

氏名(本籍)	李 潔 明 (中国)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第5904号
学位授与年月日	平成23年7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	<b>Study on Biodegradation Mechanisms of Microcystin from Cyanobacteria</b> (藍藻由来ミクロキスチンの生分解機構に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 杉浦 則夫
副査	筑波大学教授 博士(農学) 張 振 亜
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(理学) 内海 真生

### 論文の内容の要旨

湖沼の富栄養化に伴い、アオコの発生が世界各地で頻発しており、今後の温暖化予測からその頻度は高まる一方であることが推測されている。アオコの発生は藍藻、例えば *Microcystis* 属、*Anabaena* 属、*Planktothrix* 属や *Nostoc* 属などが異常増殖することによって集塊を形成する現象であり、特にこれら藍藻のなかには極めて有毒である microcystin (MC) を産生する種があり、この毒性物質が上水道や淡水水産物を汚染することから深刻な問題となっている。MC は、急性毒性として肝臓毒として働くだけでなく、慢性毒性として発ガンプロモーションを担うことがわかっており、ヒトの健康のみならず家畜などのほ乳類一般に毒性を示すため、水源水域のアオコの効果的な制御や MC 除去法の確立が焦眉の課題となっている。

本研究では、環境低負荷・低ランニングコスト・低エネルギーによって、アオコの効果的な制御や MC の除去が期待されている生物学的手法を確立するために、生物学的手法の一種、生物膜法に注目し、生物膜構成微生物のアオコ形成藍藻の捕食分解能評価、および生物膜における MC 分解現象の分子生物学的解析を行った。アオコ形成藍藻の捕食連鎖で重要な微生物として原生動物が挙げられ、これまでにアオコ形成種 *Microcystis* 属の細胞捕食及び MC 分解を同時に行う原生動物、鞭毛虫 *Monas guttula* を生物学的浄水処理装置の生物膜やアオコ発生湖沼中から分離した。しかしこの鞭毛虫が他の微生物、とくに周辺の細菌類とどのように連動・作用して MC を分解するのかその機構についてはほとんど明らかにされていない。そこで毒性物質 MC を産生する *Microcystis* 属を捕食・分解する鞭毛虫 *Monas guttula* 周辺環境に存在する細菌類の MC 分解の役割について室内実験レベルで、また実際の生物処理槽内の生物膜機能解析では、MC 分解機能解析を行うとともに分離した分解菌の分解能に及ぼす栄養塩類の影響について検討した。鞭毛虫周辺環境に存在する共存細菌は、浮遊細菌群と *M. guttula* の細胞外表面付着細菌群および細胞内細菌群が存在し、MC 分解菌は主に *M. guttula* 細胞内外表面に存在し、MC 分解過程における真正細菌群集構造解析を PCR-DGGE 法によりおこなったところ MC 分解が進行するにつれて真正細菌群集は MC 分解菌と推測できる細菌群に収束していくことがわかった。また、これらの真正細菌群集構造は顕著に異なることもわかった。さらに共生細菌群の分解方式は、MC 自体によって分解酵素の発現が次々と連動して誘導されることが確認され、MC 初発分解

酵素遺伝子 *mlrA* が、MlrA 酵素及び MC 分解に寄与する酵素が存在していることが確認できた。ついで生物学的浄水処理装置内の生物膜を通年で採取し、試験管内における MC 分解法および定量 PCR 法を用いた *mlrA* 遺伝子の定量による MC 分解菌量の動態解析を行った。とくに、冬期の生物膜中の MC 分解菌現存量は少なく、MC 分解活性も比例して低かったが、夏期の生物膜中の分解菌現存量は多く、それと比例して MC 分解活性が高まることがわかり、*mlrA* 遺伝子という一遺伝子をモニター因子として MC 分解活性を表現できる迅速でかつ効果的な確認法であることを内外で初めて明らかにした。また冬期生物膜の添加実験により MC 分解後の MC 分解菌量は、夏期の MC 分解菌量と同様であったため、越冬した MC 分解菌が夏期の MC 分解現象を担うことが推測された。一方、生物膜の MC 分解に及ぼす栄養塩類の影響を明らかにするために、異なる栄養塩類を添加し、MC 分解に対する影響および MC 分解菌量の動態解析を実施した。その結果、硝酸イオンが MC-LR の分解活性を促進し、とくに低濃度の硝酸イオンが有効であったこと、グルコースやペプトンといった炭素源やアミノ酸が存在する場合は、MC 分解が抑制されることがわかった。

以上の研究から、原生動物鞭毛虫類 *M.guttula* 共生細菌、特に付着性真正細菌が MC 分解に大きな役割を果たしていること、現場における生物処理槽の生物膜がアオコ形成種で MC 産生種 *Microcystis* 属の細胞を効果的に捕食するとともに付着性分解菌が連動して MC 分解に機能を発揮し、その分解者として分解菌の存在が大きく水温の高い夏季に量、活性ともに高くなること、そのモニター法として *mlrA* 遺伝子を確認するのみで迅速に評価可能であること、栄養塩類では硝酸イオンが分解菌の分解ポテンシャルを増大させていることが明らかとなった。

## 審査の結果の要旨

本論文は、安全・安心な上水および水産資源を持続的な方法によって確保するために、水源池で深刻な問題となっている藍藻によるアオコ現象の制御とその産生有毒物質 MC の効果的な除去法を確立するために、水環境中で藍藻バイオマス量の制御および MC 分解を担っている微生物を生物学的および分子生物学的に解析し、MC 分解活性のモニタリング法および原生動物による藍藻バイオマス制御と MC 分解に関わる真正細菌群集の動態を明らかにすることを目的とした。

効果的に藍藻を捕食かつ MC 分解する鞭毛虫 *Monas guttula* と共生細菌との役割は未解明であったが、本論文は、共存する細菌が MC に応答し、群集構造を変化させ、効果的に MC 分解できる状態に変化する現象を明らかにした。また、生物膜中の微生物による MC 分解に及ぼす栄養塩類の影響解析により、特定の条件下で MC 分解が促進されることが明らかにしている。特筆すべき点として自然現象では極めて少ない、一遺伝子で一つの反応を表現できる事例、つまり *mlrA* 遺伝子を定量することで MC 分解活性をモニタリングできることを明らかにした。

以上の知見は、水源池での微生物を用いた実際の水処理プロセスに位置付けられている生物処理法によるアオコおよび MC の制御方法の確立に極めて有用な優れた研究成果であり、高く評価される。

平成 23 年 6 月 2 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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