

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340015

研究課題名(和文) 神経毒生産ラン藻*Cuspidothrix*の生態と分子系統地理学的研究研究課題名(英文) Ecological and molecular phylogenetic study for neurotoxin producing cyanobacteria, *Cuspidothrix issatschenkoi*

研究代表者

程木 義邦 (Hodoki, Yoshikuni)

京都大学・生態学研究センター・准教授

研究者番号：60632122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経毒アナトキシン-a生産株のシアノバクテリア*Cuspidothrix issatschenkoi*に注目し、全国138カ所でサンプリングを行った。本種は北海道と本州に広く分布するが、有毒株は東北地方から中国地方東部までの限られた地域で検出された。また、本種は中栄養から富栄養の湖沼に広く分布するが高密度に増殖しブルームを形成するのは稀であると考えられたが、一部の汽水湖では高密度に増殖していたため、本種は好塩性種であると考えられた。また、東京都内の4池沼でモニタリングを行ったところ、本種および本種の有毒株は初夏および秋に密度のピークが見られ、水温が25℃以上になると密度が低下する傾向が見られた。

研究成果の概要(英文)：Distributions of anatoxin-a producing cyanobacteria, *Cuspidothrix issatschenkoi*, were studied for 138 lakes and ponds across Japan. Although this species was distributed widely throughout the Hokkaido and Honshu regions, the toxic strains were detected only from the Tohoku region to the east part of the Chugoku region. *C. issatschenkoi* appeared in mesotrophic and eutrophic lakes and ponds but did not increase density. Therefore, this species seems to rarely form cyanobacterial bloom in freshwater systems. On the other hand, high cell density of *C. issatschenkoi* was detected from one brackish lake in the Hokkaido region, and this species is considered to be halophilic. We also analyzed seasonal variations in *C. issatschenkoi* and the toxic strain densities in 4 ponds in Tokyo. Toxic and non-toxic strains increased in the beginning of the summer and/or autumn. The cell densities decreased during the summer when the water temperature reached more than 25 degree.

研究分野：微生物生態学

キーワード：シアノバクテリア シアノトキシン 神経毒 アオコ

1. 研究開始当初の背景

富栄養化した湖沼やダム等でブルーム(アオコ)を形成するラン藻類には肝臓毒や神経毒を生産する種も多く、ラン藻類のブルームの発生は水界生態系の機能に影響を及ぼすだけでなく、上水として利用される水域では公衆衛生上の問題も引き起こす。そのため、アオコの制御を目的とした研究や技術の開発はこれまでも多く取り組まれており、発生の予測や制御技術についても様々な手法が提案されている。また、ブルームを形成するラン藻類は、一般的に湖沼に出現するケイ藻や緑藻類と比べ高水温に適応しているため、多くの湖沼では夏季にブルームの規模が最大となる。そのため、温帯域では、ブルームの発生頻度や規模が湖沼の人為的富栄養化の進行と近年の気候変化、とりわけ地球温暖化に伴い増加することが予測されている。ヨーロッパでは近年の地球温暖化により、熱帯・亜熱帯原産と考えられる *Cylindrospermopsis raciborskii* や *Raphidiopsis mediterranea* などの有毒ラン藻類がヨーロッパ南部の温帯域に侵入し分布を拡大していることも既に指摘されている。そのため、人間の経済活動の拡大と長期的気候変動により、世界的にも有毒ラン藻類のブルームによるリスクが増大しつつあることは明らかといえる。

一方、日本ではこれまで、アオコを形成する有毒ラン藻類として主に肝臓毒のミクロキスティンを生産する *Microcystis* 属と神経毒のアナトキシン-aを生産する *Dolichospermum* (= *Anabaena*) 属および *Raphidiopsis* 属が報告されている。ミクロキスティンおよびアナトキシン-aを生産する株は全世界でそれぞれ6属以上が報告されているため、日本にはその一部の属が分布していると考えられていた。しかし、近年、申請者らが行った研究により近畿地方の複数の湖沼からアジアで初めてアナトキシン-a生産株の *Cuspidothrix issatschenkoi* が検出された。本種のアナトキシン-a生産株は、これまで、ニュージーランドとドイツの2つの湖沼から報告があるのみであったが、日本では *M. aeruginosa* に次いで出現頻度の高い有毒種であり、先行研究で対象としている近畿地方では約1/3の湖沼から検出されている。そのため、本種有毒株は近年になり日本に侵入し急速に分布を拡大していること、今後も日本国内における分布を拡大し各地の水域で有毒ラン藻類のブルーム発生のリスクを増加させる可能性もある。そのため、本株の生理生態学的特性の解明と共に侵入および分布拡大プロセスについての知見の収集は急務である。

一方、*C. issatschenkoi* については、形態が類似した別種が多く他種と混同されることが多い。また、本種を含むネンジュモ目全体についても、近年、16S rRNA や 16-23S

rRNA スペーサー (ITS) 領域の配列に基づく分子系統解析により、分類体系の再評価が行われている。さらにラン藻毒の生産能の有無は系統や遺伝子型のレベルで決まるため、形態分類だけでは毒生産能の評価に限界があり、自然湖沼を対象とした本種有毒株の検出には特異的な DNA マーカーの開発が必要不可欠となる。

2. 研究の目的

本研究では、日本における非在来有毒ラン藻類の侵入と分布拡大の現状とその要因について評価を行う。湖沼やダム等で「アオコ」と呼ばれるブルームを形成するラン藻類には毒を生産する種も多く、上水として利用される水域では公衆衛生上の問題も引き起こす。このブルームの発生頻度は、湖沼の人為的富栄養化と地球温暖化の進行に伴い増加することが予測されており、これまでに熱帯および亜熱帯を原産とする有毒ラン藻類の分布が温帯域に拡大していることも指摘されている。本研究では、近年アジアで初めて報告された神経毒アナトキシン-a生産株の *Cuspidothrix issatschenkoi* に注目し、1) 本株の系統学および生理生態学的特性の解明、2) 本有毒株の侵入プロセスと分布拡大要因の解明を行う。

3. 研究の方法

1) *C. issatschenkoi* の 16S rDNA に特異的な定量 PCR マーカーの開発

先行研究で決定されている *C. issatschenkoi* および本種に近縁な種 (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia*, *Nostoc* など) の 16S rDNA の塩基配列を基に、本種の 16S rDNA に特異的な定量 PCR マーカーの作成を試みた。プライマーおよび TaqMan プローブの設計には Primer3Plus を用いた。また、作成したマーカーを用い、pGEM ベクターを内部標準として用いる $\Delta\Delta CT$ 法により定量 PCR を行う条件検討を行った。定量 PCR の試薬には、TaqMan Fast PCR Master Mix (Applied Biosystem) を用い、AB7500 定量 PCR 装置を用い増幅量の検出を行った。改変 CTAB 法 (Hodoki et al. 2012) により *C. issatschenkoi* RM-6 株から DNA 抽出し、スタンダードとして用いた。抽出した DNA は原液から 10^{-5} まで 6 段階に希釈し、*C. issatschenkoi* および pGEM に特異的なマーカーをそれぞれ用い 55 サイクルまでの増幅量から増殖曲線を求め Ct (Cycle of threshold) 値を求め、各マーカーの平衡性の評価を行った。

2) 全国における *C. issatschenkoi* の単離と本種の出現に影響する環境要因の解析

2013年および2014年の7月から12月にかけて、全国138か所でサンプリングを行い、*C. issatschenkoi*の単離培養を行った。安定した継代培養が確立できた株については、窒素固定に関わる *nifH* 遺伝子および神経毒アナトキシン a 生産に関わるポリケチドシクターゼ遺伝子の有無を、それぞれに特異的なPCRマーカーを使い評価した。

また、現場において水温、pHの測定を行うとともに、採水したサンプルを用い、栄養塩濃度 (NO₃, NO₂, PO₄, TN, TP) 及び植物プランクトンの現存量の測定を行うとともに、1)の研究で開発した *C. issatschenkoi* に特異的なマーカーおよび Hodoki et al. (2013)で開発されている本種のアナトキシン a 生産株に特異的なマーカーを用い、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法による定量PCRにより、本種および本種有毒株の定量評価を行い、無毒株または有毒株が出現を促す環境要因の解析を行った。

3) Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法による分子系統地理学的解析

すでにPCRプライマーが開発されている13のハウスキーピング遺伝子を対象とし、本種のMLST解析に有効なマーカーの選別を行った。

4) *C. issatschenkoi* が出現する水域の原核生物相の評価。

2)の調査で得られたサンプルのうち、顕微鏡観察によって *C. issatschenkoi* の出現が確認された8サンプルと出現が確認できなかった5サンプルを対象とし、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスにより、シアノバクテリアを含めた原核生物相の比較を行った。PCRには原核生物の16S rDNAを標的としたユニバーサルプライマーを用いた。得られたデータを用い、*C. issatschenkoi* の出現と他のシアノバクテリアおよび従属栄養細菌組成の関係を解析した。

5) 東京都内4池沼におけるモニタリングによる *C. issatschenkoi* と本種有毒株の出現要因の解析

2013年7月に行った東京都および神奈川に点在する20か所の池沼調査の結果、石神井公園池、善福寺公園池、碑文谷公園池、薬師池において、顕微鏡観察により本種の出現が確認されたため、2013年10月から2014年12月まで、2週間毎にサンプリングを行った。現場では、水温およびpHを測定するとともに、採水を行い、定量PCR法による本種および本種有毒株の定量評価とともに、植物プランクトンの現存量 (Chlorophyll a) および各種栄養塩濃度 (NO₃, NO₂, PO₄, TN, TP) の測定を行った。

4. 研究成果

1) *C. issatschenkoi* 定量マーカーの開発

既存の本種及び本種に近縁な種の16S rDNAの塩基配列データをアラインメントし可変部位を目視で確認したところ Forward プライマーおよび Reverse プライマー、TaqMan プローブを作成した。また、単離株の *C. issatschenkoi* RM-6 株をスタンダードとして用い、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法による定量評価手法が可能か検討を行ったところ、アニリング温度60度の条件で求めた *C. issatschenkoi* に特異的なマーカーのCt値とDNA抽出の際に内部標準として混入させた pGEM ベクターのCt値から求めた ΔCt 値を使って回帰分析を行ったところ、有意な傾きは見られなかった (図1)。そのため、両マーカーには増幅率に

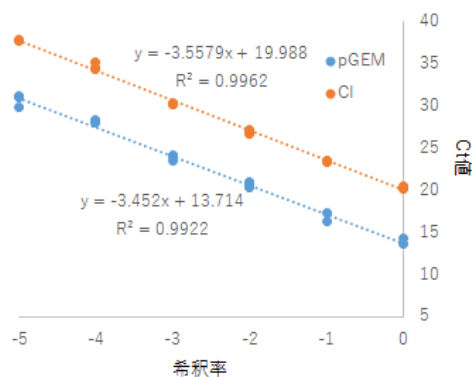


図1. pGEMと *C. issatschenkoi* に特異的なマーカー (CI) の増幅率

有意な差はないと考えられ、本条件で $\Delta\Delta\text{CT}$ 法による定量評価が可能であることが確認できた。

2) *C. issatschenkoi* の単離と環境要因の解析

2013年7月に東京および神奈川の池沼20カ所、8月に北海道の13ヶ所、9月に東北地方の14ヶ所、10月に北陸・甲信越地方20ヶ所、11月に近畿・中国・北九州地方20ヶ所、12月に関東地方15ヶ所、2014年8月に中国地方8カ所および九州地方13ヶ所、甲信越地方で7カ所の計138カ所の湖沼でサンプリングを行った (図2)。これらの地点のうち、北海道から2地点、東北地方から2地点、関東の4地点より、計118株を新たに単離した。これらの株について *nifH* 遺伝子とポリケチドシクターゼ遺伝子の有無を確認したところ、東北および東京都内の池沼より、計10種の有毒株が得られた。また、北海道の地点2湖沼から単離した系統株は、窒素固定能とアナトキシン a 生産能の両方が遺伝的に欠損していることが明らかとなった。



図 2. 日本全国の調査地点（東京都 20 地点および中国地方 8 地点を除く）

また、定量 PCR 法で *C. issatschenkoi* および本種のアナトキシン a 生産株の定量評価を行ったところ、本種は北海道から近畿地方まで広く分布しているが、北九州の 1 湖沼を除くと、広島県以西の地方では検出されなかった（図 3）。また、本種の有毒株は東北地方から中国地方東部の計 10 池沼で検出され、本州に広く分布していることが明らかとなった。一方、北海道では本種の出現頻度が高いものの、有毒株が全く検出されなかったことから、殆どは無毒株であると考えられ、これは北海道の湖沼から単離した系統株の PCR アッセイの結果と一致した。窒素固定能とアナトキシン a 生産能の両方を欠損している株は、これまで、中国で単離された 1 株だけ知られていたが、同様の株は、日本では北海道の湖沼にのみ分布していると考えられた。

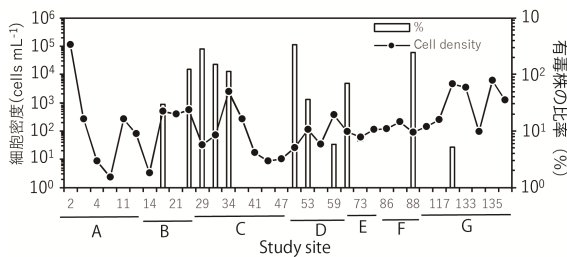


図 3. 日本全国の調査地点における *C. issatschenkoi* の細胞密度と本種有毒株の割合 (%). A: 北海道、B: 東北、C: 北陸・甲信越地方、D: 近畿・中国、E: 関東、F: 中国、G: 東京・神奈川

なお、本調査では、*C. issatschenkoi* の有毒株は北海道や九州など一部の地域には分布していないと考えられた。しかし、後に述

べる定期観測の結果では、*C. issatschenkoi* は 4 月から 11 月と長い期間の間に、複数の増殖パターンを示すことが明らかとなった。そのため、本研究で存在が確認されなかった地域については、サンプリングの時期（8 月～11 月）が問題だった可能性もあり、この点は今後の課題といえる。

3) MLST を用いた分子系統学的解析

これまでに開発されている 13 のハウスキーピング遺伝子のマーカー (fts, gln, glt, gyr, pgi, rec, tpi, rpoC1, ITS-S1, cpcB, psbA, rbcL, rbcS) を用い、MLST 解析を試みた。これまでに単離された系統株 3 株を用い PCR を行ったところ、全ての株で安定した PCR 産物を得ることができなかった。この理由については今のところ不明であるが、*C. issatschenkoi* では、例えば既知の遺伝子配列に基づき PCR マーカーを開発しても、安定した PCR 産物を得ることが難しいことがある。今後、他の遺伝子領域を対象として、再度、マーカー開発を行うこと、また他の手法により分子系統解析を行う。

4) *C. issatschenkoi* が出現する水域の原核生物相の評価。

顕微鏡観察で本種の存在が確認できた 8 湖沼と存在が確認できなかった 5 湖沼のサンプルを対象に次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンスにより原核生物相の解析を行った。各サンプルにつき、3406 から 6303 リードの 16S rDNA 配列を解析したところ、1 湖沼を除けば、本種は全リード数の 0%～0.4% 出現した。アオコを形成するシアノバクテリアとして最も知られている *Microcystis* 属については、0% から 23.9% であったことから、*C. issatschenkoi* は湖沼に出現しても *Microcystis* のように単一種で高密度なアオコを形成することは稀であると考えられた。一方、北海道の汽水湖では 9.8% を占め、本種は好塩性種であり、汽水湖で高密度に増殖し優先する可能性が示唆された。

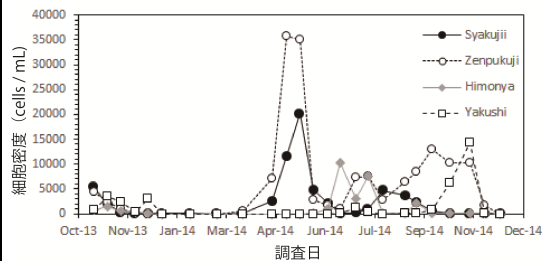


図 4. 東京都内の 4 池沼における *C. issatschenkoi* の細胞密度の変化（善福寺、碑文谷および薬師池は ×10 で表示）

5) 池沼におけるモニタリングによる *C. issatschenkoi* と本種有毒株の出現要因の解

析

定量 PCR の手法により、東京都内の 4 池沼で *C. issatschenkoi* 細胞密度の季節変化の解析を行ったところ、本種の出現パターンとして、1) 初夏(5月から6月)に増殖のピークが見られる、2) 秋(9月から11月)にピークが見られる、3) その両方でピークが見られる。の3つの増殖タイプが見られた(図4)。水温の変化を見る限り、本種の増殖至適水温は20前後と考えられ、水温が25以上になると細胞密度が減少すると考えられた(図5)。本種の本来の生育地域については、亜寒帯から温帯とする説と、亜熱帯とする説がある。本研究で得られた日本における分布と細胞密度の季節変化を見る限りでは、本種は明らかに高温には適応しておらず、亜寒帯から温帯に分布するとする説が正しいと考えられた。また、先行研究では、本種は秋に出現

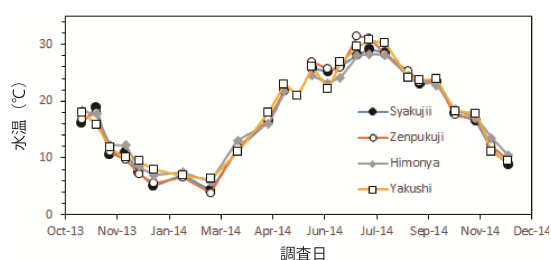


図 5. 東京都内 4 池沼の水温の変化

する植物プランクトンであることが知られていたが、湖沼によっては5月から6月にも出現することが明らかとなり、これまで秋に行っていた日本全国の湖沼調査手法を見直す必要があると考えられた。

同様に定量 PCR の手法により、有毒株の細胞密度の季節変化を評価したところ、4 池沼のうち有毒株が出現したのは、僅か 1 池沼だけであった(図6)。この池沼では、5月から6月に細胞密度のピークが見られ、全 *C. issatschenkoi* 細胞密度の 1.1% から 14.1% を占めており、夏季には細胞密度が低下するため、やはり有毒株の出現に影響をする主要因は水温と考えられた。

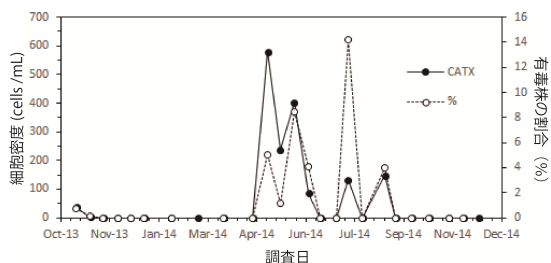


図 6. アナトキシン a 生産株の細胞密度の季節変化

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 2 件)

程木義邦・大林夏湖・小林由紀・高巢裕之・奥田昇・中野伸一：日本に分布する有毒ラン藻とその環境特性, 日本微生物生態学会, 2015 年 10 月 25 日, 茨城県土浦市(土浦亀城プラザ)。

田辺雄彦・程木義邦：アオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の汽水適応のゲノム基盤, 日本藻類学会, 2016 年 3 月 18 日~20 日, 日本歯科大学生命学部。

6. 研究組織

(1)研究代表者

程木義邦 (HODOKI, Yoshikuni)

京都大学・生態学研究センター・特定准教授

研究者番号：60632122

(2)研究分担者

中野伸一 (NAKANO, Shinichi)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：50270723