

氏 名	キム 金	チュン 忠	ゼエ 載
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 1357 号		
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日		
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当		
研究科・専攻	農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻		
学位論文題目	Toxicological and Molecular Biological Study on The Toxic Dinoflagellate Genus <i>Alexandrium</i> (有毒渦鞭毛藻 <i>Alexandrium</i> 属の毒性及び分子生物学的研究)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 田 有 恆 教 授 中 原 紘 之 助 教 授 左 子 芳 彦		

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、赤潮原因藻であり麻痺性貝毒（PSP）を生産して水産業の分野で多大の損害をひきおこし、かつ食品衛生上の問題となる渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属について、韓国由来ならびに日本国由来のその毒分析、分子系統解析、分子同定法の開発及び個体群解析を行った結果をまとめたものである。

第一章においては、本研究の背景となる、渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の分類・同定の歴史を述べ、形態情報からのみの分類法の限界と分子分類の必要性を述べている。

第二章においては、麻痺性貝毒による死亡事件も発生している韓国で本属藻を多数分離するとともにそれらの毒分析をおこなった日本のそれとの比較をおこなった結果を述べている。無毒種の *A. fraterculus* を除いて全ての分離株は有毒であり、それらが生産する総毒生産量や毒成分は種間で異なっていた。

第三章においては、本属の形態的な分類は形態的中間種が多く存在するためきわめて困難であることから、新に LSU rDNA D1-D2 及び SSU rDNA の塩基配列情報を利用した分子系統解析の有用性について述べている。系統解析の結果、*Alexandrium* を14種の異なる系統群分けることができるとしている。

第四章においては、PSP 原因藻発生現場でのモニタリングの難問の一つである種の同定をいかに迅速かつ正確におこなうかを解決するための手段としての分子同定法の開発について述べている。種特異的な DNAProbe (LSU rRNA をターゲットにした) を作成し whole-cell FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いてそれぞれの反応性や特異性を調べたところ、それぞれの DNA probe はそれぞれの *Alexandrium* と高い特異性をもって反応することを示した。またこれらの DNA probe を韓国等の現場で出現している *Alexandrium* 藻類と反応させたところ、*A. tamarense* probe のみに高い特異性で反応したことから、現場で発生している藻類は *A. tamarense* であることを証明した。

第五章においては、本属の分布範囲が世界的規模で拡大していることと関連して、その原因を追跡するための手段として個体群の解析及びその特異的なマーカの探索をおこなった結果を論じている。LSU rDNA D1-D2 及び SSU rDNA の塩基配列の分析結果より、韓国産と日本産の *A. catenella* はそれぞれ異なる rRNA タイプを示し、それらは別々の個体群と考えてよいとしている。LSU rDNA D1-D2 領域で例外的なパターンを示した CMC2 株と CMC3 株も SSU rDNA 領域では他の株と同様な rRNA タイプを示したことから *A. catenella* ではあるが異なる個体群であるとしている。また、葉緑体の PsbA 遺伝子の 3' 末端をターゲットした PCR 産物の RFLP パターン及びその塩基配列の分析結果についても検討し、LSU rDNA D1-D2 での結果と同様に韓国産と日本産はそれぞれ異なる個体群であり、CMC2 株と CMC3 株はそれら2つの個体群とは異なるという仮説を補強している。この遺伝子は個体群間で変異を多く持つことから今後の個体群の解析に有効に使えらるかと考えている。更に *A. tamarense* と *A. catenella* から反復配列を介在した satellite DNA の存在も発見しており、将来 *Alexandrium* 属の系統や個体群の追跡に有効に利用できる可能性を示唆している。

第六章においては、上記内容を総括して、DNA 情報に基づく有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の新たな分類基準を提案し、

その情報に基づいて世界的に拡散しつつある本属藻類をモニタリングすることにより、麻痺性貝毒の被害を最小限に食い止めることに寄与できると結論づけている。

論文審査の結果の要旨

渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属は麻痺性貝毒を生産する種を多く含んでおり、また、最近になって本属の藻類が世界的な規模で分布範囲を拡大していることから、水産増・養殖の面からも、水産食品衛生学的な観点からも注目されている。しかしながら、本属を分類・同定するにはこれまでは形態的な特徴にのみ基づいてきたが、それはしばしば混乱を生じる原因となっていた。

本論文はこのような混乱を解消するために、毒組成分析、分子系統解析、分子同定の情報を加えて、韓国沿岸および日本国沿岸から採集した本属の属内の関係を整理するとともに、さらに個体群の解析を行った結果を示したものである。

本研究の評価すべき点は以下のとおりである。

1. 韓国沿岸海域から多数の *Alexandrium* 属藻類を分離し、それらのもつ 毒成分を分析した結果、韓国においても日本国におけると同様に有毒 な *Alexandrium* 属が多く存在することを確認した。それらの中で特に *A. tamarense* と *A. catenella* では生産する毒の成分及び優占する毒成分に明らかな差異があることをはじめて明らかにした。
2. 分類学的に混乱していた *Alexandrium* 属内の分類を、LSU rDNA D1-D2 及び SSU rDNA の塩基配列を用いた分子系統解析をおこなうことにより14の系統学的位置に分けることができることを明らかにした。特に有毒種として最近よく出現している *A. tamiyavanichii* については、その形態的特徴に DNA 塩基配列情報を加えて属内での新しい系統学的位置を明確にした。
3. *Alexandrium* 属内での有毒種を正確に同定するために、LSU rDNA D1-D2 領域中ある特異的な配列を有毒種の *A. catenella*, *A. tamarense*, *A. tamiyavanichii* 及び無毒種の *A. affine*, *A. fraterculus*, *A. insuetum* 及び *A. pseudogonyaulax* それぞれから選択して特異的な DNA probe を作成し、それらを FISH 法に供することにより迅速かつ正確な分子同定が可能となる方法を確立した。
4. 単独の DNA probe を用いた反応では *Alexandrium* 細胞内の蛍光強度が培養時間と共に減少することから、二重の DNA probe を作成することによって蛍光強度をほぼ2倍上げることに成功した。またこの二重 DNA probe を現場で応用したところ、極めて有効に目的細胞を検出することができた。
5. 日本国および韓国沿岸の *A. catenella* に個体群が存在するか否かを検討した結果、大きく分けて3つの個体群が存在することを明らかにした。

以上のように、本論文は麻痺性貝毒の原因となる渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属について、韓国はじめ種々の場所から株を集めてそれらのもつ毒量、毒組成、リボゾーム RNA 遺伝子解析などを詳細におこない、同属内での系統学的位置を明確にするとともに、それら情報を基に藻類を正確かつ迅速にモニタリングする方法を開発したものであり、海洋微生物学、微生物生態学、藻類学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成15年2月19日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。