

京都大学	博士（人間・環境学）	氏名	大久保智司
論文題目	Molecular microbial ecology of the chlorophyll <i>d</i> -containing cyanobacteria <i>Acaryochloris</i> spp. (クロロフィル <i>d</i> を含むシアノバクテリア <i>Acaryochloris</i> spp. の分子微生物生態学的研究)		
(論文内容の要旨)			
本学位申請論文は、地球上で唯一クロロフィル<i>d</i>を主要色素として酸素発生型の光合成を行うことのできる<i>Acaryochloris</i>属シアノバクテリア（以降ACCと略記）の分布と多様性について研究したものである。具体的には、ACCが沿岸環境に広く分布していること、これまでに分離されたものと異なる遺伝子型をもつACCが数多く潜在していること、一定量のクロロフィル<i>d</i>が広く存在しており沿岸生態系の一次生産に一定の寄与をしている可能性が高いことを明らかにし、これまで全く認知されてこなかった「沿岸生態系におけるACCの多様性およびクロロフィル<i>d</i>の重要性」について述べている。 本学位申請論文は6章から構成されている。以下に各章の要旨について述べる。 第1章では、ACCおよびクロロフィル<i>d</i>に関する先行研究を精査し、その分布や多様性、生態系における役割に関する微生物生態学的研究が欠落していることを指摘している。また、環境中の微生物の分布や多様性を明らかにする手段として、近年汎用されている分子微生物学的手法の有効性とその限界について整理し、本研究に用いる手法の妥当性、新しい方法の開発の必要性について述べている。さらに、生態系におけるACCおよびクロロフィル<i>d</i>の役割を理解する上で、クロロフィル<i>d</i>の分布量を明らかにすることが不可欠であることを述べている。そのうえで、本研究の目的を提示するとともに、各章の意義・目的について整理している。 第2章では、海藻に付着するACCの分子生物学的検出法の開発について述べている。既存の方法では、ACCの検出ができなかったため、海藻からの総DNA抽出方法およびDNA増幅反応時のプライマーの組み合わせを改良することによって、海藻に付着するACCの検出を可能にした。そのうえで、淡路島沿岸から採集したすべての海藻からACCが検出されることを明らかにした。このことから、これまでクロロフィル<i>d</i>が検出されると報告されてきた紅藻類のみならず、褐藻類や緑藻類からもクロロフィル<i>d</i>が検出される可能性を指摘している。さらに本研究によって開発された解析手法が、海藻に付着する微細藻類群集構造の解析に有効であることも明らかにしている。 第3章では、第2章で開発した検出法では、サンプル中にACC以外の単細胞シアノバクテリアが優勢している場合に、存在しているはずのACCが検出できないという問題を明らかにしたうえで、これを解決する方法としてACCを選択的に検出する方法を新たに開発している。開発した選択的検出方法がACCに対して特異性の高い優れた検出方法であり、この方法によって、それまで明らかにされていなかった熱帯域の群体ボヤやカイ			

メンに共生するACCの有無と遺伝的多様性を明らかにしている。

第4章では、第3章で開発したACCの選択的検出法を利用して、北海道室蘭市から鹿児島県頴娃町までの日本沿岸各地ならびに南アフリカ沿岸から採取した海藻に付着するACCの検出とその遺伝的多様性を明らかにした。その結果、採取・分析したほぼすべての海藻からACCが検出されること、さらには、海藻以外の無機付着基質からも検出されることを示した。これらの結果から、ACCが海藻の付着生物として、また、自由生活生物として広く沿岸に分布していることを明らかにしている。

第5章では、ACCの付着によって海藻類に検出されるクロロフィル d を定量し、紅藻類、褐藻類、緑藻類を問わず、この色素が常にまた広域にわたって一定量検出されることを明らかにしている。また、クロロフィル a との存在比から、先行研究において「クロロフィル d が紅藻類のみに検出される」と解釈された原因についても考察している。さらに、沿岸生態系の一次生産に対するACCの寄与について言及している。

第6章では、本研究によって得られたデータの解釈や問題点について整理したうえで、今後の課題について述べている。

以上、本学位申請論文は、6章にわたり、*Acaryochloris*属シアノバクテリアの分布、多様性、沿岸生態系における一次生産への寄与に関する議論が展開されている。

(論文審査の結果の要旨)

本学位申請論文は、地球上で唯一クロロフィル d を主要色素として酸素発生型の光合成をおこなう*Acaryochloris*属シアノバクテリア（以降ACCと略記）の生態に焦点を当て、沿岸環境におけるその分布、多様性、存在量を明らかにするとともに、ACCあるいはクロロフィル d が沿岸生態系において担っている一次生産への寄与をも予測した画期的な研究であると高く評価できる。

第1章では、ACCおよびクロロフィル d に関する先行研究を整理したうえで、微生物生態学的研究の欠落を指摘し、その分布、多様性、存在量について明らかにする必要があることを導き出している。さらにその方法として、近年、多用されている培養を介さない分子微生物生態学的手法を用いること、また、存在量の簡便な測定法として色素定量をおこなうことの必要性について述べている。本章は、本研究の意義を明らかにするうえでの適切な議論がなされているものと評価できる。

第2章では、既存の分子生物学的手法の組み合わせと、その改良によって、海藻に付着するACCの検出が可能であることを明らかにした。また、紅藻類のみに検出されるという先行研究からの予想に反して、緑藻類や褐藻類にもACCが検出されることを見出し、緑藻類や褐藻類からもクロロフィル d が検出される可能性を指摘している。特に評価できる点は、既存技術の導入だけでは検出不可能であった理由について考察し、海藻類からの総DNAの抽出法を改良すること、DNA増幅反応の際のプライマーの組み合わせを工夫することを見出し成功に至っている点である。本研究で開発された海藻類の総DNAの抽出法が、実際、数多くの藻類研究者に用いられていること、さらに本章の研究成果が分子生物学的手法を用いて海藻表面の微細藻類群集構造を解析した最初の報告として国際学術雑誌にも掲載されている点からも、本章の研究成果は高く評価できる。

第3章では、亜熱帯域の群体ボヤおよびカイメンから15の遺伝子型のACCを検出し、これらの生物の体内や体表がACCの生育場所のひとつであることを明らかにした。本研究成果を得る過程では、ACC以外の主たる共生シアノバクテリアの存在によって、第2章で改良した方法では存在しているはずのACCが部分的にしか検出できないという問題に直面した。この問題に対して、ACCのDNAを選択的に増幅することによって検出するという発想に至り、極めて優れた選択的検出法の開発に至っている。さらにここで開発されたACC検出法は、第4章における分布および多様性研究に発展することからも、特定のシアノバクテリアの遺伝的多様性を検出する優れた研究成果であると位置づけられる。

第4章では、第3章で開発した選択的検出法を利用して、日本沿岸各地ならびに南アフリカ沿岸において採取した海藻において、ACCの付着の有無とその遺伝的多様性について調べ、採取・分析したすべての海藻からACCが検出されること、その遺伝的多様性は種分化が議論できる程度の広がりをもつことを明らかにした。これは、これまで特定の環境にのみ分布すると考えられてきたACCが全世界の沿岸に広く分布することを示した画期的な研究成果であると高く評価できる。

第5章では、日本沿岸各地および南アフリカから採取した海藻から検出されるクロロフィル*d*を定量し、測定したほとんどの海藻からクロロフィル*d*が検出されること、必ずしも紅藻類から多く検出されるわけではなく、湿重量あたりの検出量が紅藻類より多い緑藻類や褐藻類も存在することを明らかにした。この結果は1943年のクロロフィル*d*の最初の報告と矛盾しているものの、その理由を明確に述べることによって先行研究の欠点をも指摘しており高く評価できる。さらに、藻場におけるクロロフィル*d*存在量がクロロフィル*a*のおよそ1%程度になることを明らかにし、ACCおよびクロロフィル*d*が藻場および沿岸生態系における一次生産に一定量の寄与をしている可能性に言及している点において学術的に興味深い内容になっている。本章のデータの一部はScience誌に論旨を支える重要なデータとして掲載されている点からも高く評価できる。

第6章では、本研究における成果をまとめ、関連研究において残されている課題について指摘している。特に、ACCおよびクロロフィル*d*の生態系における役割に関する更なる理解のためには、極域や外洋域における分布や多様性、存在量の調査・研究が不可欠であることが的確に述べられている。

以上本論文は、優れた研究成果として高く評価できるとともに、人間と自然の共生のための新しい科学・技術のあり方を探求し、生物が種々の有機資源を効果的に産出する機能やメカニズムを解明する相関環境学専攻分子・生命環境論講座の設立の趣旨にふさわしい内容であるといえる。

よって本論文は、博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成24年1月12日論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、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