

(続紙 1)

京都大学	博 士（理 学）	氏名	Indranil Mukherjee
論文題目	Ecology of kinetoplastid flagellates in freshwater deep lakes of Japan		
(論文内容の要旨)			
湖沼や海洋に生息する20 μm以下のサイズのナノ鞭毛虫（以下、鞭毛虫）は、多くのグループの真核微生物から構成され、膨大な生物機能的多様性を持つ。それにも関わらず鞭毛虫についての研究は、ほとんどの研究が海洋において行われ、湖沼における鞭毛虫の生態は解明されていない。本研究では、湖沼の鞭毛虫の深度別の現存量と群集組成の季節動態を解明し、特にキネトプラスチド鞭毛虫の生態を考察した。 第二章では、琵琶湖において、鞭毛虫を従属栄養鞭毛虫（HNF）と独立栄養鞭毛虫（ANF）に分け、それぞれの現存量を2年間、月一回の頻度で深度別に測定した。また、真核生物の18S rDNAを標的としたユニバーサル・プライマーを用いて、クローン・ライブラリー法による鞭毛虫の群集解析を季節的に行なった。HNFは常にANFよりも高い現存量を示したのに対し、群集の多様性はANFの方が高かった。また、深水層の鞭毛虫群集にも高い多様性が見られ、従来、表水層のみで行われてきた先行研究では、深水層に生息している膨大な鞭毛虫の多様性を見過ごしてきたと示唆された。 第三章では、琵琶湖のプランクトン検鏡観察や琵琶湖からの試水を用いる培養実験において頻繁に出現するキネトプラスチド鞭毛虫に着目し、本鞭毛虫に特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを用いたCatalyzed Reporter Deposition Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization (CARD-FISH)法により、この鞭毛虫の鉛直的な現存量分布を季節的に調べた。キネトプラスチド鞭毛虫は、夏季の好氣的な深水層において優占し、その最大優占率は全鞭毛虫現存量の43.7%に達した。このことは、夏季の琵琶湖深水層において本鞭毛虫が物質循環に果たす重要性を示唆すると共に、真核生物ユニバーサル・プライマーを用いる群集構造解析では検出されない鞭毛虫グループの存在を示唆した。 第四章では、「夏季に好氣的な深水層を有する湖沼では、キネトプラスチド鞭毛虫が優占する」を仮説として、琵琶湖に加えて国内の4つの他湖沼（中禅寺湖、本栖湖、西湖、池田湖）において水温成層期にキネトプラスチド鞭毛虫の現存量を深度別に測定すると共に、真核生物ユニバーサル・プライマーおよびキネトプラスチド鞭毛虫特異的プライマーを用いた次世代シーケンサー法により本鞭毛虫の多様性を調べた。その結果、いずれの湖沼でも、深水層においてキネトプラスチド鞭毛虫の優占が確認され、上記仮説は立証された。真核生物ユニバーサル・プライマーを用いた次世代シーケンサー解析では、第二章と同様、キネトプラスチド鞭毛虫が検出されなかった。一方、キネトプラスチド鞭毛虫特異的プライマーを用いた次世代シーケンサー解析では、キネトプラスチド鞭毛虫は高い多様性で検出され、優占的なOTUは<i>Bodo saltans</i>鞭毛虫と高い相同性を示した。さらに、各湖沼特有の優占的OTUも見られた。 本研究は、世界各地で行われてきた真核生物ユニバーサル・プライマーを用いた真核微生物の多様性研究において見過ごされてきたキネトプラスチド鞭毛虫が、夏季の好氣的な湖沼深水層生態系において高い多様性をもって優占することを見出した。このことは、本鞭毛虫が当該生態系において重要な生態学的役割を果たしていることを示唆した。			

(論文審査の結果の要旨)

近年、分子生物学的手法の発展により、湖沼や海洋において細菌摂食者として重要な原生生物、鞭毛虫の多様性や生態の解明が海洋を中心に進んでいる。一方、湖沼、とりわけ水温成層が発達する大きな深度を持つ湖沼における鞭毛虫の多様性研究はほとんど無い。また、先行研究の多くが海洋でなされてきたことから、季節的なサンプル採集がなされておらず、鞭毛虫の現存量や多様性の季節動態の情報も限られている。申請者は、琵琶湖において毎月のサンプル採集を複数年行うことにより、世界的に情報が得られていない大型湖沼における鞭毛虫の現存量と多様性の鉛直分布の季節動態を解明した。申請者が行った時空間的に解像度の高い研究は、鞭毛虫の生態学において貴重なもので学術的価値は高い。

申請者は、琵琶湖において真核生物のユニバーサル・プライマーを用いた群集解析を行い、深水層において表水層とは異なりかつ多様な鞭毛虫群集であることを解明した。従来、湖沼や海洋の微生物生態学では、一次生産が活発な表水層での研究がほとんどであり、光が届かない深水層における研究は限られていた。このことから、申請者の発見は、従来、表水層のみで行われてきた先行研究では深水層に生息している膨大な鞭毛虫の多様性を見逃してきたことを示し、生物生産が比較的低いながらも水塊の規模としては表水層よりも圧倒的に大きい深水層における生態学的過程の重要性を示唆するものとして興味深い。

また、申請者は、真核生物ユニバーサル・プライマーではキネトプラスチド鞭毛虫の遺伝子を増幅できないことを解明し、本鞭毛虫以外にも真核生物ユニバーサル・プライマーで検出できない鞭毛虫グループの存在を示唆した。このことは、鞭毛虫の多様性研究が未だ課題を抱えていることを示しただけでなく、他の生物についても同様の課題が残されている可能性を示しており、重要な情報を提供した。

一方、申請者は、CARD-FISH法を用いて、夏季に好氣的深水層を有する国内5湖沼においてキネトプラスチド鞭毛虫が優占することを示した。この結果は、本鞭毛虫が食物網を通じた物質循環に果たす重要性を示唆しており、興味深い。さらに申請者は、キネトプラスチド鞭毛虫の中でも特に優占的な種 (OTU) が存在することを示しただけでなく、キネトプラスチド鞭毛虫特異的プライマーを用いた次世代シーケンサー法により海洋深層で報告のある鞭毛虫グループが湖沼深水層でも優占することを解明した。本研究で対象とした湖沼は全て淡水であり、海洋と湖沼の深水層で共通の鞭毛虫グループの優占が起こるメカニズムの解明が待たれる。

以上のように、申請者は湖沼の鞭毛虫の現存量と群集組成を鉛直的かつ季節的に高い解像度で解明し、特定鞭毛虫グループの詳細な季節動態を初めて明らかにすると共に、鞭毛虫の生態学的研究で従来指摘されなかった課題をも提示した。これらは、水圏生態系の物質循環と微生物の群集動態との関係を解明する、重要な成果と言える。

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、平成28年7月29日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日：