

奥多摩湖に発生するMicrocystis属ラン藻の、アイソ ザイムを用いた同定および毒性の予知に関する研究

1 9 9 6 年

原 慶 明

山形大学理学部生物学科教授

目 次

1. 調査・研究の目的	1
2. 調査・研究の計画	1
3. 調査・研究の効果	2
4. 調査・研究の時期	3
5. 調査・研究の組織	4
6. 研究成果の概要	4

研 究 成 果

第1章 奥多摩産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒性組成(1)	7
第2章 奥多摩産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒性組成(2)	11
第3章 奥多摩産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒性組成(3)	15
第4章 ミクロキスティス属におけるアロザイム多型とその分類学的意味	19
第5章 <i>Microcystis aeruginosa</i> の株での環状ペプチド毒素の組成について	32

1. 調査・研究の目的

多摩川上流の奥多摩湖では、近年急速に富栄養化が進むにつれて、*Microcystis* 属ラン藻（いわゆるアオコ）の大量発生が見られるようになった。*Microcystis* 属ラン藻の中には青酸カリの100–150倍の強さの猛毒（マイクロキスチンと呼ばれる肝臓毒）を生成するものがあり、現に奥多摩湖からも報告されているが、有毒なものと同定したり、毒性の強さを予測したりすることは、これまでの解析技術ではほぼ不可能であった。本研究では、アイソザイムを遺伝標識とした新しい解析法を用いて、奥多摩湖に発生する*Microcystis* 属ラン藻のアイソザイム遺伝子の遺伝子型とマイクロキスチンの生成量との相関をあらかじめスクリーニングしてデータ・ベース化しておくことにより、湖面で採取されたごく微量の*Microcystis* 属ラン藻のアイソザイムを調査するだけで、早い段階で（実際に湖面で大発生して悪臭を放ったり毒素を出したりする前の段階で）、種を同定し毒性を予知することができるようなシステムを構築することを目指している。

2. 調査・研究の計画

(1) 調査・研究の内容

① ラン藻の収集

Microcystis 属ラン藻が湖面に浮上する6月から10月にかけて、毎年5回、延べ15回の資料収集を奥多摩湖最下流右岸の定点観測点において行う。収集方法はプランクトンネットを用いた曳航採集法による。なお、採集は各月の第2週に行うことを原則とするが、悪天候等により不可能だった場合には第3週に行うものとする。

② ラン藻の単離・培養

収集した*Microcystis* 属ラン藻を実験室に持ち帰り、単一の細胞に分離したのち、継代培養するとともに、バイアビリティの高いものを選んで順次大量に培養する。大量培養したラン藻は凍結乾燥法によってサンプル化し、アイソザイム及び毒性の調査に用いる。

③ アイソザイムの調査

アイソザイムの検出は、凍結乾燥サンプルに含まれる酵素（IDH, 6PGD, PGI, PGMの4酵素）を緩衝液中で抽出し、スターチゲルを用いた等電圧水平ゾーン電気泳動によって分離したのち、ゲル活性染色することによって行う。検出されたアイソザイムのバンディング・パターンに基づき、それぞれの株の遺伝子型を決定する。

④ 毒性の調査

日本産の*Microcystis* 属ラン藻が生成する3種の毒素(マイクロキスチン-LR, RR, YR)については、高速液体クロマトグラフィーを用いた定量法が確立されている。この方法(HPLC法)により、凍結乾燥サンプルに含まれるマイクロキスチンの定量を行う。

⑤ データの解析

アイソザイム(遺伝子型)と毒性(マイクロキスチンの生成量)のデータを集積・解析して、その対応関係をデータベース化する。

⑥ 研究成果の取りまとめ

3年間の成果を取りまとめ、所期の目標にアプローチする。すなわち、アイソザイムを遺伝標識とすることにより、奥多摩湖に発生する*Microcystis* 属ラン藻を遺伝子型のレベルで同定するとともに、毒性を事前に予知することを可能にするシステムの構築を試みる。

(2) 調査・研究の実施場所

① 単離・培養

国立科学博物館植物研究部

② アイソザイムの検出

国立科学博物館筑波実験植物園

③ 毒性の調査

東京都立衛生研究所環境保健部 および 京都大学理学部化学教室

④ 討論・総括

筑波大学生物科学系

3. 調査・研究の効果

(1) 公衆衛生(とくにdrinking water management) 上の効果

本研究では、奥多摩湖に発生する*Microcystis* 属ラン藻の毒性(マイクロキスチンの生成量)とアイソザイム遺伝子の遺伝子型との相関を、スクリーニングしてデータベース化することを当面の目標としている。これが実現されれば、湖面にわずかに浮上した*Microcystis* 属ラン藻のアイソザイムを調査するだけで(場合によっては外部形態を観察するだけで)、早い段階で、すなわち実際に湖面で大発生して悪臭を放ったり毒素を出したりする前の段階で、種を同定し毒性の有無や強弱を比較的高い確

率で予知できるシステムを構築することが可能になる。

Microcystis 属ラン藻の生成する毒素がヒトに対して及ぼす毒性の強さについては明らかでないが（ヒトを対象に生物学的毒性試験を行うことは不可能なため）、すでにアメリカなどからは*Microcystis* 属ラン藻を含む湖水を飲んだウマなどの家畜が大量死したという事例が数多く報告されており、ヒトに対しても致死毒である可能性は否定できない。

奥多摩湖が首都圏の重要な水がめのひとつであることに鑑みても、本研究の成果が公衆衛生、特に上水の管理に与える効果は大きいと考えられる。

(2) 湖沼環境の浄化活動に対する効果

Microcystis 属ラン藻（いわゆるアオコ）の大量発生と、それにとまなう悪臭や水質の低下、家畜の斃死などのさまざまな弊害は、奥多摩湖のみならず世界中の富栄養化の進んだ湖沼で深刻な問題となっている。本研究の手法を敷衍することによって、琵琶湖や諏訪湖、霞ヶ浦など、アオコ問題の深刻な各地の湖沼の環境浄化に貢献できるものと期待される。

(3) その他

研究終了後、収集した*Microcystis* 属ラン藻の培養株の一部を、国立科学博物館藻株保存庫（TAC: Tsukuba Algal Collections）および国立環境研究所微生物系統保存施設（NIES: National Institute for Environmental Research）において保存・公開し、内外の研究者に対し研究材料として提供する。これによって、生態学や生化学など、さまざまな分野での研究がより活発になると期待できる。

4. 調査・研究の時期

開始 平成元年（1989年）4月1日

完了 平成4年（1992年）3月31日

5. 調査・研究の組織

氏名	研究分担課題	現職・専門
原 慶明	研究の総括 ラン藻の収集	筑波大学生物科学系助教授 生物分類学
渡辺 眞之	ラン藻の単離 ラン藻の大量培養	国立科学博物館植物第三研究室長 藻類学
渡辺真利代	毒性試験 凍結乾燥試料の精製	東京都立衛生研究所環境保健部研究員 陸水生態学
加藤 辰己	アイソザイムの検出 データの統計的解析	国立科学博物館筑波実験植物園研究官 分子分類学

6. 研究成果の概要

3年間（平成元年～3年）の調査により、奥多摩湖には形態的・遺伝的・生化学的特性の異なる少なくとも3型（hbkd型、cfid型、afga型）のミクロキスティス属藍藻が存在することが明らかになった。（Table 1）。奥多摩湖のように狭小で水深がやや深く富栄養化の程度の高くない湖沼においては、3～5遺伝子型程度がいわば平均的な多様度のレベルだと考えられており、奥多摩湖ではこれら3遺伝子型以外に新たな遺伝子型が発見される可能性は比較的低いと思われる。また、3年間を通じて、遺伝子型の組成は一定ではなく、その組成は年ごとに異なっていた。（Table 2：サンプルサイズが小さいので統計的には有意ではない）。すなわち、平成元年度には毒性の強いhbkd型が優占していたが、平成2年度には逆に無毒なafga型が優占し、平成3年度にはafga型のみが見られて他の有毒な遺伝子型は見いだされなかった。このことは、奥多摩湖においては優占する遺伝子型が年によって（もしくは季節によって）大きく変動している、すなわち湖水の毒性も年や季節によって大きく変動している可能性が強いことを示唆しており、上水管理の上で特に留意すべき点として注目される。

上記のような知見を前提にすると、奥多摩湖産のミクロキスティス属藍藻の種レベルでの同定は、かなり容易だといえる。すなわち、顕微鏡下で観察した際に、群体が風船を膨らませたような形をしていて、その周りを取り囲む粘質鞘の緑がくっきりと見えればafga

型の *M. wesenbergii* (Fig. 1)、群体が不規則に枝分かれをしていて、粘質鞘の緑がそれほど明瞭でなければ hbkd 型か cfid 型の *M. aeruginosa* (Fig. 2) である。hbkd 型と cfid 型とを外見で区別することは不可能で、また hbkd 型の中にも著しい形態的変異が見られる。したがって、hbkd 型と cfid 型とを区別するためには、アイソザイム・レベルでの解析が必要である。

群体の形態から種を明確に識別できるということは、毒性の予知の面でも有利な条件となる。前途のように、afga 型の *M. wesenbergii* は無毒性であり、一方 hbkd 型と cfid 型の *M. aeruginosa* はいずれも強毒性である。したがって、奥多摩湖においては、風船形のマイクロキスティスが数多く見いだされるようになれば、次に発生するアオコは無毒型、枝分かれ形のマイクロキスティスが数多く見いだされるようになれば、次に発生するアオコは強毒型の可能性がきわめて高いことを意味する。特定のマイクロキスティスの増加傾向が確認されてから大規模のアオコの発生に至るまでには、ふつう 1～2 カ月ほどかかるので、平素から継続的な監視体制を敷いていれば、有毒アオコの大発生のシグナルは十分にキャッチできるものと思われる。

Table 1. Allozyme genotype and toxin composition of the *Microcystis* strains from Lake Okutama-ko

Strain Nr.	Species *	Allozyme genotype **				Toxin composition ***		
		IDH	6PGD	PGI	PGM	RR	YR	LR
TAC-166	a	c	f	i	d	92	9	74
TAC-167	a	h	b	k	d	227	19	278
TAC-168	a	h	b	k	d	147	8	146
TAC-172	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
TAC-179	a	h	b	k	d	293	29	414
TAC-187	a	h	b	k	d	164	9	118
TAC-188	a	h	b	k	d	253	24	249
TAC-189	a	h	b	k	d	259	11	137
TAC-191	a	h	b	k	d	386	11	97
OT2-1	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-2	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-3	a	h	b	k	d	251	11	110
OT2-4	a	h	b	k	d	189	16	224
OT2-5	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-6	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-7	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-8	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-9	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT2-10	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT3-11	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT3-12	w	a	f	g	a	ND	ND	ND
OT3-13	w	a	f	g	a	ND	ND	ND

* a: *M. aeruginosa* w: *M. wesenbergii*

** Allele designation follow Kato et al. (1991)

*** μ g microcystins / 100mg lyophilized algal cells
ND: not detected

Table 2. Comparison of genotype composition between 1989, 1990 and 1991

Genotype	Number of strain (%)					
	1989		1990		1991	
hbkd	7	78%	2	20%	-	-
cfid	1	11%	-	-	-	-
afga	1	11%	8	80%	3	100%

第 1 章

奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の 酵素多型と毒素組成(1)

加藤 辰己¹・渡辺真利代²・渡辺 眞之³・原 慶明⁴

Allozyme Genotype and Toxin Composition of the *Microcystis* Strains from Lake Okutama-ko (1)

by

Tatsumi KATO¹, Mariyo F. WATANABE², Masayuki WATANABE³
and Yoshiaki HARA⁴

¹ 国立科学博物館筑波実験植物園 (Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba 305), ² 東京都立衛生研究所 (Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo 169), ³ 国立科学博物館植物研究部 (Department of Botany, National Science Museum, Tsukuba 305), ⁴ 筑波大学生物科学系 (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

Abstract Allozyme genotype at four enzyme loci and composition of three toxins (microcystin-RR, -YR, -LR) were determined for nine strains of *Microcystis* (Cyanophyceae) from Lake Okutama-ko. Seven strains belonging to *M. aeruginosa* were concentrated to a single genotype and found to be highly toxic. Another strain of *M. aeruginosa* exhibited different allozyme genotype and high toxicity. Only one strain was attributed to *M. wesenbergii* characterized by specific allozyme genotype and no toxicity.

ミクロキスティス *Microcystis* 属は淡水性の浮遊性藍藻で、富栄養化の進んだ湖沼でしばしば大発生して、いわゆる水の華 (アオコ) を形成する。発生したアオコは、猛烈な悪臭、酸欠による魚類の斃死、ミクロキスチンと呼ばれる肝臓毒の生成 (OISHI & WATANABE 1986, WATANABE *et al.* 1989) など、多くの弊害を引き起こすため、環境浄化や公衆衛生 (上水管理) などの社会的側面からも強い関心を集めている。

日本産のミクロキスティス属藍藻については永らく分類学的混乱が続いてきたが、渡辺・千原 (1980) および WATANABE *et al.* (1986) は、群体の形状や粘質鞘の光学的性質などを指標形質とすることにより、属内に *Microcystis aeruginosa* (KÜTZ.) KÜTZ. emend. ELENK., *M. viridis* (A. BR. in RABENH.) LEMM., *M. wesenbergii* (KOMÁREK) KOMÁREK の3種が認識できることを示した。最近では、アイソザイムを遺伝標識とした分子分類学的解析 (加藤ほか 1989, 1990, KATO *et al.* 1991)、高速液体クロマトグラフィーを用いたミクロキスチンの定量 (HARADA *et al.* 1988, WATANABE *et al.* 1988)、アイソザイム遺伝子の遺伝子型とミクロキスチンの生成量の対応 (WATANABE *et al.* 1991) など、ミクロキスティス属藍藻の種の遺伝的・生化学的特性を、単離株すなわちクローンのレベルで解

明する試みが行われている。

多摩川上流の奥多摩湖（小河内貯水池）でも、上流域からの生活排水の流入にともなう富栄養化が近年急速に進行するにつれて、ミクロキスティス属藍藻の大量発生がみられるようになった。ことに昭和 59 年（1984 年）の 8 月から 9 月にかけては、湖の上流側の約 3 分の 1 が水面から水深約 1 m にわたってアオコにおおわれるという記録的な大発生を見た。その後も小規模ながら、毎年のようにアオコの発生が観察されている。奥多摩湖は東京都の最も重要な上水源のひとつであり、アオコの発生が公衆衛生上深刻な問題を誘発する可能性も決して低くない。そのため従来から早急な取り組みの必要性を指摘されてきたが、奥多摩湖のミクロキスティス属藍藻についてはほとんど分類学的研究がなされておらず、今後の調査研究や行政施策の基礎となるべき種の同定すら充分には行われていない。

このような現状をふまえ、筆者らは奥多摩湖に発生するミクロキスティス属藍藻に関する一連の分類学的研究に着手した。これらの研究においては、外部形態に基づいて種を同定するにとどまらず、遺伝的・生化学的特性をクローンのレベルで解明することを中心課題としている。その一環として、本稿では、平成元年（1989 年）に採取されたミクロキスティス属藍藻のアイソザイム遺伝子の遺伝子型およびミクロキスチンの生成量について報告する。

材料と方法

ミクロキスティス属藍藻の収集と培養

平成元年（1989 年）の 6 月から 10 月にかけて延べ 5 回の資料収集を奥多摩湖右岸 (Fig. 1) において行い、計 21 株のミクロキスティス属藍藻を単離した。このうちバイアビリティーの高い 9 株 (TAC 166, 167, 168, 172, 179, 187, 188, 189, 191) を KATO *et al.* (1991) の方法で大量培養した後、凍結乾燥法により試料化した。なお、これらの培養株の一部は国立科学博物館筑波実験植物園藻株保存庫 (TAC: Tsukuba Algal Collections) において系統保存される。

アイソザイム遺伝子の遺伝子型の同定

上記の試料を用い、イソクエン酸脱水素酵素 (IDH; EC.1.1.1.42)、6-リン グルコン 酸脱水素酵素

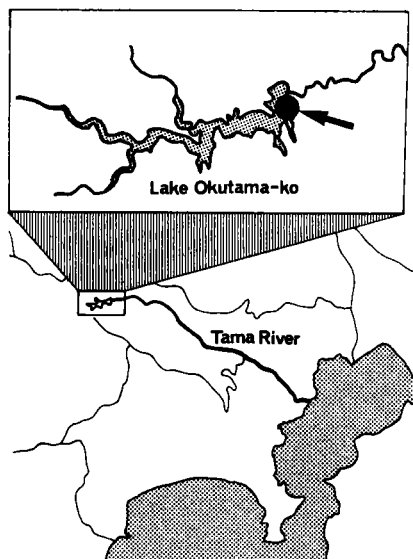


Fig. 1. Collection locality on Lake Okutama-ko.

(6PGD; EC.1.1.1.44), グルコース磷酸異性化酵素 (PGI; EC.5.3.1.9), フォスフォグルコムターゼ (PGM; EC.2.7.5.1) の4酵素 (4遺伝子座) について酵素多型を調査し, 遺伝子型を同定した. 酵素の抽出, 電気泳動, 活性染色, アロザイムおよび対立遺伝子の同定・命名などは, KATO *et al.* (1991) に準拠した.

マイクロキスチンの定量

凍結乾燥試料を用いて, 3種の毒素 (マイクロキスチン-YR, -RR, -LR) の定量を行った. 定量法は HARADA *et al.* (1988) に拠った.

結果と考察

酵素多型と毒素組成の解析結果を Table 1 に示した. アイソザイム遺伝子の遺伝子型に基づくと, 調査した9株は hbkd 型 (TAC 167, 168, 179, 187, 188, 189, 191), cfid 型 (TAC 166), afga 型 (TAC 172) の3型に集約される.

このうち hbkd 型の7株は, 不規則に枝分かれするなど群体の形状が互いによく似ており, いずれも *Microcystis aeruginosa* と同定された (cf. 渡辺・千原 1980, KATO *et al.* 1991). 毒素組成の上でも (1) 3種のマイクロキスチンをすべて含むこと, (2) マイクロキスチン-RR, -LR に比べ -YR の生成量が少ないことなど, 相互に類似性が高い. 生成されるマイクロキスチンの絶対量も比較的大きく (cf. WATANABE *et al.* 1988), 生物学的な毒性も高いと推定される. hbkd 型のマイクロキスチン属藍藻はこれまでに TAC 60, 61, 97 の3株 (いずれも長野県白樺湖産) が見いだされているが, (KATO *et al.* 1991), これらと奥多摩湖産の7株とが毒素組成においても酷似している (WATANABE *et al.* 1991) 点が注目される.

cfid 型の1株も群体の形状に基づき *Microcystis aeruginosa* と同定された. 毒素組成は基本的に hbkd 型のそれと類似しており, 毒性は比較的高いと考えられる.

afga 型の1株は (1) 群体は袋状で細胞が1層に並ぶこと, (2) 粘質鞘の縁が明瞭なこと, (3) 細胞が直径 6.12 μm (平均値) と大型なこと, などの顕著な特徴から *Microcystis wesenbergii* と同定された. 毒素組成においても他の8株とは異なり, 3種のマイクロキスチンはいずれも検出されなかった.

Table 1. Allozyme genotype and toxin composition of the *Microcystis* strains from Lake Okutama-ko.

Strain No. (TAC)	Species*	Allozyme genotype**				Toxin composition***		
		IDH	6PGD	PGI	PGM	RR	YR	LR
166	A	c	f	i	d	91.6	9.2	74.4
167	A	h	b	k	d	227	19.1	278
168	A	h	b	k	d	147	8.3	146
172	W	a	f	g	a	ND	ND	ND
179	A	h	b	k	d	293	29.4	414
187	A	h	b	k	d	164	9.1	118
188	A	h	b	k	d	253	24.6	249
189	A	h	b	k	d	259	11.4	137
191	A	h	b	k	d	386	11.1	97.6

* A: *Microcystis aeruginosa*, W: *M. wesenbergii*

** Allele designations follow KATO *et al.* (1991)

*** μg microcystins/100 mg lyophilized cells. ND: not detected.

M. wesenbergii に属する TAC 38 (茨城県霞ヶ浦産), 52, 57 (長野県諏訪湖産), 85 (島根県浮布池産) の 4 株については, (1) 遺伝的に単型で *afga* 型に固定していること (KATO *et al.* 1991), (2) ミクロキスチンを生成せず無毒であること (WATANABE *et al.* 1988) が既に示されているが, 今回の解析結果はこれらの知見に合致する.

以上のように, 奥多摩湖には形態的・遺伝的・生化学的特性の異なる少なくとも 3 型のミクロキスティス属藍藻が存在することが明らかになった. 今回調査した限りでは, 有毒性の *hbkd* 型が優占していて無毒な *afga* 型はわずかに観察されるのみであったが, これは必ずしも奥多摩湖における有毒性ミクロキスティスの優占性を意味しない. ひとつの湖沼の中でも優占する種が季節的に変動していることを強く示唆するデータも得られており (WATANABE *et al.* 1986), 奥多摩湖におけるミクロキスティス属藍藻フロラの遺伝子型組成とその動態の全容を明らかにするためには, 今後さらに詳細な調査を継続的に行う必要がある.

謝 辞

本研究に際しては, 財団法人とうきゅう環境浄化財団 (研究課題: 奥多摩湖に発生する *Microcystis* 属ラン藻の, アイソザイムを用いた同定および毒性の予知に関する研究) および文部省科学研究費補助金 (一般研究 (B), 課題番号 01480019) による研究助成を受けた. 記して謝する.

文 献

- HARADA, K.-I., K. MATSUURA, M. SUZUKI, H. OKA, M. F. WATANABE, S. OISHI, A. M. DAHLEM, V. R. BEASLEY & W. W. CARMICHAEL, 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, **448**: 275-283.
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之, 1989. アイソザイムを遺伝標識とした *Microcystis* 属藍藻の分子分類学的解析とその有効性. 藻類, **37**: 76.
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之, 1990. 藍藻 *Microcystis aeruginosa* (s. lat.) の酵素多型とその分類学的意義. 藻類, **38**: 91.
- KATO, T., M. F. WATANABE & M. WATANABE, 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Arch. Hydrobiol.* (in press).
- OISHI, S., & M. F. WATANABE, 1986. Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effects. *Environ. Res.*, **40**: 518-524.
- 渡辺眞之・千原光雄, 1980. 筑波研究学園都市地区の藻類相 V. 霞ヶ浦産藍藻プランクトンの分類. 筑波の環境研究, **5A**: 80-86.
- WATANABE, M. F., S. OISHI, K.-I. HARADA, K. MATSUURA, H. KAWAI & S. SUZUKI, 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacterium (blue-green alga). *Toxicon*, **26**: 1017-1025.
- WATANABE, M. F., K.-I. HARADA, K. MATSUURA, S. OISHI, Y. WATANABE & S. SUZUKI, 1989. Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. *Toxicity assessment*, **4**: 487-497.
- WATANABE, M. F., M. WATANABE, T. KATO, K.-I. HARADA & M. SUZUKI, 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (Blue-green algae, cyanobacteria). *Bot. Mag., Tokyo* (in press).
- WATANABE, Y., M. F. WATANABE & M. WATANABE, 1986. The distribution and relative abundance of bloom forming *Microcystis* species in several eutrophic waters. *Jap. J. Limnol.*, **47**: 87-93.

第 2 章

奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の 酵素多型と毒素組成(2)

加藤 辰己・渡辺真利代・渡辺 眞之・原 慶明

Allozyme Genotypes and Toxin Composition of the
Microcystis strains from Lake Okutama-ko (2)

by

Tatsumi KATO¹, Mariyo F. WATANABE², Masayuki WATANABE³
and Yoshiaki HARA⁴

¹ 国立科学博物館筑波実験植物園 (Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba 305), ² 東京都立衛生研究所 (Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Shinjuku 169), ³ 国立科学博物館植物研究部 (Department of Botany, National Science Museum, Tsukuba 305), ⁴ 筑波大学生物科学系 (Institute of Biological Science, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

Abstract Allozyme genotype at four enzyme loci and composition of three toxins (Microcystin-RR, -YR, -LR) were determined for ten strains of *Microcystis* (Cyanophyceae) collected at Lake Okutama-ko in 1990. Two strains of *M. aeruginosa* sharing the same genotype `hbkd` were found highly toxic. The other eight strains were attributed to *M. wesenbergii* characterized by the specific allozyme genotype `afga` and no toxicity. The genotype composition was very different from that of the previous year, suggesting that the dominant of the *Microcystis* flora could be variable year by year at Lake Okutama-ko.

ミクロキスティス *Microcystis* 属は淡水性の浮遊性藍藻で、富栄養化の進んだ湖沼でしばしば大発生して、いわゆるアオコ (水の華) を形成する。発生したアオコは、猛烈な悪臭、酸欠による魚類の斃死、ミクロキスティンと呼ばれる肝臓毒の生成 (Oishi & Watanabe 1986, Watanabe et al. 1989) など、多くの弊害を引き起こすため、環境浄化や公衆衛生 (とくに上水管理) などの社会的側面からも強い関心を集めている。

日本産のミクロキスティス属藍藻については永らく分類学的混乱が続いてきたが、渡辺・千原 (1980) および Watanabe et al. (1986) は、群体の形状や粘質鞘の光学的性質などを指標形質とすることにより、属内に *Microcystis aeruginosa* (Kutz.) Kutz. emend. Elenk., *M. viridis* (A. Br. in Rabenh.) Lemm., *M. wesenbergii* (Komarek) Komarek の3種が認識できることを示した。最近では、アインザイムを遺伝標識とした分子分類学的解析 (加藤ほか 1989, 1990, Kato et al. 1991), 高速液体クロマトグラフィーを用いたミクロキスティンの定量 (Harada et al. 1988, Watanabe et al. 1988), アインザイム遺伝子の遺伝子型とミクロキスティンの生成量の対応 (Watanabe et al. 1991) など、ミクロキスティス属藍藻の種の遺伝的および生化学的特性を、単離株すなわちクローンのレベルで解明する試みが行われている。

多摩川上流の奥多摩湖 (小河内貯水池) でも、上流域からの生活排水の流入にともなう富栄養化が近年急速に進行するにつれて、ミクロキスティス属藍藻の大量発生が見られるようになった。ことに昭和59年 (1984年) の8月から9月にかけては、湖の上流側の約3分の1が水面から水深約1mにわたってアオコにおおわれるという記録的な大発生を見た。その後も小規模ながら、毎年のようにアオコの発生が観察されている。奥多摩湖は東京都の最も重要な上水源のひとつであり、アオコの発生が公衆衛生上深刻な問題を誘発する可能性も決して低くない。そのため従来から早急な取り組みの必要性を指摘されてきたが、奥多摩湖のミクロキスティス属藍藻についてはほとんど分類学的研究がなされておらず、

今後の調査研究や行政施策の基礎となるべき種の同定すら充分には行われていない。

このような現状をふまえ、筆者らは奥多摩湖に発生するミクロキスティス属藍藻に関する一連の分子分類学的研究に着手した。これらの研究においては、外部形態に基づいて種を同定するとどまらず、遺伝的および生化学的特性をクローンのレベルで解明することを中心課題としている。その一環として、本稿では、平成2年(1990年)に採取されたミクロキスティス属藍藻のアイソザイム遺伝子の遺伝子型およびミクロキスチンの生成量について報告する。

材料と方法

ミクロキスティス属藍藻の収集と培養

平成2年(1990年)の6月から10月にかけて、延べ5回の資料収集を奥多摩湖最下流右岸の定点観測点(cf.加藤ほか1991)において行い、計10株(OT2-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10)のミクロキスティス属藍藻を単離した。これらをKato et al(1991)の方法で大量培養したのち、凍結乾燥法により試料化した。なお、これらの培養株の一部は、国立科学博物館の藻株保存庫(TAC: Tsukuba Algal Collections)において系統保存される。

アイソザイム遺伝子の遺伝子型の同定

上記の試料を用い、イソクエン酸脱水素酵素(IDH: EC.1.1.1.42)、6- 燐グルコン酸脱水素酵素(6PGD: EC.1.1.1.44)、グルコース燐酸異性化酵素(PGI: EC.5.3.1.9)、フォスソグルコムターゼ(PGM: EC2.7.5.1)の4酵素(4遺伝子座)について酵素多型を調査し、遺伝子型を同定した。酵素の抽出、電気泳動、活性染色、アロザイムおよび対立遺伝子の同定命名などは、Kato et al.(1991)に準拠した。

ミクロキスチンの定量

凍結乾燥試料を用いて、3種の毒素(ミクロキスチン-RR, -YR, -LR)の定量を行った。定量法はHarada et al.(1988)に拠った。

結果と考察

酵素多型と毒素組成の解析結果をTable 1.に示した。アイソザイム遺伝子の遺伝子型に基づくと、調査した10株はhbkd型(OT-3, -4)とafga型(OT-1, -2, -5, -6, -7, -8, -9, -10)の2型に集約される。

このうちhbkd型の2株は、(1)平均細胞サイズが径3.6~5.6ミクロンと大型なこと、(2)不規則に枝分かれした特徴的な群体の形状を示すことなどの点において、形態的に互いによく似ており、いずれも*Microcystis aeruginosa*と同定された(cf.渡辺・千原1980, Kato et al.1991)。毒素組成の上でも、(1)3種のミクロキスチンをすべて含むこと、(2)ミクロキスチン-RR, -LRに比べ-YRの生成量が少ないことなど、相互に類似性が高い。

hbkd型のミクロキスティス属藍藻はこれまでに、TAC-60, -61, 97の3株(いずれも長野県白樺湖産:Kato et al.1991)およびTAC-167, -168, -179, -187, -188, -189, -191(いずれも奥多摩湖産:加藤ほか1991)の7株の、計10株が見いだされている。これらと今回解析された2株とは形態的特徴においても毒素組成においても酷似しており(cf.Watanabe et al.1991, Kato et al.1991, 加藤ほか1991)、少なくとも奥多摩湖産の9株については遺伝的に同一なクローンである可能性が高い。このことは、奥多摩湖においてはhbkd型が恒常的に存在することを示唆しているが、この型は日本産のミクロキスティス属藍藻の中でももっとも毒性の強い型のひとつであり(cf.Watanabe et al.1988, Watanabe et al.1991)、公衆衛生の面でも十分に留意する必要がある。

afga型の8株は、(1)群体は袋状で細胞が1層に並ぶこと、(2)粘質鞘の縁が明瞭なこと、(3)平均細胞サイズが径5.5~6.2ミクロンと大型なこと、などの顕著な特徴から*M. wesenbergii*と同定された。3種のミクロキスチンはいずれも検出されなかった。従来の研究で解析された培養株のうち、*M. wesenbergii*に属するTAC-38(茨城県霞ヶ浦産)、-52および-57(長野県諏訪湖産)、-85(島根県浮布池産)の4株については、(1)遺伝的に単型でafga型に固定していること(Kato et al.1991)、(2)ミクロキスチンを生成せず無毒であること(Watanabe et al.1986)が既に示されているが、今回の解析結果はこれらの知見に合致する。afga型は昨年の調査でも見いだされており(TAC-172:加藤ほか1991)、hbkd型と同様に奥多摩湖において恒常的に存在するクローンのひとつと考えられる。

前年度(平成元年度)の調査により、奥多摩湖には形態的・遺伝的・生化学的特性の異なる少なくとも

も3型 (hbkd 型、cfid 型、afga 型) のミクロキスティス属藍藻が存在することが明らかになっている (加藤ほか 1991)。今年度の調査では、このうちの2型 (hbkd 型、afga 型) が同様に見いだされたが、その組成は大きく異なっていた (Table 2)。すなわち、平成元年度には毒性の強い hbkd 型が優占していたが、平成2年度には逆に無毒な afga 型が優占していた。このことは、奥多摩湖においては優占する遺伝子型が年によって (もしくは季節によって) 大きく変動している可能性が強いことを示唆している。その一方で、前年と同じ遺伝子型しか見いだされなかったことは、奥多摩湖のミクロキスティス属フロラがそれほど多くの遺伝子型を含んでいないことを示しているとも考えられ、ひとつの湖沼における有毒アオコのスクリーニングの可能性を例証する上でも、興味深いデータだといえる。したがって、とくに多摩川水系の上水管理という側面から言及するならば、実際に奥多摩湖で発生しているミクロキスティス属藍藻 (アオコ) が有毒な型なのか無毒な型なのかを、遺伝子型のレベルで注意深く監視し続けることが、今後強く求められるものと考えられるが、より正確な判断基準を確立するためにはさらに詳細で継続的な調査・研究が必要である。

Table 1. Allozyme genotype and toxin composition of the *Microcystis* strains from Lake Okutama-ko

Strain Nr. OT2-	Allozyme genotype *				Toxin composition **		
	IDH	6PGD	PGI	PGM	RR	YR	LR
1	a	f	g	a	ND	ND	ND
2	a	f	g	a	ND	ND	ND
3	h	b	k	d	251	11	110
4	h	b	k	d	189	16	224
5	a	f	g	a	ND	ND	ND
6	a	f	g	a	ND	ND	ND
7	a	f	g	a	ND	ND	ND
8	a	f	g	a	ND	ND	ND
9	a	f	g	a	ND	ND	ND
10	a	f	g	a	ND	ND	ND

* Allele designations follow Kato et al. (1991)

** μg microcystins/100mg lyophilized algal cells
ND: not detected

Table 2. Comparison of genotype composition between 1989 and 1990

Genotype	Number of strain (%)			
	1989		1990	
hbkd	7	78%	2	20%
cfid	1	11%	-	-
afga	1	11%	8	80%

謝 辞

本研究に際しては、財団法人とうきゅう環境浄化財団による研究助成を受けた（研究課題：奥多摩湖に発生する *Microcystis* 属ラン藻の、アインザイムを用いた同定および毒性の予知に関する研究）。記して謝する。

文 献

- Harada, K., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahlem, V.R. Beasley & W.W. Carmichael 1988
Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chromat., 448: 275-283
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之 1989
アインザイムを遺伝標識とした *Microcystis* 属藍藻の分子分類学的解析とその有効性
藻類 37:76
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之 1990
藍藻 *Microcystis aeruginosa* (s. lat) の酵素多型とその分類学的意義
藻類 38:91
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之・原慶明 1991
奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒素組成 (1)
Bull. Nat. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B, 17: 1-4
- Kato, T., M.F. Watanabe & M. Watanabe 1991
Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference.
Arch. Hydrobiolog., 64: 129-140
- Oishi, S. & M.F. Watanabe 1986
Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effects.
Environ. Res., 40: 518-524
- 渡辺眞之・千原光雄 1980
筑波研究学園都市地区の藻類相Ⅴ 霞ヶ浦産藍藻プランクトンの分類
筑波の環境研究 5A: 80-86
- Watanabe, M.F., S. Oishi, K. Harada, K. Matsuura, H. Kawai & S. Suzuki 1988
Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green alga)
Toxicon, 26: 1017-1025
- Watanabe, M.F., K. Harada, K. Matsuura, S. Oishi, Y. Watanabe & M. Suzuki 1989
Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species.
Toxicity assessment, 4: 487-497
- Watanabe, M.F., M. Watanabe, T. Kato, K. Harada & M. Suzuki 1991
Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa*
(Blue-green algae, cyanobacteria)
Bot. Mag., Tokyo, 104: 49-57
- Watanabe, Y., M.F. Watanabe & M. Watanabe 1986
The distribution and relative abundance of bloom-forming *Microcystis* species in several eutrophic waters
Jap. J. Limnol., 47:87-93

第 3 章

奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の 酵素多型と毒素組成(3)

加藤 辰己・渡辺真利代・渡辺 眞之・原 慶明

Allozyme Genotypes and Toxin Composition of the
Microcystis strains from Lake Okutama-ko (3)

by

Tatsumi KATO¹, Mariyo F. WATANABE², Masayuki WATANABE³
and Yoshiaki HARA⁴

¹ 国立科学博物館筑波実験植物園 (Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba 305), ² 東京都立衛生研究所 (Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Shinjuku 169), ³ 国立科学博物館植物研究部 (Department of Botany, National Science Museum, Tsukuba 305), ⁴ 筑波大学生物科学系 (Institute of Biological Science, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

Abstract As the last part of the molecular-phenological studies on the *Microcystis* flora of Lake Okutama-ko, allozyme genotype at four enzyme loci and composition of three toxins (Microcystin-RR, -YR, -LR) were determined for three strains collected in 1991. All three strains isolated were attributed to *M. wesenbergii* characterized by the specific allozyme genotype `afga` and no toxicity. As a result of the three year's observations, it was elucidated that (1) the *Microcystis* flora of Lake Okutama-ko consists at least of three genotypes, which are genetically, morphologically and biochemically different each other, (2) two of the three genotypes are highly toxic and the other one is un toxic, (3) a careful and incessant surveillance on the phenological change of genotype composition makes it possible to predict how toxic the coming bloom is.

ミクロキスティス *Microcystis* 属は淡水性の浮遊性藍藻で、富栄養化の進んだ湖沼でしばしば大発生して、いわゆるアオコ (水の華) を形成する。発生したアオコは、猛烈な悪臭、酸欠による魚類の斃死、ミクロキスティンと呼ばれる肝臓毒の生成 (Oishi & Watanabe 1986, Watanabe et al. 1989) など、多くの弊害を引き起こすため、環境浄化や公衆衛生 (とくに上水管理) などの社会的側面からも強い関心を集めている。

日本産のミクロキスティス属藍藻については永らく分類学的混乱が続いてきたが、渡辺・千原 (1980) および Watanabe et al. (1986) は、群体の形状や粘質鞘の光学的性質などを指標形質とすることにより、属内に *Microcystis aeruginosa* (Kutz.) Kutz. emend. Elenk., *M. viridis* (A. Br. in Rabenh.) Lemm., *M. wesenbergii* (Komarek) Komarek の3種が認識できることを示した。最近では、アイソザイムを遺伝標識とした分子分類学的解析 (加藤ほか 1989, 1990, Kato et al. 1991), 高速液体クロマトグラフィーを用いたミクロキスティンの定量 (Harada et al. 1988, Watanabe et al. 1988), アイソザイム遺伝子の遺伝子型とミクロキスティンの生成量の対応 (Watanabe et al. 1991) など、ミクロキスティス属藍藻の種の遺伝的および生化学的特性を、単離株すなわちクローンのレベルで解明する試みが行われている。

多摩川上流の奥多摩湖 (小河内貯水池) でも、上流域からの生活排水の流入にともなう富栄養化が近年急速に進行するにつれて、ミクロキスティス属藍藻の大量発生が見られるようになった。ことに昭和59年 (1984年) の8月から9月にかけては、湖の上流側の約3分の1が水面から水深約1mにわたってアオコにおおわれるという記録的な大発生を見た。その後も小規模ながら、毎年のようにアオコの発

生が観察されている。奥多摩湖は東京都の最も重要な上水源のひとつであり、アオコの発生が公衆衛生上深刻な問題を誘発する可能性も決して低くない。そのため従来から早急な取り組みの必要性を指摘されてきたが、奥多摩湖のミクロキスティス属藍藻についてはほとんど分類学的研究がなされておらず、今後の調査研究や行政施策の基礎となるべき種の同定すら充分には行われていない。

このような現状をふまえ、筆者らは奥多摩湖に発生するミクロキスティス属藍藻に関する一連の分子分類学的研究に着手した。これらの研究においては、外部形態に基づいて種を同定するにとどまらず、遺伝的および生化学的特性をクローンのレベルで解明することを中心課題としている。本稿では、研究最終年度に当たる平成3年(1991年)に採取されたミクロキスティス属藍藻のアイソザイム遺伝子の遺伝子型およびミクロキスチンの生成量について報告するとともに、3年間に得られた成果 (cf. 加藤ほか1991, 1994) について、とくに種の同定と毒性の予知の問題に留意しつつ議論を進めたい。

材料と方法

ミクロキスティス属藍藻の収集と培養

平成3年(1991年)の6月から10月にかけて、延べ5回の資料収集を奥多摩湖最下流右岸の定点観測点 (cf. 加藤ほか1991, 1994) において行った。しかし、過去2年間とは異なりミクロキスティス属藍藻の発生がほとんど認められず、結果的に計3株 (OT3-11, -12, -13) を単離するにとどまった。これらを Kato et al. (1991) の方法で大量培養したのち、凍結乾燥法により試料化した。なお、これらの培養株の一部は、国立科学博物館の藻株保存庫 (TAC: Tsukuba Algal Collections) において系統保存される。

アイソザイム遺伝子の遺伝子型の同定

上記の試料を用い、イソクエン酸脱水素酵素 (IDH: EC.1.1.1.42)、6- 燐グルコン酸脱水素酵素 (6PGD: EC.1.1.1.44)、グルコース燐酸異性化酵素 (PGI: EC.5.3.1.9)、フォソグルコムターゼ (PGM: EC2.7.5.1) の4酵素(4遺伝子座)について酵素多型を調査し、遺伝子型を同定した。酵素の抽出、電気泳動、活性染色、アロザイムおよび対立遺伝子の同定命名などは、Kato et al. (1991) に準拠した。

ミクロキスチンの定量

凍結乾燥試料を用いて、3種の毒素(ミクロキスチン-RR, -YR, -LR)の定量を行った。定量法は Harada et al. (1988) に拠った。

結果と考察

酵素多型と毒素組成の解析結果を Table 1. に示した。調査した3株はすべて *Microcystis wesenbergii* に特有な *afga* 型に固定しており、外部形態も同種の典型的な特徴、すなわち (1) 群体は袋状で細胞が1層に並ぶ、(2) 粘質鞘の縁が顕微鏡下で明瞭に認識できる、(3) 平均細胞サイズが径 5.5~6.2ミクロンと大きい、などの顕著な特徴を示した。3種のミクロキスチンは、いずれも検出されなかった。これらの特性は、従来の研究で解析された *M. wesenbergii* の培養株 (TAC-38, -52, -57, -85 など: cf. Watanabe et al. 1991, Kato et al. 1991) や、過去2年間に奥多摩湖で見いだされた本種の単離株 (TAC-172, OT2-1, -2, -5, -6, -7, -8, -9, -10: cf. 加藤ほか1991, 1994) の特性と一致する。したがって、少なくとも奥多摩湖産の *afga* 型の株については、遺伝的に同一なクローンである可能性が高く、奥多摩湖においてもっとも普通に存在する遺伝子型のひとつと考えられる。

本年は、ミクロキスティスが発生・浮上を始めるのとちょうど同時期に多量の降雨があったため、例年のようなアオコの発生が認められず、十分なサンプル収集が行えないまま秋を迎えてしまった。また採集に成功した場合でも、ミクロキスティスのバイアビリティーそのものがきわめて低く、単離しても試料化に至らない株がきわめて多数あったのも研究の障害となった。さらに、前述の昭和59年の大発生以降、行政の指導などあって奥多摩湖の富栄養化にストップがかかりつつあり、ミクロキスティスの現存量自体が減少傾向にあるように思われる。これは本研究の最終目的である公衆衛生への貢献という意味では大いに喜ばしいことであるが、研究にとっては著しく不利な条件であった。

過去2年間(平成元~2年)の調査により、奥多摩湖には形態的・遺伝的・生化学的特性の異なる少なくとも3型 (hbkd型、cfid型、*afga*型) のミクロキスティス属藍藻が存在することが明らかになっている (加藤ほか1991, 1994)。今年度の調査では、このうちの1型 (*afga*型) のみが検出され、新たな遺伝子型は見いだされなかった。3年間を通じて、遺伝子型の組成は一定ではなく、その組成は年ごとに異なっていた (Table 2、ただし、サンプルサイズが小さいので統計的には有意ではない)。

すなわち、平成元年度には毒性の強い hbkd 型が優占していたが、平成2年度には逆に無毒な afga 型が優占し、平成3年度には afga 型のみが見られて他の有毒な遺伝子型は見いだされなかった。このことは、奥多摩湖においては優占する遺伝子型が年によって（もしくは季節によって）大きく変動している可能性が高いことを示唆している。その一方で、3年間でわずか3つの遺伝子型しか検出できなかったことは、ひとつの湖沼におけるミクロキスティス属フロラの多様度の問題を考える上で、興味深いデータである。筆者らのこれまでの研究によると、ひとつの湖沼内のミクロキスティス属フロラの遺伝的多様度はそれほど高くないのが一般的で、諏訪湖のような著しく富栄養化の進んだ池沼や霞ヶ浦のような広くて浅い湖でも、せいぜい8~10遺伝子型ほどしか検出されていない (cf. 渡辺ほか 1991)。したがって、奥多摩湖のように狭小で水深がやや深く富栄養化の程度の高くない湖沼においては、3~5遺伝子型程度がいわば平均的な多様度のレベルだと考えられる。わずか3年間の調査結果からでは断定はできないが、奥多摩湖ではこれら3遺伝子型以外に新たな遺伝子型が発見される可能性は比較的低いと思われる。

上記のような知見を前提にすると、奥多摩湖産のミクロキスティス属藍藻の種レベルでの同定は、かなり容易だといえる。すなわち、顕微鏡下で観察した際に、群体が風船を膨らませたような形をしていて、その周りを取り囲む粘質鞘の縁がくっきりと見えれば afga 型の *M. wesenbergii* (Fig. 1)、群体が不規則に枝分かれをしていて、粘質鞘の縁がそれほど明瞭でなければ hbkd 型か cfid 型の *M. aeruginosa* (Fig. 2) である。hbkd 型と cfid 型とを外見で区別することは不可能で、また hbkd 型のなかにも著しい形態的変異が見られる。したがって、hbkd 型と cfid 型とを区別するためには、アイソザイム・レベルでの解析が必要である。

群体の形態から種を明確に識別できるということは、毒性の予知の面でも有利な条件となる。前述のように、afga 型の *M. wesenbergii* は無毒性であり、一方 hbkd 型と cfid 型の *M. aeruginosa* はいずれも強毒性である (Watanabe et al. 1988, Watanabe et al. 1991、加藤ほか 1991)。したがって、奥多摩湖においては、風船形のミクロキスティスが数多く見いだされるようになれば、次に発生するアオコは無毒型、枝分かれ形のミクロキスティスが数多く見いだされるようになれば、次に発生するアオコは強毒型の可能性がきわめて高いことを意味する。特定のミクロキスティスの増加傾向が確認されてから大規模なアオコの発生に至るまでには、ふつう1~2カ月ほどかかるので、平素から継続的な監視体制を敷いていけば、有毒アオコの大発生のシグナルは十分にキャッチできるものと思われる。

Table 1. Allozyme genotype and toxin composition of the *Microcystis* strains from Lake Okutama-ko

Strain Nr.	Allozyme genotype *				Toxin composition **		
	IDH	6PGD	PGI	PGM	RR	YR	LR
OT3-11	a	f	g	a	ND	ND	ND
12	a	f	g	a	ND	ND	ND
13	a	f	g	a	ND	ND	ND

* Allele designations follow Kato et al. (1991)

** μg microcystins/100mg lyophilized algal cells ND: not detected

Table 2. Comparison of genotype composition between 1989, 1990 and 1991

Genotype	Number of strain (%)					
	1989		1990		1991	
hbkd	7	78%	2	20%	-	-
cfid	1	11%	-	-	-	-
afga	1	11%	8	80%	3	100%

謝 辞

本研究に際しては、財団法人とうきゅう環境浄化財団による研究助成を受けた（研究課題：奥多摩湖に発生する *Microcystis* 属ラン藻の、アインザイムを用いた同定および毒性の予知に関する研究）。記して謝する。

文 献

- Harada, K., K. Matsuura, M. Suzuki, H. Oka, M.F. Watanabe, S. Oishi, A.M. Dahlem, V.R. Beasley & W.W. Carmichael 1988
Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography.
J. Chromat., 448: 275-283
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之 1989
アインザイムを遺伝標識とした *Microcystis* 属藍藻の分子分類学的解析とその有効性
藻類 37:76
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之 1990
藍藻 *Microcystis aeruginosa* (s. lat) の酵素多型とその分類学的意義
藻類 38:91
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之・原慶明 1991
奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒素組成 (1)
国立科学博物館紀要 17: 1-4
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之・原慶明 1994
奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の酵素多型と毒素組成 (2)
国立科学博物館紀要 (印刷中)
- Kato, T., M.F. Watanabe & M. Watanabe 1991
Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference.
Arch. Hydrobiolog., 64: 129-140
- Oishi, S. & M.F. Watanabe 1986
Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effects.
Environ. Res., 40: 518-524
- 渡辺眞之・千原光雄 1980
筑波研究学園都市地区の藻類相Ⅴ 霞ヶ浦産藍藻プランクトンの分類
筑波の環境研究 5A: 80-86
- Watanabe, M.F., S. Oishi, K. Harada, K. Matsuura, H. Kawai & S. Suzuki 1988
Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green alga)
Toxicon, 26: 1017-1025
- Watanabe, M.F., K. Harada, K. Matsuura, S. Oishi, Y. Watanabe & M. Suzuki 1989
Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species.
Toxicity assessment, 4: 487-497
- Watanabe, M.F., M. Watanabe, T. Kato, K. Harada & M. Suzuki 1991
Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa*
(Blue-green algae, cyanobacteria)
Bot. Mag., Tokyo, 104: 49-57
- Watanabe, Y., M.F. Watanabe & M. Watanabe 1986
The distribution and relative abundance of bloom-forming *Microcystis* species in several eutrophic waters
Jap. J. Limnol., 47:87-93

第 4 章

ミクロキスティス属におけるアロザイム多型と その分類学的意味

加藤 辰己 ・ 渡辺真利代 ・ 渡辺 眞之 ・ 原 慶明

摘 要

浮遊性藍藻ミクロキスティス属の分子分類学的研究の一環として、日本産ミクロキスティス3種の種間及び種内のアロザイム多型が電気泳動法で解析された。主な成果を要約すると：(1)ミクロキスティスは形態学ならびに遺伝学的に異なる少なくとも4の分類学的実体を含んでいる；*M. aeruginosa* S-タイプ、*M. aeruginosa* L-タイプ、*M. viridis* および *M. wesenbergii*；(2)*M. viridis* と *M. wesenbergii* はそれぞれに単一かつ独自のアロザイム遺伝子型に固定され、ほとんど形態学的変異を示さないことから十分に確立した種とみなされる；(3)広義の *M. aeruginosa* は二つの異質の分類学的実体を含む（S-およびL-タイプ）、それらは、分離した種とみなすことができるかもしれない。

この研究は藍藻類についてアロザイム研究の（即ちアロザイム多型に基づく分子分類学的アプローチ）最初の寄与である。アロザイム研究が、藍藻類の種間及び種内の変異を表現型でなく遺伝子型に基づいて解析することを可能にし、したがって、藍藻類の分類学的問題、殊に種ないし属レベルにおける、を解明するのに有意義で欠くことのできない手順を備えていることが明らかにされている。

緒 言

Microcystis（ミクロキスティス）は湖沼浮遊性の藍藻で、世界中の富栄養化した湖、池、貯水池で水の華を形成する藍藻で最も普通の藻である。

Microcystis の分類は、伝統的には細胞の並び方と粘質物の性質を含む群体の形態に従っている。しかしながら、これらの形態学的特性は天然の環境条件や研究室での培養において容易に失われてしまう。そのような伝統的分類基準の信頼性の低さは、問題の多いこの属の分類の貧弱な理解に起因する；*Microcystis* の“種”の厳密な範囲が依然として不確かであるため。

Microcystis の大量発生が最近水環境や飲料水管理において深刻な問題を引き起こすようになった。この属の明確な分類学的再検討が、分類学者のみならず陸水学とその隣接分

野の研究者に求められている。しかしながら、*Microcystis*の極度に単純な形態の故に、いっそう進んだ分類学的成果を得るために形態学的研究にのみ頼っているわけにはいかない。このジレンマを解消するための新しい解析的アプローチが求められている。

このような状況下で、*Microcystis*のアロザイム研究（即ちアロザイム多型に基づいた分子分類学的アプローチ）を始めた。我々はアロザイム研究を用いることにした。それはこのアプローチは方法論的に勝るいくつかの点を含んでいるからである。それは遺伝学に基づいて藍藻類の分類学的問題を解明するのに有意義で欠くことのできない手順を備えているからである。即ちアロザイム研究は藍藻の種間及び種内変異を表現型でなく遺伝子型によって解析することを可能にするのである。

最近、植物学者はエムデン・マイヤーホフ経路とペントース磷酸塩サイクルおよび他の一次代謝のいくつかの酵素（例えば、イソサイトレート脱水素酵素）、などすべての酵素に関して維管束植物は通常二つのアイソザイムを、一つをサイトソルにもう一つを色素体に持つ事を示した。真核細胞の内部共生起源説によれば、藍藻類は維管束植物の色素体アイソザイムと高度な相同性を示すただ一つの酵素を持っているものと期待される。この考え方を支持する多くの確証となるデータ（例えば、免疫学的類似）が収集されている。さらに、藍藻類には有性生殖が知られていない、これは藍藻が異型接合の状態にあることが期待できないことを示している。この証拠を基にすると、藍藻類は複製された遺伝子を持たない限り、一般的にただ一つのアロザイム（あるいはただ一つタイプのアロザイム）とその暗号づけした上述の酵素種の対立遺伝子をもつ。従って、ザイモグラム上、酵素活性はいつも単独のアロザイム表現型を示す単独のバンドによって表される。観察されたアロザイムの表現型はそのままそれが暗号付けする対立遺伝子の遺伝子型として説明される、形態学的特性に影響を与える外的環境または発生段階そしてそれら両方に関わることなく一貫にして解析することができる。

日本では、*Microcystis*の三つの形態学的タイプが次に述べる種名をもとに報告されている：*M. aeruginosa* (Kuetz.) Kuetz., *M. viridis* (A. Br. In Rabenh.) Lemm., *M. wesenbergii* (Kom.) Kom. in Kondr.。 *Microcystis*属の分子分類学的再検討の一部として、これら3種の間と種内のアロザイム多型が電気泳動法で解析された。この分析結果を基にして、この論文で日本産*Microcystis*属の分類学的問題を論議する。

藍藻に対して酵素の電気泳動特性の研究の行われた例はほんのわずかである（Baker & Holton 1973, Stulp 1983）。これらの研究はバンドパターンの表現型解釈のレベルに止まっている、アロザイム研究の優位性に向かうことのない、従って認識された電気泳動の変異型の遺伝子型を決定することがないままに。我々の研究はアロザイム多型に基づいた藍藻類の分子分類の最初の例である。

材料と方法

■藻の採集と培養

統計28系統のMicrocystisが14の富栄養化した水塊から分離された、採集地点の日本列島における地理分布が図1に示されている。形態学的特徴によって、19系統はM. aeruginosa, 5系統はM. Viridis, 4系統はM. wesenbergiiに分類された。これらの系統の番号 (=TAC 系統番号) は採集地とともに表1に示されている。TAC系統は全て国立科学博物館植物研究部、藻類系統保存室に保存されている。

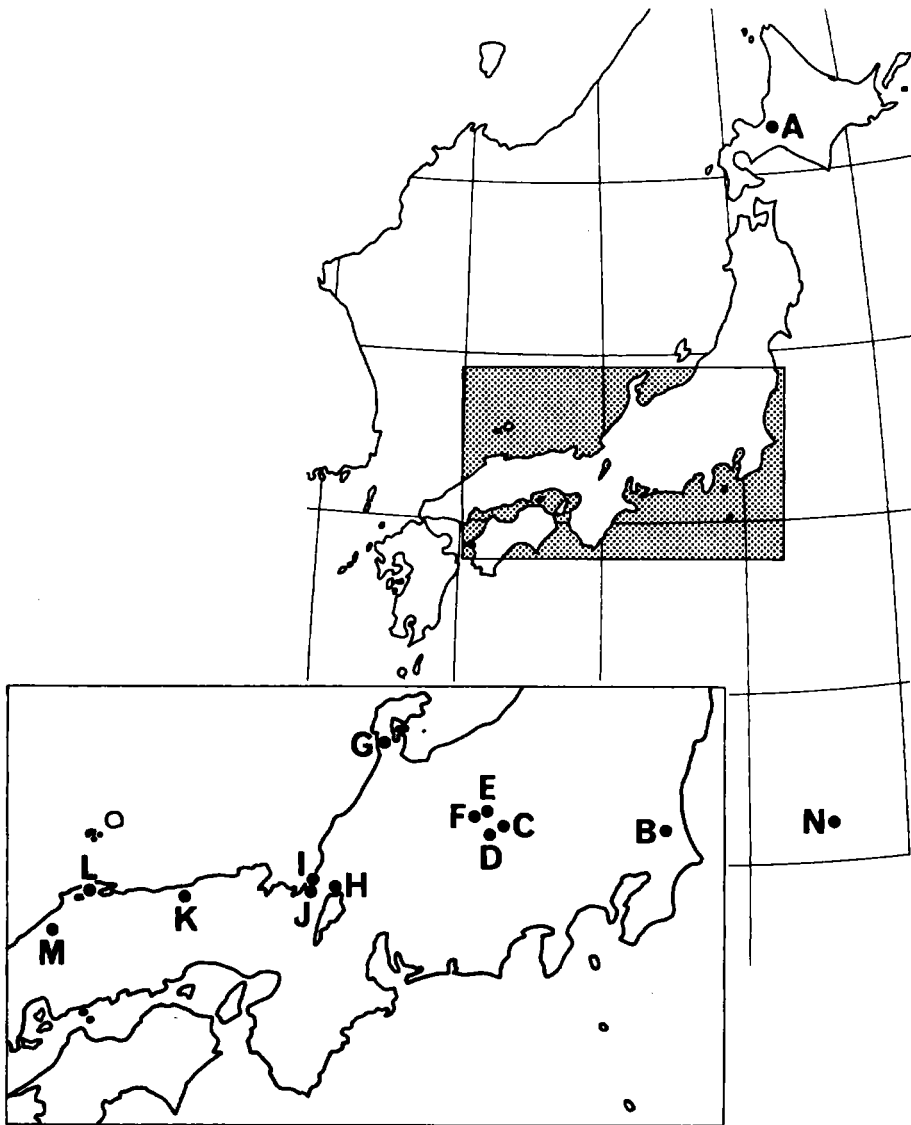


図1 Microcystisの系統の分離された湖、池、貯水池の位置 (表1 参照)

表 1. 研究に用いられた *Microcystis* の系統の由来.

Strain*	Species**	Collection Locality***
38	W	Ibaraki: Lake Kasumigaura (B)
44	V	Ibaraki: Lake Kasumigaura (B)
45	V	Ibaraki: Lake Kasumigaura (B)
48	A	Nagano: Lake Suwa-ko (D)
51	A	Nagano: Lake Suwa-ko (D)
52	W	Nagano: Lake Suwa-ko (D)
57	W	Nagano: Lake Suwa-ko (D)
60	A	Nagano: Lake Shirakaba-ko (C)
61	A	Nagano: Lake Shirakaba-ko (C)
64	V	Nagano: Chikatou-ike Pond (E)
65	A	Nagano: Chikatou-ike Pond (E)
66	A	Nagano: Rokusuke-ike Pond (F)
69	A	Nagano: Rokusuke-ike Pond (F)
70	A	Ishikawa: Takahama-ike Pond (G)
73	A	Shiga: Lake Yogo-ko (H)
76	A	Shiga: Lake Yogo-ko (H)
78	V	Fukui: Lake Mikata-ko (J)
80	A	Fukui: Lake Suigetsu-ko (I)
82	A	Tottori: Koyama-ike Pond (K)
85	W	Shimane: Ukinuno-no-ike Pond (M)
87	A	Shimane: Koshi-ike Pond (L)
91	A	Hokkaido: Lake Barato-ko (A)
92	V	Hokkaido: Lake Barato-ko (A)
95	A	Hokkaido: Lake Barato-ko (A)
97	A	Nagano: Lake Shirakaba-ko (C)
109	A	Tokyo (Ogasawara Isl.): Shigure Reservoir (N)
110	A	Tokyo (Ogasawara Isl.): Shigure Reservoir (N)
230	A	Nagano: Lake Suwa-ko (D)

* TAC (Tsukuba Algal Collection) strain number. ** A: *M. aeruginosa*; V: *M. viridis*; W: *M. wesenbergii*. *** Capitals in parentheses refer to the localities in Fig. 1.

分離された藻類は2種類の培地MA, NaCBで培養された。MAでの培養は大量で(通常4リットルの培地を入れたガラス瓶の中で)行われ、25°C、30.1 μ Em-2S-1 蛍光灯の連続照射、1.3-2.5 lh⁻¹で濾過空気の通気培養。培養は指数期の後で集められ、アロザイム研究のため連結乾燥させる。NaCBでの培養は少量で(通常10mlの培養液を入れた試験管で)行われ、20, 45, 2 μ Em-2S-1 蛍光灯の間歇照射、(16時間明/8時間暗)。2週間の培養の後、藻細胞は細胞サイズ測定のため2%グルタルアルデヒドで固定された。

■酵素電気泳動

以下の酵素が電気泳動で解析された：インサイトレートデヒドロゲナーゼ(IDH; EC 1.1.1.42), 6-フォスフォグルコネートデヒドロゲナーゼ(6PGD; EC 1.1.1.44), グルコースフォスフェートイソメラーゼ(PGI; EC 5.3.1.9)およびフォスフォグルコムターゼ(PGM; EC 2.7.5.1)。これら4種類の酵素は最初29種類の中から、それらが属内で多型であり従って上述の分類学的問題を解くための遺伝指標として有効と考えられたので選ばれたものである。

粗抽出試料は0.5mlの冷却したすり潰しのバッファーの中で連結乾燥された藻をすり潰して得られた：0.1M Tris-HClバッファー、PH8.0、以下を含む、70mM 2-メルカプトエタノール、26mM ナトリウムメタバイサルファイト、11mM L-アスコルビック酸ナトリウム塩、4%の平均分子量40,000の溶解性ポリビニールピロリドン。すり潰しの直後、粗抽出試料は加藤(1987)の簡易ゲル濾過法によって精製された。藍藻試料は、酵素の電気泳動法による分解を減退させる、フィコシアニンや多糖類のような不純物を多く含んでいる。酵素試料の予備研究の間に我々は加藤の方法を見つけた、それは元々維管束植物のために工夫され、藍藻にも効果的で、最善の分解を与える。それ故、我々は粗抽出資料の不純物を取り除き、電気泳動によって分解できる活性のある酵素を得るためにこの方法を採用した。

4種の酵素のそれぞれは3種の異なるゲルとソルチスらの電極バッファースystemによって作られた12.8%のスターチゲルの上で分解された；バッファースystem 1と2はIDHと6PGIに6と7はPGIとPGMに、5は4酵素の全部に採用された(表2)。水平スターチゲル電気泳動はブロムフェノールブルーの先端が起点から約10cm移動するまで引き延ばすように改変して加藤(1987)の方法によった。染色プロトコルソはソルチスらに従った(1983)。ほとんどの泳動レーンでMicrocystisによって特定された、たった1本の酵素バンドがはっきりと検出された。しかしながら、我々の系統は必ずしも無菌ではないので1ないし何本かの付着性の細菌に特定されるかすかなバンドがある時に検出された。我々はこの細菌のノイズを無菌でないMicrocystis試料とその系統から分離培養された細菌のみの試料とを比較することによって同定した。

検出されたアロザイムは最も+電極側のアロザイムをaとしてアルファベット順に名前付けした。この名前付けによってアロザイムとその暗号付けした対立遺伝子は次に示す例のように上付文字によって表される：IDH^a(アロザイム)、*Idh*^a(対立遺伝子)。

表2 電極と採用されたゲルバッファースystem。

No.	Electrode buffer	Gel buffer	Enzyme
1	400 mM citric acid, trisodium salt pH 7.0	20 mM histidine-HCl pH 7.0	IDH, 6PGD
2	135 mM tris, 32 mM citric acid pH 8.0	9 mM tris, 2 mM citric acid pH 8.0	IDH, 6PGD
5	223 mM tris, 69 mM citric acid pH 7.2	8 mM tris, 2 mM citric acid pH 7.2	IDH, 6PGD, PGI, PGM
6	100 mM NaOH, 300 mM boric acid pH 8.6	15 mM tris, 4 mM citric acid pH 7.8	PGI, PGM
7	38 mM LiOH, 188 mM boric acid pH 8.3	45 mM tris, 7 mM citric acid, 4 mM LiOH, 19 mM boric acid pH 8.3	PGI, PGM

■細胞の大きさの統計解析

細胞の大きさは間期の細胞がオリンパス画像解析装置CIA-102を用いて測定され統計処理され、平均直径によって示された。一つ一つの細胞の輪郭をはっきりさせるために、固定した群体を超音波破碎機でばらばらにし、ガス胞をとり除いた。一つの系統について50細胞が測定された。平均値と標準偏差値が計算された。

同様の測定は別の日本産*Microcystis aeruginosa* (TAC 4, 6, 7, 15, 19, 20, 62, 63, 71, 74, 75, 81, 83, 84, 86, 93, 11) およびネパール産の1系統 (TAC 114)にも行われた。*M. Aeruginosa* 37 系統の平均細胞径がダuncanの1%レベルの新マルチプルレンジテストに従って統計的に比較された。

結 果

4 酵素全部が明瞭に分解された。予期したとおり、ただ一つのアロザイムとその暗号付けした対立遺伝子がそれぞれの系統、それぞれの酵素について同定された。ザイモグラムの1例 (バッファースystem 7 上で分解されたPGI)とその同定されたアロザイムが示される模式的説明が2図で行われている。*Microcystis*属内において、IDHに関して全部で10種類の対立遺伝子が特定された; 6PGDに関して6種類の対立遺伝子が; PGIに関して11種類の対立遺伝子が; PGMに関して6種類の対立遺伝子が特定された。調べられた28系統の間の対立遺伝子の分布が表3に概括され、3図に模式的に示されている。この表から、以下のことが明白である:(1)*M. Viridis* 5 系統は一つの特異的遺伝子型 *Idhf-6Pgdf-Pgii-Pgmb(ffib*と略記される)に固定されている;(2)*M. Wesenbergii* 4 系統はやはり一

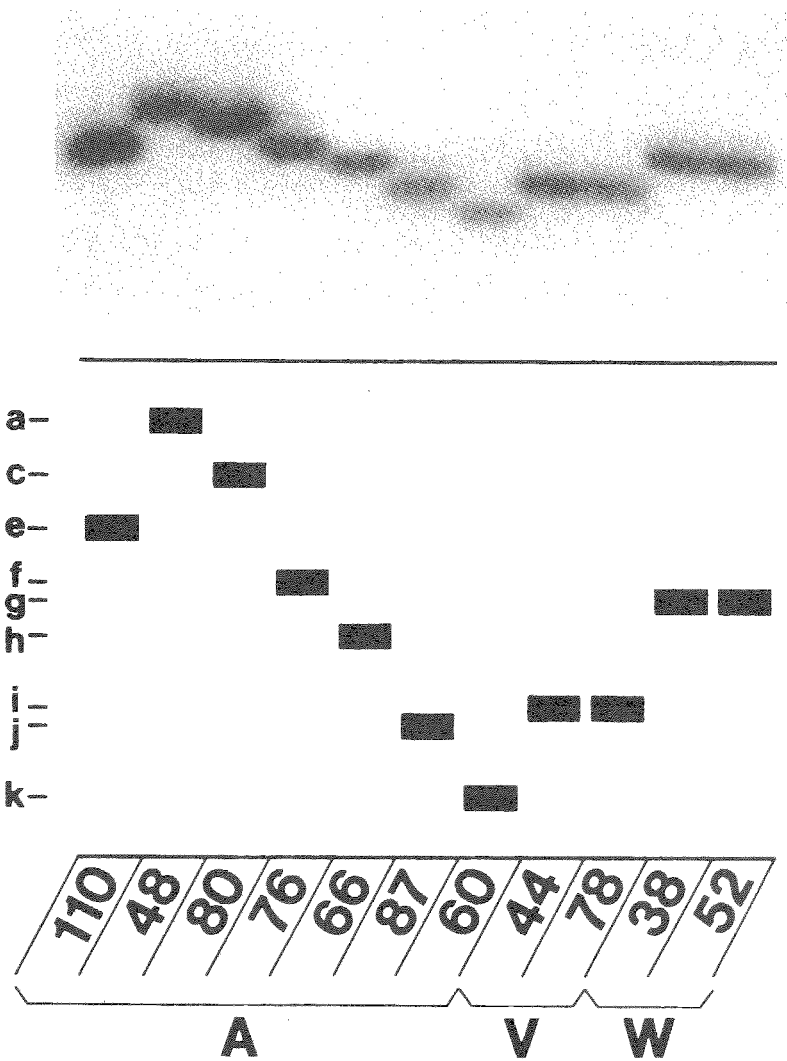


図2 バッファースystem7の上に分解されたグルコースフォスフェイトイソメラーゼ (PGI)のザイモグラムの1例(上)とその図式的説明(下)。下の文字と数字、上の文字はそれぞれアロザイムの名前付け、TAC系統番号と種(A: *Microcystis aeruginosa*; V: *M. Viridis*; W: *M. wesenbergii*)を表す。

つの特異的遺伝子型afgaに固定されている；(3)*M. Aeruginosa*は非常に多型で12の異なる遺伝子型を19系統の間を含む。

細胞サイズの統計解析の結果は4図に要約されている、系統はサイズの平均値の順序で並んでいる。この図は37系統の*Microcystis aeruginosa*の間で、より小さい平均値の幅3.25~4.19 μ m、細胞サイズの平均値に関して、異なるレンジを占める二つの明瞭な集合

が認められることを示している。25系統 (TAC4~TAC66)は平均値で3.25~4.19 μ mと小さい細胞を持ち一つの固まりを作る。その他の12系統(TAC61~TAC83)は平均値で4.58~5.08 μ mと大きい細胞を持ち第二の固まりを作る。これら二つの系統の固まりは群体の作りにおいて異なった特徴を示す。大きな細胞を持つ系統は、細胞が密に集合し、裂けたり、不規則に枝分かれする群体によって特徴つけられている (図5)。これらの特徴によって、他から区別される。他方、小さな細胞を持つ系統は群体の形態において極めて多型で細胞の小形であること以外に特徴つけることができない。細胞サイズの平均値と群体形成の違いに基づいて以下の論議において我々は大きな細胞を持つ*M. aeruginosa*の系統を*M. aeruginosa* L-type (larger cell type)と呼び、小さな細胞を持つその他の系統を*M. aeruginosa* S-type (small cell type)と呼ぶ。*M. viridis*と*M. wesenbergii*の全ての系統は*M. aeruginosa* L-typeのそれに相当する大きな細胞を持つ。

表3 調べられた*Microcystis* 28系統のアロザイム遺伝子型のリスト。

Strain	Idh	6Pgd	Pgi	Pgm
<i>M. aeruginosa</i>				
48	j	a	a	d
51	j	a	a	d
60	h	b	k	d
61	h	b	k	d
65	g	c	h	d
66	g	c	h	d
69	e	d	f	c
70	c	f	i	d
73	g	c	h	d
76	f	d	f	c
80	d	a	c	d
82	f	a	e	f
87	i	e	j	b
91	b	a	d	f
95	g	d	b	c
97	h	b	k	d
109	i	e	j	b
110	f	a	e	f
230	d	d	e	e
<i>M. viridis</i>				
44	f	f	i	b
45	f	f	i	b
64	f	f	i	b
78	f	f	i	b
92	f	f	i	b
<i>M. wesenbergii</i>				
38	a	f	g	a
52	a	f	g	a
57	a	f	g	a
85	a	f	g	a

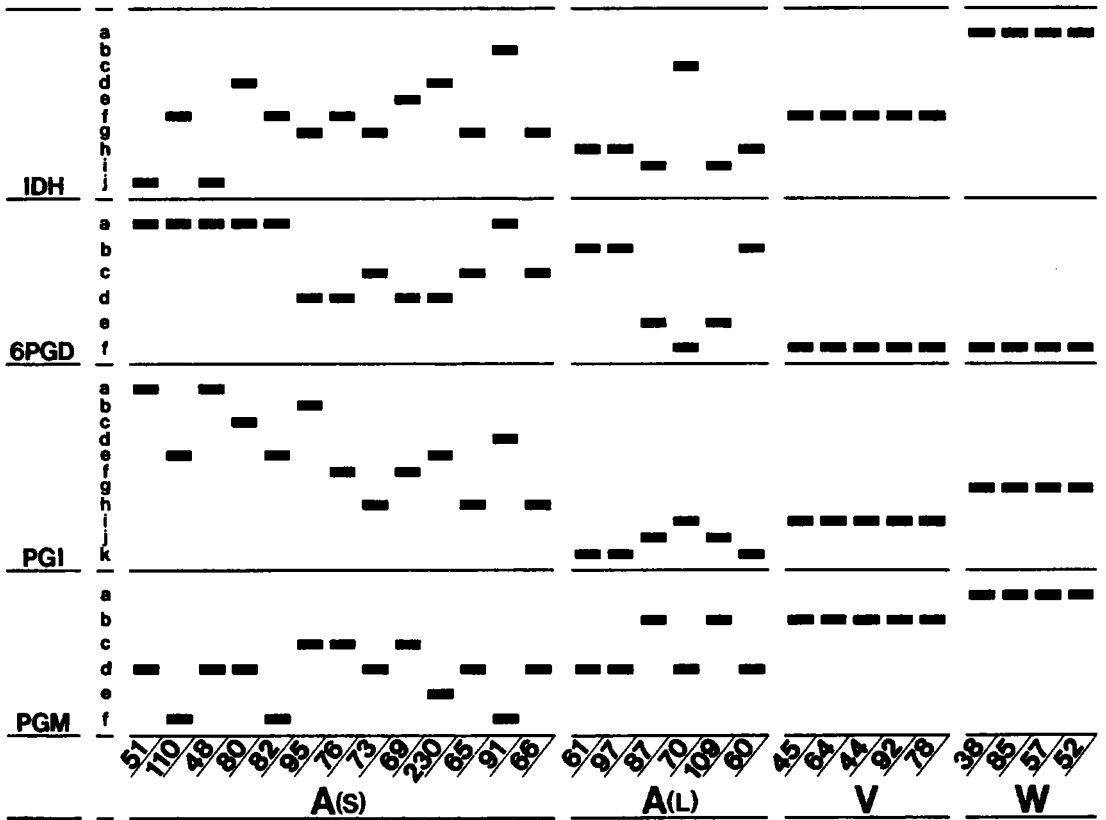


図3 調べられたMicrocystis 28系統のアロザイム遺伝子型の模式図。文字と数字はそれぞれアロザイムの名前付け（そしてそれらの暗号付けする対立遺伝子）とTAC系統番号である。A(S): *M. aeruginosa* S-type; A(L): *M. aeruginosa* L-type; V: *M. viridis*; W: *M. wesenbergii*.

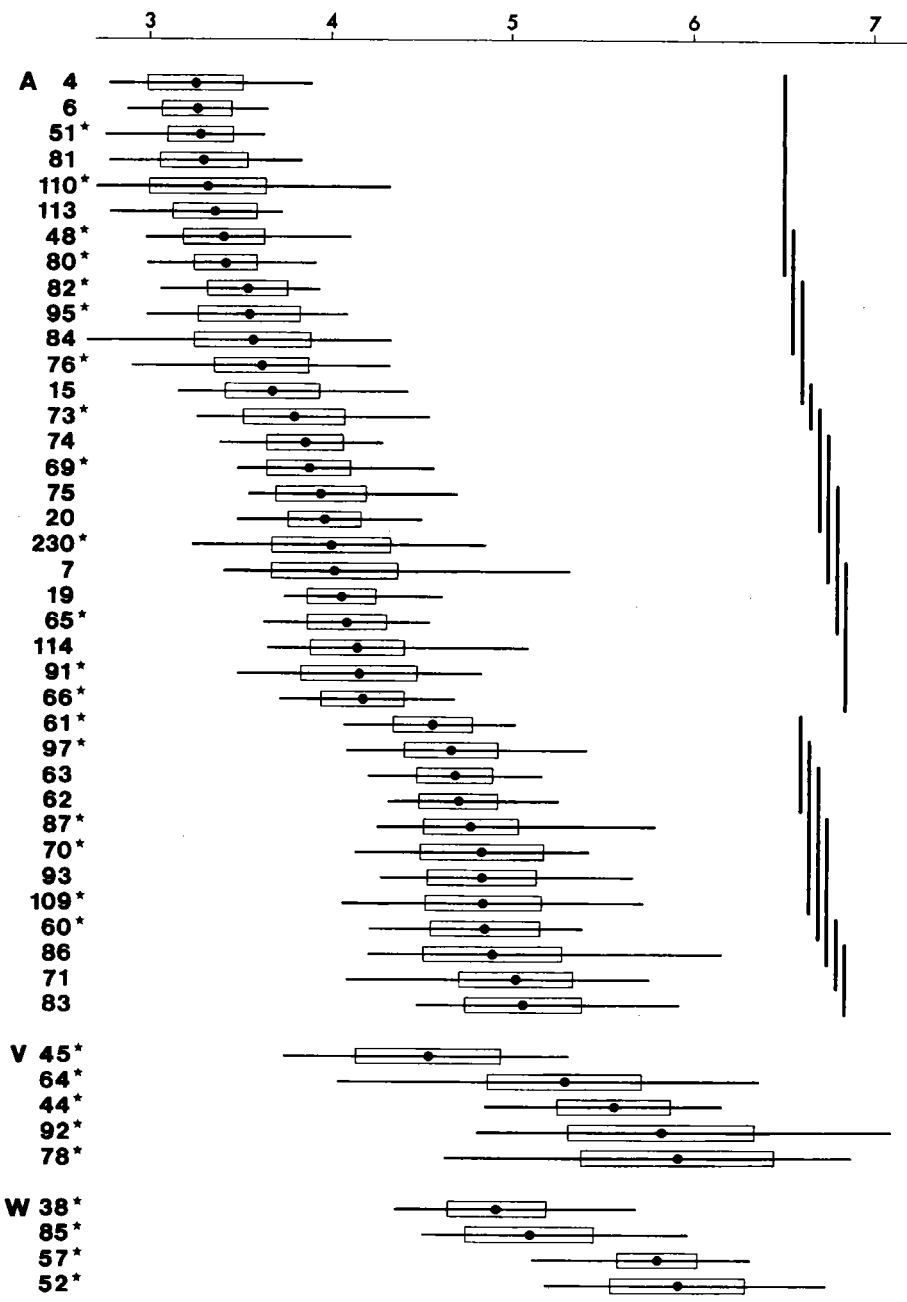


図4 Microcystis 3種における平均細胞サイズの種内及び種間の変異。左側の文字と数字は種(A: *M. aeruginosa*; V: *M. viridis*; W: *M. wesenbergii*)とTAC 系統番号を示す。肩の星印はその系統がアロザイム研究に用いられたことを示す。横線、黒点、矩形はそれぞれレンジ、平均、標準偏差を表す。右側の縦の線はM. aeruginosa 37系統についてのDuncanの新マルチプルレンジテスト(1%レベル)の結果を示している。統計的に有意の差がTAC66とTAC61の間に特定された。

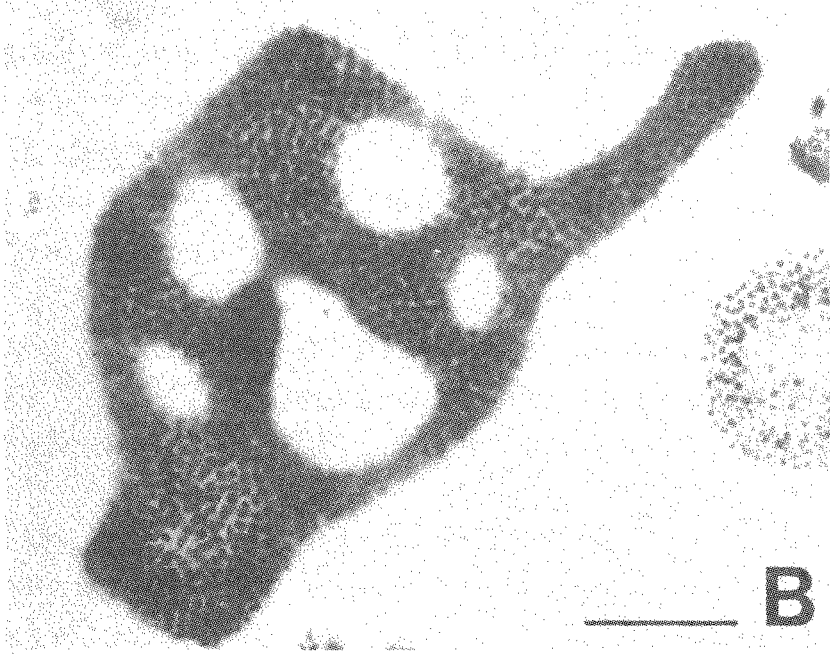
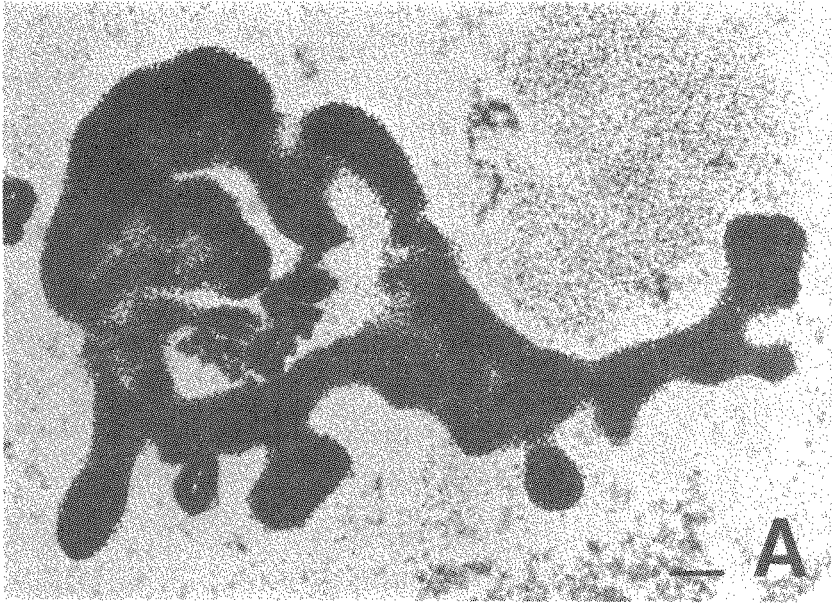


図5 *Microcystis aeruginosa* L-typeの典型的なかたち（天然の試料から）。
A: 霞ヶ浦。B: 諏訪湖。（スケール：100 μ m）

討 議

*Microcystis viridis*は日本の3種の*Microcystis*のなかで最も識別の容易な種として知られる。*M. viridis*の群体の形態学的特徴は長期間の培養あるいは保存の後にも完全に保存されやすい、そして元々の形が維持される限り*M. viridis*の群体は他の2種から容易に区別することができる。異なる由来の*M. viridis*の系統の間に形態学的違いはほとんど観察されていない。我々は*M. viridis*を十分確立した種とみなし、それがほとんどあるいは全く遺伝学的変異を示さないことをひとまず期待しておく。

得られているアロザイム資料はこの期待によく合致する。*Microcystis viridis* 5系統は全部一つの特別の遺伝子型ffibに固定され(表3)、*M. viridis*は遺伝的に単型で他の2種とは別物であることを示す。*M. viridis*は十分に確立した種であることが確認された。

*Microcystis wesenbergii*は*M. viridis*と同様の状況にあることがわかった。アロザイム研究は*M. wesenbergii* 4系統が一つの特別の遺伝子型afga(表3)に固定されていることを示している。そのような*M. wesenbergii*の遺伝的均質性は現下の、群体の形態における類のない性質から演繹されているこの種の、限界を強く支持している。*M. wesenbergii*もまた十分に確立した種とみなされる。

*Microcystis aeruginosa*には平均細胞サイズと群体形成に基づいて二つのモルフォタイプ(SタイプおよびLタイプ)の存在することが明らかになった(図4、5)。*M. aeruginosa* Lタイプにおいて認められた全部で11の対立遺伝子のなかで、Sタイプに共通して検出されたのはただ一つの対立遺伝子(Pgm^d)のみで、残りの10の対立遺伝子(Idh^c Idh^b Idh^i $6Pga^b$ $6Pga^e$ $6Pga^f$ Pgi^i Pgi^j Pgi^k Pgm^b)は検出されなかった。この結果は*M. aeruginosa*の二つのモルフォタイプがアロザイムレベルで大きく異なっていることを明らかに示している。広義の*M. aeruginosa*は少なくとも二つの分類学的実体(*M. aeruginosa* Sタイプおよび*M. aeruginosa* Lタイプ)を含んでいて、それらは形態学ならびに遺伝学的に大きく分化しており、従って別の種と見なすことができるかもしれないと結論される。

しかしながらこの論文では、仮に、これら二つの分類学的実体を同じ種*Microcystis aeruginosa*の形態学的・遺伝学的タイプとして扱い、それらに分類学的名前付けをしない。この我々の決定は次の二つの理由に導かれた:(1)このアロザイム研究は日本産の系統に限られ、殆どの*Microcystis*の種(*M. aeruginosa*及びそれと関連の種*M. flosaquae*と*M. ichthyoblabe*を含む)の記載されたヨーロッパの材料を調べていない:(2)*M. aeruginosa* Sタイプは群体の形態とアロザイム遺伝子型において極めて多型で、従って、いくつかのサブタイプに分割できるかどうか確かでない。これらの分類学的実体の厳密な境界を決めそれらに正しい科学的名前を決定するためには、さらに広い研究が必要とされる。

謝 辞

我々は有益な助言と賜ったチェコスロバキア科学アカデミーのコマーレク博士に深く感謝する。また、貴重な助言、研究の協力または支援をいただいた以下の方々に謝意を表す：原、柿嶋、梅崎、秋山、渡辺、林、清澤、リッジ、外岡、平山、伊沢、河地、ブランドン、高崎、森田。この研究は文部省科学研究費補助金の援助ならびにとうきゅう環境浄化財団の研究補助金の援助を得て行われた。

References

- BAKER, A. F. & HOLTON, R. W. (1973): Electrophoretic analysis of proteins and malic dehydrogenase isozymes in nine oscillatorian blue-green algae. – *Phycologia* 12: 83–87.
- DOOLITTLE, W. F. (1982): Molecular evolution. – In: CARR, N. G. & WHITTON, B. A. (eds.): *The Biology of Cyanobacteria*, p. 307–331. – Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- DUNCAN, D. B. (1955): Multiple range and multiple F tests. – *Biometrics* 11: 1–42.
- GOTTLIEB, L. D. (1982): Conservation and duplication of isozymes in plants. – *Science* 216: 373–380.
- ICHIMURA, T. (1979): Media for blue-green algae. – In: NISHIZAWA, K. & CHIHARA, M. (eds.): *Methods in Algological Studies*, p. 294–305. – Kyoritsu Shuppan, Tokyo. (In Japanese)
- ICHIMURA, T. & WATANABE, M. M. (1977): An axenic clone of *Microcystis aeruginosa* KÜTZ. emend. ELENKIN from Lake Kasumigaura. – *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 25: 177–181.
- KATO, T. (1987): Hybridization between *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* and *D. shinanensis* evidenced by resolvable esterase isozymes from herbarium specimens. – *Ann. Tsukuba Bot. Gard.* 6: 9–18.
- KOMÁREK, J. (1958): Die taxonomische Revision der planktischen Blaualgen der Tschechoslowakei. – In: KOMÁREK, J. & ETTL, H. (eds.): *Algologische Studien*, p. 10–206. – Nakl. ČSAV, Praha.
- MARGULIS, L. (1970): *Origin of Eukaryotic Cells*. – 349 pp., Yale Univ. Press, New Haven.
- RANDALL, D. D. & GIVAN, C. V. (1981): Subcellular location of NADP⁺-isocitrate dehydrogenase in *Pisum sativum* leaves. – *Pl. Physiol.* 68: 70–73.
- SOLTIS, D. E.; HAUFLER, C. H.; DARROW, D. C. & GASTONY, G. J. (1983): Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. – *Amer. Fern J.* 73: 9–27.
- STULP, B. K. (1983): Morphological and molecular approaches to the taxonomy of the genus *Anabaena* (Cyanophyceae, Cyanobacteria). – 115 pp., Drukkerij van Denderem B. V., Groningen.
- WATANABE, M. & CHIHARA, M. (1980): Algal flora in Tsukuba Academic New Town. V. Planktonic blue-green algae. – *Environ. Res. Tsukuba* 5A: 80–86. (In Japanese)
- WATANABE, Y.; WATANABE, M. F. & WATANABE, M. (1986): The distribution and relative abundance of bloom forming *Microcystis* species in several eutrophic waters. – *Jap. J. Limnol.* 47: 87–93.
- WEEDEN, N. F. (1983): Plastid isozymes. – In: TANKSLEY, S. D. & ORTON, T. J. (eds.): *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, p. 139–156. – Elsevier, Amsterdam.
- WEEDEN, N. F.; HIGGINS, R. C. & GOTTLIEB, L. D. (1982): Immunological similarity between a cyanobacterial enzyme and a nuclear DNA-encoded plastid-specific isozyme from spinach. – *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 5953–5955.

第 5 章

Microcystis aeruginosa の株での環状ペプチド毒素の組成について

渡辺真利代 (都衛研) ・ 渡辺 眞之 (科博) ・ 加藤 辰己 (科博)

原田 健一 (名城大) ・ 鈴木 誠 (名城大)

要 約

7個のアミノ酸からなる環状毒素マイクロキスチンの分布を*Microcystis aeruginosa* 31株について研究した。マイクロキスチン-RR, -YR, -LRを持つものが15株、マイクロキスチン-LRを持つものが2株見つかった。しかし毒素を持たない株も14株あった。3種のすべての毒素は、細胞の大きさとallozymeの遺伝子型によりlarge cell-sizeグループに属する12株すべてにおいて検出された。

この毒素の組成パターンは*M. viridis* のものと同等である。small cell-size グループでは毒素の組成はallozyme genotypeと同様なバリエーションを示した。

序 論

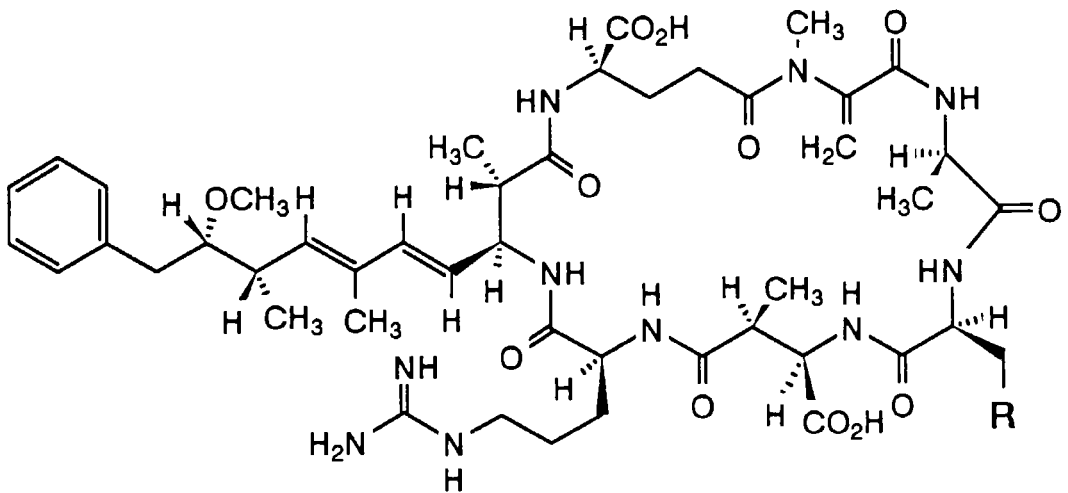
シアノバクテリアは、富栄養化した淡水において、1年のうちの暖かい時期にアオコを形成する。そして*Microcystis* 属はもっとも共通性があり、また世界共通種である。植物プランクトン集団での顕著な優占性のため、*Microcystis* 属によるアオコの出現や形成はやっかいものであると同時に科学的研究のテーマである。

Microcystis 属の生態、出現、集団としての成長について多くの研究がなされてきたが、そこでは種組成や群体の形態変異についてほとんど考慮されていなかった。しかし、Komarek(1958)による分類体系に基づき、Watanabe and Chihara(1980)は日本の湖沼に出現する*Microcystis* 属に*M. aeruginosa f. aeruginosa*, *M. aeruginosa f. flos-aquae*, *M. viridis*, *M. wesenbergii* の4種が存在することを報告した。Y. watanabeらは(1986)日本の21の湖や池で*Microcystis* 属の組成を研究し、いくつかの湖沼で*M. aeruginosa* 以外の*Microcystis*種が優占種であったことを報告した。しかしそれらの研究は、顕微鏡下での群体の形態と群体内での細胞の配列をもととして研究したものであったので、我々は分子分類学の方法であるallozymeの電気泳動パターンを使うことを試み、*M. viridis* と*M. wesenbergii* は種として認定されるべきものであり、allozymeの遺伝子型により*M. aeruginosa* から区別することができることを示した(Kato et al. 1991)。しかしながら、

M. aeruginosa の株の中ではいくつかの変異がみられていた。

肝臓毒素マイクロシスチンは *M. aeruginosa* に含まれている (Gorham and Carmichael, 1988, Charmichaelら1988)。この毒素は7個のアミノ酸を環状に持ち、そのうち5個を共通とし、残る2つのL-アミノ酸のバリエーションでいくつかのタイプが存在する (図1、Botes et al.1985)。L-アミノ酸の違いは、マイクロシスチンの末尾にXYとして明示される。我々は、*M. viridis* 中に毒素が存在すること (M. F. Watanabe et al.1986) とさらに日本の湖沼から分離してきた2株の *M. aeruginosa* と3株の *M. viridis* (Watanabe et al.1988) に存在する3種のマイクロシスチン-RR, -YR, -LRについて報告した。*M. viridis* の6株すべてにおいてマウスに対して致死作用があったが、*M. aeruginosa* の株には有毒、無毒の株両方が見つかっている (Watanabe et al.1986)。

この研究は我々は *M. aeruginosa* 株の毒素を分析し、株間での毒素の組成の比較を行った。



Microcystin LR R = CH(CH₃)₂

Microcystin RR R = CH₂CH₂NHC(NH₂)=NH

Microcystin YR R = C₆H₄-*p*-OH

図1 7種のアミノ酸からなるペプチド毒(マイクロシスチン)の3種類の成分の構造

材料と方法

■藻の採取と培養

M. aeruginosa 31株を用いた。それらは日本の17の湖沼から採取し、群体及び群体中の細胞の配列等の形態学的特徴をもとに*M. aeruginosa*として同定された。培地はMAとNaC B培地を用いた (Ichimura, 1979)。大量に培養する場合、5 lの三角フラスコに4 lのMA培地で30.1 μ einsteins per m^2 secの光を当て、1.3-2.5 liters/hr の速度でエアレーションを行った。対数増殖期の後期、遠心により細胞を集め、凍結乾燥後、毒素の解析を行うまで-20°Cで保存した。細胞の直径の測定は試験管中で培養した後、濃度が0.001%となるようにglutaraldehydeを加え固定した。

■細胞の大きさの測定

ultrasonic homogenizerを用いて、群体が単一細胞になるようにし、またガス胞を破壊した。細胞の大きさの測定と統計学的な解析はOlympus Color Image Analyzer CIA-102を用いて行った。

■HPLC条件

毒素量の推定と標準試料のためのサンプル精製はHaradaら(1988)の方法に従った。乾燥した細胞(100mg)を5%酢酸水溶液に加えた後得られた粗抽出液をODSカートリッジに付した。カートリッジからのメタノール溶出液をODSカラム (Nucleosil 5C18)、定速送液ポンプ、紫外検出装置を装備した(Shimadzu)HPLCに入れ分析した。毒素量は標準試料の吸光度 238nmのピーク面積と比較し定量した(Harada et al 1988)。メタノールのODSカートリッジからの溶出液についてはさらにsilica gel TLCを用いて毒素の同定を行った。

結 果

我々は通常、*M. aeruginosa* の群体の透明な鞘をふつうの顕微鏡で見ることにはできないので、*M. aeruginosa* は群体のまわりに目に見える層を持つ *M. viridis* や *M. wesenbergii* と区別することができる。しかし、図2に見られるように*M. aeruginosa*は形や大きさがよく変化する。大きなコロニーはしばしばFig. 2Aのように観察された。このコロニーは枝分かれとその中の空隙で特徴づけられる。細胞は密集して分布する。より小さなコロニーは時々Fig. 2Bのように観察され、コロニー内に空隙は見られない。もう1つのタイプのコロニーはFig. 2Cのように観察される。このコロニーの形や細胞の配列は、Fig. 2A

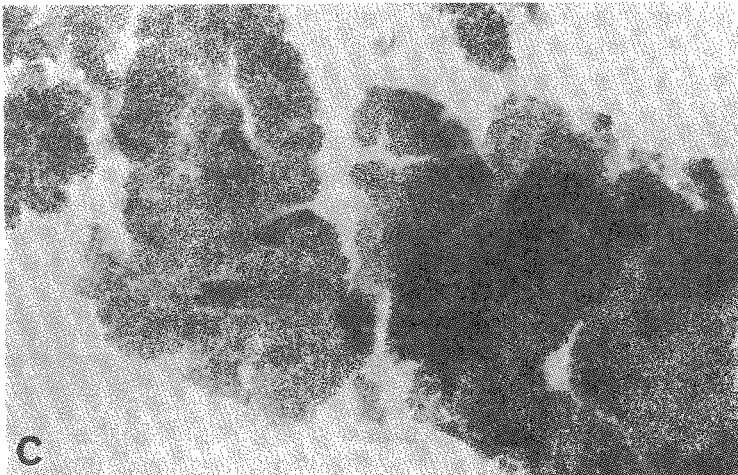
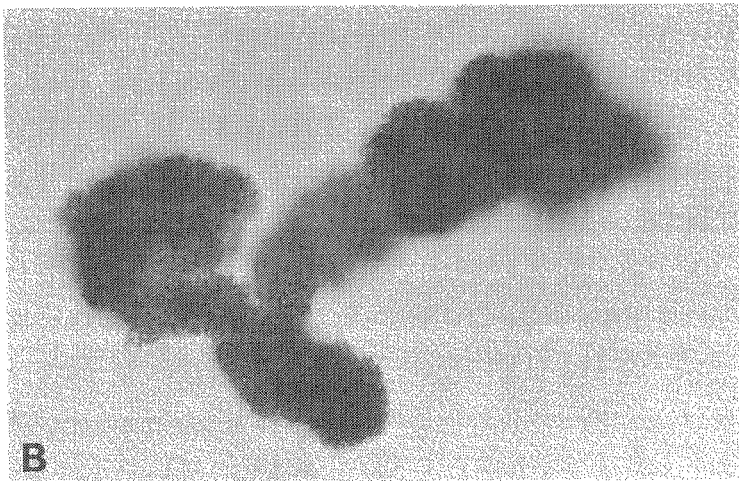
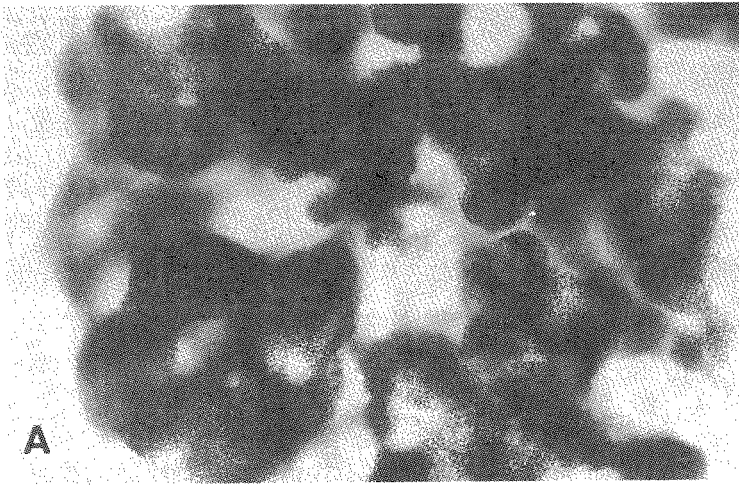


図2 *Microcystis aeruginosa*の群体
A及びB : 細胞サイズの大きいグループの群体
C : 細胞サイズの小さいグループの群体

のコロニーとは異なる。Fig. 2Aのコロニーのように枝分かれしたり、周辺が球形ではない。細胞はむしろ群体内で均等に分布している。

細胞の大きさを *M. aeruginosa* の株間で比較した。表 1 には細胞の直径と標準偏差を31株について示してある。平均の細胞直径が最も小さいのはTAC 51で $3.28\mu\text{m}$ であるのに対し、一番大きいのがTAC 166で $5.04\mu\text{m}$ である。先に(Kato et al. 1991)報告したように、Duncanのmultiple range試験を適用すると、1%のrangeで、細胞の直径により2つのグループが認められる。TAC 51からTAC 66の12株が細胞の小さいSグループに分類され、TAC 61からTAC 166の株は細胞の大きいLグループに属する。Fig. 2A及びFig. 2Bに示される群体はLグループに見いだされ、Fig. 2Cに示される群体はSグループに観察される。

本研究で比較に用いられている31株の肝臓毒はmicrocystins -RR (arginine-arginine), -YR (tyrosine-arginine), -LR (leucine-arginine) の3種であった。Table 2 には *M. aeruginosa* の乾燥重量 100mg あたりの毒素量を示してある。毒素を持たない株が14株ある一方、3種の毒素を持つ株が15株、1種の毒素を持つ株が2株見つかった。TAC 95株では、極めて多量の毒素が検出され、その量は乾燥藻体重量の1%以上となった。

Sグループに属する19株中にはたった5株しか毒素を持つ株がなかった。3種の毒素、microcystins -RR, -LR, -YRはLグループに属する12株すべてから検出された。この3種の毒が見つかったSグループの株は3株だったが、その3つの毒素の構成はそれぞれ異なっていた。たとえばTAC 113株はほぼ等量の microcystins -LR及び-YRを含み、TAC 69ではmicrocystins -LRの方が倍以上-YRより多く、-LRと-RRは似たような量であった。Lグループに属する株はすべて毒素の成分割合は似ている。-RRと-LRは多いが-YRは少ない。-YRが一番おおいの多いはTAC 70だが、この値は63株で測定された-LRの最低値よりも少ない。

論 議

本研究で、我々は7個のアミノ酸からなる環状毒素、すなわちmicrocystins-RR, -YR, -LRの *M. aeruginosa* 31株中における分布について調べた。3種の毒素すべてが検出された株は15株で、毒素のない株は14株みいだされた。メチル基のとれた誘導体の存在も報告されている (Krishnamurthy et al., 1989) が、日本の湖沼から採取してきた天然の試料や分離した株では、主要な毒素は通常microcystins -RR, -YR, -LRの3種であった。我々はmicrocystins -LA (2種のL-アミノ酸がロイシンとアラニン) の検出も試みたが、1株のみでmicrocystins -LAを含む可能性があったにすぎなかった。

前報(Kato et al. 1991)で示したように、2つのグループ、SグループとLグループは、*M. aeruginosa*の細胞の直径の平均の違いで認識され、Lグループの細胞サイズは

表1 TAC株の細胞サイズと採集場所

TAC Strain	Cell Size (μ)	S.D.*	Collection Locality
51	3.28	0.18	Nagano : L. Suwa**
81	3.30	0.24	Fukui : L. Suigetsu
110	3.32	0.32	Tokyo : Shigure Reservoir
113	3.36	0.23	Ehime : Noborio-ike P.
48	3.41	0.22	Nagano : L. Suwa
80	3.42	0.17	Fukui : L. Suigetsu
82	3.54	0.22	Tottori : Koyama-ike P.
95	3.55	0.28	Hokkaido : L. Barato
84	3.57	0.32	Shimane : Ukiginu-ike P.
76	3.62	0.26	Shiga : L. Yogo
47	3.78	0.70	Ibaraki : L. Kasumigaura
73	3.80	0.28	Shiga : L. Yogo
69	3.88	0.23	Nagano : Rokusuke-ike P.
75	3.95	0.25	Shiga : L. Yogo
20	3.97	0.20	Ibaraki : L. Kasumigaura
19	4.07	0.19	Ibaraki : L. Kasumigaura
65	4.10	0.22	Nagano : Chikato-ike P.
91	4.17	0.32	Hokkaido : L. Barato
66	4.19	0.23	Nagano : Rokusuke-ike P.
61	4.58	0.22	Nagano : L. Shirakaba
97	4.68	0.26	Nagano : L. Shirakabe
63	4.70	0.21	Nagano : L. Kutsuzawa
87	4.79	0.26	Shimane : Koshi-ike P.
70	4.85	0.34	Ishikawa : Takahama-ike P.
109	4.86	0.32	Tokyo : Shigure Reservoir***
60	4.87	0.30	Nagano : L. Shirakaba
86	4.91	0.38	Shimane : Koshi-ike P.
71	5.04	0.31	Ishikawa : Takahama-ike
168	5.24	0.34	Tokyo : L. Okutama
158	5.62	0.42	Chiba : L. Teganuma
166	5.67	0.48	Tokyo : L. Okutama

* Standard Deviation

** L. : Lake, P. : Pond

*** Ogasawara Island

M. viridis のものに匹敵する。2つのグループの認識は遺伝子型、即ち4つの酵素 isocitrate dehydrogenase (IDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), glucose phosphate isomerase (PGI), glucophosphomutase (PGM) の多型を電気泳動で解析をすることによって、行われた。*M. viridis* の持っている4つの遺伝子座のうち、PGIとPGMは *M. aeruginosa* のLグループと、6PGDは *M. aeruginosa* のLグループ及び *M. wesenbergii* と、IDH は *M. wesenbergii* と類似していた。このような *M. viridis* と *M. aeruginosa* のLグループとの密接な関係は本研究の毒素組成についてもみられた。我々は *M. viridis* に3種の毒素が存在することを報告した。このことは *M. aeruginosa* のLグループについても同様であった。

表2のTAC 61から168までの *M. aeruginosa* のLグループに属する株は全て microcystins -RR と -LRが多く、-YRは少量含まれている。このようなパターンは固定されているようにもみえるが、*M. viridis* で見られたように増殖期によって変化する。しかし、microcystins -YRの濃度が低いパターンは自然藻体でも報告されている。

Reynoldeらは *M. aeruginosa* には形態的特徴と季節の変化のタイプにより6タイプあると報告している。*Microcystis* の集団の成長に伴う形態学的変化は重要ではあるが、我々は区別が遺伝的差異に基づくか自然条件下生態学的差異に基づくかを決定する必要がある。

Komarekは *M. aeruginosa f. aeruginosa* と *M. aeruginosa f. flos-aquae* をコロニーの形や細胞の大きさで分けた。前報で、我々は *M. aeruginosa f. flos-aquae* の出現の報告をした (Watanabe & Chihara 1980, Y. Watanabe et al. 1986)。しかしながら、*M. aeruginosa f. aeruginosa* は大きな群体については比較的たやすく識別できるが、小さな群体については2種を区別するには困難なことがある。それ故、本研究においては *M. aeruginosa f. flos-aquae* は *M. aeruginosa f. aeruginosa* に含まれているかもしれない。

M. aeruginosa の形態学的変異にもかかわらず、前報で細胞の大きさと酵素多型で認識された *M. aeruginosa* のLグループは毒素組成によっても確認された。既に述べられているように (Eloff 1981, Watanabe et al. 1986)、*M. aeruginosa* の株には有毒株と無毒株が得られている。本研究は少なくともLグループに属する株は環状の7つのアミノ酸からなるペプチドを含むことを示している。我々は毒素組成が *M. aeruginosa* の分類の良い指標になると思われる。しかし、群体の形態やallozymeの多型で認識されたSグループ (Kato et al. 1991) の株の中には、有毒の株があり、その毒素組成には特に傾向はみられない。我々は更に細胞サイズの小さいグループのallozymeの多型性と毒素の関係について解析中である。

表2 *M. aeruginosa*の株に含まれる毒素

Strains	Toxins ($\mu\text{g}/100\text{ mg cells}$)		
	RR	YR	LR
TAC 51	—	—	—
81	—	—	—
110	—	—	—
113	258	250	54.0
48	—	—	—
80	—	—	—
82	—	—	—
95	—	—	1370
84	—	—	—
76	28.2	14.2	20.2
47	—	—	330
73	—	—	—
69	131	49.0	112
75	—	—	—
20	—	—	—
19	—	—	—
65	—	—	—
91	—	—	—
66	—	—	—
61	69.8	18.7	394
97	106	24.0	429
63	104	4.3	59.4
87	151	22.0	387
70	256	26.0	178
109	193	3.4	158
60	101	18.2	268
86	186	21.2	174
71	91.7	12.7	72.9
168	147	8.3	146
158	90.5	11.3	121
166	91.6	9.2	74.4

謝 辞

この研究は文部省科学研究費補助金ならびに、とうきゅう環境浄化財団の研究補助金の援助を得て行われた。

References

- BOTES D.P., P.L. WESSELS, H. KRUGER, M.T.C. RUNNEGAR, S. SANTIKARN, R.J. SMITH, J.C.J. BARNA AND D.H. WILLIAMS. 1985. Structural studies on cyanoginosin-LR, YR, YA and YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 2747-2748.
- CARMICHAEL, W.W., V.R. BEASELY, D.L. BUNNER, J.N. ELOFF, I. FALCONER, P. GORHAM, K.-I. HARADA, T. KRISHNAMURTHY, Y. MIN-JUAN, R.E. MOORE, K.L. RINEHART, M. RUNNEGAR, O.M. SKULBERG AND M.F. WATANABE. 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26: 971-973.
- DUNCAN, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- ELOFF, J.N. 1981. Autecological studies on *Microcystis*. In W.W. Carmichael, ed., *The Water Environments: Algal Toxins and Health*, 71-96. Plenum Press, New York.
- GORHAM, P.R. AND W.W. CARMICHAEL. 1988. Hazards of freshwater blue-green algae. In C.A. Lembi AND J.R. Waaland, eds., *Algae and human affairs*, 403-431, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- HARADA, K.-I., K. MATSUURA, M. SUZUKI, H. OKA, M.F. WATANABE, S. OISHI, A.M. DAHLEM, V.R. BEASELY AND W.W. CARMICHAEL, 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 4: 275-283.
- ICHIMURA, T. 1979. Media for blue-green algae. In K. Nishizawa AND M. Chihara, eds., *Methods in Algalogical Studies*, 294-305. Kyouritsu, Tokyo. (in Japanese).
- KATO, T., M.F. WATANABE AND M. WATANABE. 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic and phylogenetic inference. *Arch. Hydrobiol.* (in press).
- KOMÁREK, J. 1958. Die taxonomische Revision der planktisch Blau algen der Tschechoslowakei. In J. Komárek and H. Ettl, eds., *Alogologische Studien*. 10-206, Tschecho. Akademie der Wissenschaften.
- KRISHNAMURTHY, T., L. SZAFRANIEC, D.F. HUNT, J. SHABANOWITZ, J.R. YATES, C.R. HAUER, W.W. CARMICHAEL, O. SKULBERG, G.A. CODD AND S. MISSLER. 1989. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 770-774.
- OHTAKE, A., M. SHIRAI, T. AIDA, N. MORI, K.-I. HARADA, K. MATSUURA, M. SUZUKI AND M. NAKANO. 1989. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3202-3207.
- REYNOLDS, C.S., G.H.M. JAWORSKI, H.A. CMIECH AND G.F. LEEDALE. 1981. On the annual cycle of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* Kutz. emend. Elenkin. *Phil. Trans R. Soc. Lond. B.* 293: 419-477.

- WATANABE, M. AND M. CHIHARA. 1980. Algal flora in Tsukuba Academic New Town. V. Planktonic blue-green algae. Environ. Res. Tsukuba 5A : 80-86. (in Japanese).
- WATANABE, M.F., S. OISHI, Y. WATANABE AND M. WATANABE. 1986. Strong probability of lethal toxicity in the blue-green alga *Microcystis viridis* Lemmermann. J. Phycol. 22 : 552-556.
- , ———, K.-I. HARADA, K. MATSUURA, H. KAWAI AND M. SUZUKI. 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green alga). Toxicon 26 : 1017-1025.
- , K.-I. HARADA, K. MATSUURA, M. WATANABE AND M. SUZUKI. 1989a. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). J. Appl. Phycology 1 : 161-165.
- , ———, ———, S. OISHI, Y. WATANABE AND M. SUZUKI. 1989b. Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. Toxicity Assessment 4 : 487-497.
- WATANABE, Y., M.F. WATANABE AND M. WATANABE. 1986. The distribution and relative abundance of bloom forming *Microcystis* species in several eutrophic waters. Jpn. J. Limnol. 47 : 87-93.

「^{おくたまこ}奥多摩湖^{はっせい}に発生する^{マイクロキスティス}Microcystis^{ぞく}属^{そう}ラン藻^{もち}のアイソザイムを用いた
^{どうてい}同定^{どくせい}および^{よち}毒性^{かん}の^{けんきゅう}予知に関する研究」 (研究助成・A類NO. 175)

著者 原 慶 明
発行日 1997年3月31日
発行 財団法人 とうきゅう環境浄化財団
〒150 渋谷区渋谷1-16-14
(渋谷地下鉄ビル内)
TEL (03)3400-9142
FAX (03)3400-9141
