

課題名 D-0905 アオコの分布拡大に関する生態・分子系統地理学的研究

課題代表者名 中野 伸一（京大大学生態学研究センター水域生態学研究部門教授）

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 184,156千円（うち23年度 59,193千円）
 予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) 移入アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究（京大大学生態学研究センター）
- (2) 遺伝的多様性を指標としたアオコの分布拡散機構に関する研究（筑波大学大学院生命環境科学研究科）
- (3) アオコの生残・増殖に関する分子生態学的研究（福井県立大学海洋生物資源学部）

研究協力機関

特に無し

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

アオコは、湖水中のアオコ原因植物プランクトンが大量に増殖して起こり、世界各地の富栄養化した湖沼に普遍的に見られる。アオコが発生すると景観を悪化させ、腐敗したアオコが悪臭を放ち、さらにはアオコが作る強い毒により海外では人間や家畜等の死亡の被害が報告されている。アフリカや東南アジア諸国ではアオコの発生が深刻化しており、とくにアフリカでは多くの人が良質な水を利用できない状態が続いている。このように、アオコの防除は世界中の富栄養化した湖沼で緊急課題となっているが、未だに問題は解決されていない。我が国では、国連が掲げたミレニアム開発目標のゴール7、ターゲット10に基づき、アジア水環境パートナーシップ事業、日中水環境パートナーシップ、アフリカにおける水環境改善等の、水環境問題についての国際的な取り組みを進めてきた。しかし、アオコの生態には湖沼周辺の人間活動等の地域特性が強く影響するため、その発生機構や防除対策にかかる科学的情報の蓄積が求められている。

2. 研究開発目的

アオコは、風気流、鳥類などに運ばれて国内外の湖沼に分布を拡大しており、各湖沼には由来の異なる遺伝的に多様なアオコ群集が存在し、その一部に有害性の高いタイプが含まれると考えられる。湖沼の水質は周辺の人間活動に強く影響されるため、アオコ群集の中でどのタイプが優勢となるかは、周辺の人間活動も含めた湖沼環境総体により決定されていると考えられる。本研究では、最先端のバイオテクノロジーと大型環境解析システムを駆使し、これまで国や民間団体が蓄積してきた環境データベースを活用しながら、「当該湖沼にどのようなアオコがどのように運ばれてくるか」、「湖沼に新たに入ったアオコは生き残れるのか」、「生き残ったアオコ群集はどう多様なのか」、「多様なアオコ群集の中から特定の機能を持ったアオコ（たとえば有毒種）が増殖するのはどういった理由によるものか」について、アオコの中でも世界的に分布しておりかつ環境被害が深刻化している *Microcystis aeruginosa* に着目して、明らかにする。また、湖沼周辺の人間活動として土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の調査も行い、アオコ群集組成との対応があるか検討する。

3. 研究開発の方法

(1) 移入アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究

西日本各地の湖沼から得たアオコより、*M. aeruginosa* をおよび *Cuspidothrix issatschenkoii* を単離し、各単離株の毒素生産性を調べ、rDNA の16S-23S内部転写スペーサー領域を用いて遺伝子型を特定後、系統樹の作成を行った。その後、*C. issatschenkoii* については、アナトキシンA生産遺伝子をターゲットにした、定量PCRマーカーの開発を行った。また、同じ水サンプルを用いて、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE法）により細菌群集解析を行った。水鳥によるアオコ輸送・散布の検討について、湖沼における水鳥飛来状況を調べ、糞からのシアノバクテリアITS領域の遺伝子検出を行い、さらにマガモにアオコを飲み込ませた後に排泄される糞からアオコのDNA検出および増殖能力を保持したアオコの検出を行った。野外大規模実験系において人工的にアオコを発生させる栄養塩類濃度等の環境条件を検討し、発生したアオコの現存量と遺伝子型組成を経時的に追跡した。この時発生したアオコを用いて、アオコの増殖を事前に検出できる方法を開発した。また、アオコ発生時に特徴的な細菌群集組成と、アオコ殺滅原生生物の動態を調べた。アオコを摂食する原生生物である鞭毛虫

*Collodictyon triciliatum*について、*M. aeruginosa*を餌としたときの餌密度依存性の検討と、現場での摂食圧を評価した。琵琶湖内湖、利根川流域、東南アジア、オーストラリア、ケニアにおいて、水文、湖沼周辺の土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の調査とアオコ発生の状況、水域環境と地域社会の関係史を調べた。Googleマップを用いて、日本国内のアオコ発生状況と関連環境情報を整理し、インターネット上に掲載した。アオコについて一般市民を啓発するための資料を作成し、インターネット上に掲載した。

(2) 遺伝的多様性を指標としたアオコの分布拡散機構に関する研究

霞ヶ浦を中心とした国内湖沼とアジア・オセアニア地域の湖沼から得たアオコを用いて、*M. aeruginosa*分離株の単離作業・遺伝子型の解析及びアオコの採集・単離作業を行った。得られた株について7つのハウスキーピング遺伝子 (*ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*) の塩基配列に基づく遺伝子タイピング (MLST) を行った。これらの株に遺伝子配列が既知である株を含めて、系統関係の解析を行った。また、新規単離株取得のため、国内およびアフリカ・ケニア等の海外の湖沼や関連学術機関からアオコのサンプルあるいは *M. aeruginosa* 単離株を得、一部株についてはクローン化も行った。霞ヶ浦水系に固有の系統群であるグループGについて、特異的PCRプライマーを設計した。アオコ毒素マイクロシステンを高速液体クロマトグラフィーで検出し、質量分析により化学構造を特定した。

(3) アオコの生残・増殖に関する分子生態学的研究

Microcystis 属を遺伝子の配列から識別するためのプローブ (PCRプライマー) の開発を行った。*Microcystis* 属の16S-23S rDNAのITS領域全長の塩基配列をDNAデータベースから選出し、この領域にPCRプライマーを設計した。さらに、開発されたプライマーを用いて、実際の湖沼で発生しているアオコや野外実験系で人工的に発生させたアオコの現存量測定を行った。国立環境研究所から入手した *Microcystis* 属の異なる分離株 (NIES298、NIES112) を、アクアトロン6基を用いて培養し、増殖特性を調べた。より詳細な生理特性解明のため、上記の単離株にNIES98とNIES102を加えて、改変BG-11培地をベースに窒素あるいはリンの栄養塩濃度の異なる培養条件下で混合培養を行った。また、*Microcystis* 属の各単離株の温度に対する増殖応答を検討するため、異なる温度で各単離株を培養し、増殖速度の変化を検討した。培養液中の *Microcystis* 属細胞密度は、定量PCR法により測定した。

4. 結果及び考察

(1) 移入アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究

西日本各地の湖沼における *M. aeruginosa* の各遺伝子型および毒素生産性には、地域局在性や固有性は見られず、地理的な分化が無いことが分かった。

アオコの発生する湖沼には、水鳥が高密度で飛来する傾向を明らかにした。国境を越えて渡りを行う鳥の糞から、*M. aeruginosa* の遺伝子を検出することに成功した。特に、干潟を利用する海鳥の糞からも *M. aeruginosa* の遺伝子を検出した。マガモに *M. aeruginosa* を摂餌させた実験では、4時間以内に糞として排出された *M. aeruginosa* が増殖能力を保持していることを明らかにした (図1)。マガモが4時間飛翔すると、半径300キロ以内を移動可能であることから、マガモが広範囲の湖沼にアオコを輸送・散布している可能性が示唆された。

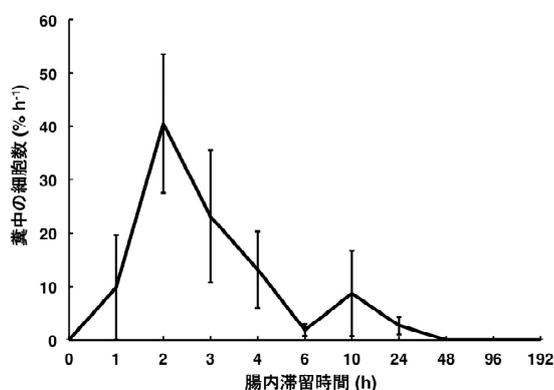


図1: マガモ糞中から検出された *Microcystis aeruginosa* 細胞の生残率

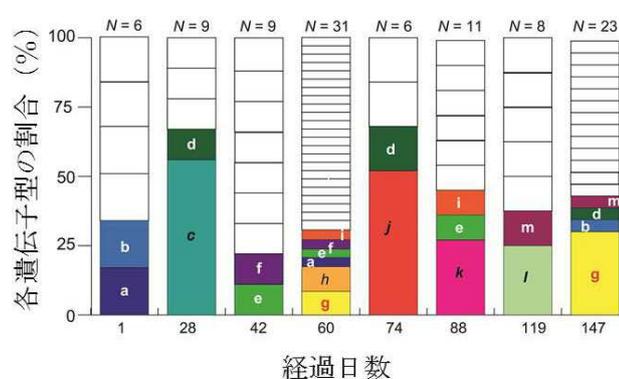


図2: 実験池に発生したアオコの優占遺伝子型の経時変化。白い部分は実験期間中に一度しか出現しなかった遺伝子型であり、その他の色は実験期間中に複数回出現した遺伝子型を示す。異なるアルファベットは、異なる遺伝子型を示す。

大規模野外実験系において、*M. aeruginosa* のアオコを人為的に発生させるノウハウを蓄積した。また、発生した *Microcystis* のアオコ個体群は、従来指摘されていたよりも多様な遺伝子型で構成され、かつ優占遺伝子型は短期間のうちに変化することを明らかにした(図2)。窒素とリンの供給を変化させた実験では、*Microcystis* は窒素に対して強く反応することを明らかにした。アオコ等シアノバクテリアは、光合成色素としてフィコシアニンを有するが、この色素が 590nm 波長の光を吸収する性質を用いて、光合成阻害剤 DCMU (3'-(3,4-dichlorophenyl)-1', 1'-dimethyl urea)を用いた、アオコの発生を事前に予測する方法の開発に成功した。アオコを摂食する鞭毛虫 *C. triciliatum* による摂食は、時として *M. aeruginosa* 現存量の 25%を一日に摂食した。この結果は、原生生物による摂食が、アオコの消滅に強く関わっている可能性を示唆している。魚類の存否によるアオコ発生水域の食物網構造の特性では、ホンモロコ存在下で系内の生物多様性が高くなることを示した。

琵琶湖内湖では、漁業活動とアオコ発生の関係が示された。アジア諸国における導水開発や淡水養殖産物の流通経路の知見から、人間活動に伴ってアオコが拡散する実態が明らかになった。ケニアのビクトリア湖では、住民の健康被害、飲料水確保の新たなコスト、家畜のアオコ摂取による健康被害、リゾート施設や水産業での被害が見られた。オーストラリアにおけるアオコ対策の戦略や官民学が連携した運営の現況を把握した。

アオコに関する一般市民の関心の喚起を知識の啓発のために、インターネット上で無料で PDF ダウンロードできる資料「アオコってなにーラン藻の大発生についてもっと知るために」を作成した(図3)。さらに、ラン藻やアオコが発生した国内水域 188 箇所の湖沼等を抽出し、その名称・位置情報・情報源情報等を GIS 整理した Cyanomap Japan をインターネット上に公開した。これらにより、アオコ情報を研究者・行政・地域社会で広く共有できる体制、水域の環境ガバナンスによるアオコ対策を整える基盤整備を行った(図3)。



図3: インターネット上で無料でPDFダウンロードできる資料「アオコってなにーラン藻の大発生についてもっと知るために」の1から2ページ(左)と、アオコ発生湖沼の名称・位置情報・情報源情報等をGIS整理したCyanomap Japan(右)。

(2) 遺伝的多様性を指標としたアオコの分布拡散機構に関する研究

国内(霞ヶ浦、諏訪湖、石垣島等)及び東南アジア(タイ、ベトナム、ミャンマー)にてアオコを採集した。これら採取サンプルと譲渡により入手したアオコから素培養株を作成した後、*M. aeruginosa*の単離・培養・クローン(単藻)化作業を行い、計209のクローン株を確立した。これらの株に譲渡により取得した株を併せた計221株について、7つの遺伝子座塩基配列を用いてタイピング(MLST)を行った。その結果、124の遺伝子型が新規であったことから、*M. aeruginosa*が大きな遺伝的多様性を保有していることが示唆された。これら新規遺伝子型に既知遺伝子型を併せた計280の遺伝子型を用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(図4)。また、日本と東南アジアの*M. aeruginosa*の遺伝的差異が小さいことから、海を越えたアオコの移動分散があることが示唆された。また、MLST系統解析及びPCR検出実験によって、種内系統の1グループ(グループG)が霞ヶ浦水系(茨城県)で近年勢力を拡大した「適応系統」である可能性を見出した(図5)。アオコ毒素をつくる有毒株は種内の3グループに偏在したが、宍道湖で2010年にアオコ大発生を起こした*M. aeruginosa*がこれらに属さない新規遺伝子型であることを明らかにした。また、クローンライブラリー法とMLST解析を組み合わせることで、アオコ内の*M. aeruginosa*の遺伝子型組成を簡便・高精度に推定できる方法を開発した。また、*Microcystis*を含むアオコ形成ラン藻の分類学的研究もを行い、南方系 *Microcystis*種が*M. aeruginosa*と遺伝的に大きな相違がないことを明らかにした(図4)。

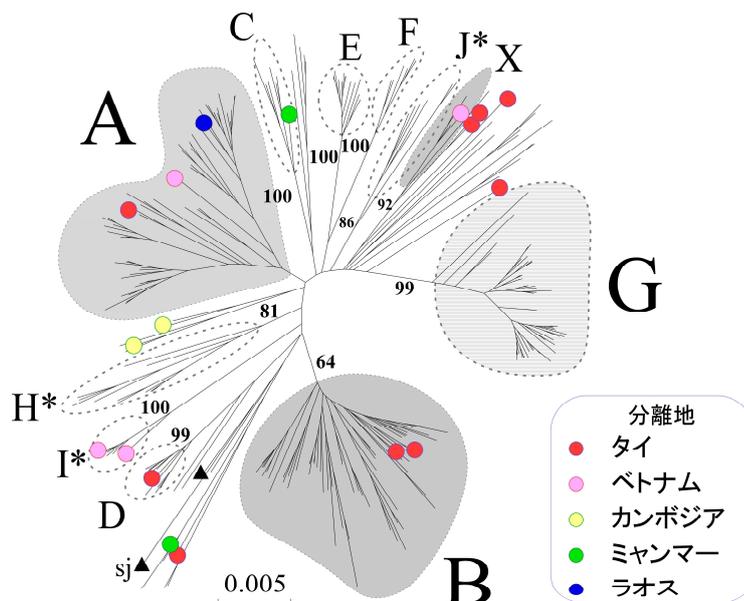


図4: 近隣結合法(NJ法)で作成したMLST系統樹。種内グループを閉曲点線で示す。本プロジェクトで発見した新規グループは*で示す。東南アジアから分離された遺伝子型を色つき丸で示し、丸印のない遺伝子型は日本産株を示す。東南アジアの遺伝子型が複数のグループに分かれて日本産株に混在していることに注意。霞ヶ浦水系で大量発生が観察されたグループGを横縞で、有毒株を含む3グループを灰色で示す。この3グループ以外から2株見出された有毒株の(図中▲)うち、本年度宍道湖から発見した遺伝子型をsjと表記。枝の数値はブートストラップ法により算出された各枝の信頼確率である。スケールバーはサイト当りの塩基置換数を示す。

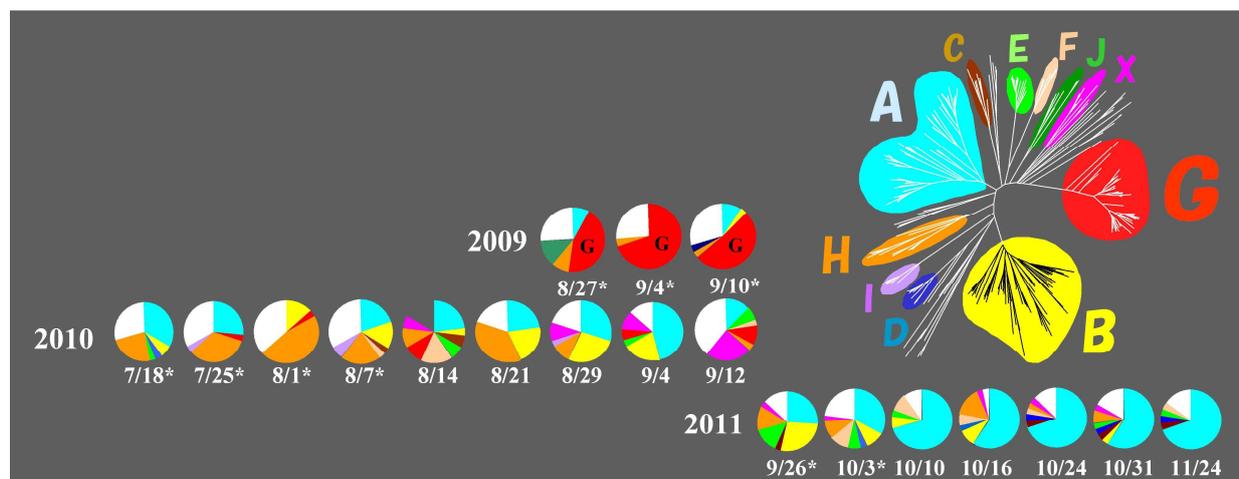


図5: クローンライブラリー法による土浦(霞ヶ浦)におけるアオコ種内系統群の頻度分布。2010年、2011年ではグループGがほとんど検出されなくなっていることに注意。*はアオコ発生時のサンプル、それ以外はアオコ非発生時にプランクトンネットで*M.aeruginosa*を濃縮したサンプル。2011年には6-9月にもアオコは継続して発生しており、現在このサンプルについて分析を行なっている。

(3) アオコの生残・増殖に関する分子生態学的研究

*Microcystis*属を識別・計数するための遺伝子プローブと定量PCR法を開発した。この方法を用いることによって、*Microcystis*属の混合培養、実験池に人工的に発生させた*Microcystis*属のアオコあるいは天然の湖沼中の*Microcystis*属細胞をグループごとに計数することが可能となった。次いで、数種の*Microcystis*属株が混在するなかで、異なる環境下での株間の競争について明らかにするため、窒素とリン濃度を変えた改変BG-11培地ならびに培養温度を変化させて混合培養実験を行った。その結果、培地中の窒素(表1)およびリン濃度(図6)に対して、*Microcystis*属の株ごとに増殖特性(比増殖速度、最大細胞密度)が異なることが明らかとなった(表1)。一方、温度に関しては*Microcystis*属株をそれぞれ単独で培養しても、株間の増殖特性に大きな変化は認められな

かったが、混合培養中では株間で競合が起こっていることが示された。これまで、それぞれ単独で調べられていた*Microcystis*属株の増殖生理特性に大きな違いは認められなかったが、より天然に近い混合培養系を用いることと、さらに、株ごとを識別・計数する技術が開発されたことにより、窒素やリンなどの栄養塩の濃度や環境温度が、現場の*Microcystis*属の群集構造を変化させている要因であることを実験的に示すことができた。

表1:各実験培地における*Microcystis*分離株ごとの対数増殖期の比増殖速度(day^{-1})

株	培地中の初期窒素濃度 (mgN L^{-1})					
	49	4.9	2.45	0.98	0.56	0
NIES98	0.52	0.67	0.46	0.42	0.41	0.29
NIES298	0.43	0.56	0.44	0.43	0.40	0.32
NIES112	0.49	0.52	0.38	0.42	0.40	0.33
NIES102	0.33	0.41	0.31	0.28	0.28	0.28

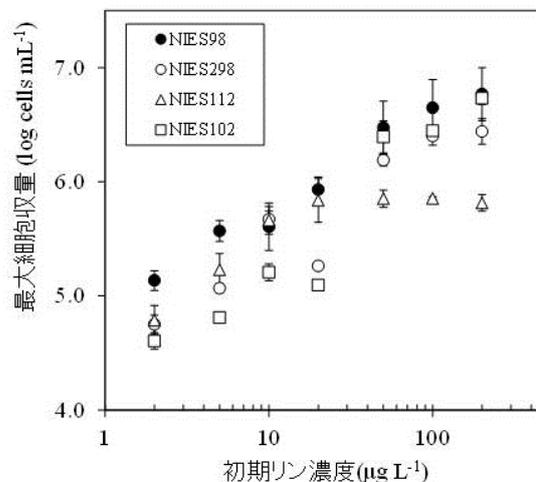


図6:各リン濃度における混合培養での*Microcystis*属株ごとの最大細胞密度の比較。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

21世紀に入り、*Microcystis*属の多くの種が*M. aeruginosa*に一括されたが、*M. aeruginosa*には複数の遺伝子型が有ると指摘され、現在は、*M. aeruginosa*遺伝子型の系統地理分布の解明が国内外で進められている。わが国においては、主として関東・利根川水系において*M. aeruginosa*遺伝子型の系統地理分布が報告されているが、その他の地域については未だに何も情報が無いだけでなく、関西以西については遺伝子型どころか単離株すらほとんど得られていなかった。本研究によって、関西以西のアオコ単離株が得られただけでなく、それらの遺伝子型や毒性をも明らかにし、これまでわが国で知られていなかった*M. aeruginosa*の新たな系統地理分布を知ることができた。さらに、本研究の*M. aeruginosa*の種内グループGのように、バクテリアの特定の種内系統群が「特定の期間・地域で大発生した」事例は病原菌以外では全くなく、微生物の種分化研究一般に大きなインパクトを与えるものである。

多種の植物プランクトンが混在する試料、あるいは異なる遺伝子グループの*Microcystis*属株が混在する試料からでも、各グループに特異的なプライマーを用いたリアルタイムPCR法によって株ごとの細胞数を正確に計数することが可能となった。さらに、我が国では、アオコが生産する毒素としてマイクロキスティンとアナトキシンaが報告されているが、前者の毒素を生産するラン藻類の検出には定量PCRマーカが開発されているのに対し、後者については定量PCRマーカが存在しなかった。本研究により、アナトキシンa生産性のラン藻類を検出可能な定量PCRマーカが開発され、マイクロキスティンだけでなくアナトキシンaについても、有害ラン藻類の分布や拡散の詳細検討が可能となった。この成果は、国内外の有害藻類研究に、大変重要な研究材料と知見を提供した。

本研究では、水鳥が多く飛来する湖沼ほどアオコが発生している傾向を見出しただけでなく、水鳥が外部散布や内部散布によってアオコを輸送・散布している科学的証拠を得た。本来*M. aeruginosa*が生存できない海域・干潟を利用する鳥類の糞からも*M. aeruginosa*遺伝子が検出されたことは、本研究により世界で初めて発見された事実である。マガモにアオコを飲み込ませた実験では、少なくとも4時間以内に糞として排出された*M. aeruginosa*は増殖能力を保持していることが明らかになった。マガモの飛翔スピードは60-80km/h程であり、連続して飛翔すると4時間では300km前後の移動が可能であることから、マガモの移動は少なくとも半径300km圏内の*M. aeruginosa*の輸送・散布に寄与していることが明らかとなった。水鳥が一度飲み込んだアオコを、どの程度の距離まで輸送し得るのか、科学的なデータを出したのは、本研究しかない。

本研究で開発したDCMU蛍光法は、従来望まれていたアオコ予報の実現に大きく近づくものである。注目すべきは、本方法は従来の方法とは異なり、汎用性が広く比較的安価な蛍光光度計を用いて行うことができるため、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。これにより、リアルタイムのアオコ生理活性状態を、国内外の広範囲に渡って収集可能となるであろう。また、本研究では、栄養塩濃度の異なる条件下ならびに培養温度の異なる条件下で数種の*M. aeruginosa*株を混合培養したところ、栄養塩濃度に対

する増殖特性が株によって異なることが明らかとなった。また、温度や栄養塩類濃度に対する増殖特性が、単独での培養と株が混在する培養とで異なることが明らかとなった。この結果は、現場における栄養塩の濃度が *Microcystis* 属の群集構造を変化させる要因の一つであるとともに、環境の温度によって優占する *Microcystis* 属の種類が変化すると考えられた。特に、水域への窒素負荷が *M. aeruginosa* の増殖に重要であることを発見できたことは、先の DCMU 蛍光法と合わせ、アオコ発生の危険性の高い水域特定に役立つものと期待される。

本研究では、数トン以上の大きな水量を持つ野外実験系で人為的にアオコを発生させるノウハウを蓄積できた。このノウハウは今後世界中で行われるであろう野外メソコスムを用いたアオコ研究において手本となるであろう。

本研究では、アオコ発生水域に特有の細菌群集組成が成立することが明らかとなった。この結果は、逆を言えば、*M. aeruginosa* ブルームが起こりにくい細菌群集組成の存在を示唆している。これに加えて、*M. aeruginosa* のブルームの初期段階にアオコを専門に摂食するアメーバの増殖が確認されたことも、*M. aeruginosa* の増殖を抑制する微生物の存在を示している。さらに本研究では、*M. aeruginosa* の摂食を行う原生生物の鞭毛虫の摂食によるアオコの死滅を検討した結果、この鞭毛虫が *M. aeruginosa* 現存量の最大 20% を一日に摂食している可能性を突き止めた。このことから、本鞭毛虫がアオコの消滅に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

社会科学調査からは、日本国内(琵琶湖周辺、および利根川水系)において、導水開発等の人間による水利用の拡大がアオコの分布を広げている事実が明らかとなった。この結果は、先の水鳥によるアオコの輸送・散布とともに、アオコの分布拡大を促進しているものとして注目される。さらに、東南アジアやアフリカ・ケニアにおける調査では、アオコによる環境問題や健康被害が明らかとなった。にもかかわらず、アオコの有害性について、当該住民はほとんど情報をもたされていないことも明らかとなった。これに対して、オーストラリアでは、アオコ発生状況やアオコの有害さについて、研究者・行政・地域社会によるアオコ関連情報の継続的共有が実現されており、効率的にアオコのリスクを回避していることが明らかとなった。

(2) 環境政策への貢献

本研究では、水鳥を介した周辺水系(場合によっては、半径 300 キロ以内)へアオコ原因ラン藻類の移動分散が起こっていること、および水資源開発等の人間による水利用拡大が、アオコを広範囲に分布拡大させている事実が判明した。すなわち、本研究の成果は、アオコの「種(タネ)」がどこに蒔かれているかを知り手がかりを提供している。

本研究で開発した DCMU 蛍光法は、汎用性が広く比較的安価な蛍光光度計を用いてアオコ発生の早期予測を行うものであるため、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。この成果は、早くも注目され、具体的には財団法人・ダム水源地環境整備センター(WEC)からの問い合わせと訪問依頼が有り、2012年5月9日、午後1時半より、WECの関係者が京都大学生態学研究センターを訪問し、D-0905の代表者(中野)とWECの研究第二部・部長が、今後のより良いダム貯水池の水質管理について議論を行った。

本研究で得られた成果を体系的に運用できれば、アオコのリスクをより経済的に効率的に確度高く回避可能かもしれない。すなわち、水鳥渡来情報(日本野鳥の会やバードウォッチャーからの情報を利用)、人間による水資源利用の情報(各自治体管理情報や水利用組合管理の情報を利用)、各水域への窒素負荷状況の情報(各自治体管理情報)を合わせれば、アオコが発生しそうな水域を特定できる。さらに、それら水域について、顕微鏡観察やアオコのDNAを用いた検出によりアオコの「種(タネ)」の存否を確認し、存在が確認されれば定期的(毎週一回か二週間に一回)にDCMU蛍光法を用いてアオコの生理状態を調べる。ここまでの作業は、大学に限らず、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。さらに、DCMU蛍光法を行いながら、アオコ遺伝子型ごとの検出や、マイクロキスティンあるいはアナトキシンaの生産遺伝子の定量PCRマーカーの利用により、有害ラン藻類の検出も同時に行うことができれば、有毒アオコの発生を早期予測できる。このように、本D-0905の成果を体系的に運用することにより、多数ある湖沼からアオコ発生可能性湖沼のみを抽出し、抽出された湖沼に対して有害アオコの存在とその増殖可能性を早期に知ることができる。

小さい池程度のアオコは、既存の民間企業の技術等を用いて除去できるかもしれない。しかし、ダム貯水池や比較的大きな湖沼に発生したアオコは、発生を阻止することは大変困難である。アオコのリスクを回避するためには、行政や水資源管理者および研究者による努力だけではなく、地域社会と一体となった取り組みが必要である。このためには、アオコに対する社会的関心を醸成し、アオコ監視・対策への市民参加を促進することが重要である。本研究では、アオコに関する一般市民の関心の喚起を知識の啓発のために、インターネット上で無料でPDFダウンロードできる資料「アオコってなにーラン藻の大発生についてもっと知るために」を作成した。さらに、ラン藻やアオコが発生した国内水域 188 箇所の湖沼等を抽出し、その名称・位置情報・情報源情報等をGIS整理したCyanomap Japanをインターネット上に公開することにより、対

象内湖の流出入経路などの周辺環境情報を当該 URL から自由に得られるようにした。以上により、アオコ情報を研究者・行政・地域社会で広く共有できる体制、水域の環境ガバナンスによるアオコ対策を整える基盤整備を行った。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Y. Tanabe, M.M. Watanabe : PLoS One, 6, e17085 (2011)
“Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
- 2) Y. HODOKI, K. OHBAYASHI, K. KOBAYASHI, N. OKUDA and S. NAKANO: J. Plankton Res., 33, 1410–1416 (2011)
“Temporal variation in cyanobacteria species composition and photosynthetic activity in experimentally induced blooms. Journal of Plankton Research”.
- 3) S. MIZUTA, H. IMAI, K.-H. CHANG, H. DOI, Y. NISHIBE and S. NAKANO: Limnology, 12, 1, i12: 205–211 (2011)
“Grazing on *Microcystis* (Cyanophyceae) by testate amoebae with special reference to cyanobacterial abundance and physiological state”
- 4) Y. HODOKI, K. OHBAYASHI, K. KOBAYASHI, N. OKUDA and S. NAKANO: Harmful Algae, (2012)
“Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria: Ubiquitous distribution of *Microcystis aeruginosa* and *Cuspidothrix issatschenkoi* in Japanese lakes (doi:10.1016/j.hal.2012.01.003)”
- 5) V. L. A. Nguyen, Y. Tanabe, H. Matsuura, K. Kaya, M. M. Watanabe : Phycol. Res. (in press)
“Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria)”

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 程木義邦、天野一葉、大林夏湖、小林由紀、田中拓弥、奥田昇、中野伸一：日本生態学会第57回大会(2010年)
「野外で人為的に発生させたアオコの環境応答」
- 2) 田中拓弥、中野伸一：日本水環境学会第44回大会(2010年)
「琵琶湖周辺23内湖の周辺環境に見られた人為的改変」
- 3) 小林由紀、程木義邦、大林夏湖、奥田昇、中野伸一：日本陸水学会第75回大会(2010)
「野外実験池における人為的誘発アオコの消長にともなう微生物群集組成の変化」
- 4) 大林夏湖、程木義邦、小林由紀、奥田昇、中野伸一：日本陸水学会第75回大会(2010)
「西日本湖沼におけるミクロキスティス属の遺伝的多様性」
- 5) 天野一葉、須川恒、片岡宣彦、吉岡美佐子、程木義邦、大林夏湖、中野伸一：日本鳥学会2010年度大会(2010)
「水鳥からのアオコ原因藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の検出」
- 6) 田辺雄彦、渡邊信：日本藻類学会第34回大会(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」
- 7) Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, N. Okuda and S. Nakano: 31st Congress of International Society of Limnology (2010)
“Genotypic succession and early detection of artificial *Microcystis* bloom occurred in outdoor experimental ponds”
- 8) K. Ohbayashi, Y. Hodoki, Y. Kobayashi, S. Nakano: 13th International Symposium of Microbial Ecology (2010)
“Genetic diversity of the *Microcystis aeruginosa* bloomed in experimental ponds using 16S to 23S rDNA internal transcribed spacer region”
- 9) T. Kataoka, R. Kondo, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, and S. Nakano: 13th International symposium on Microbial Ecology (2010)
“PCR primers for separate detection of intra-specific group variations in a bloom-forming Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*”

- 10) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, S. Nakano: 13th International symposium on Microbial Ecology (2010)
“Variations in microbial abundance and community structure during *Microcystis* bloom in an experimental pond”
- 11) S. Nakano: 2010 Fall Semester “Wednesday Talks on Life Science”, Dept. of Life Science, Hanyang University, Korea, 2010 (招待講演)
“Ecophysiology, phylogeography and environmental sociology on water blooms of the globally distributed cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
- 12) Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, N. Okuda and S. Nakano: 4th EAFES Congress (2010)
“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* blooms in experimental ponds”
- 13) S. Nakano, Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi and N. Okuda: 4th EAFES Congress (2010)
“Grazing on *Microcystis* with special reference to protistan ecology”
- 14) T. Homma, T. Kataoka, S. Nakano, and R. Kondo: CER International workshop for New Frontier of Microbial Ecology (2010)
“Assessing the Behaviour of Intra-specific Variations in A Cyanobacterial Species *Microcystis aeruginosa*”
- 15) 田辺雄彦, 加藤将, 渡邊信: 日本藻類学会第35回大会(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異」
- 16) Nanda Kyaw Thu, Y. Tanabe, Syou Kato, M. M. Watanabe: 日本藻類学会第35回大会(2011)
“Morphology, phylogeny and gas vesicle gene detection of planktonic cyanobacterium *Oscillatoria kawamurae* from different geographical regions”
- 17) Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, N. Okuda and S. Nakano: International symposium on *Microcystis* studies from Asia (2011)
“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* bloom occurred in experimental ponds”
- 18) S. Nakano, H. Amano, Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, T. Tanaka, N. Okuda: International symposium on *Microcystis* studies from Asia (2011)
“Ecophysiology, phylogeography and environmental sociology on water blooms of the globally distributed cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
- 19) Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, N. Okuda and S. Nakano: International Symposium on *Microcystis* Studies from Asia (2011)
“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* bloom occurred in experimental ponds”
- 20) 天野一葉, 須川恒, 片岡宣彦, 吉岡美佐子, 茂田 良光, 程木義邦, 大林夏湖, 中野伸一: 日本鳥学会 2011年度大会(2011)
「多様な水鳥の糞からのアオコ原因藍藻類 *Microcystis aeruginosa* の検出」
- 21) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, H. Amano, T. Tanaka, N. Okuda, S. Nakano: 12th Symposium on Aquatic Microbial Ecology (2011)
“Grazing on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in an experimental pond”
- 22) 田辺雄彦, 渡邊信: 日本陸水学会第76回大会(2011)
「遺伝子で見るアオコの多様性」
- 23) 中野伸一, 奥田昇, 天野一葉, 大林夏湖, 小林由紀, 田中拓弥, 程木義邦, 近藤竜二, 廣石伸互, 24) 高尾祥丈, 片岡剛文, 本間隆満: 日本陸水学会第76回大会(2011)
「アオコの分布拡大に関する分子生態学・環境誌的研究」
- 25) 片岡剛文, 本間隆満, 中野伸一, 近藤竜二: 日本陸水学会第76回大会(2011)
「アオコ原因藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) の遺伝子型に基づく分子識別と定量PCRを用いた細胞密度の推定」
- 26) 本間隆満, 片岡剛文, 中野伸一, 近藤竜二: 日本陸水学会第76回大会(2011)
「*Microcystis*属における遺伝子グループ組成に及ぼす栄養塩濃度の影響」
- 27) 程木義邦, 大林夏湖, 小林由紀, 奥田昇, 中野伸一: 日本陸水学会第76回大会(2011)
「西日本における有毒ラン藻類の分布」
- 28) 程木義邦, 大林夏湖, 小林由紀, 奥田昇, 中野伸一: 日本陸水学会第76回大会(2011)

「蛍光法によるラン藻類の現存量と光合成活性の評価」

29) 小林由紀、程木義邦、大林夏湖、天野一葉、田中拓弥、奥田昇、中野伸一：第27回日本微生物生態学会(2011)

「従属栄養鞭毛虫 *Collodictyon triciliatum* の *Microcystis aeruginosa* に対する摂食圧」

30) 片岡剛文、本間隆満、中野伸一、近藤竜二：第27回日本微生物生態学会大会(2011)

「遺伝子型の異なるアオコ原因藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) の栄養塩濃度に対する増殖応答」

31) H. Amano, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, S. Nakano: Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress (2012)

“Dispersal of blue-green algae by waterbirds: Retention time of *Microcystis aeruginosa* in the digestive tract of ducks and its growth ability afterwards”

32) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, H. Amano, T. Tanaka, N. Okuda, S. Nakano: Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress (2012)

“Grazing on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in experimental pond”

7. 研究者略歴

課題代表者：中野 伸一

1966年生まれ、東京農工大学農学部卒業、博士(理学)、現在京大大学生態学研究センター教授

研究参画者

(1)1): 中野 伸一 (同上)

(1)2): 奥田 昇

1969年生まれ、東京理科大学工学部卒業、現在京大大学生態学研究センター准教授

(2): 渡邊 信

1948年生まれ、東北大学理学部卒業、富山大学薬学部助手、現在筑波大学大学院生命環境科学研究科教授

(3)1): 近藤 竜二

1964年生まれ、近畿大学農学部卒業、福井県立大学生物資源学部助手、現在福井県立大学海洋生物資源学部准教授

2): 廣石 伸互

1949年生まれ、京都大学農学部卒業、群馬大学医学部助手、現在福井県立大学海洋生物資源学部教授

3): 高尾 祥文

1976年生まれ、甲南大学理学部卒業、福井県立大学生物資源学部助手、現在福井県立大学海洋生物資源学部助教

D-0905 アオコの分布拡大に関する生態・分子系統地理学的研究

(1) 移入アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究

京都大学 生態学研究センター

中野伸一・奥田昇

研究協力者

京都大学 生態学研究センター

天野一葉

大林夏湖

小林由紀

田中拓弥

程木義邦

平成21～23年度累計予算額：131,864千円

(うち、平成23年度予算額：42,193千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 世界各地の富栄養化湖沼で環境被害をもたらしてきたアオコ (*Microcystis aeruginosa*) について、生態学的・系統地理学的解析、実験系における生理生態特性解明、水鳥による輸送、国内外のアオコ発生湖沼周辺における土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の研究を行った。西日本各地の湖沼における *M. aeruginosa* の各遺伝子型および毒素生産性には、地理的な分化が無いことが分かった。アオコの発生する湖沼には、水鳥が高密度で飛来する傾向を明らかにした。国境を越えて渡りを行う鳥の糞から、*M. aeruginosa* の遺伝子を検出することに成功した。マガモに *M. aeruginosa* を摂餌させた実験では、4時間以内に糞として排出された *M. aeruginosa* が増殖能力を保持していることを明らかにした。大規模野外実験系において、*Microcystis* の個体群は従来指摘されていたよりも多様な遺伝子型で構成され、かつ優占遺伝子型は短期間のうちに変化することを明らかにした。窒素とリンの供給を変化させた実験では、*Microcystis* は窒素に対して強く反応することを明らかにした。特記すべき成果として、アオコの発生を事前に予測する方法の開発に成功した。アオコを摂食する鞭毛虫 *Collodictyon triciliatum* による摂食は、*M. aeruginosa* 現存量の25%を一日に摂食することもあった。魚類の存否によるアオコ発生水域の食物網構造の特性では、ホンモロコ存在下で系内の生物多様性が高くなることを示した。琵琶湖内湖では、漁業活動とアオコ発生の関係が示された。アジア諸国における導水開発や淡水養殖産物の流通経路の知見から、人間活動に伴ってアオコが拡散する実態が明らかになった。ケニアのビクトリア湖では、住民の健康被害、飲料水確保の新たなコスト、家畜のアオコ摂取による健康被害、リゾート施設や水産業での被害が見られた。オーストラリアにおけるアオコ対策の戦略や官民学が連携した運営の現況を把握した。

[キーワード] *Microcystis aeruginosa*、生態、分子系統地理、発生予測、社会科学

1. はじめに

アオコは、湖水中のアオコ原因植物プランクトンが大量に増殖して起こり、世界各地の富栄養化した湖沼に普遍的に見られる。アオコが発生すると景観を悪化させ、腐敗したアオコが悪臭を放ち、さらにはアオコが作る強い毒により海外では人間や家畜等の死亡の被害が報告されている。アフリカや東南アジア諸国ではアオコの発生が深刻化しており、とくにアフリカでは多くの人が良質な水を利用できない状態が続いている。このように、アオコの防除は世界中の富栄養化した湖沼で緊急課題となっているが、未だに問題は解決されていない。我が国では、国連が掲げたミレニアム開発目標のゴール7、ターゲット10に基づき、アジア水環境パートナーシップ事業、日中水環境パートナーシップ、アフリカにおける水環境改善等の、水環境問題についての国際的な取り組みを進めてきた。しかし、アオコの生態には湖沼周辺の間人活動等の地域特性が強く影響するため、その発生機構や防除対策にかかる科学的情報の蓄積が求められている。

2. 研究開発目的

アオコは、風気流、鳥類などに運ばれて国内外の湖沼に分布を拡大しており、各湖沼には由来の異なる遺伝的に多様なアオコ群集が存在し、その一部に有害性の高いタイプが含まれると考えられる。湖沼の水質は周辺の間人活動に強く影響されるため、アオコ群集の中でどのタイプが優占となるかは、周辺の間人活動をも含めた湖沼環境総体により決定されていると考えられる。本研究では、最先端のバイオテクノロジーと大型環境解析システムを駆使し、これまで国や民間団体が蓄積してきた環境データベースを活用しながら、「当該湖沼にどのようなアオコがどのように運ばれてくるか」、「湖沼に新たに入ったアオコは生き残れるのか」、「生き残ったアオコ群集はどう多様なのか」、「多様なアオコ群集の中から特定の機能を持ったアオコ（たとえば有毒種）が増殖するのはどういった理由によるものか」について、明らかにする。また、湖沼周辺の間人活動として土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の調査も行い、アオコ群集組成との対応があるか検討する。

3. 研究開発方法

(1) *M. aeruginosa*の分布拡散・発生状況

1) *M. aeruginosa*の採取と単離

西日本の10県18か所の湖沼より、アオコのサンプルを収集した。アオコの採取は、プラスチックバケツで行い、採水後2Lポリプロピレン容器に8割程度入れ、冷暗条件で保存して実験室に持ち帰った。各々のサンプルから、実体顕微鏡下で*M. aeruginosa*のコロニーを採取し、CT培地を用いて単離培養を行った。2010年は、得られた*M. aeruginosa*株から、改変CTAB法によりDNA抽出を行った⁸⁾。PCRによりミクロキスティン産生遺伝子の一部である*mcyG* 遺伝子の有無を確認するとともに³⁴⁾、シアノバクテリアに特異的なプライマーを用い、rDNA の16S-23S内部転写スペーサー領域 (internal transcribed spacer region、ITS)を用いて塩基配列を決定し¹⁶⁾、遺伝子型の特定と系統樹の作成を行った。

試水の一部を500mLビーカーに移し、*M. aeruginosa*のコロニーを崩して拡散させ、共雑物の少ないコロニーを拾い、洗浄後、滅菌ろ過湖水450 μ L+CT培地50 μ Lの培養液中にコロニーを順化させてからCT培地に移し、25 $^{\circ}$ C、光強度40 μ mol m⁻² s⁻¹で培養を行った。

2) 単離 *M. aeruginosa* からのDNA抽出と確認、毒遺伝子有無および16S-23S rDNA ITS領域の増幅コロニーサイズが十分に大きくなったものについて、DNA抽出を行った。各コロニーは、培地ごとGF/Fフィルターでろ過をし、フィルターはDNA抽出まで-20℃で保存した。DNA抽出は改変CTAB法⁸⁾によりおこなった。各サンプルについてDNAの濃度を測定し、PCR反応の鋳型とした。

単離したコロニー株について、*Microcystis*属に特異的なプライマー対、16S rDNAの184F(5'-GCC GCR AGG TGA AAM CTA A-3') と431R (5'-AAT CCA AAR ACC TTC CTC CC-3')を使用し、*Microcystis*属であることを確認した⁵⁾。また、ミクロキスチン生産遺伝子群の有無を調べるため、*mycG* 遺伝子の有無を調べた。検出には、*myc* GF(5'-GGA AAA TTT TAG ACA ATC CCT TGA T-3') と *myc* GR(5'-AAT TTC TAA GAA TAG GCG AAT CGT T-3')のプライマー対を使用した³⁴⁾。PCR産物を、2%アガロース (1×TAE) で電気泳動し、*Microcystis*属であることを確認したコロニー株について、ITS領域の増幅をおこなった。16S-23S rDNA内部転写スペーサー (internal transcribed spacer, ITS) 領域の増幅にはシアノバクテリアに特異的なプライマー対、16S rDNAのCSIF(5'-G(T/C)C ACG CCC GAA GTC (G/A)TT AC -3'; forward primer)と23SrDNAのULR(5'-CCT CTG TGT GCC TAG GTA TC -3'; reverse primer)を使用した⁴⁴⁾。得られたPCR産物を、2%アガロース (1×TAE) で電気泳動し、非特異的な増幅が見られないコロニー株について、塩基配列を決定した。

3) アオコ発生時に特異的な細菌群集の検出

2010年10月から11月にかけて西日本各地の24の湖沼から得られた試水について、CTAB法⁸⁾によりDNA抽出を行い、真正細菌に特異的な16SrDNAプライマー対を用いてタッチダウン法⁷⁾にてPCRを行った。PCR産物について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE法)²⁴⁾によりDNA断片のバンドパターンを得た。このバンドパターンを、PRIMER-E (v6.PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK)を用いて、非計量的多次元尺度構成法(NMDS法)³¹⁾と類似度行列分析 (ANOSIM法)³¹⁾を用いて、群集解析を行った。

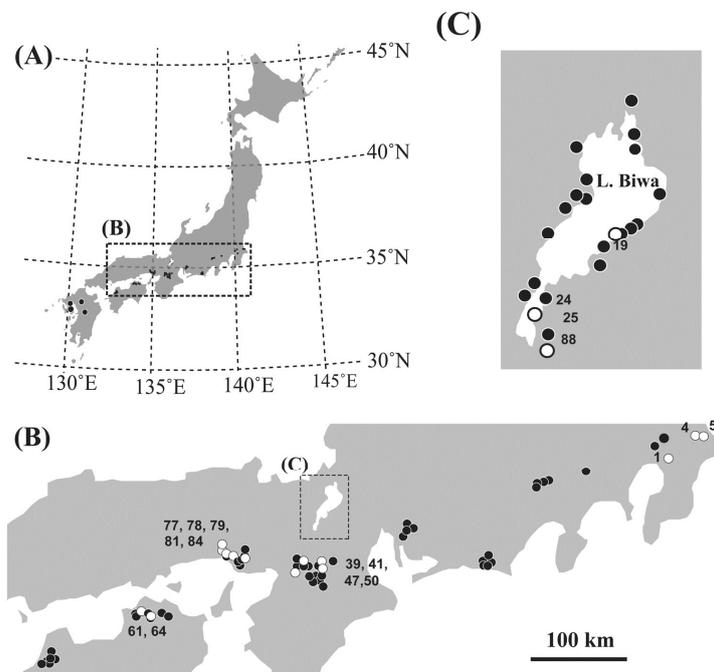
(2) 日本国内におけるその他の有害ラン藻類の分布状況

1) Automated rRNA intergenic spacer analysis (ARISA)法とトキシタイピングを用いたラン藻類の群集解析

関東以西の自然湖沼、池及び貯水池の88か所で採取した水で解析を行った (図(1)-1)。10 Lの表層水を採水し、水温、PH、電気伝導度と濁度を測定した。このサンプルを冷暗所において実験室に持ち帰り、セストンを適量 (20-150 mL) GF/F filter(420℃で3時間燃焼済み) に捕集し、クロロフィルa (Chla) 濃度測定用、DNA測定用サンプルとした。フィルターは分析まで-20℃で保存した。Chla濃度は、ジメチルホルムアミド10 mLで抽出した抽出液を、Welschmeyer (1994)の蛍光法⁴⁰⁾を用い分析した。

各サンプリング地点のろ水を使用して、溶存態無機リン (DIP)、溶存態窒素 (DIN)を測定し、原水を用いて、TP、TN、TOCの測定を行った。DINは、NH₄-NO₃ +NO₂ からもとめ、アンモニア濃度は、蛍光法¹³⁾によって求めた。硝酸、亜硝酸、リン酸態リンについては、AACS II auto analyser (Bran+Luebbe)を使用した比色分析により測定した。また、原水をペルオキソ二硫酸カリウムで酸化させたのち、TNとTPもAACS II auto analyserを使用した比色分析により測定を行った。TOC

濃度は、Shimazu TOC-5000(Shimazu CO. LTD)を使用して行った。



図(1)-1:ラン藻類の群集解析及びラン藻毒の検出のためのサンプルを採取した、関東以西の自然湖沼、池及び貯水池 88 か所 (●印)。本研究における調査地点の範囲(A)およびその拡大図 (B)と琵琶湖周辺の調査地点(C)。地点番号はQPCRによりアノトキシン-a生産株の *C. issatschenkoi* が検出された地点。

2) ITS領域とシアノトキシンシンセターゼジーンのPCR増幅による検出

改変CTAB法によりGF/FフィルターからDNAの抽出を行った。ARISAの解析のため、ラン藻類の16S-23S rDNA内部転写スペーサー (internal transcribed spacer ; ITS) 領域に特異的なプライマーを用いPCR増幅を行った^{16, 26)} (CSIF 16S rDNA 及び23S rDNA)。なおULR 23S rDNA primerの5'末端を蛍光標識したプライマーを使用した⁹⁾。100 ngの鋳型DNAを含んだ10 µl 反応液中に、0.2 mM dNTP、15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、2.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems)、及び0.5 µM 各プライマーで増幅させた。PCRのコンディションは次のとおりである ; 94°C 10分の処理ののち、94°C 1分、アニーリング温度(T_a) 1分、72°C, 1分で30サイクル、その後最終伸長として72°C 30分の処理を行った。最初の20サイクルではアニーリング温度は各サイクルごとに1°Cずつ下降し、62°Cから52°Cへタッチダウンにより温度を変化させた。最後の10サイクルのアニーリング温度は52°Cであった。PCR産物をつかってFragment解析を行いラン藻類群集の組成を検出した。Microcystinおよびnodularin, anatoxin-a, cylindrospermopsinおよび saxitoxin合成遺伝子、microcystin synthetase E (*mcyE*)を標的とした *Anabaena*, *Microcystis* および

*Planktothrix*に特異的なプライマーを用いPCR増幅を行った。合計9種類のPCR産物を、12 μ Lの脱塩ホルムアミド溶液にそれぞれ0.2-0.35 μ Lづつ添加し、95°C、2分間の変性処理後、ABI3100Avantジェネティックアナライザー（Applied Biosystem）によりPCR産物断片長の解析を行った。

3) ARISA法を使用したラン藻類群集組成解析

すべての手法はHodoki *et al* (2012)¹²⁾に従った。蛍光標識したプライマーで増幅したPCR生成物のFragment解析をABI3100でおこない、 ≤ 2 bpのフラグメント長の違いを異なる種とした^{41, 42)}。500蛍光ユニット以上のピークエリアを検出し、350 bpから1032 bpで合計100サイズクラスのフラグメントを検出した。トータルのピークエリアに占める各ピークエリアの値を計算し、 $<5\%$, $<25\%$, $<50\%$, $\geq 50\%$ で表記した。ARISAバンドのフラグメントサイズをらん藻類の種として定義し、サイズ長については以下の範囲で定義した(Hodoki *et al* 2012); *Cylindrospermopsis* 属と *Raphidiopsis* 属, 398-400 bp (ITS1), 554-564 bp (ITS2); *Dolicospermum* 属と *Anabaenopsis* 属, 420-433 bp (ITS1), 656-666 bp (ITS2); *Microcystis* 属, 520-538 bp (ITS1); *Oscillatoria* 属, 676 bp; *Merismopedia* 属, 856 bp (ITS1)。これ以外のサイズフラグメントについてはUAF (unassigned fragment)で表した。合計100フラグメントとクラスが検出され、そのうち30が対象種として絞られ、70が未知の藻類であった。統計検定のために、未知のフラグメントは下記のようにまとめて統計検定を行った; 372-396 bp, UAF 1; 404-418 bp, UAF2; 446-516 bp, UAF3; 548bp, UAF4; 576-648 bp, UAF5; 670-672 bp, UAF6; 684-854bp, UAF7; 864-1132bp, UAF8。

88か所でデータを採取したが、1か所で非常に高く外れ値の栄養塩濃度の数値を示した地点があり、この地点は省いて87か所でデータ解析を行った（UPGMA以外）。ARISAによるPCRベースの有害藻類検出では、28か所でラン藻類が検出されず、60か所でラン藻類が検出された。これらの違いをもたらす説明変数として、pH、電気伝導度、濁度、クロロフィルa濃度、TN、DIN、DIP、TON、TOP、TOC/TON、TN/TP、TOC/TOP を選抜し、ランダムマイゼーションテストを行った。それぞれの変数の平均値の差分（非検出-有検出）を使用してランダムマイゼーションテストを行ない、両側検定を行った。またそれぞれの環境要因についてはRを用いてBox plot解析を行った。

4) ラン藻類群集構造解析

ARISA法により、ラン藻類が検出された60か所のデータを使用した。バンドパターンの類似性検定にはPearson's correlation coefficientを使用し、デンドログラムはunweighted pair-wise group method with arithmetic means (UPGMA)によって構築した。ARISAバンドのフラグメントサイズは、ラン藻類として定義し、前述の方法でフラグメントサイズと種名を一致させた。Canonical correspondence analysisを使用して、検出されたラン藻類と、環境パラメータの間の関連を検証した(XLSTAT, 2011)。pH, conductivity, turbidity, Chl a concentration, TN, DIN, DIP, TON, TOP, TOC/TON, TN/TP, TOC/TOPを説明変数として使用した。スケールの違いによる影響を避けるために、説明変数はすべて標準化した後（平均0, 分散1）、解析に使用した。

5) *Cuspidothrix issatschenkoi*および*R. mediterranea* ver. *grandis*の単離培養

*C. issatschenkoi*の単離培養は計6湖沼で行った(図(1)-1)。倒立顕微鏡と滅菌したパスツールピペットを用い、単一のトリコームを無作為に拾い上げ、GF/Fフィルターで作成したろ液で3回洗浄

後、滅菌したCT培地¹⁴⁾に移し培養を行った。全ての株は25°C, 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で培養を行った。なお、*C. issatschenkoi*と*Raphidiopsis mediterranea* ver. *grandis* Hillは形態が似ているため、単離の段階では両種を区別することが出来ない。そこで、単離培養株の確立後に顕微鏡下でヘテロシストの有無を確認し、全てのトリコームにヘテロシストが見られない株は*R. mediterranea* ver. *grandis*とした。

6) 単離培養株の分子系統解析

全ての単離培養株について16S-23S rDNA内部転写スペーサー (ITS; internal transcribed spacer) 領域の塩基配列を決定し遺伝子型の特定を行った。また、アナトキシン-a合成遺伝子(ATX)²⁾およびニトロゲナーゼリダクターゼ遺伝子(*nifH*)¹⁰⁾に特異的なプライマーを用い、PCRによりアナトキシン-aの合成能および窒素固定能の有無を調べた。

7) 環境サンプルの採取と分析

先行研究により*C. issatschenkoi*は秋季に優占することが報告されているため^{11, 38)}、2011年10月に88水域よりサンプルを採取し、アナトキシン-a生産株の*C. issatschenkoi*の分布と環境特性について解析を行った(図(1)-1)。HORIBA U-22多項目水質系を用い表層水の水温、導電率およびpHを測定後、2Lの湖水を採取、冷暗所に保管し*C. issatschenkoi*および栄養塩濃度等の分析に用いるため、研究室に持ち帰った。

湖水は Whatman GF/F filters (420°C, 3時間燃焼)を用いる過を行い、フィルター上に濃縮したセストンをクロロフィルa濃度の測定、ARISA (automated rRNA intergenic spacer analysis) と定量PCR解析用のDNA抽出に用いた。また、ろ液を溶存体無機窒素(DIN: dissolved inorganic nitrogen)および溶存態無機リン(DIP: dissolved inorganic phosphorus)濃度の分析に、原水は全有機炭素(TOC: total organic carbon)、全窒素(TN: total nitrogen)および全リン(TP: total phosphorus)濃度の測定に用いた。

8) ARISA法と定量PCRによる環境サンプルの解析

環境サンプル中の*C. issatschenkoi* および*R. mediterranea*の検出はARISA法を用いて行った。ろ過で濃縮した懸濁粒子から改変CTAB法によりDNAを抽出、30 μL のTE 緩衝液に溶解し鋳型DNAとしたCSIFおよび5'末端を6-FAMで標識した23SULRプライマーを用いPCRにより16S-23S rDNA ITS領域の増幅を行った^{9, 12)}。増幅したDNA断片長の決定はABI3100-Avant キャピラリーシーケンサー (Applied Biosystems) とGeneScanTM 1200LIZサイズスタンダード (Applied Biosystems) を用いて行った。得られたピークデータをGeneMapper ver 4.0 (Applied Biosystems)により解析を行い、各ピークのサイズを求めるとともに、それぞれのピーク面積を求めた。*C. issatschenkoi*および*Raphidiopsis* spp. のDNA断片長はそれぞれ411 bpおよび399 bpであることが既に報告されているため¹²⁾、本領域に検出された蛍光面積50以上のピークを陽性として評価した。

次に、アナトキシン-a生産株の*C. issatschenkoi*の定量を行うために、*C. issatschenkoi*のATXの配列に特異的なプライマーセットとプローブを設計した。設計には、既知の*C. issatschenkoi*のATXの配列と共に、近縁種のアナトキシン-a生産株の計12配列を用いた。ClustalW³⁵⁾による各塩基配列のアラインメントの後、Primer3Plus³⁶⁾を用い、TaqMan[®] プローブ (Applied Biosystems)とプライマーの設

計を行った。

(3) 水鳥によるアオコの拡散

1) 水鳥生息・渡来状況調査

全国的な水鳥の渡来数及び既存の鳥類の移動経路について、環境省により毎年1月中旬に全国で一斉調査が行われているガンカモ類の生息調査及び標識調査の結果をまとめた鳥類アトラスからデータを引用した^{18, 19, 45)}。水鳥の渡来状況の現地調査を2010年1月13～27日に行った。琵琶湖では、双眼鏡及び望遠鏡を用いて、琵琶湖内湖に渡来している水鳥の個体数を数え、地図に観察地点及び観察範囲を記録した。

2) 水鳥体表面及び糞からのシアノバクテリアDNAの検出

水鳥によるアオコの外部散布（動物の体表等に付着して輸送される）および内部散布（動物に摂食され、未消化のまま排泄されることにより輸送される）について検討した。2010年8月から2011年3月に、日本各地の湖沼や干潟において水鳥の糞を採取した。遠方より各種の水鳥を観察し、糞をした時点でその場へ行き、できるかぎり新鮮な状態の糞を採取してその日時と場所を記録するとともに、糞をした水鳥の種を記録した。また、水鳥を無双網又は手取りで捕獲した個体及び琵琶湖岸の漁港の網に絡まった個体について、体の表面を歯ブラシで軽くこすりながら蒸留水で流し、70～140mLのサンプルを採取した。また、鳥をしばらく袋へ入れておき、糞のサンプルを収集した。また、陸上で休息又は採食している水鳥から新鮮な糞を採集した。体を洗った水、ペレットのままの糞、糞を水で溶かしたもの、培養したマイクロキスティスと一緒に入れた糞ペレットを、それぞれGF/Fフィルターでろ過した。採取した糞サンプルおよびサンプルを保持したフィルターから、抽出キット(ZR Fecal DNA Kit (Zymo Research))を用いてDNAを抽出し、藍藻類の16S rRNA遺伝子に特有のプライマー対CYAN 108F³⁷⁾ 及び16S CYR³²⁾を用いてPCRを行い、さらにこのPCR反応液を100倍希釈したものを鋳型DNAとして、*Microcystis*属の16S rRNA遺伝子に特有のプライマー対(MICR 184F、MICR 431R)²⁵⁾を用いてNested PCRを行った。PCR産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、*Microcystis*属のDNAが糞に含まれていることを確認した。

3) 水鳥によるアオコの内部散布

飼育実験は、2011年8月に、京大生態学研究センターの圃場にて、1歳以上の飼育されていたマガモ(*Anas platyrhynchos*) 8羽を用いて*Microcystis aeruginosa*培養株の給餌実験を行った。マガモは紗と動物よけネットを張った農業用ハウス(10 x 5 x 3 m)に防水シートの屋根をつけて飼育した。ハウス内には自由に水浴びができるようにプラスチックケースの小さな水場を設置した。日中はハウス内で放し飼いにして、餌は1日一回以上与え、自由に食べられるようにした。餌は水鳥用ペレット、草及び水道水を与えた。夜間と実験初日は、ハウス内の飼育ゲージ(54 × 75 × 69 cm)に個別に入れた。

10日以上飼育した後に、*M. aeruginosa*の培養株10 mlを細長いスポイドを用いて、朝10時にマガモに飲ませ、糞を決められた時間（最長10日まで；0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-6, 6-10, 23-24, 47-48, 95-96,

191-192, 239-240 時間後) に回収した。上記の時間内に排出された糞を全て回収し、CT培地に懸濁して、200 mLにメスアップした。メスアップした糞の懸濁液50mLを25%グルタルアルデヒド溶液で固定(最終濃度1%)後に冷蔵保存して、排出された*M. aeruginosa*の細胞数の計数用サンプルとした。また、DNA抽出用のサンプルは、回収した糞をそのまま用いるか、または培養実験に用いた残りの75 mLの懸濁液を3,000 rpm, 15分間遠心により上澄みを除去後、糞のペレットを回収して用いた。4羽を用いた実験を2回行った。

培養株*M. aeruginosa* NIES-111は、CT培地500 mLを用いて、25°C、30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、エアレーションの条件下で培養を行い、対数増殖期の細胞を実験に用いた。糞から回収した*M. aeruginosa*の培養については、以下の2通りの方法で行った。まず、CT培地に懸濁した糞7 mLを20mL試験管2本にそれぞれ分注して、25°C、30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で21日間培養を行った。また、倒立顕微鏡(Olympus CKX47)を用い、CT培地に懸濁した糞から*M. aeruginosa*の細胞を直接拾い出し、新しいCT培地で2回洗浄後800 μL のCT培地に1細胞ずつ添加した後、25°C、30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下で1カ月間培養を行った。

糞の計数用にグルタルアルデヒド固定したサンプルを、ポアサイズ0.8 μm のポリカーボネートフィルターを用いてろ過し、糞に含まれる懸濁物をフィルター上に濃縮した。イメージンオイルを用いてフィルターをスライドガラス上に固定・油浸し、蛍光顕微鏡(Olympus BX60)を用いて、G励起下で自家蛍光を持つ*M. aeruginosa*の細胞の計数を行った。細胞の計数は100視野以上行い、単位時間当たりに排出された全細胞数に換算した。

また、CT培地に懸濁した糞をそのまま培養した実験では、10日後と21日後に培養サンプルの一部を回収し、蛍光顕微鏡を用い細胞密度を求めた。2~4時間後に排泄された糞から、倒立顕微鏡下で細胞を拾い出し、一細胞ずつ培養した実験では、一か月後の増殖状況を倒立顕微鏡下で観察し、増殖があったものを生存、増殖が見られなかった細胞を死亡細胞として評価した。一細胞を拾い出すために、あらかじめ20から30細胞を1セルにプールしたが、そのセルの一か月後の増殖状況も確認した。

糞サンプルからのDNA抽出、PCR増幅、Nested PCT、および*Microcystis*属DNAの確認は、すでに先述の通りである。

(4) アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究

1) 野外実験池を用いたアオコ増殖実験

研究は京大生態学研究センターの敷地に設置されている10m 四方、最大水深1.7 m、容積約70 m^3 の四角すい形の野外実験池3基を用いて行った。実験は2009年8月20日より開始した。シアノバクテリアのブルーム形成を促進するため、3基の実験池にMA培地を1/50濃度となるよう添加した。MA培地¹⁴⁾は窒素：リン比が低いため(N:P=2.8:1)、無機窒素($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 および NaNO_3)については3倍量添加した。また、*Microcystis*属の細胞および自然湖沼の微生物群集を添加する処理として、3.6 m^3 の琵琶湖湖水を5 μm メッシュサイズのプランクトンネットで濃縮したものを、3基の実験池にそれぞれA:B:C=5:1:0の割合で添加した。また、栄養塩の枯渇を防ぐため、2週間おきに無機窒素($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 および NaNO_3)とリン酸(KH_2PO_4)の再添加を行った(DIN:415 $\mu\text{g L}^{-1}$ 、DIP:50 $\mu\text{g L}^{-1}$)。

採水は、1週間に2回の頻度で行った。表層の水温およびpHの測定と共に、栄養塩濃度、クロロフィル a 濃度、顕微鏡観察およびDNA解析のため採水を行った。栄養塩およびクロロフィル a 濃度、DNA解析用のサンプルは、420 °C で3時間燃焼したGF/F フィルターを用いる過処理を行い、フィルターおよび原水とろ液を-20°Cで冷凍保存した。顕微鏡観測用サンプルはグルタルアルデヒド(最終濃度1%)で固定し保存した。栄養塩類の分析はAACS II オートアナライザー(BRAN+ LUEBBE)を用いて行った。クロロフィル a 濃度の測定は、水サンプルを燃焼したGF/F フィルターを用いてろ過し、フィルター上に保持された植物プランクトンについて蛍光法で求めた⁴⁰⁾。

2) アオコ増殖に対する栄養塩類供給比の影響

70 m³の3基の実験池を4区画に仕切り、それぞれを繰り返しとして実験に用いた。*Microcystis*属を含む琵琶湖湖水を5 μmメッシュサイズのプランクトンネットで濃縮したサンプルを作成し、各区画に添加した。実験は、窒素とリンの比(N:P)を、N:P=10:1 (1,660 μg L⁻¹: 400 μg L⁻¹)、19:1 (1,660 μg L⁻¹: 200 μg L⁻¹)、80:1 (33,200 μg L⁻¹: 200 μg L⁻¹)、200:1 (166,200 μg L⁻¹: 200 μg L⁻¹)の4段階に設定したMA培地¹⁴⁾を添加することにより開始し、その後、これらの培地を各区画に2週間おきに添加した。採水は、各区画より1週間に1回の頻度で行い、栄養塩濃度、クロロフィル a 濃度、顕微鏡観察およびDNA解析を行った。サンプルは、420 °C で3時間燃焼したGF/F フィルターを用いる過処理を行い、フィルターおよび原水とろ液を-20°Cで冷凍保存した。顕微鏡観測用サンプルはグルタルアルデヒド(最終濃度1%)で固定し保存した。栄養塩類の分析はAACS II オートアナライザー(BRAN+ LUEBBE)を用いて行い、クロロフィル a 濃度の測定は蛍光法で行った⁴⁰⁾。*Microcystis*属の細胞密度は、定量PCR法により求めた¹¹⁾。

3) *Microcystis*属の細胞密度の推定と遺伝子型の多様性の評価

DNAの抽出はCTAB法⁸⁾を一部改変して行った。*Microcystis*属の細胞密度の推定は16S rDNAを標的とした*Microcystis*属に特異的なプライマーとTaqMan[®]プローブを用い $\Delta\Delta$ CT法で行った⁵⁾。25 μLの反応液に12.5 μLのTaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems社)、0.9 μM プライマー 0.2 μM TaqMan プローブおよび 1/25に希釈したDNAサンプルを2.5 μL加え、ABI 7300 Real Time PCR instrument (Applied Biosystems社)により解析を行った。

*Microcystis*属の遺伝子型の評価のため、16S-23S rDNA ITS領域の塩基配列多型の解析を行った。サンプルよりDNAを抽出し、シアノバクテリアに特異的なCSIF プライマー及び23S rDNA プライマー ULRを用いITS領域の増幅を行った⁵⁾。その後、pT7 Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen)を用いクローニングを行った。ポジティブなコロニーを100個採取、*Microcystis*属に特異的なプライマーセット (MITS-F (5'-AAG GGA GAC CTA ATT CVG GT-3')、MITS-R (5'-TTG CGG TCY TCT TTT TTG GC -3'))³⁴⁾を用いコロニーPCRを行い、2%アガロースゲル電気泳動により、PCRによる増幅の有無を確認し、*Microcystis*属のDNA断片を含んでいるコロニーのみ塩基配列の決定を行った。

4) ラン藻類の光合成活性の評価

励起光として440 nm (クロロフィル a)、485 nm (クロロフィル b & c)および590 nm (フィコシアニン)の三種を用い、それぞれの励起光下での680 nm (クロロフィル a)の蛍光強度の測定を行った¹⁵⁾。その後、DCMU (3'-(3,4-dichlorophenyl)-1', 1'-dimethyl urea)を最終濃度15 μMとなるよう添加

し再び蛍光強度の測定を行った²⁹⁾。DCMU添加前 (F_0)および後(F_m)の各励起光下での蛍光強度より、光化学系IIの光合成最大量子収率 (F_v / F_m) を求めた。この方法によるラン藻類の光合成活性の評価を、DCMU蛍光法とした。

DCMU蛍光法の有効性を確認するために、以下の実験を行った。琵琶湖湖水を5 μm メッシュサイズのプランクトンネットで濃縮したものを、8基の実験池にそれぞれに添加して実験を開始した。2週間おきに無機窒素 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 KNO_3 および NaNO_3) とリン酸 (KH_2PO_4) を添加(無機窒素を415 $\mu\text{g L}^{-1}$ 、リン酸を50 $\mu\text{g L}^{-1}$)し、各区画より1週間に1回の頻度で採水を行い、栄養塩濃度、クロロフィルa濃度、DCMU蛍光法による光合成最大量子収率を測定した。

(5) アオコ発生時の微生物群集の応答

1) 細菌と原生生物の現存量および組成の動態

アオコ発生時の細菌と原生生物の動態を把握するために、2009年8月から2010年1月にかけて、野外実験池より週一回の頻度でサンプルを採取した。細菌の現存量測定に用いるサンプルは、ホルムアルデヒド(最終濃度2%)にて固定した後、DAPI (4', 6'-diamidino - 2 phenylindole)により、落射蛍光顕微鏡を用いて、紫外線励起光下で、1サンプル当たり400細胞以上あるいは20視野以上の細菌を計数した。また、上記固定サンプルを用いて、細菌群集組成をCARD-FISH法(Catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization)³⁰⁾にて求めた。プローブは、細菌全体についてはEUB338のI, II, IIIを混合して用い、 α プロテオバクテリアはAlfa968、 β プロテオバクテリアはBeta42、 γ プロテオバクテリアはGam42a、Cytophaga-FlavobacteriumはCF319、ActinobacteriaはHGC69aを、それぞれ用いた。1サンプル当たり400細胞以上あるいは20視野以上の細菌を計数し、DAPIで染色された細菌細胞数に対する各プローブで蛍光を示した細胞の割合(% DAPI)を算出した。

原生生物は、従属栄養鞭毛虫と繊毛虫の細胞密度を求めた。サンプルをグルタルアルデヒド(最終濃度1%)にて固定した後、プリムリンで染色後、落射蛍光顕微鏡を用いて、紫外線励起光下で、1サンプル当たり100視野について観察される鞭毛虫細胞を計数した。計数の際、自家蛍光のある細胞は独立栄養鞭毛虫として計数した。繊毛虫は、500mLのサンプルを、最終濃度1%で酸性ルゴール液にて固定した後、固定サンプル中のプランクトンを自然沈殿により濃縮し、濃縮したサンプルをBurker-Turk型血球計算盤を用いて、光学顕微鏡下で繊毛虫細胞を計数した。

2) アオコに対する原生生物による摂食圧の評価

京都大学生態学研究センターの敷地内に設置してある野外実験池(10m \times 10m \times 1.7m; 容積約70m³)において、2010年7月1日から12月28日の期間、週1回サンプリングを行った。水温は、現地で測定した。クロロフィルa濃度は、試水をGFフィルターにてろ過した後、Welschmeyer(1994)の蛍光法⁴⁰⁾を用い分析した。また*M. aeruginosa*数、*Colloidietyon triciliatum*数、*C. triciliatum*内*M. aeruginosa*数をカウントするために、それぞれ500mlのサンプル水をルゴール固定(最終濃度1%)後、自然沈殿させ、Burker-TurkまたはFuchs-Rosenthal計算盤にてカウントを行った。

国立環境研究所より購入した*M. aeruginosa* NIES-843株を、滅菌した300–500 mL NalgenボトルにCT培地を入れて培養した。*C. triciliatum* を実験池より単離するため、倒立顕微鏡下で観察しながらパスツールピペットで*C. triciliatum*を1細胞採取し、CT培地を入れた24well マイクロプレートに入れた。翌日、増殖した*C. triciliatum*を再度ピペットで1匹採取し、同様に新しいCT培地の入っ

たマイクロプレートウェルに入れた。数日これを繰り返し、*C. triciliatum*以外の生物が含まれていないことを確認後、ウェル内の培地をCT培地に低濃度の*M. aeruginosa*の入った500mlボトルに入れ培養した。*M. aeruginosa*、*C. triciliatum*のいずれも、25°C、 $52 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ の条件下でCT培地¹⁴⁾にて培養した。

*C. triciliatum*の*M. aeruginosa*に対する消化速度を調べるために、*C. triciliatum*に*M. aeruginosa*を12時間摂食させた後、培地をCT培地にて10倍希釈し摂食を止めた⁶⁾。その後30分間隔で150分までサンプリングを行い、ルゴール固定後、*M. aeruginosa*、*C. triciliatum*、*C. triciliatum*内*M. aeruginosa*数をカウントし、消化速度を算出した。この消化速度を、 $Q_{10} = 2.1$ を用い、温度補正した消化速度として求めた。これを用いて、*C. triciliatum*の摂食速度 (G_c ; *M. aeruginosa* cells flagellate⁻¹ h⁻¹)、ろ過速度(nl flagellate⁻¹ h⁻¹)、一日当たりの摂食圧 (G_i ; % standing stock day⁻¹)について、それぞれ算出した²⁷⁾。

*C. triciliatum*の*M. aeruginosa*に対する摂食速度の実験の前準備として、培養中の*C. triciliatum*の食胞内*M. aeruginosa*を減少させるため、*C. triciliatum*の培地をCT培地にて2倍希釈し、12時間暗室において食胞内*M. aeruginosa*を減少させた。*M. aeruginosa*の濃度(初期濃度; $1.0 \times 10^4 - 2.1 \times 10^6$ cells ml⁻¹)培地に、一定数の捕食者*C. triciliatum* (初期濃度; 2.0×10^3 cells ml⁻¹)を添加し、25°C 暗所で摂食させた。0、15、30、45分後サンプリングを行い¹⁷⁾、ルゴール固定後、(1) 同様に、*M. aeruginosa*数、*C. triciliatum*数、*C. triciliatum*内*M. aeruginosa*数のカウントをした。摂食速度は、Michaelis-mentenの式に適用した。

$$\text{Michaelis-mentenの式: } IR = \frac{I_{\max}(x)}{K_{IR} + (x)}$$

I_{\max} ; 最大摂食速度 (cells flagellate⁻¹ h⁻¹)、 K_{IR} ; I_{\max} の1/2の速度時の*M. aeruginosa*密度

(6) アオコ発生水域の食物連鎖構造の特性

実験は2011年8月26日から10月28日まで行った。ラン藻のブルーム形成を促進するため、3基の実験池にMA培地¹⁴⁾を1/50濃度となるよう添加し、自然湖沼の微生物群集及び*Microcystis*属の細胞を添加するため、約2 m³の琵琶湖湖水(山田漁港で採取)を>150 μmメッシュサイズのプランクトンネットで濃縮したものをそれぞれに添加した。また、栄養塩の枯渇を防ぐため、2週間おきに無機窒素(Ca(NO₃)₂・4H₂O、KNO₃ およびNaNO₃)とリン酸(KH₂PO₄)の再添加を行った(DIN: 415 μg L⁻¹、DIP: 50 μg L⁻¹)。2011年9月7日にホンモロコを実験区に投入(A: 80匹、B: 240匹、D: 0匹(コントロール区))した。モニタリングおよびサンプリングは1週間に2回、栄養塩濃度、クロロフィルa濃度、顕微鏡観察およびDNA解析のため採水を行った。

魚処理区(密度2種類)およびコントロール区で、2週間ごとにサイズ分画によるPOM(懸濁態有機物)のサンプリングを行い、安定同位体比及びバイオマス量(CN含量)を測定した。網目サイズの異なるプランクトンネットを用い(mesh size: >300μm、>150μm)、約100 Lの表層水をろ過した。さらにろ水10Lを、重ねたプランクトンネット(mesh size >70μm、>40μm、>20μm)でろ過した。各メッシュ上にトラップされたセストンはポリ瓶に回収後、300mLにメスアップし、20μm以下のろ水についてはそのままサンプル処理を行った。各サイズフラクションのセストン及びろ水は、450°C、2時間で燃焼しあらかじめ秤量したGF/C filter(D:47mm)に50-190mLろ集し(安定同位

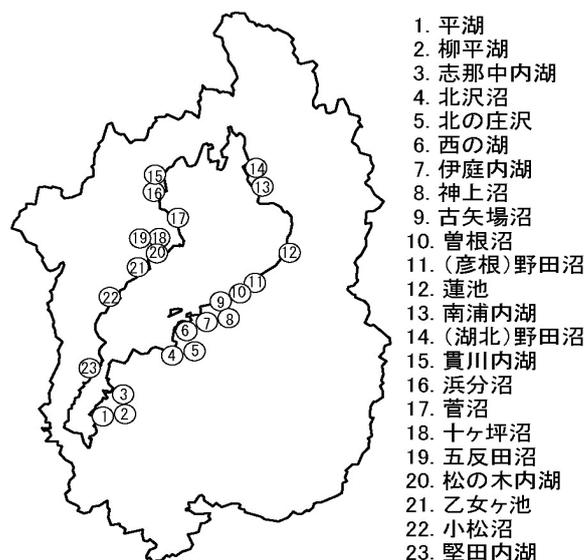
体比及びCN含量測定用)、各10mLを GF/F filter(D:25mm)に2枚ろ過し(クロロフィルa濃度とPOP測定用)、GF/Fでろ過したろ水を栄養塩分析用に採取し、分析まで -20°C で保存した。残りすべてをBiovolume換算用及び種組成の同定のためにホルマリンで固定した。実験開始時及び終了時に、ホンモロコの体重を測定し、終了時の5匹を安定同位体比解析のために凍結保存した。また魚処理区にみられたアカムシユスリカ *Propsilocerus akamusi*も採集し、解析まで -20°C で保存した。また、9月7日、9月29日、10月21日の計3回、魚処理区にみられた動物プランクトン(枝角類、カイアシ類、ワムシ類)を種ごとにソーティングし、安定同位体比解析のサンプルとした。各サイズフラクションのGF/Cフィルターサンプルは、 60°C で72時間乾燥させ、乾燥重量を測定後、フィルターを錫箔で包み、安定同位体測定用とした。ホンモロコは解凍後筋肉部分を、アカムシユスリカは個体すべてを、 60°C で72時間乾燥させた後、クロロホルム：イソアミル=2：1で脱脂処理を行い、メノウ鉢で粉砕した後、適量(0.5mg前後)を錫箔で包埋した。サンプルはElemental Analyzer(EA, Thermo Electron Corporation)とIsotope Ratio Mass Spectrometer(Delta V Plus, 同)をConFlo(ConFlo IV, 同)で結合したEA-IRMSで解析し $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ (‰)およびCN含量を求めた。

(7) アオコ発生水域の社会科学調査

1) 日本国内における土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の調査

琵琶湖周辺の内湖(図(1)-2)では文献調査と現地踏査をおこなった。前者は、内湖に関わる代表的文献^{1, 4, 21, 28, 33})から地図・空中写真・統計にいたる資料を用いて、内湖及び内湖周辺の現況の概要を把握した。後者は、灌漑期(2009年8月~9月)と非灌漑期(2009年12月~2010年1月)に主要地点で行った。必要な場合には、聞き取り調査(非構造化インタビュー)も行った。

また、利根川流域についても、同様の文献資料調査、現地踏査、聞き取り調査を行い、導水開発等の人間活動に伴ってアオコが拡散する実態の解明を行った。



図(1)-2：調査対象とした琵琶湖内湖

2) 東南アジア、オーストラリアおよびアフリカ(ケニア)におけるアオコと人間社会の関係

東南アジアにおける地域固有の生活様式(食文化等)とアオコによるリスクの関係を解明する

ため、2010年1月31日～2月6日にかけて、タイ・ベトナムにおいて現地視察と予備的な聞き取り調査を実施した。調査地点には、さまざまなタイプのアオコ発生水域が含まれるよう工夫し、水域とその周辺の写真撮影などの記録と聞き取り調査を行った。

また、2011年2月14日から18日にかけて、オーストラリア・ニューサウスウェールズ州におけるアオコ管理を対象として、文献調査と現地調査を行った。

ケニア・ビクトリア湖（ウィナム湾）におけるアオコと周辺社会の関わりについて明らかにするため、①カウンターパートとのコミュニケーション及び②インタビューから成る下記調査を実施した。2010年9月から2011年7月にかけて、カウンターパートであるケニア海洋水産研究所キスムリサーチ・センターの協力のもとで、同研究所所属のジョン・ギチュキ（John Gichuki）博士、ツマ・ジェンベ（Tsuma Jembe）博士らと情報交換をおこない、現地で聞き取り調査を実施する地域と調査対象者を選択するためのデータを得た。さらに、2011年8月19日から8月24日にかけて、ケニア・ビクトリア湖（ウィナム湾）沿岸及び流域の利害関係者に対する聞き取り調査を実施した（表(1)-1）。調査対象の地域・組織は、アオコによる害を受けている、もしくは、アオコの要因である富栄養化や土壌流出に関わっている関係者から抽出した。具体的には、アオコの害を受ける側として、ビクトリア湖沿岸漁村（7箇所）、リゾート施設（1）、浄水施設（1）、飲料品工場（1）を選んだ。また、ビクトリア湖へ環境負荷をもたらす側として、沿岸にある水産加工工場（1）、下水処理施設（2）、さらに、ビクトリア湖流域上流に位置するサトウキビ農場（1）、砂糖工場（1）、茶農園（1）、茶工場（1）を選んだ。

各々の調査地では1名～20名の情報提供者に対して聞き取り調査を実施した。所要時間は30分～1時間30分であった。インタビューでは、アオコから受ける被害の状況やアオコ問題に対する対応、そして、アオコ問題を含むビクトリア湖の環境問題に関する意見を尋ねた。また、調査地に関する背景理解のため、調査対象組織の歴史や調査地周辺の環境問題について尋ねた。また、流域の農園や工場では環境負荷削減の手法について質問した。用意した質問項目に一定沿う形式で調査したが、状況に応じて項目を適宜省略・追加した。

3) アオコに関する科学的知識啓発の小冊子作成

2010年度までの研究結果から、アオコについて一般市民と専門家の認識の違いや地域による認知の違いが見られることがわかった。たとえば、同じ淀川流域内部でも、地域によってアオコに対する認知度は大きく異なっている（図(1)-3）。アオコに対する社会的関心を醸成し、アオコ監視・対策への市民参加を促進するためには、アオコに関する知識の啓発が必要と考えられた。そこで、容易に入手可能な小冊子を作成することを企画した。

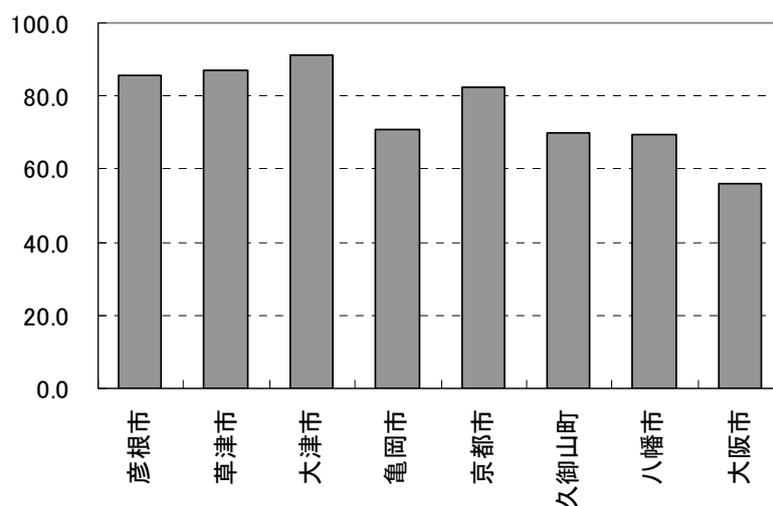
4) アオコ発生GISデータ（Cyanomap Japan）の作成

日本国内で近年シアノバクテリアが採取された水域もしくはアオコが発生した水域の情報を文献・ウェブサイトから収集した（表(1)-2）。続いて、収集した水域の緯度・経度を電子国土ポータル及びGoogle Mapを利用して求め、水域の名称・緯度経度・情報源情報等を表形式

（cyanomapjapan.xls）で整理した。最後に、この表データを変換して、シェープファイル（ポイントデータ、cyanomapjapan.shp）を作成した。

表(1)-1：ビクトリア湖周辺での調査対象者と調査実施日

No	date	name of site	memo
1	19-Aug-11	East African Seafood Ltd.	Seafood factory
2	20-Aug-11	Kichinjio B.M.U.	Fishing village
3		Equator Bottlers Ltd. (Coca Cola)	Bottlers
4		Dunga B.M.U.	Fishing village
5	21-Aug-11	Kiboko Bay Resort	Beach resort (Restaurant and hotel)
6		Mitimbili B.M.U.	Fishing village
7	22-Aug-11	Ngengu B.M.U.	Fishing village
8		Koginga B.M.U.	Fishing village
9		Mbita Town B.M.U.	Fishing village
10	23-Aug-11	Nyagina B.M.U.	Fishing village (Rusinga island)
11		Chemelil Sugar Company Ltd.	Sugarcane factory
12		Chemelil location	Sugarcane farmers
13		Taito location teafarmers (Nandi East District, Nandi Hill Division)	Tea farmers
14	24-Aug-11	Nandi Tea Estates Limited	Tea factory
15		Dunga Treatment Plant (KIWASCO)(Kisumu Water and Sewewage Corporation)	Water supplying plant
16		Kisat Treatment Plant (KIWASCO)	Sewage plant
17		Nyalenda Lagoons (KIWASCO)	Pond (Sewage system)



図(1)-3：地域別に見たアオコの認知度。2006年実施の社会調査において、「アオコ」について聞いた経験があると回答した人の割合（田中・坂上・大野，未発表データ）

表(1)-2：資料名及び作業内容とそれぞれの情報源で得られた水域数

資料名及び作業内容	水域数
彼谷邦光（2001）『飲料水に忍びよる有毒シアノバクテリア』裳華房	59
渡邊眞之（2007）『日本アオコ大図鑑』誠文堂新光社	72
水資源機構（2004）『環境報告書2004』	16
水資源機構（2011）『環境報告書2011』	18
都道府県ウェブサイトにおけるサイト内検索	65 *
国立科学博物館の『浮遊性藍藻データベース』	5 *
環境庁の『自然環境保全基礎調査 湖沼調査』（第3回及び第4回）	16
アオコプロジェクト（環境省地球環境総合研究推進費D-0905）における内湖調査	4

*の数は新たに抽出した水域の数である。

4. 結果及び考察

（1）アオコの分布拡散・発生状況

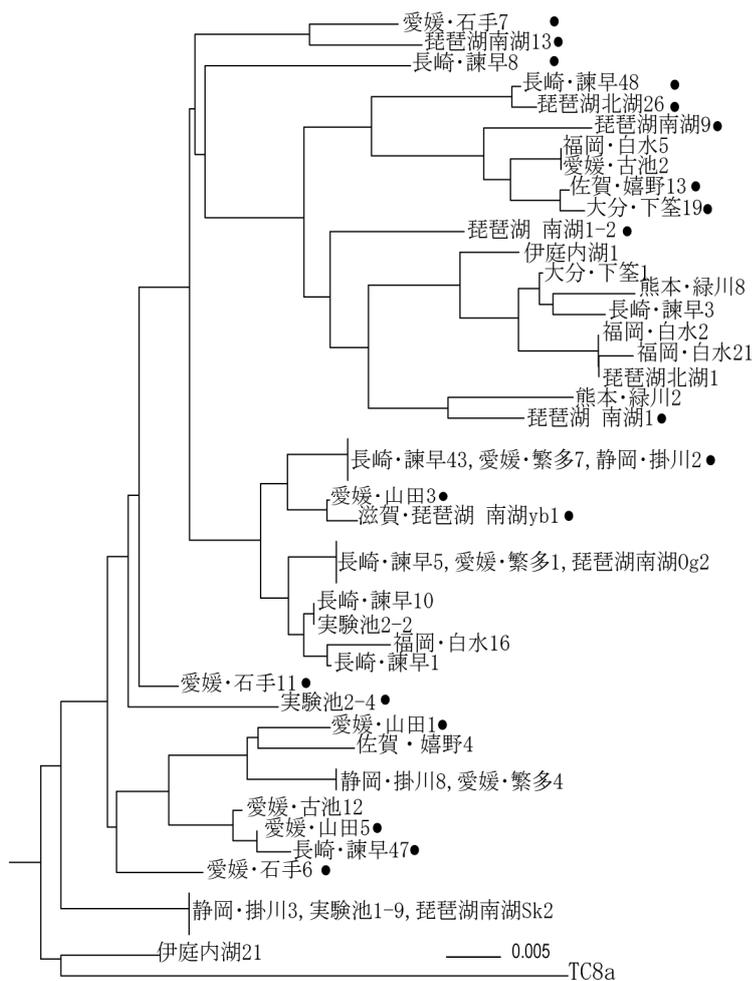
1）西日本各地における*M. aeruginosa*遺伝子型の分布

国内18か所、235株の39遺伝子型について解析を行った（図(1)-4）。*mcy* G遺伝子の有無による毒生産遺伝子の有無の検出では、21遺伝子型が毒生産株、18遺伝子型が毒非生産株に区別された。系統樹を作成した結果、毒株は近隣のクラスターにまとまる傾向があった。各クラスターには様々な地点の遺伝子型が混在し、地点ごとにまとまって形成されるクラスターは存在しなかった。また、同一の遺伝子型が地理的に異なる場所から検出された（たとえば、福岡県白水大池SR5番株と、愛媛県古池FR2番株が同一）。このことから、ITS領域を使用した解析では地理的分化は見られず、各地に同じ遺伝子型が存在していることが明らかになった。また採水地点によって、優占している遺伝子型数の傾向が異なり、大きく分けて2タイプが存在した（図(1)-5）。一つは、多様な遺伝子型がだいたい等頻度に混在するタイプ（例えば琵琶湖南湖、諫早調整池など）、もう一つは特定の遺伝子型が全体に占める割合の高いもの（例えば伊庭内湖、白水大池）であった（図(1)-5）。

2）アオコ発生時に特異的な細菌群集の検出

2010年10月から11月にかけて西日本各地の24の湖沼から得られた試水について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（DGGE法）²⁴⁾によりDNA断片のバンドパターンを得た。このバンドパターンを、PRIMER-E (v6.PRIMER-E Ltd, Plymouth, UK)を用いて、非計量的多次元尺度構成法(NMDS法)³¹⁾と類似度行列分析（ANOSIM法）³¹⁾を用いて、群集解析を行った。

採水した24湖沼のうち、7湖沼において*M. aeruginosa*のブルームが発生していた（図(1)-6）。各湖沼のDGGEバンドパターンをANOSIMにより解析した結果、*M. aeruginosa*のブルームの発生している湖沼と発生していない湖沼との間に、細菌群集組成に有意な違い($p < 0.01$)があることが明らかになった（図(1)-6）。この結果は、アオコの発生が細菌群集組成を変化させていることを示唆しているが、アオコのどのような影響が当該水環境の物理・化学環境あるいは生物環境の変化を起しているのかは、本研究では解明できなかった。



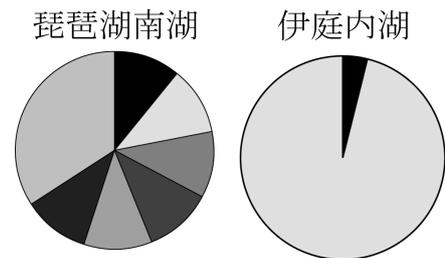
図(1)-4：近隣結合法により作成した系統樹。●は毒保有株を示す。

(2) 日本国内におけるその他の有害ラン藻類の分布状況

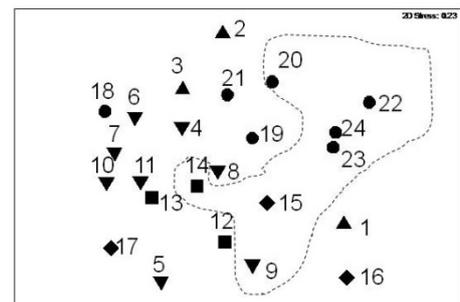
1) その他の有毒ラン藻類の単離培養と形態・系統・生態学的特性評価、および定量PCRマーカーの開発

6水域から合計60株の*C. issatschenkoi*を単離した。16S-23S rDNA intergenic spacer (ITS)領域の配列情報から、これらの株は10遺伝子型に分類することが出来た(表(1)-3)。また、形態より*C. issatschenkoi*と判断された全ての株はATXが陰性で*nifH*は陽性を示し、窒素固定能は有するがアナトキシン-a合成能は持たないことが考えられた。一方、形態より*R mediterranea* var. *grandis*と判断された全ての株はATXは陽性、*nifH*は陰性を示し、これまでに琵琶湖で報告のあったアナトキシン-a生産株の*R mediterranea* var. *grandis*の特徴と一致した³⁹⁾。

次に、単離培養した全ての株について、16S-23S rDNA ITS領域の塩基配列に基づき分子系統解析を行ったところ、全ての*R mediterranea* var. *grandis*の遺伝子型は*C. issatschenkoi*の遺伝子型と同一のクラスターに含まれた(図(1)-7)。そのため、アナトキシン-a生産能を持つ*R. mediterranea* var. *grandis*株は、ヘテロシスト生産能と*nifH*遺伝子が欠損している*C. issatschenkoi*の系統と考えられた。



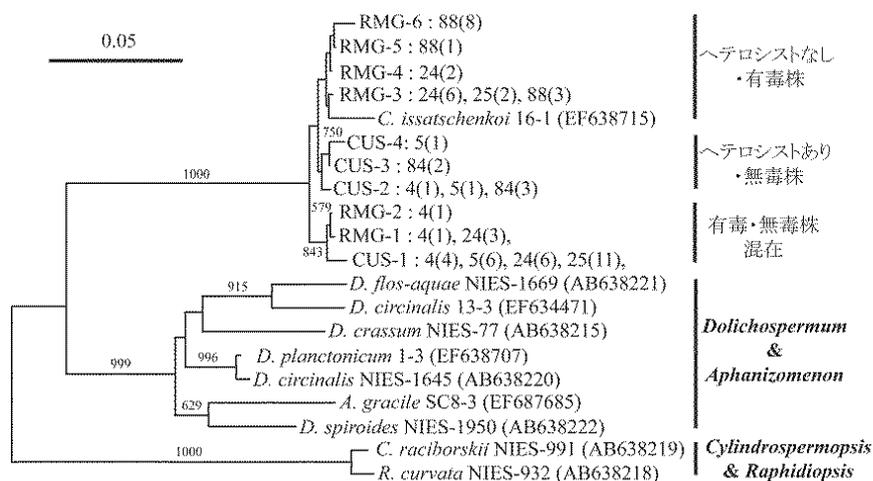
図(1)-5：優占遺伝子型の組成の違い (代表例のみ示す)



図(1)-6：ANOSIMによるDGGEバンドパターンに基づく細菌群集構造の違い ($p < 0.01$)。点線で囲まれたプロットの湖沼では、アオコが発生していなかった。番号：1-3、宍道湖；4-11、奈良県の湖沼；12、広沢池（京都）；13-14、琵琶湖；15-17、愛媛県の湖沼；18-24、琵琶湖内湖。

表(1)-3: 水域から単離した *Cuspidothrix issatschenkoi* および *Raphidiopsis mediterranea* var. *grandis* の特性。a はアナトキシン-a 合成遺伝子、b はニトロゲナーゼリダクターゼ遺伝子を示す。

地点	形態種	単離株	遺伝子型	ATX ^a	nifH ^b
霞ヶ浦	<i>C. issatschenkoi</i>	5	3	-	+
	<i>R. mediterranea</i> var. <i>grandis</i>	1	1	+	-
北浦	<i>C. issatschenkoi</i>	8	3	-	+
平湖	<i>C. issatschenkoi</i>	6	1	-	+
	<i>R. mediterranea</i> var. <i>grandis</i>	11	3	+	-
中池	<i>C. issatschenkoi</i>	11	1	-	+
	<i>R. mediterranea</i> var. <i>grandis</i>	2	1	+	-
合野池	<i>C. issatschenkoi</i>	5	2	-	+
実験池	<i>R. mediterranea</i> var. <i>grandis</i>	11	3	+	-
Total		60	10		



図(1)-7: 6 水域から単離した *Cuspidothrix issatschenkoi* (CUS) および *Raphidiopsis mediterranea* var. *grandis* (RMG) の分子系統学的関係。

次に88湖沼で採取したサンプルをARISAおよび定量PCRを用い解析を行ったところ、24カ所のサンプルで *C. issatschenkoi* が検出され、このうち、16カ所でアナトキシン-a 生産株が検出された (表(1)-4)。そのため、*C. issatschenkoi* の有毒株と無毒株では分布や環境特性が異なる可能性が示唆された。また、18項目環境要因についてアナトキシン-a 生産株が検出された水域と検出されなかった水域の2群に分けブートストラップ検定を行ったところ、pH、溶存体無機リン濃度、全有機炭素/全有機窒素および全有機炭素/全有機リンで有意な差が認められた (表(1)-5)。そのため、*C. issatschenkoi* のアナトキシン-a 生産株はpHが高く栄養塩 (窒素・リン) 制限がかかりにくい水域で出現していると考えられた。

表(1)-4: *Cuspidothrix* および *Raphidiopsis* の出現状況とアナトキシン-a 生産株の *C. issatschenkoi* の細胞密度。

Stn No.	ARISA		ATX ^a (467bp)	有毒株の細胞密度 (\pm SD) cells L ⁻¹
	<i>Raphidiopsis</i> (399-401bp)	<i>Cuspidothrix</i> (411-413bp)		
1	-	+	+	$2.5 (\pm 0.3) \times 10^4$
4	-	+	+	$7.4 (\pm 0.2) \times 10^4$
5	-	+	+	$3.5 (\pm 0.5) \times 10^4$
7	-	-	+	N.D.
8	-	+	-	N.D.
18	-	+	-	N.D.
19	-	+	+	$6.4 (\pm 0.4) \times 10^4$
22	-	+	-	N.D.
24	-	+	+	$4.9 (\pm 0.1) \times 10^5$
39	-	+	+	$1.8 (\pm 0.2) \times 10^5$
41	-	+	+	$3.4 (\pm 0.2) \times 10^4$
43	+	-	-	N.D.
47	+	+	+	$2.0 (\pm 0.1) \times 10^5$
49	+	+	-	N.D.
50	+	+	+	$9.8 (\pm 0.9) \times 10^5$
52	+	-	-	N.D.
61	-	+	+	$4.9 (\pm 0.3) \times 10^5$
62	-	+	-	N.D.
68	-	+	-	N.D.
72	-	+	-	N.D.
75	+	+	-	N.D.
77	+	+	+	$2.8 (\pm 0.2) \times 10^6$
78	-	+	+	$6.3 (\pm 0.2) \times 10^4$
79	-	+	+	$2.0 (\pm 0.2) \times 10^5$
81	-	+	+	$5.9 (\pm 0.8) \times 10^4$
84	-	+	+	$9.0 (\pm 1.0) \times 10^4$
88	-	+	+	$5.0 (\pm 0.6) \times 10^6$
Total	7	24	17	16

琵琶湖で単離された *R. mediterranea* var. *grandis* LBRI48は、*Raphidiopsis*属でアナトキシン-aおよびホモアナトキシン-a生産能があることが報告されている唯一の株として知られているが³⁹⁾、本種については形態および生態学的研究例が少なく、分類学的根拠が十分でないとの指摘もあった³⁸⁾。本研究により、日本に分布する *R. mediterranea* var. *grandis*の多くは窒素固定能を欠いた *C. issatschenkoi*の一系統であることが強く示唆された。また、アナトキシン-a生産株の *C. issatschenkoi*は、*R. mediterranea* var. *grandis*として1970年代に霞ヶ浦（茨城）および天塩川（北海道）で報告があるのみだが³⁸⁾、1990年代には琵琶湖（滋賀）でアナトキシン-a生産株が単離がされており³⁹⁾、本研究を行った2011年には四国（香川県）以東に広く分布していた。チェコ共和国では、*C. issatschenkoi*は現在も分布を拡大している侵入種と位置付けられている¹²⁾が、日本でも同様の状況と考えられた。

日本ではアナトキシン-a生産能を持つラン藻類が検出されることが少なく、これまで、研究および水源管理上の監視対象となることは少なかった。本研究により、アナトキシン-a生産株の *C. issatschenkoi*は、海外での報告と同様、近年にその分布が拡大していることが強く示唆された。そのため、水源維持や公衆衛生上、日本でも新たな外来有害藻類の侵入と分布拡大を監視することと共に、分布拡大経路やその要因の解明が必要と考えられる。

表(1)-5:ブートストラップ検定により求めたアナトキシン-a 生産株の *C. issatschenkoi* 存否間における各環境要因の有意差

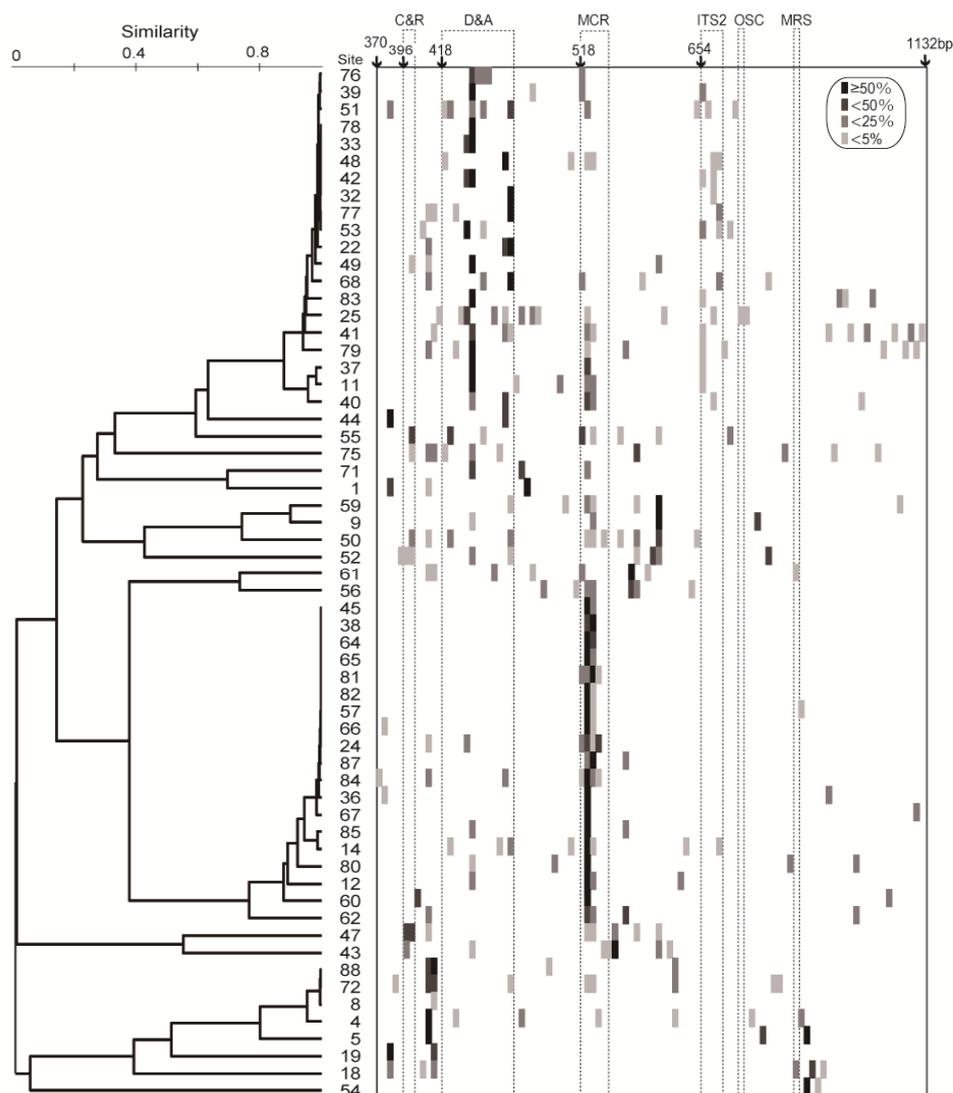
環境要因	全データ (N=88)		存在 (N=16)		非存在 (N=72)		有意確率
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
水温 (°C)	19.2	1.3	19.4	1.1	19.2	1.3	<i>n.s.</i>
pH	7.9	0.8	8.4	0.9	7.8	0.7	<0.001
導電率 (mS/m)	13.5	10.2	14.3	6.8	13.3	10.9	<i>n.s.</i>
濁度 (NTU)	50.8	262.2	26.9	32.8	22.6	52.3	<i>n.s.</i>
Chl.a (µg L ⁻¹)	123.5	573.1	78.0	68.0	60.5	115.0	<i>n.s.</i>
TOC (mg L ⁻¹)	7.4	21.8	6.2	3.9	4.9	3.9	<i>n.s.</i>
TN (µg L ⁻¹)	2046.9	8180.4	1260.5	561.3	1164.4	1032.4	<i>n.s.</i>
TP (µg L ⁻¹)	187.3	760.2	93.0	63.1	110.6	143.8	<i>n.s.</i>
DIN (µg L ⁻¹)	405.5	481.5	294.1	340.7	430.2	506.1	<i>n.s.</i>
DIP (µg L ⁻¹)	26.5	48.0	9.9	11.9	30.2	52.1	<0.001
NO ₃ -N (µg L ⁻¹)	363.9	460.0	257.5	331.7	387.5	482.6	<i>n.s.</i>
NO ₂ -N (µg L ⁻¹)	8.6	10.3	9.9	10.1	8.3	10.4	<i>n.s.</i>
NH ₄ -N (µg L ⁻¹)	33.0	55.4	26.7	37.3	34.4	58.8	<i>n.s.</i>
TN/TP	23.6	34.2	16.9	9.5	25.1	37.5	<i>n.s.</i>
TON/TOP	12.3	6.6	12.5	4.7	12.3	7.0	<i>n.s.</i>
TOC/TON	10.1	9.2	7.4	3.5	10.7	9.9	<0.001
TOC/TP	114.2	86.8	89.3	42.9	119.7	93.1	0.045
DIN/DIP	101.7	298.5	52.0	91.1	112.8	326.7	<i>n.s.</i>

2) 日本国内におけるその他の有害ラン藻類の分布状況

ARISA法の結果、解析を行った88水系のうち60水系でラン藻類が検出された(68%)。それぞれの場所で、1から13の配列長が観察された。このうち*Microcystis*属が41水域(68%)、*Cylindrospermopsis*属・*Raphidiopsis*属が7水域(11.7%)、*Cuspidithlix*属が21水域(35%)、*Dolicospermum*属・*Anabaenopsis*属が38水域(63%)、*Oscillatoria*属が1水域(1.6%)、そして*Merismopedia*属が2水域(3.3%)で検出された。その他、配列長で現時点では配列情報がなく種判別が不可能なラン藻類が検出され、この手法の有効性が示唆された。ラン藻類が検出された場所で、UPGMAを使用した類似度とARISAのバンドパターンを解析した(図(1)-8)。UPGMAのクレードとARISAのバンドパターンは同様の傾向を示し、主に①*Dolicospermum*属・*Anabaenopsis*属優占するグループ、②*Microcystis*属が優占するグループ、③他の未知のラン藻類種が優占するグループ、の3つに分類された。各クレード内では、類似度はすべて80%以上と高い数値を示した。

ラン藻類の生残と環境要因との関係を検討した結果について、外れ値1か所を除いた87か所の環境パラメーター値をBox plotにより図(1)-9に示した。ラン藻類群集の存否と環境要因の関連を調べるため、ランダムイゼーションテストを行った結果、pH、濁度、TON、及びDINで有意差がみられた(図(1)-10)。このことから、ラン藻類群集は、相対的に高いPH、高い濁度、高いTONと低いDINを示す場所で発生していることがわかった。また、CAA解析の結果、F1とF2軸により57.1%が説明された(図(1)-11)。また高い濁度の場所で*Merismopedia*属がみられ、高いクロロフィルとTOPの場所で*Microcystis*属が検出された。

トキシタイピングを用いたラン藻毒を検出した結果、microcystin と nodularin (HEP)は58水域で検出され、52水域から*Microcystis*由来の*mcyE*遺伝子が検出された。一方、ARISA法では38水域で



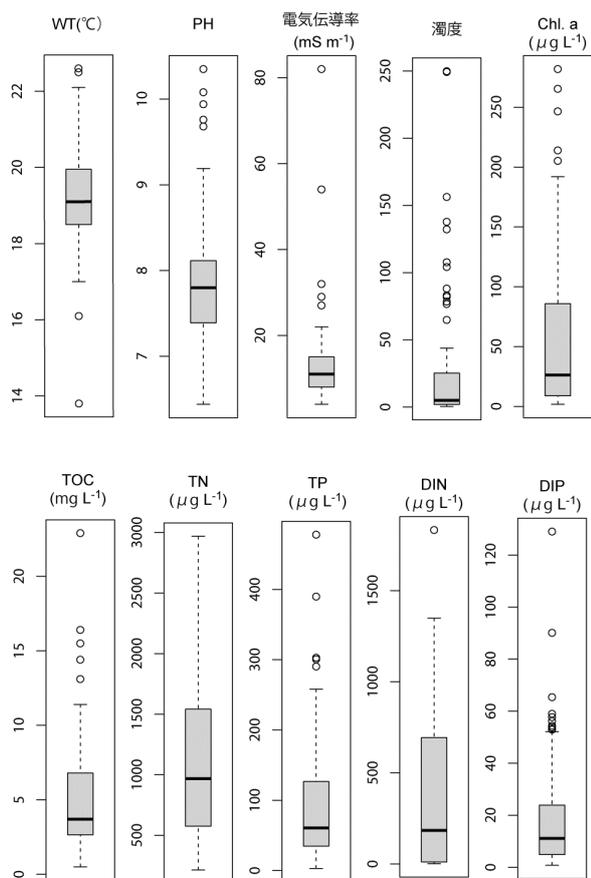
図(1)-8 : ARISA法を用いた有害ラン藻類の検出バンドパターン (右) と、UPGMAにより作成した地点間の藻類出現類似度 (左)。右 : バンド濃淡はその種のその水域での相対存在比率を表し、番号は、採水地点を示す。C&R; *Cylindrospermopsis* 属と *Raphidiopsis*属, D&A; *Dolicospermum*属と *Anabaenopsis*属, MCR; *Microcystis*属, OSC; *Oscillatoria*属, MRS; *Merismopedia*属。

*Dolicospermum*属・*Anabaenopsis*属の存在が検出されたが、これらの水域で*Anabaena*由来の*mcyE*遺伝子は検出されなかった。また、16水域でアナトキシン-aとホモアナトキシン-aが検出されたが、*cylindrospermopsin*合成遺伝子とSaxitoxin-aは検出されなかった。これらの結果から、Hodoki et al (2012)¹²⁾と同様の傾向が見られ、日本ではmicrocystinの主要な生産者は*Microcystis*属であり、microcystin生産株の*Planktothrix*および*Anabaena* spp.の存在は稀である結果が支持された。

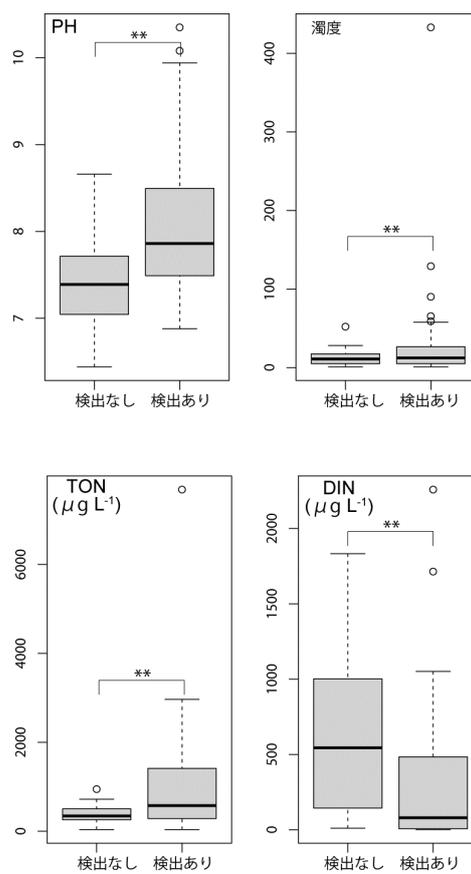
(3) 水鳥によるアオコの拡散

1) 水鳥生息・渡来状況調査

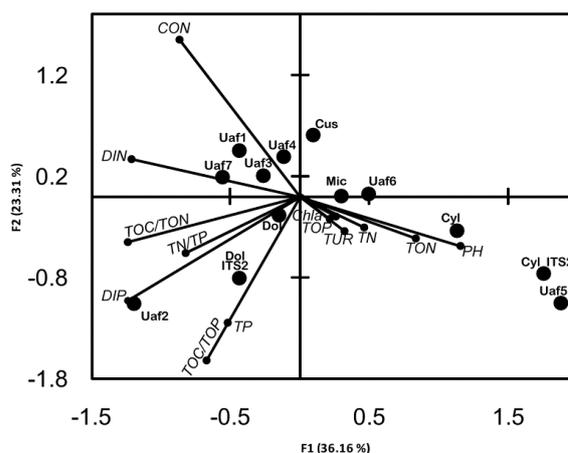
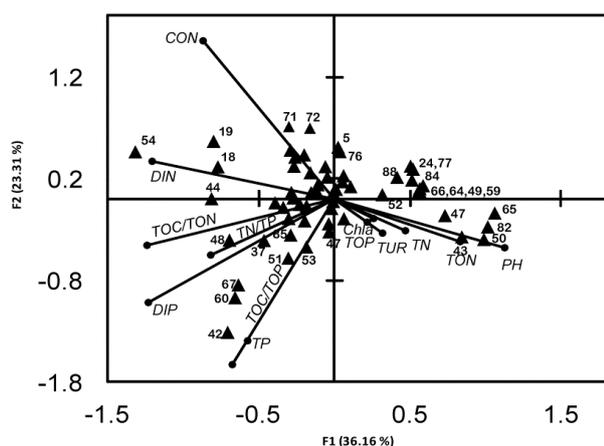
文献調査により、全国的にガンカモ類・ハクチョウ類は主に冬期に毎年約200万羽、シギ・チド



図(1)-9：全国88か所のうち外れ値を除いた87か所の環境パラメーター値 (Box plotによる表記)。



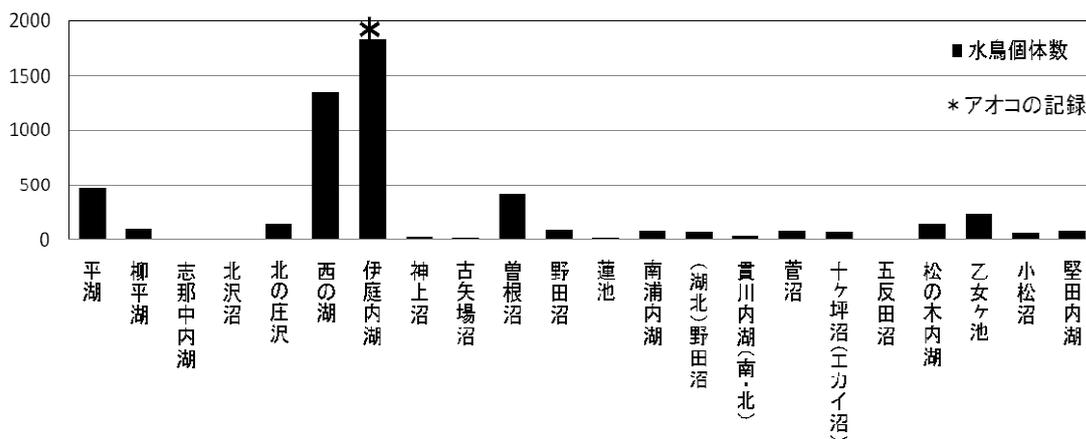
図(1)-10：ランダムイゼーション検定の結果有意差がみられた環境要因。**, $p < 0.05$



図(1)-11：CAA解析の結果。左；サンプリング地点、右：フラグメント長。

リ類は春や秋、冬期に約3～8万羽が記録されていること、日本は渡り性水鳥の中継地で、ガンカモ類は東南アジアからユーラシア大陸東部・北米大陸、シギ・チドリ類はオーストラリア・東南アジアからユーラシア大陸東部・アラスカ間を渡ること、またサギ類は日本から中国南部・台湾・フィリピンへ渡ることから、水鳥は日本と大陸間の湖沼を頻繁に行き来していることがわかった。

琵琶湖内湖32ヶ所の現地踏査では、35種（家禽のシナガチョウ、アヒルを含む）、7016羽が記録された。2009年7～9月の調査では、伊庭内湖でのみ*M. aeruginosa*ブルームの発生が認められ、翌年冬期に行った水鳥調査では本湖の水鳥の個体数及び密度が最も高かった（図(1)-12）が、次に水鳥の渡来の多かった西の湖や水鳥密度の高い平湖では、*M. aeruginosa*ブルームは見られなかった。



図(1)-12：琵琶湖内湖における水鳥確認個体数とアオコの発生状況

2) 水鳥体表面及び糞からのシアノバクテリアDNAの検出

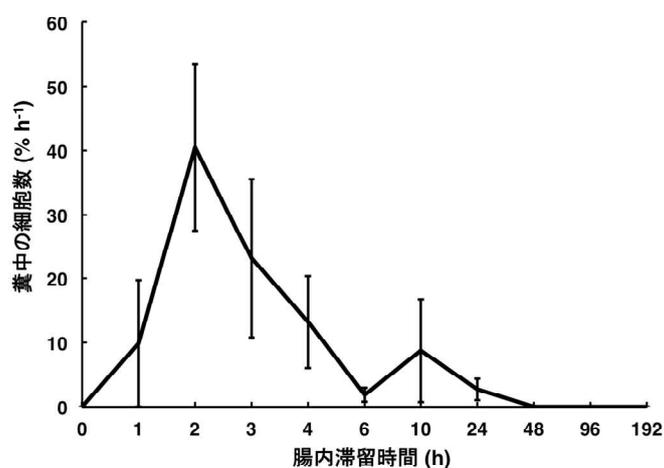
水鳥がアオコを輸送する科学的証拠を得るため、水鳥の糞からの*M. aeruginosa*遺伝子の検出を行い、163のサンプルについて分析を行った。検討した糞の73%にシアノバクテリアが含まれており、シアノバクテリアのうち*Microcystis*属は16.6%の糞から検出された（表(1)-6）。また、干潟で捕獲したシギ類の糞から*Microcystis*属が確認された。シギ類は淡水湿地も利用するため、隣接した淡水池で発生していたアオコを運んだ可能性がある。日本に飛来するカモ類やシギ類の多くは、春に中国北部やロシア東部、アラスカ等へ渡るので、広範囲にアオコを伝播する可能性があるが、水鳥がアオコをどの程度保持するのか、糞として排出されるまでの時間や糞中のアオコの状態について調べる必要が生じた。

3) 水鳥によるアオコの内部散布

マガモから排泄された糞を蛍光顕微鏡で観察すると、完全な形を保っている*M. aeruginosa*の細胞がみつかった。培養した*M. aeruginosa*を飼育しているマガモに飲ませると、排泄時間のピークは平均2時間後で、最長で24時間後まで排泄が確認できた（図(1)-13）。*M. aeruginosa*の回収率は、平均15.9%であった。糞中の*M. aeruginosa*のDNAは、10日後まで検出された（図(1)-14）。2時間後に排泄された糞に含まれる*M. aeruginosa*の細胞を拾い出して、1細胞から培養すると、培養成功率はマガモの個体当たりでは33%（2/6個体）、培養細胞当たりでは1.6%（2/126個体）であった。通常は培養株を1細胞から培養するとほぼ100%増殖するので、今回の培養成功率の低さはマガモの消

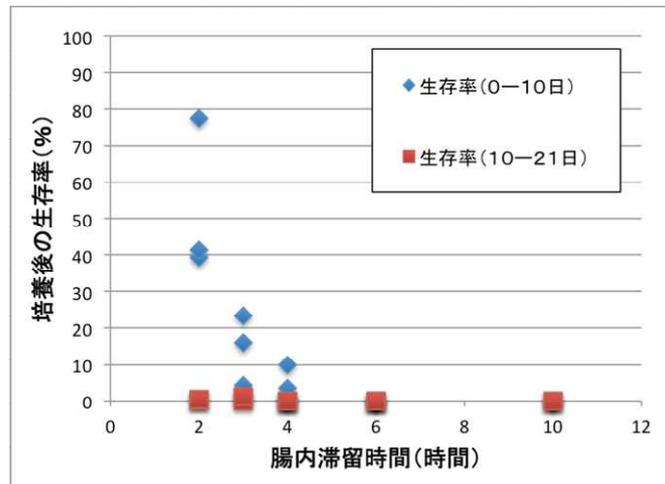
表(1)-6：水鳥の糞からのシアノバクテリアおよび*M. aeruginosa*のDNAの検出（検出サンプル数／総サンプル数）。

場所	鳥種	シアノバクテリア	<i>Microcystis</i>
霞ヶ浦（茨城）	コブハクチョウ	22/33	1/33
千波湖（茨城）	コブハクチョウ・コクチョウ	24/32	12/32
谷津干潟（千葉）	コオバシギ	1/2	1/2
	キアシシギ	0/1	0/1
	ソリハシギ	4/5	3/5
	ハマシギ	1/1	0/1
	タシギ	0/1	0/1
	メダイチドリ	0/1	0/1
	ダイゼン	1/1	0/1
	オバシギ	1/1	1/1
	トウネン	4/5	1/5
	イソシギ	1/1	0/1
木浜内湖（滋賀）	ヒドリガモ	18/18	0/18
琵琶湖南湖（滋賀）	オナガガモ	12/13	2/13
	ユリカモメ	6/9	0/9
	コサギ	0/1	0/1
	マガモ	1/1	1/1
	アオサギ	0/1	0/1
	ゴイサギ	0/1	0/1
京大実験池（滋賀）	ヨシガモ	17/18	2/18
昆陽池（兵庫）	オナガガモ	3/7	2/8
	ヒドリガモ	1/2	1/2
	カワウ（ひな）	2/8	0/8
合計		119/163	27/163
%		73.0%	16.6%

図(1)-13：マガモ糞中から検出された*Microcystis aeruginosa*細胞の生残率

化管によって細胞が損傷を受けていることを示唆する。

複数の細胞から培養すると、最長4時間後に排泄された糞から*M. aeruginosa*の増殖が確認された。また、糞を培地で懸濁したものをそのまま培養するとうまく培養できなかったが、10日後の細胞の残存率は滞留時間が短いほど高く、長いほど短くなる傾向がみられた。これは長い時間腸内環境にいるほど、*M. aeruginosa*の生存力が低下することを示唆する（図(1)-14）。



図(1)-14：糞懸濁液を培養したときの*Microcystis aeruginosa*の生存率と腸内滞留時間の関係

本研究の結果より、マガモが飲み込み、少なくとも4時間以内に糞として排出された*M. aeruginosa*は、少ない割合であるが増殖能力を保っていることが明らかになった。マガモは60-80km/h程のスピードで移動する³⁾ので、連続して飛翔すると4時間では300km前後の移動が可能である。本研究から、マガモは少なくとも半径300km圏内での*M. aeruginosa*の受動的散布に貢献可能なことが示唆された。

日本に飛来するマガモは、主に中国北部やロシア極東部、北部日本で繁殖し、途中2~3カ所の中継地に滞在しながら⁴³⁾、日本や中国南部などへ渡って越冬する。日本では冬期に200万羽前後の水鳥が記録されており²³⁾、水鳥はフライウェイ（渡り鳥の移動経路）内での移動を繰り返しながら、頻繁に*M. aeruginosa*の散布を行っていると考えられる。カモ類の越冬期のねぐらから採食場所までの距離は1~48.8kmで²²⁾、渡りの時期以外でも水鳥は地域の閉鎖水系間の*M. aeruginosa*の移動分散に寄与していると考えられる。特にアオコが発生している湖沼やダムでは、水鳥を介して周辺水系へアオコ原因藍藻類の移動分散が起こっていることを念頭に置いて、アオコの環境対策を進める必要がある。

今回は無菌培養細胞を用いたので、細胞は単体で存在していたが、野外のアオコでは群体を形成しているため、腸管通過時の消化により長い時間耐えられる可能性がある。今後は食性の異なる水鳥に対する調査や野生の群体状の細胞を用いた同様な飼育実験を行うことで、*M. aeruginosa*の野外での散布の実態がより明らかになるだろう。

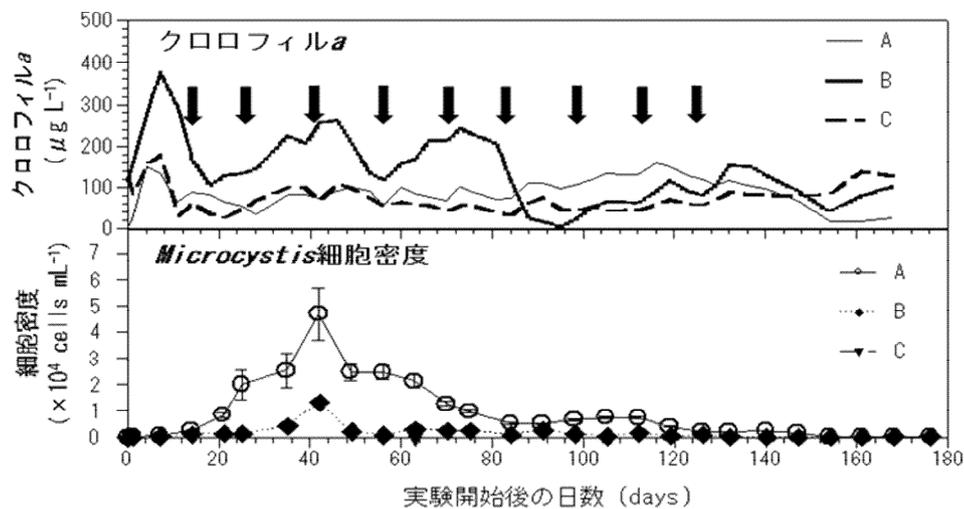
(4) アオコ群集の生存と増殖に関する生態学的研究

1) 野外実験池を用いたアオコ増殖実験

野外メソコスムを用いた実験では、元々*M. aeruginosa*のブルームが発生していないメソコスム中

で人為的にブルームを発生させることは極めて難しく、成功例が無い。本研究では、平成21年度に、京大の野外実験池を用いて、メソコスム・レベルの水体で人為的にアオコを発生させることに成功し、このことについてのノウハウを蓄積した。

クロロフィル a 濃度は、全ての実験池で実験開始後の一週間で急激に増加し、その後、12日後までに減少した。また、2週間おきの栄養塩類の再添加に同調して増減を繰り返した（図(1)-15）。濃縮湖水を最も多く添加した実験池Aでは、実験開始20日後以降に水面への*Microcystis*属の集積も確認された。*Microcystis*属の細胞密度は、濃縮湖水を添加したAおよびB池で実験開始1日後から42日後まで上昇し、その後、80日後まで緩やかに低下した（図(1)-15）。一方、細胞密度の変化と栄養塩類再添加の周期には一定の傾向は見られず、水温が20℃を下回る頃から細胞密度の低下が始まったことから、むしろ水温の影響が強いと考えられた。濃縮湖水を添加していないC池では63日後のみ*Microcystis*属の細胞が検出された。



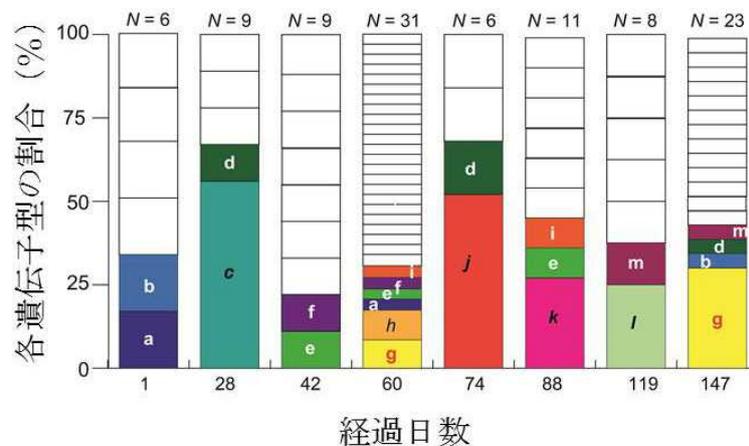
図(1)-15：実験池におけるクロロフィル a 濃度(上図)と*Microcystis*の細胞密度(下図)の変化。
矢印は栄養塩類添加を示す。A、B、Cは、それぞれ実験池を示す。

実験池Aからサンプリングごとに96個から625個の*Microcystis*コロニーを採取、103の*Microcystis*の遺伝子型が検出された（図(1)-16）。決定した塩基配列に基づき遺伝子型の特定を行ったところ、遺伝子型：クローン比は80%から100%であった。既往研究では、多くの自然湖沼の*Microcystis*のブルームは数個の遺伝子型が優占し、年間を通し5-6個の遺伝子型がみられると報告されている²⁰⁾。一方、本研究ではクローニングによる遺伝子型の定量も行った。その結果、*Microcystis*の個体群はこれまで指摘されていたよりも多様な遺伝子型で構成され、短期間のうちに優占するアオコの優占遺伝子型が変化することが明らかとなった（図(1)-16）。

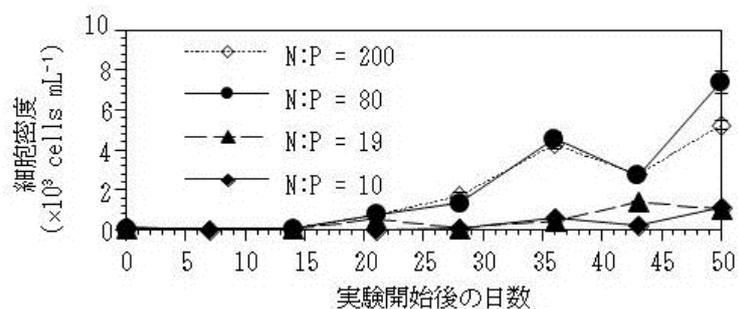
2) アオコ増殖に対する栄養塩類供給比の影響

野外実験池において、窒素とリンの栄養塩類環境が*M. aeruginosa*の増殖に及ぼす影響を検討した。窒素とリンの栄養塩類供給比（N:P比）の影響については、N:P=80:1（モル比）および200:1の区画で*Microcystis*細胞密度の増加が認められたが、N:P=19:1および20:1の区画では実験期間を通し、

*Microcystis*細胞密度の増加が認められなかった（図(1)-17）。すなわち、窒素：リン比が19から80の間に、*M. aeruginosa* の増殖を決定する栄養塩類環境が存在することが明らかとなった。



図(1)-16：実験池に発生したアオコの優占遺伝子型の経時変化。白い部分は実験期間中に一度しか出現しなかった遺伝子型であり、その他の色は実験期間中に複数回出現した遺伝子型を示す。異なるアルファベットは、異なる遺伝子型を示す。

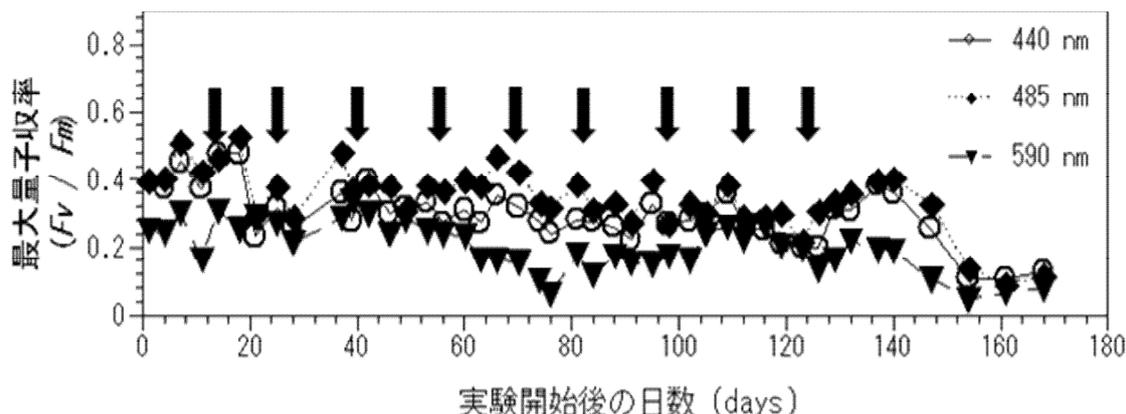


図(1)-17：窒素とリンのバランスを変化させた実験池における*Microcystis*細胞密度の経時変化

3) ラン藻類の光合成活性の評価

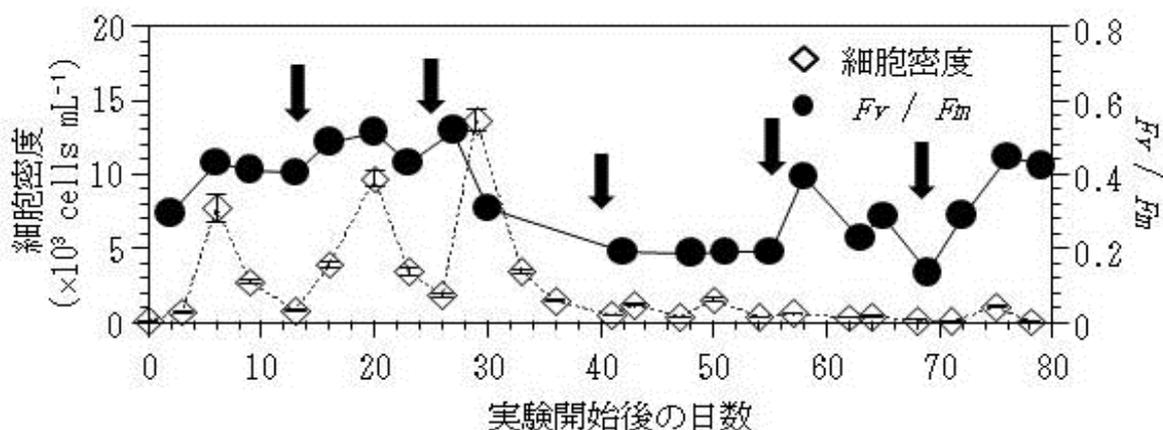
DCMU蛍光法で求めた全植物プランクトン（440 nm）および緑藻と珪藻（485 nm）の光合成最大量子収率は、クロロフィルa濃度の変化と同様、概ね栄養塩再添加の周期と同調した変動を示し、栄養塩添加後に光合成活性が上昇、その後低下した（図(1)-18）。一方、シアノバクテリア（590 nm）の光合成最大量子収率は、栄養塩再添加との関係は見られず、*Microcystis*属の細胞密度が上昇した42日後までは0.25以上あり、細胞密度が低下した50日後から76日後にかけ0.06まで低下した。

*Microcystis*属の細胞密度が低下した80日後以降、シアノバクテリアの光合成最大量子収率は再び上昇したが、これは秋期のプランクトンである*Aphanizomenon issatschenkoi*が優占したためと考えられた。このように、本研究で新たに試みたフィコシアニン励起によりDCMU蛍光法で求めた光合成最大量子収率の変動は、実験池におけるラン藻類の変動と概ね一致したことから、多くの分類群が混在する植物プランクトン群集の中からフィコシアニンをもつシアノバクテリアの光合成活性を分離し評価するのに有効であると考えられた。



図(1)-18：実験池における植物プランクトン(440 nm)、緑藻+珪藻 (485 nm)およびラン藻 (590 nm)の光合成最大量子収率の変化。矢印は栄養塩類再添加を示す。

そこで、DCMU蛍光法の信頼性について、実験池を用いて確認した。*Microcystis*細胞密度は、実験開始から30日目まで変動を伴いながら高く保たれ、それ以降は低下した(図(1)-19)。シアノバクテリアの光合成最大量子収率は、細胞密度とほぼ一致した変動パターンを示し、かつ栄養塩類添加に対して反応した(図(1)-19)。これらの結果は、本方法がリアルタイムにシアノバクテリアの生理活性状態をモニター可能であることを示している(図(1)-19)。



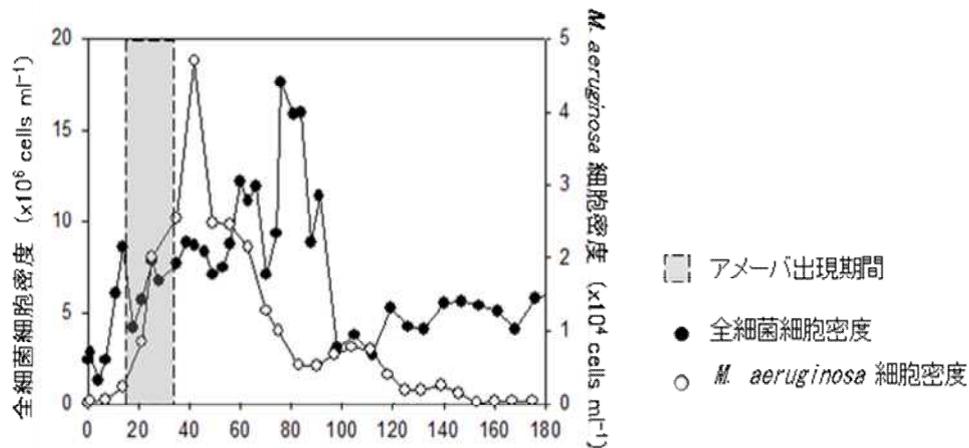
図(1)-19：実験池における*Microcystis*細胞密度(白菱形)と光合成最大量子収率(黒丸)の経時変化

(5) アオコ発生時の微生物群集の応答

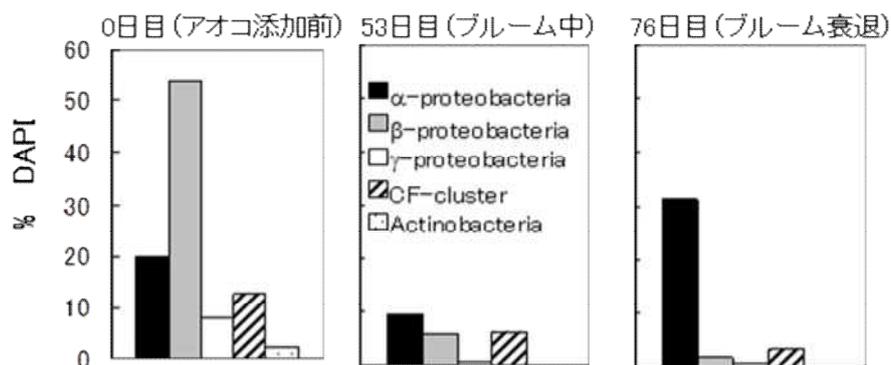
1) 細菌と原生生物の現存量および組成の動態

アオコの発生が認められたA池では、全細菌細胞密度はブルーム中は徐々に増加し、ブルーム衰退期(76日目)に顕著に増加した(図(1)-20)。実験期間中、細菌・原生生物(繊毛虫と鞭毛虫)のいずれも栄養塩類添加にわずかながらに応答した。開始から18日目に*Penardochlamys*属様のアメーバの大量発生が観察され、アメーバの衰退期(35日目)に*M. aeruginosa*のブルームが認められた(図(1)-20)。CARD-FISH法による細菌群集組成については、アオコ添加前(0日目)のA池では β -proteobacteriaが優占し、76日目以降は α -proteobacteriaが優占した(図(1)-21)。ブルーム期間中

は検出率が低下した（図(1)-21）が、この理由は今回使用したプローブでは検出できない系統分類群の細菌が優占したと考えられる。



図(1)-20：アオコが発生した実験池における細菌および*M. aeruginosa*の細胞密度の経時変化。囲い部分には、*Penardochlamys*属様のアメーバ現存量が増大した期間を示す。

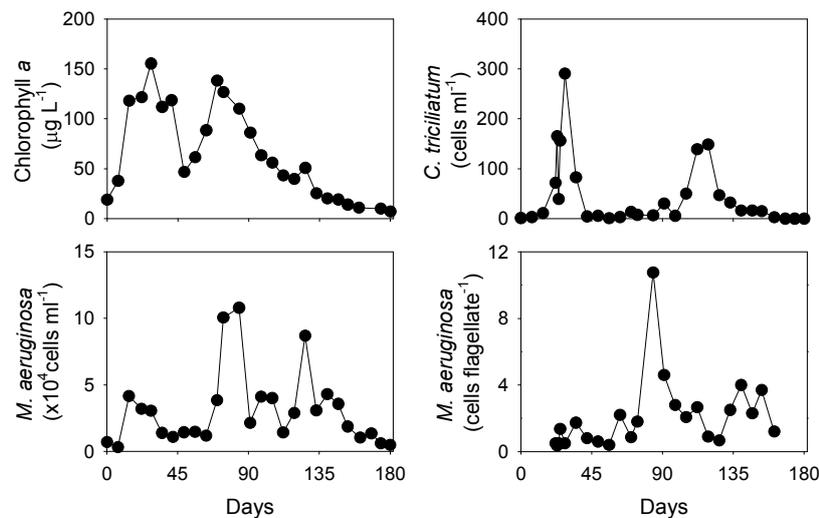


図(1)-21：アオコが発生した実験池における、FISHによる細菌群集組成の経時変化

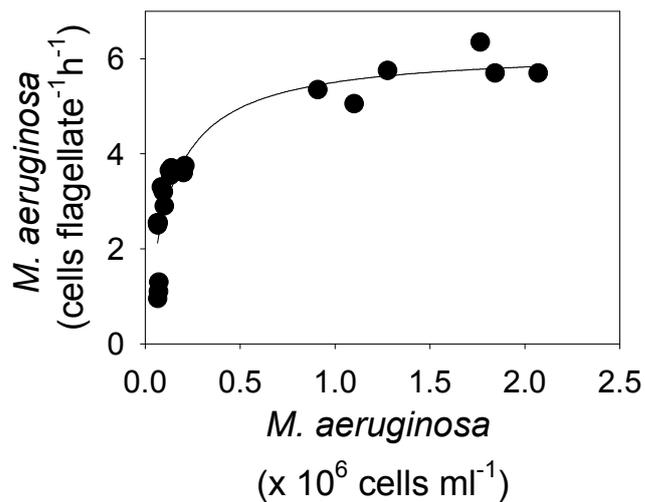
2) アオコに対する原生生物による摂食圧の評価

水温は実験開始から74日目まで30°C近辺を示していたが、その後下降した。クロロフィル濃度は、28日目に $155.3 \mu\text{g L}^{-1}$ 、70日目に $138.3 \mu\text{g L}^{-1}$ と高い値を示した（図(1)-22）。*C. triciliatum*数は105–119日目の間は比較的安定しており $22\text{--}35 \text{ cells ml}^{-1}$ 、28日目に最大値 $291 \text{ cells ml}^{-1}$ を示した（図(1)-22）。*C. triciliatum*の食胞内*M. aeruginosa*数は84日目に $10.8 \text{ cells flagellate}^{-1}$ で、*M. aeruginosa*数の最大と同日となった（図(1)-22）。消化速度を求めた結果、 $0.72 \% \text{ cell contents min}^{-1}$ であった。*C. triciliatum*の捕食圧を調べるため、この消化速度を用いて*C. triciliatum*による*M. aeruginosa*に対する一日当たりの摂食圧を算出した結果、 $0.0\text{--}25.3 \% \text{ standing stock day}^{-1}$ となった。

実験室内での*C. triciliatum*の摂食の餌密度依存性を調べた結果、摂食速度は餌密度とともに増加し、Michaelis-mentenの式が適用可能であった。最大摂食速度は、 $6.2 \text{ cells flagellate}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 、半飽和餌密度は、 $1.2 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ ($r^2 = 0.873, p < 0.001$)であった（図(1)-23）。



図(1)-22 : 実験期間中の、クロロフィルa濃度 (左上)、*M. aeruginosa*細胞密度 (左下)、*C. triciliatum*細胞密度 (右上)、および*C. triciliatum*食胞内の*M. aeruginosa*数 (右下) の経時変化。



図(1)-23 : *C. triciliatum*による*M. aeruginosa*摂食に対する餌密度依存性

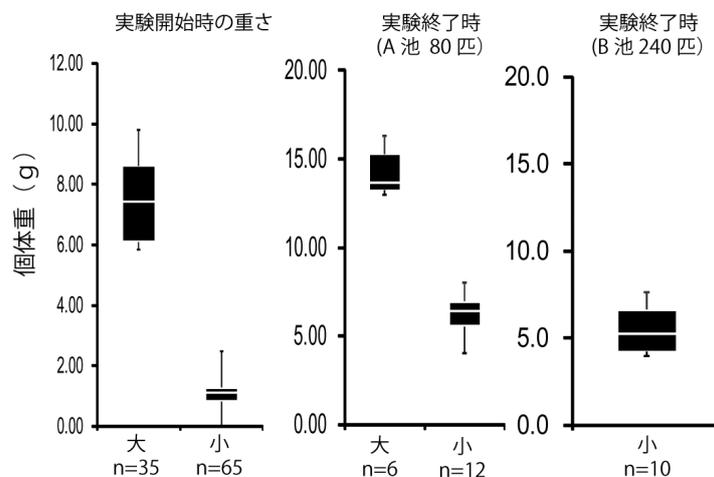
以上の結果より、原生生物によるアオコの摂食は、ときとして現場のアオコのかなりの部分を摂食しうることが示された。この結果は、原生生物による摂食が野外のアオコの現存量低下に重要であることを定量的に示した、世界的に貴重な例である。

(6) アオコ発生水域の食物連鎖構造の特性：動物プランクトン食魚の有無が*Microcystis*属のブルームと食物網構造に及ぼす影響解析

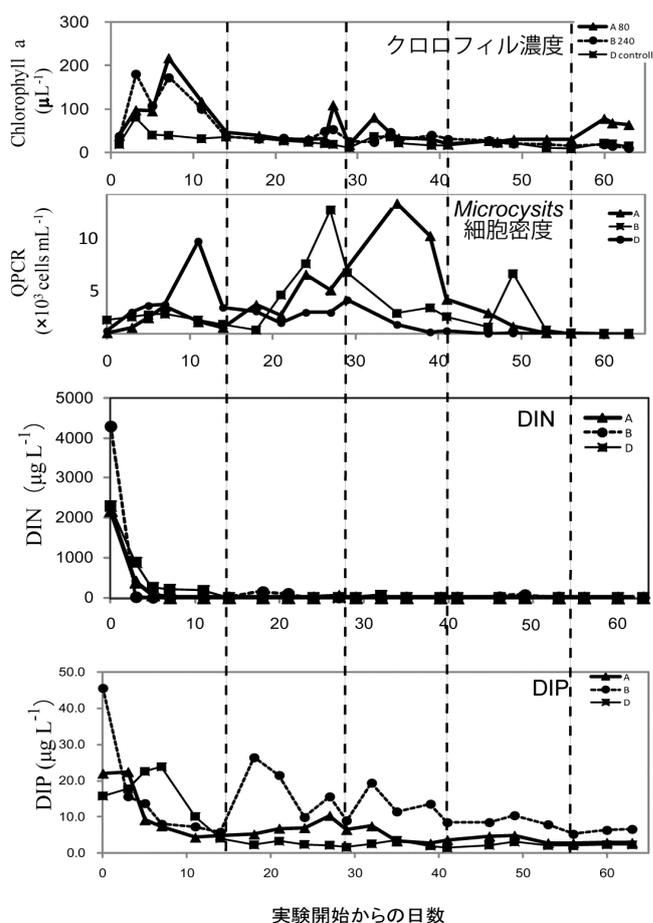
1) ホンモロコの体サイズ変化

実験開始時のホンモロコは2つの体サイズクラスがあり大きさにより2分した。実験に使用した個体重は、相対的に大きいサイズが平均7.6g (n=35)、当年魚と思われる小個体が平均1.1g (n=65)であり、合計では大サイズ55匹、小サイズ265匹であった。これらをA池に80匹(大14、小66匹)、

B池に240匹（大41匹、小199匹）を入れて2ヶ月後、一部を回収した（図(1)-24）。実験終了時の個体重は、大個体は約2倍、小個体は約6倍の重さであった。



図(1)-24：実験に用いたホンモロコの個体体重。実験開始時及び実験終了時の値を示した(Box plotによる表記)



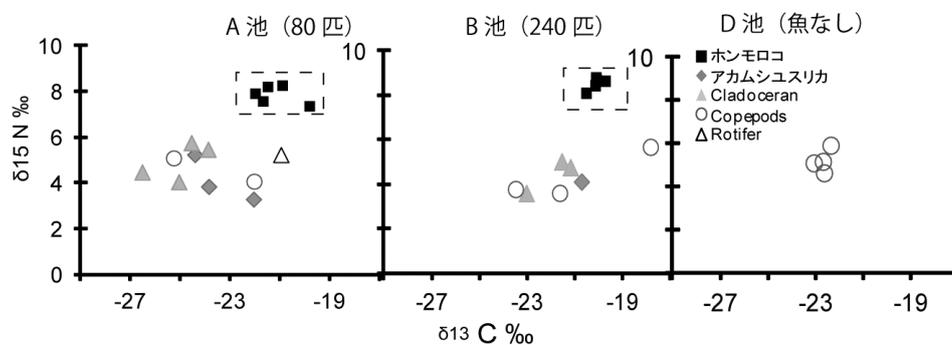
図(1)-25：実験池での環境要因変化。横軸が実験開始からの日数を表し、縦軸が各環境パラメータの単位を表す。点線は、栄養塩の再添加を表す。A池：80匹、B池：240匹、D池：魚なし（コントロール区）。

2) 実験池のクロロフィルa濃度、*Microcystis*細胞密度及び栄養塩濃度変化

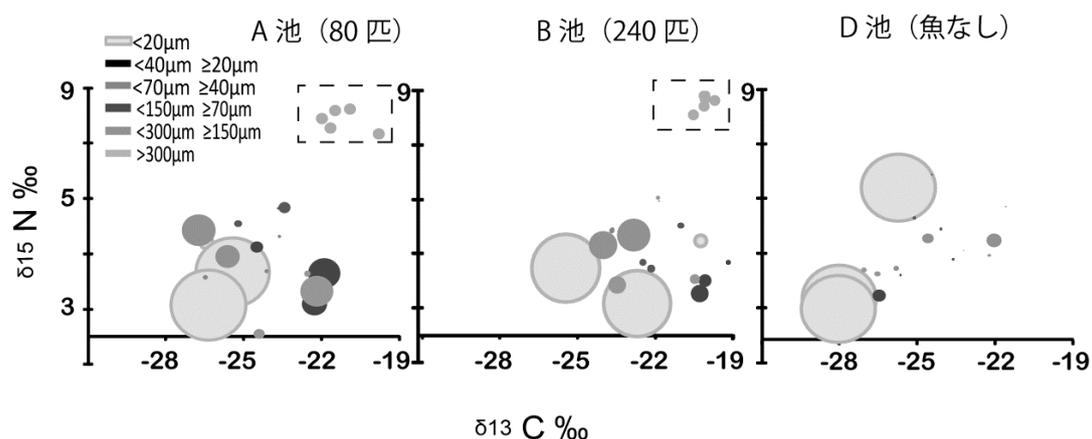
クロロフィルa濃度は、すべての池で実験開始8日前後に最大値を示しその後減少した(図(1)-25)。一方、*Microcystis*属の最大細胞密度は、実験処理区によって異なり、A池(魚60匹)で35日目、B池(魚240匹)で25日前後、D池(control 魚なし)で10日前後であった(図(1)-25)。DIPはホンモロコ密度が最も高かった処理区が他の二処理区より高い傾向を示した(図(1)-25)。

3) 安定同位体比の分析によるホンモロコの餌資源推定

9月7日、9月29日、10月21日の3回の動物プランクトンを区分けし、安定同位体比解析を行って実験期間中のホンモロコの餌資源を推定した。図(1)-26に示す通り、*Ceriodaphnia*(トガリネコゼミジンコ)、*Bosmina*(ゾウミジンコ)、*Moina*(スカシタマミジンコ)、カイアシ類、フクロワムシ、*Keratella*、*Brachionus*等の動物プランクトンが観察された。ホンモロコの安定同位体比から、動物プランクトンやユスリカを摂食していたと考えられた。



図(1)-26：9月7日、9月29日、10月21日の3回の3魚処理区ごとの動物プランクトン組成と安定同位体比解析結果。



図(1)-27：9月7日、9月29日、10月21日の3回のサイズ分画処理と、その安定同位体比の解析結果。

4) 実験期間中のPOCの安定同位体組成変化

9月7日、9月29日、10月21日にサイズ分画処理を行い、さらに安定同位体解析を行った(図(1)-27)。ホンモロコがいる処理区では、すべての分画サイズのプランクトンがまんべんなく見られたが、コントロール区(魚なし)では、<20µmのプランクトンは多くみられるものの、大型サイズのプ

ランクトンが少なかった（図(1)-27）。これは、動物プランクトン食のホンモロコがいることにより、大型プランクトンが減っているにもかかわらず、ホンモロコがいる方が系内の多様性が高い可能性を示唆している。既存の論文では、栄養塩回帰に魚類が及ぼす正の影響も指摘されており、本研究結果も同様の結果を支持していると考えられる。また、本研究では3倍のホンモロコの密度差をつけたが、この規模の実験池ではこの程度では、魚の個体密度差は検出されにくく、魚の存否の方が食物網構造を決定するうえで重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

（7）アオコ発生水域の社会科学調査

1）日本国内における土地利用形態の変遷や周辺住民の生活文化特性の調査

琵琶湖内湖に対する人為的改変を空間区分にしたがって分類すると、a)内湖内部に対する作用（浚渫、真珠養殖、魚類養殖、干拓、干拓地嵩上げ工事）、b)内湖周辺に対する作用（公園化、市街地化）、c)内湖集水域に対する作用（土地利用の変化、灌漑システム、上水道、下水道、養魚場、内水排除施設）、d)水系ネットワークに対する作用（堰状構造物の建造、川エリの設置）が見られた。各内湖では、a)～d)にある人為的作用がさまざまな強度で累積してきた。

aからdの中の細目においても人為的作用の多様性や重層性が観察できる。たとえば、水系ネットワークに対する人為的作用について見ると、内湖と琵琶湖を結ぶ水路は堰状構造物の有無とその規模・仕組みによっていくつかのタイプに分けられ、琵琶湖と内湖の連続性の違いを認識する指標と捉えることができる。今後、上述のような内湖を取り巻く属性の相違を、継続的な自然科学的調査で把握されているアオコ生息状況と比較し、関連性を検討する必要がある。

なお、滋賀県・琵琶湖の内湖の一つである伊庭内湖では、平成21年度にアオコの発生が確認されたが、その要因に関する現段階での予想は次のとおりである：①伊庭内湖岸に規模の大きな揚水機場が複数あり、その用水供給域からの農業排水等が内湖に流入する（つまり、内湖の水は反復利用されている）；②伊庭内湖は隣接干拓地への灌漑用水源でもあり、内湖水位を一定に保つために下流可動堰で水を留めておく必要がある。①と②の条件が灌漑期（夏期）に揃っているため、高い栄養塩類濃度や水温といったアオコの増殖を促進する要因に影響したと考えられる。

2）東南アジア、オーストラリアおよびアフリカ（ケニア）におけるアオコと人間社会の関係

1）タイ東部地方の貯水池

タイ東部のチョンブリ県のBangphra貯水池（表(1)-7のID.2）やラヨン県のNongPlalai貯水池（表(1)-7のID.3）では、アオコがしばしば発生していた。双方の貯水池は、開発の進むタイ東部地方の飲用水・灌漑用水・工業用水として利用されているが、中でも飲用水として利用する住民や水道施設からアオコ（臭い・濁り）に関する苦情が寄せられていた。具体的なアオコ対策として、硫酸銅投入（Bangphra貯水池）と国・県に対する貯水池流域の土地利用規制の要望（NongPlalai貯水池）が挙げられた。また、チョンブリ県の上水道施設（表(1)-7のID.1）はBangphra貯水池に近いため、独自にサンプル採取して研究者に依頼し、ミクロシスチンの検査をおこなっていた。

2）タイ・バンコク郊外の養魚場

タイ・バンコク郊外の養魚池（表(1)-7のID.4）では、購入したナマズ稚魚（Pradook, Pradook bigouy）に朝夕1回給餌し、6ヶ月間育てた成魚（1kg以上）をバンコク・チャチュンサオ県・チョンブリ

表(1)-7：東南アジアでの調査地の概要

ID	地点	訪問の形式	備考	県・省・地域	国	調査日
1	Bangphra Water Treatment Plant 1	Office1箇所と現地	上水道施設	Chomburi県	タイ	1-Feb
2	Bangphra貯水池	Office2箇所と現地	1の上水道施設の水源			
3	NongPlalai貯水池	Office1箇所	2をサポートする池	Rayong県		
4	Weera Farm	Office1箇所と現地	Cat fish養殖場	Bangkok近郊		2-Feb
5	Ke Go貯水池	Office1箇所と現地	Ha Tinh市の水道水源	Ha Tinh省	ベトナム	4-Feb
6	Boc Nguyen貯水池	Office1箇所と現地	Ha Tinh市の水道水源			
7	Turtle Farm	Office1箇所と現地	すっぽん養殖場. Ha Tinh市内			
8	Lam 川	現地のみ		Nghe An省		5-Feb
9	養魚池①	現地のみ	集落の養魚場(25m四方). Xuan Hoa commune, Nam Dan dist.			
10	養魚池②	現地のみ	4箇所の池(20m四方)でスッポンを中心に養殖. Nam Anh commune, Nam Dan			
11	住宅地の池	現地のみ	Hung Long commune, Hung Nguyen dist.			

県・サムットプラカーン県の市場に卸している。養魚池で与えられる餌は、海産小魚の粉末・豆・とうもろこし・米・粃殻・ミネラル・ビタミンの混合飼料と鶏肉工場からの廃棄物（肉以外の部位）である。以前は、フィリピンの仲介業者を經由してヨーロッパに輸出していたことがある。養魚池には、アオコがよく発生しているが、周辺住民や消費者からのアオコに関わるクレームは養魚場オーナーに対してなかった。

3) ベトナム（貯水池、スッポン養殖池、ファーミングシステム、集落・公園の池）

カウンターパート研究者との調査対象地域に関する情報交換の結果、アオコ（ミクロシスチン）が生じる場所やアオコによって引き起こされる問題として、以下のような項目がわかった。

はじめに、飲用水、灌漑用水の水源である調査対象貯水池（表(1)-7のID.5、ID.6）では、今のところアオコ発生の報告はない。しかし、今後考えられるリスクに対処するために、地元当局及び科学者がアオコや有毒藻類に関する認識を深めておく必要があると考えられた。また、貯水池より流れる灌漑用水路からの直接利用（特に夏季の洗濯・水浴びと飲用）に留意する必要がある。

続いて、スッポンの養殖池（表(1)-7のID.7）である。養殖されたスッポンは、地元レストランで消費されるほか、中国へ輸出されている。また、幼亀（hatchling turtles）としてベトナム中部の養殖場へ供給されている。この養殖池におけるアオコにともなう問題として、池からの排水による周辺環境への負荷、排水流出や幼亀流通を介した有毒藍藻類の拡散が指摘された。食品の安全性の観点から、スッポンへの有毒物質の蓄積の有無について監視が必要である。

第三番目は、魚類養殖池（表(1)-7のID.9、ID.10）である。ベトナムでは、畑・養魚池・家畜飼育の複合システム（farming system）が発達しており、さまざまなタイプが見られる。豚・牛・鶏・アヒルなどの家畜の排泄物を養魚池に流し、魚類の餌としている。排泄物と余剰の餌により富栄養化が進み、アオコがしばしば生じる。この養魚池の水は、畑への用水や水あらいのために利用される場合がある。スッポン養殖池と同様に、魚類養殖池からの排水による環境負荷、有毒藍藻の拡散、食品安全性の低下が問題として考えられる。

アオコが発生すると考えられる第四の場所は、集落や公園の池である。市街地・集落の家屋から生活排水が流入して富栄養化し、アオコが発生している場合がある。臭気や景観悪化が問題と

して考えられる。

現地カウンターパートの研究者との情報交換の結果、インタビューのための質問票を、a) 飲用水用貯水池、b) 灌漑用ため池、c) 養魚池、d) 公園等の池に即して作成した。この調査票は、タイでの調査においても一部改変して活用した。

4) ベトナムにおけるアオコと人間社会の関係

ベトナムでは、中部地方北部のゲアン省・ハティン省の域内で、貯水池（2箇所）、スッポン養殖場（2箇所）、河川（1箇所）、集落（2箇所）を訪問した。各地点での滞在時間が短かったため質問票によるインタビューは実施しなかったが、視察より以下のことが指摘できる。

まず、タイと同様にベトナムにおいてもさまざまなタイプの養魚池と流通システムの存在がうかがえる。食品の安全性を考える上では、多様な生産・流通システムの理解とそれぞれのシステムに対する安全性の評価が必要だと思われた。

続いて、ベトナムの集落の一部では人びとの非常に身近な水域でアオコがよく発生していた（表(1)-7のID.11）。ベトナム集落における水域と人びとの接触（飲用・水浴・洗濯・）を見ると、これまでのようなアオコの飲用水や食品を介した健康影響に加えて、日常的にアオコ発生水域と接するライフスタイルの健康への影響を検討する必要があると考えられた。

5) ケニアにおけるアオコと人間社会の関係

調査をおこなったBMU（漁村）の概要を表(1)-8に示した。なお、BMU（Beach Management Unit）

表(1)-8：調査対象のBeach Management Unitの概要

name of site	Number of people registered in the BMU	Water source in BMU (village)	Species of fish treated in the BMU	F(Number of people working for fishery in the village), P(Population of the village)
Kichinjio B.M.U.	400-500	Tap water, Lake Victoria	Nile perch, Tilapia, omena	
Dunga B.M.U.	480	Lake Victoria, Rainfall, Tap water	Nile perch, Tilapia, omena	F(2000), P(5000)
Mitimbili B.M.U.	120	Rainfall, Lake Victoria	Nile perch, Tilapia, okoko, kamongo, fulu, malfish(?)	F(220), P(2500)
Ngengu B.M.U.	78	Lake Victoria, other source	Nile perch, Tilapia, kamongo, mumi, okoko(?)	P(1500-2000)
Koginga B.M.U.	189	Lake Victoria, other source	Nile perch, Tilapia, Kamongo, mumi	F(320), P(500)
Mbita Town B.M.U.	300	Lake Victoria, Tap water	Nile perch, Tilapia, omena, okoko(?), fulu(?)	F(350-360), P(5000)
Nyagina B.M.U.	350	Lake Victoria, Rainfall, (Tap water)	Nile perch, Tilapia, omena, mumi, okoko	F(450), P(600)

とは、1994年、ケニア・タンザニア・ウガンダの3カ国が集まり、Lake Victoria Fisheries Organization (LVFO)を設立し、これら3カ国が水産資源管理のためにco-managementを適用することに合意し、1998年にそのために作ったコミュニティ・ベースの漁業組織のことである。現在(2004年-2005年)では、ケニア・ビクトリア湖岸に沿って306のBMUが存在している。漁業に携わる村や浜は、BMUとしてケニア政府・水産開発省(Ministry of fisheries development)の許可を受けなければならない。BMUとなった場合には、定められたガイドラインを遵守することが求められる。

表(1)-8では、魚種名について、現地名で記載している。本研究の聞き取り調査で得られた魚種名(ルオ語もしくはスワヒリ語)は以下のとおりであった：

- idji: Nile perch (*Lates niloticus*)
 ngege: Tilapia (*Oreochromis niloticus eduardianus*)
 (Fishbaseでは、他にSingida tilapia (*Oreochromis esculentus*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*), Redbreast tilapia (*Tilapia rendalli*), Redbelly tilapia (*Tilapia zillii*)の4魚種が“ngege”として示されている)
 kamongo: Lung fish (*Protopterus aethiopicus aethiopicus*)
 mumi: Catfish (*Clarias gariepinus*) or Marbled mountain catfish (*Amphilius jacksonii*)
 fulu: Blue Victoria mouthbrooder (*Haplochromis nubilus*)
 okoko: Fischer's Victoria squeaker (*Synodontis afrofisheri*)
 omena: Silver cyprinid (*Rastrineobola argentea*), 現地ではdagaaとも呼ばれる。

7つの漁村人口は表中のBMU登録漁業者数よりも多い。水源は市街地に近い漁村では水道水を利用する場合があったが、多くはビクトリア湖の湖水を利用していた。また、漁獲の対象となる魚種の筆頭はいずれもナイルパーチであった。

表(1)-9では、漁村部でのアオコを意味する言葉について整理した。6つの集落で3つの異なる語がアオコを指摘する現地語(ルオ語)として挙げられた。otuodoが、もっとも多く漁村でアオコを意味する語として挙げられたが、ある集落ではotuodoは岩間の藻類を示す語であり、アオコを指す語ではないと説明された。また、別のある集落ではosikonyodhoがアオコを示す語として指摘されたが、osikonyodhoは「漁網を重くする湖水中の透明な粘液状の物質を示し、アオコではない」と指摘した集落も見られた。全体をまとめると、アオコ(Blue-green algae bloom)を示す個別の現地語(ルオ語)はなく、類似の現象を意味する既存の言葉で代用していると考えられた。

表(1)-10は、ビクトリア湖沿岸の7漁村(BMU)におけるアオコによる被害と湖面を覆うアオコが現われはじめた時期をまとめたものである。まず、人間の健康に関わる被害として、アオコの悪臭、アオコのある水に触れた後のかゆみ、アオコを含む湖水飲用後の腹痛や下痢、が指摘された。アオコへの健康被害を避けるために、遠隔水源からの運搬や普段使用しない上水道・処理剤の利用が必要となり、追加的な時間や金銭を要していた。続いて、牛・ヤギといった家畜への被害が指摘された。家畜がアオコのある湖水を避ける行動をとることや水を飲んだ後に消化器系の不具合が見られることが示された。漁業に対する影響として、漁網の目詰まりと漁獲減少が指摘された。漁網が詰まって引くことが難しくなったり、破損するという問題が生じていた。ある種

表(1)-9：漁村（BMU）においてアオコを意味する単語。

name of site	Word in Luo language (Dholuo) to indicate "water bloom of blue-green algae (cyanobacteria)"	Other related words to indicate an environmental phenomena in the lake [meaning]
Kichinjio BMU	<i>otuodo</i>	<i>osikonyodho</i> [People can feel heavier weight than usual when they pull the fishing net. It is submerged thing in the lake. It may be made with material like a mucus. They found this phenomena since 1993-1994.]
Dunga BMU	-	<i>osikonyodho</i> [People can feel heavier weight than usual when they pull the fishing net. It is not visible. It could be algae, but it is not the blue-green algae.], <i>otuodo</i> [It used to be found near the stone. It can be used as bait for fishing. It is not the blue-green algae.]
Mitimbili BMU	<i>osikonyodho</i>	<i>osikonyodho</i> [People can feel heavier weight than usual when they pull the fishing net. People found it even in 1960's. It used to occur during certain period in a year formerly. But they can find it all the year around nowadays. This word can be used to indicate the algal bloom.]
Ngengu BMU	<i>tuoro</i>	-
Koginga BMU	<i>otuodo</i>	-
Mbita Town BMU	<i>otuodo</i>	-
Nyagina BMU	-	-

の魚はアオコのある時に漁獲が増えるという回答も見られたが、より多く指摘された問題はアオコに伴う魚類の減少・斃死であった。ほかに、アオコのある湖水で洗濯した際の染みや湖畔の畑への散水するためのポンプの故障が指摘された。

なお、指摘された被害が必ずしもアオコを原因としていない可能性はある。たとえば、アオコを含む湖水を飲用して腹痛を起こした場合でも、アオコ以外の原因である可能性はある。この報告では、漁村の住民が長年の生活経験に照らして、アオコの有無による違いを捉えているものと考えて執筆している。

各々の漁村でアオコ問題が顕著になった時期を地図上にプロットすると、Kisumu・Homabayという人口集中地域に近い沿岸から問題が顕在化し、徐々に湾内の広い範囲へ拡大してきた傾向が見られた（図(1)-28）。漁村以外の湖岸域の企業におけるアオコの被害は以下のものであった。飲料水メーカー工場（1968年に市街地に工場建設。2009年現在の湖岸に移転した）では、移転後アオコ問題に対処するために水処理装置を増設し、電気料金などのランニングコストを新たに負担していた。Kisumu近郊の浄水場（1955年から供給開始後、順次設備を拡大）では、アオコ発生時の水処理のために追加的な薬剤や水質管理の経費を要していた。いずれもスカムによる取水口

表(1)-10 : ビクトリア湖沿岸の7漁村 (BMU) におけるアオコによる被害と湖面を覆うアオコが現われはじめた時期

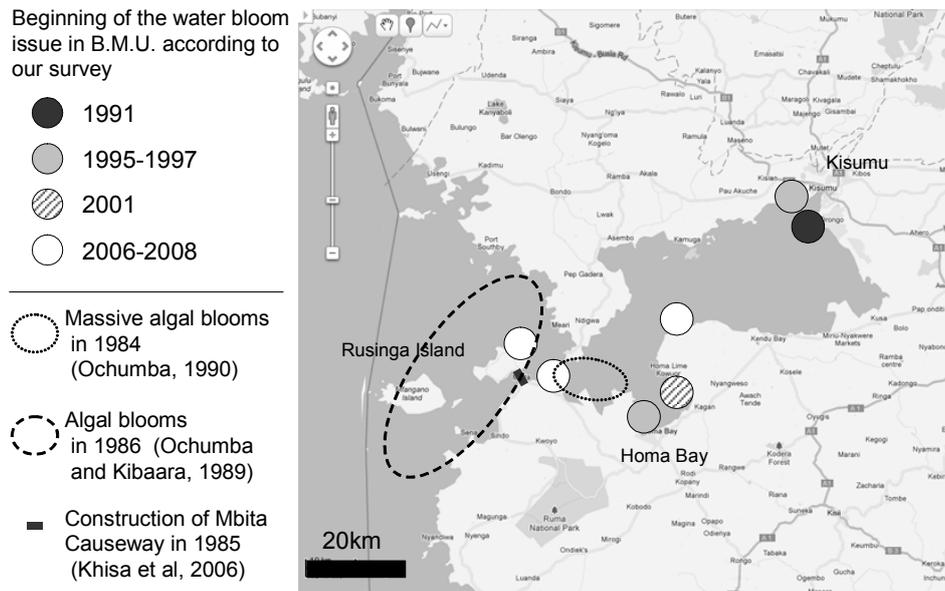
Name of site	When the algal bloom started to occur?		Concrete problems with the algal bloom
Kichinjio BMU	1995	They used to find algae near the stone. But, the whole covering bloom started in the late 1990's.	1) Bad smell 2) Itch after touching the water 3) Clogging of fishing net with algae 4) Additional cost for water treatment 5) Decrease in the fish catches of fish ----- *Headache and stomachache are not reported. But It is possible that local people did not recognize their sickness coming from the algal bloom.
Dunga BMU	1991	They never used to see the algae when they were young (one interviewee is 29 years old and another is 52 years old). The problem of the bloom started 20 years ago.	1) Itch after touching the water 2) Stomachache with diarrhea after drinking the water. 3) Health problem of animal(cow, goat) (They get diarrhea after drinking the water. They have throat problem which make their ingestion difficult.) 4) Clogging of fishing net with algae 5) Additional cost for water treatment (People use the tap water) 6) Decrease in the fish catches of fish (especially omena, Nile perch and Tilapia).
Mitimbili BMU	2006	The algae bloom was found since 7 years ago. And, we found the water bloom, which covered all surface of water, since 5 years ago. The serious and continuous bloom started 5 years ago.	1) Bad smell 2) Itch after touching the water 3) Clogging of fishing net with algae 4) Decrease in the fish catches of fish
Ngengu BMU	2001	Water bloom started since around 10 years ago. Now they have a bloom almost every day.	1) Itch after touching the water 2) Clogging of fishing net with algae and break of fishing gear 3) Additional cost for water treatment (walking 5 kilometers and dosing chemicals like Waterguard for water treatment) 4) Animals will not access it for drinking water that contaminated by bloom (When the bloom is there, the animal used to take the water very little. So they know the animals feel something bad from the bloom.). 5) Break of water pump for plant in farmland

表(1)-10 (続き) : ビクトリア湖沿岸の7漁村 (BMU) におけるアオコによる被害と湖面を覆うアオコが現われはじめた時期

Name of site	When the algal bloom started to occur?		Concrete problems with the algal bloom
Koginga BMU	1997	In 1997, algal bloom in this area started in same time of water hyacinth. Algal bloom is increasing gradually.	1) Itch after touching the water 2) Rash (eruption) on the skin after drinking the water every day. 3) Health problem of animal (cow) (It get sick gradually after drinking the affected water. It have diarrhea and wamble They have throat problem which make their ingestion difficult.) 4) Additional cost to look for domestic water 5) Decrease in the fish catches of fish (especially omena, Nile perch and Tilapia).
Mbita Town BMU	2006	Water bloom started since around 5 years ago(2006). It is expanding since 5 years ago. It become more serious problem until now.	1) Bad smell 2) Itch after touching the water 3) Waterborne diseases (like diarrhea) after drinking the water 4) Degradation of water quality ----- * They don't find animal's disease by the water bloom because it occurs recently. There may be a sickness of animals affected by the long-term effect of the algal bloom.
Nyagina BMU	2008	Algae used to be here. But, the water bloom started since around 3 years ago. The problem of it is increasing.	1) Bad smell (even after they treated the water) 2) Itch after touching the water 3) Diarrhea after drinking the water 4) Green color stain on the cloth after washing 5) Massive death of fish. Unusual behavior of fish (When there is the bloom, they can get more Tilapia than usual catch. But they cannot get less fish of other species) ----- * They don't find animals (cow and goat) which are reluctant to drink the water with the algal bloom. They cannot find the affection to the animals by drinking the water with algae.

の閉鎖のような取水障害は被っていないが、水質管理のための費用を追加的に負担していた。また、リゾート施設 (2004年設立) ではアオコ発生時には景観が損なわれ、遊泳できないという被害が見られた。

表(1)-11では、漁村 (BMU) ・湖岸企業によって挙げられたアオコ対策を列挙した。漁村部では、アオコを含む水の使用禁止を徹底したり、あるいは、別水源の利用や処理剤の投与がおこなわれていた。なお、表にある「Waterguard」とは、地元の水処理剤 (次亜塩素酸ナトリウム) のブランド名である。Waterguardは、アメリカCDCやケニアのNGOなどによる安全な水の確保のための支援事業の一環として、2003年からケニア国内で生産されてきた。ちなみに、アオコ対策に関して、漁村やBMUに対する政府やNGOによる支援は見られなかった。ただし、1箇所 (Nyagina) の漁村ではアオコ



図(1)-28：ビクトリア湖・ウィナム湾周辺での漁村（BMU）におけるアオコ発生時期。

問題に対する支援ではないが、感染症削減のための支援事業がNGOによっておこなわれていた。

なお、表には示していないが、流域上流部の工場では、環境負荷削減を目的として、原料生産農地での施肥方法改善・土壌流出防止の取組が見られた。これらは流域スケールで考えるとビクトリア湖の環境保全に資する活動と考えられる。

アオコ以外の環境問題について把握しておくことは、漁村や農村におけるアオコ対策の優先度を理解するための背景情報として必要である。この点に関する質問への回答結果を表(1)-12に整理した。調査対象地域では、アオコ以外の環境問題として、1) ホテイアオイの繁茂、2) 腸チフス・アメーバ症・住血吸虫・マラリアの感染、3) 工業廃水による生活用水の汚染、4) 除草剤など農薬による土壌劣化・土壌流出、5) 森林における固有種減少と外来種拡大、という5項目が指摘された。漁村地域や湖畔の企業から共通して指摘された環境問題は、ホテイアオイの繁茂であった。また、漁村（BMU）のヒアリングでは、腸チフス・アメーバ症・住血吸虫・マラリアの感染症問題が複数地域で指摘されていた。ホテイアオイの繁茂は、近年のビクトリア湖で大きな環境問題となってきた。聞き取り調査では、ホテイアオイによる被害として、1) 航路閉鎖など交通の妨げ、2) 漁網や漁具（漂流ホテイアオイによるomena用漁具の押し流し）の破損、3) 蚊・ヘビの侵入、4) 取水障害、5) 水質悪化といった項目が湖畔漁村や利水企業によって指摘された。

アオコとホテイアオイの問題について、どちらが生活に対する影響が大きいのか。湖畔地域の情報提供者の回答結果では、アオコの影響がより大きいとする回答が若干多く見られた。その理由として挙げられたのは、①湖水の飲用にとまなう下痢などの健康被害、②漁獲減少（対してホテイアオイは小魚を伴う）、③アオコが覆う範囲の大きさ（対してホテイアオイは湖面を部分的に被覆するのみ）であった。他方で、ホテイアオイの影響がより大きいとする回答も見られてお

表(1)-11：漁村（BMU）および湖岸企業におけるアオコ対策

site	対策
Kichinjio BMU	生活用水を処理
Dunga BMU	代替水源の使用とそのための啓発
Mitimbili BMU	薬剤（Waterguard）による処理
Ngengu BMU	ろ過・Waterguard での処理
Koginga BMU	薬剤（Waterguard）の処理を周知。家庭では処理
Mbita Town BMU	煮沸消毒と薬剤（Waterguard）による処理
Nyagina BMU	薬剤処理の前にはろ過を追加
リゾート（Kiboko bay）	アオコ発生時には、利用客に遊泳しないよう勧める。どうしても泳ぎたい場合には、沖で泳ぐことを勧める。
飲料メーカー（Equator bottlers）	アオコへの対策として、1次処理工程に対して新しい処理プロセス（Flocculator, Tube settler, Sludge press）を設置した。そして、この新しい装置を稼動するための電力を追加した。
浄水施設（Dunga treatment plant）	湖でアオコが発生している時の水処理では、通常期と異なり凝集剤や塩素が多く必要となる。さらに、塩素添加量を増量することに対する対策もおこなわなければならない。そして、水処理における水質検査の回数も増やさなければならない。なお、水質検査では物理化学的成分や大腸菌といった項目はあるが、わたしたちに測定能力がないため、アオコ毒は検査していない。

り、その場合の理由としては、①ホテイアオイによる交通や漁業への妨げ（アオコに比べて移動が困難）が指摘された。

流域上流部の農村では、アオコをはじめとするビクトリア湖の富栄養化にともなう直接的被害は指摘されなかった。その代わりに、身近で切実な環境問題として、工業廃水による飲用水汚染・土壌流出・森林植生変化が挙げられた。

アオコなどのビクトリア湖（特にウィナム湾）の環境問題に対しては、さまざまな立場の人間が意見を持っている。ウィナム湾内の水質悪化の原因としては、Mbita道路（Causeway）の建設、生活排水・工場廃水の流入、土壌流出、河岸森林の伐採、などが挙げられている。ちなみに、Mbita道路とは、ウィナム湾にあるRusinga島と対岸の町Mbitaを接続するため、1980年代半ばに建設された道路であり、本来開いていた水路を埋め立てたために、水流が阻害されたとする説があり、ウィナム湾内の水質悪化の要因と考えられている。これらの要因を取り除くことに加えて、工場廃水に関する情報の公開、アオコに関する知識啓発、研究の推進も必要な事項として指摘されている。そして、個々のステークホルダーが個別に行動をおこすのではなく、ビクトリア湖沿岸や流域の利害関係者が協働して、継続的に取り組む必要性が指摘された。

表(1)-12：漁村（BMU）・農場・浄水場におけるアオコ以外の環境問題

name of site	opinion
Kichinjio BMU	<p>ひとつの漁村が何の支援もない状態で対処できる問題ではない。多くの関係者がひとつになって問題に立ち向かう必要がある。</p> <p>ホテイアオイについて述べる。わたしたちは素人だが、ホテイアオイは十分に調整しながら手作業によって除去する方法が最善ではないかと思う。持続的に起きている問題なので、ナイロビに居ては事情を掴めない。彼らは、お金がなくなれば居なくなる。ナイロビのオフィスではなく、現場のコミュニティメンバーが携わるべきだ。そういう意味で、LVEMP I（ビクトリア湖環境マネジメント・プログラム I）や LVEMP II は失敗だったと思う。ホテイアオイを利用する Kisumu 近郊の NGO はまずまず成功しているようだ。しかし、除去への効果はまだまだ部分的で少ない。</p>
Dunga BMU	<p>問題の解決に向けては、第 1 に、政府がビクトリア湖周辺で暮らす人々を支援すべきだ。そして、第 2 に、水質を 20 年以上前の状態まで戻すことが必要だ。そのためには、産業排水の流入や河岸の森林伐採にとまらぬ湖への土壌流出の問題を解決すべきだ。</p> <p>ホテイアオイについて言えば、われわれ自身でマニュアル・手作業で除去する方法がよい。</p>
Mitimbili BMU	<p>ビクトリア湖のアオコをはじめとする環境問題の解決に向けた意見は次のとおりだ。第 1 は、流域からの土砂流入が問題だ。土砂が流入するほど、湖は浅くなってしまふ。この問題の対策のためには、湖畔の植生保全が重要であるだろう。第 2 は、Mbita 道路（1980 年台に建設）だ。これは Rusinga 島と Mbita の間にあった水路をふさいでしまっているのので、Winum 湾とビクトリア湖の間を行き来する水流を遮断している。道路を橋に作り変えるべきだろう。第 3 の問題は、湖畔の漁師が多すぎることだ。漁師は乱獲をするし、さらに湖への汚濁の流入にも貢献している。数を調整する必要がある。</p>
Ngengu BMU	<p>機械で物理的にホテイアオイ・アオコを除去する方法を開発すべきだ（アオコ除去フィルターなど）。また、水域の生物に害がないような化学物質や昆虫であれば、アオコ除去のために利用できるだろう。そして、Homabay の下水処理場の位置を変えて、システムを改善すべきだ。</p> <p>アオコは人間や家畜の健康に影響しており、人間や家畜への健康被害に対処するコストを支払っている。持続的な状況が望ましいので、この問題に関する研究を深化させる必要がある。</p>
Koginga BMU	<p>アオコの源がどこなのかわからないでいる。解決のためには、すべて湖から除去する必要がある。もし化学的薬品が有効であれば、使用することも考えられるが、魚たちの生態への影響が心配だ。</p>
Mbita Town BMU	<p>はじめに、このアオコがどこから供給されているのか知る必要がある。それがわからなければ、問題に取り組むことができない。</p> <p>Mbita 道路は 1980 年代の中頃に作られた。かつては水路があって、大変強い流れがあった。仮に、政府が Mbita 道路を取り除き、再び水路を作るのであれば、わたしたちは賛成するだろう。</p>

表(1)-12 (続き) : 漁村 (BMU) ・農場・浄水場におけるアオコ以外の環境問題

name of site	opinion
Nyagina BMU	アオコについてその生態や要因について知識を得る必要がある。そして、政府がアオコを制御する技術を開発して提供するべきだ。 1984年に建設された Mbita 道路が水路を塞いだ後に、アオコ現象は起きている。とても深くて (50m) 早い流れがあったチャンネルであり、わたしたちは多くの死を目撃してきた。道路を取り除くことについては賛同できないが、もし橋を渡すのであれば良いだろう。

アオコによる被害をこうむる企業

name of site	opinion
リゾート (Kiboko bay)	Mbita causeway のためにウィナム湾の汚染が進んだと推測している。次の世代の子どもたちのためにわたしたちはアクションをおこすべきだ。たとえば、ホテルアオイは利用価値があるのではないだろうか。わたしたちが怠け者なのか、それを利用してやろうという者が現れない。もっと多くの者がホテルなどこの産業に参入して、地域を豊かにできると思う。なぜ、皆がそれをしないのか不思議だ。
飲料メーカー (Equator bottlers)	アオコ問題について関心のある人々の存在に互いに気付いている。わたしたちは別々に取り組むのではなく、共同で戦う必要があるだろう。利害関係者が集い、この問題について一緒に考える必要がある。
浄水場 (Treatment plant, Kiwasco)	アオコをはじめとする湖の環境汚染に対しては、継続的な取り組みが必要だ。多くの利害関係者たちによる取り組みが必要であるだろう。そして、実態を知ることが重要である。誰もが湖の環境問題に対する“貢献者 (contributor)”である。

3) アオコに関する科学的知識啓発の小冊子作成

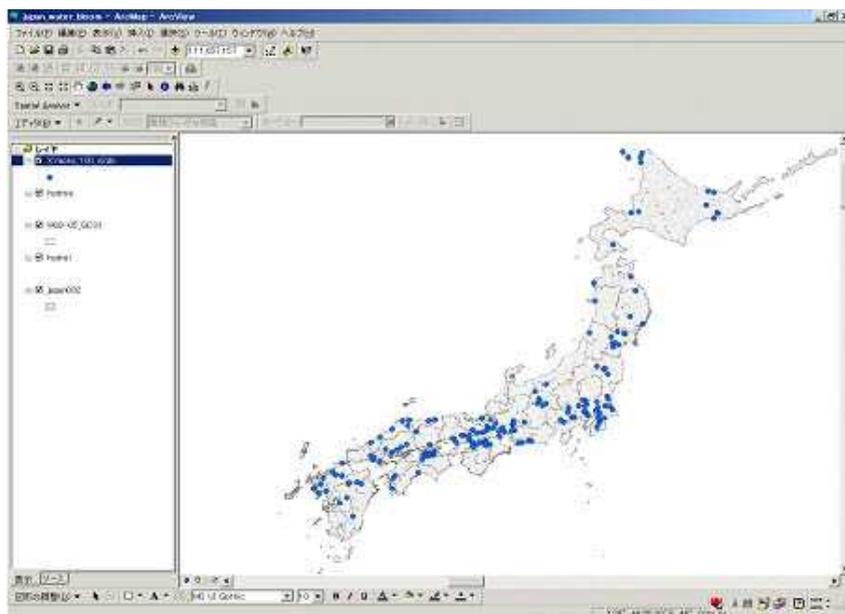
「アオコってなにーラン藻の大発生についてもっと知るために」を作成し、PDFファイルの形式でインターネット上の入手可能な環境に公開した (図(1)-29)。

4) アオコ発生GISデータ (Cyanomap Japan) の作成

ラン藻やアオコが発生した水域として、国内188箇所の湖沼等を抽出して、その名称・位置情報・情報源情報等を整理した。作成した表形式データ (cyanomapjapan.xls) とGISポイントデータ (シェープファイル、cyanomapjapan.shp) を、インターネット上の閲覧できる環境に公開した (図(1)-30)。



図(1)-29：アオコに関する小冊子（全8頁）の1～2頁目



図(1)-30：ラン藻・アオコ発生地点のGISデータ（cyanomajapan.shp）の表示例

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

21世紀に入り、*Microcystis*属の多くの種が*M. aeruginosa*に一括されたが、*M. aeruginosa*には複数の遺伝子型が有ると指摘され、現在は、*M. aeruginosa*遺伝子型の系統地理分布の解明が国内外で進

められている。わが国においては、主として関東・利根川水系において*M. aeruginosa*遺伝子型の系統地理分布が報告されているが、その他の地域については未だに何も情報が無いだけでなく、関西以西については遺伝子型どころか単離株すらほとんど得られていなかった。本研究によって、関西以西のアオコ単離株が得られただけでなく、それらの遺伝子型や毒性をも明らかにし、これまでわが国で知られていなかった*M. aeruginosa*の新たな系統地理分布を知ることができた。

さらに、我が国では、アオコが生産する毒素としてミクロキスティンとアナトキシンaが報告されているが、前者の毒素を生産するラン藻類の検出には定量PCRマーカーが開発されている（先行研究および本研究D-0905の福井県立大学チームによる）のに対し、後者については定量PCRマーカーが存在しなかった。本研究により、アナトキシンa生産性のラン藻類を検出可能な定量PCRマーカーが開発され、ミクロキスティンだけでなくアナトキシンaについても、有害ラン藻類の分布や拡散の詳細検討が可能となった。この成果は、国内外の有害藻類研究に、大変重要な研究材料と知見を提供した。

本研究では、水鳥が多く飛来する湖沼ほどアオコが発生している傾向を見出しただけでなく、水鳥が外部散布や内部散布によってアオコを輸送・散布している科学的証拠を得た。驚くべきことに、本来*M. aeruginosa*が生存できない海域・干潟を利用する鳥類の糞からも*M. aeruginosa*遺伝子が検出されたことは、本研究により世界で初めて発見された事実である。今後、アオコの鳥類による輸送を検討する際には、たとえ短時間でも淡水域を利用する渡り鳥まで検討対象としなければならない。さらに、マガモにアオコを飲み込ませた実験では、少なくとも4時間以内に糞として排出された*M. aeruginosa*は増殖能力を保有していることが明らかになった。マガモの飛行スピードは60-80km/h程であり、連続して飛行すると4時間では300km前後の移動が可能である。すなわち、マガモの移動は、少なくとも半径300km圏内での*M. aeruginosa*の輸送・散布に寄与していることが明らかとなった。水鳥が一度飲み込んだアオコを、どの程度の距離まで輸送し得るのか、科学的なデータを出したのは、本研究しかない。日本に飛来するマガモは、主に中国北部やロシア極東部、北部日本で繁殖し、途中2~3カ所の中継地に滞在しながら、日本や中国南部などへ渡って越冬する。日本では冬期に200万羽前後の水鳥が記録されており、水鳥はフライウェイ（渡り鳥の移動経路）内での移動を繰り返しながら、頻繁に*M. aeruginosa*の散布を行っていると考えられる。カモ類の越冬期のねぐらから採食場所までの距離は最長約50kmで、渡りの時期以外でも水鳥は地域の閉鎖水系間の*M. aeruginosa*の移動分散に寄与していると考えられる。渡り鳥の移動経路や生態についてこれまで得られていた情報を基に、本研究で得られた最新の情報と合わせて、水鳥によるアオコの輸送・散布について具体的数値と共に解明した点で、本研究には貴重な成果があった。

本研究で開発したDCMU蛍光法は、従来望まれていたアオコ予報の実現に大きく近づくものである。注目すべきは、本方法は従来の方法とは異なり、汎用性が広く比較的安価な蛍光光度計を用いて行うことができるため、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。これにより、リアルタイムのアオコ生理活性状態を、国内外の広範囲に渡って収集可能となるであろう。また、本研究では、*M. aeruginosa*の増殖に適適養塩類条件を絞り込んだ（溶存態の窒素：リンの比が、19から80）。特に、水域への窒素負荷が*M. aeruginosa*の増殖に重要であることを発見できたことは、先のDCMU蛍光法と合わせ、アオコ発生の危険性の高い水域特定に役立つものと期待される。

*M. aeruginosa*のブルームの研究には、従来、フラスコ等のガラス器具を適当な培養器に入れて実

験を行うマイクロコスム（定義上は、容量が1 m³以下の実験系であるが、多くは数百mlから数liter程度の実験系）を用いた実験がほとんどである。しかし、湖沼で起こっている現象を検証するためには、少なくともメソコスム（1~1000 m³）の規模を有しかつ野外における系を用いた、より自然条件を反映した実験を行う必要がある。残念ながら、従来、野外メソコスムを用いた実験では、元々*M. aeruginosa*のブルームが発生していないメソコスム中で人為的にブルームを発生させることは極めて難しく、成功例が無い。本研究では、野外メソコスムで人為的にアオコを発生させるノウハウを蓄積できたことが大変重要で、このノウハウは今後世界中で行われるであろう野外メソコスムを用いたアオコ研究において手本となるであろう。

本研究では、アオコ発生水域に特有の細菌群集組成が成立することが明らかとなった。この結果は、逆を言えば、*M. aeruginosa*ブルームが起こりにくい細菌群集組成の存在を示唆している。これに加えて、*M. aeruginosa*のブルームの初期段階にアオコを専門に摂食する *Penardochlamys* 属様のアメーバの増殖が確認されたことも、*M. aeruginosa*の増殖を抑制する微生物の存在を示している。さらに本研究では、鞭毛虫 *Collodictyon triciliatum* による *M. aeruginosa*の摂食を検討した結果、この鞭毛虫が *M. aeruginosa* 現存量の最大 20%を一日に摂食している可能性を突き止めた。現場水域の二割程度を消滅させるほどの摂食圧は、従来の報告と比べてかなり高く、本鞭毛虫がアオコの消滅に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。以上の結果は、アオコの発生を阻む生態系・食物網構造の存在を示唆している。

社会科学調査からは、日本国内（琵琶湖周辺、および利根川水系）において、導水開発等の人間による水利用の拡大がアオコの分布を広げている事実が明らかとなった。この結果は、先の水鳥によるアオコの輸送・散布とともに、アオコの分布拡大を促進しているものとして注目される。さらに、東南アジアやアフリカ・ケニアにおける調査では、アオコによる住民の健康被害（悪臭・頭痛、かゆみ、腹痛・下痢）、飲料水確保の新たなコスト（水処理、遠隔地での水汲み、水道料金）、そして、家畜（牛・ヤギ）のアオコ摂取による健康被害や水摂取忌避、水産業での被害（漁獲減少、漁具の破損）が解明された。これらにも関わらず、アオコとは何か？についてや、アオコの有害性について、住民はほとんどそれらについての情報をもたされていないことも明らかとなった。これらに対して、オーストラリアでは、アオコ発生状況やアオコの有害さについて、研究者・行政のみならず、一般市民にも広く情報が共有されていた。アオコによるリスクの軽減のためには、研究者・行政・地域社会によるアオコ関連情報の継続的共有が必須である。

（２）環境政策への貢献

本研究では、水鳥を介した周辺水系（場合によっては、半径300キロ以内）へアオコ原因ラン藻類の移動分散が起こっていること、および水資源開発等の人間による水利用拡大が、アオコを広範囲に分布拡大させている事実が判明した。すなわち、本研究の成果は、アオコの「種（タネ）」がどこに蒔かれているかを知る手がかりを提供している。

本研究で開発したDCMU蛍光法は、汎用性が広く比較的安価な蛍光光度計を用いてアオコ発生の早期予報を行うものであるため、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。この成果は、早くも注目され、具体的には財団法人・ダム水源地環境整備センター(WEC)からの問い合わせと訪問依頼が有り、2012年5月9日、午後1時半より、WECの関係者が京都大学生態学研究センターを訪問し、D-0905の代表者（中野）とWECの研究第二部・部長が、今後のより良いダム

貯水池の水質管理について議論を行った。

本研究で得られた成果を体系的に運用できれば、アオコのリスクをより経済的に効率的に確度高く回避可能かもしれない。すなわち、水鳥渡来情報（日本野鳥の会やバードウォッチャーからの情報を利用）、人間による水資源利用の情報（各自治体管理情報や水利用組合管理の情報を利用）、各水域への窒素負荷状況の情報（各自治体管理情報）を合わせれば、アオコが発生しそうな水域を特定できる。さらに、それら水域について、顕微鏡観察やアオコのDNAを用いた検出によりアオコの「種（タネ）」の存否を確認し、存在が確認されれば定期的（毎週一回か二週間に一回）にDCMU蛍光法を用いてアオコの生理状態を調べる。ここまでの作業は、大学に限らず、日本各地や諸外国の試験研究機関の多くで実施が可能である。さらに、DCMU蛍光法を行いながら、アオコ遺伝子型ごとの検出や、ミクロキスティンあるいはアナトキシンaの生産遺伝子の定量PCRマーカーの利用により、有害ラン藻類の検出も同時に行うことができれば、有毒アオコの発生を早期予報できる。このように、本D-0905の成果を体系的運用することにより、多数ある湖沼からアオコ発生可能性湖沼のみを抽出し、抽出された湖沼に対して有害アオコの存在とその増殖可能性を早期に知ることができる。

小さい池程度のアオコは、既存の民間企業の技術等を用いて除去できるかもしれない。しかし、ダム貯水池や比較的大きな湖沼に発生したアオコは、発生を阻止することは大変困難である。アオコのリスクを回避するためには、行政や水資源管理者および研究者による努力だけではなく、地域社会と一体となった取り組みが必要である。このためには、アオコに対する社会的関心を醸成し、アオコ監視・対策への市民参加を促進することが重要である。本研究では、アオコに関する一般市民の関心の喚起を知識の啓発のために、インターネット上で無料でPDFダウンロードできる資料「アオコってなにーラン藻の大発生についてもっと知るために」を作成した。さらに、ラン藻やアオコが発生した国内水域188箇所の湖沼等を抽出し、その名称・位置情報・情報源情報等をGIS整理したCyanomap Japanをインターネット上に公開することにより、対象内湖の流出入経路などの周辺環境情報を当該URLから自由に得られるようにした。以上により、アオコ情報を研究者・行政・地域社会で広く共有できる体制、水域の環境ガバナンスによるアオコ対策を整える基盤整備を行った。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Y. HODOKI, K. OHBAYASHI, K. KOBAYASHI, N. OKUDA and S. NAKANO: J. Plankton Res., 33, 1410-1416 (2011)

“Temporal variation in cyanobacteria species composition and photosynthetic activity in experimentally induced blooms. Journal of Plankton Research”.

- 2) S. MIZUTA, H. IMAI, K.-H. CHANG, H. DOI, Y. NISHIBE and S. NAKANO: Limnology, 12, 1,

i12: 205-211 (2011)

“Grazing on *Microcystis* (Cyanophyceae) by testate amoebae with special reference to cyanobacterial abundance and physiological state”

3) Y. HODOKI, K. OHBAYASHI, K. KOBAYASHI, N. OKUDA and S. NAKANO: Harmful Algae, (2012)

“Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria: Ubiquitous distribution of *Microcystis aeruginosa* and *Cuspidothrix issatschenkoi* in Japanese lakes (doi:10.1016/j.hal.2012.01.003)”

<その他誌上発表（査読なし）>

1) 田中拓弥、谷内茂雄：淡水生態学のフロンティア（吉田丈人、鏡味麻衣子、加藤元海編）、共立出版、220-223（2012）

「20章 人間社会と淡水生態系—その望ましい関係の構築に向けて」

2) 田中拓弥：総合地球環境学研究所報 地球研ニュース、12（2011）

「地域と地球を結ぶ『ことば』」

3) 中野伸一、田中拓弥：陸水学雑誌、73巻2号、31-33（2012、印刷中）

「ケニア海洋水産研究所・キスム研究ステーションを利用したビクトリア湖調査について」

4) 中野伸一、田辺雄彦：陸水学雑誌、73巻2号、（2012、印刷中）

「公開シンポジウム報告：アオコ研究最前線の多様性」

(2) 口頭発表（学会等）

1) 中野伸一、奥田昇、天野一葉、大林夏湖、小林由紀、田中拓弥、程木義邦、渡邊信、田辺雄彦、近藤竜二、廣石伸互、高尾祥丈、片岡剛文：日本生態学会第57回大会（2010）

「アオコの分布拡大に関する生態・分子系統地理学的研究」

2) 程木義邦、天野一葉、大林夏湖、小林由紀、田中拓弥、奥田昇、中野伸一：日本生態学会第57回大会（2010年）

「野外で人為的に発生させたアオコの環境応答」

3) 田中拓弥、中野伸一：日本水環境学会第44回大会（2010年）

「琵琶湖周辺23内湖の周辺環境に見られた人為的改変」

4) 小林由紀、程木義邦、大林夏湖、奥田昇、中野伸一：日本陸水学会第75回大会(2010)

「野外実験池における人為的誘発アオコの消長にともなう微生物群集組成の変化」

5) 程木義邦、天野一葉、大林夏湖、小林由紀、田中拓弥、奥田昇、中野伸一：日本陸水学会第75回大会(2010)

「野外で人為的に発生させたアオコの遺伝的多様性と環境応答」

6) 大林夏湖、程木義邦、小林由紀、奥田昇、中野伸一：日本陸水学会第75回大会(2010)

「西日本湖沼におけるミクロキスティス属の遺伝的多様性」

7) 天野一葉、須川恒、片岡宣彦、吉岡美佐子、程木義邦、大林夏湖、中野伸一：日本鳥学会2010年度大会（2010）

- 「水鳥からのアオコ原因藍藻類*Microcystis aeruginosa*の検出」
- 8) Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, N. Okuda and S. Nakano: 31st Congress of International Society of Limnology (2010)
“Genotypic succession and early detection of artificial *Microcystis* bloom occurred in outdoor experimental ponds”
 - 9) K. Ohbayashi, Y. Hodoki, Y. Kobayashi, S. Nakano: 13th International Symposium of Microbial Ecology (2010)
“Genetic diversity of the *Microcystis aeruginosa* bloomed in experimental ponds using 16S to 23S rDNA internal transcribed spacer region”
 - 10) T. Kataoka, R. Kondo, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, and S. Nakano: 13th International symposium on Microbial Ecology (2010)
“PCR primers for separate detection of intra-specific group variations in a bloom-forming Cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*”
 - 11) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, S. Nakano: 13th International symposium on Microbial Ecology (2010)
“Variations in microbial abundance and community structure during *Microcystis* bloom in an experimental pond”
 - 12) S. Nakano: 2010 Fall Semester “Wednesday Talks on Life Science”, Dept. of Life Science, Hanyang University, Korea, 2010 (招待講演)
“Ecophysiology, phylogeography and environmental sociology on water blooms of the globally distributed cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
 - 13) S. Nakano: Special seminar, Kyung-Hee University, Korea, 2010 (招待講演)
“Ecophysiology, phylogeography and environmental sociology on water blooms of the globally distributed cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
 - 14) Y. Hodoki, K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, N. Okuda and S. Nakano: 4th EAFES Congress (2010)
“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* blooms in experimental ponds”
 - 15) S. Nakano, Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi and N. Okuda: 4th EAFES Congress (2010)
“Grazing on *Microcystis* with special reference to protistan ecology”
 - 16) 大林夏湖, 程木義邦, 小林由紀, 奥田昇, 中野伸一: 日本生態学会第58回大会(2011)
「有害藻類*Microcystis*属のブルーム形成と遺伝的多様性」
 - 17) Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, N. Okuda and S. Nakano: International symposium on *Microcystis* studies from Asia (2011)
“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* bloom occurred in experimental ponds”
 - 18) S. Nakano, H. Amano, Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, T. Tanaka, N. Okuda:
International symposium on *Microcystis* studies from Asia (2011)
“Ecophysiology, phylogeography and environmental sociology on water blooms of the globally distributed cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
 - 19) Y. Hodoki, Y. Kobayashi, K. Ohbayashi, N. Okuda and S. Nakano: International Symposium on *Microcystis* Studies from Asia (2011)

“Genotypic diversity of artificial *Microcystis* bloom occurred in experimental ponds”

- 20) 天野一葉, 須川恒, 片岡宣彦, 吉岡美佐子, 茂田 良光, 程木義邦, 大林夏湖, 中野伸一 :
日本鳥学会2011年度大会(2011)
「多様な水鳥の糞からのアオコ原因藍藻類*Microcystis aeruginosa*の検出」
- 21) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, H. Amano, T. Tanaka, N. Okuda, S. Nakano : 12th
Symposium on Aquatic Microbial Ecology (2011)
“Grazing on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in an experimental pond”
- 22) 中野伸一、奥田昇、天野一葉、大林夏湖、小林由紀、田中拓弥、程木義邦、近藤竜二、廣石伸互、高尾祥丈、片岡剛文、本間隆満 : 日本陸水学会第76回大会 (2011)
「アオコの分布拡大に関する分子生態学・環境誌的研究」
- 23) 片岡剛文、本間隆満、中野伸一、近藤竜二 : 日本陸水学会第76回大会 (2011)
「アオコ原因藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) の遺伝子型に基づく分子識別と定量PCRを用いた細胞密度の推定」
- 24) 本間隆満、片岡剛文、中野伸一、近藤竜二 : 日本陸水学会第76回大会 (2011)
「*Microcystis*属における遺伝子グループ組成に及ぼす栄養塩濃度の影響」
- 25) 程木義邦、大林夏湖、小林由紀、奥田昇、中野伸一 : 日本陸水学会第76回大会 (2011)
「西日本における有毒ラン藻類の分布」
- 26) 程木義邦、大林夏湖、小林由紀、奥田昇、中野伸一 : 日本陸水学会第76回大会 (2011)
「蛍光法によるラン藻類の現存量と光合成活性の評価」
- 27) 小林由紀、程木義邦、大林夏湖、天野一葉、田中拓弥、奥田昇、中野伸一 : 第27回日本微生物生態学会 (2011)
「従属栄養鞭毛虫 *Collodictyon triciliatum* の*Microcystis aeruginosa* に対する摂食圧」
- 28) 片岡剛文、本間隆満、中野伸一、近藤竜二 : 第27回日本微生物生態学会大会 (2011)
「遺伝子型の異なるアオコ原因藍藻 (*Microcystis aeruginosa*) の栄養塩濃度に対する増殖応答」
- 29) H. Amano, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, S. Nakano: Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress (2012)
“Dispersal of blue-green algae by waterbirds: Retention time of *Microcystis aeruginosa* in the digestive tract of ducks and its growth ability afterwards”
- 30) Y. Kobayashi, Y. Hodoki, K. Ohbayashi, H. Amano, T. Tanaka, N. Okuda, S. Nakano: Joint meeting of the 59th annual meeting of ESJ and the 5th EAFES international congress (2012)
“Grazing on the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in experimental pond”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) アオコの生態・生理・分子系統地理学的研究の現状（2009年11月14日、京大大学生態学研究センター、参加者33名）
- 2) CER Mini-workshop on *Microcystis* bloom studies（2010年2月25日、京大大学生態学研究センター、参加者14名）
- 3) "Recent progress in researches on ecology, physiology and phylogeny of *Microcystis aeruginosa*", chaired by Shin-ichi Nakano, Renhui Li and Soon-Jin Hwang, the 4th EAFES International Congress（2010年9月14日、Kyungpook National University、参加者29名）
- 4) "CER International workshop for New Frontier of Microbial Ecology", chaired by Yoshitake Takao and Shin-ichi Nakano（2010年12月5日、京大大学生態学研究センター、参加者27名）
- 5) アオコ研究最前線の多様性（2011年9月24日、島根大学松江キャンパス教養棟2号館、観客72名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 京都大学総長と京大記者クラブとの定例懇談会に、生態学研究センターの代表的研究プロジェクトとして、F-093（平成22年度よりD-0905）が紹介された。
- 2) 日刊工業新聞、「アオコ増殖の条件解明」（2010年5月17日、全国版、7頁）。
- 3) 彦根東高校スーパーサイエンスハイスクール活動（8月20日、高校生（男子2名、女子9名）および教員（男性3名）に対し、アオコ問題の深刻さや研究者や行政の取り組みを説明し、D-0905の成果を紹介すると共に、顕微鏡によるアオコの観察や実験池の見学会を行った）

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 阿部泰隆、中村正久編. 1999. 湖の環境と法 —琵琶湖のほとりから. 信山社出版、東京
- 2) Ballot, A., J. Fastner, M. Lentz and C. Wiedner. 2010. First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56: 964-971.
- 3) Bellrose, F. C., R. C. Crompton 1981. Migration speeds of three waterfowl species. *The Wilson Bulletin* :121-124.
- 4) 琵琶湖干拓史編さん委員会編. 1970. 琵琶湖干拓史. 琵琶湖干拓史編纂事務局、近江八幡.
- 5) Davis, T., D. L. Berry, G. L. Boyer, and C. J. Gobler. 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8: 715-725.
- 6) Dolan, J. R., K. Šimek 1998. Ingestion and digestion of an autotrophic picoplankter, *Synechococcus*, by a heterotrophic nanoflagellate, *Bodo saltans*. *Limnol Oceanogr* 43:1740-1746.
- 7) Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker and J.S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acid Res.* 19: 4008.
- 8) Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19 : 11-15.

- 9) Drakara, S., Liess, A., 2010. Local factors control the community composition of cyanobacteria in lakes while heterotrophic bacteria follow a neutral model. *Freshwater Biol.* 55, 2447-2457.
- 10) Gugger, M., S. Lenoir, C. Berger, A. Ledreux, J. C. Druart, J. F. Humbert, C. Guette and C. Bernard. 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45: 919-928.
- 11) Hodoki, Y., K. Ohbayashi, Y. Kobayashi, N. Okuda and S.-I. Nakano. 2011. Temporal variation in cyanobacteria species composition and photosynthetic activity in experimentally induced blooms. *J Plankton Res* 33: 1410-1416.
- 12) Hodoki Y, Ohbayashi K, Kobayashi Y, Okuda N, Nakano S 2012. Simultaneous detection and identification of multiple toxic cyanobacteria: Ubiquitous distribution of potentially toxic *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon issatschenkoi* in Japanese lakes. *Harmful Algae* 16:49-57.
- 13) Holmes, R. M., A. Aminot, R. Kerouel, B. A. Hooker, B. J. Peterson 1999. A simple and precise method for measuring ammonium in marine and freshwater ecosystems. *Can J Fish Aquat Sci* 56:1801-1808.
- 14) Ichimura, T. 1979 2. Isolation and culture methods of algae. 2.5.B. Freshwater algae [2. Sôrui no bunri to baiyôhô. 2.5.B. Tansui sôrui]. In *Methods in Phycological Studies [Sôrui Kenkyûhô]*, Eds. by Nishizawa, K. & Chihara, M., Kyoritsu Shuppan, Tokyo, p. 294-305 (in Japanese without English title).
- 15) Izydorczyk, K., Carpentier, C., Mro'wczyn'ski, J., Wagenvoort, A., Jurczak, T., Tarczyn'ska, M. 2009. Establishment of an Alert Level Framework for cyanobacteria in drinking water resources by using the Algae Online Analyser for monitoring cyanobacterial chlorophyll a. *Wat Res* 43: 989-996.
- 16) Janse, I., M. Meima, W.E.A. Kardinaal and G. Zwart. 2003. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using r-RNA-Internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:6634-6643.
- 17) Jeong, H. J., J. Y. Park, J. H. Nho, M. O. Park, J. H. Ha, K. A. Seong, C. Jeng, C. N. Seong, K. Y. Lee, W. H. Yih 2005. Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat Microb Ecol* 41:131-143.
- 18) 環境省自然環境局生物多様性センター. 2009. 平成20年度重要生態系監視地域モニタリング推進事業（モニタリングサイト1000）シギ・チドリ類調査業務報告書. 環境省自然環境局生物多様性センター、富士吉田.
- 19) 環境省自然環境局野生生物課. 2009. ガンカモ類の生息調査. <http://www.biodic.go.jp/gankamo/seikabutu/index.html>
- 20) Kardinaal, W. E. A., I. Janse, M. K. Agterveld, M. Medima, J. Snoek, L. R. Mur, J. Huisman, G. Zwart, and P. M. Visser. 2007. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbial Ecology* 48: 1-12.
- 21) 近畿地方建設局琵琶湖工事事務所、水資源開発公団琵琶湖開発事業建設部編. 1993. 淡海よ永遠に —琵琶湖開発事業誌. 近畿地方建設局・水資源開発公団、大阪.
- 22) Legagneux, P., C. Blaize, F. Latraube, J. Gautier, V. Bretagnolle 2009. Variation in home-range size and movements of wintering dabbling ducks. *J Ornithol* 150:183-193.

- 23) Li, Z. W. D., T. Mundkur 2007. Numbers and Distribution of Waterbirds and Wetlands in the Asia-Pacific Region: Results of the Asian Waterbird Census: 2002-2004. Pp. 225. Wetlands International, Selangor, Malaysia.
- 24) Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *App. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- 25) Neilan, B. A., D. Jacobs, T. DelDot, L. L. Blackall, P. R. Hawkins, P. T. Cox, A. E. Goodman. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int J Syst Bacteriol* 47:693-697.
- 26) Neilan, B. A., J. L. Stuart, A. E. Goodman, P. T. Cox, P. R. Hawkins 1997. Specific amplification and restriction polymorphisms of the cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Syst Appl Microbiol* 20:612-621.
- 27) Nishibe, Y., Z. Kawabata, S. Nakano 2002. Grazing on *Microcystis aeruginosa* by the heterotrophic flagellate *Collodictyon triciliatum* in a hypertrophic pond. *Aquat Microb Ecol* 29:173-179.
- 28) 西野麻知子、浜端悦治編. 2005. 内湖からのメッセージ. サンライズ出版、彦根.
- 29) Parkhill, J. P., G. Maillet, and J. J. Cullen. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PS II as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology* 37: 517-529.
- 30) Pernthaler, A., J. Pernthaler, and R. Amann. 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094-3101.
- 31) Quinn, G.P., M.J. Keough. 2002. *Experimental Design and Data analysis for Biologists*. Cambridge University Press.
- 32) Rinta-Kanto, J, A. Ouellette, G. Boyer, M. Twiss, T. Bridgeman, S. Wilhelm 2005. Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-time PCR. *Environ Sci Technol* 39:4198-4205.
- 33) 佐野静代. 2008. 中近世の村落と水辺の環境史 —景観・生業・資源管理—. 吉川弘文館、東京.
- 34) Tanabe, Y., K. Kaya, and M. M. Watanabe 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J Mol Evol* 58:633-641.
- 35) Thompson, J.D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. Clustal-W – Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
- 36) Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J. A. M. Leunissen. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: W71-W74.
- 37) Urbach, E., D. L. Robertson, S. W. Chisholm 1992. Multiple evolutionary origins of prochlorophytes within the cyanobacterial radiation. *Nature* 355:267-270.
- 38) Watanabe, M. 1985. Phytoplankton studies of Lake Kasumigaura (2) On some rare or interesting algae. *Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo, Ser. B* 11, 137-142 (in Japanese with English abstract)
- 39) Watanabe, M.F., S. Tsujimura, S. Oishi, T. Niki and M. Namikoshi. 2003. Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa, Japan. *Phycologia* 42: 364-369.

- 40) Welshmeyer, N. A. 1994. Fluorometric Analysis of Chlorophyll a in the Presence of Chlorophyll b and Pheopigments. *Limnol Oceanogr* 39:1985-1992.
- 41) Wood, S.A., Rueckert, A., Cowan, D.A., Cary, S.C., 2008. Sources of edaphic cyanobacterial diversity in the Dry Valleys of Eastern Antarctica. *ISME J.* 2, 308–320.
- 42) Wood, S.A., Jentsch, K., Rueckert, A., Hamilton, D.P., Cary, S.C., 2009. Hindcasting cyanobacterial communities in Lake Okaro with germination experiments and genetic analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67, 252–260.
- 43) Yamaguchi, N., E. Hiraoka, M. Fujita, N. Hijikata, M. Ueta, K. Takagi, S. Konno, M. Okuyama, Y. Watanabe, Y. Osa, E. Morishita, K. Tokita, K. Umada, G. Fujita, H. Higuchi 2008. Spring migration routes of mallards (*Anas platyrhynchos*) that winter in Japan, determined from satellite telemetry. *Zool Sci* 25:875-881.
- 44) Yoshida, M., T. Yoshida, M. Satomi, Y. Takashima, N. Hosoda, and S. Hiroishi. 2008. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *Journal Applied Microbiology* 105: 407-415.
- 45) 財団法人山階鳥類研究所. 2002. 平成13年度環境省請負業務. 鳥類アトラス. 鳥類回収記録解析報告書 (1961–1995). 環境省自然環境局野生生物課・環境省自然環境局生物多様性センター、東京・富士吉田.

(2) 遺伝的多様性を指標としたアオコの分布拡散機構に関する研究

筑波大学大学院生命環境科学研究科

渡邊信

<研究協力者>

筑波大学大学院生命環境科学研究科

加藤将（平成22年度のみ）

筑波大学大学院生命環境科学研究科

中澤敦（平成23年度のみ）

平成21～23年度累計予算額：26,146千円

（うち、平成23年度予算額：8,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 本研究の目的は、国内外の湖沼からアオコ形成ラン藻*Microcystis aeruginosa*を大量に分離して遺伝子型分析を行い、各地の個体群間の遺伝子型の相違を指標にアオコの移動・分布拡散の実態解明のための生物地理学的考察を行うことである。H21-23年度の間、国内（霞ヶ浦、諏訪湖、石垣島等）及び東南アジア（タイ、ベトナム、ミャンマー）にてアオコを採集した。これら採取サンプルと譲渡により入手したアオコから素培養株を作成した後、*M. aeruginosa*の単離・培養・クローン（単藻）化作業を行い、計209のクローン株を確立した。これらの株に譲渡により取得した株を併せた計221株について、7つの遺伝子座塩基配列を用いてタイピング（MLST）を行った。その結果、124の遺伝子型が新規であったことから、*M. aeruginosa*が大きな遺伝的多様性を保有していることが示唆された。これら新規遺伝子型に既知遺伝子型を併せた計280の遺伝子型を用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。また、日本と東南アジアの*M. aeruginosa*の遺伝的差異が小さいことから、海を越えたアオコの移動分散があることが示唆された。また、MLST系統解析及びPCR検出実験によって、種内系統の1グループが霞ヶ浦水系（茨城県）で近年勢力を拡大した「適応系統」である可能性を見出した。アオコ毒素をつくる有毒株は種内の3グループに偏在したが、宍道湖で2010年にアオコ大発生を起こした*M. aeruginosa*がこれらに属さない新規遺伝子型であることを明らかにした。また、クローンライブラリー法とMLST解析を組み合わせることにより、アオコ内の*M. aeruginosa*の遺伝子型組成を簡便・高精度に推定できる方法を開発した。また、*Microcystis*を含むアオコ形成ラン藻の分類学的研究も行き、南方系*Microcystis*種が*M. aeruginosa*と遺伝的に大きな相違がないことを明らかにした。

[キーワード] アオコ、*Microcystis*、MLST、生物地理、アオコ毒素

1. はじめに

アオコとは富栄養化した湖沼・ため池・ダム等で見られるシアノバクテリア（ラン藻類）の大量発生現象である。アオコは、世界各地の富栄養化した湖沼に普遍的に見られ、景観を悪化させ、腐敗したアオコが悪臭を放ち、さらにはアオコが作る強い毒により海外では人間や家畜等の死亡

の被害をもたらしてきた。アオコの原因となるシアノバクテリアは*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nodularia*, *Planktothrix* など様々な属が知られているが、淡水域で最も発生例の多い種が *Microcystis aeruginosa* (ミクロシスティス・エルギノーザ) であり、その発生は日本のみならず世界各地で報告されている。アオコの発生は3つの大きな水環境問題を引き起こすことが知られている。一つ目はアオコ発生時、とくに後期に見られる腐敗に伴う悪臭であり、漁業等で湖沼で生産活動を行なう人のみならず、アオコ発生湖沼沿岸に居住している人にたいへんな被害をもたらす。二つ目の問題は発生したアオコの衰退期に湖底に沈降したアオコ死骸の分解に際してバクテリアが大量の酸素を消費するために起こる低層の酸素欠乏であり、これは湖沼生態系の破壊を引き起こす。三つ目の、そして最も深刻な問題はアオコによるアオコ毒素(シアノトキシン)の産生・放出である。様々なアオコ形成ラン藻が多様な神経毒・肝臓毒等を産生するが、本研究で対象とする*M. aeruginosa*は、急性肝炎を引き起こす肝臓毒であるミクロシスチンを生産することで悪名高く、実際に本種は世界各地で散発的に家畜・人の中毒事故を起こしている⁴⁾。最近では、ミクロシスチンが蓄積された貝を食べた希少絶滅危惧大型動物(ラッコ)が急性肝炎によって大量に死んで打ち上げられた例がアメリカ西海岸から報告されており⁹⁾、ミクロシスチンの食物連鎖による生物濃縮が引き起こす被害についても、今後被害実態を広く調査する必要性が指摘されている。

*M. aeruginosa*は遺伝子の均一性に基づき、バクテリア分類のルール(16S rDNAの配列の相同性が97%以上は同種と扱う)上、現在では一種に纏められているが¹⁵⁾、この種に属する各個体の特徴は決して均質ではなく、形態的・生理的にヴァリエーションに富んでいる。コロニーの形態が多様であることは古くから知られており、実際に最近まではコロニーの形態の違いに基づいて複数の種(*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*等)に分けられていた¹³⁻¹⁵⁾。*M. aeruginosa*には生理的な違いも幾つか知られている。毒性の違いはその代表例であり、*M. aeruginosa*の種内にミクロシスチン毒素をつくる個体(有毒)とつくらない個体(無毒)の双方が存在すること¹⁸⁾、さらに有毒の個体は毒性の異なる様々な種類のミクロシスチン誘導体をつくること¹⁸⁾、が知られている。これら以外にも光合成色素組成¹⁰⁾や塩分耐性^{13, 21)}にもヴァリエーションがあることも明らかになっている。これらの個体間の生理の違いは異なる生態系への適応、すなわち異なる環境変化への応答を可能にすると推察され、その結果、同じ*M. aeruginosa*がつくるアオコであっても、生理生態的特性やそれを特徴づける遺伝子型が発生する場所や時期、環境条件によって異なっていると予測される。実際、*M. aeruginosa*によるアオコは世界各地の湖沼で普通に見られるものの、場所や季節によって異なる特徴を持ったアオコが発生している。例えば、同じ*M. aeruginosa*がつくるアオコであっても無毒のアオコと有毒のアオコがあり、また有毒のアオコであっても毒性の弱いアオコと強いアオコがあり、さらには個体密度の低い「軽度のアオコ」もあれば、個体密度の高い「重度のアオコ」もある。

それぞれの湖沼におけるアオコの特徴の違いを生み出す一つの大きな原因として、何らかの運び手による湖沼間の「アオコの移動」が考えられる。例えば、最近建設されたダム湖などでは、本来その場にはいなかったはずの*M. aeruginosa*によるアオコの速やかな発生が見られるが、これはダムへの「アオコの移動」と移動先のダムでの「アオコの適応」の二つのファクターが揃う必要がある。このため、アオコの移動の動態を理解することは、アオコの発生を制御する上での第一課題である。アオコの移動分散の動態を理解するための研究手法として最も適当であるのは、各地のアオコの遺伝子型配列の違いを分析する生物地理学・集団遺伝学によるアプローチである。こ

の手法においては、湖沼から採取されたアオコ个体群の遺伝子変異を様々な地理スケールで比較し、その結果から「何がアオコを運ぶのか?」「アオコはどのぐらいの距離を移動するのか?」「運ばれたアオコの定着を決める因子は何か?」について考察を加えることができる。遺伝子型分析は同時にもう一つの重要なアオコ発生要因「アオコの適応」の研究のための土台を提供する。なぜなら、アオコを含むバクテリア一般においては、「特定の遺伝子型」には「特定の生理生態的特性」が付随する可能性が高いことが実証されているからである⁶⁾。

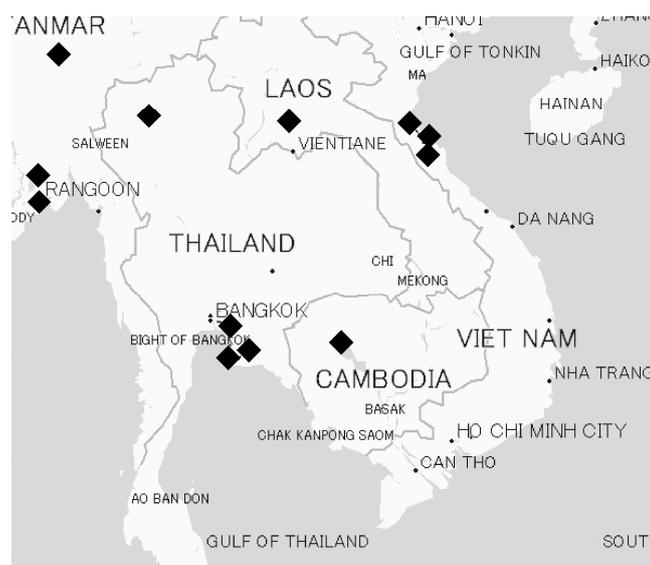
2. 研究開発目的

本研究の目的は、国内外の湖沼から*M. aeruginosa*を大量に分離して遺伝子型分析を行い、各地の个体群の遺伝子型やその組成の相違を指標にアオコの移動・分布拡散の実態解明のための生物地理学的考察を行うことである。この目的のため、日本国内及び東南アジアの湖沼をモデル地域として設定し、アオコ形成ラン藻*M. aeruginosa*を対象に遺伝子型分析・培養実験・アオコ毒素マイクロシスチンの化学分析等の手法を用い、*M. aeruginosa*の遺伝・生理生態・毒性の多様性を調べる。重点的に取り組むべき問題の具体例を以下に列挙する。1) 日本産と東南アジア産の*M. aeruginosa*は遺伝的に違うか? 2) *M. aeruginosa*の種内に地域固有系統群は存在するか? 3) 特定の遺伝子型を持つアオコの地理分布を生態系適応(環境応答)と関連付けて考察することが可能か? 4) アオコの遺伝子型の地理的な違いを簡単に分析できる方法を新たに開発できないか?

3. 研究開発方法

(1) *Microcystis aeruginosa*の採集と単離

本研究においては日本国内・東南アジアからアオコを大量に採集し、それらの遺伝子型を調べることによって、遺伝的変異の地理分布を調べてアオコの移動について考察を行う。この目的のため、国内のモデル湖沼として霞ヶ浦、諏訪湖、宍道湖を、外国のモデル地域としては東南アジア諸国(タイ、ベトナム、ミャンマー、カンボジア)を選択した。これら地域に実際に赴きアオ



図(2)-1: 東南アジア株の分離地(分離地点を菱形で示す)

コを採集した。東南アジアの採集地については図(2)-1に示す。一部のアオコサンプルは他の研究者からの譲渡によっても入手した。特に霞ヶ浦の土浦港については重点モデル地に選定し、2009年以降、アオコが見られる夏季は1週間毎、それ以外の季節では月毎のアオコを採集した。

アオコが見られた採取地では、アオコを直接（掬うことによって）採取したが、発生が見られない場所・時期においては、プランクトンネット（孔径41 μ m）によってアオコを濃縮採集した。これらの環境水サンプルから倒立顕微鏡下で*M. aeruginosa*のコロニーを選抜し、マイクロピペットを用いてコロニー単位で分離培養を行った。分離コロニーをMA液体培地⁵⁾の入ったマイクロプレートに移し、25°C、12:12時間の明暗周期で培養を行い、1.5ヶ月内に増殖が見られたコロニーを同培地10mLの入った試験管に移し、これらを素培養株として以降のクローン化作業に供した。また採取したアオコサンプルはPCRによるグループG検出及びクローンライブラリー解析にも用いた。

（2）*Microcystis aeruginosa*のクローン化（単藻化）

素培養株した株はコロニーからの分離株であるが、これには複数の異なった個体が混在している可能性があり、本研究で採用したMLSTのように複数の遺伝子座でタイピングを行うに際しては、異なる遺伝子座の配列が別個体に由来する、というように間違っただータを取得する危険が生じる。この危険を回避するため、素培養株のクローン（単藻化）化作業を行った。倒立顕微鏡下で素培養株のコロニーをマイクロピペットを用いて吸引分解した後、同様にマイクロピペットで単一細胞を分離し、新しいMA液体培地の入ったマイクロプレートに移し、25°C、12:12の明暗周期で培養を行い、2.5ヶ月内に増殖が見られたコロニーをMA培地10mlの入った試験管に移し、安定な生育が見られたものをクローン株として、以降の遺伝子タイピング実験に供した。

（3）高分解能マーカーによる遺伝子タイピング（Multilocus Sequencing Typing [MLST])

本研究ではバクテリアの高分解能マーカーとして知られているMLST法によりアオコの分離株の遺伝子変異の解析を行った。MLST法はゲノム中の数箇所の遺伝子座をPCR法により取得して遺伝子配列を決定し、その配列の違いに基いて個体や個体群間の遺伝的組成の違いから生物地理学的な考察を行うものである⁸⁾。筆者らは本プロジェクト研究に先立ち、*M. aeruginosa*のMLST法を*ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*の7つの遺伝子座（各約450bp）の配列を取得して解析する遺伝子タイピングシステムとして既に確立しており¹⁷⁾、本研究でもこのシステムを用いて遺伝子の取得を行った。アオコ菌株からFastDNA kit (Q-biogene)を用いて全ゲノム抽出を行なった。各遺伝子座を増幅するPCR反応はExTaq (Takara)を用い、初期変性94°C 3分の後、94°C 1分、60~65°C 1分、72°C 30秒を40サイクル繰り返すという反応条件で行なった。取得された遺伝子断片はExoSAP-IT (USB)を用いて酵素的に精製後、PCR増幅反応に用いたプライマーとBigDye1.1を用いてダイレクト・シーケンス反応を行ない、ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を解読した。シーケンス反応による誤読を極力避けるため、5'及び3'側双方から塩基配列を読むことによって最終的な遺伝子配列を決定した。

（4）クローンライブラリー法の開発

上述のMLST法は分離株を用いた遺伝子解析手法であるため、個体群の遺伝的多様性の推定に際しては、単離の不成功・継代培養時の喪失等による偏りが生じてしまう恐れがある。この欠点を

克服するため、上記MLSTに用いた遺伝子座の一つである*ftsZ*を用いたクローン・ライブラリー法を開発し、クローン・ライブラリーデータとMLST解析のデータが相互参照できるようなシステムを開発した。まず単離・培養を経ずに直接アオコサンプルからFastDNA kitを用いて全ゲノムを抽出し、これを鋳型として上述のPCR反応で*ftsZ*遺伝子を取得した。MLSTとは異なり、クローニング実験に際してはPCR反応におけるエラー（間違っただ塩基を取り込んでしまうこと）が致命的な問題となりうる。この問題を回避するため、高精度PCR反応酵素であるPyrobest(Takara)を用いて増幅を行なった。反応条件は、初期変性94℃ 1分の後、98℃ 10秒、63℃ 1分、72℃ 1分を30サイクル繰り返すという反応条件で行なった。増幅産物はTOPO cloning kit (invitrogen) を用いて平滑末端で大腸菌にクローニング後、ランダムに32コロニーをピックアップしてM13Forward/reverseプライマーを用いたPCRで挿入を確認した後、positive cloneのPCR産物をExoSAP-IT (USB) を用いて酵素精製を行ない、M13 forwardあるいはreverseプライマーのいずれかとBigDye1.1を用いてMLSTと同様にシーケンス反応を行なった。決定した塩基配列は*ftsZ*遺伝子のみで系統樹を作成し、取得配列がどの種内グループに相当するかを推定した。

(5) 分子系統解析

新たに取得した新規MLST遺伝子型（124個）に既報告の遺伝子型¹⁷⁻¹⁹⁾（155個）とDNAデータベースから取得したPCC7806株の遺伝子型を加えた計280遺伝子型について、系統解析ソフトウェアMEGA¹⁶⁾を用いて分子系統樹を作成し、各菌株間の系統関係を調べた。系統解析に際しては、7つの遺伝子型を連結した計2,992塩基によるアラインメントを用いた。ギャップは*tpi*遺伝子座に1コドン相当の3塩基の挿入がある株が1株存在したため、この3塩基については系統解析の前に除去した。その他の遺伝子座にはギャップが存在しなかったため、アラインメント作業は容易であった。

(6) グループG 特異的PCR検出実験

アオコ環境サンプルから*M. aeruginosa*の種内系統グループGのみを特異的にPCR増幅するプライマーセットを開発するため、各MLST遺伝子座のアラインメントを精査した結果、*ftsZ*遺伝子座にグループGが特異的に保存されている領域を見出した。この領域を増幅するPCRプライマー*ftsGF*(5'-AGGGGTRCAGGGGATT-3')を設計し、既報告のMLSTプライマー*ftsR*とセットでPCR実験に用いた。PCR実験の鋳型には、クローンライブラリー法と同様の方法でアオコから直接抽出したゲノムDNAを用いた。

(7) アオコ毒素分析

分離した*M. aeruginosa*のアオコ毒素（ミクロシスチン）の分析のため、アオコ毒素遺伝子分析及び毒素の化学分析の両方を行なった。遺伝子分析はミクロシスチン毒素の生合成遺伝子クラスターの一部(*mcyG*)をターゲットとした既報告¹⁸⁾のPCR検出系を採用した（PCR反応条件はアニーリング温度を60℃とした以外はMLSTと同様である）。アオコ毒素分析は十分に増殖した培養液10mlを酢酸とメタノールで処理後、Inertsep RP-1カートリッジを用いて80%メタノールで抽出した画分をAgilent 6224 TOF/LCMS (Agilent Technologies)を用いて高速液体クロマトグラフィー分析することによって毒性を判定した。

(8) 塩分濃度耐性実験

宍道湖で取得した株、及びグループG（後述）に属する菌株の塩分耐性を調べるため、塩分濃度を変数とした培養実験を行った。10mlのMA液体培地にNaClをそれぞれ終濃度2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 g/lになるように加え、20 mlキャップつき試験管で培養を行なった。各株を初期濃度OD660=0.01 (7×10^5 cell/ml) になるように接種し、2日ごとに10日までOD660の値を測定した。実験は各濃度につき5連 (n=5) で行なった。宍道湖株はSjs10Sj03株、グループGの株はKs09TS27株を用いた（表(2)-1）。

(9) 南方系*Microcystis*の分類学的研究

本研究で扱った*M. aeruginosa*はコスモポリタンに分布しているため有名であるが、*Microcystis*属においては熱帯域のみから記載された複数の種が存在する^{3,7)}。しかしながら、これらの種については分離されることも稀な上、*M. aeruginosa*との形態的差異が明瞭でないことから、ほとんど分類学的な観点での研究例がなかった。本プロジェクト研究の過程において、ベトナムから複数の*M. bengalensis*, *M. panniformis*, *M. protocystis*, *M. pseudofilamentosa*, *M. ramosa*, および *M. robusta*を単離したため、形態観察、16S rDNA、ITS領域の解析を行い、これらの熱帯系*Microcystis*のアイデンティティについて検討を行なった。

4. 結果及び考察

(1) クローン株の取得

本プロジェクト期間に分離した素培養株、及び本プロジェクト開始以前に取得していた素培養株の双方から併せて209株のクローン株を確立した。取得したクローン株のうち、原著論文で未発表の株について表(2)-1に示す。

(注1) リスト表記の培養株以外にも、本プロジェクト研究において日本・東南アジアから分離した非クローン素培養株を数十株維持している。これらについては、今後順次クローン化作業を行ない、MLST解析に供する予定である。

(注2) カンボジアで採集したアオコサンプルを帰国直後の震災被害により紛失してしまったため、菌株の確立ができなかった。

(2) MLST遺伝子タイピング

取得した209のクローン株及び譲渡によって取得した12株、計221株についてMLST遺伝子タイピングを行った結果、このうちの124遺伝子型は新規であった。これは2株遺伝子を調べると1株は新規遺伝子型を示すという計算になる。筆者らはこれまでにすでに155の遺伝子型を報告しており¹⁹⁾、本プロジェクト開始時は、新たな遺伝子型の発見は頭打ち傾向になると予想していた。実際は、*M. aeruginosa*が想像を超える大きな遺伝的多様性を保持していることを示す結果が得られたことになる。本研究で含めた株はほとんど日本及び東南アジア産の株であるため、地球規模では途方もない数の遺伝子型が存在している可能性が高い。現時点では*M. aeruginosa*の種内変異の全容解明には程遠い可能性が高く、これを明らかにするためには今後、諸外国でのアオコ採集・収集に多くの労力を割く必要がある。

表(2)-1 取得したクローン株のリスト^{a)}

株名	採取地	採取日時	毒性 ^{b)}	毒素遺伝子 ^{c)}
Ks09TS02	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS11	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS16	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	+	+
Ks09TS22	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS25	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS26	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS27 ^{d)}	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/13	-	-
Ks09TS46	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/27	+	+
Ks09TS50	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/27	-	-
Ks09TS59	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/8/27	+	+
Ks09TS72	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/4	-	-
Ks09TS80	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/4	-	-
Ks09TS142	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/15	+	+
Ki09TS152	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/15	NA	+
Ki09TS161	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/20	-	-
Ki09TS162	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/20	-	-
Kn09TS162	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/20	NA	-
Kw09TS121	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/10	-	-
Kw09TS151	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/15	-	-
Kw09TS152	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2009/9/15	-	-
Ks11TS72	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2011/8/30	NA	-
Ks11TS74	土浦港, 霞ヶ浦, 茨城県	2011/8/30	NA	+
Si09Km02	釜口水門, 諏訪湖, 長野県	2009/10/23	-	-
Si09Km03	釜口水門, 諏訪湖, 長野県	2009/10/23	-	-
Si09Km04	釜口水門, 諏訪湖, 長野県	2009/10/23	-	-
Ss09Mb03	みずべ公園下, 諏訪湖, 長野県	2009/10/23	+	+
Ss09Mb05	みずべ公園下, 諏訪湖, 長野県	2009/10/23	-	-
Rs10SH04	底原ダム, 石垣島, 沖縄県	2010/3/2	-	-
Ra10MS01	前栄里ダム, 石垣島, 沖縄県	2010/2/28	NA	-
Ra10MS10	前栄里ダム, 石垣島, 沖縄県	2010/2/28	-	-
Ra10MS14	前栄里ダム, 石垣島, 沖縄県	2010/2/28	-	-
Rs10MS03	前栄里ダム, 石垣島, 沖縄県	2010/2/28	+	+
Ba10Og04	雄琴港, 琵琶湖, 滋賀県	2010/8/17	NA	+
Bs10Ki03c	北沢沼, 滋賀県	2010/10/19	+	+
Sjs10Sj02	宍道駅下, 宍道湖, 島根県	2010/10/20	+	+
Sjs10Sj03 ^{d)}	宍道駅下, 宍道湖, 島根県	2010/10/20	+	+
Sjs10CH02	千鳥南公園下, 宍道湖, 島根県	2010/10/20	+	+
Sjs10CH03	千鳥南公園下, 宍道湖, 島根県	2010/10/20	+	+
Sjs10CH04	千鳥南公園下, 宍道湖, 島根県	2010/10/20	+	+
Thi10Bk04	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	-	-
Thi10Bk05	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	+	+
Thi10Bk06	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	NA	+

表(2)-1 取得したクローン株のリスト (続き)

株名	採取地	採取日時	毒性 ^{b)}	毒素遺伝子 ^{c)}
Tha10Bk04	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	NA	-
Tha10Bk05	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	-	-
Tha10Bk06	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	+	+
Tha10Bk07	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	-	-
Tha10Bk13	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	+	+
Tha10Bk14	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	+	+
Tha10Bk19	Weera Farm (Fish pond), Bangkok, タイ	2010/2/2	-	-
Thw10Bw13	Bangprha Water Treatment Plant 1, Chonburi, タイ	2010/2/1	NA	-
Thw10Bw16	Bangprha Water Treatment Plant 1, Chonburi, タイ	2010/2/1	NA	-
Vi10Bn01	Boc Nguyen Reservoir, Ha tinh, ベトナム	2010/2/4	-	-
Vi10Bn03	Boc Nguyen Reservoir, Ha tinh, ベトナム	2010/2/4	-	-
Vi10Bn04	Boc Nguyen Reservoir, Ha tinh, ベトナム	2010/2/4	-	-
Vs10Bn05	Boc Nguyen Reservoir, Ha tinh, ベトナム	2010/2/4	-	-
Va10HL05	Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	-	-
Va10HL07	Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	-	-
Va10HL12	Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	-	-
Va10HL19	Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	-	-
Va10HF3	Fish Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	NA	+
Va10HF20	Fish Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	+	+
Va10HF22	Fish Pond, Hung Long, ベトナム	2010/2/5	NA	+
Mi10Kp04	Kandawmingalar Park, Yangon, ミャンマー	2010/5/19	-	-
Mi10Kp06	Kandawmingalar Park, Yangon, ミャンマー	2010/5/19	NA	-
Mi10Kp08	Kandawmingalar Park, Yangon, ミャンマー	2010/5/19	-	-
Mi10Kp22	Kandawmingalar Park, Yangon, ミャンマー	2010/5/19	-	-
Mi10Kp24	Kandawmingalar Park, Yangon, ミャンマー	2010/5/19	-	-
Ms10Kd02	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	-	-
Ms10Kd03	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	-	-
Mw10Kd01	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	-	-
Mw10Kd02	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	-	-
Mw10Kd03	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	-	-
Ms10Kd02	Kandawgyi Lake, Yangon, ミャンマー	2010/5/17	NA	-

脚注

^{a)} 本プロジェクト開始以降に採集した株から確立したクローン株のみを示す。それ以外の新規クローン菌株情報については誌上発表(1)の論文のSupplementary InformationのTable 1

(<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017085>) を参照。

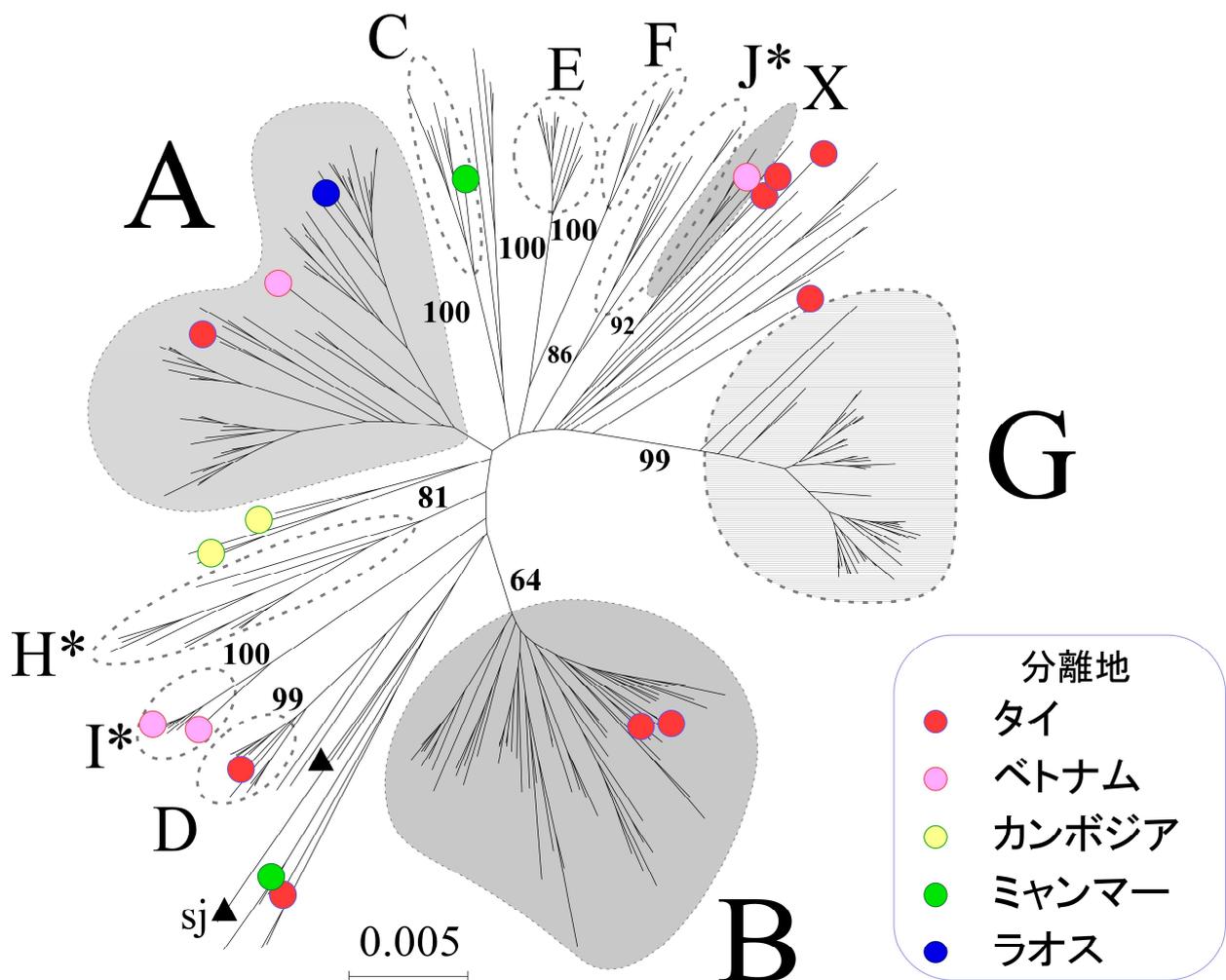
^{b)} NA, 毒素分析が完了していない株。

^{c)} アオコ毒素ミクロシスチン遺伝子の一部である *mcyG* 遺伝子のPCR検出結果。

^{d)} 塩分耐性実験に用いた株。

(3) 分子系統樹を用いた生物地理解析

取得された124の新規遺伝子型に既報告の155の遺伝子型とDNAデータベースから入手したPCC7806株の遺伝子型を加えた計280遺伝子型を用いて分子系統解析を行った。その結果、これまでに同定されていた8つの種内グループ (A-H, X)¹⁹⁾に加えて、新たに3つの明瞭な種内グループ (H, I, J) の存在が明らかとなった (図(2)-2)。



図(2)-2：近隣結合法(NJ法)で作成したMLST系統樹。種内グループを閉曲点線で示す。本プロジェクト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を横縞で、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株見出された有毒株の(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。

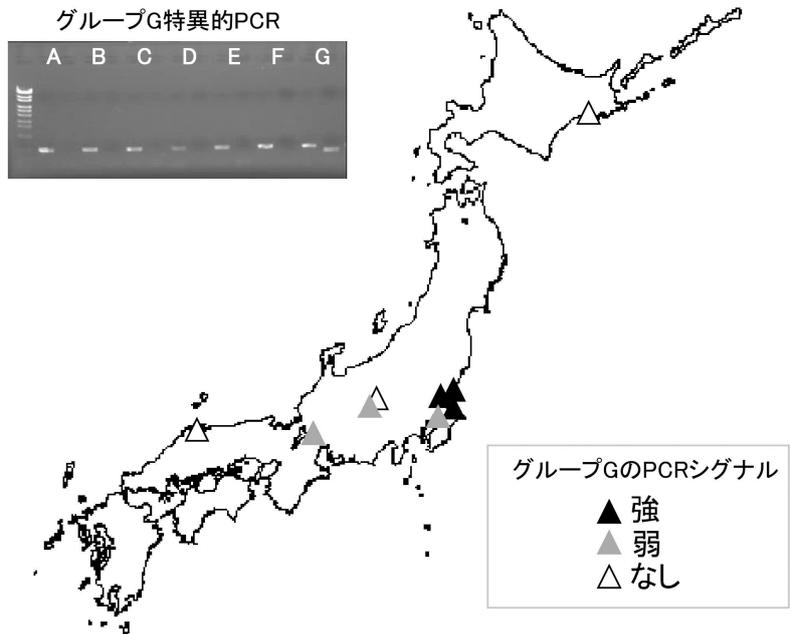
本系統樹上に菌株の分離地をマッピングしたところ、東南アジア株と日本株が複数のグループ内に混在したことから（図(2)-2）、東南アジアと日本の*M.aeruginosa*の間に大きな遺伝的な違いがないことがわかった。その一方、東南アジア産株の中にはこれまでに取得された日本産株と完全に同一なMLST遺伝子型を持つものはなかった。この結果は、少なからぬ頻度で日本と東南アジアの間で海を超えたアオコの移動があることを示唆する。ただし、日本と東南アジアではアオコ発生環境が同じではないため、高頻度のアオコの移動と自然選択（生態系適応）のバランスによって現在の遺伝的変異のパターンが形成されているという可能性もある。その意味では、「少なからぬ頻度」のアオコの移動というのは過小評価である可能性もありうる。海を越えた移動の運び手は風・鳥等が考えられるが、移入魚等を介した人為的な移動の可能性も考えられる。これについてはサブテーマ(1)の研究成果を参照されたい。

（4）謎の系統群「グループG」の解析

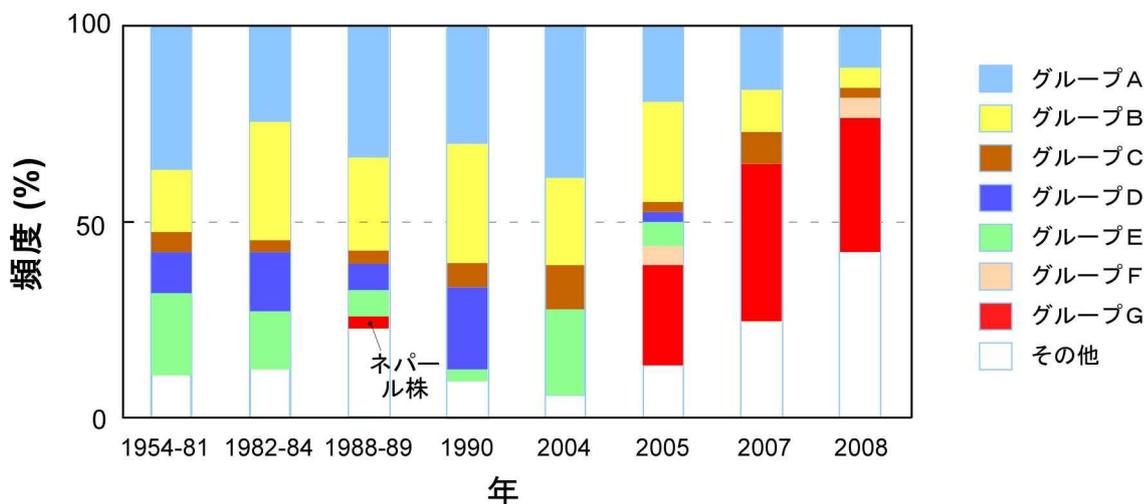
系統樹上で明瞭な東南アジア固有系統群が見つからなかった一方、グループGは大量に遺伝子型が分離されているのにもかかわらず（>40）、例外的な2株（ネパールと八郎潟からそれぞれ分離された株）を除いて全て霞ヶ浦水系（霞ヶ浦と北浦、茨城県）という非常に狭い地域からの分離株であった。この結果はグループGが霞ヶ浦水系固有の系統群である可能性を示唆した。アオコ形成ラン藻のような自由生活性のバクテリアにおいては、地域固有系統群は存在しないというのがこれまでの微生物学における定説であり¹⁾、もしこれが本当であるならば大発見である。しかしながら、MLST法は分離株を用いた遺伝子タイピング法であるため、分離培養時にグループGが選択されてしまった可能性も捨てきれない。

グループGの地理的分布を詳細に検討するため、培養を経ずに直接アオコサンプルからグループGを特異的に検出するPCR検出システムを開発した（図(2)-3）。プライマーセットftsGF/ftsRを用いた検出実験の結果、霞ヶ浦・北浦のみならず、霞ヶ浦水系に近接する印旛沼（千葉県）、千波湖（茨城県）のアオコからも強いグループGのシグナルが検出されたが、赤池（北海道）、宍道湖、石垣島からは検出されなかった。一方、諏訪湖や琵琶湖内湖からも弱いシグナルが得られたこと、グループGは霞ヶ浦水系固有の系統群ではなく、霞ヶ浦周辺で発生する傾向が大きいグループと推察された。興味深いことにH22-23年度の東南アジアのサンプルについて調べてみると、カンドー湖（ミャンマー）とトンレサップ湖（カンボジア）からは比較的強いシグナルが得られた。以前にネパールでグループG株が取得されたことを考えると（図(2)-4）、アジアの大陸部では比較的珍しくないグループであり、それが近年日本に入ってきて霞ヶ浦で大発生したとすれば面白いが、現時点では想像の域を出ない。

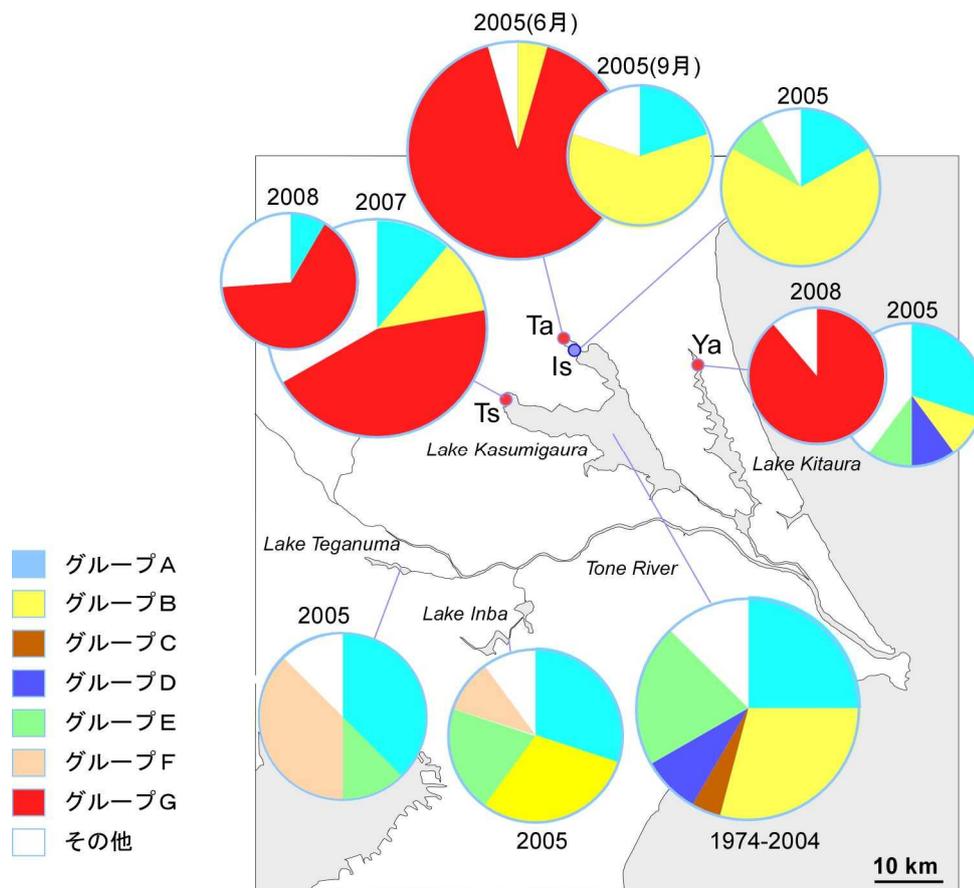
興味深いことに、グループGに属する株は2004年以前は霞ヶ浦どころか日本ではどこからも全く分離されていない（図(2)-4）。さらに興味深いことに、アオコは多くの種内系統群の*M. aeruginosa*で構成されることが一般的であるが、グループGが分離されるアオコではグループGが高度に優占する傾向があることがわかった（図(2)-5）。しかしながら、これら二つの傾向「2005年以降に出現」と「アオコ内で高度に優占」は分離株を用いたMLST分析によって得られた結果であるため、分離培養時にグループGを選択的に分離してしまうような偏りが導いた傾向である恐れがある。この問題を検討するため、アオコサンプルから直接MLST遺伝子をPCR増幅するクローンライブラリー法の開発を行なうことにした。



図(2)-3 : 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)-2参照）を示す。各グループ毎に2レーンを取り、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。地図では示されていないが、2010年のカンドーシ湖（ミャンマー）と2011年のトンレサップ湖（カンボジア）のアオコから強いグループGのシグナルが検出された。



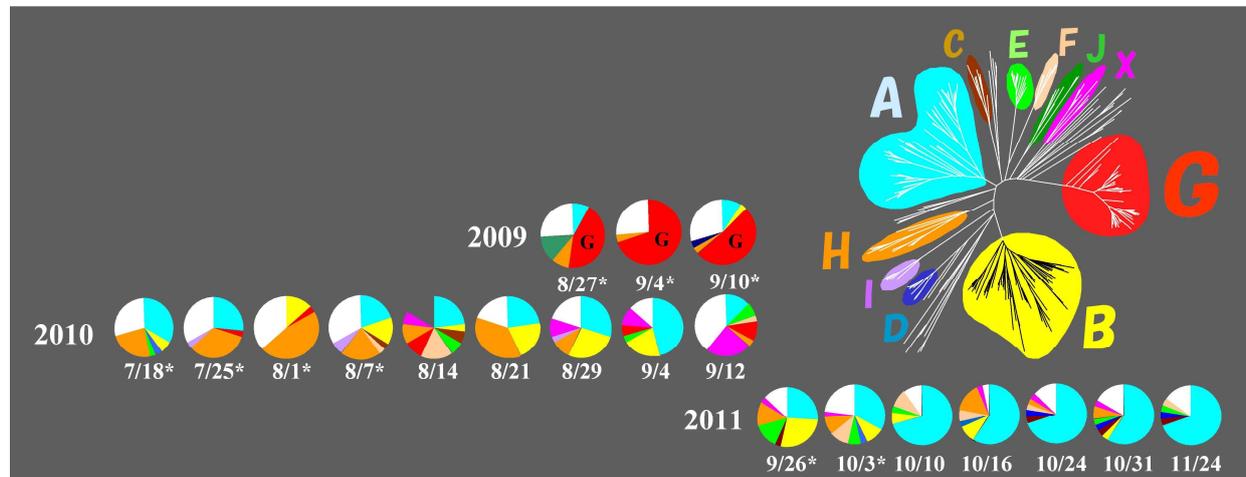
図(2)-4 : MLST法によるアオコ種内系統群の経年変動。分離株のMLSTタイピングを年度別に分けて頻度グラフで表示。同一の遺伝子型も数に含めて（遺伝子型ではなく分離株数に基づき）頻度グラフで表現。グループGは2005年以降に大量に分離されていることに注意。例外的に2004年以前に分離されたグループG株（ネパール株）を示す。



図(2)-5 : MLST法による利根川水系におけるアオコ種内系統群の頻度分布。図(2)-4と同様に同一の遺伝子型も数に含めてグラフで表現。円の直径は株数に比例するように描く。グループGが分離されないアオコは遺伝的に多様なグループで構成されるのに対し、グループGが分離されるアオコはグループGが優占する傾向があることに注意。

MLSTの7つの遺伝子それぞれ個別で作成した系統樹とMLST系統樹とを比較した結果、*ftsZ*遺伝子を指標とすることによって、取得された遺伝子がおおよそどのMLST種内系統に属するかを判断できることがわかった。グループGを含むアオコ株をこれまでに大量分離している土浦港（霞ヶ浦）をモデル地域に設定し、定期的に同地点からアオコをサンプリングしてクローンライブラリー分析を行なった。その結果、2009年のアオコにおいてはグループGが優占していたことがわかったが、驚くべきことに2010年、2011年になるとグループGがほとんど検出されなくなった（図(2)-6）。これらの結果を総合すると、グループGは霞ヶ浦近辺で2005-2009年という限定された期間に大量発生したグループであることが示唆される。このような非常に限られた期間・地域でのみ特定の種内系統群が大発生するというパターンは、例えば病原菌のアウトブレイク時にはよく見られるパターンであるが、アオコ形成ラン藻のような環境微生物では前例がない。おそらくはグループGの持つ未知の生理生態的特性が2005-2009年の霞ヶ浦水系の生態系に高度に適応した結果、グループGの大量発生が起こったと考えられる。実際、2005年以降に霞ヶ浦の植物プランクトン相が劇的に変わったことは他の研究者からも指摘されており（本間隆満博士、私信）、この

年を境に何らかの大きな環境変化があった可能性は高い。このグループGの持つ未知の生理生態的特性を特定することは残された課題である。



図(2)-6：クローンライブラリー法による土浦（霞ヶ浦）におけるアオコ種内系統群の頻度分布。2010年、2011年ではグループGがほとんど検出されなくなっていることに注意。*はアオコ発生時のサンプル，それ以外はアオコ非発生時にプランクトンネットで*M.aeruginosa*を濃縮したサンプル。2011年には6-9月にもアオコは継続して発生しており、現在このサンプルについて分析を行なっている。

(5) アオコ毒性と遺伝子型の関係

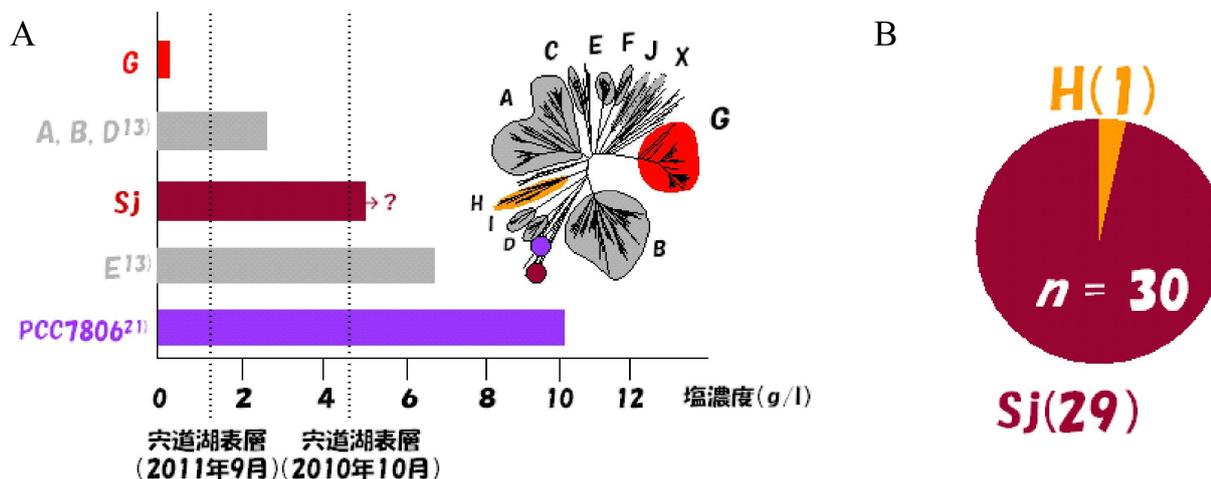
分離したクローン株については、アオコ毒素ミクロシスチン産生能を化学分析とミクロシスチン合成遺伝子 (*mcyG*) のPCR検出によって調べた (表(2)-1)。双方の分析の結果は完全に一致しており、*mcyG*遺伝子が検出された株で無毒の株は見つからなかった。ミクロシスチン毒性を系統樹上にマッピングしてみたところ、有毒株はグループA、B、Xの三系統にのみ現れたが、例外的に宍道湖から分離された遺伝子型sjのみが前述の三系統のどれにも属さず、もう一つの例外的な有毒株であるPCC7806株の近縁に位置した (図(2)-2)。遺伝子型sjが分離された2010年の宍道湖においては、近年稀に見るアオコ大発生が起こっていた。このため、この珍しい新規遺伝子型sjについてより詳細な解析を行うこととした。

(6) 宍道湖で分離された新規有毒遺伝子型「sj」の解析

2010年の夏季から秋季にかけて、宍道湖では史上稀に見るアオコ大発生が観察され、悪臭の発生等でたいへんな問題となった。2010年の10月に宍道湖のアオコサンプルをサブテーマ(1)を担当する京都大学のグループからの譲渡により入手し、顕微鏡観察を行なったところ、ほぼ*M.aeruginosa*単一種から構成されるアオコであることがわかった。一般的には同一アオコの中に多様なコロニー形態を持つ*M.aeruginosa*が混在する場合が多いのであるが、このサンプルについてはコロニー形態も均一であった。このサンプルから5株のクローン株を確立し (表(2)-1)、MLST解析を行ってみたところ、全て同一の新規遺伝子型sjを示し、また分子系統樹上で非常にユニークな位置を占めた (図(2)-2)。意外なことに、この株は既知の有毒株系統A、B、Xのいずれにも属さない

のにも関わらず、ミクロシスチンが検出された（表(2)-1）。系統樹上でsjと最も近縁に位置したPCC7806株は同様にA, B, Xに属さない株であるが、この株は*M.aeruginosa*の分子生物学の基礎研究を行う際のモデル株として利用されており、多くの知見が蓄積されている。興味深いことに、PCC7806株はオランダの汽水湖から分離された株であり、実際に高塩分濃度耐性を持つことが知られている²¹⁾。sjとPCC7806株との遺伝的近縁性、及び宍道湖が汽水湖であるという二点は、sjも塩分濃度耐性を持つ可能性を示唆する。この点について検討するために、sj株の塩分耐性を調べることにした。

Sj遺伝子型を示す株の一つであるSjs10Sj03を用いた培養実験の結果、確かにsjは2010年のアオコ発生時の宍道湖湖水表面相当の塩分濃度に耐性を持つことがわかった（図(2)-7A）。2011年の宍道湖では2010年ほどのアオコ発生は見られなかったが、2011年の9月に宍道湖で採取したアオコを用いてクローンライブラリー分析を行ってみたところ、実に30クローン中の29クローンがsjの遺伝子型を示した（図(2)-7B）。



図(2)-7：宍道湖で分離された新規遺伝子型sjの特性。Aは、sjと他の種内系統群の塩分耐性比較。宍道湖表層の塩分濃度データ（2010年10月は4.8psu, 2011年11月は1.2psu）は島根県のホームページより引用。グループA, B, D, Eに属する株の塩分耐性は一樣ではないため、各グループ内で最高の塩分耐性を持つ株のデータを棒グラフに示した。sjについては非無菌株を塩分濃度耐性実験に用いたためか結果にばらつきがあり、今回の結果以上の塩分耐性を示す可能性もある。Bは、2011年9月の宍道湖宍道大橋下で採取したアオコサンプルの*ftsZ*を指標としたクローンライブラリー解析の結果。ほとんど単一の遺伝子型sjで占められている点に注意。

残念ながら2010年のアオコサンプルを入手できなかったため、決定的な証拠を提示することはできないものの、2010年の宍道湖の*M.aeruginosa*が均一なコロニー形態を示したこと、単離した*M.aeruginosa*株が全てsj遺伝子型を示したこと、sj遺伝子型を持つ株が当時の宍道湖表層の塩分濃度を受容可能な高い塩分耐性を示したことなどから、2010年の宍道湖の空前のアオコ大発生は、新規遺伝子型sjにより引き起こされた可能性が高いと言っていると思われる。しかしながら、sjに匹敵する塩分耐性を持つ*M. aeruginosa*は、sj以外にも存在することには注意したい（例えばグルー

プE、図(2)-7)。 *M. aeruginosa*が日本国内どころか東南アジアとの間でも自由に移動していることを考えれば、グループEの個体が宍道湖にいないとは考え難い。このことは、sjには塩分濃度耐性に加えて、2010年の宍道湖の環境に高度に適応した未知の生理生態的形質を持っている可能性を示唆する。あるいは逆にグループEの個体が宍道湖で発生できない何らかの形質を持っていた可能性も考えられる。いずれにしても、sjは宍道湖のアオコ発生のキープレーヤーであることは間違いと考えられるため、今後sjについては更に詳細な生理生態特性の解析を行う必要がある。

(7) 総合考察：MLSTを利用した有毒アオコの動態研究の今後の展望

MLST法を利用した分離株の遺伝子タイピングを行った結果、*M. aeruginosa*という単一の有毒ラン藻種内に大きな遺伝的多様性が保有されていることを明らかにすることができた。MLSTの結果に基づく分子系統樹は、*M. aeruginosa*の種内に少なくとも11の明瞭な系統が存在することを明らかにした。東南アジア株と日本産株の遺伝的距離は小さく、海を越えた移動分散が少なからぬ頻度で起こっていることが強く示唆された。しかしながら、日本国内・東南アジアにおける*M. aeruginosa*の遺伝的変異の分布パターンは、単純な移動分散だけでは説明できない。なぜならば、日本・東南アジア間でアオコの生息湖沼間の距離と遺伝的近縁性に明瞭な相関が見られない一方で、グループGのように霞ヶ浦水系以外からはほとんど分離されない系統群が存在するからである。このパターンを説明するには、種内系統群のそれぞれ（あるいは一部の系統群）に固有の生理生態的な特性があり、それがアオコの移動後の定着や大量発生に際して特定のグループの選択的発生に繋がっている、と考えるのが最も自然であろう。このことは、アオコの大発生は従来考えられていたように栄養塩の過剰供給によって起こる、というような単純な図式で説明できるものではなく、それ以外の複数の要因が関与している、ということの意味する。宍道湖で発見した新規遺伝子型sjはおそらくはその顕著な一例であり、ここでは「複数の要因」のうちの一つは塩分耐性ということになるであろう。グループGについても、限られた時期・場所でのみ大発生したということから、このグループの持つ未知の生態特性が2005-2009年の霞ヶ浦水系に高度に適応した結果と考えるのが自然であり、この特性を現在比較培養実験によって調べているところである。

細菌においては、（今回のMLST遺伝子のような）中立遺伝子の系統解析で識別された種内系統群は何らかの固有の生理生態的特性を持つ、ということが理論的にも経験的にも示されている⁶⁾。このような生理生態で纏められる種内系統群のことをエコタイプ(ecotype)と呼ぶ^{2, 20)}。この観点から*M. aeruginosa*の種内系統を見直してみると、少なくともグループAとXの二つの系統群は有毒株のみで構成されるため、ミクロシチン毒性はこれらグループ固有の形質であることは確かである。ミクロシチンがこのグループの個体に何らかの（有利な）生態的特性を付与しているならば、この二つのグループはそれぞれエコタイプということになる。しかしながら、それ以外の系統群については、その固有の生態的特性が何であるのか、そもそもそのような特性があるのかすら現時点では不明である。この*M. aeruginosa*種内のエコタイプの同定こそが、今後の*M. aeruginosa*の時空間動態を探る研究の鍵を握ることになる。なぜならば、系統群固有の生態特性が明らかになれば、発生したアオコをクローンライブラリー法で分析して優占する系統群・遺伝子型を同定することでその固有の形質を推定することが可能になり、そこでのアオコの発生要因を推察することができるからである（図(2)-8）。これによって明らかとなったアオコ発生要因は、本プロジェクトの目標であった「オーダーメイドのアオコ対策」への道筋を提示するだろうし、

同時にそれは環境政策への提言にも繋がるであろう。残念ながら、本プロジェクトにおいては全ての系統群固有特性の同定には至らなかったが、「オーダーメイドのアオコ対策」への道筋を明確に提示することができたと思われる。現時点でも、発生したアオコを*ftsZ*クローンライブラリー分析し、その結果をMLST系統樹に参照することによってアオコ内の有毒個体の比率を簡便にかつ高精度で推定し、毒性から見たアオコの「危険度」を公に提示することが可能である。これは本研究の大きな成果の一つであることを付け加えておきたい。



図(2)-8：アオコ発生要因の推定スキーム案。クローンライブラリー法とMLST系統樹を相互参照することにより、発生アオコの特徴・要因を推定することが可能になる。

(8) 熱帯系*Microcystis*属の分類学的研究

*Microcystis aeruginosa*は古くはコロニー形態の違いから*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*の5種に分けられていたが、コロニー形態の可塑性や遺伝子の類縁性から比較的最近*M. aeruginosa*の一種に統合されたという分類学的経緯がある¹⁵⁾。しかしながら、*Microcystis*属には上記の5種以外にも、*M. bengalensis*, *M. panniformis*, *M. protocystis*, *M. pseudofilamentosa*, *M. ramosa*, *M. robusta*といった複数の種が熱帯域から記載されている^{3,7)}。これらの熱帯系の種はやはりコロニー形態に基づいて記載されたが、熱帯域での採集があまりなされていなかったこと、これらの種と*M. aeruginosa*との間の他のコロニーの形態が不明瞭なことなどから、分類学的な検討がほとんどなされておらず、言わば放置された状態であった。本プロジェクトの研究過程において、ベトナムからこれら熱帯系の種を複数単離できたため、これらの種の実体について分子系統解析によって検討を行なってみた。本研究は本プロジェクトの研究の範疇ではあるが、メインテーマからは若干外れるため、研究の詳細の説明は割愛して概略のみを説明したい。系統解析に使用した遺伝子マーカーは細菌の種識別マーカーとして汎用されている16S rDNA及び16S-23S ITS領域を用い、既報告のプライマーセット・PCR条件^{11,12)}で遺伝子を取得した後、上述のMLSTと同様の方法で塩基配列を取得した。双方の遺伝子データセットを用いて作成した系統樹を示す(図(2)-9)。一見して分かる通り、熱帯系の種は*M. aeruginosa*(図中では

その意味では今後のアオコ動態研究における影響は少なくない。今後、この研究で用いたこれらの熱帯系*Microcystis*株のMLST分析を行い、生物地理学解析に役立てると同時に分類学へのフィードバックも行ないたい。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究の*M.aeruginosa*の種内グループGのように、バクテリアの特定の種内系統群が「特定の期間・地域で大発生した」事例は病原菌以外では全くなく、微生物の種分化研究一般に大きなインパクトを与えるものである。アオコのような環境微生物が「流行感冒」のような時空間動態を示したことは、本プロジェクト研究のハイライトの一つと言ってよい。アオコが海を越えて移動している可能性を指摘できたことも大きな知見である。

(2) 環境政策への貢献

本研究により、さまざまな遺伝子型のアオコについて、日本国内だけでなく、東南アジア諸国にも渡る分子系統地理が解明された。アオコの各遺伝子型は、それぞれことなる生態学的特性を有していると考えられる。本研究では、例えば、霞ヶ浦水系のごく限られた地域にのみ発生したグループGや、宍道湖で優占したSjがそれにあたる。各遺伝子型の生態学的特性が明らかになれば、それぞれの遺伝子型に応じた防除策も考案可能であろう。アオコと言えど、植物プランクトンなので、アオコ一般には窒素・リンや日光といった全ての植物プランクトンに通用する増殖条件を操作すれば、その発生は防げるかもしれない。しかし、全ての植物プランクトンの増殖を抑制することは、適当ではない。このため、アオコ特有の防除対策が必要であり、他の植物プランクトンの増殖を妨げないためには、優占するアオコの遺伝子型に特化した対策、すなわち「オーダーメイドのアオコ対策」を取ることができれば、他の植物プランクトンへの影響を低減することが可能かもしれない。このためには、各アオコ遺伝子型の生態学的特性が解明される必要がある。残念ながら、本研究においては全ての系統群固有特性の同定や、各遺伝子型の生態学的特性解明には至らなかったが、「オーダーメイドのアオコ対策」への道筋を明確に提示することができた。

さらに、本研究では、発生したアオコの遺伝子型を分析し、その結果をMLST系統樹に参照することによって、アオコ内の有毒個体の比率を簡便にかつ高精度で推定することが可能となった。つまり、本研究によって、我々は毒性から見たアオコの「危険度」を公に広く提示することができるようになった。アオコの危険度が分かりやすい形で公表されることは、アオコのリスクを低減させることにつながる。

以上のように、本研究は基礎的なアオコの分子系統地理学研究であるが、国内外のアオコに関わる環境政策にも十分貢献しうるものである。

6. 国際共同研究等の状況

計画名：アジア・オセアニア地域の有毒アオコ遺伝動態研究

案件名：アジア・オーストラリア地域の遺伝的多様性をMLSTにより解析するため、オーストラリア国立自然科学産業研究機関(CSIRO)・藻類系統保存施設が管理している*M. aeruginosa*約100

株の提供を受ける。本来ならば既に菌株を受領し、遺伝子型の分析を研究期間内に完了しているはずであったが、震災によって甚大な被害を受けた実験室の復旧等により、本件への取り組みが保留となっている。また、今後は現在指導中の博士課程留学生（ベトナム1名、ミャンマー1名）の帰国以降、両名より *M. aeruginosa* の同国分離株の継続的な提供を受ける予定である。

カウンターパート名等：Susan Blackburn博士，オーストラリア国立自然科学産業研究機関(CSIRO)
 : Nanda Kyaw Thu講師，Loikaw University（ミャンマー）
 : Vinh Nguyen Le Ai講師，Vinh University（ベトナム）

連携状況：今後、さらに多くの国、特にアジア以外の国との連携を模索している

国際的位置づけ：特になし

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Y. Tanabe, M.M. Watanabe : PLoS One, 6, e17085 (2011)
 “Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*”
- 2) V. L. A. Nguyen, Y. Tanabe, H. Matsuura, K. Kaya, M. M. Watanabe : Phycol. Res. (in press)
 “Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria)”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 田辺雄彦，渡邊信：日本藻類学会第34回大会(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」
- 2) 田辺雄彦，加藤将，渡邊信：日本藻類学会第35回大会(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異」
- 3) L. A. V. Nyuen, H. Matsuura, K. Kaya, Y. Tanabe, M. M. Watanabe : 日本藻類学会第35回大会 (2011)
 ”Morphological, biochemical and phylogenetic characteristics of 57 strains of water bloom-forming *Microcystis* collected from water bodies in Vietnam”
- 4) Nanda Kyaw Thu, Y. Tanabe, Syou Kato, M. M. Watanabe : 日本藻類学会第35回大会(2011)
 ”Morphology, phylogeny and gas vesicle gene detection of planktonic cyanobacterium *Oscillatoria kawamurae* from different geographical regions”

- 5) 田辺雄彦, 渡邊信: 日本陸水学会第76回大会公開シンポジウム(2011)
「遺伝子で見るアオコの多様性」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Baas Becking, L. G. M. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- 2) Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu Rev Microbiol* 56: 457–487.
- 3) Desikachary, T.V. 1959. Cyanophyta. Indian council of Agriculture research, New Delhi.
- 4) Dittmann, E., and C. Wiegand. 2006. Cyanobacterial toxins--occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res* 50: 7–17.
- 5) Kasai, F., M. Kawachi, M. Erata, and M. M. Watanabe. 2004. NIES-Collection, List of strains, microalgae and protozoa, 7th edition. Tsukuba, Japan: National Institute for Environmental Studies.
- 6) Koepfel, A., E. B. Perry, J. Sikorski, D. Krizanc, W. A. Warner, D. M. Ward, A. P. Rooney, E. Brambilla, N. Connor, E. Nevo, R. M. Ratcliff, and F. M. Cohan. 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2504–2509.
- 7) Komárek, J., J. Komárková-Legnerová, C. L. Sant'anna, M. T. P. Azevedo, and P. A. C. Senna. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Crypto Algal* 23: 159–177.
- 8) Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth *et al.* 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3140–3145.
- 9) Miller, M. A., Kudela, R. M., Mekebri, A., Crane, D., Oates, S. C., Tinker, M. T., Staedler, M., Miller, W.A., Toy-Choutka, S., Dominik, C., Hardin, D., Langlois, G., Murray, M., Ward, K., Jessup, D. A. 2011. Evidence for a novel marine harmful algal bloom: cyanotoxin (microcystin) transfer from land to sea otters. *PLoS One* 5: e12576.
- 10) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, N. Watanabe, H. Oyaizu, M. Hiroki, A. Mahakhant, Y. Li, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 1998. Phycoerythrin-containing *Microcystis* isolated from P. R. China and Thailand. *Phycol Res* 46 (Suppl. 2): 39–50.

- 11) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. FEMS Microbiol. Lett. 164: 119–124.
- 12) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. FEMS Microbiol Lett 172: 15–21.
- 13) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, M. Watanabe, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 1999. Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. Phycol Res 47: 189–197.
- 14) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. J Gen Appl Microbiol 46: 39–50.
- 15) Otsuka, S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing *ex* Lemmermann 1907 under the Rule of the Bacterial Code. Int J Syst Evol Microbiol 51: 873–879.
- 16) Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24: 1596–1599.
- 17) Tanabe, Y., F. Kasai, and M. M. Watanabe. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Microbiology 153: 3695–3703.
- 18) Tanabe, Y., T. Sano, F. Kasai, and M. M. Watanabe. 2009. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. BMC Evol Biol 9: 115.
- 19) 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.
- 20) 田辺雄彦, 渡邊信 2011. 光合成微生物の多様性 生物の科学遺産 : 36-41.
- 21) Tonk, L., K. Bosch, P. M. Visser, and J. Huisman. 2007 Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Aquat Microb Ecol 46: 117–123.

(3) アオコの生残・増殖に関する分子生態学的研究

福井県立大学 海洋生物資源学部 海洋生物資源学科 近藤竜二・廣石伸互・高尾祥丈

研究協力者

福井県立大学 海洋生物資源学部 海洋生物資源学科

片岡剛文（現 愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

本間隆満（現 (株)建設環境研究所河川情報部）

平成21～23年度累計予算額：26,146千円

（うち、平成23年度予算額：8,500千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] アオコと呼ばれるシアノバクテリア（ラン藻）の異常増殖が世界各地の富栄養湖沼で発生し、深刻な環境問題となっている。*Microcystis*属はアオコを構成する主要なシアノバクテリアの一つであり、肝臓毒のミクロシスチンを生産することからも重要な種類である。形態的な特徴から、*Microcystis*属は幾つかの“形態種”に分けられているが、分類の指標となる形態形質は培養条件や環境条件によって大きく変化する。本研究では、*Microcystis*属を識別・計数するための遺伝子プローブと定量PCR法を開発した。この方法を用いることによって、*Microcystis*属の混合培養、実験池に人工的に発生させた*Microcystis*属のアオコあるいは天然の湖沼中の*Microcystis*属細胞をグループごとに計数することが可能となった。次いで、数種の*Microcystis*属株が混在するなかで、異なる環境下での株間の競争について明らかにするため、窒素とリン濃度を変えた改変BG-11培地ならびに培養温度を変化させて混合培養実験を行った。その結果、培地中の窒素およびリン濃度に対して、*Microcystis*属の株ごとに増殖特性（比増殖速度、最大細胞密度）が異なることが明らかとなった。一方、温度に関しては*Microcystis*属株をそれぞれ単独で培養しても、株間の増殖特性に大きな変化は認められなかったが、混合培養中では株間で競合が起こっていることが示された。これまで、それぞれ単独で調べられていた*Microcystis*属株の増殖生理特性に大きな違いは認められなかったが、より天然に近い混合培養系を用いることと、さらに、株ごとを識別・計数する技術が開発されたことにより、窒素やリンなどの栄養塩の濃度や環境温度が、現場の*Microcystis*属の群集構造を変化させている要因であることを実験的に示すことができた。

[キーワード] アオコ、*Microcystis*、16S-23S rDNA ITS、リアルタイムPCR、種内競合

1. はじめに

「アオコ」は科学的用語として明確に定義されていないが、①湖沼でシアノバクテリア（ラン藻）が大発生する現象の一つで、特に水面に集積して水の色が濃緑色を呈する場合、②そのような状態を作り出している原因のシアノバクテリア群のことを指す。すなわちアオコとは特定の微

生物の種名ではなく、アオコの原因となる微生物は常に同一であるとは限らない。我が国におけるアオコを形成するシアノバクテリアは*Microcystis*属、*Anabaena*属、*Aphanizomenon*属、*Planktothrix*属など多様である³⁰⁾。その中でも*Microcystis*属は発生報告例が極めて多く、また藍藻毒素マイクロシスチンを産生することから最も重要なアオコ原因微生物である。

シアノバクテリアは二界説に基づく古い分類体系では植物として扱われ、藍色植物として主に形態学的特徴に基づき分類がなされてきた。シアノバクテリアは原核生物であり、その細胞は本質的には細菌と同様の構造をとっている。植物に広く分布するクロロフィルaと藻類が持つフィコビリプロテインが細胞周辺部に存在し、酸素発生型の光合成を行うことから、シアノバクテリアの分類は藻類の1門として扱われてきた。原核生物であるため、本来は細菌の一つとして分類・整理されるべきシアノバクテリアであるが、この属や種レベルでの同定にはGeitler⁶⁻⁸⁾の分類が長年にわたって用いられてきた。その後、新しい多くの分類群が追加され、*Anagnostidis* and *Komárek*²⁻⁴⁾ および *Komárek* and *Anagnostidis*^{14,15)}によって新しい分類体系が提案された。Geitler⁷⁾の分類体系では、*Microcystis*属は細胞の形状、群体の形状・大きさおよび群体を取り巻く粘質体の状態、さらには細胞の大きさとガス胞の有無に従い、分類に再検討を要する8種を含む32種が記載されていた。その後、*Komárek* and *Anagnostidis*¹⁴⁾はガス胞を有する種のみを*Microcystis*属として再定義し、ガス胞を持たない種を他の分類群へと移行した。日本国内には、顕微鏡による形態観察によって、*M. aeruginosa*、*M. ichthyoblabe*、*M. wesenbergii*、*M. viridis*、*M. novacekii*、および *M. flos-aquae*の6種が存在すると報告されている¹³⁾。しかし、これらの*Microcystis*属の種の分類基準となる形態学的特徴は培養条件下で大きく変化する²⁰⁾。また、殆どの無菌株は群体を形成せずに単細胞で増殖するため³⁰⁾、形態識別による分類の妥当性について多くの議論がなされてきた。原核生物である*Microcystis*属分類の混乱を解決するために、細菌分類規定に従い16S rDNAの塩基配列やゲノムDNA相同性が調べられた^{16,17,21)}。その結果、*Microcystis*属は形態学的特徴に関わらず、DNAの相同性が70%以上を示したことから、細菌命名規約に従って*M. aeruginosa*の1種に統合することが提案された¹⁵⁾。しかしながら、*M. aeruginosa*は細菌分類指標から見れば1種類であるが、マイクロシスチン合成遺伝子 (*mcy*) を持つ有毒株と持たない無毒株が存在するだけでなく、様々な遺伝子の塩基配列を解析するによって遺伝的に多様であることが明らかになってきた^{11,24,26)}。その中でも、16S-23S rRNA遺伝子間領域 (以下、16S-23S ITS) の塩基配列で識別した*Microcystis*属の遺伝子グループは、有毒株と無毒株の組成がグループ毎に違っていることから、現場の群集構造を調査する上で良く利用されている^{5,11,12,22)}。クローンライブラリー法⁵⁾や変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE)¹²⁾による調査で、同一の湖沼でも複数の16S-23S ITS遺伝子タイプが存在し、*Microcystis*属の群集構造は時空間的に変動することが報告されている^{5,11,12,22)}。さらに、優占する遺伝子タイプの遷移が個体群中の有毒株の割合やマイクロシスチン濃度と密接に関係していることが明らかにされている^{5,12)}。さらに、これらの変動が環境中の硝酸塩濃度に依存していることが明らかにされてきた²⁷⁾。しかし、現場における*Microcystis*属の群集構造や優占グループの遷移に影響をおよぼす環境要因やそのメカニズムについては十分に解明されていない。

2. 研究開発目的

本研究課題では、*Microcystis*属の遺伝的に異なる個体群を識別する遺伝子マーカーとして、16S rDNAや他の機能遺伝子よりも変異速度の速い16S-23S ITS領域にPCRプライマーを作成し、そのマ

ーカーを用いた識別計数方法の開発を行った。この遺伝子マーカーを用いて、遺伝的特性の異なつた*Microcystis*属の増殖過程を、実験室内での混合培養と大規模培養実験（アクアトロン）および天然のアオコ群集を解析することによって明らかにし、アオコの増殖におよぼす生物的、化学的、物理的要因を解明することを目的とした。

3. 研究開発方法

(1) *Microcystis*属株と培養条件

国立環境研究所（NIES）および筑波藻類コレクション（TAC）から表(3)-1に示した培養株を入手した。これらの株をCB培地²³⁾もしくはMA培地¹⁰⁾を用いて、24°C、12:12時間の明暗周期で培養し、*Microcystis*属株を継代保存し、実験に使用した。

表(3)-1：本研究で用いた*Microcystis*属培養株

番号	形態種	株 ¹	毒性 ²	グループ ³
1	<i>Microcystis ichthyoblabe</i>	TAC48	-	1
2	<i>M. flos-aquae</i>	NIES98	-	1
3	<i>M. aeruginosa</i>	NIES298	+	1
4	<i>M. aeruginosa</i>	NIES1070	+	1
5	<i>M. aeruginosa</i>	NIES101	-	1
6	<i>M. aeruginosa</i>	NIES87	-	1
7	<i>M. wesenbergii</i>	NIES604	-	3
8	<i>M. wesenbergii</i>	NIES112	-	3
9	<i>M. wesenbergii</i>	NIES111	-	3
10	<i>M. wesenbergii</i>	NIES1062	-	3
11	<i>M. aeruginosa</i>	NIES44	-	3
12	<i>M. viridis</i>	NIES102	+	4
13	<i>M. viridis</i>	TAC17	+	4
14	<i>M. viridis</i>	NIES103	+	4
15	<i>M. aeruginosa</i>	NIES90	+	4
16	<i>M. wesenbergii</i>	NIES107	+	4

¹ TAC: : 筑波藻類コレクション、NIES: 国立環境研究所

² *mcyA*遺伝子の有無を+-で示した。

³ 図(3)-1の系統グループを示す。

(2) *Microcystis*属の系統解析とPCRプライマーの設計

DNAデータベースに登録されている*Microcystis*属のITS領域全長の塩基配列を選出した。その中で、毒素遺伝子（*mcyA*）の有無について情報がある株の塩基配列は71種類あり、これらをプライマー設計に用いた。まず、これら71種の塩基配列を用いて近隣接合法による系統樹を作成した。次いで、71株の塩基配列を、CLUSTAL W²⁵⁾を用いて多重アラインメントを行った。その変異サイトを検索し、系統グループに特異的な配列からPCRプライマーを作成した。それぞれのプライマーは、*Microcystis*属の16S-23S ITS領域の全長を増幅する既存のプライマー（MITS-F/R）²⁶⁾と組み合わせPCR反応を行い、それぞれのPCRプライマーセットの特異性を調べた。

(3) DNA抽出.

DNA抽出にはキサントゲン酸 (XS) バッファーを用いたXS法¹⁹⁾を用いた。手順は以下の通りである。菌体懸濁液あるいは菌体を捕集したGF/Fフィルターに、XSバッファー (最終濃度: 1%エチルキサントゲン酸カリウム、100 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、1%SDS、800 mM酢酸アンモニウム水溶液) 600 μ Lを加えボルテックスで懸濁した。70°Cで1時間処理した後、10秒間ボルテックスで激しく懸濁し、30分間氷上に静置した。室温で10,000 \times g、15分間遠心分離し、上澄みを新しい1.5 mLエッペンドルフチューブに移し、等量の100%イソプロパノールを用いたアルコール沈殿法によりDNAを精製した。100 μ LのTEバッファーにDNAを再懸濁した後に、等量のPCI (フェノール: クロロホルム: イソアミルアルコール = 25: 24: 1) によりタンパク質を除去し、再び、100%エタノールを用いたエタノール沈殿法でDNAを精製した。最後に57.5 μ LのTEバッファーに再懸濁した。

培養株については、対数増殖期の細胞溶液10mLを抜き取り、ガス胞を取り除くために47Hz、300W下で超音波処理した後に、14,400 \times gで10分間遠心分離して細胞を集めた。集めた細胞は50 μ LのTE溶液に懸濁した後にDNA抽出まで-20°Cで保存した。この培養株から抽出したDNA溶液については、吸光度計 (Pharma Spec UV-1700, 島津) を用いて、260 nmの吸光値からDNA濃度を算出し、全サンプルの濃度を50 ng μ L⁻¹に調節した。

(4) PCR

PCR反応は20 μ Lの反応系 (200 μ M dNTP、1xTaq buffer、0.25 μ M 各プライマー、0.5U Taqポリメラーゼ (Qiagen)、MgCl₂濃度はプライマーセットによって異なる) で行った。鋳型となるゲノムDNAは100 ngを反応に用いた。温度条件は、初期変性温度を94°Cで1分間行った後、変性反応を94°Cで30秒、アニーリング反応を30秒 (反応温度はプライマーセットにより異なる)、伸長反応を72°Cで30秒として、30回繰り返した。最後に72°Cで3分間伸長反応を行った。PCR産物は3%あるいは5%アガロースゲル電気泳動を行った後、臭化エチジウムで染色して紫外線照射下で確認した。

(5) 定量PCRと細胞計数

1) リアルタイムPCR

リアルタイムPCRによるプライマーセットの特異性を、表(3)-1に示した培養株から抽出したDNAを用いて調べた。リアルタイムPCR反応は20 μ Lの反応液 (4.0 mM MgCl₂、0.25 μ M プライマー、1x QuantiTeck SYBR Green PCR Master Mix (QuantiTec SYBR Green PCR Kit, Qiagen)) で行った。反応条件は、初期変性温度を94°Cで15分間行った後、変性反応を94°Cで30秒、アニーリング反応を55°Cで30秒、伸長反応を72°Cで30秒として、45回繰り返した。定量性については、NIES298、NIES111、NIES103から抽出したDNAを用いて調べた。

フィコシアニンのIGS領域 (PC) およびマイクロシスチン合成酵素遺伝子 (*mcyA*) の定量についてはYoshida et al.²⁷⁾の方法に従った。

2) リアルタイム PCR による DNA の定量と細胞密度の算出

抽出した DNA 試料を鋳型にリアルタイム PCR によって、遺伝子グループごとの 16S-23S ITS のコピー数から細胞密度を求めた。異なる濃度の既知量の DNA 溶液を標準溶液として用いて遺伝子グループごとのコピー数の定量を行った。標準溶液または XS 法で抽出した DNA 試料 1 μ L を鋳型として用いて、上述と同じ方法でリアルタイム PCR 反応を行った。標準溶液の閾値サイク

ル数 (Ct 値) から作成した検量線を用いて、試料中の遺伝子のコピー数を求めた。分離株ごとに作成したコピー数と細胞数の回帰直線式を用いて、細胞密度に換算した。

後述の混合培養実験において、グループ1に属するNIES98とNIES298の細胞数は、16S-23S ITS領域を標的としたPCRに加えて、Yoshida et al.²⁷⁾の方法による*mcvA*を標的とした有毒株のリアルタイムPCR法による計数値から算出した。すなわち、*mcvA*を標的としたリアルタイムPCR法により有毒株 (NIES298とNIES102) の細胞数を計数し、この計数値からグループ4を標的としたリアルタイムPCR法により求めたNIES102の細胞数を差し引くことで、NIES298の細胞数を算出した。さらに、グループ1を標的としたリアルタイムPCR法により求めたNIES98とNIES298の総細胞数からNIES298の細胞数を差し引くことでNIES98の細胞数を算出した。

(6) 混合培養実験

1) MA 培地を用いた単独・混合培養実験

NIES298、NIES112 および NIES102 を MA 培地¹⁰⁾で 25°C、16 時間明 ($34 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)・8 時間暗の明暗周期で 10 日間前培養した後、400 mL の MA 培地に単独培養実験では細胞密度が $1.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ となるように、混合培養実験では各株の細胞密度がそれぞれ $1.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ (計 $3.0 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$) となるように接種した。前培養と同じ条件で培養し、培養液を一週間に 1~3 回の頻度で採取した。採取した培養液中の *Microcystis* 細胞を超音波処理 (47 Hz、300 W) した後、フックス・ロイゼンタール血球計数盤を用いた直接計数によって細胞数を計数した。1.5 mL 容エッペンチューブに培養液 1 mL を採取し、遠心分離 (20,400×g、15 分間、室温) により細胞を回収した後、TE バッファー 50 μL に懸濁し、-25 °C で DNA 抽出まで凍結保存した。

2) 改変 BG-11 培地を用いた混合培養実験

BG-11 培地¹⁾に含まれる硝酸ナトリウムとリン酸水素二カリウムの量を変え、異なる栄養塩濃度に改変した培地 (改変 BG-11 培地) を用いて遺伝子タイプの異なる *Microcystis* 属株を混合培養した。実験に用いた改変 BG-11 培地中の窒素とリンの濃度を表(3)-2 に示す。グループ 1 の NIES98

表(3)-2：改変BG-11培地中の窒素とリンの濃度

	実験区			
	N _H P _H	N _H P _L	N _L P _H	N _L P _L
窒素濃度 (mgN L ⁻¹)	49	49	4.9	4.9
リン濃度 (mgP L ⁻¹)	7.13	0.713	7.13	0.713
N:Pモル比	15.4	154	1.54	15.4

	実験区					
	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6
窒素濃度 (mgN L ⁻¹)	49	4.9	2.45	0.98	0.56	0
リン濃度 (mgP L ⁻¹)	7.13	7.13	7.13	7.13	7.13	7.13
N:Pモル比	15.4	1.54	0.76	0.3	0.15	-

(無毒株)と NIES298 (有毒株)、グループ 3 の NIES112 とグループ 4 の NIES102 を、窒素 49 mgN L⁻¹、リン 7.13 mgP L⁻¹ を含む改変 BG-11 培地で前項と同じ条件で 10 日間前培養した後、各栄養塩濃度条件に調整した改変 BG-11 培地 400 mL に各株の細胞密度が 1.0×10⁴ cells mL⁻¹ (計 4.0×10⁴ cells mL⁻¹) となるように接種した。前培養と同じ条件で培養し、前述した MA 培地を用いた混合培養実験と同様に顕微鏡による直接計数と *Microcystis* 細胞の回収を行った。

(7) アクアトロン実験

1) 混合培養実験

MA培地⁵⁾70 Lを添加したアクアトロン6基にグループ1に属するNIES298、およびグループ3に属するNIES112をそれぞれ初期細胞密度が3.5×10³ cells mL⁻¹になるように接種し、25°C、12:12時間の明暗周期で38日間培養した。培養期間中、混合培養液の一部を直接計数用、および定量PCR用試料として1週間に1回から3回の頻度で適量採取した。直接計数用試料はグルタルアルデヒド(最終濃度2%)で固定した後、メンブレンフィルターで適量濾過した。フィルター上の*Microcystis*細胞を小型細胞(NIES298)と大型細胞(NIES112)ごとに蛍光顕微鏡を用いて計数した。リアルタイムPCR用試料は培養液中の*Microcystis*細胞をGF/Fフィルター(直径25 mm)上に集めて2 mL容エッペンチューブに入れ、-25°Cで凍結保存した。

2) 天然アオコの増殖と消滅

2011年10月12日に、琵琶湖の内湖である平湖のアオコ試料水を採取した。試料水を京都大学生態学研究センターに持ち帰り実験に供した。70 L容のアクアトロン6基に、窒素とリンの最終濃度が表(3)-3になるように改変BG-11培地の濃縮液と全量の1/100量のアオコ試料水を添加し、蒸留水で全量を70 Lとした。25°C、12:12時間の明暗周期(アクアトロン表面の光量子量を40-45 μmol m⁻² sec⁻¹)で培養した。培養期間中、培養液の一部を適当な間隔で採取した。培養液中の*Microcystis*細胞をGF/Fフィルター(直径25 mm)上に集めて2 mL容エッペンチューブに入れ、-25°Cで凍結保存した。この他、アオコ試料水そのままアクアトロンに添加し、アオコの崩壊過程をモニターした。

表(3)-3: アクアトロン実験の栄養塩濃度

アクアトロン タンク番号	N濃度 (mgN L ⁻¹)	P濃度 (mgP L ⁻¹)
1および2	49	7.13
3および4	49	0.0049
5および6	0.49	7.13
7	平湖の湖水	

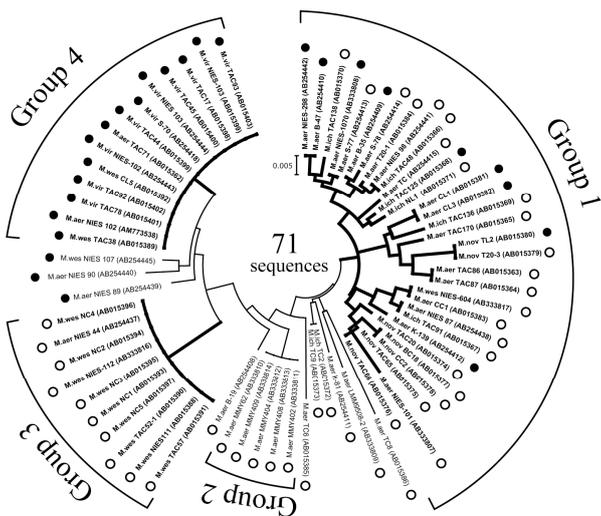
4. 結果及び考察

(1) PCRプライマーの特異性

DNAデータベースから選んだ71の塩基配列を用いて近隣接合法による系統樹を作成したところ、4つのグループに分けられた(図(3)-1)。グループ1の56.3% (18/32) は*M. aeruginosa*であり、毒素遺伝子を有する株と有さない株が含まれていた。グループ2は三方湖から単離された株のみで構成された。グループ3の90.0% (9/10) が*M. wesenbergii*であり、無毒株のみで構成されていた。グループ4は、71.4% (10/14) が*M. viridis*で構成され、全ての株が有毒株であった。

*Microcystis*属の16S-23S ITS領域は約360 bpであり、CLUSTAL W²⁵⁾を用いて塩基配列の多重アラインメントを行ったところ、52ヶ所に変異サイトが存在していた。この内、変異の大きい領域に、上述の系統グループを特異的に検出できる3つのPCRプライマーを作成した(図(3)-2)。これらのPCRプライマーは*Microcystis*属の16S-23S ITS領域に特異的なプライマーMITS-FあるいはMITS-R²⁶⁾と組合せて用いた。

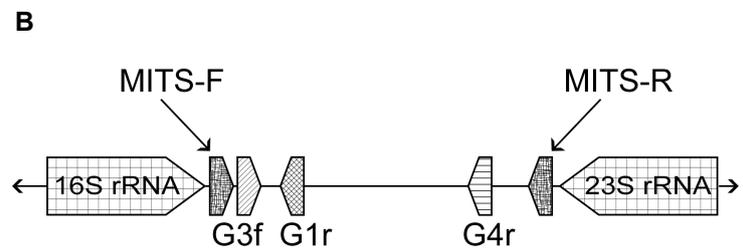
表(3)-1に示す16株から抽出したゲノムDNAを鋳型として用い、各PCRプライマーセットの特性について調べたところ、図(3)-3に示すように、グループ1に特異的なG1rとMITS-Fのプライマーセットを用いた時にグループ4に属するTAC17株の非特異的増幅が認められた場合を除き、全てのプライマーセットはそれぞれのグループに属する株に特異的であることが示された。同様に、リアルタイムPCR反応での各プライマーセットの特異性を検証し



図(3)-1：16S-23S rDNA ITS領域全長を用いた近隣接合法による系統樹。図中の●はミクロシスチン合成酵素遺伝子(mcyA)を有し、○は有さない株を示す。

A

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	文献
G1r	CGGAG CGAGG CGAAA TT	本研究
G3f	GACGA AAAAA TAGTA GTCGA AA	本研究
G4r	CAGCA CCTTA TCTTA TATAC ATATA	本研究
MITS-F	AAGGG AGACC TAATT CVGGT	Yoshida et al. ²⁶⁾
MITS-R	TTGCG GTCYT CTTTT TTGCG	Yoshida et al. ²⁶⁾



図(3)-2：本研究で作成したPCRプライマーの塩基配列(A)と*Microcystis*属ユニバーサルプライマーとの組合せ(B)。

た。G1rとMITS-FのプライマーセットのみTAC17に非特異的増幅が見られたが、作成したプライマーは各グループに特異的であった（表(3)-4）。

表(3)-4：リアルタイムPCRによるプライマーの特異性試験。

プライマーセット	株番号															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
MITS-F～G1r	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
G3f～MITS-R	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MITS-F～G4r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

株番号は表(3)-1に示した番号の株を表す。



図(3)-3：培養株から抽出したDNAを用いて、作成したプライマーセットの特異性試験。上段はG1、中段はG3、下段はG4のプライマーセットを用いて増幅したPCR産物を供した。各レーンの番号は表(3)-1に示した番号の株を表す。Mは100bp DNAサイズマーカー。

(2) 定量PCRによる*Microcystis*属細胞の計数

1) 培養細胞を用いた計数

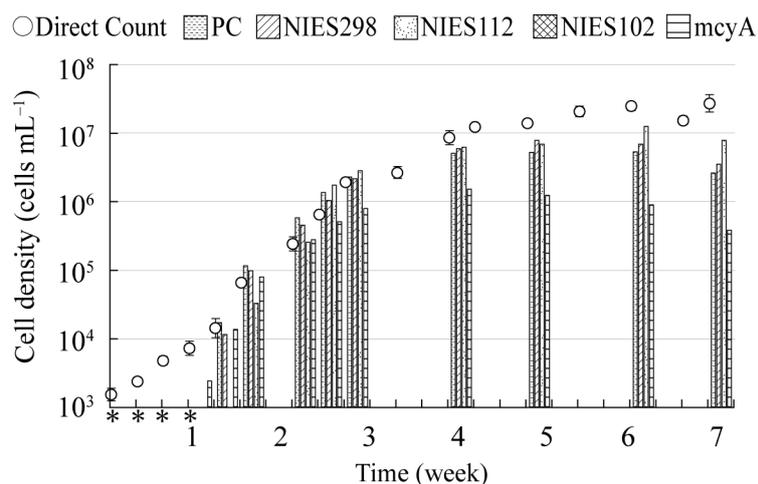
既知量のDNA溶液を10倍ずつ段階的に希釈し、リアルタイムPCR用の標準溶液を作成した。この標準溶液を反応液に添加してリアルタイムPCR反応を行ったところ、DNAのコピー数とCt値には直線関係が得られた。精製したDNAを用いた場合、 $10^2 \sim 10^{10}$ 程度のコピー数の定量が可能であった。

次に、*Microcystis*属細胞の計数方法について検討した。NIES298、NIES111およびNIES102をそれぞれ培養し、およそ $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ の細胞を得た。この細胞を段階的に希釈し、XS法でDNAを抽出した。この抽出したDNAを鋳型にリアルタイムPCRに共したところ、NIES298株は $10^2 \sim 10^5$ 細胞の範囲で直線関係が得られた。NIES111株では $10^2 \sim 10^4$ 細胞の範囲、NIES102株では $10^3 \sim 10^5$ 細胞の範囲で直線関係が得られた（データ未記載）。これらの結果からPCR一反応当たりと一試料当たりの検出限界細胞数を算出したところ、グループ1とグループ3に特異的なプライマーセットでは一反応あたり $2 \sim 5 \times 10^1$ 以上の*Microcystis*属細胞があれば検出可能であった。一方、グループ4に特異的なプライマーセットを用いた場合、 10^3 程度の*Microcystis*属細胞が必要であった。XS法で*Microcystis*属細胞からDNAを抽出する場合、細胞を遠心分離で濃縮することが可能で、現場の水試料1 Lを用いると仮定すると、検出感度が最も低かったグループ4の*Microcystis*属でも $1.2 \times 10^2 \text{ cells mL}^{-1}$ 程度の細胞密度で検出可能であり、アオコを形成する以前の*Microcystis*属を検出できることが示された。

2) 混合培養中の*Microcystis*属細胞の識別計数

グループ1、3、4にそれぞれ属するNIES298、NIES112およびNIES102をCB培地で24°C、12:12時間の明暗周期で約1週間前培養し、これを400 mLのCB培地に各株の細胞密度が約 1.0×10^3 cells mL⁻¹となるように接種し、前培養と同じ条件下で、約7週間混合培養した。一週間に1回から3回の頻度で、培養液を採取し、直接計数によって*Microcystis*属の細胞数を計数するとともに、XS法でDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型に定量PCRによって、16S-23S rDNA ITS、PC、*mcyA*の遺伝子量を定量した。その結果を図(3)-4に示す。直接計数法で計数した*Microcystis*属細胞は指数関数的に増殖し、4週間目に定常期に達した。この直接計数で得られた細胞数とPCを標的としたリアルタイムPCRによる計数値は対数増殖期では概ね一致していた。また、今回作成したグループ特異的プライマーを用いてリアルタイムPCRによってそれぞれの株を計数したところ、NIES298とNIES112は同じように増殖していることが確認された。一方、NIES102は混合培養中からは検出されなかった。同時に各株を別々に培養したが、NIES102は培養開始約17日後までは増殖が認められず、その後、増殖は認められたものの41日後の細胞密度は低く、 $4.8 \pm 2.9 \times 10^6$ cells mL⁻¹までにしか達しなかった。混合培養においては、NIES102は順応力の高い他の株と同所的に存在したために、淘汰されたと考えられる。

ところで、定常期に達すると直接計数値がリアルタイムPCRで算出した細胞数より大きくなる傾向にあった。実際の蛍光顕微鏡による観察では自家蛍光が薄く、死滅過程の細胞も計測している可能性がある。これらの細胞ではDNAの分解が起こるので、細胞の形は留めているがリアルタイムPCRによるDNAの検出に十分な質と量を持たない細胞（ゴースト）²⁹⁾であると考えられ、いわゆる“生きた”*Microcystis*属細胞を計数する場合には、直接計数よりもリアルタイムPCR法によるDNAコピーからの推定値のほうが優れているかもしれない。

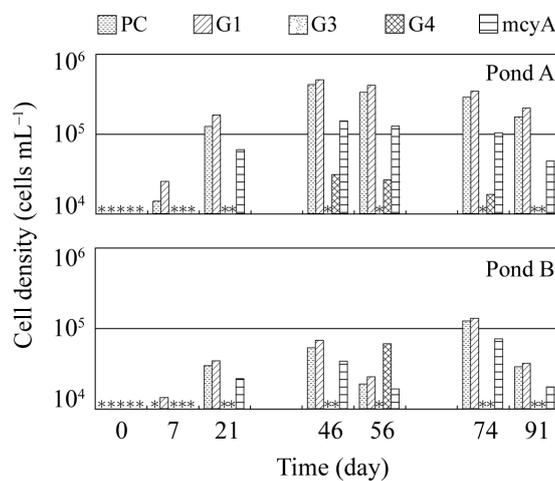


図(3)-4 : *Microcystis*属3株 (NIES298、NIES112、NIES102) の混合培養液中の細胞密度の経時変化。直接計数法により計測した細胞密度を丸印 (○) で示す。棒グラフはリアルタイムPCR法を用いて推定した遺伝子型別の細胞密度 (G1、G3、G4)、ならびにPC、*mcyA*のコピー数を示す。*は検出限界以下を示す。エラーバーは標準誤差 (n=3) を示す。

3) 野外への応用

a 実験池

京大大学生態学研究センターの屋外実験池に*Microcystis*属のアオコを人工的に発生させた試料に、今回開発したPCRプライマーを用いたリアルタイムPCRを応用した。リアルタイムPCRによって各グループの*Microcystis*属細胞を計数したところ、“アオコ”の状態になっていた実験池Aの*Microcystis*属の群集組成はグループ1が主要な構成種で、グループ3は検出されなかった(図(3)-5)。これらの細胞数は時間とともに変化した。構成比はアオコが発生している期間中、類似した傾向を示した。“アオコ”状態にならなかった実験池Bでも実験池Aと同じような*Microcystis*属の群集組成であったが、56日目のみグループ4が優占種となった。天然の湖沼で*Microcystis*属のアオコの群集組成は時間的に変動することが、クローン解析によって明らかにされており²⁸⁾、今回、人工的に発生させたアオコでも群集組成が時間的に変化していることが、今回開発した定量PCR法によってとらえることが可能となった。



図(3)-5：実験池AとBにおける、*Microcystis*属細胞の経時変化。定量PCR法を用いて推定した遺伝子型別の細胞密度（G1、G3、G4）、ならびにPC、*mcyA*のコピー数を示す。アスタリスク（*）は検出限界以下を示す。

b 天然湖沼（下笠ダム、ため池、水月湖、平湖）

アオコが発生している大分県の下笠ダム、静岡県のため池、福井県の水月湖ならびに滋賀県の琵琶湖の内湖である平湖から採取した水試料を用いて*Microcystis*属の細胞数をリアルタイムPCR法で計数した。XS法によってDNAを抽出し、PCを標的とした定量PCRで*Microcystis*属の細胞密度を見積もったところ、下笠ダムでは 2.7×10^6 cells mL⁻¹、ため池では 3.4×10^5 cells mL⁻¹、水月湖では 2.0×10^5 cells mL⁻¹、平子では 2.5×10^7 cells mL⁻¹あった(図(3)-6)。*mcyA*プライマーセットを用いて有毒個体群数を推定したところ、下笠ダムは 1.3×10^5 cells mL⁻¹、ため池は 8.2×10^4 cells mL⁻¹で、水月湖は 1.6×10^5 cells mL⁻¹、平湖は 4.2×10^6 cells mL⁻¹であった。全*Microcystis*属細胞数に占める有毒株の割合は、下笠ダムの4.8%から水月湖の83%と湖によって大きく変化していた。今回開発したプライマーを用いて各グループ別に*Microcystis*属を計数した結果、*Microcystis*属内のグループ構成は試料間で大きく異なっていた。下笠ダムはグループ3が優占していたが、他の湖沼ではグループ1が優

占していた。グループ3は形態的に分類された*M. wesenbergii*のタイプを主とする無毒の株で構成されており（図(3)-1）、下笠ダムでは全*Microcystis*属に対する有毒個体群の占める割合が低いのは、グループ3が優占していたことと一致する。一方、他の湖沼では有毒株と無毒株が混在するグループ1が優占しており、この内の有毒株の占める割合が高かったと推察できる。

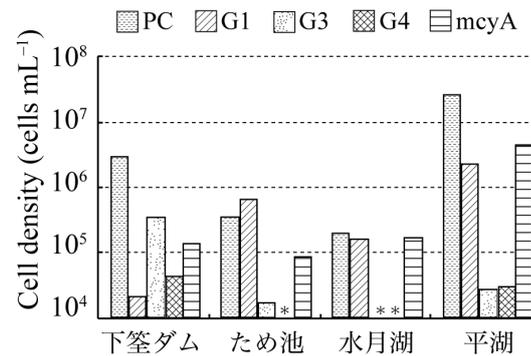
混ざり合うことのない4つの湖沼での*Microcystis*属のアオコの構成種が異なることが、今回開発したリアルタイムPCR法によって明らかにすることが可能となった。隔離された生息環境における優占種の差異は、環境の違いによるものなのか、潜在的に存在する種が異なるのかは不明である。このことについては、ラボスケールでの優占種の遷移過程を調べる実験や、実験池、天然湖沼での経時的なモニタリングを通して詳細に調べる必要がある。

(3) *Microcystis*属の増殖におよぼす栄養塩濃度の影響

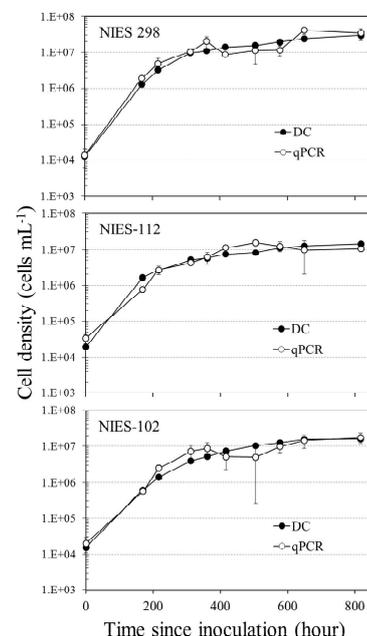
1) MA培地を用いた混合培養の予備的検討

a 単独培養実験

まず、NIES298、NIES112、およびNIES102を単独培養し、異なる増殖段階でのリアルタイムPCR法による細胞数と直接計数法による細胞数を比較した。単独培養実験における各分離株の直接計数法とリアルタイムPCR法による細胞密度の経時変化を図(3)-7に示す。直接計数法に比べてリアルタイムPCR法によって計数した細胞数のばらつきが大きかった。この結果は、*Microcystis*の細胞あたりのDNA量が変化していたと考えられる。リアルタイムPCR法による*Microcystis*属細胞の計数値は、培地中の細胞数だけでなく、細胞あたりのDNA量の変化によっても影響を受けることが知られている^{12,18)}。Kurmayer and Kutzenberger¹⁸⁾は対数増殖期から定常期への移行期間におけるリアルタイムPCR法で計数した細胞数は、粒子数



図(3)-6：下笠ダム（大分県）、ため池（静岡県）、水月湖（福井県）および平湖（滋賀県）のグループ別の*Microcystis*属細胞数。定量PCR法を用いて推定した遺伝子型別の細胞密度（G1、G3、G4）、ならびにPC、*mcyA*のコピー数を示す。アスタリスク（*）は検出限界以下を示す。



図(3)-7：単独培養実験における直接計数法（DC、●）と定量PCR法（qPCR、○）による細胞密度の経時変化の比較。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

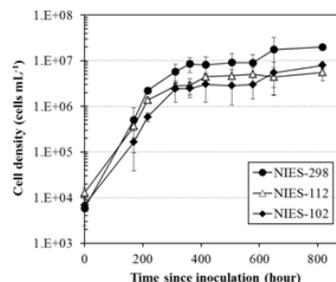
計測装置による値に比べ、最大で1桁多くなることを報告している。しかし、本実験での対数増殖期と定常期後期における直接計数法とリアルタイムPCR法による計数値の差は殆ど無く、リアルタイムPCR法による計数値を用いた比増殖速度と最大細胞密度の算出には、問題がないと判断できる。

b 混合培養実験

混合培養実験において、リアルタイムPCR法によって計数された各分離株の細胞密度の経時変化を図(3)-8に示す。培養期間を通して、3株の細胞密度の合計値は直接計数法によって求めた細胞密度とおよそ一致していたことから、リアルタイムPCR法によって個々の分離株の細胞密度を正確に測定できていたと考えられる。全ての分離株は指数関数的に増加した後、培養終了時に最大細胞密度に達した。対数増殖期における各株の比増殖速度はNIES298が 0.55 day^{-1} と最も高く、NIES112とNIES102はそれぞれ 0.43 day^{-1} 、 0.46 day^{-1} と同程度であった(表(3)-5)。これらを単独培養での比増殖速度と比較したところ、明確な差は認められなかった(表(3)-5)。一方、各分離株の最大細胞密度は、混合培養と単独培養では大きく異なっていた(表(3)-5)。このことは、混合培養では株間で栄養塩を巡って競争が起きていたと推察される。3株のうちで比増殖速度が最も高かったNIES298は、有利に栄養塩を取り込めたため最大細胞密度が他の株に比べて大きかったと考えられる。

2) 窒素

2段階の窒素濃度とリン濃度をそれぞれ組み合わせた4種類の改変BG-11培地中の*Microcystis*属分離株の細胞密度の経時変化を図(3)-9に示す。全ての株は接種後から指数関数的に増殖した後、定常期へと移行した。各分離株の細胞密度の合計は同時に測定した直接計数法による細胞密度と一致した。対数増殖期における株ごとの比増殖速度を表(3)-6に示す。各株の比増殖速度は培地間で変動がみられたが、栄養塩濃度に関わらずNIES98が最も高い値を、NIES102が最も低い値を示した。各株の最大細胞密度についても、全ての実験区においてNIES98が最も高く、次いでNIES298とNIES112が同程度、NIES102は他の株と比べて低かった(図(3)-10)。各株の培地間の最大細胞密度を比較した結果、NIES98の最大細胞密度は、高窒素濃度・高リン濃度区($N_H P_H$)で最も高く、他の実験区と有意差(ANOVA、 $p < 0.01$)が認められた。高窒素濃度・低リン濃度区($N_H P_L$)のNIES98の最大細胞密度がこれに続き、低窒素濃度区($N_L P_H$ と $N_L P_L$)が最も低かった。他の株については、NIES102が $N_H P_L$ 区で他の処理区に比べて高い値を



図(3)-8 : MA培地を用いた混合培養実験における各*Microcystis*分離株の細胞密度の経時変化。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

表(3)-5 : MA培地における各*Microcystis*属分離株の比増殖速度と最大細胞密度の比較

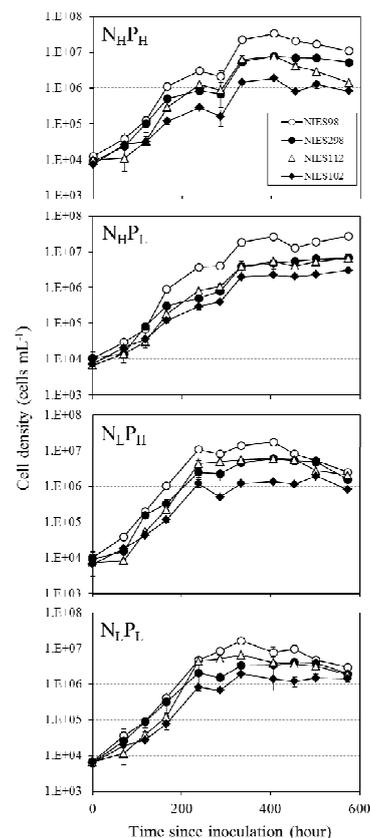
株	比増殖速度 (day^{-1})	最大細胞密度 (cells mL^{-1})
単独培養		
NIES298	0.53	3.0×10^7
NIES112	0.45	1.4×10^7
NIES102	0.44	1.6×10^7
混合培養		
NIES298	0.55	2.0×10^7
NIES112	0.43	5.6×10^6
NIES102	0.46	8.0×10^6

示したことを除き、栄養塩濃度と最大細胞密度の間に明確な関係は認められなかった。これらの結果は、NIES98が他の分離株に比べてより高濃度の栄養塩環境に適応していることを示唆している。一方、他の株については、設定した窒素濃度が高く増殖を制限していないために、最大細胞密度や比増殖速度に違いが認められなかったと考えられた。そこで、窒素濃度をより低濃度に調整した改変BG-11培地（表(3)-2下）を作成し、同様の実験を行った。

図(3)-11に示すように全ての株は接種後から指数関数的に増加した。対数増殖期は初期窒素濃度が低い程、短くなる傾向が認められた。初期窒素濃度が 0.49 mgN L^{-1} と 0 mgN L^{-1} の場合、NIES98は約400時間以降から急速に細胞密度が減少した。このような現象は、他の分離株では観察されなかった。NIES98は高濃度の窒素を含む培地では他の株よりも有利に増殖する一方で、増殖が維持できない窒素濃度以下では他の*Microcystis*属株によって淘汰されやすいのかもしれない。このことは、現場環境における窒素濃度が株間の増殖競争だけでなく、その生残競争にも影響を与えていると考えられる。

NIES98は高い初期窒素濃度（ $2.45 \sim 49 \text{ mgN L}^{-1}$ ）では他の株よりも高い比増殖速度であったが、 0.98 mgN L^{-1} 以下では、NIES298およびNIES112と同程度か低い比増殖速度であった（表(3)-7）。この結果は、NIES98は、他の株に比べて窒素による増殖制限を受けやすいことを表している。

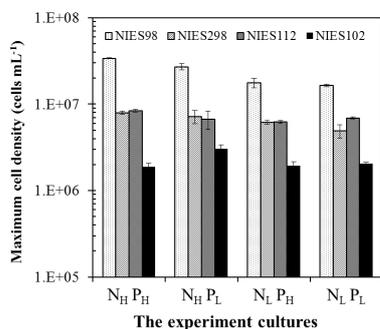
実験培地中の初期窒素濃度が $0 \sim 4.9 \text{ mgN L}^{-1}$ までの範囲において、初期窒素濃度と最大細胞密度の間に正の相関関係が示された（図(3)-12）。NIES98は初期窒素濃度に対する最大細胞密度の傾きが大きく、窒素濃度に対する増殖応答が他の株と異なっていた。現場環境では硝酸態窒素濃度によって有毒株の細胞密度が変化することが報告されており^{22,27)}、窒素濃度の変化によってNIES98のような特定の株が増減するために、*Microcystis*属アオコの群集構造や有毒株の割合が変動していると考えられる。



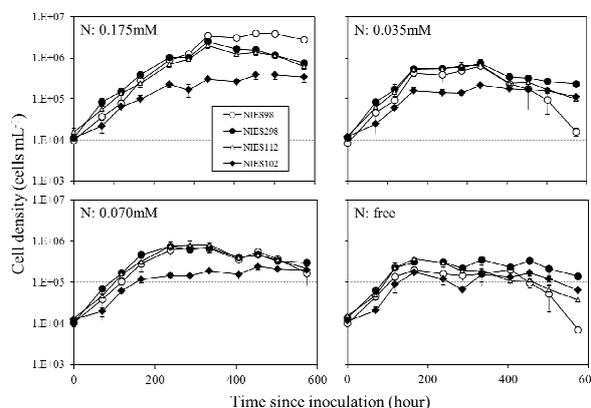
図(3)-9：定量PCR法による実験培地ごとの*Microcystis*分離株の細胞密度の経時変化。エラーバーは標準偏差を示す（ $n=3$ ）。培養条件は表2を参照。

表(3)-6：各栄養塩処理区における*Microcystis*分離株ごとの対数増殖期の比増殖速度（ day^{-1} ）

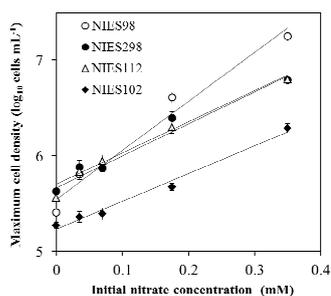
	栄養塩処理			
	$\text{N}_\text{H}\text{P}_\text{H}$	$\text{N}_\text{H}\text{P}_\text{L}$	$\text{N}_\text{L}\text{P}_\text{H}$	$\text{N}_\text{L}\text{P}_\text{L}$
NIES98	0.52	0.56	0.67	0.59
NIES298	0.43	0.42	0.56	0.56
NIES112	0.49	0.48	0.52	0.58
NIES102	0.33	0.38	0.41	0.35



図(3)-10：各実験培地における分離株ごとの最大細胞密度の比較。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。横軸は表2を参照。



図(3)-11：初期窒素濃度の異なる実験培地における分離株ごとの細胞密度の経時変化。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。図左上は初期窒素濃度を示す。



図(3)-12：改変BG-11培地中の初期窒素濃度と各分離株の最大細胞密度との関係。エラーバーは標準偏差を示す(n=3)。

表(3)-7：各実験培地における*Microcystis*分離株ごとの対数増殖期の比増殖速度 (day⁻¹)

株	培地中の初期窒素濃度 (mgN L ⁻¹)					
	49	4.9	2.45	0.98	0.56	0
NIES98	0.52	0.67	0.46	0.42	0.41	0.29
NIES298	0.43	0.56	0.44	0.43	0.40	0.32
NIES112	0.49	0.52	0.38	0.42	0.40	0.33
NIES102	0.33	0.41	0.31	0.28	0.28	0.28

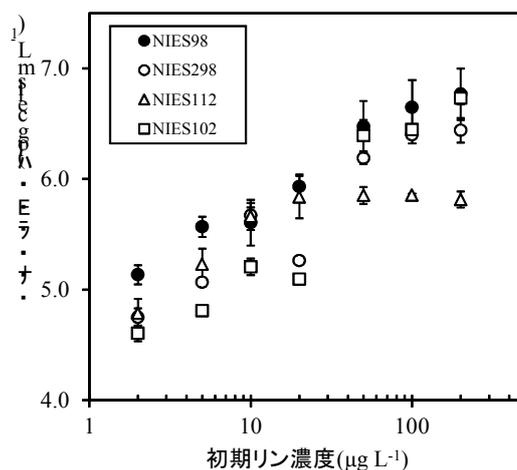
3) リン

リン濃度を7段階に変化させた培地中での、各株の増殖をモニターした。何れのリン濃度でも全ての株は増殖したが、培地中の初期リン濃度によって各株の増殖のパターンは異なった。増殖曲線の傾きから算出した比増殖速度を表(3)-8に示す。また、最大細胞密度を図(3)-13にまとめた。リン濃度が0.050 mgP L⁻¹以上では、株によって増殖速度と最大細胞収量は異なるものの、何れの株も良好に増殖した。一方、0.020 mgP L⁻¹以下のリン濃度では良好に増殖する株と増殖しない株が明確に分かれた。グループ1に属する無毒株のNIES98はリン濃度に関係なく*Microcystis*属株が混在するなかで、最も良く増殖した。これに対し、有毒株であるNIES102株はリン濃度が高い場合にはNIES98と同等程度の増殖を示したが、低濃度の場合は他の株よりも増殖が抑制された。この結果は、現場環境中のリン濃度によって優占する*Microcystis*属の種類が異なることを示唆しており、リ

ン濃度の上昇に伴って*Microcystis*属によるアオコが増大するだけでなく、アオコ中に含まれる有毒株の相対的な比率が増加するために、毒の生産・蓄積にも影響をおよぼすかもしれないことを意味している。

表(3)-8：混合培養系におけるリン濃度の異なる培地中での各*Microcystis*属株の比増殖速度 (day^{-1})

株	培地中の初期リン濃度 (mgP L^{-1})						
	0.002	0.005	0.010	0.020	0.050	0.100	0.200
NIES98	0.11	0.11	0.25	0.22	0.37	0.40	0.36
NIES298	0.09	0.13	0.28	0.20	0.29	0.28	0.30
NIES112	0.12	0.14	0.27	0.29	0.28	0.29	0.24
NIES102	0.07	0.06	0.07	0.11	0.27	0.31	0.33

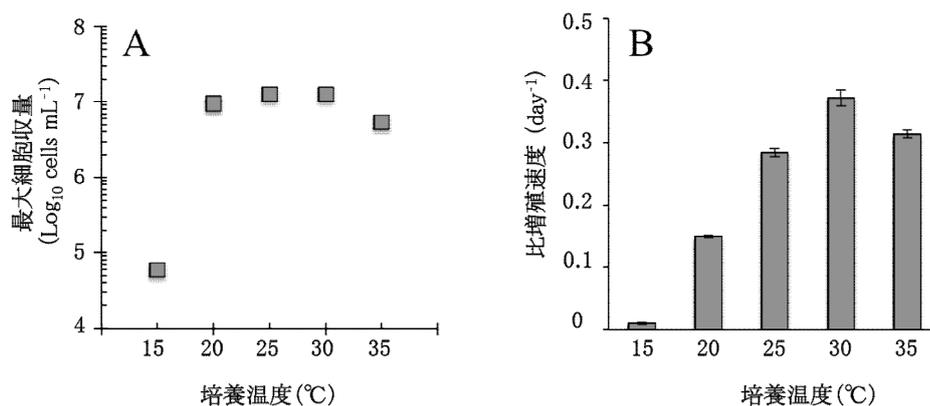


図(3)-13：各リン濃度における混合培養での*Microcystis*属株ごとの最大細胞密度の比較。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

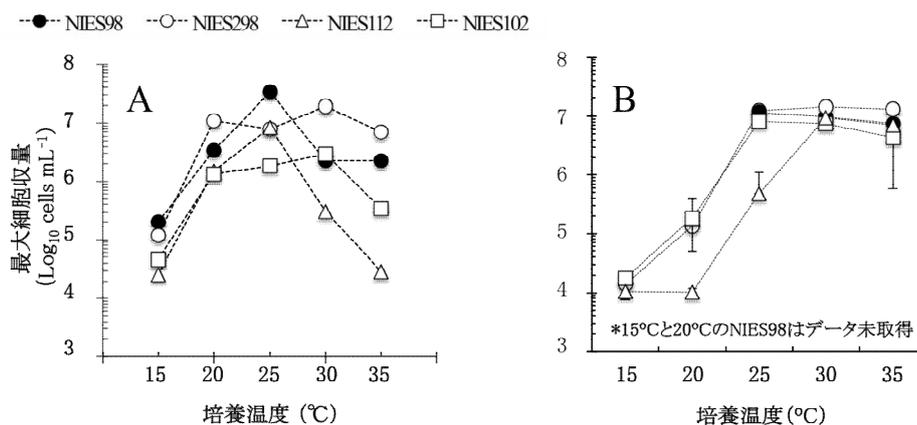
(4) *Microcystis*属の増殖におよぼす温度の影響

水温を5段階に変化させた条件下での、全菌数計測に基づく最大細胞収量と比増殖速度を図(3)-14に示す。20°C以上では温度に関係なく最大細胞収量は 10^7 cells mL^{-1} 前後であったが、比増殖速度は30°Cが最も大きな値であった。ここから、培養温度は*Microcystis*のブルームの規模ではなく、*Microcystis*群集の比増殖速度に影響を与えると考えられた。次に、混合培養と単培養中での各株の最大細胞収量を算出した結果を図(3)-15に示す。混合培養では培養温度が25°C以下の条件では、各株の最大細胞収量の違いは10倍程度であるが、30°C以上ではグループ3と4がグループ1の増殖と比べて抑制された。特にグループ3の無毒株は殆ど増殖せず、全細胞数の1/1000以下程度まで抑制された。単培養では30°C以上においてグループ3と4の最大細胞収量はグループ1に属するNIES298株と同一であったことを考えると、混合培養中では単培養と異なり、株間で何らかの競合が起こっ

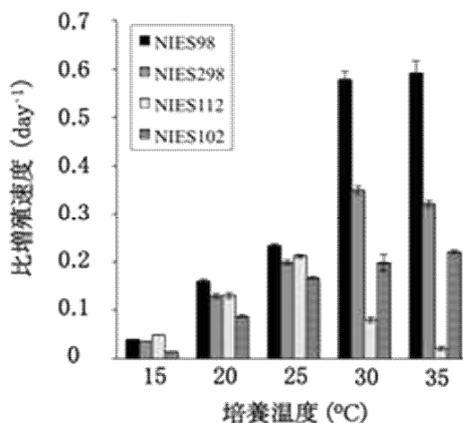
ていると考えられた。一方で、混合培養中の各株の比増殖速度は、30°C以上で大きく異なり、最大細胞収量と同様にグループ1に含まれる2株の増加が顕著であったが、グループ3は顕著に減少した(図(3)-16)。以上の実験より、混合状態での*Microcystis*属の増殖は25°Cで遺伝子タイプ間の違いが顕著となり、高い比増殖速度を有する遺伝子タイプが、最終的に大きな最大細胞収量を獲得することが示唆された。すなわち、環境の温度によって増殖の応答が遺伝子タイプ毎に異なっており、現場温度が群集組成に影響をしていることが示唆された。



図(3)-14: 各培養温度での混合培養中の全*Microcystis*属の最大細胞収量(A)と比増殖速度(B)。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。



図(3)-15: 各培養温度での混合培養中の*Microcystis*属株ごとの最大細胞収量(A)と単培養中の最大細胞収量(B)の比較。エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。



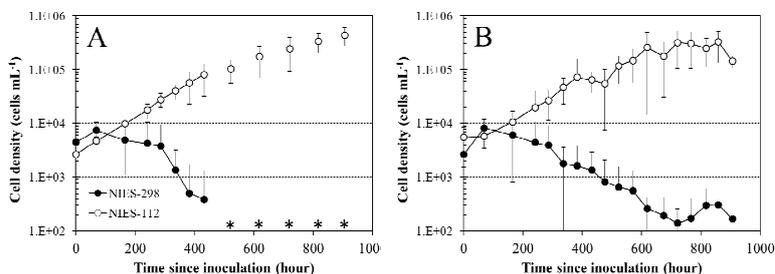
図(3)-16：各培養温度での混合培養中の*Microcystis*属株ごとの比増殖速度。
エラーバーは標準偏差を示す (n=3)。

(5) アクアトロン実験

1) *Microcystis*属2種の混合培養

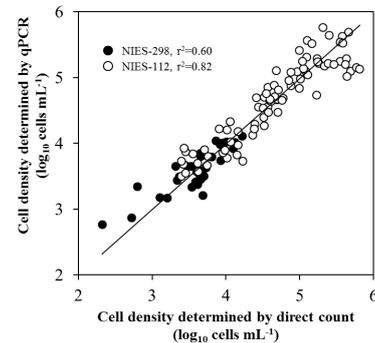
MA培地を添加したアクアトロンにおいて人工的にアオコを発生させることができた。直接計数法によるNIES298とNIES112の細胞密度の推移は、NIES112が培養期間を通して増加し、906時間後に最大値 $4.4 \pm 1.6 \times 10^5$ cells mL⁻¹に達した。これとは対照的に、NIES298は接種直後から細胞数が減少し、475時間以降は、顕微鏡を用いた直接計数法では計数が不可能であった(図(3)-17A)。一方、リアルタイムPCR法によって全ての試料からNIES298とNIES112にそれぞれ由来する16S-23S ITSを定量できた(図(3)-17B)。NIES112は接種から856時間後に最大値に達した。NIES298は直接計数法と同様に、培養開始直後からの細胞が減少した。このNIES298の減少とNIES112の増加は、株間の排他的競争を示唆している。しかし、アクアトロン内は無菌状態ではなく、その原因を推定することは困難であった。

直接計数法とリアルタイムPCR法で計数した細胞数は良く一致していた(図(3)-18)。この結果は、リアルタイムPCR法によって複数の遺伝子グループの*Microcystis*属が混在する試料からでも株ごとに細胞数を計数できることを示している。さらに、リアルタイムPCR法は、直接計数法では定量できなかったNIES298の低密度での推移を計測することができた。従来の顕微鏡による直接計数法では低密度で存在する*Microcystis*属の計数が難しく、“アオコ”状



図(3)-17：*Microcystis*属2株(NIES298とNIES112)の直接計数法(A)と定量PCR法(B)によるアクアトロン中の細胞密度の経時変化。エラーバーは標準偏差を示す(n=6)。アスタリスクは計数できなかったことを示す。

態の*Microcystis*属を対象にその細胞密度や形態種組成が観察されていた⁴⁾。しかし、近年の分子生物学的手法により、アオコが形成されない季節でも湖水中に*Microcystis*属の細胞が僅かに存在していることが明らかになっている¹²⁾。したがって、形態学的特徴、およびマイクロシスチン産生能と密接に関係する遺伝子グループを識別・計数できるリアルタイムPCR法は、アオコの発達過程での遺伝子グループ間の競争だけでなく、アオコ形成以前や衰退時などの低密度で推移する*Microcystis*属をモニタリングする上でも有効な手法といえる。

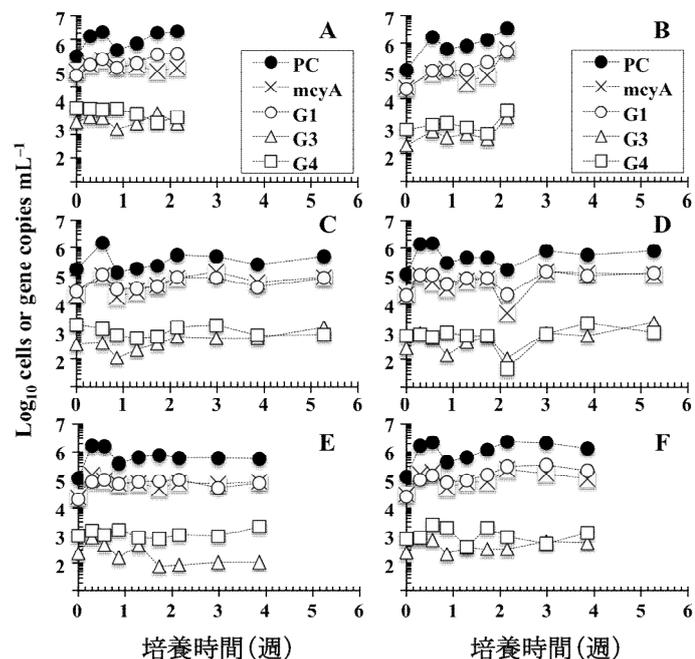


図(3)-18：直接計数法と定量PCR法による*Microcystis*属細胞数の関係。図中の直線は $y=1.00x$ の一次回帰直線を示す。

2) アクアトロンを用いた天然アオコの増殖と消滅過程

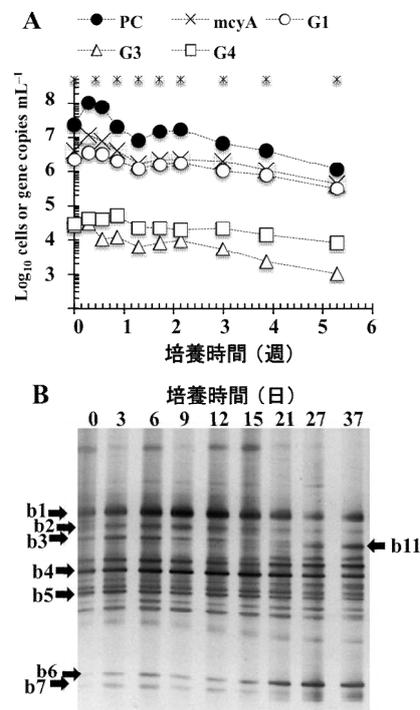
アクアトロンに添加した*Microcystis*属の細胞数は4日後にかけて、初期の添加細胞数の約8.9～17.0倍に増加し、その後不規則な増減を繰り返した(図(3)-19)。最終的にアオコは消滅へ向かったが、アオコを保持できる期間は、

「高窒素・低リン」、「低窒素・高リン」、「高窒素・高リン」の順に長かった。この結果は、栄養塩濃度およびそのバランスがアオコを保持できる期間に影響を及ぼしていると考えられた。図(3)-20にアオコ試料そのものをアクアトロンで保持した際の、各遺伝子コピー数と各遺伝子型の細胞密度の推移並びに、ラン藻類の群集組成を表すDGGEバンドパターンを示す。栄養塩を添加していない“アオコ”の状態では、培養開始後から徐々に細胞数が減少し、アオコが崩壊していく過程が観察できた(図(3)-20A)。このアオコの群集組成をDGGE解析によって調べたところ、培養期間を通して出現するバンド(b1、b2、b4、b5、b6)、培養初期に出現するバンド(b3、b7)、培養後期に出現するバンド(b11)が存在した。*Microcystis*属の株によって崩壊する速度が異なることが



図(3)-19：各アクアトロンの遺伝子コピー数および各遺伝子型の細胞数の推移。高窒素・高リン(AとB)、高窒素・低リン(CとD)、低窒素・高リン(EとF)の比較。PCとmcysAはフィコシアニンと*mycA*遺伝子コピー数を、G1、G3、G4は各遺伝子型の細胞密度を示す。

示唆された。



図(3)-20：アクアトロンで培養した天然アオコ中の各遺伝子コピー数および各遺伝子型の細胞密度の推移 (A) と *Microcystis* 属の組成を表す DGGE バンドパターン (B)。* は DGGE バンドパターンの日付に対応する。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

異なる遺伝子グループの *Microcystis* 属株が混在する試料からでも、各グループに特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR 法によって株ごとの細胞数を正確に計数することが可能となった。栄養塩濃度の異なる条件下ならびに培養温度の異なる条件下で数種の株を混合培養したところ、栄養塩濃度に対する増殖特性が株によって異なることが明らかとなった。また、温度に対する増殖特性も単独での培養と株が混在する培養では、増殖特性が異なることが示された。この結果は、現場における栄養塩の濃度が *Microcystis* 属の群集構造を変化させる要因の一つであるとともに、環境の温度によって優占する *Microcystis* 属の種類が変化すると考えられた。本研究の成果は、天然湖沼における *Microcystis* 属のアオコの形成・消滅過程を理解する上で重要な知見で、その学術的な意義は大きい。

(2) 環境政策への貢献

従来、アオコの分類については、細胞の形状、群体の形状・大きさおよび群体を取り巻く粘質体の状態、さらには細胞の大きさとガス胞の有無を、顕微鏡観察により行っていた。わが国

では*Microcystis aeruginosa*、*M. wesenbergii*、*M. viridis*、*M. ichthyoblabe*、*M. flos-aquae*、*M. novacekii*などの種類が観察されている。しかしながら、これらの種識別の基準となる形態形質は培養条件によって大きく変化する。湖沼における環境条件は時々刻々と変化するが、湖沼で発生したアオコの形態形質も環境変化に応じて変化すると考えられる。また、アオコの生理状態によっては、細胞が群体を形成せずに単細胞で湖水中に存在しており、このような場合は形態的特性が失われるので、形態形質による種の識別は不可能となる。さらに、有毒アオコの発生は公衆衛生上極めて重要な環境項目であるが、先述の形態形質が確認できたとしても、アオコが有毒であるかどうかまで判別することは不可能である。

すなわち、これまでの富栄養化に関わる環境対策においては、どんなアオコが発生しているのかを知ることが重要であったにもかかわらず、時として不安定なアオコ種の同定が行われていたであろうし、毒素生産の検討については時間と労力のかかる毒素分析を外部委託等によって行うことで対応せざるを得なかった。

本研究では、各遺伝子型のアオコに特異的に対応可能な遺伝子プライマーの開発に成功した。これにより、たとえ単細胞状態で浮遊しているアオコであっても、それがどの種で毒素生産するかについて、簡便に確実に特定することが可能となった。また、本研究の方法では、大量の試水をろ過することができれば、かなり低密度でしか存在しないアオコであっても検出可能である。従来、顕微鏡観察では、観察できる試水量が限られていたが、本研究の方法はこれを上回る量の試水を対象とした検査が可能である。

以上のように、本研究で開発した方法を使えば、まだ増殖が十分でない低密度のアオコをより早期に検知できるだけでなく、そのアオコがどんな種であり、かつ毒素生産の可能性まで、従来よりもはるかに短時間でかつ効率よく突き止めることができる。

また、本研究では、窒素の供給がアオコの増殖に特に強く作用することを明らかにした。従来、水域の窒素負荷については多くの情報がある。すなわち、既存の情報を利用すれば、現段階でアオコの発生が見られない湖沼であっても、窒素負荷状況によってはアオコの発生が将来起こるかもしれない。すなわち、本研究では、「いずれアオコが発生するのか？」の問いに答える成果が得られた。

環境問題は、ある日突然起こるように思われがちであるが、本研究の成果により、少なくともアオコ問題については、より早い段階での対策やリスク回避が可能となった。このことは、環境政策上大きな貢献と言える。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 近藤竜二、片岡剛文：アオコの生理・生態・分子系統地理学的研究の現状（京大大学生態学研究センター共同利用事業（セミナー））（2009）
「アオコ原因微生物*Microcystis*属の分子識別」
- 2) T. Homma, T. Kataoka, S. Nakano, and R. Kondo: CER International workshop for New Frontier of Microbial Ecology (2010)
“Assessing the Behaviour of Intra-specific Variations in A Cyanobacterial Species *Microcystis aeruginosa*”
- 3) 片岡剛文、本間隆満、中野伸一、近藤竜二：日本陸水学会第76回大会（2011）
「アオコ原因藍藻（*Microcystis aeruginosa*）の遺伝子型に基づく分子識別と定量PCRを用いた細胞密度の推定」
- 4) 本間隆満、片岡剛文、中野伸一、近藤竜二：日本陸水学会第76回大会（2011）
「*Microcystis*属における遺伝子グループ組成に及ぼす栄養塩濃度の影響」（ポスター）
- 5) 片岡剛文、本間隆満、中野伸一、近藤竜二：第27回日本微生物生態学会大会（2011）
「遺伝子型の異なるアオコ原因藍藻（*Microcystis aeruginosa*）の栄養塩濃度に対する増殖応答」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) アオコの生態・生理・分子系統地理学的研究の現状（2009年11月14日、京大大学生態学研究センター、参加者33名）
- 2) “CER International workshop for New Frontier of Microbial Ecology”, chaired by Yoshitake Takao and Shin-ichi Nakano (2010年12月5日、京大大学生態学研究センター、参加者27名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Allen, M. M., and R. Y. Stanier. 1968. Growth and division of some unicellular blue-green algae. J

- Gen Microbiol 51: 199-202.
- 2) Anagnostidis, K. and J. Komárek. 1985. Modern approach to the classification system of cyanophytes 1-Introduction. Arch Hydrobiol/Suppl 71 (Algological Studies 38/39): 327-472.
 - 3) Anagnostidis, K. and J. Komárek. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes 3-Oscillatoriales. Arch Hydrobiol/Suppl 80 (Algological Studies 51-53): 291-302.
 - 4) Anagnostidis, K. and J. Komárek. 1990. Modern approach to the classification system of cyanophytes 5-Stigonematales. Arch Hydrobiol/Suppl 86 (Algological Studies 59): 1-73.
 - 5) Briand, E., N. Escoffier, C. Straub, M. Sabart, C. Quiblier, and J. F. Humbert. 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. The ISME Journal 3: 419-429.
 - 6) Geitler, L. 1925. Cyanophyceae. In Süwasser-Flora Mitteleuropas 12 (ed. Pascher, A.). Gustav Fischer, Jena.
 - 7) Geitler, L. 1932. Cyanophyceae. In Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14 (ed. Rabenhorst, L.). Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H. Leipzig.
 - 8) Geitler, L. 1942. Schizophyta. In Die natürlichen Pflanzenfamilien 21b (ed. Engler, A and K. Prantl). Wilhelm Engelmann, Leipzig.
 - 9) 本間隆満、朴虎東. 2005. 諏訪湖における *Microcystis* 種組成および藍藻毒素microcystin濃度に及ぼす硝酸態窒素・リン酸態リン濃度の影響. 水環境学会誌 28、373-378.
 - 10) 市村輝宣. 1979. 淡水藻類. In 藻類研究法 (西澤一俊、千原光雄編). 共立出版、東京.
 - 11) Janse, I., W. E. A. Kardinaal, M. Meima, J. Fastner, P. M. Visser, and G. Zwart 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. Appl Environ Microbiol 70: 3979-3987.
 - 12) Kardinaal, W. E. A., I. Janse, M. K. Agterveld, M. Meima, J. Snoek, L. R. Mur, J. Huisman, G. Zwart, and P. M. Visser. 2007. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. Aquat Microbial Ecol 48: 1-12.
 - 13) Komárek, J. 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. Algological Studies 64: 115-127.
 - 14) Komárek, J. and K. Anagnostidis. 1986. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2-Chroococcales. Arch Hydrobiol/Suppl 72 (Algological Studies 43): 157-226.
 - 15) Komárek, J. and K. Anagnostidis. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes 4-Nostocales. Arch Hydrobiol/Suppl 82 (Algological Studies 56): 247-345.
 - 16) 近藤竜二、鍵谷 豪、小村 学、幸 保孝、廣石伸互、渡辺眞之. 2000. シアノバクテリアの分子分類. 日本プランクトン学会報 47、25-33.
 - 17) Kondo, R., T. Yoshida, Y. Yuki, and S. Hiroishi. 2000. DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*. Int J Syst Evol Microbiol 50: 767-770.
 - 18) Kurmayer, R. and T. Kutzenberger. 2003. Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. Appl Environ Microbiol 69: 6723-6730.
 - 19) Leuko, S., F. Goh, R. Ibáñez-Peral, B. P. Burns, M. R. Walter, and B. A. Neilan. 2008. Lysis

- efficiency of standard DNA extraction methods for *Halococcus* spp. in an organic rich environment. *Extremophiles* 12: 301-308.
- 20) Otsuka, S., S. Suda, R. Li, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J Gen Appl Microbiol* 46: 57-68.
 - 21) Otsuka, S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M. M. Watanabe. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing *ex* Lemmermann 1907 under the Rule of the Bacterial Code. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 873-879.
 - 22) Rinta-Kanto, J. M., E. A. Konopko, J. M. DeBruyn, R. A. Bourbonniere, G. L. Boyer, and S. W. Wilhelm. 2009. Lake Erie *Microcystis*: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake. *Harmful Algae* 8: 665-673.
 - 23) Shirai, M., Y. Takamura, H. Sakuma, M. Kojima, and M. Nakano. 1986. Toxicity and delayed type hypersensitivity caused by *Microcystis* blooms from Lake Kasumigaura. *Microbiol Immunol* 30: 731-735.
 - 24) Tanabe, Y., F. Kasai, and M. M. Watanabe. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Microbiology* 153: 3695-3703.
 - 25) Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
 - 26) Yoshida, M., T. Yoshida, M. Satomi, Y. Takashima, N. Hosoda, and S. Hiroishi. 2008. Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial *Microcystis* strains. *J Appl Microbiol* 105: 407-15.
 - 27) Yoshida, M., T. Yoshida, Y. Takashima, N. Hosoda, and S. Hiroishi. 2007. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. *FEMS Microbiol Letters* 266:49-53.
 - 28) Yoshida, M., T. Yoshida, Y. Takashima, R. Kondo, and S. Hiroishi. 2005. Genetic diversity of the toxic cyanobacterium *Microcystis* in Lake Mikata. *Environ Toxicol* 20: 229-234.
 - 29) Zweifel, U. L., and Å. Hagström. 1995. Total counts of marine-bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (Ghosts). *Appl Environ Microbiol* 61: 2180-2185.
 - 30) 渡邊眞之. 2007. 日本アオコ大図鑑. 誠文堂新光社、東京.

Ecophysiology, Phylogeography and Environmental Sociology on Water Blooms of the Globally Distributed Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*

Principal Investigator: Shin-ichi NAKANO
Institution: Center for Ecological Research, Kyoto University
Hirano 2-509-3, Otsu 520-2113, Shiga, JAPAN
Tel: +81-77-549-8239 / Fax: +81-77-549-8201
E-mail: nakano@ecology.kyoto-u.ac.jp

Cooperated by: Tsukuba University, Fukui Prefectural University

[Abstract]

Key Words: *Microcystis aeruginosa* blooms, Ecology, Phylogeography, Genetic diversity, Environmental sociology

The present study aims to elucidate the following issues on *Microcystis aeruginosa* blooms in eutrophic lakes: dispersal of *M. aeruginosa* into various lakes, ecology and phylogeography of particular genotypes of *M. aeruginosa*, and the relationship between human activity and *Microcystis* bloom. We identified the genotypes of 221 *M. aeruginosa* strains of Japanese lakes and Southeast Asian lakes, using a multilocus sequence typing (MLST). We found 124 new MLST genotypes out of 155 ones. Population genetic and phylogenetic analyses showed negligible differences among the genotypes, suggesting the transport of *M. aeruginosa* among those countries. A specific strains belonging to a panmictic cluster was found only in Lake Kasumigaura of 2009. We also found a halotolerance strain of *M. aeruginosa* in brackish Lake Shinji. Using 16s-23s rDNA ITS region, high genotypic diversity of *M. aeruginosa* collected in Western Japan was also found without geographical differentiation. There were significant differences in heterotrophic bacterial composition between lakes with and without *M. aeruginosa* blooms. In outdoor mesocosms, we successfully had artificial *M. aeruginosa* blooms with diverse, ephemeral dominant genotypes. We developed the method which predicts massive growth of cyanobacteria, using autofluorescence with or without DCMU (3'-(3,4-dichlorophenyl)-1', 1'-dimethyl urea). We also developed PCR primers for enumerating cells of each *M. aeruginosa* genotype using RT-PCR. We successfully detected *M. aeruginosa* ITS region DNA in bird fecal pellets collected in various Japanese waters. We also found some *Microcystis* colonies digested and excreted within four hours of ingestion by mallards (*Anas platyrhynchos*) were still alive with growth ability. The flagellate *Collodictyon triciliatum* had grazing impact on *M. aeruginosa* as up to 25% standing stock day⁻¹, suggesting the high potential of protistan grazing on *Microcystis* blooms. We conducted experiments to see the effects of nutrients on growth

of *M. aeruginosa* strains in the systems with various nitrogen:phosphorus ratios. The results suggested that nutrient supply ratio was one of the important environmental parameters which determine dominant genotype(s) of *M. aeruginosa*. The relationship between fisheries activity and *M. aeruginosa* bloom in the lagoons around Lake Biwa, the dispersal of *M. aeruginosa* through water conveyance development in Tone River water system and the dispersal of *M. aeruginosa* through the distribution of fisheries products in Southeast Asia were found, and some of the results have been uploaded using Google maps and GIS system. We also studied the risk management of *M. aeruginosa* bloom in Australia. We distributed a free-of-charge, downloadable primer of *Microcystis* bloom.

**アオコが増える前に
対策を取る**



**アオコの
早期予報**



上流

**水資源開発等による
アオコの輸送**

**水鳥による
アオコの輸送**

下流

**発生したアオコは、鳥や
人により運ばれ、適した
環境に来ると増える**

**地域固有
のアオコ**

**環境に応じて、違うタイプの
アオコが増える**

