

博士論文要約 (Summary)

平成 27 年 9 月入学
連合農学研究科 資源科学 専攻
氏 名 李 娟

タイトル	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
第 1 章 <p>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。本研究は白神山地に生息する樹木を中心に、樹皮表面に生息する細菌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。</p>	
第 2 章 <p>ブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツの樹皮に生息する培養可能な細菌数を調べるとともに、計数培地から主要な細菌株の分離を行った。分離株は 16S rRNA 遺伝子の</p>	

PCR-RFLP パターンに基づいて OTU にまとめ、代表株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいて分子同定を行った。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* 門細菌株も分離された。

第 3 章

第 2 章においてブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツから分離された細菌株の中で、新規分類群であると推定される株の多くが死滅するかあるいは増殖能を失った。*Deinococcus-Thermus* 門細菌は 2 菌株・2OTU が分離され、いずれも分離株数・OTU 数の 9.5% を占めており、高い効率で分離された。第 2 章の計数培地から分離された菌株の中で UV 耐性などの特殊な生理学的特徴を持つ *Deinococcus-Thermus* 門に所属する PtRA-8 株を選択し、形態的特徴、分子系統解析、化学分類学的解析、生理生化学的解析、UV 耐性試験、乾燥耐性および固体表面への附着能試験を行うとともに、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析に基づいて樹皮細菌群集における PtRA-8 株と *Deinococcus* 属細菌の位置付けを考察した。

第4章

Armatimonadetes 門細菌は調査した全樹木の樹皮細菌群集の 0.8~2.4%を構成していた。*Armatimonadetes* 門は 2011 年に創設された細菌門であり、これまでに 3 種しか記載されていない。第 2 章の計数培地から分離された *Armatimonadetes* 門に所属する AX-7 株を選択し、形態的特徴、分子系統解析、化学分類学的解析、生理生化学的解析、乾燥耐性および固体表面への附着能試験を行うとともに、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析に基づいて樹皮細菌群集における AX-7 株と *Armatimonadetes* 門細菌の位置付けを考察した。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。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。

第5章

樹皮から採取した試料に対し、次世代シーケンサーを用いて細菌群集構造解析を行った。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おり、樹皮には固有の細菌群集が形成することが示唆された。

第 6 章

本研究を総括し、既存の葉圏細菌に関する知見と本研究で得られたデータに基づき、樹種固有で安定な細菌群集が樹皮に形成される要因についての総合的な考察を行った。また、本研究の成果が白神山地の環境モニタリングに活用できる可能性について論じた。