

八郎湖における有害藍藻類の季節的変動

－ 2008年度を例にして －

秋田県立大学 生物資源科学部

岡野 邦宏

1. はじめに

八郎潟残存湖（以下、八郎湖）は、八郎潟調整池、東部承水路、西部承水路を合せた湛水面積47.32km²の淡水湖である。かつては湛水面積220.2km²の日本第二位の汽水湖であったが、1957年に着工した八郎潟干拓事業により約17,000haの干拓地が造成され現在の形となった（図1）。八郎湖の水質、特にCODは増加の一途を辿っており、1977年の事業竣工から29年後の2006年には全国ワースト3位となった（佐々木（2010）、秋田県（2008））。同年には八郎湖で発生したアオコの河川への遡上により近隣浄水場で取水制限される事態となり（近藤（2010））、2007年12月に湖沼水質保全特別措置法（湖沼法）の指定を受け、全国で11番目の指定湖沼となった。そのため、八郎湖では2008年度より「八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第1期）」、2014年度より「八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第2期）」に基づき、生活排水の流入対策や水田濁水の抑制などによる水質改善が進められている（秋田県（2008）、秋田県（2014））。しかしながら、八郎湖では毎年大量のアオコが確認されており、全窒素や全リンも水質環境基準を超えていることから（秋田県（2014））、今後もアオコの発生が続くことが懸念されている。

一方で、アオコを形成する有害藻類の中でも *Microcystis*属や *Anabaena*属などの一部の種は、極めて強力な毒素であるマイクロシスチンを産生することが知られている（Watanabe et al. (1988), Welker and Döhren (2006)）。マイクロシスチンは5つの特殊アミノ酸と2つのL-アミノ酸で構成される環状

ペプチドであり、最も毒性が強いとされるマイクロシスチン-LRは世界保健機関（WHO）により飲料水の暫定ガイドライン値（1.0µg/L）が設けられている（World Health Organization (2006)）。しかしながら、浄水過程の塩素処理によりマイクロシスチンの分解が起こることから、日本国内では水道水へのリスクが小さいことが指摘されている（Tsuji et al. (1997)）。しかし、八郎湖における農業や水産業への影響は無視できないため、マイクロシスチンの季節的変動やマイクロシスチンを産生する有害藍藻に関するデータを蓄積することは極めて重要である。

干拓竣工後の八郎湖における植物プランクトンに関する研究は少ないが、片野（1993）は珪藻類の変遷について、林ら（2007）は動物プランクトンも含む浮遊微生物相について報告している。また、林ら（2013）は2002年から2012年まで八郎湖におけるアオコ形成藻類を調査し、優占種が *Microcystis*属および *Anabaena*属であることを報告している。しかしながら、これまでに八郎湖では有害藍藻の発生に伴うマイクロシスチン産生の実態について調査された例はなく、マイクロシスチン産生種に関する知見もないのが現状であった。近年、マイクロシスチンの合成に関与する遺伝子群（*mcy*, *microcystinsynthetase gene cluster*）が同定され（Tillet et al. (2000)）、マイクロシスチンを産生する藍藻（マイクロシスチン産生株）に不可欠であることが報告されている（Tanabe et al. (2007)）。また、発生したアオコ形成藻類がマイクロシスチン産生株であるか否かは顕微鏡による形態観察やrRNA遺伝子な

どを用いた分子系統学的な分類においても難しいことから (Otsuka et al. (1998), *mcy*遺伝子を用いた定量が必要である。

そこで、本研究では八郎湖においてアオコ発生の実態を調査すると共に、*mcy*遺伝子の定量を行

い、ミクロシスチンとミクロシスチンを産生する有害藍藻の季節的変動を明らかにした。さらに、16S rRNA遺伝子に基づく藍藻類の変遷も調査した。

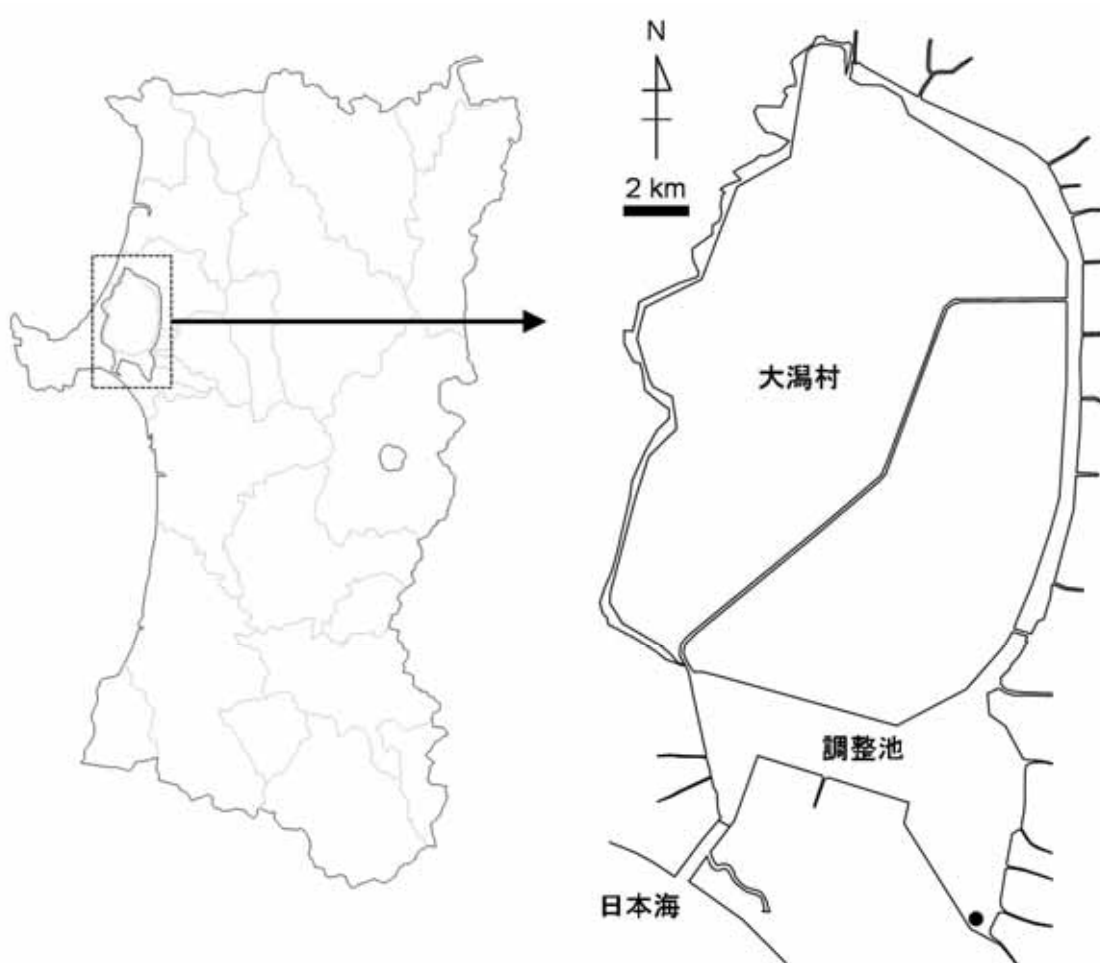


図1. 八郎湖の概略図
●が野村港 (北緯39° 42' 48" 50, 東経140° 02' 14" 47)

2. 方法

1) 採水方法

湖水試料は、2008年5月から2009年5月まで八郎湖の野村港で採水した (図1)。採水は、表層水 (20cm) をヒシヤクにより行い、現地で水温、pH、溶存酸素 (DO)、電気伝導度 (EC) を水質

チェッカー WQC-22A (東亜DKK) を用いて測定した。なお、湖水試料は2つに別けて保存した。まず、湖水試料100~200mLをガラスフィルター GF/F (0.7 μ m, Whatman, USA) でろ過し、ガラスフィルターを-80°Cで遮光保存して藍藻由来色素分析用とした。また、ミクロシスチン分析用として未

ろ過の湖水試料を -30°C で保存した。なお、アオコが集積した湖水を別途採取してDNA解析に用いた。

2) ミクロシスチン分析

凍結保存した湖水試料200mLを解凍後、酢酸(和光純薬工業)を終濃度5%になるように添加してミクロシスチンを抽出した。酢酸抽出した試料は、ガラスフィルター GF/F ($0.7\mu\text{m}$, Whatman) でろ過後、Presep[®]-C C18 (和光純薬工業)により粗精製した。100%メタノールで溶出されたミクロシスチンは、アルミブロック恒温槽DTU-1BN/CN(タイテック)により窒素乾固し、メタノールで再溶解して分析試料とした。また、分析はACQUITY UPLCシステム(Waters, USA)により高速液体クロマトグラム法で行った(Harada et al. (1998))。なお、分離カラムにはCORTECS C18 $1.6\mu\text{m}$, 2.1mm I.D. \times 150mm(Waters, USA)を用い、3種の標準物質ミクロシスチン-RR, ミクロシスチン-YR, ミクロシスチン-LR(和光純薬工業)により同定及び定量を行った。また、3種のミクロシスチンの合計を全ミクロシスチンとした。

3) 藍藻由来色素分析

GF/Fフィルター($0.7\mu\text{m}$, Whatman, USA)で捕集した湖水懸濁物からアセトン(HPLC grade, 和光純薬工業)を用いて光合成色素を抽出した。抽出した光合成色素は、SHIMADZU LC-10Aシステム(島津製作所)によりHPLC-PDA法で分析した(Soma et al. (1996), Tani et al. (2002))。クロロフィルa, b, フェオフィチンa, b, ピロフェオフィチンa, メチルフェオホルビド, β -カロテン(和光純薬工業)を基準物質として、メソポルフィリンIXジメチルエステル(Avocado Research Chemicals, UK)を内部標準物質として用い、保持時間により同定

した。なお、分離カラムにはNavi C18-5 4.6mm I.D. \times 250mm(和光純薬工業)を用いた。また、藍藻由来のカロテノイドである β -カロテン, エキネノン, カンタキサンチン, ゼアキサンチンの濃度は440nmにおけるそれぞれの吸光強度を β -カロテンと比較することで定量した(Jeffrey et al. (1997))。

4) DNA抽出およびPCR

DNAの抽出はUltraClean[™] Water DNA Kit(MOBIO, USA)を用い、添付のマニュアル(<http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/14800-NF.pdf>)に従って行った。PCRは、藍藻類の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて行った(Murakami et al. (2004))。ポリメラーゼはExTaq[®](タカラバイオ)を用い、dNTPsおよび各プライマーをそれぞれ終濃度で $200\mu\text{M}$, $0.4\mu\text{M}$ になるように添加して反応溶液とした。さらに、反応溶液には10ngの鋳型DNAとポリメラーゼ添付の緩衝液を加えた。また、サーマルサイクル反応は2720サーマルサイクラー(ABI, USA)を用いて 94°C で60秒の熱変性後、 94°C を30秒、 55°C を30秒、 72°C を90秒のステップを30サイクル行った。なお、 72°C で7分間伸長反応を行った後に 4°C で保存した。PCR後のDNAは2%アガロースで電気泳動をし、エチジウムブロマイドで染色した。染色後のDNAはUVイルミネーター(UVP, USA)により波長302nmで検出を行った。

5) 定量PCR

定量PCRは、*Microcystis*属の16S rRNA遺伝子(Rinta-Kant et al. (2005))と*mcyB*遺伝子(Briand et al. (2009))に特異的なプライマーセットおよびプローブを用いてTaqMan法で行った。反応にはFastStart Essential DNA Probes Master(Roche, USA)を用い、LightCycler[®] Nanoシステム(Roche, USA)

により解析した。反応溶液は、添付のマニュアル (https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/06402682001_en_04.pdf) に従い20 μ Lに調製した。また、サーマルサイクル反応は95°Cで10分の熱変性後、95°Cを10秒、60°Cを10秒、72°Cを15秒のステップを45サイクル行った。なお、*Microcystis aeruginosa* NIES-843株のゲノムDNAを用いてスタンダードを作成し、絶対検量線により定量を行った。鋳型DNAを20倍まで段階希釈して実験を行い、最も増幅効率の高かった20倍希釈の結果の平均値を各DNAのコピー数とした。試験は3連で行い、16S rRNA遺伝子及び*mcyB*遺伝子の各系列はANOVAにより有意差を検定した。

6) 分子系統解析

PCR増幅した16S rDNA遺伝子は、pGEM-T Easy vector system (Promega, USA) によりライブラリー化した。クローニングは、添付のマニュアル(http://www.promega.co.jp/jp/jp_tech/jp_manuals/pgem-t.pdf) に従って行い、1サンプルから16クローンずつランダムに選抜した。選別したクローンは、秋田県立大学バイオテクノロジーセンターにて全長をシーケンスした。得られたDNA配列をDDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) にてBLAST解析し、相同性の高い配列とともにMEGA (<http://www.megasoftware.net>) を用いた分子系統解析を行って帰属分類群を同定した。なお、得られた16S rRNA配列はDDBJ Accession No. AB935785~AB935946に登録した。

3. 結果および考察

1) 八郎湖のアオコ発生状況

光合成色素は、湖底コアサンプルなどにおける植物プランクトンの種組成の推定などに広く用いられている (Soma et al. (1996) , Tani et al. (2002) ,

Itoh et al. (2003))。本研究では、藍藻類由来のカロテノイドを藍藻由来色素としてアオコ発生の指標とした。その結果、7月中旬から藍藻由来色素濃度が増加し、アオコが観察された (図2.C)。7月には水温が25°Cを超えており (図2.A)、これはアオコ形成藻類である*Anabaena*属の好適増殖温度25°Cとも合致する (Imamura et al. (1981))。また、8月21日と29日の80mm/日を超える降雨により藍藻由来色素濃度が一度減少したものの、10月上旬にも藍藻由来色素濃度の急激な増加が確認され、7月から10月までの長期間でアオコが観察された (図2.B, C)。10月には水温が20°C以下まで低下しており、7月における藍藻由来色素濃度の増加時とは違う要因が考えられた。降水量の減少は、*Microcystis*属や*Anabaena*属などのアオコ形成藻類に好適な環境を形成することが報告されている (Reichwaldt et al. (2012) , James et al. (2008))。2008年9月の大潟村における降水量は50.0mmであり (図2.B)、平年149.4mmの約1/3と極めて少なかった。そのため、10月の藍藻由来色素濃度の顕著な増加は9月中の少ない降水量が大きな要因であると推察された。

一方で、図には示していないが、アオコが大量発生した8月4日を除いた全て期間で珪藻由来のカロテノイドであるフコキサンチンとジアジノキサンチンが主要色素として定量された。したがって、八郎湖の一次生産者として珪藻類が優占していることが明らかとなった。ケイ酸は珪藻類の増減に直接的に影響し、植物プランクトンの組成に大きな影響を与えることが知られている (Egge et al. (1992))。1997年の調査で、八郎湖の最大流入河川である馬場目川 (平均646百万 $\text{m}^3 \cdot \text{year}^{-1}$) のケイ酸濃度は最大13.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、2番目の流入量である三種川 (平均298百万 $\text{m}^3 \cdot \text{year}^{-1}$) が最大22.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ と高い濃度で流入していることが指摘

されている(高橋, 佐藤(2000))。八郎湖において珪藻類が年間を通して優占していることから珪藻類の増殖に適した環境条件にあると推測された。

2) ミクロシスチン及びミクロシスチン産生株の季節的変動

日本国内で検出されるミクロシスチンは、主としてミクロシスチン-RRとLRであり、YRも少量検出される(Watanabe et al. (1989), Park et al. (1993))。そこで、ミクロシスチン-RR, YR, LRの合計を全ミクロシスチンとして図2.Dに示した。野村港では、10月上旬に最も高い濃度で検出され、全ミクロシスチン濃度が $0.51\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ であった。前述した通り、ミクロシスチンの合成には*mcy*遺伝子群が必須であり、*mcy*遺伝子群を保有していない種はミクロシスチン非産生株となる(Tillet et al. (2000), Tanabe et al. (2007))。藍藻由来色素は7月に増加してアオコが確認されたが(図2.C), 全ミクロシスチンは最大でも $0.02\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ であり、7月中のアオコはミクロシスチン非産生株が主体であることが示唆された。

一方で、*Microcystis aeruginosa* NIES-843株のゲノム中には16S rRNA遺伝子が2コピー、*mcy*遺伝子群が1コピー存在することが明らかとなっている(Kaneko et al. (2007))。そこで、定量PCRによって解析された*Microcystis*属の*mcyB*遺伝子のコピー数を*Microcystis*属有毒株(ミクロシスチン産生株)相当数、16S rRNA遺伝子のコピー数を2で除して全*Microcystis*属相当数と定義し、全*Microcystis*属相当数に占める*Microcystis*属有毒株相当数を図2.Eに示した。アオコ発生期間中においてミクロシスチン産生株の割合は大きく変化し、10月上旬には全*Microcystis*属数の85.6%を占めた。この結果は、湖水中のミクロシスチン濃度の変動とよく一致して

おり(図2.D), ミクロシスチン産生量の指標となり得ることが示された。前述の通り、2008年9月の大瀧村の降水量は平年の1/3程度(50mm)であったが、その80%が9月後半の21日(14.5mm), 25日(15.5mm), 27日(10.0mm)の降水であった(図2.B)。乾燥期後の降水による栄養塩類の流入は、*Microcystis*属無毒株(ミクロシスチン非産生株)よりも*Microcystis*属有毒株(ミクロシスチン産生株)の増殖に有利であることが指摘されており(Reichwaldt et al. (2012), Davis et al. (2009)), 2008年9月から10月の野村港はミクロシスチン産生株の増殖に好適な環境であったことが示唆された。

3) アオコ発生期における藍藻類の変遷

野村港における16S rRNA遺伝子に基づいた藍藻類種組成の変遷を図3に示した。アオコ発生期間中において藍藻類の種組成は大きく変化し、2008年7月には*Anabaena*属が優占種であったが8月後半には*Microcystis*属が優占種になっていることが明らかとなった。その後も*Microcystis*属が優占していたが、再び*Anabaena*属の増加が認められた(図3)。この結果は、林らが2012年に行った顕微鏡観察の結果とも一致した(林ら(2013))。また、*Anabaena*属が優占している7月は水温が 25°C を超えて藍藻由来色素濃度が急激に増加した時期であり(図2.C), *Anabaena*属の好適増殖温度が 25°C であることとも合致する(Imamura et al. (1981))。*Anabaena*属は窒素固定が可能であるが、八郎湖の無機態窒素は湖心においても平均 $0.28\text{mg-N} \cdot \text{L}^{-1}$ と高いため(秋田県(2014)), *Anabaena*属が水温条件を先に満たすことで*Microcystis*属よりも先に増殖していると考えられた。

4. まとめ

秋田県八郎湖におけるミクロシスチンと有害藍藻の季節的変動を明らかにすることを目的として分子生物学的な手法を用いた調査を行った。得られた結果をまとめると以下ようになる。

- 1) 八郎湖では水温が25°C以上に上昇すると藍藻由来色素濃度が急激に増加し、アオコが発生することが確認された。
- 2) 8月以降にミクロシスチン濃度が上昇し、7月に発生したアオコはミクロシスチン非産生株が主体であることが示唆された。
- 3) アオコ発生期間中において藍藻類の種組成

は大きく変化し、7月には*Anabaena*属が優占種であったが8月以降は*Microcystis*属が優占種になっていることが明らかとなった。

また、2)と3)の結果を鑑みると八郎湖のミクロシスチン産生株は*Microcystis*属が主であることが予想される。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり藍藻由来色素の分析には谷幸則准教授（静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科）、16S rRNA遺伝子に基づいた藍藻類の分子系統解析には鈴木英治教授（秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科）にご協力頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

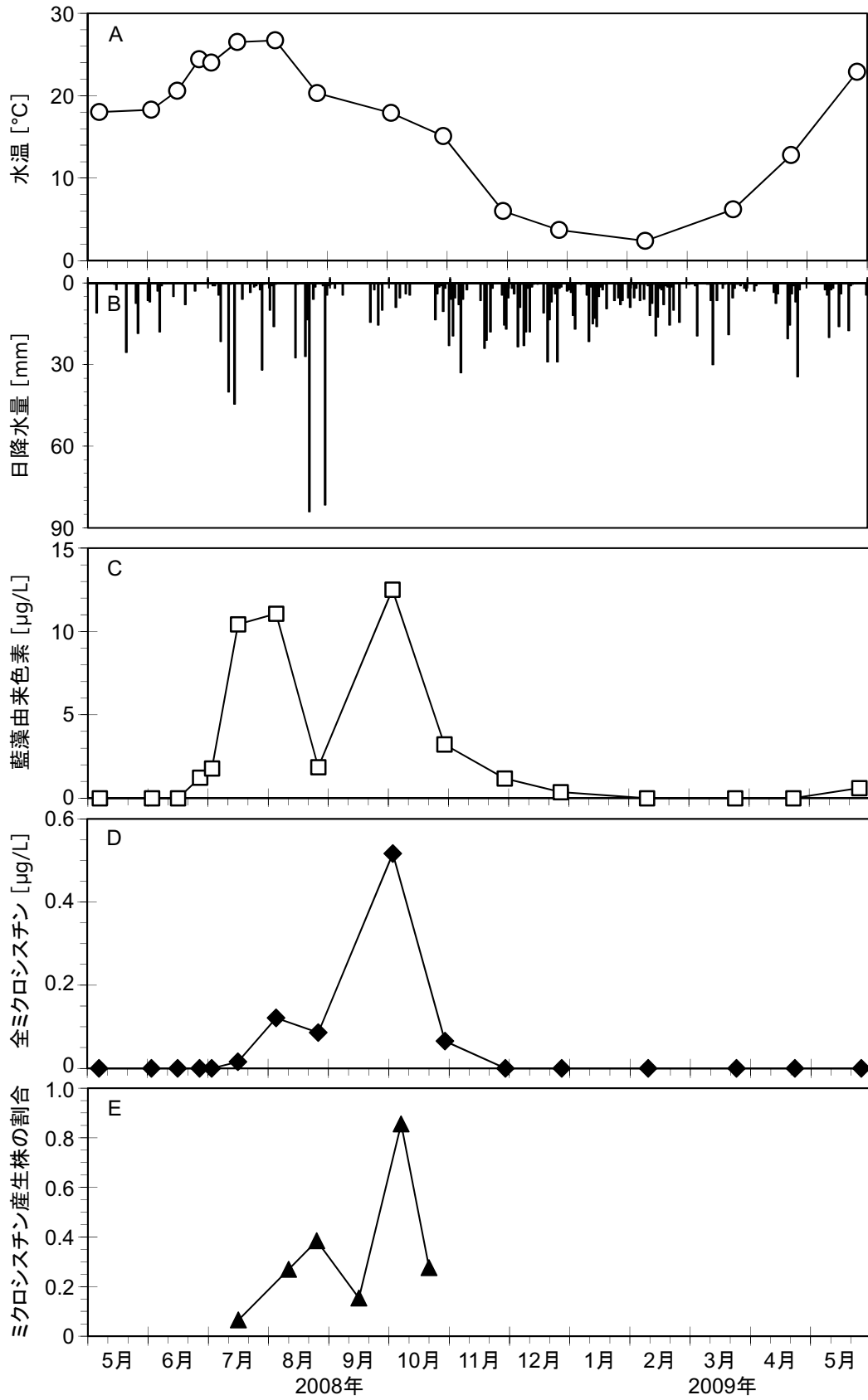


図2. 水温 (A)、日降水量 (B)、藍藻由来色素 (C)、全マイクロシスチン (D)、全*Microcystis*属に占めるマイクロシスチン産生株の割合 (E) の変動

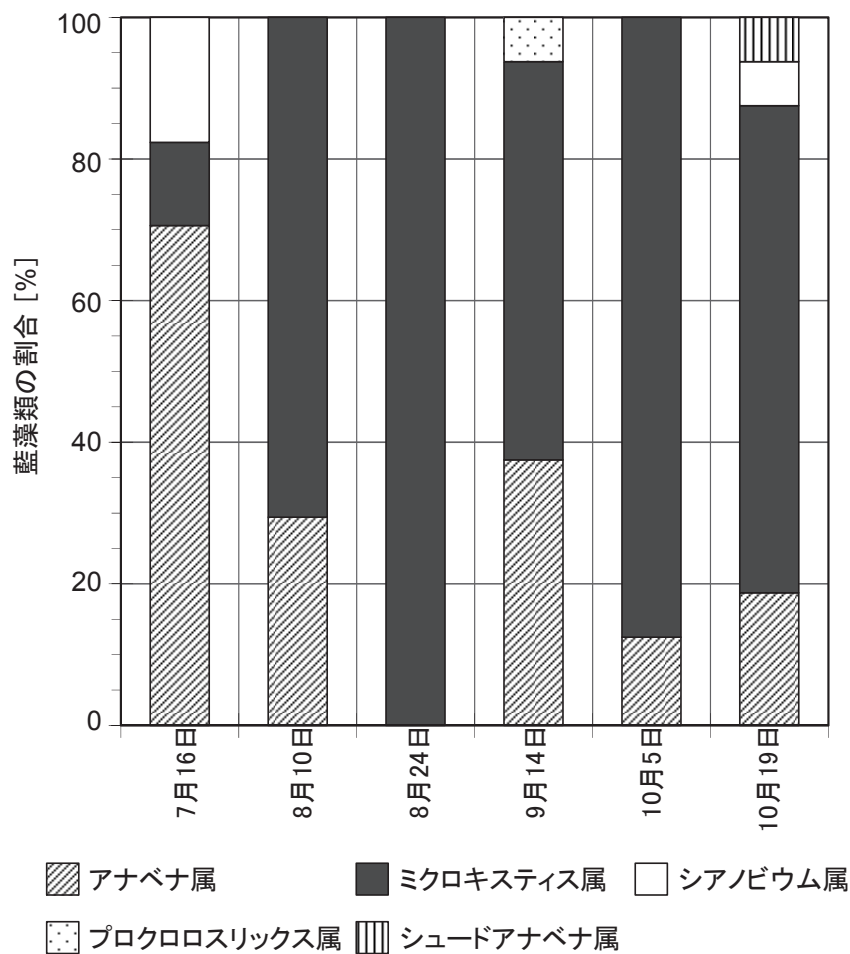


図3. アオコ発生期間中の藍藻類種組成の変遷

引用文献

- 秋田県 (2008) 八郎湖に係る湖沼水質保存計画 (第1期), 16pp.
- 秋田県 (2014) 八郎湖に係る湖沼水質保存計画 (第2期), 16pp.
- 秋田県 (2014) 環境白書 (資料編), 141pp.
- 片野登 (1993) 八郎潟の干拓 (淡水化) に伴う植物プランクトンの変遷, 全国公害研究誌, 18 (1), 28-34
- 近藤正 (2010) 八郎湖の水文・水環境特性の変遷と課題, 水環境学会誌, 33A (9), 292-298.
- 佐々木次郎 (2010) 八郎湖の水質保全対策について, 水環境学会誌, 33A (9), 287-291.
- 高橋正, 佐藤敦 (2000) 秋田県八郎潟干拓地水田のケイ酸肥沃性の現状, 日本土壌肥科学雑誌, 71 (6), 881-883.
- 林紀男, 中野芳雄, 尾崎保夫, 片野登 (2007) 八郎潟調整池 (秋田県) の浮遊微生物相, 秋田自然史研究, 51, 1-7.
- 林紀男, 岡野邦宏, 尾崎保夫 (2013) 八郎湖における浮遊性藍藻類アオコの多様性, 秋田自然史研究, 63, 7-11.
- Briand, E., Escoffier, N., Straub, C., Sabart, M., Quiblier, C. and Humbert, J.F. (2009) Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystisaeruginosa* (cyanobacteria) population,

- ISME Journal*, 3, 419-429.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J. (2009) The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms, *Harmful Algae*, 8 (5) , 715-725.
- Egge, J.K., Aksnes, D.L. (1992) Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition, *Marine Ecology Progress Series*, 83 (2-3) , 281-289.
- Harada, K-I., Matsuura, K., Suzuki, M., Oka, H., Watanabe, M.F., Oishi, S., Dahlem, A.M., Beasley, V.R. and W.W. Carmichael (1988) Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria, *Journal of Chromatography*, 448, 275-283.
- Imamura, N. (1981) Studies on the water bloom in Lake Kasumigaura, *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 21, 652-658.
- James, R.T., Chimney, M.J., Sharfstein, B., Engstrom, D.R., Schottler, S.P., East, T., Jin, K.R. (2008) Hurricane effects on a shallow lake ecosystem, Lake Okeechobee, Florida (USA) , *Fundamental and Applied Limnology*, 172 (4) , 273-287.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (eds) (1997) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, *UNESCO publishing*, 661pp.
- Kaneko, T., Nakajima, N., Okamoto, S., Suzuki, I., Tanabe, Y., Tamaoki, M., Nakamura, Y., Kasai, F., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Ono, A., Shimizu, Y., Takahashi, C., Minami, C., Fujishiro, T., Kohara, M., Katoh, M., Nakazaki, N., Nakayama, S., Yamada, M., Tabata, S. and Watanabe, M.M. (2007) Complete Genomic Structure of the Bloom-forming Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843, *DNA Research*, 14, 247-256.
- Murakami, A., Miyashita, H., Iseki, M., Adachi, K. and Mimuro, M. (2004) Chlorophyll d in an Epiphytic Cyanobacterium of Red Algae, *Science*, 303 (5664) , 1633.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M.M. (1998) Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strain of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence, *FEMS Microbiology Letters*, 172, 15-21.
- Park, H.D., Watanabe, M.F., Harada, K-I., Nagai, H., Suzuki, M., Watanabe, M. and Hayashi, H. (1993) Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters, *Natural Toxins*, 1 (6) , 353-360.
- Reichwaldt, E.S., Ghadouani, A. (2012) Effects of rainfall patterns on toxic cyanobacterial blooms in a changing climate: Between simplistic scenarios and complex dynamics, *Water Research*, 46, 1372-1393.
- Rinta-Kanto, J.M., Ouellette, A.J.A., Boyer, G.L., Twiss, M.R., Bridgeman, T.B. and Wilhelm, D.W. (2005) Quantification of toxic *Microcystis* spp. during the 2003 and 2004 blooms in western Lake Erie using quantitative real-Time PCR, *Environmental Science and Technology*, 39 (11) , 4198-4205.
- Soma, Y., Tanaka, A., Soma, M., Kawai, T. (1996) Photosynthetic pigments and perylene in the sediments of southern basin of Lake Baikal, *Organic Geochemistry*, 24, 553-561.
- Tanabe, Y., Kasai, F. and 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.

- Tani, Y., Kurihara, K., Nara, F., Itoh, N., Soma, M., Soma, Y., Tanaka, A., Yoneda, M., Hirota, M., Shibata, Y. (2002) Temporal changes in the phytoplankton community of the southern basin of Lake Baikal over the last 24,000 years recorded by photosynthetic pigments in a sediment core, *Organic Geochemistry*, 33, 1621-1634.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., Dohren, V.H., Borner, T. Neilan, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystisaeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketidesynthetase system, *Chemistry & Biology*7, 753-764.
- Tsuji, K., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, F.M., Nakazawa, H., Suzuki, M., Uchida, H., Harada, K-I. (1997) Stability of Microcystins from cyanobacteria –iv. effect of chlorination on decomposition, *Toxicon*, 35 (7) 1033-1041.
- Watanabe, F.M., Oishi, S., Harada, K-I., Kawai, H., Suzuki, M. (1988) Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae) , *Toxicon*, 26 (11) , 1017-1025.
- Watanabe, F.M., Harada, K-I., Matsuura, K., Oishi, S., Watanabe, Y., Suzuki, M. (1989) Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species, *Environmental Toxicology*, 4 (4) , 487-497.
- Welker, M. and Döhren V.H. (2006) Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis, *FEMS microbiology reviews*, 30 (4) , 530-563.
- World Health Organization (2006) Guidelines for drinking-water quality. 3rd edition, World Health Organization, 515.