

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

2018年

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(弘前大学)

李 娟

目次

第1章 緒言	1
第1節 はじめに	1
第2節 葉圏について	3
第3節 葉圏と微生物との関係に関するこれまでの研究の概要	4
第4節 本研究を行う意義	6
第5節 博士論文の構成	8
第2章 樹皮表面に生息する細菌（樹皮細菌）の培養法による解析	11
第1節 序論	11
第2節 材料と方法	13
1. 試料採取	13
2. 樹皮細菌の計数	13
3. 細菌株の分離とOTU化	17
4. OTU代表株の分子同定	20
第3節 結果	21
1. 樹皮細菌の計数值	21
2. 計数培地に形成されたコロニーの色について	21
3. 計数培地から分離した細菌株	24
第4節 考察	29
1. 樹皮細菌の計数	29
2. 樹皮細菌のコロニー色について	30
3. 樹皮から分離された細菌について	30

第3章 ヤマナラシ樹皮から分離した <i>Deinococcus</i> 属新規分類群	33
第1節 序論.....	33
第2節 材料と方法.....	35
1. 使用菌株	35
2. 形態学的特徴.....	35
3. 生理生化学的特徴.....	36
3-1. 温度試験	36
3-2. pH試験	36
3-3. NaCl試験.....	36
3-4. 基質利用試験.....	36
3-5. カタラーゼ・オキシダーゼ試験.....	37
3-6. 生化学的特徴.....	37
3-7. 嫌気環境下での増殖.....	37
4. 分子系統学的特徴.....	38
4-1. 16S rRNA遺伝子配列に基づく分子系統学特徴.....	38
4-2. DNA-DNAハイブリダイゼーション	38
5. 化学分類学的特徴.....	42
5-1. ゲノムDNA G+C 含量.....	42
5-2. 菌体脂肪酸組成の分析	43
5-3. 呼吸鎖キノン分析.....	44
5-4. 極性脂質のTLC分析.....	44
5-5. 細胞壁ペプチドグリカン組成の分析	46
6. UV耐性試験	46
7. 乾燥耐性試験	47

8. 固体表面への附着能の検定	47
9. PtRA-8 株および <i>Deinococcus</i> 属細菌と樹皮との関連性	48
第3節 結果	49
第1項 PtRA-8株の系統分類学的特徴	49
1. PtRA-8株の形態的特徴	49
2. PtRA-8株の生理生化学的特徴	51
3. PtRA-8株の分子系統学的特徴	54
3-1. 16S rRNA遺伝子系統解析	54
3-2. 参照株とのDNA類似度	54
4. PtRA-8株の化学分類学的特徴	57
4-1. ゲノムDNA G+C 含量	57
4-2. 菌体脂肪酸組成	57
4-3. 呼吸鎖キノン分析	57
4-4. 極性脂質のTLC分析	57
4-5. 細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成	58
5. PtRA-8株の紫外線照射耐性 (UV耐性)	63
第2項 PtRA-8株の生態学的特徴	65
1. 乾燥耐性	65
2. 固体表面への附着	65
3. 樹皮細菌群集におけるPtRA-8株と <i>Deinococcus</i> の位置づけ	65
第4節 考察	71
1. PtRA-8株の系統分類学的特徴	71
2. PtRA-8株と <i>Deinococcus</i> 属細菌の生態学的特徴	72

第4章	ブナ樹皮から分離した <i>Armatimonadetes</i> 門細菌の特徴.....	75
第1節	序論.....	75
第2節	材料と方法.....	77
1.	使用菌株.....	77
2.	形態学的特徴.....	77
3.	電子顕微鏡観察.....	79
4.	生理生化学的特徴.....	79
4-1.	温度試験.....	79
4-2.	pH試験.....	80
4-3.	NaCl試験.....	80
4-4.	基質利用試験.....	80
4-5.	カタラーゼ・オキシダーゼ試験.....	81
4-6.	生化学的特徴.....	81
4-7.	嫌気環境下での増殖.....	81
4-8.	抗生物質感受性試験.....	81
5.	16S rRNA遺伝子配列に基づく分子系統解析.....	82
6.	化学分類学的特徴.....	83
6-1.	ゲノムDNA G+C 含量.....	83
6-2.	菌体脂肪酸組成の分析.....	84
6-3.	呼吸鎖キノン分析.....	84
6-4.	極性脂質のTLC分析.....	84
7.	乾燥耐性試験.....	84
8.	飢餓耐性試験.....	85
9.	固体表面への附着能の検定.....	85

10. AX-7株および <i>Armatimonadetes</i> 門細菌と樹皮との関連性	85
第3節 結果	86
第1項 AX-7株の系統分類学的特徴	86
1. AX-7株の基本的な形態学的特徴	86
2. AX-7株の細胞の微細構造	88
3. 培養条件がAX-7株の粘液層様構造に及ぼす影響	91
4. AX-7株の生理生化学的特徴	94
5. AX-7の16S rRNA遺伝子に基づく系統解析	98
6. AX-7株の化学分類学的特徴	100
6-1. ゲノムDNA G+C 含量	100
6-2. 菌体脂肪酸組成	100
6-3. 呼吸鎖キノン分析	100
6-4. 極性脂質のTLC分析	100
第2項 AX-7株の生態学的特徴	103
1. AX-7株の乾燥耐性	103
2. AX-7株の飢餓耐性	103
3. 樹皮細菌群集内でのAX-7株と <i>Armatimonadetes</i> 門の位置付け	105
第4節 考察	108
1. AX-7株の系統分類学的特徴	108
2. AX-7株と <i>Armatimonadetes</i> 門細菌の生態学的特徴	110
第5章 樹皮細菌群集の解析	113
第1節 序論	113
第2節 材料と方法	115
1. 樹皮細菌の採取	115

2. 樹皮細菌DNAの抽出.....	120
3. アンプリコン解析.....	120
4. アンプリコンシーケンスのOTU化.....	120
5. 多変量解析.....	123
6. 樹皮細菌群集と葉面・土壌細菌群集との比較.....	123
7. 樹皮真核生物群集の解析.....	124
8. 樹皮表面の低分子有機物の分析.....	126
第3節 結果.....	127
1. 樹皮細菌群集の16S rRNA遺伝子のアンプリコン解析.....	127
2. 樹皮細菌群集を構成する細菌.....	129
3. 樹皮細菌群集の多変量解析.....	134
3-1. 全試料のデータに基づくNMDS解析.....	134
3-2. 樹皮細菌群集の樹種NMDS解析.....	137
3-3. 観察園内の樹皮細菌群集の時季的変動.....	140
3-4. 樹皮細菌群集と採取部位との関係.....	142
3-5. 土壌と葉面の細菌群集と樹皮細菌群集との関係.....	142
4. 樹皮低分子有機化合物と樹皮細菌群集との関係.....	146
5. 樹皮真核生物群集.....	149
第4節 考察.....	152
1. 樹皮細菌群集を構成する細菌.....	152
2. 樹皮細菌群集に影響を与える要因.....	154
第6章 総括.....	157
謝辞.....	164
参考文献.....	165

第1章 緒言

第1節 はじめに

近年、植物と微生物はこれまで考えられていた以上に密接に関わっていることが明らかになってきた。植物と微生物が関わる事象としては、1) 病原細菌・真菌による寄生、2) 菌根共生、3) 植物遺体の無機化、などが主に知られており、さらに農産や林産分野において重要な事象であるため精力的に研究されてきた。本節では植物と微生物との様々な関わりについて研究例を挙げながら紹介する。

19世紀中頃のヨーロッパにおいて、作物の病気の原因を微生物に求める研究が盛んになり、1845年、ジャガイモ飢餓の原因であるジャガイモ疫病が菌類により起こることが Berkeley によって証明された(Berkeley, 1845;平石, 2016)。病原菌は植物に感染する時、植物の細胞壁分解のため、セルラーゼ、キシラナーゼや、ペクチン分解に関わるポリガラクトナーゼ等の酵素を生産し、植物に侵入を試みる事が明らかになっている(Kubicek *et al.*, 2014)。代表的な植物病原細菌として、イネ白葉枯病を引き起こす *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* が挙げられる。*X. oryzae* pv. *oryzae* は棒状のグラム陰性細菌であり、細胞外多糖類 (EPS) や黄色の可溶性色素を生産する(Wang *et al.*, 1996)。EPS は乾燥や風雨から *X. oryzae* pv. *oryzae* 自身を防御する効果があるため(Ou, 1985)、*X. oryzae* pv. *oryzae* は灌漑用水システム、降雨、前年に収穫したイネ残留物などの汚染残渣によって伝播される(Mizukami & Wakimoto, 1969;Thri Murty & Devadath, 1984)。

Ralstonia solanacearum はナス科などの約50科200種の植物に感染し、木部で非常に高い細胞密度まで急速に増殖して萎凋症状および植物死を引き起こすことが報告されている(Hayward, 1991)。

樹木の病原菌は萎凋、枯死、材質劣化の要因となる(黒田, 1996)。特にブナの病害に関する研究はこれまでに数多く行われており、ブナの立枯病を引き起こす病原菌としては、主に *Cylindrocarpon* 属、*Fusarium* 属、*Phomopsis* 属、及び *Colletotrichum dematium* が報告されている(Sahashi *et al.*, 1994)。

植物と細菌の共生関係の代表例として、根粒が挙げられる。*Rhizobium*属細菌に代表される根粒菌がマメ科植物の根の皮質に感染することによって形成される分裂組織由来の組織塊であり、窒素固定が行われる特殊な器官である。根粒菌は固定した窒素を宿主植物に供給し、宿主植物は炭素源を根粒菌に供給することにより共生関係を築いている(Crespi & Gálvez, 2000)。

植物と菌類の共生関係としては菌根が代表的である。菌根は植物の根の組織に菌根菌の菌糸が入り込んだ構造であり、菌根を通じて、宿主植物は菌根菌に光合成由来の糖を、菌根菌は宿主植物に窒素やリンなどの無機栄養分を供給する。さらに、菌根が形成されることにより、水分吸収能も向上するため、菌根を形成した植物は菌根が形成されていないものに比べて乾燥耐性が強くなることが報告されている(Duddridge *et al.*, 1980)。さらに菌根形成は植物の成長を促進する(Abuzinadah & Read, 1989)。菌根菌は病原菌から根を守る機能も持っており、特に外生菌根では菌根菌の菌糸は細根を完全に覆うことにより物理的に病原菌の侵入を防いでいる。加えて、外生菌根菌が病原菌に対する抗菌性物質を生産することや(Sylvia & Sinclair, 1983)、菌根の形成にともない抗菌作用を持つフェノール物質の濃度が高くなることも、宿主植物の病原菌に対する抵抗性を高める要因となっている(Duchesne *et al.*, 1987)。また、樹木にとって最も重要な機能の一つである養分吸収は、菌根菌と根圏土壤に生息する微生物が果たしている(潮, 2017)。ツツジ目、マツ目、クロトウヒ、およびスノキ属の多くの樹木の根部からエリコイド型菌根を形成する *Hymenoscyphus ericae*が分離され(Hambleton & Currah, 1997;Piercey *et al.*, 2002;Villarreal-Ruiz *et al.*, 2004;Vrålstad *et al.*, 2002)、*H. ericae*が土壤中の生物遺体をプロテアーゼやキチナーゼにより分解し、その菌根を通じて宿主植物に供給することにより宿主植物の成長を促進することが明らかにされた(Cairney & Burke, 1998;Kerley & Read, 1998)。

近年、難溶性リンの可溶化や植物ホルモンの生産等(Gourion *et al.*, 2006;Reed *et al.*, 2010)の植物生育促進効果を持つ微生物や、病原性微生物に対する拮抗作用により植物の病害発生を抑える効果を持つ生物農薬として微生物を利用する研究も盛んに行われている(Wilson *et al.*, 2013)。

植物と微生物の関係性については植物遺体の無機化も重要である。地球生態系は、酸化環境、太陽光の照射、遍在する有機物を特徴としており、その中で微生物は無機炭素と有機炭素の変換を行い、地球上における物質循環の原動力となっている(Madsen, 2015)。微生物は、光エネルギーを利用して光合成を行う生産者である植物と、それを利用する消費者である動物の生産した有機物を分解し無機物に変える最終分解者として、森林生態系の中の物質循環において重要な役割を果たしている(Hawksworth, 1991)。

微生物は分泌や細胞融解によって、細胞外酵素を環境に放出する。その例として、セルロースやヘミセルロース、リグニンの分解に関わる酵素や、窒素やリンの無機化に関わる酵素が挙げられる(Carreiro *et al.*, 2000; Sinsabaugh *et al.*, 1991)。樹木は枯死すると、腐生菌や材食性昆虫などによって分解されていく。材の腐朽菌には、白色腐朽菌 (white rot fungi)、褐色腐朽菌 (brown rot fungi)、軟腐朽菌 (soft rot fungi) の3つの腐朽タイプがあり、セルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解することができる(深澤, 2013)。白色腐朽菌はラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼを産生しリグニンを生分解する(Hatakka, 1994)。褐色腐朽菌は、一般にリグニン分解酵素を持たず、代わりにFenton反応から生成される活性酸素種でリグノセルロースを分解する(Hatakka & Hammel, 2011)。軟腐朽菌はセルロース、ヘミセルロース、リグニンを分解するが、ラッカーゼ活性が無く白色腐朽菌よりペルオキシダーゼ活性が低いため、リグニンの分解性は低い(Haider & Trojanowski, 1975)。また、着生菌は生きた葉の滲出物の分解因子としても働く可能性があり(Jumpponen & Jones, 2009; Migahed & Nofel, 2001)、葉の初期分解において重要な役割を果たす最初の分解菌としても働き得る(Osono *et al.*, 2004; Voříšková & Baldrian, 2013)。

第2節 葉圏について

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(Last, 1955; Ruinen,

1956)。衛星データによると地上の総葉面積は地球表面の約125-200%であり、推定約6億4000万-10億km²である(Lindow & Brandl, 2003)。

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。有害な紫外線照射からの保護は葉に蓄積するフェノール化合物の総量ならびにフェノールプロファイルの特定の組成によって決定される(Clé *et al.*, 2008)。年間の特定の期間における樹木の成長と降雨との間には正の関係があり、降雨が樹木の成長に重要な役割を果たすことが示されている(Brienen & Zuidema, 2005)。また、温度はすべての生理学的反応の速度に直接影響を与え、葉では炭素・窒素・リンの吸収と排出の速度が制御される(Körner, 2003; Weih & Karlsson, 2001)。葉圏と光の関係としては、樹木のキャノピーが開かれると光の利用可能性が高まり、盛んな成長が起こると報告されている(Ackerly, 1996; Brown & Whitmore, 1992)。

第3節 葉圏と微生物との関係に関するこれまでの研究の概要

植物表面の主な機能の1つは草食性の昆虫および病原性微生物からの攻撃を妨げる保護バリアを備えることであり、この防御はそれぞれの植物分類群に特異的な植物組織への構造的改変および化学的改変の両方によってもたらされる。この防御機能にはワックスに(Johann *et al.*, 2007)、フェノール類(Urs & Dunleavy, 1975)、タンニン(Scalbert, 1991)、テルペン(Himejima *et al.*, 1992)などの多種多様な抗菌性物質の生産が含まれており、これらの物質により食害が抑制され、生産される物質プロファイルの違いにより異なる微生物群集が構築される。これらの物質は植物、病原体、および昆虫の化学生態学における役割について広く研究されている(Dicke, 2000; Treutter, 2006)。また、微生物群集組成を決定する選択的プロセスは成長のために炭素源として使用される有機化合物の組成に部分的に基づくことが知られており、例えば植物根の滲出液に含まれる糖や有機酸、アミノ酸組成などの違いにより変化する(Bulgarelli *et al.*, 2013)。

葉圏には細菌や古細菌、酵母、糸状菌、粘菌、地衣類、緑藻類、コケ、シダ、原生動物、ウイルスなどが生息することが知られている(Lücking,

2008)。その中で、葉圏に存在する細菌群としては、*Erwinia alni*および*E. carotovora*などの植物病原菌(Basset *et al.*, 2000; Surico *et al.*, 1996)、葉において*Botrytis cinerea*、*Fulvia fulva*、および*Alternaria solani*などの病原性真菌と拮抗する*Bacillus subtilis*などの拮抗菌(Enya *et al.*, 2007)、*Xanthomonas campestris*、*Bacillus amyloliquefaciens*、および*Klebsiella oxytoca*などの植物ホルモン生産菌(Fett *et al.*, 1987; Mohite, 2013; Shokri & Emtiazi, 2010)、*Acinetobacter lwoffii*などのフェノール分解菌(Sandhu *et al.*, 2009)、*Cyanobacteria*などの窒素固定菌(Fürnkranz *et al.*, 2008; Malam Issa *et al.*, 2001)が明らかにされている。

葉圏に生息する細菌の中で樹木葉圏の細菌に関しては、ブラジル、マレーシア、パナマ熱帯の葉面の微生物群集(Kembel & Mueller, 2014; Kembel *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Lambais *et al.*, 2006)、アメリカの温帯の葉面の微生物群集(Jackson & Denney, 2011; Redford *et al.*, 2010; Redford & Fierer, 2009)、スペインの地中海森林のセイヨウヒイラギガシの葉面の微生物群集(Penuelas *et al.*, 2012)、フランスにおける標高とブナ葉面の微生物群集との関係(Cordier *et al.*, 2012; Cordier *et al.*, 2012)、アメリカ南西部の砂漠のタマリクス葉面の微生物群集(Finkel *et al.*, 2012)、ポプラ樹木の葉、幹、根、根圏土壌の異なる部位間の細菌群集変動(Cregger *et al.*, 2018)といった様々な研究が報告されている。

Kembelら(Kembel, *et al.*, 2014)は次世代シーケンサーを用いた16S rRNA遺伝子のアンプリコン解析によりパナマの熱帯森林の57樹種の葉面の細菌群集構造を網羅的に調査し、葉面には主に*Actinobacteria*、*Alphaproteobacteria*、*Betaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Sphingobacteria*などの400種以上の細菌が生息することを明らかにした。また、宿主樹木の系統、成長および死亡率(growth and mortality)、木の密度(wood density)、面積当たりの葉量(leaf mass per area)、葉に含まれる窒素とリンの濃度等の宿主の特性が葉面の細菌群集構造と相関していることを明らかにした。Leffら(Leff *et al.*, 2015)はアメリカのアーノルド植物園のイチョウを対象とした樹皮を含む葉圏の細菌群集解析により、樹皮には*Proteobacteria*門細菌と*Bacteroidetes*門細菌が、葉には*Proteobacteria*門細菌が優占することを明らかにした。Laforest-Lapointeら(Laforest-Lapointe *et al.*, 2016)はカナダの自然林におけるサトウカエデ等の葉

面細菌群集構造が宿主と宿主の生息地に依存的で気温・降雨・森林密度に影響を受けることや、調査した樹木の葉面にはCore Microbiomeと呼ばれる共通の細菌群が存在することを明らかにした。このCore Microbiomeは調査した樹木の99%から回収された19のOTUで、これらだけで全OTUの42.7%を占めていた。また、Laforest-Lapointeら(2017)は、宿主種の同一性、機能的同一性および機能的多様性が、樹木の葉の細菌群集の構造と多様性を決定づける主要な因子であることを示唆している。樹木葉圏の細菌に関する研究は、ほぼ葉面・葉内部に限定されているが、上述の研究のように樹皮表面を対象とした研究も僅かながら行われている。

日本においても樹木と細菌群集との関係を調査した研究がいくつか報告されているが、その多くは病害に関連した研究である。Sudaら(Suda *et al.*, 2009)は、真菌性の病害に罹病した葉と健全な葉の細菌群集構造を調べ、真菌感染に付随して細菌の菌体数と多様性が増加することを示した(Suda, *et al.*, 2009)。海外の研究においても葉圏細菌群集に関する報告例は少ない上に、大半が葉面を対象としており、次世代シーケンサーなどを用いた分子生物学的手法で得られたデータで議論されているのが現状である。そこで、白神山地の樹木を対象に樹皮附着細菌に関する研究を行うことにした。

第4節 本研究を行う意義

地球上の総葉面積は 10^9 km²である。葉圏において最もバイオマス量が多いのは細菌であり、その存在量は 10^{26} 細胞以上であるとされている(Lindow & Brandl, 2003)。微生物は有機物を分解し無機物に変える最終分解者として、生態系の中の物質循環において重要な役割を果たしており(Hayward, 1991)、葉圏細菌の役割についても注目されている。しかし、葉圏細菌の生物地球化学的な重要性が理解される一方で、その細菌群集多様性の空間分布変動および宿主との相互要因に関する普遍的な知見は少なく、これまでに行われた細菌群集構造に関する研究は植物病原細菌に焦点を当てたものが多い(Castillo & Greenberg, 2007; Denny, 2006; Wang, *et al.*, 1996)。しかし近年、病原性細菌に限定することのない葉圏の細菌群集構造の多様性に関する研究が行われるよう

になってきた(Kembel, *et al.*, 2014;Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)。植物の樹皮は日光や樹幹流、乾燥などの環境ストレスに絶えず曝されているうえに、葉のような早い物質循環はなく、コケ類や地衣類がその表面を覆っていることから、従来研究対象とされてきた土壌や根圏などとは異なる細菌群集構造を形成していると予想される。そのため、樹皮表面に生息する細菌についての研究は葉圏細菌の知見を深める上で重要であると考えられる。しかし樹皮表面に生息する細菌群集の研究例はごく僅かであり(Cregger, *et al.*, 2018;Haruna *et al.*, 2018;Leff, *et al.*, 2015)、細菌群集と植物の樹皮との関係は十分にわかっていない。

現在、葉圏細菌群集解析は菌体回収後にDNAを抽出する非培養法が多く用いられている(Kembel & Mueller, 2014;Kembel, *et al.*, 2014;Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016;Laforest-Lapointe *et al.*, 2016)。しかし、非培養法では細菌と宿主植物の機能解析や生理活性の測定を行うことが困難である。そのため、細菌と宿主植物の相互作用を解明には、培養法を用いなければならない。これまでに樹皮表面から分離された細菌(Li *et al.*, 2016;Tonouchi *et al.*, 2014)に関する研究例はあまりないので、細菌と宿主樹皮の相互作用はまだはっきりとわかっていない。

白神山地は青森県・秋田県境に日本海に面して広がる山岳地帯で、総面積約130,000 ha、標高約1,000 m（最高点：向白神岳の海拔1,243 m）の峰々が連なり、人為的影響を受けていない世界最大規模のブナ原生林が分布している。1990年代の初頭に、白神山地の中心部約17,000 haが保護地区となり、1993年には屋久島とならんで、日本で最初の世界自然遺産に登録された。白神山地の生態系は多様であり、ブナ、ヤマナラシ、ウダイカンバ、ミズナラなどの広葉樹、スギ、カラマツなどの針葉樹、チシマザサ、ミヤマナラなどの低木、カタクリ、シラネアオイなどの植物が植生している。その一方で、ニホンザルやツキノワグマなどの哺乳類、キツツキやクマゲラ、イヌワシなどの鳥類が生息している(牧田肇, 2004)。これらの背景から気象と関連付けた白神山地の地形や地質および動植物に関する研究は盛んになされている。しかし、生物学的な側面からの白神山地の研究はもっぱら高等植物や高等動物

などのマクロ生物に限定されている。白神山地における動植物の研究は盛んに行われているが、微生物に関する研究報告は少なく(佐々木長市 *et al.*, 2004)、植物の樹皮表面に生息する細菌についての研究は世界的にみても少ない。そのため、本研究の樹皮表面の細菌群集に関する研究は、白神山地の生物多様性、森林の保全、生態系の物質循環に関する重要な知見となると思われる。それに加え、ヨーロッパでブナの病害の発生例が多数報告されているが(Jung, 2009; Schmitz *et al.*, 2009)、世界最大のブナ原生林におけるブナ樹皮と細菌の相互作用を調べることにより、世界のブナ林保全の参考となり得ると考えられる。

本研究では、白神山地の世界自然遺産区域の周辺地域である白神自然観察園（ミズナラを主とする二次林、ブナ林、スギ・カラマツの植林地などの林相）、世界自然遺産の緩衝地域近傍である高倉森（標高829.1 mの山で原始的なブナ林が分布）、市街地である弘前城植物園、弘前市外の白岩森林公園と志賀坊森林公園、弘前大学構内を試料の採取地とし、2013年から2017年の間に調査を行った。主な採取地である白神自然観察園内の樹種は多様であるが、その中で主要な高木であるブナ、ホオノキ、イタヤカエデ、ヤマナラシ、ウダイカンバ、ミズナラの広葉樹6種とスギ、カラマツの針葉樹2種の計8種の樹木を対象に研究を行った。

第5節 博士論文の構成

第1章

葉圏細菌群集に関するこれまでの研究例および本研究の目的を示した。

第2章

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。

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。

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。また、樹皮表面に存在する低分子有機化合物をGC-MSで分析した。解析用ソフトウェアRで樹種ごとの細菌群集の解析、および樹皮表面の低分子有機化合物の網羅的解析を行った。

第6章

本研究を総括した。

略語

OTU : Operational Taxonomic Unit (操作的分類単位)

樹皮細菌 : 樹皮に生息する細菌

観察園 : 白神自然観察園

弘前城 : 弘前城植物園

志賀坊 : 志賀坊森林公園

白岩 : 白岩森林公園

第2章 樹皮表面に生息する細菌（樹皮細菌）の培養法による解析

第1節 序論

緒言で述べたように植物と微生物はこれまで考えられていた以上に密接に関わっていることが明らかになってきた。葉圏、特に樹木の葉圏に関する研究例は少ないものの、近年、次世代シーケンサー（NGS）を用いたアンプリコン解析によって、葉圏の一部である葉面には樹種固有の細菌群集が形成されることや細菌群集は宿主樹木の温・降雨・森林密度に影響することが明らかにされている(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)。樹皮を対象にした研究例は少ないが、アメリカで行われた *Populus* 属の樹木を対象にした研究では樹皮には葉・根・土壌とは異なる細菌群集が形成されるという報告(Cregger, *et al.*, 2018)や、同じくアメリカで実施されたイチヨウの葉圏細菌群集に関する研究で、樹皮と葉面には明確に異なる細菌群集が形成されるという報告がある(Leff *et al.*, 2015)。葉は光合成の場であるために盛んに物質の交換が行われることから、葉面に生息する微生物の群集の形成に大きく関与していることは容易に想像可能であるが、樹皮は葉ほど微生物に積極的に関わるほどの場かどうかはよくわかっていない。しかし、白神山地に生えているブナとスギを比較すると、ブナの樹皮には多様な固着地衣類や苔類が附着しているのに対して、スギの樹皮に生える地衣類の種数は少ない。また、ブナとホオノキは樹皮の外見は類似しているが、ブナの方が地衣類を多く附着していることが多い。これらの事実から、樹皮が微生物に与える影響は樹種によって異なり、樹種固有の微生物群集が形成されることが予想される。

自然界に生息する微生物の研究には上記のように培養技術を用いない分子生物学的手法（ほとんどが NGS を活用したマーカー遺伝子のアンプリコン解析）が適用されることが多く、最近では培養という手法の重要性は低下している。分子生物学的手法で得られる DNA の塩基配列情報に基づく多様性解析や動態解析など様々な解析を通じて自然界に生息する微生物の姿を捉えることが可能になる。しかし、明らかにされるのは微生物群集の構造であり、群集を構成する個々の微生物の機能や生態は、近縁な培養株の性質に基

づいて推定するしかない。従って、近縁な培養株の情報が少ない場合、微生物群集解析から得られる知見も当然乏しいものとなる。このようなことから、最近では分離によって培養株を得て詳細に解析することが見直されるようになってきている(玉木 & 鎌形, 2012; 平石, 2016)。そこで、本章では次章以降の研究につながる情報を得るために培養法による樹皮細菌の研究、具体的には樹皮細菌の計数と分離（特に新規細菌）を実施した。

本研究では白神山地に生息する樹木を対象とすることにしたが、白神山地は面積が広範なため、調査地を弘前大学白神自然環境研究所（2018年4月から弘前大学農学生命科学部附属白神自然環境センター）の白神自然観察園（青森県中津軽郡西目屋村川原平）とした。園内の高木からブナ・ヤマナラシ・カラマツ・スギを選び、樹皮の生息する細菌（樹皮細菌）の中で培養可能な種類の計数と分離を試みた。

第2節 材料と方法

無菌操作に用いる器具は、高温での加熱が可能な場合は高圧滅菌器 (LSX-300; TOMY, BS-245; TOMY) によるオートクレーブ (121°C, 15 min) あるいは恒温乾燥機 (CONVECTION OVEN MoV-112F-U; SANYO) による乾熱滅菌 (180°C, 30 min) により行った。加熱不可能な器具はクリーンベンチ (CCV 1300E; 日立工機) 内での紫外線照射で滅菌した。培地の滅菌は pH の変動を最小限に抑えるためにオートクレーブ (115°C, 10 min) で行った。平板培養はポリスチレンシャーレ (90φ×20mm 滅菌深型シャーレ・FX; サンセイ医療器材株式会社) を使用した。試料採取地点の位置情報は GPS 装置 (GPSMAP 64SJ; Garmin) で記録した。

1. 試料採取

弘前大学附属白神自然環境研究所 (現在は改組されて弘前大学農学生命科学附属白神自然環境センター) の白神自然観察園 (青森県中津軽郡西目屋村川原平) のブナ、ヤマナラシ、スギ、及びカラマツの4樹種 (表 2-1) を対象にして、2013 年、2014 年および 2016 年に培養法による樹皮細菌の解析のための試料採取を行った。採取試料の情報と計数培地は表 2-1 に明示した。地上 150 cm の樹皮表面に三ヶ所から 10 cm 四方 (100 cm²) の拭取り検査枠 (CRF-1010; アズワン) をあてワイプチェック (佐藤工業所) の綿棒で枠内を隅々まで拭取り、附属のリン酸緩衝生理食塩水に懸濁し、細菌計数用試料とした。試料は氷冷したアイスボックスに入れて研究室に持ち帰り、希釈平板法による計数に供した。なお、2014 年以降の採取の際には樹皮に霧吹きで蒸留水を吹きかけ数分放置したのち、精密 pH 試験紙 (pH-Fix 3.6–6.1, 5.1–7.2) を貼り付けて簡易的に pH を計測した。

2. 樹皮細菌の計数

樹皮細菌の計数は希釈平板法により行なった。拭取り試料 100 μL を 1.5 mL 容滅菌サンプルチューブ内の滅菌水 900 μL に加え、最大スピードのボルテックスで 1 分間攪拌し、10 倍希釈液とした。この希釈操作を繰り返して

10⁵倍希釈液まで調製し、各希釈液 100 μL を表 2-2 または表 2-3 に示す培地に滴下、コンラージ棒で十分に塗り拡げた。培養は 30C°で行い、形成される細菌コロニー数が一定になるまで培養した。2013 年に採取したヤマナラシとブナの樹皮細菌に関しては一般的な低栄養培地の R2A(Reasoner & Geldreich, 1985) (表 2-2) を使用したが、2014 年以降は 2010 年に発表された難培養性細菌用培地の PPM(Eichorst *et al.*, 2011) (表 2-3) を使用した。PPM 培地の pH は試料採取の際に計測した樹皮の pH に合わせ、2014 年に行ったブナ樹皮細菌の計数の際は培地の pH によって計数値に差異が認められるかどうかを調べるために、樹皮 pH に近い 5.5 に調整した培地に加え、pH7.0 に調整した培地も使用した。計数値は樹皮 1 cm² あたりのコロニー形成単位 (colony forming unit: cfu) として算出した。2014 年のブナと 2016 年のスギ・カラマツの樹皮細菌の計数培地の pH は簡易測定した樹皮の pH を参考に設定した。2014 年に実施したブナ (S1-A) 樹皮細菌の計数と、2013 年に実施したヤマナラシ樹皮細菌の計数の際にはコロニー色の記録も行った。

表 2-1. 樹皮採取試料情報と計数培地

試料樹木	採取場所	試料情報				試料採取日と使用培地					
		個体 ID	標高 (m)	緯度	経度	2013		2014		2016	
						5/8	6/11	8/27	11/7	8/23	10/20
ブナ		S1-A	348	40.5154938	140.2151435		PPM (pH5.5, 7.0)	PPM (pH5.5, 7.0)	PPM (pH5.5, 7.0)	PPM (pH5.0)	
		SI-E	349	40.5154938	140.2151435	R2A					
ヤマナラシ	観察園	UNNO-1	346	40.51532968	140.2148372	R2A					
スギ		Djuan-24	311	40.51620198	140.213499						PPM (pH4.5)
カラマツ		Djuan-25	295	40.51672803	140.214193						PPM (pH4.5)

表 2-2. R2A 培地

Peptone	0.5 g
Yeast Extract	0.5 g
Casamino Acids	0.5 g
Glucose	0.5 g
Soluble Starch	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
Sodium Pyruvate	0.3 g
Agar	15 g
Total	1 L (pH 7.0)

表 2-3. PPM 培地

MES	2.0 g	*SL-10 の組成	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g	HCl (25%)	10 mL
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.0528 g	FeCl ₂ · 4H ₂ O	1.5 g
Xylan	0.05 g	ZnCl ₂	0.07 g
Pectin	0.05 g	MgCl ₂ · 4H ₂ O	0.1 g
Yeast Extract	0.05 g	B(OH) ₃	0.006 g
Casamino Acids	0.05 g	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.19 g
SL-10*	2.0 mL	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.002 g
Selenite-Tungstate	2.0 mL	NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.024 g
<small>(8 ppm Na₂WO₄ · 2H₂O, 6 ppm Na₂SeO₃ · 5H₂O)</small>		H ₄ MoNa ₂ O ₆ · 2H ₂ O	0.036 g
Cycloheximide	0.1 g	Total	1 L
Gelrite	8.0 g		
Total	1 L		

3. 細菌株の分離と OTU 化

ブナ (S1-A) とヤマナラシ (UNNO-1) 樹皮細菌計数培地に形成されたコロニーを無作為に選抜し、同組成の培地に画線移植を繰り返すことで純粋株を分離した。分離細菌株の 16S rRNA 遺伝子配列の PCR 増幅はダイレクトコロニーPCR により行った。分離菌株のコロニーから爪楊枝を用いて極微量の菌体を採取し、200 μ L のフラットトップ型チューブ (日本ジェネティクス) に調製した PCR 反応液 (表 2-4) 30 μ L に懸濁し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TaKaRa BIO) を用いて以下の条件で PCR を行った：1) 95C°, 5 min、2) 95C°, 1 min; 53C°, 50 sec; 72C°, 1 min 30 sec を 30 サイクル、3) 72C°, 10 min。PCR プライマーには細菌の 16S rRNA 遺伝子配列に特異的な 27F (Lane, 1991) と 1492R (Turner *et al.*, 1999) のプライマーセット (27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3') を使用した。目的産物 (約 1,500 bp) の増幅は 1.5% アガロースゲル (Fast Gene Agarose; 日本ジェネティクス) 電気泳動により確認した (松尾, 2015)。電気泳動の移動度マーカーには λ /HindIII (TaKaRa BIO) を用いた。電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色液 (0.5 μ g/mL) に約 15 分間浸漬後、プリントグラフ (AE-6933FXCF; ATTO) にセットし、紫外線を照射することにより DNA 断片を可視化し、撮影を行った。

16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の制限酵素断片長多型 (RFLP) 分析による分離株の OTU 化とグループ分けは以下の要領で行った。制限酵素反応液 (表 2-5, 2-6) 10 μ L に加え、37C°で 10 時間保温して制限酵素処理を行った。制限酵素は *Afa* I (TaKaRa BIO) と *Hha* I (TaKaRa BIO) をそれぞれ単独で用いた。反応後、2.5 μ L の反応液を 3.0% アガロースゲル (アガロース KANTO HC 短フラグメント用; 関東化学) に供し、100V で 35 分間泳動し、制限断片を分離・確認した。

Afa I と *Hha* I 処理による各分離株 16S rRNA 遺伝子の RFLP を比較検討し、同一の RFLP パターンを示す分離株を共通の操作的分類単位 (OTU) に

まとめることによりグループ分けした。各 OTU から 1 株を代表として選択し、分子同定のためのシーケンス解析に供した。

表 2-4. 16SrRNA 遺伝子配列の PCR 液組成

GoTaq® Green Master Mix	15 μ L
Forward primer (5 pmol/ μ L)	1.5 μ L
Reverse primer (5 pmol/ μ L)	1.5 μ L
Template DNA	1.5 μ L
Distilled water	10.5 μ L

表 2-5. 制限酵素反応液の組成 (*Afa* I)

<i>Afa</i> I	0.2 μ L
10 \times T buffer	1.0 μ L
0.1 \times BSA	1.0 μ L
Template DNA	3.0 μ L
Distilled water	4.8 μ L

表 2-6. 制限酵素反応液の組成 (*Hha* I)

<i>Hha</i> I	0.2 μ L
10 \times B buffer	1.0 μ L
Template DNA	3.0 μ L
Distilled water	4.8 μ L

4. OTU 代表株の分子同定

各 OTU 代表株の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物は、Fast Gene™ Gel/PCR Extraction（日本ジェネティクス）を用いて精製した。NANODROP 2000c spectrophotometer（Thermo Fisher Scientific）で精製 DNA 濃度を測定し、滅菌水で 10 ng/μL になるように調整後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）と 27F プライマーを用いて、以下の条件（30 サイクルの変性を 95C°, 30 sec、アニーリング反応を 55C°, 15 sec、伸長反応を 60C°, 4 min）でシーケンス反応を行った。反応液に 1/10 倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の 100%エタノールを添加し、-80C°で 30 分間静置後、遠心分離（15,000 rpm, 30 min, 4C°）により沈殿（DNA 増幅断片）を回収した。70% エタノール（4C°）100 μL を加えて遠心分離（15,000 rpm, 5 min, 4C°）し、上清を除く洗浄操作を 2 回繰り返した。沈殿の乾燥には遠心濃縮機（SpeedVac AES 1010; Savant）を用いた（設定：RC OFF; RUN 0.05; DRYING RATE High; FULL VACUME）。乾燥した沈殿を Hi-Di ホルムアミド 25 μL に再溶解し、熱変性（95C°, 5 min）後、氷水で急冷して 1 本鎖 DNA 溶液とし、Applied Biosystems 3500-Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）に供し、塩基配列データを得た。フリーソフトウェア BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5（Tom Hall Ibis Therapeutics）で配列データを修正・編集し、原核生物の 16S rRNA 遺伝子配列解析サイト EZ BioCloud（<https://www.ezbiocloud.net/>）で既存の配列との比較を BLAST 検索(Altschul *et al.*, 1990)により行った。供試菌株の 16S rRNA 遺伝子が正式名（valid published name）を与えられた種の基準株（type strain）と 97% 以上の配列相同性を示す場合は既知種、97%未満の場合は未知種で新種の可能性があるかと判断した(Stackebrandt & Goebel, 1994)。

第3節 結果

1. 樹皮細菌の計数値

表 2-7 に白神自然観察園の広葉樹の 2 種、ブナ・ヤマナラシと、針葉樹の 2 種、スギ・カラマツの樹皮にする培養可能な細菌の計数値をまとめた。2013 年のブナ (S1-E) については 5.65×10^2 cfu/cm² と 2014 年と 2016 年のブナ (S1-A) の結果 ($5.00 \times 10^3 \sim 2.02 \times 10^4$ cfu/cm²) に比較して低い計数値が得られたが、計数に用いた培地が前者では R2A、後者では PPM 培地と異なることに起因する結果と考えられ、単純な比較はできない。2014 年のブナ (S1-A) ではブナ樹皮の pH (試料採取の際の簡易的な測定値) に近づけて pH を 5.5 に調整した培地と pH7.0 に調整した培地で計数値に差が生じるかどうかを検討した。pH7.0 の培地では採取時季による計数結果に大きな差異は認められなかったが、pH5.5 の培地では採取時季で計数値が大きく変化し、2014/8/27 の試料では 2014/6/11 の試料と比較して 1/6 以下に低下した。

2013 年に行ったブナ (S1-E) とヤマナラシ (UNNO-1) の樹皮細菌の計数ではいずれも R2A 培地を使用した。計数値はヤマナラシの方がブナよりも 20 倍近く高かった。

2016/10/20 に実施したスギとブナの樹皮細菌の計数はカラマツ>スギであり、いずれも計数値も同じく PPM 培地を使用したブナ樹皮細菌の計数値も低かった。

2. 計数培地に形成されたコロニーの色について

樹皮細菌の計数培地に形成されたコロニーを色別に分類し、全計数値に占める比率を表 2-8 に示した。2014 年のブナ (S1-A) の場合、いずれの時季においても透明～白色コロニーの比率が最も高かったことと、針葉樹であるスギとカラマツにおいて黄～オレンジのコロニーの比率が最も高かったことを除けば明確な傾向は認められなかった。

表 2-7. 樹皮細菌の計数値

試料樹木	個体 ID	細菌計数値 (cfu/cm ²)					
		2013		2014		2016	
		5月8日	6月11日	8月27日	11月7日	8月23日	10月20日
ブナ	S1-A		2.00 × 10 ⁴	1.80 × 10 ⁴	2.02 × 10 ⁴		
			(PPM, pH7.0)	(PPM, pH7.0)	(PPM, pH7.0)	1.19 × 10 ⁴	
			3.13 × 10 ⁴	5.00 × 10 ³	6.57 × 10 ³	(PPM, pH5.0)	
			(PPM, pH5.5)	(PPM, pH5.5)	(PPM, pH5.5)		
	S1-E	5.65 × 10 ²					
		(R2A)					
ヤマナラシ	UNNO-1	1.08 × 10 ⁴					
		(R2A)					
スギ	Djuan-24					7.00 × 10 ²	
						(PPM, pH4.5)	
カラマツ	Djuan-25					2.90 × 10 ³	
						(PPM, pH4.5)	

表 2-8. 樹皮細菌の色別計数値の相対比率

試料樹木	培地	採取日	計数値の比率 (%)*			
			透明～白	黒	黄～オレンジ	ピンク～赤
ブナ (S1-A)	PPM (pH7.0)	2014/6/11	9.6	79.7	4.3	6.4
		2014/8/27	25.9	1.5	57.3	15.3
		2014/11/7	23.4	42.0	16.4	18.2
	PPM (pH 5.5)	2014/6/11	54.7	32.0	3.9	9.4
		2014/8/27	39.7	9.5	36.5	14.3
		2014/11/7	37.8	4.1	27.0	27.0
	PPM (pH 5.0)	2016/8/23	5.2	43.3	39.6	11.9
		2013/5/8	12.4	78.8	5.3	3.5
	ヤマナラシ (UNNNO-1)	R2A	2013/5/8	11.1	6.5	47.2
スギ (Djuan-24)	PPM	2013/10/20	33.3	16.7	33.3	16.7
カラマツ (Djuan-25)	(pH 4.5)	2013/10/20	25.0	8.3	38.9	27.8

* 最も高い比率を太字で示した。

3. 計数培地から分離した細菌株

ブナの個体 S1-E から採取した試料を除き、全ての試料の計数培地からランダムにコロニーを選択・分離し、16S rRNA 遺伝子の PCR-RFLP パターンが同じ株を一つの OTU にまとめ、各 OTU の代表株を 16S rRNA 遺伝子配列に基づき簡易同定した。採取時季や培地とは無関係に樹種ごとに分離菌株数と OTU 数を高次分類群で整理した（表 2-9、2-10）。分離菌株数と OTU 数はともにいずれの樹種においても *Proteobacteria* 門が最も多く半数以上を占め、次いで *Actinobacteria* 門と *Bacteroides* 門が多かった。266 菌株・170OTU と分離菌株数と OTU 数が最も多いブナから分離された *Deinococcus-Thermus* 門細菌が分離株・OTU に占める割合は 5 菌株（1.9%）・4OTU（2.4%）といずれも低い値であったが、ヤマナラシでは分離菌株数・OTU 数とも 13 で少ないにも関わらず、*Deinococcus-Thermus* 門細菌は 2 菌株・2OTU が分離され、いずれも分離菌株数・OTU 数の 9.5%を占めており、高い効率で分離された。カラマツでは分離細菌の中で *Acidobacteria* 門細菌の占める割合が 29.4%と他の樹種（ブナ, 2%; ヤマナラシ, 0%; スギ, 0%）よりも非常に高いことが特徴的であった。

OTU を門レベル以下の分類階級に整理した分離細菌のより詳細な構成を樹種別に表 2-11~14 に示した。低次分類階級では、ブナ樹皮から分離された細菌 170 OTU のうち、*Alphaproteobacteria* 綱の *Methylobacterium* 属が 10 OTU で全 OTU の 5.9%、同じく *Alphaproteobacteria* 綱の *Sphingomonas* が 13OTU で 7.6%、*Betaproteobacteria* 綱の *Burkholderia* 属が 18 OTU で 10.6%、*Bacteroidetes* 綱の *Mucilaginibacter* 属が 10 OTU で 5.9%と、それぞれ高い頻度で分離されていた。ブナ樹皮からは 2011 年に創設された細菌門で、2018 年 6 月現在、わずか 3 種しか記載されていない *Armatimononadetes* 門(Im *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Tamaki *et al.*, 2011)に所属すると推定される細菌株が得られた。ヤマナラシ・スギ・カラマツでは属レベルの OTU 構成に特徴的な傾向は認められなかった。また、属レベルでは全樹種に共通した OTU はなかった。

既存種との 16S rRNA 遺伝子配列相同性が 97%未満で新規分類群と予想された OTU が、ブナからは 40 OTU、ヤマナラシからは 6 OTU、カラマツからは 3 OTU が得られたのに対し、スギからは得られなかった。これらの新規分類群と予想される OTU の代表株はすべて 50%グリセロール懸濁液として 30°C に保存したが、一部を除いて大半が増殖能を失うか、死滅した。

表 2-9. 樹皮細菌の計数培地から分離した細菌の門レベル分離株数

分離源樹種	個体 ID	試料数	計数・分離培地	門レベルの分離株数 (全分離株数に占める割合 %)						計
				<i>Proteobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Armatimonadetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Actinobacteria</i>	
ブナ	S1-A	7	PPM	131 (49.2)	4 (1.5)	1 (0.4)	32 (12.0)	5 (1.9)	93 (35.0)	266
ヤマナラシ	UNNO-1	1	R2A	13 (61.9)	0	0	1 (4.8)	2 (9.5)	5 (23.8)	20
スギ	Juan-24	1	PPM	7 (100)	0	0	0	0	0	7
カラマツ	Juan-25	1	PPM	12 (54.5)	6 (23.3)	0	0	0	4 (18.2)	22

表 2-10. 樹皮細菌の計数培地から分離した細菌の門レベル OTU 数

分離源樹種	個体 ID	試料数	計数・分離培地	門レベルの OTU 数 (全 OTU に占める割合 %)						計
				<i>Proteobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Armatimonadetes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Actinobacteria</i>	
ブナ	S1-A	7	PPM	79 (46.5)	2 (1.2)	1 (0.6)	23 (13.5)	4 (2.4)	61 (35.9)	170
ヤマナラシ	UNNO-1	1	R2A	13 (65.0)	0	0	1 (5.0)	2 (10.0)	5 (25.0)	20
スギ	Juan-24	1	PPM	6 (100)	0	0	0	0	0	6
カラマツ	Juan-25	1	PPM	8 (47.1)	5 (29.4)	0	0	0	4 (23.5)	17

表 2-11. ブナ樹皮から分離された細菌の分類階級ごとの OTU 数

門	綱	目	科	属	新規分類群					
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	2	Beijerinckia	1	1			
					Methylocapsa	1	1			
			Bradyrhizobiaceae	1	Bradyrhizobium	1	0			
			Methylobacteriaceae	10	Methylobacterium	10	0			
			Rhizobiaceae	2	Rhizobium	2	0			
		Xanthobacteraceae	1	Labrys	1	0				
		Rhizobium	1	Hyphomicrobiaceae	1	Hyphomicrobium	1	0		
		Rhodospirillales	3	Acetobacteraceae	3	Acidisoma	1	1		
						Acidisphaera	1	1		
						Rhodovastum	1	1		
		Sphingomonadales	15	Sphingomonadaceae	15	Sphingobium	1	1		
						Sphingomonas	13	0		
						Novosphingobium	1	0		
		Betaproteobacteria	20	Burkholderiales	19	Burkholderiaceae	18	Burkholderia	18	0
						Comamonadaceae	1	Ideonella	1	1
	Neisseriales			1	Neisseriaceae	1	Amantichitium	1	0	
	Gammaproteobacteria	24	Enterobacteriales	19	Enterobacteriaceae	15	Cedecea	2	0	
							Endobacter	1	0	
							Enterobacter	3	0	
							Erwinia	3	0	
							Hafnia	1	0	
							Leclercia	1	0	
							Lelliottia	3	0	
							Pantoea	1	0	
Rahnella							2	0		
Serratia							1	0		
Yersinia	1	0								
Pseudomonadales	5			Moraxellaceae	1	Acinetobacter	1	0		
				Pseudomonadaceae	4	Pseudomonas	4	0		
Acidobacteria	2	Acidobacteria	2	Acidobacteriales	2	Acidobacteriaceae	2	Bryocella	2	2
Armatimonadetes	1	Armatimonadia	1	Unknown	1	Unknown	1	Unknown	1	1
Bacteroidetes	23	Chitinophagia	2	Chitinophagales	2	Chitinophagaceae	2	Chitinophaga	2	1
		Cytophagia	4	Cytophagales	4	Cytophagaceae	4	Spirosoma	4	4
		Flavobacteria	6	Flavobacteriales	6	Flavobacteriaceae	6	Chryseobacterium	1	0
								Hymenobacter	4	1
								Flavobacterium	1	0
		Sphingobacteriia	11	Sphingobacteriales	11	Chitinophagaceae	1	Flavitalea	1	0
Sphingobacteriaceae	10					Mucilaginibacter	10	3		
Deinococcus-Thermus	4	Deinococci	4	Deinococcales	4	Deinococcaceae	4	Deinococcus	4	2
Actinobacteria	61	Actinobacteria	59	Actinomycetales	38	Cellulomonadaceae	2	Cellulomonas	1	0
								Cellulosimicrobium	1	0
						Dermacoccaceae	11	Branchiibius	7	7
								Calidfontibacter	1	1
								Demetria	3	2
						Dietziaceae	1	Dietzia	1	0
						Frankiaceae	5	Jatrophihabitans	5	2
						Microbacteriaceae	11	Annibacterium	2	1
								Curtobacterium	2	0
								Fronthabitans	6	0
								Glaciibacter	1	1
						Propionibacteriaceae	3	Friedmanniella	3	1
						Pseudonocardaceae	5	Actinomycetospora	4	0
								Amycolatopsis	1	0
						Corynebacteriales	5	Mycobacteriaceae	5	Mycobacterium
		Frankiales	1	Frankiaceae	1	Frankia	1	1		
		Kineosporiales	3	Kineosporiaceae	3	Angustibacter	3	0		
		Micrococcales	4	Microbacteriaceae	4	Microbacterium	4	0		
		Micromonosporales	2	Micromonosporaceae	2	Actinoplanes	2	0		
		Propionibacteriales	6	Nocardioideaceae	3	Marmoricola	1	0		
Nocardioides	2					1				
Propionibacteriaceae	3			Microlunatus	3	0				
Thermoleophilia	2	Solirubrobacteriales	2	Conexibacteraceae	1	Conexibacter	1	1		
				Solirubrobacteraceae	1	Solirubrobacter	1	1		

表 2-12. ヤマナラシ樹皮から分離された細菌の分類階級ごとの OTU 数

門	綱	目	科	属	新規分類群							
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	1	Caulobacteraceae	1	Brevundimonas	1	1				
		Rhodospirillales	2	Acetobacteraceae	2	Craurococcus	1	1				
		Roseomonas	1	1								
	Sphingomonadales	3	Sphingomonadaceae	3	Sphingomonas	3	0					
		0										
	Betaproteobacteria	Burkholderiales	5	5	Comamonadaceae	2	Ramlibacter	2	0			
					unknown	3	Mitsuaria	1	0			
		Rhizobacter	1	1								
		Roseateles	1	0								
	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	2	2	Enterobacteriaceae	1	Erwinia	1	0			
Erwiniaceae					1	Pantoea	1	0				
Bacteroidetes	1	Chitinophagia	1	Chitinophagales	1	Chitinophagaceae	1	Flavisolibacter	1	1		
Deinococcus-Thermus	2	Deinococci	2	Deinococcales	2	Deinococcaceae	2	Deinococcus	2	1		
Actinobacteria	Actinobacteria	5	5	Actinomycetales	2	Pseudonocardiaceae	1	Actinomycetospira	1	0		
						Microbacteriaceae	1	Frigoribacterium	1	0		
				Streptomycetales	2	2	2	Streptomycetales	2	Streptomycetaceae	2	0
								Micromonosporales	1	Micromonosporaceae	1	Verrucosispora

表 2-13. スギ樹皮から分離された細菌の分類階級ごとの OTU 数

門	綱	目	科	属	新規分類群				
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	4	Rhodospirillales	4	Acetobacteraceae	4	Acidisoma	1	0
							Acidisphaera	1	0
							Ameyamaea	1	0
	Betaproteobacteria	1	Burkholderiales	1	Burkholderiaceae	1	Caballeronia	1	0
								Asaia	1
Gammaproteobacteria	1	Enterobacteriales	1	Enterobacteriaceae	1	Endobacter	1	0	

表 2-14. カラマツ樹皮から分離された細菌の分類階級ごとの OTU 数

門	綱	目	科	属	新規分類群				
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	1	Rhizobiales	1	Bradyrhizobiaceae	1	Afpia	1	0
							Burkholderia	1	0
	Betaproteobacteria	5	Burkholderiales	5	Burkholderiaceae	5	Caballeronia	4	0
					Beijerinckiaceae	1	Methylocapsa	1	0
Rhodanobacteraceae	1	Rhodanobacter	1	0					
Acidobacteria	Acidobacteria	5	Acidobacteriales	5	Acidobacteriaceae	5	Acidipila	3	0
							Bryocella	1	1
							Silvibacterium	1	0
Actinobacteria	Actinobacteria	4	Actinomycetales	3	Thermomonosporaceae	3	Actinodallomurus	2	1
					Actinocorallia	1	1		
Corynebacteriales	1	Mycobacteriaceae	1	0					

第4節 考察

2013年、2014年および2016年に弘前大学農学生命科学部附属白神自然環境研究センター（当時は弘前大学附属白神自然環境研究所）において樹皮の表面に生息する細菌（樹皮細菌と表記する）の培養法による解析を試みた。対象とした樹種はブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツの4種であるが、また、ブナが2個体から採取した8試料を解析したのに対して、ヤマナラシ・スギ・カラマツはそれぞれ1個体から採取した1試料しか解析していない。さらに、使用した培地の種類やpHが異なる。従って、計数値から樹皮細菌を議論することは難しい。従って、本節は樹皮から分離された細菌についての考察を主に行う。

1. 樹皮細菌の計数

2013年にはブナ・ヤマナラシ樹皮細菌の計数培地としてR2A培地(Reasoner & Geldreich, 1985)を使用した。R2A培地は貧栄養細菌の培地として用いられる一般的な培地であるが、自然環境に生息する細菌はR2A培地でも栄養が豊富すぎて培養できないことが多い(Eichorst, *et al.*, 2011)。樹木の幹の表面は水分が少なく貧栄養であるため(Whipps *et al.*, 2008)、2014年以降はより貧栄養のPPM培地(Eichorst, *et al.*, 2011)に変更した。

樹皮には培養可能な細菌として $5.65 \times 10^2 \sim 2.02 \times 10^4$ cfu/cm²の細菌が生息していた。2013年のR2A培地を用いた結果ではブナ樹皮細菌よりもヤマナラシ樹皮細菌の方が計数値は高い。また、2016年に実施したPPM培地を用いた計数ではブナよりもスギ・カラマツで計数値が低かった。樹皮の物理化学的性状・栄養成分・日照などが樹種や個体毎に異なっていることが影響しているものと推察されるが、個別の環境データを計測していないのではっきりとしたことはいえない。2014年以降の計数においても同様であり、計数値から樹皮細菌を考察することは、今回得られたデータからは困難であると考えられた。

2. 樹皮細菌のコロニー色について

樹皮細菌の計数培地には透明～白、黒、黄～オレンジ、ピンク～赤の様々な色のコロニーが形成された(表 2-8)。白神山地土壌の細菌を計数した場合に形成されるコロニーはほとんどが透明～白色である(松尾, 2015)。葉面細菌には色素生産性を示すものが多く、非色素生産の種類に比べ紫外線照射に対する耐性能が高いことが示唆されている(Lindow & Brandl, 2003; Sundin & Jacobs, 1999)。樹皮も葉面と同様に太陽光の紫外線に晒される環境にあることから(Lindow & Brandl, 2003)、紫外線耐性に関与する色素であるカロテノイド(黄色・ピンク色・オレンジ色・赤色)(Stahl & Sies, 2005)やメラニン(黒色)(Geng *et al.*, 2008)などを産生する着色コロニーが計数培地に多く形成されるものと考えられた。ヤマナラシ樹皮細菌の R2A 計数培地から分離したオレンジ色素生産性細菌の 1 つである *Deinococcus* sp. PtRA-8 の紫外線耐性については第 3 章で検定した。

3. 樹皮から分離された細菌について

分離株を OTU にまとめ、門レベル以下の分類階級に整理し表を樹種別に表 2-11～14 に示している。これらの多くは色素を産生する着色細菌で、これまでに報告された葉圏と関連が深い細菌と同属であった(Lindow & Brandl, 2003)。ここでは主要な分離株と興味深い分離株について概説する。いずれの樹種においても *Proteobacteria* 門が最も多く、46.5～100%を占めていた。*Proteobacteria* 門は最も巨大かつ多様な細菌門で、様々な陸生植物に生息する細菌群集の大部分を構成することで知られている(Knief *et al.*, 2010; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Leff, *et al.*, 2015; Meaden *et al.*, 2016)。ブナから高い効率で分離された *Methylobacterium* 属 (*Alphaproteobacteria* 綱) と *Sphingomonas* 属 (*Alphaproteobacteria* 綱) はいずれも *Proteobacteria* 門に所属する代表的な葉圏細菌である(Kim *et al.*, 1998; 池田, 2014)。*Methylobacterium* 属は主要な葉面細菌で C1 化合物代謝系を有し、植物がペクチンを生合成する際に副生する主

要な揮発性物質のメタノールを代謝することができる(Iguchi *et al.*, 2015)ことに加えて、ホルモン生産・ビタミン生産・病原菌抑制・窒素固定能を通じて植物の成長の促進や健康維持に関与する(Trotsenko *et al.*, 2001)。さらに、*Methylobacterium* は活性酸素を消去するカロテノイドを生産するために紫外線や乾燥などの環境ストレスに強いことが知られている(井原, 2016)。*Sphingomonas* 属も主要な葉圏細菌で、やはりカロテノイドを有する有色細菌で、リグニン由来の芳香族化合物を開裂して資化する細菌グループの1つである(Kim, *et al.*, 1998)。同様にブナから多く分離された *Burkholderia* 属は窒素固定細菌の1種で通常は土壌や根圏に生息し、植物成長促進作用によって植物と密接に関与する種(Poupin *et al.*, 2013)や、逆に植物に病原性を示す種を含むグループである(Coutinho *et al.*, 2014; Ura *et al.*, 2006)が、葉圏において重要な細菌であるとは現時点では認識されていない。*Mucilaginibacter* 属は *Betaproteobacteria* 綱に所属し、通常は土壌から分離される細菌である。葉圏における生態については知られていることは少ないが、flexirubin というピンク色の紫外線耐性に関与する色素を生産することや大量に生産する細胞外多糖類がバイオフィルムに形成に関与する(Pankratov *et al.*, 2007)、などの特徴を有することから葉圏にも適応可能であることが予想される。

Deinococcus 属に所属する細菌株はブナとヤマナラシから得られている。*Deinococcus* 属は Brooks と Murray (1981)によって提案された *Deinococcus-Thermus* 門の *Deinococcaceae* 科に所属する分類群であり、様々な場所から分離されているが生態については明らかにされていない。葉圏からの分離例は1種のみで、柑橘潰瘍病に罹患した柑橘類樹木の葉の病斑部から *D. citri* が分離されている(Ahmed *et al.*, 2014)。そこで、次章においてヤマナラシから分離された *Deinococcus* 属細菌の詳細を解析して、葉圏における生態について考察することにした。

Armatimonadetes 門細菌はブナからのみ分離された。*Armatimonadetes* 門は2011年にヨシの根面から分離された細菌株の解析に基づいて創設された細菌門で(Tamaki, *et al.*, 2011)、2018年6月現在、正式記載されている種は

Armatimonas rosea (Tamaki, et al., 2011)、*Chthonomonas calidirosea* (Lee, et al., 2011)と *Fimbriimonas ginsengisoli* (Im, et al., 2012)の3種にすぎず、ほとんど知見のない門である。そこで、第4章において *Armatimonadetes* 門分離菌株を詳細に解析し、樹皮における生態について考察することにした。

本章では培養法によって樹皮細菌の解析を試み、機能的・生態的に興味深い細菌株がいくつか得られた。しかし、自然に生息する細菌の殆どが人工的に分離・培養できないことはすでに良く知られている。従って、本章で得られた細菌株が樹皮細菌群集において主要な細菌であるとは限らず、真に優占する細菌は得られていない可能性が高い。また、本章では白神自然観察園のブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツの限られた樹種で少数の個体しか対象にできなかった。そこで、第5章において次世代シーケンサーを活用したアンプリコン解析により樹皮細菌群集の詳細を明らかにすることにした。

第3章 ヤマナラシ樹皮から分離した *Deinococcus* 属新規分類群

第1節 序論

第2章において世界自然遺産白神山地の周辺地域である青森県中津軽郡西目屋村に所在する弘前大学附属白神自然環境センター白神自然観察園内（以下観察園）の樹木樹皮表面に生息する細菌の培養法による研究を実施した。2013年にヤマナラシ樹皮から分離した細菌の中に薄いオレンジ色のコロニーを形成する株があり、分子同定によって *Deinococcus* 属に所属することが示唆された。ブナから分離された *Deinococcus-Thermus* 門細菌が分離株・OTUに占める割合は5菌株（1.9%）・4OTU（2.4%）といずれも低い値であったが（表 2-11）、ヤマナラシでは *Deinococcus-Thermus* 門細菌は2菌株・2OTUが分離され（表 2-12）、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。

Deinococcus 属は Brooks と Murray (1981)によって提案された *Deinococcus-Thermus* 門の *Deinococcaceae* 科に所属する分類群である。List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LSPN (<http://www.bacterio.net/deinococcus.html>)によれば2018年6月現在、75種が正式記載されている。*Deinococcus* 属に所属する種（*Deinococcus* 種）は、化学合成従属栄養・グラム染色陽性・非運動性・孢子非形成・好気性・呼吸鎖キノンとしてMK-8を含有・細胞膜の主要脂肪酸はC_{15:0}、C_{16:1 ω7c}、C_{16:0}・細胞壁ペプチドグリカンジアミノ酸としてL-オルニチンを含有するA3β型・高G+C含量、という形態学的・生理学的・化学分類学的特徴を共有する(Battista & Rainey, 2015; Embley *et al.*, 1984)。また、多くの種は平板培地上で黄色・オレンジ色・ピンク色・赤色などの着色コロニーを形成する(Battista & Rainey, 2015)。一部の例外はあるものの(Callegan *et al.*, 2008)、基準種の *D. radiodurans* を初めとして多くの種がDNAの障害に対する修復能に優れているため、放射線・紫外線・乾燥などの外因性ストレスに暴露された際にも高い生残性を示す(Battista, 1997; Tanaka *et al.*, 2004)。

Deinococcus 種は、水圏(Kampfer *et al.*, 2008)・地中の帯水層(Suresh *et al.*, 2004)・温泉(Ferreira *et al.*, 1997)・砂漠(Rainey *et al.*, 2005)・樹木(インドボダイジュ)の根圏(Lai *et al.*, 2006)・空気(Weon *et al.*, 2007)・成層圏(Yang *et al.*, 2010)などの多種多様な環境から分離されている。しかしながら、それらの生息場所における *Deinococcus* 種の生態や機能については明らかにされていない。

PtRA-8 株は上述のヤマナラシ樹皮から得られた 20TU のうちの 1 つの OTU の代表菌株で分子同定では *Deinococcus* 属に所属する種レベルで新規な細菌であると推定された。PtRA-8 株は最も希釈倍率の高い計数培地から得られているので、分離源のヤマナラシ樹皮には 10^4 cells/cm² で存在し、用いた計数培地 (R2A) で培養可能な細菌としては優占種の 1 つである。植物の葉圏から分離・記載されている *Deinococcus* 種は 2018 年 6 月現在、柑橘潰瘍病に罹患した柑橘類樹木の葉の病斑部から分離された *D. citri* のみであり(Ahmed, *et al.*, 2014)、本種の生態については明らかにされていない。近年、次世代シーケンサーを活用した 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析が葉圏の微生物生態研究に適用され、様々な植物種における葉圏(ほとんどが葉面)の微生物群集の構成や多様性が明らかにされてきている。それらの研究の中で *Deinococcus-Thermus* 門細菌は針葉樹から広葉樹まで幅広い樹種の葉面細菌群集に数%~10 数%の比率で存在することが Redford ら(2010)によって報告されているが、*Deinococcus-Thermus* 門内の構成については不明であり、また他の葉圏細菌群集研究においても *Deinococcus-Thermus* 門細菌に言及されることはまれである。わずかに実施されている樹皮の細菌群集研究においても *Deinococcus-Thermus* 門細菌は議論されていない(Cregger, *et al.*, 2018)。

以上のことから、ヤマナラシ樹皮から分離された PtRA-8 株の系統分類学的な特徴づけを行うとともに、生理・生化学的な特徴や樹皮細菌群集における位置づけから PtRA-8 株および *Deinococcus* 属の樹皮における生態の考察を試みた。

第2節 材料と方法

操作・器具は基本的に第2章の第2節に記した通りである。PtRA-8株の増殖培地はBM培地（0.2% yeast extract、1% Trypticase peptone（Difco）、0.1% MgSO₄・7H₂O [pH 6.5]）、培養は30C°の暗条件、静置で行った。必要な場合は培地を1.5%で固化した。固形培地での増殖は目視で、液体培地での菌体の増殖は培養液の濁度（OD420nm）を簡易吸光度計（mini photo 5; 三紳工業）で計測して記録した。

1. 使用菌株

PtRA-8は第2章のヤマナラシ（UNNNO-1）から分離された細菌株である。系統分類学的特徴の解析では“*Deinococcus radioresistens*”JCM 19777^T（Srinivasan *et al.*, 2015）、*Deinococcus yunweiensis* DSM 17005^T（Zhang *et al.*, 2007）と *Deinococcus metalli* DSM 27521^T（Feng *et al.*, 2015）の3株を参照株として使用した。“*D. radioresistens*”JCM 19777^Tは理化学研究所微生物材料開発室、*D. yunweiensis* DSM 17005^Tと *Deinococcus metalli* DSM 27521^Tは Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)から購入した。参照株はPtRA-8株と同一の条件で培養して比較試験に用いた。

2. 形態学的特徴

BM培地（個体）で培養したPtRA-8株細胞を採取し、位相差顕微鏡（BX-50:Olympus）を用いて細胞形態や運動性の有無、胞子や莢膜の有無を観察した。コロニーの性状を目視で観察し、コロニー色はマンセル・カラー・システムに従って市販のカラーチャート(Munsell Soil Color Book)を用いて判定した。グラム染色は Favor G Nissui kit (Nissui Pharmaceutical)を用いた。

3. 生理生化学的特徴

3-1. 温度試験

PtRA-8 株の温度試験には BM 培地でそれぞれ 4C°、10C°、15C°、20C°、25C°、30C°、35C°、40C°と 50C°に設定した恒温器で静置培養した。

3-2. pH 試験

PtRA-8 株の pH 試験には pH を 0.5 間隔で 5.0-9.0 に調整して培養を行った。pH 試験には以下のグッド緩衝剤を用いた：20mM MES (pH5.0-6.5)、20mM MOPS (pH7.0-7.5)、と 20mM TAPS (pH8.0-9.0)。

3-3. NaCl 試験

PtRA-8 株の NaCl 試験には NaCl 濃度を 0.1 間隔で 0-10%(w/v)に調整した培地を用いた。

3-4. 基質利用試験

基質利用性試験には YNB 培地を元に作成した培地を用いた (0.67% yeast nitrogen base without amino acids(Difco), 0.01% Bacto peptone(Difco), 0.1% 試験用基質 [pH 6.5])。試験に使用した基質は以下の通りである:D-arabinose、L-arabinose、D-xylose、D-galactose、D-glucose、D-fructose、D-mannose、L-sorbose、L-rhamnose、D-tagatose、D-fucose、D-cellobiose、D-maltose、D-melibiose、D-sucrose、D-trehalose、D-turanose、D-melezitose、D-raffinose、D-adonitol、D-mannitol、D-sorbitol、xylitol、arbutin、aesculin、salicin、inulin、starch、pectin、chitin、xylan と lignin。基質を含まない培地をネガティブコントロールとした。培養期間は 30 日で、測光比色計を用いて 420nm での吸光度を測定することによって増殖を評価した。培養液はネガティブコントロールと比較して光学密度の増加を示した場合は増殖に関して陽性であるとした (Abdelkafi *et al.*, 2005)。

3-5. カタラーゼ・オキシダーゼ試験

試験に用いた PtRA-8 株は BM 固形培地で 10 日間培養したものを使用した。カタラーゼ試験は ID Color Catalase (bioMérieux) を用いて試験を行った。菌体を滅菌したスライドガラス上の ID Color Catalase 試薬に懸濁し静置した。懸濁液に酸素の生成による気泡の発生が確認された場合はカタラーゼ活性陽性とした。オキシダーゼ試験はオキシダーゼ同定スティックス

(Oxoid) を用いて試験を行った。オキシダーゼ活性は Bactident™ Oxidase 試験紙 (Merck) に菌体を塗布し、試験紙の色が紫変した場合に陽性と判断した。

3-6. 生化学的特徴

酵素活性 (Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Lipase (C14), Leucine arylamidase, Valine arylamidase, Cystine arylamidase, Trypsin, Chymotrypsin, Acid phosphatase, Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -Galactosidase, β -Galactosidase, β -Glucuronidase, α -Glucosidase, β -Glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -Mannosidase, α -L-Fucosidase) の検定には API ZYM (シスメックス)、生化学的性質のうち、硝酸還元、インドール酸性、グルコースからの酸生成、尿素分解およびゼラチン分解能の検定には API 20NE (シスメックス) を、アセトイン生産 (Voges-Proskauer test : VP test)、クエン酸利用性および硫化水素生産の検定には API 20E (シスメックス) を使用した。試験には BM 固形培地で 10 日培養した菌体を使用、方法は附属の説明書に従った。

3-7. 嫌気環境下での増殖

嫌気環境下での増殖試験にはアネロパック嫌気培養システム (三菱ガス化学) を用いた。画線により菌体を接種した平板培地とアネロパウチ・ケンキをアネロパックパウチダブルチャックに入れて密閉して嫌気状態にし、30°C で保温した。

4. 分子系統学的特徴

4-1. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統学特徴

分子系統学的解析用の *Deinococcus-Thermus* 門細菌基準株の 16S rRNA 遺伝子配列は EzBioCloud から取得し、PtRA-8 株の配列と共にマルチファスタフォーマットのファイルを作成した。系統解析ではアライメント・距離行列作成・系統樹構築の全ての工程においてフリーソフトウェアの MEGA7(Kumar *et al.*, 2016)を使用した。Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE)(Edgar, 2004)でマルチファスタ配列を多重アライメントし、両末端を最短の配列に揃え、近隣系統樹(Saitou & Nei, 1987)と最尤系統樹(Gu *et al.*, 1995)の構築に供した。近隣系統樹で Kimura's two-parameter model(Kimura, 1980)を用いた。最尤系統樹で Model Test により最適と判断された進化モデル Tamura 3-parameter(Tamura & Nei, 1993)は不変部位 (G+I) model(Gu, *et al.*, 1995)とガンマ分布を組み合わせた。系統樹の各枝の分岐信頼性はブートストラップ法 (抽出回数 1,000 回) で検定した。

4-2. DNA-DNA ハイブリダイゼーション

PtRA-8 株及び参照株 (“*Deinococcus radioresistens*”JCM 19777^T(Srinivasan, *et al.*, 2015)、*Deinococcus yunweiensis* DSM 17005^T(Zhang, *et al.*, 2007)と *Deinococcus metalli* DSM 27521^T(Feng, *et al.*, 2015)) DNA は「5-1. ゲノム DNA G+C 含量」の方法に従って調製した。DNA-DNA ハイブリダイゼーションはマイクロプレート法 (Ezaki *et al.*, 1989) で行った。精製ゲノム DNA (1.5 µg /15 µL) を DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) を用い、附属のプロトコルに従ってジゴキシゲニン (DIG) 標識し、ハイブリダイゼーション用のプローブとした (標識の反応温度と反応時間はそれぞれ 37°C と 20 時間)。未標識ゲノム DNA の 96 穴マイクロプレート (IMMUNO PLATE; NUNC) への固定は以下の要領で行った。ゲノム DNA を 1×SSC (20×SSC (表 3-1) を滅菌水で希釈) で 30 µg/mL に希釈し、100°C で 10 分間加熱後、氷水で急冷して一本鎖とした。PBS-Mg 溶液 (表 3-2) で 3 µg/mL に希釈し、

1株あたり10ウェルに100 µLずつ分注した。DNA溶液の乾燥を防ぐためにプレート上部を96穴用プレートシート (MICROPLATE SERING TAPE, PP; AS ONE) でシールしてから一晩30C°で保温した。ウェルからDNA溶液を除き、アルミホイルでプレートを包んで遮光し、45C°で24時間放置して、DNAをウェルに固定した。コントロールのサケ精子DNA (ICN Biomedicals Inc) も同様に固定した。

ハイブリダイゼーション温度はPtRA-8株のG+C含量 (68.2 mol%) からMarmurとDotyの式 ($T_m = 69.3C^\circ + [G+C \text{ (mol\%)}] \times 0.41C^\circ$) (Marmur & Doty, 1962)によりTm値を算出し、その値を公式[ハイブリダイゼーション温度 = (Tm - 45C°)](Goris *et al.*, 1998)に当てはめて得られた52.3C°をハイブリダイゼーション温度とした。

標識DNAを含まないハイブリダイゼーション溶液 (表3-3) 200 µLをウェルに分注して、37C°で1時間プレハイブリダイゼーションした。溶液を捨て、標識DNA (0.1 ng/µL) を含むハイブリダイゼーション溶液100 µLをウェルに分注し、プレート上部をプレートシートでシールして47C°で38時間ハイブリダイゼーション反応を行った。ハイブリダイゼーション反応後、ウェルを2×SSC 300 µLで4回洗浄し、ブロッキング溶液 (表3-4) 100 µLを分注して室温で30分間静置した。溶液を捨て、ブロッキング溶液で150 mU/mLに希釈した抗体 (坑ジゴキシゲニンアルカリフォスファターゼ) 100 µLを分注し、30分間室温に置いた。溶液を捨て、洗浄液300 µLを分注して5分間置く操作を2回繰り返した。発色剤 *p*-nitrophenyl phosphate (1 mg/mL) を含む検出液 (表3-5) 100 µLをウェルに分注し室温で放置した。アルカリフォスファターゼで *p*-nitrophenyl phosphate が加水分解されて生成した *p*-nitrophenol による発色の検出にはマイクロプレートリーダー (MTP-450; CORONA) を用いた。プレートリーダーにマイクロプレートをセットし、10分または1時間おきに吸光度 (405 nm) を測定した。ハイブリダイゼーションはPtRA-8株と参照株との間で相互に行い、以下の計算式によってそれぞれゲノム類似度を算出した。各DNA再会合度は、同種間をハイブリダイズし

た際の吸光度の値をゲノム DNA 類似度 100%とし、それに対する相対値を異種間のゲノム DNA 類似度とした。

表 3-1. 20×SSC (pH 7.0) (終濃度)

NaCl (3 M)	175.32 g
KCl (0.3 M)	88.23 g
蒸留水	1,000 mL

表 3-2. 1×PBS-Mg (終濃度)

NaCl (137 mM)	8.0 g
KCl (2.7 mM)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O) (8.0 mM)	2.87 g
KH ₂ PO ₄ (1.5 mM)	0.2 g
MgCl ₂ (100 mM)	20.33 g
蒸留水	1,000 mL

表 3-3. ハイブリダイゼーション溶液 (終濃度)

20×SSC (2×)	8.0 mL
10% Blocking reagent (1%)	0.2 g
<i>N</i> -lauroyl sarcosine (0.1%)	2.87 g
10% SDS (0.02%)	0.2 g
ホルムアミド (50%)	20.33 g
デキストラン硫酸 (2.5%)	1.25 g
10 mg/mL Calf thymus DNA (100 µg/mL)	500 µL
蒸留水	50 mL

表 3-4. ブロッキング溶液

10×Blocking reagent	10 mL
溶液 1	90 mL
Total	100 mL

表 3-5. 検出液 (pH 9.5) (終濃度)

1 M Tris-HCl (0.1 M)	10 mL
NaCl (0.1 M)	0.58 g
MgCl ₂ (0.05 M)	1.02 g
Total	100 mL

5. 化学分類学的特徴

4-1 のゲノム DNA の調製を除き、14 日間液体培養した菌体を用いた。菌体脂肪酸組成の分析用試料の調整には 14 日間液体培養した菌体を用いた。菌体細胞を遠心分離（10,000 rpm、15 min、4°C）により回収し、回収した菌体は滅菌水で 2 回洗浄して凍結乾燥し、使用直前まで -30°C で保存した。

5-1. ゲノム DNA G+C 含量

液体培地で対数増殖期後期まで培養した菌体を遠心分離（10,000 rpm, 10 min, 4°C）により回収した。TE buffer (pH 8.0) で菌体を洗浄後、CTAB 法 (Wilson, 2001)によりゲノム DNA を抽出した。湿重量 100 mg の細胞ペレットを TESS 5 mL に懸濁し、リゾチーム (MERCK・100,000E/mg) を 50 mg 加えて転倒混和し、30°C で 30 分間保温して細胞をプロトプラスト化した。プロトプラスト懸濁液に 250 μ L の 10% SDS 溶液と 50 μ L のプロテイナーゼ K 溶液を加えて十分に混和し、懸濁液が透明になるまで 50°C に保温した。溶菌液に 900 μ l の 5 M NaCl と 750 μ l の CTAB/NaCl (組成) を加えて十分に混和し、65°C で 20 分間保温した。等量のクロロホルム：イソアミル (24:1) を加え 5 分間転倒混和し遠心分離（6,000 rpm, 20 min）した。上層の透明な溶液を取り新しいサンプルチューブに移し、目分量で等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) 混液 (PCI) を加え 5 分間転倒混和し、遠心分離（6,000 rpm, 60 min）した。上層を新しい遠沈管に移し、0.6 倍量のイソプロパノールを壁面に沿わせて添加した。ガラス棒を 70%エタノールで拭いた後、サンプルチューブにいれ、円を描くようにしてガラス棒を穏やかに動かし、核酸 (DNA/RNA 混合物) をガラス棒に巻きつけた。核酸を 70%エタノールで洗浄して風乾後、200 μ L の TE buffer に浸し 4°C で 1 時間放置した。RNase A (1 mg/mL) 10 μ l を 200 μ L の核酸溶液に添加し、37°C で 1 時間保温した。等量の PCI を加え、転倒混和を行い遠心分離（6,000 rpm, 60 min）した。上層を新しいサンプルチューブに移し、1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.3) を加え、0.6 倍量のイソプロパノールを壁面に沿わせ添加

した。キャピラリーを用いて DNA を回収し TE buffer 50 μ L に溶解し、ゲノム DNA 溶液を得た。NucleoSpin gDNA clean-up kit (Macherey-Nagel) を用いて DNA を精製した。

ゲノム DNA を滅菌水で 1 μ g/mL になるよう希釈した。10 μ L の DNA 溶液に GC 含量測定用試薬キット (ヤマサ醤油) の P1 ヌクレアーゼ溶液 (2 units/mL) を等量加え、50°C で 2 時間以上保温してモノヌクレオチド溶液を得た。10 μ L の DNA 溶液にヌクレアーゼ P1 溶液 (2 units/mL; ヤマサ醤油) を等量加え、50°C で 2 時間以上保温してモノヌクレオチド溶液を得た。モノヌクレオチドの分析には YMC-Pack ODS-AQ カラム (150 \times 6.0 mm, 5 μ m particle size, 12 nm pore; YMC) をセットした逆相 HPLC (島津 HPLC システム: ポンプ, LC-10ADvp; カラムオーブン, CTO-6A; 検出器, SPD-6A; 島津製作所) を使用した。移動相として 10 mM リン酸バッファー (pH 3.8) を用い、カラム温度 30°C、流速 (flow rate) 1.5 mL/min に設定した。スタンダード溶液とサンプルを測定し、以下の計算式により得られたピーク面積の面積値を代入し G+C 含量を求めた (x は試料、s は標準物質をそれぞれ指す)。

$$G+C(\text{mol}\%)=(C_x/C_s+G_x/G_s)/(C_x/C_s+A_x/A_s+G_x/G_s+T_x/T_s)$$

5-2. 菌体脂肪酸組成の分析

菌体脂肪酸の調製 (抽出・メチルエステル化・精製) は脂肪酸メチル化キット (ナカライテスク) とメチル化脂肪酸精製キット (ナカライテスク) 説明書に従って行った。乾燥菌体 4 mg をスクリーキャップ付試験管に量り取りキットの説明書に従い脂肪酸抽出とメチルエステル化、および精製を行った。精製した脂肪酸メチルエステル (FAME) 全量を 4 mL 容量の硼珪酸ガラス製液体用樹脂容器 (茶色; マルエム) に移して、還元銅装置で酸素を除いたアルゴンガス気流下で濃縮乾固し、分析試料とした。FAME の分析はテクノスルガ・ラボ (<https://www.tecsrg.co.jp/tecsrg/>; 静岡県清水市) に委託し

た。脂肪酸組成の分析には菌体脂肪酸組成分析システム“Sherlock Microbial Identification System”（MIDI 社）とライブラリ TSBA6 が使用された。

5-3. 呼吸鎖キノン分析

呼吸鎖キノンは微生物の分類同定 Nishijima(1997)の方法に従って調製した。乾燥菌体 200 mg を 30 mL 容量の三角フラスコに取り、クロロホルム-メタノール (2:1) 混合液 20 mL を加えて十分に懸濁した。フラスコの口をパラフィルムで密閉しアルミホイルで覆い一晩暗所に静置してキノンの粗抽出を行った。抽出液を濾紙 (5C; ADVANTEC) で濾過し細胞残渣を除き、濾液を 50 mL 容のナス型フラスコに回収した。濾紙上の細胞残渣を同じクロロホルム-メタノール混合液ですすぎ、濾液を合わせてロータリーエバポレーター (IKA RV10) で濃縮・乾固した (回転速度 100 rpm; 湯浴温度 30°C)。フラスコに 1.5 mL のアセトンを加え、スパーテルのへら部分を用いて壁面の付着物をこそぎ落とし、アセトンに十分溶解させた。抽出液を不溶物ごと 2.0 mL 容のサンプルチューブに移し、再びフラスコにアセトンを加え残った付着物ごと抽出液を前の液と合わせた。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 室温) により不溶物を沈殿除去し、上清を 4 mL 容量の硼珪酸ガラス製液体用樹脂容器 (茶色; マルエム) に移した。抽出溶媒を還元銅装置で酵素を除いたアルゴンガス気流下で濃縮乾固し、テクノスルガ・ラボに分析を委託した。

5-4. 極性脂質の TLC 分析

極性脂質の抽出と検出は Minnikin のリン脂質分析方法(Minnikin *et al.*, 1984)に従い行った。HPTLC シリカゲルプレート (HPTLC Silica gel 60; Merck Millipore) を用いて二次元薄層クロマトグラフィーを行った。凍結乾燥菌体 50mg をテフロンライナーキャップ付き試験管に入れ、メタノール 0.3% NaCl 溶液(10:1) 2mL を加えた。15 分間ボルテックスにより攪拌し、遠心分離 (3,000 rpm, 10mm) により 2 層に分け、上層をパスツールピペットを用いて除いた。下層に石油エーテル 1 mL を加え、再び遠心して上層を除いた。容器

を密栓してブロックバスで 100°C で 5 分間加熱し、37°C の水浴中で 5 分間冷却した。クロロホルム-メタノール-水(9:10:3) 2.3 mL を加えて 60 分間攪拌し、遠心後、上清を別の試験管に移した。沈澱にクロロホルム-メタノール-水 (5:10:4) 0.75mL を加え、30 分間攪拌し、遠心分離後、上清液を合わせた。上清を合わせたものにクロロホルムと水をそれぞれ 1.3 mL ずつ加え、攪拌後、遠心分離して上清を除いた。下層を窒素気流下で濃縮乾固し、極性脂質画分とした。試料を 60 µl のクロロホルム-メタノール(2:1)に溶解し、その約 5µl をシリカゲル HPTLC (HPTLC Silica gel 60 25 Glass plates 10×10 cm) (Merck KGaA 64271 Darmstadt, Germany)プレートはコーナー(下及び左側を約 1.5 cm あけて)にスポットした。TLC プレートは各種呈色反応用に各サンプルあたり 4 枚用意した。クロロホルム-メタノール-水(65:25:4)で 1 次元目を展開し、十分に風乾させる。展開方向を 90 度変え、クロロホルム—酢酸-メタノール-水(40: 7.5: 6: 2)で 2 次元目の展開をした。十分に風乾させ、以下の呈色反応によってスポットを検出した。

一般脂質

密閉可能なプラスチック容器内に展開後、風乾した HPTLC プレートのシリカゲル面を上にして入れ、その側に小瓶に入れたヨウ素結晶を置き、一般脂質を発色させた。

アミノ脂質

ニンヒドリン溶液 (0.25g を飽和ブタノールに溶解) を HPTLC プレートに噴霧した後、120 °C に設定した専用ホットプレートで数分間加熱した。

リン脂質

Dittmer-Lester 試薬:25N 硫酸 100 ml に 4.01g の三酸化モリブデン(MoO₃)を入れ、溶解するまで穏やかに加熱した(A 液)。A 液 50 ml にモリブデン粉末 0.18g を加え、15 分間穏やかに加熱後、放冷し、デカンテーションによって沈澱を取り除いた(B 液)。使用時、A 液と B 液を等量混合し、混合液の 2 倍容の水で希釈した。二次元展開後の HPTLC プレートに噴霧し、数分間放置した。

糖脂質

ヨウ素蒸気で分離を確認した後、アニスアルデヒド試薬（エタノール 90 ml, 濃硫酸 5ml, 酢酸 1ml）を噴霧した後、110 °C のホットプレートで約 15 分間加熱した。

5-5. 細胞壁ペプチドグリカン組成の分析

菌体脂肪酸組成の分析の際と同様に培養して回収した湿菌体をテクノスルガに送付した。湿菌体からは駒形と鈴木の方法(Komagata & Suzuki, 1988)に従って分析用試料が調製された。試料は 5%アセトニトリルに溶解され、5 μ L が超高性能液体クロマトグラフ（ACQUITY UPLC H-Class system(Waters, USA); BEH C18,2.1(I.D.) \times 150 mm,pore size 1.7 mm(Waters, USA)) に供され、以下に記す条件で分析された。標品ピークとの比較から試料アミノ酸の同定と相対量が求められた。標品組成は以下の通りである（ジアミノピメリン酸が 0.005 μ M である以外は全て 0.01 μ M）：アスパラギン酸; グルタミン酸; セリン; グリシン; ホモセリン; スレオニン; アラニン; *meso*-ジアミノピメリン酸; LL-ジアミノピメリン酸; ジアミノ酪酸; オルニチン; リジン; ムラミン酸; アスパラギン; ヒスチジン; プロリン; チロシン; バリン; メチオニン; ロイシン; フェニルアラニン）。

PtRA-8 株のペプチドグリカン分析カラムと分析条件

カラム	BEH C18, 2.1 (ID) \times 159 mm, pore size 1.7 mm (Waters)
カラム温度	40°C
移動相	アセトニトリル/0.02M 酢酸アンモニウム水溶液 A: 5/95, B: 60/40
流量	0.15 mL/min

6. UV 耐性試験

PtRA-8 株及び参照株を用いて、紫外線照射への耐性能を検定した。対照細菌株としては *Escherichia coli* Y1090 を用いた。UV 照射にはクリーンベンチ（Hitachi Air Conditioning Systems Co.,Ltd.）の殺菌灯（GL-15; パナソニック）を利用した。積算照度計（IL1400A Radiometer; International Light）で殺

菌灯のエネルギーを計測し、予め適当な照射位置を決定しておいた。UV 耐性試験は Feng ら(2015)の方法を改変して行った。BM 液体培地で対数期まで培養した細胞を遠心分離 (8000 g, 5 min, 4°C) により回収した。リン酸緩衝液 (0.067M リン酸カリウム、pH 7.0) で菌体を洗浄し、遠心分離 (8000 g, 5 min, 4°C) により回収した。洗浄菌体を細胞密度が約 10^8 になるようにリン酸緩衝液に懸濁し、同緩衝液を用いて $10^1 \sim 10^4$ 希釈液を調製した。0.1 mL の各希釈液を BM 固形培地プレートの上にコンラージ棒を用いて塗り広げた。プレートの蓋を外して UV 光に暴露し、設定した時間毎に回収し、30°C の暗室で 15 日間培養後、形成されたコロニー数から生残率を求めた。

7. 乾燥耐性試験

培養と菌体の回収・再懸濁は「6. UV 耐性試験」と同様に行った。希釈液 1mL を滅菌シャーレ (滅菌深型シャーレ 90Φ×20 mm) にとり、クリーンベンチ内において 90 分間送風し、乾燥させた。シャーレに蓋をし、シリカゲルを入れたデシケータ内に置き、室温で放置した。7、14、28、42 日後にシャーレを取り出し、乾燥菌体を滅菌水で懸濁し、 10^4 、 10^5 、 10^6 cells/mL になるよう希釈し、0.1 mL を NBPT 培地に塗抹した。30°C の暗室で 15 日間培養後、形成されたコロニー数から生残率を求めた。

8. 固体表面への附着能の検定

PtRA-8 株の固体表面への附着能の検定は森川の総説(2012)を参考に行った。対数期の培養液 100 μ L を滅菌 96 穴プレート (AS ONE; MICROPLATE SERING TAPE) のウェルに分注し、30°C で保温した。経時的にウェルから培養液を除き (1 回につき 4 ウェル)、滅菌水で 3 回洗浄後、0.1% クリスタルバイオレット溶液 100 μ L を加え 20 分間放置後、クリスタルバイオレット溶液を除いた。滅菌水で 3 回洗浄して残存するクリスタルバイオレットを除いた。菌体がウェルの器壁に附着している場合はクリスタルバイオレットで器壁が染色される。95%エタノールを 100 μ L 加えて器壁からクリスタルバイ

オレットを抽出し、抽出液の吸光度 590 nm を測定した。未接種の培地を分注したウェルをコントロールとして用い、コントロールで得られた吸光度と検定試料の吸光度との差が正の場合、附着能陽性と判断した。

9. PtRA-8 株および *Deinococcus* 属細菌と樹皮との関連性

PtRA-8 株はヤマナラシ樹皮から分離された *Deinococcus* 属細菌である。

PtRA-8 株や *Deinococcus* 属細菌およびそれらの上位分類階級である

Deinococcus-Thermus 門細菌のヤマナラシや他の樹木の樹皮などとの関連性を 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象にしたアンプリコン解析により推測することを試みた。なお、材料・方法は第 5 章と共通しているので省略する。

第3節 結果

第1項 PtRA-8株の系統分類学的特徴

ヤマナラシ樹皮から分離された PtRA-8 株と正式記載された細菌の基準株との 16S rRNA 遺伝子配列相同性 Blast 検索を EzBioCloud データベース上で行ったところ、PtRA-8 株は “*Deinococcus radioresistens*” JCM 19777^T 株 (Srinivasan, *et al.*, 2015) と 97.4%、*Deinococcus metalli* DSM 27521^T 株 (Feng, *et al.*, 2015) と 95.7%、*Deinococcus yunweiensis* DSM 17005^T 株 (Zhang, *et al.*, 2007) と 94.5% とそれぞれ高い相同性を示した。なお、“*D. radioresistens*” をダブルコーテーションで括っているのは、有効的に報告されているが正式名として認められていないためである (Oren & Garrity, 2016)。*Deinococcus* 属細菌は放射線のみならず紫外線にも高い耐性を示すことが知られている (Callegan, *et al.*, 2008)。一般的に樹皮は太陽光に曝される環境にあり、紫外線に弱い生物種にとっては苛酷な環境であると予想され、ヤマナラシ樹皮から分離された *Deinococcus* に所属している PtRA-8 株はこのような環境に適応が可能どうかを調べるための試験も系統分類学的試験と合わせて行った。

1. PtRA-8 株の形態的特徴

PtRA-8 株の細胞（培養 7 日目；細胞数 10 個程度の平均値）は幅が 1.0-2.0 μm 、長さが 3.0-10 μm の桿状で、細胞の端が丸く、通常は単独あるいは 2 つの細胞が連なった状態で存在した（図 3-1）。また、細胞が 2 つ以上連なった連鎖状形態も観察され、培養日数が経過するにつれ連鎖する細胞数も増加する傾向にあった。細胞の運動性はなく、胞子を形成せず、グラム染色は陰性であった。培養 14 日目のコロニーのサイズは 0.2-2.3 mm で、形状・性状は円形・全縁・凸状・表面は平滑で粘性を有していた（図 3-2）。コロニーの色は薄い赤色～ピンク色～薄いオレンジ色で一定しなかったが、移植を繰り返すことにより薄いオレンジ色に落ち着いた。



図 3-1. PtRA-8^T 株の細胞形態 (位相差顕微鏡写真)

バーは 10 μm 。



図 3-2. PtRA-8^T 株のコロニー写真

バーは 5 mm。

2. PtRA-8 株の生理生化学的特徴

増殖可能な温度範囲は 10–37°C、0°C 未満および 37°C より高い温度では増殖せず、至適温度は 25–30°C の中温性であった。増殖可能な pH 範囲は 5.5–7.5 で至適 pH は 6.5 であった。増殖可能な NaCl 濃度範囲は 0–1.5% で、1.5% 以上での増殖は観察されなかった。PtRA-8 株細胞のカタラーゼ活性・オキシダーゼ活性はいずれも陽性であった。嫌気条件下では増殖できなかった。

PtRA-8 株の増殖基質試験の結果を表 3-6 にまとめた。種々の糖質を利用したが、それらの利用性に関しては特に差異は認められなかった。

PtRA-8 株の生化学的特徴を表 3-7 と表 3-8 に示した。分類学上の重要な特徴に関しては硝酸塩還元性・インドール生産・ゼラチン加水分解・クエン酸利用性・硫化水素生産・アセトイン生産 (VP テスト) のいずれもが陰性であった。

表 3-6. PtRA-8 株の基質利用性

利用性	基質名
増殖基質	L-arabinose、D-galactose、D-glucose、D-mannose、D-cellobiose、D-sucrose、D-trehalose、D-melezitose、D-raffinose、D-adonitol、xylitol、salicin、inulin、starch、xylan
非増殖基質	D-arabinose、D-xylose、D-fructose、L-sorbose、L-rhamnose、D-tagatose、D-fucose、L-fucose、D-maltose、D-melibiose、D-turanose、D-mannitol、D-sorbitol、arbutin、aesculin、chitin、pectin、lignin

表 3-7. PtRA-8 株及び参照株の酵素活性*

酵素	PtRA-8 株	“ <i>D. radioresistens</i> ” JCM 19777 ^T	<i>D. metalli</i> DSM 27521 ^T	<i>D. yunweiensis</i> DSM 17005 ^T
Alkaline phosphatase	+	+	+	+
Esterase (C4)	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	w	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+
Valine arylamidase	w	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	w	-
Trypsin	-	-	w	-
Chymotrypsin	-	-	w	-
Acid phosphatase	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+
α -Galactosidase	+	w	+	-
β -Galactosidase	+	+	+	+
β -Glucuronidase	-	-	w	-
α -Glucosidase	+	+	+	+
β -Glucosidase	+	+	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	+	w	+	+
α -Mannosidase	-	-	-	-
α -Fucosidase	-	-	-	-

*+: 陽性; -: 陰性; w: 弱陽性

表 3-8. PtRA-8 株及び参照株の生化学的特徴

性質	PtRA-8 株	“ <i>D.radioresistens</i> ”	<i>D.metalli</i> DSM	<i>D.yunweiensis</i>
		JCM 19777 ^T	27521 ^T	DSM 17005 ^T
硝酸還元	—	—	—	—
インドール酸性	—	—	—	—
アセトイン生産	—	ND	ND	ND
グルコースからの酸生成	—	—	—	—
尿素分解	—	—	—	—
ゼラチン分解	—	—	—	—
クエン酸利用性	—	ND	ND	ND
硫化水素生産	—	ND	ND	ND

*+: 陽性; -: 陰性; ND: 未試験

3. PtRA-8 株の分子系統学的特徴

3-1. 16S rRNA 遺伝子系統解析

PtRA-8 株の 16S rRNA 遺伝子配列 (1,435 bp) を Genbank/EMBL/DDBJ に登録した (アクセッション番号 LC011389)。基準細菌株と PtRA-8 株との 16S rRNA 遺伝子配列相同性の blast 検索(Altschul, *et al.*, 1990)を EzBioCloud データベース上で行ったところ、PtRA-8 株は “*Deinococcus radioresistens*”JCM 19777^T 株(Srinivasan, *et al.*, 2015)と 97.4%、*Deinococcus metalli* DSM 27521^T 株 (Feng, *et al.*, 2015)と 95.7%、*Deinococcus yunweiensis* DSM 17005^T 株 (Zhang, *et al.*, 2007)と 94.5%とそれぞれ高い相同性を示した。EzBioCloud 検索の結果、得られた相同性上位 1435 配列を用いて構築した近隣系統樹と最尤系統樹により PtRA-8 株と参照株の系統的關係を視覚化した (図 3-3)。PtRA-8 株は *Deinococcus-Thermus* 門細菌の下位分類群で *Deinococcus* に所属することが確認された。PtRA-8 株は両系統樹において“*D. radioresistens*”JCM 19777^T 株、*D. metalli* DSM 27521^T 株及び *D. yunweiensis* DSM 17005^T 株と高いブートストラップ値 (近隣系統樹 88%; 最尤系統樹 93%) で支持されるクラスターを形成し、“*D. radioresistens*”JCM 19777^T 株と高いブートストラップ値 (近隣系統樹 99%; 最尤系統樹 97%) で分岐ノードを共有した。

3-2. 参照株との DNA 類似度

PtRA-8 株と参照株との DNA-DNA ハイブリダイゼーション (DDH) の結果を表 3-9 にまとめた。PtRA-8 株と参照株とのゲノム DNA 類似度は、標識 DNA が PtRA-8 株あるいは参照株の場合でも、DDH で求めた 2 種類の生物ゲノム DNA 類似度が 70%未満の時、その 2 種類は別種と判断される基準 Gold Standard (Stackebrandt *et al.*, 2002; Wayne *et al.*, 1987)より、PtRA-8 株と参照株は別種であると判断された。

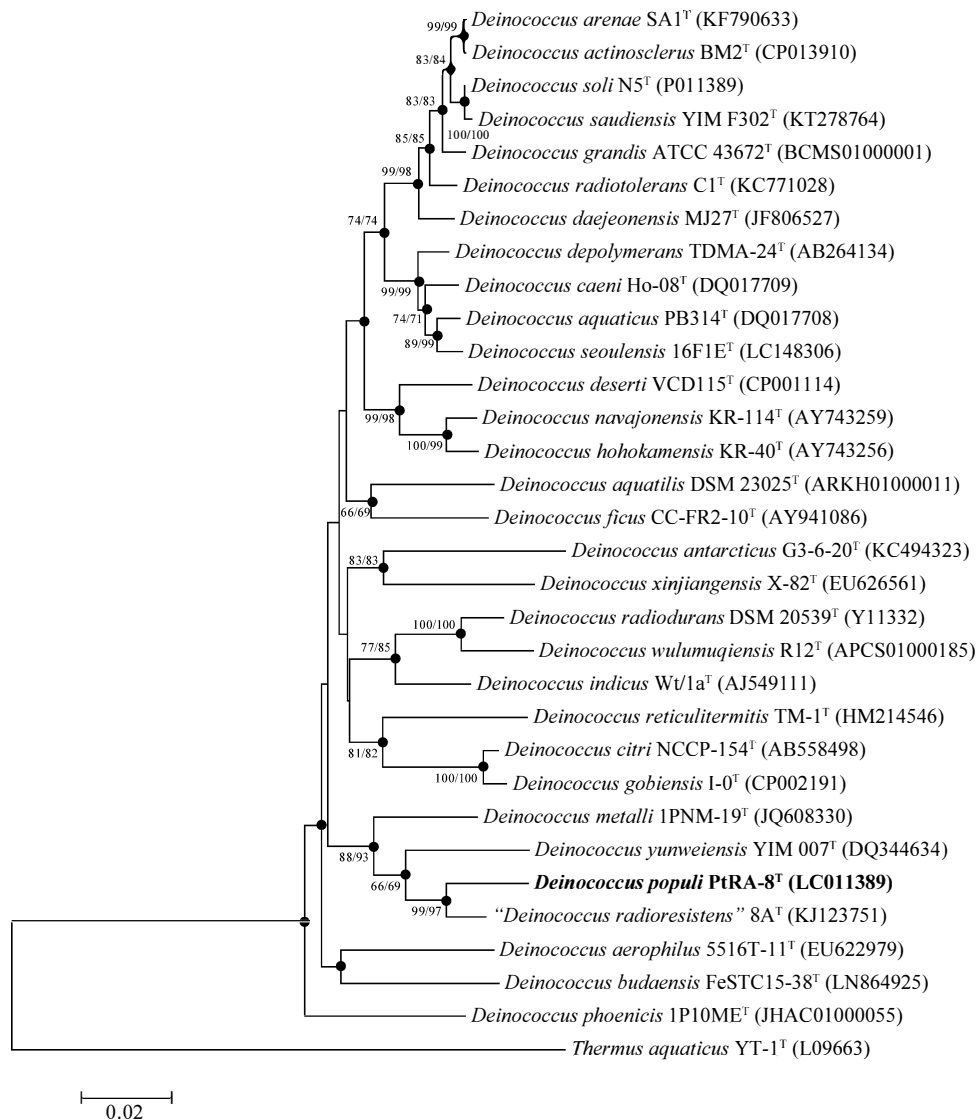


図 3-3. PtRA-8 株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた近隣結合系統樹

近隣系統樹と最尤系統樹の両方で分岐が再現されたノードには黒丸を附した。各ノードに 50%以上のブートストラップ値（近隣系統樹/最尤系統樹：NJ/ML）を示した。括弧内は遺伝子配列の GenBank/EMBL/DDBJ データベースアクセス番号。スケールバーは座位あたりの塩基置換数。*Thermus aquaticus* Yt-1^Tは外群。バーは座位のあたり置換数を示す。

表 3-9. PtRA-8 株と参照株のゲノム DNA 類似度

標識 DNA	固定 DNA			
	PtRA-8 株	“ <i>D.radioresistens</i> ”	<i>D.metalli</i>	<i>D.yunweiensis</i>
		JCM 19777 ^T	DSM 27521 ^T	DSM 17005 ^T
PtRA-8 株”		28%	20%	13%
“ <i>D.radioresistens</i> ”JCM 19777 ^T	23%	—	—	—
<i>D.metalli</i> DSM 27521 ^T	19%	—	—	—
<i>D.yunweiensis</i> DSM 17005 ^T	11%	—	—	—

4. PtRA-8 株の化学分類学的特徴

4-1. ゲノム DNA G+C 含量

PtRA-8 株のゲノム DNA G+C 含量は 68.2mol%であった。

4-2. 菌体脂肪酸組成

PtRA-8 株の菌体脂肪酸組成の結果を表 3-10 に示した。菌体細胞脂肪酸組成のうち主要脂肪酸 (>10%) は iso-C_{15:0}、C_{16:0}、iso-C_{17:0}、及び iso-C_{17:1} ω9c/ C_{16:0}10-methyl であった (表 3-10)。PtRA-8 株と主要脂肪酸のプロファイルが完全に一致する参照株はなかった。PtRA-8 株と参照株全ての主要脂肪酸が一致したのは iso-C_{17:1} ω9c/ C_{16:0}10-methyl のみであった。

4-3. 呼吸鎖キノン分析

呼吸鎖キノンは メナキノン MK-8 の 1 種類のみが検出された。

4-4. 極性脂質の TLC 分析

PtRA-8 株の極性脂質 TLC 分析の結果を図 3-4 に示した。検出された極性脂質は全部で 11 種であり、標準物質と一致するものはなかった。すべて未同定であるが以下の脂質に分類された。アニスアルデヒド染色およびナフトール染色陽性の糖脂質が 4 種類、ニンヒドリン反応陽性のアミノ脂質が 2 種類、Dittmer-Lester 染色陽性のリン脂質が 2 種類、ヨウ素蒸気のみで検出された極性脂質が 3 種類であった。

4-5. 細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成

細胞壁ペプチドグリカンの加水分解物の HPLC 分析結果を図 3-5 に示した。ペプチドグリカン構成アミノ酸としてグルタミン酸、グリシン、アラニン及びオルニチンがモル比として 1.0 : 2.5 : 2.1 : 1.0 の比率で検出された。細菌分類の指標の一つとなるポジション 3 のジアミノ酸はオルニチンで

あったため、Schleifer と Kandler(1972)の分類に従って PtRA-8 株のペプチドグリカンのタイプを A3 γ と分類した。

表 3-10. PtRA-8 株と参照株の細胞脂肪酸組成

脂肪酸	PtRA-8 株	" <i>D. radioresistens</i> "	<i>D. metalli</i> DSM	<i>D. yunweiensis</i>
		JCM 19777 ^T	27521 ^T	DSM 17005 ^T
Saturated:				
iso-C _{13:0}	tr*	1.1	tr	tr
C _{14:0}	-	tr	tr	1.1
iso-C _{15:0}	17.8	19.2	6.5	2.5
anteiso-C _{15:0}	1.3	1.2	tr	tr
iso-C _{16:0}	1.4	2.5	tr	tr
C _{16:0}	15.0	6.2	13.4	6.8
iso-C _{17:0}	10.4	12.3	8.1	13.9
anteiso-C _{17:0}	1	1.4	tr	tr
C _{17:0} cyclo	4.3	6.3	-	-
C _{17:0}	2.6	1.8	10.4	8.1
C _{18:0}	1.1	tr	tr	1.4
Unsaturated:				
iso-C _{15:1} F	1.3	1.2	tr	tr
C _{15:1} ω8c	1.3	tr	tr	tr
C _{15:1} ω6c	-	1.2	1.6	1.7
iso-C _{16:1} H	-	1.4	tr	tr
C _{16:1} ω9c	-	1.4	2.9	1.4
anteiso-C _{17:1} ω9c	-	1.9	tr	1.6
C _{17:1} ω8c	2.5	3.4	9.6	14.7
C _{17:1} ω6c	-	-	2.8	3.5
C _{18:3} ω6c (6, 9, 12)	4.0	-	-	-
C _{18:1} ω9c	1.7	tr	tr	-
Summed features** :				
iso-C _{15:1} H/C _{13:0} 3OH	1.6	tr	tr	tr
C _{16:1} ω7c/C _{16:1} ω6c	7.9	9.0	27.1	15.2
iso C _{17:1} I/C _{17:1} anteisoB	1.6	tr	tr	tr
iso-C _{17:1} ω9c/C _{16:0} 10-methyl	22.2	23.7	10.6	19.1

* 1%未満の脂肪酸

** HPTLC で分離されなかった脂肪酸は合計値で示した。

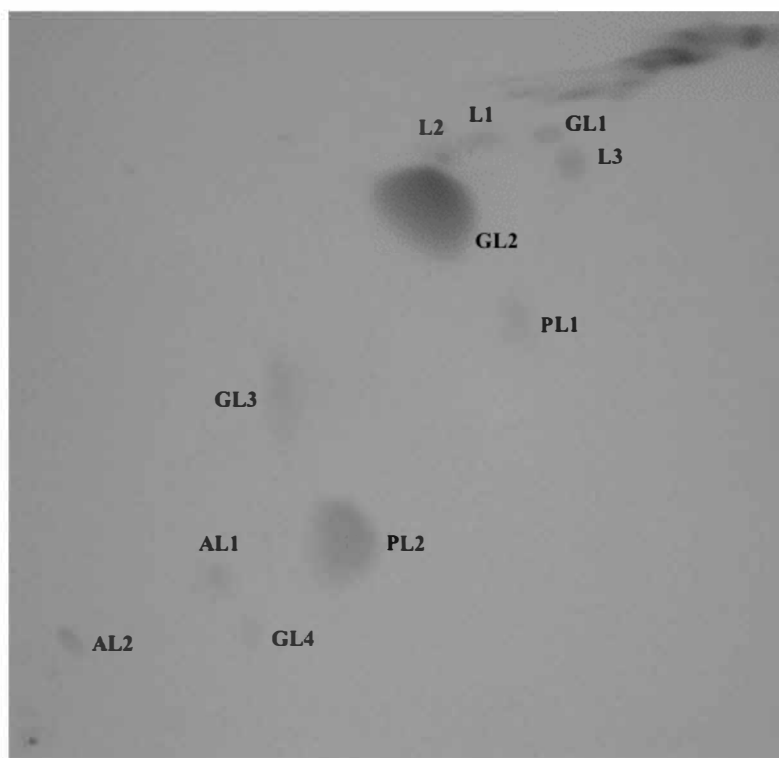
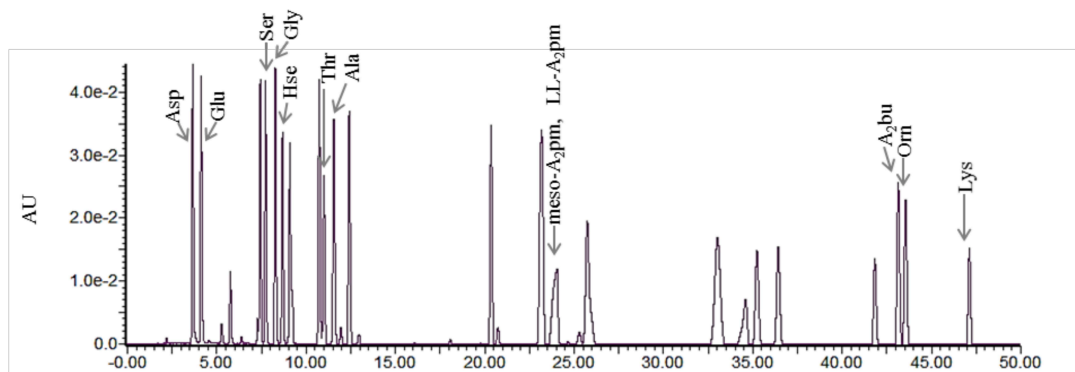


図 3-4 PtRA-8 株の極性脂質

ヨウ素蒸気により検出した極性脂質 TLC。プレート上の略号は以下の脂質を示す。PG, phosphatidylglycerol; DPG, diphosphatidylglycerol; PL, unidentified phospholipid; AL, unidentified amino lipid; GL, unidentified glycolipid; L, unidentified polar lipid.

1) アミノ酸混合標準試料



2) SIID22860

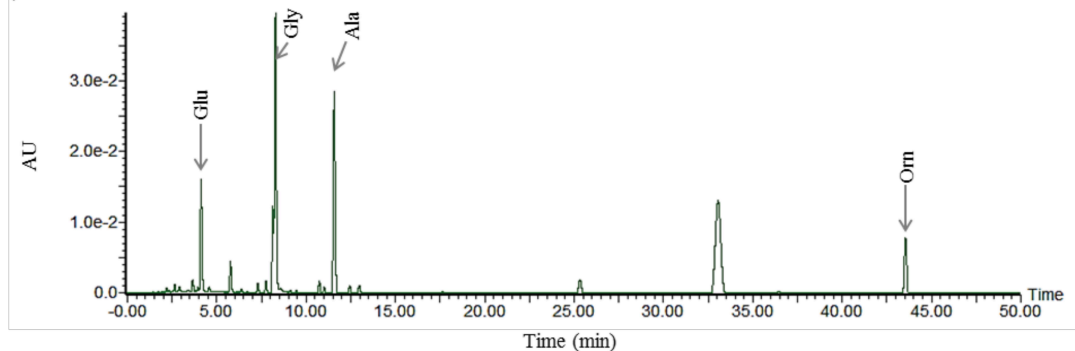


図 3-5. PtRA-8 株の細胞壁ペプチドグリカンの加水分解物の HPLC クロマトグラム

標準試料のピークに記されたアミノ酸は細菌ペプチドグリカンに検出される一般的なアミノ酸である。SIID22860 が PtRA-8 株のペプチドグリカンアミノ酸のクロマトグラム。リテンションタイム 25 分過ぎに検出されたピークは不明物質のもので、33 分のピークは誘導体化試薬に由来する。

表 3-11. PtRA-8 株及び参照株の特徴比較

項目	PtRA-8 株	“ <i>D.radioresistens</i> ” JCM 19777 [†]	<i>D.metalli</i> DSM 27521 [†]	<i>D.yunweiensis</i> DSM 17005 [†]
	細胞サイズ (μm)	1.0–2.0 × 3.0–10.0	0.5–0.9 × 1.0–1.5	1.0–1.5 × 1.0–2.0
コロニーの色	Light orange (Munsell 2.5 YR 7/10)	Light orange (Munsell 2.5 YR 7/10)	Orange (Munsell 2.5 YR 6/14)	Orange (Munsell 2.5 YR 6/14)
DNA G+C 含量 (mol %)	68.2	65.2*	71.7*	64.1*
増殖:				
40°C	-	+	-	-
pH5.0	-	-	+	-
pH8.0	-	-	+	+
1.5% NaCl	+	-	+	-
基質利用性:				
D-fructose	-	+	+	-
D-galactose	+	+	+	-
D-raffinose	+	+	+	-
D-mannose	+	+	+	-
D-melibiose	-	+	+	+
D-turanose	-	+	+	+
D-melezitose	+	+	+	-
D-adonitol	+	+	+	-
D-sorbitol	-	+	+	+
Inulin	+	+	+	-
Pectin	-	+	+	-
酵素活性:	+	w	+	-
α-galactosidase				
キノン	MK-8	MK-8	MK-8	MK-8
主要脂肪酸**	iso-C _{17:1} ω9c/C _{16:0} 10-methyl (22.2%), iso-C _{15:0} (17.8%), C _{16:0} (15.0%), iso-C _{17:0} (10.4%)	iso-C _{17:1} ω9c/C _{16:0} 10-methyl (23.7%), iso-C _{15:0} (19.2%), iso-C _{17:0} (12.3%)	C _{16:1} ω6c /C _{16:1} ω7c (27.1%), C _{16:0} (13.4%), iso-C _{17:1} ω9c/C _{16:0} 10-methyl (10.6%), C _{17:0} (10.4%)	iso-C _{17:1} ω9c/C _{16:0} 10-methyl (19.1%), C _{16:1} ω6c /C _{16:1} ω7c (15.2%), C _{17:1} ω8c (14.7%), iso-C _{17:0} (13.9%)

+: 陽性; -: 陰性; w: 弱陽性

*G+C 含量に関しては“*D. radioresistens*”JCM 19777[†] は Srinivasan et al. (2015)、*D. yunweiensis* DSM 17005[†] は Zhang et al. (2007)、*D. metalli* DSM 27521[†] は Feng et al. (2015)から引用した。

5. PtRA-8 株の紫外線照射耐性 (UV 耐性)

PtRA-8 株と参照株の UV 耐性試験の結果を図 3-6 に示した。非耐性の参照株として用いた *E. coli* Y1090 は 43 J/m^2 の UV 照射で死滅したのに対し、PtRA-8 株は同条件の照射で 40% を超える生残率を示した。PtRA-8 株と *D. yunweiensis* DSM 17005^T は UV 照射に対して同様な性質を示し、 260 J/m^2 の照射で死滅した。一方、*D. metalli* DSM 27521^T と“*D. radioresistens*”JCM 19777^T はいずれも PtRA-8 株よりも高い UV 耐性を示し、前者は 520 J/m^2 、後者は 1040 J/m^2 の UV 照射でも生残した。

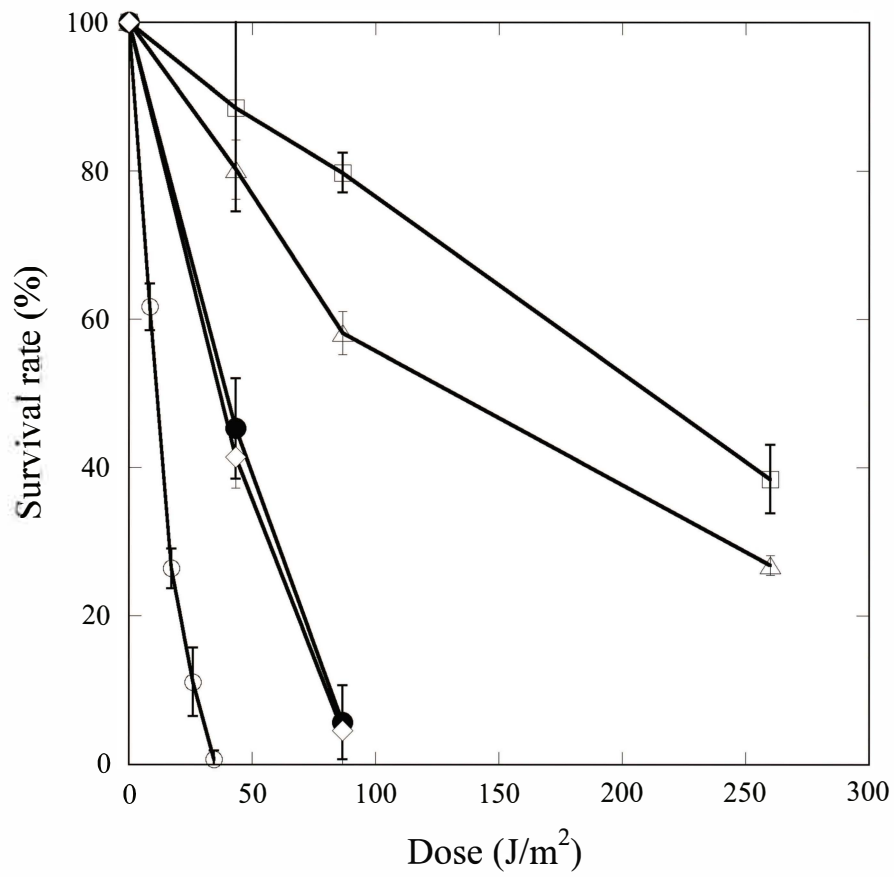


図 3-6. PtRA-8 株と参照株の紫外線照射に対する耐性

PtRA-8 (●), “*D. radioresistens*” JCM19777T (□), *D. metalli* DSM 27521T (Δ), *D. yumweiensis* DSM 17005T (◇), *E. coli* Y1090 (○)

第2項 PtRA-8株の生態学的特徴

1. 乾燥耐性

乾燥耐性試験は PtRA-8 株と *D. yunweiensis* DSM 17005^T 株で実施した。参照株の *D. yunweiensis* DSM 17005^T は7日間の乾燥後の生残率 2.89%で弱いながらも乾燥耐性を示したのに対し、PtRA-8 株は7日間の乾燥で死滅した。

2. 固体表面への附着

プラスチック製の96穴プレートのウェル壁への附着能を検定した結果を図3-7に示す。PtRA-8 株のウェル壁への附着は培養日数の増加に伴い増加した。

3. 樹皮細菌群集における PtRA-8 株と *Deinococcus* の位置づけ

2016年から2017年にかけて白神自然観察園・弘前城植物園・白岩森林公園・志賀坊森林公園・高倉森（スギは津軽峠）で実施した樹皮を対象にした細菌群集解析と2017年の白神自然観察園におけるブナの葉面とブナ樹下土壌の細菌群集解析（5章に詳述）から *Deinococcus* 門および *Deinococcus* 属に関する結果を樹種毎にまとめて表3-12に示した。*Deinococcus* 属の門レベルの上位分類階級である *Deinococci-Thermus* 門の樹皮細菌群集に占める割合は0~0.113%で、スギ・カラマツの針葉樹では全く検出されなかった。最も割合の高かったのはホオノキの0.133%で、PtRA-8 株が分離されたヤマナラシでは0.063%であった。*Deinococci-Thermus* 門内での *Deinococcus* 属の比率は PtRA-8 株が分離された樹種であるヤマナラシで最小の42.4%であったのを除き、すべて90%以上であった。ブナの葉面細菌群集では0.126%が *Deinococci-Thermus* 門細菌であり、そのうち99.1%が *Deinococcus* 属であった。ブナ樹下土壌の細菌群集では *Deinococci-Thermus* 門細菌は極めて僅かであり、*Deinococcus* 属は全く検出されなかった。表3-13に *Deinococci-Thermus* 門細菌と *Deinococcus* 属のアンプリコンリード数を試料別に整理した。全ての試料で *Deinococcus* 属が検出されたのはイタヤカエデとミズナラの樹皮、およ

びブナの葉で、ホオノキは樹皮細菌群集に占める *Deinococci-Thermus* 門細菌の割合は表 3-12 では最も高かったにもかかわらず、16 試料中 7 試料で *Deinococcus* 属が検出されなかった。*Deinococcus* 属が検出された樹種の中ではウダイカンバの検出率が最も低く、12 試料中 3 試料しか検出されなかった。*Deinococcus* 属のリード数の標準偏差が平均値の 2 倍を超えてバラツキの大きいホオノキとウダイカンバのリード数データを試料別にまとめて表 3-14 に示した。ホオノキ・ウダイカンバ、いずれにおいても *Deinococcus* 属のリード数は個体の生息場所で明確な差があり、白神自然観察園・高倉森・志賀坊の個体は 0 あるいは一桁であったのに対し、弘前城植物園の個体は三桁のリード数であった。

樹皮細菌群集において PtRA-8 株の 16S rRNA 遺伝子配列と種レベルで相同な配列のリード数はブナで 2 (弘前城植物園)、ホオノキで 7 (弘前城植物園)、イタヤカエデで 2 (白神自然観察園, 1; 弘前城植物園, 1)、ウダイカンバで 1 (弘前城植物園) であり、スギ・カラマツ・ヤマナラシ・ミズナラでは検出されなかった。

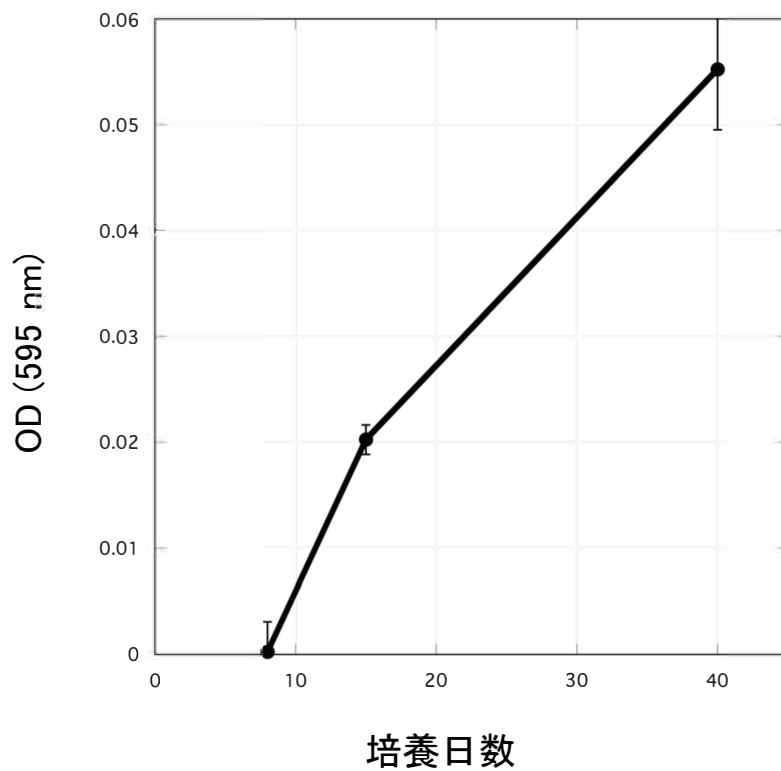


図 3-7. PtRA-8 株の附着能試験

96 穴プレートのウェルへの附着と培養日数との関係を示す。縦軸は 95%エタノールでウェルから溶出されたクリスタルバイオレットの吸光度で附着の程度を表す。バーは標準誤差 (n=4)。

表 3-12. 樹皮・葉・土壌の細菌群集における *Deinococcus-Thermus* 門および *Deinococcus* 属の位置付け

細菌群集解析の情報	試料の種類									
	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	スギ	カラマツ	ブナ葉面	ブナ樹下土壌
個体・採取ヶ所数	13	9	6	5	5	8	7	3	3	3
試料数	26	16	11	8	9	12	9	6	3	3
細菌群集に <i>Deinococci-Thermus</i> 門細菌の占める割合 (%)	0.091	0.133	0.065	0.033	0.063	0.029	0	0	0.126	0.00006
<i>Deinococci-Thermus</i> 門細菌内の <i>Deinococcus</i> 属の割合 (%)	98.0	99.8	99.7	90.4	42.4	100	-	-	99.1	0

表 3-13. *Deinococci-Thermus* 門と *Deinococcus* 属リード数の試料別比較

細菌群集解析の情報	試料の種類									
	ブナ	ホオノキ	イタヤカエデ	ミズナラ	ヤマナラシ	ウグイスカンバ	スギ	カラマツ	ブナ葉	ブナ樹下土壌
個体・採取ヶ所数	13	9	6	5	5	8	7	3	3	3
試料数	26	16	11	8	9	12	9	6	3	3
試料あたりの全細菌リード										196,903
平均数 (標準偏差)	66,719 (26,609)	56,108 (29,304)	80,986 (36,493)	75,257 (19,092)	96,381 (46,857)	32,683 (22,831)	27,850 (11,281)	37,014 (20,730)	29,284 (10,829)	(20,171)
<i>Deinococci-Thermus</i> 門細菌の										
平均リード数	60.7 (75.6)	75.1 (160.1)	52.7 (83.9)	24.6 (12.9)	61.0 (30.4)	9.3 (31.4)	0	0	37.0 (23.6)	1.33 (1.53)
(標準偏差)										
<i>Deinococcus</i> 属の平均リード										
数 (標準偏差)	59.5 (76.0)	74.9 (160.2)	52.5 (84.0)	22.3 (13.5)	42.4 (19.0)	9.3 (31.4)	0	0	36.6 (23.7)	0
<i>Deinococcus</i> 属検出試料数/全										
試料数	25/26	9/16	11/11	8/8	8/9	3/12	0/9	0/6	3/3	0/3

表 3-14. ホオノキとウダイカンバ樹皮の細菌群集アンプリコン解析における

Deinococcus 属細菌の試料・個体別リード数

樹種	個体 ID	場所	細菌総リード数			<i>Deinococcus</i> 属リード数		
			2016	2017		2016	2017	
			夏	夏	秋	夏	夏	秋
ホオノキ	MS-01	白神自然観察園	54,718	42,051	24,309	0	0	0
	MS-02		73,290	56,917	32,114	4	6	4
	MS-03		65,613	50,522	ND	1	0	ND
	MH-01	弘前城植物園	115,098	87,248	ND	166	577	ND
	MH-02		99,446	86,051	ND	127	313	ND
	MT-01	高倉森	ND	30,450	ND	ND	0	ND
	MT-02		ND	37,683	ND	ND	0	ND
	MP-01	志賀坊	ND	19,447	ND	ND	0	ND
	MP-02		ND	22,765	ND	ND	1	ND
ウダイカンバ	BS-01	白神自然観察園	25,031	25,571	11,630	2	0	0
	BS-02		55,670	41,391	ND	0	0	ND
	BS-03		ND	88,198	20,923	ND	0	0
	BH-01	弘前城植物園	ND	49,134	ND	ND	109	ND
	BT-01	高倉森	ND	20,604	ND	ND	0	ND
	BT-02		ND	31,408	ND	ND	1	ND
	BP-01	志賀坊	ND	14,950	ND	ND	0	ND
	BP-02		ND	7,686	ND	ND	0	ND

第4節 考察

1. PtRA-8株の系統分類学的特徴

*Deinococcus*に所属する種 (*Deinococcus*種) は化学合成従属栄養・グラム染色陽性・非運動性・孢子非形成・好気性・呼吸鎖キノンとしてMK-8を含有・細胞膜の主要脂肪酸はiso-C_{15:0}、C_{16:1} ω7c、C_{16:0}・細胞壁ペプチドグリカン はジアミノ酸としてL-オルニチンを含むA3β型・高G+C含量という形態学的・生理学的・化学分類学的特徴を共有する(Battista & Rainey, 2015; Embley, *et al.*, 1984)。これらの特徴に対して、PtRA-8株はグラム染色陰性であることと主要脂肪酸としてC_{15:0}とC_{16:1} ω7cを含まない(表3-10) ことを除いて一致した。参照株とした“*D. radioresistens*” JCM 19777^T (Srinivasan, *et al.*, 2015)、*D. metalli* DSM 27521^T (Feng, *et al.*, 2015)、*D. yunweiensis* DSM 17005^T(Zhang, *et al.*, 2007)とは脂肪酸プロファイル(表3-10)と紫外線照射に対する耐性(図3-6)、基質利用性や生理的性質(表3-11)において差異が認められた。

16S rRNA遺伝子配列に基づいて構築した系統樹(図3-3)においてPtRA-8株は“*D. radioresistens*” 8A^T (= JCM 19777^T)、*D. metalli* 1PNM-19^T (=DSM 27521^T)、*D. yunweiensis* YIM 007^T (=DSM 17005^T) とクレードを形成した。PtRA-8株と“*D. radioresistens*” 8A^Tは分岐のノードを共有しており、互いが最も近縁であることが示唆された。PtRA-8株との16S rRNA遺伝子配列相同性は“*D. radioresistens*” 8A^Tが97.4%、*D. metalli* 1PNM-19^Tと95.7%、*D. yunweiensis* YIM 007^Tと94.5%であり、“*D. radioresistens*” 8A^TがPtRA-8株と最も近縁であることが配列的にも示唆された。16S rRNA遺伝子配列の相同性が97%以上の場合は同種で未満の場合は別種とする基準(Stackebrandt & Goebel, 1994)に従うとPtRA-8株と“*D. radioresistens*” 8A^Tは同種となる。StackebrandtとEbers (2006)は原核生物のゲノム配列と16S rRNA遺伝子配列を比較し、種を区別する新たな基準として98.7-99.0%の16S rRNA遺伝子配列相同性を提案した。この新しい基準に従えばPtRA-8株と“*D. radioresistens*” 8A^Tは別種と判断される。種を区別する基準として最も尊重されるのがDNA-DNAハイブリダイゼーション(DDH)によるゲノム類似性であり、2種類の原核生物のDDHによるゲノム類似

度が70%未満の場合、両者は別種と判断される (Stackebrandt *et al.*, 2002; Wayne, *et al.*, 1987)。DDH試験の結果 (表3-9)、PtRA-8株と参照株とのゲノム類似度はすべて70%未満であり、PtRA-8株は種レベルで新規な細菌であることが確認された。

以上のことから PtRA-8 株を基準株 (type strain) とした *Deinococcus* 属の新種を以下のように提案した (記載文については省略する)。なお、種形容語の *populi* は分離源であるヤマナラシ (*Populus tremula* var. *sieboldii*) の属名に因む。*Deinococcus populi* は 2018 年 6 月現在、樹皮から分離・記載された唯一の *Deinococcus* 種である。

***Deinococcus populi* (L. gen. fem. n. populi of *Populus*, generic name of Japanese aspen tree). The type strain, PtRA-8^T (= DSM29820^T = NBRC110763^T) was isolated from the trunk surface of a Japanese aspen tree.**

2. PtRA-8 株と *Deinococcus* 属細菌の生態学的特徴

PtRA-8 株の特徴や樹皮細菌群集における位置づけから、樹皮における PtRA-8 株と *Deinococcus* 種の生態について考察する。PtRA-8 株は他の *Deinococcus* 種と同様に高い紫外線耐性を示す (図 3-6)。紫外線を含む太陽光に曝される樹皮においては有利に働く性質である推察される。固体表面への附着能を有することは固体の一種である樹皮を生息の場とする上で重要な性質であり (岡部, 2012)、細菌群集を形成する他の細菌とともにバイオフィルムを形成することで樹皮表面における細菌群集の安定性に関与することが考えられる。ただし、以下に示すようにそもそも PtRA-8 株や *Deinococcus* 種は樹皮細菌群集において非常にマイナーな存在であり、これらの特徴は生息の場において自身の生残には関わるが、細菌群集の全体に影響を及ぼすとは考えられない。

PtRA-8 株は従属栄養生物であり、種々の糖質を増殖基質として利用する (表 3-6)。第 5 章において GC-MS 分析により樹皮から拭取りにより採取し

た試料に含有される低分子有機物を分析した。これらは樹皮からの滲出物が微生物群集において生産される物質である（以下樹皮成分という）。ブナ・ホオノキ・ミズナラ・イタヤカエデ・ヤマナラシ・ウダイカンバ・スギ・カラマツの樹皮から D-arabinose、D-fructose、D-galactose、D-glucose、xylitol、L-threitol、D-sorbitol、D-talose、*meso*-erythritol、D-adonitol、L-arabitol、3-deoxyhexitol および propanoic acid が検出された。このうち、PtRA-8 株は D-galactose、D-glucose、xylitol および D-adonitol の利用が可能である。PtRA-8 株が分離されたヤマナラシの樹皮成分は xylitol であり、炭素源・エネルギー源的には十分に生育可能である。

16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析（表 3-12~14）によると樹皮細菌群集における *Deinococcus-Thermus* 門細菌の比率は 0~0.133% と非常に小さく、樹皮細菌群集における本門細菌の重要性は大きくないものと考えられる。ブナ葉面細菌群集の場合でも同様であったが、ブナ樹下土壌の細菌群集では樹皮や葉面以上に *Deinococcus-Thermus* 門の重要性は低いものと思われる。スギ・カラマツの樹皮からは *Deinococcus-Thermus* 門が検出されなかったことから、本門細菌と両樹種との関連性は低いものと考えられた。*Deinococcus-Thermus* 門細菌は針葉樹から広葉樹まで幅広い樹種の葉面細菌群集に数%~10% の比率で存在する報告(Lambais *et al.*, 2017; Redford, *et al.*, 2010)がある一方で、1%未満か検出されない、あるいは言及されないなどの報告もあり(Cregger, *et al.*, 2018; Haruna, *et al.*, 2018; Kembel *et al.*, 2014)、その葉圏（葉面）細菌群集における位置づけは一定していない。また、上述の Lambais ら(2017)や Redford ら(Redford, *et al.*, 2010)は *Deinococcus-Thermus* 門の構成に関しては記述していない。樹皮細菌群集についてはイチョウ(Leff, *et al.*, 2015)、セイヨウハコヤナギ類（ヒロハヤマナラシなど）、カンラン科・パンダ科・アカネ科の樹木(Haruna, *et al.*, 2018)などを対象とした限られた研究例ではあるが *Deinococcus-Thermus* 門細菌は検出されていない。本研究における結果からも *Deinococcus-Thermus* 門の葉圏（樹皮）細菌群集の位置付けをはっきりさせることはできなかった。表 3-14 に *Deinococcus* 属の検出にバラツキが大きい

かったホオノキとウダイカンバの個体・試料別に *Deinococcus* 属細菌リード数を示したが、両樹種とも弘前城植物園の個体でもっとも高いリード数であった。試験数が少ないために推定にしかすぎないが、弘前城植物園は他の場所よりも乾燥した環境にあり日光が比較的良好に当たる環境にある。このことが、ホオノキとウダイカンバの *Deinococcus* 属細菌リード数に影響したのかもしれない。

樹皮細菌群集において *Deinococcus-Thermus* 門細菌の重要性・樹皮との関連性は不明確であるが、*Deinococcus-Thermus* 門内の構成はヤマナラシで 42.4%であったのを除き 90%以上が *Deinococcus* 属であった。*Deinococcus-Thermus* 門に所属する 1 綱 2 目 3 科 10 属の中では *Deinococcus* 属は比較的樹皮と関連が深いグループであることが推察された。PtRA-8 株と種レベルで相同な配列のリード数はブナで 2、ホオノキで 7、イタヤカエデで 2、ウダイカンバで 1 しか検出されず、分離源と同種の樹木であるヤマナラシからは検出されなかった。PtRA-8 株は最高希釈倍率の計数培地から分離されたことから培養可能な細菌株としては優占していたが、細菌群集全体からみると極めてマイナーな存在であることが示された。

第4章 ブナ樹皮から分離した *Armatimonadetes* 門細菌の特徴

第1節 序論

第2章においてブナ樹皮細菌を PPM 培地で計数した際に最高希釈倍率の培地から培養可能な優占細菌の1つとして系統分類学的・生態学的に極めて興味深い細菌株 AX-7 が分離された(表 2-11)。AX-7 株は 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子同定により *Armatimonadetes* 門への所属が推定されている。

Armatimonadetes 門は 2011 年にヨシの根面から分離された細菌株の解析に基づいて創設された細菌門で(Tamaki, *et al.*, 2011)、アメリカ合衆国イエローストーン国立公園の Obsidian Pool において実施された培養非依存的な研究に基づいて提案された 12 の候補門 (candidate division) の 1 つ OP10(Hugenholtz *et al.*, 1998;Hugenholtz *et al.*, 1998)の解消により創設された。*Armatimonadetes* 門は中程度の豊富さと多様性を示す細菌グループとされるが(Lee, *et al.*, 2014)、2018 年 6 月現在、正式記載されている種は *Armatimonas rosea* (Tamaki, *et al.*, 2011)、*Chthonomonas calidirosea* (Lee, *et al.*, 2011)と *Fimbriimonas ginsengisoli* (Im, *et al.*, 2012)の 3 種にすぎず、培養株も基準株を含めて 4 株しか得られていない (Lee, *et al.*, 2014)。環境配列に基づく系統解析により *Armatimonadetes* 門の下には 10 の綱レベルのサブグループの存在が提案されている(Lee *et al.*, 2013)。これらのサブグループのうち、記載種に基づいて *Armatimonadia* 綱 (基準種: *A. rosea*)、*Chthonomonadetes* 綱 (基準種: *C. calidirosea*)、*Fimbriimonadia* 綱 (基準種: *F. ginsengisoli*) が創設されている。

Armatimonadetes 門に所属する細菌は上記 3 種 4 株を除いて分離培養されていないため、これらを除く全てが環境から取得された 16S rRNA 遺伝子の配列情報にのみ基づく OTU である。*Armatimonadetes* 門細菌は温帯土壌・人の皮膚・嫌気リアクター・廃水処理プラント・地熱土壌・温泉・植物・動物など様々な場所や試料から検出されている(Dunfield *et al.*, 2012;Lee, *et al.*, 2014)が、多くの場合、その環境の細菌群集において 1%未満の構成比率であることから比較的マイナーな細菌グループとみなされて重要視されることはほとんどない(Dunfield, *et al.*, 2012)。また、得られている培養株も 4 つのみな

ので機能・生態についての研究は皆無といっても良い現状にある。*C. calidirosea* と *F. ginsengisoli* についてはゲノム解析が終了しており(Lee, 2015; Lee *et al.*, 2014)、ゲノム情報や培養実験により得られた生理・生化学的データに基づいた生態予測が行われているが、*A. rosea* に関しては記載論文のみで詳細な情報は公開されていない。

白神自然観察園のブナ樹皮より得られた AX-7 株の解析を通じて未知のことが多い *Armatimonadetes* 門に系統分類学・生態学的に重要な新知見を加えられると考え、本章の研究を実施した。

第2節 材料と方法

本節における基本操作・器具は第2章の第2節と共通である。本章ではブナ樹皮からの細菌分離後、AX-7株の解析を主として行った。特に記述しない限りAX-7株の増殖培地はR2A培地（日本製薬）を10倍希釈してpHを6.0に調整した液体培地（1/10 R2A培地）、培養は30°Cの暗条件・静置で行った。必要な場合は培地を1.5%の寒天で固化した。菌体の増殖は培養液の濁度（OD_{420nm}）を簡易吸光度計（mini photo 5; 三紳工業）で計測して記録した。なお、AX-7株は増殖に従って凝集体を形成するため、ボルテックスで十分に攪拌した培養液を濁度の計測に用いたが、測定値の変動が大きいため目視での判定も合わせて行った。

1. 使用菌株

AX-7は2016年8月13日に実施した樹皮細菌の計数試験においてブナ（S1-A）から分離された細菌株である（第2章）。新規性の極めて高い株であることから参照株は使用しなかった。

2. 形態学的特徴

1/10 R2A 固形培地（表 4-1）で14日間培養後に形成されたコロニーの性状観察と、コロニーから採取した細胞を用いた細胞形態の観察を第3章第2節と同様にして行った。

試験に用いたAX-7株は1/10R2A 固形培地で10日間培養したものを使用した。莢膜の有無はニグロシン（Sigma-Aldrich）を用いたネガティブ染色法により確認した(Morozumi & Nicolet, 1986)。粘液層はトルイジンブルー染色により可視化した。

表 4-1. 1/10 R2A 固形培地の組成

Peptone	0.05 g
Yeast Extract	0.05 g
Casamino Acids	0.05 g
Glucose	0.05 g
Soluble Starch	0.05 g
K ₂ HPO ₄	0.03 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.005 g
Sodium Pyruvate	0.03 g
Agar	15 g
Total	1 L (pH 6.0)

3. 電子顕微鏡観察

AX-7株細胞の微細構造を超薄切片の透過型電子顕微鏡観察により試みた。AX-7株細胞は1/10 R2A培地で10日間培養したものを使用し、凍結置換法(Yamaguchi *et al.*, 2009)により固定した。試料を専用銅ディスクに挟み、液体プロパン (-175°C) 中で急速凍結させた後、-80°C の2%四酸化オスミウム (アセトン-2%蒸留水中に調製) に浸漬して-80°C で48時間置いた後、-20°C で4時間、次いで-4°C で1時間置くことにより徐々に試料温度を上昇させた。室温に戻した四酸化オスミウム固定試料を無水アセトンに30分間2回、100%エタノールに30分間2回、最後に100%エタノールに一晩浸漬して脱水した。脱水試料にプロピレンオキシド (PO) を30分間2回浸透させ、POと樹脂 (Quetol-651; Nisshin EM Co., Tokyo, Japan) との70:30混合物に1時間入れた後、チューブのキャップを開いたままにし、POを一晩揮発させた。試料を新しい100%樹脂に移し、60°C で48時間重合させた。重合された樹脂はウルトラマイクロトーム (Ultracut UCT; Leica, Vienna, Austria) でダイヤモンドナイフを用いて80 nmで超薄切片化され、切片は銅グリッド上に載置された。室温で2%ウラニルアセテートで15分間染色し、蒸留水で洗浄した後、鉛染色溶液 (Sigma-Aldrich Co., Tokyo, Japan) を用いて室温で3分間2次染色した。透過型電子顕微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) により、グリッドをCCDカメラ (EM-14830RUBY2; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で撮影した。なお、培養以降の操作はすべて東海電子顕微鏡解析株式会社 (<http://www.tokai-ema.com/>) に委託した。

4. 生理生化学的特徴

4-1. 温度試験

温度試験は4°C、10°C、15°C、20°C、25°C、30°C、35°C、40°Cと50°Cで行った。

4-2. pH 試験

pH 試験には 1/10 R2A 培地の pH を 0.5 間隔で 3.0-9.0 に調整した培地を用いた。培地の pH を安定させるために以下の緩衝剤を用いた：20mM MES (pH5.0-6.5), 20mM MOPS (pH7.0-7.5), 20mM TAPS (pH8.0-9.0)。

4-3. NaCl 試験

AX-7 株の NaCl 試験には NaCl 濃度を 0.1 間隔で 0-10% (w/v) に調整した培地を用いた。

4-4. 基質利用試験

基質利用性試験には YNB 培地を元に調製した培地を用いた (0.67% yeast nitrogen base (Difco)、0.2% 試験用基質 [pH 6.0])。試験に使用した基質は以下の通りである：L-arabinose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-sorbose, L-rhamnose, D-tagatose, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-melibiose, D-sucrose, D-trehalose, D-turanose, D-melezitose, D-raffinose, xylitol, D-adonitol, *myo*-inositol, D-mannitol, D-sorbitol, salicin, inulin, starch, soluble starch, carboxymethyl cellulose, pectin, chitin (colloidal), xylan, gellan gum, xanthan gum, lignin。

窒素源の利用性には yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate (Difco) を元に作成した培地を用いた (0.17% yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0.2 % glucose, 0.05% 試験窒素源 [pH 6.0])。試験に使用した窒素は以下の通りである：ammonium sulfate、potassium nitrate, potassium nitrite, casamino acids, yeast extract (Kyokuto Pharmaceutical)。基質を含まない培地をネガティブコントロールとした。培養期間は 30 日で、測光比色計を用いて OD_{420 nm} を測定することによって増殖を評価した。培養液はネガティブコントロールと比較して光学密度の増加を示した場合は増殖に関して陽性であるとした (Abdelkafi, *et al.*, 2005)。

4-5. カタラーゼ・オキシダーゼ試験

1/10R2A 固形培地で 10 日培養した AX-7 株細胞を使用した。章 2 節の 3-5 と同様に行った。

4-6. 生化学的特徴

1/10R2A 固形培地で 10 日培養した AX-7 株細胞を使用した。3 章 3 節の 3-6 と同様に行った。

4-7. 嫌気環境下での増殖

3 章 3 節の 3-7 と同様に行った。

4-8. 抗生物質感受性試験

1/10 R2A 固形培地に形成させたコロニーを滅菌綿棒（メンティップ；日本綿棒株式会社）で採取し、液体培地にマクファーランド濁度が 0.5 になるように懸濁した。新しい綿棒を懸濁液に浸漬して菌体を採取し、平板培地全体に塗り広げた。しばらく置いて菌液が垂れない程度に乾燥した後、センシ・ディスク（日本ベクトン・ディッキンソン）を 2.5 cm 以上間隔を空けて置き、静置培養した。以下に使用したセンシ・ディスクを示す（括弧内は 1 ディスクあたりの抗生物質量（ μg ）を示す）：Ampicillin (10), Aztreonam (30), Carbenicillin (100), Cefotaxime (30), Cefoxitin (30), Ceftazidime (30), Ceftriaxone (30), Cephalothin (30), Ciprofloxacin (5), Colistin (10), Gentamicin (10), Lincomycin (2), Neomycin (30), Netilmicin (30), Novobiocin (30), Penicillin (10), Polymyxin (300), Sulfisoxazole (250), Tobramycin (10), Amikacin (30), Chloramphenicol (30), Erythromycin (15), Kanamycin (30), Ofloxacin (5), Tetracycline (30), Imipenem (10), Bacitracin (10), Doxycycline (30), Rifampin (5), Streptomycin (300), Vancomycin (10)。感受性の判定は Nokhal と Shlegel の基準(Nokhal & Schlegel, 1983) に従い、阻害ゾーンの直径が 13 mm 以上の場合は感受性 (S)、10–12 mm の場合を中間的な感受性（弱い感受性）(I)、10 mm 以下を耐性 (R) であると判断した。

5. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析

AX-7 株の 16S rRNA 遺伝子配列情報は遺伝子データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) に寄託した (寄託番号: LC318429)。AX-7 株と系統的に近縁な細菌基準株は第 2 章第 2 節と同様にして EzBioCloud データベース上で 16S rRNA 遺伝子配列の Blast 検索(Altschul, *et al.*, 1990)により明らかにした。分子系統解析に用いる *Armatimonadetes* 門の *Armatimonadia* 綱に所属する細菌基準株 (*Armatimonas rosea* YO-36^T) と 16S rRNA 遺伝子配列情報のみに基づく環境クローンの 16S rRNA 遺伝子配列は SILVA データベース (<https://www.arb-silva.de/>) から取得した。各配列は Web サーバー上の MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) でマルチプルアライメント後、phylip フォーマットで保存し、系統解析ソフト phylip-3.695 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) の dist コマンドで距離行列を作成した。距離行列ファイルを mothur v.1.39.5 プログラム (Schloss *et al.*, 2009)に取込み、cluster コマンド (カットオフ値は 0.03) で種レベルの操作的分類単位 (OTU) にまとめ、得られた 75 の OTU から get.oturep コマンドを用いて代表配列を選択した。系統樹の構築はこの代表配列を用い、第 3 章の第 2 節 4 と同様にして行った。進化モデルは、近隣系統樹の構築には Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980)を、最尤系統樹の構築には Model Test により最適と判断された進化モデル Tamura and Nei (Tamura & Nei, 1993) と座位のカテゴリー分類モデル Gamma Distributed with Invariant sites (Gu, *et al.*, 1995)を組み合わせたモデルを用いた。系統樹の各枝の分岐信頼性はブートストラップ法 (抽出回数 1,000 回) で検定した。外群として *Armatimonadetes* 門の中で *Armatimonadia* 綱に最も近縁な *Chthonomonadetes* 綱の中から選択した 5 系統群 (IAFpp721 (GU214142), A90 (JF429056), FFCH16596 (EU135023), R58 (EU445226), *Chthonomonas calidirosea* T49^T (HF951689)) の配列を用いた。

6. 化学分類学的特徴

ゲノム DNAG+C 含量の分析以外は 14 日間液体培養した菌体を、第 2 節の 5 と同様にして凍結乾燥した試料を使用した。

6-1. ゲノム DNA G+C 含量

AX-7 株細胞は中性多糖で構成される厚い粘液層に包まれていることから、通常のゲノム DNA 抽出法(Marmur, 1961)や Blood & Cell Culture DNA Midi Kit (QIAGEN) では精製度の高いゲノム DNA の抽出は出来なかった。多糖の除去工程を含む NucleoSpin Plant II Maxi (Macherey Nagel) や CTAB 法 (Wilson, 2001)でのゲノム DNA 抽出も試みたが十分な多糖除去が困難であった。従って、以下のように CTAB 法を改変した方法によって DNA を抽出・精製した。AX-7 株を 1/10 R2A 培地で対数増殖期後期まで培養し、遠心分離によって回収した。TE 緩衝液 (10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8.0]) で 2 回洗浄後、菌体湿重量 2 g に対して TESS (25 mM Tris-HCl [pH5.5]; 5 mM EDTA; 50 mM NaCl; 25% Sucrose) 12 mL と RNase A (10 mg/mL) 100 μ L およびリゾチーム (MERCK・100,000E/mg) 100 mg を加え、37°C で 30 分間保温した。懸濁液に 60 mg の SDS とプロテイナーゼ K (20 mg/mL; 和光) を加え、55°C で時々おだやかに攪拌しながら 2 時間保温して溶菌させて細胞溶解液を得た。細胞溶解液 (約 15 mL) に 2.7 mL の 5 M NaCl と 2.25 mL の CTAB 溶液 (10 % cetyltrimethylammonium bromide, 0.7 M NaCl) を加えて十分に混合し、65°C で 30 分間保温した。遠心分離 (10,000 rpm, 20 min, 4°C) により不溶物を沈殿として除き、上清 (約 14 mL) に TE 飽和フェノール (和光) を加え、5 分間穏やかに混合した。遠心分離 (10,000 rpm, 20 min, 4°C) によって形成された二層の上層を新しい遠心容器に移す操作を中間層の不溶物が視認されなくなるまで繰り返した。フェノール抽出液に等量のクロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) 混液を加えて、フェノール抽出と同様に抽出操作を繰り返した。クロロホルム：イソアミルアルコール抽出液 (約 14 mL) に 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.3) と等量のイソプロパノールを加えて十分に混合し、析出した DNA をガラス棒で巻き取り、75%エタノールですすい

だ後、風乾した。ガラス棒に巻き取った DNA を 2 mL の TE 緩衝液に溶解し、10 μ L の RNase A (1 mg/mL) を加えて 37°C で 60 分間保温した。フェノール抽出・クロロホルム：イソアミルアルコール抽出・イソプロパノール沈殿を上記と同様に繰り返して精製ゲノム DNA を得た。ゲノム DNA の G+C 含量は第 3 章第 2 節の 4-1 と同様にして求めた。

6-2. 菌体脂肪酸組成の分析

菌体脂肪酸は第 3 章第 2 節の 5-2 と同様にして抽出・精製した。分析はテクノスルガ・ラボに委託し、菌体脂肪酸組成分析システム“Sherlock Microbial Identification System” (MIDI 社) により行われた。脂肪酸ライブラリーには TSBA6 が使用された。

6-3. 呼吸鎖キノン分析

キノンの抽出・精製は第 3 章第 2 節の 5-3 と同様に行い、分析はテクノスルガ・ラボに委託した。

6-4. 極性脂質の TLC 分析

極性脂質の TLC 分析は第 3 章第 2 節の 5-4 と同様に行った。ただし、一般脂質の発色にはモリブデンリン酸を用いた。

7. 乾燥耐性試験

1/10R2A 培地でのスラント培養から白金耳にて菌体を回収し、24 穴の微生物培養用ポリスチレンプレート (アズワン) のウェルの底に塗りつけクリーンベンチ内で風乾した。室内に放置し、経時的に 1 mL の 1/10R2A 培地に再懸濁して全量を 9 mL の 1/10R2A 培地に移し、30°C で静置し、濁度計測により増殖能回復までの日数から乾燥耐性の程度を判定した。コントロールとして大腸菌 Y1090 株を用いた。

8. 飢餓耐性試験

AX-7 株は飢餓状態でも生残するかどうかを確認するために 30°C で 270 日に培養した AX-7 株培養液を 1/10R2A 培地に移植して培養した。

9. 固体表面への附着能の検定

第 3 章第 2 節の 8 と同様に行った。

10. AX-7 株および *Armatimonadetes* 門細菌と樹皮との関連性

AX-7 株はブナ樹皮から分離された *Armatimonadetes* 門に所属する細菌である。AX-7 株および *Armatimonadetes* 門細菌のブナや他の樹木の樹皮などとの関連性を 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を対象にしたアンプリコン解析により推測することを試みた。なお、材料・方法は第 5 章と共通しているので省略する。

第3節 結果

第1項 AX-7株の系統分類学的特徴

1. AX-7株の基本的な形態学的特徴

AX-7株のコロニー（培養14日目）はサイズが0.1–3.0 mm、性状は白色・不透明・円形・凸状・平滑でやや光沢があった（図4-1）。白金耳でコロニーに触れると弾性があり、崩すと糸を引くほどではないが粘性の感触があった。大型のコロニーは凸状の盛り上がり著しく、白金耳で抑えても形が崩れにくかった。小型のコロニーは大型のコロニーに比べて弾性も強度も弱かった。AX-7株の細胞（培養14日目）はグラム染色陰性で運動性はなく、幅が1.0–2.0 μm で長さが1.2–3.0 μm の端が丸い桿状形態を示した（図4-2）。通常は1細胞で存在したが、2細胞が連なることもあった。ニグロシン染色では細胞周囲に透明帯があり、莢膜を持つことが観察された（図4-5）。



図 4-1. AX-7 株のコロニー

バーは 2 mm。

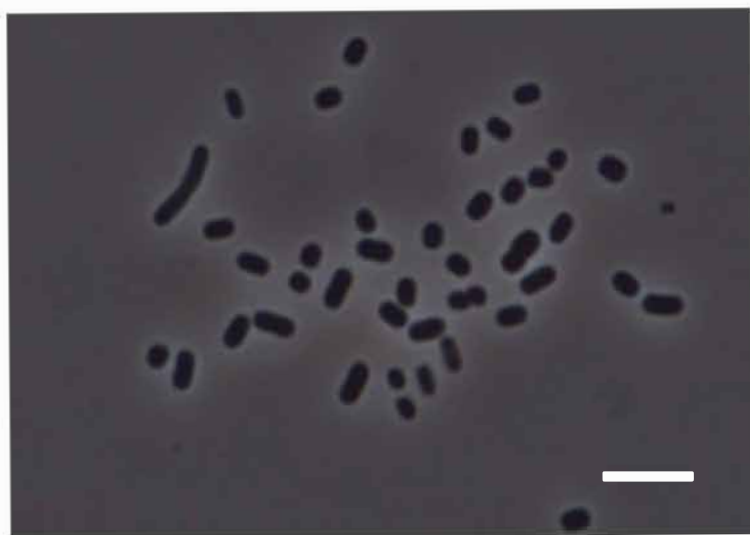


図 4-2. AX-7 株細胞の位相差顕微鏡像

バーは 5 μm 。

2. AX-7 株の細胞の微細構造

AX-7 株細胞の超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察して詳細な微細構造を明らかにした (図 4-3)。なお、参考のためトルイジンブルー染色した切片の光学顕微鏡像も示す (図 4-4)。AX-7 細胞はペプチドグリカンが薄く明確な構造が確認できないのに対して内膜 (細胞質膜) と厚い外膜を有するというグラム染色陰性細菌に共通する特徴を有していた。細胞の周囲には線毛の形成が確認された。線毛の長さと同程度の厚さの莢膜で細胞が覆われ (図 4-3C, D)、さらにその周囲には粘液層と推定される厚い構造があり複数の細胞がその構造に包まれていた。この構造はトルイジンブルーでは赤紫色に呈色せず (陰性)、中性糖の多糖で構成される粘液層であると考えられた。

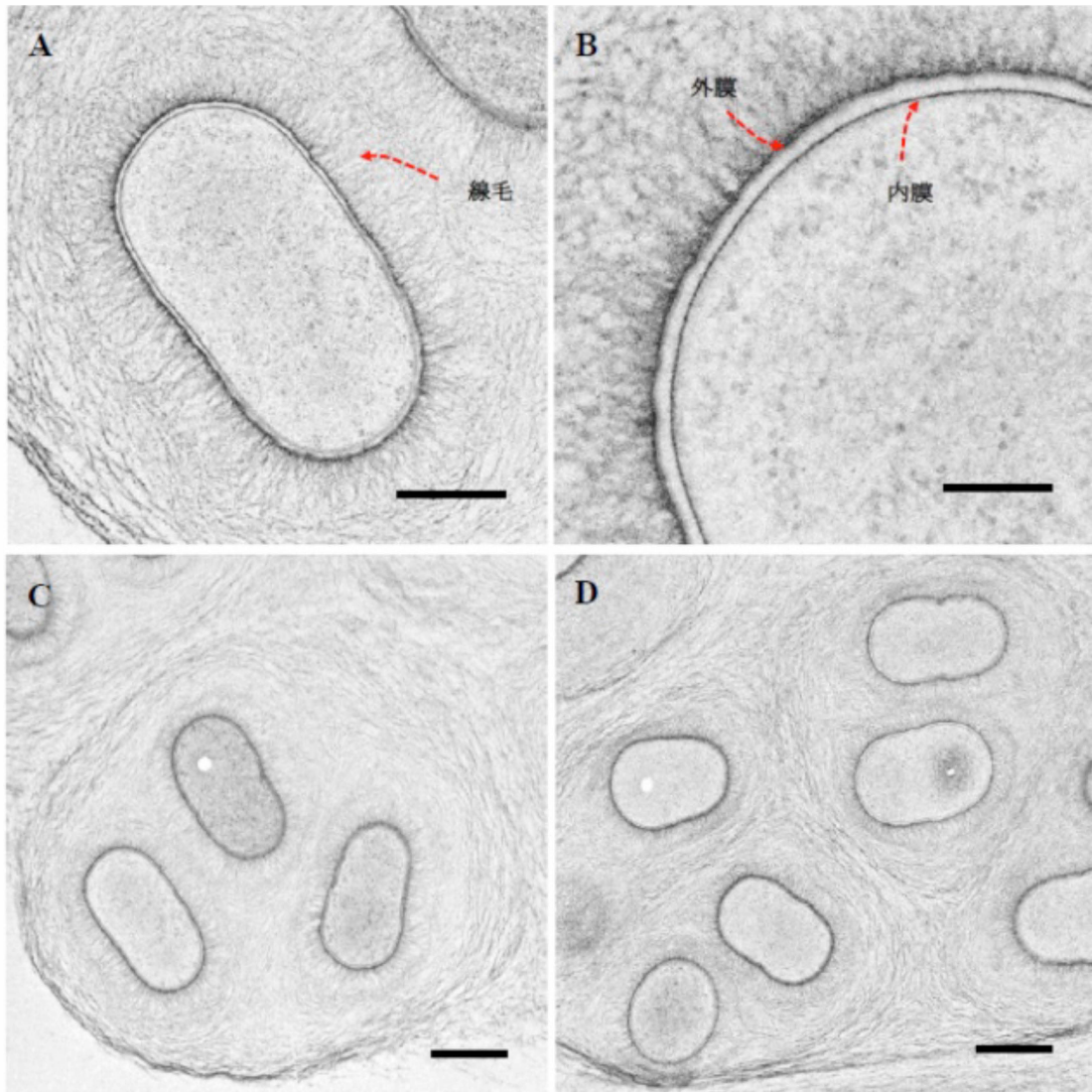


図 4-3. AX-7 株細胞超薄切片の透過型電子顕微鏡像

A のバーは 1 μm ; B のバーは 400 nm ; C と D のバーは 1 μm 。

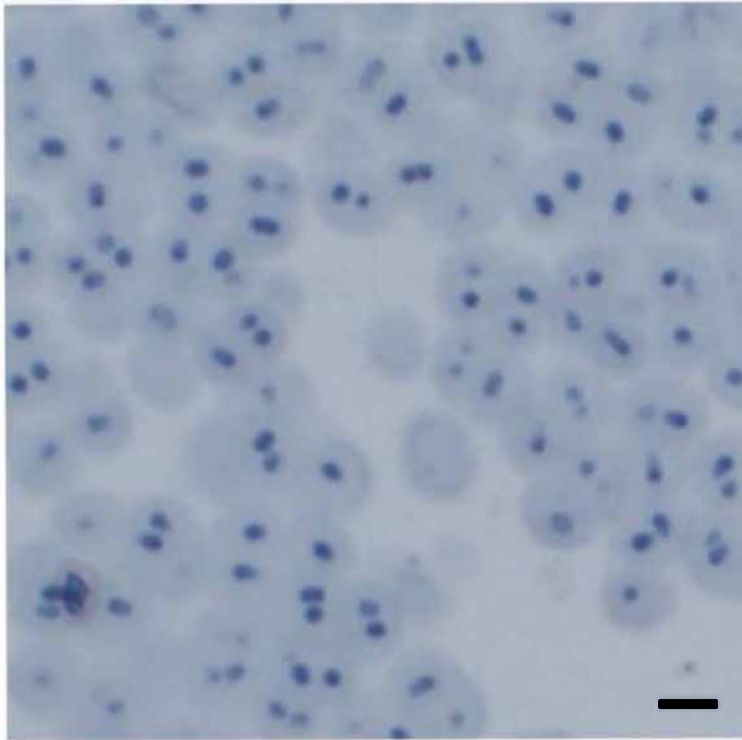


図 4-4. トルイジンブルー染色した切片の光学顕微鏡像
バーは 5 μm 。

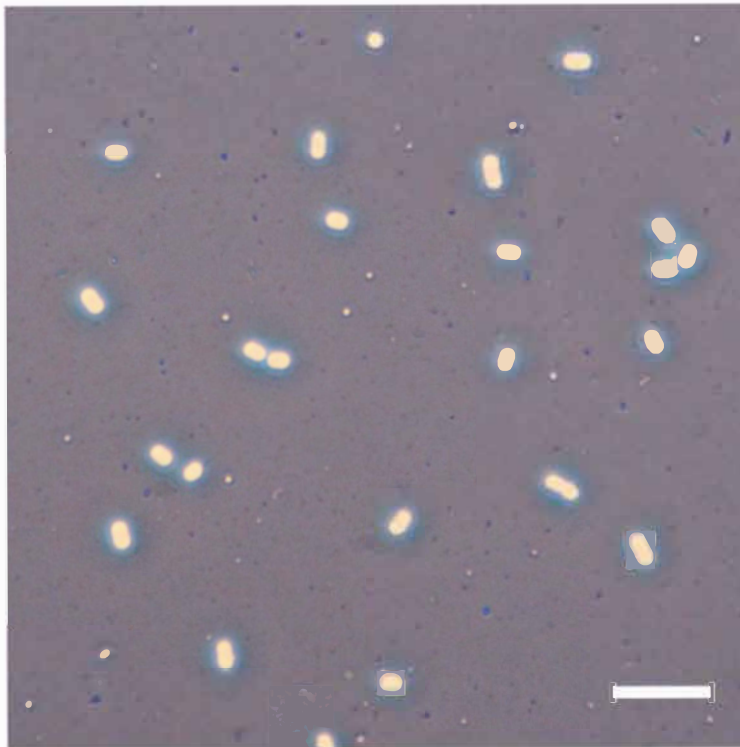


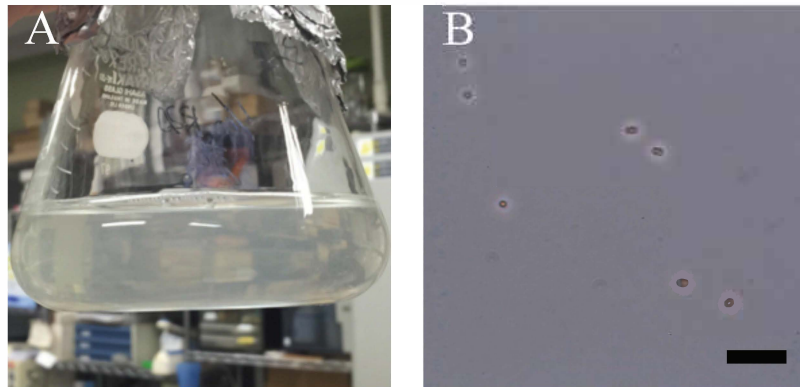
図 4-5. ニグロシンによる AX-7 株細胞莢膜のネガティブ染色
バーは 10 μm 。

3. 培養条件が AX-7 株の粘液層様構造に及ぼす影響

本節 2 において AX-7 株細胞は莢膜と厚い粘液層構造に包まれていることがわかった。そこで、この構造に培養条件が及ぼす影響を調べた。AX-7 株は静置培養では細胞が分散せずに綿状の凝集体を形成し、その凝集体が培養液下層で数 cm にまで成長することが視認され（図 4-6A）、多数の細胞が粘液層構造で包まれている様子が観察された（図 4-6B）。振盪培養では視認可能な凝集体の形成はみられず、細胞の多くが単細胞で存在することから、粘液層構造が剥離していることが考えられた。

液体培地で静置培養した AX-7 株の細胞形態変化を経時的に観察した結果を図 4-7 に示した。培養開始の際（1 日目）には多くが単独の細胞で存在していたが、培養日数が経過するにつれて多数の細胞を包むように粘液層構造が成長した（4 日目～20 日目）。培養 150 日目では粘液層構造は観察されず、培養初期や振盪培養の細胞と同様に単独の細胞で存在した。このとき、培養液粘度が培養初期の細胞に比較して上昇していたことから、粘液層様構造が培地中に剥離したものと考えられた。

振盪培養



静置培養

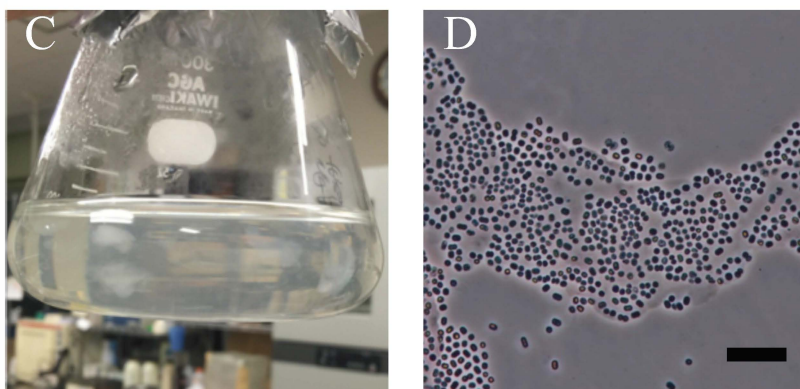


図 4-6. 培養における振盪が AX-7 株の粘液層構造に及ぼす影響

A と C は培養の性状、B と D はトルイジンブルー染色でコントラストをつけた
莖膜 (B) と粘液層様構造 (D) の位相差顕微鏡像。バーは 10 μm 。

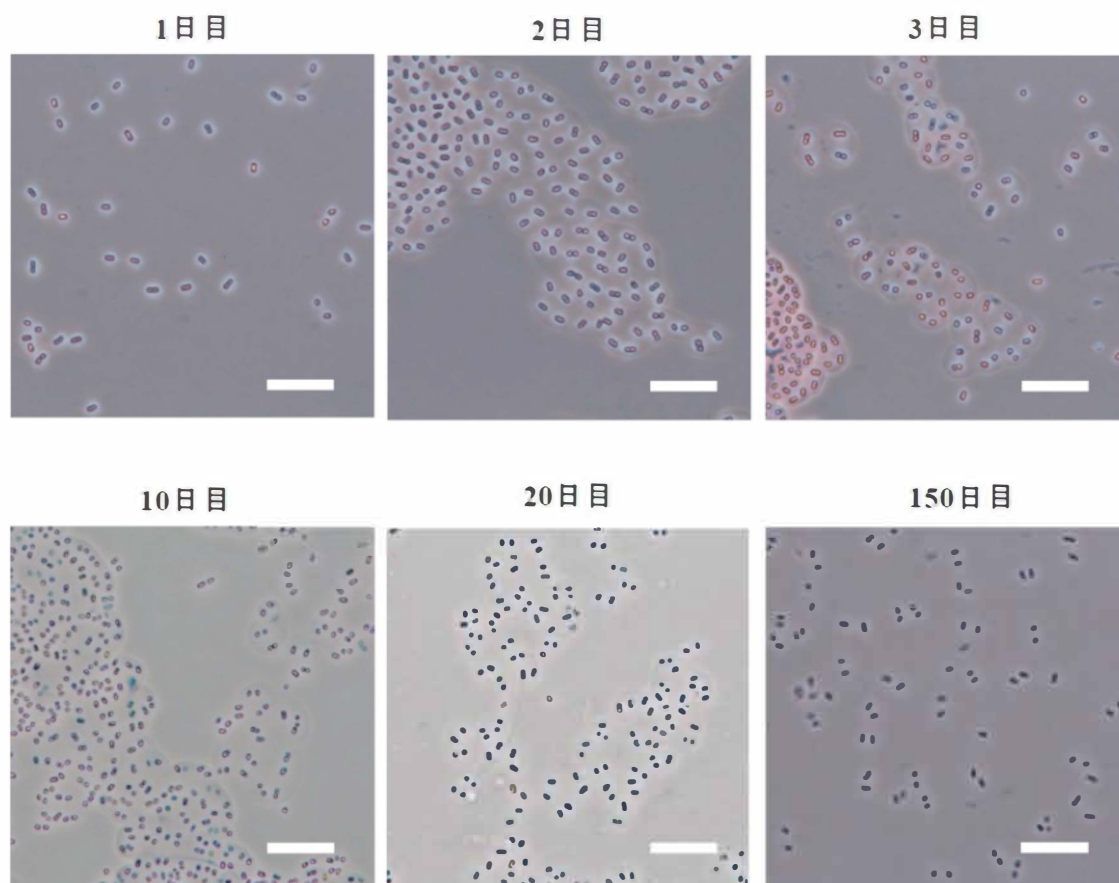


図 4-7. AX-7 株細胞のトルイジンブルー染色

写真の上は培養日数。バーは 10 μm 。

4. AX-7 株の生理生化学的特徴

AX-7 株の増殖可能温度範囲は 10–37°C（至適温度: 30°C）、増殖可能 pH 範囲は pH 5.0–7.0（至適 pH : 6.0）、増殖可能 NaCl 濃度範囲は 0–1.0%（至適 NaCl 濃度:0 %）であり、中温性・好弱酸性で耐塩性がないという性質を示した。AX-7 株は好気性で嫌気条件下での増殖は観察されなかった。AX-7 株の増殖基質を表 4-2 に示した。D-glucose よりも良好な増殖が観察された基質は D-sucrose、soluble starch、D-maltose、D-cellobiose、xylan、starch でそれらの中では D-sucrose 基質とした場合の増殖が最も良好であった。利用可能な窒素源は硫酸、硝酸、カザミノ酸及び酵母エキスで亜硝酸は利用しなかった。AX-7 株細胞のカタラーゼ活性は陽性でオキシダーゼ活性は陰性であった。API ZYM、API 20NE 及び API 20E の試験結果を表 4-3、4-4、及び 4-5 に示した。抗生物質の試験結果を表 4-6 に示した。AX-7 株は検定した 32 種類の抗生物質のうち、8 種類に対して感受性（Sensitive）、5 種類に対して弱い抵抗性（Intermediate）、残りの 19 種類に対して抵抗性（Resistant）を示した。

表 4-2. AX-7 株の増殖基質利用性

利用性	基質名
利用	L-arabinose, D-xylose, D-galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, L-rhamnose, D-cellobiose, D-lactose, D-maltose, D-melibiose, D-sucrose, D-turanose, D-raffinose, inulin (weak) , starch, soluble starch, pectin, xylan
非利用	L-sorbose, D-tagatose, D-trehalose, D-melezitose, D-mannitol, D-sorbitol, xylitol, D-adonitol, <i>myo</i> -inositol、 salicin, carboxymethyl cellulose, acid washed cellulose, chitin (colloidal) , gellan gum, xanthan gum

表 4-3. AX-7 株の API ZYM 試験

試験項目	判定
Alkaline phosphatase	+
Esterase (C4)	+
Esterase lipase (C8)	w
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	-
Valine arylamidase	-
Cystine arylamidase	-
Trypsin	-
Chymotrypsin	-
Acid phosphatase	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -Galactosidase	+
β -Galactosidase	+
β -Glucuronidase	w
α -Glucosidase	+
β -Glucosidase	+
<i>N</i> -acetyl- β -glucosaminidase	+
α -Mannosidase	+
α -Fucosidase	w

+, 陽性; -, 陰性; w, 弱陽性

表 4-4. AX-7 株の API 20NE 試験

試験項目	判定
Nitrate reduction	-
Indole production	-
Acid from glucose	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
β -Glucosidase	-
(protease)(esculin)	-
Gelatinase	+
β -Galactosidase	-

+, 陽性; -, 陰性; w, 弱陽性。

表 4-5. AX-7 株の API 20E 試験

試験項目	判定
β -galactosidase (Ortho Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosidase)	+
Arginine Dihydrolase	-
Lysine Decarboxylase	-
Ornithine Decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophane Deaminase	-
Indole production colorless	-
Acetoin production (Voges Proskauer)	-
Gelatinase	-

+, 陽性; -, 陰性。

表 4-6. AX-7 株の抗生物質感受性試験

試験項目	判定*
Ampicillin (10)	R
Aztreonam (30)	R
Carbenicillin (100)	R
Cefotaxime (30)	R
Cefoxitin (30)	S
Ceftazidime (30)	R
Ceftriaxone (30)	R
Cephalothin (30)	R
Ciprofloxacin (5)	I
Colistin (10)	R
Gentamicin (10)	R
Lincomycin (2)	R
Neomycin (30)	R
Netilmicin (30)	R
Novobiocin (30)	R
Oxacillin (1)	R
Penicillin (10)	R
Polymyxin (300)	R
Sulfisoxazole (250)	R
Tobramycin (10)	R
Amikacin (30)	I
Chloramphenicol (30)	S
Erythromycin (15)	S
Kanamycin (30)	I
Ofloxacin (5)	I
Tetracycline (30)	I
Imipenem (10)	S
Bacitracin (10)	S
Doxycycline (30)	S
Rifampin (5)	S
Streptomycin (300)	S
Vancomycin (10)	S

*S: 感受性; I: 中間的な感受性; ; R: 耐性

5. AX-7 の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

AX-7 株の 16S rRNA 遺伝子配列 (1,431 bp) を Genbank/EMBL/DDBJ に登録した (アクセッション番号 LC318429)。EzBioCloud データベースでの Blast 検索の結果、AX-7 株と 16S rRNA 遺伝子配列相同性が最も高かったのは *Armatimonas rosea* YO-36^T の 88.1% で、次いで高かったのが *Desulfotomaculum putei* SMCC W459^T の 81.8%、*Fimbriimonas ginsengisoli* Gsoil 348^T の 81.7%、*Desulfotomaculum aquiferis* Bs105^T の 81.6%、*Chthonomonas calidirosea* T49^T の 81.5% であった。予備的な系統解析により、AX-7 株は *A. rosea*、*F. ginsengisoli* および *C. calidirosea* が所属する *Armatimonadetes* 門に位置し、12 ある *Armatimonadetes* 門内の単系統群グループ (Dunfield, *et al.*, 2012; Lee, *et al.*, 2013) の中でグループ 1 と 2 で構成される *Armatimonadia* 綱に所属することが示唆された。そこで、*Armatimonadia* 綱 に所属するクローン配列を SILVA データベースから取得し、*mothur* で種レベルの OTU にまとめた後、代表配列を用いて構築した近隣系統樹と最尤系統樹により AX-7 株の *Armatimonadia* 綱における系統的位置を視覚化した (図 4-8)。系統解析には *Armatimonadia* 綱の姉妹綱 (sister class) である *Chthonomonadetes* 綱 (グループ 3) の 5 配列を外群とした。系統樹構築に用いた 108 配列と AX-7 株の配列は 80 と 29 の配列で構成される 2 つの単系統群に大きく別れた。80 配列の系統群には *Armatimonadetes* 門の基準株である *A. rosea* YO-36^T が含まれ多くの配列はグループ 1 (Lee *et al.*, 2013) に所属していることから *Armatimonadales* 目であることが考えられた。AX-7 株が位置する系統群の配列の多くはグループ 2 (Lee, *et al.*, 2013; Lee, *et al.*, 2013) と共通しており、AX-7 株を除いてすべて環境クローンであることから、AX-7 株で代表される目レベルで新規な系統群であることが示唆された。AX-7 株と最も近縁な OTU は 99.0% の配列相同性を示したポリ塩化ビフェニル汚染土壌の由来クローン WD294 (GenBank アクセッション番号: AJ292686) (Nogales *et al.*, 2001) で、配列相同性が 96.1% のアルプスツンドラ土壌由来クローン bac2nit51 (EU861949) がそれに次ぎ、いずれも AX-7 株と同じ系統群に位置づけられた (図 4-8)。

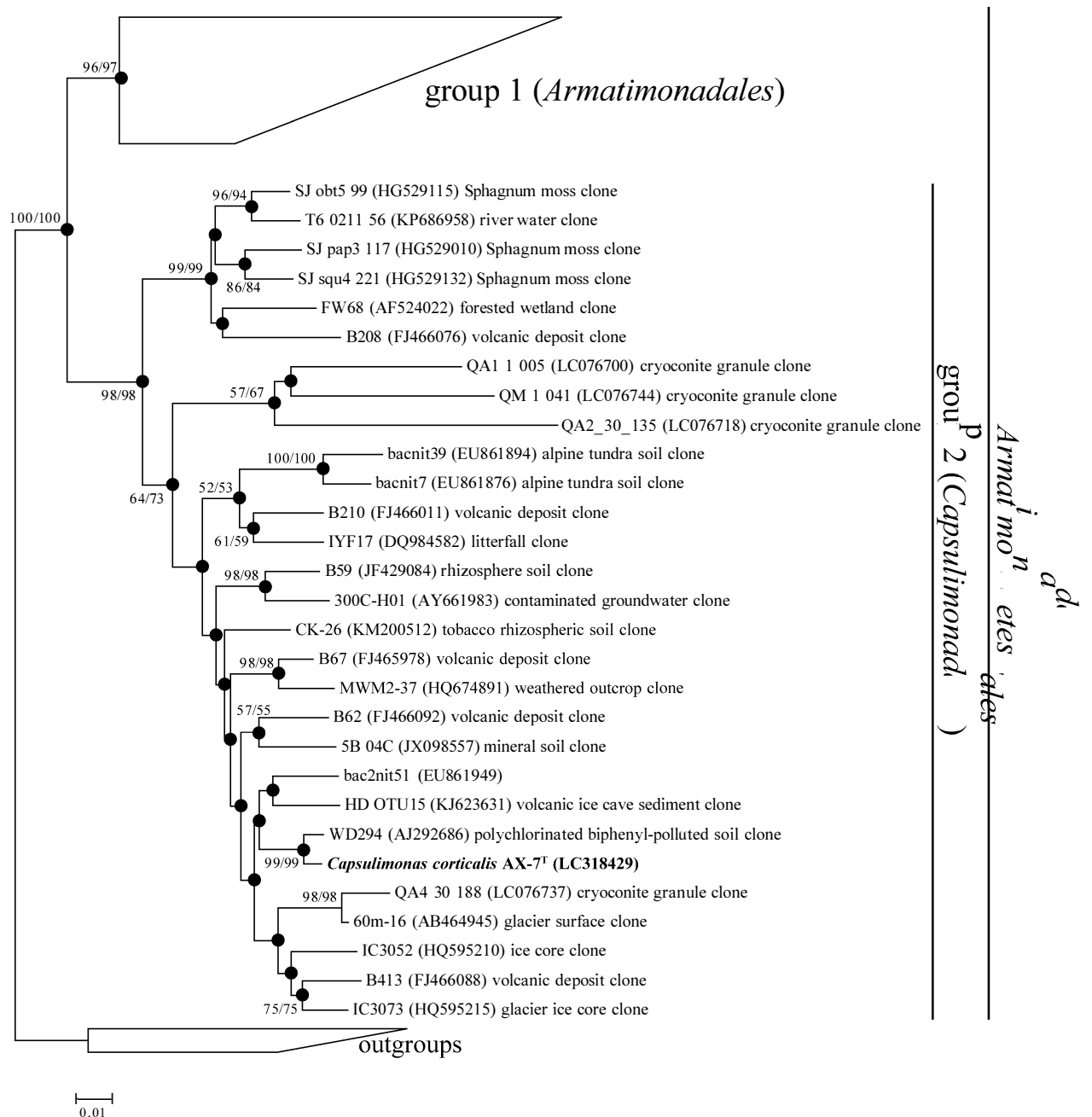


図 4-8. AX-7 株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた近隣結合系統樹

近隣系統樹と最尤系統樹の両方で分岐が再現されたノードには黒丸を付した。各ノードに 50%以上のブートストラップ値（近隣系統樹/最尤系統樹：NJ/ML）を示した。括弧内は遺伝子配列の GenBank/EMBL/DDBJ データベースアクセス番号。スケールバーは座位あたりの塩基置換数。*Thermus aquaticus* YT-1^T は外群。

6. AX-7 株の化学分類学的特徴

6-1. ゲノム DNA G+C 含量

AX-7 株のゲノム DNA G+C 含量は 61.0 mol%であった。

6-2. 菌体脂肪酸組成

AX-7 株の菌体脂肪酸組成の結果を表 4-7 に示した。菌体細胞脂肪酸組成のうち主要脂肪酸 (>10%) は C_{16:1} ω₁₁c (24.5%)、C_{16:1} ω₅c (42.8%)、C_{16:0} (18.8%)、及び C_{14:0} (10.6%)であった。

6-3. 呼吸鎖キノン分析

AX-7 株の呼吸鎖キノンとしてメナキノン MK-9 (95.9%) と MK-10 (4.1%) の 2 種類のみが検出された。

6-4. 極性脂質の TLC 分析

AX-7 株の極性脂質 TLC 分析の結果を図 4-9 に示した。検出された極性脂質は全部で 11 種であり、標準物質と一致するものはなかった。すべて未同定であるが以下の脂質に分類された。Dittmer-Lester 染色に陽性のリン脂質が 4 種で、残りはアニスアルデヒド、ニンヒドリン、ドラーゲンドルフの染色に陰性であった。

表 4-7. AX-7 株の細胞脂肪酸組成

脂肪酸	組成
Saturated:	
C _{11:0} iso	tr
C _{12:0} iso	tr
C _{13:0}	tr
C_{14:0}	10.6
C _{15:0} iso	tr
C_{16:0}	18.8
C _{17:0}	tr
C _{18:0}	tr
Unsaturated:	
C _{13:1} (at 12-13)	tr
C_{16:1} ω11c	24.5
C_{16:1} ω5c	42.8
C _{18:1} ω9c	tr
Summed features* :	
C _{13:0} 3OH/C _{15:1} iso H	tr
C _{16:1} ω6c/C _{16:1} ω7c	tr
C _{17:1} iso I/ C _{17:1} anteiso B	0.6

* 0.5%以上の任意の脂肪酸が示されている。tr:トレース; -: 検出されず; ω: メチル末端からの二重結合の位置; c: cis の異性体。10%以上の主要脂肪酸は太字で示している。合計した特徴は MIDI システムで GC 分離できない脂肪酸を表に示す。

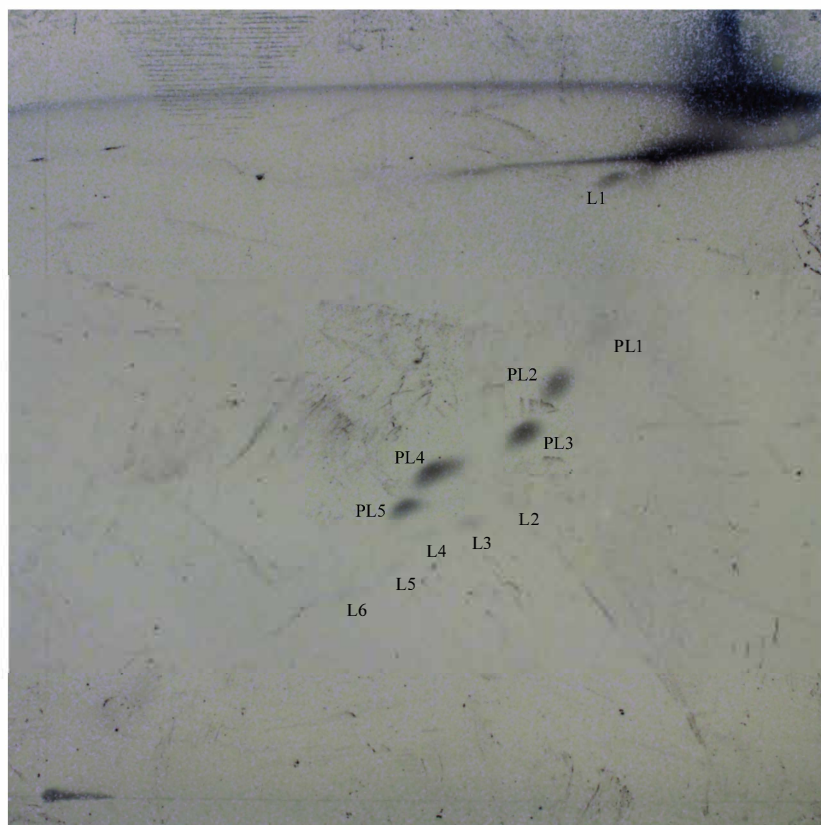


図 4-9. AX-7 株の極性脂質の二次元 TLC

L: 未同定極性脂質; PL: リン脂質。

第2項 AX-7株の生態学的特徴

1. AX-7株の乾燥耐性

AX-7株の乾燥耐性は、乾燥後に室内環境に放置し、増殖能を回復するかどうかで検定した。図4-10に増殖が確認できるまでの日数を示した。独立した実験を2回行った結果、放置日数が増加するに従って増殖開始までの日数が長くなり、24日間の放置では増殖開始までに7~9日を要した。32日間の放置後は増殖能の回復は観察されなかった。なお、コントロールとした大腸菌Y1090の場合は乾燥後の増殖能の回復はみられなかった。

2. AX-7株の飢餓耐性

AX-7株は飢餓状態でも生残するかどうかを確認するため、30℃で270日間培養したAX-7株培養液を1/10R2A培地に移植して培養したところ、コロニーの形成が確認され、飢餓状態でも生残することが示された。

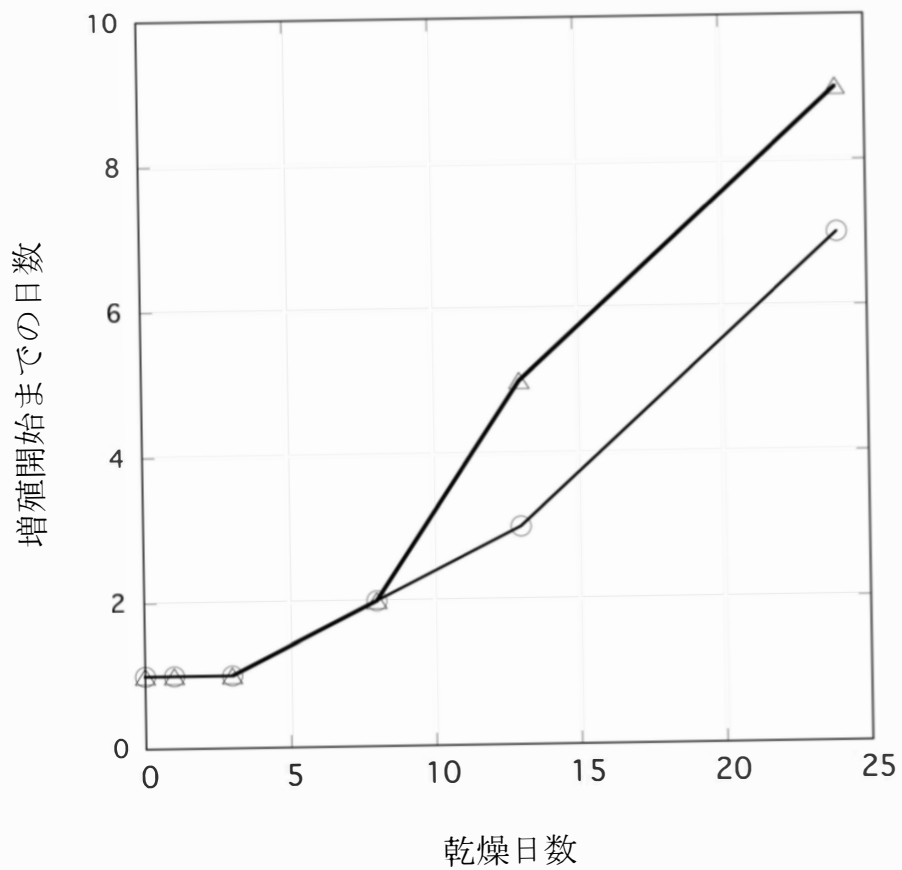


図 4-10. AX-7 株の乾燥耐性

乾燥後の増殖開始までの日数で乾燥耐性能を検定。Δ: 実験 1; ○実験 2。

3. 樹皮細菌群集内での AX-7 株と *Armatimonadetes* 門の位置付け

第 5 章で詳述する樹皮細菌群集解析において、ここでは AX-7 株と AX-7 株が所属する *Armatimonadetes* 門についての結果を記す。第 5 章の表 5-6 に示すように、樹皮細菌群集に占める *Armatimonadetes* 門細菌の比率は、ブナで 2.4%、ホオノキで 2.1%、イタヤカエデで 1.6%、ミズナラで 1.5%、ヤマナラシで 1.1%、ウダイカンバで 0.8%、スギで 1.1%、カラマツで 1.0%といずれの樹種においても低い構成比率であった。なお、同じく第 5 章の表 5-12 ではブナ葉面とブナ樹下土壌の細菌における *Armatimonadetes* 門細菌の構成比率が示されており、それぞれ 0.1%と 0.3%で樹皮細菌群集における値より低かった。表 4-8 に樹皮細菌群集における *Armatimonadetes* 門細菌の構成を示した。全樹種で *Armatimonadia* 綱の比率が最も高かった。AX-7 株が所属すると推定される目レベルのグループ FW68 はヤマナラシでの比率が非常に低いのに対して、スギ・カラマツでは 90%を超えており、スギでは 97.5%と *Armatimonadetes* 門のほぼ全てが FW68 であった。AX-7 株が分離されたブナでは FW68 の比率は 82.5%とウダイカンバの 84.1%に次いで高かった。2018 年 6 月現在 3 属 3 種しか正式記載のない *Armatimonadetes* 門細菌であるが、そのうちの 2 属が全ての樹種で検出され、特に *Fimbriimonas* についてはホオノキ・イタヤカエデ・ミズナラ・ヤマナラシの樹皮で *Armatimonadetes* 門内の主要属であった。

表 4-9 に AX-7 株と種レベルで共通する OTU の樹種別平均リード数を示した。ヤマナラシでは AX-7 株と種レベルで相同な配列は検出されなかったが、その他の樹種では複数の配列が検出された。ホオノキ・イタヤカエデ・スギ・カラマツでは樹皮の *Armatimonadetes* 門では主要な OTU であることが示された。特に、スギでは *Armatimonadetes* 門細菌の 60%近くを占めており、AX-7 株と同種の *Armatimonadetes* 門細菌はスギと関連が深いことが示唆された。

ブナ樹下土壌とブナ葉面の細菌群集には AX-7 と種レベルで一致する OTU は存在せず、このことから AX-7 株はブナを含む樹木の樹皮と関連が強いことが考えられた。

表 4-8. 樹皮細菌群集における *Armatimonadetes* 門細菌の構成 (%)

分類階級				樹種							
綱	目	科	属	ブナ	ホオノキ	イタヤカ エデ	ミズナラ	ヤマナラ シ	ウグイカ ンバ	スギ	カラマツ
0319-6E2				0.0	0.0	0.0	2.6	0.2	0.0	0.0	0.0
<i>Armatimonadia</i>	<i>Armatimonadales</i>	<i>Armatimonadaceae</i>		7.1	6.4	24.3	18.4	57.8	7.1	0.6	1.1
<i>Armatimonadia</i>	FW68			82.5	76.0	44.5	37.4	1.6	84.1	97.5	92.7
<i>Chthonomonadetes</i>	<i>Chthonomonadales</i>	<i>Chthonomonadales</i>		4.1	3.2	12.4	23.5	7.5	4.1	0.0	0.1
<i>Chthonomonadetes</i>	<i>Chthonomonadales</i>	<i>Chthonomonadales</i>	<i>Chthonomonas</i>	0.1	0.1	0.4	2.5	7.2	0.0	0.0	0.0
<i>Fimbriimonadia</i>	<i>Fimbriimonadales</i>	<i>Fimbriimonadaceae</i>	<i>Fimbriimonas</i>	6.2	14.4	18.1	13.3	25.6	4.7	1.9	6.1

表 4-9. 樹皮細菌群集の *Armatimonadetes* 門 OTU の樹種別リード数と AX-7 と種レベルで一致する OTU の樹種別リード数

分類・項目	樹皮細菌群集のアンプリコン解析における <i>Armatimonadetes</i> 門 OTU の平均リード数							
	ブナ	ホオノキ	イタヤカエデ	ミズナラ	ヤマナラシ	ウグイカンバ	スギ	カラマツ
<i>Armatimonadetes</i>	1,584	1,191	1,304	1,103	1,107	262	311	378
<i>Armatimonadia</i>	1,419	981	897	616	658	239	305	354
FW68	1,307	905	580	413	18	220	303	350
AX-7 と種レベルで一致する配列	76	186	24	63	0	34	183	117
AX-7 と種レベルで一致する配列の <i>Armatimonadetes</i> における比率 (%)	4.8	15.6	1.8	5.7	0	13.0	58.8	31.0

第4節 考察

1. AX-7株の系統分類学的特徴

*Armatimonadetes*門に所属する3種の基準株の共通な特徴は、グラム染色陰性・好気性・主要細胞脂肪酸としてC_{16:0}を含む、低栄養培地を好む、グラム染色陰性と少ない(Im, *et al.*, 2012; Lee, *et al.*, 2011; Lee, *et al.*, 2014; Tamaki, *et al.*, 2011)。AX-7株の特徴はこれらの既存株の特徴と一致した。既存株と最も異なるAX-7株の特徴は厚い粘液層(図4-3~5)を形成することである。通常、粘液層は莢膜の一種で細胞表層にゆるく附着し、液体培養では剥がれて培地中に拡散するとされる(Kim & Gadd, 2008)。AX-7株の粘液層は液体培養液内でも容易には剥がれず、激しく振盪することで厚い層は観察されなくなるが、細胞周囲には莢膜構造が残っている(図4-6)。図4-3からは粘液層内に複数の細胞が包まれ、さらに粘液層同士が結合して大きく成長している様子が伺える。筆者の知る限り、細菌においてこのような構造が報告された例はなく、極めて特徴的な構造であると考えられた。なお、一ヶ月以上経過した培養液では培地の粘性が増加することから、古い培養液では粘液層が剥離するものと思われる。このAX-7株の粘液層はトルイジンブルー染色陰性であることから中性多糖による構造であると予想された。弘前大学の吉田によるとグルコースを主要な構成糖とする中性多糖でゲルろ過では分子量推定が困難なほど巨大な分子であるらしい(吉田私信)。

16S rRNA遺伝子配列の相同性から既存種の中でAX-7株と最も近縁であると推定されたのは*A. rosea*で、基準株のYO-36^Tとは88.1%の相同性であった。16S rRNA遺伝子配列に基づいて構築した系統樹(図4-8)において、AX-7株は*Armatimonadetes*門を構成する10のサブグループ(Lee, *et al.*, 2013)の中で、グループ2のOTUと単系統群を形成した。グループ2はFW48と表記される場合もある(Yeoh *et al.*, 2017)グループ1(*A. rosea*を基準種とする*Armatimonadales*目)とともに*Armatimonadia*綱を形成する目レベルのグループである。グループ2のOTU中でAX-7株と最も近縁であったのはポリ塩化ビフェニル汚染土壌から回収された環境クローンWD294(Nogales *et al.*, 2001)であり、99%の相同性を示した。この値から両者は種レベルで同一な分類群であると考えられるが生

息環境的には離れていた。公開データベース（GenBank/EMBL/DDBJ; SILVA; RDP;s Greengenes）にはWD294以外にAX-7株と種レベルで同一なOTUは存在しなかった。グループ2内には2つのクラスターが形成され、AX-7株はそのうちOTUの多い方のクラスターに位置づけられた。このクラスター内のクローンは土壌などの地圏から回収されていること以外に共通性は認められず、両クラスターともAX-7以外に葉圏由来のクローンは存在しなかったことから、グループ2を構成する細菌の生息環境は多様であることが推定された。

16S rRNA遺伝子配列がAX-7株と97%以上の相同性を示す既存種は存在しないことから、StackebrandtとGoebel(1994)の基準に基づくAX-7株は新種細菌の培養株である。また、16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析によって、AX-7株はArmatimonadates門のグループ2のOTUと単系統群を形成することと、同グループ内に正式記載された種が存在しないことが確認された。以上のことから、AX-7株は目レベルで新規な細菌であると判断し、以下のようにArmatimonadia綱の下に新目・新科・新属・新種を創設した。なお、記載文は省略した。属名はAX-7株細胞が莢膜で覆われることに、種形容語はAX-7株が樹皮から分離されたことに因む。なお、以下の記載は2018年6月の時点でIJSEMに提案中であることを記しておく。

Description of *Capsulimonas* gen. nov.

Capsulimonas (Cap.su.li.mo'nas. L. fem. n. capsula capsule in biology; L. fem. n. monas a unit, monad; N.L. fem. n. *Capsulimonas*, capsulated monad).

Description of *Capsulimonas corticalis* sp. nov.

Capsulimonas corticalis (cor.ti.ca'lis. N. L. fem. adj. corticalis cortical, of the tree trunk surface, the source of the type strain).

Description of *Capsulimonadaceae* fam. nov.

Capsulimonadaceae (Cap.sul.i.mo.na.da.ce'ae. N.L. fem. n. *Capsulimonas* type genus of the family; -aceae ending to denote a family; N.L. fem. pl. n. *Capsulimonadaceae* the family of the genus *Capsulimonas*).

Description of *Capsulimonadales* ord. nov.

Capsulimonadales (Cap.su.li.mo.na.da'les. N.L. fem. n. *Capsulimonas* type genus of the order; -ales ending to denote an order; N.L. fem. pl. n. *Capsulimonadales* the order of the genus *Capsulimonas*).

2. AX-7 株と *Armatimonadetes* 門細菌の生態学的特徴

AX-7 株は種々の糖質を増殖基質として利用することが出来る (表 4-2)。これらの基質のうち、樹皮から検出されているのは D-galactose、D-glucose、D-fructose である (表 5-13)。この 3 つの糖質は樹皮成分としては主要ではないが、AX-7 株は樹皮ではこれらを利用しているであろう。AX-7 株の特徴として厚い莢膜を形成し、さらに複数の細胞が粘液層に包まれることが他の既知細菌とは明確に異なる特徴として挙げられる。莢膜・粘液層は多糖と蛋白質で形成される細胞表層構造で、重金属などの毒性物質に対する防護壁としての機能、保湿効果による乾燥耐性、原生動物による食作用からの防御、ファージ感染の防御、固体表面附着の促進、など様々な機能を有している (Kim & Gadd, 2008; Singleton, 2006)。AX-7 株の高い乾燥耐性 (図 4-10) や多くの抗生物質に耐性を示す性質 (表 4-6) は AX-7 株の厚い莢膜と粘液層の寄与するところが大きいものと考えられる。乾燥耐性試験ではクリーンベンチ内での送風により強制的に菌体を乾燥させたが、1 白金耳程度の量でも一晩を要したことから、AX-7 株の粘液層は非常に高い保湿能を有しているものと思われる。AX-7 株の固体表面への附着は観察されなかった。細菌の固体表面への附着の第一段階は自身や他の細菌が生産する細胞外ポリマーやイオンによってコンディショニングフィルムが形成されることから開始する (岡部, 2012)。AX-7 株の粘液層に由来する細胞外多糖はコンディショニングフィルム形成能をもたないのである。従って、AX-7 株は固体表面 (樹皮) には単独では附着せず、他の細菌群によりすでに形成されたバイオフィルムに二次的に起こるものと推察される。

16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析 (表 5-5~9, 12) によると樹皮細菌群集における *Armatimonadetes* 門細菌の比率は 0.8~2.4% で大きな比率ではないが、ブナでは *Proteobacteria* (41.5%)、*Acidobacteria* (31.0%)、*Bacteroidetes* (20.4%) の各門に次いで 4 番目の構成比率であった (表 5-6)。他の樹種の樹皮細菌群集においても *Armatimonadetes* 門は構成比率では 4 番目か 5 番目に位置づけられた (表 5-6)。土壌やブナ葉面の細菌群集ではそれぞれ 0.1% と 0.3% が *Armatimonadetes* 門の構成比率であることから (表 5-12)、*Armatimonadetes* 門はこの 2 つの環境に比べれば樹皮を好むことが考えられた。葉面の細菌群集における *Armatimonadetes* 門の構成比率に関する詳細が紹介された報告は少ない。Laforest-Lapointe ら(2016)はカナダ・ケルベック州の森林で優占する 5 樹種 (広葉樹: *Acer saccharum*, *Acer rubrum*, *Betula papyrifera*; 針葉樹: *Abies balsamea*, and *Picea glauca*) の葉面細菌群集を網羅的に解析し、*Armatimonadetes* 門細菌は針葉樹と有意に関連することを明らかにしている。Laforest-Lapointe ら(2016)の報告では *Armatimonadetes* 門について数値的なデータは掲載されていないが、掲載図からはどの樹種においても細菌群集に占める割合は 1% 未満であると判断される。Lambais ら(2017)はブラジルの森林で行った広葉樹 4 種 (*Mollinedia schottiana*, *Ocotea dispersa*, *Ocotea teleiandra*, *Tabebuia serratifolia*) を対象にした研究により、*Armatimonadetes* 門細菌は葉面細菌群集の 1~10% を構成するという結果を得ているが、本文での本門細菌への言及はない。アメリカのテネシー州ブラント群の樹木栽培試験場で実施された *Populus* 属樹木の葉圏・根圏・周辺土壌の細菌群集解析において *Armatimonadetes* 門の細菌群集に占める比率は、葉全体 (表面と内部) で 0.07%、幹 (樹皮表面・師部・木部) で 0.32%、根圏 (根面のみ) で 0.25%、土壌で 0.35% と、やはりマイナーな細菌グループであることが示されている (Cregger, et al., 2018)。アメリカのマサチューセッツ州ボストンのアーノルド樹木園内のイチョウを対象にして実施された葉圏 (葉面・枝表面・樹皮表面) の細菌群集解析では、*Armatimonadetes* 門細菌は樹皮と枝の細菌群集でそれぞれ 1% の比率で存在し、葉面の細菌群集には存在

しないことが示されている(Leff, *et al.*, 2015)。なお、これらの研究では検出された *Armatimonadetes* 門細菌の門内構成についての言及はない。本研究の結果と既報より、葉圏細菌群集における *Armatimonadetes* 門細菌の量的重要性は低いこと、葉圏では葉よりも樹皮の方を生息の場として比較的好むことが推察された。

本研究では樹皮 *Armatimonadetes* 門の構成についても解析した(表 4-7)。ヤマナラシを除く樹種において *Armatimonadia* 綱の FW68 グループ(本研究で提案する *Capsulimonadales* 目に相当)の樹皮 *Armatimonadetes* 門構成比率が最も高く本グループの樹皮との高い関連性が示唆された。特にスギ・カラマツの針葉樹では 90%以上が FW68 グループであることから、FW68 は針葉樹と関連が強いものと思われる。

16S rRNA 遺伝子の AX-7 株と種レベルで相同な配列の樹皮 *Armatimonadetes* 門内の構成比率はヤマナラシの 0%からスギの 58.8%と様々であった。ヤマナラシ以外からは全ての樹種で検出されている。AX-7 株の分離源であるブナでは *Armatimonadetes* 門の 4.8%が AX-7 株と同種の配列であるが、構成比率は高い方ではなく、ホオノキ・ミズナラ・ウダイカンバ・に劣った。構成比率からみる限りでは、AX-7 株はスギ・カラマツと関連性が強いように思われた。この事実が AX-7 株の生態にどのような意味を持つのかは現段階では不明であり、今後の課題であると考えられた。

第 5 章 樹皮細菌群集の解析

第 1 節 序論

前章までに、培養に依存した方法による樹皮細菌の計数・分離・解析を行い、ブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツの樹皮には $5.65 \times 10^2 \sim 2.02 \times 10^4$ cfu/cm² の培養可能な細菌が生息すること、培養可能な細菌としては *Proteobacteria* 門細菌が優占すること、葉圏細菌として知られる *Methylobacterium* 属や *Sphingomonas* 属が高い効率で分離されること、葉圏との関わりが不明な *Burkholderia* 属や *Mucilaginicoccus* 属もやはり高効率で分離されることを明らかにした。また、ヤマナラシから分離された *Deinococcus* 属細菌株、ブナから分離された *Armatimonadetes* 門の細菌株を詳細に解析することで新たな知見を得ることができた。このように培養法では実際に樹皮に生息する細菌株を得て研究室内での解析により生理・生化学的・系統分類学的な情報を得ることで、実際の生息場における生態や機能を知ることが出来るという点で極めて有益である。しかし、自然界に生息する細菌のほとんどが培養出来ないことから、得られた細菌株の生息環境における位置づけ（細菌群集における位置づけ）を知ることは不可能である。そこで、現在では環境微生物の研究の多くが分子生物学的手法を適用した多様性解析が主流となっている。近年、葉圏微生物（ほとんど全てが葉面微生物）の研究にも分子生物学手法（次世代シーケンサーによるマーカー遺伝子（16S rRNA 遺伝子や 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析）が応用されており、葉圏細菌群集では植物種を問わず *Proteobacteria* 門細菌が優占することや葉圏細菌群集は樹種と強く関連することなどが明らかにされている(Kembel, *et al.*, 2014;Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016;Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016;Lambais, *et al.*, 2017;Lambais *et al.*, 2014;Muller & Ruppel, 2014)。

本章では前章までの解析に加えて、次世代シーケンサーを活用したアンプリコン解析を樹皮細菌の研究に適用することにより、樹皮における細菌の多様性をより詳細に解明することを目的として研究を行った。樹種としては白神山地や周辺地域の各所に生息して試料採取の容易な広葉樹 6 種（ブナ

Fagus crenata・ホオノキ *Magnolia obovata*・イタヤカエデ *Acer pictum* subsp. mono・ミズナラ *Quercus crispula*・ヤマナラシ *Populus tremula* var. *sieboldii*・ウダイカンバ *Betula maximowicziana*)、針葉樹2種(スギ *Cryptomeria japonica*・カラマツ *Larix kaempferi*)を対象とし、採取地を青森県中津軽郡西目屋村の弘前大学附属白神自然環境研究所(現在は弘前大学農学生命科学部附属白神自然環境研究センター)の白神自然観察園(世界自然遺産白神山地の周辺地域)、同じく西目屋村の高倉森(緩衝地域と周辺地域との境界)、青森県弘前市内の弘前城植物園と弘前大学、青森県平川市の志賀坊森林公園と白岩森林公園の6ヶ所とした(図5-1)。試料採取の簡便性から主に観察園で試料採取を行ったので、解析の試料数には地域ごとに偏りがある。また、ブナからの試料採取を主として行ったため、樹種ごとにも解析試料数に偏りがあることを予め記しておく。

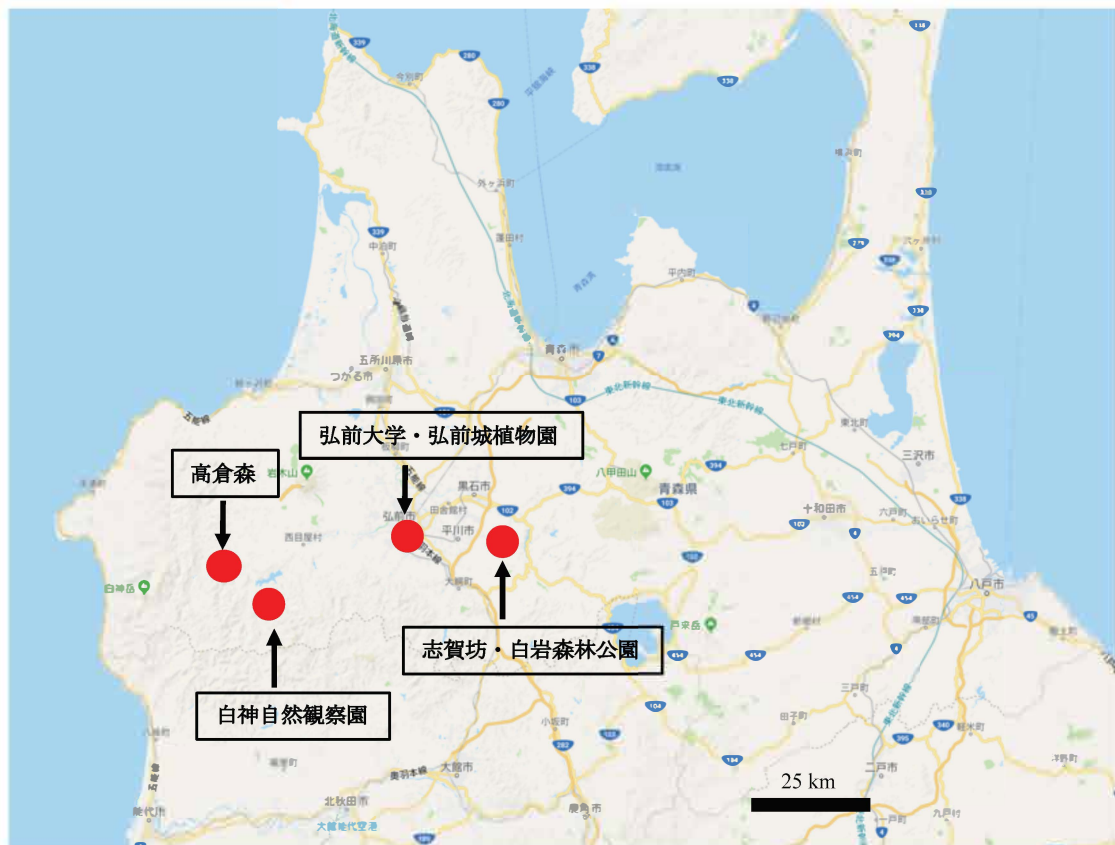


図 5-1. 試料採取地

第2節 材料と方法

1. 樹皮細菌の採取

樹皮の細菌群集解析のための試料採取は弘前大学白神自然環境研究センター白神自然観察園（青森県中津軽郡西目屋村川原平）、高倉森（青森県中津軽郡西目屋村）、志賀坊森林公園（平川市広船嘉瀬沢）、白岩森林公園（平川市尾崎黒倉沢）、弘前城植物園（弘前市下白銀町）、弘前大学農学生命科学部（弘前市文京町3）の6ヶ所で行った。採取試料の詳細な情報（樹木個体番号・生息場所・和名・地上高130 cm（胸高）と150 cmの直径・緯度・経度）は表5-1にまとめた。採取場所の位置関係は図5-1に示した。対象とした樹種はブナ、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、スギ、及びカラマツの8樹種で、地上高150 cmの位置に10 cm×10 cmの拭取り検査枠（CRF-1010; アズワン）をあて、ワイプチェック（佐藤工業所）の綿棒で枠内の樹皮から試料を拭取り、附属のリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した。同一個体からの採取は3部位で行い、計3本の試料懸濁液を得た。氷冷したアイスボックスに入れて研究室に持ち帰り、3本の試料懸濁液を50 mL容の遠心分離用コニカルチューブ（TrueLine）に移して1つにまとめ、環境DNA抽出用試料とした。

採取試料のうち、樹皮細菌群集解析に供した試料の宿主個体ごとの情報を表5-2に示した。2016年の解析数は基本的に1個体につき1試料で観察園のFS-01を除き6月22、23、30日、7月13、25、26日（夏季）のいずれかの日に採取した試料を解析に供した。FS-01のみは夏季に1回（6月22日）、秋季に2回（10月20日と11月24日）、計3回採取した試料を解析に供した。2017年の夏季は7月12、13、18、20日のいずれかの日、秋季は11月22日に採取した。

表 5-1. 試料採取に用いた樹木の情報*

樹種	場所	個体 ID	標高	地上高直径		緯度	経度
				130 cm	150cm		
ブナ	観察園	FS-01	349.06	58.1	56.5	40.51550704	140.215204
		FS-04	349.41	34.7	34.3	40.51527503	140.214912
		FS-05	280.39	37.3	36.4	40.51751803	140.214625
		FS-06	290.7	24.1	24.1	40.51727202	140.214793
	志賀坊	FP-01	357.88	62.7	62	40.56050403	140.633182
		FP-02	350.16	13.7	13.2	40.56164204	140.630996
	白岩	FW-01	351.72	68.5	67	40.57360201	140.654213
	弘前城	FH-01	48.33	31.3	31	40.60505896	140.464826
		FH-02	41.75	29.3	28.7	40.60474204	140.464618
	高倉森	FT-01	796.84	39.5	40	40.54261504	140.164046
		FT-02	712.65	54.5	51.6	40.55033997	140.163428
		FT-03	789.88	52	51.5	40.54250398	140.163794
	弘前大学	FU-01	ND	ND	ND	ND	ND
ホオノキ	観察園	MS-01	343.15	34.3	34.2	40.51534804	140.214927
		MS-02	267.07	31.8	31.5	40.51729297	140.214678
		MS-03	277.45	27.2	26.5	40.516924	140.21456
	志賀坊	MP-01	338.3	33.4	32.7	40.56142604	140.631953
		MP-02	345.77	46.3	47.1	40.56102103	140.632501
	弘前城	MH-01	46.43	24	21.9	40.60461002	140.464711
		MH-02	48.17	36.2	37.5	40.60435899	140.465164
	高倉森	MT-01	805	15	14.9	40.32685	140.09631
		MT-02	747	16	15.5	40.32816	140.09654
	イタヤカエデ	観察園	AS-01	341.22	35.1	34.3	40.51463197
AS-02			248.06	30	29.2	40.51774501	140.214662
AS-03			261.23	25.3	25.4	40.51738903	140.214749
AS-04			346.69	26.5	26.9	40.51468201	140.214633
弘前城		AH-01	45.78	26.1	25.9	40.60451698	140.465023
		AH-02	46.07	41.3	41.7	40.60428497	140.464749
ミズナラ	観察園	QS-01	353.4	29.5	29	40.51556496	140.215231
		QS-02	348.69	15.4	15	40.51554903	140.215331
		QS-03	325.5	45.5	44.5	40.51616401	140.215191
	弘前城	QH-01	ND	21	22	ND	ND
		QH-02	ND	37	35	ND	ND

*個体 ID の 1 文字目は樹種の属名の頭文字、2 文字目は樹木の生息場所 (S: 観察園、P: 志賀坊、W: 白岩、H: 弘前城、T: 高倉森、U: 弘前大学) を指す。同一場所の個体の識別は番号で行う。

表 5-1. 試料採取に用いた樹木の情報 (続き)

樹種	場所	個体 ID	標高	地上高直径		緯度	経度
				130 cm	150cm		
ヤマナラシ	観察園	PS-01	350.47	31.1	31.1	40.51541802	140.214892
		PS-02	351.12	27.1	27	40.51523597	140.214904
		PS-03	313.31	34.6	34.5	40.51615404	140.21406
	弘前城	PH-01	ND	38	38	ND	ND
		PH-02	ND	42	43	ND	ND
ウダイカンバ	観察園	BS-01	344.59	25.6	25.4	40.51561198	140.215169
		BS-02	281.47	34	33	40.51553202	140.214898
		BS-03	349.61	42	40.5	40.51679702	140.214429
	弘前城	BH-01	ND	23	22	ND	ND
	志賀坊	BP-01	ND	47.4	46.5	ND	ND
		BP-02	ND	52	51.3	ND	ND
	高倉森	BT-01	721	62	61	40.32994	140.09786
		BT-02	641	33	32.5	40.33232	140.09918
スギ	観察園	CS-01	349.61	35.3	34.7	40.51529699	140.215138
		CS-02	311.65	34.8	34.5	40.51620198	140.213499
		CS-03	254.01	40	40	40.51791801	140.216111
	弘前城	CH-01	ND	39	37	ND	ND
		CH-02	ND	26	24	ND	ND
	津軽峠	CT-01	640	44	42.8	40.33238	140.09921
		CT-02	641	44.2	43.7	40.33235	140.09918
カラマツ	観察園	LS-01	278.65	34	34.5	40.517341	140.214195
		LS-02	295.77	47.3	46.2	40.51672803	140.214193
		LS-03	312.33	37.9	37.8	40.51619603	140.214208

表 5-2. 樹皮細菌群集解析に供した試料情報

樹種	場所	個体 ID	2016		2017	
			夏季	秋季	夏季	秋季
ブナ	観察園	FS-01	1	2	1	1
		FS-04	1	0	1	1
		FS-05	1	0	1	1
		FS-06	1	0	1	0
	志賀坊	FP-01	1	0	1	0
		FP-02	0	0	1	0
	白岩	FW-01	1	0	0	0
	弘前城	FH-01	1	0	1	0
		FH-02	1	0	1	0
	高倉森	FT-01	1	0	1	0
		FT-02	1	0	0	0
		FT-03	0	0	1	0
	弘前大学	FU-01	0	0	1	0
ホオノキ	観察園	MS-01	1	0	1	1
		MS-02	1	0	1	1
		MS-03	0	0	1	0
	志賀坊	MP-01	0	0	1	0
		MP-02	0	0	1	0
	弘前城	MH-01	1	0	1	0
		MH-02	1	0	1	0
	高倉森	MT-01	0	0	1	0
MT-02		0	0	1	0	
イタヤカエデ	観察園	AS-01	1	0	1	1
		AS-02	1	0	1	0
		AS-03	1	0	1	1
		AS-04	1	0	1	1
	弘前城	AH-01	1	0	0	0
		AH-02	1	0	0	0
ミズナラ	観察園	QS-01	1	0	1	1
		QS-02	0	0	1	1*
		QS-03	0	0	1	1
	弘前城	QH-01	0	0	1	0
		QH-02	0	0	1	0

* アンプリコン解析に供したのがクオリティが低いために以降の解析では除外した。

表 5-2. 樹皮細菌群集解析に供した試料情報（続き）

樹種	場所	個体 ID	2016		2017	
			夏季	秋季	夏季	秋季
ヤマナラシ	観察園	PS-01	1	0	1	1
		PS-02	1	0	1	0
		PS-03	0	0	1	1
	弘前城	PH-01	0	0	1	0
		PH-02	0	0	1	0
ウグイカンバ	観察園	BS-01	1	0	1	1
		BS-02	1	0	0	1
		BS-03	0	0	1	1
	弘前城	BH-01	0	0	0	1
	志賀坊	BP-01	0	0	1	0
		BP-02	0	0	1	0
	高倉森	BT-01	0	0	1	0
		BT-02	0	0	1	0
スギ	観察園	CS-01	1	0	1	1
		CS-02	0	0	1	1
		CS-03	0	0	1	0
	弘前城	CH-01	0	0	1*	0
		CH-02	0	0	1	0
	津軽峠	CT-01	0	0	1	0
		CT-02	0	0	1	0
カラマツ	観察園	LS-01	1	0	1	0
		LS-02	0	0	1	1
		LS-03	0	0	1	1

* アンブリコン解析に供したがクオリティが低いために以降の解析では除外した。

2. 樹皮細菌 DNA の抽出

試料懸濁液から遠心分離（10,000 rpm, 5 min, 4°C）によって細菌を回収、上清をデカントにより除き、残溶液で沈殿を再懸濁し、PowerSoil DNA Isolation Kit（Mo Bio）に供し、プロトコールに従って DNA を抽出した。菌体の破碎工程には Mini-BeadBeater-8（Biospec Products）を使用した。抽出 DNA は Nano Drop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) で定量後、-30°C で凍結保存した。

3. アンプリコン解析

樹皮細菌群集解析のための次世代シーケンサーによる 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスはファスマック株式会社に委託した。ファスマックでは 2step tailed PCR 法により細菌 16SV4 領域ライブラリー作製後、Illumina の MiSeq を使用して次世代シーケンシングが実施された。得られた RawData のクオリティフィルタリング（sickle ver 1.33）、トリミング（Fastx toolkit ver 0.0.13.2）、キメラチェック（USERACH ver 8.0.1623_i86linux64）はいずれも括弧内のプログラムによりファスマックにおいて行われ、納入された。

4. アンプリコンシーケンスの OTU 化

ファスマックより納入されたキメラチェック後のデータを用い、研究室においてアンプリコンシーケンスを OTU 化し、細菌群集解析のための基礎データを構築した。OTU 化には NGS アンプリコン解析ソフト QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) をマッキントッシュ環境に適合させた MacQIIME 1.9.1

(<http://www.wernerlab.org/software/macqiime>) を使用した。各試料のアンプリコン解析結果はマルチファスタファイルとして提供されているので、「sed -e」コマンドで各配列のヘッダ行に由来試料の identifier を附加した（例えば L1 という試料由来の配列の場合、各配列のヘッダ部分に L1 という文字列を追加して配列と試料の関係を一致させる）。ついで、「cat」コマンドにより各マルチファスタファイルを連結して 1 つの解析用ファスタファイル作成

し、QIIME のワークフロー : 「pick_de_novo_otus.py」

(<http://qiime.org/scripts/>) により、97%相同性を基準としたクラスタリングによる種レベルの OTU 化と、各 OTU の既存分類群への割当を行った。

pick_de_novo_otus.py により構築された OTU テーブル (otu_table.biom) を用いて表 5-3 にまとめた処理・解析を行った。

表 5-3. アンプリコンシーケンスの OTU 化と解析のための QIIME スクリプト*

処理・解析	QIIME スクリプト
細菌 OTU 以外の除去や特定分類群の抽出	<code>filter_taxa_from_otu_table.py</code>
OTU テーブルの分離	<code>split_otu_table.py</code>
OTU テーブルのテキストファイルへの変換	<code>biom convert</code>
リードのカウントデータの統計値計算	<code>biom summarize-table</code>
分類群の相対値比較チャートの作成	<code>summarize_taxa_through_plots.py</code>
階級別に分類群をリスト化	<code>summarize_taxa.py</code>
コアマイクロビオームの抽出	<code>compute_core_microbiome.py</code>
特定配列の抽出	<code>filter_fasta.py</code>

*<http://qiime.org/scripts/>

5. 多変量解析

4の「アンプリコンシーケンスの OTU 解析」で作成された OTU テーブルから QIIME のスクリプト「filter_taxa_from_otu_table.py」により細菌以外の OTU（古細菌・葉緑体など）を除去した OTU テーブルを作成し、多変量解析に供した。多変量解析には統計分析フリーソフト「R」の群集解析用パッケージ `vegan` 2.5-2 (<https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>) を用いた。樹皮細菌群集の差異（ β 多様性）は Bray-Curtis 法で作成した距離行列に基づき非計量的多次元尺度法（Non-metric Multidimensional Scaling: NMDS）で座標化した。座標化に際しては、リード数の多少が座標化に影響を与えるのを防ぐためにランダムレアファクションにより個々の試料のリード数を希釈しリード数が最少の試料に合わせた。樹皮細菌群集と環境変数（宿主の種類や生息場所など）との相関性は Permutation test により検定した。`vegan` による解析結果は基本的に R の `plot()`関数により作図したが、一部の結果の作図には `ggplot2` パッケージ (<http://ggplot2.tidyverse.org/>) を使用した。

6. 樹皮細菌群集と葉面・土壌細菌群集との比較

樹皮細菌群集の特異性を同一個体樹木の葉面細菌群集と同一個体樹下の土壌細菌群集との比較で検定した。対象樹木として観察園のブナ 3 個体 FS-01、FS-04、FS-05（表 5-1）を選び、2017 年 6 月 20 日と 21 日の両日で試料採取を行った。なお、樹皮からは地上高 50 cm、150 cm、200 cm の部位から試料採取を行い、それぞれの細菌群集に差異が認められるかどうかも検討した。

ブナの葉は高枝切りバサミを用いて枝ごと採取し、葉のみを UV 滅菌したジップロックに封入し、氷冷しながら研究室に持ち帰った。湿重量 30 g の葉を新しい滅菌ジップロックに量り取り、0.03%の Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）500mL を加え、水を満たした器具洗浄用ソニケーター（AS ONE; ASU-M）につけて超音波処理を 7 分間行った後、往復振盪機で振盪

(150 rpm, 60 min) し、葉面細菌を溶液中に分散させた。懸濁液全量を 0.22 μ L の減圧フィルター濾過器 (Sartolab) で回収し、0.1 M リン酸カリウム (pH 7.0) 0.2 mL に懸濁し、「2. 樹皮細菌 DNA の抽出」と同様にして DNA を抽出した。

土壌は樹下 (幹から 1 m 以内) の 3 ヶ所を無作為に選択し、表面の有機層を除いて、A 層表面から約 5 cm の位置から滅菌移植ゴテにて採取した。採取土壌は滅菌ジップロックに入れ、氷冷しながら研究室に持ち帰り、一つにまとめた。土壌の小石や植物遺体などの有機物を 2 mm 目の篩にかけて除き、土壌 200 mg から「2. 樹皮細菌 DNA の抽出」と同様にして DNA を抽出した。葉面や土壌から抽出した DNA を用いた細菌 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析は樹皮採取試料と同様にして行った。

7. 樹皮真核生物群集の解析

樹皮には樹種固有の微生物叢が形成されるかどうかの検討を行った。試料の採取や DNA の抽出は上述の方法に準じた。アンプリコン解析は 18S rRNA 遺伝子の V8-V9 領域を対象とし、ファスマックに委託した。アンプリコン解析と真核生物群集の多変量解析も上述の方法に準じて行った。なお、採取試料の情報は表 5-4 に示した。解析用試料は全て 2017 年の夏季に行った細菌群集解析用試料 (表 5-2) と同一である。

表 5-4. 樹皮真核生物群集解析に供した試料情報*

樹種	場所	個体 ID
ブナ	観察園	FS-01
		FS-04
		FS-05
		FS-06
	弘前城	FH-01
		FH-02
	高倉森	FT-01
		FT-03
ホオノキ	観察園	MS-01
		MS-02
		MS-03
イタヤカエデ	観察園	AS-01
		AS-02
		AS-03
ミズナラ	観察園	QS-01
		QS-02
ヤマナラシ	観察園	PS-01
		PS-02
		PS-03
ウダイカンバ	観察園	BS-01
		BS-02
		BS-03
スギ	観察園	CS-01
		CS-02
		CS-03
カラマツ	観察園	LS-01
		LS-02
		LS-03

* 2017 年夏季に採取した細菌群集解析試料と同じものを真核生物群集解析に供した

8. 樹皮表面の低分子有機物の分析

上記拭取り法によって得た懸濁液上清を分析することにより樹皮表面から回収された有機物の種類と相対量を求めた。懸濁液を遠心分離（10,000 rpm, 10 min, 4°C）した後上清を回収し、全量を凍結乾燥した。乾燥試料に蒸留水を 5 mL 入れてボルテックスで懸濁し、そのうち 1 mL を 1.5 mL チューブに移し、内部標準としてアジピン酸（脱イオン水で 8.04 g/L に調製）を 60 μ L 加えて混合した。試料を SpeedVac Concentrator（Savant）を用いて 5 時間減圧濃縮した後、一晚凍結乾燥した。乾燥試料にメトキシアミン塩酸塩（20 mg/mL のピリジン溶液）を 100 μ L 加え加温振盪器で振盪（1,200 rpm, 90 min, 30°C）してメトキシ化を行った。*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）を 50 μ L 加えて混合後、加温振盪器で振盪（1,200 rpm, 30 min, 37°C）してトリメチルシリル化を行った。遠心分離（16,000 rpm, 5 min）により得た上清を専用バイアルに移し、GC-MS 分析用試料とした。GC-MS 分析は JMS-Q1500GC ガスクロマトグラフ質量分析計（日本電子）を用いて行った。カラムは InertCap 5MS/NP ProGuard 5M（GL Sciences; 長さ:35.0 m; 内径:0.25 mm; 膜厚:0.25 μ m）を、システムコントロールは msPrimo System Controller（日本電子株式会社）を使用した。サンプル注入量は 1 μ L、スプリットモードでスプリット比を 25:1 に設定した。注入口温度は 230°C とし、キャリアガスにはヘリウムを用い、流速は 1.12 mL/min とした。オープン温度は 80°C で 2 分間保持後 15°C/min で昇温、330°C で 6 分間保持した。イオン源温度は 200°C、GC-IF 温度は 250°C、イオン化方法は電子イオン化法（EI）で行い、イオン化エネルギー 70eV とした。測定モードは Scan、マスレンジは m/z 85-500 で測定を行った。データ解析ソフトウェア Escripe（日本電子株式会社）を使用した。90%以上の信頼度で推定された物質の得られたクロマトグラムの中のピークを、内部標準のアジピン酸のピーク面積に対する相対値として求めた。採取源（樹種）と試料の成分組成との関連性は R の **vegan** パッケージを用い、クラスター分析により行った（距離行列: ユークリッド距離; クラスター: ウォード法）。

第3節 結果

1. 樹皮細菌群集の16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析

同一個体の細菌群集の時季の変動の確認は主として観察園内の樹木から採取した試料で行った。観察園では同一樹種につき少なくとも3個体以上から採取した試料で解析を行った。解析には合計97の試料を供した。

樹皮の拭取り試料からDNAを抽出し、ファスマック（株）に委託して細菌16S rRNA 遺伝子V4領域の次世代シーケンサーによるアンプリコン解析を行なった。解析試料のうち、シーケンス結果のクオリティの低かった2017年の夏季に採取したQS-02（観察園ミズナラ）とCH-01（弘前城植物園スギ）は以降のOTU解析から除いた。解析に用いた試料数は97である。表5-5に古細菌や葉緑体などの解析のノイズとなる配列を除いた後のアンプリコン解析のリード数を樹種別に示す。最大のリード数（188,653）は2016年7月16日に観察園で採取したヤマナラシ個体PS-02由来の試料で得られた。一方、最小リード数は2017年7月18日に津軽峠で採取したスギ個体CT-02由来の試料の6,647であった。平均リード数はヤマナラシが最も多く、スギが最も少なかった。

表 5-5. 樹皮細菌群集のアンプリコン解析の樹種別リード数

樹種	試料数	リード数合計	最小リード数	最大リード数	平均リード数	標準偏差
ブナ	26	1,734,690	18,417	115,697	66,718	26,091
ホオノキ	16	897,722	19,447	115,098	56,107	28,374
イタヤカエデ	11	890,842	24,716	136,796	80,985	34,795
ミズナラ	8	602,054	50,539	102,575	75,256	17,859
ヤマナラシ	9	867,427	47,980	188,653	96,380	44,178
ウダイカンバ	12	392,196	7,686	88,198	32,683	21,859
スギ	9	250,650	6,647	44,113	27,850	10,635
カラマツ	6	222,084	14,474	72,438	37,014	18,923
全樹種	97	5,857,665	6,647	188,653	60,388	34,336

2. 樹皮細菌群集を構成する細菌

樹皮細菌群集を構成する細菌の比率を門レベルでまとめた（表 5-6）。全ての樹種で *Proteobacteria* 門と *Acidobacteria* 門が優占し、この両者で樹皮細菌群集の 50%以上を構成した。ブナ、ホオノキ、イタヤカエデ、ミズナラではこの両者に加えて *Bacteroidetes* 門が優占していた。ウダイカンバでは *Bacteroidetes* 門の構成比率が 4.1%であり、比較的優占度の低い細菌群であった。スギ、カラマツでは *Proteobacteria* 門と *Acidobacteria* 門に加えて *Actinobacteria* 門の比率が高い一方で、*Bacteroidetes* 門はスギでは 0.2%、カラマツでは 0.1%と構成比率の極めて低い細菌群であった。

全樹種の樹皮細菌群集で主要な細菌門であった *Acidobacteria* 門と *Proteobacteria* 門については綱レベルの構成も表 5-7 と表 5-8 に示した。

樹皮細菌群集で優占する上位 6 番目までの細菌グループを表 5-9 にまとめた。なお、属レベルで近縁な既存分類群が現段階では報告されていないグループは直上の分類階級が示してある。表 5-6 より樹皮細菌群集は門レベルでの多様性は低いことが示されたが、科・属レベルでも多様性は低かった（表 5-9）。*Acetobacteraceae* 科は全ての樹種で、*Acidobacteriaceae* 科はヤマナラシを除くすべての樹種の優占細菌として検出された。*Hymenobacter* 属はブナ・ホオノキ・イタヤカエデ・ミズナラ樹皮の優占細菌で、イタヤカエデにおいては属レベルでありながら樹皮細菌群集の 21.4%を構成している。*Sphingomonas* 属は *Hymenobacter* 属には劣るが属レベルでの優占細菌であり、針葉樹であるスギとカラマツ以外の全ての樹種で検出された。

全試料で検出された細菌「Core microbiome」は *Alphaproteobacteria* 綱の *Methylocystaceae* 科 (OTU: denovo244954) と *Caulobacteraceae* 科 (OTU: denovo316297) でいずれも属レベル以下で一致する既存細菌種は存在しなかった。樹種別の「Core microbiome」は数が多いので省略した。

表 5-6. 樹皮細菌群集を構成する門レベル細菌グループ

門レベルの分類階級	樹皮細菌群集の構成比率 (%) *							
	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	スギ	カラマツ
<i>Acidobacteria</i>	31.0	29.0	19.2	16.5	14.6	28.7	49.2	45.9
<i>Actinobacteria</i>	1.9	3.0	2.9	10.0	9.3	2.6	13.2	13.8
<i>Armatimonadetes</i>	2.4	2.1	1.6	1.5	1.1	0.8	1.1	1.0
<i>Bacteroidetes</i>	20.4	19.0	39.2	20.3	35.9	4.1	0.2	0.1
<i>Chloroflexi</i>	0	0.2	0.1	0.9	0.3	0	0	0
<i>Cyanobacteria</i>	0	0	0.3	0.6	2.4	0	0	0
FBP	0.3	0.6	1.3	0.4	1.1	0.1	0	0
<i>Firmicutes</i>	0.1	0.1	0	0	0	0.1	0	0
<i>Gemmatimonadetes</i>	0.2	0.1	0.2	1.5	1.4	0	0	0
<i>Planctomycetes</i>	1.0	1.0	0.6	1.7	0.9	1.3	1.1	1.5
<i>Proteobacteria</i>	41.5	43.5	31.8	41.5	31.5	59.9	29.8	34.1
<i>Tenericutes</i>	0	0	0	0.2	0	0.1	0	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0.9	1.0	2.5	4.2	1.2	0.6	0.3	1.0
WPS-2	0	0.1	0.1	0.1	0	1.6	4.9	2.4
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0	0	0

*太字は10%以上を構成する細菌群

表 5-7. 樹皮細菌群集における *Acidobacteria* 門細菌の詳細

分類群	樹皮細菌群集の <i>Acidobacteria</i> 門細菌の構成 (%)							
	ブナ	ホオノ キ	イタヤ カエデ	ミズナ ラ	ヤマナ ラシ	ウグイ カンバ	スギ	カラマ ツ
<i>Acidobacteriaceae</i>	69.8	77.6	59.2	39.3	0.5	86.6	91.3	83.9
<i>Edaphobacter</i>	14.1	7.2	22.4	7.7	2.5	5.1	1.3	0.5
<i>Terriglobus</i>	14.1	9.8	10.8	5.5	0.2	2.6	0.1	0.1
<i>Solibacteraceae</i>	0.9	3.6	2.4	5.1	1.2	4.8	7.1	10.3
RB41	0.0	0.0	0.3	6.2	18.9	0.0	0.0	0.0
Ellin6075	0.3	0.2	1.7	14.4	68.8	0.1	0.0	0.0

Acidobacteria 門は大半が同定されていないので未同定分類群も表に載せた。

表 5-8. 樹皮細菌群集における主要な *Proteobacteria* 門細菌の詳細*

綱レベル	科・属レベル	ブナ	ホオノキ	イタヤカエ デ	ミズナラ	ヤマナラシ	ウグイカン バ	スギ	カラマツ
		(72.9)	(83.4)	(82.6)	(62.2)	(75.4)	(90.0)	(84.8)	(93.5)
	<i>Acetobacteraceae</i>	25.2	31.2	25.2	11.4	16.1	32.3	48.8	69.0
	<i>Methylocystaceae</i>	22.7	22.4	17.4	9.5	2.5	20.2	4.5	3.4
	<i>Sphingomonas</i>	12.7	15.3	21.5	13.4	19.3	4.9	-	-
α - <i>proteobacteria</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	3.4	3.9	6.6	3.9	10.1	-	-	-
	<i>Caulobacteraceae</i>	3.3	3.8	2.6	3.0	2.7	9.7	4.5	5.4
	<i>Acidisoma</i>	-	-	-	-	-	2.3	10.0	2.2
	<i>Acidocella</i>	-	-	-	-	-	-	3.2	-
	<i>Novosphingobium</i>	-	-	-	-	-	7.1	-	-
		(7.4)	(7.2)	(8.4)	(10.5)	(10.8)	(2.5)	(0.4)	(0.5)
β - <i>proteobacteria</i>	<i>Comamonadaceae</i>	-	-	3.4	3.8	8.2	-	-	-
	<i>Oxalobacteraceae</i>	-	2.6	-	2.1	-	-	-	-
		(3.9)	(2.5)	(3.6)	(7.5)	(12.3)	(5.3)	(10.0)	(3.5)
γ - <i>proteobacteria</i>	<i>Cystobacterineae</i>	-	-	-	-	-	3.6	7.9	-
		(15.8)	(7.0)	(5.4)	(19.7)	(1.5)	(2.2)	(4.8)	(2.6)
δ - <i>proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	12.6	2.6	-	7.7	-	-	-	-
	<i>Enterobacteriaceae</i>	-	-	-	6.8	-	-	-	-
	<i>Methylibium</i>	-	-	-	2.6	5.2	-	-	-

*表の数値は *Proteobacteria* 門内の構成比率を示す。括弧内は各綱の *Proteobacteria* 門内の比率。科レベルまで同定され、かつ 2%以上の構成比率の細菌群を示した。

表 5-9. 樹皮細菌群集において優占する細菌グループ*

樹種	優占細菌グループ (%)					
ブナ	<i>Acidobacteriaceae</i> (21.6)	<i>Hymenobacter</i> (13.1)	<i>Acetobacteraceae</i> (10.5)	<i>Methylocystaceae</i> (9.4)	<i>Sphingomonas</i> (5.3)	<i>Pseudomonas</i> (5.3)
ホオノキ	<i>Acidobacteriaceae</i> (22.4)	<i>Acetobacteraceae</i> (13.6)	<i>Hymenobacter</i> (10.0)	<i>Methylocystaceae</i> (9.7)	<i>Sphingomonas</i> (6.7)	<i>Sphingobacteriaceae</i> (3.2)
イタヤカエデ	<i>Hymenobacter</i> (21.4)	<i>Acidobacteriaceae</i> (11.3)	<i>Chitinophagaceae</i> (8.2)	<i>Acetobacteraceae</i> (8.0)	<i>Sphingomonas</i> (6.8)	<i>Methylocystaceae</i> (5.5)
ミズナラ	<i>Chitinophagaceae</i> (9.1)	<i>Acidobacteriaceae</i> (6.1)	<i>Sphingomonas</i> (5.6)	<i>Acetobacteraceae</i> (4.7)	<i>Hymenobacter</i> (4.7)	<i>Methylocystaceae</i> (4.0)
ヤマナラシ	<i>Chitinophagaceae</i> (19.6)	Ellin6075 (10.1)	<i>Hymenobacter</i> (8.9)	<i>Sphingomonas</i> (6.1)	<i>Acetobacteraceae</i> (5.1)	<i>Sphingobacteriaceae</i> (3.2)
ウグイスカバ	<i>Acidobacteriaceae</i> (24.5)	<i>Acetobacteraceae</i> (19.3)	<i>Methylocystaceae</i> (12.1)	<i>Caulobacteraceae</i> (5.8)	<i>Novosphingobium</i> (4.3)	<i>Sphingomonas</i> (2.9)
スギ	<i>Acidobacteriaceae</i> (44.8)	<i>Acetobacteraceae</i> (14.5)	<i>Conexibacteraceae</i> (8.3)	WPS-2 (4.9)	<i>Solibacteraceae</i> (3.5)	<i>Acidisoma</i> (3.0)
カラマツ	<i>Acidobacteriaceae</i> (38.5)	<i>Acetobacteraceae</i> (23.5)	<i>Conexibacteraceae</i> (7.1)	<i>Solibacteraceae</i> (4.7)	WPS-2 (2.4)	<i>Actinomycetales</i> (2.1)

*上位 5 番目までの細菌群をリストした。なお、表中で学名の表記されていないのは全て *Acidobacteria* 門の未同定グループである。いずれも種レベルで単独の OTU である。

3. 樹皮細菌群集の多変量解析

3-1. 全試料のデータに基づく NMDS 解析

図 5-2 に OTU データから作成した全試料間 Bray-Curtis 距離行列に基づいて行った非計量的多次元尺度法 (Non Metric Multidimensional Scaling: NMDS) の結果を示した。各試料の細菌群集は試料間の距離に基づき平面にプロットされている。プロット間の距離が近いほど類似していることを示す。NMDS の結果から、一部の例外はあるものの細菌群集は樹種毎にまとまっていた。広葉樹における樹皮細菌群集はブナ (図の青色)、ホオノキ (ピンク色) およびイタヤカエデ (黒色) が比較的近い関係にあり、それらの近くにウダイカンバ (赤色) が位置していた。また、ミズナラ (灰色) とヤマナラシ (黄色) は比較的近く、ウダイカンバからは離れていた。また、針葉樹のスギ (緑色) とカラマツ (水色) は混在しており、樹皮細菌群集は非常に類似していることが示された。個別の樹種と座標付との相関を **Permutation test** で検定したところ、イタヤカエデを除く全ての樹種が細菌群集と相関することが示された (表 5-10)。イタヤカエデの相関が低かったのは、プロットが 2 つに明確に別れたことが原因であると思われるが、両者の距離は大きく離れてはなかったので試料数を増やすことで解消できるものと考えられた。

表 5-10. NMDS 解析における細菌群集と樹種との相関

樹種	r ² (決定係数)	p 値	有意性
ホオノキ	0.0916	0.014	*
スギ	0.4262	0.001	***
カラマツ	0.2388	0.001	***
イタヤカエデ	0.0334	0.196	
ヤマナラシ	0.4078	0.001	***
ミズナラ	0.2368	0.001	***
ブナ	0.3583	0.001	***
ウダイカンバ	0.0755	0.022	*
全体	0.8362	0.001	***

有意性: * 5%有意水準, ** 1%有意水準, ***0.1% 有意水準

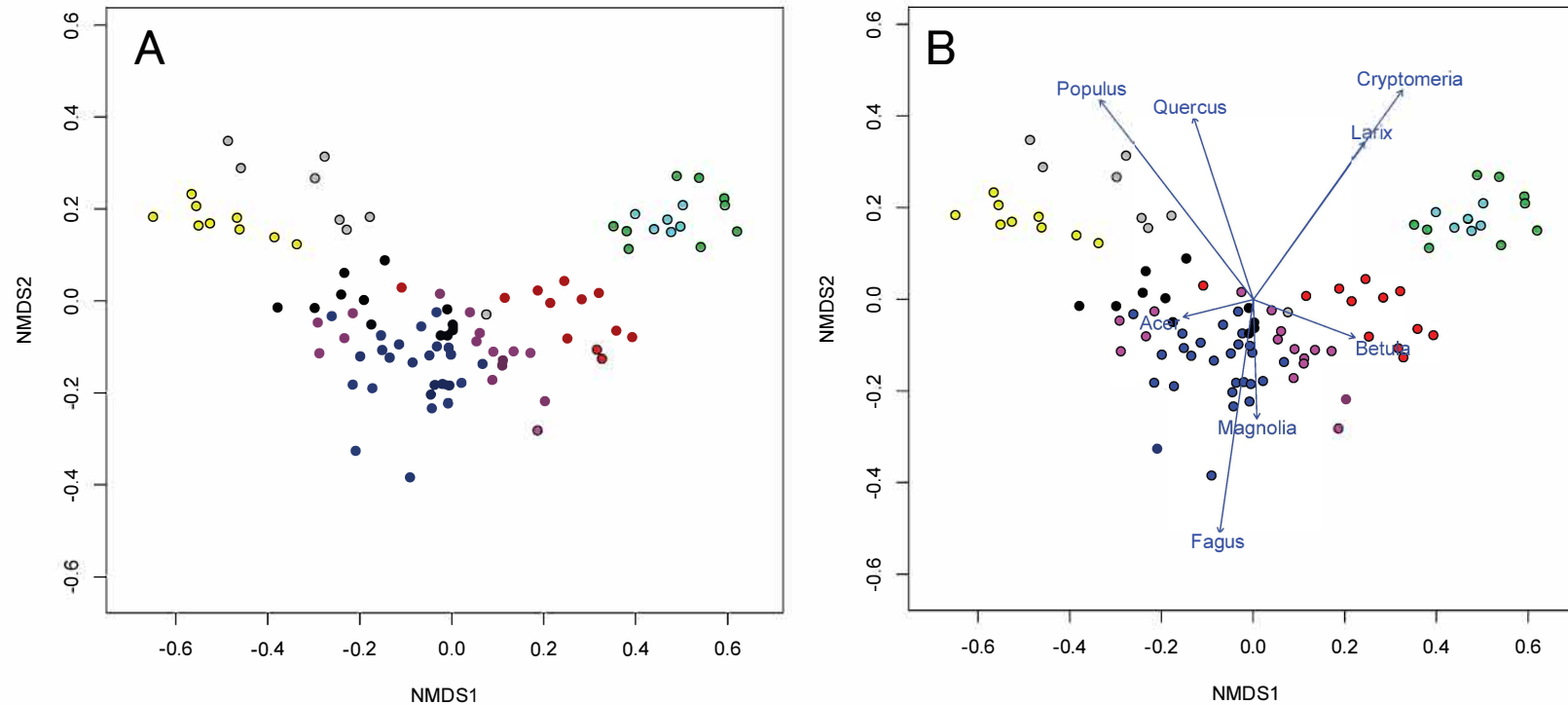


図 5-2. 全試料の樹皮細菌群集の NMDS 解析

A, NMDS 座標にプロットされた樹皮細菌群集。B, 樹種と座標付との相関を示す矢印を付した NMDS 座標。座標付には 2016 年から 2017 年に採取し、アンプリコン解析した全ての試料を用いた。青色: ブナ、ピンク色: ホオノキ、黒色: イタヤカエデ、灰色: ミズナラ、黄色: ヤマナラシ、赤色: ウダイカンバ、緑色: スギ、水色: カラマツ。各樹種と座標付との相関は矢印で示した。矢印の長さは相関の大きさを、向きはその方向に樹種と関係の深い細菌群集がプロットされる傾向があることを示している。

3-2. 樹皮細菌群集の樹種 NMDS 解析

樹皮細菌群集と個体・生息場所・採取時季との相関性を検定した結果を表 5-11 に示した。樹皮細菌群集と個体は全ての樹種で有意に相関していたが、その有意性には強弱があり、ブナ・ホオノキ・イタヤカエデ・ウダイカンバでは強く、ミズナラ・スギは中程度、カラマツでは弱かった。生息場所についてはミズナラとスギおよび生息場所（採取場所）が観察園の 1 ヶ所であったカラマツを除き、強弱はあるものの有意に相関していた。採取時季についてはブナのみに相関性がみられた。しかし、試料数・個体数・生息場所（採取場所）などが樹種によって異なるので、この結果がすべて有効であるとはいえない。ブナに関しては解析した試料数・個体数とも多いので比較的信頼できる結果であると思われる。図 5-3 にブナ全試料の樹皮細菌群集の NMDS 解析の結果を個体・採取場所別に示した。図 5-3 の A では同一個体の樹皮細菌群集のプロットを同色で示し、2016 年の採取試料のプロットには矢印を付している。図 5-3 の A と B より、例外（水色の FS-01 など）はあるが、同一個体の樹皮細菌群集は近い位置にまとまっており、採取年での変動は小さい（例えば緑色の FP-01 と紫色の FS-04）ことが示された。また図 5-3 の B から生息場所が共通するブナの細菌群集は近い位置にプロットされていた。図 5-3 の C ではブナの樹皮細菌群集が時季（夏と秋）で変動するようであり、有意性の検定でも細菌群集と時季が相関するような結果が得られている（表 5-11）。ただし、図 5-3 は複数の生息場所から採取した試料による解析のため、3-3 において観察園内に限定した解析を行った。

表 5-11. 細菌群集と個体・生息場所・採取時季との関連性

樹種	個体		生息場所		採取時季 (夏・秋)	
	r ² (決定係数)	p 値	r ² (決定係数)	p 値	r ² (決定係数)	p 値
ブナ	0.817	0.001(***)	0.464	0.001(***)	0.245	0.002(**)
ホオノキ	0.975	0.001(***)	0.914	0.001(***)	0.035	0.649
イタヤカエデ	0.982	0.001(***)	0.453	0.026(*)	0.022	0.964
ミズナラ	0.981	0.003(**)	0.159	0.305	0.174	0.245
ヤマナラシ	0.985	0.001(***)	0.625	0.026(*)	0.066	0.641
ウグイスカンバ	0.958	0.001(***)	0.598	0.078 (・)	0.023	0.742
スギ	0.940	0.005 (**)	0.293	0.379	0.074	0.483
カラマツ	0.753	0.067(・)	- [‡]	-	0.460	0.200

有意性: . . 10% 有意水準, * 5%有意水準, ** 1%有意水準, ***0.1% 有意水準

[‡]カラマツは観察園でのみ採取

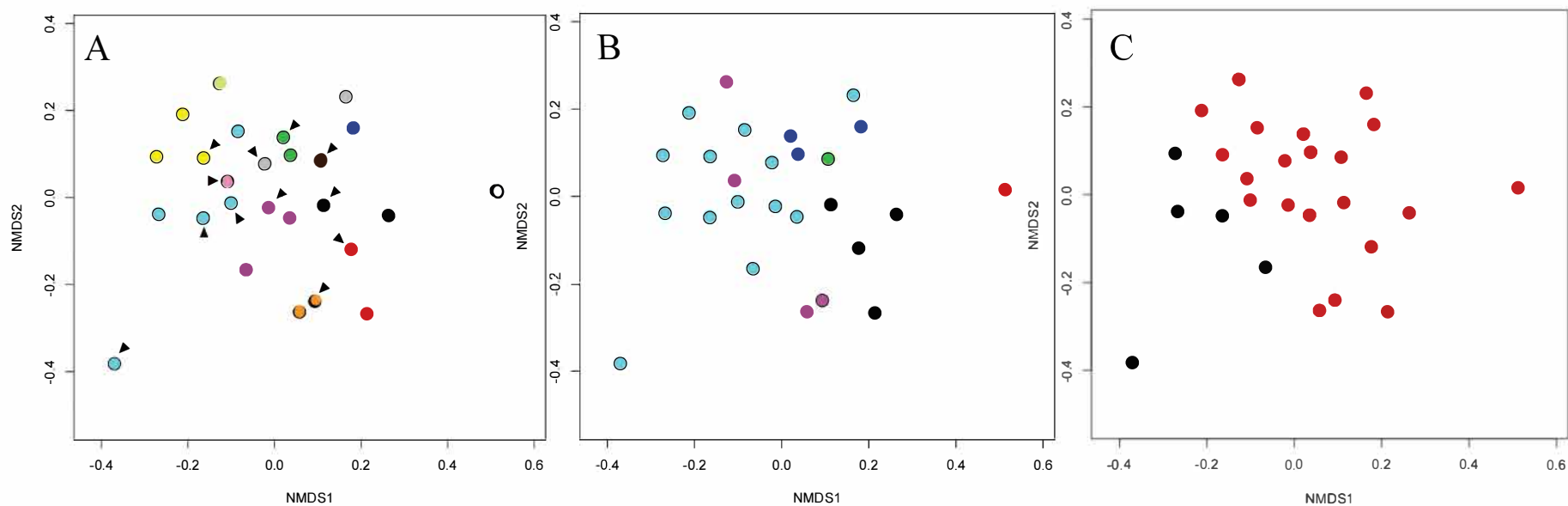


図 5-3. ブナ樹皮細菌群集の NMDS 解析

A, NMDS 座標にプロットされたブナ樹皮細菌群集。2016 年および 2017 年の採取試料の細菌群集解析結果をすべてプロットした。水色: FS-01、紫色: FS-04、黄色: FS-05、灰色: FS-06、緑色: FP-01、青色: FP-02、茶色: FW-01、黒色: FH-01、赤色: FH-02、橙色: FT-01、桃色: FT-02、黄緑色: FT-03、白色: FU-01。2016 年の採取試料は矢印で示した。個体 ID の 2 番目の文字は以下のように生息場所（採取場所）示す。S: 観察園、P: 志賀坊、W: 白岩、H: 弘前城、T: 高倉森、U: 弘前大学。

B, NMDS 座標にプロットされたブナ樹皮細菌群集をブナの生息場所別に色分けした。水色: 観察園、緑色: 志賀坊、青色: 白岩、黒色: 弘前城、紫色: 高倉森、赤色: 弘前大学。

C, 採取時季で色分けしてプロットした。赤色: 夏季、黒色: 秋季

3-3. 観察園内の樹皮細菌群集の時季的変動

3-2 で樹皮細菌群集は樹種や樹木の生息場所と関係があること、また解析数の多いブナに関して調べたところ、例外はあるものの樹皮細菌群集は安定しており、採取年によって大きな変化はないことが示された。ブナでは採取時季（夏・秋）と樹皮細菌群集が相関していることから（表 5-11）、本項において 2017 年における観察園樹木の樹皮細菌群集の時季的変動を NMDS により解析した。解析に使用した樹種はブナ・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・スギ・カラマツでブナが 3 個体、他の樹種は 2 個体の樹皮から、それぞれ夏季と秋季に採取した試料で細菌群集解析を行った。図 5-4 に NMDS 解析によって得られた樹皮細菌群集間の距離的な相対関係を示した。スポットは座標上で樹種別に明確に分かれる傾向にあった。カラマツとスギはプロットが分離せず樹皮細菌群集が非常に類似していること、ブナ・ホオノキ・イタヤカエデの 3 樹種間、ミズナラとヤマナラシの間ではそれぞれ樹皮細菌群集が近い関係にあることがわかる。また、ウダイカンバは針葉樹（スギ・カラマツ）と広葉樹（ブナ・ホオノキ・イタヤカエデ・ヤマナラシ・ミズナラ）の中間的な樹皮細菌群集を形成していることが示された。これらのことは、全試料を用いた解析（図 5-2）の結果と一致していた。また、各個体のプロット（個体 ID と採取時季を付している）は採取時季によって大きく変動することはなく、樹皮細菌群集は安定していることが示唆された。Permutation test の結果、樹皮細菌群集と有意な相関があったのは樹種（決定係数: 0.990; p 値: 0.001）、個体（決定係数: 0.939; p 値: 0.001）、針葉樹・広葉樹の違い（決定係数: 0.494; p 値: 0.001）で、いずれも有意水準 0.1% で有意であった。時季（夏・秋）に関しては有意な相関はなかった（決定係数: 0.002; p 値: 0.947）。

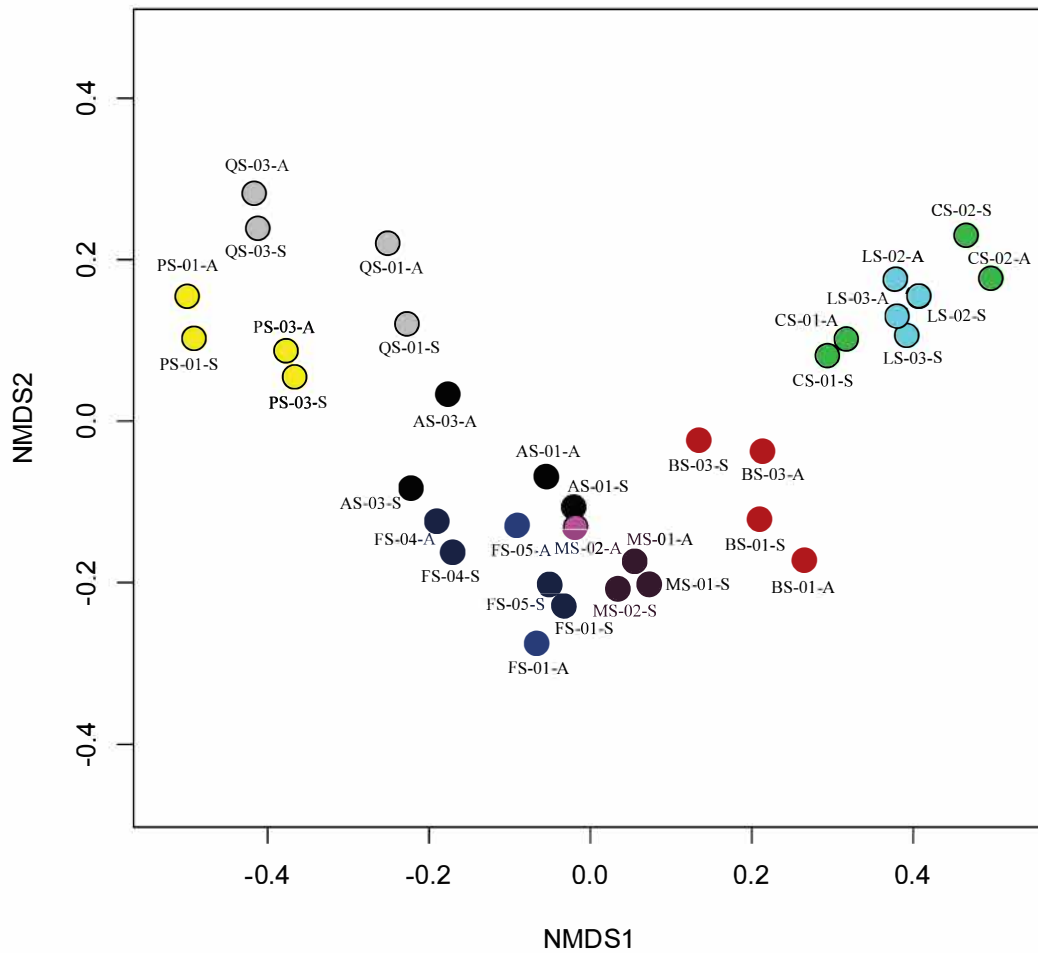


図 5-4 観察園の樹皮細菌群集の時季的変動

青色: ブナ、紫色: ホオノキ、黒色: イタヤカエデ、灰色: ミズナラ、黄色: ヤマナラシ、赤色: ウダイカンバ、緑色: スギ、水色: カラムツ。個体 ID の後の S は夏季、A は秋季に採取したことをそれぞれ示す。個体番号の 1 番目のアルファベットは樹木学名の頭文字。

3-4. 樹皮細菌群集と採取部位との関係

樹皮細菌群集が部位によって異なるかどうかを、観察園のブナ3個体（FS-01、FS-04、FS-05）の地上高50 cm、150 cm、200 cmの位置で採取した樹皮拭取り試料で検討した。解析によって得られた樹皮細菌群集をNMDS解析に供した結果、図5-5に示すように同一個体由来の細菌群集は採取部位とは無関係に全く同じ座標にプロットされたことから、少なくともブナ樹皮では地上高200 cmまでは一様な細菌群集が形成されていることが示された。

3-5. 土壌と葉面の細菌群集と樹皮細菌群集との関係

葉圏における主要な部位である葉面に形成される細菌群集と樹皮細菌群集に関連があるか、また土壌が樹皮の細菌群集に影響を及ぼしているかどうかを調べるために、観察園のブナ3個体（FS-01、FS-04、FS-05）の樹皮、葉面、樹下土壌の細菌群集の比較をNMDS解析により行った。図5-6では3個体・9試料を解析に供したにも関わらず座標上には樹皮、葉面、樹下土壌の細菌群集の3点しか確認されなかった。これは、各細菌群集の個体間（または採取場所間）の差異と比較して、樹皮細菌群集、葉面細菌群集および樹下土壌細菌群集の間の差異が極めて大きいことを意味しており、樹皮・葉面・樹下土壌に形成される細菌群集に関しては互いの関連性は低いことが示唆された。

表5-12にブナの樹皮・葉面・樹下土壌の細菌群集を構成する門レベルの細菌グループをまとめた。樹皮細菌群集を構成する主要な細菌グループは比率の高い順に *Acidobacteria*、*Proteobacteria* および *Bacteroidetes* であった。この3グループの中で、葉面では *Proteobacteria* の比率が最も高く *Acidobacteria* は優占細菌ではなかった。一方、土壌では *Bacteroidetes* の比率が低く、*Acidobacteria* と *Proteobacteria* が優占細菌であった。

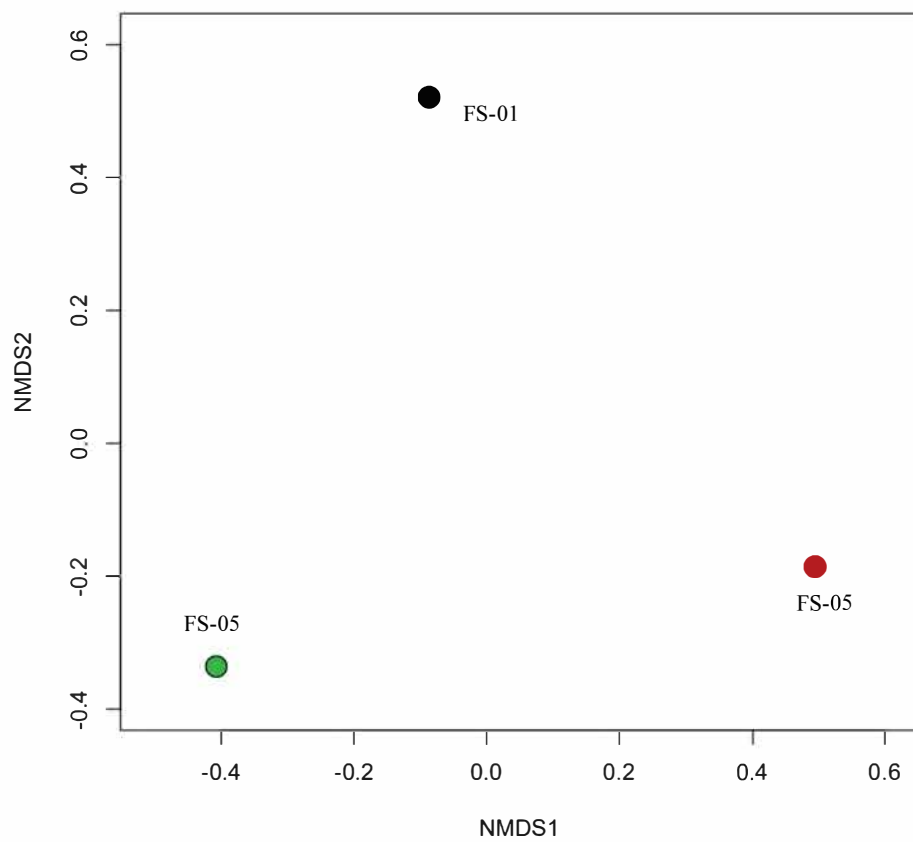


図 5-5. 地上高 50 cm、150 cm、200 cm の位置のブナ樹皮から採取した試料の細菌群集の NMDS 解析

個体 ID 毎に色付けした。採取部位による細菌群集に差異がないために各個体あたりのプロットはみかけ上 1 つしかないが、実際には 3 つのプロットが重なっている。

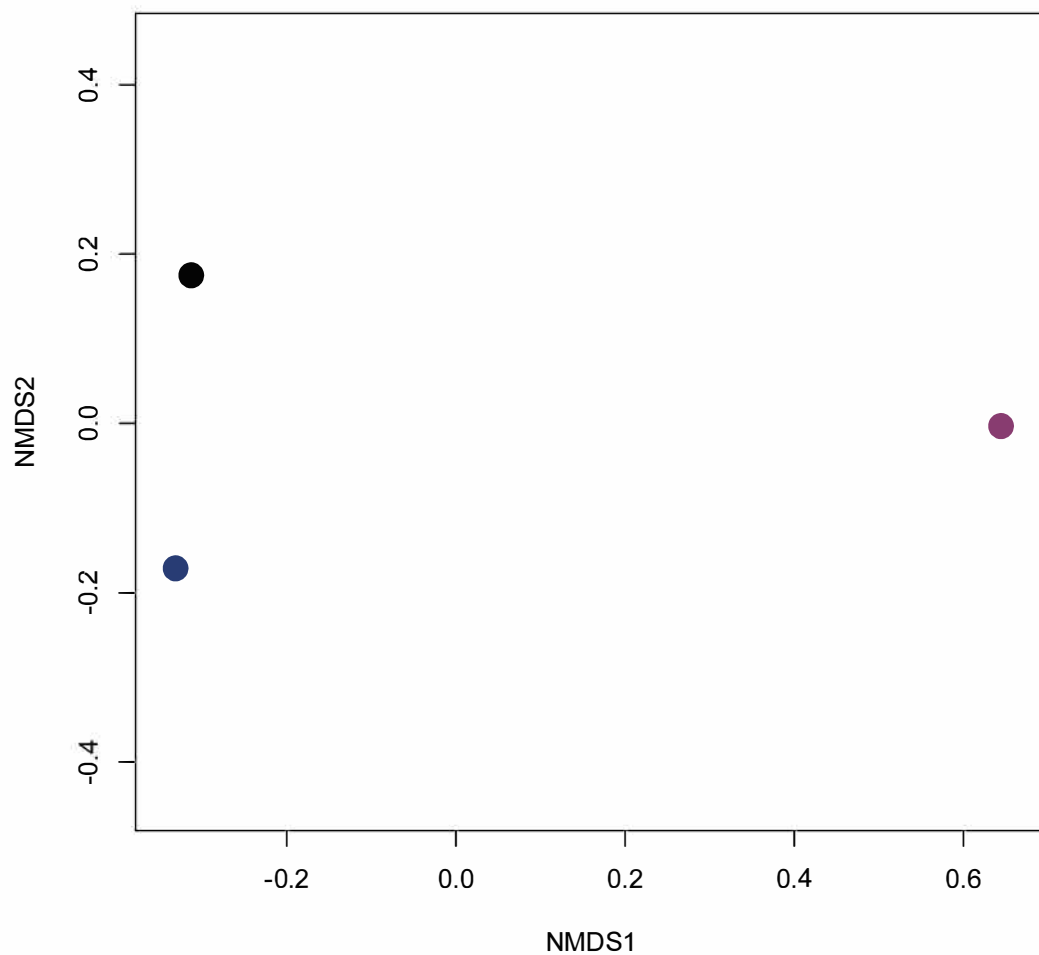


図 5-6. ブナ樹皮・ブナ葉面・ブナ樹下土壌の細菌群集の NMDS 解析

青: ブナ樹皮、黒: ブナ葉面、紫: ブナ樹下土壌

表 5-12. ブナ樹皮・葉面・樹下土壌の細菌群集を構成する門レベル細菌グループ

門レベルの分類階級	構成比率 (%) *		
	樹皮	葉面	土
<i>Acidobacteria</i>	43.7	4.1	45.1
<i>Actinobacteria</i>	1.0	2.9	10
<i>Armatimonadetes</i>	1.9	0.1	0.3
<i>Bacteroidetes</i>	15.7	20.6	2.9
<i>Chlamydiae</i>	0	0	1.0
<i>Chlorobi</i>	0	0	0.1
<i>Chloroflexi</i>	0	0	0.8
<i>Cyanobacteria</i>	0	0.1	0.3
FBP	0.1	0.1	0
FCPU426	0	0	0.3
<i>Firmicutes</i>	0.2	1.2	0.1
<i>Gemmatimonadetes</i>	0.3	0	0.7
<i>Nitrospirae</i>	0	0	0.1
OD1	0	0	0.2
OP3	0	0	0.1
<i>Planctomycetes</i>	0.9	0.4	3.0
<i>Proteobacteria</i>	34.9	71.7	33.3
TM6	0	0	0.5
TM7	0	0	0.1
<i>Verrucomicrobia</i>	1.0	0.1	5.7
WPS-2	0	0	0.8
<i>Deinococcus-Thermus</i>	0.1	0.1	0

* 3 個体・採取場所から得られた結果の平均値を示す。10%以上を太字にした。

4. 樹皮低分子有機化合物と樹皮細菌群集との関係

白神自然観察園で採取したブナ・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・スギ・カラマツ樹皮からの拭取り試料に含有される低分子有機物（以下樹皮成分という）を GC-MS により分析した。1 樹種につき 3 個体から採取し、得られた GC-MS 分析の結果を樹種毎に平均した。標準物質として用いたアジピン酸のピーク面積から求めた相対値を全て足しあわせ、その和に対する個々の物質の比率を求め、いずれかの樹種で 2% 以上の比率であった物質を表 5-13 に示した。樹皮からは糖・アミノ酸・有機酸など細菌のエネルギー源・炭素源となり得る多様な有機物が検出された。表 5-13 は定量的な数値ではないが、グルコースの糖アルコールである D-sorbitol が全樹種の樹皮における主要な有機物であることが予想された。ブナで多く検出された L-threitol は他の樹種では検出されないか、またはごく少量であった。また、他の樹種では中程度の量で検出された D-talose がスギでは主要な有機物であった。

樹皮成分の GC-MS 分析の結果から求めた組成により樹種間の距離行列を作成し、クラスター分析を行った。図 5-7 にクラスター分析の結果をデンドログラムで示す。この図から樹皮成分組成は 2 つの大きなクラスターに別れ、1 つはホオノキ・ヤマナラシ・カラマツ・スギ、他の 1 つはブナ・イタヤカエデ・ミズナラ・ウダイカンバで構成されていた。前者のクラスターではヤマナラシ・カラマツ・スギが比較的近く、ホオノキとは離れていた。後者ではブナを除く 3 樹種の関係が非常に近く、この 3 樹種の樹皮成分組成は類似していることが示された。

表 5-13. 樹皮拭取り試料から GC-MS 分析によって検出された化合物*

化合物	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	スギ	カラマ ツ
D-arabinose	1.0	0.7	2.1	1.6	0.7	1.2	2.9	1.1
D-fructose	1.9	0.9	0.8	1.3	0	1.8	3.4	2.5
D-galactose	0.01	0	0.4	0	0	0	0	0.6
D-glucose	0.5	0.3	0.8	2.8	1.3	0.9	2.2	5.2
xylitol	27.3	23.8	24.4	29.2	16.1	27.6	6.9	24.9
L-threitol	19.1	0	0	1.3	1.8	0	0	0
D-sorbitol	15.5	25.7	30.0	30.2	35.9	25.2	17.7	13.8
D-talose	4.9	4.9	4.0	6.7	3.5	7.3	22.9	6.6
meso-erythritol	0.02	9.5	13.0	7.4	3.0	15.1	0.2	2.8
D-adonitol	0	0	0	1.6	0.8	0	2.0	0.0
L-arabitol	0	0	0	2.7	0	0	0	0
D-mannitol	0	0.1	0.2	0	0	0	0.2	5.9
3-deoxyhexitol	0.8	2.9	8.3	3.1	0.7	0.4	0	1.1
propanoic acid	2.1	3.2	0.3	1.2	1.9	0.5	3.0	2.4

*標準物質アジピン酸との相対面積を全物質について足し合わせ、その和に対する比率を%で示している。

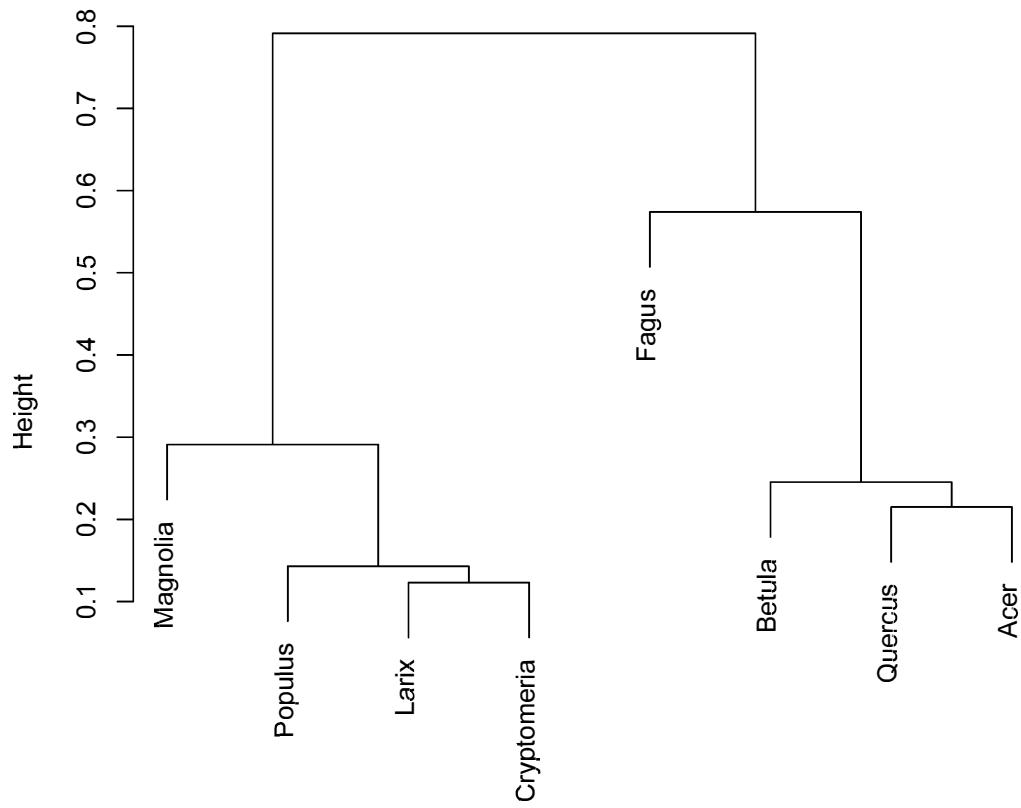


図 5-7. 樹皮拭取り試料成分のクラスター分析

GC-MS 分析で得られた各物質の標準物質アジピン酸との相対ピーク値を用いてクラスター分析に供した。

5. 樹皮真核生物群集

ここまでに樹皮には樹種固有の細菌群集が形成されることが示された。このことから、樹皮環境には樹種固有の生態系が存在することを予想し、樹皮拭取り試料を用いて、真核生物の 18S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った。対象とした樹種はこれまでと同様にブナ・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・スギ・カラマツで、試料の採取はブナを除き全て 2017 年の夏季に観察園内で行った。ブナについては高倉森で採取した試料も解析に供した。アンプリコン解析により得られたデータに基づき NMDS 解析により樹皮真核生物群集を 2 次元座標にプロットして、相違度（あるいは類似度）を視覚化した（図 5-8）。樹皮真核生物群集は樹種別に明確に分離し、ブナ・ホオノキ・イタヤカエデ、ヤマナラシ・ミズナラ、スギ・カラマツではそれぞれ比較的近い関係にあること、ウダイカンバは他の広葉樹と針葉樹（スギ・カラマツ）との間に位置することなど、樹皮細菌群集の特徴（図 5-2）と共通していた。Permutation test では樹種が樹皮真核生物群集と有意水準 0.1% で有意に相関していた（決定係数: 0.902; p 値: 0.001）。表 5-14 に樹皮真核生物群集を構成する生物を門レベルで示した。

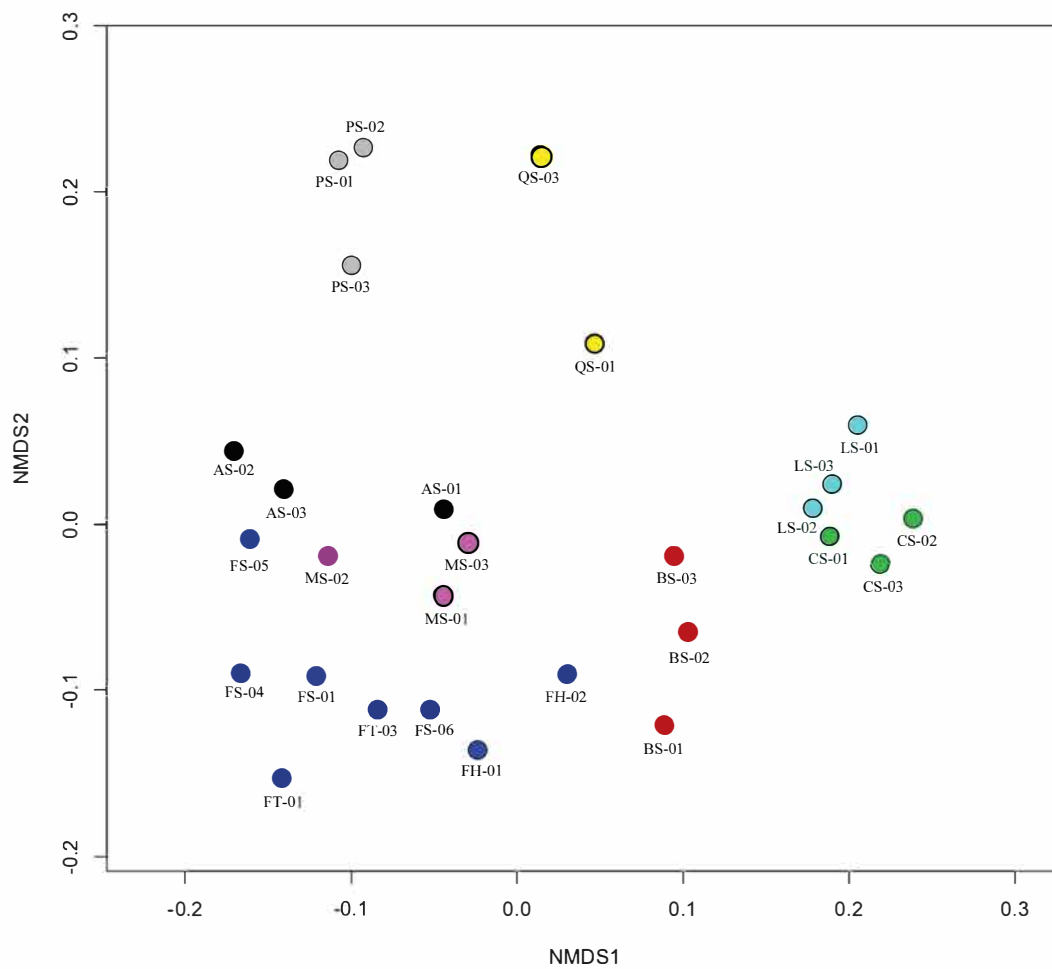


図 5-8. 樹皮真核生物群集の NMDS 解析

青色: ブナ、紫色: ホオノキ、黒色: イタヤカエデ、灰色: ヤマナラシ、黄色: ミズナラ、赤色: ウダイカンバ、緑色: スギ、水色: カラマツ。

表 5-14. 樹皮真核生物群集の構成

門レベルの 分類階級	樹種別の構成 (%)							
	ブナ	ホオノ キ	イタヤ カエデ	ミズナ ラ	ヤマナ ラシ	ウグイ カンバ	スギ	カラマ ツ
<i>Chlorophyta</i>	46.7	33.9	24.0	25.0	23.0	34.7	36.9	32.1
<i>Metazoa</i>	10.5	23.2	27.1	25.0	23.3	8.8	8.8	8.6
<i>Fungi</i>	28.3	23.2	28.4	30.5	41.0	38.5	42.6	48.8
<i>Ciliate</i>	3.8	4.7	7.0	3.7	1.7	2.2	2.1	1.4
<i>Cercozoa</i>	0.3	0.1	0.3	4.5	2.4	0.4	0.5	0.4

第4節 考察

1. 樹皮細菌群集を構成する細菌

樹皮細菌群集は高次分類群においては *Proteobacteria* 門が優占しており、既報の葉圏（葉面・樹皮）細菌群集と同様な結果が得られた（表 5-6）。他の門や下位分類群については樹種間で差異があった。細菌の高次分類群は多様な細菌グループで構成されており、個々の門と樹種とを関連付けて議論することに大きな意味はないので、樹皮細菌群集で優占する下位分類群（表 5-9）の中で特に優占するグループについて概説する。いずれの樹皮においても下位分類群の多様性は低く、少数の OTU で群集の 50%以上を構成する樹種もあった。優占する OTU は樹種間で多くの場合共通していた。表 5-9 で同一の名称はすべて共通の OTU であり、優占する細菌は樹種を問わず共通しているという興味深い結果が得られた。*Acidobacteriaceae* 科は 9 属の正式記載された属を含む *Acidobacteria* 門のグループであるが、表の OTU は既存の属とは異なるグループである。多くは貧栄養の酸性環境を好み、セルロース・キシラン・セロビオースなどの植物由来の基質を利用する種や(García-Fraile *et al.*, 2016)、根圏に生息して植物成長促進作用を示す種も存在する(Kielak *et al.*, 2016)。植物と関連が深いグループで葉面では細菌群集の数%を構成するという報告はあるが(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)、表 5-9 のように 20%を超えるという報告はない。本 OTU は樹皮と関連が深い新規な *Acidobacteria* 門細菌の可能性がある。*Hymenobacter* 属は *Bacteroidetes* 門細菌で紫外線耐性に関与するカロテノイドを生産し(Dai *et al.*, 2009)、主要な葉面細菌であるとの報告もあるが(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)、生態については明らかにされていない。*Chitinophagaceae* 科は同じく *Bacteroidetes* 門細菌で、キチン分解能を有するグループであることから昆虫や真菌と関係が深いとされている(Rosenberg, 2014)。葉面での検出例はあるが、優占細菌とは看做されていない(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)。*Acetobacteraceae* 科は *Proteobacteria* 門に所属するグループでいわゆる酢酸菌の *Acetobacter* 属を含む。本科も葉面での検出例(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)はあるが葉面における生態や機能については不明である。*Sphingomonas* 属は主要な葉圏細菌でカ

ロテノイドを有する有色細菌であり、リグニン由来の芳香族化合物を開裂して資化する細菌グループの1つであることから植物と関連が深く、培養法でも多く分離される(Kim, *et al.*, 1998)。 *Sphingomonas* 属は本研究においても培養可能な優占細菌としてブナとヤマナラシの樹皮から分離されている(表 2-11, 12)。

表 5-9 のリストの中で、 *Alphaproteobacteria* 門の *Methylocystaceae* 科と *Caulobacteraceae* 科の OTU が全試料から検出された Core Microbiome である。いずれも優占度は高くないものの樹皮との関連が強く示唆された。 *Methylocystaceae* 科には *Methylosinus* 属や *Methylocystis* 属に代表されるメタノールなどのメチル基化合物やメタンの代謝を行える細菌グループが所属している (*Pleomorphomonas* 属と *Terasakiella* 属を除く) (Webb *et al.*, 2014)。メタノールは植物がペクチンを代謝する際にメチルエステル基から生じ、葉面に生息する *Methylobacterium* 属などのメチル基化合物利用細菌やメチル基利用性の酵母に利用される(Iguchi *et al.*, 2012; Kawaguchi *et al.*, 2011)。メタンは絶対嫌気条件下でメタン古細菌によって生成される還元物質であるが、近年、植物がペクチンのメチルエステル基から好氣的にメタンを生成することが明らかにされた(Keppler *et al.*, 2006)。Iguchi ら(2015)によると葉圏のメタン酸化細菌が植物由来のメタンの酸化に寄与しているらしい。樹皮からメタンやメタノールが発生するかどうかは不明であるが、メタノールは樹皮拭取り試料からは検出されなかったことから、樹皮の *Methylocystaceae* 科細菌がメタノールやメタンを利用するならば葉で生産されて周辺大気中に拡散したものを利用しているものと思われる。本研究において樹皮からは *Methylocystaceae* 科細菌は分離されなかった(表 2-11~14)。 *Caulobacteraceae* 科には *Caulobacter crescentus* (Skerman *et al.*, 1980)に代表される有柄 (prostheca) 細菌が所属し、多くが貧栄養環境を好む(Abraham *et al.*, 2014)。有柄の *Caulobacteraceae* 科細菌は柄を用いて固体表面に定着することが可能であり、Lafrest-Lapointe ら(2016)も樹木葉面の Core Microbiome の1つとして報告している。本研究ではヤマナラシ樹皮から *Caulobacteraceae* 科の *Brevundimonas* 属の分離に成功したが、保存の間に死滅した。

第2章においてブナ樹皮細菌の計数培地から培養可能な優占細菌として分離された *Burkholderia* 属、*Methylobacterium* 属、*Mucilaginibacter* 属は表 5-9 にはリストされておらず、実際の樹皮細菌群集では非常にマイナーな細菌であることがわかった (*Burkholderia* 属 0.1~0.5%)。表 5-9 にリストされた OTU と種レベルで一致する培養株は得られていない。近縁な培養株はいくつか得られているが、ほとんどが死滅・または増殖能を失うか、あるいは非常に増殖が遅く、培養により機能を明らかにすることは出来なかった。樹皮細菌群集において優占する細菌を分離・維持して解析するためには、培地・培養条件・維持の条件を工夫する必要がある。

2. 樹皮細菌群集に影響を与える要因

2016年と2017年において実施した次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析により樹皮細菌群集の詳細が明らかになった。すなわち、樹皮細菌群集は宿主の樹種と強く相関した (図 5-2; 表 5-11)。また、宿主の生息場所とは樹種によって異なるがやはり相関する傾向にあった (図 5-3; 表 5-11)。今回はブナとホオノキについては比較的十分な試料数を複数の場所から得ることが出来たために、生息場所と細菌群集の有意な相関が得られたものと考えられる。他の樹種について樹皮細菌群集と宿主の生息場所との関係を正確に把握するためにはより試料数を増やす必要があると考えられた。試料の採取場所 (宿主の生息場所) や試料数が多変量解析に与える影響を抑えるために、2017年の夏と秋に実施した観察園内の樹木に限定した解析の結果は樹種と樹皮細菌群集の関係を良く表していると思われる (図 5-4)。NMDS 座標上のプロットは群集間の距離を反映しており群集構造が類似しているほど近い位置にプロットされる (Ramette, 2007)。図 5-4 では同一個体の樹皮細菌群集は採取時季に関わらず近い位置にプロットされ、また同一樹種の場合は近い位置にプロットされる。この結果からも、樹皮細菌群集は樹種と個体に依存的で時季による変動は小さいことが示された。カナダのケベック州の温帯林で実施された 5 樹種 (サトウカエデ *Acer saccharum*、アメリカハナノキ *Acer rubrum*、アメリカシラカンバ *Betula*

papyrifera、バルサムモミ *Abies balsamea*、カナダトウヒ *Picea glauca*) の葉面細菌群集解析では、細菌群集と強く関連するのは宿主の樹種で、時季や場所とは有意な関連性はあるものの樹種との関連性より低いことが示されている (Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)。同一樹種内では葉面細菌群集の形成には個体の影響が大きいとされる (Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016)。さらに、葉面の細菌群集は樹種特異的に形成されるという複数の報告例があり (Kim *et al.*, 2012; Knief *et al.*, 2010; Muller & Ruppel, 2014)、葉面には樹種特異的な細菌群集が形成されることは間違いないと思われる。今回は場所に関しての詳細な解析は出来なかったが、葉面細菌群集と同様に樹皮細菌群集も宿主の樹種および個体と強く関連することが示された。樹皮細菌群集に関する研究例は少ない上に (Cregger, *et al.*, 2018; Leff, *et al.*, 2015)、樹種との関連性を調べた研究は知る限りない。

樹皮の細菌群集に宿主の樹種が大きく関連することは分かったが、では樹種の何が影響しているのだろうか。樹皮真核生物群集は細菌群集と同様に樹種依存的に形成されている (図 5-8)。このことは、樹皮には樹種固有の微生物群集が形成されているということを示唆するものである。樹木の葉面の場合、細菌群集の形成に関与する要因としては、葉に含有される窒素・リンの濃度・単位面積あたりの葉量 (Kembel, *et al.*, 2014) や、気温・降雨・森林密度 (Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016) などが挙げられているが、いずれも数値データの多変量解析による結論であり、実験的な証明が与えられているわけではない。また、葉面細菌群集を構成する細菌の由来についてもよくわかっておらず、葉に永久的に附着する細菌群が近傍の葉に移ることで新たな細菌群集が形成される説や (Lindow & Brandl, 2003; Wilson & Lindow, 1994)、大気、雨水、動物から外来的に移入するという考え (Kembel, *et al.*, 2014) もあるが証明はされていない。なお、周辺の大気に由来する可能性はギリシアの地中海沿岸で行われた樹木葉面細菌に関する研究では否定されている (Vokou *et al.*, 2012)。常緑樹では「葉に永久的に附着する細菌群が近傍の葉に移ることで新たな細菌群集が形成される説」は成立するかもしれないが、落葉樹では難しいであろう。ブナの例ではあるが、図 5-6 に示すように樹皮・葉面・土壌と

の間では細菌群集の関連性は極めて低いため、樹皮細菌が葉や土壌由来であるとは考えにくい。樹皮は葉に比べれば葉圏の中では物理的には安定した生息環境である。動物の食害も病原菌の侵入も葉より受けにくい。幹からの物質の供給は葉に比べれば少ないにしても、図 5-8 と表 5-14 のように樹種固有で光合成生物である藻類を主要な構成者とした真核生物群集が形成されており、細菌などの従属栄養生物は炭素源の供給を光合成微生物に依存することが出来る。樹皮における細菌・真核生物群集の形成には最初に樹皮定着した藻類や地衣類の働きが大きいのもかもしれない。また、その定着に宿主となる樹種の性質（樹皮の表面性状・物理化学的性質・抗菌性など[スギやカラマツ樹皮からは抗菌物質が抽出されている(渋谷 *et al.*, 1998;小藤田 *et al.*, 2001)])が関与しているのもかもしれない。GC-MS 分析によって樹皮から検出された低分子有機化合物の成分パターンは樹種により異なっていた（表 5-13）。その成分パターンの樹種間類似性と樹皮細菌群集の樹種間類似性は一致しなかったが（図 5-7）、樹皮細菌群集を形づくる要因の 1 つであると思われる。

本章の結果により、樹皮には樹種固有の細菌群集が形成されることがわかった。しかし、その形成要因の解明のためには樹木と細菌との関係だけではなく、真核生物との関係も含めて総合的に研究を行う必要がある。

第6章 総括

植物の地下部を根圏、地上部を葉圏という用語で言い表す。根圏では宿主の植物と根圏に生息する微生物（主に細菌）が物質交換・ホルモン生産・感染防御などにより共生的な関係を結んでいることが知られており、特に作物栽培の分野での研究が盛んに行われている。一方で葉圏は、乾燥・太陽光の紫外線・昼夜の温度差などの外因的ストレスに曝され、さらに栄養的にも貧弱な環境であることから、葉圏での微生物との関わりについては不明なところが多い(Iguchi, *et al.*, 2012; Lindow & Brandl, 2003)。葉圏からは窒素固定能や植物ホルモン生成能を有する細菌（*Methylobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Pantoea* 属、*Microbacterium* 属など）が宿主非依存的に分離される(池田, 2014)。葉圏（主に葉面・葉内）に生息する微生物（多くは細菌）は、窒素固定・植物ホルモン生産・抗菌物質生産や拮抗阻害による病原菌からの感染防御などを通じて植物の成長と健康に積極的に関わり、葉圏微生物はそのかわりに宿主に生息の場の提供を受けるとともに栄養（ペクチン由来のメタノール・メタン、クチクラ層のワックス分・アルコールやアセトンなどの揮発性物質）を供給される共生関係を築いていることが近年示唆されるようになってきた(Iguchi, *et al.*, 2012; Lindow & Brandl, 2003; 池田, 2014)。

樹木の葉圏細菌に関する研究は作物・草本植物に比べれば少ないが、次世代シーケンサーによるマーカー遺伝子のアンプリコン解析などの培養非依存的方法が葉圏細菌の研究に適用されるようになり、近年ではいくつかの興味深い事実、樹木葉圏の細菌群集は *Proteobacteria* 門細菌が優占し、群集は宿主依存的に形成されるということが明らかにされている(Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Lambais, *et al.*, 2017; Lambais, *et al.*, 2014; Muller & Ruppel, 2014)。樹木葉圏の細菌に関する研究の対象はほとんどが葉面に限られており、樹皮を対象にした研究はわずかにしか行われていない。また、樹皮を対象にした研究においても樹皮細菌群集の樹種特異性については明らかにされていない。そこで、本研究では培養依存のおよび非依存的手法を適用することにより樹皮に生息する細菌の生態や多様性を解明することを目指した。また、研究のフィールドとしては東アジア最大規模の原生

的なブナ林を有する白神山地を対象とした。白神山地は動植物などの豊富な生態系を誇る魅力的な場所であるが、その生態系を支える微生物の生態・機能・多様性についてはほとんど明らかにされていないことから、白神山地の生態系解明に活用できる成果を得ることも目的の一つとした。

2014年～2016年にかけて実施した白神自然観察園のブナ・ヤマナラシ・スギ・カラマツの樹皮細菌の計数により、樹皮には培養可能な細菌として $5.65 \times 10^2 \sim 2.02 \times 10^4$ cfu/cm² の細菌が生息していた。樹皮細菌の計数培地には多くの有色コロニーが形成されるという葉面での研究と同様な結果が得られ(Lindow & Brandl, 2003)、樹皮は太陽光の紫外線に曝される環境にあることから(Lindow & Brandl, 2003)、紫外線耐性に関与する色素であるカロテノイド(黄色・ピンク色・オレンジ色・赤色)(Stahl & Sies, 2005)やメラニン(黒色)(Geng, *et al.*, 2008)などを産生する着色コロニーが計数培地に多く形成されるものと考えられた。

計数培地から分離された樹皮細菌は *Proteobacteria* 門が最も多く、同門において代表的な葉圏細菌とされる *Methylobacterium* 属と *Sphingomonas* 属が前者はブナ樹皮から、後者はブナとホオノキ樹皮から分離された。

Methylobacterium 属は植物由来のメタノールを代謝したり(Iguchi, *et al.*, 2015)、ホルモン生産・ビタミン生産・病原菌抑制・窒素固定能を通じて植物の成長の促進や健康維持に関与する(Trotsenko, *et al.*, 2001)とされていたため、樹皮における機能と生態に興味を持たれた。しかし、第5章でのアンプリコン解析により、樹皮細菌群集において *Methylobacterium* 属はマイナーな存在であることがわかり、樹皮における生態的・機能的な重要性は低いものと考えられた。*Sphingomonas* 属についてはリグニン由来の芳香族化合物の資化(Kim, *et al.*, 1998)を行う植物との関連性が深いグループであり、群集解析によっても樹皮細菌群集において主要であることが示された。培養可能な優占細菌としてブナから分離された *Burkholderia* 属と *Mucilaginibacter* 属も樹皮細菌群集では量的な重要性は低いことが明らかになった。樹皮細菌群集における優占細菌に種レベルで一致する分離株は得ることができなかった。群集において量的に優占する細菌は生態的にも機能的にもその群集において重要である

と考えられるので、そのような細菌を得るための培地・培養条件を工夫する必要があると考えられた。

Deinococcus 属に所属する細菌株がブナとヤマナラシの樹皮から分離された。*Deinococcus* 属は Brooks と Murray (1981)によって提案された *Deinococcus-Thermus* 門の *Deinococcaceae* 科に所属する分類群である。様々な場所から分離されているが生態については明らかにされていないため、ヤマナラシからの分離株 (PtRA-8 株) を詳細に解析して、葉圏における生態について考察することにした。また、*Armatimonadetes* 門細菌がブナから分離された (AX-7 株)。*Armatimonadetes* 門は 2011 年にヨシの根面から分離された細菌株の解析に基づいて創設された細菌門で (Tamaki, *et al.*, 2011)、ほとんど知見のない門である。そこで、本株について詳細に解析し、樹皮における生態について考察することにした。

ヤマナラシから分離された *Deinococcus* 属に所属する PtRA-8 株は形態学的・生理生化学的・化学分類学的・分子系統学的な特徴解析により、種レベルで新規な細菌であることが確認され学名を *Deinococcus populi* として記載した。PtRA-8 株は高い紫外線耐性を示し、固体表面への附着能を有していた。いずれも樹皮を生息の場とする上で重要な性質であり (岡部, 2012)、細菌群集形成の足場となるバイオフィルムを形成する細菌グループの 1 種であるが、*Deinococcus* 種は樹皮細菌群集において非常にマイナーな存在であり (第 5 章)、これらの特徴は生息の場において自身の生残には関わるが、細菌群集の全体に影響を及ぼさないものと考えられた。PtRA-8 株はブナ・ホオノキ・ミズナラ・イタヤカエデ・ヤマナラシ・ウダイカンバ・スギ・カラマツの樹皮で検出された D-galactose、D-glucose、xylytol、D-sorbitol および D-adonitol の利用が可能であったことから、樹皮においてこれらの成分を利用しているものと推察された。

AX-7 株はブナ樹皮から分離された *Armatimonadetes* 門細菌である。形態学的・生理生化学的・化学分類学的・分子系統学的な特徴解析により、AX-7 株は目レベルで新規な細菌であると判断して学名を *Capsulimonas corticalist* とし、*Armatimonadia* 綱の下に新目・新科・新属・新種を提案することにした。

AX-7 株は厚い莢膜と粘液層に包まれており、乾燥耐性はあったが固体表面への附着は観察されなかった。樹皮は葉面と同様に乾燥ストレスに曝されやすい環境であり(池田, 2014)、AX-7 株の強い乾燥耐性は樹皮において自身の生残に有益な性質であると思われる。また、固体表面への附着は観察されなかったことから樹皮への附着は、すでに形成されたバイオフィームに二次的に起こるものと推察された。樹皮細菌群集における *Armatimonadetes* 門細菌の構成比率は 0.8~2.4%と低かったが、ブナでは *Proteobacteria* (41.5%)、*Acidobacteria* (31.0%)、*Bacteroidetes* (20.4%) の各門に次いで 4 番目の構成比率であった。他の樹種の樹皮細菌群集においても *Armatimonadetes* 門は構成比率では 4 番目か 5 番目に位置づけられた。土壌やブナ葉面の細菌群集ではそれぞれ 0.1%と 0.3%が *Armatimonadetes* 門の構成比率であることから、*Armatimonadetes* 門はこの 2 つの環境に比べれば樹皮を好むことが考えられた。ヤマナラシを除く樹種において *Armatimonadia* 綱の FW68 グループの樹皮 *Armatimonadetes* 門構成比率が最も高く本グループの樹皮との高い関連性が示唆された。特にスギ・カラマツの針葉樹では 90%以上が FW68 グループであることから、FW68 は針葉樹と関連が強いと考えられた。AX-7 株と種レベルで相同な配列の樹皮 *Armatimonadetes* 門内の構成比率はヤマナラシの 0%からスギの 58.8%と様々であった。構成比率からみる限りでは、AX-7 株はスギ・カラマツと関連性が強いように思われた。

樹皮細菌群集は高次分類群では *Proteobacteria* 門が優占しており、既報の葉圏(葉面・樹皮)細菌群集と同様な結果が得られた(Finkel *et al.*, 2016; Kembel, *et al.*, 2014; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Laforest-Lapointe, *et al.*, 2016; Lambais, *et al.*, 2014; Muller & Ruppel, 2014)。他の門や下位分類群については樹種間で差異があった。優占する OTU は樹種間で多くの場合共通していた(表 5-9)。 *Alphaproteobacteria* 門の *Methylocystaceae* 科と *Caulobacteraceae* 科の OTU が Core Microbiome であった。 *Methylocystaceae* 科には *Methylosinus* 属や *Methylocystis* 属に代表されるメタノールなどのメチル基化合物やメタン酸化代謝を行える細菌グループが所属する。 *Caulobacteraceae* 科には *Caulobacter crescentus* (Skerman, *et al.*, 1980)に代表される有柄(prostheca)細

菌が所属し、多くが貧栄養環境を好む(Abraham, *et al.*, 2014)。本研究ではヤマナラシ樹皮から *Caulobacteraceae* 科の *Brevundimonas* 属の分離に成功したが、保存の間に死滅し、特徴付けは出来なかった。

16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析により、樹皮細菌群集は樹種と個体に依存的で時季による変動は小さいことが示された。樹皮には光合成生物の藻類を主要構成者とする真核生物群集が形成され、細菌群集と同様に樹種依存的に形成されていた。これらのことから、樹皮には樹種固有の微生物群集が形成されることが示唆された。

樹皮細菌群集の形成に与える影響は宿主となる樹木の影響が大きいことを明らかにした。しかし、それ以外の要因を解析するための十分な研究を行うことが出来なかった。樹木は草本植物とは異なり実験室で無菌的に栽培することは困難であるため、フィールドでの研究が主体にならざるを得ない。今後、樹皮細菌群集の詳細（多様性・形成要因）を解明するためには、樹種・試料数・場所をある程度増やすとともに、様々な樹齢・健康状態・生息環境にある個体を選択して解析を進める必要があると考えられた。

なお、カラマツを除いて全ての樹種で白神山地以外の場所からも採取して樹皮細菌群集解析を行ったが、やはり群集には宿主の生息（採取）場所よりも樹種が相関しており、白神山地に固有の群集構造は見出されなかった。群集の構成者の中には白神山地に固有の細菌種が存在する可能性は否定できないが、本研究ではその可能性の検討までには至らなかった。

本研究では樹齢およそ 40-50 年の健康な樹木を対象として研究を行い、同一個体、樹種によって固有の細菌群集が形成され、それらが安定していることが示された。また同一樹種内では生息地も細菌群集に影響を与える要因となりうる可能性を示唆する結果も得られている。今後、樹齢・健康・生息環境などが異なる樹木の樹皮細菌群集解析を進めるとともに、同一個体の樹皮細菌群集を継続して解析することにより、樹皮細菌群集が常に安定なのか、あるいは様々な要因によって変動するのかを確かめる必要がある。白神山地は 1993 年にユネスコの世界自然遺産に登録されている。それは白神山地には東アジアで最大の原生的なブナ林（ブナ属が優占する極相林）が分布してい

ることが評価されたことによるものであり、将来に渡って世界自然遺産として認められていくためには白神山地の「顕著で普遍的な価値、すなわち東アジア最大の原生的なブナ林」が維持されていく必要がある。そのためには、白神山地の環境の変化を正確に把握して、その成果を保全管理に活かしていくことが不可欠となる。環境省は2012年に白神山地世界遺産地域モニタリングを策定し (<http://tohoku.env.go.jp/nature/shirakami/monitoring/>)、I. ブナ林を成立させている気象・水象・地象の基礎的環境条件が把握されていること、IIA. 原始性の高いブナ林が、広域で健全な状態に保たれていること、II B. ブナ林における動植物の多様性が適切に保護されていること、III. 利用及び人為活動等が世界遺産登録時の価値を損なわず、かつ地域振興に役立つよう遺産地域周辺の社会状況の変化を踏まえつつ適正に管理されていること、の3項目について調査を実施している。II Bのモニタリング対象は植物・動物・菌類であり、菌類に関しての具体的な調査項目として「土壌菌類、酵母、乳酸菌、放線菌等の状況」が挙げられ、それらについて「酸性降下物による土壌菌類の組成の変動、気候変動による特定菌類の組成の変動等生息環境の不可逆的な変化がみられる」ことが自然遺産の価値を損ねる危機・予兆現象であるとしている(白神山地世界自然遺産地域連絡会議, 2017)。ここでいう菌類とは分類学上の真菌類を指すものではなく、細菌・真菌類を含む微生物一般のことである。モニタリング調査評価書には「現在のところ、酸性降下物による土壌菌類の組成の変動、気候変動による特定菌類の組成の変動等生息環境の不可逆的な変化は報告されていない」と記載されているが(白神山地世界自然遺産地域連絡会議, 2017)、これは単に報告されていないという事実の記載であり、実質的な調査は行われていないのが現状である。本研究は樹皮に生息する細菌を対象としたものであるが、上述のように樹皮には樹種固有の細菌群集が存在し、その構造は少なくとも短期間は安定であるという成果を得ている。もしその安定性が崩れるということがあれば、その樹木の生息環境の恒常性に異常が生じたと判断することが可能であろう。樹皮は土壌とは異なり大気に直接暴露されていることから、気候・気温などの環境変動に影響を受けやすく、環境変動と関連付けた微生物のモニタリングには適した対

象であると思われる。本研究で得た成果は今後の実質的な白神山地微生物モニタリングに資する基礎データとなると期待される。

謝辞

本研究の遂行に当たり、主指導教員として終始御指導御鞭撻を賜りました弘前大学農学生命科学部殿内暁夫教授に心より深く感謝致します。また、熱心なるご指導を頂きました第一副指導教員の弘前大学農学生命科学部赤田辰治准教授に心より感謝申し上げます。第二副指導教員の山形大学農学部加来伸夫教授には研究にわたり多くの貴重なご指導を頂き心より感謝申し上げます。学位審査の際に多くのご助言を頂きました帯広畜産大学大和田琢二教授に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり技術的に協力して頂いた弘前大学農学生命科学部環境微生物学研究室卒業生の海野裕晃氏と新谷つばさ氏に心より感謝いたします。

また、日頃から多くのご助言を頂きました弘前大学農学生命科学部環境微生物学研究室の松尾平三氏と工藤千沙希氏、前川泰輝氏、横山心結氏、山口量平氏に心より感謝いたします。実験施設や様々な実験器具等を使用させて頂き下さった遺伝子実験施設の方々にも厚く御礼申し上げます。そして本論文を作成する上で様々な配慮とご協力を頂いた環境微生物学研究室の学生の皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- Abdelkafi, S., Chamkha, M., Casalot, L., Sayadi, S. & Labat, M. (2005).** Isolation and characterization of a novel *Bacillus* sp., strain YAS1, capable of transforming tyrosol under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 79-84.
- Abraham, W.-R., Rohde, M. & Bennisar, A. (2014).** The family *Caulobacteraceae*. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, pp. 179-205. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Abuzinadah, R. A. & Read, D. J. (1989).** The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. IV. The utilization of peptides by birch (*Betula pendula* L.) infected with different mycorrhizal fungi. *The New Phytologist* **112**, 55-60.
- Ackerly, D. D. (1996).** Canopy structure and dynamics: integration of growth processes in tropical pioneer trees. In *Tropical forest plant ecophysiology*, pp. 619-658: Springer.
- Ahmed, I., Abbas, S., Kudo, T., Iqbal, M., Fujiwara, T. & Ohkuma, M. (2014).** *Deinococcus citri* sp. nov., isolated from citrus leaf canker lesions. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 4134-4140.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Basset, A., Khush, R. S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J. A. & Lemaitre, B. (2000).** The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3376-3381.
- Battista, J. R. (1997).** Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu Rev Microbiol* **51**, 203-224.
- Battista, J. R. & Rainey, F. A. (2015).** *Deinococcus*. In *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, pp. 1-13: John Wiley & Sons, Ltd.
- Berkeley, M. (1845).** Disease in potatoes. *Gardeners' Chronicle* **4**, 608-640.
- Brienen, R. J. W. & Zuidema, P. A. (2005).** Relating tree growth to rainfall in Bolivian rain forests: a test for six species using tree ring analysis. *Oecologia* **146**, 1-12.
- Brooks, B. W. & Murray, R. G. E. (1981).** Nomenclature for “*Micrococcus radiodurans*” and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and

Deinococcus gen. nov., including five species. *Int J Syst Evol Microbiol* **31**, 353-360.

Brown, N. & Whitmore, T. (1992). Do dipterocarp seedlings really partition tropical rain forest gaps? *Phil Trans R Soc Lond B* **335**, 369-378.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L. & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 807-838.

Cairney, J. W. G. & Burke, R. M. (1998). Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan: their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil. *Plant Soil* **205**, 181-192.

Callegan, R. P., Nobre, M. F., McTernan, P. M., Battista, J. R., Navarro-Gonzalez, R., McKay, C. P., da Costa, M. S. & Rainey, F. A. (2008). Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1252-1258.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J. & other authors (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**, 335-336.

Carreiro, M., Sinsabaugh, R., Repert, D. & Parkhurst, D. (2000). Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* **81**, 2359-2365.

Castillo, J. A. & Greenberg, J. T. (2007). Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1225-1238.

Clé, C., Hill, L. M., Niggeweg, R., Martin, C. R., Guisez, Y., Prinsen, E. & Jansen, M. A. K. (2008). Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance. *Phytochemistry* **69**, 2149-2156.

Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L. & Vacher, C. (2012). Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecol* **5**, 509-520.

Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Desprez-Loustau, M. L. & Vacher, C. (2012). The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica*) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytol* **196**, 510-519.

Coutinho, B. G., Das, M., Suarez-Moreno, Z. R., Gonzalez, C. F. & Venturi, V. (2014). The phytopathogenic *Burkholderia*. In *Burkholderia: from genomes to*

function, pp. 161. Edited by T. Coenye and E. Mahenthiralingam: Caister Academic Press.

Cregger, M. A., Veach, A. M., Yang, Z. K., Crouch, M. J., Vilgalys, R., Tuskan, G. A. & Schadt, C. W. (2018). The *Populus* holobiont: dissecting the effects of plant niches and genotype on the microbiome. *Microbiome* **6**, 31.

Crespi, M. & Gálvez, S. (2000). Molecular mechanisms in root nodule development. *J Plant Growth Regul* **19**, 155-166.

Dai, J., Wang, Y., Zhang, L., Tang, Y., Luo, X., An, H. & Fang, C. (2009). *Hymenobacter tibetensis* sp. nov., a UV-resistant bacterium isolated from Qinghai-Tibet plateau. *Syst Appl Microbiol* **32**, 543-548.

Denny, T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In Plant-associated bacteria, pp. 573–644. Edited by S. S. Gnanamanickam: Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands.

Dicke, M. (2000). Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. *Biochem Syst Ecol* **28**, 601-617.

Duchesne, L. C., Peterson, R. & Ellis, B. (1987). The accumulation of plant-produced antimicrobial compounds in response to ectomycorrhizal fungi: A review. *Phytoprotection* **68**, 17-27.

Duddridge, J. A., Malibari, A. & Read, D. J. (1980). Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* **287**, 834.

Dunfield, P. F., Tamas, I., Lee, K. C., Morgan, X. C., McDonald, I. R. & Stott, M. B. (2012). Electing a candidate: a speculative history of the bacterial phylum OP10. *Environ Microbiol* **14**, 3069-3080.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**, 1792-1797.

Eichorst, S. A., Kuske, C. R. & Schmidt, T. M. (2011). Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 586-596.

Embley, T. M., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. & O'Donnell, A. G. (1984). Lipid and wall amino acid composition in the classification of *Rothia dentocariosa*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* **257**, 285-295.

Enya, J., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K. & Tsushima, S. (2007). Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microb Ecol* **53**, 524-536.

- Feng, G. D., Wang, Y. H., Li, Y. X. & Zhu, H. H. (2015).** *Deinococcus metalli* sp. nov., isolated from an abandoned lead-zinc mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 3457-3461.
- Ferreira, A. C., Nobre, M. F., Rainey, F. A., Silva, M. T., Wait, R., Burghardt, J., Chung, A. P. & da Costa, M. S. (1997).** *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 939-947.
- Fett, W. F., Osman, S. F. & Dunn, M. F. (1987).** Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1839-1845.
- Finkel, O. M., Burch, A. Y., Elad, T., Huse, S. M., Lindow, S. E., Post, A. F. & Belkin, S. (2012).** Distance-decay relationships partially determine diversity patterns of phyllosphere bacteria on *Tamarix* trees across the Sonoran Desert. *Appl Environ Microbiol* **78**, 6187-6193.
- Finkel, O. M., Delmont, T. O., Post, A. F. & Belkin, S. (2016).** Metagenomic signatures of bacterial adaptation to life in the phyllosphere of a salt-secreting desert tree. *Appl Environ Microbiol* **82**, 2854-2861.
- Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F. & Sessitsch, A. (2008).** Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. *ISME J* **2**, 561.
- García-Fraile, P., Benada, O., Cajthaml, T., Baldrian, P. & Lladó, S. (2016).** *Terracidiphilus gabretensis* gen. nov., sp. nov., an abundant and active forest soil *Acidobacterium* important in organic matter transformation. *Appl Environ Microbiol* **82**, 560-569.
- Geng, J., Yu, S.-B., Wan, X., Wang, X.-J., Shen, P., Zhou, P. & Chen, X.-D. (2008).** Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *J Biochem Biophys Methods* **70**, 1151-1155.
- Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T. & Kersters, K. (1998).** Evaluation of a microplate DNA - DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol* **44**, 1148-1153.
- Gourion, B., Rossignol, M. & Vorholt, J. A. (2006).** A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13186.
- Gu, X., Fu, Y. X. & Li, W. H. (1995).** Maximum likelihood estimation of the

heterogeneity of substitution rate among nucleotide sites. *Mol Biol Evol* **12**, 546-557.

Haider, K. & Trojanowski, J. (1975). Decomposition of specifically ¹⁴C-labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft and white rot fungi. *Arch Microbiol* **105**, 33-41.

Hambleton, S. & Currah, R. S. (1997). Fungal endophytes from the roots of alpine and boreal *Ericaceae*. *Can J Bot* **75**, 1570-1581.

Haruna, E., Zin, N. M., Kerfahi, D. & Adams, J. M. (2018). Extensive overlap of tropical rainforest bacterial endophytes between soil, plant parts, and plant species. *Microb Ecol* **75**, 88-103.

Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* **13**, 125-135.

Hatakka, A. & Hammel, K. E. (2011). Fungal biodegradation of lignocelluloses. In *Industrial Applications*, pp. 319-340. Edited by M. Hofrichter. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* **95**, 641-655.

Hayward, A. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.

Himejima, M., Hobson, K. R., Otsuka, T., Wood, D. L. & Kubo, I. (1992). Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: A defense mechanism against microbial invasion. *J Chem Ecol* **18**, 1809-1818.

Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L. & Pace, N. R. (1998). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* **180**, 366-376.

Iguchi, H., Sato, I., Sakakibara, M., Yurimoto, H. & Sakai, Y. (2012). Distribution of methanotrophs in the phyllosphere. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 1580-1583.

Iguchi, H., Yurimoto, H. & Sakai, Y. (2015). Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria. *Microorganisms* **3**, 137-151.

Im, W. T., Hu, Z. Y., Kim, K. H., Rhee, S. K., Meng, H., Lee, S. T. & Quan, Z. X. (2012). Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*. *Antonie Leeuwenhoek*

102, 307-317.

Jackson, C. R. & Denney, W. C. (2011). Annual and seasonal variation in the phyllosphere bacterial community associated with leaves of the southern *Magnolia* (*Magnolia grandiflora*). *Microb Ecol* **61**, 113-122.

Johann, S., Oliveira, V. L. d., Pizzolatti, M. G., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Branco, A. & Smânia Jr, A. (2007). Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**, 681-685.

Jumpponen, A. & Jones, K. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol* **184**, 438-448.

Jung, T. (2009). Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. *For Pathol* **39**, 73-94.

Kampfer, P., Lodders, N., Huber, B., Falsen, E. & Busse, H. J. (2008). *Deinococcus aquatilis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2803-2806.

Kawaguchi, K., Yurimoto, H., Oku, M. & Sakai, Y. (2011). Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plos One* **6**, e25257.

Kembel, S. W. & Mueller, R. C. (2014). Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities. *Botany* **92**, 303-311.

Kembel, S. W., O'Connor, T. K., Arnold, H. K., Hubbell, S. P., Wright, S. J. & Green, J. L. (2014). Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13715-13720.

Keppler, F., Hamilton, J. T., Brass, M. & Rockmann, T. (2006). Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* **439**, 187-191.

Kerley, S. J. & Read, D. J. (1998). The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. XX. Plant and mycorrhizal necromass as nitrogenous substrates for the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ericae* and its host. *New Phytol* **139**, 353-360.

Kielak, A. M., Cipriano, M. A. & Kuramae, E. E. (2016). *Acidobacteria* strains from subdivision 1 act as plant growth-promoting bacteria. *Arch Microbiol* **198**, 987-993.

Kim, B. H. & Gadd, G. M. (2008). *Bacterial Physiology and Metabolism*. Cambridge: Cambridge University Press.

Kim, H., Nishiyama, W., Kunito, T., Senoo, K., Kawahara, K., Murakami, K. & Oyaizu, H. (1998). High population of *Sphingomonas* species on plant surface. *J Appl Microbiol* **85**, 731-736.

Kim, M., Singh, D., Lai-Hoe, A., Go, R., Abdul Rahim, R., Ainuddin, A. N., Chun, J. & Adams, J. M. (2012). Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees. *Microb Ecol* **63**, 674-681.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C. & Vorholt, J. A. (2010). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *ISME J* **4**, 719-728.

Komagata, K. & Suzuki, K.-I. (1988). 4 Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. In *Methods Microbiol*, pp. 161-207: Elsevier.

Körner, C. (2003). *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems; with 47 tables*: Springer Science & Business Media.

Kubicek, C. P., Starr, T. L. & Glass, N. L. (2014). Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **52**, 427-451.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**, 1870-1874.

Laforest-Lapointe, I., Messier, C. & Kembel, S. W. (2016). Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure. *Microbiome* **4**, 27.

Laforest-Lapointe, I., Messier, C. & Kembel, S. W. (2016). Tree phyllosphere bacterial communities: exploring the magnitude of intra- and inter-individual variation among host species. *PeerJ* **4**, e2367.

Laforest-Lapointe, I., Paquette, A., Messier, C. & Kembel, S. W. (2017). Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature* **546**, 145-147.

Lai, W. A., Kampfner, P., Arun, A. B., Shen, F. T., Huber, B., Rekha, P. D. & Young, C. C. (2006). *Deinococcus ficus* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Ficus religiosa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 787-791.

Lambais, M. R., Barrera, S. E., Santos, E. C., Crowley, D. E. & Jumpponen, A. (2017). Phyllosphere metaproteomes of trees from the Brazilian atlantic forest show

high levels of functional redundancy. *Microb Ecol* **73**, 123-134.

Lambais, M. R., Crowley, D. E., Cury, J. C., Büll, R. C. & Rodrigues, R. R. (2006). Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. *Science* **312**, 1917.

Lambais, M. R., Lucheta, A. R. & Crowley, D. E. (2014). Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the Atlantic forest are host taxon dependent. *Microb Ecol* **68**, 567-574.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc.

Last, F. (1955). Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves. *Transactions of the British Mycological Society* **38**, 221-239.

Lee, C.-Y. K. (2015). The first insights into the phylogeny, genomics, and ecology of the novel bacterial phylum *Armatimonadetes*. In Hamilton, New Zealand: University of Waikato.

Lee, K. C., Dunfield, P. F., Morgan, X. C., Crowe, M. A., Houghton, K. M., Vyssotski, M., Ryan, J. L., Lagutin, K., McDonald, I. R. & Stott, M. B. (2011). *Chthonomonas calidirosea* gen. nov., sp. nov., an aerobic, pigmented, thermophilic micro-organism of a novel bacterial class, *Chthonomonadetes* classis nov., of the newly described phylum *Armatimonadetes* originally designated candidate division OP10. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2482-2490.

Lee, K. C., Herbold, C. W., Dunfield, P. F., Morgan, X. C., McDonald, I. R. & Stott, M. B. (2013). Phylogenetic delineation of the novel phylum *Armatimonadetes* (former candidate division OP10) and definition of two novel candidate divisions. *Appl Environ Microbiol* **79**, 2484-2487.

Lee, K. C., Morgan, X. C., Dunfield, P. F., Tamas, I., McDonald, I. R. & Stott, M. B. (2014). Genomic analysis of *Chthonomonas calidirosea*, the first sequenced isolate of the phylum *Armatimonadetes*. *ISME J* **8**, 1522-1533.

Lee, K. C. Y., Dunfield, P. F. & Stott, M. B. (2014). The Phylum *Armatimonadetes*. In *The Prokaryotes: Other major lineages of bacteria and the Archaea*, pp. 447-458. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Leff, J. W., Del Tredici, P., Friedman, W. E. & Fierer, N. (2015). Spatial structuring of bacterial communities within individual *Ginkgo biloba* trees. *Environ Microbiol* **17**, 2352-2361.

Li, Y., Guo, L.-m., Chang, J.-p., Xie, S.-j., Piao, C.-g. & Li, X. (2016).

Corticobacterium populi gen. nov., sp. nov., a member of the family Phyllobacteriaceae, isolated from bark of *Populus×euramericana*. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 2617-2622.

Lindow, S. E. & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1875-1883.

Lücking, R. (2008). *Foliicolous lichenized fungi*: Bronx, NY: Published for the Organization for Flora Neotropica by the New York Botanical Garden Press, 2008.

Madsen, E. (2015). *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*. USA: Blackwell Publishing.

Malam Issa, O., Stal, L. J., Défarge, C., Couté, A. & Trichet, J. (2001). Nitrogen fixation by microbial crusts from desiccated Sahelian soils (Niger). *Soil Biol Biochem* **33**, 1425-1428.

Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol* **3**, 208-IN201.

Marmur, J. & Doty, P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* **5**, 109-118.

Meaden, S., Metcalf, C. & Koskella, B. (2016). The effects of host age and spatial location on bacterial community composition in the English Oak tree (*Quercus robur*). *Env Microbiol Rep* **8**, 649-658.

Migahed, F. F. & Nofel, A. M. (2001). Leaf exudates of *Vicia faba* and their effects on *Botrytis fabae* and some associated fungi. *Mycobiology* **29**, 198-204.

Minnikin, D. E., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* **2**, 233-241.

Mizukami, T. & Wakimoto, S. (1969). Epidemiology and control of bacterial leaf blight of rice. *Annu Rev Phytopathol* **7**, 51-72.

Mohite, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr* **13**, 638-649.

Morozumi, T. & Nicolet, J. (1986). Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J Clin Microbiol* **23**, 138-142.

Muller, T. & Ruppel, S. (2014). Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiol Ecol* **87**, 2-17.

- Nishijima, M., Araki-Sakai, M. & Sano, H. (1997).** Identification of isoprenoid quinones by frit-FAB liquid chromatography–mass spectrometry for the chemotaxonomy of microorganisms. *J Microbiol Methods* **28**, 113-122.
- Nogales, B., Moore, E. R., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R. & Timmis, K. N. (2001).** Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1874-1884.
- Nogales, B., Moore, E. R., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R. & Timmis, K. N. (2001).** Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1874-1884.
- Nokhal, T. & Schlegel, H. (1983).** Taxonomic study of *Paracoccus denitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* **33**, 26-37.
- Oren, A. & Garrity, G. M. (2016).** List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol* **66**, 4299-4305.
- Osono, T., Bhatta, B. K. & Takeda, H. (2004).** Phyllosphere fungi on living and decomposing leaves of giant dogwood. *Mycoscience* **45**, 35-41.
- Ou, S. H. (1985).** *Rice diseases*: IRRI.
- Pankratov, T. A., Tindall, B. J., Liesack, W. & Dedysh, S. N. (2007).** *Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan- and laminarin-degrading members of the family *Sphingobacteriaceae* from acidic Sphagnum peat bog. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2349-2354.
- Penuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A. S. & Terradas, J. (2012).** Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biol (Stuttg)* **14**, 565-575.
- Piercey, M., Thormann, M. & Currah, R. (2002).** Saprobic characteristics of three fungal taxa from ericalean roots and their association with the roots of *Rhododendron groenlandicum* and *Picea mariana* in culture. *Mycorrhiza* **12**, 175-180.
- Poupin, M. J., Timmermann, T., Vega, A., Zuniga, A. & Gonzalez, B. (2013).** Effects of the plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* **8**, e69435.
- Rainey, F. A., Ray, K., Ferreira, M. & other authors (2005).** Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and

description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5225-5235.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**, 142-160.

Reasoner, D. J. & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1-7.

Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y. & Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* **12**, 2885-2893.

Redford, A. J. & Fierer, N. (2009). Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. *Microb Ecol* **58**, 189-198.

Reed, S. C., Townsend, A. R., Cleveland, C. C. & Nemergut, D. R. (2010). Microbial community shifts influence patterns in tropical forest nitrogen fixation. *Oecologia* **164**, 521-531.

Rosenberg, E. (2014). The family *Chitinophagaceae*. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, pp. 493-495. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Ruinen, J. (1956). Occurrence of *Beijerinckia* species in the 'Phyllosphere'. *Nature* **177**, 220-221.

Sahashi, N., Kubono, T. & Shoji, T. (1994). Temporal Occurrence of dead seedlings of Japanese beech and associated fungi. *Journal of the Japanese Forestry Society* **76**, 338-345.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Sandhu, A., Halverson, L. J. & Beattie, G. A. (2009). Identification and genetic characterization of phenol-degrading bacteria from leaf microbial communities. *Microb Ecol* **57**, 276-285.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**, 3875-3883.

Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**, 407.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H. & Robinson, C. J. (2009).

Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7537-7541.

Schmitz, S., Zini, J. & Chandelier, A. (2009). Involvement of phytophthora species in the decline of beech *Fagus sylvatica* in Wallonia (Belgium). In The fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party pp. 320-323. Monterey.

Shokri, D. & Emtiazi, G. (2010). Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design. *Curr Microbiol* **61**, 217-225.

Singleton, P. (2006). *Dictionary of microbiology and molecular biology* / Paul Singleton, Diana Sainsbury. New York: Wiley.

Sinsabaugh, R. L., Antibus, R. K. & Linkins, A. E. (1991). An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agr Ecosyst Environ* **34**, 43-54.

Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol*, 225-420.

Srinivasan, S., Lee, J. J., Lim, S. Y., Joe, M. H., Im, S. H. & Kim, M. K. (2015). *Deinococcus radioresistens* sp. nov., a UV and gamma radiation-resistant bacterium isolated from mountain soil. *Antonie Leeuwenhoek* **107**, 539-545.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today* **33**, 152-155.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. & other authors (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.

Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 846-849.

Stahl, W. & Sies, H. (2005). Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1740**, 101-107.

Suda, W., Nagasaki, A. & Shishido, M. (2009). Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. *Microbes Environ* **24**, 217-223.

Sundin, G. W. & Jacobs, J. L. (1999). Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Microb Ecol* **38**, 27-38.

- Suresh, K., Reddy, G. S., Sengupta, S. & Shivaji, S. (2004).** *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 457-461.
- Surico, G., Mugnai, L., Pastorelli, R., Giovannetti, L. & Stead, D. E. (1996).** *Erwinia alni*, a new species causing bark cankers of alder (*Alnus* Miller) species. *Int J Syst Evol Microbiol* **46**, 720-726.
- Sylvia, D. M. & Sinclair, W. A. (1983).** Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology* **73**, 390-397.
- Tamaki, H., Tanaka, Y., Matsuzawa, H., Muramatsu, M., Meng, X. Y., Hanada, S., Mori, K. & Kamagata, Y. (2011).** *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1442-1447.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993).** Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* **10**, 512-526.
- Tanaka, M., Earl, A. M., Howell, H. A., Park, M. J., Eisen, J. A., Peterson, S. N. & Battista, J. R. (2004).** Analysis of *Deinococcus radiodurans*'s transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance. *Genetics* **168**, 21-33.
- Thri Murty, V. S. & Devadath, S. (1984).** Role of seed in survival and transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* causing bacterial blight of rice. *J Phytopathol* **110**, 15-19.
- Tonouchi, A., Tazawa, D. & Fujita, T. (2014).** *Paenibacillus shirakamiensis* sp. nov., isolated from the trunk surface of a Japanese oak (*Quercus crispula*). *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 1763-1769.
- Treutter, D. (2006).** Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ Chem Lett* **4**, 147.
- Trotsenko, Y. A., Ivanova, E. G. & Doronina, N. V. (2001).** Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology* **70**, 623-632.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. & Palmer, J. D. (1999).** Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol* **46**, 327-338.
- Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K. & Matsuyama, N. (2006).** *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and

leaf-sheath browning of rice plants. *J Gen Plant Pathol* **72**, 98-103.

Urs, N. & Dunleavy, J. (1975). Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans, bacterial diseases]. *Phytopathology*.

Villarreal-Ruiz, L., Anderson, I. C. & Alexander, I. J. (2004). Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytol* **164**, 183-192.

Vokou, D., Vareli, K., Zarali, E., Karamanoli, K., Constantinidou, H. I., Monokrousos, N., Halley, J. M. & Sainis, I. (2012). Exploring biodiversity in the bacterial community of the Mediterranean phyllosphere and its relationship with airborne bacteria. *Microb Ecol* **64**, 714-724.

Voříšková, J. & Baldrian, P. (2013). Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J* **7**, 477.

Vrålstad, T., Schumacher, T. & Taylor, A. F. (2002). Mycorrhizal synthesis between fungal strains of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and potential ectomycorrhizal and ericoid hosts. *New Phytol* **153**, 143-152.

Wang, G.-L., Song, W.-Y., Ruan, D.-L., Sideris, S. & Ronald, P. C. (1996). The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & other authors (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

Webb, H. K., Ng, H. J. & Ivanova, E. P. (2014). The family *Methylocystaceae*. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, pp. 341-347. Edited by E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt and F. Thompson. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Weih, M. & Karlsson, P. S. (2001). Growth response of Mountain birch to air and soil temperature: is increasing leaf-nitrogen content an acclimation to lower air temperature? *New Phytol* **150**, 147-155.

Weon, H. Y., Kim, B. Y., Schumann, P., Son, J. A., Jang, J., Go, S. J. & Kwon, S. W. (2007). *Deinococcus cellulosityticus* sp. nov., isolated from air. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1685-1688.

Whipps, J., Hand, P., Pink, D. & Bending, G. D. (2008). Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J Appl Microbiol* **105**, 1744-1755.

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. In Current Protocols in Molecular Biology: John Wiley & Sons, Inc.

Wilson, K., Benton, T. G., Graham, R. I. & Grzywacz, D. (2013). Pest control: Biopesticides' potential. *Science*.

Wilson, M. & Lindow, S. E. (1994). Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4468-4477.

Yamaguchi, M., Okada, H. & Namiki, Y. (2009). Smart specimen preparation for freeze substitution and serial ultrathin sectioning of yeast cells. *J Electron Microscop (Tokyo)* **58**, 261-266.

Yang, Y., Itoh, T., Yokobori, S., Shimada, H., Itahashi, S., Satoh, K., Ohba, H., Narumi, I. & Yamagishi, A. (2010). *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 776-779.

Yeoh, Y. K., Dennis, P. G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M. A., Schmidt, S. & Hugenholtz, P. (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. *Nat Commun* **8**, 215.

Zhang, Y. Q., Sun, C. H., Li, W. J., Yu, L. Y., Zhou, J. Q., Zhang, Y. Q., Xu, L. H. & Jiang, C. L. (2007). *Deinococcus yunweiensis* sp. nov., a gamma- and UV-radiation-resistant bacterium from China. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 370-375.

井原, 望. (2016). 浴室に潜むピンクモンスター. *生物工学会誌* **94**, 207.

岡部, 聡. (2012). バイオフィルムの理解・制御から共存へ. *日本海水学会誌* **66**, 191-197.

玉木, 秀. & 鎌形, 洋. (2012). 環境ゲノム情報時代の未知微生物探索研究. *化学と生物* **50**, 730-741.

黒田, 慶. (1996). 樹病:病原微生物の感染戦略と樹木の反応— . *木材保存* **22**, 205-214.

佐々木長市, 殿内明夫, 野田香織, 松山信彦, 桧垣大助 & 諸泉利嗣 (2004). 白神山地の土壌に関する研究 (1). *白神研究: Shirakami kenkyu*, 24-29.

渋谷, 栄., 鮫島, 正. & 佐分, 義. (1998). 日本産針葉樹樹皮抽出成分の抗菌活性について. *東京大学農学部演習林報告*, 219-233.

小藤田, 久., 藤野, 陽., 佐々木, 達., 長谷部, 真., 太田, 路. & 鈴木, 幸. (2001). スギ樹皮の抗菌活性とその関連成分. *木材学会誌* **47**, 479-486.

松尾, 平. (2015). 白神山地土壤の細菌群集構造と難培養性 Acidobacteria 門細菌に関する研究. In 弘前大学農学生命科学研究科 修士論文.

森川, 正. (2012). 生物工学基礎講座 バイオよもやま話 バイオフィルムを調べてみよう. *生物工学会誌* 90, 246-250.

深澤, 遊. (2013). 木材腐朽菌による材の腐朽型が枯死木に生息する生物群集に与える影響(<特集>枯死木をめぐる生物間相互作用). *日本生態学会誌* 63, 311-325.

池田, 成. (2014). 植物と微生物 2. In 環境と微生物の事典, pp. 320-321.

潮, 雅. (2017). マキ科・ナンヨウスギ科の根の形態・菌根菌・窒素固定活性. *日本生態学会誌* 67, 339-345.

白神山地世界自然遺産地域連絡会議 (2017). 白神山地世界遺産地域モニタリング計画. In, pp. 1-21: 東北森林管理局.

平石, 明. (2016). 微生物系統分類学の潮流 環境微生物の培養性とその生態学的意義. *日本微生物資源学会誌 = Microbial resources and systematics* 32, 1-11.

牧田肇 (2004). 白神山地の自然と人: 伝統と未来. *白神研究: Shirakami kenkyu*, 2-4.