B−7　淡水性藍藻類*Microcystis aeruginosa*の細胞活性に及ぼすレクチンの影響

○真砂佳史[1]・佐々木史織[1]・藤井学[1,2]・伊藤紘晃[1]・大村達夫[1]

[1]東北大学大学院工学研究科土木工学専攻（〒980-8579　仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06）

[2]ニューサウスウェールズ大学土木環境工学科（Sydney, NSW, 2052, Australia）

＊ E-mail: *masago@water.civil.tohoku.ac.jp*

1. はじめに

淡水性藍藻類は，湖沼や貯水池などの閉鎖性水域で富栄養化に伴い大量増殖し，溶存酸素低下や水質の悪化，魚類などの生物への被害をもたらす。たとえば*Microcystis*属や*Anabena*属などの藍藻類は，真核生物にとって強力な肝臓毒であるミクロシスチンを生成する。ミクロシスチンが混入した水を摂取したことで家畜や野生生物が死亡したという報告が数多くされている[1)]。しかし，ミクロシスチンによる被害が最初に報告されてから30年以上が経過したにもかかわらず，その生理学的機能についてはいまだ多くの議論があり，またなぜ同じ種であってもミクロシスチン生成株と非生成株が存在するのかはよくわかっていない[2)]。

ミクロシスチンの生成は細胞内鉄摂取と関連があることが指摘されている。Utkilen and Gjølmeは，放射性同位体^{59}Feを用いた実験により，*M. aeruginosa*の毒素生産株は非生産株よりも著しく鉄摂取効率が高いことを明らかにしている[3)]。最近の研究では，培地内鉄の制限下においてミクロキスチン生成に関わる遺伝子の１つである*mcyD*の発現が促進されることも明らかとなっている[4)]。鉄は一次生産者が光合成や窒素固定を行うために必要不可欠な微量栄養素である。特に，藍藻類は他の藻類よりも鉄の要求量が高いため，自然環境中で鉄制限により増殖が低下するという報告がある。Nagaiらは，霞ヶ浦湖において鉄が*M. aeruginosa*の生長に影響を与える因子であることを示している[5)]。また，ミクロシスチンが第一鉄のキレータであることも示され，細胞内での鉄輸送にミクロシスチンが関わっているとも提案されている。

近年，ミクロシスチンの生成にレクチンが関与しているとの報告がなされている。レクチンは糖に特異的に結合するタンパク質の総称であり，細胞の外表面に存在する被膜状の粘性物質層である莢膜の形成に寄与していると考えられている[6)]。*Microcystis*属が産生するレクチンとして，PCC7806株，NIES-102株，M288株からそれぞれmicrovirin（MNV），*M. viridis* NIES-102 lectin（MVL），*M. aeruginosa* M228 lectin（MAL）が発見されている[6-8)]。MNVとMVLはマンナン，MALはN-アセチルガラクトサミンやガラクトースに対して特異性を持つ。この中で，MNVをコードする遺伝子を欠損させた*M. aeruginosa* PCC7806株は，欠損させていない株と比較してミクロシスチン生成量が低下するという知見が得られているが，その機構などはまだわかっていない。

以上のことから，ミクロシスチンの産生や細胞内への鉄摂取にレクチンが関与している可能性が考えられる。ミクロシスチンの生成や莢膜形成は，鉄摂取速度を増加させる因子と考えられ，レクチンはそれらの因子を活性化する重要な役割を果たしているのではないかと予想される。しかし，レクチンと鉄摂取の関係を調べた研究はこれまでに行われていない。そこで本研究では，閉鎖性淡水域で大量発生する藍藻類である*M. aeruginosa*を対象とし，レクチン存在下におけるミクロシスチン生成量や鉄摂取速度を測定し，レクチンが*M. aeruginosa*の鉄摂取や毒素生成に及ぼす影響を検討した。

2. 実験方法

供試藻類として国立環境研究所より分与された藍

藻類*M. aeruginosa* NIES-478株を用いた。peanut agglutinin（PNA: Gal, GalNAcに特異性を持つ，以下同様），wheat germ agglutinin（WGA: GlcNAc, Sia），Concanavalin A（Con A: Man, Glu）の３種のレクチンをそれぞれ培地に添加し，７日培養後にミクロシスチン濃度，細胞内および細胞表面への鉄取り込み速度をそれぞれ下記の方法で測定した。

ミクロシスチン（-LR, -RR, -YR）は，密閉式超音波細胞破砕装置（UCW-201, COSMOBIO）で細胞を破砕したのちに液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS- 2010 CTO-10V, SHIMAZU）で測定した。

*M. aeruginosa*細胞内および細胞表面への鉄取り込み速度は，放射性同位体^{59}Feを用いた実験により測定した。*M. aeruginosa*の細胞に^{59}FeEDTAを[^{59}Fe] = 0.7 μM, [EDTA] = 26 μMとなるよう添加して，照度5000 luxで5時間培養した。培養後，遠心式フィルターユニットに細胞を補足し，2 mM $NaHCO_3$で2回洗浄し，培地内の^{59}Feを除去した。その後，EDTAシュウ酸溶液（100 mM EDTA, 50 mM シュウ酸）で2回洗浄して洗浄液を回収した。この時回収された^{59}Feを細胞表面^{59}Fe量とした。また，洗浄後フィルター上に残存していた^{59}Feを細胞内^{59}Fe量とした。^{59}Fe量はウェルタイプシンチカウンターで測定した。

レクチンの細胞表面への結合を観察するため，FITCで標識したレクチンを用いた細胞観察を行った。まず藻類培養液30 μLをガラススライドに取り，室温で乾燥させた。その上に250 mg・L^{-1}のFITC標識レクチン（PNA, WGA, ConA）を50 μL添加し，1時間暗室で静置後，溶液を濾紙で取り除いた。次に，PBSを用いて同法の方法で2回洗浄した後蛍光顕微鏡（Axioplan 2, ZEISS）観察に供した。励起と放出のフィルタセットは，シアノバクテリアを赤で可視化できる555nm/617nmフィルタセットと，FITCで染色部分が緑色に可視化できる490nm/528nmフィルタセットの2つを使用した。

3. 実験結果

FITC標識レクチンを用いた細胞観察により，今回用いた3種のレクチンが*M. aeruginosa*の細胞表面に結合する事が確認できた（図１）。

PNAやWGA添加時には対称系と比較して全てのミクロシスチンの生成量が有意に増加した（図２上）。一方，ConA添加時はミクロシスチン-LRの生成量のみ増加した（図２下）。また，細胞内への鉄摂取速度は，PNA添加時には有意に上昇した（$p <$

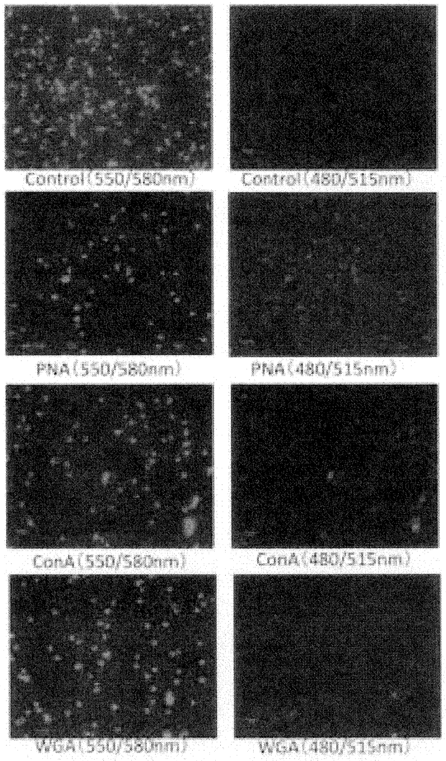

図１　FITC標識レクチンの藻類細胞への結合（左図は細胞を，右図は同視野のFITC標識レクチンによる蛍光の観察結果。図の下は添加したレクチンと励起／放出フィルタの波長を示す。）

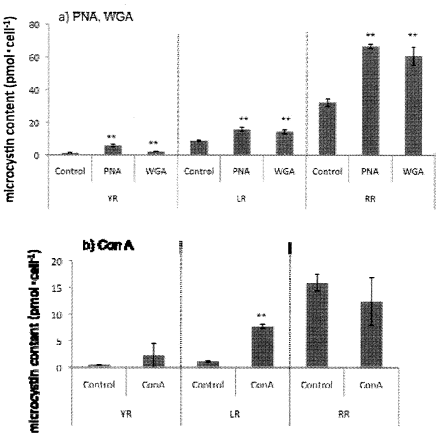

図２　１細胞あたりのミクロシスチン生成量（値とエラーバーは２連の測定値の平均値と標準誤差を示す。 : $p < 0.01$）**

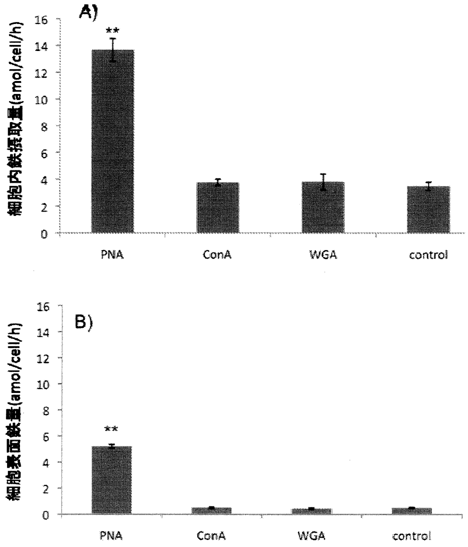

図３　細胞内（A）および細胞表面（B）への ^{59}Fe取り込み速度
（値とエラーバーは３連の測定の平均値と標準誤差を示す。：p < 0.01）**

0.01）が，ConAとWGAを添加した条件では対称系と比較して差は見られなかった（図３）。

4. 考察

本研究で用いたレクチンは3種とも細胞表面に吸着し（図１），培地へのレクチンの添加によりミクロシスチン生成量が上昇することが確認された（図２）。特にPNAはミクロシスチン生成量だけでなく鉄の取り込み速度も有意に上昇させることが示された（図３）。PNAはガラクトースやN-アセチルガラクトサミン構造に特異性を持つ。今回用いた*M. aeruginosa* NIES-478株の細胞表面にこれらの糖が存在するかどうかは確認されていないが，以上の結果から，PNAが細胞表面に結合することにより，ミクロシスチンの生成や細胞内および細胞表面への鉄の取り込みが促進されたのではないかと考えられた。

また本研究では，藻類細胞が生成しないレクチンを外部から投与することで，ミクロシスチン生成や鉄摂取に影響を与えることを初めて示した。これは，ミクロシスチン合成や鉄の取り込みに対してレクチンがキー因子となっていることを示唆するものである。

既往の研究では，*M. aeruginosa*が生成するレクチンとミクロシスチン生成が関係していることが示されている[6]。またSevillaらは，細胞内への鉄の取り込みに関わる遺伝子発現を調整するタンパク質（Fur: ferric uptake regulator）の結合領域に*mcy*遺伝子のプロモーター領域が含まれるため，鉄欠乏下でFurがそのプロモーター領域から解離することで，ミクロシスチンの合成が促進される可能性を示している[4]。また，*M. aeruginosa* M288株のレクチンMALは低温度（15℃）や低照度（12μE・m^{-2}）の増殖制限下で生成量が増加することも報告されている[9]。レクチンとミクロシスチン生成および鉄摂取についての関係についてはこのように断片的な情報しか存在しておらず，また論文により相反する結果も多いが，さまざまなストレスを受ける自然環境条件下で*M. aeruginosa*が生き残るために，レクチンは重要な役割をしているのではないかと考えられる。

参考文献

1) 彼谷邦光：飲料水に忍びよる有毒シアノバクテリア，裳華房，2001.
2) Zurawell, R. W., *et al.*: *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, **8**, 1-37, 2005.
3) Utkilen, H. and Gjølme, N.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(2), 797-800, 1995.
4) Sevilla, E., *et al.*: *Environ. Microbiol.*, 10(10), 2476-2483, 2008.
5) Nagai, T., *et al.*: *Aquat. Sci.*, 70, 388-396, 2008.
6) Kehr, J.C., *et al.*: *Mol. Microbiol.*, 59, 893-906, 2006.
7) Yamaguchi, M., *et al.*: *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 119(3), 593-597, 1998.
8) Yamaguchi, M., *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265(3), 703-708, 1999.
9) Yamaguchi, M., *et al.*: *Fisheries Sci.* 66, 665-669, 2000.