

藍藻類 *Microcystis* 属の有毒物質 microcystin 産生特性に関する研究

農学研究科農林工学専攻 亀山恵司
研究指導教官 前川孝昭

我国をはじめ世界各地の汚濁湖沼において、シアン化カリウムより強い毒性物質 microcystin を産生する藍藻類(アオコ)の異常増殖が顕在化している。これらの湖沼は農業用水・飲料水等、多目的に活用されていることから大きな社会問題となっているため、アオコおよび microcystin の発生抑制のための対策を講じることが急務となっている。しかし、アオコ形成藍藻類の代表種の一つである *Microcystis* 属の microcystin 産生のメカニズムに関しては未だ不明な点が多いのが現状である。従って、本研究では *Microcystis* 属がいつどのような条件下でなぜ microcystin を産生するのかを解明することを目的とし、富栄養化湖沼における有毒物質 microcystin 発生抑制に資する基礎的知見を得るための検討を行った。

まず、我国の代表的な富栄養化湖沼でアオコの発生が認められる水域において、microcystin 現存量の実態調査を行い、特に、夏季の *Microcystis* 属細胞が活発に増殖した時に細胞内 microcystin 含有量が最も高くなるという現象が認められたことから、*Microcystis viridis* NIES-102 を用いて回分培養実験を行ったところ、対数増殖期に細胞内 microcystin 含有量が高いことが明らかになった。このことから、細胞増殖の原単位である細胞周期に注目する必要があることがわかった。一方、湖沼の富栄養化の原因物質の一つである $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の *M.viridis* の microcystin 産生への影響解析を回分培養系によって行ったところ、 $\text{PO}_4\text{-P}$ の枯渇により細胞内 microcystin 含有量が増加するという現象が認められ、細胞内 ATP の枯渇が microcystin 含有量の調節機構に対して影響することが考えられた。つまり細胞内の microcystin 含有量の調節には細胞増殖という内的要因と $\text{PO}_4\text{-P}$ という外的要因が影響していることが明らかとなった。そこで、フローサイトメーターを用いて *M.viridis* の細胞周期測定を行い、細胞周期と microcystin 産生の関係についての詳細な検討を行い、microcystin は G2/M 期 > S 期 > G0/G1 期の順で細胞内に多く含有されることが明らかとなり、S 期 ~ G2/M 期の間に microcystin 産生が活発に行われることを示した。更に microcystin 産生時期を特定するために、各細胞周期における microcystin 合成遺伝子 (*mcy*) の発現レベルを調べたところ、S 期の細胞の割合が最も高いときに *mcy* 遺伝子の発現レベルが高く、*mcy* 遺伝子は S 期に発現し G2 期までの間に microcystin が合成されることが明らかとなった。

上記の結果を鑑み、microcystin はプロテインホスファターゼ 2A (PP2A) に対して強い阻害作用を持つことが知られていることから、microcystin は細胞周期の中の G2 期において細胞分裂の中心的な制御因子として働くサイクリン依存性キナーゼ (CDK) とともに細胞周期制御機構におけるタンパク質活性化に関与し、CDK を介した Cdc25 のポジティブフィードバック機構によって急速な細胞分裂を引き起こすと伴に、G2 チェックポイント機構を調節するための重要な役割を持つ物質であることが推定された。

このことから藍藻類の microcystin 産生を抑制することは湖沼における有毒物質の発生を抑制するだけでなく有毒藍藻類の増殖をも抑制し、結果としてアオコそのものの低減化が可能であると期待できる。今後は S 期における *mcy* 遺伝子発現の転写因子を特定し、その阻害物質を探索・開発することが課題である。

もくじ

第1章 緒論	1
1.1. 背景	1
1.2. 既往の研究および目的	7
1.2.1. microcystin の構造と種類	7
1.2.2. microcystin の生合成	7
1.2.3. 藍藻類の microcystin 産生特性	9
1.2.4. 研究の目的	13
1.3. 論文の構成	13
第2章 富栄養化湖沼における microcystin の動態	15
2.1. はじめに	15
2.2. 調査方法	15
2.3. 結果および考察	18
2.3.1. microcystin 現存量の比較	18
2.3.2. microcystin の挙動解析	18
2.4. 結論	25
第3章 <i>M. viridis</i> の細胞増殖と microcystin 産生特性の関係	26
3.1. はじめに	26
3.2. 実験方法	27
3.2.1. 供試藻類	27
3.2.2. 回分培養法	27
3.2.3. 連続培養法	28
3.3. 結果および考察	30
3.3.1. 回分培養	30
3.3.2. 連続培養	31
3.4. 結論	36
第4章 <i>M. viridis</i> の microcystin 産生に及ぼす窒素・リンの影響	37
4.1. はじめに	37
4.2. 実験方法	38
4.2.1. 供試藻類	38
4.2.2. 培養条件	38
4.2.3. microcystin の分析方法	39
4.2.4. microcystin 産生能の評価法	39
4.3. 結果および考察	40
4.3.1. 細胞の増殖	40
4.3.2. microcystin 産生	40
4.4. 結論	47

第5章 <i>M. viridis</i> の細胞周期と microcystin 産生の関係	48
5.1. はじめに	48
5.2. 実験方法	50
5.2.1. 供試藻類	50
5.2.2. 培養方法	50
5.2.3. SYTOX Green 核酸染色	51
5.2.4. 細胞周期の測定	51
5.2.5. dsDNA の定量	53
5.3. 結果および考察	53
5.3.1. SYTOX Green 核酸染色の効果	53
5.3.2. NO ₃ -N の影響	53
5.3.2-1. 同調培養	53
5.3.2-2. 細胞内 microcystin 含有量と細胞周期の関係	54
5.3.3. PO ₄ -P の影響	64
5.3.3-1. 同調培養	64
5.3.3-2. 細胞内 microcystin 含有量と細胞周期の関係	64
5.4. 結論	76
第6章 <i>M. viridis</i> の microcystin 合成遺伝子発現に及ぼす細胞周期の影響	77
6.1. はじめに	77
6.2. 実験方法	78
6.2.1. 供試藻類	78
6.2.2. 培養方法	78
6.2.3. 核酸の抽出法	79
6.2.4. PCR	79
6.2.5. PCR 産物のシーケンス	81
6.2.6. RNA プローブの合成	81
6.2.7. RNase Protection Assay (RPA)	81
6.3. 結果および考察	82
6.3.1. PCR による <i>mcy</i> 遺伝子増幅	82
6.3.2. 細胞の増殖と細胞周期の割合	83
6.3.3. 細胞内 microcystin 含有量と <i>mcy</i> 遺伝子の発現との関係	84
6.4. 結論	91
第7章 総括および展望	92
謝辞	99
参考文献	100

第1章 緒論

1.1. 背景

我国をはじめ世界各地の湖沼において、人間の経済活動の発展に伴う農業廃水・生活排水・工業廃水中の窒素・リンの流入量の増大による富栄養化が進行するとともに、夏季に植物プランクトンをはじめとした一次生産が活発化し、特に有毒藍藻類の異常増殖による水の華（アオコ）の形成が社会的な問題となっている。このような湖沼は、農業用水・飲料水・工業用水の水源として利用されるばかりではなく観光業や漁業・養殖業など様々な経済活動の中心的な役割を果たしている場合が多いため、有毒藍藻類の発生は人的にも経済的にも甚大な被害をもたらす可能性が懸念されるからである（図 1-1）。特に、農業用水としてアオコの発生した湖沼の水を利用した場合、藍藻由来有毒物質が根を通して農作物中に吸収・蓄積されることや、散水により農作物表面に付着することが懸念される。そして、この汚染された農作物が市場に出回ることにより藍藻由来有毒物質による被害が湖沼周辺住民のみならず広い地域に拡大されることが危惧される。

有毒藍藻類による動物への被害の最初の報告は、1878 年、オーストラリアのアデレードにあるアレキサンドリア湖においてウシ・ウマなどがアオコの発生によって表面に浮いたスカムを摂取した後、動きが鈍くなり昏睡状態となり、まひ・けいれん等の症状を示し死亡したという例である（Francis, 1878）。その後、1900 年代に入って、湖沼や池などの表面に浮いた藍藻細胞を摂取したために動物が死亡した例が多く、国々から報告されるようになった（Falconer *et al.*, 1983; WHO, 1984; Carmaichael *et al.*, 1985; Palmstrom *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1990; Kotak *et al.*, 1995）。1996 年 4 月には、ブラジル北東部のカルアルにおいて、上水源として利用されているダムで藍藻類 *Microcystis* 属によるアオコが発生し、この種が主に産生する毒素 microcystin-LR の水道水への混入によって、腎臓透析患者が 55 人も死亡するという事故が起き世界的に大きな問題となった（Dunn, 1996; Jochimsen *et al.*, 1998）。

体内に入った microcystin は胆汁酸輸送系によって肝臓に特異的に取り込まれ、プロテインホスファターゼの阻害や炎症に関与するアラキドン酸カスケードの活性化等を引き起こし、肝機能不全を引き起こしなど致命的な障害をもたらす（Stotts *et al.*, 1993）。肝臓以外ではマクロ

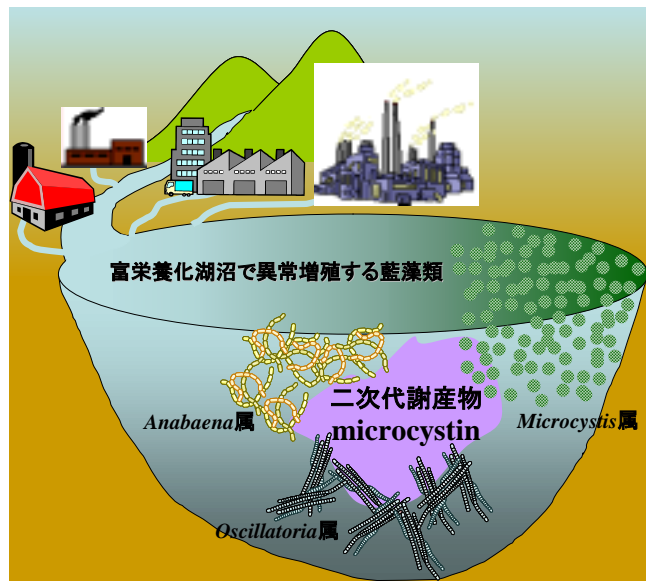
ファージに作用し、炎症反応を引き起こすと考えられている。また、microcystin には強い発癌作用が認められている (Falconer and Buckley, 1989; Falconer, 1991; Runnegar *et al.*, 1991)。これは、microcystin のプロテインホスファターゼ阻害作用によって引き起こされるタンパク質の過剰リン酸化と、腫瘍壊死因子- (TNF-) の誘導によるものと考えられている (Robinson *et al.*, 1991)。microcystin の中でも最も毒性が高いとされる LR 型はマウスの半数致死量 (LD₅₀) が 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 、また RR 型は 660 $\mu\text{g kg}^{-1}$ であり microcystin の種類により毒性も異なる (Sttotts *et al.*, 1993)。microcystin は解毒されにくい毒素であるが、肝臓でゆっくり解毒代謝され、尿中に排泄される。しかし、一部は 1 週間以上も解毒されず、肝臓に残ることが考えられている。このことは、毎日摂取する水や食物の中に microcystin が混入した場合、次第に microcystin が肝臓に蓄積していくことを示唆している。

我国の湖沼における有毒藍藻類の出現に関しては、1980 年に最初の報告がある (Watanabe *et al.*, 1980)。この報告では、霞ヶ浦、諏訪湖、手賀沼、津久井湖、相模湖等の関東近辺の湖沼から採取した自然の *Microcystis aeruginosa* の藻体の水抽出液に、マウスに対する致死作用があることを示している。さらに、1986 年には、霞ヶ浦と諏訪湖から単離された *M. viridis*、*M. aeruginosa*、*M. wesenbergii* などの毒性に関する比較実験の結果も報告されている (Watanabe *et al.*, 1986)。また、1993 年には、日本の湖沼でアオコを形成する藍藻類種は約 20 種類であり、最も多いのは *Anabaena* 属の 9 種で *Microcystis* 属と *Oscillatoria* 属がこれに次ぎ、この他には *Aphanizomenon*、*Anabaenopsis*、*Phormidium* 等が挙げられるが、*Anabaena* 属によるアオコの発生が地域的にも北部に限られ、また発生の期間も短いのに対し、*Microcystis* 属によるアオコの発生は霞ヶ浦や琵琶湖等の日本を代表する富栄養化湖沼を中心に、また、期間も長く出現していることが報告されている (Park *et al.*, 1993; Watanabe and Harada, 1993; Tsuji *et al.*, 1996; Alam *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001)。また、これらの藍藻類が産生する主な有毒物質としては、microcystin (環状ペプチド、肝臓毒性) 以外にも、nodularin (環状ペプチド、肝臓毒性)、anatoxin-a、anatoxin-a(s) (アルカロイド、神経毒性)、cylindrospermopsin (アルカロイド、肝臓毒性)、saxitoxin (アルカロイド、神経毒性) などが既に同定されている (Namikoshi *et al.*, 1996) (表 1-1)。特に、microcystin は重篤な肝障害 (急性毒性) を引き起こすとともに、発がん促進作用 (慢性毒性) を併せ持つ極めて有害な化合物であることもまた明らかとなっているほか、近年では、世界各地の湖沼において microcystin の発生が顕著

であることから、WHO（世界保健機関）では、microcystin の一種で最も毒性が高いとされる microcystin-LR に対して規制基準の設定を各国に勧告している（WHO, 1998）。これらのことから、藍藻由来有毒物質は様々であるが、現在、各国で最も注目され、研究対象となっているのが microcystin であり、これに対する基礎的知見の収集のための研究が行われている。

我国の富栄養化問題を改善するための対策として、従来からの水質汚濁防止法に基づき、昭和 59 年（1984 年）に湖沼水質保全特別措置法を制定し、昭和 60 年 3 月から施行している。同法に基づく指定湖沼は、環境基準が達成されない又は達成されないこととなるおそれが著しく、利水状況、汚濁の推移等から水質保全対策を総合的に講ずる必要がある湖沼である。これまでに、霞ヶ浦、琵琶湖、諏訪湖、手賀沼、印旛沼、児島湖、釜房ダム貯水池、中海、野尻湖、宍道湖の 10 湖沼を同法に基づく水質改善強化のための指定湖沼とし、汚濁源（事業場排水、生活排水など）に対して、アオコの発生原因とされる窒素およびリンを主体とした栄養塩類の放流規制措置を総合的かつ計画的に推進するようになった。1994 年には、「特定水道利水障害防止のための水道水源水域の水質保全に関する特別措置法」および「水道原水水質保全事業の実施の促進に関する法律」の両法が制定された。その結果として、湖沼やダムへの栄養塩類の流入は抑制されるようになったものの、ひとたび栄養塩類が湖沼へ流入すると多様な形態で底泥に蓄積され、容易に除去することが困難である。指定湖沼の COD 濃度は平成 6 年以降、減少傾向にあるが湖沼水質保全特別措置法施行以前の値とほとんど変わっていない（図 1-2）。また、COD に対する環境基準達成率は、河川や海域の BOD・COD 達成率と比較しても非常に低く、40%前後でほぼ横ばいであることから（図 1-3）、今後もこの汚濁した現状は永きに渡り続き、多くの湖沼で夏季にアオコが発生することは避けられないことが予想される。

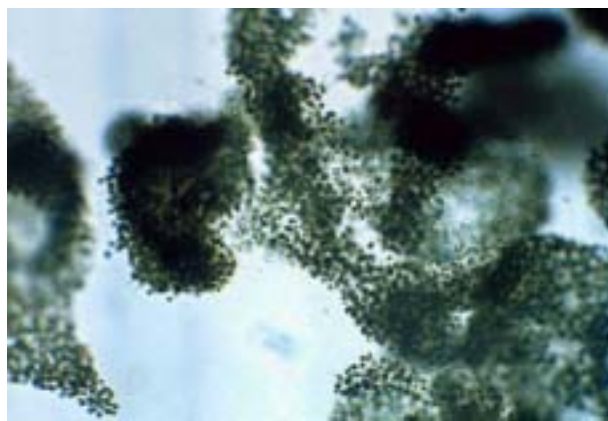
従って、我国の湖沼においては、非常に強力な毒素 microcystin を産生する藍藻類の異常増殖を抑制できるだけの水質改善が達成されていないことから、水圏生態系の悪化はもとより飲料水として利用されている水源では、その混入による生体への危険性が危惧されるため、湖沼におけるモニタリング、人体への影響、水圏生態系への影響、分解プロセス、生合成メカニズムについての研究・開発が極めて重要である。



A



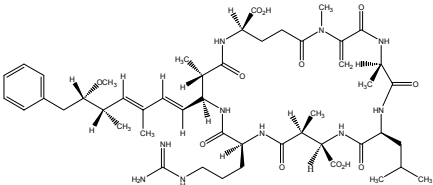
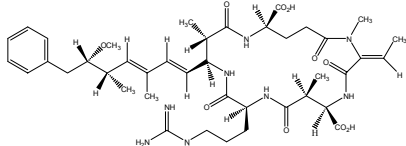
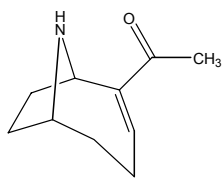
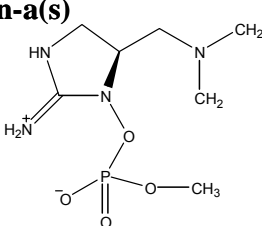
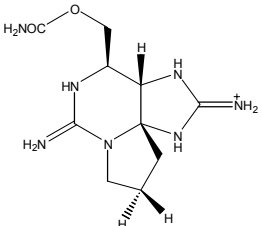
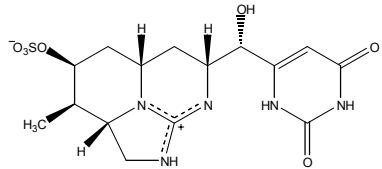
B



C

図 1-1 研究背景の概略(A)、1998 年 7 月 29 日の霞ヶ浦土浦港で発生したアオコ(B)および、その時のアオコ形成藍藻類 *Microcystis* sp.の顕微鏡写真(C)

表 1-1 主な藍藻由来有毒物質

藍藻由来有毒物質	産 生 種	毒 性
microcystin-LR 	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis viridis</i> <i>Microcystis wesenbergii</i> <i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Oscillatoria agardhii</i> <i>Nostoc</i> sp.	タンパク質脱リン酸化 阻害 (肝臓毒性)
nodularin 	<i>Nodularia spumigena</i>	タンパク質脱リン酸化 阻害 (肝臓毒性)
anatoxin-a 	<i>Anabaena circinalis</i> <i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> <i>Oscillatoria</i> sp. <i>Cylindrospermum</i> sp.	神経刺激伝達阻害 (神経毒性)
anatoxin-a(s) 	<i>Anabaena flos-aquae</i>	神経刺激伝達阻害 (神経毒性)
saxitoxin 	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	神経刺激伝達阻害 (神経毒性)
cylindrospermopsin 	<i>Cylindrospermopsis rachiborskii</i> <i>Umezakia natans</i>	タンパク質脱リン酸化 阻害 (肝臓毒性)

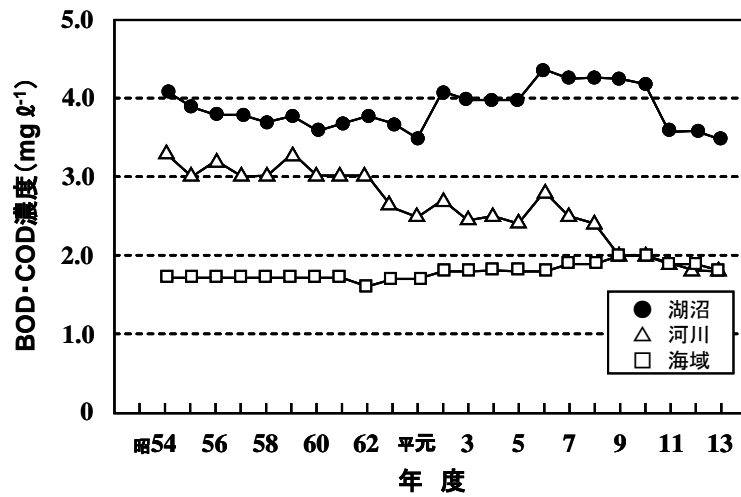


図 1-2 河川・湖沼・海域における BOD 又は COD の濃度推移
(環境省環境管理局水環境部, 2002 より引用)

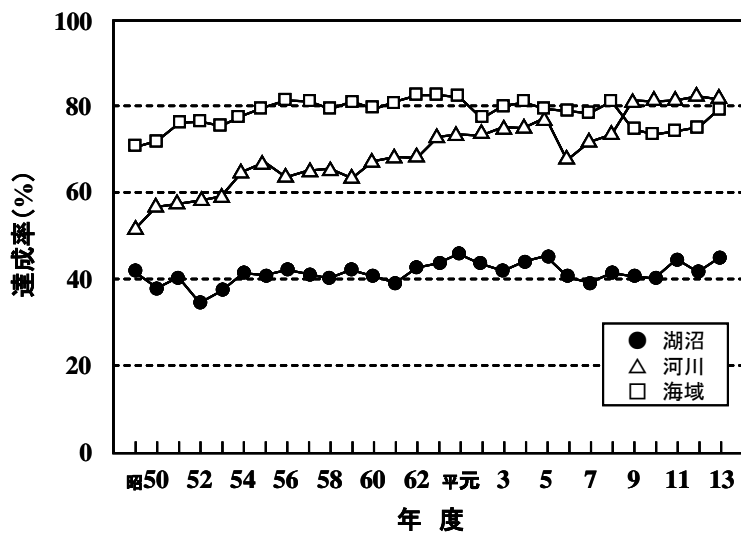


図 1-3 環境基準 (BOD 又は COD) 達成率の推移
(環境省環境管理局水環境部, 2002 より引用)

1.2. 既往の研究および目的

1.2.1. microcystin の構造と種類

Microcystis 属をはじめ *Anabaena* 属および *Oscillatoria* 属によって産生される microcystin は (Krishnamurthy *et al.*, 1986, 1989; Harada *et al.*, 1991; Carmichael *et al.*, 1992; Rinehart *et al.*, 1994) 7 個のアミノ酸からなる環状ペプチド構造であり、その構造は、cyclo(D-Ala-L-X-erythro-β-methyl-D-isoAsp-L-Z-Adda-D-isoGlu-N-methyldehydro-Ala) で表され、3 種類の右旋性アミノ酸である D-アラニン (Ala)、D-グルタミン酸 (Glu)、D-β-メチルアスパラギン酸 (β-MeAsp) と、自然界におけるタンパク質構成アミノ酸とは異なる N-メチルデヒドロアラニン (Mdha) および炭素 20 個の Adda (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca- 4,6-dienoic acid) の 5 個アミノ酸を基本骨格とし (Carmichael *et al.*, 1988) X および Z が種々の左旋性の L-アミノ酸残基に置き換わることにより、現在までに 60 種類以上もの microcystin 類の種類が報告されている (Harada *et al.*, 1990; Rinehart *et al.*, 1994; Sivonen, 1996)。我国での検出頻度・現存量ともに最も多いのは、Z 置換基がアルギニン (Arg) で、X 置換基のみがそれぞれロイシン (Leu)、アルギニン (Arg)、チロシン (Tyr) である LR 型・RR 型・YR 型の 3 種類である (図 1-4)。microcystin の構造で最も特徴的な部位は β-アミノ酸の Adda である。このアミノ酸は汽水域に生息する藍藻類 *Nodularia spumigena* によって産生される有毒物質 nodularin (表 1-1) にも含有されており、microcystin と極めて類似した生理活性を示す。従って、このアミノ酸は microcystin の生理活性の面で極めて重要な役割を持っていると考えられている。

1.2.2. microcystin の生合成

リボソーム非依存的ペプチド合成酵素 microcystin の生合成に関する初めての報告は、Moore *et al.* (1991) が microcystin-LR を主に産生する *M.aeruginosa* PCC7820 を用いて microcystin の前駆体となる物質について調べた研究である。その報告では、生理活性部位として考えられている Adda は主に 4 分子の酢酸と L-フェニルアラニンによって構成され、D-Glu 部位は L-Glu に由来するが -Me-Asp は L-Glu の異性化で生じるのではなく酢酸とピルビン酸より合成され、Arg 部位には L-Glu と酢酸が導入されることなどが明らかとなった。そして、微生物の合成する免疫抑制剤サイクロスポリン

(cyclosporine ; 臓器移植者のための拒絶反応を抑える薬) や抗生物質グラミシジン S (gramicidin S)・チロシジン (tyrocidin)・サーファクチン (surfactin) などの研究において明らかとなったペプチドの生合成メカニズムであるリボソーム非依存的ペプチド合成酵素複合体 (nonribosomal peptide synthetases, NRPS) (Kleinkauf and Dohren, 1996)の発見によってさらに microcystin 生合成機構の解明の研究は進展した。タンパク質の多くはリボソーム上で合成されるが、50 アミノ酸残基以下の小さいポリペプチドは、リボソーム非依存的に NRPS によって合成される (Neilan *et al.*, 1999; Dittmann *et al.*, 2001)。NRPS は、原核生物や下等な真核生物のみに存在し、チオテンプレート機構 (thio-template mechanism) とよばれるペプチドの合成反応を触媒する巨大な酵素である (Aermant and Carmichael, 1996)。NRPS は 100 - 1,700 kDa の大きな酵素複合体であり (Marahiel *et al.*, 1997) それぞれの酵素はそれぞれ一つのモジュールを形成し、aminoacyl adeylation (A), condensation (C), aminotransferase (AMT), racemase (RC), N-methyltransferase (NM), epimerization (Ep), thioesterase (TE)の機能を有する (図 1-6)。

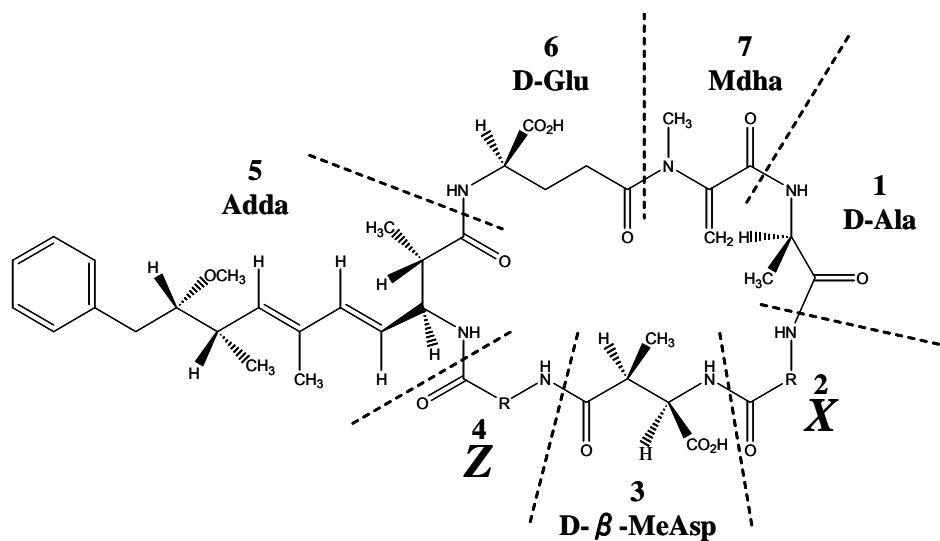
ポリケチド合成酵素 microcystin をはじめ多くの微生物由来生物活性物質はポリケチド構造(-CH₂)_nの脂肪酸を含んでいる。ポリケチド生合成はマクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン (erythromycin) の生合成研究によって明らかにされた微生物の代謝機構である (Katz, 1997)。リボソーム非依存的ペプチドとポリケチドの構造や生合成メカニズムに関しては多くの点で異なるが、いくつかの類似性も見られる (Cane and Walsh, 1999)。ポリケチド合成酵素複合体 (polyketide synthases, PKS) は、NRPS と同様に、多機能を有した巨大酵素の複合体であり、それぞれの PKS ユニットは、ポリケチド鎖の伸長反応を離散的に直接触媒し、β-ketoacyl synthase (KS), acyltransferase (AT), acyl carrier protein (ACP), ketoacyl reductase (KR), dehydratase (DH), C-methyltransferase (CM), O-methyltransferase (OM)の機能を有する (図 1-6)。

microcystin 合成遺伝子 microcystin 合成遺伝子 (*mcy*) は 51 kbp からなり (図 1-5) 転写方向の異なる 2 つのオペロンから構成されている。 *mcyABC* オペロンは microcystin-LR 骨格中の Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg の合成に関与しており、先にも述べたように、microcystin もまた 7 つのアミノ酸からなる環状のペプチド化合物で、Adda と呼ばれる部位には(-CH₂)_n 結合が存在するため、 *mcyDEFG* オペロンは、1 つの PKS 遺伝子 (*mcyD*)、2 つの NRPS/PKS ハイブリッド遺伝子 (*mcyE* および *mcyG*)、そして 1

つのラセマーゼ遺伝子 (*mcyF*) から構成される。藍藻類のペプチド合成で、チオテンプレートメカニズムによるリボソーム非依存的ペプチド合成やハイブリッド遺伝子が発見されたのは microcystin がはじめての例である。また、*mcyDEFG* オペロンは、microcystin の毒性部位と考えられている Adda 部位の合成に関与していることが明らかとなっている。

1.2.3. 藍藻類の microcystin 産生特性

既に、藍藻類の microcystin 産生特性と各種水環境因子 (水温・pH・光強度・微生物代謝物・各種栄養塩) の関係に関しては、いくつかの研究報告があり、細胞乾燥重量当たりの microcystin 量が最も高くなる時の最適値がいくつかの因子については明らかになっている (表 1-2)。水温は、藍藻類種によっても異なるが 20 前後の温度が最適値であり、表層の水温が 30 程度となる夏季が最も microcystin 産生に適した条件ではないと考えられる。また、夏季のアオコ発生時の表層は pH 9~10 にまで達することを考慮すると、最適 pH 7.0 というのは非常に低い値であり、アオコ形成時には microcystin 産生にとって決して有利な条件ではないことが考えられる。従って、一般的に考えられているような高水温で日照時間が長く、湖沼の一次生産の活発化による高 pH 条件の夏季に microcystin 産生が最も活発に行われるのではないことが推察される。また、*Microcystis* 属の microcystin 産生特性と窒素・リンの影響に関しては、いくつか報告があるが、それぞれの報告で窒素・リン濃度が及ぼす影響は異なり、未だ明確な結論が得られていないのが現状である。



	<i>X</i>	<i>Z</i>
microcystin-LR	L-Leu	L-Arg
microcystin-RR	L-Arg	L-Arg
microcystin-YR	L-Tyr	L-Arg

図 1-4 microcystin の基本構造

(渡辺ら 1994 より引用)

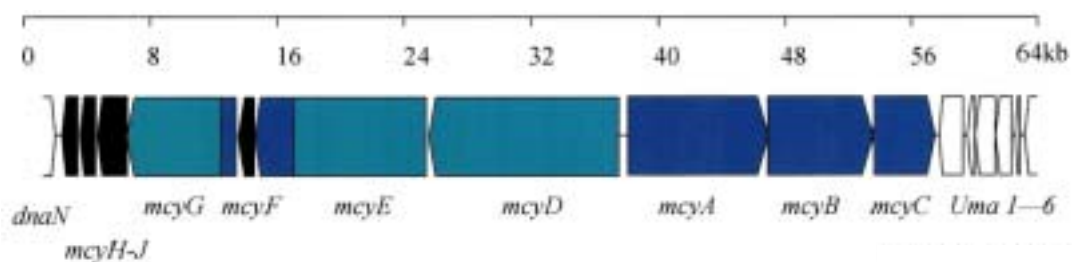


図 1-5 microcystin 合成遺伝子クラスター *mcyABC* と *mcyDEFGHIJ*

(Tillett *et al.*, 2000 より引用)

表 1-2 有毒藍藻類の microcystin 産生のための最適条件

水環境因子	最適値	供試藻類	文献
水温 ()	20	<i>Microcystis aeruginosa</i> UV006	Van der Westhuizen and Eloff (1985)
	20-25	<i>Oscillatoria agardii</i> 97	Sivonen <i>et al.</i> (1990)
	15-25	<i>Oscillatoria agardii</i> CYA128	Sivonen <i>et al.</i> (1990)
	25	<i>Microcystis viridis</i>	Song <i>et al.</i> (1998)
pH	7.0	<i>Microcystis viridis</i>	Song <i>et al.</i> (1998)
光強度 ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	15-30	<i>Oscillatoria agardii</i> 97	Sivonen <i>et al.</i> (1990)
	12-24	<i>Oscillatoria agardii</i> CYA128	Sivonen <i>et al.</i> (1990)
	40	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Utkilen and Gjoleme (1992)
	15	<i>Microcystis viridis</i>	Song <i>et al.</i> (1998)
	68-400(赤色光)	<i>Microcystis aeruginosa</i> PCC7806	Kaebernick <i>et al.</i> (2000)
微生物代謝物	影響無	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH01-A19	Orr and Jones (1998)
	影響有	<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX1444	Kearns and Hunter (2000)
Fe^{3+}	高濃度	<i>Microcystis aeruginosa</i> CYA228	Utkilen and Gjoleme (1995)
N/P	小	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kotak <i>et al.</i> (2000)
	16	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX2388	Lee <i>et al.</i> (2000)
$\text{NO}_3\text{-N}$	不明	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH01-A19	Orr and Jones (1998)
	高濃度	<i>Microcystis aeruginosa</i> MASH01-A19	Long <i>et al.</i> (2001)
	不明	<i>Microcystis</i> spp. GL260735, GL060916	Vezil <i>et al.</i> (2002)
$\text{PO}_4\text{-P}$	低濃度	<i>Microcystis aeruginosa</i> UTEX2388	Oh <i>et al.</i> (2000)
	不明	<i>Microcystis</i> spp. GL260735, GL060916	Vezie <i>et al.</i> (2002)

1.2.4. 研究の目的

このように、湖沼の汚濁による富栄養化は、有毒物質 microcystin を産生する有毒藍藻類 *Microcystis* 属の異常増殖を引き起こすという危険性があるにもかかわらず、現在のところ、湖沼水質の改善は停滞しており、今後も恒常的に世界各地の湖沼において有毒アオコの発生が危惧される。このような水域における効果的な microcystin の発生抑制対策を講じることや microcystin 産生阻害剤等の開発を行うためには、藍藻類による microcystin 産生のメカニズムや microcystin 産生特性について詳細に解明する必要がある。従って、本研究は富栄養化湖沼における藍藻類の microcystin 産生抑制のための基盤研究として位置付けることができる。

Microcystis 属の microcystin 生合成に関する研究は世界各地で行われ、遺伝子レベルでの microcystin 合成機構も解明されつつあるが、藍藻類がいつ、どのような条件で、なぜ microcystin を産生するのかという産生特性については未だ解明されていない。本研究では、外的因子としての各種水環境因子の影響と内的因子としての細胞周期に注目し藍藻類 *Microcystis* 属の microcystin 産生特性を解明するために以下の調査・研究を行った。

1.3. 論文の構成

第1章では、研究背景および既往の研究について述べた。

第2章では、我国の代表的な富栄養化湖沼でアオコの発生が認められる水域において、microcystin 現存量の調査を行い、特に、初夏の *Microcystis* 属細胞が活発に増殖する時に細胞内 microcystin 含有量が最も高くなるという現象を示した。

第3章では、湖沼調査の結果を検証するために、*Microcystis viridis* NIES-102 無菌単藻株を用いた回分培養実験を行い、対数増殖期に細胞内 microcystin 含有量が高いことを明らかにし、細胞増殖と microcystin 産生に密接な関係のあることを示した。

第4章では、回分培養系を用いて、湖沼の富栄養化原因物質であるリン濃度の *M.viridis* の microcystin 産生への影響解析を行い、リン濃度の枯渇により細胞内 microcystin 含有量が増加するという現象が認められたことから、細胞周期制御に係るペプチド分子の分解を司る ATP 高要求性のユビキチン - プロテアソーム系が阻害されたことが考えられ、

また、細胞増殖の原単位である細胞周期に注目することが必要であることがわかった。

第 5 章では、フローサイトメーターを用いて *M. viridis* の細胞周期測定を行い、細胞周期と microcystin 産生の関係について検討を行い、microcystin は G0/G1 期 < S 期 < G2/M 期の順で細胞内に多く含有されることが明らかとなり、S 期 ~ G2/M 期の間に microcystin 産生が活発に行われることを示した。

第 6 章では、更に詳しく microcystin 産生時期を特定するために、各細胞周期における microcystin 合成遺伝子 (*mcy*) の発現レベルを検出したところ、S 期の細胞の割合が最も高いときに *mcy* 遺伝子の発現レベルが高く検出され、*mcy* は S 期に発現し G2 期までの間に microcystin が合成されることがわかった。従って、microcystin は細胞周期の中の G2 期に最も必要な物質であることが考えられ、この時に細胞分裂の中心的な制御因子として働くサイクリン依存性キナーゼ (CDK1) とともに細胞周期制御機構におけるタンパク質活性化の関与し、細胞増殖をコントロールするための重要な役割を持つ物質であることを考察した。

第 7 章では、これまでの研究結果を総括し展望について述べた。

第2章 富栄養化湖沼における microcystin の動態

2.1. はじめに

第1章で既に述べたように、有毒藍藻類 *Microcystis* 属によるアオコの発生によって肝臓毒性 microcystin が産生され、湖沼水中に存在するという問題が生じている。

そこで、アオコの発生が恒常的に認められる富栄養化湖沼において、microcystin 発生抑制のための手法開発を行うためには、アオコの発生と microcystin 現存量の関係を十分把握し、地域による microcystin 現存量の差異や、湖沼水中の microcystin の季節的な挙動など藍藻類の microcystin 産生特性に関する基礎的な知見を得ることを目的として、我国の代表的な富栄養化湖沼において実態調査を行った。

2.2. 調査方法

1998 年の夏季に、我国における代表的な富栄養化湖沼で、上水・農業用水・工業用水の水源として利用され、且つ、湖沼水質保全特別措置法に指定されている 6 湖沼、児島湖（岡山県、7 月 26 日）・諏訪湖（長野県、8 月 8 日）・津久井湖（神奈川県、8 月 8 日）・手賀沼（千葉県、8 月 9 日）・印旛沼（千葉県、8 月 9 日）・霞ヶ浦（茨城県、8 月 8 日）を選定し、サンプリングを行った。また、霞ヶ浦および手賀沼においては 6 月から 10 月までの間、定期的に同一のポイントでサンプリングを行った。

それぞれの湖沼からのサンプリングは、アオコの集積が最も顕著な水域の表層から約 30 cm の深さの湖水を採取し、0℃ で保存した。サンプリング後、24 時間以内に chlorophyll *a* 濃度($\mu\text{g l}^{-1}$)・*Microcystis* sp 細胞数(cells ml^{-1})の測定を行い、3 種の microcystin-LR・-RR・-YR 濃度($\mu\text{g l}^{-1}$)の測定のための前処理を行った。

microcystin の分析は、Harada *et al.* (1988) の方法に従って行った。方法の詳細は図 2-1 に示した。それぞれの湖沼から採水したサンプルは、湖沼水中全ての microcystin 濃度 (Total-MC) を測定するための原液と、藍藻細胞から溶出し湖沼水中に溶存の microcystin 濃度 (Extra-MC) を測定するための GF/C フィルター (Whatman Ltd.) を通したろ液の 2 種類に分けた。サンプルの原液は、湖沼水中の藍藻細胞を破碎し細胞内にある microcystin を全て溶出させるため、酢酸を最終濃度 5 % となるように添加し、30

分間振とう放置した後、GF/C を用いて濾過した。濾液は microcystin を濃縮精製するため Sep-pak C18 ODS カートリッジ (Waters Co.) を用いて、流速 5 ml min^{-1} で microcystin を固定した。次いで、供雑物質を洗い流すため 15 ml の超純水で 2 回洗浄し、さらに 5 ml の 20% メタノールでカートリッジの中を 2 回洗浄した。次いで、5 ml の 99.9% メタノールでカートリッジから microcystin を溶出させ、抽出液を濃縮乾固し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用キャリアー (0.05 M リン酸緩衝液 pH 3.0 : メタノール = 1 : 1) 1 ml に溶解させ、HPLC 用のサンプル瓶に移した。サンプルの GF/C の濾液は、直接 Waters Sep-pak C18 ODS カートリッジに通し、以下原液と同様の操作で濃縮し、高速液体クロマトグラフ用のサンプル瓶に移した。

HPLC (Shimadzu Co.) による microcystin 定量は、最大吸収波長 238 nm、流速 1 ml min^{-1} 、カラム温度 40 °C、内径 4.8 mm・長さ 15 cm の Cosmosil 5C18 ODS カラム (Nacalai tesque Inc.) の条件下で行った。なお、この HPLC の検出限界は $1 \mu\text{g l}^{-1}$ であり、RSD < 5% であることを確認済みである。

なお、高速液体クロマトグラフィーにより、サンプル原液より Total-MC を、サンプル濾液より Extra-MC を求め、Total-MC から Extra-MC を差し引くことにより細胞内 microcystin 濃度 (Intra-MC) を算出した。*Microcystis* sp. 一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) は、Intra-MC を *Microcystis* sp. 細胞数 (cells l^{-1}) で割ることによって求めた。

また、microcystin は現在 60 種類以上の同族体が確認されているが、中でも最も一般的な microcystin-RR、-YR、-LR の 3 つのタイプについて定量を行なった。分析のための標準物質として、microcystin-LR、-RR、-YR (Wako Co.) を用い、3 種の microcystin の同定のためには、液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC/MS, Hitach Co.) を用いた。

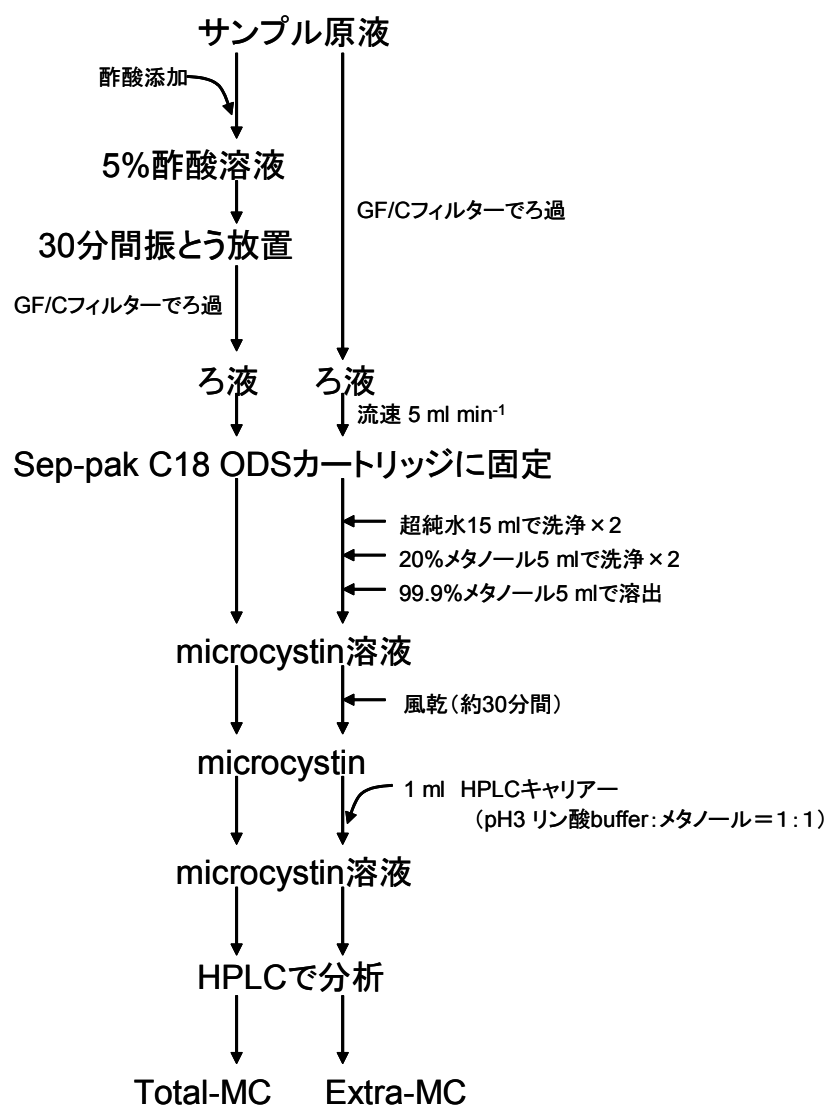


図 2-1 microcystin 分析法

2.3. 結果および考察

2.3.1. microcystin 現存量の比較

調査を行った 6 湖沼の全てにおいて、*Microcystis* 属を優占藻類とするアオコの形成が認められ、同時に、3 種の microcystin、LR 型・RR 型・YR 型が検出された。アオコの集積が最も顕著であったのは霞ヶ浦で、次いで児島湖、諏訪湖であった（図 2-2）。3 種の Total-MC の合計は、霞ヶ浦で $2,880 \mu\text{g l}^{-1}$ 、諏訪湖で $726 \mu\text{g l}^{-1}$ 、児島湖で $685 \mu\text{g l}^{-1}$ 、印旛沼で $150 \mu\text{g l}^{-1}$ 、手賀沼で $20.7 \mu\text{g l}^{-1}$ 、津久井湖で $2.88 \mu\text{g l}^{-1}$ であった。調査を行った 6 湖沼の内、児島湖・諏訪湖・霞ヶ浦・津久井湖・手賀沼においては、*M.aeruginosa* が優占種であった。この 5 湖沼において、細胞内に含有される 3 種の microcystin の割合を比較すると、児島湖・諏訪湖・霞ヶ浦においては、3 種の microcystin がほぼ同じ割合で含有されていたが、津久井湖・手賀沼においては、YR 型はほとんど含有されず、LR 型・RR 型が多く含まれていたことが分かった（図 2-3）。これらの湖沼では、同一の種 *M.aeruginosa* によるアオコの形成が認められたにもかかわらず、Con-MC もまた大きく異なり、その水域に特有の物理・化学的な水環境因子やあるいは生物・生態学的な様々な因子の影響が *M.aeruginosa* の細胞内における microcystin 産生特性に対して影響したものと考えられた。

一方、印旛沼においては RR 型の割合が非常に低く、YR 型が高い割合で含有され、また、印旛沼の Con-MC も他と比べ極めて高かった（図 2-3）。これは、他の 5 つの湖沼においては *M.aeruginosa* が多く認められたが、印旛沼においては特に *M.wesenbergii* が多く認められた。これまで、*Microcystis* 属の中で microcystin を産生する種として知られていたのは、*M.aeruginosa* と *M.viridis* のみであったが、最近の報告では *M.wesenbergii* や *M.ichthyoblabe* もまた microcystin を産生することが明らかとなっている (Watanabe *et al.*, 1988; Neilan *et al.*, 1997; Otsuka *et al.*, 1999)。従って、手賀沼においては *M.wesenbergii* による microcystin 産生が行われたため、*M.aeruginosa* の microcystin 産生特性との差異が現れたものと考えられた。

2.3.2. microcystin の挙動解析

microcystin の産生特性を把握するためには季節変動に伴う *Microcystis* 属細胞の増殖

および microcystin 現存量変化を明らかにする必要がある。そこで、関東地域の水資源として重要な霞ヶ浦と全国の湖沼で最も汚濁が進行している手賀沼について microcystins の動態を詳細に調べた。図 2-4-A に霞ヶ浦土浦港の *Microcystis* 属の細胞数および chlorophyll *a* 濃度の季節的变化を示した。*Microcystis* 属は 7 月初旬から増加し始め、8 月後半で細胞数は消滅しつつあった。最も増殖の著しい時期で、 1×10^9 cells m l^{-1} 程度であり、主な種は *M.aeruginosa* であった。また、*Microcystis* 属が認められなかった 6 月および 10 月の chlorophyll *a* は約 $50 \mu\text{g l}^{-1}$ であったが、その chlorophyll *a* の由来は、顕微鏡観察により藍藻 *Oscillatoria* 属が極めて多く存在していたためこの種に起因したものと考えられた。また、Total-MC が最も高かったのは 7 月下旬であり、3 種の microcystins のいずれも $3,000 \mu\text{g l}^{-1}$ 以上存在した。8 月下旬以降 Total-MC は著しく減少し、9 月後半には検出限界以下となった（図 2-4-B）。一方、Con-MC は、*Microcystis* 属の細胞数および Total-MC が最大となった 7 月下旬の時とは異なり、それより早い時期の 7 月中旬に最大となった（図 2-4-C）。次に細胞内外での microcystins の存在形態を明らかにするために、Intra-MC と Extra-MC の割合を図 2-4-D に示した。7 月中旬から 8 月中旬の湖水中に存在する microcystins のほとんどは細胞内に保持され、細胞外に存在しないことから、図 2-4-C および図 2-4-D より、この期間中において細胞内では microcystin 産生特性が顕著に変化したことを示している。また、8 月後半から 9 月下旬にかけて細胞外 microcystin 濃度の割合が増加したのは、細胞の死滅によって細胞外へ放出されたものと考えられる。

手賀沼の *Microcystis* 属の細胞数および chlorophyll *a* 濃度の変化を図 2-5-A に示した。手賀沼は霞ヶ浦よりも早い時期の 6 月中旬から *Microcystis* 属の出現が確認され、その細胞数の大きな変動は無くほぼ一定量を推移し、9 月中旬までその存在が確認された。それ以降、糸状性藻類 *Anabaena* 属や *Oscillatoria* 属が存在したが microcystins が検出されることはなかった。しかしながら、これらの種による microcystin 産生についての報告もいくつかあるため、*Anabaena* 属や *Oscillatoria* 属による microcystins の産生特性の解明も注目すべき課題である。また、細胞数の変化とは無関係に、7 月下旬から 3 種の Total-MC は顕著に増加し、8 月下旬に最大濃度となった（図 2-5-B）。これは、日照時間の増加や気温の上昇など様々な要因により、microcystins 産生の活性が高まったためであると考えられる。Con-MC は、霞ヶ浦の場合と同様に、Total-MC が最大となる以前

に最大となった(図 2-5-C)。また、Con-MC の高い時期には湖水中に溶存する microcystins のほとんどは細胞内に存在し、細胞外に存在する量は全体の約 10% であった(図 2-5-D)。

以上のことから、霞ヶ浦および手賀沼において、3 種の microcystins は、*M.aeruginosa* を中心とした藍藻類の細胞増殖の初期段階で産生され、それが細胞内に蓄積され、死滅時期になると細胞外への溶出が始まるものと推定される。また、細胞内に含まれる microcystins 量は一定の値ではなく、地域によっても経時的にも様々に変化した。今回調査を行った 6 湖沼のうち印旛沼を除く 5 の湖沼で *M.aeruginosa* を優占種とするアオコの形成が認められた。しかしながら、Con-MC は湖沼に固有の値であり、含有されている microcystins の存在比は児島湖、諏訪湖、霞ヶ浦の 3 種の microcystins が均等に存在する *M.aeruginosa* が出現するグループと、津久井湖、手賀沼のような YR 型が非常に少ない *M.aeruginosa* が出現するグループの 2 つに別けることができた。その要因として、近年湖沼の富栄養化で問題となっている窒素およびリンに関しては、Long *et al.* (2001) は、硝酸塩濃度と microcystin 産生特性の関係に関して、硝酸塩濃度の増加に伴って単位細胞あたりの microcystins 量は増加することを報告している。一方、Lee *et al.* (2000) は、リン酸塩と microcystin 産生特性の関係に関して、リン濃度の増加とともに単位細胞あたりの microcystins 量は減少するという報告をしている。また、その他の様々な環境因子によっても細胞あたり又は乾燥重量あたりの microcystins 濃度が変化するという報告がなされており、それぞれの地域に特有な水環境の違いによって引き起こされると考えられる。さらに、特に霞ヶ浦においては、細胞数の増加が顕著な時期であった 6 月に Conc-MC は最も多かった。Watanabe *et al.* (1989) や Kaya and Watanabe (1990) の報告によると、回分培養実験において、細胞の乾燥重量あたりの microcystins 濃度は、細胞の対数増殖期に最も多く、定常期にかけて減少する傾向があることを示している。このことから、水質等の外的要因のみならず、細胞増殖という内的要因によっても microcystins 産生特性が変化することが考えられる。従って、本調査より今後富栄養化湖沼において microcystins の産生特性を把握するためには、対象とする湖沼の水質等の外的な水環境因子パラメータを明らかにするとともに、細胞の増殖活性についても十分把握することが重要であることが示唆された。

また、夏季において、Extra-MC の割合は非常に少なく、そのほとんどは細胞内に保持されることから、湖沼中の microcystin の動態を把握するためには Con-MC に注目す

ることが重要であることが分かった。霞ヶ浦湖水からは、数時間で microcystin を完全に分解する菌が見つかった（Saito *et al.*, 2003）。湖水中の菌が microcystin を分解する酵素を保有していることも明らかとなっている（Jones *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996）。従って、細胞外へ溶出した microcystins は湖水中に存在する様々な従属栄養細菌類によって速やかに分解されるため、夏季の湖水に溶存する microcystin は非常に少ないことが考えられた。湖沼において microcystins は高濃度で長期的に存在したり、急激に減少したり、大きく変化することがわかった。従って、細胞内外での microcystin の動態を把握するためには、microcystins 産生の助長・抑制あるいは microcystins 分解に関与する細菌類等の生物学的な要因にも今後注目する必要がある。

本調査では、日本の代表的な富栄養化湖沼において *Microcystis* 属および microcystins 現存量の変化を調べたところ、空間的（水域）にも時間的（季節）にも microcystins 産生特性は様々に変化することが分かった。恐らく、この microcystins 産生特性の違いは、細胞を取り巻く外的要因としての水質等の各種水環境因子（物理化学的的要因）や共存する微生物等の相互作用（生物学的要因）によって引き起こされと考えられる。また、特に、細胞増殖が活発な時に細胞内 microcystin 含有量が高かったことは細胞増殖という内的要因も大きく関与していることが考えられるがそのメカニズムについては明らかにされていない。従って、細胞内における microcystins の産生メカニズムを詳細に解明することによって、自然水域における microcystin 産生特性を把握し、効果的な microcystin 産生抑制手法を確立することができると考えられた。

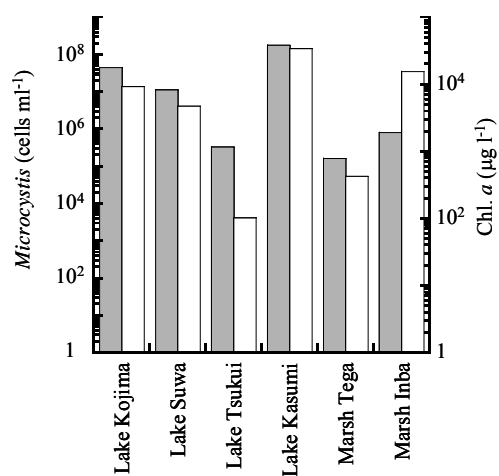


図 2-2 調査対象湖沼における *Microcystis* sp.細胞数(cells ml⁻¹)
および chlorophyll a 濃度(µg l⁻¹)の比較

Microcystis sp.細胞数 (cells ml⁻¹) Chlorophyll a 濃度 (µg l⁻¹)

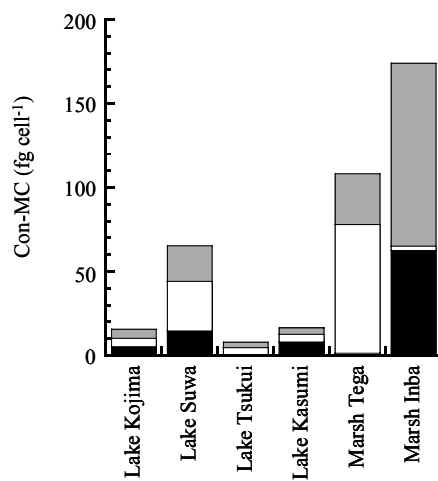


図 2-3 調査対象湖沼における細胞内 microcystin 含有量の比較

microcystin-LR、 microcystin-RR、 microcystin-YR 濃度 (µg l⁻¹)

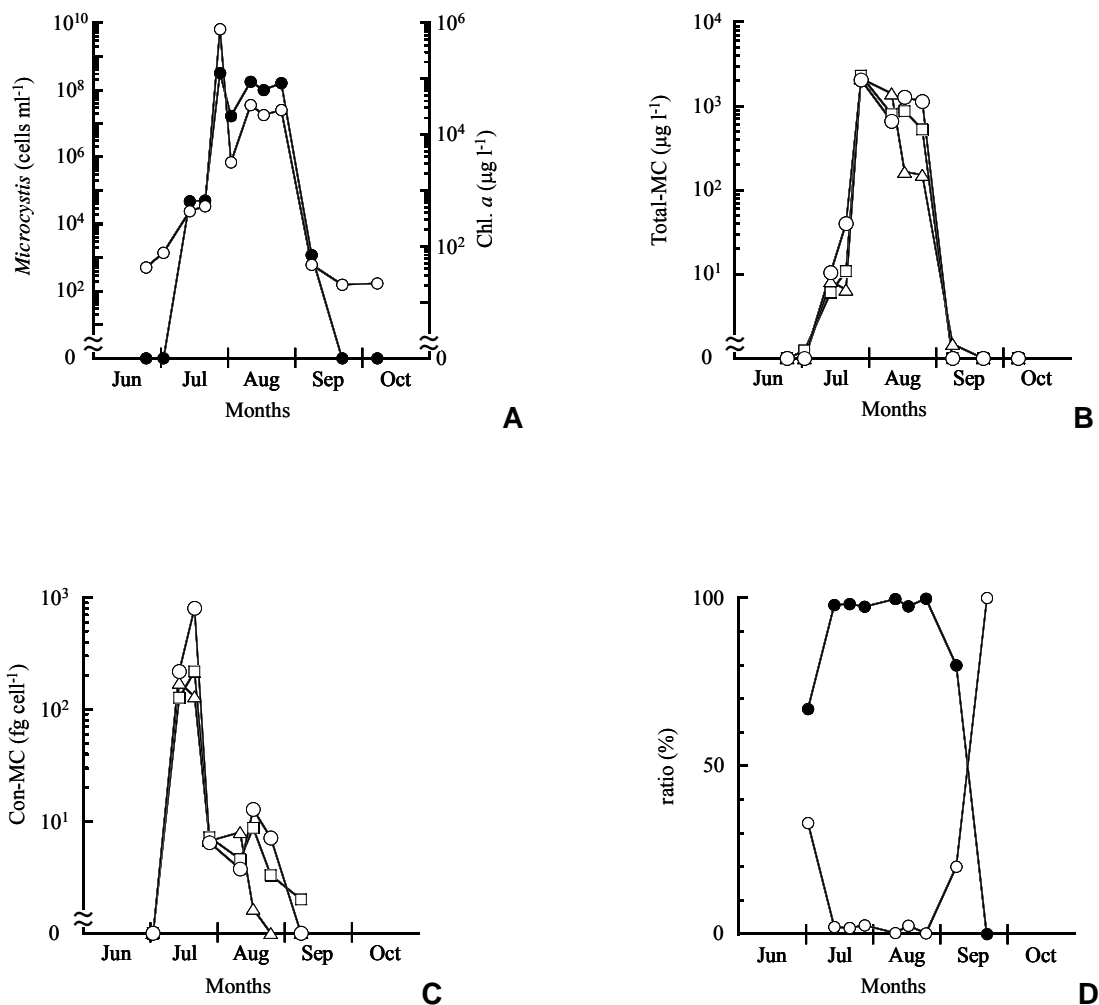


図 2-4 電ヶ浦における *Microcystis* sp.細胞数および chlorophyll *a* 濃度 (A)、全 microcystin 濃度 (Total-MC) (B)、細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) (C) および細胞内外に存在する microcystin の割合 (Intra-MC : Extra-MC) (D) の経時変化

- (A) *Microcystis* sp.細胞数 (cells ml⁻¹)、chlorophyll *a* 濃度 (μg l⁻¹)
- (B) LR 型、RR 型、YR 型濃度 (μg l⁻¹)
- (C) LR 型、RR 型、YR 型の細胞内含有量 (fg cell⁻¹)
- (D) 細胞内の割合、細胞外の割合 (%)

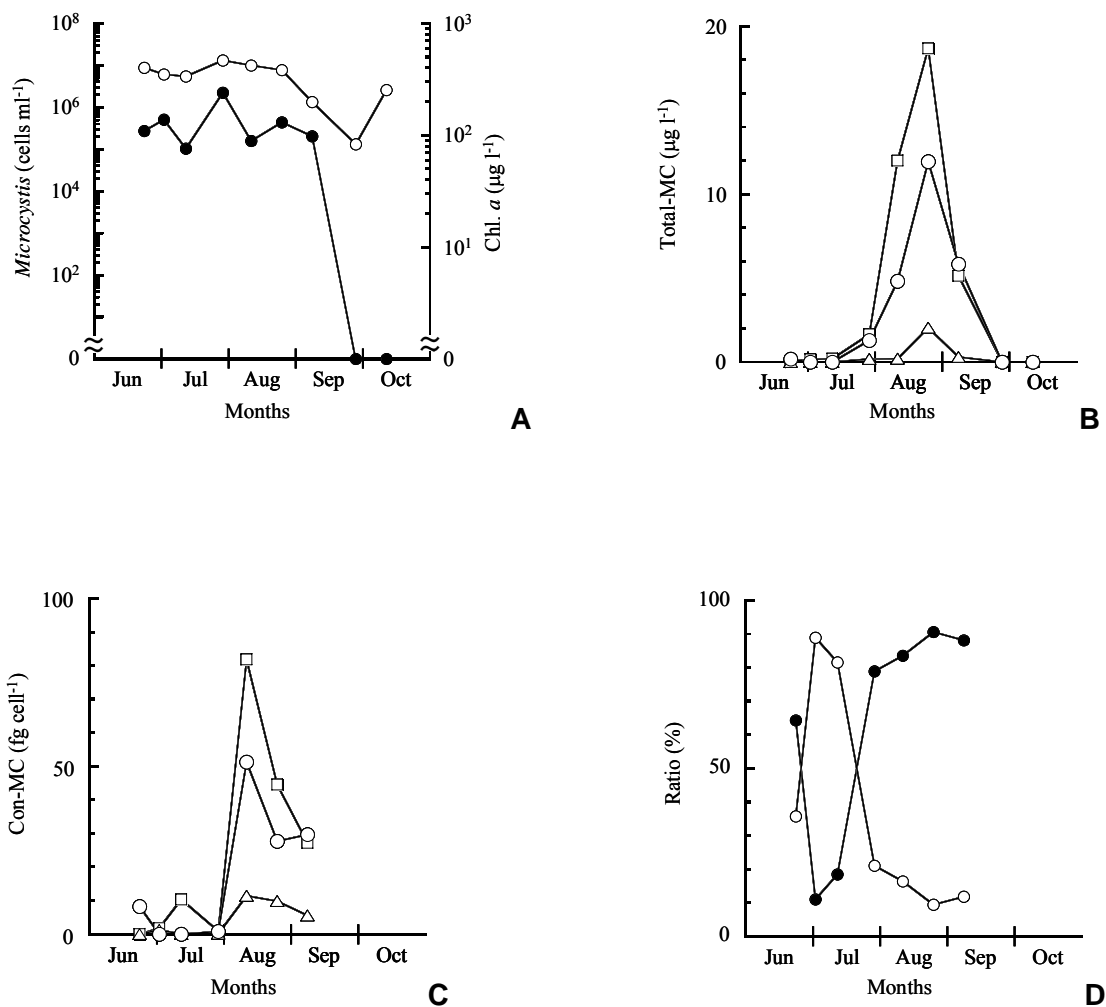


図 2-5 手賀沼における *Microcystis* sp.細胞数および chlorophyll *a* 濃度 (A)、全 microcystin 濃度 (Total-MC) (B)、細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) (C) および細胞内外に存在する microcystin の割合 (Intra-MC : Extra-MC) (D) の経時変化

- (A) *Microcystis* sp.細胞数 (cells ml⁻¹)、chlorophyll *a* 濃度 (μg l⁻¹)
 (B) LR 型、RR 型、YR 型濃度 (μg l⁻¹)
 (C) LR 型、RR 型、YR 型の細胞内含有量 (fg cell⁻¹)
 (D) 細胞内の割合、細胞外の割合 (%)

2.4. 結論

夏季における日本の代表的な富栄養化湖沼における *Microcystis* 属の出現と microcystin 現存量の調査を行なったところ、以下のような知見を得ることができた。

- 1) 6 湖沼中 5 湖沼で *M.aeruginosa* を優占種とする水の華の形成が認められた。
- 2) この 5 湖沼は、細胞内の 3 種の microcystins がほぼ同じ割合で存在する児島湖、諏訪湖、霞ヶ浦のグループと、RR 型および LR 型の割合が高く YR 型がほとんど存在しない津久井湖および手賀沼のグループの 2 つに分類することができた。
- 3) *M.aeruginosa* の細胞内における microcystins の含有量および存在比は水域および季節によって様々に変化した。
- 4) 霞ヶ浦においては、細胞の増殖が著しい時期において細胞内の microcystins 含有量が最も高くなった。
- 5) 7 月から 8 月の細胞の増殖が活発に行なわれる時期には、湖沼水中の microcystins の多くが細胞内に保持され、細胞外にはほとんど存在しないことが明らかとなった。

第3章 *M. viridis* の細胞増殖と microcystin 産生特性の関係

3.1. はじめに

我国の富栄養化湖沼における microcystin 現存量の実態調査より、発生したアオコを形成している *Microcystis* sp. の増殖が活発な時期においては、湖水中に存在する microcystin のほとんどが細胞内に保持され、その細胞内の microcystin 含有量や3種の microcystin の割合は季節的に変化し、特に7月から8月の細胞の増殖が活発な時に最も多くの microcystin が蓄積されていることが明らかとなった。従って、*Microcystis* sp. の microcystin 産生特性は細胞の増殖に伴って変化し、microcystin 産生と細胞増殖が密接に関係していることが考えられた。

藍藻類の産生する有毒物質 microcystin は、第1章で述べたように人体にとって毒として作用する物質であるが、藍藻類細胞内における microcystin の役割は未だに明らかとなっていない。生体における一次代謝は、エネルギー獲得のための代謝、および生体高分子を合成するための素材を供給するための代謝を一括したものである。これに対して、二次代謝と呼ばれる代謝は、主として合成反応であるが、その代謝物は明確な役割を持っていないように見えるという特徴がある。また、一次代謝が全ての生物にとって基本的には同一であるのに対し、二次代謝は植物および微生物のみに限ってみられるものである。一般的に、一次代謝産物が細胞内外に蓄積されることはないが、二次代謝産物は細胞内あるいは外に蓄積される。また、細胞内での生理作用として、微生物にとって重要なのは、二次代謝産物そのものではなく、二次代謝の過程であり、過剰な一次代謝中間体を二次代謝によって除去することで一次代謝のバランスを保つという役割を果たしていると考えられている(柳田 1988)。これらのことから、一般的に microcystin は二次代謝物であると考えられ、細胞の増殖と直接関わりのある一次代謝のバランスを保つために microcystin を産生すると仮定すると、細胞の増殖と密接なつながりがあると考えることができる。

本章ではまず、回分培養実験によって細胞の増殖段階の変化と microcystin 産生特性の変化についての検討を行った。つぎに、実湖沼においては、河川等からの流入によって、湖沼への窒素の流入による増加と減少が繰り返され、その影響による細胞の増殖期

の変化に模倣させた系として連続培養実験をおこなった。この連続培養実験によって、流入させる培地の窒素濃度を著しく変化させることによって、人為的に増殖段階（対数増殖期・定常期・死滅期）をコントロールし、microcystin 産生特性の変化についての検討を行い、細胞内の microcystin 含有量および存在比の変化について注目した。また、*Microcystis* sp.細胞の各増殖段階（対数増殖期・定常期・死滅期）において細胞内に含有される microcystin の含有量と種類を定量的に解析し、細胞増殖の最も活発な対数増殖期に細胞内 microcystin 含有量が最も多いことを証明することができれば、湖沼における microcystin 濃度の変化を説明し、*Microcystis* sp.の増殖と microcystin 産生特性を明らかにすることができると考え、以下の実験を行った。

3.2. 実験方法

3.2.1. 供試藻類

茨城県つくば市にある（独）国立環境研究所微生物系統保存施設より分与された無菌単藻株 *Microcystis viridis* NIE-102 を用いた。なお、この株は霞ヶ浦湖水より分離されたものであり、主に LR・RR・YR 型の microcystin を産生する株であることが明らかとなっている。

3.2.2. 回分培養法

12 L 容の培養ビンに 10 L の M-11 培地 (Yagi *et al.*, 1986 [NaNO₃ (100 mg), K₂HPO₄ (10 mg), MgSO₄·7H₂O (75 mg), CaCl₂·2H₂O (40 mg), Na₂CO₃ (30 mg), FeSO₄·7H₂O (1.0 mg), Na₂EDTA·2H₂O (1.0 mg), distilled water (1 L), pH 8.0] を入れ、121 °C・40 分間滅菌後、あらかじめ 500 ml 容の Erlenmyer flask で前培養を行い定常期に達した *M.viridis* NIE-102 を 100 ml 添加し、温度 30 ± 0.5 °C、照度 4,000 Lx 連続照射 (白色蛍光灯、54 μmol photons m⁻² sec⁻¹)、曝気 250 ml min⁻¹ の条件で緩やかに攪拌しながら 15 日間純粋培養を行った。

細胞数カウントのためのサンプルは 24 時間毎に採取した。microcystin 測定用のサンプルは 48 時間毎に採取し、分析まで -20 °C で保存した。

microcystin 分析は、第 2 章と同様の方法で行い、サンプル原液より培養液中の全 microcystin 濃度 (Total-MC) を、サンプル濾液より細胞外へ溶出し培地に溶存する microcystin 濃度 (Extra-MC) を求め、Total-MC から Extra-MC を差し引くことにより細

胞内 microcystin 濃度 (Intra-MC) を算出した。*Microcystis* sp. 一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) は、Intra-MC を *Microcystis* sp. 細胞数 (cells l⁻¹) で割算することによって求めた。

3.2.3. 連続培養法

6 L 容の培養ビンに 5 L の M-11 培地をいれ、温度 30±0.5 、照度 4,000 Lx 連続照射 (白色蛍光灯、54 μmol photons m⁻² sec⁻¹)、曝気 250 ml min⁻¹ の条件で緩やかに攪拌しながら純粋培養を行った。培養液の供給速度は、回分培養実験における細胞の比増殖速度が約 0.2 (day⁻¹) であったことから、培養槽の希釈率 0.2 (day⁻¹)、培養液流入速度 0.7 ml min⁻¹ の条件で、M-11 培地を流入させ、細胞数がほぼ一定となった後、M-11 培地より NaNO₃ のみを除いた窒素濃度 0 の M-11 培地を 14 日間流入させ細胞の増殖段階を人為的に死滅期とし、その後、再び M-11 培地を流入させ、細胞の増殖をコントロールした。培養装置の模式図を (図 3-1) に示した。

microcystin 濃度の測定用のサンプルは、4000 × g、4 で遠心分離し、回収された細胞ペレットを凍結乾燥後、-20 で保存した。分析の直前に、5%酢酸に懸濁し microcystin 抽出を各サンプル 3 回行った。この microcystin 粗抽出液を第 2 章の microcystin 測定法に従って分析し、Intra-MC とした。*Microcystis* sp. 一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) は、Intra-MC を *Microcystis* sp. 細胞数 (cells l⁻¹) で割算することによって求めた。

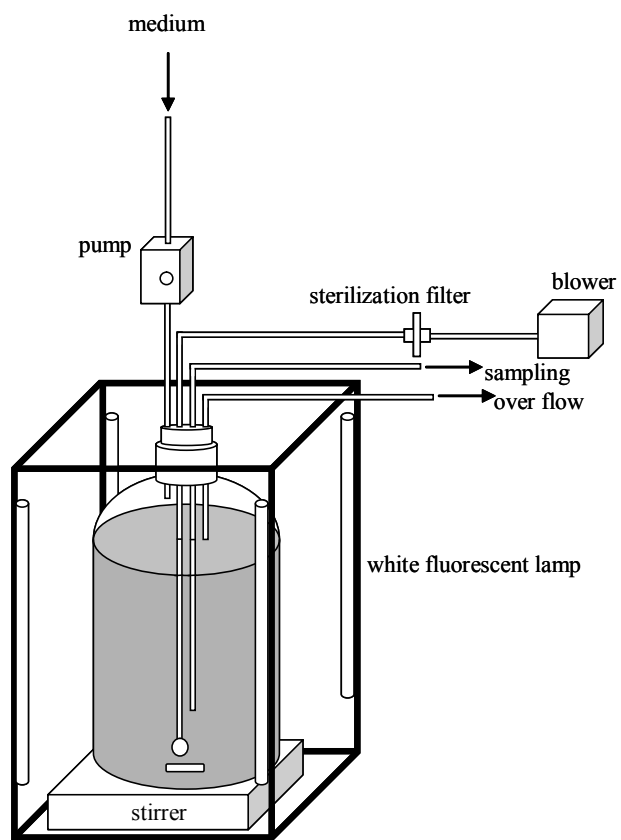


図 3-1 連続培養実験の培養装置

3.3. 結果および考察

3.3.1. 回分培養

回分培養実験における細胞の培養は 15 日間行い、その増殖を図 3-2 に示した。*M. viridis* の細胞数の変化は、生物の増殖を表すときに一般的に用いられる下記のロジスティック曲線によって回帰した。

$$y(t) = K / (1 + C^{-rt})$$

$$y = M. viridis \text{ 細胞数 (cells ml}^{-1}\text{)}$$

$$t = \text{時間 (day)}$$

$$K, C, r = \text{定数}$$

M. viridis の増殖曲線は、 $R^2 = 0.994$ の高い相関でこの式に一致し、このとき K, C, r の値はそれぞれ、 8.32×10^6 、85.0、0.507 であった。*M. viridis* は、約 12 日目まで対数増殖し、その後定常期となった。この増殖曲線より細胞の比増殖速度を求めた結果、 0.19 day^{-1} であり、この値を連続培養実験での希釈率の決定に用いた。

Total-MC は、3 種の microcystin とともに 8 日目までは細胞の増殖とともに増加したが、10 日目以後、細胞の増殖が緩やかとなったのと同時に、microcystin 濃度の増加は停止し、ほぼ一定量に達した。一方、Extra-MC は、3 種の microcystin とともに 4 日目まではほとんど検出されず、6 日目以後緩やかに増加した。Total-MC の増加が認められた 8 日目までの 3 種の microcystin の Extra-MC の割合は、20%未満であったが、10 日目以後、LR 型・YR 型の Extra-MC の割合は 30 ~ 40% に達したが、RR 型の Extra-MC の割合は約 10% で、他の 2 種の microcystin よりも少ない値となった (図 3-2)。このことから、富栄養化湖沼の microcystin がほとんど細胞内に存在していたのと同様に、培養液中の microcystin の存在形態もまた、ほとんどが細胞内であることが明らかとなった。また、細胞内で産生された microcystin は、細胞内に蓄積され、細胞の溶菌によって細胞外に溶出するが、3 種の microcystin が同時に溶出するのではなく、親水性の違いなどにより溶出の特性が異なり、RR 型は細胞組織の中に残りやすく LR 型や YR 型は速やかに溶出する傾向のあることが考えられた。

細胞の対数増殖後期において、増殖に伴う Intra-MC は、microcystin-RR 型で 12 日目、

LR 型および YR 型で 10 日目以後、減少する傾向がみられた。また細胞内における 3 種の microcystin の存在比は、対数増殖前期においてはほとんど同量存在したが、対数増殖中期においては、RR 型、LR 型、YR 型の順に多く、約 RR : YR : LR = 53 : 20 : 27 の割合で存在した。対数増殖後期から定常期にかけては YR 型と LR 型の存在量が逆転し、RR 型、YR 型、LR 型の順に多く存在し、約 RR : YR : LR = 53 : 26 : 21 の存在比へと変化した（図 3-3）。従って、細胞内の microcystin 存在比は増殖段階の違いによって、著しく変化することが明らかとなり、自然界において microcystin 存在比が変化する要因として、このように細胞の増殖段階の変化も大きく関与していることがわかった。

次に、細胞一個体あたりの microcystin 含有量を求めた結果を図 3-4 に示した。3 種の microcystin それぞれの細胞内含有量の変化は、RR 型で 4 日目、YR 型および LR 型で 2 日目まではその含有量は増加したが、その後、顕著に減少したことから、*M. viridis* は対数増殖前期に最も多くの microcystin を含有し、定常期にはその含有量が 1/7 程度まで減少することが分かった。

3.3.2. 連続培養

連続培養実験における細胞数の変化および NO₃-N 濃度の変化を図 3-5 に示した。培養は 40 日間行い、培養開始から 10 日後、細胞数が安定したことを確認し、14 日間の窒素流入停止を行った。窒素流入停止後、4 日間は細胞の増殖が活発であったと考えられ、細胞数はほとんど変化しなかった。これは、細胞増殖に必要な窒素源の供給として、細胞内に蓄積された窒素源となり得る物質を利用していることが考えられた。窒素流入停止から 5 日目以後は、著しい細胞数の減少が認められたが、再び窒素の流入が開始されると同時に細胞は増加したが、6 日間は、その増加が緩やかであり、その後著しい増加を示した。この緩やかな細胞の増加期間に、細胞増殖に十分必要な量にまで窒素を細胞内に貯蔵し、その後急激に増加したと考えられる。図 3-6-A に、Intra-MC の経時変化を示した。3 種の microcystin はいずれも窒素流入が停止するとともに減少したが、再び窒素の流入を開始しても、6 日間はほとんど一定であった。Intra-MC は、窒素濃度の変化による影響を極めて顕著にしました。特に、窒素流入の停止とともに減少し、17 日目に最小値に達した。このときの、それぞれの microcystin の含有量、LR 型 7.6 fg、RR 型 19.6 fg、YR 型 5.9 fg が *M. viridis* の最低限細胞内に必要な microcystin 量と考えられる。

そして、窒素の流入開始後 12 日間で、Con-MC は平均して 6 倍程度の増加を示した。3 種の microcystin 存在比は、窒素流入停止の影響はほとんど表れず、停止する前の状態とほとんど変化しなかったが、窒素の再流入によって細胞の増殖が活発化すると、3 種の microcystin 存在比はめまぐるしく変化し、32 日目には LR 型の割合が RR 型の割合よりも高くなった(図 3-6-C)。これらのことから、定常期、死滅期の増殖段階においては、細胞内に含有される代表的な 3 種の microcystin の存在比はほとんど変化しないが、対数増殖期において microcystin の存在比は変化することが明らかとなった。

以上のことから、対数増殖期の細胞増殖が活発である時期においては、microcystin 産生もまた活発に行われ、その産生特性は変化するが、定常期・死滅期においては、microcystin 産生が停止するため microcystin 含有量は減少し、産生特性に変化が現れなかったものと考えられた。つまり、microcystin 産生は細胞の増殖と相互に関係することが明らかとなり、細胞増殖(細胞分裂)の原単位である細胞周期が microcystin 産生と関係していることが考えられた。

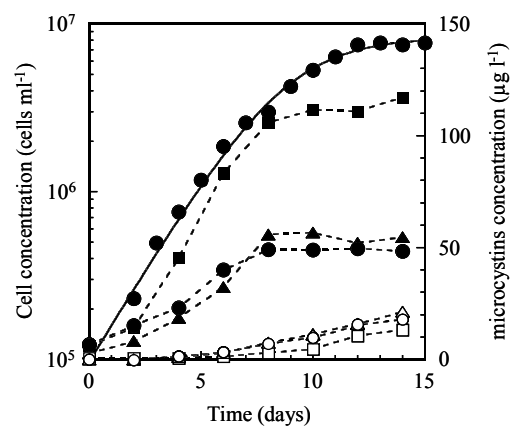


図 3-2 回分培養実験における *M. viridis* の増殖と Total-MC・Extra-MC の経時変化

— — *M. viridis* 細胞数、
 --- --- Total-MC (LR 型) --- --- Total-MC (RR 型) --- --- Total-MC (YR 型)
 --- --- Extra-MC (LR 型) --- --- Extra-MC (RR 型) --- --- Extra-MC (YR 型)

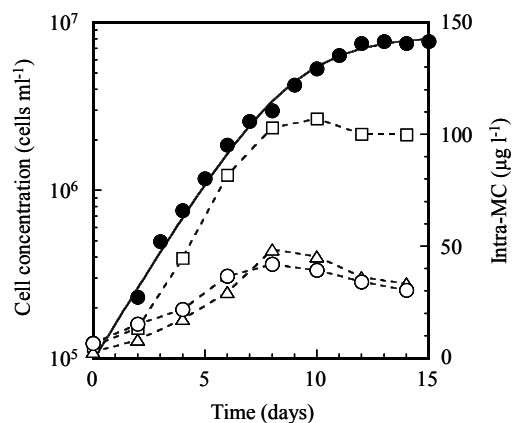


図 3-3 回分培養実験における Intra-MC の経時変化

— — *M. viridis* 細胞数、
 --- --- Intra-MC (LR 型) --- --- Intra-MC (RR 型) --- --- Intra-MC (YR 型)

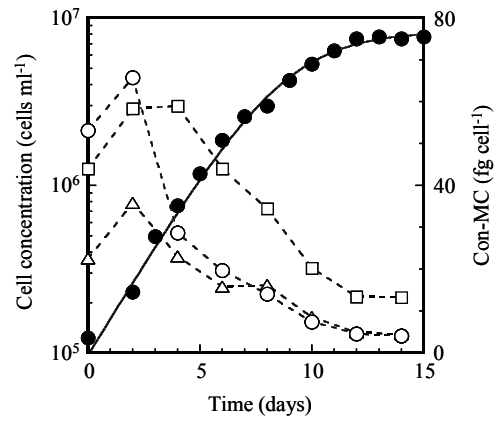


図 3-4 回分培養実験における Con-MC の経時変化

— — *M.viridis* 細胞数、
 --- --- Con-MC (LR 型) --- --- Con-MC (RR 型) --- --- Con-MC (YR 型)

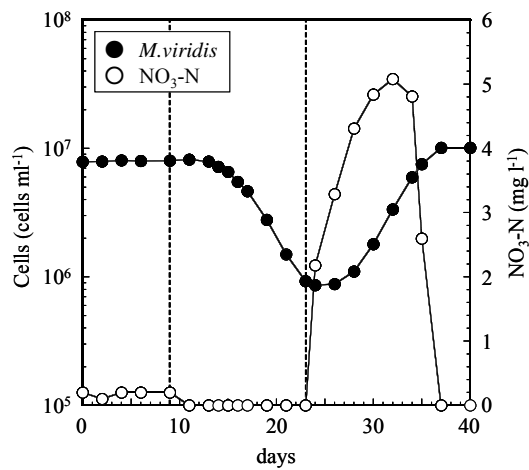


図 3-5 連続培養実験における *M.viridis* 細胞数の変化と NO₃-N 濃度の経時変化

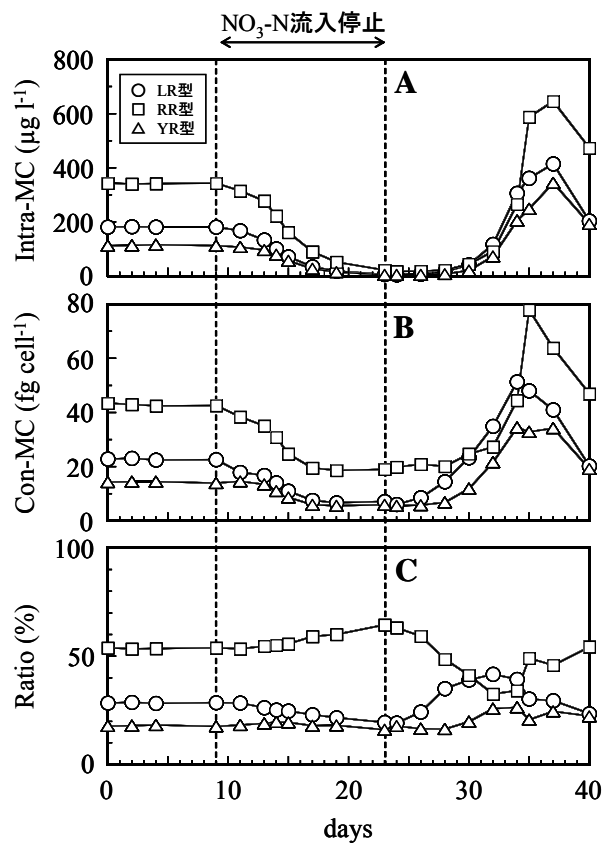


図 3-6 連続培養実験における Intra-MC (A)、Con-MC (B) および細胞内の microcystin の存在比 (C) の経時変化

3.4. 結論

本章において、有毒藍藻類の一種である *M.viridis* を用いて、細胞の増殖段階と microcystin 産生特性の関係についての基礎的な知見を得るために、回分培養実験と細胞の増殖段階を人為的にコントロールするために連続培養実験を行い、下記の知見を得ることができた。

- 1) 産生された microcystin のほとんどが細胞内に保持されることが明らかとなった。
- 2) 細胞内 microcystin 含有量および細胞内の microcystin 存在比は、細胞の対数増殖前期・後期・定常期で著しく変化し、特に、対数増殖前期にもっとも多くの microcystin が含有されることがわかった。
- 3) 細胞内における microcystin 存在比は、対数増殖期において顕著に変化し、定常期および死滅期においてはほとんど変化せず一定であることがわかった。

第 4 章 *M.viridis* の microcystin 産生に及ぼす窒素・リンの影響

4.1. はじめに

第 2 章において、我国の富栄養化湖沼における microcystin 濃度の調査により、それぞれの湖沼および時期によって、*Microcystis* の細胞内に含有される microcystin の量や種類には大きな違いがあることがわかった。この違いの第一の要因として、microcystin 産生藍藻類の増殖に応じて microcystin の量や種類に関する産生特性が変化するためではないかと考えられたことを第 4 章で述べた。第二の要因として、同じ *Microcystis* 属でも *M.viridis*、*M.aeruginosa*、*M.wesenbergii*、*M.ichthyoblabe*、*M.novacekii* 等の種類が確認されており、それぞれの種によっても microcystin の産生特性が異なることが考えられた。第 2 章の湖沼調査によっても、*M.aeruginosa* の優占化によるアオコの発生が認められた霞ヶ浦と、*M.aeruginosa* および *M.wesenbergii* の 2 種の優占化によるアオコの発生が認められた印旛沼では明らかに microcystin の細胞内含有量および構成比が異なっていた。そして、第 3 の要因として、それぞれの湖沼によって水温、pH、照度、濁度、溶存酸素濃度、栄養塩濃度等の様々な環境要因が異なり、その影響として、アオコを形成する有毒藍藻類 *Microcystis* 属の microcystin 産生特性が変化することが考えられる。第 1 章で述べたように、microcystin の基本構造は 7 つのアミノ酸からなる環状ペプチド構造であるため、その骨格中には、LR 型で 9 原子、RR 型で 12 原子、そして YR 型で 9 原子の窒素が含まれている。また、microcystin 生合成機構の thio-template 機構においては、ペプチド合成酵素の働きに非常に多くの ATP が必要であるため、リンは microcystin 生合成に対して間接的に作用することが考えられる。さらに、藍藻類の異常増殖は富栄養化した水域で頻繁に起きる現象で、湖沼・池・貯水池の富栄養化現象は無機態の窒素およびリンの増加が要因であり、これらの物質は一次生産者である藍藻類の増殖には欠くことのできない物質である。特に、*Microcystis* 属のようにヘテロシストを形成しない種の藍藻類は、大気中の窒素を固定することができないため、湖水中の窒素のみを利用して microcystin を合成することから直接的な影響を及ぼす環境因子であることが考えられる。

従って、本研究の目的でもある、安全な水利用のために自然水域において有毒藍藻類

による microcystin 産生メカニズムを解明し、microcystin 産生抑制手法を構築するためには、湖水中の栄養塩の濃度、特に、第一次生産者の増殖にも影響を及ぼしている窒素およびリンに注目して、これらの影響を解明する必要がある。閉鎖性の強い水域においては、滞留時間が非常に長く、河川からの流入による栄養塩の供給も乏しいため、富栄養化によって一次生産者が異常増殖すると湖水中の利用可能な栄養塩は激減し、藻類の代謝物も水域に蓄積されるため、一次生産者の異常発生前の環境因子の影響が大きいと考えられる。本研究では、有毒藍藻類発生と関わりの深い環境因子、窒素およびリン濃度と microcystin 産生特性との関係を明らかにするために、増殖によって栄養塩が減少し、代謝物も蓄積する回分培養系が閉鎖性水域モデルに類似すると考え、回分培養実験によって基礎的検討を行った。また、しばしばアオコの発生が認められる霞ヶ浦では、湖水中に溶存する硝酸塩およびリン酸塩の濃度は年間を通じてそれぞれ約 $0 \sim 2.0 \text{ mg l}^{-1}$ および $0 \sim 0.2 \text{ mg l}^{-1}$ の範囲である（茨城県企業局, 1982-1996）。従って、本章では硝酸塩およびリン酸塩を霞ヶ浦レベルに設定した培養条件で、*Microcystis viridis* の microcystin 産生特性を調べた。

4.2. 実験方法

4.2.1. 供試藻類

茨城県つくば市にある（独）国立環境研究所微生物系統保存施設より分与された無菌単藻株 *Microcystis viridis* NIE-102 を用いた。なお、この株は霞ヶ浦湖水より分離されたものであり、主に LR・RR・YR 型の microcystin を産生する株であることが明らかとなっている。

4.2.2. 培養条件

1 L の三角フラスコに M-11 培地 400 ml を分取し、*M. viridis* を初期添加濃度約 $2.0 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ となるように接種後、温度 28°C 、光量子放射束密度 $1,500 \text{ Lx}$ 連続照射（白色蛍光灯、 $20.1 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ ）を照射し、緩やかに攪拌しながら回分培養を行なった。窒素制限回分培養実験では、硝酸態窒素 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度を 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.8, 2.0 mg l^{-1} 、リン制限回分培養実験ではオルトリン酸態リン $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度を 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.09, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20 mg l^{-1} に設定し、計 22 系で行った。また、

細胞内の microcystin 含有量は細胞の増殖段階によって異なることが明らかとなり、また、Watanabe ら (1989) の報告より、他の有毒藍藻類の無菌単藻株においても同様の結果が得られていることから、回収期は比較的速い段階で microcystin 構成比がほぼ一定となり、且つ産生量の多い対数増殖後期に行った。

4.2.3. microcystin の分析方法

microcystin 分析は、第 2 章と同様の方法で行い、サンプル原液より培養液中の全 microcystin 濃度 (Total-MC) を、サンプル濾液より細胞外へ溶出し培地に溶存する microcystin 濃度 (Extra-MC) を求め、Total-MC から Extra-MC を差し引くことにより細胞内 microcystin 濃度 (Intra-MC) を算出した。*Microcystis* sp. 一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) は、Intra-MC を *Microcystis* sp. 細胞数 (cells l⁻¹) で割算することによって求めた。

4.2.4. microcystin 産生能の評価法

microcystin 産生の活性を評価するための手法として、microcystin 構成元素の一つである窒素を指標とした下記の式を用いた。つまり、細胞内に取り込まれた窒素の microcystin への変換率 (収率) を求めることによって microcystin 産生能として評価を行った。

$$P = 100A (dM / dN)$$

$$A = 14.01 \quad /$$

但し、 P ; microcystin 産生能 (%)、 M ; Total-MC (mg l⁻¹)、 N ; 懸濁態有機窒素濃度 (mg l⁻¹)、 T ; 培養日数、 A ; 定数 (α ; microcystin 分子量、 β ; 窒素原子の数) とした。本研究で特に注目した 3 種の microcystin それぞれの分子量および窒素原子数の値は、microcystin-RR(α , β) = (1044, 12)、microcystin-YR(α , β) = (984, 9)、microcystin-LR(α , β) = (984, 9)である。

また、全てのデータ解析および回帰曲線の作成には、KaleidaGraph 3.08 for Windows を用いて最小二乗法により求めた。

4.3. 結果および考察

4.3.1. 細胞の増殖

細胞の回収は、細胞の増殖段階の違いによって細胞内の microcystin 含有量および microcystin 構成比が異なることから、これらの影響による microcystin 産生特性を一定化するためにすべての培養系において対数増殖後期に回収を行った。

NO₃-N 濃度 0 ~ 2.0 mg l⁻¹ および PO₄-P 濃度 0 ~ 0.2 mg l⁻¹ におけるそれぞれの培養系の *M.viridis* の比増殖速度を求めた (図 4-1-A, B)。NO₃-N 濃度の変化に対して、細胞の増殖速度は顕著に変化し、特に、0.2 ~ 0.6 mg l⁻¹ の濃度範囲においてその変化は大きく、0.8 mg l⁻¹ 以上の濃度では 0.18 day⁻¹ の値でほぼ一定となった。一方、PO₄-P 濃度の変化に対しては、比増殖速度はほとんど影響を受けず、0 ~ 0.2 mg l⁻¹ の濃度範囲においては 0.15 day⁻¹ の値でほぼ一定であった。ほとんどリンが存在しない条件下でも *M.viridis* の増殖が確認されたことは、細胞内に蓄積された僅かなリンを用いて十分増殖が可能であることを示している。また、*M.viridis* の増殖に対し窒素濃度影響が顕著に現れたことは、細胞内に蓄積し再利用可能な窒素源はほとんど存在しないことを示しており、富栄養化湖沼における窒素濃度の管理がアオコの発生抑制に極めて重要であることが理解できる。

4.3.2. microcystin 産生

microcystin 産生藍藻類によるアオコの形成が頻繁に起こる富栄養化湖沼においては、microcystin の発生を抑制・コントロールし、湖水利用の際の危険回避や処理対策を講じることが極めて重要である。様々な水環境因子の *Microcystis* 属による microcystin 産生特性との関係を明らかにするこれまでの研究方法は、いずれも細胞乾燥重量当たりの microcystin 濃度 (mg microcystin g⁻¹ dry weight) で評価されてきたが、この方法では、湖水の水質と microcystin の産生特性との関係を評価することは困難である。そこで、本研究では、microcystin 骨格中に多く存在する窒素原子に注目し、湖沼の富栄養化の原因物質である窒素・リン濃度が変化したときの、培養液中の NO₃-N の細胞内への取り込み量と microcystin の産生量を測定し、取り込んだ NO₃-N の microcystin への変換率 (収率) を求めることによって microcystin 産生能の評価を行った。

NO₃-N 濃度を 0 ~ 2.0 mg l⁻¹ に変化させたときの microcystin の収率は、特に、RR 型の microcystin において顕著な変化を示した。培地中に NO₃-N が存在しないとき、3 種の

microcystin とともに産生は皆無であったため、収率は 0%であった。NO₃-N 濃度 0.2 ~ 1.0 mg l⁻¹ の範囲において *M. viridis* の microcystin 産生能は NO₃-N 濃度変化に伴って増加し、NO₃-N 濃度 1.2 mg l⁻¹ 以上では閾値に達した。LR 型の収率も RR 型に比べその変化は僅かではあるが、RR 型の変化とほぼ同調した変化を示した。一方、YR 型においては NO₃-N 濃度の変化によらず、ほとんど一定の収率であった (図 4-2-A)。3 種の microcystin 全ての収率としては、窒素濃度の変化に伴って 0.8 mg l⁻¹ までは増加し、1.0 mg l⁻¹ 以上では、収率約 0.3%でほぼ一定となった。この microcystin の収率の変化は、図 4-1-A で示したように、NO₃-N 濃度変化に依存した細胞の比増殖速度の変化と極めてよく似ているため、このことから microcystin 産生と細胞増殖の密接な関係が示唆された。Orr *et al.* (1998) もまた、細胞の増殖と microcystin 産生の関係についての報告の中で、細胞の比増殖速度と microcystin 産生速度は正の相関があり、その相関は切片 0 を通る直線で表すことができることを明らかにしている。これらのことから、microcystin 産生に係る酵素が細胞の増殖によって活性化しているのか、あるいは microcystin 産生が細胞の増殖を活性化させているのか、など未解明な点について明らかにする必要がある。さらに、表 4-1-A に示したように、培地中の NO₃-N 濃度に応じて、microcystin 産生量が異なり、microcystin の収率が変化したにもかかわらず、細胞内に含有された microcystin の量はほとんど一定か、あるいは窒素濃度とは無関係であったことは、対数増殖後期という同じ増殖段階においては、細胞内に含有される microcystin 量は等しく、培養液中の NO₃-N 濃度の変化には全く依存しないことを示した。このことから、第 3 章で示した様に、microcystin 産生特性が細胞の増殖に依存して変化することが考えられた。

PO₄-P 濃度を 0 ~ 0.2 mg l⁻¹ に変化させたときの microcystin の収率は、NO₃-N 濃度を変化させたときとは全く異なる結果が得られた。前述のように、*M. viridis* は培地中に PO₄-P が全く存在しない条件においても増殖し、microcystin 濃度の増加が認められた。特に、PO₄-P 濃度が希薄な条件下において、microcystin の収率は高く (図 4-2-B) また、細胞内の microcystin 含有量も高い値となった (表 4-1-B)。microcystin 合成のためのリボソーム非依存的ペプチド合成酵素の働きには ATP は欠くことできない必須要素であるが (Arment and Carmichael, 1996) リンが無い条件でも細胞数の増加や microcystin 濃度の増加が認められたことは、*M. viridis* が細胞内に蓄積したリンを利用し ATP 合成を行ったためと考えられる。しかしながら、PO₄-P 濃度が希薄な条件の時の方が PO₄-P 濃度が

高い条件の時より、細胞内により多くの microcystin が含有されるという矛盾する結果が得られた。

細胞内の microcystin 含有量が変動する要因として考えられるのは、細胞内における microcystin 産生機構と microcystin 分解機構の 2 つのメカニズムである。僅かなリンの存在下においても microcystin 濃度の増加が認められたことから microcystin 産生機構に対するリン濃度の影響はほとんどなく、microcystin 分解機構に対してはリン濃度の枯渇が影響し、microcystin 分解が抑制されたものと考えられる。その結果、産生された microcystin は分解されずに細胞内に蓄積されたと推定される。このリン濃度の関与する microcystin 分解のメカニズムとしては、ユビキチン-プロテアソーム系が考えられる。ユビキチン-プロテアソーム系とは、本来エネルギーを必要としない化学反応であるペプチド化合物およびタンパク質の加水分解に、大量の ATP を必要とするペプチド分解機構であり、細胞の増殖、特に、細胞周期にかかわるペプチドやタンパク質などの細胞周期調節因子をはじめ、シグナル伝達因子、転写因子などの多種多様な生体機能分子の分解に関与するシステムである。分子量約 8 kDa、76 個のアミノ酸から構成される小さなタンパク質のユビキチンが、標的となる分子に鎖状に多数結合すると、それを 26S プロテアソームが認識して、標的分子を速やかに分解するというシステムである (Glutzer *et al.*, 1991)。ユビキチン-プロテアソームによる標的物質の分解メカニズムは、ユビキチンを標的物質に鎖状に結合させる前段階 (ポリユビキチン化) と、ポリユビキチン化された標的物質をプロテアソームによって分解する後段階からなる。前段階には、E1・E2・E3 の 3 つの酵素が必要であり、この中で特に E3 が標的物質を認識するために重要な役割を果たす (図 4-3)。

microcystin が細胞内に存在しその含有量は細胞の増殖に伴って増減することを第 3 章で述べたが、細胞内 microcystin 含有量が減少するという現象に関しては、これまで、細胞内における microcystin 分解酵素というものが未だ発見されていない。実験データは示していないが、対数増殖期にある *M. viridis* の細胞破碎液に microcystin 標準物質を添加し、バクテリアによる microcystin の分解を排除するために 0.1% のアジ化ナトリウムを添加して 24 時間 30℃ でインキュベートするという実験を行ったが、microcystin 濃度が減少することは無かったという結果も得られている。

これらのことから、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度が希薄な条件下では、ある程度の増殖および microcystin

産生は可能であるが、細胞内に蓄積されたリンが消費されリン枯渇状態になると、大量のエネルギーを必要とするユビキチン-プロテアソーム系の働きに必要な ATP が不足するため、microcystin の分解が抑制され、その結果として、多くの microcystin が細胞内に分解されずに蓄積されることから細胞内 microcystin 含有量が多くなったと推測された。そして、microcystin の収率や細胞内 microcystin 含有量の増減に対しては $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の影響が大きく作用することが明らかとなり、特に、高 $\text{NO}_3\text{-N}$ ・低 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の条件では自然水域において多くの microcystin が発生する可能性が示唆された。

図 4-4 に microcystin の収率と培養液中の 3 種の microcystin の存在比の関係を示した。これまでの結果より、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度を变化させたところ、microcystin の収率は顕著な変化を示した。しかしながら、産生された 3 種の microcystin の割合は、対数増殖後期においてはほとんど変化せず一定の割 ($\text{LR}:\text{RR}:\text{YR} = 24:66:10$) であった。従って、窒素やリン濃度の変化は、産生する microcystin の種類に対してほとんど影響しないことが明らかとなった。また、細胞増殖の特定の段階においては、産生される microcystin の種類には特異性があり、その特異性は細胞外の環境状態には影響されず、決められた固有の値を持つことが推定された。

そこで、細胞の各増殖の段階における細胞内環境を理解するためには、細胞増殖の原単位である細胞周期に注目し DNA 複製のための各段階を把握する必要がある。事実、Shi *et al.* (1995) の報告によると、*M.aeruginosa* 細胞内における microcystin 分子の分布を免疫抗体法により調べた結果、ゲノム DNA が含まれる核様体付近に多くの microcystin が存在することが明らかとなっている。このことから、DNA 複製と microcystin 産生が密接に関係していることが示唆される。従って、細胞周期というの細胞内環境の変化に伴う microcystin 産生特性を明らかにすることによって細胞増殖と microcystin 産生との関係について更に詳細な知見が得られると考えられた。

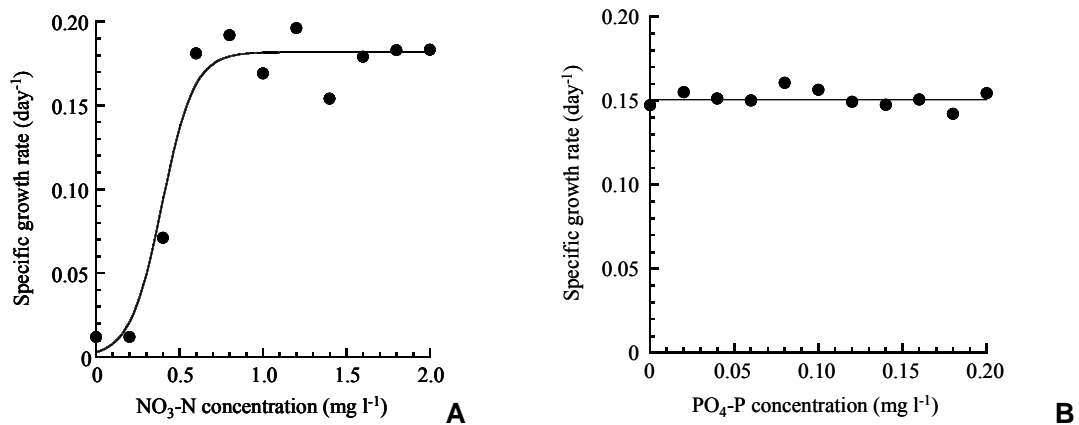


図 4-1 *M. viridis* の比増殖速度に及ぼす NO₃-N 濃度(A)および PO₄-P 濃度(B)の影響

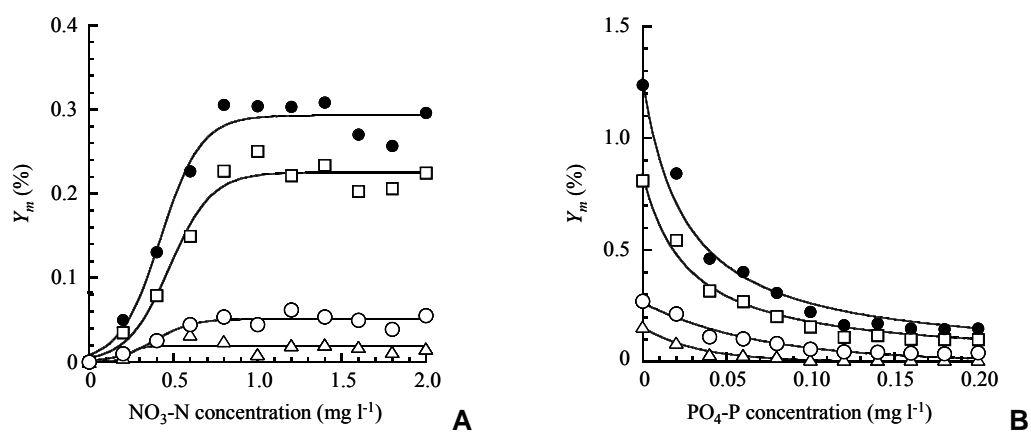


図 4-2 microcystin 収率に及ぼす NO₃-N 濃度(A)および PO₄-P 濃度(B)の影響
3 種の microcystin の合計、 LR 型、 RR 型、 YR 型

**表 4-1 細胞内 microcystin 含有量に及ぼす
NO₃-N 濃度 (A) および PO₄-P 濃度 (B) の影響**

A

NO ₃ -N (mg l ⁻¹)	Intracellular microcystin (fg cell ⁻¹)		
	LR	RR	YR
0.0	5.70	17.5	2.82
0.2	5.87	14.6	4.32
0.4	4.98	14.1	3.45
0.6	5.68	15.9	3.72
0.8	6.06	19.6	2.94
1.0	4.58	19.6	1.45
1.2	5.73	17.1	2.22
1.4	5.29	18.8	2.38
1.6	4.63	15.7	2.00
1.8	3.70	15.5	1.41
2.0	5.21	17.6	1.64

B

PO ₄ -P (mg l ⁻¹)	Intracellular microcystin (fg cell ⁻¹)		
	LR	RR	YR
0.0	12.4	33.0	7.10
0.02	9.08	21.2	3.30
0.04	6.94	17.9	2.19
0.06	7.04	16.8	2.21
0.08	5.68	12.8	1.78
0.10	4.21	11.2	1.09
0.12	3.24	9.18	0.87
0.14	2.84	8.88	0.95
0.16	2.80	8.92	1.12
0.18	2.34	8.66	1.05
0.20	2.16	7.85	1.03

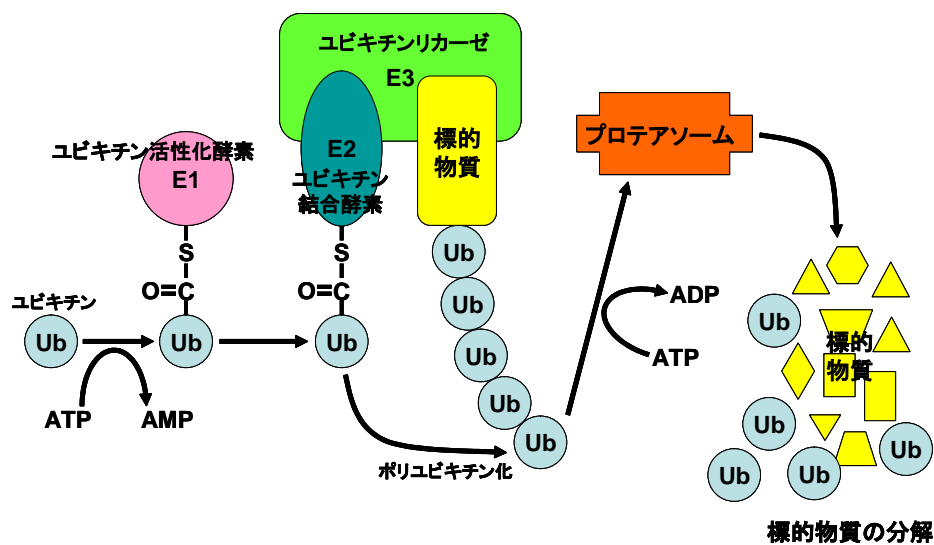


図 4-3 ユビキチン-プロテアソーム系による標的物質の分解メカニズム（模式図）
（服部 2000 より引用）

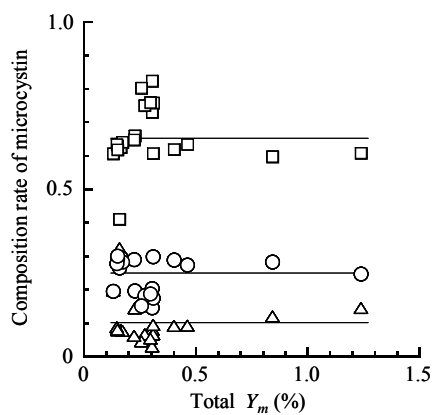


図 4-4 microcystin の収率と 3 種の microcystin の存在比の関係
3 種の microcystin の合計、 LR 型、 RR 型、 YR 型

4.4. 結論

本章では、閉鎖性水域での藍藻類の microcystin 産生特性を明らかにするための基礎的な知見を得るために、初期添加窒素およびリン濃度を变化させた回分培養実験によって、*Microcystis* 属の microcystin 産生特性の評価を行い下記のような知見を得ることができた。

- 1) 窒素濃度の変化は *M. viridis* の増殖速度に影響を及ぼすがリン濃度はほとんど影響しないことから、僅かなリンが存在していれば細胞増殖は可能であることがわかった。
- 2) 窒素制限回分培養実験による細胞内 microcystin 含有量は、初期添加濃度の変化にかかわらずほぼ一定であったが、リン制限回分培養実験における細胞内 microcystin 含有量は、低濃度のリン存在下において特に多くの microcystin を含有することがわかった。
- 3) 初期添加窒素およびリン濃度を变化させても、対数増殖後期における産生する 3 種の microcystin の割合は、ほとんど変化しないことがわかった。

第 5 章 *M. viridis* の細胞周期と microcystin 産生の関係

5.1. はじめに

第 2 章から第 4 章までの結果を整理すると、まず、湖沼における一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量は季節的に変化し、特に、夏季の細胞増殖の活発なときに最も多くなった。室内系の純粋培養実験においても、細胞の各増殖段階に応じて細胞内 microcystin 含有量が変化し、対数増殖前期に最も多く定常期・死滅期に最も少なくなった。また、窒素濃度の変化に対して、細胞内 microcystin 含有量および 3 種の microcystin の存在比はほとんど影響を受けず、リン濃度の変化に対しては、3 種の microcystin の存在比はほとんど影響を受けなかったものの、低濃度のリン存在下においては、ユビキチン-プロテアソーム系の関与と思われる細胞内 microcystin の蓄積が認められた。これらの結果を鑑みると、microcystin 産生は細胞増殖には密接な関係があり、特に、細胞増殖の原単位である細胞周期との係わり合いが影響していると考えられた。

自立増殖能を持った生物は細胞から形成され、原核生物であれ真核生物であれ、細胞周期という一連の異なった機能状態を経過しながら増殖する。細胞周期とは、G1 期（Gap1；DNA 複製準備期間） S 期（Synthesis；DNA 複製期間） G2 期（Gap2；細胞分裂準備期間） M 期（Mitosis；細胞分裂期間） G1 期の 4 層で構成される一方向性のサイクルで逆回転することは無い。ただし、細胞を顕微鏡で観察したときには、可視的な変化が見られるのは M 期のみで、G1、S、G2 を区別することは不可能であるため、M 期以外の相は一括して間期（interphase）と呼ばれる。藍藻類のような染色体を持たない原核細胞においては、ただ一組の環状 DNA を複製して 2 つの娘細胞に分配するため、真核細胞のような有糸分裂を行う必要が無いが、細胞周期の中では細胞内の DNA 量は 1 倍～2 倍の周期的な変化を繰り返す（図 5-1）。また、G1 期の途中には制御点（R 点）と呼ばれるチェックポイントがあり、細胞周期のサイクルの進行に必要な細胞内環境はこの地点を通るまでの間に整えられなければならない。この制御点までの間に、細胞内の栄養状態などの条件が満たされない場合は、G1 期あるいは G0 期で細胞周期は停滞する。しかしながら、この制御点を越えてしまえば、細胞内外の諸条件を問わず細胞周期のサイクルは自動的に S 期・G2 期・M 期へと動き出すというシステムで

ある。

上記の点を鑑み、DNA 複製に伴う細胞周期という細胞内環境の変化と共に、細胞内 microcystin の *Microcystis viridis* の細胞内における動態を測定し、その含有量の周期性、microcystin 産生特性について明らかにするために、以下の実験を行った。

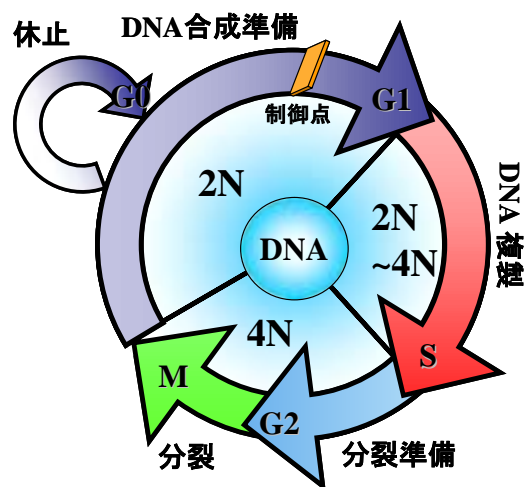


図 5-1 細胞周期の概念図

(中山 2001 より引用)

5.2. 実験方法

5.2.1. 供試藻類

茨城県つくば市にある(独)国立環境研究所微生物系統保存施設より分与された無菌単藻株 *Microcystis viridis* NIE-102 を用いた。なお、この株は霞ヶ浦湖水より分離されたものであり、主に LR・RR・YR 型の microcystin を産生する株であることが明らかとなっている。

5.2.2. 培養方法

microcystin 濃度が十分測定可能な 1×10^6 cells ml^{-1} の細胞濃度で、且つ *M. viridis* の細胞周期を同調するための前培養を行うために、12 L 容の培養ビンに $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 1 mg l^{-1} 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度 0.1 mg l^{-1} に調製した 10 L の M-11 培地 (Yagi *et al.*, 1986) [NaNO_3 (100 mg), K_2HPO_4 (10 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75 mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mg), Na_2CO_3 (30 mg), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg), distilled water (1 L), pH 8.0] を入れ、121 °C・40 分間滅菌後、あらかじめ 500 ml 容の Erlenmeyer flask で前培養を行い定常期に達した *M. viridis* NIES-102 を 100 ml 添加し、温度 30 ± 0.5 °C、照度 4,000 Lx 連続照射(白色蛍光灯、 $54 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$)、曝気 250 ml min^{-1} の条件で緩やかに攪拌しながら 8 日間純粹培養を行った。この同調培養により培養液中のほとんどの細胞が G0/G1 期に同調されたことを確認後、通常の M-11 培地の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 16 mg l^{-1} 、 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度 1.75 mg l^{-1} になるように、 NaNO_3 溶液および K_2HPO_4 溶液をそれぞれ 滅菌済み孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通して添加した。この系を $\text{NO}_3\text{-N}$ 高濃度系および $\text{PO}_4\text{-P}$ 高濃度系とした。また、同様に $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 1 mg l^{-1} および $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度 0.1 mg l^{-1} になるように NaNO_3 溶液および K_2HPO_4 溶液を添加した系を $\text{NO}_3\text{-N}$ 低濃度系および $\text{PO}_4\text{-P}$ 低濃度系とし、窒素・リン濃度の違いによる各細胞周期での細胞内 microcystin 含有量の比較を行った。この時を実験開始 0 時間目とし、6 時間ごとに細胞のカウントおよびサンプリングを行った。microcystin 濃度の測定用のサンプルは、 $4000 \times g$ 、4 °C で遠心分離し、回収された細胞ペレットを凍結乾燥後、 -20 °C で保存した。分析の直前に、5%酢酸に懸濁し microcystin 抽出を各サンプル 3 回行った。この microcystin 粗抽出液を第 2 章の microcystin 測定法に従って分析し、Intra-MC とした。*Microcystis* sp.一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量(Con-MC)は、

Intra-MC を *Microcystis* sp.細胞数 (cells l^{-1}) で割算することによって求めた。細胞周期測定用のサンプルは、4000 × g、4 で遠心分離し、回収された細胞ペレットを蒸留水で洗浄後、70%イソプロパノールに再懸濁した状態で測定まで - 20 で保存した。

5.2.3. SYTOX Green 核酸染色

SYTOX Green (MolecularProbes Co.) は、細胞膜に吸着されることなく、容易に死細胞の細胞膜を透過できる核酸との親和性が非常に高い核酸染色蛍光試薬であり、グラム陽性・グラム陰性のどちらのバクテリアに対しても有効で、酵母やその他多くの原核生物に利用することができる。短時間の染色時間で、細胞膜を透過した SYTOX Green は核酸と結合し、488 nm のアルゴンイオンレーザーによって励起することができ、523 nm の緑色の蛍光を発するため、フローサイトメーターによる検出が可能である。また、一般的に細胞周期の測定のために用いられている Propidium Iodide(PI)より SYTOX Green は DNA と結合したときの蛍光強度が強いため高い測定精度を得られることが明らかとなっている。この SYTOX Green を用いた *M.viridis* 細胞の核酸染色は、Roth *et al.* (1997) の方法に従って行った。70%イソプロパノールに再懸濁した *M.viridis* 細胞は、 $10^4 \sim 10^7$ cells ml^{-1} になるように 4000 × g、4 で遠心分離し、回収された細胞ペレットを 10 mM Tris · 1 mM EDTA · pH 8.0 (TE buffer) で洗浄し、TE buffer で再懸濁後、全ての細胞を完全に死滅させるために恒温器で 80 、10 分インキュベートした。次いで、SYTOX Green の RNA への非特異的な結合を防ぐために、最終濃度 100 $\mu g\ ml^{-1}$ となるように RNase A (DNase free) を添加し、恒温器で 37 、30 分インキュベートした。そして、最終濃度 0.5 μM となるように SYTOX Green を加え核酸の蛍光染色を行った。

5.2.4. 細胞周期の測定

STOX Green によって核酸を蛍光染色された細胞サンプルは、488 nm アルゴンイオンレーザーを装備したフローサイトメーター、FACSCalibur(Becton Dicknson)を用いて、培養液中の細胞の細胞周期の割合を測定した。フローサイトメーターの原理を図 5-2 に示した。測定可能な細胞周期は、細胞内の DNA 量が 1 倍量の G0/G1 期、1 ~ 2 倍量の間の状態である S 期、2 倍量の G2/M 期の 3 つの相である。細胞周期の分析では、細胞分裂が終了後も 2 細胞が接着したために生じる 2 倍の蛍光強度を排除するために、Forward

Scatter および Side Scatter を用いて分析エリアのゲーティングを行った。細胞周期の割合は 10,000 細胞の蛍光強度を測定し、ゲート内のデータ収集速度は、 $300 \text{ event sec}^{-1}$ 以下で行った。収集したデータの解析には、ModFit LT (Version 2.0 ; Verity Software House, Inc) を用いた。

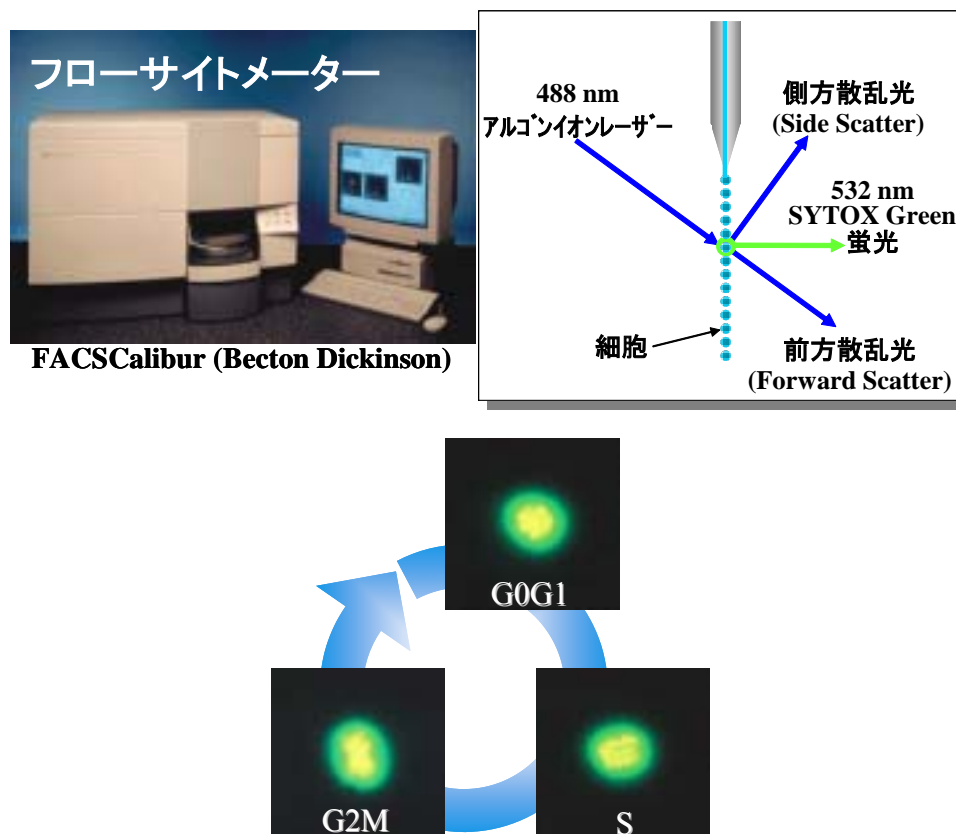


図 5-2 フローサイトメーターの原理

5.2.5. dsDNA の定量

培養液中の dsDNA を定量するために、上記の操作で dsDNA の蛍光染色を行った後、Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystem) を用いて、蛍光強度の測定を行った。SYTOX Green/dsDNA 複合体は 485 nm で励起し、その蛍光の 532 nm を検出した。定量のための蛍光強度の標準として、Calf thymus DNA (Wako Co.) を使用した。

5.3. 結果および考察

5.3.1. SYTOX Green 核酸染色の効果

M. viridis NIES-102 に対する SYTOX Green の染色効果を確認するための予備実験を行った (図 5-3)。SYTOX Green 濃度を 0.005 から 5 μM まで変化させ、異なる細胞濃度 ($10^4 \sim 10^7$ cells ml^{-1}) を染色し蛍光の強度を比較した。細胞濃度によって最大蛍光を示す SYTOX Green 濃度は異なり、0.5 μM 以上の濃度では蛍光強度の減少が見られた。従って、細胞濃度に係わらず *M. viridis* NIES-102 の染色には 0.5 μM の SYTOX Green 濃度が最も有効であることがわかった。

5.3.2. $\text{NO}_3\text{-N}$ の影響

5.3.2-1. 同調培養

前培養による細胞数の増加と、8 日目の細胞周期の FACS による分析結果のヒストグラムを図 5-4 に示した。4 日目の培養液中の全ての $\text{NO}_3\text{-N}$ が細胞内に取り込まれたため、窒素枯渇状態になり、細胞の増殖が停止し、さらに 4 日間の定常期を継続させた。8 日目の培養液中の細胞の細胞周期を測定したところ、どちらの系においても、1 本のシャープなヒストグラムが得られ、90%以上の細胞が G0/G1 期であることを示した。従って、この同調培養により培養液中のほとんどの細胞が増殖における定常状態の G0/G1 期に同調されたことが確認され、通常の M-11 培地の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度である 16 mg l^{-1} になるように添加した系と 1.0 mg l^{-1} になるように添加した系の 2 系を調製しそれぞれの細胞周期における microcystin 含有量の比較のための実験を開始した。この時を 0 時間目とした。

5.3.2-2. 細胞内 microcystin 含有量と細胞周期の関係

NO₃-N 高濃度系および低濃度系の Con-MC の経時変化を図 5-5 に示した。どちらの系においても、窒素添加後から 18 時間目までは、3 種の microcystin の含有量はほぼ一定量を推移し、それらの存在比も変化しなかった。18 時間目以後から 36 時間目まで、どちらの系においても 3 種の microcystin の含有量の増加が認められ、3 種の中でも特に LR 型の増加が最も著しかった。36 時間目以後、低濃度系では細胞内 microcystin 含有量が減少したが、培養液ろ液中の細胞外 microcystin の増加は認められなかったことから、microcystin が細胞内で異化・分解されたものと考えられた。一方、高濃度系においては、LR 型および YR 型の含有量は減少したが、RR 型の含有量は 48 時間目まで増加した。3 種の microcystin の総含有量は 36 時間目以後ほぼ一定となったことから、細胞内では RR 型の合成と LR 型・YR 型の異化・分解反応が同時に起きていたことが考えられた。これらの結果からも明らかなように、僅か 36 時間の間に Con-MC の値は大きな変動を示した。

次に、microcystin 産生と細胞周期の関係を明らかにするために、フローサイトメーターを用いて、高濃度系・底濃度系の NO₃-N 添加後の細胞増殖と、細胞周期の割合の経時変化を測定した。*Microcystis* 属の細胞周期を測定したデータは世界的にも前例が無いため、本研究では、フローサイトメーターで各細胞周期を決定するために、培地中の窒素が枯渇し細胞の増殖が定常期となった 0 時間目に得られたヒストグラム中の一本のピークを G0/G1 期のピークと定義した。また、顕微鏡観察においても、0 時間目の細胞に分裂途中の細胞は無く単一の比較的小さな細胞集団であったことを確認した。全てのデータを通してヒストグラム中の G0/G1 ピークと G2/M ピークの DNA 蛍光強度 (FL-1) の比は 1.9 であった (図 5-7)。また、細胞周期分析の精度を表す、G0/G1 ピークの変動係数 (CV_{G0/G1}) の値は、平均して 9.6 であった。この値は、他の核酸蛍光染色試薬である SYBR Green I を用いて海洋性植物プランクトンの細胞周期を測定した Maria *et al.* (1997) の報告における値とほぼ一致したことから、SYTOX Green はアオコ形成藍藻類 *M. viridis* の細胞周期解析に対して有効であることが明らかとなった。図 5-6 に *M. viridis* の細胞数の経時変化と各細胞周期の割合の経時変化を示した。また、図 5-7 に 0、24、36、48 時間目におけるフローサイトメーターによる細胞周期ヒストグラムを示した。時間の経過と共に、G0/G1 ピークが小さくなり、代わりに S 期および G2/M 期の

ピークが大きくなる変化が明確に示された。1.0 mg l⁻¹ NO₃-N の M-11 培地を用いた前培養の同調によって、どちらの系においても、0 時間目の培養液中の細胞のうち、90% 以上が G0/G1 期に同調された。その後、G0/G1 期の細胞の割合が緩やかに減少するとともに、DNA 複製期である S 期の細胞の割合が緩やかに増加し、24 時間目には S 期の細胞の割合が 60 時間の培養を通して最も高い値となった。また、24 時間目に初めて G2/M 期の細胞が検出され、36 時間目には約 50% の細胞が G2/M 期に移行したことを示した。36 時間目以後、高濃度系においては G2/M 期の割合は減少し、60 時間目にはほとんど検出されず G0/G1 期の細胞が再び増加したが、低濃度系においては、G2/M 期の細胞の減少は緩やかで、G0/G1 期の増加量も僅かであったことから、窒素濃度の違いによって細胞周期サイクルの回転速度に差が現れたものと考えられた。細胞濃度の変化は、36 時間目まではほとんど一定であり、42 時間目以後細胞分裂が起こり増殖が認められた。図 5-5 と図 5-6 より、細胞の増殖は 36 時間目以後からであったのに対して、Con-MC の増加は 18 時間目以後からであったことから、細胞内での microcystin の蓄積は増殖よりも早い段階で始まっていることが分かった。また、Con-MC の値の増加が認められた 18 時間目というのは、どちらの系においても G2/M 期の細胞が初めて検出された時間であり、G2/M 期の細胞の増加と Con-MC の値の増加は極めてよく一致した。つまり、この G2/M 期の細胞が顕著に増加した 18 ~ 36 時間の間というのは、細胞内において DNA 複製が活発に行われていた期間であり、この期間に Con-MC が増加したということは、DNA 複製と同時に microcystin 産生が活発に行われたことを示している。

従って、DNA 複製と microcystin 産生が同時に起こるということは、DNA 濃度と microcystin 濃度には正の相関があると考え培養液中の dsDNA を定量し、microcystin 濃度との関係を求めた (図 5-8)。その結果、やはり DNA 濃度と microcystin 濃度には高い正の相関があり、高濃度系・低濃度系の結果を合わせても、3 種の microcystin とともに R^2 0.9 の高い決定係数が得られたことから、DNA 複製と microcystin 産生には何らかの強い関係があることを示した。また、細胞内に含有された 3 種の microcystin の存在比は高濃度系においては、特に 0 時間目と 60 時間目ではほぼ等しく、LR : RR : YR = 25 : 60 : 15 の割合であった (図 5-9)。このことから、60 時間目には G2/M 期の細胞がほとんど無くなり G0/G1 期の細胞が増加したことから、60 時間で細胞周期が一周したことが考えられ、18 ~ 42 時間目の間で細胞周期の進行とともに 3 種の microcystin の割合が

変動しても、再び同様の割合に戻るという変化から、細胞周期の中で固有の microcystin の量や割合が保持されていることが示唆された。

このことから、60 時間の培養の中で、最も代表的な 3 点 (G0/G1 期の割合が最も多かった 0 時間目、S 期の割合が最も高くなった 24 時間目、G2/M 期の割合が最も高くなった 36 時間目) を選択し、それぞれの時間における細胞周期の割合および 3 種の Con-MC の値 (表 5-1) より、下記の連立方程式を用いて各細胞周期における固有の microcystin 含有量を求めた。また、細胞周期における固有の microcystin 含有量 = LR 型 (L_{G0G1} , L_S , L_{G2M}), RR 型 (R_{G0G1} , R_S , R_{G2M}), YR 型 (Y_{G0G1} , Y_S , Y_{G2M}) 細胞周期の割合 = G0/G1 期 (A), S 期 (B), G2/M 期 (C) Con-MC = LR 型 (L), RR 型 (R), YR 型 (Y) 時間 = 0 h (t_1), 24 h (t_2), 36 h (t_3) と定義した。

$$\begin{cases} A_{t1} L_{G0G1} + B_{t1} L_S + C_{t1} L_{G2M} = L_{t1} \\ A_{t2} L_{G0G1} + B_{t2} L_S + C_{t2} L_{G2M} = L_{t2} \\ A_{t3} L_{G0G1} + B_{t3} L_S + C_{t3} L_{G2M} = L_{t3} \end{cases}$$

$$\begin{cases} A_{t1} R_{G0G1} + B_{t1} R_S + C_{t1} R_{G2M} = R_{t1} \\ A_{t2} R_{G0G1} + B_{t2} R_S + C_{t2} R_{G2M} = R_{t2} \\ A_{t3} R_{G0G1} + B_{t3} R_S + C_{t3} R_{G2M} = R_{t3} \end{cases}$$

$$\begin{cases} A_{t1} Y_{G0G1} + B_{t1} Y_S + C_{t1} Y_{G2M} = Y_{t1} \\ A_{t2} Y_{G0G1} + B_{t2} Y_S + C_{t2} Y_{G2M} = Y_{t2} \\ A_{t3} Y_{G0G1} + B_{t3} Y_S + C_{t3} Y_{G2M} = Y_{t3} \end{cases}$$

この連立方程式により求められた各細胞周期に固有の microcystin 含有量を図 5-10 に示し、3 種の microcystin の固有の割合を表 5-2 に示した。細胞内 microcystin 含有量は G2/M 期に最も多く、G0/G1 期に最小であり、細胞周期の移行に伴って増加することが明らかとなった。このことは、図 5-7 の DNA 濃度と microcystin 濃度の関係が高い正の相関を示したことと一致する結果であった。細胞周期の中で、G0/G1 ~ G2/M へ移行するときの細胞内の microcystin 含有量は、高濃度系・低濃度系どちらの計においても約 6 倍の変動であった。しかしながら、各細胞周期における microcystin 含有量を高濃度系と低濃度系で比較してみると、G2/M 期において、高濃度系のほうが低濃度系よりも約 1.3 倍多い値となったが、G0/G1 期および S 期の microcystin 含有量はほとんど等し

かった。従って、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度の違いによる microcystin 含有量への影響は、細胞周期の違いによる microcystin 含有量への影響に比べ非常に小さいことがわかった。また、それぞれの細胞周期に含有された 3 種の microcystin の割合もまた、窒素濃度の違いによらずそれぞれの細胞周期においてほとんど等しい割合で存在した。しかしながら、細胞周期の遷移に伴って、3 種の microcystin の割合は顕著に変化し、特に、G0/G1 期および G2/M 期においては RR 型の割合が最も高かったが、S 期においては LR 型の割合が最も高くなった。このことは、図 5-5 において、他の 2 種と比べ 18~36 時間目における LR 型の Con-MC の増加の傾きが大きかったことから、S 期において、LR 型の microcystin を特に活発に産生していたことが推定された。また、G0/G1 期における 3 種の microcystin の割合は、Kaya and Watanabe (1990) が報告した *M. viridis* NIES-102 の定常期における 3 種の microcystin の割合 LR : RR : YR = 23 : 67 : 10 とほぼ一致する値であった。

以上のことから、細胞増殖の定常期においては G0/G1 期の細胞の割合が非常に高く、対数増殖期においては S 期や G2/M 期の細胞の割合が高いと推定され、第 3 章で行った実験のように、細胞の増殖段階によって細胞内 microcystin の含有量や種類が様々に変化するという現象は、培養液中の細胞の細胞周期の割合が変化するためであると考えられた。従って、富栄養化湖沼においても同様に、細胞内 microcystin の含有量や種類が様々に変化する要因は、発生した藍藻類の細胞周期の割合の影響が大きいと考えられた。本研究の目的でもある湖沼における microcystin 発生抑制・コントロールを行うためには、優占化したアオコ形成藍藻類の細胞周期注目することが必要不可欠であることが明らかとなった。

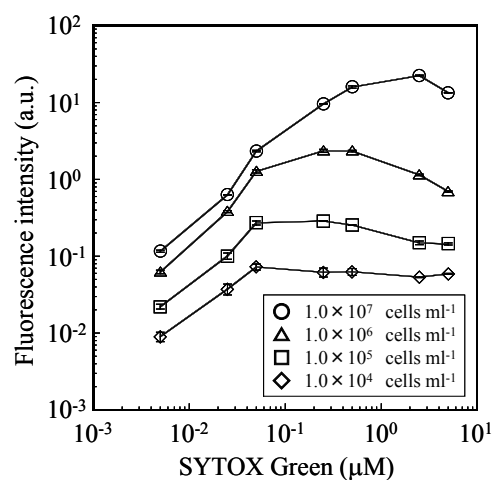


図 5-3 細胞濃度と SYTOX Green 濃度の関係

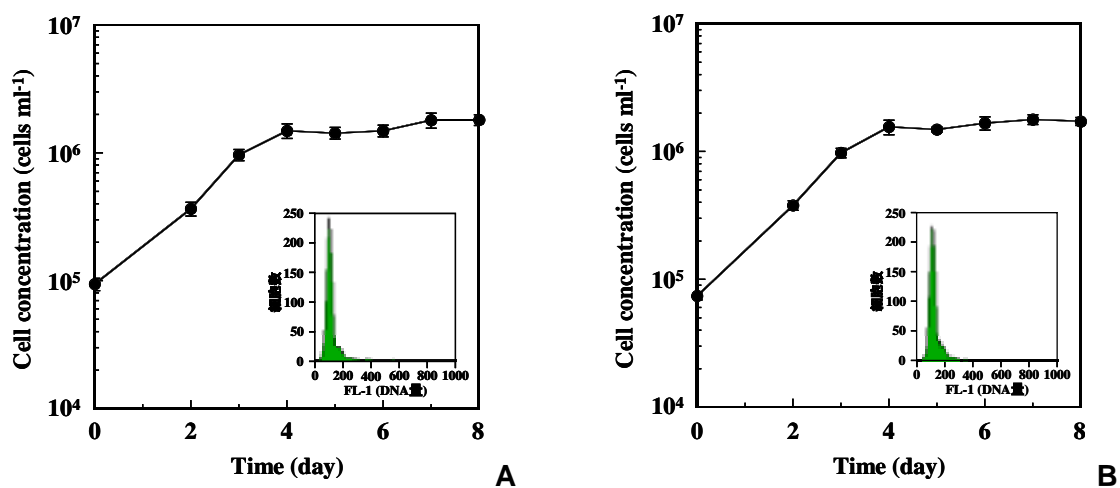


図 5-4 同調培養による細胞数の変化と同調後の細胞周期のヒストグラム
(A)NO₃-N 高濃度系、(B)NO₃-N 低濃度系で使用するための前培養

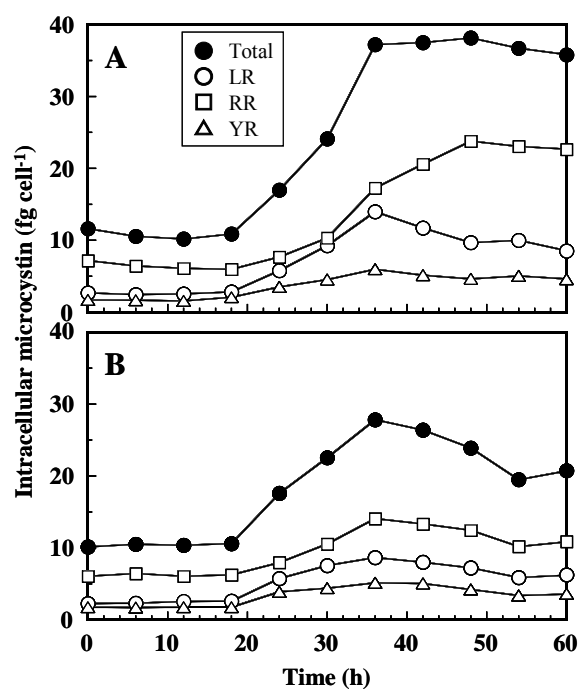


図 5-5 細胞内 microcystin 含有量の経時変化
(A)NO₃-N 高濃度系、(B)NO₃-N 低濃度系

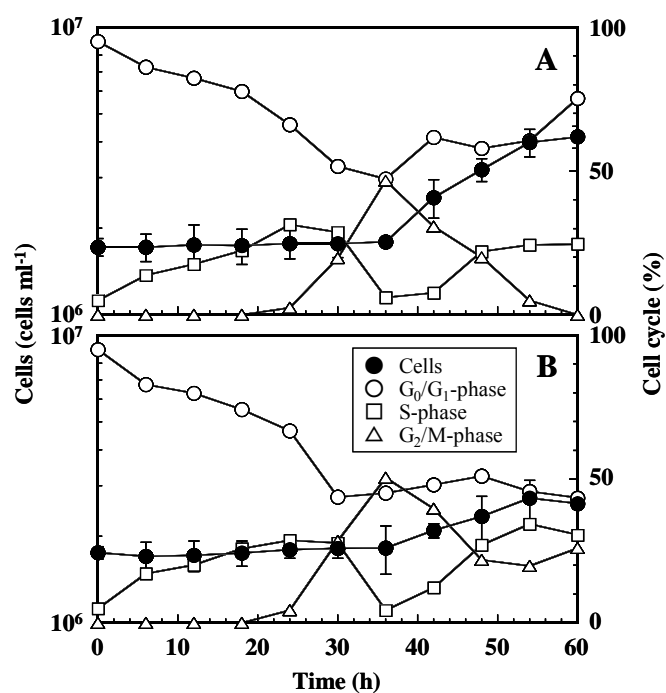


図 5-6 *M. viridis* 細胞数および各細胞周期の割合の経時変化
(A)NO₃-N 高濃度系、(B)NO₃-N 低濃度系

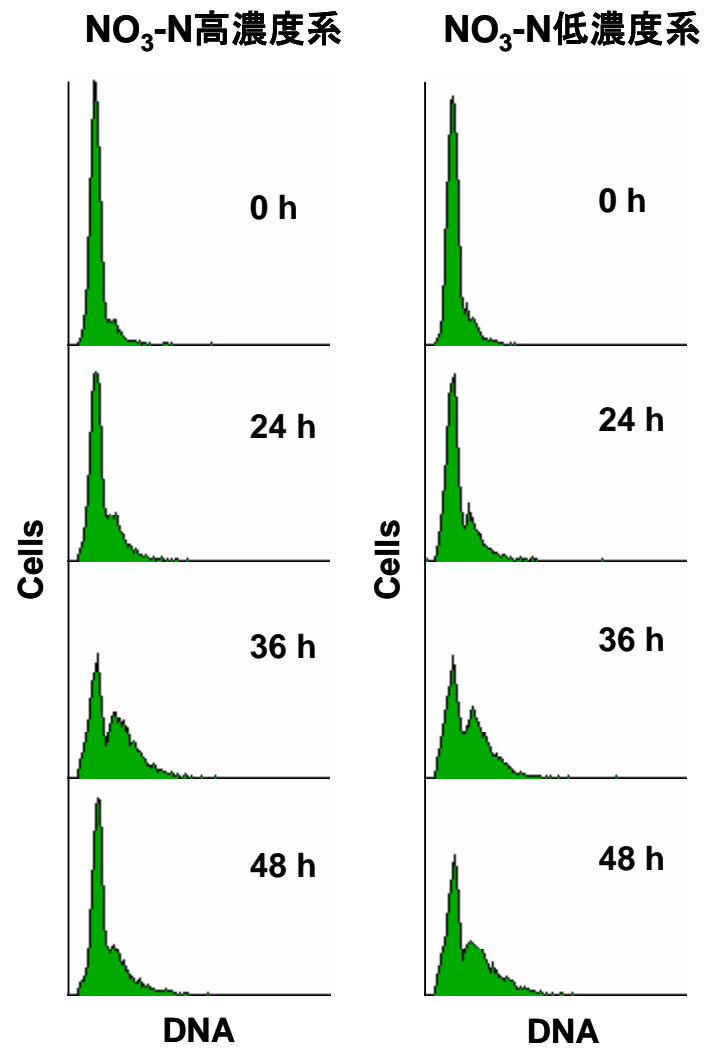


図 5-7 フローサイトメーターによる細胞周期ヒストグラム

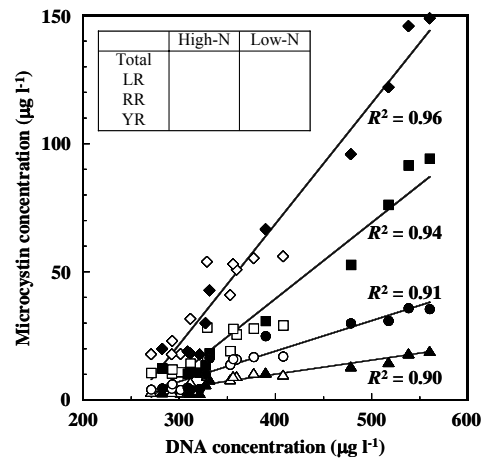


図 5-8 培養液中の dsDNA 濃度と microcystin 濃度の関係

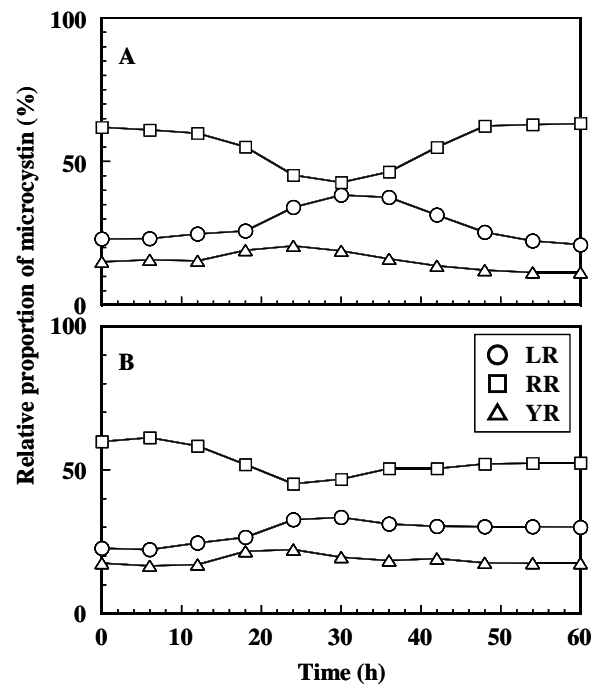


図 5-9 3 種の細胞内 microcystin の存在比
(A)NO₃-N 高濃度系、(B)NO₃-N 低濃度系

表 5-1 各細胞周期の割合の最大値とその時の細胞内 microcystin 含有量の値

Time (h)	microcystins (fg cell ⁻¹)			cell cycle (ratio)			
	LR	RR	YR	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	CV G ₁
	High-N treatment (NO ₃ -N 16 mg l ⁻¹)						
0	2.69	7.20	1.75	0.950	0.050	0	8.9
24	5.79	7.69	3.51	0.661	0.314	0.025	10.5
36	14.0	17.3	5.99	0.473	0.060	0.467	10.1
	Low-N treatment (NO ₃ -N 1.0 mg l ⁻¹)						
0	2.30	6.08	1.77	0.950	0.050	0	9.2
24	5.75	7.95	3.90	0.668	0.287	0.045	10.3
36	8.67	14.1	5.12	0.451	0.044	0.505	10.3

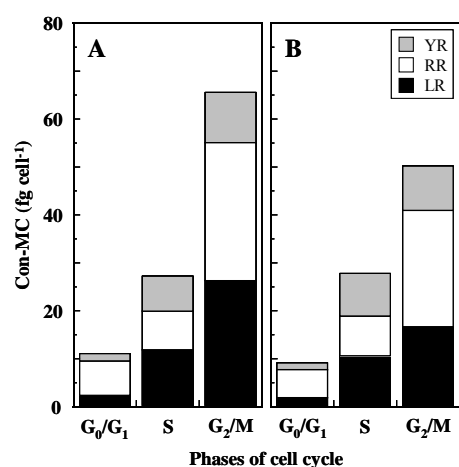


図 5-10 各細胞周期に固有の細胞内 microcystin 含有量
(A)NO₃-N 高濃度系、(B)NO₃-N 低濃度系
 データは 3 つのサンプルを測定した平均値である。

表 5-2 各細胞周期に固有の細胞内 microcystin の存在比

	cell cycle	LR (%)	RR (%)	YR (%)
High-N treatment (NO ₃ -N: 16 mg l ⁻¹)	G ₀ /G ₁	20.3	66.3	13.4
	S	43.3	29.7	27.0
	G ₂ /M	40.1	44.0	15.9
Low-N treatment (NO ₃ -N: 1.0 mg l ⁻¹)	G ₀ /G ₁	19.1	65.3	15.6
	S	37.9	29.9	32.2
	G ₂ /M	33.0	48.6	18.4

5.3.3. PO₄-P の影響

5.3.3-1. 同調培養

前培養による細胞数の増殖曲線を図 5-11 に示した。5 日目に培養液中の全ての PO₄-P が細胞内に取り込まれたが、細胞の増殖はどちらの系においても 9 日目まで継続し、細胞内のリンのみを利用して長期間増殖可能であることを示した。そして 10 日目に増殖はほぼ停止した。10 日目の培養液中の細胞の細胞周期を測定したところ、どちらの系においても、1 本のシャープなヒストグラムが得られ、90%以上の細胞が G₀/G₁ 期であることを示した。従って、この同調培養により培養液中のほとんどの細胞が増殖における定常状態の G₀/G₁ 期に同調されたことが確認され、通常の M-11 培地の PO₄-P 濃度である 1.75 mg l⁻¹ になるように添加した系と 0.1 mg l⁻¹ になるように添加した系の 2 系を作成しそれぞれの細胞周期における microcystin 含有量の比較のための実験を開始した。この時を 0 時間目とした。

5.3.3-2. 細胞内 microcystin 含有量と細胞周期の関係

PO₄-P 高濃度系および低濃度系の Con-MC の経時変化を図 5-12 に示した。どちらの系においても、NO₃-N 高濃度系および低濃度系の実験結果と同様に、リン酸塩添加後から 18 時間目までは、3 種の microcystin の含有量はほぼ一定量を推移しほとんど増減は認められなかった。細胞が窒素およびリン枯渇状態に陥った場合、*M. viridis* は microcystin の産生が可能な状態になるまでに約 18 時間必要であることがわかった。この 18 時間目までの 3 種の microcystin の割合は、どちらの系においても、約 LR : RR : YR = 40 : 40 : 20 であった (図 5-13)。NO₃-N 高濃度系および低濃度系の実験結果では、最初の 18 時間目まで約 LR : RR : YR = 20 : 65 : 15 であったため、前培養で細胞内の窒素が枯渇した場合とリンが枯渇した場合では細胞内に保持される microcystin の種類・割合が異なることが考えられた。また、0 ~ 18 時間目までの細胞内の総 microcystin 量は 4 系全ての実験系で約 15 fg cell⁻¹ で等しかったことから、microcystin の枯渇した栄養塩の種類によらず産生量は変化しないことがわかった。リン酸塩添加から 24 時間目以後、どちらの系においても RR 型の存在比が増加および LR 型・YR 型の割合の減少が顕著に現れ、60 時間目には約 LR : RR : YR = 20 : 65 : 15 の割合となった。NO₃-N 高濃度系において、

24 時間目以後 3 種の microcystin の割合は変化したものの 48 ~ 60 時間目に再び初期の割合に回復するという現象が認められたため、LR : RR : YR = 20 : 65 : 15 という割合は、栄養塩が十分に存在した時の細胞の定常状態において特徴的な比率であり、細胞分裂を引き起こすための細胞内環境として重要な割合であると考えられた。リンが枯渇した場合には ATP の不足が生じたことにより、第 4 章でも述べたように、高エネルギー要求性のユビキチン-プロテアソーム系に影響し、細胞内での microcystin 分解特性が変化したために分解される microcystin の種類が変化した結果、蓄積された microcystin の割合が変化したものと考えられた。24 時間目以後、LR 型および YR 型の細胞内含有量は 36 時間目まで増加し 42 時間目以後減少した。RR 型は 42 時間目まで増加したのちほぼ一定量となった。この変化は、NO₃-N 高濃度系における変化と類似しており、LR : RR : YR = 20 : 65 : 15 の割合を保持するために RR 型の microcystin 産生が活発に生じたと推測された。*mcy* 遺伝子が解読された現在においても、このような種類の異なる microcystin のそれぞれの産生特異性については未だ明らかとなっていないが、細胞増殖、細胞周期に応じて microcystin 産生は変化することが示された。

培養液中の細胞のそれぞれの細胞周期の割合の経時変化を図 5-14 に示した。0 時間目の細胞周期の割合は、どちらの系においても 90% 以上が G0/G1 期に同調された。G0/G1 期の細胞は緩やかに減少し、まず S 期の細胞の割合が 30 時間目にピークとなり、次いで G2/M 期の細胞の割合が 42 時間目に最大値となった。細胞の増殖が顕著に認められたのは、42 時間目からであるが、microcystin の蓄積が始まったのは 24 時間目からであるため、増殖よりも microcystin 産生が先行して生じていることが分かった。また、NO₃-N 高濃度系および低濃度系の結果と同様に、G2/M 期の細胞の割合と細胞内 microcystin 含有量の変化は同期しており、G2/M 期の細胞内にはより多くの microcystin が含まれることが推定された。

これらのことから、それぞれの細胞周期に固有の microcystin 含有量を、上述の連立方程式を用いて、表 5-3 に示した 0 時間目 (t₁)、30 時間目 (t₂)、42 時間目 (t₃) のそれぞれの測定値より求めた。細胞周期に固有の microcystin 含有量は、細胞周期サイクルの移行と共に増加する傾向を示し、また、S 期および G2/M 期における含有量は、PO₄-P 低濃度系において高い値となった (図 5-15)。この結果は、第 4 章の回分培養実験における低リン濃度ほど microcystin 含有量が高いという結果と一致するものであった。し

かしながら、2 系間における含有量の差異は最大でも G2/M 期における 1.25 倍であったが、細胞周期の間では約 4 倍の変化が求められた。このことから、microcystin 産生特性に及ぼす窒素やリンなどの外的要因よりもむしろ、細胞周期という内的要因の影響は非常に大きいことが分った。また、それぞれの細胞周期にける固有の microcystin の存在比は、図 5-13 から明らかなであったように、NO₃-N 濃度の影響とは全く異なり、細胞周期サイクルの移行と共に RR 型の割合の増加が顕著であった。

細胞内の microcystin 含有量を制御するには産生と分解の双方の機構が係わっていると考えられる。NO₃-N で同調した実験では、PO₄-P は培養液中に十分存在するため双方のバランスは保たれるが、PO₄-P で同調した実験では、NO₃-N は培養液中に十分存在するが、実験開始直後から ATP 不足によるユビキチン-プロテアソーム系が阻害され分解機構が抑制されるため産生と分解のバランスが崩れると思われる。その結果、NO₃-N 系および PO₄-P 系で、異なる結果が得られたと考えられた。

以上のことから、細胞周期と microcystin 産生の関係について以下のようなことが考えられた。細胞周期のサイクルには、アクセルやブレーキの役割を果たす制御機構が備わっている (Murray, 1989; Murray and Kirschner, 1989; Morgan, 1995)。その主たる制御機構であるサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体の周期メカニズムやその上流に位置するシグナル伝達機構、下流に位置する DNA 複製調節の 3 層構造のそれぞれが密接に関与し合うことによって、アクセルやブレーキの役割を果たす種々のタンパク質や分子の発現量や、リン酸化などの修飾による活性制御が細胞周期の 4 相のサイクルの中で周期的に変化する (Wells *et al.*, 1999)。サイクリン依存性キナーゼ (CDK, cyclin dependent kinase) は、キナーゼ活性を担う触媒サブユニットの CDK と調節サブユニットのサイクリンの複合体からなり、CDK は単独では活性が無いため、キナーゼの活性化のためにはサイクリンの CDK への結合が必要である (Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.*, 1988)。サイクリン-CDK 複合体が完全に活性化するためには、更に CDK 活性化キナーゼ (CAK, cyclin activating kinase) による CDK のスレオニン残基のリン酸化が必要である。サイクリンの結合と CAK による T160 のリン酸化により活性部位を覆っている T ループが構造変化し、CDK の活性中心が露出して、基質となるタンパク質をリン酸化可能となる。キナーゼ本体である CDK は細胞周期を通じて存在する安定なタンパク質であるが、キナーゼ活性は細胞周期の進行に伴い変動する。この周期性は

サイクリンの合成と分解に強く依存している。一方、CDK をリン酸化する CAK 活性も細胞周期を通じて存在するため、合成されたサイクリンが CDK と結合すると複合体は直ちにリン酸化されて活性状態になる。従って、活性型の CDK のキナーゼレベルを細胞周期の適切な時期になるまで抑制し、その抑制解除によって CDK キナーゼを一過的に活性化させる調節系が細胞内には存在している。その一つとして、活性化ポケットの ATP 結合部位の近傍にあるチロシン (Y14) とスレオニン (T15) のリン酸化による CDK のキナーゼ活性抑制制御のメカニズムがある。この活性抑制は Y14/T15 を脱リン酸化するプロテイン (Tyr) ホスファターゼ Cdc25 により解除されるが、Cdc25 の活性はプロテイン (Ser/Thr) ホスファターゼ PP2A の脱リン酸化によって制御される (Kumagai and Dunphy, 1992; Clarke *et al.*, 1993)。もう一つの仕組みは、CDK 阻害因子 (CKI, CDK inhibitor) のサイクリン-CDK 複合体への結合によるキナーゼ活性の抑制である。この CDK 活性の抑制は、ユビキチン-プロテアソーム系による CKI の選択的分解によって解除される。これらの、抑制と解除による CDK 活性制御は、細胞周期における CDK 活性化のタイミングばかりでなく、細胞周期の進行をモニターするチェックポイントの制御においても重要な役割を果たしており、細胞分裂によって増殖する多くの生物間で共通した機構であると考えられている (図 5-16)。

本章の結果より、microcystin は G2/M 期の細胞内に多く含有されたことから、細胞周期制御機構の中で特にこの時期に重要な役割を持っていることが推定できる。そして、この時期に特異的に発現し活性化する細胞周期制御分子としてはサイクリン B および CDK1 (Cdc2) が挙げられ、これらのサイクリン B - CDK1 複合体は G2 期から M 期への遷移を調節し細胞分裂を促すという働きを持つ (Pines, 1999)。さらに microcystin はプロテイン (Ser/Thr) ホスファターゼ PP1 および PP2A の働きを阻害することが明らかとなっていることや (Honkanen *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990)、近年、microcystin を産生する *Microcystis* 属および *Anabaena* 属もまた多くの真核生物の PP1 および PP2A と相同性の高いプロテイン (Ser/Thr) ホスファターゼを持つことが明らかとなっていることから (Shi and Carmichael, 1997; Shi *et al.*, 1999)、*M. viridis* 細胞内においても microcystin は PP1 および PP2A を介してタンパク質のリン酸化・脱リン酸化の調節に關与する性質を持つことが推定され、藍藻類の細胞周期制御機構の中で G2 期において M 期の開始を調節するための Cdc25C の脱リン酸化に關与する PP2A の阻害作用を持ち、サイクリン

B - CDK1 複合体の活性化に対して間接的に作用することが考えられた(図 5-16)。また、Cdc25C によって活性化されたサイクリン B - CDK1 複合体は、細胞周期制御タンパク質をリン酸化するだけでなく、非活性型の Cdc25C もまたリン酸化し活性化させるという CDK1/Cdc25C 間のポジティブフィードバック機構が存在するため、それによって急速なサイクリン B - CDK1 複合体の活性化を引き起こすことができる (Karaiskou *et al.*, 1998, 1999)。従って、microcystin は、PP2A による Cdc25C の脱リン酸化を抑制することで、サイクリン B - CDK1 複合体による Cdc25C のリン酸化を促進させ、結果としてサイクリン B - CDK1 複合体の劇的な活性化を引き起こすと考えられる。このことから microcystin は、G2 期から M 期への移行を調節するための重要な役割を持つ分子の一つで、G2 チェックポイント機構に関係すると推定され、つまり microcystin は *M. viridis* の細胞分裂を制御するための重要な物質であることが推察された。

このような microcystin の役割によって、有毒藍藻類は無毒藍藻類よりも急速な細胞増殖能を獲得し、アオコ形成藍藻類として優占化するのではないかと推定できる。従って、有毒藍藻類の microcystin 産生を抑制することは、アオコ発生水域から microcystin を減少させるだけでなく有毒藍藻類の増殖抑制効果もあり、富栄養化湖沼で発生した有毒アオコそのものの低減化が可能であると考えられる。

従来、原核生物と真核生物のタンパク質リン酸化および脱リン酸化の反応は、原核生物においてはヒスチジン/アスパラギン酸およびチロシン残基上で起こり、真核生物ではセリン/スレオニン残基上で起こると考えられていたが、近年、種々のバクテリアにおいて報告されたタンパク質リン酸化および脱リン酸化酵素の中には真核生物と極めて相溶性の高い酵素のあることが明らかとなっている (Alex and Simon, 1994; Hunter, 1995; Appleby *et al.*, 1996; Kennelly and Potts, 1996; Zhang, 1998)。このことは、原核生物と真核生物が同様のタンパク質リン酸化および脱リン酸化メカニズムを有することを示している。そこで、出芽酵母・ショウジョウバエ・ヒトのタンパク質 Ser/Thr 脱リン酸化酵素ファミリーに共通する一次構造より設計された degenerate プライマーセット (Cohen, P. T. W. and Cohen, P., 1989; Chen *et al.*, 1992) を用いて、microcystin 産生株 *M. viridis* NIES-102 および *M. aeruginosa* NIES-298 と microcystin 非産生株 *M. aeruginosa* NIES-44 の細胞より抽出したゲノム DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、図 5-17 に示したように、いくつかの PCR 産物の中にタンパク質 Ser/Thr 脱リン酸化酵

素ファミリー遺伝子と思われる約 120 bp のバンドが認められた。このことから、アオコ形成藍藻類 *Microcystis* 属においても真核生物に類似したタンパク質 Ser/Thr 脱リン酸化酵素が存在する可能性の高いことが示唆された。従って、今後これらの PCR 産物の塩基配列をそれぞれ明らかにし、*Microcystis* 属の PP2A 遺伝子の特定およびクローニングを行うことによって、microcystin による PP2A の阻害作用を明らかにすることができると考えられた。

また、これまでに報告されている細胞周期制御機構に関する数多くの知見は、ヒト・カエル・ショウジョウバエ・ウニ・線虫・酵母等の細胞を用いた実験によって明らかとなったものであり、藍藻類をはじめ原核生物の細胞を用いた細胞周期制御機構に関する研究報告はほとんどない。サイクリン - CDK の活性制御による細胞周期を制御する機構は多くの生物に共通であると考えられているため、藍藻類 *M. viridis* においても類似した機構が存在するであろうという仮説に基づくものであり、今後、本章で推定された microcystin による細胞周期制御のメカニズムを明らかにするために藍藻類細胞内の CDK・サイクリン・Cdc25・PP2A 等について詳細に調べなければならない。

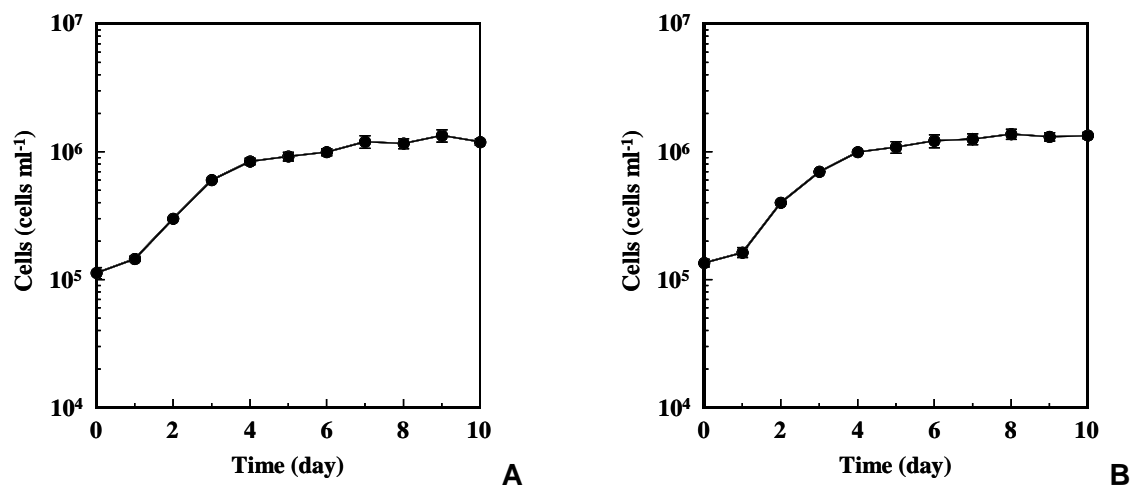


図 5-11 同調培養による細胞数の変化と同調後の細胞周期のヒストグラム
(A)PO₄-P 高濃度系、(B)PO₄-P 低濃度系で使用するための前培養

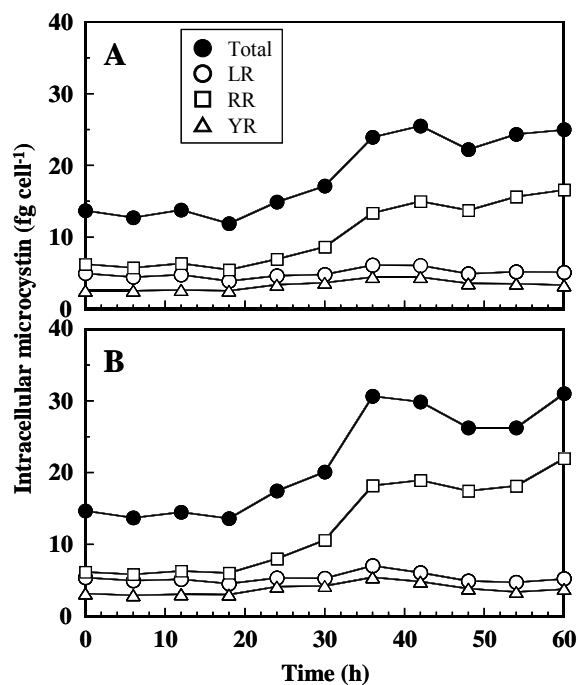


図 5-12 細胞内 microcystin 含有量の経時変化
(A)PO₄-P 高濃度系、(B)PO₄-P 低濃度系

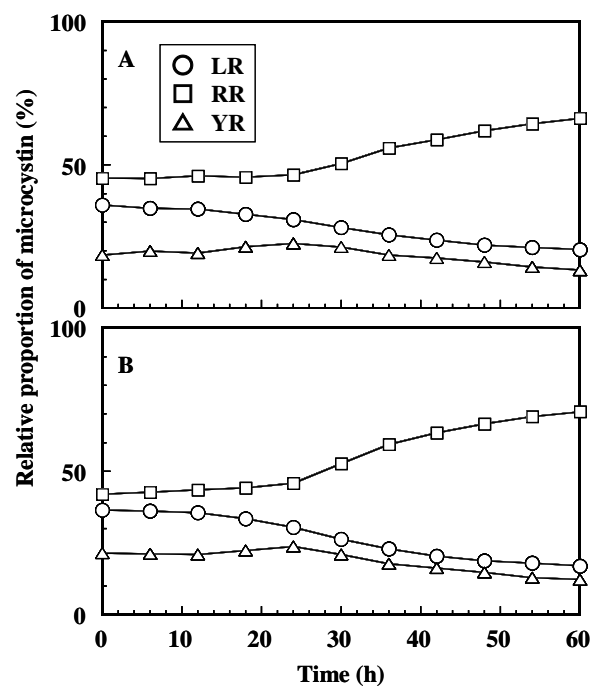


図 5-13 3 種の細胞内 microcystin の存在比
(A) $\text{PO}_4\text{-P}$ 高濃度系、(B) $\text{PO}_4\text{-P}$ 低濃度系

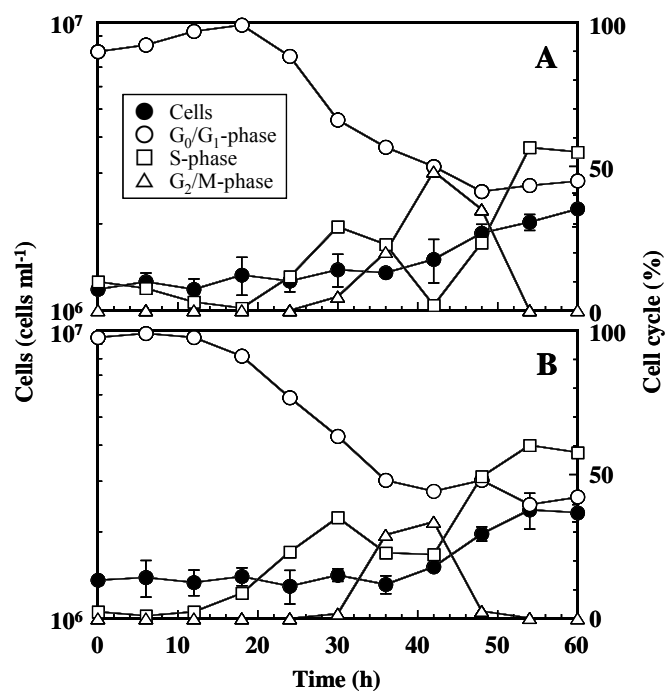


図 5-14 *M. viridis* 細胞数および各細胞周期の割合の経時変化
(A) $\text{PO}_4\text{-P}$ 高濃度系、(B) $\text{PO}_4\text{-P}$ 低濃度系

表 5-3 各細胞周期の割合の最大値とその時の細胞内 microcystin 含有量の値

Time (h)	microcystins (fg cell ⁻¹)			cell cycle (ratio)			
	LR	RR	YR	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	CV G ₁
	High-P treatment (PO ₃ -P 1.75 mg l ⁻¹)						
0	4.95	6.23	2.54	0.900	0.100	0	10.9
30	4.82	8.65	3.65	0.662	0.291	0.047	9.5
42	6.06	15.0	4.46	0.500	0.017	0.483	11.1
	Low-P treatment (PO ₃ -P 0.1 mg l ⁻¹)						
0	5.36	6.16	3.15	0.977	0.023	0	10.5
30	5.28	10.6	4.23	0.633	0.351	0.016	11.3
42	6.09	19.0	4.84	0.442	0.223	0.335	11.3

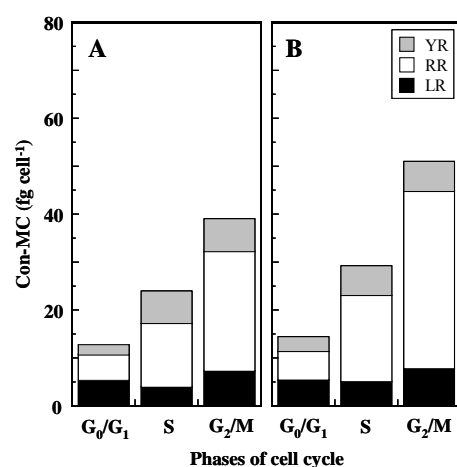


図 5-15 各細胞周期に固有の細胞内 microcystin 含有量
(A)PO₄-P 高濃度系、(B)PO₄-P 低濃度系
データは 3 つのサンプルを測定した平均値である。

表 5-4 各細胞周期に固有の細胞内 microcystin の存在比

	cell cycle	LR (%)	RR (%)	YR (%)
High-P treatment (PO ₄ -P: 1.75 mg l ⁻¹)	G ₀ /G ₁	40.2	43.3	16.5
	S	16.2	55.6	28.2
	G ₂ /M	18.4	64.0	17.5
Low-P treatment (PO ₄ -P: 0.1 mg l ⁻¹)	G ₀ /G ₁	37.4	41.1	21.5
	S	17.2	61.5	21.3
	G ₂ /M	15.2	72.5	12.3

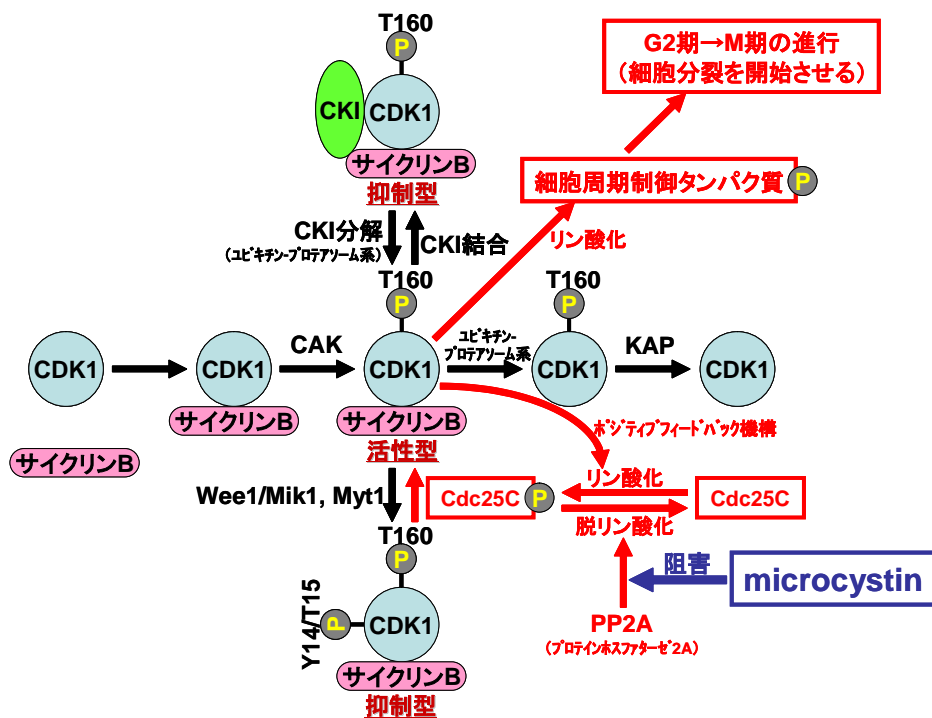
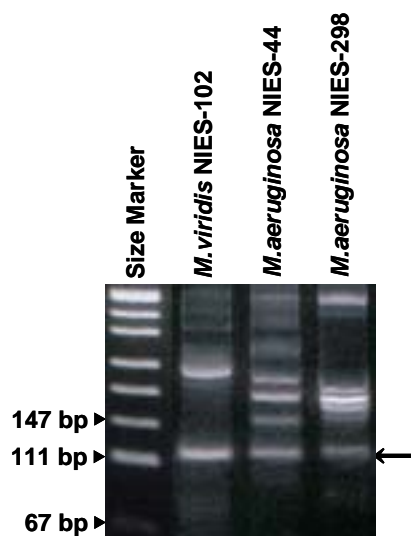


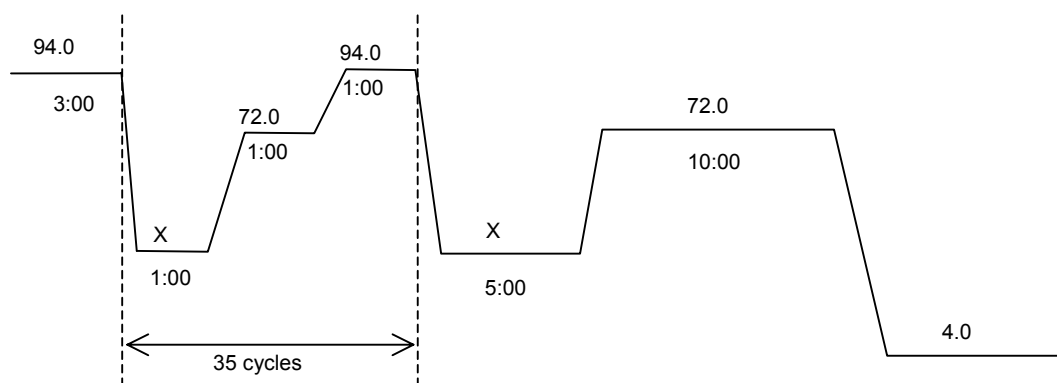
図 5-16 CDK1 活性制御機構

(中山 2001 より一部引用)

CDK1 の活性化には、サイクリンの結合が必要である。CDK1 と結合したサイクリン B が選択的に分解されると、CDK1 のキナーゼ活性が消失する。活性型 CDK1 に CDK1 阻害因子 (CKI) が結合するとキナーゼ活性が抑制され、CKI の分解あるいは解離により抑制が解除される。また、チロシン (Y14) /スレオニン (T15) のリン酸化によっても、CDK 活性部位が構造変化して基質への ATP 受け渡しが妨げられ、キナーゼ活性が抑制される。Wee1/Mik1 キナーゼが Y14 を、Myt1 キナーゼが T15 をリン酸化し、プロテイン (Tyr) ホスファターゼ Cdc25 が脱リン酸化する。CAK は、サイクリン H と CDK7 の複合体で、CDK1 スレオニン (T160) をリン酸化する。リン酸化された T160 は KAP ホスファターゼによって脱リン酸化される。特に G2/M 期における主要なサイクリン・CDK・Cdc25 はそれぞれサイクリン B・CDK1・Cdc25C である。



(2%アガロース S、100V、30 分)



(PCR 条件、X = 35 (NIES-298)、38 (NIES-44)、45 (NIES-102))

PP2AF 5' -RTITGYGGIGAYRTICAYGG-3'

PP2AR 5' -TAICCIKRTCIACRWARTC-3'

(プライマーセット、ただし I=inosine ; K=G/T ; R=A/G ; W=A/T ; Y=C/T)

図 5-17 degenerate-PCR によるタンパク質 Ser/Thr 脱リン酸化酵素遺伝子の検出

5.4. 結論

本章において、SYTOX Green という新たな核酸蛍光試薬を用いて *M.viridis* の細胞周期をフローサイトメーターで測定し、microcystin 産生と細胞周期の関係解析を窒素濃度の異なる二つの培養系で検証した。ここで明らかとなったことを以下にまとめた。

- 1) SYTOX Green を用いて *M.viridis* の核酸蛍光染色を行うためには 0.5 μ M の SYTOX Green 濃度が最当であった。
- 2) フローサイトメーター (FACACalibur) を用いてアオコ形成藍藻類の *M.viridis* の細胞周期を測定することができた。
- 3) LR : RR : YR = 20 : 65 : 15 という細胞内での割合は、細胞の定常状態において一定に保持されることが分かった。
- 4) *M.viridis* の細胞内において、DNA 複製と microcystin 産生が平行して行われることが明らかとなった。
- 5) 各細胞周期における microcystin 含有量には固有の値があり、その含有量は G0/G1 期 < S 期 < G2/M 期の順であった。
- 6) 低リン濃度の条件下では、細胞内における microcystin の含有量が多いことが明らかとなった。
- 7) 細胞周期プロセスにおける microcystin 含有量および種類の変化は、NO₃-N 濃度および PO₄-P 濃度の影響に比べ 4 ~ 6 倍と非常に大きかった。

第 6 章 *M. viridis* の microcystin 合成遺伝子発現に及ぼす細胞周期の影響

6.1. はじめに

これまでの実験結果より、microcystin 産生は細胞の増殖と密接な関係があり、特に細胞周期サイクルに伴った microcystin 産生量および種類の周期的な変化が認められた。また、各細胞周期における固有の microcystin 含有量は、細胞周期サイクルの遷移と共に増加する傾向があり、S 期の細胞内で microcystin 産生が活発に行われ、G2/M 期で細胞内に蓄積されることが推察されたことから、microcystin 合成機構が細胞周期制御機構の一部であることが仮説として挙げられた。

一般的に、適当な条件下で培養された細胞の全タンパク質量は細胞周期を通して連続的に増加し、細胞分裂直前の遺伝子転写が抑制される M 期以外は、RNA 合成も一定速度で行われる。つまり、細胞内のほとんどの成分は常に連続して合成されており、M 期の細胞が分裂する短い間だけ停止する。しかしながら、このようなタンパク質の連続的な増大に対して、DNA 複製と細胞分裂は不連続に起こる現象である。この不連続な現象の鍵となる細胞内成分は細胞周期のある特定の時期にのみ合成される。遺伝子の活性の切り替えや、DNA 複製、細胞分裂の開始・終結は、細胞周期制御機構によって引き起こされる様々な反応が顕著に現れたものである (Albert *et al.*, 1995)。

第 5 章までの結果からは、3 種の microcystin の割合には周期性が認められたが、細胞周期サイクルの進行と共に microcystin 含有量は増加したため、上記のように、細胞周期とは係りの無いほとんどのタンパク質が細胞周期を通じて発現し細胞周期と共に増加することから、microcystin も例外ではないということもまた考えられる。従って、microcystin が細胞周期に係る物質であることを明らかにするためには *mcy* 遺伝子の発現が特定の時期においてのみ発現していることを明らかにする必要があるため、本章では *mcy* 遺伝子より転写された mRNA が実際に S 期あるいは G2/M 期に多く検出されるかを検証した。また、第 5 章の結果を考慮して、microcystin の産生と分解のバランスが保たれると考えられる NO₃-N を制限した同調培養実験を行った。

6.2. 実験方法

6.2.1. 供試藻類

茨城県つくば市にある(独)国立環境研究所微生物系統保存施設より分与された無菌単藻株 *Microcystis viridis* NIE-102 を用いた。なお、この株は霞ヶ浦湖水より分離されたものであり、主に LR・RR・YR 型の microcystin を産生する株であることが明らかとなっている。

6.2.2. 培養方法

microcystin 濃度が十分測定可能な 1×10^6 cells ml^{-1} の細胞濃度で、且つ *M. viridis* の細胞周期を同調するための前培養を行うために、12 L 容の培養ビンに $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度 1 mg l^{-1} に調製した 10 L の M-11 培地 (Yagi *et al.*, 1986) [NaNO_3 (100 mg), K_2HPO_4 (10 mg), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75 mg), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mg), Na_2CO_3 (30 mg), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg), distilled water (1 L), pH 8.0] を入れ、121 °C・40 分間滅菌後、あらかじめ 500 ml 容の Erlenmeyer flask で前培養を行い定常期に達した *M. viridis* NIE-102 を 100 ml 添加し、温度 30 ± 0.5 °C、照度 4,000 Lx 連続照射(白色蛍光灯、 $54 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$)、曝気 250 ml min^{-1} の条件で緩やかに攪拌しながら 8 日間純粋培養を行った。この同調培養により培養液中のほとんどの細胞が G0/G1 期に同調されたことを確認後、通常の M-11 培地の $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度である 16 mg l^{-1} になるように、 NaNO_3 溶液を滅菌済み孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通して添加した。この時を実験開始 0 時間目とし、第 5 章でそれぞれの細胞周期の割合が最も高い値となった、0 時間目、24 時間目、36 時間目にサンプリングを行った。

microcystin 濃度の測定用のサンプルは、 $4000 \times g$ 、4 °C で遠心分離し、回収された細胞ペレットを凍結乾燥後、 -20 °C で保存した。分析の直前に、5%酢酸に懸濁し microcystin 抽出を各サンプル 3 回行った。この microcystin 粗抽出液を第 2 章の microcystin 測定法に従って分析し、Intra-MC とした。*Microcystis* sp. 一細胞当たりの細胞内 microcystin 含有量 (Con-MC) は、Intra-MC を *Microcystis* sp. 細胞数 (cells l^{-1}) で割算することによって求めた。細胞周期測定用のサンプルは、 $4000 \times g$ 、4 °C で遠心分離し、回収された細胞ペレットを蒸留水で洗浄後、70%イソプロパノールに再懸濁した状態で測定まで -20 °C で保存した。細胞周期の解析は第 5 章と同様の方法で行った。

6.2.3. 核酸の抽出法

ゲノム DNA 抽出のための *M. viridis* 細胞は、500 ml 容の Erlenmyer flask に M-11 培地を 100 ml 入れ、温度 30 ± 0.5 、照度 4,000 Lx 連続照射（白色蛍光灯、 $54 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）の条件で 20 日間培養し定常期に達した細胞を $4,000 \times g$ で遠心回収した。沈殿した細胞ペレット約 10^8 cells を超純水で洗浄した後、FastDNA Kit (Bio101 Co.) および FastPrep (Bio 101 Co.) を用いて細胞を破碎し DNA を抽出・精製した。また、0 時間目・24 時間目・36 時間目に回収した培養液を孔径 $2 \mu\text{m}$ の親水性ポリカーボネート Membrane Filter (Whatman Co.) でろ過濃縮し、超純水で洗浄した後、FastRNA Pro Kit (Bio101 Co.) および FastPrep で細胞を破碎し Total RNA の抽出・精製を行った。DEPC 処理水に溶解後の Total RNA 濃度は GeneQuant pro (Amersham Biosciences Co.) を用いて測定し、OD₂₆₀ で 0.2 に調製した。

6.2.4. PCR

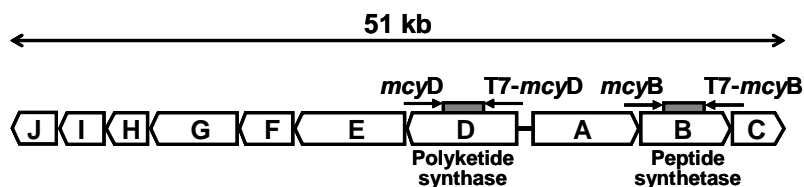


図 6-1 microcystin 合成遺伝子 *mcyABC* および *mcyDEFGHIJ* と PCR による増幅領域

mcyB, *mcyD*, 16S rDNA の塩基配列は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) を参照し、Accetion No. **AB092807**, *Microcystis viridis* NIES-102 *mcyB* gene for microcystin synthetase partial cds、Accetion No. **AB032549**, *Microcystis aeruginosa* *mcyD*, *mcyE*, *mcyF*, *mcyG*, orf3, orf4 genes for polyketide synthase, polyketide synthase and peptide synthetase, racemase, peptide synthetase and polyketide synthase, hypothetical ABC transporter ATP-binding protein, d-3-phosphoglycerate dehydrogenase,

complete cds、 Accetion No. **U40332**, *Microcystis viridis* NIES-102 16S rRNA gene、 のシーケンズデータを用いた。これらのデータを基に、Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)を用いて、図 6-1 に示した *mcyB* および *mcyD* の領域を増幅するためのプライマー *mcyB*, T7-*mcyB*, *mcyD*, T7-*mcyD* と、mRNA 検出のためのポジティブコントロールとして 16SrRNA を用いるためのプライマー 16SrDNA, T7-16SrDNA を設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を下記に示した。シーケンズおよび RNA プローブ合成のための反応に PCR 産物中に T7 プロモーター配列が必要なため、プライマーには T7 プロモーター配列 (部分) を付加し、*mcyB* および *mcyD* の PCR 産物中に人工的に導入した。

***mcyB* (T_m 63.72)**

5'-GTGGCTAAACCTGACGGGTA-3' (mer:20)

T7-*mcyB* (T_m 63.68)

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAATAGGAACCGGTTGGAGA-3' (mer:40)

***mcyD* (T_m 63.63)**

5'-AAAGTCGCGCTCATATGCTT-3' (mer:20)

T7-*mcyD* (T_m 63.59)

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAAAACGGCGGACATACTT-3' (mer:40)

16SrDNA (T_m 64.03)

5'-AGAGGATGAGCAGCCACACT-3' (mer:20)

T7-16SrDNA (T_m 63.55)

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGTTTCCACCGCCTTTAGGT-3' (mer:40)

プライマーペア *mcyB*/T7-*mcyB*、*mcyD*/T7-*mcyD*、16SrDNA/T7-16SrDNA を用いた予想される PCR 産物のサイズは、それぞれ 381 bp、368 bp、349 bp である。

PCR は、GeneAmp2400 Thermocycler (Applied Biosystems Co.) を用いて行った。全てのプライマーペア (*mcyB*/T7-*mcyB*, *mcyD*/T7-*mcyD*, 16SrDNA/T7-16SrDNA) で、PCR のサイクルを初期熱変性 94.0 ・ 2 min、熱変性 94.0 ・ 30 sec、アニーリング 58.5.0 ・ 30 sec、伸長反応 72.0 ・ 1 min の条件に設定し、35 サイクルの反応を行った。*M.viridis* より抽出された DAN 約 1 µg を PCR 反応液(表 6-1)に添加し PCR 反応液を調製した。

また、アニーリング温度の決定は、Rychlik *et al.* (1990) の方法に従って決定し、T_m 値は nearest-neighbor 法で求めた。

PCR 産物の精製は、1.5%アガロースゲル（低融点アガロース；Agaros L, Wako Co.）で電気泳動を行い、目的のバンドを切り出した後、GenePure（Nippongene Co.）を用いて行った。

6.2.5. PCR 産物のシーケンス

3 種類の遺伝子の PCR 産物の確認のために CUGA 7 Sequencing Kit (Nippon Genetech Co.) を用いた。本キットでは、アンチセンス鎖と同じ配列のプライマーの 5'末端に付加された T7 プロモーター配列によって、PCR 産物中に T7 プロモーター配列が導入される。PCR 産物からの RNA 合成は、T7 ファージ由来 RNA ポリメラーゼがこの配列を認識することによって *in vitro* 転写反応を開始し、蛍光標識されたターミネーターを取り込んだ RNA が合成される（図 6-2）。この蛍光標識された RNA を ABI PRISM 310 Analyzer（Applied Biosystems Co.）で測定し、PCR 産物のシーケンスを行い、DDBJ に登録されている配列との比較を行った。

6.2.6. RNA プローブの合成

mcyB および *mcyD* より転写された mRNA 検出とポジティブコントロールとして 16S rRNA 検出のための RNA プローブは、DNA シーケンス反応と同様に、T7 プロモーター配列を導入したそれぞれの遺伝子の PCR 産物と T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* RNA 合成法を用いた CUGA7 *in vitro* transcription kit（Nippon Genetech Co.）によって作成した。

6.2.7. RNase Protection Assay (RPA)

RNase Protection Assay は、RNA 分解酵素の一つである RNase A が二本鎖 RNA は分解しないが、一本鎖 RNA は分解するという特徴を利用した実験方法である。検出したい RNA に相補的な RNA をプローブとして用い、サンプル中の目的 RNA と RNA-RNA ハイブリッドを形成させる。ハイブリダイズしなかった一本鎖 RNA を RNase A で分解し、二本鎖のものだけ電気泳動で検出する。また、ノーザンブロッティング法よりも検出感度がよく、1 塩基でもミスマッチがあると 1 本鎖 RNA の部分が生じるため RNase A で分解されるので、1 塩基の置換も検出できる。ここでは、RPA Kit（Ambion Co.）

を用いて実験を行った。また、RNA-RNA 二本鎖の検出のための電気泳動は、5%アクリルアミド / 8M 尿素ゲルを用い、二本鎖 RNA 検出のための電気泳動後のゲルの染色には、SYBR Gold (Molecular Probes Co.) を用いた。

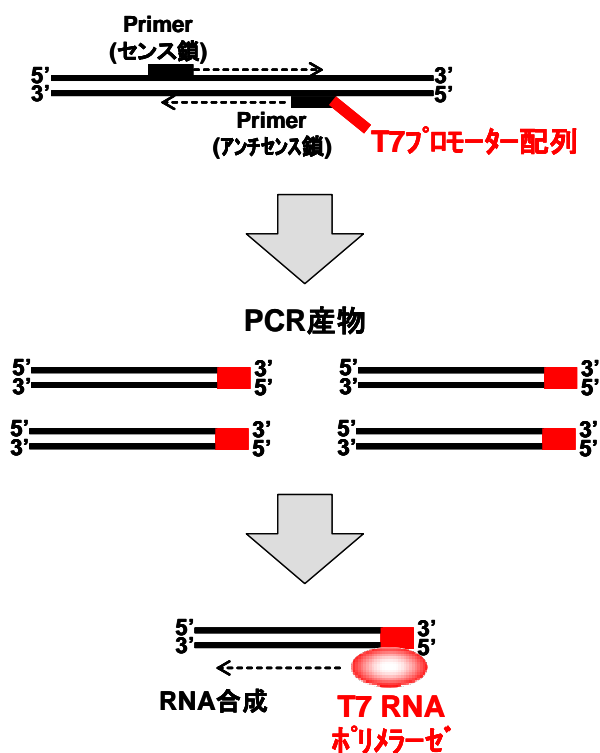


図 6-2 *in vitro* RNA 合成の概念図

(Izawa *et al.*, 1998 より引用)

6.3. 結果および考察

6.3.1. PCR による *mcy* 遺伝子増幅

mcy 遺伝子より転写された mRNA と相補的な RNA プローブを作成するためには、鋳型となる *mcy* 遺伝子の DNA 断片が必要である。本研究では、*mcy* 遺伝子が 2 つのオペロンから構成されることと、microcystin がポリケチド構造とペプチド構造から構成される物質であることから、それぞれのオペロンから 1 つずつ microcystin に特異的な遺伝子を選択しそれらの一部分を PCR により増幅させ RNA 合成のための鋳型 DNA とした。*mcyB* 遺伝子は、ペプチド合成酵素をコードしており LR 型の microcystin に特徴的なロイシンの合成に関与している。また、*mcyD* 遺伝子は、ポリケチド合成酵素をコードし

ており、全ての microcystin や nodularin の基本骨格中で共通した構造の Adda の部分の合成に関与している。また、これらの遺伝子は microcystin を産生する藍藻類中に高度に保存された配列であることが明らかとなっている。

mcyB・*mcyD* および 16S rDNA 断片の PCR 産物の電気泳動の結果を図 6-3 に示した。それぞれの PCR 産物の電気泳動パターンには非特異的なバンドは認められず、それぞれ 300 ~ 400 bp のサイズマーカーの範囲内に検出され、381 bp、368 bp、348 bp の目的の部分が増幅されていることを示した。また、確認のための DNA シークエンスを行ったところ、*mcyB* および 16S rDNA の PCR 産物は DDBJ に登録されているそれぞれの遺伝子の配列と 99% 以上一致していることがわかった。*mcyD* 遺伝子は、現在のところ、*M. viridis* においてはその詳細な塩基配列は報告されていないため、*M. aeruginosa* における塩基配列を基にプライマーを作成し PCR による増幅を行ったが、*mcyD* の PCR 産物と *M. aeruginosa* の *mcyD* 遺伝子の配列は増幅した範囲内において 98% 以上の相同性が確認された (図 6-4)。

6.3.2. 細胞の増殖と細胞周期の割合

実験開始前の同調培養による細胞の増殖曲線を図 6-5 に示した。細胞の増殖は 4 日間で停止し定常期に入ったが、更に 4 日間の定常期を延長させることによってより多くの細胞を G0/G1 に同調させた。その結果、8 日目の細胞のうち 95% の細胞が G0/G1 期に同調され、8 日目を 0 時間目とし、NO₃-N 濃度 16.5 mg l⁻¹ となるように NaNO₃ 溶液を添加した。サンプリングは 0 時間目・24 時間目・36 時間目に行い、その時の細胞数と細胞周期の比率をを図 6-6 に示した。細胞数は 0 時間目から 24 時間目までほとんど変化せず一定であった。しかしながら、細胞周期の割合は、時間の経過と共に G0/G1 期の細胞の割合が減少し、24 時間目には僅かではあるが G2/M 期の細胞が認められ、36 時間目には G0/G1 期と G2/M 期の細胞の割合がほぼ均しくなった。S 期の細胞の割合は 24 時間目に最も多く認められたが 36 時間目には減少し、0 時間目の割合とほぼ均しい値となった。

これらのことから、サンプリングをおこなったそれぞれの時間において、各細胞周期の割合が異なるため、それぞれの時間において microcystin 産生特性が異なっていることが予想され、*mcy* 遺伝子の発現レベルにも変化が現れているものと考えられる。

6.3.3. 細胞内 microcystin 含有量と *mcy* 遺伝子の発現との関係

それぞれのサンプリング時期における細胞内 microcystin 含有量は、時間の経過と共に増大し、また、3 種の microcystin の存在比もまた異なった（図 6-7）。従って、サンプリングを行ったそれぞれの時間で、細胞周期の割合と microcystin の産生特性が異なることから、*mcy* 遺伝子の mRNA 発現レベルの検出を行った。

ポジティブコントロールとして検出した 16S rRNA はいずれのサンプルからもほぼ同程度の傾向強度でバンドが確認された。S 期の細胞の割合が最も高かった 24 時間目のサンプルにおいて *mcyB* および *mcyD* 遺伝子の発現も顕著であり、S 期の細胞がほとんど存在しなかった 0 時間目・36 時間目においては二本鎖 RNA のバンドは検出されなかった（図 6-8）。また、細胞内の microcystin 含有量の増加が認められた時間（24 h）と両 *mcy* 遺伝子の発現が認められた時間（24 h）は一致した。

これらの結果と第 5 章の結果より、microcystin 産生と細胞周期の関係について図 6-9 のような機構が考えられた。まず、S 期における DNA 複製プロセスの進行とともに *mcy* 遺伝子より mRNA が転写され microcystin 合成酵素が発現する。そして、G2 期終了までの間に microcystin 合成が進行し細胞内に蓄積され、M 期ではタンパク質合成など種々の反応が抑制されるため microcystin 含有量は一定となる。細胞分裂の完了と共にユビキチン-プロテアソーム系の働きによって急速に microcystin の分解反応が進行し減少する。これらの反応が細胞周期のサイクルと共に周期的に起こり、その結果細胞内の microcystin 含有量が周期的に変化するものと考えられた。また、DNA 複製プロセスの進行とともに microcystin が合成されることから、DNA 複製と microcystin 合成に密接な関係があることもまた示唆された。従って、*M. viridis* は $\text{NO}_3\text{-N}$ が不足すると G1 期の制御点を越える細胞周期の進行が制御されるため、S 期より開始される microcystin 産生のプロセスを行うことが不可能となる。また、 $\text{PO}_4\text{-P}$ が不足すると細胞周期は回転するが、分裂終了後のユビキチン-プロテアソーム系の働きが抑制され microcystin の分解が進行せず多くの microcystin を蓄積したまま G1 期の制御点で停止することが推定されることから、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{PO}_4\text{-P}$ は、microcystin 産生機構に対して影響するものではなく、細胞周期の制御機構に影響する要因であり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{PO}_4\text{-P}$ の細胞周期への影響が microcystin 産生および分解機構に間接的に作用し細胞内 microcystin 含有量に変化した

と考えられた。このことは、一般的に、富栄養化湖沼において窒素・リンを削減することがアオコの発生防止のために重要であると考えられているが、microcystin の発生抑制のためには、窒素・リンよりもむしろ有毒藍藻類の細胞周期に注目することが必要であることを示している。

表 6-1 PCR 反応液の組成

ddH ₂ O	37.5 μ l
10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer	5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mmol l ⁻¹ each)	4 μ l
Forward-primer (20 pmol μ l ⁻¹)	1 μ l
Reverse-primer (20 pmol μ l ⁻¹)	1 μ l
Gene <i>Taq</i> (5 unit μ l ⁻¹)	0.5 μ l
鋳型 DNA < 1 μ g	1 μ l
Total	50 μ l

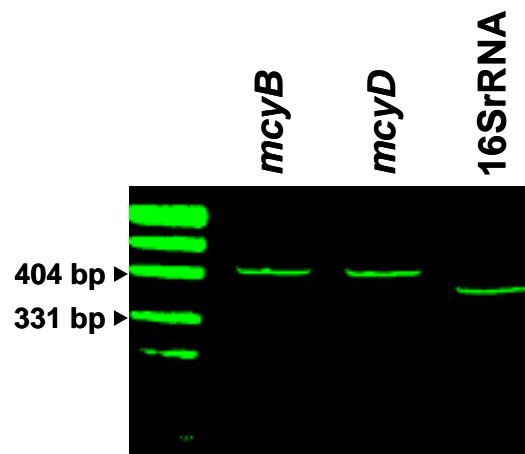


図 6-3 *mcyB*・*mcyD* および 16S rDNA PCR 産物の電気泳動
(2%アガロースゲル、100V・30 分、SYBR Green 染色)

```

1      caaaaacggcggacatacttttctaattcaatgggattaccaagggctgttccagtgccgt
7925   caaaaacggcggacatacttttctaattcaatcggattaccaagggctgttccagtgccgt

61     gagcttcataataatcgattttgttcaggcttgagattagcacttttaagggttgatgta
7865   gagcttcgataataatcgattttgttcaggcttgagattagcacattttaagggttgatgta

121    ataatttttcttgagcttgaccattaggaacagttagcccactacttggaccatcatgat
7805   ataatttttcttgagcttgaccattaggaacagttagcccactacttggaccatcatgat

181    tgacggctgtgccataaaatttcgctaaaaatttggtctccattcttaactgcttggctca
7745   tgacggctgtaccataaaatttcgccaataatttggtctccattcttaattgcttggctca

241    atcttttcagaacaactattccacagccttctcctcgccaccatgccatttgcgctctcat
7685   atcttttcagaacaactattccacagccttctcctcgccaccatgccatttgcgctctcat

301    caaaggttttgcaatgtccatcaggggcaagcatatgagcgcg
7625   caaaggttttgcaatgtccatcaggggcaagcatatgagcgcg

```

図 6-4 *M. viridis* NIES-102 株の *mcyD* 遺伝子の PCR 産物シーケンス結果（上段）と *M. aeruginosa* PCC7086（AB032549）の *mcyD* 遺伝子（下段）の比較

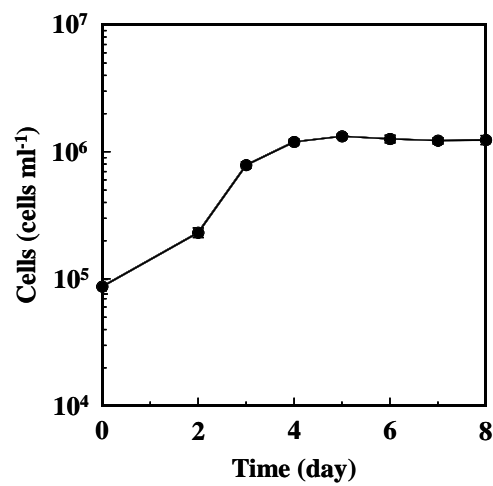


図 6-5 同調培養による細胞数の経時変化

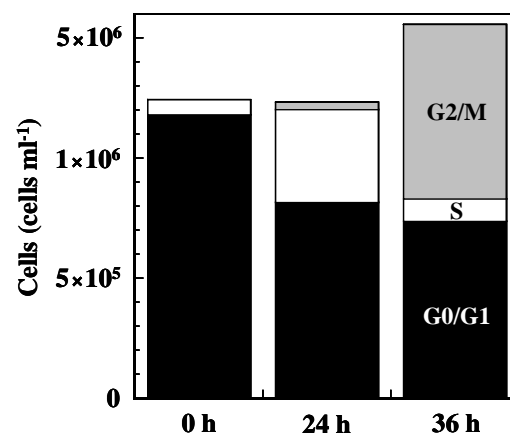


図 6-6 実験開始後 0 時間目・24 時間目・36 時間目の細胞数と細胞周期の比較
データは 3 つのサンプルを測定した平均値である。

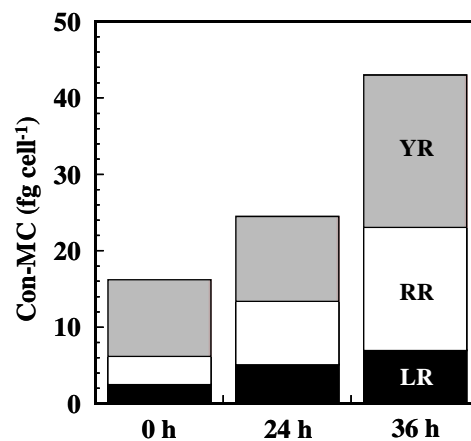


図 6-7 実験開始後 0 時間目・24 時間目・36 時間目の 3 種 microcystin 含有量の比較
データは 3 つのサンプルを測定した平均値である。

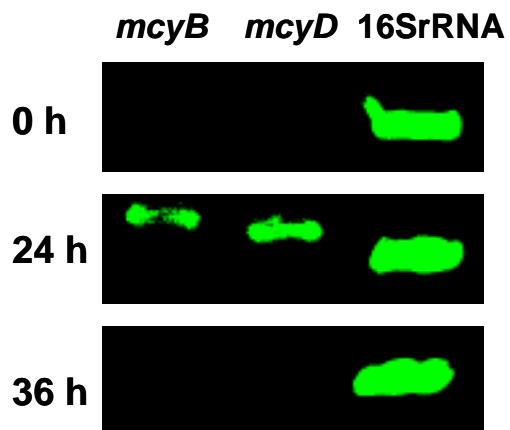


図 6-8 0 時間目・24 時間目・36 時間目の *mcyB*・*mcyD* 遺伝子の発現レベルの比較
(5%アクリルアミド / 8M 尿素ゲル、100V・60 分、1/10000SYBR Gold 染色)

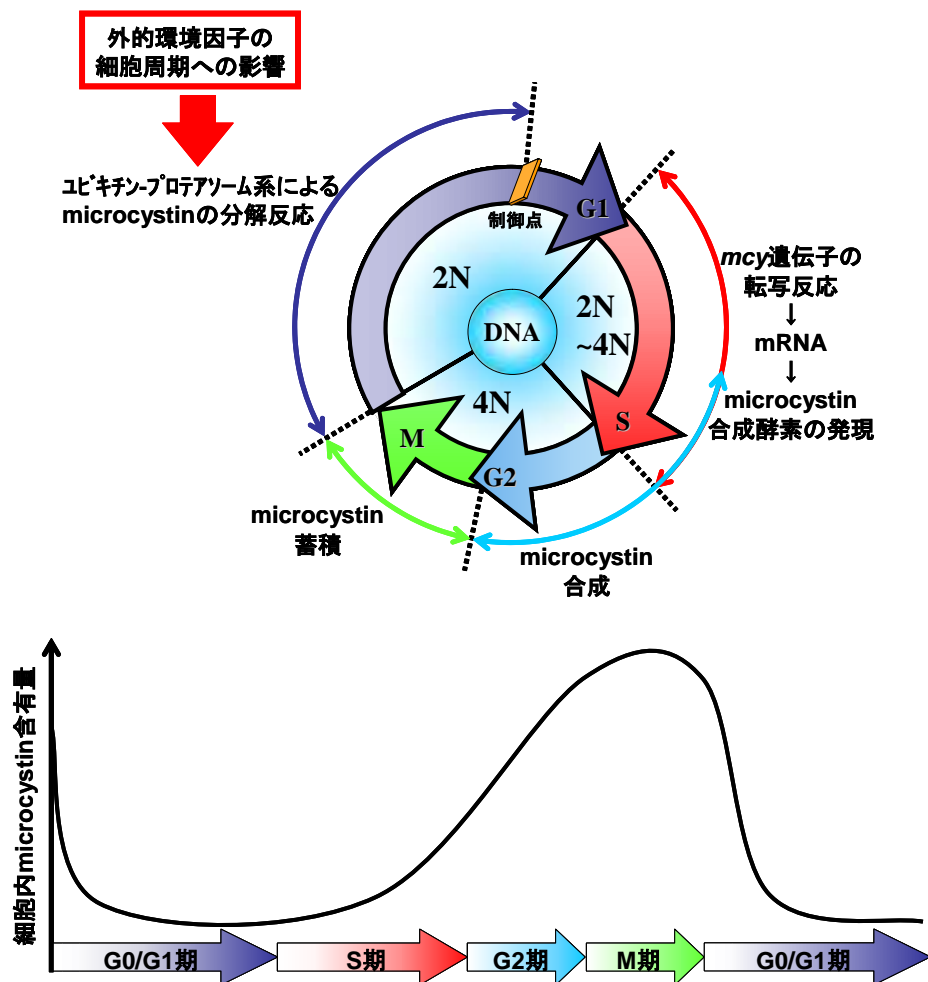


図 6-9 細胞周期と microcystin 産生の関係

6.4. 結論

第 5 章の結果より、*M. viridis* の microcystin 合成は S 期から G2/M 期にかけて活発に行われ、G2/M 期に最も多くの microcystin が蓄積されることが明らかとなったが、microcystin 合成が細胞周期に特異的であることをさらに明らかにするために、分子生物学的な手法を用いて、*mcy* 遺伝子の発現レベルを細胞周期ごとに解析し以下の知見を得ることができた。

- 1) *mcy* 遺伝子より転写された mRNA は S 期の細胞で最も多く発現することが明らかとなった。
- 2) S 期で特異的に遺伝子が転写され、G2 期までの間に microcystin 合成が行われることが明らかとなった。

第 7 章 総括および展望

本研究では、富栄養化湖沼において異常増殖する藍藻類の有毒物質 microcystin 産生を抑制し安全な水利用を行うためには、藍藻類の microcystin 産生特性を十分把握する必要があると考え、代表的なアオコ形成藍藻類の一種である *Microcystis viridis* を供試藻類として藍藻類がいつ、どのような条件で、なぜ microcystin を産生するのかを明らかにするための実験を行った。

第 2 章では、実際に、アオコの発生している水域において microcystin 現存量とその季節的变化についての調査を行った。我国で最も多く検出される microcystin の種類である LR 型・RR 型・YR 型の藍藻類細胞内における含有量および存在比は、調査対象 6 湖沼のうち 5 湖沼間で *M.aeruginosa* によるアオコの形成が認められたにもかかわらず、各湖沼とも異なる値となった。また、霞ヶ浦および手賀沼において初夏から秋にかけて microcystin の挙動解析を行ったところ、細胞内の microcystin の種類も量も季節的に様々に変動し、特に、細胞の増殖が活発に行われている時期においては、湖水中の microcystin のほとんどが細胞内に存在し、含有される量もまた他の時期に比べ多いことが明らかとなった。従って、湖水中に存在する microcystin の種類や量を変動させる要因としては、アオコ形成藍藻類が生息する水域の水環境や細胞の増殖過程にともなう細胞内環境という外的・内的な環境因子の影響が考えられた。

第 3 章では、内的な環境因子として細胞の増殖の microcystin 産生特性の関係についての検討を行った。細胞の増殖を対数増殖期・定常期・死滅期の大きく 3 段階に分類すると、細胞内の microcystin 含有量が最も多くなるのは対数増殖期であり、特に、初期の段階では細胞内に含有される microcystin の種類も量も顕著に変化した。定常期・死滅期においては細胞内の microcystin 存在比は一定となり変化することはないが徐々に減少することが分かった。また、このとき、microcystin は細胞外へ放出するのではなく細胞内で異化・分解されることが推察された。これらの結果より、細胞の増殖と microcystin 産生には密接な関わりのあることが明らかとなった。

第 4 章では、外的な環境因子として、湖沼の富栄養化の原因物質であり藻類の増殖に必要な不可欠な物質である硝酸塩およびリン酸塩濃度の microcystin 産生への影響につい

て検討を行った。microcystin は 7 つのアミノ酸から成る環状ペプチド構造であるため当然その骨格中には多くの窒素原子が存在する。*Microcystis* 属のようなヘテロシストを形成しない藍藻類は、大気中の窒素を固定することができないため窒素源としては水中に溶存する窒素化合物を利用して増殖する。従って、培地中の唯一の窒素源である $\text{NO}_3\text{-N}$ の濃度は microcystin 産生に対して非常に大きな影響力を持つことが予想されたが、細胞の増殖には 0.8 mg l^{-1} 以下の濃度で影響したものの、細胞内 microcystin の種類や量には全く影響しないことが明らかとなった。一方、 $\text{PO}_4\text{-P}$ は細胞内 microcystin の存在比には影響しないが含有量に対して顕著な影響を示し、低濃度の $\text{PO}_4\text{-P}$ 存在下においては細胞内 microcystin の含有量が多くなるという傾向を示した。この要因として、 $\text{PO}_4\text{-P}$ はエネルギー物質である ATP に利用されるために、低濃度の $\text{PO}_4\text{-P}$ では ATP 合成のためのリンが不足するため、多量の ATP を要求するペプチド分解機構であるユビキチン-プロテアソーム系の働きが ATP 不足により阻害されるため、結果として多くの microcystin が分解されずに残り蓄積されたためと考えられた。そして、microcystin の収率や細胞内 microcystin 含有量の増減に対しては $\text{NO}_3\text{-N}$ および $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の影響が大きく作用することが明らかとなり、特に、高 $\text{NO}_3\text{-N}$ ・低 $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度の条件では自然水域において多くの microcystin が発生する可能性が示唆された。

第 5 章では、microcystin 産生が細胞の増殖と密接な関係があることと、microcystin が細胞周期関連物質の分解を調節するユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けると推測されたことから、細胞増殖の原単位である細胞周期と microcystin 産生との関係を明らかにするための検討を行った。細胞内 microcystin の含有量は細胞周期サイクルの進行と共に増加し、G2/M において最も多くの microcystin が含有され、僅か 36 時間の間に約 6 倍もの microcystin 含有量の増加が認められた。microcystin 産生が活発に行われるのは細胞周期の中の S 期から G2/M 期の期間であることが分かり、microcystin は、M 期の開始に関与するサイクリン B - CDK1 複合体の急速な活性化を促進する役割を持つことが考えられた。

第 6 章では、microcystin 産生が S 期から G2/M 期の期間で特徴的に行われることを証明するために分子生物学的な手法を用いて、それぞれの細胞周期における *mcy* 遺伝子の発現レベルの検出を行った。そして、24 時間目の S 期の細胞の割合が最も高いときに *mcy* 遺伝子の発現レベルが最も高く、G0/G1 期および G2/M 期の細胞の存在によらず 0

時間目・36 時間目のサンプルからは *mcy* 遺伝子より転写された mRNA が検出されなかった。このことから、S 期の細胞内では特異的に *mcy* 遺伝子が転写され microcystin 合成酵素が発現していることが明らかとなった。

こららのことから、推測された細胞内における microcystin の役割と microcystin 含有量の調節について図 7-1 にまとめた。microcystin は細胞周期制御分子群によって過剰リン酸化された CDK1 のプロテイン (Tyr) ホスファターゼ Cdc25C による脱リン酸化を促進するために、プロテイン (Ser/Thr) ホスファターゼ PP2A による Cdc25C の不活性化を阻害し、CDK1 の急速な活性化を促進する。そして細胞周期制御タンパク質のリン酸化に対して間接的に影響することで細胞周期のサイクル進行の調節に係る。そして、S 期に入った細胞内で何らかの転写因子が作用し *mcy* 遺伝子が発現し、microcystin 合成酵素が合成され microcystin が産生する。細胞内の microcystin 量の調節にはユビキチン-プロテアソーム系が作用し、細胞周期制御分子群などと同様に分解され、細胞内で必要な時期に必要な量だけ存在するように調節され、再び Cdc25C による脱リン酸化が調節されるという機構が考えられた。この推定された機構を明らかにするためには、藍藻類をはじめとした原核生物のユビキチン-プロテアソーム系、細胞周期制御分子・タンパク質などの様々な研究をさらに要する。

本研究の成果によって、microcystin 産生抑制のためには、 $\text{NO}_3\text{-N}$ ・ $\text{PO}_4\text{-P}$ 濃度などの外的因子よりもむしろ発生している藍藻類の細胞周期に注目しなければならないことが明らかとなった。つまり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ や $\text{PO}_4\text{-P}$ は、図 7-1 における *mcy* 遺伝子発現のための転写因子を活性化させる要素ではなく、S 期に行われる DNA 複製などの細胞内環境の変化が *mcy* 遺伝子発現のための転写因子として関与していると考えられる。従って、今後、さらに microcystin 産生抑制手法開発を展開していくためには、各細胞周期における細胞内タンパク質発現解析を二次元電気泳動によって網羅的に行うことが転写因子特定のための最も効果的な手法であると考えられる。本研究は細胞周期という細胞内環境の変化に注目する必要性を明らかにしたはじめての報告である。この *mcy* 遺伝子発現のための転写因子を特定することによって、恒常的にアオコの発生が認められる富栄養化水域において、有毒藍藻類の microcystin 産生のみを阻害する物質の開発や、microcystin 産生を抑制するための効果的な対策を講じることができるばかりでなく、microcystin が細胞の増殖に係る重要な物質であると考察されたことから、microcystin 産

生を抑制することは有毒藍藻類の増殖を阻害し、結果として有毒アオコそのものの低減化にも資することが予想され、農耕地をはじめ浄水施設や養殖場、レクリエーション施設など多目的水利用におけるアオコによる被害の回避・防止を行うことができると考えられる。

藍藻類の有毒物質産生の研究は 1970 年代より行われているが、なぜ毒素を作るのかは未だ明らかとなっておらず、現時点での最も有力な説としては、動物プランクトンからの捕食を避けるためであると考えられている。また、自然界の藍藻類は純粋培養系を遥かに凌ぐ量の毒素を産生することも報告されている。これらのことから藍藻類の microcystin の産生メカニズムには、湖水中に共存する微生物の代謝物をシグナル伝達物質とした微生物間相互作用が深く関わっていることも注目すべき課題である。これによって、自然界における藍藻類の microcystin 産生を促進あるいは抑制する物質が特定されることによって、富栄養化湖沼における microcystin 発生および有毒アオコ発生のコントロールを行うことが可能となると考えられる。

本研究において、藍藻類細胞中における microcystin の役割は細胞周期プロセスの調節のためであり、microcystin 産生は細胞周期制御機構の一部であるという結論に達した。そこで、細胞内における microcystin の役割についての更なる知見を得るためには RNA 干渉 (RNAi ; RNA interference) 法が適当ではないかと考えられる。RNAi は、二本鎖 RNA (dsRNA) を細胞内に導入すると、その配列に対応する mRNA が特異的に分解されることにより遺伝子発現が抑制されるという現象である (図 7-2)。RNAi は線虫 *Caenorhabditis elegans* で最初に発見された現象であるが (Fire *et al.*, 1998)、様々な生物種において同様の現象が観察され、有効な逆遺伝学的手法として広く用いられるようになってきている。この手法を microcystin 産生藍藻類種に適用し、*mcy* 遺伝子の発現を RNAi によって抑制することによって、その細胞の細胞周期やタンパク質発現パターン、更には細胞の形態などに対する影響を詳細に観察し、microcystin 産生が抑制されたことによる影響を明らかにすることで藍藻類細胞内における microcystin の役割にアプローチすることができると考えられる。本研究の結果を鑑みると、本法により藍藻類の microcystin 産生を阻害しても細胞の増殖は可能であるが、microcystin 産生が可能な細胞と比べ、細胞分裂時期 (M 期) の開始が遅れるため、増殖速度の著しい低下が認められることが予想される。さらに、本法は特異的に microcystin 合成酵素の発現のみを阻害

することが可能なため、遺伝子組み換え技術とは異なり自然水域における microcystin 産生抑制手法としても応用が期待できる技術の一つである。

また、このほかにも解明すべき課題としては、microcystin 産生 *Microcystis* 属由来 PP2A 遺伝子のクローニングおよび PP2A の単離・精製と microcystin による阻害作用の解明、*in vitro* ユビキチン - プロテアソーム系の構築とその microcystin 分解能・分解特性の解明、二次元電気泳動を用いた S 期タンパク質発現の網羅的解析による microcystin 合成に関する転写因子の特定、リン酸塩枯渇状態における細胞内 ATP 量と microcystin 含有量の関係解析、microcystin 合成抑制分子の天然物資源からの探索およびデザインなどが挙げられ、今後これらの研究を展開していくことが、「富栄養化湖沼における藍藻由来有毒物質発生抑制技術開発のための基盤研究」として極めて重要である。

富栄養化湖沼における有毒藍藻類の異常発生は深刻な環境問題であり、その二次代謝産物の中にはヒトに対し極めて強い有毒物質として作用する物質も数種類同定されているが、抗癌・抗菌・プロテアーゼ阻害等の生理活性作用を持つ多くの新規な物質も存在するため疾病に有効な生理活性物質として利用できる可能性がある。従って、藍藻類の二次代謝産物の合成機構を解明することによって、藍藻類による二次代謝産物合成の人為的コントロールが可能となり、その合成に係わる代謝系を促進あるいは抑制することによって有用な生物活性物質の高効率な大量生産技術開発に資することができる。また、この研究の成果は、藍藻類のみならず様々な微生物に応用されることが期待できることから、微生物機能開発の分野において十分生かすことができると考えられ、今後も藍藻類の有毒物質（生理活性物質）産生制御に関する研究は多岐に渡って展開され、環境・医療・産業の分野において重要な位置づけとなることが期待される。

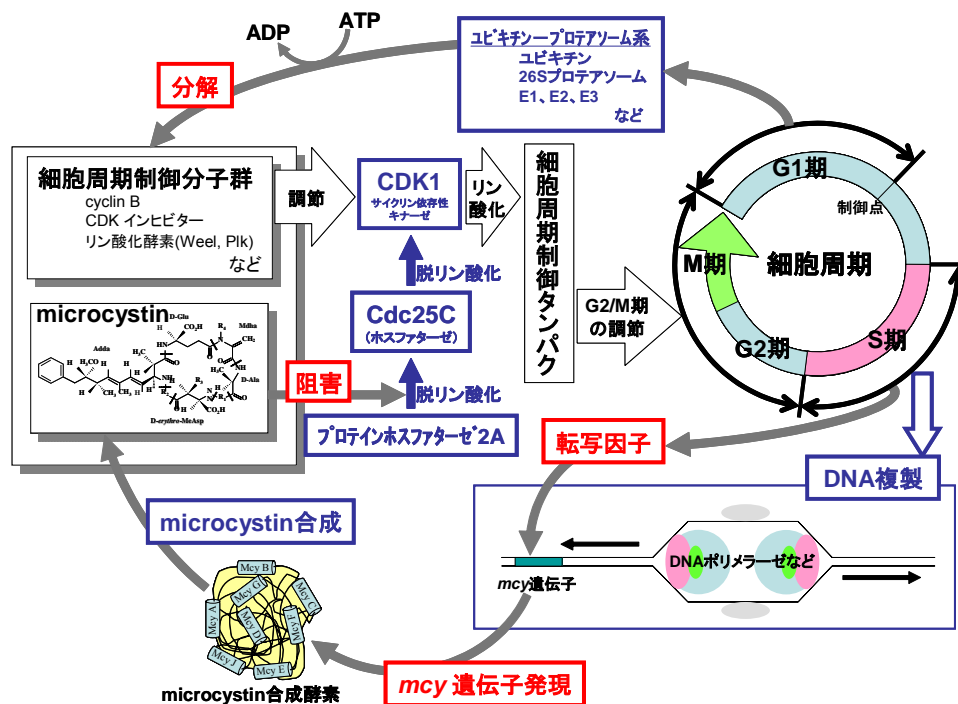


図 7-1 細胞内における microcystin の挙動と役割

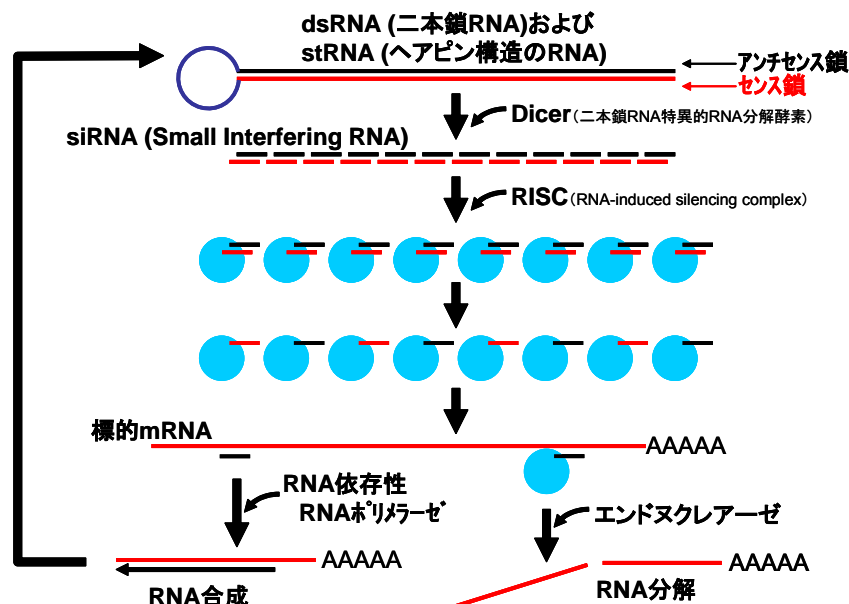


図 7-2 RNAi の分子機構

(杉本 2002 より引用)

細胞内に導入された dsRNA は、Dicer と呼ばれる RNase ファミリーに属する二本鎖 RNA 特異的 RNA 分解酵素によって 21 ~ 25 塩基対の small interfering RNA (siRNA) に分断化される。生じた siRNA は 3' 末端にヒドロキシル基を、5' 末端にリン酸基を持っている。この siRNA の構造は RNAi を引き起こすために重要であり、末端の塩基が突出していない平滑端 siRNA や 5' 末端にリン酸基を持たない siRNA は、RNAi の有効なトリガーとはならない。次に siRNA は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれる。RISC に取り込まれた siRNA は、ATP 依存的に一本鎖へと解離し活性型の RISC となる。この活性型 RISC は siRNA のガイド鎖を鋳型として標的 mRNA を認識し、siRNA と相同性のある領域のほぼ中央で mRNA を切断する。

謝辞

本研究を遂行するにあたり懇切なるご指導を賜りました筑波大学農林工学系教授前川孝昭先生・同助教授杉浦則夫先生・環境省国立環境研究所地域環境研究グループ総合研究官稲森悠平先生・東邦大学理学部教授戎野棟一先生に厚く御礼申し上げます。また、本論文の御校閲を賜りました筑波大学農林工学系教授黒田健一先生・筑波大学応用生物化学系教授小林達彦先生に対して衷心より感謝の意を表します。さらに、実験を進める上で多大なるご協力・技術のご指導を頂きました国立環境研究所板山朋聡博士・岩見徳雄博士・理化学研究所亀山東光恵氏に深く感謝申し上げます。また、公私共々大変お世話になりました筑波大学前川グループ・国立環境研究所稲森研究室・東邦大学戎野研究室の学生の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- Alam, M.G., Jahan, N., Thalib, L., Wei, B. and Maekawa, T., 2001. Effects of environmental factors on the seasonally change of phytoplankton populations in a closed freshwater pond. *Environ. Int.* 27, 363-371.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D., 1995. *Molecular Biology of the cell*. KYOIKUSYA.
- Alex, L. A., Simon, M. I., 1994. Protein kinase and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* 10, 133-138.
- Appleby, J. L., Parkinson, J. S., Bourret, R. B., 1996. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86, 845-848.
- Arment, A. R., Carmichael, W. W., 1996. Evidence that microcystin is a thio-temple product. *J. Phycol.* 32, 591-597.
- Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakely, R. L., Jones, A., Nergri, A. P. and Riddles, P., 1996. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4086-4094.
- Cane, D. E., Walsh, C. T., 1999. The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, 319-325.
- Carmichael, W. W., Tones, C. L. A., Mahmood, N. A. and Theiss, W. C., 1985. Algal toxins and water-based diseases. *CPC Crit. Rev., Environ. Control* 15, 275-283.
- Carmichael, W. W., Beasley, V., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falconer, I., Gorham, P., Harada, K., Krishnamurthy, T., Yu, M. J., Moore, R. E., Rinehart, K., Runnegar, M., Skulberg, O. M., Watanabe, M., 1988. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26, 971-973.
- Carmichael, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 445-459.
- Chen, M. X., Chen, Y. H., Cohen, P. T. W., 1992. Polymerase chain reaction using *Saccharomyces*, *Drosophila* and human DNA predict a large family of protein

- serine/threonine phosphatases. FEBS 306, 54-58.
- Clarke, P. R., Hoffmann, I., Draetta, G., Karsenti, E., 1993. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. Mol. Biol. Cell 4, 397-411.
- Cohen, P. T. W., Cohen, P., 1989. Discovery of a protein phosphatase activity encoded in the genome of bacteriophage . Biochem. J. 260, 931-934.
- Dittmann, E., Neilan, B. A., Börner, T., 2001. Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57, 467-473.
- Dunn, J., 1996. Algae kills dialysis patients in Brazil. Br. Med. J. 312, 1183-1184.
- Dunphy, W. G, Brizuela, L., Beach, D., Newport, J., 1988. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell 54, 423-31.
- Erikson, J. E., Gronberg, L., Nygard, S., Slotte, J. P., Meriluoto, J. A. O., 1990. Hepato cellular uotake of ³H-dehydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin, Biochem. Biophys. Acta. 1025, 60-66.
- Falconer, I. R., Beresford, A. M., Runnegar, M. T., 1983. Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa*. Med. J. Aust. 28, 511-514.
- Falconer, I. R., and Buckley, T. H., 1989. Tumor promotion by *Microcystis*. A blue-green alga occurring in water supplies. Med. J. Aust. 150, 351.
- Falconer, I. R., 1991. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 177-184.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas S. A., Driver, S. E., Mello, C. C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391, 806-811.
- Francis, G., 1878. Poisonous Australian lake. Nature 18, 11-12.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., Maller, J., 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. Cell 54, 433-9.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W., 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. Nature 349, 132-138.

- Harada, K.-I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M. F., Oishi, S., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., Carmichael W. W., 1988. Analysis and purification of toxic peptide from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 448, 275-283.
- Harada, K.-I., Matsuura, K., Suzuki, M., Watanebe, M. F., Oishi, S., Dahlem, A. M., Beaseley, V. R., Carmichael, W. W., 1990. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystin LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28, 55-64.
- Harada, K.-I., Ogawa, K., Kimura, Y., Murata, H., Suzuki, M., Thorn, P. M., Evans, W. R., Carmichael, W. W., 1991. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.* 4, 535-540.
- 服部公彦, 中山敬一, 2000. 細胞内タンパク質の分解制御を担うユビキチンシステム SCF 複合体によるユビキチン化の分子機構. *化学と生物* 38(10), 653-660.
- Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M., Boynton, A. L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a protein inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 265, 19401-19404.
- Hunter, T., 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225-236.
- 茨城県企業局 (1982-1996) 企業局水質年報 14-28.
- Izawa, M., Sasaki, N., Watahiki, M., Ohara, E., Yoneda, Y., Muramatsu, M., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., 1998. Recognition sites of 3'-OH group by T7 RNA polymerase and its application to transcriptional sequencing. *J. Biol. Chem.* 273, 14242-6.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., Melo Filho D. A. de, Lyra, T. M., Barreto, V. S., Azevedo, S. M., Jarvis, W. R., 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.* 38, 873-878.
- Jones, G. J., Bourne, D. G., Blakeley, R. L. and Doelle, H., 1994. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by aquatic bacteria. *Nat. Toxins* 2, 228-235.
- Kaebernick, M., Neilan, B. A., Börner, T., Dittmann, E., 2000. Light and transcriptional

response of the microcystin biosynthesis gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3387-3392.

環境省環境管理局水環境部（2002）平成 13 年度公共用水域水質測定結果

Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jesus C., Ozon, R., 1998. MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. Exp. Cell Res. 244, 491-500.

Karaiskou, A., Jesus, C., Brassac, T., Ozon, R., 1999. Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. J. Cell. Sci. 112, 3747-3756.

Kaya, K., Watanabe, M. M., 1990. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters. J. Appl. Phycol. 2, 173-178.

Katz, L., 1997. Manipulation of modular polyketide syntheses. Chem. Rev. 97, 2557-2575.

Kearns, K. D., Hunter, M. D., 2000. Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium. Environ. Microbiol. 2, 291-297.

Kennelly, P. J., Potts, M., 1996. Fancy meeting you here! A fresh look at “prokaryotic” protein phosphorylation. J. Bacteriol. 178, 4759-4764.

Kleinkauf, H., Döhren, H. von, 1996. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. Eur. J. Biochem. 236, 335-351.

Kotak, B. G., Lam, A. K.-Y., and Prepas, E. E., 1995. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hypereutrophic drinking water lakes. J. Phycol. 31, 248-263.

Kotak, B. G., Lam, A. K.-Y., Prepas, E. E., Hruddy, S. E., 2000. Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57, 1584-1593.

Krishnamurthy, T., Carmichael, W. W., Sarver, E. W., 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. Toxicon 24, 865-873.

Krishnamurthy, T., Szafraniec, L., Hunt, D. F., Shabanowitz, J., Yates, J. R., Hauer, C. R., Carmichael, W. W., Skulberg, O., Codd, G. A., Missler, S., 1989. Structural characterization

- of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86, 770-774.
- Kumagai, A., Dunphy, W. G., 1992. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 70, 139-51.
- Lee, S. J., Jang, M.-H., Kim, H.-S., Yoon, B.-D., Oh, H.-M., 2000. Variation of microcystin content of *Microcystis aeruginosa* relative to medium N : P ratio and growth stage. *J. Appl. Microbiol.* 89, 323-329.
- Long, B. M., Jones, G. J., Orr, P. T., 2001. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 278-283.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H. D., 1997. Modular peptide synthetases involved in peptide synthesis. *Chem. Rev.* 97, 26511–26573.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186-193.
- Moore, R. E., Chen, J. L., Moore, B. S., Patterson, G. M. L., Carmichael, W. W., 1991. Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the Adda and Masp units. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 5083–5084.
- Morgan, D. O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Murray, A. W., 1989. Cyclin synthesis and degradation and the embryonic cell cycle. *J. Cell Sci. Suppl.* 12, 65-76.
- Murray, A. W., Kirschner, M. W., 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339, 275-80.
- 中山敬一 (2001) 細胞周期がわかる, 羊土社, pp24-43.
- Namikoshi, M., Rinerhart, K. L., 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol.* 17, 373-384.
- Neilan, B. A., Jacobs, D., Blackall, L. L., Hawkins, P. R., Cox, P. T. and Goodman, A. E., 1997. rRNA sequences and evolutionary relationship among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 693-697.
- Neilan, B. A., Dittmann, E., Rouhianen, L., Bass, R. A., Schaub, V., Sivonen, K., Börner, T.,

1999. Nonribosomal peptide synthesis and Toxigenicity of Cyanobacteri. J. Bacteriol. 181, 4089-4097.
- Oh, H.-M., Lee, S. J., Jang, M.-H., Yoon, B.-D., 2000. Microcystin-production by *M.aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat. Appl. Environ. Microbiol. 66, 176-179.
- Orr, P. T., Jones, G. J., 1998. Relationship between microcystin-production and cell division rate in nitrogen limited *Microcystis aeruginosa* cultures. Limnol. Oceanogr. 43, 1604-1614.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M., 1999: Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequences. FEMS Microbiol. Lett. 172, 15-21.
- Palmstrom, N. S., Carlson, R. E., Cooke, G. D., 1988. Potential links between eutrophication and formation of carcinogens in drinking water. Lake Reservoir Mgmt. 4, 1-15.
- Park, H. D., Watanabe, M. F., Harda, K., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M., Hayashi, H., 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. Nat. Toxins 1, 353-360.
- Pines, J., 1999. Four-dimentional control of the cell cycle. Nature Cell Biol. 1, E73-E79.
- Rinehart, K. L., Namikoshi, M., Choi, B. W., 1994. Structure and biosynthesis of toxin toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6, 159-176.
- Robinson, N. A., Pace, J. G., Matoson, C. F., Miura, G. A., Lawrence, W. B., 1991. Tissue distribution, excretion and hepatic biotrans formation of microcystin-LR in mice. J. Pharmac. Exp. Therap. 256, 176-182.
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., Millard, P. J., 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX Green nucleic acid stain. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2421-2431.
- Runnegar, M. T. C., Gerdes, R. G., Falconer, I. R., 1991. The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by isolated rat hepatocytes, Toxicol 29, 43-51.
- Rychlik, W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E., 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acid Research 18, 6409-6412.
- Saito, T., Sugiura, N., Itayama, T., Inamori, Y., Matsumura, M., 2003. Degradation

- characteristics of microcystins by isolated bacteria from Lake Kasumigaura. J. Wat. Suppl. 52, 13-18.
- Shi, L., Carmichael, W. W., Miller, I., 1995. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. Arch. Microbiol. 163, 7-15.
- Shi, L., Carmichael, W. W., 1997. *pp1-cyano2*, a protein serin/threonine phosphatase 1 gene from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* UTEX 2063. Arch. Microbiol. 168, 528-531.
- Shi, L., Carmichael, W. W., Kennelly, P. J., 1999. Cyanobacterial PPP family protein phosphatase possess multifunctional capabilities and are resistant to microcystin-LR. J. Biol. Chem. 274, 10039-10046.
- Sivonen, K., 1990. Effect of light, temperature, Nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2658-2666.
- Sivonen, K., 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia 35, 12-24.
- Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y., Kaya, K., 1998. *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycol. Res. 46, 19-23.
- Stoner, R. D., Adams, W. H., Slatkin, D. N., Siegelman, H. W., 1989. The effects of single L-amino acid substitution on the lethal potencies of the microcystins. Toxicon 27, 825-828.
- Stotts, R. R., Namikoshi, M., Haschek, W. M., Rinehart, K. L., Carmichael, W. W., Dahlem, A. M., Beasley, V. R., 1993. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp.. Toxicon 31, 783-789.
- 杉本亜砂子, 2002. RNAi その分子機構と応用. 化学と生物 40(11), 713-718.
- Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, H., Börner, T., Neilan, B. A., 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7906: an integrated peptide-polyketide synthetase system. Chemistry and Biology 7, 753-764.
- Tsuji, K., Setsuda, S., Watanuki, T., Kondo, F., Nakazawa, H., Suzuki, M., Harada, K., 1996. Microcystin levels during 1992-1995 for Lakes Sagami and Tsukui-Japan. Nat. Toxins 4, 189-194.
- Turner, P. C., Gammie, A., Hollinrake, K., Codd, G. A., 1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. Br. Med. J. 300, 1440-1441.

- Utkilen, H., Gjølme, N., 1992. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1321-1325.
- Utkilen, H., Gjølme, N., 1995. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 797-800.
- Van der Westhuizen, A. J., Eloff, J. N., 1985. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa* (UV006). *Planta*. 163, 55-59.
- Vezie, C., Rapala, J., Vaitomaa, J., Seitonen, J., Sivonen, K., 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbiol. Ecol.* 43, 443-454.
- 渡辺真利代、原田健一、藤木博太 (1994) アオコその出現と毒素、東京大学出版会、pp117-164.
- Watanabe, M. F., Oishi, S., 1980. Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions. *Jpn. J. Limnol.* 41, 5-9.
- Watanabe, M. F., Oishi, S., Watanabe, Y., Watanabe, M., 1986. Strong probability of lethal toxicity in the blue-green alga *Microcystis viridis* Lemmerman. *J. Phycol.* 22, 552-556.
- Watanabe, M. F., Oishi, S., Harada, K.-I., Matsuura, K., Kawai, H., Suzuki, M., 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26, 1017-1025.
- Watanabe, M. F., Harada, K.-I., Matsuura, K., Watanabe, M., Suzuki, M., 1989. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.* 1, 161-165.
- Watanabe, M. F., Harada, K.-I., 1993. Toxic water bloom of blue-green algae: biological and chemical characteristics. *Jpn. J. Limnol.* 54, 225-243.
- Wei, B., Sugiura, N., Maekawa, T., 2001. Use of artificial neural network in the prediction of algal blooms. *Wat. Res.* 35, 2022-2028.
- Wells, N. J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M. A., Hunter, T., 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J. Cell. Sci.* 112, 3361-3371.
- World Health Organization. 1984. Aquatic (marine and freshwater) biotoxins. Environmental

- Health Criteria 37. Geneva: WHO.
- World Health Organization, 1998. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Addendum to Vol. 1. Recommendations. 13-14.
- Yagi, O., Inamori, Y., Inagaki, N., 1986. Purification of *Microcystis aeruginosa*. Res. Rep. Natl. Inst. Environ. Stud. Japan 92, 7-17.
- 柳田友道 (1988) 微生物科学 1、学会出版センター、pp197-216.
- Yoshizawa, S., Matsushima, R., Watanabe, M. F., Harada, K., Ichihara, A., Carmichael, W. W., Fujiki, H., 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 116, 609-614.
- Zang, C.-C., 1996. Bacterial signaling involving eukaryotic-type protein kinases. Mol. Microbiol. 20, 9-15.