

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20880023
 研究課題名（和文） 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
 研究課題名（英文） Construction of “Hachirou Lake Database” of Toxic Cyanobacteria
 and Study on the Application of the Database to Risk Prediction.
 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）：富栄養化の進行やアオコの発生などから平成 19 年 12 月に湖沼法の指定を受けた秋田県八郎湖において、アオコ形成藻類が産生する強力な肝臓毒 microcystin の実態調査と分子生物学的な手法によるアオコ形成藻類の解析を行った。その結果、八郎湖のアオコは *Anabaena* 属から *Microcystis* 属に劇的に変遷しているとともに、microcystin を産生する有毒アオコは *Microcystis* 属が主となっていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In Hachirou Lake (Akita Prefecture) was designated as Clean Lake Act from the progress of eutrophication and the occurrence of “water bloom” in December 2007, the field examination of hepatotoxins called microcystins from blue-green algae and the molecular biological analysis of blue-green algae were carried out. In the results, it was clarified that the blue-green algae were changed dramatically from *Anabaena* sp. into *Microcystis* sp. and the toxic water bloom were chiefly formed by *Microcystis* sp. in Hachirou Lake.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,290,000	387,000	1,677,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,490,000	747,000	3,237,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：有毒アオコ、microcystin、分子系統解析、リスク予測

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。これらアオコを形成する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ことから、有毒アオコの水域における抑制や発生予測（リスク予測）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、国内のCODに対する環境基準達成率は河川や海域のCOD達成率と比較しても極めて低く、今後もこの汚濁（富栄養化）した現状は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ことから、安全な水利用を確保するためにはリスク予測手法の確立が焦眉の課題といえる。この有毒アオコのリスク予測技術の最終的な目標は、湖沼において「いつ、どのような種類（どれぐらいの毒性を持った）の有毒アオコがどれぐらい増える（増殖する）のか？」を予測することである。しかしながら、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リスク予測を困難にしている。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）によって分類が進められてきたため、同じ種においても毒の有無や毒性などが株（strain）レベルで異なることも予測手法の確立を困難なものにしている。したがって、藍藻類の表現型に基づいた精確な分類はその発生予測手法の開発において最初の課題となっている。

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、リボソ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: PKS）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¹⁾。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²⁾。これらの知見は、藍藻類において重要な位置づけにある有毒藍藻の分類に*mcy*遺伝子群が使用できることを示唆しており、有毒アオコの分子系統マーカー（遺伝子マーカー）に*mcy*遺伝子群を用いることで効率的なデータベースの構築が可能であるとの仮説から本研究の着想に至った。

【参考文献】

- 1) Tillett, D., Parker, D. L., Neilan, B. A.: 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)
- 2) Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M.,

Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T., Sivonen, K.: Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 568-573 (2004)

2. 研究の目的

近年、藍藻 *Microcystis* 属などによるアオコの発生が顕在化している湖沼に秋田県八郎潟調整池（八郎湖）がある。八郎湖はその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やリスク予測は焦眉の課題といえる。しかしながら、それらアオコやmicrocystinに関連する一貫したデータの蓄積は進んでおらず、周辺住民が求める『リスク予測』に必要な知見は不足しているのが現状である。

そこで、本研究では八郎湖を対象湖沼としてmicrocystinの産生量（濃度）について実態調査を行うとともに、八郎湖におけるmicrocystin産生藍藻類およびアオコ形成藻類のデータベース=『八郎湖データベース』を構築する。データベースの構築には、microcystin合成酵素遺伝子（*mcy*遺伝子）をターゲットとした新規系統マーカーを用い、*mcy*遺伝子の多様性と毒性の違うmicrocystin類（LR、RRなど）の関係を明らかにし、八郎湖における有毒アオコのリスク予測技術の開発を最終目的とする。具体的には、八郎湖のアオコ形成藻類を単藻化し、“毒を産生するのか？”、“毒をどれぐらい産生するのか？”、“増殖の速度は？”などリスク予測に重要なデータを蓄積する。さらに、八郎湖のアオコ形成に関連する生物相の季節（時間的）変動の容態を調査することでアオコ発生機構の解明に資するとともにリスク予測に応用する。

3. 研究の方法

(1) 湖水採取および測定項目

湖水試料は、平成20年5月から平成21年11月まで秋田県北西部に位置する八郎湖湖岸の7地点（平成21年度は4地点）で表層水を採水した（図1）。また、水質分析はpH、DO、SS、COD_{Mn}、Chl.aについて行った。また、Chl.aはホットメタノール法で行った。

(2) microcystin分析

microcystinは湖水試料を酢酸抽出し、Presep@-C C18（WAKO）により粗精製・濃縮

した。また、分析は HPLC(Shimadzu LC-10AD vp シリーズ) を用いて行った。

(3) DNA 抽出および PCR

湖水 DNA の抽出は、UltraClean™ Water DNA Kit (MO BIO) を用いて行った。PCR は藍藻類の 16S rRNA 遺伝子および microcystin 合成酵素遺伝子 (mcy) に特異的なプライマーセットを用いて行った。また、mcy 遺伝子は mcyA および mcyB をターゲットとした。

(4) クローンライブラリー解析

藍藻類特異的な 16S rRNA 遺伝子および mcyB 遺伝子プライマーセットで PCR した反応産物は、pGEM-T Easy (Promega) を用いてクローンライブラリー化して分子系統解析を行った。また、クローンライブラリーの配列解析は秋田県立大学バイオテクノロジーセンターの受託解析にて行った。

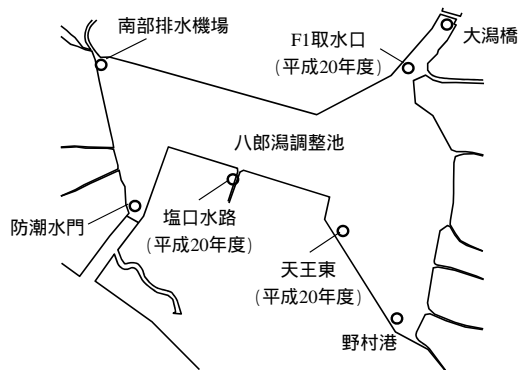


図 1. 採水地点

4 . 研究成果

(1) 水質調査

平成 20 年度は 7 月から 10 月までの長い期間で藍藻類の集積 (アオコ) が観察された。特に 8 月は多くの観測地点で Chl.a が 50 μg/L を超え、その由来は藍藻類であることが強く示唆された。また、水温が 25 を超えると Chl.a が急激に上昇し、これは平成 21 年度においても同様の傾向であったことから八郎湖のアオコ発生には水温 25 が重要な要因であることが示唆された (図 2)。また、湖水サンプルより microcystin が検出され、アオコが高濃度に集積した地点では一時期その濃度が microcystin RR: 364.3 μg/L、YR: 87.5 μg/L、LR: 320.0 μg/L であった。

平成 21 年度はアオコの発生が少なく、夏期に Chl.a が 50 μg/L を超えたのは 2 地点のみであった。これは、平年の 2 倍以上 (333 mm/月) という 6 月の降水量に起因していることが推察された。また、microcystin 濃度はアオコが発生した地点で microcystin RR: 3.6 μg/L、YR: 3.9 μg/L、LR: 1.1 μg/L であった。

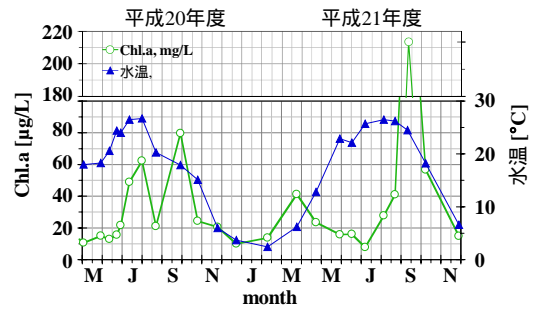


図 2. 野村港における Chl.a と水温の変動

(2) DNA 解析

16S rRNA 遺伝子

平成 20 年度の湖水 DNA の 16S rRNA 遺伝子による分子系統解析の結果、7 月から 8 月にかけてアオコを形成する藍藻類は *Anabaena* 属から *Microcystis* 属に劇的に変遷していることが明らかとなった (図 3)。この結果は、顕微鏡観察の結果とも一致した。

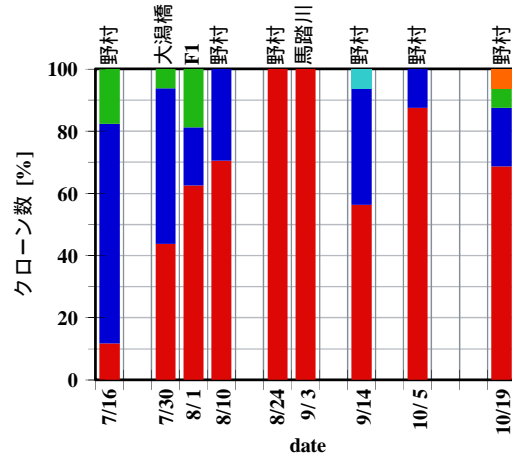


図 3 16S rRNA 遺伝子による

分子系統解析の結果 (平成 20 年度)

Pseudoanabaena 属, *Prochlorothrix* 属
Cyanobium 属, *Anabaena* 属
Microcystis 属

mcy 遺伝子

平成 20 年度の湖水 DNA (野村港) において microcystin の産生に必須である mcy 遺伝子を検出した結果、mcy 遺伝子を保存する有毒株は *Microcystis* 属が優占した 8 月以降のサンプルにおいてのみ観察された。このことから、八郎湖の有毒アオコは *Microcystis* 属が主となっていることが示唆された。

また、の分子系統解析と同じ DNA サンプルにおいて、*Anabaena* 属が優占しているサンプル (平成 20 年 7 月 16 日および 9 月 14 日) の mcy 遺伝子をクローンライブラリー解析した結果、全て *Microcystis* 属近縁であり八郎湖の有毒アオコが *Microcystis* 属であるという上記の仮説を支持する結果となった (図 4)。

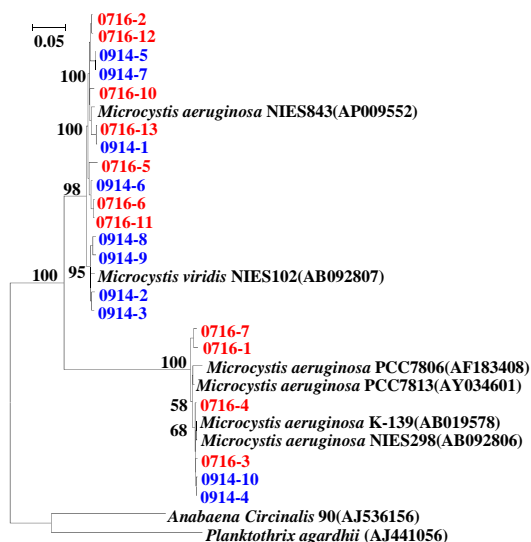


図 4. *mcyB* 遺伝子に基づく分子系統樹
赤字：平成 20 年 7 月 16 日，青字：9 月 14 日
約 1,000 bp を解析して作成した。

八郎湖単藻化株

平成 20 年度～21 年度において八郎湖のアオコより *Microcystis* 属 5 株、*Anabaena* 属 1 株、*Pseudoanabaena* 属 2 株を単藻化（藻類 1 種のみでの培養系）を行った。それら単藻化株において *mcy* 遺伝子の検出を行った結果、*Microcystis* 属 4 株においてのみ *mcy* 遺伝子が保存されていた。この結果は、上記のクローンライブラリーによる解析結果と一致しており、八郎湖の有毒株は *Microcystis* 属であることが強く示唆された。

(3) まとめおよび今後の展望

本研究により八郎湖におけるアオコ形成藻類の優占種は、*Anabaena* 属から *Microcystis* 属に劇的に変遷し、八郎湖における有毒アオコは主に *Microcystis* 属であることが明らかにされた。また、アオコ形成藻類が産生する強力な毒素である microcystin に着目した水質調査により、アオコ発生時、特に *Microcystis* 属が優占する 8 月以降に microcystin 濃度が上昇し、遺伝子解析の結果と一致した。

八郎湖は最北に位置する指定湖沼であり、高水温を好む有毒アオコに関する本研究のようなデータの蓄積は安全な水環境の利用のみならず学術的意義も大きい。アオコの発生と温暖化などの気候変動の関連が危惧されていることを鑑みても、本研究により国内最北の指定湖沼のアオコ発生機構に関する知見が蓄積されたことは社会的インパクトも極めて大きい。

一方、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およびアオコデータベース構

築のためには無毒性のアオコ形成藻類の特性解明が極めて重要であることが明らかとなった。最近、遺伝子型に注目した *Microcystis* 属の多様性を研究するために rRNA 内部転写スプーサー領域（rRNA-ITS）を利用し、種（species）レベル、さらには有毒株と無毒株の分類が行われている³⁾。今後は、本研究で蓄積された *mcy* 遺伝子を保存する有毒株に関する研究に加えて、16S rRNA 遺伝子や rRNA-ITS などにより本研究で単藻化された *Anabaena* 属のような無毒のアオコ形成藻類にも着目して研究を進めることで『八郎湖データベース』の構築が行えると考えられる。

【参考文献】

- 3) Kardinaal, W.E.A., Janse, I., Agterveld, M.K., Marion Meima, Snoek, J., Mur, L.R., Huisman, J., Zwart, G., Visser, P.M.: *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes, *Aqua. Microb. Ecol.* Vol. 48, No. 1, pp. 1-12 (2007)

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）

〔学会発表〕（計 3 件）

岡野邦宏ら、秋田県八郎湖における有毒アオコの特性と藻類変遷に関する研究、日本水環境学会、平成 22 年 3 月 15 日、福岡市（福岡大学）

岡野邦宏ら、分子系統マーカーおよび光合成色素マーカーを用いた秋田県八郎湖の植物プランクトン相の解析、日本水処理生物学会、平成 21 年 11 月 12 日、高知市（高知文化かるぽーと）

岡野邦宏ら、秋田県八郎湖における有毒アオコの分布と変遷に関する研究、日本水環境学会、平成 21 年 3 月 18 日、山口市（山口大学）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡野 邦宏 (OKANO KUNIHICO)
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

(3) 研究協力者

鈴木 英治 (SUZUKI EIJI)
秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号：60211984