

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310045

研究課題名（和文）天然有用ファージを用いた有毒アオコ防除技術による水源環境保全に関する基盤的研究

研究課題名（英文）Foundational study on water-resource conservation by control methods for toxic cyanobacterial blooms using natural cyanophages.

研究代表者

吉田 天士（YOSHIDA TAKASHI）

京都大学大学院・農学研究科・准教授

研究者番号：80305490

研究成果の概要（和文）：天然有用ファージを利用した新しい水環境保全技術開発のための基盤構築を目的として、有毒ラン藻に感染するファージの宿主との相互作用について検討した。その結果、ファージが有毒ラン藻大量発生への動向に大きなインパクトを与えていると推察された。また、ファージとマイクロキスティスとの間で遺伝子のやり取りが行われている可能性を見出すとともに、マイクロキスティス群集は互いに異なる様々なファージ感染履歴を持つ個体群から構成されているものと推察された。

研究成果の概要（英文）： To assess the practical application of phages in environments for water sources, we investigated ecological and biological relationships between toxic cyanobacteria, *Microcystis* and its infectious cyanophage. The main results can be summarized as follows; Cyanophage infection contributes to the control of the *Microcystis* bloom. Cyanophages partially contribute to the genome plasticity of *Microcystis*. *Microcystis* bloom consists of various strains each of which retains greatly different ‘infection memories’.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術環境材料

キーワード：環境修復技術

1. 研究開始当初の背景

ラン藻の大量増殖により湖沼等で発生するアオコは、しばしば水源の毒化を引き起こし、動物被害や人体への健康被害の原因となる自然現象である。代表的なアオコ原因藍藻として知られるマイクロキスティス・エルギノーサ（以下、マイクロキスティス）は、マイクロシスチンという強力な肝臓毒でかつ発癌プロモーター活性を有するペプチドを産生する。そのため、飲用水源などにおけるアオコの発生は、国内のみならず世界中において深刻な社会問題となっている。したがって、マイクロキスティス等有毒ラン藻の発生予察ならびに防除技術の開発は、安全な水資源の確保ならびに安全な農林水産資源の確保とい

う観点から、世界に共通する火急の課題となっている。

我々は、これまで取り組んできた基礎研究の中で、マイクロキスティスに感染するシアノファージ（Ma-LMM01）を世界に先駆けて分離することに成功した。本ファージは宿主特異性がきわめて高く、その利用により生態系を乱すことなく標的有毒ラン藻を選択的に駆除できる道が拓かれるものと期待されている。しかしながら、環境中で遺伝子の水平伝播を担うベクターとして機能している可能性が推察された

2. 研究の目的

上述の研究背景に基づき、有用ファージの生理・分子生物学的性状をさらに詳細に解明し、その安全性にかかる知見を蓄積し、ファージを利用したアオコ予防・駆除技術に係る技術適用の妥当性を検討すべく、本研究では、以下に示す3課題を設定した。

シアノファージMa-LMM01-宿主マイクロキスティス感染性システムをモデルに、(1)シアノファージによる遺伝子水平伝播の可能性の検証を行い、(2)宿主特異性決定機構を解明することでマイクロキスティス対ファージの生物学的相互関係をより詳細に検討する。(3)さらに、様々なアオコ原因ラン藻無菌株を樹立して、分子分類データを付与した宿主ライブラリーを構築し、期間を通じて新規ファージの分離体制を強化する。

3. 研究の方法

(1) シアノファージによる遺伝子水平伝播の可能性の検証

①マイクロキスティスゲノムに見出されたファージ様遺伝子の解析

マイクロキスティス培養株37株について、抽出したDNAを鋳型にMa-LMM01ゲノム上のORF135とORF136を標的としたPCRを行い、その有無を確認した。PCRで増幅断片が得られた株についてその塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。

②マイクロキスティスゲノムに存在するファージ感染履歴の解析

宿主ゲノム上のファージ感染履歴でありファージ耐性機構として働くCRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 配列を解析した。全ゲノム塩基配列が明らかとされているマイクロキスティス NIES843株のゲノム配列に基づいて同株のCRISPR全長を同定した。得られた配列情報に基づきTail-PCR法を主としたプライマー歩行を行い、本種培養4株のCRISPR配列全長を決定した。CRISPR配列から感染の記録であるスペーサー配列を抜き出し、株間およびデータベースとの比較を行った。

③環境に生息するマイクロキスティスのファージ感染履歴の多様性

広沢池(京都市)の表層水50mlを採取し、遠沈した細胞からDNAを抽出した。本種CRISPRに特異的なPCR法を用いて、その部分配列を網羅的に増幅し、複数クローンの配列を決定した。

(2) Ma-LMM01株の宿主特異性決定機構の解明

①ファージ耐性変異株の性状解析

研究室で継代培養していたマイクロキスティス NIES298株のファージ低感受性サブカルチャーより一細胞ずつキャピラリーで分離し、非感受性変異株を樹立した。得られた変異株の株マーカー遺伝子領域の塩基配列を決定した。さらに、本種ゲノムに数多く散在する転移性因子をターゲットとしたRAPD解析を行った。

②感染過程における転写動態解析

マイクロキスティスならびにMa-LMM01の全ORFを含む計6,496遺伝子を搭載したマイクロアレイを作製した。60merのプロンプを1遺伝子あたり平均5カ所に設定した。次に、マイクロキスティス NIES298株にMa-LMM01を感染させ、0、1、3および6時間後に細胞から全RNAを抽出した。ランダムプライマーを用いた逆転写により得たcDNAをCy3でラベルし、マイクロアレイ解析に供した。

(3) 新規ファージ分離体制の強化

①環境中のマイクロキスティスにおけるシアノファージ感染の日周期性

京都市広沢池で、2009年9月15日と10月21日の午前9時から翌日午前9時まで3時間間隔で表層水を採取した。試水を遠心分離して得たペレットより抽出したDNAを鋳型として、それぞれフィコシアニン内部スペーサー領域(PC-IGS)、マイクロシスチン生合成遺伝子(*mcyA*)、ファージ尾部遺伝子(*g9I*)を標的としたリアルタイムPCR法に供し、それぞれ全マイクロキスティス、有毒マイクロキスティス、Ma-LMM01タイプファージ(以下、ファージ)として、それらの動態を評価した。

②環境からのファージ濃縮法の確立

環境から得たファージ画分100mLに対して、終濃度が10mg Fe/LとなるようFe溶液(10g FeCl₃/L)を加え、緩やかに混合した。20°Cで1時間静置し、孔径0.8μmのポリカーボネート製メンブレンフィルター(Whatman)を用いてろ過し沈殿物をフィルター上に集めた。沈殿物をフィルターごと50mL遠心管にいれ、シュウ酸緩衝液(0.25Mシュウ酸、0.2M Mg₂EDTA、0.25M Tris HCl, pH=6)10mLを加え、フィルターに緩衝液が行き渡るよう振とうした。得られた懸濁液を濃縮ウイルス画分とし、計数およびタイター測定により回収率を評価した。

4. 研究成果

(1) シアノファージによる遺伝子水平伝播の可能性の検証

①マイクロキスティスゲノムに見出されたファージ様遺伝子の解析

ORF135とORF136は、可動遺伝子IS607を構成する一対のトランスポザーゼと推察され、いくつかのラン藻ゲノム上に高い相同性を示す配列が認められた。しかしながら、ゲノム配列が公開されているマイクロキスティス2株(NIES843, PCC7806)には本配列のホモログは見出されなかった。PCRの結果からマイクロキスティス22株中4株に本ISの存在が確認された(表1)。ISが存在する4株は互いに遺伝子タイプが異なっていた。これらの塩基配列はMa-LMM01のそれと非常に高い類似性(95%以上)を示し、分子系統樹上で姉妹群を形成した(図1)。本研究成果は、ファージ

ジとマイクロキスティスとの間で遺伝子のやりとりがごく最近に起こった可能性を示唆するもので、国際誌（雑誌論文②参照）に掲載された。

表 1. ミクロキスティス株における IS607 の分布

Strain	Morphospecies	Origin	Toxality	IS
NIES90	aeruginosa	河口湖（山梨県）	+	+
NIES91	aeruginosa	農ヶ池（茨城県）	ND	ND
NIES96	fluviatilis	農ヶ池	ND	ND
NIES99	aeruginosa	藤巻湖（長野県）	ND	ND
NIES101	aeruginosa	農ヶ池	ND	ND
NIES102	viridis	農ヶ池	+	ND
NIES112	wesenbergii	諏訪湖	ND	+
NIES298	aeruginosa	農ヶ池	+	ND
NIL3604	wesenbergii	農ヶ池	ND	+
NIES894	aeruginosa	農ヶ池	+	ND*
NIES1058	viridis	農ヶ池	ND	ND
NIES1067	wesenbergii	千屈菜池（長野県）	ND	ND
NIES1070	lathyrababae	大淵池（長野県）	+	ND
NIES1086	aeruginosa	青森池（長野県）	+	ND
NIES1088	aeruginosa	青野ダム（東京都）	ND	ND
NIES1106	lathyrababae	茶戸池（北海道）	ND	ND
PCC7900	aeruginosa	オランダ	+	ND*
LIM9609-11	unidentified	三方湖（福井県）	NT	ND
LIM9609-2	unidentified	三方湖	NT	ND
RMS	unidentified	豊後寺池（長野県）	NT	+
RMK1	unidentified	豊後寺池	NT	ND
IMY62	unidentified	三方湖	NT	ND

: detected, ND: not detected, ND: not detected in complete genome, NT: not tested.

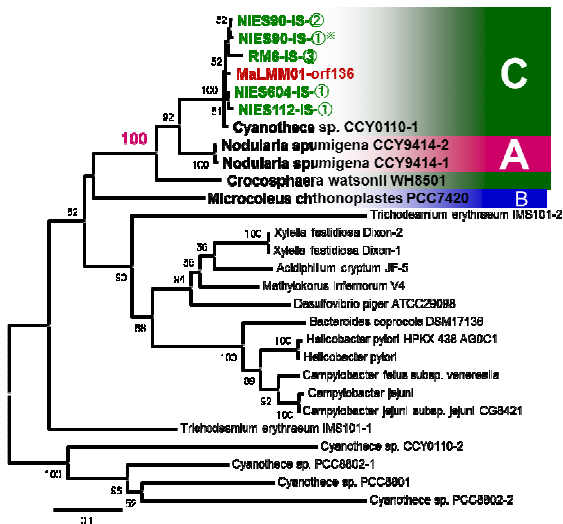


図 1. IS607 transposase A の系統樹

②ミクロキスティスゲノムに存在するファージ感染履歴の解析

5株のミクロキスティスについてCRISPRの全長配列を決定することができた。残りの株については一部配列を決定した（図2）。シアノファージMa-LMM01の宿主であるNIES298株のCRISPRには、Ma-LMM01のゲノム配列の一部と相同な配列が見出され（図2）、ミクロキスティスにおいてCRISPRが機能していることが示された。ただし、現存するファージデータベースにヒットする配列は、解析した640スペーサー配列のうち5配列だけであった（図2）。さらに、本研究で得られたス

ペーサー配列のほぼ全ては株特異的な配列であり、宿主-ファージの組み合わせは極めて多様である可能性が示された。その一方で、異なる株のCRISPRに複数回記録された配列も存在しており、多くの株に感染できるファージの存在が示唆された。

本成果は、ファージとミクロキスティスの生物学的相互作用をダイレクトに示すものであり、現在国際誌への投稿に向け準備している。

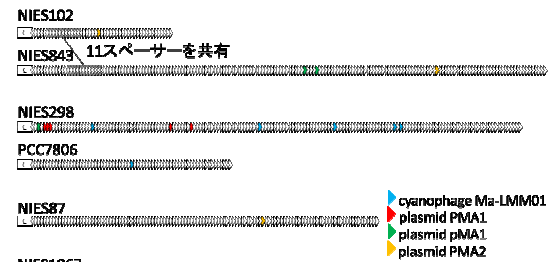


図 2. ミクロキスティス株間における CRISPR の比較

③環境に生息するミクロキスティスのファージ感染履歴の多様性

②で得られた CRISPR 内部の保存部位に基づいた PCR 法を適用することで、アオコ発生水域の試水から CRISPR の部分配列を選択的に増幅することが可能となった（図3）。環境試料に対する本解析の結果は、複数の株におけるプラスミドの頻繁な伝達、ファージMa-LMM01による感染の痕跡、ならびに広宿主域性ファージによる複数株への感染の可能性を示すものであった。

本手法を大規模な解析に応用して、アオコ環境におけるファージとラン藻のせめぎ合いの過程を解析することが可能となった。

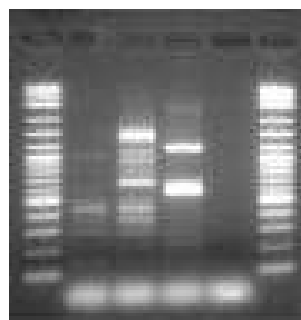
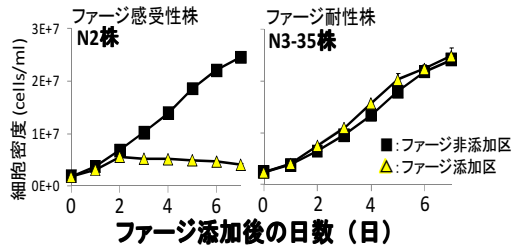


図 3. 環境 DNA より増幅されたミクロキスティス CRISPR 領域。いずれのバンドも CRISPR 領域であった。両端はサイズマーカー

(2) Ma-LMM01 株の宿主特異性決定機構の解明

①ファージ耐性変異株の性状解析
ファージ感受性株に派生するファージ低感受性サブカルチャーより、キャピラリーを用いて単一細胞由来のファージ耐性サブク

ローン株 2 株を確立した。継代後も耐性が維持されていたことから (図 4)、耐性は遺伝的要因によることが強く示唆された。本種ゲノムに数多く散在する転移性因子をターゲットとした RAPD 解析において、野生株とのバンドパターンの違いは見出せなかった。したがって大規模なゲノム編成ではなく、点変異が耐性獲得に寄与していることが強く示唆



された。

図 4. 変異株の増殖に対するファージ添加の影響

②感染過程における転写動態解析

感染後、全ての Ma-LMM01 遺伝子は顕著に発現量が增大した。その一方で、マイクロキスティス遺伝子の多くは発現比が低下したが、2 倍以上発現比が増大する遺伝子が 176 個認められた。中には 20~30 倍の高い発現比を示す遺伝子があり、これらは強光ストレスに対する光合成反応中心 I I (P S I I) の修復に関連する遺伝子であった。本ファージは光合成色素タンパク質の分解関連遺伝子をコードしており、感染によって生じる過剰な光エネルギーの捕集を抑制し、P S I I を保護していると推察される。ラン藻感染性ファージは、他のファージと比較して長い潜伏期間を要することから、光合成を中心としたエネルギー生産を維持するさまざまなシステムを獲得したものと推察された。また、感染後に 8 つの宿主シグマ因子 (mRNA を生成する

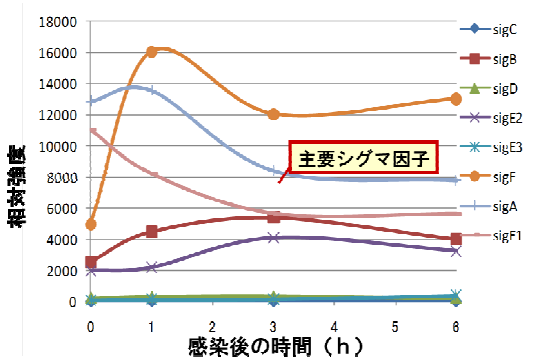


図 5. 感染過程におけるマイクロキスティスが有するシグマ因子の転写動態 (酵素のサブユニット)のうち 3 つが誘導され (図 5)、ファージ遺伝子の転写に関わってい

るものと推察された。さらに、ファージ耐性はこうした遺伝子の変異に起因する可能性がある。

ファージラン藻の感染過程における転写解析は、両者の生物学的相互作用の分子メカニズムを理解する上で極めて貴重な情報であり、国際誌への投稿へ向けさらなる研究を進めている。

(3) 新規ファージ分離体制の強化

①環境中のマイクロキスティスにおけるシアノファージ感染の日周期性

現在、環境からファージを効率的に分離する手法はまだ確立されていない。そこで、環境において、どのようなタイミングでファージが生産されているのかを明らかにすることで、ファージ試料の採取の最適なタイミングを推測することを目的とした。両調査日とも、マイクロキスティスのブルームが確認され、マイクロキスティスの存在量を示す、PC-IGS および *mcyA* の遺伝子コピー数は 1 mL あたり 10^6 コピー検出された (図 6)。遠心ペレット中の *g91* は、宿主内で複製途上にあったファージ遺伝子や懸濁物に付着したファージに由来し、両日とも 12-15 時に 10^5 コピー/ml のピークを示した。また、*g91* 転写産物量も 12-15 時に高く、夜間に顕著に低下した (図 6)。これらのことから、日中にファージ DNA の複製、ファージ粒子の放出が起こっていることが示唆された。すなわち、午後から夕刻にかけて試料を採取することで効率的にファージが分離できる可能性が示された。

一方、本研究において、ウイルス生態学的に極めて重要な観測データを得た。一般的にウイルス画分は $0.2 \mu\text{m}$ フィルターでろ過したる液を用いる。ウイルス画分 ($<0.2 \mu\text{m}$) の *g91* (浮遊ファージ) は 15 時以降に高くなる傾向にあり、最大で 10^3 コピー/ml であった。一方ペレット中の *g91* は、ウイルス画分のそれらより数百倍高かった (図 6)。これは、本研究期間を通じて行った全ての観測でも支持された。従来の浮遊ファージ数から推定されたファージ生産は、過小評価されており、環境におけるラン藻へのファージのインパクトは非常に大きいものと推察された。

本研究の一部成果は、すでに国際誌で公表済である (雑誌論文④参照)。また、ファージ感染の日周期性に関する知見はアオコの動態のみならず、海洋環境の一次生産者の動態を知る上でも極めて重要度が高く、現在国際誌への投稿に向け準備を進めている。

②環境からのファージ濃縮法の確立

排水や飲料水の浄化のために、鉄沈殿物に排水中に含まれるウイルス粒子を付着させて沈殿・除去する技術が用いられている。この技術は、ウイルス粒子が中性付近で負に荷電するという性質を利用し、表面が正に荷電し

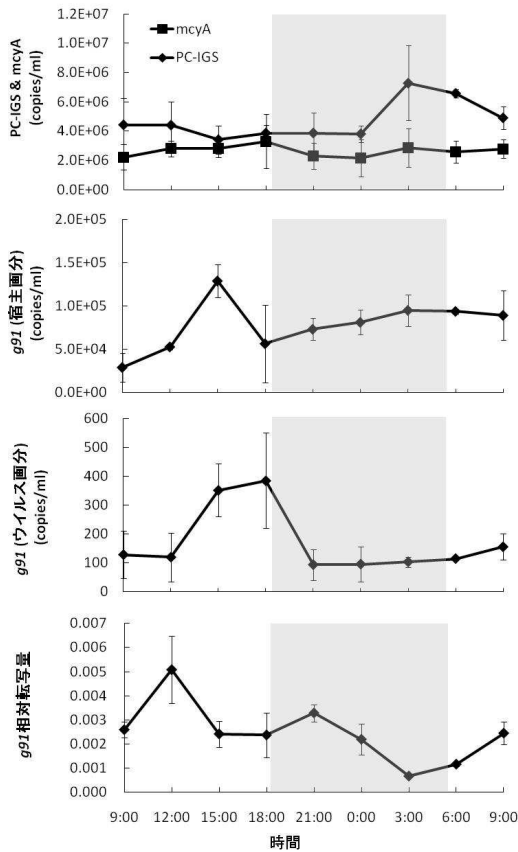


図 6. 環境中のマイクロスティスにおけるシアノファージ感染の日周期性
紙面の都合上、2009年9月15日に行われた観測データのみを示す

た鉄沈殿物表面上にウイルス粒子を吸着させる事を原理としており、排水中に存在するウイルス粒子の99%近くを取り除く事ができる。本手法を用いて淡水試料中のウイルス粒子の濃縮を行うと、Fe終濃度が10mg Fe/Lのとき、サンプル中に存在する全ウイルスの80.3%が回収された。また、Ma-LMM01ファージを本手法、ならびにウイルス濃縮法として汎用される限外ろ過法で濃縮し、濃縮液のタイターを測定してそれぞれの感染可能なウイルス粒子の回収率を算出した。その結果、本手法による回収率は、限外ろ過法による回収率を大きく下回った。したがって、ファージ分離のために本手法を利用することは困難であるが、環境ファージDNAの分析などへの適用が可能であると考えられた。

(4) その他の関連する成果

Ma-LMM01がコードするORF69はファミリー19キチナーゼと推定され、大腸菌によるタンパク質発現を用いて性状解析を行った。その結果、本遺伝子がリゾチーム活性、キチナーゼ活性を有すること、ならびに基質認識に関与すると推定される残基G209とI213の可能

性を明らかにした。本研究の成果は学術誌に投稿し、受理された(雑誌論文①参照)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Hosoda N., Kurokawa Y., Sako Y., Nagasaki K., Yoshida T., Hiroishi S.: The functional effect of Gly209 and Ile213 substitutions on lysozyme activity of family 19 chitinase encoded by cyanophage Ma-LMM01. Fisheries Science, 2011 (印刷中). 査読有
- ② Kuno, S., Yoshida, T., Kamikawa, R., Hosoda, N. and Sako Y. The distribution of a phage-related insertion sequence element in the cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. Microbes Environ., 25: 295-301, 2010. 査読有
- ③ Mochizuki, T., Yoshida, T., Tanaka, T., Forterre, P., Sako, Y. and Prangishvili, D. Diversity of viruses of the hyperthermophilic archaeal genus *Aeropyrum*, and isolation of the *Aeropyrum pernix* bacilliform virus 1, APBV1, the first representative of the family "Clavaviridae" *Virology* 402:347-352, 2010. 査読有
- ④ Yoshida, M., Yoshida, T., Yoshida-Takashima, Y., Kashima A. and Hiroishi, S. Real-time PCR detection of host-mediated cyanophage gene transcripts during infection of a natural *Microcystis aeruginosa* population. *Microbes Environ.* 25:211-215, 2010. 査読有
- ⑤ Nagasaki, K., Y. Tomaru, T. Yoshida. Viral impacts on harmful algal blooms - possible tools for aquatic bioremediation. *Phycologia* (Supplement) 48; 88, 2009. 査読無

[学会発表] (計30件)

- ① 長崎慶三・外丸裕司・中山奈津子・吉田天土・緒方博之・J.M. Claverie. 藻類とウイルスの関係ーゲノミクスの視点から。ナショナルバイオリソースプロジェクト藻類シンポジウム「未来を支える藻類、その多様性ーゲノミクス・ポストゲノミクスの視点からー」東京、東京住友ビル2011年1月29日。
- ② Kimura, S., T. Yoshida, N. Hosoda, T. Honda, S. Kuno, R. Kamiiji and Y.

- Sako. ” Seasonal dynamics of cyanophages infectious to *Microcystis aeruginosa* in Hiroawanoike Pond.” 第26回日本微生物生態学会大会, 茨城, 筑波大学 2010年11月24-26日.
- ③ Kuno, S., T. Yoshida, T. Kaneko and Y. Sako. Analysis On CRISPR Sequences Of Toxic Bloom-forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. 14th International conference on Harmful Algae, Crete, Greece, 2010年11月1-5日.
- ④ Hosoda, N., T. Yoshida, Y. Sako, K. Nagasaki, S. Hiroishi and Y. Kurokawa: Expression and characterization of family 19 chitinase from the cyanophage Ma-LMM01 infecting *Microcystis aeruginosa*. 14th International conference on Harmful Algae, Crete, Greece, 2010年11月1-5日.
- ⑤ Yoshida, T., Y. Takashima, S. Hiroishi, K. Nagasaki and Y. Sako. The *Microcystis aeruginosa* cyanophage encoding the phycobilisome degradation gene. 14th International conference on Harmful Algae, Crete, Greece, 2010年11月1-5日.
- ⑥ 吉田天士「ファージゲノム情報のアオコ防除への活用」平成22年度日本水産学会秋季大会シンポジウム「微生物ゲノムが拓く水産の新たな潮流」, 京都, 京都大学 2010年9月25日.
- ⑦ 長崎慶三・外丸裕司・吉田天士「水圏環境のウイルス・ファージ研究の現状と将来展望」大阪大学蛋白質研究所セミナー合同シンポジウム・第3回ファージ研究会「バクテリオファージ研究の課題と展望」大阪, 大阪大学 2010年9月9日-10日
- ⑧ 吉田天士・左子芳彦・長崎慶三・高島ゆかり・広石伸互「宿主の光合成に依存したシアノファージの増殖戦略」第25回日本微生物生態学会, 東広島, 広島大学 2009年11月21日.
- ⑨ 吉田天士 「シアノファージ *Microcystis aeruginosa* 間の生物学・生態学的相互作用」 京大大学生態研究センター・共同利用事業セミナー「アオコの生態・生理・分子系統地理学的研究の現状」京大大学生態研究センター, 2009年11月14日
- ⑩ 吉田天士・久野草太郎・左子芳彦・細田直彦・広石伸互・長崎慶三 (「アオコ原因ラン藻-溶菌性シアノファージ感染系における遺伝子水平伝播の可能性」平成21年度日本水産学会秋季大会, 盛岡市,

いわて県民情報交流センター・アイーナ 2009年10月2日

- ⑪ 吉田天士・左子芳彦・鹿嶋亜樹・高島ゆかり・広石伸互・吉田光宏「有毒アオコ発生時におけるシアノファージ感染細胞の動態」平成21年度日本水産学会春季大会, 東京, 東京海洋大学 2009年3月28日
- ⑫ Hiroishi, S., A. Kashima, M. Yoshida, Y. Takashima, N. Hosoda, Y. Takashima, K. Nagasaki and T. Yoshida. Dynamics of toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its infective cyanophages in the environment. 13th International Conference on Harmful Algae, Hong kong, China, November 2008年11月3-7日.
- ⑬ Yoshida, T, M. Yoshida, A. Kashima, Y. Takashima, N. Hosoda, K. Nagasaki and S. Hiroishi. Dynamics of cyanophages infecting the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the environment. 5th World Fisheries Congress, Yokohama, Japan, 2008年10月23日.
- ⑭ 吉田天士, 左子芳彦, 高島ゆかり, 広石伸互, 緒方博之, 長崎慶三. 光合成を中心とするラン藻とシアノファージの相互作用. 第2回ファージ研究会, 佐賀市, 佐賀大学 2008年9月11-12日.
(他16件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.microbiology.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 天士 (YOSHIDA TAKASHI)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号：80305490

(2) 研究分担者

広石 伸互 (HIROISHI SHINGO)
福井県立大学・海洋生物資源学部・教授
研究者番号：00114190
左子 芳彦 (SAKO YOSHIHIKO)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：60153970
長崎 慶三 (NAGASAKI KEIZO)
独立行政法人水産総合研究センター・
瀬戸内海区水産研究所赤潮環境部・室長
研究者番号：00222175