【215】

氏　名（本籍）	出村幹英（茨城県）
学位の種類	博　士（理　学）
学位記番号	博甲第 4678 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 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	**Study on the Genetic Diversity and Life Cycle of the Red Tide-forming Harmful Algae *Chattonella* (Raphidophyceae) Using Microsatellite Markers** （マイクロサテライトマーカーを用いた有害赤潮形成藻 *Chattonella*（ラフィド藻綱）の遺伝的多様性と生活史に関する研究）

主　査	筑波大学教授（連携大学院）	理学博士	笠井文絵
副　査	筑波大学教授	理学博士	渡邉　信
副　査	筑波大学教授	理学博士	濱　健夫
副　査	筑波大学准教授（連携大学院）	理学博士	河地正伸

論文の内容の要旨

Chattonella antiqua，*C. marina*，*C. ovata* の 3 種は，不等毛植物門ラフィド藻綱に所属する海産の植物プランクトンである。3 種は夏季に瀬戸内海などの西日本沿岸域で大量繁殖し，赤潮を形成して，養殖漁業に多大な被害をもたらしてきた。この *Chattonella* は，1990 年以前には，インドや日本といったごく限られた海域でのみ生息が確認されていた。しかし 1990 年以降，オーストラリアや USA など 10 カ国以上の国々で次々と確認されるようになり，急速な分布拡散が懸念されている。分布域の拡大には，大型船舶バラスト水といった人為的要因で引き起こされた可能性が指摘されているが，今のところ科学的な証拠はない。*Chattonella* の分布拡散の実態について明らかにするには，世界の *Chattonella* 集団の多様性と類縁関係について調査し，生活史や生理特性などと併せて比較解析することが必要である。しかし，世界各地の集団について解析する前に，様々な種類の *Chattonella* が高頻度に確認される日本（特に瀬戸内海）における *Chattonella* 集団の現状について把握しておく必要があると考えられる。本研究では，3 種の遺伝的多様性を詳細に把握するとともに，集団の遺伝的多様性に影響を与える生殖様式を明らかにすることで，瀬戸内海における *Chattonella* 集団の現状について把握することを目的とした。本研究では，遺伝的多様性と生殖様式の解析に利用可能な分子マーカーとして，共優性マーカーであるマイクロサテライトマーカーを用いた。通常，マイクロサテライトマーカーは種に特異的とされており，種ごとに開発を行う必要がある。

(1) マイクロサテライトマーカーの開発

C. antiqua（NIES-2 株）の DNA を用いて，14 のプライマーセットの開発に成功した。このプライマーセットの有効性について，*C. antiqua*，*C. marina*，*C. ovata* の 3 種，そして他のラフィド藻 3 種（*Chattonella subsalsa*，*Heterosigma akashiwo*，*Haramonas dimorpha*）で試験した。その結果，*C. antiqua*，*C. marina*，*C. ovata* に対してのみ有効であることが明らかになり，3 種の近縁性が強く示唆された。

(2) 3 種の遺伝的多様性解析と分類体系の改訂

3種104株の形態観察の結果，典型的形態を示す細胞は識別可能であるが，*C. antiqua* と *C. marina* を識別する形質である『細胞長50μm』という基準は明確ではなく，境界付近の平均細胞長を示す株が複数確認されること，*C. ovata* を特徴づける発達した液胞が，*C. antiqua* と *C. marina* の株でも観察されることがあることが明らかになった。

遺伝的多様性解析では，まず，*C. antiqua* 21株，*C. marina* 17株，*C. ovata* 21株の合計59株において，核のITS（580bp），葉緑体のrbcL遺伝子（520bp），ミトコンドリアのCOI遺伝子（480bp）を用いて分子系統解析を行った。その結果，ITSでは59株中51株が同一配列となりほとんど変異がなかった。3種全体で認められた配列の変異率は，0.71％に過ぎず，その他の藻類における種内変異率と比較しても非常に低いものであった。また，rbcLにおいても，3種全体で認められた配列の変異率は，1.09％であり，この数値もその他藻類の種内変異の範囲に収まるものであった。COIの3種全体の変異率は，4.26％と解析した3分子中では一番大きな変異が検出された。しかし，COIの変異率も珪藻の *Sellaphora* 属内の交配グループ内に認められた変異率（3.7％）と同じレベルのものであった。ただし，クレードの支持率が低いながらも，rbcLでは *C. marina* が多く集まるクレード，COIでは *C. ovata* が多く集まるクレードなどが認識された。マイクロサテライトマーカーによる解析は，*C. antiqua* 41株，*C. marina* 31株，*C. ovata* 32株の合計104株を用いて行った。開発したマーカーにより104株すべての株識別が可能であった。各株の増幅断片データ行列の比較から株間の遺伝的距離を算出し，系統解析を行った結果，認められたクレードと形態種3種との間に対応関係が認められた。

しかし，それらのクレードにおいても，少数ではあるが，他の種が混在していた。

以上の結果に基づき，3種の分類学的措置について検討した。3種では，種の同定基準である形態形質の連続性，そして遺伝的分化の程度の低さから判断し，3種を独立した種と言うよりも1つの種としてまとめざるを得ないという結論に達した。しかし，典型的形態を示す株が存在し識別できること，そのような株の形態は長年の継代培養によっても維持されること，さらに，形態種に対応する遺伝的グループが認められること，などを考慮すると，1種にまとめた上で，種内分類群として認識するのが現段階では妥当であろうという結論に達した。そして，3種を3変種とする分類学的取り扱いを提案した。

(3) マイクロサテライトマーカーによる核相解析による生殖様式の検証

Chattonella 3種104株におけるマイクロサテライトマーカーの増幅断片の解析から，すべての株において，いずれかのマーカーで2本の増幅断片を確認した。このことは3種104株のすべてが2倍体でヘテロ接合体であることを示唆しており，3種が接合を行っていることが推察された。更に減数分裂の時期について調べるために，マイクロサテライトマーカーによる1細胞単位の核相解析を小型細胞について行った結果，DEM-124株では20細胞中8細胞で，DEM-3011株では19細胞中9細胞で，1本バンドのみが検出された。すなわち小型細胞の時点で減数分裂が既に起きていることが示唆された。また栄養細胞と同じ核相（2倍体ヘテロ接合体）を示す小型細胞の存在を本研究で初めて確認した。この2倍体の小型細胞は，接合を経ずに栄養細胞から直接シスト（休眠細胞）へ変化する可能性が考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では，水産上深刻な問題を引き起こす赤潮形成藻 *Chattonella* 3種について，個体識別が可能な精度のマイクロサテライトマーカーを開発し，形態形質および遺伝的多様性の詳細な調査･解析結果に基づいて，3種の分類系の改訂を提唱した。また同マーカーを用いて，細胞レベルの核相解析等を行うことで，生殖様式や生活史に関する新しい知見を得た。これらの結果は，水産学及び分類学的貢献だけでなく，分布の広域化が懸念される *Chattonella* の世界規模の分子生物地理学的研究へと発展させる上で重要な基礎的知見を与え

たと言える。

よって，著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。