

## 助成年度：平成7年度

[所属] 福井県立大学 生物資源学部

[役職] 助教授

[氏名] 広石 伸互 (畑 幸彦 近藤 竜二)

[課題]

### 有毒アオコの生態解明のための免疫学的および分子生物学的手法の確立

[内容]

世界各地の富栄養化した湖沼では、しばしば *Microcystis* 属藍藻を優占種とするアオコが発生し、その水を飲んだ陸上動物やその水域の魚類の斃死、異臭の発生、上水道におけるろ過障害、景観の悪化など深刻な環境問題を引き起こしている。これらの諸問題を解決するためには *Microcystis* の異常発生機構を解明することが必須であるが、その前提として本属に属する微生物の種の識別が必要不可欠であり、より簡便で迅速かつ客観的な種・株の同定法の確立が強く求められている。この様な状況を背景にして、私達は *Microcystis* 属の分子識別の確立を目指し、種に特異的なモノクローナル抗体および 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を比較することによる種の識別を試みた。さらに、*Microcystis* 属に固有の塩基配列を検索し、これらを検出することのできる PCR のプライマーを作製し、三方湖からの試料を用いてその有用性を検討した。

その結果、まず免疫学的な手法の検討においては、*Microcystis* の 2 種 (*M. aeruginosa* と *M. wesenbergii*) に反応する 3 種類のモノクローナル抗体を得ることができた。現在、さらに、多くの株を用いて特異性の確認を行っている所である。細胞の検出系についてはアビジン・ビオチンを用いた間接蛍光抗体法により、従来法より高感度な検出系であることを示すことができた。今後はこれらの抗体をさらに多くの株と反応させて、抗体のもつ特異性を確認するとともにフィールドへの適用を考えて行くつもりである。

一方、遺伝子の解析による *Microcystis* の種を識別する試みでは、各種の *Microcystis* から得られた塩基配列と既報のシアノバクテリアおよび細菌の 16S rDNA の塩基配列から系統樹を作成したところ、*M. aeruginosa* f. *aeruginosa* (NIES-87)、*M. aeruginosa* f. *flos-aquae* (NIES-98)、*M. wesenbergii* (NIES-111)、*M. viridis* (NIES-102) を含む AERU グループは他のシアノバクテリアと独立したクラスターを形成することが明らかになった。しかし、AERU グループ内の進化距離は低く、塩基配列が種間で大きく異なる部位は認められなかった。一方、*M. elabens* var. *minor* (NIES-42) および *M. holsatica* (NIES-43) と AERU グループとの進化距離は大きい上に、形態的にも異なっており、*Microcystis* 属であるとは考え難いことが判明した。さらに、AERU グループに特異的な配列が少なくとも 2 ヶ所存在することを見だし、これらの部分に挟まれた塩基配列をもとに系統樹を作成した。その結果、全塩基配列から作成した系統樹と同様に AERU グループは他のシアノバクテリアと独立した深いクラスターを形成したので、これらの部分がシアノバクテリアの系統解析に利用できることが示唆された。そこで、これらの結果をフィールドに応用する目的で、AERU グループに特異的なプライマーを作製し、三方湖から分離した *Microcystis* 属およびアオコ群集の系統学的解析を行った結果、全て AERU グループに含まれることが明らかになった。本法は他の微生物が混在する試料からも AERU グループのみを選択的に検出できることが分り、生態系の研究に非常に有用な手段であることも明らかになった。このことは群体を形成せず単一細胞で存在する場合や堆積物中にアオコの「種(タネ)」として存在する *Microcystis* 属の検出に非常に有効であると考えられる。

以上、モノクローナル抗体を用いた免疫学的なアプローチにより *M. aeruginosa* および *M. wesenbergii* の識別、16S rDNA 遺伝子解析により *Microcystis* 属 AERU グループの識別が可能になった。将来、より詳細な解析を行うとともに、フィールドへの応用をめざすつもりである。