

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19760370

研究課題名（和文） 有害物質生成藻類の増殖抑制技術の開発

研究課題名（英文） Development of growth inhibition technology of toxic-producing blue-green algae

研究代表者

日高 平 (HIDAKA TAIRA)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30346093

研究成果の概要（和文）：実験室での *Microcystis* 培養実験において、リアルタイム PCR 法の適用性を検討した。対数増殖相以降では *mcy A* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子いずれの測定でも、顕微鏡観察と同程度の細胞数が算出できた。細胞数もしくは *mcyA* 遺伝子の増加に従い、おおむねマイクロシスチン濃度が増加した。現地調査では、*mcyA* 遺伝子濃度とマイクロシスチン濃度の両者が共に増加する傾向が見られた。リアルタイム PCR 法によりマイクロシスチン生成藍藻類を定量可能であり、現場での維持管理や藻類増殖抑制に資する技術となることが示された。

研究成果の概要（英文）：Applicability of real-time PCR method was evaluated by cultivation experiments of *Microcystis*. After logarithmic growth phase, quantification results by both *mcy A* gene and 16S rRNA gene were similar to cell numbers measured by microscopic analysis. Increase in cell number and *mcy A* gene corresponded with increase in microcystin production. Simultaneous increase in *mcy A* gene and microcystin was observed in a field survey. These results proved that real-time PCR quantification can be applied to microcystin-producing blue-green algae, and it is promising to develop monitoring and growth inhibition technologies of toxic-producing blue-green algae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

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：水質汚濁・土壌汚染防止・浄化、モデル化、有害化学物質

1. 研究開始当初の背景

飲料水源となっている湖沼やダム湖での富栄養化に伴う、有毒物であるマイクロシスチ

ン生成藍藻類の問題については、古くより研究されており、窒素やリンの制御、マイクロシスチン分解方法など様々な対策が検討され

てきている。しかしながら、ミクロシスチン生成藍藻類の増殖やミクロシスチン生産の原因となる因子は明確に特定されていないのが現状であり、依然として、日本国内および世界各国でミクロシスチン生成藍藻類の問題は解決されているとはいえない。ミクロシスチン生成藍藻類の中でも最もよく知られている *Microcystis* 属については、有毒種と無毒種が存在し、顕微鏡による観察や藻類の一般的な指標としてのクロロフィル a の測定では、ミクロシスチン生成能力の有無を直接評価できない点が問題である。そのような中、近年分子生物学的手法の活用が、環境工学分野の中でも広まりつつある。リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法による特定遺伝子濃度の定量技術が開発されてきており、ミクロシスチン生成藍藻類の挙動を把握するのに有用であると考えられた。

2. 研究の目的

実験室でのミクロシスチン生成藍藻類の培養実験および自然水中での調査を行い、リアルタイム PCR を利用してミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性を分析し、自然水の中のミクロシスチン生成藍藻類を全藍藻類から区分して定量する技術の確立により、現場での維持管理や藻類増殖抑制に資する技術の開発目的とした。

表 1 培養条件

Run	培地	温度
1	MA培地	25°C
2	半分に希釈したMA培地	25°C
3	MA培地	30°C

3. 研究の方法

独立行政法人国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲された無菌単藻株 *Microcystis aeruginosa* (NIES-102) を、人工気象器 (日本医化器械製作所) 内にて各条件下で 28 日間培養した。培養条件は表 1 に示すとおりである。細胞数は 2~3 日に 1 回、その他の項目は 7 日に 1 回、分析を行った。培地は、MA 培地もしくは半分に希釈した MA 培地を用いて、温度条件は 25°C もしくは 30°C とし、約 1000 lux および 12h:12h の明暗周期の条件下で培養した。

また、自然水を対象とした検討を行うために、現地調査として *Microcystis* が優占して観測されている京都市内の池での分析も、2007 年 5 月~12 月および 2008 年 4 月~7 月にかけて行った。この期間中は、雨天時を避けながら 1~2 週間に 1 回採水を行い、水温などの基礎項目を現地で測定し、実験室にて水質などの分析を行った。琵琶湖南湖 6ヶ所での調査も同様にして 2008 年 9 月に行った。

Microcystis が生成するミクロシスチンの測定には、間接競合 ELISA 法(常盤化学工業(株))を用いた。その際には、3 回凍結融解を繰り返し 5 分間の超音波処理を行うことで細胞中に保持されているミクロシスチンを溶出させた。細胞数の測定は、プランクトン計数板(MPC-200)を用いて顕微鏡下で行った。窒素、クロロフィル a などその他の一般的な水質項目については、上水試験方法・下水試験方法に準拠した。

本研究では、リアルタイム PCR 法によるミクロシスチン生成藍藻類の定量を試みた。DNA の抽出は DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて行った。PCR は Light Cycler (Roche) を用いて、反応試薬 Fast Start DNA Master Plus SYBR Green I (Roche) により行った。定量プライマーには、*Microcystis* の *mcy A* 遺伝子をターゲットとした MSF

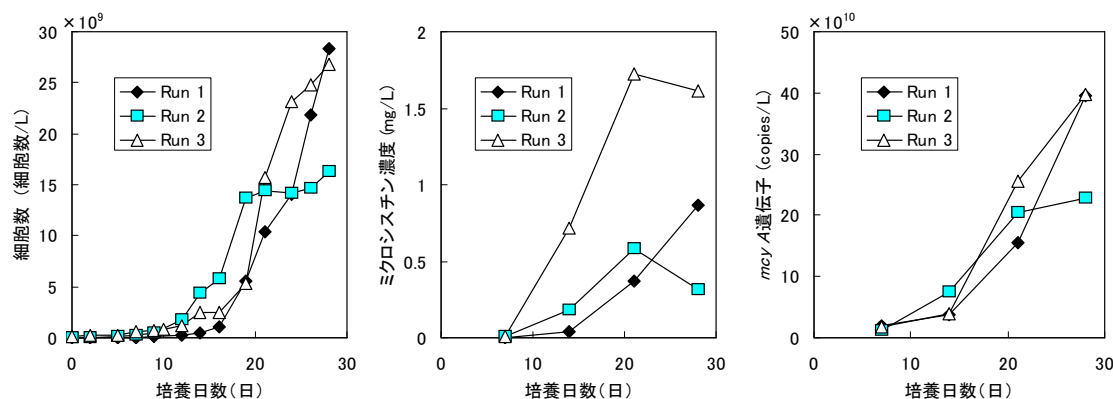


図 1 培養実験における経日変化

(5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3')/MSR (5'-TGCAGATAACTCCGCGAGTTG-3')、および *Microcystis* の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした 209F (5'-ATGTGCCGCGAGGTGAAACCTAAT-3')/409R (5'-TTACAATCCAAGACCTTCCTCCC-3')を用いた。PCR 条件は、95°C×30 分 + (95°C×10 秒 + アニール温度 62°C×10 秒 + 72°C×30 秒) ×25 サイクルとした。検量線は、DNA 濃度既知サンプルの希釈列より作成した。

4. 研究成果

(1) 培養実験

28 日間の培養実験における細胞数、ミクロシスチン濃度および *mcy A* 遺伝子の経時変化を図 1 に示す。16S rRNA 遺伝子も同様の変化を示した。MA 培地を半分まで希釈した Run 2 では 20 日目以降に増殖が停止していたのに対して、Run 1 および Run 3 では 28 日目まで増加し続けていた。特に対数増殖相以降で、ミクロシスチン濃度、*mcy A* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子いずれも細胞数の増加に従い増加しており、おおむね線形関係が見られた。そこで、すべての実験における遺伝子濃度と細胞数の関係をまとめて、最小二乗法により一次式で表した。その関係式を用いることで、リアルタイム PCR による遺伝子濃度の測定結果から細胞数が算出できるようになる。リアルタイム PCR による測定結果から算出した細胞数と細胞数の顕微鏡観察による実測値との比較を図 2 に示す。低濃度域では、リアルタイム PCR による算出値がやや高く過大評価する傾向が見られた。遅滞相においては、細胞の増殖と遺伝子の増殖の特性が異なり単純な比較は難しいかもしれないものの、対数増殖相以降では *mcy A* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子いずれの測定でも、実測値と同程度の細胞数が算出できた。図 3 に細胞数の実測値および *mcy A* 遺伝子とミクロシスチン濃度の関係を示す。細胞数および *mcy A* 遺伝子いずれも増加するに従い、おおむねミクロシスチン濃度が増加していた。これらの結果より、リアルタイム PCR による測定が、ミクロシスチンを生成する藍藻類の挙動を把握するために有用であると考えられた。

(2) 現地調査

京都市内の池での現地調査での測定結果を図 4 に示す。調査期間の水温は 11~34°C の範囲であった。全窒素濃度は、通常 1~5 mgN/L であったものの、藻類の急激な増加が見られた際には、30 mgN/L を超過したこともあった。クロロフィル a 濃度は、通常 0.1~0.5 mg/L 程度で、最大 10 mg/L 程度まで増加した。ミクロシスチン濃度は通常 0.01~1 mg/L であったものの、藻類の急激な増殖

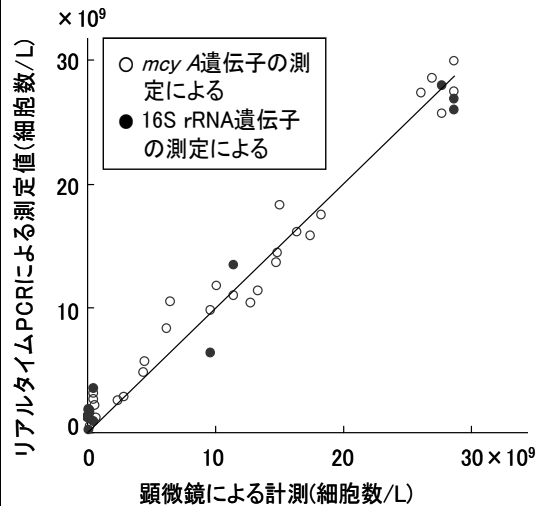


図 2 リアルタイム PCR の測定結果から算出した細胞数

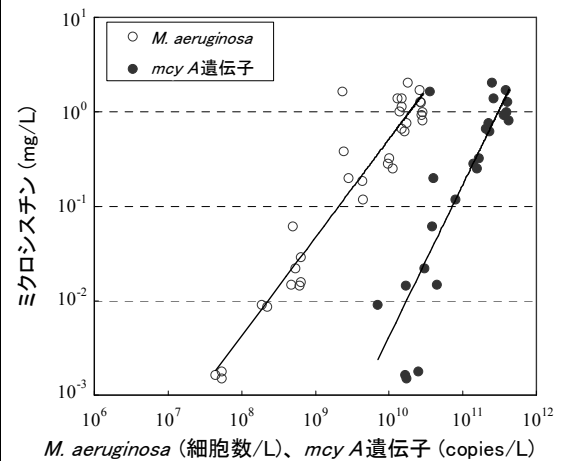


図 3 *Microcystis* 濃度および *mcy A* 遺伝子とミクロシスチン濃度の関係

が見られた際には、5 mg/L を超過したこともあった。2008 年 4 月~7 月の間は、全窒素濃度が 1 mgN/L 程度、クロロフィル a 濃度が 0.1 mg/L 程度、ミクロシスチン濃度が 0.0005 mg/L 程度であり、藻類の急激な増殖は見られなかった。現地調査での *mcy A* 遺伝子濃度とミクロシスチン濃度の関係を図 5 に示す。低濃度域で両者の関係は明確でないものの、高濃度の場合には両者が共に増加する傾向が見られた。ミクロシスチン/クロロフィル a 比が変動していたことについて、ミクロシスチン生成藍藻類の成長に着目すると、ミクロシスチン/クロロフィル a 比は、夏季で特にミクロシスチン生成 *Microcystis* の濃度が高く安定的にアオコが維持される時に高く、

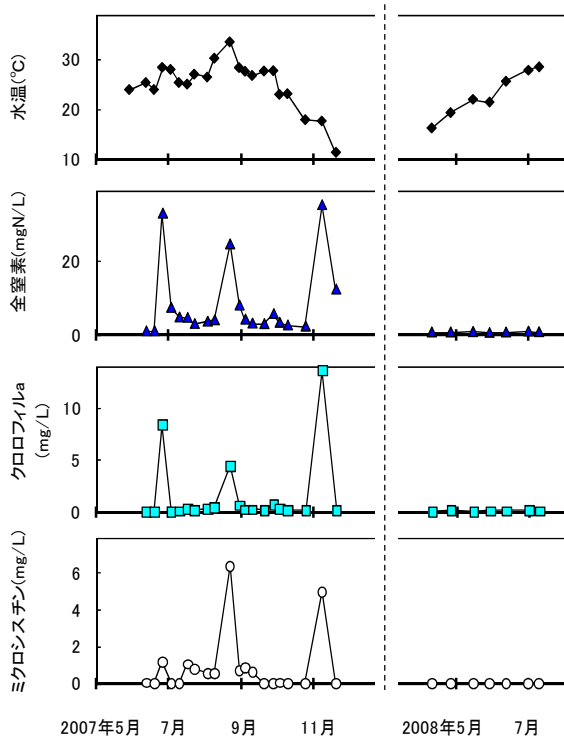


図4 現地調査での測定結果

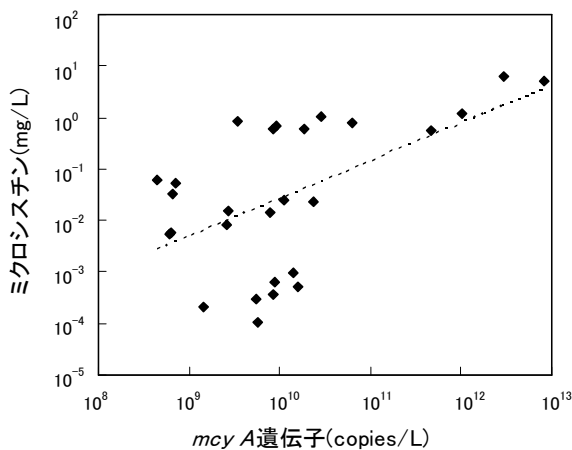


図5 現地調査での *mcy A* 遺伝子濃度と
マイクロシスチン濃度の関係

アオコの毒性を予測する上では従来のクロロフィル a 濃度だけでは不十分で、アオコの成長状況を考慮する必要があると考えられた。2007 年には、有毒 *Microcystis* の全 *Microcystis* に占める割合はおよそ 80%であった。環境条件がマイクロシスチン生成藍藻類の成長およびマイクロシスチン生成特性に及ぼす影響を検討したところ、アンモニアがマイクロシスチン生成藍藻類の成長を促進しマイクロシスチン濃度を増加させることが示された。一方、リンの影響は少なかった。

琵琶湖南湖でのマイクロシスチン濃度は、 $0.10 \mu\text{g/L} \sim 1.6 \mu\text{g/L}$ であった。リアルタイム PCR 法による測定結果は同様の傾向を示しており、適用可能であった。

これらの結果より、リアルタイム PCR 法による測定で、マイクロシスチン生成藍藻類の挙動を把握し、水質管理に適用可能であると考えられ、現場での維持管理や藻類増殖抑制に資する技術となることが示された。

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 2 件)

① Joo H. Ha, Taira Hidaka, Hiroshi Tsuno : Analysis of factors affecting the ratio of microcystin to chlorophyll-a in cyanobacterial blooms using real-time polymerase chain reaction, *Environmental Toxicology*, 印刷中.(査読有)

② Joo H. Ha, Taira Hidaka and Hiroshi Tsuno : Quantification of Toxic Microcystis and Evaluation of Its Dominance Ratio in Blooms Using Real-Time PCR, *Environmental Science Technology*, Vol.43, No.3, pp.812-818, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① J.H. Ha, T. Hidaka, H. Tsuno : Application of Real-time PCR to Analyze the Effects of Environmental Conditions on Microcystin-producing Cyanobacterial Blooms and Microcystin Production, The 3rd IWA-ASPIRE Conference and Exhibition, W4-0-1, 2009 年 10 月 18 日～22 日, 台北, 中華民国.

② Taira HIDAKA, Joo Hyun HA, Yasunari KUSUDA, Fumitake NISHIMURA, Hiroshi TSUNO : Quantification of toxic cyanobacterial bloom using real-time PCR, 6th Netherlands-Japan Workshop on Water Technology, p.110, 2009 年 10 月 14 日～16 日, 京都.

③ 目高 平, 河 周賢, 楠田育成, 津野洋 : リアルタイム PCR によるマイクロシスチン生成藍藻類の分析, 環境衛生工学研究, Vol.23, No.3, pp.116-119, 2009 年 7 月 31 日～8 月 1 日, 京都.

④ 目高 平, 河 周賢, 楠田育成, 津野

洋：リアルタイム PCR を用いたマイクロシ
スチン生成藍藻類の分析，第 46 回下水道
研究発表会講演集，pp.413-415，2009 年 7
月 28 日～30 日，東京。

- ⑤ J.H. HA, T. HIDAKA, H. TSUNO :
Monitoring of microcystin synthetase
(mcy) gene concentration and
microcystin production in
cyanobacterial blooms with real time
PCR, 11th International Conference on
Applied Phycology, p.181, 2008 年 6 月 22
日～27 日 Galway, Ireland.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日高 平 (HIDAKA TAIRA)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30346093