

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	森本 大地
論文題目	Comprehensive studies on transcriptional dynamics of cyanoviruses infecting a bloom-forming cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> (アオコ原因ラン藻ミクロキスティス・エルギノーサ感染性シアノウイルスの転写動態に関する包括的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ラン藻<i>Microcystis aeruginosa</i>は富栄養化した湖沼で異常増殖し、アオコと呼ばれるブルームを形成する。一部の株は肝臓毒ミクロシチン産生能を有し、飲料水の水質低下や家畜の斃死を引き起こすため、アオコの発生予察・防除は世界の共通課題である。水圏環境に高密度に存在するウイルスは本種生物量や個体群組成に大きな影響を与えると考えられている。実際、本種ゲノム上には細菌・古細菌最多のウイルス耐性遺伝子が存在し、ウイルス部分配列獲得(ウイルス感染履歴)を通じて個体群を多様化させてきた。一方、本種ウイルス分離例はMa-LMM01に限定されており、感染様式やそれに伴う宿主の発現応答、他の本種ウイルスゲノム情報は乏しい。そこで本研究では、1) 網羅的転写解析により多数のウイルス耐性機構をかいくぐるMa-LMM01の感染様式を明らかにした。さらに、2) Cross-Omics解析により本種未分離ウイルスを同定し、環境中でのその転写動態とそれに伴う宿主発現応答を明らかにした。</p>			
1. Ma-LMM01感染時におけるアオコ原因ラン藻<i>M. aeruginosa</i>の網羅的転写解析			
<p><i>M. aeruginosa</i> NIES-298株を宿主とするMa-LMM01感染培養系を用いて感染実験をおこない、得られた感染後0, 1, 3, 6時間の潜伏期の細胞を網羅的転写解析に供した。その結果、ウイルス全転写産物は感染後6時間でも全体の33%を占めるに留まり、Ma-LMM01感染時には宿主代謝系からウイルス生産への完全な切り替えは起こらないと示唆された。また、宿主遺伝子の発現動態に着目すると、潜伏期全体に渡って本種遺伝子の98.6%はウイルス感染に対して有意な発現変動を示さなかった。</p> <p>一方で、ウイルス遺伝子は感染1時間(初期)、3時間(中期)、6時間(後期)のいずれかで発現量が急増し、3段階の転写ピークの変遷を示した。さらにMa-LMM01が初期・中期・後期の各段階の遺伝子発現制御に用いる遺伝子発現プロモーターを明らかにするため、遺伝子上流のプロモーター探索を行った。その結果、遺伝子発現パターンに依らず、初期・中期・後期遺伝子のいずれの上流にもラン藻のハウスキーピング遺伝子発現に寄与する主要σ因子SigAの認識プロモーターが見出された。以上の結果から、Ma-LMM01はSigAを利用して宿主遺伝子転写量に影響を与えず自己複製すると考えられた。宿主である<i>M. aeruginosa</i>ゲノム上には、ウイルス感染時に宿主自殺因子として機能するToxin-Antitoxin (TA) 遺伝子が高密度に存在している。この宿主ゲノム性状を考慮すると、Ma-LMM01はTAシステムによる感染途中での宿主の自殺を回避するため、このようなウイルス耐性機構に認識されない“ステルス感染様式”をもつと示唆された。</p>			
2. Cross-Omics解析による有毒アオコ原因ラン藻<i>M. aeruginosa</i>感染性広域および狭域宿主ウイルスの解明			
<p>本種未分離ウイルスを同定するため、2017年に京都府広沢池のアオコ発生環境から試水を採取し、ウイルス画分から抽出したDNAをMiSeqでのシーケンスに供した。得られた環境ウイルス配列を用いて、メタゲノム解析によりウイルスゲノムを構築した。そのうち、本種分離株ゲノム上のウイルス感染履歴と一致する配列を有するものを探索した。その結果、大きく3系統(Group I-III)からなる15の新規本種ウイルスの同定に成功した。同定した15の本種ウイルスの宿主域予測のため、本種分離株を種内</p>			

多様性指標であるリボソームRNAオペロン内部転写領域（ITS）に基づき3タイプに分類し、各ウイルスグループに対するウイルス感染履歴獲得状況を調べた。

その結果、Group IおよびIIIウイルスは一部のITSタイプの株にのみ感染履歴が獲得されていたのに対し、Group IIウイルスは全てのITSタイプの株に感染履歴が獲得されていた。すなわちGroup IおよびIIIウイルスは狭域宿主ウイルスであるのに対し、Group IIウイルスは初の本種広域宿主ウイルスであると示唆された。

次に、同環境中の潜伏期細胞を対象として24時間に渡るメタトランスクリプトーム解析をおこなった結果、同定した15の本種ウイルスは全て実際に日中に感染・転写しているウイルスであると示された。さらに本環境において、宿主TA遺伝子の転写動態に着目すると、日中に高発現しており、環境中では一部のウイルス感染に応答すると示唆された。一般的に広域宿主ウイルスは、感染時に宿主ウイルス耐性機構を活性化させやすいため、ウイルス感染履歴の獲得を引き起こす。従って、Group IIウイルスは本種個体群多様性の創出に寄与すると示唆された。これに対し、Ma-LMM01のような狭域宿主ウイルスはステルス感染により、ウイルス耐性機構を回避して宿主を溶菌死滅させ、宿主個体群の数を制御することで特定個体群のみの優占を防ぎ、本種個体群の多様性維持に寄与すると示唆された。

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)

有毒アオコ原因ラン藻*Microcystis aeruginosa*は環境中で多様なウイルスと相互作用し、ウイルスDNAの塩基配列の一部を獲得することで、種内個体群を多様化させてきた。このような本種ブルームへのウイルスの潜在的な重要性にも関わらず、本種感染ウイルス分離例はMa-LMM01に限定されており、その感染様式やウイルス感染に対する宿主の発現応答も明らかになっていなかった。そこで本論文では1) Ma-LMM01の感染様式とウイルス感染に対する本種遺伝子の発現応答を明らかにした。さらに、2) 環境中の未分離本種感染ウイルスゲノムを同定し、環境中でのそれらウイルスゲノム転写量の経時的変化およびそれに伴う宿主遺伝子の発現応答を調べた。その主な成果は、以下の3点に大別できる。

(1) 本種ゲノム上に高密度に存在するToxin-Antitoxin (TA) 遺伝子による感染途中での宿主の自殺を回避するため、Ma-LMM01は宿主遺伝子転写量に影響を与えず自己複製可能な“ステルス感染様式”をもつことを明らかにした。

(2) 京都府広沢池のアオコ発生環境からメタゲノム解析により、大きく3系統 (Group I-III) からなる15の本種感染未分離ウイルスを同定した。このうち、Group IおよびIIIウイルスは狭域宿主ウイルス、Group IIウイルスは初の本種広域宿主ウイルスであると示唆された。

(3) 同環境におけるメタトランスクリプトーム解析により、同定した15の新規本種ウイルスは全て日中に感染・転写をおこなうことを示した。また、環境中では日中に宿主TA遺伝子が高発現しており、一部ウイルス感染に応答していることを見出した。広域宿主ウイルスは一般にウイルス耐性機構を活性化させやすいため、Group IIのようなウイルスがウイルス感染履歴に基づく本種個体群多様性創出に寄与すると示唆された。

以上のように、本論文は有毒アオコ原因ラン藻*M. aeruginosa*とウイルス間相互作用に関する重要な知見を提供するものであり、微生物学、微生物生態学、ウイルス生態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、平成31年2月12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)