

かび臭産生藍藻*Anabaena* 属の遺伝子工学を適用した分類方法の検討

東北学院大学大学院 学生会員 ○村上将也 フェロー会員 石橋良信

1 はじめに

高度浄水処理が普及した現在では異臭味水被害人口は減少傾向にあるが、中小の水道事業体では、コストや施設上の理由から導入が難しく、一方、依然として貯水池では原因となる藻類が異常増殖しており、根本的な解決に至っていない。水道における異臭味被害の大部分は、かび臭問題であり藍藻類あるいは放線菌のある種により産生されるかび臭物質 2-MIB や geosmin に起因している。かび臭物質は極微量含まれているだけで人に不快感を与える。

従来貯水池で増殖し、かび臭物質産生する藍藻類の分類は検鏡による判定が主であった。そのため、*Anabaena* 属を対象に遺伝子工学的手法を用いて簡便に分類する手法を検討することを目的とし、16S rRNA 遺伝子 23S rRNA 間のスペーサー部位や 16S rRNA 遺伝子を用いて遺伝子分析を行なった。遺伝子工学的な分類のうち、*Phormidium* 属は 16S rRNA 遺伝子が適用できるが、*Anabaena* 属は相同性が高く 16S rRNA 遺伝子は使えない。

Anabaena 属は 16 rRNA 遺伝子の相同性は 100%に近く、16S rRNA 遺伝子による種の特特定は困難である。gyr B や RNA polymerase 等の特異的特定手法もあるが、本研究では、16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子の間のスペーサー部位（以下スペーサー部位）を利用して *Anabaena* 属の種特定の可能性を模索した。なお、課題は緒についたばかりであり、方向性を中心に報告する。

2 実験および解析方法

解析は、スペーサー部位の塩基配列の決定、相同性解析および tRNA の有無の確認、塩基配列の決定、系統樹の作成の流れで行った。解析に使用したネット上からの遺伝情報は「NCBI」のデータベースを用い、かつ菌株の 16S rRNA 遺伝子から F プライマー、23S rRNA 遺伝子から R プライマーを設計して塩基配列を決定する。なお、菌株は国立環境研究所微生物系統保存施設から購入した。

3 実験結果および考察

3-1 スペーサー部位を適用した種の同定

遺伝情報は「NCBI」のデータベースから特異性をそれぞれ確認できたが、研究者によって属種の見極めが異なっており、同じ属種でも塩基配列の違いが見受けられた。そのため、菌株を国立環境研究所微生物系統保存施設から購入し、自らスペーサー部位の塩基配列をクローニングし、決定した。なお同定した 5 種の *Anabaena* 属は以下に記す。

1. *Anabaena circinalis* NIES41
2. *Anabaena cf. lemmermannii* NIES 1674
3. *Anabaena flos-aquae* NIES75
4. *Anabaena spiroides* NIES77
5. *Anabaena solitaria* NIES80

3-2 *Anabaena* 属の相同性

かび臭産生物質を産生する *Anabaena* 属は現在 8 種確認されている。図-1 にそのうちの 5 種のスペーサー部位の塩基配列の相違を示す。途中段階ではあるが、特異的箇所を確認しつつ、その構造の違いから種を同定することができた。

具体的に、スペーサー部位 400～500 bp の塩基配列は異なっており、その中に tRNA に対応するアミノ酸がみられた。tRNA に対応するアミノ酸は tRNA-Ile と tRNA-Ala の組み合わせが確認できたが、スペーサー部位に tRNA が存在しない種も見受けられた。この結果より、スペーサー部位は相同性 70%前後と、16 rRNA 遺伝子と比較して、特異性があきらかになった。

3-3 系統樹

図-2 は *Anabaena* 属 5 種における系統樹である。tRNA の有無や位置の違いから、特異的部分が多いことがあきらかになった。また図としては載せていないが、16S rRNA 遺伝子で作成した系統樹よりも、より明確に分類できている。

4 おわりに

Anabaena 属を対象に、16S rRNA 遺伝子 23S rRNA 遺伝子間に位置するスペーサー部位を用いて分類を行なった結果、種が保持する特異的な塩基配列が多く、検出に利用できることが示された。また、スペーサー部位を詳細に解析することで、アミノ酸を合成する際に必要である tRNA-Ile や rRNA 遺伝子-Ala の有無や位置の違いが明らかになり、*Anabaena* 属を分類するために有用であることを確認したことから、種特異的プライマーおよび種特異的 PCR を開発が可能であり、貯水池に増殖する *Anabaena* 属を含む検水から容易に属種を把握することも可能であり、強いては、かび臭物質産生藍藻類の抑制、さらに、かび臭の予測にも貢献できると思われる。

参考文献

村上将也, 石橋良信, 及川栄作: 16S rRNA と 23S rRNA 遺伝子間のスペーサー部位を適用した *Anabaena* 属の分類, 第 59 回全国水道研究発表会, pp.510-511, 2008-5.

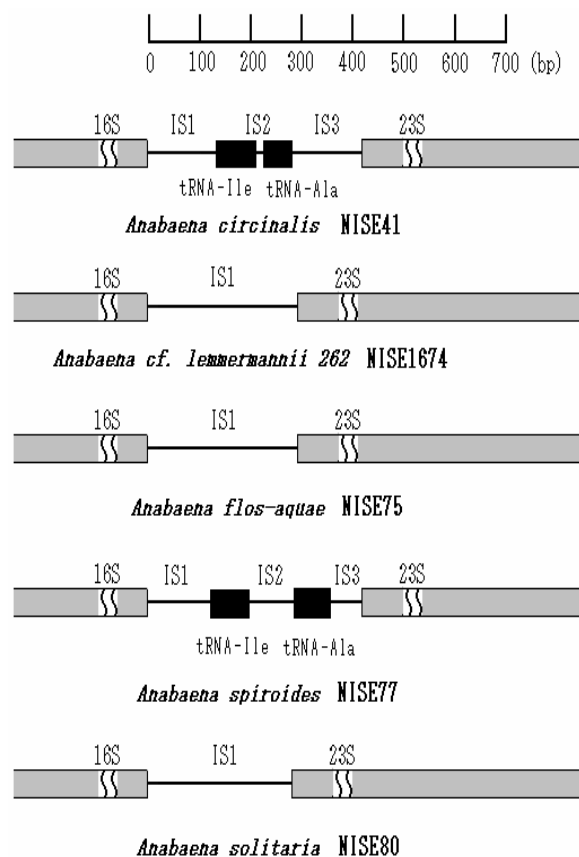


図-1 スペーサー部位による *Anabaena* 属の分類

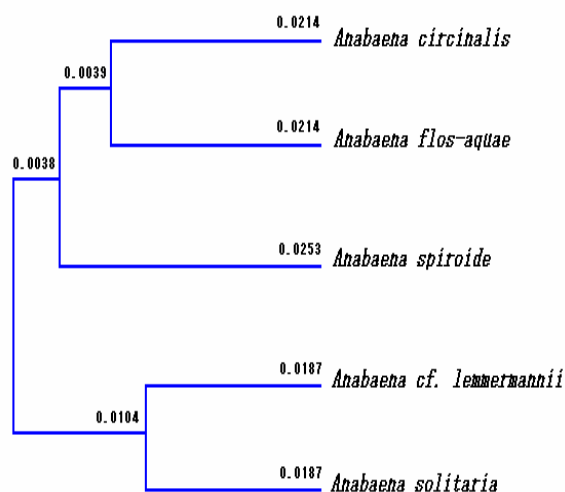


図-2 *Anabaena* 属スペーサー系統樹