

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	Florian Prodinge
論文題目	Novel metabarcoding method reveals pronounced seasonality and high turnover rate of <i>Imitervirales</i> in coastal communities (新規メタバーコーディング法が明かす沿岸域イミテルウイルス群集の明瞭な季節変動と速い遷移速度)		
(論文内容の要旨)			
<p>本研究は二つの研究から構成される。第一の研究ではイミテルウイルス目のメタバーコード法 (アンプリコン解析による群集構造解析法) を改良した。第二の研究では、本改良法を利用し、沿岸域におけるイミテルウイルス、真核微生物群集、原核生物群集の群集構造動態を長期間追跡し、それぞれの群集動態の特徴を比較解析した。</p> <p>イミテルウイルス目は、ゲノム長が 30 万塩基対を超え 100 万塩基対にも達する「巨大ウイルス」及び他の大型ウイルスを含むウイルス分類群である。近年の研究から、海洋イミテルウイルスが高い多様性を示し、様々な真核微生物に感染し、海洋物質循環や真核生物の進化に大きな影響を与えている様相が浮かび上がっている。</p> <p>第一の研究では、イミテルウイルスの群集構造を解析するためのメタバーコード法 (メガプライマー法) の改良を行った。メガプライマー法は、先行研究により開発され、イミテルウイルスの DNA ポリメラーゼ遺伝子を標的とする 82 の縮重プライマー対を利用した手法で、試料中に存在するイミテルウイルスの多様性を高精細・網羅的に検出する優れた手法である。しかし、82 対ものプライマー対を利用するため、その利用には多くの DNA 試料 (約 80 ng) と労力を要した。本研究では、複数のプライマーを混合しポリメラーゼ連鎖反応回数を削減しても、従来法と同程度の結果が得られることを示した。これにより、1 サンプル解析に必要な DNA 試料を 8 ng 以下まで削減し、大規模かつ貴重な試料セットに本手法を応用することが可能となった。</p> <p>第二の研究では、高知県浦ノ内湾におけるイミテルウイルス、真核微生物、原核生物の群集構造を 20 カ月にわたり調査した。浦ノ内湾は頻繁に赤潮が発生するため、赤潮藻類とウイルスの相互作用に着目した調査が進められている沿岸域でもある。イミテルウイルスの群集構造解析には、上述の改良法を利用した。真核微生物、原核生物の群集構造解析は既存の手法を利用した。本研究により下記の 3 点が明らかになった。第一に、イミテルウイルス、真核微生物、原核生物の全ての微生物群集が四季に沿った周期的な季節変動を提示することが明らかになった。イミテルウイルス群集変動が季節性を示すことは、本研究が初めて明らかにしたことである。第二に、群集変動速度が三つの微生物群集間で異なっていた。具体的には、イミテルウイルスが最も速い群集変動速度を示し、原核生物群集は最も遅かった。真核微生物群集は中間的な速度であった。本研究では、この傾向がそれぞれの微生物群集に属する種 (Amplicon Sequence Variant: ASV) が持続的に出現する期間の長さの違いに依存していることを示した。第三に、微生物群集変動に対する、水温、塩濃度、栄養塩濃度などの物理化学的条件の変動の寄与は小さいことが明らかになった。</p> <p>以上の結果に基づき、本研究では微生物群集遷移に群集構造のマルコフ性が重要な役割を果たしており、現時点の群集構造が未来の群集構造に影響を及ぼしていると議論している。また、微生物群集間の群集遷移速度の相違を「群集記憶」の相違と定義し、群集記憶が微生物群集により異なるのは、それぞれの群集に属する種のニッチ幅が群集間で異なることに由来していると推定している。さらに、群集遷移のマルコフ性には、物理化学的条件のみならず、生物間相互作用 (ウイルスによる宿主の感染等) が重要な因子である可能性を提示している。</p>			

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

環境ゲノム解析の進展により、ヌクレオサイトビリコタ門に属する大型 DNA ウイルスの海洋環境における高い現存量と多様性が明らかになり、その生態学的、進化的意義の解明が広く関心を集めている。本研究ではヌクレオサイトビリコタ門の中でも、海洋で最も高い多様性を示すウイルス群であるイミテルウイルス目に着目し、その多様性と群集動態を日本沿岸域において特徴づけた。

候補者は、先行研究により開発されたイミテルウイルス目に特化した群集解析法（メガプライマー法）を、大規模な試料に応用すべく実験プロトコルの改良を実施した。その結果、必要とされる DNA 試料量を大幅に削減することが可能となり、実験手順の簡略化にも成功した。本手法を赤潮発生域として知られる高知県浦ノ内湾で2017年1月から1年半の期間に採取された43試料に応用し、イメテルウイルスの群集構造を解析した。同時に、従来法により、真核微生物群集（イミテルウイルスの宿主を含む）、及び原核生物群集の群集動態を解析した。

本研究により、全ての微生物群集が季節変動を示すことが明らかになった。春と秋とでは環境条件が類似しているが、冬と夏と同様に群集構造が大きく異なっていた。これは、微生物にもマクロな植生と同様に四季があることを示し、世代交代が短く、環境因子が群集構造を決定する主要因であるとみなされがちな微生物群集構造においても、長期（一カ月以上）のマルコフ性が重要であることを示唆している。また、微生物群集は1年経過後類似した群集構造に復帰するが、100%同じ群集構造には復帰せず、50%程度の復帰率であった。本研究では、群集変動の速度が微生物群集により異なることも明らかにした。具体的には、ASV (amplicon sequence variant) レベルでの群集構造の変動速度がウイルスで最大、次に真核微生物、最も遅いのが原核生物であった。候補者は微生物の「群集記憶」に差があると表現している。ウイルスの存在は宿主の存在に依存するが、複数のウイルスが同じ宿主種に異なる時期において感染する結果、ウイルスの群集変動速度が速くなると議論されている。また、候補者はネットワーク解析により、赤潮藻類のカレニアやシャトネラに感染するウイルスの候補配列も発見した。

本研究で得られたこれら成果は、海洋におけるウイルスの生態学的役割を理解する上で重要な研究基盤となるだけでなく、微生物群集動態を生存戦略・生物間相互作用の観点で理解するための今後の研究に大きく寄与するものと期待される。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年3月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：                      年              月              日以降