【236】

氏　名（本籍）	ザーレネジャード　サハール（イ ラ ン）
学位の種類	博　　士（理　　学）
学位記番号	博　甲　第　6111　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 23 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	**Phylogeography of Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*** （有毒シアノバクテリア *Cylindrospermopsis raciborskii* の系統地理学的研究）

主　　査	筑波大学准教授（連）	博士（理学）	河　地　正　伸
副　　査	筑波大学教授	博士（理学）	石　田　健一郎
副　　査	筑波大学教授	理学博士	井　上　　勲
副　　査	筑波大学教授	理学博士	渡　邉　　信

論 文 の 内 容 の 要 旨

Cylindrospermopsis raciborskii は陸水環境に広く生息し、大量繁殖する糸状体性のシアノバクテリアである。本種の作る毒は、肝臓毒の一種で、シリンドロスパモプシン（CYN）と deoxy-CYN の 2 つが知られる。全ての *C. raciborskii* が毒を作るのではなく、有毒性集団と毒のない無毒性集団が報告されている。有毒性集団の分布は限定されており、はじめオーストラリアで環境問題を引き起こして問題となり、次いでタイからも確認されるようになった。有毒性の集団の分布拡大が危惧されているが、分布拡大の実態は不明であり、幾つかの仮説が提唱されているに過ぎない。また本種の有毒性集団と無毒性集団との間の系統関係は不明瞭であること、そしてごく限られた集団のみが解析された結果に基づいて、グローバルな系統地理学的関係が論じられてきたのが現状である。そこで、本研究では、まず日本国内から初めて確認された有毒株について詳細な解析を行った。次に大陸スケールのグローバルな集団間の関係、そして有毒性と無毒性の集団間の関係について明らかにするために、世界各地の様々な集団に由来する培養株を収集し、既に登録されている遺伝子データを含めて系統地理学的解析に取り組んだ。また本研究を通して、シリンドロスパモプシンの代謝系遺伝子の 1 つ *CyrJ*（硫酸基転移酵素）に特異的なプライマーセットを独自に開発することで、DNA レベルで毒の有無を確認できる手法、そして種内の系統関係を調べるのに有効な遺伝子間領域の配列（ITS-L）のダイレクトシーケンシングを可能とする研究手法を新たに確立することが出来た。これにより効率的に多数の培養株の毒性の検査や配列情報を取得することが可能となった。

(1) 日本南方域からの有毒性 *Cylindrospermopsis raciborskii* の発見とその毒の特徴

様々な集団由来の培養株の毒性について、LC-MS 分析と *CyrJ* 遺伝子の特異的検出法で調査を行った結果、オーストラリアとタイの培養株に加えて、沖縄石垣島で採取、確立された培養株（ISG9）が deoxy-CYN をもつことが分かった。日本で初めての有毒性株である。他の有毒株では CYN のみが検出されたが、興味深いことに、沖縄産有毒株 ISG9 では CYN は検出されずに、deoxy-CYN のみが存在していた。生物濃縮率は deoxy-CYN の方が格段に高い事から、CYN よりも環境問題を引き起こすリスクが高いと考えられた。今後、本種について、石垣島だけでなく近隣の島嶼を含めて詳細な分布調査が必要と言える。

2）*Cylindrospermopsis raciborskii* の系統地理学的解析

遺伝子間領域の配列（ITS-L）は、幾つかのシアノバクテリアで種内の系統関係を解析するのに有効な配列情報として報告されている。本研究では、このITS-Lによる系統解析を行うために、世界各地の集団に由来する30の既知配列情報と新たに取得した61株の配列情報を用いた。またITS-L分子系統樹の系統関係を比較検証するために、フィンガープリント法の1種であるHighly Iterative Palindrome（HIP）のバンドパターン解析から構築したクラドグラムも用いた。

分子系統解析の結果、ITS-L分子系統樹では、①主要な4つのクレードが認識されること、②4クレードはそれぞれ大陸スケールの地理的区分とほぼ一致すること、③有毒性の培養株は1つのクレードにのみ含まれることが明らかになった。HIPで得られたクラスター間の関係もこの分子系統解析の結果を強く支持する結果となった。2つの異なる解析で同じ結果が得られたことから、この関係は高い信頼性をもつと考えられる。地理的区分と4クレードの関係は以下の通りである。クレードⅠ：ユーラシア温帯域、クレードⅡ：アフリカ熱帯域、クレードⅢ：太平洋西岸の熱帯・亜熱帯域、クレードⅣ：アメリカ熱帯域。この中で、クレードⅢの大部分は有毒株で構成されており、他のクレードには有毒株は存在しないことから、このクレードⅢを有毒株クレードとして認知することができる。

一方で2つの例外的な事例も見出されている。1つはオーストラリアに由来する2つの無毒株（AJ582277 and AJ582278）が、有毒株とともにクレードⅢに含まれていたことである。これ以外のオーストラリア株は全て有毒株であることから、この2つの株は、二次的に毒を作る能力を失ったと考えられた。2つ目は、タイ産の株（DMK51016）で、LC-MS分析では無毒で、クレードⅠに含まれているにも関わらず、サイズの異なる *CyrJ* 遺伝子断片が検出された。この無毒株と同じ池から、クレードⅢに含まれる有毒株が採取されていることから、同所的に存在する有毒性集団から、クレードⅠに所属する無毒集団に *CyrJ* 遺伝子の水平伝搬が起きている可能性が示唆された。

ITS-Lの配列情報をもとに算出した遺伝的多様性の解析では、クレードⅠが0.92と最も高く、次いで、クレードⅣの0.64、クレードⅡの0.54、クレードⅢの0.19という結果となった。クレードⅠはヨーロッパからアジアにいたる広大な範囲の温帯域の集団由来の培養株で構成されており、エリアサイズや自然環境の多様さが、高い遺伝的多様性の背景にあることが推察された。

審査の結果の要旨

本研究において、有毒性シアノバクテリア *Cylindrospermopsis raciborskii* を研究対象として、世界規模の集団を解析することにより、地理的区分に基づく集団の進化系統的独自性に加えて、有毒性集団の独自性を明らかにすることができた。すなわち、少なくとも大陸スケールで区分された集団間では、今のところ遺伝的な交流は無かったと推定できる。また有毒性集団は、太平洋西岸の熱帯・亜熱帯域に限定されており、その北限が日本南方域にあることが、本研究により初めて提示された。本研究で得られた結果は、過去に提案された大陸スケールの分布拡散や越境移動の可能性に関する仮説が誤りであることを示している。有毒シアノバクテリアは環境問題の原因生物として社会的な関心も高く、本研究で得られた独自の系統地理学的結果は、重要な基礎的、科学的な知見を提供するものと言える。

平成24年2月2日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

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。