

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04588

研究課題名(和文) モリブデンの環境動態に着目した毒性藍藻類の窒素固定特性と異常増殖メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of nitrogen fixing property and overgrowth mechanism of toxic cyanobacteria in view of environmental behavior of molybdenum

研究代表者

藤井 学 (Fujii, Manabu)

東京工業大学・環境・社会理工学院・特任准教授

研究者番号：30598503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、毒性藍藻類を対象とした室内培養試験ならびに国内外における野外調査を通して、毒性藍藻類の発生に関わる環境水質因子を特定することを主目的とした。本研究から、水中の微量金属(鉄、銅など)や主要金属(カルシウムなど)濃度が藍藻毒の発生に強く関連していることが明らかとなった。従って、閉鎖性水域における毒性藍藻類の発生を抑制する観点では、従来の環境水質基準で藻類の増殖に関連のある栄養塩(窒素やリン)のみならず、新たに微量金属や主要金属などにも着目した水質管理を実施することが望ましいと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダム湖などの閉鎖性水域では、夏季になると藻類の大量増殖(いわゆるアオコ)が発生することがある。アオコが発生すると、水質悪化を生じ、水利用(上水や工業用水、農業用水など)に影響を及ぼす。本研究では、アオコが生産する毒素(藍藻毒)に着目し、国内外における野外湖沼調査や室内試験から、金属類などの水質が毒素の生産に関連していることが明らかとなった。この結果は、藍藻毒の発生を抑制するためには、従来の環境水質基準(窒素やリンなど)に基づく水質管理では不十分であり、微量に存在する金属類(重金属類なども含む)などにも着目していく必要があることを示している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the environmental water quality factors that can affect the occurrence of toxic cyanobacteria through the laboratory-based algal culturing experiment in addition to the field survey in semiclosed freshwater lakes (in Japan and Australia). Consequently, this study identified that concentrations of major metals (e.g., calcium etc) and trace metals (e.g., iron, copper, etc.) are tightly related to the occurrence of cyanobacterial toxin (cyanotoxin). Therefore, the management of water qualities focusing on not only traditionally important major nutrients (i.e., nitrogen and phosphorous) but also other water qualities (in particular metals) will be recommended in view of the management of cyanotoxin occurrence in the lakes.

研究分野：水環境工学

キーワード：シアノバクテリア 毒性藍藻類 藍藻毒 金属 水質 湖沼

## 1. 研究開始当初の背景

農地や排水などを由来とする窒素やリンの下流域への過剰供給により、世界各国の淡水湖沼では富栄養化が生じている。高い栄養塩濃度に加え、夏季の高い水温などが続くと、藍藻類(シアノバクテリア)が優先的に増殖し、いわゆるアオコを形成する。藍藻類の中でも *Microcystis* や *Cylindrospermopsis*(*Raphidiopsis*) は、真核生物に有害な毒素(ミクロシスチンなど)を生産する。毒素生産性藍藻類の発生により、これまで野生生物や家畜の死亡も確認されているため、生態系への影響が懸念される。一方、飲料水源となる場合、流域の人の健康にも影響を及ぼす可能性がある。従って、毒素生産性藍藻類の発生メカニズムやその環境要因、また藍藻毒の生理学的役割について理解を深めることは、藍藻毒の発生制御や効率的な除去技術の開発にもつながり、持続可能な水利用にむけて重要となる。

毒素生産性藍藻類の中でも *Microcystis* は、世界各国の湖沼でみられる最も生息分布の広い藍藻類である。従って、毒性藍藻類の調査研究において、*Microcystis* は世界標準となっている。一方で、熱帯性藍藻類である *Raphidiopsis* は、窒素固定により細胞の窒素要求量を満たすことが可能であり、環境変化への高い生理耐性や適応能力を有している。世界に広い生息域をもつ *Microcystis* に加え、*Raphidiopsis* の毒素生産について調査することは、温暖化進行に伴う貧栄養温帯地域への生息域拡大やそういった地域での毒素生成要因等を明らかにするうえで重要である。

## 2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では、室内藻類培養試験ならびに国内外での野外調査を通して、藍藻毒の発生メカニズムや重要な環境因子、生理学的役割などを明らかにすることを目的とした。特に、モリブデンや鉄などの微量金属は、淡水性藍藻類の毒素生産や増殖に重要な窒素固定活性と密接な関係にあることが推測されるため、微量金属動態が毒素生産に及ぼす影響を中心に研究を推進した。野外調査における湖沼としては、熱帯性藍藻類の異常増殖の解決が望まれている豪州淡水域(ニューサウスウェールズ州)を対象とし、また、比較のために、国内の複数の淡水湖沼も対象とした。室内培養試験における対象種としては、前述の理由から *Microcystis* ならびに *Raphidiopsis* を選定した。以上の研究から、毒性藍藻類異常増殖の解決に資する水質管理に関して提言を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1 窒素固定藍藻類の増殖と窒素固定特性に及ぼす栄養素と毒性の影響

窒素固定藍藻類の増殖と窒素固定特性に及ぼす栄養素と毒性の影響を調べるための室内培養試験を実施した。藻類株として、窒素固定特性を有する糸状藍藻類 *Cylindrospermopsis raciborskii* (*Raphidiopsis raciborskii*) を用いた。毒性株 (CS-506) ならびに非毒性株 (CS-509) の2株を対象に実験を行った。培地には Jaworski 培地を用いた。培養(バッチ式)は、滅菌条件下で恒温槽内にて行った(培養条件は 27℃、14h:10h の明暗サイクル、光強度は 178  $\mu\text{mol-quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  など)。様々な栄養条件下(例えば、窒素源[硝酸、アンモニア]や微量金属[鉄など]濃度を変動させた系)において培養試験を実施し、細胞増殖応答や窒素固定特性、鉄摂取速度等のパラメータを測定した。細胞数は光学顕微鏡下でノイバウアー血球計(深さ 0.1mm)により測定した。窒素固定特性の測定には、ニトロゲナーゼ活性をアセチレン還元アッセイ(ガスクロマトグラフィー)で分析した。鉄摂取速度の測定では、放射性認識した鉄同位体を用いた試験により、細胞内取り込み量を調べた。

### 3.2 金属類が藻類の細胞酸化ストレスや藍藻毒生成に及ぼす影響

金属類が藻類の細胞酸化ストレスや藍藻毒生成に及ぼす影響を明らかにするための室内培養試験を行った。藻類株としては、パスツール研究所より分与された藍藻類 *M. aeruginosa* (PCC-7806 株) を用いた。培地としては、Fraquil\*培地を用いた。Fraquil\*培地は、微量金属濃度を厳密に制御可能であり、微量金属動態が藻類の代謝や増殖応答に及ぼす影響を調査する研究に用いられる。本実験では、Fraquil\*中の各主要・微量元素(Ca、Mg、N、P、Fe、Cu、Zn、Mn、Co、Mo など)濃度を変化させ、増殖や代謝に及ぼす影響を評価した。藻類培養は恒温槽内で行った。恒温槽は温度 27℃、光強度 $\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$  とし、光条件として 12:12 hr の明暗サイクルで静置培養した。1 から 2 週間培養後に細胞を回収し、酸化ストレス測定やミクロシスチン濃度の測定を行った。酸化ストレス測定には DCFH-DA 試薬を用いた。各細胞試料に、蛍光試薬の DCFH-DA 試薬を最終濃度 10 $\mu\text{M}$  になるように添加し、細胞の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することで、細胞酸化ストレスを評価した。ミクロシスチン濃度の測定では、各細胞試料に 40% メタノール水溶液を添加後、凍結融解ならびに超音波処理により細胞破碎し、抽出されたミクロシスチン濃度を ELISA 法により測定した。

### 3.3 国内外における野外調査

調査対象として、藍藻類による毒素生産が報告されている、関東近郊の国内湖沼ならびに豪州

(ニューサウスウェールズ州)の湖沼を選定した。国内外において25点の調査地点を設定し、2018年1月～2019年1月までに複数回の調査を実施した。調査手法として、湖沼表層水を採取し、メンブレンフィルターによるろ過を行った。ろ液について、水試料については、pHやイオン強度などの基礎水質項目に加え、微量金属濃度(鉄や銅、モリブデンなどの計10種類)、栄養塩濃度(窒素、リン)、有機物濃度(TOC濃度)等を測定した。微量金属濃度や栄養塩濃度は誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)やイオンクロマトグラフィーを用いて測定した。また、ろ紙に捕捉された試料について、藍藻毒分析ならびに菌叢解析を行った。藍藻毒では、ミクロシスチン(MC)をターゲットとし、ELISAキット(Wako)を用いて測定した。菌叢解析は、16s rRNAをターゲットとしたメタバーコーディング(次世代シーケンス)解析により実施した。統計処理ならびに機械学習は、Rを用いて行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 毒性・無毒性 *Raphidiopsis raciborskii* の増殖と窒素固定に及ぼす栄養素の影響

*Raphidiopsis raciborskii* の増殖特性と窒素固定特性に及ぼす栄養素の影響を明らかにするため、窒素固定(ニトロゲナーゼ酵素)に重要な鉄やモリブデンなどの微量栄養素に加え、主栄養塩である窒素の利用性が増殖・代謝特性に及ぼす影響を、室内培養試験により調査した。その結果、微量栄養素欠乏下において窒素固定活性(アセチレン還元法)は低下したものの、毒素株(CS506)は無毒素株(CS509)と比較して、高い増殖速度を維持することができ、毒素株が窒素固定などのストレス環境下において優位である可能性が示唆された。また、昼夜通して行われる窒素固定活動は無毒素株より毒素株の方が高かった。以上の培養試験結果から、窒素や微量栄養素制限下における毒性藍藻類の生態的優位性(無毒性藍藻類に対して)が示唆された。また、微量金属(放射能標識された鉄)の細胞内摂取の観点では、有機キレートと錯結合した第二鉄が光により還元作用を受けることで第一鉄が生成され、生成された第一鉄を摂取していることが明らかとなった。この知見は、ニトロゲナーゼに必要な鉄取り込みが主として日中に生じていることを示している。

### 4.2 微量金属の利用制限が藍藻類の細胞酸化ストレスならびに毒素生成に及ぼす影響

淡水性藍藻類の *Microcystis* は、ミクロシスチン(MC)と呼ばれる藍藻毒(肝臓毒)を生産する。既往研究では、細胞酸化ストレスがMCの生成に寄与していることが示唆されているが、細胞酸化ストレスに及ぼす環境因子や水質項目については不明な点が多い。本課題では、微量金属元素に着目し、*Microcystis aeruginosa* (PCC7806株)を用いた室内培養試験を実施した。酸化ストレスは様々な微量元素により誘発されることが示唆されるため、本課題では、培地中の微量金属濃度(Mo、Cu、Zn、Feなど)を変動させ、細胞内酸化ストレスならびに毒素生産量を測定した。その結果、特に、重金属類(Cu、Zn)の濃度が高い培養条件、ならびにアルカリ土類金属類(MgやCaなど)が低い条件において細胞内酸化ストレスが生じ、細胞内のMC量が増加することが明らかとなった。また、鉄に関しては、特に大きな影響がみられたため、*Microcystis* の毒性株に対して、鉄制限下で室内培養試験を行い、酸化ストレス、毒素生成の関係性を明らかにした。その結果、微量金属が不足する条件(鉄濃度が100nM以下)では細胞酸化ストレスが上昇し、細胞当たりの藍藻毒量が増加した。実験に用いた最も低い鉄濃度20nMでは、細胞中のMC生産が最も増加することが明らかとなった。また、培地内の鉄濃度が上昇するに従い細胞増殖速度も増加したが、細胞増殖速度を考慮したMC生産速度(すなわち、細胞増殖速度と細胞MC量の積[単位 fg/day])は、微量金属濃度が中程度(例えば鉄濃度~100nM)の時に最小となることが明らかとなった。

以上の結果は、水中における微量金属濃度が毒素生産と密接にかかわっており、毒素生産を抑制するためには従来の主栄養塩のみならず微量金属元素にも着目した水質管理が重要であることが示された。

### 4.3 国内外の湖沼水質調査：毒性藍藻類の発生に関する水質因子の特定

前節までの研究課題では、室内培養試験を中心に特定の藍藻種に対する毒素生産に及ぼす水質・環境因子の影響を検討した。具体的には、単相関分析などを通して、因子間の単純な関係性を調べてきた。しかし、野外環境においては、種々の藻類種や環境因子との複雑な相互作用のもと毒素が生産されていると考えられる。そこで、本課題では、国内外の閉鎖性水域において野外調査を行い、藍藻毒生成に関連する水質・環境因子についての検討を、機械学習により行った。

具体的には豪州(ニューサウスウェールズ州)と関東近郊の淡水湖沼において、夏季(アオコ発生時)と冬季に野外調査を実施し、藻類・水試料を採取した。水試料については、基礎水質項目に加え、微量金属濃度、栄養塩濃度、有機物濃度、毒素濃度、光合成活性等のデータを取得し、藻類試料については、16s rRNAメタバーコーディングによる藍藻組成(属レベル)ならびに毒素濃度(ミクロシスチン濃度)を測定した。藍藻組成としては、*Microcystis* や *Cylindrospermopsis* (*Raphidiopsis*)、*Anabaena* 等が主として検出された。藍藻毒濃度ならびに各種水質濃度データを

用いて、ランダムフォレストにより藍藻毒と水質・環境因子の関係性を調べた。その際、目的変数を藍藻毒濃度（対数変換値：ln MC）とし、説明変数を種々の水質データ（微量金属、栄養塩など）より選定した。ここで、説明変数は、相関分析、主成分分析結果から ln MC との相関が高い変数を抽出した。藍藻毒と相関が高い水質・環境パラメータを全て機械学習モデルに組み込まず、毒素発生予測に活用しやすい（比較的高頻度での観測が可能）と考えるパラメータのみを用い、高精度での予測を目的とした選定を行った。

機械学習における水質パラメータとして、Chl-a、Cu、Fe、Ni、Ca、Mg、K が選出され、毒素発生予測モデルを作成した。上述の国内外データ（合計 59 試料）をランダムな 5 群に分離し、4 群に対してモデル作成を行い、残り 1 群に対してモデルの予測精度検証を行った。その結果、予測精度の評価指標である RSR は 0.56 を示し、モデルの精度は十分高いことが示された。それに加え、Partial Dependence Plot から目的変数 ln MC と関連の高い説明変数が金属類の中でも Fe や Ni、Ca であることが明らかとなった。この結果は、室内培養試験での毒素生産に及ぼす微量金属の影響とも整合性がある結果となった。

以上より、毒性藍藻類の異常増殖の解決に資する流域・湖沼水質管理として、従来から重要視されてきた窒素やリンなどの主栄養塩（環境水質基準）のみならず、微量金属や主要金属などの金属元素の湖内動態・流域起源などにも着目していかなければならないことが示唆された。微量金属の中では、Fe、Ni、Cu、Zn が重要であり、また主要金属では Mg や Ca が重要であると考えられるが、構築された機械学習モデルは、毒素生産を誘発する水質状況かどうかの判断材料の一つとして活用できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fu Qing Long, Yeung Anna C. Y., Fujii Manabu, Neilan Brett A., Waite T. David	4. 巻 21
2. 論文標題 Physiological responses of the freshwater N2 fixing cyanobacterium Raphidiopsis raciborskii to Fe and N availabilities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 1211 ~ 1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1111/1462-2920.14545">https://doi.org/10.1111/1462-2920.14545</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takaara Tomoko, Sasaki Shiori, Fujii Manabu, Ito Hiroaki, Masago Yoshifumi, Omura Tatsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Lectin-stimulated cellular iron uptake and toxin generation in the freshwater cyanobacterium Microcystis aeruginosa	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Harmful Algae	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.01.003">https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.01.003</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fu Qing-Long, Fujii Manabu, Natsuike Masafumi, Waite T. David	4. 巻 247
2. 論文標題 Iron uptake by bloom-forming freshwater cyanobacterium Microcystis aeruginosa in natural and effluent waters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Pollution	6. 最初と最後の頁 392 ~ 400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.071">https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.071</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Samy Abeer, Ibrahim Mona G., Mahmud Wael Elham, Fujii Manabu, Eltawil Amr, Daoud Waled	4. 巻 11
2. 論文標題 Statistical Assessment of Rainfall Characteristics in Upper Blue Nile Basin over the Period from 1953 to 2014	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Water	6. 最初と最後の頁 468 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/w11030468">https://doi.org/10.3390/w11030468</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 NASUKAWA Kohei、MATSUMAE Hiroki、FUJII Manabu	4. 巻 74
2. 論文標題 EFFECT OF IRON STRESS ON OXIDATIVE STRESS AND TOXIN PRODUCTION BY FRESHWATER CYANOBACTERIA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Civil Engineers, Ser. G (Environmental Research)	6. 最初と最後の頁 111_153 ~ 111_160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.2208/jscej.74.111_153">https://doi.org/10.2208/jscej.74.111_153</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 那須川康平, 松前大樹, 藤井学
2. 発表標題 鉄制限が淡水性藍藻類の細胞酸化ストレスならびに毒素生成に及ぼす影響
3. 学会等名 環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 那須川康平, 藤井学
2. 発表標題 水性藍藻類の細胞酸化ストレスならびに毒素生成に及ぼす水質因子の影響
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷鴻太, 藤井学
2. 発表標題 湖沼水質が藍藻毒生成と微生物多様性に及ぼす影響
3. 学会等名 第5回環境水質工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fu, Q., L., Fujii, M., Yeung, A. C. Y., and Waite, T. D.
2. 発表標題 Iron Uptake Kinetics of Bloom-Forming Cyanobacteria
3. 学会等名 6th Australian & New Zealand Cyanobacteria Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujii, M.
2. 発表標題 Increased toxin production by metal induced oxidative stress for freshwater cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i>
3. 学会等名 6th Australian & New Zealand Cyanobacteria Workshop
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fu, Q.L., Fujii, M.
2. 発表標題 Iron Uptake Kinetics of Bloom-Forming Cyanobacteria
3. 学会等名 Water and Environment Technology Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井学
2. 発表標題 森と海のつながりにおける鉄と有機物の動態
3. 学会等名 日本陸水学会第82回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	名尾 祐美 (長濱祐美)  (Nagahama Yumi)  (00618506)	茨城県霞ヶ浦環境科学センター (湖沼環境研究室、大気・化学物質研究室)・湖沼環境研究室・技師    (82124)	
研究分担者	菊地 哲郎  (Kikuchi Tetsurou)  (50453965)	茨城県霞ヶ浦環境科学センター (湖沼環境研究室、大気・化学物質研究室)・湖沼環境研究室・技師    (82124)	
研究分担者	伊藤 紘晃  (Ito Hiroaki)  (80637182)	熊本大学・くまもと水循環・減災研究教育センター・助教    (17401)	
研究分担者	吉村 千洋  (Yoshimura Chihiro)  (10402091)	東京工業大学・環境・社会理工学院・准教授    (12608)	