

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420527

研究課題名(和文)メタボローム解析による有害アオコの形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Metabolic analysis of Microcystis becoming Water-bloom Algae

研究代表者

牧野 育代(Makino, Ikuyo)

東北大学・環境・安全推進センター・助教

研究者番号：00542060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アオコは、国や地域を問わず世界中に分布しており、極めて普遍的な水質リスクの一つである。生命活動に必要とされる代謝産物データを用いて、水面および水中の空間的变化がアオコの化学生態に及ぼす影響を検討した。アオコの化学生態の変化は、光合成に関係する昼間と夜間の違いよりも、細胞の鉛直移動を表現した水面と水中の違いにおいて、顕著に現れた。アオコのリスクを高くする毒素microcystinの生合成は空間や1日単位から月単位によって大きく差が生じることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Blue-green algae are distributed worldwide, regardless of country and region, and are one factor posing a serious universal risk to water quality. We studied the effects of water surface and water spatial changes on the chemical ecology of blue-green algae, by using quantitative data of 110 chemicals required for biological activity. Changes in the chemical ecology of blue-green algae were more pronounced due to differences in surface level and medium depth-water which represented vertical motion of cells, as opposed to daytime and nighttime differences related to photosynthesis. With only a maximum difference of 0.5 cm in water depth, it was revealed that concentrations of chemicals which blue-green algae biosynthesizes and metabolizes differed greatly. This concentration difference reflected requirements for cell proliferation.

研究分野：水資源工学

キーワード：アオコ Microcystis メタボローム

1. 研究開始当初の背景

アオコを形成する *Microcystis* 細胞は光合成によって、糖、アミノ酸、たんぱく質(フィコピリソーム等)を液胞に蓄積し、重くなって沈降する。沈降した細胞は糖をエネルギー化することで空胞を作り、浮上する。*Microcystis* はもともと単細胞の状態であるが、細胞自らが分泌したバイオフィームにより集結し、大小さまざまな群体を形成する。群体が高密度に達すると、水面が一面緑色になりマット状のアオコ現象が生じる。一旦このようになると大小のアオコ塊が重なり層をなすため、下層の浮上力によりアオコ全体が沈みにくくなり、アオコが肥大化するとともに、バイオフィームも厚く堆積する。バイオフィームは主に光合成と窒素源による糖質、アミノ酸、有機酸、脂肪酸等の内因性からなる代謝産物で構成されており、分解されにくく難分解性物質による新たな水質汚濁源として注目されている。*Microcystis* は、7種のアミノ酸からなる無毒あるいは有毒のミクロキスチン(microcystin)を生合成するが、その同族体の microcystin-LR は肝臓に特異的に取り込まれ、青酸カリの200倍にも達する強い毒性を有する二次代謝産物である。microcystin は細胞内では異化・分解するが、溶出すると異化・分解されずほとんどが留まるため、バイオフィームが有毒化する。

このように、アオコ形成種の *Microcystis* は、アオコの有害化にかかわる多様な二次代謝産物を細胞が有するさまざまな経路から産生していることが明らかとされつつある。二次代謝産物は細胞のふるまいによって生合成される。よって、メタボロミクス(生体の内因性代謝産物の同定・定量)の技術を用いて二次代謝産物を包括的に解析することで、アオコ形成に至るメカニズムの観察が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

アオコが生合成する microcystin は世界中の水資源の質を脅かしており、アオコが排出するバイオフィームは難分解性物質として湖底に蓄積するとともに取り込まれている *Microcystis* 細胞が越冬するための機能を有している。アオコがかかわる水資源の質の問題は、これらの要因について深く理解することが解決の糸口となる。

バイオフィームは細胞を紫外線と乾燥から守り空胞機能高めるとともに細胞の栄養繁殖や二次代謝産物である microcystin 等の毒素の内包にとって有利に働くため、アオコの肥大化や有害化が生じやすい。シアノバクテリアを含む藻類における代謝産物の検出・同定はその生態を理解するうえで極めて有用である。*Microcystis* については、貯水湖の水質保全の側面からもその研究成果が待たれている。本研究は、これまで断片的な観測で留まっていた *Microcystis* の代謝産物をメタボロミクスの技術により一斉検出し、ア

オコが有害化するに至る有害アオコ形成メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 代謝産物の測定

アオコを形成する前の小群体(100 μ m-500 μ m程度)の *Microcystis* およびアオコを形成した後の群体(500 μ m<)についてメタボローム解析を行った。環境中から採取したアオコは *Microcystis* 細胞の前処理スキームを行い、サンプルを適切に調整した。サンプルの代謝産物の測定には、主に質量分析計を用いた。細い管のキャピラリーを用いて電気泳動を行うことにより、細胞の液胞中で混合物として存在する代謝産物を分離し、次に分離した代謝産物をイオン化して、最終的に質量分析器(キャピラリー電気泳動質量分析計装置)によって検出した。

(2) データ解析

検出されたピークと一致した代謝産物に対してサンプル間の変動求めた。各種データベースよりシアノバクテリアの代謝経路を確認し化合物データをあてはめた。サンプル間の特徴の抽出には主成分分析およびクラスター解析を用いた。

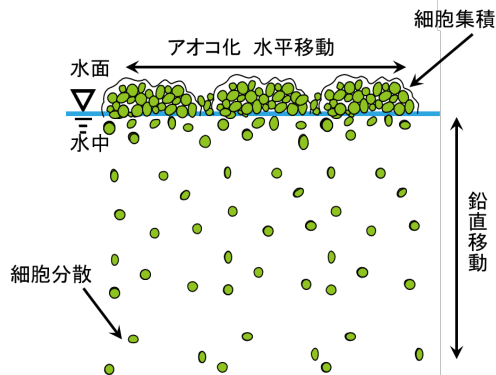


図1. アオコ化する *Microcystis* 細胞

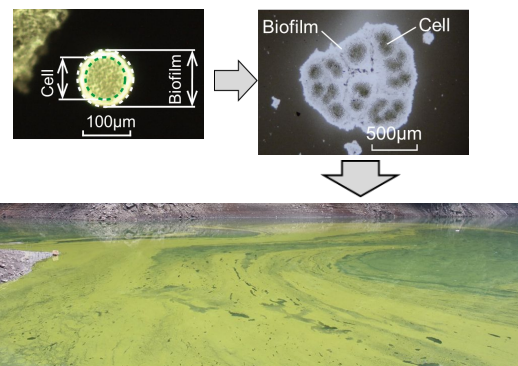


図2. 細胞とバイオフィームから形成されるアオコ

4. 研究成果

アオコを形成する前のサンプリングは、採水時刻と水深を変えた6群(n=3)とした。その6群については主成分分析した(図3)。主成分1(34.6%)は、0地点で水面(午前10時,午後2時,午後4時)と水中(午後2時,午後4時,午前2時)とではっきりと分離した。また、主成分2(15.9%)では、水中において昼間(午後2時,午後4時)と夜間(午前2時)とで分離した。*Microcystis*は酸素発生型光合成藻類であり、本メタボローム解析の結果からは*Microcystis*細胞の代謝の変動は光合成あるいは細胞が位置する水位において支配的であることが示唆された。

水面において特に高い値をとった代謝産物は核酸関連(AMP,UDP等)(図4)であり、一方、水中においてはアミノ酸(Arg,Ala)(図5)が高い値をとった。20種類のアミノ酸のうち、その多くは夜間を除いて水中で高い値を示した。毒素 microcystin はノンリボソームペプチド物質であり、アミノ酸の濃度に依存していることが考えられる。一方、水面で高い値を取った核酸はアミノ酸を材料にして合成されるが、水面のアミノ酸は低い値を取っていた。これらのことから、水面と水中を比較した場合、microcystin と核酸を生合成する材料となるアミノ酸の多くは水中で生合成され、そのアミノ酸を材料に水面で microcystin あるいは核酸が生合成されていることが推測された。

Microcystis のエネルギー源である高エネルギー化合物(ATP)は水面で高く、光合成によるATPの生合成が進んでおり、午前10時~午後4時にかけて徐々に増加した。日射のピークは通常午後2時であることから、午後4時に最大になった理由には、ATPの蓄積あるいはエネルギー放出の鈍化が考えられる。午後4時の水中ではアミノ酸が特に増加していたが核酸代謝の変動はほぼ生じていない。このことは、同化に対して異化が進んでいることを示唆するものであり、*Microcystis*細胞は午後4時に向かって、細胞増殖に関する代謝の機能を低下させていくことが代謝産物の変化から確認できた。一方、アオコを形成した後のサンプルは、午前2時の水中を除いてATPが高いまま推移した。アオコを形成する前とアオコを形成した後を比較してATPの増減リズムが異なっており、代謝産物の異化・同化と深く関係があることから、代謝産物の測定から有害アオコの形成メカニズムを追うことに対して情報の限界があった。

*Microcystis*細胞は、代謝経路間での流れを時間帯あるいは水深によってこまめに調整しており、さらに、アオコを形成する前と形成した後も異なっていた。そのことがアオコの有害化や形成の予測を難しくしている要因であると考えられた。

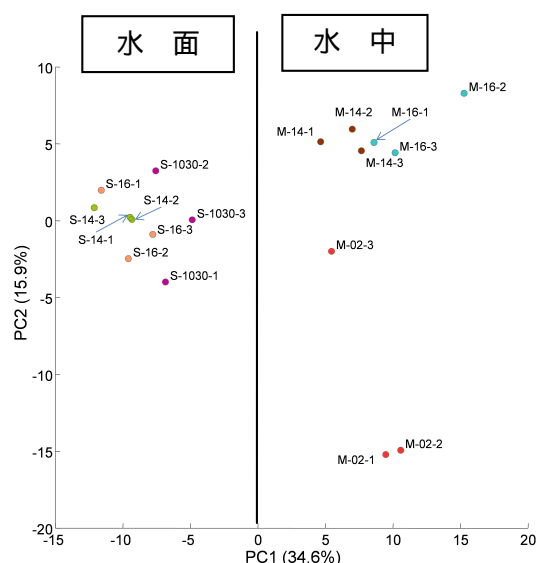


図3. 代謝産物の主成分解析

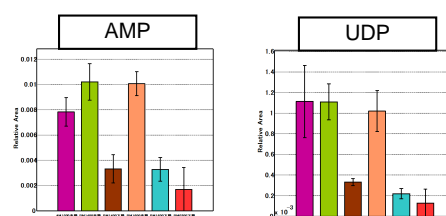


図4. 水面の*Microcystis*に影響する代謝産物

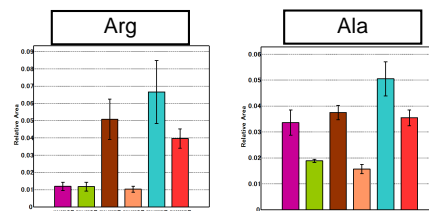


図5. 水中の*Microcystis*に影響する代謝産物

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. Ikuyo Makino, Yuji Yahagi, Takahiro Nakayama, Atsushi Kobayashi, Change in the chemical ecology of blue-green algae during periods of active growth, Lakes & Reservoirs: Research & Management, 査読有り,印刷中,2017.
2. 牧野育代, 矢作裕司: 集水域を対象とした *Anabaena* と *Microcystis* における流入起源の推定,環境と安全,査読有り,第7巻,3号,P.213~P.219,2016.
<http://doi.org/10.11162/daikankyo.16G0701>

[学会発表](計 1件)

1. Ikuyo Makino, Yuji Yahagi, Takahiro

Nakayama , Emission Point Estimation of Micropollutant Loads in Water Resource Area, 9th IWA Specialist Conference on Assessment and Control of Micropollutants and Hazardous Substances in Water, Nov22-Nov25, Singapore, 156, CD-ROM, 2015.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 育代 (MAKINO, Ikuyo)

東北大学・環境・安全推進センター・助教

研究者番号 : 00542060