

## 論文審査および最終試験結果報告書

論文提出者氏名： Jonaira Rashid

論文題目： Metagenomics-based studies on seasonal variations of microbial flora in the Ofunato Bay associated with environmental parameters

論文概要と審査結果：

海洋生態系において、分解者としての細菌および基礎生産者としての植物プランクトンは非常に重要な存在である。さらに、これら微生物は環境中で物質循環と密接に関連していることから、海洋環境を理解する上でも微生物叢およびその季節変動を明らかにする必要がある。このようなことから、これまでに顕微鏡観察や培養実験などの手法を用いたプランクトンや細菌数のモニタリングが行われてきている。しかしながら、海洋環境では難培養性の微生物がほとんどであることから、それらの動態には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、リアス海岸に位置し、半閉鎖性の内湾でカキなどの養殖が盛んな岩手県の大船渡湾に着目し、メタゲノム解析により難培養性の細菌および真核プランクトンを含む微生物叢の季節変動を調べて、環境要因との関係を明らかにすることを目的とした。

第一章では背景および方法を記載した。本研究では、大船渡湾で盛川が流入する湾奥 (KSt.1)、カキ養殖が盛んな湾中央部 (KSt.2)、太平洋に面する湾口 (KSt.3) の3定点につき、2015年～2017年の3年間、月に1回、1 m (KSt.1, KSt.2, KSt.3) および8 m (KSt.1) あるいは10 m (KSt.2, KSt.3) の水深より海水を採取した。次に、この海水を孔径20、5、0.8 および0.2  $\mu\text{m}$  の各フィルターで順次ろ過して生物細胞を分画し、0.2  $\mu\text{m}$  フィルター画分は2016および2017年のものを、0.8  $\mu\text{m}$  フィルター画分は2015年のものを対象に、次世代シーケンサを用いてショットガンメタゲノム解析を行った。一方、水温、クロロフィル *a* 濃度、栄養塩濃度などの環境要因は常法により調べた。

第二章では、大船渡湾の海水から2016および2017年の0.2  $\mu\text{m}$  フィルターに捕捉された生物細胞のDNAにつき解析を行い、既報の2015年のものと比較した。その結果、3定点の2水深ともに細菌、真核生物、古細菌およびウイルスの存在が確認でき、そのうち細菌が最も多いことを示した。細菌叢を属レベルで調べたところ、*Candidatus Pelagibacter* および *Planktomarina* が優占することが明らかとなった。一方、これら2属の占める割合は2016および2017年では似た傾向を示したが、いずれも2015年とは異なった。2015年で異なる結果を示した理由として、水温などの環境調査の結果から寒流の親潮が影響した可能性が示された。さらに、月別の細菌叢のクラスター解析により、細菌叢が季節変動し、その変動は年によって異なることを示した。次に、真核生物の解析では、その多くが光合成ピコ真核生物 (PPE) の *Bathycoccus*、*Micromonas* および *Ostreococcus* で占められ、これらPPEの出現割合も季節変動し、クロロフィル *a* 濃度が高い時期には減少する傾向を示した。また、PPEに感染するプラシノウイルスも検出されたことから、PPEにはウイルスが付着あ

るいは感染しており、それらが PPE の季節変動に関与する可能性も示した。





第三章では、PPE をより詳細に解析することを目的として、2015 年の 0.8  $\mu\text{m}$  フィルターに捕捉された生物細胞より DNA を抽出してメタゲノム解析を行った。その結果、細菌叢は主に *Planktomarina* および *Synechococcus* が占めることを示した。また、珪藻ブルームとの関連性が示唆されている *Roseobacter*、*Polaribacter*、*Flavobacterium* などの細菌が、クロロフィル *a* 濃度と類似した季節変動を示したことから、これら細菌が大船渡湾における植物プランクトンのブルーム形成に関与することを示唆した。さらに、細菌叢について環境データとの関連性を NMDS 解析で調べた結果、4 および 5 月の細菌叢は他の月のものとは明らかに異なり、同時にクロロフィル *a* 濃度との相関が示された。この結果からも植物プランクトンのブルームと細菌叢とが影響し合う可能性が示唆された。なお、0.8  $\mu\text{m}$  フィルターでは、0.2  $\mu\text{m}$  フィルターと比較して PPE がより多く検出され、その季節変動はクロロフィル *a* 濃度とは負の相関を示すことが再確認された。また、8 月の KSt.2 で 1 m および 10 m 層とも *Crassostrea* 属の出現が目立った。そこで、PPE の一種、*Prasinophyceae* を同地点の海水から単離し、その培養株を用いて試験したところ、二枚貝幼生に摂食されることが示された。さらに、0.8  $\mu\text{m}$  フィルターにおいてもプラシノウイルスが検出されたことから、本ウイルスは PPE に感染あるいは付着し、PPE の季節変動に関与する可能性が改めて示された。

以上、本研究は、これまで顕微鏡観察や培養実験を中心とした解析が行われていた大船渡湾の微生物叢につき、メタゲノム解析の手法を用いて微生物叢が大きく季節変動すること、その変動が植物プランクトンのブルームと関連していることなど、これまで不明であった海洋生態系の多くの現象を明らかにした。これら研究成果は、海水中の物質循環と微生物生態系の関係を解き明かすための研究に大きく寄与するものであり、博士論文にふさわしいものと判断できる。

また、2019 年 1 月 24 日に実施した最終試験において、論文の内容ならびに質疑応答に関して、本人が学位を受けるのに必要十分な学識を持つことを認め、合格と判定した。

以上の結果から、審査員一同は Jonaira Rashid 氏が北里大学・博士（水産学）の学位を授与されるのに値するものと判定した。

#### 論文審査担当者：

主 査	北 里 大 学	教 授	山 口 峰 生	
副 査	北 里 大 学	教 授	菅 野 信 弘	
	水産研究・教育機構	センター長	坂 見 知 子	
	北 里 大 学	特 任 教 授	渡 部 終 五	
	北 里 大 学	准 教 授	小 檜 山 篤 志	