

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	橋本 怜弥
論文題目	Ecological and genomic studies on diazotrophic cyanobacteria in coastal seas (沿岸海域における窒素固定ラン藻の生態・ゲノム学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>単細胞性窒素固定ラン藻は、大気中のガス態窒素を細胞内で固定するため、海洋環境において窒素供給源として重要な微生物である。窒素固定は、窒素をアンモニアへと還元するニトロゲナーゼ (<i>nifDK</i>) とその反応に必要な還元力を供給するニトロゲナーゼ還元酵素 (<i>nifH</i>) が担う。海洋の単細胞性窒素固定ラン藻は、<i>nifH</i>遺伝子配列に基づきUCYN (unicellular diazotrophic cyanobacteria) -A、BおよびCの3つのグループに分かれる。これらに関する研究は貧栄養な外洋域を中心に行われ、とりわけ広域に分布するUCYN-AとBの生理・生態学的研究は精力的に行われてきた。その一方で、陸域から栄養塩を供給される沿岸海域では、本ラン藻の重要性は相対的に小さいとの考えから今まで看過されその知見は乏しい。そこで本研究では、日本沿岸海域において、単細胞性窒素固定ラン藻の分布と多様性を明らかにするとともに、本研究で得られた分離株の系統解析と比較ゲノム解析を行った。</p>			
1. 日本海における窒素固定ラン藻の分布と多様性			
<p>日本海は、閉鎖海域でありながらも外洋における海流状況と類似した特徴を有することからミニチュアオーシャンと呼ばれており、さらに下層に日本海固有水という孤立した水塊を有する特異な環境である。2011年8月下旬に兵庫県但馬沖のStn. 2 (35°50N、134°19E) およびStn. 7 (37°20N、134°19E) において、異なった深度(0、10、30、75、100mおよび50m付近のクロロフィル極大層 (DCM)) から海水を採取し、<i>nifH</i>遺伝子のクローン解析を行った。Stn. 7のクロロフィル極大層を中心にUCYN-Aが分布していた。一方、Stn. 2、7から陸生のα、β、γ-Proteobacteriaに近縁な<i>nifH</i>配列が得られた。これらの結果から、日本海では従属栄養性の窒素固定生物が主に分布しており、独立栄養性の窒素固定生物が優占する外洋域とは異なる窒素固定生物群集を構成していることをはじめて見出した。</p>			
2. 瀬戸内海における単細胞性窒素固定ラン藻の分布と多様性			
<p>次に窒素濃度が高い沿岸海域として瀬戸内海に着目し、上記研究成果1で確立した実験手法を用いて、単細胞性窒素固定ラン藻に関する生態学的な研究を行った。2012から2013年の2年間にわたり、大阪湾・紀伊水道・播磨灘の定点から海水を採取して実験に供した。単細胞性窒素固定ラン藻に特異的な16S rRNA遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果、大きく4つのグループの配列が得られた。</p> <p>この内の一つはUCYN-Aとクレードを形成した。残りの3つのグループをそれぞれRibotype-1、2および3と名付けた。Ribotype-1には<i>Cyanothece</i> sp. ATCC51142株、Ribotype-2には<i>Cyaothece</i> SKTU126株などの独立栄養性ラン藻が含まれ、Ribotype-3には珪藻<i>Rhopalodia gibba</i>の内部共生菌が含まれていた。これらの参照株は<i>nifH</i>遺伝子に基づく系統樹ではいずれもUCYN-Cに属することから、得られた3つのグル</p>			

ープの16S rRNA遺伝子配列は、いずれもUCYN-Cに由来するものと考えられた。

リアルタイムPCRによる定量を行った結果、UCYN-Aは本沿岸域において6-7月と限定された時期に検出され、その遺伝子コピー数密度 (最大密度 1.2×10^4 *nifH* gene copies L⁻¹) は外洋より低い値を示した。従って、UCYN-Aが外洋水から一時的に侵入してきたことが示唆された。一方、UCYN-Cは外洋では非常に低密度であるが、本海域で年中を通じて検出され、特に低水温・高無機態窒素濃度時に最も密度が高かった。その密度 (最大 8.6×10^5 *nifH* gene copies L⁻¹) は、これまでの報告の中でも最も高く、UCYN-Cが沿岸をニッチェとして生息していることを初めて示した。

3. 新規単細胞性窒素固定ラン藻分離株のゲノム解析

瀬戸内海における本研究により、単系統だと考えられていたUCYN-Cが、サブグループに分かれることが強く示唆された。2012-2013年の2年間にわたり瀬戸内海の計16地点から、炭素源・窒素源無添加培地を用いて集積培養系を作成し、この中から2株のラン藻GS-1とYR-1を分離することに成功した。

両株を培養して*nifH*遺伝子を調べた結果、UCYN-Cに属した。16S rRNA遺伝子に基づきこの2株は、これまでゲノム解析事例が未報告のRibotype-2に属することが明らかとなった。

そこで両分離株から抽出したDNAを、次世代シーケンサーMiSeqを用いてシーケンスを行いドラフトゲノムを決定した。5つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *rpoB*, *gyrB*, *recA*, *secY*) に基づくML系統樹およびゲノム全体の相同性に基づくデンドログラムを作成した結果、16S rRNA遺伝子に基づいた系統樹と同じくUCYN-Cは大きく3つの系統に分岐した。GS-1とYR-1は、他のUCYN-Cとは系統的に離れた新規UCYN-C系統群を形成した。研究成果2において分類されたUCYN-C Ribotype-1、2、3をこれらの系統解析に基づいて、それぞれUCYN-C clade-1、2、3と再定義した。

今回得られたGS-1とYR-1が属するclade-2は、他の窒素固定ラン藻に共通する光合成や窒素固定、中央代謝経路といった重要な代謝経路を保存していた。一方で、clade-2は浸透圧を含む様々なストレス耐性機構に関与するスクロースやトレハロースの代謝経路を複数保有しており、clade-2は浸透圧を含めた多様なストレスに対して耐性能が高い系統であることが示唆された。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

単細胞性窒素固定ラン藻は、海洋における窒素供給源として極めて重要な役割を担っている。単細胞性窒素固定ラン藻は、ニトロゲナーゼ還元酵素 (*nifH*) に基づきUCYN (unicellular diazotrophic cyanobacteria) -A、B、Cの大きく3つのグループに分かれる。これらに関する研究は貧栄養な外洋域を中心に行われてきた一方で、河川からの栄養塩の供給に富む沿岸海域ではその知見は乏しい。本論文では、日本沿岸海域において、単細胞性窒素固定ラン藻に関する生態・ゲノム学的側面を明らかにした。その主な成果は以下の3点に大別される。

(1) 日本海における窒素固定微生物の群集構造をはじめて解析し、本海域において、UCYN-Aを含めた従属栄養性窒素固定微生物が優占していることを明らかにした。

(2) 瀬戸内海においてUCYN-Cが年間を通じて検出され、外洋よりも高密度であったことから、このグループが沿岸海域に適応している可能性を示唆した。今後、沿岸海域の窒素循環を研究する上で、貴重な情報になりうると考えられる。

(3) 瀬戸内海から新規UCYN-Cを2株分離し、そのドラフトゲノム配列の解読に成功した。詳細な系統解析を行い、UCYN-Cが3つのサブグループを形成することを明らかにした。さらに比較ゲノム解析により、分離した2株は適合溶質に関する様々な代謝経路を保有し、ストレス負荷の大きい環境に適応している可能性を示唆した。

以上のように、本論文は単細胞性窒素固定ラン藻の沿岸海域での動態について重要かつ基礎的な知見を提供し、その詳細な系統関係・遺伝的特徴を明らかにしたものであり、微生物生態学、海洋微生物学、遺伝学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)