

落葉広葉樹枯葉部抽出液による *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制および光合成阻害について

日本大学理工学研究科 学生会員 ○島田浩司・喜多延政
 日本大学理工学部 正会員 吉田征史・松島 眸
 日本大学理工学部 非会員 浅田泰男

1. 研究背景

閉鎖性水域の富栄養化に伴い発生するアオコにより、microcystin などの毒性物質が水道水源へ溶出する問題が懸念されている。しかし、現在行われているアオコ対策は経済的、技術的課題が多く有効なアオコ対策には至っていない。そこで、近年注目されている方法としてホザキノフサモ¹⁾ や茶²⁾ などの植物を用いたアオコの増殖抑制があり、これらの方法は自然由来の成分を用いているため新たな環境負荷になり難いと考えられる。そこで我々は落葉広葉樹の枯葉を用いて *Microcystis aeruginosa* (以下 *M.a.*) の増殖抑制効果を検討したところ、縮合型タンニン量を指標とし、枯葉から溶出する成分の増加に伴い増殖抑制効果を示すことが確認された³⁾。しかしその具体的なメカニズムは不明である。

一方、タンニン的一种であるエピガロカテキンガレートは、グラム陰性細菌の細胞膜を破壊するとの報告がある⁴⁾。*M.a.* もグラム陰性細菌であるため、同様に細胞膜への作用も考えられる。藍藻類は細胞膜付近に光合成器官が存在しているため *M.a.* の増殖抑制メカニズムが細胞膜への作用に伴う光合成阻害である可能性が考えられる。

2. 研究目的

落葉広葉樹枯葉部を DI 水に浸漬し、成分を溶出させた溶液 (以下、抽出液) による *M.a.* の光合成阻害効果を確認することで、*M.a.* の増殖抑制メカニズムが光合成阻害にあるかを確認する。更に、既往の研究より得られた細胞増殖率との比較を行い光合成阻害効果と細胞増殖抑制効果との関連性の検討を行ない、光合成阻害が細胞増殖抑制効果の要因であるかの検討を試みた。

3. 試験方法

本試験では国立環境研究所から購入した *M.a.* (NIES102 株) を、M-11 培地にて 7 日間前培養したものを用いた。枯葉抽出液の作成にはサクラ、トウカエデ、クヌギを用い、これらの試料を風乾状態で室内保存したものを食品用ミキサーにて 15 秒間破碎後、蒸留水 : 枯葉 = 50 (ml) : 0.5~2.0 (g) の割合で密栓した容器内にて浸漬、7 日間室温で静置したものをガラス繊維ろ紙 (GF/B) にてろ過した。なお、抽出液の縮合型タンニン濃度は食品分析方法に準じたバニリン - 硫酸法にて測定し、カテキン換算量として定量した。光合成阻害試験には光合成試験装置 (図 1) を用いた (試験中は水循環装置を用いて水温約 25°C で制御)。有効容積 2.45(ml) の反応セル内に M-11 培地を 2.0 (ml) 添加後、窒素曝気により DO を 1.0 (mg/l) 以下まで低下させた後、前培養した *M.a.* を 0.4 (ml) 添加し、ハロゲンランプを用いて約 12,000lux の照度下にて *M.a.* の酸素発生速度を観察した。試験開始数分後、抽出液 0.05 (ml) を *M.a.* 細胞当りのタンニン負荷量に変動するよう添加し、抽出液添加前後の酸素発生速度の割合 (光合成活性の残存率) を算出することで光合成阻害の程度を評価した。

更に、光合成阻害試験で得られた光合成活性残存率と、既存の研究より得られた細胞増殖率が同値となるそれぞれのタンニン負荷量の比率を求めることで、枯葉抽出液を用いた *M.a.* の細胞増殖抑制における光合成阻害の影響の程度を検証した。またその結果から、植物種の相違による細胞増殖抑制効果が同様のメカニズムであるか否かを検討した。

4. 試験結果

光合成を行わせた *M.a.* に枯葉抽出液を添加すると、酸素発生速度が 81.6 (mgO₂/l.h) から 27.6 (mgO₂/l.h) に低下した (図 2)。しかし、縮合型タンニンが酸化され見かけ上酸素発生速度が低下したとも考えられる。そこで枯葉抽出液の酸素消費速度を測定し

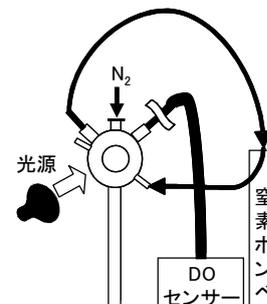


図 1 光合成試験装置

キーワード 落葉広葉樹、枯葉抽出液、*Microcystis aeruginosa*、光合成活性残存率、細胞増殖率

連絡先 〒101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14 日本大学理工学部 TEL03 (3259) 0673

た結果、 $0.72 \text{ (mgO}_2\text{/l.h)}$ と算出され (図 3)、抽出液添加前後の酸素発生速度の差 $54.0 \text{ (mgO}_2\text{/l.h)}$ と比較して極微小であった。よって上記の酸素発生速度の低下は抽出液中のタンニンの酸化による影響ではなく、抽出液成分による *M.a.* の光合成阻害であることが強く示唆された。

次に、サクラ、トウカエデ、クヌギそれぞれの抽出液を用いた光合成阻害試験の結果を図 4 に示す。これより *M.a.* の光合成活性残存率は単位細胞当りの縮合型タンニン負荷量の増加に伴い低下する傾向が確認された。これは枯葉に含まれる縮合型タンニンが *M.a.* の細胞膜および光合成器官 (特に PS II) に作用したことで酸素発生速度が低下したものと推測される。また図 4 より、落葉広葉樹の光合成阻害効果を検討すると、クヌギ、トウカエデ、サクラの順に阻害力が大きいという結果となった。以上から、比較的入手が容易である落葉広葉樹の枯葉の多くが光合成阻害効果を有する可能性があると考えられる。

さらに *M.a.* のエネルギー生産は光合成由来であるため、光合成阻害と *M.a.* の細胞増殖抑制には関連があると考えられる。その関連性を検討するため、既存の研究における *M.a.* の細胞増殖抑制試験より得られたタンニン負荷と細胞増殖率の関係 (図 5) と比較した結果、抑制効果の順位は光合成阻害試験と同様であった。(クヌギについてはデータ数が少ないため図 5 に示すことが出来なかったが、同程度のタンニン負荷量で増殖抑制試験を行った場合には、クヌギが最も増殖抑制効果が大きいことは確認している)。以上より、*M.a.* の光合成阻害効果と細胞増殖抑制には相関性があることが示唆された。また、サクラおよびトウカエデについては光合成活性残存率と細胞増殖率の両プロットが得られているため、各々の近似式から光合成活性残存率と細胞増殖率が同値となる時のタンニン負荷量の比率を求めることで図 6 を得た。図 4、5 に示したとおり、同量のタンニン負荷量においては光合成活性残存率や細胞増殖率の値がサクラ、トウカエデで異なっているが、図 6 を見ると、サクラ、トウカエデのどちらの抽出液であってもほぼ同等の比率となっている。このことは、サクラおよびトウカエデ抽出液中の増殖抑制に効いた成分・効果が同一である可能性を示唆している。つまり、今回指標とした縮合型タンニン濃度を基にタンニン負荷量を設定したが、サクラおよびトウカエデの抽出液中のタンニン組成が異なり、増殖抑制に効いている成分の組成比に従っていた可能性が考えられる。

5. まとめ

落葉広葉樹の枯葉抽出液中のタンニン類により、*M.a.* の光合成が阻害された。またサクラとトウカエデの光合成活性残存率と細胞増殖率が同値を示す時のタンニン負荷量の比率を比較すると、両者はほぼ同様の比率となった。このことは抽出液に含まれるタンニン組成は異なるが、増殖抑制効果を発現している成分の組成比 (含有率) に従っている可能性が示唆された。

参考文献: 1) 中井ら: ホザキノフサモが放出したアレロパシー物質による藍藻類 (*Microcystis aeruginosa*) の増殖抑制, 日本水処理生物学会誌, 第 34 巻, PP.159-170, 1998. 2) 笹尾ら: 茶抽出液によるアオコ増殖抑制への効果, 陸水学雑誌, Vol.62, pp.115-122, 2001. 3) 喜多村ら. (2006). 落葉広葉樹枯葉部抽出液を用いた有毒藍藻類の増殖抑制に関する基礎的研究, 環境工学研究論文集, 43, 543-549. 4) 生貝ら. Epigallocatechin gallate の膜障害作用に関する研究. 日本化学療法学会雑誌. 46, No.5, 179-183.

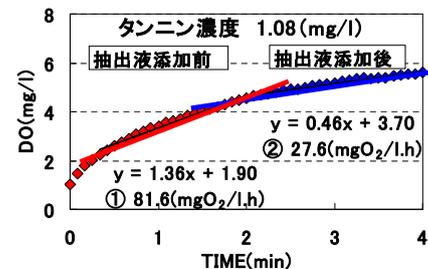


図 2 光合成阻害試験の概要

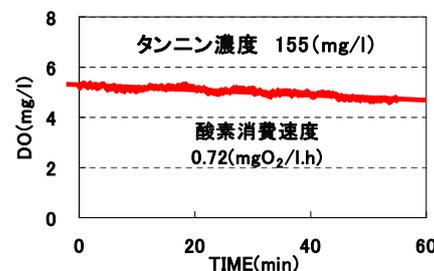


図 3 枯葉抽出液の酸素消費速度

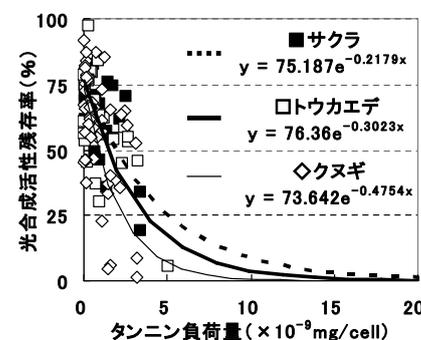


図 4 三種の抽出液を用いたタンニン負荷と光合成活性残存率の関係

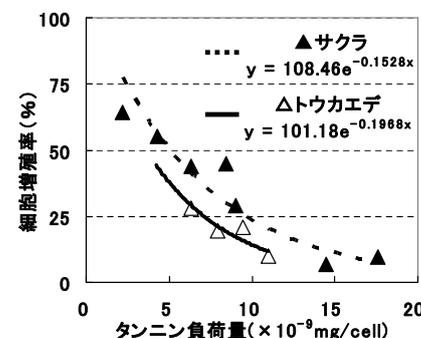


図 5 サクラとトウカエデ抽出液を用いたタンニン負荷と細胞増殖率の関係

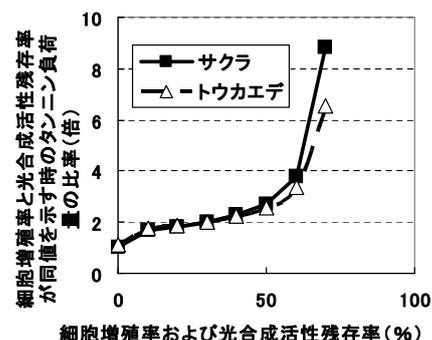


図 6 サクラおよびトウカエデの増殖抑制メカニズムの検討