

〇ー１ アジアにおける水資源域の水質汚濁評価と有毒アオコ発生モニタリング手法の開発に関する研究

(２) アオコの発生診断手法と発生制御手法の開発に関する研究

② アオコの発生制御手法の開発に関する研究

独立行政法人国立環境研究所

環境研究基盤技術ラボラトリー長

彼谷邦光

環境研究基盤技術ラボラトリー・環境分析化学研究室 佐野友春・高木博夫

<研究協力者>

中国科学院水生生物研究所

劉 永定

タイ国タイ科学技術研究所

Aparat Mahakhan

平成13～15年度合計予算額

25,033 千円

(うち、平成15年度予算額

7,466千円)

〔要旨〕①熱帯・亜熱帯地域で発生するアオコの優占種であるミクロキステスの増殖を選択的に阻害する物質を酵母抽出物から単離した。増殖阻害物質はマロン酸およびリジンであった。リジンは1.0 ppmの濃度でミクロキステスを死滅させたが、クロレラ等の緑藻類、魚類、バクテリア、ミジンコ等に対しても0.1%の濃度まで全く影響を示さなかった。②ミクロキステスの増殖を選択的に阻害する物質をタイの自然発生*Anabaena spiroides* から単離した。本物質はこれまで報告されていないリポペプチドの一種であり、スピロイデシン (spiroidesin) と命名した。有毒ミクロキステスの増殖を 1.6×10^{-6} Mの濃度で阻害した。③有毒アオコである*Microcystis aeruginosa*を選択的に駆除するための隔離水界実験を中国科学院水生生物研究所と共同で中国雲南省昆明市郊外の滇池 (Dianchi Lake)に接した隔離水界実験施設施設 (10m x 10m x 1.5 m(深さ) 3基を用いて行った。隔離水界には滇池のアオコを含む湖水と水生植物種子などを含む湖の底質を10～15 cmの厚さになるように入れた。隔離水界はリジン、リジン+マロン酸処理区およびコントロールとした。リジン処理区、リジン+マロン酸処理区では、リジン (10 g/m²)またはリジン+マロン酸 (10 g/m² + 10 g/m²) 散布後3日目アオコは完全に沈殿し、隔離水界の底が見えるもでになった。3週間後、リジン処理区では水面にヒシが繁茂し、水中にはエビモが繁茂し始めた。しかし、*Microcystis* の増殖が再び起こり始めた。一方、リジン+マロン酸処理区では、水中にアオコ増殖抑制物質を産生するホザキノフサモが繁茂し、アオコの発生は観察されなかった。また、pHは実験開始直後の9.2 から3週間後には7.8 まで低下した。この低下はアオコの炭素源である炭酸水素イオン濃度が低下し、大型藻類の炭素源である二酸化炭素濃度が上昇していることを意味している。これらの結果から、リジン+マロン酸処理は長期間にわたってアオコの発生を制御できる方法であると考えられた。

〔キーワード〕アオコ、ミクロキステス、リジン、マロン酸、ホザキノフサモ

1. はじめに

これまで、アオコの駆除のために多くの試みがなされてきた。効果的な駆除剤として古くから硫酸銅が用いられてきたが、硫酸銅はアオコだけでなく、ほとんどの水生動植物に対して毒性を示す。特に、魚類に対してはアオコの増殖を阻害する濃度より低い濃度で毒性を発現することから、硫酸銅の使用を禁止している国も多い。このような状況から、アオコに対して選択的に作用し、他の生物には無害な駆除剤の開発が望まれている。

2. 研究目的

本研究ではアジアの熱帯、亜熱帯地域で発生するアオコの優占種であるミクロキステスの増殖を選択的に阻害する物質を自然界から探索することを目的とした。本研究で有毒アオコに対する選択的増殖阻害剤としてリジンやスピロイデシンを同定した(12~15)。また、選択性が無く、増殖阻害活性の低いマロン酸の同定を行った。これまでの研究から、リジンとマロン酸の併用は相乗効果(12)が見られることを見出したので、隔離水界実験ではリジン+マロン酸処理による有毒アオコの発生制御手法の確立を試みた。また、隔離水界に水生植物種子を含む湖の底質を入れることで、水生植物が産生するアレロケミカルズによるアオコの抑制効果を調べた。実験は中国雲南省昆明市近郊で、中国科学院水生生物研究所の協力を得て行った。

3. 研究方法

(1) リジンおよびマロン酸の同定

中国およびタイにおける湖沼におけるアオコの発生と水質およびバクテリア数のデータを取得し、相関関係を解析した。微細藻類株の無菌化のチェックに用いられるバクテリア用培地でアオコ形成藍藻ミクロキステスが増殖しないことから、バクテリア用培地の中のミクロキステス増殖阻害物質を単離・同定した。バクテリア用培地の中の酵母抽出物中に増殖阻害活性が認められたので、酵母抽出物を分画した。酵母抽出物の水溶液をD E A EおよびC Mのイオン交換樹脂で処理し、D E A E樹脂に吸着したものを酸性画分、C M樹脂に吸着したものを塩基性画分、どちらにも吸着しないものを中性画分とした。各画分をM A培地で増殖させたミクロキステス・ヴィリディス(*Microcystis viridis*)に添加し、24時間および48時間⑤の細胞数を計数して細胞の減少割合から増殖阻害活性度を求めた。

(2) スピロイデシン試料

アナベナ・スピロイデス(*Anabaena spiroides*)はタイ国チェンマイ市郊外の淡水池でプランクトンネットを用いて採集した。採集したアナベナは現場でドライアイス中で凍結し、バンコクのタイ科学技術研究所微細藻類系統保存施設に運搬した。試料は凍結状態のまま凍結乾燥で乾燥させた。凍結乾燥試料は-20℃の容器に入れ、空路日本に運んだ。国立環境研究所に運ばれた飼料は使用するまで、-20℃の冷凍庫で保存した。

(3) 活性物質の抽出と単離

凍結乾燥試料(10 g)はメタノールで活性物質を抽出した。抽出液はロータリーエバポレーターを用いて減圧下でメタノールがなくなるまで濃縮した。濃縮残渣を5%酢酸水溶液にけん濁し、2,000 rpm、20分間遠心し、不溶物を除いた。上澄液をO D Sカートリッジに通し、活性物質を吸着させた。O D Sカートリッジは20%メタノールで洗浄後、80%メタノールで溶出し

た。これを濃縮乾固して、20%メタノールに再溶解した。この画分中の活性物質を高速液体クロマトグラフ装置（カラム：Mightysil 20mm i.d. x 25cm, 移動相：60%メタノール・40% 50 mMリン酸緩衝液（pH 3.0）, 流速：10 ml/min）を用いて単離した。

単離した活性物質は薄層クロマトグラフィー（プレート：HPTLC Si gel 60 蛍光剤を含む、Merck, 展開液：クロロホルム：メタノール：水＝60：40：10、v/v）で精製した。活性物質の収量は35 mgであった。

（４）NMR および MS

NMRスペクトルはJEOL JMNA-500スペクトロメーター（500 MHz）で測定した。¹Hおよび¹³CのNMRにおけるケミカルシフトはTMSを基準にした。

活性物質、スピロイデシンの高分解能MS（HRMS）および低分解能MSはJEOL JMS-700スペクトロメーターで測定した。

（５）部分加水分解

スピロイデシンの部分加水分解は試料をスクリュキャップ付試験管に入れ、0.2 mlの2 M HCl メタノールと0.8 mlのn-ヘキサンの混合溶媒中で74℃、12時間の条件で行った。加熱後、溶媒を窒素気流下で蒸発させ、残渣を少量のクロロホルムに溶解した。クロロホルム溶液は蛍光剤入りシリカゲル薄層プレートに塗布し、クロロホルム：メタノール＝9：1で展開した。展開後、UV下で分解物の位置を確認した。Rf 0.67, 0.46および0.23に主要分解ペプチドが認められた。これらの分解ペプチドは6 M HClで加水分解し、それぞれの構成アミノ酸および脂肪酸を高速液体クロマトグラフィーGC/MSで同定した。

（６）アミノ酸の同定

市販されていないD-およびL-ホモチロシンはイギリスのサザンプトン大学のMark Bradley 博士から分与されたものを標品として用いた。その他のアミノ酸標準品はシグマ社から購入した。加水分解されたアミノ酸はMarfey試薬（1-fluoro-2,4-dinitrophenyl -5-L-alanine amide）と反応させ、C18の逆相カラムを備えた高速液体クロマトグラフィーで分析した。分析条件は50 mMのトリメチルアミン-リン酸緩衝液（pH 3.0）に10%のアセトニトリル含む移動相のアセトニトリルを40%まで直線的に増加させた。流速は2.0 ml, 検出器の波長は340 nmである。本条件ではL-Phe(42.8 min), D-Phe(48.6 min), L-Htyr(60.4 min) およびD-Htyr(66.9 min)であった。

（７）生物活性の測定

10⁵細胞/mlの*Microcystis aeruginosa* (NIES-88)をMA培地中に分散させ、これに0, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ および10⁻⁴Mのスピロイデシンを添加して5日間培養した。培養後、細胞数を計数し、細胞数の変化を求めた。

.. キモトリプシンの活性阻害はN-benzoyl-L-tyrosine ethyl esterを基質として求めた。スピロイデシンの濃度が10⁻⁶Mで、基質濃度が2x10⁻³Mの時、活性が50%阻害された。

（８）隔離水界

隔離水界は中国人民共和国雲南省昆明市郊外に滇池にある中国科学院水生生物研究所滇池隣湖実験所内の小型隔離水界（10 m×10 m×1.5 m（深さ））3基を使用した。各隔離水界の底に水生植物の種子を含む湖の底質（10～15 cm）およびアオコが発生している湖水を入れ、2週間静置することで水質を安定させた。

① リジンおよびマロン酸の散布

1 kg のリジンを 5 L の水に溶解し、農薬散布機を用いて水面 1 平米当たり 10 g の割合で散布した。マロン酸も同様に水面 1 平米当たり 10 g の割合で散布した。

② 水質および生物のモニタリング

サンプリングは散布直前および直後、散布から 1、3 および 5 日後、以後は 1、2、3 および 4 週間後に行った。サンプリングポイントおよび測定ポイントは各隔離水界の 3 箇所のコーナーの壁面から 1 m 離れたところの深さ 50 cm に設定した。測定値は 3 箇所の平均値で表した。測定項目は pH、水温、溶存酸素、リジン濃度、マロン酸濃度、クロロフィル a、全マイクロシスチン量である。微細藻類は全植物プランクトンの細胞数を顕微鏡下で計数した。珪藻、藍藻およびユーグレナの細胞数は個別に計数した。また、植物プランクトンの捕食者であるミジンコ類 (cladocera) の個体数を経時的に計数した。測定項目のうち、pH、水温および溶存酸素は電極を用いた水質計 (東和工業、東京) で測定した。リジン、マロン酸およびマイクロシスチンは試料水 100 ml に同僚のメタノールを加え、密栓、遮光して航空便で国立環境研究所に運び測定した。リジンは渡辺らの方法 (16) で、マロン酸は Ting and Dugger の方法 (17) で定量した。全マイクロシスチン量は Kaya らの方法 (18) で定量した。細胞数は 3 % 中性ホルマリンを用いて細胞を固定し、顕微鏡下で計数した。

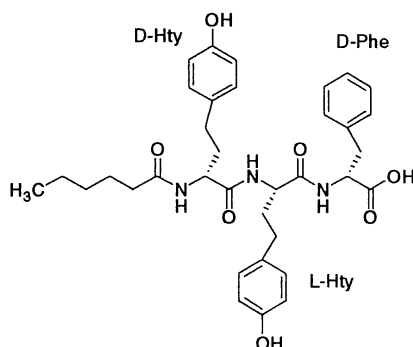
4. 結果・考察

中国、タイおよび国内の淡水湖沼の調査から、(1) 有機物の多い湖沼ではバクテリアが多く、アオコが発生しにくいこと、(2) バクテリア用の培地にはアオコと呼ばれる藍藻類、特にマイクロキステス (*Microcystis aruginosa*) が生育できないことをつきとめた。そこで、バクテリア用の培地の成分である酵母抽出物中に存在するアオコ増殖阻害物質の単離を行った。酵母抽出物の物質をイオン交換樹脂を用いて塩基性、酸性及び中性の 3 成分に分けた。各成分をアオコの増殖培地に一定量添加し、増殖阻害効果を調べてところ、中性の画分には活性が認められなかったが、酸性と塩基性の画分に増殖阻害活性が認められた。さらに、酸性と塩基性の成分をシリカゲルカラムおよび薄層クロマトグラフィーを用いて分画・精製し、増殖阻害物質を単離した。NMR (核磁気共鳴) や MS (質量分析計) を用いてこれらの増殖阻害物質の構造を解析した。解析の結果、酸性の成分にある増殖阻害物質はマロン酸 ($\text{HOOC-CH}_2\text{-COOH}$) であり、塩基性の成分はリジン ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH}$) であった。マロン酸の阻害活性を調べると、40ppm の濃度でマイクロキステス (NIES-102) の増殖を完全に止め、細胞を死滅させた。一方、塩基性の成分であるリジンの場合は 1.0 ppm の濃度でマイクロキステスを死滅させた。リジンはマイクロキステスやプランクトスリックス (*Planktothrix*) に対して活性を示したが、マイクロキステスと同じようにアオコを形成するアナベナ (*Anabaena*) に対してはリジン濃度を 0.1% まで上昇させても全く影響が見られなかった。また、クロレラ等の緑藻類、魚類、バクテリア、ミジンコ等に対しても 0.1% の濃度まで全く影響を示さなかった。バクテリアではリジンによって増殖が促進され、バクテリアを餌とする原生動物の増殖も観察された。以上の結果から、酵母抽出物中のアオコ形成藍藻マイクロキステスの増殖を阻害する物質はマロン酸とリジンであるが、リジンの活性はマロン酸の 40 倍であった。リジンはアオコ形成藍藻類であるマイクロキステスとプランクトスリックスに対して選択的に作用し、死滅させるが、他の生物に対しては全く影響を与えないことを明らかにした。

スピロイデシンは無色、非結晶固体で、 $\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O})276\text{nm}$ (ϵ 2200); $[\alpha]^{25}_{\text{D}}-62^\circ$ (c 0.56, MeOH)の性質を示す。グリセリンをマトリックスとして用いた高分解能FABMSで[M + H]⁺イオンがm/z 618.3134に認められた。この結果からスピロイデシンはC₃₅H₄₃N₃O₇(calcd for [M + H]⁺618.3179, Δ -4.5 mmu)と求められた。1Hおよび13CのNMRデータからスピロイデシンは脂肪酸を含むペプチドであることが示唆された。また、本物質はニンヒドリンに対して呈色しないことから、N-末端が修飾されていると考えられた。加水分解後のアミノ酸分析では2分子のホモチロシン (Htyr) と1分子のフェニルアラニン (Phe) が同定された。さらに、Marfey法による光学異性体分析ではD-およびL-のHtyrとD-のPheの存在が明らかとなった。

アミノ酸配列はNMRのHMBCスペクトル解析によって行った。その結果、N-末端にC₆no脂肪酸が結合したリニアペプチドとあることが明らかとなった。その配列(Hex)-(D,L-Htyr)-(D,L-Htyr)-(D-Phe)と考えられた。しかし、NMRデータからは光学異性体の同定はできなかった。そこで、スピロイデシンを部分加水分解して、その部分加水分解ペプチドの構造を調べた。得られた3種類の部分加水分解ペプチドのうち、ペプチドIは薄層クロマトグラフでRf0.67を示し、ニンヒドリンに対して陰性であった。高分解能FABMSで[M + H]⁺イオンがm/z 308.1838に観測された。この結果から、ペプチドIはC₁₇H₂₅N₁O₄と求められ、ヘキサン酸-DまたはL-Htyrであると判明した。Marfey法によるアミノ酸分析の結果、ペプチドIのHtyrはD-Htyrであると同定された。ペプチドIIはニンヒドリン陽性でD-およびL-Htyr、ペプチドIIIはニンヒドリン陽性で、構成アミノ酸がL-HtyrとD-Pheであった。以上の結果からスピロイデシンの構造は[(Hex)-(D-Htyr)-(L-Htyr)-(D-Phe)](1)であると同定した。

スピロイデシン (1.6 x 10⁻⁶M) は有毒アオコである*Microcystis aeruginosa* NIES -88の増殖を5日間で50%抑制した。また、たんぱく質分解酵素の一種キモトリプシンの活性を阻害した。



Spiroidesin

滇池 (Dianchi Lake) は中国南西部の雲南省昆明市標高1,700 mの高地にある。実験期間中の水温は20~22℃であり、天候は2日目の一時雨を除き概晴れであった。隔離水界実験場所の概観を図1に示した。

リジンおよびマロン酸の濃度変化

リジンを隔離水界BおよびCに10 g/m²を散布した時、散布2時間後の濃度は隔離水界Bで9.1 mg/L、Cで9.8 mg/Lであった。その後、隔離水界B、Cのリジンの濃度はともに低下し、2日後

にはB, Cそれぞれ3.8 及び4.0 mg/Lになった。14日後にはB, Cともリジンは完全に消失した。また、隔離水界Cに散布したマロン酸 (10 g/m³) も14日後には検出できなかった。

pHおよび溶存酸素(DO)の変化

リジンおよびマロン酸散布前の3基の隔離水界のpHは9.0付近にあった。リジン散布後の隔離水界BのpHは9.2と8.6の間で変動したが、この変動幅はコントロールの隔離水界とほとんど同じ変動であった。一方、リジンとマロン酸を散布した隔離水界CのpHは実験期間中を通して次第に低下していった。21日後には7.8を示し、28日後には若干上昇した。

実験開始前の隔離水界A, BおよびCの溶存酸素濃度(DOC)は18.6, 19.3 及び19.0 mg/Lであった。隔離水界BのDOCはリジン散布3日後にコントロールの70%に低下したが、7日後にはコントロールと同じ値に回復し、その後はコントロールと同じ濃度で推移した。一方、隔離水界Cでは実験期間を通してコントロールの60%であった。

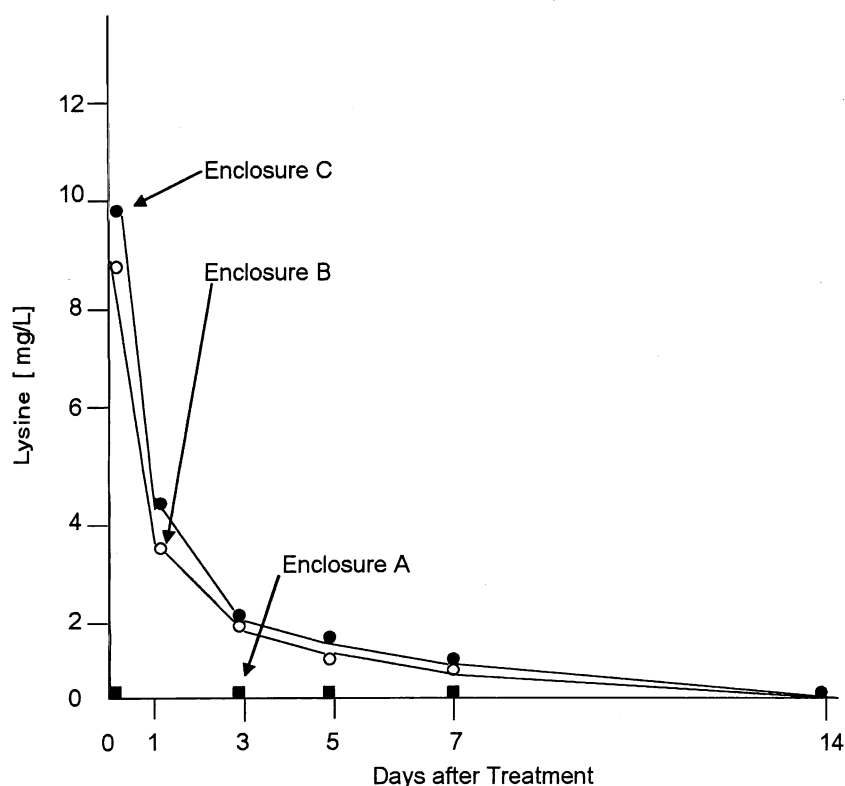


図1. 隔離水界における散布リジンの濃度変化

Enclosure A: コントロール; Enclosure B: リジン散布;

Enclosure C: リジン+マロン酸散布

植物プランクトンの遷移

リジンまたはリジン+マロン酸散布後、植物プランクトンのバイオマスをクロロフィル-a測定によって経時的に調べた。散布前、隔離水界A, BおよびCのクロロフィル-a量はそれぞれ79.5, 79.7 および76.4 μ g/Lであった。隔離水界Cではリジンおよびマロン酸の散布後、クロロフィル

ーa量がしだいに減少し、28日目には初期値の3.7%になった。これらの結果を図4に示した。隔離水界Bの場合、リジン散布後2日目に散布前の49%に減少し、7日目までその値を保った。7日目以後、クロロフィルーa量は増加し始め、28日目には初期値に到達した。コントロールである隔離水界Aでは実験期間中緩やかにクロロフィルーa量の増加が続いた。しかし、28日目には幾分減少傾向を示した。

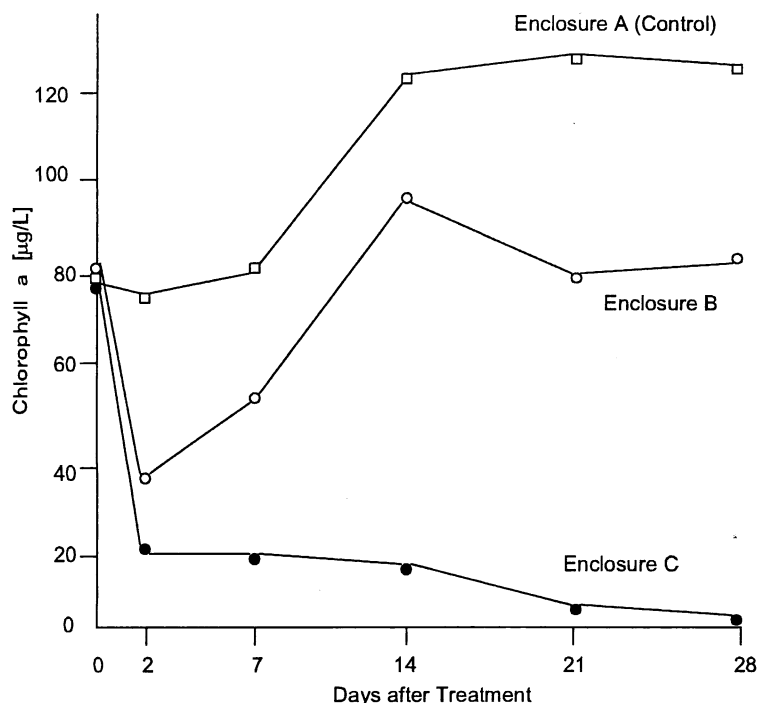


図2. リジンおよびリジン+マロン酸散布によるバイオマスの変化

Enclosure A: コントロール; Enclosure B: リジン散布;

Enclosure C: リジン+マロン酸散布

植物プランクトンの組成の変化では、実験開始前の隔離水界A, B, およびCのシアノバクテリアの細胞数はそれぞれ 6.2 , 6.2 および 6.4×10^6 cell/Lであった。散布後2日目には隔離水界BおよびCのシアノバクテリア細胞数は 2.3 および 1.3×10^6 cells/Lに減少した。しかし、コントロールの隔離水界Aでは 7.5×10^6 cells/Lに増加した。隔離水界BおよびCの珪藻の細胞数は散布2日目に焼く2倍に増えたが、コントロールの隔離水界Aでは係争の細胞吸うに変化はなかった。7日目には隔離水界Bの珪藻の細胞数はコントロールの5倍に増加したが、隔離水界Cではコントロールと同じ程度になっていた。7日目以後隔離水界Bの珪藻は減少し始め、28日目にはコントロールと同程度の細胞数を示した。

動物プランクトンの遷移

動物プランクトンとしてワムシ (rotifer), 原生動物 (protozoa), ノープリウス幼生 (nauplius), ミジンコ (cladoceran) およびカイアシ (copepod) が3つの隔離水界で確認された。ミジンコを除く動物プランクトンの個体数は実験期間中変動しなかった。隔離水界Cのミジンコの個体数は

リジンとマロン酸の散布後しだいに増加し、21日目に最大となり、その後急激に減少した。一方、隔離水界AおよびBではミジンコの個体数の変動は僅かであった。

全マイクロシスチン濃度の変化

実験開始前の隔離水界A、BおよびCの全マイクロシスチン濃度はそれぞれ8.3, 8.1および8.4 $\mu\text{g/L}$ であった。コントロールである隔離水界Aのマイクロシスチン濃度は実験開始7日目まで8.5 $\mu\text{g/L}$ 付近にあったが、その後増加し始め実験終了時には14.2 $\mu\text{g/L}$ に達した。隔離水界Bではリジン処理2日目に初期値の訳半分に低下した。7日目までさらに低下し続け、その後、緩やかに増加傾向に転じた。28日目には初期値と同程度の値に回復した。一方、隔離水界Cでは隔離水界Bと同じく2日目には実験開始前の値の約半分に低下した。その後さらに減少し、28日目には実験開始前の1/4にまで減少した。

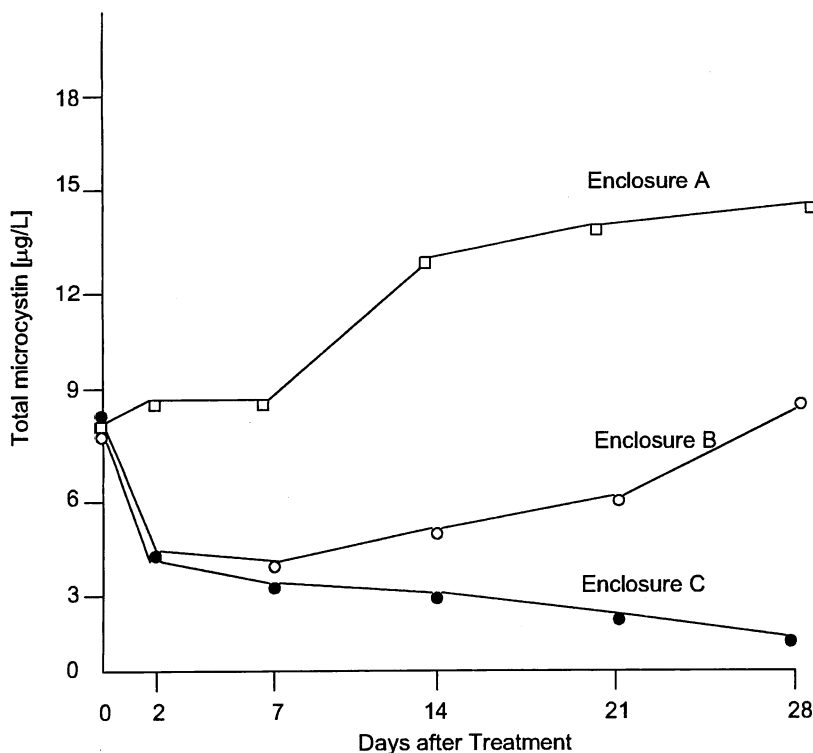


図3. リジンおよびリジン+マロン酸散布による隔離水界のマイクロシスチン濃度の変化

Enclosure A: コントロール; Enclosure B: リジン散布;

Enclosure C: リジン+マロン酸散布

大型藻類およびヒシの増殖

隔離水界BおよびCのアオコ (*Microcystis aeruginosa*) はリジンまたはリジン+マロン酸散布によって、散布後2日以内に沈殿した。3日目には両隔離水界は透明になったが、コントロールの隔離水界Aはのす居面はアオコで覆われていた。実験後半になって、ホザキノフサモ (*Myriophyllum spicatum* L.) およびエビモ (*Potamogeton crispus* L.) の増殖が隔離水界Cで観察された。また、ヒシ (*Trapa* sp) とエビモの増殖が隔離水界Bで観察された。実験開始後28日目にはヒシが隔離水界Bの水面を覆うまでになり、水面下ではエビモが少し観察された。一方、隔離水界Cではホザキノフサモとエビモが高密度に繁茂しているのが観察された。

5. 本研究により得られた成果

ヒトの必須アミノ酸であるリジンが有毒アオコ的一种マイクロシステスの増殖を阻害する活性を持つことは意外であった。また、マイクロシステス以外の生物に対して全く毒性を示さず、バクテリアや原生動物の増殖を促進するという結果はアオコがバクテリアや原生動物によって素早く分解・除去されることを示唆しており、実用性のある物質と評価している。増殖阻害物質の探索の継続によって、さらに効果的な物質の発見につとめたい。

これまで天然のアオコ増殖阻害物質を探索してきた。生態系においては微細藻類もアレロパシー (Allelopathy) 物質を放出して、アオコを含む他種生物の増殖を阻害していることが明らかとなった。本成果から、リジンの場合と同様にアオコの増殖を生態系のシステムを用いて抑制することは可能であるとの確信を得た。スピロイデシンはリジンに比べて構造が複雑であり、大量に得ることは不可能であろうが、生産者である *Anabaena spiroides* の細胞の利用を考えれば可能性はある。また、選択性の高いこれらの増殖抑制物質の利用は生態系の攪乱ではなく、攪乱された生態系の復元と位置づけるべきでと考える。

リジンとマロン酸をアオコ (*Microcystis*) に散布すると 2~3 日以内にアオコが沈殿死滅する。アオコが水面から除去されたことにより、アオコに代わって珪藻類が優占種となった。沈殿したアオコの分解にともなって、動物プランクトンのミジンコが一時的に増殖するが、散布後 3 週間後にはコントロールと同じ程度になった。散布したリジンおよびマロン酸は散布後 2 主観で完全に消失した。アオコの毒素であるマイクロシスチンは散布後 28 日目に散布前の 1/4 に減少した。隔離水界の底質に含まれていたホザキノフサモ、エビモ、ヒシなどの大型水生植物がアオコに代わって繁茂した。特に、ホザキノフサモはアオコの増殖阻害物質を産生することが知られていること、散布後の隔離水界の pH が 7.8 まで低下していることなどから、アオコが再発生しにくい水質となることが明らかになった。リジンとマロン酸の散布が小規模の水域のアオコ駆除に有効な手法となることを本隔離水界実験で明らかとなった。

6. 引用文献

- 1) Okino, T.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 501-504.
- 2) Sano, T.; Kaya, K. *Phytochemistry* 1997, 44, 1503-1507
- 3) Luesch, H.; Yoshida, W.Y.; Moor, R.E.; Paul, V.J. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1106-1112.
- 4) Jemenez, J.I.; Scheuer, P. J. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 200-203.
- 5) Nogle, L.M.; Okino, T.; Gerwick, W.H. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 983-985.
- 6) Gerwick, W.H.; Tan, L. T.; Sitachitta, N. In *Alkaloides*; Cordell, G., Ed.; Academic Press: San Diego, 2001; pp 75-184.
- 7) Sano, T.; Kaya, K. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 8603-8606.
- 8) Ishida, K.; Matsuda, H.; Murakami, M.; Yamaguchi, K. *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 184-187.
- 9) Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* 1984, 49, 591-596.
- 10) Watanabe, M.M.; Hiroki, M. *NIES-Collection List of Strains fifth Edition Microalgal and Protozoa*, Natl. Inst. Environ. Stud.: Japan 1997; p.32
- 11) Perlmann, G. E.; Lorrain, L. In *Method in Enzymology*; Academic Press: New York, 1970; Vol.19, pp64-108

- 12) Kaya K, Sano T, 1996. *Phycologia* 35: 117-119.
- 13) Hehmann A, Kaya K, Watanabe MM, 2002. *J. Applied Phycol.* 14: 85-89.
- 14) Hehmann A, Watanabe MM, Kaya K, 2002. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 28: 1147-1150.
- 15) Kaya, K.; Mahakhant, A.; Keovara, L.; Sano, T.; Kubo, T.; Takagi, H. 2002, *J. Nat. Prod.* 65, 920-921.
- 16) Watanabe Y, Imai K, 1982.. *J. Chromatog.* 239: 723-732.
- 17) Ting IP, Dugger Jr WM, 1965. *Anal. Biochem.* 12: 571-578.
- 18) Kaya K, Sano T, 1999. *Anal. Chim. Acta* 386:107-112.
- 19) Hanazato T, Yasuno M, Iwakuma T, Takamura N. 1984. *Jpn. J. Limnol.* 45, 153-157.

7. 国際共同研究等の状況

本研究はタイ国科学技術研究所および中国科学院水生生物研究所と共同研究である。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表 (学術誌・書籍)

<学術誌、(査読あり)>

- ① Kaya, K., Sano, T., Inoue, H., and Takagi, H. 2001, *Analytica Chimica Acta*, 450, 73-80. Selective determination of total normal microcystin by colometry, LC/UV detection and/or LC/MS.
- ② Kaya, K.; Mahakhant, A.; Keovara, L.; Sano, T.; Kubo, T.; Takagi, H. 2002, *J. Nat. Prod.* 65, 920-921. Spiroidesin, a novel lipopeptide from the cyanobacterium *Anabaena spiroides* that inhibits cell growth of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*
- ③ Hehmann A, Kaya K, Watanabe MM, 2002, *J. Applied Phycol.* 14: 85-89. Selective control of *Microcystis* using an amino acid - a laboratory assay.
- ④ Hehmann A, Watanabe MM, Kaya K, 2002. *Verh. Internat. Verein Limnol.* 28: 1147-1150. Killing of *Microcystis* by an amino acid: results of laboratory and enclosure experiments.
- ⑤ Kubo, T., Hosoya, K., Watabe Y., Tanaka, N., Sano, T. and Kaya, K. 2004, *J. Sep. Sci.*, 27, 316-324. Recognition of hepatotoxic homologues of microcystin using a combination of selective adsorption media.

<学術誌 (査読なし)>

- ① 彼谷邦光, 2002 「湖沼にいる有毒プランクトン」 公衆衛生 66巻7号 546-550

<書籍>

- ① 彼谷邦光, 2001 「有毒シアノバクテリア」 p148 (裳華房)
- ② 彼谷邦光, 2003 第5章らん藻のアオコ p106-122 「環境医学入門」 レナード・メラー著 清水・安達監訳, p416 (中央法規出版)

(2) 口頭発表

- ① Kaya, K. (2001) Selective determination of normal Microcystin using LC/UV and/or LC/MS,

International Symposium on Eutrophication and Cyanobacterial Bloom Control
-Theoretical Principles and Practical Eco-technology in Hypereutrophic Lakes-.
(Invited Speaker), (Kunming, China).

- ② Kaya, K (2002) “Bioactive compounds of freshwater cyanobacteria” in Satellite Symposium of Algae 2002 on Culture collection and Environmental Researches. (23 July, 2002)
- ③ Kaya, K. (2002) Special Lecture “ Bioactive compounds of freshwater cyanobacteria” at Department of Biochemistry, Abo Academi University, Turku, Finland (August, 21th, 2002)
- ④ 彼谷邦光 (2003)「シアノバクテリア (アオコ) の毒素の化学と分析法の開発」日本環境化学会 (功績賞受賞講演) (新潟) (2003年6月)
- ⑤ Kaya, K. Liu, Y-D, shen, Y-W., Xiao, B-D., Sano, T. 6th International Congress on Toxic Cyanobacteria (Bergen, Norway) June 24th, 2004, Controlling of toxic Microcystis waterblooms using lysine and malonic acid: an enclosure experiment.

(3) 出願特許

なし

(4) 受賞等

彼谷邦光 2003,6月 「環境科学功績賞」日本環境化学会 (2003)「シアノバクテリア (アオコ) の毒素の化学と分析法の開発」

(5) 一般への公表・報道等

- ① 朝日新聞 2001年11月14日朝刊12ページ「水世界で、アオコに悩む中国」
- ② 彼谷邦光 日本学術会議公開シンポジウム～飲み水の危機～
「湖沼にいる有毒プランクトン」 2001年11月29日東京慈恵会医科大学講堂
- ③ NHKサイエンスZERO 「有毒アオコを防げ」 2003年6月4日NHK総合テレビで放送

9. 成果の政策的な寄与・貢献について

アジアの内陸部に居住する人々のタンパク質源は淡水魚であり、富栄養化は養魚にとって必要な条件であるが、有毒アオコの発生は抑えてほしいというのが、アジア諸国の要望である。この考えはアジア特有であり、ヨーロッパにはない。このアジア型水質管理手法の開発のために本研究では「リジンとマロン酸」を用いた有毒アオコの選択的駆除法を開発した。この有毒アオコの選択的駆除法は世界で初めてのもので、国際的にも高く評価されており、今後、アジア各国への技術移転が考えられている。