

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05785

研究課題名(和文) 湖沼で神経毒を生産するラン藻類のモニタリングと制御に向けたゲノム基盤研究

研究課題名(英文) Genome-based approaches for monitoring and controlling neurotoxin-producing cyanobacteria in lakes

研究代表者

程木 義邦 (Hodoki, Yoshikuni)

中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：60632122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼で神経毒アナトキシン-a類を生産するシアノバクテリア*Cuspidothrix issatschenkoi*の有毒株の比較ゲノム研究と野外湖沼における環境特性の評価を行った。ゲノムが決定されている有毒株は、窒素固定遺伝子の有無や生産するシアノトキシンが異なること、トランスポゾンに関する遺伝子が多く検出され、本種の系統や生態型の多様性に関係していることが考えられた。また、本種の毒合成遺伝では、複数の領域で変異が生じ有毒株が無毒化することが考えられるため、野外における有毒株の定量が困難であると考えられた。日本に分布していなかったか稀にしか出現しなかった有毒株の分布が拡大している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本および海外で分離培養されたシアノバクテリア*Cuspidothrix issatschenkoi*の神経毒アナトキシン-a合成遺伝子を比較したところ、合成遺伝子上の複数の個所で欠損が生じ有毒株が無毒株化していることが明らかとなり、毒合成遺伝子の特定の領域を定量PCRなどで増幅・定量することによって有毒株の現存量を評価するのは困難であると考えられた。また、愛知県のため池より肝臓毒シリンドロスペルモブシンと神経毒サキトキシンの合成遺伝子が検出され、この10年の間に、これまで日本に分布していなかったか稀にしか出現しなかった有毒株の分布が拡大している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Genomic and environmental characteristics of neurotoxin anatoxin-a-producing cyanobacterium *Cuspidothrix issatschenkoi* were evaluated. Toxic strains already determined their genomes differ in the presence or absence of nitrogen-fixing genes and producing cyanotoxins. They also have many transposon-related genes, which would be related to the diversity of environmental characteristics of this species. On the other hand, it is difficult to quantify the toxic strains in water systems because mutations occur in multiple regions in the toxin synthesis gene. It was also suggested that the distribution of virulent strains, which were not distributed in Japan or appeared only rarely, may be expanding.

研究分野：陸水学

キーワード：シアノバクテリア シアノトキシン 湖沼 ゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

富栄養化した湖沼・ダム等でシアノバクテリアが増殖し水面に集積する「アオコ」を形成する種には、シアノトキシンと呼ばれる神経毒や肝臓毒を生産する種が含まれる。そのため、湖沼の富栄養化問題が顕在化した 1970 年代から現在まで、アオコ研究は陸水学・藻類学の重要なテーマの一つである。また、近年の研究により、アオコを形成する種の多くは高水温に適応しているため、人為的富栄養化の進行と地球温暖化に伴い、温帯域でのブルーム発生頻度・規模の増加が予測されている (Paerl and Huisman, 2008)。

日本の湖沼に出現する主要な有毒シアノバクテリアは、肝臓毒マイクロシスチンを生産する *Microcystis aeruginosa* であり、それ以外にも神経毒を生産するシアノバクテリア数種が報告されていた (渡辺, 1994; Hodoki et al. 2012)。しかし近年になり、神経アナトキシン-a 類を生産する *Cuspidothrix issatschenkoi* が中国・四国地方以北の本州に広く分布していることが報告された (Hodoki et al. 2012 & 2013)。本種の有毒株については、これまで、ニュージーランドとドイツの 2 湖沼で有毒株が各 1 株ずつ報告されているのみであるが、これまでに分離培養されている殆どは無毒株であった (Wood et al., 2007; Ballot et al., 2010)。一方、日本では 20-30%の湖沼で有毒株が検出され、世界的に例をみないほど高頻度で神経毒生産株が存在している (Hodoki et al., 2012 & 2013)。しかし、世界的にも出現頻度が高い *M. aeruginosa* や本種が生産する肝臓毒の研究と比べ、アナトキシン-a 類および本毒を生産する *C. issatschenkoi* の研究事例は極めて少ない。このことから、世界的にも日本は本種有毒株の増殖による内水面の水環境や公衆衛生上の問題が生じるリスクが高いため、国内における多面的な研究により、基礎情報の早急な集積必要である。

2. 研究の目的

本研究は、神経毒アナトキシン-a 類を生産する *C. issatschenkoi* について、毒生産遺伝子の変異や有毒株と無毒株の比較ゲノム研究、野外湖沼における増殖動態や環境特性の評価から、本種有毒株の生理生態学的特性を解明し、今後のモニタリングや増殖制御に向けた学術基盤を創成することを目的とした。そのため、1) 現在までに日本で分離培養されている有毒株と無毒株のゲノム解析を進め、毒生産遺伝子の変異と他の機能遺伝子の比較、2) 愛知県のため池を対象としたモニタリングを行い、野外における本種の動態や環境特性の評価を行った。

3. 研究の方法

(1) *C. issatschenkoi* のゲノム解析

京都大学生態学研究センターの実験池より分離した *C. issatschenkoi* RM-6 株を含めた有毒株 3 株、無毒株 3 株を持ちいてゲノム解析を行った。なお、培養株には従属栄養細菌が含まれている。そのため、培養株からの DNA 抽出前に界面活性剤を含む滅菌培地で洗浄処理することにより、従属栄養細菌を可能な限り除去した。DNA は改変 CTAB 法によって抽出を行った。

遺伝子配列の決定は、HiSeq (illumina) によるショートリード解析と GridION (Oxford Nanopore Technologies) によるロングリード解析を組み合わせて行った。まず、単一の環状ゲノムを得るため、最初に Flye によってロングリード解析結果の *de novo* アセンブリを行った。その後、ショートリード解析の配列を使用し、Pilon によって配列の修正を行った。その結果、4,748,695 bp の単一の環状ゲノムが得られた。これらの遺伝情報を prokka 1.14.6 により遺伝子コード領域(CDS)の特定とアノテーションを行った。また、Orthovenn2 により、RM-6 株およびチェコ共和国 (CHARLIE-1) とポルトガルの湖沼 (LEG03284) から分離された株の CDS の比較を行っ

た。

(2) 愛知県のため池を対象としたモニタリング

愛知県犬山市にある中島池、徳ヶ池、入鹿池を対象とし、2021年11月から月1回の頻度で調査を行った。表層の水を採取し、栄養塩濃度などの一般的な水質項目の測定と共に、有毒種のDNA解析用のサンプルとした。また、DNA解析用のサンプルは、湖水をGF/Fフィルターでろ過し、フィルター上に微生物を濃縮したものをDNA抽出まで-20℃で冷凍保存をし、DNAの抽出は改良CTAB法によって行った (Hodoki et al. 2012)。

4. 研究成果

(1) *C. issatschenkoi* のゲノム解析

日本で分離培養された *C. issatschenkoi* の有毒株と無毒株の計6株の決定を試みた。いずれの株も従属栄養細菌が含まれているため、培養後に可能な限り洗浄処理を行い、従属栄養細菌の除去を行ったが、除去処理が不十分なものが多く、現時点までに完全長のゲノムが得られたのは、神経毒ホモアナトキシン a 生産株の RM-6 株のみであった。そのため、RM-6 株のゲノム情報を解析するとともに、海外の株との比較を行った。その結果、RM-6 株のゲノムから、47 個の tRNA 遺伝子および 5 セットの rRNA 遺伝子を含む 4,328 個のコード配列 (CDS) が確認された (図 1)。ゲノムの G + C 含量は 37.7% で CRISPR の座位は 12 個検出された。また、二次代謝産物生合成遺伝子として、ホモアナトキシン-a のほかランチジン、シアノバクチン合成遺伝子が検出された。しかし、チェコ共和国で分離された株から報告されたカスペリン遺伝子は検出されなかった。また、RM-6 のゲノムから多くのトランスポゾンに関する遺伝子が検出された。本種は、シアノトキシンの生産能だけでなく、単一種内で窒素固定能を有する系統と欠損した系統がみられる (表 1)。また、現在までにゲノムが決定されている有毒株は、それぞれ生産するシアノトキシンが異なる (表 1)。この様な遺伝的特性が本種の系統や生態型の多様性に関係していることが考えられた。

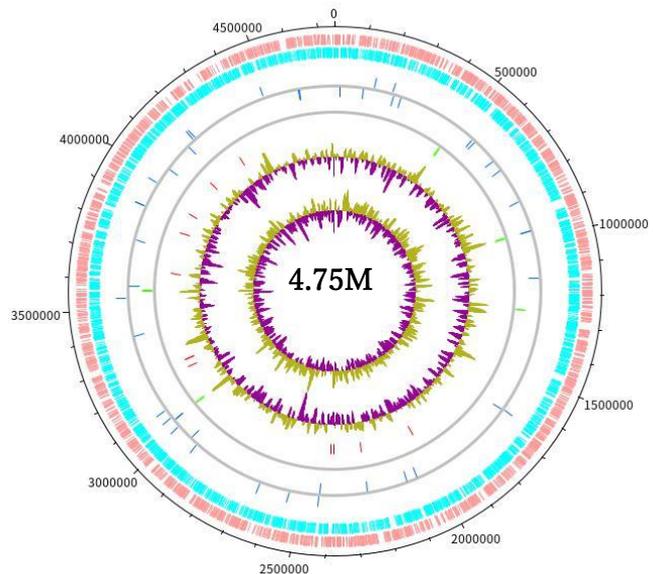


図 1. *C. issatschenkoi* RM-6 株の環状ゲノムマップ。内側より GC plot、GC skew、CRISPR、rRNA (reverse and forward)、tRNA (reverse and forward)、CDS (reverse and forward)を示す。

表 1. 各株より検出された合成遺伝子の比較

株名 (国)	窒素固定	シアノトキシン	その他
RM-6 (日本)	—	ホモアナトキシン a	
CHAELE-1 (チェコ)	—	アナトキシン a	カスペリン
LEGE03284 (ポルトガル)	+	サキシトキシン	

また、日本および海外で分離培養されている本種のアナトキシン-a 合成遺伝子を比較したと

ころ合成遺伝子上の複数の個所で欠損が生じており、その領域は株によって異なった。そのため、系統上で生じたランダムな変異によって有毒株が無毒株化していると考えられ、これまでの研究で行われていたように、毒合成遺伝子の特定の領域を定量 PCR などで増幅・定量することによって有毒株の現存量を評価するのは困難であると考えられた。

(2) 愛知県のため池を対象としたモニタリング

愛知県犬山市にある中島池、徳ヶ池、入鹿池を対象とし、2021年11月から月1回の頻度で調査を行ったところ、2か所のため池より神経毒アナトキシン-a、ホモアナトキシン-a 合成遺伝子が冬季～春季に検出された。顕微鏡及び合成遺伝子の塩基配列より、従来から日本で報告されている *Cuspidothrix issatschenkoi* であることが確認された。しかし、(1)の実験結果より、本種の場合、シアノトキシン合成遺伝子の複数の領域で変異が生じ有毒株が無毒化することが考えられるため、現時点ではこれらのため池に有毒株が分布していると断定はできない、そのため、変異が生じる可能性がある複数の領域を対象として更なる解析を進める必要がある。一方で、1か所のため池より肝臓毒シリンドロスペルモプシン合成遺伝子と神経毒サキシトキシン合成遺伝子が検出された。Hodoki et al. (2013) による日本の88カ所の湖沼で行った有毒シアノバクテリアの分布調査では、これらの毒合成遺伝子は検出されていない。シリンドロスペルモプシン合成遺伝子は夏季のみ検出されたことから、熱帯域が原産と考えられている *Raphidiopsis raciborskii* である可能性が高いと考えられた。また、サキシトキシン合成遺伝子も夏季(6-10月)に検出された。表1の通り、サキシトキシンを生産する *C. issatschenkoi* がポルトガルより分離されている。現在、これらの毒の生産者の特定を行っているが、この10年の間に、これまで日本に分布していなかったか稀にしか出現しなかった有毒株の分布が拡大している可能性が示唆された。

<引用文献>

- Ballot, A., Fastner, J., Lentz, M., Wiedner, C. (2010) First report of anatoxin-a-producing cyanobacterium *Aphanizomenon issatschenkoi* in northeastern Germany. *Toxicon* 56, 964-971.
- Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kobayashi, Y., Okuda, N., Nakano, S.-I. (2012) Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria: ubiquitous distribution of *Microcystis aeruginosa* and *Cuspidothrix issatschenkoi* in Japanese lakes. *Harmful Algae* (doi:10.1016/j.hal.2012.01.003).
- Hodoki, Y., Ohbayashi, K., Kobayashi, Y., Okuda, N., Nakano, S.-I. (2013) Anatoxin-a-producing *Raphidiopsis mediterranea* Skuja var. *grandis* Hill is one ecotype of non-heterocytous *Cuspidothrix issatschenkoi* (Usacev) Rajaniemi et al. in Japanese lakes. *Harmful Algae* 21-22: 44-53.
- Paerl, H. W., Huisman, J. (2008) Climate - Blooms like it hot. *Science* 320, 57-58.
- 渡辺 真利代、原田 健一、藤木 博太 (1994) アオコ—その出現と毒素. 東京大学出版会
- Wood, S.A., Rasmussen, J.P., Holland, P.T., Campbell, R., Crowe, A.L.M., 2007. First report of the cyanotoxin anatoxin-a from *Aphanizomenon issatschenkoi* (cyanobacteria). *Journal of Phycology* 43, 356-365.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 程木義邦・岡崎友輔・朴虎東
2. 発表標題 日本の湖沼から単離された神経毒生産シアノバクテリアのゲノム特性
3. 学会等名 日本水環境学会
4. 発表年 2020年～2021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	朴 虎東 (Park Ho-dong) (20262686)	信州大学・学術研究院理学系・教授 (13601)	

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
---------	---------