

かび臭物質および毒物産生藍藻類の 16S-rRNA 塩基配列に基づく系統発生分類

○東北学院大学工学部 正会員 石橋 良信
東北学院学大学院 梅津 洋
前澤工業株式会社 正会員 及川 栄作

1. はじめに

湖沼の富栄養化に伴って発生するアオコは藍藻が異常増殖した様のことである。この藍藻の中には異臭(かび臭物質)や毒物(アオコ毒)を産生する種が知られている。藍藻によって産生されたかび臭や毒物は水道水に混入して、人々に不快な異臭味水の被害や健康に影響を及ぼす懸念があり、安全でおいしい水供給の観点から、その発生状況の現状把握や分析法の確立が早急に求められている。

本研究者はこのような藍藻によるかび臭や毒物の大量発生メカニズムの解明や発生予防対策に役立つ目的でかび臭を高感度で迅速に測定できるセンサーの開発や、これらの物質を産生する藍藻類の 16S リボソーマル RNA(16S-rRNA)の塩基配列に基づく系統発生分類を試みている。本研究では以前のデータに加えてかび臭物質 2-Methyisoborneol (2-MIB)および Geosmin を産生する藍藻類や毒物 Anatoxin-a や Cylindrospermopsin を産生する藍藻類の 16S-rRNA 塩基配列に基づく分類を行った。特にかび臭産生藍藻類に関しては釜房湖に特異に棲息する 9 株の野生株藍藻類について試みた。また、Anatoxin-a を産生する藍藻類は *Anabaena flos-aquae* NIES-73 株、Cylindrospermopsin を産生する藍藻類は *Cylindrospermopsis rachiborskii* 野生株を用いた。

2. 実験方法

1) 2-MIB 産生の供試菌株は釜房湖から単離された藍色の A 株(冬場単離)、D 株、KG1 株、S 株、T 株、Y 株であり、2-MIB 非産生株で藍色の C 株および KB1 株である。Geosmin 産生の供試菌株は、*Anabaena macrospora* 野生株および、地球・人間環境フォーラム(NIES)から譲与された *Anabaena circularis* NIES-41, *Anabaena spiroides* NIES-76 を用いた。*Phormidium tenue* NIES-512(愛知)株と NIES-611(琵琶湖)株および *Anabaena circularis* NIES-21 株は対照の標準菌株として用いた。各々の藍藻は 50~200ml の CT 培地で、蛍光灯を照射して静置培養した。

2) トータル DNA の調整と 16S-rRNA の塩基配列の決定は次の手順で行った。トータル DNA は菌体にリゾチーム処理、SDS-Proteinase K 処理、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行って調整した。PCR の反応条件は 94 °C 1 分、60 °C 45 秒、72 °C 45 秒を 25 サイクルであり、プライマーは藍藻特異性プライマー、520F および 1400 R を用いた。PCR 産物は pGEM-Tvector (プロメガ)に挿入し、大腸菌に導入してクローン化した。塩基配列は 310 Genetic Analyzer (パーキンエルマー)を用いて決定し、その相同性解析や系統樹作成は遺伝情報解析 Genetyx MAC ver.8 を用いて行った。

3. 実験結果

図 1 は系統樹解析ソフト genetic MAC ver8.0 による NJ 法を用いて作図したものである。系統樹から、毒性・かび臭産生藍藻類は大きく 2 群に分けられ、ほぼ同時期に分岐している。また、*A. flos-aquae*, *C. rachiborskii* の 2 種のグループは毒性産生藍藻類で、その他はかび臭産生藍藻類に分けられるのは興味深い。その中でも *Anabaena circularis*, *A. spiroides*, *A. macrospora* の 3 種は Geosmin を、*Oscillatoria tenuis*, *Phormidium tenue*, 2 種は 2-MIB を産生するものに分類された。

キーワード：16S-rRNA、かび臭、系統樹、藍藻

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1 丁目 13-1 TEL022-368-7418 FAX022-368-7070

Oscillatoria の属するグループと *Anabaena* 等の属の系統は、はるかに離れた関係にあるといわれており、本解析でも異なった系列のもとに成立したことを立証している。*C.rachiborskii* は *Anabaenopsis circularis* は近縁にあるといわれているが、むしろ *Anabaena flos-aquae* に近いことが明らかになった。さらに、図には示してはいないが Microcystin を産生する *Microcystis* 属は *Phormidium* 属や *Oscillatoria* 属に近い関係にあることが示された。

図 2 は、UPGMA 法を用いて作成した釜房湖の *P.tenue* の 16S-rRNA 塩基配列に基づく系統樹を示している。系統的に釜房湖の *P.tenue* は大きく分けて 2 群に分けられ、さらに細かく分けると、図に示すように 4 群に分けられることが示された。4 群に分けた場合、1 つ目のグループは冬場に見られる A 株と D 株および KG1 株の 3 株が分類された (I 群)。2 つ目のグループは NIES-512 株を含む S 株と T 株と Y 株が分類された (II 群)。3 つ目のグループはいずれも褐色で 2-MIB を産生しない C 株と KB1 株および NIES-611 (2-MIB 産生有無は未確認) は分類された (III 群)。4 つ目のグループは藍色であるが 2-MIB を産生しない B 株が分類された (IV 群)。このように 16S-rRNA の遺伝子型に基づく分類は、冬場に見られる株や褐色株、さらに 2-MIB の産生の有無で示される表現型の特徴も分類している。それと同時に、この事実は培養条件によって藍色から褐色に変化する現象とは別に遺伝的に異なる種がもともと湖に棲息していることを示している。

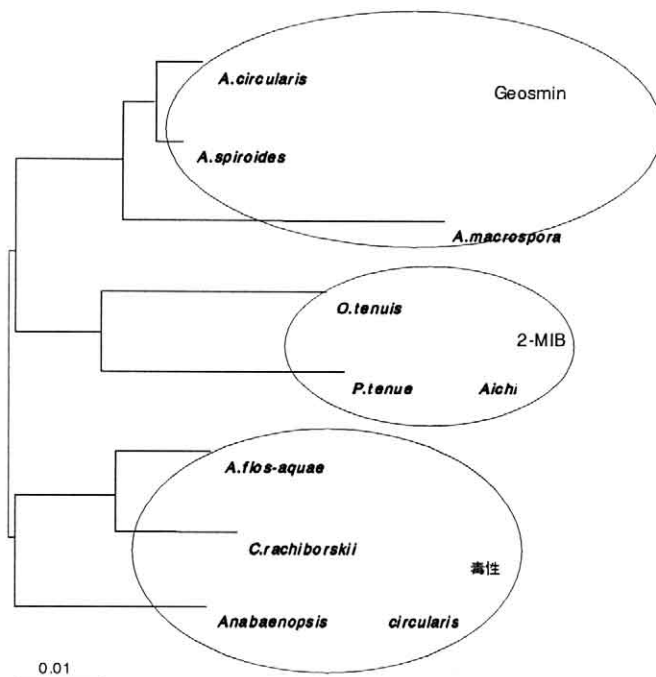


図 1 毒素産生藍藻類の系統樹

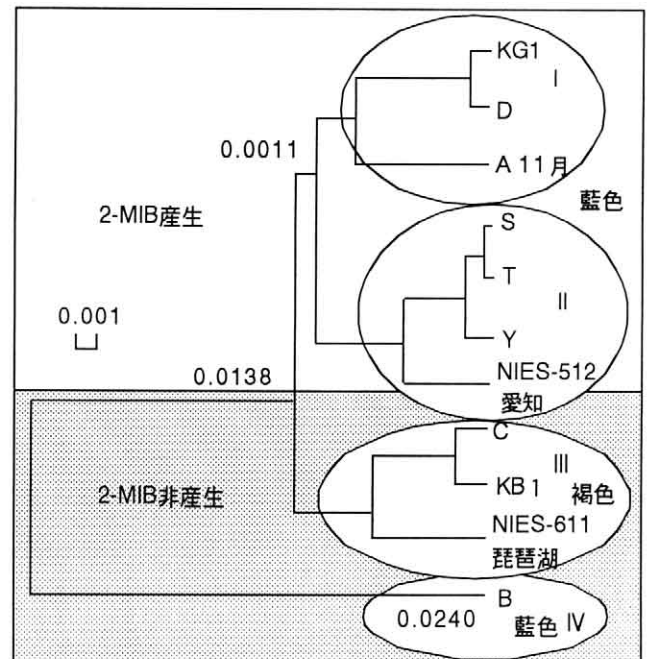


図 2 釜房湖の藍藻類の系統樹

4. おわりに

本研究によって、かび臭物質や毒物産生藍藻類を系統的に分類することができた。特に、釜房湖のかび臭産生藍藻類は系統分類によって、かび臭を出す種と出さない種に分類することができた。これらの種にはそれぞれ種特異的な塩基配列の存在も示されている。今後は、種特異的な塩基配列部位を PCR プライマーに用いて、かび臭物質や毒物産生藍藻類を迅速に選別して、発生状況に対応した水処理に役立てて行きたいと考えている。