

# 沈水植物コカナダモ *Elodea nuttallii* 培養水中に放出されるアオコ形成シアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* の増殖抑制活性<sup>#</sup>

渡辺 真利代\*      仁木 拓志\*  
上野 祐子\*\*      浪越 通夫\*\*\*

キーワード：アオコ形成シアノバクテリア、沈水植物、シアノバクテリア増殖抑制活性

## 1 はじめに

第二次世界大戦後の急速な経済発展に伴い、水域には様々な生活・産業・農業排水等が流入するようになった。これらの人為起源排水は水域の富栄養化を引き起こし、各地の湖沼で、しばしば藻類の大増殖による水の変色（いわゆる「水の華（water bloom）」）が観察されるようになってきている。このようなブルームを起こす生物の中でも、シアノバクテリア（cyanobacteria；ラン藻類とも呼ばれる）には、細胞内にガス胞を有し高い浮上性を持った *Microcystis* 属等が含まれる。これらが大量増殖し、水面に集積すると、緑色の粉を撒いたような様相を呈する。このような状態は「アオコ」と呼ばれ、景観の著しい悪化、その分解に伴う悪臭の発生や貧酸素水の形成等、多くの問題を引き起こす（渡辺ら1994）。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家畜・人間被害も数多く報告されている（Francis 1878; Galey *et al.* 1987; Kimura 1999）。また、致死量以下でも発ガン促進作用を持つという指摘もある（Fujiki and Suganuma 1993）。アオコの問題は現代社会の水環境問題における重大な関心事の一つである。

水域におけるアオコ防除策としては、凝集剤や殺藻剤の散布があるが、それら自身の毒性や残留性が常に問題となる。また、シアノバクテリアの毒素は細胞内に保持されるものが多く、細胞が死んで破壊されると毒素が水域に流出してしまうため、効果的な方法とは言えない。富栄養化した水域から栄養塩を除去するのが最も本質的な解決策であるが、流入負荷量を効率的に減少させ、さらに、既に系内に負荷されてしまった栄養塩を効率的に除去するのは、技術的にも経済的にも大きな困難を伴う。

近年では、アオコ防除策として、大型の水生植物との相互関係を利用する方法が大きな注目を集めている。シアノバクテリアと水生植物との相互作用として、光や栄養塩をめぐる競争（特にウキ草等の浮葉性植物）、水生植物から放出される化学物質を介したアレロパシー効果（沈水性、浮葉性を含む幅広い水生植物）等が考えられる。水生植物の保護・増殖、移植等によってアオコ発生が防除できるならば、そのコストやエネルギーは比較的小さく、なおかつ景観上、環境教育上も大きな効果が期待できる。

このような背景に基づき、水生植物からシアノバクテリアの増殖阻害活性を持つ物質を分離・同定した報告は比較的多い（Anthoni *et al.* 1980; Aliotta *et al.* 1991）。しかし、実際に起こるアレロパシー現象を考えた場合、その活性物質は植物体から水中に放出されなければならないのだが、この点を考慮した報告は極めて少ない。本研究は、アオコ防除へ応用できる可能性を持った水生植物を探索するとともに、大型水生植物とアオコ形成シアノバクテリアの間のアレロパシー現象を、化学生態学的視点から明らかにすることを目的としている。本稿では、草体抽出物を用いたプレスクリーニングの結果、シアノバクテリア増殖抑制活性の認められた沈水植物コカナダモ *Elodea nuttallii* を用い、その培養水から抽出された成分について、アオコ形成シアノバクテリアの増殖抑制活性を検討した。

## 2 材料と方法

### 2.1 水生植物

コカナダモは、群馬県前橋市内の農業用水路から採集した。これを、MA 培地（市村1979）でエンリッチし

\* 立正大学地球環境科学部

\*\* 東京水産大学大学院水産学専攻科海洋環境学専攻

\*\*\* 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

た約300Lの水槽に入れ、雨水等が入らない場所で屋外培養した。培養期間は最低でも1ヶ月以上とし、混入・増殖したアオミドロはこまめに除去した。

## 2. 2 培養液中の化学物質の抽出

### 2. 2. 1 粗抽出

コカナダモ培養水槽水240Lを、Whatman GF/C フィルターで吸引ろ過し、ろ液を試水とした。試水中の化合物は、固相抽出担体 SP-207 (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) で非吸着成分を除去した後、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、凍結乾燥した。この SP-207メタノール溶出物について2.3節に述べるシアノバクテリア増殖抑制試験を行った。

### 2. 2. 2 活性成分の分離

SP-207メタノール溶出物は様々な化合物の混合物であると考えられるので、より詳細な分離を行った。

SP-207メタノール溶出物を少量の蒸留水で溶解し、固相抽出担体 ODS-SS-1020T (センシュウ科学) 20g を充填したオープンカラム (2 cm i.d. × 50cm length) に吸着させた後、蒸留水 (100ml) で洗浄した。さらに、25%、50%、75%、100%メタノール各100ml で順次溶出させた。洗浄水、溶出液は、それぞれロータリーエバポレータで濃縮乾固した。洗浄水フラクションを En1、各濃度の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 En2、En3、En4、En5 とし、それぞれシアノバクテリア増殖抑制試験に供した。

さらに、En1 と En2 については、TSK-gel TOYOPEARL HW-40S (東ソー) 充填カラム (1 cm i.d. × 30 cm length) による MPLC を行った。移動相には水 (0.5ml min<sup>-1</sup>) を用い、溶出物はフラクションコレクターを用いて分取した。MPLC に接続した UV 検出器 (検出波長210nm) によって得られたクロマトグラムを元に、En1 は En11 ~ En14、En2 は En21 ~ En28 のフラクションに分けてそれぞれ凍結乾燥し、シアノバクテリア増殖抑制試験を行った。

### 2. 3 シアノバクテリア増殖抑制試験

抽出物のシアノバクテリア増殖抑制活性は、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。M.

*aeruginosa* は主要なアオコ形成シアノバクテリアであり、microcystin と呼ばれる強い毒素を生産することでも知られている。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  $1 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup> になるように MA 培地で調製した検定藻を 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、Fucks-Rosenthal 型もしくは Thoma 型の血球計算盤により、計数した。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 (%) をもって、増殖抑制活性とした。すなわち、TAC20がまったく増殖しなければ100%、コントロールと差がない程度に増殖すれば0%の値となる。

## 3 結果

分離のフローチャートを Fig. 1 に、各過程で得られた活性フラクションの重量及びシアノバクテリア増殖抑制活性試験の結果を Table. 1 ~ 3 に示した。SP-207メタノール溶出物は、240L の試水から1.08g を得た。この粗抽出物の TAC20増殖抑制活性は200ppm で45%であった。また、この粗抽出物を ODS カラムで分離して得た En1 から En5 の各フラクションの重量及び抽出物濃度100ppm におけるシアノバクテリア増殖抑制活性を Table. 1 に示した。活性が認められたのは、ODS 非吸着フラクションである En1 (100ppm で13%) と25%メタノール溶出フラクションである En2 (100ppm で17%) であった。En3 ~ En5 には抽出物濃度100ppm において増殖抑制活性は認められなかった。

この結果を受け、活性の認められた En1 及び En2 については、さらに HW-40充填カラムを用いた MPLC により、活性成分の分離を行った。MPLC クロマトグラムと各フラクションの分取位置を Fig. 2 に示す。各フラクションについてシアノバクテリア増殖抑制試験を行った結果、En1 からは En11 (35mg) に活性が認められた。このフラクションの増殖抑制活性は100ppm で16%であった。また、同条件の MPLC で En2 を分離したク

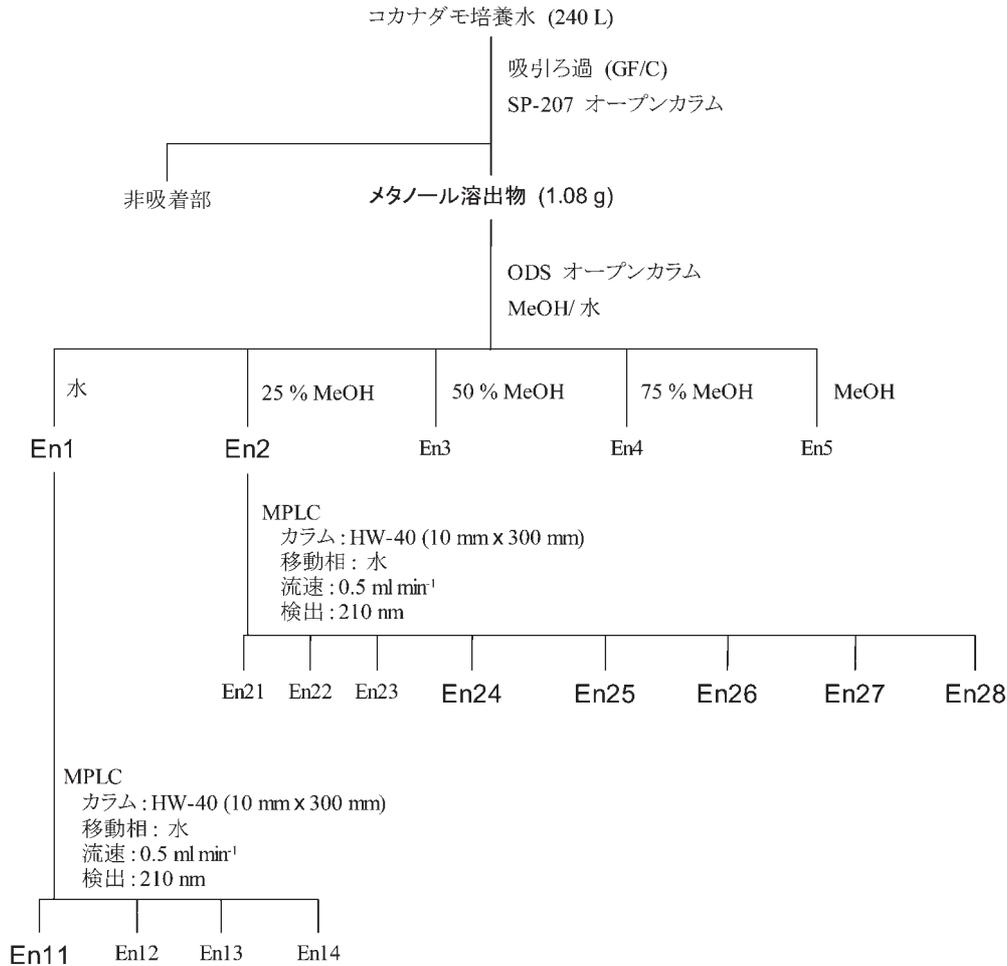


Fig. 1 : コカナダモ培養水からのシアノバクテリア増殖抑制活性物質の分離フローチャート (太字は活性の検出されたフラクションを示す)

Table. 1 : SP-207メタノール溶出物の ODS オープンカラム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    | En1 | En2      | En3      | En4      | En5       |
|-----------|-----|----------|----------|----------|-----------|
| 溶出溶媒      | 蒸留水 | 25% MeOH | 50% MeOH | 75% MeOH | 100% MeOH |
| 重量(mg)    | 644 | 98       | 44       | 30       | 173       |
| 増殖抑制活性(%) | 13  | 17       | -        | -        | -         |

増殖抑制試験の際の濃度 : 100ppm, - : 活性なし

Table. 2 : En1 の MPLC 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    | En11 | En12 | En13 | En14 |
|-----------|------|------|------|------|
| 重量(mg)    | 35   | 4    | 3    | 2    |
| 増殖抑制活性(%) | 16   | -    | -    | -    |

増殖抑制試験の際の濃度 : 100ppm, - : 活性なし

Table. 3 : En2 の MPLC 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    | En21 | En22 | En23 | En24 | En25 | En26 | En27 | En28 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 重量(mg)    | 3    | 30   | 12   | 7    | 10   | 2    | 2    | 2    |
| 増殖抑制活性(%) | -    | -    | -    | 43   | 64   | 60   | 42   | 39   |

増殖抑制試験の際の濃度 : 100ppm, - : 活性なし

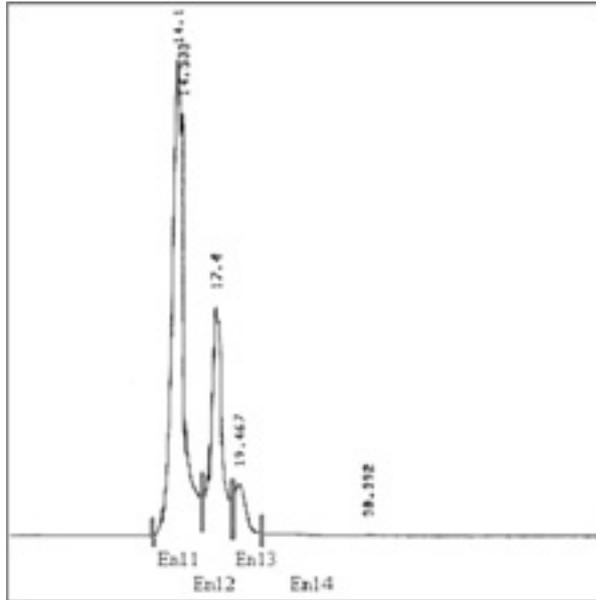


Fig. 2 : En1 の HW-40カラムを用いた MPLC クロマトグラムと各フラクションの分取位置

クロマトグラムとフラクションの分取位置を Fig. 3 に示す。ここで回収された各フラクションについてシアノバクテリア増殖抑制試験を行った結果、活性フラクションは En24、En25、En26、En27、En28まで分散していた。各フラクションの回収量と増殖抑制活性を Table. 3 に示す。

MPLC クロマトグラムを見てわかる通り、この段階では活性物質の分離は不完全であり、En11、En24~En28の各フラクションとも、複数の物質の混合物であることが明らかとなった。

#### 4 考察

大型水生植物 - 藻類間のアレロパシーに関する研究では、水生植物草体から直接化合物を分離した例 (Anthoni *et al.* 1980; Aliotta *et al.* 1991) がほとんどで、草体から放出されるか否かについては検証されていないものが多い。水生植物草体からシアノバクテリア増殖抑制物質が単離・同定できたとしても、それがアレロパシー物質として機能するかどうかについては、その植物の生育する水域からその物質 (あるいはその分解物と思われる物質) を抽出して確認する必要がある。水中でのアレロパシー現象に関しては、草体外に放出された物質が乱流等で速やかに拡散してしまうため、低濃度でも効果を示す必要がある。しかし、低濃度で存在すると思われる活性物質を、多様な物質の混在した環境中から取り出すことは容易ではない。

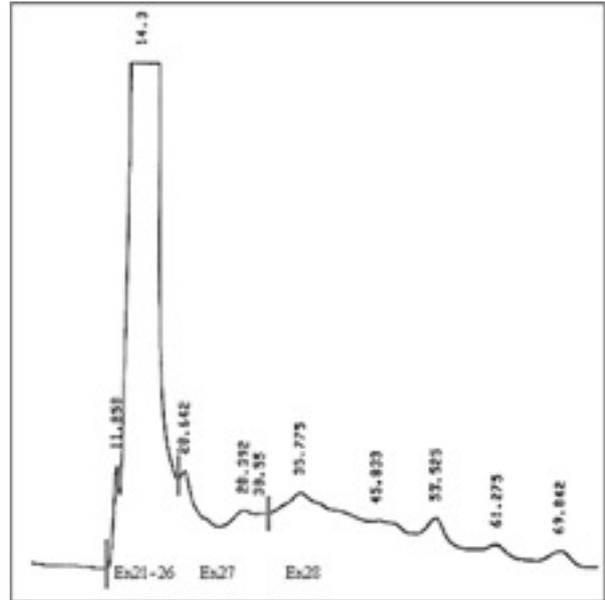


Fig. 3 : En2 の HW-40カラムを用いた MPLC クロマトグラムと各フラクションの分取位置

本研究では、コカナダモ培養水槽水から、シアノバクテリア増殖抑制活性を示す成分を、SP-207を用いた固相抽出により抽出することができた。これがコカナダモによって放出されたアレロパシー物質であるかどうかを確認するためには、草体から抽出された物質との比較が必要になる。ODS による分離では、非吸着画分と20%メタノール溶出画分にのみ活性が溶出したことから、コカナダモ培養水から得られた活性物質は高極性の物質であることが推測される。高極性の成分は水中での拡散も比較的早いと考えられるため、沈水性植物がシアノバクテリアに対抗するためのアレロパシー物質としては有利な反面、濃度当たりの増殖抑制活性が高い、恒常的に放出されている、比較的分解されにくい (あるいは分解生成物も増殖抑制活性を持つ)、といった条件が整わないと、アレロパシー物質としては機能しない可能性があるため、活性物質そのものの環境中における分布濃度やシアノバクテリア増殖阻害活性を明らかにする必要がある。また、Fig. 2 及び 3 からわかる通り、活性物質は一種類ではない。複数の活性物質が関わることで、それぞれ単独の時よりも活性が増大する可能性もある。

コカナダモと同じ沈水性の植物における高極性のシアノバクテリア増殖抑制物質としては、ホザキノフサモ *Myriophyllum spicatum* から数種のポリフェノール類が報告されている (Nakai *et al.* 1999, 2001)。ただし、ポリフェノール類は多くの植物が生成する物質であり、様々な抗菌、生理活性が知られているので、本研究で認められたコカナダモ由来の活性物質がポリフェノール類

であった場合、それがコカナダモ特有の物質なのか、類似の化合物のシアノバクテリア増殖抑制活性がどうか等の検討を行った上で、コカナダモからシアノバクテリアに対するアレロパシー物質として放出されているものなのかどうかを解釈する必要があるだろう。

これらの問題を解決するためには、本研究で分離された活性フラクションに含まれる活性物質の精製と構造決定を行う必要がある。しかし、本研究の結果から、コカナダモ由来の活性物質が一種類である可能性は低い。これらの物質は極性が高く、MPLC クロマトグラムから見ると比較的挙動の似た夾雑物質との混合物であることが推測されることから、単純な極性による分離は困難であると考えられる。したがって、今後、化合物の誘導体化などを検討しながら分離・精製を進め、構造決定を行う必要がある。

#### 謝 辞

コカナダモ水槽や検定藻株の維持、採水、生物検定などでご助力いただい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学科水圏生態化学研究室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., P. Monaco, G. Pinto, A. Pollio and L. Previtiera (1991) Potential allelochemicals from *Pistia stratiotes* L. *J. Chem. Ecol.* 17(11): 2223 - 2234.
- Anthoni, U., C. Christophersen, J. Madsen, S. Wiium-Andersen and N. Jacobsen (1980) Biologically active sulphur compounds from the green alga *Chara guobularis*. *Phytochem.* 19: 1228 - 1229.
- Francis, G. (1878) Poisonous Australian lake. *Nature* 8: 11 - 12.
- Fujiki, H. and M. Suganuma (1993) Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: The okadaic acid class of compounds. *Adv. In Cancer Res.* 61: 143 - 194.
- Galey, F. D., V. R. Beaseley and W. W. Carmichael (1987) Blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) hepatotoxicosis in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1415 - 1420.
- 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。
- Kimura, Y. (1999) Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in Nishinomiya, Japan: Sudden appearance of toxic cyanobacteria. *Natural Toxins* 7: 81 - 84.
- Nakai, S., U. Inoue, M. Hosomi and A. Murakami (1999) Growth inhibition of blue-green algae by allelopathic effects of macrophytes. *Wat. Sci. Tech.* 39(8): 47 - 53.
- 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.
- 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。

## Growth Inhibition of a Bloom-forming Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* by Exudates of a Submersed Plant, *Elodea nuttallii*

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

\*Faculty of Geo-environmental Science, Risho University

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

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

Exudates of a submersed plant, *Elodea nuttallii* was extracted from the water sampled from *E. nuttallii* culture by solid-phase extraction. The extract showed growth inhibition of *Microcystis aeruginosa* strain TAC 20, which suggested an allelopathic interaction between *E. nuttallii* and *M. aeruginosa*. The extract was separated by ODS open column and then MPLC to purify the anti-cyanobacterial fractions. The results showed that some polar compounds would participate in the anti-cyanobacterial activity originated from *E. nuttallii*.

Keywords: cyanobacteria, submersed plants, anti-cyanobacterial activity