

0-1 アジアにおける水資源域の水質汚濁評価と有毒アオコ発生モニタリング手法の開発に関する研究

(3) アオコ等有毒藻類及び毒素のモニタリング手法の開発に関する研究

① アオコ等有毒藻類のモニタリング手法の開発に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

生物圏環境研究領域長

渡辺信

生物圏環境研究領域

系統・多様性研究室

田辺雄彦・河地正伸・笠井文絵

平成 13～15 年度合計予算額 26,336 千円

(うち、平成 15 年度予算額 8,177 千円)

[要旨] 有毒藻類のモニタリング手法の開発として、主に有毒ラン藻 *Microcystis* 属を対象に研究を進めた。*Microcystis* はミクロシスチン毒素を生産するが、毒素を生産しない株も存在するため、同毒素の生合成遺伝子を標的とした有毒株の検出・識別 PCR システムの構築を試みた。本遺伝子の部分領域を増幅するプライマーを設計し、本邦及びタイ・中国からの分離株について PCR 実験を行った結果、有毒株からは当該遺伝子の増幅が確認されたが、無毒株からは検出されなかった。以上の結果より、今回開発した PCR システムは、有毒 *Microcystis* を検出する強力なツールとなることが示された。さらに湖沼より採取した混在サンプルについても本法が有効であることを確認した。*cpcBA* 遺伝子座をマーカーとした各株の系統解析を行った結果、分離地と *Microcystis* の類縁性に相関が見られない例が散見されたことから、有毒アオコの移動が地球規模で起こっている可能性が指摘された。さらにミクロシスチン生合成遺伝子配列の系統解析を行い、*cpcBA* 遺伝子座の解析結果と比較したところ、同毒素生合成遺伝子が異なる個体間を水平伝播することが示唆された。このことから、有毒アオコのモニタリングに際して、毒素生合成遺伝子自体をマーカーとする解析の重要性が示唆された。分離株の毒素生合成遺伝子を比較解析した結果から、水域環境において株間での同遺伝子の組み換えが起こっていることを見出した。この知見は、遺伝子のシャフリングによって *Microcystis* が多様な毒素を作り出すポテンシャルを有することを意味する重要な発見である。ミクロシスチン毒素を生産する別のラン藻 *Planktothrix* 属についてもミクロシスチン生合成遺伝子を標的にした同属特異的プライマーを設計し、PCR 検出システムを構築した。しかしながら、本属については無毒・有毒全ての株から同遺伝子が検出された。この結果は、無毒株についても毒素生産のポテンシャルを有する可能性を示唆するものであり、*Planktothrix* のモニタリングには見かけの毒性にとらわれずに注意する必要性が指摘された。

[キーワード] 有毒アオコ、*Microcystis*、毒素生合成遺伝子、PCR 検出、水平伝播

1. はじめに

アオコは特に富栄養化した湖沼等の水域環境において見られるラン藻類の大量増殖現象であり、広く世界中で見られる。アオコは主に生活排水や工業廃水などが閉鎖した水域に流入し、栄養塩類等が過剰になることによって発生すると考えられている。アオコの発生自体も悪臭などを

付随するために好ましいものではないが、それ以上にアオコの生産するアオコ毒素（シアノトキシン）がもたらす水域環境への影響は、そこに生息する生物にとってはもちろんのこと、周辺に暮らす人類の健康にとってもたいへんな脅威であり、現実に毒素の飲料水への混入等による中毒によって死者を出すに至る事故が世界各地で起こっている。このため、有毒アオコの発生をモニタリングすることは、水域環境の保全や公衆衛生の観点から見て、極めて重要な研究であると考えられる。有毒アオコの発生の制御や発生後の処方のためには、有毒アオコの遺伝子に着目した研究が必要不可欠である。しかしながら、有毒アオコがもたらす水環境問題の歴史がたいへん古いにもかかわらず、有毒アオコの遺伝子レベルでの研究はこれまでほとんど行われていなかった。近年、アオコ毒素生産の遺伝的基盤の理解を目指した研究がようやくはじまり、最近になってアオコを形成するラン藻、*Microcystis aeruginosa* 及び *Planktothrix agardii* からマイクロシスチンというアオコ毒素の生合成を行う遺伝子が同定された^{(1),(2)}。この次のステップとして、アオコ毒素遺伝子をプローブとした毒素生産株の迅速簡便な同定法の開発や、適切なマーカー遺伝子を用いた有毒アオコの生態系における遺伝的挙動の解明等が、今後の有毒アオコの発生モニタリングの鍵となる研究として位置づけられることは間違いないと考えられる。そこで本研究においてはこうした課題に取り組むことにした。

2. 研究目的

上記のような背景から、アオコ毒素の中で最も有名な毒素として知られるマイクロシスチンを生産する *Microcystis* 属のラン藻を対象に、培養株及び環境水サンプル双方から、マイクロシスチン生合成遺伝子の特異的検出を可能とする PCR 法に基づいた実験システムを開発する。また、各菌株におけるこの毒素遺伝子の存在と毒素生産能との相関を見ることによって、本検出法の有効性を評価する。*Microcystis* 各株の系統的類縁関係を調べ、毒素遺伝子の存在や毒素遺伝子の近縁性と照らし合わせて、有毒アオコの水域環境中における遺伝的な挙動についての基礎知見を得る。有毒アオコの菌株のアオコ毒素遺伝子の配列を多くの株について比較解析することによって、同遺伝子の遺伝的多様性の時空間的ダイナミクスについて知見を得ることを目指す。

Microcystis と同様にマイクロシスチン毒素を生産することが知られている *Planktothrix* 属のラン藻についても、マイクロシスチン生合成遺伝子をターゲットとした特異的なプライマーによる PCR 検出システムを開発し、毒性の有無と本遺伝子の存在の相関を調べることによって、その有効性を評価する。

3. 研究方法

2～4週間、通常の継代培養と同じ条件⁽³⁾で培養した指数対数増殖期から定常期の *Microcystis* 菌体をゲノム DNA の抽出に供した。ゲノム DNA の抽出は、NaI とリゾチームを用いる方法⁽⁴⁾及び FastDNA kit (Q-Bio 社)を用いる方法等、複数の方法を試み、最も適切な方法について検討した。最近報告された、*Microcystis aeruginosa* のマイクロシスチン生合成遺伝子クラスター⁽²⁾に含まれる3つの遺伝子(*mcyD*, *mcyG*, *mcyJ*)の部分領域の遺伝子配列を標的に選択し、これらを特異的に増幅可能なプライマーセットを設計した。さらにこれら3つのプライマーと、既に報告されている *mcyA* を標的とするプライマーを用いた PCR 実験を、*Microcystis* 属の NIES 保存株及び中国・タイの湖沼からの分離株に対して行う事により、本法による検出能力の比較評価及び最適反応条件

の検討を行った。NIES 菌株・未処理サンプルに対して各種 DNA 抽出法を試み、高純度に DNA を抽出可能とするサンプル保存法、処置方法を探索した。さらにこれら菌株について、ラン藻の系統解析に広く使われている *cpcBA* 遺伝子座を、既報告のプライマー⁽⁴⁾を用いた PCR 反応によって増幅後、塩基配列を決定し、この遺伝子に基づく系統解析を行うことにより、毒性及び毒素遺伝子の有無、分離地、及び *Microcystis* の系統的近縁性との相関を調べた。上記の PCR 検出系によって検出された遺伝子のうち、*mcyA* 遺伝子座の遺伝子配列を決定した。決定した配列と既報告の配列を併せて系統解析を行うことにより、ミクロシスチン生合成遺伝子の系統と *Microcystis* の系統との相関について調べた。さらに各株の *mcyA* の配列を詳細に比較解析することにより、ミクロシスチン生合成遺伝子の遺伝的多様性のダイナミクスについて考察を行った。

Planktothrix 属のラン藻について、有毒・無毒双方の NIES 株及び分離株を 2～4 週間通常の条件で培養を行い、キット等を用いてゲノム DNA の抽出を行い、これを PCR 実験に供した。最近報告された *Planktothrix agardhii* のミクロシスチン生合成遺伝子群⁽²⁾に含まれる遺伝子の中から、*Microcystis* のミクロシスチン生合成遺伝子には存在しない *mcyT* 遺伝子を標的としたプライマーを設計した。このプライマーを用いて、*Planktothrix* 各株の毒性の有無との相関を調べ、有毒株検出への利用可能性を評価した。

4. 結果・考察

(1) *Microcystis* におけるミクロシスチン生合成遺伝子の検出

ミクロシスチン生合成遺伝子クラスターは *mcyA-J* の 10 個の遺伝子からなることが報告されており (図 1)、これら遺伝子がアミノ酸を順次縮合して、環状ペプチド性の毒素であるミクロシスチンを生合成すると考えられている⁽¹⁾。これらの遺伝子は、遺伝子配列上類似した同じペプチド鎖伸張・修飾反応を触媒するドメインを一単位として、複数の単位から構成されるという、「モジュール構造」を取っている。このため、プライマーの設計には類似のドメインの増幅を避けることが標的部分の「特異的」増幅には必須である。さらに、類似のドメインが毒素生合成遺伝子以外のゲノム中に存在する可能性についても検討し、そのような領域も避けなくてはならない。この 2 つの条件を凡そ満たすことが期待される領域を 3 箇所同定した。*mcyD* の脱水酵素ドメイン (図 4 中“DH”)、*mcyG* のアデニル化ドメイン (“A”)、*mcyJ* の *o*-メチル基転移酵素ドメイン (“OM”) である。これらの領域について、図 2 に示すように PCR プライマーを 3 ペア (DF/DR, GF/GR, JF/JR) 設計し、以降の検出実験に用いた。この 3 つのプライマーは 3 つとも、500bp 前後の遺伝子断片を増幅するように設計した。表 1 に今回設計した、及び既報告のプライマーの塩基配列を示す。

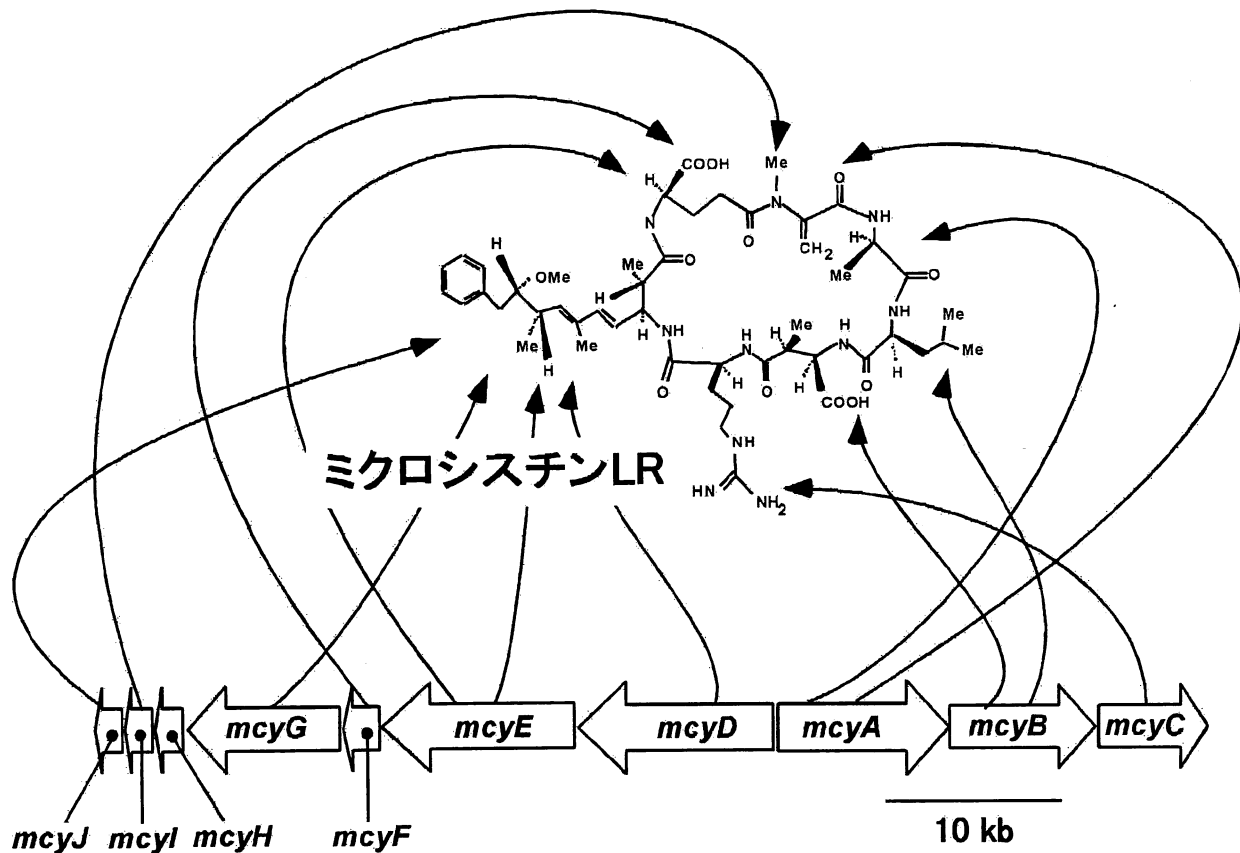


図1 アオコ毒素マイクロシスチンの化学構造とマイクロシスチン生合成遺伝子クラスターを構成する遺伝子⁽¹⁾。

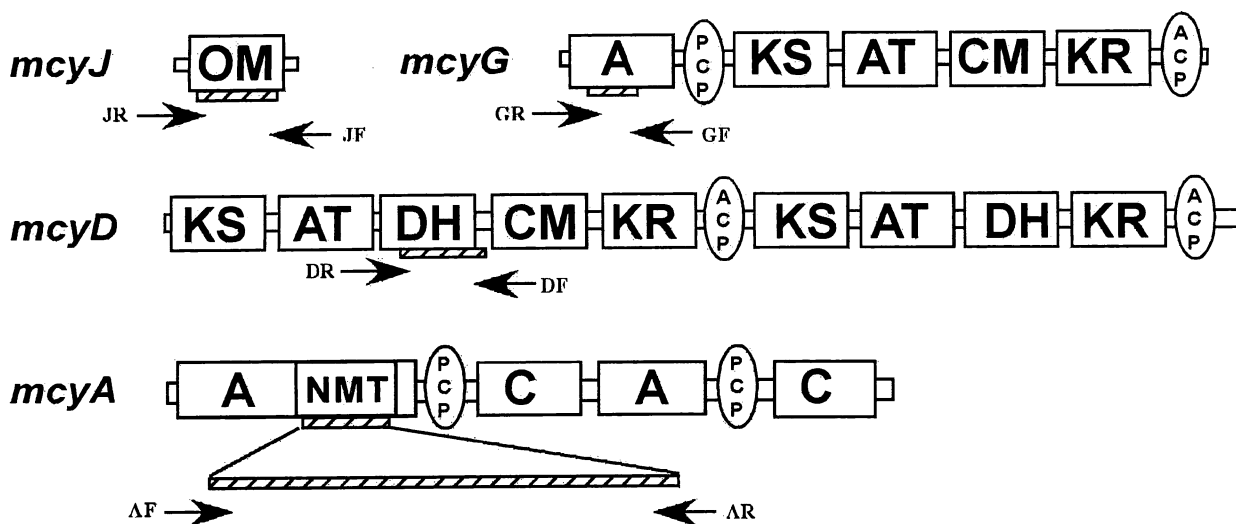


図2 設計したプライマー及びその位置。*mcyA* のプライマーは既報告のものを使用。図の2文字アルファベットに示すように、*mcy* 遺伝子は複数のドメインから成る。(略称については誌上発表文献①を参照。)

表1 PCR 検出実験において使用したプライマー

Primer	Sequence	Author
AF (MSF)*	5'-ATCCAgCAgTTgAgCAAgC -3'	Tillett <i>et al.</i> (2001) ⁽⁵⁾
AR (MSR)*	5'-TgCAgATAACTCCgCAgTTg -3'	Tillett <i>et al.</i> (2001) ⁽⁵⁾
DF	5'-gTCAATATCgAgggAgCATTAgTCA -3'	This study
DR	5'-AAAATgCCAATTTACCAAACgAAC -3'	This study
GF	5'-ggAAAATTTTAACAATCCCTTgAT -3'	This study
GR	5'-AATTTCTAAgAATAggCgAATCgTT -3'	This study
JF	5'-AAAgCCggAgATCACCTTTT -3'	This study
JR	5'-TTgACCAAAGCTTCgAgTCCT -3'	This study

脚注 *括弧の中のプライマー名は原論文での名称。本報告書では便宜上、仮称をつけた。

菌体 DNA の抽出法は予備実験により、NaI とリゾチームを用いる方法や他の方法よりも、FastDNA kit を用いる方法が、回収率・純度・迅速性において優れていることが判明したため、この方法を主として採用した。この方法を用いると、1 時間弱で菌体からゲノムを取得することが可能である。さらに、この方法はプランクトンネットによって捕集した水域環境の混合サンプルからの DNA 抽出についても有効であることがわかった。

PCR 反応の十分な条件検討を行った結果、最適反応条件は、94°C で 3 分の熱変性後、94°C 1 分、60°C 1 分、72°C 30 秒を 40 サイクル行うという系であることが判明した。このため、以下の PCR 実験は全てこの条件で行った。本システムの有効性を評価するため、*Microcystis* の NIES 保存株、及びタイ・中国の湖沼からの分離株に対して PCR 検出実験を行った。その結果を図 3 及び表 2 に示す。この実験の結果、培養株の有毒菌株の全て (11 株) について、今回設計した 3 つのプライマー (DF/DR、GF/GR、JF/JR) によって、期待されるサイズの増幅産物が確認された。また図には示さないが、既報告のプライマー (AF/AR) についても増幅が確認された。これらの増幅バンドについては、シーケンシングにより、全ての増幅産物がミクロシスチン生合成遺伝子の標的部分であることを確認した。それ以外の全ての無毒株 (12 株) からは、いずれのプライマーを用いても増幅産物は確認されなかった。無毒株については、さらに PCR におけるアニーリング温度を 50°C まで下げても、やはり増幅バンドは得られなかった。このことは、*Microcystis* におけるミクロシスチン毒素の生産が、同生合成遺伝子の有無によってのみ決定されることを示唆している。以上の結果から、今回設計したプライマーを単独あるいは組み併せて PCR 実験に使用することによって、ミクロシスチン生合成遺伝子を検出できること、また同時に分離した *Microcystis* の株の毒性の有無を PCR 実験の結果から識別可能であることが示唆された。

さらに、*Microcystis* によるアオコが発生しているタイ及び中国の湖沼からプランクトンネットを用いて採取した環境水サンプル (*Microcystis* がサンプル中に相当量含まれていることは顕微鏡観察により確認) から抽出した DNA について本 PCR 検出実験を試みた。その結果、期待される塩基長を持つ増幅バンドを確かに検出することができた (図 3)。実際に反応物を直接シーケンシングすることにより、ミクロシスチン生合成遺伝子の標的部分の特異的増幅を確認できた。

この結果から本法は環境中の混合サンプルより、有毒の *Microcystis* を検出できる強力な手法として利用可能であることが判明した。



図 3 PCR 検出実験の結果を示すアガロースゲル電気泳動。図中、D、G、J、はそれぞれ *mcyD*、*mcyG*、*mcyJ* 遺伝子特異的プライマーを表す。Ch は中国雲南省昆明近郊のデンチー湖より採集したアオコ含有環境水サンプル、Th はタイのバンコク近郊の貯水池からの同様の環境水サンプル。左端のレーンサイズマーカーであり、縦軸の数値はマーカーの塩基数を表す (bp)。

表 2 使用菌株及び PCR 検出実験の結果

Strain*	毒性	<i>mcyA</i>	<i>mcyD</i>	<i>mcyG</i>	<i>mcyJ</i>
N88, N89, N90, N102, N103, N107, CL4, PCC7941, T20 -3, TL2, MCS3	+	+	+	+	+
N87, N90, N98 -101, N104, N105, N108, N109, N111, N112	-	-	-	-	-

脚注 * N, 国立環境研 NIES 株; PCC, フランスパスツール研 PCC 株; CL, 中国からの分離株; T, TL, MCS; タイからの分離株。

また、採集したアオコ含有環境水サンプルの採集時の処理及び、その後の長期保存についても検討を行った。この結果、アセトンにサンプルを浸す保存方法を採用することにより⁶⁾、4℃で少なくとも2年間冷蔵保存しておいたサンプルからの DNA 抽出物でも、上記プライマーをもちいることにより、特異的かつ高感度にミクロシスチン生合成遺伝子を PCR 検出することができた。また同法を用いると、常温下でのサンプル保存でも、最低2ヶ月後までは増幅バンドが得られることを確認している。一般にアオコは高気温時に発生することが多いため、腐敗・分解を避

ける採集直後のサンプル処置は重要な課題となっていた。今回の実験では、採取時の気温が 30℃ を超えたタイからのサンプルについても有効であったため、長距離・長期間のアオコサンプル採集に際しては、本法が強力な保存手段として利用可能であることが示唆される。今後、さらに常温での長期保存の可能性について検討してみたい。

(2) *cpcBA* 遺伝子座に基づく *Microcystis* 各株の系統関係

今回使用した *Microcystis* 各株間の系統的近縁性を調べるために、シアノバクテリアの遺伝子系統解析で汎用され、その有効性が広く認められている *cpcBA* 遺伝子座 (光合成補助色素タンパクであるフィコシアニンの 2 つのサブユニット *cpcA*, *B* 及びその介在配列 IGS を含んだ部分) をマーカーとして選択した (図 4)。各菌株について、同領域を約 600bp 増幅するように設計された既報告のプライマー PC.F (5'-ggCTgCTTgTTTAC gCgACA-3') 及び PC.R (5'-CCAgTACCACCAgCAACTAA-3')⁽⁴⁾ を用いて PCR 増幅し、増幅断片をオートシーケンサーを用いて遺伝子配列を決定した。これらの配列に、既にデータベースで公表されている世界中から分離された他の菌株の配列を加えて系統関係の解析を行った。その結果 (図 5) によると、今回解析を行った *Microcystis* 各菌株は大きく 3 つの系統群 (group I-III) に分かれることが示された。またネットワーク図中の「枝」の長さ (遺伝子間の距離を表す) に表現されているように、グループ III はグループ I, II に比べて遺伝的多様性が大きいことも示唆された。このうちの 2 つの群 (group I-II) については、例えばグループ I において北米株 (UWOCC 001)・オーストラリア株 (UWOCC 017, 023)・ヨーロッパ株 (PCC7806) が完全に同一の遺伝子型を持つことが示されたように、分離地と系統関係の間の相関性が全く見られなかった。この結果は、*Microcystis* が相当の頻度で地球規模で広く移動分散していることを示唆しており、有毒アオコの分散力の大きさを示す興味深い知見である。今回同定された 3 群中の 1 群 (group III) を構成する菌株は全て日本から分離されており、このグループの日本における地域分化の可能性を示唆する。しかしながら、この結果は解析したサンプルが少ないがゆえの「見かけ」のグルーピングである可能性も否定できない。今後、さらにサンプル数、マーカーとする遺伝子座の双方を増やして解析することにより、この問題を明らかにしていく必要があるだろう。

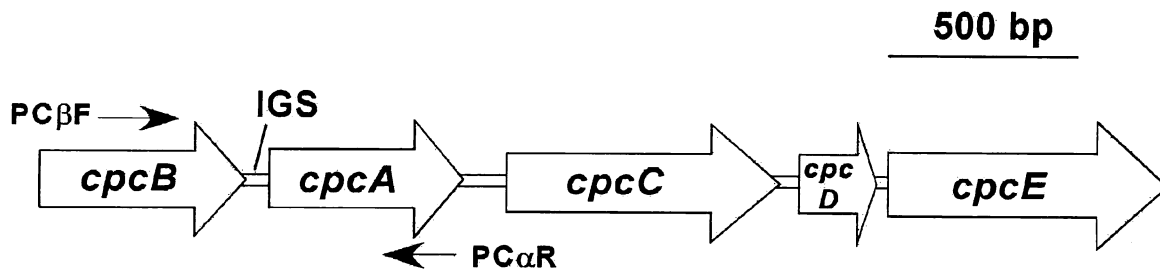


図 4 フィコシアニンサブユニットをコードする遺伝子はオペロン構造を成しており、*cpcA-E* の 5 つの遺伝子及び介在配列から構成される。今回使用した *Microcystis* の系統解析マーカー、*cpcBA* 遺伝子座を増幅するプライマー、PC.F/PC.R の位置を矢印で示す。

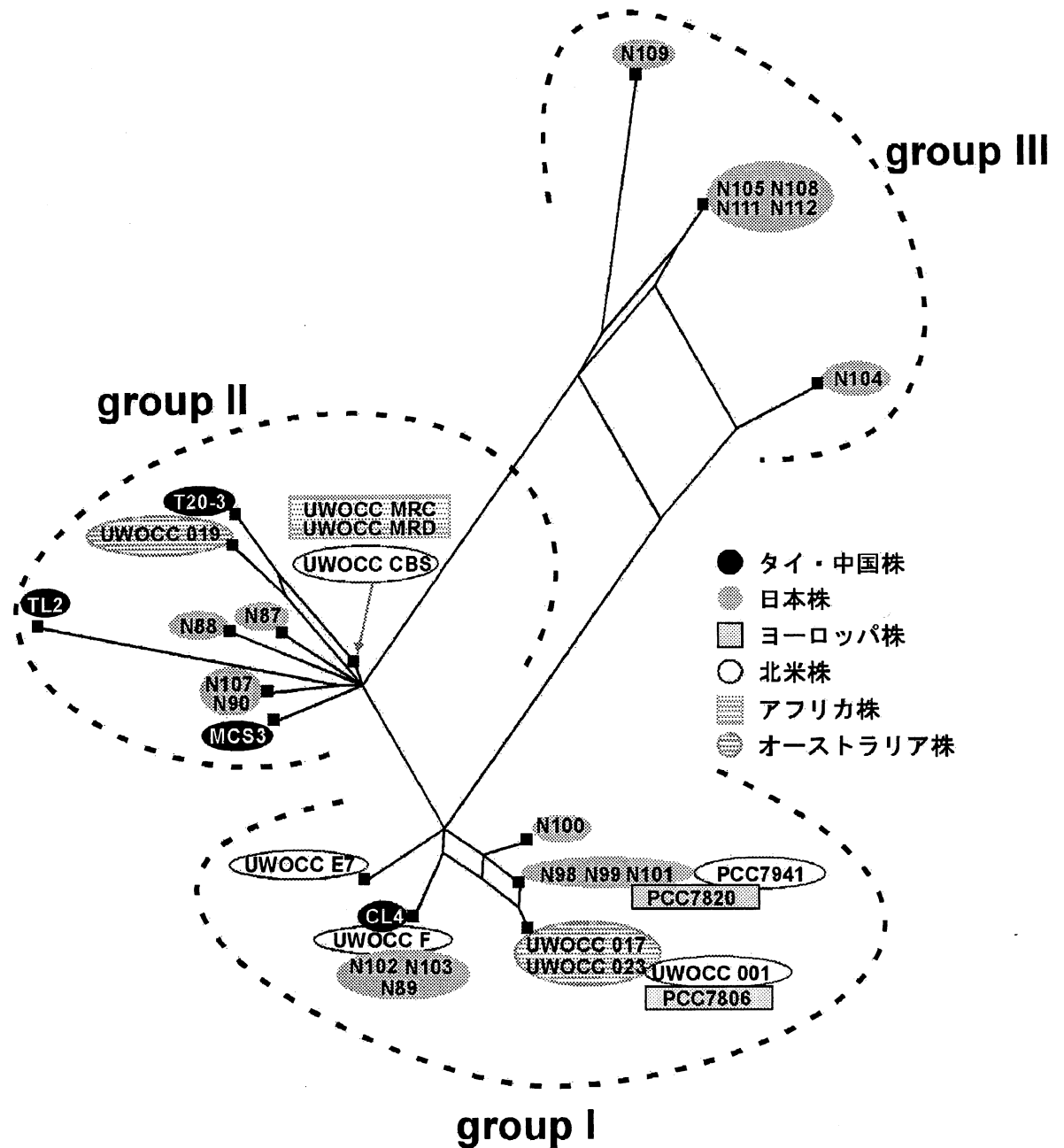


図5 *cpcBA* 遺伝子座を用いたスプリット分割法⁷⁾による *Microcystis* 各株間の系統関係を示すネットワーク図。

(3) *Microcystis* 各株の系統関係と *mcyA* 遺伝子の系統関係の比較

Microcystis 各株間の系統的近縁性と毒性との相関を調べるため、上記の毒素遺伝子検出実験によって得られた *mcyA* 遺伝子の部分領域の配列 (AF/AR プライマーで増幅される約 1,300bp に相

当する部分) を決定して、データベースに登録されている既報告の同遺伝子の配列を加えて分子系統解析を行い、*cpcBA* 遺伝子座によって示された *Microcystis* 各株間の系統関係と比較した。その結果、この2つの遺伝子の系統関係には多くの不一致な点が見られた(図6)。*cpcBA* 遺伝子座の系統関係が *Microcystis* の系統を表していると仮定すれば、この結果はミクロシスチン生合成遺伝子が異なる株間で相当の頻度で水平伝播することを示唆しており、有毒 *Microcystis* の動態を解析するには、生物本体とは独立した毒素生合成遺伝子そのものの動態に特に留意する必要性が示唆された。水平移動に関与する媒体は未知であるが、他のバクテリアの例に照らし合わせるならば、*Microcystis* の細胞本体とは独立した遺伝因子(プラスミド・ファージ等)である可能性も高いと思われる。実際にそうであるならば、そうした遺伝因子を含んでいると考えられる環境中の水の移動には、有毒アオコの存在の有無に関わらず注意を払うことが必要であろう。

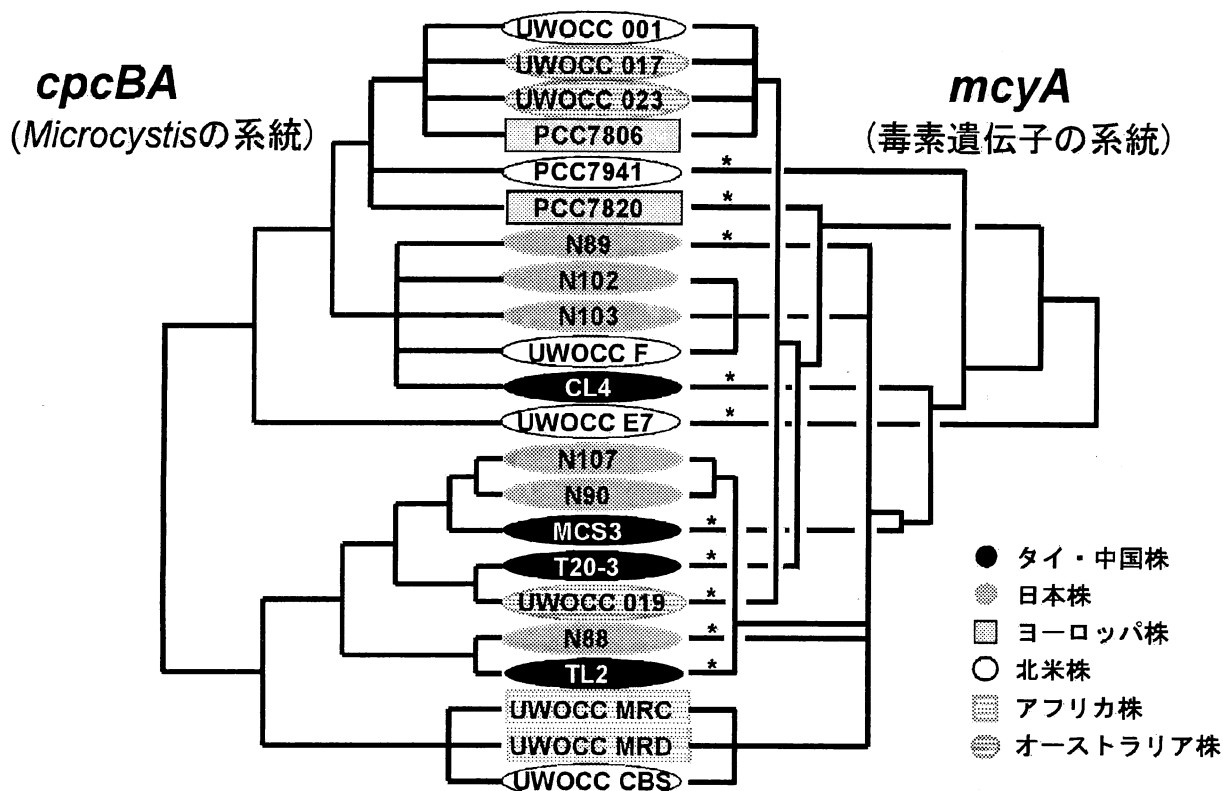


図6 *Microcystis* とミクロシスチン生合成遺伝子(*mcyA*)の系統関係の比較系統図。相当の箇所(図中*)で二つの遺伝子配列の系統関係に矛盾が生じており、遺伝子水平移動が起こったことが示唆される。

(4) ミクロシスチン生合成遺伝子の遺伝的多様性の解析

Microcystis のミクロシスチン生合成遺伝子の遺伝的多様性の動態について知見を得るため、今回 PCR 検出実験を行った株について、増幅された各遺伝子断片の配列を決定し、比較解析を行ってみた。その結果、同遺伝子には相当量の遺伝的変異が含まれていることが判明した。具体的な株間における遺伝的変異として、塩基のパーセント相違量にして平均 1.86%、最大で 5.87% という値が試算された。さらに同遺伝子配列を統計的に比較解析することにより、株間における遺伝子の組み換え、すなわち”recombination”が同遺伝子の遺伝的多様性の維持生成に寄与していることが判明した。図 7 に一例を示すように、数百塩基という比較的短い配列を単位とした recombination の痕跡が複数検出された。こうした recombination の頻度はそれほど多くないと推定されるものの、ミクロシスチン生合成遺伝子群内において、かなり広い範囲で起こっていることを示唆するデータも得られている（詳細は誌上発表論文①）。これらの結果は、自然界において *Microcystis* の株間の遺伝子の組み換えが、生合成されるミクロシスチンの化学構造の多様化、ひいては毒性のスペクトルの多様化を極めて短期間で引き起こす可能性を示唆するという意味で、有毒アオコのモニタリング研究にとってたいへん重要かつインパクトのある発見である。

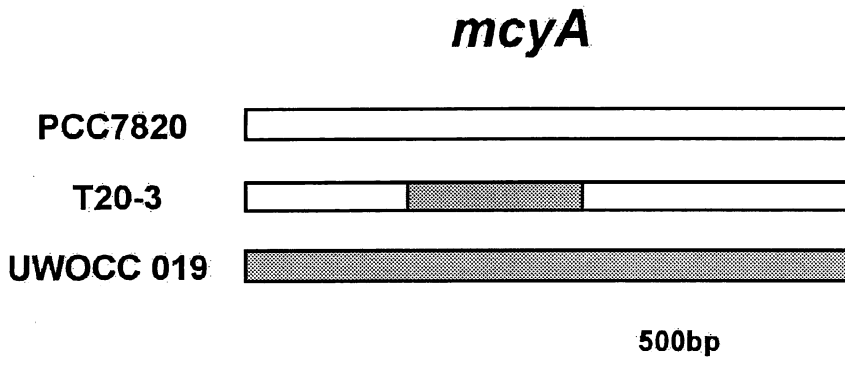


図 7 ミクロシスチン生合成遺伝子 *mcyA* の PCR 増幅断片において検出された recombination の一例。T20-3 株（タイ産）の *mcyA* 遺伝子の一部は、PCC7820 株（カナダ産）と UWOC019 株（オーストラリア産）の同遺伝子の組み換え型である可能性が示唆された。（詳細については誌上発表論文①を参照）

(5) *Planktothrix* 属からのミクロシスチン生合成遺伝子の検出

Planktothrix 属は *Microcystis* と同様に湖沼にアオコを形成する有毒ラン藻として知られており、*Microcystis* と同様に有毒株と無毒株があることが知られている。ごく最近、*Planktothrix agardhii* のミクロシスチン生合成遺伝子群が同定された⁽²⁾。この遺伝子群は、*mcyA-E, G, H, T* の 9 つの遺伝子からなり、*Microcystis* のミクロシスチン生合成遺伝子と構造上よく類似していることから、*Microcystis* の同遺伝子とほぼ同様なプロセスでミクロシスチン毒素の生合成を行うものと推定されている⁽²⁾。しかしながら、*Microcystis* と *Planktothrix* のミクロシスチン生合成遺伝子の配列上の相同性はさほど高くはなく、相同性が 60% を下回るドメインも存在し、さらには *Planktothrix*

の同遺伝子群においてのみ見られるユニークな遺伝子(*mcyT*、チオエステル化ドメインをコードする)も存在する。このことから、様々な微生物が混在する環境水サンプルからの同属特異的な毒素遺伝子検出を可能にするプライマーの設計が可能であると考えられた。(現時点では環境水に対しては試みるに至っていない。)そこで特異的 PCR プライマーの作成に当たり、*Microcystis* のミクロシスチン生合成遺伝子群には相同性のある部分が存在しない”*mcyT*”の遺伝子を標的として選択し(図8)、この領域をおよそ 500bp 弱増幅するプライマーペア、TF/TR を設計した。本プライマー(表3)を用いて実際に予備 PCR 実験を行った結果、図9に示すように、*Microcystis* の有毒株からは増幅バンドは検出されず、*Planktothrix* の株からのみ検出された。(シーケンシングによって確かに増幅産物が該当する遺伝子であることを確認した。)したがって、本プライマーは確かに *Planktothrix* のミクロシスチン生合成遺伝子群を特異的に検出可能であることが示された。同プライマーを用いた PCR 実験の最適反応条件の検討を行った結果、先に記述した *Microcystis* と同様、94°Cで3分の熱変性後、94°C 1分、60°C 1分、72°C 30秒を40サイクル行うという系であることが判明したため、以降の実験ではこの条件で行った。また、DNA 抽出法も *Microcystis* の場合と同様、FastDNA kit を用いる方法が最も有効であることが判明したので、以降の実験では同法を採択した。

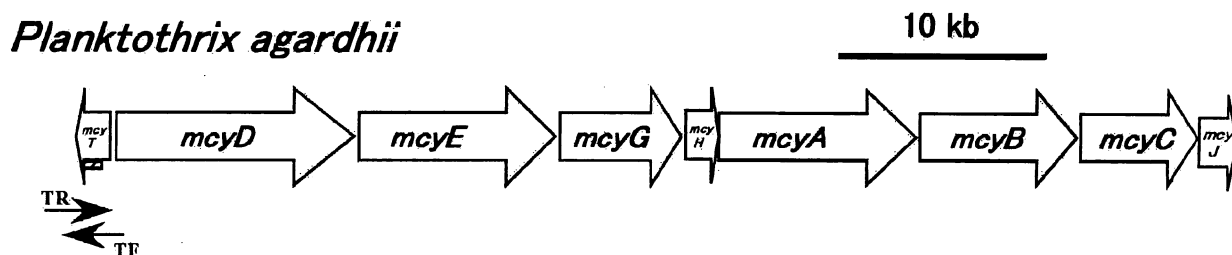


図8 *Planktothrix agardhii* のミクロシスチン生合成遺伝子⁽²⁾の構造と設計したプライマーの位置。

表3 PCR 検出実験において使用したプライマー

Primer	Sequence	Author
TF	5'- TgTCCAATCgAACTTCCCgg -3'	This study
TR	5'- CCACAgAgAAAgCCgAgTTggT -3'	This study

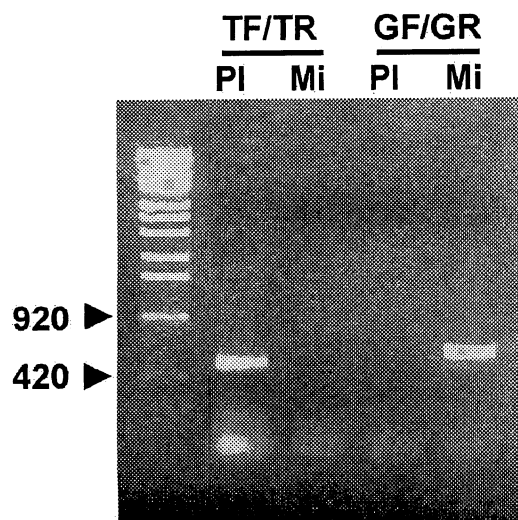


図9 今回設計した *Planktothrix* のミクロシスチン生合成遺伝子検出プライマーの特異性。同時にこの結果は、*Microcystis* の *mcyG* を標的としたプライマーが *Microcystis* に特異的であることも示している。PI, *Planktothrix agardhii* CCAP1459/11A 株、Mi, *Microcystis aeruginosa* NIES102 株。その上の表記は用いたプライマーペア。

本プライマーを用いた有毒株の PCR 検出・識別の有効性を評価するため、世界各地から分離された *Planktothrix* の培養株を対象とし、有毒株 20 株及び無毒株 3 株について実際に PCR 実験を試みた。その結果、有毒株の全てから期待される塩基長の増幅バンドが検出される一方で、無毒株についても 3 株全てから検出された (図 10)。これらの増幅バンドは、シーケンシングによって全てが *mcyT* 遺伝子であることが確認された。解析した無毒株の数が 3 つと少ないので断定はできないが、本結果は有毒株のみから毒素生合成遺伝子が検出された *Microcystis* のケースとは極めて対照的である。すなわち、*Planktothrix* の有毒株の識別に際しては、PCR による遺伝子検出系が有効に機能しない可能性を示唆する。一方で、*Planktothrix* の無毒株についても毒素生合成遺伝子を保持しているという結果は、同属の無毒株も毒素を生産するポテンシャルを有している可能性が考えられるという意味で、たいへん重要な発見である。また同毒素の生産が、環境条件依存性であるという可能性も考えられる。今後、さらに多くの (特に無毒) 株の解析を行っていくことによって、より確かなことが明らかとなるであろう。

現時点では環境水混在サンプルへの本 PCR 検出システムの適用を試みるに至っていないが、有効に機能することが期待されることから、今後、標的遺伝子の特異的検出が可能かどうかを評価する予定である。結果によっては、さらに *Planktothrix* のミクロシスチン生合成遺伝子に対しても、*Microcystis* のケースと同様に複数のプライマーを設計して使用する予定である。

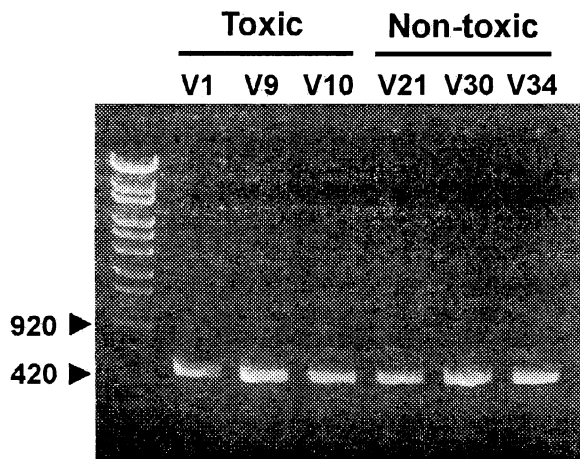


図 10 *Planktothrix* 各株からのマイクロシスチン生合成遺伝子(*mcyT*)の PCR 検出。有毒株からのみならず、無毒株からも増幅産物が得られる。V, ノルウェイ水域研究所 NIVA-CYA 株。

表 4 使用菌株及び PCR 検出実験の全結果

Strain *	毒性	<i>mcyT</i>
V1, V9, V10, V11, V13, V15, V35, V55, V97, V98, V117, V126, V129, C1459/11A, C1459/14, N610, D2 -3, D3 -4, D4-1, D4 -2	+	+
V21, V30, V34	-	+

脚注 *C, 英国菌株保存施設 CCAP 株; D, 佐野友春博士 (国環研) による分離株; N, NIES 株; V, NIVA-CYA 株。

5. 本研究により得られた成果

有毒アオコ *Microcystis* について、有毒株の迅速かつ効果的な識別・検出を可能にする PCR 実験システムを確立した。本システムを用いることにより、分離培養株は勿論のこと、湖沼から採取した様々な微生物が混在する環境水サンプルからもマイクロシスチン生合成遺伝子の特異的に検出することが可能である。また、有毒 *Microcystis* の異なる水域環境中への移動が広く地球規模で起こっていること、マイクロシスチン生合成遺伝子が有毒アオコの異なる株間を水平伝播する可能性を明らかにした。さらに、マイクロシスチン生合成遺伝子には相当の遺伝的変異が保有されており、同遺伝子の遺伝的多様性の生成・維持には、数百塩基という極めて短い配列を単位とした、個体間での遺伝子組み換え(recombination) が関与していることを明らかにした。

Planktothrix 属の有毒ラン藻についても、同属が生産するマイクロシスチンの生合成遺伝子の特異的に検出可能な PCR システムを開発した。さらに *Planktothrix* については、無毒株においても毒素を生産するポテンシャルを有している可能性を指摘した。

6. 引用文献

- 1) Tillett, D., E. Dittman, M. Erhard, H. van Dohren, T. Borner, and B. A. Neilan. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-synthetase system. *Chem. Biol.* **7**:753-764.
- 2) Christiansen, G., J. Fastner, M. Erhard, T. Borner, and E. Dittmann. (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *J. Bacteriol.* **185**:564-572.
- 3) Kasai, F., M. Kawachi, M. Erata, and M. M. Maokoto (2004) NIES -Collection, List of Strains 7th ed., Microalgae and Protozoa.
- 4) Neilan, B. A., D. Jacobs, and A. E. Goodman. (1995) Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3875-3883.
- 5) Tillett, D., D. L. Parker, and B. A. Neilan. (2001) Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2810-2818.
- 6) Fukatsu, T. (1999) Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Mol. Ecol.* **8**:1935-1945.
- 7) Huson, D. H. (1998) SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* **14**:68-73.

7. 国際共同研究等の状況

なし

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

<学術誌 (査読あり)>

- ① Y. Tanabe, K. Kaya, and M. M. Watanabe (2004): *J. Mol. Evol.* (in press)
“Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp.”

(2) 口頭発表

- ① Y. Tanabe, K. Kaya, and M. M. Watanabe : Algae 2002, 26th annual and 50th anniversary congress of Japanese Society of Phycology and 3rd Asian Pacific Phycological Forum joint conference, Tsukuba, Japan (2002)
“Detection of microcystin synthetase genes from Japanese strains of *Microcystis*.”
- ② 田辺雄彦、彼谷邦光、渡辺信: 日本進化学会第5回大会 (2003)
「非リボソーム型ポリペプチドシンセターゼのバクテリア同種内における多様化機構～有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の例。」

- ③ 田辺雄彦、渡辺信: 日本藻類学会第 28 回大会 (2004)
「シアノバクテリア *Microcystis aeruginosa* における recombination」
- ④ Y. Tanabe and M. M. Watanabe: ICC10, the 10th international congress for culture collections,
Tsukuba, Japan, 2004
“The impact of recombination to the genetic diversity of *Microcystis aeruginosa*” (アブストラクト提出
済)

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

なし

(5) 一般への公表・報道等

なし

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

有毒アオコの毒素遺伝子の検出法の開発はモニタリング手法に適しており、中国ではモニタリング手法の一つとしてミクロシスチン遺伝子の検出方法の簡易化を行っている。特に、飲料水の検査法への導入が有効であろうと考えられる。