秋田県八郎湖における藍藻毒ミクロシスチンと有毒藍藻の季節的変動

岡野 邦 宏^{1),*}
宮田 直 幸¹⁾

鈴木 英 治²⁾
谷 幸 則⁴⁾

太田 栞³⁾
尾崎 保 夫¹⁾

Seasonal Changes in Cyanotoxin Microcystin and Toxic Cyanobacteria in Lake Hachiro

Kunihiro OKANO^{1),*}, Eiji SUZUKI²⁾, Shiori OHTA³⁾,
Naoyuki MIYATA¹⁾, Yukinori TANI⁴⁾ and Yasuo OZAKI¹⁾

¹⁾ Department of Biological Environment, Akita Prefectural University, 241-438 Kaidobata-Nishi, Nakano, Shimoshinjo, Akita, Akita 011-0195, Japan

²⁾ Department of Biological Production, Akita Prefectural University, 241-438 Kaidobata-Nishi, Nakano, Shimoshinjo, Akita, Akita 011-0195, Japan

³⁾ Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, 241-438 Kaidobata-Nishi, Nakano, Shimoshinjo, Akita, Akita 011-0195, Japan

⁴⁾ Department of Environmental and Life Sciences, University of Shizuoka, Yada 52-1, Suruga-ku, Shizuoka, Shizuoka 422-8526, Japan

Abstract

In this study, we investigated the seasonal changes in the concentration of microcystins by HPLC, the composition of cyanobacteria based on the 16S rRNA gene, and the presence of toxic *Microcystis* sp. by quantitative PCR in the surface water of Lake Hachiro, Akita prefecture, Japan. Moreover, the unialgal cultures of 8 strains of *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., and *Pseudoanabaena* sp. were isolated from algal bloom. The concentration of chlorophyll *a* increased and algal bloom occurred when the water temperature exceeded 25°C in Lake Hachiro. The concentrations of microcystins increased from August 2008, probably because of the growth of toxic *Microcystis* sp., which was determined by quantitative PCR of the *mcyB* gene. Furthermore, the *mcyA* gene was also detected from a unialgal culture of *Microcystis* sp., and it was confirmed that some *Microcystis* sp. strains in Lake Hachiro was toxic. The results of this study were suggested that the change in concentration of microcystins was related to the ratio of toxic *Microcystis* sp. equivalents to total *Microcystis* sp. equivalents in Lake Hachiro.

Keywords: Lake Hachiro; Microcystin; Toxic cyanobacteria; *mcy* gene

1. はじめに

近年、世界各地の富栄養化した湖沼において有害藻類によるアオコの発生が顕在化している。アオコを形成する有害藻類の中でも *Microcystis* 属や *Anabaena* 属などの一部の種は、極めて強力な毒素であるミクロシスチンを産生することが知られている^{1, 2)}。ミクロシスチンは5つの特殊アミノ酸と2つのL-アミノ酸で構成される環状ペプチドであり、L-アミノ酸の組み合わせなどにより80種類以上の構造類似体が存在する^{2, 3)}。最も毒性が強いとされるミクロシスチン-LRは世界保健機関 (WHO) により飲料水の暫定ガイドライン値 (1.0 µg・L⁻¹) が設けられている⁴⁾。しかしながら、塩素処理によりミクロシスチンの分解が起こることから、日本国内では水

道水へのリスクが小さいことが指摘されている⁵⁾。

秋田県八郎湖残存湖 (以下、八郎湖) は秋田県西部に位置し、八郎湖調整池、東部承水路、西部承水路を合わせた湛水面積は47.32 km²である。かつては北緯40°、東経140°の経緯度交会点を中心とした湛水面積220.2 km²の日本第二位の汽水湖であったが、1957年に着工した八郎湖干拓事業により約17,000 haの干拓地が造成され現在の形となった (Fig. 1)。防潮水門の設置により汽水湖から淡水湖へと変化し、その水は海拔-4 m程度と海水面より低い干拓地にサイホンで導入され農業用水として循環利用されている。そのため、2006年ベースで全COD負荷量13.2 t・y⁻¹の48.1%が水田からの負荷によるものと見積もられている⁶⁾。このような背景に加えて、流域人口も増加していることから八郎湖の水質、特に

1) 秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科 〒010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438

2) 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科 〒010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438

3) 秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 〒010-0195 秋田市下新城野字街道端西 241-438

4) 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1

* 連絡先: k_okano@akita-pu.ac.jp

Fig. 1 The schematic diagram of Lake Hachiro. Black circles denote sampling points. A is Nomura port at lat. 39°42'48"500 N and long. 140°02'14"470 E, B is Tide gate at lat. 39°54'25"046 N and long. 139°57'31"055 E, C is Ogata bridge at lat. 39°56'58"784 N and long. 140°03'22"760 E.

CODは増加の一途を辿っており、1977年の事業竣工から29年後の2006年には全国ワースト3位となった^{6,7)}。同年には八郎湖で発生したアオコの河川への遡上により近隣浄水場で取水制限される事態となり⁸⁾、2007年12月に湖沼水質保全特別措置法（湖沼法）の指定を受け、全国で11番目の指定湖沼となった。そのため、八郎湖では2008年度より「八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第1期）」、2014年度より「八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第2期）」に基づき、生活排水の流入対策や水田濁水の抑制などによる水質改善が進められている^{7,9)}。

八郎湖では上記の水質改善対策が進められているものの^{7,9)}、毎年大量のアオコが確認されており、全窒素や全リンも水質環境基準を超えていることから⁹⁾、今後もアオコの発生が続くことが懸念されている。また、ミクロシスチンによる水道水へのリスクは小さいことが報告されているが⁵⁾、八郎湖における農業や水産業への影響は無視できない。そのため、八郎湖においてミクロシスチンの季節的変動やそれを産生する有毒藍藻に関するデータを蓄積することは極めて重要である。干拓竣工後の八郎湖における植物プランクトンに関する研究は少ないが、片野は珪藻類の変遷について¹⁰⁾、林らは動物プランクトンも含む浮遊微生物相について報告している¹¹⁾。また、林らは2002年から2012年まで八郎湖におけるアオコ形成藻類を調査し、優占種が*Microcystis*属および*Anabaena*属であることを報告している¹²⁾。しかしながら、これまでに八郎湖では有毒藍藻の発生に伴うミクロシスチン産生の実態について調査された例はなく、ミクロシスチン産生種に関する知見もないのが現状である。

近年、ミクロシスチンの合成に関与する遺伝子群(*mcy*, *microcystin synthetase gene cluster*)が同定され¹³⁾、ミクロシスチン産生株（有毒株）に不可欠であることが報告されている¹⁴⁾。また、発生したアオコ形成藻類がミクロシスチン産生株であるか否かは顕微鏡による形態観察やrRNA遺伝子などを用いた分子系統学的な分類におい

ても難しいことから¹⁵⁾、*mcy*遺伝子を用いた検討が必要である。そこで、本研究では秋田県八郎湖においてミクロシスチンの実態を調査すると共に、16S rRNA遺伝子に基づく藍藻類変遷の調査、さらに*mcy*遺伝子の検出・定量を行い、ミクロシスチンとそれを産生する有毒藍藻の季節的変動を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 採水方法

湖水試料は、2008年5月から2009年5月まで八郎湖の八郎潟調整池2地点（野村港、防潮水門）及び東部承水路1地点（大潟橋）で採水した（Fig. 1）。採水は、表層水（20 cm）をヒシヤクにより行い、現地で水温、pH、溶存酸素（DO）、電気伝導度（EC）を水質チェッカーWQC-22A（東亜 DKK）を用いて測定した。なお、湖水試料は3つに別けて保存した。まず、湖水試料100～200 mLをガラスフィルター GF/F（0.7 μm, Whatman, USA）でろ過し、ガラスフィルターを-80℃で遮光保存して光合成色素分析用とした。同様に、0.2 μm フィルター（MO BIO, USA）でろ過し、フィルターを-80℃で保存してDNA解析用とした。特に野村港では、アオコが集積した湖水を別途採取して2.4および2.5のDNA解析用とした。最後に、ミクロシスチン分析用として未ろ過の湖水試料を-30℃で保存した。

2.2 ミクロシスチン分析

凍結保存した湖水試料200 mLを解凍後、酢酸（和光純薬工業）を終濃度5%になるように添加してミクロシスチンを抽出した。酢酸抽出した試料は、ガラスフィルター GF/F（0.7 μm, Whatman）でろ過後、Presep®-C C18（和光純薬工業）により粗精製した。100%メタノールで溶出されたミクロシスチンは、アルミブロック恒温槽DTU-1BN/CN（タイテック）により窒素乾固し、メタノールで再溶解して分析試料とした。また、分析はACQUITY UPLCシステム（Waters, USA）によりHPLC法で行った¹⁶⁾。なお、分離カラムにはCORTECS C18 1.6 μm, 2.1 mm I.D. × 150 mm（Waters, USA）を用い、標準物質としてミクロシスチン-RR、ミクロシスチン-YR、ミクロシスチン-LR（和光純薬工業）により同定及び定量を行った。

2.3 光合成色素（クロロフィル類、カロテノイド）分析

GF/F フィルター（0.7 μm, Whatman, USA）で捕集した湖水懸濁物からアセトン（HPLC grade, 和光純薬工業）を用いて光合成色素を抽出した。抽出した光合成色素は、SHIMADZU LC-10 A システム（島津製作所）によりHPLC-PDA法で分析した^{17,18)}。クロロフィル *a*, *b*, フェオフィチン *a*, *b*, ピロフェオフィチン *a*, メチルフェオホルビド, β-カロテン（和光純薬工業）を基準物質として、メソボルフィリン IX ジメチルエステル（Avocado Research Chemicals, UK）を内部標準物質として用い、保持時間により同定した。なお、分離カラムにはNavi C18-5 4.6 mm I.D. × 250 mm（和光純薬工業）を用いた。また、カロテノイドの濃度は440 nmにおけるそれぞれの吸光強度をβ-カロテンと比較することで定量した¹⁹⁾。藻類の組成は珪藻類由来のカロテノイドであるフコキサンチン、19'-ブタノイルオキシフコキサンチン、

ジアジノキサンチン, 緑藻由来のカロテノイドであるルテイン, ビオラキサンチン, アスタキサンチン, クリプト藻由来のカロテノイドであるアロキサンチン, 藍藻由来のカロテノイドである β -カロテン, エキネノン, カンタキサンチン, ゼアキサンチンの濃度を相対比として算出した¹⁹⁾。

2.4 DNA抽出およびPCR

DNAの抽出はUltraClean™ Water DNA Kit (MO BIO, USA)を用い, 添付のマニュアル (<http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/14800-NF.pdf>)に従って行った。PCRは, 藍藻類の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーセット²⁰⁾, および $mcyA$ 遺伝子に特異的なプライマーセット²¹⁾を用いて行った。ポリメラーゼはExTaq® (タカラバイオ)を用い, dNTPsおよび各プライマーをそれぞれ終濃度で200 μ M, 0.4 μ Mになるように添加して反応溶液とした。さらに, 反応溶液には10 ngの鋳型DNAとポリメラーゼ添付の緩衝液を加えた。また, サーマルサイクル反応は2720 サーマルサイクラー (ABI, USA)を用いて94℃で60秒の熱変性後, 94℃を30秒, 55℃を30秒, 72℃を90秒のステップを30サイクル行った。なお, 72℃で7分間伸長反応を行った後に4℃で保存した。PCR後のDNAは2%アガロースで電気泳動をし, エチジウムブロマイドで染色した。染色後のDNAはUVイルミネーター (UVP, USA)により波長302 nmで検出を行った。

2.5 分子系統解析

PCR増幅した16S rDNA遺伝子は, pGEM-T Easy vector system (Promega, USA)によりライブラリー化し

た。クローニングは, 添付のマニュアル (http://www.promega.co.jp/jp_tech/jp_manuals/pgem-t.pdf)に従って行い, 1サンプルから16クローンずつランダムに選別した。選別したクローンは, 秋田県立大学バイオテクノロジーセンターにて全長をシーケンスした。得られたDNA配列をDDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)にてBLAST解析し, 相同性の高い配列とともにMEGA (<http://www.megasoftware.net>)を用いた分子系統解析を行って帰属分類群を同定した。なお, 得られた16S rRNA配列はDDBJ Accession No. AB935785 ~ AB935946に登録した。

2.6 定量PCR

定量PCRは, *Microcystis* 属の16S rRNA遺伝子²²⁾と $mcyB$ 遺伝子²³⁾に特異的なプライマーセットおよびプローブを用いてTaqMan法で行った。反応にはFastStart Essential DNA Probes Master (Roche, USA)を用い, LightCycler® Nano システム (Roche, USA)により解析した。反応溶液は, 添付のマニュアル (https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/06402682001_en_04.pdf)に従い20 μ Lに調製した。また, サーマルサイクル反応は95℃で10分の熱変性後, 95℃を10秒, 60℃を10秒, 72℃を15秒のステップを45サイクル行った。なお, *Microcystis aeruginosa* NIES-843株のゲノムDNAを用いてスタンダードを作成し, 絶対検量線により定量を行った。鋳型DNAを20倍まで段階希釈して実験を行い, 最も増幅効率の高かった20倍希釈の結果の平均値を各DNAのコピー数とした。試験は3連で行い, 16S rRNA遺伝子及び $mcyB$ 遺伝子の各系列はANOVAにより有意差を検定した。

2.7 アオコ形成藻類の単藻化

野村港のアオコが集積した湖水より正立顕微鏡BX51 (オリンパス)の観察下で藍藻類をマイクロキャピラリーで分離し, 改変CB培地 (Bicine-NaOH (pH9) 490 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, KNO_3 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, β - $\text{Na}_2\text{glycerophosphate} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 588 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 108 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 66 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)により25℃, 34.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で静置培養した。8種類の単藻培養株を継代培養し, 顕微鏡観察により純化を確認した。また, 顕微鏡観察 (200倍) 及び16S rRNA遺伝子による分子系統解析により属レベルでの同定を行った。なお, 分子系統解析は2.4および2.5と同様の方法で行い, DDBJ Accession No. AB936774 ~ AB936781に登録した。

3. 結果及び考察

3.1 八郎湖のアオコ発生状況と藻類種の組成

2008年5月から2009年5月までのクロロフィルa (以下Chl.a) 濃度と水温の変動をFig. 2に示した。全地点で7月中旬からChl.a濃度が上昇し, アオコが観察された。特に大湯橋 (地点C) では8月上旬にChl.a濃度が125 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ に達した (Fig. 2C)。7月には全地点で水温が25℃を超えており, これはアオコ形成藻類である*Anabaena*属の好適増殖温度25℃とも合致する²⁴⁾。また, 全地点で10月上旬にもChl.a

Fig. 2 Seasonal changes in chlorophyll *a* and water temperature at Nomura port (A), Tide gate (B) and Ogata bridge (C). Open circle and closed square denote concentration of chlorophyll *a* and water temperature, respectively.

Fig. 3 Seasonal changes in carotenoid concentration in lake water collected at Nomura port (A), Tide gate (B) and Ogata bridge (C).

濃度の増加が確認され、7月から10月までの長期間でアオコが観察された。10月には水温が20℃以下まで低下しており、7月におけるChl.a濃度の増加時とは違う要因が考えられた。降水量の減少は、*Microcystis* 属や *Anabaena* 属などのアオコ形成藻類に好適な環境を形成することが報告されている^{25, 26)}。2008年9月の大潟村における降水量は50.0 mmであり、平年149.4 mmの約1/3と極めて少なかった。そのため、10月のChl.a濃度の顕著な増加は9月中の少ない降水量が大きな要因であると推察された。

光合成色素は、湖底コアサンプルなどにおける植物プランクトンの種組成の推定などに広く用いられている^{17, 18, 27)}。本研究ではChl.a濃度を全藻類量の指標とし、植物プランクトンの種組成をカロテノイドの組成比を求めて解析した (Fig. 3)。全地点で6月27日より藍藻類由来のβ-カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチンの割合が増加し、特に8月4日の野村港 (地点A) ではカロテノイド全体の60%を超えた (Fig. 3A)。大潟橋 (地点C) では、β-カロテン、エキネノン、カンタキサンチン、ゼアキサンチンが10月1日においてもカロテノイド全体の30%に達しており (Fig. 3C)、アオコの観察結果と一致した。

一方で、アオコが大量発生した8月4日の野村港 (地点A) を除いた全ての地点でフコキサンチンとジアジノキサンチンが主要色素として検出され、八郎湖の一次生

Fig. 4 Seasonal changes in the concentration of microcystins at Nomura port (A), Tide gate (B) and Ogata bridge (C). The concentrations of microcystin-LR, YR and RR are shown.

産者として珪藻類が優占していることが明らかとなった (Fig. 3)。ケイ酸は珪藻類の増減に直接的に影響し、植物プランクトンの組成に大きな影響を与えることが知られている²⁸⁾。1997年の調査で、八郎湖の最大流入河川である馬場目川 (平均646百万m³・year⁻¹) のケイ酸濃度は最大13.8 mg・L⁻¹、2番目の流入量である三種川 (平均298百万m³・year⁻¹) が最大22.0 mg・L⁻¹と高い濃度で流入していることが指摘されている²⁹⁾。前述の通り、八郎湖において珪藻類はアオコが大量発生した期間を除き、年間を通して優占していることから珪藻類の増殖に適した環境条件にあると推測された。

3.2 藍藻毒ミクロシスチンの季節的変動

日本国内で検出されるミクロシスチンは、主としてミクロシスチン-RRとLRであり、YRも少量検出される^{3, 30)}。そこで、2008年5月から2009年5月までのミクロシスチン-RR, YR, LR濃度を測定した (Fig. 4)。野村港 (地点A) では、10月上旬に最も高い濃度で検出され、ミクロシスチン-RRが0.22 μg・L⁻¹、YRが0.15 μg・L⁻¹、LRが0.15 μg・L⁻¹であった (Fig. 4A)。防潮水門 (地点B) では、8月下旬に最も高い濃度で検出され、ミクロシスチン-LRが1.8 μg・L⁻¹に達した (Fig. 4B)。また、大潟橋 (地点C) も野村港と同様に10月上旬に最も高い濃度で検出され、ミクロシスチン-RRが0.55 μg・L⁻¹、LRが0.13 μg・L⁻¹であった (Fig. 4C)。前述した通り、ミクロシスチンの合成に

は *mcy* 遺伝子群が必須であり, *mcy* 遺伝子群を保有していない種はマイクロシスチン非産生株 (無毒株) となる^{13, 14)}。Chl. *a* 濃度は7月に上昇してアオコが確認されたが (Fig. 2), マイクロシスチンは最大でも防潮水門 (地点 B) のマイクロシスチン-YR $0.13 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ であり, 7月中のアオコはマイクロシスチン非産生株が主体であったことが示唆された。

また, 観測地点や採水時期によりマイクロシスチン濃度や各マイクロシスチンの割合が大きく異なることが興味深い。特に防潮水門 (地点 B) では, 8月下旬にマイクロシスチンの濃度が最も高くなっており (Fig. 4B), 他の観測地点と産生時期が異なっていた。さらに, 8月下旬は Chl. *a* 濃度が一度低下した時期であり (Fig. 2B), Chl. *a* 濃度当たりのマイクロシスチン濃度も 0.039 と野村港 (0.004) や大潟橋 (0.001) と比較して極めて高い。防潮水門付近は海水の影響を受けやすく, 電気伝導度が平均 $38.6 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$, 最大 $53.0 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ と野村港の平均 $29.7 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ と比較すると高かった。汽水域から単離された *Microcystis aeruginosa* PCC7806 には, 他の *Microcystis* 属株には存在しない Hik33 や *actM* などの塩分耐性に関連するタンパク質が見つかっており³¹⁾, 塩分濃度は *Microcystis* 属の株 (遺伝子型) レベルでの組成に影響を及ぼすことが予想される。防潮水門付近で観測された電気伝導度は淡水域での変動ではあるが, 局所的な海水濃度の上昇が *Microcystis* 属の株組成に影響を与える可能性が考えられた。加えて, マイクロシスチンを産生する藍藻類は *Microcystis* 属, *Anabaena* 属, *Oscillatoria* 属, *Nostoc* 属, *Planktothrix* 属などに分布し²⁾, 産生するマイクロシスチンの種類も異なることが知られている³²⁾。そのため, 八郎湖におけるマイクロシスチンの濃

度や割合の地理的, 季節的な変動は有毒藍藻の種あるいは株レベルの組成の違いに由来していると考えられた。

3.3 有毒藍藻の季節的変動

野村港における 16S rRNA 遺伝子に基づいた藍藻類の種組成の季節的変動を Fig. 5 に示した。アオコ発生期間中において藍藻類の種組成は大きく変化し, 2008 年7月には *Anabaena* 属が優占種であったが8月後半には *Microcystis* 属が優占種になっていることが明らかとなった。その後も *Microcystis* 属が優占していたが, 再び *Anabaena* 属の増加が認められた (Fig. 5)。この結果は, 林らが2012年に行った顕微鏡観察の結果とも一致した¹²⁾。また, *Anabaena* 属が優占している7月の試料は水温が 25°C を超えて Chl. *a* 濃度が急激に上昇した時期であり (Fig. 3), *Anabaena* 属の好適増殖温度が 25°C であることも合致する²⁴⁾。 *Anabaena* 属は窒素固定が可能であるが, 八郎湖の無機態窒素は湖心においても平均 $0.28 \text{ mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ と高いため³³⁾, *Anabaena* 属が水温条件を先に満たすことで *Microcystis* 属よりも先に増殖していると考えられた。

次に, 野村港における *Microcystis* 属の 16S rRNA 遺伝子と *mcyB* 遺伝子を定量した結果を Fig. 6A に示した。なお, 16S rRNA 遺伝子及び *mcyB* 遺伝子の時系列での変動は有意であった ($P < 0.00001$)。 *Microcystis* 属の 16S rRNA 遺伝子数は7月から8月にかけて約 300 倍に増加しており, Fig. 5 で示した *Microcystis* 属の優占が急激に進んでいた結果と一致した。 *mcyB* 遺伝子数の増加はより顕著であり, 7月から8月にかけて約 1,200 倍となった (Fig. 6A)。 *Anabaena* 属が優占した7月の野村港では, マイクロシスチン-LR が $0.016 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ と僅かに検出されただけであり, 8月以降にマイクロシスチン濃度が上

Fig. 5 Seasonal changes in the clone number of cyanobacterial 16S rRNA gene at Nomura port. Relative abundances of clone sequences closely related with the genera *Anabaena*, *Microcystis*, *Cyanobium*, *Prochlorothrix*, and *Pseudoanabaena* are shown.

Fig. 6 Seasonal changes in the copy number of 16S rRNA gene and *mcyB* gene (A) and the ratio of toxic *Microcystis* sp. equivalents to total *Microcystis* sp. equivalents (B) at Nomura port. Open diamonds and closed triangles denote copy number of 16S rRNA gene and *mcyB* gene, respectively. Data points are means of triplicates, and the error bars (where visible) represent ± 1 SD.

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA gene and *mcvA* gene fragments from the unialgal cultures. A 16S rRNA gene fragment, marker (M), water control (N), *M. aeruginosa* NIES-843 (P), *Microcystis* sp. strain 0824 (1), *Microcystis* sp. strain 0830-M (2), *Microcystis* sp. strain 0901-3A (3), *Microcystis* sp. strain 0901-4C (4), *Microcystis* sp. strain 0901-5B (5), *Anabaena* sp. strain 0830-A (6), *Pseudanabaena* sp. strain 0830-3 (7), *Pseudanabaena* sp. strain 0901-3C (8). B *mcvA* gene fragment, M, P and number are the same as A. C microphotograph, number is the same as A. The arrows show the positions of bands of 16S rRNA gene and *mcvA* gene fragments.

昇していることから (Fig. 4A), 八郎湖における有毒株は *Microcystis* 属が主であると考えられた。しかしながら, 8月と10月の *mcvB* 遺伝子数はほぼ同程度であり, ミクロシスチン濃度の結果 (Fig. 4A) と一致しなかったことから, *mcvB* 遺伝子数のみではミクロシスチン産生量を評価することは困難であると考えられた。Wangらは太湖で秋に起きたミクロシスチン濃度の上昇が, 細胞当たりのミクロシスチン産生能の高い *Microcystis* 属遺伝子型の増加に起因することを報告している³⁴⁾。また, *mcv* 遺伝子当たりのミクロシスチン濃度が環境によって異なることも報告されている³⁵⁾。したがって, 野村港における8月と10月のミクロシスチン濃度の違いは *Microcystis* 属の遺伝子型レベルでの違いによると推察された。

Microcystis aeruginosa NIES-843 株のゲノム中には 16S rRNA 遺伝子が2コピー, *mcv* 遺伝子群が1コピー存在することが明らかとなっている³⁶⁾。そこで, 定量PCRによって解析された *Microcystis* 属の *mcvB* 遺伝子のコピー数を *Microcystis* 属有毒株相当数, 16S rRNA 遺伝子のコピー数を2で除して全 *Microcystis* 属相当数と定義し, 全 *Microcystis* 属相当数に占める *Microcystis* 属有毒株相当数を Fig 6B に示した。アオコ発生期間中において *Microcystis* 属有毒株の割合は大きく変化し, 10月上旬には全 *Microcystis* 属数の85.6%を占めた。この結果は,

Table 1 Nearest relatives of the unialgal cultures.

No.	Strain	DDBJ Accession No.	Most closely related organism*		
			Strain	Accession No.	Identity %
1	0824	AB936774	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	NR_074314.1	99
2	0830-M	AB936776	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-298	FJ461749	99
3	0901-3A	AB936778	<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	NR_074314.1	99
4	0901-4C	AB936780	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BB35S02	AJ635430	99
5	0901-5B	AB936781	<i>Microcystis aeruginosa</i> 0BB35S02	AJ635430	99
6	0830-A	AB936775	<i>Anabaena</i> sp. CCAP1403/4A	HE975015	99
7	0830-3	AB936777	<i>Pseudanabaena</i> sp. 1tu24s9	AM259269	99
8	0901-3C	AB936779	<i>Pseudanabaena</i> sp. 0tu30s18	AM259268	99

* Based on BLAST search data for 16S rRNA genes.

湖水中のミクロシスチン濃度の変動 (Fig. 4A) とよく一致しており, ミクロシスチン産生量の指標となり得ることが示された。前述の通り, 2008年9月の大湯村の降水量は平年の1/3程度 (50 mm) であったが, その80%が9月後半の21日 (14.5 mm), 25日 (15.5 mm), 27日 (10.0 mm) の降水であった。乾燥期後の降水による栄養塩類の流入は, *Microcystis* 属無毒株よりも *Microcystis* 属有毒株の増殖に有利であることが指摘されており^{25, 37)}, 2008年9月から10月の野村港は *Microcystis* 属有毒株の増殖に好適な環境であったことが示唆された。

3.4 アオコ形成藻類の単藻化による有毒株の特定

前項におけるアオコ形成藻類の属組成の季節的変動と定量PCRによる *mcvB* 遺伝子の解析によって, 八郎湖のミクロシスチン産生株が主に *Microcystis* 属であることが示唆された。そこで, 8月および9月のアオコが集積した八郎湖表層水よりアオコ形成藻類の単藻化を行い, 3属8株の単藻培養株を取得した (Table 1, Fig. 7C)。顕微鏡観察および 16S rRNA 遺伝子による分子系統解析により, *Microcystis* 属5株, *Anabaena* 属1株, *Pseudanabaena* 属2株であることが明らかになった (Table 1)。これら単藻培養株のDNAを抽出し, *mcvA* 遺伝子をPCRにより検出した結果を Fig. 7B に示した。*mcvA* 遺伝子は, *Microcystis* 属0830-M株でのみ検出され, *Anabaena* 属および *Pseudanabaena* 属の単藻株からは検出されなかった (Fig. 7AB)。この結果は, 八郎湖に生育する少なくとも一部の *Microcystis* 属がミクロシスチン産生株であることを示している。

一方で, *Microcystis* 属5株においても4株では *mcvA* 遺伝子が検出されなかった。野村港の8月および9月の *Microcystis* 属有毒株の割合は最大でも38.5%であり (Fig. 6B), 定量PCRの結果とも矛盾しない。*mcv* 遺伝子群を保有していないミクロシスチン非産生株は, 進化の過程で *mcv* 遺伝子群を欠損していると考えられており³⁸⁾, 湖沼での生育時に発現する生理活性が異なることも報告されている^{37, 39)}。また, Kardinaalらは3つの湖沼において *Microcystis* 属の遺伝子型を調査し, アオコ発生時期を通して有毒株が優占していたものの *Microcystis* 属の遺伝子型が季節的に変動していたことから, ミクロシスチン産生・非産生を含む *Microcystis* 属遺伝子型の遷移が湖沼のミクロシスチン濃度を決定する重要なメカニズムになり得ることを示唆している⁴⁰⁾。八郎湖が農業用水に使用されていることや流入河川の河口付近に上水施設があること, さらには水産業への影響を鑑みても, 八郎湖においてミクロシスチン濃度を決定付ける一因子

としてアオコ形成藻類の遺伝子型の遷移を明らかにすることは重要な課題といえる。

4. まとめ

秋田県八郎湖におけるミクロシスチンと有毒藍藻の季節的変動を明らかにすることを目的として分子生物学的な手法を用いた調査を行った。本研究でミクロシスチンの季節的変動、16S rRNA 遺伝子に基づくアオコ形成藻類の種組成の変動、および定量 PCR による *Microcystis* 属有毒株の変動を調査した。さらに、八郎湖水より3属8株の藍藻類を単藻化した。得られた結果をまとめると以下ようになる。

- 1) 八郎湖では水温が25℃以上に上昇すると Chl.a 濃度が急激に上昇し、アオコが発生することが確認された。
- 2) 8月以降のミクロシスチン濃度の上昇は、定量 PCR の結果から *Microcystis* 属の増加に起因していることが示唆された。
- 3) *Microcystis* 属単藻培養株から *mcyA* 遺伝子が検出され、八郎湖に生育する一部の *Microcystis* 属がミクロシスチン産生株であることが明らかとなった。
- 4) *Microcystis* 属有毒株が全 *Microcystis* 属に占める割合の変化と湖水中のミクロシスチン濃度の変動がよく一致し、ミクロシスチン産生量の指標となり得ることが示された。

謝 辞

本研究は、JSPS 科学研究費補助金 若手研究（スタートアップ）20880023 の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表する。

（原稿受付 2014 年 6 月 16 日）

（原稿受理 2014 年 10 月 21 日）

参 考 文 献

- 1) Watanabe, F. M., Oishi, S., Harada, K -I., Kawai, H. and Suzuki, M. (1988) Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae), *Toxicon*, **26** (11), 1017-1025.
- 2) Welker, M. and Döhren V. H. (2006) Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS Microbiology Reviews*, **30** (4), 530-563.
- 3) Watanabe, F. M., Harada, K -I., Matsuura, K., Oishi, S., Watanabe, Y. and Suzuki, M. (1989) Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species, *Environmental Toxicology*, **4** (4), 487-497.
- 4) World Health Organization (2006) Guidelines for drinking-water quality. 3rd edition, 515pp., World Health Organization, Geneva.
- 5) Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, F. M., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H. and Harada, K -I. (1997) Stability of Microcystins from cyanobacteria-iv. effect of chlorination on decomposition, *Toxicon*, **35** (7) 1033-1041.
- 6) 佐々木次郎 (2010) 八郎湖の水質保全対策について, 水環境学会誌, **33** (A) (9), 287-291.
- 7) 秋田県 (2008) 八郎湖に係る湖沼水質保存計画 (第1期), 16pp.
- 8) 近藤正 (2010) 八郎湖の水文・水環境特性の変遷と課題, 水環境学会誌, **33** (A) (9), 292-298.
- 9) 秋田県 (2014) 八郎湖に係る湖沼水質保存計画 (第2期), 16pp.
- 10) 片野登 (1993) 八郎湖の干拓 (淡水化) に伴う植物プランクトンの変遷, 全国公害研究誌, **18** (1), 28-34.
- 11) 林紀男, 中野芳雄, 尾崎保夫, 片野登 (2007) 八郎湖調整池 (秋田県) の浮遊微生物相, 秋田自然史研究, **51**, 1-7.
- 12) 林 紀男, 岡野邦宏, 尾崎保夫 (2013) 八郎湖における浮遊性藍藻類アオコの多様性, 秋田自然史研究, **63**, 7-11.
- 13) Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, V. H., Borner, T. and Neilan, B. A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system, *Chemistry & Biology*, **7**, 753-764.
- 14) Tanabe, Y., Kasai, F. and Watanabe, M. M. (2007) Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Microbiology*, **153**, 3695-3703.
- 15) Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. (1998) Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strain of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence, *FEMS Microbiology Letters*, **172**, 15-21.
- 16) Harada, K -I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M. F., Oishi, S., Dahlem, A. M., Beasley, V. R. and Carmichael, W. W. (1988) Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria, *Journal of Chromatography*, **448**, 275-283.
- 17) Soma, Y., Tanaka, A., Soma, M. and Kawai, T. (1996) Photosynthetic pigments and perylene in the sediments of southern basin of Lake Baikal, *Organic Geochemistry*, **24**, 553-561.
- 18) Tani, Y., Kurihara, K., Nara, F., Itoh, N., Soma, M., Soma, Y., Tanaka, A., Yoneda, M., Hirota, M. and Shibata, Y. (2002) Temporal changes in the phytoplankton community of the southern basin of Lake Baikal over the last 24,000 years recorded by photosynthetic pigments in a sediment core, *Organic Geochemistry*, **33**, 1621-1634.
- 19) Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C. and Wright, S. W. (eds) (1997) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, 661pp., UNESCO publishing, Paris.
- 20) Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M. (2004) Chlorophyll d in an Epiphytic Cyanobacterium of Red Algae, *Science*, **303** (5664), 1633.
- 21) Hisbergues, M., Christiansen, G., Rouhiainen, L., Sivonen, K. and Börner, T. (2003) PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera, *Archives of Microbiology*, **180** (6), 402-410.
- 22) Rinta-Kanto, J. M., Ouellette, A. J. A., Boyer, G. L., Twiss, M. R., Bridgeman, T. B. and Wilhelm, D. W. (2005) Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-Time PCR, *Environmental Science and Technology*, **39** (11), 4198-4205.
- 23) Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C. and Humbert, J. F. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population, *ISME Journal*, **3**, 419-429.
- 24) Imamura, N. (1981) Studies on the water bloom in Lake Kasumigaura, *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **21**, 652-658.
- 25) Reichwaldt, E. S. and Ghadouani, A. (2012) Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics, *Water Research*, **46**, 1372-1393.
- 26) James, R. T., Chimney, M. J., Sharfstein, B., Engstrom, D. R., Schottler, S. P., East, T. and Jin, K. R. (2008) Hurricane effects on a shallow lake ecosystem, Lake Okeechobee, Florida (USA), *Fundamental and Applied Limnology*, **172** (4), 273-287.
- 27) Itoh, N., Tani, Y., Nagatani, T. and Soma, M. (2003) Phototrophic activity and redox condition in Lake Hamana, Japan, indicated by sedimentary photosynthetic pigments and molybdenum over the last ~ 250 years, *Journal of Paleolimnology*, **29**, 403-422.
- 28) Egge, J. K. and Aksnes, D. L. (1992) Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition, *Marine Ecology Progress Series*, **83** (2-3), 281-289.
- 29) 高橋正, 佐藤敦 (2000) 秋田県八郎湖干拓地水田のケイ酸肥化性の現状, 日本土壌肥科学雑誌, **71** (6), 881-883.
- 30) Park, H. D., Watanabe, M. F., Harada, K -I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M. and Hayashi, H. (1993) Hepatotoxin (microcystin) and

- neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural Toxins*, **1** (6) , 353-360.
- 31) Frangeul, L., Quillardet, P., Castets, A. M., Humbert, J. F., Matthijs, H. C. P., Cortez, D., Tolonen, A., Zhang, C. C., Gribaldo, S., Kehr, J. C., Zilliges, Y., Ziemert, N., Becker, S., Talla, E., Latifi, A., Billault, A., Lepelletier, A., Dittmann, E., Bouchier, C. and de Marsac, N. T. (2008) Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium, *BMC Genomics*, **9**, doi:10.1186/1471-2164-9-274.
- 32) Tooming-Klunderud, A., Fewer, D. P., Rohrlack, T., Jokela, J., Rouhiainen, L., Sivonen, K., Kristensen, T. and Jakobsen, K. S. (2008) Evidence for positive selection acting on microcystin synthetase adenylation domains in three cyanobacterial genera, *BMC Evolutionary Biology*, **8**, doi:10.1186/1471-2148-8-256.
- 33) 秋田県 (2014) 環境白書 (資料編), 141pp..
- 34) Wang, X., Sun, M., Xie, M., Liu, M., Luo, L., Li, P. and Kong, F. (2013) Differences in microcystin production and genotype composition among microcystis colonies of different sizes in Lake Taihu, *Water Research*, **47** (15) , 5659-5669.
- 35) Fortin, N., Aranda-Rodriguez, R., Jing, H., Pick, F., Bird, D. and Greer, C.W. (2010) Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **76** (15) , 5105-5112.
- 36) Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S. and Watanabe, M. M. (2007) Complete Genomic Structure of the Bloom-forming Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843, *DNA Research*, **14**, 247-256.
- 37) Davis, T. W., Berry, D. L., Boyer, G. L. and Gobler, C. J. (2009) The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms, *Harmful Algae*, **8** (5) , 715-725.
- 38) Rantala, A., Fewer, D. P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Borner, T. and Sivonen, K. (2004) Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, **101**, 568-573.
- 39) Joung, S. H., Oh, H. M., Ko, S. R. and Ahn, C. Y. (2011) Correlations between environmental factors and toxic and non-toxic *Microcystis* dynamics during bloom in Daechung Reservoir, Korea, *Harmful Algae*, **10** (2) , 188-193.
- 40) Kardinaal, W. E. A., Janse, I., Agterveld, M. K., Meima, M., Snoek, J., Mur, L. R., Huisman, J., Zwart, G. and Visser, P. M. (2007) Microcystis genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes, *Aquatic Microbial Ecology*, **48**, 1-12.

〔論文要旨〕

本研究では秋田県八郎湖において藍藻毒ミクロシスチン濃度と 16S rRNA 遺伝子に基づく藍藻類の種組成の季節的変動、定量 PCR による *Microcystis* 属有毒株の存在比を調査した。さらに、アオコが集積した湖水より *Microcystis* 属、*Anabaena* 属、*Pseudoanabaena* 属の 8 株を単藻化した。八郎湖では水温が 25℃ 以上になるとクロロフィル *a* 濃度が上昇し、アオコが発生することが確認された。2008 年 8 月にミクロシスチン濃度の増加が認められたが、これは *Microcystis* 属有毒株の増加に起因していた。さらに、*Microcystis* 属単藻株から *mcyA* 遺伝子が検出され、八郎湖の一部の *Microcystis* 属がミクロシスチン産生株であることが確認された。本研究の結果、八郎湖におけるミクロシスチン濃度の変動には *Microcystis* 属有毒株の優占割合が関係していることが示唆された。

キーワード：八郎湖；ミクロシスチン；有毒藍藻；*mcy* 遺伝子