

琵琶湖など閉鎖性水域における難分解性有機物の起源解明 —リアルタイム PCR を用いる藻類の影響評価—

山田 悦*

1. はじめに

琵琶湖北湖では1984年を境として生物化学的酸素要求量（BOD）は横ばいあるいは減少傾向なのに対し、化学的酸素要求量（COD）は増加傾向にあり、CODとBODの乖離現象が生じている（図1）。流入河川のCOD値には大きな変動は見られないことから、これは微生物による分解が困難な難分解性の溶存有機物（Dissolved Organic Matter: DOM）の増加が原因と考えられる。このようなBODとCODの乖離現象は、琵琶湖北湖以外にも霞ヶ浦、十和田湖及び野尻湖などの湖沼や富山湾などの他の閉鎖性水域でも報告されている。難分解性DOMは、浄水場の塩素処理過程で生成する発がん性のトリハロメタン（THM）の前駆物質であるとされており、また難分解性DOMの蓄積による水生生態系等への影響が懸念されることから、難分解性DOMの蓄積の原因解明は重要である。

琵琶湖におけるDOMの特性や起源解明につい

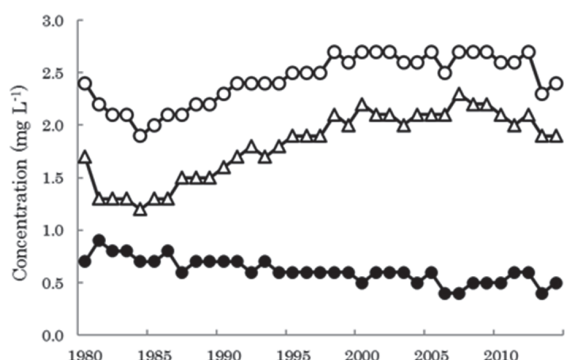


図1 琵琶湖におけるCODおよびBODの経年変化
○ COD, ● BOD, △ COD - BOD

ては、カラム分画法、炭素安定同位体比分析及び分光分析などを用いて1995年以降多くの研究がなされている。当初は外来性の土壌フミン物質が主な原因ではないかと考えられていたが、外来性の土壌フミン物質に加えて内部生産の藻類由来有機物など親水性有機物の寄与があること、さらに底質からのフミン物質の溶出があることが明らかになってきた。これらについては、陸水学会近畿支部会の陸水研究に総説¹⁾としてまとめた。ここでは、琵琶湖における藻類由来有機物の特性と動態、及び定量リアルタイムPCRを用いる藻類の影響評価を中心に述べる。

2. 藻類由来有機物の特性と動態

琵琶湖における親水性有機物は植物プランクトンによる内部生産と推測されたが、そのDOMへの寄与に関する研究はほとんどなかった。そこで、琵琶湖に生息する3種の植物プランクトン、1985年以前と以後の優占種となった緑藻類の*Staurastrum dorsidentiferum*と褐色鞭毛藻類の*Cryptomonas ovata*及びアオコの原因である藍藻類の*Microcystis aeruginosa*を培養し、増殖時と生分解時における藻類由来DOMの可視及び蛍光特性を評価した。琵琶湖の難分解性有機物へのこれら藻類由来DOMの影響とその特性を、蛍光検出-ゲルクロマトグラフ法及び三次元蛍光光度法(3-DEEM)などを用いて検討した。

琵琶湖水DOMのゲルクロマトグラム(Ex/Em=340/435 nm)には3つのピーク、Peak 1 (RT=30 min)、Peak 2 (RT=32 min)及びPeak

*京都工芸繊維大学名誉教授

3 (RT=35 min) が検出され、これらのピークの分子量はそれぞれ 5-10 kDa, 3-5 kDa, 3 kDa 未満と見積もられた。土壤フルボ酸 (FA) は、特に Peak 1 の蛍光強度が高く、琵琶湖水中のフルボ酸様蛍光物質に含まれる 5-10 kDa の物質は土壤 FA が寄与していると推測される。一方、植物プランクトン培養時における藻類由来 DOM のフルボ酸様蛍光物質のゲルクロマトグラムでは、3 種類の藻類とも Peak 3 の蛍光強度が最大となることから、藻類由来 DOM は分子量 3 kDa 以下の物質の割合が大きく、土壤 FA よりも低分子量である。琵琶湖水中 DOM のフルボ酸様蛍光物質には、Peak 1 と Peak 3 が共に検出されることから、その起源には、土壤 FA と藻類由来 DOM の両方が寄与していると推測される。

藻類由来 DOM を 3-DEEM で測定すると、3 種類の藻類共に 2 つのフルボ酸様蛍光ピークと 1 つのタンパク質様蛍光ピークが検出され、フルボ酸様蛍光物質は土壤 FA と蛍光特性は同じだが主に親水性であり、タンパク質様蛍光物質は主に疎水性である。琵琶湖北湖で成層期に表層付近で DOC 濃度が高くなるのは、主に親水性有機物の増加によるためであり、藻類由来 DOM の大半が親水性 DOM であることから、成層期の DOC 濃度の増加は植物プランクトンの増殖に伴う藻類由来有機物の増加が関与していると考えられる。また、藻類由来有機物の THM 生成能は *M. aeruginosa* > *C. ovata* > *S. dorsidentiferum* の順で、藻類の種類によってかなり異なり、土壤起源のフミン物質の THM 生成能より低い値を示した。培養時の *M. aeruginosa*, *S. dorsidentiferum* 及び *C. ovata* 由来 DOM を分画すると、親水性有機物の存在割合はそれぞれ 61.6, 81.4 及び 85.6% であり、親水性 DOM の割合が大きい。疎水性の土壤 FA に対し、藻類由来フルボ酸様蛍光物質は親水性で分子量も低く異なる特性だが、藻類の種類に関係なく大部分が土壤 FA と同様に難分解性である。一方、タンパク質様蛍光物質は、*M. aeruginosa* と *S. dorsidentiferum* 由来は比較的難分解性で

あるが、*C. ovata* 由来のものは分解しやすく、藻類の種類により生分解性や分子量が異なることが分かった。琵琶湖北湖では、寒天質状の細胞外多糖類 (粘質鞘) を有する藻類種が増加し、粘質鞘の一部が難分解性有機物に変化しているとの報告がある。これらの結果より、琵琶湖の難分解性有機物の増加には内部生産の藻類由来の難分解性 DOM の寄与が大きいと推測できる。

3. 定量リアルタイム PCR を用いる藻類の影響評価

藻類が難分解性 DOM に与える影響を明らかにするためには、藻類の生態をモニタリングし、その量を把握する必要がある。しかし、現在藻類のモニタリングは顕微鏡による形態学的分類に基づいた直接計数法が主で、非常に時間と労力が掛かる上、形態学的に類似した種の区別が困難など様々な問題がある。そこで、種特異的なプライマーを用いた定量リアルタイム PCR (polymerase chain reaction) による藻類の分子認識に基づく同定・定量法について検討した。

赤潮やアオコのモニタリングのため、有害な藻類から DNA 抽出後にリアルタイム PCR 分析を行い、その原因藻類の同定・定量に適用されている²⁻⁵⁾。石川らは、リアルタイム PCR を用いて琵琶湖水中の植物プランクトンの分子分類による識別について検討し、*Uroglena americana* などの同定・定量について報告している^{6,7)}。

PCR とは DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA の伸長反応を 1 サイクルとし、このサイクルを繰り返し行うことで、DNA の特定領域を増幅させる技術であり、種特異的なプライ

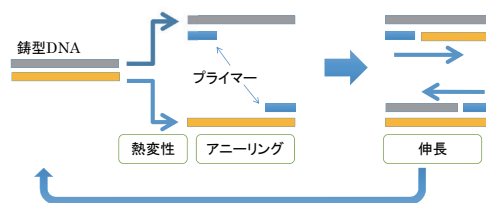


図 2 PCR の原理

マーを用いることで目的の DNA のみを増幅させる (図 2)。リアルタイム PCR 分析は PCR による増幅産物量をリアルタイムに解析する方法で、従来の電気泳動に基づいた PCR 法よりも定量的、高感度かつ正確である。リアルタイム PCR 分析による増幅曲線を図 3 (A) に示す。この増幅曲線に対し、PCR 増幅量の閾値を設定した場合、その閾値とそれぞれの増幅曲線が交わる点、Threshold Cycle (Ct 値) が決定できる、鋳型 DNA 量と決定した Ct 値をプロットすると検量線が得られ、未知試料の鋳型 DNA 量を求めることができる (図 3 (B))。鋳型 DNA 量の代わりに細胞密度を用いることができる。リアルタイム PCR における DNA の検出法には、インターカレーション法やハイブリダイゼーション法などがある。インターカレーション法とは、蛍光物質が二本鎖 DNA に入り込み励起光の照射によって蛍光を発する特性を利用した手法である (図 4)。

本研究では、藻類は上述した 3 種に琵琶湖でもよく観測される珪藻類の *Fragilaria capucina* を加え、4 種の藻類に特異的なプライマーを設計し、DNeasy Plant Mini Kit を用いる DNA 抽出法 (DNeasy 法) とリアルタイム PCR 分析による藻類モニタリング法を開発し、培養試料や琵琶湖北

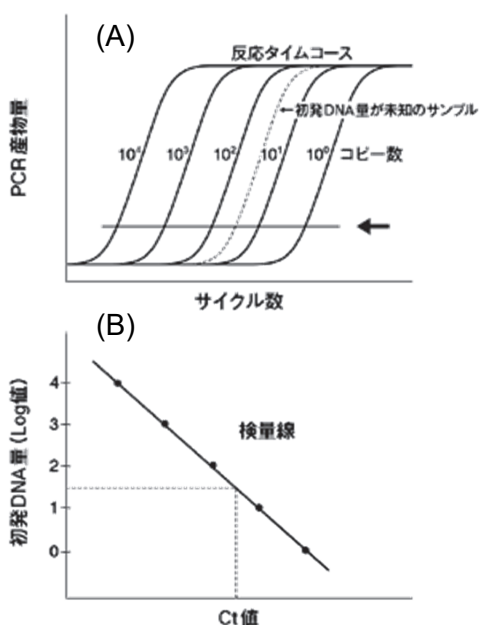


図 3 PCR 増幅曲線 (A) と検量線 (B)

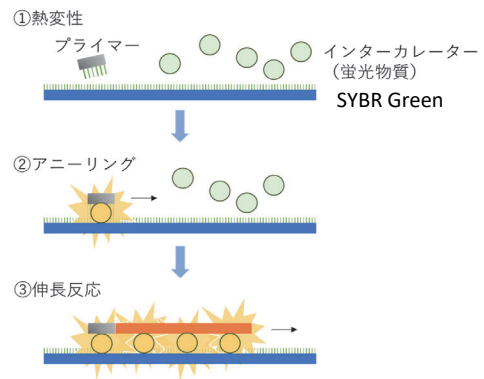


図 4 インターカレーション法の原理

湖の植物プランクトンネット試料に適用した⁸⁾。

藻類の培養液を純水で希釈した細胞密度系列の検量線用試料、培養試料、植物プランクトンネット試料について、DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA 抽出した。2 mL バイアルの約 1/3 量になるようにビーズを入れ、藻類試料を 1.5 mL 加えて蓋をし、2500 rpm で 30 秒間遠心分離して細胞のビーズ破壊を行った。破碎後の試料を -80°C で凍結し、凍結後の試料を凍結乾燥し、DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA 抽出した。抽出後の試料は、リアルタイム PCR 測定まで -80°C で保管した。

リアルタイム PCR に使用した藻類のプライマーを表 1 に示す。 *S. dorsidentiferum* 用のプライマーは石川らが報告しているものを用い、これ以外の藻類用のプライマーはプライマー設計ソフト Primer3Plus を用いて設計し、その種特異性は BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて確認した。

PCR チューブに SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL 、フォワード及びリバースプライマー (それぞれ 5 μM) 各 1 μL 、DNA 抽出液 2 μL 、滅菌水 8.5 μL により PCR 反応液を調製し、初期熱変性 95°C で 180 秒の加熱を 1 サイクル行い、熱変性 95°C で 2 秒、アニーリング 58°C で 5 秒、伸長反応 72°C で 5 秒の加熱を 45 サイクル行った後、最終伸長反応 78°C で 60 秒の加熱を行った。閾値 (Ct 値) は、CFX managerTM を用いるフィットポイント法 (500RFU) により決定した。それぞ

表1 使用した各藻類のプライマー

Class	Species	Primer name	Sequences (5'-3')	Position (5'-3')	Product length (bp)	GenBank Number
Cyanobacteria	<i>M. aeruginosa</i>	Micro 2F	ATGAGCAGCCACACTGGGAC	252-271	275	FJ461750
		Micro 2R	AGACTTGGCTGACCACCTGC	507-526		
Chlorophyceae	<i>S. dorsidentiferum</i>	STAU 1F	GGTCTGCCTACCGGTTGATAC	610-630	195	LC037445
		STAU 1R	GGTCCCGAAGACCAACACAA	785-804		
Cryptophyceae	<i>C. ovata</i>	Crypto 1F	AAGCAGGCTGTTGCTTGAAT	638-657	172	AB240952
		Crypto 1R	TGCTTTCGCACAAGTTTCATC	790-809		
Bacillariophyceae	<i>F. capucina</i>	Frag 2F	GGGCCTTTACAGGTCTGGCA	426-445	167	LC037435
		Frag 2R	ACGGCCCATCCACAAATCCA	573-592		

れの測定は3回行い、融解曲線分析は、60~95℃で行った。PCR生成物はアガロースゲル電気泳動により確認した。

藻類の細胞密度とCt値との間には、*M. aeruginosa*, *S. dorsidentiferum*, *C. ovata* 及び *F. capucina* について、それぞれ細胞密度、 $2.7 \times 10^2 - 2.7 \times 10^7$, $8.2 \times 10 - 8.2 \times 10^4$, $2.1 \times 10 - 2.1 \times 10^4$ 及び $4.6 \times 10^3 - 4.6 \times 10^5$ cells mL⁻¹ の範囲で直線性が得られ、この細胞密度範囲での定量性が示された。PCR効率値は、*M. aeruginosa*, *S. dorsidentiferum*, *C. ovata* 及び *F. capucina* に対し、それぞれ117, 87, 66及び84%であった。さらに、リアルタイムPCR法では、他の藻類や湖水に含まれる浮遊物質(SS)などの影響は小さかった(図5)。リアルタイムPCR法を培養期間の藻類種の細胞密度定量に適用し、顕微鏡によ

る直接計数法と比較した(図6)。*F. capucina* の細胞密度は両法で良い一致を得たのに対し、他の3種の藻類の細胞密度はリアルタイムPCR分析の方がやや高かったが、いずれも細胞密度の増減は同様の変化を示した。リアルタイムPCR法を植物プランクトンネット試料中の藻類種の細胞密度定量にも適用し、良い結果が得られた。

しかし、DNeasy法によるDNA抽出では、琵琶湖北湖のように水中の藻類の細胞密度が低い試料には適用できず、細胞のDNAだけでなく、細胞外のDNAを検出する可能性があった。そこで、より高感度で簡便なDNA抽出法として、メンブレンフィルター上に捕集した藻類細胞からDNA抽出(フィルター法)後、リアルタイムPCR分析する方法を開発し、琵琶湖北湖でこれら藻類の鉛直分布や月変化など動態解析に適用し良い結果を得た⁹⁾。

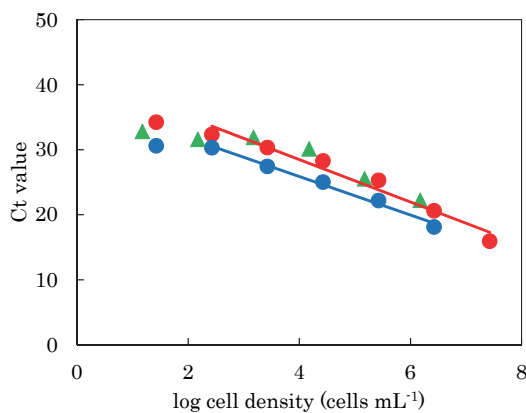


図5 *Microcystis aeruginosa* のCt値と細胞密度の関係
純水希釈系: ●, *M. aeruginosa* 単独; ●, *S. dorsidentiferum* と *C. ovata* が共存する場合,
琵琶湖水希釈系: ▲, *M. aeruginosa* 単独

4. 終わりに

琵琶湖北湖では1985年以降、難分解性のDOMの増加が問題となっており、フミン物質と藻類由来DOMなどが原因であることがわかってきた。

琵琶湖での藻類の増加は、親水性有機物のみでなくフミン物質(疎水性酸)の増加にも寄与する。藻類由来DOMは主に親水性だが、藍藻類や珪藻類由来DOMは30%程度が疎水性である。藻類由来のフルボ酸様蛍光物質は土壌FAと同様の蛍光特性をもつが低分子量(主に3kDa以下)で、

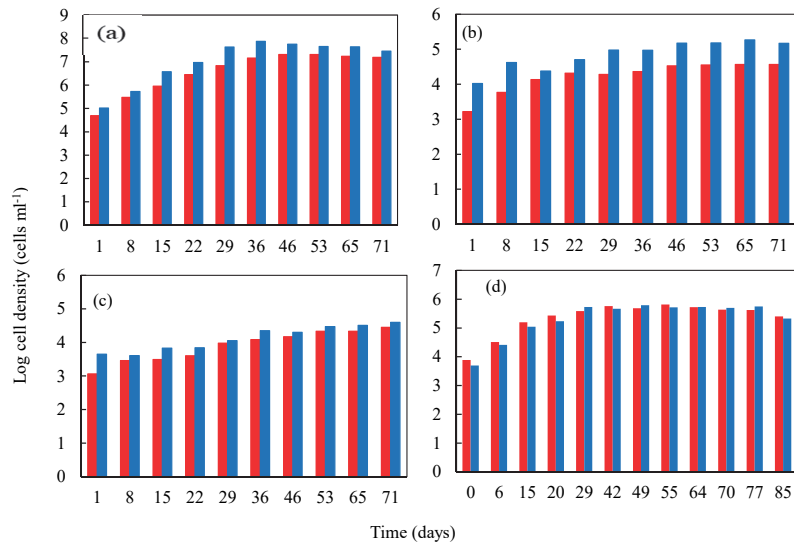


図6 培養期間における4種の藻類の細胞密度の直接計数法（赤棒グラフ）とreal-time PCR法（青棒グラフ）との比較
 (a) *M. aeruginosa*, (b) *S. dorsidentiferum*, (c) *C. ovata*, (d) *F. capucina*

藻類の種類に関係なく大部分が難分解性である。一方、タンパク質様蛍光物質は30 kDa以上の高分子量のものが約90%以上であり、藻類の種類により分子量や分解性が異なる。琵琶湖表層部では、太陽光によるフミン物質の蛍光強度の減少と低分子化が生じている。難分解性であるフミン物質（フルボ酸）の底質からの溶出も明らかになってきたので、その底質での機構解明が求められる。藻類由来及び琵琶湖水のタンパク質様蛍光物質についても二次元電気泳動やMALDI-TOF-MSにより同定してきたが、未だ不明な点も多い。環境水中DOMへの藻類の寄与を解明するには、藻類のモニタリングが重要であり、ここで述べた種特異的なプライマーを用いる定量リアルタイムPCRによる藻類の同定・計数法は有効な藻類モニタリング法と言え、今後の発展が期待される。

参考文献

- 1) 山田 悦, 水口裕尊, 布施泰朗, 陸水研究, 6, 21-30 (2019).
- 2) R. Kamikawa, J. Asai, T. Miyahara, K. Murata, K. Oyama, S. Yoshimatsu, T. Yoshida, Y. Sako, *Microbes and Environments*, 21, 3, 163-173 (2006).

- 3) R. Kamikawa, Y. Sako, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 73, 299-301 (2007).
- 4) N. Tomioka, T. Nagai, T. Kawasaki, A. Imai, A. K. Matsushige, K. Kohata, *Microbes and Environments*, 23, 306-312 (2008).
- 5) T. Yoshida, R. Nakai, H. Seto, M. K. Wang, M. Iwataki, S. Hiroishi, *Microbes and Environments*, 18, 216-222 (2003).
- 6) K. Ishikawa, S. Hosoi-Tanabe, Y. Sako: *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 29, 1103-1106 (2005).
- 7) 石川可奈子: 湖沼のプランクトン分子分類に基づく識別とモニタリングへの適用, 科学研究費補助金研究成果報告書 (2011).
- 8) H. Mizuguchi, Soh Fujii, Shiori Fujii, R. Higa, K. Ishikawa, K. Hayakawa, T. Okamoto, Y. Fuse, H. Karatani, E. Yamada, *Limnological Study*, 5, 3-12 (2018).
- 9) 藤井 颯 リアルタイムPCRを用いる琵琶湖北湖における藻類の動態解析, 2017年度京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科機能物質化学専攻修士論文 (2018).