

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02840

研究課題名(和文) 藍藻産生毒素分解菌の分子育種株を用いた新規水環境修復技術の開発

研究課題名(英文) Development of aquatic environment restoration technology using molecular breeding strain of cyanotoxin-degrading bacteria

研究代表者

清水 和哉 (SHIMIZU, Kazuya)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：10581613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、microcystin分解菌の全ゲノム解析を完了させ、様々な分子育種株を作製し、microcystin分解経路を同定とmicrocystin分解酵素群の細胞内局在の同定およびMlrA酵素がほとんどのmicrocystinアナログを分解できると推察される知見、等の重要な知見を得た。また、地域に依らず、発生現場で活用可能なこの有用細菌と有用原生動物・微小動物を用いた水環境修復技術を構築した。以上から本研究は、分子育種株を活用した水処理技術の向上の可能性を示すとともに、実際の現場で利用可能な水環境修復技術を構築するための解析ツールおよび実際現場で活用できる水処理技術を創出した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we completed the whole genome sequence of microcystin-degrading bacteria, and then made and used various molecular breeding strains to identify microcystin degradation pathway and intracellular localization of microcystin-degrading enzymes. We got the results that MlrA degrade most microcystin analogues. In addition, we have constructed an aquatic environment restoration technology by useful bacteria, protozoa, and micro-animal that can be utilized at the site which is occurred cyanobacterial bloom.

This research has shown the possibility of innovating water treatment technology utilizing molecular breeding strains and also provides the aquatic environment restoration and water treatment technology that can be used on the actual site.

研究分野：水環境修復

キーワード：汚濁質除去 生物膜法 淡水資源 藍藻類産生有毒物質 浄水処理技術

1. 研究開始当初の背景

淡水域は飲料水源・水産資源の場として極めて重要であるが、急速な経済発展に伴う水質汚濁による有毒藍藻の異常増殖（有毒アオコ）は両資源に重大な問題を引き起こし、世界中で大きな社会問題となっている。今後も拡大が続くと考えられており、対策は急務となっている。有毒藍藻は難生分解性有毒物質 microcystin を産生し、毒性が極めて高い（青酸カリの 100 倍かつ発がんプロモーターとして作用）ため、諸外国において死亡例を含む健康被害が報告されている。アメリカのエリー湖では、毎年、深刻なアオコの発生が報告されており、この先進国の水道水でさえ microcystin が混入したことが、驚きをもって報告された（National Geographic, 2014）。しかし、microcystin は難分解性のため、その安全・安心な除去には、高価な高度浄水処理法が必要である。だが、有毒アオコが問題となっている地域のほとんどが、発展途上国であることから、問題解決には安価かつ高効率処理技術の確立が急務である。報告者らは、実際に稼働中の浄水場の生物学的浄水処理槽内の生物膜によって microcystin が分解除去できることを見出していた。このことから、報告者はその分解に水環境微生物、特に細菌が強く関わっていると予想し、microcystin 分解菌を取得した。この分解菌が、microcystin 分解酵素遺伝子を有している事も確認していた。多くの有毒アオコは常在しているのではなく、突発的に発生する。このため、生物膜中の細菌群は、流入した microcystin を直ちに効率良く分解除去することに対応できないので、対応可能な安価かつ高分解効率の生物学的浄水処理法の確立が渴望されている。

Microcystin 分解酵素の発現は遺伝子

レベルでしっかりと制御されており、有毒藍藻汚濁水域で分解菌が microcystin とその分解産物に連鎖反動的に応答し、microcystin 分解酵素遺伝子群の発現を上昇させることで、急速な microcystin 分解を引き起こすことを報告者らは、報告している。この現象は、汚染物質を浄化する微生物に広く備わっている機構であり、本研究の分子育種株を用いた新規水環境修復技術は、水処理のみならず土壌処理など広い分野での生物学的処理法における新規機能微生物による浄化手法の構築に繋がるものと期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得た分子生物学的知見を活用し、microcystin の高分解効率を達成する生物学的浄水処理法の実現を目指し、microcystin 分解菌による分解機構を分子レベルで詳細に解析し、microcystin 分解効率を高上昇させた分子育種株を創出し、有毒藍藻捕食微小動物群と併用することで高効率な藍藻細胞および有毒物質を処理可能な新規水環境修復技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

3.1 *Sphingopyxis* sp. C-1 株の分子育種株の創出と microcystin 分解酵素の細胞内局在

C-1 株内の microcystin 分解酵素遺伝子を特異的に破壊し、microcystin 分解経路を同定する。Microcystin は 90 種類以上のアナログが報告されているが、これまで報告されてきた分解菌によって分解可能かは未確認である。海外においては、microcystin LR 以外も水環境中の microcystin として報告されているが、どれも adda-arg をもつ microcystin RR や microcystin YR であった。そこで、adda-arg ではない microcystin LA, LW, LF, LY を用いてアナログにおける分解経路も解明することを

目指した。

Sphingopyxis sp. C-1 の microcystin 分解酵素遺伝子を高発現させ、microcystin を高効率に分解する分子育種株を創出するために、microcystin 分解酵素の局在の理解は極めて重要である。酵素の局在の理解によって、MlrB と MlrC が同機能をもちながら、なぜ microcystin 分解菌に高度に遺伝子が保存されているという微生物生態学的知見が得られる。

3.2 全ゲノム解析

Sphingopyxis sp. C-1 株のゲノム DNA は○○に従って抽出した。

Sphingopyxis sp. C-1 株のホールゲノム配列の解析は、HiSeq1000 (Illumina) による 400 bp ペアエンドライブラリーと HiSeq2500 (Illumina) によるメイトペアライブラリー (8-10 kb) で行った。*Sphingopyxis* sp. C-1 株のリードデータ (2,262,436,506 bp) は、Velvet v1.2.08 (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>) により de novo アセンブルを行った。さらに、得られた Contig 配列 (33 contigs) を Platanus v1.2.1 (<http://platanus.bio.titech.ac.jp/platanus-assembler/>) を用いて gap クローズした。ドラフトアッセンブルした配列は、RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) においてタンパク質コード配列 (CDS) の推定を行った。

3.3 藍藻類捕食者を用いた藍藻類細胞および microcystin 同時除去法の確立

セラミックを担体とした水処理装置に有毒藍藻類捕食者を付着固定させ、有毒藍藻細胞の除去効率と MC 分解除去効率を分析した。この有毒藍藻類捕食者の共存細菌群については、複数種類の培地 (LB 培地、PY 培地、NB 培地、MC 分解菌単離培地) により単離後、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読するとともに、培養を介さずに直接、16S rRNA 遺伝子を解析し、共存細菌群集の情報を得た。

Microcystin の捕食者に対する毒性影響を microcystin LR を用いて確認した。

アオコ発生湖沼から有毒藍藻捕食者を有 *Microcystis aeruginosa* NIES 102 を用いて集積培養後、分離した。分離した捕食者の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読した。

4. 研究成果

4.1 *Sphingopyxis* sp. C-1 株の分子育種株の創出と microcystin 分解酵素の細胞内局在

microcystin 初発分解酵素遺伝子 *mlrA* 欠損株 (CMS01) に加えて、*mlrB* 欠損株、*mlrC* 欠損株を特異的遺伝子破壊により遺伝子欠損変異株を創出した。それら遺伝子欠損株を用いて、microcystin 分解経路を同定し、MlrA 酵素や MlrB 酵素、MlrC 酵素の細胞内局在について推測できる結果を得た。加えて microcystin 初発分解酵素が、microcystin LA 等の adda-L 型アミノ酸を保持する microcystin アナログを分解できることがわかった (図 1)。したがって、microcystin 初発分解酵素 MlrA が、ほとんどの microcystin アナログを分解できると推察された。既往成果とあわせると、microcystin 初発分解酵素遺伝子がバイオマーカーとして用いることができると考えられるため、microcystin 産生藍藻類が主構成となるアオコ発生水域のモニタリング調査を実施した。その結果、microcystin 濃度と *mlrA* 遺伝子コピー数の間に相関関係があることを明らかにした。つまり、microcystin 濃度の上昇に伴い、*mlrA* 遺伝子コピー数も増大し、microcystin 急減現象が生じる時、最大コピー数を示した。以上から、microcystin 初発分解酵素遺伝子 *mlrA* がバイオマーカーとして用いられることを示した。

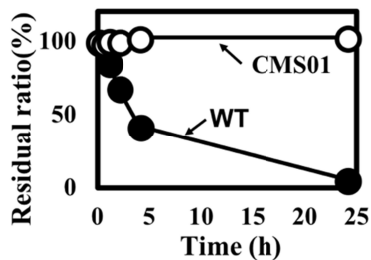


図1 microcystin LA の分解

4.2 全ゲノム解析

Sphingopyxis sp. C-1 株のゲノムは BBRO01000001 and BBRO01000002 の2つの contig 配列から構成され、PCR の結果、BBRO01000001 の3'末端が BBRO01000002 の5'末端に BBRO01000002 の3'末端が BBRO01000001 の5'末端に繋がっていた。ホールゲノムは全長4,583,092 bp でG+C含量は63.70%であった。また、4,318 のタンパク質コード配列と48(1セットのrRNA遺伝子と45のtRNA遺伝子)のRNAをコードする遺伝子が含まれていた。アノテーション解析の結果、2,937のCDSが機能既知の遺伝子と同一性が示され、残りの1,381遺伝子が機能未知の仮想タンパク質と同定された。

Sphingopyxis sp. C-1株のマイクロシスチン分解酵素群 MlrB, MlrD, MlrA, MlrC をコードする遺伝子は BBRO01000002 上の locus_tag SC1_04306 から SC1_04309 (1352105 から 1356054) に確認された。また、新たにジペプチダーゼをコードする1,140 bpの遺伝子(SC1_04305)とD-アミノアシラーゼをコードする1,461 bpの遺伝子(SC1_04304)が同定された。これらのペプチド修飾酵素遺伝子は *mlrB* 遺伝子の下流に隣接して存在するため、6つの遺伝子でマイクロシスチン分解酵素群を形成している。そこで、我々は2つの遺伝子をそれぞれ *mlrE* (SC1_04305) と *mlrF* (SC1_04304) と命名した。なお、*Sphingopyxis* sp. C-1株の Whole Genome Shotgun プロジェクトは、DDBJ/EMBL/GenBank に、アクセッション No. BBRO00000000 として登録した。

4.3 藍藻類捕食者を用いた藍藻類細胞および microcystin 同時除去法の確立

保有している有毒藍藻類捕食原生動物の18S rRNA 遺伝子塩基配列を解読するとともにその共存細菌群集構造を明らかにした。共存細菌には、microcystin 分解菌の報告例が多い *Sphingomonas* 属が含まれていた。同培養サンプルから、共存細菌を単離し、microcystin 分解菌がいることを明らかにした。

有毒藍藻類捕食原生動物とセラミック担体を用いた有毒藍藻類および microcystin 除去を目的とした水処理装置を構築し、セラミック担体が効果的な除去に活用できることを見いだした。さらに、原生動物の回分培養においてセラミック担体を添加することにより、安定な培養に資するという知見も得ることができた。

アオコ発生水域から microcystin 産生藍藻類 *Microcystis aeruginosa* を捕食させることで、微小動物のヒルガタワムシ類を集積培養した。1個体ずつ分離し、*Microcystis aeruginosa* を捕食させ、得られたヒルガタワムシ類の18S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読した。その結果、18S rRNA 遺伝子の同一性が極めて高いことがわかった。

microcystin 産生藍藻類を捕食し、かつ microcystin 濃度も減少させる微小動物・原生動物捕食者から、それぞれ異なる「属」に分類される microcystin 分解菌を単離した。単離された microcystin 分解菌は、microcystin 分解菌の既往報告にない「属」に分類しており、捕食者と共生している分解菌として、初めての単離例である。無菌培養に成功している捕食者に microcystin を曝露すると、microcystin の毒性影響を受けたが、単離した microcystin 分解菌を共生させると、microcystin 曝露による毒性影響を

受けることはなかった。つまり、捕食者は microcystin 分解菌と共生することで、microcystin による毒性影響を軽減し、microcystin 産生藍藻類を捕食していることを突き止めた。

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)

Kazuya Shimizu, Motoo Utsumi, Kunihiro Okano, Tomoaki Itayama, Norio Iwami, Hideaki Maseda, Hiroyuki Kinohira, Jieming Li, Yuhei Inamori, Zhenya Zhang, and Norio Sugiura, Removal of *Microcystis aeruginosa* cells and microcystin-LR using ceramic carrier in a continuous flow bioreactor, *Japanese Journal of Water Treatment Biology* 52; 35-43, 2016. 査読有
Kunihiro Okano, Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Yukio Kawauchi, Motoo Utsumi, Tomoaki Itayama, Zhenya Zhang, Norio Sugiura, Whole-Genome Sequence of the Microcystin-Degrading Bacterium *Sphingopyxis* sp. C-1, *Genome Announcements* 3; e00838-15, 2015. 査読有

[学会発表](計6件)

柳谷将、岩澤俊平、板山朋聡、雷中方、内海真生、張振亜、角野立夫、清水和哉、藍藻毒が藍藻類捕食者に及ぼす影響とその適応機構の解明、第52回日本水環境学会年会、2018.

古田土実和、新井美智子、柳谷将、岡野邦宏、内海真生、張振亜、杉浦則夫、間世田英明、清水和哉、Microcystin 分解酵素遺伝子 *mlrA* の特性—遺伝子マーカーと転写制御機構—、第51回日本水環境学会年会、2017.

古田土実和、新井美智子、黒古成美、岡

野邦宏、内海真生、張振亜、杉浦則夫、間世田英明、清水和哉、Microcystin 初発分解酵素 *MrA* の microcystin 分解特性、日本水処理生物学会第53回大会、2016.
Miwa Kodato, Michiko Arai, Narumi Kurogo, Kunihiro Okano, Zhenya Zhang, Motoo Utsumi, Norio Sugiura, Hideaki Maseda, Kazuya Shimizu, *MrA*, the essential enzyme for microcystins biodegradation, 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), 2016.

Kazuya Shimizu, Kunihiro Okano, Hiroyuki Kinohira, Hideaki Maseda, Norio Iwami, Tomoaki Itayama, Zhenya Zhang, Motoo Utsumi, Norio Sugiura, Removal of cyanobacteria and cyanotoxin using micro-animal and co-existing bacteria in a bioreactor, 16th International Symposium on Microbial Ecology (ISME16), 2016.

黒古成美、岡野邦宏、内海真生、杉浦則夫、間世田英明、清水和哉、Microcystin 分解菌による microcystin 分解特性、第50回日本水環境学会年会、2016.

[その他]

ホームページ等

<https://researchmap.jp/kazuya-urso/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 和哉 (SHIMIZU, Kazuya)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：10581613

(2) 研究分担者

杉浦 則夫 (SUGIURA, Norio)
筑波大学・生命環境系・名誉教授
研究者番号：10302374

内海 真生 (UTSUMI, Motoo)
筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号： 6 0 3 2 3 2 5 0

間世田 英明 (MASEDA, Hideaki)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号： 1 0 3 7 2 3 4 3

岡野 邦宏 (OKANO, Kunihiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号： 3 0 4 5 5 9 2 7

原 啓文 (HARA, Hirofumi)

長岡技術科学大学・アジアグリーンテック開発センター・客員研究員

研究者番号： 8 0 5 1 1 0 7 1

(3)研究協力者

Niwoti Whangchai

岩本 浩二 (IWAMOTO, Iwamoto)

Zuriati Zakaria