

II-601

かび臭產生、非產生藍藻類の16SリボソームRNA塩基配列の比較

東北学院大学大学院 学生員 ○木村 陽平、及川 栄作、大沼 孝宏
同 工学部 正会員 石橋 良信

1. はじめに

異臭味水の被害は、平成2年には2,100万人を越え、中でもかび臭は近畿、関東地方を中心に多大の不快感を与え、おいしい水供給の観点から解決に急を要する大きな課題になっている。かび臭原因物質は主にカンファーに似た二環性モノテルペンである2-メチルイソボルネオール(2-MIB)とギリシヤ語に由来する二環性モノテルペンのジオスミン(geosmin)が同定されており、藍藻類(藍菌: Cyanobacteria)あるいは放線菌のある種によって產生される。かび臭產生藍藻類は、分類上ネジ目(*Nostocales*)に属し、世界で*Oscillatoria*属18種、日本でも9種と多く、その他の藻類としてわが国では*Anabaena*属6種、*Phormidium*属5種が確認されている。

かび臭產生微生物を正確に分類することは重要である。藍藻類の同定にあたっては現在、検鏡による形態上の特徴の把握、培地組成の相違による増殖の如何、代謝産物の種類などを調べることによってその生理、生態を理解して分類している。しかしながら、このような方法では、季節、培養条件、継代培養の繰り返しなどで正確に同定し得ない場合も生じている。また、*Phormidium tenue* (*P. tenue*)と*Oscillatoria limnetica* (*O. limnetica*)が同種であるか否かは以前より懸案の事項になっている。

原核生物細胞の蛋白質合成の場であるリボソームを構成する分子のうちの一つである16SリボソームRNA(rRNA)は、塩基配列を決定するのに手ごろの大きさ1,500b (base:塩基数)である。また、ユニバーサルな部位と呼ばれる全生物、真核生物、真正細菌、古細菌などそれぞれ高く保存されている部位があることが知られている。これらの部位は、16SrRNAを直接塩基配列決定する際のプライマーとして使用されたり、全RNAを抽出後逆転写酵素(Reverse Transcriptase)反応をして相補鎖DNAを合成後PCR(Polymerase Chain Reaction)により、増幅する(RT-PCR)や、染色体抽出後に16SrDNAをPCRにより特異的に増幅する際のプライマーとして使用されている。

本研究では、16SrRNAのユニバーサルプライマーを用いて染色体上の16SrDNAをPCR増幅しPCR産物を大腸菌にサブクロニングしたクローンをNon Restriction法により塩基配列を決定し、この比較を基にして迅速にかび臭產生菌の同定法確立を目的とするとともに、幾株かの*Phormidium tenue*および*Anabaena* spp. が同じ塩基配列を有しているか、またかび臭產生種と非產生種で塩基配列上に相違があるかどうかを検討した。さらに、*P. tenue*と*O. limnetica*の塩基配列の相違についても調べいくつかの知見を得たので報告する。

2. 研究方法

研究に供した菌株の内、*P. tenue*については、近畿地方にあって、2-MIBを產生し、O貯水池より分離された形態的に*P. tenue*と分類されている菌株を用い、また、*P. tenue*と形態的に同定されているものの2-MIB非產生のM貯水池から分離された菌株を用いた。また、同様にジオスミン產生、非產生の*A. spiroides*は関東地方のS湖からの2株を用いた。さらに、地球・人間環境フォーラムから購入した*P. tenue*(Meneghini)NIES-512株と*A. spiroides*(Kiebahn)NIES-76株を比較のための標準菌株とした。*O. limnetica*(Lemmermann)NIES-36株についても同フォーラムより入手

した。菌株はいずれも250 ml, C T培地で2〜3週間、25℃、1,500 lux光照射下で純粋培養した。以下の研究方法は、図-1に従って行った。

3. 研究結果

目的の16SrDNA断片は、PCR法を用いて微量な染色体から短時間で増幅することができた。PCR産物は、T-A'ク'とカ'セクション法により迅速にク'ニングすることができた。

相同性解析の結果を表-1に示し、塩基配列を決定した結果の例として *P. tenue* を図-2に示す。ここで、一番上段には、大腸菌の16SrRNAの1264-1406の部位の塩基配列を示している。2段目は、標準菌株の *P. tenue* (Wene-ghini) NIES-512株、3段目の *P. sp* 産生と記しているのは、形態的に *P. tenue* と分類されている2-MIB 産生株、4段目の *P. sp* 非産生と記しているのは、形態的に *P. tenue* と分類されているが2-MIB非産生株である。

本研究は、これまで形態的な分類しかなされていなかった藍藻類に対して16rRNAの塩基配列を比較することにより分子レベルから分類を試みたものである。今まで、形態的には、*P. tenue* または、*A. spiroides* と分類されているが、かび臭を産生しないと言う生理的には異なっている菌株があることが見つけられていた。これらは、同じ種でありかび臭を出していたものがなんらかの原因で変異が起き後天的にかび臭を出さなくなってしまったのではないかと考察されたものもあった。本研究の結果、かび臭産生株は、かび臭産生の標準菌株と高い相同性が示され、非産生株は、塩基配列に多くの違いが見出されたために、別の種であると推測され、変異説を否定する結果を示した。*P. tenue* と *O. lianetica* の相同性は、87.9%で近縁関係にはあるが、形態的な分類法と一致し異なる種であると推測される。かび臭産生藍藻の16SrRNA 塩基配列のデータの蓄積は、この属、種に特異的領域が明らかにされ、属、種特異的な'ローブ'の開発につながり遺伝子工学的手法により、より迅速に遺伝子レベル、細胞レベルの検出に役立てられるものと期待される。

4. おわりに

本実験を遂行するにあたり、伊藤裕之氏、田中和明氏から菌株を譲り受けたことを記し感謝する。

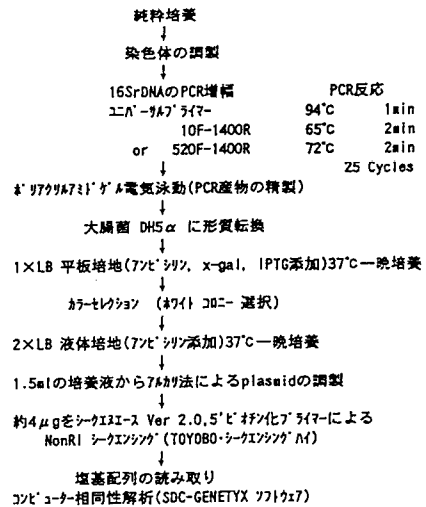


図-1 16SrRNAユニバーサルプライマー-PCR、NonRI シーケンシング法による塩基配列の決定

表-1 かび臭産生、非産生藍藻の16SrRNAの相同性

	<i>P. sp.</i> 0池 産生	<i>P. sp.</i> W池 非産生	<i>O. lianetica</i> NIES-36
<i>P. tenue</i> NIES-512	93.1%	73.1%	87.9%
	<i>A. sp.</i> S池 産生	<i>A. sp.</i> S池 非産生	<i>A. sp.</i> DB
<i>A. spiroides</i> NIES-76	98.6%	78.6%	93.1%

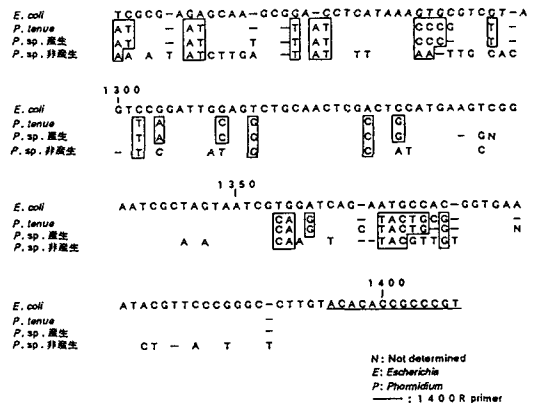


図-2 *P. tenue* と2-MIB産生、非産生株の16SrDNA部分塩基配列の比較 (1264-1406 *E. coli* 16SrRNA 参照)