

15 リアルタイム PCR によるミクロシスチン生成藍藻類の分析

京都大学 日高 平 河 周賢 楠田育成 津野 洋

Analysis of microcystin-producing cyanobacterial bloom using real-time PCR

Kyoto Univ. Taira HIDAKA, Joo Hyun HA, Yasunari KUSUDA, Hiroshi TSUNO

1. はじめに

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、有毒物であるミ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、ミ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¹⁾²⁾。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る⁴⁾。そこで本研究では、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を目的とした。

2. 研究方法

2.1 培養実験および現地調査

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℃ もしくは 30℃ 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 週間に一度採水を行い、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。

2.2 分析方法

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。

表 1 培養条件

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

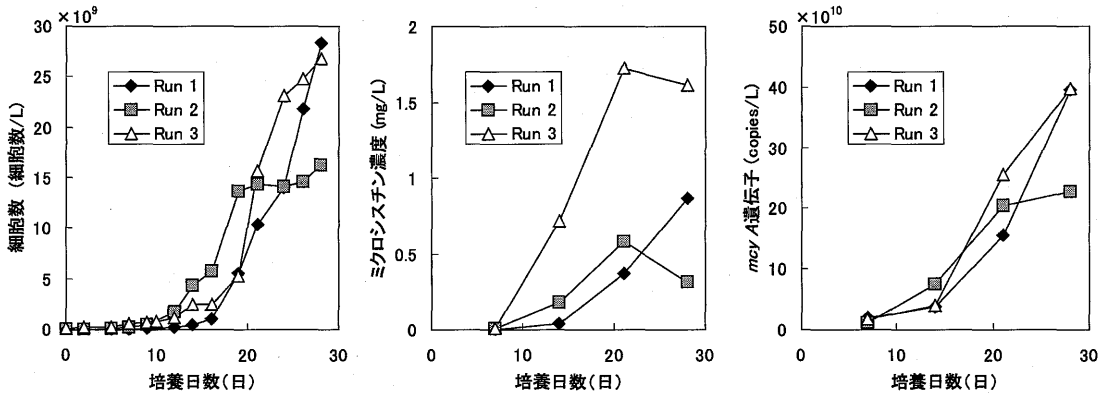


図1 培養実験における経日変化

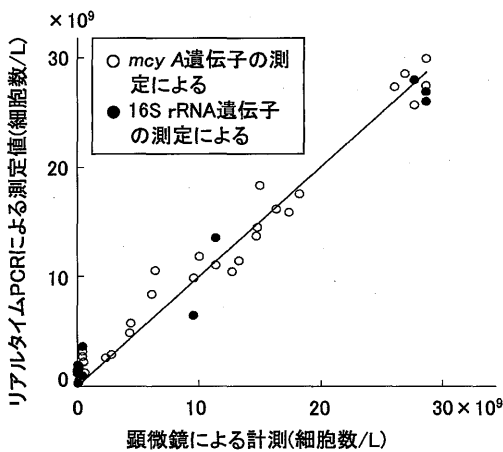


図2 リアルタイム PCR の測定結果から算出した細胞数

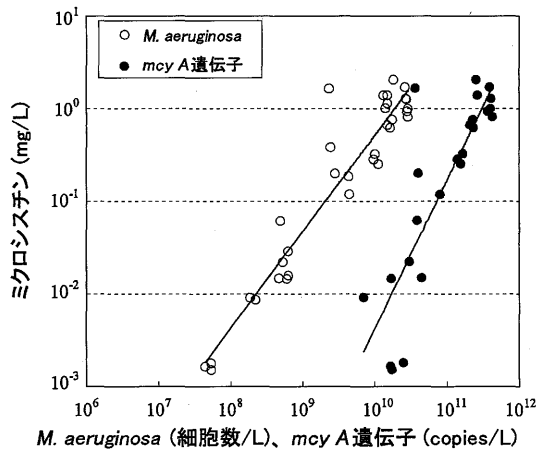


図3 *Microcystis* 濃度および *mcys A* 遺伝子とミクロシスチン濃度の関係

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 *mcys A* 遺伝子をターゲットとした MSF (5'-ATCCAGCAGTTGAGCAAGC-3')/MSR (5'-TGCAGATAACTCCGAGTTG-3')⁹⁾、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'-TTACAATCCAAAGACCTTCCTCCC-3')¹⁰⁾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。

3. 結果および考察

3.1 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 *mcys A* 遺伝子の経時変化を図1に示す。16S

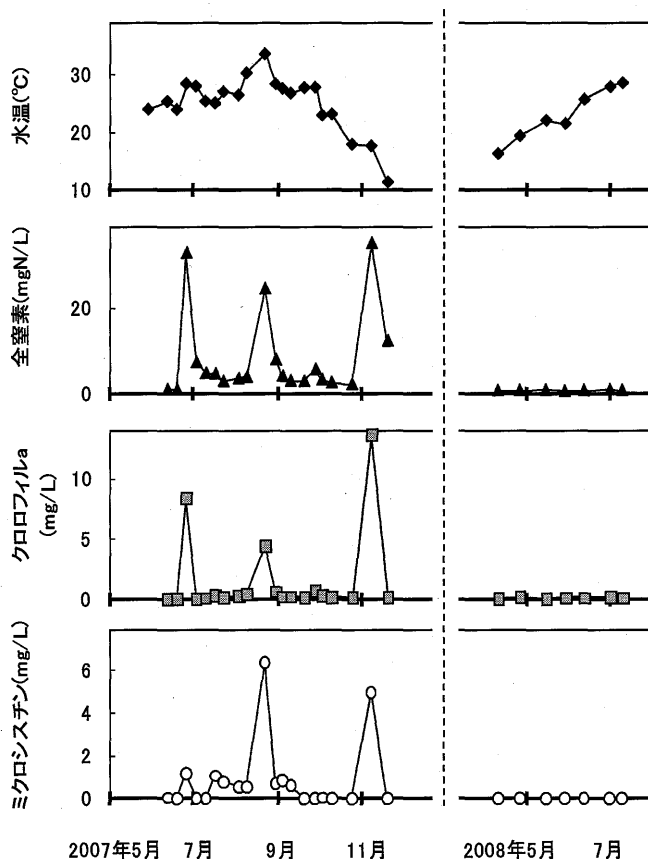


図4 現地調査での測定結果

rRNA遺伝子も同様の変化を示した。MA培地を半分に希釈した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。

3.2 現地調査

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℃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*mcyA*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。

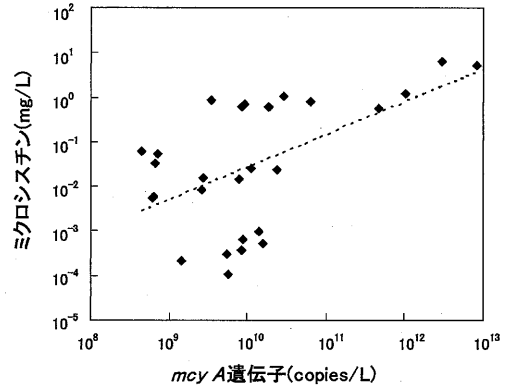


図5 現地調査での *mcyA* 遺伝子濃度とミクロシスチン濃度の関係

これらの結果より、リアルタイムPCR法による測定で、ミ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る。

4. 結論

- 1) 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 *mcyA* 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。また、細胞数もしくは *mcyA* 遺伝子の増加に従い、おおむねミクロシスチン濃度が増加していた。
- 2) 現地調査では、*mcyA* 遺伝子濃度とミクロシスチン濃度の関係について、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。
- 3) これらの結果より、リアルタイムPCR法により、ミクロシスチン生成藍藻類を定量可能であることが示された。今後、湖沼やダム湖での水質管理に有用な技術になることが期待できる。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費補助金若手研究(B) 19760370の助成を得て行いました。

参考文献

- 1) 渡辺真利代, 原田健一, 藤木博太編著 (1994): アオコ その出現と毒素, 東京大学出版会。
- 2) 原田健一 (1999): 有毒ラン藻類をめぐる最近の研究動向, 衛生化学, 46(3), pp.150-165.
- 3) 沖野外輝夫 (2004): アオコ問題の変遷 現状とこれから, 海洋と生物, 26(1), pp.26-34.
- 4) Furukawa, K., Noda, N., Tsuneda, S., Saito, T., Itayama, T., Inamori, Y. (2006): Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. *J. Biosci. Bioeng.*, 102(2), pp.90-96.
- 5) Tillett, D., Parker, D.L., Neilan, B.A. (2001): Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (Phycocyanin Intergenic Spacer) Phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(6), pp.2810-2818.
- 6) Neilan, B., Jacobs, D., Deldot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., Goodman, A.E. (1997): rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and non-toxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(3), pp.693-697.

キーワード: ミクロシスチン、アオコ、リアルタイムPCR

Key Words: microcystin, cyanobacterial bloom, real-time PCR