

## 受賞総説

# シアノバクテリアとカルチャーコレクション

渡邊 信

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丁目1-1

## Cyanobacteria and culture collections of microorganisms

Makoto M. Watanabe

Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba  
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

### シアノバクテリア

#### 1) シアノバクテリアとは

原始大気の主成分は二酸化炭素であった。原始地球に海が誕生したことで、大気中の二酸化炭素が海にとけ、空は青く晴れ上がり、太陽光が地球表面にふんだんにふりそそいだと考えられている。太陽光、二酸化炭素及び水を利用して、酸素を発生する光合成生物、シアノバクテリア（藍藻類）が出現した時期については、27億年前、27億年より前、35億年前、38億年前と、意見が分かれる。しかしながら、シアノバクテリアは、光合成による大気中の二酸化炭素の減少と遊離酸素の増加をもたらし、さらに植物の葉緑体の起源となったことについては多くの研究者が一致するところである。今は有毒アオコ形成で環境分野では忌み嫌われている存在であるが、多様な生物が育む地球環境の創成と生命の進化に大きな役割を果たした微生物である。

#### 2) シアノバクテリアの分類をめぐる状況

シアノバクテリアは、植物分野では藍色植物として扱われ、植物命名規約の下で形態的特徴に基づき分類されてきた。これまで認識されてきた種の数はおおよそ1500種類に及ぶ。シアノバクテリアが原核生物であるということから、細菌命名規約の下で純粋培養に基づいて分類すべきであると最初に主張したのは、Stanierらのグループ (Stanier *et al.*, 1971) であった。これをうけて、細菌分類で最も権威のある書 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* の第

8版 (1974) に、シアノバクテリアはどんな細菌であるかが紹介された。さらに *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* と書名があらたまった第9版 (1989) からは、シアノバクテリアは酸素発生型光合成細菌として、属レベルまでの分類同定が可能な形でまとめられている。シアノバクテリアの分類をめぐる、植物分類学者と細菌分類学者の間でかなりの論争があったが、現時点では、正式ではないが、植物学者と細菌学者の間で互いの分類方法を尊重する形でシアノバクテリアの分類を体系化していくこととなっている。少なくとも、シアノバクテリアの分類は、形態学的特徴のみならず、生理学的・生化学的形質、遺伝的形質を踏まえた多相的分類手法 (Polyphasic taxonomy) によることについては、双方が理解するところであった。しかし、最近のシアノバクテリアの分類・系統に係わる研究のほとんどは、形態とDNAに基づく系統の比較検討だけにとどまっており、生態学的適応に重要な生理学的・生化学的形質についてはほとんど無視されている状況である。

#### 3) アオコの分類に適用した細菌学的分類

富栄養湖沼でアオコを形成するシアノバクテリアである *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* や *Cylindrospermopsis* 等については、筆者と大学院生であった大塚博士 (現東大講師)、須田博士 (現琉球大教授)、李博士 (現中国科学院水生生物研究所教授)、Chonudomkul博士 (現カセート大学助手) とともに形態、生理・生化学的、遺伝的特性 (分子系統も含む) を解析し、それに基づく新たな分類を提唱してきた。特にアオコを形成する *Microcystis* については、

E-mail: makoto@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

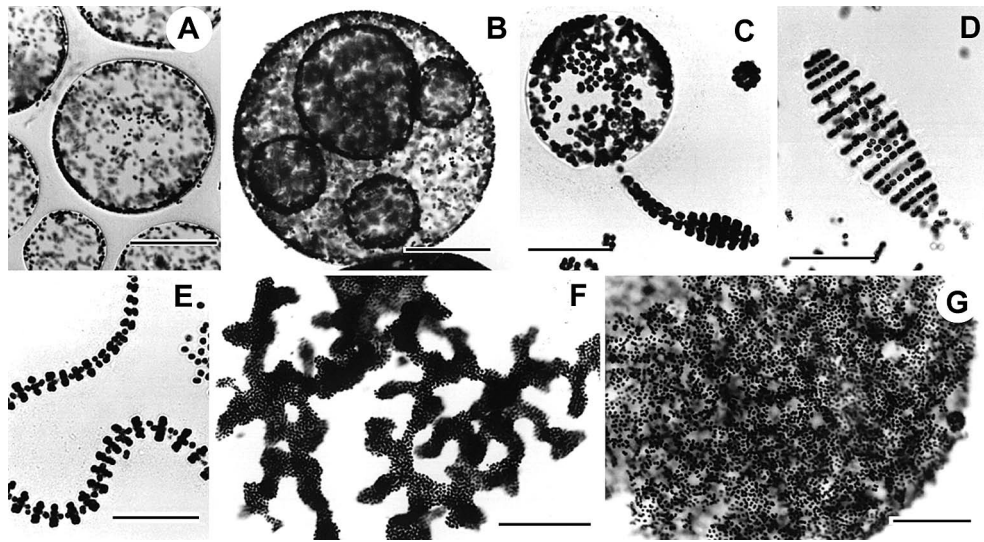


図1 クローン培養下での *Microcystis wesenbergii* のコロニー形態の変化

A, B: 典型的な *M. wesenbergii*, C, D: コロニーから派生した縞状に配列した細胞からなる楕円形のコロニー, E: 背骨状コロニー, F: *M. aeruginosa* 状コロニー, G: *M. ichthioblabe* 状コロニー, スケールバー: A, B, F, G は 100  $\mu\text{m}$ , C, D, E は 50  $\mu\text{m}$  (Otsuka *et al.*, 2000)

植物分類ではコロニーの形態的特性から5形態種 (*M. aeruginosa*, *M. ichthioblabe*, *M. novaceki*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*) が認識されていたが、コロニー形態はクローン内でも種を限定する形態を越えた変異を示すこと (図1), 生理学的・生化学的特性 (脂肪酸組成, 色素組成, 温度特性, 塩分特性, 従属栄養性・光従属栄養性等), 遺伝的特性 (GC 含量, 16S rDNA や7種のハウスキーピング遺伝子による MLST, DNA-DNA ハイブリダイゼーション) で形態種間の差異は認められなかったことから (Otsuka *et al.*, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b, 2000), 同一種と結論し, *M. aeruginosa* に統一した (Otsuka *et al.*, 2001). これは細菌分類, 植物分類の双方に大きな波紋をもたらした. 細菌分類では, 基本的には我々の結論に同意しつつ, *Microcystis* という属名がまだ細菌分類では認証されていないということから, 正式に認めるところまでにはいたっていない. さらに植物分類では, あくまでも形態に固執しており, 最近になってようやく *M. aeruginosa*, *M. ichthioblabe*, *M. novaceki* は同一種であると認めてきているが, *M. viridis* や *M. wesenbergii* については別種とする植物分類学者もまだ存在する. また, これら5形態種を1種に統合するという結論に基本的には非の打ちどころがないとしたり, さらにその結論をサポートするデータが得られたりしても, 「さみしい」とか「生態学者が困るだろう」とかいう理由で, 従来のままでいくとする不思議な植物分類学者も現れ

てきている. 一方, アオコを形成するユレモである *Planktothrix* については, 同様の多相的分類手法により, 4属6種に分類した (Suda *et al.*, 2002). これは植物分類学者による形態的分類とかなりの点で対応していたことから, 植物分類学者により非常に好意的に受け入れられ, 採用されてきている. また, 細菌分類では, *Microcystis* の時と同様に基本的には我々の結論に同意しつつ, 属名がまだ細菌分類では認証されていないということから, すべてを正式に認めるところまでにはいたっていない. *Anabaena* や *Cylindrospermopsis* については省略するが, 詳細は共同研究者との論文を参照されたい (Li *et al.*, 1997, 1998, 2000; Li & Watanabe, 2001a, 2001b, 2002; Chonudomkul *et al.*, 2004).

#### 4) シアノバクテリアの遺伝的多様性—集団遺伝学研究

富栄養湖沼でアオコを形成する *Microcystis aeruginosa* は毒素ミクロシチンを産生する. この毒素産生に係わる遺伝子群は *mcyA* ~ *mcyJ* の10の遺伝子からなる. シアノバクテリアの系統を俯瞰的にみると *mcyA* 遺伝子系統樹と系統のマーカー遺伝子である16S rRNA 遺伝子系統が一致していたことから, *mcyA* 遺伝子はシアノバクテリアの進化とともに共進化し, 同遺伝子の獲得と喪失が何度か起きたとされている. *Microcystis aeruginosa* 集団においては, 個体の遺伝的分化の過程で, *mcyA* 遺伝子の獲得と喪失が起きていることが示唆されているが, *mcyA* 系統樹と

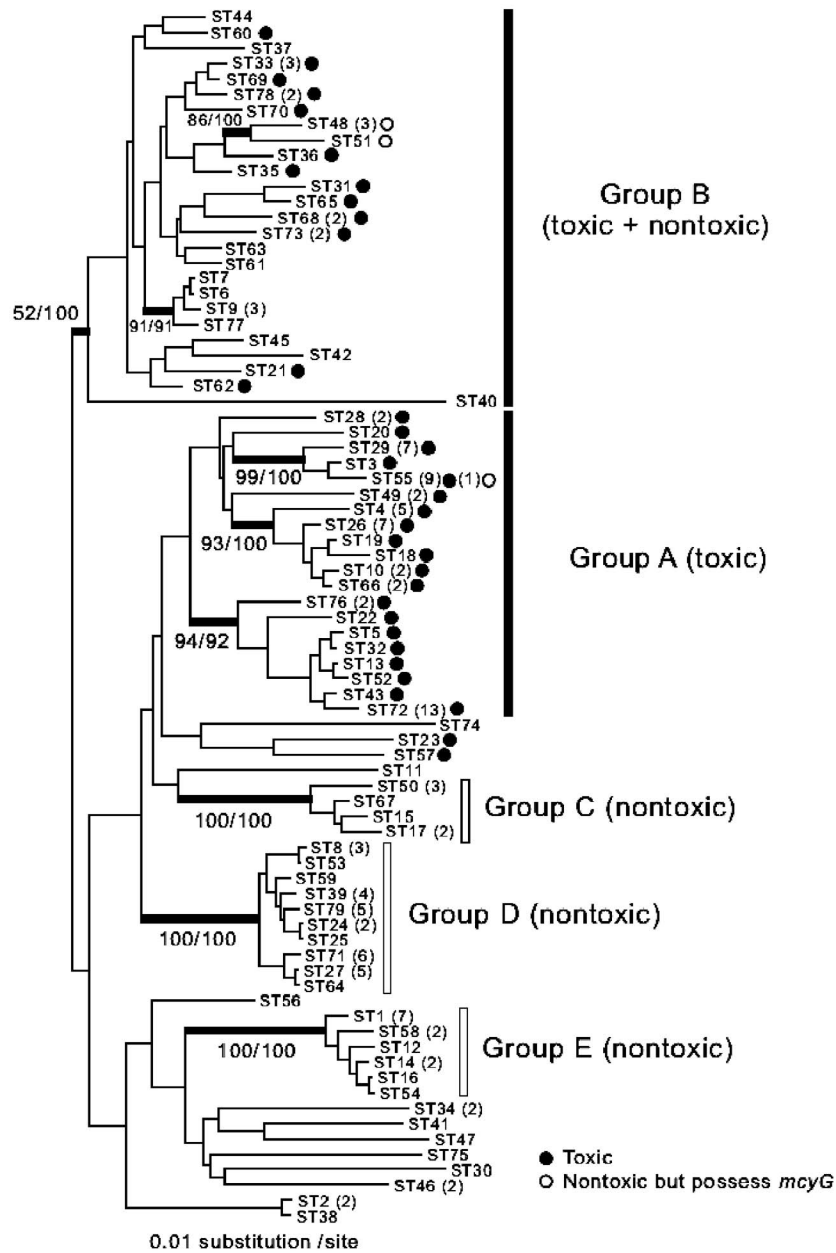


図2 *Microcystis aeruginosa* の遺伝的系統

系統マーカーである *pcy* 遺伝子系統樹が一致せず、*mcyA* 遺伝子の水平移動が示唆されている。さらに田辺博士（現国立環境研究所ポストドクフェロー）との共同研究により、*mcyA*、*mcyB*、*mcyD*、*mcyG* の詳細な解析から、自然界で *mcyA* の組み換えが起きていること、これらの4つの遺伝子間でも組み換えが起きていることが示唆された（Tanabe *et al.*, 2004）。さらに7つのハウスキーピング遺伝子のMLST解析により、日本国内の *M. aeruginosa* の遺伝的多様性は、

Nei (1987) の指数で0.982と、他の生物（人間0.195、*Enterococcus* 0.60）と比べて異常に高い。これは同一湖沼内でもそうであった（0.667-0.904）。*M. aeruginosa* は、MLSTに基づく系統解析で、大きく5グループ（A-E）に分かれ、さらにグループAは、それぞれ3つ程度のサブグループに分かれる傾向がみられた（図2）（Tanabe *et al.*, 2007）。それぞれのグループについて、クローン繁殖かパンミクサ（自由組み換え交雑）繁殖かを統計的解析から調べたところ、すべ

でのグループがクローン繁殖戦略をもっていることが判明した。また、グループ A は毒素遺伝子をもつ培養株、グループ B は毒素遺伝子をもつ株ともたない株、他のグループは毒素遺伝子をもたない株で構成されることがわかってきている。

## カルチャーコレクション (CC)

### 1) バイオリソースをめぐる情勢

ライフサイエンスやバイオテクノロジーにおけるゲノム解析の急激な進展に伴い、様々な遺伝子配列の決定や遺伝子機能に関連する分析が行われたゲノム数は増加の一途をたどり、それらについての知識は急速に深まってきている。「目的に応じて遺伝子機能を選択し、自在に組み合わせて利用する」といった方法も決して非現実的でないものとなりつつある。反面、機能的未知の遺伝子の数も急速に増加していることから、ポストゲノムというライフサイエンス及びバイオテクノロジーの新たな挑戦に向けて、活動の幅を広げることが求められている。こうした観点から、環境保全やエネルギー確保、健康や食糧確保、発酵・醸造、鉱工業などの広範な応用分野において、生物及び遺伝子の新たな用途の開発が急速に進んでおり、生物や遺伝子に対する需要は急速に増大している。特に微生物、動植物細胞、DNA、ウイルス、胚などのバイオリソースは、その多様性によって新しいライフサイエンスの研究対象となってきており、21世紀時代の先導的な研究を進展させるために必須の要件であると考えられている。OECDでは「生物資源センター (BRC) — 生命科学とバイオテクノロジーの未来を支えるために」の勧告が2001年3月になされた。日本では第2期科学技術基本計画 (閣議決定2001) 及びそれに基づく分野別推進戦略ライフサイエンス (総合科学技術会議2001) でバイオリソースの充実が謳われ、第3期科学技術基本計画 (閣議決定2006) とそれに基づく分野別推進戦略ライフサイエンス (総合科学技術会議2006) でも踏襲されている。

### 2) JSCC の先導的活動：カルチャーコレクションからバイオリソースへ

昭和の最後の年である63年、日本微生物株保存連盟会誌第4巻2号に「保存学論：保存を保存学として体系化させるための方策的課題」と題し、主に下記のような提案をおこなった。

- ・日本微生物株保存連盟から日本微生物保存学会へ — JFCC 総会に一般講演を！
- ・日本でのメインバンクの設立と各機関の CC との

### ネットワーク構築の必要性

- ・保存研究者の処遇上の問題
- ・人材交流の活発化：JFCC 機関連絡会議の改革
- ・遺伝子資源の確保方策の実行を科学技術庁へ要求

JSCC (当時 JFCC) では、この提案をしっかりと受けとめ、多くの会員が実現にむけて多大な努力を行い、提案のほとんどを実現させるにいたっている。日本微生物株保存連盟は日本微生物資源学会 (JSCC) へ発展し、そこにはカルチャーコレクション委員会と実務担当者会議、一般講演、学会賞等が設けられた。また、理化学研究所が中核となって、当時培養生物部長であった中瀬博士をリーダーとして推進された科学技術振興調整費「アジア微生物研究ネットワーク」において、アジア地域における基礎・応用微生物研究と CC のネットワークが構築された。現在、CC のネットワークは NBRC (製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門) と国立環境研究所によって一層の展開が図られている。1999年には、JSCC での討議を経て、「これからのカルチャーコレクションの基本的あり方に対する日本微生物資源学会の提言」として「我が国における中核的生物資源センター設立に関する提言」を作成し、日本学術会議の報告書としてまとめ上げることができた。2004年には ICCO-10 をつくばで開催することができ、1回目と同様に、参加者全員に大きな感動をもたらし、いつまでも記憶に残る大会となった (図3)。

特に、1999年7月、JSCC 会員の検討を基にまとめ上げた「我が国における中核的生物資源センター設立に関する提言」は、第2期科学技術基本計画で謳われた「バイオリソースの充実」、製品評価技術基盤機構における NBRC の設立、理化学研究所におけるバイオリソースセンターの設立や文部科学省でのナショナルバイオリソースプロジェクトを産み出し、日本におけるバイオリソースの先導的役割を果たしたといえる。しかし、微生物資源に関するカルチャーコレクションが100年の歴史を誇る日本は、生物資源保存機関の予算や人材確保、インフラ整備の面では、欧米や韓国、中国と比較してまだまだ劣っている。大学では、カルチャーコレクションにとって重要な分類学、培養保存学の研究者を養成する研究室が極めて少なくなっていること等解決すべき課題は多い。

### 3) 国立環境研究所微生物系統保存施設

国立環境研究所 (NIES) がまだ国立公害研究所と名乗っていた1983年に、環境微生物の培養株を収集、保存及び提供することを目的とした微生物系統保存施設が設立された。水域の富栄養化に伴い発生する赤潮



図3 大きな感動をもたらしたICCC-10 (2004年10月, つくばで)

やアオコが大きな環境問題であることや日本では微細藻類のカルチャーコレクションの整備が遅れていることから、微細藻類を中心とした微生物系統保存施設 (NIES-Collection) として立ち上げた。1985年に262の藻類株を掲載したリスト第1版を刊行したが、その後、藻類株数は着実に増加し、2006年度末には2000を超える株数となり、テキサス大学や英国CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) と並ぶ藻類株数を有し、施設も1983年当時2階建て800 m<sup>2</sup>だったものが、2002年に1400 m<sup>2</sup>が増築され、総面積2200 m<sup>2</sup>の世界最大の藻類バイオリソースセンターとなった。NIESに保存されている藻類株は、独自のものが90%以上もあり、CCAPやテキサス大学 (50~65%程度) と比較して、独自性が高いのも特徴である。さらに2002年度から開始された文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて藻類の中核機関となり、第1期が終了した2006年度にはプロジェクトの数値目標であった3600の藻類株を収集・保存を達成し、東大・分生研に保存されていた藻類株もNIESに移管され、海藻類を含む藻類株情報も一元管理され、名実ともに日本における中核的藻類保存機関となった。現在、笠井文絵博士 (国立環境研究所生物圏環境研究領域微生物生態研究室長) をリーダーとして第二期に入っている。

NIESが藻類保存をはじめた時に、保有株を第三者へ分与することを禁ずるとした時、多くの海外の保存機関からクレームがついたことを思い出す。しかし、クレームには真っ向から反論し、方針を曲げることなく、継続してきた結果、現在では多くのバイオリソース機関が知財権の問題を取り上げ、第三者への分与を

認めている機関は圧倒的に少数派となっている。パソコンによる培養株管理システムをいち早く取り入れたのもNIESである。培養株の利用件数も増え、品質の点でも評判は高い。2003年に藻類のバイオリソース機関として産まれて、今年度で25年となる。継続性、信頼性、先導性を発足当時からもっていた数少ない保存機関のひとつといえよう。

これから重要なことは、この継続性、信頼性及び先導性をより形にみえるように発信し、一層の発展をとげていくことといえる。

## 謝 辞

「シアノバクテリアの分類学的研究と日本における微生物系統保存事業の基盤構築」で日本微生物資源学会学会賞を受賞できたことは、多くの方との共同研究・事業とJSCCメンバーからの協力・サポートがあったからこそである。若いころに臆面もなく「保存学」を提案した時に、真っ向からうけとめていただき、その実現のために多大な労をとっていただいた元JFCC会長の故長谷川武治先生、駒形和男先生、故飯島貞二先生、山里一英先生、中瀬 崇先生に深謝いたします。また、私が会長時代に理事として、JSCCの発展のために努力していただきました多くのメンバーに感謝いたします。NIESの藻類保存がこのように発展したことはひとえに笠井博士をはじめとした広木博士、河地博士、恵良田博士、森さん、湯本さん、佐藤さん、石本さん他多くのスタッフの努力による。彼らの支えがあったからこそ、カルチャーコレクション分野での渡邊の存在があった。深く感謝の意を表す。シアノバクテリアの研究では、彼谷邦光博士 (東北大学教授)、佐野友春博士 (国立環境研究所主任研究員)、大塚重人博士 (現東大講師)、須田彰一郎博士 (現琉球大学教授)、李 仁輝博士 (現中国科学院水生生物研究所教授)、Duenrut Chonudomkul博士 (現カセタート大学助手)、田辺雄彦博士 (現国立環境研究所ポストドクフェロー) との共同研究により多くの成果を得ることができた。深く感謝いたします。大学院時代に東大応微研にて藻類の培養と種生物学の指導を受けた故市村輝宜先生 (元北海道大学教授) に感謝するとともに、昨年の突然の死に対して深い哀悼の辞を表します。最後にこれまでの研究生生活を支えてくれた妻の努力に満腔の敬意を表するとともに、大きな感謝を申し上げます。

## 文 献

Chonudomkul, D., Yongmanichai, W., Theeragool, G.,

- Kawachi, M., Kasai, F., Kaya, K. & Watanabe, M.M. (2004). Morphology, genetic diversity, temperature tolerance and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) strains from Thailand and Japan. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**: 345-355.
- Li, R., Watanabe, M. & Watanabe, M.M. (1997). Akinete formation in planktonic *Anabaena* spp. (Cyanobacteria) by treatment with low temperature. *J. Phycol.* **33**: 576-584.
- Li, R., Yokota, A., Sugiyama, J., Watanabe, M., Hiroki, M. & Watanabe, M.M. (1998). Chemotaxonomy of planktonic cyanobacteria based on nonpolar and 3-hydroxy fatty acid composition. *Phycol. Res.* **46** (1): 21-28.
- Li, R., Watanabe, M. & Watanabe, M.M. (2000). Taxonomic studies of planktonic species of *Anabaena* based on morphological characteristics in cultured strains. *Hydrobiol.* **438**: 117-138.
- Li, R. & Watanabe, M.M. (2001a). Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) with straight trichomes. *Phytochem.* **57**: 721-731.
- Li, R. & Watanabe, M.M. (2001b). Physiological properties of planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) and their taxonomic value at species level. *Algol. Stud.* **103**: 31-45.
- Li, R. & Watanabe, M.M. (2002). DNA base composition of planktonic species of *Anabaena* (Cyanobacteria) and its taxonomic value. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**: 77-82.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia University Press, New York.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Hiroki, M., Mahakhant, A., Liu, Y., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1998a). Phycoerythrin-containing *Microcystis* isolated from P.R. China and Thailand. *Phycol. Res.* **46** (Suppl.): 45-50.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1998b). 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Letters* **164**: 119-124.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1999a). Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequences. *FEMS Microbiol. Letters* **172**: 15-21.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (1999b). Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycol. Res.* **47**: 189-197.
- Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. & Watanabe, M.M. (2000). Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**: 39-50.
- 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. Sys. Evol. Microbiol.* **51**: 873-879.
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakhant, A., Yongmanitchai, W., Noparatnaraporn, N., Liu, Y. & Day, J.D. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **52**: 1577-1595.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M.M. (2004). Evidence for recombination in the microcystins synthetase (*mcy*) genes of the 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.