



学位論文審査の結果の要旨

専攻	生物圏生命科学専攻	氏名	水谷 雪乃
審査委員	主査教授 副査教授 副査教授 副査准教授	福崎 智司 田丸 浩 柿沼 誠 田中 礼士	
論文題目 (題目変更の有無) 有・ <input checked="" type="radio"/> 無	Genomic and ecological studies on novel <i>Arcobacter</i> isolated from abalone (アワビから分離された新規アルコバクターに関する遺伝学および生態学的研究)		
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>アルコバクター (<i>Arcobacter</i>) は1991年にVandammeらによって分類されるまで、カンピロバクター属 (<i>Campylobacter</i>) に分類されていた細菌群である。カンピロバクター属にはヒトの消化管内にて食中毒を引き起こす <i>C. coli</i> や <i>C. jejuni</i> が含まれていることに加え、アルコバクター属の中にも <i>A. butzleri</i>, <i>A. cryaerophilus</i> および <i>A. skirrowii</i> といった陸生動物の病原性細菌が含まれている。アルコバクターの研究はこれらの種に関するものが多いため、本細菌群にはヒトや家禽類などの陸生動物に生息する病原性細菌というイメージが強く刷り込まれている。しかし近年、海水、堆積物またはカキやムール貝などの二枚貝といった海洋環境から、本細菌群に分類される様々な新種の細菌が単離され始めている。さらに、世界で初めて巻貝であるアワビから <i>A. haliotis</i> の単離を成功させており、アワビも本細菌群の生息環境の一つであると推察していた。そこで本細菌群の海洋環境における生態を明らかにするために、アワビを対象にアルコバクターの特異的検出を行い、これら検出されたアルコバクターの単離を試みた。さらに単離に成功した株のゲノム解読および他種との比較ゲノム解析により、アワビ由来のアルコバクターの遺伝学的特徴を明らかにした。</p> <p>まず、アワビに存在するアルコバクターの一群を明らかにするため、アルコバクターの16S rRNA遺伝子特異的プライマーセットを用いたクローニング解析を行った。この解析の結果、本細菌群に分類される12タイプの16S rRNA遺伝子が検出され、アワビには非常に多様なアルコバクターが生息していることが明らかとなった。さらに、検出された遺伝子タイプのうち9タイプの遺伝子が、既存のアルコバクターと</p>			

97%以下の相同性を示しており、アワビにはこれまでに報告されていない、新規のアルコバクターが複数種生息していることが確認された。また、本細菌群特異的プローブ (ARC94 probe) を用いた fluorescence in situ hybridization method (FISH法)を用いて本細菌群の定量を行った。FISH法を用いた検鏡観察の結果、 $8.06 \pm 0.05 \times 10^5$ cells/g のARC94 probe陽性細菌がアワビのホモジナイズサンプルから検出された。

次に、2種類の単離方法を用いて、アワビからこれらのアルコバクターの単離を試みた。1つ目の単離方法は、アワビから単離された *A. haliotis* が乳酸利用陽性である事を確認していたため、乳酸を単一炭素とした培地を用いて単離した。2つ目の単離方法は、2016年に Salas - Massóらによって提唱された単離方法を参考に、2.5% NaCl添加下の代替として人工海水添加下とし、30℃の培養温度を15-25℃に改良した方法を用いた。乳酸培地を用いた単離では1株の新規アルコバクター (LA11株) が、Salas - Massóらの方法を用いた単離では2種の新規アルコバクター (15T96H-1, 15T96H-2) がそれぞれ単離された。

さらに、単離された3株のうち、LA11株のゲノムを解読し、既存種と比較することにより、アワビに生息しているアルコバクターの遺伝学的特徴を解析した。既存種の中からヒガタアシの根に共生している *A. nitorofigilis*、二枚貝から単離された *A. lekithochrous* および *A. bivalviorum*、海水から単離された *A. halophilus*、汚水から単離された *A. defluvii* さらに病原性細菌である *A. cryaerophilus* を代表株として使用した。ゲノム解析の結果、7種のアルコバクターはともにグルコースの6リン酸化の遺伝子を保有せず、糖を資化できない事が確認されたが、代わりに有機酸を資化する遺伝子を多く保有していた。また、二枚貝から単離された2種のアルコバクターおよびアワビから単離されたLA11株のみ完全な脱窒経路を有していた。加えて、LA11株は窒素固定によりアンモニアを生成し、アンモニアから16種のアミノ酸を合成する代謝経路をもつことを確認した。LA11株から *A. butzleri* が保有する病原因子を探したところ *ciaB* 及び *mviN* が検出されたものの、他の種よりも保有している病原遺伝子の数は少なかった。以上の研究により、アワビには複数種の新規アルコバクターが存在し、さらにはそれらは陸生生物に生息する病原保有株とは異なる遺伝子群を有し、特に窒素循環に深く関与する可能性を見出した。

これら一連の研究は提出論文として示した国際誌2報に掲載され、うち1報 (Genome Announcement誌に掲載された "Genome Sequence of *Arcobacter* sp. Strain LA11, isolated from the gut of *Haliotis discus*") についてはその解析データが国立遺伝学研究所および米国NCBI (National Center for Biotechnology Information) に登録され、多くの研究者に利用され、すでに *Frontiers in Marine Science* 誌などの評価の高い国際誌に引用されている。

以上の諸点より、学位論文審査委員会は全員一致で本論文を博士学位論文としての評価に値するものと認め、学位論文審査合格と判断した。