

天然環境における有毒藍藻 *Microcystis* の消滅因子の探索

～有毒 *Microcystis* の分子生態とその感染性ファージの発見～

○吉田 天士

(福井県大・生物資源)

キーワード: *Microcystis*、シアノファージ、リアルタイム PCR、マイクロシステン

1. はじめに

筆者らは、マイクロシステン合成酵素遺伝子を標的とする定量的 PCR 法を用いた環境における有毒 *M. aeruginosa* 細胞の定量的検出法を開発した。本法を環境に適用することにより、本種によるアオコは、多様性に富んだヘテロな集団で構成されており、かつその群集組成はダイナミックに変化していることを明らかにしてきた。さらに筆者らは、本種に特異的に感染・溶菌するシアノファージの分離に世界に先駆けて成功し、すでにその全ゲノム解読も完了したので、その現状を合わせて報告する。

2. 有毒 *Microcystis* の動態解析と個体群解析

M. aeruginosa は、有毒・無毒細胞が混在するが、両者を明確に区別する形態マーカーあるいは分子マーカーが存在せず、両者の生態学的挙動を個別にモニタリングすることは不可能であった。こうした中、マイクロシステン合成酵素遺伝子 (*microcystin synthetase gene*; *mcy*) が明らかにされ、*mcy* を指標とした定量的 PCR を行うことで、有毒細胞を定量的に検出することが可能となった。演者らはフィコシアニン内部スペーサー領域 (PC-IGS) と *mcy* 特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、全 *M. aeruginosa* 細胞と有毒細胞の数をそれぞれ見積もった。2004 年 7 月から 11 月と 2005 年 5 月から 9 月にかけて、福井県三方湖で行った調査では、すべての試水から有毒タイプに特異的な増幅産物が得られた。全 *Microcystis* 細胞に対する有毒細胞数の比を算出したところ、0.05~0.35 と大きな変動を示し、*M. aeruginosa* において有毒タイプと無毒タイプの動態が異なっているものと考えられた。さらに、有毒細胞数の割合と硝酸の間に正の相関関係 ($r = 0.53$, $P < 0.05$, $n = 14$) が得られたことから、水中の硝酸量の増加が群集内の有毒タイプの生育促進作用を有するものと推察された。また、16S rDNA タイピングに基づき、環境水に対して 16S rDNA クローンライブラリー解析を行った。有毒リボタイプが占める割合が高くなる時期は、定量 PCR により得られる有毒タイプの割合が高くなる時期と一致していた。

以上の結果は、1 つの *M. aeruginosa* によるブルームは多様な個体群から構成されており、その構成群集が変化することを示している。また、その各個体群は環境中の硝酸をはじめ物理化学的条件に対してそれぞれ異なる増殖生理を有している可能性があるため、各個体群を代表する株での詳細な増殖生理試験を行い、検証していく必要がある。

3. 有毒 *Microcystis* 感染性ファージの発見

1980 年代末以降、湖沼および沿岸海域における浮遊ウイルス様粒子密度が $10^7 \sim 10^8$ /ml に達するとの観察事例が報告され、水圏のウイルスおよびファージに対する生態学的視点からの興味急速に高まっている。*M. aeruginosa* の細胞数の減少時にも、シアノファージが特異的に増加するという現象が報告されてきたが、その分離事例は皆無であった。こうした背景のもと、演者らはその分離を試みた。福井県三方湖と京都府広沢池において 2003 年夏季に採取した表層水より、*M. aeruginosa* NIES-298 株を溶菌するファージ 4 株を分離・クローン化することに成功した。陰性染色による電顕観察を行った結果、多角形の頭部と収縮

性の尾部を持つミオウイルス科のファージであることが確認された。Ma-LMM01 は *M. aeruginosa* NIES-298 株 (有毒株) のみに対して感染性であり、高い宿主特異性を示した。また、Ma-LMM01 の潜伏期間は 6~12 時間、バーストサイズは 50~170 と推定された。

次に、*M. aeruginosa* NIES-298 株溶菌上清に対して PEG による沈殿操作を行った後、CsCl ステップ密度勾配遠心法により Ma-LMM01 粒子を精製した。核酸を抽出後、ショットガンクローニングにより Ma-LMM01 の全ゲノムを解読した。得られた塩基配列について ORF 検索ならびに相同性解析を行った。Ma-LMM01 ゲノムマップは 162,109 bp の環状 2 本鎖 DNA としてアセンブルされた。T4 様ファージと同様、ビリオンに含まれるゲノムは直鎖状 2 本鎖 DNA であり、PFGE の結果、鎖長は約 160 kbp と推定された。Ma-LMM01 ゲノム上には、約 180 個の ORF と 2 個の tRNA 遺伝子がコードされていると予測された。BLASTX を用いて相同性解析を行った結果、その 85% はデータベース上の配列に対してヒットせず、T4 ファージ (大腸菌感染性ファージ) をはじめ詳細なゲノム解析がなされているミオウイルスの中でも、既知のファージとは大きく異なるファージであることが推察された。これを裏付けるデータとして、ミオウイルス科に特徴的な鞘構造タンパク質 (gp91) について系統解析を行ったところ、既知のファージのいずれとも近縁性を示さなかった。

3. 環境中における *Microcystis* 感染性シアノファージのモニタリング

異なる水域由来の分離株を含む他の *Microcystis* 感染性シアノファージ分離株 3 株についても、*gp91* のアミノ酸配列が Ma-LMM01 の配列と完全に一致していた。このように、環境において Ma-LMM01 に非常に近縁なファージ (Ma-LMM01 タイプファージ) が広く分布している可能性が考えられた。そこで、本領域を標的としたリアルタイム PCR 法を構築することで、環境水中における Ma-LMM01 タイプファージの定量的検出を試みた。広沢池試水より回収したファージ画分より抽出した DNA に対し同系を適用した結果、2005 年 10 月および 11 月にはそれぞれ 9.7×10^5 および 2.2×10^3 粒子/mL の Ma-LMM01 タイプファージ粒子が検出された。さらに、各サンプリング時期におけるその出現の有無が *M. aeruginosa* の出現の有無と一致したことから、*M. aeruginosa* の動態に Ma-LMM01 タイプファージが影響を与えている可能性を示唆するものであった。

4. 最後に

M. aeruginosa は多様な個体群から構成されていることが明らかとなってきた。演者らは、各個体群が互いに異なる増殖生理を有しているとともに、多様な宿主域を有するファージ群集との間での生態学相互作用により、現場のブルームの質的变化が生じているものと考えている。今後、リアルタイム PCR 法により *M. aeruginosa*・シアノファージの環境動態に関する解析データを蓄積する一方で、より多くの組み合わせの *M. aeruginosa*-感染性ファージ培養系を確立し、そこから得られる知見をすり合わせることで、*M. aeruginosa* の生態学的挙動が明確化されるものと期待している。