

氏名	リケン 李 娟
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 721 号
学位授与年月日	平成 30 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学
学位論文題目	白神山地の樹木の樹皮表面に生息する細菌に関する研究 (Studies on bacteria inhabiting the bark surfaces of trees in the Shirakami Mountains)
学位審査委員	主査 殿内 暁夫(弘前) 副査 加来 伸夫(山形 教授),大和田 琢二(帯広 教授),赤田 辰治 (弘前 准教授)

論文の内容の要旨

葉圏とは微生物学の専門用語の一つであり、植物の地上部でかつ微生物の生息域である空間を示し、葉・芽・茎・花・果実を含む。葉圏は雨・気象・気温による影響を受ける以外にも、有害な紫外線に頻繁かつ長時間曝されているため、植物の地下部にある根圏と比較すると生物の生息の場としては苛酷な環境にあるといえる。近年、次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析により、葉圏の一部である葉面には宿主特異的な細菌群集が形成されることが示唆されている。樹木の葉圏細菌についての研究例は少ないが、宿主である樹種に特異的な細菌群集が形成されるという複数の報告がある。樹皮も樹木の葉圏を構成する重要な部分であるが、葉圏細菌の研究において対象とされたことは殆どない。本研究は白神山地の樹木の樹皮表面に生息する細菌を詳細に解析して樹木と細菌との関わりを解明することを目的とした。

主に青森県中津軽郡西目屋村の弘前大学白神自然観察園を研究のフィールドとし、広葉樹 6 種（ブナ・ホオノキ・イタヤカエデ・ミズナラ・ヤマナラシ・ウダイカンバ）と針葉樹 2 種（スギ・カラマツ）の樹皮表面から拭取り法によって試料を採取し、培養法による計数と分離、細菌群集の次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を行った。

樹皮には $10^2 \sim 10^4$ cfu/cm² の培養可能な細菌が生息し、多くが葉圏細菌の特徴であるカロテノイドなどの色素生産性の細菌であった。樹皮からは *Proteobacteria* 門、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Acidobacteria* 門、*Deinococcus-Thermus* 門に所属する細菌が分離された。葉圏細菌として知られる *Methylobacterium* 属や *Sphingomonas* 属は高効率で分離され樹皮においても優占することが示唆された。興味深いことに葉圏では殆ど検出されることのない *Thermus-Deinococcus* 門の *Deinococcus* 属の細菌株（PtRA-8 株）がブナとヤマナ

ラシ樹皮から分離された。また、ブナ樹皮からはこれまでに3種しか正式記載されていない *Armatimonadetes* 門細菌株 (AX-7 株) も分離された。両分離菌株の樹皮における生態と機能を明らかにするために、詳細な解析を行った。

PtRA-8 株の細胞壁ペプチドグリカンにはジアミノ酸としてオルニチンを含む A3 γ 型で、呼吸鎖キノンが MK-8 で、主要細胞脂肪酸が C_{16:0} であるという *Deinococcus* 属細菌に共通な特徴を有した。さらに分子系統樹上で“*Deinococcus radioresistens*”、*Deinococcus metalli*、*Deinococcus yunweiensis* 共通のクレードを形成する種レベルで新規な細菌であることが示されたことから、新種 *Deinococcus populi* と命名し、樹皮における機能と生態についての解析を行った。樹皮細菌群集内での *Deinococcus* 属細菌の量的な重要性は低く、針葉樹2種の樹皮には *Deinococcus* 属細菌は検出されなかった。PtRA-8 株と種レベルで同一な OTU はブナ・ホオノキ・イタヤカエデで検出されたが、量的には希少であった。PtRA-8 株は固体表面への附着能を有し、43 J/m² 紫外線照射に対しても40%の高い生残性を示すこと、さらに樹皮に検出された有機化合物の利用性があることなどから樹皮環境に適応していることが示唆された。

AX-7 株は系統分類学的な解析により *Armatimonadia* 綱に所属する目レベルで新規な細菌であることが示されたため、AX-7 株を新種“*Capsulimonas corticalis*”とし、新目“*Capsulimonadales*”、新科“*Capsulimonadaceae*”、新属“*Capsulimonas*”を創設した。AX-7 株の所属する *Armatimonadetes* 門細菌は樹皮細菌群集の0.8~2.4%を構成し、比率としては *Proteobacteria* 門、*Acidobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Actinobacteria* 門に次ぐグループであった。AX-7 株と種レベルで一致する OTU は樹皮 *Armatimonadetes* 門細菌の0~58.8%を構成した。その構成比率は広葉樹よりも針葉樹で高く、AX-7 株は針葉樹と関連が深いことが示された。AX-7 株は複数の細胞が極めて厚い莢膜と粘液層で包まれ視認可能な大きな凝集体を形成した。抗生物質の多くに耐性があり、乾燥条件下でも高い生残性を有することで樹皮環境に適応しているものと考えられた。

樹皮細菌群集の全ての樹種で主要な構成細菌グループは *Proteobacteria* 門と *Acidobacteria* 門であった。この2門に加えて広葉樹では *Bacteroidetes* 門、針葉樹では *Actinobacteria* 門が主要なグループであった。すべての試料に共通する Core Microbiome は *Methylocystaceae* 科と *Caulobacteraceae* 科の OTU であった。非計量的多次元尺度構成法 (NMDS) 解析により樹皮細菌群集は宿主である樹種特異的に形成されることがわかった。同一樹種内では個体間で差異があり、宿主の生息場所も樹皮細菌群集の形成に影響を与える傾向にあったが、時季による変動は小さかった。樹皮細菌群集はブナ・ホオノキ・イタヤカエデ、ヤマナラシ・ミズナラ、スギ・カラマツでそれぞれ類似していた。ウダイカンバの樹皮細菌群集は NMDS 座標上でスギ・カラマツとブナ・ホオノキ・イタヤカエデの中間に位置した。ブナを対象にした解析では樹皮細菌群集は葉面と樹下土壌の細菌群集とは明確に異なっていた。樹皮には藻類を主要構成者とする真核生物群集が形成されており、やはり構造は樹種特異的で、NMDS 座標上の位置関係も樹皮細菌群集と同様であった。以上のことから樹皮には樹種に固有な生物群集が形成されることが示された。GC-MS 分析によって樹皮からは樹種ごと

に異なる成分パターンの化合物群が検出され、樹種に固有の樹皮細菌群集を形成する要因の1つであることが考えられた。

論文審査の結果の要旨

近年の研究では葉圏に生息する細菌が宿主の栄養や健康に関与する可能性が示唆されている。樹皮は樹木の葉圏を構成する重要な部分であるが、葉圏細菌の研究において対象とされたことは殆どない。本研究は白神山地の樹木（広葉樹6種と針葉樹2種）の樹皮表面に生息する細菌を詳細に解析して樹木と細菌との関わりを解明することを目的として行われたものである。

樹皮には培養可能な細菌が $10^2 \sim 10^4$ cfu/cm² の個体密度で生息し、その多くが葉圏細菌の特徴であるカロテノイドなどの色素生産性の *Proteobacteria* 門細菌であった。葉圏では殆ど検出されないことのない *Thermus-Deinococcus* 門の細菌株（PtRA-8 株）がブナとヤマナラシ樹皮から分離された。また、ブナ樹皮からはこれまでに3種しか正式記載のない *Armatimonadetes* 門細菌株（AX-7 株）も分離された。両分離菌株の樹皮における生態と機能を明らかにするために、詳細な解析を行った。

PtRA-8 株は分子系統樹上で“*Deinococcus radioresistens*”、*Deinococcus metalli*、*Deinococcus yunweiensis* 共通のクレードを形成する種レベルで新規な細菌であることが示されたことから、新種 *Deinococcus populi* と命名した。樹皮細菌群集内での *Deinococcus* 属細菌の量的な重要性は低いものの、PtRA-8 株は樹皮表面から検出された主要糖質のキシリトールの利用性を示し、また高い紫外線照射耐性と個体附着能を有することから樹皮環境に適応した細菌であることが示唆された。

AX-7 株は *Armatimonadia* 綱に所属する目レベルで新規な細菌であり、新種“*Capsulimonas corticalis*”とし、新目“*Capsulimonadales*”、新科“*Capsulimonadaceae*”、新属“*Capsulimonas*”を創設した。培養非依存的解析により AX-7 株の所属する *Armatimonadetes* 門細菌および AX-7 株とその同種の細菌は針葉樹と関連が深いことが明らかにされた。AX-7 株は複数の細胞が極めて厚い莢膜と粘液層で包まれ視認可能な大きな凝集体を形成した。抗生物質の多くに耐性があり、乾燥条件下でも高い生残性を有することで樹皮環境に適応していることが示された。

樹皮細菌群集の全ての樹種で主要な構成細菌グループは *Proteobacteria* 門と *Acidobacteria* 門であった。この2門に加えて広葉樹では *Bacteroidetes* 門、針葉樹では *Actinobacteria* 門が主要なグループであった。非計量的多次元尺度構成法（NMDS）解析により樹皮細菌群集は宿主である樹種特異的に形成されること、同一樹種内では個体間で差異があり、宿主の生息場所も樹皮細菌群集の形

成に影響を与える傾向にあるが、時季による変動は小さいことが明らかにされた。

本研究において、樹木の樹皮には樹種固有の細菌群集が形成されることを明らかにしたことに加え、生態や機能が殆ど知られていない *Deinococcus* 属細菌や *Armatimonadetes* 門細菌に新知見を与えた。得られた成果は白神山地の環境モニタリングにも有用であると考えられる。よって、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Juan Li, Chisaki Kudo, Akio Tonouchi (2018) Description of *Deinococcus populi* sp. nov. from the trunk surface of a Japanese aspen tree. *Archives of Microbiology* 200 (2): 291-297.