

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20405001

研究課題名（和文） 広域スケールにおける有毒アオコの動態機構の解明

研究課題名（英文） Large-scale dynamics of toxic cyanobacteria

研究代表者 渡邊 信(WATANABE MAKOTO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：10132870

研究成果の概要（和文）：

日本、タイ、ベトナム、カンボジアの*Microcystis aeruginosa*を含む276の遺伝子型について分子系統解析を行った結果、*M. aeruginosa*が少なくとも11の明瞭な種内系統グループを含むことがわかった。東南アジア株と日本株はこれら11グループの中に混在したことから、日本と東南アジアのアオコの間の遺伝的な差異が小さいことが示唆された。*Cylindrospermopsis*についてはPC-IGS解析により、オーストラリア・アセアングループ、東アジアグループ、欧州グループ、アメリカグループと大陸により遺伝的の分化している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The molecular phylogenetic analysis of 276 genotypes of *Microcystis aeruginosa* clearly showed that *M. aeruginosa* composed of 11 intraspecific, genetic groups (A-K). Since Japanese strains and the ASEAN strains were intermingled in the 11 clusters, it is possible that the moving of *M. aeruginosa* frequently occurs between these countries. From PC-IGS analysis of 30 strains of *Cylindrospermopsis raciborskii*, it was found that *C. raciborskii* composed of the four different clusters which were geographically differentiated into Australia-ASEAN, East Asia, Europe, and American groups, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成20年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
平成21年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
平成22年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：環境生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：*Microcystis aeruginosa*、ミクロシスチン、MLST、ハウスキーピング遺伝子、毒素遺伝子、*Cylindrospermopsis raciborskii*、PC-IGS、シリンドロスパモプシン

1. 研究開始当初の背景

富栄養湖沼に大発生する有毒アオコには *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii*, *Cylindrospermopsis raciborskii* 等20種類以上のシアノバクテリアが報告されているが、その中でも *M. aeruginosa* と *C. Raciborskii* は高頻度にあオコを形成し、健康被害や家畜斃死を引き起こす肝臓毒（ミクロシスチン、シリンドロスパモプシン）を産生することから、最も注意すべき環境微生物として世界的に広く認識されている。これらの種の発生や毒素の種類・強さは時空間的に大きく変動することが知られていることから (Falconer 2005)、これらの種及び毒素の広域スケールでの分布・拡散などの動態を解明することは、有毒アオコの影響をグローバルに評価する上で必須の課題となっている。

UNESCOは、国際水文学計画の一環として、世界の有毒アオコによる情報を発信する事業を行い、世界各地域から有毒アオコとその毒素に関する情報を収集したが、東南アジア地域からの情報はほとんどなく、空白地帯とされている。

我々の研究グループは、アオコを形成する *Microcystis* の純粋培養、種の分類、毒素の同定・構造決定、毒素の分析法の開発、自然界における毒素の挙動、捕食者による摂取・消化プロセスにおける毒素の挙動で世界を先導するおおくの成果をあげてきた。特に、化学形質や分子系統解析からアオコを形成する5種の *Microcystis* は *M. aeruginosa* の1種に統合できることや、*M. aeruginosa* は種内に大量の遺伝的変異を保有し、毒素遺伝子も多型であり個体間で遺伝子組み換えがおこっていることを明らかにしてきた。さらに、*M. aeruginosa* の日本各地の湖沼から得られた200株以上の培養株について、7つのハウスキーピング遺伝子をつかったMLST解析をおこなった結果、少なくとも5つの種内遺伝系統が確認され、系統により毒素遺伝子をもつものともたないものがあることを明らかにしてきた。なお、我々の研究グループでは世界に先駆けて *Microcystis aeruginosa* の全ゲノム解析をおこなった。また、これまでのタイ、ベトナムでのアオコの調査から下記のような成果を得ている。

- ・タイから分離培養された株の中で、毒素遺伝子をもつ系統ともたない系統間の遺伝子組み換えを起源とすると思われる株が得られてきており、これらを解析することは、将来的に有毒アオコ *M. aeruginosa* と毒素遺伝子の分化・伝播機構並びに *Microcystis* の種分類の本質的解明につながるものと期待されること。
- ・ベトナムの多くの公共水域で *Microcystis* の

アオコが発生しており、*M. botrys*, *M. panniformis*, *M. protocystis* といった *M. aeruginosa* に統一された形態種とは異なった形態種が原因となっていることが報告された。これらの種の化学形質・分子系統並びに毒素を解析することは、*Microcystis* 及びその毒素の動態を知る上で極めて重要であること。以上のことから、タイ及びベトナムにおける *Microcystis* の分子集団遺伝学的研究及び毒性学的研究は、有毒アオコの動態解明と影響評価に関わる学術研究に重要なブレイクスルーをもたらすとともに、UNESCOの事業へ多大な貢献を果たすことが期待された。

2. 研究の目的

富栄養湖沼に高頻度に発生し、人、家畜および野生生物に甚大な被害を与える最も代表的な有毒アオコである *Microcystis* の広域スケールでの動態を解明するため、分布情報、培養株確立及びその遺伝情報に乏しいタイ、ベトナムのフィールドと対象区として日本のフィールドを中心にして、それぞれ下記で研究を実施した。

(1) *Microcystis* 種個体群の多様性と遺伝子の交流・伝播の実態解明

7つのハウスキーピング遺伝子 (*ftsZ*, *gkuna*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*) に基づく MLST により、タイの培養株には、毒素遺伝子のない系統毒素遺伝子をもつ系統の間での遺伝子組み換えにより、毒素を獲得したと思われるものが存在する。タイ及びベトナムの主要な貯水池等から多くの *M. aeruginosa* の培養株を確立し、タイ、ベトナムおよび日本における *M. aeruginosa* の MLST による遺伝的多様性や機能的多様性を解析し、それぞれの国内での種内系統関係をあきらかにするとともに、日本やその他の地域 (中国、欧州、米国、オーストラリア等) から得られ、すでに解析がすすんでいる培養株との系統関係の解析から、地域間での遺伝子交流・伝播 (毒素遺伝子も含む) の実態を明らかにする。

(2) *Cylindrospermopsis* の遺伝的多様性の解明と毒素シリンドロスパモプシンの総合分析技術の確立

タイと日本の一部の *C. raciborskii* が遺伝的に同じ系統群であることが示唆されたことから、より多くの培養株を日本、タイ、ベトナムを含む多くの国から分離・培養あるいは分譲をうけ、DNA 解析からそれらの系統関係を明らかにする。本種は、タイやベトナム等の熱帯域で高頻度に発生する種であり、毒素シリンドロスパモプシンは多様な派生体を有していることから、本毒素動態の適切な

モニタリングのために、総合的に分析する技術を確立する。

3. 研究の方法

研究期間を通じて、タイ、ベトナムおよび日本の湖沼を調査し、*Microcystis* や *Cylindrospermopsis* を分離培養し、無菌培養を確立した。それぞれの株について、形態観察、分子分類を行うとともに、*Microcystis* については毒素遺伝子及び7つのハウスキーピング (HK) 遺伝子 (*ftsZ*, *glunA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*—いずれも 500base 程度で拡散、アミノ酸、タンパク合成、解糖系に係わる) の塩基配列解析を行い、HK 遺伝子群については統合して MLST 解析を行った。また、*Cylindrospermopsis* については、PC-IGS 遺伝子に基づく分子系統解析と毒素のモニタリング手法の開発をおこなった。

4. 研究成果

国内(琵琶湖、宍道湖等)及び東南アジア(ミャンマー、ベトナム、カンボジア)のアオコサンプルから *M. aeruginosa* の単離・培養作業を行い、計65のクローン株を得た。これら65株について、7箇所のハウスキーピング遺伝子座塩基配列を用いて遺伝子タイピング (MLST) を行った。その結果、44の MLST 遺伝子型が見出され、このうち39遺伝子型が新規であり、同種が大きな遺伝的多様性を有していることが再確認された。これら新規遺伝子型に既知の237遺伝子型を併せて分子系統解析を行った結果、*M. aeruginosa* が少なくとも11の明瞭な種内系統グループを含むことがわかった(図1)。

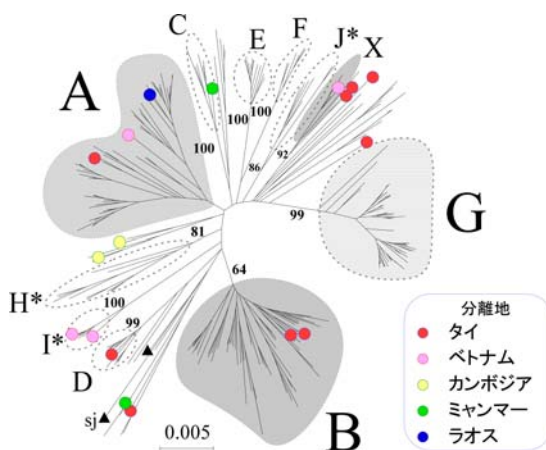


図1. 近隣結合法で作成したMLST系統樹 種内グループを閉曲点線で示す。今回の研究で発見した新規グループは*で示す。東南アジアから分離された遺伝子型を色つき丸で示し、丸印のない遺伝子型は日本産株を示す。東南

アジアの遺伝子型が複数のグループに分かれて日本産株に混在していることに注意。霞ヶ浦水系で大量発生が観察されたグループGを横線で、有毒株を含む3グループを灰色で示す。この3グループ以外から2株見出された(図中▲)うち、本年度宍道湖から発見した遺伝子型をsjと表記。枝の数値はブートストラップ法により算出された各枝の信頼確率である。スケールバーはサイト当りの塩基置換数を示す。

東南アジア株と日本株はこれら11グループの中に混在したことから、日本と東南アジアのアオコ間の遺伝的な差異が小さいこと、すなわちアオコの移動があることが示唆された。平成21年度の研究でGと命名した種内系統グループに属するほぼ全ての株が霞ヶ浦水系(霞ヶ浦・北浦、茨城県)からの分離株であったことから、このグループは同地の固有系統群であることが示唆された。平成22年度においても、グループGに属する株はやはり霞ヶ浦からしか分離されなかった。この「霞ヶ浦水系固有系統群の可能性」をさらに検討するため、アオコ環境サンプルから直接抽出したゲノムより、グループGを特異的にPCR検出できるシステムを開発した(図2)。

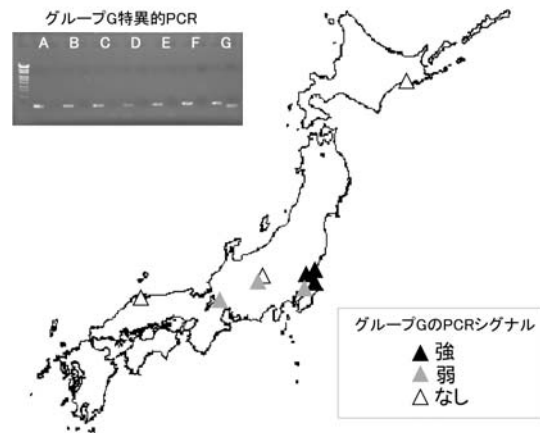


図2 グループG特異的PCR検出実験 ゲル写真上のアルファベットは *M. aeruginosa* の種内グループ(図2参照)を示す。各グループ毎に2レーンをとり、左側は *ftsZ* (コントロール)、右側は *ftsZG* (グループG特異的PCR)を示す。グループGのみ右レーンに増幅バンドが確認できることに注意。各地からのアオコサンプルについてPCR実験で得られたグループGのシグナル強度を地図上に示す。

このシステムにおいては、7つのハウスキーピング遺伝子の一つ *ftsZ* をターゲットにしたプライマーペア (*ftsGF*,

5' -AGGGGTRCAGGGGATT-3/ftsR) を用いるものである。これにより、国内外の湖沼からグループ G の存在有無をサーベイしたところ、霞ヶ浦水系以外の湖沼からも弱いながらも検出シグナルが得られた (図 2)。つまり単離には成功していないものの、グループ G は低頻度で霞ヶ浦水系以外の湖沼にも生息していることが示唆された。この結果から、グループ G は霞ヶ浦水系固有の系統群ではなく、同地の環境の変化にตอบสนองして同地で近年勢力を拡大したグループであることが示唆された。

各分離株のアオコ毒素ミクロシスチン毒性を化学分析によって検出し、これを系統樹上にマッピングしたところ、有毒株はこれまでに発見されていた有毒株を含むグループ A,B,X の 3 群に存在することがわかった。ところが今回、これに当てはまらない例外を 2 株発見した。一株は全ゲノムデータが得られている同種の PCC7806 株であり、もう 1 株は 2010 年の秋季に宍道湖で分離された株 (図 1, sj) であった。

同年の夏季から秋季にかけて、宍道湖ではアオコが空前の大量発生を引き起こしたことが知られているが、本株はまさにそのアオコから分離されたものである。汽水湖である宍道湖の分離株ということから、塩分耐性を有することが示唆される。系統樹上において、PCC7806 株とともに他の有毒株と系統的に離れて位置していることから、アオコ毒素遺伝子の水平伝播等により、「比較的最近有毒化した株」であると考察可能である。本株の生理・生態的特徴については、今後詳細な解析を行う必要がある。

*Cylindrospermopsis*についてはPC-IGS等の塩基配列解析を行うためのプライマーを設計した。タイと日本及びオーストラリアから採取された *C. raciborskii* は化学分類においては差異がなく、糸状体が直線タイプと螺旋タイプでも差異はみられなかった。以上から、直線タイプと螺旋タイプは種の違いではないことが示唆された。さらに世界各地から得られた *C. raciborski* の培養株 30 株の PC-IGS 解析により、オーストラリア・アセアングループ、東アジアグループ、欧州グループ、アメリカグループと大陸により遺伝的の分化している可能性が示唆された。肝臓毒アルカロイドシリンドロスパモプシンに相当画分を分取し、オーストラリアのシドニーの有毒株から単離したシリンドロスパモプシンと物理化学的性質を比較した。本研究で採用した精

製法ではアルカロイドが塩を含まない分子として得られることがあきらかになり、これまでの分子吸光係数や旋光度を訂正する必要が生じたので、Short CommunicationとしてTOXICONにその内容を掲載した。また、タイの株の中にはシリンドロスパモプシンとOHがHに代わった毒性の無いデヒドロオキシシリンドロスパモプシン(dehydroxycylindrospermopsin)を生産するものがあった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Y. Tanabe, Y. and Watanabe M.M. 2011. Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. PLoS ONE, 6, e17085 (2011) 査読有
2. Sano T, Takagi H, Nagano K, Nishikawa M, Kaya K. 2011. Accurate LC-MS analyses for microcystins using per ¹⁵N-labeled microcystins. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2511-2516. 査読有
3. Tanabe, Y., F. Kasai, and M. M. Watanabe. 2009. Fine-scale spatial and temporal genetic differentiation of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: revealed by multilocus sequence typing. *Environ Microbiol Rep* 1: 575-582 査読有
4. Codd, G.A., Morrison, L.F., Nath, M., Sano, T. and Kaya, K. 2009 Extraction of cyanostatins and their analysis with microcystins and anabaenopeptin-A, in a 21-year archive of cyanobacterial bloom samples. *Algological Studies* 130, 53-68, (2009) 査読有
5. Sano, T, Kikuchi, S, Kubo, T, Takagi, H, Hosoya K. and Kaya K. 2008. New values of molecular extinction coefficient and specific rotation for cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *TOXICON* 51:717-719 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 田辺雄彦, 加藤将, 渡辺信 2011 アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の東南アジア個体群における遺伝的変。日本藻類学会第35回大会 2011年3月27日 富山大学、富山
2. Nguyen Le Ai Vinh, Mtsuura H., Kaya

- K., Tanabe Y. and Watanabe M.M. 2011 Morphological, biochemical and phylogenetic characteristics of 57 strains of water-bloom forming *Microcystis* collected from water bodies in Vietnam. 日本藻類学会第35回大会 2011年3月27日 富山大学、富山
3. Nanda Kyaw Thu, Tanabe Y., Kato S. and Watanabe M.M. 2011 Morphology, phylogeny and gas vesicle gene detection of planktonic cyanobacterium *Oscillatoria kawamurae* from different geographic regions. 日本藻類学会第35回大会 2011年3月27日 富山大学、富山
4. 田辺雄彦, 渡邊信 2010 アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* における霞ヶ浦水系固有系統群の発見 日本藻類学会第34回大会 2010年3月20日, 筑波大学
5. Ikeda, K. and Watanabe, M.M. 2009. Interaction between *Microcystis* bloom and heterotrophic protists in a eutrophic lake, L. Inba, Chiba Prefecture, Japan. The 9th International Phycological Congress, August 4, 2009, Youth Education National Olympics Memorial Youth Center, Tokyo
6. 池田啓二・渡邊 信 2009 富栄養湖沼に発生するアオコの動態と原生生物の相互関係の解明。日本藻類学会第33回大会 2009年3月27日、琉球大学、那覇
7. 田辺雄彦・佐野友春・笠井文絵・渡邊 信 2009 ラン藻 *Microcystis aeruginosa* におけるアオコ毒素合成遺伝子の中立進化 日本藻類学会第33回大会 2009年3月27日、琉球大学 那覇

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信 (WATANABE MAKOTO)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：10132870

(2) 研究分担者

彼谷邦光 (KAYA KUNIMITSU)
筑波大学・特任教授
研究者番号：40124341