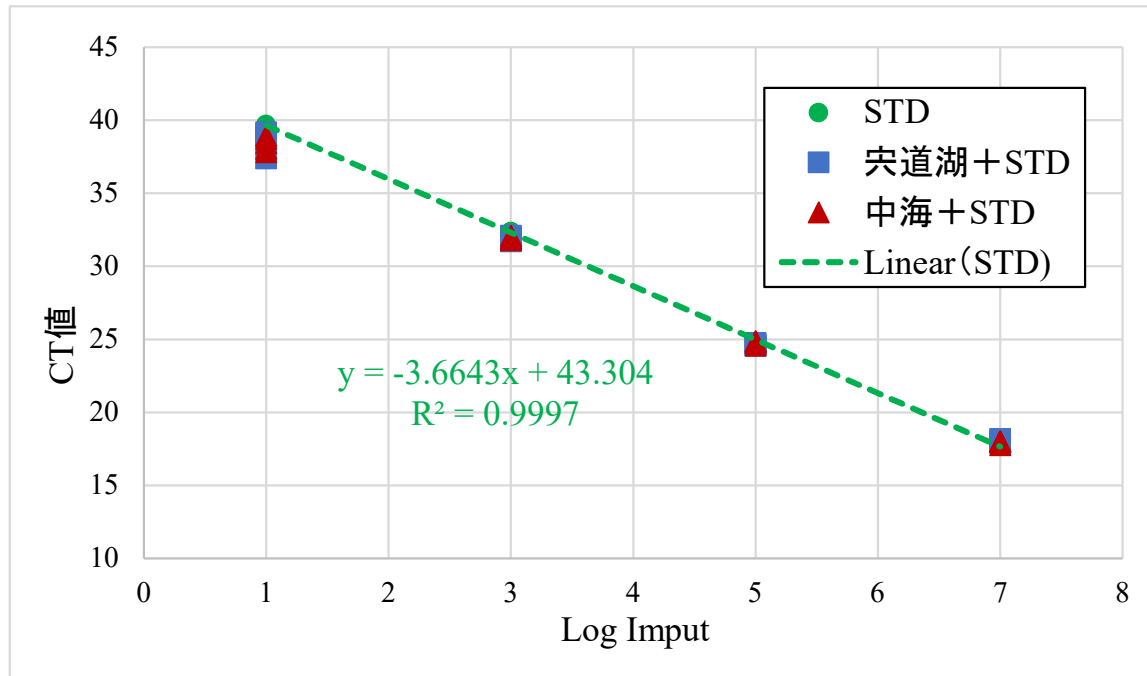


図2. 阻害あり例

PCR阻害物質の確認



- STDと同様な反応
- 抽出時、PCR時に除去されていると考えられる

今後の遺伝子分析方法について

湖水サンプル

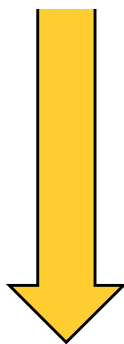


DNA抽出 (GITC法)



qPCR

(リアルタイムPCR)



結果 (copies/ μ L)



DNA Template	2 μ l
Primer Probe Mix	1 μ l
TaqMan ポリメラーゼ	10 μ l
AmpErase Uracil N-Glycosylase	0.1 μ l
milliQ	6.9 μ l
<hr/>	
Total	20 μ l



50°C	2min	55 cycle
95°C	10min	
95°C	15sec	
60°C	1min	

Coelosphaerium sp. カビ臭発生種の早期発見に資する方法が確立した (現在作業書作成中)

今年度(R7)の研究概要

① 遺伝子検査による定量性の検討

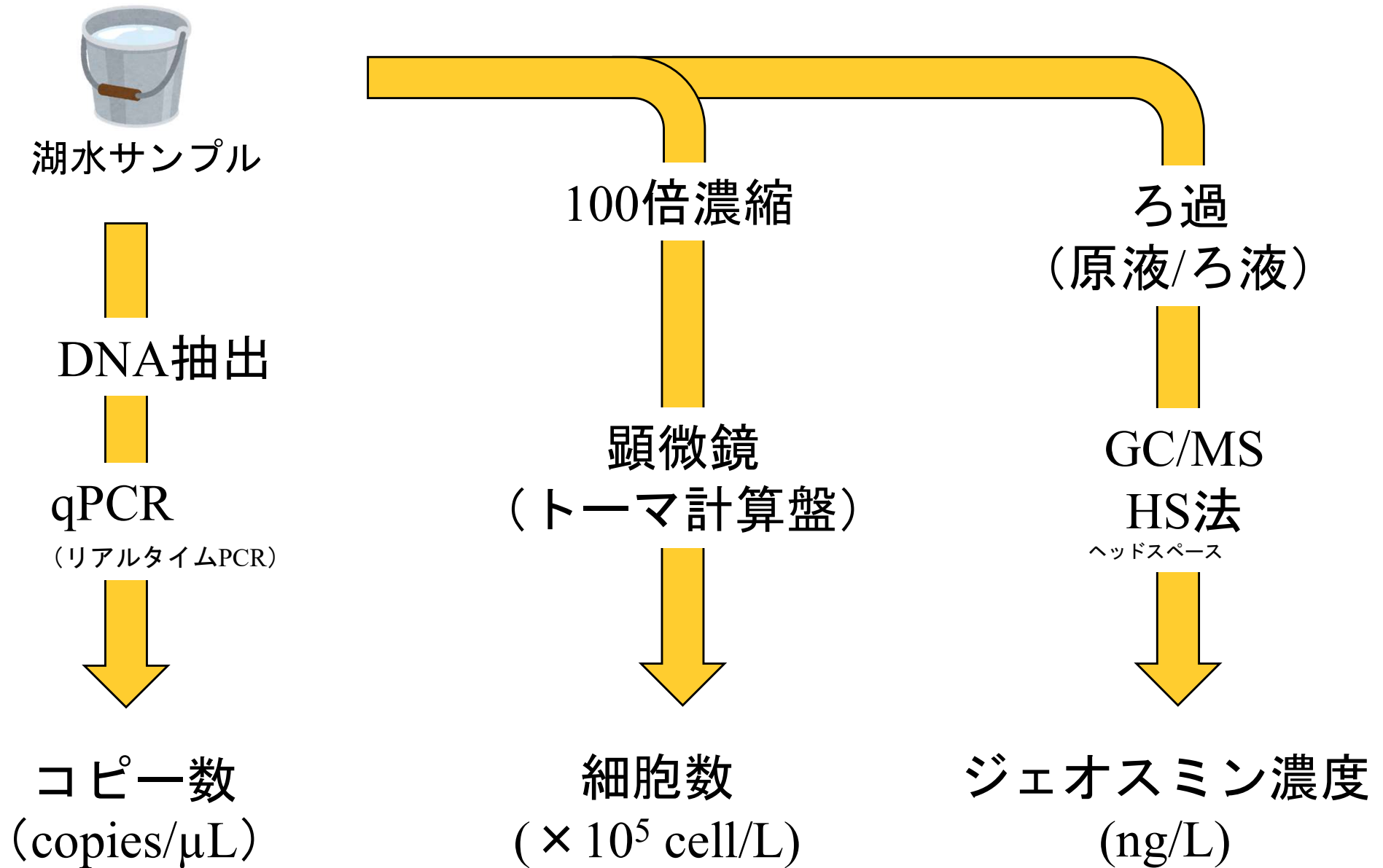
リアルタイムPCRの結果（遺伝子数（コピー数））と、細胞数およびジェオスミン濃度の関係を調査する

- ・ 分析方法の変更
- ・ PCR阻害物質有無の確認

② 穴道湖・中海のモニタリング

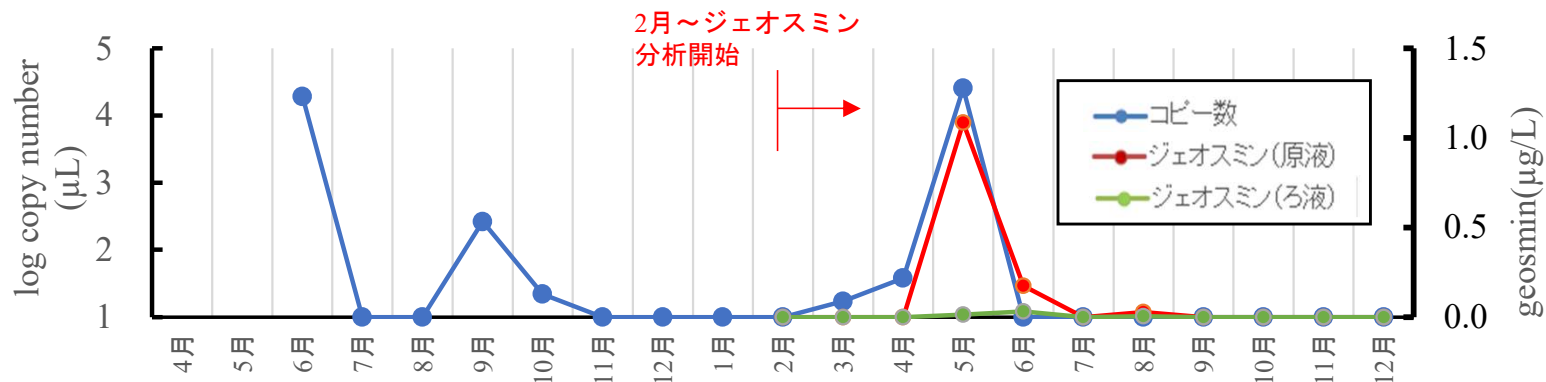
穴道湖・中海の*Coelosphaerium* sp.カビ臭産生株の実態を調査する

宍道湖・中海のモニタリング調査



宍道湖・中海のモニタリング結果

宍道湖

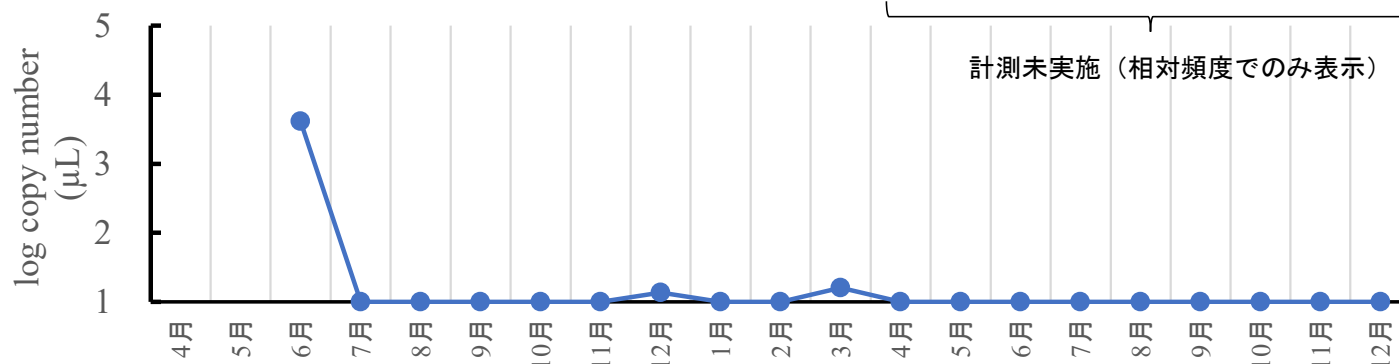


cell number($\times 10^5/L$)
相対頻度

ND	5.0	1.7	ND	ND	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	rr	r	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
----	-----	-----	----	----	---	----	----	----	----	----	----	----	---	---	----	----	----	----	----	----	----

計測未実施 (相対頻度でのみ表示)

中海 (細胞数・コピー数のみ)



cell number($\times 10^5/L$)
相対頻度

ND	ND	0.3	ND	ND	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
----	----	-----	----	----	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

2024

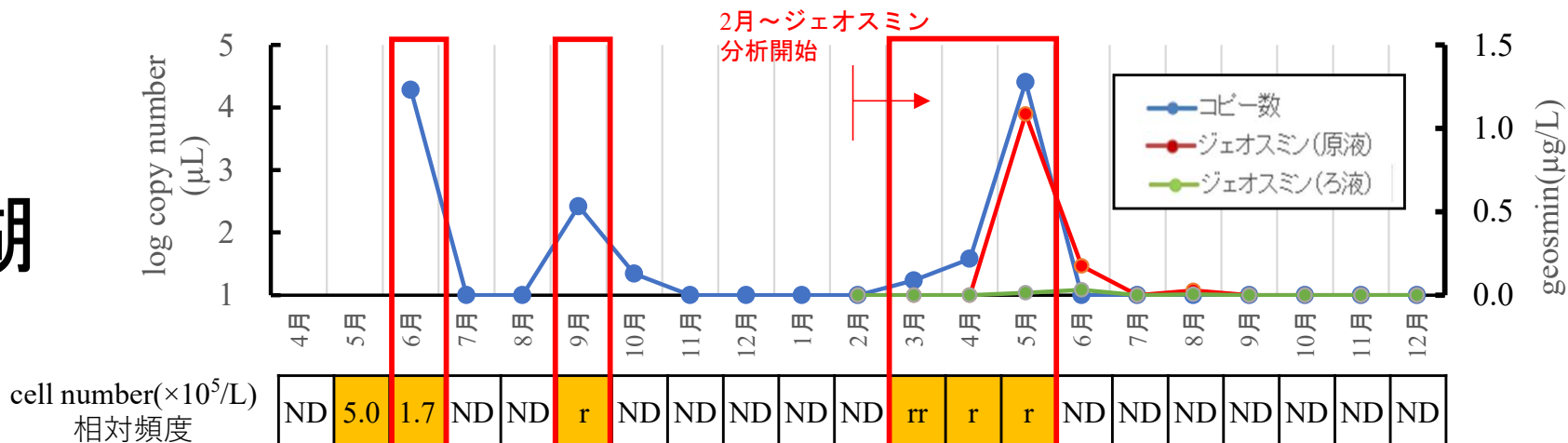
2025

※定量下限値未満は0(1)で記載

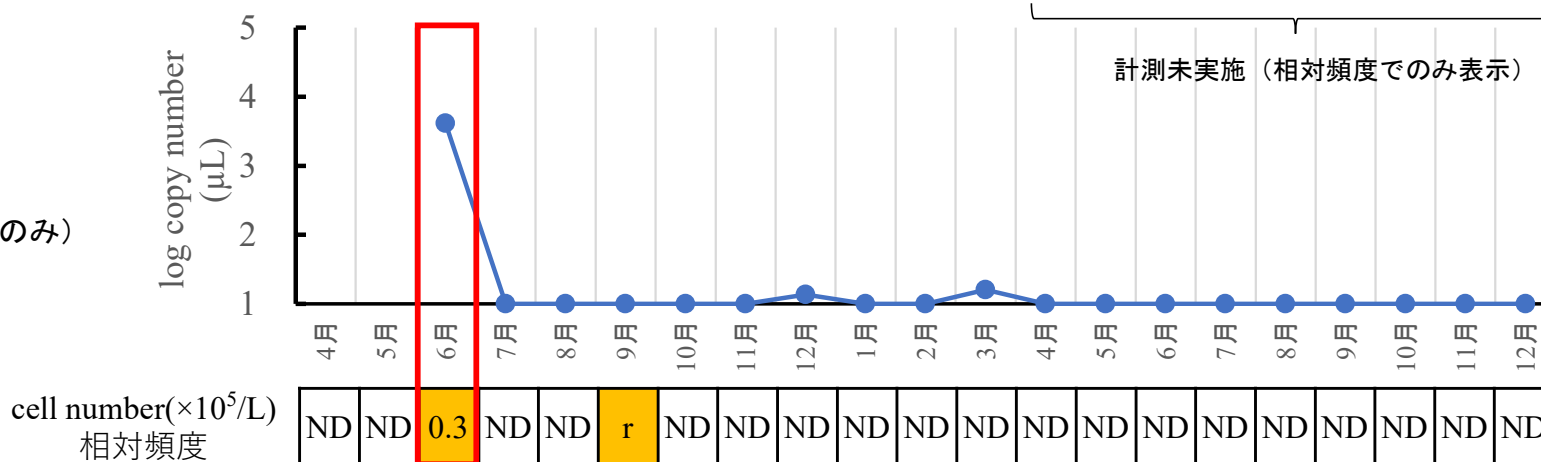
- ・細胞数とコピー数が増加 (6、9、3~5月)
- ・ジェオスミン濃度とコピー数が増加 (5月)
- ・実フィールドでも当分析法で測定可能

宍道湖・中海のモニタリング結果

宍道湖



中海 (細胞数・コピー数のみ)



2024

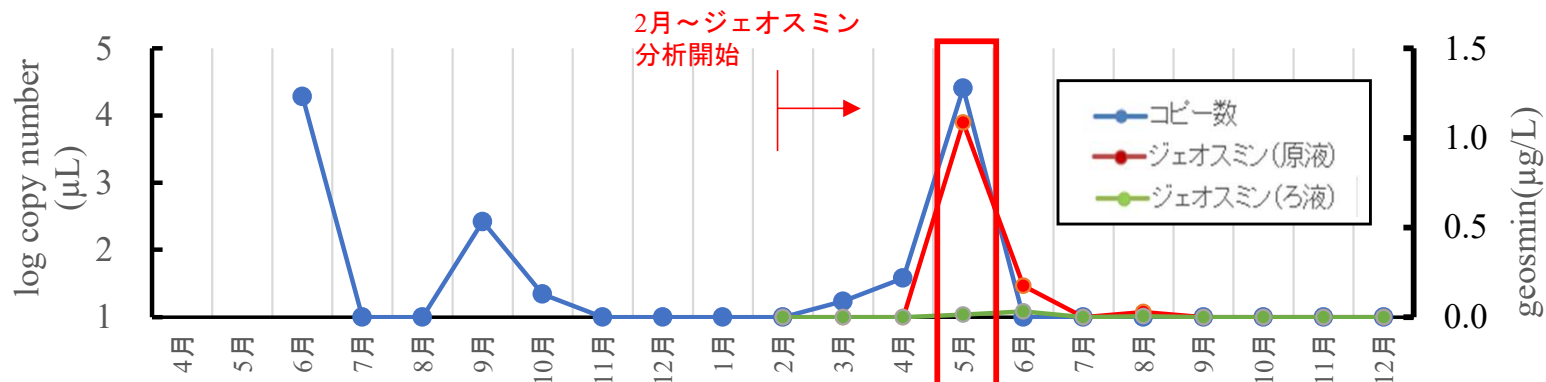
2025

※定量下限値未満は0(1)で記載

- ・細胞数とコピー数が増加（6、9、3～5月）
- ・ジェオスミン濃度とコピー数が増加（5月）
- ・実フィールドでも当分析法で測定可能

宍道湖・中海のモニタリング結果

宍道湖

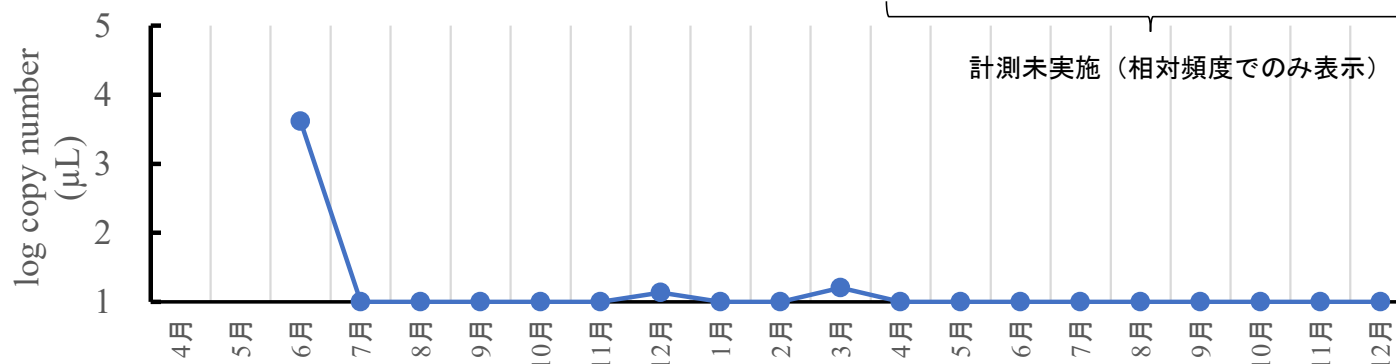


cell number($\times 10^5/L$)
相対頻度

ND	5.0	1.7	ND	ND	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	rr	r	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
----	-----	-----	----	----	---	----	----	----	----	----	----	----	---	---	----	----	----	----	----	----	----

中海

(細胞数・コピー数のみ)



cell number($\times 10^5/L$)
相対頻度

ND	ND	0.3	ND	ND	r	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
----	----	-----	----	----	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

2024

2025

※定量下限値未満は0(1)で記載

- ・細胞数とコピー数が増加 (6、9、3~5月)
- ・ジェオスミン濃度とコピー数が増加 (5月)
- ・実フィールドでも当分析法で測定可能

今後(R8)の調査

- ・ *Coelosphaerium* sp. の種特異的解析について、引き続き宍道湖・中海のモニタリングを行う
- ・ 得られた結果と水質との比較を行い、関連性の調査を行う。