

令和元年6月11日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07523

研究課題名(和文)汽水湖で特異的に大量発生する新奇強毒アオコのエコトキシコ・ゲノミクス

研究課題名(英文) Ecological and toxicological genomics of toxic waterbloom-forming cyanobacterium occurring in brackish water

研究代表者

田辺 雄彦 (Tanabe, Yuuhiko)

筑波大学・藻類バイオマス・エネルギーシステム開発研究センター・主任研究員

研究者番号：80391126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：有毒アオコを形成するラン藻の一種ミクロシスティス(*Microcystis aeruginosa*)は塩分に弱いため、通常は淡水でしか増殖しないが、稀に塩分を含む汽水湖でアオコを形成することがある。日本の汽水湖では、宍道湖(島根県)や網走湖(北海道)でアオコの発生がよく見られる。本研究課題において、汽水湖から採集したミクロシスティスのゲノム解析・遺伝子発現解析・化学分析、及び日本各地の汽水湖のフィールド調査を行った。その結果、ミクロシスティスが遺伝子水平伝播(異種生物から遺伝子をもらうこと)によって塩分耐性を持つように進化し、その結果、汽水湖でアオコが発生するようになったことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本において汽水湖は、シジミ漁に代表される水産業がさかんな自然環境である。それゆえに、汽水湖における有毒アオコの発生には悪臭・生態系破壊・水産物の毒素汚染等の様々な公衆衛生リスクが潜在する。本研究課題において、汽水湖の富栄養化が塩分耐性を持つアオコの急速な進化を誘発することを明らかにした。また、1%以上の塩分ではアオコは増殖できないことも明らかにした。以上の結果は、汽水湖への栄養塩負荷を下げることで、塩分のコントロール等によってアオコの発生を抑制可能なことを意味するため、汽水湖の環境保全施策に示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：A toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* is often found associated with blooms in eutrophic water bodies worldwide. *M. aeruginosa* is salt-sensitive; so blooms of *M. aeruginosa* commonly occur in fresh water. Although rare, they also found in brackish water such as Lakes Shinji and Abashiri in Japan. However, the biological basis of *M. aeruginosa* bloom occurrence in brackish water has been poorly investigated. In this study, we performed genomic, genetic, physiological, and biochemical characterization of *M. aeruginosa* isolated from brackish water. We have revealed the genomic basis and evolutionary process of *M. aeruginosa* bloom occurrence in brackish water. We suggest that *M. aeruginosa* has evolved salt-resistance via horizontal transmission of genes for salt-resistance in response to recent anthropogenic eutrophication of brackish water.

研究分野：有毒ラン藻

キーワード：アオコ 汽水湖 塩分耐性 浸透圧調整物質 ゲノミクス ミクロシスティス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2010-12年に宍道湖(島根県)でアオコが大発生した。このアオコの原因藻類がラン藻類の一種マイクロシスティス(*Microcystis aeruginosa*)であり、アオコ毒素をつくる有毒アオコであることがわかったが、この種は通常は塩分に弱く淡水でしか増殖しないため、なぜ塩分を含む汽水湖である宍道湖で大発生できたかが謎であった。

2. 研究の目的

ゲノム解読、分子生物学・生化学・生理学実験やフィールド調査を行い、マイクロシスティスのアオコが汽水湖で発生する原因とメカニズムを明らかにすることを目的とした。ゲノム解析を中心とした有毒アオコ形成ラン藻の環境適応機構を解明するための研究スキーム「エコトキシコゲノミクス」の確立も目的とした。

3. 研究の方法

宍道湖から分離したマイクロシスティス(Sj株)について、塩分耐性の生理試験を行った。また、次世代シーケンサーを用いてSj株の全ゲノム解析を行った。マイクロシスティスに塩分耐性を賦与する候補遺伝子について、リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析、高速液体クロマトグラフィー(LC)による遺伝子産物の定量分析を行った。日本各地の汽水湖にアオコの採集に赴き、マイクロシスティスによるアオコの発生と水質分析、採取したアオコからマイクロシスティスの分離による培養株の確立、環境DNA分析による塩分耐性株の分布調査を行った。藻類株保存施設に系統保存されているマイクロシスティスについて網羅的にPCR分析を行い、新規の塩分耐性株を探索した。新たに取得・発見した塩分耐性株を含む汽水株について、全ゲノム解析を行った。得られた塩分耐性株の全ゲノムデータについて、塩分耐性を持たないマイクロシスティスのゲノムと比較するバイオインフォマティクス解析を行った。

4. 研究成果

宍道湖から分離したマイクロシスティス(Sj株)の塩分耐性を調べるために、異なる塩分(NaCl)濃度下で培養試験を行った。その結果、NaCl 10 gL<sup>-1</sup>(塩分1%)まで増殖が可能になったことがわかった。この結果は、分離時の採集地の塩分0.5%と矛盾がない(この濃度では通常のマイクロシスティスが増殖できず死滅する)。次世代シーケンサーHiSeqを用いて本株の全ゲノム解析を行った結果、Sj株のゲノムサイズは4.6Mbpであることがわかった。Sj株の全ゲノム配列のアノテーションを行った結果、抗浸透圧物質(適合溶質)として知られているスクロース(ショ糖)の合成に關与する3遺伝子(*spsA*, *sppA*, *susA*)が見つかった(図1a)。LCによるスクロースの定量実験、RT-qPCRによる遺伝子発現解析を行ったところ、実際に塩分に応答して遺伝子発現が上昇し、またスクロースの細胞内蓄積量も大きく上昇することがわかった(図1b, c)。以上の結果から、スクロースの合成遺伝子によるスクロースの合成が、Sj株の塩分耐性の基礎であることが示唆された。

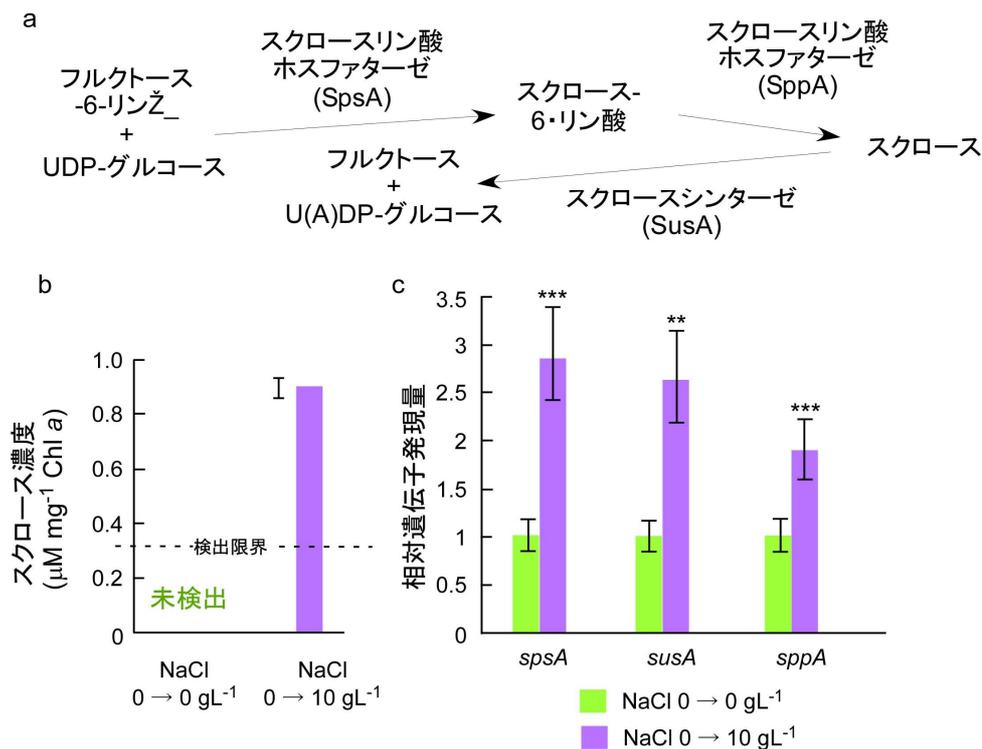


図1 ミクロシスティス Sj 株のスクロース蓄積とその合成遺伝子の発現 a, スクロース合成遺伝子とコードするタンパクが触媒するスクロースの合成・分解反応。b, 塩分暴露によるスクロースの蓄積。クロロフィル量で標準化している。c, スクロース合成系の塩分暴露による遺伝子発現の上昇、*mpB* の遺伝子発現 (Makower *et al.* 2015) で標準化している。

DNA データバンクに登録されているマイクロシスティスの約 30 株の全ゲノムの中で、スクロースの遺伝子を持っているのはオランダの汽水湖から分離された1株(PCC 7806 株)のゲノムのみであった。マイクロシスティスの 100 以上の分離株について、スクロース遺伝子の存在を PCR によって調べたところ、汽水湖である濤沸湖(北海道)から分離された1株(NIES-1211)からのみ、スクロースの遺伝子が検出された。この NIES-1211 株についても HiSeq を用いて全ゲノム配列を決定した。その結果、Sj 同様にスクロース合成に関与する 3 遺伝子が検出された。また、この株についても培養実験の結果から塩分 1%まで増殖可能な塩分耐性を持つことが確認された。次に、これらスクロース合成遺伝子を持つ 3 株(Sj, PCC 7806, NIES-1211)のゲノム比較解析を行った。その結果、ゲノム中の他の配列には大きな配列の差があるにもかかわらず、スクロース遺伝子にのみほとんど配列に差がないことがわかった(図 2)。この結果はスクロース遺伝子が最近に起こった遺伝子水平伝播によってマイクロシスティスに広がったことを示唆する(図 3)。

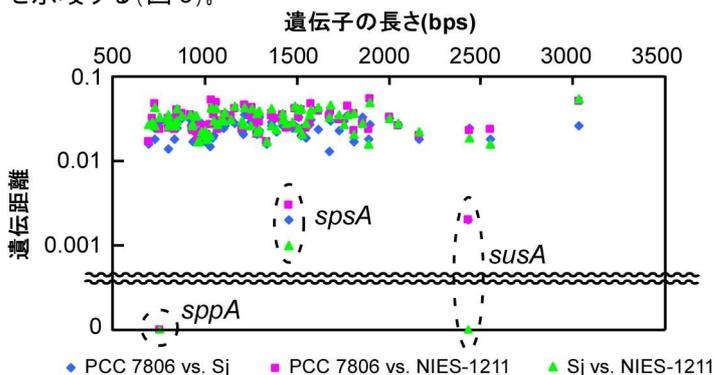


図2 スクロース合成遺伝子と他の遺伝子(コアゲノム遺伝子)の遺伝子変異の株間比較 遺伝距離は(異なる塩基数)/(遺伝子の全長塩基数)。

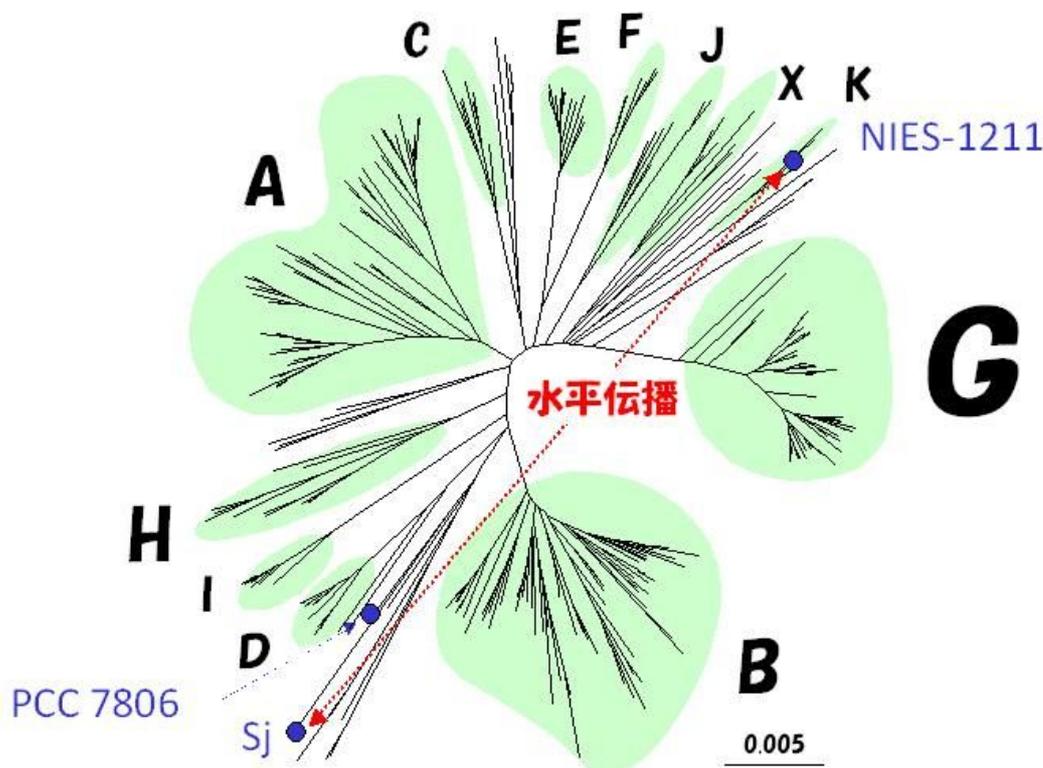


図3 ハウスキーピング遺伝子によるマイクロシスティスの系統樹 7つの遺伝子配列(Tanabe et al. 2007)を用いた近隣結合法による連結解析。各グループは Tanabe et al. (2011)に基づく。図中のスケールはサイトあたりの塩基置換数。塩分耐性株を青で示す。

塩分耐性を持つマイクロシスティスの分布を調べるため、日本各地の汽水湖に赴き、アオコ採集を行った。PCR による環境 DNA 分析の結果、鳥取県の汽水湖2か所からも Sj 株と同一と考えられる株の存在が確認できた。一方、網走湖(北海道)からはこれまでにない新規遺伝子型を持つ塩分耐性株の存在が示唆された。網走湖に数回赴きアオコを採集して分離作業を繰り返した結果、ついに新規塩分耐性株の分離培養に成功した。このゲノムについて次世代シーケンサー-MiSeq による全ゲノム解析を行った結果、Sj とはかなり異なるスクロース遺伝子の配列を持っていることが明らかになった。一方、同時

に網走湖から分離した塩分耐性を持たない株についても MiSeq を用いて全ゲノム解析を行った結果、スクロースの遺伝子を持たないことがわかった(発表論文)。汽水湖は気象条件によって塩分濃度が変動することが知られているため、様々な塩分によって異なるアオコが出てくる可能性が考えられる

日本各地の汽水湖には塩分耐性を持つミクロシステイスが少なからず分布しているようである。興味深いことに、分子系統解析の結果は、ミクロシステイスが祖先種から受け継いで持っていたスクロースの遺伝子を、淡水域に適応するという進化の過程で失ったことを示唆している。さらに、汽水で分離されたミクロシステイスのスクロース遺伝子は、別のラン藻から遺伝子水平伝播によって二次的に獲得されたものであることも示唆している。これらの結果から、近年の人間活動に起因する汽水域の富栄養化が、ミクロシステイスの「先祖返り」ともいえる特異な進化を誘発したという仮説を提示した(図4)(発表論文)。

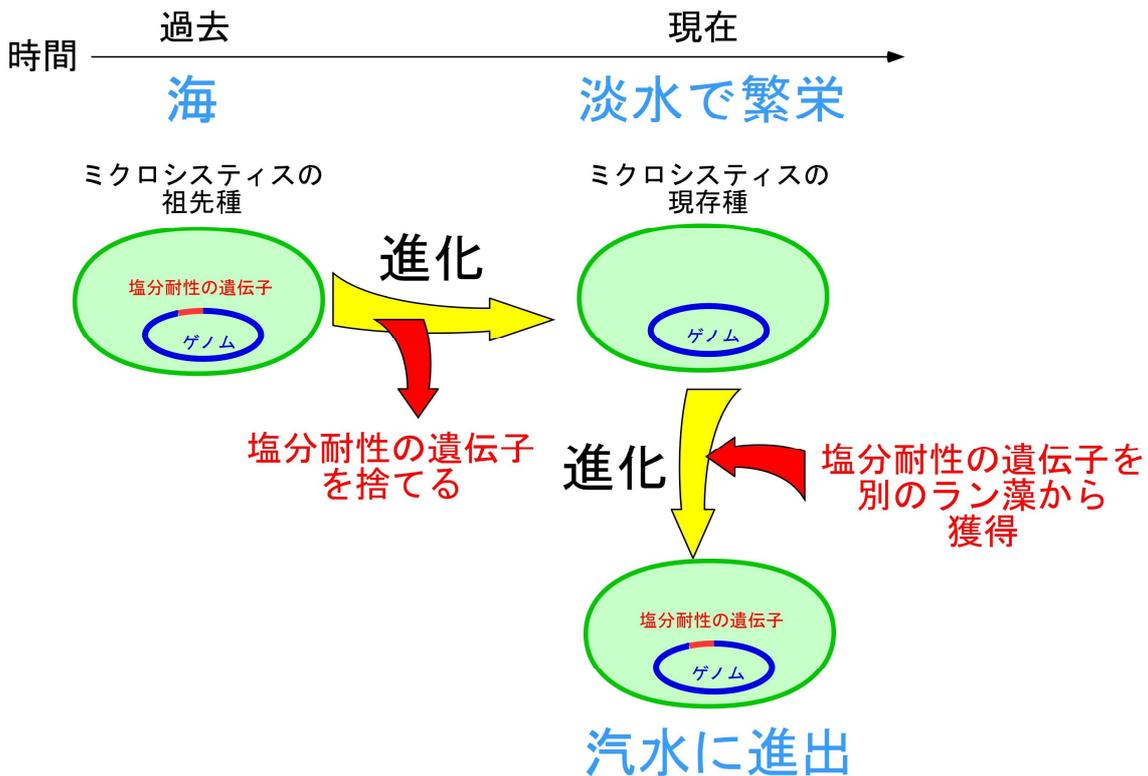


図4 ミクロシステイスの進化仮説

今回確立したゲノム解析を基本とするミクロシステイス生態系適応研究スキーム(湖沼から対象株の分離 ゲノム解析 生態系適応に關与する候補遺伝子の探索 代謝産物の定量と遺伝子発現解析 遺伝子の特定)は、塩分耐性のみならず、毒性やその他有毒アオコのもつあらゆる生理生態適応形質の解明に適用可能である。その実証例として、通常ミクロシステイスは持たない光合成色素フィコエリスリンを持つミクロシステイスの解析を行った。

フィコエリスリンを持たない通常ミクロシステイスは青緑色をしているが、フィコエリスリンを含有する株は褐色を呈するので容易に区別することができる。しかしながら、ミクロシステイスにおいてフィコエリスリン生合成のゲノム基盤については全くわかっていなかった。上述の濤沸湖産の塩分耐性株 NIES-1211 もこのフィコエリスリンを持っていた。これに加えてこれまで研究実施者が分離して維持していたフィコエリスリン培養株 5 株について、MiSeq による全ゲノム解析を行った結果、フィコエリスリンの生合成遺伝子クラスターを同定することができた(図5)。生理学実験により、フィコエリスリンが光環境の違いに応答してフィコエリスリンの発現量を調整する補色馴化を行うことも示された(発表論文)。

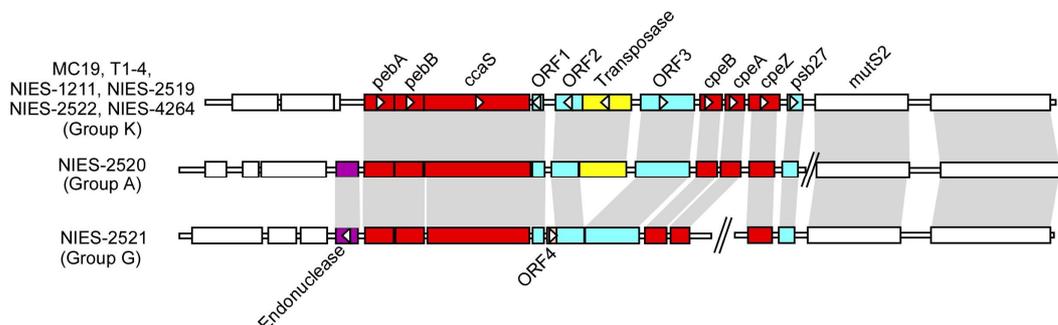


図5 ミクロシステイスのフィコエリスリン遺伝子クラスター フィコエリスリン生合成に關与する遺伝子を赤で示す。フィコエリスリンを持たない株にはこれらの遺伝子が存在しない。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

Draft genome sequence of *Microcystis aeruginosa* NIES-4285, isolated from brackish water (Lake Abashiri, Japan).

Tanabe Y, Yamaguchi H

Microbiology Resource Announcements 8: e00001-19 (2019) 査読有

DOI: 10.1128/MRA.00001-19

Evolutionary history of phycoerythrin pigmentation in the water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.

Tanabe Y, Yamaguchi H

bioRxiv 485508 (2018) 査読なし

DOI: <https://doi.org/10.1101/485508>

Adaptation of the freshwater bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to brackish water is driven by recent horizontal transfer of sucrose genes.

Tanabe Y, Hodoki Y, Sano T, Tada K, Watanabe MM

Frontiers in Microbiology 9:1150. (2018) 査読有

DOI: 10.3389/fmicb.2018.01150

(学会発表) (計 5 件)

日本藻類学会第 43 回大会, 京都, 2019 年 3 月 17 日

「赤いあおこちゃん～フィコエリスリンを持つマイクロシステイスのゲノム解析」

田辺雄彦, 山口晴代

日本藻類学会第 42 回大会, 仙台, 2018 年 3 月 25 日

「網走アオコ番外地～マイクロシステイスの汽水適応の最前線」

田辺雄彦

研究集会「シアノバクテリアの生態学的多様性と系統分類」, 京都, 2017 年 11 月 23 日

「アオコ形成ラン藻 *Microcystis* の多様性: genotype vs. ecotype」

田辺雄彦

日本藻類学会第 41 回大会, 高知, 2017 年 3 月 25 日

「アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の汽水適応株の生理と多様性」

田辺雄彦, 程木義邦, 多田清志, 佐野友春, 渡邊信

日本藻類学会第 40 回大会, 東京, 2016 年 3 月 20 日

「アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の汽水適応のゲノム基盤」

田辺雄彦, 程木義邦

(その他) (計 2 件)

ホームページ等

海に生まれ, 海に帰る? - 汽水でアオコを形成するようになったマイクロな藻類の進化の旅路

田辺雄彦

Academist Journal (2018)

<https://academist-cf.com/journal/?p=7952>

報道発表資料 2018 年 6 月 5 日

「宍道湖, 網走湖などの汽水湖でアオコが出現するメカニズムを解明」

田辺雄彦, 程木義邦, 佐野友春, 多田清志, 渡邊信

<https://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201606051300.html>

\* 本発表は下記記事に掲載された

・宍道湖アオコ 遺伝子で解明」中国新聞 6/6(水)朝刊

・「本来淡水に発生するアオコが塩分を含む湖に生じるのは何故か? 筑波大が解明」財経新聞 6/10(日)web 記事

<https://www.zaikei.co.jp/article/20180610/446642.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田辺 雄彦 (YUUHIKO TANABE)

筑波大学藻類バイオマス・エネルギーシステム開発研究センター・主任研究員

研究者番号: 80391126

### (2) 研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。