

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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21310049

研究課題名（和文） 微生物による藍藻産生毒素分解機構の解明とその水環境修復への利用

研究課題名（英文） Elucidation of microbial cyanotoxin degradation mechanism and use the knowledge for aquatic environment treatment application

研究代表者

杉浦 則夫 (SUGIURA NORIO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：10302374

研究成果の概要（和文）：

ミクロシスチン分解菌が水環境における主な分解者であることを強く推察するデータを得た。その分解菌の *MlrA* と *MlrB*, *MlrC* が担う分解機構を明らかにするとともにその遺伝子の発現は, Adda (*mlrA* と *mlrB* 遺伝子に対して) およびミクロシスチン環状構造 (*mlrC* 遺伝子に対して) により誘導されることを世界で初めて明らかにした。さらに浄水処理過程での生物膜処理法がミクロシスチンを効果的に分解し上水への混入を防いでいることを明らかにした。また, これまでの知見を利用し, 新規水環境修復技術となる藍藻類の増殖抑制技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we revealed enzymatic pathway of microbial microcystin degradation in microcystin-degrading bacterium. The abundance of *mlrA* gene in aquatic environment strongly related to microcystin concentration, thus microcystin-degrading bacteria play a key role in microcystin degradation. Moreover, we confirmed that Adda induce expression of *mlrA* and *mlrB*, and cyclic structure of microcystin relate to expression of *mlrC*. Finally, we have constructed new water treatment apparatus using electrochemical degradation without electrolyte. The apparatus inhibit toxic cyanobacteria growth, but do not inhibit other organism, such as animal plankton and fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総 計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：環境修復学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術、生物膜法

1. 研究開始当初の背景

世界各国で問題が顕在化している水質汚濁の進行は、別名「水の世紀」と呼ばれる21世紀の大きな課題である。特に人口増に伴い淡

水資源の需要は増すばかりであり、貴重な淡水資源を確保・保全するための水質汚濁対策は緊急かつ切実な問題となっている。湖沼な

ど閉鎖性淡水水域の富栄養化はアオコ（ミクロシスティス属等のラン藻類の異常増殖）を引き起こし、景観悪化、悪臭発生、魚類死滅、浄水障害といった問題を発生させる。これらに加え、ラン藻類が産生する毒素

（ミクロシスチン）による人畜への被害が、アオコ発生水域で大きな問題となっている

（Skulberg et al. 1984 他）。ラン藻類が産生するミクロシスチンは哺乳類に対する強力な肝臓毒であり、急性毒性は青酸カリの100倍にも相当する。さらに、発ガンプロモーターとしての作用の報告もあり、急性毒性・慢性毒性の両方での人体への影響が危惧されている（Dawson, 1998）。このため、世界保健機関においても水源の暫定規制基準値1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ が設定され、世界各国へ対策を講じるよう勧められている。また、ミクロシスチンが植物の生育にも影響を与え、生物濃縮される可能性も近年指摘されている（Saqrane et al. 2007）。日本国内においても、霞ヶ浦をはじめとして諏訪湖、琵琶湖など代表的なアオコ発生湖沼においてミクロシスチンは高濃度で検出されている。たとえば霞ヶ浦においては、7月から8月にかけて1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ という高濃度まで産生された後、9月に急激にその濃度が減少することが代表者らにより報告されている。これまでにラン藻類の体内でミクロシスチンが自己分解している可能性も報告されているが、ラン藻細胞から溶出した高濃度ミクロシスチンが水環境中で急速に分解される機構は明らかにされていない。一般的に、水域での化学物質消失には、希釈、光分解、pH 変化影響などの物理化学的分解、化学物質同士の包合体形成による未知物質への変化、他物質への吸着、微生物による生分解が関与する。ミクロシスチンは特殊アミノ酸を含む環状構造を持つ物質で、物理化学的に安定であることが確認されている。さらに代表者らのグループにより既存の各種タンパク質分解酵素によってもほとんど分解されないことが明らかにされている（Okano et al. 2006）ことから、環境中で何らかの特殊な生分解を受けて消失しているのは間違いない。ミクロシスチンの湖沼内での動態に関する研究から、ミクロシスチンの消失には産生量変化との間にタイムラグが認められている。このことは、水中にミクロシスチンを特異的に分解する微生物が存在することが示唆するものであり、実際に、これまでにミクロシスチンを特異的

に分解する細菌は代表者らが単離したものを含め9株、種属が未同定なものを含めると合計12株単離されている。世界で初めて報告されたミクロシスチン分解菌であるMJ-PV株では、実験室内でそのミクロシスチン分解機序が解析され、環状ミクロシスチンは鎖状ミクロシスチン、tetra-peptideを介してさらに小さなペプチドやアミノ酸まで分解されることが明らかにされた（Bourne et al. 1996）。しかしながら、天然水環境中でのミクロシスチン分解機序の解明に関する研究はほとんど進んでいない。また、ミクロシスチン分解産物の毒性試験から、その毒性が元のミクロシスチンに比べて急激に減衰することが報告（Goodman et al. 1999 他）されていることから、浄水処理でのミクロシスチン除去にミクロシスチン分解菌を用いる有効性が示唆されているがその研究も進んでいない。環境微生物がもつ難分解汚染物質の分解機構を解明し、その分解機構にかかわる分解酵素遺伝子の発現を制御できれば分解活性効率を高めることが可能である。従って、微生物の持つ分解酵素遺伝子の制御による環境浄化の技術開発は淡水環境の持続的利用を考慮した場合、きわめて重要な技術開発課題であるといえる。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究成果を元に、水環境中でのミクロシスチン分解機序の詳細の解明、自然水域におけるミクロシスチン分解能の評価、ミクロシスチン分解酵素遺伝子群の分解菌細胞内での発現解析、その成果を利用して安定的で高効率のミクロシスチン生物処理系の構築を目的に実施した。

3. 研究の方法

（1）単離分解菌の特性解析

ミクロシスチン分解菌が保有する、ミクロシスチン分解遺伝子群の塩基配列解析をインバースPCR法により実施した。実施後、それぞれの遺伝子を大腸菌に組み込み発現させ、ミクロシスチン分解における役割をLC-MSを用いて解析した。

遺伝子の発現解析においては、各増殖期やミクロシスチンとその分解産物をそれぞれ分解菌に暴露させた時の全RNAを抽出し、ミクロシスチン分解酵素遺伝子群（*mlrA-mlrC*）を標的として定量PCR法により解析した。

（2）環境中の分解菌の挙動

基本水質および定量PCR法による全細菌、有毒藍藻類数、ミクロシスチン分解菌数を解

析するとともに、ミクロシスチン濃度を分析した。モニタリング対象は、霞ヶ浦およびタイ国内の養魚池、浄水場で実稼働中の生物学的浄水処理装置とした。

(3) 新規水環境修復技術の開発

有毒アオコ発生時において浄水処理過程での浄水処理コストは増大するため、水源で直接有毒アオコを発生抑制する方法が求められる。本研究では、電気化学処理に着目し、淡水において電解質がなくても電気分解可能な装置を開発し、その効果を評価した。

評価は、有毒藍藻細胞密度、ミクロシスチン濃度、微小動物プランクトン密度とした。

4. 研究成果

(1) C-1株の特性解析により、C-1株は*Sp hingopyxis* sp. の耐アルカリ性細菌であり、既に保有しているMD-1株とは異なる性質をもっていることがわかった。次に、Inverse PCR法により既知配列周辺 (*mlrA*) の塩基配列を解析したところ、MD-1株及びC-1株ともに既に報告があるミクロシスチン分解酵素遺伝子群 (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC*, *mlrD*) のみならず2つの遺伝子を分解酵素遺伝子群周辺に保有していることを明らかにした。そこで、それらをそれぞれ*mlrE*, *mlrF*と名付けた。次に、同定したミクロシスチン分解酵素遺伝子群 (*mlrA*, *mlrB*, *mlrC*, *mlrD*) を個別に大腸菌に導入し発現させミクロシスチン分解特性を解析し、ミクロシスチン分解機序を明らかにした。さらに、ミクロシスチンからその分解産物を単離取得する手法を開発した。ここで*mlrD*は、ミクロシスチン分解に直接関与しないことがわかり、遺伝子データベース上の既知遺伝子の塩基配列との相同性検索からミクロシスチンやその分解産物の取り込みに関与することが考えられた。

ミクロシスチン分解酵素遺伝子群の発現解析では、ミクロシスチン分解酵素遺伝子 *mlrA*, *mlrB*, *mlrC* は対数増殖期中期に発現量が最大となることがわかった。さらに、ミクロシスチンやミクロシスチン分解産物はミクロシスチン分解酵素遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。すなわちミクロシスチン分解菌は連鎖反応的にミクロシスチンを分解することが示された。

(2) ミクロシスチン分解に関与する微生物群集の動態解析では、ミクロシスチン初分解酵素遺伝子 *mlrA* と標的とした定量PCR法によりミクロシスチン分解菌は季節によらず水環境および生物学的浄水処理生物膜中に存在していることを明らかにし、越冬したミクロシスチン分解菌が夏期の有毒アオコ発生時に応答してミクロシスチン分解を行うことが推察された。さらに*mlrA* 遺伝子量とミクロシ

スチン分解活性に正の相関があることを明らかにし、ミクロシスチン分解は、1つの遺伝子で1つの事象を追えることがわかった。そこで、浄水場で導入されている生物膜法の処理施設のミクロシスチン分解能を評価した。結果、生物膜法はミクロシスチンを分解し、上水へのミクロシスチン混入を阻止する有効な手段となっていることを示した。また安定で高効率のミクロシスチン生物処理系の構築のために、浄水場の生物膜法処理施設から生物膜を採取し、様々な環境因子におけるミクロシスチン分解活性を分析した。その結果、硝酸態窒素濃度によりミクロシスチン分解活性が亢進するが、リン酸態リン濃度によってはその活性が阻害されることがわかった。また、ミクロシスチン以外の炭素源がある場合においてもその活性が阻害されることがわかった。以上の知見がどのような機構で起きているのかは未解明であり、この未解明な部分を明らかにしていくことは、ミクロシスチン生物処理における分解活性の制御法の構築につながる。

一方、初夏のアオコ発生からその消失までの期間に現地調査(霞ヶ浦)を実施し、試水中の定量PCR法によるミクロシスチン分解菌の動態解析とミクロシスチン濃度分析を行った。結果、比較対象としたタイ王国の養魚池よりも霞ヶ浦の有毒アオコの方がミクロシスチン濃度は高かったため、環境因子が産生能に関与することがわかった。またミクロシスチン分解菌はミクロシスチン濃度依存的にポピュレーションを変動させることがわかった。

(3) 新規水環境修復技術の開発では、環境低負荷・低エネルギーで純酸素を発生させる装置を開発した。この装置は、ミクロシスチンを分解可能であるとともにミクロシスチン産生の*Microcystis*属の増殖を抑制させることができた。また、微小動物プランクトンや魚類に対する毒性影響の解析を実施し、増殖や生殖に影響はみられていない。

以上から、ミクロシスチン分解菌によるミクロシスチン分解機構についての知見を多く得るとともに、環境中でミクロシスチン分解菌が主にミクロシスチン分解を担っている事や浄水処理過程での生物膜処理法がミクロシスチンを効果的に分解し上水への混入を防いでいることを明らかにした。さらに、省エネルギー型の新規水処理装置を開発した。

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 8 件)

1. Maseda H., Doi Y., Okano K., Sugiura N., Kobayashi M.: Rapid and high efficiency transformation of *Sphingomonas* and *Sphingopyxis* by electroporation using frozen cell suspensions, *Journal of Bioindustrial Science* 1: 1-4 (2012) 有
2. Li J., Shimizu K., Maseda H., Lu Z., Utsumi M., Zhang Z., and Sugiura N.: Investigations into the biodegradation of microcystin-LR mediated by the biofilm in wintertime from a biological treatment facility in a drinking-water treatment plant, *Bioresource Technology* 106: 27-35 (2012) 有
3. Shimizu K., Maseda H., Okano K., Itayama T., Kawauchi Y., Chen R., Utsumi M., Zhang Z., and Sugiura N.: How microcystin-degrading bacteria express microcystin degradation activity, *Lake & Reservoirs: Research and Management* 16: 169-178 (2011) 有
4. Li J., Shimizu K., Zhou Y., Utsumi M., Sakharkar K. M., Zhang Z., Sun H., and Sugiura N.: Biodegradation of microcystin by bacterial communities co-existent with flagellate *Monas guttula* and concurrent succession of the community structures, *Journal of Water Supply* 60: 352-363 (2011) 有
5. Li J., Shimizu K., Sakharkar K. M., Utsumi M., Zhang Z., and Sugiura N.: Comparative study for the effects of variable nutrient conditions on the biodegradation of microcystin-LR and concurrent dynamics in microcystin-degrading gene abundance, *Bioresource Technology* 102: 9509-9517 (2011) 有
6. Li J., Shimizu K., Utsumi M., Nakamoto T., Sakharkar M. K., Zhang Z., and Sugiura N.: Dynamics of the functional gene copy number and overall bacterial community during microcystin-LR degradation by a biological treatment facility in a drinking water treatment plant, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111: 695-701 (2011) 有
7. Jimbo Y., Okano K., Shimizu K., Maseda H., Fujimoto N., Utsumi M., and Sugiura N.: Quantification of microcystin-degrading Bacteria in a Biofilm from a Practical Biological Treatment Facility by Real-time PCR, *Journal of Water and Environment Technology* 8: 193-201 (2010) 有
8. Okano K., Shimizu K., Kawauchi Y., Maseda H., Utsumi M., Zhang Z., Neilan B., and Sugiura N.: Characteristics of a microcystin-degrading bacterium under alkaline environmental conditions, *Journal of Toxicology* 2009, doi:10.1155/2009/954291 有

[学会発表] (計 25 件)

1. Gao Y., Shimizu K., Utsumi M., Sugiura N.: Inhibition on *Microcystis aeruginosa* growth and microcystins production in oxygen production system using a new electrolysis cell, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 東洋大学白山第二キャンパス
2. 赤迫春菜、清水和哉、李潔明、内海真生、杉浦則夫: 生物膜法における microcystin 分解および分解酵素遺伝子の動態解析, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 東洋大学白山第二キャンパス
3. 崔海龍、高宇、清水和哉、内海真生、杉浦則夫: 電解酸素曝気が藻類の増殖に及ぼす影響評価, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月 16 日, 東洋大学白山第二キャンパス
4. 古澤文章、板山朋聡、内海真生、杉浦則夫: 日本とタイ水域における microcystin の合成および分解に関する遺伝子 (*mcy*, *mlr*) の比較解析, 第 46 回日本水環境学会年会, 2012 年 3 月 14 日, 東洋大学白山第二キャンパス
5. Sugiura N., Itayama T., Iwami N., Maseda H., and Shimizu K.: Problems of water supply relevant to Global Warming, *The Fourth International Fisheries Conference 2011*, 2011 年 12 月 1 日, Maejo University in Thailand
6. Shimizu K., Maseda H., Okano K., Hiratsuka T., Jimbo Y., Xue Q., Itayama T., Utsumi M., Zhang Z., and Sugiura N.: Determination of the microcystin-LR degrading genes, *mlrAs* on biofilm in water purification plant, *The Fourth International Fisheries Conference 2011*, 2011 年 12 月 1 日, Maejo University in Thailand

7. Furusawa F., Shimizu K., Whangchai N., Itayama T., Utsumi M. and Sugiura N.: Dynamics of microcystin production *mcy* gene and microcystin degradation *mlr* gene, *The Fourth International Fisheries Conference 2011*, 2011 年 12 月 1 日, Maejo University in Thailand
8. 赤迫春菜、清水和哉、李潔明、内海真生、杉浦則夫: 生物学的処理法における microcystin 分解活性および分解酵素遺伝子の挙動解析, 日本水処理生物学会 第 48 回大会, 2011 年 11 月 17 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
9. 古澤文章、板山朋聡、岩見徳雄、清水和哉、Niwooti Whangchai、Chayarat Pleumsumran、Sirapran Fakrajang、Ruenkeaw Praphrute、Redel Gutierrez、Khomsan Ruangdet、Korntip Kannika、内海真生、杉浦則夫: 国内水域とタイ北部水域の microcystin 産生能の比較解析, 日本水処理生物学会 第 48 回大会, 2011 年 11 月 17 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
10. 崔海龍、高宇、清水和哉、内海真生、杉浦則夫: 電解酸素曝気環境下での藻類の増殖特性に関する影響評価, 日本水処理生物学会 第 48 回大会, 2011 年 11 月 17 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
11. 小林宏聡、清水和哉、白井昭博、大政健史、杉浦則夫、間世田英明: ミクロシスチン分解関連タンパク質 MlrB の局在と機能解析, 日本水処理生物学会 第 48 回大会, 2011 年 11 月 17 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
12. 清水和哉、間世田英明、岡野邦宏、内海真生、張振亜、杉浦則夫: 有毒藍藻産生物質ミクロシスチン分解細菌の分解機構の解析, 日本農芸化学会関東支部 2011 年度大会, 2011 年 10 月 15 日, 東洋大学板倉キャンパス
13. Kobayashi H., Shimizu K., Zhang Z., Sugiura N., Omasa T., and Maseda H.: Characterization of MlrB involved in degradation of cyanobacterial toxin microcystin LR, *Doctoral Forum of China and the 4th China - Japan Graduate Student Forum*, 2011 年 9 月 25 日, Chinese geoscience University, Beijing in China
14. Akasaka H., Shimizu K., Li J., Utsumi M., and Sugiura N.: Study of biological ミクロシスチン degradation at biological treatment facility in a water purification plant, Japan, *Doctoral Forum of China and the 4th China - Japan Graduate Student Forum*, 2011 年 9 月 25 日, Chinese geoscience University, Beijing in China
15. Shimizu K., Maseda H., Okano K., Itayama T., Utsumi M., Zhang Z., and Sugiura N.: Expression of microcystin degradative activity in microcystin-degrading bacterium, *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress*, 2011 年 9 月 9 日, Sapporo Convention Center
16. Gao Y., Xue Q., Omori K., Shimizu K., Utsumi M., Sugiura N.: Application of Oxygen Productive Electrode (OPE) to the Toxic Cyanobacteria Inhibition in water treatment, 日本水環境学会, 北海道大学, 2011 年 3 月 20 日
17. 大森啓、高宇、崔海龍、清水和哉、内海真生、杉浦則夫: 水環境生態系に及ぼす電解酸素の影響評価, 日本水環境学会, 北海道大学, 2011 年 3 月 20 日
18. 赤迫春菜、清水和哉、李潔明、内海真生、杉浦則夫: 生物処理槽におけるミクロシスチン分解能および分解酵素遺伝子の挙動解析, 日本水環境学会, 北海道大学, 2011 年 3 月 20 日
19. 清水和哉、星麻里恵、伊藤聡史、間世田英明、岡野邦宏、陳榮志、内海真生、張振亜、杉浦則夫: microcystin 分解産物の特性解析, 日本水環境学会, 北海道大学, 2011 年 3 月 20 日
20. 清水和哉、星麻里恵、伊藤聡史、間世田英明、岡野邦宏、陳榮志、内海真生、張振亜、杉浦則夫: ミクロシスチン分解産物の特性解析, 日本水処理生物学会, 2010 年 11 月 18 日, 筑波大学大学院
21. 大森啓、清水和哉、高宇、内海真生、杉浦則夫: 電解酸素発生装置を用いた純酸素曝気による水質改善手法の検討, 日本水処理生物学会, 2010 年 11 月 18 日, 筑波大学大学院
22. Li J., Shimizu K., Utsumi M., Sugiura N.: Biodegradation of ミクロシスチン s by the bacterial communities symbiotic with microflagellate *Monas guttula*, 日本水処理生物学会, 2010 年 11 月 18 日, 筑波大学大学院
23. Gao Y., Shimizu K., Omori K., Xue Q., Utsumi M., Sugiura N.: Application of Oxygen Productive Electrode (OPE) in water treatment, 日本水処理生物学会, 2010 年 11 月 18 日, 筑波大学大学院
24. Shimizu K., Okano K., Maseda H., Kawauchi Y., Utsumi M., Zhang Z. and Sugiura N.: Finding of microcystin-degrading Bacterium and Elucidation of Its Degradation

Mechanism, 13th World Lake Conference,
Key note presentation, 2009 年 11 月 3
日, 中華人民共和国、武漢

25. 清水和哉、間世田英明、岡野邦宏、内海真生、杉浦則夫: 藍藻由来毒性物質 microcystin 分解酵素遺伝子の機能解析, 日本水処理生物学会, 2009 年 11 月 12 日, 高知県高知市・高知市文化プラザかるぽーと

〔その他〕

ホームページ

<http://nc.bsys.tsukuba.ac.jp/Lab-Top/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

内海 真生 (UTSUMI MOTOO)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号: 60323250

間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI)
徳島大学大学院・ソシオテクノサイエンス
研究部・准教授
研究者番号: 10372343

岡野 邦宏 (OKANO KUNIHIO)
秋田県立大学・生物資源学部・助教
研究者番号: 30455927

清水 和哉 (SHIMIZU KAZUYA)
東洋大学・生命科学部・助教
研究者番号: 10581613