

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	河野 圭丞
論文題目	Exploring the hidden microbial world in the sub-cuticular layer of echinoderms: unveiling the diversity and ecological significance of host-specific symbiotic bacteria through culture-dependent and -independent methods (棘皮動物の表面下に隠れた微生物の世界を探る：培養法と非培養法を用いた宿主特異的共生細菌の多様性と生態的意義の解明)		
(論文内容の要旨)			
多くの生物は体内に多様な微生物を保持しており、免疫をはじめとした生理機能に重要な役割を果たしている。海洋無脊椎動物である棘皮動物には、棘皮動物に特有の共生細菌「皮下細菌 (sub-cuticular bacteria; SCB)」が存在することが知られている。SCBは、外骨格と内部組織の間の特殊な環境に局在しており、様々な棘皮動物の組織観察によって多くの種でその存在が確認されている。しかし、SCBの起源や多様性、生理的機能については依然として不明な点が多く、「普遍的に棘皮動物に存在するが、その役割はまだわかっていない」細菌とされている。他の海洋生物に共生する細菌と比較しても、解明すべき部分が多いのが特徴である。 SCBについてはこれまでに分離培養された例がないため、SCBが宿主の生存に重要である可能性は示唆されているが、培養株を用いた実験によって宿主への機能が解明された報告はない。そこで本研究では、棘皮動物の皮下に生息する未知の微生物であるSCBの多様性と宿主への生理的機能を明らかにするために、以下の3つを実施した。 (1) 潮間帯に生息するクモヒトデを対象とした微生物群集構造の解析と宿主体内でのEndozoicomonadaceae科細菌の局在性解析、(2) 分離した<i>Kistimonas</i> sp. ToK13株のゲノム解析と分類学的性状解析、(3) 共培養系を用いたToK13株の抗菌活性の評価である。第一章では、本研究の背景と目的を述べている。 第二章では、潮間帯に生息するクモヒトデの微生物群集構造について、研究を行った。クモヒトデは棘皮動物の中で最も種数が多く（3,000種類以上）、SCBの多様性を明らかにするうえで適していると考えたからである。千葉県、和歌山県、大阪府からクモヒトデ3種類を採集し、腕と体表面、海水のサンプルからDNA抽出を行った後、次世代シーケンサーを用いて16Sr RNA遺伝子を標的としたシーケンス解析を行った。その結果、3種類のクモヒトデで異なる系統の細菌群が高頻度に検出された。その中でもトウメクモヒトデ (<i>Ophiarachnella gorgonia</i>) ではEndozoicomonadaceae科の細菌が全ての個体で高頻度に検出された (mean ± SD = 82.43 ± 9.76%)。26個体中12個体は検出された配列の95%以上がEndozoicomonadaceae科細菌であり、宿主体内に高頻度に存在していることが示唆された。さらにEndozoicomonadaceae科細菌に特異な蛍光プローブを作成し、宿主体内での局在を確認したところ、腕の外骨格に特異プローブの蛍光が観察でき、宿主体内でパッチ状に存在していることを確認した。 第三章では、トウメクモヒトデ体内で高頻度に検出されたEndozoicomonadaceae科に属するToK13株を分離培養し、16S rRNA遺伝子の相同性解析から<i>Kistimonas</i>属に分			

類された。ゲノム相同性から既知の*Kistimonas*属細菌とは異なる新規株であることが明らかとなった。また、ToK13株のゲノムにはビタミンB群をはじめとした宿主の栄養に関わる遺伝子や、宿主への感染に関わる分泌装置及びシグナル伝達物質に関わる遺伝子が保存されていた。以上のように、これまで培養されてこなかったSCBの分離培養、ゲノム・性状解析に成功した。

第四章では、*Kistimonas* sp. ToK13株のインビトロにおける抗菌効果と相互作用に関する研究を行った。ToK13株ゲノムについて、二次代謝産物の生合成に関わる遺伝子の有無を調べたところ、鉄キレート剤の1種であるシデロフォアの生合成遺伝子などを持つことから、抗菌活性を持つ物質を生成する可能性が示唆された。そこで、分離したToK13株を用いて、宿主であるトウメクモヒトデが死滅した水槽から分離した他の微生物株への抗菌試験を行った。その結果、21株の細菌に対して、正常なコロニーの形成が阻害され、そのうち6株において、コロニー形成に顕著な違いが見られた。共培養後にコロニーの面積と細胞数を計測したところ、共培養によってコロニーの面積は減少したものの細胞数は変化しなかった。これらの結果から、ToK13株は非殺菌性の抗菌物質を合成していることが示唆された。

本研究で得られた成果は、クモヒトデにおける微生物共生の重要性を明らかにし、海洋生態系の保全や炭素循環の解明に向けた新たな知見を提供する重要な成果である。第五章では、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)

棘皮動物の多くは、「sub-cuticular bacteria (SCB)」と呼ばれる微生物をクチクラ層直下に定着させている。本研究では、潮間帯のクモヒトデに生息する特定の微生物を明らかにするため、16S rRNA遺伝子を標的とした微生物群集構造解析を行った。さらに、一部のクモヒトデに高頻度に検出されたEndozoicomonadaceae科に属する新規微生物ToK13株を単離し、ゲノム解析や競合試験を行い、ToK13株の宿主特異的な共生が重要な役割を果たす可能性を示した。本研究で得られた成果は、棘皮動物における微生物共生の重要性を明らかにし、海洋生態系の保全や持続可能な利用に向けた新たな知見を提供する重要な成果である。主な成果は以下の3点に大別できる。

- (1) 潮間帯のクモヒトデに生息する特定の微生物を明らかにするため、16S rRNA遺伝子を標的とした微生物群集構造解析を行った。その結果、種ごとに異なる細菌が高頻度で検出され、SCBは高度な宿主特異性を示すことを明らかにした。また、特定のSCBについては蛍光プローブ法によりクチクラ層直下にパッチ状に分布していることを発見した。
- (2) 一部のクモヒトデに高頻度に検出されたEndozoicomonadaceae科に属する新規微生物ToK13株を分離培養し、ゲノム解析から宿主への栄養供給の可能性を示した。
- (3) ToK13株において、抗菌活性を持つ二次代謝産物に関わる遺伝子を確認し、競合試験で複数の微生物の増殖を阻害することが示された。これらの結果は、ToK13株の宿主特異的な共生が重要な役割を果たす可能性を示した。

以上のように、本論文はクモヒトデにおける微生物共生の重要性を明らかにし、海洋生態系の保全や炭素循環の解明に向けた新たな知見が得られたことから、共生微生物学・海洋環境微生物学・海洋生態学に寄与するところが大い。

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7年1月24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と支障がある場合は、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）