

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	本間 千穂
審査委員	主査 足立 真佐雄 副査 多田 邦尚 副査 一見 和彦 副査 山口 晴生 副査 大林 由美子

### 論文名

アオブダイ毒化原因生物の特定を目指したアオブダイの餌生物の網羅的解明

### 審査結果の要旨

南日本海域では、毒化したアオブダイ (*Scarus ovifrons*) の喫食による中毒が発生しており、死者も発生している。本中毒に関して、アオブダイ自身が毒を産生している訳では無く、食物連鎖を介して餌生物由来の毒がアオブダイの体内に蓄積されると考えられることから、本毒を産生する毒化原因生物を特定することが極めて重要である。さらに、アオブダイの毒化原因生物を明らかにするためには、まずアオブダイの餌生物を明らかにすることが重要と考えられる。魚類の餌生物を網羅的に同定する方法として、近年消化管内容物から抽出した DNA を用いたメタバーコーディングが頻用されている。本法では、様々な真核生物を検出可能な 18S rDNA ユニバーサルプライマーがしばしば用いられているが、本プライマーを魚類の餌生物の解析に用いた場合、餌生物に由来する DNA のみならず、魚類自身に由来する DNA が増幅され、時として得られた塩基配列の殆どを当該魚類の塩基配列が占めることが報告されている。この様な状況の下で、特定の遺伝子の DNA 増幅を抑制するブロッカーとして、ブロッキングプライマーおよび peptide nucleic acid (PNA) clamp が報告されている。しかし、いずれのブロッカーが、より効率良く魚類自身の DNA 増幅を抑制し、魚類の餌生物の解明を目指したメタバーコーディングに適しているかについては、未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、まずいずれのブロッカーがブダイ科魚類を含めた真骨魚類全般の DNA 増幅を効率良く抑制するのか検討した。これにより選抜したブロッカーを用いて、アオブダイ検体およびブダイ検体の消化管内容物から抽出した DNA をメタバーコーディングに供することにより、両魚種の餌生物を網羅的に解明し、それらを比較することによりアオブダイに'特徴的'な餌生物を探索し、アオブダイの毒化原因生物の解明に役立つ基盤的知見を得ることを目的とした。

本研究の結果は次のように要約される。

#### 1) 藻食魚類の餌生物解明に有用なメタバーコーディングの開発

まず、真核生物の 18S rDNA の塩基配列の中で、ブダイ科魚類を含めた真骨魚類に特異的

な配列を検索し、本配列に結合する 3 種類のブロッキングプライマーおよび 1 種類の PNA clamp を設計し、様々な魚類の DNA に対するこれらブロッカーの増幅抑制効果を検討した。その結果、本研究にて設計した 4 種のブロッカーのうち、BlockFish\_long6 および PNA clamp である BlockFishPNA は、魚類の DNA に対して高い増幅抑制効果を示した。さらに、これらのブロッカーが魚類の餌生物の解明に向けたメタバーコーディングに有用であるかについて精査するために、アオブダイの DNA に加えて、餌生物と想定される生物の DNA を混合した疑似消化管内容物試料 (Mock 試料) を鋳型として用い、ブロッカー存在下にてメタバーコーディングを行った。その結果、Blockfish\_long6 添加区では、アオブダイに由来する配列が全体に占める割合は非添加区と比較して 3.3~33.2%減少した。一方、BlockfishPNA 添加区では、その割合は 99.2~99.9%減少したことから、BlockFishPNA はアオブダイの餌生物の解明に向けたメタバーコーディングに最適であると判断した。

## 2) アオブダイおよびブダイの餌生物の網羅的解析

次に、アオブダイに特異的に摂食された餌生物を明らかにするために、高知県、徳島県および長崎県にて採捕されたアオブダイ 20 検体およびブダイ 12 検体の消化管内容物から DNA を抽出し、これらを上記の検討により選抜した BlockFishPNA を用いたメタバーコーディングに供した。その結果、アオブダイおよびブダイは、いずれも紅藻および褐藻を高い割合で摂食しているが、それらの中からアオブダイにのみ摂食された生物として、紅藻スギノリ目の 1 種を見出した。また、渦鞭毛藻やシアノバクテリア等の微生物 (<1 mm) も検出され、その中には有毒種として知られる *Alexandrium* 属や *Gambierdiscus* 属が、ブダイと比較してアオブダイからより多く検出された。これらのことから、アオブダイにのみ、あるいはアオブダイに優先的に摂食されたこれら餌生物の中に、アオブダイ中毒の毒化原因生物が存在する可能性が考えられた。

以上のように、本学位論文は藻食魚類の餌生物解明に有用なメタバーコーディングを開発した上で、アオブダイにより特異的に摂食された餌生物を明らかにしたことから、アオブダイの毒化原因生物を解明する上で基盤的な知見を得た点で、高く評価される。

学位論文公開審査会は令和 4 年 7 月 30 日、愛媛大学農学部において開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き学位論文審査会を開いて慎重に審査した結果、本論文が博士 (農学) の学位を授与するに値するものと審査委員全員一致で判定した。