

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00639

研究課題名(和文) 淡水起源シアノトキシンの海域生態系への拡散と残留

研究課題名(英文) Diffusion and persistency of the freshwater cyanotoxin in the marine ecosystem.

研究代表者

高橋 徹 (Takahashi, Tohru)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70369122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：諫早湾調整池では夏期から秋期にかけて、有毒アオコの大発生が恒常化している。発生シーズンにおける現地での24時間連続観測により、調整池では約52kg/dayの強力な肝臓毒ミクロシスチン類(MCs)が産生され、うち40%が湖底に堆積していると推計された。このMCsは排水と共に海域に拡散している。しかし、淡水起源のアオコは海域では死滅し、MCsも分解されるとされ、注目されてこなかった。ところが、室内実験では、20度C以下ではMCs分解が進行せず、リアルタイムPCRによって、分解菌が機能していない事が確認された。この事は、従来の調査で、冬期の海底泥から夏期より高濃度のMCsが検出された結果と合致する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大規模な有毒シアノバクテリアの発生は世界各地で報告されているが、淡水域で産生された毒素の行方や分解過程については未解明な点が多い。今回、我々は、窒素消費からミクロシスチンの産生量を推定し、その分解は低温では進まないことを示した。そのため、海域生態系には未分解のミクロシスチンが残留・循環している事が示された。もちろん、この事は有明海特有の現象ではない。例えば、韓国ナクトンガンの河口域で厳冬期に採取された堆積物に高い濃度のMCsが残留している事が確認された。したがって、今後は、有毒アオコ発生時には下流のエコトーンから海域に至る調査が必要である事を示した。

研究成果の概要(英文)：The blooming of toxic cyanobacteria has become an annual event constant in the Isahaya Bay reservoir from the summer to the autumn. Our 24hrs consecutive field survey estimated that about 52kg of strong hepatotoxin, microcystines (MCs) was produced and 40% of them deposited in the bottom in the blooming season. MCs spreads with drainage in the sea area. However, cyanobacteria of the fresh water origin are thought to perish and MCs are degraded in the sea area, and has not attracted attention. However, laboratory experiment revealed that the MCs are not degraded at less than 20C, and it was confirmed by real time PCR that the bacterial degrading did not function. This support the result of field survey that MCs content of the Ariake Sea's sediment is higher in winter (non-blooming season of cyanobacteria) than that in summer (blooming season).

研究分野：海洋生態学

キーワード：ミクロシスチン 分解菌 諫早湾調整池 生物濃縮 HABs

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有明海奥部の諫早湾には 29km² にわたる軟泥干潟が存在していたが、大規模干拓事業によって、そのすべてを含む 36 km² の海域が長さ 7 km の潮受け堤防にとって閉め切れ、その生物相が全滅した。その後、タイラギ漁の壊滅や海苔色落ちなどの「有明海異変」が生じ、漁業被害が取り上げられた裁判で 2010 年、福岡高裁は「5 年間の潮受け堤防排水門の常時開門」を命じ、判決は確定した。しかし、その後の複雑な政治的状況の中で確定判決は未だ実行されていない。一方、裁判や人間社会内の事情如何に関わらず、自然環境は自然の法則に従うのであって、調整池における夏期～秋期の有毒シアノバクテリア大発生は毎年の恒常的イベントとなっている。我々は 2007 年から調整池の有毒シアノバクテリア(アオコ)発生をモニタリングしてきた。その結果、例年、優占種である *Microcystis* 属が産生するミクロシスチン類 (MCs) はアオコ発生期以外を含む年間を通じて調整池湖底堆積物中に残留している事が明らかとなった(Uamehara et al., 2012)。さらに調査を続けると、MCs は魚類や無脊椎動物に蓄積している事が判明し、特に海域のベントスや魚類からも MCs は検出された(Takahashi et al., 2014)。

また、大量排水時の 26 時間連続観測により、排水直後に諫早湾内に一定量の MCs が堆積する事も確認した (Umehara et al., 2015)。そこで、有明海湾奥部の海底堆積物を分析したところ、あらゆる地点の海底堆積物から MCs は検出され、しかも、アオコ非発生期で水温が最も低い 3 月の MCs 含量が最も高かった。そのため、調整池由来の MCs は海域生態系に影響を与えている可能性があるかと推察された。

2. 研究の目的

有毒シアノバクテリアの大規模発生は世界各地から報告されているが、シアノトキシンが海域に到達した後の運命に関する報告は多くはない。淡水起源のアオコは海に達すると浸透圧の影響で死滅し、ミクロシスチンは分解菌によって分解されると考えられているためであろう。しかし、現実には MCs は海域の堆積物、ベントス、魚類から検出されており、「分解説」では、この事実を説明できない。本研究では、これまで確認された、海域での堆積物と生物への MCs が調整池由来 MCs の残留物と考えられるかどうかについて、より具体的な検討をおこなった。

3. 研究の方法

野外調査

- モニタリング調査 (水質、底質、魚類、ベントス, Takahashi et al., 2014 の方法)
- DIN 消費と MCs 生産量の関係(過去データ解析含む, Umehara et al., 2019)
- 基礎生産の簡易測定 (明暗瓶法)
- 室内分解実験: 堆積物中 MCs の分解追跡実験 (温度、深度、塩分の違い)
- リアルタイム qPCR により、d の実験に用いた堆積物における MCs 合成酵素遺伝子、MCs の定量

< DNA 抽出 >

材料: 分解実験後の底質サンプル

方法: 日鉄住金環境株式会社環境資料 DNA 抽出キット Extra Soli DNA Kit ver.2 を用い、説明書の手順に則り堆積物から DNA を抽出した。

< 定量 PCR >

機器: LightCycler Nano Roche Applied Science Essential DNA Green Master

リアルタイム PCR には、FastStart Essential DNA Green Master (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社) を使用しマニュアルに従って実施した。

4. 研究成果

a. モニタリング

2007 年から継続中の諫早湾調整池のモニタリング調査を継続した。ただし、Takahashi et al.(2014) のような毎月調査ではなく、今回は、基本的パターンが繰り返し継続している事を確認することを基本におき、DIN 等の環境データについては 2 回/月に観測されている九州農政局の公式データを確認した。

その結果、シアノバクテリアの発生パターンに大きな変動はなかった。すなわち、水温が 25°C を越える 5 月以降にシアノバクテリアの発生が始まり、水面でのスカムも目立ち始める。この時期は *Planktothriciodes* 属、*Anabaena* 属、*Arthrospira* 属等、数種のシアノバクテリアが数日おきに優占種交替を伴いながら発生する事が多く、これらは梅雨の豪雨で一気に排水されて姿を消すものの、梅雨明け後、風の弱い夏日が数日続くと表層にシアノバクテリアのスカムが確認できるようになる。この時の優占種は *Microcystis* 属、特に有毒な *M. aeruginosa* である場合が多い。2017-19 年の夏 秋にもやはり *Microcystis* 属が優占した。但し、2017 年においては、5 月の時点でも *Microcystis* 属が優占しており、堆積物中の MCs 含量は高かった。

- b. DIN 消費と MCs 生産量の関係 (過去データ解析含む, Umehara et al., 2019)
 Takahashi et al. (2014)では、調整池内の3地点 (B1, S11, B2) における湖水の MCs 濃度と近くの排水ゲートまたはポンプ排水機からの排水量の積算から、毎年、数十～数百 kg の MCs が、海域に排出されていることが推定された。ただしこれは月に一度の観測に基づいた粗推定であるため、別の角度からの検討も必要である。そこで、2011年9月9日に S11 地点でおこなった3時間ごとに24時間観測を行ったデータを解析し、DINの減少から、MCs 生産量の推定を試みた (詳細プロセスは Umehara et al., 2019 参照)。

表1 栄養塩と MCs の収支

Nutrient budgets along with total microcystin (MC) production (PMCs) and sedimentation (SMCs) rates in the reservoir over the 24-h study period. DIN, dissolved inorganic nitrogen; DIP, dissolved inorganic phosphate. The potential total denitrification rate in the reservoir sediments was estimated based on the maximum denitrification rate ($1800 \text{ mg N m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) observed in October at Lake Suwa, Japan, which has similar environmental conditions, such as shallow, eutrophic waters and muddy sediment (Hasegawa and Okino, 2004).

	DIN (kmolN reservoir ⁻¹ d ⁻¹)	DIP (kmolP reservoir ⁻¹ d ⁻¹)	MCs (kgMCs reservoir ⁻¹ d ⁻¹)
Δ	-541	-34.8	PMCs 52.2
Influx	0	0	ΔMCs 30.7
Diffusion	5.9	0.5	
Denitrification	-36		
Uptake	-511	-35.3	SMCs 21.5

Umehara et al. (2019) より

調査期間において DIN と DIP の消費は調整池全体でそれぞれ 541kg, 34.8kg と推定され、それに対応して 52.2kg の MCs が産生され、そのうち約 40% の 21.5kg が堆積した。シアノバクテリア発生域が 50%, 同レベルで 90 日継続したとすると、総産生量は 2t 以上となる。堆積した MCs も水深が浅い調整池では容易に攪拌される事を勘案すると、年間数十～数百 kg の MCs が海域に排出されているとの推定 (Takahashi, 2014) は過大とは言えない。

- c. 基礎生産の簡易測定 (13C を用いた明暗瓶法)
 現地測定を二回実施したが、台風の影響でアオコ最発生期の観測が実施できていない。そこで、今期に自費で実施し、¹³C の分析は凍結試料と併せて外注する予定である。(安定同位体分析機がないため)
 現場調査から言える事は、以下の通り：
 S11 地点における期間中の透明度は 10-20cm であった。
 2018年3月25日の場合。透明度 15cm。光量子 $390 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (水面)、 $12 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (水深 15cm)、 $1 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (水深 30cm)。
 上記により、シアノバクテリアブルームが発生していない時期でも、それに替わる真核植物プランクトンが極めて少ない。水深 30cm より深い部分は全く光合成ができない深海と同じゾーンと言える。
 そのため、冬期の排水には余剰の DIN, DIP が大量に含まれている。これが排水されると、比重が軽く表層に拡散するため冬期赤潮の原因となる。
 以上のように現場観測からの情報と九州農政局の公開データからも、調整池で通常の湖沼生態系を支える一次生産が機能していないと推察される。
 シアノバクテリアブルームシーズンの観測と ¹³C の測定終了後に MCs 分解の問題とは別個の論文として投稿したい。
- d. 室内分解実験：堆積物中 MCs の分解追跡実験 (温度、深度、塩分の違い)
 2013年、8月30日に S11 地点で採取した堆積物を 10°C, 20°C, 25°C, 30°C のインキュベータに入れ、三日に一度、30日目までサンプリングをおこない、MCs 含量を測定した。サンプルは表層 0-1 cm と中層 2-3cm から 10ml シリンジを改造した器具を用いておこない、さらに、25°C に関しては人工海水を満たした容器の系列も追加した。
 結果は基本的に 2015 年のサンプルを用いた簡易予備実験の結果に合致するものとなった。但し、図については二つの理由でここへの掲載を見合わせたい。
 理由 1：未投稿であること。理由 2：一部データの精度に問題がある事が判明した。大勢の結論には影響がないと考えられるが、このままの論文化は避け、凍結サンプルを解冻後に再検出した結果に基づいて論文化すべきと判断した。
 図 3 には予備実験の結果を示している。本実験は表層と中層を区分したので、好気的な表層では回帰直線の傾きがより大きく、中層では小さくなったものの、温度による傾向は予備実験と同じであった。Microcystis のブルームが出現する 25°C, 30°C の時だけ MCs の分解は進行していた。25°C 実験区は海水であったが、分解は進行した。10°C と 20°C 実験区では MCs は全く減少せず、むしろ、僅かながら増加の傾向すら示した。

* 高橋が昨年より手の振戦を伴う「パーキンソン症候群」を患い、一部の PCR や ELISA の結果の精度に問題があると判明した。振戦は手術によって治癒すると診断されており手術後直ちに再測定を実施する準備を整えているが、COVID-19 により計画が未定である。

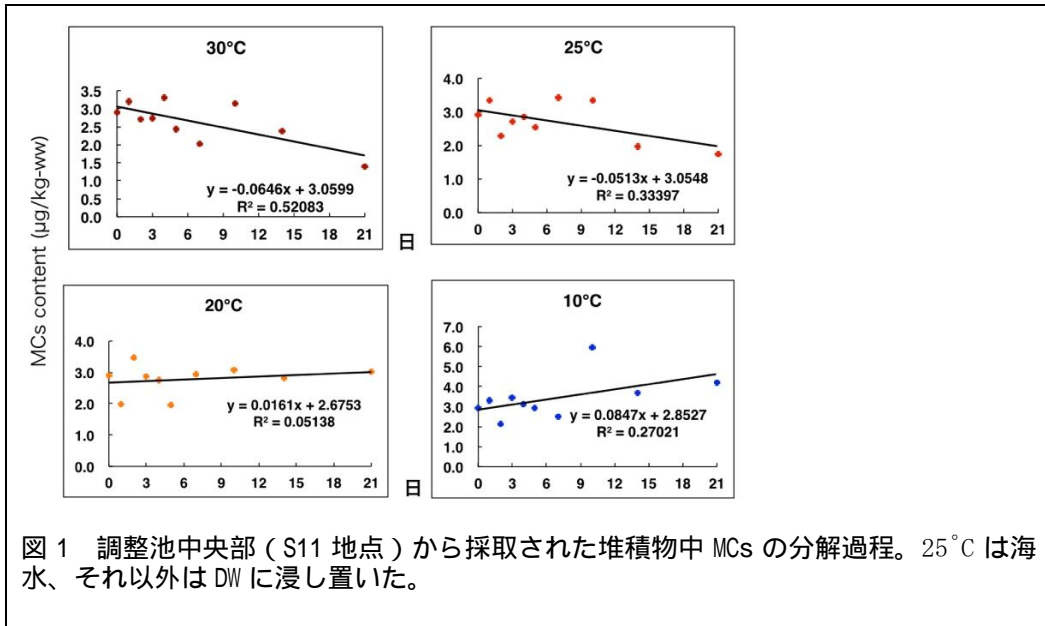


図1 調整池中央部 (S11 地点) から採取された堆積物中 MCs の分解過程。25°C は海水、それ以外は DW に浸し置いた。

e. リアルタイム qPCR により、d の実験に用いた堆積物における MCs 合成酵素遺伝子、MCs の定量

国立環境研究所より分譲された *Microcystis aeruginosa* 標準株 (NIES843) の細胞数を定量し、その希釈系列と *Microcystis16sDNA*、*mcyD* (合成酵素遺伝子) の実測値から作成した検量線によって両遺伝子の標準株等量を定量した。その結果、*Mrcocystis16SDNA* 量は 30°C が一番多かったが、3 週間目の実験終了時では、10°C の系列でも 2 番目に高かった。25°C の海水系列では、実験開始後一気に下がったが、低い水準で安定した(図 2)。

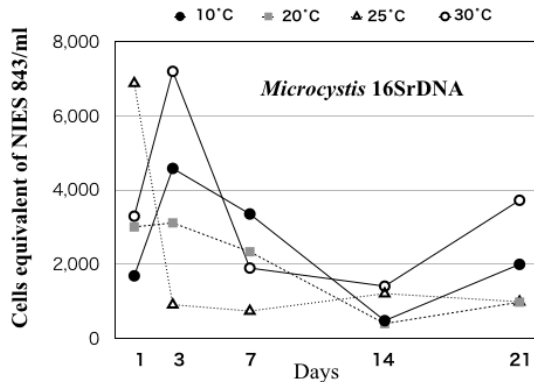


図2 間隙水中の *Microcystis 16SrDNA* の推移

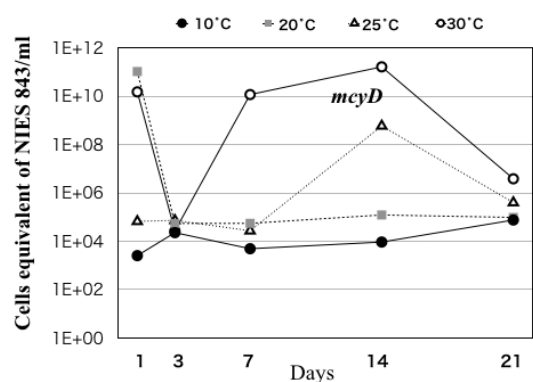


図3 間隙水中の *mcyD* の推移

一方、*mcyD* (MCs 合成酵素遺伝子) は全体的に温度の順で高くなった(図 3)。

Sphingomonas 16SrDNA と *mlrA* (MCs 分解酵素遺伝子) は信州大学理学部、朴虎東教授より分譲された *Sphingomonas sp.*, *Seifu* 株による検量線に基づいて算出した。*Sphingomonas 16SrDNA* は、全体的には 30°C における DNA 量が高く、10°C では大きく低下した(図 6)。25°C 系列(海水)でも、*Sphingomonas* は存在し、増加傾向も示された。

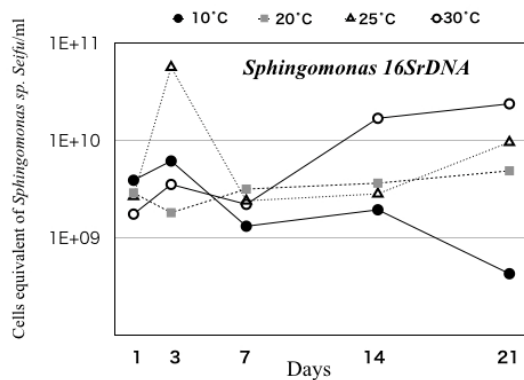


図4 *Sphingomonas 16SrDNA* の推移

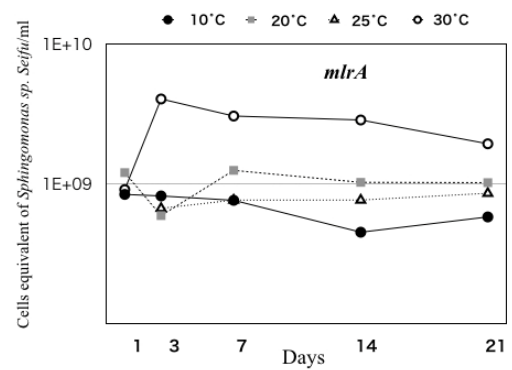


図5 *mlrA* の推移

MCs 分解酵素 *mlrA* は 30°C で最も高く、10°C 低かった。20°C, 25°C(海水)では、その中間で推移した。

以上のリアルタイム qPCR の結果は、図 1 に示した MCs の変動に概ね合致していると考えられた。

- 1) 30°C: 3 週間で MCs 量は半減した。*mcyD* は実験区で最も高かったものの、Umehara et al. (2019) が示す様に MCs の大部分は水塊中で DIN を消費して生産される。したがって、*mlrA* に示される分解酵素の活性が合成を上回ったと考えられる。
- 2) 25°C(海水): *Microcystis 16SrDNA* は実験直後に減少し、淡水性の MCs が海水に触れて減少したことがわかる。しかし、*mcyD* は実験区間で最も少ないものの、ゼロにはならず、徐々に増える傾向も示された(図 3)。*Sphingomonas 16SrDNA*, *mlrA* は一定量存在し(図 4, 5)、そのため、MCs も減少した(図 1)。
- 3) 20°C: *Microcystis 16SrDNA*, *mcyD* とともに低い値で推移したが、*mlrA* も低く分解も進まなかった。
- 4) 10°C: *mcyD* は最も低いもののゼロではなく、3 週目には弱いながらも増加傾向を示している。一方、*mlrA* は弱く、分解は進んでいないと考えられる。このことは図 3 において MCs が増加傾向を示していることと合致している。

4. まとめ 今回の研究で明らかとなった主な点

- a. 調整池は巻き上げられた有明粘土の微細粒子によって緑藻類の光合成が 30cm 以深では殆ど進行しない。
- b. 夏期には紫外線に強いシアノバクテリアが表層に拡散して光を独占する。緑藻の競争がない事でこの傾向が強化されていると考えられる。
- c. シアノバクテリアがいない冬期でも、緑藻類の光合成が殆ど無いため、余剰の栄養塩が海域に排出されている。比重が軽い排水が表層を拡散すると冬期赤潮の要因になる可能性がある。
- d. *Microcystis* ブルーム期の調整池で MCs の生産量を測定し、24 時間で約 52kg が生産され、その約 40%が堆積した (Umehara et al., 2019)。
- e. 調整池や海域に堆積した MCs は高水温期(最低 20°C 以上)では徐々に分解されるが、20°C を下回る温度ではそのまま残留し、堆積物中の *Microcystis* による合成によって増加する場合もあり得る。
- f. 海水導入によって MCs の加入は停止し、残留 MCs も温暖期を数回重ねることで分解されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umehara A, Komorita T, Takahashi T, Tsutsumi H.	4. 巻 183
2. 論文標題 Estimation of production and sedimentation of cyanobacterial toxins (microcystin) based on nutrient budgets in the reservoir of Isahaya Bay, Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecotoxicology and Environmental Safety, Elsevier	6. 最初と最後の頁 109477-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ecoenv.2019.109477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 高橋 徹	4. 巻 73(2)
2. 論文標題 潮受け堤防による海域生態系の疲弊に追い打ちをかける調整池排水	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本ベントス学会誌	6. 最初と最後の頁 123-128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Umeharra A, Takahashi T, Komorita T, Orita R, Choi JW, Takenaka R, Mabuchi R, Park HD, Tsutsumi H.	4. 巻 167
2. 論文標題 Widespread dispersal and bio-accumulation of toxic microcystins in benthic marine ecosystems.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 492-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2016.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tohru Takahashi, Akira Umehara	4. 巻 4
2. 論文標題 Blooming of toxic cyanobacteria in the Isahaya Bay reclaimed land reservoir, South Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 有明海の環境と漁業	6. 最初と最後の頁 19-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高橋 徹	4. 巻 3
2. 論文標題 諫早湾調整池から排出された アオコ毒素マイクロシスチンは海域で消滅するのか？	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 有明海の環境と漁業	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高橋 徹、梅原 亮
2. 発表標題 淡水産アオコ毒素マイクロシスチンによる有明海の汚染
3. 学会等名 熊本生物研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohru TAKahashi, Akira Umehara
2. 発表標題 Pollution of the shore ecosystem with microcystins (hepatotoxic cyanotoxin) derived from fresh water cyanobacteria
3. 学会等名 3rd Asian Marine Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 徹
2. 発表標題 潮受け堤防による海域生態系の疲弊に追い打ちをかける調整池排水
3. 学会等名 日本プランクトン学会日本ベントス学会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tohru Takahashi, Akira Umehara
2. 発表標題 Microcystine (freshwater origin cyanotoxin) hibernates in the sea bottom.
3. 学会等名 The 4th Asian Marine Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

最終年度におこなった実験の精度に問題があり、一部再実験の必要あり。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	正木 孝幸 (Masaki Takayuki) (00746232)	熊本保健科学大学・保健科学部・教授 (37409)	