

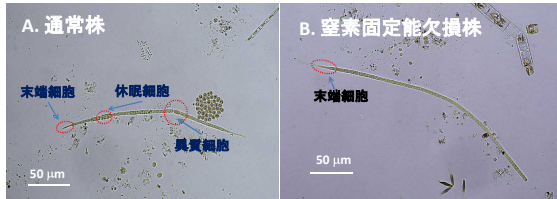
神経毒を生産する糸状シアノバクテリア *Cuspidothrix issatschenkoii*のゲノム特性

湖沼環境研究室 程木義邦

研究の概要

*Cuspidothrix issatschenkoii*は温帯および亜熱帯域に広く分布しているネンジュモ目のシアノバクテリアで、日本でも富栄養化した湖沼で頻繁に出現し、西浦や北浦でも出現頻度の高い植物プランクトンに分類されます。また、本種は神経毒のアナトキシン-aおよびホモアナトキシン-aを生産する系統を持ち、日本に分布する淡水産の有毒シアノバクテリアとして2番目に出現頻度が高いです。本研究では日本で単離された本種のゲノム決定を行い、海外で単離・ゲノムが決定されている株と比較を行いました。その結果、今回ゲノム決定を行ったRM-6株はのゲノムサイズは約4.7 Mbpで、チェコ共和国とポルトガルで単離された1株の中間的なゲノムサイズでした。また、RM-6のゲノムから多くのトランスポゾンに関する遺伝子が検出されました。本種は、シアノトキシンの生産能だけでなく、ネンジュモ目の中では唯一、単一種内で窒素固定能を有する系統と欠損した系統がみられます。この様な遺伝的特性が本種の系統や毒生産能などの機能の多様性に関係していることが考えられました。

*Cuspidothrix issatschenkoii*の形態と系統 (syn. *Aphanizomenon issatschenkoii*)



ヘテロサイトおよびアキネートを持ち、末端の細胞が段階的に細くなり、毛状になる。日本では、1976年に豊ヶ浦で記載(渡辺1985)。それ以外の記載はほとんどない

写真. *Cuspidothrix issatschenkoii*の通常株(A)および窒素固定能欠損株(B)日本で報告されている有毒株はBの窒素固定能が欠損しているタイプが多い。

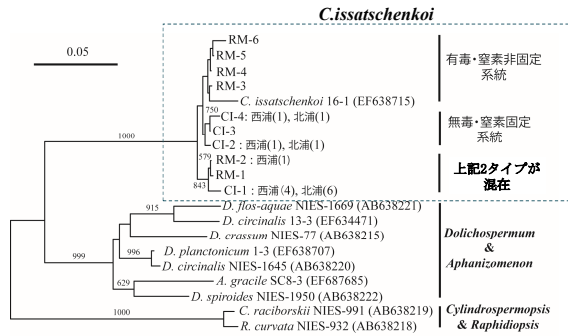


図1. 16S-23S ITS領域に基づいた*Cuspidothrix issatschenkoii*の分子系統樹。西浦と北浦からは本種の無毒株と有毒株が単離されている。

*C. issatschenkoii*のゲノムマップと 日本で単離された株の特性

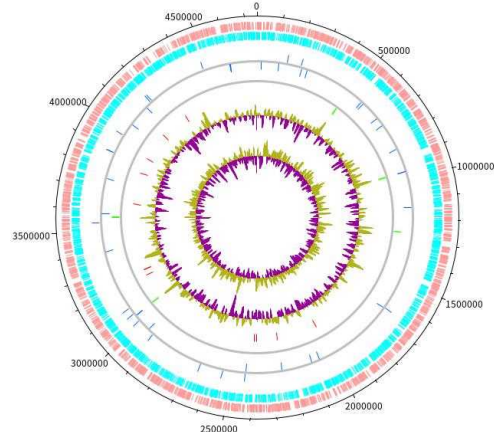


図3. *C. issatschenkoii* RM-6の環状ゲノムマップ。内側より、GC plot, GC skew, CRISPER, rRNA (reverse and forward), tRNA (reverse and forward), CDS (reverse and forward)を示す。

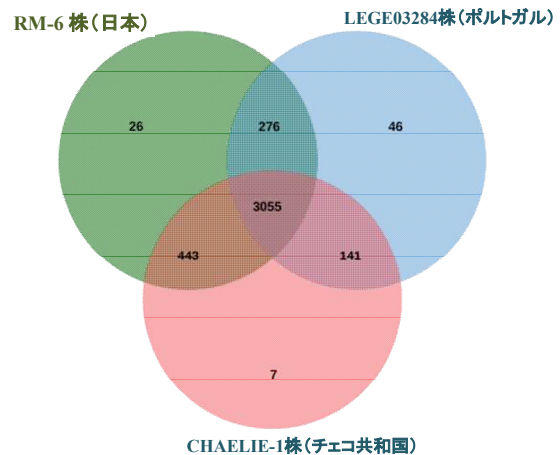


図4. *C. issatschenkoii* 3株のコーディング領域のベン図。日本で単離されたRM-6株は26の固有の遺伝子を持ち、その多くはトランスポゾンに関する遺伝子であった。

北浦における現存量の季節変化

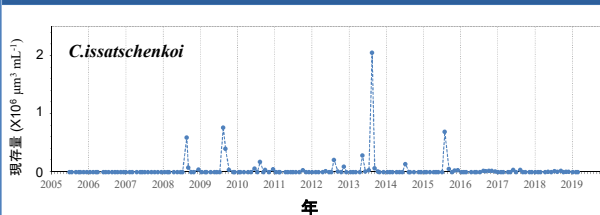


図2. 北浦における*Cuspidothrix issatschenkoii*現存量の季節変化。本種は6月~10月に出現し、8月に現存量が最大となることが多い。

培養とゲノム解析方法

○*C. issatschenkoii*の単離培養

*C. issatschenkoii*の培養株は、これまで、西浦や北浦、琵琶湖などから得られています。本研究では、RM-6株を持ちいてゲノム解析を行いました。培養はCT培地を用い、20°C、30 μmol m⁻² s⁻¹の条件で培養を行いました。

○培養株の洗浄とDNA抽出

RM-6株には従属栄養細菌が含まれていたため、DNA抽出前にリゾチーム、TWEEN-80、ドデシル硫酸ナトリウム溶液等で処理した後、滅菌培地で洗浄することにより、従属栄養細菌を可能な限り除去しました。DNAは改変CTAB法によって抽出を行いました。

○ゲノム配列の決定

遺伝子配列の決定は、HiSeq (illumina) によるショートリード解析とGridION (Oxford Nanopore Technologies) によるロングリード解析を組み合わせて行いました。まず、単一の環状ゲノムを得るため、最初にFlye (4) によってロングリード解析結果の*de novo*アセンブリを行いました。その後、ショートリード解析の配列を使用し、Pilon (5) によって配列の修正を行いました。その結果、4,748,695 bpの単一の環状ゲノムが得られました。

RM-6株のゲノム概要

RM-6株のゲノムから、47個のtRNA遺伝子および5セットのrRNA遺伝子を含む4,328個のコード配列(CDS)が確認されました。ゲノムのG+C含量は37.7%でCRISPERの数は12個検出されました。また、二次代謝産物生成遺伝子として、ホモアナトキシン-a、ランチジン、シアノバクチン合成遺伝子を持つことが明らかとなりました。一方、チェコ共和国で単離された株から報告されたカスベリン遺伝子は検出されませんでした。また、RM-6株から窒素固定に関わる遺伝子も検出されませんでした。これまでゲノム情報が明らかになっている3株は、それぞれ異なるシアノトキシン合成遺伝子を持つことも明らかとなりました。

引用文献

- Baltz A, Scherer PI, Wood SA. 2018. Variability in the anatoxin gene clusters of *Cuspidothrix issatschenkoii* from Germany, New Zealand, China and Japan. *PLoS One* 13:e0200774.
- Hodoki Y, Ohbayashi K, Kobayashi Y, Okuda N, Nakano S. 2013. Anatoxin-a-producing *Raphidiopsis mediterranea* Skuja var. *grandis* Hill is one ecotype of non-heterocystous *Cuspidothrix issatschenkoii* (Usacev) Rajaniemi et al. in Japanese lakes. *Harmful Algae* 21-22: 44-53.
- Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner P. 2019. Assembly of Long Error-Prone Reads Using Repeat Graphs. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/s41587-019-0072-8
- Walker BJ, Abed T, Shen T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM. 2014. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* 9(11):e112963.
- Seeman T. 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30(14):2068-2069.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, Medema MH, Weber T. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* doi: 10.1093/nar/gz210.
- Kisti A, Mares J, Jekela J, Urnjak P, Hajek J, Saurav K, Vranicová K, Fewer DP, Rajaniemi E, Perni P, Roshkova K, Sivonen K, Hrouzek P. 2018. Discovery of a plecterin family compound in a non-symbiotic bloom-forming cyanobacterium. *ACS Chem Biol* 13:1123-1129.