

# 天然有用ファージを利用した有毒アオコの防除技術の開発

福井県立大学生物資源学部助手  
吉田 天士

代表的なアオコ原因藍藻ミクロキスチス・エルギノーサは、肝臓毒マイクロシスチンを産生し、世界各地の飲用水源における本種アオコの発生は深刻な社会問題となっている。シアノファージはアオコの消滅因子として古くから注目されてきたが、本種感染性シアノファージの分離事例は皆無であった。こうした背景の下、演者らは世界に先駆け本種感染性ファージ Ma-LMM01 の分離に成功し、さらにそのゲノム全塩基配列データ解析を完了した。本演題では、ファージの有毒アオコ防除対策への応用の可能性について論ずる。

## 1. はじめに

世界各地の湖沼では富栄養化に伴ってラン藻が大量に増殖し、水を着色させる現象、いわゆるアオコが頻発している。こうしたアオコの原因となるラン藻には神経毒や肝臓毒あるいはカビ臭を生産するものがあり、水源管理の上で深刻な問題となっている。また最近では、魚類へ毒素が蓄積する例やカビ臭が魚体へ移ることで消費価値がなくなるなどの問題が報告されるようになり、アオコは水源管理のみならず魚場管理の面でも深刻になりつつある。

なかでも代表的なアオコ形成種として知られるミクロキスティス・エルギノーサ（以下、ミクロキスチスとする）（図1）は、肝臓毒マイクロシスチン（発癌プロモータ活性を有する環状ペプチド毒素、図2）を生産し、しばしば水源の強毒化の原因となり、家畜・野生生物のへい死を招いてきた。さらに、1996年にブラジル カルアル市の人工透析センターで、血液透析用の水へのミクロキ

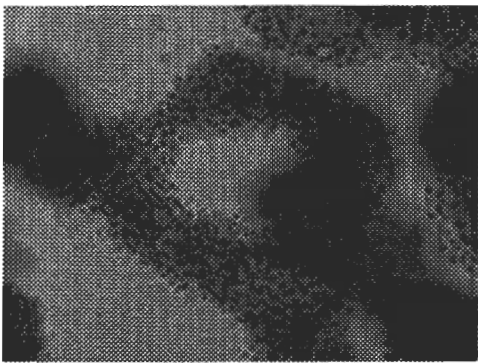


図1. ミクロキスチスの顕微鏡写真

Bar = 50  $\mu$ m

スチン混入により 50 名の死亡事例が報告された。こうした事例を背景に、世界保健機構（WHO）では、飲料水中のアオコ毒の暫定的なガイドライン値を 1  $\mu$ g/L 以下と定めた。またカナダでは、ミクロシスチンそのものの由来は未解明であるものの、海面養殖のサケのへい死にミクロシスチンが関与しているとの報告がなされ、水産学的視点からの本種の研究の重要性が指摘された。これまで

のところ、わが国ではミクロシスチンによる人体への健康被害は報告されていないものの、近年、本種の強毒株の出現やアオコ発生池での野鳥の死亡事例が報じられるなど、予断を許さない状況にある。したがって、消費者の水資源・水産資源への信頼を確保するためには、有毒アオコへの具体的な対策の構築が危急の課題であるといえる。

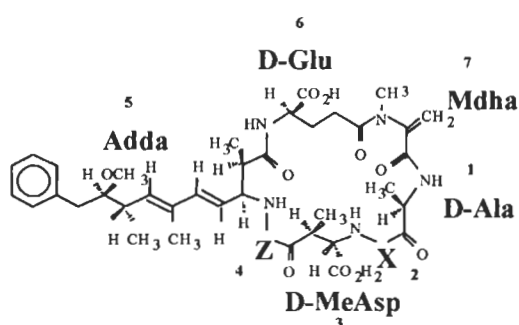


図2. ミクロシスチンの構造

7員環のペプチド化合物。X, YはL-アミノ酸であり、このアミノ酸の組合せの違いなどにより約50種類が同定されている。

Adda, 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid;

Mdha, N-dehydro-alanine;

MeAsp, methylasparagine

## 1. シアノファージ研究の歴史

アオコは元来、自然に消滅するものであり、その過程には、日照・温度などの物理的要因、窒素・リンを初めとする各種栄養塩などの化学的要因、ならびに捕食生物などの生物学的要因が大きく影響すると考えられる。藍藻（シアノバクテリア）に感染するファージ（バクテリアに感染するウイルス）をシアノファージ呼び、生物学的アオコ消滅因子として古くから注目されてきた。その最初の発見は1963年にさかのぼる。その後、新奇シアノファージの発見事例が相次ぎ、生物学的アオコ制御への応用の可能性が指摘されたが、ファージ抵抗性細胞の出現の問題、他種の藍藻を含む藻類の優占により十分な水質改善効果が認められないといった問題などが明らかになるにつれ、これらのブレークスルーを放置したまま、淡水藍藻を宿主とするシアノファージならびにその生態に関する研究は大きく減速した。一方1989年、ベルゲン大学のBerghらが水圏に大量にウイルス様粒子が存在することを報告した(図3)。さらに、海洋においてウイルスが植物プランクトンの動態を制御する重要な因子であることが明らかとなってきた。こうした海洋での重要な発見を受け、近年、ミクロシスチスの現場動態にもファージが影響を与えている可能性が複数の研究グループにより報告された。ミクロシスチスに対するシアノファージの生態学的重要性が指摘されたが、本種に感染するシアノファージの分離事例の報告は皆無であった。

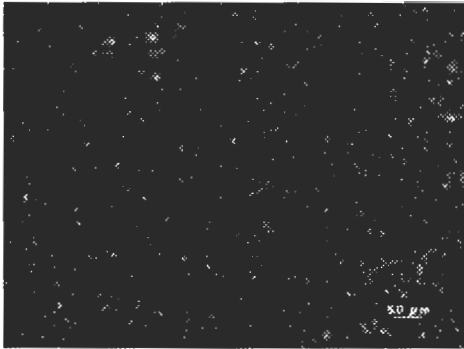


図3. 福井県三方湖採水試料におけるウイルス用粒子の蛍光顕微鏡写真

採水試料を孔径  $0.2\mu\text{m}$  フィルターで細菌サイズ以上の画分を除去した後、SYBRGreen で染色して、青色励起光下で観察した。白く見える粒子は核酸を有することを示す。

## 2. ミクロキスチス・エルギノーサ感染性シアノファージ MaLMM01 の分離・性状ならびにゲノム解析

こうした背景の下、演者らは *M. aeruginosa* に感染するシアノファージの単離ならびに生物学的基本性状の解明を試みた。

福井県三方湖と京都府広沢池において 2003 年夏季に採取した表層水より、ミクロキスチス NIES298 株（有毒株）を溶藻するファージ 4 株を分離・クローン化することに成功した。このうちの 1 株を Ma-LMM01 として、陰性染色による電顕観察を行った結果、多角形の頭部と収縮性の尾部を持つミオウイルス科のファージであることが確認された（図4）。これまでの実験の結果、Ma-LMM01 はミクロキスチス NIES298 株のみに対して感染性であり、高い宿主特異性が示唆されている。演者らは、Ma-LMM01 の形態学的特性、殺藻能、ならびに高い宿主特異性に基づき、本殺藻因子がミクロキスチスを宿主とするシアノミオウイルスグループに属するシアノファージであると結論した。一段増殖実験の結果、Ma-LMM01 の潜伏期間は 6~12 時間、バーストサイズは 50~170 と推定された。

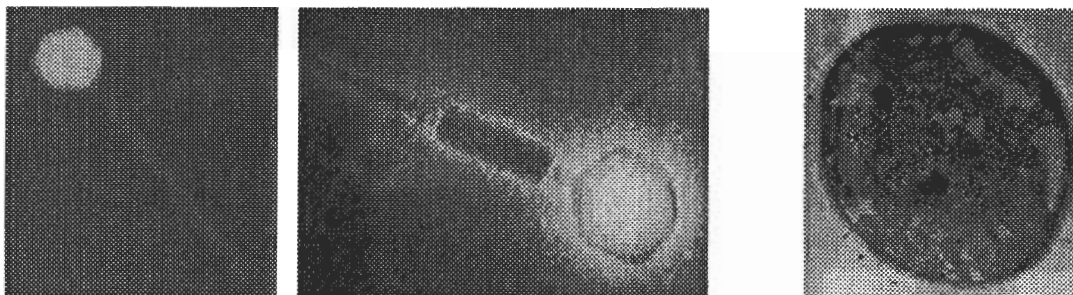


図4. 申請者らが世界で初めて単離に成功した有毒ミクロキスティスに感染するファージ株（左、中）。DNA を収納する頭部（直径 86nm）と収縮性の鞘構造を持つ尾部（約 220nm）から構成される。写真（中）は尾部が収縮した状態。感染から約 8 時間後には宿主細胞内で約 100 倍に複製する。黒い粒子が複製したファージ頭部（右）。

また、 $-80^{\circ}\text{C}$ および $-196^{\circ}\text{C}$ の超低温条件下では力価の減少を伴うことなく Ma-LMM01 を安定に保存可能であることが示された。

本実験結果は、世界初のマイクロキスチス感染性ファージの分離成功事例である。そこでさらに、ショットガンクローニング法により Ma-LMM01 の全ゲノムを解読し、環状マップを作製した。Ma-LMM01 ゲノムマップは 162,109 bp の環状 2 本鎖 DNA としてアセンブルされた。ピリオンに含まれるゲノムは直鎖状 2 本鎖 DNA であり、鎖長約 160 kbp と推定された。Ma-LMM01 ゲノム上には、約 180 個の ORF と 2 個の tRNA 遺伝子がコードされているものと予測された。BLASTX を用いて相同性解析を行った結果、その 76% はデータベース上の配列に対してヒットせず、T4 ファージ（大腸菌感染性ファージ）をはじめ詳細なゲノム解析がなされているミオウイルスの中でも、新規な遺伝子情報を有するファージであるものと推察している。また、機能が予測される遺伝子を解析したところ、光合成微生物を宿主とするファージの新規な増殖機構を提示しており、本ファージは学術的にも極めて価値が高いものと考えられる。

### 3. 有用ファージを利用した有毒アオコの防除法の確立にむけて

有毒アオコに対する対策は、浄水または水源環境への薬剤の投入が主体である。さらに、これらの化学品散布による環境影響を軽減するためのエアレーション装置・遮光装置などの開発研究ならびに現場適用が行われているが、いずれの技術についても効果・コストの点でさらなる検討が求められているのが現状である。

上述したように、シアノファージによるアオコ防除に関する研究は、1960-1970 年代に一部の研究者により試みられ、その後中断している。医療分野においても、かつてファージによる細菌感染症に対する治療技術が研究されたが、実症例への適用は不可能との結論が出されていた。さらに、ちょうど時期を同じくして抗生物質ペニシリンが発見されたことにより、細菌感染症への治療の主役は抗生物質となり、ファージの応用研究は衰退した。ところが近年、細菌感染症に対する抗生物質の過剰な使用により、耐性菌の出現による細菌感染症の難治療化が顕在化するとともに、ファージ療法 (phage therapy = ファージを用いた細菌症治療技術) という用語が学術論文に頻出するようになった。ファージに関する多くの知見が集積した現在、ファージ療法はファージ研究の大きな分野となり、その有効性が改めて見直されている。

演者らが確立したシアノファージ-マイクロキスチスの感染実験系は、有毒ラン藻宿主と感染性ファージ系として世界でも唯一この組合せのみであり、常時その感染実験が可能な状態にある。このことから、環境改善分野におけるシアノファージ利用についてその実用化の可能性を再吟味することは有意義であ

ると考えられる。しかしながら、特定の宿主株にのみ感染性を示すなど、本ファージの有毒アオコ防除への即時応用は課題も多い。そこで、ファージを用いた有毒アオコ防除に関する研究開発の推進に向け、以下のプロセスを想定している。

- (1) 有毒マイクロキスティス-MaLMM01 をモデル系として、宿主-ウイルスのゲノム解析および遺伝子発現プロファイル解析により、有毒藍藻の増殖・衰退、毒性発現様態、およびファージ感染への応答を分子生態学的側面から詳細に解明する
- (2) 上記(1)に基づき、水源におけるアオコの増殖・衰退および毒性発現を迅速・簡便に診断するための測定キットを開発し、水源環境保全のためのアセスメントシステムの構築する
- (3) 上記(2)で開発した技術を用いてアオコ類発湖沼でのファージおよび宿主藍藻の時空間的消長パターンを明確化し、有害・有毒藍藻に対するファージの増殖抑制能を利用したアオコ発生防止・防除技術システムを立ち上げるための基礎的知見を蓄積する
- (4) 現場からの新奇シアノファージ探索体制を整備し、分離したシアノファージの性状解析を進める。また、マイクロキスティス-ファージMa-LMM01系をモデルに開発した技術を拡大適用する。
- (5) 上記(4)に基づき有用シアノファージの生産、製剤化技術を完成させるとともに、生物製剤としてのシアノファージ製剤の事業化に必要な基礎情報を蓄積する。

これらの目標を達成することにより、有毒アオコ原因藍藻の現存量、増殖活性、ファージによる増殖抑制活性等を測定者の技量に影響されことなく精確に測定することが可能となる。これにより、有毒アオコの動態をリアルタイムで的確に把握することが可能となり、水源の環境保全コスト（水質改善費用・浄水費用）の大幅な削減が期待される。さらに、ファージの安全性を精査しつつ、様々なファージが製剤化に至れば、適材となるファージを適所となる水源に適時に施用することで、本来よりも小規模かつ短期間に有毒アオコを終息させること、あるいは予防することが可能となる。

一方、いかにして社会から受容されるかが本技術開発の重要なポイントとなることが予想される。ファージによるアオコの衰退は、おそらく実際の自然界で起きている現象である。したがってファージは天然の抗アオコ因子であり、ファージによるアオコ防除は、自然現象の拡大利用として位置付けられ、有害有毒生物の選択的な除去方法としてはきわめて高い合理性を有すると考えられる。しかしながら、ファージ(=ウイルス)を利用した技術であるという点で、消費者が抱くイメージの改善を積極的に図る必要がある。開発しようとする技

術の安全性保証に関して十分検討しつつ、一般への宣伝・啓蒙活動により、こうした自然現象の拡大利用に関する理解を得るための努力が必要である。

世界水会議 2000 では、2025 年には人口の 40% が深刻な水不足に直面することが、また国連環境計画 (UNEP) ではアジアでの深刻な水不足の発生がそれぞれ予測されており、21 世紀には「安全な水」が最も貴重な資源になる可能性が示されている。すなわち、今世紀前半には、安全な水源の確保が人類の存続に関わる緊急重要課題となる可能性がきわめて高く、シアノファージによるアオコ防除に関する研究は著しく重要度の高いミッションといえるのではないだろうか。

#### 参考文献

1. Yoshida T, Takashima Y, Tomaru Y, Shirai Y, Takao Y, Hiroishi S, Nagasaki K. Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 79: 1239-1247.
2. 長崎慶三, 高島ゆかり, 外丸裕司, 白井葉子, 高尾祥丈, 広石伸互, 吉田天士. 有毒アオコ原因藍藻ミクロキスティス属に感染するウイルスの発見. *プレインテクノニュース* 2006; 114: 33-36.
3. 吉田天士, 高島ゆかり, 広石伸互. アオコを溶かす微生物. 有毒アオコの分子生態学-ミクロシスチンを中心に-. *月刊海洋* 2005; 37: 368-374.
4. 吉田天士, 吉田光宏, 広石伸互. ミクロシスチン生合成遺伝子による有毒ミクロキスティスの検出. 有毒アオコの分子生態学-ミクロシスチンを中心に-. *月刊海洋* 2005; 37: 319-324.
5. 佐野友春. 世界における有毒アオコの動向と日本への侵入の危険性. 有毒アオコの分子生態学-ミクロシスチンを中心に-. *月刊海洋* 2005; 37: 344-350.
6. 浪越通夫. 古くて新しいアオコ毒素マイクロシスチン類. *化学と生物* 2001; 39: 313-321.
7. 白井誠, 西澤明人. ミクロシスチン生合成遺伝子の解析. 有毒アオコの分子生態学-ミクロシスチンを中心に-. *月刊海洋* 2005; 37: 312-318.
8. Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Heldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 1989; 340: 467-468.