

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590124

研究課題名（和文） 異常発生するラン藻類制御のためのライフサイクルに関する研究

研究課題名（英文） Study on life cycle of cyanobacteria for regulation of its outbreak

研究代表者

原田 健一 (HARADA KEN-ICHI)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：90103267

研究成果の概要（和文）：湖沼生態系におけるラン藻類の制御法の確立を最終目的に置き、その一環として湖沼生態系におけるラン藻類の生活環の解明を試みた。本研究では、これらの過程は何らかの有機化合物によって調節されると考察し、*Microcystis* 自身が産生する 2 種の揮発性化合物、 β -cyclocitral および関連化合物と低級アルコール類の生合成、産生挙動、分解（代謝）などの動態を検討し、実際の湖沼で生起する現象と比較・検討した。

研究成果の概要（英文）：In order to establish a regulation method for outbreak of cyanobacteria in aquatic environment as the final purpose, we tried to elucidate the life cycle of a cyanobacterium, *Microcystis*. In this study, the life cycle was considered to be controlled by organic compounds that were produced by the cyanobacterium itself. Two types of compounds, β -cyclocitral and related compounds, and lower alcohols were focused and their biosynthesis, dynamics of the production and degradation (metabolism) were intensively investigated. Finally, the obtained results were compared to various phenomena observed in a lake.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境・衛生系薬学

キーワード：ラン藻、*Microcystis*、生活環（ライフサイクル）、揮発性化合物、光合成色素

1. 研究開始当初の背景

現在、富栄養化などにより湖沼生態系においてラン藻類が大量発生するアオコという現象が起きている。このアオコにより浄水施設のろ過障害、カビ臭物質の産生、有毒化合物の産生による人間、家畜、野生動物への死亡を含む被害などの環境問題が引き起こされている。これらを解決する方法として、本研究では湖沼生態系におけるラン藻類の制御法の確立を最終目的に置き、その一環として湖沼生態系におけるラン藻類の生活環の解明を試みている。生活環とは、生物がどのように生まれ、育ち、繁殖し、いかに次の個体を生み出すかの過程である。研究代表者は、ラン藻におけるこれらの過程が何らかの有機化合物によって調節されており、その消長を制御することによりラン藻類制御法の確立が可能と考察した。

最近、当研究室の尾崎らはラン藻自身から産生され、湖沼のラン藻が消滅する際にしばしば観察される青色化現象の原因物質である β -cyclocitral がラン藻の生活環に関与している可能性を指摘した。 β -Cyclocitral は、 β -carotene が細胞膜に存在する carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) により酸化的に分解され、生成する揮発性化合物であり、通常細胞内では生成せずラン藻細胞の破壊の際に CCD の活性化により生成され、細胞外に放出されると考えられている。また、 β -cyclocitral はラン藻の中でもアオコの主原因である *Microcystis* 属のみが産生していることも興味深い。何故、*Microcystis* 属ラン藻は自らをも死滅させるような化合物を産生する必要があるのだろうか。研究代表者は、 β -cyclocitral の産生は *Microcystis* 属自身の個体数を制御することにより自己の生存を可能にする、すなわちクオラムセンシングの一環であり、*Microcystis* 属の生活環に関与する

と考察している。一方、 β -cyclocitral の検出過程で、*Microcystis* 属由来の揮発性化合物として 2-および 3-methyl-1-butanol が検出された。これらの化合物は酵母においても産生が確認されており、アミノ酸代謝の中間産物である 2-keto-acid から 2-keto-acid decarboxylase (KDC) と alcohol dehydrogenase (ADH) により産生され、酵母における窒素源飢餓時の情報伝達物質であることが知られている。研究代表者はラン藻の培養実験において、培養後期つまり栄養状態の乏しい時期にこれらの産生を確認しており、栄養状態の低下など生存の厳しい時期に産生・放出されることで生活環境悪化の情報伝達物質として働き、最終的に休眠などに移行させると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、*Microcystis* 属ラン藻の生活環の解明およびそれに基づく制御法の確立の一環として、 β -cyclocitral、2-および 3-methyl-1-butanol などのアルコール類の生成経路、生産挙動、水中における挙動およびラン藻に対する機能の解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 湖沼における β -cyclocitral の役割の解明

① *Microcystis* 属における β -cyclocitral の生成機構解明

(a) *Microcystis aeruginosa* NIES-298 の有する 2 種の CCD の機能解明

(b) MaCCD1 および MaCCD2 遺伝子のクローニング

(c) MaCCD1 および MaCCD2 の活性測定

② β -Cyclocitral および類似化合物のラン藻培養液における酸化および青色化挙動の観察

(a) β -Cyclocitral および perillaldehyde の酸化銀による酸化およびその挙動

(b) ラン藻培養液への β -cyclocitral および類似化合物の添加実験

(c) β -Cyclocitral の酸化され易さおよび青色化の原因予測

③ β -Cyclocitral の酸化挙動

(a) 水中における β -cyclocitral の変化

(b) 2,2,6-Trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate の単離・精製

(c) 2,2,6-Trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate の安定性実験

(d) β -Cyclocitral の酸化経路

(e) 水、MA 培地およびラン藻培養液に添加された β -cyclocitral の酸化挙動の比較

④ ラン藻培養液からの β -cyclocitral、 β -cyclic acid、2,2,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate および 2,2,6-trimethylcyclohexanone の探索

⑤ β -Ionone、 β -cyclocitral、 β -cyclic acid、2,2,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate および 2,2,6-trimethylcyclohexanone の MIC

(2) 湖沼におけるアルコール類の役割解明

① ラン藻におけるアルコール類の生合成機構解明

(a) NIES-843 からの KDC 遺伝子の探索

(b) MaKDC の精製

(c) MaKDC 発現大腸菌を用いたアルコール類産生実験

(d) 精製 MaKDC を用いた脱炭酸活性実験

(e) *Microcystis* 属より産生された 2-methyl-1-butanol の絶対配置の確認

② NIES-843 の成長曲線、生育環境における栄養状態とアルコールの産生挙動の関係解明

(a) 培養液における NIES-843 の成長挙動の硝酸態窒素量の推移

(b) 培養液における NIES-843 のアルコール類産生挙動

4. 研究成果

(1) β -Cyclocitral

① β -Cyclocitral の生成機構解明

Microcystis 属ラン藻で確認された 2 種の CCD 遺伝子 (*MaCCD1*、*MaCCD2*) のクローニング後、精製したタンパク質を β -apo-8'-carotenal と retinal を基質として反応させ、その活性を測定したところ、*MaCCD2* は β -apo-8'-carotenal を開裂し、retinal を生成することが明らかとなった。しかし、*MaCCD1* は基質と反応せず、その活性を確認するに至らなかった。この結果に関しては基質が正しくないのか、あるいは CCD 酵素の活性化には他の要因が関与していることなどが推察され、今後の課題となった。

② β -Cyclocitral と類似化合物のラン藻培養液における酸化および青色化挙動

β -Cyclocitral と構造の類似している perillaldehyde の 2 種のアルデヒド体およびそれらのカルボン酸体を用いて水中の酸化挙動を比較したところ、 β -cyclocitral のみ完全に酸化され、他は全く変化しなかった。つぎに、 β -cyclocitral、perillaldehyde およびこれらのカルボン酸体をラン藻培養液に添加し、溶藻に伴う青色化の有無の観察を行った。その結果、 β -cyclocitral および perillaldehyde のカルボン酸体では青色化が観察され、青色化が引き起こされる pH は 5.5~6.5 であることが確認された。

③ β -Cyclocitral の水中における酸化挙動

上述の結果に基づき、 β -cyclocitral を水に添加し、GC/MS を用いて酸化挙動を調査した。その結果、2,2,6-trimethylcyclohexene-1-carboxylic acid の生成とともに 2,2,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate (エノールエステル体) が検出された。このエノー

ルエステル体は酸性 (pH 3) ~ 中性 (pH 7) において安定であるが、アルカリ性 (pH 10) では 2,2,6-trimethylcyclohexanone に変化することが明らかとなった。この結果から、水中のβ-cyclocitral は Baeyer-Villiger 酸化に類似した機構で溶存酸素によって容易に酸化されることが示された。

④ 水、MA 培地および *Microcystis* NIES-102 培養液に添加されたβ-cyclocitral の酸化挙動の比較

③の実験と同様の操作を水だけではなく MA 培地および NIES-102 培養液中で行い、β-cyclocitral の酸化挙動を比較した。その結果、β-cyclocitral を NIES-102 培養液に添加し場合のみ、β-cyclocitral の経時的な減少量が少なく、*Microcystis* 属が溶藻されることによりβ-cyclocitral が放出されることが推察された。

⑤ NIES-102 培養液からのβ-cyclocitral、カルボン酸体、エノールエステル体および 2,2,6-trimethylcyclohexanone の探索

④の結果を確認するために NIES-102 の細胞を凍結融解により破壊し、放出されるβ-cyclocitral の挙動を GC/MS により確認した。その結果、β-cyclocitral が水中に放出され酸化されるとともに、周辺の *Microcystis* 属ラン藻を溶藻し、さらにそこからβ-cyclocitral が放出されることが示された。

⑥ β-Cyclocitral、カルボン酸体、エノールエステル体および 2,2,6-trimethylcyclohexanone の MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 測定

β-Cyclocitral、カルボン酸体、エノールエステル体、2,2,6-trimethylcyclohexanone と β-ionone の MIC を求めた。その結果、β-ionone、β-cyclocitral およびβ-cyclocitric acid はそれぞれ 1.6、1.3、2.5 mM とほぼ同等の MIC を示

したが、2,2,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate および 2,2,6-trimethyl-cyclohexanone の MIC はそれぞれ 7.1、5.8 mM となり上記の3種より高い値を示した。

①~⑥の結果から、湖沼においてスカムが形成された時、ストレス、ウイルスやバクテリアなどによる *Microcystis* 細胞の破壊により CCD が活性化し、放出されたβ-cyclocitral によって溶藻の連鎖が引き起こされることが推定される。

(2) アルコール類

① ラン藻におけるアルコール類の生成機構解明

Microcystis の中でも全ゲノムが解明されている NIES-843 を用いて、酵母においてアルコール類生成に関与する KDC 遺伝子に相当する遺伝子を探索した。その結果、KDC 遺伝子に相同性を持つ遺伝子が確認され、*MaKDC* と名付けた。つぎに、*MaKDC* 遺伝子のクローニングを行い、*MaKDC* 発現大腸菌を用いたアルコール類産生実験を行った。その結果、*MaKDC* 発現大腸菌のみから 2 および 3-methyl-1-butanol の産生が確認されとともに 2-phenylethanol の産生も確認された。また、大量培養した *MaKDC* 発現大腸菌から *MaKDC* を精製した後、2-keto-4-methylpentanoate、2-ketomethylvalerate、2-ketoisovalerate、phenylpyruvate、pyruvate および indole-3-pyruvate の 6 種の 2-keto acid を基質として、*MaKDC* の脱炭酸活性を測定した。その結果、2-keto-4-methylpentanoate、2-ketomethylvalerate、2-ketoisovalerate および phenylpyruvate において脱炭酸活性が確認され、さらに 3-methyl-1-butanol の前駆体である 2-keto-4-methylpentanoate においてより高い活性が確認された。したがって、*MaKDC* が 2

および 3-methyl-1-butanol、2-phenylethanol の産生に関与していることが確認された。

② NIES-843 のラン藻の成長曲線、生育環境における栄養状態とアルコール類の産生挙動の関係解明

NIES-843 を MA 培地に植え継ぎ、週に 3 回経時的に採取し、クロロフィル吸光度測定による成長曲線の測定および硝酸態窒素の測定を行った。さらに、1 週間毎に培養液を採取し、HS-SPME を用いた GC/MS により 2 および 3-methyl-1-butanol とともに 2-phenylethanol を測定し、これらの産生挙動を確認した。その後、ラン藻の成長曲線、生育環境における栄養状態とアルコール類の産生挙動の関連性を検討したところ、これらのアルコール類は成長曲線における死滅期後期に産生されており、その時の培地中の硝酸態窒素は全て消費されていた。

①、②の結果から、2-methyl-1-butanol、3-methyl-1-butanol および 2-phenylethanol などのアルコール類は老化もしくは環境が悪化したときに産生され、*Microcystis* 属の生活環に関与していることが考えられた。また、2-phenylethanol は本実験によって初めて *Microcystis* 属からの産生が明らかにされ、さらにアルコール類の中で最も多く検出されたことから *Microcystis* 属の生活環に対し重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究は、生物間において相互作用する天然由来の化合物の起源や機能を生態学的に理解するために実施された。研究代表者は実験室的に行った研究結果と湖沼生態系における現象を照らし合わせ、ラン藻および揮発性化合物の出現と消長を考察した。その結果、 β -cyclocitral および酸化生成物と 2-methyl-1-butanol、3-methyl-1-butanol や 2-phenylethanol などのアルコール類が、

Microcystis 属の生活環に深く関わりがあると結論した。 β -Cyclocitral およびこれらのアルコール類は *Microcystis* 属のみに由来し、本研究によって多くのことが明らかにされたが、 β -cyclocitral の生合成機構の一部が不明瞭であり、 β -cyclocitral およびアルコール類の機能に関しても仮説の域を出ない。今後、これら揮発性化合物と *Microcystis* 属の生活環との関わりをより明確にすることで、生活環の制御機構の理解さらには湖沼における *Microcystis* 属の制御が可能になると考えている。

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 3 件)

① Masateru Hasegawa, Akito Nishizawa, Kiyomi Tsuji, Shigenobu Kimura, Ken-ichi Harada: Volatile organic compounds derived from 2-keto-acid decarboxylase in *Microcystis aeruginosa*, *Microbes Environ.*, **27**, 525-528 (2012). 査読有

② Daiki Fujise, Kiyomi Tsuji, Naoko Fukushima, Kohei Kawai and Ken-ichi Harada: Analytical aspects of cyanobacterial volatile organic compounds for investigation of their production behavior, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6122-6125 (2010). 査読有

③ Ken-ichi Harada, Masateru Hasegawa, Naoko Fukushima, Akito Nishizawa, Daiki Fujise and Kiyomi Tsuji: Degradation behavior of β -carotene during cultivation of cyanobacteria, *J. Res. Insti. Meijo Univ.* **9**, 83-91 (2010). 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

① 有井鈴江、長谷川真照、辻 清美、原田健一: ラン藻の制御に関する研究 (XXXIII) *Microcystis* が産生する VOC に対する種によ

る感受性の違い、日本薬学会第 133 年会（横浜）平成 25 年 3 月 28 日

② 長谷川真照、Beata Bober、有井鈴江、辻清美、明壁博彦、原田健一：ラン藻の制御に関する研究（XXXIV）*Microcystis* の生活環と放出されるアルコール類の関係解明の試み、日本薬学会第 133 年会（横浜）平成 25 年 3 月 28 日

③ Beata Bober、疋田清美、金田典雄、西澤明人、辻清美、長谷川真照、原田健一：ラン藻の制御に関する研究（XXXV）*Microcystis aeruginosa* 株による VOC 生産挙動に関する遺伝子的研究、日本薬学会第 133 年会（横浜）平成 25 年 3 月 28 日

④ 原田健一、Beata Bober、長谷川真照、有井鈴江、辻清美、明壁博彦：*Microcystis* の生活環と放出されるアルコール類の関係解明の試み、第 47 回日本水環境学会年会（大阪）平成 25 年 3 月 14 日

⑤ 有井鈴江、辻清美、原田健一、ラン藻が産生する VOC に対する種による感受性の違い（その 2）第 47 回日本水環境学会年会（大阪）平成 25 年 3 月 11 日

⑥ 長谷川真照、有井鈴江、辻清美、明壁博彦、富田浩嗣、猪飼誉友、原田健一：*Microcystis* が放出する β -cyclocitral の特徴的な酸化挙動、フォーラム 2012：衛生薬学・環境トキシコロジー（名古屋）平成 24 年 10 月 26 日

⑦ 長谷川真照、有井鈴江、辻清美、明壁博彦、富田浩嗣、猪飼誉友、原田健一：ラン藻の制御に関する研究（XXX）-*Microcystis* が放出する β -cyclocitral の特徴的な酸化挙動-、第 132 年会日本薬学会（札幌）平成 24 年 3 月 31 日

⑧ 有井鈴江、長谷川真照、辻清美、原田健一：ラン藻の制御に関する研究（XXXI）-*Microcystis* 由来の VOC の水中における作用

濃度に関する考察-、第 132 年会日本薬学会（札幌）平成 24 年 3 月 31 日

⑨ 辻清美、有井鈴江、長谷川真照、富田浩嗣、猪飼誉友、原田健一：ラン藻の制御に関する研究（XXXII）-GC/MS によるラン藻、*Microcystis* 由来の VOC の分析-、第 132 年会日本薬学会（札幌）平成 24 年 3 月 31 日

⑩ 長谷川真照、有井鈴江、辻清美、原田健一：*Microcystis* が放出する β -cyclocitral の特徴的な酸化挙動（II）、第 46 回日本水環境学会年会（東京）平成 24 年 3 月 14 日

⑪ 有井鈴江、長谷川真照、辻清美、原田健一：*Microcystis* が産生する VOC に対する種による感受性の違い、第 46 回日本水環境学会年会（東京）平成 24 年 3 月 14 日

⑫ 長谷川真照、西澤明人、辻清美、原田健一：シアノバクテリア *Microcystis* 由来 2-keto-acid decarboxylase の生化学的解析、第 45 回日本水環境学会（札幌）平成 23 年 3 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 健一 (HARADA KEN-ICHI)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：90103267

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：