

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32663

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710081

研究課題名(和文) 淡水環境における藍藻由来有毒物質の分解活性に及ぼす環境因子の解明

研究課題名(英文) Environmental factor for microcystin degradative activity in freshwater environment

研究代表者

清水 和哉 (Shimizu, Kazuya)

東洋大学・生命科学部・講師

研究者番号：10581613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、microcystin分解菌が保有するmicrocystin分解酵素によるmicrocystin分解経路及びmicrocystin分解活性に影響を及ぼす環境因子を明らかにした。水環境中においてもmicrocystin分解とmicrocystin初発分解酵素遺伝子mlrAおよびその酵素MlrAが1対1の関係にあることを見いだした。室内実験と同様の環境因子がmicrocystin分解活性に関与していると考えられ、microcystin分解菌と関連微生物が相互に連携し、microcystin分解を連鎖反応的に生じさせ急速に分解していると推測された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, environmental factor for microcystin degradative activity and enzymatic pathway of microcystin degradation in microcystin degrading bacterium were revealed. In aquatic environment, the relationship between microcystin degradation and microcystinase gene, mlrA is one to one. This relationship is very interesting because most of the cases are not one to one relation. The mlrA gene is unique. The rapid microcystin degradation in aquatic environment and drinking water treatment system is supposed that microcystin sequential degradation is occurred by interaction between microcystin degrading bacteria and microcystin degradation related microorganisms in microbial community.

研究分野：水処理微生物分子生物学

キーワード：淡水資源 浄水処理法 藍藻類由来有毒物質 生物膜法 水圏現象

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類の異常増殖(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。世界中で水質汚濁の進行により淡水はあるが、水質が悪く使用できない事例が急速に拡大しているのが現状であり、さらに、温暖化の進行により有毒アオコの発生頻度が世界中で高まること予測されている (Science 200, 他) ことから、水量はあるが水質悪化による淡水確保量の減少傾向はさらに進行することが予想される。有毒藍藻は難生分解性有毒物質 microcystin を産生するが、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 (Skulberg *et al.*, 1984, 他)。このため、世界保健機関 (WHO) において上水中のミクロシスチン濃度を microcystin-LR として、1 µg/L 以内にするという暫定規制基準値を設定し、世界各国に対し対策を講じることを勧告している。しかし、microcystin は難生分解性であることからその除去には、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は、発展途上国が多く、問題解決には安価な処理技術の確立が急務である。アオコ発生湖沼における詳細なモニタリング解析から有毒アオコ消失時に microcystin 分解が、水環境中で速やかに行われることが指摘されている (図1)。

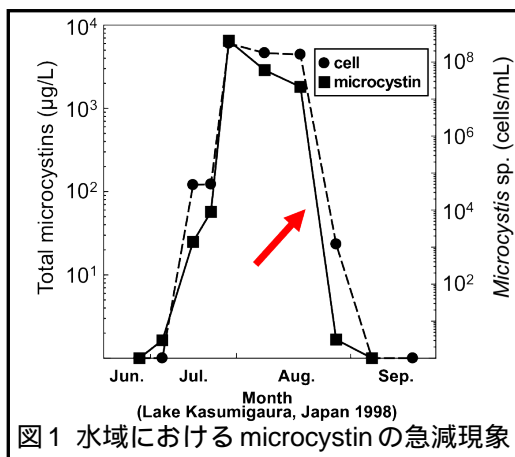


図1 水域における microcystin の急減現象

これらのモニタリングの知見により microcystin 分解に水環境微生物、特に microcystin 分解細菌群が強く関わっていると予想され、国内外で多くの microcystin 分解細菌が単離された。従って、微生物を利用した安価な生物学的浄水処理法の確立を目指し研究が展開されている。Microcystin 分解に関与すると言われている *mlr* 遺伝子クラスター (Bourne *et al.*, 1996;2001) もいくつ

かの microcystin 分解細菌が保持していることが確認されているとともに、microcystin 分解は microcystin 分解菌が主要な分解者であると推察されている。microcystin 分解活性の解析から他生物種である藍藻類が産生する microcystin の環状構造とその分解産物 Adda により microcystin 分解酵素遺伝子の発現量は上昇され、microcystin 分解活性も亢進されたという極めてユニークな現象を報告者は見出してきた (Shimizu *et al.*, 2011)。つまり、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、有毒藍藻類汚濁水域で分解菌が microcystin とその分解産物に連鎖反応的に応答し、急速な分解をすることをほのめかしている。これは、他の汚濁物質を浄化する微生物にも起こり得る制御機構であり、この知見を利用した制御法は、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機能微生物の活性制御手法の構築に繋がるものと期待できる。

真にこの分解菌を利活用するには、当然、生物処理時に最も問題となる点の一つである処理担体の劣化等による微生物濃度の減少や機能活性の減衰問題を克服する必要がある。しかし、微生物の濃度に着目した制御法はいくつか既に存在していることから、今後は、いかに効率的に分解を促進するか、つまり制御可能な微生物活性化処理法の確立が渴望されている。

2. 研究の目的

本研究は、microcystin 分解活性の制御法を構築するために、室内実験環境および水環境の両面から microcystin 分解活性に関わる環境因子や制御因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Microcystin 分解経路の推定

Microcystin 分解菌の microcystin 分解酵素遺伝子 *mlrA* 遺伝子、*mlrB* 遺伝子、*mlrC* 遺伝子、*mlrD* 遺伝子の全長を genome walking 法にて決定した後に、それぞれをタンパク高発現用ベクターに組み込み、大腸菌を用いてそれぞれのタンパクを高発現させた。高発現させたタンパクを用いて microcystin-LR の分解試験を実施し、得られた分解産物は、LC-MS/MS を用いて解析した。

(2) 室内実験における microcystin 分解活性に影響を与える環境因子

Microcystin 分解菌の最少合成培地を構築した。その後、最少合成培地にて培養した microcystin 分解菌を用いて、各種栄養塩類の影響や天然培地素材であ

る酵母エキス、ペプトンの影響を解析した。さらに、酵母エキスやペプトンを用いた天然培地中での microcystin 分解特性と microcystin 分解菌の増殖特性を解析した。

(3) 生物学的浄水処理槽の担体付着微生物の真正細菌群集構造解析および MlrA の多様性解析

実際の浄水場の生物学的水処理槽から季節ごとに生物膜を採取し、生物膜から全 DNA を得た。Microcystin 分解菌の動態解析に関しては、直列に接続されている生物処理槽それぞれから、毎月 1 回もしくは 2 回の頻度でサンプリングを行った。各種基本水質項目を分析した。サンプリングして得られた全 DNA より、細菌群集構造解析のための 16S rRNA 遺伝子および microcystin 初発分解酵素遺伝子 *mlrA* を PCR クローニングし、クローンライブラリー法にて塩基配列を解析した。Microcystin 分解菌の動態解析においては、各槽から得た全 DNA を鋳型として、全細菌群数を反映する 16S rRNA 遺伝子および microcystin 初発分解酵素遺伝子 *mlrA* を標的として、定量 PCR 法によりコピー数を定量した。

(4) アオコ発生淡水域におけるモニタリング解析

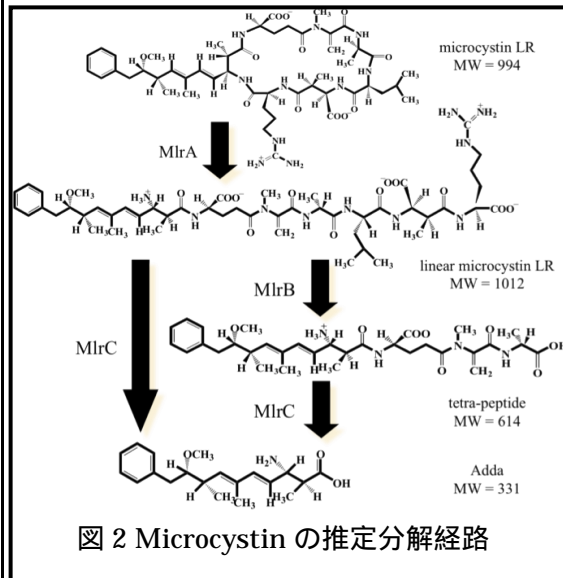
毎年、アオコの発生が確認されている閉鎖性淡水域をモニタリング対象地点として、毎週 1 回から 4 回の頻度でサンプリングを行った。各基本水質項目を分析するとともに、microcystin 濃度を液体クロマトグラフィーで分析した。また、採水サンプルから全 DNA を得て、microcystin 分解菌群数を解析した。

4. 研究成果

(1) Microcystin 分解経路の推定

大腸菌によるタンパク質発現系を用いて microcystin 分解経路を推定した結果、MlrB が、MlrA による microcystin 分解産物、直鎖 microcystin を tetrapeptide に分解し、tetrapeptide を MlrC が Adda に分解する。さらに、MlrC は直接、直鎖 microcystin を Adda に分解することを明らかにした(図 2)。また、MlrD は当初の推測通り、microcystin やその分解産物を分解することはなかった。アミノ酸配列結果からの推測から、MlrD は microcystin やその分解産物のトランスポーターであることが予想されている。一方、MlrB と MlrC が同じ機能を有することから、microcystin 分解菌内での MlrB と MlrC の細胞内局在は異なることが考えられた。今後、microcystin 分解菌を用いた特異的遺伝子破壊株を作成し、解析することが必要

である。



研究成果は、雑誌論文研究業績記載の 1 の学術論文として発表した。

(2) 室内実験における Microcystin 分解活性に影響を与える環境因子

Microcystin 分解菌の最少合成培地を構築した。構築した最少合成培地を用いて各種栄養塩類の影響や天然培地素材である酵母エキス、ペプトンのそれぞれの microcystin 分解への影響を解析した。その結果、硝酸態窒素とペプトンが microcystin 分解活性に正の効果を与えた。一方、リン酸態リンについては、microcystin 分解菌を含む生物膜による microcystin 分解活性の解析では、負の効果を与えていた結果とは異なり、microcystin 分解菌のみの場合には、負の効果を与えなかった。

酵母エキスやペプトンを用いた天然培地中で microcystin を添加系と無添加系における microcystin 分解菌の増殖特性を解析した。その結果、microcystin 添加系において無添加系よりも増殖特性が良い結果を得た。従って、microcystin 分解菌が保持している *mlr* 遺伝子クラスターは、microcystin を分解し資化するために保持していると考えられた。

現在、各環境因子によって動く、遺伝子の制御機構の詳細について解析中である。

(3) 生物学的浄水処理槽の担体付着微生物の真正細菌群集構造解析および MlrA の多様性解析と microcystin 分解菌の動態解析

Microcystin 分解活性に影響を与える環境因子において microcystin 分解菌の分子生物学的挙動を解析するとともに

水環境中や生物学的浄水処理槽内の微生物群集構造解析および microcystin 分解菌の挙動と環境因子との関係について解析した。その結果、室内実験環境で見いだした環境因子と同様の因子が影響を与えていることが考えられた。また初発 microcystin 分解酵素 MlrA のアミノ酸配列は高度に保存されていた。これまでの研究成果より Microcystin 分解と MlrA が 1 対 1 の対応関係にあると考えられる結果を得ており、初発 microcystin 分解酵素 MlrA のアミノ酸配列が高度に保存されているためであることが考えられた。

実際の浄水場の直列に接続された生物学的浄水処理槽中の生物膜から得た全 DNA から定量 PCR 法にて、解析した *mlrA* 遺伝子コピー数と 16S rRNA 遺伝子コピー数を定量した。16S rRNA 遺伝子コピー数は、冬季において減少が見られたものの *mlrA* 遺伝子は、見られなかった。モニタリング期間中に動物プランクトン個体群数が多量に増大した際に、16S rRNA 遺伝子コピー数はほぼ減少しなかったのに反して、*mlrA* 遺伝子コピー数は減少した。この理由は、担体付着の生物膜量が減少していたことを確認していることから、動物プランクトンの補食作用によるものであり、生物膜中の表面に microcystin 分解菌が局在しているのではないかと考えられた。*mlrA* 遺伝子コピー数は microcystin 分解に応じて増加しており、*mlrA* 遺伝子という一つの遺伝子を用いて一つの現象を追えることが、明確に示された。また、生物学的浄水処理法が、上水の安全確保に貢献していることを示した。

研究成果は、雑誌論文研究業績記載の 2 の学術論文として発表した。また、学会発表研究業績記載の 1 および 2 として発表した。

(4) アオコ発生淡水域におけるモニタリング解析

モニタリング調査において、細胞外 microcystin が検出限界以下となった際や細胞内外を合わせた総 microcystin が低い時期は、microcystin 分解菌の細胞密度も低いことがわかった。そのため、極めて細胞密度が高い microcystin 産生藍藻類がアオコを形成している際には、細胞外 microcystin が少ないことが考えられた。Microcystin 分解菌の細胞密度は、microcystin 濃度が急減した際に、急激に高くなったため、水環境中においても microcystin 分解と microcystin 初発分解酵素 MlrA が 1 対 1 の対応関係にあると示された。また、microcystin 濃度が低い時期が継続すると microcystin 分

解菌の生物学的浄水処理槽の生物膜中の microcystin 分解菌の動態とは異なるため、生物膜中の付着細菌群集構造と浮遊細菌群集構造との生息環境の違いによるものと考えられた。室内実験結果より見いだした環境因子は、microcystin 分解が急激に発現した際に、変動があったことから、microcystin 分解菌と関連微生物群が相互に連携し、microcystin 分解を連鎖反応的に生じさせていると考えられた。

本研究成果をまとめると、microcystin 分解に対して細菌間の種間相互作用のみならず、微小動物と細菌間の種間相互作用が密接に関与することで、水環境中の microcystin の急減現象を microcystin 分解菌内において遺伝子レベルでしっかりと制御し引き起こし、硝酸態窒素濃度や *mlrA* 遺伝子コピー数の制御により、microcystin 分解活性を制御できることが考えられた。

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)

1. Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Kunihiro Okano, Takumi Hiratsuka, Yusuke Jimbo, Qiang Xue, Haruna Akasako, Tomoaki Itayama, Motoo Utsumi, Zhenya Zhang, and Norio Sugiura "Determination of microcystin-LR degrading gene *mlrA* in biofilms at a biological drinking water treatment facility" *Maejo International Journal of Science and Technology* 7 (Special Issue), S22-S35, 2013. 査読有
2. Kazuya Shimizu, Hideaki Maseda, Kunihiro Okano, Takumi Kurashima, Yukio Kawauchi, Qiang Xue, Motoo Utsumi, Zhenya Zhang, and Norio Sugiura "Enzymatic pathway for biodegrading microcystin LR in *Sphingopyxis* sp. C-1" *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114, 630-634, 2012. 査読有

[学会発表](計2件)

1. Kazuya Shimizu, Motoo Utsumi, Haruna Akasako, Jieming Li, Hideaki Maseda, and Norio Sugiura "Seasonal analysis of microcystin degradation by biological treatment facility at a water purification plant in Japan" SETAC 34th North America (Oral Presentation), November 17th-21st, 2013 (Nashville, TN, USA).
2. 清水和哉、赤迫春菜、李潔明、内海真生、杉浦則夫「生物学的浄水処理法における藍藻由来有毒物質分解および分解酵素遺伝子の動態」第19回日本環境毒性学会研

究発表会(口頭発表), 9月17日-18日,
2013, 東洋大学白山キャンパス(東京都
文京区).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www2.toyo.ac.jp/~k_shimizu/ri_ben_yu/JP
N-TOP.html](http://www2.toyo.ac.jp/~k_shimizu/ri_ben_yu/JP
N-TOP.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 和哉 (SHIMIZU, Kazuya)

東洋大学・生命科学部・講師

研究者番号: 10581613

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: