

田辺雄彦：有毒アオコを形成するラン藻 *Microcystis aeruginosa* の集団遺伝学～遺伝子の変異パターンから何が読み取れるか？

生物の種内の遺伝的変異は、突然変異 (mutation), 組み換え (recombination), 移住 (migration), 遺伝的浮動 (genetic drift), 淘汰 (selection) の主に5つの進化力 (evolutionary force) の作用を受けて時間とともに変化していく。その結果として、短期的には種内集団の分化が起こり、より長期的には種分化が起こる。このメカニズムはバクテリアから高等動物に至るまで、いかなる生物種においても基本的には変わらない。しかしながら、バクテリアには高等動物と大きく異なる点がある。有性生殖の不在、及びそれに付随する毎世代ごとの遺伝子の組み換えの不在である。その一方で、バクテリアにはベクターを介した遺伝子水平移動機構が広く存在する。このメカニズムも有性生殖同様に組み換えを引き起こすが、ドナー個体からレシピエント個体へと一方向的である点、一度に起こる組み換えの規模が小さい (数百 bp ~) という点、頻度は低いものの系統的に離れた別種個体とも組み換えを起こすという点、などで有性生殖と異なっている。このような相違のため、バクテリアは前述の5つの進化力のうちの1つ、組み換えの遺伝的変異への影響が、毎世代ごとに組み換えが起こる高等動物とはかなり異なったものになっている可能性がある。事実、PCR法とシーケンス技術の発達により大量に遺伝子配列を決定することが容易になった1990年代初頭以降、この問題は多くの研究者の関心を集め、バクテリア特有の遺伝様式に即した methodology が開発されると共に、これを利用することによって様々な種類のバクテリア自然集団における組み換えの影響が調べられている。本総説では、前述の5つの進化力の中の一つである組み換

えに焦点を絞り、これについて初めにこれまでバクテリアの分子集団遺伝学的研究によって得られた知見を解説し、次に筆者らが行っている有毒ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の組み換えと遺伝構造を扱った研究を紹介したい。

バクテリア集団解析の手法～Multilocus sequence typing (MLST)

分子集団遺伝学研究に際してまず必要なことは、適切なマーカーの選択である。他の生物種がそうであったように、古くはバクテリアの種内変異の解析に用いられた主要なマーカーは、複数 (通常は十数個以上) の酵素の電気泳動パターンを調べる (Multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) というものであった。この手法は安価で大量にサンプルを処理できるという利点の反面、酵素の電気泳動パターンを変化させるような突然変異しか検出できないという潜在的な欠点があった。事実、後のDNA配列による解析の結果から、多くの重要な突然変異が見逃されていたことが明らかになり、DNAシーケンス技術のローコスト・ハイスループット化と相まって、その主役の座をDNA配列を利用する手法に譲ることとなった。また、DNA配列情報はデータベースを通じて研究者間で共有可能なため、MLEEのもう一つの欠点であった「異なるラボで得られたデータ同士を比較することができない」というネックも同時に解消された。現在の主流は、実質MLEEのDNA配列版であるMultilocus sequence typing (MLST) である。MLSTは、ゲノムに散在する複数 (推奨は経験則により7つとされている、この

PCRによりマーカー遺伝子 (推奨は7つのハウスキーピング遺伝子座) を取得し、DNA配列を決定する

ftsZ, glnA, gltX, gyrB, pgi, recA, tpi

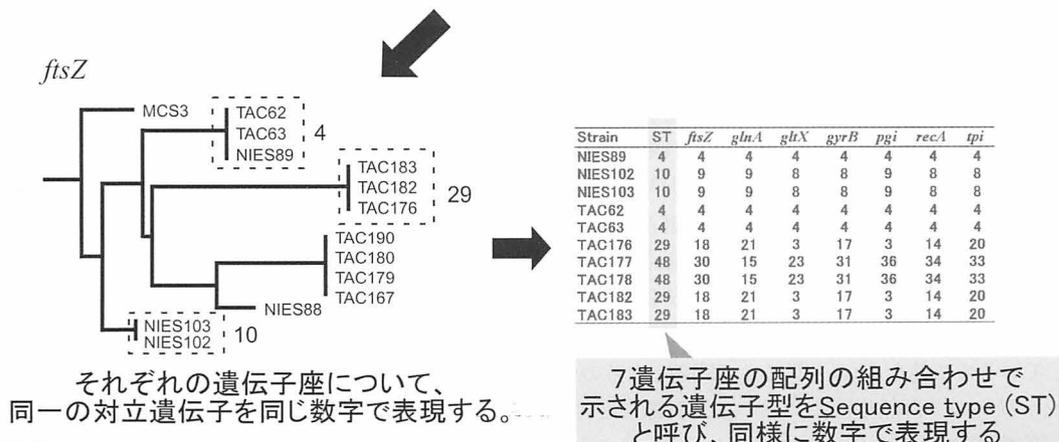


図1 MLSTの手順。

数は MLEE に必要な遺伝子座の半分以下である) のハウスキープ遺伝子座, それぞれ 450 bp 程度の DNA 配列をマーカーとするというものである (Maiden *et al.* 1998)。本手法について説明をすると以下になる。まず各個体について, それぞれの遺伝子座を PCR で取得した後, DNA 配列を決定し, その結果から各対立遺伝子に配列の同一性のみに基づいて数字を割り当てる (同じ配列の対立遺伝子は同じ数字で表す, 数値の近さと配列の近縁性は全く無関係)。この結果, 一個体の遺伝子型は 7 つ (これは解析した遺伝子座の数に相当する) の数字の組み合わせによって決定されることになる。この複数の遺伝子座の組み合わせによる遺伝子型のことを Sequence Type (ST) と称し, この ST に対してもその組み合わせの同一性のみに基づいて数字を割り当てる。この結果, 例えば X 株の遺伝子型は ST22 である, というように, 各個体の遺伝子型が数値で表現される。図 1 に以上の手順の概略を示す。MLST がバクテリア集団解析の主流となっている背景には, バクテリアは真核生物に比べて一般に種内の遺伝的変異量が大きく, タンパクをコードする遺伝子の DNA 配列情報が幾つか得られれば, それで十分に個体識別が可能である, という経験的な事実がある。実際, MLST で集団レベルの解析はほぼ足りているが, 疫学的な興味等から更に詳細な個体識別を行う必要に迫られた場合は, ハウスキープ遺伝子より高変異性であることが知られている, variable number of tandem repeat (VNTR) と呼ばれる繰り返し配列, 細胞壁・膜系のタンパク (cell surface-associated protein), 病原性遺伝子 (virulence gene) などを付加的に用いる場合もある。現在, MLST は英国の Imperial College がホストになって web データベース化されており, 世界中のあらゆる研究者が様々な微生物種の MLST データを簡単に利用できるようなシステムとして提供されている (<http://www.mlst.net/>)。この web サイトは最近さらに改良され, Google Maps/Google Earth とのカップリングによって, 遺伝子型 (ST) の分布を地図上に載せ, どの地域にどの遺伝子型がどの程度分布しているか, などの情報を俯瞰的に見られるような工夫がなされている。

クローンかランダム交配か? ~バクテリアの遺伝構造

バクテリアは分裂によって無性的に増殖するため, 娘細胞には親細胞のゲノムのコピーがそのまま伝わる。このため, 組み換えが起こらない限り, バクテリアの種内集団は遺伝的に均一な一つ, 或いは少数のクローンで構成されるはずである (クローナル・モデル)。このモデルの下では, 各クローン間の遺伝的な差異は, 全て突然変異の蓄積に由来すると考えられる。しかしながら, 実際にはバクテリアにおいても, プラスミドやファージ等の染色体外遺伝因子の遺伝子水平移動を介して組み換えを引き起こす機構が存在することは古くから知られているところである。(例えば, 分子生物学研究において, あるバクテリアの遺伝子をノック・アウトする際に用いられる方法の一つは, この組み換えを利用しているのに他ならない。) ここで問題となるのは, 組み換えがバクテリアの「自然集団」において, 実際にどの程度作用し, 遺伝的変異に影響を及ぼしているか? ということである。この問題に取り組むため, Smith *et al.* (1993) はゲノム中

の複数のマーカー遺伝子座の連鎖不平衡 (遺伝子座間の対立遺伝子の組み合わせがランダムではなく, 連鎖が見られる状況のこと) の程度を定量化する指数 (I_A , index of association) によって, バクテリアの自然集団における組み換えの影響を評価する方法を提案した。この指数 I_A は, 「集団内で組み換えが起こると, 個体間で遺伝子が混ざりあうために, クローン増殖の場合に比べて相対的に個体間の遺伝距離が小さくなる」という原理を利用している。この指数は, 組み換えがランダム交配型 (panmictic) に匹敵するほど起こっている時に 0 となり, 組み換えの影響が小さくなればなるほど大きい正の値をとる (clonal)。 (図 2)。指数 I_A は, 2 つ以上の遺伝子座をマーカーとする方法であるならば, MLST に代表される DNA 配列ベースの手法は勿論のこと, MLEE のような酵素電気泳動データ, マイクロサテライトのような繰り返し配列など, あらゆる種類のマーカーに適用可能である。また, 遺伝子型の数値化に簡単な規則を導入することによって, 半数体のみならず 2 倍体の生物の解析に利用することもできる。このため, この分類法はバクテリアのみならず真核微生物にも適用されている。Smith *et al.* (1993) は, さらにこの指数を元にバクテリアを含む微生物の遺伝構造を以下の 3 つに分類することを提案した (図 2)。

(1) “clonal” (クローン型)

対立遺伝子の組み合わせには連鎖不平衡が認められる。組み換えは起こっていないか, あるいは起こっていても対立遺伝子の組み合わせがランダムになるほどではなく (連鎖不平衡), その効果は限定的。 I_A が 0 より有意に大きくなる。

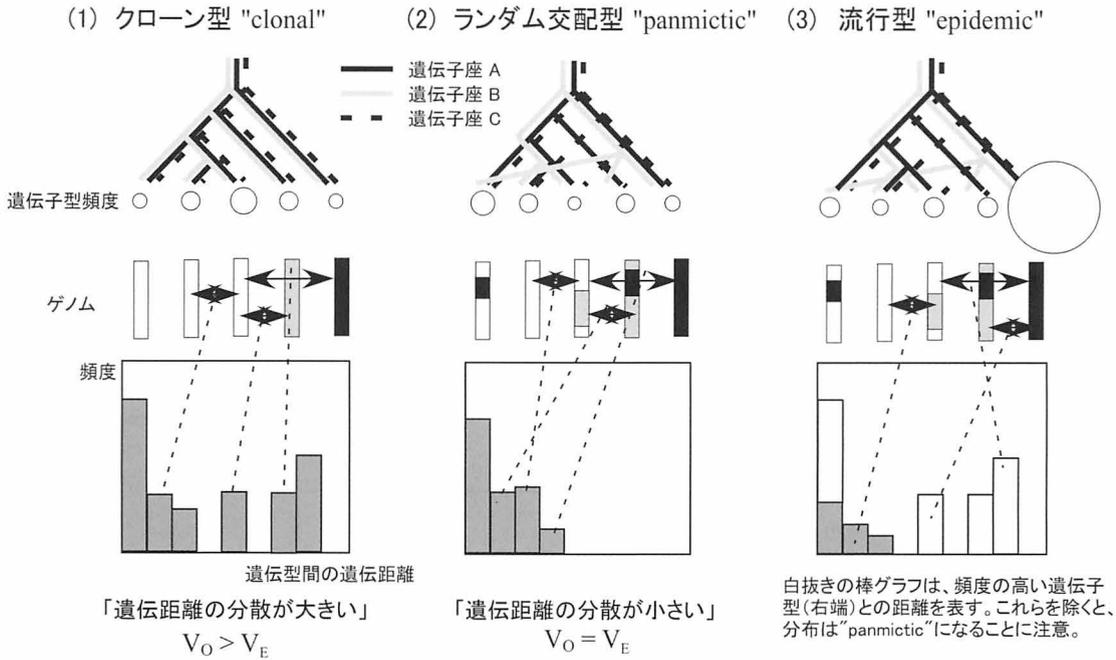
(2) “panmictic” (ランダム交配型)

組み換えの頻度が非常に大きく, 対立遺伝子の組み合わせはランダムであり, 連鎖が認められない (連鎖平衡)。遺伝的多様性に及ぼす組み換えの効果は, 有性生殖を行う高等動物と同様である。 I_A は 0 より有意に大きくならない。

(3) “epidemic” (流行型)

高度に適応的なクローンが大量に増殖した結果, クローン構造のように見えるが, この例外的なクローンを除けばランダム交配型である。病原菌の大流行時には, しばしば感染性の強い特定の遺伝子型がクローンとして爆発的に増える状況が観察されるが, その場合によく見られる遺伝構造。全ての個体を含めると I_A は 0 より有意に大きくなるが, これは同一の遺伝子型が大量に分離されたことに起因している。この偏りを排除するためには, 重複を除いた単一の遺伝子型のみを用いればよく, この最小化したサンプルに基づく解析の元では, I_A は 0 より有意に大きくならないことで, 前の二つの遺伝構造と区別できる。

実際にこの指数 I_A を利用することにより, これまで様々なバクテリア種について集団の遺伝構造が調べられている。その結果は, バクテリアは種によっては勿論のこと, 同一種内の集団によっても異なる遺伝構造を形成しているというものであった。ところで



I_A , Index of association (Smith *et al.* 1993)

$$I_A = (V_O / V_E) - 1$$

V_O , 遺伝距離分散の観察値
 V_E , 遺伝距離分散の帰無仮説"panmixia"の元での期待値

(注)「二つの個体間で異なっている遺伝子座の数」を遺伝距離として用いる。



	全ての株	I_A ユニークなSTのみ ¹⁾
(1) クローン型	> 0 ²⁾	> 0 ²⁾
(2) ランダム交配型	0	0
(3) 流行型	> 0 ²⁾	0

¹⁾ 重複するSTを除いた解析
²⁾ 有意に0より大きい

図2 遺伝構造の種類とその分類のための指数

この指数 I_A の値は、解析に含めた遺伝子座の数が増えるに従って大きくなるという性質を持つため、異なる数のマーカーを用いた他の研究結果と組み換えの程度を比較しようとする際に不都合が生じる。このため、最近では I_A を解析に含めた遺伝子座の数に依存しないように0 (panmictic) から1 (strictly clonal) までの値を示すように標準化した値、" I_A^S , standardized index of

association" (Haubold & Hudson 2000) が用いられることも多い (もっとも、実際には I_A も I_A^S もサンプリングの偏りの影響を非常に受けやすい指数であるため、これらの値を比較して組み換え頻度の大小を論じることは、ほとんどできていなかったりする)。指数 I_A の利用によって解明された種々の細菌、及び真核微生物の遺伝構造の実例の一部を表1に示す。

表1 各生物における遺伝構造の分類

生物種	I_A		I^S_A		遺伝構造	マーカー
	All	ST	All	ST		
バクテリア						
<i>Bacillus cereus</i> (Vilas-Boas et al. 2002)	0.286	0.195			panmictic	MLEE
<i>Bacillus thuringiensis</i> (Vilas-Boas et al. 2002)	0.771*	0.507*			clonal	MLEE
<i>Bacillus thuringiensis</i> サイト"F"集団 (Vilas-Boas et al. 2002)	0.157	0.526			panmictic	MLEE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Lomholt et al. 2001)	0.274*	0.148			epidemic	MLEE
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Enright & Spratt 1998)	-	0.478*			clonal	MLST
<i>Microcystis aeruginosa</i> (Tanabe et al. 2007)	3.608*	1.755*			clonal	MLST
アーキア						
<i>Sulfolobus islandicus</i> (Whitaker et al. 2005)			0.076*	0.033	epidemic	MLST
真核生物						
<i>Plasmodium falciparum</i> (Smith et al. 1993)	0.19	0.19			panmictic	MLEE
<i>Plasmodium falciparum</i> コンゴ集団 (Anderson et al. 2000)			0.0018	-0.0046	panmictic	Microsatellite
<i>Plasmodium falciparum</i> コロンビア集団 (Anderson et al. 2000)			0.0597*	0.0133	epidemic	Microsatellite
<i>Trypanosoma brucei</i> ウガンダ集団 (MacLeod et al. 2000)	1.340*	-0.548			epidemic	Microsatellite

*有意に0より大きい値 ($P < 0.01$)

Microcystis aeruginosa ~アオコの原因ラン藻

筆者らはアオコの大量発生や分布拡散メカニズム、種分化機構の解明のため、数年前より *Microcystis aeruginosa* を対象とした集団遺伝学的研究を進めている。*Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann は、富栄養化した淡水域の湖沼等において大量発生し、いわゆるアオコを形成することで知られるラン藻類(シアノバクテリア)の一種である。分類学的にはネンジュモ目(Chroococcales)に含まれ、単細胞性、寒天質に包まれたコロニーを形成すること、及び浮遊生活を可能にするガス胞を有していることなどで特徴付けられる。本種はコロニー形態のバリエーションが著しいことで知られる。事実、本種は古くはコロニー形態の相違から、5つの異なる種(*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis*, *M. wesenbergii*)として認識されていたが、Otsuka et al. (2001)によって一種に統合されたという経緯がある。本種は世界中で分離されており、分布はコスモポリタンであると考えられている。また本種はアオコを形成することから、淡水漁業やレジャー等の現場で悪臭や汚染等の水環境問題を引き起こす生物として周知されている。さらに、本種の中には急性肝炎を引き起こすアオコ毒素マイクロシスチンを生産する個体が少なからず存在する。実際に飲料水等へのマイクロシスチンの混入による中毒事故が世界各地で起こっていることから、水資源の安全な利用という公衆衛生上の観点からもしばしば問題視される。

M. aeruginosa のアオコ毒素遺伝子における組み換え

M. aeruginosa の一部の個体は、前述のようにマイクロシスチンというアオコ毒素(シアノトキシン)を生産する。マイクロシスチンは7つのアミノ酸(非典型的なアミノ酸を含む)からなる環状ポリペプチドであり、*mcvABCDEFGHIJ* の10個の遺伝子から成るマイクロシスチン・シンセターゼ遺伝子クラスターによって生合成されている(Tillett et al. 2000)。これらの10個の遺伝子のうち、機能不明の *mcvH* を除いた9個の遺伝子は、バクテリア・菌類に広く分布していることが知られるポリケタイドシンセターゼ(Polyketide synthase, PKS)、及び非リボゾーム型ポリペプチド

シンセターゼ(Non-ribosomal polypeptide synthetase, NRPS)と称する遺伝子のいずれか、あるいは両方に該当する。筆者らは、この遺伝子クラスターの中の *mcvA* 遺伝子配列を比較解析した結果から、*M. aeruginosa* の個体間でこの遺伝子内に組み換えが起こっていることを明らかにした(図3)。*mcvA* のみならず、*mcvD*, *G*, *J* の系統関係にも互いに不一致が見られることから、*mcv* 遺伝子を跨ぐような大規模な組み換えも起こっているようである(Tanabe et al. 2004)。また *mcv* 遺伝子の組み換えは相同部分のみならず、異なる遺伝子間(*mcvB* と *mcvC*)との間でも組み換えが起こっている例(いわゆる gene conversion)も見出されており、それによって部分的に異なる構造を持つマイクロシスチンが作られている可能性も示唆されている(Mikalsen et al. 2003)。一般にバクテリアの組み換えのホットスポットに該当する遺伝子には、細胞表面の抗原や薬剤耐性遺伝子に代表されるように、いわゆる正の多様性選択(positive diversifying selection)が作用していることが多い(Smith et al. 1991)。この意味において、*mcv* 遺伝子の組み換えの適応的意義を考察することは興味深い問題であるが、そのためにはまずマイクロシスチンの生物学的機能を知る必要がある。マイクロシスチンの機能については、古くからアレロパシー、金属イオンスカベンジャーなどの可能性が指摘されており、最近では細胞外シグナル伝達因子として機能しているという新説も提示されている(Schatz et al. 2007)。残念ながら、現時点ではこの問題については決定的な解答が得られていないため、*mcv* 遺伝子の適応進化の可能性に関する議論は、今後の研究の進展を待たなければならない。その一方、*mcv* 遺伝子が組み換えのホットスポットになっているかどうかについては、他の遺伝子との比較によって推察することができる。つまり、*M. aeruginosa* における個体間の組み換えは、マイクロシスチン遺伝子のみの特異的に見られる現象なのであるか?それとも、広くゲノム全体で起こっている現象がたまたま調べた *mcv* 遺伝子で顕在化しただけなのであるか?という疑問に言い換えられるわけである。この点を明らかにするための一つの方法は、*M. aeruginosa* の複数のハウスキーピング遺伝子座を調べる、つまり MLST を利用するというものである。ハウスキー

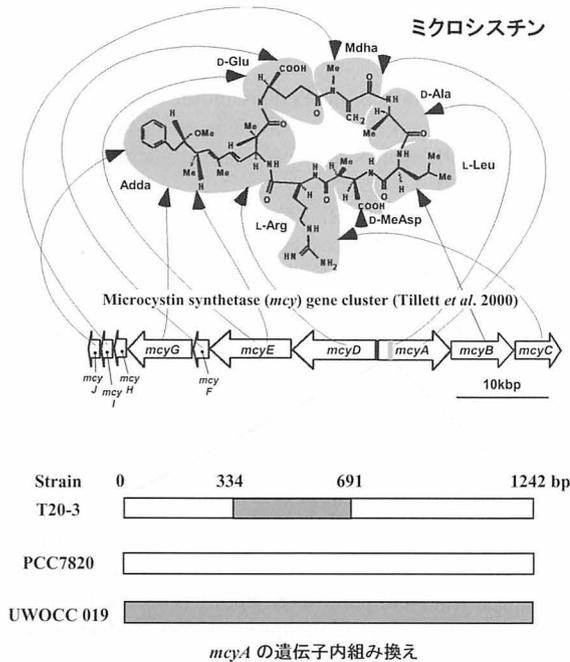


図3 ミクロシスチン生合成遺伝子と *mcyA* の遺伝子内組み換え

ピング遺伝子座は一般に中立遺伝子であり、組み換えのホットスポットになっている例はほとんど報告されていないため、MLSTにより解明された組み換えの有無及び頻度は、ゲノム全体の組み換えの有無や頻度を大枠で反映しているものと考えられるからである。そして同時に、複数のハウスキーピング遺伝子座の組み換えを調べるという作業は、本文前半で解説した「種内集団の遺伝構造を調べる」という研究に繋がるわけである。筆者らは、*M. aeruginosa* に前述の MLST 法を適用してみることにした。

M. aeruginosa の遺伝構造

筆者らは、*M. aeruginosa* の集団遺伝学解析のため、*M. aeruginosa* のゲノム中の7箇所のハウスキーピング遺伝子座 (*ftsZ*, *glnA*, *gltX*, *gyrB*, *pgi*, *recA*, *tpi*) をマーカーとする MLST プロトコルを構築した (Tanabe *et al.* 2007)。日本産を中心に同種 164 培養株を選択し、開発した MLST 法によって遺伝子タイピングを行った。得られた DNA 配列データについて、それぞれの遺伝子座ごとに系統解析を行い比較してみたところ、各遺伝子座の系統関係の間に多くの不一致が見られ、またこの不一致は最尤法に基づく統計的検定 (SH test) によっても有意であることがわかった。組み換えが全く起こらない「完全なクローン構造」の場合においては、ゲノム中のどの遺伝子をピックアップして系統解析を行っても、全く同様な分岐パターンが得られるはずである。このため、今回の結果は、ハウスキーピング遺伝子座間においても、個体間の組み換えが少なからず起こっていることを示唆している。*M. aeruginosa* における組み換えはアオコ毒素遺伝子 *mcy* に限らず、ゲノムワイドに起こっていることはほぼ間違いないようであるが、*mcy* とハウスキーピング遺伝子座組み換えの間で組み換えの頻度に差異が見られるかどうかを調べることは、今後の課題である。

表2 各湖沼における I_A

	I_A
全ての株 (n = 164)	3.608*
ユニークなSTのみ (n = 79)	1.755*
霞ヶ浦 (n = 25)	4.227*
奥多摩湖 (n = 15)	6.000*
白樺湖 (n = 12)	6.000*
諏訪湖 (n = 14)	5.084*

*有意に0より大きい値 ($P < 0.001$)

(注) 奥多摩湖と白樺湖の I_A の値は、理論上の最大値 (解析した遺伝子座の数から 1 を引いた数、今回は 7 つの遺伝子座を使用したもので 6 となる) を示す。(つまり、この二つの集団では組み換えが全く起こっていない。)

次に、前述の指数 I_A を用いて *M. aeruginosa* 遺伝構造の分類を試みた。統計的検定の結果、全 164 株を用いた解析、単一の ST (79 遺伝子型) のみを用いた解析の双方において、 I_A は有意に 0 より大きく、*M. aeruginosa* の遺伝構造は“clonal”であることが示唆された (Tanabe *et al.* 2007)。しかしながら、この結果の解釈には次の点に注意する必要がある。つまり、各湖沼間に地理的な隔離が生じている場合、そのような集団を一緒に解析してしまうと、元来“panmictic”である種を、誤って“clonal”と判定してしまうことがある。なぜならば、集団間に地理的な隔離が生じると、たとえ組み換えのポテンシャルは高くても、各集団同士の接触の機会が少なくなるために、結果として組み換えの頻度が小さくなってしまふからである。そこで、比較的多くの個体が得られていた国内 4 箇所の湖沼を選択し、湖沼内の集団単位で I_A を計算して統計的検定を行ってみた。その結果は、各湖沼の集団間でも“clonal”であるというものであり、中には全く組み換えが観察されない集団 (白樺湖と奥多摩湖) もあった (表 2)。これらの結果から、*M. aeruginosa* の遺伝構造はやはり“clonal”であり、個体間の組み換えはある程度の頻度で起こり、集団の遺伝的多様性にある程度の影響を及ぼすもののその効果は限定的であり、有性生殖に匹敵するレベルには達していないということが示唆される。シアノバクテリアの「分裂増殖」という繁殖形態を考えれば、この結果はある意味当然のことに思えるかもしれないが、バクテリアの中には *Bacillus* 属細菌のように、分裂により増殖するのにも関わらず、“panmictic”な遺伝構造を形成する種も少なからず存在することには注意したい (表 1)。Panmictic な *Bacillus* 属細菌は、実験系で形質転換が容易に起こることが知られているため、自然界においても組み換えを引き起こす類の外來プラスミドの取り込みが頻繁に起こっているのであろう。水塊中には淡水・海水を問わず、大量にファージやプラスミドが存在していることが知られており、*M. aeruginosa* に感染するベクターも幾つか同定されている。それにもかかわらず、*M. aeruginosa* は“clonal”であるということは、細胞内へのベクターの取り込みプロセスの段階で何らかの制限がかかっている可能性が高い。実際、前述のように同じ湖沼間の個体で全く組み換えが観察されないケース (白樺湖・奥多摩湖) の存在はこの考察と矛盾しない。興味深いことに、*M. aeruginosa* は実験系での形質転換が「可能だが難しい」バクテリアとして知られている。*Bacillus* 属細菌と対照的なこの観察結果は、*M. aeruginosa* の“clonal”な遺伝構造の一因を反映しているのかもしれない。

応用に向けて

バクテリアの集団遺伝学研究から得られた成果は、単に進化学的な知識の蓄積に留まらない。実際、病原性バクテリアの集団遺伝学研究は、感染症の発生源の究明や抗生物質耐性菌の出現機構の解明、またこうした疫学上の問題にいかに対処すべきか、などの社会的ニーズによって強く推し進められてきた。また、微生物農薬の使用、いわゆるバイオコントロールに用いられる遺伝子組み換えバクテリアの自然集団への影響評価を行う上でも、集団遺伝学の理解は本質的であろう。今回、我々の研究から *M. aeruginosa* の遺伝構造は“clonal”であることがわかったが、その結果として、応用に向けたなんらかの考察が可能であろうか？例えば、それは将来的なアオコ駆除に向けての一つのヒントを与える。*M. aeruginosa* の個体間の遺伝子組み換え頻度が低いため、薬剤耐性やフェージ耐性に関与する遺伝子の耐性獲得が制限されている可能性がある（多くのバクテリアでは、しばしば組み換えによって生じた変異によってこれらの耐性が獲得されることが知られている）。つまり、薬剤やフェージの利用によるアオコ駆除は、比較的効率よく機能する可能性がある。

今後の展望

本総説においては、バクテリア個体間における遺伝子の組み換え、及びそれをベースにした遺伝構造の分類について解説し、実例としてアオコ形成ラン藻 *Microcystis aeruginosa* の組み換えと遺伝構造を解析した例を紹介した。しかしながら、冒頭で述べたように、実際は集団の遺伝的多様性に関与する力は組み換えだけではない。組み換えと他の4つの力（遺伝的浮動・淘汰・移住・突然変異）がどのように作用した結果として、現在の *M. aeruginosa* の種内変異のパターンが形成されたのか、を明らかにすることは今後の重要な課題である。また、それぞれの進化力の中身を精査することは更に重要である。なぜならば、例えば淘汰機構の理解は大量発生メカニズムの解明と表裏一体であるだろうし、移住のパターンを理解することは、アオコの拡散プロセスの理解そのものであるからである。筆者らは現在、*M. aeruginosa* の集団遺伝学的諸問題の全容解明のため、網羅的・集中的なサンプリングを行って解析を進めているところである。この網羅的・集中的というのは、実はかなり本質的である。バクテリアは前述の通り、真核生物に比べると種内変異がたいへん大きいことで知られており、また一方で *demography* が不安定（局所的に突然大量発生したり、絶滅したりと言ったような状況）でもある。言うまでもなく、このことは *M. aeruginosa* についても例外ではない。このため、アオコの集団解析の結果がどれだけ信頼できるものになるかは、実はいかに大量に、そして満遍なくサンプリングすることができるかにかかっている、と言っても過言ではないのである。

引用文献

Anderson, T. J., Haubold, B., Williams, J. T., Estrada-Franco, J. G., Richardson, L., Mollinedo, R., Bockarie, M., Mokili, J., Mharakurwa, S., French, N., Whitworth, J., Velez, I. D., Brockman, A. H., Nosten, F., Ferreira, M. U. & Day, K. P. 2000.

- Microsatellite markers reveal a spectrum of population structures in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1467–1482.
- Enright, M. C. & Spratt, B. G. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144 (Pt 11): 3049–3060.
- Haubold, B. & Hudson, R. R. 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847–848.
- Lomholt, J. A., Poulsen, K. & Kilian, M. 2001. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect. Immun.* 69: 6284–6295.
- MacLeod, A., Tweedie, A., Welburn, S. C., Maudlin, I., Turner, C. M. & Tait, A. 2000. Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97: 13442–13447.
- 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. U S A* 95: 3140–3145.
- Mikalsen, B., Boison, G., Skulberg, O. M., Fastner, J., Davies, W., Gabrielsen, T. M., Rudi, K. & Jakobsen, K. S. 2003. Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcvABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. *J. Bacteriol.* 185: 2774–2785.
- 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* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 873–879.
- Schatz, D., Keren, Y., Vardi, A., Suenik, A., Carmeli, S., Borner, T., Dittmann, E. & Kaplan, A. 2007. Towards clarification of the biological role of microcystins, a family of cyanobacterial toxins. *Environ. Microbiol.* 9: 965–970.
- Smith, J. M., Dowson, C. G. & Spratt, B. G. 1991. Localized sex in bacteria. *Nature* 349: 29–31
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90: 4384–4388.
- Tanabe, Y., Kaya, K. & Watanabe, M. M. 2004. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (*mcv*) 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* (in press).
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Dohren, H., Borner, T. & Neilan, B. A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* 7: 753–764.
- Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M. V & Bourguet, D. 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1414–1424.
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W. & Taylor, J. W. 2005. Recombination shapes the natural population structure of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*. *Mol. Biol. Evol.* 22: 2354–2361.