

(論文内容の要旨)

飲料水源となっている湖沼やダム湖での富栄養化に伴うミクロシスチン生成藻類の問題については、古くより研究されてきている。しかしながら、ミクロシスチン生成藻類の増殖や有毒物であるミクロシスチン生産の原因となる因子は明確に特定されていないのが現状であり、依然として、日本国内および世界各国でミクロシスチン生成藻類の問題は解決されていない。近年リアルタイム PCR 法による特定遺伝子濃度の定量技術が開発されてきており、ミクロシスチン生成藍藻類の挙動を把握するのに有用であると考えられる。本論文は、実験室での培養実験および自然水での調査を行い、リアルタイム PCR を利用してミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性を分析し、それらに及ぼす環境条件の影響を検討したをまとめたものであり、9章からなっている。

第1章は序論であり、研究の背景および目的について言及し、本研究の社会的な重要性や意義について論議し、考察を行っている。また、文献考察として、ミクロシスチン生成藍藻類やリアルタイム PCR の適用について、既往研究をまとめながら、本研究の工学的な意義と位置付けに関する考察を行っている。

第2章は実験方法について記述しており、実験室での *Microcystis aeruginosa*(NIES102)の無菌培養方法、水質分析方法、ミクロシスチン濃度の分析方法、リアルタイム PCR によるミクロシスチン生成藍藻類の分析方法などの実験方法についてまとめている。

第3章では、*Microcystis aeruginosa*(NIES102)の無菌培養の結果をまとめ、培養条件としての温度や栄養塩濃度がミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性に及ぼす影響を考察している。増殖速度は、栄養塩類濃度が豊富である時に、25℃の温度条件下で最も速いこと、ミクロシスチン生成能力は同じ栄養塩濃度下では 33℃までは温度が高い程高いこと、またミクロシスチン生成は、栄養塩および細胞濃度が高く、高温である時に最も活発であることを明らかにしている。

第4章では、無菌培養実験における *Microcystis* の *mcy A* 遺伝子および *Microcystis* の 16S rRNA 遺伝子の濃度と細胞数との関係を考察している。それぞれの比は、14 および 250 であり、特に対数増殖相以降の高濃度時に相関関係が見られることを明らかにしながら、従来の顕微鏡による方法では不可能であった有毒 *Microcystis* を全 *Microcystis* から区分して定量する技術を確立している。また、ミクロシスチン濃度は特に *mcy A* 遺伝子濃度と相関が

見られることも明らかにしている。

第5章では、2007年から2008年にかけて、京都市の広沢池および琵琶湖で行った現地調査の結果として、水質項目、顕微鏡による観察結果、リアルタイムPCRによる分析結果などをまとめている。広沢の池では春季から秋季にかけての季節変動に、琵琶湖では夏季における平面的な分布に着目して、調査を行っている。調査時の広沢池および琵琶湖はいずれも富栄養状態であり、TN/TP比が高いときにクロロフィルa濃度が増加することや、ミクロシスチンの濃度が高い時には藍藻類の比率が増加していることを明らかにしている。

第6章では、現地調査においてミクロシスチン/クロロフィルa比が変動していたことについて、ミクロシスチン生成藍藻類の成長に着目して考察している。その結果、ミクロシスチン/クロロフィルa比は、夏季で特にミクロシスチン生成 *Microcystis* の濃度が高く安定的にアオコが維持される時に高いことを示し、アオコの毒性を予測する上では従来のクロロフィルa濃度だけでは不十分で、アオコの成長状況を考慮する必要性を明らかにしている。

第7章では、現地調査での *Microcystis* の *mcyA* 遺伝子および *Microcystis* の 16S rRNA 遺伝子の濃度の分析結果により、第4章で確立した技術を用いながら、有毒 *Microcystis* が全 *Microcystis* に占める割合を算出している。特に2007年の広沢の池では、有毒 *Microcystis* の全 *Microcystis* に占める割合はおよそ80%であること、ミクロシスチン濃度と有毒 *Microcystis* 濃度の相関関係が見られること、窒素濃度が *Microcystis* の増殖に関連していることなどを明らかにしている。

第8章では、現地調査の結果を用いて、環境条件がミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性に及ぼす影響を検討している。その結果、アンモニアがミクロシスチン生成藍藻類の成長を促進しミクロシスチン濃度を増加させること、リンの影響は少ないことなどを明らかにしながら、リアルタイムPCRによる測定の有用性を示している。

第9章は結論であり、本論文で得られた成果について要約している。

(論文審査の結果の要旨)

湖沼の富栄養化に伴い生ずる *Microcystis* の水の華とそれの生成する毒性物質であるミクロシスチンが、飲料水の観点等から問題となっている。本論文は、実験室での培養実験および自然水での調査を行い、リアルタイム PCR を利用してミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性を分析し、環境条件がそれらに及ぼす影響の検討を試みた結果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. *Microcystis aeruginosa* (NIES102) の無菌培養により、培養条件としての温度や栄養塩濃度がミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性に及ぼす影響を明らかにした。

2. *Microcystis* の *mcy A* 遺伝子および *Microcystis* の 16S rRNA 遺伝子の濃度と細胞数の関係を把握し、自然水の中の有毒 *Microcystis* を全 *Microcystis* から区分して定量する技術を確立した。

3. 2007 年から 2008 年にかけて、京都市の広沢池および琵琶湖で現地調査を行い、TN/TP 比が高いときにクロロフィル a 濃度が増加することや、ミクロシスチンの濃度が高い時には藍藻類の比率が増加していることを明らかにした。

4. ミクロシスチン/クロロフィル a 比は、夏季で特にミクロシスチン生成 *Microcystis* の濃度が高く安定的にアオコが維持される時に高いことを明らかにした。

5. 環境条件がミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性に及ぼす影響を検討し、アンモニアがミクロシスチン生成藍藻類の成長を促進しミクロシスチン濃度を増加させること、リンの影響は少ないことなどを明らかにした。

以上要するに、本論文は、ミクロシスチン生成藍藻類の成長およびミクロシスチン生成特性についてリアルタイム PCR を活用して考察したものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 2 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。