化学生態学的手法による湖沼生態系におけるラン藻が関与する諸現象の解明

原 田 健 一

Elucidation of Phenomena Involving Cyanobacteria in Freshwater Ecosystem by Chemically Ecological Approach

Ken-ichi Harada

Faculty of Pharmacy, Meijo University; 150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan.

(Received June 28, 2021)

Lakes Sagami and Tsukui are reservoirs constructed by connecting to the Sagami River. Because of eutrophication of the lakes, cyanobacteria have appeared every year. This review deals with phenomena related to occurrence of cyanobacteria that have been observed for 40 years since 1974 at the lakes. These 40 years of observations raised three interesting issues including the retention of cyanobacteria on their surfaces. These phenomena have been attributed to the usual factors, such as illuminance, nutrition and water temperature, but our research results suggested that they cannot be resolved without the introduction of another factor. We have attempted to elucidate various phenomena involving cyanobacteria in lake ecosystems by chemical ecological methods using volatile organic compounds (VOCs) produced by the cyanobacteria as indicators. One of the VOCs, β -cyclocitral, was significantly involved in the above phenomena, which was considered to be produced by the carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) of the cyanobacteria. β -Cyclocitral was not produced in the two known CCDs, but two additional CCDs to *Microcystis aeruginosa* participated to produce the β -cyclocitral. These CCDs did not directly produce β -cyclocitral, but it was accumulated in cells as their precursors. The released β -cyclocitral underwent a Baeyer-Villiger-like oxidation. It was speculated that *Microcystis* activated the CCD genes through density stress and produced β -cyclocitral, which acted as an allelopathic substance. As a result, the number of cells of cyanobacteria decreased, and the resulting nitrogen and phosphorus were fed to the living cyanobacteria. It is postulated that this “quorum sensing” was functioning in the above-mentioned issues.

Key words—chemical ecology; water bloom; β -cyclocitral; density stress; quorum sensing

1. はじめに

1-1. 背景 水は地球環境において必要不可欠な物質であり、物質や熱の循環を始めとして様々な機能を有している。液状で保持された水は、良質な溶媒で、生物体における最大の構成要素であり、生命の発展においても非常に重要な因子であった。地球は“水の惑星”とも称されるが、水は地表の7割を覆っているものの、地球全体に対する質量比は0.05%と少ない。体積としては14億km³になるが、そのうち96.5%が海水であり、塩水地下水を除くと淡水は2.5%となる。さらに、これらの大半は氷河など凝固した形で存在しており、地下水や河

川、湖沼としての淡水はわずか0.8%である。そして、実際に利用し易い状態で存在している河川・湖沼の淡水に限ると、0.01%に過ぎない。人類やほとんどの陸上生物は、わずか0.01%の水を分け合って生きていることになる。現在、これらの貴重な水源は大量消費により発生した副産物や廃棄物により汚染され、河川や湖沼では富栄養化が進行している。富栄養化は環境問題の1つであり、生活排水や工業廃水、化学肥料や農薬の流入により栄養塩が過剰となった状態である。富栄養化が進んだ閉鎖水域では夏季になるとラン藻類が異常増殖し、水面が緑色に覆われる水の華 (Water bloom)、通称アオコという現象が生起する (Fig. 1).^{1,2)} この現象は悪臭・毒の産生、生態系の破壊や飲用水としての品質低下など様々な問題を引き起こしている。これまでにアオコの対策を目的として、ラン藻に関する研究は昭和中期より盛んに進められてきた。生理学、生

名城大学薬学部 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山150番地)

e-mail: kiharada@meijo-u.ac.jp

本総説は、2020年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Water Bloom of Cyanobacteria at Lake Sagami
(Color figure can be accessed in the online version).

態学, 毒性学や処理方法の探索, 発生予測, 水処理など様々なアプローチで研究が進められ多くの知見が積み上がっているものの, 最終的な解決にはいまだ至っていないのが現況である. ラン藻はおよそ 35 億年前から生息したとされている原核細胞生物であり, 細菌類でありながら光合成を行うための葉緑素を有している. 地球上で初めて光合成を行った生物でもあり, 今日の酸素呼吸型の生物が生息できる環境を作り上げた功労者でもある. また, 分類学においては植物, あるいは微生物としても扱われてきたが, 現在は「cyanobacteria」として細菌に位置付けられている.^{1,2)}

神奈川県北部にある相模湖・津久井湖では 1967 年以降毎年ラン藻が発生し, 大きな問題となっている. 1997 年, 神奈川県企画部科学技術振興課 (当時) が科学技術庁の補助金を得て科学技術総合研究委託費地域先導研究「相模湖・津久井湖の藻類による汚濁機構解明とその浄化・資源化技術に関する研究」をテーマに研究者を招集し, 平成 9-11 年度 (1997 年 4 月-2000 年 3 月) に神奈川県の研究機関, 大学, 国の研究機関等の研究者が 5 部門 14 テーマについて研究を行った. その中で, 神奈川県衛生研究所は, 「藻類の産生するカビ臭と有毒化合物の制御に関する研究」のなかの「生物学的手法によるカビ臭等の分解に関する研究」のテーマの下, 外部結集研究者であった原田の協力で相模湖・津久井湖から溶藻性微生物及び microcystin 分解性微生物の探索を行い, 溶藻活性を持つ 11 株の放線菌と 8 株の細菌, microcystin 分解性細菌 3 株を単離した.

1-2. 相模湖及び津久井湖における 40 年 (1974-2013 年) 間の観察

相模湖は, 富士五湖の 1 つである山中湖を水源とする全長 113 km の相模川 (山梨県下では桂川と呼ばれる) の河口から約 50 km 上流に 1947 年に建造された相模ダムによりせき止められたダム湖である. 一方, 津久井湖は相模湖の約 10 km 下流に 1965 年に建造された城山ダムによりできた人工湖である (Fig. 2). 筆者の共同研究者の一人である有井は, 相模湖及び津久井湖を 40 年間 (1974-2013 年) にわたりラン藻に関する種々の調査を行った. Figure 3 には相模湖及び津久井湖に出現するラン藻類の顕微鏡写真を示す. 発生したラン藻の一部が常に流出している相模湖では, それを上回る増殖を示すときに細胞密度が高くなる. ラン藻は, 29°C 以下では水温が高いほど増殖率が高いため, 相模湖では水温のピークとラン藻の細胞密度のピークはおおむね一致している. 1988 年以降, 神奈川県では水温を下げるために湖に揚水筒という筒をたて, 筒の底から空気を注入することで大きな泡を作り, この泡と一緒に湖底の冷たい水を湖の表面に運ぶ「エアレーション」と呼ばれる装置を導入した. その結果, エアレーション導入前は 7 月下旬から 8 月上旬にピークとなることが多かったのに対し, エアレーション導入後は水温上昇が遅れ, ラン藻のピークは 8 月下旬になり, アオコ状態の期間が短くなり, 10^6 細胞/mL を超えたのは 1997 年 8 月 28 日の 1 回に減少した. しかしながら, 本装置の効果は持続せず, 導入後の 10 年間より最後の 10 年間の方がアオコ状態の期間が増加傾向であった. 一方, 出現するラン藻の種類に関しては, 通常細胞の小さいネンジュモ目 (Nostocales) は細胞の大きい *Dolichospermum* より早く出現するが, 1997 年は 8 月下旬に大発生し, 細胞の大きい *Dolichospermum* より遅く出現した. 8 月は *Microcystis* が優占することが多いが, 9 月中旬には

原田健一

1971 年千葉大学薬学部製薬化学科卒, 73 年同大学院薬学研究科修士課程修了後, 田辺製薬 (株) 発酵化学研究所, 76 年名城大学薬学部助手, 83 年薬学博士 (東北大学), 85 年名城大学薬学部講師, 85 年米国イリノイ大学化学科博士研究員, 88 年名城大学薬学部助教授, 2002 年同大学院総合学術研究科及び薬学部教授を経て 21 年同大学名誉教授.

Fig. 2. Map of Lakes Sagami and Tsukui

Nostocales

Aphanizomenon flos-aquae *Dolichospermum affine* *Dolichospermum mendotae* *Dolichospermum crassum* *Dolichospermum mucosum* *Dolichospermum ucrainicum*

Microcystis

(M. aeruginosa) *(M. ichthyoblabe)* *(M. wesenbergii)*Fig. 3. Micrographs of Several Cyanobacteria Appearing in Lakes Sagami and Tsukui
(Color figure can be accessed in the online version).

水温躍層が弱くなり、流出率が高くなって減少し、10月上旬にはアオコ状態ではなくなった。³⁾

津久井湖においては流出がないため、徐々に蓄積し続けて細胞密度が高くなる。そのため、前期(74-93年)の水温は相模湖同様7月から8月にかけてピークとなったが、ラン藻は増殖率が下がっても蓄

積が続き、そのピークは1994年を除き9月上旬であった。2007年8月下旬に *Microcystis* が 10^7 細胞/mL に達し、平均値の最大も 0.7×10^6 細胞/mL となった。また、*Dolichospermum mendotae* が最も早く出現し、5月にアオコ状態となることもあった。さらに、7月には *Aphanizomenon flos-aquae*,

D. affine, *Microcystis* が出現し、細胞の大きい *Dolichospermum* は比較的少なく、8月中旬以降は *Microcystis* が優占した。津久井湖は相模湖より水温が高く、そのうえ攪拌水深の水量が多いために水温が低下し難く、10月上旬まで 20°C 以上あることが多く、台風による流出がない限り、11月までラン藻がみられた。³⁾

2つの連続したダム湖である相模湖及び津久井湖の40年間(1974–2013年)にわたる長期的記録のうち、生物的及び無生物的なパラメータである栄養塩、水温、細胞密度及び水の滞留がラン藻類の動態へいかに影響するかを評価した。これらのパラメータの栄養塩のうち dissolved inorganic nitrogen (DIN) はいずれの地点でも充足していた。Soluble reactive phosphorous (SRP) は相模湖では過剰にあり、常に利用できていた。一方、津久井湖においては、鉛直分布が変化し、利用性の変化による影響がみられたが、相模湖より濃度が低いにもかかわらず出現量が多いことから、出現量と優占種の変化には SRP の利用性への影響を含め、湖水の流れの影響が大きいと考えられる。最高水温として 23.5°C から 29°C まで観測されたが、この範囲では、ラン藻の出現量と優占種の出現に影響はみられなかった。また、エアレーションの導入により表層水温は約 2°C 低下したが、これは上述の範囲内であった。最もラン藻の出現量と優占種の出現に影響があったのは表層の滞留状況であり、相模湖では通常ネンジュモ目が優占するが、表層が滞留し、流出率が低いときは *Microcystis* が優占した。一方、津久井湖では前期(74–93年)の20年間では表層が完全に滞留してラン藻が流出せず、集積を続け *Microcystis* が優占した。エアレーションを導入した後期でも流出しないが、表層のラン藻は分散し、ネンジュモ目が優占したが、表層が特に滞留したときは *Microcystis* が優占した。したがって、気象条件やダム湖の構造や付帯設備に基づく表層の滞留状況が「優占種がネンジュモ目であるか *Microcystis* であるか」に最も影響していることになる。これまで相模湖で3回、津久井湖で4回の溶藻現象が記録された。そのうち、*Microcystis* がほとんど観察されなかった2回は湖面にできるラン藻の厚い膜状の浮かす(スカムと呼ばれる)が白濁し、*Microcystis* が10%以上のときは青色化を伴った溶藻現象が生じた(Fig.

Fig. 4. Cyanobacteria with Blue Color Formation during Lysis in Lake Sagami
(Color figure can be accessed in the online version).

4). 溶藻現象は、*Dolichospermum* や *Aphanizomenon* が定点で 10^6 細胞/mL 程度の高密度のところでは生起していたが、溶藻現象が起きた地点は定点より高密度で、 10^7 細胞/mL に達していたと推察された。しかし、ほとんどのラン藻が *Microcystis* のときは溶藻現象が起き難く、津久井湖定点で *Microcystis* が 10^7 細胞/mL に達することがあった。*Microcystis* だけが 10^6 細胞/mL のときは、激減することではなく、2ヵ月以上続いたが、 10^7 細胞/mL では約2週間続いた後、1週間で1/100以下に減少した。また、溶藻現象の際に種組成の変化が起こり、*Dolichospermum* や *Aphanizomenon* は減少し、*Microcystis* が優占した。³⁾

1-3. 解明すべき問題点 各種生物的及び無生物的な条件下、湖沼生態系では種々の営みが行われている。上述した40年間(1974–2013年)の観察から以下の3つの興味深い問題が提起された。

1) ラン藻類の増殖と減少

ラン藻の出現量と優占種の出現に最も影響があったのは表層の滞留状況であった。湖沼ではラン藻類の増殖と減少はかならず生起するが、従来から指摘されていた照度、pH、ガス胞、増殖速度、栄養、水温などは決定打にはなっていないようである。それでは、表層の滞留状況で何が起きているのであろうか(Fig. 1)。

2) ラン藻類の溶藻と青色化を伴う現象とは

通常、湖沼生態系で起きる現象は注意深い観察によってのみ見出しされる。上述したように、ラン藻類の溶藻現象は多くは生起していないようである

が、昨日まで真緑だったラン藻類が次の日には白濁したり、あるいは青色化を伴って溶けていることは極めて不思議である。これらの現象は今回の現場である相模湖・津久井湖ばかりではなく、諸外国でも報告されている。一体、何がこれらの現象の原動力になっているのだろうか (Fig. 4)。

3) ラン藻類の種の季節遷移

毎年、湖沼生態系では数種のラン藻類が出現しては消失している。温帯に属している相模湖・津久井湖では、初夏あたりから *Aphanizomenon*、そして *Dolichospermum* が出現し、真夏から初秋には *Microcystis* が現れ、10月頃には消失する。このラン藻類の種の季節遷移には再現性がありそうである。これらの遷移をどのように考えればいいのだろうか (Fig. 3)。

本総説では、神奈川県相模湖・津久井湖で1974年以来40年間観察されてきたアオコ形成に関する現象を扱う。従来、これらの現象は照度、pH、ガス胞、増殖速度、栄養や水温などの因子によるとされてきたが、筆者の研究結果からは他の因子を導入しなければ解決できないことが示唆された。偶然にも、ラン藻由来の溶藻活性化化合物を発見したことにより、「ラン藻が産生し、自らを溶藻する本化合物を研究の中心に据え」、湖沼で生起する諸現象との関連を調査するものである。具体的には、ラン藻自身が産生する揮発性有機化合物 (volatile organic compound; VOC) を指標とする化学生態学的手法により湖沼生態系におけるラン藻が関与する諸現象の解明を試みる。

2. ラン藻類からの VOC の検出と溶藻性

2-1. ラン藻類からの VOC の検出 湖沼生態系では多くの微生物が相互作用しており、当然ラン藻を消滅させる微生物も存在している。筆者たちは溶藻性のためのスクリーニング法を確立させ、⁴⁾ 相模湖や津久井湖の水関連試料から溶藻性微生物の探索を行った。今回の実験において11種の活性のある細菌を見出したが、これらはほとんどが自然界にありふれて存在する *Bacillus* 属類であった。抗ラン藻活性のあった8種 (B-1-B-8) のうちの1つである B-1A 株は、相模湖の底泥より単離されたグラム陽性の好気性桿菌であり、最終的に遺伝研アクセッション番号 D78460 *Brevibacillus formosus* と 98.512% の相同性を示したことから、*Brevibacillus*

sp. と同定された。引き続いて、B-1A 株の培養を行い、その培養液を ODS カラムによる分画を行った。しかし、活性化化合物を見出すことはできず、本細菌が産生する活性化化合物は、ODS カラムによる分画では単離困難であった。⁵⁾ Wright らは、*Bacillus* sp. により産生される VOC が、ラン藻 (主に *Anabaena* 属) の成育を阻害することを報告している。^{6,7)} そこで、B-1A 株の溶藻性は揮発性物質に起因する可能性を考慮し、GC/MS を用いて B-1A 株及びラン藻懸濁液中に含有される揮発性化合物を探索することとした。実際には、GC/MS により以下に示した4種の試料 (試料 a, b, c 及び d) を解析した。なお、桜井培地は細菌類の培養のための培地である。⁸⁾ その結果、桜井培地 (試料 a) と B-1A 株培養液 (試料 b) を比較して B-1A 株からは、ピーク (1) を特異的に検出した。また、National Institute Environmental Study (NIES)-102 ラン藻懸濁液 (試料 c) と B-1A 株をラン藻に添加したラン藻懸濁液 (試料 d) を比較して、共存培養によりピーク (2) 及び生成量が増加したピーク (3) を検出したが、B-1A 株由来ピーク (1) は検出されなかった。ピーク (1) は、GC/MS における保持時間及びマススペクトル解析より 8-methyl-2-nonanone と推定した。また、ピーク (2) 及び (3) のマススペクトルをデータベースに照合した結果、ピーク (2) は 3-methyl-1-butanol、ピーク (3) は β -cyclocitral であると同定した (Fig. 5)。⁹⁾ これらの揮発性化合物のうち 3-methyl-1-butanol は、Wright らの報告によりラン藻溶藻活性を持つ VOC であることが明らかとなっており、⁷⁾ β -cyclocitral は、Jüttner らが *Microcystis* 属から検出される揮発性化合物として報告している化合物である。^{10,11)} さらに、被検ラン藻 NIES-73, 103, 112, 298 株に対しても、同様に B-1A 株共存培養3日目の培養液を GC/MS 分析したところ、すべての被検ラン藻から β -cyclocitral が検出され、3-methyl-1-butanol は NIES-73 以外のラン藻株において検出された。

2-2. ラン藻類由来 VOC の溶藻活性 B-1A 株が溶藻性を示すにもかかわらず、活性本体を単離することはできなかったが、ラン藻自身からは β -cyclocitral や 3-methyl-1-butanol が検出された。既に示したように、B-1A 由来の溶藻性を追跡すると、その比活性は精製を進めるに従って減少する。それ

Fig. 5. Structures of Volatile Organic Compounds (VOC) Derived from *Microcystis aeruginosa* NIES-102
Reproduced with permission from *Chemosphere*, 71 (8), 1531–1538 (2008). Copyright 2008 Elsevier.

Fig. 6. Structures of Volatile Organic Compounds (VOC) from Cyanobacteria

を考慮するとラン藻自身が生産する揮発性化合物が上述した溶藻性に関与していると推察された。そこで、NIES-102 株を被検ラン藻として、ラン藻が産生する VOC, β -cyclocitral, β -ionone, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, 1-butanol, geosmin 及び 2-methylisoborneol (2-MIB) の溶藻性を調べた (Fig. 6)。クロロフィル吸光度測定法により β -cyclocitral 及び β -ionone の添加量をそれぞれ 0.01, 0.1, 1 mL としたときの溶藻性の検討を行った。 β -Cyclocitral を 1 mL 添加した 65 mM 溶液では添加 30 分後に懸濁液の色調が鮮やかな青色に変化し, 0.1 mL 添加した 6.5 mM 溶液では 1 時間後に青色に変化した。その後, 1 日以内に溶藻は完了し, 白濁した。しかしながら, 0.01 mL 添加溶液では溶藻活性は観察されなかった。一方, β -ionone は 0.01 mL 添加した 0.5 mM 溶液でも溶藻が観察され, いずれの濃度においても添加 6 時間後に黄緑色を呈し, その後白濁し, 一日で溶藻が完了した。結果的に, 添加した化合物によって懸濁液の色調が異なる溶藻現象が観察された。⁹⁾ β -Cyclocitral による特徴的な青色化現象は非常に興味深く, chlorophyll *a* 及び β -carotene が分解し, phycocyanin による色が現れたものと考えられた。 β -Cyclocitral は *Microcystis* 属ラン藻が産生する揮発性の化合物であり,^{11,12)} 本化合物は緑藻類の *Chlorella pyrenoidosa* の成長阻害作用を持つことが

Ikawa らにより報告されている。¹³⁾ 3-Methyl-1-butanol は 0.058 mL 添加した 6.5 mM 溶液では溶藻活性は観察されず, 0.58 mL 添加した 65 mM 溶液において 4 日間かけて徐々に溶藻が進行した。同時に行った 6.5 mM β -cyclocitral 添加液と比べて 10 倍以上溶藻活性が低かった。また, 最大濃度が 2 mM (β -cyclocitral の溶藻活性評価濃度の 3 分の 1) の geosmin と 2-MIB^{10,12)} では添加直後から懸濁液の色調が変化し, β -cyclocitral や β -ionone よりも急速に溶藻が進行し, 添加後 6 時間で chlorophyll *a* の吸収を消失することを確認した。最も溶藻の進行が早かったのは geosmin で, つぎに 2-MIB であった。以上の結果から, 最も低濃度で溶藻活性が観察されたのは β -ionone で, 0.01 mL 添加した 0.5 mM 溶液であった。逆に, 3-methyl-1-butanol は溶藻活性が低く, 65 mM 溶液で溶藻活性が観察された。 β -Cyclocitral は 0.1 mL 添加した 6.5 mM 溶液で溶藻活性が確認され, 懸濁液の色調が青色に変化する特徴的な溶藻現象が観察された。⁹⁾

2-3. 溶藻活性と疎水性 これまで述べた結果から, ラン藻が産生する揮発性化合物によって自身が溶藻することが明らかとなった。これらの化合物は揮発性を有する低分子化合物であることから, これら溶藻活性に関与する因子として疎水性が溶藻現象を生起すると推察した。そこで, 同様の性質を有し, 抗菌活性を有することが報告されているテルペ

Fig. 7. Structures of Terpenoids from Plant

Reproduced with permission from *Chemosphere*, 71 (8), 1531–1538 (2008). Copyright 2008 Elsevier.

ノイド^{14–16}が溶藻性を示すか否かを検討した。今回、実験に用いた化合物はアルデヒド基、アルコール性水酸基、フェノール性水酸基、ケトン基を有する植物性テルペノイド (Fig. 7) である。Table 1 にはこれらの化合物の疎水性を数値化した分配係数 $\log D$ 、分子量 (M. W.) 及び minimum inhibitory concentration (MIC) をまとめた。 $\log D$ 値は水と 1-octanol 間の pH 依存分配係数の対数で、しばしば疎水性のパラメーターとして使用されている。^{17,18} つぎに、溶藻活性の尺度となる MIC を求め、物理化学的性質と溶藻活性の間に相関関係があるかを考察した。さらに、 β -cyclocitral を添加した際に観察された青色化現象を示す化合物があるか否かを調べるために、溶藻時の懸濁液の色調変化の観察も併せて実施した。疎水性数値 $\log D$ は酸解離定数 (pK_a) を考慮したものであり、ここでは溶藻活性の評価を行うにあたり、MA 培地²⁾への添加が想定されたため pH 8.6 における値を用いた。数値は大きいほど疎水性が高く、小さいほど親水性が高いことを示している。テルペノイドの $\log D$ 値は 0.31 から 4.39 の間に分布し、最も疎水性が高い化合物は β -ionone で、つぎに geosmin、ついで geraniol 及び linalool であった。逆に、最も疎水性の低い化合物は vanillin、ついで 3-methyl-1-butanol, cinnamaldehyde の順であった。これらの化合物の分子量は 88.15 から 192.30 の間に分布し、最も大きい化合物は β -ionone で、つぎに geosmin であ

Table 1. $\log D$, Molecular Weight (M. W.) and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Terpenoids and Volatile Organic Compounds (VOC) from Cyanobacteria

	$\log D$	M. W.	MIC (mM) ^a
β -ionone	4.39	192.30	2.5
geosmin	3.84	182.30	3.0
geraniol	3.28	154.25	0.6
linalool	3.28	154.25	2.5
thymol	3.28	150.22	0.15
carvacrol	3.27	150.22	0.15
β -cyclocitral	3.26	152.23	2.0
menthol	3.20	156.27	2.5
citral	3.17	152.24	0.6
2-MIB	2.77	168.28	2.5
perillaldehyde	2.68	150.22	0.6
menthone	2.63	154.25	5.0
cinnamaldehyde	2.12	132.16	0.15
3-methyl-1-butanol	1.22	88.15	200
vanillin	0.31	152.15	0.3

^a These were obtained using NIES-102 strain. Reproduced with permission from *Chemosphere*, 71 (8), 1531–1538 (2008). Copyright 2008 Elsevier.

た。これは $\log D$ 値の高い順とも一致した。逆に、最も小さい化合物は 3-methyl-1-butanol であった (Table 1)。同一条件下で算出された MIC 値を比較すると最も溶藻活性が高かった化合物は植物テルペノイド thymol, carvacrol, 及び cinnamaldehyde で、ラン藻由来揮発性化合物の 10 倍低濃度で発育阻害を示した。ラン藻由来揮発性化合物の MIC 値はほぼ等しく、2.5 mM 前後であったが 3-methyl-1-

butanol は他と異なり、著しく高濃度であった。クロロフィル吸光度測定法による溶藻活性評価において、ラン藻由来揮発性化合物では最も活性が高く、2 mM で急速な溶藻を示した geosmin の MIC 値は 3 mM と 2-MIB のそれより高い値を示した。一方、植物テルペノイドの MIC 値は様々な数値を示し、フェノール性水酸基やアルデヒド基を有する化合物の活性が高く、アルコールやケトン基ではやや活性が低い傾向にあった。官能基が活性に関与しているとされているが、¹⁹⁾ ラン藻由来揮発性化合物にはこの傾向が当てはまらなかった。さらに、使用したテルペノイドの log *D* 値と MIC 値との間に相関性があるか確認したところ、相関係数 $r = -0.439$ であり、両者の間に相関関係は成立しないと考えられた。

2-4. ラン藻由来アルコール類 上述したように、ラン藻由来揮発性化合物には β -cyclocitral や β -ionone ばかりではなく 3-methyl-1-butanol ようなアルコールも存在していた (Fig. 6)。Microcystis 属の産生するアルコール類が酵母の産生するアルコール類²⁰⁻²²⁾と同様に 2-keto-acid decarboxylase (KDC) 由来であることを明らかにするため、全ゲノムの解明された NIES-843 を用いて KDC に相当する遺伝子を探したところ、目的遺伝子が確認され、MaKDC と名付けた。この MaKDC を大腸菌へ挿入し、生成物を探索したところ、MaKCD 挿入大腸菌より、2-methyl-1-butanol 及び 3-methyl-1-butanol だけでなく、新たに 2-phenylethanol も検出され、産生量は 2-phenylethanol > 3-methyl-1-butanol > 2-methyl-1-butanol であった。したがって、MaKCD は 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol 及び 2-phenylethanol の生成に関与していることが示された。²³⁾ そこで、大量に培養した MaKDC 発現大腸菌から酵素である MaKDC を精製した後、2-keto-4-methylpentanoate, 2-ketomethylvalerate, 2-ketoisovalerate, phenylpyruvate, pyruvate 及び indole-3-pyruvate の 6 種の 2-ケト酸を基質として、MaKDC の脱炭酸活性を測定した。その結果、2-keto-4-methylpentanoate, 2-ketomethylvalerate, 2-ketoisovalerate 及び phenylpyruvate は、それぞれ 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, isobutanol 及び 2-phenylethanol へと変化し、脱炭酸活性が確認された。また、これらの基質に対する活性の強さは

2-keto-4-methylpentanoate > phenylpyruvate > 2-ketomethylvalerate > 2-ketoisovalerate の順であり、MaKCD 挿入大腸菌における産生実験とは異なる結果となった。これは、MaKDC としては 2-keto-4-methylpentanoate に対する活性が最も高いが、生体から産生される場合、他の環境的な要因が影響しているためであると考えられた。キラルカラムを用いた Microcystis 属の産生する 2-methyl-1-butanol の絶対配置の確認を行ったところ、(S)-(-)-2-methyl-1-butanol と決定され、L-isoleucine と同様の絶対配置を持つことが明らかとなった (Fig. 6)。以上のことから、Microcystis 属の産生するアルコール類は MaKDC 由来であることが明らかとなった。²³⁾

Microcystis 属の産生する 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol 及び 2-phenylethanol などのアルコール類の役割を明らかにするために、Microcystis 属の成長、培地に含まれる硝酸態窒素の推移及び産生されるアルコール類の挙動を比較した。その結果、アルコール類は Microcystis 属の培養における死滅期後期に大量に産生されており、そのとき、培地中の硝酸態窒素はすべて消費されていた。さらに、自然界においても Microcystis 属が大量に発生し、溶藻が引き起こされている状況において、大量に産生されていることが確認されている。²⁴⁾ これらのことから、2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol 及び 2-phenylethanol などのアルコール類は老化若しくは環境の悪化したときに産生され、Microcystis 属の生活環に関与していることが考えられた。また、2-phenylethanol は本実験によって初めて Microcystis 属からの産生が明らかにされ、さらにアルコール類の中で最も多く検出されたことから、Microcystis 属の生活環に対し重要な役割を担っていることが示唆された。

2-5. ラン藻類由来の VOC による溶藻形態

Microcystis 属由来揮発性化合物 β -cyclocitral と β -ionone 及び Anabaena 属や Oscillatoria 属が産生するカビ臭化合物の geosmin や 2-MIB によってラン藻自身が溶藻することが判明している。一体どのようにして細胞を破壊しているのか、水及びメタノールを加えたものを陰性コントロールとして、ラン藻由来揮発性化合物による溶藻時の細胞形態変化を走査型電子顕微鏡により観察し、比較を行うとともにクロロフィル吸光度測定法も併せて実施した。

陰性コントロールの水及びメタノール中では、50時間以上経過しても細胞表面が滑らかであったのに対し、6.5 mM 濃度の β -cyclocitral 及び β -ionone における形態変化は添加後1時間程度でしわが形成され、縮小している様子が観察された。また、クロロフィル吸光度測定法により得られる chlorophyll *a* 量の減少よりもラン藻細胞の形態変化が先に起こることが判明した。このことから、揮発性化合物を細胞の外側から加えた場合、細胞膜若しくは細胞膜を通して細胞内へ傷害を与え、chlorophyll *a* 量が減少することが示唆された。さらに、培養を続けて15時間ほど経過し、chlorophyll *a* がほとんど検出されなくなる頃には細胞は壊れて凝集し、残骸の塊となっている像が観察された。結果的に、 β -cyclocitral 及び β -ionone による形態変化はしわ型を示した。²⁵⁾ 種々の官能基を有する植物性テルペノイドでアルデヒド基を有する perillaldehyde 及びアルコール性水酸基を有する linalool による溶藻時の形態変化を観察した。これらは形態変化を示すまでの時間はラン藻由来揮発性化合物より遅い傾向にあるが、perillaldehyde は試薬添加後2時間で細胞表面全体の剥離が観察され、linalool は9時間で細胞表面の一部が剥ぎ取られたような変化が観察された。一方、アミノ酸である β -cyano-L-alanine や L-lysine^{26,27)} ではその形態変化にはしわ型は認められず、中央陥没型であった。²⁵⁾ つぎに、特徴的な溶藻性を示した β -cyclocitral 及び L-lysine を作用させ、透過型電子顕微鏡を用いてその細胞内小器官の変化を観察した。その結果、 β -cyclocitral は細胞膜全体に作用し、穴が空いた様子が観察された。細胞内のチラコイド膜は残存しており、フィコビリソーム顆粒が細胞中心部に多く観察された。このことから、細胞膜に傷害を与える植物テルペノイドとは異なり、 β -cyclocitral では細胞内部で中心に集まっていたフィコビリソーム顆粒若しくはそれ以外の器官へなんらかの作用を与えていることが推察された。一方、L-lysine は細胞壁及び細胞膜の一点に作用し、チラコイド膜は残存した状態で、その他の小器官が消失していた。²⁵⁾

3. β -Cyclocitral による青色化を伴う溶藻現象と呈色機構

3-1. 青色化現象 ラン藻類は自身の増殖過程で産生する芳香性化合物の β -cyclocitral や β -ionone

及びカビ臭物質の geosmin や 2-MIB などの揮発性有機化合物により溶藻することが判明した。その際、ラン藻は緑色から黄緑色を経て白色へと変化した。が、 β -cyclocitral の場合にのみ、極めて特徴的な青色を呈した後、白濁することが確認された。^{9,28)} しかしながら、化学的性質が類似した植物由来の揮発性化合物を用いた溶藻過程ではこのような青色化現象は観察されなかったことから、 β -cyclocitral が自然界で生起する溶藻現象に深く関与していると推測された。この仮説を証明するためラン藻に β -cyclocitral 及び比較対照として β -ionone を添加した際の変化を詳細に観察した。一般に、ラン藻細胞は吸収波長の異なる3種の光合成色素、chlorophyll *a*、 β -cyclocitral 及び phycocyanin を有しており、青色化現象はこれらの色素が溶藻により培養液中に溶出し、光などにより分解することにより引き起こされていると考察された。NIES-102 を被験ラン藻として、 β -cyclocitral 又は β -ionone を添加し、紫外可視分光光度法により培養液中の光合成色素の消長を追跡した。添加前の被験ラン藻懸濁液を測定すると、420 nm と 680 nm 付近に chlorophyll *a* のピークを、また 500 nm 付近に β -carotene のピークを、さらに 620 nm 付近に phycocyanin のピークが出現する。 β -Cyclocitral 添加によって青色を示すとき、添加前に存在した chlorophyll *a* と β -carotene のピークが消失し、615 nm 付近のピークのみが残存していた。一方、 β -ionone を添加したものは、特定のピークが先に消失する現象はみられず、同一の割合で各ピークの減少が観察された。水を添加した場合には、その特徴的なスペクトルパターンを保ったまま吸光度が徐々に増加し、ラン藻が増殖していることを示している。²⁸⁾ 以上の結果、 β -cyclocitral 添加による培養液の青色化現象は、青色色素の phycocyanin に由来すると結論される。すなわち、phycocyanin は chlorophyll *a* よりも β -cyclocitral に対して安定であり、 β -cyclocitral を添加すると chlorophyll *a* が phycocyanin よりも先に消失することを示している。一方、 β -ionone は β -cyclocitral のように、chlorophyll *a* や β -carotene を特異的に分解する能力は有しておらず、3種の色素を同様に分解していく。すなわち、 β -cyclocitral を添加した場合、その直後では懸濁液表面に油滴が観察されるが2時間ほど経過すると油滴は消失した。一方、 β -io-

Fig. 8. pH of the Resulting Solution Added with β -Cyclocitral and β -Ionone

Reproduced with permission from *J. Chem. Ecol.*, 35(11), 1295–1301 (2009). Copyright 2009 Springer.

none を添加した場合には油滴の消失は観察されなかった。おそらく、この挙動の違いが、 β -cyclocitral と β -ionone の chlorophyll *a* への挙動の違いに反映しており、特に β -cyclocitral が親水性の化合物に変化していることを示唆している。²⁸⁾

3-2. 培養液の酸性化 被験ラン藻に β -cyclocitral を添加し、一定時間経過後の pH を測定したところ、いずれの株においても直後から pH の低下が起き、添加から約 3 時間で pH 5.5 付近まで低下した。一方、 β -ionone を添加したものでは pH の顕著な低下は起きず、溶藻後も pH 8.0 付近を維持した。コントロールとして水を添加したものでは、pH は逆に上昇した。これはラン藻の成長に伴い、盛んに行われる光合成によって水中の二酸化炭素が消費されたためである。ラン藻に β -cyclocitral を添加すると β -ionone 又はコントロールとしての水を添加したときと比較して明らかに pH が低下した (Fig. 8) が、その pH は Huang らの報告の値 (pH 3.6 以下で溶藻) よりかなり高かった。²⁹⁾ また、 β -ionone 添加時では溶藻は起こるにもかかわらず pH の低下が起きなかったことから、溶藻と青色化現象は同一の機構で生起していないと考えられた。以上述べてきた結果から、 β -cyclocitral のアルデヒド基が水溶液中でカルボキシル基へと変化し、結果的に反応液が酸性を示すと推察された。そこで、水又は MA 培地にアルデヒド基を有する化合物を添加し、pH 変化を追跡した。 β -Cyclocitral を添加した場合、水中においても、緩衝能のある培地中でもその直後から pH の低下が起こり、安定するまでに時間は必要であったが、pH 4 前後まで低下し、その後はほぼ一定となった。水に cinnamaldehyde を添加

した場合、 β -cyclocitral と同程度の酸性を示したが、MA 培地中では pH 低下を示さなかった。Perillaldehyde を水に添加した際、直後からの急激な pH 変化は認められなかったものの、徐々に低下し、19 時間後には pH 4 と酸性溶液となったが、やはり MA 培地中では酸性を示さなかった。Citral 及び vanillin を水に添加した場合 pH 8 から pH 6 にまで低下したものの、培地中で pH が低下したものは vanillin のみであった。以上の結果から、 β -cyclocitral は他のアルデヒド体とは異なり、極めて特徴的な挙動を示すことが示された。すなわち、培養液に添加した際にはその直後から bicine の緩衝作用を超えるほどの酸性化合物に変換されていることが明らかとなった。結果的に、生成した酸性化合物による急激な pH 低下によって chlorophyll *a* は分解され、phycocyanin が顕在化し、結果的に懸濁液の青色化が生起したことになる。²⁸⁾

3-3. β -Cyclocitral の酸化機構 水溶液に β -cyclocitral を添加するとその水溶液の pH が急激に低下した。このことから疎水性で油状物質の β -cyclocitral は水に添加直後から水溶性の酸性化合物へと変化することが示唆され、溶藻や青色化には β -cyclocitral そのものではなく、水との反応後に生じた酸性化合物が関与していると推測された。そこで、生成する酸性化合物の同定を試みた。まず、水に β -cyclocitral を添加して鮮やかな青色を呈する 20 時間経過した水溶液から酸性及び中性・塩基性化合物を分画した。酸性画分から得られた生成物を LC/MS 及び NMR によりスペクトル分析を行った。その結果、 β -cyclocitral を水に添加すると直ちに酸化を受けてカルボン酸となり、分子量 168 の酸性化合物、2,6,6-trimethylcyclohexene-1-carboxylic acid (β -cyclocitric acid) が生成することが判明した。結果的に、水中における β -cyclocitral より β -cyclocitric acid への酸化はなんら酸化剤を添加しなくても容易に進行することが判明した。³⁰⁾ 一体、どのような経路で酸化されるのか、また上述したように β -cyclocitric acid だけではなく複数の生成物の存在が示唆された。これらを明らかにする目的で、 β -cyclocitral を水に添加した後、その酸化挙動を GC/MS を用いて調査した。まず、 β -cyclocitral を水に添加した後、0, 1, 3, 5, 10, 24 及び 72 時間毎に培養液を採取した。採取した試料の pH を測定後、

Fig. 9. GC/MS Chromatograms of the Reaction Products of β -Cyclocitral with Water after 1 and 72 Hours
Reproduced with permission from *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**(12), 11998–12006 (2016). Copyright 2016 Springer.

Et₂O 抽出し、得られた Et₂O 層の GC/MS 分析を行った。その結果、 β -cyclocitral 添加 1 時間後には、 β -cyclocitral 及び β -cyclocitric acid 以外に出発原料由来の peak A のピークが確認され、 β -cyclocitric acid 以外のピークは 72 時間後にほぼ消失していた (Fig. 9)。Peak A の EI マススペクトルを確認したところ、分子イオンである m/z 168 以外に、フラグメントイオンとして m/z 153, 140 及び 125 が確認され、これらはそれぞれ ($M^+ - 15$), ($M^+ - 28$), ($M^+ - 43$) と考えられ、peak A は β -cyclocitral のエノールエステル体である 2,6,6-trimethylcyclohex-1-ene-1-yl formate であると推定された。本化合物の同定は別途調製した標準品及びその ¹H-NMR スペクトル及び高分解マススペクトルにより、2,6,6-trimethylcyclohex-1-ene-1-yl formate であることを確認した。得られたエノールエステル体の構造確認及びその安定性を調べるために、GC/MS 分析を用いて本化合物の各 pH における安定性を調べた。その結果、本化合物は酸性及び中性下では安定であったが、アルカリ性下においては 2,2,6-trimethylcyclohexanone へと分解され、24 時間後には開始時のほぼ半分の量に減少していた。³⁰⁾ 以上の結果から、 β -cyclocitral の水中での酸化は Baeyer-Villiger 型で進行し、主に β -cyclocitric acid と 2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate を与えることが示された (Fig. 10)。

3-4. 相模湖における青色化を伴う溶藻現象

ここまでは主に実験室において β -cyclocitral によるラン藻の青色化を伴う溶藻現象を議論してきた。一方、野外ではラン藻が高密度で発生した湖面の一部が青白色に変色した溶藻現象が生起することは早くから知られ、溶藻活性を持つ原生動物や細菌等についての多くの報告がある。³¹⁻³³⁾ また、溶藻現象として認識されていないため溶藻現象とは記述されていないが、多くのラン藻の水の華に関する総説や解説等に出されている写真には白色や青色に変色した部分がみられ、密度の高いアオコでは一般的な現象である。³⁴⁻³⁶⁾ 2013 年 9 月、相模湖で青色化を伴う溶藻が観察された。この年はこれまでで最も降水量が少なかったが、宮ヶ瀬湖からの導水により相模湖からの放流量を減らしていたため、水位低下は 2 m 程度であり、滞留時間は相模湖としては最も長く、6-8 月の平均は約 16 日で、発電放流を停止している時間が長かった。9 月 6 日に取水口前からアオコフェンス沿いに相模湖大橋付近まで青色化を伴った溶藻現象が生起した。このとき、上流に向かった風 (海風) が吹き始め、青白色のスカムがアオコフェンス沿いに湖心方向に流れていた。Station (St.) 8 の溶藻スカム、St. 7 のアオコフェンスより取水口側の緑色のスカム、St. 6 の溶藻現象の地点から離れた左岸よりの薄いラン藻を採取した。近寄れないためサンプリングできなかったが、2001 年に溶藻

Fig. 10. Reaction Scheme of β -Cyclocitral with Water

Reproduced with permission from *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23(12), 11998–12006 (2016). Copyright 2016 Springer.

現象が生じた地点 St. 5 がロープで囲われており、その地点においても青色化がみられた。³⁷⁾

2013 年、相模湖でのラン藻は、7 月上-中旬及び 8 月下旬-9 月上旬は、*Dolicospermum mucosum* が優占しており、9 月 3 日 St. 5 では 84% が *D. mucosum*、14% が *Microcystis* であったが、9 月 6 日の St. 6 では *D. mucosum* がやや減少して 74%、*Microcystis* 14% であった。溶藻していた St. 8 では *D. mucosum* は 6% に激減、*Microcystis* は 72% に増加して優占種となり、それまでは少なかった *D. crassum* は増加した。St. 7 も *D. mucosum* は 37% に減少、*Microcystis* 63% になり、優占種となった。一方、採取した湖水はろ過し、そのろ液を Et₂O 抽出し、通常の GC/MS により分析し、 β -cyclocitric acid 等の β -cyclocitral の酸化生成物を分析した。検出限界が 10 ng/L であり、 β -cyclocitral は検出限界以下であったが、 β -cyclocitral の酸化生成物である 3 化合物、 β -cyclocitric acid、エノールエステル体の 2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate、2,2,6-trimethylcyclohexanone が高濃度で検出され、pH の低下も確認された。 β -Cyclocitral の添加実験では、酸化生成物は β -cyclocitric acid が圧倒的に多かったが、St. 8 においては、pH は 6.2 に低下していたが 2,2,6-trimethylcyclohexanone の濃度が β -cyclocitric acid より高いことが特徴的であった (Fig. 11)。なお、St. 6 では β -ionone だけが検出され、St. 7 では細胞密度が高く、通常は pH が 10 前

後あるはずであったが、pH は St. 6 より低く、 β -cyclocitric acid も検出された。³⁸⁾

4. VOC による種々のラン藻類に対する感受性

4-1. 各種ラン藻に対する VOC の MIC これまでに観察された溶藻現象の際、種組成の変遷がみられ、特に 2008 年及び 2013 年で顕著であった。これは、ラン藻種により VOC に対する感受性に差があるためであると考えられた。そこで、数種の NIES 保存株を購入し、各 VOC に対する MIC を測定するとともに相模湖・津久井湖に出現するラン藻類の感受性を比較した。MIC の測定は、試験管法とマイクロプレートリーダー法の両者を用いた。 β -Cyclocitral、 β -ionone、 β -cyclocitric acid は 20 mM、2,2,6-trimethylcyclohexanone は 40 mM から順次 1/2 濃度になるように 6 段階の MA 培地に各揮発性化合物を添加した希釈列を 10 mL ずつ、 β -cyclocitric acid は試薬量が少ないことから 1 mL ずつ用意し、等量のラン藻懸濁液を加えて培養した。*Microcystis* NIES-298 に β -cyclocitral を添加した実験の経過においては、10 mM の添加では瞬時に青色化、翌日には退色し、5 mM の添加では翌日に青色化、3 日目には退色などが観察された。通常は 5 日後、野生株では 7 日後に攪拌後 10 mL 中 5 mL を、 β -cyclocitric acid は全量を GF/A でろ過して chlorophyll *a* を MeOH で抽出して濃度を測定した。このような実験を各 3 回繰り返し、平均値を求めた。³⁹⁾ その結果、 β -ionone、 β -cyclocitral、 β -cy-

Fig. 11. Amounts ($\mu\text{g/L}$) of β -Cyclocitral and Related Compounds and pH Values in Collected Samples from Sts. 6, 7 and 8 at Lake Sagami on September 6, 2013

Reproduced with permission from *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, 15, 11–16 (2016). Copyright 2016 Meijo University.

clocitric acid, 2,2,6-trimethylcyclohexanone の順に溶藻活性が強く、 β -cyclocitral に対する感受性は、*D. mendotae* > *Aphanizomenon* > *D. affine* > *D. mucosum*, *D. ucrainicum* > *D. crassum* > *Microcystis* の順に高く、溶藻現象の際の種組成の変遷と一致した。また、*Microcystis* は、自然界では、厚い粘質物質に包まれ、細胞が密集していることから NIES 株を用いた実験室での感受性の違い以上に他のラン藻より感受性が低い。⁴⁰⁾ これは、粘質物質に保護され、塊になっていることにより、内部の細胞に揮発性化合物が接触し難いことによると考えられる。また、VOC の溶藻活性は、 β -ionone > β -cyclocitral > β -cyclocitric acid > 2,2,6-trimethylcyclohexanone の順に強かったが、 β -cyclocitral の酸化生成物である β -cyclocitric acid と 2,2,6-trimethylcyclohexanone にも β -cyclocitral より弱いものの、同様に溶藻活性が認められた。しかし、 β -cyclocitral 酸化後の酸化生成物濃度では閾値に達しないが、一定時間後、添加濃度に応じて chlorophyll *a* 濃度が低下することから最初に接触する β -cyclocitral 濃度が重要である。また、 β -ionone は β -cyclocitral より溶藻活性が高いが、*Microcystis* 以外のラン藻も産生することから β -cyclocitral より検出されることが多く、計算上の作用濃度を上回っているにもかかわらず、 β -ionone によると考えられる事例が 1 例しかないことから、疎水性があまりに強いため、 β -

cyclocitral と比較すると影響は少ないと考えられる。

4-2. Log *D* を用いる作用濃度 MIC 測定で得られた VOC 濃度は、自然界から得た溶藻サンプルでの VOC 濃度よりけた違いに高い。 β -Cyclocitral を始めとする VOC は疎水性であり、添加した化合物のごく一部が水に溶解して溶藻活性を示すと考えられる。Table 1 に β -cyclocitral 及び関連化合物の分配係数 (Log *D*) を示した。Table 1 に示した MIC 濃度 (mM) を log *D* を自然数化した数 (β -cyclocitral であれば 1820) で割った濃度 ($\mu\text{M/L}$) が、MIC の濃度の VOC を添加したときに水に溶解し、ラン藻に作用すると考察した。これは、溶藻現象を引き起こす閾値に近い値とも言える。例えば、最も感受性の高い *A. flos-aquae* の β -cyclocitral による MIC は 0.6 mM で、その 1/1820 である 0.3 μM (50 $\mu\text{g/L}$) が 0.6 mM を添加したときに作用し、chlorophyll *a* が 50% となる濃度である。これは、2008 年に津久井湖での溶藻現象の際に得られた 8 月 5 日の 50 $\mu\text{g/L}$ 、12 日 100 $\mu\text{g/L}$ と同等である。しかしながら、この濃度では *Microcystis* は溶藻しない。また、 β -cyclocitral は、すみやかに酸化されて β -cyclocitric acid 及び 2,2,6-trimethylcyclohexanone になる。半減期は 1 時間程度で、これらの酸化生成物は溶藻活性が低く、20 倍以上の高濃度でないと作用濃度にならないが、酸化生成物ではなく、最初に添加した β -cyclocitral 濃

度に応じて、数日後に溶藻していた。したがって、最初に接触する VOC 濃度が重要である。このように、各 VOC はその溶藻活性が異なり、それに基づいてラン藻の種により感受性に差が生じ、自然界で生起する溶藻現象における種の変遷が説明可能となった。結果的に、これは自然界での種の変遷と一致し、感受性の高い種は、*Microcystis* が増殖すると減少する傾向となる。さらに、溶藻現象が起こらない濃度でも沈降し易くなるなどの影響があり、種の変遷に β -cyclocitral が関与している可能性が強く示唆された。³⁹⁾

4-3. メスシリンダー法 これまで相模湖・津久井湖で観察された溶藻現象は、いずれも堰堤に近く、ラン藻が高密度に集積したところで生起していたことから、密度ストレスが溶藻現象、そしてそれに引き続く種の変遷の引き金の 1 つとして重要な役割を果たしていると推察された。このことを検証するために以下に示す一連の実験を行った。すなわち、津久井湖から採取したラン藻をメスシリンダーに入れて静置し、ラン藻が持つガス胞による浮上能力を利用して稠密化し、経過を観察した (メスシリンダー法)。⁴¹⁾ 7 月 22 日、ゴミ除けフェンス脇に集積していたラン藻を採取し、500 mL のメスシリンダーに注いだ。採取したラン藻類では、*D. affine* が優占種で、ついで *D. mendotae*、*Microcystis* であり、*A. flos-aquae* は非常に少なく、 10^4 細胞/mL 以下であった。ラン藻の合計細胞密度は、 8.3×10^6 細胞/mL であったが、5 時間後にはラン藻は上層 60 mL に移動し、細胞密度は 10 倍になった。翌日、上層のラン藻は約 40 mL になり、約 20 mL は底層に沈降した。*D. mendotae* は底層に多く、上層では減少していたが、*Microcystis* は上層のほうやや多かった。このときの上層の細胞は健全に見えたが、底層に沈降したラン藻は群体が小さく、単細胞になったものもみられ、細胞はガス胞が少なく、弱っているようであった。2 日後は、変化していないように見え、サンプリングしなかったが、3 日後には上層のラン藻は非常に少なくなり、底層のラン藻はほとんど溶藻して褐色となった。⁴¹⁾ つぎに、採取試料の pH 値、 β -cyclocitral とその関連化合物の分析結果 ($\mu\text{g/L}$)、*Microcystis* の細胞密度 (細胞/mL)、ラン藻全体の細胞密度 (細胞/mL) を測定した。22 日の開始時の試料 (A) は、すぐには Et_2O

抽出できなかったため、試験管に分取して冷蔵庫に保管、3 時間後に抽出しようとしたときは、試験管の中で上下の層に分かれており、津久井湖で多項目測定器を用いた現場での測定では pH は 9.9 であったが、この試験管では 7.8 に低下していた。 β -Cyclocitral 濃度は、 $10 \mu\text{g/L}$ 以下であったが、 β -cyclocitric acid、2,2,6-trimethylcyclohexanone、 β -ionone が検出された。5 時間後の試料 (B) からは β -cyclocitral も検出された。翌日の試料は、表層 (C) 及び底層 (D) のろ液が青色を呈し、 β -cyclocitric acid が検出され、 β -cyclocitral は全層で検出された。(B) から (D) の表層及び (C) から (D) の底層では pH は約 6 に低下し、 β -cyclocitric acid が検出された。2,2,6-Trimethylcyclohexanone 及び β -ionone はすべての試料から検出された。⁴¹⁾

4-4. ラン藻の種の変遷 メスシリンダー法を用いて湖沼から得たラン藻を稠密化する実験の結果、細胞密度を成功裏に増加させ、最大細胞密度は 8.3×10^7 細胞/mL に達した。ラン藻を含む湖水の pH は、実験前は 10 前後であったが、これまで相模湖・津久井湖でみられた溶藻試料と同様 6 前後に低下し、青色化が観察され、 β -cyclocitral とともに β -cyclocitric acid を検出した。⁴¹⁾ メスシリンダー実験により、ラン藻類が稠密化され、結果的に *Microcystis* 細胞から β -cyclocitral を放出させ、*Microcystis* 細胞自身及び *Dolichospermum* などの他のラン藻を溶解させた。さらに、 β -cyclocitral は対応する β -cyclocitric acid 及び 2,2,6-trimethylcyclohexanone へと急速に酸化され、pH は急速に低下し、その酸ストレスによって chlorophyll *a* 及び β -carotene は分解された。これらの連続する事象の結果として、phycocyanin が残存することにより青色化が達成されたことになる。上層に浮上したラン藻は、およそ 2:1 の割合で表層と底層に分かれ、脆弱又は死んだ細胞は、2008 年津久井湖並びに 2013 年相模湖での溶藻した試料と同様、ガス胞がほとんどなく、沈降した。2013 年相模湖の溶藻した試料では *D. mucosum* のヘテロサイトが多数残存していたが、この実験では *D. mendotae* と *D. affine* のヘテロサイトは非常に小さくて少ないため、観察できなかったが、2008 年の溶藻した試料と同様に多くのアキネートが沈殿物中にみられた。一方、*Microcystis* 細胞は表層に残存していた。

Crayton は、ラン藻は異常な高密度では長期間維持することはできず、1-2 週間で急激に死滅し、条件がよければ別種のラン藻の水の華が急速に置き換わると述べている。⁴²⁾ この実験では、3 日間で種組成が変わった。溶藻したラン藻の細胞密度を考慮すると、相模湖では 2013 年に溶解前の数は 4.1×10^7 細胞/mL と推定され、この実験と同レベルであった。したがって、ラン藻の密度ストレスにより *Microcystis* が β -cyclocitral を産生し、それが素早く酸化され、結果的に生じる酸ストレスにより青色化を伴う溶藻現象が生じたことになる。

これまで相模湖・津久井湖で観察された溶藻現象は、いずれも堰堤に近く、ラン藻が高密度に集積したところで生起していたことから、密度ストレスが溶藻現象の引き金の 1 つとして重要な役割を果たしていると推察された。ここでは、メスシリンダー法を用いて青色化を再現する一連の実験を行った。結論として、溶解プロセス全体を視認化することが可能であるという利点を有するメスシリンダー法を用いてラン藻を濃縮することによって、自然条件下と同じ溶解現象を再現することができた。すなわち、濃縮過程中、密度ストレスによって *Microcystis* から β -cyclocitral が放出され、短時間でカルボン酸に酸化され、水の pH は約 6 まで低下した。*Dolichospermum* 及び *Microcystis* を含むラン藻は、ほとんどの細胞が溶藻し、溶出した chlorophyll *a* 及び β -carotene は酸ストレスによって分解され、phycocyanin のみが残って青色を呈した。最終的に、少数の *Microcystis* が残り、優占した。この引き金となる細胞密度は 10^7 細胞/mL 以上で、これは相模湖で溶藻現象が生じたときの推定値と一致していた。また、これらの結果は種の変遷は β -cyclocitral により引き起こされていることも示している。

5. β -Cyclocitral の産生挙動とその産生条件

5-1. 各種環境条件による β -cyclocitral 産生因子

溶藻活性を有する VOCs のうち β -cyclocitral 及び β -ionone は、ラン藻が保有する光合成色素の 1 つである β -carotene が carotenoid cleavage dioxygenase (CCD) により酸化開裂を受けることで生成される。⁴³⁾ 一体、ラン藻はどのように環境中の因子を感知し、CCD を活性化させ、 β -cyclocitral を産生、放出しているのだろうか。この因子につい

て、古くは細胞の破壊が産生条件の 1 つであると予想されており、¹¹⁾ その後様々な研究から他の微生物による攻撃、飢餓、揮発性化合物による細胞破壊や細胞数増加によるストレス等が因子として挙げられている。しかしながら、どのような因子が CCD の活性化及び β -cyclocitral の産生亢進に寄与するかの検証は行われていない。ここでは、過去の継代培養や湖沼生態系での知見に基づき、ストレス因子として照度・栄養・細胞密度に関する 3 種の培養条件を設定した。物理的因子である照度条件について、通常の 1500 lx ($28 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) に対して 2500 lx ($56 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) の高照度条件と 300 lx ($3 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$) の低照度条件を設定した。 β -Cyclocitral は植物において強光障害に適応するための化合物と位置付けられており、⁴³⁾ ラン藻においても同様の機能を有する可能性がある。また、湖沼における β -cyclocitral の検出時期は晩夏に集中しており、日照量の減少が β -cyclocitral の産生に寄与するか検証を行った。つぎに、化学的因子である栄養条件では、培養に用いる MA 培地からラン藻の成長に必須とされる窒素とリンを減じた。窒素制限条件は通常と比較して窒素を半減、リン制限条件ではリン量を 1/4 に設定している。これは予備試験において *M. aeruginosa* NIES-843 が培地のリンを半減させても細胞成長にほとんど影響を及ぼさなかった点、及び MA 培地の組成が比較的リンが過剰であることに基づいている。ラン藻が密集した際に栄養飢餓状態となることが予想されるため、これらに応答して β -cyclocitral が産生されるか検証を行った。最後に、生物学的因子である高密度条件について、通常 10^6 細胞/mL から培養を開始するところ、10 倍である 10^7 細胞/mL と 100 倍である 10^8 細胞/mL を初期密度として設定した。なお、初期密度を 10^8 細胞/mL とする高密度条件を技術的に設定できず、結果的に 30 倍に相当する 3×10^7 細胞/mL で実験を行った (Table 2)。

ラン藻の細胞成長を評価するため、細胞数・濁度・pH・濾物乾燥重量・光合成色素の測定及び培養液の観察を行った。細胞数・濁度・乾燥重量は直接的にラン藻の細胞量を計測するものであり、基本的には Burkert-Turk 血球計算盤を用いた細胞の直接計数を主とし、ほかはその補強という位置づけとした。pH はラン藻の成長指標を表し、通常光合成

Table 2. β -Cyclocitral Producing Factors under Different Environmental Conditions

	Culture conditions		Detailed conditions
Physical	Illuminance	Higher intensity	$28 \mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$ $\rightarrow 56 \mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$
		Lower intensity	$28 \mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$ $\rightarrow 2.8 \mu\text{Em}^{-2} \text{S}^{-1}$
Chemical	Nutrition	Nitrogen restriction	200 mg N_2 $\rightarrow$ 100 mg N_2
		Phosphorus restriction	100 mg P $\rightarrow$ 25 mg P
Biological	Cell density	Higher density	1.0×10^6 $\rightarrow 1.0 \times 10^7$ cells/mL
		Higher density	1.0×10^6 $\rightarrow 3.0 \times 10^7$ cells/mL

が活発に行われると水中の二酸化炭素が消費され塩基性に傾く。^{28,37)} ラン藻が有する光合成色素である chlorophyll *a*, phycocyanin, β -carotene は細胞成長の指標となり、上述した3種の色素の定量を行った。培養液の観察は写真撮影により色調を比較した。通常、新しい培地に植え継いだラン藻はしばらくすると対数的に増殖し、淡い緑から濃緑色に変化する。その後に増殖と死滅が平衡となる定常期を経て、やがて死滅が優勢となり細胞数は減少していく。 β -Cyclocitral を始めとする VOCs の分析項目として、ラン藻培養液中の細胞内外の VOCs を対象とする VOCs (total) と、濾液のみを対象とする VOCs (filtrate) の分析を行った。分析法は藤瀬らの開発した一斉分析法に基づいて、固相マイクロ抽出 (solid-phase microextraction; SPME) GC/MS と溶媒抽出-GC/MS を併用した。⁴⁴⁾ 前者は VOC (total) に存在する β -cyclocitral の分析に、後者は VOC (filtrate) 中の β -cyclocitric acid の分析に適用した。

5-2. 各種培養条件下の β -cyclocitral の産生挙動

M. aeruginosa NIES-843 に対する各種培養条件を表 2 に示す。細胞成長に関しては、高照度では大きく抑制、低照度では光合成能が低下するため成長が遅延した。窒素制限・リン制限では定常期を迎えることなく早期に細胞が減少し、栄養源の不足が増殖抑制因子となったことが示された。また、初期密度 10^6 細胞/mL に対して 10 倍程度が最大到達密度となるところ、高密度条件ではそれぞれ 1.5 倍・1.1 倍程度が最大到達密度であり、同じく細胞成長の抑制因子であることが示された。また、30

倍の高密度条件では、6 週目に急激に細胞数が減少した。光合成色素の変化について、chlorophyll *a* はおよそ共通して 1 週に最大値をとり、その後減少傾向となった。播種直後の対数増殖に合わせて chlorophyll *a* が合成されていることが予想される。一方、 β -carotene は各条件の外観が黄色に変化するタイミングで最大値となっており、いずれの条件においても 3-4 週まで増加し続ける傾向にあった。Phycocyanin は chlorophyll *a* 同様 1-2 週に最大値をとった後、chlorophyll *a* よりも早く減少していた。また、phycocyanin の定量値は chlorophyll *a* や β -carotene の 5 倍程度となった。pH はいずれも chlorophyll *a* と同様の推移をとり、1-2 週で上昇しその後減少していく結果が示された。

β -Cyclocitral と β -ionone は、すべての条件の VOCs (total) から検出された。さらに、VOCs (filtrate) からは β -cyclocitric acid が検出された。また、 β -ionone は β -cyclocitral とともに検出されており、その検出量は β -cyclocitral の 2 割程度である。それぞれの産生条件について、対照群では 1 週から 8 週にかけて β -cyclocitral が検出され、 β -cyclocitric acid は 1 週より検出された後時間がたつごとに増加した。これに対し、高照度条件では検出された β -cyclocitral は少なかったものの、 β -cyclocitric acid が多量に検出された。低照度条件では、2 週より β -cyclocitral の検出量が増加し、14 週まで維持されたが、 β -cyclocitric acid の検出量はそれほど多くなかった。窒素制限では 1 週から 3 週、リン制限では 1 週から 4 週まで β -cyclocitral が検出され、 β -cyclocitric acid の検出量は同程度であった。密度条件で用いた対照群は 1 週から 5 週にかけて β -cyclocitral が検出され、 β -cyclocitric acid は同様に増加していった。高密度条件ではいずれも 0 週から β -cyclocitral が検出され、10 倍では 3 週以降対照群と同じ挙動をとり、30 倍では 5 週まで大量に β -cyclocitral が検出された。また、30 倍のみ β -cyclocitric acid が減少し、6 週から定量限界を超えなかった (Fig. 12)。

5-3. β -Cyclocitral の産生に関する考察 β -Cyclocitral の産生は、 β -carotene が CCD により酸化開裂を受け、生成されるという仮説に基づき、CCD 亢進因子を明らかにすることを目的とした。照度・栄養制限・細胞密度の各条件を設定して培

Fig. 12. VOC Quantification Results and Changes in Cell Number of *Microcystis aeruginosa* NIES-843 under Higher Density Conditions

(a) Control VOC (Total); (b) Control VOC (Filtrate); (c) 10 Fold (Total); (d) 10 Fold (Filtrate); (e) 30 Fold (Total); (f) 30 Fold (Filtrate). (Color figure can be accessed in the online version.)

養・分析を行い、細胞数が 10^7 細胞/mL を超えている間、 β -cyclocitral が産生されるという結果を得た。より詳細に β -cyclocitral の産生挙動を検討するために、*M. aeruginosa* NIES-843 を用いて、初期密度を 10^6 細胞/mL に設定して培養を開始した。分析項目は細胞成長の評価としては細胞数のみとし、VOCs 分析法は VOCs (total) として溶媒抽出-GC/MS 法と加熱-溶媒抽出-GC/MS 法の 2 種を行った (Fig. 13)。青線は細胞数、赤は β -cyclocitral、緑は β -ionone、紫は β -cyclocitric acid のそれぞれの分析値を示している。細胞成長は上述の結果と比較すると遅く、18 日目によりやく 10^7 細胞/mL に到達した。その後、24 日から 72 日目まで定常期を迎えた後、死滅期となった。 10^7 細胞/mL を超えていた期間は 17 日から 92 日目までである。 β -Cyclocitral は、やはり通常の溶媒抽出法では検出されなかったが [Fig. 13(b)], 加熱-溶媒抽出法では確実に検出されている [Fig. 13(a)]。この結果は β -cyclocitral はそのままの形で培養液中に存在しておらず、加熱のような刺激を受けて初めて検出されたことを示している。 β -Cyclocitral の検出は 10^7 細胞/mL に到達した 17 日目では検出されず、24 日以降に検出され、またこの日を境に定常期へ移行した。 β -Ionone

も同時期から増加傾向にあり、40 日目まで維持される。また、 β -cyclocitric acid はどちらの分析条件でも検出され、75 日から 95 日まで検出された。

これらの結果から、 β -cyclocitral の産生には 10^7 細胞/mL 以外に定常期への到達が重要であり、加熱条件における検出は高密度かつ定常期以降に中間体が生成・蓄積されることを示唆している。また、定常期は増殖と死滅が同等で見掛け上細胞数が維持される期間であり、定常期への移行とともに β -cyclocitral 前駆体の蓄積が開始されることは、高密度環境に対する応答の 1 つであると推察される。また、*M. aeruginosa* NIES-843 の死滅期付近で β -cyclocitric acid の検出量が増加し、加熱を含まない通常の溶媒抽出においても増加している [Fig. 13(b)]。 β -Cyclocitric acid は過去の β -cyclocitral 産生を示し、該当する期間において、自然発生的に β -cyclocitral が放出される要因が存在していることが予想される。細胞数と β -cyclocitral 及び β -cyclocitric acid の変化を比較すると、72 日以降、 β -cyclocitric acid 増加後に細胞数と β -cyclocitral 量が減少し、さらに β -cyclocitric acid の検出量が最も高い 84 日を境にさらに β -cyclocitral 量が減少し、細胞が死滅している。以前に、 β -cyclocitral と β -ionone の検出量

Fig. 13. VOC Quantification Results and Changes in Cell Number of *Microcystis aeruginosa* NIES-843

(a) GC/MS-solvent extraction with heating; (b) GC/MS-solvent extraction. The colored lines indicate the followings: blue, cell number; red, amount of β -cyclocitral; green, amount of β -ionone; purple, amount of β -cyclocitric acid. (Color figure can be accessed in the online version.)

と死滅との関連性を指摘したが、本実験からも死滅の進行と自然的な β -cyclocitral の放出は密接な関係があることが示唆された。以上の結果から、溶藻活性化化合物である β -cyclocitral は、単純な細胞密度に依存しているのではなく、細胞増殖段階と密接な関連があることが示唆される。すなわち、増殖が優勢となる対数増殖期では β -cyclocitral は産生されず、増殖と死滅が均衡状態となる定常期において β -cyclocitral の前駆体が細胞内に蓄積され、 β -cyclocitral が産生・放出されることで死滅期に移行することが予想される。

5-4. β -Cyclocitral は *Microcystis* 属ラン藻により特異的に産生される β -Cyclocitral が *Microcystis* 属に特異的であるかどうかを明らかにするために、種々のラン藻の VOC 産生挙動を調査した。この目的のために、クロオコックス目から 2 種 (*M. aeruginosa* NIES-843, *Synechocystis* sp. PCC6803), ユレモ目から 2 種 (*Pseudanabaena* sp. NIES-611, *Planktothrix agardhii* NIES-989), ネンジュモ目から 1 種 (*Dolichospermum lemmermannii* NIES-808) を使用した。Figure 14 に各種ラン藻の VOCs 定量結果を示す。 β -Cyclocitral は *M. aeruginosa* NIES-843 のみ、 β -ionone, 3-methyl-1-butanol や 1-butanol は、定量値に差異はあるものの全種のラン藻から検出された。 β -Cyclocitral は *M. aeruginosa* NIES-843 のすべての週から検出され、3 週目に最大となった。

1 週以降、細胞数が維持されているにもかかわらず β -cyclocitral は増加していき、その後細胞数の減少とともに減少した。*M. aeruginosa* NIES-843 以外の 4 種は、VOCs のうち β -ionone が最も多く検出された。その産生挙動は細胞数に比例しており、*Synechocystis* sp. PCC6803 以外の 4 種では、細胞量が最大を示す週の前後に最大値となっている。*Synechocystis* sp. PCC6803 は 3 週以降の細胞数が増加傾向であり、 β -ionone も増加傾向であることから、さらに高密度に到達することが予想される。種類によって細胞数は大きく違うが、 β -ionone の検出量はそれほど変化していない。2 種のアルコール類のうち 10 μ g/L が 2 週以上にわたり検出されたラン藻を挙げると、3-methyl-1-butanol が *D. lemmermannii* NIES-808 と *P. agardhii* NIES-989 から、1-butanol が *M. aeruginosa* NIES-843 と *Pseudanabaena* sp. NIES-611 から検出された。前者は比較的实验の前半に、後者は後半に検出される傾向を示した。

Microcystis 属である NIES-843 から β -cyclocitral が検出され、本化合物は *Microcystis* 属ラン藻に特異的であるという仮説と一致した。この結果を確認するために、当研究室で既に植え継ぎが行われている 4 属 14 種のラン藻を用いて分析を行った。これらを *Microcystis* 属とそれ以外に分け、検出される VOCs を比較した。*Microcystis* 属ラン藻 7 種の β -

Fig. 14. Quantitative Results of 5 Different Species of Cyanobacteria

(a) *Microcystis aeruginosa* NIES-843; (b) *Synechocystis* sp. PCC6803; (c) *Pseudanabaena* sp. NIES-611; (d) *Anabaena lemmermannii* NIES-808; (e) *Planktothrix agardhii* NIES-989. (Color figure can be accessed in the online version.)

cyclocitral の検出量に着目すると、22 日目の NIES-843 では、酸添加後の検出量は $40 \mu\text{g/L}$ となっており、多量の β -cyclocitral が検出された。NIES-102, NIES-103 は、それぞれ培養後 106 日目、48 日目のラン藻が最も多くの β -cyclocitral を検出した。NIES-298 では非添加時と比較して 1.5–2 倍ほどであるが検出量が増加した。また、100 日を超えたラン藻では細胞数はそれ以前のものよりわずかであるが細胞数は減少しており、死滅期に移行していると考えられる。しかしながら、多くの *Microcystis* 属ラン藻では 100 日目以降でも細胞数は 10^7 細胞/mL 以上を維持しており、 β -cyclocitral は検出され続けた。つまり、個体差はあるが、定常期は比較的長く、いずれにおいても酸添加条件で β -cyclocitral の検出量は増加した。 β -Cyclocitric acid は、酸添加条件に関係なく、50–100 日を超えたラン藻類から、検出され始めている傾向にある。それらの多くは非添加群の方が酸添加群よりもわずかながら値が上回る結果が得られた。 β -Ionone は、わずかながら酸添加条件において検出量の増加が確認できた。*Microcystis* 属ラン藻以外の 3 属 7 種では β -cyclocitral, β -cyclocitric acid は $1.0 \mu\text{g/L}$ 未満しか検出されず、酸添加条件を加えても検出量に変化はみられなかった。以上、7 種の *Microcystis* 属ラン藻からは酸添加条件において β -cyclocitral が検出され、

Dolichospermum 属と *Synechocystis* 属、*Pseudanabaena* 属においては β -ionone は検出されたが、 β -cyclocitral は検出できなかった。以上の結果から β -cyclocitral は *Microcystis* 属ラン藻に特異的であると結論付けられる。

6. β -Cyclocitral はどのように産生されるか

6-1. CCD による β -cyclocitral の産生 β -Cyclocitral は、植物界では β -carotene の二次代謝産物であることが判明しており、強光阻害に対する応答物質として位置づけられている。⁴⁵⁾ ラン藻においては、これまでのところアオコを形成する代表的な種である *Microcystis* 属ラン藻のみから検出されており、種特異的な化合物である。⁴⁵⁾ 植物・ラン藻ともに β -cyclocitral や β -ionone は β -carotene の二重結合が酸化的に開裂されることで産生され、その反応を触媒するのがカロテノイド開裂酸化酵素 (CCD) である。CCD は 7 種に大別され、それぞれ基質や反応位置が異なり特異的な機能を有することが報告されている。⁴³⁾ ラン藻においては、*M. aeruginosa* NIES-843 を始め様々な種の全ゲノムが解読されている。^{46,47)} Cui らは、ラン藻ごとにどのような系統の CCD を保有するかを報告している。⁴⁸⁾ β -Cyclocitral を産生する *M. aeruginosa* NIES-843 は CCD7 と apo-carotenoid oxygenase (ACO) の 2 種の酸化開裂酵素を保有しており、前者は β -carotene

を 9',10' 位で酸化開裂させ、 β -ionone と β -apo-10'-carotenal を生成させる。一方、後者は双方の末端にシクロヘキセン環を持つ β -carotene を基質とすることができず、例えば CCD7 の副生成物のような環を 1 つのみ有する β -apo-10'-carotenal を基質として反応することができ、15,15' 位で酸化開裂させて retinal を産生する。当研究室の長谷川らは、*M. aeruginosa* NIES-298 から CCD 酵素と思われる 2 種の配列を選択し、MaCCD1 と MaCCD2 として単離し、後者は β -apo-8'-carotenal を retinal に変換することにより、MaCCD2 が ACO に相当する機能を持つことを明らかにした（未発表データ）。 β -Cyclocitral に関して、Jüttner らは *Microcystis* 属から β -cyclocitral 及び crocetindial が検出されたと報告している。¹¹⁾ すなわち、 β -carotene を基質として 7',8'-位で切断して β -cyclocitral と β -apo-8'-carotenal を産生し、さらに再度酸化開裂が起こり 2 分子の β -cyclocitral と 1 分子の crocetindial が産生されるとしている。しかしながら、 β -cyclocitral の生合成に関与する CCD の報告はこれまでになされておらず、 β -cyclocitral の生合成については不明のままである。

6-2. ラン藻由来 VOC の分析法—加熱因子と酸添加 ラン藻由来 VOCs の分析には 2010 年に藤瀬らが開発した一斉分析法を用いてきた。⁴⁴⁾ 本法は、SPME-GC/MS 法と溶媒抽出-GC/MS 法を併用するものであり、 β -cyclocitral が SPME-GC/MS 法で、 β -cyclocitric acid が溶媒抽出-GC/MS 法でのみ定量可能である。しかしながら、これらの分析法が β -cyclocitral や酸化生成物の分析に適しているか否かに関する詳細な理由は明らかにされていない。Zhang らは本分析法に従って同一の試料を SPME-GC/MS 及び溶媒抽出-GC/MS を用いて分析を行い、それぞれの化合物が一方でしか分析されないことを再現している。⁴⁹⁾ 藤瀬ら及び Zhang らはともに結果の違いは分析方法によるものと考察しているが、何が影響したのかは明らかにしていない。^{44,49)} ここでは、SPME 法を用いることでなぜ β -cyclocitral が分析可能なのかという視点に立ち、 β -cyclocitral が *Microcystis* 属ラン藻から放出される過程を明らかにすることを目的として分析法の再検討を行った。まず、 β -cyclocitral が検出可能な SPME-GC/MS の検証を行った。本法はガラス製バ

イアル中に、液面に接触しないようにファイバーを挿入し、水中の揮発物を気相中のファイバーに吸着させる手法である。実際の分析では、目的物をファイバーに吸着させる、すなわち平衡を達成させることが重要であり、そのために加熱や塩析などの操作が追加される。 β -Cyclocitral 分析においても同様であり、乾燥した NaCl 添加による塩析、抽出時の 60°C、20 分の加熱及び超音波を用いた振盪を加えている。これらの操作は溶媒抽出-GC/MS 法には含まれないため、 β -cyclocitral 検出に寄与する因子と予想された。同一のラン藻試料を用いて SPME-GC/MS 法による分析を行い、分析中の塩析・加熱・振盪の 3 操作を総当たり方式で除き、それぞれの β -cyclocitral 検出量を比較した。既存の分析法では 9.7 $\mu\text{g/L}$ の β -cyclocitral が検出されたのに対し、各操作からは異なる結果が得られた。単一操作のうち加熱操作のみ β -cyclocitral が検出され、それ以外では検出されていない。また、全 7 種の操作のうち、 β -cyclocitral は 5 種、うち加熱を含む 4 種すべてが該当することから、加熱が β -cyclocitral の検出に重要であることが示された。⁵⁰⁾

溶媒抽出-GC/MS では、ふた付試験管に培養液と抽出溶媒を加えて振盪させ、有機層に目的物を抽出する。 β -Cyclocitric acid を分析するために抽出前に 1 M HCl を加えると、液性が pH 8-10 から pH 3 程度になり、 β -cyclocitric acid が分子型へと変化するため、溶媒抽出が可能になる。SPME 法における加熱条件は、分析直前にヘッドスペース内で 60°C、20 分の条件を付与している。これを再現するため、水浴で 60°C、20 分間加熱し、常温に戻し、通常の溶媒抽出-GC/MS 法を用いて分析を行った。非加熱条件での β -cyclocitral ピーク面積は 70、加熱条件ではピーク面積が 796 で、非加熱サンプルの約 11 倍のピーク面積が得られた。この結果から、溶媒抽出法においても加熱条件を付与することにより β -cyclocitral が定量可能であることが示された。 β -Cyclocitral の検出には加熱が必要であることが判明したため、加熱条件の検討を行った。既知条件の 60°C、20 分を考慮して、温度を 20-60°C、加熱時間を 0-120 分をそれぞれ検討し、加熱時間は 5 分以上、温度は 60°C が最適であると結論された。⁵⁰⁾

上述の一斉分析法において、酸の添加は SPME-

GC/MS には含まれず、溶媒抽出-GC/MS でのみ実行された。この操作は β -cyclocitric acid を分子型にするためのもので、通例塩酸を添加後すぐに有機溶媒を添加し、3 分程度の振盪の後抽出を行うため、酸の添加から抽出するまでの時間はおよそ 5 分程度である。予備実験で酸性条件が β -cyclocitral の検出の可能性を示したことから溶媒抽出法を用いてあらかじめ酸を添加し、一定時間静置後通常の抽出操作を行い、分析結果を比較した。0 時間の時点では β -cyclocitral は定量限界を超えなかったが、0.5 時間以上の静置により β -cyclocitral の検出量が増加した。1, 3, 6 時間の静置による β -cyclocitral の検出量がほぼ同程度であるため、1 時間以上の酸性条件で β -cyclocitral の検出量が頭打ちとなることが示された。また、本条件下 β -ionone 及び β -cyclocitric acid の検出量はほとんど増加しなかった。前述した加熱条件下では β -cyclocitral は $10 \mu\text{g/L}$ を超えなかったことに対し、本実験では $60 \mu\text{g/L}$ と非常に多量の β -cyclocitral が検出された。このことから、 β -cyclocitral の検出には加熱のほかに酸添加が有効であり、1 時間ほどの待ち時間が必要ではあるが、より効果的な条件であることが示された。⁵⁰⁾

6-3. β -Cyclocitral 生合成のための中間体と新たな CCD の存在 加熱や酸を添加することで β -cyclocitral が検出可能となることが明らかとなり、これに基づいて過去の分析法を調査すると、 β -cyclocitral の分析法ではいずれも加熱を含む操作を使用していることが判明した。⁵¹⁾ したがって、過去の分析結果は湖沼における β -cyclocitral 自身を定量したものではなく、加熱後の β -cyclocitral を検出しており、本化合物はなんらかの前駆体として存在していることが示された。既に述べたように、 β -ionone は β -carotene を出発物質として CCD によって産生することが報告されており、⁵²⁾ β -cyclocitral も同様の経路によって産生されると推察される。CCD による酵素反応に関しては、Harrison 及び Bugg がその反応機構を提案している。⁵³⁾ 彼らの酸化開裂反応機構では、2 種の中間体を経ることが報告されており、Fig. 15 中に intermediate-1 及び 2 として示している。ここで、intermediate-1 から β -cyclocitral が産生される経路にはプロトンが必要であり、本実験中の酸添加条件が該当する。また、intermediate-2 は四員環のジオキセタン構造を持

Fig. 15. Plausible Intermediates for β -Cyclocitral Production Based on the CCD Reaction Mechanism by Harrison and Bugg

ち、化学的に立体ひずみが大きく、加熱のようなエネルギーが与えられることで、 β -cyclocitral が産生されることが考えられ、本実験中の加熱条件が該当する。したがって、 β -cyclocitral が加熱や酸の条件で検出される背景として、CCD 酵素による反応を受けて中間体として蓄積されることが予想された。また、酸添加条件により目的化合物が効率的に検出されるという結果は、2 種の開裂経路のうち intermediate-1 を経由する反応が優勢であることを示しており、さらにこの反応を触媒する CCD 酵素が *Microcystis* 属ラン藻中に存在することが予想された。 β -Cyclocitral は自身に対しても溶藻活性を有するため、細胞中にそのままの形で保持することは考え難く、中間体として保持されれば実験結果とも整合性がとれる。

CCD は植物を中心として様々な研究がなされており、多くのサブタイプが存在することが知られている。⁴⁵⁾ ラン藻 *M. aeruginosa* NIES-843 は 2 種の CCD, CCD7 及び ACO を保有している。ゲノム解読ラン藻として *M. aeruginosa* NIES-843 の近縁に *Synechocystis* sp. PCC6803 が存在しているが、本株からは β -cyclocitral は検出されなかった。しかし、 β -cyclocitral の合成には CCD 反応が介在することが予想され、*Microcystis* 属ラン藻が β -cyclocitral を産生するためには、Cui らが報告していない新たな CCD 酵素の存在が示唆された。⁴⁸⁾ そこで、かずさ DNA 研究所が公開していたラン藻のゲノムデータベースである“cyanobase”を用いて、*Synechocystis* sp. PCC6803 を対照として *M. aeruginosa* NIES-843 の CCD 酵素の探索を行った。⁵⁴⁾ *M. aeruginosa* NIES-843 には CCD7 である MAE_09040 と ACO である MAE_60600 の 2 つの CCD が存在する。一方、*Synechocystis* sp. PCC6803 には CCD7 である AOY38_09620 と ACO である

AOY38_09805 の 2 種の CCD がある。これらの 4 種の CCD 酵素について検索を行ったところ、互いに高い相同性が得られた。しかし、*M. aeruginosa* NIES-843 に対してのみ、MAE_09040 及び MAE_60600 に相同性がある新規酵素、MAE_33390 が発見された。また、MAE_33390 は 4 種の CCD に対して相同性を示すほか、新たな酵素 MAE_22790 との相同性も示唆された。結果を整理すると、cyano-base を用いて *M. aeruginosa* NIES-843 及び *Synechocystis* sp. PCC6803 が保有する計 4 種の CCD を検索、それぞれに相同性があることを確認した。さらに、*M. aeruginosa* NIES-843 に特異的な CCD 酵素候補 MAE_33390 とともに、これにのみ類似性を持つ MAE_22790 も併せて発見したが、本研究期間中にはこれら 2 種の新規 CCD 酵素の単離及び機能解析はできなかった。

7. 湖沼生態系における諸現象を化学の目を通して考える

本総説では、神奈川県の新相模湖・津久井湖で 1974 年以来 40 年間観察されてきたアオコの形成に関する現象を扱い、以下の 3 種の特徴的な現象が観察された：

- 1) ラン藻類の増殖と減少
- 2) ラン藻類の青色化を伴う溶藻
- 3) ラン藻類の種の季節遷移

これらの現象には従来から議論されてきた照度、pH、ガス胞、増殖速度、栄養、水温や湖沼の構造などの因子が関与するとされてきたが、最終的にはラン藻が表層に滞留することに帰結された。本総説では、滞留したラン藻の中で何が起きているかを追求した。

1) ラン藻類の増殖と減少

当然、上述した条件が整えばラン藻類は増殖するが、また適当な条件になれば減少していく。これらはラン藻類の「生活環」として知られ、現象論的には広く受け入れられている。本研究においては、ラン藻類の生活環を制御している因子の 1 つは「細胞密度」であることが示された。一般に、季節によりラン藻類の増殖程度は異なるが、晩夏に最も増殖し、種々の興味深い現象が生起する。特に重要なことは、ラン藻類は「細胞密度ストレス」を感じ、より自分たちの生存が脅かされないような挙動を取ることである。単なる観察では理解し難いが、過剰に

なった細胞は適当な手段でその数を減じるような行為を行っている。これらに関しては後述する「クオラムセンシング (quorum sensing)」の考え方をを用いて説明したい。

2) ラン藻類の青色化を伴う溶藻

青色化を伴う溶藻現象は多くは観察されないことから、現在までに筆者のグループ以外からの報告は見当たらない。既に述べたように、筆者はラン藻由来の VOC を見い出し、これらのうちの 1 つである β -cyclocitral が極めて酸化され易く、 β -cyclocitric acid に変換され易いことを明らかにした。結果的に「酸ストレス」が生じ、chlorophyll *a* や β -carotene が分解され、phycocyanin が顕在化することにより青色化が生起する。現在までのところ、 β -cyclocitral は *Microcystis* のみから産生されることから、*Microcystis* が存在しない場合には青色化は観察されず、白濁することが観察されている。青色化現象はラン藻の生活環は化学物質により制御されている重要な証左の 1 つである。

3) ラン藻類の種の季節遷移

温帯に属している新相模湖・津久井湖では、初夏あたりから *Aphanizomenon*、そして *Dolichospermum* 種が出現し、真夏から初秋には *Microcystis* が現れ、10 月頃には消失する。このラン藻類の種の季節遷移には、上述したクオラムセンシングやラン藻自身が産生する VOC が関与することが判明した。特に、出現するラン藻と VOC 間の感受性の違いが大きく関与している。各 VOC はその溶藻活性が異なり、それに基づいてラン藻の種により感受性の差が生じる。結果的に、これは自然界での種の変遷と一致し、感受性の高い種は、*Microcystis* が増殖すると減少する傾向となる。さらに、溶藻現象が起こらない濃度でも沈降し易くなるなどの影響があり、種の変遷に β -cyclocitral が関与している可能性が強く示唆された。

本研究において、上述の現象に *Microcystis* が産生する β -cyclocitral が深く関与していることが明らかとなった。 β -Cyclocitral はラン藻自身が有する CCD により産生されると考えられているが、いまだそれを明らかにした報告は存在しない。*M. aeruginosa* NIES-843 に存在する 2 種の既知 CCD では β -cyclocitral は産生されず、*Synechocystis* sp. PCC6803 の CCD 酵素の一致率を比較したところ、

Fig. 16. Summary of the Present Study for Clarification of the Three Interesting Issues Based on 40 Years of Observations

M. aeruginosa NIES-843 に特異的な配列が 2 種発見され、これらが β -cyclocitral を産生する CCD である可能性が浮上した。また、これらの CCD により直接的に β -cyclocitral を産生するのではなく、その前駆体で細胞内に蓄積され、適当な条件下、実験室的には加熱や酸性条件、野外ではでは共存微生物などで目的化合物に変換されると推察された。放出された β -cyclocitral は Baeyer-Villiger 様の酸化が進行し、 β -cyclocitric acid と 2,6,6-trimethylcyclohex-1-en-1-yl formate 経由で 2,2,6-trimethylcyclohexanone を与える。

Microcystis 属ラン藻は湖沼生態系において、高密度かつ定常期に到達すると新規に推定された CCD 遺伝子の発現が亢進され、 β -cyclocitral の中間体まで反応が進む。引き続いて、なんらかの刺激で β -cyclocitral が産生されると周りのラン藻を溶解させることになる。この機能を適切に制御するために β -cyclocitral は、極めて特異的な機能を備えている。まず、産生された β -cyclocitral は揮発性であり、水中に長く滞留せず、その一部は空气中に霧散する。事実、青色化を伴う溶藻現象が局所的に発生しており、³⁷⁾ 湖沼のラン藻を死滅させ過ぎない制御機構とも考えられる。また、上述したように、 β -cyclocitral は Baeyer-Villiger 様の酸化が進行し、 β -cyclocitric acid と 2,2,6-trimethylcyclohexanone を与えるが、これらの生成物は β -cyclocitral よりその溶藻活性は減じられており、ここでもラン藻へのダ

メージを抑える仕組みが工夫されている。また、 β -cyclocitric acid が水中に蓄積し湖沼が酸性化されることで、連鎖的に *Microcystis* 属ラン藻から β -cyclocitral が放出され、条件が揃えば青色化を伴う溶藻現象として観察される。

Microcystis は、なんらかの刺激で CCD 遺伝子が活性化され、 β -cyclocitral が生成され、他の藻類に対してアレロパシー物質として働くと推察される。*Microcystis* のアレロパシーについては、緑藻^{55,56)} や珪藻⁵⁷⁾ への作用の報告がある。最近、Chia らは *Microcystis* と *Anabaena* 属ラン藻 (*Dolichospermum* 3 株, *Anabaena* 1 株) の混合又は細胞を除去したろ液を用いての培養実験から、*Microcystis* 培養液からの無細胞ろ液は *Anabaena* の増殖を著しく阻害したと報告している。⁵⁸⁾ おそらく、この現象にも β -cyclocitral が関与していると考えている。*Microcystis* 属はラン藻類の中でも強い浮上能を持ち、より効率的に光合成を受けるために行動することが知られている。⁵⁹⁾ 湖沼において、栄養素や日光の確保は彼らにとって非常に重要であり、 β -cyclocitral による溶藻は同種を含めた細胞数の調節・自身の優占化・栄養塩の回収など様々な利点を有し、生存戦略上重要な化合物であることが推察される。

高密度になったラン藻では、少なくともその細胞の周辺は栄養濃度が低下するためなんらかの形で細胞数と栄養のバランスを調節しなければならない。

Microcystis 属ラン藻は一体どのようにしてその細胞数を調節しているのだろうか。本研究で明らかになった *Microcystis* 属ラン藻に関する知見を Fig. 16 にまとめた。既に述べたように、照度、pH、ガス胞、増殖速度、栄養、水温や湖沼の構造などの因子はすべてラン藻が表層に滞留することに帰結された。ここではこの刺激が「密度ストレス」という形で周辺に存在するラン藻に伝わり、“オートインデューサー (autoinducer)” なるものが放出され、細胞密度を感知する。今回の実験では本化合物は特定できていないが、*Microcystis* はこの機構により CCD 遺伝子が活性化され、 β -cyclocitral が生成され、他の藻類に対してアレロパシー物質として働くと推察される。結果的に、*Microcystis* を始めとするラン藻類の細胞数は減少し、結果的に生じた窒素やリンが生存しているラン藻の栄養となることになる。おそらく、上述した「ラン藻類の増殖と減少」にこの「クオラムセンシング」が機能していると考察している。⁶⁰⁾

本研究は、溶藻性化合物の探索においてラン藻由来の溶藻活性化合物を偶然発見したことに端を発する。なぜラン藻自身が一見すると自殺を行うかのような化合物を産生するのか。その疑問からラン藻の生活環の解明に挑み、課題や議論の余地が残されているものの、晩夏の細胞数調節とみられる生活環の一部を解明した。従来の各種生物的及び無生物的な条件とは異なり、適切な有機化合物を座標軸として湖沼生態系で起こる現象との関連を追跡する、いわゆる化学生態学的アプローチにより更なる知見を得られることが期待され、この試みが湖沼生態学を推し進める一助となると考えている。

謝辞 本退職記念総説の執筆にあたり長年にわたり共同研究をして頂きました下記の皆様に深謝いたします。辻 清美博士、尾崎恵子博士、藤瀬大輝博士、長谷川真照博士、Beata Bober 博士、有井鈴江博士、山下竜司博士、富田浩嗣修士、太田朱美修士。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Watanabe Y., “Waterbloom of blue—green algae and their toxin,” ed. by Watanabe F.

- M., Harada K.-I., Fujiki H., University of Tokyo Press, Tokyo, 1994, pp. 1–24.
- 2) Watanabe F. M., “Toxic *Microcystis*,” ed. by Watanabe F. M., Harada K.-I., Carmichael W. W., Fujiki H., CRC Press, Boca Raton, 1966, pp. 13–34.
- 3) Ariei S., Tsuji K., Harada K.-I., *Jpn. J. Limnol.*, **81**, 1–17 (2020).
- 4) Uchida H., Kouchiwa T., Watanabe K., Kawasaki A., Hodoki Y., Otani I., Yamamoto Y., Suzuki M., Harada K.-I., *Jpn. J. Water Treat. Biol.*, **34**, 67–75 (1998).
- 5) Harada K.-I., Tsuji K., Ohta A., Takayanagi K., Tamaki S., Suzuki T., Ozaki K., Ito E., Fujii K., *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, **6**, 17–28 (2007).
- 6) Wright S. J. L., Thompson R. J., *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 263–267 (1985).
- 7) Wright S. J. L., Linton C. J., Edwards R. A., Drury E., *Lett. Appl. Microbiol.*, **13**, 130–132 (1991).
- 8) Kato H., Imanishi S. Y., Tsuji K., Harada K.-I., *Water Res.*, **41**, 1754–1762 (2007).
- 9) Ozaki K., Ohta A., Iwata C., Horikawa A., Tsuji K., Ito E., Ikai Y., Harada K.-I., *Chemosphere*, **71**, 1531–1539 (2008).
- 10) Jüttner F., *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 814–820 (1984).
- 11) Jüttner F., Höflacher B., *Arch. Microbiol.*, **141**, 337–343 (1985).
- 12) Jüttner F., *Wat. Sci. Technol.*, **31**, 69–78 (1995).
- 13) Ikawa M., Sasner J. J., Haney J. F., *Hydrobiologia*, **443**, 19–22 (2001).
- 14) Vilanova X., Casanovas M., *J. Invest. Dermatol.*, **20**, 447 (1953).
- 15) Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N., *J. Essent. Oil Res.*, **1**, 119–128 (1989).
- 16) Griffin S. G., Wyllie S. G., Markham J. L., Leach D. N., *Flavour Fragr. J.*, **14**, 322–332 (1999).
- 17) Vrakas D., Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., *J. Chromatogr. A*, **1116**, 158–164 (2006).
- 18) Rocher F., Chollet J.-F., Jousse C., Bonnemain J.-L., *Plant Physiol.*, **141**, 1684–1693 (2006).
- 19) Zakarya D., Fkih-Tetouani S., Hajji F., *Plantes Med. Phytother.*, **26**, 319–331 (1993).

- 20) Abe F., Horikoshi K., *Cell Mol. Biol. Lett.*, **10**, 1565–1568 (2005).
- 21) Dickinson J. R., Lanterman M. M., Danner D. J., Pearson B. M., Sanz P., Harrison S. J., Hewlins M. J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 26871–26878 (1997).
- 22) Schoondermark-Stolk S. A., Jansen M., Veurink J. H., Verkleij A. J., Verrips C. T., Euvierink G. J., Boonstra J., Dijkhuizen L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 237–246 (2006).
- 23) Hasegawa M., Nishizawa A., Tsuji K., Kimura S., Harada K.-I., *Microbes Environ.*, **27**, 525–528 (2012).
- 24) Kern K., Nunn C. D., Pichová A., Dickison J. R., *FEMS Yeast Res.*, **5**, 43–49 (2004).
- 25) Ozaki K., Ito E., Tanabe S., Natsume K., Tsuji K., Harada K.-I., *J. Health Sci.*, **55**, 578–585 (2009).
- 26) Yoshikawa K., Adachi K., Nishijima M., Takadera T., Tamaki S., Harada K.-I., Mochida K., Sano H., *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 718–722 (2000).
- 27) Yamamoto Y., Kouchiwa T., Hodoki Y., Hotta K., Uchida H., Harada K.-I., *J. Appl. Phycol.*, **10**, 391–397 (1998).
- 28) Harada K.-I., Ozaki K., Tsuzuki S., Kato H., Hasegawa M., Kuroda E. K., Arie S., Tsuji K., *J. Chem. Ecol.*, **35**, 1295–1301 (2009).
- 29) Huang J. J., Kolodny N. H., Redfearn J. T., Allen M. M., *Arch. Microbiol.*, **177**, 486–493 (2002).
- 30) Tomita K., Hasegawa M., Arie S., Tsuji K., Bober B., Harada K.-I., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **23**, 11998–12006 (2016).
- 31) Shilo M., *Bacteriol. Rev.*, **31**, 180–193 (1967).
- 32) Fallon R. D., Brock T. D., *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 499–505 (1979).
- 33) Nishibe Y., Kawabata Z., Nakano S., *Aquat. Microbiol. Ecol.*, **29**, 173–179 (2002).
- 34) Pearl H. W., Fulton R. S., Moisaner P. H., Dyble J., *The Scientific World Journal*, **1**, 76–113 (2001).
- 35) Pearl H. W., Hall N. S., Calandrino E. S., *Sci. Total Environ.*, **409**, 1739–1745 (2011).
- 36) Pearl H. W., *Life*, **4**, 988–1012 (2014).
- 37) Arie S., Tsuji K., Tomita K., Hasegawa M., Bober B., Harada K.-I., *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 2667–2675 (2015).
- 38) Arie S., Tomita K., Tsuji K., Harada K.-I., *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, **15**, 11–16 (2016).
- 39) Arie S., Yamashita R., Tsuji K., Tomita K., Hasegawa M., Bober B., Harada K.-I., *Chemosphere*, **284**, 131378 (2021).
- 40) Nakamura K., Homma T., Miyabara Y., Hanazato T., Park H.-D., *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, **33**, 123–129 (2010).
- 41) Arie S., Tsuji K., Tomita K., Hasegawa M., Yamashita R., Bober B., Harada K.-I., *Phycol. Res.*, **66**, 161–166 (2018).
- 42) Crayton M. A., “Toxic cyanobacterial blooms: a field/laboratory guide,” 1993.
- 43) Auldridge M. E., McCarty D. R., Klee H. J., *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 315–321 (2006).
- 44) Fujise D., Tsuji K., Fukushima N., Kawai K., Harada K.-I., *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6122–6125 (2010).
- 45) Havaux M., *Plant Physiol. Biochem.*, **155**, 35–41 (2020).
- 46) Kaneko T., Nakajima N., Okamoto S., Suzuki I., Tanabe Y., Tamaoki M., Nakamura Y., Kasai F., Watanabe A., Kawashima K., Kishida Y., Ono A., Shimizu Y., Takahashi C., Minami C., Fujishiro T., Kohara M., Katoh M., Nakazaki N., Nakayama S., Yamada M., Tabata S., Watanabe M. M., *DNA Res.*, **14**, 247–256 (2007).
- 47) Kaneko T., Tabata S., *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1171–1176 (1997).
- 48) Cui H., Wang Y., Qin S., *Com. Funct. Genomics*, 164690 (2012).
- 49) Zhang K., Lin T. F., Zhang T., Li C., Gao N., *J. Environ. Sci. (China)*, **25**, 1539–1548 (2013).
- 50) Yamashita R., Bober B., Kanei K., Arie S., Tsuji K., Harada K.-I., *Molecules*, **25**, 832 (2020).
- 51) Watson S. B., Monis P., Baker P., Giglio S., *Harmful Algae*, **54**, 112–127 (2016).
- 52) Sommerburg O., Langhans C. D., Arnhold J., Leichsenring M., Salerno C., Crifò C., Hoffmann G. F., Debatin K. M., Siems W. G., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 1480–1490 (2003).
- 53) Harrison P. J., Bugg T. D. H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **544**, 105–111 (2014).
- 54) “CyanoBase”: <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>, cited 27 November, 2021.
- 55) Leão P. N., Vasconcelos M. T. S. D., Vascon-

- celos V. M., *Eur. J. Phycol.*, **44**, 347–355 (2009).
- 56) Dunker S., Jakob T., Wilhe C., *Freshw. Biol.*, **58**, 1573–1587 (2013).
- 57) Wang L., Zi J., Xu R., Hilt S., Hou X., Chang X., *Harmful Algae*, **61**, 56–62 (2017).
- 58) Chia M. A., Jankowiak J. G., Kramer B. J., Gloleski J. A., Huang I.-S., Zimba P. V., Bitencourt-Oliveira M. C., Gobler C. J., *Harmful Algae*, **74**, 67–77 (2018).
- 59) Ganf G. G., Oliver R. L., *J. Ecol.*, **70**, 829–844 (1982).
- 60) Ikeda T., *Seibutsu-kogaku Kaishi*, **90**, 582–585 (2012).