

Establishment and Application of Nucleic Acid-Based Methods for Ecological Studies of Myxomycetes

(変形菌類の生態解明のための核酸を用いた研究手法の確立および適用)

学位論文内容の要旨

変形菌類（真正粘菌類）は特異な生活史をとる真核微生物である。その生態学的研究は主に、休眠期を代表する子実体のステージを対象として行われてきた。一方、栄養期には、単細胞一核性のアメーバ状細胞とアメーバ状多核体の変形体の二つのステージがある。これら栄養期にはバクテリアやカビなどを餌としており、重要な生態的地位を占めることが示唆されている。しかし、栄養期の環境中における生態については、ほとんど解明されていない。その理由のひとつとして、分類・同定が主に子実体の形態形質に基づいて行われている一方で、子実体以外のステージでは肉眼や顕微鏡観察での検出・識別が不可能な場合が多いことが挙げられる。加えて、培養法が十分に確立されていないため、土壌などの環境試料中の変形菌類を培養により検出・定量する手法や、培養により子実体形成を促して同定する手法では、試料中の変形菌類を正確に把握しきれないと言える。これらの制限は、環境中における微生物の生態研究で多くの場合本質的に共通している。近年、微生物生態学において、非培養法として微生物の核酸（DNA および RNA）を直接扱う分子生態学的手法も広く用いられるようになった。こうした手法を用いることで、生活史を通して培養に依存しない変形菌類の検出・識別が可能となり、環境中での生態解明に大きく貢献するものと期待される。本研究では、スモールサブユニットリボソーム RNA 遺伝子（SSU rDNA）を分子マーカーとして選択した。しかし、研究開始時に公表されていた変形菌類の SSU rDNA 塩基配列情報は極めて乏しかったため、変形菌類すべてを対象とすることは困難であった。そこで、研究が比較的進んでいる分類群である Didymiaceae 科と Physaraceae 科を対象として、PCR を利用する生態研究手法の確立を行い、環境試料に適用することを本研究の目的とした。

最初に、登録配列に基づいて PCR プライマーを設計し、子実体試料を用いてプライマーの特異性を評価した。形態形質に基づき同定された乾燥子実体標本の一部から DNA を直接抽出し、PCR に供した。その結果、設計したプライマーペアを用いることにより、Didymiaceae 科の 5 属（*Diachea*, *Diderma*, *Didymium*, *Lepidoderma*, *Mucilago*）と Physaraceae 科の 5 属（*Badhamia*, *Craterium*, *Fuligo*, *Leocarpus*, *Physarum*）に属する 192 試料から増幅産物が得られた。それらの塩基配列解析により、全試料で変形菌類に由来する単一 DNA 断片が得られたことが示された。また、PCR 解析において、期待される増幅断片より長い産物が 24 試料で得られたが、これはイントロン挿入によるものであった。解析した SSU rDNA 領域には 2 ヶ所の挿入部位が認められた。

エキソンの塩基配列については、同一の種/変種/品種に属す試料間で異なる配列が認められた一方で、同じ配列は同一の種/変種の試料からのみ得られた。したがって、同じ配列をもつ試料は同種または同変種に属すると考えられた。このことは、SSU rDNA 配列データベースを比較対照として用いることにより、環境中から直接得た DNA 断片の塩基配列からその由来を推定することを可能とする。環境試料によっては複数の対象生物が混在しており、このような試料の抽出核酸を解析する場合には、個々の生物を区別することが必要となる。ここでは、二本鎖 DNA 断片をその配列の違いによりバンドとして分離する、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) の利用を検討した。設計プライマーペアの PCR-DGGE への適用を、土壌試料を用いて評価した。その結果、対象変形菌類に由来する配列の分離・同定ができ、手法の有効性が示された。そこで、この確立した分子生態学的研究手法を用い、下記の解析を行った。

子実体の野外採集に基づく知見から、変形菌類の多くはおそらく汎存種であると考えられている。これは、散布様式が効果的であることを示唆し、その主要な様式として胞子の風散布が挙げられる。しかし、飛散している変形菌類を実際に調べた研究は非常に少ない。そこで、空気中の対象変形菌類の季節変化を調べるために、北海道大学低温科学研究所建物屋上で捕集されたエアロゾル試料に上記手法を適用した。捕集時期の異なる試料から抽出した DNA を PCR に供し、DGGE 解析を行った結果、バンドパターンに季節による違いがみられた。DGGE バンドの塩基配列を解析し、得られた 9 配列のうち 4 つを同定できた。このことは、北海道で採集した子実体 40 試料の配列データベースを構築することにより可能となった。2001、2002、2005 年の雪解け時期では類似のバンドパターンが示された。この時期にのみ検出されたバンドのひとつは *Didymium dubium* に相当した。この種は、日本において残雪の縁付近の植物遺体上に子実体を形成することが知られている。胞子形成時期に対応した DGGE バンドの検出がみられ、空気中から検出される対象変形菌類が季節的に変動することが示された。

土壌中の変形菌類を対象とした培養に基づく定量的解析法により、存在やその量に関する研究が行われてきた。しかし、土壌中における変形菌類の群集構造自体については捉えきれていない。そこで、低温科学研究所付近の調査区 (人工植栽地) で採取した土壌試料を用い、対象変形菌類の群集構造の時間的・空間的变化を調べた。ここでは RNA に基づいた解析を行い、増幅はセミネステッド RT-PCR 法によった。2006 年 4、6、7 月に 1 回ずつ土壌採取を行い、各採取日に 3 本の土壌コアを採取した。解析の結果、少なくとも 6 本の異なる DGGE バンドが検出され、各採取日のコア間および土壌深度間で DGGE バンドパターンに小さな差異が認められた。この結果は、土壌中において変形菌類が空間的に不均質な分布をすることを示唆する。一方で、それら 6 本のバンドは、積雪下より試料を採取した 4 月も含め、すべての採取日で検出された。しかし、土壌中から得た配列はいずれも、同じ調査区で採集した子実体 4 試料のものとは同一でなかった。この解析では変形菌類の群集構造に大きな変動は認められなかったが、得られたデータを基に定量的解析を行うことでより詳細に群集を捉えることが可能となるであろう。

本研究において確立した核酸を用いた研究手法は、Didymiaceae 科と Physaraceae 科の生態研究において有効であることが示された。今後、子実体試料や環境試料を用いた塩基配列情報の蓄積により、飛躍的に生態解明が進むものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 井 学
副 査 教 授 甲 山 隆 司
副 査 助 教 授 笠 原 康 裕
副 査 室 長 萩 原 博 光 (国立科学博物館植物
研究部)

学位論文題名

Establishment and Application of Nucleic Acid-Based Methods for Ecological Studies of Myxomycetes

(変形菌類の生態解明のための核酸を用いた研究手法の確立および適用)

変形菌類の生態研究は主に、休眠期を代表する子実体のステージを対象として行われている。栄養期の環境中における生態を知ることは、変形菌類の生態を捉える上で重要であると言える。しかし、その栄養期の生態は、ほとんど解明されていない。その理由として、分類・同定が主に子実体の形態形質に基づいて行われている一方で、子実体以外のステージでは肉眼や顕微鏡観察での検出・識別が不可能な場合が多いことが挙げられる。加えて、培養法が十分に確立されていない。これらの制限は、微生物の生態研究で多くの場合本質的に共通している。近年、微生物生態学において、非培養法として微生物の核酸を直接扱う分子生態学的手法も広く用いられている。こうした手法により、生活史を通して培養に依存しない変形菌類の検出・識別が可能となると期待される。本学位論文は、変形菌類を対象とした分子生態学的手法を確立し、これを用い環境中の変形菌類の生態を解明することを目的としたもので、その成果の要約を下記に示す。

研究手法の確立では最初に、Physarales 目の Didymiaceae 科と Physaraceae 科のモールサブユニットリボソーム RNA 遺伝子 (SSU rDNA) を対象とする PCR プライマーの設計を試みた。次に、子実体試料を用い、設計プライマーペアの特異性を評価した。PCR の結果、Didymiaceae 科の 5 属 (*Diachea*, *Diderma*, *Didymium*, *Lepidoderma*, *Mucilago*) と Physaraceae 科の 5 属 (*Badhamia*, *Craterium*, *Fuligo*, *Leocarpus*, *Physarum*) に属する試料で増幅が認められた。塩基配列解析により、全試料で変形菌類に由来する単一 DNA 断片が得られたことが示された。したがって、設計プライマーペアは、これら 2 科に対する特異性が高いことが示唆された。また、エキソンの塩基配列については、同一の種/変種/品種に属す試料間で異なる配列が認められた。一方で、同じ配列は同一の種/変種の試料からのみ得られた。このことは、塩基配列データベースを比較対照として用いることにより、環境中から直接得た DNA 断片の配列からその由来を推定することを可能とする。さらに、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) の利用を検討した。設計プライマーペアの PCR-DGGE への適用を、土壌試料を用いて評価した。その結果、対象変形菌類に由来する配列の分離・同定ができ、手法の有効性が示された。

次に、この確立した研究手法を用い、下記の二つの解析を行っている。

変形菌類の多くは汎存種であり、その散布様式が効果的であると考えられている。その主要な様式として孢子の風散布が挙げられる。しかし、その実態についてはわかっていない。そこで、北海道大学低温科学研究所建物屋上で捕集されたエアロゾル試料に上記手法を適用し、空気中の変形菌類の季節変化を調べた。捕集時期の異なる試料の PCR-DGGE 解析の結果、バンドパターンに季節による違いがみられた。このことから、空気中の変形菌類の種構成が季節的に変化することが示唆された。子実体形成時期と対応した、空気中における変形菌類の存在が認められた。また、変形菌類の孢子が風により散布されており、この散布様式により比較的長距離の輸送が可能であることが示唆された。

本論文で対象とした変形菌類の多くは、子実体以外のステージでは土壌中に生息していると考えられている。培養法を用いた研究により、土壌におけるその存在が示されている。しかし、変形菌類の群集構造については捉えきれていない。そこで、低温科学研究所付近の調査区で採取した土壌試料を用い、対象変形菌類の群集構造の時間的・空間的变化を調べた。各採取日の異なる試料の PCR-DGGE 解析の結果、バンドパターンに小さな差異が認められた。また、バンドの多くは、積雪期も含め、すべての採取日で検出された。これらの結果から、土壌中の変形菌類は、空間的に不均質な分布をする一方で、種構成は季節的に大きく変わらないことが示唆された。得られたデータを基に定量的解析を行うことで、より詳細に土壌中の変形菌類の生態を捉えることが可能となる。

本論文は、変形菌類の生態研究に分子生態学的手法を導入した最初の研究報告である。確立した核酸を用いた研究手法は、Didymiaceae 科と Physaraceae 科の生態研究に有効であることが示された。今後、子実体試料や環境試料を用いた塩基配列情報の蓄積により、飛躍的に生態解明が進むものと期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。