

(19) かび臭および毒素産生藍藻類の系統発生的分類

Phylogenetic classification of musty odor and/or toxic compounds
producing cyanobacteria

及川栄作*、石橋良信**、阿部隆弘***、梅津 洋***

Eisaku OIKAWA*, Yoshinobu ISHIBASHI**, Takahiro ABE***, Hiroshi UMETSU***

ABSTRACT : The scientific technique such as genetic engineering is important in both classification of the cyanobacteria and analysis of the evolution process. The purpose of this research was to decide the base sequence of such cyanobacteria by 16S ribosomal RNA for the classification and its applications.

From the result of the experiments, the base sequences of musty odor and toxin producing cyanobacteria were determined, and cyanobacteria have many species specificity. Moreover, cyanobacteria were identified by PCR and FISH methods using probes with different species specificity. Musty odor producing cyanobacteria and toxic compound producing cyanobacteria were divided into two groups in phylogenetic tree. The former also could divide two groups, one was 2-methylisoborneol producing group and another was geosmin producing group. It is interesting when evolution is argued.

It was found out that the various forms of *Phormidium tenue* existed in Kamafusa Lake from the base sequences and its phylogenetic tree. For example, dark-brown *P. tenue* does not change from the indigo-blue *P. tenue*. Furthermore, occurrence of musty odor of summer and winter is caused by different *P. tenue*.

KEYWORDS : Cyanobacteria, musty odor, 16S ribosomal RNA, PCR, phylogenetic tree

1. はじめに

貯水池での藻類の増殖は景観を損なうのみならず、ある種は凝集阻害や過閉塞等の浄水障害を与え、また THM 生成をも促している。さらに、かび臭や毒素を産生して、水道水として不快感を与えたり、健康上の問題を生じさせる等の弊害をもたらす。したがって、藻類、中でもかび臭物質と毒素を産生する藍藻類の分類上の位置付けを明確にすることは、水道に係わる水質管理を行う上で重要なことと考える。

1980 年代後半、藍藻類の生理学的な特徴を見直し、Blue-green algae (藍藻類) は細菌類の 1 つのグループとして位置付けられ、Cyanobacteria (藍細菌) とも呼ばれるようになった。しかし、植物学者は未だ藍藻類の名称を使い、生理学者は藍細菌を用いており、使い分けが必要である。藍藻類の同定は依然として検鏡によっているが、判別には熟練を要する。また、識別する「鍵」は形や大きさのみで行われるので人による個人差が生じ、明確に分類することは困難である。このような現況の中、遺伝子工学を駆使した分類がみられるようになってきた。

遺伝子工学の適用は、微生物による汚染地域、水域の特定や有害物質の浄化による環境修復、またバイオセンサーの開発など環境微生物の分野では重要な手段になっている。水道を対象とした場合も、貯水池での微生物の分類や動態、また例えば、かび臭物質産生機構の解明など微視的な面から現象を知る道具と

* 前澤工業株式会社環境事業本部 (Research and Development Sect. Maezawa Industries, Inc.)

** 東北学院大学工学部 (Faculty of Eng., Tohoku Gakuin University)

*** 東北学院大学大学院工学研究科 (Graduate School of Eng., Tohoku Gakuin University)

して、さらには特別な菌の検出など応用範囲は多岐にわたる。

本研究では、かび臭等の問題を遺伝子レベルで解明する研究の一環として、未だ明らかにされていないかび臭と毒素を産生する藍藻類の、16S-rRNA による塩基配列を決定した。この塩基配列は分類や応用に供するのに十分な長さを有している。応用例としては、PCR と FISH 法を用いてターゲット藻類を混合系の中から判別する手法を検討するとともに、系統樹を作成して各藍藻類の進化過程とその位置付けを明らかにした。

2. 実験方法

2.1 培養株

2-methylisoborneol (2-MIB) 産生の培養株は、釜房湖から単離された藍色を呈する A 株 (冬季採取)、D 株、KG1 株、S 株、T 株、Y 株であり、2-MIB 非産生株は褐色の C 株および KB1 株などである。また、地球・人間環境フォーラム (NIES) から譲与された *Phormidium tenue* NIES-512 (愛知) 株と NIES-611 (琵琶湖) 株、*Phormidium tenue* NIES-30 および *Oscillatoria tenuis* NIES-33 を対照の標準株として用いた。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からの *Anabaena circularis* NIES-41、*Anabaena spiroides* NIES-76 である。毒性産生藍藻類としては、*Anabaena flos-aquae* NIES-73 を、野生株 *Cylindrospermopsis rachioborskii* はタイ国南部の貯水池から採取した他、*Anabaena circularis* NIES-41 をかび臭産生との共通株として用いている。さらに、*Anabaenopsis circularis* NIES-21 株を *C. rachioborskii* との比較のために採用した。なお、*C. rachioborskii* は肝臓毒の cylindrospermopsin を産生することからタイで懸念されている藍藻である。各々の藻類は 50~200 ml の CT 培地 (*C. rachioborskii* は MA 培地) で、培養温度 25 °C、照度 1,500 lux の連続照射のもとで静置培養した。

2.2 核酸配列ファイル

トータル DNA の調製と 16S-rRNA の塩基配列の決定は以下の手順で行った。トータル DNA は培養株にリゾチーム処理、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製した。DNA シークエンサーによる迅速微生物同定法のフローチャートを図-1 に示す。遺伝子操作は特に断わりのない限り J. Sambrook¹⁾ および鈴木・山本²⁾ らの方法に準拠した。

原核生物細胞のタンパク質合成の場であるリボソームを構成する分子のうち、リボソーム RNA (rRNA) は 23S, 16S, 5S (S: 沈降速度) の 3 つに分けられる。藍藻類の rRNA 遺伝子群の塩基配列は、*Anacystis nidulans* で明らかにされており、構成は原核生物の大腸菌に類似する。一方、真核生物のタバコ葉緑体に塩基配列の相同性が高いことが知られている。

16S-rRNA は、塩基配列を決定するのに取り扱いやすい 1,500 b (base: 塩基) ほどの大きさでありながら生物種によって共通なユニバーサル部位と呼ばれる全生物、真核生物、真正細菌、古細菌などにそれぞれ保存性の高い部位が存在する。ユニバーサルな部位は直接 16S-rRNA の塩基配列を決定する際のシーケンシングプライマーとして使用されたり、16S-rRNA を逆転写酵素 (Reverse Transcriptase) 反応をさせて相補鎖 DNA を合成後 PCR により増幅する PT-PCR に応用される。

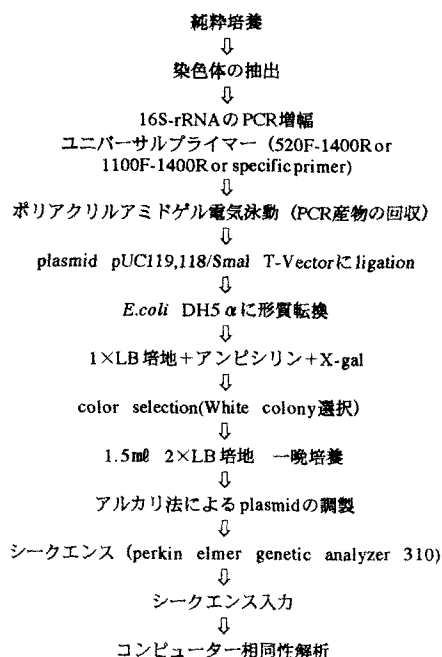


図-1 16S-rRNA のシーケンスのフローチャート

また、染色体の 16S-rDNA を PCR により特異的に増幅する際のプライマーとしての使用もなされている。微生物の 16S-rRNA 塩基配列のデータは多く、塩基配列の比較による微生物の分類がなされる。この情報をもとに属、種特異性の高い部位を見積もることができる。この部位は、遺伝子工学的手法の特定の遺伝子検出法であるハイブリダイゼーションのプロープとして特定の属、種のための検出法にも使用されている。

16S-rRNA 遺伝子の増幅のための PCR の反応条件は以下の 2 つの条件を行った。PCR クローニングを行う際は 94 °C 45 秒、60 °C または 65 °C 45 秒、72 °C 2 分を 25 サイクル、さらにアデニン付加反応として 72 °C 10 分を 1 サイクルで行い、種特異的 PCR を行う際は 94 °C 30 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1 分を 25 サイクルで行った。プライマーは 520F および 1400R、または 520F および APU1350R を PCR クローニングに使用した。また、YST1000F と PTU1240R プライマーは *P.tenue* 種特異的 PCR に用いた (塩基配列は 3.2 参照)。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 (パーキンエルマー社製) を用いて決定した。

2.3 系統樹の作成³⁾

本研究では系統樹解析ソフト GeneticMAC Ver 8.0 によって系統樹を作図した。UPGMA 法 (unweighted pair-group method using arithmetic averages) は、各 OTU (operational taxonomic unit、操作的分類単位；系統解析において、解析対象となる分類単位。属・科などの上位分類群、種 (亜種) や地域集団を代表する個体などが OTU として用いられる) 間の距離を平均し、距離の近いものからボトムアップして作成する。Node に接続される枝の長さはお互いに等しいと仮定、すなわち、進化速度が一定であることが前提になっている。NJ 法は、最小の枝長を持つ近接関係にある OUT を見つけ、次に OTU を合体させることを繰り返して系統樹を作り上げていく。

数値はサイト (マルチアライメントの縦列) 当たりの塩基配列数を表している。図中、進化速度が一定と仮定すれば横線で示した長さは時間で表現した進化距離と同等となる。したがって、進化距離である長さが短いとき、塩基置換数は少なく同じ種である可能性が高くなる。いいかえれば、対象個体同士が互いに近縁であるような場合、塩基置換数が少なく信頼度が少ないことになるが、この状況では塩基配列の相同性も加味して評価することになる。

なお、進化でみるときは NJ 法 (Neighbor-Joint 法：近隣結合法)、最尤法などの適用が一般的であり、分類を重視する場合 UPGMA 法を用いることも可能である。

3. 実験結果および考察

3.1 16S-rRNA による塩基配列の決定

今回解析に供したかび臭および毒素産生藍藻類の 16S-rRNA による解析から得られた代表的塩基配列を図-2 に示す。

求めた塩基数はそれぞれ 1,000 ベース程度であり、それ自身が供試藍藻を表現するものである。また、系統樹の作成および進化過程をみるのに十分な長さと考えられる。一方、塩基配列中には種特異的な部位が存在している。この部位は、種々の藍藻類に当てはめることにより、属種の分類 (同定) を図るのに有用となる。なお、すべての解析結果は国立遺伝研究所のデータベースに登録しており、その Accession Number は図-2 の下段に表示してある。

3.2 PCR 法および FISH 法による *P.tenue* の判別、定量への応用

(1) PCR 法

かび臭産生藍藻類属および種特異的な部位の塩基配列は、本研究で決定した塩基配列とデータベースに登録してある微生物の塩基配列を比較することによって見積もることができる。そこで *P.tenue* と他の藍藻類を比較した結果、*P.tenue* に対して 4 箇所の種特異性の高い部位を見いだした。これらの部位に対するオリゴヌクレオチド DNA を PCR プライマーとして用いた。なお、PCR クローニングに用いたユニバーサルプライマー 520F; 5'-GCCACG(AC)GCCGCGGT-3' と 1400R; 5'-ACGGGCGGTGTGT(GA)C-3' または本研究で

1 GCCACG--CGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTA---GGCTGTT-AGTAAGTCTGTTGTCAAAGCGG-AG---GCTCAAC---CT---TGTAAGGCAAT 635
2 GCCACC--CGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-ATA---GGCTGTTA-ATAAGTCTGTTGTCAAAGCGG-AG---GCTTAAC---CT---TGGAAGGCAAT
3 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTA---GGCTGTTA-ATAAGTCTGTTGTCAAAGCGG-AG---GCTCAAC---CT---TGGAAGGCAAT
4 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
5 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
6 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
7 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
8 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
9 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
10 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT
11 GCCA--CG--AGCCGCGGTAAGACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGAATATTGGGCGTAAAGCGTAC-GTCAAGGT-G-GTT-GGAACAAGTCTGCTGTCAAAA--GGCG-G--GAGCTTAA---CT---CGGTAAAGCGCGGT

1 GGAAACTGTCT---GA-CTAGAG-A-GAGATAGGGG-CAG-GA-GGAATT-C-CAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA 758
2 GGAAACTGTCT---GA-CTAGAG-A-GAGATAGGGG-CAG-GA-GGAATT-C-CAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
3 GGAAACTGT-TA---GA-CTAGAG-A-GAGATAGGGG-CAG-GA-GGAATT-C-CAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
4 GGAAACTGT-TAC-GA-CTAGAGTACG-G-TAGGGGTC-GCG---GGAATCCCA-GTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
5 GGAAACTGT-TAC-GA-CTAGAGTACG-G-TAGGGGTC-GCG---GGAATCCCA-GTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
6 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---CGGCTAGGGG-CAG---AAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
7 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---CGGCTAGGGG-CAG---AAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
8 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---CGGCTAGGGG-CAG---AAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
9 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---TTGCTCGGGG-CAG---GAAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
10 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---TTGCTCGGGG-CAG---GAAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA
11 GGAAA---CTACAGAACTAGAGT---TTGCTCGGGG-CAG---GAAGGAATT-CTCTGTTAGCGGTGAATGCGTAGATATCT-GGAAGAACAACAGTGGCGAAAGCG-TC-CTG-CTGGA-TCTC---AACTGACGCTGA

1 -AGTCAAGAACTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGCCGTATGACCCCGTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG 896
2 -AGTCAAGAACTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGCCGTATGACCCCGTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
3 -AGTCAAGAACTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGCCGTATGACCCCGTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
4 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGCCGTATGACCCCGTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
5 CAGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
6 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
7 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
8 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
9 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
10 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG
11 -GGGACGAAAGCTAGGGGAGCGGAATGGGATAGATACCCAGTAGTCTAGCGGTTAAACGATGGTACTAGGTGTTGGGATGATGACCTCAAGTGGCTAGTCAACGCGCTTAAGTACCCCGCTGGGAGTACGCTG

1 ---GCAAGAT-TGAAGATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A----- 1019
2 ---GCAAGAT-TGAAGATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
3 ---GCAAGAT-TGAAGATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
4 ---GCAAG-TGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
5 ---GCAAG-TGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
6 AGCGAA-GTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
7 AGCGAA-GTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
8 AGCGAA-GTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
9 AGCGAA-GTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
10 AGCGAA-CTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----
11 AGCGAA-CTGTGAAATCAAGGAATGACGGGGGCGGCAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAAATCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACAT-GTGGCGAA---TCTT-CTTGAAA---GGG-A-----

1 -GGAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGTAT-TAGTGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A-- 1150
2 -GGAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGTAT-TAGTGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
3 -GGAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGTAT-TAGTGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
4 -GAGATGTCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
5 AAGATGTCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
6 -GAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
7 -AAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
8 -AAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
9 -AAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
10 -AAGTGCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-T-TCTAGTGGCATCA-TTAAGTGGGCACCTCT--A--
11 AAGGATGTCCTTCGGGAGC-GAACAAGTGGTGCATGGCTGTGTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-C-TATCAATGTCACCAAGTGAATGTCGGGACATCT--ATT

1 GATAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACG-CCTTGGGCTACACAGTACTACAAATGGT-GGGCAAAAGATGTCGAGG---A-T--GCGA-A-TG-CAAG 1275
2 GATAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACG-CCTTGGGCTACACAGTACTACAAATGGT-GGGCAAAAGATGTCGAGG---A-T--GCGA-A-TG-CAAG
3 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTACG-CCTTGGGCTACACAGTACTACAAATGGT-GGGCAAAAGATGTCGAGG---A-T--GCGA-A-TG-CAAG
4 G--AGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-TTGC-A-AGTCAGCG--A-TGACAAG
5 G--AGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-CAGE-A-AGTTAGCG--A-TGACAAG
6 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-AGC-A-AGCTAGGAT--G-G-CAAG
7 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-GGC-A-AGCTAGGAT--G-G-ATG
8 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-AGCTACA-C-AGCGAT--GT-CAAG
9 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-AGCTACA-C-AGCGAT--GT-GATG
10 GAGAGACTGCCG--GTGCAAAACG-GAGGAAGTGGGATGACGTCAAGTCAGATGCCCTTACGTC-TGGGCTACACAGTACTACAAAT--G-CTTCGGACAGAG--G-G-AGCTACA-C-AGCGAT--GT-GATG
11 GA-A-AGTGCCTGCTG-AGA-CGTGAGGAGGAGGAGGATGATGTCAGTCATGCTGCTGTCGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAAGCGGCAACCTCGT-C-TATCAATGTCACCAAGTGAATGTCGGGACATCT--ATT

1 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT 1405
2 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
3 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
4 CTAATCTCATAAAC--G-GAGGTGAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
5 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
6 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
7 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
8 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
9 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
10 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT
11 CTAATCTCATAAAC--G-GTCTAGTTCAGATTGACGCG-TGCAACTC-GCTTCGATGAAGCGGGAATCGTAGTAATCG--AGGTGAGCATACTGCGGTGAATACGTCCCGGGCTGTGACACACGCCCTGT

図-2 かび臭および毒物産生藍藻類の16S-rRNA塩基配列 (*E.coli* 16S-rRNA 516-1405部位)
1, *Phormidium tenue* NIES-512(AB042838); 2, *Phormidium tenue* Y(AB047105); 3, *Phormidium tenue* NIES-611(AB042842); 4, *Phormidium tenue* NIES-30 (AB042857); 5, *Oscillatoria tenuis* NIES-33(AB042844); 6, *Cyandrospermopsis raciborskii* wild-type (AB042985); 7, *Anabaena flos-aquae* NIES-73(AB042858); 8, *Anabaenopsis circularis* NIES-21(AB043537); 9, *Anabaena spiroides* NIES-76(AB047104); 10, *Anabaena circularis* NIES-41(AB042859); 11, *Anabaena macrospora* wild-type(AB047103); ()はDNA Data Bank Accession No.

Anabaena 属や *Phormidium* 属など多くのかび臭産生藍藻類に保存された配列である APU1350R; 5'-C(CT)GCAGTATGCTGACCTGC-3'はPCRのポジティブコントロールのプライマーとして用いた。DNAを添加しない試料はポジティブコントロールに用いたプライマーを使用してPCRに供し、これをネガティブコントロールとした。使用した藍藻は*A. macrospora* wild-type, *A. spiroides* NIES-76, *A. circularis* NIES-41, *A. flos-aquae* NIES-73, *Anabaenopsis circularis* NIES-21, *C. raciborskii* wild-type, *P. tenue* NIES-30, *P. tenue* NIES-512, *P. tenue* NIES-611 (茶色), *P. tenue* 釜房湖 Y 株, *P. tenue* 釜房湖 B 株 (かび臭非産生), *O. tenuis* NIES-33 である。

使用したPCRのテンプレートはそれぞれの藍藻の純粋培養液から調製したトータルDNAを上記のユニバーサルプライマーを用いてPCRクローニングした際の1 ngのプラスミドである。

図-3Aは520FプライマーとAPU1350Rを用いてPCRを行ったポジティブコントロールの結果を示している。すべての藍藻で増幅が確認された。ただし、データは示していないが*A. spiroides* NIES-76は520Fと1400Rプライマーを用いて増幅されることを確認している。図-3Bは*P. tenue*に種特異性の高いものと同定した部位のプライマー YST1000F; 5'-CGTGAATCCTCTTGAAAGGGAGG-3', PTU1240R; 5'-GTCTGGGACAAAGAGTTGCGAGCATGCG -3'を用いてPCRを行った結果を示している。*P. tenue* 釜房湖 Y 株と *P. tenue* NIES-611 のみの増幅が確認された。*P. tenue* NIES-30 と *P. tenue* 釜房湖 B 株は形態的に *P. tenue* と分類されながらPCR増幅されなかった。これは図-4および図-6の系統樹作製結果より、*P. tenue* NIES-30 と *P. tenue* 釜房湖 B 株は他のいずれの *P. tenue* と近縁な関係になく、他の *P. tenue* との塩基配列の相同性も90%未満であること、プライマーの塩基配列の相同性も低いためである。特に *P. tenue* NIES-30 は図-4より *O. tenuis* NIES-33 と近縁にあることが明らかであり、94.5%の相同性が示された。したがって、PCRによって各種かび臭産生藍藻類の中で *P. tenue* を種特異的に識別することができるプライマーをデザインすることができた。

今後は、環境水を試料にして同様にPCRを行い、*P. tenue*を検出することが可能であるか検討する考えである。もし環境水を試料にした場合と同様に *P. tenue* を検出することができれば、かび臭発生状況を迅速に捕らえて、かび臭処理に役立てることが可能になると考えられる。

(2) FISH 法

藍藻類の分類は主に検鏡による方法によっているが、蛍光オリゴヌクレオチドDNAプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法をかび臭産生藍藻分類法に適用することは、より迅速な分類と計数を同時に行うことができると考えられる。

そこで本研究では、純粋培養液および釜房湖から採取した環境水を試料に *P. tenue* の検出をFISH法によって試みた。プローブは *P. tenue* の16S-rRNAの種特異性の高いと認められた部位に対するオリゴヌクレオチドDNA、PT533R; 5'-GCGTACGTAGGCTGTTAGAT-3'を用いた。また、プローブは5'末端にx-ローダミン(赤色)またはFITC(黄色)の蛍光標識した。FISH法はAmannらの方法⁹⁾に従って行った。ハイブリダイゼーションは65℃で一晩行った。

その結果、FITCで標識したプローブを用いた場合には、蛍光顕微鏡観察下で黄色に発光し、*P. tenue*を検出することができた。しかしながら、x-ローダミンで標識したプローブを用いた場合は多くの藍藻類が細胞中の何らかの蛍光物質が赤色系の蛍光を発することから、他の種の藍藻類の混合している環境試料では *P. tenue* 以外の藍藻も赤く発光したために *P. tenue* のみを判別することが難しく、顕微鏡フィルターを変えて波長域を絞り込む等の工夫が必要がある。

3.3 かび臭、毒素産生藍藻類の系統樹と進化過程

図-4は系統樹解析ソフトGeneticMAC Ver8.0によるNJ法を用いて作図した。系統樹は、かび臭に関連する上部の2群と下部の1群に分けられ、これらは同時期に分岐している。上部の藍藻類はかび臭産生に関係し、2-MIB, geosminの大きく2群に分けられる。なお、*O. tenuis*, *P. tenue*は2-MIBを、*A. circinalis*, *A. spiroides*, *A. macrospora*の3種はgeosminを産生している。また、確信は持てないものの *A. flos-aquae*,

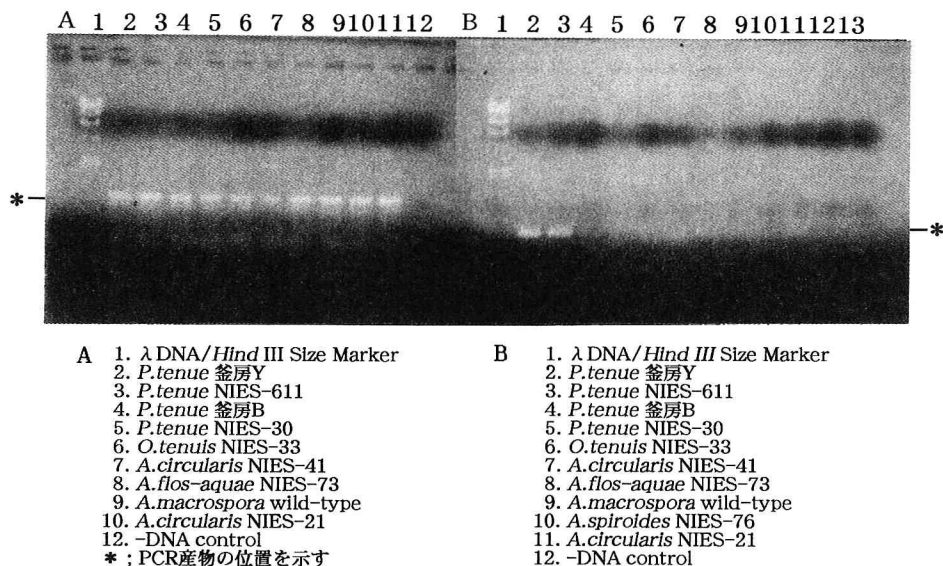


図-3 *P. tenue* 種特異的 PCR の結果

C. rachiborskii, *Anabaenopsis circularis* の3種のグループは毒素産生藍藻類に分けられるように感じられる。また、*Oscillatoria* や *Phormidium* が属するグループと *Anabaena* 等の属の系統は、進化的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が立証される。⁵⁾ 一方、肝臓毒を産生す

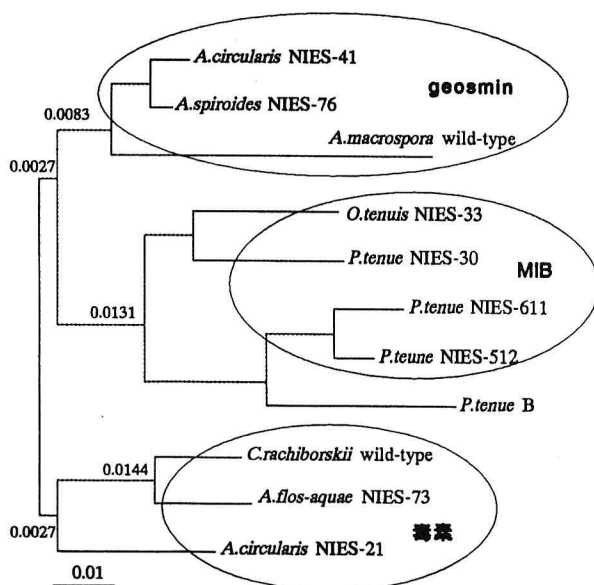


図-4 かび臭および毒素産生藍藻類の系統樹

る *C. rachiborskii* は形態上、アキネートをもつ等のことから *Anabaenopsis circularis* NIES-21 は近縁にあると考えられているが、むしろ Anatoxin-a を産生する藍藻の一つである *Anabaena flos-aquae* に近いことが明らかになった。

3.4 釜房湖のかび臭発生藍藻類の系統発生的分類

(1) かび臭発生状況の遷移⁹⁾

釜房湖は東北地方にあって、水道水に不快なおいを着けるかび臭問題が生じるダム湖としてよく知られている。しかも、冬季にも発生する希有な湖でもある。

釜房湖のかび臭は 2-MIB を産する *Phormidium tenue* に起因している。ここ 10 数年のかび臭発生状況（官能試験から求める臭気強度と表示）と *P. tenue* の藻体数の変化を図-5 に示す。このような弊害に対処するため、仙台市は粉末活性炭でかび臭を除去してきた。一方、建設省では昭和 59 年 6 月に空気揚水筒を 2 筒設置し、同年 9 月、昭和 62 年、平成元年と増設され、現在 9 筒が稼働している。揚水筒設置以前は *P. tenue* の藻体数が数千、甚だしくは 1 万個、かつかび臭が発生していたものが、設置後は数 100 のオーダーになり、かび臭は発生していない時期が続いた。このことから釜房湖は全国的にも空気揚水筒が成功した例として着目されてきた。しかし、平成 8 年冬季から再びかび臭が発生し、現在は夏季、冬季で悩まされている。

最近の原因生物に関する調査では、顕微鏡のもとで観察し、*P. tenue* と判定されながらもかび臭を生みだすもの、生みださないもの、さらに細胞表面に藍藻のもつ色素が現れて褐色にみえるものなど数種類の *P. tenue* かまたは近縁の種が存在していることがわかってきている。

(2) 釜房湖における *Phormidium tenue* の分類

解析は分類を重視して UPGMA 法で行った。図-6 は釜房湖の *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 2 群に分けられる。水道局の検鏡から 1998 年に *P. tenue* と判断されたかび臭非産生の B 株 (Ⅳ) と上部のグループ (Ⅰ～Ⅲ) である。なお、B 株は 3.2 の(1)で指摘したように *P. tenue* ではないと考えられる。上部は、図に示すように 3 群に分けられる。これらは相同性が 98% 以上であり、広い意味では *P. tenue* に属すると考えられる。グループ (Ⅰ) は冬季に着臭する 1998 年 11 月に採取した藍色の A 株と 1998 年 6 月の湖下層から採取した臭いをだす藍色の D 株および K

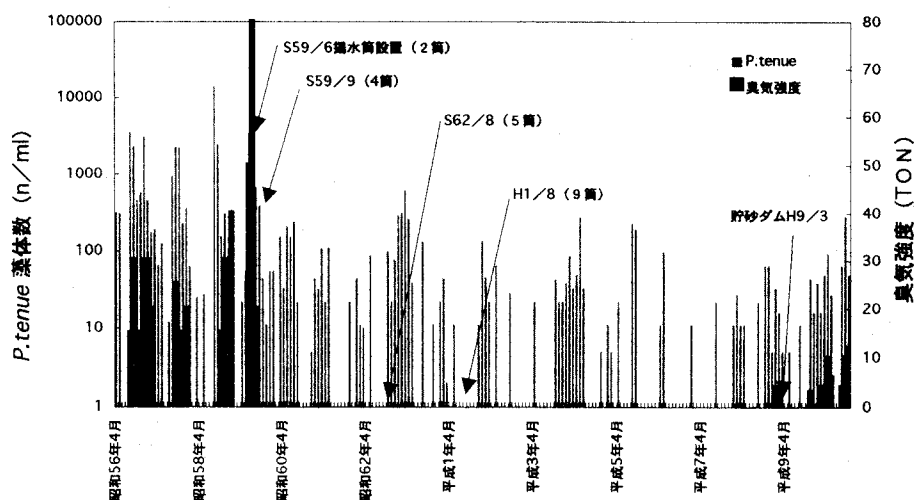


図-5 臭気強度と *Phormidium tenue* 藻体数の経年変化

(文献 6) 等をもとに作成)

社から譲渡された藍色の KG1 株の 3 株が分類された。D 株は採取時期から推定して夏季の発生に関与すると思われるが、A 株は夏季に発生の KG1 株、D 株とは異なって分類されているために夏季の発生株が冬季もかび臭をつけるとは考えられない。グループ（Ⅱ）は 1999 年に釜房湖取水塔近くから採取したかび臭產生藍色 S 株および 1998 年 9 月に採取した藍色 T 株、国立公園内調整池から採取した Y 株、および人間-環境フォーラムから購入した *P. tenue* NIES-512 株に分類された。このグループは *P. tenue* NIES-512 と相同性が高いことから愛知県産の *P. tenue* に近いと考えられる。また、Y 株は湖にも流出していることから 1999 年の湖内の *P. tenue* 増殖に係わっていた可能性もあると思われる。グループ（Ⅲ）はいずれも褐色で 2-MIB を產生せず、1998 年に採取した褐色 C 株と K 社からの KB1 株および *P. tenue* NIES-611（2-MIB 產生の有無は未確認）が分類された。このグル

ープは *P. tenue* NIES-611 を含んでおり、琵琶湖の褐色の *P. tenue* と近い関係にあると推測される。系統樹では藍色の *P. tenue* と褐色の *P. tenue* は別のグループに分類され、季節的に藍色から褐色に変化したり、かび臭產生株から非產生株に変化することはないと考えられる。

また、作図結果は、かび臭を產生するグループ（Ⅰ～Ⅱ）と非產生のグループ（Ⅲ）に分類されるとの見方でもできる。

かび臭関連藍藻類に関しては外来種の存在の報告はないが、系統樹は、釜房湖には遺伝子的に異なる数種の *P. tenue* が生息していることを裏付けており、検鏡による形態観察のみならず、科学的解析手法の導入も今後必要になることを示唆している。

4. 結 論

かび臭を產生または毒素を產生する藍藻類の 16S-rRNA による塩基配列を決定し、この情報に基づく系統樹の作成、種の同定などの応用を図った結果、以下のような知見が得られた。

- 1) かび臭產生藍藻類と毒性產生藍藻類の塩基配列を決定、提示することができた。種にはそれぞれ特異な塩基配列が存在し、これら種特異的な部位を PCR 法、FISH 法のプローブにして種を同定することができた。
- 2) 代表的な藍藻類の系統樹において 2-MIB と geosmin の 2 種のかび臭物質を產生する藍藻類がそれぞれ別個のグループに区分されるとの進化を論ずる上で興味深い結果が得られた。さらに、毒性產生藍藻類もかび臭產生藍藻類とは明確とまではいかないまでも別のグループに位置付けできる可能性が示された。
- 3) *Oscillatoria* 属と *Anabaena* 属は異なった系列の進化過程であることは知れていたが、本研究においても立証された。
- 4) *Cyrrindrospemopsis* 属は *Anabaenopsis* 属と近縁にあると考えられていたが、むしろ *Anabaena flos-aque* NIES-73 に近いことが明らかになった。また、*A. circumularis* NIES-41 と *A. spiroides* NIES-76 は、性質・形状ともの似ていとされていたが、塩基配列においても 98.6% と同種といって良いほどの相同性を示した。

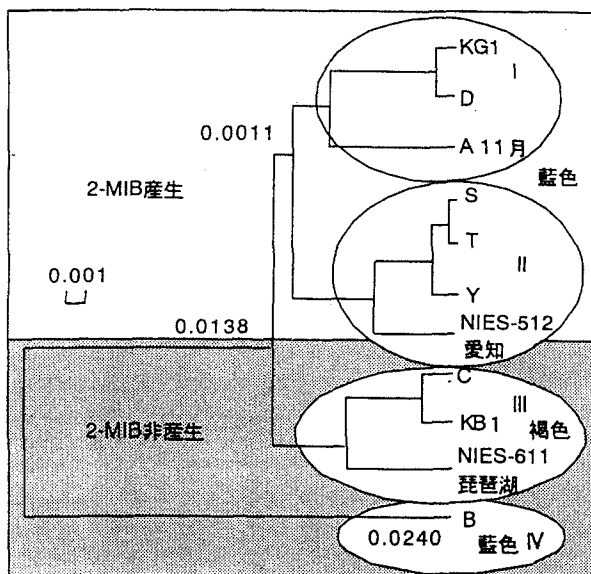


図-6 釜房湖藍藻類の系統樹

5) 釜房湖のかび臭原因藻類は *P. tenue* とされていたが、遺伝子的に微妙に異なる数種の *P. tenue* が存在する。形態的、また相同性上は *P. tenue* に分類されと考えられるが、褐色株は藍色株が変化するのではなく、また、冬季のかび臭発生は夏季の株がかび臭を生じさせるのではないなど季節的な変化も判明した。さらに、国立公園調整池で増殖している *P. tenue* は釜房湖内で近年増殖する *P. tenue* と同種である可能性が示された。これらの結果と今後のデータの蓄積は、従来の粉末活性炭によらない高度処理の導入、空気揚水筒の稼働のための資となり得ると考えられる。

系統樹の作成にあたり東北大学遺伝生態研究センター三井久幸助教授から有益な助言を得た。また、*Cylindrospermopsis* の採取に当たりタイ国 Regional Office 4, Surat Thani Waterworks, PWA に便宜をいただいた。記して感謝する。なお、本研究は環境庁「藻類増殖制御の面から見た公共用水域の水質管理技術の向上に関する研究」および水道技術研究センター「高効率浄水技術開発研究」からの援助を得たことを付記する。

参考文献

- 1) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : Molecular Cloning, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 2) 鈴木裕之、山本徳男 : GRC 版遺伝子操作の基本手技、東北大学遺伝子実験施設, 1990.
- 3) 遺伝情報解析ソフトウェア GeneticMAC Ver 8.0、取り扱い説明書
- 4) Amann, R.L., L. Krumholz and D. A. Stahl : Fluorescent Oligo Nucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental Studies in Microbiology, J.Bacteriol, 172, pp.762-770, 1990.
- 5) 藤田善彦、大城 香 : 藍藻という生きもの、東京大学出版会、1989.
- 6) 仙台市水道局 : 水質年報、昭和 52 年度～平成 9 年度