

氏 名	ほそい たなべ しょう こ 細井(田辺) 祥子
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1358 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	Classification and Identification of Marine Dinoflagellate the Genus <i>Alexandrium</i> by Molecular Biological Technique (分子生物学的手法を用いた渦鞭毛藻 <i>Alexandrium</i> 属の分類・同定)
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

麻痺性貝毒の原因渦鞭毛藻 *Alexandrium* 属の数種は、サキシトキシンやゴニオトキシンなどの強力な神経毒を生産し、カキやホタテなどの二枚貝を毒化させることから、食品衛生の面からも、また水産養殖の面からも深刻な問題となっている。そのため、有毒種の発生を正確にモニタリングし、迅速に対応することによって被害を最小限に抑えることが重要である。しかしながら、本藻の分類基準が形態的特徴にのみ基づいていることと、その形態の差異が微妙で同定に熟練した技術と多大な時間を要することが原因となり、そのモニタリングを困難にしている。本研究においては、現在行われているモニタリングの問題点を解決し、本藻の分類・同定を正確に行うことを目的として、DNA の塩基配列に基づく本属の新たな分類基準の確立と、その配列を利用した迅速かつ簡便な同定・定量法の開発をおこなっている

第一章においては、これまでの研究の背景として、*Alexandrium* 属の形態による分類の不確実性とその同定の困難性があったことを述べている。また、このことを克服するための分子分類の導入の必要性を述べている。

第二章においては、細菌や古細菌の種の分類基準として用いられている DNA-DNA hybridization を本藻に応用し、この手法の分類基準としての有用性を検討するとともに、統一された分類体系の確立について述べている。まず、形態的特徴および rDNA の塩基配列の比較から同定された *A. tamarense* 4 株、*A. catenella* 4 株、*A. ostenfeldii* 1 株および *A. tamiyavanichii* 1 株からの全 DNA を用いて、固相法により DNA-DNA hybridization を行なっている。その結果、異種間の DNA 相同性が 72% 以下であるのに対し、同種間の相同性は 85% 以上と高い値を示したこと、rDNA の系統関係より最も近縁と考えられた *A. tamarense* および *A. catenella* 間の相同性は 60-72% であるのに対し、系統関係が遠いと考えられる他の種間における相同性は 50% 以下の低い値であることから、相同性の値は種の系統関係を反映してしているとしている。また、種を分ける基準となりうる相同性の値は約 80% であることを提唱している。これらの結果から、DNA-DNA hybridization 法によって種の分類を行うことは可能であり、微細藻類において本法で得られた値が新たな分類基準になりうる結論づけている。

第三章においては、分子生物学的手法の一つである FISH 法を用いて、現場海域での本藻の迅速かつ簡便な同定・識別法を確立したことを述べている。28S rDNA D1/D2 領域の塩基配列の比較から、日本での発生件数が最も多い有毒種 *A. tamarense*、*A. catenella* および無毒種 *A. affine* のそれぞれに特異的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブを作成したところ、それらプローブは厳密な種特異性を示したことから、多種多様な微細藻類が存在する現場海水でのある種だけの検出に応用できるものであった。次に、サンプルとなる本藻の固定法・固定時間、hybridization の温度・時間、プローブの洗浄の温度・時間などを検討し、FISH 法のプロトコルを確立している。確立した FISH 法は、その処理法が非常に簡便であるとともに、培養細胞の検出まで約 30 分しか要さない非常に迅速なものであった。さらに、確立した FISH 法に改良を加え、現場海水から *A. tamarense* および *A. catenella* を迅速かつ簡便に検出することに成功した例を示している。改良された FISH 法を用いて顕微鏡観察したところ、安定した細胞数の回収率があり、実際に *Alexandrium* 属が発生している現場海

水から、*A. tamarense* 細胞および *A. catenella* 細胞を定量的に検出することが可能であった。本法が硬い細胞壁をもつ微細藻類の検出に有用であることから、*Alexandrium* 属のみならず、他の有毒・有害微細藻類への応用も可能であるとしている。

第四章においては、Taq man プローブを用いて、*Alexandrium* 栄養細胞の正確な定量的検出を行うとともに、FISH 法では同定不可能な休眠細胞（シスト）の同定を行った結果について述べている。28S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列の比較から、有毒種 *A. tamarense*, *A. catenella* および *A. tamiyavanichii* に特異的な PCR プライマーおよび Taq man プローブを作成するとともに、種々の有毒・有害微細藻類の培養細胞から作成したプライマーとの特異性を調べている。おのおののプライマーは種特異性が高く、標的とする種以外の DNA から増幅が見られなかった。その検出感度は非常に高く 1 細胞からの検出が可能であった。段階希釈した培養細胞を現場海水に添加し、それぞれ PCR を行うことによって細胞定量的ための検量線を得ることができ、それを用いて現場海水中からの本属の検出を試みた結果、種の同定のみならず細胞数の定量が可能であることを示している。最後に、本法を雌雄異株の接合により培養系において作成した *A. tamarense* のシストに供した結果、シスト 1 細胞の検出が可能であるとしている。ここで確立した Real Time PCR 法は、顕微鏡を用いることなく迅速かつ簡便で高感度な細胞の同定・定量を行うことが可能であり、さらには、シストの効率良い同定・定量も可能な汎用性の高い手法であると結論している。

第五章では、以上の研究を総括して、新たな分類基準を提唱するとともに、今までになく迅速かつ簡便で正確な同定・定量が可能な 2 つの手法の現場への応用を提案するとともに、これらの方法が、しばしば生じる本藻のモニタリングにおける混乱を解決し、貝毒の被害の縮小に大きく寄与すると結論づけている。

論文審査の結果の要旨

麻痺性貝毒の原因藻 *Alexandrium* 属は、現在、形態的特徴のみに基づいて分類・同定されている。しかしながら、形態的特徴に基づく分類・同定の正確性には問題があり、しばしば混乱が生じている。そのため、形態的特徴に代わる新たな分類基準の構築と、その基準に基づく迅速かつ簡便な同定法の開発が長年切望されてきた。また、その方法を用いての貝毒発生海域のモニタリング法の開発も必須であった。本論文は、これらの問題解決のために、まず DNA-DNA hybridization を用いて新たな分類基準の構築を試み、さらには新しいモニタリングの方法を検討し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. 細菌や古細菌の種の分類基準に用いられている DNA-DNA hybridization を本藻の分類に応用した結果、DNA-DNA hybridization の相同性の値は *Alexandrium* 属における種の系統関係を反映しており、種を分ける基準として約 80 % の相同性の値を設定できると考えた。本法の微細藻類への応用に関する報告は未だなかったが、本研究において、DNA-DNA hybridization による種の分類が可能であり、*Alexandrium* 属を含む微細藻類の新たな分類基準となりうる可能性があることを示唆した。
2. *Alexandrium* 属有毒種である *A. tamarense* および *A. catenella* を、正確に同定する FISH 法を培養細胞において確立した。確立した FISH 法は、細胞検出までに 30 分しか要さず、さらにはその実験操作が非常に簡便なものであった。現在までに報告のある FISH 法は、すべて細胞検出まで 3 時間以上要しており、本研究によって確立された FISH 法の迅速性は極めて高いものであることを明らかにした。
3. 確立した FISH 法を改良し、現場海水中から *A. tamarense* および *A. catenella* を同定・定量した結果、標的種の細胞数が非常に少ない海水や、他の微細藻類が大量に含まれる海水からも *A. tamarense* および *A. catenella* を特異的に検出することが可能であった。さらに、本法を用いた場合、海水に含まれる標的細胞のうち約 80 % の細胞検出が可能であり、細胞定量を正確に行える可能性を示した。これらの結果から、従来の形態的特徴に基づく同定・定量と比較して、本法は迅速性、簡便性、客観性および正確性の点で非常に優れたものであり、モニタリング現場へ応用することにより貝毒の被害防止の一助となりうることを示した。
4. Taq man probe を用いて、有毒種 *A. tamarense*, *A. catenella* および *A. tamiyavanichii* を定量的検出する手法を確立した。現在までにこれらの種を簡便に定量する手法はなく、本手法の確立によって、現場におけるモニタリングの労力が

格段に減少するのではないかと考えられる。また、本プローブを用いたこれら3種の検出は感度が非常に高く、1細胞の細胞検出が可能であり、現在では不可能な厳密なモニタリングが可能になることを示した。

5. 確立した手法を用いて、培養系において作成した *A. tamarense* の休眠細胞（シスト）を迅速かつ簡便に定量検出した。シストは、*Alexandrium* 属のブルームの種（seed population）として非常に問題になっているが、形態的特徴から種を同定することが不可能なため、厳密なモニタリングが全く行われていない。確立した本手法のモニタリングへの応用により、今までにない厳密な発生予測が可能であることを示した。

以上のように、本論文は麻痺性貝毒の原因藻である *Alexandrium* 属の分類および同定の問題点を克服し、本藻の正確なモニタリングを行う方法を確立した論文であり、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。