

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710096

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Fundamental Study on the Clarifying of Algal Bloom Outbreak Mechanism in Lake Hachiro-ko (Akita).

研究代表者

岡野 邦宏 (Kunihiro OKANO)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：30455927

研究成果の概要（和文）：秋田県八郎湖におけるアオコ発生機構の解明を最終的な目標として、競合 PCR と DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置を組合せた有毒および無毒のアオコ形成藻類の新規な定量手法を開発した。また、次世代シーケンサーを用いてアオコ発生水域のメタゲノム、特に藍藻類を含む細菌に着目して網羅的な遺伝子多様性解析を行った。その結果、シース（藍藻の細胞外多糖類）やアオコ毒 microcystin の分解への関与が予想される細菌群の遷移が確認された。

研究成果の概要（英文）：With the ultimate goal of clarifying the algal bloom outbreak mechanism in Lake Hachiro-ko (Akita Prefecture), a novel method was developed for determining quantity of toxic and non-toxic cyanobacteria, by combining competitive PCR with a DNA/RNA analytical microchip electrophoresis device. In addition, the comprehensive genetic diversity analysis of the algal bloom outbreak waters with particular focus attention on eubacteria including cyanobacteria was carried out using a next generation sequencer (NGS). The results confirmed the succession of bacterial populations predicted to contribute to the degradation of sheath (extracellular polysaccharide of cyanobacteria) and the cyanotoxin, microcystin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,800,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境技術・環境材料

キーワード：アオコ, microcystin, 八郎湖, 分子生物学的手法

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめとする先進諸国では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 microcystin 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ことも明らかとなっている。また、microcystin は生物が産生する毒性物質であるため、農薬や人工化学物質とは異なり、その環境中にお

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極めて困難である。そのため、有毒アオコの水域における抑制や発生予測（機構解明）に関する研究が極めて重要な位置づけとなっている。さらに、国内湖沼の COD に対する環境基準達成率は河川や海域と比較しても低く、今後もこの水質汚濁（富栄養化）した現状の継続と拡大傾向が続くとともに多くの湖沼で有毒アオコが発生することは避けられないことが予想される。したがって、安全な水利用を確保するためにはアオコ発生機構の

解明が極めて重要な課題となっている。

このアオコ発生機構の解明には、水温や日照条件などの環境条件に加えてアオコ形成藻類の生理特性（浮上性、温度適性など）の把握が不可欠であるが、最近の研究でその代表種である *Microcystis* 属の遺伝子型の季節遷移、特に有毒株と無毒株の動態が重要であることが指摘されている<sup>1)</sup>。そのため、アオコ形成藻類における有毒・無毒を含む株レベルでの動態解析技術の確立が求められるが、microcystin 産生株が目 (order)、属 (genus)、種 (species) によらず散在していること、形態分類では microcystin を産生するか否かを特定することが不可能なことがその確立を困難なものにしている。さらに、藍藻はその分類が形態や群集構造といった表現型 (phenotype) によって進められてきたため、同じ種においても毒素産生の有無などが“株 (strain) レベル”で異なることも研究の進展を難しいものになっている。

一方で microcystin の生合成に関する研究が急速に進展し、microcystin の生合成にはリボゾームを介しない生合成経路 (non-ribosomal biosynthesis) およびポリケチド合成系 (polyketide synthases) の遺伝子クラスター (microcystin 合成酵素遺伝子群: *mcy* 遺伝子群) が働いていることが明らかとなっている<sup>2)</sup>。さらに、この *mcy* 遺伝子群が水平伝播せず、ハウスキーピング遺伝子と共進化していることが報告されている<sup>3)</sup>。これらの知見を基に平成 20~21 年度に若手研究 (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」(課題番号 20880023) において秋田県八郎湖残存湖 (八郎湖) の microcystin 実態調査と *mcy* 遺伝子群を用いた有毒アオコの遺伝子解析を進めた。その結果、八郎湖で発生するアオコを形成する藍藻が *Anabaena* 属から *Microcystis* 属に劇的に変化することを明らかにした。また、アオコ発生初期 (6 月~7 月上旬) には microcystin 濃度も低く *mcy* 遺伝子群も検出限界以下であり、八郎湖におけるアオコ発生機構の解明ためには無毒性のアオコ形成藻類の動態が極めて重要であるとの研究成果から本研究の着想に至った。

#### 【参考文献】

- 1) Kardinaal, W. E. A. *et al.*, *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes, *Aqua. Microbiol. Ecol.* 48, 1-12 (2007)
- 2) Tillett, D. *et al.*, Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon

(*phycocyanin intergenic spacer*) phylogenies, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2810-2818 (2001)

- 3) Rantala, A. *et al.*, Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 568-573 (2004)

## 2. 研究の目的

秋田県八郎湖は富栄養化の進行とアオコの発生などから平成 19 年 12 月より湖沼法の指定を受け、その水質改善対策が急務となっている。上記の通り藍藻 *Microcystis* 属などは microcystin という極めて強力な毒素を産生することから、その発生は八郎湖汚濁における県民および近隣住民の最大の懸念となっている。また、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上水施設があることを鑑みてもその改善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 microcystin 合成酵素遺伝子 (*mcy* 遺伝子) および rRNA 遺伝子を利用した有毒アオコと無毒アオコの動態解析を行ない、アオコ発生機構の解明に結びつけることを最終目的とした。具体的には、分子生物学的手法を用いて有毒アオコおよび無毒アオコを簡易かつ簡便に定量できる技術を確認し、その技術によりそれらアオコ形成藻類の動態解析を行った。また、有毒藍藻および藍藻類全体の遺伝子多様性を解析するとともにアオコ毒やその他の水質特性を並行して調査することで有毒・無毒を含む“株レベル”でのアオコ形成藻類の変遷との関係を明らかにし、アオコ発生機構の解明へと結びつける。

## 3. 研究の方法

### (1) 調査方法および測定項目

湖水採取は、平成 24 年 7 月から 10 月まで秋田県北西部に位置する八郎湖の野村港で表層水を採水した (図 1)。また、水温、pH、溶存酸素 (DO)、電気伝導度 (EC)、Chl.a などを測定し、一部の解析には平成 22 年 8 月 28 日に八郎湖全域 45 地点を調査した時の湖水試料も用いた。

### (2) microcystin 分析

microcystin は湖水試料を酢酸抽出し、Presep<sup>®</sup>-C C18 (WAKO) により粗精製・濃縮した。また、分析は超高速液体クロマトグラフィー (UPLC, Waters) を用いて行った。

### (3) プライマー

藍藻類特異的な 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマーセット及び、microcystin 合成酵素遺伝子 *mcyB* に特異的なプライマーセットを新たに設計した。また、定量 PCR に

は *mcyD* をターゲットとしたプライマーセット (Rinta-kanto *et al.* 2005) を用いた。

#### (4) 競合 PCR (新規定量手法)

コンペティターおよび定量 PCR 用スタンダードの作製は、TOPO<sup>®</sup> Cloning Kit (Invitrogen) を用いて行った。競合 PCR 後のサンプルを TE 緩衝液により 5 倍希釈し、マイクロチップ電気泳動 MCE-202 MultiNA (島津製作所) により定量した。一方、定量 PCR は FastStart Essential DNA Probes Master (Roche) を用いて LightCycler<sup>®</sup> Nano (Roche) により解析を行った。反応溶液の調製などは添付のマニュアルに従った。

#### (5) 遺伝子多様性解析

湖水試料から遠心分離により菌体を回収し、Morita *et al.* (2007) の改変法により DNA を抽出した。各試料を識別するための配列を連結した真正細菌特異的なプライマーセットを用いて 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行い、Roche 454 GS Junior システムにより配列を決定した。得られた配列は Ribosomal Database Project (RDP) Pyrosequencing Pipeline により試料毎に分別され、RDP Classifier により分子系統学的に分類した。



図 1. 八郎湖の概要と採水地点

### 4. 研究成果

#### (1) 有毒株および無毒株の定量

上記の通り、アオコ形成藻類における有毒・無毒を含む株レベルでの動態解析技術の確立が求められるが、正確性とランニングコストを両立するような技術の開発には至っていない。そこで、有毒および無毒のアオコ

形成藻類の定量において、操作が簡便である競合 PCR (Competitive PCR) と DNA 濃度を高精度かつ高感度で分析できる DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置を組合せた手法について検討を行った。

その結果、TaqMan プロブ法による定量 PCR と同等の検量線が得られた (図 2)。また、本開発手法は定量 PCR と同等の感度を持ち、*Microcystis* 属標準株に対して行った実験では定量 PCR よりも microcystin 合成酵素遺伝子 (*mcy* 遺伝子) の感度が高く、本開発プライマーが環境中の有毒株の実態を良く反映することが示唆された (表 1)。

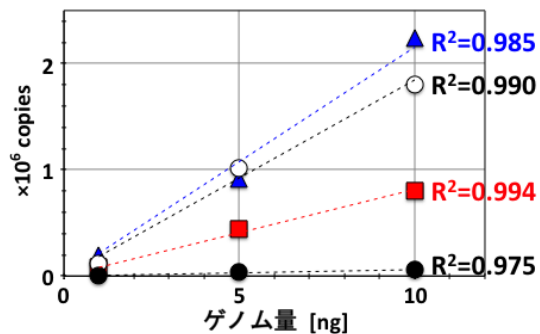


図 2. *Microcystis* 属標準株を用いた検量線  
▲本手法 (16S rDNA) ○定量 PCR (16S rDNA)  
■本手法 (*mcyB*) ●定量 PCR (*mcyD*)

表 1. 鋳型ゲノム当りのコピー数 [copies/ng]

	本手法	定量 PCR
16S rDNA	$2.16 \times 10^5$	$1.85 \times 10^5$
<i>mcy</i> 遺伝子	$8.16 \times 10^4$	$5.98 \times 10^3$

#### (2) 遺伝子多様性解析

全域調査における水質分析の結果、Chl.a 濃度と microcystin 濃度に相関がない地点が多数確認された。*Microcystis* 属は、同じ種であっても有毒な株や無毒な株が存在するため、本現象は *Microcystis* 属の種・株レベルでの多様性に起因していることが推察された。この推察は、遺伝子解析の結果においても支持されており、連続した有毒・無毒株の定量が重要であることが裏付けられた。

一方で、第 2 世代シーケンサーと称される超並列解析型シーケンサーは数 Gb/day という膨大な DNA 配列の解析が行えるため、より網羅的・高解像度な遺伝子解析が可能である。そのため、アオコ発生の様な複雑な微生物相互作用の解析にも極めて有用であると考えられる。そこで、アオコ発生水域における真正細菌の遺伝子多様性を解析するために、次世代シーケンサーを用いて 16S rRNA 遺伝子の PCR パイロシーケンスを行った。

その結果、アオコが集積した 8 月のサンプルでは *Microcystis* 属が真正細菌全体の約 45% を占めていた。また、門レベルでの解析では

Cyanobacteria門を除くと Proteobacteria門および Bacteroidetes 門が優占かつ変遷しており (図 3)、アオコの消長に伴うシース (藍藻の細胞外多糖類) やアオコ毒 microcystin の分解などにこれらの細菌群が関与していることが予想された。

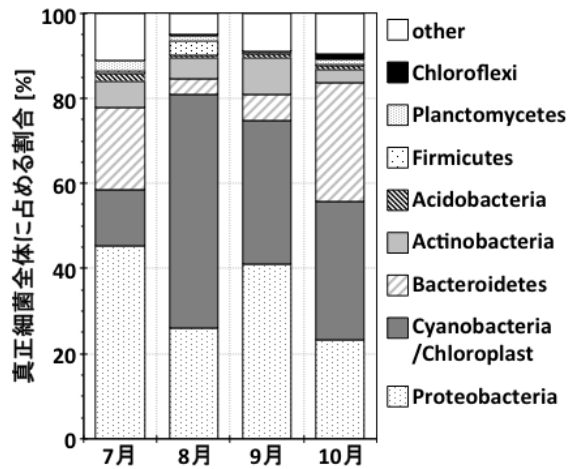


図 3. 真正細菌の門レベルでの割合

### (3) まとめ

八郎湖水において *Microcystis* 属の有毒株と無毒株を定量した結果、*mcy* 遺伝子を保存していない無毒株の比率は各月だけでなく各年においても大きな差 (最大約 100 倍) があることが明らかとなった。したがって、今後も継続してアオコ形成藻類の株レベルでの動態調査を行うことでアオコ発生機構の解明に繋がるのが十分に見込まれる。また、*Microcystis* 属の全ゲノム解析は有毒株である NIES-843 株でしか行われておらず (Kaneko *et al.* 2007)、無毒株の全ゲノム解析を行うことで microcystin 産生などの重要な生理特性の解明が期待できる。

一方で、網羅的な遺伝子多様性解析の結果、糖 (シース) や microcystin の分解への関与が予想される細菌群の遷移が確認された。しかしながら、異なるプライマーセットを用いた解析では検出頻度が異なる結果となった。これはプライマーの特性に起因することが予想されるため、今後はショットガン法によるメタゲノム解析を進める必要がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- 林紀男, 岡野邦宏, 尾崎保夫: 八郎湖における浮遊性藍藻類アオコの多様性, 秋田自然史研究, 63: 7-11 (2013)
- Shimizu, K., Maseda, H., Okano, K., Kurashima, T., Kawachi, Y., Xue, Q., Utsumi, M., Zhang, Z., Sugiura, N.: Enzymatic pathway for biodegrading microcystin LR in *Sphingopyxis* sp. C-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*,

114(6): 630-4 (2012)

- 林紀男, 岡野邦宏, 尾崎保夫: 待入堤 (秋田県秋田市) の浮遊微生物 (藻類・原生動物) 相, 秋田自然史研究, 61: 1-5 (2012)
- Nakamoto, T., Okano, K., Kaul, C.S., Utsumi, M.: Phylogenetic Analysis of microcystin Biosynthesis Gene-*mcyF* from *Microcystis*. *Japanese Journal of Water treatment Biology*, 47(1): 29-36 (2011)

[学会発表] (計 5 件)

- 岡野邦宏, 浅野亮樹, 福島淳, 鈴木英治, 宮田直幸, 杉浦則夫, 尾崎保夫, 次世代シーケンサーを用いた秋田県八郎湖の遺伝子多様性解析, 日本水環境学会第 47 回大会, 2013.3.11, 大阪市
- 岡野邦宏, 宮田直幸, 杉浦則夫, 尾崎保夫, マイクロチップ電気流動を利用した有毒藍藻の定量に関する基礎的検討, 日本水処理生物学会第 49 回大会, 2012.10.15, 東京都
- 岡野邦宏【招待講演】八郎湖残存湖の汚濁状況とその生活排水対策に関する基礎的研究, 日本畜産環境学会第 11 回大会, 2012.9.7, 秋田市
- Okano, K., Problem of algal bloom and study on the toxic cyanobacteria in Hachirou Lake. 2012 Joint International Symposium Between Sunchon National University & Akita Prefectural University, 2012.10.16, Akita city
- 岡野邦宏, 鈴木英治, 早川敦, 宮田直幸, 尾崎保夫, 秋田県八郎湖の全域調査におけるアオコの特性解析, 日本水処理生物学会第 48 回大会, 2011.11.17, 草津市

### 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

#### (2) 研究協力者

杉浦 則夫 (SUGIURA NORIO)

筑波大学大学院・生命環境科学研究科・教授

研究者番号: 10302374

福島 淳 (FUKUSHIMA JUN)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 00181256

浅野 亮樹 (ASANO RYOKI)

秋田県立大学・生物資源科学部・

流動研究員

研究者番号: 20646137