

# 分子生物学的手法で見えてきたシアノバクテリアの分布と多様性

大久保 智司

京都大学大学院人間・環境学研究科

〒606-8501 京都市左京区吉田二本松町

Distribution and diversity of cyanobacteria revealed by molecular approaches

Keywords: cyanobacteria; microbial ecology; molecular biology.

Satoshi Ohkubo

Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University

Yoshida-nihonmatsucho, Sakyo, Kyoto 606-8501, Japan

## 1. はじめに

シアノバクテリアは様々な生態系において一次生産者として重要な微生物である。海水や淡水中に多く存在するが、砂漠などの乾燥した環境、高温、低温、高塩濃度環境といった極限環境に生育するものや動物や植物、菌類と共生するものもあり、地球上の様々な環境に広く分布している (Whitton & Potts 1999)。しかし、その生態については未だ分かっていないことが多い。

微生物の生態を明らかにする上で最も基本的な課題は、「どんな種類の」微生物が「どこに」いて「何を」しているのか、ということである。そもそも微生物は肉眼では見えないため、その多様性や分布を明らかにすることが容易ではない。そのため、伝統的には顕微鏡観察と培養という2つの方法が用いられてきたが、それぞれ、形態による分類・同定には限界がある、環境中の微生物の多くは容易に培養できない (Amann et al. 1995) といった問題があった。近年では、上記の方法に加えて核酸をマーカーとして微生物の多様性や群集構造を明らかにしていく分子生物学的手法が多く用いられている (Dahllöf 2002, Kowalchuk et al. 2004)。本稿では、このような分子生物学的手法によって明らかになってきたシアノバクテリアの分布や多様性に関する知見を紹介する。

## 2. 微生物の多様性を明らかにする方法

### 2-1. 形態観察および培養による方法とその限界

シアノバクテリアの分類は歴史的に、形態的特徴に基づいて行われてきた。形態的に大きく分けると単細胞のものと多細胞（糸状体）のものに分かれ、単細胞のものはさらに二分裂あるいは外生胞子で増殖するもの (Chroococcales) と内生胞子形成を行うもの (Pleurocapsales) に、糸状体のものは異質細胞 (heterocyst) をもたないもの (Oscillatoriales), 異質細胞をもち、分枝しないもの (Nostocales) と分枝するもの (Stigonematales) に分けられる。これに加えて栄養細胞の形態、異質細胞や休眠胞子 (akinetes) の位置、コロニー形状、糸状体の先端細胞の形態、鞘 (sheath) や液胞の有無などが属や種の分類に用いられる (Boone & Castenholtz 2001)。

しかし、実際に環境中のシアノバクテリアをこのような形態的特徴だけで分類・同定するには限界がある。例えば窒素固定の場である異質細胞や飢餓状態に作られる休眠胞子は常に存在するわけではなく、生息環境中の栄養塩濃度によって形態が変化する。それ以外にも物理的に断片化した糸状体などは正確な分類が困難である。また、ピコシアノバクテリアと呼ばれる単細胞シアノバクテリア (*Synechococcus*属, *Prochlorococcus*属) は、その細胞サイズの小ささ (長径2  $\mu\text{m}$ 以下) と細胞形態の単純さ (球形-楕円球形) のため光学顕微鏡下でその系統的な違いを見出すのは困難である。

培養は、このような問題点を克服する一つの方法である。培養細胞の形態的特徴や生理学的、生化学的特徴、あるいは遺伝情報を調べることで、正確に分類・同定することが可能となる。例えば脂質組成 (Kenyon 1972, Kenyon et al. 1972) やタンパク質組成 (Lyra et al. 1997) はシアノバクテリアの分類に有用であることが知られており、16S rRNA遺伝子などの塩基配列を用いた分子系統解析が系統分類に用いられている (Woese 1987, Wilmotte & Herdman 2001)。しかし、環境中の全てのシアノバクテリアを培養することは現在のところ不可能である。例えば、顕微鏡観察によって計測した環境中の全細菌細胞数に対して、平板法によって検出できる細菌の割合は1%にも満たないことが知られている (Amann et al. 1995)。

このように、形態観察や培養による多様性解析の方法には原理的、技術的限界がある。そこで、近年では環境中から直接核酸を抽出し、その塩基配列を利用して多様性解析を行う分子生物学的手法が用いられている。

## 2-2. 分子生物学的手法

核酸をマーカーとして環境中の微生物の多様性や群集構造を明らかにする手法として、環境中から得られた核酸を直接用いる手法と、PCRによって増幅したDNAを用いる手法がある。直接核酸を用いる方法として DNA:DNA 再会合反応速度解析 (Torsvik et al. 1990), 核酸ハイブリダイゼーション (Buckley et al. 1998), 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (Christensen et al. 1999, Ravensschlag et al. 2000), DNAマイクロアレイ (Rhee et al. 2004, Small et al. 2001), メタゲノム解析 (Handelsman 2004) などが使われている。一方、PCRを用いた代表的な方法としては、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE; Muyzer et al. 1993), 末端標識制限酵素断片多型分析 (T-RFLP; Liu et al. 1997), 一本鎖高次構造多型 (SSCP; Schwieger & Tebbe, 1998), リボゾーム遺伝子間スペーサー解析 (RISA; Ranjard et al. 2000), 自動リボゾーム遺伝子間スペーサー解析 (ARISA; Cardinale et al. 2004), クローンライブラリー法 (Lane 1991, Olsen et al. 1986) などがある。これらの方法には、それぞれ長所と短所があり (de Bruin et al. 2003), 目的に合わせた手法の選択が必要である。シアノバクテリアについては、この中でもDGGEとクローンライブラリー法、あるいはそれらを併用した例がこれまでに最も多く報告されており、様々な環境においてシアノバクテリアの分布や多様性に関する新たな知見が生み出されている。

## 2-3. PCR-DGGEとクローンライブラリー法

DGGEは直線的に変性剤（尿素とホルムアミド）濃度が変化するポリアクリルアミドゲル中でDNA電気泳動を行うことにより、ほぼ同じ長さのDNA断片を塩基配列の違いによって分離する方法である。微生物生態学においては、環境中から抽出したDNAを鋳型としてPCR増幅を行い、得られたDNA断片をDGGEによって分離する(PCR-DGGE)。検出された各バンドをゲルから切り出し、PCRで再増幅した後、塩基配列を決定することにより群集構造や多様性を明らかにすることができる(図1)。原理的にはゲル内で二本鎖DNAの一部が変性し、移動度が変わることによって分離されるため、プライマーの片側にGCクランプと呼ばれる40塩基程度のグアニンとシトシンから成る配列を付加することでDNA断片全体が一本鎖になるのを防いでいる(Sheffield et al. 1989)。

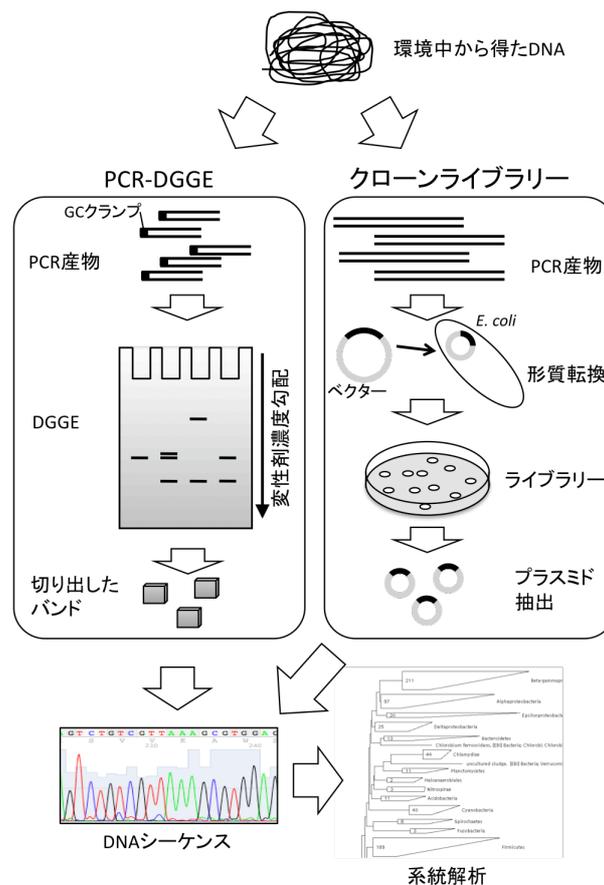


図1 PCR-DGGEとクローンライブラリー法による多様性解析の流れ

一方、クローンライブラリー法は、抽出したDNAを鋳型としてPCR増幅した後、増幅産物をプラスミドベクターに挿入して大腸菌に取り込ませ、培地上に出現したコロニー（クローンライブラリー）について、ベクター内に挿入されたDNA断片の塩基配列を決定する方法である(図1)。

クローンライブラリー法では、配列を決定するクローンの数を増やせば増やすほど、環境中の実際の微生物群集構造を反映することができ、相対的に存在量の少ない生物も検出することができる。また、PCR-DGGEで解析できるPCR増幅産物の長さは100-500 bpに限られるが、クローンライブラリー法はより長いPCR産物（例えば16S rRNA遺伝子のほぼ全長: 約1500 bp）を用いることができるため、より解像度の高い多様性解析が可能である。しかし、数百から数千クローンの塩基配列を決定するには莫大な時間やコストがかかるため、時間的・空間的に異なる複数のサンプル間で群集構造を比較する場合や優占する生物の動態を明らかにしたい場合には、PCR-DGGEのようなフィンガープリント法が適している。

## 3. 様々な環境におけるシアノバクテリアの分布と多様性

### 3-1. 海洋のシアノバクテリア

外洋、特に貧栄養な海域には、*Synechococcus*属や*Prochlorococcus*属のようなピコシアノバクテリアが優占しており、地球全体の一次生産にも大きく寄与している。特に細胞長0.5-0.7 μmの*Prochlorococcus*は北緯40度から南緯40度の間の海域で深さ100-200 mまで広く分布しており、北太平洋の中心ではバイオマス全体の60%を占めるとも言われている (Campbell et al. 1994, Partensky et al. 1999)。これまでに分離された*Prochlorococcus*には強光に適応した株 (HL型) と弱光に適応した株 (LL型) があることが知られており、それぞれ浅い場所と深い場所という異なるニッチに適応した生態型 (ecotype) であると考えられていた (Moore et al. 1998)。West and Scanlan (1999) は、大西洋においてPCR-DGGEを用いて*Prochlorococcus*の遺伝子型を深度別に調べ、実際にHL型が浅い場所に (10-50 m)、LL型が深い場所に (50-110 m) それぞれ分布していることを明らかにした。また、紅海や地中海において行われたPCR-DGGEによる解析でも同様の現象が見られ (Zeidner & Béja 2004)、生態型が存在することが明らかとなった。

沿岸域に存在するシアノバクテリアに対しても分子生物学的手法を用いた解析は行われている。沿岸の岩に付着する (epilithic) シアノバクテリアはマットやバイオフィームを形成し、潮間帯において一次生産や窒素固定といった役割を担っている。オーストラリア、ヘロン島の砂浜にある岩の表面には、シアノバクテリアを含むマットとバイオフィームが形成されており、Diéz et al. (2007) は形態観察とPCR-DGGE、クローンライブラリー法によってシアノバクテリアの多様性解析を行った。16S rRNA遺伝子を用いたPCR-DGGEの結果、形態観察で見出されたよりも多様なシアノバクテリアが検出され、その多くは既知の分離株の塩基配列とは系統的に異なった新しい属や種である可能性が高いと考えられた。また、マットについて窒素固定遺伝子*nifH*を用いたPCR-DGGEを行ったところ、異質細胞をもたない糸状体シアノバクテリアの系統群に属する新規な遺伝子型が主要なバンドとして検出された。マット内では夜間に高い窒素固定活性が確認されており、この糸状体シアノバクテリアがマット内やその周囲の窒素供給に大きく寄与していることが示唆された。また、このマットやバイオフィームから検出されたいくつかの遺伝子型はメキシコやバハマの塩湖でも近縁な配列が検出されており、これらのシアノバクテリアは塩濃度の高い環境における付着生物として世界中に分布していると考えられた。

### 3-2. 淡水環境のシアノバクテリア

*Synechococcus*属のピコシアノバクテリアは海洋だけでなく貧栄養な湖沼においても優占している。しかし、湖沼の*Synechococcus*の多様性に関する研究は海洋のそれに比べて少なく、あまり進んでいなかった (Callieri & Stockner 2002)。Becker et al. (2004) は、中央ヨーロッパのLake Constanceにおいて、浮遊性および付着性の*Synechococcus*についてPCR-DGGEを用いた群集構造解析を行った。先行研究で16S-23S rDNAスペーサー領域 (ITS-1) を用いた系統解析の結果、Lake Constanceから分離された浮遊性*Synechococcus*は海洋の*Synechococcus*や*Prochlorococcus*を含むクレード内で単系統群を形成し、その中で4つのクラスターに分かれることがわかっていた (Ernst et al. 2003)。海洋のピコプランクトンを含むこの単系統群は全て浮遊性のシアノバクテリアであり、沿

岸の岩などに付着するピコシアノバクテリアは、これらとは系統的に異なるものであると予想された。ところがITS-1を用いたPCR-DGGEの結果、湖水中から検出される遺伝子型と付着生物から検出される遺伝子型の間に系統的な違いはほとんど見られず、これらの*Synechococcus*は浮遊生物としても付着生物としても生育することが明らかとなった。また、Ivanikova et al. (2007) はアメリカ合衆国のLake Superiorに生息するピコシアノバクテリアの多様性について、クローンライブラリー法を用いて網羅的に解析した。その結果、Lake Constanceで検出されたものと同じクラスターに属する複数の遺伝子型に加えて、全く新しい複数のクラスターを形成する遺伝子型が検出された。このように、湖沼のピコシアノバクテリアの多様性については未知の部分が多く、今後の研究によって次第に明らかになっていくと期待される。

一方、富栄養な水系において優占するシアノバクテリアは貧栄養な湖沼とは異なる。オランダのLake Loosdrechtは浅い富栄養湖であり、糸状体のシアノバクテリアが優占することが知られていた。形態観察の結果から、最も多いシアノバクテリアは*Oscillatoria limnetica*と同定され（もしくは*Oscillatoria limnetica*-likeシアノバクテリア）、2番目に多いのはクロロフィル*b*をもつシアノバクテリア*Prochlorothrix hollandica*であると考えられていた (Dignum 2003, Pel et al. 2004)。しかし、分離培養やクローンライブラリー法、脂質分析とPCR-DGGEを組み合わせた多様性解析の結果、優占するシアノバクテリアは*Limnithrix redekei*や*Pseudoanabaena* spp.を含む系統群に属する複数の種であることが明らかとなった (Zwart et al. 2005)。また、同実験において*Prochlorothrix hollandica*と姉妹群を形成する複数の遺伝子型も検出された。未培養のためこの遺伝子型をもつ生物の色素組成は不明だが、塩基配列の相同性が約93%であることから、*Prochlorothrix hollandica*と少なくとも種レベルで異なる生物であり (Stackebrandt & Goebel 1994)、シアノバクテリアの色素組成の多様化を考える上で進化的に重要な生物であると考えられる。

### 3-3. 極限環境のシアノバクテリア

砂漠の土壌表面には土膜 (crust) と呼ばれるシアノバクテリアや藻類などの微生物から成る構造物が存在する。Garcia-Pichel et al. (2001) はコロラド高原の生物性土膜を形成するシアノバクテリア群集について形態観察と培養、PCR-DGGEによる多様性解析をおこなった。土膜中に優占するシアノバクテリアは形態的に*Microcoleus vaginatus*と同定され、PCR-DGGEでもこの生物に由来するバンドが最も濃く検出された。それ以外には、*Nostoc commune*と土膜中から得られた遺伝子型のみからなる4つの未知の系統群が見出された。このうち2つは分離された株の形態からそれぞれ*Microcoleus sociatus*, *Oscillatoria* spp.と同定されたが、残り2つのうち一方はPCR-DGGEで検出された未分離の生物のみからなり、もう一方は分離株の形態的特徴から新属のシアノバクテリア (“*Xeronema*”) であると考えられた。また、スイスの山中にある剥き出しになったドロマイトの内部には*Nostoc*, *Scytonema*, *Microcoleus*, *Chroococciopsis* などのシアノバクテリアが存在することがPCR-DGGEによって明らかとなった (Sigler et al. 2003)。この中にはコロラド高原の土膜から見

つかった*Microcoleus sociatus*と近縁なものも含まれており、これらは乾燥や紫外線にさらされると  
いう類似した環境に適応した系統群であろうと考えられた。

シアノバクテリアは超高塩濃度の環境にも分布しており、メキシコの人工蒸発池にある超高塩  
濃度の微生物マット中からは複数のシアノバクテリアが分離されている。これらの分離された生  
物は確かに培養液中で高い塩濃度耐性を示すが、実際に超高塩濃度の微生物マット中でこれらの  
生物が優占しているかどうかはわかっていなかった。また、耐性塩濃度範囲や至適塩濃度が種に  
よって異なっていたが、この生理学的特徴が実際の環境中における分布と一致しているのかも不  
明であった。そこで、異なる塩濃度の複数の微生物マットについて、PCR-DGGEによる群集構造  
解析がおこなわれた (Nübel et al. 2000)。その結果、塩濃度5-11%では*Microcoleus chthonoplastes*に  
近縁な生物が優占し、塩濃度14%のマットでは*Euhalothece*属や*Halospirulina*属の分離株と同じクラ  
スターに属するシアノバクテリアが優占していた。*Euhalothece*や*Halospirulina*は至適塩濃度が広  
範囲であるにも関わらず (それぞれ1.5-25%, 3.5-20%)、その分布域は塩濃度の最も高いマットに  
限られており、実際の環境中での分布には他の制限要因が影響していると考えられた。

南極にあるLake Fryxellの微生物マットの中からは複数の系統群に属するシアノバクテリアが  
検出された (Taton et al. 2003)。PCR-DGGEとクローンライブラリー法で得られた遺伝子型は22の  
異なる系統群に分かれ、そのうち9つは南極に特有の遺伝子型からのみ成っており、さらにその中  
の2つは既知の配列を含まない新しい系統群であった。この結果は、世界中に広く分布するコスモ  
ポリタン種が存在すると同時に、南極という特殊な環境に固有な系統群も存在することを示唆す  
るものであった。

### 3-4. 動植物と共生するシアノバクテリア

海綿動物には多くの微生物が共生しており、そのほとんどは従属栄養細菌とシアノバクテリア  
である。海綿に共生するシアノバクテリアは単細胞から糸状体まで多岐にわたり、*Synechocystis*,  
*Aphanocapsa*, *Oscillatoria* (*Phormidium*), *Anabaena*, *Synechococcus*などであることが知られている。  
その中でも形態的に*Aphanocapsa feldmannii*と同定された単細胞シアノバクテリアが最も一般的な  
海綿共生シアノバクテリアと考えられていた (Diaz 1996)。しかし、この*Aphanocapsa feldmannii*  
様シアノバクテリアが共生する9種の海綿について、PCR-DGGEによる群集構造解析をおこなっ  
たところ、各海綿個体から検出されたシアノバクテリア由来のバンドは1本であり、それらの塩基  
配列のほとんどは*Synechococcus/Prochlorococcus*を含む系統群に属していた (Usher et al. 2003)。

熱帯の沿岸域に生息する群体ボヤの一部には単細胞のシアノバクテリア*Prochloron* spp.が共生  
することが知られている (Lewin & Cheng 1989)。形態観察によってこのシアノバクテリアは宿主  
のホヤ群体の中に単クローンで存在していると考えられていた (Lewin 1981)。PCR-DGGEによ  
っていくつかの群体ボヤ内のシアノバクテリアを検出したところ、1つの群体ボヤ内からは  
*Prochloron*に由来する遺伝子型が1つずつ検出され、やはり単クローンであることが明らかとな  
った (Schmidt et al. 2004)。

*Acaryochloris*属はクロロフィルdを主要色素とするシアノバクテリアであるが、この生物もまた熱帯に生息する群体ボヤの共生シアノバクテリアとして分離された (Miyashita et al. 1996)。その後、日本沿岸に生息する紅藻の表面にもこのシアノバクテリアが付着していることが明らかとなり (Murakami et al. 2004)、クロロフィルdが紅藻の微量色素として検出されてきたという経緯から (Manning & Strain 1943)、一部の紅藻に特異的に付着すると考えられた。そこで、*Acaryochloris* sp. が発見された紅藻とその周囲に生息する他の紅藻、緑藻、褐藻についてPCR-DGGEによって付着シアノバクテリアの群集構造が解析された。その結果、全ての海藻から*Acaryochloris*に由来する遺伝子型が2つ検出され (図2)、このシアノバクテリアは紅藻だけでなく様々な海藻に付着していることが示された (Ohkubo et al. 2006)。

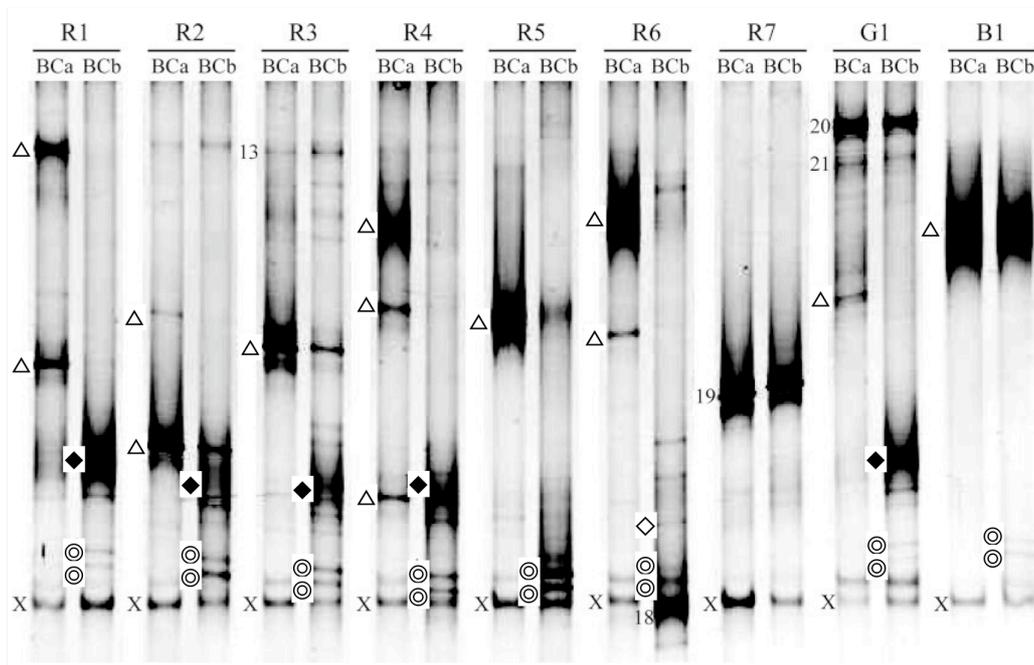


図2 海藻に付着するシアノバクテリア群集のPCR-DGGE解析。PCR増幅には2つのプライマーセットBAC341F-CYA781R(a) (BCa) およびBAC341F-CYA781R(b) (BCb) を用いた。解析に用いた海藻は紅藻の*Ahnfeltiopsis flabelliformis* (R1), *Carpopeltis prolifera* (R2), *Chondrus ocellatus* (R3), *Caulacanthus ustulatus* (R4), *Grateloupia lanceolata* (R5), *Gloiopeltis furcata* (R6), *Chondria crassicaulis* (R7), 緑藻の*Ulva pertusa* (G1), 褐藻の*Undaria pinatifida* (B1)。◎: *Acaryochloris* sp., ◆: 単細胞シアノバクテリア, ◇: *Oscillatoria* sp., △: 藻類の葉緑体。Ohkubo et al. (2006) の図を一部改変。

*Azolla*属 (シダ植物) の葉の内部には窒素固定能をもつ*Anabaena*属のシアノバクテリアが共生していることが知られている (Van Hove & Lejeune 2002)。 *Azolla*に共生するシアノバクテリアの多様性と宿主特異性を明らかにするためにPCR-DGGEを用いた解析が行われた (Papaefthimiou et al. 2008)。 検出されたシアノバクテリアの遺伝子型は*Azolla*の種間で異なっており、同一種内でも多様性が見られた。また、*Azolla*各種から検出された遺伝子型は宿主特異性を示し、*Azolla*属内の2つの節、*Azolla*節と*Rhizosperma*節の間で大きく2つの系統群に分かれた。これらの結果は、*Azolla*とシアノバクテリアの共生というイベントが過去に1度だけ起こり、共進化してきたということを示唆している。

## 4. 様々なPCRプライマーの利用

PCRを用いた群集構造解析手法の場合、プライマーの選び方は重要である。多くの場合、16S rRNA遺伝子を対象とするが、他の機能遺伝子が用いられることもある。また、特定の系統群に特異的なプライマーを用いることによって、目的の生物を選択的に検出することができる。

### 4-1. マーカー遺伝子

DNAマーカーとして最も多く用いられる遺伝子は16S rRNA遺伝子である。その理由は、全ての生物が持っていること、構造や機能が保存されていること、多くの生物間にわたって保存された部位が存在するためプライマーが作りやすいこと、種間や属間の分類に用いるのに十分な解像度があることなどである。また、データの蓄積量が他の遺伝子に比べて圧倒的に多いことも理由の一つである。しかし、16S rRNA遺伝子を用いた系統解析にも問題があり、例えば種内や株間の多様性を見たいときには解像度が不十分である。そのため、種内の多様性を明らかにするという目的のためにはより解像度の高いITS領域が用いられている (Janse et al. 2003, Ernst et al. 2003, Becker et al. 2004, Erwin & Thacker 2008)。また、16S rRNA遺伝子がゲノム中に複数コピー存在し、個々の配列が異なる場合もあるため、ゲノム中に1コピーしか存在しない*rpoB*という遺伝子を用いる例もある(Dahllöf et al. 2000)。この遺伝子を使えば、微生物の存在比を正確に見積もることができるが、データの蓄積量が少ないため現状では多様性解析に用いるには限界がある。他の機能遺伝子については、シアノバクテリアでは*nifH*や*psbA*, *ntcA*などが用いられている (Diéz et al. 2007, Bauer et al. 2008, Junier et al. 2007)。*nifH*は特に窒素固定能をもったシアノバクテリアの多様性や分布について明らかにしたい時に有効なマーカーとなる。

### 4-2. 特異的プライマー

16S rRNA遺伝子を対象とする場合、全ての真正細菌を検出することのできるユニバーサルプライマーがいくつか報告されている (Muyzer et al. 2004)。しかし、このプライマーではシアノバクテリアだけでなく従属栄養細菌も含めて検出されるため、シアノバクテリアに特異的なプライマーセットがNübel et al. (1997) によって開発された。このプライマーセットはCYA359Fというフォワードプライマー (5'末端にGCクランプを付加する) とCYA781R (CYA781R(a)とCYA781R(b)の混合プライマー) というリバースプライマーから成り、ほとんど全てのシアノバクテリアと葉緑体の16S rRNA遺伝子を増幅することができるため、シアノバクテリアや微細藻類を対象とした研究に広く用いられている。

Boutte et al. (2006) は、リバースプライマーCYA781R(a)とCYA781R(b)の個々の特異性について調べ、CYA781R(a)は主に糸状体のシアノバクテリアに対して特異性が高く、ほとんどの単細胞シアノバクテリアはCYA781R(b)に対応する配列をもっていることを報告した (表1)。実際の環境サンプルに対してもこれらのプライマーが個々に用いられている (Boutte et al. 2008)。また、葉緑体の16S rRNA遺伝子はほとんどがCYA781R(a)と対応する配列をもつため、Ohkubo et al. (2006)は海藻に付着するシアノバクテリア群集に対してこの2つのプライマーを別々に用いることによって

海藻の葉緑体の影響を減らし, *Acaryochloris* spp.を高感度で検出することに成功した (図2)。また, これ以外にも特定の属や種レベルの特異的プライマーが用いられている (West & Scanlan 1999, Becker et al. 2004)。

表1 既知シアノバクテリア由来16S rRNA遺伝子配列のCYA781R(a)およびCYA781R(b)に対する適合数

糸状体 異質細胞有り	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match	糸状体 異質細胞無し	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match	単細胞	CYA 781R(a)	CYA 781R(b)	No match
<i>Anabaena</i>	82	0	0	<i>Arthrospira</i>	4	1	0	<i>Acaryochloris</i>	0	3	0
<i>Anabaenopsis</i>	4	0	0	<i>Geitlerinema</i>	6	1	0	<i>Aphanocapsa</i>	0	1	1
<i>Aphanizomenon</i>	31	0	2	<i>Halospirulina</i>	4	0	0	<i>Aphanothece</i>	0	2	0
<i>Calothrix</i>	8	0	2	<i>Leptolyngbya</i>	0	20	3	<i>Chamaesiphon</i>	0	1	1
<i>Capsosira</i>	1	0	0	<i>Limnothrix</i>	2	3	0	<i>Chroococcidiopsis</i>	16	0	3
<i>Chlorogloeopsis</i>	3	0	0	<i>Lyngbya</i>	9	0	3	<i>Cyanobium</i>	0	4	0
<i>Coleodesmium</i>	1	0	2	<i>Microcoleus</i>	45	0	7	<i>Cyanothece</i>	0	8	0
<i>Cyanospira</i>	0	0	1	<i>Oscillatoria</i>	24	36	6	<i>Dactylococcopsis</i>	0	1	0
<i>Cylindrospermopsis</i>	51	0	0	<i>Phormidium</i>	19	19	2	<i>Dermocarpa</i>	0	13	0
<i>Cylindrospermum</i>	4	0	0	<i>Planktothricoides</i>	6	0	0	<i>Dermocarpella</i>	0	2	0
<i>Fischerella</i>	9	0	0	<i>Planktothrix</i>	85	1	0	<i>Euhalothece</i>	0	4	0
<i>Hapalosiphon</i>	4	0	0	<i>Plectonema</i>	0	2	0	<i>Gloeobacter</i>	3	0	0
<i>Mastigocladopsis</i>	1	0	0	<i>Pseudoanabaena</i>	10	1	0	<i>Gloeocapsa</i>	0	2	0
<i>Mastigocladus</i>	2	0	0	<i>Spirulina</i>	6	1	0	<i>Gloeothece</i>	0	4	0
<i>Nodularia</i>	41	0	0	<i>Symploca</i>	5	0	0	<i>Halothece</i>	0	1	0
<i>Nostoc</i>	94	0	4	<i>Trichodesmium</i>	8	0	0	<i>Merismopedia</i>	0	1	0
<i>Nostochopsis</i>	2	0	0	<i>Tychonema</i>	7	0	0	<i>Microcystis</i>	0	70	3
<i>Scytonema</i>	4	0	2					<i>Myxosarcina</i>	0	2	0
<i>Spirirestis</i>	3	0	0	Total	240	85	21	<i>Pleurocapsa</i>	0	6	0
<i>Stigonema</i>	2	0	0	Percentage	69.4	24.6	6.1	<i>Prochlorococcus</i>	0	26	0
<i>Symphyonema</i>	2	0	0					<i>Prochloron</i>	0	2	0
<i>Symphyonemopsis</i>	1	0	0					<i>Prochlorothrix</i>	0	5	0
<i>Tolypothrix</i>	3	0	0					<i>Staniera</i>	0	3	0
<i>Westiellopsis</i>	6	0	0					<i>Synechococcus</i>	18	184	3
								<i>Synechocystis</i>	1	6	1
Total	359	0	13					<i>Xenococcus</i>	0	2	0
Percentage	96.5	0.0	3.5					Total	38	353	12
								Percentage	9.4	87.6	3.0

Boutte et al. (2006) を参考に改変した。

## 5. 課題と展望

分子生物学的手法を用いた微生物の多様性解析にはまだ課題も残されている。技術的な課題としては、抽出した核酸の質とプライマーの質である。環境中に存在する細胞の形や大きさ、堅さは生物種によって異なり、全ての細胞から核酸を抽出するのは困難である。また、土壌や植物体にはPCR反応を阻害する物質が含まれており、DNA抽出時にこれらを除去する必要がある。これらの課題をクリアした核酸抽出技術の開発が望まれる。また、現在用いられているプライマーは既知の塩基配列を基に作られている。したがって、未知の塩基配列をもった生物を見過ごす、あるいは過小評価してしまう危険性がある。塩基配列データの蓄積に伴って、プライマーの特異性を見直す必要がある (Mühling et al. 2008)。もう一つの課題は、検出された生物の実体が見えないということである。環境中からは「未分離の」微生物に由来する塩基配列が多く得られているが、その生物がどんな形をして、どんな代謝をおこなっているのか、系統的に近縁な株が存在する場合を除いては知り得ない。環境中から得られる塩基配列を生物学的特徴と対応付けるためには、形態観察や分離・培養による知識の蓄積もまた必要である。

しかしながら、PCR-DGGEやクローンライブラリー法といった手法は非常に強力なツールであり、今後も続々とシアノバクテリアの分布や多様性に関する様々な新しい知見が生み出されていくと期待される。

## 引用文献

- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbial Reviews* 59: 143-169.
- Bauer, K., Díez, B., Lugomela, C., Seppälä, S., Borg, A.J. and Bergman, B. 2008. Variability in benthic diazotrophy and cyanobacterial diversity in a tropical intertidal lagoon. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 205-221.
- Becker, S., Singh, A.K., Postius, C., Boger, P. & Ernst, A. 2004. Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 181-190.
- Boone, D.R. & Castenholz, R.W. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Springer. New York.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasart, P. & Wilmotte, A. 2006. Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J. Microbiol. Methods* 65: 542-550.
- Boutte, C., Mankiewicz-Boczek, J., Komarkova, J., Grubisic, S., Izydorczyk, K., Wautelet, F., Jurczak, T., Zaleski, M. and Wilmotte, A. 2008. Diversity of planktonic cyanobacteria and microcystin occurrence in Polish water bodies investigated using a polyphasic approach. *Aquat. Microb. Ecol.* 51: 223-236.
- Buckley, D.H., Graber J.R. & Schmidt, T.M. 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4333-4339.
- Callieri, C., & Stockner, J.S. 2002. Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.* 61: 1-14.
- Campbell, L., H. A. Nolla, and D. Vaultot. 1994. The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39: 954-961.
- Cardinale, M., Brusetti, L., Quatrini, P., Borin, S., Puglia, A.M., Rizzi, A., Zanardini, E., Sorlini, C., Corselli, C. & Daffonchio, D. 2004. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 6147-6156.
- Christensen, H., Hansen, M. & Sorensen, J. 1999. Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence *in situ* hybridization with an rRNA oligonucleotide probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1753-1761.
- Dahllöf, I., Baillie, H. & Kjelleberg, S. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3376-3380.
- Dahllöf, I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 213-217.
- Diaz, M.C. 1996. Molecular and ecological studies of sponge- microbial associations. PhD Thesis, University of California, Santa Cruz.

- Díez, B., Bauer, K. & Bergman, B. 2007. Epilithic cyanobacterial communities of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): Diversity and diazotrophy. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3656-3668.
- de Bruin, A., Ibelings, B.W. & Van Donk, E. 2003. Molecular techniques in phytoplankton research: from allozyme electrophoresis to genomics. *Hydrobiologia* 491: 47-63.
- Ernst, A., Becker, S., Wollenzien, U.I.A. & Postius, C. 2003. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. *Microbiology* 149: 217-228.
- Erwin, P.M. & Thacker, R.W. 2008. Cryptic diversity of the symbiotic cyanobacterium *Synechococcus spongiarum* among sponge hosts. *Mol. Ecol.* 17: 2937-2947.
- Garcia-Pichel, F., López-Cortés, A. & Nübel, U. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1902-1910.
- Geitler, L. 1932. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14 Cyanophyceae. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 669-685.
- Ivanikova, N.V., Popels, L.C., Michael, R., McKay, L. & Bullerjahn, G.S. 2007. Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4055-4065.
- Janse, I., Meima, M., Kardinaal, W.E. & Zwart, G. 2003. High-resolution differentiation of Cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6634-6643.
- Junier, P., Witzel, K.P. & Hadas, O. 2007. Genetic diversity of cyanobacterial communities in Lake Kinneret (Israel) using 16S rRNA gene, *psbA* and *ntcA* sequence analyses. *Aquat. Microb. Ecol.* 49: 233-241
- Kenyon, C.N. 1972. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. *J. Bacteriol.* 109: 827-834.
- Kenyon, C.N., Rippka, R. & Stanier, R.Y. 1972. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 83: 216-236.
- Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. 2004. Molecular Microbial Ecology Manual (2nd ed.) Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Lewin, R.A. & Cheng, L. 1989. *Prochloron*, a Microbial Enigma. Chapman & Hall. New York.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.
- Lyra, C., Hantula, J., Vanio, E., Rapal, J., Roushiainen, L. & Sivonen, K. 1997. Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole cell proteins and PCR/RFLP of 16S rRNA gene. *Arch. Microbiol.* 168: 176-184.
- Manning, W.M. & Strain, H.H. 1943. Chlorophyll *d*, a green pigment of red algae. *J. Biol. Chem.* 151: 1-19.

- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M. & Miyachi, S. 1996. Chlorophyll *d* as a major pigment. *Nature* 383: 402-402.
- Moore, L.R., Rocap, G. & Chisholm, S.W. 1998. Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* 393: 464-467.
- Mühling, M., Woolven-Allen, J., Murrell, J.C. & Joint, I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2: 379-392.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. & Mimuro, M. 2004. Chlorophyll *d* in an epiphytic cyanobacterium of red algae. *Science* 303: 1633-1633.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C. 2004. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L. & van Elsas, J.D. (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*, 2nd edition. pp. 743-770. Kluwer Academic. Boston.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., Clavero, E. & Muyzer, G. 2000. Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ. Microbiol.* 2: 217-226.
- Ohkubo, S., Miyashita, H., Murakami, A., Takeyama, H., Tsuchiya, T. & Mimuro, M. 2006. Molecular detection of epiphytic *Acaryochloris* spp. on marine macroalgae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7912-7915.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R. & Stahl, D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Papaefthimiou, D., Van Hove, C., Lejeune, A., Rasmussen, U. & Wilmotte, A. 2008. Diversity and host specificity of genus *Azolla* cyanobionts. *J. Phycol.* 44: 60-70.
- Partensky, F., W. R. Hess, and D. Vaulot. 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 106-127.
- Pel, R., Floris, V. & Hoogveld, H.L. 2004. Analysis of planktonic community structure and trophic interactions using refined isotopic signatures determined by combining fluorescence-activated cell sorting and isotope-ratio mass spectrometry. *Freshwater Biol.* 49: 546-562.
- Ranjard, L., Poly, F., Combrisson, J., Richaume, A., Gourbiere, F., Thioulouse, J. & Nazaret, S. 2000. Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microbiol. Ecol.* 39: 263-272.

- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B.B. & Amann, R. 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3592-3602.
- Rhee, S.-K., Liu, X., Wu, L., Chong, S.C., Wan, X. & Zhou, J. 2004. Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4303-4317.
- Schmidt, E.W., Sudek, S. & Haygood, M.G. 2004 Genetic evidence supports secondary metabolic diversity in *Prochloron* spp., the cyanobacterial symbiont of a tropical ascidian. *J. Nat. Prod.* 67: 1341-1345.
- Schwieger, F. & Tebbe, C.C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R. & Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236.
- Sigler, W.V., Bachofen, R. & Zeyer, J. 2003. Molecular characterization of endolithic cyanobacteria inhabiting exposed dolomite in central Switzerland. *Environ. Microbiol.* 5: 618-627.
- Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M. & Chandler, D.P. 2001. Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4708-4716.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Wit, R. & Wilmotte, A. 2003. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo dry valleys, Antarctica): A morphological and molecular approach. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5157-5169.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Usher, K.M., Fromont, J., Sutton, D.C. & Toze, S. 2004. The biogeography and phylogeny of unicellular cyanobacterial symbionts in selected sponges from Australia and the Mediterranean. *Microbial Ecol.* 48: 167-177.
- van Hove, C. & Lejeune, A. 2002. Applied aspects of *Azolla-Anabaena* symbiosis. In: Rai, A.N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (eds.) *Cyanobacteria in Symbiosis*. pp. 179-193. Kluwer Academic, Dordrecht.
- West, N.J. & Scanlan, D.J. 1999. Niche-partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the eastern North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2585-2591.
- Whitton, B.A. & Potts, M. 1999. Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton B.A. & Potts, M. (eds.) *The Ecology of Cyanobacteria*. pp. 1-11. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Whitton B.A. & Potts, M. 2000. *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Wilmotte, A. & Herdman, M. 2001. Phylogenetic relationships among the Cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: Boone, D.R. and Castenholz R.W. (eds.) *Bergey's Manual of Systematic*

Bacteriology. Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototropic Bacteria. Second Edition. pp. 487-493. Springer. New York.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Zeidner, G. & Béjà, O. 2004. The use of DGGE analyses to explore eastern Mediterranean and Red Sea marine picophytoplankton assemblages. *Environ. Microbiol.* 6: 528-534.

Zwart, G., Agterveld, M.P.K., van der Werff-Staverman, I., Hagen, F., Hoogveld, H.L. & Gons, H.J. 2005. Molecular characterization of cyanobacterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 7: 365-377.