

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	木村 成子
論文題目	Temporal dynamics and genetic diversity of cyanophage populations infecting the toxic cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> in a natural pond (天然水域における有毒ラン藻ミクロキスティス・エルギノーサ感染性シアノファージの経時的変動と遺伝的多様性)		
(論文内容の要旨)			
ミクロキスティス・エルギノーサは、世界中の湖沼に遍在しブルームを形成するラン藻であり、その一部の株が毒素産生能を有していることから、本種によるブルームの発生は世界に共通する深刻な社会問題となっている。本種ブルームは、遺伝的に多様な個体群から構成され、ラン藻に感染するウイルス（ファージ）はこの個体群組成変動に関与していると考えられている。したがって、ミクロキスティスの消長に関わるメカニズム解明のために、その感染性ファージの生態学的特徴を理解することは必要不可欠である。そこで、本研究では、京都市広沢池においてミクロキスティス感染性ファージの生態学的特徴（感染サイクル、季節変動、遺伝的多様性）を明らかにし、本ファージが宿主へ及ぼす影響を評価することを目的とした。			
1. <u>自然環境中におけるミクロキスティス感染性シアノファージの感染サイクル</u>			
ファージ複製は宿主代謝に依存しているため、光合成生物を宿主とするファージは、光周期に依存した感染サイクルをとると予測された。しかしながら、環境中におけるファージ感染サイクルを調べた研究例はない。そこで、唯一のミクロキスティス感染性ファージ分離株であるMa-LMM01ゲノム情報をもとに、ファージの尾部遺伝子（ <i>g91</i> ）を標的としたリアルタイムPCR法を用いて、環境水中（ $<0.2\ \mu\text{m}$ ）（ファージ画分）および宿主細胞内（宿主画分）の <i>g91</i> 遺伝子コピー数およびその転写産物量（RNA画分）を定量することで、自然環境中におけるファージ感染サイクルを調べた。さらに、その3つの画分の遺伝子タイプを調べた。その結果、 <i>g91</i> 遺伝子コピー数および転写産物量は日中にピークを示した。また、それぞれの画分のファージ遺伝子タイプは極めて多様であったが、1つの遺伝子タイプが全ての画分において認められた。これらのことから、ファージ遺伝子は日中に転写・複製され、夜間に娘ファージが環境水中に放出されており、その感染は光周期に依存した日周性を示すと考えられた。また、環境水中に放出された娘ファージに比べ、宿主細胞内において常に数百倍高い <i>g91</i> 遺伝子コピー数が検出された。宿主細胞内のファージ粒子数を考慮することで、ファージ生産は従来考えられていたより高い可能性が示された。			
2. <u>自然環境中におけるミクロキスティス感染性シアノファージの遺伝的多様性と宿主に及ぼす生態学的影響</u>			
1の実験より認められたファージの遺伝的多様性が、どのように創出・維持されているのかを明らかにするため、京都市広沢池において、2006年から2011年までのブルーム発生時期（7 - 9月）に計23回、Ma-LMM01タイプファージの遺伝的多様性を調査した。各試料から抽出したDNAを鋳型として <i>g91</i> 遺伝子を標的としたPCR法を行い、それぞれ29 - 41クローン、計810クロンの塩基配列（554 bp）を決定した。それらは、100 %塩基配列相同性で419の遺伝子タイプに分類された。多様性解析（Chao1およびShannon指数）の結果、調査期間を通してファージの高い多様性が維持されていることが示された。また、最節約ネットワークを構築した結果、419遺伝子タイプは大きく3つのグループI-IIIに分けられ、それぞれのグループにおいて24配列以上を含む優占する遺伝子タイプ（5/419）が認められた（主要タイプ）。また、調査期間中、一時的に、7 - 18配列を含む遺伝子タイプ（6/419）も認められた（準主要タ			

イブ)。一方で、ほとんどの遺伝子タイプ(408/419)が1配列しか含まず(希少タイプ)、ほぼすべての希少タイプが主要および準主要タイプの1-2塩基異なる変異体であり、ファージの高い多様性は希少タイプの出現に由来していた。5つの主要タイプは調査期間を通して共存し、その組成は経時的に変動した。これは、宿主の頻度に依存して、感染可能なファージ遺伝子タイプが増減を繰り返したことによると考えられた(頻度依存選択)。希少タイプは、それぞれの由来となる主要あるいは準主要タイプが存在したときにのみ確認された。ミクロキスティスは、多くのファージ耐性遺伝子を有しており、その中の一つにCRISPR-Casシステムがある。本システム下では、ファージは点変異によって、その防御機構を回避することが可能である。したがって、希少タイプの出現パターンは、ファージ-宿主間で急速な軍拡競争型共進化が起きていることを示唆している。以上より、ファージの遺伝的多様性は、頻度依存選択が働くことによって維持され、宿主との軍拡競争型共進化により創出されることが明らかとなった。

これまで、1で用いたプライマー(以下、旧プライマー)によるリアルタイムPCR法により、ファージが宿主へ及ぼす影響を評価し、ファージ感染は宿主個体群組成の変動に影響を及ぼすと指摘されてきた。しかしながら、上述したように、Ma-LMM01タイプファージ個体群は遺伝的に異なる3つのグループから構成され、Ma-LMM01は最も小さなグループIIIに属することから、従来法では本ファージの一部しか検出できないことが明らかとなった。そこで、3つのグループを網羅するプライマー(以下、新プライマー)を作成し、環境水中(<0.2 µm)および宿主細胞内の*g91*遺伝子コピー数をリアルタイムPCR法にて定量した。その結果、調査期間を通して環境水中の*g91*遺伝子コピー数は、旧プライマーを用いた定量で検出限界以下であったのに対し、新プライマーを用いた定量では、 10^3 - 10^4 コピー数/mL検出された。Ma-LMM01タイプファージに感受性である宿主の被感染率は、0.05-36 %だった。従って、ファージ感染は宿主個体群組成の変動のみならず、本ファージ感受性宿主動態へ影響を及ぼす可能性が示された。

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)

ミクロキスティス・エルギノーサは世界各地でブルームを形成し、一部の株が毒素を産生することから、本種ブルームの動態要因を解明することは、世界共通の課題である。その動態に関与する要因の一つとして、ミクロキスティス感染性ファージが挙げられているが、本ファージの生態学的特徴や宿主への影響に関する知見は限られている。本論文では、自然環境中における本ファージの生態学的特徴を明らかにし、本ファージが宿主動態へ及ぼす影響について評価した。その主な成果は、以下の3点に大別できる。

(1) 自然環境中において、ミクロキスティス感染性ファージは、光周期に依存した感染サイクルを示すことを明らかにした。従来、ファージ量推定に用いられていた環境水中に放出された娘ファージに比べ、宿主細胞内で複製されたファージ遺伝子コピー数が常に数百倍高いことから、自然環境中のファージ生産がさらに高い可能性を指摘した。

(2) 自然環境中において、ミクロキスティス感染性ファージは遺伝的に非常に多様であることを明らかにした。さらに、宿主の頻度に依存してファージ遺伝子タイプが増減を繰り返す頻度依存選択が働くことで、ファージの遺伝的多様性が維持されることが示された。また、ファージが点変異によって宿主防御機構を回避することで、ファージ-宿主間に急速な軍拡競争型共進化が起きていることを示し、それによって、ファージが遺伝的に多様化していることが明らかとなった。

(3) ミクロキスティス感染性ファージ分離株Ma-LMM01タイプファージは、宿主個体群組成変動に影響を及ぼすだけでなく、本ファージ感受性宿主動態へ影響を及ぼしている可能性を示した。

以上のように、本論文はミクロキスティス感染性ファージの生態学的特徴について重要かつ基礎的知見を提供し、本ファージ感染が宿主動態へ及ぼす影響の一端を明らかにしたものであり、微生物生態学、進化生態学、陸水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25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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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