

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 船木 紘
Name

学位論文題目： 本邦産のシガテラ中毒原因藻*Gambierdiscus*属の多様性と分布ならびに
Title of Dissertation 有毒種*G. silvae*の生理

学位論文要約：
Dissertation Summary

南日本沿岸域を中心とした本邦沿岸域では、毒化した魚類を摂食することによって引き起こされるシガテラ中毒が散発的に発生し、食品衛生上の問題となっている(Oshiro et al., 2010; Toda et al., 2012; Yogi et al., 2013)。本中毒は、海藻付着性の渦鞭毛藻*Gambierdiscus*属が産生する神経毒の1種であるシガトキシンに起因する可能性が指摘されている(Yasumoto, 2001)。従って、本邦沿岸域における本属藻類の発生種とその分布を網羅的に明らかにし、さらに発生種の毒性や増殖特性を解明することは、シガテラ中毒発生機構の解明に向けて重要な課題である。これまでに本邦沿岸域に発生する本属藻類として、*Gambierdiscus australes*および*Gambierdiscus scabrosus*がその細胞の形態学的特徴に基づいて種同定・記載されている(Nishimura et al., 2014)。また、その培養株を確立したものの、既報種との形態学的特徴の差異を見出すことが困難であった系統型も報告され、これらはリボソームRNA遺伝子(ribosomal RNA gene: rDNA)の塩基配列に基づく分子系統解析により、*Gambierdiscus* sp. type 2および*Gambierdiscus* sp. type 3とそれぞれ名付けられた(Nishimura et al., 2013; 神川・左子, 2008)。そのうち*Gambierdiscus* sp. type 2は、その後海外の研究者によって*Gambierdiscus jejuensis*として記載されている(Jang et al., 2018; Nishimura et al., 2013)。

先に述べたように、シガテラ中毒の発生機構を解明するためには、当該海域における本属藻の発生種を明らかにすることが重要である。発生種を把握する手法として、Nishimura et al. (2013)は現場海域より単離した本属藻類の細胞を培養することにより多数の株を作成し、これらの株を分子系統解析に供することによって、本邦沿岸域における本属藻類の発生種ならびにそれらの分布について報告している。しかし、多数の培養株を作成するためには手間と時間を要すること、さらに沿岸域にて発生する*Gambierdiscus*属藻の中には、通常の培養条件下では培養株の確立が困難なものも存在する可能性が考えられる。この様な状況を踏まえて、沿岸域における本属藻の発生種を網羅的に明らかにする手法として、近年メタバーコーディングが注目されている(Biessy et al., 2021; Kohli et al., 2014a, 2014b; Roué et al., 2020; Smith et al., 2017a, 2017b; Ternon et al., 2020)。メタバーコーディングとは、解析対象とする試料中に存在するDNA配列を網羅的かつ大量に取得することが可能な手法であり、本手法を用いることにより、試料中に含まれる微生物群集の全体像を把握することが可能となる。また、本手法はDNAを対象とする分子生物学的な手法であるため、培養株の確立を必要としない。従って、本手法を用いることで本邦沿岸域における本属の発生種の全体像を簡便かつ網羅的に解明することが可能であると考えられるが、本邦沿岸域においては未検討である。

シガテラ中毒の発生機構を明らかにするためには、上述したメタバーコーディングによる発生種の網羅的な把握に加えて、その発生種の毒性を明らかにすることが重要である。これまでに、*Gambierdiscus*属は種によりその毒性が大きく異なることが報告されている(Chinain et al., 2021; Tester et al., 2020)。なかでも、北アメリカのメキシコ湾およびカリブ海沿岸域から南東大西洋のカナリア諸島沿岸域にかけて分布する*Gambierdiscus silvae*は、Neuro-2aによる細胞毒性試験により、これらの沿岸域にて発生する*Gambierdiscus*属6種/系統型と比較して最大で1,000倍高い細胞毒性を有していることが報告されている(Robertson et al., 2018)。このため、*G. silvae*はこれらの海域において、シガテラ中毒原因生物の最重要種として注目されており、“Superbug”と呼称されている(Robertson et al., 2018)。

また、シガテラ中毒の発生機構を解明するためには、当該海域において発生する*Gambierdiscus*属

各種の増殖に対する水温、塩分ならびに光をはじめとする環境条件の影響を明らかにすることは極めて重要である。前述した様に、*Gambierdiscus silvae*は、シガテラ中毒原因種として大西洋沿岸域にて注目されており、本種についてはその毒性だけでなく、水温、塩分ならびに光条件などの環境条件が本種の増殖に及ぼす影響について検討されてきた(Leynse et al., 2017; Ramilo et al., 2021; Xu et al., 2016)。この様に、*G. silvae*は大西洋沿岸域の各地から報告され、その毒性や増殖特性が報告されているが、本邦沿岸域においても18S rDNAに基づく分子系統解析により*Gambierdiscus cf. silvae*とされた株が分離されている(Adachi et al., 2016)。本報告によると、本種はKuno et al. (2010)やNishimura et al. (2013)の調査の対象とされてきた沿岸域の浅い水深(3 m)からではなく、水深30 mの深い水深からその細胞が単離され、その培養株が確立されていることから、既報の本邦産*Gambierdiscus*属4種/系統型(*G. australes*, *G. jejuensis*, *G. scabrosus*および*Gambierdiscus* sp. type 3)とは異なる増殖特性や毒性を有する可能性が指摘されているが、それらの検討は未だ行われていない。

そこで本研究では、本邦におけるシガテラ中毒の発生機構を明らかにする上で基盤となる知見を取得するために、まず18S rDNAを解析対象の遺伝子とするメタバーコーディングを実施することにより、本邦沿岸域にて発生する本属藻類を網羅的に明らかにしようとした。その際、渦鞭毛藻を含むAlveolata上門の18S rDNAのV8-V9領域を特異的に増幅するプライマーを新たに設計し、これを用いることにより渦鞭毛藻類の18S rDNAの取得割合を増やし、より多くの*Gambierdiscus*属藻に由来する塩基配列を取得することを目指した。次に、本プライマーを用いたメタバーコーディングにより、本邦沿岸域の亜熱帯にあたる沖縄県および温帯域にあたる高知県における本属藻類の群集組成を比較することにより、本邦沿岸域における本属藻類の水平分布について検討した。また、両地点において水深3 m地点および30 m地点の異なる2水深における本属藻類の群集組成を比較することにより、本邦沿岸域における本属藻類の鉛直分布についても検討した。さらに、水温、採取深度(水深3 m/30 m)および採取地点(沖縄/高知)が、本属藻類の発生に及ぼす影響について考察した。さらに、大西洋においてシガテラ中毒原因種として重要視されている*G. silvae*に注目し、本邦沿岸域より得られた*Gambierdiscus cf. silvae*株を用いて、まず光学顕微鏡および電子顕微鏡観察に基づく形態学的特徴の観察ならびに28S rDNAおよび18S rDNAに基づく分子系統解析により、本種が*G. silvae*であるのか検討した。さらに、本種のマウス毒性を腹腔内投与ならびに経口投与により検討した。最後にその発生予測も視野に入れて、本種株を用いて水温、塩分ならびに光強度がその増殖に及ぼす影響を明らかにした。

1) メタバーコーディングによる本属藻類の多様性と水平的・鉛直的な分布

*Gambierdiscus*属を含む渦鞭毛藻を解析対象とするメタバーコーディングを行うにあたり、これらの配列を特異的にPCR増幅可能なプライマーを用いることが望ましい。そこでメタバーコーディングに使用可能な渦鞭毛藻に特異的なPCRプライマーを新規に設計するために、Adl et al. (2012)によって再編された真核生物の分類、すなわち5種類のSupergroup (Amoebozoa, Archaeplastida, Excavata, OpisthokontaおよびSAR:後述)のそれぞれに注目し、SARはさらに3種類のSuperphylum (Alveolata, RhizariaおよびStramenopiles)に細分化し、GenBankよりそれぞれの18S rDNA配列を取得した(504属、2,766配列)。取得した18S rDNA配列を用いて、Alveolataに特異的でありかつ、渦鞭毛藻類について可能な限り種分解能が高くなるように、18S rDNAの複数の超可変領域を増幅するプライマーの設計を行った。その際、メタバーコーディングに用いるMiSeq Reagent Nano Kit v2 2 × 250 bp PE (Illumina, San Diego, CA, USA)による制約から、DNA配列が取得可能な増幅断片長(500 bp以下)となるようにフォワードプライマーおよびリバースプライマーを設計した。その結果、渦鞭毛藻類を含むAlveolataの18S rDNAのV8-V9領域を特異的に増幅することが期待されるプライマーセットを1組設計した。設計したフォワードプライマーは18SV8FAlveolata、リバースプライマーは18SV9RAlveolata3と名付け、これらのプライマーの3'末端にメタバーコーディングに用いるアダプター配列を付加したプライマーを、それぞれ18SV8FAlveolata+adapterおよび18SV9RAlveolata3+adapterと名付けた(Table 1)。以降は、18SV8FAlveolata+adapterおよび18SV9RAlveolata3+adapterの組み合わせをAlveolataプライマーセットとする。次に、Alveolata 15種とStramenopiles 9種のゲノムDNAを鋳型として、Alveolataプライマーセットおよびユニバーサルプライマーセット[V8f (Bradley et al., 2016)および1510R (Amaral-Zettler et al., 2009)]をそれぞれ用いてPCRを行った後に、得られたDNA増幅産物を電気泳動に供した。その結果、前者のプライマーセットを用いることにより得られたDNA増幅産物に関して、渦鞭毛藻類(Dinoflagellates) 15種のいずれのゲノムDNA溶液を鋳型として用いた場合であっても、増幅産物が確認されたものの、Stramenopiles 9種のいずれのゲノムDNA溶液を鋳型として用いた場合であっても、DNA増幅産物は確認されなかった(Fig. 1)。また、後者のプライマーセットを用いることにより得られたDNA増幅産物に関して、Alveolataの渦鞭毛藻類(Dinoflagellates) 15種ならびにStramenopiles 9種のゲノムDNA溶液を鋳型として用いた場合、いずれも増幅産物が確認された(Fig. 1)。

メタバーコーディングに供する藻類付着性微生物試料を調製するために、2015年1月から2018年2月までの3年間に、サンプリング2地点(KONおよびOUN, Fig. 2)からそれぞれ47試料と42試料の海藻

試料を採取した。その際、*Gambierdiscus*属の鉛直的な分布状況を検討するために、両県にて水深2-8 m地点および水深30 m地点からスキューバダイビングによって、現場海域にて優占している海藻を海水中にて1 Lポリビンに入れた。サンプリングは、春(3-5月)、夏(6-8月)、秋(9-11月)および冬(12-2月)の各季節に1回実施して、合計89の海藻試料を採取した。採取した海藻試料から藻類付着性の微生物を剥離させ藻類付着性微生物試料を調製した。次に、上述した藻類付着性微生物試料から微生物由来のDNAを抽出し、Alveolataプライマーセットを用いてPCR増幅した増幅産物を用いて、MiSeqによるメタバーコーディングに供した。MiSeqによって得られた89試料の配列データは、ウェブサイトのGalaxy (<https://usegalaxy.org/>, Afgan et al., 2018)に導入されているMothur (ver. 1.36.1, Schloss et al., 2009)を用いてデータを編集した。その結果、Mothurによるペアエンド配列の作成および配列データの前処理によって、55,158ユニーク配列および1,294,322リードが得られた。これらのユニーク配列はローカルBLAST検索により、4種類のSupergroup、3種類のSuperphylumおよびそれら以外の真核生物として同定した。89試料における全分類群に占めるAlveolataのユニーク配列数およびリード数の平均割合および標準偏差は、それぞれ85.6% ± 12.4%および76.0 ± 31.2%となり、得られた配列の多くをAlveolataの配列が占めていた。従って、AlveolataプライマーセットのAlveolataに対する特異性は高いことが示唆された。次に、Alveolataに属したユニーク配列のうち、ローカルBLAST検索によって*Gambierdiscus*属の参照配列と90%以上の配列類似度を示すユニーク配列を選抜したところ、50リード以上のリード数を示すユニーク配列を40配列取得した。これら40配列および既報の本属藻類各種の塩基配列を用いた最尤系統樹およびベイズ系統樹を作成し、本属藻類におけるユニーク配列の分子系統学的位置を検討したところ、本属6種/系統型(*G. australes*, *G. caribaeus*, *G. jejuensis*, *G. scabrosus*, *G. silvae*および*Gambierdiscus* sp. type 3)のクレードに属するユニーク配列が得られた(Fig. 3)。さらに、上述した6種/系統型とは異なる系統学的位置に、4つの新規系統型がクレードを形成した。これらの新規系統型は、Nishimura et al. (2013)によって報告された*Gambierdiscus*属のClades II-Vに基づいて、それぞれ*Gambierdiscus* sp. Clade II 1、*Gambierdiscus* sp. Clade II 2、*Gambierdiscus* sp. Clade II 3および*Gambierdiscus* sp. Clade VI 1と名付けた(Fig. 3)。これら本属10種/系統型の水平的・鉛直的な分布傾向を求めるために、各種/系統型のリード数に基づくHeatmap分析を行ったところ、4種/系統型は亜熱帯域にのみ、1系統型は温帯域にのみ、残りの5種/系統型はいずれの海域にも分布していた(Fig. 4)。また、鉛直分布に関しては、5種/系統型は浅い水深にのみ、2系統型は深い水深にのみ、残りの3種/系統型はそのいずれにも分布した(Fig. 4)。従って、本邦沿岸域において新規系統型を含む本属10種/系統型は、種/系統型によりその分布様式が異なることが示唆された。

2) *Gambierdiscus* cf. *silvae*株の種同定

Adachi et al. (2016)により報告された、2013年4月19日に沖縄県うるま市中城湾の水深30 m地点に由来する海藻より分離された*Gambierdiscus* cf. *silvae* dOHHG1株、ならびに2019年5月14日および2020年2月7日に沖縄県石垣市川平湾の水深30 m地点由来の海藻より分離された*Gambierdiscus* spp. ISK190517_M4株およびISK200207_A3株について、それらの形態学的特徴を精査し、これら3株の形態学的特徴をカナリア諸島産の*G. silvae*のそれと比較することで、その種同定を試みた。まず、光学顕微鏡を用いてdOHHG1株の細胞の奥行き(depth、細胞の背側から腹側の長さ)、横幅(width、腹側からみて左右の長さ)および縦幅(length、細胞の頂点から底辺の長さ)を測定したところ、それぞれ $59.0 \pm 8.4 \mu\text{m}$ (41.6-75.5 μm , $n = 100$)、 $54.2 \pm 8.7 \mu\text{m}$ (43.8-80.2 μm , $n = 100$)、 $36.3 \pm 4.6 \mu\text{m}$ (27.7-45.8 μm , $n = 21$)であった。これらの測定結果は、いずれもカナリア諸島産の*G. silvae* VGO1022株と比べて多少の変動があるものの、平均長はいずれも概ね一致した。次に、電子顕微鏡を用いて3株の鎧板構造を観察したところ、dOHHG1株の鎧板配列はPo, 4', 0a, 6", 6c, 6s, 5"', 0p, 2'''となり、残りの2株の配列はPo, 4', 0a, 6", 6?, 6s, 5"', 0p, 2'''であった。また本種と近縁種(*G. holmesii*および*G. polynesiensis*)を区別する上で重要視される鎧板構造について観察したところ、いずれの株も*G. silvae* VGO1022株と同様の鎧板構造を示し、近縁種のそれとは明確に区別することが出来た。次に、*G. silvae* 3株の28S rDNAのD8-D10領域およびdOHHG1株の18S rDNAに基づく最尤法およびベイズ法による分子系統解析を行ったところ、いずれの分子系統樹においても本邦産*G. silvae*の塩基配列は海外産*G. silvae*と同じクレードに属した。これらの結果を踏まえて、本研究に用いた本邦産本属3株を*G. silvae*と同定した。

3) *G. silvae*株の毒性

*G. silvae*と同定した本属藻3株(dOHHG1株、ISK190527_M4株およびISK200207_A3株)の腹腔内投与および経口投与によるマウス毒性を検討するために、各株の大量培養および細胞集藻物を調製し、Nishimura et al. (2013)の方法に従ってマウスバイオアッセイに用いる投与試料、すなわちシガトキシンを含むと考えられる脂溶性画分およびマイトトキシンを含むと考えられる水溶性画分をそれぞれ調製した。その際、腹腔内投与のためにはそれぞれ 1.50×10^4 細胞、 5.00×10^4 細胞および 1.50×10^5 細胞相当の画分を、経口投与のためには 5.25×10^5 細胞および 1.75×10^6 細胞相当の画分を調製した。腹腔内投

とおよび経口投与に用いる両画分を、1% Tween 60を含む0.85%生理食塩水にそれぞれ溶解させ、それらを3匹のddyマウス(雄、約20g、Japan SLC、Shizuoka、Japan)へ投与した。まず、脂溶性画分を腹腔内投与した結果、dOHHG1株については 200×10^4 MU/1,000 cellsの毒性を示し、次いで残りの2株はいずれも 67×10^4 MU/1,000 cellsの毒性を示した。水溶性画分を投与した結果、ISK190517_M4株については 200×10^4 MU/1,000 cellsの毒性を示し、次いで残りの2株はいずれも 67×10^4 MU/1,000 cellsの毒性を示した。これらの毒性値のうち、dOHHG1株の脂溶性画分の毒性値は本邦産本属藻類の同毒性値において2番目に、残りの2株のそれらは3番目に高かった。また3株の水溶性画分による毒性は、本邦産本属藻類の毒性の中で最も高かった。また経口投与の結果、いずれの株の脂溶性画分も毒性を示し、その毒性値はいずれの株も 5.71×10^4 MU/1,000 cellsとなった。本邦産の*G. silvae*は、腹腔内投与による毒性のみならず、経口投与による毒性も示したことから、本種は本邦沿岸域におけるシガテラ中毒の原因種の1つである可能性が示唆された。

4) *G. silvae*株の増殖に及ぼす環境要因の影響

本邦産*G. silvae*株の増殖に及ぼす水温および塩分条件の検討に先立ち、*G. silvae* dOHHG1株の直接計数値に加えてクロロフィル*a*蛍光量を測定することにより、両手法により得られた結果の相関関係を検討した。また、クロロフィル*a*蛍光量の測定には、Turner fluorometer (Model 10-AU、Turner Designs、CA、USA、Brand et al., 1981)を用いた。その培養試験には、Yoshimatsu et al. (2014)によって本邦産本属4種/系統型の培養試験に最適であることが報告されているIMK/2培地を用いた。その結果、両測定値に基づく増殖曲線は同様の傾向を示し、両者の測定結果には正の相関関係が認められた($r = 0.969$)。従って以降の本邦産*G. silvae*株の水温塩分試験の増殖評価には、クロロフィル*a*蛍光量を用いた。

次に、本邦産*G. silvae* 3株の発生予測に向けて、本種をYoshimatsu et al. (2014)により報告された本属4種/系統型に適用した水温・塩分培養試験に従って、25°C塩分35の培養条件からステップワイズ法を用いて、水温5段階(17.5、20、25、30および35°C)および塩分5段階(塩分20、25、30、35および40)の組み合わせ条件下にて培養試験を実施し、2日毎にクロロフィル*a*蛍光量を測定した。また2日毎に測定したクロロフィル*a*蛍光量の連続した3回分の値に基づいて、最小二乗法(Guillard, 1973; Yamaguchi and Honjo, 1989)によって増殖速度(μ)を算出した。また、全25試験区における最大増殖速度に基づいて、Kriging gridding法(Surfer 8、Golden Software、USA)を用いてコンタ図(等高線図)を作成し、コンタ図に基づく増殖準至適条件(最大増殖速度の80%の値が得られる条件)を求めた。その結果、*G. silvae* dOHHG1株、ISK190517_M4株およびISK200207_A3株が増殖した水温の範囲は、それぞれ20.0-30.0、17.5-30.0および17.5-30.0°Cとなった(Fig. 5)。同様にそれらの塩分の範囲は、それぞれ塩分25.0-40.0、25.0-35.0および25.0-40.0であった(Fig. 5)。また、いずれの株についても、最大増殖速度は水温25°Cかつ塩分30の条件下にて得られた(Fig. 5)。各培養株の増殖準至適水温は、それぞれ21.5-27.7、21.6-27.0および21.5-28.4°Cであり、増殖準至適塩分はそれぞれ塩分28.4-35.3、28.2-33.6および25.0-36.2であった(Fig. 5)。また各培養株の増殖可能水温(増殖が見られた試験区の上限および下限条件)は、それぞれ20.0-30.0、17.5-30.0および17.5-30.0°Cであり、塩分はそれぞれ塩分25.0-40.0、25.0-35.0および25.0-40.0であった(Fig. 5)。これらの結果から、*G. silvae* 3株の増殖に影響を与える水温の増殖至適条件、増殖準至適条件および増殖可能条件は、株間において殆ど違いが見られず(Fig. 5)、本結果を本邦の亜熱帯域や温帯域における沿岸海域に見られる水温と比較した結果、本種はその亜熱帯から温帯の幅広い水温下にて増殖が可能であることが示唆された。また、本邦産株の水温に対する増殖特性は、Ramilo et al. (2021)およびXu et al. (2016)により報告されているカリブ海産およびカナリア諸島産*G. silvae*のそれらと同様の傾向を示し(Fig. 5)、各分布域における海水温に適した増殖特性をもつことから、本種は熱帯/亜熱帯/温帯と広い海域に分布する汎世界種であると考えられた。本邦産*G. silvae* 3株の増殖に影響を与える塩分の各種条件についても、株間においてほぼ同じ結果となり、高塩分な外洋水の影響を受ける本邦沿岸域の塩分環境に適した増殖特性を示すと考えられた。一方、Xu et al. (2016)により報告されているカリブ海産*G. silvae*の塩分に対する増殖特性は、本邦産種と比較して極めて高塩分よりの幅広い塩分に適しているが(Fig. 5)、これはカリブ海産*G. silvae*がメキシコ湾の南西から西インド諸島付近の高塩分な環境に適したためと考えられ、両海域における塩分環境の違いは、両海域にて生息する*G. silvae*の塩分に対する増殖応答の差異に反映されている可能性が示唆された。

最後に、本邦産本種3株をYoshimatsu et al. (2016)により報告された方法に従って、Yamaguchi et al. (2014)が開発した光強度可変型恒温培養システムを用いた12段階の光強度条件下にて培養試験を実施し、2日毎に採取した培養液の一部の細胞密度を光学顕微鏡IX-70 (Olympus)下にて直接計数により求めた。各培養株の光強度条件については、dOHHG1株では0.00、5.00、11.2、32.5、52.0、112.0、213.0、405.0、610.0、810.0、1204.0および1620.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ にて、ISK190517_M4株およびISK200207_A3株では0.00、10.2、29.1、56.2、101.5、215.8、399.7、561.5、781.2、1236.6および1621.5 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ にて実施した。また2日毎に測定した細胞密度の連続した3回分の値に基づいて、最小二乗法(Guillard, 1973; Yamaguchi and Honjo, 1989)によって増殖速度(μ)を算出した。また、得られた各光強度下におけ

る最大増殖速度に基づいて、各株の増殖至適光強度および増殖準至適光強度をPlatt et al. (1980)による photosynthesis-light (*P-L*) modelによる回帰式に当てはめることにより求めた。その結果、*G. silvae* dOHHG1株、ISK190517_M4株およびISK200207_A3株が増殖を示した光強度の範囲は、それぞれ11.2-610.0、5.75-718.2および5.75-718.2 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であった(Fig. 5)。また各株の回帰式より求めたdOHHG1株、ISK190517_M4株およびISK200207_A3株の増殖至適光強度条件は、それぞれ83.0、42.0および56.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であった(Fig. 5)。また、各培養株の増殖準至適光強度(最大増殖速度の80%の値が得られる光強度)の範囲は、それぞれ256.0、13.0-318.0および19.0-267.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であった(Fig. 5)。さらに、dOHHG1株の増殖可能光強度および半飽和定数は、それぞれ11.2-610.0および14 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 、ISK190517_M4株ならびにISK200207_A3株の増殖可能光強度いずれも5.75-781.2 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であり(Fig. 5)、これら2株の半飽和定数はそれぞれ6および9 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ であった。これらの株の光に対する増殖応答に関して、その増殖至適光強度、増殖準至適光強度ならびに増殖可能光強度幅には、3株に共通した傾向が見られ、特に増殖至適光強度はいずれの株も100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 以下となった(Fig. 5)。一方、本邦産本属4種/系統型の増殖至適光強度(Yoshimatsu et al., 2016)は、いずれも*G. silvae*のそれらよりも大きく(Fig. 5)、また最大増殖速度の半分の値が得られる半飽和光強度(*K*)について、*G. silvae* 3株のそれら(6-19 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$)は他の本属4種/系統型のそれらよりも小さいことから、本種は他4種/系統型と比べて低光強度の環境に適応していると考えられた。一方、前述したメタバーコーディングによる*G. silvae*の鉛直分布調査によると、本種は水深30 m地点よりも水深3 m地点において、より多く発生する傾向を示した。本研究における培養試験により、本種は弱光を好み、強光(800 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ 以上)を好まない傾向にあることが明らかとなったことから、本種の分布傾向はその増殖特性と一見一致していないように見受けられた。この不一致に関して、複数の先行研究(Ballantine et al., 1988; Nakahara et al., 1996; Villareal and Morton, 2002)において、強光が照射される浅い水深において、本属藻類がその付着基盤となる海藻などの影を積極的に利用することにより強光を緩和するシェーディング効果を利用する可能性が指摘されている。そのため、本種についても海藻などの影を利用して浅い水深における強光を避けつつ、生存している可能性が考えられる。海外産の*G. silvae*株の光に対する増殖応答について、Leynse et al. (2017)およびXu et al. (2016)により報告されているカリブ海産およびフロリダ半島産*G. silvae*は、それぞれ光強度が400.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ および100.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ の条件下にて良好な増殖を示している(Fig. 5)。このうちカリブ海産本種の110.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ における増殖速度は400.0 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ におけるそれとほぼ同等であることから、これら2株の光に対する増殖特性は、本邦産*G. silvae*と同様の傾向を示していると言える。従って、*G. silvae*は弱光下において増殖・発生が可能な増殖特性を有する種であると考えられ、日本のみならず世界的にも鉛直的に幅広く発生している可能性が示唆された。

5) 本研究の総括

本研究では、*Gambierdiscus*属を含む渦鞭毛藻を解析対象とするメタバーコーディングを行うにあたり、本属藻類などの渦鞭毛藻を含む分類群のAlveolataを特異的にPCR増幅可能なプライマーを新規に開発し、それらをAlveolataプライマーセットと名付けた。次に、本邦の温帯域に当たる高知県および亜熱帯域に当たる沖縄県の水深2-8 m地点および水深30 m地点から採取した海藻試料を用いて、それらの18S rDNAのV8-V9領域の塩基配列に基づくメタバーコーディングを行った。その際、Alveolataプライマーセットを解析に用いたところ、全試料より取得した全真核生物に占めるAlveolataのユニーク配列数およびリード数の平均割合は、それぞれ85.6%および76.0%となり、得られた配列の多くをAlveolataの配列が占めていたことが明らかとなった。さらに、メタバーコーディングによって得られた配列から、本邦沿岸域には既報の本属藻類5種/系統型のみならず、発生報告例のない*G. caribaeus*および新規な4系統型の存在を見出した。また、メタバーコーディングによって、本邦沿岸域の亜熱帯域および温帯域の浅い水深のみならず深い水深にも分布することが明らかになった*G. cf. silvae*について、Adachi et al. (2016)によって報告された本種の培養株を含む3株は、形態学的にも分子系統学的にも大西洋カナリヤ諸島産*G. silvae*とほぼ一致する特徴および分子系統学的位置を示したことから、これら3株を*G. silvae*と同定した。これらの株はいずれも高いマウス毒性を示したことから、本邦におけるシガテラ中毒原因種の1種である可能性が考えられた。さらに、本種の水温・塩分および光に対する増殖特性は、他の本邦産本属4種/系統型とは異なる増殖特性を示し、この特性はメタバーコーディングによって明らかとなった本種の分布海域における環境条件と概ね対応していると考えられた。

また、本研究におけるメタバーコーディングによって見出された新規4系統型については、未だこれらの培養株が確立されていないため、今後はそれら新規系統型の培養株を確立し、その毒性や増殖特性について明らかにすることが望まれる。また、今回用いたメタバーコーディングでは、本属10種/系統型の細胞数に基づく現場動態については明らかにすることが出来ないため、今後は本属10種/系統型に特異的なプライマー・プローブを用いた定量PCR法等を用いることにより、本邦沿岸域

(様式5) (Style5)

における本属10種/系統型の発生量を明らかにし、発生量に基づく現場動態の解明が期待される。また、本邦におけるシガテラ中毒の原因種の可能性が示唆された*G. silvae*について、本種が産生する毒の性状分析ならびに毒生産量をLC-MS/MSなどの機器分析により決定し、現場海域における魚の毒化状況との関係について解明されることが期待される。さらに、本種を含めた本邦産種の増殖特性について、今後は水温・塩分および光などの環境要因を複合的に組み合わせて培養試験を行うことにより、本邦沿岸域の現場海域に即した複合的な環境要因が本属藻の増殖に与える影響について検討することが望まれる。これらの検討により得られる結果を踏まえ、将来的には本邦産本属各種の発生量、毒性/毒量、増殖特性を総合的に考慮することで、日本におけるシガテラ中毒発生のメカニズムの解明、およびそれらを踏まえたシガテラ中毒の発生予知を行うことが期待される。

Table and Figs

Table 1 Details of primers targeting the 18S rDNA V8–V9 region used in this study.

Primer name	Direction	Primer sequence with adapter ^a (5'-3')	bp	Tm ^b	Annealing position ^c	Fragment length ^d	Reference
18SV8FAlveolata+adapter	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> GCCCTTAGATGTTCTGGGCT	53	83	1441-1460	394	This study
18SV9RAIveolata3+adapter	Reverse	GTCCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTACGACTTCTCCTTCTCTAAG	59	80	1743-1767		This study
V8f	Forward	ATAACAGGTCTGTGATGCCCT	21	67	1425-1445	371	Bradley et al. (2016)
1510R	Reverse	CCTTCYGCAGGTTCACTAC	20	66 ^e	1776-1795		Amaral-Zetter et al. (2009)
V8f+adapter	Forward	<u>TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG</u> ATAACAGGTCTGTGATGCCCT	54	82	1425-1445	438	Modified in this study
1510R+adapter	Reverse	GTCCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTCYGCAGGTTCACTAC	54	82 ^e	1776-1795		Modified in this study

^a Underlined sequences are adapter sequences for Nextera XT Index kit primer (Illumina, San Diego, CA, USA)

^b Melting temperature (Tm) calculated by the Oligos Calculator on the Promega website (<https://www.promega.jp/resources/tools/bio/math/tm-calculator/>)

^c Primer annealing sites to *Karenia* (*Gymnodinium*) *mikimotoi* (GenBank accession number: AF009131)

^d Length of PCR fragments amplified using each primer pair

^e Tm value calculated from the 18S rDNA sequence of *Karenia* (*Gymnodinium*) *mikimotoi* (AF009131) due to the presence of mixed bases in the primers

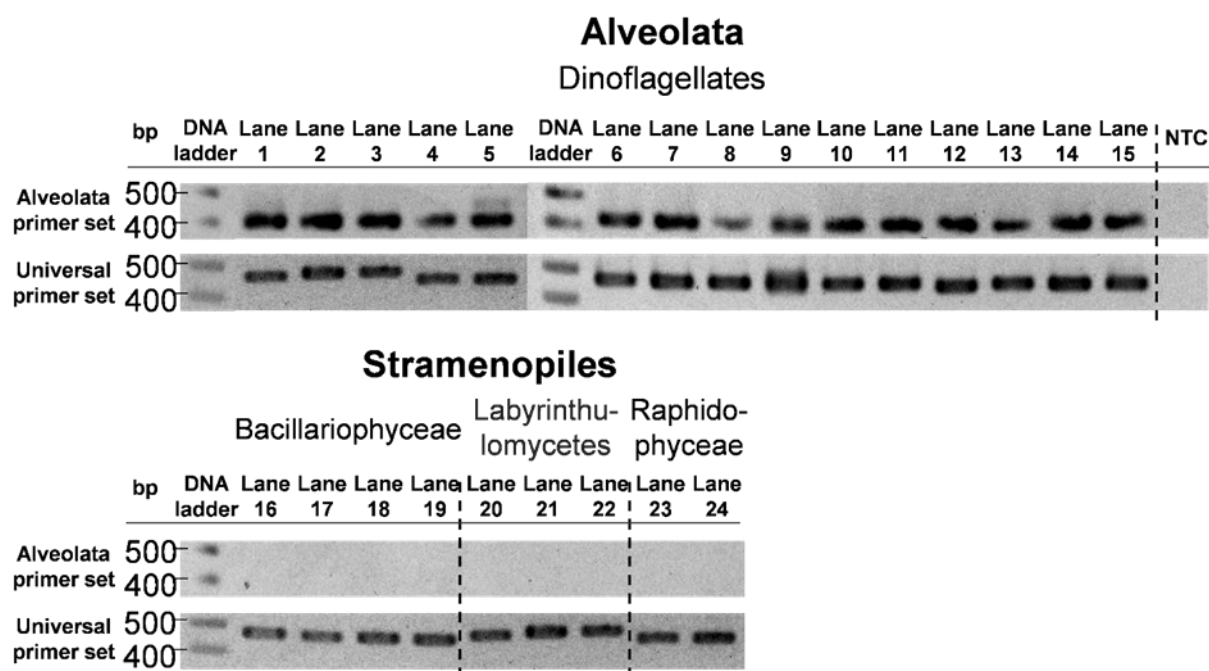


Fig. 1 Specificity of Alveolata primer set (primers 18SV8FAlveolata+adapter and 18SV9RAIveolata3+adapter) analyzed by electrophoresis of DNA fragments amplified using various gDNA of Alveolata (dinoflagellates) and Stramenopiles (bacillariophyceae, labyrinthulomycetes, and raphidophyceae) as templates shown below. As positive controls, amplicons with universal primer (primers V8f+adapter and 1510R+Adapter) were electrophoresised.

Lane 1: *Alexandrium pacificum* (formerly *A. catenella*), Lane 2: *Alexandrium catenella* (formerly *A. tamarense*), Lane 3: *Coolia* sp., Lane 4: *Fukuyoa* cf. *yasumotoi*, Lane 5: *Gambierdiscus scabrosus*, Lane 6: *Gambierdiscus* cf. *silvae*, Lane 7: *Ostreopsis* cf. *ovata* (Med/Pac clade), Lane 8: *Ostreopsis* sp. 1, Lane 9: *Ostreopsis siamensis* (formerly *Ostreopsis* sp. 6), Lane 10: *Karenia digitata*, Lane 11: *Karenia mikimotoi*, Lane 12: *Margalefidinium polykrikoides*, Lane 13: *Margalefidinium* sp. Type-Kasasa, Lane 14: *Heterocapsa circularisquama*, Lane 15: *Prorocentrum lima*, Lane 16: *Chaetoceros* sp., Lane 17: *Pseudo-nitzschia multiseriata*, Lane 18: *Rhizosolenia setigera*, Lane 19: *Thalassiosira pseudonana*, Lane 20: *Aurantiochytrium* sp., Lane 21: *Parietichytrium sarkarianum*, Lane 22: *Thraustochytrium aureum*, Lane 23: *Chattonella marina*, Lane 24: *Heterosigma akashiwo*, NTC: Negative control using water for injection.

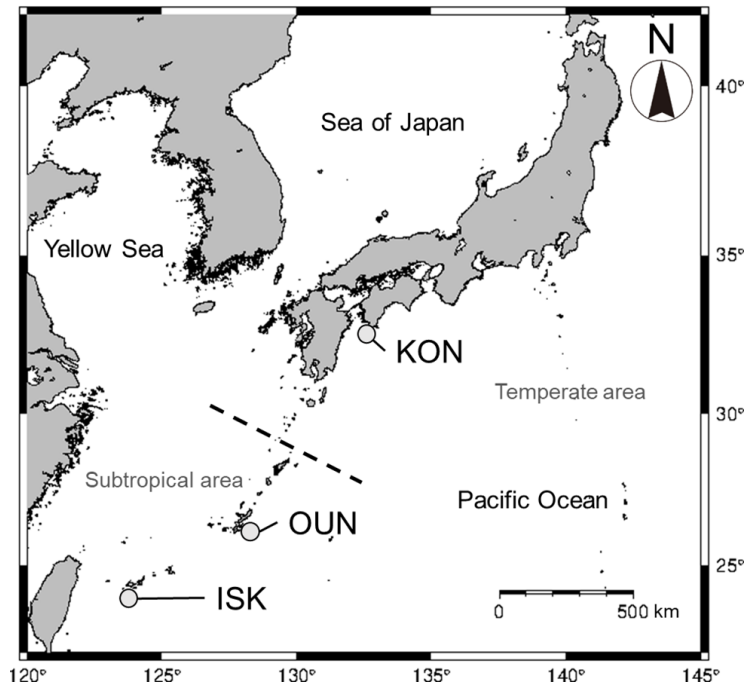


Fig. 2 Map of sampling locations. The abbreviations for the sampling sites are described as follows. KON: the coastal site of Nishidomari, Otsuki Town, Kochi Prefecture (32°46'26.4"N 132°43'27.6"E); OUN: Nakagusuku Bay, Uruma City, Okinawa Prefecture (26°14'46.8"N 127°52'59.0"E); ISK: Kabira Bay, Ishigaki City, Okinawa Prefecture (24°28'39.6"N 124°08'51.0"E). The map of Japan and nearby seas are depicted using GMT6 (Wessel et al., 2019).

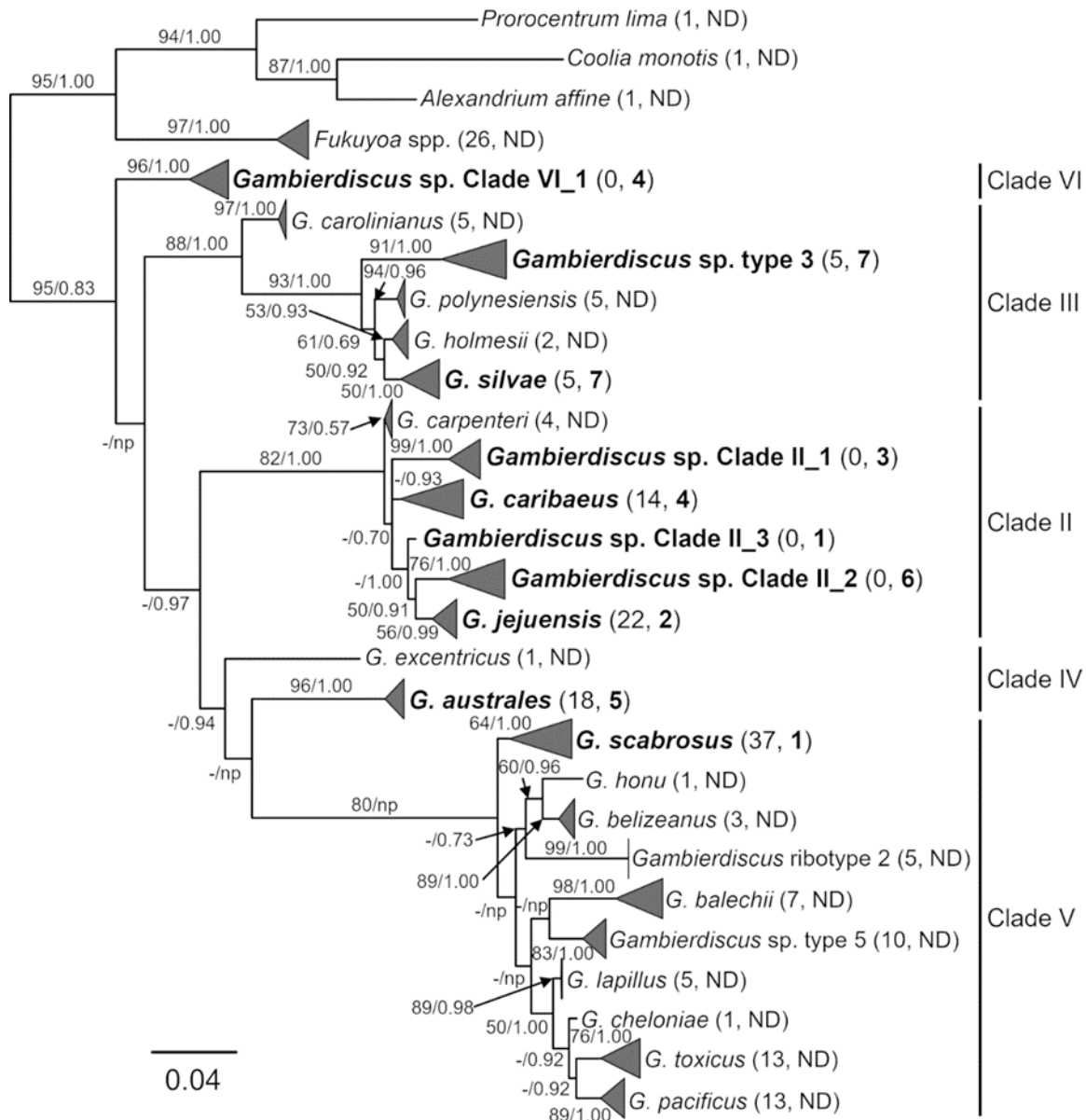


Fig. 3 A maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of the 18S rDNA V8–V9 region sequences of *Gambierdiscus* species/phylotypes. A total of 245 sequences were used to construct the phylogenetic tree including 176 sequences of *Gambierdiscus* species/phylotypes from GenBank, 40 sequences of the unique sequences obtained in this study, and 29 sequences of other genera as outgroups. The nodal number indicates the ML bootstrap value and BI posterior probability. Nodal supports that were under 50 in ML and 0.50 in BI are shown as hyphens. Nodes that were not present in the BI tree are shown as np. The clade numbers shown on the right side of the phylogenetic tree represent the clade divisions of the genus *Gambierdiscus*. The bold black species/phylotype names indicate the unique sequences obtained in this study. Every species/phylotype is abbreviated by a triangular mark, which contains the unique sequences and references. Parentheses shown on the right side of a species/phylotype name indicates the number of reference sequences (first number) and the unique sequences obtained in this study (second number, bold). A second number written as ND indicates that the unique sequence was not obtained in this study.

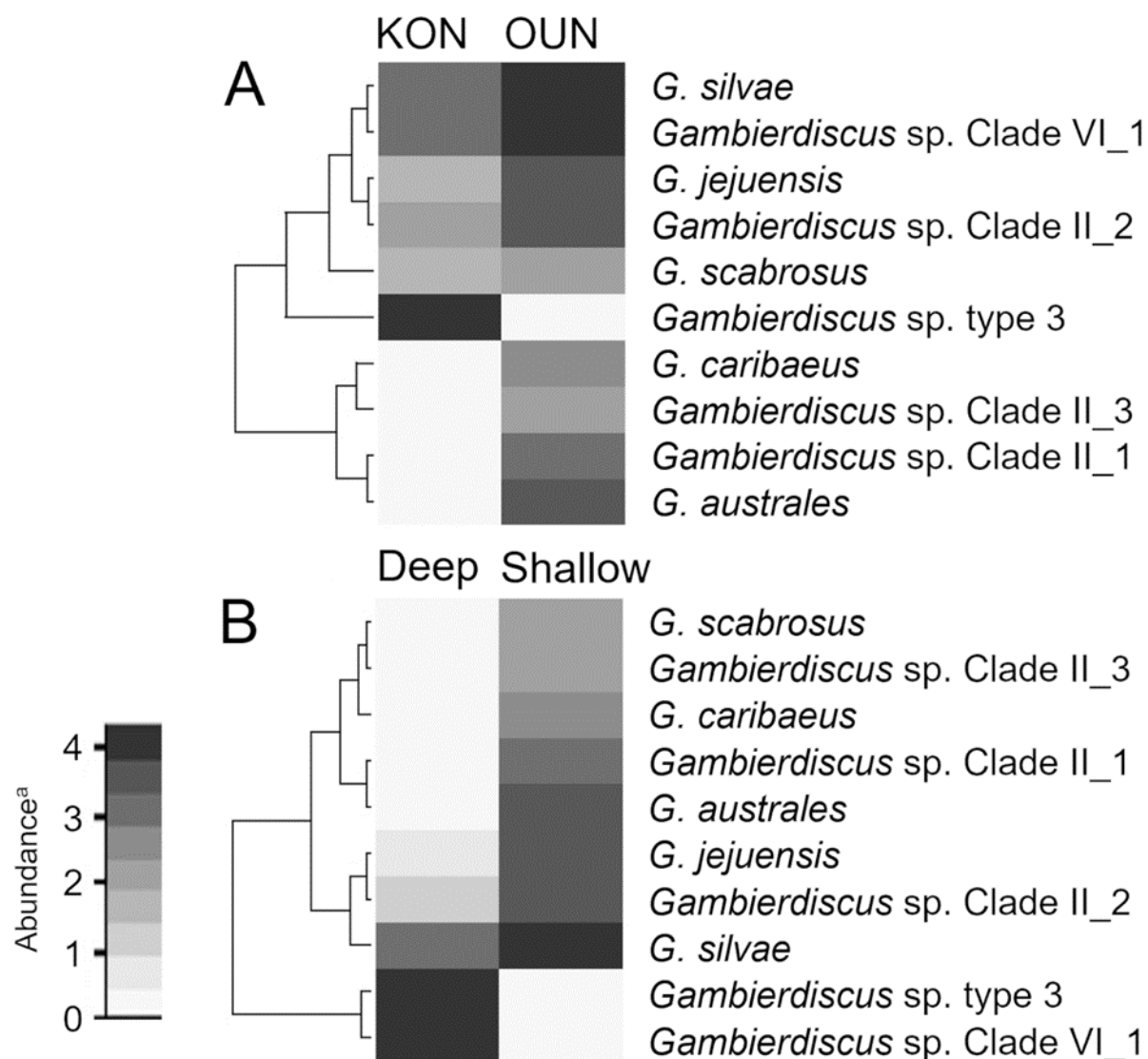


Fig. 4 Heatmaps based on the read number of ten *Gambierdiscus* species/phylotypes obtained from MiSeq sequencing under two conditions (A: sampling location, B: sampling depth). The nine grey shadings on the heatmaps are based on the total reads of each *Gambierdiscus* species/phylotype. Deep = 30 m, Shallow = 2–8 m.
^a: The total read number of each species/phylotype at each site or at each depth subjected to ordinary logarithmic transformation with the base being 10.

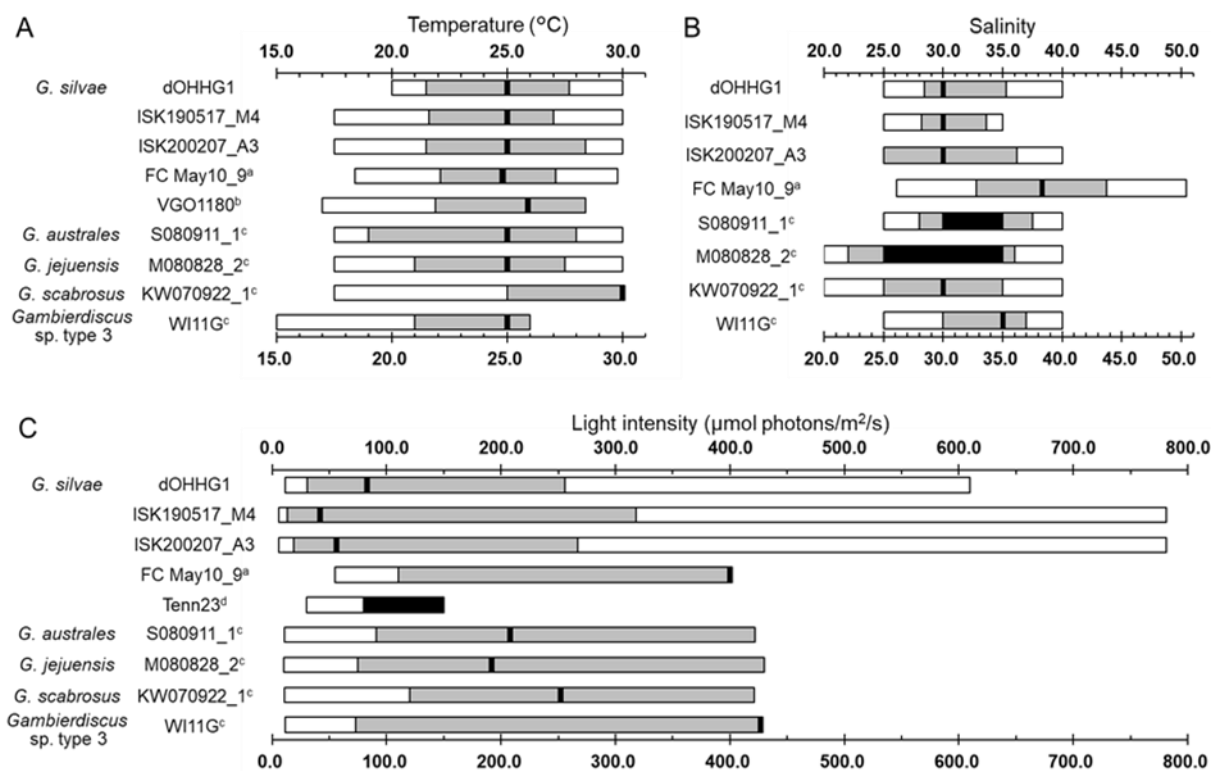


Fig. 5 The optimal, semi-optimal, and tolerable ranges of temperature (A), salinity (B), and light intensity (C) for growth of *G. silvae* and the species found in Japanese coastal waters. The white areas indicate the range at which cells grew (T_{tol} , S_{tol} , and L_{tol}). The gray areas indicate the range at which 80% of the growth rate was observed (T_{s-opt} , S_{s-opt} , and L_{s-opt}) and the black areas indicate at which the maximum growth rate was obtained (T_m , S_m , and L_m).

^a: Xu et al. (2016).

^b: Ramilo et al. (2021). The minimum tolerable temperature was taken from the "survival" assessment in their report.

^c: Yoshimatsu et al. (2014).

^d: Leynse et al. (2017).

(注) 要約の文量は、学位論文の文量の約10分の1として下さい。図表や写真を含めても構いません。

(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations