

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	久野 草太郎
論文題目	Genetic analysis of host-phage interactions involving the toxic cyanobacterium <i>Microcystis aeruginosa</i> （有毒ラン藻ミクロキスティス・エルギノーサにおける宿主－ファージ相互作用の遺伝的解析）		
（論文内容の要旨）			
有毒ラン藻ミクロキスティス・エルギノーサは、富栄養化した湖沼でアオコを引き起こす。ラン藻とそれに感染するウイルス（ファージ）との相互作用を解明することは、本種個体群の遺伝的多様性や制御因子を理解し、水資源の保全を図る上で重要である。本種は極めて多くのファージ防御遺伝子を有しており、多様なファージとの密接な相互作用が示唆されている。しかし、ミクロキスティス感染性ファージの分離株は限られており、本種における宿主－ファージ感染系に関する知見は不足している。そこで本研究では、ミクロキスティスのゲノム上に存在するファージ感染の痕跡配列に注目した。まず、本種感染性ファージが有する挿入配列（IS）のラン藻株における分布を調べ、両者間における遺伝子伝播の可能性を検証した。さらに、外来因子（ファージ・プラスミド）の部分配列が記録された防御領域（CRISPR）を解析し、本種における宿主－ファージ感染系の多様性、ならびに相互作用を通じた両者のゲノム進化について重要な知見を得た。			
<u>1. ミクロキスティスにおけるファージ関連ISの分布</u>			
ミクロキスティス感染性ファージMa-LMM01のゲノムには、ラン藻ゲノム上の配列と高い相同性を示すISが見いだされ、ラン藻－ファージ間の遺伝子伝播が示唆された。しかし、既知のミクロキスティスゲノムにはそれに相当する配列が存在せず、ファージが保有するISの由来は不明であった。そこで、ISを標的としたPCR法により、21株のミクロキスティスにおけるISの分布を調査した。その結果、系統的に異なる4株でPCR産物が得られ、それらの株ではゲノム上の3か所のいずれかにISが挿入されていることが判明した。また、ISがコードする転移酵素遺伝子の塩基配列に基づいて系統樹を作成したところ、ミクロキスティスとMa-LMM01が保有するISは互いに極めて近縁であることが明らかになった。以上の結果から、ミクロキスティスからMa-LMM01へISの伝播が起きたこと、ならびに本ファージがISの伝播を仲介し得る可能性が示された。これらの結果は、Ma-LMM01が宿主以外の株と相互作用した可能性を示している。そこで、以降は本種における宿主－ファージ相互作用についてより包括的に解明を試みた。			
<u>2. ファージ防御領域CRISPRの解析に基づくミクロキスティスにおける宿主－ファージ相互作用の解析</u>			
CRISPRは細菌および古細菌のゲノムに見られる繰り返し領域であり、外来因子に対する獲得免疫機構として機能する。CRISPRには、細胞に侵入したファージおよびプラスミドの部分配列がスペーサーと呼ばれる介在配列として記録されている。そこで、ミクロキスティスの培養株4株についてCRISPR配列を決定し、ゲノムが既報の2株と合わせて本種におけるスペーサー組成の多様性を調査した。その結果、スペーサー組成は株ごとにほぼ完全に異なっていた。さらに環境における本種のCRISPR多様性を詳細に調べるため、CRISPRの前半部分を網羅的に増幅するPCR法を開発し、京都市の広沢池より採取した試料に適用した。増幅産物より決定した89配列は、それぞれスペーサー組成が異なる24種の配列（CRISPRタイプ）に分類された。以上の結果から、ミ			

クロキスティスでは、特異的なファージとそれに感受性の宿主株から成る「感染可能な組み合わせ」が複数存在することが示唆された。

次に、ファージ感受性に基づいてミクロキスティスの個体群構造を明らかにするため、2010年および2011年の夏季に広沢池より計94株のミクロキスティスを分離し、CRISPR前半配列の解析、ならびに種内多様性の指標である16S-23S rRNA内部介在配列(ITS)に基づく系統解析を行った。CRISPRに由来するPCR産物は52株から得られ、その配列はスペーサー組成が異なる22タイプに分類された。そのうち同日に採取された33株は異なる16タイプで構成されていた。また、7種のCRISPRタイプにおいて、新たなスペーサーの付加によるCRISPRの多様化が認められた。CRISPRの多様化は群集内で優占するITSタイプで最も顕著であり、それらの株ではゲノム構造が比較的保たれている一方で、スペーサー組成は大きく異なっていた。以上の結果から、ミクロキスティス群集にはファージ感受性の異なる複数タイプが安定的に共存していること、それぞれのタイプにおいてファージとの相互作用によりスペーサーの付加、すなわち耐性獲得進化が起こることが示された。

最後に、スペーサー配列をデータベース上の外来因子と比較することで、その由来の特定を試みた。本研究で得た1,212個のスペーサーのうち、由来を推定できたものはわずかに53個(4%)であり、本種に感染する未知ファージの多様性が示唆された。Ma-LMM01に由来するスペーサーは12個見出されたが、いずれも標的とする配列との間に1～5塩基のミスマッチが存在した。CRISPRによる感染阻害は標的配列との完全一致を必要とすることから、Ma-LMM01はこうした変異により感染阻害を回避していると考えられた。3種の機能未知プラスミドに由来するスペーサーが様々な株のCRISPRに取り込まれており、ミクロキスティス群集においてそれらのプラスミドが頻繁に伝播したと考えられた。

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。

(論文審査の結果の要旨)

宿主－ファージ間の相互作用は、環境微生物の動態を理解する上で欠かすことのできない極めて重要な生物現象である。ミクロキスティス・エルギノーサは世界中の淡水域で有毒アオコを形成するラン藻でありその制御要因や個体群動態の把握が急務とされているが、本種とファージとの相互作用に関する知見は限られていた。本論文では、ファージゲノムに見出された挿入配列 (IS) に注目して両者間の遺伝子伝播を検証し、さらに、ファージ感染の履歴配列であるCRISPR領域を解析することで、本種における宿主－ファージ感染系について明らかにした。その主な成果は、以下の4点に大別できる。

(1) ファージMa-LMM01が保有するISが系統的に異なる4株のミクロキスティスに存在することを見出し、両者間における遺伝子伝播を明らかにした。また、本ファージがISのベクターとなることで、ミクロキスティスのゲノム構造に寄与する可能性を指摘した。

(2) ミクロキスティスのCRISPR領域を増幅するPCR法を確立し、培養株および環境試料におけるCRISPRの多様性を明らかにした。CRISPRに記録されたファージ由来配列 (スパーサー) が株間で大きく異なることから、本種個体群には特異的なファージと感受性の宿主からなる「感染可能な組み合わせ」が複数存在することを示した。

(3) 広沢池 (京都市) から分離したミクロキスティス株について、16S-23S rRNA 内部介在配列 (ITS) に基づく系統関係を示した上で、CRISPR領域の多様性を明らかにした。本種個体群内には、ファージ感受性の異なる複数の系統タイプが共存していること、それぞれのタイプではファージとの相互作用を通じ、スパーサー取り込みによる耐性獲得進化が起こることを示した。

(4) スパーサー配列の由来となった外来DNAを推定し、本種が未知ファージやプラスミドを含む極めて多様な外来因子と相互作用したこと、ならびにファージ群集がCRISPRを回避するために点変異による多様性を保持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における宿主－ファージ感染系について重要かつ基礎的な知見を提供し、本種の多様性やゲノム進化、個体群動態にファージ感染が与える影響の一端を明らかにしたものであり、微生物生態学、遺伝学、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1月16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