

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 温度環境が農耕地土壌の繊毛虫群集の生態に及ぼす影響

氏名 大島 崇彰

論文内容の要旨

1. 背景と目的

繊毛虫は、海、河川、土壌などの様々な環境に生息する原生生物の一群である。土壌に生息する繊毛虫の多くは細菌、糸状菌および他の原生生物を餌として利用する捕食者であり、捕食を介して餌微生物の生態に影響を及ぼすとともに、土壌物質循環の促進にも寄与する。また、繊毛虫は土壌環境の状態を反映する指標生物として有用とされており、土壌環境の変化に鋭敏に応答を示す微生物群であると考えられる。

温度は生物の生育や生残に影響を与える最も基本的な環境要因の一つである。温度の重要性は繊毛虫にとっても例外でなく、生育可能な温度範囲内では環境温度の上昇に伴って繊毛虫の増殖速度や捕食速度が増加することが明らかになっている。一方、先行研究では特定の分離株の低温域 (<30℃) における生育が主に解析されてきたが、農耕地土壌はそれよりも高温になる。また、温度は繊毛虫の種間相互作用にも影響を与えることが知られている。したがって、農耕地土壌に生息する繊毛虫に対する温度の影響を理解するためには、さらに広範な温度域における繊毛虫の生育・生残を、群集レベルで解析する必要がある。

本研究では、培養に依らない分子学的手法と分離微生物を対象とした培養法により、温度環境が農耕地土壌の繊毛虫群集の生態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

2. 温度環境に対する繊毛虫群集の感受性と回復力

温度環境に対する繊毛虫群集の感受性と回復力を明らかにすることを目的として、異なる温度条件 (10–60℃) で土壌を培養した後、繊毛虫を計数するとともに、土壌から DNA を抽出し、PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) により繊毛虫群集を解析した。繊毛虫の栄養細胞数は、培養 14 日目では 10℃、20℃で検出されたが、

30℃以上の条件ではほとんど検出されず、培養 28 日目にはいずれの土壌でも栄養細胞はほとんど観察されなかった。DGGE バンドの数から推定した繊毛虫群集の多様性は、50℃以上で大きく減少し、30℃と 40℃でも 10–20℃に比べて少なくなった。その結果、10–20℃、40℃、50℃、60℃の各温度条件で異なる群集を形成した。30℃以上の温度は、概して繊毛虫に抑制的にはたらく傾向にあったが、40℃で優占度が高くなる DGGE バンドも観察され、この温度での生残あるいは活動する繊毛虫の存在が示唆された。また土壌繊毛虫の優占グループである Colpoda 綱は比較的高温に対する耐性が高いと推察された。40℃および 60℃で処理した土壌を 20℃に移して繊毛虫群集の回復の過程を検証した。40℃処理した土壌では 20℃での培養 90 日後には DGGE バンドの数の増加が認められ、20℃で培養を続けた対照土壌の群集に類似した。一方、60℃で培養した土壌では回復は認められず、繊毛虫群集が致命的なダメージを受けたと推察された。繊毛虫の温度に対する応答は糸状菌群集のものと類似した一方、繊毛虫の主要な餌微生物である細菌群集はより高い耐熱性と回復力を示した。

3. 温度環境が細菌を捕食する繊毛虫群集に及ぼす影響 – DNA-SIP による解析 –

DNA 安定同位体プロービング (DNA-SIP) 法により、異なる温度条件で捕食に関与する繊毛虫を特定するとともに、その群集構成に及ぼす温度の影響を解析した。土壌に ^{13}C 標識した大腸菌を接種し、20、30、40℃で培養した。培養後の土壌より抽出した DNA を CsCl 密度勾配遠心により分画し、PCR-DGGE およびアンプリコンシーケンスにより大腸菌由来の炭素を取り込んだ繊毛虫群集を解析した。大腸菌の接種による群集構成の変化は認められなかったが、20℃と 30℃で培養した土壌と 40℃で培養した土壌とで異なる群集が形成されており、繊毛虫の群集構成は温度環境に応答して変化することが確認された。いずれの温度条件でも繊毛虫が大腸菌由来の ^{13}C を取り込んでいることが確認され、繊毛虫群集が大腸菌を捕食したと考えられた。 ^{13}C で標識された群集と分画前の群集の主要なメンバーは概ね一致しており、各温度条件下で優占する繊毛虫が大腸菌の捕食に関与したと推察された。 ^{13}C で標識された群集を温度条件間で比較した結果、20℃と 30℃では Colpodea 綱や Spirotrichea 綱の繊毛虫をはじめとした多様な繊毛虫に近縁な配列が得られた一方で、40℃では Colpodea 綱のうち Cyrtolophosididae 科の繊毛虫に近縁な配列のみが得られ、限られた繊毛虫が 40℃に適応していると推察された。以上より、温度環境は捕食に関わる繊毛虫群集の構成に影響を与えること、40℃のような比較的高温条件下でも捕食を行う繊毛虫が存在することが示された。

4. 土壌より分離した繊毛虫の温度環境に対する応答

土壌から繊毛虫を分離し、異なる温度条件に対する応答を明らかにした。20℃および 40℃で培養した土壌から、大腸菌を餌細菌に用いて同じ温度条件で繊毛虫を分離培養した。得られた繊毛虫株を異なる温度 (10–45℃) で培養し、顕微鏡観察により生育ステージを経時的に追跡するとともに、培養終了時に細胞数を計測した。40℃で培

養した土壌からの分離株は、いずれも 40℃ 付近の温度で活発に増殖しシスト化の進行も早いことから、40℃ 付近の温度に適応していると推察された。一方で、20℃ で培養した土壌からの分離株は、30℃ 付近の温度で増殖およびシスト化の進行が早く、至適温度は 30℃ 付近と推察された。培養終了時の細胞密度を比較すると、40℃ で分離した繊毛虫は 15℃ では増加しなかったのに対し、20℃ で分離した繊毛虫は増加した。高温側については、40℃ で培養した土壌からの分離株は 40℃ 以上で増殖したのに対し、20℃ で培養した土壌からの分離株は 40℃ 以上では増殖しなかった。また、同じ温度で分離した複数の繊毛虫の間にも増殖可能な温度範囲に差が見られた。また、異なる温度条件下で分離した繊毛虫株の混合培養を行い、PCR-DGGE 法により形成した群集構成を比較したところ、45℃ で輝度の高かった繊毛虫は 35℃ 以下では検出されなかった。45℃ で増殖可能だった繊毛虫は、単独では 35℃ 以下でも十分に増殖可能だったため、他の分離株の存在により増殖が抑制されたと考えられた。以上より、農耕地土壌の繊毛虫群集は、異なる生育温度範囲を持つメンバーから成ることが示されるとともに、増殖可能な温度範囲であっても別の繊毛虫の存在によってある繊毛虫の増殖が抑制される場合があることが示唆された。

5. 本研究により得られた成果

本研究より、土壌には幅広い温度に対して異なる適応性を示す繊毛虫が混合して生育することが明らかとなり、温度が土壌繊毛虫群集の多様性に寄与する環境要因であることが示唆された。土壌繊毛虫の多様性は高温となるほど低下するが、土壌温度が 40℃ 程度に上昇しても全ての繊毛虫を死滅させるわけではなく、むしろその温度に適応した繊毛虫が存在すること、また生残した繊毛虫は温度環境が好適になれば再び増殖できることが示された。一方、60℃ ではそのような回復は見られず土壌繊毛虫群集の生残に致命的であると考えられた。土壌繊毛虫群集の温度に対する応答は餌微生物である細菌群集とは異なっており、微生物食物連鎖の構造や機能も温度に影響を受ける可能性が示唆された。