

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16206

研究課題名(和文) 新規ホールゲノムジェノタイピング(GWGS)に基づいた有毒アオコ変動機構の解明

研究課題名(英文) Elucidate of change mechanism of harmful algal blooms based on the novel GWGS (genotyping by whole genome sequencing) method.

研究代表者

岡野 邦宏 (Okano, Kunihiro)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30455927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：秋田県八郎湖の有毒アオコ変動機構の解明を最終目的として、八郎湖より分離した *Microcystis* 属を新規ホールゲノムジェノタイピング(GWGS)法で分類し、その分類に基づいて *Microcystis* 属培養株の増殖特性を調査した。低温適応株であった0824株は特徴的な遺伝子構造を有しており、GWGSに供した *Microcystis* 属10株との相同性は最大73.7%であった。また、0824株は *mcy* 遺伝子群が欠損したミクロシスチン非産生株、N7株は保有する産生株であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：With the ultimate goal of clarifying the change mechanism of harmful algal blooms in the Lake Hachiro (Akita Prefecture), *Microcystis* sp. isolated from Lake Hachiro were classified by the novel whole genome genotyping (GWGS) method and the growth characteristics of *Microcystis* sp. was investigated. The low temperature-adapted *Microcystis* sp. strain 0824 had a characteristic gene structure, and the homology of strain 0824 to *Microcystis* sp. (10 strains) analyzed by GWGS was at most 73.7%. In addition, it was clarified that *Microcystis* sp. strain 0824 was non-microcystin-producing strain with *mcy* gene cluster deletion and strain N7 was microcystin-producing strain with *mcy* gene cluster conservation.

研究分野：微生物生態学

キーワード：有毒アオコ 八郎湖 ホールゲノム解析 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

我が国をはじめ世界各国の富栄養化した湖沼において藍藻 *Microcystis* 属などによるアオコの発生が顕在化している。これら藍藻類が産生する有毒物質ミクロシスチンは重篤な肝障害を引き起こし青酸カリの100倍以上の急性毒性を持つうえ、プロテインフォスファターゼ阻害による発がん促進作用(慢性毒性)を併せ持つ極めて有害な化合物である。また、ミクロシスチンは生物が産生するため、農薬などの人工化学物質とは異なり環境中における排出時期や排出量を事前に把握することや人為的にコントロールすることが困難である。実際に、2014年8月にエリー湖を水源とするトレド市(オハイオ州, USA)の水道水にミクロシスチンがWHOの暫定基準値(1 µg/L)以上に混入し、50万人に影響が出ている(National Geographic, 2014)。したがって、安全な水利用を確保するためにはアオコ消長の機構を解明し、アオコ抑制やアオコ発生予測に結びつけることが最重要である。一方で、Kardinaalらはアオコ減少期に *Microcystis* 属ミクロシスチン非産株が増加することを報告しており¹⁾、*Microcystis* 属の遺伝子型レベルでの変動とアオコ消長との関係が世界的な研究動向として注目されている。

研究代表者は、平成20~21年度若手研究(スタートアップ)「有毒アオコの八郎湖データベースの構築とリスク予測手法への応用に関する研究」で、秋田県八郎湖においてもミクロシスチン合成酵素(*mcy*)遺伝子を保存する“ミクロシスチン産生株”と保存しない“非産生株”の割合が大きく変動することを明らかにした²⁾。また、研究代表者は平成23~24年度若手研究(B)「秋田県八郎湖におけるアオコ発生機構の解明に関する基礎的研究」で八郎湖全域において藍藻類のバイオマスを示すChl. *a*濃度とミクロシスチン濃度に相関がない地点を多数確認している。この時の優占種が *Microcystis* 属であったことから、この現象は *Microcystis* 属の株レベルでの多様性が空間的にも大きく変化し、“毒産生能の高い株”やその逆の“非産生株”などが同じ水域、同日時においても散在していることを示している。このような湖沼における有毒アオコの変動を明らかにするためには、アオコ形成藻類がどのような環境条件で増殖し、毒産生がどのように変化するのか?といった生理特性の解析が不可欠である。しかし、*Microcystis* 属は16S rRNA遺伝子などの分子系統マーカーの変異が種間においても2%以内であるが、様々な表現型が1種で混在しているため、まずは培養株を高精度にジェノタイピング(遺伝子型鑑別)することが重要な研究ステップである。

現状では、極めて高精度なジェノタイピングとして病原性細菌などに用いられる MLST (Multilocus sequence typing) 法でもミクロシスチン産生株と非産生株が鑑別できて

いない³⁾。また、同じ *Microcystis* 属ミクロシスチン産生株でも構造の異なるミクロシスチンを産生するため⁴⁾、有毒アオコ、特に *Microcystis* 属の株レベルでの変動機構の解明には、まず株レベルでの従来技術以上に高精度なジェノタイピングが不可欠であるとの研究成果から本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

平成19年に全国で11番目の指定湖沼となった八郎湖では、水質改善対策が進められているものの継続的にアオコが発生している。湖水が農業用水に使用されていることや流入河川の末端付近に浄水施設があること、さらには水産業への影響を鑑みても八郎湖におけるアオコ問題の解決は焦眉の課題といえる。そこで、本研究では八郎湖を対象湖沼として、(1)新たに開発する GWGS (Genotyping by Whole Genome Sequencing) 法により *Microcystis* 属培養株を分類し、(2)その分類に基づいて毒素産生特性の解明を行う。具体的には、八郎湖より分離した *Microcystis* 属培養株を次世代シーケンサー(NGS)により配列解析し、de novo アッセンブル後にホールゲノムでの系統解析を行う。この結果を基に *Microcystis* 属培養株の生理特性、特に水温に着目した増殖及び毒素産生特性を明らかにする。予備研究において、16S rRNA 遺伝子ベースで99.7%の相同性である *M. aeruginosa* NIES-44 と NIES-843 株を十分な精度でジェノタイピング可能なことを確認している⁵⁾。NIES-44 株と NIES-843 株は同じ湖沼(霞ヶ浦)で分離された株であるため、アオコ発生水域全般に適用の可能性が期待できる。また、ホールゲノム配列を用いて *Microcystis* 属培養株の遺伝子特性、特に *mcy* 遺伝子群の変異や欠損について明らかにすることで、ミクロシスチン産生機構の解明に資することも目的とした。

3. 研究の方法

(1)八郎湖におけるアオコ形成藻類を含む細菌叢と水質の変動

湖水試料は、秋田県北西部に位置する八郎湖の距離の離れた3地点(図1)で2014年3月から2016年12月まで毎月1~3回表層水をヒシャクにより採取した。現地にて水温、pH、電気伝導度(EC)、実験室にてChl. *a*、各態窒素・リン濃度を測定した。また、湖水試料を酢酸抽出後、Presep®-C C18 (WAKO)により粗精製・濃縮してミクロシスチン類を分析した。

一方、湖水を孔径0.2 µmのフィルターでろ過し、ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE)によりDNA抽出を行った。抽出したDNAを用いて真正細菌を対象とした16S rRNA遺伝子アンプリコン解析を行った⁶⁾。得られた配列はClaident v.0.2により分子系統学的に分類した。また、細菌叢の類似度解析はRパッケージのvegan 2.4-4を用いて行った。

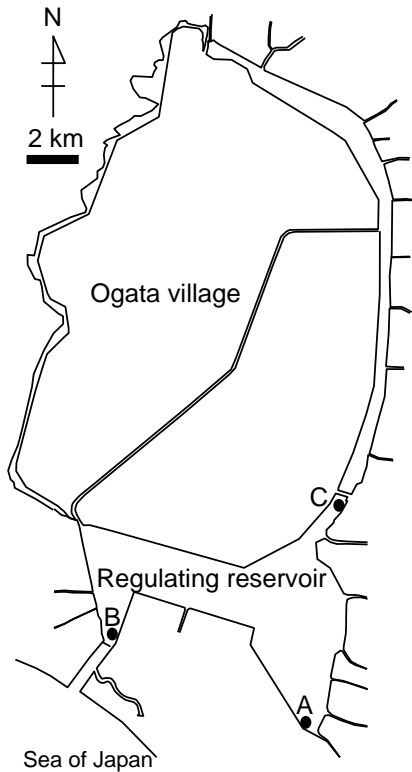


図1 八郎湖の概要と採水地点

A: 野村港 (北緯 39° 42' 48" 500, 東経 140° 02' 14" 470), B: 防潮水門 (北緯 39° 54' 25" 046, 東経 139° 57' 31" 055), C: 大渦橋 (39° 56' 58" 784, 東経 140° 03' 22" 760)

(2) *Microcystis* 属培養株の遺伝子構造

Microcystis 属 0824 株 (Taxonomy ID: 1502726) および N7 株は八郎湖より研究代表者らが単離し, 研究室にて継代した。菌体は 500 mL の MA 培地で培養後, 遠心回収した。回収した菌体より Tillett らの方法を改良してゲノム DNA を抽出した⁷⁾。

ホールゲノム配列の解析は, 800 bp ペアエンドライブラリーを調製し, MiSeq v3 (600 cycles) (Illumina) により行った。MiSeq リードデータは Velvet v1.2.10 により de novo アセンブルを行い, 得られた Contig 配列を Platanus v.1.2.4 を用いて Gap クローズした。また, *Microcystis* 属 0824 株のドラフト配列は, RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) においてタンパク質コード配列 (CDS) の推定を行った。

一方, 八郎湖より単離された *Microcystis* 属培養株 2 株を含むホールゲノム配列の相同性解析は, Genees v.2.2.1 を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 八郎湖におけるアオコ形成藻類を含む細菌叢と水質の関係

野村港 (A) において 2014 年から 3 年間の定期調査を行った。2014 年は夏季の水温が低く, 観測期間中のアオコの観察は 2 回だったが, 10 月に *Microcystis* 属主体のアオコが確

認された。2015 年は 6 月から 10 月まで長期間アオコが観察されたが, 9 月以降は *Microcystis* 属がアオコ形成の主体となっていた (図 2)。また, 2016 年も 6 月から 10 月まで長期間のアオコが観察されたが, 9 月には 2015 年とは異なり *Planktothrix* 属が優占した。2014 年から 2016 年の夏季の降水量には大きなばらつきがあり, 特に 2014 年は 6 月から 8 月までの降水量が極めて多かった (2015 年比で約 2.7 倍)。そのため, 各年でのアオコ発生状況は異なっていたが, 秋季の *Microcystis* 属主体のアオコ発生には周期性が認められ, これは八郎湖特有の現象であると考えられた。

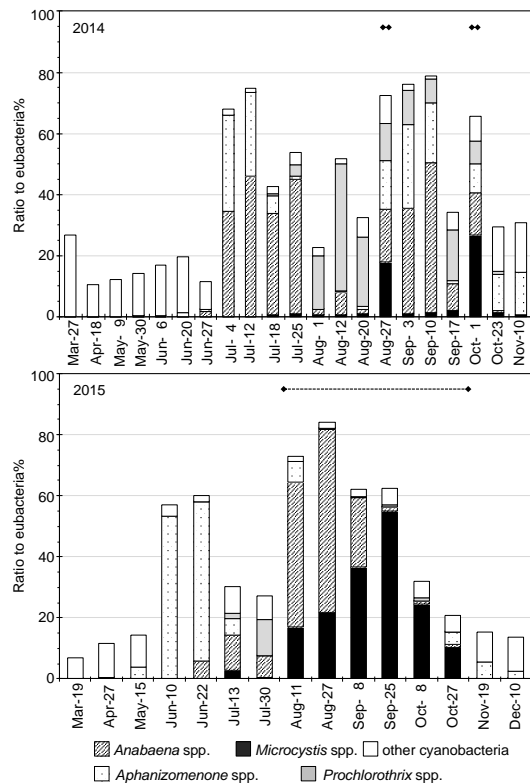


図2 アオコ形成藻類の季節変動

一方で, 2016 年はアオコ形成藻類として 3 地点共通して *Anabaena* 属と *Microcystis* 属, そして *Planktothrix* 属が優占した。3 地点の細菌叢の変化は概ね一致していたが, 野村港でのみ *Microcystis* 属が 9 月下旬にも優占した。3 地点の細菌叢の多様性は季節的な変動はあるものの 3 地点間で有意な差は確認されなかった ($p > 0.05$)。1 年間のデータではあるが距離の離れた 3 地点での細菌叢に有意な差がなかったことから, アオコ形成藻類を含む細菌叢は湖内流動や流入水などの影響よりも季節的な変動の方が大きいことが示唆された。

(2) *Microcystis* 属培養株の遺伝子構造

八郎湖より単離した *Microcystis* 属を培養試験に供した結果, *Microcystis* 属 0824 株は 15°C でも増殖可能な低温適応株であることが明らかとなった (図 3)。上述の通り, 八郎

湖では秋季に *Microcystis* 属主体のアオコが頻発しており、*Microcystis* 属 0824 株のような低温適応株の寄与が予想される。そこで、*Microcystis* 属 0824 株のホールゲノム解析を行った結果、ゲノムは 79 の contig から構成され、全長 4,103,639 bp で G+C 含量は 43.0% であった。また、4,185 のタンパク質コード配列と 47 (2 セットの rRNA 遺伝子と 41 の tRNA 遺伝子) の RNA をコードする遺伝子が含まれていた。アノテーション解析の結果、1,805 の CDS が機能既知の遺伝子と相関性が示され、残りの 2,380 遺伝子が機能未知の仮想タンパク質と同定された。

また、*Microcystis* 属 0824 株はミクロシスチン合成酵素遺伝子 (*mcy*) 群が完全に欠損したミクロシスチン非産生株であることが明らかとなった。しかしながら、著者らが以前に解析した同じミクロシスチン非産生株である *M. aeruginosa* NIES-44 株とは異なり、3 つの非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) を保有していた。0824 株は、NIES-44 株間でも 2,221 の非共通遺伝子を有しており、特徴的な遺伝子構造を持つことが推察された。なお、*Microcystis* 属 0824 株の Whole Genome Shotgun プロジェクトは、DDBJ/EMBL/GenBank にアクセス No. BDSM000000000 として登録した。

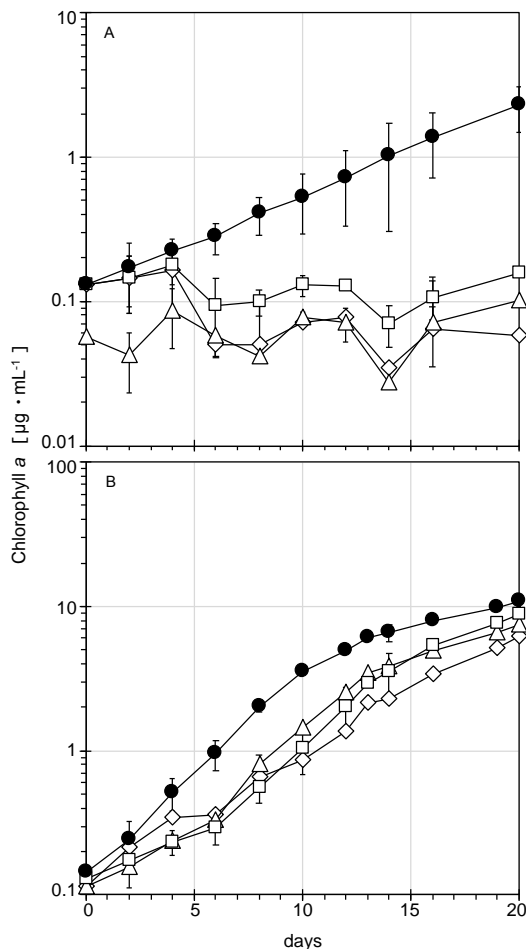


図3 八郎湖株の増殖 (A: 15°C B: 20°C)
0824, N7, N6, N1

ホールゲノム配列がデータベースで公開されている *Microcystis* 属 8 株に 0824 株と N7 株を加えて GWGS 法で解析を行った結果、0824 株はホールゲノムベースの相関性が最大でも 73.7% であった (図 4)。GWGS 法を評価するために用いた NIES-843 株 (by MiSeq) がデータベース上の NIES-843 株と 99% 以上の相関性を示しており (図 4)、本手法の正確性も確認された。一方で、N7 株は *mcy* 遺伝子群を保有するミクロシスチン産生株であることが明らかとなった。同じ八郎湖単離株である 0824 株と N7 株とのホールゲノムベースの相関性は、72.1% であり、湖内での遺伝子多様性も極めて高いことが明らかとなった。したがって、低温適応株である 0824 株ゲノムから遺伝子比較により低温適応に関する遺伝子を探索し、八郎湖の秋季におけるアオコ発生の機構に資する研究を進めることは難しいことが予想された。

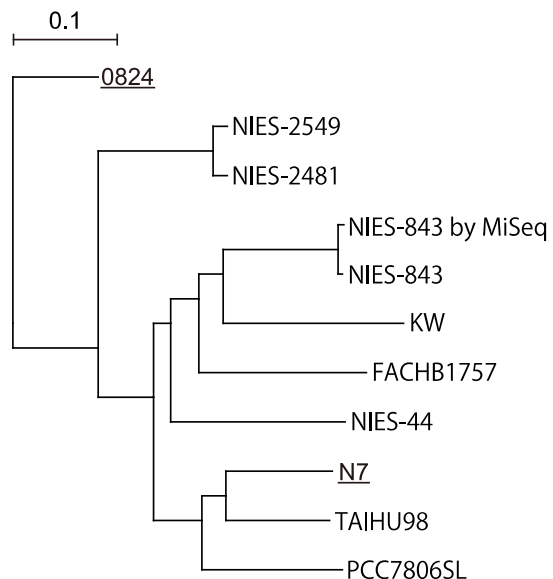


図4 *Microcystis* 属の GWGS 法による解析
下線は八郎湖培養株

< 引用文献 >

- 1) Kardinaal, W.E.A., Janse, I., Agterveld, M.K., Meima, M., Snoek, J., Mur, L.R., Huisman, J., Zwart, G., Visser, P.M.: *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes, *Aqua. Microbiol. Ecol.*, 48, 2007, 1-12
- 2) Okano K, Suzuki E, Ohta S, Miyata N, Tani Y, Ozaki Y: Seasonal changes in cyanotoxin microcystin and toxic cyanobacteria in Lake Hachiro. *J. Jpn. Soc. Water Environ.*, 38(1), 2015, 1-12 [in Japanese].
- 3) Tanabe, Y., Kasai, F., Watanabae, M.M.: Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis*

- aeruginosa*. *Microbiology*, 153, 2007, 3695-3703,
- 4) Watanabe, F.M., Oishi, S., Harada, K-I., Matsumura, K., Kawai, H., Suzuki, M.: Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26(11), 1988, 1017-1025
 - 5) Okano, K., Miyata, N., Ozaki, Y.: Whole genome sequence of the non-microcystin-producing *Microcystis aeruginosa* strain NIES-44. *Genome Announcements*, 3(2), 2015, e00135-15
 - 6) Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R.: Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(SUPPL. 1), 2011, 4516-4522
 - 7) Tillet, D., Neilan, B.A.: Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 36(1), 2000, 251-258

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Araki, M., Okano, K., Ohta, S., Suzuki, E., Fujibayashi, M., Miyata, N.: Characteristics of harmful algal blooms during a low water temperature season in Lake Hachiro. *Journal of Water and Environment Technology*, 査読有, 2018, in press

〔学会発表〕(計 8件)

Okano, K., Matsuo, A., Araki, M., Ohta, S., Fujibayashi, M., Miyata, N.: The Relationship of the Microbiota including Algal Bloom Forming Cyanobacteria and the Environmental Factors in Lake Hachiro. 17th World Lake Conference (2018), つくば市

岩谷文香, 岡野邦宏, 荒木美穂, 藤林恵, 宮田直幸: *Microcystis* 属八郎湖株の増殖及び毒素産生における水温と光の影響, 第52回日本水環境学会, 2018.3.16, 札幌市

岡野邦宏, 鈴木英治, 藤林恵, 宮田直幸: 秋田県八郎湖より単離された *Microcystis* 属培養株の遺伝子構造, 第52回日本水環境学会, 2018.3.15, 札幌市
岡野邦宏, 荒木美穂, 松尾歩, 藤林恵, 宮田直幸: 秋田県八郎湖のアオコ発生メカニズムと住民参加型調査, 第82回日本陸水学会, 2017.9.29, 仙北市

Okano, K., Araki, M., Ohta, S., Fujibayashi, M., Miyata, N.: Characteristics of harmful algal blooms during low water temperature season in Lake Hachiro. WET2017 (Water and Environment Technology Conference 2017), 2017.7.23, 札幌市

岡野邦宏, 松尾歩, 荒木美穂, 宮田直幸: MiSeq Nano Kit で追いかける湖沼のマイクロバイオームダイナミクス, NGS 現場の会 第五回研究会, 2017.5.22, 仙台市

岡野邦宏, 荒木美穂, 太田菜, 藤林恵, 宮田直幸: 秋田県八郎湖における有毒アオコの季節的変動に及ぼす降水量や水温の影響, 日本水処理生物学会第53回大会, 2016.11.11, 習志野市

岡野邦宏, 荒木美穂, 太田菜, 藤林恵, 宮田直幸: 八郎湖沿岸における有毒アオコの消長特性, 第19回日本水環境学会シンポジウム, 2016.9.14, 秋田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 邦宏 (OKANO KUNIHIRO)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 30455927