

奥多摩湖産ミクロキスティス属藍藻の 酵素多型と毒素組成 (1)

加藤辰己¹・渡辺真利代²・渡辺眞之³・原 慶明⁴

Allozyme Genotype and Toxin Composition of the *Microcystis* Strains from Lake Okutama-ko (1)

by

**Tatsumi KATO¹, Mariyo F. WATANABE², Masayuki WATANABE³
and Yoshiaki HARA⁴**

¹ 国立科学博物館筑波実験植物園 (Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba 305), ² 東京都立衛生研究所 (Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Tokyo 169), ³ 国立科学博物館植物研究部 (Department of Botany, National Science Museum, Tsukuba 305), ⁴ 筑波大学生物科学系 (Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305)

Abstract Allozyme genotype at four enzyme loci and composition of three toxins (microcystin-RR, -YR, -LR) were determined for nine strains of *Microcystis* (Cyanophyceae) from Lake Okutama-ko. Seven strains belonging to *M. aeruginosa* were concentrated to a single genotype and found to be highly toxic. Another strain of *M. aeruginosa* exhibited different allozyme genotype and high toxicity. Only one strain was attributed to *M. wesenbergii* characterized by specific allozyme genotype and no toxicity.

ミクロキスティス *Microcystis* 属は淡水性の浮遊性藍藻で、富栄養化の進んだ湖沼でしばしば大発生して、いわゆる水の華 (アオコ) を形成する。発生したアオコは、猛烈な悪臭、酸欠による魚類の斃死、ミクロキスチンと呼ばれる肝臓毒の生成 (OISHI & WATANABE 1986, WATANABE *et al.* 1989) など、多くの弊害を引き起こすため、環境浄化や公衆衛生 (上水管理) などの社会的側面からも強い関心を集めている。

日本産のミクロキスティス属藍藻については永らく分類学的混乱が続いてきたが、渡辺・千原 (1980) および WATANABE *et al.* (1986) は、群体の形状や粘質鞘の光学的性質などを指標形質とすることにより、属内に *Microcystis aeruginosa* (KÜTZ.) KÜTZ. emend. ELENK., *M. viridis* (A. BR. in RABENH.) LEMM., *M. wesenbergii* (KOMÁREK) KOMÁREK の3種が認識できることを示した。最近では、アイソザイムを遺伝標識とした分子分類学的解析 (加藤ほか 1989, 1990, KATO *et al.* 1991)、高速液体クロマトグラフィーを用いたミクロキスチンの定量 (HARADA *et al.* 1988, WATANABE *et al.* 1988)、アイソザイム遺伝子の遺伝子型とミクロキスチンの生成量の対応 (WATANABE *et al.* 1991) など、ミクロキスティス属藍藻の種の遺伝的・生化学的特性を、単離株すなわちクローンのレベルで解

明する試みが行われている。

多摩川上流の奥多摩湖（小河内貯水池）でも，上流域からの生活排水の流入にともなう富栄養化が近年急速に進行するにつれて，マイクロキスティス属藍藻の大量発生がみられるようになった。ことに昭和 59 年（1984 年）の 8 月から 9 月にかけては，湖の上流側の約 3 分の 1 が水面から水深約 1 m にわたってアオコにおおわれるという記録的な大発生を見た。その後も小規模ながら，毎年のようにアオコの発生が観察されている。奥多摩湖は東京都の最も重要な上水源のひとつであり，アオコの発生が公衆衛生上深刻な問題を誘発する可能性も決して低くない。そのため従来から早急な取り組みの必要性を指摘されてきたが，奥多摩湖のマイクロキスティス属藍藻についてはほとんど分類学的研究がなされておらず，今後の調査研究や行政施策の基礎となるべき種の同定すら充分には行われていない。

このような現状をふまえ，筆者らは奥多摩湖に発生するマイクロキスティス属藍藻に関する一連の分類学的研究に着手した。これらの研究においては，外部形態に基づいて種を同定するにとどまらず，遺伝的・生化学的特性をクローンのレベルで解明することを中心課題としている。その一環として，本稿では，平成元年（1989 年）に採取されたマイクロキスティス属藍藻のアイソザイム遺伝子の遺伝子型およびマイクロキスティンの生成量について報告する。

材料と方法

マイクロキスティス属藍藻の収集と培養

平成元年（1989 年）の 6 月から 10 月にかけて延べ 5 回の資料収集を奥多摩湖右岸 (Fig. 1) において行い，計 21 株のマイクロキスティス属藍藻を単離した。このうちバイアビリティーの高い 9 株 (TAC 166, 167, 168, 172, 179, 187, 188, 189, 191) を KATO *et al.* (1991) の方法で大量培養した後，凍結乾燥法により試料化した。なお，これらの培養株の一部は国立科学博物館筑波実験植物園藻株保存庫 (TAC: Tsukuba Algal Collections) において系統保存される。

アイソザイム遺伝子の遺伝子型の同定

上記の試料を用い，イソクエン酸脱水素酵素 (IDH; EC.1.1.1.42)，6-隣グルコン酸脱水素酵素

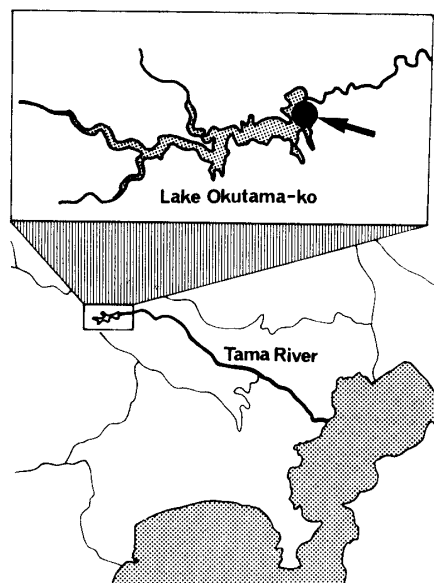


Fig. 1. Collection locality on Lake Okutama-ko.

(6PGD; EC.1.1.1.44), グルコースリン酸異性化酵素 (PGI; EC.5.3.1.9), フォスフォグルコムターゼ (PGM; EC.2.7.5.1) の 4 酵素 (4 遺伝子座) について酵素多型を調査し, 遺伝子型を同定した. 酵素の抽出, 電気泳動, 活性染色, アロザイムおよび対立遺伝子の同定・命名などは, KATO *et al.* (1991) に準拠した.

マイクロキスティンの定量

凍結乾燥試料を用いて, 3 種の毒素 (マイクロキスティン-YR, -RR, -LR) の定量を行った. 定量法は HARADA *et al.* (1988) に拠った.

結果と考察

酵素多型と毒素組成の解析結果を Table 1 に示した. アイソザイム遺伝子の遺伝子型に基づくと, 調査した 9 株は hbkd 型 (TAC 167, 168, 179, 187, 188, 189, 191), cfid 型 (TAC 166), afga 型 (TAC 172) の 3 型に集約される.

このうち hbkd 型の 7 株は, 不規則に枝分かれするなど群体の形状が互いによく似ており, いずれも *Microcystis aeruginosa* と同定された (cf. 渡辺・千原 1980, KATO *et al.* 1991). 毒素組成の上でも (1) 3 種のマイクロキスティンをすべて含むこと, (2) マイクロキスティン-RR, -LR に比べ -YR の生成量が少ないことなど, 相互に類似性が高い. 生成されるマイクロキスティンの絶対量も比較的大きく (cf. WATANABE *et al.* 1988), 生物学的な毒性も高いと推定される. hbkd 型のマイクロキスティス属藍藻はこれまでに TAC 60, 61, 97 の 3 株 (いずれも長野県白樺湖産) が見いだされているが, (KATO *et al.* 1991), これらと奥多摩湖産の 7 株とが毒素組成においても酷似している (WATANABE *et al.* 1991) 点が注目される.

cfid 型の 1 株も群体の形状に基づき *Microcystis aeruginosa* と同定された. 毒素組成は基本的に hbkd 型のそれと類似しており, 毒性は比較的高いと考えられる.

afga 型の 1 株は (1) 群体は袋状で細胞が 1 層に並ぶこと, (2) 粘質鞘の縁が明瞭なこと, (3) 細胞が直径 6.12 μm (平均値) と大型なこと, などの顕著な特徴から *Microcystis wesenbergii* と同定された. 毒素組成においても他の 8 株とは異なり, 3 種のマイクロキスティンはいずれも検出されなかった.

Table 1. Allozyme genotype and toxin composition of the *Microcystis* strains from Lake Okutama-ko.

Strain No. (TAC)	Species*	Allozyme genotype**				Toxin composition***		
		IDH	6PGD	PGI	PGM	RR	YR	LR
166	A	c	f	i	d	91.6	9.2	74.4
167	A	h	b	k	d	227	19.1	278
168	A	h	b	k	d	147	8.3	146
172	W	a	f	g	a	ND	ND	ND
179	A	h	b	k	d	293	29.4	414
187	A	h	b	k	d	164	9.1	118
188	A	h	b	k	d	253	24.6	249
189	A	h	b	k	d	259	11.4	137
191	A	h	b	k	d	386	11.1	97.6

* A: *Microcystis aeruginosa*, W: *M. wesenbergii*

** Allele designations follow KATO *et al.* (1991)

*** μg microcystins/100 mg lyophilized cells. ND: not detected.

M. wesenbergii に属する TAC 38 (茨城県霞ヶ浦産), 52, 57 (長野県諏訪湖産), 85 (島根県浮布池産) の 4 株については, (1) 遺伝的に単型で *afga* 型に固定していること (KATO *et al.* 1991), (2) ミクロキスティンを生成せず無毒であること (WATANABE *et al.* 1988) が既に示されているが, 今回の解析結果はこれらの知見に合致する.

以上のように, 奥多摩湖には形態的・遺伝的・生化学的特性の異なる少なくとも 3 型のミクロキスティス属藍藻が存在することが明らかになった. 今回調査した限りでは, 有毒性の *hbkd* 型が優占して無毒な *afga* 型はわずかに観察されるのみであったが, これは必ずしも奥多摩湖産における有毒性ミクロキスティスの優占性を意味しない. ひとつの湖沼の中でも優占する種が季節的に変動していることを強く示唆するデータも得られており (WATANABE *et al.* 1986), 奥多摩湖におけるミクロキスティス属藍藻フロラの遺伝子型組成とその動態の全容を明らかにするためには, 今後さらに詳細な調査を継続的に行う必要がある.

謝 辞

本研究に際しては, 財団法人とうきゅう環境浄化財団 (研究課題: 奥多摩湖に発生する *Microcystis* 属ラン藻の, アイソザイムを用いた同定および毒性の予知に関する研究) および文部省科学研究費補助金 (一般研究 (B), 課題番号 01480019) による研究助成を受けた. 記して謝する.

文 献

- HARADA, K.-I., K. MATSUURA, M. SUZUKI, H. OKA, M. F. WATANABE, S. OISHI, A. M. DAHLEM, V. R. BEASLEY & W. W. CARMICHAEL, 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.*, **448**: 275-283.
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之, 1989. アイソザイムを遺伝標識とした *Microcystis* 属藍藻の分子分類学的解析とその有効性. *藻類*, **37**: 76.
- 加藤辰己・渡辺真利代・渡辺眞之, 1990. 藍藻 *Microcystis aeruginosa* (s. lat.) の酵素多型とその分類学的意義. *藻類*, **38**: 91.
- KATO, T., M. F. WATANABE & M. WATANABE, 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Arch. Hydrobiol.* (in press).
- OISHI, S., & M. F. WATANABE, 1986. Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effects. *Environ. Res.*, **40**: 518-524.
- 渡辺眞之・千原光雄, 1980. 筑波研究学園都市地区の藻類相 V. 霞ヶ浦産藍藻プランクトンの分類. *筑波の環境研究*, **5A**: 80-86.
- WATANABE, M. F., S. OISHI, K.-I. HARADA, K. MATSUURA, H. KAWAI & S. SUZUKI, 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacterium (blue-green alga). *Toxicon*, **26**: 1017-1025.
- WATANABE, M. F., K.-I. HARADA, K. MATSUURA, S. OISHI, Y. WATANABE & S. SUZUKI, 1989. Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. *Toxicity assessment*, **4**: 487-497.
- WATANABE, M. F., M. WATANABE, T. KATO, K.-I. HARADA & M. SUZUKI, 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (Blue-green algae, cyanobacteria). *Bot. Mag., Tokyo* (in press).
- WATANABE, Y., M. F. WATANABE & M. WATANABE, 1986. The distribution and relative abundance of bloom forming *Microcystis* species in several eutrophic waters. *Jap. J. Limnol.*, **47**: 87-93.