

アオコ形成ラン藻ミクロシスティスの生物地理

田辺 雄彦

筑波大学大学院 生命環境科学研究科

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

Biogeography of a water-bloom forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*

Key words: biogeography; F_{ST} *Microcystis*; MLST; waterbloom.

Yuuhiiko Tanabe

Graduate School of Life & Environmental Sciences, University of Tsukuba

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

1. バクテリアの生物地理学？

生物地理学は地球上における生物種の空間分布を説明するための学問である (Avisé 2000)。ところで、一般に高等動物や大型植物を対象としている研究者の生物地理学の研究方法は、様々な地域においてある種あるいはその近縁種の分布を調べ、多数の個体を採集して形態観察等を行い、適当な遺伝子マーカーを使って系統・集団解析を行った結果と地理分布との関係を議論する、というものではないだろうか。バクテリアについてもほぼ同様のアプローチを踏襲することによって生物地理学研究が行われてきてはいたが、残念ながらその結果は高等動植物の研究成果に見られるようなクリアなものではなく、かなりの曖昧さを伴うものであった。その原因はバクテリア特有の二つの属性に拠るところが大きい。その二つの属性とは、細胞サイズが小さいこと、及び個体群サイズ（ある集団内の個体数）が途方もなく大きいことである。前者の属性は対象とするバクテリアが特定の場所に生息しているか否かを直ちに確認することは難しいこと、それはつまり、バクテリアの分布域を把握することが困難であることを意味する。また、双方の属性からバクテリアにおいては長距離移動が頻繁に起こることが想像される。もしこの想像が正しいならば、バクテリアには地理的隔離あるいは分断といった、生物種の分布に地理的なパターン・違いをもたらす決定的な要因が欠落していることになる。このことはさらに、生育環境さえフィットしていれば地球上のあらゆる所に同一のバクテリア種が分布する、という仮説に帰結する (図 1)。この点に気づいたオランダの微生物学者 Baas Becking は 1934 年にこの仮説を定式化し、「Everything is everywhere: where environment selects (意識：微生物の空間分布は環境要因によってのみ決定される)」という名句で表現した (Baas Becking 1934)。この仮説は結局のところ、バクテリアの生物地理学という研究分野はそもそも成立し得ない (研究したところで地理的パターンは出てこないから意味がない)、ということを言っているのである。直感的なわかりやすさゆえに、この "Everything is everywhere" 仮説は提唱後数十年の間、微生物学の中において定説として君臨することになった。タンパク質・遺伝子変異の解析技術が種多様性研究に導入されるようになって以降も、しばらくはこの状況は変わらなかった。これは、初期にそのような研究の対象となったバクテリアが主に感染症を引き起こす病原菌であり、それらの大陸間伝播が異常に早いことが

本説の正しさの傍証と考えられたためである。少なくとも 20 年前までは、バクテリアの生物地理学の研究を扱った論文の数は散発的なレベルに留まり、一分野を形成するには至らなかったのである。



図1 “Everything is everywhere”仮説の概念図。高等動物においては、地理的分断によって個体群が隔離された結果、種分化が起こる（図中の動物、異種を異なる色で示す）。一方、バクテリアにおいては長距離移動が容易に起こるため、地理的隔離が存在しないと考えられ、従って地理的隔離による種分化はおこらない。このことは、環境にフィットさえしていれば、地球上のどこにでも同種のバクテリアが存在することを意味する（図中、異種バクテリアを異なる色で示す）。

ところが近年になって状況が一変した。1990 年代半ば以降、PCR 法の普及に伴い、遺伝子マーカーを用いて種内の遺伝的多様性を調べる研究が病原菌以外の環境微生物（土壌や水圏に生息する微生物）についても行われるようになったが、その結果、一部のバクテリア種については、生息地の環境要因ではなく地理を反映した分布を示すことが明らかとなったのである (Papke et al. 2003)。長く信じられていた ”Everything is everywhere” 仮説は検証すべき問題として再認識されるようになり、以降、様々な種について生物地理パターンの有無が大小様々なスケールで調べられてきている。現在はバクテリアの生物地理学が一分野として成立しつつあると言っている状況であるが、実のところ、厳密に生物地理的な分布パターンが証明された種は未だ非常に少ない。数少ない明瞭な例の一つは、*Sulfolobus islandicus* というアーキアである（バクテリアではないが、属性的にバクテリアの一例として便宜上扱っても問題はないであろう）。本種を世界各地から採集して遺伝子解析を行った結果、カムチャツカ・北米・アイスランドで分離された個体は系統樹上でそれぞれ明瞭な地域固有のグループを形成した、すなわち系統地理的なパターンを示すことがわかったが、種内で生態的特性の相違は全く見られなかった (Whitaker et al. 2003)。この結果は、同種に地理的隔離が存在することを強く示唆する。このアーキアにおいては何が地理的隔離をもたらしているのだろうか？という疑問が次に生じるが、このケースで考えられたのは地理的距離であった。生息地間の距離が大きくなればなるほど、ある個体が別の個体群へと移動する確率は小さくなり、その結果、時間経過とともに地理的に離れた個体群は遺伝的にも離れていく、と

いう考えはごく自然な推論であると考えられる。この推測の下では、距離が離れた生息地（個体群）間の地理的距離と個体群間の平均遺伝距離の間に正の相関が観察されることが期待されるが、この関係のことを「距離による隔離【Isolation-by-distance】」と呼ぶ (Slatkin 1993)。*Sulfolobus islandicus* についても、「距離による隔離」が観察され、個体群間の距離の大きさに比例して移動が制限されていることが強く示唆された。それではなぜ *Sulfolobus islandicus* においては、他のバクテリアを含む微生物には見られない地理的隔離が観察されたのであろうか？本種は高温低 pH の温水といういわば極限環境に生息し、また耐久性孢子も作らないことから、長距離移動は他の微生物種に比べれば困難であると考えられる。こうした他のバクテリアにはない特殊な性質が、本種に生物地理パターンをもたらした可能性が高いと考えられている。現在、種によってはバクテリアの個体群間にも地理的隔離が存在しうること自体は多くの微生物研究者が認めるところであるが、今後のバクテリアの生物地理学が明らかにすべき問題は、「どのような属性のバクテリアに地理的隔離が起こるか？」、あるいは「バクテリアに地理的隔離をもたらす要因は何か？」ということであろう (Whitaker et al. 2009)。この問題に対して回答を与えるための一つのアプローチとして、多くの種の異なる属性を持ったバクテリアについて生物地理パターンの有無を調べて比較するという研究が考えられる。しかしながら、現在までに生物地理学的研究が展開されている種は主として病原菌、土壌性バクテリア、海洋性バクテリアに限定されており、淡水性のバクテリアについてはなぜかほとんど調べられていない。筆者らはこの問題に「淡水性バクテリア」を用いて取り組むため、数年前よりアオコ形成ラン藻マイクロシスティスを対象とした生物地理学的研究を行っている。

2. アオコ形成ラン藻マイクロシスティス

富栄養化した湖沼・貯水池・ダム等において、青緑色の粉状、あるいはペンキをこぼしたような浮遊物が確認できることがある。これはアオコ（青粉）と呼ばれるラン藻類（シアノバクテリア）の大量発現現象である（図 2 A）。様々な種類のラン藻類がアオコをつくることが知られているが、最も一般的に見られるアオコ形成ラン藻は *Microcystis aeruginosa*（マイクロシスティス・エルギノーザ）という種である（図 2 B）。

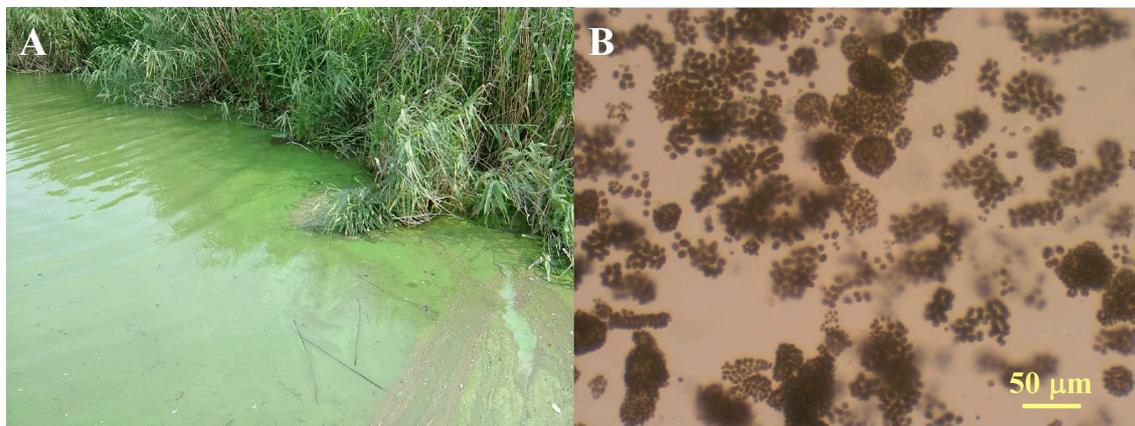


図 2 A 霞ヶ浦で発生したアオコ、B アオコ形成ラン藻マイクロシスティスの顕微鏡写真、細胞密度や形状が異なる様々なコロニーが観察できる。かつてはこれらは別種として分類されていたが、現在はすべて *Microcystis aeruginosa*（マイクロシスティス・エルギノーザ）一種として分類されている。

本種は 3-8 μm 程度のサイズの単細胞性の球菌であるが、通常は個々の細胞が集合し、寒天質を含んだ形態的に多様なコロニーを形成することで知られる。古くはその多様なコロニー形態によって 5 つ以上の種に分類されていたが、遺伝子レベルでほとんど違いがないこと、コロニー形態の可塑性（培養条件によってコロニー形態が変わる）ことが発見されたことなどから、現在では全て *Microcystis aeruginosa* 一種として分類されている (Otsuka et al. 2001)。本種が水面近くに浮遊しているのは、細胞内にガス胞と呼ばれる浮き袋の役割を果たす器官を有しているためである。本種は世界中で分布が確認されており、熱帯域では年間を通じて発生が見られるが、日本を含む温帯域では主に夏季を中心に発生が見られる。本種によるアオコの発生は、特に発生後期における腐敗による悪臭の発生・アオコ死骸の蓄積に起因する底層の酸欠等の水環境問題を引き起こす。さらに深刻な問題として、本種の一部の個体はミクロシスチンという急性肝炎を引き起こすアオコ毒素を放出するということが挙げられる。実際、本種アオコ含有水の誤飲による中毒事故が世界各地で散発的に報告されていることから、1995 年には WHO（世界保健機関）はミクロシスチンの飲料水における含有率のガイドラインの ($1\mu\text{g/l}$ 以下) を設けた。現在も世界中の飲料水源において、同種アオコ及び同種のつくるミクロシスチンの監視が続けられている。

同じミクロシスティスに分類される個体であっても、有毒と無毒の個体が存在するため、有毒アオコの監視という実践上の必要性から、両者を識別する試みが数多く行われている。16S rDNA (Otsuka et al. 2001) や ITS (Janse et al. 2004) のようなお馴染みの系統マーカーにはじまり、*cpcBA*（フィコシアニンサブユニット遺伝子座）のような光合成生物特異的マーカー (Tillett et al. 2002) やアオコ毒素ミクロシスチンの生合成遺伝子 *mcy* (Tanabe et al. 2004) など、様々な遺伝子を用いた解析が行われてきた。しかしながら、いずれの研究も毒性の識別に関する議論に終始し、アオコの地理的な分布や移動パターンに言及する研究はほぼ皆無であった。しかし、例えば新しく建築されたダム等の人造湖において、ある時に突然アオコが発生するケースがあることはよく知られている。その場合、アオコはどこから来たのであろうか？ また、アオコは世界中で見られるが、どのようにして広まったのであろうか？ アフリカ大陸のアオコとユーラシアのアオコは遺伝的に異なるのであろうか？ そのような疑問に答えるためには、各地で採集したミクロシスティスについて、高い分解能を持つ（詳細な個体識別ができる）遺伝子マーカーを用いて解析し、地理分布と合わせて議論する「生物地理学的な研究」が必須である。アオコは現場で直ちに存在を確認できる数少ない微生物の一つであり、時に航空・衛星画像からも存在を確認することができるが、このことは細菌学の生物地理学的研究のモデル生物としても大きな利点となる。あるいは、アオコの研究を通して、前章最後で述べた細菌学の生物地理学における問題に、部分的にでも回答を与えることができるかもしれない。

3. MLST を用いたミクロシスティスの系統・集団解析

生物地理学的研究を始めるに際してまず重要なことは、適当な分解能を持った遺伝マーカーを選択することである。細菌学において、現在最も広く用いられている種内の個体識別のための遺伝マーカーは、複数（7 つの遺伝子座を用いるのが一般的）のハウスキーピング遺伝子座（それぞれ約 450 塩基程度）の遺伝子配列であり、これらを用いて基づいて個体識別を行う手法を

MLST (Multilocus sequence typing) という (Maiden et al. 1998)。本手法が汎用されている理由として、バクテリアは一般に高等動物等と比較して種内の遺伝的多様性が大きく、タンパク質をコードする短い遺伝子断片を調べることにより十分な分解能が得られる (詳細な個体識別ができ、かつ個体間の類縁関係も明瞭に理解できる) ということが挙げられる。また、バクテリアはプラスミドやファージ等の染色体外遺伝因子の媒介によって、種内の個体間で頻りに遺伝子を交換 (組み替え, "recombination") することが知られている (Smith et al. 1993)。実際、マイクロシスティスの自然集団においても、個体間で遺伝子の組み替えが、比較的高い頻度で起こっていることが示唆されている (Tanabe et al. 2009a)。複数の遺伝子を用いて解析する理由は、組み替えによって生じるバイアス、例えば最近組み換えを起こした遺伝子をマーカーとすることによって遺伝的に離れた個体を近縁であると結論づけてしまう、というような誤判断を軽減させるためである (Hanage et al. 2005)。

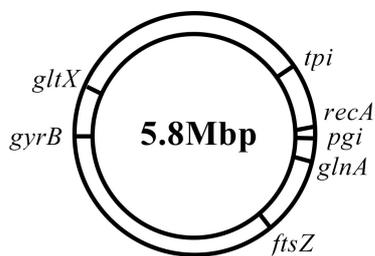


図3 ミクロシスティスの7つの MLST 遺伝子座の位置。*M. aeruginosa* NIES-843 株のゲノムデータを元に作成。

筆者らはマイクロシスティスの生物地理学的研究のため、ゲノムに散在する7箇所のハウスキーピング遺伝子座 (図3) をマーカーとする MLST スキームを構築した (Tanabe et al. 2007)。次に予備研究として、日本産のマイクロシスティス約 160 株を入手し、これらについて MLST により遺伝子タイピングを行った。その結果、解析株数の半数弱に匹敵する 76 の異なる遺伝子型が得られたこと、それらの遺伝子型間に相当の遺伝距離が得られたことなどから、MLST が本種の生物地理解析に必要な分解能を期待通りに有していることがわかった。ところが、この約 160 株について系統解析を行ってみたところ、同一の湖沼から分離された個体が遺伝的にまとまったグループをつくる傾向は全く見られなかった (図4)。日本国内のマイクロシスティスにおいては、系統樹で識別可能な生物地理パターンは形成されていないようである。

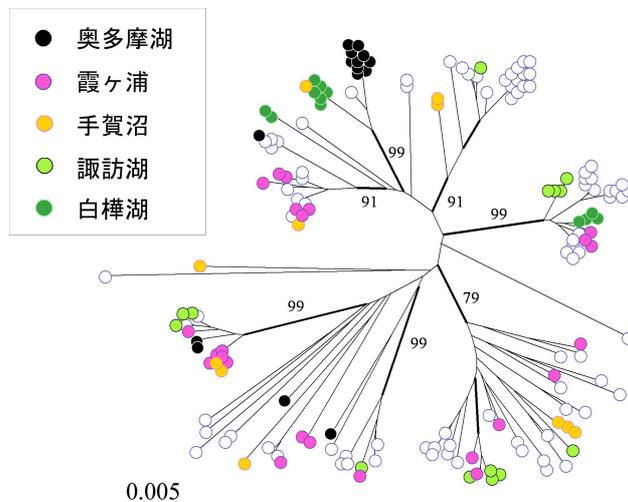


図4 ミクロシスティス 164 株を用いた近隣結合法による MLST 系統樹 (7つの遺伝子座を併せた計 2,992 塩基に基づく)。系統樹内の数値はグループの統計的信頼度を示すブートストラップ確率 (主要な系統群のみ示す)、スケールバーはサイト当たりの塩基置換数、白抜き円は上記 5 箇所以外の湖沼から分離された個体を示す。各湖沼から採集された個体が系統群としてまとまらず、系統樹内に散在している点に注意。

さて、MLSTによる系統樹を見る限り、マイクロシステイスに生物地理的なパターンは存在しないようであるが、それでは本種は頻繁に日本中の湖沼間を移動しているのであろうか？ この問題を考えるに際しては、個体群の遺伝的組成が経時変化していく過程を理論的に抑えておく必要がある(図5)。アオコが生息する二つの湖沼があり、仮にその湖沼間での移動を妨げるような地理的障壁が生じたとしよう。以降、双方のアオコは独自の進化の道を辿り、それらの遺伝子組成は「遺伝的浮動」と呼ばれる確率論的变化によって互いに異なっていき、そして時に「自然選択」によって進化のスピードが速められ、最終的には系統樹上で別のグループとして認識できるに至る。ここで重要なことは、そうした進化のスピードは速いものではないということである。実際、地理的隔離が生じたとしても、系統樹上で別のグループとして表現されるまでには相当な時間を要するということが理論的研究によりわかっている。しかしその一方で、系統樹上で異なるグループとして認識できる以前の段階であっても、地理的隔離などによって湖沼間の移動が制限されると、ほどなくして湖沼間で遺伝子組成の違いが現れる(しばしば「遺伝的分化」と表現される)。実はこの集団間に生じた初期的な遺伝子組成の違いは、 F_{ST} という指数を用いて検出することができる。従って、系統樹で地理的パターンが得られない場合であっても、地理的隔離の存在をこの指数を利用することによって推測することができる。

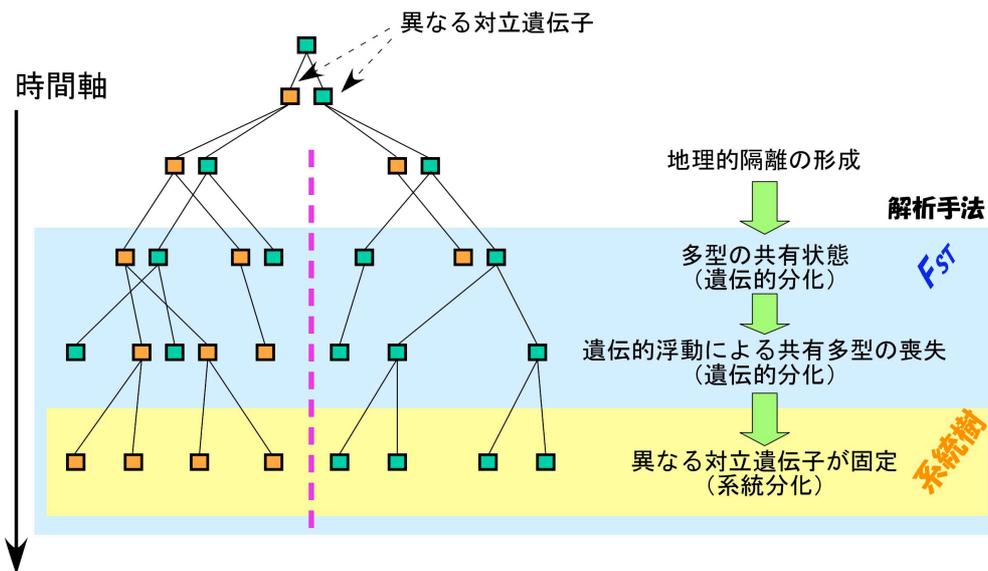


図5 地理的隔離と集団内の遺伝子型組成の時間発展。地理的隔離が形成されて二つの集団に分かれて以降、しばらくの間は遺伝子型は共有される。時間経過とともに、「遺伝的浮動」と呼ばれる集団内遺伝子組成の確率論的変動(偶然に子孫を沢山残したり、残せなかったりという状況を生む効果)によって、二つの集団間で遺伝子型頻度(特定の遺伝子型の集団中に占める頻度)は変わっていく。この段階(図中青)では F_{ST} という遺伝子型頻度を変数とする指数を用いることによって、集団間の遺伝的組成の違いの有無の検出(0より有意に大きければ組成は異なると判断)、及び遺伝的組成の大きさの違いを推測(0から1までの数値の大きさで表現)を行うことができる。最終的には二つの集団で異なる遺伝子型が固定するが、この段階(図中黄)になって初めて系統樹で二つの集団の間の地理的隔離を検出できる。(注： F_{ST} という指数は実際には地理的隔離以外の様々なファクターの影響を受けて変動するため、その解釈には注意が必要。)

ところで、この指数は個体群内の遺伝子頻度(個体群の中で特定の対立遺伝子の占める割合)の推定値の関数であるため、統計的に有意な結果を得るためには、一つの採集地から大量にアオ

コを単離して解析する必要がある。そこで筆者らはこの問題に取り組むため、利根川水系の下流域に発達している複数の湖沼をモデル地域に設定し、そこから2005年夏季にアオコの大量採集・分離培養を行い、これら分離株についてMLST解析を行った結果を元に F_{ST} を用いた解析を行った。その結果、全体的に見ると F_{ST} は有意に正の値を示すこと($F_{ST} = 0.351, P < 0.001$)、つまり各地点の個体群間の遺伝子組成に違いが見られることがわかったが、その違いのパターンは単純ではなかった(図6)。最も驚くべき結果は、わずか3キロしか離れていない同一湖沼内の地点間でアオコの遺伝子組成が全く異なっていたことである。さらに驚くべきことに、同一の地点のアオコの遺伝子組成が2ヶ月後に全く異なるものに変化していた(Tanabe et al. 2009b)。

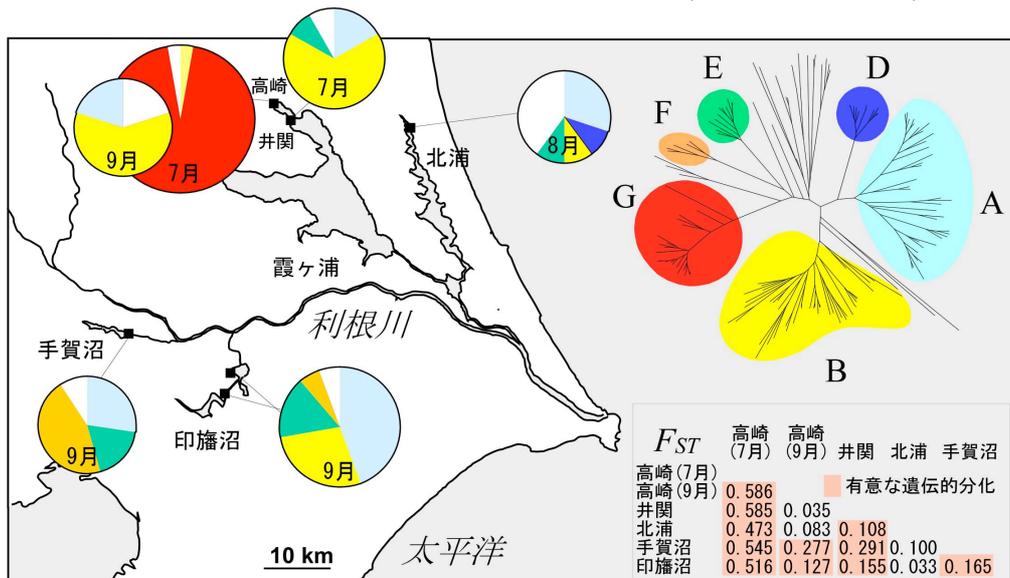


図6 利根川水系のアオコ個体群における遺伝的分化。各地個体群における遺伝子型頻度分布をMLST系統樹(右)における6つのグループ分け(グループA, B, D-G)に基づいて円グラフで示す。円グラフの面積は分離株の個数に比例するように描く。グループCは小群のため省略。表(右下)の F_{ST} 値の有意水準は0.1%。最も大きな F_{ST} 値を示す(最も異なった遺伝的組成を示す)個体群のペアは、同一地点(高崎、霞ヶ浦)の7月と9月、及び最近接する二集団(高崎と井関、同じ日に採集)であることに注意。

さて、今回観察された複雑なマイクロシテイスの個体群の遺伝的相違パターンをどのように解釈すればよいだろうか? MLSTの系統樹を精査してみると、この二つの意外な観察結果には、グループGと仮称する種内系統群が関与していることがわかる。1章で説明した「距離による隔離」は、利根川水系の湖沼のマイクロシテイスにおいては観察されなかったが、グループGを除くと弱いながらも「距離による隔離」を示唆するパターンも見られた(Tanabe et al. 2009b)。筆者らはこのグループGが他の種内系統群(A~F)とは異なる生態的特性を持つ適応的なグループである可能性を考えており、現在その特性の解析を進めている。いずれにしても、少なくとも今回の地理スケール(60キロ程度)においては、地理的距離や水域の分断といった地理的要素以外のファクターが、アオコの分布パターンに相当に大きなインパクトを与えていることが示唆される。グループGが実際に適応的なグループであるならば、そのファクターは自然選択ということになるであろう。

4. 今後の展望

今回紹介した研究は日本国内のアオコを対象としたものであるが、前述の通り、マイクロシテ

イスは世界各地で見られる。より大きい地理スケールで解析した場合に、どのような結果が得られるかは興味深いところである。アオコは "Everything is everywhere" 仮説が述べるように、世界各地で似たような遺伝子組成を持っているのであろうか？それとも地域固有の系統群が見出されるのであろうか？そのような系統群があるならば、それに生態系適応・自然選択はどのように関わっているのであろうか？これらの諸問題に取り組むため、現在、筆者らはアジア・オセアニア地域より集中的にミクロシテイスの採集・単離・遺伝子タイピングを行っている。将来的には欧州、新大陸、アフリカ等においても採集を行い、同種を材料とした地球規模の生物地理学的研究を展開したいと考えている。

引用文献

- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge (Massachusetts): Harvard University Press.
- Baas Beeking, L.G.M. 1934. *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. 2005. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.* 3: 6.
- Janse, I., Kardinaal, W.E., Meima, M., Fastner, J., Visser, P.M. & Zwart, G. 2004. Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3979-3987.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. & Spratt B.G.. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3140-3145.
- Otsuka, S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe M.M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 51: 873-879.
- Papke, R.T., Ramsing, N.B., Bateson, M.M. & Ward D.M. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environ. Microbiol.* 5: 650-659.
- Papke, R.T. & Ward, D.M. 2004. The importance of physical isolation to microbial diversification. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 293-303.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. & Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4384-4388.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M.M. 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. *J. Mol. Evol.* 58: 633-641.
- Tanabe, Y., Kasai F. & Watanabe, M.M. 2007. Multilocus sequence typing (MLST) reveals high genetic diversity and clonal population structure of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.

Microbiology 153: 3695-3703.

- Tanabe, Y., Sano, T., Kasai, F. & Watanabe, M.M. 2009a. Recombination, cryptic clades and neutral molecular divergence of the microcystin synthetase (*mcy*) genes of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *BMC Evol. Biol.* 9: 115.
- Tanabe, Y., Kasai, F. & Watanabe, M.M. 2009b. Fine-scale spatial and temporal genetic differentiation of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: revealed by multilocus sequence typing. *Environ. Microbiol. Reports* 1: 575-582.
- Tillett, D., Parker, D.L. & Neilan, B.A. 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2810-2818.
- Whitaker, R.J., Grogan, D.W. & Taylor, J.W. 2003. Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science* 301: 976-978.
- Whitaker, R.J. 2006. Allopatric origins of microbial species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361: 1975-1984.