

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	武部 紘明
論文題目	Molecular ecological studies on effects of a marine harmful algal bloom-forming species, <i>Heterosigma akashiwo</i> , on prokaryotic community (海洋性有害赤潮形成藻類 <i>Heterosigma akashiwo</i> が原核生物群集に及ぼす影響に関する分子生態学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>海洋微細藻類の大量発生である赤潮は沿岸域の一次生産に大きく寄与する。赤潮中では特定の従属栄養性の原核生物が急増し、物質循環に影響を及ぼすとされるが、特定の赤潮形成藻類が原核生物動態に及ぼす影響は未解明であった。ラフィド藻 <i>Heterosigma akashiwo</i> は世界各地の沿岸部で有害赤潮を引き起こし、生物地球化学および水産学上重要な種である。そこで本論文ではマイクロコズム培養実験による疑似環境の構築とマイクロバイームデータによる追検証を組み合わせ、<i>H. akashiwo</i> が原核生物動態に及ぼす影響の解明を試みた。第一章では、本研究の背景と目的を述べている。</p> <p>第2章では、<i>H. akashiwo</i> 栄養細胞由来の溶出物が原核生物群集に及ぼす影響を調べている。微細藻類の栄養細胞から物質が溶出する機構には、生細胞による分泌物と、捕食により放出される内容物が存在し、その有機物組成が異なる。本種の分泌物 (EF) と内容物 (WF) をそれぞれ大阪湾由来原核生物画分に添加し、14日間培養した。原核生物画分試料に対してrRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングを行い、種レベル (OTU) に分類してその動態を調査した。EF区およびWF区ではそれぞれ13および10のOTUが特異的に増加しており、前者にはGammaproteobacteria綱Vibrionales目、後者にはAlphaproteobacteria綱Rhodobacterales目およびAlteromonadales目などが含まれた。これらのOTUが、本種の天然赤潮に応答するか確認するため、マイクロバイームデータを用いて天然環境中での動態を調べると、内容物に特異的に応答したAlteromonadales目の2 OTUsは本種の天然赤潮発生時に増加していた。以上より、本種の生細胞分泌物および死細胞溶出物は異なる原核生物の増殖を促すことが示唆され、本マイクロコズム培養系により本種の天然赤潮に応答する原核生物動態の少なくとも一部を再現できることが確認された。</p> <p>第3章では、赤潮形成藻類の差異が原核生物-ウイルス動態に及ぼす影響を調べている。天然赤潮中では複数の藻類種が混在し、その有機物組成は異なる。さらに、赤潮中では原核生物感染性ウイルスも活発に生産されることから、原核生物動態に影響を及ぼすと考えられるが、赤潮形成藻類の差異が原核生物-ウイルス群集に異なる影響は不明である。<i>H. akashiwo</i> と <i>Chaetoceros</i> sp. の細胞内容物 (HIFおよびCIF) をそれぞれ大阪湾由来原核生物画分に添加し、7日間培養した。原核生物画分試料に対してrRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングを行い、種内個体群レベル (ASV) に分類して動態を解析した。ウイルス画分試料についてはメタゲノムシーケンシングを行い、種レベルのゲノム配列相同性 (vOTU) で分類して動態を解析した。HIFおよびCIF区でそれぞれ8および5のASVが特異的に増加した。前者には、Vibrionales目 <i>Vibrio</i> 属、後者にはRhodobacterales目が含まれた。これらのASVの動態がウイルス動態に及ぼす影響を調べるため、培養中に増加したvOTUを抽出すると、13および41のvOTUが1日目以降にそれぞれHIF区およびCIF区で特異的に増加していた。前者には <i>Vibrio</i> ウイルス、後者にはRhodobacteralesウイルスが含まれ、計16 vOTUsの宿主は同一実験区で特異的に優占したASVと一致し、培養系内で共起的な動態を示した。このような共起動態は大阪湾で月ごとに採取されたマイクロバイームデータにおいても確認された。以上より、赤潮形成藻類種の違いは異なる原核生物の増殖を促し、それらの原核生物に感染するウイルスの動態にまでその影響が及ぶことが示唆された。</p> <p>第4章では、<i>H. akashiwo</i> に対するウイルス感染が原核生物群集に及ぼす影響を調べ</p>			

ている。環境中には真核生物感染性ウイルスも多量に存在する。*H. akashiwo*の天然赤潮後期には多量の細胞が本種感染性ウイルスの増加に伴い消失することが報告されるため、周囲の原核生物はウイルス感染細胞由来の溶出物の影響を強く受ける可能性が考えられる。*H. akashiwo*に本株感染性ウイルスを接種し、ウイルス溶藻物 (VDF) を得た。非感染細胞から分泌物 (EDF) と内容物 (IDF) を抽出した。これらを大阪湾由来原核生物画分にそれぞれ添加し、4日間培養した。原核生物画分試料に対してrRNA遺伝子アンプリコンシーケンシングを行い、ASVsを作成してその動態を解析した。各実験で増加したASVの分類群を調べると *Vibrio*属が最も頻繁に検出された。しかし全9の *Vibrio*属ASVのうち、3 ASVsはVDF区のみで優占しており、本種ウイルス溶藻物にのみ応答する個体群が存在すると考えられた。VDF特異的な *Vibrio*属ASVsとVDF非特異的な応答を示すASVsの代謝の差異を調べるため、VDF特異的および非特異的系統の近縁株ゲノムのKEGG代謝モジュールの組成を比較した。計248のモジュールのうち、5つはVDF特異的ASVの近縁株のみに高頻度に認められ、分枝鎖アミノ酸の輸送体が含まれた。これらのモジュールと、VDFの有機物組成の関係を調べるため、GC-MSによるメタボローム解析を行うと、分枝鎖アミノ酸はVDFのみで高い相対量を示した。よって、本種のウイルス溶藻物には分枝鎖アミノ酸が蓄積し、それに応答して分枝鎖アミノ酸を取り込むことができる特定の *Vibrio*属個体群が増加することが示唆された。以上より、本種に対するウイルス感染により溶出する有機物の組成が変化し、有機物利用能が異なる細菌群集の増殖を促すと考えられた。

以上のように本論文は海洋において微細藻類を起点とする原核生物・ウイルス間の相互作用に関する重要な知見を提供するものであり、第5章では、本研究の総合討論を述べている。

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)

海洋では、微細藻類が一次生産の起点となり特定の原核生物が増殖し、地球科学的物質循環に影響を及ぼす。ラフィド藻の微細藻類*Heterosigma akashiwo*は世界各国の沿岸域で大量発生し、有害赤潮形成種として時に魚介類斃死を引き起こす。本種を初め赤潮形成種が沿岸の原核生物群集に及ぼす影響は未解明であった。本研究では、本種の栄養細胞・ウイルス被感染細胞に由来する溶出物を海洋原核生物群集に添加して疑似環境を再現し、藻類の原核生物群集へ及ぼす影響解明を試みたものであり、主な成果は次のとおりである。

1. 本種の栄養細胞内容物により*Vibrio*属など23種の細菌が特異的に増殖することを明らかにした。メタゲノムデータを用い、このうち2種は本種の天然赤潮期間に増加することを確認し、本疑似環境培養系により環境中の原核生物群集動態を再現できることを示した。
2. 次に同手法を用いて、藻類種による影響の差異を明らかにした。本種は*Vibrio*属など2目に属する細菌とそのウイルス、珪藻 *Chaetoceros* sp. は *Rhodobacteriales*目および*Alteromonadales*目などに属する細菌とそのウイルスの増殖を促した。つまり、赤潮藻類の差異は原核生物組成を変化させ、その原核生物感染性ウイルスの動態にまで影響を及ぼすことを示した。
3. ウイルスは微細藻類の消長に大きく影響し、またウイルス感染は藻類の代謝を改変する。*H. akashiwo*に特異的なウイルスを感染させて得られた被感染細胞溶出物は、*Vibrio*属細菌のなかで分枝鎖アミノ酸輸送体遺伝子を有する個体群の増殖を促した。ウイルス被感染細胞溶出物は、分枝鎖アミノ酸を多く含んだことから、ウイルス感染は*H. akashiwo*の有機物組成を変化させ、有機物利用能が異なる細菌群集の増殖を促すことを示した。

以上のように、本論文は海洋における微細藻類と原核生物・ウイルス間の相互作用に関する重要な知見を提供するものであり、水産学、微生物学、微生物生態学、ウイルス生態学および海洋学の発展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、令和5年2月13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）