

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K04610

研究課題名(和文) アオコ化する野生型Microcystisの進化戦略情報の探究

研究課題名(英文) Bioinformatics analysis of the evolution strategy for wild-type Microcystis

研究代表者

牧野 育代 (Makino, Ikuyo)

静岡理工科大学・理工学部・准教授

研究者番号：00542060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：大繁殖したシアノバクテリアで構成されるアオコ現象は、世界的な水資源の脅威となつて久しい。本研究では、アオコ対策を講じる準備段階として、まずアオコの生態を理解することに焦点を当てた。具体的には、遺伝子解析とメタボローム解析によりシアノバクテリアの挙動とアオコの形成メカニズムについて検討した。その結果、アオコ形成に必要なバイオフィルムの構成要素は、光合成作用により生産される細胞外多糖であることが明らかとなった。つまり、アオコの形成に最も適した時間帯は日中であると推測される。さらに、夜間には多糖の排出が減少することでバイオフィルムマトリクスの生成が制御され、細胞集合体の維持が困難になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子解析とメタボローム解析を用いてアオコ形成の生物学的メカニズムの一部の可視化に成功した。これによりシアノバクテリアの挙動とアオコ形成との間の生物学的プロセスを詳細に理解することが可能となり、特に水資源工学の領域において新たな視点を提供することができた。具体的には、アオコ形成に最適な時間帯や細胞外多糖の生成、並びにバイオフィルムマトリクスへの影響など、未解明であったアオコ形成の過程について新たな理解を得た。本研究の成果は、アオコ問題に対する解決策の策定に必要な重要な情報源となり得ると考えられ、アオコに対する予防策や対策の開発において重要な基盤を提供できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The phenomenon of algal blooms, constituted by the massive proliferation of cyanobacteria, has been a persistent global threat to water resources for some time. In this study, we focused initially on gaining a deeper understanding of the ecology of these blooms as a preparatory step towards implementing countermeasures. More specifically, we utilized genetic and metabolomic analyses to study the behavior of cyanobacteria and the underlying mechanisms of algal bloom formation. Our results elucidated that the biofilm crucial for algal bloom formation is composed of extracellular polysaccharides, produced through photosynthesis. This indicates that the most favorable period for bloom formation is likely during daylight hours. Moreover, we hypothesize that maintaining cellular conglomerates becomes more challenging during the night, due to decreased polysaccharide secretion, leading to regulation of biofilm matrix production.

研究分野：水資源工学, 流体科学, バイオインフォマティクス

キーワード：アオコ Microcystis メタボローム解析 RNA-seq De novo解析

### 1. 研究開始当初の背景

水棲微生物は、鞭毛やガス胞といった水中での運動や移動を可能にする機能遺伝子を有することで常に浮上する状態を回避し、乾燥や限られた栄養塩をめぐる競争から身を守る。ただし、*Microcystis*に限っては、ガス胞遺伝子を調節して鉛直移動するものの、増殖するうちに水面に固定化(アオコ化)され、命を危険にさらしている。生き物の最大の目的は生命の維持だが、それに反するようにアオコ化する理由には、水中では得られない重要な利益が水面に存在することを示唆している。ダム湖に出現したアオコを遺伝子解析したところ、*Microcystis*以外の微生物の遺伝子が全体の3割前後を占めていた。その結果からは、アオコにおいて、微生物間で遺伝子を授与し合う“遺伝子の水平伝播”による遺伝子の多様性が生じることを覗かせる。遺伝情報の多様化は進化に等しいとする生命科学の定義に従うと、アオコは生物の進化を促進する特殊な形態であることが予測される。

### 2. 研究の目的

本課題はアオコ化と進化の関係を遺伝情報と代謝情報を用いて探索し、近年、顕著になった大規模アオコ化の核心的意義の解明を目指し、代謝産物の新規合成経路の発掘と遺伝的形質変化の検出を併用してアプローチする新しい手法を用いて、*Microcystis*の進化戦略によって引き起こされるアオコを予測するための基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 代謝産物によるアオコ化する野生型 *Microcystis* の細胞内動態の把握

調査地点はアオコが発生するダム貯水池の浅瀬とし、7月~10月に現地調査を行い、水面と水中の数地点を採水ポイントとした。代謝産物の分析には、キャピラリー電気泳動質量分析計装置を用いた。マトリクスデータは主成分分析により解析して *Microcystis* の常に欠かすことのできない成分、また、ある時点では不要となる成分を抽出する。その結果をもとに、*Microcystis* のアオコ化に至る理由の解明に迫る上で欠かせない代謝産物などの重要な情報が含まれているサンプルを選択し、これらについて遺伝子発現解析を行う。さらに、web 公開されている KEGG pathway 等を用いて新規代謝経路を発掘し、新規代謝産物の合成に関する細胞内動態の条件について検討した。

#### (2) 活性化トランスポゼース遺伝子の抽出による野生型 *Microcystis* の進化の検証

NCB Refseq データベースを用いてアセンブリした転写産物について相同性検索を行い、トランスポゼースと相同性の高い転写産物を抽出した。水面と水中のトランスポゼース遺伝子の発現変動を比較してトランスポゼースを特定し、生命科学の“遺伝子情報の多様化は進化に等しい”とする定義に沿い、アオコ化した野生型 *Microcystis* の遺伝子の多様化を検討した。以上の総合的なデータに基づき、*Microcystis* がアオコ化する合理的理由を導く。水面のみで生じるアオコの遺伝子情報を用いて野生型 *Microcystis* の多様性に関してまとめ、*Microcystis* の進化戦略によって引き起こされるアオコを予測するための基盤を構築する。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子解析

アオコが生じたダム貯水池の浅瀬に定点観測地点を設け、水面と水中 30cm 地点の湖水を採取し、遺伝子解析に供した。表-1 に、検体に含まれる遺伝子情報より得た生物種とその全体に占める割合とを示す。その割合が多い順に *Microcystis a.* (35%)、*Microcystis panniformis* (32%)、*Anabaena sp. wa102* (3%)であった。3位以下の生物種が占める割合はわずかで有り、生物として機能するだけの遺伝子を発現していないと考えられることから、試水の採取時は、全体の67%を占めた *Microcystis* 属が優占種であることを遺伝子解析においても確認した。また、検体ごとの機能推定遺伝子における遺伝子発現量 (TPM 値) については、どの検体も光合成に関する機能遺伝子群が上位を占めた。

表 1 遺伝子解析検体の遺伝子の含有量と生物種

順位	生物種	FPKM 値 (total:1,741,827)	全体に占める割合 (%)
1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	610,238.6	35.03
2	<i>Microcystis panniformis</i>	561,028.3	32.21
3	<i>Anabaena sp. wa102</i>	51,570.5	2.96

## (2) メタボローム解析

上記の遺伝子解析と同様に水面と水中 30cm 地点の湖水を採取して、メタボローム解析に供した。ただし、10:00 の水中と 2:00 の水面については、メタボローム解析の条件を満たすだけの濁質 (20 OD600 程度) を採取することができなかった。そのため、6 群、n=3 の 18 検体について、メタボローム解析を実施した (表-2)。代謝物質は、カチオン 131 ピーク、アニオン 126 ピーク、合計 257 ピークについて特定した。これら代謝物質最大 257 種、検体数 18 本の主成分解析結果を図-1 に示す。主成分得点の寄与率は主成分 1 (横軸) で 34.6%、主成分 2 (縦軸) で 16.0% であり、主成分 2 までで全体の 50.6% を占めた。主成分 1 の 0 地点において、水面 (頭文字 S、左側) と水中 (頭文字 M、右) との間にはっきりとした分離が認められた。このことは、シアノバクテリアは、光環境の条件 (昼あるいは夜) よりも生息位置 (水面あるいは水中) が代謝、すなわち細胞内動態に強い影響を与えていること、また後述するように、水面のシアノバクテリアと水面から 30cm 下方に位置するシアノバクテリアとでは、基本的な代謝活動が異なることを示していた。主成分 1 (左) と主成分 2 (右) の因子負荷量に基づいた代謝物質のうち、主成分 1 の上位に特に寄与した Uridine (核酸前駆体)、Galactosamine (アミノ糖) は昼夜を問わず明らかに水面に対して水中で高く、主成分 1 の上位 20 種は水中において多く生産される代謝物質であることがわかった。一方、主成分 1 の下位に特に寄与した AMP (Adenosine monophosphate, 核酸) と UDP (Uridine diphosphate, 核酸) は水中に対して水面で明らかに高かったことから、主成分 1 の下位は水面において多く生産される代謝物質であることがわかった。さらに、上位の 20 種のうち、9 種類が核酸の前駆体 (Uridine, Cytidine, Guanine, Adenosine, Uracil) あるいはその分解物質 (Xanthosine, 2-Deoxyadenosine or 5-Deoxyadenosine, Hypoxanthine, 2-Deoxycytidine) で、残りの多くは核酸に関連する代謝物質であった。下位 20 種では 7 種類が核酸 (AMP, UDP, CDP, XMP, ADP, CTP, UTP) で、5 種類が糖ヌクレオチド (核酸に糖が付く、ADP-glucose-1 or GDP-fucose-1, UDP-glucosuronic acid, UDP-glucose or UDP-galactose, ADP-glucose-2 or GDP-fucose-2, GDP-glucose or GDP-mannose or GDP-galactose) であった。

糖ヌクレオチドは多糖の材料であり、細胞から排出された細胞外多糖は *Microcystis* のコロニー形成における重要な成分である。その細胞外多糖はバイオフィルムの立体構成を維持するうえで重要な働きを持ち、バイオフィルムは単種あるいは複数種のバクテリアの集団的な行動をサポートするために不可欠である。日中の光合成によって炭素固定が過剰になり、その代謝物質である糖ヌクレオチドは細胞外に排出される (細胞外多糖の生成)。植物の病原細菌において細胞外多糖は特に乾燥条件下での生存に関与しており、日中は水面に浮上したままで乾燥に耐えるアオコ化したシアノバクテリアにおいても、その生存を細胞外多糖が支えている可能性がある。言い換えれば、乾燥のない水中では細胞外多糖の排出が減少することで、シアノバクテリアの分散状態が維持される。このように、*Microcystis* が優占種化したシアノバクテリア群は、水面において自前で生合成した細胞外多糖およびバイオフィルムを利用して高密度集積、すなわちアオコ化を可能とし、光合成が続く時間帯においてアオコ化を維持する。

主成分 2 については、図-1 の M02-3 を除くと 2:00 (水中 30cm) とその他の時間帯とに分かれた。主成分 2 の上位 20 種においては、9 種類がアミノ酸であった。下位 20 種においては、ほとんどが二次代謝産物に関する代謝物質であった。また、代謝物質の全体的な傾向として 2:00 で低下しており、夜間では低活性になっていると推測された。上位に特に寄与した Cysteic acid (アミノ酸) と N6-Acetyllysine (N-アセチル化アミノ酸) は、夜間において低下した。一方、下位に特に寄与した 3-Hydroxybutyric acid (ケトン体) と 1-Methyladenosine (修飾を受けた核酸前駆体) は夜間で明らかに高くなった。3-Hydroxybutyric acid は窒素やリンが不足して、その不足を補う場合に脂質が分解される際、副次的に生合成する代謝物質である。化学エネルギー (ATP) の生合成、炭素固定および窒素同化は光合成に連動する。シアノバクテリアは概日性を有しており、遺伝子発現 (mRNA) や ATP の合成等は日中で高く、夜間において低下する。このため、夜間には呼吸 (異化) によってエネルギーを生産するための代謝が進行する。呼吸は糖、アミノ酸

表-2 メタボローム解析の検体

採水時刻と水深 (2015/8/18-19)	試料名	吸光度(600nm)の 平均 (n=3)	水温 ( )	pH
10:00, 水面	S10-1~3	0.217, 0.170, 0.185	27.6	9.99
14:00, 水面	S14-1~3	0.660, 0.655, 0.653	29.9	9.96
14:00, 水中30cm	M14-1~3	0.040, 0.043, 0.040	28.8	9.97
16:00, 水面	S16-1~3	0.443, 0.455, 0.458	27.9	9.98
16:00, 水中30cm	M16-1~3	0.025, 0.024, 0.027	27.8	9.98
02:00, 水中30cm	M02-1~3	0.038, 0.035, 0.032	26.0	10.0

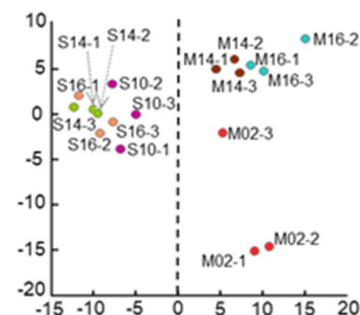


図-1 代謝化合物の主成分分析

および脂質が基質となる。夜間は、糖の供給が見込めず、さらに窒素欠乏状態に陥っている可能性があるため、脂質の異化によるエネルギーの生産が現実的である。よって、3-Hydroxybutyric acid の増加は脂質を分解することによる夜間のエネルギー調達の仕組みを反映する。*Microcystis* が優占種化するシアノバクテリア群が生命を維持するために昼と夜とで代謝機能を切り替える様子を捉えており、アオコ化の仕組みを理解するには夜間観測が重要であることを意味するものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 牧野育代、矢作裕司、中山貴博、小林厚志	4. 巻 75
2. 論文標題 Microcystisが優占種化するシアノバクテリア群の細胞内動態に関するメタボローム解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 土木学会論文集（水工学）B1	6. 最初と最後の頁 673, 678
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野 育代
2. 発表標題 水棲シアノバクテリア群の高密度集積前後における動粘度特性
3. 学会等名 日本機械学会第99回流体部門講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野育代、矢島 啓、増木新吾、矢作裕司、長崎慶三
2. 発表標題 ダム湖におけるアオコ発生時のウイルスの挙動とその生態学的意義
3. 学会等名 環境ウイルス研究集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 厚志  (Kobayashi Atsushi)  (90361138)	日本大学・工学部・准教授    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------