

毒性アオコの検出とミクロシスチン合成遺伝子群の保存性について

野 口 貴 彦*

I はじめに

世界中の湖沼などにおいて富栄養化が進み、アオコ（青粉、水の華）が発生し大きな環境問題となっている。特に深刻なのは毒性アオコの発生である^{1) 2)}。アオコの原因生物であるシアノバクテリアには、糸状性の Nostocales に分類される *Anabaena*, *Aphanizomenon* および *Nodularia*, Oscillatoriales に分類される *Planktothrix*, *Oscillatoria*, また球状の Chroococcales に分類される *Microcystis* があり、日本に発生するアオコを構成するシアノバクテリアの優占種としては、*Microcystis* が最もよく観察される。シアノバクテリアには、カビ臭（ジオスミン）、肝毒素（ミクロシスチン、ノジュラリン、シリンドロパーモブシン）、神経毒（アナトキシン、サキシトキシン）などの有毒物質を生産する株があり、その中で最も問題となるのが肝毒素ミクロシスチン（microcystin）である。ミクロシスチンは細胞内毒素であり、細胞の破壊・溶解により環境中に放出される。これまでにミクロシスチンは、*Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria* などが生産することが明らかとなっている。さらに近年、ミクロシスチン合成遺伝子（*mcy*）クラスターの構造が明らかとなったことから、その遺伝子情報を用いて環境中から毒性株の検出や *mcy* クラスター構造の詳細な検討が可能となってきた。ここでは、毒性アオコの問題、遺伝情報を用いた毒性アオコの検出、ミクロシスチン合成遺伝子クラスターの構造と多様性、そしてミクロシスチンの生合成について得た知見について述べる。

II 毒性アオコの発生とその被害

近年、世界各地において家庭や工場からの排水が増え、また土壌からは過剰施肥などによる肥料成分（窒素、リン）の流出もあり、水環境を汚染する物質の流出は増え続け、富栄養化した湖沼、河川、ダムなどが増加している。そしてアオコが大量発生し、その湖水を飲んだ野生動物や家畜の死亡被害が多数報告されるようになった。アオコの毒性については、1878 年に出された報告が最初であり³⁾、我が国では Watanabe らにより 1977 年に諏訪湖から採取した *M. aeruginosa* よりなるアオコに毒性があることが初めて報告された⁴⁾。1990 年にはオーストラリアのニューサウスウェールズを流れるダーリング川流域で 1,200km にわたってアオコが大発生し、それによって数百頭もの家畜が死亡した例が報告された⁵⁾。日本におても 1995 年に発生した新池（兵庫県西宮市）における野鳥の変死の原因がミクロシスチンであることが報告され⁶⁾、これが日本におけるミクロシスチンによる野生動物への被害として最初の報告である。ヒトへの被害については、1996 年に南米のブラジルにおいて、病院で有毒アオコが発生した水を人工透析に使ったため、透析患者 50 人あまりが死亡し、その原因はミクロシスチンであることが報告された⁷⁾。そのため世界保健機構 (WHO) ではミクロシスチンのヒトへの健康被害を未然に防ぐため、1998 年に初めて飲料水中の microcystin-LR の暫定ガイドラインを 0.001 mg/L と設定した⁸⁾。

この様に水源において毒性アオコが発生した場合、ヒトの健康への被害が憂慮されることから、毒性アオコの発生防除と除去対策が求められている。アオコを構成するシアノバクテリアの多くの種はミクロシスチンを生産し、その生産性は株特異的であり、ミクロシスチンは 89 種にのぼる。シアノバク

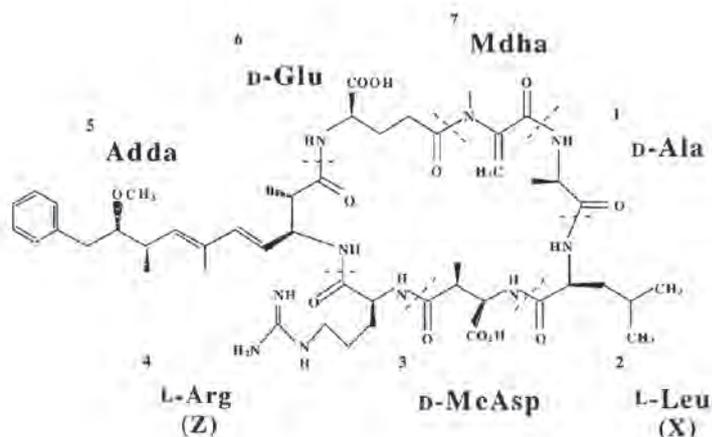
* 鯉淵学園農業栄養専門学校 生活栄養科学科

テリアはどの様にしてマイクロシスチン生産能を獲得したのか (あるいは失ったのか), また, ミクロシスチン合成遺伝子はシアノバクテリア間で伝播しているのかなど, 遺伝生態学的な解明が大きな課題となっている。

III ミクロシスチン合成遺伝子と生合成機構の解明

マイクロシスチンは, 1985年に Botes らにより *M. aeruginosa* の生産する肝毒素が単離され構造が決定された⁹⁾。マイクロシスチンは7つのアミノ酸からなる環状ヘプタペプチドで, [cyclo-D-Ala-X-β-MeAsp (β-erythro-methyl-D-Asp)-Z-Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadienoic acid)-D-Glu-Mdha (N-methyldehydroalanine)] の共通構造を有し, XとZの位置のL型アミノ酸はマイクロシスチンにより変化する (図1)。マイクロシスチンの命名は, Xの位置がロイシン (Leu, L) で, Zがアルギニン (Arg, R) の場合, microcystin-LR とよばれる。これまでに89種の構造の異なるマイクロシスチンが報告されている¹⁰⁾。マイクロシスチンの分子構造が決定されたことから, 次の課題はマイクロシスチン合成遺伝子 (*mcy*) 構造の解明であった。マイクロシスチンは, その分子構造から非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS: nonribosomal peptide synthetase) 複合体により合成されると推定され¹¹⁾, 西澤らはNRPSにおいてアミノ酸の活性化を触媒するアデニレーションドメインに共通に

保存されている領域からプライマーをデザインし, PCR法を基盤とした手法を用いて, 霞ヶ浦より分離した *M. aeruginosa* K-139 よりマイクロシスチン合成遺伝子をクローニングし, その遺伝子構造を世界で最初に明らかにした^{12) 13)}。マイクロシスチン合成遺伝子は, 10個の遺伝子からなり, 転写方向が逆向きの *mcyABC* と *mcyDEFGHIJ* の2つのクラスターから構成されていた (図2)。その特徴は, NRPS 遺伝子とポリケチド合成酵素 (PKS: polyketide synthase) 遺伝子が融合した2つの遺伝子 (*mcyE*, *mcyG*) を有することである。これらのMcyのマイクロシスチン生合成における役割を図3に示した。一般的にペプチド生合成遺伝子のモジュールの配列は, ペプチドを構成するアミノ酸配列と一致している。*mcyA* → *mcyB* → *mcyC* は, Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg の合成に関与し^{12) 13) 14)}, McyCのC末端には, 生合成の最終段階であるNRPSからペプチドの遊離と環状化に関するチオエステラーゼドメインがある。これらのことからマイクロシスチンの生合成はAddaの合成から開始されると推定されている。そしてAddaは, McyG, McyDおよびMcyEにより合成されると推定される。合成されたAddaは, McyEによりGluと縮合し, Adda-Gluのジペプチドが合成され, 次のステップへと進むと考えられる。McyFはAsp/Gluのラセミ化に^{15) 16)}, McyIは2-hydroxy-acid dehydrogenaseで, ミクロシスチン分子の3位のD-MeAspの合成に関わっていることが報告されている¹⁷⁾。McyJは, Adda分子のO-メチル化の役割を担っていることが示され



M.W., 994

図1. Microcystin-LRの構造

Adda, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,6,8-trimethyl-deca-4,6-dienoic acid; D-MeAsp, D-erythro-β-methylaspartic acid; Mdha, methyldehydroalanine; M.W., molecular weight.

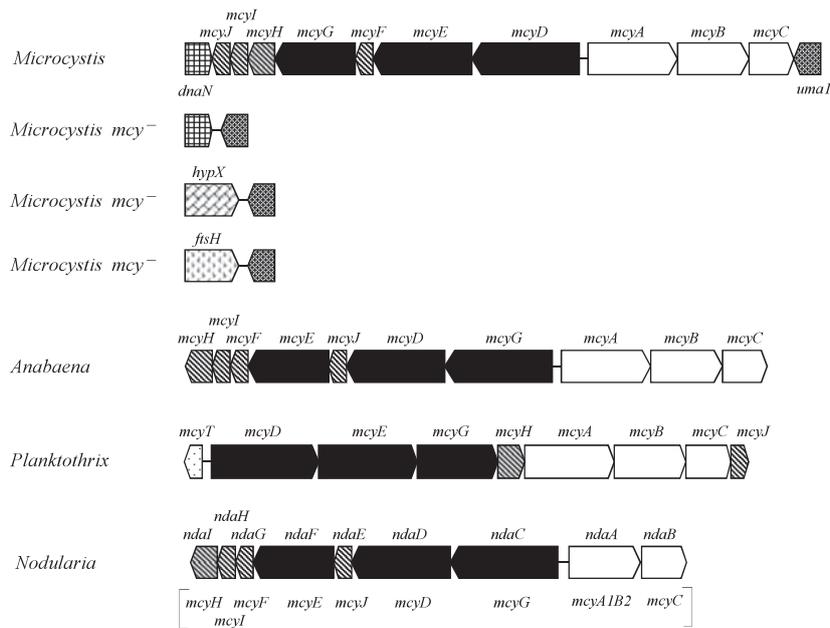


図 2. シアノバクテリアのミクロシスチン合成遺伝子構造

mcy⁻: ミクロシスチン合成遺伝子構造非保有株 (非生産株)

Nodularia: 肝毒素ノジュラリン合成遺伝子 (*nda*) [] に対応する *mcy* を示した

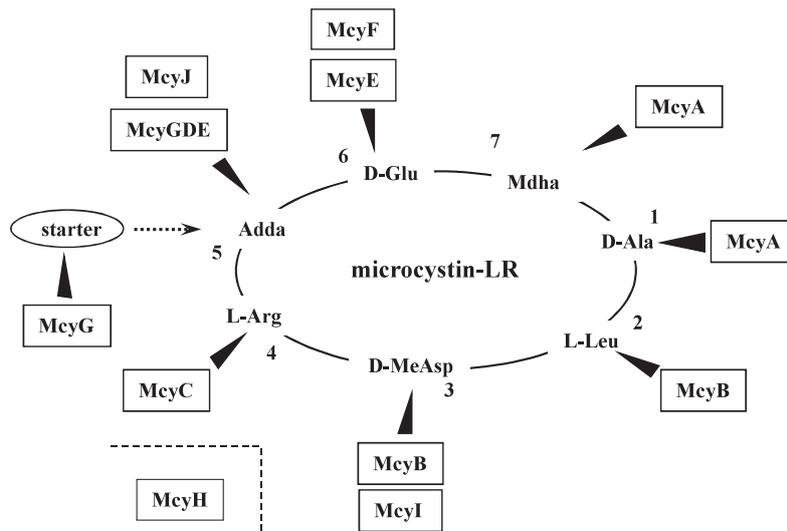


図 3. ミクロシスチン合成におけるMcyの機能

ている¹⁸⁾。また McyH は ABC トランスポーターと同一性を持つ遺伝子で、*mcyH* を破壊することによりミクロシスチンを生産しなくなることが報告されている¹⁹⁾。

IV 環境における毒性株の検出とその動態解析

毒性アオコの発生が世界的に深刻な環境問題となったことから、その環境における毒性アオコの動態解析のために、毒性アオコのモニタリング

や毒性株の検出が積極的に行われている。ミクロシスチン合成遺伝子が解明される以前は、HPLC や LC/MS/MS などを用いた機器分析法、モノクロナール抗体を用いた ELISA²⁰⁾、プロテインホスファターゼ阻害測定法などが用いられてきた⁴⁾。湖水などのミクロシスチン濃度は様々な環境要因により変化すること、あるいは 89 種ものミクロシスチンがあることなどから、これらの方法だけでは環境中におけるミクロシスチンの動態を調べるには不十分であった。そこで、遺伝学的指標を基にした毒性株の分類・同定が試みられた。毒性および

非毒性 *Microcystis* 株の 16S rRNA 遺伝子, 16S-23S internal transcribed spacer region (16S-23S ITS region) あるいはフィコシアニン遺伝子を用いた系統樹解析が行われた^{21) 22) 23)}。しかし, これら遺伝子による系統学的解析から毒性株を特異的に検出することは困難であることが示唆された。

マイクロシスチン合成遺伝子の構造が明らかとなったことから, 遺伝情報を用いた毒性株 (*mcy*⁺) の検出法が検討された。Tillett らは *mcyA* からデザインしたプライマーを用いた PCR 法により毒性株を検出し, 16S rRNA 遺伝子とフィコシアニンオペロンの系統樹との比較検討を行った²²⁾。また Pan らは, *mcyB* よりデザインしたプライマーを用いて PCR 法によるマイクロシスチン生産株の検出を報告した²⁴⁾。さらに定量的 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法による環境中の毒性株の定量的計測へと発展した。Kurmayer らは, ドイツの Wannsee 湖で *mcyB* を標的とし, フィコシアニンオペロンを構成する遺伝子間の増幅と比較することにより, *Microcystis* 中での毒性株 (*mcy*⁺) の測定が可能であることを報告した²⁵⁾。Vaitomaa らは, フィンランドの Tuusulanjärvi 湖などで *mcyE* を標的とした定量的 PCR 法を用いて *mcyE* のコピー数を導きだし, その値と湖水中のマイクロシスチン濃度と相関関係があることからモニタリング方法として有効な手段であると報告している²⁶⁾。また, Rantala らはフィンランドの 70 ヶ所の湖において, *mcyE* を標的として PCR 解析を行ったところ, マイクロシスチンを生産する可能性のある株は *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* spp. ではそれぞれ 70 %, 63 %, 37 % であり, 富栄養化が進んだ湖においてマイクロシスチン合成遺伝子を保持した株の割合が高くなっていることを報告している²⁷⁾。日本においても, 吉田らは, 福井県の三方湖と新月湖に発生したシアノバクテリアについて, *mcyA* を標的とした Competitive PCR 法を用いてマイクロシスチン合成遺伝子を持つ株の湖沼中における菌体数の推定が可能であること報告した²⁸⁾。古川らも茨城県の霞ヶ浦と北浦で発生したシアノバクテリアについて *mcyA* を標的とした定量的 PCR 法を用いてマイクロシスチン合成遺伝子を持つ株の湖沼中における菌体数の測定が可能であると報告した²⁹⁾。これまでに *mcyA*, *mcyB* および *mcyE* などを増幅領域とした定量的 PCR 法を用いた毒性株動態解析の報告

が出されている。PCR 法の問題点としては, マイクロシスチンを生産する可能性のある株を検出しているものであり, 必ずしも生産株を検出してはいないことである。西澤らはマイクロシスチン合成遺伝子を保有しているが, マイクロシスチンは生産しない株 (*mcy*-containing non-toxic strain) があることを明らかにしている^{12) 13)}。またマイクロシスチン生産能は生産株により異なること, また生産性は環境要因に大きく影響されることから, *mcy*⁺ 株の割合は必ずしも環境中のマイクロシスチン量を示すものではないことに留意する必要がある。よってアオコ中の毒性株の動態解析には遺伝学的解析, 化学的分析や免疫学的手法による解析も併用する必要がある。しかし遺伝子工学的検出法はアオコ毒性株の動態を解析するためには, 極めて有効な方法であり, 特に定量的 PCR 法により, 毒性株の割合の解析が可能となったことは, 環境中の毒性アオコのモニタリングに大きく貢献するものといえる。

V 湖沼に発生したアオコの毒性と *mcy*⁺ の分離

筆者らは, 湖沼における *mcy*⁺ 株の動態と *mcy* 構造を明らかにするため, 塘路湖 (北海道標茶町), 諏訪湖 (長野県), 阿木川ダム (岐阜県恵那市), 昆陽池 (兵庫県伊丹市, 採取場所の違いを「昆陽池 2」, 「昆陽池 3」と示した) の地域や環境の異なる 4 つの湖沼を対象とし (図 4), アオコの毒性調査と *mcy* を指標に *mcy*⁺ 株の分離を試みた。塘路湖は鉦路川水系 3 湖沼の一つで, その周辺は鉦路湿原国立公園の特別地域であり, 2000 年以前からアオコの発生が認められている。諏訪湖は 1960 年代からアオコが発生し, 我が国において霞ヶ浦, 三方湖などともにアオコに関する研究が最も活発に行われている湖である³⁰⁾。阿木川ダムは近隣市町村や愛知県の水として利用されている多目的ダムで, 1999 年頃からアオコの発生が観察されている。昆陽池は都市部に位置する昆陽池公園にあり, 地下水を水源としている。富栄養化によるアオコが大発生し, 大きな問題となっている。2002 年にそれぞれ採取したアオコでは, PCR 法を用いた *mcyG*-*mcyH* 領域の増幅の結果から, 全ての採取場所においてマイクロシスチン合成遺伝子 (*mcyG*, *mcyH*) を持つシアノバクテリアの存在が示唆され, HPLC および MALDI-



図4. 本研究の対象とした湖沼・ダム湖
日付は採取日を示した

TOF/MS 解析により、昆陽池 3 を除いて、いずれの試料からもミクロシスチンが検出された (表 1)。昆陽池 3 からはミクロシスチン生産菌が分離されていることから³¹⁾、昆陽池 3 に存在した *mcy*⁺ 株は、ミクロシスチンの生産量が極めて低かったと考えられた。阿木川ダムのアオコからは、ごく微量の microcystin-LR が検出された。よって阿木川ダムではアオコ中に毒性株は存在するが、その割合は非常に少ないと考えられた。このことは *mcy*⁺ 株の分離結果とも一致していた³¹⁾。

2002 年に昆陽池、阿木川ダム、諏訪湖及び塘路湖より採取したアオコから分離された株について、*mcyA* プローブと *mcyG* プローブを用いたゲノミック・サザン解析により *mcy* プローブに陽性を示した株を *mcy*⁺ 株とした。また、塘路湖から分離した 19 株について、さらに PCR 法で *mcyG-mcyH* 間、*mcyA-mcyD* 間を増幅し、アガロースゲル電気泳動で増幅断片を確認することにより *mcy*⁺ 株の検定を行った。その結果、2002 年に採取したアオコについて、昆陽池 2 から分離した 30 株のうち 7 株 (23 %) が、また昆陽池 3 から分離した 26 株のうち 7 株 (27 %)

表 1. アオコの毒性

採取地	PCR (<i>mcyG-H</i>)	Microcystin の検出	
		HPLC	MALDI-TOF/MS
昆陽池 2	++	MCYST-LR,RR	MCYST-LR, RR
昆陽池 3	++	—	—
阿木川ダム	+	—	MCYST-LR
諏訪湖	+++	MCYST-LR,RR	MCYST-LR,RR
塘路湖	++	MCYST-RR	MCYST-LR,RR

+ , PCR バンドの強度を示す。
— , 検出なし

が *mcy*⁺ 株であった。阿木川ダムに発生したアオコから分離した 20 株からは *mcy*⁺ 株は検出されなかった。諏訪湖から分離した 30 株のうち 4 株 (13 %) が、塘路湖から分離した 19 株のうち 2 株 (11 %) が *mcy*⁺ 株であった (表 2)。これらの結果より昆陽池では、他の湖沼に比べ *mcy*⁺ 株の割合が高いことが示された³¹⁾。Matsunaga らは 1995 年に昆陽池に発生したアオコから高い濃度のミクロシスチンを検出しており、特に毒性の強い microcystin-LR の濃度が高く、アオコ乾燥菌体の LD₅₀ が 41 mg/kg- マウスと、毒性が極めて強いことを報告している⁶⁾。さらに

表 2. アオコから *mcy*⁺ 株の分離

採取地	分離株 (<i>mcy</i> ⁺)	<i>mcy</i> ⁺ / 総分離数
2002 年 昆陽池 2	K2-18, K2-19, K2-22, K2-23, K2-26, K2-28, K2-30	7/30
昆陽池 3	K3-9, K3-15, K3-17, K3-20, K3-23, K3-27, K3-26	7/26
阿木川ダム	none	0/20
諏訪湖	S-11, S-14, S-26, S-24	4/30
唐路湖	T-3, T-14	2/19
2004 年 唐路湖	TF-1, TF-3, TF-4, TF-5, TF-7, TF-8, TF-9, TF-10, TF-14, TF-21, TM-28	11/16

Rantala らは 2002 年夏季にフィンランドの 70 ヶ所の湖で、富栄養化が進んだ湖においては *mcy*⁺ 株の割合が高くなることを報告している²⁷⁾。よって面積が 1.5 ha と小さく、富栄養化が進んでいる昆陽池では毒性株の割合が高くなっているのかもしれない。このことから昆陽池でのアオコの発生には注意が必要であると考えられた。一方、阿木川ダムでは検出されたマイクロシスチンは、ごく微量で *mcy*⁺ 株も分離できなかつた。しかし、ごく微量でもマイクロシスチンが検出されたことから、阿木川ダムにおける毒性株の割合が今後どう変化するのか興味を持たれた。

塘路湖は最も緯度が高い地域の湖沼であり、ここに生息している *Microcystis* の群体は大きく、フラスコ壁面に付着するなどの特徴が観察された。そこで 2004 年にも塘路湖よりアオコを採取して単藻株 (16 株) を分離し、*mcyG-mcyH* と *mcyA-mcyD* 間の PCR 増幅することで *mcy*⁺ 株の検定を行った。分析の結果、分離した 16 株のうち 11 株 (69 %) が *mcy*⁺ 株であった (表 2)。塘路湖では、2002 年に比べると、*mcy*⁺ 株の割合が約 6 倍に増加していた³¹⁾。白井らは霞ヶ浦において 1998 年の 7～9 月までの 3 ヶ月間のアオコ中の毒性株 (マウス毒性) の割合は、6～47 % であったことを報告している³²⁾。また Saker らは、ポルトガルの Tamega 川で、1999 年の 8 月採取の 14 株は全て microcystin-LR 生産株 (100 %) であったのに対し、9 月採取の 12 株では microcystin-LR 生産株は 2 株 (16.7 %) に大きく減少したと報告している³³⁾。塘路湖における毒性株の変化が、一時的な増加であるのか、それとも増加傾向を示しているのか断定はできない。マイクロシスチン毒性株の環境中における動態を明らかにするため、今後も継続的に分子生物学的手法を用いた生態学的解析が必要であると考えられた。

VI *Microcystis* 分離株のマイクロシスチン合成遺伝子構造の解析

これまでマイクロシスチン合成遺伝子の構造は、*Microcystis* 属、*Anabaena* 属および *Planktothrix* 属で明らかにされている (図 2)。*M. aeruginosa* では *mcy* クラスタは、10 個の遺伝子からなり、転写方向が逆向きの *mcyABC* と *mcyDEFGHIJ* の 2 つのクラスタから構成されていた。*P. agardhii* の *mcy* クラスタの構成をみると、*mcyT* を除いて全て同じ転写方向に配置され、*mcyD* → *mcyE* → *mcyG* の配列順序は *Microcystis* 属と同じであった。しかし *mcyF* と *mcyI* は、クラスタ内に存在せず、ゲノムの別の位置に存在すると推定されている¹⁸⁾。また、*Anabaena* strain 90 の *mcy* クラスタの構成をみると、*Microcystis* 属と同じ 2 つのクラスタから構成されているが、「Adda-Glu」の合成に関わるクラスタは生合成過程における順序と同じになるように *mcyG* → *mcyD* → *mcyE* の順序で配置しており、*mcyF* → *mcyH* → *mcyI* → *mcyJ* の配置は *Microcystis* 属とは異なっていた³⁴⁾。このように、*mcy* 構造には属間で多様性が認められる。もし、シアノバクテリアの共通祖先に *mcy* が存在していたとしたら³⁵⁾、進化の過程で分岐するとき遺伝子の再編が起こったか、あるいは特定の属で遺伝子の再構成が行われたとも考えられる。*Nodularia* のノジュラリン合成遺伝子 (*nda*) クラスタは (図 2)、*mcy* から 2 つの NRPS 遺伝子が欠失して生じたと考えられ、遺伝子の再構成が行われたと推定される³⁵⁾。また、*Microcystis* においては、*M. aeruginosa* K-139、*M. aeruginosa* PCC7806、*M. aeruginosa* NIES-843 の *mcy* の全構造が明らかとなり、いずれも 2 つのクラスタからなる *mcy* が *dnaN* と *uma1* の間に位置し

ていた。西澤らはPCR法を用いて、*Microcystis* 保存株における *mcy* 構造の保存性を調べた結果、保存株において *mcy* クラスター構造は保存されているものの、遺伝子 - 遺伝子間への挿入配列が観察されたことから、*mcy* の多様性を指摘した²³⁾。これまで *mcy* 構造の解析は、各湖沼から分離された保存株を用いて解析されており、特定の湖沼などに発生したアオコを構成する *mcy*⁺ 株の *mcy* 構造を比較解析した報告例はない。ここでは、*mcy* 構造の保存性を解析することにより、環境中におけるマイクロシチン合成遺伝子保有 (*mcy*⁺) 株の動態を明らかにし、さらに昆陽池、諏訪湖、塘路湖の三つの湖沼から分離された *mcy*⁺ 株の遺伝子構造について述べる。

1. *mcy*⁺ 株のマイクロシチン生産性解析

昆陽池、諏訪湖、塘路湖から分離された *mcy*⁺ 株 (13 株) は、HPLC 及び LC/MS/MS による分析の結果、K2-26, K3-15, K3-17, K3-20, K3-26 株を除いて、いずれの株からもマイクロシチンが検出された (表 3)。生産株の多くは、microcystin-LR、-RR の desmethyl 体を生産していた。昆陽池 2 から分離した K2-26 株と昆陽池 3 から分離した K3-15, K3-17, K3-20, K3-26 株については、さらに質量分析計による解析を行ったがマイクロシチン類に相当するピークを得ることはできず、マイクロシチンを

生産していないと判断された³¹⁾。

2. *mcy*⁺ 株における *mcy* 構造の解析

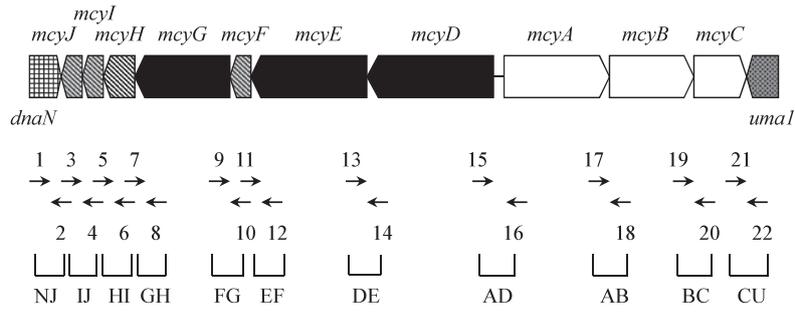
分離株の *mcy* 構造は、構造解析用に設計された隣接した二つの遺伝子間を増幅させるためのプライマー (図 5) を用いて、PCR 法により解析した。解析の対照として *mcy* 構造がすでに決定されている *M. aeruginosa* K-139 の *mcy* を用いた。2002 年に昆陽池 (8 株)、諏訪湖 (4 株)、塘路湖 (1 株) から分離した 13 株と、2004 年に塘路湖から分離した 8 株について解析を行った。その結果、全ての株において全領域で増幅断片が検出されたことから (表 3)、これらの株の *mcy* は染色体上の *dnaN* と *uma1* の間に位置し、*mcyABC* と *mcyDEFGHIJ* の二つのクラスターからなることが示された³¹⁾。しかし、数株において *M. aeruginosa* K-139 とは異なるサイズの増幅断片が認められた領域があり、それらの塩基配列を決定した。諏訪湖から分離した 2 株 (S-14, S-24) は *dnaN-mcyJ* 遺伝子間にトランスポザーゼ遺伝子 (*trpI*) の挿入があり (図 6)、この挿入配列は *ISMae4* (IS5 family) と相同であった。面白いことに、1987 年に霞ヶ浦から分離した *M. aeruginosa* B-47 株の *dnaN-mcyJ* 間にも同様の挿入が認められた。このことは、諏訪湖と霞ヶ浦という全く異なる地域、異なる時期から同じ挿入配列を同じ部位にもつ株が

表 3. *Microcystis* 分離株の PCR による *mcy* 構造解析とマイクロシチン生産性

株名	PCR 増幅領域											マイクロシチン生産
	NJ	IJ	HI	GH	FG	EF	DE	AD	AB	BC	CU	
K-139	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[Dha ⁷] MCYST-LR, [D-Asp ³ ,Dha ⁷] MCYST-LR
T-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Desmethyl MCYST-RR
S-11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Desmethyl MCYST-LR
S-14	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Desmethyl MCYST-LR
S-24	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Desmethyl MCYST-LR
S-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Desmethyl MCYST-LR, -RR, -YR, Didesmethyl MCYST-RR
K2-23	+	+	+	+	+	+	+	+ *	+	+	+ *	Desmethyl MCYST-LR
K2-26	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ *	none
K2-28	+	+	+	+	+	+	+	+ *	+	+	+ *	Desmethyl MCYST-LR, -RR
K3-9	+	+	+	+	+	+	+	+ *	+	+	+ *	Desmethyl MCYST-LR
K3-15	+	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	none
K3-17	+	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	none
K3-20	+	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	none
K3-26	+	+ *	+	+	+	+	+	+	+	+	+	none

+ , positive; + * , positive and long size; MCYST, microcystin.

毒性アオコの検出とマイクロシスチン合成遺伝子群の保存性について



1: 3'-*dnaN*, 2: 3'-*mcyJ*, 3: 5'-*mcyJ*, 4: 3'-*mcyI*, 5: 5'-*mcyI*, 6: 3'-*mcyH*, 7: 5'-*mcyH*, 8: 3'-*mcyG*, 9: 5'-*mcyG*, 10: 3'-*mcyF*, 11: 5'-*mcyF*, 12: 3'-*mcyE*, 13: 5'-*mcyE*, 14: 3'-*mcyD*, 15: PKM1-a, 16: NSZW1, 17: 3'-*mcyA*, 18: 5'-*mcyB*, 19: FB, 20: BB, 21: 3'-*mcyC*, 22: 3'-*orf2*

図5. ミクロシスチン合成遺伝子間増幅用プライマーセット

(A) *M.aeruginosa* K-139, T-14, S-26, S-11



(B) S-14, S-24



(C) K2-23, K2-28, K3-9



(D) K2-26



(E) K3-15, K3-17, K3-20, K3-26



図6. *Microcystis*分離株の*mcy*構造比較

分離されたことになり、何らかの原因でこの株が湖沼を移動したか、あるいはこの位置がこの挿入配列のホットスポットであることを示すと考えられた。一方、昆陽池から分離した3株 (K2-23, K2-28, K3-9) は *mcyA-mcyD* 遺伝子間および *mcyC-umaI* 遺伝子間に、1株 (K2-16) は *dnaN-mcyJ* 遺伝子間および *mcyC-umaI* 遺伝子間に、それぞれDNA断片の挿入が認められた。また4株 (K3-15, K3-17, K3-20, K3-26) は、どれも *mcyI* の構造遺伝子内に103 bpの挿入断片が認められ、*mcyI* 破壊株 (Δ *mcyI*) であった (図6)。これまで *Microcystis* では、*mcyI* 変異株の報告はなく、これが初めての報告となった³¹⁾。昆陽池から分離した8株の *mcy*⁺ 株は全て遺伝子間に何らかのDNA断片の挿入があり、これらの挿入断片にはトランスポナーゼ遺伝子はコードさ

れていなかった。しかし、これらの挿入断片の幾つかは、塩基配列を解析した結果、霞ヶ浦や河口湖から異なる時期に分離された株にも存在することが示された³¹⁾。また、塘路湖から分離した9株は、対照とした *M. aeruginosa* K-139 と全て同じ増幅パターンを示した。これまで報告された *mcy* 構造についての結果を併せて考察すると、*dnaN-mcyJ* と *mcyA-mcyD* は遺伝子の挿入が起こりやすいホットスポットであり、また転位因子によるものと思われる挿入配列が *mcy* 遺伝子の多様性に関わっていると考えられた。そして、これまで *mcyC-umaI* 間の保存性は非常に高いとされていたが、4株 (K2-23, K2-28, K3-9, K2-16) においてDNA断片の挿入が認められたことは、初めての報告となった³¹⁾。

Ⅶ 昆陽池より分離したマイクロシスチン生産性変異株の解析

昆陽池より分離した K3-15 株は *mcyI* 構造内に、K2-26 株には *dnaN-mcyJ* と *mcyC-uma1* 間にそれぞれ DNA 断片の挿入が認められた。そして K3-15, K2-26 株は、ともにマイクロシスチンを生産していない。ここでは、*mcy*⁺ 株でありながらマイクロシスチンを生産しない K3-15, K2-26 株の解析について述べる。

1. K3-15 株における *mcy* の転写発現と Δ *McyI* の oxidoreductase 活性の解析

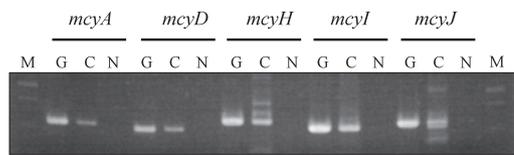
K3-15 株は、*mcyI* 構造内に DNA 断片が挿入したことにより、C-末端側の欠失した Δ *McyI* が合成される *mcyI* 変異株 (Δ*mcyI*) である。Pearson らは、*McyI* は 2-hydroxy-acid dehydrogenase で、マイクロシスチン分子の 3 位の D-MeAsp のプレカーサー分子である 3-Methylzaloacetate の 3-Methylmalate からの変換に関わっていることを報告している¹⁷⁾。K3-15 株はマイクロシスチンを生産しないことから、DNA 断片の挿入による *mcyI* の変異がその生産能を失わせたと推察された。*mcy* は光誘導的に発現し、*mcyABC* クラスタはポリシストロニックに、*mcyDEFGHIJ* はポリシストロニックとモノシストロニックに転写される^{12) 36) 37)}。そこで光連続照射下に培養した K3-15 細胞から RNA を抽出し、*mcyA*, *mcyD*, *mcyH*, *mcyI* および *mcyJ*, それぞれの発現について調べたところ、*mcyI* を含め、いずれの遺伝子も発現していることが認められた (図 7)。次に Δ *McyI* の oxidoreductase 活性を調べるために、*M. aeruginosa* K-139 株と K3-15 株のゲノム DNA から PCR 増幅した *mcyI* と Δ*mcyI* コード領域を発現ベクター (pQE-60) にクローニングし、大腸菌 M15 株で発現させ、精製した組換えタンパクの *McyI*_{K-139} と Δ *McyI*_{K3-15} を得た。SDS-PAGE で分子量サイズを分析したところ、予想される 40 kDa と 29 kDa のタンパクとして確認できた (図 8)。これらの組換えタンパクを用いて、reductase 活性を測定したところ、Δ *McyI*_{K3-15} では明らかに活性は認められなかった (図 8)。Pearson らは、*McyI* の推定される構造は、N 末端側と C 末端側に基質結合ドメインがあり、その間に核酸結合ドメインが、そして C 末端領域にある調節ドメインからなると報

告している¹⁷⁾。そこで、K3-15 株の Δ *McyI*_{K3-15} と K-139 株の *McyI*_{K-139} のアミノ酸配列を比較したところ、Δ *McyI*_{K3-15} では、核酸結合ドメインの一部と、C 末端側の基質結合ドメインと調節ドメインが完全に欠損していることが示された³¹⁾。Δ *McyI*_{K3-15} ではこの欠損によって活性を失い、そのため MeAsp が合成できず、マイクロシスチンが合成できなくなったと考えられた。

2. K2-26 株における *mcy* の転写発現

K2-26 株は、*mcyABC*, *mcyDEFGHIJ* クラスタ構造は保持しているが、マイクロシスチン生産性は失われていた。そこで *dnaN-mcyJ* と *mcyC-uma1* 間への DNA 断片の挿入が転写へ影響しているかを調べ

(A) K3-15株



(B) K2-26株

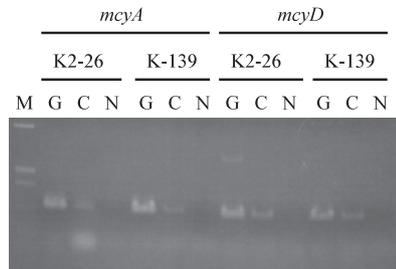


図 7. マイクロシスチン合成遺伝子の転写解析

G: genome (positive control)
C: cDNA
N: DNA-free total RNA (negative control)
M: pUC119/*HinfI*

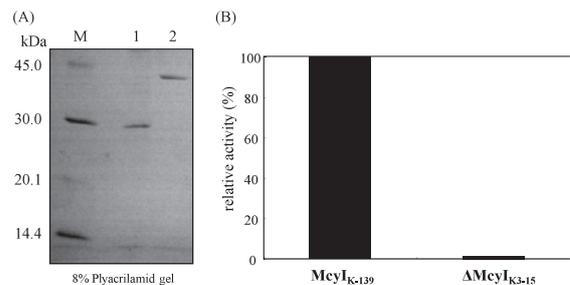


図 8. *McyI* タンパクの Reductase 活性の測定
(A) SDS-PAGE 解析 M: 分子量マーカー 1: Δ *McyI*_{K3-15}
2: *McyI*_{K-139}
(B) Reductase 活性 *McyI*_{K-139} の活性を 100% として表示

た。その結果, *mcyA* と *mcyD* の発現が確認された (図 7)。西澤らは, *mcyABC*, *mcyDEFGHIJ* クラスター構造は保持しているが, ミクロシスチンを生産しない株があることを報告している²³⁾。これらの株では構造遺伝子に点突然変異などの変異が起こった結果, ミクロシスチン生産能が失われたと推定された。よって, K2-26 株も *mcy* 構造遺伝子内の変異により, ミクロシスチン生産能を失ったと考えられた³¹⁾。

VIII おわりに

日本の 4 つの湖沼において, *mcy*⁺ 株の分離および分離株の *mcy* 構造の解析を行い, 湖沼環境におけるマイクロシスチン生産株の動態を明らかにしようとする試みについて述べた。これまでに得られた

Microcystis における *mcy* の構造は, *M. aeruginosa* K-139 株を Type I とすると, DNA 断片の挿入位置の違いから 7 つのタイプに分けられた (図 9)。*Microcystis* の *mcy* は, 2 つのクラスターからなり, *dnaN* と *uma1* の間に位置しその構造は極めて保存性が高いことが示された。さらに, *mcy* の多様性は「組換え」, 「遺伝子の挿入」の要因が大きく関与していることが示された。そして, これまで保存性が高いとされていた *mcyC-uma1* 間に DNA 断片の挿入が認められたことから, それぞれのクラスターの両端である *dnaN-mcyJ*, *mcyAD*, *mcyC-uma1* 間は, DNA 断片の挿入などが起こりやすいホット・スポットであると考えられた。しかし, *Microcystis* では *mcy* 遺伝子の再編は観察されていないが, もし原始シアノバクテリアが *mcy* 遺伝子を保有していたの

【 Type I 】



S-26, S-11, T-14, TF-4, TF-5, TF-7, TF-8, TF-9, TF-10, TF-21, TM-28
K-81, K-139, B-35, M-20, NIES-89, NIES-298, S-70, S-77, S-78, TC

【 Type II 】



S-14, S-24



NIES-102, NIES-103

【 Type III 】



B-47

【 Type IV 】



NIES-90, NIES-107

【 Type V 】



K2-23, K2-28, K3-9

【 Type VI 】



K2-26

【 Type VII 】



K3-15, K3-17, K3-20, K3-26

図 9. *Microcystis* におけるマイクロシスチン合成遺伝子構造

と仮説が正しいなら、*mcy* 遺伝子非保有株では、転移因子様遺伝子あるいは組換えにより脱落が起こった可能性が考えられた。また、*Microcystis* において初めて遺伝子内への挿入断片による *mcyI* 変異株が分離された。その解析の結果、McyI タンパクは、ミクロシスチン生合成に必須である可能性が示唆された。この分離株は、ミクロシスチン生合成機構の詳細な解析に貢献すると考えられる。この様に *mcy* 構造の解析により、挿入する多様な断片により *mcy* の多様性が増すことが示唆され、また湖沼ごとに *mcy* へ挿入される断片が特徴を持つことが確かめられた。これらの研究により、*mcy* 遺伝子構造解析の重要性を示唆するとともに、その解析技術も確立されてきた。今後は、それぞれの湖沼に発生したアオコから *mcy* 遺伝子を指標に *Microcystis* 株を分離し、その毒素生産性を解析し、分離株の *mcy* 遺伝子構造を解析することにより、さらに遺伝子の多様性が明らかになり、遺伝子の脱落や水平伝播が起こっているかなどの情報を得られると思われ、それぞれの湖沼における *mcy* 株の特徴が明らかとなることが期待される。

世界中の多くの湖沼においてミクロシスチン毒性株の増加が問題となっている。湖沼におけるミクロシスチン毒性株の動態解析とともに、分離株を用いた研究室レベルでの毒性アオコの発生機構の解明により、発生の防除も可能になると思われる。日本でも近年になり、諫早湾（長崎県）など多くの湖沼でアオコの発生が問題となってきており、これらの研究が湖沼におけるミクロシスチン生産株の動態解析に貢献することを期待したい。

引用文献

- 1) 広石伸互ら (2005) 総特集 有毒アオコの分子生態学. 月刊海洋 37: 309-384.
- 2) 西澤智康, 白井 誠 (2006) 特集「シアノバクテリアがひらく新しい世界」: トキシンをつくるシアノバクテリア. 「生物の科学遺伝」(株)エヌ・ティー・エス 60(6): 40-45.
- 3) G. Francis (1878) Poisonous Australian lake. Nature 18: 11-12.
- 4) M. F. Watanabe *et al.* (ed.) (1995) Toxic Microcystis. CRS press, BocaRaton, FL..
- 5) 渡邊眞之 (2007) 日本アオコ大図鑑. 誠文堂

新光社, 東京.

- 6) H. Matsunaga *et al.* (1999) Possible cause of unnatural mass death of wild birds in a pond in nishinomiya, Japan: sudden appearance of toxic cyanobacteria. Nat. Toxins 7: 81-84.
- 7) E. M. Jochimsen *et al.* (1998) Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil, The New England J. Med. 338: 873-878.
- 8) I. Chorus and J. Bartram (ed.) (1999) Toxic cyanobacteria in water. E & FN Spon, London, U.K., Published on behalf of WHO.
- 9) D.P. Botes *et al.* (1985) Structure studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins form *Microcystis aeruginosa*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2747-2748.
- 10) A. Tooming-Klunderud *et al.* (2008) The mosaic structure of the *mcyABC* operon in *Microcystis*. Microbiology 154: 1886-1899.
- 11) B. A. Neilan *et al.* (1999) Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria. J. Bacteriol. 181: 4089-4097.
- 12) T. Nishizawa *et al.* (1999) Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. J. Biochem. 126: 520-529.
- 13) T. Nishizawa *et al.* (2000) Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. J. Biochem. 127: 779-789.
- 14) D. Tillett *et al.* (2000) Structure organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chem. Biol. 7: 753-764.
- 15) T. Nishizawa *et al.* (2001) Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. Microbiology 147: 1235-1241.
- 16) H. Sielaff *et al.* (2003) The *mcyF* gene of the microcystin biosynthetic gene cluster from *Microcystis aeruginosa* encodes an aspartate racemase. Biochem. J. 373: 909-916.
- 17) L. A. Pearson *et al.* (2007) Characterization of the 2-hydroxy-acid dehydrogenase McyI, encoded within the microcystin biosynthesis gene

- cluster of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. J. Biol. Chem. 282: 4681-4692.
- 18) G. Christiansen *et al.* (2003) Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. J. Bacteriol. 185: 564-572.
- 19) L. A. Pearson *et al.* (2004) Inactivation of an ABC transporter gene, *mcyH*, results in loss of microcystin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6370-6378.
- 20) S. Nagata *et al.* (1999) A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. Nat. Toxins 7: 49-55.
- 21) S. Otsuka *et al.* (1999) Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. FEMS Microbiol. Lett. 172: 15-21.
- 22) D. Tillett *et al.* (2001) 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.
- 23) T. Nishizawa *et al.* (2007) Diversity within the microcystin biosynthetic gene clusters among the genus *Microcystis*. Microbes Environ. 22: 380-390.
- 24) H. Pan *et al.* (2002) Detection of hepatotoxic *Microcystis* strains by PCR with intact cells from both culture and environmental samples. Arch. Microbiol. 178: 421-427.
- 25) R. Kurmayer and T. Kutzenberger (2003) Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6723-6730.
- 26) J. Vaitomaa *et al.* (2003) Quantitative real-time PCR for determination of microcystin synthetase E copy numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in lakes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7289-7297.
- 27) A. Rantala *et al.* (2006) Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Finnish lakes with genus-specific microcystin synthetase gene E (*mcyE*) PCR and Association with environmental factors. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6101-6110.
- 28) T. Yoshida *et al.* (2003) Quantitative detection of toxic strains of the cyanobacterial genus *Microcystis* by competitive PCR. Microbes Environ. 18: 16-23.
- 29) K. Furukawa *et al.* (2006) Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase A gene. J. Biosci. Bioeng. 102: 90-96.
- 30) 沖野外輝夫, 花里孝幸 (編) (2005) アオコが消えた諏訪湖, 信濃毎日新聞社.
- 31) T. Noguchi *et al.* (2009) Genetic analysis of the microcystin biosynthesis gene cluster in *Microcystis* strains from four bodies of eutrophic water in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 55: 111-123.
- 32) M. Shirai *et al.* (1991) Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1241-1245.
- 33) M. L. Saker *et al.* (2005) Variation between strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* isolated from a Portuguese river. J. Appl. Microbiol. 99: 749-757.
- 34) L. Rouhiainen *et al.* (2004) Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. Appl. Environ. Microbiol. 70: 686-692.
- 35) A. Rantala *et al.* (2004) Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 568-573.
- 36) M. Kaebernick *et al.* (2000) Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3387-3392.
- 37) M. Kaebernick *et al.* (2002) Multiple alternate transcripts direct the biosynthesis of microcystin, a cyanobacterial nonribosomal peptide. Appl. Environ. Microbiol. 68: 449-455.