

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 レニ ヤップ デジェト

珪藻は海洋の微小プランクトンの主要な一群であり、わが国沿岸はじめ世界の海洋に広く分布して、海洋の基礎生産を担う重要な分類群であるが、一部の属種は赤潮や貝毒の原因となる有害種とされている。特に、浮遊珪藻 *Pseudo-nitzschia* (以下 *PN*) 属の 11 種は、脳神経細胞を不可逆的に破壊するドーモイ酸というアミノ酸の一種を生産し、記憶喪失性貝中毒の原因となるため、その生態や生産毒の貝への蓄積機構は世界各地で研究されてきた。しかし、*PN*属に属する 32 種はほとんどが長さ 10- 200 μ m で、幅はその 1/10 以下という極めて細い針状の外形をもち、電子顕微鏡でのみ観察可能な形態形質による分類がされているため、天然に発生する種の迅速な定量分析ができず、生態研究の大きな妨げとなっていた。このような背景のもと、本研究は *PN* 属を形態および遺伝子塩基配列を基にした特徴を用いて、種の同定計数手法の開発を目指し、生態研究に役立てようとしたものである。

研究材料としては東京湾奥部とフィリピン中部のレイテ島サンペドロ湾で、孔径 20 μ m の目合いのプランクトンネットあるいはヴァンドーン採水器により 2006 年から 2009 年の間に定期的に採集した試料を主に用いた。これら試料は、光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡下で形態を観察し、原記載など過去の形態観察例と比較して、種を査定した。さらに、これらの種の培養株を作成して LSU rDNA の塩基配列を決定し、プローブ作成に供した。培養株の作れなかった種は過去の文献などの情報を元にプローブを作成した。また、原記載を含む過去の形態観察結果を参考に *PN* 属の 32 種を、光学顕微鏡で区別ができる 6 つのグループにわけ、種の同定のための識別検索の基準とした。そして、本研究では、*PN* 属の同定手法は用いることのできる観察機器によって異なるということを基本的な考え方とし、光学あるいは電子顕微鏡による形態観察と、LSU rDNA の遺伝子塩基配列に基づいて作成されたプローブを組み合わせて、4 種の観察手法を考案した。

まず第一法として、光学顕微鏡のみを用いて試料の形態を観察し、その結果を識別検索グループにあてはめ、種を同定する方法を考案した。この方法は、発生する種数が少ないサンペドロ湾のような海域の試料には応用可能で、種ごとに計数することができたが、東京湾のように11種が発生する海域の試料の定量には不十分であった。このため第二法として、第一法に基づいて分けた細胞を識別検索グループごとに異なる容器に移し入れて、電子顕微鏡下で種の査定をしながら計数することにしたところ高い再現性が認められ、実用的と考えられた。ただしこの方法は、種ごとに万単位の細胞数を分取して電子顕微鏡観察に供する必要があるため、結果を得るまでに時間と多大な労力を要する欠点があった。第三法は、FITC 標識した種特異性の高いプローブを用いた FISH 法により蛍光顕微鏡下で計数して、同時に第一法の形態情報と合わせて種ごとに確認する方法を考案した。同じ試料を第三法と第二法で計数した結果はよく一致し、遺伝子塩基配列と形態観察結果の組み合わせによって、第二法に比べて短時間で種別に計数することが可能になった。また *PV* 属全体をターゲットにしたプローブを作成して、これまで報告のない種が出現した場合にも対応可能になった。ただし、作成したプローブには交叉反応するものがあること、また1種ごとに試料を作成する必要があるため、第一法に比べて試料の準備と観察に時間を要した。そこで、さらにこれらを改良し、第四法として、第三法で用いたプローブに3種類の発色の異なる蛍光標識を結合させ、これらを同時に用いることにより、交叉反応の問題を解決し、観察時間を削減させた。以上のことから、これら4種の観察手法が有用であることがわかった。

以上本研究は、その困難さから研究の立ち遅れていた *PV* 属珪藻類に関し、過去に記載のある32種の詳細な形態観察結果と遺伝子塩基配列を基に、現場で使用できる簡易な同定手順を、必要とされる研究精度に応じて選ぶように4方法考案したものである。この成果は *PV* 属に限らず、光学顕微鏡では同定困難な種を含む、多くの珪藻の属に応用できるものであり、生態研究における実用的同定手法が作られたものともいえる。すなわち、有毒種を含めた *PV* 属の生理生態研究において研究材料の同定の標準化を踏ることが容易になり、水圏生物科学の発展に資するところが極めて大であると考えられた。よって、審査委員一同は本論文をもって、本研究の申請者デジエット レニ ヤップさんが博士（農学）の学位を授与するに値する研究者であると判断した。