

水面浮上を維持する浮遊性シアノバクテリア群の代謝解析

静岡理科大学 正会員 ○牧野 育代
 芝浦工業大学 非会員 矢作 裕司

1. はじめに

アオコの規模拡大は急速に世界的なひろがりを見せており、水資源の安定的供給に対してアオコは脅威の存在となっている。アオコの生態に関しては世界中の水資源研究者のみならず行政や企業においても関心の的であり、その解明が急がれている。アオコ（blue-green algae）は、特定の浮遊性シアノバクテリアが高密度に集積し水面に固定化された姿であり、通常、光の受益が見込まれる日中に確認できる現象である。浮遊性シアノバクテリアの浮上・沈降サイクルに関しては、日周期¹⁾や概日リズム²⁾としてよく知られており、一定のリズムで浮上・沈降を繰り返していることが明らかになった。また、アオコ現象に関しては、概日リズムと代謝産物の関係から追究したものが報告されている³⁾。このように、浮遊性シアノバクテリアは本来、夜間は水中に沈降するが、細胞増殖の安定期から衰退期にさし掛かると、夜間においても水面に浮上して留まり、その結果、浮上・沈降サイクルに乱れが生じるようになる。このようにアオコは、夜間においてもその姿を水面に維持することを踏まえれば、アオコ対策を検討するうえでも夜間観測に基づく議論は必須である。そのような背景のもと、本研究ではデータの蓄積が十分とは言えない夜間帯～明け方を含めた水面浮上を維持するアオコ様態を観察し、その代謝解析を試みた。

2. 方 法

(1) 代謝物解析検体の回収

東京都と山梨県をまたぐ貯水湖の河川流入部において 2014 年 9 月中旬に出現したアオコ様態を採取して、代謝物解析に供した。観測初日は午前中曇り、午後より晴れになった。また、最終日は台風の影響により朝のうちは小雨が降っていたが、その後、晴れ間が広がった。観測及び試験体の採取は午後から翌日の午前中にかけて行った。アオコ様態の採取は、湖沼の水面及び水中（水深 30cm）を対象に、日中（10:00）の水面、夜間（20:00）の水中 30cm、深夜（2:00）の水面及び水中 30cm、朝方（5:00）の水面及び水中 30cm の 4 パターンとし、6 群、n=3 の 18 検体についてメタボローム解析を実施した。なお、時間帯によっては水面と水中とが対になっていないが、それはメタボローム解析の条件を満たすだけの濁質（20 OD₆₀₀ 程度）を採取することができなかったためである。水面のサンプル採取はアオコ化した層をすくい取るように採水瓶に収め、水中については採水瓶を沈ませて採取した。試料は、現場でガラス繊維ろ紙（Whitman, A3）を用いてろ過した後、密閉容器に保管してドライアイス保存した。分取した各サンプルは持ち帰って顕微鏡観察し、水面及び水中 30cm においてはほぼ全て *Microcystis* 属で占められていることを確認した。また、定点観測地点より上流 2km、下流 2km のアオコ場における水面及び水中 30cm のサンプルについて顕微鏡観察し、それらの地点でもほぼ *Microcystis* 属で占められていることを確認した。

(2) CE-TOFMS による候補代謝物質の検出とデータ解析

ろ紙から生物試料を回収した試験検体は、キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）を用いて、カチオンモード、アニオンモードによる測定をいった。また、代謝物質の化学的特性と装置の設定上、検出された代謝物質の分子量の上限は 1,000 である。データは、検出されたピークを候補代謝化合物として下記の通り処理したものである。検出したピークをシグナル/ノイズ（S/N）比が 3 以上に絞って自動抽出し、質量電荷比（m/z）、ピーク面積値、泳動時間（Migration time: MT）を得た。得たピーク面積値は、相対面積値（相対面積値=目的ピークの面積値÷（標準物質の面積値×濁度））に変換した。

キーワード アオコ、浮遊性シアノバクテリア、代謝解析、夜間観測

連絡先 〒436-8555 静岡県袋井市豊沢 2200-2 静岡理科大学理工学部機械工学科 TEL 0538-45-0142

m/z と MT の値をもとに、代謝物質ライブラリ⁴⁾を用いてピークの照合・整列化を行った。また、代謝物質の化合物に関する情報は主に KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)⁵⁾より取得した。以上の作業により代謝化合物を推定した。次に、主成分分析 (SampleStat ver.3.18) を用いて検出された全ての代謝産物を対象にデータ解析し、前処理段階においてピーク単位で標準化 (平均 $\mu=0$, 標準偏差 $\sigma=1$) した。検出限界以下の代謝物質には 0 に近い極小値の浮動小数点相対精度である 2^{-52} を代入して解析対象に加えた。

3. 結果および考察

(1) 候補代謝化合物の検出

試験検体から、カチオン 96 ピーク、アニオン 126 ピーク、合計 222 ピークが検出された。これら候補代謝化合物最大 222 種、検体数 18 本を対象とした主成分得点の寄与率は、主成分 1 で 30.1%, 主成分 2 で 19.2% であり、主成分 2 までで全体の 49.3% を占めた。以下には、因子負荷量を用いて、主成分 1 の上位 20 位および下位 20 位の代謝化合物を対象に検討する。主成分 1 の上位 1 位は S-Adenosylhomocysteine (アミノ酸代謝物)、2 位は N-Acetylglucosamine 1-phosphate (リポ多糖などの原料) で、深夜 (2:00) と明け方 (5:00) は、群間でのピーク高さが水中において高い。また、日中 (10:00, 水面) は、サンプル間でのピーク高さの差が大きい傾向を示し、主成分 1 の上位は深夜～明け方の水中において多く生産される代謝物質と推測した。

主成分 1 の下位 1 位は Adipic acid (有機酸)、2 位は UTP (Uridine 5'-triphosphate, RNA 合成基質) で、水中で低く、特に深夜 (2:00) においては水面と水中とで大きな差がみられた。下位の 1 位 Adipic acid をはじめとする 5 位 Mucic acid, 14 位 Terephthalic acid, 16 位 Glycolic acid 及び 17 位 Azelaic acid は、*Microcystis aeruginosa* (NIES-843) において中間代謝産物や細胞外物質として位置付けられており、共通する物性としては高分子関係の化合物であった。また、下位 2 位 UTP をはじめとする 3 位 ATP, 5 位 CTP (Cytidine 5'-triphosphate), 11 位 dTTP (Deoxythymidine 5'-triphosphate) および 15 位 GTP (Guanosine 5'-triphosphate) は、DNA 合成や RNA 合成の基質である。残りの 10 種は、藻類代謝産物、生理活性物質、脂質などであり、水面では時間帯にかかわらず様々な代謝が生じていることが覗えた。さらに、主成分 1 の下位 1 位～20 位のうち 12 種が窒素を含まない代謝化合物であった。また、窒素が不足した状態の細胞において蓄積する 2-Oxoglutaric acid⁶⁾は深夜 (2:00) の水中のみで検出されており、比較的低分子に数えられる分子量 1,000 以下の一次代謝化合物の生合成について、アオコを形成する *Microcystis* 属は、深夜の水中において窒素不足を反映した代謝化合物の生成や代謝経路の切り替え等が生じていることが考えられる。

4. まとめ

一日の間で鉛直移動を繰り返す浮遊性シアノバクテリア群は、アオコを形成してしばらくすると水面に浮上したままの状態を維持することがある。このような状態が観測されたアオコ場を対象に、分子量 1,000 以下の候補代謝化合物を用いて主成分解析し、夜間においてもアオコ状態を維持する浮遊性シアノバクテリア群の動態について検討した。主成分 1 では、水面と水中との間にはっきりとした分離が認められており、アオコを形成する *Microcystis* 属は、生息位置 (水面あるいは水中) と代謝化合物の生成との間に強い関係性を有することが示唆された。

参考文献

- 1) Brookes, J.D. and Ganf, G.G.: Variations in the buoyancy response of *Microcystis aeruginosa* to nitrogen, phosphorus and light. *Journal of Plankton Research*, Vol.23, No.12, pp.1399-1411, 2001.
- 2) 増木 新吾, 若林 健一, 高橋 智, 別所 大, 戸島 邦哲, 國井 秀伸: 成層化したダム湖における藍藻類の鉛直移動, 水環境学会誌, 35 巻, 9 号, pp.151-157, 2012.
- 3) Lorne, J., Scheffer, J., Lee, A., Painter, M., Miao, V. P. W.: Genes controlling circadian rhythm are widely distributed in cyanobacteria, *FEMS Microbiology Letters*, Vol.189, No.2, pp.129-133, 2000.
- 4) <https://humanmetabolome.com/jp/hmtcom/wp-content/uploads/downloads/2011/12/Chapter5.pdf>
- 5) <https://www.genome.jp/kegg/>
- 6) 石川 周, 小笠原 直毅: 蛋白質核酸酵素, 53 巻, pp.1725-1731, 2008.