

平成22年3月17日現在

| |
|---|
| 研究種目：基盤研究(B) |
| 研究期間：2006～2008 |
| 課題番号：18360255 |
| 研究課題名(和文) 有害藻類モニタリングおよび特性解析のための新規計測システムの開発 |
| 研究課題名(英文) Development of new measurement system for monitoring and characteristic analysis of harmful algae |
| 研究代表者 板山 朋聡 (ITAYAMA TOMOAKI) 独立行政法人国立環境研究所・化学環境研究領域・研究員 研究者番号：80353530 |

研究成果の概要：

有毒藍藻の増殖を自動的にモニタリングするための、特殊形状のガラス製の通気培養容器を試作開発し、また RGB3 色分光装置による藻類増殖の自動測定装置を試作開発した(特許出願)。また、簡易で安価な窒素、リンなどの水質分析や藻類増殖測定のために、汎用のスキャナーとパソコン、フリーソフトの組み合わせによる分析システムを試作開発した(特許出願)。また、藻類の単一細胞光合成活性をモニタリングするためのマイクロデバイスを試作開発し、単一細胞からの酸素発生をモニタリングに成功した。さらに、単一細胞レベルでの藍藻の PCR とシーケンスに成功した。また、脱リン酸化酵素 PP2A のマイクロキスティンによる阻害効果を活用した酵素アッセイシステムの低コスト化手法について検討し、従来の 1/3 のコストにすることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 7,000,000 | 2,100,000 | 9,100,000 |
| 2007年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,110,000 |
| 2008年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：マイクロデバイス、藍藻、マイクロキスティス、マイクロキスティン、増殖特性、脱リン酸化酵素、自動測定、酵素アッセイ

1. 研究開始当初の背景

富栄養化した湖沼やダム湖等で発生するアオコは主に藍藻から構成されているが、この中にはマイクロキスティス属などの藍藻毒産生種も多い。またフォルミedium属などのカビ臭産生藍藻も大きな問題となっている。今後、富栄養化や温暖化が進行した場合、水源池や湖沼における

藍藻増殖のリスクが増大すると考えられるため、各水域毎の有害藍藻のモニタリングや発生予測は重要な課題である。

そのためには、各藍藻類の増殖特性や毒素含有量などを明らかにする必要がある。現在、藍藻の研究では、分子生物学的手法が発展しているが、増殖速度や温度特性といった生理特

性値、また毒素含有量を定量することはできないため、実際に培養等を行うことが必要になる。また水域には様々な藍藻が生息しており、それらの生理特性取得には数多くの培養実験が必要になってくるため、迅速に多量の増殖特性を調べる手法が必要となってくる。

一方、このような水域を適正管理していく上で、藍藻毒に加え、窒素、リンのモニタリングが重要であるが、それらの定量には、分光光度計やHPLCなどの分析機器は高価であり、特に途上国での適正な水域管理の妨げになっている。そのため、迅速性に加えて安価で簡易な分析手法の必要性も極めて高い。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究では、迅速に多量の増殖特性を調べる手法として、一度に多くの藻類を培養し増殖試験を行うことができる自動増殖測定装置を開発することを目的とした。さらに、水域環境から採取した様々な藻類を培養することなく特性解析するために、単一細胞レベルでの細胞操作および活性測定が可能なマイクロデバイスシステムの開発を目指した。また、藍藻毒の中でもっとも問題となっているミクロキスティンの酵素アッセイシステムや富栄養化の原因となっている窒素、りん等の栄養塩分析の低コスト化システムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 藻類の自動増殖測定装置の開発

藻類の培養では、照射量を均一化することが重要である。そこで、すべての培養容器を光源（蛍光灯）の周りを同一円周上で回転させながら、光エネルギーを均一化する（回転培養装置）を利用することとした。この回転培養装置には、自動的に増殖をモニタリングすることが可能な分光システムを配置することとした。また、試作システムの試験には有毒藍藻ミクロキスティスを用いた。

(2) 藻類単一細胞測定システムの開発

藻類の単一細胞の光合成活性を測定するためのマイクロ流体電気化学デバイスを試作開発することとした。このマイクロデバイスでは、単一細胞を操作する電気泳動システム、酸素発生をモニタリングするマイクロ電気化学センサーから構成されるシステムとした。また、単一細胞のPCRとシーケンスを行うこととした。

(3) 藍藻毒低コスト化測定手法の開発

藍藻毒の酵素アッセイとして脱リン酸化酵素 PP2A へのミクロキスティンの特異的阻害効果を活用した酵素アッセイシステムにおいて、酵素量の低減化等による低コスト化を検討した。

(4) 汎用スキャナーによる分析システムの開発

窒素、リンの定量分析のために、24穴のマイクロウェルに1mlずつサンプルを採取し、そのマイクロウェルをフラットベッドスキャナーでスキャンし、パソコンに取り込み、フリーソフトウェアのGimp2.2とImage-J(Ver.1.4)を用いてウェルごとのRGB強度を数値化し定量分析を試みた。

4. 研究成果

(1) 藻類の自動増殖測定装置の開発

①自動藻類増殖測定装置の構成

図1-1に、試作した装置の概要を示す。本装置は、各培養容器間の照射量を均一化するために、培養容器をアームの先に取り付け、蛍光灯の前で回転させることを特徴としている。さらに、この回転時に各培養容器はRGB簡易3色分光光度計（図1-2）を通過する。

これは、白色LED光と受光部の間に藍藻培養容器を通過させ、透過光をRGBカラーに分けて測光した。これには3CCDビデオカメラ用のプリズム光学系（ダイクロイックミラー）を用いてRGBに分光し、それぞれをフォトダイオードで受光し、フォトアンプで増幅してRGBの各電圧出力を取り出した。また蛍光灯からの外乱をさけるために、1601Hzのサイン波で白色LED光を変調し、フォトアンプの出力を位相検波することでサイン波の同期成分を直流信号として取り出した。

また、培養容器への通気装置が各アームに取り付けてある。この培養容器は内容積は約80mLの底が細ったガラス瓶であり、通気攪拌により藻類が沈降しないようにすることができる。なお、この容器の蓋はポリカーボネイト製で滅菌可能である。

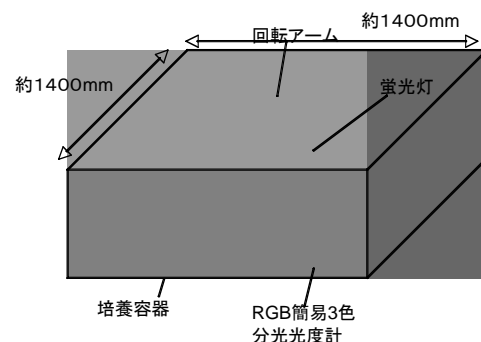


図1-1 試作した藻類自動増殖測定装置の概要

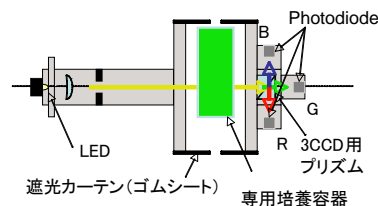


図1-2 試作したRGB簡易3色分光光度計

②基本性能試験結果

試作した装置の基本性能試験にはM11培地（窒素濃度 34mg-N/L,17mg-N/L,11mg-N/L）に懸濁した藍藻 *Microcystis aeruginosa* を使用した。これを 4.0×10^4 cell/mL の細胞密度で60 mL、専用培養容器に入れ自動藻類増殖測定装置のアームにセットした。光強度は平均 2,300Lux、温度は平均 23.5 度であった。各RGBの位相検波信号をPCデータロガーに取り込んだ。細胞密度は十分に高い増殖後期では、LED光はほとんど吸収されている。増殖に従い、光が吸収されフォトダイオードの出力が大きくなっていく。RO水の時の各RGBの出力電圧をR0、G0、B0とし、各細胞密度の時の各RGBの出力電圧をR(G、B)とすると、培養容器のセル厚さが 2.5cm であるので、各RGBの吸光度Ar(Ag, Ab)は

$A_r = -\ln(R/R_0)/2.5$, $A_g = -\ln(G/G_0)/2.5$, $A_b = -\ln(B/B_0)/2.5$ となる。各窒素濃度での増殖にともなう R の吸光度の時間変化を図1-3に、また *M.aeruginosa* 希釈列で求めた吸光度と細胞密度の関係と図1-4に示した。

細胞密度が約 1.0×10^5 cell/mL (0.4 OD) までは密度と吸光度は比例しているが、細胞密度が高くなると吸光度の傾きが低下してくる。従って、本装置で増殖試験を行う場合には、この比例関係が成立する 0.4 OD以下の細胞密度までの間で測定を行うことが望ましいと考えられる。この範囲では、次式を持ちいてRGB吸光度から細胞数を推定できる。

$N(\text{cell/mL}) = a \cdot A_r + b \cdot A_g + c \cdot A_b$: $a = 7.87 \times 10^4$, $b = -33.61 \times 10^4$, $c = 57.68 \times 10^4$

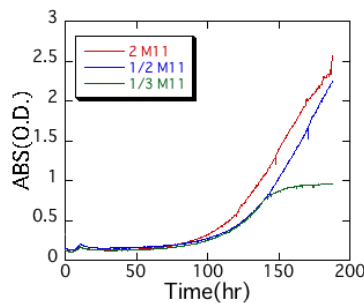


図1-3 窒素濃度の異なる藍藻 *M.aeruginosa* 増殖過程での R 成分の吸光度の変化

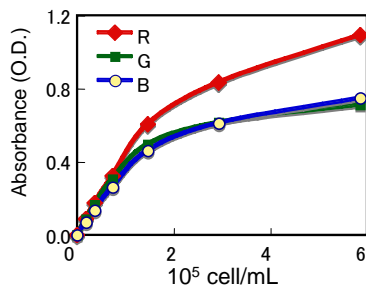


図1-4 吸光度と細胞数の関係

③結論と課題

本装置を用い藻類の細胞密度を吸光度から推定できることがわかった。次に、増殖実験における条件として栄養塩濃度を変えることは容易であるが、光強度をパラメータとする場合には、各培養瓶の前に遮光スクリーン（金網など）をおき、コントロールする必要がある。

(2) 藻類単一細胞測定システムの開発

①マイクロ流体電気化学デバイスの構成

マイクロ流路内に導入した藍藻細胞をウェル内に取り入れる方法として電気泳動法を用いた。また酸素を取り込むために、このマイクロウェル中には電気泳動用の電極と酸素センサーとしてのマイクロ電極（作用極）としてマイクロパターン Pt 電極を作成した。また、マイクロ流路やマイクロウェルには透明シリコンゴム素材である PDMS を SU-8 を型としたモールドイングによって作成した。マイクロ流体電気化学デバイスの概要図を図2-1に示した。さらに、試作デバイスの外見を図2-2に示した。

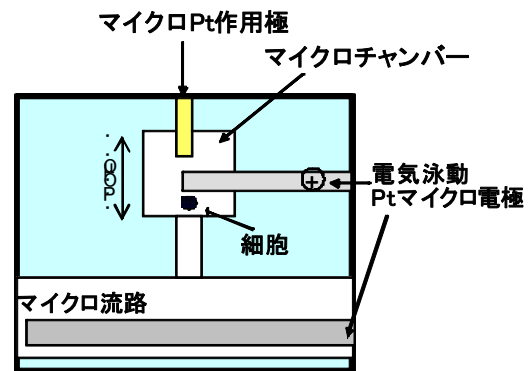


図2-1 マイクロ流体電気化学デバイス概要図

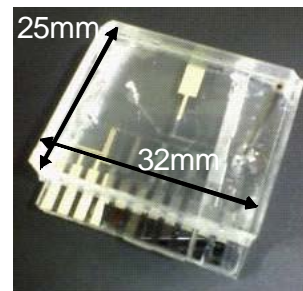


図2-2 試作デバイス

今回試作したデバイスでは幅 $200 \mu\text{m}$ で長さ 2.3mm 、厚さ $15 \mu\text{m}$ のマイクロ流路に、4つの測定用ウェル ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ 厚さ $15 \mu\text{m}$) が幅 $20 \mu\text{m}$ 、長さ $50 \mu\text{m}$ 、厚さ $15 \mu\text{m}$ の細い流路で接続された構造である。

② 藍藻マイクロキスティスの光合成活性測定

藍藻マイクロキスティス細胞の光合成活性を測定するために、試作したマイクロ流体電気化学デバイスの流入口にマイクロピペットで *M. viridis* の M11 培地に懸濁サンプル液を注入し細胞を顕微鏡下で観察して、マイクロ流路中 Pt 電極に対し、マイクロチャンバー内 Pt 電極に +2.3V を印加しチャンバー内に細胞を引き込んだ。

引き続き、光合成活性測定実験を実施した。光合成で発生する酸素をチャンバー内の Pt 作用電極に -0.5V の電位にポテンシオスタットで印加して酸素還元電流を測定した。

藍藻 *M. viridis* の単一細胞を用いて、同様の実験を実施した。その結果、LED ライトを 150 秒間 ON にした結果、酸素の還元電流がバックグラウンドから約 100 pA 増加した (図 2-3)。この結果から、試作したマイクロデバイスは単一細胞の藍藻細胞の光合成活性をとらえることができたと考えられる。

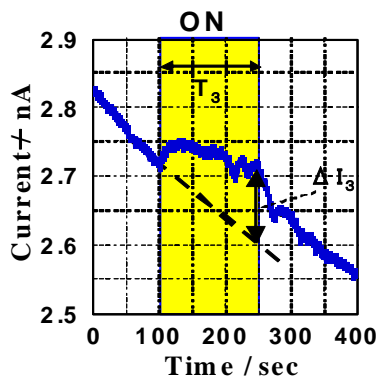


図 2-3 単一細胞からの酸素発生

③ 藍藻単一細胞レベル PCR とシーケンス

ラン藻類の検出には、毒素産生遺伝子 *mcya* 等による定量 PCR 手法などが用いられている。実際に霞ヶ浦の湖水で *mcya* に対するプライマーを設計し定量 PCR を検討すると、湖水では 100 細胞/mL オーダーでの検出が可能であった。また、PCR チューブあたりでは、10 細胞程度での検出が可能であった。

そこで、さらに単一細胞レベルでの PCR が可能であることを検討するために 16S rDNA の藍藻特異領域 (209F-409R) の外側にさらに、27F で増幅させることによる Nested-PCR を用いた。まず、キャピラリーで各 PCR チューブに *M. viridis* の細胞を入れた (1~18 細胞)。さらに PCR 前に 70 度 30 分で熱処理をすることで、PCR 効率を上げることが分かった。この PCR の結果を図 2-4 に示した。さらに、PCR 産物を回収してシーケンスを行ったその結果、50 細胞の

M. viridis の PCR とデータベースのシーケンスで 209-409 領域を比較した結果、1 塩基の読み取りミスを除いて一致し単一細胞レベルでのシーケンスも可能でなことが分かった。したがって、単一細胞での光合成活性測定の後には、藻類の系統解析を行うことが可能である。

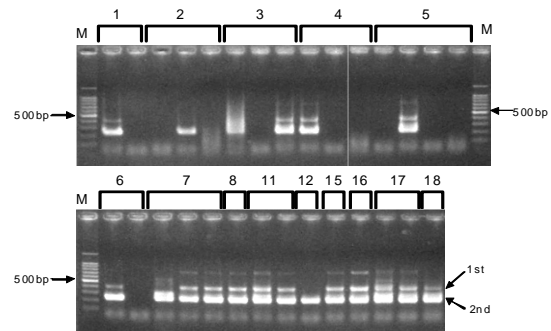


図 2-4 *M. viridis* (NIES102) の単一細胞レベルでの PCR 結果 (ゲルのレーン上の数字が細胞数を示す)。

(3) 藍藻毒低コスト化測定手法の開発

① 実験方法

アッセイ用酵素として Protein Phosphatase-2A (Promega Co., 0.5U/μL) を用い (以下 PP2A)、pNPP (4-Nitrophenyl phosphate Disodium salt Hexahydrate) を基質に用いた。標準基質濃度の反応液 (RM) に対して、pNPP の濃度を 5 倍、2 倍、.5 倍、0.1 倍とした RM を作成した。また PP2A:3.04 μL を含む標準酵素液 (EZ) とした。この標準 EZ に対し、0、1/2、1/3 濃度酵素液を作成した。市販の microcystin-LR と八郎湖のアオコ発生湖水を用いた試験を行った。

測定には 96 穴マルチプレートとプレートリーダー (TECAN, SUNRISE THERMO RC) を用い、各ウェルに RM100 μL、希釈マイクロキスティン溶液 10 μL を入れ混合し、その後 EZ10 μL を一斉に添加し反応開始とした。なお、標準 pNPP 濃度に対して酵素なしの条件を割り当てた。本プレートリーダー内を恒温条件 (36°C) に設定しインキュベーションを行い、生成するパラニトロフェノール (黄色) を、405nm と 492nm の吸光度差で、3 分おきに自動的に全ウェルを測定した。

② 結果

図 3-1 に酵素反応産物 (黄色) の生成量の酵素量と基質 (pNPP) 量を変化させた場合の結果を示した。この場合 1 時間では酵素量を 1/3 にすると、基質 (pNPP) 量を 5 倍にしても反応生成物が少なく検出のための十分な着色がすくない。そこで、次に反応時間を増加させた。2 時間の反応時間になると、標準基質 (pNPP) 量では着色は倍くらいになるが、まだ標準条件の半分以下である。2 時間以上のインキュベーションでは、急

速に着色し始め、pNPP の脱リン酸化以外の副反応があると考えられた。また酵素失活もあるため、反応時間は2時間以内が適切であった。そこで、基質 pNPP を5倍にすることで酵素反応速度を上げて着色を向上させ、検出感度を標準法と同程度にすることができた (図3-2)。

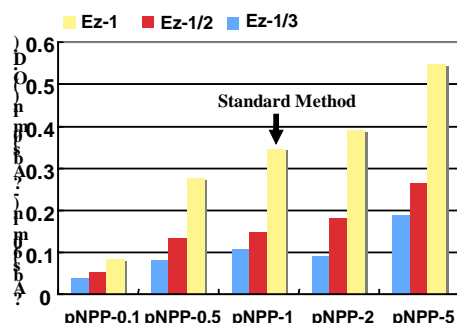


図3-1 の酵素量と基質 (pNPP) 量に対する反応生成物の変化

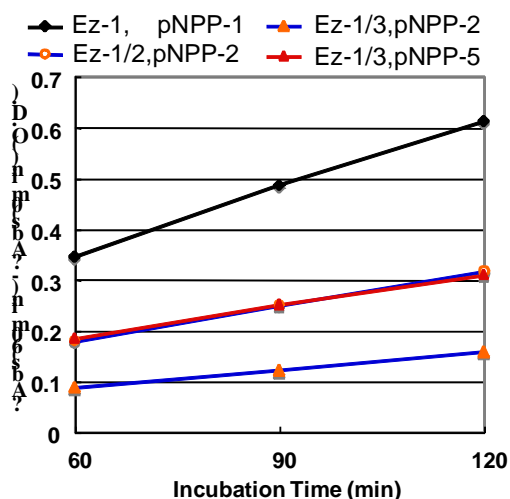


図3-2 インキュベーション時間に対する反応生成物の変化

③実湖水に対する試験

アオコが発生した秋田県の八郎湖の湖水を用いてPP2Aによるマイクロシステイン定量試験を行った。(詳細の採取地点と年月日は今回秘匿する)。Site1とSite5で、標準法とともに、酵素使用量を低減化した方法での定量結果を比較した。結果を図3-3に比較した。その結果、両地点ともに、標準法にくらべ、少し低く検出されるものの、酵素量を1/3に低減化し、基質(pNPP)量を5倍、反応時間を倍の2時間にすることで、ほぼ同じ定量値をえることができた。これにより、新たな定量法は、酵素が消耗品の価格のほとんどであることから、1/3の消耗品コストで分析が可能であることが分かった。

| | Microcystin (ppb) | |
|---|-------------------|--------|
| | Site 1 | Site 2 |
| Standard condition :60 min | 0.363 | 1.398 |
| Ez-1/3 pNPP1 :120min | 0.001 | 0.413 |
| Ez-1/3 pNPP5 :120 min (Cost effective condition) | 0.325 | 1.121 |

図3-3 八郎湖の2地点の低コスト化PP2A法による定量結果

④電気化学的検出法との比較検討

PP2Aの基質としてpAAPを使用すると生成物pAPが電気化学的検出できたのでマイクロシステインの電気化学的定量が可能であったが、電極の汚染や並列化の困難性のため、電気化学検出システムの実用化には課題が残った。

(4) 汎用スキャナー分析システムの開発

①分析試験方法

今回、硝酸態窒素(NO₃-N)を還元-ナフチルエチレンジアミン吸光光度法で、リン酸態リン(PO₄-P)をモリブデン青吸光光度法とし、市販試薬キットを用いた。黒色枠の24穴のマイクロウェルに1ml標準サンプル水と各キットの試薬を入れ発色させたのちに、そのマイクロウェルをフラットベッドスキャナ(EPSON:GT-X970)で、RGB16ビットの画像をフリーウェアGimp2.2とImage-J(Ver.1.4)を用いて各ウェルのRGB(Red, Green, Blue)強度を測定した。分光光度計による測定データとスキャナーによるRGBデータとの関係を回帰分析した。

②分析結果

通常の分光光度計によるNO₃-NおよびPO₄-Pの分析結果に対するそれぞれのRGBデータとの関係を図4-1に示した。さらにNO₃-NはG値、PO₄-PではR値を用いて、濃度との関係を回帰分析により求めた。NO₃はGと、PO₄はRと単回帰し $G/G_0 = 1.00 - 0.99(\text{NO}_3\text{-N}) + 0.42(\text{NO}_3\text{-N})^2$ 、 $\text{PO}_4\text{-P} = -0.30 + 26.74(R^1) + 77.27(R^2)$ が得られた(R²は0.999以上)。

この結果は、NO₃-NおよびPO₄-Pの濃度をスキャナーで測定できることを示唆する。さらに、この方法で、東京都内の公園池の窒素、リン濃度を測ることに成功し、極めて低価格の分析システムを完成させることができた。

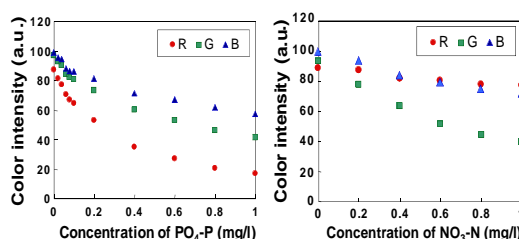


図4-1 NO₃-N、PO₄-P濃度とRGB値の関係

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)

① Kazuhiro Furukawa, Naohiro Noda Satoshi Tsuneda, Takeshi Saito, Tomoaki Itayama and Yuhei Inamori: "Highly Sensitive Real-Time PCR Assay for Quantification of Toxic Cyanobacteria Based on Microcystin Synthetase A Gene" Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol.102. 90-96 (2006)

[学会発表] (計8件)

① 板山朋聡, 小出昌宏, 長峰邦明, 末永智一: "藻類特性評価のためのマイクロデバイスの開発" 第41回日本水環境学会. 2007年3月20日. 東大阪:大阪産業大学

② 板山朋聡, 小出昌弘, 長峰邦明, 安川智安, 末永智一: "マイクロ流路電気化学デバイスによる藻類活性測定" 第15回化学とマイクロ・ナノシステム研究会. 2007年5月26日. 仙台:東北大学

③ 板山朋聡, 小出昌弘, 長峰邦明, 安川智安, 末永智一: "マイクロ電気化学デバイスによる微生物活性測定" 日本分析化学会第56年会. 2007年9月19日. 徳島:徳島大学

④ 板山朋聡, 田中伸幸, 桑原享史, 尾崎保夫: "藍藻毒microcystinのPP2A酵素アッセイの低コスト化" 第42回日本水環境学会. 2008年3月20日. 名古屋:名古屋大学

⑤ Tomoaki Itayama, Masahiro Koide, Kuniaki Nagamine, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matue: "Development of microdevices for measuring microbial activity in environmental microbial studies", 2008年9月, IWA World Water Congress and Exhibition, Vienna, Austria: (査読つき)

⑥ Masahiro Koide, Tomoaki Itayama, Kuniaki Nagamine, Tomoyuki Yasukawa, Tomokazu Matue: "Development of microdevices for measuring microbial activity in environmental microbial studies", 2008年9月, IWA World Water Congress and Exhibition, Vienna, Austria: (査読つき)

⑦ 板山朋聡, 田中伸幸, 岩見徳雄, 杉浦則夫: "自動藻類増殖測定装置の試作開発" 第44回日本水環境学会. 2010年3月17日). 福岡:福岡大学

⑧ 岩見徳雄, 大森 啓, Niwooti Whangchai, 板山朋聡: "水質分析の簡易・低コスト化手法の開発" 第44回日本水環境学会. 2010年3月16日). 福岡:福岡大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

①電気化学測定装置の製造方法
発明者:板山朋聡、小出昌弘、長峰邦明、安川智之、沼井大輔、珠玖仁、末永智一
権利者:(独) 国立環境研究所
種類:特許
番号:特願2008-012608
出願年月日:2008年1月26日
国内外の別:国内

②藻類増殖量自動測定装置
発明者:板山朋聡、岩見徳雄
権利者:明星大学
種類:特許
番号:特願特願 2010-52972
出願年月日:2010年3月10日
国内外の別:国内

③分析システムおよび分析方法
発明者:岩見徳雄、板山朋聡、
権利者:明星大学
種類:特許
番号:特願特願 2010-55269
出願年月日:2008年3月10日
国内外の別:国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板山朋聡 (ITAYAMA TOMOAKI)
国立環境研究所・化学環境研究領域・研究員
研究者番号:80353530

(2) 研究分担者

尾崎保夫 (OZAKI YASUO)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号:10029308

(3) 連携研究者

岩見徳雄 (IWAMI NORIO)
明星大学・理工学部・准教授
研究者番号:00353532
末永智一 (MATSUE TOMOKAZU)
東北大学・環境科学研究科・教授
研究者番号:70173797

川端善一郎 (KAWABATA ZENICHIRO)
総合地球環境学研究所・研究部・教授
研究者番号:80108456