

琵琶湖におけるクロモ *Hydrilla verticillata* 繁茂水域及びクロモ培養水槽から検出されたアオコ形成シアノバクテリアの増殖抑制活性[#]

渡辺 真利代* 仁木 拓志*
上野 祐子** 浪越 通夫***

キーワード：アレロパシー、アオコ形成シアノバクテリア、水生植物

1 はじめに

琵琶湖は、周知の通り、日本最大の湖であり、「近畿の水がめ」とも言われる重要な水源でもある。しかし、戦後の経済発展に伴い、大量の産業・生活排水の流入を受け、富栄養化が進行した結果、琵琶湖においても頻繁にアオコの発生が観察されている。アオコとは、シアノバクテリアが大増殖し、水が変色した状態を指す。著しい場合は水面にマット状に集積（スカムと呼ばれる）することもある。アオコは景観悪化や、その分解に伴う悪臭、貧酸素水の形成等、多くの問題を引き起こす。また、アオコを形成するシアノバクテリアの中には毒素を産生する種も多く、中毒や死亡といった被害の他、発ガン促進作用も指摘されている（渡辺ら1994）。

しかし、琵琶湖においては、沈水性植物であるクロモ、ホザキノフサモが繁茂している水域には、アオコ発生が見られないという現象が観察されている。これらの水域は透明度もよく、水深が浅くなる夏季には、植物の間を泳ぎ回る魚類が観察できるほどである。沈水性植物は根から堆積物中の栄養塩を吸収できるので、これらを水中から吸収するシアノバクテリアとの間で栄養塩の競合が起こっているとは考えにくい。また、沈水性植物は完全に水没した状態で繁茂するため、ガス胞を有し高い浮上性を持つシアノバクテリアに対して、光獲得の点では不利であることから、光競合の結果として沈水性植物が勝ち残るとも考えにくい。実際、琵琶湖では他種の水生植物の繁茂帯でアオコ発生が見られる場所もある。これらのことから、クロモやホザキノフサモは何らかのアレロパシー物質を放出し、シアノバクテリアの増殖を抑えている可能性がある。ホザキノフサモについては、アレロパシー物質として、数種のポリフェノール類が単離・構

造決定されていることから（Nakai *et al.* 2000）、クロモについても同様な活性を持つ物質が放出されている可能性がある。水圏生態系におけるアレロパシー現象についての報告は少ないが、水生植物とシアノバクテリアの間のアレロパシー現象は、生態系に低負荷なアオコ防除法への応用が期待されており、近年の水圏生態化学の分野におけるホットな話題の一つとなっている。本研究では、クロモ *Hydrilla verticillata* とシアノバクテリアの間で起こっていると考えられるアレロパシー現象を、化学生態学的に解明することを目的とし、琵琶湖のクロモ繁茂水域及び琵琶湖産クロモの培養水槽水中において、アオコ形成シアノバクテリアの増殖抑制活性を持つ物質を探索した。

2 材料と方法

2.1 琵琶湖における採水と粗抽出

2002年10月12日、琵琶湖南湖のクロモ繁茂水域において、水深約1mの地点から、水中ポンプを用いて、800Lの湖水を採取した。採取した湖水は、いったんポリタンクに移した後、以下に述べるバッチ法を用いて溶存有機物の固相抽出を行った。HP-20担体（三菱化成）10Lを45Lのポリバケツ（底面に小孔を多数開け、布を敷いた物）に入れたものを固相抽出カラムとした。カラムはメタノール（20L）で洗浄した後、蒸留水（20L）で置換した。同サイズのポリバケツに上述の固相抽出カラムを重ね、ここに湖水を導入した。カラム中で湖水を静かに攪拌した後しばらく静置して抽出を行い、湖水を捨てた。この操作を繰り返し行うことによって、湖水からの固相抽出を行った。その後、カラムを蒸留水（20L）で洗浄し、中のHP-20担体をガラスカラムクロマト管

* 立正大学地球環境科学部

** 東京水産大学大学院水産学研究科海洋環境学専攻

*** 東京水産大学水産学部（現：東京海洋大学海洋科学部）

立正大学大学院地球環境科学研究科オープン・リサーチ・センター 平成14年度業績

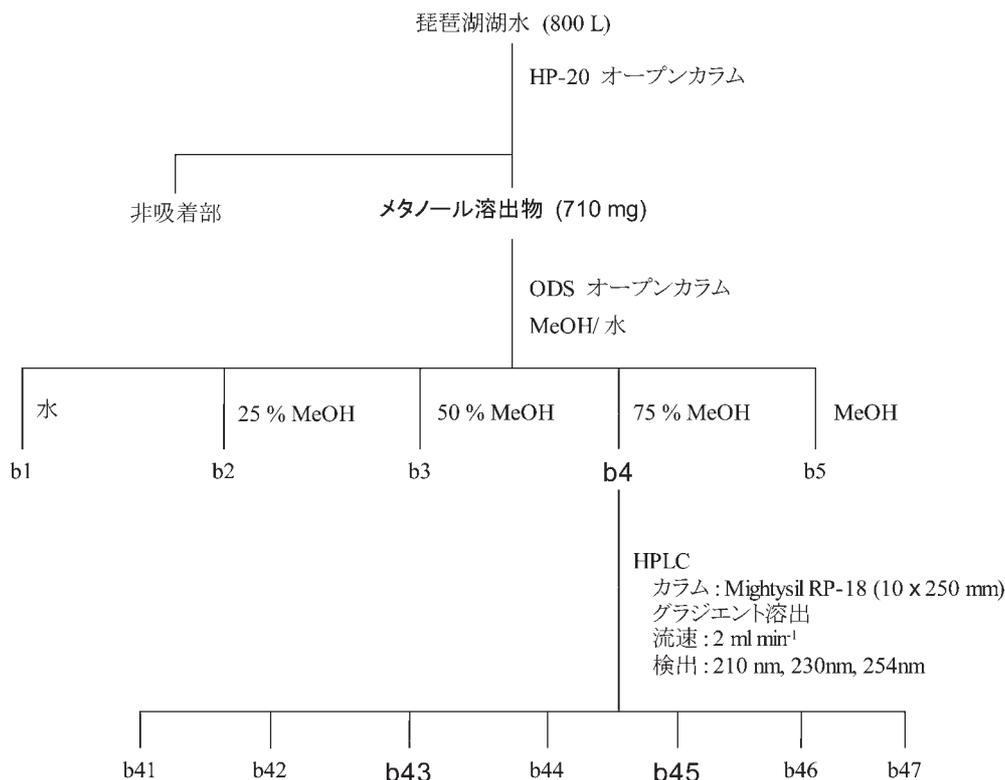


Fig. 1 : 琵琶湖湖水からのシアノバクテリア増殖抑制活性物質の分離フローチャート (太字は活性の検出されたフラクションを示す)

(5 cm i.d. × 75cm length) に移した。メタノール20Lを流すことにより、HP-20に吸着した成分の溶出を行った。溶出液は、ロータリーエバポレータでメタノールを除去した後、凍結乾燥を行って、HP-20メタノール溶出物を得た (Fig. 1)。

2. 2 クロモ培養水中からの粗抽出

琵琶湖から採集したクロモを約300Lの培養槽に入れ、MA 培地 (市村1979) でエンリッチして、雨水の入らない場所で屋外培養を行った。ただし、低水温による枯死を避けるため、秋から冬にかけては約60Lのプラスチック水槽を使用し、25、14L : 10Dの明暗周期でエアレーションをしながら屋内培養を行った。培養期間は1ヶ月以上とし、その間、混入・増殖したアオミドロはこまめに除去した。クロモ培養水槽水50Lを、Whatman GF/C フィルターで吸引る過し、試水とした。

試水中の化合物は、HP-20担体 (三菱化成) 500ml (膨潤時) を充填したオープンカラム (5 cm i.d. × 50cm length) に通すことによって固相抽出した。蒸留水 (1.5L) で非吸着成分を溶出した後、1.5Lのメタノールにより吸着した成分を溶出させた。溶出液はロータリーエバポレータを用いてメタノールを除去した後、凍結乾

燥し、HP-20メタノール溶出物を得た (Fig. 2)。

2. 3 活性成分の分離

琵琶湖湖水の HP-20メタノール溶出物を少量の蒸留水で溶解し、ODS 担体 (ODS-SS-1020T、センシュウ科学) 40g を充填したオープンカラム (2 cm i.d. × 50 cm length) に吸着させた後、蒸留水 (200ml) で洗浄した。さらに、25%、50%、75%、100%メタノール各200mlで順次溶出させた。洗浄水フラクションをb1、メタノール溶出フラクションを25%メタノール溶出フラクションから順にb2、b3、b4、b5とし、それぞれ、ロータリーエバポレータ及び凍結乾燥によって抽出物を得た。このうち、b4フラクションについては、さらにHPLCによる分離を行った。カラムには Mightysil RP-18 (10 mm i.d. × 250mm length、関東化学) を用い、流速 2 ml min⁻¹でグラジエント溶出 (0 ~ 50min : 60% 100%メタノール、50 ~ 60min : 100%メタノール) を行った。検出器にはフォトダイオードアレイ (検出波長 : 210nm、230nm、254nm) を用い、溶出液はフラクションコレクターで回収し、b41からb47までの7フラクションを得た (Fig. 1)。

クロモ培養水の HP-20メタノール溶出物も同様の操

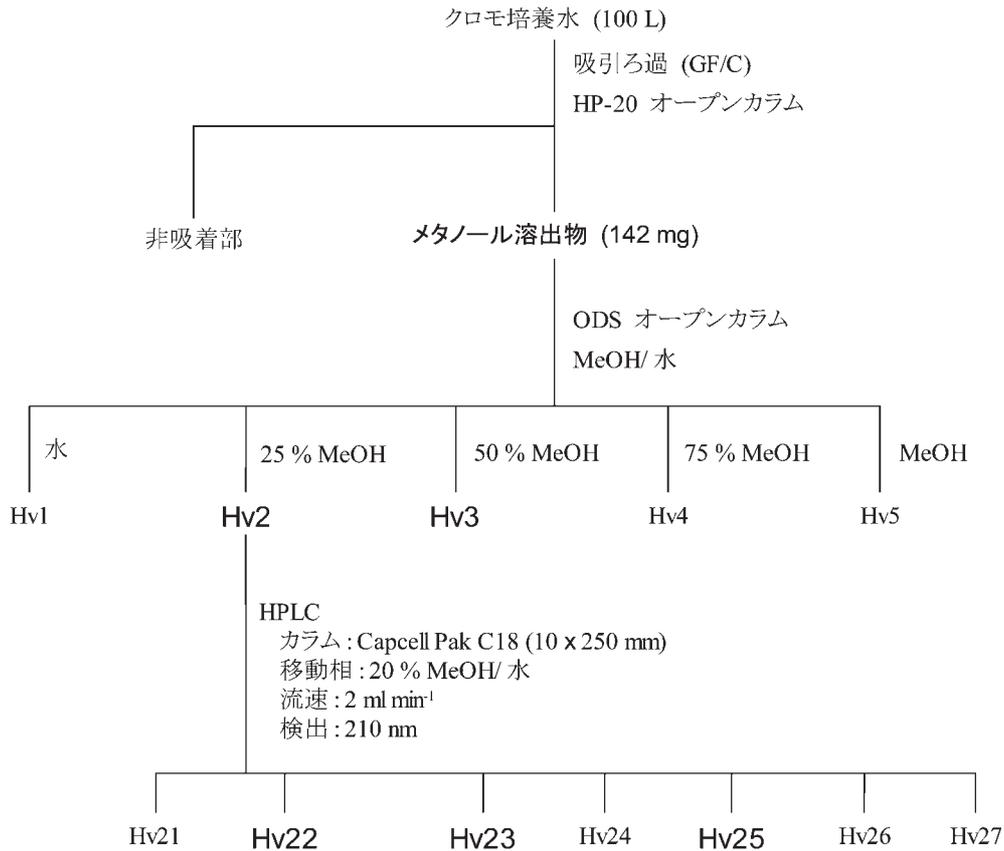


Fig. 2 : クロモ培養水からのシアノバクテリア増殖抑制活性物質の分離フローチャート (太字は活性の検出されたフラクションを示す)

作で ODS 担体 (20g) に吸着させた後、琵琶湖湖水抽出物と同様のスキームで順次溶出させた。蒸留水フラクションを Hv1、メタノール溶出フラクションを25%メタノール溶出フラクションから順に Hv2、Hv3、Hv4、Hv5 とし、それぞれ、ロータリーエバポレータ及び凍結乾燥によって抽出物を得た。このうち、Hv2 については、さらに HPLC で分離を行った。カラムには Capcell Pak C18 (10mm i.d. x 250mm length、資生堂) を用い、流速 2 ml min^{-1} で20%メタノールによって溶出を行った。検出器にはフォトダイオードアレイ (検出波長: 210nm、230nm、254nm) を用い、溶出液はフラクションコレクターで回収し、Hv21から Hv26を得た。その後、カラムに100%メタノールを流し、その溶出液を Hv27として、合計7フラクションを得た (Fig. 2)。

得られた各フラクションは、後述のアオコ形成シアノバクテリア増殖抑制試験を行い、活性の検出を行った。

2. 4 アオコ形成シアノバクテリア増殖抑制試験

抽出された化合物のアオコ増殖抑制活性は、48穴マイクロプレートを用いてアッセイした。検定藻には

Microcystis aeruginosa strain TAC20を用いた。検定藻は MA 培地を用いて予備培養を行い、使用した。検定対象となる抽出物は、エタノールを溶媒として定量的に溶解し、マイクロプレートに分注した。溶解しなかった成分については、超音波、ボルテックスミキサーで均一に分散させた後、分注した。分注後、クリーンベンチ内で静置してエタノールを完全に蒸発除去した後、アッセイ時の初期細胞濃度が $1 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ になるように MA 培地で適宜希釈した検定藻を 1 ml ずつ分注した。なお、アッセイにはマイクロプレートの中央24穴のみを用いた。マイクロプレートはプレートシールで密封し、25℃、連続光下で、マイルドシェーカーを用いて緩やかに攪拌しながら1週間培養した。培養後、各ウェルの TAC20細胞数を計数した。TAC20細胞数の計数には、Fucks-Rosenthal 型もしくは Thoma 型の血球計算盤を用いた。コントロール (エタノールのみ) の細胞数と各対象抽出物を加えた系の細胞数との差分を、コントロールの細胞数で除した値 (%表示) をもって、増殖抑制活性とした。

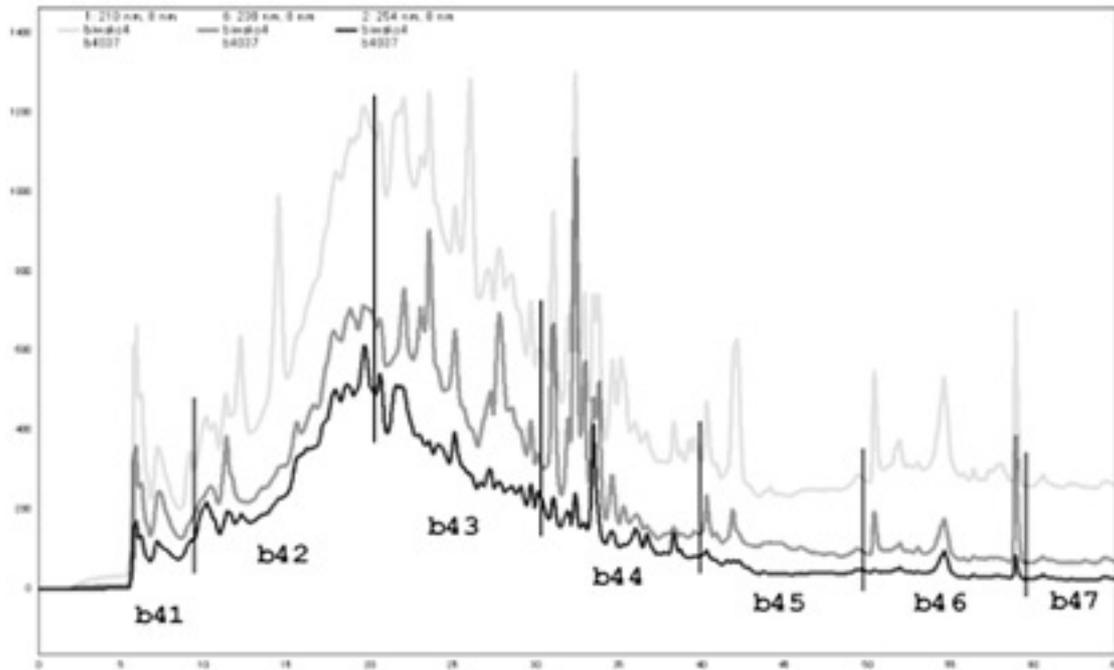


Fig. 3 : b4 の HPLC クロマトグラムと各フラクションの分取位置

Table. 1 : HP-20メタノール溶出物を ODS オープンカラムにより分離して得られた各フラクションの重量とシアノバクテリア増殖抑制活性 (琵琶湖湖水)

フラクション	b1	b2	b3	b4	b5
溶出溶媒	蒸留水	25% MeOH	50% MeOH	75% MeOH	100% MeOH
重量(mg)	163.7	226.5	91.8	33.1	17.0
増殖抑制活性(%)	-	-	-	38	-

増殖抑制試験の際の濃度：100ppm, - : 活性なし

Table. 2 : b4 の HPLC による分離で得た各フラクションの重量とシアノバクテリア増殖抑制活性

フラクション	b41	b42	b43	b44	b45	b46	b47
重量(mg)	2.8	7.7	7.0	3.8	3.4	3.3	2.3
増殖抑制活性(%)	-	-	65	-	68	-	-

増殖抑制試験の際の濃度：50ppm, - : 活性なし

3 結果

3.1 琵琶湖湖水から得られたアオコ増殖抑制活性

琵琶湖湖水からの分離フローチャートを Fig. 1 に、各フラクションの重量と活性の一覧を Table. 1 と 2 示す。800L の琵琶湖湖水から得られた HP-20メタノール溶出物は710mg であった。この溶出物のシアノバクテリア増殖抑制活性は300ppm の濃度において33%と低かった。この HP-20メタノール溶出物を ODS カラムで分離して得られた b1 から b5 の各フラクションのうち、増殖抑制活性の認められたフラクションは、75%メタノール溶出フラクションである b4 (33.1mg) のみであり、その活性は100ppm において38%であった (Table. 1)。

この b4 フラクションを HPLC でさらに分離したクロマトグラムを Fig. 3 に示す。b41から b47の各フラクションのうち、b43と b45の2つにシアノバクテリア増殖抑制活性が認められた。これらの増殖抑制活性は、50ppm において、それぞれ65%、68%と比較的高い値を示した (Table. 2)。

3.2 クロモ培養水から得られたアオコ増殖抑制活性

クロモ培養水からの分離フローチャートを Fig. 2 に、各フラクションの重量と活性の一覧を Table. 3 と 4 に示す。100L のクロモ培養水から得られた HP-20メタノール溶出物は142mg であった。この溶出物のシアノバクテリア増殖抑制活性は200ppm で33%であった。また、

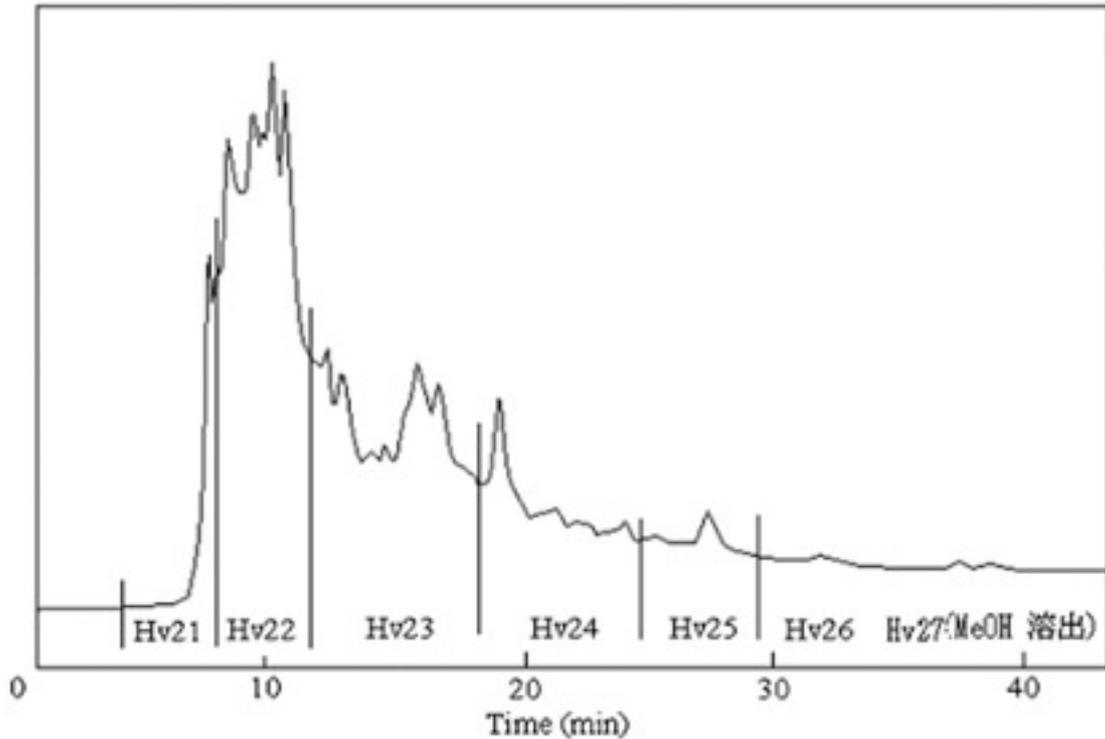


Fig. 4 : Hv2 の HPLC クロマトグラムと各フラクションの分取位置

Table. 3 : HP-20メタノール溶出物を ODS オープンカラムにより分離して得られた各フラクションの重量とシアノバクテリア増殖抑制活性 (クロモ培養水)

フラクション	Hv1	Hv2	Hv3	Hv4	Hv5
溶出溶媒	蒸留水	25% MeOH	50% MeOH	75% MeOH	100% MeOH
重量(mg)	27	46	32	13	7
増殖抑制活性(%)	-	77	10	-	-

増殖抑制試験の際の濃度：100ppm, - : 活性なし

Table. 4 : Hv2 の HPLC による分離で得た各フラクションの重量とシアノバクテリア増殖抑制活性

フラクション	Hv21	Hv22	Hv23	Hv24	Hv25	Hv26	Hv27
重量(mg)	2.8	4.8	3.2	2.6	2.3	1.4	4.5
増殖抑制活性(%)	-	83	61	-	52	-	-

増殖抑制試験の際の濃度：50ppm, - : 活性なし

この抽出物を ODS カラムに吸着させ、水 - メタノール溶媒で溶出させた Hv1 から Hv5 の各フラクションにおいて、増殖抑制活性は25%メタノール溶出フラクションである Hv2 (46mg) と50%メタノール溶出フラクションである Hv3 (32mg) に認められ、特に Hv2 では100 ppm 濃度で77%と比較的高い活性が認められた (Table. 3)。Hv3 の増殖抑制活性は100ppm において10%であった。

高い活性の認められた Hv2 をさらに HPLC で分離した結果を Fig. 4、Table. 4 に示す。得られた7フラクションのうち、Hv22 (4.8mg)、Hv23 (3.2mg)、Hv25

(2.3mg) の3フラクションに増殖抑制活性が認められた。これらの増殖抑制活性は、50ppm において、それぞれ83%、53%、62%と比較的高い値を示した。

4 考 察

本研究により、クロモ培養水と琵琶湖におけるクロモ繁茂水域から、ともにシアノバクテリアの増殖を抑制する活性が認められたことから、自然生態系にもクロモとシアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* の間にアレロパシー現象が存在する可能性が示唆された。

アレロパシー物質は植物から放出される物質であるため、生命維持に必要な一次代謝産物とは考えにくく、二次代謝産物に含まれると考えられる。従来、水生植物から抽出されたシアノバクテリア増殖抑制物質の中には、脂肪酸類 (Kakisawa *et al.* 1988)、ステロイド類 (Aliotta *et al.* 1990) 等、それ自身の生理的役割等から、アレロパシー物質としては機能しないのではないかと考えられるものもある。しかし、一方で、水生植物の生育する水中からアレロパシー物質を分離することは、水中で化合物が容易に拡散・希釈されてしまうことから、非常に困難であり、そのような報告も少ない (宝月ら1960; Sho-wen *et al.* 1991)。一方、中井らのグループによって、ホザキノフサモ *Myriophyllum spicatum* 草体及びその培養水から抽出された数種のポリフェノール類が、シアノバクテリア増殖活性を示すことが報告されている (Nakai *et al.* 2000)。フェノール性化合物は、植物細胞内のシキミ酸経路という生合成経路で合成される。また、キノンやフェニルプロパノイドもシキミ酸経路で合成されることから、中井らのグループではこれらシキミ酸経路で合成される主要な化合物についてシアノバクテリア増殖抑制活性を試験し、いくつかの物質で活性を確認している (Nakai *et al.* 2001)。しかし、シキミ酸経路は陸上植物、水生植物共に持っている生合成経路であり、アレロパシー現象を引き起こす植物に限った経路ではない。また、ポリフェノール類はさまざまな抗菌、抗藻作用が知られていることから、特異的なアレロパシー現象に関与するとは考えにくい。

本研究は、天然のクロモ繁茂水域とクロモ培養水から、ともに比較的高いアオコ形成シアノバクテリア増殖抑制活性を抽出できたという点で、今後のこの分野の研究に大きな貢献をすることができると考えられる。しかし、現時点では、活性フラクションに含まれる化合物がどのような物質であるかは、物質の精製が不十分であることから、不明である。琵琶湖湖水とクロモ培養水から抽出された活性フラクションは、ODS 分離の段階で別のフラクションに溶出している。草体から放出された物質が、微生物や光等により何らかの変換を受けてなお、活性を維持している可能性もあり、活性物質が同一起源であるかどうかについては、それぞれのフラクションから活性物質を単離し、構造決定を行う必要がある。シアノバクテリア増殖抑制活性は複数のフラクションから見出されており、クロモから放出されるシアノバクテリア増殖抑制物質は複数あると考えられる。また、それぞれの活性フラクションの中には依然として複数の物質が存在して

いることから、各フラクションに含まれる活性物質を分離・精製するためには、その分離条件をさらに詳細に検討する必要がある。また、各フラクションの回収量が少ないため、その中に含まれる活性物質を単離し、構造決定を行うためには、さらに大量の試水から物質を回収する必要があるだろう。また、実際には各フラクションに含まれている活性物質が相乗的に働くことによって、活性を増強させている可能性もある。複数の物質の相乗効果による活性の増強については、現在のところほとんど知られていない。水生植物 - アオコ形成シアノバクテリア間の相互作用を明らかにするためには、今後、これらの課題について詳細に検討することが必要である。

謝 辞

琵琶湖サンプリングの際に多大なるご助力をいただきました琵琶湖研究所中島拓男博士、濱端悦治博士、村上泰三氏、クロモ水槽や検定藻株の維持、採水、生物検定などご助力をいただきました代紀世美氏に深く感謝いたします。また、研究の遂行にあたりご助力いただいた、立正大学地球環境科学部環境システム学科水界生態系研究室、東京水産大学水産学部海洋環境科学科水圏生態化学研究室内の学生諸氏に深く感謝いたします。

なお、本研究は、文部科学省オープン・リサーチ・センター整備事業により実施した。

引用文献

- Aliotta, G., M. D. Greca, P. Monaco, G. Pinto, A. Pollio and L. Previtiera (1990) *In vitro* algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. *J. Chem. Ecol.* 16(9): 2637 - 2646.
- 宝月欣二, 岡西良治, 菅原久江 (1960) 植物プランクトンと大型水生植物との拮抗的關係について. *陸水学会誌* 21: 124 - 130.
- 市村輝宜 (1979) 藻類の分離と培養法: 淡水藻類. 西澤一俊, 千原光男 (編) 藻類研究法. 294 - 305. 共立出版.
- Kakisawa, H., F. Asari, T. Kusumi, T. Toma, T. Sakurai, T. Oohusa, Y. Hara, M. Chihara (1988) An allelopathic fatty acid from the brown alga *Cladosiphon kamuranus*. *Phytochem.* 27(3): 731 - 735.
- Nakai, S., U. Inoue, M. Hosomi and A. Murakami (2000) *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Wat. Res.* 34 (11): 3026 - 3032.
- Nakai, S., U. Inoue and M. Hosomi (2001) Algal growth inhibition effects and inducement modes by plant-producing phenols. *Wat. Res.* 35(7): 1855 - 1859.
- Sho-wen, Y., S. Wen-hao and Y. Zi-wen (1991) Detection of antialgal compounds of water hyacinth. In: *Bioindicators*

and *Environmental Management*. p.255 - 262. Academic Press, London, Tokyo.

渡辺真利代, 原田建一, 藤木博太 (1994) アオコ - その出現と毒素 - . 東京大学出版会.

Anti-cyanobacterial Activities Found in Water Samples Taken from a *Hydrilla verticillata*-rich Area in Lake Biwa, Japan and *H. verticillata* Culture

Mariyo F. WATANABE*, Takushi NIKI*, Yuko UENO** and Michio NAMIKOSHI***

*Faculty of Geo-environmental Science, Rissho University

**Graduate Student of Marine Environmental Science, Tokyo University of Fisheries

***Faculty of Tokyo Fisheries, Tokyo University of Fisheries

To investigate an allelopathic interaction between bloom-forming cyanobacteria and aquatic plants in the environment, anti-cyanobacterial activities in a *Hydrilla verticillata*-rich area in Lake Biwa, Japan and *H. verticillata* culture were assayed. The organic compounds in the water samples were extracted by solid-phase extraction. Both of the extracts showed growth inhibition of a bloom-forming cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* strain TAC20. The extracts were separated into several fractions using ODS open column and HPLC. The activities were found in two fractions for the Lake Biwa sample and three fractions for the culture sample. These results suggests that *H. verticillata* may inhibit cyanobacterial bloom in the environment by producing and releasing some allelochemicals against cyanobacteria.

Keywords: allelopathic interaction, cyanobacteria, aquatic plants