学位論文題名

Relationship between microbial community structure and environmental factor in high altitude and high latitude regions

(高緯度および高標高域における微生物群集構造と環境要因との関係)

学位論文内容の要旨

自然界における微生物の分布や群集構造を制御する要因を解明することは、微生物生態学における重要な課題の一つである。環境中における微生物の移住率は、動物や陸上植物のような大型の生物と比べて比較的高いと推定されている。実際に、地形、気候帯、さらには大陸を越えて、同種および同系統の微生物がしばしば地球上のいたる所から検出されている。このことは、微生物の分布を決定するうえでは距離や地形による分散制限の効果より、移住した環境への定着性が重要であることを示唆している。つまり、環境の違いが微生物の分布や多様性、および分類群構成を決定する要因として重要であると考えられる。しかし、環境と微生物群集との関係は複雑多様であり、解析には多数の地域での調査を必要とする。高緯度および高標高域といった調査の困難な環境については、その知見は限られており、研究が十分に進んでいるとはいえない。本研究では、高緯度 (南極ラングホブデ ; 2章) および高標高 (東日本の山岳湖沼 ; 3章) 域における微生物の分布や多様性、群集構造に影響を及ぼす環境要因について調査した。

2006年と2007年、南極ラングホブデの雪上において赤雪現象が観察された。赤雪とは、冰雪藻類と総称される単細胞藻類のブルームによって雪が赤色を呈する現象のことである。冰雪藻類は生命活動の乏しい雪や氷河のような極限環境における一次生産者として重要な存在であると考えられている。採集した赤雪サンプルから直接DNAを抽出し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってスモールサブユニットリボソームRNA遺伝子を増幅した。得られたPCR増幅産物を用いて変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE法) およびクローニング法による群集構造解析を行った。真核生物を対象とした群集構造解析の結果、2006年と2007年に採集した赤雪はどちらも複数種の緑藻と真菌類で構成されており、その群集構造は年によって異なっていた。一方で、真正細菌を対象とした群集構造解析では、いずれの年においても好気性従属栄養細菌である *Hymenobacter* 属に近縁なバクテリアが優占しており、それぞれの年の群集構造に大きな違いはなかった。また、2006年に採集した冰雪藻類のブルームが発生していない白い雪においては、真正細菌を対象としたPCRによる増幅産物は得られなかった。これ

らの結果は、南極の雪上におけるバクテリアの分布を制御する要因として、氷雪藻類ブルームの発生が重要であることを示唆している。*Hymenobacter*属に近縁なバクテリアは、氷雪藻類の一次生産に依存することで南極の雪上という炭素源の制限された厳しい環境に適応しているのかもしれない。窒素同位体比を測定した結果、2006年と2007年に採集した赤雪は、どちらも付近の環境と比較して有意に重い窒素同位体比を示した。栄養段階の推定に基づいて、これら赤雪の窒素源は海鳥の排泄物から供給されていることが示唆された。つまり、南極ラングホブデの雪上において、氷雪藻類およびバクテリアの分布は、栄養塩類の供給源である海鳥の行動によって制御されていることが示唆された。

東日本の山岳地域に位置する41湖沼について、環境要因と湖沼浮遊性細菌群集構造との関係を調査した。群集構造は16S rRNA遺伝子を対象としたPCR-DGGEによって解析した。正準対応分析 (CCA) の結果、群集構造と環境要因との関係は湖沼栄養状態の違いによって異なる傾向を示した。全湖沼を対象としたCCAでは、群集構造のpHに対する有意な影響を示していた。一方で、貧栄養湖沼を対象としたCCAでは、溶存有機炭素(DOC)による影響が示された。山岳湖沼におけるDOCは主に陸域を起源とする有機物質で構成されており、炭素源の乏しい貧栄養環境に生息するバクテリアにおいて陸性有機物の供給が重要性であることを示唆した。一般化線形回帰によって、山岳湖沼におけるバクテリアの分類群数を最もよく説明する環境要因のモデルを選択した結果、DOCに対する負の関係が示された。この結果は、山岳湖沼に生息する分類群の多くが、陸域から供給されるDOCを利用することが困難であることを意味しているのかもしれない。同様に、調査湖沼から最も高頻度で検出された*Polynucleobacter*属の在、不在を最もよく説明する環境要因のモデルを選択した結果、DOCに対する正の関係と全リン(TP)に対する負の関係が示された。また、TPによる影響はDOCの影響よりも高いことが示された。*Polynucleobacter*属は、多くのバクテリアにとって利用困難である腐食物質の利用性を持つが、この属の分布にはDOC (腐食物質) の供給よりむしろ貧栄養環境であることが重要となることが示された。これらの結果は、湖沼内への有機物供給経路の違い (陸域からの供給、もしくは光合成生物の一次生産による湖沼内生産) が、山岳湖沼バクテリア群集の分類群構成や多様性、さらに優占種である*Polynucleobacter*属の存在に強い影響を及ぼすことを示唆した。

南極雪上や山岳湖沼のように、光合成生物による一次生産の限られた貧栄養環境においては、炭素源として利用可能な基質の供給に関わる要因が微生物群集に対して強い影響を示すことが明らかとなった。また、個々の分類群における基質利用性の違いが、自然環境中における微生物の分布や群集構造を決定する要因として重要な意味を持つことが示唆された。本論文の結果は、多様な自然環境における微生物分布を説明する上で、重要な知見を提供するものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 井 学
副 査 教 授 森 川 正 章
准教授 笠 原 康 裕
助 教 小 島 久 弥

学位論文題名

Relationship between microbial community structure and environmental factor in high altitude and high latitude regions

(高緯度および高標高域における微生物群集構造と環境要因との関係)

自然界における微生物の分布や群集構造を規定する要因を解明することは、微生物生態学における重要な課題の一つである。微生物の分散速度は、動物や陸上植物のような大型の生物と比較して高いと推定されている。実際に、地形や大陸を越えて、同種および同系統の微生物がしばしば地球上のいたる所から検出されている。これらの事実は、微生物の分布を規定するうえで、距離や地形による分散制限の効果よりも移住した環境への定着性が重要であることを示唆している。しかし、微生物と環境との関係は複雑多様であり、解析には多数の地域での調査を必要とする。高緯度および高標高域といった調査の困難な環境については、その知見は限られており、研究が十分に進んでいるとはいえない。本研究では、高緯度（第2章）および高標高（第3章）域において、微生物の分布や多様性、群集構造に影響を及ぼす環境要因について調査した。

第2章では、南極ラングホプデの雪原において観察された氷雪藻類ブルーム（赤雪）の分布を規定する要因について解析を行った。2006年と2007年に採取した赤雪サンプルから直接DNAを抽出し、18Sおよび16S rRNA遺伝子を対象として赤雪を構成する微生物群集構造を解析した。その結果、赤雪は複数種の藻類と真菌類で構成されており、その分類群構成は年によって異なっていた。一方で、赤雪を構成するバクテリアの分類群構成はいずれの年においても大きな違いはなく、氷雪藻類と同様に雪上の強いUV照射に耐性を有すると予想される *Hymenobacter* 属に近縁なバクテリアが優占していた。また、バクテリアから藻類への窒素供給を予想して、窒素固定遺伝子 (*nifH*) を対象とした解析を行った結果、目的の遺伝子は検出されなかった。さらに、赤雪の対照区として付近の白い雪に対して同様の解析を行った結果、氷雪藻類だけでなくバクテリアに由来する遺伝子も検出されなかった。以上の結果は、南極ラングホプデの雪原において、氷雪藻類とバクテリアはどちらも雪上環境に適応しているが、それらの分布にはそれぞれの異なる要因も影響していることを示唆している。調査した赤雪において窒素成分はすでに枯渇していたため、安定同位体比の測定による窒素供給経路の推定を行った。その結果、赤雪の窒素源は調査地近辺に生息する海鳥の排泄物から供給されていることが推測された。つまり、南極ラングホプデの雪原において、氷雪藻類および

バクテリアの分布は、海鳥によって規定されていると考えられる。

第3章では、東日本の山岳地域に位置する41湖沼を調査し、環境と湖沼浮遊性バクテリア群集構造との関係について解析を行った。採取した湖沼サンプルから直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を対象としてバクテリア群集構造を解析した。正準対応分析によってバクテリア群集構造と環境要因との関係を比較した結果、pHの重要性が示された。一般化線形回帰 (GLMs) を行い、バクテリアの分類群数と環境要因との関係を解析した結果、溶存有機炭素 (DOC) に対する負の関係が示された。山岳湖沼におけるDOCは主に陸域を起源とする有機物 (腐食物質) で構成されており、山岳湖沼に生息する分類群の多くが、陸域から供給される腐食物質を利用することが困難であることを示唆した。同様に、調査湖沼から最も高い頻度で検出された*Polynucleobacter*属の在、不在と環境要因との関係を解析した結果、DOCに対する正の関係と、湖沼内生産性の指標である全リン(TP)に対する負の関係が示された。また、TPによる影響はDOCよりも強いことが示された。*Polynucleobacter*属は多くのバクテリアにとって利用困難である腐食物質の利用性を有するが、この属の分布にはDOC (腐食物質) の供給よりむしろ生産性の低い貧栄養環境であることが重要となることが示唆された。山岳湖沼バクテリア群集構造を規定する要因は主にpHだったが、個々の分類群に着目すると、湖沼内への有機物供給経路の違い (陸域からの供給、もしくは光合成生物による湖沼内生産) が重要であることが示唆された。

本研究の結果は、多様な自然環境における微生物と環境要因との関係について重要な知見を提供するものと期待される。また、第3章で用いた微生物群集構造解析とGLMsを組み合わせた分析手法は、特定分類群と環境要因との関係を推定することが可能であり、未培養の分類群の生態を明らかにすることによって新たな分離培養の糸口となることが期待される。

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 (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。