

氏名(本籍)	神保有亮(栃木県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4711号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	有毒藍藻類 <i>Microcystis</i> 属の microcystin 産生予測手法の開発に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	杉浦則夫
副査	筑波大学教授	農学博士	佐竹隆顕
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	北村豊
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	張振亜

### 論文の内容の要旨

近年、多くの富栄養化湖沼では、有毒藍藻類(アオコ)が異常増殖し、大きな問題となっている。有毒藍藻類 *Microcystis* 属が産生する毒素 microcystin は、シアン化カリウムの100倍に相当する毒性を持つ。わが国でも霞ヶ浦をはじめ、代表的な湖沼で有毒アオコの発生が目立っており、水圏生態系の不健全化はもとより、飲料水として利用されている水源では、その混入による生体への危険性が危惧されている。

また、日本国内の湖沼における環境基準達成率は依然として低迷化していることから、今後も湖沼における長期的なアオコの発生ならびにアオコによる microcystin の産生が予想される。そこで、本研究では microcystin リスクアセスメントの構築を目的として、microcystin 産生種の高感度で迅速な検出法ならびに microcystin 産生予測手法の開発を行った。さらに、microcystin を分解する microcystin 分解菌の検出も行った。

従来の microcystin 産生種の検出法は、操作が煩雑で多大な時間を要するものが多かった。そこで、whole-cell PCR を用いた microcystin 産生種の検出を行った(第2章)。その結果、whole-cell PCR は、DNA 抽出を行った場合と同様に増幅が確認され、その感度は DNA を抽出した系の1000倍であった。また、従来の microcystin 産生種の検出法と比較すると、検出までの時間は大幅に短縮が可能であり、その簡便性と迅速性が証明された。一方、whole-cell PCR により microcystin 分解菌の検出も行った(第3章)。その結果、microcystin 産生種の時と同様に、microcystin 分解菌を明瞭で高感度に検出することが可能であった。また添加実験では、霞ヶ浦湖水に microcystin 分解菌を添加した系においても whole-cell PCR は分解菌を高感度に検出することが可能であった。しかし、生物膜などの環境サンプルからは分解菌を検出することはできなかった。

以上のように、whole-cell PCR では microcystin 産生種を迅速かつ高感度に検出できた。さらに、microcystin が、いつ、どのくらい産生されるかを予測するために、次の実験として AGP 試験(Algal Growth Potential 試験)を用いた、microcystin 産生能評価を行った(第4章)。その結果、過去にアオコの発生履歴のある湖沼水では、高濃度の microcystin が産生され、培養液を用いた時の microcystin より高濃度であった。さらに、細胞増殖量も高い値を示した。また、栄養塩と microcystin 濃度との相関を調べたところ、NO<sub>3</sub>-N

と microcystin 濃度の間に強い相関が、見られ有為な差もあった。また、サンプリングポイントの拡大を考慮し、試験管を用いた microcystin 産生能評価も行ったが、この結果も同様に、アオコ発生湖沼においては高濃度の microcystin が確認され、NO<sub>3</sub>-N との相関も確認された。これにより、AGP 試験による microcystin 産生能評価法は microcystin 産生予測ならびに環境因子との関係解析に有効であることが明らかとなった。つぎに、microcystin 分解菌の季節的動態把握を行うため、real-time PCR を用いた microcystin 分解菌の定量を行った（第5章）。その結果、10月、12月、8月のサンプルから microcystin 分解菌が確認された。特に10月のサンプルでは比較的高濃度の microcystin 分解菌が確認された。この結果より、microcystin 分解菌はアオコが消長する秋季に増加していることが示唆された。

本研究では、microcystin 産生種に対する、迅速検出法ならびに microcystin 産生能評価法の開発を行った。その結果、whole-cell PCR と AGP 試験を用いた microcystin 産生能評価を組み合わせることにより、有毒藍藻発生ポテンシャルならびに microcystin 産生量を早期に予測できることが明らかとなった。また、microcystin 分解菌の生物量は秋季に増大することが示唆された。本研究で得られた結果は microcystin に対するリスクアセスメントとしての有効的な利用が大いに期待される。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、有毒藍藻類 *Microcystis* 属の microcystin 産生予測手法に関して、whole-cell PCR 法を用いた有毒藍藻類の初期スクリーニング技術と、AGP 試験法を用いた microcystin 産生予測手法を開発した。whole-cell PCR は microcystin 産生藍藻類を迅速かつ簡便に検出することが可能であり、また検出感度も非常に高く、10<sup>4</sup>cells/mL (60cells/PCRreaction) の濃度においても microcystin 産生藍藻類を明確に検出することが可能であることから、whole-cell PCR は有毒藍藻類の初期スクリーニング技術としての利用が可能であることを明らかにした。また、whole-cell PCR は microcystin を特異的に分解する microcystin 分解菌についても検出することが可能であり、whole-cell PCR は他の様々な微生物の検出に応用が可能であることを明らかにした。次に、microcystin 産生能評価手法として AGP 試験 (Algal Growth Potential 試験) を用いた microcystin 産生能評価を行った。この結果、過去にアオコの発生履歴のある湖沼水では、高濃度の microcystin が産生され、培養液を用いた時の microcystin より高濃度であった。さらに、microcystin 産生量は NO<sub>3</sub>-N の濃度と密接な関係にあることを明らかとした。また、サンプリングポイントの拡大を考慮し、試験管を用いた microcystin 産生能評価も行い、同様にアオコ発生湖沼においては高濃度の microcystin が確認され、NO<sub>3</sub>-N との相関も確認された。これにより、AGP 試験による microcystin 産生能評価法は microcystin 産生予測ならびに環境因子との関係解析に有効であることを明らかにした。次に、microcystin 分解菌の季節的動態把握を行い、世界で初めて microcystin 分解菌の定量を可能とした。

以上より、*Microcystis* 属の microcystin 産生予測手法に対して新規な知見を得て、水環境生態工学の発展に寄与していることが高く評価される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。