

アオコ化する野生型 *Microcystis* の浮揚と遺伝子発現との関係

静岡理科大学 正会員 ○牧野 育代
芝浦工業大学 非会員 矢作 裕司

1. はじめに

世界中の淡水域で猛威を振るう有害アオコの正体は、水面に高密度に集積した野生型 *Microcystis* である場合が多い。野生型 *Microcystis* は暖かくなると光エネルギーを利用して生命活動を活性化し、やがて、水面に浮揚することで高密度に細胞群体が集積し厚いバイオフィルムに覆われてアオコ化に至る。しかしながら、無菌状態の継代株 *Microcystis* は環境要因の条件を同じにしても細胞群体をほぼ形成しない¹⁾。このことは、アオコは野生型 *Microcystis* 特有の形態であることを意味する一方でなぜ、乾燥や栄養をめぐる競争にも不利なアオコのような形態を作るのかという問いを生じさせる。一般的に、水棲の微生物や細菌は鞭毛やガス胞といった水中での運動や移動を可能にする機能遺伝子を有することで常に浮上する状態を回避し、乾燥や狭い空間の限られた栄養塩をめぐる競争から身を守る。ただし、*Microcystis* に限っては、ガス胞遺伝子の発現を調節して鉛直移動するものの、増殖するうちに水面に浮揚（アオコ化）し、命を危険にさらしている。生き物の最大の目的は生命の維持だが、それに反するようにアオコ化する理由については明らかになっていない。このような背景より本報では、生息水深の違いに見られる遺伝子発現の変化について、*Microcystis* 属の RNA-seq 解析²⁾ を用いて検討する。

2. 湖水の採取と遺伝子情報の取得

遺伝子解析については、アオコ発生時の2019年9月にダム貯水池流入部において採取した試水を実験に供した。試水の採取は水面および水中30cm深について、午前7時と午後2時とに行った。各試水は採水後、室内においてガラスフィルター（GF/F）でろ過し、ろ紙上の懸濁物質を遺伝子解析の対象物とした。また、分取した試水を顕微鏡観察して、採取地点において優占種は *Microcystis* であったことを確認した。本解析では次世代シーケンシングシステムを用いた。ろ紙上の懸濁物質について total RNA を抽出後、1μg の total RNA に対し Ribo-zero Kit (Illumina, USA) を用いて大量に存在するリボゾーム RNA を除去して RNA を一定量にした。遺伝子のクローニングに用いた cDNA のライブラリー調製については、20ng/μL の total RNA に対し、ライブラリー調整試薬 TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, USA) を用いた。次世代シーケンス解析は、HiSeq4000 (Illumina, USA) を用いて、ペアエンド(100 bp×2)でシーケンス配列とクオリティーが記載された Fastq ファイルを取得した。クオリティーチェックはプログラム Fastqc により品質上問題ないことを確認した。遺伝子発現解析は *Microcystis aeruginosa* NIES-843 (以下、*Microcystis a.*) のゲノム配列を参照配列とする RNA-seq assembly を行った。発現定量値の計算には、FPKM 値 (Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped) および TPM 値を用いた。遺伝子データ解析に用いる情報は、主に、生命システム統合データベースの KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>) から取得した。KEGG データベースに登録されている生物種のゲノム情報を基にアルゴリズム Blastx を用いて DNA の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性検索を行った。

3. 結果

表1に、検体に含まれる遺伝子情報より得た生物種とその全体に占める割合とを示す。その割合が多い順に *Microcystis a.* (35%)、*Microcystis panniformis* (32%)、*Anabaena sp. wa102* (3%) であった。3位以下の生物種が占める割合はわずかで有り、生物として機能するだけの遺伝子を発現していないと考えられることから、試水の採取時は、全体の67%を占めた *Microcystis* 属が優占種であることを遺伝子解析においても確認した。表

キーワード アオコ, *Microcystis*, 遺伝子発現, RNA-seq 解析

連絡先 〒436-8555 静岡県袋井市豊沢 2200-2 静岡理科大学理工学部機械工学科 TEL 0538-45-0142

2に、検体ごとの機能推定遺伝子における1位～8位の遺伝子発現量 (TPM 値) を示す。なお、紙面の都合上、9位以降の発現量については本文のカッコ内に示した。どの検体も光合成に関する機能遺伝子群が上位を占めた。特に、午後2時水面ではその遺伝子群の発現量は倍増した。機能遺伝子を個別に見ていくと、ガス胞遺伝子は、午前7時水中30cmにおいて他の検体より半減している。エネルギー合成 (F-type ATPase) は、午前7時水面より順に、17,163, 12,456, 5,049 (20位) および3,355 (26位) であった。また、午前7時および午後2時の水中30cmでは、tmRNAの発現量が遺伝子発現量全体の4割以上を占めた。

4. 考察

試水採取当日のアオコ化の動態として、*Microcystis* は午前2時ごろからゆっくりと浮上しはじめ午前8時には水面を覆うほどになり、昼にかけてマット状のアオコを形成していった。午後2時ごろからは分散しはじめ、午後4時には水面にまばらに漂う程度にまで減少した。光合成に関する機能遺伝子群は、日射の強くなる午後の水面において受光を促進することが見て取れる一方で、午前7時水中30cmではわずかながら発現量が低下した。日中のシアノバクテリアにおける主なエネルギー合成システムは光合成システムを介して駆動する。このため、水面と比べて水中では入射光の相対的に減衰が生じることでエネルギー合成 (F-type ATPase) の遺伝子発現量が減少したと考えられる。細胞内構造の一つであるガス胞の機能生成によって得た浮力はエネルギーの消費を伴わずに *Microcystis* を水面近傍へと浮揚させアオコの形成を促進する³⁾。午前7時水中30cmでは、ガス胞遺伝子の発現量が他の検体と比べて半量程度に低下しており、十分な浮力を得られず水中に留まっているものと推測される。これら鉛直方向の水面～水中30cmにおける入射光の減衰、水圧の変化がもたらす水環境の差によって、日中の *Microcystis* は鉛直移動を可能にしているものと考えられた。

表1 遺伝子解析検体の遺伝子の含有量と生物種

順位	生物種	FPKM 値 (total:1,741,827)	全体に占める割合 (%)
1	<i>Microcystis aeruginosa</i>	610,238.6	35.03
2	<i>Microcystis panniformis</i>	561,028.3	32.21
3	<i>Anabaena sp. wa102</i>	51,570.5	2.96

表2 機能推定遺伝子とその遺伝子発現量の検体間比較 (各検体の TPM total:1,000,000)

順位	午前7時 水面		午前7時 水中30cm		午後2時 水面		午後2時 水中30cm	
	機能名	発現量 (TPM 値)	機能名	発現量 (TPM 値)	機能名	発現量 (TPM 値)	機能名	発現量 (TPM 値)
1	ガス胞	25,341	tmRNA	405,393	光合成	56,067	tmRNA	427,327
2	光合成	21,326	光合成	17,545	光合成	46,392	ガス胞	25,345
3	光合成	19,101	光合成	16,651	光合成	42,132	光合成	17,199
4	光合成	18,232	光合成	12,856	光合成	39,083	光合成	17,179
5	エネルギー合成	17,163	光合成	12,621	光合成	27,818	光合成	16,784
6	光合成	16,350	エネルギー合成	12,456	光合成	26,000	光合成	14,855
7	光合成	15,425	光合成	12,121	ガス胞	23,786	光合成	13,288
8	光合成	13,888	ガス胞	12,072	rRNA	14,155	光合成	12,293

6. まとめ

本研究ではアオコ形成種の *Microcystis* を対象に遺伝子発現解析を行った。その結果、走光性のみでは説明できない *Microcystis* の振る舞いは一見、整合性がないようであるが、水環境がもたらす物理量の変動に反応していた。今後は、水環境を構成する物理因子と遺伝子情報とを用いて、アオコ発生の条件を明らかにしたい。

参考文献

- 1) Ana Conesa, Pedro Madrigal, Sonia Tarazona, David Gomez-Cabrero, Alejandra Cervera, Andrew McPherson, Michał Wojciech Szczesniak, Daniel J. Gaffney, Laura L. Elo, Xuegong Zhang, Ali Mortazavi: A survey of best practices for RNA-seq data analysis, *Genome Biology*, vol.17, Article number: 13, 2016.
- 2) Min Zhang, Fanxiang Kong, Xiao Tan, Zhou Yang, Huansheng Cao, Peng Xing: Biochemical, morphological, and genetic variations in *Microcystis aeruginosa* due to colony disaggregation, *World J. Microbiology Biotechnol.*, vol.23, pp.663-670, 2007.
- 3) Alyssa Mlouka, Katia Comte, Anne-Marie Castets, Christiane Bouchier, Nicole Tandeau de Marsac: The Gas Vesicle Gene Cluster from *Microcystis aeruginosa* and DNA Rearrangements That Lead to Loss of Cell Buoyancy, *J Bacteriol.*, vol.186, pp.2355-2365, 2004.